

## 凝胶渗透色谱法研究壳聚糖生物材料酶降解过程的均匀性

任东文<sup>1,2</sup>, 衣洪福<sup>1,2</sup>, 谢威扬<sup>1</sup>, 马小军<sup>1</sup>

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要**: 壳聚糖是一种重要的生物医用材料, 脱乙酰度是影响其生物降解性能的重要因素。运用凝胶渗透色谱研究了脱乙酰度及相对分子质量分布相似、而聚合单元 *N*-乙酰氨基-D-葡萄糖和 D-氨基葡萄糖分布不同的两种壳聚糖材料在溶菌酶作用下的降解过程, 分析检测了壳聚糖材料在降解过程中的重均相对分子质量、相对分子质量多分散性和相对分子质量分布的变化。发现聚合单元为随机分布的壳聚糖样品, 其降解是均匀的; 而聚合单元为段状分布的壳聚糖样品, 其降解是非均匀的; 表明其聚合单元的分布方式决定壳聚糖材料酶降解过程的均匀性。

**关键词**: 凝胶渗透色谱法; 壳聚糖; 降解; 溶菌酶; 均匀性

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2006)04-0407-04 栏目类别: 研究论文

## Study on Homogeneity of Enzymatic Degradation of Chitosan as Biomaterials by Gel Permeation Chromatography

REN Dongwen<sup>1,2</sup>, YI Hongfu<sup>1,2</sup>, XIE Weiyang<sup>1</sup>, MA Xiaojun<sup>1</sup>

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract**: Chitosan is an important biomedical material, and its degree of deacetylation is a main parameter of its biodegradation. Gel permeation chromatography was used to investigate the lysozymic degradation of two types of chitosan samples (A and B) with similar degree of deacetylation and relative molecular mass but with different distributions of two units of *N*-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine. Weight average relative molecular mass, polydispersity and gel permeation chromatograms during the degradation process were obtained. It was found that chitosan sample A with random distribution of the two units underwent a homogeneous degradation process while chitosan sample B with block distribution underwent a heterogeneous degradation process. The results suggest that the homogeneity of the degradation of chitosan materials by lysozyme depends on the distribution type of the two units, which can help to design chitosan-based biomedical devices.

**Key words**: gel permeation chromatography; chitosan; degradation; lysozyme; homogeneity

壳聚糖是由天然高分子甲壳素经脱乙酰化而得到的一种氨基多糖, 其大分子链中同时存在 *N*-乙酰氨基-D-葡萄糖和 D-氨基葡萄糖两种单元。D-氨基葡萄糖单元在壳聚糖分子中的摩尔含量称为脱乙酰度(DD)。由于其良好的生物相容性和生物降解性<sup>[1]</sup>, 壳聚糖在生物医用材料领域受到广泛的关注和研究<sup>[2-4]</sup>。在应用中常根据临床的具体要求使用生物降解速度不同的壳聚糖材料。溶菌酶是壳聚糖的主要裂解酶之一, 文献已报道较多关于溶菌酶降解壳聚糖的研究, 发现其降解速度随壳聚糖分子中

DD 的降低而加快<sup>[5-7]</sup>, 同时与分子中两种单元的分布有密切联系<sup>[8]</sup>。

相对分子质量及其分布是壳聚糖的主要性质之一, 凝胶渗透色谱法(GPC)是测定壳聚糖相对分子质量及其分布的常用方法<sup>[9-11]</sup>。本实验的目的就是利用凝胶渗透色谱对 DD 接近而其聚合单元分布不同的两种壳聚糖材料的溶菌酶降解过程进行分析检测, 根据其相对分子质量及其分布的变化来研究壳聚糖材料酶降解过程中的均匀性, 这将有助于推动壳聚糖作为生物医用材料的选择和设计。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

凝胶渗透色谱系统配有美国 Waters 公司 515 单元泵、2414 示差检测器、Rheodyne 7725i 手动进样器以及 Empower Pro GPC 软件包。色谱柱为 TSK G4000PWxl( 7.8 mm i. d. × 300 mm, 填料粒径 10  $\mu\text{m}$  )。GPC 标准样品为普鲁兰多糖( pullulan, Shodex Standard P-82 )。

原料壳聚糖 Chi93( DD 为 93.5% ,重均相对分子质量  $M_w$  为 83 600 )购于浙江玉环海洋生物化学有限公司 ;壳聚糖 Chi52( DD 为 52.6% , $M_w$  为 102 500 )由本实验室通过原料壳聚糖的 *N*-乙酰化反应制得。降解实验中使用的样品 A( DD 为 71.7% )由本实验室通过原料壳聚糖 Chi93 的 *N*-乙酰化反应制得 ,样品 B( DD 为 68.9% )由壳聚糖 Chi93 和壳聚糖 Chi52 以 1:1( 质量比 )混合得到。溶菌酶( 活性为 70 000 U/mg )购于美国 Fluka 公司。实验用水为双蒸水 ,经 Millipore 过滤 ,电阻率为 18.2  $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。其他试剂均为分析纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 壳聚糖样品的降解

将壳聚糖样品 A 和 B 分别与溶菌酶按质量比 10:1.5 与一定体积的磷酸盐缓冲液( pH 7.4 ,含 0.5 g/L  $\text{NaN}_3$  )混合 ,在 37  $^{\circ}\text{C}$  下以 120 r/min 振荡降解 ,于不同时间取出降解后的壳聚糖样品 ,迅速用水浸泡处理多遍 ,以除去残留的溶菌酶和磷酸缓冲液。冷冻干燥 24 h 后 ,保存于干燥器中。

#### 1.2.2 色谱条件及其他

流动相 0.2 mol/L HAc + 0.1 mol/L NaAc ,流速 0.6 mL/min。将壳聚糖样品溶于流动相中 ,质量浓度为 4 g/L ,进样量 20  $\mu\text{L}$ 。柱温及检测器温度均为 30  $^{\circ}\text{C}$  ,检测时间 30 min。相对分子质量多分散性系数  $PI$  由公式  $PI = M_w/M_n$  计算(  $M_n$  为壳聚糖的数均相对分子质量 )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 壳聚糖相对分子质量及其分布的测定

使用凝胶渗透色谱法测定壳聚糖的相对分子质量及其分布时 ,需要先对一系列相对分子质量呈窄分布的标准样品进行色谱分离以得到普适校正曲线 ,然后由该校正曲线计算壳聚糖的相对分子质量及其分布。表 1 给出了标准样品 pullulan 的相对分子质量分布 ,其中  $\eta$  为标准样品的特性粘度( intrinsic viscosity )。图 1 为这些标准样品的 GPC 谱图。

由此可得到用于壳聚糖相对分子质量及分布测定的普适校正曲线( 见图 2 )。

表 1 标准样品 pullulan 的性质

Sample	$M_w$	$M_w/M_n$	$\eta$ /( mL/g )
P5	5900	1.09	12.81
P10	11800	1.10	18.47
P20	22800	1.07	23.96
P50	47300	1.06	36.61
P100	112000	1.12	50.77
P200	212000	1.13	72.75
P400	404000	1.13	108.81
P800	788000	1.23	154.07

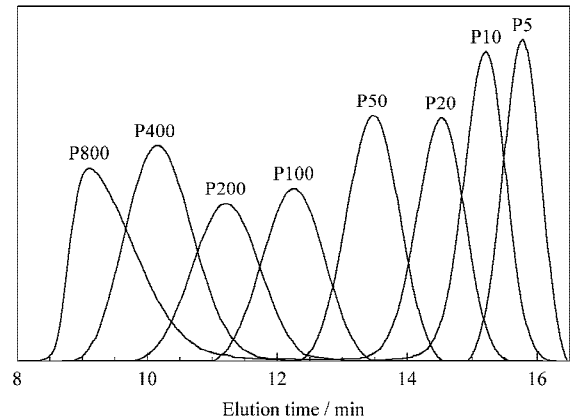


图 1 标准样品普鲁兰多糖的 GPC 谱图

Fig. 1 GPC chromatograms of pullulan standards

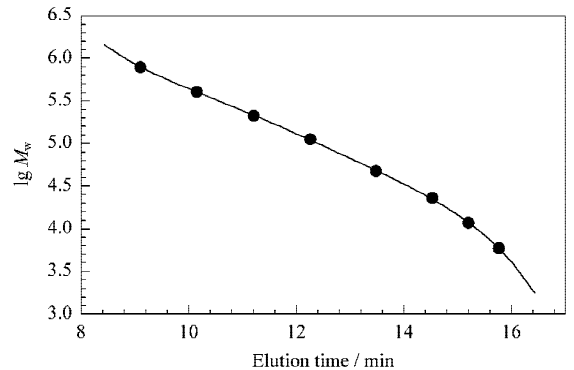


图 2 壳聚糖的普适校正曲线

Fig. 2 Universal calibration curve of chitosan

本实验使用的两个壳聚糖样品的脱乙酰度、相对分子质量及其分布都非常接近 ,样品 A 和样品 B 的  $M_w$  分别为 98 500 和 98 800 ,  $PI$  分别为 1.85 和 1.88 ,DD 分别为 71.7% 和 68.9%。样品 A 和 B 的  $M_w$  分布也很接近 ,均为从 500 000 到 6 000 的宽分布 ,峰值为 110 000( 见图 3 )。

### 2.2 壳聚糖样品的降解

用凝胶渗透色谱法测定壳聚糖样品的相对分子质量及其分布时 ,尽管样品 B 为混合物 ,但从其结构来看仍为壳聚糖 ,因此前面得到的普适校正曲线

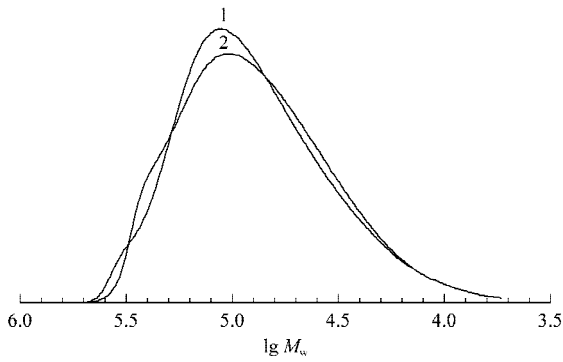


图 3 (1)样品 A 和(2)样品 B 的  $M_w$  分布图  
Fig.3  $M_w$  distribution plots of (1) chitosan A and (2) chitosan B

仍然适用。如图 4-a 所示,样品 A 的  $M_w$  随降解反应的进行呈指数下降趋势,7 d 后  $M_w$  降低到降解开始前的 81%,14 d 后降低到 65%,然后变化趋于平缓。而样品 B 在开始 7 d 也经历了一个明显的降解过程, $M_w$  降低到原来的 82%,但接下来的变化并不明显,14 d 后  $M_w$  才开始进一步降低,28 d 后降低到原来的 68%。在样品 A 和 B 降解的过程中  $PI$  变化也有非常明显的区别(见图 4-b)。样品 A 的  $PI$  在降解过程中变化较小,由降解前的 1.85 增加至降解 28 d 后的 1.94。而样品 B 在降解时  $PI$  增加非常明显,从降解前的 1.87 增至降解 21 d 后的 2.27,其后稍有下降,降解 28 d 后为 2.15。

这种不同的变化趋势与壳聚糖样品 A 和 B 分子中聚合单元的分布方式相关。样品 A 中两种聚合单元为随机分布,样品的整体性质一致,溶菌酶可

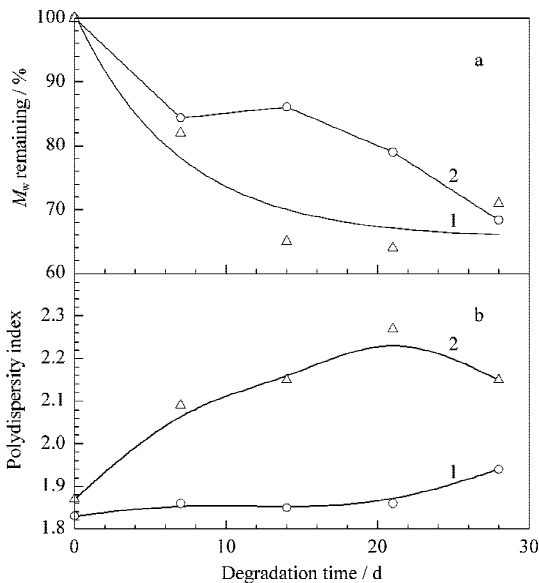


图 4 降解过程中两种壳聚糖样品的 (a)  $M_w$  及 (b)  $PI$  变化  
Fig.4 Comparison of (a)  $M_w$  remaining and (b)  $PI$  of the two chitosan samples

1. chitosan sample A ; 2. chitosan sample B.

随机降解其中两个  $N$ -乙酰氨基-D-葡萄糖单元之间的糖苷键,因此样品 A 的  $M_w$  呈指数趋势下降,同时  $PI$  的变化也较小。样品 B 中同时存在两种结构的壳聚糖,其中 Chi93 的分子链基本由 D-氨基葡萄糖单元构成,降解非常缓慢,而 Chi52 中两种聚合单元呈随机分布,因此可将样品 B 中的聚合单元视为段状分布,其整体性质并不均匀,其中 Chi93 与 Chi52 的大分子链既有交缠,也有彼此自由的存在形式;在溶菌酶降解样品 B 时,可较快地降解掉其中自由存在的 Chi52,但与 Chi93 交缠的 Chi52 的降解则要滞后一些,因此样品 B 的  $M_w$  在降解前期出现一个较快的下降;由于 Chi93 的降解非常缓慢,整个样品 B 中同时存在基本保持不变的 Chi93 大分子链和长度不断降低的 Chi52 大分子链,因此样品 B 在降解过程中的  $PI$  逐渐增大。

降解过程中壳聚糖样品  $M_w$  分布的变化也可表明这两种降解过程的区别。如图 5-a 所示,样品 A 的  $M_w$  分布范围在降解前为 500 000 到 6 000,降解 28 d 后变为 310 000 到 6 000,峰值从降解前的 110 000 降低到降解 28 d 后的 26 000,峰宽基本保持不变。样品 B 的  $M_w$  分布范围(如图 5-b)从降解前的 500 000 到 6 000 变为降解 28 d 后的 280 000 到 6 000,峰值则从降解前的 110 000 变为 120 000 到 31 000 的一个较

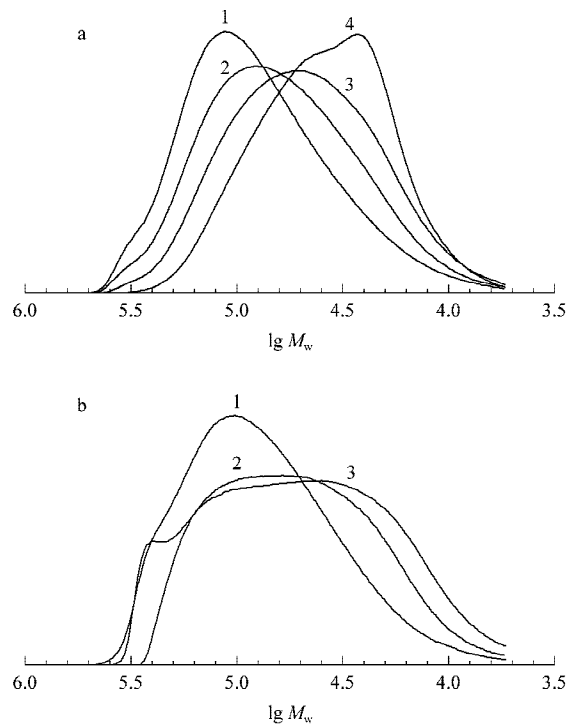


图 5 (a)样品 A 和 (b)样品 B 降解后的  $M_w$  分布图  
Fig.5  $M_w$  distribution plots of (a) chitosan sample A and (b) chitosan sample B

a. (1) after 0 day ; (2) after 7 days ; (3) after 14 days ; (4) after 28 days. b. (1) after 0 day ; (2) after 14 days ; (3) after 28 days.

宽的分布。其半峰宽在降解过程中明显增大,为分布较宽的平缓峰,无明显峰尖存在。

以上实验结果表明,尽管壳聚糖样品 A 和 B 的脱乙酰度、 $M_w$  及其分布都非常接近,但在溶菌酶作用下的降解行为区别较大。对样品 A 而言,由于大分子链中的 *N*-乙酰氨基-D-葡萄糖和 D-氨基葡萄糖两种单元呈随机分布,降解过程中表现为  $M_w$  的逐步降低和 *PI* 的相对保持不变。而样品 B 尽管其 DD 与样品 A 接近,但大分子链中两种聚合单元呈段状分布,降解过程中表现为  $M_w$  的非规则降低和 *PI* 的明显增加,为一非均匀的过程。该凝胶渗透色谱研究的结果可在壳聚糖基生物医用材料的应用设计和制备中得到应用。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Tomihata K, Ikada Y. *Biomaterials*, 1997, 18( 7 ): 567
- [ 2 ] Le Tien C, Lacroix M, Ispas-Szabo P, Mateescu M A. *J Controlled Release*, 2003, 93 : 1
- [ 3 ] Ma J B, Wang H J, He B L, Chen J T. *Biomaterials*, 2001, 22 : 331
- [ 4 ] Madhally S V, Matthew H W T. *Biomaterials*, 1999, 20 : 1 133
- [ 5 ] Nordtveit R J, Varum K M, Smidsrod O. *Carbohydr Polym*, 1996, 29 : 163
- [ 6 ] Varum K M, Myhr M M, Hjerde R J N, Smidsrod O. *Carbohydr Res*, 1997, 299 : 99
- [ 7 ] Freier T, Koh H S, Kazazian K, Shoichet M S. *Biomaterials*, 2005, 26( 29 ): 5 872
- [ 8 ] Aiba S. *Int J Biol Macromol*, 1992, 14( 4 ): 225
- [ 9 ] Wu A C M, Bough W A, Conrad E C, Alden K E Jr. *J Chromatogr*, 1976, 128 : 87
- [ 10 ] Sheng Yiyu, Zhong Huijuan. *Journal of China Pharmaceutical University* ( 盛以虞, 仲惠娟. 中国药科大学学报 ), 1994, 25( 4 ): 242
- [ 11 ] Qin Caiqin, Xiao Ling, Du Yumin, Fan Mu, Shi Xiaowen. *Journal of Wuhan University : Natural Science Edition* ( 覃彩芹, 肖玲, 杜予民, 樊木, 施晓文. 武汉大学学报:自然科学版 ), 2000, 46( 2 ): 195

## 欢迎订阅 2007 年《中国组织工程研究与临床康复》杂志

经新出报刊[ 2006 ]288 号批准《中国临床康复》更名为《中国组织工程研究与临床康复》,变更后国内统一连续出版物号为 CN11-5516/R。

更名后的《中国组织工程研究与临床康复》2007 年出版 53 期。每月第一周出版:种子细胞研究(全年 12 期);每月第二周出版:组织构建研究(全年 12 期);每月第三周出版:生物材料研究(全年 12 期);每月第四周出版:临床应用研究(全年 12 期);每月第五周出版:康复工程研究(全年 5 期)。

本刊诚邀组织工程及其相关领域各类资金资助课题论文,博士后、博士、硕士优秀答辩论文,上述项目的开题综述类稿件!诚邀院士指导项目论文,“长江学者”课题论文,国际合作项目课题论文以及前瞻性、多中心、开放式课题的论文!诚邀新老作者以中、英文体例投稿,尤其欢迎中医药方面的相关研究论文及其学术探讨!

本刊“绿色特快通道”承诺修回稿件 3 个月内出版,一般稿件修回后 6 个月出版。

设有咨询电邮 szb100@zglckf.com 电话 024-23389106 024-23384352

国内订阅邮发代号 8-584; 本社订阅:辽宁省沈阳 1200 邮政信箱 邮编:110004

咨询电话 024-23389106 024-23384352

传真 024-23381085

投稿电邮 kcf23385083@sina.com

kf22838105@sina.com

更多信息详见 www.zglckf.com

《中国临床康复》杂志社

2006 年 7 月