



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108691028 B

(45)授权公告日 2019.07.23

(21)申请号 201810523902.1

D01D 1/02(2006.01)

(22)申请日 2018.05.28

D01D 5/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61L 27/48(2006.01)

申请公布号 CN 108691028 A

A61L 27/58(2006.01)

A61L 27/50(2006.01)

(43)申请公布日 2018.10.23

审查员 韩佩

(73)专利权人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山
武汉大学

(72)发明人 陈云 张强 赵亚楠 陈飞翔

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222

代理人 彭劲松

(51)Int.Cl.

D01F 8/02(2006.01)

D01F 8/14(2006.01)

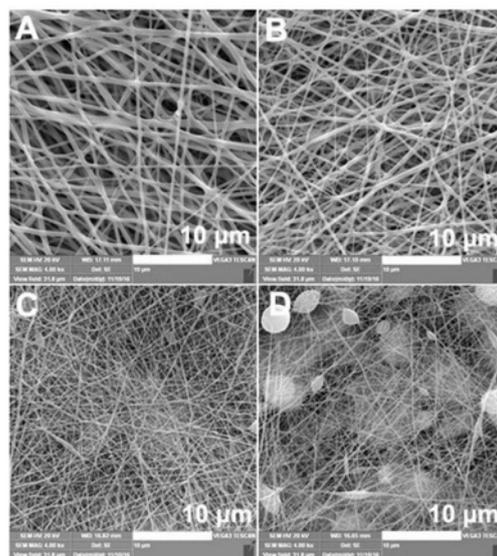
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维的
制备方法和得到的纳米纤维及应用

(57)摘要

本发明公开了一种聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维的制备方法和得到的纳米纤维及应用。属于生物医用材料领域。本发明包括：将聚乳酸和大豆分离蛋白颗粒分别溶于六氟异丙醇中，经不同时间溶解后，获得均匀的聚乳酸溶液和大豆分离蛋白溶液；将聚乳酸溶液和大豆分离蛋白溶液均匀混合，然后通过静电纺丝过程制备不同配比的聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维，又通过改变接收器的转速，制备不同排列形式的复合纳米纤维。该方法操作简单，实施条件温和，在常规温度和湿度下即可进行。所得聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维的直径可调、纤维排列形式可调、降解性能可控且生物相容性较好，可以广泛用于生物医学领域。



1. 一种静电纺丝制备聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1)原料准备:

按质量份数,分别称取聚乳酸颗粒8份、大豆分离蛋白粉末2份、六氟异丙醇170份;

2)纺丝液的制备

a、将所称取的聚乳酸颗粒加入到六氟异丙醇中,室温搅拌溶解1天,制备成质量分数为10 wt%的聚乳酸溶液;

b、将所称取的大豆分离蛋白粉末加入到六氟异丙醇中,室温搅拌溶解2周,制备成质量分数为2 wt%的大豆分离蛋白溶液;

c、分别将聚乳酸溶液和大豆分离蛋白溶液按照80:20或60:40或40:60的质量比混合,室温搅拌1天,即可得聚乳酸/大豆分离蛋白复合纺丝液;

3)静电纺丝制备聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维

将上述复合纺丝液加入到静电纺丝设备的注射器中,安装到微量注射泵上,调节微量注射泵的推进速度、自制滚筒接收器的转速,喷射距离,启动高压直流电源,即可得到聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维。

2. 根据权利要求1所述的静电纺丝制备聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维的方法,其特征在于,所述的聚乳酸的平均分子量为10万、特征粘度范围为0.7-1.0 dL/g。

3. 根据权利要求1或2所述的静电纺丝制备聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维的方法,其特征在于,步骤3)中自制滚筒接收器宽度:5 cm,外径:25 cm,喷射距离是注射器针头顶端与滚筒接收器边缘之间的最短直线距离。

4. 根据权利要求3所述的静电纺丝制备聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维的方法,其特征在于,所述静电纺丝的主要工艺参数如下:

电压:12 kV;

注射器喷头到滚筒接收器的距离:11 cm;

注射泵的推进速度:1.2 mL/h;

滚筒接收器的转速:0-1500 rpm;

相对湿度:50%。

5. 权利要求1、2或4所述的方法得到的聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维,其特征在于,所述纳米纤维的纤维直径为201-493 nm。

6. 权利要求5所述的聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维作为细胞支架和组织工程支架的应用。

一种聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维的制备方法和得到的纳米纤维及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医用材料领域,具体涉及一种静电纺丝制备聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维的方法和得到的纳米纤维及应用。

背景技术

[0002] 组织工程领域的发展加速了生物相容性和生物降解支架材料的需求。作为一种来源于可再生资源的热塑性聚酯材料,聚乳酸因具有较好的可加工性、适宜的生物降解性以及特殊的生物学活性而被广泛应用于生物医用材料领域。然而由于较差的亲水性、较慢的降解性及欠佳的生物活性,聚乳酸生物材料的进一步应用受到了限制。为了解决聚乳酸生物材料的这些不足,研究人员已经采用添加天然活性高分子的方法改性聚乳酸生物材料,如壳聚糖、丝素、玉米蛋白、胶原蛋白和大豆分离蛋白。其中,大豆分离蛋白是一种天然植物蛋白,它不仅含量丰富、价格低廉,还含有较多的活性功能基团。目前,大豆分离蛋白已经被广泛的用于抗菌成分、活性包装袋、粘附剂、药物缓释系统和组织工程支架等领域。这些应用表明大豆分离蛋白是一类具有多功能、高性能的生物材料。基于大豆分离蛋白的上述优点,用大豆分离蛋白改性聚乳酸生物材料,不仅能够保留聚乳酸生物材料的优点,同时还能弥补其不足,大大扩展了聚乳酸和大豆分离蛋白在生物医学领域的应用范围。

[0003] 聚乳酸不溶于水,溶于大多有机溶剂,如氯仿、二氯甲烷、六氟异丙醇和 1,4-二恶烷等(Gorey,Zou,Zhang,Ferreira)。大豆分离蛋白不溶于大多有机溶剂,微溶于水,少量溶于某些有机溶剂,大量溶于酸或碱溶液中,如甲酸、氢氧化钠 / 尿素溶液等(Zhang,Chen,Mendes)。以前的研究通常采用酸或碱溶液溶解大豆分离蛋白,而很少有报道使用有机溶剂。为了制备聚乳酸/大豆分离蛋白复合材料,有研究采用添加亚硫酸氢钠的方法在高温下经混合,热挤出制备复合材料,虽然能成功制备出聚乳酸/大豆分离蛋白复合材料,但高温处理以及亚硫酸氢钠的加入破坏了大豆分离蛋白的原有结构。也有研究添加增融剂实现聚乳酸和大豆分离蛋白混合制备复合材料,但这种方法制备的复合材料易碎且表面较粗糙。

发明内容

[0004] 为解决上述问题,本发明以六氟异丙醇作为聚乳酸和大豆分离蛋白的共溶剂,利用静电纺丝技术制备聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维,通过调节聚乳酸溶液和大豆分离蛋白溶液的配比,实现了复合纳米纤维的直径可调、通过调节滚筒接收器的旋转速度,实现了复合纳米纤维的排列形式可调。其工艺控制简单、纺丝液的可纺性较好。可以广泛用于生物医学领域。

[0005] 为实现上述目的本发明采用如下技术方案:

[0006] 第一方面,本发明提供一种静电纺丝制备聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维的方法,包括以下步骤:

[0007] 1) 原料准备:

[0008] 按质量份数,分别称取聚乳酸颗粒(博立生物材料有限公司,深圳,中国)8份、大豆分离蛋白粉末(杜邦漯河蛋白有限公司,漯河,中国)2份、六氟异丙醇(广东翁江化学试剂有限公司,广东,中国)170份;

[0009] 2) 纺丝液的制备

[0010] a、将所称取的聚乳酸颗粒加入到六氟异丙醇中,室温搅拌溶解1天,制备成质量分数为10wt%的聚乳酸溶液;

[0011] b、将所称取的大豆分离蛋白粉末加入到六氟异丙醇中,室温搅拌溶解2周,制备成质量分数为2wt%的大豆分离蛋白溶液;

[0012] c、分别将聚乳酸溶液和大豆分离蛋白溶液按照80:20或60:40或40:60或20:80的质量比混合,室温搅拌1天,即可得聚乳酸/大豆分离蛋白复合纺丝液;

[0013] 3) 静电纺丝制备聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维

[0014] 将上述复合纺丝液加入到静电纺丝设备的注射器中,安装到微量注射泵 (NE-1000, KD Scientific Syringe Pump Company, USA) 上,调节微量注射泵的推进速度、自制滚筒接收器的转速(宽度:5cm, 外径:25cm), 喷射距离(注射器针头顶端与滚筒接收器边缘之间的最短直线距离), 启动高压直流电源 (DW-P-303-1, 天津东文高压电源有限公司, 中国), 即可得到聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维。

[0015] 优选地,上述聚乳酸的平均分子量为10万、特征粘度范围为0.7-1.0dL/g。

[0016] 根据实验过程,优选上述聚乳酸的平均分子量为10万、特征粘度范围为0.7-1.0dL/g。该优选方案带来的直接技术效果是,选择平均分子量为10万、特征粘度范围为0.7-1.0dL/g的聚乳酸,可以使纺丝液形成稳定的泰勒锥,不至于堵塞注射器针头,从而更有利于静电纺丝工艺参数的控制和连续化生产的稳定进行。

[0017] 优选地,上述静电纺丝的主要工艺参数如下:

[0018] 电压:12kV;

[0019] 注射器喷头到滚筒接收器的距离:11cm;

[0020] 注射器推进速度:1.2mL/h;

[0021] 滚筒接收器的转速:0-1500rpm;

[0022] 相对湿度:50%。

[0023] 第二方面,提供上述方法得到的聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维,所述纳米纤维的纤维直径为201-493nm。

[0024] 第三方面,提供上述方法得到的聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维作为细胞支架和组织工程支架的应用。

[0025] 综上所述,与现有技术相比,本发明的突出优点在于:

[0026] (1) 充分利用来源丰富、价格低廉、绿色环保的聚乳酸和大豆分离蛋白,且原料及复合纳米纤维材料均具有生物相容性;

[0027] (2) 以天然植物来源的大豆分离蛋白为聚乳酸生物材料的改性剂,六氟异丙醇为聚乳酸和大豆分离蛋白的共同溶剂,所制备的复合纳米纤维材料既保留了聚乳酸生物材料的优点,又弥补了聚乳酸生物材料的不足;

[0028] (3) 与单纯聚乳酸纳米纤维相比,本发明制备的聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维材料的降解性能和生物相容性明显增加;

- [0029] (4) 通过改变聚乳酸和大豆分离蛋白的浓度以及聚乳酸与大豆分离蛋白的配比,可获得具有不同结构和性能的复合纳米纤维材料;
- [0030] (5) 通过改变接收器的转速可获得具有不同排列形式和性能的复合纳米纤维材料;
- [0031] (6) 静电纺复合纳米纤维材料在细胞支架和组织工程支架材料领域均具有潜在用途。

附图说明

- [0032] 图1为实施例1、实施例2、实施例3和实施例4中获得的 $80:20$ 、 $60:40$ 、 $40:60$ 和 $20:80$ 的复合纳米纤维的扫描电镜图,A、B、C和D分别为聚乳酸和大豆分离蛋白配比为 $80:20$ 、 $60:40$ 、 $40:60$ 和 $20:80$ 的复合纳米纤维。
- [0033] 图2为实施例5中获得的 $80:20$ 、 $60:40$ 和 $40:60$ 的复合纳米纤维与红细胞共孵育后的扫描电镜图,A、B和C分别为聚乳酸和大豆分离蛋白配比为 $80:20$ 、 $60:40$ 和 $40:60$ 的复合纳米纤维组。
- [0034] 图3为实施例6中获得的 $80:20$ 、 $60:40$ 和 $40:60$ 的复合纳米纤维与大鼠许旺细胞共培养后的荧光染色图,A、B和C分别为聚乳酸和大豆分离蛋白配比为 $80:20$ 、 $60:40$ 和 $40:60$ 的复合纳米纤维组。
- [0035] 图4为实施例7中获得的 $80:20$ 、 $60:40$ 和 $40:60$ 的复合纳米纤维浸泡于溶菌酶溶液12周后的扫描电镜图,A、B和C分别为聚乳酸和大豆分离蛋白配比为 $80:20$ 、 $60:40$ 和 $40:60$ 的复合纳米纤维组。
- [0036] 图5为实施例8中获得的 $80:20$ 、 $60:40$ 和 $40:60$ 的复合纳米纤维埋植于大鼠背部皮下12周后的HE染色图,A、B和C分别为聚乳酸和大豆分离蛋白配比为 $80:20$ 、 $60:40$ 和 $40:60$ 的复合纳米纤维组,箭头代表残余材料。
- [0037] 图6为实施例1、实施例9和实施例10中获得的无序复合纳米纤维组、低有序复合纳米纤维组和高有序复合纳米纤维组的扫描电镜图,A、B和C分别为无序复合纳米纤维组、低有序复合纳米纤维组和高有序复合纳米纤维组。
- [0038] 图7为实施例11中获得的无序复合纳米纤维组、低有序复合纳米纤维组和高有序复合纳米纤维组与PC12细胞共培养后的扫描电镜图,A、B和C分别为无序复合纳米纤维组、低有序复合纳米纤维组和高有序复合纳米纤维组。
- [0039] 图8为实施例11中获得的无序复合纳米纤维组、低有序复合纳米纤维组和高有序复合纳米纤维组与PC12细胞共培养后的荧光染色图,A、B和C分别为无序复合纳米纤维组、低有序复合纳米纤维组和高有序复合纳米纤维组。

具体实施方式

[0040] 通过以下详细说明结合附图可以进一步理解本发明的特点和优点。所提供的实施例仅是对本发明方法的说明,而不以任何方式限制本发明揭示的其余内容。

[0041] 实施例1

[0042] 聚乳酸溶液与大豆分离蛋白溶液的质量配比为 $80:20$ 的复合纳米纤维的静电纺丝方法,包括以下步骤:

[0043] 第一步,原料准备

[0044] 按质量份数,分别称取聚乳酸颗粒8份、大豆分离蛋白粉末2份、六氟异丙醇170份;

[0045] 第二步,纺丝液的制备

[0046] (1)将所称取的聚乳酸颗粒加入到六氟异丙醇中,室温搅拌溶解1天,制备成质量分数为10wt%的聚乳酸溶液;

[0047] (2)将所称取的大豆蛋白质粉末加入到六氟异丙醇中,室温搅拌溶解2周,制备成质量分数为2wt%的大豆分离蛋白溶液;

[0048] (3)将聚乳酸溶液和大豆分离蛋白溶液混合,室温搅拌1天,即可得聚乳酸/大豆分离蛋白复合纺丝液。

[0049] 第三步,聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维的制备

[0050] 将上述复合纺丝液加入到静电纺丝设备的注射器中,安装到微量注射泵上,调节注射泵的推进速度为1.2mL/h,注射器与自制滚筒接收器之间的距离为11 cm,自制滚筒接收器的转速为0rpm,设置高压直流电源为12kV,即可得到聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维。经检测,所制得的复合纳米纤维的平均直径为493nm,与预先选定的纳米纤维的平均偏离角度为 $\pm 48^\circ$ 。

[0051] 实施例2

[0052] 除“第二步中,将聚乳酸溶液和大豆分离蛋白溶液按60:40的质量比例进行混合,室温搅拌1天,即可得聚乳酸/大豆分离蛋白复合纺丝液”之外,其余步骤均同实施例1。

[0053] 经检测,所制得的复合纳米纤维的平均直径为435nm,与预先选定的纳米纤维的平均偏离角度为 $\pm 48^\circ$ 。

[0054] 实施例3

[0055] 除“第二步中,将聚乳酸溶液和大豆分离蛋白溶液按40:60的质量比例进行混合,室温搅拌1天,即可得聚乳酸/大豆分离蛋白复合纺丝液”之外,其余步骤均同实施例1。

[0056] 经检测,所制得的复合纳米纤维的平均直径为349nm,与预先选定的纳米纤维的平均偏离角度为 $\pm 48^\circ$ 。

[0057] 实施例4

[0058] 除“第二步中,将聚乳酸溶液和大豆分离蛋白溶液按20:80的质量比例进行混合,室温搅拌1天,即可得聚乳酸/大豆分离蛋白复合纺丝液”之外,其余步骤均同实施例1。

[0059] 经检测,所制得的复合纳米纤维的平均直径为201nm,与预先选定的纳米纤维的平均偏离角度为 $\pm 48^\circ$ 。

[0060] 图1为实施例1、实施例2、实施例3和实施例4中所获得复合纳米纤维的扫描电镜图片。如图所示,复合纳米纤维均成相互交错的网状结构,且随着聚乳酸和大豆分离蛋白配比中大豆分离蛋白含量的增大,复合纳米纤维的直径逐渐减小。

[0061] 补充说明:对于实施例4中的聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维(聚乳酸溶液和大豆分离蛋白溶液在比例为20:80时),虽然可观察到部分纤维,但所得纤维无法从接收器上取下,故在本专利中不做其他研究。

[0062] 实施例5

[0063] 将实施例1、实施例2和实施例3中的样品剪成 $1 \times 1 \text{cm}^2$ 大小放入24孔板底部,蒸馏水清洗3次,PBS缓冲液漂洗30min,之后 37°C 水浴30min,加入 0.1mL稀释全血, 37°C 恒温水

浴60min。用未放样品的组织培养板作对照。PBS 清洗除去未粘附的红细胞,4%多聚甲醛固定12h后,乙醇梯度脱水,干燥,喷金,扫描电子显微镜观察红细胞形态。

[0064] 图2为实施例1、实施例2和实施例3中所获得复合纳米纤维与红细胞共孵育1h后的扫描电镜图片。如图所示,在聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维表面,红细胞能够均匀的粘附且维持正常形态。

[0065] 实施例6

[0066] 将实施例1、实施例2和实施例3中制备的复合纳米纤维样品经UV照射,75%乙醇灭菌后与大鼠许旺细胞共培养72h,4%多聚甲醛固定1h后用于荧光染色观察。

[0067] 图3为实施例1、实施例2和实施例3所获得复合纳米纤维与大鼠许旺细胞共培养72h后的荧光染色图。由图可知,聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维表面均有大量的许旺细胞生长,表明复合纳米纤维均具有较好的细胞相容性。

[0068] 实施例7

[0069] 将实施例1、实施例2和实施例3中所制备的纳米纤维剪成 $2 \times 2 \text{cm}^2$ 大小,经UV照射,75%乙醇灭菌后浸泡于含有0.02wt%溶菌酶的PBS溶液中。12周将样品取出,PBS清洗3次,酒精梯度脱水,真空干燥,喷金后扫描电镜观察。

[0070] 图4为实施例1、实施例2和实施例3所获得复合纳米纤维在浸泡于溶菌酶溶液12周后的扫描电镜图。如图所示,随着时间的延长,聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维均逐渐降解。且随着聚乳酸和大豆分离蛋白配比中大豆分离蛋白含量的增大,纳米纤维的降解速度增大。

[0071] 实施例8

[0072] 将实施例1、实施例2和实施例3中所制备的复合纳米纤维剪成 $1 \times 1 \text{cm}^2$ 大小,经UV照射,75%乙醇灭菌后埋植于大鼠背部皮下。在埋植12周后取出,样品经固定、脱水、包埋、切片后行HE染色。

[0073] 图5为实施例1、实施例2和实施例3所获得复合纳米纤维在埋植大鼠皮下12周后降解的HE染色图。由图可知,在埋植大鼠皮下12周后,聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维被周围结缔组织包裹,且随着聚乳酸和大豆分离蛋白配比中大豆分离蛋白含量的增大,纳米纤维的降解速度也逐渐增大,表明复合纳米纤维材料的降解性可通过调节聚乳酸和大豆分离蛋白的配比来实现。

[0074] 实施例9

[0075] 除“第三步,聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维的制备:将上述复合纺丝液加入到静电纺丝设备的注射器中,安装到微量注射泵上,调节注射泵的推进速度为1.2mL/h,注射器与自制滚筒接收器之间的距离为11cm,自制滚筒接收器的转速为800rpm,设置高压直流电源为12kV”之外,其余步骤均同实施例1。

[0076] 经检测,所制得的复合纳米纤维的平均直径为493nm,与预先选定的纳米纤维的平均偏离角度为 $\pm 20^\circ$ 。

[0077] 实施例10

[0078] 除“第三步,聚乳酸/大豆分离蛋白复合纳米纤维的制备:将上述复合纺丝液加入到静电纺丝设备的注射器中,安装到微量注射泵上,调节注射泵的推进速度为1.2mL/h,注射器与自制滚筒接收器之间的距离为11cm,自制滚筒接收器的转速为1500rpm,设置高压直

流电源为12kV”。之外,其余步骤均同实施例 1。

[0079] 经检测,所制得的复合纳米纤维的平均直径为493nm,与预先选定的纳米纤维的平均偏离角度为 $\pm 8^\circ$ 。

[0080] 实施例11

[0081] 将实施例1、实施例9和实施例10中制备的不同排列形式的复合纳米纤维样品经UV照射,75%乙醇灭菌后与大鼠PC12细胞共培养72h,4%多聚甲醛固定后,部分样品喷金后用扫描电子显微镜观察,部分样品用于荧光染色观察。

[0082] 图7和图8分别为实施例8所获得不同排列形式的复合纳米纤维与大鼠PC12 细胞共培养72h后的扫描电镜图和荧光染色图。由图可知,在无序排列的纳米纤维上细胞呈多角度、多方向生长,而在有序排列的纳米纤维上的细胞沿着纳米纤维的轴向生长,且在有序纳米纤维上生长的PC12细胞比无序纳米纤维上生长的细胞具有更长的神经突,表明有序纳米纤维不但能定向引导细胞生长还能促进神经细胞的神经突延长。

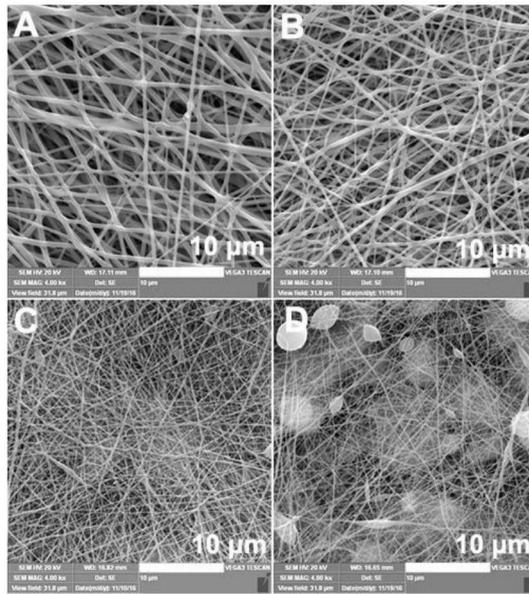


图1

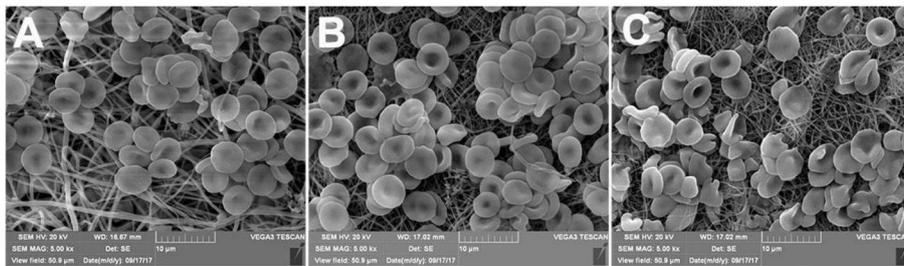


图2

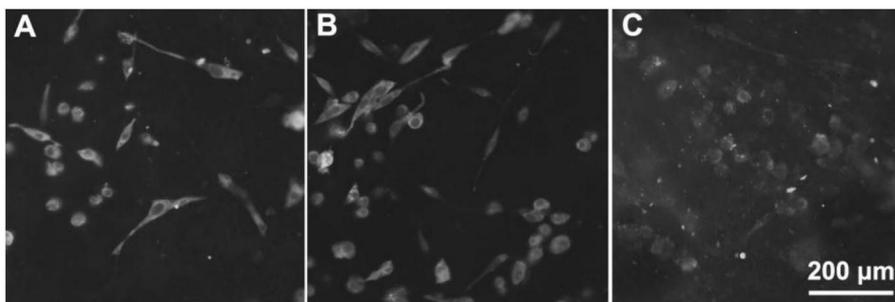


图3

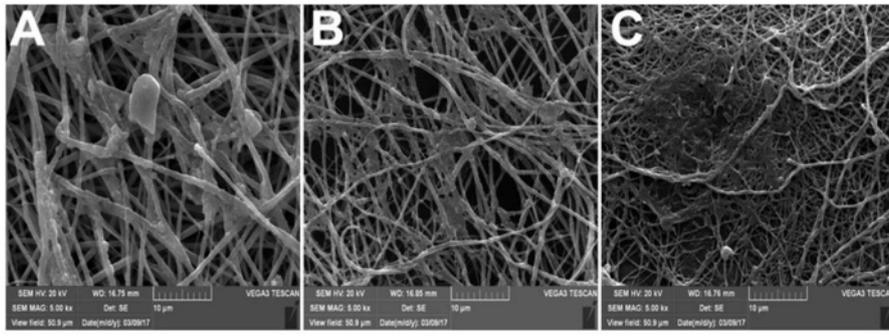


图4

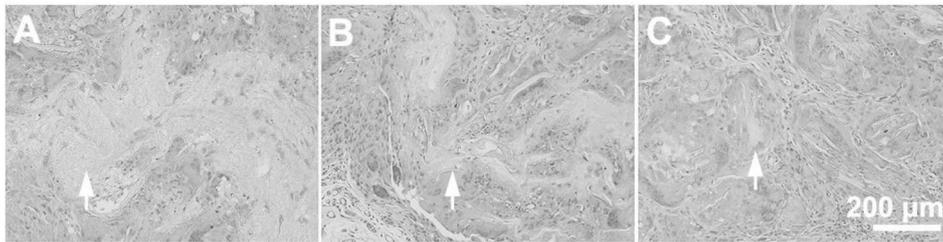


图5

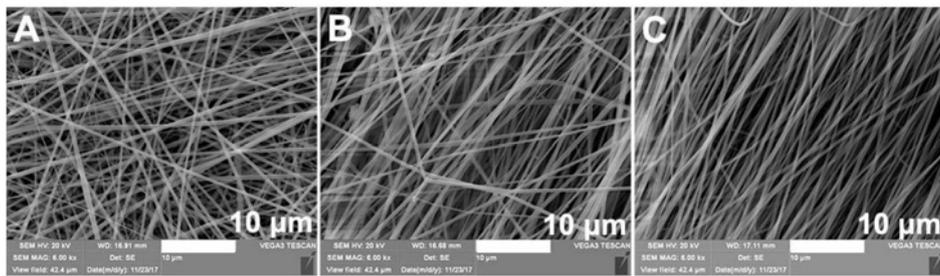


图6

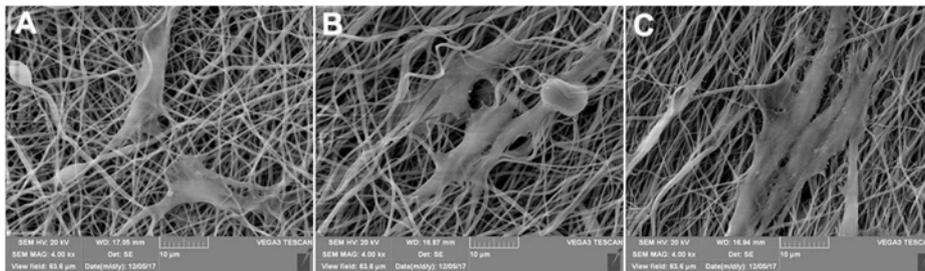


图7

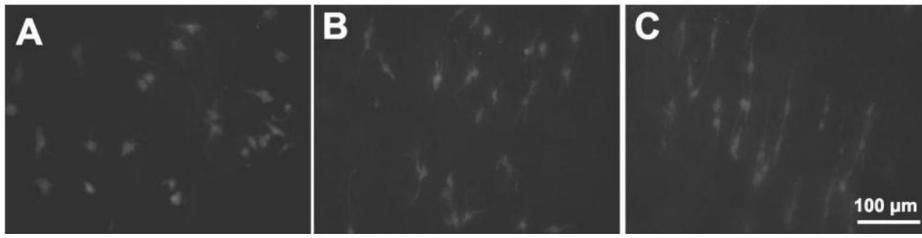


图8