

doi:10.3969/j.issn.1001-3539.2018.04.003

交联改性细菌纤维素/肝素复合膜的制备及性能

张雅琴, 陈袁曦, 周晓东

(华东理工大学多相结构材料化学工程重点实验室, 上海 200237)

摘要:通过在细菌纤维素(BC)发酵培养液中加入肝素(Hep)原位制备BC/Hep复合膜,并向提纯后的复合膜加入交联剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)进行交联改性,研究了肝素对BC培养液中木醋杆菌生长的影响,以及不同物质的量之比的交联剂对复合膜力学性能、膨胀率和透湿性的影响。结果表明,在BC培养液中加入Hep能够促进木醋杆菌的生长,Hep可提高BC膜的拉伸强度,但降低了膨胀率和透湿性;交联改性后复合膜的拉伸强度进一步得到提高,当EDC/NHS/Hep-COOH的物质的量之比为0.4/0.24/1时,复合膜的拉伸强度较纯BC及未加交联剂的BC/Hep复合膜分别提高了28.28%和15.4%,且膨胀率和水蒸气透过率与纯BC相近,分别为8274%和 $(814.10 \pm 44.87) \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$,可以作为一种理想的创伤敷料。

关键词:细菌纤维素;肝素;交联改性;拉伸强度;膨胀率;水蒸气透过率;创伤敷料

中图分类号: TQ321.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3539(2018)04-0012-05

Preparation and Properties of Bacterial Cellulose/Heparin Composite Membrane with Crosslinking Modification

Zhang Yaqin, Chen Yuanxi, Zhou Xiaodong

(Shanghai Key Laboratory of Multiphase Materials Chemical Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Bacterial cellulose (BC) / heparin (Hep) composite membrane was prepared in situ by adding Hep in BC culture medium, the composite membrane was modified by adding 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) as crosslinking agents after purified. The influence of Hep on the growth of acetobacter xylinum in the BC culture medium was studied, and the effects of the crosslinking agents with different molar ratio on the mechanical properties, swelling characteristics and water vapor transmission of the composite membrane were also tested. The results show that the addition of Hep to the medium promotes the growth of acetobacter xylinus, and the tensile strength of the membrane is improved while the swelling ratio and water vapor transmission rate of the membrane was reduced with adding Hep. What's more, the tensile strength of the composite membrane is improved further after crosslinking. When the molar ratio of EDC/NHS/Hep-COOH is 0.4/0.24/1, the tensile strength of the composite membrane increases by 28.28% than that of the pure BC and increases by 15.4% than that of BC/Hep without crosslinking agent, the swelling ratio and water vapor transmission rate of the composite membrane are similar to BC, which are 8274% and $(814.10 \pm 44.87) \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ respectively, these show that the BC/Hep composite membrane can be used as an ideal wound dressing.

Keywords: bacterial cellulose; heparin; crosslinking modification; tensile strength; swelling ratio; water vapor transmission rate; wounding dressing

近年来随着科技发展,创伤敷料的成分、种类都发生了翻天覆地的变化,目前根据材料的不同可以分为传统敷料、生物敷料、人工合成敷料和生长因子敷料等^[1]。这些创伤敷料通常都要求满足以下几

个条件:能提供潮湿的环境,保温和有效的氧气循环;确保液体引流和上皮迁移;有助于吸收伤口渗出液;提供免受细菌负荷和继发感染的保护;很容易应用和无痛去除;生物相容性好且不引起过敏反

通讯作者:周晓东,教授,主要从事聚合物基复合材料制备及成型技术、聚合物材料的界面和嵌段共聚物的组装行为及相关功能材料的研究 E-mail: cissyeyx@163.com

收稿日期: 2018-02-07

引用格式:张雅琴,陈袁曦,周晓东. 交联改性细菌纤维素/肝素复合膜的制备及性能[J]. 工程塑料应用,2018,46(4):12-16.

Zhang Yaqin, Chen Yuanxi, Zhou Xiaodong. Preparation and properties of bacterial cellulose/heparin composite membrane with crosslinking modification[J]. Engineering Plastics Application, 2018, 46(4):12-16.

应^[2-4]。

细菌纤维素(BC)具有优良的理化性质,是一种新型的由微生物发酵产生的生物高分子材料,被广泛用于生物材料。作为敷料材料,BC有以下的优势:高孔隙率和高比表面积可以引入和释放抗微生物剂、药物和其它生物功能材料^[5];3D网络结构具有良好的透气性以及能阻挡微生物的入侵,防止感染;潮湿环境下具有优异稳定的力学性能;高吸水性和高持水性能使其快速吸收伤口渗出液,促进伤口愈合;良好的生物相容性和生物可降解性;无毒^[6]。

肝素(Hep)是硫酸化和酸性最强的糖胺聚糖,也是在烧伤治疗中使用最多的糖胺聚糖,Hep能和许多蛋白质反应,包括与炎症反应过程中释放的介质如趋化因子、生长因子和酶如弹性蛋白酶、组织蛋白酶G反应,具有抗炎的作用^[7-10]。Hep还能够改善局部创面微循环,减轻疼痛,减少菌群位移。将Hep掺杂到BC中,制得的BC/Hep复合膜将兼有BC的优良性能和Hep优良的生理功能。

陈丹丹等^[11]采用浸泡法和交联法制备了BC/Hep复合膜,发现交联法制备的复合膜具有更好的性能,笔者在此基础上通过在培养基中添加一定浓度的Hep原位培育出BC/Hep复合膜,再用不同物质的量之比的交联剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)^[12]对BC/Hep进行交联改性,研究Hep的加入对BC生长的影响,并通过傅里叶变换红外光谱(FTIR)仪对复合膜结构进行表征,同时研究了交联剂EDC/NHS物质的量之比对BC/Hep复合膜膨胀率和透湿性的影响。

1 实验部分

1.1 主要原料

木醋杆菌:A.xylinum 1.1812,中科院微生物研究所;

酵母浸膏:生物纯,上海天莲化工科技有限公司;

葡萄糖、无水乙醇、氢氧化钠:分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司;

2-吗琳乙烷磺酸(MES):纯度 $\geq 99\%$,上海麦克林生化科技有限公司;

NHS:纯度 $>98\%$,上海麦克林生化科技有限公司;

EDC:分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;

Hep:生物纯,北京华威锐科化工有限公司。

1.2 主要仪器及设备

FTIR 仪:Nicolet IS10 型,美国 Thermo Fisher 公司;

微机控制电子拉伸试验机:UH2502 型,上海优鸿测控技术有限公司;

恒温恒湿培养箱:LHS-150HC-11 型,上海一恒科学仪器有限公司;

紫外可见光分光光度计:TU-1818 型,北京普析通用仪器有限责任公司;

pH 计:FE20 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.3 BC/Hep 复合膜的制备

将 7 g 葡萄糖、1.5 g 酵母浸膏、10 mL 无水乙醇、0.05 g Hep 配成 100 mL 溶液,再用氢氧化钠溶液调 pH 至 6.8 后在 121℃ 下高温灭菌,接种后在 30℃ 下静置培养。培养 10 d 后取出 BC/Hep 复合膜,将其用流水冲洗、碱液提纯处理,再用流水冲洗至中性。

1.4 BC/Hep 复合膜的交联改性

将提纯过后的 BC/Hep 复合膜放入含有 NHS 与 EDC 的 MES 缓冲溶液中在室温下浸泡 24 h, NHS, EDC 与 Hep 中羧基(Hep-COOH)的物质的量之比为 $m/n/1$, m/n 分别取 0.4/0.24, 0.8/0.48 和 1.6/0.96,对应的缓冲溶液体积分别为 100, 200, 400 mL。将改性后的复合膜用 Na_2HPO_4 溶液、NaCl 溶液清洗,然后用去离子水冲洗后干燥备用。

1.5 测试与表征

(1) 发酵培养液中残糖量及 pH 值的测定。

葡萄糖标准曲线的绘制:分别取葡萄糖标准溶液(1 mg/mL) 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 于试管中,用蒸馏水补足至 2.0 mL,再加入 1.5 mL DNS 溶液,混合均匀,沸水浴加热 5 min 取出,流水冷却至室温用蒸馏水补足到 25 mL 刻度,并在 540 nm 波长下测定吸光度并绘制标准曲线。

取 1 mL 不同培养时间的发酵液定容到 100 mL 为待测样品。其余步骤同测定葡萄糖标准曲线的步骤相似,在 540 nm 波长下测试溶液的吸光度,根据葡萄糖标准曲线计算发酵液中的残糖量。用 pH 计测试不同时培养间的发酵液 pH 值。

(2) 发酵培养液中细菌生长曲线的测定。

在无菌的紫外洁净台取不同培养时间的发酵液放入 4 mL 的比色皿中,利用分光光度计测试 595 nm 波长下的吸光度并绘制生长曲线^[13]。

(3) FTIR 分析。

利用 KBr 压片制样, 然后进行 FTIR 分析, 扫描范围为 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$, 分辨率为 4 cm^{-1} 。

(4) 拉伸性能测试。

将热干后的膜剪成宽度为 4 cm 的试样, 测出试样的厚度, 然后将试样放入去离子水中浸泡至少 2 h 后进行拉伸性能测试。按式 (1) 计算拉伸强度, 并求其平均值以及标准偏差。

$$\sigma_t = F_t / (b \times d) \quad (1)$$

式中: σ_t ——拉伸强度;

F_t ——拉伸最大载荷;

b ——试样原始宽度;

d ——试样原始厚度。

(5) 膨胀率的测定^[14]。

称重冻干的膜, 其质量记为 W_{dry} , 然后在室温下将其浸泡于去离子水中, 每隔一定时间将吸水后的膜取出, 用滤纸去除表面多余水分后进行称重, 测得的质量记为 W_{wet} , 膨胀率按式 (2) 计算。

$$\text{膨胀率} = (W_{\text{wet}} - W_{\text{dry}}) / W_{\text{dry}} \times 100\% \quad (2)$$

(6) 透湿性的测定^[15]。

在离心管内装入一定量的去离子水, 然后将冻干的膜固定在离心管口处, 将膜管组件称重, 其质量记为 W_0 , 将膜管组件放入温度为 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, 相对湿度为 50% 的培养箱中培养一定时间后称重, 其质量记为 W_1 , 然后根据式 (3) 计算水蒸气透过率 (WVTR)。

$$\text{WVTR} = (W_0 - W_1) / (A \cdot t) \quad (3)$$

式中: A ——膜面积, m^2 ;

t ——测试持续时间, d 。

2 结果与讨论

2.1 肝素对细菌培养液的影响

图 1 为纯 BC 及 BC/Hep 发酵培养液在发酵培养过程中的残糖量、pH 值以及 595 nm 波长处的吸光度 ($\text{OD}_{595 \text{ nm}}$) 变化图。从图 1a 可以看出, 在整个发酵培养液过程中, 前 2 d 内, 发酵培养液中的葡萄糖含量及 pH 值均降低缓慢; 随后的 6 d 内, pH 值降低速度变快, 发酵液中的葡萄糖以较快的速度被消耗; 在最后 2 d , 发酵培养液的 pH 值趋于稳定, 葡萄糖含量趋于平缓, 发酵过程到达尾声。这证明木醋杆菌消耗葡萄糖转化为葡萄糖酸合成了 BC, 降低了发酵液的 pH 值。BC 形成过程中木醋杆菌经历迟滞期、快速生长期、终结期。培养初期为木醋杆菌的迟滞期, 生长缓慢; 随后为木醋杆菌的快速

生长期, 加入 Hep 的培养液中木醋杆菌消耗的葡萄糖更多; 最后为木醋杆菌生长的终结期, 培养液中的木醋杆菌菌落数趋于不变, 可以发现加入 Hep 后, 培养液中最终的残糖量更低, 表明 Hep 促使木醋杆菌消耗了更多的葡萄糖。从图 1b 也可以看出, 在培养初期, 纯 BC 及 BC/Hep 发酵培养液的 $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$ 相差很小, 但培养时间超过 5 d 后, 加入 Hep 的培养液 $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$ 明显提升, 进一步表明加入 Hep 后能够促进 BC 培养液中木醋杆菌的生长。

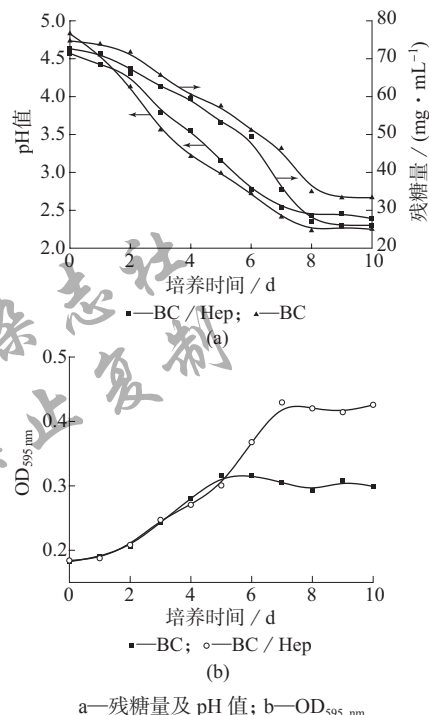


图 1 不同培养时间下纯 BC 及 BC/Hep 发酵培养液在发酵培养过程中的残糖量、pH 值以及 $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$

2.2 FTIR 分析

图 2 为纯 BC, 纯 Hep, BC/Hep 及交联改性 BC/Hep 的 FTIR 谱图。从图 2 可以看出, 纯 BC, BC/Hep 及交联改性 BC/Hep 在 3326 cm^{-1} 处均有一 OH 的伸缩振动峰, 2900 cm^{-1} 处有一 CH_2 的伸缩振动峰, 与纤维素的基本结构吻合, 说明加入 Hep 后的 BC 以及交联过后的 BC/Hep 都保持了纯 BC 的基本骨架。BC/Hep 在 $3300 \sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ 处的振动峰加强, 这归因于 Hep 的 N—H 拉伸振动吸收; 在 1640 cm^{-1} 处的峰增强, 归因于 Hep 的 C=O 的伸缩振动; 在 1236 cm^{-1} 处出现了 Hep 的 S=O 振动伸缩特征峰。交联过后, 在 1250 cm^{-1} 附近的一 OH 的弯曲振动峰消失, 说明加入交联剂过后, BC 的一 OH 与 Hep 的一 COOH 间发生了作用, 使 BC 与 Hep 的结合更加牢固。

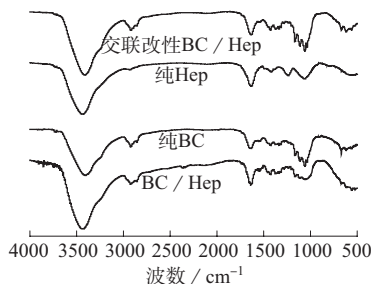
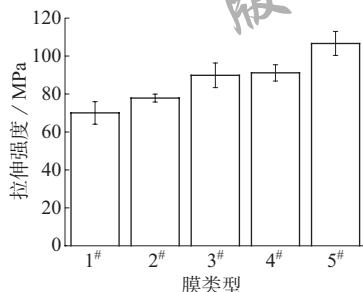


图2 纯BC,纯Hep,BC/Hep及交联改性BC/Hep的FTIR谱图

2.3 力学性能分析

图3为纯BC,BC/Hep以及不同EDC/NHS物质的量之比的交联改性BC/Hep复合膜的拉伸强度。由图3可知,加入Hep以及交联改性后,复合膜的拉伸强度提高,随着交联剂EDC/NHS用量的增加,复合膜的拉伸强度总体呈升高趋势。当EDC/NHS/Hep-COOH物质的量之比为0.4/0.24/1时,BC/Hep的拉伸强度为89.85 MPa,相比于纯BC提高了28.28%,相比于未加交联剂的BC/Hep提高了15.4%;当EDC/NHS/Hep-COOH物质的量之比为1.6/0.96/1时,BC/Hep的拉伸强度为106.66 MPa,相比于纯BC提高了52.28%,相比于未加交联剂的BC/Hep提高了36.99%。加入交联剂后,BC纤维间的—OH以及BC的—OH与Hep的—COOH发生化学连接,复合膜结构变得更加紧密,力学性能得到增强。



1[#]—纯BC膜; 2[#]—BC/Hep复合膜; 3[#], 4[#], 5[#]—EDC/NHS/Hep-COOH物质的量之比为0.4/0.24/1, 0.8/0.48/1和1.6/0.96/1的交联改性BC/Hep复合膜

图3 不同类型膜的拉伸强度

2.4 膨胀率分析

理想的敷料要求具有高吸水能力,膨胀率和含水率是敷料吸水性能的表现,高吸水能力的敷料能够快速吸收伤口的渗出液,能够防止伤口感染,减轻伤口疼痛,加速伤口的愈合。图4为纯BC,BC/Hep以及不同EDC/NHS物质的量之比的交联改性BC/Hep复合膜的膨胀率曲线。由图4可知,纯BC浸泡去离子水24 h平衡后,膨胀率达到

8818%;加入Hep后,复合膜的膨胀率有所降低;而当EDC/NHS/Hep-COOH物质的量之比为0.4/0.24/1时,BC/Hep复合膜平衡后的膨胀率比未加交联剂的BC/Hep的大,与纯BC的膨胀率接近,为8274%,其原因可能是交联剂用量较小时,BC与Hep之间只发生部分交联,形成了较大的孔洞,从而有利于吸水。但交联剂用量继续增加时,复合膜平衡后的膨胀率逐渐降低,均比未加交联剂的低,可能是因为交联剂用量增大,复合膜中BC之间连接得更加紧密,从而不利于吸水。

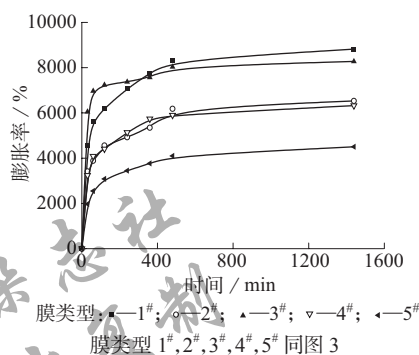


图4 不同类型膜的膨胀率

2.5 透湿性分析

表1为纯BC,BC/Hep以及不同EDC/NHS物质的量之比的交联改性BC/Hep复合膜的WVTR(表1中膜类型1[#],2[#],3[#],4[#],5[#]同图3)。伤口敷料要求具有适当的WVTR,WVTR太高,很难将伤口保持在潮湿的环境中,WVTR太低,会影响组织的正常代谢过程。有文献报道在温度(35.8±0.2)℃时,正常皮肤的WVTR约为(204±12)g/(m²·d),根据受伤程度的不同,受伤皮肤的WVTR变化范围是(278.4±1.1)~(5138±202)g/(m²·d)^[16],BC的WVTR是(827.04±23.83)g/(m²·d),未加交联剂的BC/Hep的WVTR是(785.43±36.35)g/(m²·d)。当EDC/NHS/Hep-COOH物质的量之比为0.4/0.24/1时,交联改性复合膜的WVTR比未加交联剂有所提高,达到(814.10±44.87)g/(m²·d),这可能因为加入的交联剂用量小,BC与Hep之间发生部分交联形成较大的孔洞,因而与膨胀率测试结果相一致。随着交联剂用量继续增加,复合膜的WVTR减少,原因是交联程度增加,复合膜变得更加紧密,孔隙减少。结合力学性能、膨胀率以及透湿性测试结果,发现当EDC/NHS/Hep-COOH物质的量之比为0.4/0.24/1时,BC/Hep可以作为—种理想的创伤敷料。

表1 不同类型膜的 WVTR $\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$

膜类型	WVTR
1 [#]	827.04 ± 23.83
2 [#]	785.43 ± 36.35
3 [#]	814.10 ± 44.87
4 [#]	607.43 ± 88.59
5 [#]	588.71 ± 86.71

3 结论

(1) Hep 的加入在一定程度上会促进 BC 培养液中木醋杆菌的生长。

(2) 加入 Hep 可提高 BC 的拉伸强度,但会降低 BC 的膨胀率和透湿性;随着交联剂 EDC/NHS 用量增加,BC/Hep 复合膜的拉伸强度提高,膨胀率与透湿性先有所上升而后下降。

(3) 相比于未加入交联剂的 BC/Hep 复合膜,当 EDC/NHS/Hep-COOH 物质的量之比为 0.4/0.24/1 时,复合膜具有较高的力学性能,其拉伸强度较纯 BC 及未加交联剂的复合膜分别提高了 28.28% 和 15.4%,膨胀率和透湿性接近于纯 BC,分别为 8274% 和 $(814.10 \pm 44.87) \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$,可以作为一种理想的创伤敷料。

参考文献

- [1] 杜天乐,刘东林,景春晖,等. 创伤敷料对促进创面愈合的研究进展[J]. 医学综述,2015,21(6):969-971.
Du Tianle, Liu Donglin, Jing Chunhui, et al. Research progress of wound dressing to promote wound healing[J]. Medical Recapitulate, 2015,21(6):969-971.
- [2] Sulaeva I, Henniges U, Rosenau T, et al. Bacterial cellulose as a material for wound treatment:Properties and modifications.A Review[J]. Biotechnology Advances,2015,33(8):1547-1571.
- [3] 江涛,刘兴太,张国权,等. 新型生物创伤敷料的制备与研究[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志,2011,6(11):925-929.
Jiang Tao, Liu Xingtai, Zhang Guoquan, et al. Preparation and investigation of a novel wound dressing[J]. China Journal of Emergency Resuscitation and Disaster Medicine,2011,6(11):925-929.
- [4] Shah N, Ullislam M, Khattak W A, et al. Overview of bacterial cellulose composites:A multipurpose advanced material[J]. Carbohydrate Polymers,2013,98(2):1585-1598.
- [5] Kucińska-Lipka J, Gubanska I, Janik H. Bacterial cellulose in the field of wound healing and regenerative medicine of skin:Recent trends and future perspectives[J]. Polymer Bulletin,2015,72(9):2399-2419.
- [6] Casu B, Naggi A, Torri G. Re-visiting the structure of heparin[J]. Carbohydrate Research,2015,403:60-68.
- [7] Lever R, Page C P. Non-anticoagulant effects of heparin:An overview[J]. Handbook of Experimental Pharmacology,2012,207(207):281-305.
- [8] Lever R, Mulloy B, Page C P. Heparin - A century of progress[M]. Berlin:Springer,2012.
- [9] Yagmurdu M C, Turk E, Moray G, et al. Effects of heparin on bacterial translocation and gut epithelial apoptosis after burn injury in the rat:Dose-dependent inhibition of the complement cascade[J]. Burns,2005,31(5):603-609.
- [10] Jr M J S. Heparin in the treatment of burns:A review[J]. Burns Journal of the International Society for Burn Injuries,2001,27(4):349-358.
- [11] 陈丹丹,陈袁曦,张雅琴,等. 细菌纤维素/肝素复合物的制备与力学性能[J]. 工程塑料应用,2016,44(8):18-21.
Chen Dandan, Chen Yuanxi, Zhang Yaqin, et al. Preparation and mechanical properties of bacterial cellulose/heparin composites[J]. Engineering Plastics Application,2016,44(8):18-21.
- [12] Wang J, Wan Y, Huang Y. Immobilisation of heparin on bacterial cellulose-chitosan nano-fibres surfaces via the cross-linking technique[J]. Iet Nanobiotechnology,2012,6(2):52-57.
- [13] Yassine F, Bassil N, Chokr A, et al. Two-step formation mechanism of, Acetobacter, cellulosic biofilm:Synthesis of sparse and compact cellulose[J]. Cellulose,2016,23(2):1087-1100.
- [14] Lin W C, Lien C C, Yeh H J, et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications[J]. Carbohydrate Polymers,2013,94(1):603-611.
- [15] Li Y, Jiang H, Zheng W, et al. Bacterial cellulose-hyaluronan nanocomposite biomaterials as wound dressings for severe skin injury repair[J]. Journal of Materials Chemistry B,2015,3(17):3498-3507.
- [16] Lamke L O, Nilsson G E, Reithner H L. The evaporative water loss from burns and the water-vapour permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns[J]. Burns, 1977,3(3):159-165.

帝斯曼将上调 PA6 和 PA66 价格

帝斯曼已于4月1日在全球范围内上调 PA6 和 PA66 产品的价格,涨幅为 1400 元/t。目前,PA66 国内市场报价约在 32000 元/t。

此前,法国索尔维己二腈工厂遭遇不可抗力,该装置产能 52 万 t/a,约占全球总产能的 1/3。1 月份,巴斯夫也宣布其己二胺遭遇不可抗力,且至今未有明确恢复消息。己二腈与己二胺均为 PA66 生产的关键中间体,其产能受限加剧

了 PA66 切片的供给紧张。业内认为,未来即使装置恢复生产,考虑到己二腈行业整体 90% 以上的开工水平,整体供需仍将持续偏紧。由于欧洲的己二腈供给问题已使得兰蒂奇、朗盛等公司宣布降低 PA66 产品供给,行业供需矛盾或对国内进口量产生更大的影响和冲击。

PA66 与 PA6 同属于尼龙家族,广泛应用于制造机械、汽车、化学与电子电气、体育用品、生活用品、医疗器械等。产量在工程塑料中居于首位。
(中国证券网)