

N-烷基壳聚糖纤维的制备与凝血性能研究

王晓燕^{1,2} 庄旭品^{1*} 关 静^{2*}

(1.天津工业大学纺织学院,天津 300387;2.军事医学科学院卫生装备研究所,天津 300161)

摘 要 采用还原氧化法将不同碳链长度的醛接枝到壳聚糖(CS)主链上,得到取代度(DS)分别为 8.82%(CS6a)、19.22%(CS6b)和 28.31%(CS6c)的己醛接枝物和 DS 分别为 9.53%(CS12a)、17.8%(CS12b)、33.57%(CS12c)的十二醛接枝物。采用湿法纺丝技术制备了系列 N-烷基壳聚糖纤维,并对 N-烷基壳聚糖及其纤维材料进行了表征和细胞毒性测试。通过体外全血凝固时间测试评价了材料的凝血性能。研究表明,DS 为 19.22%,制备的 N-烷基壳聚糖纤维的断裂强度和断裂伸长率分别为 0.47cN/dtex 和 12.44%,并且无毒性,体外凝血时间较短为 33s,具有较好的凝血性能。

关键词 壳聚糖,烷基化,纤维,湿法纺丝,凝血性能

Preparation and coagulation of N-alkyl chitosan fiber

Wang Xiaoyan^{1,2} Zhuang Xupin¹ Guan Jing²

(1.Department of Textile, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300387;

2.Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300161)

Abstract Chitosan (CS) was modified by grafting aldehyde with different carbon chain length into its backbone, and N-hexane chitosan and N-dodecane chitosan were obtained with degree of substitution (DS) of 8.82% (CS6a), 19.22% (CS6b), 28.31% (CS6c) and 9.53% (CS12a), 17.8% (CS12b), 33.57% (CS12c) respectively. A series of N-alkyl chitosan fibers were prepared by wet spinning technology, the characterization and cytotoxicity of materials were studied. The coagulation properties of materials were evaluated by measuring the coagulation time of whole blood in vitro. The results showed that the material with DS value of 19.22% (CS6b) had much better blood coagulation property. The study showed that the fracture strength and fracture elongation of fiber were 0.47 cN/dtex and 12.44%, respectively, which was not toxic. The coagulation time was 33s in vitro, which had better coagulation performance.

Key words chitosan, alkylate, fiber, wet spinning, coagulation property

外伤出血可产生并发炎症或造成患者死亡,成年人的出血量若超过 0.8~1.0L 将引起休克,危及生命^[1]。外伤出血后能够快速有效止血的材料也日渐丰富,但是无法控制的大量失血仍会造成较高的死亡率和严重的并发症。因此,寻求更加快速、安全和有效的新型止血材料已成为一项重要的课题。壳聚糖(CS)是一种生物共聚物,由葡萄糖胺和 N-乙酰氨基葡萄糖组成,是甲壳素的碱性脱乙酰化产物,具有无毒、生物相容性、可生物降解、保湿和廉价的特性。有关研究指出壳聚糖还具有加速体内血液凝固和伤口愈合的功效^[2-4],已成为止血材料的研究热

点。此外,壳聚糖纤维制成的医用敷料,可促进肉芽组织的新生,促进伤口愈合,并且可降解^[5-6]。基于壳聚糖纤维在此方面的优势,本研究通过在壳聚糖的氨基上接枝不同碳链长度和不同取代度的醛,得到 N-烷基壳聚糖后,再经过湿法纺丝得到 N-烷基壳聚糖纤维^[7-10]来研究其凝血性能。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

CS(分子量为 1.97×10^6 , 脱乙酰度为 90.0%),桓台县金湖甲壳制品有限公司;胎牛血清、DMEM

基金项目:国家自然科学基金资助项目(315370956)

作者简介:王晓燕(1990-),女,硕士,研究方向为壳聚糖止血材料。

联系人:庄旭品,男,教授,研究方向为功能非织造材料和生物高分子的研究。

关静,女,研究员,研究方向为生物医用材料。

培养基、人胚肺细胞(MRC5),美国 Hyclone 公司;醋酸、乙酸、己醛、十二醛、十二烷基磺酸钠、硼氢化钠、脲素、甘油、氯化钙,天津瑞博星生物科技有限公司;凝血活酶、凝血酶原、凝血酶试剂盒,上海太阳生物技术有限公司;MTT 试剂盒,美国 Sigma 公司。

电动搅拌器(RW 20 型),德国 IKA 公司;水热反应釜(KH-200mL 型),上海凌科实业发展有限公司;螺杆挤出机(实验室自制);傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, TENSOR27 型),德国 Bruker 公司;扫描电子显微镜(SEM, SSX-550 型),日本岛津公司;热重-差热分析仪(TG8210 型),日本 Rigaku Thermo Plus 公司;纤维切断器(Y171 型),上海标卓仪器有限公司;电子分析天平(BS124S 型),德国赛多利斯公司;电子单纤维强力仪(YM-06A 型),莱州元茂仪器有限公司;元素分析仪(IR, Vario Micro cube 型),德国艾力蒙塔公司;恒温油水浴锅(XMTE-7000 型),上海申顺生物科技有限公司;酶标仪(ELX808 型),美国 BioTek 公司;半自动凝血仪(CloteK-II),日本 Cooper Biomedical 公司。

1.2 实验动物

成年新西兰大白兔 4 只,雌雄不限,体重约 3kg,由军事医学科学院动物中心提供。

1.3 *N*-烷基壳聚糖的制备

称取 2g CS 溶解于 200mL 的 2% 的醋酸溶液中,采用电动搅拌器(RW 20 型,德国 IKA 公司)室温搅拌溶解后,加入 75mL 乙醇溶液,这是为了更好地进行均相反应,继续搅拌至溶解,加入一定量的醛,之后调节 pH=5.1,在室温下继续搅拌 4h,缓慢滴加硼氢化钠,搅拌反应 12h 后将溶液的 pH 调至 10,沉淀生成的产物过滤并分别用 70%、80%、100% 的乙醇/水溶液洗涤至中性。产物先进行预冷冻,冷冻干燥后在反应器中保存,即制得 *N*-烷基壳聚糖。

1.4 *N*-烷基壳聚糖纤维的制备

配制 3.5%(wt,质量分数,下同)的纺丝原液:乙酸用量为 2%,脲素用量为 1%,甘油用量为 CS 质量的 0.5 倍。将配制好的纺丝液采用电动搅拌器(RW 20 型,德国 IKA 公司)进行搅拌,直到完全溶解,静置一段时间,除去纺丝液中的气泡。将脱泡后的纺丝液倒入水热反应釜(KH-200mL 型,上海凌科实业发展有限公司)中,过滤后挤出,采用螺杆挤出机(实验室自制)调节转速,与接收滚筒速度相匹配,使丝条匀速进入凝固浴中(氢氧化钠:乙醇的体积配合比为 70:30),并得到一定拉伸,经凝固浴凝固的丝条卷绕在接收滚筒上。将接收滚筒上的丝条取

下,进行固定,使丝条不相互缠绕,先放入 5% 甘油溶液处理 2h,取出后放入 50% 乙醇溶液 2h,最后放入无水乙醇中干燥 1h,取出后待纤维自然干燥,即制得 *N*-烷基壳聚糖纤维。

1.5 样品的测试

采用傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, TENSOR 27 型,德国布鲁克公司)对样品进行测试, KBr 压片。采用扫描电子显微镜(SEM, SSX-550 型,日本岛津公司)观察纤维的表面形态。采用电子单纤维强力仪(YM-06A 型,莱州元茂仪器有限公司)测试纤维的拉伸断裂强力 and 拉伸断裂伸长率,夹持距离为 20mm,拉伸速度为 10mm/min。采用热重-差热分析仪(TG8210 型,日本 Rigaku Thermo Plus 公司)对样品进行热学性能测试,氮气氛围,测试温度为 30~1000℃,升温速度 20℃/min。

纤维的细度测试。将制得的 *N*-烷基壳聚糖纤维排成平行伸直的状态,采用纤维切断器(Y171 型,上海标卓仪器有限公司)在纤维中段切取 30mm 长的纤维束,采用电子分析天平(BS124S 型,德国赛多利斯公司)称重,计数纤维的根数。纤维的线密度计算见式(1)。

$$T_t = \frac{G}{L} \times 1000 \quad (1)$$

式中, T_t 为线密度, tex; G 为纤维重量, g; L 为纤维长度, m。

N-烷基壳聚糖取代度测定。采用元素分析仪(IR, Vario Micro cube 型,德国艾力蒙塔公司)测定同一体系中 *N*-烷基壳聚糖的 C、N 元素含量,根据公式(2)计算烷基化取代度。

$$\frac{[8(1-x) + 6x + n \times DS] \times 12}{14} = \frac{C}{N} \quad (2)$$

式中, x 为 CS 的脱乙酰度 90.0%; n 为烷基化壳聚糖中 C 的个数, 个; C/N 为碳氮元素百分比的比值, %; DS 为取代度, %。

通过计算,得到己醛接枝物样品的不同取代度(DS):样品 CS6a 为 8.82%、样品 CS6b 为 19.22%、样品 CS6c 为 28.31%;十二醛接枝物样品 CS12a 为 9.53%、样品 CS12b 为 17.8%、样品 CS12c 为 33.57%。

1.6 细胞毒性测试

1.6.1 细胞增殖率

采用恒温油水浴锅(XMTE-7000 型,上海申顺生物科技有限公司)40℃水浴,在 1min 内快速解冻人胚肺细胞(MRC5),放置于 T-25 培养瓶培养;复苏后 24h 更换新鲜生长培养基,待细胞密度增加

至 80% 以上时,采用 0.25% 胰酶消化 2min 后,加入生长培养基终止胰酶反应,调整细胞密度为 2×10^4 个/mL;称取 0.6g 纤维,并用 3mL 细胞培养基浸泡;同时设置未浸泡纤维膜的细胞培养基作为对照;37℃ 放置 24h;将调整好密度的 MRC5 细胞铺于 96 孔细胞培养板内,100 μ L/孔,24h 后更换浸泡纤维膜的浸泡液;浸泡 72h 后,弃原细胞培养液,加入 10 μ L MTT 和 90 μ L 无血清培养基,37℃ 反应 4h;弃 MTT 工作液,加入 100 μ L 10% 十二烷基磺酸钠 (SDS) 溶解 MTT;并设置对照组,采用酶标仪 (ELX808 型,美国 BioTek 公司) 测试样品 630nm、570nm 处吸光度。

$$RGR = \frac{A}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中, RGR 为吸光度; A 为实验组在 570nm 处吸光度与 630nm 处吸光度的差值; A_0 为对照组在 570nm 处吸光度与 630nm 处吸光度的差值。

1.6.2 荧光标记

细胞培养 24h 后,弃去孔内原液,每孔加入 100 μ L N -烷基壳聚糖纤维浸提液,阴性对照组加 6cm²/mL 高密度聚乙烯浸提液,放入培养箱中培养 48h 后,加入荧光细胞染料 SYTO-9 和 PI,继续孵育 10min,最后用荧光显微镜拍照。

1.7 体外凝血时间测试

大白兔经心脏取血后,将血液和抗凝剂柠檬酸钠以 9:1 的配合比均匀混合,制成抗凝全血。将 60mg 样品放入试管中,37℃ 预温 3min,加入 1mL 抗凝兔血后 37℃ 继续孵育 1min,然后从加入 775 μ L 氯化钙溶液 (浓度 0.025mol/L) 后开始计时,每隔 10s 取出试管并倾斜,观察血液是否流动,直至血液完全凝固,倾斜 90° 也无血流下时,记录时间即为全血凝固时间。

2 结果与讨论

2.1 FT-IR 分析

CS 和 CS6b 的 FT-IR 谱图见图 1。从图可以看出,CS 在 3400cm⁻¹ 左右的宽峰是 O—H 与 N—H—伸缩振动峰重叠而成,对应 CS 骨架上的羟基和氨基;2810~2986cm⁻¹ 为亚甲基 C—H 的伸缩振动峰,1384cm⁻¹ 为 CH₂ 的弯曲振动峰^[11]; N -烷基壳聚糖 CS6b 在 2810~2986cm⁻¹ 为 $-C_nH_{2n+1}$ 的振动峰,1503~1625cm⁻¹ 为 $-NH$ 的振动峰^[12],随 DS 的增加,其伸缩振动峰逐渐增加。研究结果表明,CS 成功地接枝上了己醛。

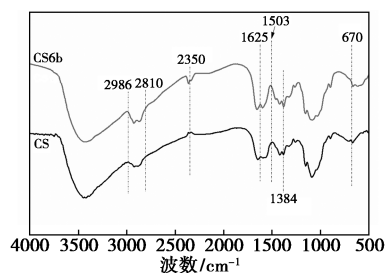


图 1 CS 和 CS6b 的 FT-IR 谱图

2.2 SEM 分析

CS、 N -烷基壳聚糖纤维纵截面的 SEM 图见图 2。从图 2(a) 可以看出,纤维表面粗糙,有沟槽和白点,沟槽可能因“双扩散”运动时溶剂析出,纤维无法及时修复而导致材料收缩造成的;还可能对初生纤维的拉伸形变而产生的^[13],纤维表面的白点可能是纤维水洗不充分,初生纤维表面残留了凝固浴中的 NaOH,干燥后形成了固体颗粒。从图 2(b) 可以看出, N -烷基壳聚糖纤维表面的沟槽分布密集,可能是 N -烷基壳聚糖初生纤维内部的结构更为疏松。

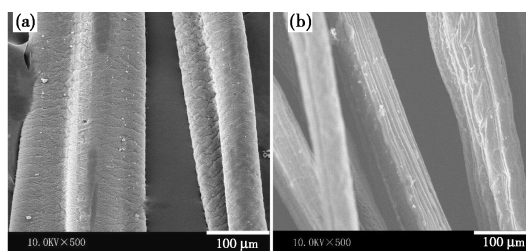


图 2 CS、 N -烷基壳聚糖纤维纵截面的 SEM 图

2.3 N -烷基壳聚糖的 C 和 N 含量与 DS 值分析

N -烷基壳聚糖的 C 和 N 含量与 DS 值见表 1。样品 CS6b 的 DS 值为 19.22%。

表 1 N -烷基壳聚糖的 C 和 N 含量与 DS 值

样品	C/%	N/%	DS/%
CS6b	34.99 $\pm$ 1.45	5.55 $\pm$ 0.08	19.22 $\pm$ 0.04

2.4 线密度和力学性能分析

CS 纤维和 N -烷基壳聚糖纤维的线密度、断裂强度和断裂伸长率见表 2。从表 2 可知,CS6b 纤维的线密度明显低于 CS 纤维,可能是 N -烷基壳聚糖初生纤维由于接枝后分子内部的结构更易于拉伸使得纤维变细;CS6b 纤维的断裂强度和断裂伸长率分别为 0.47cN/dtex,断裂伸长率为 12.44%,相比 CS 纤维均较低,这可能因 CS 分子中含有大量的环状结构,分子内和分子间的氢键,使得其分子间结合紧密,断裂强度较大,而接枝后的 CS,一方面是由于接枝的己醛破坏了原来的氢键结构,另一方面是由于

N-烷基壳聚糖纤维表面的沟槽相对较多和内部的疏松性导致了拉伸性能很差,断裂强度降低^[14]。

表 2 CS 纤维和 *N*-烷基壳聚糖纤维的线密度、断裂强度和断裂伸长率

样品	线密度/dtex	断裂强度/(cN·dtex ⁻¹)	断裂伸长率/%
CS 纤维	55.6	0.67	24.64
CS6b 纤维	35.0	0.47	12.44

2.5 热性能分析

CS 纤维、CS6b 纤维的热重曲线见图 3。从图可以看出,CS 纤维和 CS6b 纤维在 150℃ 以下均发生了失重现象,说明 CS 和 *N*-烷基壳聚糖分子内部存在吸附水及部分结晶水,此外 CS 纤维和 CS6b 纤维在 250℃ 再次失重,开始发生热分解。研究结果表明,CS 纤维和 CS6b 纤维的耐热性没有较大的变化。

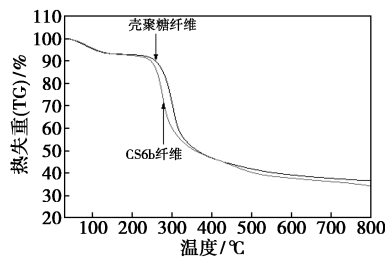


图 3 CS 纤维、CS6b 纤维的热重曲线图

2.6 安全性分析

作为医用材料,其生物相容性是必须检测的。采用浸提液法来检测材料的细胞毒性。CS 纤维、CS6b 纤维细胞毒性测定结果见表 3。从表 3 可知,CS 纤维、CS6b 纤维细胞均具有较低的毒性^[12]。

表 3 CS 纤维、CS6b 纤维细胞毒性测定结果

样品	570nm 与 630nm 吸光度差值	相对增殖率/%
CS 纤维	0.872±0.020	91.80
CS6b 纤维	0.771±0.075	91.97

采用纤维浸提液培养细胞,细胞的死活采用 SYTO9 和 PI 进行标记。空白、CS 和 CS6b 细胞荧光标记图见图 4。从图可以看出,各纤维浸提液培养的细胞维持了活细胞的形态特征,细胞呈菱形^[11]。

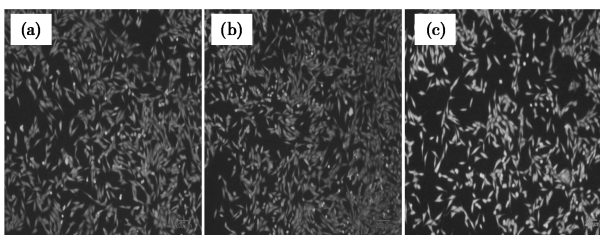


图 4 空白、CS 和 CS6b 细胞荧光标记图

[(a)空白;(b)CS;(c)CS6b]

2.7 体外凝血性能分析

血栓的形成是以血小板为中心,红细胞的存在有助于血小板聚集。空白、CS 纤维、CS6b 纤维的体外凝血时间见图 5。从图可以看出,较空白对照组,CS 纤维的凝血时间明显缩短,CS6b 纤维的体外凝血时间为 33s,主要原因是 CS 能够引发红细胞和血小板的聚集,CS6b 纤维的凝血时间较 CS 纤维更短,这是因接枝的烷基基团能够插入到血细胞(红细胞、白细胞、血小板)细胞膜中间的疏水区而起到桥连作用,促进弹性血栓形成^[15-16]。

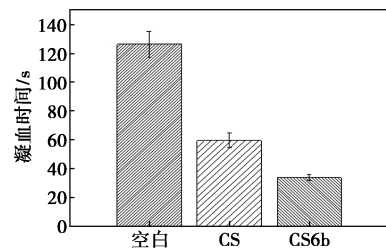


图 5 空白、CS 纤维、CS6b 纤维的体外凝血时间图

3 结论

通过还原氨化法制备了 DS 在 8%~34% 的 *N*-己烷壳聚糖和 *N*-十二烷壳聚糖。采用湿法纺丝技术制备了相应的 *N*-烷基壳聚糖纤维,烷基后的纤维变细,同时断裂强度和断裂伸长率下降。制得的 *N*-烷基壳聚糖纤维细胞毒性较低,体外凝血性能测试表明制备的 *N*-己烷壳聚糖纤维的体外凝血时间均比 CS 纤维明显缩短,其中 DS 为 19.22% (CS6b) 的 *N*-烷基壳聚糖纤维的体外凝血时间较短为 33s。影响 *N*-烷基壳聚糖纤维体外凝血性能的主要因素还有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] 李保强,黄雁鸣,张宇锡,等.壳聚糖复合止血膜的制备及性能评价[J].中国修复重建外科杂志,2010,24(3):340-343.
- [2] Lu Z, Gao J T, He Q F, et al. Enhanced antibacterial and wound healing activities of microporous chitosan-Ag/ZnO composite dressing[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 156(4): 460-469.
- [3] Brandenberg G. Chitosan: a new topical hemostatic agent for diffuse capillary bleeding in brain tissue[J]. Neurosurgery, 1984, 15(1): 9-13.
- [4] Klokkevold P R, Fukayama H, Sung E C, et al. The effect of chitosan (poly-*N*-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits[J]. Journal of Oral & Maxillofacial Surgery, 1999, 57(1): 49-52.

(下转第 165 页)