



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110124082 A

(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201910435962.2 *A61L 15/42*(2006.01)
(22)申请日 2019.05.23 *A61L 15/44*(2006.01)
(71)申请人 南京晓庄学院 *A61L 15/46*(2006.01)
地址 210000 江苏省南京市江宁区弘景大 *A61L 31/04*(2006.01)
道3601号 *A61L 31/00*(2006.01)
A61L 31/02(2006.01)
(72)发明人 唐宁 张边江 陈全战 王立科 *A61L 31/14*(2006.01)
杨平 *A61L 31/16*(2006.01)
(74)专利代理机构 南昌丰择知识产权代理事务
所(普通合伙) 36137
代理人 吴称生

(51)Int.Cl.
A61L 15/28(2006.01)
A61L 15/40(2006.01)
A61L 15/32(2006.01)
A61L 15/18(2006.01)

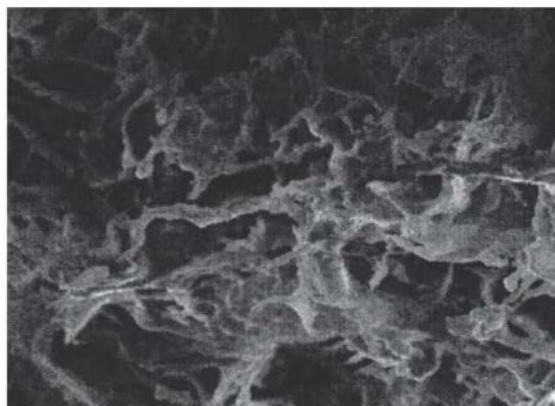
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

基于马齿苋多糖及黄酮提取物的溶胀型医用生物凝胶填料

(57)摘要

本发明涉及一种基于马齿苋多糖及黄酮提取物的溶胀型医用生物凝胶填料,包括复合多糖修饰的胶原蛋白凝胶组分、溶胀性复合多糖凝胶组分以及负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石组分;所述溶胀型医用生物凝胶填料为集吸收渗液、止血、填充、促愈合等效果一体的骨架支撑性多糖类填充材料,兼具有抗菌消炎特性。其中马齿苋来源丰富,多糖制备成本较低,适合工业化生产。



1. 一种基于马齿苋多糖及黄酮提取物的溶胀型医用生物凝胶填料的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

- (1) 从马齿苋中联合提取多糖及马齿苋总黄酮;
- (2) 制备复合多糖修饰的胶原蛋白凝胶组分;
- (3) 制备溶胀性复合多糖凝胶组分;
- (4) 制备负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石;
- (5) 胶原蛋白凝胶组分、复合多糖凝胶组分及纳米羟基磷灰石混合复配;

其中,步骤(2)中制备复合多糖修饰的胶原蛋白凝胶组分的具体步骤如下:

S1: 纯化后的马齿苋多糖0-5℃条件下溶于含氢氧化钠和氯化钠的混合溶液中,缓慢滴加氯乙醇,室温反应5-6小时后升温至60℃继续反应,反应结束后调至中性,抽滤,透析袋透析,透析后通过超滤分离纯化,浓缩产物,醇沉,所得沉淀洗涤,真空干燥,得到羟乙基取代修饰的多糖粉末;

S2: 取上述羟乙基取代的马齿苋多糖溶于0.1-0.3M碳酸氢钠溶液中,加入透明质酸以及任选的硫酸软骨素,搅拌均匀得到多糖混合液,然后加入胶原蛋白至1.0-2.5wt%,震荡摇匀;加入还原催化剂及有机溶剂,搅拌反应;反应结束后加入醋酸进行酸化处理,超滤离心;所得沉淀重悬离心3-4次,冷冻干燥,获得多糖修饰的胶原蛋白凝胶组分;

其中,步骤(3)中制备溶胀性复合多糖凝胶组分的具体步骤如下:

S1: 称取透明质酸钠和纯化后的马齿苋多糖,用葡甘聚糖溶液搅拌溶解,得到复合多糖溶液,调节pH值至4-5;然后在室温及搅拌下向溶液中缓慢滴加交联剂;

S2: 滴加完毕后搅拌反应12-16h,反应完毕后旋蒸浓缩,降温,醇沉,抽滤,固形物洗涤后干燥,得溶胀性复合多糖凝胶组分。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(4)中制备负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石步骤如下:

将硫酸软骨素或羧甲基壳聚糖溶解于去离子水中配制成溶液,加入纳米羟基磷灰石,37℃加热搅拌1-2h后,加入马齿苋黄酮以及可溶性钙盐,继续保温搅拌3-6h,反应结束后将混合液在干燥箱中低温真空干燥,所得固体经研磨得到负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石颗粒。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中从马齿苋中联合提取多糖及总黄酮步骤如下:

S1: 对马齿苋进行脱脂处理,从脱脂液中提取马齿苋总黄酮;

S2: 从脱脂马齿苋中提取粗多糖,采用胶束介质萃取方法对粗多糖进行联合除杂,所得多糖进行透析处理;

其中,步骤S1中得到总黄酮初提物浓缩液后,将浓缩液用65-75%乙醇稀释,石油醚萃取,除脂;脱脂后的萃取液用大孔吸附树脂柱进行梯度洗脱,依次用去离子水、50%乙醇、75%乙醇进行洗脱,洗脱过程中紫外检测扫描吸收峰,直至洗脱液无色且无吸收峰出现时,停止洗脱,收集含黄酮洗脱液;蒸发析出马齿苋总黄酮类化合物晶体。

4. 根据权利要求3所述的制备方法,其特征在于,步骤S2中的具体流程为:

(1) 将脱脂处理过的马齿苋粉末与去离子水混合,超声提取2-3次,过滤,合并提取液,将提取液在蒸发器中蒸发浓缩,4℃下将浓缩滤液用95%乙醇或无水乙醇进行醇沉,得到粗

多糖沉淀,依次用无水乙醇、丙酮淋洗,干燥,即得马齿苋粗多糖;

(2) 配制胶束介质萃取液:取适量十六烷基三甲基溴化铵溶于庚烷、50%体积分数的丁醇溶液组成的混合溶剂中,充分混匀,得到胶束介质萃取液,其中十六烷基三甲基溴化铵在溶液中的质量分数为3-10%;

将马齿苋粗多糖溶于蒸馏水,配制成粗多糖溶液,加入NaCl至质量分数3-5%进行盐化;然后加入胶束介质萃取液,剧烈震荡萃取10-15min,然后高速离心分层,取下层溶液,得到多糖提取液;其中,胶束介质萃取液加入量为粗多糖溶液体积的20-25%;

(3) 将经萃取处理的多糖溶液进行蒸发浓缩,然后在5KD截留分子量的透析袋中用蒸馏水透析24-36h,得到透析处理的多糖溶液,将透析液旋转蒸发浓缩,析出的多糖用无水乙醇洗涤,冷冻干燥,从而得到高纯马齿苋多糖。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,制备溶胀性复合多糖凝胶组分具体操作如下:

S1:称取重量比为1:1-2的透明质酸钠和纯化马齿苋多糖,用60-100倍重量的魔芋葡甘聚糖溶液搅拌溶解得到复合多糖溶液,向其中滴加醋酸调节溶液的pH值至4-5;然后在室温及搅拌下向溶液中缓慢滴加2-3wt%的碳二亚胺溶液,碳二亚胺用量为透明质酸质量的1-3%;其中,所述魔芋葡甘聚糖溶液的浓度为0.3-0.5wt%;

S2:滴加完毕后继续搅拌反应12-16h,反应完毕后旋蒸浓缩,降温,向浓缩液中加入4-5倍质量的95%乙醇溶液进行沉淀,抽滤,固形物用无水乙醇洗涤,真空干燥,得溶胀性复合多糖凝胶组分。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述制备负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石具体操作如下:

将硫酸软骨素或羧甲基壳聚糖溶解于去离子水中配制成质量分数为1-1.5%的溶液,加入溶液质量40-60wt%的纳米羟基磷灰石,在37℃加热搅拌1-2h后,加入马齿苋黄酮乙醇溶液以及可溶性钙盐,继续保温搅拌3-6h,反应结束后将混合液在干燥箱中低温真空干燥,所得固体经研磨得到负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石颗粒;其中,纳米羟基磷灰石:马齿苋黄酮质量比为100:0.5-5;可溶性钙盐用量为纳米羟基磷灰石质量的1-3%。

7. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤(5)混合复配具体操作如下:

将制备的多糖修饰的胶原蛋白凝胶组分、溶胀性复合多糖凝胶组分以及负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石进行混合复配,得到所述医用凝胶填料;其中,胶原蛋白凝胶组分、溶胀性复合多糖凝胶组分以及负载型纳米羟基磷灰石的质量比为1:(1-3):(0.1-0.3);优选地,所述组分的质量比为1:(1.5-2):(0.1-0.2)。

8. 根据上述权利要求1-7任一项所述制备方法得到的溶胀型医用生物凝胶填料。

9. 根据上述权利要求1-7任一项所述制备方法得到的溶胀型医用生物凝胶填料在制备创面止血消炎敷料或拔牙后牙槽填充医用材料中的应用。

基于马齿苋多糖及黄酮提取物的溶胀型医用生物凝胶填料

技术领域

[0001] 本发明属于医用材料领域,具体涉及一种基于马齿苋多糖及黄酮提取物等生物大分子的溶胀型医用生物凝胶填料及其制备方法。

背景技术

[0002] 马齿苋属于马齿苋科植物,在我国分布广泛,易栽培,可食用,还具有药用价值,具有清热、解毒、凉血功效。研究报道,马齿苋提取物具有抗炎作用,可制备抗炎药物,进一步研究表明,马齿苋提取物中含有多糖、生物碱、黄酮类等成分,对血管有收缩作用,能促进上皮细胞生长,有利于溃疡愈合。虽然现有技术对于马齿苋多糖和黄酮均有提取的报道,但是迄今为止还未有同时提取高纯马齿苋多糖和黄酮并将其联合应用的报道。CN108542926A公开了一种马齿苋提取物的制备方法和药物组合物及其应用,所提供的制备方法包括以下步骤:称取马齿苋粉,脱脂,加入提取溶剂,于30℃~50℃下进行提取,过滤,收集提取液,减压浓缩,干燥,即得;脱脂包括:将马齿苋粉置于石油醚中回流提取,然后于通风处完全挥发石油醚;提取溶剂为醇水溶液,醇水溶液的醇浓度为0~75%;对马齿苋提取物进行活性成分的检测,测得生物碱的含量0.056%,黄酮类的含量4.45%。

[0003] 虽然该方法获得马齿苋水提取物,且具有一定的抗炎活性,然而该法提取物中包括多种物质,成分复杂,且有效活性成分的纯度较低。

[0004] 在日常生活中,创面的止血消炎是常见的情形,现有技术也开发了多种止血材料,例如蛋白粘合止血剂、壳聚糖止血剂等,通常以矿物质颗粒、高分子多糖、凝血酶、纤维蛋白原以及氯化钙等为组成成分。然而,虽然矿物质组分性质稳定、易于携带且止血效果明显,但是使用过程中与血液接触容易形成血栓,而凝血酶和蛋白等组分保质期短,长时间保存后性质不稳定。目前将生物多糖应用于止血主要有壳聚糖、纤维素类。壳聚糖具有凝血、抑菌、促进伤口愈合等多种作用,例如壳聚糖止血带。尽管壳聚糖材料能够覆盖伤口,但是仅能轻度地阻止伤口出血,这是由于壳聚糖的止血效果有限,其形成血凝块的时间较长,且不易黏附在出血较多的伤口部位,导致止血效果较差。因此,目前现有技术中缺乏高效且生物安全性较高的止血材料。

[0005] 牙齿诊疗也是另外一种经常需要止血填料的情形,尤其是涉及拔牙操作或牙齿外力脱落导致的牙槽,需要进行拔牙后的牙槽填充进行消炎止血。目前填充材料通常在整形外科应用,包括有生物型和合成型填充材料。例如交联透明质酸及胶原因具有较好的安全性和组织相容性而得到广泛应用。但是透明质酸不具有消炎作用且原料价格较高,导致其使用受到限制。虽然生物多糖类填充材料如纤维素类及壳聚糖类不具备炎性反应,具有较好的生物安全性和组织相容性,越来越得到重视。然而,该类材料的成型支撑性较差,用于牙槽等较大凹陷的填充时,容易在组织液渗透下形成流体而流失,因此骨架型填充材料更为适合口腔牙槽填充。另外,鉴于口腔部位细菌密集,该材料有必要具有一定的抗菌消炎特性。而目前尚未有集吸收渗液、止血、消炎一体的骨架支撑性多糖类填充材料的报道。

[0006] 对生物分子材料进行修饰是改善材料的有效方法,例如通过交联降低多糖的水溶

性,以更好地黏附于创面。CN1387923A公开了一种无细胞真皮支架,用胰蛋白酶和戊二醛处理乳猪皮而得,但其渗透性差,创面易产生积液、积气,且抗菌性能不足。

[0007] 硫酸软骨素是一类糖胺聚糖,具有抗凝血作用。将其修饰在生物相容性差的材料(例如矿物质)表面能够改善材料的生物相容性,利于创面粘附,加速创面愈合。

[0008] 羟基磷灰石(hydroxyapatite,HAP)具有可控的生物降解性、良好的生物相容性和生物活性。研究显示,球状纳米HAP(n-HAP)利用其较大的比表面积,能吸附蛋白质、多肽类、疫苗等生物活性药物。

[0009] 透明质酸是酸性粘多糖,由葡糖胺和葡萄糖醛酸通过糖苷键连成,具有高保水性,可以隔离保护创面,防止感染,并可加快创口愈合。在填充材料上用透明质酸修饰,可提高填料的创面恢复能力。

[0010] 但是到目前为止,还未见对于马齿苋多糖或修饰的多糖衍生物用于医用填充材料的报道。

[0011] 现有技术利用生物大分子作为医用材料的现有技术可列举如下。

[0012] CN 108752529 A公开了一种淀粉-丙烯酸盐-普鲁兰多糖半互穿网络聚合材料及制备方法。将淀粉加入到蒸馏水中,加热糊化并搅拌均匀,得到糊化淀粉;将丙烯酸加入到蒸馏水中,滴加碱性溶液至中和度为70%~90%,得到丙烯酸盐溶液;搅拌条件下依次将丙烯酸盐溶液、普鲁兰多糖、引发剂和交联剂加入到糊化淀粉中,然后置于微波反应器中反应,反应产物经洗涤、干燥、粉碎,得到产物。所得材料可作为生物医学、制药技术中的新型生物材料或作为农业领域中的保湿材料。

[0013] CN106478994A涉及一种基于海藻多糖的聚电解质高吸水材料的制备方法。首先将适量海藻多糖和羧甲基壳聚糖溶解于去离子水中,通过降低聚电解质混合物水溶液的pH值,使海藻多糖分子和羧甲基壳聚糖分子间通过库仑力相互作用形成复合物并凝胶化,聚电解质复合物凝胶经干燥后得到具有超高吸水能力的海藻多糖聚电解质高吸水材料。

[0014] CN 106905553 A公开了一种生物多糖层层自组装修饰的醋酸纤维素膜材料及其制备方法;该方法制备的醋酸纤维素膜材料具有优异的抗凝血、抗菌和抗氧化活性三种功能,用于血液过滤、血液透析等生物医用高分子材料领域。

[0015] CN 107486562 A公开了一种植物多糖提取物还原金属盐制备金属纳米材料的方法,是将金属盐与植物多糖提取物按混合,加水搅拌使其充分络合,再加入碱液继续搅拌,然后置于微波中进行微波处理,冷却,洗涤,干燥,即得金属纳米材料。制备金属纳米材料中,植物源性多糖提取物作为还原剂和支撑材料,具有生物降解性和生物安全性,能够有效地减少有毒化学品使用,对环境起到了保护作用,同时能够克服金属纳米材料合成后的团聚缺陷,具有较大的应用潜力。将其作为电极修饰材料,构建葡萄糖传感器应用于葡萄糖的检测,选择性好、灵敏度高;对埃希氏杆菌属、金黄色葡萄糖球菌、根霉菌、毛霉菌等具有较高的抗菌率,具有明显的广谱抗菌性。

[0016] CN 107383236 A公开了一种新型水溶性天然多糖抗菌材料。所述新型水溶性天然多糖抗菌材料,其分子上既带有胍基又带有氨基酸基团,在提高壳聚糖抗菌性能的同时,兼顾了其生物安全性,细胞毒性小,是一种绿色抗菌产品。

[0017] CN108892124公开了一种石墨烯/纳米羟基磷灰石复合材料,其通过以下步骤制得:步骤一:以天然多糖为模板剂,水热法合成准球形的聚合物基纳米羟基磷灰石;步骤二:

在350℃-700℃范围内,对聚合物基纳米羟基磷灰石进行热处理,制备所述石墨烯/纳米羟基磷灰石复合材料。所得的石墨烯/纳米羟基磷灰石复合材料对胰岛素具有较好的缓释效果,生物利用度高。

[0018] 尽管现有技术中公开了多种基于天然多糖等生物材料的医用材料,但是关于具有兼顾止血、抗菌和组织填充的医用材料及制备方法尚缺乏研究。

发明内容

[0019] 本发明的目的在于克服现有技术中医用凝胶填料成型韧性及抗菌性差的缺点,提供一种基于马齿苋多糖及黄酮提取物的溶胀型医用生物凝胶填料及其制备方法,所制备出的凝胶填料吸水膨胀后具有较高的成型性,并具有较好的抗凝血性以及优良抗菌活性。

[0020] 本发明的医用凝胶可用于创面止血、创面修复的填料/敷料或牙科拔牙后的牙槽凹陷填充,其中,所述创面包括血液、组织液渗出的创面。本发明的医用凝胶尤其可作为牙科拔牙后的止血消炎凝胶填料。

[0021] 本发明的技术方案如下。

[0022] 本发明提供一种基于马齿苋多糖及黄酮提取物的溶胀型医用生物凝胶填料,其包括马齿苋中联合提取多糖及总黄酮、复合多糖修饰的胶原蛋白凝胶组分、溶胀性复合多糖凝胶组分以及负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的负载型纳米羟基磷灰石。

[0023] 本发明还提供上述溶胀型医用生物凝胶填料的制备方法,包括如下步骤:

[0024] (1) 从马齿苋中联合提取多糖及总黄酮;

[0025] (2) 制备复合多糖修饰的胶原蛋白凝胶组分;

[0026] (3) 制备溶胀性复合多糖凝胶组分;

[0027] (4) 制备负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石;

[0028] (5) 混合复配。

[0029] 其中,所述制备复合多糖修饰的胶原蛋白凝胶组分步骤如下:

[0030] S1:纯化后的马齿苋多糖0-5℃条件下溶于含氢氧化钠和氯化钠的混合溶液中,缓慢滴加氯乙醇,室温反应5-6小时后升温至60℃继续反应,反应结束后调至中性,抽滤,透析袋透析,透析后通过超滤分离纯化,浓缩产物,醇沉,所得沉淀洗涤,真空干燥,得到羟乙基取代修饰的多糖粉末;

[0031] S2:取上述羟乙基取代的马齿苋多糖溶于0.1-0.3M碳酸氢钠溶液中,加入透明质酸以及任选的硫酸软骨素,搅拌均匀得到多糖混合液,然后加入胶原蛋白至1.0-2.5wt%,震荡摇匀;加入还原催化剂及六氟异丙醇,搅拌反应;反应结束后加入醋酸进行酸化处理,超滤离心;所得沉淀重悬离心3-4次,冷冻干燥,获得多糖修饰的胶原蛋白凝胶组分。

[0032] 其中,所述制备溶胀性复合多糖凝胶组分步骤如下:

[0033] S1:称取透明质酸钠和纯化后的马齿苋多糖,用葡甘聚糖溶液搅拌溶解,得到复合多糖溶液,调节pH值至4-5;然后在室温及搅拌下向溶液中缓慢滴加交联剂;

[0034] S2:滴加完毕后搅拌反应12-16h,反应完毕后旋蒸浓缩,降温,醇沉,抽滤,固形物洗涤后干燥,得溶胀性复合多糖凝胶组分。

[0035] 其中,所述制备负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石步骤如下:

[0036] 将硫酸软骨素或羧甲基壳聚糖溶解于去离子水中配制成溶液,加入纳米羟基磷灰

石,37℃加热搅拌1-2h后,加入马齿苋黄酮以及可溶性钙盐,继续保温搅拌3-6h,反应结束后将混合液在干燥箱中低温真空干燥,所得固体经研磨得到负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石颗粒。

[0037] 具体地,各步骤操作流程如下。

[0038] 步骤(1):从马齿苋中联合提取多糖及总黄酮

[0039] S1:对马齿苋进行脱脂处理,从脱脂液中提取马齿苋总黄酮;

[0040] S2:从脱脂马齿苋中提取粗多糖,采用胶束介质萃取方法对粗多糖进行联合除杂,所得多糖进行透析处理。

[0041] 其中,步骤S1中的具体流程为:

[0042] 1) 马齿苋茎叶经恒温烘干,粉碎过40-60目筛,得马齿苋粉末;在索氏提取器中马齿苋粉末用95-99%乙醇浸3-12h,50-60℃下进行索氏提取1-5h。

[0043] 2) 将上述处理液减压蒸馏,得到总黄酮初提物浓缩液;将浓缩液用65-75%乙醇稀释,石油醚萃取,除脂;脱脂后的萃取液用大孔吸附树脂柱进行梯度洗脱,依次用去离子水、50%乙醇、75%乙醇进行洗脱,洗脱过程中紫外检测扫描吸收峰,直至洗脱液无色且无吸收峰出现时,停止洗脱,收集含黄酮洗脱液;蒸发析出马齿苋总黄酮类化合物晶体。

[0044] 其中,洗脱液样品的紫外检测方法为:取洗脱液于比色管中,依次加5%亚硝酸钠溶液、10%硝酸铝溶液、4%氢氧化钠溶液,摇匀放置,用75%乙醇稀释。在紫外分光光度计上于460~560nm波长范围内扫描吸收峰。

[0045] 其中,步骤S2中的具体流程为:

[0046] 1) 将脱脂处理过的马齿苋粉末与去离子水混合,超声提取2-3次,过滤,合并提取液;将提取液在蒸发器中蒸发浓缩;4℃下将浓缩滤液用95%乙醇或无水乙醇进行醇沉,得到粗多糖沉淀,依次用无水乙醇、丙酮淋洗,干燥,即得马齿苋粗多糖。

[0047] 2) 配制胶束介质萃取液:取适量十六烷基三甲基溴化铵溶于庚烷、50%体积分数的丁醇溶液组成的混合溶剂中,充分混匀,得到胶束介质萃取液,其中十六烷基三甲基溴化铵在溶液中的质量分数为3-10%;

[0048] 将马齿苋粗多糖溶于蒸馏水,配制成粗多糖溶液,加入NaCl至质量分数3-5%进行盐化;然后加入胶束介质萃取液,剧烈震荡萃取10-15min,然后高速离心分层,取下层溶液,得到脱蛋白、色素等杂质的多糖提取液。其中,胶束介质萃取液加入量为粗多糖溶液体积的20-25%。

[0049] 3) 将经萃取处理的多糖溶液进行蒸发浓缩,然后在5KD截留分子量的透析袋中用蒸馏水透析24-36h除盐及小分子杂质,得到透析处理的多糖溶液。将透析液旋转蒸发浓缩,析出的多糖用无水乙醇洗涤,冷冻干燥,从而得到高纯马齿苋多糖。

[0050] 步骤(2):制备多糖修饰的胶原蛋白凝胶组分,具体操作如下:

[0051] S1:制备低羟乙基取代的马齿苋多糖

[0052] 称取部分纯化后的马齿苋多糖,0-5℃条件下溶于含1wt%氢氧化钠和3wt%氯化钠混合溶液中(多糖与混合溶液的质量比为1:80-100),缓慢滴加2-氯乙醇(用量为0.1-0.3ml/g多糖),室温反应5-6小时后,升温至60℃继续反应2-3小时,反应结束待反应液冷却至室温后用0.5-1M盐酸调至中性,抽滤,滤液用截留分子量为10000的透析袋透析,透析后通过超滤分离纯化,浓缩产物,加入乙醇沉淀浓缩液,离心所得沉淀依次用丙酮、乙醚洗涤,

真空干燥,得到羟乙基取代修饰的多糖粉末,备用(羟乙基取代度为0.10-1)。

[0053] S2:取上述羟乙基取代的马齿苋多糖溶于0.1-0.3M碳酸氢钠溶液中形成质量浓度为0.5-1.5%的溶液,加入透明质酸至0.1-0.5wt%,以及任选的硫酸软骨素0.3-0.5wt%(如果存在的话),搅拌均匀得到多糖混合液,然后加入胶原蛋白至1.0-2.5wt%,震荡摇匀;向混匀后的溶液中加入催化剂氰基硼化钠至0.1-0.3wt%,并加入体积量为溶液体积30-50%的六氟异丙醇,避光条件下37℃搅拌反应16-24h;反应结束后加入等体积的8-10%醋酸水溶液(v/v)进行酸化处理15-30min,超滤(截留分子量为10kDa)离心20~30min;所得沉淀用上述醋酸溶液重悬离心3-4次以充分除去杂质,将所得产物于-80℃冷冻过夜,冻干机冷冻干燥,从而获得多糖修饰的胶原蛋白凝胶组分。

[0054] 该步骤中,在还原催化剂作用下,多糖醛基与胶原蛋白氨基基团在加热条件下缩合形成席夫碱基,从而得到多糖修饰的胶原蛋白。其中,多糖和胶原蛋白都是来自机体组织本身的纯天然材料,具有很好的生物相容性,不仅可以隔离创面,还可以促进诱导创面组织愈合,更重要的是,修饰后的胶原蛋白对溶胀后的凝胶具有一定的成型支撑性。

[0055] 步骤(3):制备溶胀性复合多糖凝胶组分

[0056] S1:称取重量比为1:1-2的透明质酸钠和纯化马齿苋多糖,用60-100倍重量的魔芋葡甘聚糖溶液(葡甘聚糖浓度0.3-0.5wt%)搅拌溶解,得到复合多糖溶液,向其中滴加醋酸调节溶液的pH值至4-5;然后在室温及搅拌下向溶液中缓慢滴加2-3wt%的碳二亚胺溶液作为交联剂,碳二亚胺用量为透明质酸质量的1-3%;

[0057] S2:滴加完毕后继续搅拌反应12-16h,使得溶液中的多糖充分交联;反应完毕后旋蒸浓缩,降温,向浓缩液中加入4-5倍质量的95%乙醇溶液进行沉淀,抽滤,固形物用无水乙醇洗涤,真空干燥,得溶胀性复合多糖凝胶组分。

[0058] 步骤(4):制备负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石

[0059] 将硫酸软骨素或羧甲基壳聚糖溶解于去离子水中配制成质量分数为1-1.5%的溶液,加入溶液质量40-60wt%的纳米羟基磷灰石(粒径范围50nm-800nm),在37℃加热搅拌1-2h后,加入马齿苋黄酮乙醇溶液(纳米羟基磷灰石:马齿苋黄酮质量比为100:0.5-5),以及可溶性钙盐(用量为纳米羟基磷灰石质量的1-3%),继续保温搅拌3-6h,反应结束后将混合液在干燥箱中低温真空干燥,所得固体经研磨得到负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石颗粒。

[0060] 步骤(5):混合复配

[0061] 将上述制备的多糖修饰的胶原蛋白凝胶组分、溶胀性复合多糖凝胶组分以及负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石进行混合复配,得到所述医用凝胶填料;其中,胶原蛋白凝胶组分、溶胀性复合多糖凝胶组分以及负载型纳米羟基磷灰石的质量比为1:(1-3):(0.1-0.3)。

[0062] 优选地,所述组分的质量比为1:(1.5-2):(0.1-0.2)。

[0063] 进一步地,还可将胶原蛋白凝胶组分、溶胀性复合多糖凝胶组分以及负载型纳米羟基磷灰石用蒸馏水溶解后搅拌形成混合凝胶液,然后通过真空冷冻干燥、研磨粉碎制得合适颗粒大小的医用凝胶填料。

[0064] 进一步地,还包括消毒步骤:将所得凝胶材料辐照消毒,放入常温或-4℃无菌环境密封保存。

[0065] 示例性地,制备涂覆本发明所述抗菌医用凝胶的创口贴医用胶布步骤如下:将所述凝胶填料用去离子水溶解配制成1-2wt%的溶胶液,将醋酸纤维素膜或吸水垫片加入到溶胶液中浸泡5-10min,然后取出真空干燥,从而得到表面覆盖凝胶的膜/片,将膜片贴合于纱布、胶布等材料,即可得到具有消炎杀菌吸液效果的医用创口贴,具有止血、护创作用。

[0066] 另外,本发明还提供所述凝胶填料在创面止血消炎或拔牙后牙槽填充方面的应用。

[0067] 本发明的有益技术效果为:

[0068] (1) 本发明所制备的医用凝胶填料,在改善吸液能力、保证生物安全性的前提下提高了凝胶的抑菌消炎性能。对于该材料分子含有的马齿苋黄酮类消炎成分,溶胀后的凝胶具有缓释功能。

[0069] (2) 相比较单独的天然多糖水凝胶,本发明的多糖修饰的胶原蛋白凝胶组分可显著提高凝胶溶胀后的成型韧性和抗张强度,较强的机械韧性克服了现有的壳聚糖类止血剂对于创面低黏附的弊端,有利于止血凝血,更有利于拔牙后的牙槽成型式填充。本发明凝胶填料具有低吸水性蛋白骨架组分以及高吸液膨胀性的复合多糖组分,兼具支撑性和吸液后韧性,不易随液流失,适合作为止血性填充材料。

[0070] (3) 天然复合多糖/胶原蛋白凝胶组成的双凝胶网络生物毒性低、生物相容性好,兼具溶胀性和支撑性,其中含有的钙离子等组分显著降低出血时间,有利于快速止血、加速创面愈合。将富含羟基和胺基的硫酸软骨素吸附在羟基磷灰石之后再吸附钙离子和黄酮化合物,硫酸软骨素介联之后可显著增强羟基磷灰石的吸附能力,并具有缓释作用。

[0071] (4) 胶原蛋白和马齿苋多糖成本较低,来源丰富,适合工业化生产。

附图说明

[0072] 图1为实施例6中凝胶填料溶胀后的凝胶断面形貌图(SEM×500)。

具体实施方式

[0073] 下面通过具体的制备例和实施例对本发明进行详细说明,但这些实施方式仅用来例举本发明,并非对本发明的实际保护范围构成任何形式的任何限定,更非将本发明的保护范围局限于此。

[0074] 实施例1

[0075] 从马齿苋中提取高纯度多糖及总黄酮类

[0076] 1) 将1kg干燥的马齿苋茎叶烘干,粉碎过60目筛得马齿苋粉末;所得马齿苋粉末用95%体积分数的乙醇浸泡3h后,分批在索氏提取器中于55℃下进行索氏提取2h。

[0077] 2) 将所得提取液减压蒸馏浓缩,得到浓缩液约460ml;将浓缩液用等体积的75%乙醇稀释后,用石油醚萃取除脂;脱脂后的萃取液用大孔吸附树脂柱进行梯度洗脱,依次用去离子水、50%乙醇、75%乙醇进行洗脱,洗脱过程中紫外检测扫描吸收峰,收集含黄酮洗脱液;蒸发浓缩结晶,析出马齿苋总黄酮类化合物晶体约14g。

[0078] 其中,洗脱液样品的紫外检测方法为:取洗脱液于比色管中,依次加5%亚硝酸钠溶液、10%硝酸铝溶液、4%氢氧化钠溶液,摇匀放置,用75%乙醇稀释。在紫外分光光度计上于520-550nm波长范围内扫描吸收峰。

[0079] 3) 将步骤1)中乙醇提取处理过的马齿苋粉末与10L去离子水混合,90℃浸提2h,然后超声提取2次,每次30min,过滤,合并提取液;将提取液在蒸发器中蒸发浓缩至680ml;4℃下将浓缩滤液用5倍体积的95%乙醇进行醇沉,得到粗多糖沉淀,依次用无水乙醇、丙酮淋洗,干燥,即得马齿苋粗多糖。

[0080] 4) 取十六烷基三甲基溴化铵溶于庚烷、50%体积分数的丁醇溶液(庚烷、50%丁醇=3:1)组成的混合溶剂中,充分混匀,得到胶束介质萃取液,其中十六烷基三甲基溴化铵在溶液中的质量分数为4%。

[0081] 将上述得到的马齿苋粗多糖溶于蒸馏水,配制成5%的粗多糖溶液,加入NaCl至质量分数3%进行盐化;然后加入胶束介质萃取液(加入量为粗多糖溶液体积的25%),剧烈震荡萃取15min,脱除蛋白、色素等杂质,然后高速离心分层,取下层溶液,得到多糖提取液。

[0082] 5) 将上述多糖提取液进行蒸发浓缩至880ml左右,然后分装在5KD截留分子量的透析袋中用蒸馏水透析3次除盐及小分子杂质,总透析时间24h,得到透析处理的多糖溶液。将透析处理后的多糖溶液蒸发浓缩结晶,析出的多糖用无水乙醇洗涤,干燥,从而得到高纯马齿苋多糖粉末约82g。

[0083] 实施例2

[0084] 制备修饰的胶原蛋白凝胶组分

[0085] (1) 制备低羟乙基取代的马齿苋多糖

[0086] 称取纯化后的多糖20.8g,4℃下溶于含1wt%氢氧化钠和3wt%氯化钠的1.6kg混合溶液中,缓慢滴加2-氯乙醇2.5ml,室温反应5小时后,升温至60℃继续反应2小时,反应结束后待反应液冷却至室温后用1M盐酸调至中性,抽滤,滤液用截留分子量为10000的透析袋透析,透析后通过超滤分离纯化,浓缩产物至110ml,加入500ml的95%乙醇沉淀浓缩液,离心所得沉淀,然后依次用丙酮、乙醚洗涤,真空干燥,得到低羟乙基取代修饰的多糖粉末。

[0087] (2) 将上述羟乙基取代的马齿苋多糖溶于1.8L的0.2M碳酸氢钠溶液中形成约1.3wt%的多糖溶液,加入透明质酸至0.5wt%,以及硫酸软骨素0.3wt%,搅拌均匀得到复合多糖混合液,然后加入胶原蛋白至2wt%,震荡摇匀;向混匀后的溶液中加入催化剂氰基硼化钠2.6g,并加入650ml六氟异丙醇,避光条件下37℃搅拌反应16h;反应结束后加入等体积的8%醋酸水溶液(v/v)进行酸化处理30min,超滤离心30min(截留分子量为10kDa);所得沉淀用上述醋酸溶液重悬离心3次以充分除去杂质,将所得产物于-80℃冷冻过夜,冻干机冷冻干燥,从而获得多糖修饰的胶原蛋白凝胶组分约75g。

[0088] 实施例3

[0089] 制备溶胀性复合多糖凝胶组分

[0090] (1) 称取等重量的透明质酸钠和纯化后的马齿苋多糖共50.4g,用3.5L魔芋葡甘聚糖溶液(葡甘聚糖浓度0.45wt%)搅拌溶解,得到复合多糖溶液,向其中滴加醋酸调节溶液的pH值至4.5;然后在室温及搅拌下向溶液中缓慢滴加2wt%的碳二亚胺溶液作为交联剂,滴加量共28ml;

[0091] (2) 滴加完毕后继续搅拌反应16h,反应完毕后蒸发浓缩至380ml,向浓缩液中加入5倍质量的95%乙醇溶液进行醇沉,抽滤过滤,固形物用无水乙醇洗涤,真空干燥,研磨粉碎,得粉末状的溶胀性复合多糖凝胶组分约65g。

[0092] 实施例4

[0093] 制备负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石

[0094] 将5g硫酸软骨素溶解于去离子水中配制成质量分数为1%的溶液500ml,加入200g纳米羟基磷灰石(粒径100-200nm),在37℃加热搅拌1h后,加入乙醇溶解的马齿苋黄酮(其中含上述实施例提取得到的马齿苋黄酮3.2g),以及氯化钙2g,继续保温搅拌6h,反应结束后将混合液在干燥箱中55℃真空干燥,研磨所得固体,得到负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石颗粒约208g。

[0095] 实施例5

[0096] 制备医用溶胀型凝胶填料

[0097] 将上述各相应实施例制备的胶原蛋白凝胶组分15g、溶胀性复合多糖凝胶组分30g以及负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石3g进行混合复配,紫外辐照消毒后,放入-4℃无菌环境密封保存,从而得到医用溶胀型凝胶填料,记为填料1。

[0098] 实施例6

[0099] 制备医用溶胀型凝胶填料

[0100] 将上述各相应实施例制备的胶原蛋白凝胶组分10g、溶胀性复合多糖凝胶组分25g以及负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石2g进行混合复配,所得混合物用蒸馏水溶解,搅拌均匀形成混合凝胶液,然后将混合凝胶液-80℃冷冻后,通过真空冷冻干燥制得医用凝胶填料,紫外辐照消毒后,常温密封保存,从而得到医用溶胀型凝胶填料,记为填料2。根据图1所示的该凝胶断面图SEM照片,复合凝胶呈现出内部多孔且无明显相分离现象,内部孔道疏松相连,有利于复合凝胶的溶胀和响应性。

[0101] 对比实施例1

[0102] 将上述各相应实施例制备溶胀性复合多糖凝胶组分30g以及负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石3g进行混合复配,紫外辐照消毒后,密封保存,从而得到医用溶胀型凝胶填料,记为填料D1。

[0103] 对比实施例2

[0104] 将上述各相应实施例制备的胶原蛋白凝胶组分15g以及负载马齿苋黄酮提取物及钙离子的纳米羟基磷灰石3g进行混合复配,紫外辐照消毒后,密封保存,从而得到医用溶胀型凝胶填料,记为填料D1。

[0105] 实施例7

[0106] 制备含凝胶填料的医用贴布

[0107] 将实施例5所述凝胶填料用去离子水溶解配制成1wt%的溶胶液,将纤维素基吸水垫片置入溶胶液中浸泡5min,取出真空干燥,从而得到表面覆盖凝胶的垫片,将膜片贴合于开孔医用胶布,即可得到具有消炎杀菌、止血效果的医用创口贴。

[0108] 效果实施例1

[0109] 凝胶填料的抑菌试验

[0110] 试验方法:将本发明实施例制备的凝胶材料按照GB15979-2002标准对金色葡萄球菌进行抗菌性能测试。具体地,将本实施例5-7中的凝胶材料用去离子水溶解,制备成1mg/mL的初始浓度;取灭菌试管,依次半倍稀释(即0.5mg/mL,0.25mg/mL,0.125mg/mL以此类推),其中一管不添加凝胶填料作为空白对照。取各试管中溶液对金色葡萄球菌培养基涂菌平板进行涂板操作后,在37℃恒温恒湿培养箱中培养24小时后取出培养皿观察并测算抑菌

率,每组三个平行,取均值。抑菌率=1-(各组菌落密度/空白对照组菌落密度),以%表示(结果四舍五入取整数)。结果如下表1所示。

[0111] 表1凝胶材料抑菌能力

| | 组别 | 浓度 | 浓度 | 浓度 |
|--------|---------|-----------|-------------|--------------|
| | | /1(mg/ml) | /0.5(mg/ml) | /0.25(mg/ml) |
| [0112] | 凝胶填料 1 | 98% | 85% | 50% |
| | 凝胶填料 2 | 100% | 86% | 52% |
| | 凝胶填料 D1 | 95% | 78% | 40% |
| | 凝胶填料 D2 | 92% | 68% | 24% |

[0113] 实验结果表明,该结果表明:本实施例制备的凝胶填料对金色葡萄球菌具有优良抑制性能。与两个对照组相比,实施例制备的凝胶填料抑菌效果显著增强。

[0114] 效果实施例2

[0115] 吸液溶胀效果

[0116] 分别称取100mg上述实施例5-7的凝胶材料,分别置于10ml的玻璃皿中;室温下往培养皿中缓慢滴加去离子水直至凝胶材料溶胀饱和、不能继续吸收为止,记录吸收的水分重量与凝胶本身重量的比例(溶胀率),从而测试凝胶填料的吸液性。

[0117] 结果如下表2所示。

[0118] 表2凝胶材料吸液能力

| | 组别 | 吸收水量(g) | 溶胀率 |
|--|---------|---------|--------|
| | | [0119] | 凝胶填料 1 |
| | 凝胶填料 2 | 4.6 | 46 |
| | 凝胶填料 D1 | 5.5 | 55 |
| | 凝胶填料 D2 | 2.8 | 28 |

[0120] 结果表明,溶胀性复合多糖凝胶组分含量越高,吸液溶胀能力越强。这说明,相比较胶原蛋白凝胶组分,溶胀性复合多糖凝胶组分的吸液能力更优。但是,胶原蛋白凝胶组分含量较高填料在溶胀后的成型韧性较好:参照GB/T1040.3对充分溶胀后上述凝胶进行拉伸强度(抗张强度(MPa)=试样断裂时承受的最大张力/试样断裂时的横截面积)测试发现,凝胶填料D2抗张强度可达1.14MPa,显著高于凝胶填料D1的0.72MPa。而凝胶填料1和凝胶填料2则分别为0.95MPa、0.90MPa,也显著高于缺乏胶原蛋白凝胶组分的填料D1。

[0121] 效果实施例3

[0122] 凝血效果的测定

[0123] 将耳静脉取血后的兔全血保存在36℃恒温水浴中。在EP试管中加入3ml全血,向每管中加入15mg实施例5-7的凝胶填料(用量比例5g填料/L全血),置于25℃恒温水浴架上,记录全血凝固时间,每组三个平行,取平均值,设不加入填料的空白组;每隔5-6s将样品倾斜一次,观察血液是否凝固。结果见下表3。

[0124] 表3凝胶材料凝血能力

| 组别 | 凝血时间(s) |
|---------|---------|
| 凝胶填料 1 | 70 |
| 凝胶填料 2 | 66 |
| 凝胶填料 D1 | 62 |
| 凝胶填料 D2 | 94 |
| 空白组 | 198 |

[0126] 由此可见,实施例的凝胶填料可使得凝血效率显著提高。

[0127] 应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;本领域的普通技术人员应当理解:对前述各实施例所记载的技术方案进行修改或者替换,并不脱离本发明各实施例技术方案的范围。

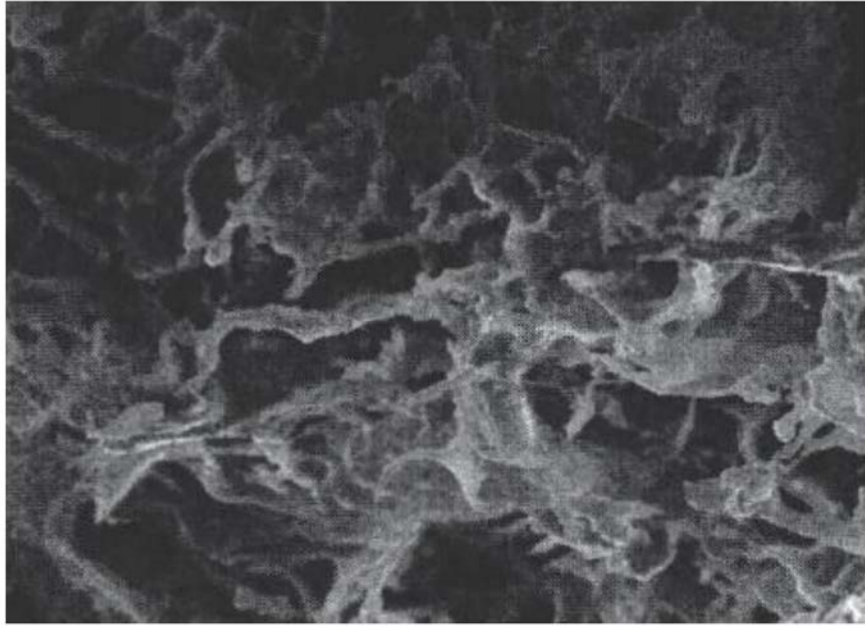


图1