

肝素化聚甲基丙烯酸的合成及抗凝血性能的研究*

冯品珍 马延光** 安宝珠

(中国科大研究生院化学部,北京,邮政编码: 100039)

摘 要

本工作采用四价铈盐作引发剂,进行了甲基丙烯酸在肝素上的接枝聚合,合成了肝素化的交联型聚甲基丙烯酸,并对接枝聚合的反应条件及接枝聚合物的抗凝血性能进行了研究。实验结果表明,肝素化的聚甲基丙烯酸具有优良的抗凝血性能,是一种很有应用前景的新型聚合物。

关键词 抗凝血性、肝素、甲基丙烯酸、接枝聚合

虽然在过去几十年中合成高分子材料在医疗领域获得了日益广泛的应用,但是由于一般的高分子材料在与血液接触时或多或少都会在其表面形成血栓,从而限制了高分子材料在人工脏器、人工血管等与血液相接触的材料方面的应用。为开发高分子材料在人工内植器官方面的应用,抗凝血高分子材料的研制受到了各国化学家们的重视,成了医用高分子中的热门课题^[1,2]。

从凝血机理、血栓形成过程的分析得知,要防止血栓在高分子材料表面上形成,首先必须减少聚合物表面与血液成份的相互作用。为此,我们可以模仿生物体表面,合成某些新型聚合物,如合成非活性表面聚合物材料、带负电荷表面的聚合物、水凝胶、具有不均一结构的嵌段共聚物等都可以改善材料表面的抗凝血性。另外,我们也可以利用血栓阻止剂或溶解剂来修饰高分子材料表面,如尿激酶(urokinase)、纤维蛋白溶酶(fibrinolysin)、天然抗凝剂肝素等都能在血栓形成的不同阶段起阻止作用。如果通过适当方式将它们固定在高分子材料表面,定能赋予高分子材料抗凝血性。自从 Vincent 首次发现固定化肝素的抗凝血作用以来,肝素化高分子的研究一直十分活跃^[3,4]。虽然通过物理吸附或离子键联的方法可以将肝素固定在高分子上,得到了抗凝血性的高分子材料,但是由于在材料的使用过程中,肝素不断流失,致使材料的抗凝血性能逐渐下降。为得到持久性的抗凝血性高分子材料,各国化学同行们开始探索用共价键联的方法将肝素固定在高分子上的途径,并取得了一定的成效^[5-7],如通过戊二醛将肝素固定在聚乙烯醇分子上,解决了肝素在使用过程中的流失问题。然而用共价键联的方法制得的肝素化高分子材料的抗凝血性能并不十分理想,其原因可能是多方面的。主要原因可能是反应条件不温和,在反应过程中肝素构型发生了变化,使肝素失去活性。另外,肝素是水溶性高分子,在有机溶剂中不溶,这使肝素化反应的条件受到很大限制,结果是接到高分子上的肝素量很少。因此,要把肝素成功地共价键联到高分子上而同时又不失肝素本身的活性,必须选择温和的反应条件,

* 1990年9月24日收到;本工作是科大基金、中关村测试基金资助项目。

** 中国科学院化学研究所。

尽可能增加高分子中的肝素含量。

本工作采用四价铈盐引发的方法使甲基丙烯酸在肝素上进行接枝聚合, 制得肝素化聚甲基丙烯酸。为增强抗凝血效果, 聚合后又将其羧酸转化成钠盐形式。这样制得的聚合物除含有一定量的肝素外, 还存在大量的羧酸根离子, 因而, 材料具有优良的抗凝血性能。实验中发现这种肝素化聚合物仍为水溶性, 不能直接作为材料使用。为此, 我们在聚合体系中加入了一定量的交联剂, 制得了水不溶的交联型肝素化聚合物。聚合物中的肝素含量由元素分析结果按 I 式计算。材料的抗凝血性能由 TTT (Thrombine Time Test) 和 RTT (Recalcification Time Test) 实验测定。

$$\text{聚合物中肝素含量 \%} = \frac{\text{聚合物中 S 的百分含量}}{\text{肝素中 S 的百分含量}} \quad (1)$$

实 验 部 分

1. 原料及仪器

甲基丙烯酸和丙烯酸羟乙酯使用前进行减压蒸馏; 吡啶、草酰氯、NP40 (Ethyl phenyl polyethylene glycol)、凝血酶均为进口试剂, 使用前未作任何处理; 肝素为市售生物试剂, 白色粉末 (140 单位/0.1 克), 冰箱贮存, 直接使用; 磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、硝酸铈铵、氯化钙及其它溶剂均为分析纯试剂, 未经纯化, 直接使用。

交联剂的氢谱在 JNM-F × 100 型核磁共振仪上测定, 交联剂及肝素化聚甲基丙烯酸的红外光谱在 Specord 75 IR 上测得; 熔点测定在熔点仪 PHMK 80/2536 上进行; 交联剂、肝素及肝素化聚合物的元素分析由中科院化学所元素分析室承担。

2. 交联剂的制备

将 4 克 (0.034 mol) 新蒸馏的丙烯酸羟乙酯、2.5 克 (0.0316 mol) 吡啶、10 ml 苯及少量阻聚剂氯化亚铜置于 25 ml 单口瓶中, 在室温搅拌下由带平衡管的滴液漏斗中逐渐滴加 2 克 (0.0157 mol) 草酰氯。滴加过程中有大量白色沉淀析出。草酰氯滴加完毕后, 在室温下继续反应 10 分钟, 滤出沉淀物并用少量苯洗涤沉淀物, 洗涤液与滤液合在一起, 放入分液漏斗中, 用蒸馏水洗数次, 直至未反应的原料全部洗去。(用薄层色谱法检查)。苯溶液用无水硫酸钠干燥数小时, 然后在旋转薄膜蒸发仪上除去苯, 得到 3.1 克白色固体, 产率为 70%。粗产品在正己烷中进行重结晶, 得到 1.8 克白色针状晶体, 熔点为 46.0°C—47.0°C; IR(KBr) 1745、1732、1719、1636、1420、1301、1213、1184、995、807; ¹H-NMR (CDCl₃): δ 4.38—4.61 (m, 8H); 5.80—6.56 (m, 6H); 交联剂 C₁₂H₁₄O₈。元素分析:

理论值 C, 50.35% H, 4.92%;

实测值 C, 50.20% H, 4.83%。

3. 聚合反应

将一定量的交联剂、甲基丙烯酸、肝素及水加入三口瓶中, 恒温通 N₂ 半小时后将予先配制好的硝酸铈铵溶液由带平衡管的滴液漏斗加入, 此时反应液总体积为 1.8 ml。铈盐加入后, 反应液颜色变深, 继而褪色, 出现白色浑浊, 最后变成白色胶冻。聚合时间为 2—4 小时。聚合结束后将产物取出, 用丙酮反复洗涤, 除去铈盐、单体及大部分水, 得白色颗

粒,然后用 $\text{pH} = 8$ 的碳酸氢钠溶液淋洗,去掉未键联的肝素,并将大部分 $-\text{COOH}$ 转化为 $-\text{COO}^-$,淋洗结束后,再一次用丙酮除去大部分水,真空干燥后得白色颗粒状聚合物, $\text{IR}(\text{KBr})$: 3595(宽)、1703、1487、1269、1175; 聚合物中肝素含量可由聚合物元素分析结果,根据式(1)计算而得。

4. 去血小板血浆的制备及抗凝血性能测定^[8]:

取当日新鲜血液 200ml,分装在 6 支塑料管中,在温度为 0°C ,转速为 3500rpm 条件下进行离心分离,取出中层黄色血浆部分,分别在 4500、7500、10000 rpm 及 0°C 下离心分离 30 分钟,去掉上层漂浮物,这样制得的去血小板血浆 (PPP) 在 -25°C 下保存备用。

凝血酶时间试验 (TTT): 称取 1mg 聚合物放入刻度试管中,加入 0.1ml NP 40 溶液[该溶液用 Michaelis 缓冲溶液配制,浓度为 0.1% (v/v)。试管放入 37°C 的恒温浴中培养 10 分钟,取出试管,加入 0.2ml 凝血酶溶液 (5.1 单位/ml),测定凝血时间。

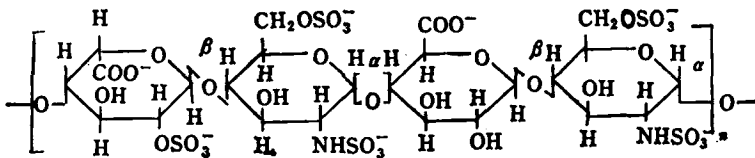
复钙化时间试验 (RTT): 称取 1mg 聚合物放入试管中,加入 0.1ml NP 40 溶液,将试管置于 37°C 恒温浴中恒温 10 分钟后取出,加入 0.2ml 0.025 mol/l 的氯化钙溶液。测定凝血时间。

空白试验的试管中不加聚合物,在同样条件下测定凝血时间。

结果与讨论

1. 肝素化聚甲基丙烯酸酯的制备

肝素是一种分子量为 20000 左右的粘多糖,重复单元的结构式如下:



肝素

从肝素重复单元的结构式可知,肝素具有多种可反应的功能团。作者曾试图用聚甲基丙烯酸通过高分子酰氯化反应接肝素,但未能成功,其失败原因是聚甲基丙烯酸是一种聚电解质,它只能溶于水,虽然文献报道聚甲基丙烯酸可溶于乙醇、二氧六环等极性溶剂中,但我们的实验结果表明聚甲基丙烯酸在这些溶剂中几乎不溶或溶解度极小,因此,我们无法在有机溶剂中进行酰氯化反应。我们也曾试图先制备甲基丙烯酰氯,再在二氧六环中进行溶液聚合。然而在聚合过程中也有大量聚合物析出,呈溶胀胶冻状。此时,即使有部分聚甲基丙烯酰氯溶解在二氧六环中,由于难于定量,无法进行下一步肝素化反应。四价铈盐引发的甲基丙烯酸的接枝聚合可在水的介质中进行,交联型的接枝聚合物以沉淀形式析出,方法简便,反应条件温和,肝素量可在一定范围内调节,此法是制备肝素化聚合物的一个行之有效的方法。

四价铈盐引发的烯类单体的接枝聚合机理很复杂,至今仍有许多不明之处。一般认为,含有羟基的聚合物如纤维素、聚乙烯醇都可以被接枝。这些含羟基的高分子与四价铈

盐组成氧化还原引发体系,在引发过程中可产生二种或二种以上的氧自由基或碳自由基。这些自由基进一步引发烯类单体的聚合。肝素—四价铈盐引发的甲基丙烯酸的聚合反应示意图如图 1 所示。考虑到位阻因素,形成氧自由基的可能性要比形成碳自由基的可能性大,但从自由基的稳定性考虑,似乎形成三级的碳自由基更为稳定些。因此这二种自由基都有可能存在。

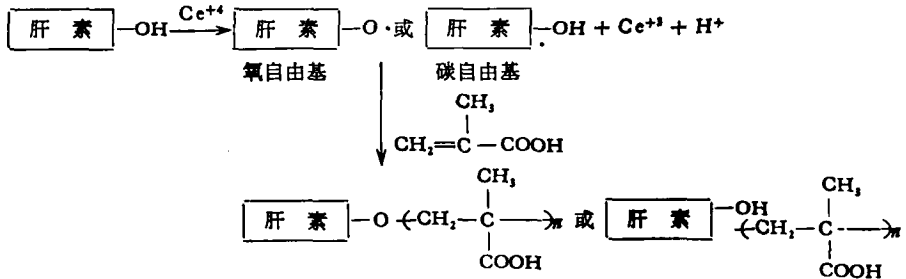


图 1 Ce^{+4} 引发聚合反应示意图

在选择聚合反应最佳条件时,我们发现增加铈盐浓度可以提高聚合反应速度,但由于引发中心多,低分子量产物相应增加,这些低分子量产物易在后处理的淋洗过程中被洗掉,从而降低了聚合物产率。从图 2 可以看出,当铈盐浓度改变时聚合物产率与之成反比变化,但当铈盐浓度达到 $3 \times 10^{-2} \text{mol/l}$ 时产率变化趋缓。

聚合物中肝素含量根据元素分析硫含量按 (I) 式计算而得。我们发现聚合物中肝素含量随四价铈盐浓度的增加而增加 (见表 1)。对此,目前还未得到满意的解释。

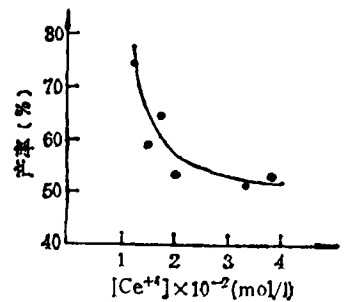


图 2 铈盐浓度与产率关系

当选定铈盐浓度为 $3.34 \times 10^{-2} \text{mol/l}$, 改变投料中肝素的用量, 其结果见表 2。从表 2 可看出, 当铈盐浓度一定时, 如果肝素用量过少, 在选定条件下得不到聚合物, 但当肝素用量太多时, 聚合物中肝素含量不但不增加反而略有下降。这可能是由于肝素自由基过多, 增加了自身偶合终止的可能性, 因而减少了接枝聚合物中的肝素含量。

表 1 产物中肝素含量与铈盐浓度关系

| 样品编号 | 516-B-3 | 514-B-2 | 516-B-2 | 511-B-3 | 514-B-3 |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|
| $[\text{Ce}^{+4}] (10^{-2} \text{mol/l})$ | 1.27 | 1.77 | 2.03 | 3.34 | 3.82 |
| 聚合物中肝素含量 (%) | <3.3* | <3.3* | <3.3* | 7.12 | 8.35 |

聚合条件: $T = 50^\circ\text{C}$; 甲基丙烯酸 200mg; 交联剂 20mg 肝素 50mg; 反应时间 2 小时。

* 聚合物中 S 的含量 $\leq 0.3\%$ 时, 元素分析无法测得精确的数值

聚合温度直接影响聚合反应速度。我们发现在 50°C 下聚合反应进行得较好, 反应时间只需 2 小时。若降低聚合温度, 就需适当增加聚合反应时间, 否则会影响产率。我们曾在 40°C 下进行聚合反应, 也获得了较为满意的结果。但在更低的温度下, 如 20°C , 反应

表 2 肝素投料比对产物中肝素含量的影响

| 样品编号 | 511-A-2 | 510-A-2 | 511-A-3 |
|-------------|---------|---------|---------|
| 肝素用量 (mg) | 15 | 25 | 50 |
| 肝素/单体投料比(%) | 6.4 | 10.2 | 18.5 |
| 产物中肝素含量(%) | 无聚合物 | 10.5 | 7.12 |

聚合反应条件: $T = 50^{\circ}\text{C}$; 甲基丙烯酸 200mg; 交联剂 20 mg $[\text{Ce}^{+4}] = 3.34 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$; 聚合时间 2 小时

难以进行。

综合考虑聚合物产率、肝素含量、聚合反应时间、肝素的有效利用率、聚合物性能等因素,我们认为聚合反应的最佳条件如下:聚合温度 $40-50^{\circ}\text{C}$, 铈盐浓度为 $3.34 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$, 肝素与甲基丙烯酸浓度比为 1:8, 甲基丙烯酸浓度为 1 mol/l , 交联剂为单体量的 10%, 此时产率为 60—70%, 聚合反应时间为 2—4 小时。

2. 肝素化聚甲基丙烯酸的抗凝血性能测定

为测定聚合物的抗凝血性能,我们对接枝聚合物进行了凝血酶时间试验(以下简称 TTT)和复钙时间试验(以下简称 RTT)。TTT 实验是在去血小板血浆中加入凝血酶,而在 RTT 实验中加入 Ca^{++} (详见实验部分)。无论是加入凝血酶还是 Ca^{++} , 都是起凝血作用,它们先将可溶性纤维蛋白原转化成可溶性纤维蛋白,进而使可溶性纤维蛋白交联成不溶物-血栓。肝素的作用是与各种凝血因子形成络合物,从而阻止了血栓的形成。例如:肝素可与凝血酶、纤维蛋白原(凝血第一因子)、前凝血酶以及凝血因子 IX—XII 等形成络合物,中和了这些因子的凝血作用。另外肝素还大大增加了抗凝血酶 III 的活化,它可以阻止凝血的产生。

肝素化聚甲基丙烯酸的 RTT 及 TTT 实验结果见表 3。RTT 和 TTT 的实验结果表明:当聚合物中肝素含量小于 3.3% 时,几小时后试管内略有浑浊,但与空白试验的试管中凝成一团的现象不同,这说明即使肝素含量小于 3.3%, 此聚合物仍具有一定的抗凝血作用。当聚合物中肝素含量大于 3.3% 时,具有与纯肝素一样的抗凝作用。

表 3 肝素化聚合物的抗凝血性能

| 肝素含量% | 空 白 | 小于 3.3% | 7.12 | 8.35 | 10.5 | 肝素 |
|-------|-------|----------|------|------|------|----|
| RTT | 5'10" | 几小时后略有浑浊 | 不凝 | 不凝 | 不凝 | 不凝 |
| TTT | 2'04" | 几小时后略有浑浊 | 不凝 | 不凝 | 不凝 | 不凝 |

本方法与其它化学键联法相比,既具有方法简便、反应条件温和的优点又能保持肝素活性。因此,这是一个制备肝素化聚合物的好方法。

致谢 凝血试验曾得到本院生物学部甘午君教授指导,王瑞林老师帮助,特此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Plate', N. A., Valuew, L. I., *Advances in Polymer Science*, 1986, 79, 96
 [2] 陈慧英、杨兵、孙丹红、冯新德, *高分子通讯*, 1984, 1, 33

- [3] Cholakis, C. H., Sefton, M. V., *Polymer as Biomaterial*, Plenum Press, 1984
- [4] Dincer, A. K., Lindor, J. N., Salzman, E. W., *Chem Eng. Commun.*, 1984, 30, 155
- [5] Miyama, H., Harumiya, N., Mori, Y., Tanzawa, H., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1977, 11, 251
- [6] Labarre, D., Jozefonicz, M., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1977, 11, 283
- [7] Ito, Y., Sisido, M., Imanishi, Y., *J. Biomed. Mater. Res.*, 1986, 20, 1157
- [8] Boffa, M. C., Delori, P., Soulier, J. P., *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, 1972, 28, 509

SYNTHESIS OF HEPARINIZED POLYMETHACRYLIC ACIDS AND THEIR ANTITHROMBOGENICITY

FENG Pinzhen, MA Yanguang, AN Baozhu

(Chemistry Department, Graduate School, Academia Sinica, Beijing, Post code: 100039)

ABSTRACT

Heparinized cross-linked polymethacrylic acids were synthesized by tetravalent ceric ion initiation in aqueous solution under mild condition. The antithrombogenic properties were determined by TTT and RTT. The preliminary results showed that these heparinized polymers are antithrombogenic.

Key words Heparinized polymer, Antithrombogenic, Tetravalent ceric ion initiation, Polymethacrylic acid