

粘度法研究明胶在聚氨酯弹性体表面的吸附

吴丽敏¹, 侯逢文¹, 朱峰健¹, 尹红根¹, 李 艺¹, 程镭时²

(1. 苏州大学材料与化学化工学部, 苏州 215123; 2. 南京大学化学系, 南京 210093)

摘要:根据文献以异佛尔酮二异氰酸酯(IPDI)为原料制备了具有较好机械性能的聚氨酯弹性体胶条(PU),并在胶条表面接枝肝素,得到肝素化聚氨酯胶条(PU-Hep)。将聚氨酯胶条浸泡在明胶稀溶液中,测量溶液粘度随时间、溶液浓度和温度的变化,并采用具有界面校正的粘度方程从实验相对粘度数据计算明胶在聚氨酯表面的吸附量。研究发现明胶分子迅速吸附到聚氨酯胶条表面,但是达到吸附平衡需要较长时间。在35℃~42℃范围内,明胶吸附量随温度升高而增大,表面肝素化后胶条吸附蛋白质的能力增大。

关键词: 聚氨酯; 明胶; 粘度法; 吸附

介入导管装置已广泛应用于临床治疗,但是医学导管使用时最常遇到的问题是凝血诱发血栓形成。凝血机制十分复杂,但是研究发现,对血栓起着主要作用的是血小板的粘附和蛋白质的吸附现象^[1,2]。导管材料一与血液接触,在一分钟甚至几秒钟内在材料表面产生白蛋白和球蛋白以及各种蛋白质的竞争吸附,形成复杂的蛋白质吸附层。当材料表面吸附球蛋白、纤维蛋白原时,易于使血小板粘附表面,进而导致血小板变形凝集,继发凝血形成,因此,导管表面蛋白质吸附情况极大程度地决定着导管的抗凝血性。研究蛋白质在导管材料表面的吸附量、吸附状态、吸附条件等对于选择合适的抗凝材料以及判断材料表面抗凝修饰效果尤为重要。

聚氨酯材料(polyurethane, PU)具有很好的耐磨性、弹性、生物相容性及抗凝血性,在具有良好物理机械性能的PU表面进行亲水改性和肝素化处理,是研究最成熟和应用最广泛的抗凝血修饰手段^[3~5]。肝素是一种高度磺化的阴离子型聚多糖,可催化和增强抗凝血酶Ⅲ(AT-Ⅲ)对凝血酶的结合而防止凝血,是很好的抗血栓制剂。肝素化PU导管表面血小板黏附量明显降低,其抗凝有效性已为众多试验及临床效果所证实^[6,7]。但PU导管表面肝素化后蛋白质吸附变化则少见文献报道。研究吸附于材料表面的蛋白的种类、组成、分布、配比和结构变化的方法较多,目前国际上大多采用同位素标记法^[8],此种方法可定性定量地分析材料表面吸附蛋白。例如陈红等^[9]利用同位素示踪法测定纤维蛋白原在PU及其共混膜表面的吸附,根据放射量计算出静态环境下蛋白质在PU表面的吸附量。由于蛋白质吸附是个动态过程,动物体内的血液又处于不断循环中,导管表面蛋白质吸附量随时间、温度等条件的动态变化难以精确测定。

稀溶液的粘度测量是获得大分子的分子量、尺寸和形状信息的最简单的方法之一,在一定浓度范围内大分子溶液的比浓粘度与浓度存在线性关系,可以通过粘度变化了解浓度变化。当蛋白质吸附到聚氨酯材料表面后,必然导致溶液中溶质量减少,粘度值降低。在较浓溶液中吸附量的变化对溶液浓度的影响有限,不足以造成粘度的明显改变。在低浓度下(低于 10^{-3} g/mL)溶液的粘度变化除了直接与浓度相关外,还受到界面吸附效应的干扰^[10~12]。利用经界面吸附校正的粘度方程,就可以通过粘度变化值计算出稀溶液浓度的改变,从而直观了解蛋白质在材料表面的吸附量变化。

1 实验部分

1.1 原料和仪器

聚醚 220(分子量 2000)(上海高桥石化); 1,4-丁二醇(BDO)和异佛尔酮二异氰酸酯(IPDI)(日本东

收稿: 2010-10-27; 修回: 2010-12-29;

基金项目: 江苏省高校自然科学基金基础研究计划(08KJB430014);

* 通讯联系人, 李艺, (1974—), 女, 副教授, 研究方向为功能高分子材料, E-mail: liyi@suda.edu.cn.

京化成工业株式会社);二月桂酸二丁基锡(DBTDL)(上海雨田化工有限公司);甲苯胺蓝(国药集团化学试剂公司);明胶(上海光华化学试厂);肝素钠(湖北五瑞生物工程有限公司);

乌氏粘度计(自制),玻璃毛细管直径为 0.203mm;

紫外可见分光光度计(新世纪 T6),北京普析通用仪器有限责任公司;

拉力试验机(XLL-100 型),广州材料试验机厂。

1.2 IPDI 型聚氨酯弹性体合成及表面修饰

1.2.1 聚氨酯胶条合成 合成方法参照文献^[13]并作改进:将计量的聚醚 220 加入到装有搅拌器、温度计和氮气保护的三颈瓶中,温度控制在 100℃脱水至肉眼无气泡;降温至 60℃,按配方迅速加入 IPDI、BDO 和重量比万分之一的催化剂 DBTDL 后快速搅拌,迅速将胶液倒入已预热的标准模具中,置于 120℃环境下真空熟化 4h,然后自然降温至 60℃以下,脱模即制成胶条。

将聚氨酯胶条压制成长 2cm,宽 0.5cm,厚约为 1mm 的样品。按 GB 1040-92 在拉力试验机上测定力学性能,拉伸速率为 500mm/min。

1.2.2 聚氨酯表面肝素接枝修饰 参照文献^[6]在经过二异氰酸酯活化的聚氨酯表面接枝肝素,采用甲苯胺蓝法^[14]测定聚氨酯表面肝素接枝量。

1.3 粘度测量

粘度计经充分清洗后在 130℃下干燥后使用。在溶液配制和测量粘度手续上全都采用了称重和逐步加浓溶液的方法^[10]。

在测量粘度与时间关系时,首先测量一定温度下已知重量的溶剂(纯水)在粘度计中的流过时间 t_0 ,它可以作为实验条件和粘度计状态恒定性的判据。然后向粘度计中加入精确称量的已知浓度的明胶浓溶液,混合均匀后测定明胶溶液流出时间 t_s , t_s 与 t_0 的比值即视作相对粘度。最后向粘度计大球中加入聚氨酯样品胶条,胶条浸没在液面下。测量不同时间段溶液的流出时间。

在测量粘度随浓度的变化时,在一定温度下首先测量已知重量的溶剂(纯水)在粘度计中的流过时间,再用称量法逐次向粘度计内加入同样以称量法配制的浓储备试样溶液,依次测量粘度计中各个浓度下溶液的流过时间。在加入样品胶条后的溶液中重复该实验。重量浓度再经密度校正后得到重量-体积浓度。

在测量粘度随温度的变化时,首先测量已知浓度的明胶稀溶液的在不同温度下的流过时间 t_s ,然后加入胶条,等吸附完全后,再测量在不同温度下溶液在粘度计中的流出时间 t'_s ,利用溶液粘度与浓度的理论公式测算出样品胶条在不同温度下吸附量的变化。

分别向明胶溶液中加入表面未经处理的聚氨酯胶条和表面接枝肝素后的聚氨酯胶条,胶条约为 2cm 长,1cm 宽,厚度约 0.5cm,均精确计算出表面积。

溶剂(纯水)的流过时间分别为 296.08s (35℃)、291.13s (36℃)、284.89s (37℃)、279.29s (38℃)、274.41s (39℃)、269.51s (40℃)、264.53 s (41℃)和 260.41s (42℃)。

2 结果与讨论

实验得到了 R 值为 1.03、硬段含量为 50%的透明泛黄聚氨酯弹性体胶条,断裂伸长率为 464%,拉伸强度为 3.34MPa。表面肝素接枝量为 23.9mg/m²。

将表面未处理的聚氨酯样条浸没在浓度一定的明胶稀溶液中,明胶稀溶液的相对粘度随时间的变化如图 1 所示。图中,在 90min 之前,溶液相对粘度急剧降低,在 90min 以后,相对粘度基本不变。明胶大分子一接触到聚氨酯胶条,就迅速吸附到胶条表面,导致溶液中明胶量立即减少,溶液浓度降低,粘度随之下降。在 0~90min 内为吸附期,明胶大分子不断聚集到聚氨酯弹性体表面,吸附速率大于解吸速率,溶液实际浓度不断减少,粘度下降;90min 以后吸附达到平衡,溶液浓度不再变化,粘度也不再改变。因此,我们通过测量溶液流出时间变化(即粘度变化),可以直观地了解到明胶在聚氨酯表面吸附很快,但是达到吸附平衡所需时间较长。

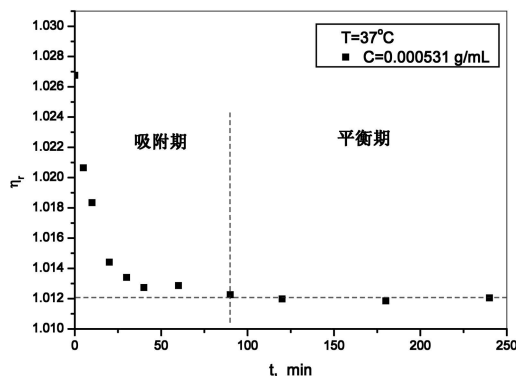


图1 加入PU胶条后明胶稀溶液相对粘度随时间的变化

Figure 1 Variation of relative viscosity with time for a dilute gelatin aqueous solution after adding PU film

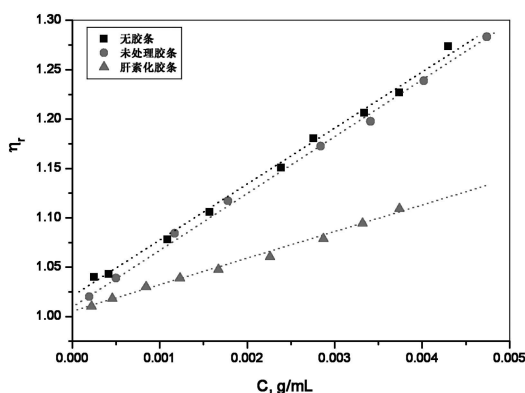


图2 明胶稀溶液的相对粘度-浓度曲线(37°C)

Figure 2 Plots of relative viscosity versus concentration of dilute gelatin aqueous solutions at 37°C

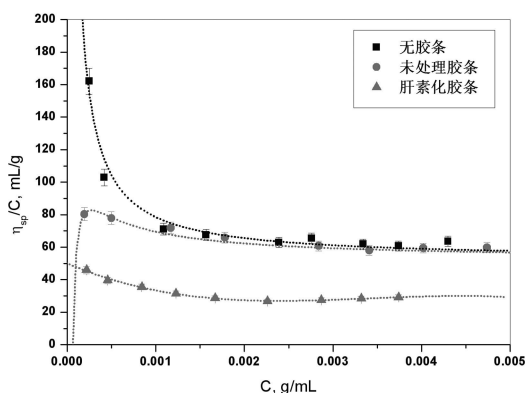


图3 明胶稀溶液的比浓粘度-浓度曲线(37°C)

Figure 3 Plots of reduced viscosity versus concentration of dilute gelatin aqueous solutions at 37°C

在 37°C (人体的正常体温下) 测量明胶稀溶液的相对粘度随浓度的变化, 结果如图 2 所示: 随着浓度增加, 溶液相对粘度增大。但是放入聚氨酯弹性体胶条后, 溶液的粘度值明显降低。明胶的原料—胶原蛋白在工业加工中有许多肽键被破坏, 在分子链上产生了大量可离解的基团如 $-\text{COOH}$ 或 $-\text{NH}$, 这些基团是易于与聚氨酯弹性体表面的结构基团 (氨基甲酸酯) 相互结合的。而接枝上的肝素具有更多的 $-\text{NH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 等基团, 这些基团与蛋白质中的 $-\text{COOH}$ 或 $-\text{NH}$ 基团能够更好地结合在一起, 导致溶液中的明胶量减少, 溶液实际粘度降低。为了从粘度变化直观了解明胶在聚氨酯胶条表面的吸附, 实验选择的溶液是在极稀浓度区。在图 3 比浓粘度-浓度曲线上观察到了曲线在低浓度下

的上弯现象。这种蛋白质稀溶液的粘度异常行为与溶质在玻璃毛细管壁的吸附有关,程镕时等提出了包含界面效应校正的粘度方程来处理高分子极稀溶液粘度数据^[10~12]:

$$\eta_{\text{r.exp}} = (1 + [\eta] \cdot C + 6 \cdot K_m \cdot [\eta] \cdot C^2) \cdot \left[1 + k \cdot \frac{C}{C_a + C} \right] \quad (1)$$

式中 $[\eta]$ 是高分子的特性粘数, K_m 是表观自缔合常数,它与 Huggins 参数 K_H 在数值上可以通过 $[\eta]$ 而互换, $K_m = \frac{1}{6} \cdot K_H [\eta]$ 。 k 是毛细管管壁吸附饱和后溶剂流过时间与干净粘度计中溶剂流过时间相比的增量分数, C_a 是溶液所接触粘度计的一半被溶质吸附时的溶液浓度。

在粘度测量过程中,当将最初浓度为 C_0 、体积为 V mL 的样品溶液放入到玻璃粘度计中,由于溶质吸附到玻璃粘度计表面而使得溶液浓度发生改变。平衡浓度 C 与最初浓度 C_0 存在以下关系^[12],

$$C = C_0 \cdot \left[1 - \left(\frac{A}{C_a + C_0} \right) \right] \quad (2)$$

式中,参数 A 是与溶质在玻璃粘度计内表面的吸附容量有关的参数。考虑因溶质吸附引起的浓度变化,则将式 2 代入式 1,得到真正的实验比浓粘度-浓度表达式为,

$$\frac{\eta_p}{C_0} = \frac{\left[1 + [\eta] \cdot C_0 \cdot \left(1 - \frac{A}{C_a + C_0} \right) + 6 \cdot K_m \cdot [\eta] \cdot C_0^2 \cdot \left(1 - \frac{A}{C_a + C_0} \right)^2 \right] \cdot \left[1 + k \cdot \frac{C_0 \left(1 - \frac{A}{C_a + C_0} \right)}{C_a + C_0 \left[1 - \frac{A}{C_a + C_0} \right]} \right] - 1}{C_0} \quad (3)$$

利用上式对未加胶条溶液中的比浓粘度数据进行拟合,将计算出的 η_p/C_0 也一同画到图 3 上,实验线与计算线很好地吻合。得到的参数值为: $[\eta] = 51.17 \text{ mL/g}$, $k = 0.03$, $C_a = 1 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$, $K_m = 0$, $A = 1 \times 10^{-14} \text{ g/mL}$ 。

蛋白质是聚两性电解质,在等电点时以两性离子的形式存在于溶液中,其总电荷为零,这样的蛋白质颗粒因为没有相同电荷而互相排斥的影响,很容易借静电引力结合成聚集体,因此蛋白质的行为类似中性高分子,而且由于蛋白质分子链上有许多极性和非极性基团,比普通的中性高分子更易吸附到玻璃表面,所以它的真实粘度受界面作用的影响更大。但是在非等电状态时,蛋白质分子上有净的正电荷或负电荷,带相同电荷的分子之间存在强烈的库仑排斥力,因而自缔合常数 K_m 实际上等于零,公式 4 可以简化为,

$$\frac{\eta_p}{C_0} = \frac{\left[1 + [\eta] \cdot C_0 \cdot \left(1 - \frac{A}{C_a + C_0} \right) \right] \cdot \left[1 + k \cdot \frac{C_0 \left(1 - \frac{A}{C_a + C_0} \right)}{C_a + C_0 \left[1 - \frac{A}{C_a + C_0} \right]} \right] - 1}{C_0} \quad (4)$$

文献^[15]指出明胶稀溶液的粘度参数 A 的数值随温度升高而降低,表明温度越高,明胶分子在玻璃表面的吸附量越少,当实验温度超过 35°C 后参数 A 值接近于零,意味着由界面吸附引起的浓度校正项可忽略,因此在高温下比浓粘度-浓度公式可进一步简化为:

$$\frac{\eta_p}{C_0} = \frac{\left[1 + [\eta] \cdot C_0 \right] \cdot \left[1 + k \cdot \frac{C_0}{C_a + C_0} \right] - 1}{C_0} \quad (5)$$

如果向 V mL 溶液中加入面积为 S (cm^2)的聚氨酯胶条,溶质会吸附到胶条表面,导致溶液实际浓度降低。令胶条表面平衡吸附量为 B (g/cm^2),当溶质在胶条表面吸附达到平衡时,定义:

$$Z = \frac{B \cdot S}{V} \quad (6)$$

Z 即为溶液标称浓度与实际浓度之差($C_0 - C$)。利用公式 5 对明胶稀溶液的比浓粘度数据进行拟合,得到粘度参数 $[\eta]$ 、 k 和 C_a ,代入公式 1,就可以根据相对粘度数据计算出溶液实际浓度 C ,与溶液标称浓度 C_0 相减得到 Z ,进而计算出胶条表面平衡吸附量 B 。

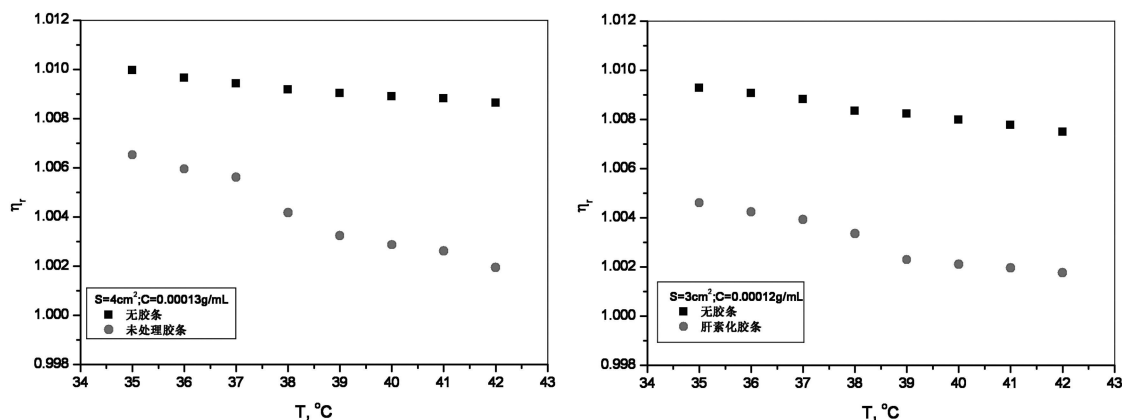


图4 明胶稀溶液的相对粘度-温度曲线

Figure 4 Plots of relative viscosity versus temperature of dilute gelatin aqueous solutions.

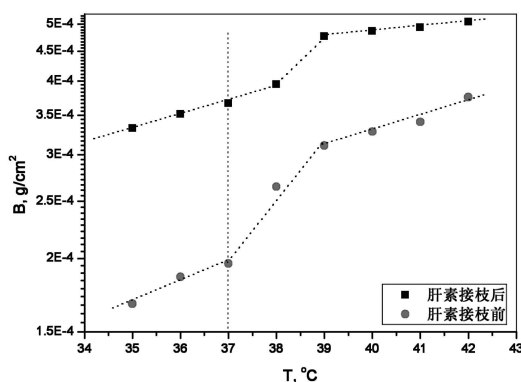


图5 聚氨酯表面明胶吸附量B随温度的变化

Figure 5 Variation of gelatin adsorption amount B with temperature on the surface of PU film.

图4是明胶稀溶液的相对粘度随温度的变化曲线。从图中可见,溶液相对粘度随温度升高而降低,加入胶条后,相对粘度值明显下降。利用相对粘度差计算出的聚氨酯胶条在不同温度下的对明胶的吸附量变化参见图5。从图5可以看到,随着温度的升高,吸附量逐渐变大。同时表面接枝肝素后,明胶吸附量增加。这表明这一吸附,除了常规的物理吸附外,还有化学吸附,随着温度的增加化学吸附的作用更明显。聚氨酯表面接枝肝素后,亲水基团增多,与明胶分子的结合也增多。图5中我们发现,在37到39℃附近,明胶吸附量发生突增,肝素化聚氨酯胶条表面明胶吸附量增幅明显低于未肝素化聚氨酯胶条。作为一种介入导管材料,在人体正常体温下表面吸附胶原蛋白较少,而体温过高后胶原蛋白吸附量增大一倍左右,对血小板的凝聚必然产生影响,需要进一步研究。

3 结论

本工作制备了肝素化IPDI型聚氨酯胶条,通过稀溶液粘度变化研究明胶蛋白在聚氨酯胶条表面的动态吸附,并通过稀溶液粘度-浓度换算方法推导明胶的吸附量,发现明胶分子很快吸附到聚氨酯胶条表面,但是吸附达到平衡需要较长时间,吸附量随温度升高而增大,在37℃附近出现突增。

参考文献:

- [1] Bernacca G M, Gulbransen M J, Wilkinson R, Wheatley D J. *Biomaterials*, 1998, 19; 1151~1165.
- [2] Blomberg E, Claesson P M. *Biomaterials*, 1998, 19; 371~386.
- [3] Khan I, Smith N, Jones E, Finch D S, Cameron R E. *Biomaterials*, 2005, 26(5); 621~631.

- [4] Jiang Y, Rongbing B, Ling T, Jian S, Sicong L. *Colloid Surface B, Biointerfaces*, 2004, 36(1): 27~33.
- [5] 胡国栋. 国外医学: 生物医学工程分册, 2002, 25(6): 271~273.
- [6] 许乾慰, 肖世英. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(13): 2415~2419.
- [7] 王琴梅, 潘仕蒙, 郑振声. 北京生物医学工程, 1997, 16(1): 44~48.
- [8] Wilson D F, ed. *Techniques of Biocompatibility Testing*. Florida: CRC Press Inc, 1984.
- [9] Wu Z, Chen H, Huang H, Zhao T, Liu X, Li D, Yu Q. *Macromol Biosci*, 2009, 9: 1165~1168.
- [10] Cai J, Bo S, Qin W, Yan X, Cheng R. *Appl Chem*, 2001, 18(5): 377 ~380.
- [11] Li Y, Cai Z, Zhong W, Cheng R. *J Appl Polym Sci*, 2008, 107, 1850~1856.
- [12] Pan Y, Cheng R. *Chin J Polym Sci*, 2000, 18(1): 57~67.
- [13] 朱志博, 许宏, 路新卫, 蔡玉春. 第一军医大学分校学报, 2004, 27(1): 24~25.
- [14] Smith P K, Mallia A K, Hermanson G T. *Anal Biochem*, 1980, 109(2): 466~473.
- [15] Li Y, Cheng R. *J Polym Sci, Part B: Polym Phys*, 2006, 44, 1804~1812.

A Viscometric Study of Adsorption of Gelatin on the Surface of Polyurethane Elastomer

WU Li-min¹, HOU Feng-wen¹, ZHU Feng-jian¹, YIN Hong-gen¹, LI Yi^{1*}, CHENG Rong-shi²

(1. *College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Soochow University, Suzhou 215123, China;*

2. College of Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: A special Polyurethane (PU) Elastomer with good mechanical property was prepared from Isophorone diisocyanate (IPDI) according to literature. Heparin has been grafted onto the surface of the PU elastomer and PU-Hep elastomer was obtained. By immersing the PU elastomers in dilute gelatin aqueous solution and measuring the viscosity of the solution at different time, concentration and temperature, we found that the gelatin macromolecules accumulated on the surface of PU elastomer as soon as they contacted. However, it need a long time to reach the adsorption equilibrium. The amount of adsorption for gelatin was calculated from experimental relative viscosity data using a viscosity equation with interfacial effect correction. The result showed that in the range of 35°C ~ 42°C, along with the increasing of the temperature, more gelatin macromolecules has been adsorbed on the surface of the PU elastomer, and the PU-hep elastomer showed larger adsorption capacity.

Key words: PU elastomer; Gelatin solution; Adsorption; Viscosity