

丙烯酸胺 / 天然橡胶接枝聚合物 抗凝血性能的研究*

潘慧铭 黄素娟 姚似玉

(华南理工大学材料科学研究所 广州 510641)

潘仕荣 施 锋 金丽华

(中山医科大学人工心研究室 广州 510089)

摘 要 研究了丙烯酸胺 / 天然橡胶接枝聚合物的表面能色散分量 (γ_s^d) 及酸碱属性对抗凝血性能及抗血小板粘附特性的影响。结果表明: 具有较低 γ_s^d 值 (29.7 mJ/m^2) 并呈弱碱性的接枝聚合物, 其抗凝血性能 (血液接触时间 60 min, 吸光度为 0.059) 优于天然橡胶和甲基硅油涂层。该聚合物表面粘附的血小板数 (14.8 ± 6.4 个 / $1000 \mu\text{m}^2$) 也特别低。

关键词 丙烯酸胺 (AAM) / 天然橡胶 (NR) 接枝聚合物, 抗血凝性能, 表面能, 酸碱作用

聚合物的血液相容性决定于其表面结构是否能维持与它接触的血液 (含血浆蛋白质及血细胞膜的生物大分子) 的正常构象^[1]。血液与聚合物表面相接触, 并引起血液大分子构象发生变化的主要原因之一是血液 / 聚合物界面区的吸附力。

界面的色散作用与酸碱配位作用是界面吸附力的来源之一。血液的 pH 值为 7.4 ± 0.05 , 血小板带负电性。所以, 表面呈碱性的弱极性的聚合物有可能具有对血小板的较低吸附力和较好的抗凝血性能。

本文探讨了表面呈碱性的丙烯酸胺 (AAM) - 天然橡胶 (NR) 接枝聚合物的抗凝血功能及其作用机理。

1 实验方法

1 AAM-NR 接枝聚合物

将浓缩天然胶乳与不同量的 AAM 单体的接枝聚合物水乳液^[2]经加入丙酮凝聚、抽滤及多次水洗后于 60°C 干燥得固体产物。该产物经沸水萃取 6 ~ 10 h 以除去游离的 AAM 单体和 AAM 的均聚物, 再经石油醚-苯混合溶剂在室温中浸 24 ~ 48 h 以除去游离的天然橡胶。实验用接枝聚合物共三种, 即 AAM-NR-10、15、25, 样品的数码代表接枝聚合物中 PAAM 接枝链段所占的克分子百分比。

2 接触角测定

采用协和 CA-A 型接触角仪 (日本), 测定温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度为 $65 \pm 5\%$, 参照液滴经微注射器排出, 滴量为 $1.6 \sim 3.3 \mu\text{l}$ / 滴, 取 5 次试验平均值。

* 1993-07-09 收稿; 1994-02-27 修稿; 国家自然科学基金资助项目

所用的参照液如下:

正己烷 含量 >95%, 日本产; 液体石蜡 分析纯, 天津化学试剂二厂; 二碘甲烷 分析纯, 上海化学试剂站; 苯酚 / 磷酸三甲苯酯 (TCP) 30 / 70 溶液, 自配.

3 表面及界面张力测定

采用承德试验机厂 JZHY-180 界面张力仪测定, 温湿度同上.

4 动态凝血时间测定

采用 Nose 等人改良的动态凝血时间试验^[3], 用新鲜健康的 ACD 抗凝人血 (血: ACD=4:1), 将 0.2 ml ACD 人血滴在涂有接枝聚合物的表面皿上, 然后用微量加样器分别加入 20 μ l 的 0.2 mol / l CaCl_2 立即与血混匀, 每组试验设 8 个间隔时间 (5、10、20、30、40、50、60 及 70 min), 每个时间做三个重复样, 共 24 个表面皿, 到预定时间后, 分别用 100 ml 蒸馏水缓慢流注于血液表面, 并将流注液收集于烧杯内, 由分光光度计 (UV-120-02 型, 日本岛津制作所) 在 540 nm 波长测流注液光密度 (即吸光度), 再将吸光度绘成动态凝血时间曲线, 并与涂甲基硅油 (化工部晨光化工二厂, 四川) 的表面皿及空白的表面皿作对照试验.

5 血小板粘附与变形试验

参考 Coleman 法^[4]作适当修改, 以健康雄兔心脏穿刺采血, 抗凝处理, 以 800 转 / 分离心 20 min, 制得富血小板血浆 (PRP), 取 0.5 ml 待用并计算血小板数, 其余 PRP 再以 3000 转 / 分离心 20 min, 上清液为贫血小板血浆 PPP, 通过 G6 漏斗过滤得无血小板血浆 PFP, 将适当比例的 PRP 与 PFP 配成 2000 个 / μ l 浓度的稀释血小板悬浮液, 把橡胶试样贴在有机玻璃制的平底试管的底部, 往试管内注入 1 ml 血小板悬浮液, 所有测试样品均以 3500 转 / 分速度离心处理 1 min, 倒出悬浮液, 用生理盐水清洗三次, 尽可能将未粘附的血小板洗脱, 试样用常规方法固定、脱水、冷冻干燥、镀金, 最后在 HITACHI-450 扫描电镜上观察血小板粘附变化情况.

2 结果与讨论

1 参照液表面张力及其色散成分的测定

当两液体处于界面接触平衡状态时, 两液体的表面张力 γ_1 、 γ_2 及其色散成分 γ_1^d 、 γ_2^d 和两液体间界面张力 γ_{12} 的关系如下^[5]:

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2(\gamma_1^d \gamma_2^d)^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

烷烃类非极性液体的表面张力 γ_{LV} 完全由色散成分组成, 即 $\gamma_{LV} = \gamma_L^d$. 两液体接触体系中如有一种液体是非极性液体 ($\gamma_1 = \gamma_1^d$), 则另一种液体的表面张力的色散成分 γ_2^d 可按下式计算:

$$\gamma_2^d = \frac{1}{4\gamma_1} (\gamma_1 + \gamma_2 - \gamma_{12})^2 \quad (2)$$

选取 5 种液体为参照体系, 其表面张力 γ_{LV} , 界面张力 γ_{12} 及由 (2) 式计算得到的 γ_2^d 值见表 1.

由表 1 的测定及计算结果可见, 除正己烷和液体石蜡因是烷烃类非极性液体, 其

Tab.1 The values of γ_{LV} and γ_L^d (mN / m)

Liquid	γ_{LV}	γ_{12} (to Hexane)	γ_2^d
Hexane	18.8	—	18.8
Liquid paraffin	30.7	—	30.7
Phenol / TCP (30 / 70)	43.5	8.0	39.2
Diiodomethane	51.0	8.0	50.8
Formamide	58.2	19.2	44.5

γ_{LV} 值与 γ_2^d 值相同外, 二碘甲烷的此二值也十分接近, 可作为非极性参照液体用于接枝聚合物的表面能色散成分的测算。

2 接枝聚合物表面能色散成分的测算

液体与固体表面接触体系的界面粘附功 W_a 与液体表面张力 γ_{LV} , 液体对固体表面的接触角 θ 的关系如下^[6]:

$$W_a = \gamma_{LV} (1 + \cos\theta) \tag{3}$$

接触体系 W_a 的色散成分 W_a^d 与液体表面张力色散成分 γ_L^d 及固体表面能色散成分 γ_s^d 间的关系为:

$$W_a^d = 2 (\gamma_L^d \gamma_s^d)^{\frac{1}{2}} \tag{4}$$

对于非极性液体与固体的接触体系, 其界面粘附功全部为色散成分组成, 即 $W_a = W_a^d$, 利用该关系并结合 (3)(4) 可得:

$$\gamma_s^d = \frac{\gamma_{LV}^d}{4} (1 + \cos\theta)^2 \tag{5}$$

以液体石蜡及二碘甲烷作为参照液并测定其在各接枝聚合物表面的接触角, 利用 (5) 式计算各接枝聚合物的 γ_s^d 值, 见表 2。

Tab.2 The Values of γ_s^d of graft polymers

Graft polymers	Contact angles (Degree)		γ_s^d (mJ / m ²)		
	Liquid paraffin	Diiodo methane	From liquid paraffin	From diiodo methane	Average
NR	20	60	28.9	28.6	28.8
AAM-NR-10	13	58	29.9	29.7	29.8
AAM-NR-15	10	57	30.2	30.3	30.3
AAM-NR-25	5	56	30.6	30.9	30.8
Methyl silicone oil*	14	58	—	—	27
Glass	—	—	—	—	51.6

* Reference

由表 2 可见, AAM-NR 接枝聚合物的 γ_s^d 值随 PAAM 接枝链段含量的增大而增大, 这是由于 PAAM 链段的色散作用大于天然橡胶主链的缘故。

3 接枝聚合物表面的酸碱配位作用

液体 / 固体接触体系界面的酸碱配位作用来源于液体、固体的酸碱属性即电子的斥引作用的匹配。碱（酸）性液体对酸（碱）性固体表面具有配位作用的可能性，同种属性的接触体系不存在配位作用。

本文采用酸性液体——苯酚 / TCP 溶液及碱性液体——甲酰胺为参照液。通过测定其在 AAM-NR 接枝聚合物表面的接触角并用下式（6）计算，其结果见表 3。

Tab.3 The values of W_a^{ab} of reference liquid / graft polymer systems

Graft polymers	Phenol / TCP			Formamide		
	Contact angle (degree)	W_a (mJ / m ²)	W_a^{ab} (mJ / m ²)	Contact angle (degree)	W_a (mJ / m ²)	W_a^{ab} (mJ / m ²)
NR	57	67.2	0.0	77	71.3	0.3
AAM-NR-10	47	73.2	4.7	76	73.3	0.3
AAM-NR-15	45	74.2	5.8	75	73.3	-0.3
AAM-NR-25	42	75.8	6.3	75	73.3	-0.2

$$W_a^{ab} = W_a - W_a^d = \gamma_{LV}(1 + \cos\theta) - 2(\gamma_L^d \gamma_s^d)^{\frac{1}{2}}$$

(6)

以 W_a^{ab} 值对接枝聚合物中 PAAM 链段的含量作图得图 1。

由图 1 可见，含呈碱性的酰胺基团的 AAM-NR 接枝聚合物对酸性液体——苯酚 / TCP（30 / 70）的 W_a^{ab} 值随 PAAM 链段含量增大而增大。但对碱性液体甲酰胺，其 W_a^{ab} 值随 PAAM 链段数量的增大有轻微的下降。但其下降值不明显，而且所有 AAM-NR 接枝聚合物对甲酰胺的 W_a^{ab} 值均接近于零。此结果表明，PAAM 链段中呈碱性的酰胺基团对酸性介质存在界面的配位作用，而对碱性液体则无此作用。

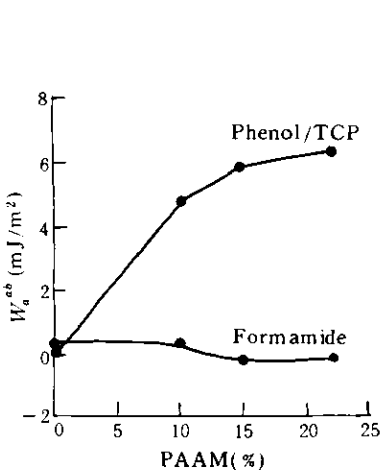


Fig.1 The relation of W_a^{ab} against to the contents of PAAM segment

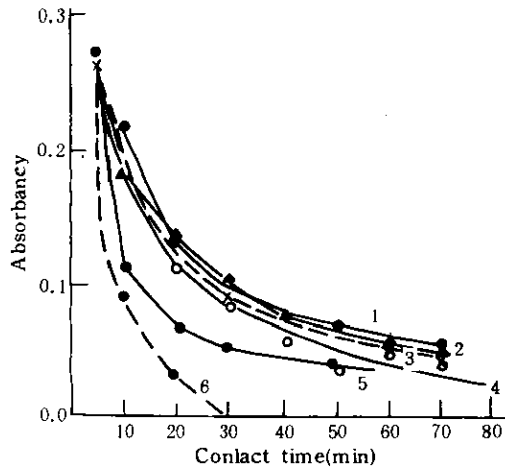


Fig.2 The curves of influence of the contact time against to the absorbancy

4 接枝聚合物表面的抗血凝试验

NR-AAM 接枝聚合物表面接触血液时间对吸光度的影响的测定数据见表 4, 为了对比, 本研究还采用了甲基硅油涂复表面的玻璃片及未作涂复处理的玻璃片的表面作同样的测定, 其数据一并列于表 4. 图 2 是各试样的吸光度对接触时间的关系示意.

根据图 2 各曲线的形状及位置可以看到, 玻璃表面的吸光度随接触时间的延长下降最快, 表示其抗凝血性能最差. 而 AAM-NR-10 接枝聚合物接触体系的吸光度随时间的延长下降最慢, 表示其抗凝血性能最好.

Tab.4 Contact time of blood to each sample's surface effect on the adsorbancy

Samples	Contact time (min) and the values of absorbancy							
	5	10	20	30	40	50	60	70
NR	0.254	0.116	0.072	0.054	0.077	0.046	0.038	0.009
AAM-NR-10	0.255	0.183	0.140	0.106	0.098	0.087	0.059	0.052
AAM-NR-15	0.249	0.217	0.133	0.110	0.091	0.071	0.063	0.055
AAM-NR-25	0.263	0.219	0.115	0.090	0.047	0.085	0.056	0.047
Methyl Silicone oil coat	0.265	0.193	0.115	0.084	0.056	0.040	0.049	0.036
Glass	0.274	0.090	0.035	0.007	—	—	—	—

5 接枝聚合物血小板粘附与变形试验

每个接枝聚合物及对比用材料的样品表面在接触血液后经脱水、镀金处理、然后在电镜下观察, 随机抽取 6 个视野拍下照片, 并计算其粘附于试样表面的血小板的数目, 同时观察其形态, 结果见表 5. 在上述试验中, AAM-NR-10, 甲基硅油涂层及玻璃样品 /血液处理体系的电镜照片见图 3.

Tab.5 The amount of blood platelet absorbing on sample's surface

Sample	Amount of blood Platelet (average)		Shape of blood Platelet
	(Per 1000 μm^2)		
NR	42.6 $\pm$ 11.6		Several blood platelet get together occasionally
AAM-NR-10	14.8 $\pm$ 6.4		single platelet absorbing
AAM-NR-15	14.9 $\pm$ 1.8		out of shape lightly
AAM-NR-25	16.1 $\pm$ 4.5		
Methyl silicone oil	26.6 $\pm$ 4.5		Several blood platelet get together occasionally
Glass	83.4 $\pm$ 6.2		Blood platelet get together enormously

由表 5 的数据及图 3 照片的对比, 可明显地看到, AAN-NR-10 接枝聚合物表面粘附的血小板数远远低于玻璃表面, 也明显地低于甲基硅油和未接枝的天然橡胶. 而且, 其粘附的血小板呈单个粘附状态, 变形程度轻. 而玻璃的表面有大量凝集的血小板群.

众所周知, 血液在材料表面的凝集与材料表面对血液的吸附性有密切关系. 甲基硅油、天然橡胶均是低表面能材料 (γ_s 值分别为 27 mJ / m² 和 28.8 mJ / m²), 为此, 对血

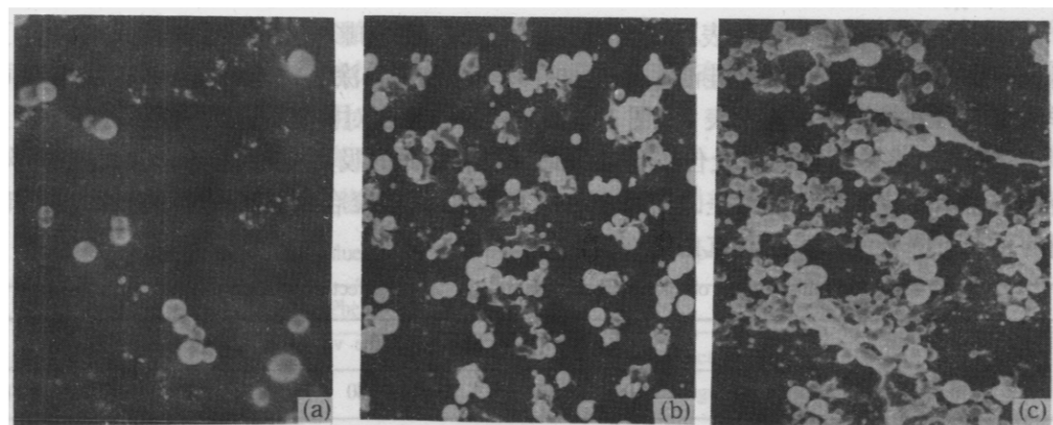


Fig.3 The observation of absorbing condition of blood platelet (3000 $\times$)
a. NR-AAM-10 b. Methyl silicone oil c. Glass

液中的生物大分子的吸附力较低, 其抗凝血性能较好. 而玻璃是较高表面能的材料 ($\gamma_s^d = 51 \text{ mJ/m}^2$), 对血小板的吸附性大, 故其抗凝血性能较差.

血液是呈弱碱性的介质, 而 AAM-NR 接枝聚合物也是呈碱性的材料, 两同种属性的物质处于界面接触状态时, 接触界面没有由酸碱作用所导致的吸附过程, 而且有可能存在某种具抗吸附作用的作用因素 (类似于斥力), 这一作用有利于血液维持正常的构象, 这可能是该接枝聚合物具有较好抗凝血性能的主要原因之一.

参 考 文 献

- [1] 驹井乔, 能势之彦. 人工脏器 (日), 1975, 4: 114
- [2] 黄素娟, 潘慧铭, 陈洪蕊等. 中国胶粘剂, 1992, 1(4): 36
- [3] 潘仕荣, 黄宁芳, 施 峰等. 生物医学工程杂志, 1991, 8(3): 209
- [4] Coleman D L. *J Biomed Mater Res*, 1982, 16: 381
- [5] Fowkes F M. *J Phys Chem*, 1962, 66: 302
- [6] 潘慧铭, 黄素娟, 肖发荣等. 高分子学报, 1989, (1): 121

STUDY OF THE PROPERTY OF ANTI-BLOOD CONDENSING OF THE NATURAL RUBBER GRAFTED ACRYLAMIDE POLYMER

PAN Huiming, HUANG Sujuan, YAO Siyu

(Research Institute of Materials Science, South China University of Technology, Guangzhou 510641)

PAN Shirong, SHI Feng, JIN Lihua

(Institute of Man-Made Heart, Zhong Shan Medical University, Guangzhou 510089)

Abstract The effect of the dispersion component of surface energy (γ_s^d) and the character of acid / base of natural rubber grafted acrylamide polymers on the property of anti-blood condensing was studied. The results showed that above graft polymer with lower value of γ_s^d ($29.7 \text{ mJ} / \text{m}^2$) and expressing a weak basic character possessed a better property of anti-blood condensing (time of contacting with blood: 60 min, absorbancy: 0.059) and had a very low absorbing character to blood platelet (absorbtion value: $14.8 \pm 6.4 / 1000 \mu\text{m}^2$), Comparatively, the natural rubber was 0.038 and 42.6 ± 11.6 .

Key words Natural rubber grafted acrylamide polymer, Anti-blood condensing character, Surface energy, Acid-base interaction