

抗凝血生物材料研究 VI. 聚乙烯的表面肝素化*

王安峰 车 波 李逸云 林思聪**

(南京大学高分子科学与技术系 生物材料分子工程与控制释放分子工程室 南京 210093)

摘 要 通过聚乙烯膜表面的臭氧活化及其随后与甲基丙烯酸环氧丙酯(GMA)的接枝共聚、 α, ω -二氨基聚氧乙烯(Jeffamine ED-600、ED-900、ED-2001)的亲核开环反应以及在碳二亚胺(EDC)缩合剂存在下与肝素的缩合反应, 可对聚乙烯膜表面进行高效的肝素共价固定化, 其中 Jeffamine ED-600 所固定的肝素浓度可高达 $1.36 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 材料抗凝血性也最好。

关键词 表面肝素化, 抗凝血生物材料, 表面接枝共聚

提高抗凝血性一直是生物材料研究与发展(R/D)的主要内容之一。半个多世纪来, 通过早期对几乎所有能收集到的材料的普遍筛选, 60~70年代对其筛选结果的归纳与演绎, 以及80年代以来的分子工程研究, 抗凝血材料的R/D已取得了很大的进展^[1,2]。生物材料的分子工程研究可以概括为材料本体、材料表面及其两者的统一等三个方面。对生物材料肝素化的分子工程研究也是这样。所谓肝素化就是指肝素分子在生物材料上的固定化(Immobilization)。利用肝素化来提高生物材料抗凝血性的研究开始于60年代, 时至今日, 其具体方法已有很多^[3~6]。不过, 按其固定化力的性质, 可以概括为物理吸附和化学结合两大类, 后者又可以进一步分为共价键结合及离子键结合两种。对于固定化肝素的稳定性而言, 通过化学键, 特别是共价键结合的, 远较物理吸附的高; 但就固定化肝素的抗凝血性来说, 一般却正相反。因此, 如何提高共价键固定化肝素的抗凝血性, 同时又不影响材料的本体性能, 是生物材料肝素化分子工程研究的主要内容。^[1]

要使固定化肝素具有高的抗凝血性, 除了减少固定化对肝素生物活性的影响外, 还应提高材料表面固定化肝素的浓度。前者, 根据“维持正常构象”说, 可以通过海藻状聚氧乙烯链来固定肝素, 而后者则可以通过高分子链的放大作用来提高^[1]。至于材料抗凝血性与其本体力学性能的统一, 则可通过上述这些分子结构在材料表面的建构与组装来实现。当然, 这需要一个活化材料表面的适当方法, 对此, 材料表面的臭氧活化有其一定的优点^[7]。因此, 本文以聚乙烯膜为基材, 通过图1所示的路线对其表面进行肝素的共价固定化, 目的是探讨在生物材料表面固定肝素(或其它生物大分子)比较有效而普遍的途径与方法。

* 1998-04-06 收稿, 1998-05-20 修稿; 国家自然科学基金资助项目(基金号 59493200-05); ** 通讯联系人

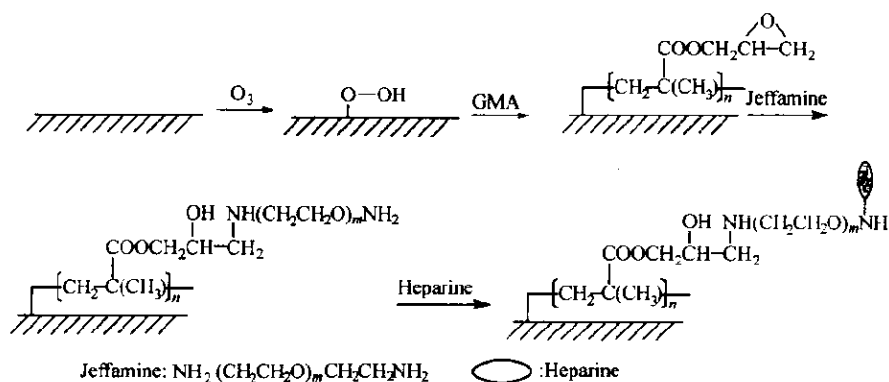


Fig. 1 Route scheme of surface heparinization of PE

1 实验部分

1.1 主要原料

聚乙烯(PE)薄膜,市售品,用前用丙酮在 Soxhlet 抽取器抽取 12h,真空干燥至恒重;甲基丙烯酸缩水甘油酯(glycidylmethacrylate, GMA)系日本 Nacalai Tesque, INC 出品,用前减压蒸馏;分子量为 600, 900 和 2000 的双-(β -氨基乙基)聚氧乙烯, Jeffamine ED-600、ED-900 和 ED-2001, 为美国 Huntsman Corporation 提供;碳二亚胺(EDC), 美国 Sigma Chemical Co. 出品;肝素钠, 南京大学生化厂出品, 精品, 效价 >140 单位/mg; 枸橼酸钠(ACD)新鲜血液, 南京红十字血液中心出品。

1.2 表征与测试

ATR-FTIR 谱系在 NICOLET 170SX FTIR 光谱仪上测定;表面过氧基团浓度的测定方法同文献[7];表面固定化肝素浓度的测定方法同文献[6];氨基浓度测定方法同文献[8];抗凝性的测定方法同文献[9]。

1.3 PE 膜的臭氧活化

臭氧活化的设备及操作同文献[7]。条件为电压 152V, O_2 流速 52~54 mL/min, 温度 17℃。

1.4 PE 活化膜与 GMA 的接枝共聚

在聚合管中置入经 O_3 活化的 PE 膜, 真空脱气 1h, 加入浓度 20% (wt%) 的 GMA-1,4-二氧六环/ H_2O 溶液(1,4-二氧六环/ H_2O 的体积比为 4:1), 使其全部浸泡。反复抽空/充氮 4 次后, 用微型注射器注入硫酸亚铁铵水溶液, 使体系中的 Fe^{2+} 浓度为 $2.6 \sim 3.0 \times 10^{-4}$ mol/L。再反复抽空/充氮 4 次后, 负压下封管。

把聚合管悬挂在恒温槽中, 一定时间后取出。接枝膜用丙酮清洗后, 再用丙酮在 Soxhlet 抽取器中抽取 10h; 凉干, 真空干燥至恒重。

1.5 接枝膜与 Jeffamine 的反应

在聚合管中放入电磁搅拌用的磁转子和恒重的接枝膜。用针筒注入 Jeffamine-二氧六环溶液(50%, wt%), 使接枝膜全部浸泡。反复抽空/充氮 4 次后, 负压下封管。封管在

80℃下搅拌至预定时间. 取出薄膜, 用蒸馏水冲洗多次后, 置于大量的蒸馏水中搅拌漂洗 48h. 其间每约 4h 换水一次. 取出薄膜, 真空干燥至恒重. 测定其氨基含量.

1.6 膜表面聚氧乙烯链端氨基与肝素的缩合

在带有玻璃磨口塞子的广口瓶中加入电磁搅拌用的磁转子和表面已建构聚氧乙烯链端氨基的 PE 膜, 加入肝素水溶液 (15%, wt%) 使其全部淹没. 用稀盐酸 (2mol/L) 调节体系的 pH 至 4.75 左右后, 在搅拌下, 缓慢地滴入计算量的 EDC 水溶液 (EDC 与肝素的质量比为 0.06:1). 在滴加 EDC 溶液过程中, 适当滴加稀盐酸溶液, 使体系的 pH 维持在 4.75 左右. EDC 溶液滴加完后, 盖上磨口塞子, 在室温 (25℃) 反应至预定时间. 取出薄膜, 先用蒸馏水冲洗, 再在大量蒸馏水中搅拌漂洗 48h. 其间每约 8h 换水一次, 以除去表面吸附的肝素. 清洗后的薄膜凉干后, 测其固定化肝素的含量.

2 结果与讨论

2.1 PE 膜的臭氧活化及其 GMA 接枝

对于高分子生物材料表面的臭氧活化与接枝, 作者等在前文报告了聚(醚-氨酯)的臭氧活化及其与甲基丙烯酸聚乙二醇单甲醚酯的接枝共聚^[7]. 本文进一步把这个方法应用于 PE 膜的表面肝素化.

臭氧活化的化学本质是生成过氧化基因. PE 膜在活化过程中过氧化基因浓度与活化时间的关系如图 2 所示. 可以看出, 在实验范围内, 过氧化基团的浓度与活化时间基本上呈线性关系.

利用活化生成的过氧化基因来引发烯类单体而进行接枝共聚, 可以有两种不同的途径. 一是通过热分解, 另一是藉助于 Redox 活化 (Redox activation). Redox 活化的优点不仅在于聚合温度较低, 而且更重要的是, 只生成链自由基, 从而可以大大减少由于 HO·对单体的引发作用而导致均聚物的生成. 因此, 我们在 GMA 的接枝共聚中采用 Redox 活化. 通过 Redox 活化引发, GMA 可以顺利地在 PE 膜上进行接枝共聚. 生成肉眼就可以看到的白色沉淀. 接枝共聚物的存在还可以通过其红外光谱而进一步证实. 图 3 是接枝膜用丙酮抽取、真空干燥后的 ATR-FTIR 谱. 图 3 中也同时附上 PE 膜及臭氧活化后 PE 膜的 ATR-FTIR 谱, 以资比较. 可以看

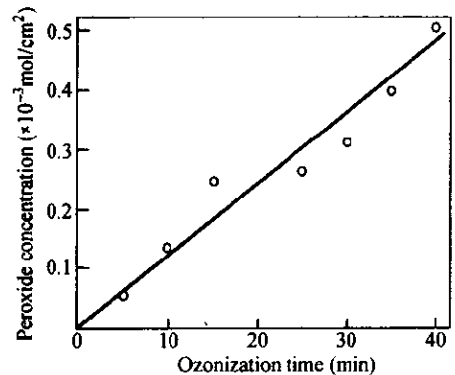


Fig. 2 Plot of peroxide concentration vs ozonization time

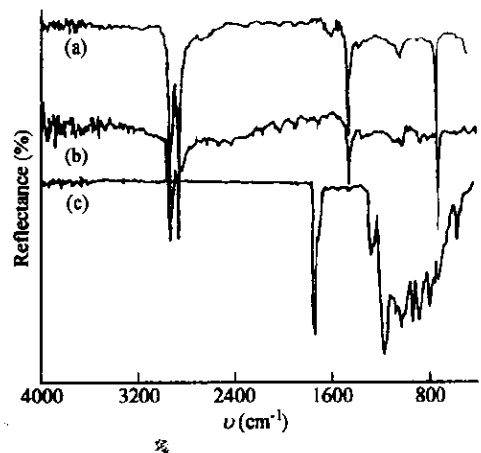


Fig. 3 ATR-FTIR spectra of PE films

(a) PE; (b) PE activated with O₃; (c) PE grafted with PGMA

出,由于过氧化基团浓度很低,臭氧活化 PE 膜的与 PE 膜 ATR-FTIR 谱并没有显示出什么差别;而接枝共聚后,情况则大不相同.由于 PGMA 接枝膜的生成,原 PE 膜 ATR-FTIR 谱中的 720cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$ 链摇摆)及 1462cm^{-1} (CH_2 、 CH_3 弯曲)的特征吸收峰消失,代之出现的是 1735cm^{-1} 及 915cm^{-1} 、 843cm^{-1} ,它们分别是 PGMA 中的 $\text{C}=\text{O}$ 及 $-\text{C}-\text{C}$ 的特征吸收峰.

图 4 是 36°C 及 40°C 下接枝率与接枝时间的关系图.可以看出,通过臭氧活化的 PE 膜与 GMA 间的接枝是比较快的.实际上,如果接枝时间不加控制,接枝的 PGMA 就会大量生成而使 PE 基质膜变形.

对于材料的表面接枝来说,一个比较重要的问题是,接枝反应是否真正仅发生在材料的表面?对于 PE 臭氧活化膜的 GMA 接枝来说也是这样.虽然这个问题的回答最后还需要直接的证据,但是,上述关于过氧化基团及接枝共聚物生成与反应时间的关系似乎暗示

着,在 O_3 活化及接枝过程中,由于小分子向基膜内的扩散与渗透,活化反应及接枝反应并不仅仅发生在膜的表面,而是随着条件的不同,有可能进一步发展到其近表面甚至其深部.也就是说要使接枝共聚仅发生在材料的表面,尚需要严格控制其反应条件.

2.2 接枝膜与 Jeffamine 的反应

PE 接枝膜与 Jeffamine 反应的目的在于把上述通过臭氧活化及 GMA 接枝放大而在膜表面建构的大量环氧基团的进一步转变为氨基封端的聚氧乙烯链以用于肝素(或其它生物大分子)的共价固定.为此,我们研究了在高浓度(50%, wt%)下,Jeffamine 分子量及反应时间对生成的链端氨基浓度的影响,结果如图 5 所示.

可以看出,通过这个途径可以把 ω -氨基聚氧乙烯链结构引入 PE 膜的表面;但是,其反应速度与 Jeffamine 的分子量及反应温度有很大的关系.分子量 600 及 900 的 Jeffamine 与膜上 PGMA 的反应,在 80°C 约 30h 后,其生成的链端氨基浓度基本上不再增加;而对于分子量为 2000 的来说,40h 后尚呈上升趋势.另外,其反应程度也与 Jeffamine 的分子量有较大的关系,分子量大的,反应程度低.对于 Jeffamine ED-600 来说,其最后膜表面链端氨基的浓度为 $0.89\mu\text{mol}/\text{cm}^2$,反应程度约 25%;而对于 Jeffamine ED-900 及 ED-2001 来说,则仅分别为 $0.43\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ 、 $0.18\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ 及 12%、5%.Jeffamine 分子量的这种影响可能是由于在反应过程中,分子量大的,其氨基的空间位阻较大而且摩尔浓度较低所致.另一方面,Jeffamine ED-600 只能使 PGMA 中 25% 左右的环氧基参与反应这一结果,也可能进一步暗示着,如前所述,与 PE 膜接枝的 PGMA 并不完全都位于膜的真正表面上.

2.3 肝素在 PE 膜表面的共价固定

肝素在 PE 膜上的共价固定是通过膜上聚氧乙烯链端氨基与肝素分子中羧基在 EDC 存在下的缩合而实现的.结果如表 1 所示.

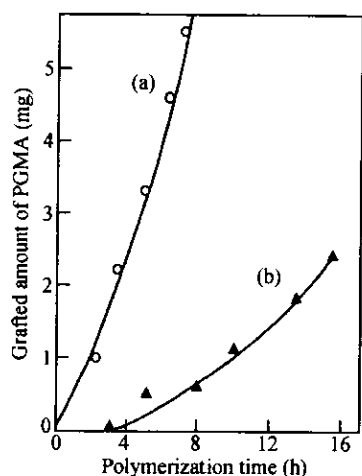


Fig. 4 Dependence of grafted PGMA amount on polymerization time (a) 40°C ; (b) 36°C

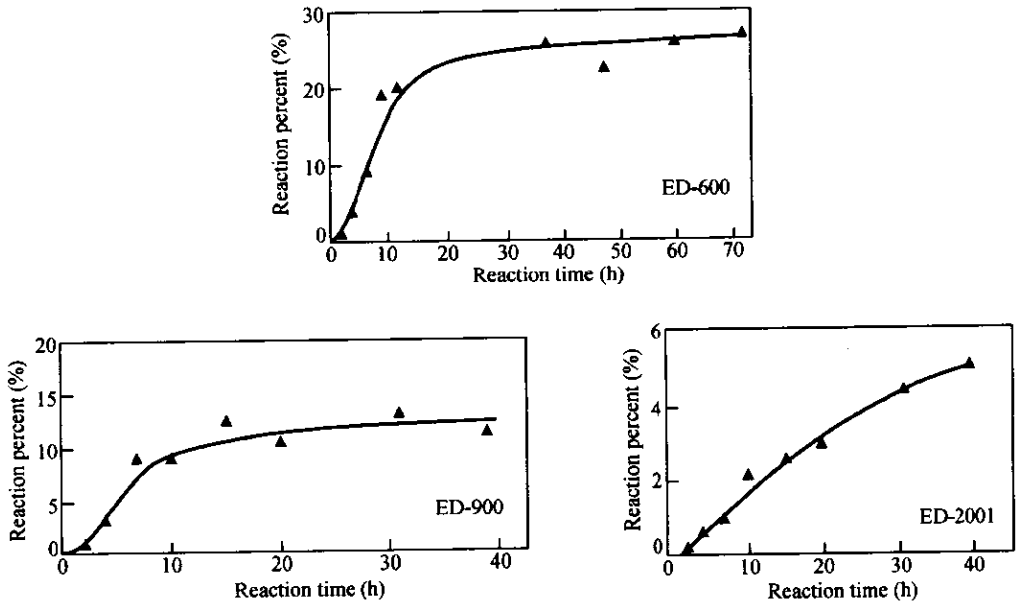


Fig. 5 Effect of molecular weight of Jeffamine on reaction extent of grafted PGMA(80°)

Table 1 Thromboresistance of heparinized PE

Film	PE-ED600-Hep	PE-ED900-Hep	PE-ED2001-Hep
Surface heparin concentration($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	1.36	1.07	0.75
Thromboresistance(%) *	100.0	99.2	95.0

* Control: Glass 30.5%; PE 54.6%; PE/PGMA 71.9%; PE/ED-600 81.8%; PE/ED-900 78.7%; PE/ED-2001 83.4%

从表 1 结果可以看出:

1. Jeffamine 分子量对表面固定化肝素的浓度有较大的影响. 分子量最小的, 其表面固定化肝素的浓度高. 其中通过 Jeffamine ED-600 固定的表面肝素浓度可高达 $1.36\mu\text{g}/\text{cm}^2$. 这是来自 GMA 聚合而放大的结果. 这个结果与作者等通过聚乙烯亚胺(PEI)大分子与-NCO 反应而放大的结果($1.40\mu\text{g}/\text{cm}^2\sim 1.62\mu\text{g}/\text{cm}^2$)相近^[6], 从而再一次证明, 在生物大分子表面共价固定中, 通过高分子链的“化学放大”是提高其表面浓度的有效途径.

2. PE 膜表面固定肝素后, 其抗凝血性都有很大的提高; 其中, 膜表面肝素浓度最高的, 抗凝血性最佳.

最后, 鉴于“化学放大”的程度还取决于 PGMA 与二胺反应的程度, 而分子量更低的 Jeffamine 或小分子二胺与 PGMA 反应将有更高的反应程度, 同时其产物亦将具有水溶性海藻状链状结构而在一定程度上有利于固定化生物大分子天然构象的维持. 因此, 利用 GMA 在膜表面上接枝的放大作用及其与分子量更低的 Jeffamine 或小分子二胺反应后的链结构来固定肝素(或其它生物大分子)也将是很有意义的.

REFERENCES

- 1 Lin Sicong. Polymer Bulletin, 1997, (1):1~7;1997, (2):76~81
- 2 Lin Sicong, Polymer Bulletin, 1998, (1):1~10
- 3 Leininger R I. Chemtech, March, 1975, 172~179
- 4 Ito Y. J Biomaterials Applications, 1987, 2:235~295
- 5 Eloy R, Belleville J. J. Biomaterials Applications, 1988, 3:475~502
- 6 Lin Sichong, Harvey A Jacobs, Sung Wan Kim. J Biomed Mater Res, 1991, 25:791~795
- 7 Wang Chenhui(王晨晖), Wang Anfeng(王安峰), Che Bo(车波), et al. Acta Polymerica Sinica (高分子学报), 1997, (1):114~119
- 8 Critchfield F E, Johnson J B. Anal Chem, 1956, 28:435~440
- 9 Lin Sicong, Yao Xudong, Tu Xiangton, et al. Chinese Journal of Polymer Science, 1992, 10(2):127~136

STUDIES ON BLOOD COMPATIBLE BIOMATERIALS

V. SURFACE HEPARINIZATION OF POLYETHYLENE

WANG Anfeng, CHE Bo, LI Yiyun, LIN Sicong

(Department of Polymer Science and Technology, Section for Molecular Engineering of Biomaterials and Controlled Delivery, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract Surface heparinization of polyethylene was effectively achieved by O_3 induced graft copolymerization of the film with glycidyl methacrylate (GMA), reaction of grafted polyglycidylmethacrylate (PGMA) with Jeffamine, forming polyoxyethylene chain capped with amino group, and then the condensation of the terminal amino group with the carboxy group of heparin in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide (EDC). Three kinds of Jeffamine with molecular weight 600, 900, and 2000 were investigated, respectively. It was found that the molecular weight of Jeffamine shows a great influence on the extent of both the reaction with PGMA and the Heparinization. Jeffamine with lower molecular weight shows higher extent of the both. For Jeffamine ED-600 the surface concentration of immobilized heparin amounts to as high as $1.36\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and the film shows highest antithrombogenicity.

Key words Surface heparinization, Blood compatible biomaterials, Surface graft copolymerization