

壳聚糖的脱乙酰度、分子质量和性状对其体外促凝血活性的影响

程沁园¹, 张家骊², 夏文水¹

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 制备不同脱乙酰度、分子质量的壳聚糖固体粉末和溶液, 并利用试管法比较了不同浓度、不同性质及不同状态的样品的体外凝血时间。结果表明: 当分子质量相近时, 壳聚糖溶液的体外凝血时间随脱乙酰度的增加而减少, 脱乙酰度中等的固体粉末具有最强的促凝血能力; 当脱乙酰度相近时, 只有高分子质量的壳聚糖溶液具有一定的促凝血活性, 但固体粉末状态的三种壳聚糖均具有一定的缩短体外凝血时间的能力; 同等剂量的壳聚糖溶液和粉末, 除了高脱乙酰度、高分子质量的壳聚糖外, 其余样品的固体粉末对于缩短体外凝血时间更为有效。

关键词: 壳聚糖; 粉末; 溶液; 促凝血活性

中图分类号: R962; O636.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2012)06-0059-05

壳聚糖(chitosan, CS)是一种由若干 *N*-乙酰-2-氨基-2-脱氧-*D*-氨基葡萄糖和 2-氨基-2-脱氧-*D*-氨基葡萄糖以 β -1,4-糖苷键形式连接而成的多糖, 是由甲壳素(chitin)部分或完全脱乙酰基的产物, 是自然界中唯一的天然碱性多糖, 也是少数具有正电荷的天然产物之一^[1], 无毒, 物理和化学性质相对稳定, 同时具有良好的生物相容性、生物降解性及降血脂、絮凝、抗菌等多种生物活性, 因而在医药、化工、环境、食品等诸多方面显示出良好的应用前景^[1-2]。

自 1977 年 Muzzarelli 首度报道了甲壳素对人类创伤的作用^[3]后, 甲壳素和壳聚糖及其衍生物与血液的相互作用就成为研究热点之一。多年研究显示: 甲壳素、壳聚糖及部分衍生物都具有良好的止血活性, 其作用机理目前虽尚未明确, 但可以肯定的是其作用过程完全不同于一般传统的止血剂^[4]。已有研究表明壳聚糖可黏附聚集红细胞和血小板, 通过血小板的活化激活凝血途径, 加速纤维蛋白胶的合成, 刺激血管收缩, 最终封合伤口^[5]。同时壳聚糖还具有一定的抗菌、止痛、促进伤口愈合及减少疤痕的作用^[6], 是一种理想的伤口敷料。

然而, 目前的研究大多集中于止血性壳聚糖的剂型开发^[7-8]和作用机制研究^[5], 尚未有对其状态(固体粉末或溶液)对止血活性的影响报道。本文主要对

比研究了不同脱乙酰度、分子质量的壳聚糖在不同状态下(溶液或固体粉末)体外促凝血活性的差异。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

壳聚糖(CS): 实验室自制, 粉末粒径 <0.44 mm; 兔血: 新西兰白兔耳缘静脉取血, 3.8%枸橼酸钠抗凝; 乙酸酐(Ac_2O)、乙酸(HAc)、过氧化氢(H_2O_2)、盐酸(HCl)等, AR, 国药集团化学试剂有限公司; 云南白药粉: 4g/瓶, 批号 20080420, 云南白药股份集团有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 不同脱乙酰度和不同分子质量壳聚糖的制备

以高脱乙酰度的壳聚糖为原料, 参照文献^[9]中的乙酸酐-吡啶法, 在反应体系中加入不同量的乙酸酐制备得不同脱乙酰度的壳聚糖, 沉淀洗净后冻干样品。

以高分子质量的壳聚糖为原料, 参照文献^[10]用

收稿日期: 2011-05-19; 修回日期: 2011-12-04

基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA091603); 食品科学与技术国家重点实验室 2008 年目标导向项目(SKLF-MB-200805); PCSIRT0627; 111 project-B07029

作者简介: 程沁园(1981-), 女, 江苏无锡人, 博士研究生, 研究方向: 生物活性物质研究, E-mail: cheng-qinyuan@163.com; 夏文水, 通信作者, E-mail: xiaws@jiangnan.edu.cn

HAc/H₂O₂ 体系对其进行不同时间的降解得到一系列分子质量较低的壳聚糖样品, 沉淀洗净后冻干。

参照文献^[11-12], 采用酸碱滴定法和乌氏黏度法分别测定壳聚糖的脱乙酰度和黏均分子质量。结果如表 1 所示。本实验制得一系列分子质量相近、脱乙酰度依次降低的壳聚糖样品(CS、CS-A、CS-B)和脱乙酰度相近、分子质量依次降低的壳聚糖样品(CS、CS-a、CS-b)。

表 1 壳聚糖样品的脱乙酰度和黏均分子质量
Tab. 1 Degrees of deacetylation and molecular weights of chitosan samples

样品	脱乙酰度(%)	黏均分子质量($\times 10^5$, Da)
Chitosan(CS)	85.32	12.20
CS-A	68.22	11.76
CS-B	59.46	10.95
CS-a	85.44	1.45
CS-b	80.03	0.16

1.2.2 试管法测定凝血时间

参考文献^[13]的方法, 取洁净的试管, 分别加入 1 mL 浓度分别为 40、2 g/L 的壳聚糖-0.1 mol/L 盐酸溶液或 80、40、20、10 mg 的壳聚糖粉末, 1 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液或空白试管作阴性对照, 1 mL 浓度为 40 g/L、2 g/L 云南白药-0.1 mol/L 盐酸混悬液或 40 mg 云南白药粉末作阳性对照, 每样品每浓度设 3 支试管。将各管轻轻摇匀或使粉末尽量铺开于试管底部, 37 °C 水浴中保温 1 h, 自兔耳缘静脉取血开始计时, 依次将 1 mL 兔血加入上述试管中, 平稳地移入 37 °C 水浴中, 每隔 30 s 将第一支试管倾斜一次(角度小于 30°), 其余两支暂时不要动, 直到第一支试管缓慢倒置血流不动为止, 以同样方法观察第二、第三支试管, 至第三管内的血全凝后, 按停秒表, 记下该组的凝血时间。凝血时间以 60 min 为上限, 超过即判为不凝血。每样品重复 6 次。

1.3 数据处理

采用 SPSS16.0 统计软件进行分析。实验数据均以 “ $\bar{x} \pm s$ ” 表示, 多组间两两比较进行统计学分析处理。

2 结果与讨论

2.1 脱乙酰度对壳聚糖溶液及粉末的促凝血活性的影响

2.1.1 不同脱乙酰度壳聚糖溶液的体外凝血时间

不同浓度、不同脱乙酰度的壳聚糖-盐酸溶液的

体外促凝血活性如图 1 所示。

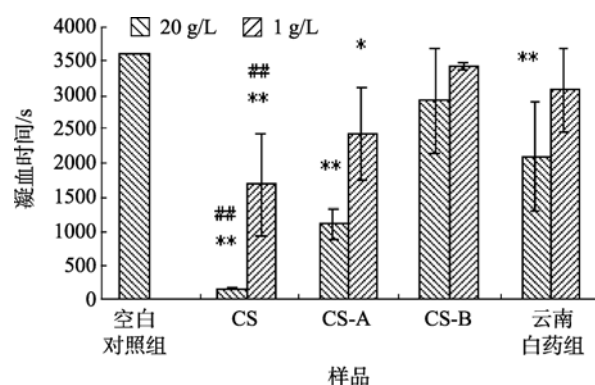


图 1 不同脱乙酰度壳聚糖-盐酸溶液的体外凝血时间

* 表示与空白对照组相比的统计学差异 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$; ## 表示与云南白药组相比的统计学差异为 $P < 0.01$

Fig. 1 The coagulation time of chitosan-HCl solutions with different degrees of deacetylation *in vitro*

* denotes comparison with the control group, $P < 0.05$, ** denotes $P < 0.01$; ## denotes comparison with Yunnan Baiyao $P < 0.01$

由图 1 可知, 各脱乙酰度、各浓度的壳聚糖-盐酸溶液均有一定的体外促凝血能力, 且其活性随脱乙酰度的降低而降低。与空白组相比, 高脱乙酰度(85.32%)的 CS 高、低浓度组和中等脱乙酰度(68.22%)的 CS-A 高浓度组的凝血时间有极显著的差异 ($P < 0.01$)。同时, 壳聚糖的促凝血能力与其浓度高低具有相关性。此外, 高脱乙酰度的 CS-盐酸溶液的凝血时间更比同浓度的云南白药-盐酸混悬液极显著缩短 ($P < 0.01$), 其体外促凝血能力更优于云南白药混悬液。

2.1.2 不同脱乙酰度壳聚糖粉末的体外凝血时间

不同剂量、不同脱乙酰度的壳聚糖粉末的体外促凝血活性如图 2 所示。由图 2 可知, 与空白试管中兔血的凝固时间相比, 终浓度为 40 g/L 的 CS 粉末(脱乙酰度为 85.32%)和 80、40、10 g/L 的 CS-A 粉末(脱乙酰度为 68.22%)均具有极显著的体外促凝血能力 ($P < 0.01$), 终浓度为 80、20 g/L 的 CS 粉末、20 g/L 的 CS-A 粉末及 80 g/L 的 CS-B 粉末具有显著的促凝血活性 ($P < 0.05$)。此外, 终浓度为 40 g/L 的 CS 粉末、80、40、10 g/L CS-A 粉末和 80 g/L CS-B 粉末的凝血时间均值(分别为 517.90、258.86、171.55、466.36 及 416.45 s)都低于阳性对照 40 g/L 云南白药的凝血时间(540.36 s)。三种不同脱乙酰度的壳聚糖粉末相比, 脱乙酰度为 68.22% 的 CS-A 具有最好的促凝血能力, CS 次之, CS-B 最差, 且各样品的促凝血活性呈现一定的剂量相关性。

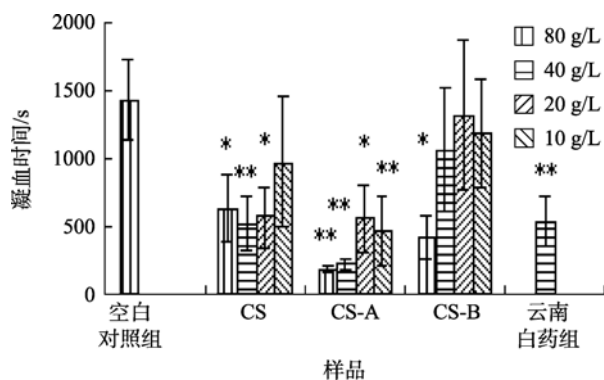


图 2 不同脱乙酰度壳聚糖粉末的体外凝血时间

* 表示与空白对照组相比的统计学差异 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$
 Fig. 2 The coagulation time of chitosan powder with different degrees of deacetylation *in vitro*
 * denotes comparison with the control group, $P < 0.05$, ** denotes $P < 0.01$

2.2 分子质量对壳聚糖溶液及粉末的促凝血活性的影响

2.2.1 不同分子质量壳聚糖溶液的体外凝血时间

不同浓度、不同分子质量的壳聚糖-盐酸溶液的体外促凝血活性如图 3 所示。

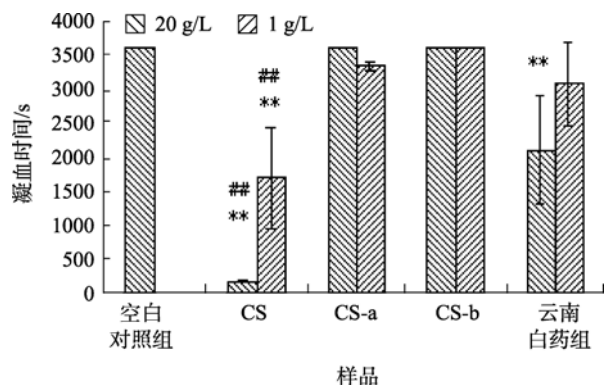


图 3 不同分子质量壳聚糖-盐酸溶液的体外凝血时间

** 表示与空白对照组相比的统计学差异 $P < 0.01$; ## 表示与云南白药组相比的统计学差异为 $P < 0.01$
 Fig. 3 The coagulation time of chitosan-HCl solutions with different molecular weight *in vitro*
 ** denotes comparison with the control group, $P < 0.01$; ## denotes comparison with Yunnan Baiyao $P < 0.01$

由图 3 可知, 各分子质量、高低各浓度的壳聚糖-盐酸溶液的体外促凝血能力差异较大。高分子质量(12.20×10^5 , Da)的 CS 溶液与空白对照相比, 其体外凝血时间极显著缩短($P < 0.01$), 甚至比对应同浓度的云南白药混悬液的凝血时间都有极显著缩短($P < 0.01$), 但中等分子质量的 CS-a(1.45×10^5 , Da)只在低浓度时略有促凝血活性, 低分子质量的 CS-b

(0.16×10^5 , Da)则已完全无体外促凝血活性。因此, 分子质量的高低对壳聚糖溶液的促凝血活性具有极其显著的影响, 只有高分子质量的壳聚糖溶液才具有较强的体外促凝血能力。

2.2.2 不同分子质量壳聚糖粉末的体外凝血时间

不同剂量、不同分子质量的壳聚糖粉末的体外促凝血活性如图 4 所示。

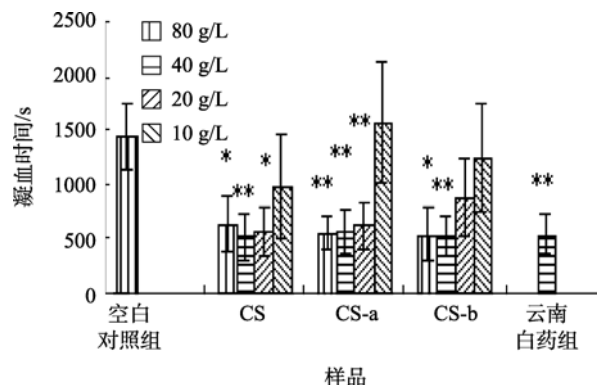


图 4 不同分子质量壳聚糖粉末的体外凝血时间

* 表示与空白对照组相比的统计学差异 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$
 Fig. 4 The coagulation time of chitosan powder with different molecular weight *in vitro*
 * denotes comparison with the control group, $P < 0.05$, ** denotes $P < 0.01$

由图 4 可知, 各分子质量的壳聚糖粉末都有一定的体外促凝血能力, 终浓度为 40 g/L 的 CS 粉末、80、40、20 g/L CS-a 粉末及 40 g/L CS-b 粉末的体外凝血时间都较空白对照有极显著的缩短($P < 0.01$), 且与云南白药组对照无显著差异; 终浓度为 80、20 g/L 的 CS 粉末和 80 g/L CS-b 粉末的体外凝血时间则都较空白对照显著缩短($P < 0.05$)。

此外, 对比图 1 和图 2、图 3 和图 4 可以发现, 同等剂量的壳聚糖溶液和粉末(终浓度均为 20 g/L), 除了高脱乙酰度、高分子质量的 CS 外, 其余样品的固体粉末均能更为有效地缩短体外凝血时间, 尤其是分子质量较低的 CS-a 和 CS-b 在溶液状态时基本无促凝血活性, 而其粉末却仍可保持一定的促凝血能力, 其中 CS-a 的促凝血活性更可与高出一倍剂量的云南白药相媲美($P = 0.702$)。

3 结论

本文主要对比研究了壳聚糖的脱乙酰度、分子质量及状态(溶液或固体粉末)对其体外促凝血活性的影响。结果显示: 三个因素对壳聚糖的促凝血活性的影响互有交叉。

当分子质量相近时(CS、CS-A、CS-B), 溶液状态的壳聚糖的体外凝血时间随脱乙酰度的增加而缩短, 即促凝血活性增加; 而固体粉末状态的壳聚糖体外凝血时间变化规律略有不同, 脱乙酰度中等(68.22%)的 CS-A 具有最强的促凝血能力。

而当脱乙酰度相近时(CS、CS-a、CS-b), 只有高分子质量的 CS 溶液具有一定的促凝血活性, 但固体粉末状态的三种壳聚糖均具有一定的缩短体外凝血时间的能力, 且活性大致相当, 分子质量的影响并不十分明显。

同时对比发现, 除了高脱乙酰度、高分子质量的 CS 外, 其余同等剂量的壳聚糖样品的固体粉末对于缩短体外凝血时间更为有效, 而分子质量的影响更为显著。

因此, 鉴于高脱乙酰度、高分子质量壳聚糖制备成本较高, 且适合溶剂较少, 生产开发的困难较大, 因此建议可将研究重点置于分子质量较低、脱乙酰度中等的壳聚糖, 开发其粉末制剂应用于人类或动物的止血中。

参考文献:

- [1] 蒋挺大. 壳聚糖[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 1-15.
- [2] 杨新超, 赵祥颖, 刘建军. 壳聚糖的性质、生产及应用[J]. 食品与药品, 2005, 7(8A): 59-62.
- [3] Muzzarelli R A A. Chitin[M]. Oxford, UK: Pergamon Press, 1977: 262.
- [4] 程沁园, 张家骊, 夏文水. 甲壳素/壳聚糖及其衍生物与血液的相互作用[J]. 中国药科大学学报, 2011, 42(1): 92-96.
- [5] 马军阳, 陈亦平, 李俊杰, 等. 甲壳素/壳聚糖止血机理及应用[J]. 北京生物医学工程, 2007, 26(4): 442-445.
- [6] 陈煜, 窦桂芳, 罗运军, 等. 甲壳素和壳聚糖在伤口敷料中的应用[J]. 高分子通报, 2005, 2: 94-100.
- [7] Ishihara M, Nakanshi K, Ono K, et al. Photocrosslinkable chitosan hydrogel as a wound dressing and a biological adhesive[J]. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2002, 14(80): 331-341.
- [8] Wedmore I, McManus J G, Pusteri A E. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: Experience in current combat operations[J]. Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care, 2006, 60(3): 655-658.
- [9] 宋巍, 陈元维, 史国齐, 等. 不同脱乙酰度壳聚糖的制备及结构性能的研究[J]. 功能材料, 2007, 38(10): 1705-1708.
- [10] 王红昌, 孙晓飞. 不同分子量高脱乙酰度壳聚糖的制备及表征[J]. 中国海洋药物, 2007, 26(1): 16-19.
- [11] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 262.
- [12] Wang W, Bo S, Li S, et al. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1991, 13(10): 281-285.
- [13] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 480-482.

The effects of degrees of deacetylation, molecular weights and states of chitosans on procoagulant activities *in vitro*

CHENG Qin-yuan¹, ZHANG Jia-li², XIA Wen-shui¹

(1. Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, 1800 Lihu Avenue, Wuxi 214122;
2. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, 1800 Lihu Avenue, Wuxi 214122)

Received: May,19,2011

Key words: chitosan; powder; solution; procoagulant activity

Abstract: To investigate the effects of degrees of deacetylation, molecular weights and states (solutions or solid powder) of chitosans on the procoagulant activities *in vitro*, the blood clotting time of the samples with different concentrations, properties and states were tested the in tube method. When molecular weights were close, the blood clotting time of chitosan solutions decreased with the increasing of degree of deacetylation, however, the procoagulant ability of the chitosan powder with medium degree of deacetylation was the best of all. When degrees of deacetylation were close, the solution of chitosan with high molecular weight was the only one that had procoagulant activity, but all the powders could decrease the clotting time *in vitro*. All solid chitosan powders, except the one with high degree of deacetylation and molecular weight, promoted the blood coagulations more efficiently than the correspondent solution at the same concentration.

(本文编辑: 康亦兼)