

壳聚糖-甘油膜的制备和表征

吴海若 (浙江经济技术职业学院, 杭州 310018)

摘要:目的 制备壳聚糖-甘油膜,用于解决术后粘连问题。方法 通过将壳聚糖和甘油共混,充分利用两者的优点,达到生理功能的协同增效及物化性能的改善。结果 实验表明,壳聚糖-甘油膜在湿态下仍具有良好的力学性能,在实际应用中能够承受缝合强度,其最大拉伸强度达到 17.3MPa,断裂伸长率达到 99%,并且壳聚糖-甘油膜具有良好的吸水率,最大吸水率为 123%,在实际应用中减少了创伤面的积液。结论 采用溶致沉淀法制备壳聚糖-甘油膜,大大节省了制备时间。甘油的加入有利于改善膜的柔韧性,满足实际应用需要,壳聚糖-甘油膜无色透明、表面光洁、无气泡、手感柔韧性较好。该膜经动物体内植入实验,与对照组相比,有明显的防粘连效果。

关键词:壳聚糖;甘油;防粘连膜;生物评价

中图分类号:R943.4 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2007)01-0049-04

Preparation and Characterization of Chitosan/glycerol Blend Membrane

WU Hai-ruo (*Zhejiang Vocational Institute of Economic Technology, Hangzhou, 310018, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare chitosan/glycerol membrane for solving the problem of conglutination after operation. **METHODS** In this paper, chitosan/glycerol blend membranes were prepared by the sol-gel transformation method. **RESULTS** The present method took about 6 hours to get a flexible membrane with fine appearance. The physical and biological properties of the chitosan/glycerol membrane were also investigated. The result showed that the mechanical properties of blend membranes greatly enhanced with the increase of glycerol. The chitosan/glycerol membrane had best properties with 8% (wt) glycerol and fixed at 70°C for 2 hours in a mixed fixation agent composed of ethanol, glycerol and sodium hydroxide. **CONCLUSION** The animal test shows that such a membrane can be used practically, however, the membrane becomes hard and small when glycerol loses which will do harm to organization.

KEY WORDS: chitosan; glycerol; anti-adhesion membrane; biological evaluation

防术后粘连一直是外科手术中需要解决的问题,目前国内 内外均进行了研究,并已有壳聚糖防粘连凝胶制剂出售,但

是凝胶容易流失,防粘连效果不佳。同时由于纯壳聚糖膜力学性能欠佳,制备工艺复杂和降解缓慢等因素的制约,目前还尚无成熟的防术后粘连膜产品。因此,本实验通过加入甘油作为增塑剂,保湿剂来改善壳聚糖基膜的力学性能,并用溶致沉淀法改善壳聚糖基膜的制备工艺,探讨一条新的、便捷的工艺路线^[1]。

1 实验部分

1.1 原料与试剂

壳聚糖:生化试剂,浙江省玉环县澳星甲壳素有限公司。丙三醇:分析纯,杭州化学试剂厂。无水乙醇:分析纯,杭州长征化工厂。冰醋酸:化学纯,宜兴市钮家化工助剂厂。氢氧化钠:分析纯,杭州萧山化学试剂厂。蒸馏水:自制。

1.2 原料的表征

1.2.1 脱乙酰度的测定^[2] 壳聚糖脱乙酰度定义为:壳聚糖分子中,脱去乙酰基的链节数占所有链节数的百分比。准确称取 0.3~0.5g 壳聚糖样品,溶于 30mL 0.1mol/L 盐酸溶液中,以甲基橙-苯胺蓝作指示剂,用 0.1mol/L 氢氧化钠标准溶液滴至终点,其溶液颜色由紫色变为绿色,按公式 2-1、2-2 计算脱乙酰度 (DD):

$$\% \text{NH}_2 = \frac{(C_1 V_1 - C_2 V_2) \times 0.016}{G \times (100 - W)} \times 100\% \quad (2-1)$$

$$\text{DD} = \frac{\% \text{NH}_2}{9.94} \times 100\% \quad (2-2)$$

式中: C_1 - 盐酸标准溶液浓度 (mol/L)

C_2 - 氢氧化钠标准溶液浓度 (mol/L)

V_1 - 加入盐酸标准溶液体积 (mL)

V_2 - 滴定时消耗氢氧化钠标准溶液体积 (mL)

G - 试样重 (g)

W - 试样水分 (%)

0.016 - 与 1mL 1mol/L 盐酸相当的胺量 (g)

1.2.2 特性黏数和分子量测定 以 0.1mol/L CH_3COONa + 0.2mol/L CH_3COOH 的缓冲溶液 (pH = 4.40) 为溶剂,将待测壳聚糖配制成 0.1% 左右的溶液,于 (30 ± 0.05) °C 恒温水中,用乌氏黏度计按稀释法测各样品的特性黏数 $[\eta]$,代入 Mark-Houwink 方程。每种样品做三份平行实验,取平均值,计算各样品的平均相对分子质量 \bar{M}_n 。

1.3 壳聚糖-甘油膜的制备

将壳聚糖溶解在 2% 醋酸溶液中配制成浓度为 1% ~ 2% 的溶液,然后加入一定量的甘油,搅匀,静置脱泡。用流延法将壳聚糖-甘油溶液在玻璃板上展开,并浸入凝胶混合液中,在恒温蒸气浴中凝胶,完全凝胶后取出,测试凝胶和剩余凝胶溶液的 pH 值。放入恒温烘箱中干燥。

1.4 壳聚糖-甘油膜的性能表征

1.4.1 外观 肉眼观察壳聚糖-甘油膜的颜色、透明性和表面光洁性。

1.4.2 力学性能 用 CPJ-25 冲片机压制一定规格的哑铃型样品,样品宽度为 10.0mm,总长度为 100.0mm,有效测试距

离为 25.0mm。用螺旋测微器沿样品长度等间距测量三次厚度,记录,并取平均值。

每一组取五个样品,用 LDS-500 数字式材料试验机测定样品的拉伸强度和断裂伸长率。测试条件为:温度:25°C,拉伸速度:50mm/min,拉力范围:0~40N。

1.4.3 吸水率 每一组取 7 个样品分别称重,记为 W_1 ,然后在 37°C 恒温浸泡 24h,小心取出膜片,用滤纸吸去表面水份,再分别称量湿膜的重量并记为 W_2 ,按公式 2-3 计算吸水率:

$$Q = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \quad (2-3)$$

式中: W_1 - 干膜的重量, W_2 - 湿膜的重量。

1.5 壳聚糖-甘油膜的动物试验

1.5.1 实验动物 SD 大鼠,由浙江省医科院实验动物中心提供,体重 200~250g,48 只,随机分为 2 组,雌雄各半。

1.5.2 实验方法 对照组:3% 异戊巴比妥钠腹腔内注射,剂量为 0.25mL/100g 体重,麻醉后仰卧位固定大鼠,常规消毒铺单后下腹部正中切口逐层进腹,切口长 2~3cm,找到蜗突后将其提至切口外,在蜗突盲端 3cm 的范围内用手术刀片轻刮蜗突的浆膜面(一侧面),至浆膜面充血且有少量小出血点,再用无水乙醇处理被刮过的浆膜面,待乙醇挥发后再将蜗突送回腹腔,分两层关腹。

实验组:在对照组的基础上,待乙醇挥发后用含 8% 甘油的壳聚糖-甘油膜 (8mm × 20mm × 0.6mm) 包绕损伤的蜗突盲端一圈,然后再将蜗突送回腹腔。术后 6 周再次打开腹腔,肉眼观察蜗突盲端周围肠管、系膜及腹壁的粘连情况和降解情况。

2 结果与讨论

2.1 壳聚糖原料的表征

壳聚糖是甲壳素脱乙酰化后的产物,因制备工艺条件和需求的不同,壳聚糖脱乙酰度由 60% 至 100% 不等,故其脱乙酰度和相对分子质量是其两项主要性能指标。本实验采用最常用的酸碱滴定法,用甲基橙-苯胺蓝混合溶液作指示剂,测定壳聚糖的脱乙酰度为 91%。

目前测定壳聚糖相对分子质量的方法主要有光散射法和黏度法。光散射法虽可获得绝对分子量的数据,但由于实验条件的限制,本实验采用黏度法测定壳聚糖的相对分子质量。壳聚糖的 DD 值决定了大分子链上氨基含量的多少,DD 值不同必将影响壳聚糖稀酸溶液中带电基团和聚电解质电荷密度。以往在对 Mark-Houwink 方程中的 K 和 α 值进行标定时,没有考虑壳聚糖 DD 值对方程的影响。王伟等^[2]发现参数 K 和 α 值依赖于壳聚糖 DD 值而变化,有如下关系:

$$\alpha = -1.02 \times 10^{-2} \times \text{DD} + 1.82 \quad (2-4)$$

$$K = 1.635 \times 10^{-30} \times \text{DD}^{14.0} \quad (2-5)$$

$$[\eta] = K \bar{M}_n^\alpha \quad (2-6)$$

因此,只要知道了壳聚糖的 DD 值和 $[\eta]$ 值,便可通过内插法计算得到 DD 在 69~100 的试样的分子量。

试验测得壳聚糖 $[\eta] = 446.42$, $DD = 0.91$, 由 2-4.2-5.2-6 式可得:

$$\alpha = 0.89, K = 4.37 \times 10^{-3} (\text{mL/g}), \bar{M}_n = 4.25 \times 10^5$$

所以本实验所用的壳聚糖的分子量为 $\bar{M}_n = 4.25 \times 10^5$ g/mol.

2.2 制备条件的确定

2.2.1 凝胶介质的选择

选择凝胶介质时, 必须注意以下问题: 其一, 它对采用的制膜高聚物不起溶解作用。其二, 与选用的溶剂混溶。因此在本实验中选用不同浓度的乙醇或乙醇-氢氧化钠溶液作为凝胶介质, 发现乙醇含量越高凝胶化时间越短, 氢氧化钠的加入能大大加快凝胶化时间, 见表 1。但是在实验过程中也发现, 在凝胶化过程中甘油也更加容易溶解在乙醇溶液中, 因此有部分甘油流失, 这是在实验中不希望出现的情况, 所以在选择无水乙醇做凝胶介质时又添加了一定比例的甘油, 使得混合溶液中的甘油比例和膜液中的甘油比例能够保持动态平衡。通过使用这种混合凝胶液在脱乙酸的同时又能很好地保持甘油的比例。

表 1 凝胶介质的含量与凝胶时间的关系

Tab 1 Relationship between content of gel medium and gel time

凝胶介质的含量 /%	凝胶化时间 /h	膜的外观
0(纯水)	> 36	未凝胶
60	> 36	未凝胶
85	30	表面凝胶
90	24	白色凝胶
95	18	白色凝胶
100	12	白色凝胶
95(5% NaOH)	6	白色凝胶

注: 温度为 15℃

Note Temperature 15℃

采用无水乙醇-甘油混合凝胶液 (A) 这一混合体系进行壳聚糖-甘油膜凝胶化过程所需要的时间大约为 2~4h。凝胶固化后膜呈弱酸性 ($\text{pH} = 6.4 \sim 6.7$)。选用无水乙醇-甘油-氢氧化钠混合溶液 (B) 来制备的壳聚糖-甘油膜呈中性或弱碱性 ($\text{pH} = 7.0 \sim 7.1$), 同时由于氢氧化钠是壳聚糖的沉淀剂, 因此膜的凝胶化时间大大缩短, 可以缩短 50% 左右, 提高了生产效率。

不同的凝胶介质对膜外观的影响比较大。采用混合溶液 A 制备的壳聚糖-甘油膜无色透明, 膜表面比较光洁, 厚度较均匀; 采用混合凝胶液 B 制备的壳聚糖-甘油膜透明略带黄色, 膜表面不是很光洁。因此, 选用合适的凝胶介质的组成、浓度是制膜成功的关键。

2.2.2 凝胶温度的选择

当壳聚糖/甘油溶液在不同温度下进行凝胶化时, 温度对壳聚糖-甘油膜外观的影响也比较大。考察了壳聚糖/甘油溶液在不同温度下进行凝胶化的情况, 发现在 70℃ 以下所制得的膜透明性较好, 且颜色为无色, 表面也较为光洁; 而当温度高于 70℃ 时制得的膜容易在膜边

缘出现小气泡, 且膜颜色常略带黄色, 透明性和表面光洁度仍较好; 当温度升高到 80℃ 以上时, 所制得的膜颜色进一步加深常为褐色, 膜中间出现气泡的比例增加, 膜表面的光洁性大大降低。

凝胶温度对凝胶化时间有较大的影响, 随着凝胶温度的升高, 壳聚糖-甘油膜的凝胶时间有较大幅度的缩短。根据实验结果可知凝胶温度控制在 70℃、凝胶时间 2h 为宜。这时制备的壳聚糖-甘油膜无色、透明、表面光洁, 具有良好的机械性能和生物相容性。同时可以大大节省制膜全过程的时间, 提高工作效率, 对本实验扩大到实际生产具有可行性和现实意义。

2.2.3 凝胶时间的选择

影响膜外观还有一个较为重要的因素——凝胶时间。在相同的凝胶温度下, 采用不同的凝胶时间所制得的壳聚糖-甘油膜也表现出不同的外观。在 70℃ 凝胶温度下考察不同凝胶时间对膜外观的影响。发现如果凝胶时间过长, 制备的湿膜边缘甚至膜中间也会出现小气泡。干燥后膜呈现白色或黄色半透明, 膜表面比较粗糙, 手感比较硬, 所以在制膜时应注意凝胶时间的控制。

2.3 壳聚糖-甘油膜的机械性能

壳聚糖-甘油膜的拉伸试验结果见图 1 和图 2。从图中可以看到无论用凝胶混合液 (A) 还是 (B), 壳聚糖-甘油膜的拉伸强度都呈现下降趋势, 但是断裂伸率先出现一个增长, 到一定值后呈现下降趋势。从实验结果可知在甘油和壳聚糖相对配比为 8% 时壳聚糖-甘油膜的拉伸强度和断裂伸长率都表现得较为理想, 比纯壳聚糖膜的机械性能有较大的改善。

从图 1 和图 2 中还可以看到凝胶混合液 (A) 和 (B) 制备的壳聚糖-甘油膜的拉伸强度和断裂伸长率虽然总的趋势是一致的, 但是用凝胶混合液 (A) 制备的壳聚糖-甘油膜的拉伸

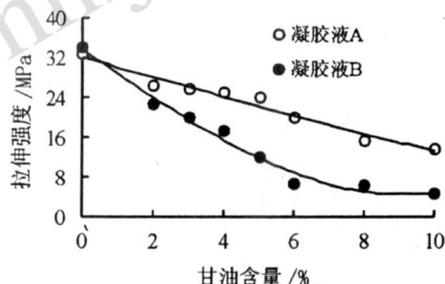


图 1 甘油含量对壳聚糖-甘油膜拉伸强度的影响

Fig 1 The effect of glycerol content on the strength of chitosan/glycerol membrane

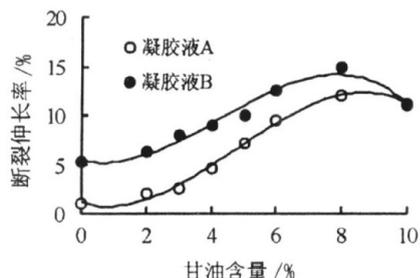


图 2 甘油含量对壳聚糖-甘油膜断裂伸长率的影响

Fig 2 The effect of glycerol content on the rupture elongation rate of chitosan/glycerol membrane

强度明显比用凝胶混合液(B)制备的壳聚糖-甘油膜的拉伸强度大,而断裂伸长率刚好相反。这主要是因为氢氧化钠的加入能加快壳聚糖的凝胶化,使得壳聚糖链被迅速固定,从而降低了膜的拉伸强度,但同时也由于凝胶时间的加快使得甘油容易被包裹在壳聚糖基体中,不易流失,因而膜的断裂伸长率有显著的提高。

2.4 壳聚糖-甘油膜的吸水率

膜的吸水率见图3。发现影响壳聚糖-甘油膜的吸水率的主要因素有两个:甘油的含量和凝胶化时间。在壳聚糖-甘油膜中,甘油起到了增塑剂和保湿剂的作用^[3],从图3中看到,随甘油的增加,膜的吸水率明显增加,提高幅度达到8倍左右,充分说明了甘油的增塑作用和保湿作用。同时,吸水率的提高也可以从一个侧面说明壳聚糖-甘油膜的透气性较好,这样在使用中可以透湿透气,保持创伤面的干燥和新鲜。虽然随甘油含量的增加,膜的吸水率会有较大的增加,但这种增加不是呈线性的,主要原因是因为在制备过程中甘油容易被流失,不容易控制其准确的含量。

在不同凝胶化时间下相同甘油含量的壳聚糖-甘油膜的吸水率作比较,发现凝胶时间较长情况下,壳聚糖-甘油膜的吸水率反而下降,见图4。这说明当凝胶化时间过长时脱溶剂太彻底,反而使得膜表面收缩较大形成了表面致密层,膜孔变得细小,使得膜的吸水速率降低。但随着凝胶时间的增加,膜的吸水率的下降到后来变化很小,几乎保持不变。

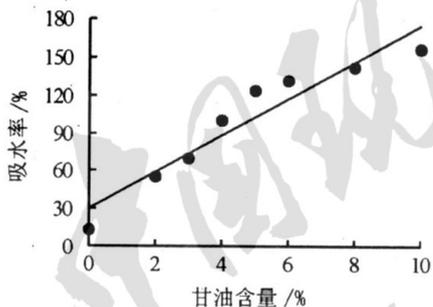


图3 甘油含量与壳聚糖-甘油膜的吸水率的关系

Fig 3 The effect of glycerol content on the water absorbing rate of chitosan/glycerol membrane

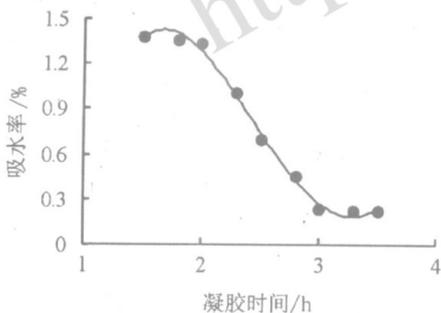


图4 凝胶时间与壳聚糖-甘油膜的吸水率的关系

Fig 4 The relationship between gel time and water absorbing rate of chitosan/glycerol membrane

2.5 动物试验结果

动物试验初步结果显示:对照组出现明显的组织粘连,并且炎症比较严重,植入6周后粘连仍未消失,炎症稍有减弱,这主要是因为机体本身具有防御能力。含8%甘油的壳聚糖-甘油膜植入后,膜周围组织出现前期炎症,并且周围组织充血。6周后在创伤面表面形成包膜,炎症基本消失,无出现组织粘连。膜降解失重大约50%。但是膜变硬,同时出现明显的收缩。见图5。动物实验详细结果另文讨论。



图5 空白对照组与壳聚糖-甘油膜组防粘连情况对比

Fig 5 Blank comparison group and chitosan/glycerol membrane conglutination condition

a 空白对照组粘连情况; b 壳聚糖-甘油膜组粘连情况

a blank comparison group conglutination condition b chitosan/glycerol membrane conglutination condition

3 结论

3.1 采用溶致沉淀法制备壳聚糖-甘油膜,大大节省了制备时间。

3.2 影响壳聚糖-甘油膜性能的主要因素是凝胶介质、凝胶温度、凝胶时间和甘油的含量。当甘油相对含量为8%,用凝胶混合液(B)在70℃凝胶2h制备的壳聚糖-甘油膜无色透明、表面光洁、无气泡、手感柔韧性较好。

3.3 甘油的加入有利于改善膜的柔韧性,满足实际应用需要。随甘油含量的增加,膜的抗张强度下降,断裂伸长率提高。但是由于甘油为小分子物质,容易从膜中流失,随着甘油的减少膜的硬度增加,在动物试验中也表现出膜硬度增加并出现收缩现象。

参考文献

- [1] HU Q L, FANG Z P, ZHAO Y, XU C W. A new method to prepare chitosan membrane as a biomedical material[J]. Chinese Journal of Polymer Science, 2001, 5(19): 467-470
- [2] WANG W, BO S Q. Establishing of Mark-Houwink equation on chitosan with different deacetyl rate[J]. Science in China(Series B) 1990, 11: 1126-1131.
- [3] YE C T, LU X L, MA F G. Preparation of CG wound dressing [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering 1996, 2(15): 112-115

收稿日期: 2005-12-11