

纤维素/明胶复合膜的超分子结构与性能^{*}

裴莹¹ 张俐娜^{1**} 王慧媛¹ 张先正¹ 徐敏²

(¹武汉大学化学与分子学院 武汉 430072) (²华东师范大学物理系 上海 200241)

摘 要 通过一种绿色的方法在 NaOH/尿素水体系中制备出纤维素和明胶组成的复合膜(C/G),并且证明这两种大分子间存在强的氢键作用,导致明胶耐水性明显改善.同时,用戊二醛作为交联剂对复合膜化学交联,进一步提高其抗水性.通过红外光谱(FTIR)、紫外光谱(UV-Vis)、¹³C 固体核磁共振谱、扫描电镜(SEM),力学和溶胀测试对复合膜的结构和性能进行表征.结果证明交联前后复合膜都具有良好的相容性和力学性能,进一步支持这2种大分子间存在强相互作用.然而,交联后复合膜的力学性能和耐水性都进一步提高.细胞培养试验表明,复合膜具有良好的生物相容性,能够支持细胞的黏附和生长.

关键词 纤维素,明胶,非共价键力,生物相容性

纤维素是自然界最丰富的天然高分子,它可以用于制备各种生物可降解性和生物相容性以及可衍生化的产品^[1~4].充分利用纤维素资源不仅可以保护环境,并且可节约有限的石油资源^[5~7].由于存在强氢键,纤维素很难溶解在一般溶剂中,从而限制了其应用.本实验室开发了一系列纤维素新溶剂,如 NaOH/尿素、NaOH/硫脲和 LiOH/尿素等水溶液体系^[8~11],并利用这种水溶剂溶解的纤维素溶液成功地制备出纤维素膜和丝^[12~15].此外,在 NaOH/尿素水体系中已制备纤维素/酪蛋白^[16]、纤维素/海藻酸钠^[17]和纤维素/玉米蛋白^[18]等共混膜.由于两种生物大分子间产生较强的非共价键力,这些共混膜具有良好的力学性能和功能.

明胶是胶原蛋白的水解产物,其组成与胶原蛋白类似,主要由甘氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸组成.它是一种变性的蛋白质,变性水解过程也在一定程度上减少了材料潜在的病原体.由于其结构与胶原蛋白相似,具有良好的生物相容性,明胶已广泛应用于组织工程^[19~21].然而,明胶单独作为一种材料时,它极易吸水,而且易脆等缺点.本工作试图综合纤维素和明胶这两种天然高分子的优点,通过非共价键作用制备它们的复合材料.利用 NaOH/尿素低温溶剂体系溶解纤维素,然后凝固得到再生纤维素膜,经明胶处理后并借助戊二醛

作为交联剂,制备具有交联结构的复合材料.同时表征它们的结构、相互作用力以及力学和光学性能.此外,通过在膜表面观察非洲绿猴肾成纤维细胞(COS7 细胞)的生长和增殖情况,对它的生物相容性进行评估.

1 实验部分

1.1 实验材料

纤维素(棉短绒浆,α 纤维素含量超过 95%)由湖北化纤集团有限公司(湖北,襄樊)提供.纤维素试样的黏均分子量(M_v)由黏度法在 LiOH/尿素水溶液中,25℃测得为 1.0×10^5 ^[22].其余的化学试剂均为国产市售分析纯.

1.2 纤维素/明胶复合膜的制备与表征

将纤维素溶于预冷到 -12℃ 的 7 wt% NaOH 和 12 wt% 尿素水溶液中,得到透明的纤维素溶液.将纤维素溶液在玻璃板上流延成型,以 5 wt% H₂SO₄ 水溶液做凝固剂制备出再生纤维素(RC)膜^[23].制得的纤维素膜用蒸馏水将残余的 NaOH 和尿素洗净.将洗净的 RC 膜放在不同浓度的明胶溶液中浸泡处理 24 h 后,再放入 0.02 g/mL 的戊二醛溶液中交联 1 h.将交联后的复合膜贴在有机玻璃板上室温干燥.未交联的复合膜依次标记 C/G10, C/G22, C/G31, C/G39, C/G49(标记中的数字代表复合膜中蛋白质的含量),交联的膜编

^{*} 庆祝沈家骢院士 80 华诞专稿; 2011-04-29 收稿, 2011-05-17 修稿; 国家重点基础研究发展计划(973 计划, 项目号 20101CB732203) 和国家自然科学基金(基金号 20874079)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: lnzhang@public.wh.hb.cn, lnzhangwhu@gmail.com
doi:10.3724/SP.J.1105.2011.11143

号为 cro-C/G10, cro-C/G22, cro-C/G31, cro-C/G39, cro-C/G49.

将试样剪成粉末,于 50℃ 下真空干燥 24 h 后用元素分析仪 (VarioEL III, Germany) 分析复合膜中 N 元素含量 (W_N). 复合膜中蛋白质的含量 (W_{pro}) 可用以下公式计算:

$$W_{pro} = W_N \times 6.25 \quad (1)$$

为了研究纤维素和明胶之间的相互作用,测量复合膜在蒸馏水中浸泡 24 h 的失重率. 膜的初始干重为 W_0 , 于室温下在蒸馏水中浸泡 24 h, 然后置于 50℃ 真空烘箱中干燥至恒重 W_1 , 样品在蒸馏水中的失重率 (W_{loss}) 可由下列公式计算:

$$W_{loss} = [(W_0 - W_1)/W_0] \times 100\% \quad (2)$$

为了研究化学交联对复合膜溶胀性能的影响,我们测量了复合膜在水中一定时间的溶胀比. 复合膜的初始干重为 W_0 , 室温置于蒸馏水中一定时间后拿出,用滤纸轻轻拭去复合膜表面水分,称得质量为 W_t ,直到试样的重量不会变化,视为溶胀平衡,此时质量记为 W_∞ ,则复合膜在蒸馏水中的溶胀比 S 以及平衡溶胀比 S_{eq} 可由下列公式进行计算:

$$S = (W_t - W_0)/W_0 \quad (3)$$

$$S_{eq} = (W_\infty - W_0)/W_0 \quad (4)$$

试膜的透光率 ($Tr\%$) 用紫外-可见分光光度计 (UV-160A, Shimadzu, Japan) 测试. 试样膜的厚度为 0.3 mm, 测量的波长范围为 200 ~ 800 nm. 将试膜剪成粉状,用 KBr 压片后在傅里叶红外光谱仪 (NICOLET 5700 FTIR) 上进行红外表征,波长范围为 4000 ~ 500 cm^{-1} .

固体 ^{13}C CP/MAS NMR 测试在 Bruker AVANCE-300 型核磁共振仪器上完成, ^{13}C 的共振频率分别为 75.47 MHz, 4 mm 转子, 魔角旋转速度 5 kHz, 交叉极化时间 (CP) 1 ms, 弛豫延迟时间 5 s, 累加次数 5 K.

用扫描电镜 (SEM, Hitachi S-570, Japan) 观察膜的截面形貌. 湿态的膜试样在液氮中冻干并立即折断,膜的断面经过喷射铂金后观察并拍照. 利用 AGS-J 型通用拉力机 (CMT6503, Shenzhen SANS Test Machine Co. Ltd, 中国深圳) 测量复合膜试样在干态和湿态下的力学性能,依据 ISO 527-3, 1995 (E) 标准测定. 测试时拉伸速度为 3 mm/min, 测试长度为 50 mm. 测量前所有的试样均在装有饱和 NaCl 溶液的干燥器中 ($RH = 75\%$) 中调湿一周,每个试样分别测试 5 次后的平均值

作为试样的力学数据值. 将干态复合膜室温置于蒸馏水中 1 h 后,依照上述条件测量膜的湿态力学性能.

将复合膜剪成直径约为 1.6 cm 的圆片,置于紫外灯下灭菌 2 h 后放入 24 孔聚苯乙烯 (表面附有细胞黏附因子,购自 Corning 公司) 细胞培养板中. 将含有 COS7 细胞 (密度为 6×10^4) 的培养液 (10% FBS 和 1% 的 antibiotics cpenicillin streptomycin, 10000 u/mL) 移植在纤维素膜表面上,置于培养箱中培养,培养箱的温度为 37℃,空气中 CO_2 含量控制在 5%, 培养时间为 24 h. 另外,将 COS7 细胞直接在无样品的孔中培养作为参照. 细胞形貌通过光学显微镜 (IX 70, Olympus, Japan) 放大 100 倍后进行观察.

2 结果与讨论

2.1 纤维素/明胶复合膜的结构与相容性

RC 膜和 C/G 复合膜的 N 元素含量 (W_N) 及蛋白含量 (W_{pro}) 见表 1. RC 膜 N 含量为 0, 表明纤维素再生膜中的尿素已经完全被水洗出来. 因此, C/G 复合膜中 W_N 值仅代表明胶中 N 含量. 结果表明,复合膜由明胶和纤维素组成,随着明胶溶液浓度的增大,更多的明胶分子与纤维素结合使复合膜 N 元素含量增加. 由此可以通过调节明胶溶液的浓度控制 C/G 复合膜中蛋白质含量的变化.

Table 1 The N content (W_N , %) and the protein content (W_{pro} , %) of the C/G films immersed gelatin solution with different concentrations (c , wt%) for 24 h

Samples	c	W_N	W_{pro}
C/G10	2	1.59	9.94
C/G22	5	3.56	22.3
C/G31	8	4.91	30.7
G/G39	12	6.18	38.6
G/G49	15	7.78	48.6
Gelatin	100	15.08	94.3
RC	0	0	0

图 1 示出 RC 膜、复合膜和明胶的 ^{13}C 固体核磁共振图谱. 其中 $\delta = 103.7, 78.4$ 和 63.0 分别是纤维素分子 C1、C4 和 C6 的共振吸收峰. $\delta = 173.2$ 处为明胶分子中含量最多的甘氨酸 C 原子共振吸收峰^[24], $\delta = 0 \sim 80$ 处的共振吸收峰为明胶中其它氨基酸 C 原子吸收峰^[25]. 从图上可以看出, C/G31 和 cro-G/G31 复合膜的核磁谱图中均含有以上共振吸收峰,进一步证明复合膜是由纤维素和明胶通过非共价键力组成的复合材料,这 2 种大

分子之间没有共价键生成.

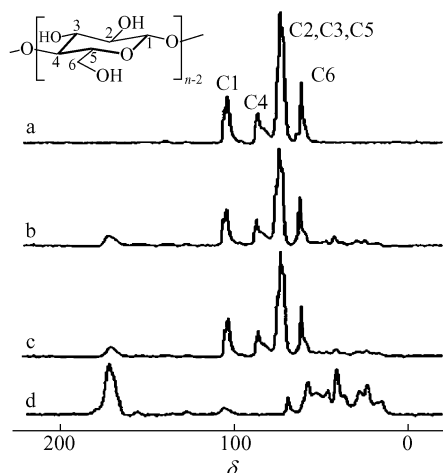
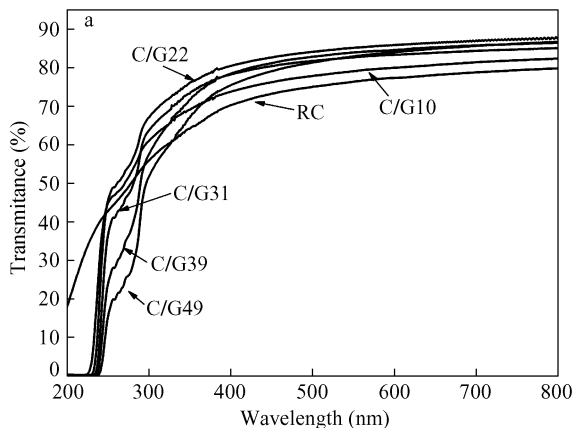


Fig. 1 ^{13}C solid-state NMR of RC (a), C/G31 (b), cro-C/G31 (c) films and gelatin (d)

图 2(a) 示出未交联的 C/G 复合膜的 FTIR 图谱. RC 膜中—OH 基团的伸缩振动的吸收峰在 3431 cm^{-1} 左右. 然而, C/G 复合膜的该峰值向低波数方向移动, 而且变宽, 表明复合材料两种生物大分子间氢键作用力增强. 这是由于纤维素中的一—OH 基团与蛋白质中的一— NH_2 、—CONH—基团形成了较强的氢键相互作用. 如图 2(a) 所示, 1648 、 1540 和 1239 cm^{-1} 分别为明胶中酰胺 I、酰胺 II 和酰胺 III 特征峰值, 可见复合膜中出现了明胶的特征峰, 且它在复合膜中表现为向低波数方向移动, 这是由于明胶中引入了纤维素成分, 同样形成了新的氢键作用. 随着 W_{pro} 含量增加, 复合膜中也逐渐出现酰胺 III 谱带. 由于戊二醛的醛基与明胶的氨基基团交联后形成了酰胺键, 与蛋白质中酰胺键在红外光谱中表现一致. 所以交联后的



复合膜的红外光谱图(图 2(b))的变化与图 2(a) 类似.

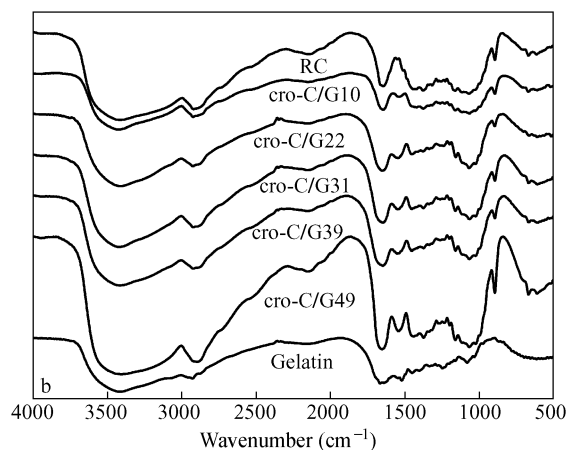
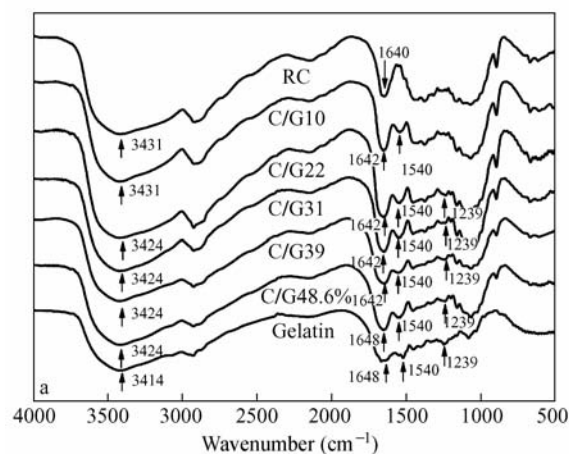


Fig. 2 FTIR spectra of the C/G films (a) and the crosslinked C/G films (b) treated in gelatin solution with different concentrations for 24 h

图 3 示出未交联的复合膜紫外-可见光谱图和它们的照片. 这些 C/G 交合膜均显示出优良透

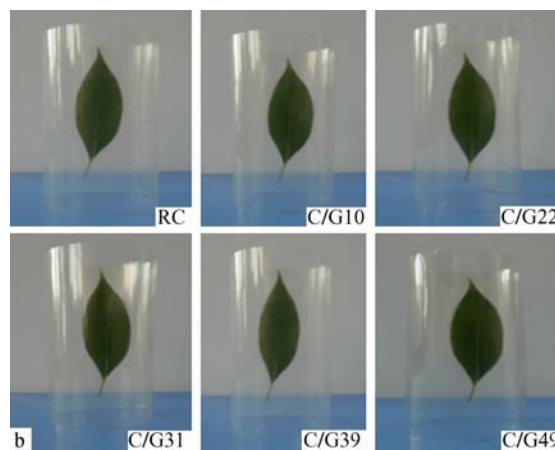


Fig. 3 The optical transmittance curves of the C/G films (a) and the photographs (b) of the RC and C/G films

光性,在 400 ~ 800 nm 波段的透光性 C/G 复合膜的均高于 RC. 然而,C/G 复合膜在 200 ~ 250 nm 处,表现出明显的紫外吸收能力,而且随着紫外波长增加,复合膜的透过率迅速增加,. 通常,光学透过性反映复合材料两种以上组分之间的相容性,上述结果表明纤维素和明胶之间具有良好的相容性. 其中,600 ~ 800 nm 处 C/G22 的透光率达到了 85% 以上,由此可见,适量蛋白质的加入可以增进这些生物大分子间通过氢键的结合,提高复合膜的透光性能.

图 4 示出 RC 膜和 C/G 复合膜断面的扫描电镜形貌图. 复合膜呈现了十分均匀的多孔结构. 进

一步证明纤维素和明胶具有较好的相容性,并且表明 2 种不同的大分子通过非共价键力彼此结合在一起. 有趣的是,相对于 RC 膜,C/G 复合膜的孔洞尺寸明显增大. 这是由于蛋白质的引入,导致体系亲水基团的增加,使复合膜锁住了较多的水分子. 当复合膜在液氮冷冻时,产生了大尺寸冰晶,冷冻干燥后留下了尺寸较大的孔洞结构. 交联的复合膜 cro-C/G 的 SEM 图像与未交联的类似,说明交联作用并没有对复合膜的形貌产生明显影响. 由此证明 C/G 复合膜是由纤维素与明胶分子通过非共价键力构筑的超分子材料.

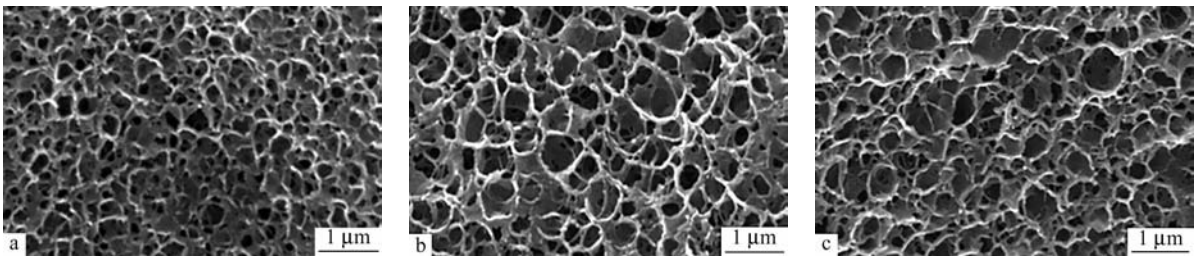


Fig. 4 SEM images of the cross sections of RC (a), C/G31 (b) and cro-C/G31 (c)

2.2 纤维素/明胶复合膜的性能

如表 2 所示,RC 膜在水中只是溶胀而不会溶解. 所以它在蒸馏水中浸泡 24 h 后,质量未发生变化. 然而,明胶是由一系列分子量不同的蛋白质组成的混合物,且具有亲水性,因此 C/G 复合膜在水中的质量损失应归因于小分子量蛋白质溶出. 未交联复合膜在水中浸泡后质量损失为 1.0% ~ 2.8%,这表明只有很少明胶分子溶出. 经

过交联后,能明显地降低复合膜在水溶的质量损失,质量损失仅为 0.2% ~ 1.1%. 结果表明,明胶分子不仅可以结合在纤维素框架上,而且由于交联作用,明胶分子形成了交联网络,两种作用共同将蛋白质分子较为牢固地结合在复合材料中. 总体而言,明胶与纤维素分子间存在强的相互作用,导致非共价键结合成复合材料. 这样使明胶在湿态下使用成为可能.

Table 2 The percentage of weight loss (W_{loss} , %) in the films immersed in distilled water at room temperature for 24 h

Samples	RC	C/G10	C/G22	C/G31	C/G39	C/G49
C/G films	0	1.030	1.804	2.025	2.639	2.833
cro-C/G films	—	0.276	0.2600	1.106	1.137	1.141

Table 3 The equilibrium swelling ratios ($S_{eq,g/g}$) of the C/G films with different protein content

Samples	RC	C/G10	C/G22	C/G31	C/G39	C/G49
C/G films	0.7580	0.8819	1.565	1.660	2.157	2.390
cro-C/G films	—	0.7263	1.188	1.202	1.257	2.091

图 5 示出 RC 膜和交联前后 C/G 复合膜在蒸馏水中的溶胀曲线. C/G 复合膜在 15 min 左右基本能达到溶胀平衡状态. 随着蛋白含量提高,复合膜的溶胀比明显增加. 交联作用在一定程度上降低了复合膜在水中的溶胀比. 这是由于分子间的

化学交联能有效地在体系中形成网络结构,限制明胶分子链的运动能力,使复合膜溶胀度明显降低. 由此表明,C/G 复合膜的抗水性明显提高,为明胶在湿态下的应用提供可能.

复合膜在干态和湿态下的力学性能分别示于

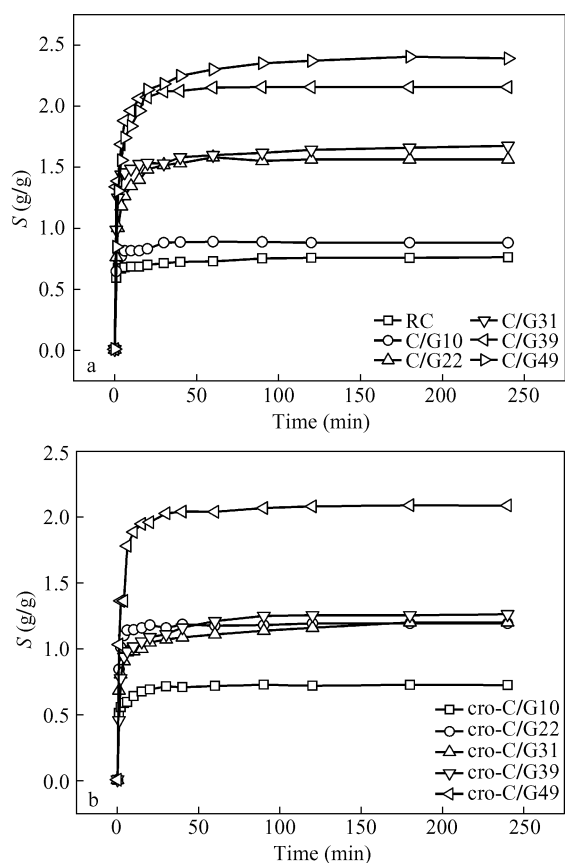


Fig. 5 The swelling ratio (S) curves of the C/G films (a) and the cro-C/G films (b) immersed in distilled water with different time

图6和图7. 复合膜的拉伸强度(σ_b)都比较高,但 σ_b 随着蛋白质含量的增加稍有降低,交联作用明显地提高复合膜的拉伸强度. 其中C/G10和C/G22经交联后,其拉伸强度分别达到了124.4和117.1 MPa,均高于RC膜. 复合膜的断裂伸长率随着蛋白质含量的增加呈现先升高后降低的趋势. 当蛋白质含量为22.3%时,断裂伸长率 ε_b 达

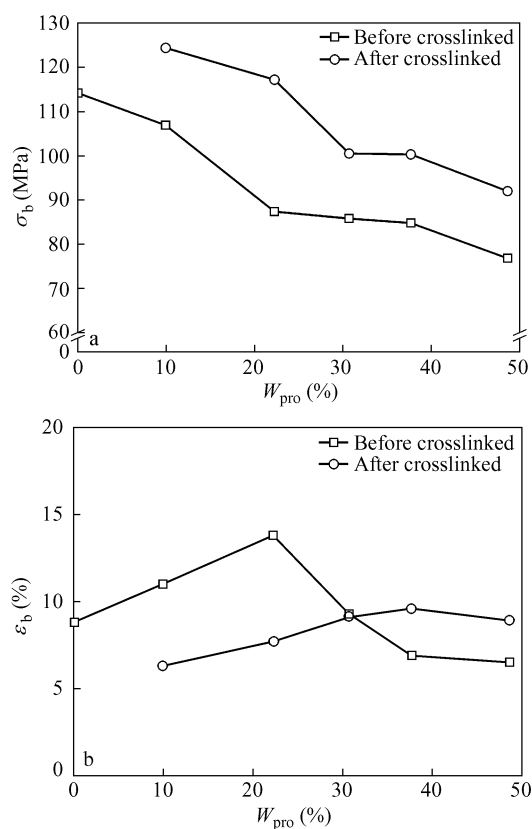


Fig. 6 Effect of W_{pro} on σ_b (a) and ε_b (b) of the C/G and cro-C/G films in the dry state

到最大值13.8%. 蛋白质含量较少时,部分分子量较小的蛋白质分子对复合膜起到了一定增塑作用. 随着蛋白质含量提高,复合膜的拉伸强度和断裂伸长率的降低,这是蛋白质弱的力学性能所致. 复合膜在湿态下的拉伸强度亦随蛋白质含量增大而降低,且交联作用使得复合膜拉伸强度有所提高. 但在湿态下,交联前后复合膜的断裂伸长率却

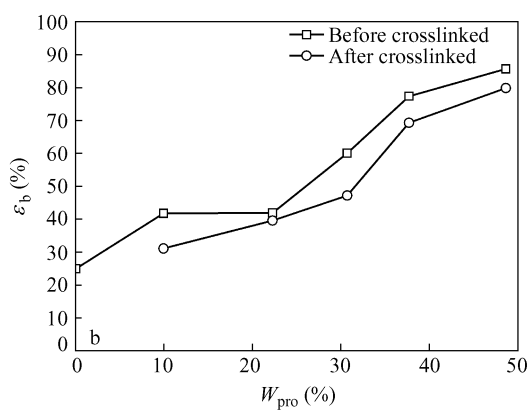
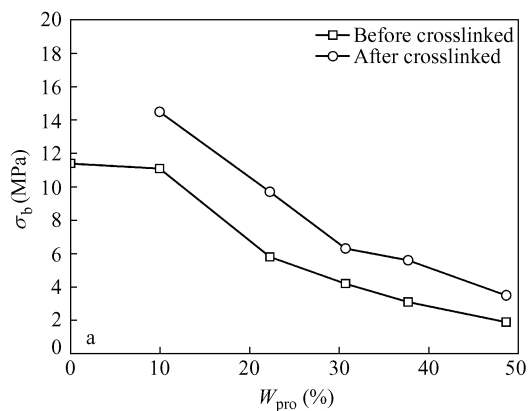


Fig. 7 Effect of W_{pro} on σ_b (a) and ε_b (b) of the C/G and cro-C/G films in the wet state

随蛋白质含量增大而提高.这是由于蛋白质分子结合了相当数目的水分子,而这些水分子也充当了复合膜的增塑剂,从而造成复合膜断裂伸长率提高.而明胶分子由于交联作用而产生网络结构,从而使复合膜“增塑剂”分子数目减少,造成复合膜断裂伸长率相对于未交联的复合膜有所降低.

2.3 纤维素/明胶复合膜生物相容性

为了研究 C/G 复合膜的生物相容性,我们进行了细胞培养试验(图 8).COS7 细胞悬液置于样

品表面进行黏附与增长实验,并以聚苯乙烯培养皿作为对照.培养 24 h 后,细胞能很好地黏附在 C/G 复合膜表面,且有一些细胞呈现了舒展生长的形貌.然而,对照实验中(图 8(a))虽显示出了大量细胞黏附与生长,但细胞形态不如 C/G 复合膜铺展.由此说明含有明胶分子的复合膜为细胞的生长提供了一个促进细胞黏附和增殖的良好载体.因此,这种 C/G 复合膜具有良好的生物相容性,它们在生物医用领域具有潜在的应用价值.

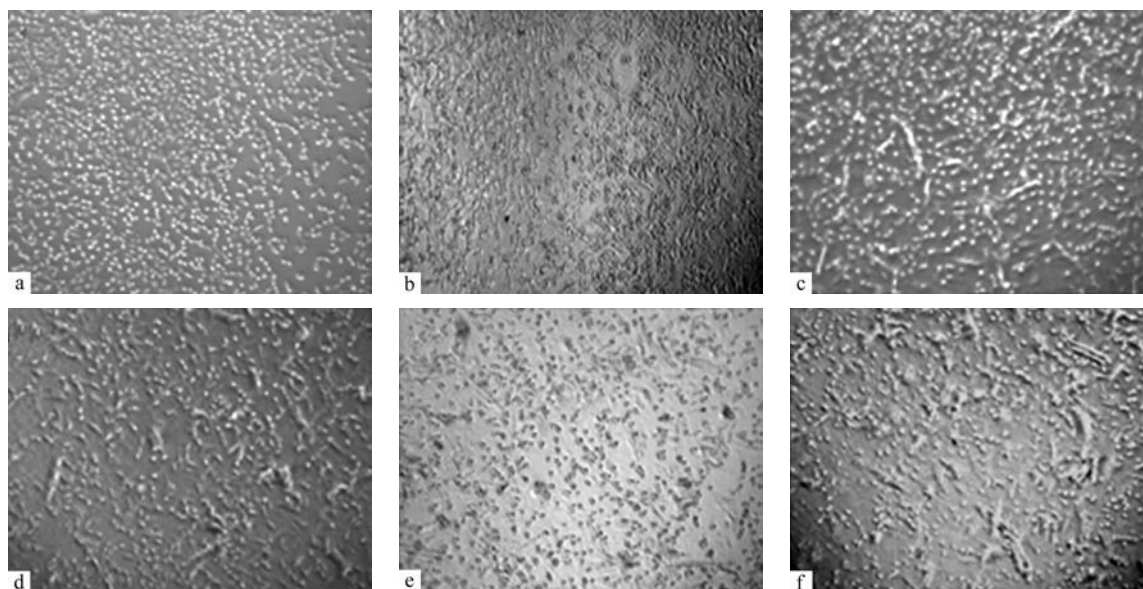


Fig. 8 Optical photographs ($\times 100$) of COS7 cells proliferation on polystyrene Petri plate (a) and the RC (b), C/G10 (c), C/G 49 (d), cro-C/G10 (e) and cro-C/G 49 (f) for 24 h

3 结论

在水溶液体系中制备出纤维素/明胶(C/G)复合膜,由此使明胶在湿态下应用成为可能.纤维素的羟基和明胶分子的氨基和酰胺基团有较强的氢键作用,导致非共价键力构成它们的超分子结构.这种由纤维素与明胶通过分子间强相互作用

构筑的复合材料具有良好的相容性和力学性能.当复合膜中蛋白质含量低于 22.3% 时,复合膜具最好的力学性能.用戊二醛作为交联剂对复合膜进行化学交联可以改善复合膜的力学性能及耐水性.细胞培养试验表明复合膜能够黏附细胞并支持它生长.这种 C/G 复合膜具有生物相容性和可生物降解性,有望在生物医用领域进行应用.

REFERENCES

- 1 Read S M, Bacic T. Science, 2002, 295: 59 ~ 60
- 2 Gavillon R, Budtova T. Biomacromolecules, 2008, 9: 269 ~ 277
- 3 Bodin A, Concaro S, Britberg M, Gatenholm P. J Tissue Eng Regen Med, 2007, 1: 406 ~ 408
- 4 Zhang Jinming(张金明), Zhang Jun(张军). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2010, (12): 1376 ~ 1398
- 5 Mascal M, Nikitin E B. Angew Chem Int Ed, 2008, 47: 7924 ~ 7926
- 6 Nogi M, Yano H. Adv Mater, 2008, 20: 1849 ~ 1852
- 7 Klemm D, Heublein B, Fink H P, Bohn A. Angew Chem Int Ed, 2005, 44: 3358 ~ 3393
- 8 Cai J, Zhang L, Liu S, Liu Y, Xu X, Chen X, Chu B, Guo X, Xu J, Cheng H, Han C C, Kuga S. Macromolecules, 2008, 41: 9345 ~ 9351

- 9 Cai J, Zhang L. *Macromol Biosci*, 2005, 5: 539 ~ 548
- 10 Cai J, Zhang L. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 183 ~ 189
- 11 Ruan D, Zhang L, Mao Y, Zeng M, Li X. *J Membr Sci*, 2004, 241: 265 ~ 274
- 12 Liu S, Zhang L. *Cellulose*, 2009, 16: 189 ~ 198
- 13 Qi H, Chang C, Zhang L. *Green Chem*, 2009, 11: 177 ~ 184
- 14 Ruan D, Zhang L, Lue A, Zhou J, Chen H, Chen X, Chu B, Kondo T. *Macromol Rapid Comm*, 2006, 27: 1495 ~ 1500
- 15 Cai J, Zhang L, Zhou J, Qi H, Chen H, Kondo T, Chen X, Chu B. *Adv Mater*, 2007, 19: 821 ~ 825
- 16 Yang G, Zhang L, Han H. *J Appl Polym Sci*, 2001, 81: 3260 ~ 3267
- 17 Zhou J, Zhang L. *J Polym Sci, Part B: Polym Phys*, 2001, 39: 451 ~ 458
- 18 Yang Q, Lue A, Qi H, Sun Y, Zhang X, Zhang L. *Macromol Biosci*, 2009, 9: 849 ~ 856
- 19 Kang H W, Tabata Y, Ikada Y. *Biomaterials*, 1999, 20: 1339 ~ 1344
- 20 Kuijpers A J, Engbers G H M, Krijgsveld J, Zaat S A J, Dankert J, Feijen J. *J Biomat Sci-Polym E*, 2000, 11: 225 ~ 243
- 21 Liu X H, Ma P X. *Annals of Biomedical Engineering*, 2004, 32: 477 ~ 486
- 22 Cai J, Liu Y, Zhang L N. *J Polym Sci Part B: Polym Phys*, 2006, 44: 3093 ~ 3101
- 23 Zhou J, Li R, Liu S, Li Q, Zhang L, Zhang L, Guan J. *J Appl Polym Sci*, 2009, 111: 2477 ~ 2484
- 24 Kameda T, Takeda N, Kuroki S, Kurosu H, Ando S, Ando I, Shoji A, Ozaki T. *J Mol Struct*, 1996, 384: 17 ~ 23
- 25 Abil E A. *Biopolymer*, 2005, 77: 230 ~ 245

SUPERMOLECULAR STRUCTURE AND PROPERTIES OF CELLULOSE/GELATIN COMPOSITE FILMS

PEI Ying¹, ZHANG Lina¹, WANG Huiyuan¹, ZHANG Xianzheng¹, XU Min²

(¹ Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072)

(² Department of Physics, East China Normal University, Shanghai 200241)

Abstract Natural polymers have attracted much attention because of the rising demand for materials with features of renewability, non toxicity, biocompatibility and biodegradability. Cellulose and gelatin were the two abundant resources from plant and animal, and it was significant that new biomaterials were prepared by using these two natural polymers. In this work, a series of cellulose/gelatin (C/G) films were prepared in NaOH/urea aqueous solution *via* a simple, low cost, green pathway. To overcome the disadvantages (brittleness, poor water resistance) of the protein material, gelatin was combined with the regenerated cellulose (RC) film to construct cellulose/gelatin composite materials. The strong interaction between the two macromolecules was confirmed to exist in the composite materials, leading to the improvement of the water resistance of gelatin. Cross-linking with glutaraldehyde further improved the mechanical properties of the composite materials. Their structure and properties were characterized by element analysis, FTIR, ultraviolet-visible (UV-Vis), ¹³C solid-NMR, scanning electron microscopy (SEM), tensile testing and swelling test. The results revealed that good compatibility existed between cellulose and gelatin in the composite films. The mechanical properties and the water resistance of the crosslinked films were significantly improved. Furthermore, by proliferation of COS7 cells on the surface of the C/G films, they exhibited good biocompatibility, supporting cell adhesion and growth.

Keywords Cellulose, Gelatin, Non-covalent bond, Biocompatibility