

纤维素/甲壳素共混膜的结构表征与抗凝血性能*

郑化 杜予民**

周金平 张俐娜

(武汉大学环境科学系 武汉 430072)

(武汉大学化学与分子科学学院 武汉 430072)

摘要 以6 wt% NaOH/4 wt% 尿素为纤维素的新溶剂,采用溶液共混法制备出纤维素/甲壳素共混膜,为甲壳素在碱性溶液中制膜提供了新的方法.红外光谱、X-射线衍射、扫描电镜和力学性能、抗凝血性能测试结果表明,共混膜中甲壳素含量低于40 wt%时,纤维素与甲壳素分子间具有良好的相容性;在纤维素中引入适量甲壳素可提高共混膜的抗张强度,共混膜的干、湿态抗张强度在甲壳素含量10 wt%时最大,其值分别为89.1 MPa和43.7 MPa,比纯态纤维素膜的干、湿态抗张强度分别提高了6.7%和11.5%;甲壳素的引入可明显降低血小板在共混膜表面的粘附、凝聚与变性,增大共混膜的抗凝血参数,甲壳素含量达到50 wt%时,该共混膜具有良好的抗凝血性能.

关键词 纤维素, 甲壳素, 共混膜, 结构表征, 抗凝血性能

作为与血液接触的医用高分子材料,抗凝血性能为其重要的评价指标.目前,制备抗凝血性医用高分子材料的主要方法是将天然抗凝血剂在载体表面固定化,如在材料表面接枝或负载肝素、尿激酶和纤维蛋白溶酶^[1-4]或模拟血管内膜,合成表面呈液晶态的高分子材料和低表面自由能、带负电荷表面的聚合物^[5].近年来,甲壳素以其良好的抗凝血性和较低的人体免疫原性^[6],其膜对尿素、尿酸、肌肝等物质透过性能良好并可抑止 Na^+ 、 K^+ 等金属离子和血清蛋白的透过等特点^[7]已引起人们极大的关注,但其膜强度低、抗水性差的缺陷限制了其广泛应用.本文以6 wt% NaOH/4 wt% 尿素为纤维素的新溶剂,通过溶液共混法将甲壳素引入纤维素,以期得到机械强度较高、抗水性和抗凝血性能良好的高分子合金材料.

1 实验部分

1.1 材料

再生纤维素(Bemlile)由日本 Asadhi 化学工业公司提供,粘均分子量(M_v)为 1.12×10^5 ;甲壳素由浙江玉环海洋生物化学有限公司提供,乙酰度(Degree of acetylation, DA)和粘均分子量(M_v)分别为92.5%和 1.31×10^6 . ACD(Anticoagulant citrates dextrose)全血由同济医科大学血液中心提供;其余试剂均为化学纯.

1.2 碱性纤维素、甲壳素真溶液及共混膜的制备

依文献[8,9]方法,将160 g再生纤维素于计量6 wt% NaOH和4 wt% 尿素混合溶液中充合溶胀,于 -20°C 冷冻24 h后解冻,过滤,制得3.5 wt%的纤维素钠溶液.将160 g甲壳素粉末加入到616 mL 46 wt%的NaOH溶液,于冰浴中溶胀6 h,再加入计量碎冰,搅拌后于 -20°C 冷冻24 h,解冻、过滤,制得3.5 wt%的甲壳素钠溶液.

将上述甲壳素钠盐溶液和纤维素钠盐溶液于 $10 \sim 15^\circ\text{C}$ 按设定比例混合均匀,真空脱泡后于洁净的玻璃板上刮膜,待膜流平后,依次于5 wt% CaCl_2 和1 wt% HCl溶液中凝固30 min和5 min,取膜,用流水洗至中性,再用去离子水充分洗涤,将湿膜固定于有机玻璃板上自然晾干.根据共混膜中甲壳素含量0%、10%、20%、30%、40%、50%,将共混膜分别标记为RC、RCCH-1、RCCH-2、RCCH-3、RCCH-4、RCCH-5,甲壳素膜标记为CH.

1.3 膜的结构表征

试膜的红外光谱用 Nicolet 170-SX 型傅立叶变换红外光谱仪记录, KBr 压片; X-射线衍射谱图用 RigKu Denki Dmax-rA 型 X-射线衍射仪记录, $\text{CuK}\alpha$ 、管电压40 kV、管电流50 mA、扫描范围 $6^\circ \sim 40^\circ(2\theta)$,扫描速度 $8^\circ/\text{min}$,走纸速度40 mm/min; 试膜的截面形貌用 Hitachi S-570 扫描电镜观察并拍照.

1.4 力学性能测试

试膜的抗张强度(σ_b)及断裂伸长率(ϵ_b)按 GB4456-84 用 CMT-6503 型电子拉力试验机(中国深圳新三思试验设备有限公司)于室温,65%的相对湿度下测量,拉伸速率 5 mm/min.

膜抗水性按下式计算:

$$R = \sigma_b(\text{wet})/\sigma_b(\text{dry})$$

式中 R 为湿膜抗水性, $\sigma_b(\text{wet})$ 为湿态抗张强度, $\sigma_b(\text{dry})$ 为干态抗张强度. 湿膜力学性能是将膜于蒸馏水中室温浸泡 12 h 后测量.

1.5 抗凝血性测试

将从同济医科大学血液中心购买的 ACD (Anticoagulant citrate dextrose) 全血在 100 g 离心力下分离 10 min, 取上层血浆, 得富血小板血浆, 用生理盐水稀释(富血小板血浆/生理盐水 = 1/4.5)后, 将试膜(3 mm × 3 mm)置于富血小板血浆的生理盐水稀释液中 37℃ 恒温 1 h, 试膜取出后用 PBS (Phosphate-Buffered saline) 缓冲液洗涤 3 次, 经 2% (m/V) 戊二醇固定后, 真空镀金 5 min, 用 Hitachi S-570 扫描电镜观察血小板粘附性能.

以蒸馏水作为对比参照, 用分光光度计法^[10]进行试膜的动态凝血性能测试. 其抗凝血性能定义为:

$$BCI = (I_s/I_w) \times 100$$

式中 I_s 为血液和 CaCl_2 的混合液与样品接触设备时间后血液的相对吸光度; I_w 为血液与一定量的蒸馏水混合后的相对吸光度.

试膜溶血性能采用分光光度计法^[5]测试. 溶血率(Hemolysis ratio, HR)按式 $HR = (AS - AN)/(AP - AN) \times 100\%$ 计算, 式中 AS 为 ACD 全血与样品接触设定时间后, 血液在 542 nm 处的相对吸光度; AP 为阳性对照物(蒸馏水)在 542 nm 处吸光度; AN 为阴性对照物(生理盐水)在 542 nm 处的相对吸光度.

2 结果与讨论

2.1 共混膜的相容性

许多实验结果表明, 共混物之间存在的特殊相互作用如离子键、共价键、氢键等可降低共混体系的吉布斯(Gibbs)能, 从而使各共混组分之间产生良好的相容性. 而纤维素的吡喃环单元中的羟基、甲壳素的羟基和乙酰胺基既可作为质子给体, 也可以作为质子受体. 图 1 示出了纤维素、甲壳素

及其共混膜的 FT-IR 光谱. 甲壳素的红外光谱中 1652 cm^{-1} 、1555 cm^{-1} 和 1310 cm^{-1} 处的吸收峰分别归属于酰胺 I 带、酰胺 II 带及酰胺 III^[11], 3266 cm^{-1} 和 3455 cm^{-1} 处的宽峰则可分别归属于 N—H 和 O—H 的伸缩振动. 再生纤维素膜的红外光谱中, 3450 cm^{-1} 处的宽峰归属于 O—H 的伸缩振动, 1645 cm^{-1} 处的吸收峰可归属于葡萄糖内酯的伸缩振动. 共混后, 甲壳素、纤维素膜的红外光谱发生了明显变化. 甲壳素的酰胺 I 带随着纤维素的引入逐渐向高波数移动, 其 O—H 的伸缩振动吸收峰也不对称变宽, 并明显移至低波数, 这表明纤维素的引入使甲壳素部份 C=O...H—N 发生解缔, 并与纤维素的 O—H 形成了新的 C=O...H—O 氢键. 纯态甲壳素膜中, 1628 cm^{-1} 处的吸收峰为甲壳素特征吸收峰, 共混后, 该吸收峰因纤维素的引入而逐渐减弱并消失. 这表明甲壳素原有的结晶结构因纤维素的引入发生了变化. 红外光谱分析结果表明, 共混膜中甲壳素与纤维素分子间存在强的氢键作用, 纤维素的引入改变了甲壳素原有的晶型结构. 该结论还可从 X-RD、SEM 分析中得到进一步的证实.

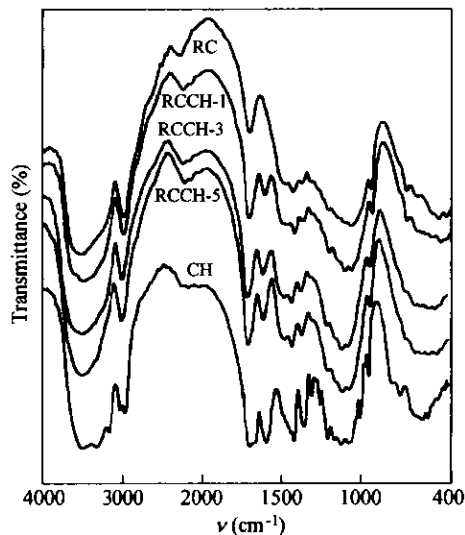


Fig. 1 IR spectra of chitin, cellulose and their blend films

图 2 为试膜(RCCH)的 X-射线衍射图谱. 甲壳素膜在 $2\theta = 9.3^\circ$ 、 12.3° 、 19.1° 、 23° 和 26° 处出现明显的衍射吸收峰, 纤维素膜的衍射峰则出现在 $2\theta = 12^\circ$ 、 20° 、 21° 处, 与文献报道的相一致. 从甲壳素、纤维素及共混膜的 X-RD 图谱中可以发现, 甲壳素于 $2\theta = 9.3^\circ$ 、 23° 、 26° 处的衍射峰随着纤维素的引入逐渐消失, 纤维素于 $2\theta = 12^\circ$ 、 20° 处衍射峰

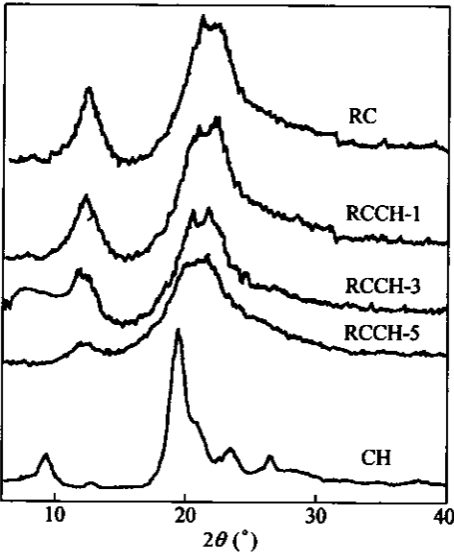


Fig.2 X-ray diffraction patterns of chitin,cellulose and their blend films

的相对强度也随甲壳素含量的增加逐渐减弱,但其 $2\theta = 21^\circ$ 处的衍射峰强度却随甲壳素含量的增加逐渐增强. 根据文献^[12],测得共混膜结晶度 (X_c) 的大小次序为 $RC < RCCH-1 < RCCH-2 < RCCH-3 < RCCH-4 < RCCH-5$, 其值依次为 51%、54%、56%、61%、63.5%、67.4%,很显然,共混膜的结晶度随着甲壳素的引入而逐渐增大. 这进一步表明共混膜中甲壳素与纤维素分子间的相互作用使其原有的晶型结构发生了改变.

图 3 显示出了共混膜的截面形貌. RCCH-1、RCCH-3 的截面均匀并致密,表明共混膜 RCCH-1、RCCH-3 良好的相容性. 而 RCCH-4 的截面存在微弱分层,这说明 RCCH-4 中纤维素与甲壳素发生了微相分离.

红外光谱、X-射线衍射、扫描电镜分析结果显示,纤维素与甲壳素在共混膜达到了部分相容,该相容性源于分子间强的氢键作用.

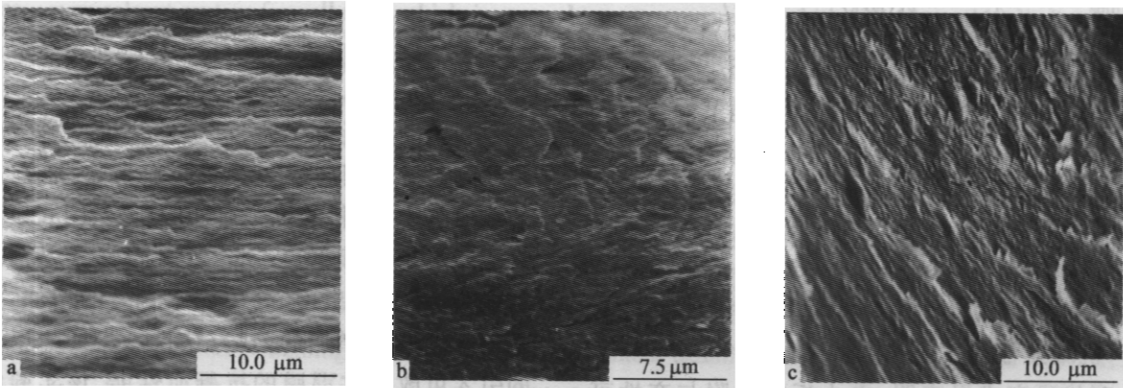


Fig.3 SEM of blend films RCCH-1,RCCH-3,RCCH-4
a) RCCH-1; b)RCCH-3; c)RCCH-4

2.2 共混膜的力学性能

图 4 和图 5 分别示出了共混膜抗张强度及断裂伸长率与甲壳素含量的关系. 随着甲壳素的引入,共混膜的抗张强度迅速增大并达到最大值,而断裂伸长率却随着甲壳素含量的增加逐渐降低. 甲壳素含量为 10 wt% 时,共混膜具有最大的干、湿态抗张强度,其值分别为 89.1 MPa 和 43.7 MPa,比纯态纤维素膜的干、湿态抗张强度 (83.5 MPa, 39.2 MPa) 分别提高了 6.7% 和 11.5%. 甲壳素含量低于 20 wt% 时,由于甲壳素与纤维素分子间强烈的氢键作用及良好的相容性和协同效应,致使 RCCH-1、RCCH-2 的干、湿态抗张强度明显高于纤维素膜. 甲壳素含量高于 40 wt% 时,甲壳素与纤维素在共混体中的微相分离及甲壳素较差的成膜

性能,导致 RCCH-4、RCCH-5 共混膜抗张强度迅速下降,并明显低于纯态纤维素.

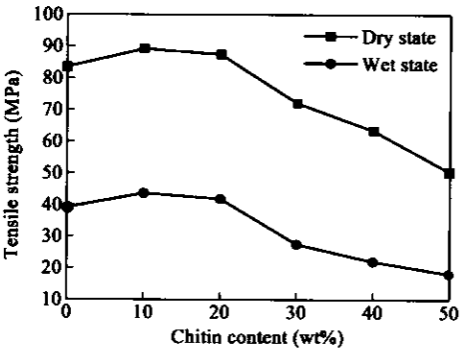


Fig.4 The effect of chitin content in blend films on tensile strength

纤维素及其共混膜的抗水性能示于表 1. 共

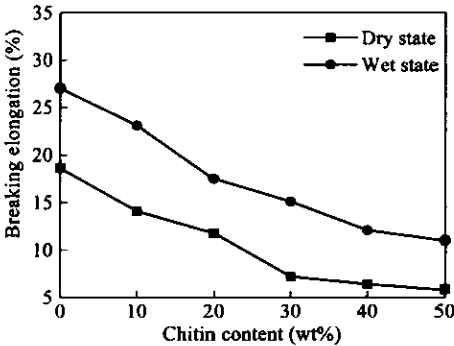


Fig.5 The effect of chitin content in blend films on elongation

混膜的抗水性能随着甲壳素含量的增加迅速增大,并在甲壳素含量 10 wt%达到最大值,RCCH-1、RCCH-2 膜的抗水性高于纤维素膜,表明甲壳素的适量引入提高甲壳素的抗水性.

Table 1 The physical and mechanical properties of cellulose, chitin and their blend films

Films no	X_c (%)	σ_b (MPa) (dry/wet)	ϵ_b (%) (dry/wet)	R
RC	51.0	83.5/39.2	18.6/27	0.47
RCCH-1	54.0	89.1/43.7	14.1/23.1	0.49
RCCH-2	56.0	87.4/41.9	11.8/19.8	0.48
RCCH-3	61.0	72.1/27.5	7.2/15.1	0.38
RCCH-4	63.5	63.5/23	6.4/12.3	0.36
RCCH-5	67.4	50.4/18.1	5.8/11	0.36

2.3 抗凝血性

现代研究成果表明,血小板的粘附与变性可以激活凝血因子,促进纤维蛋白的形成,进而形成血栓并产生凝血^[5].因此,研究血小板在材料表面的粘附与变性对评价材料的抗凝性能具有重要意义.表 2 显示了共混膜表面对血小板的粘附性能.从表中看出,纯纤维膜表面有明显的血小板粘附与凝聚,血小板变性也较明显.随着甲壳素含量的增加,血小板的粘附逐渐减少,血小板的形状也越来越规则.当甲壳素含量达到 50 wt%时,已观察不到血小板在共混膜表面的粘附与变性.由此可以推断,甲壳素的适量引入,可明显的改善纤维素

的抗凝血性能,而甲壳素与纤维素的微相分离并没有降低共混膜的抗凝血性能.

Table 2 Adhesion of platelets on surfaces of blend films in vitro

RC/CH	Content of chitin (wt%)					
	0	10	20	30	40	50
RC/CH	+++	++	++	+	+	-

- :Not recognized; + :Slightly recognized; ++ :Moderately recognized; +++ :Notably recognized

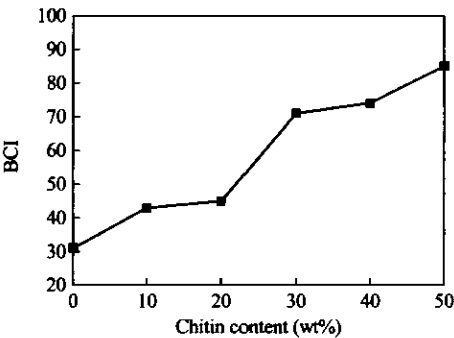


Fig.6 The effect of chitin content in blend films on the blood anticoagulant index(BCI)

利用动态凝血实验,可定性获得材料与血液接触到设定时间后的 BCI 抗凝血参数.通常,BCI 的数值越大,材料的抗凝血性能愈好.图 6 显示了共混膜与血液接触 25 min 后甲壳素含量对 BCI 的影响.可以看出,随着甲壳素含量的增加,共混膜的 BCI 值呈增加的趋势,这进一步证明甲壳素的引入可改善共混膜的抗凝血性能.该实验结果与血小板粘附性能实验结果基本吻合.

材料表面与血液接触时,会在不同程度上引起血液中血红细胞的破裂,出现溶血现象.作为与血液接触的医用高分子材料,既要具有良好的抗凝血性能,又要具有低的溶血性能.溶血率(HR)反映了血液与材料接触到设定时间后,血红细胞的破坏程度.本实验中,纤维素及共混膜与血液接触 15 min 后,其溶血率均在 3.5%左右,符合生物材料的溶血实验标准(5%).表明纤维素及其共混膜基本上不会对血红细胞产生破坏作用.

REFERENCES

1 Chen S Y(陈世英),Wu Z Q(吴奏谦),Feng C Y(冯朝阳).Polymer Materials Science & Engineering(高分子材料科学与工程),1993,9(1):87 ~ 91

2 Lin S C.Polym Bull,1998,(1):1 ~ 10

3 Lin S C,Harvey A J,Sung W K.J Biomedical Materials Res,1991,25:791 ~ 798

- 4 Wang A F(王安锋), Che P(车坡), Li Y Y(李逸云), Lin S C(林思聪). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 1998, (4): 465 ~ 470
- 5 Zhou Z R(周长忍), Mu S S(牟善松), Tu M(屠美). *Polymer Materials Science & Engineering*(高分子材料科学与工程), 2001, 17(1): 166 ~ 169
- 6 Hirano S, Noishiki Y. *J Biomedical Materials Res*, 1985, 19: 413 ~ 417
- 7 Mima S, Yoshikawa S, Mies M. Japan Patent, 130870. 1975-10-16
- 8 Zhang L, Zhou J, Ruan D. CN 00114485. 2000-04-05
- 9 Hirano S, Midorikawa T. *Biomaterials*, 1998, 19: 293 ~ 297
- 10 Imai E, Nose Y. *J Biomedical Materials Res*, 1972, 6: 165 ~ 172
- 11 Jiang M, Li M, Xiang M, Zhou H. *Adv Polym Sci*, 1999, 146: 1221 ~ 1294
- 12 Klug H P, Alexander L E. *X-ray Diffraction Procedure for Poly-Crystalline Amorphous Material*. New York: Wiley-Interscience, 1974. 74 ~ 89

STRUCTURE CHARACTERIZATION AND BLOOD ANTICOAGULANT ACTIVITY OF CELLULOSE/CHITIN BLEND FILMS

ZHENG Hua, DU Yumin

(Department of Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430072)

ZHOU Jinping, ZHANG Lina

(College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract The blend films based on cellulose and chitin were prepared by solution casting 6% (wt) NaOH/4 wt% urea as a new solvent system for cellulose, which is a novel way to prepare the chitin film from the alkali solution. The structure and morphology of the blend films were investigated by infrared spectroscopy (IR), X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscope (SEM), respectively. The interaction and properties in the blend films were further discussed. IR results suggested that the strong effect due to hydrogen bonding resulted in the changes of crystalline structure because of the addition of chitin, which was also confirmed by X-RD test. Such interaction directly affected the blend miscibility. When the content of chitin lower than 40 wt% the blend films exhibited a good miscibility at a molecular scale, and or else the microphase separation occurred. The tensile test showed that introduction of chitin with moderate content can effectively enhance the tensile strength (σ_b) of the blend films. Furthermore, the blend film containing the 10 wt% of chitin content exhibited 89.1 MPa of $\sigma_{b, dry}$ and 43.7 MPa of $\sigma_{b, wet}$ respectively, which were enhanced by 6.7% and 11.5% compared to that of the cellulose film. However, the increase of chitin content resulted in the decrease of water resistivity (R) of the blend films, suggesting that the coarse structure due to the microphase separated structure makes the water easily interpenetrate into the blend films. Simultaneously the introducing of chitin can effectively lower the adhesion, agglomeration and denaturalization of palate, namely enhance the blood anticoagulant index of the blend film. The results showed that the blend films with the chitin content higher than 50 wt% exhibited the best blood anticoagulant activity. This kind of blend film is promising in the field of medical materials.

Key words Cellulose, Chitin, Blend films, Structure characterization, Blood anticoagulant activity