

浙江理工大学

---

硕士学位论文

---

介孔生物活性玻璃/壳聚糖止血材料的制备及研究

---

姓名：贾天保

---

申请学位级别：硕士

---

专业：纺织工程

---

指导教师：陈建勇

---

20120305

# 介孔生物活性玻璃/壳聚糖止血材料的制备及研究

## 摘要

每年有大量人死于失血过多，特别是在战场、野外突发事件等，因此止血材料的开发与研究一直是热点。壳聚糖是研究者开发的一种新型止血材料，由于其对人体生物相容性好，可生物降解、能促进伤口愈合等而逐渐用于临床。但由于纯壳聚糖材料止血作用有限，常需复合其他止血药如凝血因子等。介孔生物活性玻璃是一种很好的止血剂，其具有均匀的纳米级介孔结构、较高的比表面积和生物活性，但介孔止血材料是粉体止血材料，使用不便。本文通过冷冻干燥方法，将介孔生物活性玻璃（M58S）和壳聚糖（CS）复合制成具有纳米及微米级的多孔止血材料，并对材料结构和性能进行了研究；本论文主要包括以下四个方面的研究内容：

1. 介孔生物玻璃 M58S 的制备和交联剂的优选。首先，采用一步法制备 M58S，采用 TEM 和小角 XRD 对其进行表征，表明制备的介孔生物活性玻璃 M58S 具有孔道结构且孔道均匀，孔径大小为 5~8nm。其次，壳聚糖用交联剂的优选。本论文选用香草醛为交联剂，通过考察其多孔膜的力学性能来确定香草醛与壳聚糖之间的最佳比例。研究中分析了不同交联剂含量对壳聚糖力学性能的影响，结果表明：当壳聚糖和香草醛的质量比为 4:1 时，壳聚糖的力学性能达到最佳，此时壳聚糖多孔膜的拉伸应力为 0.28MPa。

2. M58S/CS 多孔膜材料的制备及其性能研究。结合 M58S 和 CS 的两者特性，采用冷冻干燥技术制备 M58S/CS 复合多孔膜。采用 SEM、FTIR、XRD 等测试手段对 M58S/CS 复合多孔膜的表面形貌，多孔结构，构相等进行表征，结果表明复合膜材料呈现连绵的多孔结构且孔隙分布较均匀；M58S 与 CS 的复合主要以物理作用为主，M58S 的加入对壳聚糖和香草醛之间的席夫碱反应无影响。探讨了介孔生物玻璃 M58S 加入后对 M58SCS 复合多孔膜的溶胀率、密度、吸水率、孔隙率和力学等性能影响，结果表明：随着介孔生物玻璃 M58S 含量的增加，复合多孔膜的吸水率和孔隙率下降；由于介孔粒子 M58S 的加入，改善了壳聚糖膜的保形性，可以根据材料的具体用途合理配置 M58S 和 CS 的比例；纯壳聚糖多孔膜的密度最小但力学性能最好，随着介孔生物活性玻璃 M58S 的加入，复合多孔膜的密度在增加，力学性能在下降。

3. M58S/CS 复合多孔膜的生物活性和生物降解性能。首先，对复合多孔膜的生物活性及生物降解性进行了研究，结果表明：随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加，复合多孔膜材料表面的沉积物越来越多，即 M58S 的加入提高了 CS 的生物活性。相关的生物降解性研究表明：纯壳聚糖多孔膜在溶菌酶溶液中降解速率最快。加入 M58S 后，不同比例

的 M58S/CS 复合多孔膜都具有良好的生物降解性；随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加，不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜降解率有一定程度的下降。

4. 基于动物实验的止血性能研究及其应用。首先，对制备出来的 M58S/CS 复合多孔膜进行了动物止血和细胞毒性测试，结果如下：介孔生物活性玻璃 M58S 粉，纯壳聚糖膜和不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜都有一定的止血性能，但止血效果和材料的形态以及 M58S 和 CS 的质量比有关。粉体试剂的止血效果不及多孔膜。复合多孔膜的止血效果随着 M58S 的含量的增加，止血时间和出血量都在减小。当介孔生物活性玻璃 M58S 含量为 60% 时，止血时间为 90 秒，出血量为  $0.4 \pm 0.02\text{g}$ 。通过细胞形态观察法和 MTT 比色法两种方法对纯壳聚糖膜和不同比例 M58S/CS 复合多孔膜进行细胞毒性测试，结果表明材料生物相容性好，是无毒的。其次，将 M58S/CS 的复合溶液涂覆在市场上普遍采用的医用脱脂棉纱布和吸收性明胶海绵上制备止血带，并进行动物止血试验。采用 SEM、FTIR、TG 等表征方法对止血带进行表征并对明胶海绵止血材料进行动物止血实验，结果表明：制备的止血带材料具有疏松多孔结构，保证了其透气性；M58S/CS 止血和棉质纱布有很好的相容性，有利于进一步改善止血纱布的性能；热分析表明随着 M58S 含量的增加，重量损失在减小，材料的热稳定性提高；动物实验表明将 M58S/CS 的复合溶液涂敷在明胶海绵后，提高明胶海绵的止血性能。

以上研究表明，本文采用冷冻干燥法制备的 M58S/CS 复合多孔膜具有较好的形态结构；介孔生物活性玻璃 M58S 的加入对材料机械性能、吸水率、降解性等性能有一定的影响，但提高了材料的生物活性和止血性能；细胞毒性测试表明材料是无毒的，并且将介孔生物活性玻璃 M58S 和壳聚糖的复合溶液涂敷在医用脱脂棉纱布和吸收性明胶海绵上拓宽了其应用领域。因此，该复合材料有望作为一种新型止血材料。

关键词：介孔生物活性玻璃；壳聚糖；冷冻干燥；止血材料

# The preparation and study of mesoporous bioactive glass/chitosan hemostatic material

## Abstract

Every year, many people die due to excessive hemorrhage, especially in the battlefield. Thus, the development of the hemostatic materials is a research hotspot in the field of biomedical engineering. As a new hemostatic material, chitosan is used in clinic for its excellent biological properties such as biodegradability, biocompatibility and wound healing activity. Owing to the limitation of chitosan's hemostatic effect, the hemostatic functional fillers are usually added. Mesoporous bioactive glass ( MBG ) has uniform nanoscale mesoporous structure, high specific surface area and good bioactivity. It could be also used as a hemostatic. However, it is inconvenient to use the MBG as the hemostatic because it is powder. In this paper, a novel composite material including mesoporous bioactive glass ( M58S ) and chitosan ( CS ) were prepared by lyophilization technique. Moreover, the structure and relative properties of films were studied. The main research contents and results were listed as follows:

1. The preparation of mesoporous bioactive glass M58S and optimization of cross-linker. Firstly, the mesoporous bioactive glass M58S was successfully prepared through one-step method and the structure was characterized by TEM and small angle XRD. The results showed that M58S had uniform mesoporous structure and the pore size was about 5-8nm. Secondly, the vanillin was selected as the cross-linker. The tensile strength of chitosan film was improved with different weight ration between chitoan and vanillin. The tensile strength was the best and the value was 0.28 MPa when the ration was 4:1.

2. The preparation and study of the M58S/CS composite porous films. Firstly, the surface morphology, porous structure of the M58S/CS composite porous films were investigated by SEM、FTIR and XRD. All the films were highly porous with continuous structure of well-interconnected pores. The M58S particles were dispersed as islands scattering in the composite scaffolds homogenously, and the M58S played little effect on the schiff base reaction between CS and vanillin. The interaction between M58S and CS could be found from the XRD results of M58S and CS. Secondly, the swelling ration, density, water adsorption, porosity and mechanical properties of M58S/CS composite porous films were studied. The effect of M58S content on these properties were also discussed, the results had been studied as follows: the water adsorption and porosity decreased with increasing of M58S content; the swelling property could be modulated by varying ratio of M58S and CS; the density of pure chitosan was the smallest, and the density of the composite films increased with increasing of M58S content.



However, the tensile strength decreased.

3. The in vitro bioactivity and degradation of the M58S/CS composite porous films. The results of in vitro bioactivity and degradation demonstrated that the amount of apatite on the surface of the composite film increased with increasing of M58S content. The apatite could be formed more efficiently on the composite films than that on the pure chitosan film, implying that the bioactivity of composite films was improved by increasing of M58S content. In vitro degradation behavior indicated that the composite films had good degradability.

4. Study of the hemostatic properties based on the animal experiments. Firstly, the hemostatic properties and in vitro cytotoxicity of the composite films were evaluated. The M58S, pure chitosan film and the composite films with different M58S/CS ratios had hemostatic effect. Nevertheless, the hemostatic effect had something to do with form of wound dressing and weight ration between M58S and CS. The hemostatic effect of porous films was better than the powder. With the increasing of M58S, the hemostatic time and amount of bleeding decreased. The hemostatic property was the best when the weight percentage of M58S was 60%, the hemostatic time was 90s and amount of bleeding was  $0.4 \pm 0.02\text{g}$ . The in vitro cytotoxicity of the composite films was studied through the observation of cell morphology and MTT assay. The results indicated that the composite films had good biocompatibility and were non-cytotoxicity against L929 cell. Secondly, the new hemostasis material was obtained through coating the composite solution of M58S and CS on the medical gauze and absorbable gelatin sponge. The wound dressing was characterized by SEM、FTIR、TG, and the hemostatic properties of gelatin sponge hemostatic material was evaluated. The results showed that the wound dressing had good air permeability because of its porous structure; the properties of the wound dressings could be improved for the compatibility M58S, CS and cotton gauze. Increased with the M58S content, the weight loss decreased and the thermal stability improved. The hemostatic effect of gelatin sponge was better when the composite solution of M58S and CS was coated on the gelatin sponge.

Above all, the M58S/CS composite porous films prepared by freeze-drying method showed a good morphological structure. The mechanical properties, water adsorption and degradation were affected by adding M58S, but the bioactivity and hemostatic of the composite films improved. The prepared films were confirmed non-cytotoxicity against L929 cell. The application fields of medical gauze and absorbable gelatin sponge were broadened by the incorporation of M58S and CS. Thus, the composite films could be potentially applied as a new wound dressing material.

**Keywords:** Mesoporous bioactive glass; Chitosan; Lyophilization; Wound dressing material

## 第一章 绪论

因车祸、摔砸伤、地震灾害、洪水灾害、手术中或手术后以及其它突发事件,我国每年有上百万人死于失血过多,如战场上 50%的阵亡士兵是由于出血过多所致<sup>[1]</sup>。因此,止血材料的研究一直是医学上的热点。

目前,止血材料主要分为生物性和化学性两类。生物性的止血材料主要包括纤维蛋白胶和胶原蛋白;化学性止血材料主要有壳聚糖、多微孔类无机材料(如沸石(zeolite)等)、可溶性止血纱布、组织胶等。但生物性止血材料如纤维蛋白胶和胶原蛋白成本过高、止血速度慢而且存在疾病感染等危险;可溶性止血纱布主要存在止血时间过长、对出血迅猛者止血性能差等。因此,研究新型的止血效果优异的材料,一直是研究者孜孜不倦的追求。自从 Malette WG 等<sup>[2]</sup>发现壳聚糖具有较好的止血性能后,很多研究者对壳聚糖的止血性能展开了广泛研究<sup>[3,4]</sup>,但研究发现壳聚糖材料的止血作用有限,对于广泛的出血创面止血效果不甚理想,常需复合其他止血药如凝血因子等<sup>[5,6]</sup>;但凝血因子等生物止血剂的保存条件比较苛刻,储备不便,价格较高等不足,使壳聚糖止血材料的应用受到很大程度的制约。因此,对壳聚糖止血材料的改性研究成为新的重点和热点。

沸石是最早的介孔类止血材料,目前已经获得美国 FDA 批准上市。但介孔材料在止血使用过程中依然存在许多问题亟待的问题,如介孔沸石分子筛在使用过程中放热灼伤组织表面<sup>[7]</sup>;沸石分子筛生物活性低,使用过程中难以被人体吸收,且介孔止血材料都是粉体止血材料,使用过程中极为不便。近年来,有机和无机复合止血材料成为一个热点,本文将通过对具有止血功能的壳聚糖和介孔生物活性玻璃 M58S 进行复合,并对复合止血材料的结构和性能进行分析,以望开发一种新型的止血材料。

### 1.1 壳聚糖

#### 1.1.1 壳聚糖的结构特点和物理性质

甲壳素又名几丁质(Chitin),是一种天然高分子化合物,化学名为(1,4)-2-乙酰氨基-2-脱氧- $\beta$ -D-葡聚糖,是由 N-乙酰氨基葡萄糖通过  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) 苷键缩合而成的直链状多糖,是自然界中存在的唯一天然碱性多糖。其存在于甲壳类动物(蟹、虾等)以及昆虫外壳中,在蘑菇、贝类、藻类、软骨动物及真菌类细胞壁中亦广泛存在;是地球上数量最大的含氮类有机化合物,其产量仅次于植物纤维,是继淀粉、纤维素之后人类在地球上发现的第三大类生物资源;但不溶于水及有机溶剂,因此很难被人体吸收利用。

壳聚糖是甲壳素的 N-脱乙酰基产物,化学名为(1,4)-2-氨基-2-脱氧- $\beta$ -D-葡聚糖。通常认为 N-乙酰基脱去 55%以上可以称之为壳聚糖,由于脱乙酰度不会超过 100%,壳聚糖

实际上是两者单体组成的线性共聚体。壳聚糖不溶于水和碱性溶液中，能够溶于稀的盐酸、硝酸等无机酸中以及大部分有机酸中，其应用要比甲壳素广泛。壳聚糖之所以能够溶于稀的酸溶液中是因为其分子中有大量的游离氨基，氨基中的氮原子有未共用的电子对，使得氨基呈现弱碱性，可以和溶液中的一个氢离子结合，使得壳聚糖成为带正电荷的聚电解质，破坏了壳聚糖分子间和分子内的氢键作用，使其溶解性得到改善<sup>[8]</sup>。两者的结构图如下：

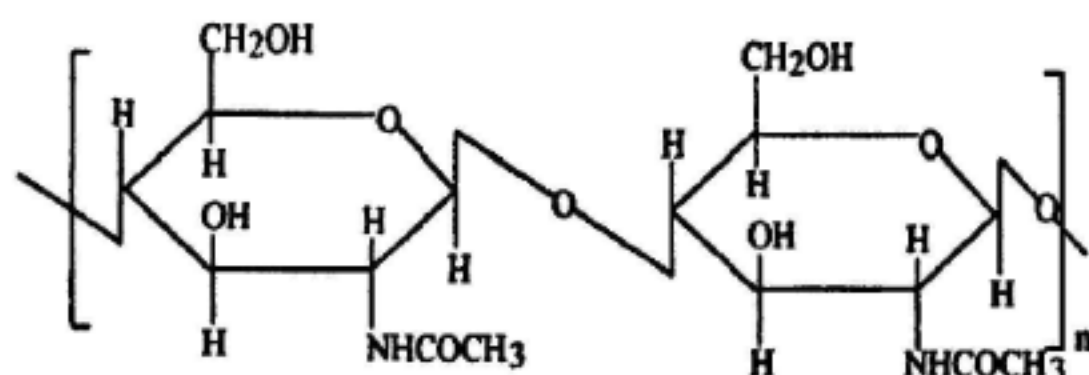


图 1.1 甲壳素的结构图  
Fig.1.1 Structure of Chitin

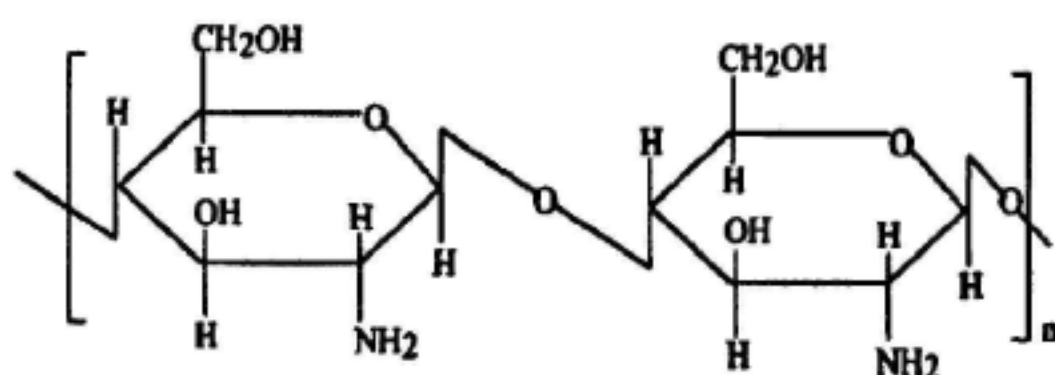


图 1.2 壳聚糖的结构图  
Fig.1.2 Structure of Chitosan

纯的壳聚糖为白色或灰白色、半透明的片状固体。从其结构图中看到壳聚糖分子链上大量的羧基和氨基，有较强的吸水能力。另一方面，壳聚糖具有良好的成膜性能，由于其溶于酸性溶液后成为具有带正电荷的聚电解质，通过静电作用力能和其带相反电荷的物质形成复合物，在成膜过程中能够形成互穿网络结构，提高膜的强度，拓宽壳聚糖生物应用领域<sup>[9]</sup>。影响壳聚糖的性能主要由脱乙酰度和分子量决定。

(1). 脱乙酰度。脱乙酰度是指(1,4)-2-氨基-2-脱氧-β-D-葡聚糖和(1,4)-2-乙酰氨基-2-脱氧-β-D-葡聚糖单元的比值，是表征壳聚糖质量的一个重要指标，对壳聚糖的溶解性和溶液的性质有显著的影响，如溶液的溶解能力、粘度、离子交换能力以及与氨基有关的化学反应等。关于壳聚糖脱乙酰度的测定方法有很多<sup>[10]</sup>，如红外光谱法、裂解气相色谱分心法、凝胶渗透色谱法、紫外光谱法、紫外光谱一阶导数法、核磁共振法、热分析法、各种滴定法和高效液相色谱法，以及最近使用的近红外法<sup>[11]</sup>。脱乙酰度的高低对壳聚糖的抗菌性以及酶解性有很大的影响<sup>[12]</sup>，其值越高，-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>的密度就越大，壳聚糖的抗菌性就越好，尤其是对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抑制作用最好；且脱乙酰度越高，壳聚糖酶和



溶菌酶的酶解速率越快。另外,有相关文献指出壳聚糖的止血效果也受到脱乙酰度的影响<sup>[13]</sup>,其值越高,伤口周围纤维原细胞生长的越快,即高脱乙酰度壳聚糖能够加速伤口的愈合。

(2).分子量是衡量壳聚糖及其衍生物的重要参数,其溶解性随着分子量的增大而降低,强度、硬度和耐热性等随着分子量的增加而增大;分子量越低,材料的生物降解速率越高;当壳聚糖分子量降低时,分子链柔性减弱,溶解性提高,壳聚糖的生物活性能够提高。

### 1.1.2 壳聚糖的生物活性

近年来,国内外研究者对壳聚糖做了大量的研究,发现壳聚糖具有良好的生物相容性,生物降解性<sup>[10]</sup>,止血性能<sup>[14]</sup>,加速伤口愈合<sup>[15]</sup>以及无毒<sup>[10]</sup>等性质,其应用领域很广泛。其性质主要体现在以下几个方面:

(1) 良好的生物相容性。壳聚糖具有纤维素和胶原质两者的生物性能,对人体组织器官及细胞几乎无免疫原性,植入体内无排斥现象。已有相关研究将壳聚糖做人造皮肤,研究发现其具有良好的生物相容性。Malafaya 等<sup>[16]</sup>用壳聚糖成功制备出了支架材料,并将支架材料植入大鼠腰椎内,定期进行生物组织学观察和细胞免疫性检测,发现支架在大鼠体内生长状况良好,无炎症现象发生。Mi Fwu-Long<sup>[17]</sup>等制备出了壳聚糖微粒,并将微粒植入大白鼠骨肌中,发现微粒能够与骨细胞紧密结合,生物相容性好。

(2) 良好的生物降解性。壳聚糖在生物体内主要是通过溶菌酶的作用,使得壳聚糖大分子链断裂而水解成为低分子的壳寡糖和葡萄糖胺,这些低分子糖类物质可以被人体吸收或者通过新陈代谢作用排出体外<sup>[18]</sup>。其降解速率与其结晶度和脱乙酰度相关<sup>[19]</sup>,随着脱乙酰度的提高其降解速率降低,高结晶度的壳聚糖会在人体内持续数月。对于植入生物体内的材料其生物降解速率必须与组织的生长相比配,因此可以根据新生组织生长周期来选择合适脱乙酰度的壳聚糖。

(3) 抑菌、抗菌性。壳聚糖是一种天然抗菌剂,抗菌谱广,能有效抑制细菌和真菌的生长和繁殖,与其他抗菌剂相比,具有抗菌活性高、杀灭率高,对哺乳动物细胞毒性低等优点<sup>[20]</sup>,其脱乙酰度、分子量、溶液的浓度和 pH 值等会影响其杀菌效果。壳聚糖抗菌原理大致可以分为以下几类:在酸性条件下,壳聚糖分子链中的氨基由于质子化作用,使其带正电荷,它能够与细胞表面带负电荷的大分子基团相互作用,在细胞表面形成一层致密层阻止细菌对营养物质的吸收,影响其新陈代谢作用致使细菌死亡;同时影响细胞壁的形成,打破自然状态下细胞壁合成和溶解平衡,使细胞趋向溶解,细胞膜由于渗透压过大而



变形破裂<sup>[21]</sup>。低分子量的壳聚糖可以通过渗透作用穿过细胞壁进入到细胞内部,和 DNA 作用,干扰 RNA 和蛋白质的形成,同时阻止各种酶的作用,从而抑制细菌的生长,使其死亡<sup>[22]</sup>。

(4) 抗凝血和促进伤口愈合。壳聚糖不仅具有良好的止血作用还能够加速伤口愈合。伤口愈合大致分为 2 个阶段:炎症反应阶段和新组织生成阶段<sup>[15]</sup>。在炎症反应阶段壳聚糖可以加速炎症细胞到伤口的浸润从而加速伤口的清洁<sup>[23]</sup>。在新组织生成阶段,壳聚糖可以刺激巨噬细胞移行,纤维母细胞的增生和 III 型胶原纤维产生,从而加速伤口愈合。自从 1983 年 Malette WG 等<sup>[2]</sup>发现壳聚糖可以作为止血剂以来,人们对其止血机理做了大量研究。研究发现壳聚糖与正常的凝血机制无关,而是与红细胞相关。壳聚糖对红细胞的凝集作用不仅与本身的结构和分子量有关,更依赖其阳离子效应<sup>[24]</sup>,当红细胞经过神经氨酶处理后其表面呈中性,壳聚糖对红细胞的凝集作用减弱。另外,有研究表明壳聚糖中的氨基还能够吸附血脂<sup>[25]</sup>,并且红细胞上有丰富的酯质。从以上分析可知,壳聚糖通过对红细胞的凝集而起到止血作用;另一方面,壳聚糖对血小板有粘附和聚集作用。Sugamori T 等<sup>[4]</sup>发现壳聚糖对血小板有刺激作用,能使血小板由静止相转变为机能相,促使其释放  $\beta$ -TG、PF-4 等促凝血因子。Chou 等<sup>[26,27]</sup>研究发现,壳聚糖对血小板的凝集作用随着壳聚糖浓度的增加而增强,并且壳聚糖可以刺激血小板细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  离子浓度的增加,从而促进 GP II b/IIIa 复合物的分泌,加快血小板的粘附和聚集。壳聚糖有可能就是在上述两者机制的共同作用下起到止血作用。

### 1.1.3 壳聚糖的应用

#### (1) 组织工程

组织工程是将体外培养扩增的正常组织细胞吸附于一种具有优良细胞相容性并可被机体降解吸收的生物材料上形成复合物,然后将其植入人体组织、器官的病损部位,在作为细胞生长支架的生物材料逐渐被机体降解吸收的同时,细胞不断增殖、分化,形成新的并且其形态、功能方面与相应组织、器官一致的组织,从而达到修复创伤和重建功能的目的。壳聚糖具有良好的生物相容性和生物降解性,因此是一种理想的组织工程用材料。

作为组织工程用材料,壳聚糖材料的生物活性相对较低,往往需加入其它一些物质来改善其生物活性,如羟基磷灰石、明胶、胶原等。Kong 等<sup>[28]</sup>研究了纳米羟基磷灰石对壳聚糖支架生物活性的影响,研究表明在相同矿化时间内,纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合支架表面沉积物要多于纯壳聚糖支架,且细胞在复合支架的增殖生长情况要好于纯壳聚糖支架,说明复合支架的生物活性好,更适合应用于组织工程领域。Mathew 等<sup>[19]</sup>将壳聚糖、

明胶、纳米羟基磷灰石三者通过冷冻干燥技术有机复合在一起,发现复合支架具有良好的生物活性和生物降解性,无毒,细胞能够在支架上良好生长,是一种潜在的良好组织支架材料。

## (2) 载药系统

壳聚糖无毒,可内服,无副作用,因此可以作为理想的载药材料。壳聚糖可以用于多种药物和生物制品的理想载体。目前常用的载药方式,是把壳聚糖作为互穿网络结构的一部分。Lee 等<sup>[29]</sup>将聚乙烯和  $\beta$  型壳聚糖混合以后用紫外线照射作为交联剂制备出了部分互穿网络结构的水凝胶,此胶体有理想的机械性能和较高的吸水率。Gupta 等<sup>[30]</sup>用相似的方法制备出载药系统,在载药研究过程中,将戊二醛作为混合体的交联剂,其载药能力可达到 93%。有的研究将无机硅酸盐和有机壳聚糖复合制备出复合膜用于载药<sup>[31]</sup>,此复合膜不仅对 pH 值、药物的离子浓度敏感,而且外界温度的变化也会影响载药过程。

壳聚糖微球和纳米颗粒也可以应用于载药领域。Mi 等<sup>[17]</sup>采用雾化干燥法制备出直径较小、球形度好的壳聚糖微粒,与戊二醛交联后的壳聚糖微粒相比,用京尼平交联该微粒后,其具有更好的生物相容性并且在体内可以作用更长时间,因此该微粒可作为在人体内作用较长时间药物的载体。Hu 等<sup>[32]</sup>制备出的壳聚糖纳米粒子药物缓释过程对 pH 值比较敏感,其可以应用于胃部的药物缓释。

## (3) 水处理工程

壳聚糖大分子链中有大量游离的氨基,可借助氢键或者离子键作用形成网状结构,和金属离子之间形成配位作用,从而对金属离子有很强的吸附作用。壳聚糖已经被用于多种废水的重金属离子吸收。壳聚糖溶液的 pH 值和脱乙酰度都会影响吸收效率。在偏酸性条件下,壳聚糖中的氨基会转变为  $-NH^3+$ ,对金属离子的有效吸附作用减弱。脱乙酰度的高低影响壳聚糖分子中游离氨基的数目和结晶度,从而影响壳聚糖的溶解性,进而影响对金属离子的吸收<sup>[33,34]</sup>。

Rhazi 等<sup>[33]</sup>研究了铜离子和壳聚糖之间的作用机制,发现铜离子浓度和溶液的 pH 值会影响壳聚糖对其的吸收。当铜离子和氨基离子浓度比为 0.5,溶液的 pH 值为 5~7 时,壳聚糖能最大化的吸收废水中的铜离子。由于壳聚糖适用的 pH 值范围较小,在酸性条件下产品不稳定,所以很多研究通过交联壳聚糖来提高其稳定性。Baroni 等<sup>[35]</sup>利用醛基和氨基之间的席夫碱反应,采用戊二醛为交联剂,制备出改性壳聚糖膜,研究了对铬离子的吸附。在 pH 值为 2 和 6 时,壳聚糖对铬离子吸附值分别为 81.1mg/g 和 29.5mg/g,扩大了壳聚糖在废水处理中的 pH 值适用范围。

#### (4) 止血材料

壳聚糖具有止血和加快伤口愈合等特性,因此关于壳聚糖止血材料研究的报道较多。现壳聚糖已经被制成各种各样的止血材料。

##### ① 壳聚糖纤维

理想的生物止血材料不仅要具有良好的生物相容性,还要能提高真皮和表皮层组织的生长。Chen 等<sup>[36]</sup>应用静电纺丝技术制备出壳聚糖与明胶的复合纳米纤维。胶原是一种很好的止血剂,能诱导血小板聚集,能启动凝血机制,直接或间接参与凝血的多个过程,目前有胶原膜,胶原凝胶,胶原海绵等止血材料<sup>[37]</sup>。研究表明制备出的纳米纤维膜不仅加速伤口愈合还提高了材料的组织相容性。

Liu 等<sup>[38]</sup>设计了一种新颖的双层复合材料,上层为大豆蛋白纤维的非织造物,下层为经过京尼平交联后的壳聚糖膜。此复合材料不仅能够防止伤口脱水,并且具有良好的力学性能。体内组织学表明复合材料不仅可以加快伤口的愈合,而且伤口愈合去除材料时无粘连现象,不会破坏新生组织。

##### ② 壳聚糖水凝胶

水凝胶柔软,可有效与伤口接触,能够为伤口提供一个良好的润湿环境,促进伤口愈合。Ribeiro 等<sup>[39]</sup>对壳聚糖作为止血材料进行了相关性能的评估,发现壳聚糖水凝胶能够加快细胞的贴服和增殖。这是由于静电力作用刺激壳聚糖和葡萄糖胺聚糖相互作用,激活一些生长因子从而刺激细胞生长和增殖<sup>[40]</sup>。在动物模型测试中,壳聚糖水凝胶降解产物是无毒的,且对受损皮肤形态有一定的影响。为了加快伤口的愈合,很多研究者对壳聚糖进行了改性,如 Kweon 等<sup>[41]</sup>将水溶性的壳聚糖和肝磷脂混合制备出复合水凝胶;Murakami 等<sup>[42]</sup>等将甲壳素、壳聚糖、藻酸盐、褐藻糖胶四者复合制备出功能性凝胶止血材料,其可以为伤口愈合提供良好的环境,促进伤口愈合。

##### ③ 壳聚糖膜

有研究表明壳聚糖膜也可作为止血材料,并且对材料做了相关性能的分析。研究结果表明网状结构的壳聚糖膜能加快伤口的愈合,对上皮层的再生有积极的影响,可以作为一种潜在的人类止血材料<sup>[43]</sup>。为了提高壳聚糖膜的性能,很多研究者对其进行了改性研究,如 Sliva 等<sup>[44]</sup>把壳聚糖膜在氮气或者氩气等离子体中处理 10~40min 后,结果发现细胞能在壳聚糖膜表面能很好的贴服,其生物相容性得到了很大的改善;Clasen 等<sup>[45]</sup>制备出了水溶性的壳聚糖膜,膜的透气性、保水能力、拉伸应力满足医用止血敷料的要求。

在伤口护理过程中,抗药性微生物是面临的主要问题,其有可能感染伤口延缓伤口的



愈合,因此一些新的抗菌剂被研发来处理此问题<sup>[46]</sup>。银是一种很好的抗菌剂,Thomas 等<sup>[47]</sup>利用壳聚糖对金属离子的螯合作用,将纳米银加入到壳聚糖溶液中,制备出壳聚糖/纳米银膜,其具有优秀的抗菌能力,可以用于包装、止血敷料等多领域。Li 等<sup>[48]</sup>将 ZnO 和银同时加入壳聚糖溶液中,制备出了三者的混合膜,氧化锌粒子和银粒子在壳聚糖膜中均匀分布,其抗菌性能要优于壳聚糖/银混合膜。

#### ④ 壳聚糖海绵

海绵柔韧性好,具有相互连通的微孔结构,由于其特殊的结构使其具有超强的吸附能力。海绵状的止血材料能为伤口愈合提供湿润的环境,快速吸收血液中的水分和伤口表面分泌物,促进凝血,加速伤口愈合,减少伤疤的形成,可应用于烧伤。Jayakumar 等<sup>[49]</sup>将 ZnO 均匀分散到壳聚糖的水凝胶中,通过冷冻干燥技术制备出了多孔 CS/ZnO 复合海绵,对材料的抗菌、血液凝固、细胞毒性等性能进行了测试,结果表明复合海绵能够缩短血液凝固时间,抗菌性能好,对人体真皮成纤维细胞无毒害作用,可以作为一种潜在的止血材料。Mi 等<sup>[50]</sup>制备出不对称的壳聚糖海绵,有致密层和疏松层。致密层可以防止细菌的渗透和伤口表面水分的蒸发,给伤口愈合提供一个良好的环境。疏松层可以将伤口表面的分泌物排出,抑制伤口出血,促进新组织的生长,加快伤口愈合。

## 1.2 生物活性玻璃

### 1.2.1 生物活性玻璃研究概况

生物活性玻璃一般是指  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$  系统,部分含少量的 Na、Mg、Al、F、B 等元素。自从 1971 年 Hench.L.L 教授<sup>[51]</sup>发现了 45S5 生物活性玻璃以来,其引起来了科学家的广泛关注和研究。如德国的 Bromer 等开发的 Ceravital<sup>®</sup>玻璃陶瓷<sup>[52,53]</sup>,提高了生物活性玻璃的机械强度;日本的 Kokubo 课题组研制出具有力学性能优良同时能与骨组织形成较好键合的 A-W 玻璃陶瓷<sup>[54,55]</sup>;德国的 Vogel 和 Holand 研制了 Bioverit<sup>®</sup>玻璃陶瓷<sup>[56]</sup>,可对此玻璃陶瓷进行任意形态上的切削,改善了生物玻璃的可加工性。以上生物活性玻璃和玻璃陶瓷都是采用传统熔融烧结法制备而成的,玻璃结构致密,密度大,但比表面积小,其生物活性主要依赖于化学组成;而且由于碱金属成分的存在,对烧结坩埚要求较高,需采用铂金坩埚;且对高温设备也有一定要求,能耗较大。进入上世纪 90 年代,随着溶胶凝胶和纳米技术的兴起,人们开始关注尺寸效应、微观精细结构对材料性能的影响。2000 年,Zhong 等<sup>[57]</sup>通过溶胶凝胶制备出 58S 和 77S 生物活性玻璃;2004 年,Zhao 等人<sup>[58]</sup>采用溶剂挥发自组装法制备出有序介孔生物活性玻璃,首次在生物玻璃中引入介孔尺寸,发现介孔生物活性玻璃比传统生物活性玻璃具有更好的沉积羟基磷灰石的能力即更好的生物活



性；Vallet-Regi 等人也进一步证实了这一结果<sup>[59]</sup>。2006 年，Brunner 等人<sup>[60]</sup>用火焰法合成了生物玻璃纳米粉体，并体现出比羟基磷灰石和碳酸钙更好的生物活性。Kim 等人<sup>[61]</sup>也制备得到了纳米生物玻璃纤维，并体现出了很好的生物活性。Yan 等<sup>[62]</sup>人制备出了介孔生物活性玻璃，其具有良好的生物活性。

### 1.2.2 生物活性玻璃的组成和结构

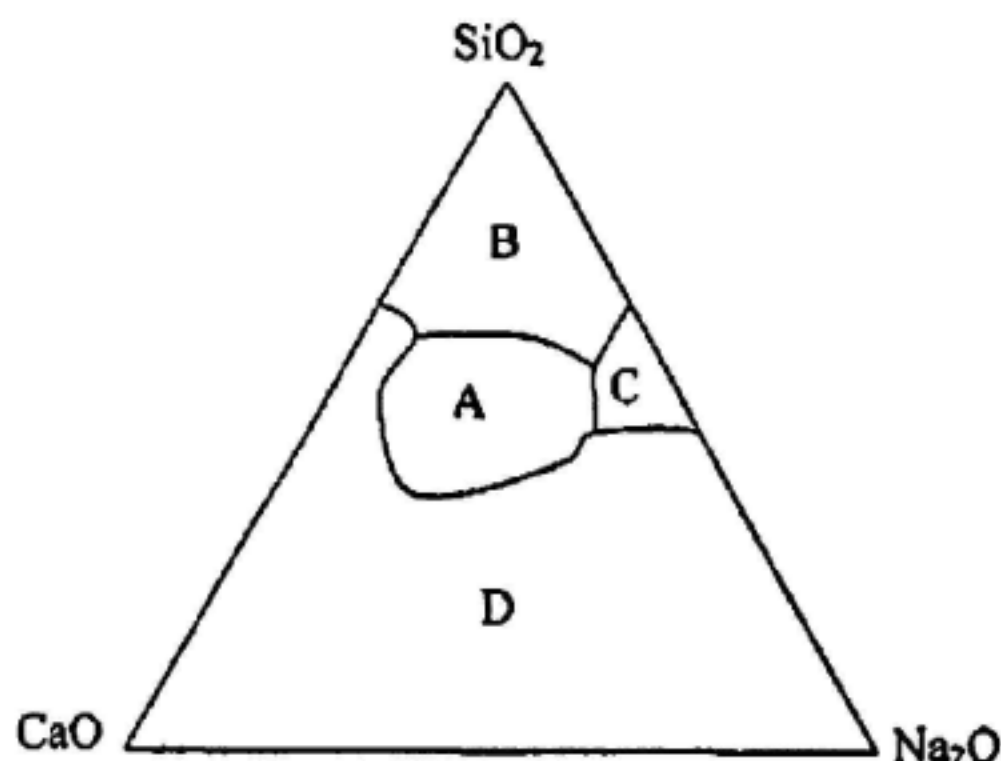


图1.3 生物活性玻璃的活性组成范围  
Fig.1.3 Bioactive area of the Ca-Si-Na-P glass

由生物活性玻璃简介部分可知生物活性玻璃的主要组成为 $\text{SiO}_2$ 和 $\text{CaO}$ ，这两种氧化物在生物活性玻璃中的重量百分比一般在70%以上，因而生物活性玻璃主要是硅氧四面体形成网络框架；一价的钠离子，二价的钙离子等离子嵌在 $\text{Si-O}$ 网络中，而五价的磷在网络中的存在形式有着两种不同的观点，一种认为磷同钙和钠都不参与网络构建，嵌在 $\text{Si-O}$ 网络中<sup>[63]</sup>；另一种认为磷可以与硅一起构成网络框架<sup>[64]</sup>。在生物活性玻璃制备过程中， $\text{Ca}$ 与 $\text{P}$ 是骨组织的主要无机成份， $\text{Si}$ 是形成玻璃的关键，碱金属和碱土离子则对玻璃性能起着调节作用（如图1.3）。从图1.3可以看出，只有组成成分落在A区域内的玻璃才具有生物活性；B区域内由于 $\text{SiO}_2$ 含量过高，制备出来的玻璃不具有生物活性；C区域内的玻璃降解速度太快，无法应用于生物医药领域；而D区域无法形成玻璃<sup>[65]</sup>。

材料的组成和结构影响材料的性能，因此在生物活性玻璃制备过程中加入一些其他元素会影响生物活性玻璃的性质，如加入放射性钷元素，制备出来的生物活性玻璃可以应用于治疗肿瘤细胞<sup>[66]</sup>。加入强磁体，在外界交变磁场的作用下生物活性玻璃能产生热效应，因此可以杀死热敏感的病毒细胞<sup>[67]</sup>。

介孔生物活性玻璃是在生物活性玻璃材料基础上合成研制的一种新型有序纳米介孔生物活性玻璃材料，与传统的生物活性玻璃相比，介孔生物活性玻璃由于具有均匀的纳米

级的介孔结构及较高的比表面积，在人体模拟生理溶液中浸泡后可在较短的时间内形成表面类似于天然骨中无机矿物的羟基磷灰石，具有较高的生物活性和较强的降解性，因而被认为是更好组织修复替代材料。

### 1.2.3 生物活性玻璃的制备方法

生物活性玻璃的制备方法大致有熔融法和溶胶凝胶法两种。传统的生物活性玻璃是采用熔融法制备而成。采用溶胶凝胶法制备的生物活性玻璃比用熔融法制备的生物活性玻璃具有更高的生物活性<sup>[57]</sup>。熔融法制备生物活性玻璃是将  $\text{Na}_2\text{O}$ 、 $\text{CaO}_2$ 、 $\text{SiO}_2$ 、 $\text{P}_2\text{O}_5$  等原料混合均匀后在高温条件下烧结而成。适当调整熔制温度可以提高生物活性玻璃的生物活性，生成的较细小的晶粒可以提高玻璃的断裂韧性，但该法制备的生物活性玻璃致密无孔、比表面积小，而且当  $\text{SiO}_2$  含量超过 60% 时生物活性玻璃失去生物活性。溶胶凝胶法是用含高化学活性组分的化合物作前驱体，在液相下将这些原料均匀混合，并进行水解、缩合化学反应，在溶液中形成稳定的透明溶胶体系，溶胶经陈化胶粒间缓慢聚合，形成三维空间网络结构的凝胶，凝胶网络间充满了失去流动性的溶剂，形成凝胶。凝胶经过干燥、烧结固化制备出分子乃至纳米结构的材料。采用溶胶凝胶法制备生物活性玻璃时一般采用无机盐或者金属醇盐为前驱体，通常将正硅酸乙酯（TEOS）作为二氧化硅的前驱体，磷酸三乙酯（TEP）作为五氧化二磷的前驱体，在无机盐制备生物活性玻璃过程中，TEOS 和 TEP 在酸或碱的催化作用下在水解形成溶胶，然后加入硝酸盐等混合均匀，搅拌若干小时反应后得到凝胶，然后经过干燥和煅烧后得到生物活性玻璃；在金属醇盐制备生物活性玻璃过程中是将 TEOS、TEP 和金属醇盐等混合均匀后，让其水解凝胶化，再经陈化、干燥，最后经煅烧即可得到生物活性玻璃<sup>[68]</sup>。溶胶凝胶法与熔融法相比其制备的生物活性玻璃颗粒小，比表面积大，操作温度低，有利于烧结，制备过程容易控制，而且制得的产品在分子或原子水平上达到高度均匀<sup>[69]</sup>。由于溶胶凝胶法制备的生物活性玻璃成分其原始配方和化学计量偏差较小，因此介孔生物活性玻璃制备可以采用溶胶凝胶法。制备介孔生物活性玻璃时需要选择合适的模板剂（ $(\text{C}_m\text{TMA})\text{Br}$ 、PEO-PPO 嵌段共聚物等）加入生物活性玻璃的制备体系中，制备过程中利用模板剂的自组装；同时结合各种前驱体与模板剂共同作用形成凝胶状物质；经过高温煅烧等处理后即可得到介孔生物活性玻璃。

### 1.2.4 生物活性玻璃材料的应用

#### （1）药物缓释材料

介孔生物活性玻璃由于具有规整有序的孔道结构，较大的孔容和比表面积，各种各样的药物可以包埋在其孔道里，并且能够对药物进行控释，因此介孔生物活性玻璃

在药物缓释领域应用很广泛。周艳玲等<sup>[70]</sup>研究了介孔生物活性玻璃 M58S 药物缓释性能, 研究表明作为亲水性的抗癌药物表阿霉素 (EPI) 的载体, 介孔生物活性玻璃 M58S 对药物的装载量是普通溶胶凝胶生物活性玻璃 58S 的 3 倍多, 具有更缓慢的释放速率, 并且释放介质的 pH 值对 EPI 的释放速率有很大的影响, pH 值越低生物活性玻璃表面的硅羟基越难与 EPI 分子形成氢键, 因此释放速率也越快。装载有抗癌药物的介孔生物活性玻璃给药系统可以在修复骨组织的同时, 持续释放抗癌药物分子, 有望成为骨肿瘤治疗的新方法。介孔材料之所以具有良好的药物缓释作用, 是因为其具有较高的比面积和规则有序的孔道; 对药物分子有很好的吸附作用可以实现对药物的储藏; 由于介孔生物活性玻璃分子中存在大量的硅羟基, 利用硅羟基的高活性可以在其表面接枝上功能性基团, 利用功能性基团与药物分子之间较强化学键作用实现对药物的储藏; 同时对介孔材料表面改性, 不仅可以提高其载药量还有利于减慢药物缓释速度; 将药物分子载入介孔孔道后, 可以利用氢键作用或者利用环境响应性的材料对孔道口进行封盖实现药物储藏。将药物载入人体后, 主要是通过扩散作用将药物从孔道内运送到孔道外<sup>[68]</sup>, 实现缓释作用。

## (2) 组织工程

生物活性玻璃具有良好的生物活性, 因此在组织工程领域应用很广泛, 但生物玻璃本体强度差, 难以成型大尺寸和复杂形状的材料, 因此有必要和其他材料复合。近年来有机无机复合材料已经得到深入的研究<sup>[71]</sup>, 而且复合材料应用范围广泛。生物活性玻璃及其复合多孔材料可以弥补壳聚糖、丝素蛋白、胶原蛋白等组织工程支架材料在生物活性和细胞相容性等方面的不足。谢林等<sup>[72]</sup>制备出了 58S 生物玻璃/壳聚糖复合多孔支架材料, 生物矿化实验表明具有良好的生物活性, 小鼠骨髓间充质干细胞在支架材料上培养 5 天后黏附生长良好, 说明细胞相容性好, 支架材料具备做为骨组织工程支架材料的基本条件。Li 等<sup>[73]</sup>将聚己内酯与介孔生物活性玻璃复合制备出多孔支架材料。研究表明介孔生物活性玻璃的加入提高了多孔支架材料的亲水性, 并且能加速诱导羟基磷灰石的在材料表面上的沉积, 支架材料有很好的生物活性。目前关于介孔生物活性玻璃的复合支架材料鲜有报道, 而就有关壳聚糖/羟基磷灰石复合多孔膜<sup>[74]</sup>, 壳聚糖/磷酸钙复合多孔支架材料<sup>[75]</sup>等有机无机复合材料的研究很多。鉴于介孔生物活性玻璃的高比表面积及孔道规整性, 故制备有关介孔生物玻璃的组织工程用复合支架的应用前景是十分良好的。

## (3) 止血材料的应用

除了可以应用于药物缓释和组织工程领域外, 生物活性玻璃还可以应用于止血领域, 拓宽了其应用范围。Todd A 等<sup>[76]</sup>指出生物活性玻璃可以作为良好止血材料, 通过水合



作用生物活性玻璃可以释放出  $\text{Ca}^{2+}$ ，钙离子能促进血液的凝固，并且生物活性玻璃粒子的形状和粒径都会影响止血效果。Stucky 等<sup>[77]</sup>人研究发现介孔生物活性玻璃比传统生物活性玻璃具有更好的止血活性。关于介孔止血材料国内也有相关研究，复旦大学余承忠教授等<sup>[78]</sup>发现介孔生物活性玻璃具有很好的止血效果并申请了国家发明专利，随后华东理工大学刘昌胜<sup>[79]</sup>教授制备出了介孔硅基干凝胶，其具有很好的止血性能。

### 1.3 本课题的目的与主要内容

#### 1.3.1 研究目的

随着止血材料的长足发展，快速止血和功能性止血将是未来止血带发展的方向。因此，如何把两种具有良好止血功能的材料有机复合，并赋予一定的新功能是本研究开发的重点。本研究将从制备介孔生物活性玻璃 M58S 与壳聚糖复合多孔膜材料入手，将根据壳聚糖良好的成膜性能、止血性能以及介孔生物活性玻璃良好的快速止血性能，开发一种原料易得、价格便宜、止血速度快、生物相容性好、可生物降解、能促使创面快速修复及其它功能性如止痛等的快速止血材料；进一步将介孔生物活性玻璃与壳聚糖进行复合，研究不同比例材料的止血性能，然后将开发不同形貌如膜、片、多孔等止血材料以满足不同临床应用的需求。通过探讨介孔生物活性玻璃与壳聚糖复合多孔工艺优化，为设计具有既能快速止血、又能促进创面修复和抗菌的新型的快速止血材料的开发奠定基础。

#### 1.3.2 研究内容

壳聚糖材料止血作用有限，对于广泛的出血创面止血效果不甚理想，常需复合其他止血材料如凝血因子等<sup>[5,6]</sup>，而凝血因子等生物止血剂的保存条件比较苛刻，储备不便，使得价格较高，这又为壳聚糖快速止血材料的广泛应用带来阻碍。由于介孔生物活性玻璃的粉体特性在具体应用时带来不便。如何将两者特性有效结合，制备具有快速止血和可生物降解的止血材料，是本课题的研究意义所在。围绕本课题的研究目的，本文主要研究内容分为以下几个部分：

(1) 介孔生物活性玻璃 M58S 的制备和交联剂的优选。介孔生物活性玻璃 M58S 粉体制备及其结构形貌研究；在壳聚糖溶液中加入不同量的交联剂，考察不同交联剂含量对壳聚糖力学性能和吸水性能的影响，进而优化交联剂的用量。

(2) M58S/CS 复合多孔膜材料的制备和表征。M58S/CS 复合多孔膜的制备及其性能研究。分析复合多孔膜的微观结构；通过不同测试手段研究不同含量 M58S 对复合多孔膜结构的影响；研究改性后复合多孔膜的吸水率、孔隙率以及力学性能等性能，为其应用提供一定的实验和理论依据。

(3) M58S/CS 复合多孔膜的生物活性和生物降解性能研究。探讨不同比例 M58S 的加入对改性后复合多孔膜的生物活性、生物降解性、止血性能以及细胞毒性等性能的影响。

(4) 基于动物实验的止血性能研究及其应用拓展。将 M58S/CS 复合溶液分别涂覆在脱脂棉纱布和可吸收性明胶海绵上，进行动物实验，对其止血效果展开分析和探讨，拓展 M58S/CS 复合多孔膜新型止血材料的应用范围。

## 第二章 介孔生物玻璃 M58S 的制备和交联剂的优选

### 2.1 引言

合成有序介孔生物活性玻璃的常用方法有溶剂挥发自组装法和两步酸催化自组装水热合成法,这两种方法最大的缺点是合成时间长(溶剂挥发自组装法一般需要两周左右,二水热法至少需要一周左右)和合成量少(两种方法一次一般只能合成 2g 左右),所以很难大量生产,这为介孔生物玻璃的应用留下很大的障碍。本文采用一步法成功制备出介孔生物活性玻璃 M58S,周期短产量高,并采用透射电镜和小角 XRD 对合成的介孔生物活性玻璃 M58S 进行表征。

壳聚糖的力学性能较差,相关文献指出常用化学交联的方法来改善壳聚糖的力学性能,最常用的交联剂为戊二醛。相关文献指出戊二醛是有毒的<sup>[80]</sup>,但是涉及于应用医药和人体上时,戊二醛做为交联剂是不合适的。本文选用对人体无害的香草醛做为交联剂,测试了不同交联剂含量对壳聚糖多孔膜性能的影响。

### 2.2 实验部分

#### 2.2.1 介孔生物活性玻璃 M58S 的制备

##### (1) 主要试剂

EO20-PO70-EO20 (P123): 德国 BASF

正硅酸乙酯 TEOS: 分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司

磷酸三乙酯 TEP: 分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司

硝酸钙  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : 分析纯, 中国医药(集团)上海化学试剂公司

盐酸 HCl: 分析纯, 上海凌峰化学试剂有限公司

去离子水  $\text{H}_2\text{O}$ : 自制

##### (2) M58S 的制备流程

介孔生物活性玻璃 M58S 制备流程图如图 2.1 所示:

本实验用溶胶凝胶法三元共组装(三元分别为模板剂、TEOS、TEP)制备生物活性玻璃,如图 2.1 所示,其具体过程如下:首先,将 120g P123 溶解到 15 L 去离子水中,在 30℃ 水浴条件下搅拌至溶液澄清;其次,用盐酸调节至溶液的 pH 值低于 2 以下,然后依次加入 TEOS、TEP 和四水硝酸钙机械剧烈搅拌 6 小时,搅拌 6 小时后温度设定在 85℃ 下搅拌 72 小时,TEOS 和 TEP 在盐酸的催化作用下进行水解缩聚,整个体系随着搅拌的持续进行混合均匀形成溶胶;最后,搅拌结束后将溶液取出静置沉淀 24 小时,将沉淀物取出在烘箱中烘干得到介孔生物活性玻璃初样。



得到的初样采用高温分段煅烧法脱去其中的有机模板剂，具体步骤如下：煅烧分成 3 段：250℃保温煅烧 2 个小时；550℃保温煅烧 6 个小时；650℃保温煅烧 4 小时。煅烧过程中升温速率为 1℃/min，高温煅烧中除去初样中的模板剂 P123、残余的有机物、水分和硝酸根，即得到介孔 58S 生物活性玻璃（M58S）；粉体经 500 目筛分，待用。

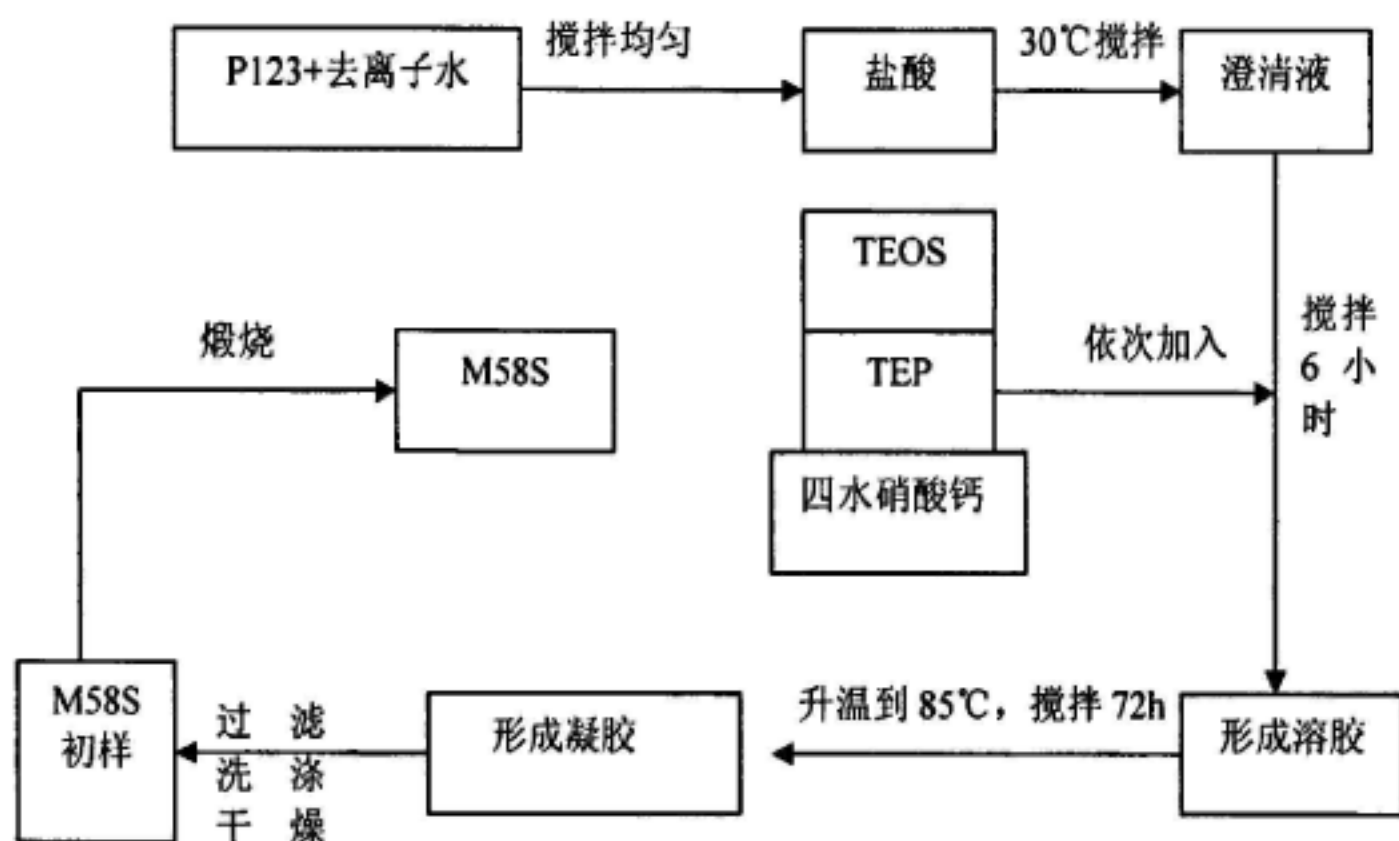


图 2.1 介孔生物活性玻璃 M58S 制备流程图

Fig.2.1 The preparation flow chart of Mesoporous bioactive glass (M58S)

## 2.2.2 介孔生物活性玻璃 M58S 表征

### (1) TEM 测试

采用日产 2100F 型透射电镜对制备出的介孔生物活性玻璃 M58S 进行微观结构形貌分析，加速电压为 200kV。

### (2) 小角 XRD 观察

使用日本 Rigaku 公司的 D/Max 2550V X 射线衍射仪对介孔生物玻璃 M58S 进行小角物相分析，采用 Cu 靶 K $\alpha$  射线 ( $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$ )，工作电压电流分别为 40kV、40mA，扫描范围为 0.5-5°，扫描步长为 0.02°。

## 2.2.3 交联剂的选择

壳聚糖交联剂的选择有 2 大类：一类是化学交联，另外一类是物理交联。常用于交联壳聚糖的化学交联剂以二醛为主，如乙二醛<sup>[81]</sup>，戊二醛<sup>[82]</sup>等。二醛和壳聚糖发生反应的条件简单，在水溶液中无需加入其它辅助试剂如还原剂，就可以和壳聚糖发生化学反应，但是二醛类物质做为交联剂，是有毒的<sup>[80]</sup>。由于本文制备的壳聚糖多孔膜要应用于生物医学方面，因此二醛类的交联剂不适合做为本文的交联剂。

因此本文选用和二醛具有相同官能团的香草醛做为交联剂。香草醛又名香兰素是人类所合成的第一种香精，具有香荚兰香气及浓郁的奶香，为香料工业中最大的品种，是人们普遍喜爱的奶油香草香精的主要成份。其用途十分广泛，广泛运用在各种需要增加奶香气息的调香食品中，如蛋糕、冷饮、巧克力、糖果、饼干、方便面、面包以及烟草、调香酒类、牙膏、肥皂、香水化妆品、冰淇淋、饮料以及日用化妆品中起增香和定香作用。香兰素也大量用于生产医药中间体，植物生长促进剂、杀菌剂、润滑油消泡剂、电镀光亮剂、印制线路板生产导电剂等；并且香草醛符合 FCCIV 标准，目前还没有相关报道说香兰素对人体有害。

#### 2.2.4 交联剂用量的选择

##### (1) 主要试剂

壳聚糖：国药集团化学试剂有限公司（脱乙酰度为 80-95%，粘度为 50-800mPa·s）

冰醋酸  $C_2H_4O_2$ ：分析纯，杭州高晶精细化工有限公司

香草醛  $C_8H_8O_3$ ：分析纯，天津市科密欧化学试剂有限公司

去离子水  $H_2O$ ：自制

##### (2) 壳聚糖溶液的配制

量取一定体积的纯醋酸试剂加入容量瓶中再加入一定量的去离子水，配制成 2% (wt) 的醋酸溶液。取上述配制好的醋酸溶液倒入烧杯中加入适量的壳聚糖粉末，机械搅拌直至壳聚糖完全溶解在醋酸溶液中即得到壳聚糖溶液。

##### (3) 交联剂用量的选择

取 20mL 壳聚糖溶液，在 80℃ 水浴情况下，然后分别按壳聚糖和香草醛的质量比为 12:1、6:1、4:1、3:1 加入香草醛，磁力搅拌 8 小时对壳聚糖进行化学交联。

#### 2.2.5 交联壳聚糖膜的性能测试和表征

##### (1) 吸水率

按照 Bing Yang 等<sup>[83]</sup>的方法测定壳聚糖膜的吸水率。将质量为  $W_0$  的干燥材料浸入去离子水，一段时间后取出，用滤纸吸掉其表面的水，称其质量为  $W_t$ ，吸水率计算如下：

$$\text{吸水率} = (W_t - W_0) / W_0 \times 100\% \quad 2-(1)$$

##### (2) 力学性能

取不同交联程度的壳聚糖多孔膜材料，从材料上截取 10mm×40mm 大小的试样，并在试样上选取不同位置的 5 个点测试其厚度。采用美国 Instron 英斯特朗公司的万能材料 5543 型试验机对不同交联程度的壳聚糖多孔膜进行机械拉伸测试，材料的宽度为 10mm，夹具

间的距离为 20mm，拉伸速率为 5mm/min，在恒温恒湿条件下进行实验。每组实验数据取三个试样的平均值。

### (3) 红外分析

采用 KBr 压片法使用 Nicolet5700（美国）傅里叶红外光谱仪分析不同交联剂含量对壳聚糖结构的影响，测试范围： $400\sim 4000\text{cm}^{-1}$ 。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 M58S 的 TEM 分析

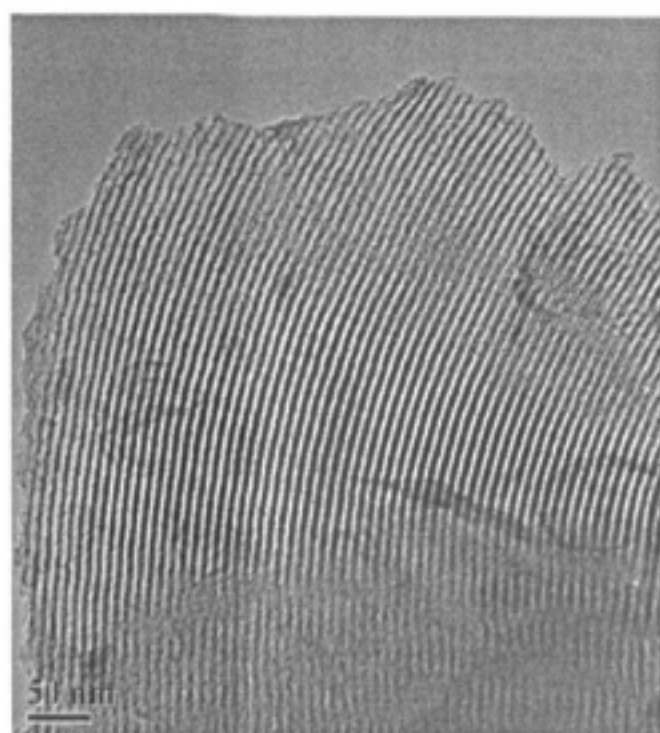


图 2.2 M58S 的 TEM 图  
Fig.2.2 TEM image of M58S

图 2.2 是介孔生物活性玻璃 M58S 的 TEM 图。图中可以看到所制备的 M58S 样品介孔孔道清晰可辨，排列高度有序，孔道均匀一致，孔径大小 5~8nm 左右，具有比较规整的六方相介孔结构。

### 2.3.2 M58S 的小角 XRD 测试

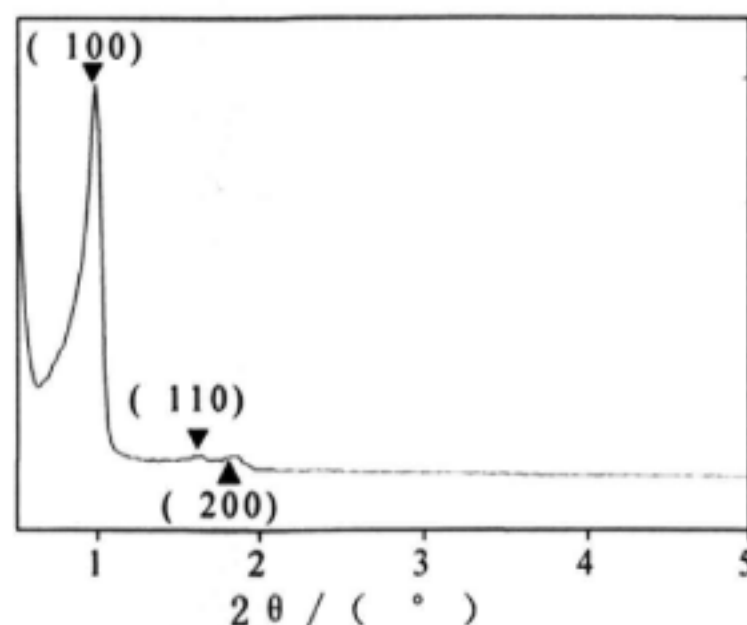


图 2.3 M58S 的小角 XRD 图谱  
Fig.2.3 Small angle XRD pattern of M58S



图 2.3 是 M58S 的小角 XRD 图。从图中可以看到 M58S 有三个可清晰分辨的衍射峰，通过计算为六方相 ( $P6mm$ ) 介孔材料的 (100)、(110)、(200) 方向的特征衍射峰，与文献报道的介孔生物活性玻璃<sup>[84]</sup>介孔材料的 XRD 衍射图谱相一致，表明制备出的生物活性玻璃具有介孔结构。

### 2.3.3 壳聚糖膜的吸水率测试

图 2.4 是纯壳聚糖膜和不同交联比例的壳聚糖膜的吸水率。从图中可以看出，纯壳聚糖膜在 10s 内吸水率达到了 3572%，说明纯壳聚糖膜的吸水率好，这主要是因为壳聚糖分子链中含有大量的亲水性基团；当壳聚糖和交联剂的质量比为 12:1 时，吸水率为 2448%；当壳聚糖和交联剂的质量比为 6:1 时，吸水率为 1985%；当壳聚糖和交联剂的质量比为 4:1 时，吸水率为 1486%；当壳聚糖和交联剂的质量比为 3:1 时，吸水率为 985%。由以上分析可知，随着交联剂含量的增多，改性壳聚糖的吸水性下降。这主要是由于纯壳聚糖膜中有大量的氨基存在，使得材料具有优异的亲水性；而交联剂的加入，壳聚糖中的氨基和香草醛中的醛基发生了席夫碱反应，使得氨基的数目减少，亲水性下降，降低了材料的吸水率。

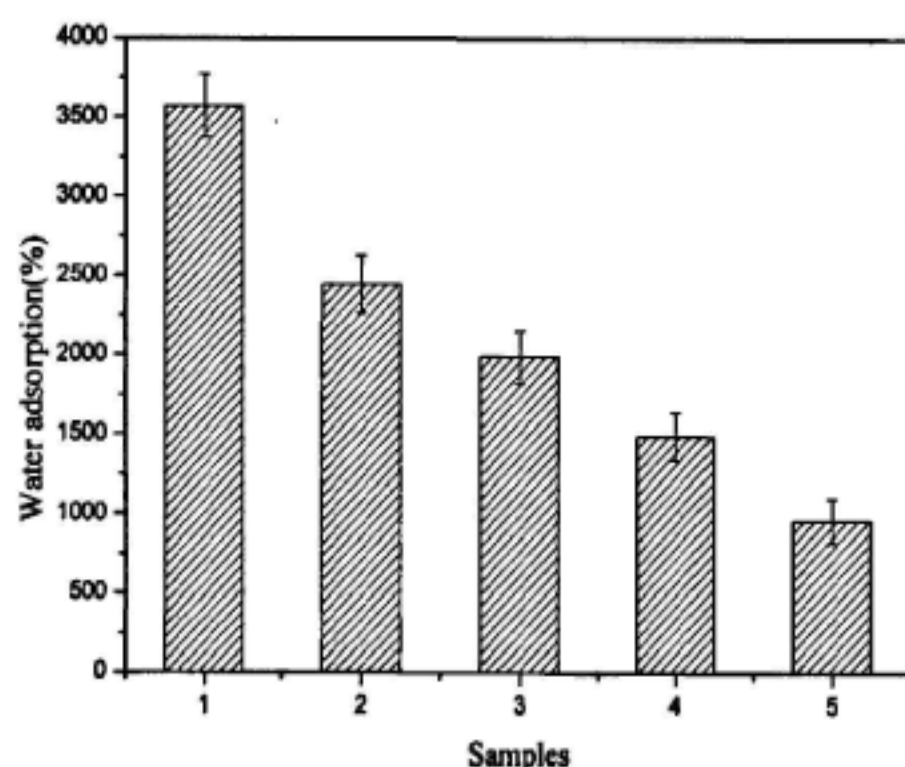


图 2.4 不同比例 CS/Vanillin 复合多孔膜的吸水性能图: (1) 100/0; (2) 12:1; (3) 6:1; (4) 4:1; 和 (5) 3:1  
Fig.2.4 Water adsorption charts of CS/Vanillin porous films with different ratios: (1) 100/0; (2) 12:1; (3) 6:1; (4) 4:1; and (5) 3:1

### 2.3.4 壳聚糖膜的力学性能

图 2.5 是纯壳聚糖膜和不同交联比例的壳聚糖膜的拉伸应力图。纯壳聚糖膜的拉伸应力为 0.12MPa；当壳聚糖和交联剂的质量比为 12:1 时，壳聚糖膜的拉伸应力 0.16MPa；当壳聚糖和交联剂的质量比为 6:1 时，壳聚糖膜的拉伸应力 0.19MPa；当壳聚糖和交联剂的质量比为 4:1 时，壳聚糖膜的拉伸应力 0.28MPa；当壳聚糖和交联剂的质量比为 3:1 时，壳聚糖膜的拉伸应力 0.21MPa。以上分析可知，纯壳聚糖膜的力学性能较差；随着交联剂含

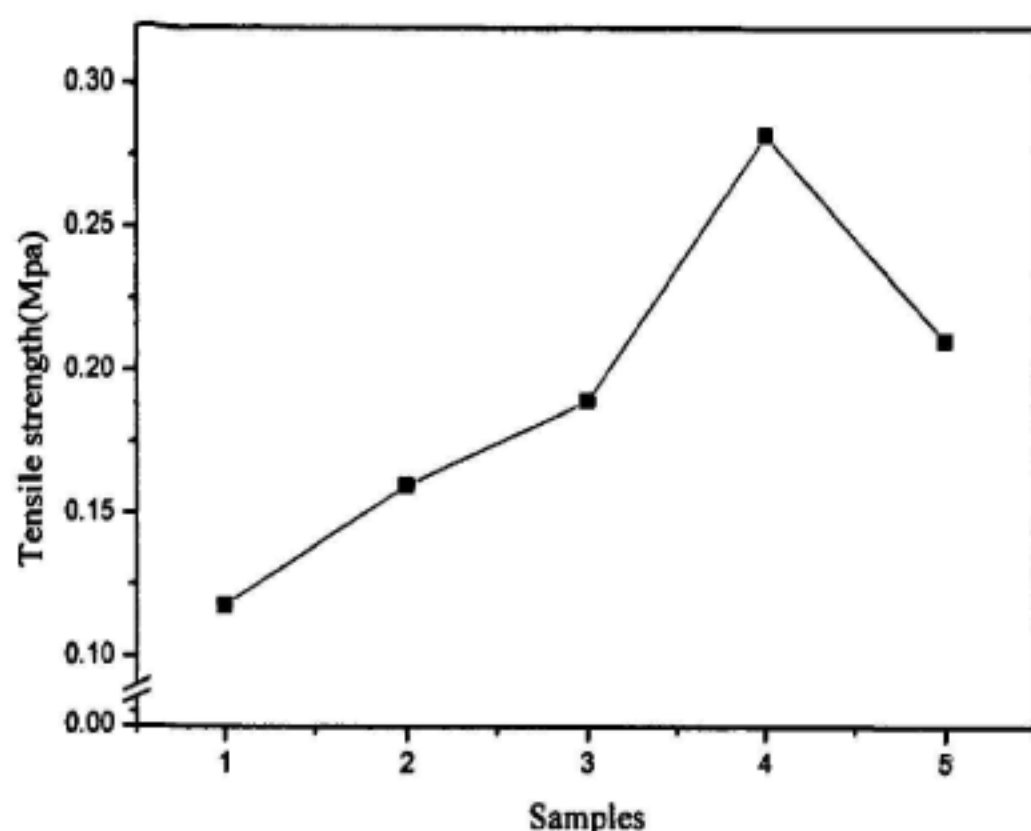


图 2.5 不同比例 CS/Vanillin 复合多孔膜的拉伸应力: (1) 100/0; (2) 12:1; (3) 6:1; (4) 4:1; 和(5)3:1  
Fig.2.5 Tensile strength curve of CS/Vanillin porous films with different ratios: (1)100/0;  
(2)12:1; (3)6:1; (4)4:1; and (5)3:1

量的增加,壳聚糖的力学性能获得了改善;且从图 2.5 中进一步分析可知,交联剂含量存在一个很明显的转折点,当壳聚糖和香草醛的质量比为 4:1 时,壳聚糖的力学性能达到最佳,之后再增加交联剂时,壳聚糖的力学性能下降。研究表明:壳聚糖和香草醛合适的交联比例为 4:1,此时改性壳聚糖膜的力学性能达到最佳。。

### 2.3.5 壳聚糖膜的 FTIR 析

图 2.6 是壳聚糖、香草醛交联壳聚糖多孔膜和香草醛的红外谱图。图 2.6(a)中  $1655\text{cm}^{-1}$  和  $1597\text{cm}^{-1}$  分别为壳聚糖的酰胺 I 带酰胺、II 带吸收峰<sup>[85,86]</sup>;图 2.6 (b) 是香草醛交联壳聚糖后的红外谱图,从图 2.6 (b) 中可以看出在  $1642\text{cm}^{-1}$  处为 C=N 伸缩振动峰<sup>[87,88]</sup>,表明壳聚糖中的氨基和香草醛中的醛基发生了席夫碱反应;同时从图 2.6 (b) 中可以看出壳聚糖的酰胺 II 特征峰消失,酰胺 I 带吸收峰强度减弱,都验证了氨基和醛基发生了反应。图 2.6 (c) 中  $1665\text{cm}^{-1}$  为醛基的 C=O 伸缩振动峰,  $1266\text{cm}^{-1}$  为酚羟基的弯曲振动峰,  $1589\text{cm}^{-1}$ 、 $1509\text{cm}^{-1}$ 、 $813\text{cm}^{-1}$  为苯环的特征伸缩振动峰<sup>[91]</sup>。从图 2.6 (b) 中可以看出,一些特征峰的强度和位置都发生了明显的改变,说明壳聚糖和香草醛之间还存在着氢键作用。

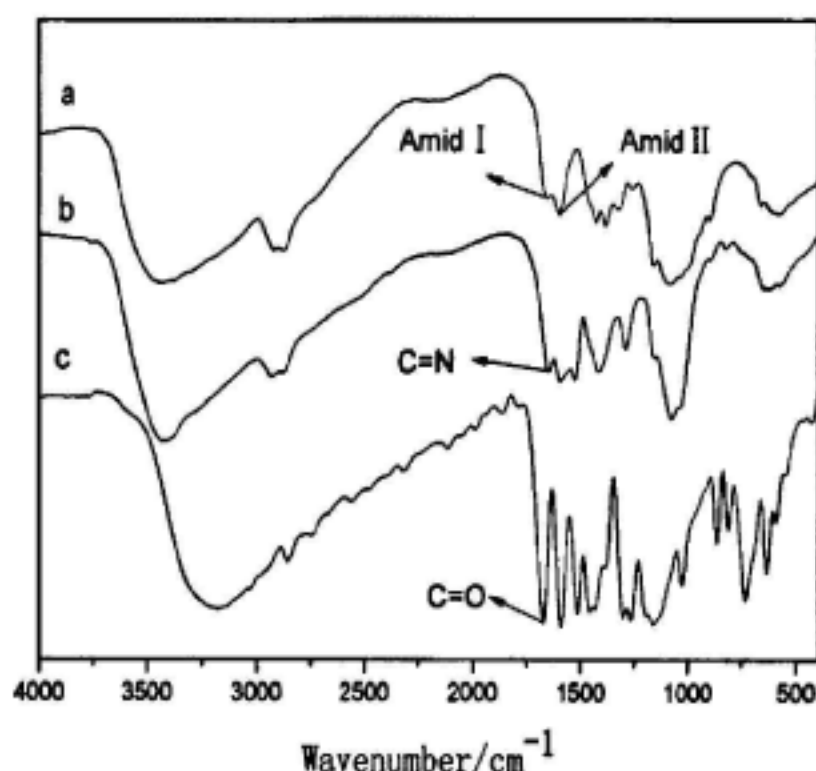


图 2.6 壳聚糖、香草醛交联壳聚糖多孔膜和香草醛的红外谱图  
Fig.2.6 FTIR spectrums of chitosan (a), chitosan-vanillin (b), vanillin (c)

### 2.3.6 交联机理分析

壳聚糖交联剂的选择有两大类：一类是化学交联，另外一类是物理交联。常用于交联壳聚糖的化学交联剂以二醛为主，其交联原理是交联剂中的醛基和壳聚糖中的氨基通过席夫碱反应形成共价交联。二醛和壳聚糖发生反应的条件简单，在水溶液中无需加入其它辅助试剂如还原剂，就可以和壳聚糖发生化学反应，但是二醛类物质做为交联剂，是有毒的<sup>[80]</sup>；由于本研究所制备的壳聚糖多孔膜要应用于生物医学方面。因此，二醛类的交联剂不适合做为本文的交联剂。

物理交联主要利用壳聚糖溶解后其基团带正电荷，加入带负电荷的交联剂，利用正负电荷的相互作用达到交联的目的，其交联强度的大小取决于电荷量的密度。电荷量的密度一般取决于溶液的 pKa 和发生反应时溶液的 pH 值<sup>[89]</sup>。壳聚糖溶液的 pKa 值为 6.5<sup>[90]</sup>，因此物理交联的 pH 值应该在 6.5 附近，pH 值太高的话，壳聚糖所带的正电荷会被中和，交联剂无法和壳聚糖作用，且壳聚糖出现沉淀<sup>[91]</sup>，因此，pH 值不宜太大。

由于香草醛和壳聚糖之间的交联作用和二醛和壳聚糖之间的作用相似，并且已有文献报道用香草醛交联壳聚糖，可以用于吸收废液中的重金属离子<sup>[92]</sup>。因此本文选用对人体无害的香草醛做为壳聚糖的交联剂，其交联原理属于化学交联。与化学交联相比，物理交联作用不稳定，且对 pH 值比较敏感，难以控制交联程度。因此，本研究利用化学交联的方法，通过醛基和氨基之间的席夫碱反应来改善壳聚糖的力学性能和结构稳定性。

## 2.4 本章小结

1. 应用一步法成功制备出了介孔生物活性玻璃 M58S，TEM 表明制备的介孔生物活性玻璃 M58S 孔道均匀，孔径大小为 5~8nm 之间；同时采用了小角 XRD 对介孔生物活性玻

璃 M58S 粉体进行了分析, 进一步表明了所制备的 M58S 生物活性玻璃具有介孔结构。

2. 交联剂用量选择及其优化: 随着交联剂含量的不同, 壳聚糖膜的力学性能先增加, 后下降。当壳聚糖和香草醛的质量比例达到为4:1时, 壳聚糖的力学性能达到最佳, 此时壳聚糖多孔膜的拉伸应力为0.28MPa。通过FTIR分析可知, 在壳聚糖中加入香草醛交联剂后, 图谱中出现了出现了C=N特征峰, 表明两者之间发生了席夫碱反应。



### 第三章 M58S/CS 复合多孔膜材料的制备和表征

#### 3.1 引言

本章采用冷冻干燥法成功制备出了 M58S/CS 复合多孔膜,采用扫描电镜 (SEM)、红外光谱 (FTIR)、X 射线衍射 (XRD) 等测试方法对不同混合质量比的 M58S/CS 复合多孔膜的形貌和结构进行表征。并探讨了介孔生物活性玻璃 M58S 的加入对多孔膜材料密度、吸水率、孔隙率等性能的影响,以期获得综合性能较好的复合多孔膜。

#### 3.2 M58S/CS 复合多孔膜的制备及表征

##### 3.2.1 原料与仪器

###### (1) 原料

介孔生物活性玻璃 (M58S): 自制

壳聚糖: 国药集团化学试剂有限公司

香草醛  $C_8H_8O_3$ : 分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司

冰醋酸  $C_2H_4O_2$ : 分析纯, 杭州高晶精细化工有限公司

无水乙醇  $CH_3CH_2OH$ : 分析纯, 杭州长征化学试剂有限公司

去离子水  $H_2O$ : 自制

###### (2) 仪器

电子天平: Sartorius 制造的 BS110S 型电子天平, 精确到 0.001g

磁力搅拌器: 78-1 型磁力搅拌器, 江苏省金坛市江南仪器厂

DF-101S 集散式磁力搅拌器, 江苏省金坛市江南仪器厂

冷冻干燥机: 美国 Labconco 公司

超低温冰箱: 英国 New Brunswick Scientific

拉伸试验机: Instron 5543, Instron 公司

扫描电子显微镜 (SEM): JSM-5610LV, 日本电子 (JEOL) 公司

傅立叶红外光谱仪 (FTIR): Thermo Nicolet 5700 (美国)

X-射线衍射仪 (XRD): Thermo ARL-X' TRA (美国)

##### 3.2.2 M58S/CS 复合多孔膜材料的制备

本文采用冷冻干燥法制备多孔膜材料。冷冻干燥法是一种常用的制备多孔材料的方法,其原理如下:在冷冻过程中,水在超低温条件结晶致使固液相分离,介孔生物活性玻璃 M58S 纳米粒子和壳聚糖形成的网络与冰晶分离,形成连续相;在真空条件下,当冰晶升华后,就形成了复合多孔膜。从上述多孔膜孔径的形成过程可知,多孔膜的孔密度与单

位体积内冰晶的数量成正比,即冷冻时单位体积内冰晶的数量越多,复合多孔膜的孔隙率越大;孔径的大小取决于冰粒子的大小,即冷冻时产生的冰晶颗粒越大,则经过真空干燥后形成的复合多孔膜的孔径就越大。

本章采用溶液共混-冷冻干燥方法制备复合多孔膜,具体制备过程如下:首先,按照第二章中溶液的方法配制壳聚糖溶液,配制的壳聚糖溶液浓度为 3% (wt),取上述 20mL 壳聚糖溶液在 80℃ 水浴条件加入 0.15g 香草醛对其进行交联;其次,分别按照  $m(\text{M58S})/m(\text{CS})=0:100$ 、20:80、40:60 和 60:40 加入 M58S,搅拌均匀后,倒入培养皿中,放入-80℃低温冰箱冷冻 8 小时;最后,放入冷冻干燥机中冷冻干燥制备出复合多孔膜。

### 3.2.3 结构和性能表征

#### (1) 密度的测定

裁切一定尺寸的多孔膜,烘干后称重重量记为  $M$ ,然后用游标卡尺分别测量材料的长度、宽度和厚度,计算出材料的体积为  $V$ ,材料的密度为:密度= $M/V$ ,每组数据为 3 个数据的平均值。

#### (2) 吸水率的测定

按照 Bing Yang 等<sup>[83]</sup>的方法测定复合多孔膜的吸水率。将质量为  $W_0$  的干燥材料浸入去离子水,一段时间后取出,用滤纸吸掉其表面的水,称其质量为  $W_t$ ,吸水率计算如下:

$$\text{吸水率} = (W_t - W_0) / W_0 \times 100\% \quad 3-(1)$$

#### (3) 溶胀率的测定

取 6cm×1cm 的复合多孔膜,在烘箱中烘干后,质量记为  $W_0$ ,将其浸于去离子水中溶胀 1 小时后取出,用滤纸迅速擦干表面液体称重,质量为  $W_w$ 。

$$\text{溶胀率} = (W_w - W_0) / W_0 \times 100\% \quad 3-(2)$$

#### (4) 孔隙率的测定

按照 Jian Yang 等<sup>[93]</sup>的方法测试复合多孔膜的孔隙率。测试公式:  $\epsilon = (W_2 - W_3 - W_s) / (W_1 - W_3)$ ,其中  $W_1$  为 25mL 的比重瓶装满无水乙醇后的重量,  $W_2$  为干燥多孔膜经无水乙醇浸泡抽真空后放进比重瓶并加满无水乙醇的总质量,  $W_3$  为取出材料后,比重瓶和剩余无水乙醇的总质量,  $W_s$  为干燥多孔膜的质量。测试时应该循环抽真空直至试样完全沉在比重瓶底部,使多孔膜材料中注满无水乙醇。

#### (5) SEM 分析

本实验采用日本 JEOL 公司的 JSM-5610LV 电子扫描电镜观察纯壳聚糖膜和不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜材料孔的结构及表面形态。测试制样时材料表面喷金。

## (6) FTIR 分析

采用 KBr 压片法使用 Nicolet 5700 (美国) 傅里叶红外光谱仪分析 M58S 与 CS 不同比例对 M58S/CS 复合多孔膜结构的影响, 测试范围:  $400\sim4000\text{cm}^{-1}$ 。

## (7) XRD 测试

采用 ARL-X'TRA 型 X-射线衍射仪, 在 Cu 靶  $K\alpha$  射线 ( $1.54\text{ nm}$ ) 下进行实验, 管电压  $45\text{ kV}$ 、管电流  $40\text{ mA}$ 、扫描速度为  $2^\circ/\text{min}$ , 角度范围为  $10\sim70^\circ$ 。

## (8) 拉伸测试

取不同比例的复合多孔膜材料, 从材料上截取  $10\text{ mm}\times40\text{ mm}$  大小的试样, 并在试样上选取不同位置的 5 个点测试其厚度。采用美国 Instron 英斯特朗公司的万能材料 5543 型试验机对不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜进行拉伸实验, 材料的宽度为  $10\text{ mm}$ , 夹具间的距离为  $20\text{ mm}$ , 拉伸速率为  $5\text{ mm/min}$ , 在恒温恒湿条件下进行。每组实验数据取三个试样的平均值。

# 3.3 结果与讨论

## 3.3.1 M58S 含量对 M58S/CS 复合多孔膜密度影响

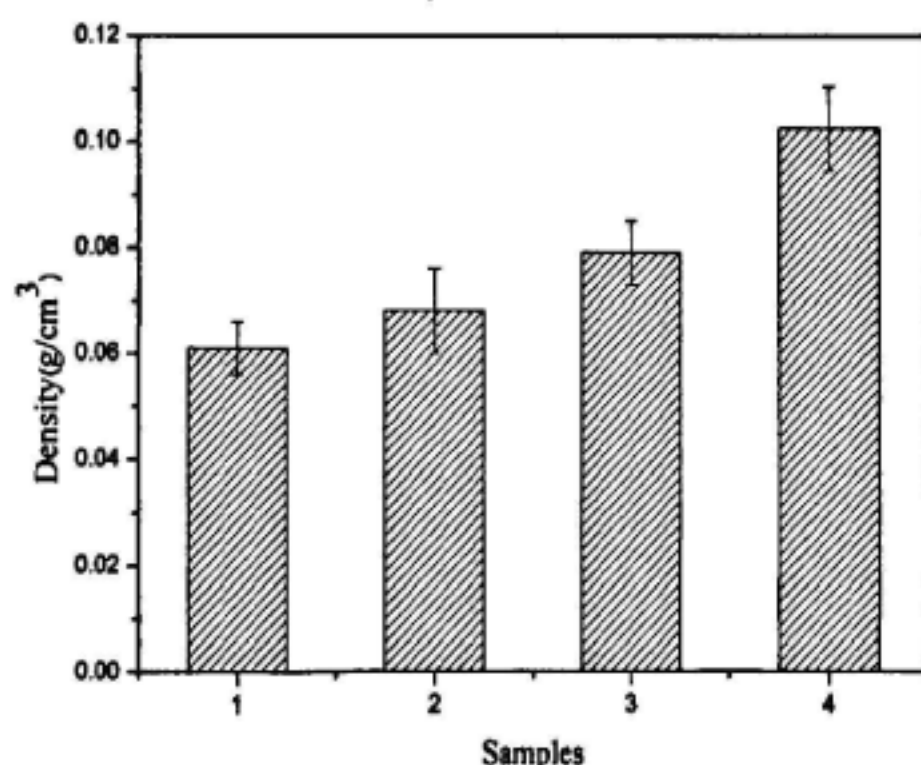


图 3.1 不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的密度: (1) 纯壳聚糖膜; (2) 20% M58S/CS 复合多孔膜; (3) 40% M58S/CS 复合多孔膜; (4) 60% M58S/CS 复合多孔膜

Fig.3.1 Density of M58S/CS composite porous films porous films with different ratios: (1) pure chitosan porous films; (2) composite porous films with 20% M58S; (3) composite porous films with 40% M58S; (4) composite porous films with 60% M58S

图 3.1 是 M58S/CS 复合多孔膜密度随 M58S 含量的变化。从图中可以得知, 纯壳聚糖膜的密度为  $0.061\text{ g/cm}^3$ ; 当 M58S 含量为 20% 时, M58S/CS 复合多孔膜的密度为  $0.068\text{ g/cm}^3$ ; 当 M58S 含量为 40% 时, M58S/CS 复合多孔膜的密度为  $0.079\text{ g/cm}^3$ ; 当 M58S 含量为 60% 时, M58S/CS 复合多孔膜的密度为  $0.1025\text{ g/cm}^3$ 。以上分析可知, 纯壳聚糖的密

度最小,随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加,复合多孔膜的密度增加。

### 3.3.2 M58S 含量对 M58S/CS 复合多孔膜吸水率影响

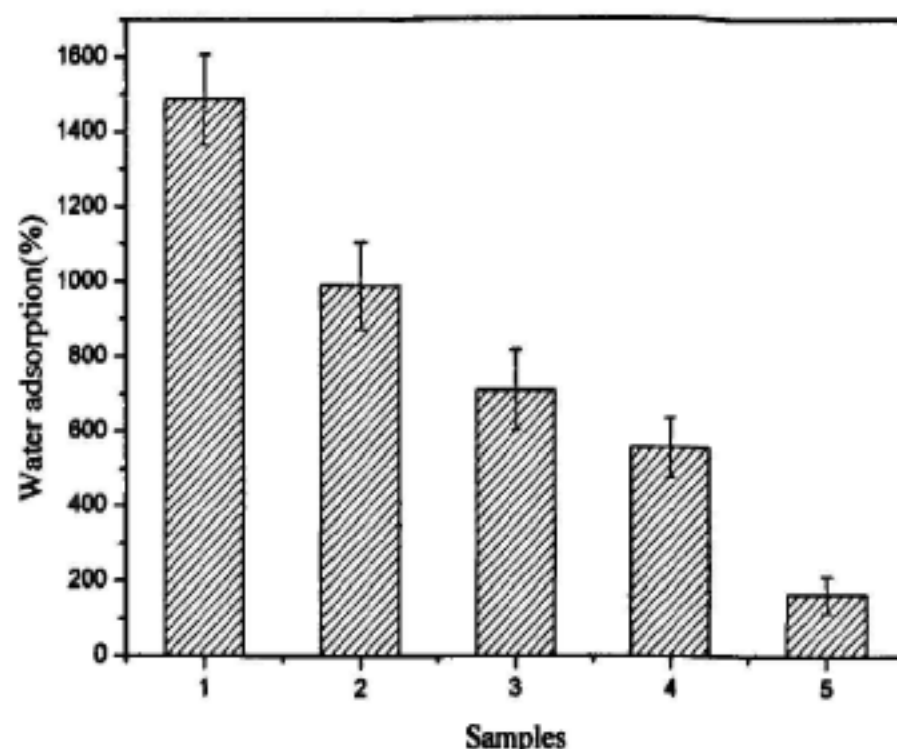


图 3.2 不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的吸水率: (1) 纯壳聚糖膜; (2) 20% M58S/CS 复合多孔膜; (3) 40% M58S/CS 复合多孔膜; (4) 60% M58S/CS 复合多孔膜; (5) 纯介孔生物活性玻璃 M58S

Fig.3.2 Water adsorption of M58S/CS composite porous films porous films with different ratios: (1) pure chitosan porous films; (2) composite porous films with 20% M58S; (3) composite porous films with 40% M58S; (4) composite porous films with 60% M58S; (5) pure mesoporous bioactive glass M58S

良好的吸水率是材料做为医用止血材料的一个基础条件,较高的吸水率能够快速吸收伤口表面的血液加速止血过程,反之会造成创口表面的大面积污染给使用其他止血材料进行再止血带来一定的困难,因此吸水率是复合多孔膜做为止血材料的一个重要条件。图 3.2 是不同比例 M58S/CS 复合多孔膜 10s 内的吸水率。由图可知,纯壳聚糖膜 10s 内的吸水率为 1486%; 20% M58S/CS 复合多孔膜 10s 内的吸水率为 987.5%; 40% M58S/CS 复合多孔膜 10s 内的吸水率为 708.5%; 60% M58S/CS 复合多孔膜 10s 内的吸水率为 554.9%; M58S 在 10s 内的吸水率为 165%。由此可知,纯壳聚糖的吸水率明显高于介孔生物活性玻璃 M58S,这是由于 CS 相对于 M58S 含有更大量的亲水基团,因此吸水性能优于 M58S; 同时,在相同时间内多孔膜的吸水率随着 CS 含量的减少而降低,这一方面是由于 M58S 吸水性能较差,另外可能是 M58S 中的钙离子和 CS 中的-NH<sub>2</sub> 发生作用而减弱了材料的吸水性能<sup>[19]</sup>。

### 3.3.3 M58S 含量对 M58S/CS 复合多孔膜溶胀率影响

表 3.1 是不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的溶胀率。从表中可以看出,纯壳聚糖多孔膜和壳聚糖含量为 80%的多孔膜在去离子水中浸泡 1 小时后,由于 CS 具有较强的亲水性和较高的含量,CS 完全或部分溶解,导致材料保形性差,由此可见 CS 含量较高的复合多孔



膜仅适宜于短时间内使用；当 CS 含量为 60%和 20%时，复合多孔膜浸泡 1 小时后的溶胀率虽比在去离子水浸泡 10s 后的吸水率低，但从形态上看多孔膜还基本保持完好，说明 CS 含量越低，多孔膜形态完整性越好；由 3.3.2 分析也可知，多孔膜的吸水率的高低也与 CS 的含量有关。因此，可以根据材料的具体用途合理配置 CS 和 M58S 的比例。

表 3.1 不同比例 M58S/CS 多孔膜的溶胀率  
Table3.1 Swelling rate of CS/M58S porous films with different rations

| M58S/CS | 溶胀率 (1h) |
|---------|----------|
| 0/100   | 完全溶解     |
| 20/80   | 部分溶解     |
| 40/60   | 1378%    |
| 60/40   | 459%     |

### 3.3.4 M58S 含量对 M58S/CS 复合多孔膜孔隙率影响

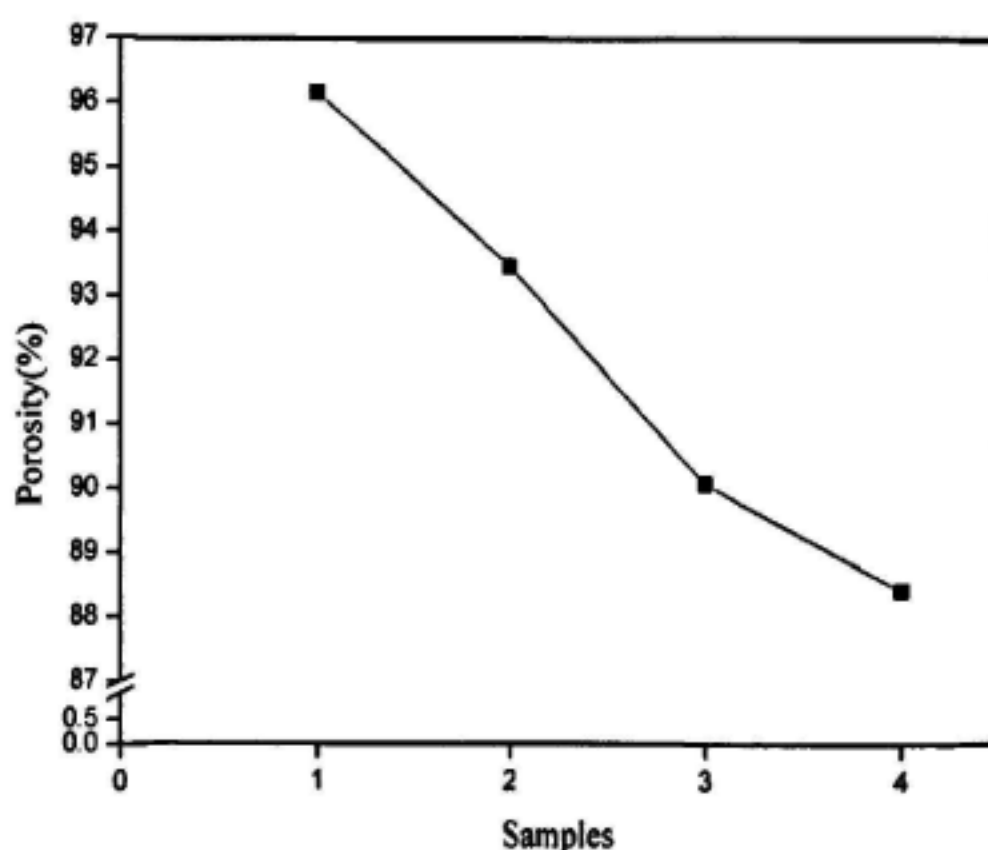


图 3.3 不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的孔隙率: (1) 纯壳聚糖膜; (2) 20% M58S/CS 复合多孔膜; (3) 40% M58S/CS 复合多孔膜; (4) 60% M58S/CS 复合多孔膜

Fig.3.3 Porosity of mesoporous bioactive glass/chitosan composite porous films porous films with different rations: (1) pure chitosan porous films; (2) composite porous films with 20% M58S; (3) composite porous films with 40% M58S; (4) composite porous films with 60% M58S

图 3.3 是 M58S/CS 复合多孔膜的孔隙率随 M58S 含量的变化曲线。从图中可以看出，纯壳聚糖膜的孔隙率为 96.16%；20% M58S/CS 复合多孔膜的孔隙率为 93.46%；40% M58S/CS 复合多孔膜的孔隙率为 90.06%；60% M58S/CS 复合多孔膜的孔隙率为 88.41%。可知，复合多孔膜的孔隙率都在 85%之上，但随着 M58S 含量的增加，多孔膜的孔隙率减小，这主要是由于孔隙是由冰晶升华而成<sup>[94]</sup>，M58S 的加入使冰晶数目相对减少致使孔隙率下降。另外，孔隙率对材料的吸水率也有一定的影响，从 3.3.2 分析可知，随着 M58S

含量的增多吸水率下降,部分原因是由于孔隙率的下降,使材料储水能力下降,进而对吸水率造成了一定的影响<sup>[95]</sup>。综上分析,制备的多孔膜有较高的孔隙率,这对止血材料来说是十分重要的。较高的孔隙率可以提供足够的空间来吸收从伤口表面流出的血液,并且介孔生物活性玻璃 M58S 具有较高的比表面积,可以提高多孔膜材料的吸附作用,对缩短材料的止血时间有一定的作用。

### 3.3.5 M58S 含量对 M58S/CS 复合多孔膜力学性能影响

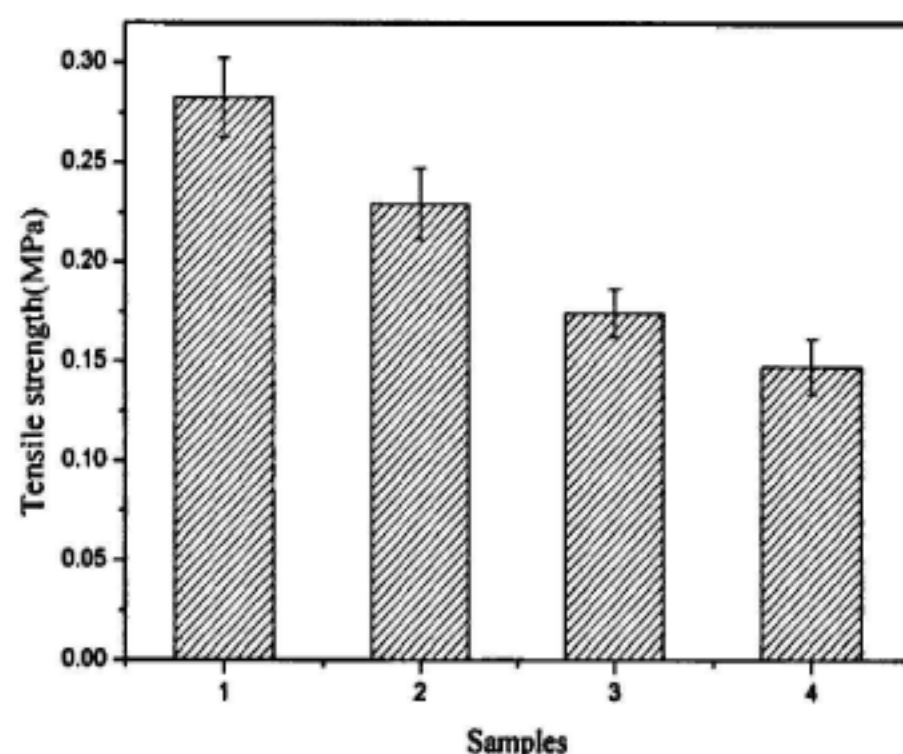


图 3.4 不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的拉伸应力图: (1) 纯壳聚糖膜; (2) 20% M58S/CS 复合多孔膜; (3) 40% M58S/CS 复合多孔膜; (4) 60% M58S/CS 复合多孔膜

Fig.3.4 Tensile strength figures of M58S/CS composite porous films porous films with different rations: (1) pure chitosan porous films; (2) composite porous films with 20% M58S; (3) composite porous films with 40% M58S; (4) composite porous films with 60% M58S

图 3.4 是不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的力学性能图。从图中可以得知,纯壳聚糖膜的拉伸应力为 0.28MPa; M58S 含量为 20% 的 M58S/CS 复合多孔膜的拉伸应力为 0.22MPa; 含量为 40% 的 M58S/CS 复合多孔膜的拉伸应力为 0.17MPa; 含量为 60% 的 M58S/CS 复合多孔膜的拉伸应力为 0.14MPa。与纯壳聚糖膜相比,随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加, M58S/CS 复合膜的拉伸应力在下降。一方面是因为无机介孔生物活性玻璃 M58S 的加入使复合膜的脆性增加; 另一方面是可能是由于复合多孔膜的孔径变大造成的,从 SEM 图中可以看出随着 M58S 含量的增加,多孔膜的孔径增大。

### 3.3.6 M58S/CS 复合多孔膜的 SEM 表征

图 3.5 显示了不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的微观结构图。从图中可以看出,不同比例 M58S/CS 复合多孔膜材料均呈现多孔绵状结构,孔隙分布较均匀。图 3.5 (a) 是纯壳聚糖多孔膜材料的 SEM 图,其孔径相对较小,孔隙分布也较密;随着 M58S 含量增加,复合多孔膜的孔隙分布较为松散,孔径也逐渐增大(图 3.5 (b-d))。这主要是由于混合溶液

冷冻过程时其中的冰晶升华所留下的孔隙偏大造成的。因为 M58S 的逐步增加时,使得周围的壳聚糖溶液相应地收缩,复合溶液相中水由冰点向过冷却条件下转变时产生了冰粒子,随着时间的延长它可以成长为较大的冰粒子。而复合膜内的孔径又取决于冰粒子的大小,即冷冻时所产生的冰粒子越大,则产生的多孔膜孔径越大。这也说明了多孔膜的孔径可以通过 CS 和 M58S 的质量比来调节;同时,随着 M58S 的含量的增加,其介孔粒子能够在孔壁上均匀分散,说明通过冷冻干燥法能够实现 CS 和 M58S 的均匀复合。

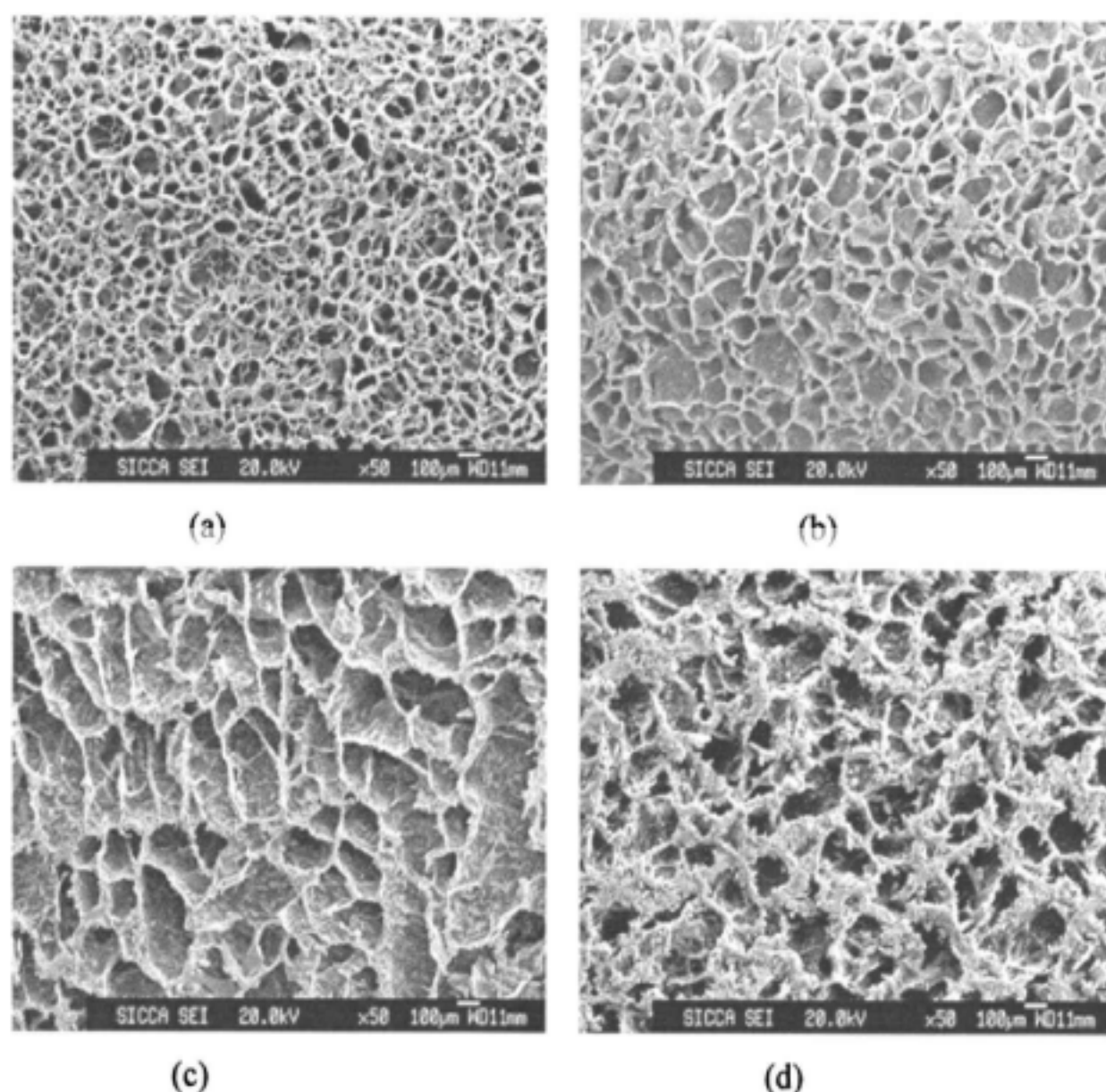


图 3.5 不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的 SEM 图: (a) 纯壳聚糖膜; (b) 20% M58S/CS 复合多孔膜; (c) 40% M58S/CS 复合多孔膜; (d) 60% M58S/CS 复合多孔膜

Fig.3.5 SEM images of M58S/CS composite porous films porous films with different rations: (a) pure chitosan porous films; (b) composite porous films with 20% M58S; (c) composite porous films with 40% M58S; (d) composite porous films with 60% M58S

### 3.3.7 M58S/CS 复合多孔膜的 FTIR 分析

图 3.6 是 CS, CS-Villian 和不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的红外谱图。图 3.6 (a) 中  $1655\text{cm}^{-1}$  和  $1597\text{cm}^{-1}$  分别为壳聚糖的酰胺 I 带酰胺 II 带吸收峰<sup>[85,86]</sup>; 图 3.6 (b) 是香草醛交联壳聚糖后的红外谱图,从图 3.6(b)中可以看出在  $1642\text{cm}^{-1}$  处为 C=N 伸缩振动峰<sup>[87,88]</sup>,表明壳聚糖中的氨基和香草醛中的醛基发生了席夫碱反应。同时从图 3.6 (b) 中进一步发现壳聚糖的酰胺 II 特征峰消失,酰胺酰胺 I 带吸收峰强度减弱,都验证了氨基和醛基发生了反应。图 3.6 (c-e) 中  $466\text{cm}^{-1}$ 、 $802\text{cm}^{-1}$  和  $1082\text{cm}^{-1}$  处的 Si-O-Si 弯曲振动峰、Si-O-H



摇摆振动峰及 Si-O-Si 伸缩振动峰为 M58S 的特征吸收峰<sup>[59,96]</sup>, 可以发现复合多孔膜中同时出现了 CS 和 M58S 的特征吸收峰, 表明 CS 和 M58S 在复合前后没有明显的变化, 但随着 M58S 含量的增加, 复合膜中部分吸收峰的强度和位置有所变化,  $466\text{cm}^{-1}$  和  $802\text{cm}^{-1}$  处的 Si-O-H 摇摆振动峰及 Si-O-Si 伸缩振动峰区段愈加锐化, 验证了介孔粒子 M58S 的加入量不断增加。从图 3.6 (c-e) 中还可以看到 C=N 伸缩振动峰依然存在, 表明 M58S 的加入对氨基和醛基之间的席夫碱反应没有影响。

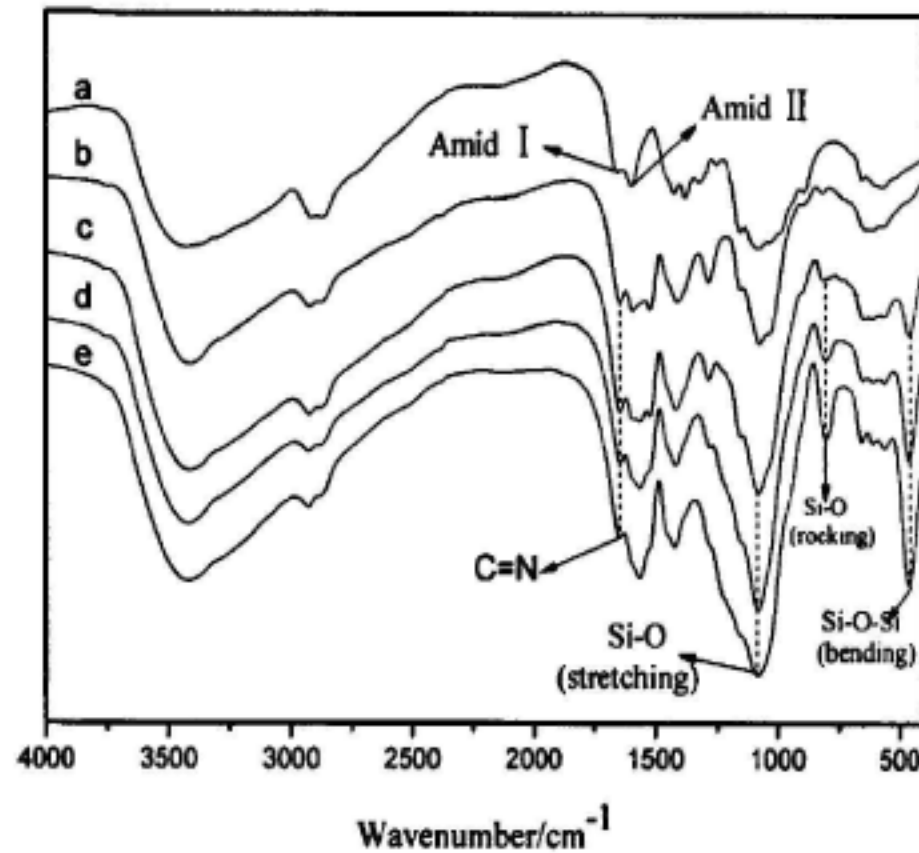


图 3.6 不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的红外谱图: (a) 纯壳聚糖膜; (b) CS/Vanillin 多孔膜; (c) 20% M58S/CS 复合多孔膜; (d) 40% M58S/CS 复合多孔膜; (e) 60% M58S/CS 复合多孔膜

Fig.3.6 FTIR spectrums of M58S/CS composite porous films porous films with different ratios: (a) pure chitosan porous films; (b) CS/Vanillin porous films; (c) composite porous films with 20% M58S; (d) composite porous films with 40% M58S; (e) composite porous films with 60% M58S

### 3.3.8 M58S/CS 复合多孔膜的 XRD 分析

图 3.7 是 CS, M58S 和不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的 XRD 谱图。图 3.7 (a) 中可以看到  $2\theta=20^\circ$  附近的衍射峰为 CS 的特征峰<sup>[86,97]</sup>。M58S 在  $18^\circ\sim40^\circ$  有一个宽的衍射峰<sup>[62]</sup>, 如图 3.7 (e) 所示。图 3.7 (b-d) 是 CS 和 M58S 复合后的 XRD 谱图, 从图谱中可以看出两者的特征峰重叠在一起, 说明 CS 和 M58S 存在着一定的相互作用, 这可能是由于 CS 中的氨基和 M58S 中的 Si-OH 形成氢键作用以及  $\text{-NH}_2$  与  $\text{Ca}^{2+}$  形成螯合作用<sup>[98]</sup>。另外随着 M58S 含量的增加, 复合膜中 CS 的特征衍射峰越来越弱化, 且复合峰的位置偏移 (图 3.7 (b-d)), 这也验证了介孔粒子含量的增加。



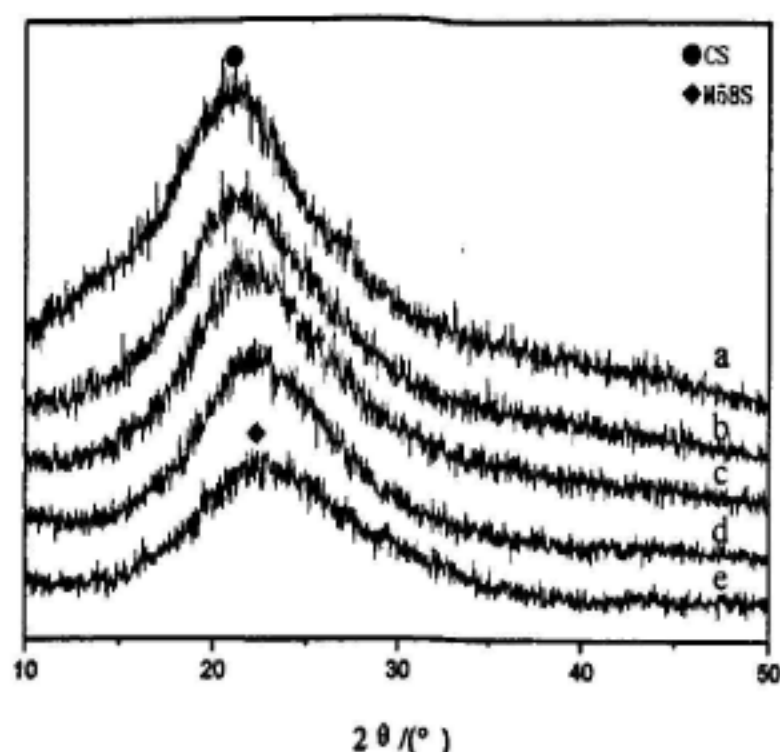


图 3.7 不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的 XRD 图: (a) 纯壳聚糖膜; (b) 20% M58S/CS 的复合多孔膜; (c) 40% M58S/CS 的复合多孔膜; (d) 60% M58S/CS 的复合多孔膜; (e) 纯介孔生物活性玻璃 M58S

Fig.3.7 XRD patterns of M58S/CS composite porous films porous films with different rations: (a) pure chitosan porous films; (b) composite porous films with 20% M58S; (c) composite porous films with 40% M58S; (d) composite porous films with 60% M58S; (e) pure mesoporous bioactive glass M58S

### 3.4 本章小结

1. SEM 表明采用冷冻干燥方法制备的 M58S/CS 复合多孔膜材料呈现连绵的多孔结构且孔隙分布较均匀。随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的不断增加, 多孔膜壁上的介孔粒子越来越多, 且在孔壁上分布均匀, 表明通过冷冻干燥法, 可以实现壳聚糖和无机介孔生物活性玻璃 M58S 的均匀复合。

2. 由 FTIR、XRD 测试表明: 壳聚糖和香草醛作用后, 出现了 C=N 特征峰, 表明壳聚糖中的氨基和香草醛中的醛基发生了席夫碱反应; 当介孔生物活性玻璃 M58S 加入后, 复合膜中同时出现了两者的特征峰, 表明两者在复合前后无明显变化; CS 和 M58S 复合后, 两者的 XRD 谱图的特征峰重叠在一起, 说明 CS 和 M58S 存在着一定的相互作用。

3. 溶胀率分析表明: 纯壳聚糖膜由于含有大量的亲水性基团, 因此在去离子水中浸泡时间过长, 会因壳聚糖的溶解, 使得多孔膜材料的保形性变差。因此可以根据材料的具体用途合理配置介孔生物活性玻璃 M58S 和壳聚糖的比例, CS 含量高的多孔膜材料仅适宜在短时间内使用。

4. 密度分析表明: 纯壳聚糖膜的密度最小, 随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加, 复合多孔膜的密度随之增加。

5. 力学性能分析表明: 与纯壳聚糖多孔膜相比, 随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加, M58S/CS 复合多孔膜的拉伸应力有一定程度的下降。一方面可能是因为无机介孔生

物活性玻璃 M58S 的加入使复合膜的脆性增加, 另一方面可能是由于增加的介孔粒子使得多孔膜孔径变大致使机械性能下降。

6. 吸水率和孔隙率分析表明: 由于纯壳聚糖膜相对于介孔生物活性玻璃 M58S 而言中存在大量的亲水性基团, 吸水性能明显强于介孔生物活性玻璃 M58S, 因此随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加, 复合多孔膜的吸水性能下降。由于多孔膜中的空隙是由于冰晶升华后形成的, 因此多孔膜的孔隙率的大小与冰晶数目的多少相关。由于介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加, 使得冰晶数目相对减少, 使得孔隙率下降。

## 第四章 M58S/CS 复合多孔膜的生物活性和生物降解性能

### 4.1 引言

壳聚糖是一种良好的生物医用材料,具有良好的生物降解性、生物相容性等优点,广泛应用于组织工程、止血材料和载药等领域<sup>[50,99,100]</sup>,但是纯壳聚糖的生物活性较低<sup>[75]</sup>,使其应用收到了一定的限制。因此,壳聚糖常常和其他生物活性好的物质复合,提高其生物活性。介孔生物活性玻璃具有良好的生物活性,但其成形性较差。壳聚糖可以通过冷冻干燥法制备出多孔材料,因此本文通过冷冻干燥法将介孔生物活性玻璃M58S和壳聚糖复合制备出复合多孔膜。

理想的生物医用材料,应该具有良好的生物活性以及较好的生物降解性。生物活性一般采用材料诱导钙磷盐沉积的能力来评估,采用人体模拟体液(SBF)来探究材料的体外生物活性<sup>[101]</sup>。本章将讨论M58S/CS复合多孔膜的生物活性以及生物降解性,将纯壳聚糖膜和M58S/CS复合多孔膜材料进行人体模拟体液(SBF)浸泡实验和PBS缓冲液降解实验,通过X射线衍射(XRD)、场发射扫描电镜观察(FESEM)、EDS能谱扫描、FTIR分析测定多孔膜材料在SBF中浸泡7天后的沉积物,采用溶菌酶PBS缓冲液分析复合多孔膜材料的降解率,研究介孔生物活性玻璃M58S对复合多孔膜的体外生物活性及其可降解性能的影响。

### 4.2 实验部分

#### 4.2.1 实验与仪器

##### (1) 原料

CS/M58S 复合多孔膜: 自制

溶菌酶: 进口分装, 美国

氯化钠NaCl: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司

碳酸氢钠 NaHCO<sub>3</sub>: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司

磷酸氢二钾 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司

氯化镁 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司

氯化钾 KCl: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司

氯化钙 CaCl<sub>2</sub>: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司

硫酸钠 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司

三羟甲基氨基甲烷 C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>(Tris): 分析纯, 美国 Amresco

盐酸: 分析纯, 天津市博迪化工有限公司

## (2) 仪器

傅立叶红外光谱仪 (FTIR): Thermo Nicolet 5700, 美国

X-射线衍射仪 (XRD): Thermo ARL-X' TRA, 美国

场发射扫描电镜 (FESEM): Hitachi S-4800, 日本

### 4.2.2 生物活性

采用模拟体液浸泡法来评估材料的生物活性, 按照文献[102]中的方法配制模拟体液, 其离子浓度与人体血液的离子浓度相近 (见表4.1)。将一定尺寸的经无水乙醇溶液处理后的纯CS膜和不同比例的M58S/CS复合多孔膜浸泡在装有模拟体液的塑料瓶中。然后在将盛有材料的塑料瓶放入37℃恒温水浴锅中浸泡7天, 7天后将材料取出, 用去离子水把材料表面清洗干净, 然后放入真空干燥箱中干燥待用。采用FESEM来观察材料表面的变化, 采用FTIR和XRD来表征复合多孔膜材料的生物活性。

表 4.1 模拟体液和人体血浆的离子浓度 (mmol/L)  
Table4.1 Ion concentrations of SBF and human blood plasma (mmol/L)

|        | Na <sup>+</sup> | K <sup>+</sup> | Mg <sup>2+</sup> | Ca <sup>2+</sup> | Cl <sup>-</sup> | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> |
|--------|-----------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 模拟体液   | 142.0           | 5.0            | 1.5              | 2.5              | 148.8           | 4.2                           | 1.0                            |
| 血浆离子浓度 | 142.0           | 5.0            | 1.5              | 2.5              | 103.0           | 27.0                          | 1.0                            |

### 4.2.3 生物降解性

生物降解性采用将样品至于一定浓度的溶菌酶磷酸盐缓冲液中浸泡一定时间后, 用失重来测量其降解性。首先配制磷酸盐缓冲液 (PBS), 然后在磷酸盐缓冲液中加入适量的溶菌酶配制成 10000U/mL 的溶菌酶溶液。将一定尺寸的经无水乙醇溶液处理后的纯壳聚糖膜和不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜浸渍在装有溶菌酶溶液的塑料瓶中。然后在将盛有材料的塑料瓶放入 37℃恒温水浴锅中浸泡 1、2、3、4、5、6、7 天, 一定时间后将材料取出用去离子水把材料表面清洗干净, 然后放入真空干燥箱中干燥待用。

#### (1) 降解率测试

降解率的测定按照文献<sup>[103]</sup>中的方法测定, 公式为:

$$\text{降解率} = (W_0 - W_t) / W_0 \times 100\% \quad 4- (1)$$

其中  $W_0$  为多孔膜浸泡前的干燥质量,  $W_t$  为多孔膜预定时间降解后的干重, 每组数据为 3 个平行试样的平均值。

### 4.2.4 性能表征

#### (1) XRD 测试

采用 ARL-X' TRA 型 X-射线衍射仪, 对经过模拟体液浸泡的纯壳聚糖膜和不同比例的



M58S/CS 复合多孔膜进行分析, 管电压 45kV、管电流 40mA、扫描速度为  $2^\circ/\text{min}$ , 角度范围为  $10\sim70^\circ$ 。

## (2) FESEM 分析

本研究采用日本 HitachiS-4800 型电子扫描电镜观察纯壳聚糖膜和不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜材料在模拟体液中浸泡后的表面形态变化。测试制样时材料表面喷金。

## (3) FTIR 分析

采用 KBr 压片法使用 Nicolet5700 (美国) 傅里叶红外光谱仪对经过模拟体液浸泡的纯壳聚糖膜和不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜进行分析。

# 4.3 结果与讨论

## 4.3.1 生物活性

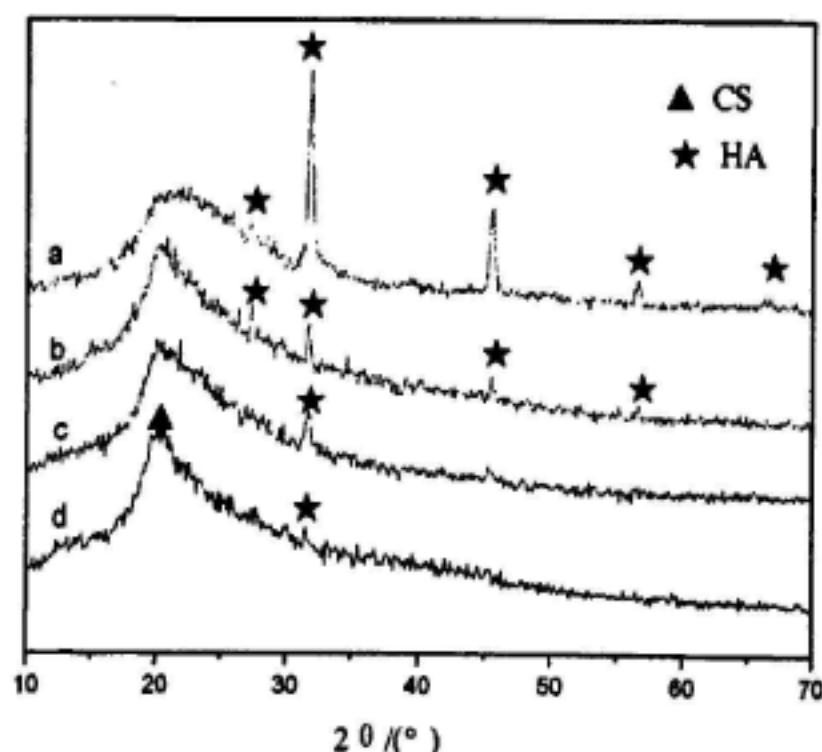


图 4.1 多孔膜在 SBF 中浸泡 7 天后的 XRD 图谱: (a) 60% M58S/CS 复合多孔膜; (b) 40% M58S/CS 复合多孔膜; (c) 20% M58S/CS 复合多孔膜; (d) 纯壳聚糖膜

Fig.4.1 XRD patterns of composite porous films after soaking in SBF for 7days: (a) composite porous films with 60% M58S; (b) composite porous films with 40% M58S; (c) composite porous films with 20% M58S; (d) pure chitosan porous films

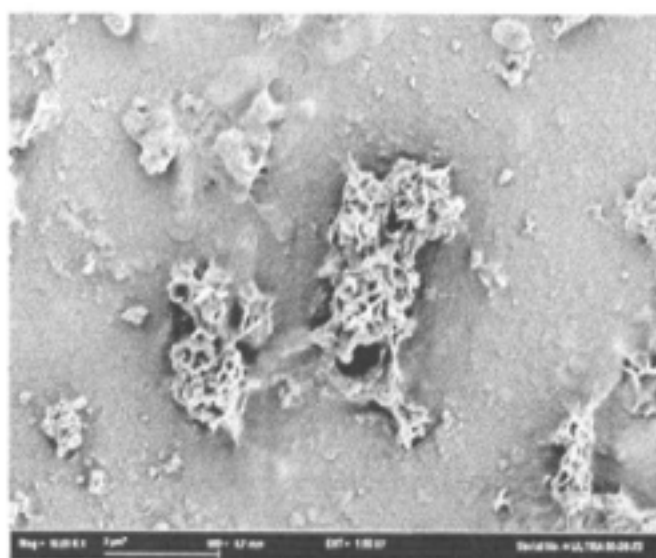
图 4.1 是为多孔膜材料在 SBF 中浸泡 7 天后的 XRD 图片。从图中可以看出, 不同比例的复合多孔膜材料在 SBF 中浸泡 7 天后都在  $2\theta=31.8^\circ$  处出现了羟基磷灰石主衍射峰<sup>[104]</sup>, 说明不同比例的复合多孔膜都有一定的生物活性。但是从 4.1 (d) 图中可以看到, 纯壳聚糖表面沉积物的衍射峰强度很低, 说明纯壳聚糖多孔膜表面沉积物较少, 生物活性低; 随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增多,  $31.8^\circ$  附近衍射峰的强度也随之增强。当介孔生物活性玻璃 M58S 的含量达到 40% 时, 在  $27^\circ$ 、 $45^\circ$ 、 $56^\circ$  附近出现了新的衍射峰, 表明多孔膜的生物活性增强。当介孔生物活性玻璃 M58S 的含量达到 60% 时,  $27^\circ$ 、 $45^\circ$ 、 $56^\circ$  附近新

的衍射峰的强度增强,说明介孔生物活性玻璃 M58S 含量越多,多孔膜表面沉积物越多即生物活性越强。

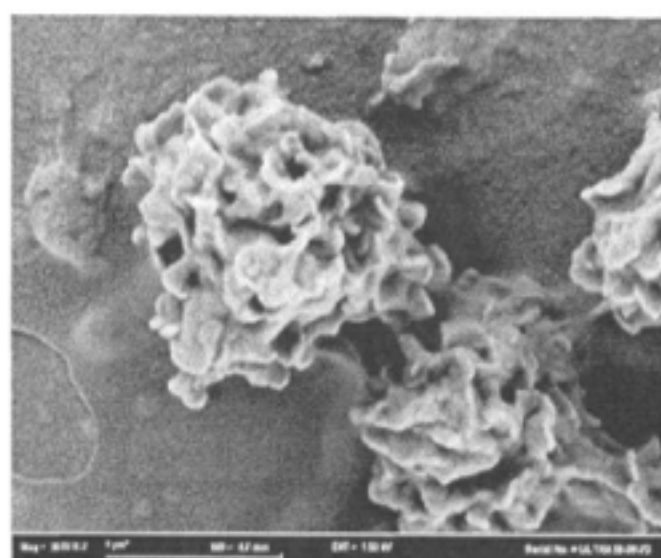
图 4.2 为多孔膜材料在 SBF 中浸泡 7 天后的 FESEM 照片。从图 4.2 (a) 和 4.2 (b) 中可以看到在 SBF 中浸泡 7 天后,纯壳聚糖复合多孔膜表面出现了沉积物,表明壳聚糖具有一定的生物活性,但是发现壳聚糖膜表面沉积物较少,说明其活性较低;随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加,复合多孔膜材料表面聚集了越来越多的沉积物(图 4.2(c,e,g));由图 4.2 (d,f,h) 的高倍显微镜可以看出,多孔膜表面显的沉积物是由花瓣状晶体构成,花瓣状沉积物数量随介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加而明显增多且分布更加均匀。图 4.2 (i) 是沉积物的 EDS 图,从图中可以看到沉积物的主要成分为钙和磷,通过计算可以得出钙和磷的原子摩尔比大约为 1.65,接近羟基磷灰石的钙、磷原子摩尔比。

图 4.3 是纯壳聚糖多孔膜和不同比例 M58S/CS 复合多孔膜分别在 SBF 中浸泡 7 天后的 FTIR 图。从图中可以看出  $608\text{cm}^{-1}$ 、 $565\text{cm}^{-1}$  两个属于  $\text{PO}_4^{3-}$  官能团的弯曲振动峰,在  $1462\text{cm}^{-1}$ 、 $1419\text{cm}^{-1}$  附近的峰是  $\text{CO}_3^{2-}$  官能团的伸缩振动峰<sup>[105]</sup>。图 4.3 (a-d) 中都出现了上述特征峰,说明纯壳聚糖膜和不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜都具有生物活性;但可以看到位于  $608\text{cm}^{-1}$ 、 $565\text{cm}^{-1}$  两个属于  $\text{PO}_4^{3-}$  官能团的弯曲振动峰随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加,峰的强度有一定的增强,表明 M58S 的加入增加了材料的生物活性。

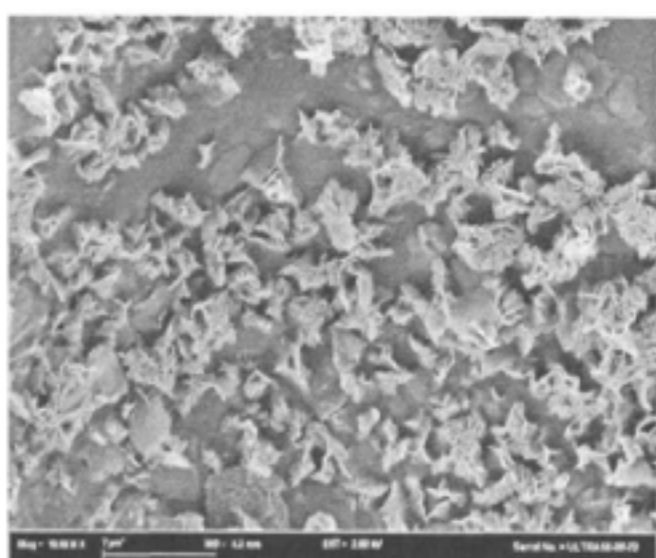
生物活性实验结果表明:具有高生物活性和较大的比表面积 of 介孔生物活性玻璃 M58S 与壳聚糖复合后浸泡在 SBF 中,更容易在短时间内形成无机矿物 HA 成分。因此,说明介孔生物活性玻璃 M58S 的加入,使得复合膜有了较高的生物活性。



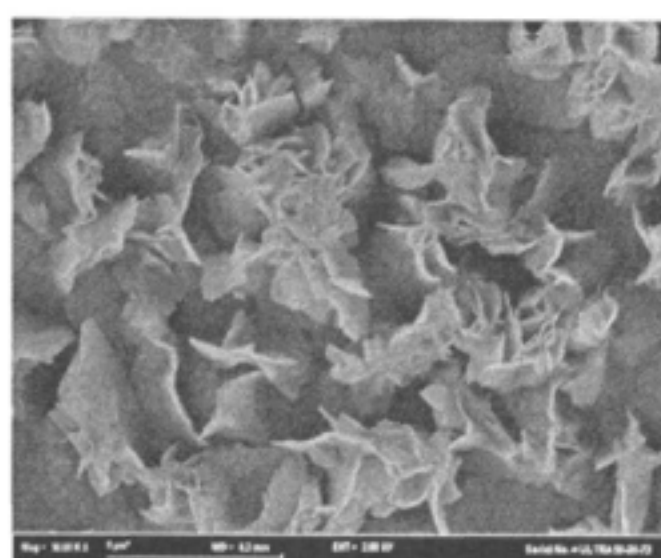
(a)



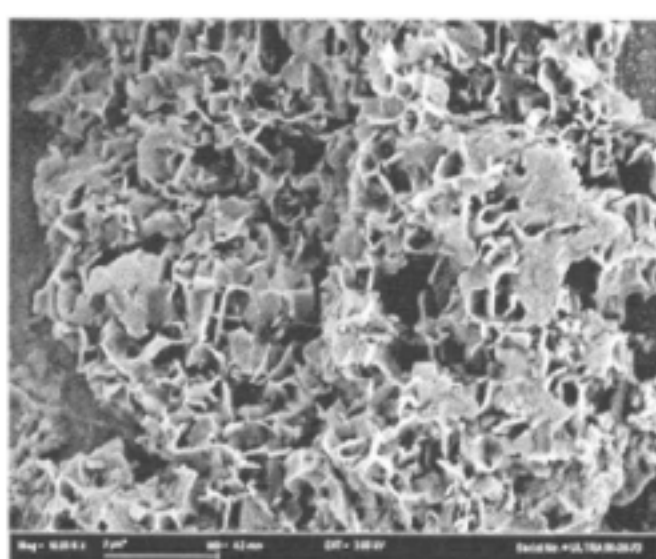
(b)



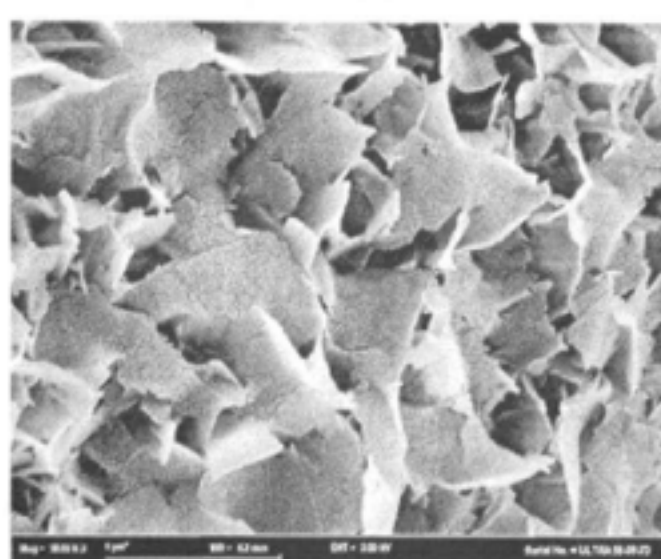
(c)



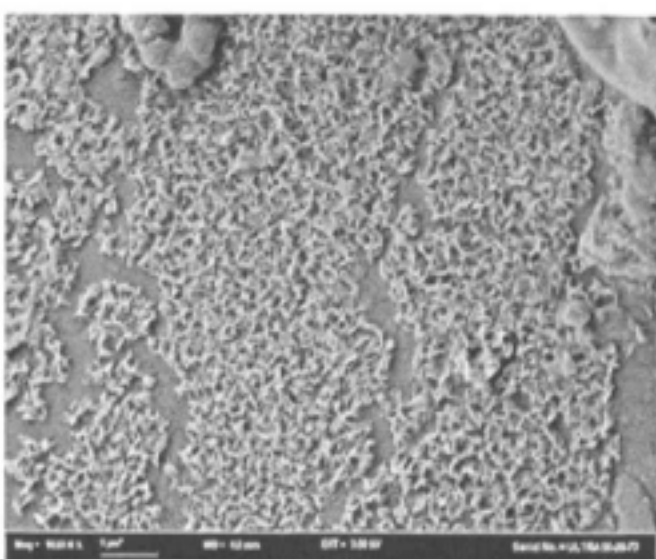
(d)



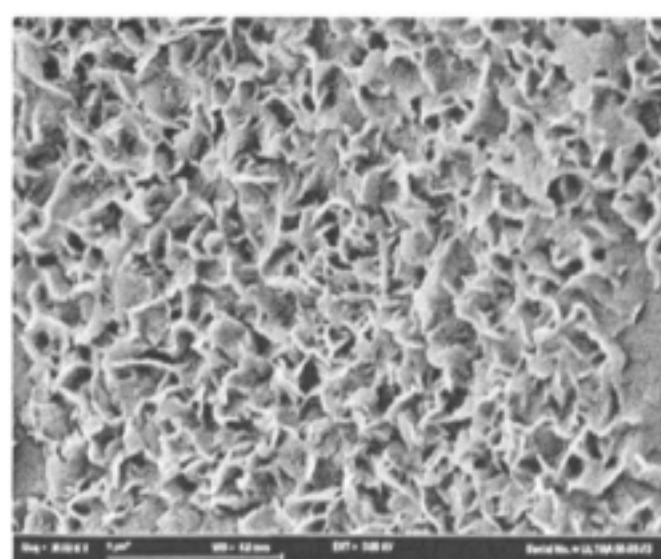
(e)



(f)



(g)



(h)

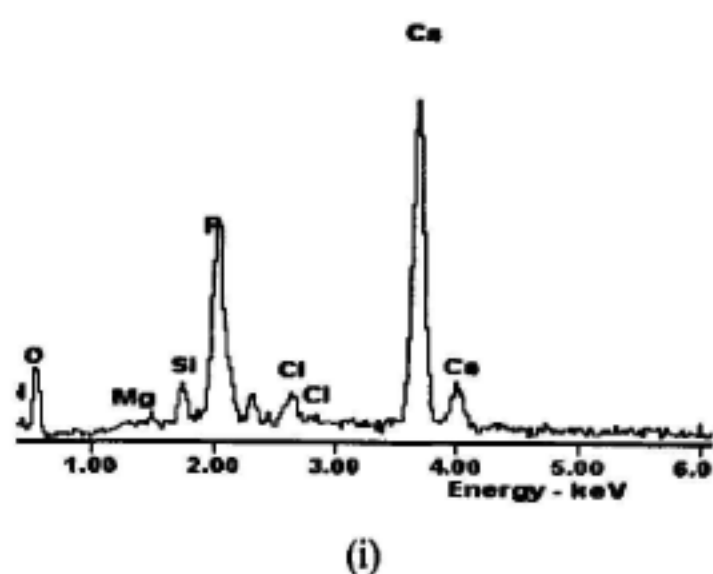


图4.2 多孔膜在SBF中浸泡7天后的表面扫描电镜照片: (a, b) 纯壳聚糖膜; (c, d) 20% M58S/CS复合多孔膜; (e, f) 40% M58S/CS复合多孔膜; (g, h) 60% M58S/CS复合多孔膜;  
(i) M58S/CS复合多孔膜能谱图

Fig.4.2 FESEM images of the porous films surface after soaking in SBF for 7 days: (a, b) pure chitosan porous films; (c, d) composite porous films with 20% M58S; (e, f) composite porous films with 40% M58S; (g, h) composite porous films with 60% M58S;  
(i) DES of M58S/CS composite porous films

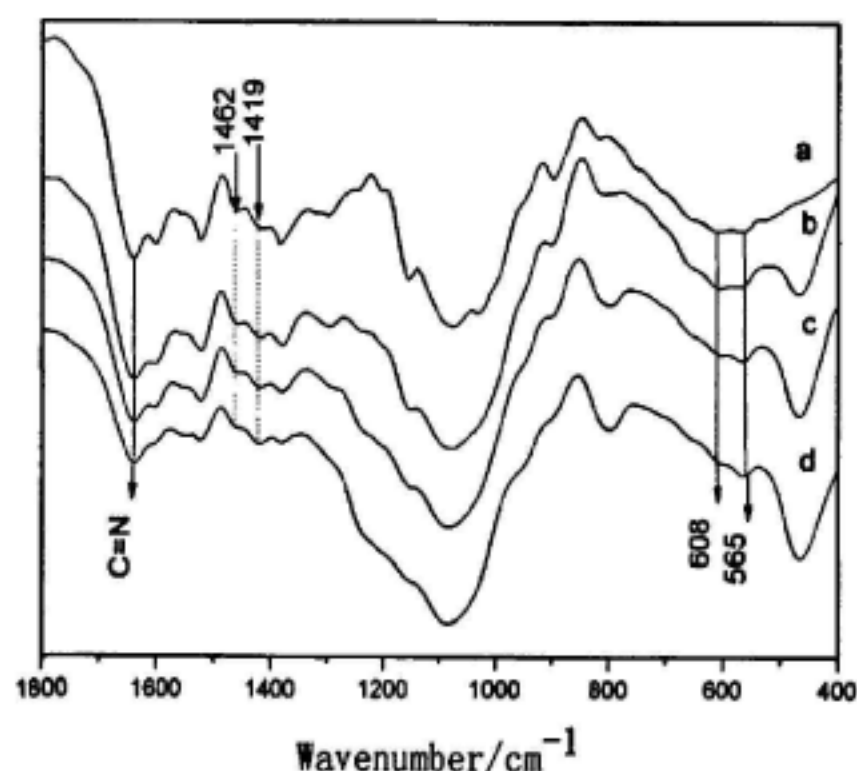


图 4.3 在 SBF 中浸泡 7 天后复合膜的 FTIR 图: (a) 纯壳聚糖膜; (b) 20% M58S/CS 复合膜;  
(c) 40% M58S/CS 复合膜; (d) 60% M58S/CS 复合膜

Fig.4.3 FTIR spectrums of the composite films after immersion in SBF for 7 days: (a) pure chitosan porous films; (b) composite porous films with 20% M58S; (c) composite porous films with 40% M58S; (d) composite porous films with 60% M58S

#### 4.3.2 生物降解性

在人体血清中, 壳聚糖主要是通过溶菌酶的作用使得壳聚糖的分子链断裂成为小的分子, 而不是通过其他酶的作用或者其他作用机制<sup>[106]</sup>。通过溶菌酶的水解作用, 壳聚糖分子中的乙酰氨基葡萄糖分解为氨基糖<sup>[107]</sup>, 氨基糖可以和糖蛋白作用或者通过新陈代谢排出体外。因此, 复合多孔膜中壳聚糖含量的高低将会影响材料的生物降解性。



图4.4是纯壳聚糖膜和不同比例的M58S/CS复合多孔膜在含有溶菌酶的PBS缓冲液中浸泡不同时间后的降解曲线。由图可知，纯壳聚糖膜和不同比例的M58S/CS复合膜的降解率都随着时间的延长，呈现逐渐增大的趋势。纯壳聚糖膜的降解速率较快，3天后的降解率为9.68%，5天后降解率为12.82%，7天后的降解率达到了17.9%；当介孔生物活性玻璃M58S的含量达到60%时，复合多孔膜3天后的降解率为6.46%，5天后降解率为8.77%，7天后的降解率为12.12%。对比研究表明：随着M58S含量的增加，复合多孔膜的降解率在降低，这主要是由于复合多孔膜中壳聚糖含量相对减少。从图中可以进一步看出，虽然随着M58S含量的增加，降解率有一定程度的下降，但是改性后的多孔膜材料仍具有良好的生物降解性。

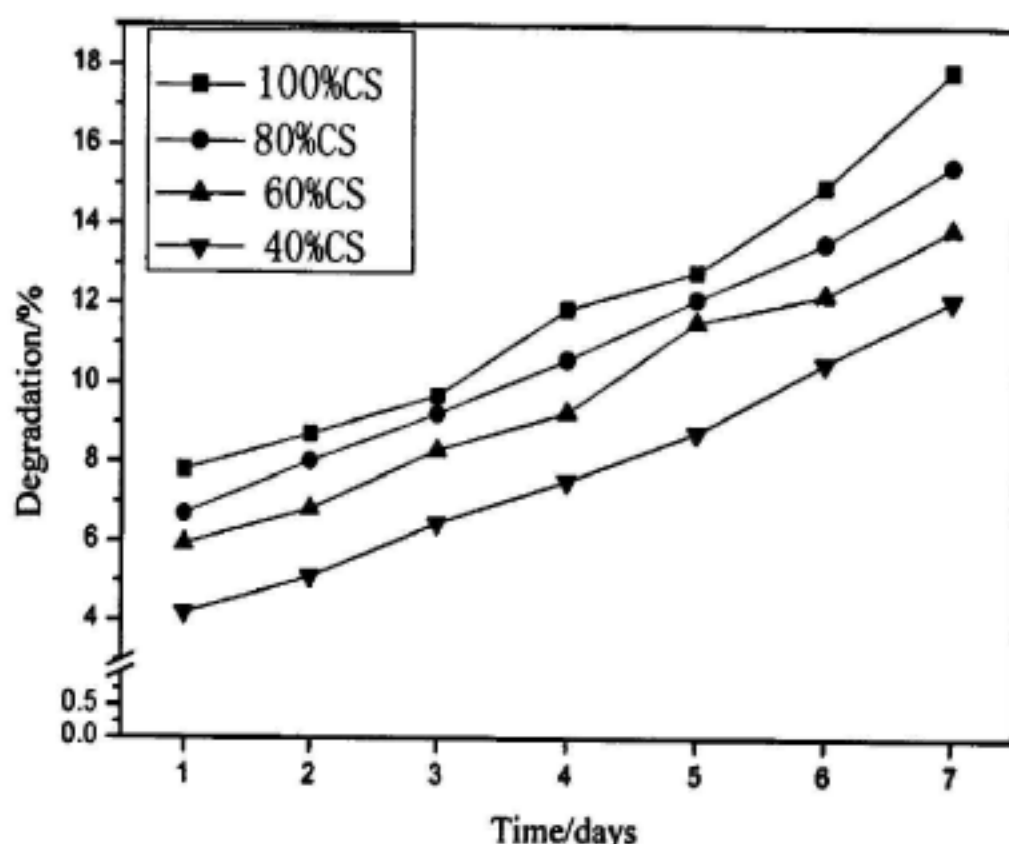


图 4.4 M58S/CS 复合多孔膜在 PBS 缓冲液中浸泡 1 周后的降解率

Fig.4.4 Degradation ratio of theM58S/CS composite porous films after soaking in PBS for 1week

#### 4.4 本章小结

1. 生物矿化研究表明：纯壳聚糖膜和不同比列的 M58S/CS 复合多孔膜都具有诱导 CHA 的能力。虽然不同的材料在 SBF 中浸泡 7 天后，材料表面都有 CHA 沉积物的出现，但是纯壳聚糖膜和不同比列的 M58S/CS 复合多孔膜诱导 CHA 的能力不同；同样经过 SBF 中浸泡 7 天，但纯壳聚糖膜表面的沉积的 CHA 较少，而随着加入含量不同的介孔生物活性玻璃 M58S 后，材料表面沉积的 CHA 越来越多。从 FESEM 图中可以清晰的看到，当介孔生物活性玻璃 M58S 的含量达到 60%后，复合多孔膜表面有一层致密的沉积物。研究结果表明：介孔生物活性玻璃 M58S 的加入促进了 CHA 在壳聚糖表面的沉积，提高了材料的生物活性。

2. 生物降解性研究表明：纯壳聚糖膜在溶菌酶溶液中降解速率最快，7 天后的降解率

为 17.9%；M58S 含量为 20%的 M58S/CS 复合多孔膜，7 天后的降解率为 15.5%；含量 40% 的 M58S/CS 复合多孔膜，7 天后的降解率为 13.9%；含量 60%的 M58S/CS 复合多孔膜，7 天后的降解率为 12.12%；随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加，M58S/CS 复合多孔膜的降解率有一定程度的下降，但是不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜都具有良好的生物降解性。

## 第五章 止血性能和细胞毒性研究及应用拓展

### 5.1 前言

每年我国有上百万的人死于失血过多,这些人群主要集中在车祸、摔砸伤、地震灾害、洪水灾害、手术中或手术后以及其它突发事件等出血。在战场上,50%的阵亡士兵是由于出血过多所致<sup>[1]</sup>,因此关于止血材料的研究一直是医学上的一个热点。

介孔材料作为止血材料研究时间不长,最早开始于20世纪80年代。Francis X. Hursey 无意发现沸石分子筛具有良好的止血作用并申请专利,2002年专门生产以沸石分子筛为主体的Z-Medica公司成立,生产的商品名为Quikclot<sup>®</sup>,在实际应用中(特别是野战战场),该新型止血材料的止血效果及提高存活率等方面多优于传统止血材料,因而目前已经获得美国FDA批准上市。到2005年复旦大学余承忠教授报道<sup>[78]</sup>介孔生物活性玻璃具有很好的止血效果并申请国家发明专利;随后2006年华东理工大学刘昌胜教授报道<sup>[79]</sup>介孔硅基干凝胶具有很好的止血性能并申请国家发明专利。虽然介孔材料作为快速止血材料的研究取得了一定的成就,但介孔材料在止血使用过程中依然存在许多问题亟待改进,如介孔沸石分子筛在使用过程中放热灼伤组织表面<sup>[7]</sup>,介孔硅基干凝胶粉和沸石分子筛生物活性低,在使用过程中难以被人体吸收,而且最为关键的是介孔止血材料都是粉体止血材料,给使用中带来极为不便。

壳聚糖是研究者开发的一种新型止血材料,由于其对人体生物相容性好,可生物降解、能促进组织再生<sup>[108,109]</sup>等而逐渐用于临床。早在1983年Malette WG等<sup>[2]</sup>就发现壳聚糖具有较好的止血功能,并申请专利。随后研究者对壳聚糖的止血性能展开了很多研究,如Klokkevold PR等<sup>[3]</sup>在兔舌上进行壳聚糖止血性能研究,在实验中给兔注射前列环素抑制体内血小板功能,进一步证实壳聚糖醋酸盐溶液的止血功效,同时也说明了止血作用不依赖于血小板;Malette WG, Fukasawa M等<sup>[110]</sup>展开了壳聚糖止血机理研究,发现其止血机制不是常规依赖于血小板和凝血因子,而是通过对红细胞作用,使其发生黏附,从而达到止血效果。但由于壳聚糖材料止血作用有限,对于广泛的出血创面止血效果不甚理想,常需复合其他止血药如凝血因子等<sup>[5,6]</sup>,而凝血因子等生物止血剂的保存条件比较苛刻,储备不便,使得价格较高,这又为壳聚糖快速止血材料的应用带来阻碍。

本文通过冷冻干燥法将介孔生物活性玻璃M58S和壳聚糖两者有机复合在一起,由于两种材料均具有良好的止血性能,因此该复合材料有望作为一种新型止血材料。本章首先对制备的材料进行了动物止血试验和细胞毒性测试,观察不同比例的M58S/CS复合多孔膜的止血时间和出血量以及L929成纤维细胞在不同比例复合多孔膜表面和不同比例复合多孔

膜浸提液中的生长状况。其次,为了拓宽其应用领域,将介孔生物活性玻璃 M58S 和壳聚糖的复合溶液分别均匀的涂敷在普通脱脂棉纱布上和吸收性明胶海绵上而后应用冷冻干燥法制备出了新型的止血材料,采用 SEM、FTIR、TG 等测试方法对止血性纱布进行了表征并对涂覆明胶复合止血材料进行了动物止血实验。

## 5.2 实验部分

### 5.2.1 实验与仪器

#### (1) 原料

不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜: 自制

健康成年 SD 大鼠: 上海长征医院实验动物中心

L929 小鼠成纤维细胞: 中国科学院上海细胞研究所

氯化钠 NaCl: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司

氯化钾 KCl: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司

磷酸氢二钠  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司

磷酸二氢钾  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司

RPMI1640 培养液: GIBICO 公司, 美国

胎牛血清: FBS, GIBICO 公司, 美国

青霉素: 杭州四季青生物工程材料有限公司

链霉素: 上海先锋药业公司

胰蛋白酶: GIBICO 公司, 美国

二甲基亚砜: DMSO, 中国医药集团上海化学试剂有限公司

二甲基噻唑二苯基四唑溴盐: MTT, Sigama 公司, 美国

Triton X-100: Sigama 公司, 美国

#### (2) 仪器

$\text{CO}_2$  培养箱: NAPCO, 美国

DSH-系列超净工作台: YJ-875SA, 上海淀山湖净化设备厂

细胞培养板: 96 孔 Coring, 美国

酶标仪: CLINIBIO 18C-400, 澳大利亚

离心机: KR4i, 法国

微量可调移液管:  $1000\mu\text{L}$ ,  $200\mu\text{L}$ , EPPENDORF 公司, 美国

细胞计数器: 中国



微型振荡器: MH-2, 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司

### 5.2.2 复合多孔膜的老鼠肝切口止血预实验

取健康成年 SD 大鼠 18 只, 体重为  $180 \pm 10\text{g}$ , 随机分成 6 组, 每组 3 只, A1 组为沸石粉, A2 组为纯介孔生物玻璃粉, A3 组为纯壳聚糖多孔膜、A4 组为 20% M58S/CS 复合多孔膜, A5 组为 40% M58S/CS 复合多孔膜, A6 组为 60% M58S/CS 复合多孔膜。采用 3% 戊巴比妥钠 ( $1\text{mg}/100\text{g}$ ) 溶液对 SD 大鼠进行静脉腹腔麻醉, 麻醉成功后, 将 SD 大鼠仰卧固定于解剖台上, 并用碘尔康溶液消毒。然后在肋弓下沿着腹中线切一纵行切口, 长度约  $2\text{cm}$ , 深度先至皮肤全层, 然后提起腹肌沿着腹中线剪开腹肌, 注意避开腹内重要脏器, 轻轻挤压腹部, 肝中叶从切口处被挤出, 注意避免损伤肝中叶, 用无菌纱布吸干肝脏周围腹腔液, 用天平称过重量的无菌纱布垫于肝中叶下, 快速切除肝中叶, 切线约是肝中叶下缘以上  $2\text{cm}$ 。同时立刻上不同类型的止血材料, 并用秒表计时, 直至出血停止, 记下出血时间。出血量为吸血的无菌纱布重量, 与之前称出未吸血纱布的重量的差值。实验具体方法详见参考文献<sup>[11]</sup>。

### 5.2.3 细胞毒性实验

#### (1) 试剂配制

磷酸盐缓冲液 (PBS): 将氯化钠  $8.0\text{g}$ 、氯化钾  $0.2\text{g}$ 、磷酸氢二钠  $2.88\text{g}$ 、磷酸氢二钾  $0.2\text{g}$  溶于  $1000\text{mL}$  的去离子水中, 并用 pH 计将溶液的 pH 值调整至 7.4, 高压灭菌, 放入  $4^\circ\text{C}$  环境下冷藏待用。

0.25%胰蛋白酶溶液: 称取胰蛋白酶  $0.5\text{g}$ , 加入到  $100\text{mL}$  PBS 溶液中, 然后用  $0.22\mu\text{m}$  滤膜过滤去除溶液中的细菌,  $4^\circ\text{C}$  环境下冷藏待用。

MTT 溶液: 按照 MTT 溶液浓度  $5\text{mg}/\text{mL}$ , 取一定量的 MTT 粉末加入 PBS 溶液中配制溶液, 然后用  $0.22\mu\text{m}$  滤膜过滤去除溶液中的细菌,  $4^\circ\text{C}$  环境下冷藏待用。

#### (2) 细胞培养及浸提液的准备

细胞培养条件: L929 小鼠成纤维细胞株在细胞培养液 RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) 中培养, 培养液中加入 10% 小牛血清 (FCS), 青霉素  $100\text{U}/\text{mL}$  和链霉素  $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将盛有 L929 小鼠成纤维细胞的培养瓶放置在  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  和 95% 湿度 (标准条件) 培养箱中培养, 每 3 天换液。

复合多孔膜的浸提液的准备: 将不同比例的材料在超净台中置于紫外线下照射 24 小时, 置于无菌瓶中, 按材料面积与浸提液为  $2\text{cm}^2/\text{mL}$  的比例加入无菌 RPMI1640 培养液, 在  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中浸置 24 小时, 然后去其上清液,  $1000\text{rpm}$  离心  $10\text{min}$ , 用  $0.22\mu\text{m}$

滤膜过滤去除溶液中的细菌，4℃环境下冷藏待用。

### (3) 细胞形态观察法

将培养 72 小时的 L929 成纤维细胞进行消化，吸去原 RPMI1640 培养液，用 37℃ 的 PBS 缓冲液洗涤 2 次，加入适量的 0.25% 胰蛋白酶溶液消化，然后将培养瓶放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中 5 分钟后取出用倒置显微镜观察细胞生长状况，若细胞收缩变圆应立即加入应终止消化，加入含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液将成纤维细胞吹打成单个细胞悬液，再加入适量含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液制成  $1 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液。不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜材料为实验组，阳性对照组为含有有机锡添加的聚氯乙烯。将实验组和对照组材料用生理盐水充分漂洗后分别放入培养皿中，再在培养皿中加入  $10^4$  个/mL 的 L929 成纤维细胞悬液 5mL。另设一组不加试样只种植细胞为阴性对照组。各组材料放入 37℃，含 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养，72 小时后取出用倒置相差显微镜观察材料边缘的细胞生长状况。

### (4) MTT 比色法

MTT 比色法，是一种检测细胞存活和生长的方法。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚 (Formazan) 并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。二甲基亚砜 (DMSO) 能溶解细胞中的甲瓚，用酶联免疫检测仪在 490nm 波长处测定其光吸收值，因此可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内，MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。

细胞悬液的配置方法和细胞观察法中的配置方法相同。将配置的  $10^4$  个/mL 的细胞悬液接种于 96 孔培养板，每孔加入细胞悬液 100μL，接种时尽量使得每一孔种植的植物数目相对均匀。然后放入 37℃，含 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 小时，使细胞贴壁。之后弃去孔内原细胞培养液，用 37℃ PBS 缓冲液洗涤 2 次，实验组和阴性对照组分别加入含 10% 胎牛血清的浸提液 100μL 和含 10% 胎牛血清的新鲜培养液 100μL，阳性对照 (Ctrl+) 为含 10% 胎牛血清和 0.2% Triton X-100 的培养液 100μL (对细胞有强烈的毒性作用)。继续在培养箱中 37℃，5%CO<sub>2</sub> 和 95% 湿度的条件下分别培养 1、3 和 7 天。然后向每孔加入 50μL 0.5mg/mL 的 MTT 溶液继续在培养箱标准条件下培养 4 小时。随后小心吸去培养孔中的细胞培养液，再加入 100μL DMSO，用微型震荡器震荡 10min 后，利用酶标仪测试波长为 490nm 处的 OD (Optical Density) 值。

## 5.2.4 止血带的制备

### (1) 原料

医用脱脂棉纱布：盐城市盐康医疗器材有限公司

吸收性明胶海绵：南昌市祥恩堂医疗器械有限公司

M58S/CS 混合溶液：按照 3.2.2 中 M58S/CS 复合材料制备中的方法制备复合溶液

## (2) 止血材料的制备

剪取 4 块 10cm×10cm 大小的纱布，平铺在涂抹板上，然后取不同比例的 M58S/CS 的混合溶液 10mL 分别均匀的涂抹在纱布上，然后放入-80℃冰箱中冷冻 3 个小时后放入冷冻干燥机中冷冻干燥 24 小时后即可得到止血带。

取 4 块吸收性明胶海绵，然后取不同比例的 M58S/CS 的混合溶液 5mL 分别均匀的涂抹在明胶海绵的表面，然后放入-80℃冰箱中冷冻 3 个小时后放入冷冻干燥机中冷冻干燥 24 小时后即可得到涂覆明胶止血材料。

## (3) 表征

### ① SEM 分析

本实验采用日本 JEOL 公司的 JSM-5610LV 电子扫描电镜观察止血带的表面形态。测试制样时材料表面喷金。

### ② FTIR 分析

采用 ATR 法使用 Nicolet 5700（美国）傅里叶红外光谱仪对止血带进行结构分析。

### ③ TG 分析

采用美国 PE 公司 Pyris Diamond TGA 对止血带进行热重分析。测试条件：N<sub>2</sub> 保护，升温速率 20℃/min，升温范围为 50~700℃。

### ④ 涂覆明胶止血材料的止血实验

取健康成年 SD 大鼠 15 只，体重为 180±10g，随机分成 5 组，每组 3 只，A1 组为 CS/Gelatin 止血材料，A2 组为 20% M58S/CS/Gelatin 止血材料、A3 组为 40% M58S/CS/Gelatin 止血材料，A4 组为 60% M58S/CS/Gelatin 止血材料，A5 组为没有经过处理的吸收性明胶海绵。动物处理方法和出血量的测量同 5.2.3 中的方法，出血量测量时将时间固定在 60s。

## 5.3 结果与讨论

### 5.3.1 不同止血材料的止血性能评价

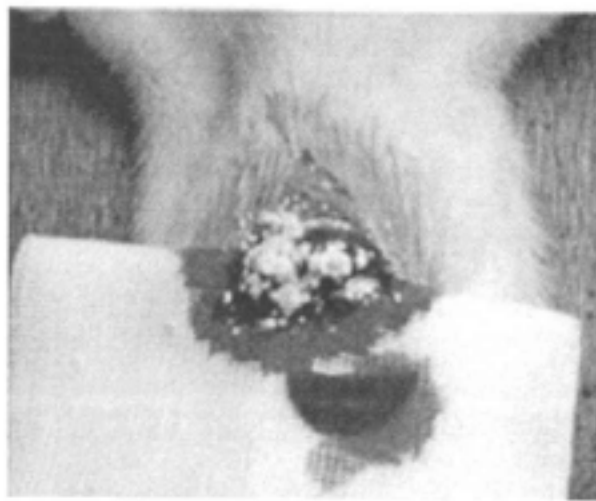
表 5.1 是沸石、介孔生物活性玻璃 M58S 粉和不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的出血时间及出血量；图 5.1 是沸石、介孔生物活性玻璃 M58S 粉和不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的动物止血实验。从表 5.1 可以看出，沸石粉的止血时间最长出血量最大，止血时间是 270 秒，出血量是 1.13±0.04g；然后是纯介孔生物活性玻璃 M58S 粉，止血时间是 230 秒，出血量是 0.94±0.04g；随后是纯壳聚糖膜，止血时间为 130 秒，出血量是 0.8±0.03g；20%



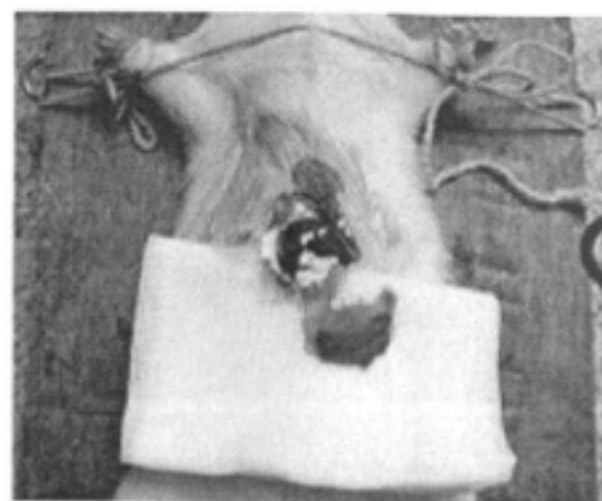
表5.1 不同材料的出血时间及出血量

Table5.1 The hemostatic time and amount of bleeding of different materials

|                  | 止血时间 (s) | 出血 (g)    |
|------------------|----------|-----------|
| 沸石               | 270      | 1.13±0.04 |
| 纯介孔生物活性玻璃粉       | 230      | 0.94±0.04 |
| 纯壳聚糖膜            | 130      | 0.8±0.03  |
| 20% M58S/CS复合多孔膜 | 120      | 0.60±0.02 |
| 40% M58S/CS复合多孔膜 | 105      | 0.50±0.02 |
| 60% M58S/CS复合多孔膜 | 90       | 0.40±0.02 |



(a) 沸石



(b) 纯 M58S 粉



(c) 纯壳聚糖膜



(e) 20% M58S/CS 膜



(f) 40% M58S/CS 膜



(g) 60% M58S/CS 膜

图 5.1 不同材料止血效果观察

Fig.5.1 The observation of hemostatic effect in different materials



M58S/CS复合多孔膜止血时间为120秒,出血量是 $0.6\pm 0.02\text{g}$ ; 40% M58S/CS复合多孔膜止血时间为105秒,出血量是 $0.5\pm 0.02\text{g}$ ;当介孔生物活性玻璃M58S的含量达到60%时止血时间和出血量都最低,分别为90秒和 $0.4\pm 0.02\text{g}$ 。由以上分析知:沸石止血性能不及介孔生物活性玻璃M58S;粉剂的止血效果不及多孔膜的止血效果;而且随着介孔生物活性玻璃M58S在复合膜中的含量增加,止血性能越来越好。

介孔生物活性玻璃粉M58S的止血效果要好于沸石这可能是由于介孔生物活性玻璃M58S相比沸石有更高的比表面积,有超强的吸附能力,能够快速吸收血液中的水分,使凝血因子浓缩立即起到止血效果。多孔膜的止血效果要好于粉剂,一方面是由于制得的复合多孔膜有较高的孔隙率,储水和吸水性能好;另一方面是由于多孔膜能够和伤口较好的贴合,阻止血液流出,而粉体试剂与伤口的贴合性差。

### 5.3.2 复合多孔膜材料的细胞毒性分析

图 5.2 是培养 3 天后在倒置相差显微镜下的细胞形态图片。从图中可以看出,在纯壳聚糖多孔膜和不同比例 M58S/CS 复合多孔膜以及阴性对照液中的 L929 小鼠成纤维细胞数量众多。其中阴性对照组中细胞大部分贴壁,折光性好,细胞突伸展开细胞。细胞与细胞之间排列紧密,形态呈长梭形和多边形。实验组较阴性对照组,有少量细胞变形,但细胞生长状况良好,证明复合多孔膜生物相容性好,对细胞无毒。而阳性对照液中 L929 小鼠成纤维细胞数量较少,细胞形态呈圆形,核固缩,细胞存活数量较实验组和阴性对照组较少。

图 5.3 是细胞在不同比例 M58S/CS 复合多孔膜浸提液中的增殖情况。从图中可以看出,相同培养条件下,24 小时后 L929 细胞在不同比例 M58S/CS 复合多孔膜浸提液中生长良好,没有出现细胞大量死亡的现象。从图中还可以明显的看出,随着培养时间的增长不同比例 M58S/CS 复合多孔膜浸提液中的细胞增殖数量都不断增加,培养 7 天后的细胞数量显著的大于培养 1 天后的;不同比例 M58S/CS 复合多孔膜浸提液中的细胞增殖情况与阴性对照组相比没有明显差异,未出现细胞数量剧减的情况,并且细胞数量明显多于阳性对照组,所以制备的不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜对 L929 成纤维细胞没有毒性。

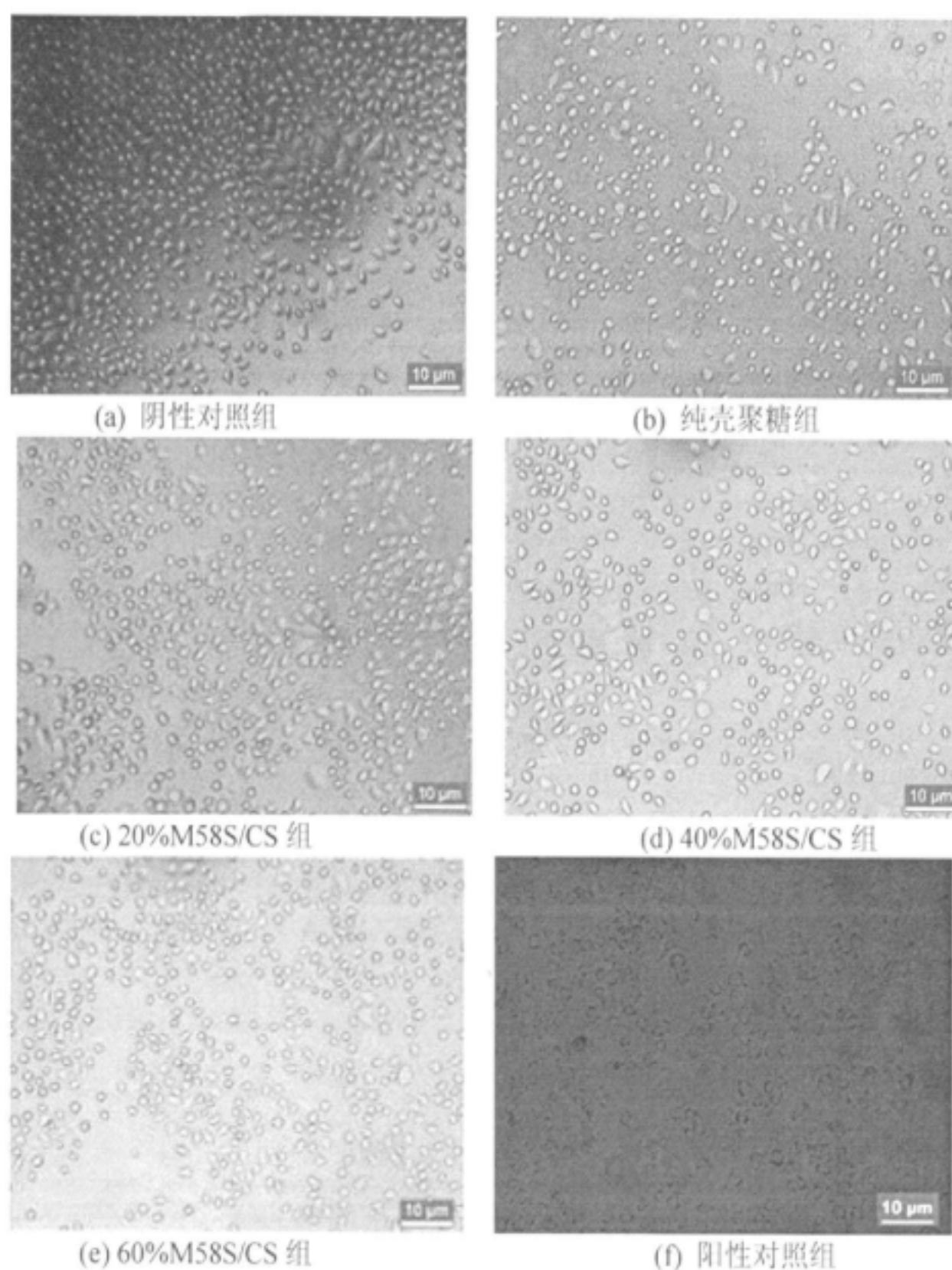


图5.2 培养3天后细胞形态学改变 (×100)

Fig.5.2 The change of cellular morphology in 3day after modeling

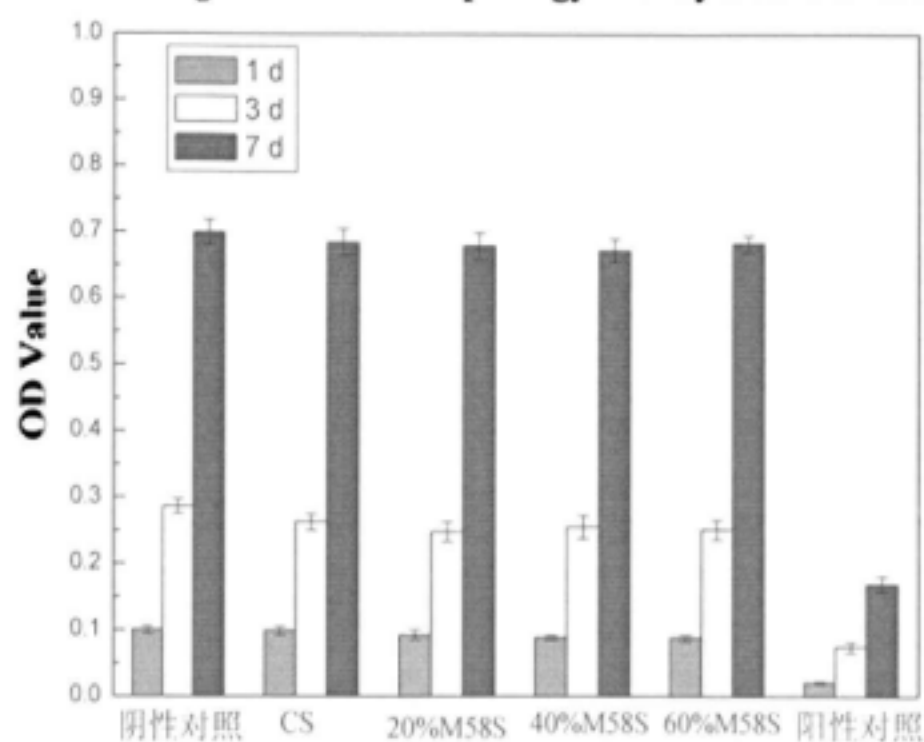


图 5.3 不同材料的 MTT 测试

Fig.5.3 The MTT test of different materials

### 5.3.3 止血带的 SEM 分析

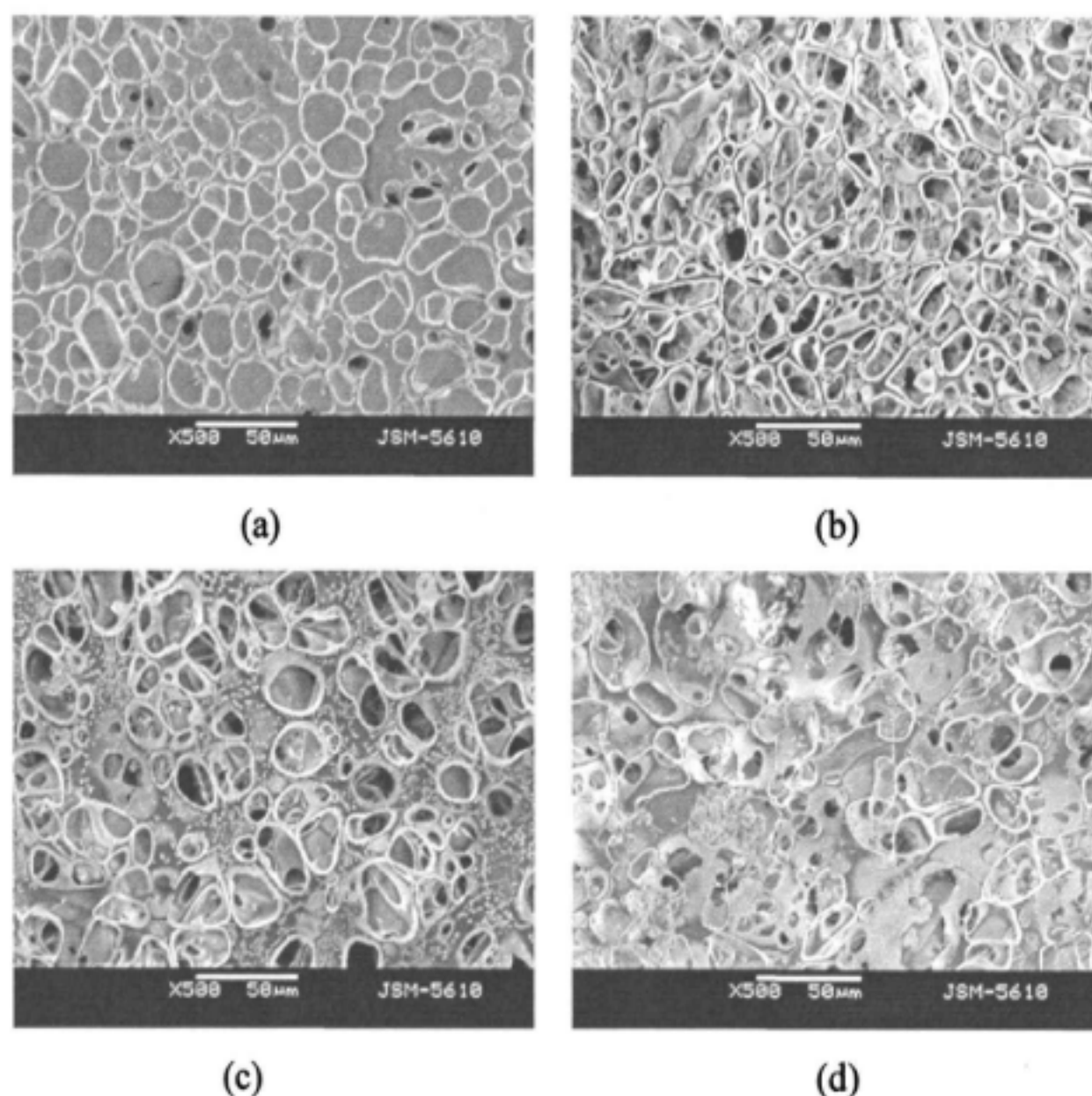


图5.4 M58S/CS复合止血带的SEM图: (a) 纯壳聚糖止血带; (b) 20% M58S/CS复合止血带; (c) 40% M58S/CS复合止血带; (d) 60% M58S/CS复合止血带

Fig.5.4 SEM images of different M58S/CS composite wound dressing: (a) pure chitosan composite wound dressing; (b) composite wound dressing with 20% M58S; (c) composite wound dressing with 40% M58S; (d) composite wound dressing with 60% M58S

图 5.4 是不同比例的 M58S/CS 复合止血带的电镜图。从图中可以看出，不同比例的 M58S/CS 混合溶液均匀涂敷在纱布表面经冷冻干燥后，在纱布表面可以形成绵状多孔结构，且多孔分布较均匀。图 5.4 (a) 是纯壳聚糖止血带的 SEM 图，可以看到多孔内壁光滑，孔径相对较小，孔隙分布也较密。随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增多，可以看到纱布表面的介孔粒子越来越多，且孔隙分也较为松散，孔径逐渐增大（如图 5.4 (b-e)）。作为止血材料应该具有良好的透气性，由于制备的材料表面是多孔结构且材料的基布是疏松多孔的纱布，因此制备出来的材料有望做为一种新型的止血材料。

### 5.3.4 止血带的 FTIR 分析

图 5.5 是不同比例 CS/M58S 涂层止血带的红外谱图。从图 5.5 (a-d) 中可以看到在  $1642\text{cm}^{-1}$  处的 C=N 伸缩振动峰<sup>[87,88]</sup>，说明壳聚糖中的氨基和香草醛中的醛基发生了席夫碱反应，同时从图 (a) 中可以看到壳聚糖的酰胺 II 带酰胺 I 带特征吸收峰消失，证实了两者之间的反应。将壳聚糖涂敷在棉质纱布上，从图 5.5 (a) 中得知  $1028\text{cm}^{-1}$ 、 $1070\text{cm}^{-1}$  分别



为 C-O 伸缩振动峰和 C-O-C 的吸收峰<sup>[112]</sup>。当介孔生物活性玻璃 M58S 加入后, M58S/CS 复合止血带中的  $1028\text{cm}^{-1}$  处的 C-O 伸缩振动峰的强度随之减弱,这有可能是介孔生物玻璃之中的-OH 发生了氢键作用使之峰强越来越弱。 $1070\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰的强度越来越强,这有可能是  $1082\text{cm}^{-1}$  处的 Si-O-Si 伸缩振动峰和 C-O-C 的吸收峰通过氢键作用联系在一起,致使峰强度增加并且使 Si-O-Si 伸缩振动峰的位置向低数方向有了轻微移动。由以上分析可 CS/M58S 涂层和棉质纱布有很好的相容性,有利于进一步改善止血纱布的性能。

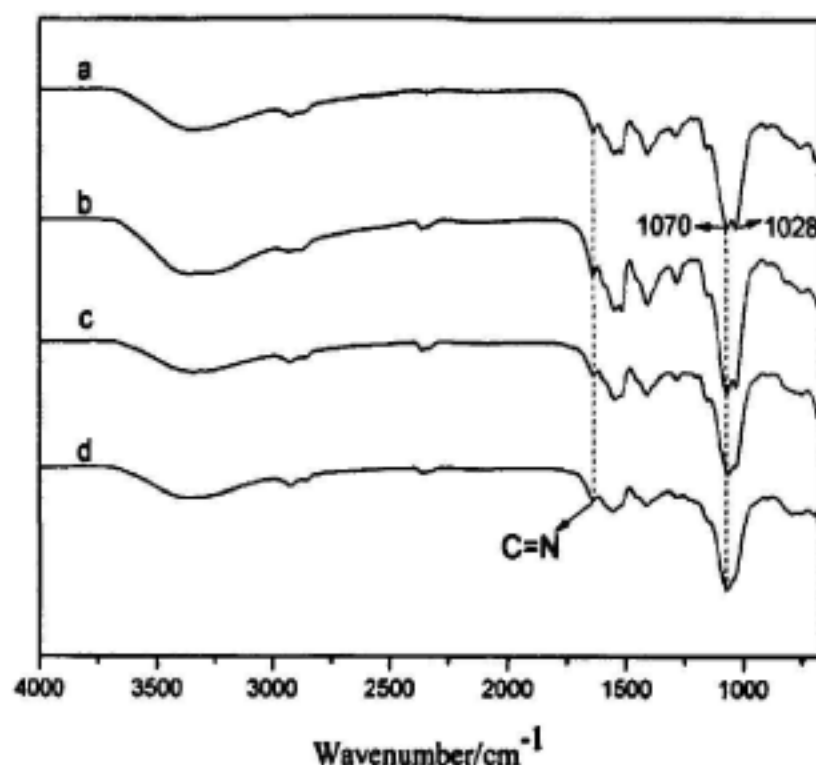


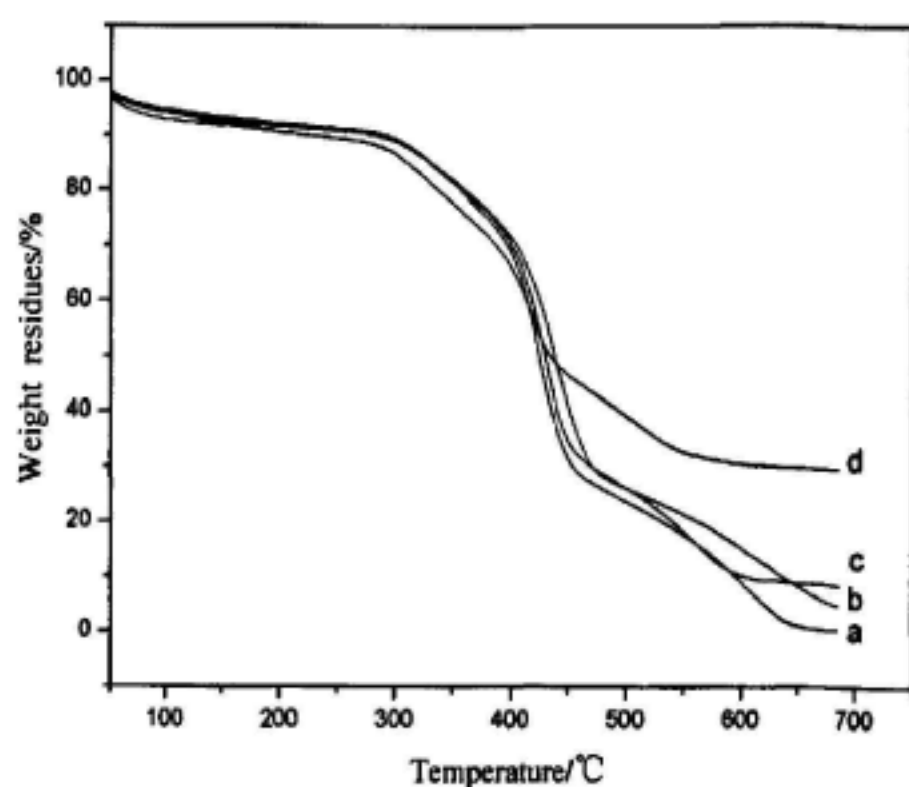
图5.5 M58S/CS复合止血带的FTIR图: (a) 纯壳聚糖止血带; (b) 20% M58S/CS复合止血带; (c) 40% M58S/CS复合止血带; (d) 60% M58S/CS复合止血带

Fig.5.5 FTIR spectrums of different M58S/CS composite wound dressing: (a) pure chitosan composite wound dressing; (b) composite wound dressing with 20% M58S; (c) composite wound dressing with 40% M58S; (d) composite wound dressing with 60% M58S

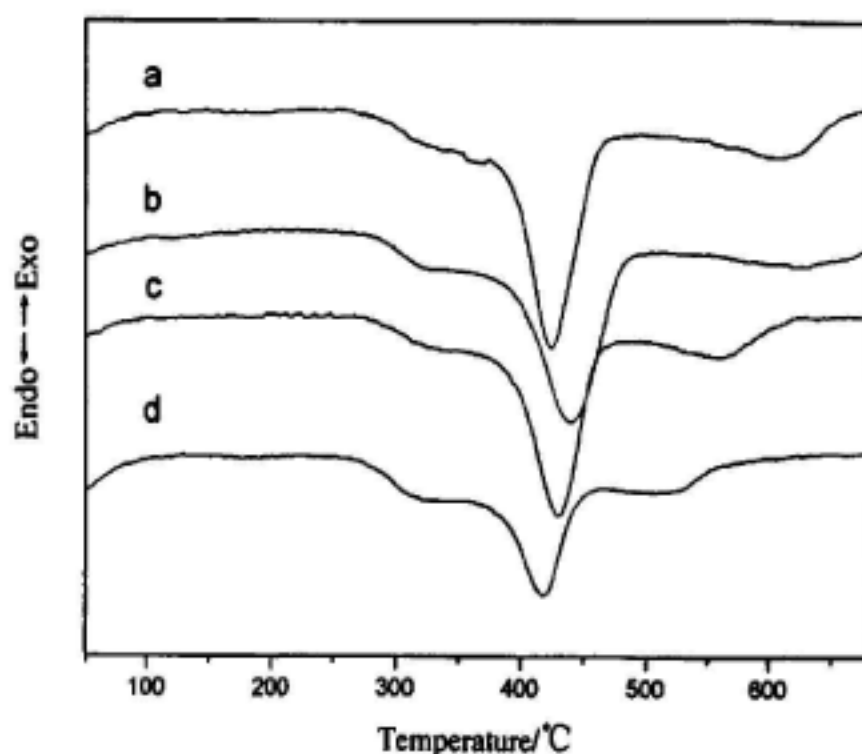
### 5.3.5 止血带的 TG 分析

图5.6 (A) 为不同涂层物止血带的TGA曲线图。从图中可以看出,在 $200^{\circ}\text{C}$ 之前,不同比例的M58S/CS复合止血带的失重率在10%左右,这主要是材料中的水分蒸发导致的。随着温度的升高,在 $300\sim 450^{\circ}\text{C}$ 范围内,止血带材料的重量急剧下降:纯壳聚糖涂层材料的重量损失大约60%左右,加入介孔生物活性玻璃M58S的涂层材料随着介孔粒子含量的增加,重量损失在减小,60% M58S/CS涂层止血材料重量损失为50%左右。图5.6 (B) 为止血带的DTG曲线图。从图中可以看出,在 $300^{\circ}\text{C}$ 左右,不同比例M58S/CS涂层止血带有一个热失重,这有可能是止血带中棉质纱布分解引起的。随着温度的升高,到 $420^{\circ}\text{C}$ 左右材料达到最大热失重,这主要是由于壳聚糖链段受到破坏而引起的。 $500^{\circ}\text{C}$ 以后不同比例M58S/CS涂层止血带在不同位置上又出现了热失重,这可能主要是由于部分介孔生物活性玻璃M58S由无定型结构向结晶态转变造成的。





(A)



(B)

图5.6 M58S/CS复合止血带的 TG 图 (A) 和 DTG 图 (B): (a) 纯壳聚糖止血带; (b) 20% M58S/CS 复合止血带; (c) 40% M58S/CS复合止血带; (d) 60% M58S/CS复合止血带

Fig.5.6 (A) TG and (B) DTG curves of M58S/CS composite wound dressing: (a) pure chitosan composite wound dressing; (b) composite wound dressing with 20% M58S; (c) composite wound dressing with 40% M58S; (d) composite wound dressing with 60% M58S

### 5.3.6 涂覆明胶止血材料的动物止血实验

表5.2是不同止血材料60s内的出血量; 图5.7不同止血材料动物止血实验。从表5.2可以看出, 在相同时间内吸收性明胶海绵出血量最大, 出血量是0.2248g; 然后是CS/Gelatin止血材料, 出血量是0.1153g; 随后是20% M58S/CS/Gelatin止血材料, 出血量是0.0891g; 40% M58S/CS/Gelatin止血材料出血量是0.0543g; 60% M58S/CS/Gelatin止血材料出血量为0.0413g。由以上分析知明胶海绵的止血性能最差, 在相同时间内出血量最大。当在其表面涂上不同比例的M58S/CS复合溶液后, 出血量在减少。这是由于两者都具有良好的止血性

表5.2 不同止血材料的60s内的出血量  
Table5.2 The amount of bleeding of different materials in 60s

|                          | 出血（g）  |
|--------------------------|--------|
| 吸收性明胶海绵                  | 0.2248 |
| CS/Gelatin止血材料           | 0.1153 |
| 20% M58S/CS/ Gelatin止血材料 | 0.0891 |
| 40% M58S/CS/ Gelatin止血材料 | 0.0543 |
| 60% M58S/CS/ Gelatin止血材料 | 0.0413 |

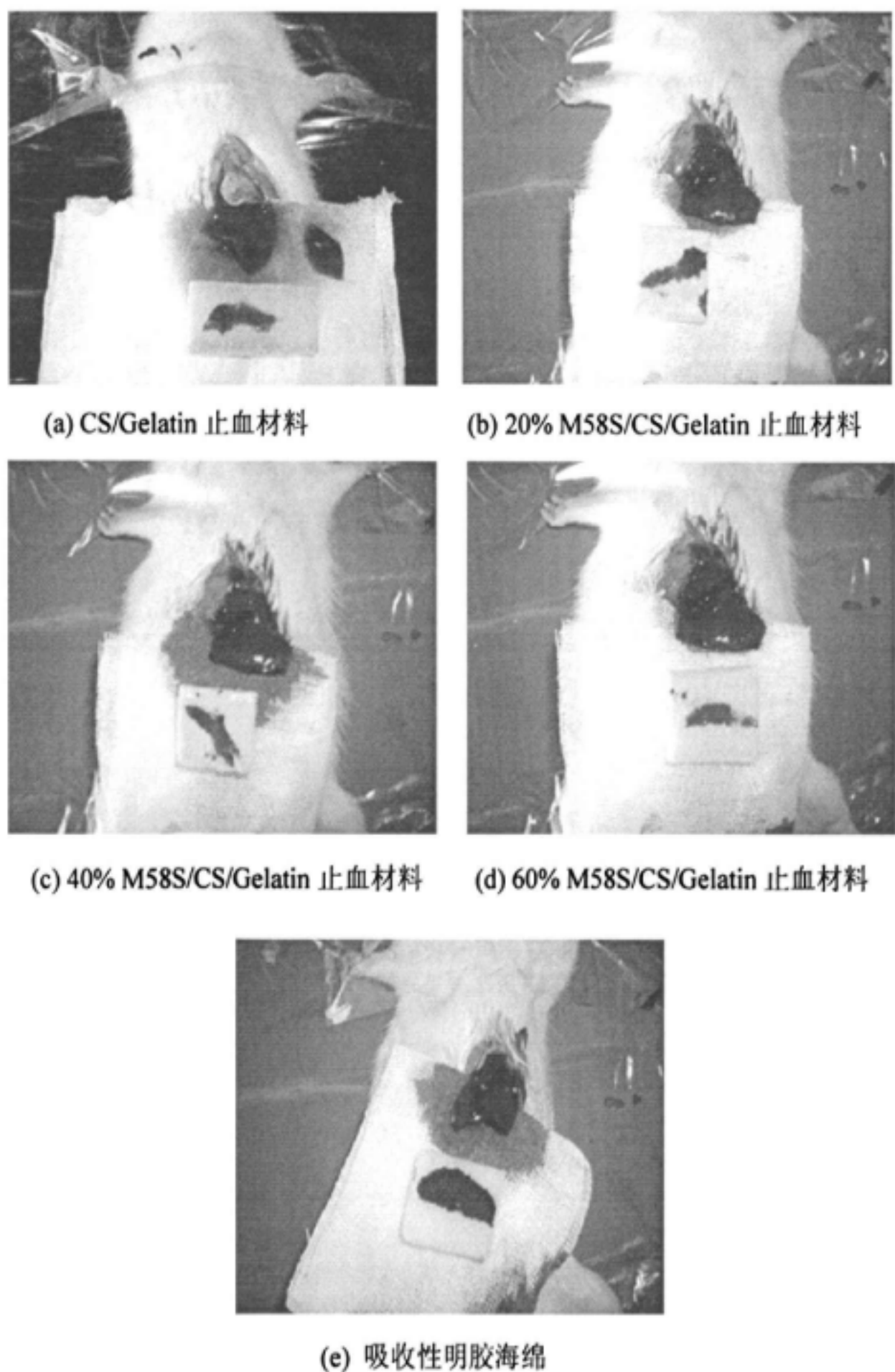


图 5.7 不同材料止血效果观察  
Fig.5.7 The observation of hemostatic effect in different materials

能并且由于介孔生物活性玻璃M58S有较高的比表面积,有超强的吸附能力,能够快速吸收血液中的水分,加快止血过程,因此随着介孔生物活性玻璃M58S含量的增加,出血量越来越少。由以上分析可知将不同比例的M58S/CS复合溶液均匀涂覆在明胶海绵的表面能够改善其止血性能。

#### 5.4 本章小结

1. 动物止血研究表明:介孔生物活性玻璃 M58S 粉,纯壳聚糖膜和不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜都有一定的止血性能,但止血效果和材料的形态以及介孔生物活性玻璃 M58S 和壳聚糖的比例有关。粉体试剂的止血效果不及多孔膜;复合多孔膜的止血效果随着介孔生物活性玻璃 M58S 的含量的增加,止血时间和出血量都在减小。当介孔生物活性玻璃 M58S 含量为 60%时,止血时间为 90 秒,出血量为  $0.4\pm0.02\text{g}$ 。

2. 通过细胞形态观察法和 MTT 比色法两种方法对纯壳聚糖膜和不同比例 M58S/CS 复合多孔膜进行细胞毒性研究,结果表明材料生物相容性好, L929 成纤维细胞可以很好的贴服在材料表面,且生长状况良好; L929 成纤维细胞在不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的浸提液中生长良好,且随着时间的延长细胞数量越来越多。两种测试方法表明所制备的材料是无毒的。

3. 将 M58S 和壳聚糖的复合溶液分别涂敷在医用脱脂棉纱布和吸收性明胶海绵上制备出了新型止血材料。采用 SEM、FTIR、TG 等表征方法对止血带进行表征并对涂覆明胶海绵止血材料进行动物止血研究,结果表明:制备的止血带材料具有疏松多孔结构,保证了其透气性; M58S/CS 涂层和棉质纱布有很好的相容性,有利于进一步改善止血纱布的性能;热分析表明随着介孔粒子 M58S 含量的增加,重量损失在减小,材料的热稳定性提高;动物实验表明将介孔生物活性玻璃 M58S 和壳聚糖的复合溶液涂敷在明胶海绵后,提高了明胶海绵的止血性能。

## 第六章 全文结论与展望

### 6.1 主要结论

本文以介孔生物活性玻璃 M58S 和壳聚糖复合作为新型止血材料为出发点,介绍了两者作为生物医用材料的优点,同时指出两者作为止血材料存在的一些不足;为了最大限度的提高材料的止血性能,进一步通过冷冻干燥法将两者均匀复合在一起,制备出了多孔膜材料,并以此为研究对象,展开了一系列基础性和探讨,得出的主要结论有:

1. 应用一步法成功制备出了介孔生物活性玻璃 M58S, TEM 表明制备的介孔生物活性玻璃 M58S 孔道均匀,孔径大小为 5~8nm。同时采用了小角 XRD 对介孔生物活性玻璃 M58S 粉体进行了测试,表明材料存在介孔结构。

2. 通过对比研究,选用香草醛为壳聚糖的交联剂,并对分析了不同交联剂含量对壳聚糖力学性能的影响。当壳聚糖和香草醛的质量比例达到为 4:1 时,壳聚糖的力学性能达到最佳,此时壳聚糖多孔膜的拉伸应力为 0.28MPa; FTIR 分析可知,在壳聚糖中加入香草醛交联剂后,图谱中出现了出现了 C=N 特征峰,表明两者之间发生了席夫碱反应。

3. 采用 SEM、XRD、FTIR 等测试手段对 M58S/CS 复合多孔膜的结构形貌,构相等进行表征。结果如下:

(1) SEM 表明采用冷冻干燥方法制备的 M58S/CS 复合多孔膜材料呈现连绵的多孔结构且孔隙分布较均匀。随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的不断增加,多孔膜壁上的介孔粒子越来越来,且在孔壁上分布均匀,表面通过冷冻干燥法,可以实现壳聚糖和无机介孔生物活性玻璃 M58S 的均匀复合。

(2) 由 FTIR、XRD 测试表明:壳聚糖和香草醛作用后,出现了 C=N 特征峰,表明两者之间发生了席夫碱反应;当介孔生物活性玻璃 M58S 加入后,复合膜中同时出现了两者的特征峰,表明两者在复合前后无明显变化;M58S 和 CS 复合后,两者的 XRD 谱图的特征峰重叠在一起,说明 M58S 和 CS 存在着一定的相互作用。

4. M58S/CS 复合多孔膜性能研究。对复合多孔膜的溶胀率、密度、吸水率、孔隙率和力学等性能展开了分析,探讨了介孔粒子 M58S 对上述性能的影响。结果表明:随着介孔生物玻璃 M58S 含量的增加,复合多孔膜的吸水率和孔隙率下降;由于介孔粒子 M58S 的加入,改善了壳聚糖膜的保形性,可以根据材料的具体用途合理配置介孔生物活性玻璃 M58S 和壳聚糖的比例;壳聚糖膜的密度最小但力学性能最好,随着介孔生物活性玻璃 M58S 的加入,复合多孔膜的密度在增加,力学性能在下降。

5. M58S/CS 复合多孔膜生物活性和降解性研究。将纯壳聚糖膜和不同比列的 M58S/CS



复合多孔膜在 SBF 体液中浸泡 7 天后, 其表面都有 CHA 沉积物的出现, 表面材料都具有生物活性。但是随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加, 材料表面沉积的 CHA 越来越多, 表明 M58S 的增加, 能够增加材料的生物活性; 生物降解性实验表明, 纯壳聚糖膜在溶菌酶溶液中降解速率最快, 虽然随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加, M58S/CS 复合多孔膜的降解率有一定程度的下降, 但是不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜都具有良好的生物降解性。

6. M58S/CS 复合多孔膜进行动物止血和细胞毒性研究, 主要结果如下:

(1) 动物止血实验表明: 介孔生物活性玻璃粉 M58S, 纯壳聚糖膜和不同比例的 M58S/CS 复合多孔膜都有一定的止血性能, 但止血效果和材料的形态以及介孔生物活性玻璃 M58S 和壳聚糖的比例有关。粉体试剂的止血效果不及多孔膜, 复合多孔膜的止血效果随着介孔生物活性玻璃 M58S 含量的增加, 止血时间和出血量都在减小。当介孔生物活性玻璃 M58S 含量为 60% 时, 止血时间为 90 秒, 出血量为  $0.4 \pm 0.02\text{g}$ 。

(2) 通过细胞形态观察法和 MTT 比色法两种方法对纯壳聚糖膜和不同比例 M58S/CS 复合多孔膜进行细胞毒性研究。结果表明: 复合多孔膜生物相容性好, L929 成纤维细胞可以很好的贴服在材料表面, 且生长状况良好; L929 成纤维细胞在不同比例 M58S/CS 复合多孔膜的浸提液中生长良好, 且随着时间的延长细胞数量越来越多。两种测试方法表明所制备的材料是无毒的。

7. M58S/CS 复合多孔膜新型止血材料制备及其性能研究。将介孔生物活性玻璃 M58S 和壳聚糖的复合溶液分别涂敷在医用脱脂棉纱布和吸收性明胶海绵上制备出了新型止血材料。采用 SEM、FTIR、TG 等表征方法对止血带进行表征并对涂覆明胶止血材料进行动物止血实验, 结果表明: 制备的止血带材料具有疏松多孔结构, 保证了其透气性; M58S/CS 涂层和棉质纱布有很好的相容性, 有利于进一步改善止血纱布的性能; 热分析表明随着 M58S 含量的增加, 重量损失在减小, 材料的热稳定性提高; 动物实验表明将介孔生物活性玻璃 M58S 和壳聚糖的复合溶液涂敷在明胶海绵后, 提高了胶海绵的止血性能。

## 6.2 研究展望

本文将具有良好生物活性的介孔生物活性玻璃 M58S 和壳聚糖通过冷冻干燥法复合制备出新型止血材料, 克服了市面上一些止血材料活性不足和止血效率低等缺陷, 但为了使其能够早日应用于临床, 其后续的研究还可以在以下几方面进行深入分析和探讨:

1. 进一步改善介孔生物活性玻璃 M58S 的制备条件来控制其粒径、比表面积、介孔孔径以此来使介孔生物活性玻璃 M58S 达到最好的止血效果; 同时可以通过介孔玻璃 M58S

负载一些药物如止痛药等来设计不同功能、能满足不同临床应用需求的止血材料。

2. 作为止血材料，应该具有良好的抗菌效果，防止伤口感染，本研究只是对材料进行了细胞毒性测试，在后续研究中应该对材料的抗菌效果进行分析；也可以在材料中载入银离子提高材料的抗菌性能。

3. 本课题只是对动物的肝脏进行了切口止血实验，但是将制备的材料应用于临床，还需更加深刻的了解材料的生物止血性能。因此，还需要对动物体内的其他器官进行止血性能的研究。

4. 后续研究中应该对材料的致敏性、局部刺激以及致癌性进行测试，争取材料能够早日应用于临床。

## 参考文献

- [1] John MacManus, McR,MD, *et al.* A case series describing thermal injury resulting from zeolite use for hemorrhage control in combat operations[J]. Prehospital Emergency care, 2007, 11(1): 67-71.
- [2] Malette W G, William G. Quigley Jr. *et al.* Method of achieving hemostasis[P]. USA: 4394373, 1983.
- [3] Klokkevo Id PR, L ew DS, Ellis DG, *et al.* Effect of chitosan on lingual hemostasis in rabbits[J]. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 1991, 49(8): 858-863.
- [4] Sugamori T, Iwase H, Maeda M, *et al.* Local hemostatic effects of microcrystalline partially deacetylated chitin hydrochloride[J]. Journal of Biomedical Materials Research, 2000, 49(2): 225-232.
- [5] Cochrum, Kent C. Fibrinogen/chitosan hemostatic agents[P]. USA: 5773033, 1998.
- [6] Knill CK, Kennedy JF, Mistry J, *et al.* Alginate fibres modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressings[J]. Carbohydrate polymer, 2004,55(1): 65-76
- [7] Hasan B Alam, Hasan B Alam, ColDavid Burris, *et al.* Hemorrhage control in the battlefield role of new hemostatic agents[J]. Military Medicine, 2005, 170(1): 63-69.
- [8] 唐星华. 壳聚糖交联接枝改性及性能研究[D]. 湖南: 湖南大学, 2008.
- [9] S.Y. Park, S.T. Jun, K.S. Marsh. Physical properties of PVOH/chitosan-blended films cast from different solvents[J]. Food Hydrocolloids, 2001, 15(4-6): 499-502.
- [10] Majeti N.V., Ravi Kumar. A review of chitin and chitosan applications[J]. Reactive and Functional Polymers, 2000, 46(1): 1-27.
- [11] Thomas D. Rathke, Samuel M. Hudson. Determination of the degree of N - deacetylation in chitin and chitosan as well as their monomer sugar ratios by near infrared spectroscopy[J]. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 1993, 31(3): 749-753.
- [12] 杜予民. 甲壳素转化利用与分子结构参数[C]. 中国化学会第三届甲壳素化学与应用研讨会.第三届甲壳素化学与应用研讨会论文集. 北京: 武汉大学甲壳素研究开发中心, 2001: 1-5.
- [13] Tatsuya Minagawa, Yasuhiko Okamura, Yoshihiro Shigemasa, *et al.* Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing[J]. Carbohydrate Polymers, 2007,67(4): 640-644.
- [14] George H. Scherr, Park Forest, IL. Chitosan wound dressing[P]. USA: 0237811A1, 2007.
- [15] Hiroshi Ueno, Haruo Yamada, Ichiro Tanaka, *et al.* Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs[J]. Biomaterials, 1999, 20(15): 1407-1414.
- [16] Patricia B. Malafaya, Tircia C. Santos, Martijn van Griensven, *et al.* Morphology, mechanical characterization and in vivo neo-vascularization of chitosan particle aggregated scaffolds architectures[J]. Biomaterials, 2008, 29(29): 3914-3926.
- [17] Fwu-Long Mi, Yu-Chiun Tan, Hsiang-Fa Liang, *et al.* In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant[J]. Biomaterials, 2002, 23(1): 181-191.
- [18] Claire Chatelet, Odile Damour, Alain Domard. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films[J]. Biomaterials, 2001, 22(3): 261-268.
- [19] Mathew Peter, Nitya Ganesh,N.Selvamurugan, *et al.* Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications[J].

- Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 687-694.
- [20] Xiaofei Liu, Yunlin Guan, Dongzhi Yang, *et al.* Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2001, 79(7): 1324-1335.
- [21] Möller. H., Grelier. S., Pardon. P., *et al.* Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-HMPC based films[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 6585-6591.
- [22] Entsar I.Rabea, MohamedE.-T.Badaway, Christian V.Stevens, *et al.* Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action[J]. Biomacromolecules, 2003, 4(6): 1457-1465.
- [23] Okamoto Y, Shibazaki K, Minami S, *et al.* Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 1995, 57(5): 851-4.
- [24] S. Bhaskara Rao, Chandra P. Sharma. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential[J]. Journal of Biomedical Materials Research, 1997, 34(1): 21-28.
- [25] 田丰, 陈世谦, 高万玉等. 碱性多糖吸附剂对血脂吸附行为的X-射线光电子能谱分析[J]. 医疗卫生装备, 2000, 91(1): 9-11.
- [26] Tz-Chong Chou, Chi-Yuan Li, An-Rong Lee, *et al.* Mechanism of inhibition of platelet aggregation by HCL-31D[J]. European Journal of Pharmacology, 2000, 387(2): 125-131.
- [27] Tz-Chong Chou, Earl Fu, Chang-Jer Wu, *et al.* Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 302(3): 480-483.
- [28] Lijun Kong, Yuan Gao, Guangyuan Lu, *et al.* A study on the bioactivity of chitosan/nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering[J]. European Polymer Journal, 2006, 42(12): 3171-3179.
- [29] Y.MLEE, S.S.KIM and S.H.KIM. Synthesis and properties of poly (ethylene glycol) macromer/ $\beta$ -chitosan hydrogels[J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1997, 8(9): 537-541.
- [30] K.C.Gupta and Majeti N. V. Ravi Kumar. pH dependent hydrolysis and drug release behavior of chitosan/poly (ethylene glycol) polymer network microspheres[J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2001, 12(9): 753-759.
- [31] Seong-Bae Park, Jin-Oh You, Ham-Yong Park, *et al.* A novel pH-sensitive membrane from chitosan — TEOS IPN; preparation and its drug permeation characteristics[J]. Biomaterials, 2001, 22(4): 323-330.
- [32] Yong Hu, Xiqun Jiang, Yin Ding, *et al.* Synthesis and characterization of chitosan-poly (acrylic acid) nanoparticles[J]. Biomaterials, 2002, 23(15): 3193-3201.
- [33] M Rhazi, J Desbrières, A Tolaimate, *et al.* Contribution to the study of the complexation of copper by chitosan and oligomers[J]. Polymer, 2002, 43(4): 1267-1276.
- [34] Keisuke Kurita, Takanori Sannan, Yoshio Iwakura. Studies on chitin. VI. Binding of metal cations[J]. Journal of Applied Polymer Science, 1979, 23(2): 511-515.
- [35] P. Baroni, R.S. Vieira, E. Meneghetti, *et al.* Evaluation of batch adsorption of chromium ions on natural and crosslinked chitosan membranes[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 152(3): 1155-1163.
- [36] Jyh-Ping Chen, Gwo-Yun Chang, Jan-Kan Chen. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2008, 313-314: 183-188.
- [37] Manimalha Balasubramani, T.Ravi Kumar, Mary Babu. Skin substitutes: a review[J]. Burns, 2001, 27, (5): 534-544.



- [38] Bai-Shuan Liu, Chun-Hsu Yao, Shr-Shin Fang. Evaluation of a non-woven fabric coated with a chitosan bilayer composite for wound dressing[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2008, 8(5): 432-440.
- [39] Maximiano P. Ribeiro MD, Ana Espiga MD, Daniela Silva MD, *et al.* Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing[J]. *Wound Repair and Regeneration*, 2009, 17(6): 817-824.
- [40] Duck Weon Lee, Hosun Lim, Ha Na Chong, *et al.* Advances in chitosan material and its hybrid derivatives: a review[J]. *The open Biomaterials Journal*, 2009, 1: 10-20.
- [41] Dong-Keon Kweon, Seok-Beom Song, Yong-Yook Park. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(9): 1595-1601.
- [42] Kaoru Murakami, Hiroshi Aoki, Shingo Nakamura, *et al.* Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(1): 83-90.
- [43] Abul Kalam Azad, Niwet Sermsintham, Suwalee Chandkrachang, *et al.* Chitosan membrane as a wound - healing dressing: Characterization and clinical application[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2004, 69B (2): 216-222.
- [44] Simone S. Silva, Sandra M. Luna, Manuela E. Gomes, *et al.* Plasma surface modification of chitosan membranes: characterization and preliminary cell response studies[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2008, 8(6): 568-576.
- [45] C. Clasen, T.Wilhelms, W.-M.Kulicke. Formation and characterization of chitosan membranes[J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7 (11): 3210-3222.
- [46] Mahendra Rai, Alka Yadav, Aniket Gade. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(1): 76-83.
- [47] Thomas, Varsha, Yallapu, *et al.* Fabrication, characterization of chitosan/nanosilver film and its potential antibacterial application[J]. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2009, 20 (14): 2129-2144.
- [48] Li-Hua Li, Jian-Cheng Deng, Hui-Ren Deng, *et al.* Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan/Ag/ZnO blend films[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2010, 160(1): 378-382.
- [49] Jayakumar R, Sudhesh Kumar PT, Abhilash S, *et al.* The art, method, manner, process and system of chitosan hydrogel/nano zinc oxide membranes for wound dressing applications[P]. Indian: 1025CHE, 2010.
- [50] Fwu-Long Mi, Shin-Shing Shyu, Yu-Bey Wu, *et al.* Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing[J]. *Biomaterials*, 2001, 22(2): 165-173.
- [51] Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, *et al.* Bonding mechanism at the interface of ceramic prosthetic materials[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1971, 5(6): 117-141.
- [52] Strunz V, Bunte M, Bromer H, *et al.* Glass ceramics as a bioactive implantation material[J]. *Dtsch Zahnarztl Z*, 1976, 31(1): 69-70.
- [53] Bromer H, Pfreil E, Kas HH. Glass-ceramic prosthetic material[P]. Germany: 2326100, 1973.
- [54] Kokubo T, Ito S, Sakka S. Formation of a high-strength bioactive glass-ceramic in the system MgO-CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>[J]. *Journal of Materials Science*, 1986, 21(2): 536-540.
- [55] Kokubo T, Shigematsu M, Nagashima Y, *et al.* Apatite-and Wollastonite-containing glass-ceramics for prosthetic application[J]. *Bulletin of the Institute for Chemical Research*, 1982, 60(3-4): 260-280.
- [56] W. Vogel, W.Holand. Development, structure, properties and application of glass-ceramics for medicine

- [J]. Journal of Non-Crystalline Solids, 1990, 123(1-3): 349-353.
- [57] Zhong JP, Greenspan DC. Processing and properties of sol-gel bioactive glasses[J]. Journal of Biomedical Materials Research, 2000, 53(6): 694-701.
- [58] Yan XX, Yu CZ, Zhao DY, *et al.* Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2004, 43(44): 5980-5984.
- [59] A Lopez-Noriega, D Acros, M Vallet-Regi. Ordered mesoporous bioactive glasses for bone tissue regeneration[J]. Chemical of Materials, 2006, 18(3): 3137-3144.
- [60] Tobias J. Brunner, R N Grass, Wendelin J. Stark. Glass and bioglass nanopowders by flame synthesis[J]. Chemical Communications, 2006: 1384-1386.
- [61] Hae-Won Kim, H-E Kim, Jonathan C. Knowles. Production and potential of bioactive glass nanofibers as a next-generation biomaterial[J]. Advanced functional materials, 2006(16): 1529-1535.
- [62] Yan X X., Deng H X., Huang X H., *et al.* Mesoporous bioactive glasses. I. Synthesis and structural Characterization[J]. Journal of Non-Crystalline Solids, 2005, 351(40-42): 3209- 3217.
- [63] A Pardini, C Mercier, C Follet-Houttemane, Z Lebecq, F Desanglois.  $^{31}\text{P}$  and  $^{29}\text{Si}$  MAS-NMR of  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$  bioactive glasses[C]. 15th Interdisciplinary Research Conference on Biomaterials, Shanghai, 2005.
- [64] V Rajendran, A N Begum, M A Azooz, F H El-Batal. Microstructural dependence on relevant physical-mechanical properties on  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  biological glasses[J]. Biomaterials, 2002, 23: 4263-4275.
- [65] Hench LL. Bioceramics: From concept to clinic [J]. Journal of the American Ceramic Society, 1991, 74: 1487-510.
- [66] 苑金生. 功能独特的生物医学玻璃[J]. 世界产品与技术, 1998, 1(3): 20-21.
- [67] Daniela Eniu, Dana Cacaina, Marin Coldea, *et al.* Structural and magnetic properties of  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-Fe}_2\text{O}_3$  glass-ceramics for hyperthermia[J]. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2005, 293(1): 310-313.
- [68] 夏炜. 介孔及纳米生物活性玻璃的制备与性能研究[D]. 上海: 中国科学院上海硅酸盐研究所, 2007.
- [69] 连鹏飞. 生物活性玻璃/碳复合纳米纤维的制备及其生物性能的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2010.
- [70] 周艳玲, 翟万银, 常江. 介孔生物活性玻璃装载和释放抗癌药物表阿霉素的研究[J]. 无机材料学报, 2011, 26(1): 68-72.
- [71] Jie Wei, Fangping Chen, Jung-Woog Shin, *et al.* Preparation and characterization of bioactive mesoporous wollastonite-Polycaprolactone composite scaffold[J]. Biomaterials, 2009, 30(6): 1080-1088.
- [72] 谢林, 陈晓峰, 周嘉安等. 58S生物玻璃/壳聚糖复合多孔支架材料的制备[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(3): 525-528.
- [73] Xia Li, Jianlin Shi, Xiaoping Dong, *et al.* A mesoporous bioactive glass/polycaprolactone composite scaffold and its bioactivity behavior[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008, 84A (1): 84-91.

- [74] Seong-Hoon Kim, Byoung-Ki Lim, Fangfang Sun, *et al.* Preparation of high flexible composite film of hydroxyapatite and chitosan[J]. Polymer Bulletin, 2009, 62(1): 111-118.
- [75] Yong Zhang, Miqin Zhang. Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering[J]. Journal of Biomedical Materials Research, 2001, 55(3): 304-312.
- [76] Todd A. Ostomel, Qihui Shi, Galen D. Stucky. Oxide Hemostatic Activity[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(26): 8384-8385.
- [77] Galen D. Stucky, Santa Barbara, Todd A. Ostomel, *et al.* Oxides for wound healing and body repair[P]. USA: 0154564A1, 2007.
- [78] 余承忠, 严晓霞, 赵东元. 新型的介孔分子筛止血材料及其制备方法[P]. 中国发明专利: ZL200510026838.9., 2005.
- [79] 刘昌胜, 袁媛. 纳米介孔硅基干凝胶止血材料及其制备方法和应用[P]. 中国发明专利: 200610116061. X., 2006.
- [80] Hon-Wing Leung. Ecotoxicology of glutaraldehyde: Review of environmental fate and effects studies[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2001, 49(1): 26-39.
- [81] V.R. Patel, M.M. Amiji. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly (ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach[J]. Pharmaceutical research, 1996, 13(4): 588-593.
- [82] Kazunori Yamada, Tianhong Chen, Guneet Kumar, *et al.* Chitosan based water-resistant adhesive. Analogy to mussel glue[J]. Biomacromolecules, 2000, 1(2): 252-258.
- [83] Bing Yang, Xingyi Li, Shuai Shi, *et al.* Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 860-865.
- [84] Dongyuan Zhao, Jianglin Feng, Qisheng Huo, *et al.* Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores[J]. Science, 1998, 279(5350): 548-552.
- [85] C.L.de Vasconcelos, P.M.Bezerril, D.E.S.dos Santos, *et al.* Effect of molecular weight and ionic strength on the formation of polyelectrolyte complexes based on poly (methacrylic acid) and chitosan[J]. Biomacromolecules, 2006, 7(4): 1245-1252.
- [86] W.W.Thein-Han, R.D.K.Misra. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering[J]. Acta Biomaterial, 2009, 5(4): 1182-1197.
- [87] Hailong Peng, Hua Xiong, Jinhua Li, *et al.* Vanillin cross-linked chitosan microspheres for controlled release of resveratrol[J]. Food Chemistry, 2010, 121(1): 23-28.
- [88] T Wang, M Turhan, S Gunasekaran. Selected properties of pH - sensitive, biodegradable chitosan-poly (vinyl alcohol) hydrogel[J]. Polymer International, 2004, 53(7): 911-918.
- [89] X.Z. Shu, K.J. Zhu, Weihong Song. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2001, 212(1): 19-28.
- [90] J.W.Lee, S.Y.Kim, S.S.Kim, *et al.* Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogel composed of chitosan and poly (acrylic acid)[J]. Journal of Applied Polymer Science, 1999, 73(1): 113-120.
- [91] Fwu-Long Mi, Shin-Shing Shyu, Sung-Tao Lee, *et al.* Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate



- complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method[J]. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 1999, 37(14): 1551-1564.
- [92] Antonio R. Cestari, Eunice F.S. Vieira, Charlene R.S. Mattos. Thermodynamics of the Cu (II) adsorption on thin vanillin-modified chitosan membranes [J]. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2006, 38(9): 1092-1099.
- [93] Jian Yang, Guixin Shi ,Jianzhong Bei, *et al.* Fabrication and surface modification of macroporous poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid)(70/30)cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, 62(3): 438-446.
- [94] Dana L. Nettles, Steven H.Elder, Jerome A.Gilbert. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering[J]. *Tissue Engineering*, 2002, 8(6): 1009-1016.
- [95] X. Wu, Y. Liu, X. Li,*et al.* Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method[J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(3): 1167-1177.
- [96] Vallet-Regí M, Victoria Ragel C., Salinas A J. Glasses with Medical Applications[J]. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2003, (6): 1029-1042.
- [97] Jiang Han, Ziyu Zhou, Ruixue Yin, *et al.* Alginate-chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: Preparation and characterization[J]. *International Journal of Biomedical Macromolecules*.2010, 46(2): 199-205.
- [98] 向鸿照. 纳米羟基磷灰石/聚酰胺/壳聚糖复合骨修复材料研究[D]. 四川: 四川大学, 2007.
- [99] Yan Huang, Stella Onyeri, Mbonda Siewe, *et al.* In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(36): 7616-7627.
- [100] J.A.Ko, H.J.Park, S.J.Wang, *et al.* Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 249(1-2): 165-174.
- [101] Lu HH, Pollack SR, Ducheyne P. Temporal zeta potential variations of 45S5 bioactive glass immersed in an electrolyte solution[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 51:80-87.
- [102] Kokubo T. Surface chemistry of bioactive glass-ceramics[J]. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1990, 120(1-3): 138-151.
- [103] Mathew Peter, N.S. Binulal, S. Soumya, *et al.* Nanocomposite scaffolds of bioactive glass ceramic nanoparticles disseminated chitosan matrix for tissue engineering applications[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79(2): 284-289.
- [104] Shan Zhao, Yanbao Li, Dongxu Li. Synthesis and in vitro bioactivity of CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mesoporous microspheres[J]. *Microporous and Mesoporous Materials*.2010, 135(1-3): 67-73.
- [105] Salinas A J, Vallet-Regí M, Izquierdo-Barda I. Biomimetic apatite deposition on calcium silicate gel glasses[J]. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2001, 21(1-2): 13-25.
- [106] Pamela J. VandeVord, Howard W. T. Matthew, Stephen P. DeSilva, *et al.* Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice[J]. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, 59(3): 585-590.
- [107] Hyun-Min Kim, Teruyuki Himeno, Masakazu Kawashita, *et al.* The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment[J]. *Journal of the Royal Society*



Interface, 2004, 1(1): 17-22.

- [108] Xiaodan Zhang, Dongzhi Yang, Jun Nie. Chitosan/polyethylene glycol diacrylate films as potential wound dressing material[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 43(5): 456-462.
- [109] In-Young Kim, Seog-Jin Seo, Hyun-Seuk Moon, *et al.* Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications[J]. Biotechnology Advances. 2008, 26(1): 1-21.
- [110] Manabu Fukasawa, Hiromasa Abe, Toshiaki Masaoka, *et al.* The hemostatic effect of deacetylated chitin membrane on peritoneal injury in rabbit model[J]. Surgery Today, 1992, 22(4): 333-338.
- [111] Matsuoka T, Hildreth J, Wisner DH. Liver injury as a model of uncontrolled hemorrhagic shock: resuscitation with different hypertonic regimens[J]. Journal of Trauma-Injury Infection Critical Care, 1995, 39(4): 674-680.
- [112] Bhuvanesh Gupta, Abha Arora, Shalini Saxena, *et al.* Preparation of chitosan-polyethylene glycol coated cotton membranes for wound dressings: preparation and characterization[J]. Polymers advanced technologies, 2009, 20(1): 58-65.

### 硕士期间发表论文

1. 贾天保,陈建勇,冯新星,常江. 壳聚糖/介孔生物活性玻璃多孔膜的制备和表征[J]. 中国组织工程研究与临床康复.2011,15(42):7877-7880.

## 致 谢

在浙江理工大学不知道不觉已经 2 年多时间。在这 2 年的光阴中，师长的悉心教导和同学的关爱历历在目。即将走出校门步入社会，对学校的生活充满了无限的怀念，是你们的关爱和鼓励使我不断前进。同时你们的孜孜不倦的教诲也将照亮我前行的道路。

感谢导师陈建勇和冯新星老师，本课题是在他们悉心指导下完成的。陈老师渊博的知识，严谨科学的治学态度，谦逊的品格是我学习的榜样；冯老师严谨认真、诲人不倦的敬业精神，严于律己、宽以待人的品格感染着我。本论文具体工作的开展和论文撰写都凝聚了他们大量心血，值此论文完成之际，谨向陈老师、冯老师致以最诚挚的谢意。

感谢实验室郭玉海、张华鹏、朱海霖老师在实验和学习中给予我的热心指导和热情帮助。

感谢分析测试中心邵敏、张国庆、汪丽娜老师在扫描电镜、XRD衍射、热重、红外光谱等分析技术方面给予我的热心帮助。

感谢研究生09级纺织工程班全体同学的帮助和勉励，我们是一个快乐的大家庭，既有兄弟友谊又有同窗之情，我将终生难忘。

感谢实验室同门兄弟姐妹们，特别是刘涛师姐，她细心的教导和热心的帮助都将在我的研究生活中留下浓厚的一笔，还有我的室友陈平磊，能够和你们一起学习，一起生活，相互鼓励，我感到很开心，谢谢你们，祝福你们天天开心。

最后，特别感谢我的父母和亲人对我的支持、关怀，他们的长期鼓励和无限关怀是我奋斗的精神动力。衷心祝愿你们健康快乐，幸福安康！