

壳聚糖混合膜酶降解的 FTIR 分析

任东文¹, 王一力¹, 包德才^{1,2}, 谢威扬¹, 马小军^{1*}

1. 中国科学院大连化学物理研究所, 生物医学材料工程组, 中国科学院研究生院, 辽宁大连 116023
2. 渤海大学化学与化工学院, 辽宁 锦州 121000

摘要 生物可降解性是壳聚糖的重要性质之一, 但利用傅里叶变换红外光谱(FTIR)研究降解过程中壳聚糖的变化则较少。文章制备了由高脱乙酰度壳聚糖(HDC)和中脱乙酰度壳聚糖(MDC)组成的混合膜。运用 FTIR 分析了壳聚糖混合膜组分变化对其红外谱图和脱乙酰度(DD)的影响, 并研究了该混合膜在溶菌酶的降解作用下红外谱图和脱乙酰度的变化。发现壳聚糖混合膜材料的脱乙酰度与膜中 MDC 组分的比例呈线性关系; 随降解的进行, 混合膜的脱乙酰度增加。结果证实了溶菌酶对较低脱乙酰度壳聚糖的选择性降解作用, 而且表明 FTIR 可用于分析壳聚糖混合膜降解过程中的化学变化。

主题词 壳聚糖; 膜; 溶菌酶; 降解; 红外光谱

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)10-1825-04

引言

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, 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。壳聚糖可溶于稀酸溶液中, 并具有良好的成膜性。由于其良好的生物相容性和生物降解性^[1], 壳聚糖高分子膜在生物医用材料领域, 如药物控释^[2]、创伤敷料^[3]及组织支架^[4]等方面, 受到广泛的关注和研究。

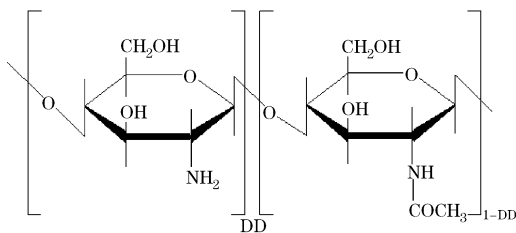


Fig. 1 Chemical structure of chitosan.
DD is the degree of deacetylation

在这些实际应用中, 往往需要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。壳聚糖能被体内广泛存在的溶菌酶降解。文献对壳聚糖的溶菌酶降解已有较多研究, 降解速度随壳聚糖分子中 D-氨基葡萄糖单元的减少而加快^[5], 而 D-氨基葡萄糖单元的含量可通过壳聚糖与乙酸酐的

N-乙酰化反应来控制^[6], 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)(见图 1)。但这些研究缺乏对材料酶解过程中壳聚糖结构和化学的变化分析。傅里叶变换红外光谱(FTIR)是壳聚糖的常用分析方法^[7, 8]。本论文运用 FTIR 分析了壳聚糖混合膜成分变化对膜脱乙酰度的影响, 以及该膜在酶降解过程中脱乙酰度的变化, 为研究壳聚糖材料的酶降解过程提供了一种快捷有效的分析方法, 有助于推动壳聚糖作为生物医用材料的选择和设计。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

壳聚糖混合膜由两种不同脱乙酰度的壳聚糖混溶后铸膜得到, 其中一种为高脱乙酰度壳聚糖(HDC), 另一种为中脱乙酰度壳聚糖(MDC)。MDC 在混合膜中的比例(X_{MDC})由以下公式计算

$$X_{MDC} = W_{MDC} / (W_{MDC} + W_{HDC})$$

其中 W_{MDC} 和 W_{HDC} 分别为膜中加入的 MDC 组分和 HDC 组分的重量。

高脱乙酰度壳聚糖(HDC, DD 93%, M_w 83,600)购于浙江玉环海洋生物化学有限公司。中脱乙酰度壳聚糖(MDC, DD 53%, M_w 105 000), 由本实验室通过 HDC 的 N-乙酰化反应制得。壳聚糖的分子量由 GPC 测定。溶菌酶(活度 70 000 U · mg⁻¹)购于 Fluka。实验用水为双蒸水, 经 Milli-

收稿日期: 2005-07-16, 修订日期: 2005-11-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(2002CB713804)和国家“863”计划项目(2001AA326020)资助

作者简介: 任东文, 1974 年生, 中国科学院大连化学物理研究所博士研究生 * 通讯联系人

pore 过滤, 电阻率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ 。其他试剂均为分析纯。

恒温振荡培养箱(哈尔滨东联电子), 红外光谱仪(布鲁克 Vector 22)。

1.2 壳聚糖膜的制备

配制 2% (W/V) 的壳聚糖的醋酸溶液。经 $0.8 \mu\text{m}$ 的膜过滤, 于 5°C 冰箱中静置 24 h 脱气。取该溶液 30 mL, 待其恢复到室温后, 缓慢倾倒在聚四氟乙烯模具上, 室温下干燥 7 d 脱除溶剂。经 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液处理 10 min, 中和残留的醋酸, 水洗至中性。最后将膜室温下干燥 3 d, 再冷冻干燥 24 h, 得到透明坚韧的壳聚糖膜, 厚度约为 $120 \sim 160 \mu\text{m}$ 。将得到的壳聚糖膜剪成直径为 13 mm 的小片, 于干燥器中保存备用。

1.3 壳聚糖膜的溶菌酶降解

在 24 孔板中每孔加入 1 片壳聚糖膜及 3 mL PBS (pH 7.4, 含有 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶菌酶), 0.05% (W/V) NaN_3 。于 37°C 下以 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡降解 28 d。分别于 7, 14, 21 和 28 d 取出降解后的壳聚糖膜, 迅速用水浸泡处理多遍, 以除去残留的溶菌酶和磷酸缓冲盐。室温下干燥 3 d 后, 再冷冻干燥 24 h, 于干燥器中保存供下一步检测用。

1.4 壳聚糖膜的红外光谱

将得到的壳聚糖粉末和 KBr 充分干燥后混合研磨, 压片, 在红外光谱仪上记录壳聚糖的红外光谱图。壳聚糖材料的 DD 可用如下公式计算^[8]

$$\text{DD} = (1 - 1.15 \times A_{1650} / A_{3450}) \times 100\%$$

其中 A_{1655} 为 1650 cm^{-1} 处的吸收强度, A_{3450} 为 3450 cm^{-1} 处的吸收强度。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖二元混合膜的制备及红外光谱分析

本文采用溶液铸膜法制备壳聚糖膜, 通过改变溶液中 MDC 组分的比例, 得到了如表 1 所示的 4 种膜, MDC 含量 (W/W) 分别为 0, 10, 30 和 50%, 膜重量 $6 \sim 8 \text{ mg}$, 直径 13.5 mm , 厚度 $130 \sim 150 \mu\text{m}$, 重均分子量 (M_w) 约为 10 万。

Table 1 Properties of fabricated chitosan films

编号	重量/mg	$X_{\text{MDC}}/\%$	直径/mm	厚度/ μm	M_w/Da
1	8.3 ± 0.6	0	13.5	140 ± 10	99 400
2	7.5 ± 0.9	10	13.5	150 ± 16	99 700
3	6.5 ± 0.7	30	13.5	130 ± 12	98 400
4	7.1 ± 1.1	50	13.5	142 ± 15	98 800

将得到的壳聚糖膜在液氮中磨成细粉, 在红外灯照射下与 KBr 混合研磨后压片, 记录其红外光谱图, 如图 2 所示。在壳聚糖的红外光谱中, 比较特征的有 3450 cm^{-1} 左右由 O—H 的伸缩振动吸收峰和 N—H 的伸缩振动吸收峰重叠而成的 1 个宽峰, 2920 cm^{-1} 附近有甲基或次甲基的 C—H 伸缩振动吸收峰。此外还有酰胺 (NH—C=O) 的 3 个特征吸收峰, 分别是 1650 cm^{-1} (酰胺 I), 1560 cm^{-1} (酰胺 II) 和

1320 cm^{-1} (酰胺 III), 以及氨基 (—NH₂) 在 1600 cm^{-1} 附近的 N—H 变形振动吸收峰。图 2 中 a 是壳聚糖 HDC 的红外光谱图, 在 1600 cm^{-1} 处是非常明显的氨基特征吸收峰, 而 1650 cm^{-1} 处酰胺 I 和 1320 cm^{-1} 处的酰胺 III 强度较弱, 看不到酰胺 II。e 是壳聚糖 MDC 的红外光谱图, 其中酰胺 I, II 和 III 均非常明显, 而 1600 cm^{-1} 处的氨基特征峰被强的酰胺 I 和 II 所掩盖, 变得不可见。曲线 b, c 和 d 则显示了当 HDC 和 MDC 以不同比例混合所得到的壳聚糖膜的红外谱图。从中可看出, 随着 MDC 含量的增加, 酰胺 I 和 III 逐渐增强, 同时 1600 cm^{-1} 处的氨基特征峰逐渐减弱。当 X_{MDC} 增大到 0.5 时, 氨基特征峰已变为一个小峰, 而酰胺 II 开始出现。由此可见, 壳聚糖混合膜中 MDC 比例的变化在红外谱图中有非常明显的表现, 其红外谱图中的 3 个酰胺吸收谱带和 1 个氨基特征峰可比较灵敏的反映出混合膜中 HDC 和 MDC 的含量变化, 这也表明可通过这几个特征峰的强度变化来估计混合膜的组成变化。

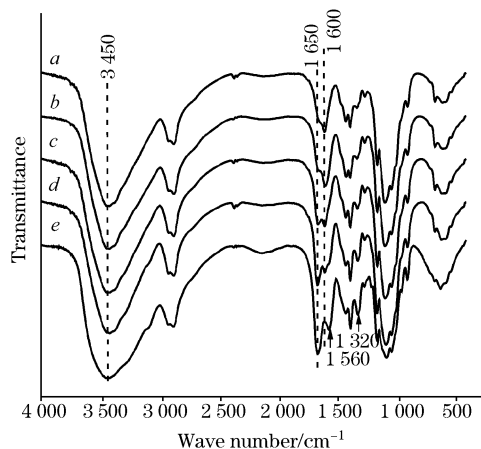


Fig. 2 FTIR spectra for the initial chitosan films with different X_{MDC}

a: 0; b: 0.1; c: 0.3; d: 0.5; e: 1.0

在定量计算时, 一般可选择 1650 cm^{-1} 处的酰胺 I 和 3450 cm^{-1} 处的特征峰来计算壳聚糖材料的脱乙酰度^[8]。图 3 显示了混合膜中 MDC 组分的含量与壳聚糖混合膜材料的脱乙酰度 DD 之间的关系。可以看出, 混合膜材料的脱乙酰度随膜中 MDC 组分的增加而降低, 两者基本呈线性关系。

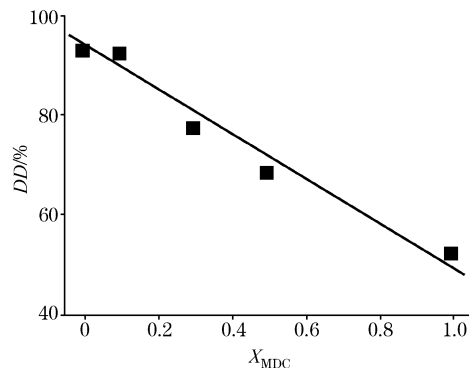


Fig. 3 DD of blend chitosan films as a function of X_{MDC}

当 X_{MDC} 为 0 时,膜材料的 DD 为 93.5%;当 X_{MDC} 增大到 0.3 和 0.5 时,混合膜材料的 DD 分别降低到 78% 和 69%。在壳聚糖混合膜的酶降解中,可以通过测量膜材料的 DD,再利用该线性关系来计算混合膜中 MDC 组分比例变化。

2.2 壳聚糖二元混合膜酶解过程的红外光谱分析

图 4 是 $X_{\text{MDC}(0)}$ 为 0.5 的壳聚糖膜在溶菌酶的降解下不同时间的红外光谱图。从中可以看出,降解前的壳聚糖膜有非常明显的酰胺 I 带(1650 cm^{-1})和 III 带(1320 cm^{-1})和不太明显的酰胺 II 带(1560 cm^{-1}),以及 1 个较小的氨基特征

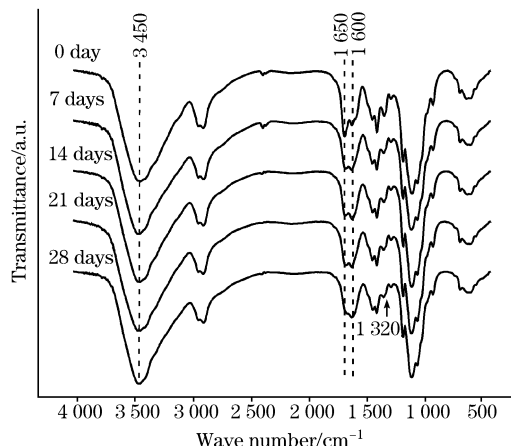


Fig. 4 Typical FTIR spectra of the blend chitosan films with $X_{\text{MDC}} = 0.5$ as a function of degradation time

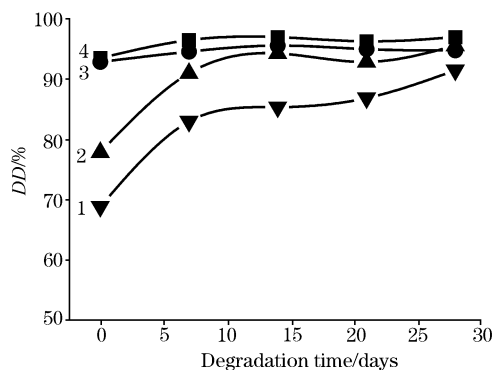


Fig. 5 DD of the degraded blend films estimated by FTIR as a function of degradation time
 $X_{\text{MDC}} = 1: 0.5; 2: 0.3; 3: 0.1; 4: 0$

峰(1600 cm^{-1}),这与膜中较高 MDC 含量是一致的。随着降解的进行,酰胺 I 和 III 带明显减弱,酰胺 II 带在 7 d 后即已消失不见。降解 28 d 后,酰胺 I 和 III 带已变得非常微弱,与此同时氨基特征峰(1600 cm^{-1})则变得较为突出,整个谱图与 HDC 的红外谱图(图 2a)已比较接近。

红外光谱图表明壳聚糖混合膜在酶降解过程中脱乙酰度发生变化。如图 5 所示,在溶菌酶的降解作用下,壳聚糖混合膜的脱乙酰度随降解的进行不断增加。降解开始的 7 d 内,混合膜的脱乙酰度增加较快,其中 $X_{\text{MDC}(0)}$ 为 0.3 和 0.5 的壳聚糖混合膜表现较明显,分别从降解前的 78% 和 69% 增加到 83% 和 91%。在随后的 21 d 中,脱乙酰度增加较为缓慢,实验结束时(28 d)分别为 87% 和 92%。这表明,由于溶菌酶的降解作用,壳聚糖混合膜材料分子中的 N-乙酰氨基-D-葡萄糖单元逐渐从膜上进入周围的溶液中,因此脱乙酰度的逐步增加。如图 6 所示,壳聚糖混合膜是由 MDC 和 HDC 组分构成,MDC 的分子中含有较多 N-乙酰氨基-D-葡萄糖单元。当与溶菌酶溶液接触时,溶菌酶可特异性的剪切两个 N-乙酰氨基-D-葡萄糖单元之间的 β -1,4 糖苷键,使得 MDC 大分子链发生断裂,生成较小分子量的壳聚糖、壳寡糖和单体,并溶于周围的溶液中,因此混合膜中的 MDC 组分逐渐减少。同时 HDC 组分中仅含有很少的 N-乙酰氨基-D-葡萄糖单元,剪切作用基本不发生,因此 HDC 组分较好的保留在混合膜中。壳聚糖的红外光谱亦可参见文献[9]。

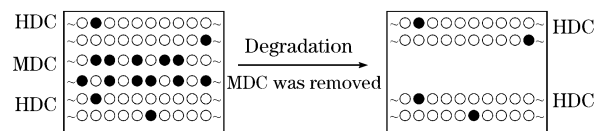


Fig. 6 Schematic representation of selective degradation of MDC component from blend chitosan membranes
○: D-glucosamine; ●: N-acetyl D-glucosamine

3 结 论

(1) FTIR 分析结果表明,壳聚糖混合膜中 MDC 组分含量与混合膜材料的脱乙酰度呈线性关系。

(2) 溶菌酶降解壳聚糖混合膜时,FTIR 能清晰的反映酶对其中 MDC 组分的选择性降解去除作用。

(3) FTIR 可作为分析壳聚糖降解过程的一种快捷有效的方法,用于壳聚糖生物医用材料的设计与选择。

参 考 文 献

- [1] Tomihata K, Ikada Y. *Ciomaterials*, 1997, 18: 567.
- [2] Tien C L, Lacroix M, Ispas-Szabo P, et al. *J. Controlled Release*, 2003, 93: 1.
- [3] Ma J B, Wang H J, He B L, et al. *Biomaterials*, 2001, 22: 331.
- [4] Madhally S V, Matthew H W T. *Biomaterials*, 1999, 20: 1133.
- [5] Nordtveit R J, Varum K M, Smidsrod O. *Carbohydr. Polym.*, 1996, 29: 163.
- [6] Hirano S, Tsuchida H, Nagao N. *Biomaterials*, 1989, 10: 574.
- [7] WANG Ai-qin, ZHAO Pei-qing, GAO Xiao-jun, et al(王爱勤, 赵培庆, 高小军, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 1999, 19(6): 817.
- [8] Khor E. *Chitin; Fulfilling a Biomaterials Promise*. Elsevier, Amsterdam, 2001.
- [9] HUANG Zhong-hua, SUN Xiu-yun, LI Yan, et al(黄中华, 孙秀云, 李 燕, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 25(5): 698.

FTIR Analysis of the Enzymatic Degradation of Chitosan Blend Membranes

REN Dong-wen¹, WANG Yi-li¹, BAO De-cai^{1, 2}, XIE Wei-yang¹, MA Xiao-jun^{1*}

1. Lab of Biomedical Materials Engineering, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, and Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China
2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Bohai University, Jinzhou 121000, China

Abstract Chitosan blend membranes were prepared by casting the mixture solution of highly deacetylated chitosan (HDC) and moderately deacetylated chitosan (MDC). FTIR was used to investigate the components of the blend membranes before and after lysozymic degradation. It was found that the ratio of MDC in the blend membranes had a linear relation with the degree of deacetylation(DD) of the membranes. In enzymatic degradation process, DD of the membranes exhibited an increasing tendency. The FTIR data indicate that MDC component in the blend membranes can be removed by selective enzymatic degradation. This also suggests that FTIR can be used as an efficient and rapid method to investigate the degradation process of chitosan.

Keywords Chitosan; Membrane; Lysozyme; Degradation; FTIR

(Received Jul. 16, 2005; accepted Nov. 18, 2005)

* Corresponding author