

单模微波辐照下壳聚糖-左旋聚乳酸接枝共聚物的酶催化合成*

曾庆慧¹ 田 冶² 周长忍^{1**} 罗丙红¹

(¹ 暨南大学材料科学与工程系 广州 510632) (² 广东省医疗器械质量监督检验所 广州 510663)

摘 要 以猪胰脂肪酶(PPL)代替传统的有机金属作为催化剂,在单模微波辐照下利用左旋丙交酯(L-LA)的开环聚合制备壳聚糖-左旋聚乳酸(CS-*g*-PLLA)接枝共聚物.考察了反应温度及酶用量对接枝率的影响.以此为基础,利用DTG、XRD和3T3成纤维细胞培养对产物的物理性能及细胞相容性进行分析.结果显示,猪胰酶可有效催化接枝反应的进行.反应温度和酶用量对产物的接枝率有较大影响.在单模微波作用下,较低的反应温度(50℃)可获得具有较高接枝率(178.8%)的接枝产物.与纯壳聚糖相比,接枝产物的结晶度和热稳定性降低,说明PLLA的引入破坏了壳聚糖的高结晶性.产物具有良好的细胞相容性,可作为优良的组织工程支架材料.

关键词 接枝聚合, 酶催化, 微波, 壳聚糖, 左旋聚乳酸

壳聚糖(chitosan, CS)是由甲壳素经脱乙酰化后得到的一种天然碱性多糖,具有杀菌、消炎、促进伤口愈合等功效,对人体细胞无毒且有亲和性.壳聚糖良好的性能使其被广泛应用于医用敷料、药物缓释材料、可吸收缝合线、人工皮肤和人工肾透析膜等领域^[1].近年来,壳聚糖以其良好的生物相容性和低免疫原性在组织工程领域得到广泛的关注^[2,3],但其较差的力学性能和非可控的降解速率限制了其作为理想组织工程支架的进一步研究.对壳聚糖进行改性制备衍生物可在一定程度上改善壳聚糖的物理和生物性能,其中又以制备壳聚糖-聚乳酸接枝共聚物的研究最引人注目.研究显示,接枝物具有良好的力学强度和细胞亲和性^[4],其降解性能可通过聚乳酸接枝量的大小进行调控^[5,6].

壳聚糖-聚乳酸接枝共聚物的合成研究已有多年历史,合成路线的设计焦点之一在于选择合适、高效的催化剂,目前研究最多的是以辛酸亚锡为代表的有机金属催化剂.在反应中使用这类催化剂能获得较高的接枝率^[7],但其具有一定的细胞毒性且难以从产物中完全去除,这将直接影响到共聚物在生物材料领域的应用.因此,开发新型的催化剂替代传统的催化剂就成为目前接枝共聚反应研究的热点,而其中脂肪酶的催化作用正日益得到关注.脂肪酶是一种特殊的酰基水解酶,可催化水解、脂合成等反应,在食品、生物和医药化

工领域得到广泛的应用^[8]. Uyama在1993年最先利用脂肪酶作为催化剂催化内酯聚合获得成功^[9]. Fujioka进一步研究证实,酶促反应同样可以催化内酯在壳聚糖上的接枝聚合^[10].与其它催化剂相比,酶促反应可以在较温和的条件下进行,反应不需除水和隔绝空气,更重要的是其低细胞毒性可以避免残留物对接枝产物的生物学性能造成影响.但酶促反应需在温和的条件下进行,其中反应温度是影响酶催化活性的最重要因素.常规的热聚合制备壳聚糖-聚乳酸接枝共聚物需较高的反应温度和较长的反应时间,这将对酶的催化活性造成影响.有研究指出,利用微波代替热能作为反应能量来源,能够显著的降低反应温度和减少反应时间^[11,12].因为微波辐射使单体具有很大的能量,使分子能够迅速越过反应能垒而发生聚合反应.但目前大多数研究采用家用微波炉作为反应器,存在微波功率输出不连续、不能控温及体系加热不均匀等缺点.而单模微波合成仪的出现又弥补了以上不足,与微波炉相比,单模合成仪能够提供连续的微波场和高密度微波,并且可根据设定的反应温度,通过自动调整微波功率,对系统温度进行精确调控.

具有良好生物相容性的壳聚糖衍生物在组织工程领域具有广阔的应用前景.本研究以猪胰脂肪酶(PPL)代替有机金属作为催化剂制备CS-*g*-PLLA接枝共聚物,以避免传统催化剂所可能带

* 2011-09-08 收稿, 2011-12-27 修稿; 中国博士后科学基金(基金号 20090450872)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: tcrz9@jnu.edu.cn
doi:10.3724/SP.J.1105.2012.11287

来的细胞毒性. 为最大限度保持酶活性, 采用 DISCOVER 单模微波合成仪作为反应器, 以降低反应温度. 综合考察了反应温度和酶用量对产物接枝率的影响, 并以此为基础对接枝产物的物理性能及细胞相容性进行分析.

1 实验部分

1.1 实验原料

CS ($M_w = 30000$, 脱乙酰度 $\geq 95\%$, 80 目), 济宁海得贝生物有限公司; L-LA, 北京元生融科技有限公司, 使用前用乙酸乙酯重结晶; PPL, 美国 SIGMA 公司 (酶活性 400 U/mg); 3T3 成纤维细胞, 暨南大学生物材料研究室提供.

1.2 CS-g-PLLA 的酶促微波合成

将 CS, L-LA 和 PPL 均匀混合后放入 10 mL 微波反应管中, 置于 DISCOVER 单模微波合成仪的反应腔内, 用 ChemDriver 软件设置反应温度和反应时间, 在大气环境及微波辐照下进行接枝反应. 产物在索氏抽提器内用氯仿和蒸馏水分别抽提 24 h, 40℃ 下真空干燥至恒重后备用.

1.3 CS-g-PLLA 化学结构的红外光谱 (FTIR) 分析

将产物用 KBr 压片, 以纯 CS 为对照, 用德国 Bruker 公司 EQUINOX55 型傅立叶红外光谱仪对 CS-g-PLLA 共聚物的化学结构进行分析.

1.4 接枝率的测定

根据前期预实验, 固定反应时间为 30 min, 参加反应的 CS 糖环数与 L-LA 的摩尔比为 1:20, 考察反应温度和 PPL 用量对接枝率的影响. 其中, 反应温度分别选取 40℃, 50℃, 60℃, 70℃ 和 80℃; 催化剂用量为反应物质量的 0.3%, 0.5%, 1% 和 2%. 将所得产物准确称重, 按下式计算共聚产物的接枝率:

$$\text{接枝率} = \frac{\text{产物的质量} - \text{加入 CS 的质量}}{\text{加入 CS 的质量}} \times 100\%$$

1.5 CS-g-PLLA 的热稳定性分析

以纯 CS 为对照, 用美国 TA 公司的 SDT Q600 型综合热分析仪对 CS-g-PLLA 的热稳定性能进行分析, 试样测试温度的范围为 25 ~ 500℃, 加热速率为 20 K/min, 氮气气氛 (40 mL/min), 试样质量 7 ~ 9 mg.

1.6 CS-g-PLLA 的结晶性分析

以纯 CS 为对照, 用北京大学仪器厂 MASL-XD2 全自动 X-射线衍射仪对 CS-g-PLLA 的 X-RD

曲线进行测定. 其中, 管压 36 kV, 管流 20 mA, 扫描范围 5° ~ 60°, 扫描速度 8 (°)/min, 步宽 0.02°, K α 射线, Cu 靶.

1.7 CS-g-PLLA 的细胞相容性分析

将产物和壳聚糖粉末用热熔的琼脂固定于 96 孔培养板中, 每孔分别加入含有 3T3 成纤维细胞的培养液 200 μ L, 接种密度为 1.0×10^5 个/mL. 将培养板置于美国 Shelab 培养箱, 在 37℃、5% CO₂ 和 100% 湿度下培养 5 天, 分别于培养 1、3、5 天后取样测试.

细胞形态观察采用日本 NIKON 公司的 ELIPSE TS100 倒置显微镜进行测定. 细胞的生长曲线采用 MTT 法测定, 将培养板中孔内的培养液洗净, 每孔加入 MTT 溶液 20 μ L, 37℃ 继续孵育 4 h, 终止培养, 洗净孔内的 MTT 溶液, 每孔加入 150 μ L 的 DMSO, 震荡 10 min, 选择 492 nm 波长, 在酶标仪上测定各孔吸光度值, 以时间为横坐标, 光吸收值 (OD) 为纵坐标绘制细胞生长曲线.

2 结果与讨论

2.1 CS-g-PLLA 的化学结构

图 1 为纯 CS 和 PPL 催化下 CS-g-PLLA 接枝共聚物的 FTIR 图. 由图可见, 与 CS 对比, CS-g-PLLA 在 1758 cm^{-1} 处出现了对应于 PLLA 的 C=O 的伸缩振动吸收峰; 在 1455 cm^{-1} 处出现的峰为 PLLA 的 $-\text{CH}_3$ 的弯曲振动吸收峰; 在 1093、1131 和 1186 cm^{-1} 则出现了 C—O—C 的伸缩振动吸收峰; 由以上结果可初步判断, 在微波辐照作用下, 以 PPL 为催化剂可促进接枝反应的进行. 研究认为, PPL 的催化活性点在其丝氨酸残基^[13]. 在 L-LA 开环反应中, 首先会与 L-LA 形成活性酶单体 (EAM). 反应初期, CS 链上的羟基与氨基会进攻

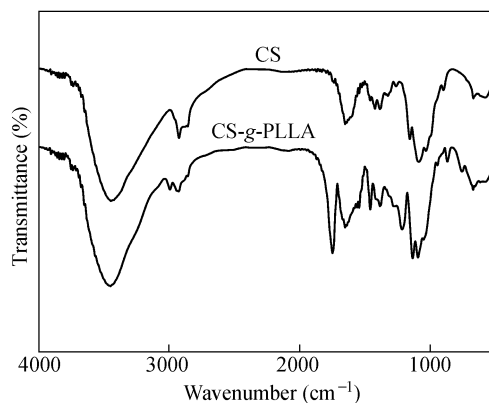
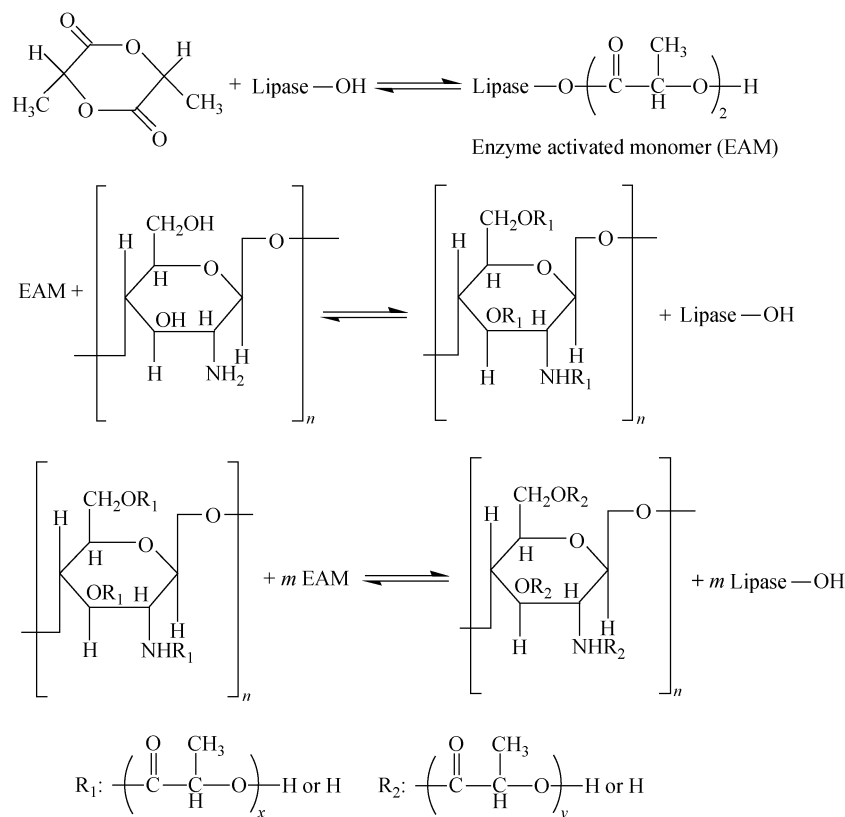


Fig. 1 FTIR spectra of CS and CS-g-PLLA

EAM 的酰基碳原子生成 CS-L-LA 复合物. 在随后的链增长阶段, CS-L-LA 复合物上的末端羟基继

续进攻 EAM, 形成逐步增长的聚合物链 (示意图 1).



Scheme 1 The synthesis of chitosan-graft-poly(L-lactide) copolymer

2.2 反应条件对接枝率的影响

温度对酶催化反应接枝率的影响可从两方面考虑:一方面,酶的催化反应需在较低温度下进行,有研究指出,PPL 在 40℃ 时具有最大生物活性^[14];另一方面,较高的反应温度能够使反应中各个分子运动加速,增加 L-LA 单体碰撞到 CS 主链上活性基团的可能性.由图 2 可见,本反应体系在温度为 50℃ 时接枝率达到最大值,继续升高温度,接枝率随着反应温度的增加而减小.反应温度

过高容易使酶失去活性,同时也增加了接枝的 PLLA 支链热分解的可能性,因此不利于接枝反应的进行.

酶用量与接枝率的关系如图 3 所示,当 PPL 用量为原料质量的 1% 时,接枝率最大.在一定范围内增加催化剂用量可提高产物的接枝率,但过量的催化剂一方面会导致引发 L-LA 单体开环的活性点过多,使单体发生均聚反应的可能性增加;另一方面,PPL 既是聚合催化剂也是解聚催化剂,

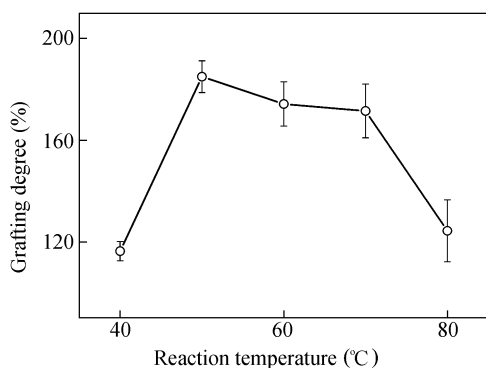


Fig. 2 Effect of reaction temperature on grafting percentage

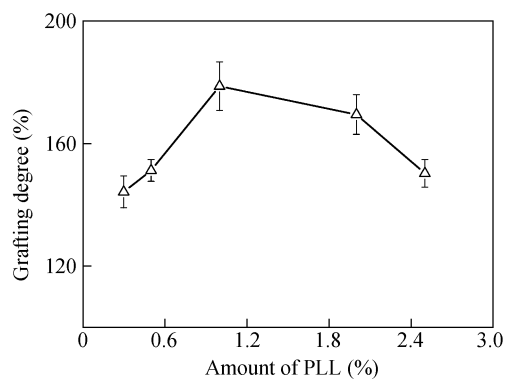


Fig. 3 Effect of PPL amount on grafting percentage

其含量越高, 聚合物聚合与解聚的速率也越快^[15], 当催化剂过量时, 催化解聚的速率将大于催化聚合的速率, 从而使接枝率下降.

2.3 热性能分析

利用 DTG 对 CS 与 CS-g-PLLA 的热性能进行分析, 所用产物是在反应温度为 50℃, 反应时间 30 min, PPL 用量为 1% 时制备的, 接枝率为 178.8%. 由图 4 可见, 接枝前的 CS 在 77.2℃ 和 318.3℃ 有 2 个峰值, 分别对应着 CS 样品中物理性吸附的自由水的失重温度和 CS 的分解温度^[16]. 而 CS-g-PLLA 在 208.6℃ 处出现 1 个新峰, 可能是由 PLLA 支链的热分解引起的, 这也说明 PLLA 支链被成功的引入了 CS 链上. 与 CS 相比, CS-g-PLLA 中 CS 的分解温度降低至 302.5℃, 这说明 PLLA 支链的引入使得 CS 分子间和分子内强烈的作用力减弱, 热稳定性受到破坏, 分解温度降低.

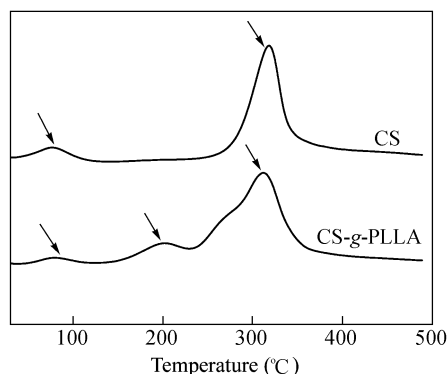


Fig. 4 DTG of CS and CS-g-PLLA

2.4 结晶性能分析

利用 XRD 对 CS 与 CS-g-PLLA 的结晶性能进行分析, 所用产物的反应条件和接枝率同 2.3 节. 由于分子内及分子间强烈的氢键作用, CS 具有较高的结晶度, 其晶体为斜方晶系, 晶胞参数为 $a = 0.824 \text{ nm}$, $b = 1.039 \text{ nm}$, $c = 1.648 \text{ nm}$. 由图 5 可见, CS 在 $2\theta = 10^\circ$ 和 20° 附近有特征峰, 分别对应于 (001) 和 (100)、(020) 和 (200) 晶面的衍射峰^[17, 18], 而 CS-g-PLLA 在 $2\theta = 10^\circ$ 附近的衍射峰消失, 仅在 $2\theta = 19^\circ$ 附近有一个较弱的宽峰, 为典型的无定形结构特征峰, 表明接枝 PLLA 后 CS 的结晶性能降低. 这是因为 PLLA 支链的引入破坏了 CS 分子间和分子内的氢键, 造成 CS 链的规整性降低, 结晶性能减弱.

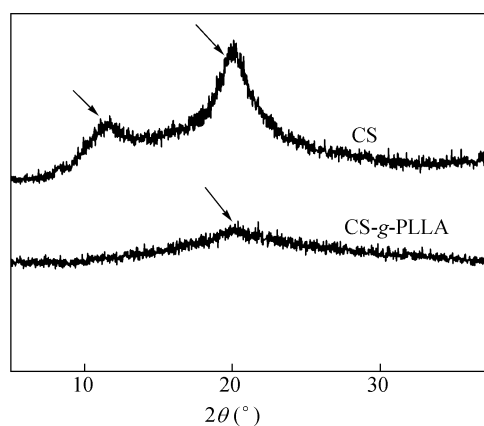


Fig. 5 XRD of CS and CS-g-PLLA

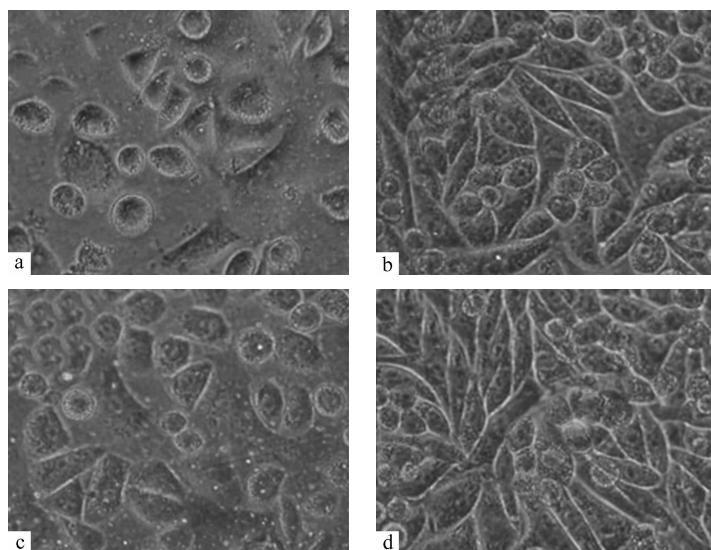


Fig. 6 Morphology of 3T3 fibroblast cultured on CS for 1 day (a), 5 days (b) and CS-g-PLLA for 1 day (c), 5 days (d)

2.5 细胞相容性

利用 3T3 成纤维细胞的体外培养,对 CS 和 CS-*g*-PLLA 的细胞相容性进行分析.细胞的生长形态如图 6 所示,培养 1 天时,在 CS 上生长的细胞仍大多为圆形,而在 CS-*g*-PLLA 上的细胞一部分已开始呈现梭形结构;培养 5 天后,材料表面均被大量的梭形细胞所覆盖,显示细胞在两种材料上的生长情况良好.

图 7 显示,与 CS 相比,细胞在 CS-*g*-PLLA 的黏附量并无明显提高,但培养 5 天后其增殖量大

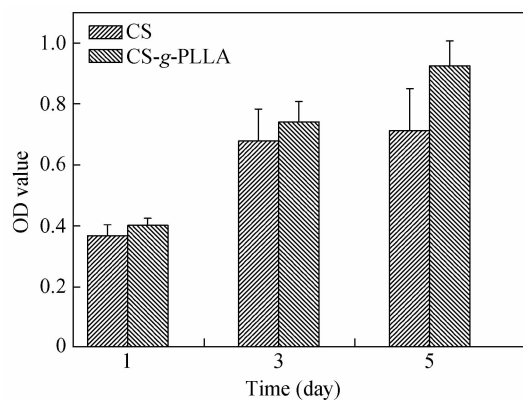


Fig. 7 Growth curve of 3T3 fibroblast on CS and CS-*g*-PLLA

于 CS,说明接枝后的共聚物的细胞相容性要优于未接枝的 CS.大量研究认为,CS 具有良好的细胞相容性,但也有研究指出,大部分动物细胞在生理 pH 下都带有负电荷,而 CS 链上大量的带正电—NH₂会使细胞在材料表面黏附过强,不利于细胞的铺展与迁移,这对细胞在材料上的增殖会造成影响^[19, 20].在 CS 链上引入 PLLA 支链,可减少 CS 链上的一NH₂数量,在一定程度上减弱细胞与 CS 的相互作用.

3 结论

本研究以 PPL 为催化剂,在单模微波辐照下制备了 CS-*g*-PLLA 接枝共聚物,反应在大气环境下进行并且反应条件温和,避免了使用传统的有机金属催化剂可能给带来的细胞毒性. DTG 和 XRD 结果显示 PLLA 支链的引入破坏了 CS 的高结晶度,热稳定性降低;共聚物具有比纯 CS 更优异的细胞相容性,可作为理想的组织工程支架材料.以酶作为催化剂制备可用于生物材料的多糖类接枝衍生物,与传统催化剂相比,具有无可比拟的优势.

REFERENCES

- Shi Xiaowen(施晓文), Li Xiaoxia(李晓霞), Du Yumin(杜予民). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2011, (1): 1 ~ 11
- Martino A D, Sittlinger M, Risbud M V. *Biomaterials*, 2005, 26: 5983 ~ 5990
- Zhang L, Ao Q, Wang A J, Lu G G, Kong L J, Gong Y D, Zhao N M, Zhang X F. *J Biomed Mater Res Part A*, 2007, 77A: 277 ~ 284
- Yao F G, Chen W, Wang H, Liu H F, Yao K D, Sun P C, Lin H. *Polymer*, 2003, 44: 6435 ~ 6441
- Luckachan G E, Pillai C. K. S. *Carbohydr Polym*, 2006, 64: 254 ~ 266.
- Li L H, Zhou C R, Ding S. J. *Appl Polym Sci*, 2004, 91: 274 ~ 277.
- Wang J L, Wang, L, Dong C M. *J Polym Sci Part A: Polym Chem*, 2005, 43: 5449 ~ 5457
- Zhu Hao(朱浩), Hou Chen(侯晨), Li Yanfeng(李彦锋). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2011, (8): 861 ~ 865
- Uyama H, Kobayashi S. *Chem Lett*, 1993, 7: 1149 ~ 1150
- Fujioka M, Okada H, Kusaka Y, Nishiyama S, Noguchi H, Ishii S, Yoshida Y. *Macromol Rapid Commun*, 2004, 25: 1776 ~ 1780
- Ge H C, Pang W, Luo D K. *Carbohydr Polym*, 2006, 66: 372 ~ 378
- Singh V, Tiwari A, Tripathi D N, Sanghi R. *Polymer*, 2006, 47: 254 ~ 260
- Varma I K, Albertsson A C, Rajkhowa R, Srivastava R K. *Prog Polym Sci*, 2005, 30: 949 ~ 981
- Ariela V P, Daniele U, Julio C S, Heizir F D Castro. *J Chem Technol Biotechnol*, 2007, 82: 281 ~ 288
- Witzke D R, Narayan R. *Macromolecules*, 1997, 30: 7075 ~ 7085
- Wirsén X Q A, Albertsson A C. *Polymer*, 2000, 41: 4841 ~ 4847
- Kulkarni R K, Moore E G, Hegyeli A F, Leonard F. J. *J Biomed Mater Res*, 1971, 5: 169 ~ 181
- Yuan Hua(袁华), Ge Fangfang(葛芳芳), Qiao Xinle(乔馨乐), Ren Jie(任杰). *Polymer Materials Science and Engineering*(高分子材料科学与工程), 2009, 25: 1 ~ 4
- Howling G I, Dettmar P W, Goddard P A, Hampson F C, Dornish M, Wood E J. *Biomaterials*, 2001, 22: 2959 ~ 2966
- Mao J S, Cui Y L, Wang X H, Sun Y, Yin Y J, Zhao H M, Yao K D. *Biomaterials*, 2004, 25: 3973 ~ 3981

ENZYMATIC SYNTHESIS OF CHITOSAN-GRAFT-POLY(L-LACTIDE) COPOLYMERS UNDER SINGLE-MODE MICROWAVE IRRADIATION

Qing-hui Zeng¹, Ye Tian², Chang-ren Zhou¹, Bing-hong Luo¹

(¹Department of Materials Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632)

(²Guangdong Medical Devices Quality Surveillance and Test Institute, Guangzhou 510663)

Abstract The porcine pancreatic lipase (PPL) was used to replace the traditional catalysts to catalyze L-lactide (L-LA) graft copolymerization onto chitosan under single-mode microwave irradiation, in order to prepare chitosan-graft-poly(L-lactide) copolymers (CS-g-PLLA). The effects of reaction temperature and catalyst dosage on the reaction were investigated. The physical properties and cell affinity of the copolymer were further discussed by differential thermogravimetry (DTG), X-ray diffraction (XRD) and 3T3 fibroblast incubation, taking pure chitosan as references. The results showed that the grafting reaction could be carried out by PPL catalyzing under normal atmospheric pressure. The reaction temperature and amount of PPL influenced the grafting degree greatly. The copolymer with high grafting degree (178.8%) could be achieved at low reaction temperature (50°C) under single-mode microwave radiation. Compared with pure chitosan, the thermal stability and crystallinity of copolymers decreased because grafting PLLA would destroy the high crystallinity of chitosan. The copolymer offered an excellent substrate for cell adhesion and proliferation, demonstrating that it could be applied as scaffold material in tissue engineering. The above results proved that the enzyme might be an ideal catalyst to prepare derivatives of polysaccharose for application in biomaterials.

Keywords Graft copolymerization, Enzymatic polymerization, Microwave irradiation, Chitosan, Poly(L-lactide)