

辐射灭菌对壳聚糖管力学性能和生物降解性的影响研究

曹文灵 李 静 井多辉 公衍道 赵南明 张秀芳

(清华大学生物科学与技术系 生物膜与膜生物工程国家重点实验室 北京 100084)

摘要 采用剂量为 25 kGy 的 γ 射线对壳聚糖管进行辐射灭菌,并测试了其体外降解性能、溶胀性能和力学性能。结果表明, γ 射线辐射灭菌明显降低了溶菌酶对壳聚糖管的降解速率和其在水溶液中的溶胀,并显著提高了其拉伸强度和弹性模量。同时,运用傅里叶红外光谱 (FTIR)、X 射线衍射 (XRD) 和差热分析 (DSC) 表征了辐射灭菌前后壳聚糖材料的化学结构和结晶形态,探讨了辐射灭菌对壳聚糖管性能影响的机制。

关键词 壳聚糖管,辐射灭菌,生物降解性,力学性能,神经修复

中图分类号 R817.8, R826.23, O644.2, R318.08

壳聚糖是一种具有良好生物相容性的天然多糖,可生物降解,已在生物医学领域得到广泛的应用^[1]。通过旋转蒸发法和冷冻干燥法可将壳聚糖加工成管^[2,3],应用于组织器官的修复,如外周神经修复、人工血管等。作为植入性的医疗器械,壳聚糖管在使用前需要灭菌。通常的灭菌方法有干热灭菌、蒸汽灭菌、环氧乙烷灭菌和 γ 辐射灭菌。与其他方法相比, γ 辐射灭菌因具有灭菌彻底、操作安全、不污染环境、可对热敏材料灭菌等优点^[4],而适用于壳聚糖材料的灭菌。但 γ 射线照射会引起材料结构和性能的变化,故在使用前需要研究评价。本文以壳聚糖管为研究对象,重点研究了辐射灭菌对壳聚糖管的生物降解性及相关性能的影响。同时,为了探讨辐射对壳聚糖管性能影响的机制,我们对其化学结构和物理形态进行了表征。

1 实验

1.1 设备与材料

^{60}Co γ 射线辐照装置 (北京大学第三附属医院);Spectrum GX 傅里叶红外光谱仪;D8 Advance X 射线衍射仪;KYKY-2000 扫描电子显微镜;SETARAM DSC92 差热分析仪;AG-1 万能材料试验机 (岛津公司)。壳聚糖,脱乙酰度 83.6%,青岛海生生物有限公司;溶菌酶,活性 20000 U/mg, Sigma, 货号 L-6876。其它试剂均为分析纯。

1.2 壳聚糖管的制备和 γ 辐射灭菌

在图 1 所示的模具中加入质量浓度为 2% 的壳聚糖溶液, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冷冻 12 h, 取出模具, 在室温下剥除顶盖、底座和外套, 再将固化的壳聚糖溶液冷冻干燥。然后经脱酸、洗涤、干燥, 即得多孔壳聚糖管。为增加导管的刚性, 在多孔管外壁上均匀涂覆两次壳聚糖溶液, 重复脱酸、洗涤、干燥过程, 最后脱除芯模, 得到壳聚糖管^[3]。最后将壳聚糖管装入塑料包装袋中, 抽除空气后密封。用 γ 射线照射, 辐照剂量率 3.6 kGy/h, 辐照剂量 25 kGy。

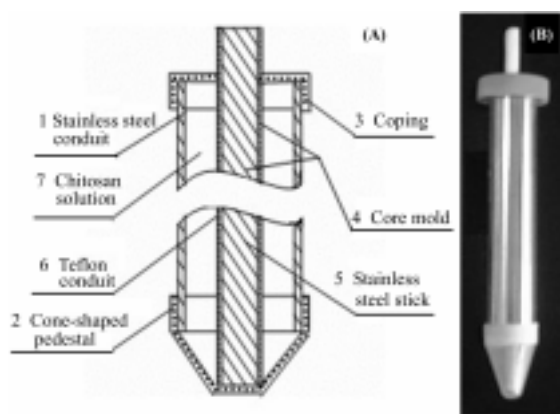


图 1 制备壳聚糖管模具的示意图 (A) 和照片 (B)

Fig. 1 Schematic drawing (A) and photograph (B) of the mold used for preparing chitosan conduits

国家“863”计划项目 (2001AA620506) 和国家“973”计划项目 (G1999064702) 资助

第一作者: 曹文灵, 男, 1976 年出生, 2001 年于重庆大学获得硕士学位, 现为清华大学博士研究生, 从事生物材料研究

通讯作者: 张秀芳, E-mail: zxf-dbs@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2004-07-09, 修回日期: 2004-08-24

1.3 性能测试

精确测量壳聚糖管重量后, 将其放置在磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH=7.4) 中充分溶胀, 12 h 后取出样品, 用滤纸吸除表面水分, 称重, 依下式计算样品的溶胀指数 (SI):

$$SI (\%) = (W_{\text{wet}} - W_{\text{dry}}) / W_{\text{dry}} \times 100\%$$

式中, W_{dry} 和 W_{wet} 分别为溶胀前干管和溶胀后湿管的重量。

将长度为 8 cm、内径为 3 mm 的壳聚糖管放置在 PBS (pH=7.4) 溶液中, 充分溶胀后, 用滤纸吸除表面水分。在导管的两端各插入长度为 2 cm、直径为 3 mm 的不锈钢棒, 固定在夹具上进行拉伸实验, 拉伸速度 10 mm/min, 记录材料的应力-应变曲线, 从而得到壳聚糖管的弹性模量、拉伸强度和断裂伸长率。

将壳聚糖管置于含 4 mg/mL 溶菌酶的 PBS (pH=7.4) 溶液中, 于 37 °C 下降解, 降解液每周更换一次^[5]。分别在 1、3、5、7 周后, 取出样品, 洗涤、冷冻干燥、称重。用扫描电镜观察导管外表

面的形貌, 并按照上述的方法, 测试降解后导管的力学性能, 根据下式计算导管拉伸强度的保持率 (Tensile strength reserve ratio, 简记 TSRR):

$$TSRR (\%) = \sigma_t / \sigma_0 \times 100\%$$

式中, σ_0 和 σ_t 分别为壳聚糖管降解前的拉伸强度和降解到时间 t 的拉伸强度。

1.4 结构表征

取内径为 8 cm 的壳聚糖导管, 纵向切开, 压成片状, 在 650—4000 cm^{-1} 波长范围内采用衰减全反射 (ATR) 模式记录红外 (IR) 光谱, 在 5°—40° 扫描区间内记录 X 射线衍射 (XRD) 图谱。另称取 5—6 mg 样品, 装入差热分析仪的样品盘中, 在氮气 (40 mL/min) 保护下, 从室温以 20 °C/min 的加热速度升温到 200 °C, 记录热流和温度 (DSC) 曲线。

2 结果

2.1 辐射灭菌对壳聚糖管的性能影响

表 1 列出了辐射灭菌前后壳聚糖管的溶胀性能和力学性能。辐照后壳聚糖管的溶胀系数明显减小,

表 1 辐照前后壳聚糖管的溶胀性能和力学性能的比较

Table 1 Swelling and mechanical properties of chitosan conduits before and after irradiation

壳聚糖管 Chitosan conduits	溶胀系数 Swelling index/%	弹性模量 Elastic modulus /MPa ¹⁾	断裂强度 Tensile strength/MPa ¹⁾	断裂伸长率 Breaking elongation/% ¹⁾
辐照前 Nonirradiated	307 ± 56	2.07 ± 0.40	1.67 ± 0.31	87.8 ± 8.7
辐照后 Irradiated	137 ± 28	6.23 ± 0.83	4.29 ± 0.50	67.9 ± 5.7

注: 1) 平均值±方差, $n=3$, 湿态的壳聚糖用于力学性能测试。

1) Mean ± SD, $n=3$, chitosan conduits in wet state were determined.

表明壳聚糖管在水溶液中的溶胀程度降低。辐射灭菌后壳聚糖管的力学强度也发生了很大变化, 弹性模量和断裂强度分别为辐照前的 3.0 和 2.6 倍, 但断裂伸长率下降了 23%。这表明辐射灭菌使其刚性和强度增强, 而韧性有所减弱。本文采用溶菌酶的磷酸盐缓冲溶液模拟体内壳聚糖管的降解。在 7 周的降解实验中, 虽然壳聚糖管的质量没有明显的变化, 但其强度随着降解时间的延长而逐渐降低 (见图 2)。从图 2 中可以看出, 辐射灭菌明显提高了壳聚糖管在溶菌酶溶液中的拉伸强度保持率, 表明辐照使壳聚糖管在溶菌酶中的降解速率减慢, 这可从降解管的外表面形貌进一步证实。图 3 显示了辐照前后壳聚糖管被溶菌酶降解 49 d 后的表面形貌。与未辐照的壳聚糖管相比, 经辐射灭菌的壳聚糖管表面较平整, 降解孔洞较少。

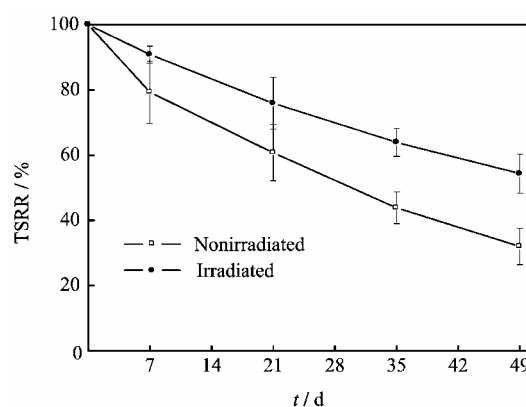


图 2 辐照和未辐照壳聚糖管在溶菌酶溶液中降解时的强度保持曲线 (平均值 ± 方差, $n=3$)

Fig. 2 Tensile strength reserve ratio curves of nonirradiated and irradiated chitosan conduits after degradation by lysozyme (Mean ± SD, $n=3$)

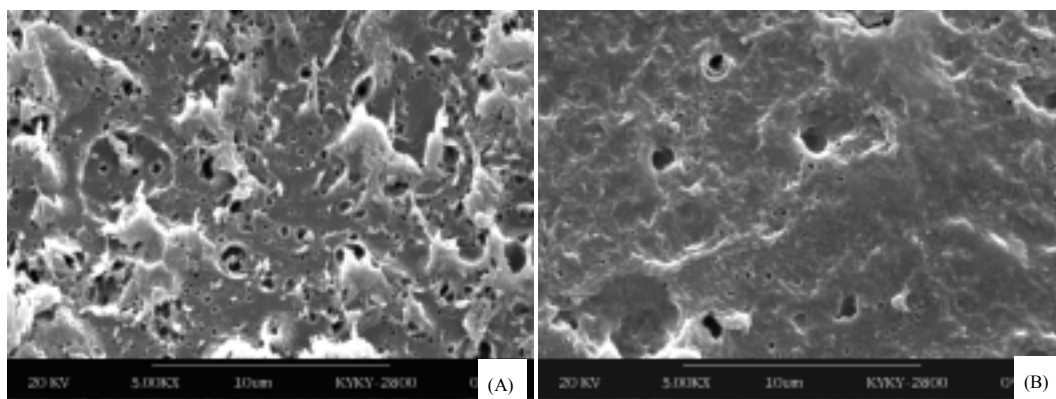


图3 未辐照(A)和辐照壳聚糖管(B)在溶菌酶中降解49 d后的外管壁扫描电镜图(放大倍数:5000倍;标尺:10 μm)

Fig. 3 SEM images of the outer wall of nonirradiated (A) and irradiated (B) chitosan conduits after degradation by lysozyme for 49 days (Magnification: 5000X; Bar:10 μm)

2.2 辐射灭菌对壳聚糖材料结构的影响

壳聚糖的IR谱图(图4)中3450—3200 cm^{-1} 处的吸收峰是—OH的特征吸收。由于壳聚糖管中的—OH大多以缔合形式存在,所以此吸收峰很宽。从强度上分析, γ 射线照射并没有对—OH造成显著影响。1575 cm^{-1} 处的吸收峰由—NH₂的对称弯曲振动引起,此峰的强度在辐照前后变化不大,表明—NH₂的数量基本没有改变。图5是辐照前后壳聚糖管的XRD图。辐照后壳聚糖管原有的衍射峰消失,在30°附近出现了两个细小的衍射峰,这表明其结晶形态发生了明显变化。图6为壳聚糖管在辐照前后的DSC曲线。壳聚糖易吸水,普通的干燥方法不能彻底去除壳聚糖材料中的结合水,这些结合水参与壳聚糖分子的结晶,从而使其DSC曲线出现很宽的熔融峰。辐照后壳聚糖管的DSC曲线形状发生明显的改变,熔融峰的位置移向高位,峰的面积增大,这再一次表明辐照后壳聚糖管的结晶形态发生了变化。

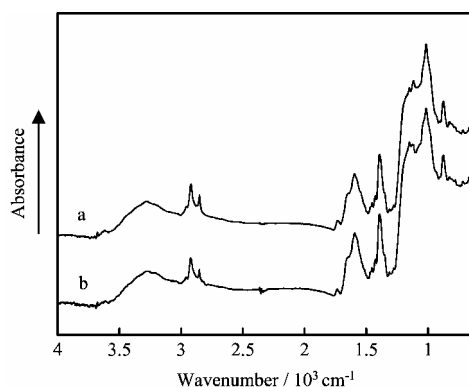


图4 未辐照(a)和辐照壳聚糖管(b)的FTIR图

Fig. 4 FTIR spectra of nonirradiated (a) and irradiated (b) chitosan conduits

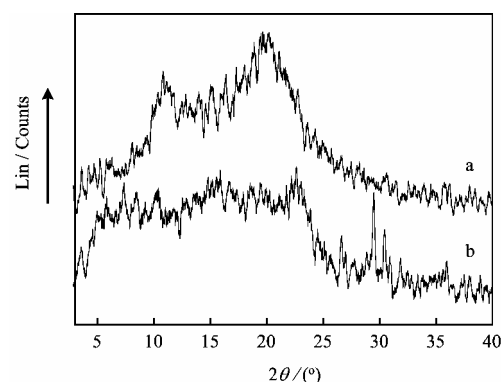


图5 未辐照(a)和辐照壳聚糖管(b)的XRD图

Fig. 5 XRD patterns of nonirradiated (a) and irradiated (b) chitosan conduits

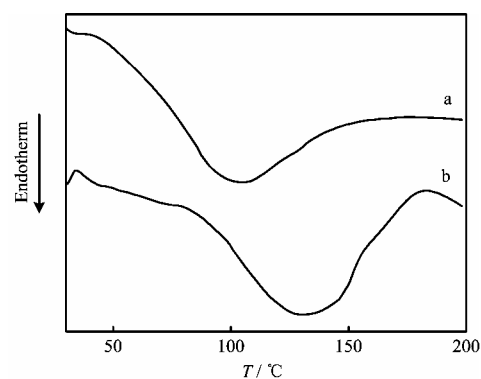


图6 未辐照(a)和辐照壳聚糖管(b)的DSC曲线

Fig. 6 DSC curves of nonirradiated (a) and irradiated (b) chitosan conduits

3 讨论

在 γ 射线的照射下,壳聚糖分子发生了自由基反应^[8]。C₁或C₄位上的自由基反应会导致连接结构单元的 β -1,4糖苷键的断裂,引起壳聚糖分子的

降解,其他位置的自由基反应会引起功能基团的变化。同时,自由基链的结合会导致壳聚糖分子的交联。这些反应的发生程度与照射的环境和照射的剂量有关。空气中氧气、水蒸气的存在,会加速壳聚糖的辐射降解^[6],所以本研究采用真空包装后再进行辐照的方法。辐射降解随着照射剂量的增加而逐渐增大,而辐射交联和官能团的变化则主要在高剂量下发生^[8]。对于辐照剂量的选择,我们采用国际通用的 25 kGy 的灭菌剂量进行辐照。Lim 等人^[7]通过测定壳聚糖的粘均分子量发现,经 25 kGy γ 射线照射后壳聚糖的分子量有所降低,说明壳聚糖分子发生了降解;而在同样剂量下,壳聚糖分子的交联却很少发生,可以忽略^[8]。此外,本文的 IR 谱图显示,经 25 kGy 的剂量照射后壳聚糖分子中的 NH_2 和 OH 的含量没有明显变化。

辐射灭菌除了影响壳聚糖分子的化学结构外,还影响壳聚糖管的结晶形态。在 γ 射线照射后壳聚糖管中原有的大尺寸结晶被破坏,形成了许多细小微晶。另外,由于部分壳聚糖分子在辐照过程中降解,导致了分子链的结构发生变化,从而影响分子间的相互作用和聚集形态。降解形成的短链分子具有较高的运动自由度,在高能射线的作用下,形成更多的规整结晶区。通常在材料结晶形态相近时,可以采用 XRD 图中结晶区和非晶区的面积来测定壳聚糖膜的结晶度。但图 5 显示,辐照后壳聚糖管的结晶形态发生显著变化。并且辐照后产生的微晶尺寸太小,X 射线衍射无法检测到^[9],因此,本文采用 DSC 测定熔融热焓的方法来定性评价壳聚糖材料的结晶度^[10]。辐照后壳聚糖管的 DSC 曲线形状发生明显的改变,熔融温度升高,熔融峰的面积增大,熔融热焓增大,这表明辐照后其结晶度增大。对此可通过分析材料的溶胀性能来进一步证实。

壳聚糖材料在水溶液中的溶胀是指水分子浸入材料内部,与材料的亲水基团结合。壳聚糖材料中亲水基团的含量和材料的结晶度是影响溶胀的两个重要因素。亲水基团含量的减少,或结晶度的增大,都会引起溶胀系数的降低。IR 谱图分析表明,辐照后壳聚糖分子中的氨基、羟基等亲水基团的数量并没有显著变化。这表明辐照壳聚糖管溶胀系数的降低是由结晶度的增大而引起的。

干态的壳聚糖管具有较高的刚性和强度,但在水溶液中溶胀后,水分子浸入材料内部充当增塑剂,使材料的强度下降。材料的溶胀程度越大,其强度的下降越大。辐照后,壳聚糖管的溶胀程度降低,从而使其表现出比未辐照壳聚糖管更高的弹性模量和断裂强度。溶菌酶是降解壳聚糖的主要酶类,它

的活性位点与壳聚糖分子中的乙酰基葡萄糖胺结构单元结合从而使材料降解,分子量降低^[11]。随着降解程度的加深,低分子量的降解物开始溶出,材料表面出现许多细小的孔洞。在降解初期,虽然溶出的降解物质量很少,壳聚糖管的质量基本保持不变,但细小孔洞的出现和分子量的降低使材料的强度明显下降。壳聚糖材料中的晶区能阻止溶菌酶溶液的浸入,减少了溶菌酶分子与底物的结合,从而使其降解速度减慢。辐照灭菌后,虽然壳聚糖分子的分子量有所降低,但是壳聚糖材料的结晶度增大。结晶度增大,材料中的结晶区增多,从而使辐射灭菌后的壳聚糖管在溶菌酶溶液中的降解速度低于未照射的样品。

对于用于组织器官修复的壳聚糖管而言,其主要的性能有生物活性、力学性能和生物降解性能。许多研究表明^[1],壳聚糖材料的氨基含量(或脱乙酰度)决定其生物活性。辐照后,材料的氨基含量并没有变化,说明辐射灭菌并没有引起其生物活性的降低。辐照后,壳聚糖管的强度和弹性模量增大,降解速度明显下降,在许多情况下这有利于其在体内的使用。例如,在神经修复中,神经导管为损伤神经生长提供通道,需要抵抗肌肉的挤压,保持管形,较高的刚性和强度保证了这些功能的实现。虽然辐照后的壳聚糖管断裂伸长率有所下降,但这并不妨碍神经导管的使用,因为 67.9%的伸长率远远超过在正常情况下肌体可能出现的应变。材料的降解速度应与组织的修复速度一致,辐照后,壳聚糖管降解速度降低,因此可用于所需时间较长的大段组织缺损的修复。

4 结论

γ 辐射灭菌会引起壳聚糖分子量的降低和结晶形态的改变,从而使材料强度提高、降解速度降低。这些性能也可在壳聚糖管制备前通过选择不同脱乙酰度或不同分子量的原料来调节^[1,10,11]。

参考文献

- 1 Khor E, Lim LY. Biomater, 2003, 24(13): 2339—2249
- 2 LI Jianchun, ZHONG Yinghui, GONG Yandao, *et al.* Tsinghua Science and Technology (in China), 1999, 4(3): 1515—1518
- 3 张秀芳, 曹文灵, 公衍道, 等. 中国专利, 02149086.4, 2001
ZHANG Xiufang, CAO Wenling, GONG Yandao, *et al.* Chinese Patent, 02149086.4, 2001
- 4 朱南康, 王春雷, 滕维芳. 核技术, 2003, 26(3):

- 190—196
- ZHU Nankang, WANG Chunlei, TENG Weifang. Nucl Tech, 2003, **26**(3):190—196
- 5 Kenji T, Yoshito I. Biomater, 1997, **18** (7): 567—575
- 6 方月娥, 余大斌, 周日生, 等. 核技术, 1997, **20**(4): 226—229
- FANG Yue'e, YU Dabin, ZHOU Risheng, *et al.* Nucl Tech, 1997, **20**(4): 226—229
- 7 Lim LY, Khor E, Kool O. J Biomed Mater Res, 1998, **43**(3): 282—290
- 8 Rosiak J, Ulanski P, Kucharska M, *et al.* J Radioanal Nucl Chem, 1992, **159** (1): 87—96
- 9 Kesting R E. Synthetic polymer membranes. New York: McGraw-Hill Book Comp, 1971. 23—24
- 10 Chen R H, Hwa H D. Carbohydr Polym, 1996, **29** (4): 353—358
- 11 Sashiwa H, Saimoto H, Shigemasa Y, *et al.* Int J Biol Macromol, 1990, **12** (6): 295—296

Influence of irradiation sterilization on mechanical properties and biodegradability of chitosan conduits

CAO Wenling LI Jing JING Duohui GONG Yandao ZHAO Nanming ZHANG Xiufang

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract Chitosan conduits were sterilized with ^{60}Co γ ray irradiation at a dose of 25 kGy and their swelling properties, mechanical properties and biodegradability in lysozyme solution were measured. After γ ray irradiation, the swelling index of chitosan conduit was considerably reduced and the tensile strength and elastic modulus were markedly increased. The results from SEM and measurement of mechanical properties showed that the degradation rate of the irradiated conduits in lysozyme solution was lower than that of the nonirradiated conduits. In addition, the chitosan conduits were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD) and differential scanning calorimeter (DSC), and the influence mechanism of irradiation sterilization on the properties of chitosan conduits was explored.

Key words Chitosan conduit, Irradiation sterilization, Biodegradation, Mechanical property, Nerve repair

CLC R817.8, R826.23, O644.2, R318.08