

药械组合产品属性界定中壳聚糖分子量与抗菌机制的关系探讨

董谦, 母瑞红* (中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要 目的: 针对以壳聚糖的抗菌作用为工作机制的药械组合产品, 探讨其属性界定中壳聚糖分子量与抗菌机制的关系, 为科学监管决策提供技术支撑。方法: 通过查阅国内外文献, 以分子量为研究对象, 进一步区分此类产品属性界定中抗菌作用的不同机制, 并提出初步建议。结果与结论: 当壳聚糖的黏均分子量在100kDa及以上时, 此类产品中壳聚糖通过物理阻隔作用实现抗菌目的, 可认为医疗器械作用; 当黏均分子量在10kDa以下时, 壳聚糖通过干扰细胞新陈代谢活动实现抗菌目的, 可认为药理作用; 对于黏均分子量在10kDa至100kDa之间的壳聚糖抗菌作用的相关机制需在今后试验中作进一步研究。

关键词: 药械组合; 属性界定; 壳聚糖; 分子量

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)11-1324-05

doi:10.16153/j.1002-7777.2020.11.012

On Relationship between Molecular Weight of Chitosan and the Antibacterial Mechanism in Jurisdictional Designation of Drug-device Combination Products

Dong Qian, Mu Ruihong* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To analyze the relationship between molecular weight of chitosan and its antimicrobial mechanism in the process of jurisdictional designation for drug-device combination products that contain chitosan and perform antibacterial function with it, so as to provide technical support for scientific regulatory supervision. **Methods:** By consulting relevant literature home and abroad, molecular weight was chosen as the research object to distinguish different antibacterial mechanisms in the process of jurisdictional designation, and preliminary suggestions were put forward. **Results and Conclusion:** When viscosity-average molecular weight of chitosan was at 100kDa or beyond, its antibacterial function could be realized through physical barrier, which could be considered as the role of medical devices. When viscosity-average molecular weight was below 10kDa, its antibacterial function could be realized by interfering in the metabolic activities of cells, which could be considered as the role of pharmacological effect. When viscosity-average molecular weight is between 10kDa and 100kDa, the mechanism of the antibacterial action of chitosan needs to be studied further in future experiments.

Keywords: drug-device combination; jurisdictional designation; chitosan; molecular weight

壳聚糖, 作为典型的碱性聚合多糖, 因其良好的生物相容性、广谱抗菌性、黏合性和无毒性, 被广泛用于医学领域。壳聚糖分子内存在游离的氨基和羟基, 可通过分子设计实现受控化学修饰^[1-2], 更是进一步扩大了其应用范围。随着对壳聚糖及其衍生物性能研究的不断深入和应用范围的创新拓展, 以壳聚糖的抗菌作用为工作机制的有关产品申报药械组合产品属性界定(以下简称属性界定)的数量越来越多。

药械组合产品是由药品与医疗器械共同组成, 并作为一个单一实体生产的产品。属性界定一般根据具体产品的主要作用机制确定其管理属性, 即以药品为主或以医疗器械为主的药械组合产品^[3-4]。根据属性界定结果, 产品进入不同的上市前审评通道。以药品为主的药械组合产品需申报药品注册; 以医疗器械为主的药械组合产品需申报医疗器械注册, 并按照第三类医疗器械管理。因此, 对于含壳聚糖且声称其发挥抗菌作用的药械组合产品, 结合当前科学技术发展进一步区分其抗菌作用的具体机制成为确定其上市途径和科学监管的重要基础。本文通过分析含壳聚糖的药械组合产品属性界定中存在的主要问题, 对比分析国内外相关文献, 总结壳聚糖及其衍生物抗菌作用影响因素的研究成果, 为此类产品属性界定的精细化管理提供技术建议。

1 属性界定中壳聚糖作用机制判定存在的问题

目前大多数文献研究结果均表明, 壳聚糖及其衍生物对多种微生物包括细菌、真菌等都具有抑制效果^[5-9]。含壳聚糖的药械组合产品, 比如壳聚糖敷料、壳聚糖功能性敷料凝胶、含壳聚糖的口腔溃疡贴等, 均声称“用于体外创伤、创面的护理, 缓解创面疼痛, 具有抗菌、预防感染、促进创面愈合等作用”。根据属性界定原则, 此类产品均以壳聚糖、羧甲基壳聚糖发挥的抗菌作用为主, 被界定为以药品为主的药械组合产品或应按药品管理。此外, 如果含壳聚糖敷料仅通过在创面表层形成一层高分子膜, 为创面愈合提供微环境, 起物理屏障作用, 依据《医疗器械分类目录》, 则可判定为按照医疗器械管理。随着对壳聚糖抗菌机制和性能的不断了解, 进一步明确其在产品中发挥的抗菌作用是屏障阻隔的物理作用, 或是干扰细胞生理活动的

药理作用, 成为准确把握此类产品属性界定的关键所在。

壳聚糖的抗菌性能影响因素众多且复杂, 目前已研究的影响因素有分子量、浓度、脱乙酰度、pH、金属离子、菌株、晶型等^[10]。其中, 分子量被认为是影响壳聚糖抗菌性能大小的主要因素^[11]。虽然关于分子量与抗菌效果的定量规律尚不明确, 但是针对以壳聚糖的抗菌作用为工作机制的药械组合产品, 其属性界定仅需要对抗菌作用的不同机制^[12]进行定性确定。因此, 建议以分子量为研究对象进一步区分壳聚糖的抗菌机制。

2 分子量对壳聚糖及其衍生物抗菌效果的影响

目前, 分子量影响壳聚糖及其衍生物抗菌效果的研究主要集中在未改性的壳聚糖, 对壳聚糖衍生物的研究较少。因此, 将重点分析分子量对壳聚糖抗菌效果的影响, 所查阅的文献采用黏均分子量和重均分子量两种方法表征壳聚糖分子量大小。黏均分子量指根据高分子溶液的特性黏数计算得出的分子量, 重均分子量指按照不同分子的分子重量统计的平均分子量。一般情况下, 重均分子量略大于黏均分子量。考虑壳聚糖制备过程中多采用黏度法测定其分子量^[13-15], 且文献中仅个别数据采用重均分子量, 选择以黏均分子量为分子量的表征方法进行分析^[16]。虽然文献采用抑菌圈法和光密度法两种方法测定其不同分子量的抗菌效果, 但是区分壳聚糖的不同抗菌机制仅需要其发挥药理作用和物理阻隔作用的两个分子量边界值, 对两种机制共存的情况有待进一步研究。综上, 采用黏均分子量作为进一步区分此类产品抗菌机制的要素是可行的。

2.1 黏均分子量对壳聚糖抗菌效果的影响

郑连英等^[17-18]以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为试验菌株, 对黏均分子量分别为5以下、48.5、72.5、129、166和305kDa的壳聚糖的抗菌效果进行研究。结果表明, 分子量在305kDa以下时, 壳聚糖对金黄色葡萄球菌的抗菌作用随分子量减小而逐渐减弱; 对大肠杆菌随分子量减小而逐渐增强。分析认为, 壳聚糖的抗菌作用主要有以下两种机理: 一种是壳聚糖通过吸附在细胞表面, 形成一层高分子膜, 阻止了营养物质向细胞内运输, 从而起到阻菌作用; 另一种是壳聚糖通过渗透进入细胞内, 吸附细胞体内带有阴离子的细胞质, 并发生絮凝作

用,扰乱细胞正常的生理活动,从而杀灭细菌。对于金黄色葡萄球菌,前一种机理起主导作用;对于大肠杆菌,后一种作用机理起主导作用。此外,当分子量在72.5kDa到129kDa之间,由于抗菌所遵循的机理正处于两种机制的转变,因此对大肠杆菌的抗菌作用效果较差。

冯小强等^[11]以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等5种菌株为试验对象,对黏均分子量分别为50、100、140、200、800和1000kDa的壳聚糖的抗菌效果进行研究。宋献周等^[19]以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等水产品中的常见菌为试验对象,对黏均分子量分别为15.6、33、95、720kDa的壳聚糖的抗菌效果进行研究。两个试验结果表明,壳聚糖对试验菌株均有抑制作用;无论是革兰氏阳性菌还是革兰氏阴性菌,分子量低的壳聚糖的抗菌作用均优于分子量高的壳聚糖。分析认为,之所以较低分子量的壳聚糖有更好的抗菌活性,是因为其既兼备成膜特性,又易于进入菌体细胞,吸附结合一些带负电的细胞质,扰乱菌体细胞的正常生理代谢。

Liu Xiaofei等^[20]以大肠杆菌为试验菌株,对分子量分别为5、8、51.1、91.6、274、650和1080kDa的壳聚糖的抗菌效果及影响因素进行研究。其中,5kDa和8kDa的分子量类型为重均分子量,其余为黏均分子量。结果表明,当分子量为91.6kDa以下,随着分子量增加, $-NH_2$ 增加,抗菌效果增强。当分子量大于91.6kDa,由于壳聚糖所具有的氨基基团数量太多,互相之间强大的分子内氢键形成虚拟的交联结构,进而不再具有吸附细菌表面的能力,导致抗菌效果随分子量的增加而减小。此外,5kDa和8kDa的壳聚糖可在大肠杆菌细胞内观察到,印证了壳聚糖可以阻碍DNA转录、干扰RNA和蛋白质合成的推论。同时,Li Jianhui等^[21]以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为试验菌株研究超高黏均分子量(1200kDa至1500kDa)的壳聚糖的抗菌效果。试验发现,壳聚糖的抗菌过程是一个渐进的过程,一开始细菌细胞被限制住,接着通过壳聚糖的包裹和黏合作用杀灭细菌。分析认为,超高分子量的壳聚糖的抗菌效果可归因于氨基的质子化,同时超长分子链的包裹和黏合作用较好地提升了壳聚糖对试验菌株的抗菌效果。

李小芳^[22]以大肠杆菌为试验菌株研究不同黏均分子量(黏均分子量为3kDa和50kDa)的壳聚糖对

被试菌的作用位点;以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌为试验菌株,研究50kDa的壳聚糖对细菌细胞膜的影响。研究发现:①3kDa的壳聚糖能进入到大肠杆菌细胞内部,与细胞内带负电的DNA结合,阻碍了DNA的进一步复制,从而抑制大肠杆菌的生长;50kDa的壳聚糖无法进入到大肠杆菌细胞内部,而是通过破坏细菌细胞膜而起抗菌作用。②3kDa的壳聚糖中的氨基与DNA分子的磷酸根之间由于静电作用,存在着较强的相互作用而形成了非电活性化合物,导致DNA双螺旋结构破坏。③不管是对大肠杆菌还是对金黄色葡萄球菌,壳聚糖的抗菌作用是由于其迅速破坏细胞膜所致。此外,试验通过透射电镜观察,对于金黄色葡萄球菌的成熟细胞,加入壳聚糖的细菌细胞壁比对照组加厚,由此推测壳聚糖堆积在菌体的表面,阻碍了营养物质的输入而使菌体死亡。

此外,关于壳聚糖成膜性能的研究结果也从侧面证明了壳聚糖在较高分子量的情况下可成膜,以阻断营养物质输入细胞内的推论。谭春园^[23]通过研究发现黏均分子量在100kDa以上的壳聚糖可不依赖明胶而自行成膜,但3kDa的水溶性壳聚糖在没有明胶的情况下不成膜状。强志斌等^[24]通过黏均分子量分别为200、350、500和680kDa的壳聚糖制备壳聚糖均质膜,以研究壳聚糖膜的各项性能。曹宗顺等^[25]通过黏均分子量为380kDa和430kDa的壳聚糖溶液制备药用壳聚糖生物降解膜。

2.2 分子量对不同壳聚糖衍生物抗菌效果的影响

陈凌云等^[26]以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等5种细菌为试验菌株,对黏均分子量分别为5、8、62和195kDa的羧甲基壳聚糖的抗菌效果进行研究,发现N,O-羧甲基壳聚糖的抗菌性能与分子量之间的关系十分密切。N,O-羧甲基壳聚糖的抗菌活性随分子量的降低而显著增强,分子量低于5kDa的样品对金黄色葡萄球菌等细菌具有抑制杀灭作用。根据结果推测,其抗菌机理可能为较低分子量的羧甲基壳聚糖能够渗透入细胞内,吸附细胞体内带有电荷的细胞质,发生絮凝作用,扰乱细胞正常的生理活动,或阻断细菌体内DNA转录,从而抑制细菌繁殖。

Meng Xiangtao等^[27]以大肠杆菌为试验菌株,对重均分子量为1.4、27、51和99kDa的N-乙基壳聚糖的抗菌效果进行研究。结果表明,当N-乙基壳

聚糖的分子量达到27kDa时,分子量的增加对抗菌效果基本无影响;当分子量为1.4kDa时,抗菌效果急剧减小。考虑到分子量为27kDa时,分子难以穿过细胞膜进入细胞内部,推测壳聚糖衍生物主要与细胞膜发生作用达到抗菌目的;分子量为1.4kDa时的抗菌效果剧减,则可能因为低分子量与细胞膜产生的作用较弱所致。

Priyanka Sahariah等^[28]以金黄色葡萄球菌为试验菌株,对重均分子量为3kDa至186kDa之间的20个不同分子量的N-三甲基壳聚糖样本的抗菌效果进行研究,并与未改性壳聚糖的抗菌效果进行对比试验。结果表明,对于N-三甲基壳聚糖,随着分子量的增加,其抗菌效果逐渐增强;当分子量达到20kDa及以上,抗菌效果不再变化。对于未改性的壳聚糖,抗菌效果同样地随分子量增加而增强,当分子量达到50kDa及以上,抗菌效果不再变化。

综上所述,虽然影响抗菌效果的因素众多且相互之间又有交错作用,但是可以确定的是,当分子量减小至一定程度,壳聚糖及其衍生物可以进入菌体细胞内,通过干扰细胞的新陈代谢发挥抗菌作用,如阻碍DNA转录、干扰RNA和蛋白质合成;当分子量增大至一定程度,壳聚糖及其衍生物无法进入菌体细胞内,抗菌效果随分子量的不断增加而减弱或不再变化,通过在细胞表面形成足够致密的膜阻止营养输入发挥抗菌作用。

3 属性界定中壳聚糖分子量与抗菌机制的关系

结合文献中的试验数据,在以壳聚糖的抗菌作用为作用机制的药械组合产品属性界定中,从控制产品风险和确保安全的角度考虑,建议视情况区分壳聚糖分子量与抗菌机制的关系:①当黏均分子量在100kDa以上时,壳聚糖通过物理屏障作用实现其抗菌目的,可认为属医疗器械作用;②当黏均分子量在10kDa以下时,壳聚糖通过渗透入细菌细胞内阻碍DNA转录、干扰RNA和蛋白质合成实现其抗菌目的,可认为属药理作用;③对于黏均分子量介于10kDa至100kDa之间的壳聚糖抗菌主要作用机制,是以医疗器械作用为主或以药品作用为主,由于目前文献中的试验数据有限不足以确定,可在今后通过试验进一步研究。同样地,对于不同类型壳聚糖衍生物的抗菌机制的分子量划分标准也应作专题研究。

4 结语

含壳聚糖的药械组合产品具有安全有效、生物相容性好的特点。基于壳聚糖及其衍生物的抗菌作用研制的相关产品又能实现保护创面、预防感染和促进愈合等综合生物学功效,具有良好的临床应用前景^[29-33]。结合科学技术的发展,不断推进此类产品属性界定中有关问题的研究非常必要,相关成果不仅可以指导同类产品的判定、避免重复申报,而且有助于满足此类产品的监管需求、促进行业发展。

参考文献:

- [1] 杨黎明. 壳聚糖的改性及其智能水凝胶的研究[D]. 上海: 上海大学, 2005.
- [2] 李静. 壳聚糖的改性及其止血功能研究 [D]. 长春: 长春理工大学, 2015.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 国家食品药品监督管理局通告2009年第16号 关于药械组合产品注册有关事宜的通告 [S]. 2009.
- [4] 温贤涛, 朱宁, 冷鹏, 等. 浅谈对药械组合产品属性界定的认识和建议[J]. 中国医疗器械信息, 2010, 16(5): 42-45.
- [5] Younes I, Rinaudo M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications[J]. Marine Drugs, 2015, 13: 1133-1174.
- [6] Benhabiles M, Salah R, Lounici H, et al. Antibacterial Activity of Chitin, Chitosan and Its Oligomers Prepared from Shrimp Shell Waste[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 29: 48-56.
- [7] Verlee A, Mincke S, Stevens C. Recent Developments in Antibacterial and Antifungal Chitosan and Its Derivatives[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 164: 268-283.
- [8] Bano I, Arshad M, Ghauri M, et al. Bioactivity of Variant Molecular Weight Chitosan Against Drug-resistant Bacteria Isolated from Human Wounds[J]. Microbial Drug Resistance, 2017, 23(8): 958-965.
- [9] 葛为公, 杨红梅, 黄崇基, 等. 羧甲基壳聚糖的制备及抑菌作用的研究[J]. 华夏医学, 2005, 18(6): 903-904.
- [10] 柯松, 王敏, 徐源, 等. 壳聚糖抑菌性能的研究进展 [J]. 生物骨科材料与临床研究, 2019, 16(3): 59-62.

- [11] 冯小强, 杨声, 李小芳, 等. 不同分子量壳聚糖对五种常见菌的抑制作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 335-338.
- [12] 陈威, 吴清平, 张菊梅, 等. 壳聚糖抑菌机制的初步研究[J]. 微生物学报, 2008, 48(2): 164-168.
- [13] 陈颢, 王磊, 林羽. 3种市售壳聚糖创伤修复类产品的粘均分子量测定[J]. 海峡药学, 2015, 27(1): 37-40.
- [14] 唐振兴, 石陆娥, 易喻. 壳聚糖及其降解物分子量的测定[J]. 化工技术与开发, 2004, 33(6): 38-39.
- [15] 贺岚, 白海红, 艾有年. 粘度法测定壳聚糖分子量的一些体会[J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(5): 631-632.
- [16] 胡秀林, 张海连. 壳聚糖理化性能: 粘均分子量、脱乙酰度及结晶性能测定[J]. 广东化工, 2019, 46(22): 22-25.
- [17] 郑连英, 朱江峰, 孙昆山. 壳聚糖的抗菌性能研究[J]. 材料科学与工程, 2000, 18(2): 22-24.
- [18] Zheng L Y, Zhu J F. Study on Antimicrobial Activity of Chitosan with Different Molecular Weights[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 54: 527-530.
- [19] 宋献周, 沈月新. 不同平均分子量的 α -壳聚糖的抑菌作用[J]. 上海水产大学学报, 2000, 9(2): 138-141.
- [20] Liu X F, Guan Y L, Yang D Z, et al. Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2001, 79(7): 1324-1335.
- [21] Li J H, Wu Y G, Zhao L Q. Antibacterial Activity and Mechanism of Chitosan with Ultra High Molecular Weight[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 148: 200-205.
- [22] 李小芳. 壳聚糖抑菌活性及机理研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2009.
- [23] 谭春园. 不同分子量壳聚糖膜的制备、降解、缓释及壳聚糖抗菌性能的研究[D]. 昆明: 昆明医学院, 2009.
- [24] 强志斌, 陈寅生, 郭华文, 等. 壳聚糖膜的制备及膜性能[J]. 东华大学学报: 自然科学版, 2007, 33(2): 212-220.
- [25] 曹宗顺, 卢凤琦. 药用壳聚糖生物降解膜的研制[J]. 中国医药工业杂志, 1996, 27(1): 14-16.
- [26] 陈凌云, 杜予民, 刘义. 羧甲基壳聚糖的结构与抗菌性能研究[J]. 武汉大学学报: 自然科学版, 2000, 46(2): 191-194.
- [27] Meng X T, Xing R, Liu S, et al. Molecular Weight and pH Effects of Aminoethyl Modified Chitosan on Antibacterial Activity In Vitro[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 50: 918-924.
- [28] Sahariah P, Cibor D, Zielinska D, et al. The Effect of Molecular Weight on the Antibacterial Activity of N, N, N-Trimethyl Chitosan (TMC) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20: 1743.
- [29] 蒋玉燕, 毕忆群, 蒋建国. 几丁聚糖生物敷料的研究与开发[J]. 海洋学研究, 2007, 25(4): 59-64.
- [30] 车小琼, 孙庆申, 赵凯. 甲壳素和壳聚糖作为天然生物高分子材料的研究进展[J]. 高分子通报, 2008, 2: 45-49.
- [31] 易喻, 徐云霞, 梅建风, 等. 壳聚糖流体敷料膜的制备及其促伤口愈合的研究[J]. 中国医药生物技术, 2017, 12(3): 232-237.
- [32] 夏桂雪. N-丁二酰壳聚糖纤维作为伤口敷料的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- [33] 彭思凯. 羧甲基壳聚糖促进创伤愈合机理的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.

(收稿日期 2020年6月30日 编辑 王雅雯)