

文章编号: 1000-7032(2018)09-1207-06

改性羧甲基壳聚糖复合材料的制备、表征与研究

董丽丹^{1,2}, 魏长平^{1*}, 李中田³, 汪凤明¹

(1. 长春理工大学 材料科学与工程学院, 吉林 长春 130022;

2. 长春医学高等专科学校, 吉林 长春 130031; 3. 中水东北勘测设计研究有限责任公司, 吉林 长春 130061)

摘要: 为了提高壳聚糖的水溶性及其止血方面的性能, 将壳聚糖(CS)进行羧甲基化改性, 并引入具有抗菌作用的 Ag^+ 和 TiO_2 , 制备出羧甲基壳聚糖复合止血材料。首先, 在壳聚糖中引入羧甲基, 制得羧甲基壳聚糖(CMCS), 之后向其中引入 Ag^+ 和 TiO_2 , 分别制备出 Ag^+ -CMCS、 TiO_2 -CMCS 和 Ag^+ - TiO_2 -CMCS 复合材料。然后, 采用 FTIR、XRD、SEM 等手段对复合材料的结构进行表征。最后, 对复合物的凝血、止血性能进行了测试。实验结果表明: 改性后的羧甲基壳聚糖的 IR 图谱在 $3\ 423\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 380\ \text{cm}^{-1}$ 处出现了羧甲基壳聚糖钠盐的特征吸收峰。改性后的羧甲基壳聚糖在 XRD 图谱中表现出了金属晶态。CMCS 的粒径为 $14.8\ \text{nm}$ 左右, Ag^+ 粒径为 $143.5\ \text{nm}$ 左右, 纳米 TiO_2 的粒径为 $267.2\ \text{nm}$ 左右, 且三者分散的很均匀。 Ag^+ - TiO_2 -CMCS 的凝血、止血效果要优于 Ag^+ -CMCS 和 TiO_2 -CMCS, 同时 Ag^+ -CMCS 和 TiO_2 -CMCS 的凝血、止血效果要优于 CMCS。

关键词: 羧甲基壳聚糖; 改性; 复合材料; 表征

中图分类号: TP394.1; TH691.9

文献标识码: A

DOI: 10.3788/fgxb20183909.1207

Preparation, Characterization and Research of Modified Carboxymethyl Chitosan Composite

DONG Li-dan^{1,2}, WEI Chang-ping^{1*}, LI Zhong-tian³, WANG Feng-ming¹

(1. School of Materials Science and Engineering, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China;

2. Changchun Medical College, Changchun 130031, China;

3. China Water Northeastern Investigation, Design and Research Co., Ltd., Changchun 130061, China)

* Corresponding Author, E-mail: changpingwei@hotmail.com

Abstract: In order to improve the water soluble and the hemostatic performance of chitosan, the chitosan(CS) was modified by carboxymethylation, and Ag^+ and TiO_2 with antibacterial action were introduced. In this way, carboxymethyl chitosan composite hemostatic material was prepared. Firstly, in chitosan, carboxymethyl was introduced, and carboxymethyl chitosan(CMCS) was prepared, then Ag^+ and TiO_2 were introduced, and Ag^+ -CMCS, TiO_2 -CMCS and Ag^+ - TiO_2 -CMCS composites were prepared, respectively. Then, FTIR, XRD and SEM were used to characterize the structure of composites. Finally, the coagulation and hemostatic properties of the complex were tested. There are characteristic absorption peaks of carboxymethyl chitosan sodium salt around $3\ 423\ \text{cm}^{-1}$ and $1\ 380\ \text{cm}^{-1}$ in the IR spectra of modified carboxymethyl chitosan. The XRD shows it is metals crystalline. The average diameter of CMCS is about $14.8\ \text{nm}$, Ag^+ is $143.5\ \text{nm}$, nanometre TiO_2 is $267.2\ \text{nm}$, and all of them are homodisperse. The properties of crour and hemostasis of Ag^+ - TiO_2 -CMCS are superior to Ag^+ -CMCS and TiO_2 -CMCS, while Ag^+ -CMCS and TiO_2 -CMCS also have an advantage over CMCS.

Key words: carboxymethyl chitosan; modified; composite materials; characterization

1 引 言

随着医学技术的发展,应用医用可吸收止血材料处理伤口受到科研人员和医务工作者的广泛关注,世界范围内,可吸收止血材料逐渐成为医疗和制药行业发展的热门方向^[1-4]。壳聚糖因具有抗菌、止血和良好的组织相容性,且其凝血过程不依赖凝血系统等性能而被广泛作为止血材料^[5-8]。

近年来通过复合一些具有止血、消炎、抗菌效果的药物或离子来提高壳聚糖及其衍生物类止血材料的止血效果研究见诸文献。尹刚等^[9]通过剂型改造和结构改变向壳聚糖中加入 Ca^{2+} 及 Zn^{2+} , 研制出一种新型壳聚糖止血粉,通过凝血、止血实验,证明了这种新型止血粉剂是一种有效、安全、可降解的生物止血材料。羧甲基化的壳聚糖较单纯的壳聚糖具有更好的水溶性、生物可降解性等优点,且无细胞毒性作用,可促进细胞生长,其止血作用比之壳聚糖更加优秀^[10-13]。 Ag^+ 能通过缓释技术使微生物蛋白质结构遭到破坏,造成微生物死亡或使其产生功能性障碍,从而达到抗菌效果^[14]。 TiO_2 具有广谱长效抗菌、屏蔽紫外线等优点,目前已被国家批准为食品添加剂^[15]。

本文首先在壳聚糖分子结构中引入羧甲基,得到的羧甲基壳聚糖再与硝酸银和纳米二氧化钛溶液充分反应,得到羧甲基壳聚糖复合止血材料。采用 FTIR、XRD、SEM 等手段对复合材料的结构进行表征并考察了其凝血、止血性能。实验结果表明,羧甲基壳聚糖络合了 Ag^+ 和纳米 TiO_2 生成了新的复合物,且较羧甲基壳聚糖具有更好的止血性能。

2 实 验

2.1 样品制备

羧甲基壳聚糖:向三口烧瓶中加入一定量的脱乙酰度为 80.0 ~ 95.0 壳聚糖和分析纯的异丙醇,搅拌。加入 30% NaOH 溶液,将 6 g 分析纯氯乙酸分 4 次加入溶液中,加热反应 3 h,加入蒸馏水,调 pH 为 7.0。抽滤,用 70% 甲醇、95% 乙醇、无水乙醇洗涤。所得产品放入烘箱烘干,即得羧甲基壳聚糖。

羧甲基壳聚糖银:称取一定量羧甲基壳聚糖

溶于蒸馏水中,再加入 0.10 mol/L 的 AgNO_3 溶液,加热搅拌 2 h。所得产品放入鼓风干燥箱中干燥,研磨成粉。

羧甲基壳聚糖吸附纳米 TiO_2 : 首先进行纳米 TiO_2 粉体改性。称取一定量分析纯纳米 TiO_2 加入到 70 mL 水中,调 pH 为 5.0,加入月桂酸钠,反应 30 min,干燥,得白色纳米 TiO_2 粉体,研磨成粉,备用。称取微量改性纳米 TiO_2 溶于蒸馏水中,搅拌,再加入一定量羧甲基壳聚糖,搅拌 3 h,烘干,研磨成粉。

羧甲基壳聚糖银吸附纳米 TiO_2 复合材料:称取少量改性纳米 TiO_2 溶于蒸馏水中,搅拌,分别加入一定量羧甲基壳聚糖和 0.10 mol/L 的 AgNO_3 溶液,搅拌,制得 $\text{Ag}^+ - \text{TiO}_2 - \text{CMCS}$ 混合液,洗涤后,干燥 10 h,得到成品。

2.2 样品分析与性能测试

羧甲基壳聚糖取代度的测定:测定羧甲基壳聚糖的取代度,采用的方法是电位滴定法。具体步骤:将 0.2 g 羧甲基壳聚糖样品溶于 20 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 HCl 标准溶液中,用 0.1 mol/L 的 NaOH 标准溶液进行缓慢滴定,用 pH 计观察 pH 值的变化情况,分别记下 pH 值是 2.1 和 4.3 时所消耗的 NaOH 标准溶液的体积 V_1 和 V_2 ,通过公式(1)、(2)计算羧甲基壳聚糖取代度(K_{DS}):

$$K_{\text{DS}} = 0.161A / (1 - 0.058A), \quad (1)$$

$$A = (V_1 - V_2)M, \quad (2)$$

式中: A 代表每克样品中羧甲基的物质的量, mmol; 0.161 是每个乙酸氨基葡萄糖残基的物质的量, mmol; 0.058 是每毫克当量的羧甲基质量; M 代表 NaOH 标准溶液的浓度; W 代表样品的净重。

红外光谱(FT-IR):在傅里叶变换红外光谱仪上,使用 KRS-5 型 ATR 探头,用反射法在 500 ~ 4 000 cm^{-1} 波数范围内扫描,并记录各样品的红外光谱。

射线衍射光谱(XRD):室温下使用 Rigaku D/MAX-RB 型 X 射线衍射仪记录样品的 X 射线衍射图谱。X 射线源为 Cu-K α 线,电压为 40 kV,电流为 50 mA,扫描范围为 10° ~ 80°,扫描速度为 10(°)/min。

扫描电镜(SEM):为了更明显地看见混合了

金属离子, 所以将其铺成膜。用 Quanta-200 扫描电镜观察膜表面。

样品的凝血、止血性能测试: 为了测试实验样品的凝血和止血性能, 本文建立了动物实验模型, 选用体重在 18 ~ 26 g 之间的成年雄性昆明鼠, 进行样品的体外凝血和止血实验。

3 实验结果与讨论

3.1 样品结构测试分析

3.1.1 羧甲基壳聚糖取代度的测定

根据取代度的测定方法, 在本文实验条件下, 制得的羧甲基壳聚糖的取代度为 1.43。

3.1.2 样品的红外光谱分析

壳聚糖和羧甲基壳聚糖的红外光谱如图 1 所示。由图像分析可知, CS: 波数 3 423 cm^{-1} 处属于 N—H 键伸缩振动吸收峰, 2 876 cm^{-1} 是 —CH— 键对称伸缩振动吸收峰, 1 596 cm^{-1} 处是 —COO 键不对称伸缩振动吸收带, 1 380 cm^{-1} 处是 C—H 键对称变形振动和弯曲振动吸收带, 1 080 cm^{-1} 处吸收峰很宽, 是 C—O 键吸收带。CMCS: 波数 3 386 cm^{-1} 处是 N—H 键伸缩振动吸收峰, 2 918 cm^{-1} 处是 —CH— 键不对称伸缩振动吸收峰, 1 593 cm^{-1} 处是酰胺 II 吸收峰, 1 413 cm^{-1} 处有两个吸收峰, 故判断为羰基对称伸缩振动吸收峰, 1 072 cm^{-1} 处为醚键 C—O—C 吸收峰。由于图像在 3 423 cm^{-1} 和 1 380 cm^{-1} 处吸收峰发生了明显的偏移, 说明取代反应分别发生在 N 位、O 位上, 所得产物为 N, O-羧甲基壳聚糖。

CMCS 复合 Ag^+ 、纳米 TiO_2 红外光谱如图 2 所示。从图中可看出, 随着 Ag^+ 和 TiO_2 的加入, CMCS 于 3 386 cm^{-1} 处羟基和胺基的伸缩振动吸收宽峰发生了波数移动, 这表明 Ag^+ 、 TiO_2 和 CMCS

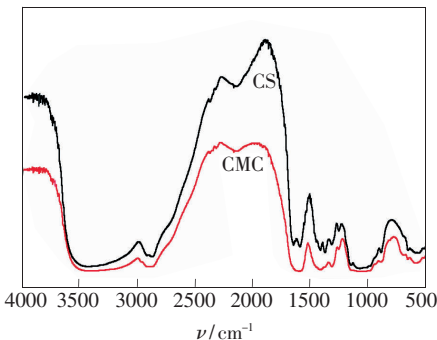


图 1 CS 和 CMCS 的红外光谱图

Fig. 1 FT-IR spectra of chitosan and carboxymethyl chitosan

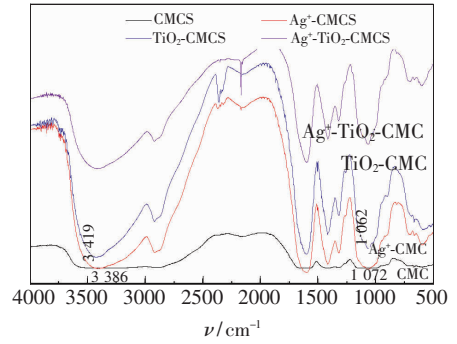


图 2 CMCS 复合 Ag^+ 、 TiO_2 的红外光谱图。

Fig. 2 FT-IR spectra of carboxymethyl chitosan composite Ag^+ , TiO_2 .

间有较强的氢键相互作用; 此外, CMCS 复合物在 1 072 cm^{-1} 处羟基伸缩振动吸收峰移至低波数 1 062 cm^{-1} , 这进一步证明了 Ag^+ 、 TiO_2 和 CMCS 间存在较强的氢键相互作用。

3.1.3 样品的射线衍射分析

CS 和 CMCS 的 XRD 如图 3 所示。研究表明, 壳聚糖 X 射线衍射图谱峰的强度与其结晶性有关, 结晶性越强则峰的强度也越强; 反之, 峰的强度则减弱。壳聚糖结构单元引入羧甲基后削弱了 2、6 位羟基与 3 位羟基的氢键作用, 使壳聚糖的结晶性减弱, 因而峰的强度减小。

CMCS 复合 Ag^+ 、纳米 TiO_2 的 XRD 如图 4 所示。羧甲基壳聚糖在 $2\theta = 19.56^\circ$ 处出现衍射吸收峰, 可以看出 CMCS 是非晶态的。当 CMCS 复合 Ag^+ 时, 其 $2\theta = 27.42^\circ, 36.11^\circ, 54.22^\circ, 67^\circ$ 处出现衍射峰, 这些衍射峰与 JCDPS 卡片上立方晶系银的衍射峰基本一致, 分别对应标准晶态银卡片上的 (111)、(200)、(220)、(311) 晶面, 说明成功复合了银离子。当 CMCS 复合纳米 TiO_2 时, 在 44.34° 处出现特征衍射峰, 表明 CMCS 复合了纳米 TiO_2 。

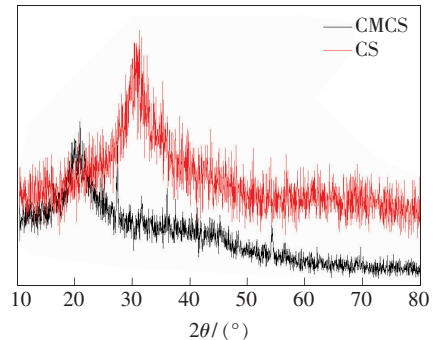


图 3 CS 和 CMCS 的 XRD 图

Fig. 3 XRD patterns of chitosan and carboxymethyl chitosan

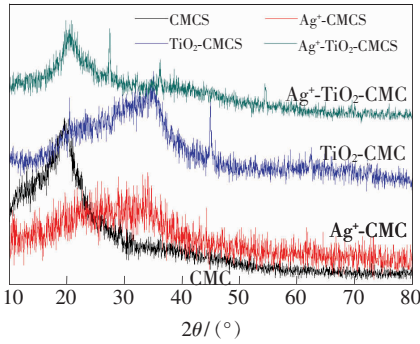


图 4 CMCS 复合 Ag⁺、TiO₂ 的 XRD 图。

Fig. 4 XRD patterns of carboxymethyl chitosan composite Ag⁺, TiO₂.

3.1.4 样品的扫描电镜分析

羧甲基壳聚糖复合 Ag⁺、TiO₂ 的扫描电镜图如图 5 所示, (a)、(b)、(c) 分别为 Ag⁺-CMCS、TiO₂-CMCS、Ag⁺-TiO₂-CMCS 的 SEM 图片。

通过图片可以看出 CMCS 的粒径为 14.8 nm 左右, Ag⁺ 粒径为 143.5 nm 左右, 纳米 TiO₂ 的粒径为 267.2 nm 左右。Ag⁺ 和纳米 TiO₂ 负载在 CMCS 的表面和内部, 3 种物质分布均匀。

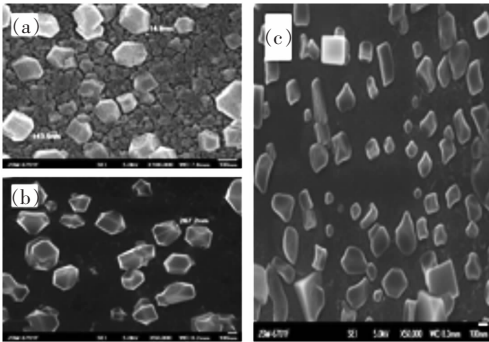


图 5 Ag⁺-CMCS (a)、TiO₂-CMCS (b) 和 Ag⁺-TiO₂-CMCS (c) 的扫描电镜图。

Fig. 5 SEM micrographs of Ag⁺-CMCS (a), TiO₂-CMCS (b) and Ag⁺-TiO₂-CMCS (c), respectively.

3.2 样品性能测试分析

3.2.1 凝血测试分析

样品的凝血性能测试方法: 向每个试管中加入 1 mL 浓度为 0.10 mol/L 草酸钾溶液作为抗凝剂备用。取全血 5 mL 分别放入 5 个试管中, 按每毫升血液加入 0.2 g 样品粉末, 每隔数秒倾斜试管, 发现血液凝集立即记录时间, 每个样品测试 3 组平行数据, 取平均值, 结果见表 1。

由凝血测试时间可知, CMCS 的凝血时间要好于 CS, 这是由于 CMCS 的氨基具有活性, 发生

质子化生成阳离子, 进而吸引带有负电荷的血小板和红细胞, 另外, 氨基的亲水性能会增加血纤蛋白原吸附的数量, 加速凝血过程从而缩短了凝血时间。Ag⁺-TiO₂-CMCS 的凝血效果要优于 Ag⁺-CMCS 和 TiO₂-CMCS 的凝血效果, 同时 Ag⁺-CMCS 和 TiO₂-CMCS 的凝血效果要好于 CS 和 CMCS 的凝血效果。

表 1 样品的凝血时间测试

Tab. 1 Clotting time test of the sample

Sample	Number	Clotting time/s	Average blood coagulation time/s
Natural cruor	1	337	318
	2	302	
	3	316	
CS	1	220	220
	2	203	
	3	236	
CMCS	1	217	200
	2	199	
	3	34"	
Ag ⁺ -CMCS	1	195	192
	2	183	
	3	198	
TiO ₂ -CMCS	1	168	184
	2	190	
	3	196	
Ag ⁺ -TiO ₂ -CMCS	1	170	172
	2	160	
	3	185	

3.2.2 止血测试分析

样品的止血性能测试方法: 将小鼠放进离心管中使其头部固定, 于尾尖 3 cm 处切断, 制造出血创面。空白对照实验使尾尖在自然状态下止血, 从切断尾尖开始, 到不再有血滴渗出, 记录止血时间, 分别测试 3 组平行数据, 计算平均值; 另外 5 组样品, 在切断小鼠尾尖后, 取 0.2 g 样品均匀涂抹于伤口, 使尾部保持自然状态不动, 使伤口与样品始终接触, 从切断尾尖开始, 直到不再出血为止, 记录止血时间, 5 个样品分别测试 3 组平行数据, 计算平均值, 结果见表 2。

表2 样品的止血时间测试

Tab.2 Bleeding time test of the sample

Sample	Number	Hemostasis time/s	Average hemostasis time/s
Natural hemostasis	1	1 117	1 054
	2	984	
	3	1 060	
CS	1	565	686
	2	605	
	3	588	
CMCS	1	587	562
	2	538	
	3	560	
Ag ⁺ -CMCS	1	510	490
	2	500	
	3	460	
TiO ₂ -CMCS	1	513	483
	2	455	
	3	483	
Ag ⁺ -TiO ₂ -CMCS	1	456	422
	2	386	
	3	425	

从平均止血时间来看,Ag⁺-TiO₂-CMCS 的止

血效果要优于 Ag⁺-CMCS 和 TiO₂-CMCS 的止血效果,同时 Ag⁺-CMCS 和 TiO₂-CMCS 的止血效果要好于 CS 和 CMCS 的止血效果。

4 结 论

壳聚糖经羧甲基化制得羧甲基壳聚糖,向其中加入 Ag⁺ 和纳米 TiO₂ 制得羧甲基壳聚糖复合止血材料。

羧甲基壳聚糖复合物的结构表征数据表明:添加了 Ag⁺ 和纳米 TiO₂ 的羧甲基壳聚糖其 IR 图谱显示,在 3 386 cm⁻¹ 和 1 062 cm⁻¹ 处吸收峰发生了位移,XRD 图谱表现出相应的晶行行态,以上说明 Ag⁺ 和纳米 TiO₂ 与羧甲基壳聚糖进行了复合。SEM 图像可以更直观地看出:CMCS 的粒径为 14.8 nm 左右,Ag⁺ 粒径为 143.5 nm 左右,TiO₂ 的粒径为 267.2 nm 左右,Ag⁺ 和纳米 TiO₂ 负载在 CMCS 的表面和内部,3 种物质分布均匀。

复合物的凝止血测试数据表明:添加了 Ag⁺ 和纳米 TiO₂ 的羧甲基壳聚糖可以有效地缩短凝血和止血时间。其中单独添加 Ag⁺ 和纳米 TiO₂ 制备的止血粉相比,添加纳米 TiO₂ 止血粉其止血效果要稍好于添加 Ag⁺ 止血粉。同时添加 Ag⁺ 和纳米 TiO₂ 止血粉,在复合效应作用下获得了更优的凝血和止血性能。

参 考 文 献:

- [1] 郭苗苗, 浦金辉, 徐丹, 等. 壳聚糖基快速止血材料的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(1):49-51. GUOM M, PU J H, XU D, *et al.*. The research progress of chitosan fast hemostatic materials [J]. *Chin. Hosp. Pharm. J.*, 2012, 32(1):49-51. (in Chinese)
- [2] SALGADO C L, GRENHO L, FERNANDES M H, *et al.*. Biodegradation, biocompatibility, and osteoconduction evaluation of collagen Nanohydroxyapatite cryogels for bone tissue regeneration [J]. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2016, 104(1):57-70.
- [3] 石凉, 汪涛, 吴大洋. 壳聚糖止血材料及最新研究进展 [J]. 蚕业科学, 2009, 35(4):929-934. SHI L, WANG T, WU D Y. The latest research progress hemostatic properties of chitosan [J]. *Canye Kexue*, 2009, 35(4):929-934. (in Chinese)
- [4] WALTERS B D, STEGEMANN J P. Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales [J]. *Acta Biomater.*, 2014, 10(4):1488-1501.
- [5] UITTE DE WILLIGE S, MIEDZAK M, CARTERAM, *et al.*. Oteolytic and genetic variation of the alpha-2-antiplasmin c-terminus in myocardial infarction [J]. *Blood*, 2011, 117(24):6694-6701.
- [6] XIE H, TEACH J S, BURKE A P, *et al.*. Laparoscopic repair of inferior vena caval injury using a chitosan-based hemostatic dressing [J]. *Am. J. Surg.*, 2009, 197(4):510-514.
- [7] 巴根, 赵贵成, 傅强. 可吸收止血材料的安全性及临床应用 [J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(8):911-914. BA G, ZHAO G C, FU Q. Absorbable hemostatic materials; safety and clinical application [J]. *Acad. J. Second Milit.*

Med. Univ., 2011, 32(8):911-914. (in Chinese)

- [8] 尹刚, 侯春林, 刘万顺, 等. 新型壳聚糖止血粉止血作用的实验研究 [J]. 中国修复重建外科志, 2009, 23(11): 1371-1349.
YIN G, HOU C L, LIU W S, *et al.*. Experiment study on hemostasis of a new chitosan hemostatic powder [J]. *Chin. J. Repar. Reconstruct. Surg.*, 2009, 23(11):1371-1349.
- [9] 庄金娟, 王香梅. 改性壳聚糖的研究进展及其应用前景 [J]. 天津化工, 2011, 25(2):7-9.
ZHUANG J J, WANG X M. The research progress and application prospect of modified chitosan [J]. *Tianjin Chem. Ind.*, 2011, 25(2):7-9. (in Chinese)
- [10] 孙磊. 高粘度壳聚糖止血材料的制备及其应用性研究 [D]. 北京:中央民族大学, 2012.
SUN L. *Preparation and Application of High Viscosity Chitosan Hemostatic Materials* [D]. Beijing: Minzu University of China, 2012. (in Chinese)
- [11] MAKOTO A, TAKESHI E, NOBUKO E, *et al.*. Antioxidant effects of a dietary supplement: reduction of indices of oxidative stress in normal subjects by water-soluble chitosan [J]. *Food Chem. Toxicol.*, 2009, 47(1):104-109.
- [12] PANWAR P, LAMOUR G, MACKENZIE N C W, *et al.*. Changes in structural-mechanical properties and degradability of collagen during aging-associated modifications [J]. *J. Biolog. Chem.*, 2015, 290(38):23291-23306.
- [13] BADYLAK S F, FREYTES D O, GILBERT T W. Reprint of: extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function [J]. *Acta Biomater.*, 2015, 23:S17-S26.
- [14] 何小松. 改性 TiO₂ 光催化抗菌材料的制备与性能研究 [D]. 武汉:武汉理工大学, 2011.
HE X S. *Study on Preparation and Properties of Modified TiO₂ Photocatalysis* [D]. Wuhan: Wuhan University of Technology, 2011. (in Chinese)
- [15] ZHANG H, ZHANG J, SUN R, *et al.*. Preparation of magnetic and photocatalytic cenosphere deposited with Fe₃O₄/SiO₂/Eu-doped TiO₂ core/shell nanoparticles [J]. *J. Mater. Res.*, 2015, 30(23):3700-3709.



董丽丹(1980 -),女,吉林长春人,博士研究生,讲师,2007年于长春理工大学获得硕士学位,主要从事医用壳聚糖材料的研究。

E-mail: 573972433@qq.com



魏长平(1960 -),女,吉林长春人,教授,博士生导师,1999年于吉林大学获得博士学位,主要从事医用基础功能材料的研究。

E-mail: changpingwei@hotmail.com