

## 螭螂疏水壳聚糖的制备及其止血活性研究

李雨秋<sup>1</sup>, 温华强<sup>1</sup>, 马家骅<sup>1\*</sup>, 王静<sup>1</sup>, 安雨琪<sup>1</sup>, 谭承佳<sup>2</sup>

1. 西南科技大学, 四川省生物质资源利用与改性工程技术研究中心, 四川 绵阳 621010

2. 绵阳师范学院, 四川 绵阳 621006

**摘要:** **目的** 制备螭螂疏水壳聚糖, 研究其止血性能。 **方法** 以螭螂壳聚糖为原料, 通过与月桂酸酐酰基化反应, 进行疏水改性表征, 同时采用离体凝集实验与小鼠肝创面实验研究其凝血性能。 **结果** 制备的螭螂疏水壳聚糖疏水基取代度为(11.69±0.14)%, 高于疏水市售壳聚糖; 离体凝集实验表明其与血液混合后质量分数达6.0 mg/g时即可快速凝血(3.42±0.39) s, 较螭螂壳聚糖与市售疏水壳聚糖效果更优; 小鼠肝创面实验显示螭螂疏水壳聚糖的止血时间较螭螂壳聚糖与疏水市售壳聚糖明显缩短。 **结论** 采用疏水改性可明显提高壳聚糖的凝血性能, 且螭螂疏水壳聚糖最为优良, 有望成为一种有巨大潜力的新型止血材料。

**关键词:** 螭螂; 疏水壳聚糖; 螭螂壳聚糖; 疏水改性; 止血性能

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1141-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.017

## Preparation of hydrophobic chitosan from *Catharsius molossus* and its hemostatic effect

LI Yu-qi<sup>1</sup>, WEN Hua-qiang<sup>1</sup>, MA Jia-hua<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, AN Yu-qi<sup>1</sup>, TAN Cheng-jia<sup>2</sup>

1. Science and Technology Engineering Research Center for Biomass Resource Utilization and Modification of Sichuan Province, Southwest University, Mianyang 621010, China

2. Mianyang Normal University, Mianyang 621006, China

**Abstract: Objective** To prepare hydrophobic chitosan from *Catharsius molossus* and study its hemostatic effect. **Methods** The chitosan from *C. molossus* was used as material to carry out hydrophobic modification and characterization by acylation with lauric anhydride. At the same time, the hemostatic effect was studied by *in vitro* agglutination test and mouse liver wound experiment. **Results** The prepared hydrophobic chitosan had a hydrophobic group substitution degree of (11.69 ± 0.14)%, which was higher than that of commercially available hydrophobic chitosan. The *in vitro* agglutination experiment showed that it could coagulate in (3.42 ± 0.39) s when mixed with blood at a concentration of 6.0 mg/g, which was better than chitosan and hydrophobically modified commercial chitosan. The mouse liver wound experiment showed that chitosan from *C. molossus* could shorten hemostatic time significantly compared with chitosan and hydrophobically modified commercial chitosan. **Conclusion** Hydrophobically modified chitosan can significantly improve the coagulation performance of chitosan, and the hydrophobic chitosan from *C. molossus* is excellent, and it is expected to be a new hemostatic material with great potential.

**Key words:** *Catharsius molossus* L.; hydrophobic chitosan; chitosan from *Catharsius molossus*; hydrophobic modify; hemostatic effect

止血是各类事故现场和临床治疗的首要措施之一, 现今止血材料主要包括传统的止血纱布、止血带、纤维蛋白类以及无机类止血材料, 尽管止血效果较好, 但存在难以保存、环境适应性差、价格昂贵或容易造成二次伤害等问题<sup>[1]</sup>。因此寻找止血更加迅速,

促进伤口愈合等理想的止血材料是当前止血领域的重要研究目标。而壳聚糖作为自然界唯一带正电的天然碱性多糖物质<sup>[2]</sup>, 是甲壳素脱乙酰基后的产物, 属于高分子多糖类止血材料, 具有高安全性、无毒副作用、抑菌愈创、止血效果良好以及较高的生物活性

收稿日期: 2018-07-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30902005); 四川省科技厅项目(2017JY0163); 西南科技大学龙山学术人才科研支持计划(18LZX561); 四川省大学生创新创业训练计划资助项目(201710619046)

作者简介: 李雨秋(1996—), 女, 主要从事中药制药技术研究。E-mail: 774458641@qq.com

\*通信作者 马家骅(1978—), 男, 博士, 副教授, 主要从事中药与天然产物开发。E-mail: jiahuama@163.com

与可降解性等特点<sup>[3-6]</sup>。是一种重要的止血材料。

市面上的壳聚糖多为虾蟹来源,具有过敏性和季节性等缺陷,而蛭螂为鞘翅目金龟子科昆虫蛭螂 *Catharsius molossus* L. 的干燥虫体,本课题组在前期研究中发现,从蛭螂中提取的壳聚糖性能优越,可作为壳聚糖的新来源<sup>[7]</sup>。目前对壳聚糖进行改性主要采用的方法有希夫碱法、烷基化、季铵盐化等<sup>[8]</sup>,但普遍存在制备过程复杂,反应条件要求高且非环境友好型等不足之处。为了提高壳聚糖的凝血性能和弥补虾蟹壳聚糖的缺陷,本课题组通过将蛭螂壳聚糖与月桂酸酐酰基化反应制备得到蛭螂疏水壳聚糖,再表征其基本特性与结构,并采用离体凝集与小鼠肝创面止血实验来评价其凝血性能,为其在止血领域的应用发展提供技术支撑。

## 1 材料

乌氏毛细管黏度计(直径 0.5~0.6 mm,上海申谊玻璃仪器制品有限公司);HJ-4A 数显温控磁力搅拌器(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);BSA124S 电子天平(德国 Sartorius 公司);KXH-202-1A 电热恒温干燥箱(上海科析实验仪器厂);VarioEL CUBE 元素分析仪(德国元素分析系统公司);AvanceIII 600 MHz 核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司)。

蛭螂药材购于成都荷花池中药材市场,经西南科技大学马家骅副教授鉴定为蛭螂 *Catharsius molossus* L. 的干燥虫体,符合部颁药材标准;盐酸、氢氧化钠、无水乙醇、冰乙酸、柠檬酸钠、甲基橙、亚甲基蓝均为分析纯(成都市科隆化学品有限公司);硫化钠九水合物(罗恩试剂);壳聚糖(脱乙酰度≥95%,上海阿拉丁试剂公司);月桂酸酐(梯希爱上海化成工业发展有限公司);其他试剂均为分析纯。

SPF 级昆明小鼠(体质量 20~30 g)、新西兰兔(体质量 2~3 kg)均由成都达硕实验动物有限公司提供,动物许可证号分别为 SCXK(川)2015-030、SCXK(川)2013-17。

## 2 方法与结果

### 2.1 制备工艺

取蛭螂药材按照文献方法<sup>[9]</sup>制备蛭螂壳聚糖,产物得率为(14.47±3.74)%,其相对分子质量约为 400 000,经检测,蛭螂壳聚糖质量符合《中国药典》规定<sup>[10]</sup>。取适量置 1%冰乙酸溶液中,使其浓度为 1%,加入适量 5.23 mmol/L 月桂酸酐乙醇溶液,于 55 °C 下反应过夜,用氢氧化钠将溶液 pH 调至 10 终

止反应,抽滤,收集滤渣,干燥得淡黄色固体颗粒,研磨,过 80 目筛得细粉,同法制备疏水市售壳聚糖。

### 2.2 基本特性测定

**2.2.1 脱乙酰度测定<sup>[11]</sup>** 精密称定蛭螂壳聚糖与市售壳聚糖 0.2 g,分别置于 50 mL 烧杯中。加入 0.1 mol/L HCl 标准溶液 20 mL 搅拌至完全溶解,加入 4~6 滴甲基橙-亚甲基蓝指示剂,溶液变为紫色,0.1 mol/L NaOH 标准溶液滴定,溶液变成淡绿色即为滴定终点,记录消耗 NaOH 标准溶液用量。每种样品各平行测定 3 组,用以下公式计算脱乙酰度(DD),结果见表 1。

$$DD = \{(C_1V_1 - C_2V_2) \times 0.016 / [G \times (100 - W)]\} / 0.0994$$

$C_1$  为 HCl 标准溶液浓度,  $C_2$  为 NaOH 标准溶液浓度,  $V_1$  为加入 HCl 标准溶液体积,  $V_2$  为滴定消耗 NaOH 标准溶液体积,  $G$  为样品质量,  $W$  为样品含水量

表 1 各种壳聚糖脱乙酰度和特性黏度及取代度 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Table 1 Deacetylation degree, intrinsic viscosity, and degree of substitution of chitosans ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品	DD/%	$[\eta]/(\text{mL} \cdot \text{g}^{-1})$	DS/%
蛭螂壳聚糖	95.83±0.20	532.32±8.17	—
蛭螂疏水壳聚糖	—	458.05±5.34	11.69±0.14
市售壳聚糖	95.43±0.76	655.17±5.35	—
疏水市售壳聚糖	—	528.99±6.04	10.84±0.13

**2.2.2 特性黏度测定<sup>[12]</sup>** 将 0.2 mol/L 的冰醋酸溶液与 0.1 mol/L 的乙酸钠溶液,按 1:1 混合均匀得缓冲溶液,精密称定蛭螂壳聚糖、市售壳聚糖、蛭螂疏水壳聚糖、疏水市售壳聚糖各 0.025 g,分别溶于 50 mL 缓冲溶液中,过 G3 砂芯漏斗。取乌氏黏度计,置于 25 °C 恒温水浴锅中,控制测定温度为(25.0±0.1) °C,加入样品溶液 25 mL,记录缓冲液流出时间( $t_0$ ),样品溶液流出时间( $t$ ),按照公式计算特性黏度( $[\eta]$ ),结果见表 1。

$$[\eta] = ([\eta_{sp}] + 3 \times \ln[\eta_r]) / 4C$$

$[\eta_r]$  为相对黏度,  $[\eta_r] = t/t_0$ ;  $[\eta_{sp}]$  为增比黏度,  $[\eta_{sp}] = [\eta_r] - 1$ ;  $C$  为样品质量浓度

**2.2.3 取代度测定<sup>[13]</sup>** 使用元素分析仪测定蛭螂疏水壳聚糖与疏水市售壳聚糖的碳氮元素质量分数,计算以上样品取代度(DS,每 100 个壳聚糖残基上取代的疏水基数),结果见表 1。

$$DS = [14w(C) / 12w(N) - 8(1 - DD) - 6DD] / n$$

$w(C)$  为碳元素质量分数,  $w(N)$  为氮元素质量分数,  $n$  为引入氨基上的碳原子数,  $n=12$

由表 1 可知, 螭螂壳聚糖 *DD* 高达 95% 以上, 属于高脱乙酰度范围, 质量优良。通过元素分析得螭螂疏水壳聚糖 *DS* 高于疏水市售壳聚糖, 初步分析差异原因是 2 种壳聚糖的来源不同, 螭螂壳聚糖在灰分残留等方面优于市售壳聚糖。螭螂壳聚糖与市售壳聚糖自身在黏度上的差异直接影响疏水改性后的产物黏度, *DD* 差异可能影响疏水 *DS* 大小。

### 2.3 结构表征

**2.3.1 红外光谱分析** 分别取螭螂壳聚糖、螭螂疏水壳聚糖适量, 采用溴化钾压片法制成供试片, 在  $400\sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$  扫描, 分析结果见图 1。

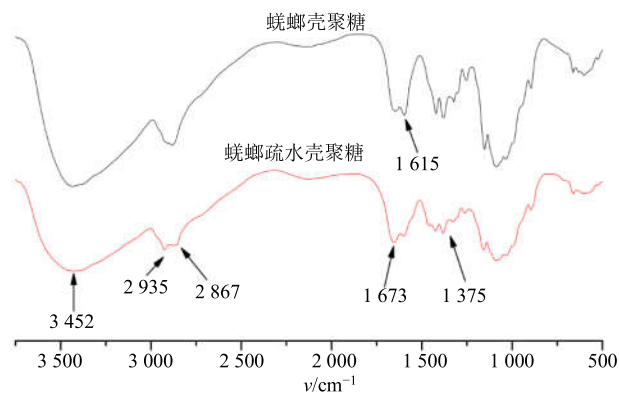


图 1 螭螂壳聚糖与螭螂疏水壳聚糖红外光谱图

Fig. 1 Infrared spectrum of chitosan and hydrophobic chitosan from *C. molossus*

由图 1 可知  $3\,452\text{ cm}^{-1}$  为 2 种壳聚糖的羟基伸缩振动峰,  $2\,935\text{ cm}^{-1}$  与  $2\,867\text{ cm}^{-1}$  分别为长链上乙基、甲基伸缩振动峰, 与螭螂壳聚糖相比, 螭螂疏水壳聚糖在该处峰值增强, 且  $1\,375\text{ cm}^{-1}$  出现了新的乙基、甲基弯曲振动峰,  $1\,673\text{ cm}^{-1}$  处氮氢键吸收峰增强, 而  $1\,615\text{ cm}^{-1}$  氨基吸收峰基本消失, 表明合成产物为螭螂疏水壳聚糖。

**2.3.2  $^1\text{H-NMR}$  检测** 采用氘代乙酸重水溶液分别溶解螭螂壳聚糖、螭螂疏水壳聚糖, 进行  $^1\text{H-NMR}$  测试, 温度  $298\text{ K}$ , 共振频率  $600.1\text{ MHz}$ , 谱宽  $12\,019\text{ Hz}$ , 扫描次数  $100\sim 200$ , 四甲基硅烷 (TMS) 对  $^1\text{H}$  位移标定, 结果见图 2。由图 2 可知, 螭螂疏水壳聚糖在  $\delta\ 1.17$  处出现了  $-\text{CH}_2-$  对应质子峰, 在  $\delta\ 1.09$  和  $1.06$  出现  $-\text{CH}_3$  对应质子峰, 也表明合成了螭螂疏水壳聚糖。

### 2.4 止血活性测定

**2.4.1 离体凝集实验** 实验用新西兰兔耳中央动脉取血  $4.5\text{ mL}$ , 按  $9:1$  加入  $38\text{ mg/mL}$  枸橼酸钠溶液抗凝剂  $0.5\text{ mL}$ , 混合均匀, 备用。从中随机选择部

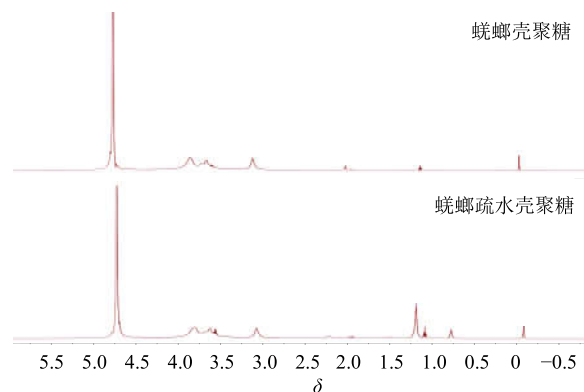


图 2 螭螂壳聚糖与螭螂疏水壳聚糖核磁共振氢谱

Fig. 2 Nuclear magnetic resonance spectrum of chitosan and hydrophobic chitosan from *C. molossus*

分以  $1\,000\text{ r/min}$  离心  $10\text{ min}$ , 分离得血浆, 称取螭螂壳聚糖、螭螂疏水壳聚糖、市售壳聚糖与疏水市售壳聚糖, 配制为  $1\%$  样品溶液, 按照相同比例分别与兔全血、兔血浆混合, 混合体系中样品质量分数依次为  $5.0$ 、 $6.0$ 、 $7.5\text{ mg/g}$ , 记录凝集时间, 结果螭螂疏水壳聚糖在混合体系中质量分数达  $6.0\text{ mg/g}$  时, 与兔全血凝集时间为  $(4.95\pm 0.56)\text{ s}$ , 与兔血浆凝集时间为  $(3.42\pm 0.39)\text{ s}$ , 而此质量分数下的螭螂壳聚糖、市售壳聚糖与疏水市售壳聚糖均不与兔全血或兔血浆发生凝集反应。螭螂疏水壳聚糖在混合体系中质量分数达  $7.5\text{ mg/g}$  时, 与兔全血凝集时间为  $(4.07\pm 0.36)\text{ s}$ , 与兔血浆凝集时间为  $(3.58\pm 0.38)\text{ s}$ ; 在质量分数达  $7.5\text{ mg/g}$  时, 疏水市售壳聚糖表现出了凝集性能, 与兔全血凝集时间为  $(4.76\pm 0.36)\text{ s}$ , 与兔血浆凝集时间为  $(4.82\pm 0.52)\text{ s}$ , 而此质量分数下的螭螂壳聚糖、市售壳聚糖均不与兔全血或兔血浆发生凝集反应。质量分数为  $5.0\text{ mg/g}$  的螭螂壳聚糖、螭螂疏水壳聚糖、市售壳聚糖与疏水市售壳聚糖均不与兔全血或兔血浆发生凝集反应。该结果表明, 壳聚糖疏水改性后凝血性能明显提高, 且螭螂疏水壳聚糖较疏水市售壳聚糖效果好。

**2.4.2 小鼠肝创面实验<sup>[14]</sup>** 取实验用 SPF 级昆明小鼠, 随机分为 6 组, 每组 10 只, 分别为医用纱布组、云南白药组、螭螂壳聚糖组、螭螂疏水壳聚糖组、市售壳聚糖组、疏水市售壳聚糖组。采用硫化钠进行腹部脱毛处理,  $3\text{ d}$  后依据小鼠体质量分别 ip  $0.1\text{ mg/L}$  水合氯醛, 待小鼠完全处于麻醉状态后, 仰卧固定, 腹部消毒, 腹中部作约  $2\text{ cm}$  纵行切口, 清理腹腔液, 将已称质量的无菌纱布垫置于充分显

露的小鼠肝脏下,对肝脏快速作十字切口,当血液充满肝脏切口表面时,敷以均匀涂有相同质量(20 mg)上述药粉的纱布,以医用纱布组作为对照,并记录止血用时与出血量,结果见表 2。与医用纱布组相比,各组均能缩短止血时间,且差异显著( $P < 0.01$ ),而出血量无明显差异。螭螂壳聚糖组止血时间比市售壳聚糖快约 8 s,说明螭螂壳聚糖本身止血性能较市售壳聚糖更优。壳聚糖疏水改性后能明显缩短止血时间,其中螭螂疏水壳聚糖组止血时间与其他实验组相比止血时间更短,且差异显著( $P < 0.01$ ),说明螭螂疏水壳聚糖止血性能更优。

表 2 小鼠肝创面实验结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 2 Results of mouse liver test ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	止血时间/s	出血量/g
医用纱布	152.80 ± 12.83	0.099 5 ± 0.036 5
云南白药	53.60 ± 10.92 <sup>△△**</sup>	0.101 0 ± 0.045 9
螭螂壳聚糖	79.00 ± 8.45 <sup>△△**</sup>	0.126 2 ± 0.034 2
螭螂疏水壳聚糖	37.60 ± 4.39 <sup>△△</sup>	0.090 8 ± 0.047 0
市售壳聚糖	87.00 ± 7.75 <sup>△△**</sup>	0.153 8 ± 0.069 8
疏水市售壳聚糖	56.40 ± 8.62 <sup>△△**</sup>	0.150 9 ± 0.057 9

与医用纱布组比较: <sup>△△</sup> $P < 0.01$ ; 与螭螂疏水壳聚糖组比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs medical gauze group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs hydrophobic chitosan group

### 3 讨论

对壳聚糖进行修饰或改性可以增加其应用功能,有报道称对壳聚糖酰化改性发生在羟基或氨基上<sup>[15]</sup>,本实验结果属于在氨基上的反应。相比其他的改性方法如接枝改性、交联改性<sup>[16]</sup>或者将壳聚糖与其他材料制备为复合物,课题组所采用的制备工艺条件温和简单,易于控制,且仅使用无水乙醇、月桂酸酐等试剂,无刺激性物质生成,实验产率高,属于经济环保型的制备方法。

目前常用小鼠、家兔等进行动物止血实验<sup>[17]</sup>。课题组在前期实验中发现,兔耳与兔肝脏出血模型静脉和动脉伤口出血不均且出血量过大,造成实验材料浪费且不利于观察。小鼠肝创面伤口大小和出血量适合使用壳聚糖粉止血,现今中药外用普遍存在用药剂量难以把控的问题,临床多适量用药<sup>[18]</sup>,而壳聚糖并不会经由出血伤口被吸收,因此课题组依据文献方法<sup>[19]</sup>中止血药研究方法,综合总结将离体凝集实验作为直接观察研究止血性能的方法,并设计用药浓度梯度实验。为了更加全面地体现止血性能,可通过将实验中的几类壳聚糖制成如止血海绵、止血凝胶等复合材料时进行进一步研究探索。

依据离体凝集实验与小鼠肝创面止血实验可知改性后的螭螂壳聚糖与市售壳聚糖均表现出比改性前更加优良的凝血性能,且螭螂疏水壳聚糖的凝血性能更优,但具体凝血机制有待进一步探索。

### 参考文献

- [1] 李 钊,田 丰,刘长军,等.急救止血材料的研究进展 [J]. 材料导报,2013,27(3): 70-73.
- [2] 黄 勇.壳聚糖碱性氨基酸衍生物的合成及抑菌活性研究 [D].北京:中国科学院研究生院(海洋研究所),2016.
- [3] Ming K, Chen X G, Ke X, *et al.* Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review [J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 144(1): 51-63.
- [4] 赵 瑞.壳聚糖改性及壳聚糖止血材料的止血作用和安全性研究 [D].青岛:中国海洋大学,2015.
- [5] 何 琴.疏水改性壳聚糖的制备、表征及止血评价 [D].天津:天津工业大学,2013.
- [6] 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.
- [7] 马家骅,谭承佳,邓 霞,等.螭螂药渣中壳聚糖的回收与初步表征 [J].中药材,2012,35(7): 129-1032.
- [8] 刘 奇,药萌瑶,韩 萍,等.壳聚糖改性方法研究进展 [J].能源与环境,2015(2): 12-13.
- [9] Ma J, Chao X, Tan C. Preparation, physicochemical and pharmaceutical characterization of chitosan from *Catharsius molossus* residue [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 80: 547-556.
- [10] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [11] 赵 颖,杨 琰,卢 实,等.壳聚糖脱乙酰度两种测定方法的比较 [J].武汉轻工大学学报,2009,28(2): 15-17.
- [12] 宣 寒.一点法测定壳聚糖的特性黏度 [J].安徽建筑大学学报,2008,16(3): 82-84.
- [13] 温华强,马家骅,王 静,等.疏水壳聚糖的制备及其凝血性能 [J].精细化工,2018,35(8): 1370-1375.
- [14] 汤朝晖,周露婷,谢志芳,等.利用分叶顺次肝切除术建立小鼠肝脏大部切除后再生模型 [J].第二军医大学学报,2009,30(5): 524-526.
- [15] 李 静.壳聚糖的改性及其止血功能研究 [D].长春:长春理工大学,2015.
- [16] 王艺旋,杨志伟,单天娇.壳聚糖的改性研究进展 [J].合成技术及应用,2016,31(3): 16-20.
- [17] 张 宜,喻 晶,曹利利,等.基于止血药研究的兔止血模型概述 [J].华南国防医学杂志,2015,29(7): 560-562.
- [18] 苗明三,尹俊涛,缪君娴,等.中药外用药理实验存在问题及解决思路 [J].时珍国医国药,2008,19(12): 2945-2946.
- [19] 陈 奇.中药药理研究方法学 [M].第 2 版.北京:人民卫生出版社,2006.