

文章编号:2095-0411(2017)03-0077-06

## 柠檬酸改性壳聚糖膜材料的构建及其性能研究

刘 杨,沈 欣,任 彦,顾希茜,邓林红

(常州大学 生物医学工程与健康科学研究院,江苏 常州 213164)

**摘要:**为了改善壳聚糖基材料表面的亲水性和生物相容性,通过引入柠檬酸小分子,分别以 EDC 和 NHS 为交联剂和催化剂,对壳聚糖基材料进行了表面化学改性。FTIR 和 XPS 测试结果表明柠檬酸小分子被成功接枝到了壳聚糖膜的表面,材料表面引入的羧基等官能团使得材料表面的亲水性提高。此外,细胞实验结果表明 MC3T3 成骨细胞能够在改性后的材料表面良好地生长和增殖,证明柠檬酸改性之后的材料具有良好的生物相容性。该材料有可能为骨组织工程支架表面的涂层材料提供一种新选择。

**关键词:**壳聚糖;柠檬酸;化学改性;生物材料

**中图分类号:**R 318.08

**文献标志码:**A

**doi:**10.3969/j.issn.2095-0411.2017.03.011

## Preparation and Performance of a Chitosan Film Modified by Citric Acid

LIU Yang, SHEN Xin, REN Yan, GU Xixi, DENG Linhong

(Institute of Biomedical Engineering and Health Sciences, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

**Abstract:**In order to improve the hydrophilicity and biocompatibility of the chitosan-base material, the citric acid was grafted onto the surface of chitosan film by making use of 1-Ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) as the cross-linker in this study. The results of FTIR and XPS test showed that citric acid molecule was successfully grafted onto the surface of the chitosan film. The hydrophilicity of the film was increased due to the introduction of carboxyl functional groups. In addition, the results from cell experiments indicated that the MC3T3 osteoblasts can grow and proliferate well on the surface of the modified material. This chitosan-citric acid film, which can be prepared in large quantities and at low cost, should be applicable potentially in bone tissue engineering.

**Key words:**chitosan; citric acid; chemical modification; biomaterials

骨组织缺损患者数量众多,金属基支架材料由于其较好的力学性能和稳定性,常被应用于骨缺损修复和替代<sup>[1-2]</sup>。但是,金属材料表面与天然骨组织的不相容性往往会引起一定的排斥反应,同时降低材料表面的骨再生速度<sup>[3-4]</sup>。鉴于此,材料学和医学研究者尝试通过在材料表面构建一层天然高分子活性涂层,以降低组织工程支架材料的免疫排斥反应<sup>[5-6]</sup>。壳聚糖作为一种生物相容性和成膜性能卓越天然可降解高分子材料,成为支架材料表面涂层的首选材料<sup>[7-10]</sup>。然而,由于壳聚糖材料表面的亲水性较差,在植入体内后不

收稿日期:2016-06-02。

基金项目:江苏省教育厅自然科学基金面上项目(15KJB310001)。

作者简介:刘杨(1985—),男,湖北仙桃人,博士,讲师,主要从事生物医用材料领域相关研究。

利于体液中钙、磷等无机盐离子的吸附和沉积,从而影响骨缺损部位的组织修复和再生。而柠檬酸作为一种生物安全的天然小分子,分子中含有较多的羧基官能团,能够与壳聚糖分子中的氨基官能团发生酰胺键结合<sup>[11-13]</sup>。为了提高壳聚糖基材料表面的亲水性和生物相容性,本研究对壳聚糖膜材料表面进行了小分子化学修饰,并对改性前后的壳聚糖基材料的理化性能和生物学性能进行了评价。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂及仪器

壳聚糖原料(脱乙酰度高于 95%)、柠檬酸(AR)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和碳酸氢钠由 Aladdin 公司提供,醋酸(AR)由上海申博化工有限公司提供,盐酸(AR)和氢氧化钠(AR)由国药集团化学试剂有限公司提供,戊二醛(25%)由江苏强盛功能化化学股份有限公司提供,碳二亚胺(EDC)由吉尔生化(上海)有限公司提供。MC3T3 成骨细胞由西北工业大学提供,MEM 培养基由 GIBCO 公司提供,胎牛血清由美国 Thermo scientific 公司提供,乙二胺四乙酸由 Sunshine 公司提供,胰蛋白酶由烟台赛尔斯生物技术有限公司提供,二甲基亚砷由上海凌峰化学试剂有限公司提供。

### 1.2 材料的制备

将纯化后的壳聚糖溶于浓度为 0.1 mol/L 的醋酸溶液中,磁力搅拌制备质量分数为 2%~3%的壳聚糖溶液;避开加入一定量的 2.5%~3.0%的戊二醛,磁力搅拌交联反应 3 min;将交联得到的壳聚糖凝胶加入到干净的培养皿中,然后在 18~25℃、洁净的环境下自然风干;将风干好的薄膜用 5% NaOH 溶液浸泡 1~2 h,再用去离子水洗涤 3 次后再次风干,得到壳聚糖(CS)薄膜。然后,配制 3%的柠檬酸溶液,加入质量比为 1:1 的 EDC 和 NHS,控制 EDC 和 NHS 两者与柠檬酸和壳聚糖两者的质量比为 1:6,将 CS 膜浸泡在柠檬酸溶液中,4℃下发生交联反应,1~2 h 后取出薄膜,去离子水洗涤 3 遍后,自然风干得到改性之后的壳聚糖-柠檬酸(CSCA)薄膜。图 1 是柠檬酸小分子与壳聚糖分子发生化学交联反应的机理图,其中 EDC 起到交联剂的作用,而 NHS 则起到催化剂的作用。

### 1.3 材料性能表征

真空下将材料裁剪成大小为 6 mm×6 mm 的薄膜的表层喷金,采用扫描电镜(Zeiss EVO18,德国 Zeiss 公司)观察材料表面和断面的形貌。取一定量的材料置于研钵中研磨成粉末,将干燥后的粉末样品与溴化钾按 1:100 的比例混匀研细并压片,然后采用傅里叶红外光谱仪(Nicolet Avatar 370,美国尼高力公司)进行红外测试,扫描范围 400~4 000 cm<sup>-1</sup>。采用 X 射线光电子能谱(ESCALAB 250Xi,美国 Thermo Scientific 公司)表征薄膜表面的元素种类及含量,并采用高斯函数对 XPS 测试结果进行拟合。全谱和狭谱的 X 射线条件设定为 14.9 kV 和 207 W,采用 Al K $\alpha$  作为 X 射线源,其中全谱分析条件为:扫描范围为 0~1 000 eV,通能为 100.00 eV 和 1.0 eV 的步频;而狭谱扫描的通能为 30 eV,采用 0.1 eV 的步频在高分辨率范围内扫描。在 25℃下,以水作为测试液滴,采用表面接触角仪(Powereach JC2000D1,上海中晨数字技术设备有限公司)测定材料表面的接触角。

此外,为表征改性之后材料的生物相容性,本研究还采用 MC3T3 成骨细胞,通过 MTT 法对改性前后材料的生物相容性进行了评价。MC3T3 成骨细胞由西北工业大学提供,细胞培养使用的培养液为含有生长因子,重组人胰岛素,人转铁蛋白,谷氨酰胺,青/链霉素双抗,非必须氨基酸,胎牛血清的完全培养基。接种细胞前,将膜材料浸泡于 70%的乙醇中 2 h,然后将膜用 PBS 洗涤 5 次,在紫外灯下将材料的两个面各照射 30 min。样品模贴附于 6 孔板底部,将 MC3T3 细胞悬液以 5 000 个/cm<sup>2</sup> 加入到孔板中,加入完全培养基,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下进行培养,每天更换一次培养基。通过 MTT 法评估 MC3T3 成骨细胞在样品表面的活性与增殖情况,将样品模贴附于 96 孔板底部,以组织培养孔板为对照组,每组样品均设 10 复孔。在每个样品孔中加入 100  $\mu$ L 密度为 2×10<sup>4</sup> 个/mL 的 MC3T3 成骨细胞悬液,在样品槽周围的孔洞里加入少量的培养液,以维持细胞稳定的生存环境。在细胞培养至第 1、2、3、4、5、6 d 和 7 d 时各取出一块培养板,

在每个样品孔中加入 20  $\mu\text{L}$  质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液后,放回 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续孵育 4 h,然后终止培养。用滴管小心吸出样品孔内的上清液后,在每孔中加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO,震荡 10 min,使结晶物充分溶解。用微孔板式连续波长酶标仪测定溶解液在波长为 490 nm 时的吸光值。

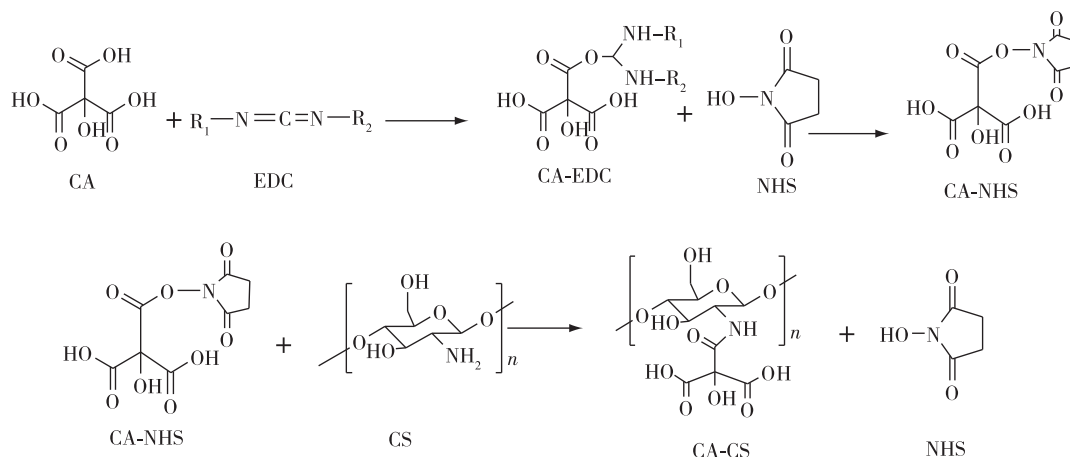


图1 柠檬酸改性壳聚糖的反应式

## 2 结果与讨论

### 2.1 SEM 分析

图2和图3分别是柠檬酸改性前后的2种薄膜材料表面和截面的SEM观察照片。从图2的SEM图可以清晰的观察到改性前后的壳聚糖基材料表面光滑,呈现均一的结构,表明柠檬酸接枝改性没有显著改变材料的表面结构。而图3显示的两种材料断面结构表面材料的层间结构均匀致密,表明柠檬酸接枝改性没有显著改变材料的内部结构。综合图2和图3的结构表明:改性前后材料表面和截面的微观结构未发生明显变化,柠檬酸接枝改性的过程没有显著影响材料的微观结构。

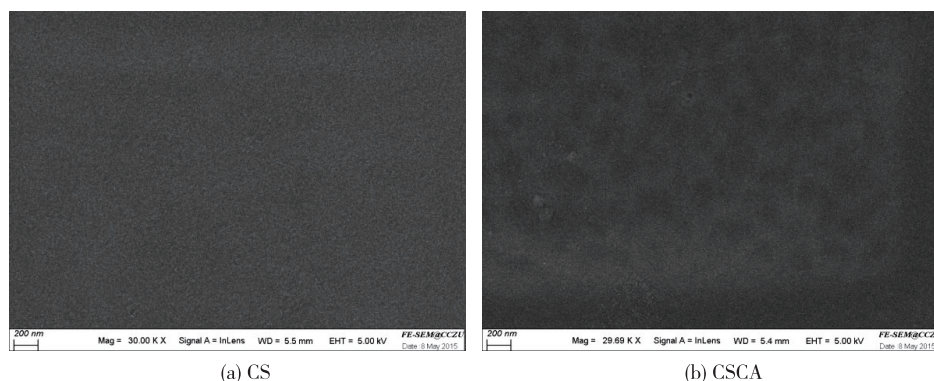


图2 壳聚糖改性前后材料表面的SEM图

### 2.2 材料改性前后红外光谱分析

图4是对改性前后的材料在4 000~400  $\text{cm}^{-1}$  区间进行红外扫描得到的红外光谱图,两种材料的红外光谱图中都出现了壳聚糖的特征吸收峰,其中,位于1 642  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰为氨基 I 的酰胺键和  $\text{C}=\text{O}$  键的伸缩振动峰,1 577  $\text{cm}^{-1}$  处为氨基 II 的非对称伸缩振动峰,1 326  $\text{cm}^{-1}$  处为氨基 III 的  $\text{C}-\text{N}$  键的伸缩振动峰和  $\text{N}-\text{H}$  的弯曲振动吸收峰。柠檬酸的加入使得材料表面的羧基大量增加,从而导致羟基的收缩振动峰及

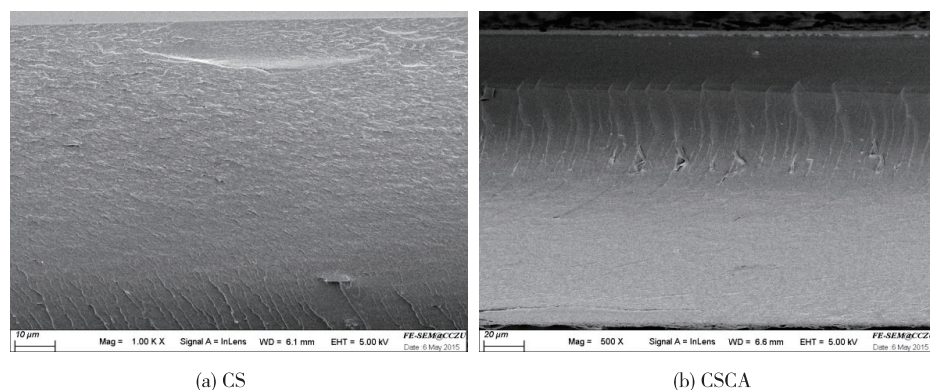


图 3 壳聚糖改性前后材料截面的 SEM 图

$3\,361\text{cm}^{-1}$ 处变强。此外,在改性之后的材料中,出现了柠檬酸分子的特征吸收峰,在 $1\,028\text{cm}^{-1}$ 和 $894\text{cm}^{-1}$ 处出现了 C—O—C 伸缩振动的吸收峰。红外光谱结果表明柠檬酸小分子被成功接枝到了壳聚糖表面。

## 2.3 XPS 分析

X 射线光电子能谱是一种用于表征材料表面元素组成的测试手段,利用 X 射线激发样品可以用来进行多种元素定性和定量的分析。图 5 是 CS 和 CSCA 膜的全谱图,本研究以此来分析壳聚糖材料在改性前后表面的元素成分和含量变化结果。结果表明:2 种膜表面在结合能为  $285,400\text{eV}$  和  $532\text{eV}$  附近分别出现了明显的 C,N 峰和 O 峰。

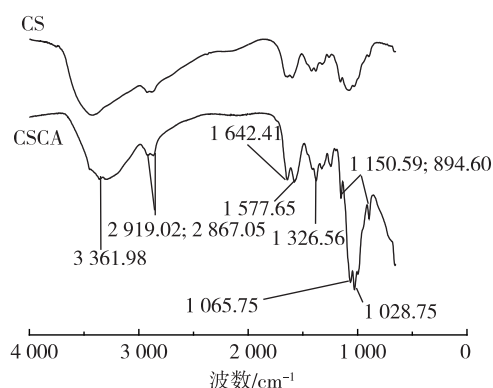


图 4 改性前后壳聚糖的红外光谱图

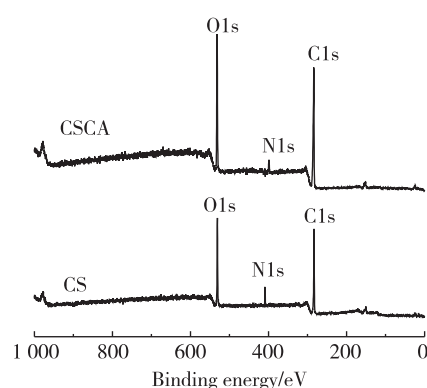


图 5 表面改性前后壳聚糖膜的表面 X 射线光电子能谱

表 1 列出了薄膜改性前后表面各元素含量的变化。当柠檬酸分子引入壳聚糖表面之后,材料表面氮元素的含量由  $3.21\%$  降低变为  $1.32\%$ ,氧元素的含量则由  $27.45\%$  增加到  $33.03\%$ 。相应地,氧碳含量比由  $0.40$  升高为  $0.50$ ,而氮碳含量比则由  $0.05$  降为  $0.02$ 。总的来说,引入柠檬酸分子后导致材料表面的 O/C 增加和 N/C 减小,这是由于柠檬酸分子中含有大量的羧基官能团,在接枝到壳聚糖膜表面后导致材料表面的氧元素含量增加。

此外,本研究还对柠檬酸改性前后材料表面的各种化学基团组成利用高分辨谱进行了分析。图 6 及表 2 分别给出了 CS 和 CSCA 2 种材料表面的 C1s 峰的高分辨 X 射线光电子能谱(HRXPS)图以及各分峰的分布与归属数据。通过对 XPS 谱峰中 C1s 在  $285\text{eV}$  的峰进行曲线拟合分析,如图 6 所示,位于  $283.47$ 、 $284.07$ 、 $285.27$ 、 $287.00\text{eV}$  附近的峰分别代表 2 种膜材料表面的 C 元素所处的—C—C—、—C—N—、—C—O—和—C=O— 4 种不同的环境。

表 1 接枝改性前后壳聚糖膜表面的元素含量

Sample	$w(\text{C})/\%$	$w(\text{N})/\%$	$w(\text{O})/\%$	$m(\text{O})/m(\text{C})$	$m(\text{N})/m(\text{C})$
CS	69.34	3.21	27.45	0.40	0.05
CSCA	65.65	1.32	33.03	0.50	0.02



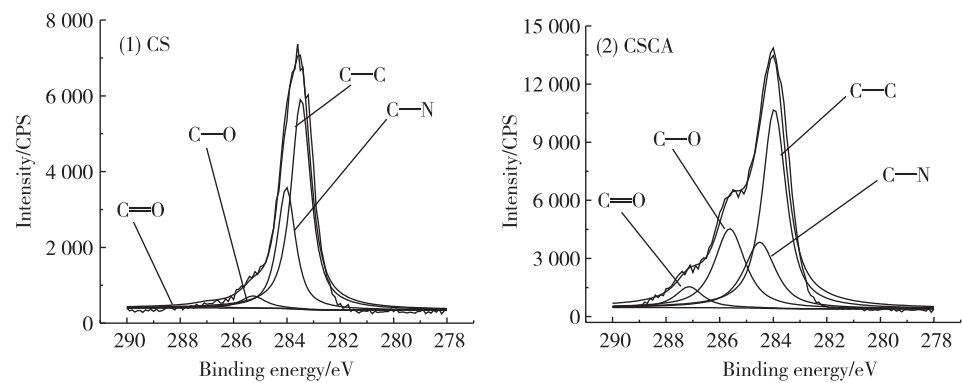


图 6 壳聚糖改性前后膜表面 C1s 的拟合曲线图

表 2 是 2 种薄膜材料上 C 元素所处不同环境所对应的含量,结果表明相较于改性前的壳聚糖膜,—C—O—和—C=O—所对应的吸收峰面积比例明显增大,这与接枝反应过程中生成新的酰胺键和引入了新的羰基官能团是相符的。

综合红外光谱的结果和 XPS 测试的结果,进一步证实柠檬酸小分子被成功接枝到了壳聚糖膜的表面。

表 2 CS 和 CSCA 膜表面的 C1s 归属的峰位

Sample	Position/eV	Relative intensity/%	Possible element state
CS	283.47	62.22	—C—C—
	284.07	32.56	—C—N—
	285.27	4.42	—C—O—
	287.00	0.80	—C=O—
CSCA	283.93	48.46	—C—C—
	284.50	21.22	—C—N—
	285.62	24.55	—C—O—
	287.14	5.78	—C=O—

2.4 材料亲疏水性

亲疏水性是影响材料能否与机体发生良好结合的重要指标之一,对水接触角越小的材料亲水性能就越好,与有机体就有可能结合的越紧密。图 7 和图 8 分别是 CS 和 CSCA 膜表面的接触角和表面自由能随时间的变化图。结果表明:相比改性前的壳聚糖膜,改性之后的 CSCA 膜材料表面的接触角变小,表明改性后材料的亲水性有了一定的提高。

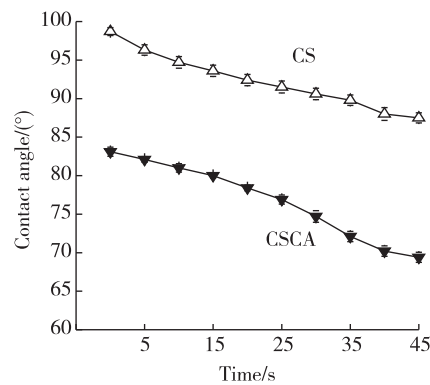


图 7 不同时间段内改性前后材料接触角的变化图 (n=5)

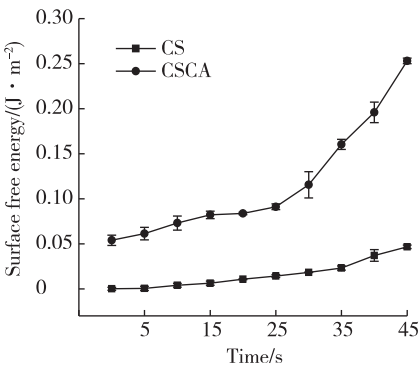


图 8 改性前后材料表面自由能的变化图 (n=5)

2.5 生物相容性分析

本研究采用 MTT 法对改性前后材料的生物相容性进行了评价。图 9 为 MC3T3 成骨细胞在接种到空白组、CS 和 CSCA 膜上一周内的活性和增殖情况。吸光度值随着培养时间的延长逐渐升高,表明细胞能够在几种基底上良好地生长,改性前后的 2 种材料均能支持细胞黏附和生长。此外,MC3T3 细胞在柠檬酸改性之后的材料表面增殖速度更快,这说明 CSCA 材料表面更利于细胞培养基中的蛋白等营养物质黏附,从

而促进细胞的黏附和增殖。研究结果表明,柠檬酸改性之后的壳聚糖基材料保持了较好的生物相容性。

### 3 结 论

本研究通过引入柠檬酸小分子,分别以 EDC 和 NHS 为交联剂和催化剂,对壳聚糖基材料进行表面化学修饰改性,成功地在壳聚糖基材料表面引入了大量的亲水性官能团,在维持材料稳定形貌的基础上提高了材料表面的亲水性。此外,细胞实验结果表明,MC3T3 成骨细胞能够在改性后的材料表面可以良好地生长和增殖,证明柠檬酸改性之后的材料具有良好的生物相容性。该材料有可能为骨组织工程支架表面的高分子涂层材料提供一种新选择。

### 参考文献:

- [1]CHANG S H, CHIAN C H. Plasma surface modification effects on biodegradability and protein adsorption properties of chitosan films [J]. *Applied Surface Science*, 2013, 282: 735-740.
- [2]CORDERO-ARIAS L, CABANAS-POLO S, GOUDOURI O M, et al. Electrophoretic deposition of ZnO/alginate and ZnO-bioactive glass/alginate composite coatings for antimicrobial applications [J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2015, 55:137-144.
- [3]CHEN S H, ZHENG L Z, XIE X H, et al. Comparative study of poly (lactic-co-glycolic acid)/tricalcium phosphate scaffolds incorporated or coated with osteogenic growth factors for enhancement of bone regeneration [J]. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2014, 2: 91-104.
- [4]BALLARRE J, MANJUBALA I, SCHREINER W H, et al. Improving the osteointegration and bone-implant interface by incorporation of bioactive particles in sol-gel coatings of stainless steel implants [J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6: 1601-1609.
- [5]PISHBIN F, MOURINO V, GILCHRIST J B, et al. Single-step electrochemical deposition of antimicrobial orthopaedic coatings based on a bioactive glass/chitosan/nano-silver composite system [J]. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9:7469-7479.
- [6]BELLUCCI D, SOLA A, GENTILE P, et al. Biomimetic coating on bioactive glass-derived scaffolds mimicking bone tissue [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2012, 100A: 3259-3266.
- [7]LI Z, DOU H, FU Y, et al. Improving the hydrogen peroxide bleaching efficiency of aspen chemithermomechanical pulp by using chitosan [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 132: 430-436.
- [8]GARCIA M A, PEREZ L. Effect of molecular weight reduction by gamma irradiation on chitosan film properties [J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2015, 55: 174-180.
- [9]MA X Y, FENG Y F, MA Z S, et al. The promotion of osteointegration under diabetic conditions using chitosan/hydroxyapatite composite coating on porous titanium surfaces [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 7259-7270.
- [10]RAFAT M, LI F, FAGERHOLM P, et al. PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 3960-3972.
- [11]LIN Z, LIU S, SUN X, et al. The effects of citric acid on the synthesis and performance of silver-tin oxide electrical contact materials [J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2014, 588: 30-35.
- [12]SANCHEZ-FERRERO A, MATA Á, MATEOS-TIMONEDA M A, et al. Development of tailored and self-mineralizing citric acid-crosslinked hydrogels for in situ bone regeneration [J]. *Biomaterials*, 2015, 68: 42-53.
- [13]WANG X, CHEN J, YAN X, et al. Heavy metal chemical extraction from industrial and municipal mixed sludge by ultrasound-assisted citric acid [J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2015, 27: 368-372.

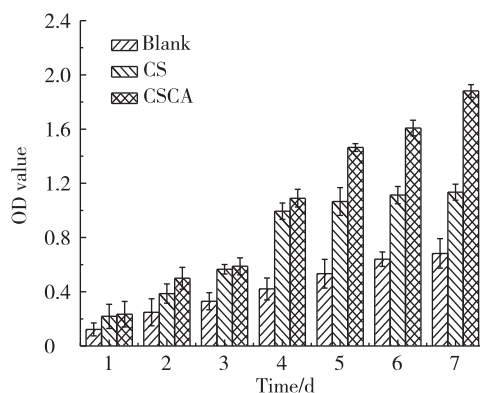


图9 MC3T3 细胞在 CS 和 CSCA 膜上的 MTT 吸收光值 ( $n=5$ )

(责任编辑:殷莉莉)