

测试·分析

药用聚异戊二烯橡胶细胞毒性的研究

刘海洪¹, 崔喆^{1,2}, 付鹏^{1,2*}

(1. 郑州大学 材料科学与工程学院, 河南 郑州 450001; 2. 河南省先进尼龙材料及应用重点实验室, 河南 郑州 450001)

摘要:以两种不同催化体系合成的药用聚异戊二烯橡胶(IR0307和IR80)为研究对象,分别以质量分数为0.9%的氯化钠注射液和纯化水为浸提介质,在两种浸提条件(在高压灭菌器内于121℃下浸提60 min或在密闭容器内于37℃下浸提24 h)下进行浸提处理,然后采用显微镜观察法和四唑盐比色法测定IR0307和IR80的体外细胞毒性,分析不同浸提条件下IR0307和IR80的细胞毒性反应等级。在药用聚异戊二烯橡胶生产中,建议控制催化剂的残留量以及对杂质和金属离子的含量和种类,使用洁净的非污染型防老剂和稳定剂。

关键词:聚异戊二烯橡胶;氯化钠注射液;纯化水;浸提;显微镜;四唑盐比色法;细胞毒性

中图分类号:TQ333.3

文献标志码:A

文章编号:1000-890X(2021)02-0134-06

DOI:10.12136/j.issn.1000-890X.2021.02.0134



OSID开放科学标识码
(扫码与作者交流)

聚异戊二烯橡胶具有顺式-1,4-结构含量和相对分子质量大、凝胶含量小、纯净、无杂质、透明、有光泽等优点,在医药包装材料和医疗器械配件,如注射液用胶塞、真空采血器胶塞、橡胶垫片、预灌封注射器用橡胶针头护帽和输液器用橡胶肝素帽等中大量应用^[1-5]。

市场上流通的药用聚异戊二烯橡胶生产时所用的催化剂主要有齐格勒型催化剂、烷基锂型催化剂和稀土化合物催化剂等。目前比较典型的药用聚异戊二烯橡胶是美国科腾聚合物有限公司采用烷基锂型催化剂生产的IR0307和广东茂名石化有限公司采用齐格勒型催化剂生产的IR80^[6-9]。

聚异戊二烯橡胶是异戊二烯单体经过聚合反应而制得的,生产过程中除需要添加催化剂外,还需要添加溶剂、防老剂和稳定剂等,将这些添加剂的含量控制在一定限度范围内,对保证聚异戊二烯橡胶的化学安全性和生物安全性很关键。

国内外相关法规对于医用基础橡胶材料的生物安全性,如原材料的细胞毒性、过敏性、刺激性、

全身毒性和遗传毒性等越来越重视^[10-11]。本工作主要对药用聚异戊二烯橡胶生物安全性指标中的细胞毒性进行研究。细胞毒性的检测,是将一定量的供试品溶液加入细胞培养液中,培养细胞,通过对细胞形态增殖和抑制影响的观察,评价供试品对体外细胞潜在毒性的作用^[12]。

在GB/T 14233.2—2005《医用输液、输血、注射器具检验方法 第2部分:生物学试验方法》中,细胞毒性试验主要是针对医疗器械浸提液[浸提介质是质量分数为0.9%的氯化钠(NaCl)注射液],采用四唑盐比色法和显微镜观察法进行;在GB/T 16886.5—2017《医疗器械生物学评价 第5部分:体外细胞毒性试验》中,在细胞毒性试验的试样制备过程中,对于浸提介质的选择要先进行验证,当浸提过程中使用含血清培养基时,只能采用(37±2)℃下不短于24 h的浸提条件。

本工作选择IR0307和IR80为研究对象,采用不同浸提介质和浸提处理方法,研究对比两种橡胶样品的细胞毒性,探讨影响聚异戊二烯橡胶细

作者简介:刘海洪(1974—),男,河南南阳人,郑州大学在读博士研究生,主要从事药用橡胶制品的配方设计、工艺开发以及新材料应用研究。

*通信联系人(fupeng@zzu.edu.cn)

引用本文:刘海洪,崔喆,付鹏.药用聚异戊二烯橡胶细胞毒性的研究[J].橡胶工业,2021,68(2):134-139.

Citation: LIU Haihong, CUI Zhe, FU Peng. Study on Cytotoxicity of Medicinal Polyisoprene Rubber[J]. China Rubber Industry, 2021, 68(2): 134-139.

胞毒性的因素,从而为药用聚异戊二烯橡胶的生产提供参考。

1 实验

1.1 主要原料和试剂

IR0307,美国科腾聚合物有限公司产品;IR80,广东茂名石化有限公司产品;质量分数为0.9%的NaCl注射液(简称0.9%NaCl注射液)和纯化水,市售品。

1.2 主要仪器

二氧化碳培养箱、倒置显微镜、酶标仪、振荡器、分度值为0.001 g的电子天平、定时器、移液器和96孔培养板等。

1.3 试样制备

1.3.1 供试品及对照品制备

供试液:取洁净的供试品(橡胶材料),必要时用适宜的清洁剂清除油污,再用纯化水冲洗干净,用滤纸吸干后切成0.5 cm×2 cm的长条,置于玻璃容器内,加浸提液(按照0.2 g供试品加1 mL浸提液的比例),使浸提液浸没供试品。

供试品浸提条件及处理方法分为两种:(a)将放置供试品的容器置于高压灭菌器内,在121℃下浸提60 min,冷却至室温,用该浸提液作为溶剂配制MEM(Minimum Essential Medium)培养基,添加质量分数为10%的牛血清后用于试验;(b)供试品于密闭容器内在37℃下浸提24 h,冷却至室温,用该浸提液作为溶剂配制MEM培养基,添加质量分数为10%的牛血清后用于试验。

阴性对照品:按3 cm²对照品加1 mL浸提液的比例添加浸提介质,浸提液制备方法同供试品。

阳性对照品:体积分数为10%的二甲基亚砜的完全培养基。

空白对照品:采用新鲜细胞培养液进行试验。

1.3.2 细胞悬浮液制备

对已培养48~72 h、生长旺盛的L-929细胞消化2~3 min,加入MEM培养液,混匀并计数,配制每毫升10 000个细胞的细胞悬浮液,备用。

1.4 测试分析

1.4.1 显微镜观察法

将配制好的细胞悬浮液接种于96孔培养板内,每孔加入100 μL细胞悬浮液,按照GB/T

14233.2—2005中显微镜观察法的试验要求,培养48 h后置于显微镜下观察细胞形态。

1.4.2 四唑盐比色法

四唑盐比色法的原理是活细胞的线粒体酶可将黄绿色的四唑盐降解生成蓝紫色物质,用二甲基亚砜将其溶解成溶液,用酶标仪测定其浓度,从而定量测定细胞的存活比例^[13]。试验过程是测定供试品浸提液与L-929细胞直接接触产生的细胞毒性,以细胞相对增殖率(RGR)进行分级^[14-15]。

本工作采用四唑盐比色法结合显微镜观察法测定橡胶体外细胞毒性。按照1.4.1节的步骤制备供试品,培养48 h后置于显微镜下观察细胞形态;然后每孔加入20 μL四唑盐比色法溶液,继续培养4 h后弃去孔内液体,加入150 μL二甲基亚砜,在振荡器上振荡10 min,在酶标仪上以570 nm为测量波长、630 nm为参考波长测定吸光度,计算试样的细胞RGR:

$$R=A/A_0\times 100\% \tag{1}$$

式中,R为细胞RGR,A为供试品或阴性、阳性对照品的吸光度,A₀为空白对照品的吸光度。

1.4.3 细胞毒性反应分级

在GB/T 14233.2—2005细胞毒性试验中,在显微镜下观察分析细胞形态;在四唑盐比色法试验中,根据细胞RGR,细胞毒性反应被判定为0,1,2,3和4五个等级(见表1)。阴性对照品的细胞毒性反应等级应不大于1,阳性对照品的细胞毒性反应等级至少为3,才表明试验成立。供试品的细胞毒性反应等级应不大于2才合格。

表1 细胞毒性反应分级
Tab.1 Cytotoxicity reaction grade

等级	细胞RGR/%	等级	细胞RGR/%
0	≥100	3	30~49
1	80~99	4	0~29
2	50~79		

2 结果与讨论

2.1 以0.9%NaCl注射液为浸提介质的试验分析

2.1.1 显微镜观察法

以0.9%NaCl注射液作为浸提介质,分别采用121℃×60 min和37℃×24 h两种浸提条件处理供试品,通过显微镜观察细胞形态,结果如表2所示。

表2 两种浸提条件下的细胞形态显微镜观察结果
Tab.2 Cell morphology observation by microscope under two extraction conditions

样 品	细胞形态	细胞生长状况
空白对照品	细胞正常	细胞贴壁生长良好，呈棱形
阳性对照品	90%悬浮死细胞	细胞几乎无贴壁生长
IR0307(浸提121℃×60 min)	至多50%的细胞呈圆形	明显可见细胞溶解和细胞间空区
IR80(浸提121℃×60 min)	至多50%的细胞呈圆形	明显可见细胞溶解和细胞间空区
IR0307(浸提37℃×24 h)	细胞正常	细胞贴壁生长好，偶见悬浮死细胞
IR80(浸提37℃×24 h)	细胞正常	细胞贴壁生长好，偶见悬浮死细胞

2.1.2 四唑盐比色法

以0.9%NaCl注射液作为浸提介质处理供试品,显微镜观察的细胞形态如图1所示,四唑盐比色法测定的细胞毒性见表3。

由表3可知:以0.9%NaCl注射液作为浸提介质,在121℃×60 min浸提条件下,IR0307和IR80的细胞毒性反应等级均为2;在37℃×24 h浸提条件下,IR0307和IR80的细胞毒性反应等级均为1。

2.2 以纯化水为浸提介质的试验分析

2.2.1 显微镜观察法

以纯化水作为浸提介质,采用121℃×60 min的浸提条件处理供试品,显微镜观察的细胞形态如表4所示。

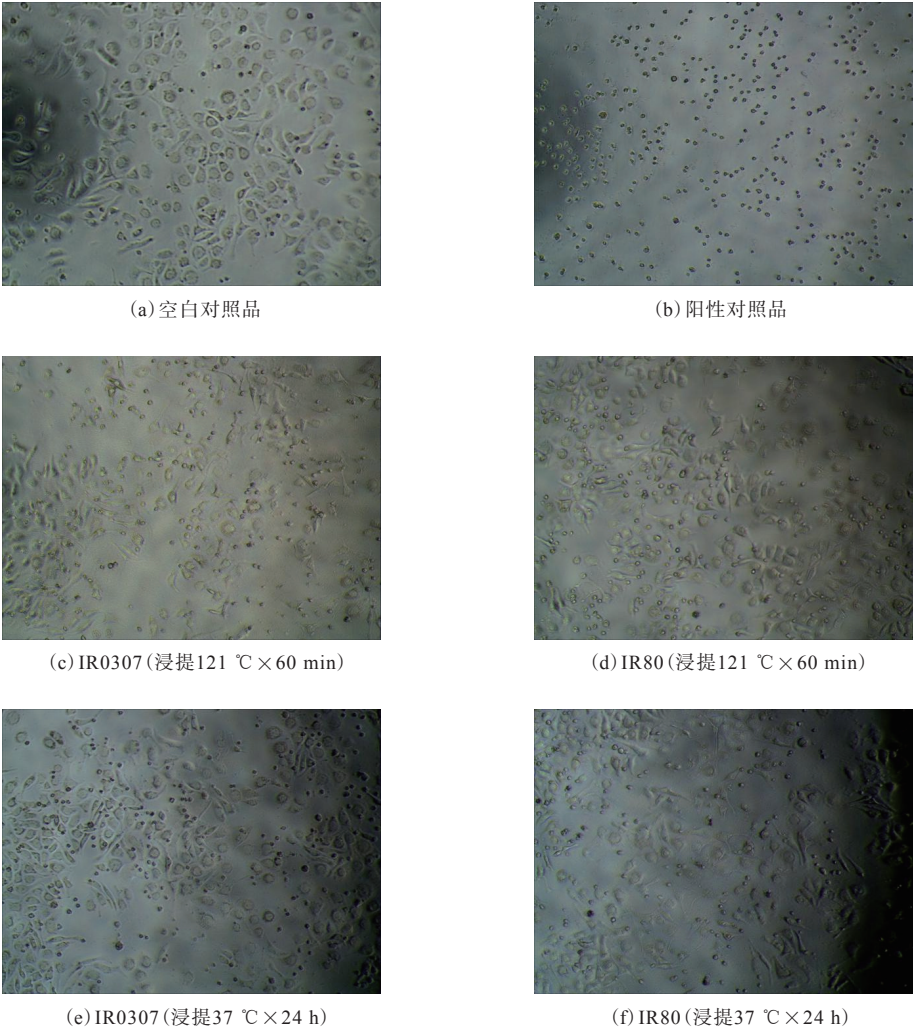


图1 0.9%NaCl注射液浸提条件下显微镜观察的细胞形态(放大40倍)

Fig.1 Cell morphology observed by microscope under 0.9%NaCl injection extraction conditions(magnified by 40 times)

表3 0.9%NaCl注射液浸提条件下细胞毒性分析结果
Tab.3 Cytotoxicity analysis results under 0.9%NaCl injection extraction conditions

项 目	空白对照品	阳性对照品	IR0307 (浸提121℃×60 min)	IR80 (浸提121℃×60 min)	IR0307 (浸提37℃×24 h)	IR80 (浸提37℃×24 h)
吸光度						
1 [#]	0.433	0.143	0.309	0.313	0.385	0.330
2 [#]	0.414	0.137	0.316	0.296	0.361	0.374
3 [#]	0.453	0.140	0.328	0.311	0.304	0.348
4 [#]	0.428	0.144	0.297	0.322	0.342	0.374
5 [#]	0.412	0.137	0.274	0.281	0.398	0.402
6 [#]	0.431	0.136	0.331	0.320	0.386	0.405
平均值	0.429	0.140	0.309	0.307	0.363	0.372
RGR/%		32.6	72.0	71.6	84.6	86.7
细胞毒性反应 等级		3	2	2	1	1

表4 纯化水浸提条件下细胞形态显微镜观察结果
Tab.4 Cell morphology observation by microscope under
purified water extraction

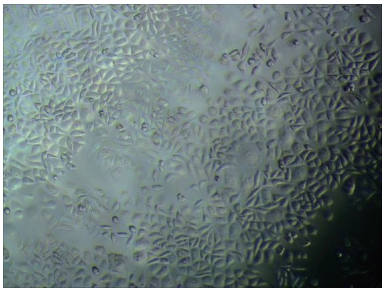
样品	细胞形态	细胞生长状况
空白对照品	细胞正常	细胞贴壁生长良好， 呈棱形
阳性对照品	90%悬浮死细胞	细胞几乎无贴壁生长
供试品		
IR0307(浸提121℃×60 min)	细胞正常	细胞贴壁生长好，偶见 悬浮死细胞
IR80(浸提121℃×60 min)	至多50%的细 胞呈圆形	明显可见细胞溶解和 细胞间空区

2.2.2 四唑盐比色法

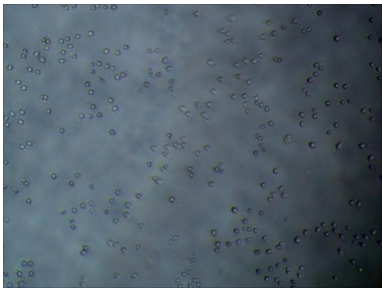
以纯化水作为浸提介质,在121℃×60 min的浸提条件下处理供试品,显微镜观察的细胞形态如图2所示,四唑盐比色法测定的细胞毒性如表5所示。

从图2可以看出,采用纯化水浸提121℃×60 min,细胞形态正常。

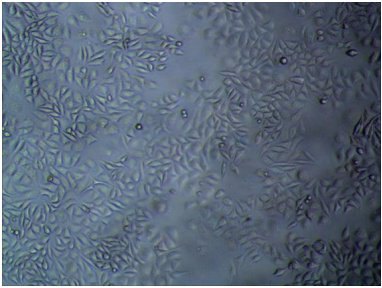
从表5可以看出:采用纯化水浸提121℃×60 min,IR0307的细胞毒性反应等级为1,IR80的细胞毒性反应等级为2,IR0307的细胞毒性小于IR80。



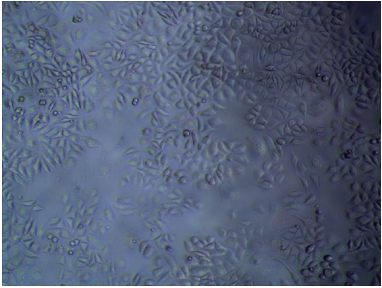
(a) 空白对照品



(b) 阳性对照品



(c) IR0307(浸提121℃×60 min)



(d) IR80(浸提121℃×60 min)

图2 纯化水浸提条件下显微镜观察的细胞形态(放大40倍)

Fig.2 Cell morphology observed by microscope under purified water extraction (magnified by 40 times)

表5 纯化水浸提条件下细胞毒性分析结果
Tab. 5 Cytotoxicity analysis results under purified water extraction

项 目	空白 对照品	阳性 对照品	IR0307(浸提 121 ℃×60 min)	IR80(浸提121 ℃×60 min)
吸光度				
1 [#]	1.050	0.170	0.774	0.750
2 [#]	0.884	0.141	0.684	0.585
3 [#]	0.701	0.149	0.942	0.708
4 [#]	0.821	0.147	0.851	0.608
5 [#]	0.953	0.135	0.757	0.565
6 [#]	0.932	0.164	0.687	0.577
平均值	0.922	0.151	0.783	0.599
RGR/%		16.4	84.9	65.0
细胞毒性反 应等级		4	1	2

3 结论

本工作采用显微镜观察法和四唑盐比色法测定聚异戊二烯橡胶体外细胞毒性,根据试验结果有如下初步判断。

(1) 采用0.9%NaCl注射液为浸提介质,在37℃×24 h浸提条件下,IR0307和IR80的细胞毒性反应等级均为1。

(2) 采用0.9%NaCl注射液为浸提介质,在121℃×60 min浸提条件下,IR0307和IR80的细胞毒性反应等级均为2。

(3) 采用纯化水为浸提介质,在121℃×60 min浸提条件下,IR0307的细胞毒性反应等级为1,IR80的细胞毒性反应等级为2,IR0307的细胞毒性小于IR80。

(4) 聚异戊二烯橡胶采用0.9%NaCl注射液浸提时,由于0.9%NaCl注射液配制的MEM培养基渗透压偏高,在121℃×60 min浸提条件下细胞状态为非正常状态,这有待进一步优化。

相关资料显示,引起聚异戊二烯橡胶本身产生细胞毒性的物质主要与橡胶生产过程中所用的催化剂、溶剂、防老剂、抗氧剂以及稳定剂的种类和含量有关,在聚异戊二烯橡胶生产过程中,建议控制催化剂的残留量以及杂质和金属离子的含量和种类,使用洁净的非污染型防老剂和稳定剂。目前,国内生产聚异戊二烯橡胶的企业不断增多,生产规模和产品质量不断提升,但产品主要还是

用于非医用橡胶制品,如轮胎、工业橡胶制品、输送带、衬垫和密封件等^[16]。随着医用橡胶制品用量和规模的提升,开发生产符合医用要求的聚异戊二烯橡胶并确保聚异戊二烯橡胶的细胞毒性符合相关法规要求是一项很有必要的工作。

参考文献:

- [1] 中国食品药品检定研究院. 国家药包材标准 药用合成聚异戊二烯橡胶垫片: YBB 00232004—2015[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 中国食品药品检定研究院. 国家药包材标准 预罐封注射器用聚异戊二烯橡胶针头护帽: YBB 00102004—2015[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [3] 宗绪凯, 汤琦, 吴剑铭, 等. 反式聚异戊二烯接枝马来酸酐的制备及应用研究[J]. 橡胶工业, 2019, 66(7): 525-528.
- [4] 崔小明. 我国聚异戊二烯橡胶生产技术进展[J]. 橡胶科技, 2019, 17(11): 605-611.
- [5] 李汉堂. 医疗器械用橡胶部件的性能和安全[J]. 世界橡胶工业, 2016, 43(1): 43-49.
- [6] 徐政, 钱寒冬. 聚异戊二烯橡胶塞生产与性能研究[J]. 世界橡胶工业, 2005, 32(1): 3-7.
- [7] 贺小进, 张春庆, 王雪, 等. 锂系聚异戊二烯橡胶合成及结构分析[J]. 弹性体, 2018, 28(2): 39-44.
- [8] 汪昭伟, 秦健强, 李兴, 等. 顺-1,4-聚异戊二烯橡胶的合成与表征[J]. 测试技术学报, 2017, 31(4): 352-356.
- [9] 赵慧, 翟月勤, 杜烨, 等. 异戊二烯橡胶(IR)评价方法的确定[J]. 合成材料老化与应用, 2019, 48(3): 71-73.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 医疗器械生物学评价 第5部分: 体外细胞毒性试验: GB/T 16886. 5—2017[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [11] 全国医用输液器具标准化技术委员会. 医用输液、输血、注射器具检验方法 第2部分: 生物学检验方法 第8条 细胞毒性试验: GB/T 14233. 2—2005[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
- [12] 中国食品药品检定研究院. 国家药包材标准 细胞毒性检查法 YBB 00012003—2015[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [13] 桑晶, 朱社敏, 张劲松, 等. 四唑盐法与相对增殖度法检测输液用包装材料的细胞毒性比较[C]. 中国药理学学会药检药理专业委员会第十一届学术研讨会论文集. 广州: 中国药理学学会药检药理专业委员会, 2014: 21-26.
- [14] 邱辉, 曹苹, 王晓炜. 浸提方法对药用胶塞体外细胞毒性评价的影响[J]. 中国医疗器械信息, 2011, 17(7): 45-46.
- [15] 徐晓月, 梁改玲, 殷飞. 5种含硫化物胶塞的细胞毒性试验研究[J]. 齐鲁药事, 2011, 30(3): 132-133.
- [16] 黄宝琛. 反式-1,4-聚异戊二烯橡胶的制备及其在轮胎胶料中的应用[J]. 橡胶科技, 2014, 12(3): 26-32.

收稿日期: 2020-08-16

Study on Cytotoxicity of Medicinal Polyisoprene Rubber

LIU Haihong¹, CUI Zhe^{1,2}, FU Peng^{1,2}

(1. Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Henan Key Laboratory of Advanced Nylon Materials and Applications, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Taking the medicinal polyisoprene rubber (IR0307 and IR80) synthesized by two different catalytic systems as the research object, the cytotoxicity of medicinal polyisoprene rubber was studied. IR0307 and IR80 were extracted by using 0.9% sodium chloride injection and purified water as the extraction medium, respectively, and two extraction conditions were applied: extraction in an autoclave at 121 °C for 60 min or extraction in a closed container at 37 °C for 24 h. Then the in vitro cytotoxicity of IR0307 and IR80 was determined by microscopic observation and tetrazolium salt colorimetry, and the cytotoxicity levels of IR0307 and IR80 under different extraction conditions were analyzed. In the production of medical polyisoprene rubber, it was suggested to control the residual amount of catalyst and the content and type of impurities and metal ions, and use clean, non-polluting antioxidants and stabilizer.

Key words: polyisoprene rubber; sodium chloride injection; purified water; extraction; microscope; tetrazolium salt colorimetry; cytotoxicity

一种硅橡胶按键及其制备方法 由南京林名鑫电子有限公司申请的专利(公布号 CN 111849166A, 公布日期 2020-10-30)“一种硅橡胶按键及其制备方法”,涉及的硅橡胶按键配方为:硅橡胶 100~110,气相法白炭黑 10~18,滑石粉 1~2,抗黄原料 8~12,稳定剂 1~2,硫化剂 8~20。其制备方法为:(1)对模具表面进行喷砂处理,以确保模具表面无颗粒、光滑平整,然后将模具放入真空硫化机中加热;(2)胶料经过密炼机混炼、一段硫化成型、图案印刷、二段硫化、喷油和镭雕,制得硅橡胶按键。该硅橡胶按键不易变色,不易黄变,耐候性和耐磨性能好,强度较高,原材料成本低;且二段硫化降低了胶料中残存的硫化剂分解产物等含量,有利于减少气泡,提高按键质量。

(本刊编辑部 赵 敏)

一种楼面防水用改性纳米硅氟橡胶及其制备方法 由广州汇纳新材料科技有限公司申请的专利(公布号 CN 111849414A, 公布日期 2020-10-30)“一种楼面防水用改性纳米硅氟橡胶及其制备方法”,涉及的改性纳米硅氟橡胶配方为:

α, ω -端羟基聚二甲基硅橡胶 100,羟基氟硅树脂 15~25,二甲基硅油 25~35,改性纳米球形硫酸钡 150~200,扩链剂 2~4,硅烷偶联剂 1.5~3,催化剂 0.06~0.1,交联剂 8~10。该发明通过优化配方体系,加入功能性填料,结合有机硅材料优异的综合性能,提供了一种实用性和耐久性能好的楼面防水材料,从而能够彻底地解决建筑楼顶漏水问题。

(本刊编辑部 赵 敏)

一种橡胶电缆料及其制备方法 由中辰电缆股份有限公司申请的专利(公布号 CN 111793259A, 公布日期 2020-10-20)“一种橡胶电缆料及其制备方法”,涉及的电缆料配方为:氯丁橡胶 55~62,乙丙橡胶 34~50,环氧树脂 20~30,热塑性聚烯烃弹性体 5~8,煅烧高岭土 6~9,空心玻璃微珠 10~16,玻璃微珠 3~6,硅烷偶联剂 1~2,丙酮 5~10,二乙烯三胺 5~10,无水乙醇 2~5,蒸馏水 2~3,抗氧剂 1~2,二苯基磷酸酯 1~2,加工助剂 1~2,促进剂 1~2。该电缆料韧性好,阻燃性能优异。

(本刊编辑部 赵 敏)