

# 木薯淀粉微球的止血性能初步研究<sup>\*</sup>

曹勇<sup>1</sup>, 黎演明<sup>2</sup>, 冼学权<sup>2</sup>, 苏志恒<sup>3</sup>, 李晓捷<sup>1</sup>, 李秉正<sup>2\*\*</sup>

(1. 广西医科大学口腔医学院, 广西南宁 530021; 2. 广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物质产业化工程院, 广西生物质炼制重点实验室, 广西南宁 530007; 3. 广西医科大学药学院, 广西南宁 530021)

**摘要:**为了初步探索木薯淀粉微球用作局部止血材料的止血性能, 本研究以酸改性木薯淀粉为原料, 三偏磷酸钠为交联剂, 采用水包水乳液-交联法制备木薯淀粉微球。通过体外和体内止血试验评价木薯淀粉微球的止血性能。研究结果表明, 木薯淀粉微球组的全血凝固时间、血浆复钙时间及家兔脾脏划破止血时间均显著低于空白对照组( $P < 0.05$ ), 与云南白药组相比无显著差异( $P > 0.05$ )。初步证明木薯淀粉微球的体外及体内止血性能良好, 具有用作局部止血材料的良好潜力。

**关键词:**木薯淀粉微球 止血材料 全血凝固时间 血浆复钙时间 局部止血

中图分类号: TS23 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2019)02-0233-05

## 0 引言

粉状止血材料使用方便快捷, 不受创面大小和部位的影响, 不仅能迅速有效止血, 其吸水形成的凝胶还能封堵并有效保护创面, 防止细菌的二次污染, 特别适用于复杂伤口的局部止血<sup>[1-2]</sup>。以壳聚糖<sup>[3]</sup>、淀粉、明胶和海藻酸盐<sup>[4]</sup>等天然高分子为原料制备粉状止血材料的研究已经广泛开展。淀粉具有来源丰富、成本低廉、易于加工、无免疫原性、易于体内降解且其降解产物对人体无害等诸多优点, 使淀粉基止血材料备受关注<sup>[5-7]</sup>。美国的 Arista<sup>®</sup> 止血粉是以马铃薯淀粉为原料, 采用油包水乳液法制备的淀粉微球产品, 是粉状止血材料的代表产品之一, 目前已进入我国市

场, 并在临床实际应用中展示了良好的止血效果<sup>[8-10]</sup>。

然而, 油包水乳液法制备淀粉微球需要使用大量有机溶剂, 因此在生产安全性和产品安全性方面均存在一定隐患。在前期研究中, 本课题组采用安全性和生产效率等方面更具优势的新型水包水乳液法, 成功制备了三偏磷酸钠交联木薯淀粉微球<sup>[11]</sup>, 研究结果表明, 该木薯淀粉微球具有很强的吸水溶胀性<sup>[12]</sup>, 且细胞毒性试验初步证实了其具有较好的生物安全性<sup>[13]</sup>, 具有作为粉状止血材料应用于医药领域的良好潜力。本研究通过体外和体内止血试验, 对木薯淀粉微球的止血性能开展初步研究, 为推动其在局部止血材料领域的应用奠定基础。

<sup>\*</sup> 广西自然科学基金项目(2015GXNSFAA139281)和广西高校中青年教师基础能力提升项目(KY2016LX051)资助。

### 【作者简介】

曹勇(1984—), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事牙槽骨修复材料相关研究。

### 【\*\*通信作者】

李秉正(1982—), 男, 副研究员, 主要从事生物质资源转化与利用研究, E-mail: libingzheng@gxas.cn。

### 【引用本文】

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20190321.001

曹勇, 黎演明, 冼学权, 等. 木薯淀粉微球的止血性能初步研究[J]. 广西科学, 2019, 26(2): 233-237.

CAO Y, LI Y M, XIAN X Q, et al. Preliminary study on hemostatic properties of cassava starch microspheres [J]. Guangxi Sciences, 2019, 26(2): 233-237.

## 1 材料与方 法

### 1.1 药品、试剂与仪器

酸改性木薯淀粉(ACS),食品级,1 kg,由广西农垦明阳生化集团有限公司提供;聚乙二醇 20 000,化学纯,250 g,购自汕头市西陇化工厂有限公司;三偏磷酸钠(TSTP),分析纯,1 kg,购自阿法埃莎(天津)化学有限公司;无水乙醇,分析纯,2.5 L,购自成都市科龙化工试剂厂;NaOH,分析纯,500 g,购自国药集团化学试剂有限公司;柠檬酸三钠(二水),分析纯,500 g,购自国药集团化学试剂有限公司;戊巴比妥钠,粉剂,25 g,购自国药集团化学试剂北京有限公司;云南白药,市售商品,4 g,购自当地药店。

电动搅拌器,RW20,德国 IKA 公司;高速离心机,GT10-1,北京时代北利离心机有限公司;高速冷冻离心机,MIKRO 200R,德国 Hettich 公司;恒温水浴锅,HH-4,江苏金坛市宏华仪器厂;恒温培养箱,GXZ-600C,宁波江南仪器厂;真空干燥箱,BZF-50,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;扫描电子显微镜,S-4300N,日本日立公司;光学显微镜,DM4 B,德国徕卡公司。

### 1.2 木薯淀粉微球的制备

参照文献[12]的方法制备木薯淀粉微球,具体步骤如下:搅拌状态下(400 r/min)将 20 mL 含有 NaOH 和三偏磷酸钠的淀粉溶液(ACS:NaOH:TSTP:H<sub>2</sub>O=10:1:3:50,g/g)缓慢倒入含有 60 mL 聚乙二醇溶液(37.5 g/100 g)的高型烧杯中。维持搅拌 10 min 形成水包水乳液,乳化过程中搅拌转速为 400 r/min,乳化温度为 30℃。将烧杯放入恒温培养箱中静置温育 4 h,然后将乳液移入离心管中离心(5 000 r/min,5 min)。用去离子水将下层产物(微球)洗涤 3 次,再用无水乙醇洗涤 3 次。洗涤后的微球在 60℃下真空干燥 12 h,并密封保存在干燥器中备用。体外及体内止血性能研究所用的样品,使用前均经过紫外灭菌。

### 1.3 木薯淀粉微球的形貌表征

采用扫描电子显微镜观察并拍摄干燥状态下木薯淀粉微球的形态和表面形貌照片。为表征木薯淀粉微球溶胀前后的形态,分别将微球分散到异丙醇和去离子水形成悬浮液,并用光学显微镜进行观察并拍照。

### 1.4 全血凝固时间

全血凝固时间试验参照文献[14]的方法并略作修改,具体步骤如下:称量 4.0 mg 木薯淀粉微球并置于直径 1 cm,长度 10 cm 的玻璃试管中。抽取 1.5

mL 大鼠肝脏门静脉血并分别注入 3 支试管,每支各注入 0.5 mL。将试管摇匀并置于 37℃ 的恒温水浴锅中观察,同时开始计时。从开始计时到倾斜试管而血液不流动的时刻为止,即为凝血时间。阳性对照组以 4.0 mg 云南白药代替木薯淀粉微球,空白对照组不加任何止血材料,采用与淀粉微球组相同的方法进行试验,每组试验重复 8 次。

### 1.5 血浆复钙时间

将大鼠肝脏门静脉血和 3.8% 柠檬酸钠溶液按体积比 9:1 充分混匀,然后离心 12 min(5 000 r/min,4℃)获取上清液,即为乏血小板血浆(PPP)。将 0.5 mL 的 PPP 加入含有 4.0 mg 木薯淀粉微球的玻璃试管(直径 1 cm,长度 10 cm)中,并在 37℃ 水浴锅中温育 1 min。将 30 μL 浓度为 0.5 mol/L 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液加入试管,摇匀并开始计时。每隔 30 s 用竹签检测 PPP 中是否形成纤维蛋白丝。从开始计时到检测到纤维蛋白丝的时刻为止,即为血浆复钙时间。阳性对照组以 4.0 mg 云南白药代替木薯淀粉微球,空白对照组不加任何止血材料,采用与淀粉微球组相同的方法进行试验,每组试验重复 8 次。

### 1.6 脾脏划破止血时间

沿家兔耳缘静脉注射浓度为 3%(30 mg/kg)的戊巴比妥钠注射液进行麻醉,无菌操作暴露家兔脾脏。用 15# 手术刀片沿垂直脾脏的长轴先后划出长约 1 cm,深约 0.5 cm 的 2 条对称性伤口。按照随机分配原则,分别对创口敷以 1.0 g 木薯淀粉微球、1.0 g 云南白药或不使用任何止血材料。用手指压迫创口 1 min,然后观察创口出血情况。如果 2 min 内未再出血,即认为止血成功,否则去除创口表面血凝块及止血材料,重新敷药并手指轻压 1 min,如此反复直至成功止血并记录创口止血所用时间。每组试验重复 8 次。

### 1.7 统计方法

采用 SPSS16.0 进行数据分析。数据以平均值±标准偏差( $\bar{X} \pm \text{STD}$ )表示。组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。以双侧检验  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

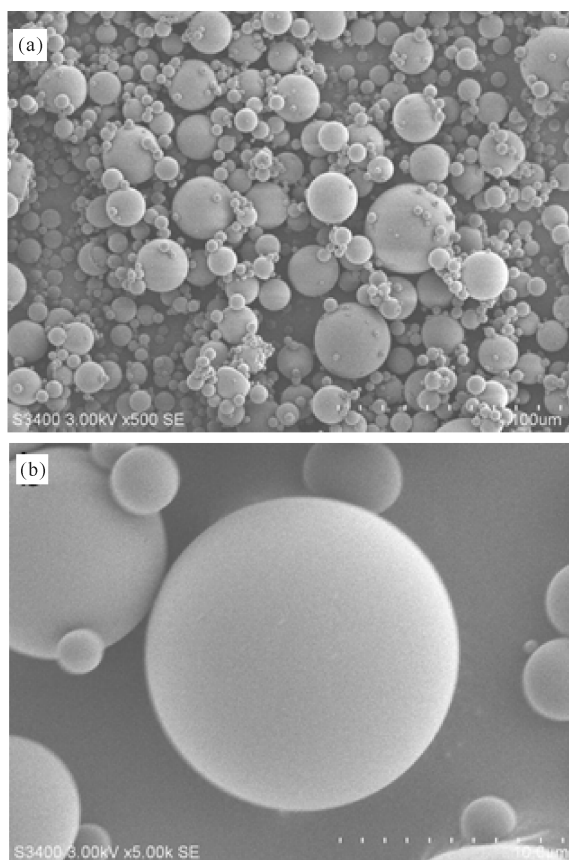
## 2 结果与分析

### 2.1 木薯淀粉微球的形貌表征

扫描电镜照片(图 1)表明,本研究中制备的木薯淀粉微球粒径大多分布在 10~40 μm,形态较圆整,且表面光滑,未观察到明显孔洞。

木薯淀粉微球分散在异丙醇中时,仍保持了与干燥状态下基本一致的粒径大小,无明显溶胀现象。当

分散在去离子水中时,微球由于吸水溶胀而导致粒径明显增大,其中溶胀后较大的微球粒径约达到 100 μm(图 2)。光学显微镜照片显示,木薯淀粉微球具有良好的吸水溶胀能力。



(a)放大 500 倍,(b)放大 5 000 倍

(a)Magnification 500×,(b)Magnification 5 000×

图 1 木薯淀粉微球的扫描电镜照片

Fig.1 SEM images of cassava starch microspheres

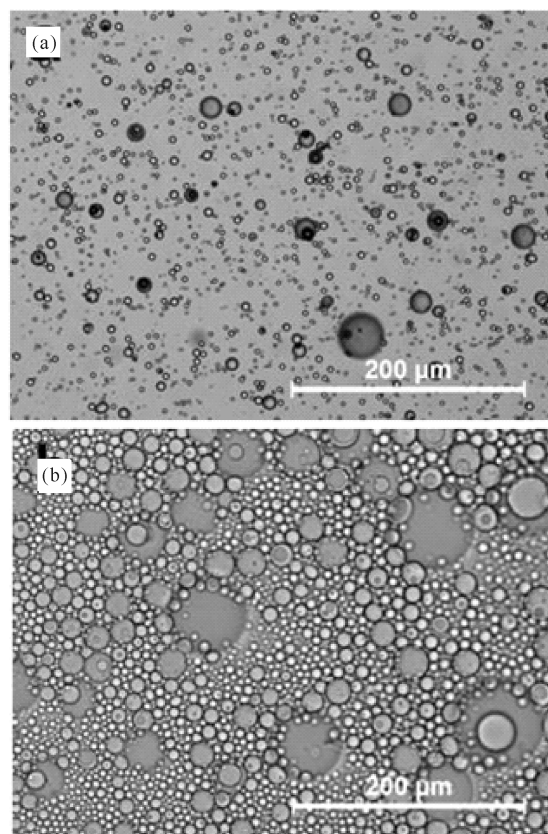
### 2.2 木薯淀粉微球的体外、体内止血研究

空白对照组、淀粉微球组和云南白药组的平均全血凝固时间分别为 46 s、31 s、29 s,淀粉微球组及云南白药组全血凝固时间均低于空白对照组,差别具有统计学意义( $P < 0.05$ ),淀粉微球组与云南白药组全血凝固时间差别无统计学意义( $P > 0.05$ )(表 1)。

此外,空白对照组、淀粉微球组和云南白药组的平均血浆复钙时间分别为 409 s、338 s 和 330 s,淀粉微球组及云南白药组血浆复钙时间均低于空白对照组,差别具有统计学意义( $P < 0.05$ ),淀粉微球组与云南白药组血浆复钙时间差别无统计学意义( $P > 0.05$ )。

从表 1 中还可以看出,空白对照组、淀粉微球组和云南白药组的平均脾脏划破止血时间分别为 118 s、80 s 和 77 s,淀粉微球组及云南白药组的脾脏划破止血时间低于空白对照组,差别具有统计学意义( $P < 0.05$ ),淀粉微球组与云南白药组脾脏划破止血

时间差别无统计学意义( $P > 0.05$ )。



(a)分散在异丙醇中,(b)分散在水中

(a)Suspended in isopropanol,(b)Suspended in water

图 2 木薯淀粉微球悬浮液的光学显微照片

Fig.2 Optical microscope images of suspensions of cassava starch microspheres

表 1 止血材料对全血凝固时间、血浆复钙时间和脾脏划破止血时间的影响( $\bar{X} \pm \text{STD}$ )

Table 1 Influence of hemostatic materials on whole blood coagulation time, plasma recalcification time and hemostatic time of splenic bleeding ( $\bar{X} \pm \text{STD}$ )

项目 Item	凝固时间 Coagulation time (s)	血浆复钙时间 Plasma recalcification time (s)	脾脏划破止血时间 Hemostatic time (s)
空白对照组 Blank control group	46 ± 4	409 ± 42	118 ± 7
淀粉微球组 Cassava starch microsphere group	31 ± 4 <sup>ab</sup>	338 ± 20 <sup>ab</sup>	80 ± 9 <sup>ab</sup>
云南白药组 Yunnan Baiyao group	29 ± 2 <sup>a</sup>	330 ± 26 <sup>a</sup>	77 ± 8 <sup>a</sup>

注:  $\bar{X}$  表示平均值,STD 表示标准偏差;两两比较采用 LSD-t 检验,<sup>a</sup>表示与空白对照组相比, $P < 0.05$ ;<sup>b</sup>表示与云南白药组相比, $P < 0.05$

Note:  $\bar{X}$  indicates mean value,STD indicates standard deviation;LSD-t test is used for comparison of data between two groups,<sup>a</sup> indicates significant difference ( $P < 0.05$ ) in comparison to blank control group,<sup>b</sup> indicates significant difference ( $P < 0.05$ ) in comparison to Yunnan Baiyao group

### 3 讨论

对于止血材料而言,吸水能力是最重要的特性之一。材料吸水后,可浓缩血液中的血小板及凝血因子,从而加快凝血过程<sup>[15]</sup>。因此,提高吸水性能是提高止血能力的关键。天然的原淀粉颗粒由结晶区和无定型区组成,属于部分晶体结构。虽然淀粉分子链上含有大量的羟基,但原淀粉颗粒的吸水能力并不强,基本不具备浓缩血液中血小板和凝血因子的能力,原因是常温下水分子难以进入原淀粉颗粒内部结构较致密的结晶区。采用酶或其他方法对原淀粉颗粒进行部分水解,可使淀粉颗粒表面和内部形成多个孔道,增加水分子进入颗粒内部的通道从而提高吸水溶胀能力。然而,由于多孔淀粉中通常仍存在大量结构较致密的结晶区<sup>[16]</sup>,因此溶胀能力提高程度有限。本研究中的木薯淀粉微球由水包水乳液法制成,其原理是乳液液滴中分散的淀粉分子通过交联键重新组装而成,属于无定型结构的材料,基本不存在结晶区<sup>[11]</sup>。因此,微球容易吸水并将水分子束缚在其内部的三维网络结构中。此外,交联剂三偏磷酸钠将二淀粉磷酸酯键引入微球中,进一步提高了微球的亲水性。因此,虽然扫描电镜照片显示木薯淀粉微球表面并无明显孔洞(图 1b),但光学显微照片表明其具有出色的吸水溶胀能力(图 2)。另外,本课题组早期的研究也证明,三偏磷酸钠交联木薯淀粉微球的溶胀率可达 300%~550%<sup>[12]</sup>,高于多孔淀粉的溶胀率<sup>[17]</sup>。

全血凝固时间及血浆复钙时间是评价内源性凝血的指标,用于评价止血材料的体外止血效果。Janvikul 等<sup>[14]</sup>研究发现,采用壳聚糖作为止血材料可显著缩短全血凝固时间,但并不能显著缩短血浆复钙时间。原因是壳聚糖仅可以促进血液中血小板的凝聚,但不能加速血浆凝血酶的激活。本研究的试验结果表明,木薯淀粉微球既能显著缩短全血凝固时间,又能显著缩短血浆复钙时间(表 1)。主要原因可能是微球具有良好的吸水能力,可大量吸收血液中的水分从而提高血液中的血小板和凝血因子浓度,进而促进内源性凝血。

脾脏划破止血试验是评价材料体内止血效果的指标。试验结果表明,木薯淀粉微球组的脾脏划破止血时间低于空白对照组(表 1)。原因是一方面木薯淀粉微球本身就具有促进内源性凝血的作用(见 2.2 节),另一方面可能是微球吸水溶胀后形成的凝胶有助于封堵创面,减缓血液流动,加快了局部血栓形成。木薯淀粉微球的脾脏划破止血时间与云南白药相比无统计学差异,说明其具有与云南白药相近的体内止

血效果,具有运用于创面止血的良好潜力。

然而,本研究制备木薯淀粉微球虽然展示了良好的止血性能和潜力,但仍难以满足对止血性能要求较高的场合。要进一步提高微球的止血性能,可通过表面改性和/或利用微球的载药功能<sup>[18]</sup>负载具有止血活性的药物来得以实现。本课题组将在今后的工作中对此进行研究。

### 4 结论

淀粉是一种来源广泛的天然材料,利用淀粉为原料制备粉状止血材料——木薯淀粉微球具有成本低廉、性能优良和应用方便等诸多优点。通过初步研究,证实了水包水乳液法制备的三偏磷酸钠交联木薯淀粉微球具有良好的体外和体内止血能力,表明其具备用作局部止血材料的良好潜力。今后将进一步探讨对微球表面进行改性和负载止血药物来进一步加强止血效果,以利于该止血材料的临床应用。

#### 参考文献

- [1] 姚迪,孙蕾蕾,刘晗,等. 鳕鱼皮明胶-Ca<sup>2+</sup> 复配止血粉的止血活性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(14): 35-39.
- [2] ALAM H B, BURRIS D, DACORTA J A, et al. Hemorrhage control in the battlefield: Role of new hemostatic agents [J]. Military Medicine, 2005, 170(1): 63-69.
- [3] LI J X, WU X W, WU Y Q, et al. Porous chitosan microspheres for application as quick in vitro and in vivo hemostat [J]. Materials Science and Engineering: C, 2017, 77: 411-419.
- [4] 王超, 罗文峰, 李普旺, 等. 海藻酸钙多孔微球-白芨多糖复合止血粉的制备及止血性能评价[J]. 高分子通报, 2017(7): 63-69.
- [5] 李明洋, 黄赤兵, 范明齐, 等. 多孔止血淀粉在肝及脾中的止血效果[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(11): 2002.
- [6] CHEN F P, CAO X Y, YU J X, et al. Quaternary ammonium groups modified starch microspheres for instant hemorrhage control [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2017, 159: 937-944.
- [7] BJÖRSES K, FAXÄLV L, MONTAN C, et al. In vitro and in vivo evaluation of chemically modified degradable starch microspheres for topical haemostasis [J]. Acta Biomaterialia, 2011, 7(6): 2558-2565.
- [8] 刘鹏, 赵建华, 范伟力, 等. 新型止血材料 Arista AH 在脊柱手术中的临床应用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(23): 2382-2384.
- [9] 谢肇, 许建中, 周强, 等. Arista 微孔多聚糖止血球在胸腰椎前路减压术中的临床应用[J]. 中华创伤杂志,

2006,22(12):894-896.

- [10] ANTISDEL M D J L, WEST-DENNING J L, SINDWANI M D R. Effect of microporous polysaccharide hemospheres (MPH) on bleeding after endoscopic sinus surgery: Randomized controlled study [J]. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 2009, 141(3): 353-357.
- [11] LI B Z, WANG L J, LI D, et al. Preparation and characterization of crosslinked starch microspheres using a two-stage water-in-water emulsion method [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88(3): 912-916.
- [12] 洗学权,黎演明,杨辉,等.凝沉型及交联型淀粉微球的水包水乳液法制备及理化特性比较研究[J].*河南工业大学学报:自然科学版*,2017,38(3):25-30,37.
- [13] 李秉正,潘丽霞,黄纪民,等.水包水乳液法制备木薯淀粉微球的研究[J].*广西科学院学报*,2014(2):95-100.
- [14] JANVIKUL W, UPPANAN P, THAVORNYUTIKARN B, et al. In vitro comparative hemostatic studies of chitin, chitosan, and their derivatives [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, 102(1): 445-451.
- [15] SONG H F, CHEN A Z, WANG S B, et al. Preparation of chitosan-based hemostatic sponges by supercritical fluid technology [J]. *Materials*, 2014, 7(4): 2459-2473.
- [16] 谢涛,余秉奇.黑曲霉发酵法制备小红栲多孔淀粉[J].*中国粮油学报*,2010,25(7):62-66.
- [17] 吴珊,肖鉴谋,罗明辉.新型交联活性玉米多孔淀粉的制备及工艺优化[J].*食品工业*,2013,34(1):96-99.
- [18] AHMAD M Z, AKHTER S, AHMAD I, et al. In vitro and in vivo evaluation of Assam Bora rice starch-based bioadhesive microsphere as a drug carrier for colon targeting [J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2012, 9(2): 141-149.

## Preliminary Study on Hemostatic Properties of Cassava Starch Microspheres

CAO Yong<sup>1</sup>, LI Yanming<sup>2</sup>, XIAN Xuequan<sup>2</sup>, SU Zhiheng<sup>3</sup>, LI Xiaojie<sup>1</sup>, LI Bingzheng<sup>2</sup>

(1. College of Stomatology, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China; 2. State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Science, Nanning, Guangxi, 530007, China; 3. Pharmaceutical College, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

**Abstract:** To preliminarily investigate the hemostatic properties of cassava starch microspheres as topical hemostatic material, using acid modified tapioca starch as raw material and sodium trimetaphosphate as cross-linking agent, cassava starch microspheres were prepared by water-in-water emulsion-crosslinking method. The hemostatic properties of cassava starch microspheres were evaluated by in vitro and in vivo hemostatic tests. The whole blood coagulation time, recalcification time and the hemostatic time of experimental splenic bleeding model in rabbit in the cassava starch microsphere group were significantly lower than that in the blank control group ( $P < 0.05$ ), and there were no significant differences when compared with the Yunnan Baiyao group ( $P > 0.05$ ). The results preliminarily showed that cassava starch microspheres had good hemostatic performance in vitro and in vivo, and had good potential as a topical hemostatic material.

**Key words:** cassava starch microsphere, hemostatic material, whole blood coagulation time, plasma recalcification time, topical haemostasis