http://pmse.scu.edu.cn

O-烷基壳聚糖的制备及其止血性能

丁若辰，周雯雯，陈 任，杨 健
（军事科学院系统工程研究院，天津 300161）

摘要：壳聚糖作为止血材料已获临床广泛应用，为进一步探究结构改性对止血性能的影响，文中设计制备出C6羟基接枝不同链长烷烃的O-烷基壳聚糖（OACS）。核磁共振氢谱和红外光谱分析证实烷烃链接枝成功；元素分析显示短链烷烃较长链更容易接枝在C6羟基上；X射线衍射和热重分析显示烷烃链破坏了壳聚糖晶区，热分解温度与接枝烷烃链长度无直接关联。相对分子质量测定结果显示相对分子质量和分子量分布与烷烃链长呈正相关；L02人正常肝细胞毒性实验结果显示，1 mg/mL不同烷烃链长度OACS的细胞增值率在83%~90%区间内；体外凝血实验表明，OACS较空白对照组凝血时间缩短63.4%～64.2%，具有促进纤维蛋白原转化成纤维蛋白、增加纤维蛋白原的凝固性以促进血液凝固的潜力，但烷烃链长度间差异不明显。

关键词：壳聚糖；O-烷基壳聚糖；羟基；烷基化改性；凝血
中图分类号：O636.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1000-7555（2025）07-0053-09

动脉血管破损导致的大出血是军事冲突、手术和意外事故中的致命因素，死亡率超过30%[1]。及时有效止血是降低伤亡率的关键措施，因此，高效、安全的快速止血剂是近二十年来创伤救治和军事医学中重要的研究内容[2]。临床应用中发现高岭土、纤维蛋白原、凝血酶等止血剂存在一定局限性[3]，如高岭土可能会对伤口造成二次伤害且易引发血栓；纤维蛋白原混合型止血剂存在病毒传播风险；凝血酶保存条件要求高，难以日常携行备用。壳聚糖（CS）由β-(1→4)糖苷键连接葡萄糖胺和N-乙酰基葡萄糖胺组成，价格低廉，生物相容性好，无毒易降解，能够进行羧甲基化、酰化、烷基化等改性[4]，是止血材料的研究重点之一。

壳聚糖单体C2位氨基上接枝烷烃链获得的N-烷基壳聚糖（NACS）可通过锚定细胞膜的脂质双分子层中疏水端增强凝血效果[5]。针对不同烷烃链长和取代度的NACS研究结果显示，取代度为3.85%的N-十八烷基壳聚糖凝血时间相比CS缩短50%[5]。基于N-烷基化壳聚糖通过浸渍法负载凹凸棒石（AT）制成的多孔复合海绵，可将红细胞和凝血因子集中在创面，激活凝血途径的同时降低AT的血栓风险[6]。N-十二烷基壳聚糖与明胶和聚乙烯醇交联后负载氧化石墨烯（GO），得到GO/N-CS/GEL/PVA复合海绵，一方面降低了GO自身的细胞毒性和溶血性，另一方面增强了凝血效果，体外凝血时间仅为普通医用纱布的34.5%[7]。

理论上，壳聚糖/甲壳素单体C6羟基也可以接枝烷烃链，然而O-烷基壳聚糖是否可作为止血材料应用尚未可知。本文以甲壳素（CT）为原料，选取不同链长的卤代烷烃对其C6羟基进行接枝，然后进行脱乙酰反应得到O-烷基壳聚糖（OACS）。通过^{1}H-NMR，FT-IR和XRD等表征手段对OACS分子结构进行了分析，进一步通过TGA测定了OACS的热稳定性。研究了不同链长、取代度的OACS对生物相容性和凝血性能的影响。结果显示，OACS表现出较好的凝血性能，丰富了壳聚糖烷基化改性的方式，

doi: 10.16865/j.cnki.1000-7555.2025.0128
收稿日期：2024-07-08
基金项目：国家重点研发计划项目（2022YFC3006202）
通讯联系人：杨健，主要从事医用材料及战创伤救治器材研究，E-mail: Johnwfu@qq.com

为拓展凝血效能提供了另一种可行思路。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

甲壳素(JK-1908001):浙江金壳药业股份有限公司;异丙醇:北京伊诺凯有限公司;氢氧化钠:国药集团化学试剂有限公司;氯丁烷:阿达玛斯试剂有限公司;氯辛烷、氯十二烷和四丁基溴化铵:阿拉丁试剂有限公司。APTT、PT、TT试剂盒、0.025 mol/L $CaCl_2$:上海太阳生物技术有限公司。以上试剂均为分析纯。

核磁共振仪:AV400型,美国Bruker公司;傅里叶变换红外光谱仪:470FT-IR型,美国Thermo公司;元素分析仪:RARIO EL III型,德国Elementar公司;热重分析仪:TGA55型,美国Discovery公司;冷冻干燥机:CDFT-10型,青岛永合创信电子科技有限公司;X射线衍射仪:XPert Pro型,荷兰Malvern公司;半自动凝血仪:PUN-204813型,北京普朗新技术有限公司;酶标仪:KHB ST360型,上海科华实验系统有限公司。

1.2 O-烷基壳聚糖的制备

将2 g甲壳素放入20 mL异丙醇中充分搅拌,加入预冷好的质量分数50%氢氧化钠溶液,在−20 ℃冷冻碱化12 h后过滤。将活化C6羟基的甲壳素加入溶有0.015 mol氯代烷(氯丁烷、氯辛烷、氯十二烷)与0.2 g四丁基溴化铵相转移催化剂的异丙醇中,在50 ℃持续搅拌4 h以上。洗涤后真空干燥得到3种烷基化甲壳素。分别将烷基化甲壳素按100 g/L投入50%的氢氧化钠溶液,于N_2气氛中70 ℃搅拌1 h以脱去乙酰基。经后处理得到O-丁烷基壳聚糖(OACS-4)、O-辛烷基壳聚糖(OACS-8)、O-十二烷基壳聚糖(OACS-12)。

1.3 测试与表征

1.3.1 脱乙酰度测定:称取0.2 g干燥后的OACS,用0.1 mol/L盐酸标准溶液完全溶解后加入5滴甲基橙-苯胺蓝指示剂,再用0.1 mol/L氢氧化钠滴定液返滴定,观察到红色褪去停止滴定。脱乙酰度(*DD*)按式(1)和式(2)计算

$$-NH_2=\frac{(C_1V_1-C_2V_2)\times 0.016}{m} \tag{1}$$

$$DD=\frac{-NH_2}{9.94} \tag{2}$$

式中:C_1,C_2——分别为盐酸和氢氧化钠溶液的摩尔浓度,mol/L;V_1,V_2——对应其消耗体积,mL;m——OACS样品质量。

1.3.2 核磁共振氢谱分析:用体积比2%氘代乙酸溶液溶解并稀释OACS样品得到5 mg/mL稀溶液,采用^{1}H-NMR对材料成分进行分析。

1.3.3 红外光谱分析:将OACS粉末与KBr混合压片制成透明薄片,傅里叶变换红外光谱扫描范围为400 ~ 4000 cm^{-1}。

1.3.4 元素分析:采用元素分析仪测定OACS样品中C,N元素的百分含量。壳聚糖的烷基链取代度(Degree of substitution,*DS*)按式(3)进行计算

$$DS=\left[\frac{7C}{6N}-8(1-x)-6x\right]/n \tag{3}$$

式中:C,N——碳、氮元素的百分含量;x——壳聚糖脱乙酰度;n——接枝烷烃链中C的数量(n = 4,8和12,分别对应于OACS-4,OACS-8和OACS-12)。

1.3.5 X射线衍射分析:X射线衍射仪在10° ~ 80°范围内进行扫描,确定各O-烷基壳聚糖的微观结构。

1.3.6 相对分子质量测定:GPC-MALLS测定各OACS的$\overline{M}_w$,$\overline{M}_n$,$\overline{M}_z$和$\overline{M}_w/\overline{M}_n$。

1.3.7 热重分析:N_2气氛下以30 °C/min升温速度测试OACS在25 ~ 500 °C范围内失重速率。

1.3.8 冻干形貌分析和孔隙率测定[8]:将OACS溶于0.5 g/L乳酸水溶液中,调节pH至5左右。48孔细胞培养板中每孔加入1 mL溶液,相同条件下进行冻干。将冻干的OACS于液氮中冷冻切割,用导电胶固定断面,对其表面进行2 ~ 3 min喷金处理,扫描电镜在5 kV加速电压下对OACS断面的微观形貌进行观察。采用乙醇置换法测定孔隙率[9],对OACS的尺寸进行测量并记录。称量其初始质量为m_0(单位g),充分浸泡吸收无水乙醇后质量为m_1(单位g),通过式(4)计算孔隙率(*P*)

$$P=\frac{m_1-m_0}{\rho V} \tag{4}$$

式中:ρ——无水乙醇密度,0.785 g/cm^3;V—海绵体积,cm^3。

1.3.9 细胞相容性分析:通过MTT比色法检测

OACS对L02细胞的细胞毒性[10]。OACS经γ射线辐照灭菌后，配置成1 mg/mL，0.25 mg/mL和0.0625 mg/mL溶液。将细胞接种于96孔板中，加入含10% FBS的DMEM培养基，在37 ℃（5% CO_2）培养24 h。去除培养基后，将正常DMEM培养基为空白对照组，样品DMEM培养基作为实验组加入96孔板，放入37 ℃（5% CO_2）继续培养24 h。弃去每孔培养基，每孔加入100 μL 10% MTT溶液，另行孵育4 h充分形成结晶。结束后去除MTT试剂，每孔加入150 μL DMSO溶剂甲臜结晶。用酶标仪在570 nm波长处读取各孔*OD*值，通过式(5)计算材料的细胞存活率（Cell viability，C_V）[11]

$$C_V(\mathrm{OACS}) = \frac{OD_{\mathrm{OACS}}}{OD_{\mathrm{Black}}} \tag{5}$$

式中：OD_{OACS}——实验组吸光度；OD_{Black}——空白对照组吸光度。

1.3.10　APTT，PT和TT凝血功能检测指标：将ICR小鼠抗凝全血以3000 r/min离心15 min左右，上清液为贫血小板血浆（PPP）。APTT测试中，将100 μL PPP与样品孵育10 min后吸至比色皿，加入100 μL APTT试剂后放入半自动凝血仪，37 ℃预热5 min，快速加入100 μL 37 ℃的$CaCl_2$溶液触发凝血，半自动凝血仪自动读取时间。PT测试中，将100 μL接触样品的PPP吸至比色皿后，在37 ℃环境中预热5 min，快速加入200 μL 37 ℃ PT试剂触发凝血，半自动凝血仪自动读取时间。TT测试中，除将TT试剂用量改为100 μL以外，其余步骤和PT测试完全相同。

1.3.11　体外全血凝固时间测定：混合ICR小鼠血液并检查，未观察到凝血或溶血现象。取20 mg测试样品加入10 mL试管中，37 °C温浴3 min后加入1 mL ICR小鼠抗凝全血混匀，温浴3 min后加入500 μL $CaCl_2$溶液，以此为起点每隔30 s左右将试管缓慢倾斜观察全血凝固情况，止血标志为试管倾斜180°时血液凝固，记录该时长为全血凝固时间（Whole blood coagulation time，WBCT）。

2　结果与讨论

2.1　脱乙酰度对比

CT进行O-烷基化处理后，仍不具备弱酸溶解性，强疏水性不利于凝血。脱乙酰化处理后得到的OACS溶解性显著提升，有利于材料与血液充分接触，加强与血液组分之间的相互作用。式(1)和式(2)计算结果见Tab.1。

Tab. 1　Degree of *DD* of OACS

OACS	V_1/mL	V_2/mL	*DD*/%
OACS-4	30.00	19.50	84.51
OACS-8	30.00	19.31	86.01
OACS-12	30.00	19.26	86.43

DD: degree of deacetylation

控制脱乙酰反应条件一致的情况下，酸碱滴定法测得的3种OACS的DD值相差不大，在84.51%~86.43%范围内，随取代烷烃链长度的增加，脱乙酰度呈略上升趋势。

2.2　核磁共振氢谱分析

壳聚糖和3种OACS的^{1}H-NMR光谱如Fig.1所示。CS的峰化学位移值：δ1.95（乙酰基上的—CH_3），δ3.07（—NH_2裂分成的2个等面积峰之一），δ3.50~δ3.90（H2，H3，H4，H5，H6）。OACS-4光谱在δ1.01~

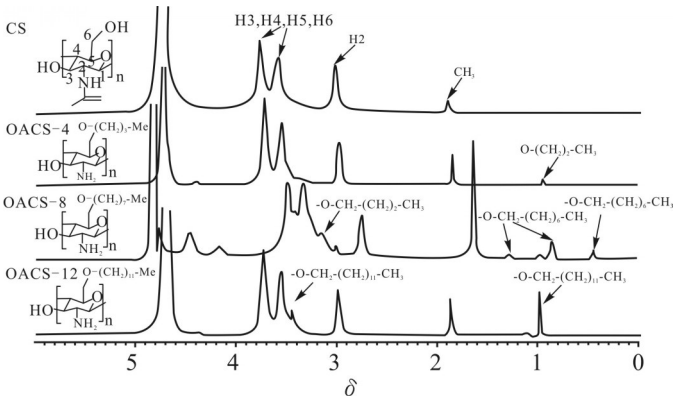


Fig. 1　^{1}H-NMR spectra of CS, OACS-4, OACS-8 and OACS-12

δ1.05（—O—$(CH_2)_3$—CH_3）处出现新峰；OACS-8光谱在 δ3.12（—O—CH_2—$(CH_2)_6$—CH_3），δ0.82 和 δ1.26（—O—CH_2—$(CH_2)_6$—CH_3），δ0.41（—O—$CH_2(CH_2)_6$—CH_3）处出现新峰；OACS-12 的光谱在 δ3.50（—O—CH_2—$(CH_2)_{11}$—CH_3），δ0.78~δ1.18（—O—CH_2—$(CH_2)_{11}$—CH_3）处出现新峰，其他位置峰不变。这表明丁烷基链、辛烷基链和十二烷基链均已成功接枝到壳聚糖链上。

2.3 红外光谱分析

CS和OACS的红外光谱如Fig.2所示。

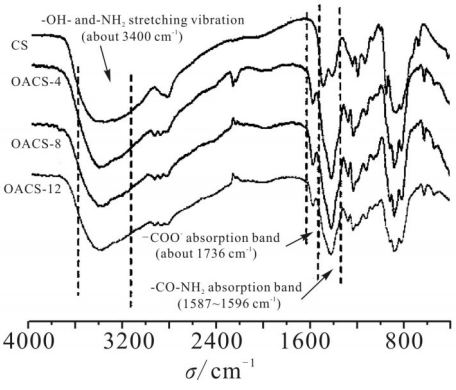


Fig. 2 FT-IR spectra of CS and OACS with varied carbon chain lengths of alkane

CS和OACS在3400 cm^{-1}附近的吸收峰变窄，此处吸收峰是—NH_2和—OH伸缩振动峰的叠加，说明接枝烷烃链对—NH_2和—OH的吸收峰强度有一定影响。3种OCSA分别在1739 cm^{-1}，1730 cm^{-1}和1736 cm^{-1}附近出现新吸收峰，该峰为质子化处理O-烷基壳聚糖产生的羧基伸缩振动峰。OACS在1587 ~ 1596 cm^{-1}处的吸收峰强度明显增加，证明OACS与酸发生共价结合生成新的酰胺基。对比图中CS在1152.77 cm^{-1}和898.19 cm^{-1}的2处糖苷键特征吸收峰，3种OACS该处吸收峰均发生蓝移，分别为1125.95 cm^{-1}和855.21 cm^{-1}，1131.90 cm^{-1}和852.23 cm^{-1}，1128.93 cm^{-1}和858.18 cm^{-1}，证明烷烃链接枝在甲壳素上影响了分子内和分子间的作用力，分子结构显著变化。

2.4 取代度对比

通过元素分析测定了OACS中N和C的含量，计算接枝不同长度烷烃链的壳聚糖取代度。数据和计算结果见Tab.2。

OACS的取代度在10% ~ 15%之间，且随烷烃链的增长，*DS*呈下降趋势。在异相体系中，各反应物之间的接触面积和反应活性小于均相反应，反应难度较大，故取代度不高。因此，O-烷基化壳聚糖取代度显著低于N-烷基化壳聚糖[5]。同时，烷烃链的增长会导致空间位阻效应加剧，长烷烃链接枝率下降，而短烷烃链更容易接枝在羟基上。

Tab. 2 Percentage content of N, C and *DS* of the OACS

OACS	N/%	C/%	*DS*/%
OACS-4	6.794	40.140	14.48
OACS-8	6.527	39.850	10.54
OACS-12	5.309	35.440	12.64

DS: degree of substitution

2.5 X射线衍射分析

CS与OACS的X射线衍射图谱见Fig.3。XRD图谱显示，晶区X射线强度表现为尖峰，非晶区为平缓的宽峰，峰形越宽晶区尺寸越小。根据Scherrer公式结合图谱计算，各OACS的粒径均小于50 nm。CS的衍射图分别在2θ为19.3°和27.6°处出现结晶峰，在12.6°左右出现无水结晶峰，在2θ = 40°出现弥散的衍射峰，这表明壳聚糖除晶体结构外还同时具有非晶体结构。与CS相比，OACS在2θ = 20°左右的峰强度明显变弱，峰宽增宽；同时2θ = 40°处的弥散峰消失，这说明烷烃链的接枝导致OACS结晶区被破坏，无序程度提高。

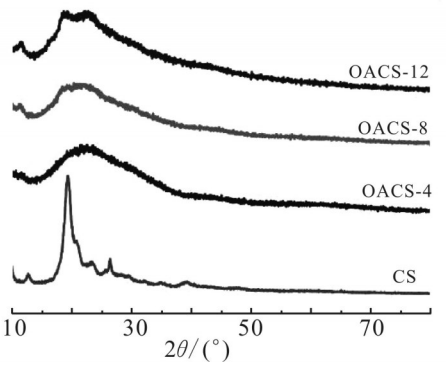


Fig. 3 XRD patterns of CS and OACS with varied carbon chain lengths of alkane

2.6 相对分子质量及分子量分布

OACS的相对分子质量及分子量分布情况如Tab.3，Tab.4和Fig.4所示。

OACS-4，OACS-8，OACS-12的重均分子量（$\overline{M}_w$）分别为2.654×10^4，2.680×10^4和3.378×10^4，随烷

烃链长度增加,其相对分子质量呈增加趋势,与分子结构变化规律相符;分子量分布指数(PDI)依次为1.53,1.58和1.69,表明随接枝烷烃链长度的增长,其相对分子质量分布变宽,较低和较高分子量的OACS占比提升。

Tab. 3 Molecular weight of OACS

	$\overline{M}_n\times10^{-4}$	$\overline{M}_w\times10^{-4}$	$\overline{M}_z\times10^{-4}$
OACS-4	1.741	2.654	5.580
OACS-8	1.818	2.680	5.394
OACS-12	1.995	3.378	6.931

2.7 热重分析

OACS的热重曲线图见Fig.5。热重(TGA)和热重微分(DTG)曲线分别显示出OACS在程序升温过程中质量与质量变化速率随温度的变化情况。

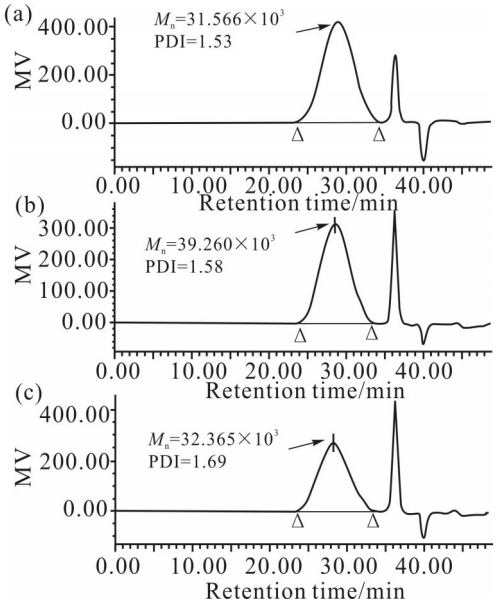


Fig. 4 Molecular weight and polymer dispersity index of (a) OACS-4, (b) OACS-8 and (c) OACS-12

Tab. 4 Polymer dispersity index of OACS

	$\overline{M}_w\times10^{-3}$	Percentage/%	PDI
OACS-4	2.1~20.1	32.00	1.53
	20.1~40	29.00	
	40~96	28.00	
	96~248	11.00	
OACS-8	3~20.1	24.00	1.58
	20.1~41	30.00	
	41~100	33.00	
	100~254	13.00	
OACS-12	2.5~29.8	37.00	1.69
	29.8~68.2	34.00	
	68.2~100	12.00	
	100~330	17.00	

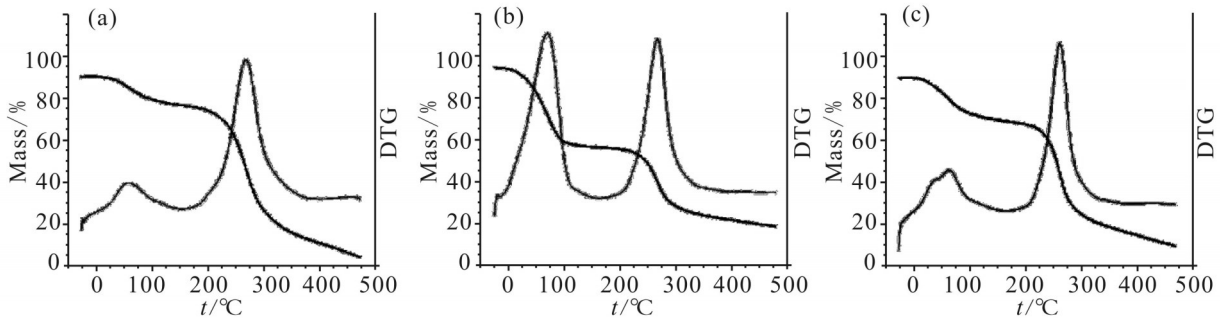


Fig. 5 Mass loss and derivative mass loss of (a) OACS-4, (b) OACS-8 and (c) OACS-12

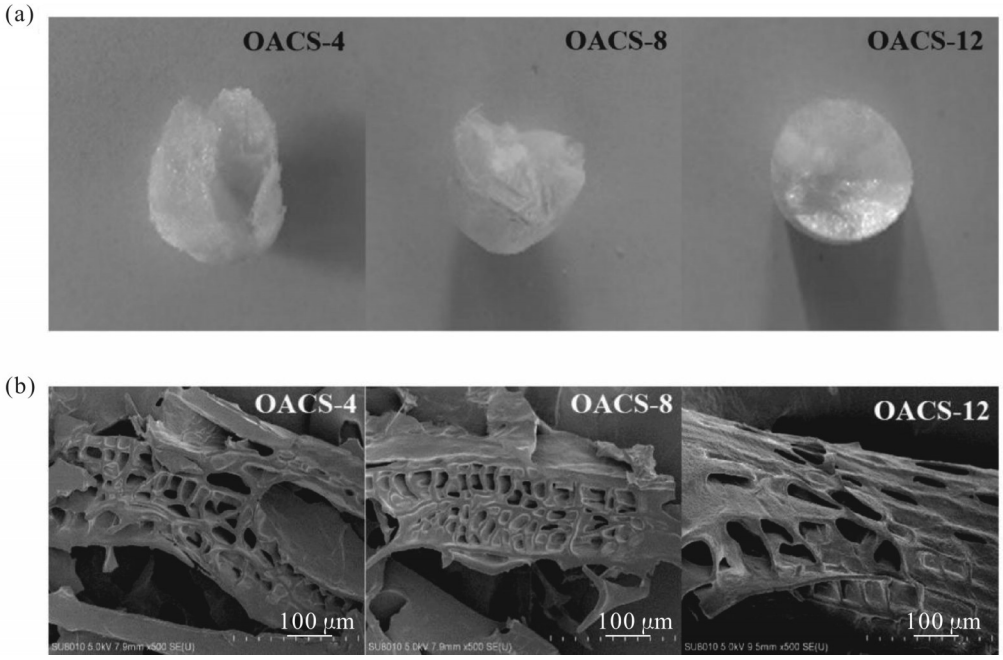


Fig. 6 (a) Digital photos and (b) cross-sectional SEM images (the scale bar is 100 μm) of the freeze drying OACS

Tab. 5 Porosity of OACS

OACS	*H*/mm	*d*/mm	m_0/g	m_1/g	Porosity/%
OACS-4	10.9	10.8	0.732	1.390	83.3
OACS-8	10.8	10.8	0.760	1.411	82.4
OACS-12	11.1	10.7	0.755	1.365	77.2

热分解分为2步：第1个失重过程（50~ 200 ℃）为OACS失去自由水和结合水；第2个失重过程（200～500 ℃）为OACS长链间糖苷键和分子内部分化学键断裂。3种OACS均从250 ℃左右化学键开始断裂，300 ℃附近失重速率达到峰值，400 ℃时固体残余量仍能维持在30% ~ 50%。虽然OACS晶体结构被破坏，但酰胺键一定程度提升了分子链刚性，维持了OACS的耐热性能。

2.8 形态观察和孔隙率计算

冻干态OACS的外观形态图和扫描电镜图分别如Fig.6(a)和Fig.6(b) 所示。

壳聚糖基材料对纤维蛋白的吸附能力与质子化程度呈正相关，经质子化的OACS外观蓬松且规整，多孔结构赋予其良好的吸液能力，其粗糙的孔壁结构表面有利于吸附纤维蛋白原，诱导血小板黏附和活化，促进血液凝结。

孔隙率是指材料中孔隙体积与材料总体积之比，多孔隙材料可以更多吸附血液组分材料，乙醇置换法测定OACS孔隙率得到的数据见Tab.5。孔板中冻干得到的样品为圆柱体，*H*与*d*表示样品厚度与直径。3种OACS孔隙率在77% ~ 84%之间，孔隙率较高，与SEM图相互印证。

2.9 生物相容性实验

生物相容性是评判生物安全性的重要指标之一。止血剂常用于体表止血，多用L929小鼠成纤维细胞进行细胞毒性测试，但在实际止血应用中，往往有内脏器官破裂出血的情况，因此本文采用L02人肝细胞，对OACS应用于肝脏等不可压迫处进行止血的细胞毒性进行探索。实验结果见Fig.7，MTT比色法检测各OACS材料的细胞相对增值率均在83% ~ 90%区间内，说明该材料对细胞毒性低，具有良好的生物相容性。

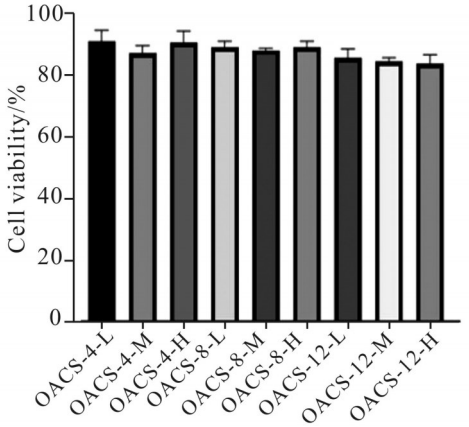


Fig. 7 L02 cell viability of the different sample groups after 24 h of treatment by MTT assay

2.10 凝血功能检测指标

凝血功能检测指标数据可以初步确定样品对血液凝结的影响，所有样品的APTT，PT和TT凝血指标数据如Fig.8所示。

CS-a，CS-b，CS-c和CS-d分别为商品Celox止血剂、商品壳聚糖乳酸盐止血剂、商品羧甲基壳聚糖止血剂和高密度纯壳聚糖。从Fig.8(a)可以看出，在内源性止血途径中，商品壳聚糖APTT时间较空白对照稍有延长，原因主要有二，凝结初期壳聚糖的正电荷难以显着促进非黏附血小板的活化，延迟了凝血酶生成和血液凝结。其次，壳聚糖的正电荷抑制了接

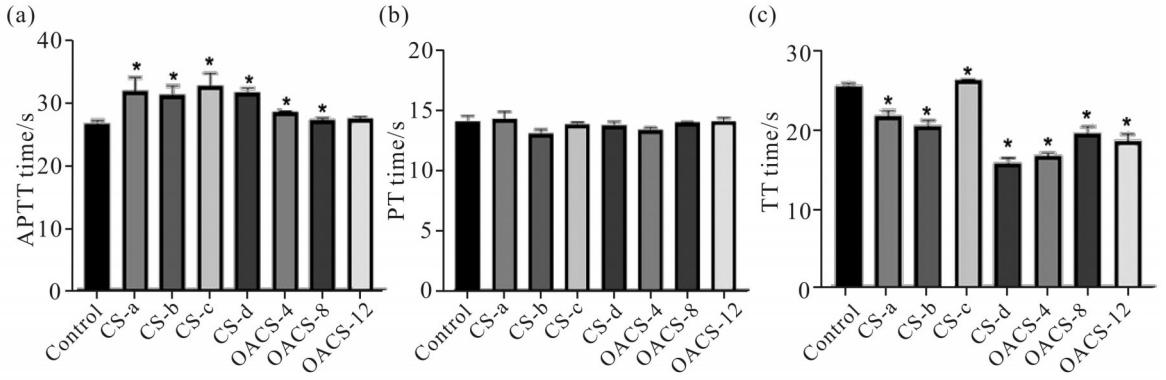


Fig. 8 Coagulative function index of commercially available chitosan and OACS: (a) APTT (*: vs. control, $p < 0.05$); (b) PT; (c) TT (*: vs. control, $p < 0.05$)

触活化。OACS与商品壳聚糖相比，APTT时间明显缩短，随着接枝烷烃链的增长，APTT时间延迟程度减小，直至OACS-12与空白对照时间接近。说明OACS可通过内源性途径加速凝血，但效果有限，可能是烷烃长链加速凝血抵消了壳聚糖原本的延迟效应。商品壳聚糖和OACS的PT结果 (Fig.8(b)) 与空白对照相比无显著性差异，说明对外源性途径几乎无影响。在共同凝血途径中 (Fig.8(c))，OACS的TT时长显著低于空白对照和部分商品壳聚糖，可能具有促进纤维蛋白原转化成纤维蛋白，增加纤维蛋白原的凝固性促进血液凝固的潜力。上述差异均有统计学意义。

2.11 体外全血凝固时间

WBCT用于评价OACS与全血接触后血液凝固的效果，WBCT越短，表示材料促进血液凝固效果越明显[12]，测试结果如Fig.9所示。

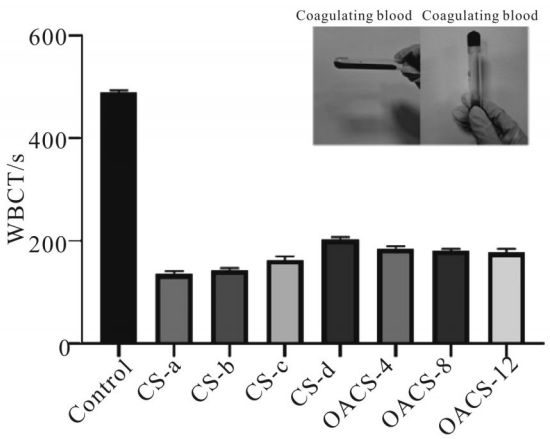


Fig. 9 WBCT of commercially available chitosan and OACS

商品壳聚糖及OACS与全血接触后迅速形成凝结物，在体外均能促进新鲜血液的凝结，显著缩短凝血时间。CS-a，CS-b，CS-d与血液接触发生轻度溶胀但不溶于血液；CS-c，OACS-4，OACS-8，OACS-12与血液接触后明显溶胀，形成不溶于血液的凝胶态物

质。与空白对照相比，所有OACS均能显著促进凝血，差异有统计学意义（$p < 0.05$）。其主要原因是壳聚糖接入烷烃长链后与细胞膜中脂质双分子层结合增强了凝血性能[13]；O-烷基壳聚糖与血液接触后以质子化形式存在，正电荷数量显著增加，加强了红细胞的聚集效果；同时吸附血液后呈凝胶状态，利于血液凝固，加速伤口闭合。此外，OACS的*DD*约为85%，其C2位置仍保留一部分乙酰基，烷烃与乙酰基的协同作用可促进凝血[5,14,15]。通过各组间的比较发现，3种OACS显示出与CS-c有相似的促凝效果；同时，3种OACS间WBCT相近，这可能是接枝率和接枝烷烃链长度共同作用的结果。整体来看，OACS是一种具有潜力的止血材料，还需要开展更多的实验以提高接枝率并深化机理分析。

3 结论

本文采用甲壳素与氯代烷烃在异丙醇体系中的异相反应，成功制备出一系列具有不同长度烷基链的O-烷基壳聚糖（OACS）。所得产物的脱乙酰度在84%到87%之间，烷基链取代度在10%~15%范围内，与N-烷基壳聚糖相比，异相体系O-烷基化取代难度较大。OACS不仅具备良好的生物相容性，还展现出一定的促凝血性能。其止血作用机制可能涉及多重协同效应：首先，C6位引入的长链烷烃能够有效插入血细胞膜，改变细胞膜的流动性与通透性，加速凝血相关物质的交换与反应。其次，主链上保留的乙酰氨基能够与血液成分结合，促进凝血进行。最后，氨基阳离子具有使红细胞团簇的作用，能促进血小板的聚集与血栓的初步形成。将OACS制成多孔海绵结构后，其血液吸收能力进一步提高，能够快速吸附血液中的水分，浓缩凝血因子，从而在复杂伤口条件下，其凝血效果得到了显著增强。在3种可能的促凝血因素的协同作用下，从加速物质交换、促进血小板聚集及促进血栓形成等多方面，全方位提升了OACS的加速凝血作用。后续研究将进一步探索上述3个因素的交互作用，以期提升材料凝血性能和与创面的黏附性，在出血部位形成稳定三维止血网络结构。

参考文献：

[1] Peng H T. Hemostatic agents for prehospital hemorrhage control: a narrative review[J]. Military Medical Research, 2020, 7: 18.

[2] Wang C W, Zhou H Y, Niu H Y, *et al.* Tannic acid- loaded mesoporous silica for rapid hemostasis and antibacterial activity [J]. Biomaterials Science, 2018, 6: 3318-3331.

[3] Yang S, Li X M, Liu P, *et al.* Multifunctional chitosan/ polycaprolactone nanofiber scaffolds with varied dual- drug release for wound- healing applications[J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2020, 6: 4666-4676.

[4] El K H, Belaabed R, Addaou A, *et al.* Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 1181-1189.

[5] Chen Z H, Yao X P, Liu L, *et al.* Blood coagulation evaluation of N-alkylated chitosan[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 173: 259-268.

[6] Chen X, Yan G L, Chen M, *et al.* Alkylated chitosan- attapulgite composite sponge for rapid hemostasis[J]. Biomaterials Advances, 2023, 153: 12.

[7] 王雪. 烷基化壳聚糖基快速止血海绵的制备及其性能研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2022.
Wang X. Preparation and properties of alkylated chitosan- based fast hemostatic sponge [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2022.

[8] 于飞, 奚廷斐, 张姝江, 等. 具有垂直孔道的壳聚糖乳酸盐海绵的制备及体外释药模型的拟合分析[J]. 高等学校化学学报, 2012, 33(4): 843-849.
Yu F, Xi T F, Zhang S J, *et al*. Preparation of chitosan lactate sponges with uniform vertical pores and fitted analysis of release medicine model in vitro[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2012, 33(4): 843-849.

[9] Fan X L, Chen K K, He X C, *et al.* Nano-TiO_2/collagen-chitosan porous scaffold for wound repairing[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 15-22.

[10] Wu X B, Peng C H, Huang F, *et al.* Preparation and

characterization of chitosan porous microcarriers for hepatocyte culture[J]. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International, 2011, 10: 509-515.

[11] Seo Y B, Lee O J, Sultan M T, *et al.* In vitro and in vivo evaluation of the duck's feet collagen sponge for hemostatic applications[J]. Journal of Biomaterials Applications, 2017, 32: 484-491.

[12] Cui H R, Cai J J, He H J, *et al.* Tailored chitosan/glycerol micropatterned composite dressings by 3D printing for improved wound healing[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 255: 13.

[13] Dowling M B, Smith W, Balogh P, *et al.* Hydrophobically-modified chitosan foam: description and hemostatic efficacy[J]. Journal of Surgical Research, 2015, 193: 316-323.

[14] Chen A Q, Li B Y, Dang Q F, *et al.* Carboxymethyl chitosan/dialdehyde quaternized pullulan selfhealing hydrogel loaded with tranexamic acid for rapid hemostasis[J]. Carbohydrate Polymers, 2025, 348: 122817.

[15] Zhou X, Kong M, Cheng X J, *et al.* In vitro and in vivo evaluation of chitosan microspheres with different deacetylation degree as potential embolic agent[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 113: 304-313.

Preparation and Hemostatic Performance of O-Alkyl Chitosan

Ruochen Ding, Wenwen Zhou, Ren Chen, Jian Yang

(*Systems Engineering Institute, AMS, PLA, Tianjin 300161, China*)

ABSTRACT: Not only C2 amino groups of chitosan but also C6 hydroxyl groups of the chitin can undergo alkylation reaction with haloalkanes. O-alkyl chitosan (OACS) with varying alkane chain lengths were synthesized to explore the effects of structural modifications on hemostatic properties. ^{1}H-NMR and FT-IR results confirm that the alkane chains were successfully grafted onto the C6 hydroxyl group. Elemental analysis reveals that shorter alkane chains are more readily grafted. XRD and TG results indicate that the crystalline region is disrupted with alkyl chains, although no direct correlation was observed between the thermal decomposition temperature and the length of the grafted alkyl. The cytotoxicity test shows that proliferation rates of L02 human normal liver cells range within 83%~90% in 1 mg/mL solution of OACS with different alkyl chain. In-vitro coagulation assay reveals that OACS significantly reduces coagulation time by 63.4% to 64.2% compared to the blank control group, suggesting fibrinogen is converted to fibrin to facilitate blood coagulation. Differences in hemostatic properties among the lengths of alkane chain are not pronounced.

Keywords: chitosan; O-alkyl chitosan; hydroxy; alkylation modification; hemostasis