

辐射交联聚己内酯的酶降解动力学研究

张龙彬^{1,2} 朱光明¹ 许硕贵³ 王金花¹ 秦瑞丰¹

¹ (西北工业大学应用化学系 西安 710072)

² (第二炮兵工程学院 西安 710025)

³ (第二军医大学长海医院 上海 200433)

摘要 研究了聚己内酯 (Polycaprolactone, PCL) 和辐射交联 PCL 的脂肪酶降解行为及酶促反应动力学, 得到了 PCL 降解速度与时间和底物浓度的关系及 Michaelis-Menten 常数。实验发现, 降解产物浓度随着降解时间和底物浓度增加而增加。PCL 粉末和交联 PCL 颗粒的降解动力学较好地符合米氏方程, 其动力学参数 K_m 分别为 1.14、71.95mg/mL, 最大降解速度 V_{max} 分别为 0.39、0.96mL/h。

关键词 聚己内酯, 辐射交联, 酶降解, 动力学

中图分类号 TQ321

聚己内酯 (Polycaprolactone, PCL) 是一种具有良好的生物相容性和生物降解性的新型高分子材料, 其对小分子的药物通透性好, 是体内植入及药物缓释胶囊理想的材料。辐射交联 PCL 具有形状记忆特性^[1], 主要应用于生物医学工程 and 环境保护等领域^[2-4]。

生物降解性是 PCL 作为生物医学和环保材料使用的一个关键因素。对于 PCL 及辐照交联 PCL 的生物降解性研究较少, 对其降解机理还不是很清楚^[5,6]。PCL 辐射交联后, 其分子中仍含有酯键, 仍可发生水降解反应^[7], 但是分子间结成网状结构后, 其生物降解性能必然随之发生变化。本文采用 AK 脂肪酶作为 PCL 水解催化剂, 探讨了降解时间, 底物浓度以及底物形态等对 PCL 和辐射交联 PCL 降解的影响, 并对其动力学进行了分析。

1 试验

1.1 试验原料

PCL, 日本大塚 (Daicell) 公司, 重均分子

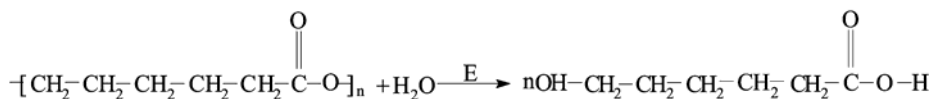
量 (M_w) 为 50000; Lipase AK, 日本 Amano 公司生产 (活性 > 20000); 乙醇, 西安三浦精细化工厂, 分析纯; 酚酞, 天津市双船化学试剂厂。

1.2 样品的辐照及其动力学研究^[8]

将 PCL 样品装在聚乙烯密封袋中以 10kGy/h 剂量率分别辐照 50、100、200、300、400kGy。采用滴定法对 PCL 进行降解反应动力学研究。其原理为 PCL 水解反应产生羟基己酸等有机酸降解产物, 用 NaOH 溶液滴定, 以其滴定量表征 PCL 降解产物羟基己酸的产生速度, 即 PCL 的降解速度。将不同 PCL 试样完全浸泡于一系列 5mL 浓度为 1mg/mL 酶溶液试管中, 置于 (52±1) °C 恒温槽中; 不同时间的降解后, 取出三支平行实验试管, 完全转移到锥形瓶中。用 0.01mol/L NaOH 溶液滴定, 计算平均消耗 NaOH 量。

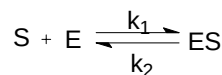
2 PCL 酶降解动力学理论

脂肪酶催化水解 PCL 主要反应如下:



其反应机理如下:

(1) 底物 (PCL) 与酶的结合:



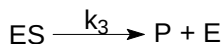
陕西省自然科学基金 (2004B05) 资助

第一作者: 张龙彬, 男, 1980 年 12 月出生, 2006 年于西北工业大学获硕士学位, 材料物理与化学专业

通讯联系人: 朱光明

收稿日期: 初稿 2006-01-10, 修回 2006-05-15

(2) 脂肪酶从链端把 PCL 水解成羟基酸 (P)



根据上述反应机理, PCL 的酶降解为非均相酶催化反应, 且 P 为一元酸, 由反应可得:

$$d[ES]/dt = k_1([E]_0 - [ES])[S] \quad (1)$$

$$-d[ES]/dt = k_2[ES] + k_3[ES] \quad (2)$$

假定酶促反应体系处于动态平衡, 则:

$$k_1([E]_0 - [ES])[S] = k_2[ES] + k_3[ES] \quad (3)$$

$$\text{整理得: } [ES] = k_1[E]_0[S] / (k_1[S] + k_2 + k_3) \quad (4)$$

$$\text{瞬时反应速度: } V = dP/dt = k_3[ES] \quad (5)$$

把 (4) 式代入 (5) 式可得:

$$V = k_3 k_1 [E]_0 [S] / (k_1[S] + k_2 + k_3) \quad (6)$$

当酶浓度固定时, 令 $K_m = (k_2 + k_3) / k_1$, 则:

$$V = k_3 [E]_0 [S] / (K_m + [S]) \quad (7)$$

这就是著名的 Michaelis-menten 公式 (常称米氏方程)。如果 $[S] \gg [E]$, 则酶全部与底物结合, 即 $[E]_0 = [ES]$, 酶促反应达到最大速率, 此时最大速率为 $V_{\max} = k_3[ES] = k_3[E]_0$ 。Michaelis-menten 公式可改写为:

$$V = V_{\max}[S] / (K_m + [S]) \quad (8)$$

为了得到准确的 K_m , 上式可变为:

$$1/V = (K_m + [S]) / V_{\max}[S] = 1/V_{\max} + K_m / (V_{\max}[S]) \quad (9)$$

3 结果与讨论

3.1 PCL 的酶降解动力学研究

现有的 PCL 水解理论认为其降解符合一级动力学方程。我们采用滴定法表征 PCL 的降解速率, 并研究其 AK 脂肪酶降解动力学。以 PCL 粉末作为降解底物, 不同浓度的降解底物随时间的变化如图 1。同一底物浓度的滴定量随着降解时间增加, 并随时间的延长而趋缓。这是由于滴定后期酶的活性有所降低, 因而催化效率降低, 引起降解速率降低。图 1 还表明, 底物浓度越大, 滴定量越大。因为底物浓度增加, 使 PCL 与酶结合的几率增大, 生成较多的降解产物, 因而消耗较多的碱液。

对图 1 进行数学处理, 得到降解速率随时间的变化如图 2。由图 2 可见, PCL 的酶降解速率明显随时间下降, 但线性关系不理想。我们还计算了产物浓度对数随时间的变化 (见图 3), 其反应也不呈线性变化, 即该降解不符合一级反应动力学。而由图 1、图 2 我们已经知道降解产物浓度与降解速率随时间的变化并不完全符合线性关系, 因而降解反应不符合零级反应动力学。这说明 PCL 粉末的降解

动力学并不是简单的级数反应, 可能是个较为复杂的级数反应。

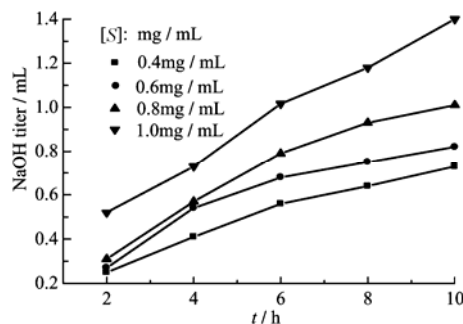


Fig.1 Effect of time on degradation of PCL powder at different substrate concentrations

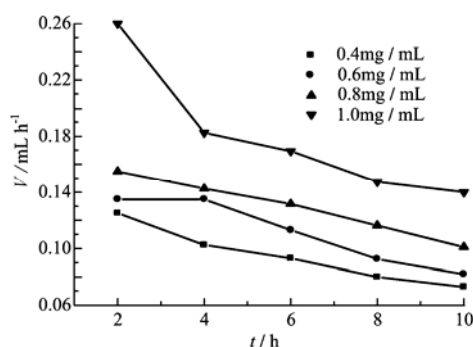


Fig.2 Effect of time on degradation rate of PCL powder at different substrate concentrations

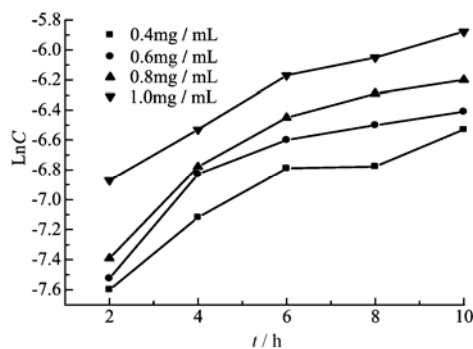


Fig.3 The relationship between the degradation time and lnC of the PCL powder

为进一步了解 PCL 粉末的降解动力学, 我们考察了不同底物 (PCL) 浓度和不同酶浓度对降解速率的影响 (见图 4)。由图 4 可知, 底物的降解速率随着底物浓度的增大而增加。这是因为底物浓度增加, 与酶结合的几率增大, 生成较多的产物。图 4 也表明, 酶浓度大, 降解速率快, 这同酶的活性有关。

对底物浓度和降解速率的倒数作图 (见图 5), 可发现不同浓度下底物浓度的倒数和体积倒数基本成线性关系, 即较符合米氏公式, 其斜率约为 0.74。由米氏公式可计算 1.5mg/mL 底物的降解最大速率

$V_{\max}=0.39\text{mL/h}$, $K_m=1.14\text{mg/mL}$ 。对图 1 处理可知, PCL 的酶降解并不符合简单的一级或零级动力学方程, 而属于零级和一级混合反应^[9]。图 5 表明, 不同酶浓度对 K_m 值影响并不大。

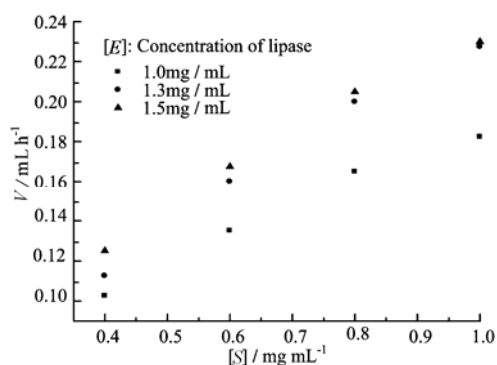


Fig.4 Effect of substrate concentration of PCL on the degradation rate [S]: substrate concentration

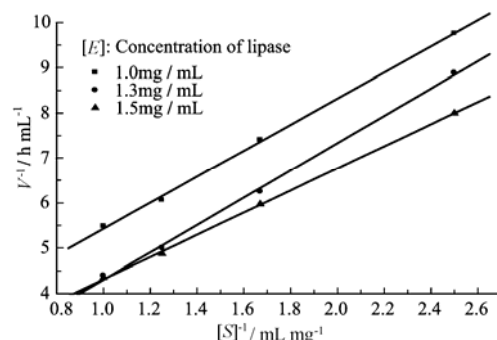


Fig.5 The relationship between $[S]^{-1}$ and V^{-1} for PCL powder

3.2 辐射交联 PCL 的酶降解动力学

PCL 经辐射交联, 其降解性能会发生变化。由不同吸收剂量下 PCL 颗粒的酶降解动力学(见图 6)可知, 降解产物均呈先增后减趋势。这是因为随着降解进行, 酶的活性不断减弱所致。同时, 在酶降解初始阶段, 高剂量辐照样品的降解速度快, 而降解过程的后期, 低剂量辐照样品的降解量有所增加。从图 6 可知, 辐射交联 PCL 的降解级数也不符合零级反应; 通过计算也不符合一级反应, 其动力学也较复杂。

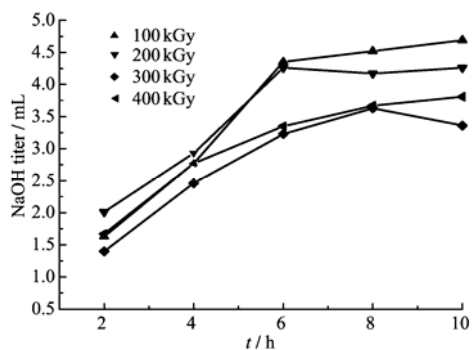


Fig.6 Effect of time on degradation of cross-linked PCL par ticulates

我们还考察了不同剂量辐射交联 PCL 酶降解滴定量随着底物浓度变化情况, 如图 7 所示。从图 7 中我们发现随着底物浓度的增加, 滴定量不断增加, 这是由于底物浓度的增加, 使得酶与底物结合的几率增大, 因而降解产物增加了。我们对图 7 利用米氏方程变化式处理得到图 8。我们从图 8 中可以看出, 米氏方程对其处理的结果的线性关系较为理想。经计算, 200kGy PCL 的降解参数 $V_{\max}$ 为 0.96mL/h , K_m 为 71.95mg/mL 。其它辐射剂量参数与之相差不多。由此可知, 辐射交联 PCL 颗粒同样是符合零级和一级的混合降解动力学反应^[9]。

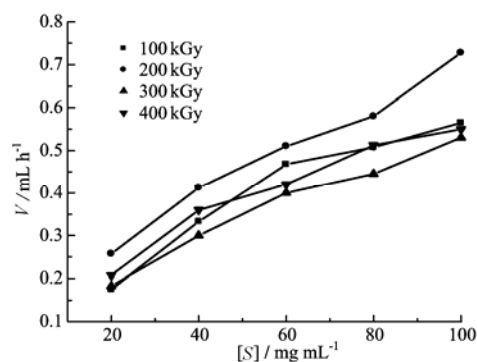


Fig.7 Effect of substrate concentration on degradation of PCL particulates

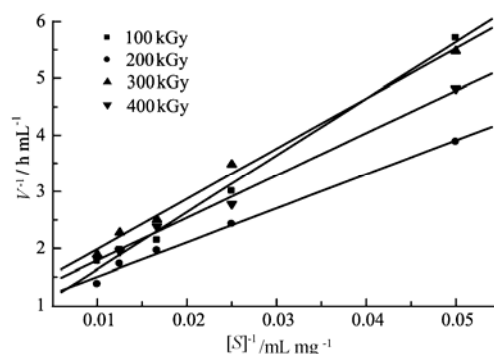


Fig.8 The relationship between $[S]^{-1}$ and V^{-1} of the PCL particulates

总之, PCL 粉末和辐射交联 PCL 颗粒较好的符合了米氏方程, 其降解动力学属于混合动力学反应。我们分析, PCL 的酶降解过程比较复杂, 其包括酶分子在聚合物表面的吸附、酶向聚合物本体的扩散、聚合物酯键的断裂、降解分子碎片向溶液中的扩散等过程, 因而降解反应除了和底物、酶浓度有关外, 可能也受降解产物从聚合物表面及内部扩散速率的影响。交联 PCL 颗粒的动力学与 PCL 粉末降解动力学类似, 较好地符合了米氏方程, 这说明辐射对 PCL 的降解动力学影响不大。

参考文献

- 1 Zhu G, Liang G, Xu Q, *et al.* J Appl Polym Sci, 2003, **90**(6): 1589-1595
- 2 Lendlein A, Langer R. Science, 2002, **296**(5573): 1673-1676
- 3 Barralet J E, Wallace L L, Strain A J. Tissue Eng, 2003, **9**(5): 1037-1046
- 4 Kweon H, Yoo M K, Park I K, *et al.* Biomaterials, 2003, **24**(5): 801-808
- 5 Darwis D, Mitomo H, Yoshii F. Polym Degradation Stab, 1999, **65**(2): 279-285
- 6 Dos S R D, Calil M R, Das G F G C, *et al.* J Polym Environ, 2001, **9**(3): 109-113
- 7 Fumio Y, Darmawan D, Hiroshi M, *et al.* Radiat Phys Chem, 2000, **57**: 417-420
- 8 郑裕东, 王迎军, 吴刚. 高分子学报, 2002, (6): 760-763
ZHENG Yudong, WANG Yingjun, WU Gang. Acta Polym Sinica, 2002, (6): 760-763
- 9 戴树桂. 环境化学. 北京: 高等教育出版社, 2000. 278-280
DAI Shugui. Environment chemistry. Beijing: Higher Education Press, 2000. 278-280

Kinetic study for enzymatic degradation of PCL

ZHANG Longbin^{1,2} ZHU Guangming¹ XU Shuogui³ WANG Jinhua¹ QIN Ruifeng¹

¹ (Department of Applied Chemistry, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072)

² (The Second Artillery Engineering University, Xi'an 710025)

³ (Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433)

ABSTRACT Kinetics of enzymatic degradation behavior of cross-linked PCL was studied. It is well known that the enzymatic hydrolysis of water-insoluble PCL by depolymerases produces water-soluble products. The result showed that the concentration of product in the solution increased with the time and substrates concentration. The degradation kinetics followed Michaelis-Menten equation. The degradation parameter of the PCL powder was 1.14mg/mL for K_m and 0.39mL/h for V_{max} , respectively. And the degradation parameter of cross-linked PCL particulate was 71.95mg/mL for K_m and 0.96mL/h for V_{max} , respectively.

KEYWORDS Polycaprolactone, Enzymatic degradation, Kinetics, Titrimetry

CLC TQ321