



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103505759 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 15

(21) 申请号 201310277222. 3

(22) 申请日 2013. 07. 04

(71) 申请人 四川大学

地址 610065 四川省成都市武侯区一环路南一段 24 号

(72) 发明人 但年华 但卫华 肖世维 陈娇
陈一宁

(51) Int. Cl.

A61L 15/32(2006. 01)

A61L 15/20(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种用环氧季铵盐对胶原进行改性的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用环氧季铵盐对胶原进行改性的方法,其特点是采用环氧季铵盐与胶原反应,制备出季铵盐型胶原,从而使胶原具有更好的亲水性和一定的抗菌性能;将一定比例的胶原和环氧季铵盐在 0~45℃下反应 1~24h,然后水洗;加入 0.1~2 重量份的氨基酸在 0~45℃下反应 0.5~1h,然后水洗;再加入 0.5~3.5 重量份的酸或酸性盐,调节 pH 至 6.5~7.5;最后加入 100~500 重量份的水,在 0~45℃下水洗 6 次,每次 10~30min。

1. 一种用环氧季铵盐对胶原进行改性的方法,其特征是称取 50~200 重量份的水,将其 pH 调节至 7.0~10.5,加入 100 重量份的胶原,将温度调节至 0~45℃,搅拌 10~30min;然后加入 1~20 重量份的环氧季铵盐,反应 1~24h 后,弃去废液;加入 100~500 重量份的水,在 0~45℃下水洗 10~30min,弃去水洗废液;加入 50~200 重量份的水,将温度调节至 0~45℃,再加入 0.1~2 重量份的氨基酸,反应 0.5~1h,弃去废液;加入 100~500 重量份的水,将温度调节至 0~30℃下水洗 10~30min;再加入 100~200 重量份的水,将温度调节至 0~30℃,加入 0.5~3.5 重量份的酸或酸性盐,调节 pH 至 6.5~7.5,弃去废液;最后加入 100~500 重量份的水,在 0~45℃下水洗 6 次,每次 10~30min。

2. 根据权利要求 1 所述的用环氧季铵盐对胶原进行改性的方法,其中所述的将其 pH 值调节为 7.0~10.5,该 pH 是通过使用 NaOH-NaHCO₃ 缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、硼酸-硼砂缓冲溶液达到的;或者使用氢氧化钠、纯碱调节而得的。

3. 根据权利要求 1 所述的用环氧季铵盐对胶原进行改性的方法,其中所述的环氧季铵盐,是指 2-环氧基丙基三烷基季铵盐和环氧基有机硅季铵盐。

4. 根据权利要求 1 所述的用环氧季铵盐对胶原进行改性的方法,其中所述的氨基酸,是指甘氨酸、赖氨酸和组氨酸。

5. 根据权利要求 1 所述的用环氧季铵盐对胶原进行改性的方法,其中所述的酸或酸性盐是指甲酸、盐酸、乳酸、硫酸铵和氯化铵。

一种用环氧季铵盐对胶原进行改性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用环氧季铵盐对胶原进行改性的方法。属于医用生物材料领域。

背景技术

[0002] 胶原是组成结缔组织的主要结构蛋白,在哺乳动物中约占总蛋白质的 1/ 3,广泛存在于动物皮肤、骨、软骨、肌腱、韧带和血管壁等之中,以三维网络的胶原纤维形式存在。胶原具有低的免疫原性、低刺激性、低细胞毒性、良好的生物相容性、良好的促进细胞生长的性能以及生物可降解性等诸多优点,在生物医学领域的应用日益广泛。

[0003] 由于胶原本身不具备抗菌 / 抑菌的性能。当胶原用作生物敷料等时,由于伤口是温暖而且潮湿的环境,细菌在伤口上繁殖增快,特别是一些清创不彻底或难以彻底的伤口,细菌有可能会增加,加重病情,同时也容易在病区内交叉感染。

[0004] 抗生素曾经在一段时间内,使用比较普遍。但细菌对抗生素容易产生抵抗力,产生抗药性,使抗生素作用效果越来越不明显。目前使用最为普遍的是含银抗菌敷料。银作为烧伤创面外用用药已有几十年历史,包括硝酸银、磺胺嘧啶银和纳米银。在使用硝酸银时,由于银很快离子化,与人体中的半胱氨酸反应形成硫化银沉淀。而使用磺胺嘧啶银时,10% 的银可以被人体吸收,高度血管化伤口的吸收会更高。在应用过程中,以离子形式存在的银离子被体内吸收的量会随用药面积增加而增加,会导致累积毒性。此外,在伤口上使用含银医用敷料,随着银离子从敷料上进入伤口,在光照下形成黑色的硫化银沉淀,这种银质沉着影响了病人的美观。随着纳米技术的兴起,纳米银粒子被应用于敷料。黄桂娟等(黄桂娟,景红霞,夏栋林,等. 纳米银猪脱细胞真皮敷料的细胞毒性评估. 中国组织工程研究与临床康复. 2010, 14(25):4607-4610)对纳米银猪脱细胞真皮敷料的细胞毒性实验证明,其细胞毒性为 I 级。陈炯等(陈炯, 韩春茂,林小玮,等. 纳米银敷料在修复 II 度烧伤创面的应用研究. 中华外科杂志. 2006, 44(1):50-52)将纳米银敷料用于小面积 II 度烧伤创面,银代谢在安全范围,但有部分患者出现肝功能异常的现象。熊玲等(熊玲,蒋学华,陈亮,等. 不同粒径银粒子的体外细胞毒性比较. 中国生物医学工程学报. 2007, 26(4):600-604)发现,粒径不同银粒子的体外细胞毒性有较大差异,同等剂量下,纳米银粒子比粒径较大的微米级银粒子的体外细胞毒性更大。纳米银敷料用于创面时能迅速入血,通过血液循环分布于肝、肾、脾等脏器;移除敷料后,迅速下降至正常。由于纳米银颗粒尺寸小,只比 Ag^+ 大一两个数量级,从理论上讲,完全有可能直接越过某些血 - 组织屏障而进入特定器官(如脑、睾丸等)。纳米银粒子可能的潜在威胁正在被人们重视。

[0005] 季铵盐化合物能吸附带负电荷的细菌,具有良好的杀菌作用,在国际上广泛使用。季铵盐若以游离态存在,毒性相对较大,刺激性也强,易洗脱,且易在人体表面逐渐富集,长期使用易产生病变。有机硅季铵盐抗菌剂对金色葡萄球菌、大肠杆菌和白色珠球菌 24h 后的抑菌率分别达到 98. 12%、96. 86%、95. 14%,能有效抑制革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、酵母菌和真菌,显示广谱抗菌效果和较高抗菌率性能。对人体和皮肤无刺激和致癌作用,亚急性毒性、致突变性、促畸形性、粘膜刺激性试验,都充分认定其安全性和耐久性。尽管季铵盐具

有良好的抗菌性能,被广泛应用到纺织、塑料等行业,但将其用于胶原改性的研究资料比较少。

[0006] 含银抗菌剂之所以可能存在潜在的生物相容性安全危机,完全是由于含银抗菌材料只是以物理吸附或较弱的化学作用与材料复合,在与潮湿的伤口接触后,导致银离子或粒子容易从材料上脱落,通过体液循环遍布全身。而避免这种现象的根本办法,就是将抗菌物质牢固地绑定到材料上。也就是将抗菌物质接枝到胶原上,通过化学键的作用,使两者相互联合形成一个不可分割的整体,从而得到一种新型的具有抗菌功能的新材料。

[0007] 环氧季铵盐具有较高的化学活泼性,环氧基中电荷的极化和环氧环张力的存在,使得环氧基具有极高的反应活性,易与胶原中的胺基、酚羟基、羧基、巯基等发生反应。从而使季铵盐接枝到胶原上,制备出含有季铵基的胶原材料。当胶原中引入季铵盐成分后,不仅具有良好的抗菌性能,而且季铵盐还能赋予材料良好的湿润性能,从而有利于防止伤口感染,促进伤口愈合。在创伤修复等医用领域,季铵盐改性后的胶原将发挥更加重要的作用。

发明内容

[0008] 本发明是针对胶原在抗菌/抑菌方面的不足而设计的,它克服了没有反应活性的抗菌剂不能与胶原形成稳定结合,抗菌剂容易产生迁移的缺点。通过环氧基与胶原活性基团的反应,将季铵盐引入到胶原中。从而赋予胶原一定的抗菌/抑菌性能,并进一步改善其亲水性能。

[0009] 本发明的目的是由以下技术措施来实现的:

称取 50~200 重量份的水,将其 pH 调节至 7.0~10.5,加入 100 重量份的胶原,将温度调节至 0~45℃,搅拌 10~30min;然后加入 1~20 重量份的环氧季铵盐,反应 1~24h 后,弃去废液;加入 100~500 重量份的水,在 0~45℃ 下水洗 10~30min,弃去水洗废液;加入 50~200 重量份的水,将温度调节至 0~45℃,再加入 0.1~2 重量份的氨基酸,反应 0.5~1h,弃去废液;加入 100~500 重量份的水,将温度调节至 0~30℃ 下水洗 10~30min;再加入 100~200 重量份的水,将温度调节至 0~30℃,加入 0.5~3.5 重量份的酸或酸性盐,调节 pH 至 6.5~7.5,弃去废液;最后加入 100~500 重量份的水,在 0~45℃ 下水洗 6 次,每次 10~30min。

[0010] 根据权利要求 1 所述的用环氧季铵盐对胶原进行改性的方法,其中所述的将其 pH 值调节为 7.0~10.5,该 pH 是通过使用 NaOH-NaHCO₃ 缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、硼酸-硼砂缓冲溶液达到的;或者使用氢氧化钠、纯碱调节而得的。

[0011] 环氧季铵盐对皮胶原进行改性的方法,其中所述的环氧季铵盐,是指 2-环氧基丙基三烷基季铵盐和环氧基有机硅季铵盐。

[0012] 用环氧季铵盐对皮胶原进行改性的方法,其中所述的氨基酸,是指甘氨酸、赖氨酸和组氨酸。

[0013] 用环氧季铵盐对皮胶原进行改性的方法,其中所述的酸或酸性盐是指甲酸、盐酸、乳酸、硫酸铵和氯化铵。

[0014] 本发明所使用的试剂均为市售商品。

[0015] 本发明具有以下优点:

(1) 结合稳定

环氧季铵盐中含有环氧基,能够与胶原中的氨基、羧基、羟基等基团发生反应,形成共

价键,从而稳定地结合到胶原分子中。与物理吸附相比,具有更强的结合性,从而克服物理吸附容易迁移的缺陷;

(2) 环氧季铵盐水溶性好

环氧基亲水性不高,不含季铵基团的环氧化合物,有些是油溶性的,不溶于水,若采用有机溶剂,则可能产生有机溶剂残留,对生物相容性产生不利影响。环氧季铵盐由于含有季铵基团,因而具有很好的水溶性,可以以水为溶剂,方便进行改性;

(3) 环氧基残留低

后期采用氨基酸处理,使残留的环氧季铵与氨基反应,除去可能残留的环氧基。由于季铵盐水溶性好,与清洗相结合,可以基本除尽残留的环氧季铵盐;

(4) 产品亲水保湿性好

通过环氧季铵盐改性后的胶原,引入了羟基和季铵基团,因而提高了胶原的亲水性能,提高了材料的保湿性;

(5) 适用范围广

本方法可以适用于含有氨基等活性基团产品的改性,可以广泛应用于生物医学材料。

[0016] 具体实施方式

下面通过实施对本发明进行具体的描述,有必要在此指出的是本实施例只用于对本发明进行进一步说明,而不能理解为对本发明保护范围的限制,该领域的技术熟练人员可以根据上述发明的内容作出一些非本质的改进和调整。

[0017] 应用实例 1

用该方法改性脱细胞猪真皮基质,可在小型不锈钢转鼓中进行,包括以下步骤:

(1) NaHCO₃-NaOH 缓冲液(pH 值 10.0)的配制

A 液:0.05mol/L NaHCO₃ 溶液(4.2g NaHCO₃ 溶解于蒸馏水并稀释至 1000 ml);B 液:0.10mol/L NaOH 溶液(4.0g NaOH 溶解于蒸馏水并稀释至 1000 ml);将二者按 A (ml):B(ml)=500:107 混合即得;

(2) 改性

①. 技术规定:内温:42℃;脱细胞猪真皮基质 100 重量份;pH 值为 10.0 的 NaOH-Na₂CO₃ 缓冲溶液 50 重量份;2-环氧丙基十二烷基二甲基氯化铵 5 重量份;

②. 操作方法:按规定调好液比、内温,将脱细胞猪真皮基质放于转鼓中,然后加入,环氧丙基十二烷基二甲基氯化铵,转动 10h。弃去废液;

(3) 水洗

加入温度为 37℃的蒸馏水 150 重量份,洗涤 30min。弃去废液;

(4) 氨基酸处理

①. 技术规定:在以上废液中进行。温度:42℃,赖氨酸 1.0 重量份

②. 操作方法:在加入赖氨酸,处理 1h,弃去废液;

(5) 水洗

加入温度为 37℃的蒸馏水 200 重量份,洗涤 30min。弃去废液;

(6) 脱碱

①. 技术规定:温度:37℃;蒸馏水 100~300%;氯化铵 2.5 重量份;

②. 操作方法:将加入规定的蒸馏水,调节至要求的温度,加入氯化铵处理 60min,此时 pH 值接近中性。弃去废液;

(7) 洗涤

①. 技术规定:温度:37℃;注射水 300 重量份;

②. 操作方法:加入注射水,调节至要求的温度,转动 30min,排去废液;

(8) 洗涤

重复(6)的操作 2 次;

(9) 冷冻干燥

将已改性的脱细胞猪真皮基质冷冻干燥。

[0018] 应用实例 2

用该方法改性胶原的工艺,可在带搅拌的容器中进行,包括以下步骤:

(1) pH8.4 硼酸-硼砂缓冲溶液的配制

A 液:0.2mol/L 硼酸溶液(H_3BO_3 12.4g 加蒸馏水溶解并稀释至 1000ml)。B 液:0.05mol/L 硼砂溶液($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 19.1g 加蒸馏水溶解并稀释至 1000ml)。将二者按 A (ml):B(ml)=55:45 混合即得;

(2) 改性

①. 技术规定:内温:3℃;胶原 100 重量份;硼酸-硼砂缓冲溶液 200 重量份;2-环氧丙基十六烷基二甲基氯化铵 20 重量份;

②. 操作方法:按规定调好液比、内温,将胶原放入容器中,然后加入 2-环氧丙基十六烷基二甲基氯化铵,转动 4h。弃去废液;

(3) 水洗

加入温度为 2℃的蒸馏水 200 重量份,洗涤 30min。弃去废液;

(4) 氨基酸处理

①. 技术规定:在以上废液中进行。温度:3℃,甘氨酸 1.0 重量份

②. 操作方法:在加入甘氨酸,处理 30min。弃去废液;

(5) 水洗

加入温度为 2℃的蒸馏水 200 重量份,洗涤 30min。弃去废液;

(6) 脱碱

①. 技术规定:温度:2℃;蒸馏水 100~300%;硫酸铵 3.5 重量份;

②. 操作方法:将加入规定的蒸馏水,调节至要求的温度,加入硫酸铵处理 60min。弃去废液;

(7) 洗涤

①. 技术规定:温度:3℃;注射水 100 重量份;

②. 操作方法:加入注射水,调节至要求的温度,转动 30min。排去废液;

(8) 洗涤

重复(6)的操作 2 次;

(9) 冷冻干燥

将已改性的胶原冷冻干燥。

[0019] 应用实例 3

用该方法改性牛心包的工艺,可在带搅拌的容器中进行,包括以下步骤:

(1) NaHCO_3 - NaOH 缓冲液(pH 值 10.5)的配制

A 液:0.05mol/L NaHCO_3 溶液(4.2g NaHCO_3 溶解于蒸馏水并稀释至 1000 ml);B 液:0.10mol/L NaOH 溶液(4.0g NaOH 溶解于蒸馏水并稀释至 1000 ml);将二者按 A (ml):B(ml)=500:50 混合即得 pH10.5 的缓冲液。将二者按 A (ml):B(ml)=500:178 混合即得 pH10.5 的缓冲液;

①. 技术规定:内温:25℃;牛心包 100 重量份;硼酸-硼砂缓冲溶液 200 重量份;二乙基-2,3-环氧丙基-[3-(甲基二甲氧基)]硅丙基氯化铵 20 重量份;

②. 操作方法:按规定调好液比、内温,将胶原放入容器中,然后加入 2-环氧丙基十六烷基二甲基氯化铵,转动 4h。弃去废液;

(3) 水洗

加入温度为 25℃的蒸馏水 200 重量份,洗涤 30min。弃去废液;

(4) 氨基酸处理

①. 技术规定:在以上废液中进行。温度:25℃,甘氨酸 1.0 重量份

②. 操作方法:在加入甘氨酸,处理 30min。弃去废液;

(5) 水洗

加入温度为 25℃的蒸馏水 200 重量份,洗涤 30min。弃去废液;

(6) 脱碱

①. 技术规定:温度:20℃;蒸馏水 100~300%;硫酸铵 3.5 重量份;

②. 操作方法:将加入规定的蒸馏水,调节至要求的温度,加入硫酸铵处理 60min。弃去废液;

(7) 洗涤

①. 技术规定:温度:25℃;注射水 100 重量份;

②. 操作方法:加入注射水,调节至要求的温度,转动 30min。排去废液;

(8) 洗涤

重复(6)的操作 2 次;

(9) 冷冻干燥

将已改性的牛心包冷冻干燥。