

功能材料

季铵盐化糖原衍生物/明胶复合水凝胶抗菌
材料的制备及性能

纪倩, 徐晓宇, 陈曦, 陈敬华*

(江南大学 生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 首先, 利用乙二胺对糖原进行氨基化修饰得到氨基化糖原衍生物(N-Gly); 接着, 利用2,3-环氧丙基三甲基氯化铵(简称季铵盐)对N-Gly进行部分季铵盐化修饰, 得到季铵盐化糖原衍生物(QA-N-Gly); 然后, 以明胶为基材通过酰胺键交联制备季铵盐化糖原衍生物/明胶复合水凝胶(QA-N-Gly/Gel)。对糖原衍生物进行FTIR、¹HNMR、粒径、Zeta电位以及微观形貌的考察, 并对QA-N-Gly/Gel水凝胶进行了理化性能和生物性能评价。结果表明, 糖原的氨基化和季铵盐化修饰成功, QA-N-Gly为均匀分散的纳米粒子, 粒径分布在100~200 nm, Zeta电位为(93.9±1.7) mV, 粒子带有明显的正电荷, 具有抗菌性。糖原衍生物的加入可以提高明胶基水凝胶体系的机械强度和稳定性, QA-N-Gly/Gel的断裂应力为66.8 kPa, 压缩模量为13.3 kPa。QA-N-Gly/Gel具有明显的抑菌作用, 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率分别达到97%和50%。此外, QA-N-Gly/Gel无溶血性, 细胞毒性低, NIH-3T3细胞的48 h存活率在80%以上。

关键词: 糖原; 季铵盐; 明胶; 水凝胶; 抗菌材料; 功能材料

中图分类号: TQ427.26

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2024) 03-0597-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Preparation and properties of quaternary ammonium glycogen
derivative-gelatin composite hydrogel as antibacterial material

JI Qian, XU Xiaoyu, CHEN Xi, CHEN Jinghua*

(School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Aminated glycogen derivative (N-Gly) was firstly prepared from glycogen by amination with ethylenediamine, and then partially modified by 2,3-epoxypropyl trimethyl ammonium chloride (quaternary ammonium salt) to obtain cationic quaternary ammonium glycogen derivative (QA-N-Gly), which was further crosslinked with gelatin via amide bonding to synthesize quaternary ammonium glycogen derivative-gelatin composite hydrogel (QA-N-Gly/Gel). The glycogen derivatives obtained were characterized by FTIR and ¹HNMR, and analyzed for particle size distribution, Zeta potential and morphology. Meanwhile, QA-N-Gly/Gel hydrogel was further evaluated for analyses on physicochemical and biological properties. The results showed that glycogen was successfully aminated and quaternary ammonium modified. The QA-N-Gly, uniformly dispersed nanoparticles with a size distribution of 100~200 nm and a Zeta potential of (93.9±1.7) mV exhibited distinctly positive charges and antibacterial activity. QA-N-Gly/Gel displayed a fracture stress of 66.8 kPa and compression modulus of 13.3 kPa, indicating improved mechanical strength and stability due to addition of glycogen derivative. QA-N-Gly/Gel also showed obvious antibacterial effect on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, with the corresponding inhibition rate reaching 97% and 50%, respectively. In addition, QA-N-Gly/Gel showed no hemolysis and low cytotoxicity, with the 48 h survival rate of NIH-3T3 cells > 80%.

收稿日期: 2023-05-16; 定用日期: 2023-07-17; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230394

基金项目: 国家自然科学基金项目(22205083)

作者简介: 纪倩(1989—), 女, 实验师, E-mail: jiqian@jiangnan.edu.cn. 联系人: 陈敬华(1971—), 男, 教授, E-mail: chenjinghua@jiangnan.edu.cn.

Key words: glycogen; quaternary ammonium salt; gelatin; hydrogels; antibacterial materials; functional materials

水凝胶是一类具有三维网络结构的新型高分子材料,在水中可吸水溶胀但又不溶解于水^[1-2]。水凝胶具有类固体的机械行为和类液体的快速扩散行为,含水量高,在生物医药领域可作为药物载体、组织支架、伤口敷料、智能传感器等^[3]。明胶是胶原通过解三股螺旋结构得到的单链分子,是胶原的部分变性产物,具有良好的生物相容性、生物降解性以及皮肤亲和性,但是明胶自身形成的水凝胶机械性能和热稳定性欠佳,限制了其在生物材料领域的应用,所以研究者们通常将明胶与其他功能性材料复合使用来制备多元化的明胶基水凝胶材料^[4]。

抗菌聚合物是一类能够杀死微生物或抑制微生物生长的材料,具有高效、低毒、耐药、环境影响小等优点,是传统小分子抗菌药物的良好替代品,引起了业界的极大兴趣和广泛关注。其中,阳离子树枝状大分子及其水凝胶材料能够吸附带负电荷的细菌,通过破坏细胞结构导致细菌死亡,这种独特的细菌膜破坏机制使其不仅具有高效的杀菌能力,而且可以避免细菌产生耐药性^[5-6]。糖原是由葡萄糖聚合而成的内源性多糖,无毒,无免疫原性。糖原是天然的多糖纳米材料,具有密集的支链和树枝状大分子结构,富含羟基官能团,具有活泼的化学性质^[7-8]。

本研究在糖原(Gly)上进行逐步化学修饰,先氨基化再季铵盐化。氨基化过程中将氨基基团修饰到糖原支链上,一是因为氨基基团可与明胶发生酰胺交联反应;二是因为氨基的反应活性比羟基强,后续季铵盐修饰更易发生。在此基础上,对氨基化糖原衍生物(N-Gly)进行季铵盐化修饰,使糖原分子带有大量正电荷,形成阳离子树枝状大分子结构的季铵盐化糖原衍生物(QA-N-Gly),QA-N-Gly表面的强阳离子可以破坏细菌的细胞膜和细胞壁,从而杀死细菌或抑制细菌生长。然后,将季铵盐化糖原衍生物与明胶通过酰胺键交联,制备具有抗菌作用的季铵盐化糖原衍生物/明胶复合水凝胶(QA-N-Gly/Gel)。本研究以天然生物材料为基材,综合发挥正电性高分子优势,探索具有优良性能的新型抗菌水凝胶材料,以用于医疗、卫生、日化等领域。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

糖原(Gly, BR)、无水乙醇(AR)、丙酮(AR)、二甲基亚砜(DMSO, AR)、*N,N*-羰基二咪唑(CDI, 质量分数 98%)、乙二胺(AR)、盐酸(CP)、氢氧化钠(AR)、明胶(A 型猪皮, CP)、铬酸钾(质

量分数 99.5%)、氯化钠(CP), 国药集团化学试剂有限公司;肉汤培养基、琼脂培养基, 杭州滨和微生物试剂有限公司;硝酸银(0.1 mol/L)、2,3-环氧丙基三甲基氯化铵(质量分数≥95%)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC, 质量分数 98.5%)、*N*-羧基琥珀酰亚胺(NHS, 质量分数 98%)、噻唑蓝(MTT, 质量分数>99.0%)、乙酸异戊酯(AR), 上海麦克林生化科技股份有限公司;I 型胶原酶, 美国 Sigma-Aldrich 试剂公司;DMEM 高糖细胞培养基、青霉素-链霉素(双抗)、胎牛血清, 美国 Gibco-Invitrogen 公司;金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*), 江南大学生命科学与健康工程学院菌种保藏中心;小鼠成纤维细胞 NIH-3T3, 中国科学院细胞库(上海)。

PHS-25C pH 计, 梅特勒托利多仪器(上海)有限公司;TENSOR II 型傅里叶变换红外光谱仪、Avance III 型核磁共振波谱仪, 德国 Bruker 公司;FreeZone 冷冻干燥机, 美国 Labconco 公司;4111FO 恒温生化培养箱、MULTISKAN GO 酶标仪, 美国 Thermo 公司;Zetasizer nano ZS Zeta 电位及纳米粒度分析仪, 英国 Malvern 仪器公司;DHR-3 流变仪, 美国 TA 仪器公司;BSC-1300 II A2 生物安全柜, 苏州安泰空气技术有限公司;E43.104 万能试验机, 美特斯工业系统(中国)有限公司;FEI Tecnai 12 透射电子显微镜, 荷兰 Philips 公司;SU1510 和 SU8100 扫描电子显微镜, 日本 Hitachi 公司;THZ-C 恒温摇床, 太仓市强乐实验设备有限公司。

1.2 糖原衍生物的合成

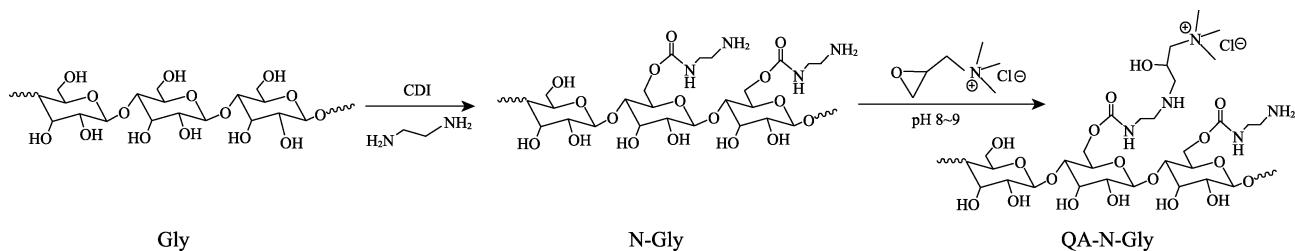
1.2.1 氨基化糖原衍生物(N-Gly)的合成

称取 2.0 g Gly 溶于 100 mL 无水 DMSO 中, 磁力搅拌至 Gly 完全溶解。向溶液中加入 2.0 g CDI, 35 °C 下搅拌 1 h 充分活化。将 3.08 mL 乙二胺溶于 5 mL DMSO 中, 然后在氮气保护下通过注射器将乙二胺溶液缓慢滴加到反应液中, 氮气保护下室温反应 24 h。反应结束后, 将反应液透析 3 d(截留相对分子质量 8000~14000), 随后将透析液在-80 °C 冻干 48 h, 得到 N-Gly 固体^[9]。

1.2.2 季铵盐化糖原衍生物(QA-N-Gly)的合成

称取 N-Gly 2.0 g 溶于 50 mL 去离子水中, 在 60 °C 磁力搅拌下溶解, 并用 NaOH 溶液(0.1 mol/L)调节 pH 至 8~9。将 2.0 g 2,3-环氧丙基三甲基氯化铵加入 N-Gly 溶液中, 在 60 °C 下恒温搅拌反应 6 h。待反应结束后, 将反应液透析 3 d(截留相对分子质量 8000~14000), 然后将透析液在-80 °C 冻干 48 h, 得到 QA-N-Gly 固体^[10-11]。

对 Gly 的逐步正电性修饰路线如下所示:



1.3 糖原衍生物的表征

1.3.1 N-Gly 取代度的测定

采用酸碱滴定法^[12], 随 NaOH 滴定体积的变化实时监测混合液 pH, 绘制 NaOH 溶液体积与 pH 变化的滴定曲线, 测定 NaOH 在两个 pH 突变点的消耗量, 按式 (1) 计算 N-Gly 的取代度:

$$DS_{N-Gly} / \% = \frac{M_{\text{葡萄糖单体}} \times (V_2 - V_1) \times C_{NaOH}}{W_{N-Gly} - M_{\text{乙二胺基}} \times (V_2 - V_1) \times C_{NaOH}} \times 100 \quad (1)$$

式中: DS 为取代度, %; W_{N-Gly} 为 N-Gly 的质量, g; C_{NaOH} 为 NaOH 溶液的浓度, mol/L; V_1 、 V_2 分别为两个 pH 突变点时 NaOH 的消耗量, L; $M_{\text{葡萄糖单体}}$ 为葡萄糖单体的摩尔质量, 161 g/mol; $M_{\text{乙二胺基}}$ 为乙二胺和羰基的摩尔质量之和, 87 g/mol。

1.3.2 QA-N-Gly 取代度的测定

QA-N-Gly 的取代度用滴定法测定, 以铬酸钾作为指示剂, 以硝酸银作为滴定溶液^[13]。Ag⁺ 与 QA-N-Gly 中的 Cl⁻ 充分反应后, 会生成砖红色沉淀, 通过监测所消耗硝酸银的量, 按式 (2) 计算 QA-N-Gly 的取代度:

$$DS_{QA-N-Gly} / \% = \frac{M_{\text{葡萄糖单体}} \times V_{AgNO_3} \times C_{AgNO_3}}{W_{QA-N-Gly} - V_{AgNO_3} \times C_{AgNO_3} \times (M_{\text{季铵盐}} + M_{\text{乙二胺基}})} \times 100 \quad (2)$$

式中: V_{AgNO_3} 为滴定消耗的硝酸银体积, L; C_{AgNO_3} 为硝酸银溶液的浓度, mol/L; $W_{QA-N-Gly}$ 为 QA-N-Gly 的质量, g; $M_{\text{季铵盐}}$ 为 2,3-环氧丙基三甲基氯化铵的摩尔质量, 152 g/mol。

1.3.3 FTIR 测定

取适量固体样品, 用傅里叶变换红外光谱仪 (FTIR) 对其分子结构与化学键进行测定。

1.3.4 ¹HNMR 测定

称取约 25 mg 固体样品溶于 500 μL 重水中, 然后通过核磁共振波谱仪测定其 ¹HNMR 谱图。

1.3.5 粒径和 Zeta 电位测定

将固体样品用去离子水配成质量分数 0.5% 的水溶液, 利用 Zeta 电位及纳米粒度分析仪测定糖原衍生物的粒径分布以及 Zeta 电位。

1.3.6 TEM 测试

将固体样品溶于超纯水, 取 10 μL 滴在铜网上,

通过电压 120 V 的透射电子显微镜 (TEM) 来观察样品的微观形态。

1.4 糖原衍生物的抑菌性评价

将单菌落菌种 (*S. aureus* 和 *E. coli*) 转接至液体肉汤培养基中, 在 37 °C, 220 r/min 的恒温摇床培养 24 h。采用平板计数法对活化的菌液进行浓度测定, 挑选菌落数 30~300 个的平板进行计数, 计算出每毫升菌液的活菌数。采用二倍稀释法 (溶液为肉汤) 将糖原衍生物稀释至不同质量浓度并逐一加入 96 孔板中, 再向孔板中加入菌液使细菌终浓度为 1×10^6 CFU/mL, 加样完毕后, 将 96 孔板置于 37 °C 恒温生化培养箱中培养 18 h, 然后使用酶标仪测定样品板在 600 nm 处的吸光度。设置单纯菌液为阳性对照, 单纯糖原衍生物肉汤溶液为阴性对照。按式 (3) 计算抑菌率:

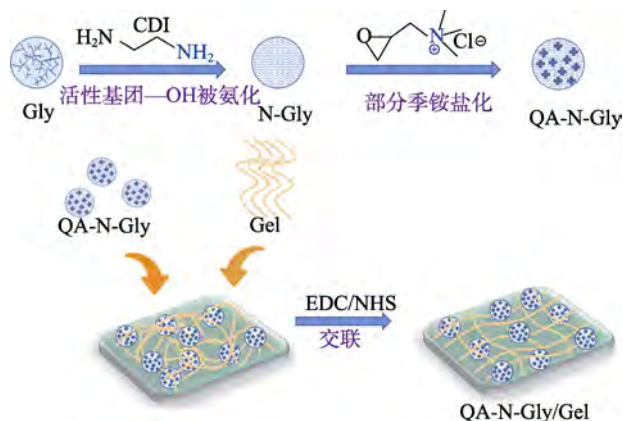
$$IR / \% = \frac{A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{实验组}}}{A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阴性对照}}} \times 100 \quad (3)$$

式中: IR 为抑菌率, %; $A_{\text{阳性对照}}$ 为阳性对照组吸光度; $A_{\text{阴性对照}}$ 为阴性对照组吸光度; $A_{\text{实验组}}$ 为实验组吸光度。

1.5 糖原衍生物/明胶复合水凝胶的制备和表征

1.5.1 制备

将明胶和糖原衍生物 (N-Gly 或 QA-N-Gly) 混合溶于纯水中, 40 °C 水浴加热使固体完全溶解, 其中明胶的质量浓度为 100 g/L, 糖原衍生物的质量浓度为 25 g/L, 通过超声或离心去除溶液中的气泡, 然后将溶液倒入直径 22 mm (2 mL/个) 或 35 mm (1.5 mL/个) 的圆形模具中, 放置在 4 °C 低温环境冷藏成型。同时用纯水配制 EDC/NHS 混合溶液 (EDC 与 NHS 物质的量之比为 2:1), 其中 EDC 质量浓度为 2 g/L, NHS 质量浓度为 0.6 g/L, 滴加少量盐酸调节 EDC/NHS 溶液的 pH 至 4~6, 然后将冷藏成型的凝胶浸泡于 3 倍体积的 EDC/NHS 溶液中 [$V(\text{凝胶溶液}) : V(\text{EDC/NHS 溶液}) = 1 : 3$], 于 4 °C 下交联反应 24 h。将交联后的凝胶用磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.4) 清洗数次, 得到糖原衍生物/明胶复合水凝胶。作为对比材料, 将质量浓度为 100 g/L 的明胶溶液交联制备明胶水凝胶 (Gel), 具体制备步骤同上。季铵盐化糖原衍生物/明胶复合水凝胶 (QA-N-Gly/Gel) 的制备路线如下所示:



1.5.2 SEM 测试

将水凝胶在 -80°C 冻干,再用液氮脆断,以获得内部横截面。将水凝胶的截面向上用导电胶带固定在样品台,然后进行溅射镀金,用 SEM 观测水凝胶的内部形貌。

1.5.3 流变学性能测试

在室温下,将水凝胶(薄层圆片,直径 35.0 mm,厚 1.6 mm)放置在 40 mm 的平行板之间,调节板间隙至 1500 μm ,角频率范围设置为 0.1~100 rad/s,在线性黏弹区域内测量水凝胶的储能模量(G')和损耗模量(G'')。

1.5.4 机械压缩性能测试

室温下,将水凝胶(圆柱体,直径 21~22 mm,高 7~8 mm)放置在万能试验机上带有圆形金属夹具的称重传感器(50 N)之间,调节两夹具间的距离至上方夹具与凝胶上表面刚刚接触,然后以 1 mm/min 的速率将样品压缩至断裂,根据检测数据绘制应力-应变曲线。

1.5.5 体外溶胀率测定

将冻干后的水凝胶称重,然后完全浸入室温 PBS 溶液中(pH 7.4),分别在不同时间点取出样品并用滤纸除去表面多余的水分,然后立即测量样品的质量并记录,按式(4)计算溶胀率:

$$\text{SR} / \% = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100 \quad (4)$$

式中:SR 为溶胀率,%; W_0 为冻干水凝胶的原始质量,mg; W_1 为样品在 PBS 溶液中浸泡一定时间后的质量,mg。

1.5.6 体外降解率测定

在 PBS 溶液(pH 7.4)以及含有 I 型胶原酶的 PBS 溶液(1 U/mL)中评估水凝胶的体外降解性。将冻干的水凝胶完全浸入 PBS 溶液或酶溶液中,并在 37°C , 100 r/min 的条件下振荡反应 6、12、24、48 h,离心,移除液体,用 PBS 溶液清洗沉淀物,然后将沉淀物冻干,称重并记录,按式(5)计算降解率:

$$\text{BR} / \% = \frac{W_0 - W_2}{W_0} \times 100 \quad (5)$$

式中:BR 为降解率,%; W_0 为冻干水凝胶的原始质量,mg; W_2 为样品振荡反应一定时间后取出并冻干的质量,mg。

1.6 水凝胶的抑菌性评价

称取 100 mg 冻干后的凝胶小块,放置在紫外灯下杀菌过夜,然后浸泡于无菌 PBS 溶液中使凝胶达到溶胀平衡,将溶胀后的凝胶转移入 1 mL 细菌悬液中(1×10^6 CFU/mL)在 37°C 下共培养 24 h,充分涡旋,用移液枪吹打菌液,然后用无菌生理盐水对菌液进行梯度稀释。吸取稀释的样品菌液 100 μL 至平板内,然后用倾注法倒入 10~15 mL 无菌 48°C 保温的液体琼脂,快速振荡混匀,待琼脂凝固后于 37°C 下倒置培养 24 h,观察并记录平板上的菌落数量。以 Gel 组为对照组,按式(6)计算抑菌率:

$$\text{IR} / \% = \frac{\text{CFU}_{\text{对照}} - \text{CFU}_{\text{实验}}}{\text{CFU}_{\text{对照}}} \times 100 \quad (6)$$

式中:IR 为抑菌率,%; $\text{CFU}_{\text{实验}}$ 为实验组的菌落数,个; $\text{CFU}_{\text{对照}}$ 为对照组的菌落数,个。

通过 SEM 观察水凝胶中的细菌。将与细菌共培养 24 h 后的 Gel 水凝胶回收,用质量分数 2.5% 戊二醛溶液将凝胶固定过夜,弃去戊二醛固定液,用 PBS 溶液漂洗凝胶 3 次。再用质量分数 1% 锇酸溶液固定样品 1~2 h,弃去锇酸废液,用 PBS 溶液漂洗凝胶 3 次。然后用梯度体积分数(30%、50%、70%、80%、90%、95% 和 100%)的乙醇水溶液对样品进行脱水处理(每次 15 min)。用无水乙醇与乙酸异戊酯的混合液(两者体积比 1:1)处理样品 30 min,再用纯乙酸异戊酯处理样品 1 h。临界点干燥,镀膜,用 SEM 观察。

1.7 水凝胶的溶血性评价

取小鼠血液,3000 r/min 下离心 5 min 以分离红细胞,用生理盐水洗涤 5 次至上清液澄清,用生理盐水重悬红细胞配成体积分数 5% 的红细胞悬液。称取 50 mg 冻干凝胶浸泡于 800 μL 生理盐水中,再加入 200 μL 红细胞悬液,置于 37°C 水浴中孵育 4 h,3000 r/min 离心 5 min,吸取上清液加入 96 孔板中(100 μL /孔),用酶标仪检测 540 nm 处上清液的吸光度。以生理盐水作为阴性对照(0 溶血),以纯水作为阳性对照(100% 溶血)。按式(7)计算溶血率,溶血率超过 5% 视为溶血:

$$\text{HR} / \% = \frac{A_{\text{实验}} - A_{\text{阴性对照}}}{A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阴性对照}}} \times 100 \quad (7)$$

式中:HR 为溶血率,%; $A_{\text{阳性对照}}$ 为阳性对照组吸光度; $A_{\text{阴性对照}}$ 为阴性对照组吸光度; $A_{\text{实验}}$ 为实验组吸光度。

1.8 水凝胶的细胞毒性评价

称取 100 mg 冻干后的凝胶,在紫外灯下照射过夜杀菌,然后浸泡于 4 mL 细胞培养基中(无血清),于 37 °C, 100 r/min 恒温摇床中浸提 24 h,收集浸提液并过 0.22 μm 水系滤膜,然后向浸提液中加入胎牛血清(体积分数 10%)和双抗(体积分数 1%),备用。将 NIH-3T3 细胞接种于 96 孔板中(5×10^3 个/孔),待细胞贴壁后弃去旧培养基,加入浸提液,置于 CO₂ 恒温生化培养箱中分别培养 24 和 48 h(阴性对照为普通培养基与细胞共培养,空白对照为纯培养基),然后弃去孔中液体,加入质量浓度 0.5 g/L 的 MTT 溶液,在恒温培养箱中继续孵育 4 h,移除溶液,每孔加入 100 μL DMSO,避光振摇 15 min,使用酶标仪在 570 nm 波长处测定溶液的吸光度,按式(8)计算细胞存活率:

$$CV/\% = \frac{A_{\text{实验}} - A_{\text{空白对照}}}{A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{空白对照}}} \times 100 \quad (8)$$

式中:CV 为细胞存活率,%; $A_{\text{空白对照}}$ 为空白对照组吸光度; $A_{\text{阴性对照}}$ 为阴性对照组吸光度; $A_{\text{实验}}$ 为实验组吸光度。

1.9 统计分析

统计学处理结果以平均值±标准差表示,采用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)或 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 糖原衍生物的合成与表征

2.1.1 取代度分析

以 Gly 为原料,首先合成 N-Gly,然后进行季铵盐化修饰,合成 QA-N-Gly。冻干后,N-Gly 为白色海绵状固体(图 1a),QA-N-Gly 为白色絮状固体(图 1b)。

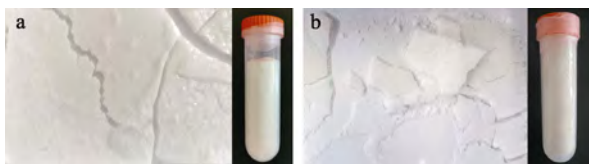


图 1 N-Gly (a)、QA-N-Gly (b) 冻干产物的照片

Fig. 1 Pictures of freeze-dried products of N-Gly (a) and QA-N-Gly (b)

通过酸碱滴定法测得 N-Gly 取代度为 22.6%,相当于每 4.4 个葡萄糖单体重复单元(约 4~5 个重复单元)上接有 1 个伯氨基。通过硝酸银溶液滴定法测得 QA-N-Gly 取代度约为 14.6%,小于 N-Gly 取代度,说明不是所有的氨基都被季铵盐化,QA-N-Gly 上仍有一部分游离氨基存在,这为后续与

明胶的酰胺交联反应提供了基础。

2.1.2 FTIR 分析

图 2a 为 Gly、N-Gly、QA-N-Gly 的 FTIR 谱图。从图 2a 可以看出,Gly 在 3300 cm⁻¹ 处宽强峰对应于—OH 的伸缩振动,2923 cm⁻¹ 处中弱峰对应于 C—H 键(—CH/CH₂)的伸缩振动,1151 cm⁻¹ 处尖峰对应于醇类 C—O 键的伸缩振动,1080~950 cm⁻¹ 处峰对应于葡萄糖环中 C—O—C 键的伸缩振动,700~500 cm⁻¹ 处峰对应于葡萄糖环的呼吸振动^[14]。N-Gly 与 Gly 对比,N-Gly 在 1695 cm⁻¹ 处出现了新的吸收峰,为乙二胺通过 CDI 与糖原偶联的酰胺键的 C=O 键的伸缩振动;此外,N-Gly 在 1536、1260 cm⁻¹ 处也存在较强的特征吸收峰,分别为 N—H 键的变形振动和 C—N 键的伸缩振动^[15],表明氨基化修饰成功。QA-N-Gly 与 N-Gly 对比,QA-N-Gly 在 1450 cm⁻¹ 处出现了新的吸收峰,为季铵盐上甲基(—CH₃)的变形振动^[13,16],表明季铵盐化修饰成功。

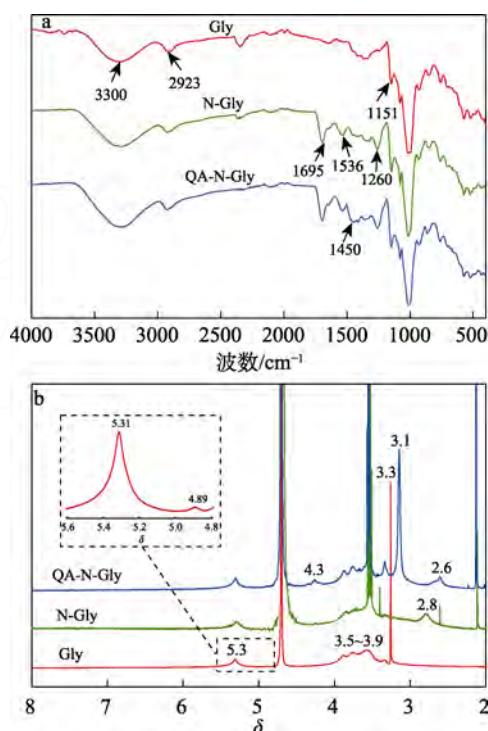


图 2 Gly、N-Gly、QA-N-Gly 的 FTIR (a) 和 ¹H NMR (b) 谱图

Fig. 2 FTIR (a) and ¹H NMR (b) spectra of Gly, N-Gly and QA-N-Gly

2.1.3 ¹H NMR 分析

图 2b 为利用 ¹H NMR 对 Gly、N-Gly、QA-N-Gly 的化学结构进行表征。如图 2b 所示,所有样品均在 δ 3.0~6.0 处呈现 Gly 的典型序列峰,Gly 的主要化学位移有 δ 5.3 (葡萄糖单元, H1)、δ 3.5~3.9 (葡萄糖单元, H2~H5)、δ 3.3 (葡萄糖单元, H6)。与 Gly 对比,N-Gly 在 δ 2.8 处出现新峰,归属于乙二胺

上亚甲基的质子吸收峰^[17]; QA-N-Gly 在 δ 4.3 和 δ 3.1 处出现新峰, 前者是季铵盐中与羟基相连的次甲基的质子吸收峰, 后者是季铵盐基团中与氮相连的 3 个甲基的质子吸收峰^[18], 由此确认得到目标产物。此外, 氢原子核对其周围的电子云密度敏感, 氢原子所处的化学环境发生变化会引起质子峰的偏移, Gly 中 δ 3.3 处峰在 N-Gly 和 QA-N-Gly 中偏移到 δ 3.5 附近, N-Gly 中 δ 2.8 处峰在 QA-N-Gly 中偏移到 δ 2.6 处。

糖原是一种超支化多糖, 由 α -D-葡萄糖分子通过 α -1,4-糖苷键连接形成直链, 直链的末端通过 α -1,6-糖苷键相互连接形成支链结构。NMR 是分析支链结构的一种常用手段, 糖原支化度为 α -1,6-糖苷键连接的葡萄糖残基 C_1 位的质子信号积分占 C_1 位糖苷质子信号积分之和的百分比。图 2b 局部放大图中, δ 4.89 处峰归属于 α -1,6-糖苷键连接的葡萄糖残基 (H1-6), δ 5.31 处峰归属于 α -1,4-糖苷键连接的葡萄糖残基 (H1-4)^[8]。 δ 4.89 和 δ 5.31 处峰的峰面积之和可代表糖原结构中的总葡萄糖单元, 因此, 糖原的支化度可根据式 (9) 进行估算, 得到本研究糖原的支化度为 6.2%。

$$\text{支化度} / \% = \frac{\delta 4.89 \text{ 处峰面积}}{\delta 5.31 \text{ 处峰面积} + \delta 4.89 \text{ 处峰面积}} \times 100 \quad (9)$$

2.1.4 粒径和 Zeta 电位分析

表 1 为 Gly、N-Gly、QA-N-Gly 的粒径和 Zeta 电位。从表 1 可以看出, Gly 被修饰后, 其粒径和 Zeta 电位均发生了变化。Gly、N-Gly 和 QA-N-Gly 的粒径分别为 (71.8 ± 8.2) 、 (202.1 ± 3.0) 和 (162.3 ± 7.6) nm, 氨基化使 Gly 的粒径明显变大, 进一步季铵盐化后, 粒径稍有减小。Gly 本身带有少量负电性, 在与乙二胺偶联形成 N-Gly 后, 其 Zeta 电位由负变正, 在季铵盐化后, 其正电性明显增强, QA-N-Gly 的 Zeta 电位为 (93.9 ± 1.7) mV。Zeta 电位的变化趋势说明, Gly 的逐步修饰是成功的, 季铵盐化修饰使 Gly 具有强正电性。

表 1 Gly、N-Gly、QA-N-Gly 的粒径和 Zeta 电位
Table 1 Size and Zeta potential of Gly, N-Gly, QA-N-Gly

样品	粒径/nm	Zeta 电位/mV
Gly	71.8 ± 8.2	-18.3 ± 0.7
N-Gly	202.1 ± 3.0	28.4 ± 0.6
QA-N-Gly	162.3 ± 7.6	93.9 ± 1.7

2.1.5 TEM 分析

图 3 为 Gly 和 QA-N-Gly 的 TEM 图。从图 3 可以看出, Gly 和 QA-N-Gly 均为球形纳米粒; Gly 粒子分散均匀, 无团聚现象, 粒径在 50~100 nm 之间; QA-N-Gly 粒子分散均匀, 几乎无团聚现象, 粒径在

100~200 nm 之间。由此可见, Gly 经过逐步修饰后仍可保持树枝状纳米球结构。

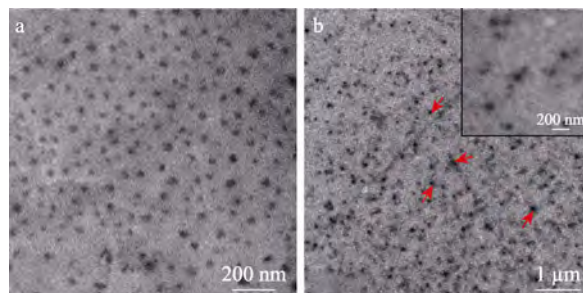


图 3 Gly (a) 和 QA-N-Gly (b) 的 TEM 图
Fig. 3 TEM images of Gly (a) and QA-N-Gly (b)

2.2 糖原衍生物的抑菌性评价

抑菌是指采用化学或物理方法抑制或妨碍细菌生长繁殖及其活性的过程。图 4 为 N-Gly 和 QA-N-Gly 的抑菌率 (为了展现整个抑菌过程, 横坐标未按实际比例均匀分割, 下同)。

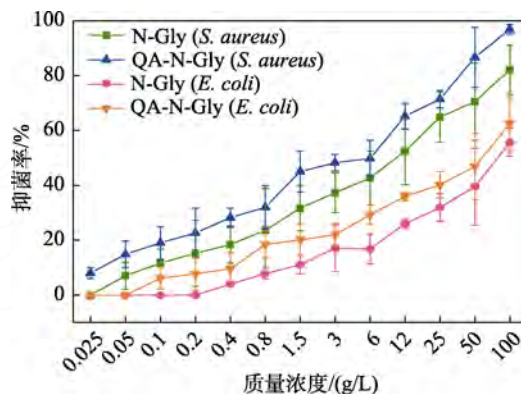


图 4 N-Gly 和 QA-N-Gly 的抑菌率
Fig. 4 Inhibition rates of N-Gly and QA-N-Gly

从图 4 可以看出, 抑菌率随糖原衍生物质量浓度的增加而升高, 且 QA-N-Gly 的抑菌率整体高于 N-Gly 的抑菌率, 说明 QA-N-Gly 的抑菌作用强于 N-Gly。通过 SPSS 软件回归计算 N-Gly 和 QA-N-Gly 的半数最低抑菌浓度 (MIC_{50})^[19], 得到 N-Gly 对 *S. aureus* 的 MIC_{50} 为 7.99 g/L, 对 *E. coli* 的 MIC_{50} 为 79.67 g/L; QA-N-Gly 对 *S. aureus* 的 MIC_{50} 为 2.62 g/L, 对 *E. coli* 的 MIC_{50} 为 44.12 g/L。*S. aureus* 为革兰氏阳性菌, *E. coli* 为革兰氏阴性菌, 两者的细胞壁结构及组成不同。*S. aureus* 的细胞壁较厚, 结构简单, 其中含有大量的肽聚糖和磷壁酸; *E. coli* 细胞壁较薄, 结构复杂, 分为外壁层和内壁层, 其中肽聚糖含量少, 脂类物质含量高^[20]。磷壁酸带有负电荷, 因此, *S. aureus* 更容易被带正电荷的糖原衍生物吸引束缚, 引起细胞破裂死亡; *E. coli* 不含磷壁酸成分, 所以糖原衍生物对 *E. coli* 的吸引和破

坏能力较弱;另外, *E. coli* 的细胞壁结构复杂, 具有更强的韧性、弹性和抗压性, 相对不易被破坏^[21]。两种细菌的细胞结构差异造成了其对正电性糖原衍生物的敏感性不同, 表现为糖原衍生物对 *S. aureus* 的抑菌作用较强, 对 *E. coli* 的抑菌作用较弱。

2.3 糖原衍生物/明胶复合水凝胶的制备和表征

2.3.1 外观形貌分析

水凝胶的外观形貌如图 5 所示。从图 5 可以看出, 明胶水凝胶 (Gel) 为无色透明固体, 氨基化糖原衍生物/明胶复合水凝胶 (N-Gly/Gel) 为乳白色固体, 季铵盐化糖原衍生物/明胶复合水凝胶 (QA-N-Gly/Gel) 为半透明固体且具有光泽。



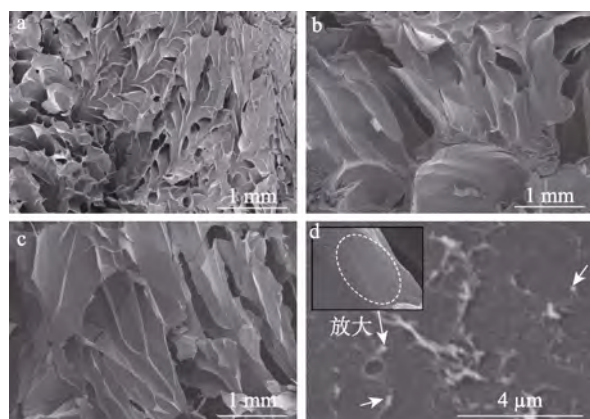
a—Gel; b—N-Gly/Gel; c—QA-N-Gly/Gel

图 5 水凝胶的外观形貌

Fig. 5 Appearance of hydrogels

2.3.2 微观结构分析

通过 SEM 观察水凝胶的微观结构, 如图 6 所示。从图 6 可以看出, Gel 呈现出致密且均匀的网络孔隙, 孔隙多而小, 网络骨架密度低; N-Gly/Gel 和 QA-N-Gly/Gel 呈现疏松且不规则的网络孔隙, 孔隙少而大, 网络骨架密度高。放大观察 QA-N-Gly/Gel 的内壁, 发现内壁上有圆形颗粒物质, 根据大小判断是 QA-N-Gly 纳米粒, 说明 QA-N-Gly 纳米粒交联在明胶骨架上。



a—Gel; b—N-Gly/Gel; c—QA-N-Gly/Gel; d—QA-N-Gly/Gel 内壁纳米粒子

图 6 水凝胶的 SEM 图

Fig. 6 SEM images of hydrogels

2.3.3 机械性能分析

储能模量 (G') 反映材料的弹性行为和固态特

性, 损耗模量 (G'') 反映材料的黏性行为 and 液态特性。通过流变仪检测水凝胶的 G' 和 G'' 随角频率变化的动态扫描曲线, 结果见图 7a。如图 7a 所示, 3 种水凝胶的 G' 均高于 G'' , 说明固态特性占主导, 水凝胶具有稳定的交联网络^[22]。比较不同水凝胶的 G' , 发现 N-Gly/Gel 和 QA-N-Gly/Gel 的 G' 相近, 但远高于 Gel 的 G' , 表明 N-Gly/Gel 和 QA-N-Gly/Gel 具有较好的储能能力, N-Gly/Gel 和 QA-N-Gly/Gel 的内部结构相较 Gel 变得更加稳定。

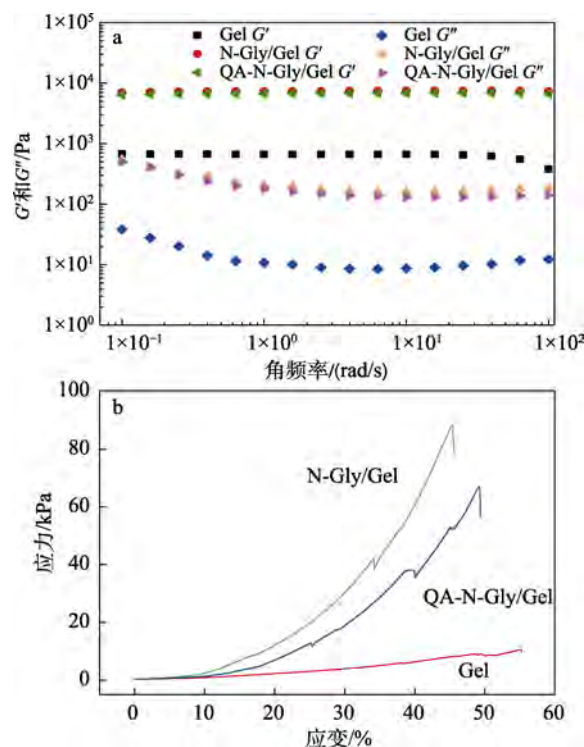


图 7 水凝胶的 G' 和 G'' 随角频率变化的动态扫描曲线 (a) 及应力-应变曲线 (b)

Fig. 7 Dynamic scanning curves of G' and G'' with angular frequency (a) and stress-strain curves (b) of hydrogels

水凝胶的应力-应变曲线见图 7b。水凝胶的压缩过程如图 8 所示, 压缩前的水凝胶为一个完整的圆柱体, 在压缩过程中水凝胶发生了形变, 当压力超过水凝胶的弹性形变极限时, 水凝胶的结构受到不可逆损伤, 压缩后的水凝胶出现了不同程度的破裂。应力-应变曲线可反映材料在外力作用下的弹性、塑性、屈服、断裂等变形过程^[23]。如图 7b 所示, 3 种水凝胶的应力随应变的增大而逐渐上升, 其中 Gel 上升缓慢, 在 55.2% 应变处断裂, 断裂应力为 10.6 kPa, 压缩模量为 8.61 kPa; N-Gly/Gel 上升最快, 在 44.3% 应变处断裂, 断裂应力为 88.2 kPa, 压缩模量为 24.1 kPa; QA-N-Gly/Gel 上升较快, 在 49.1% 应变处断裂, 断裂应力为 66.8 kPa, 压缩模量为 13.3 kPa。

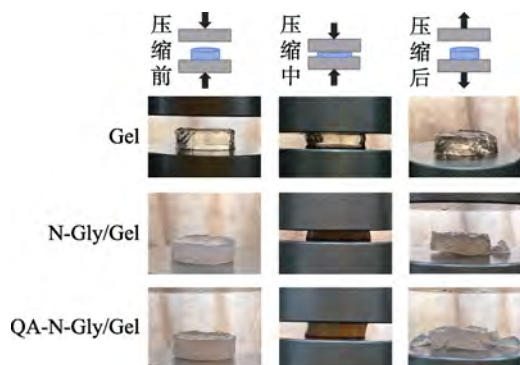


图 8 水凝胶的压缩过程

Fig. 8 Compression process of hydrogels

由此说明, 机械性能方面 N-Gly/Gel 最强, QA-N-Gly/Gel 次之, Gel 最弱。水凝胶的机械性能与其内部交联结构密切相关, N-Gly 上的大量氨基可以与明胶上的羧基发生交联, 增强凝胶体系的机械强度; 将 N-Gly 进一步季铵盐化修饰后, 糖原链段上的游离伯氨基数量减少, 与明胶羧基的交联位点相应减少, 凝胶的交联程度变低, 因此, QA-N-Gly/Gel 的机械强度介于 N-Gly/Gel 和 Gel 之间。

2.3.4 体外溶胀性能分析

水凝胶的溶胀曲线如图 9 所示。从图 9 可以看出, 随着时间的延长, 水凝胶溶胀率逐渐上升。随着水凝胶溶胀率的上升, 样品的增重幅度逐渐减小, 溶胀率变化趋于平稳, 水凝胶逐渐吸水饱和。水凝胶的溶胀过程实际上是两种相反趋势的平衡过程: 溶剂渗透到凝胶网络内部使三维分子网络伸展, 凝胶体积增大, 同时分子网络的弹性收缩力试图使网络收缩, 当两种相反的倾向互相抵消时, 水凝胶达到溶胀平衡^[24]。N-Gly/Gel 和 QA-N-Gly/Gel 的溶胀速度和程度明显低于 Gel。Gel 的网络结构致密, 高密度的孔隙更有利于吸收外源水分, 溶胀较快。糖原衍生物的加入, 降低了水凝胶的孔隙密度, 增大了骨架体系的交联程度, 因此, 水凝胶的弹性收缩趋势增大, 溶胀相对缓慢。

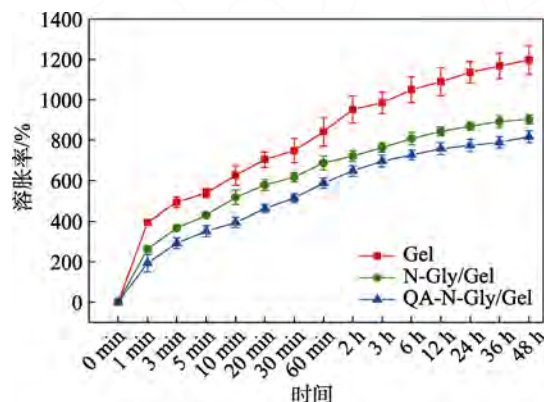
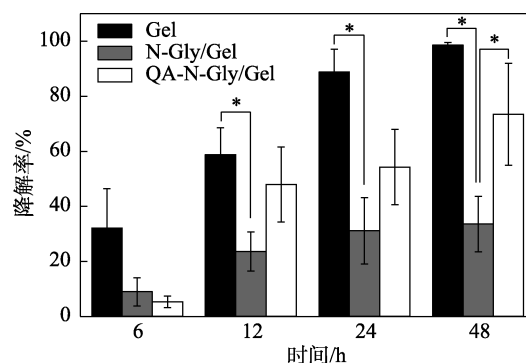


图 9 水凝胶的溶胀曲线

Fig. 9 Swelling curves of hydrogels

2.3.5 体外降解性能分析

水凝胶在 PBS 溶液中的降解率如图 10 所示。从图 10 可以看出, 在 37 °C PBS 溶液中, 随着时间的增长, 凝胶的降解率逐渐上升。Gel 降解最快, 在 48 h 时, 其降解率超过 90%; QA-N-Gly/Gel 降解速度适中, 在 48 h 时, 其降解率达到 73.4%; N-Gly/Gel 降解相对缓慢, 在 48 h 时, 其降解率仅为 33.5%。水凝胶的降解性能可以间接反映凝胶的内部交联情况^[25], 由此判断 Gel 交联疏松, QA-N-Gly/Gel 交联适中, N-Gly/Gel 交联紧密。在胶原酶溶液中, 3 种水凝胶在 6 h 的降解率已达到 90% 以上, 12 h 的降解率均达到 100% (图略), 说明以明胶为基材的本研究水凝胶在胶原酶的作用下会快速降解。



“*”代表差异显著 ($P < 0.05$), 下同

图 10 水凝胶在 PBS 溶液中的降解率

Fig. 10 Degradation rate of hydrogels in PBS solution

2.4 水凝胶的抑菌性评价

通过平板计数法测定水凝胶的抑菌性, 结果见图 11。如图 11a 所示, 经 Gel 处理过的菌液, 平板上 *S. aureus* 和 *E. coli* 的菌落生长良好且数量较多; 经 N-Gly/Gel 处理的菌液, 平板上的菌落明显减少; 经 QA-N-Gly/Gel 处理的菌液, 平板上的菌落最少。酸法猪皮明胶的等电点一般在 pH 7.5~9.0^[26], 在 pH 7 的生理盐水中明胶表现为碱性, 偏于带正电^[27]。大多数细菌等电点的 pH 为 2~5, 在生理盐水中细菌表面带负电荷^[28], 因此, 在水凝胶与菌液共孵育的过程中, 明胶和细菌之间具有一定的相互吸引作用, 通过 SEM 观察发现, *S. aureus* 和 *E. coli* 可吸附在 Gel 水凝胶的明胶基材骨架上 (图 11b 和 c)。以 Gel 组为对照计算抑菌率能够有效反映糖原衍生物/明胶复合水凝胶的抑菌效果, 如图 11d 所示, QA-N-Gly/Gel 的抑菌效果显著优于 N-Gly/Gel, 其中, QA-N-Gly/Gel 对 *S. aureus* 的抑菌率达到 97%, 对 *E. coli* 的抑菌率达到 50%。由于 *S. aureus* 的细胞结构更易被强阳离子破坏, 因而, QA-N-Gly/Gel 对 *S. aureus* 的抑制作用强于对 *E. coli*。

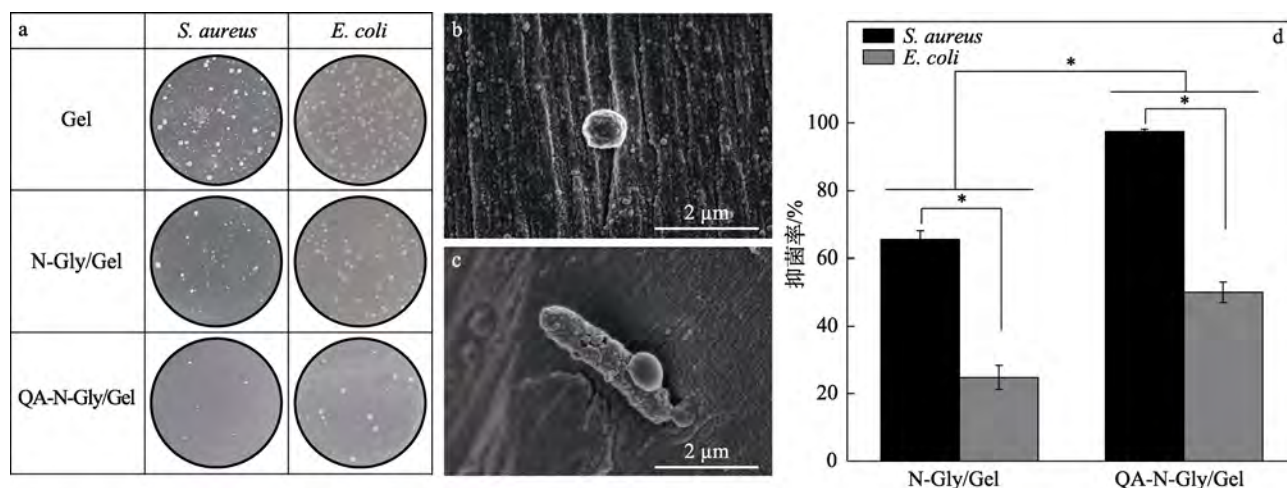


图 11 平板上菌落的生长情况 (a); 水凝胶中 *S. aureus* (b) 和 *E. coli* (c) 的 SEM 图; 水凝胶的抑菌率 (d)
Fig. 11 Growth of colonies on the plates (a); SEM images of *S. aureus* (b) and *E. coli* (c) in hydrogel; Inhibition rate of hydrogels (d)

2.5 水凝胶的生物相容性评价

将水凝胶与红细胞一起孵育后, 评估不同凝胶的血液相容性, 如图 12a 所示 (离心管中的上清液与横坐标顺序对应), Gel、N-Gly/Gel、QA-N-Gly/Gel 的溶血率均低于 5%, 观察上清液无溶血现象, 表明 3 种凝胶不会对红细胞造成溶胀, 具有良好的血液相容性。

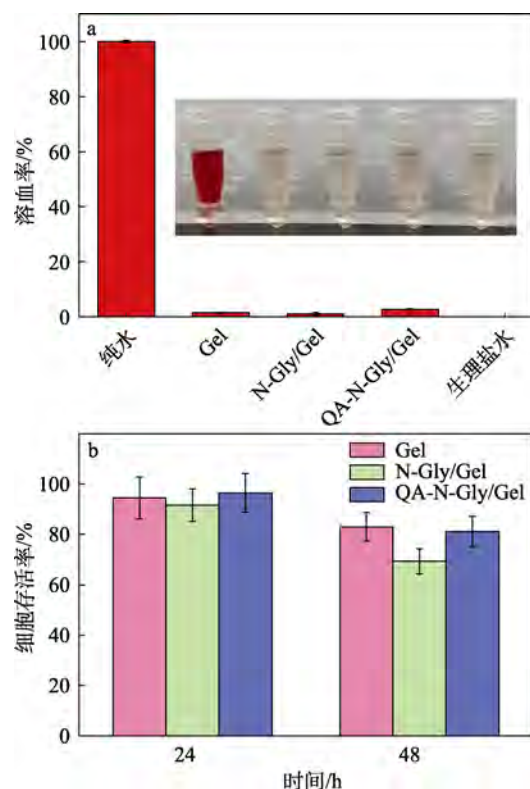


图 12 水凝胶的溶血率 (a); NIH-3T3 的细胞存活率 (b)
Fig. 12 Hemolysis rate of hydrogels (a); Cell viability of NIH-3T3 (b)

采用 MTT 法检测水凝胶对 NIH-3T3 细胞的毒

性, GB/T 16886.5—2017 医疗器械生物学评价中概述: 定量实验中细胞活性下降大于 30% 被认为有细胞毒性。如图 12b 所示, 经过 24 h 的培养, 3 种水凝胶的细胞存活率均大于 90%, 没有明显的细胞毒性; 经过 48 h 的培养, Gel 和 QA-N-Gly/Gel 的细胞存活率维持在 80% 以上, N-Gly/Gel 的细胞存活率在 60%~70% 之间。水凝胶的细胞存活率是相对于普通培养基中细胞活力的比值, 48 h 的细胞存活率相较于 24 h 有所下降。24 h 时, 细胞在普通培养基中比在凝胶浸提液中生长得更好, 48 h 时, 这种趋势更加明显, 说明浸提液中可能含有不利于细胞长期增殖的物质, 其中 N-Gly/Gel 的细胞存活率下降最显著且表现出明显的细胞毒性。QA-N-Gly/Gel 的细胞毒性小于 N-Gly/Gel, 说明在糖原氨基化修饰的基础上再进行季铵盐化修饰不仅可以提高抑菌性还可降低细胞毒性, 因此, QA-N-Gly/Gel 的安全性较高, 生物相容性较好。

3 结论

(1) 对糖原进行逐步正电性修饰, 成功制备了糖原衍生物 QA-N-Gly, 这种带有大量正电荷的糖原树枝状纳米球可以破坏细菌的细胞膜和细胞壁, 发挥抗菌作用。

(2) 以明胶为基材, 通过化学交联构建了糖原衍生物/明胶复合水凝胶, 与单纯的明胶水凝胶相比, 糖原衍生物/明胶复合水凝胶的交联程度和机械强度更高, 溶胀速率和降解速率较低, 稳定性更高。

(3) 强正电性 QA-N-Gly 纳米粒赋予了明胶基水凝胶良好的抑菌性, QA-N-Gly/Gel 水凝胶对 *S. aureus* 和 *E. coli* 的抑菌率分别达到 97% 和 50%, QA-N-Gly/Gel 对 *S. aureus* 的抑制效果尤为显著。此

外, QA-N-Gly/Gel 无溶血性且细胞毒性低, 生物相容性较好。综上, 本研究制备的功能性明胶基水凝胶作为一款新型抗菌材料具有良好的科学意义和应用价值。

参考文献:

- [1] ZHANG Y S, KHADEMHOSEINI A. Advances in engineering hydrogels[J]. Science, 2017, 356(6337): eaaf3627.
- [2] WONG L C, LEH C P, GOH C F. Designing cellulose hydrogels from non-woody biomass[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 264: 118036.
- [3] XU Q, XU X, MA J, *et al.* "Casein micelle-nanoparticle double cross-linking" triggered stable adhesive, tough CA/MWCNT/PAAm hydrogel wearable strain sensors, for human motion monitoring[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 238: 124055.
- [4] WANG X C (王学川), GAN T (甘婷), ZHU X (朱兴). Classification of functional gelatin-based hydrogels and research progress[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2021, 38(2): 217-225, 248.
- [5] JAIN A, DUVVURI L S, FARAH S, *et al.* Antimicrobial polymers[J]. Advanced Healthcare Materials, 2014, 3(12): 1969-1985.
- [6] FAN Y, MOHANTY S, ZHANG Y, *et al.* Dendritic hydrogels induce immune modulation in human keratinocytes and effectively eradicate bacterial pathogens[J]. Journal of the American Chemical Society, 2021, 143(41): 17180-17190.
- [7] BESFORD Q A, CAVALIERI F, CARUSO F. Glycogen as a building block for advanced biological materials[J]. Advanced Materials, 2020, 32(18): e1904625.
- [8] WOJNIOVICZ M, BESFORD Q A, WU Y L, *et al.* Glycogen-nucleic acid constructs for gene silencing in multicellular tumor spheroids[J]. Biomaterials, 2018, 176: 34-49.
- [9] LAN B, WU J, LI N, *et al.* Hyperbranched cationic polysaccharide derivatives for efficient SiRNA delivery and diabetic wound healing enhancement[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154: 855-865.
- [10] ENGELBERTH S A, HEMPEL N, BERGKVIST M. Chemically modified dendritic starch: A novel nanomaterial for SiRNA delivery[J]. Bioconjugate Chemistry, 2015, 26(8): 1766-1774.
- [11] SONG R R (宋然然). Preparation and characterization of antibacterial alginate/quaternarized chitosan hydrogel dressings[D]. Jinan: Shandong University (山东大学), 2018.
- [12] DENG S H (邓淑豪), LAI L (赖莉), WANG Z Q (王志清), *et al.* Glycogen as novel gene vector[J]. Journal of Food Science and Biotechnology (食品与生物技术学报), 2022, 41(5): 38-45.
- [13] PAN Q Y (潘晴彦), ZHOU C (周闯), YANG Z M (杨子明), *et al.* Preparation and characterization of quaternary ammonium salt modified chitosan and its composite film[J]. Modern Food Science and Technology (现代食品科技), 2021, 37(12): 136-144, 204.
- [14] PAIS M, GEORGE S D, RAO P. Glycogen nanoparticles as a potential corrosion inhibitor[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 182: 2117-2129.
- [15] LAN B Y, WU J F, LI N, *et al.* Hyperbranched cationic polysaccharide derivatives for efficient SiRNA delivery and diabetic wound healing enhancement[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154: 855-865.
- [16] WEN Y, TAN Z, SUN F, *et al.* Synthesis and characterization of quaternized carboxymethyl chitosan/poly(amidoamine) dendrimer core-shell nanoparticles[J]. Materials Science and Engineering: C, 2012, 32(7): 2026-2036.
- [17] ZHANG X H, ZHOU J, YING H Y, *et al.* Glycogen as a cross-linking agent of collagen and nanohydroxyapatite to form hydrogels for bMSC differentiation[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2020, 8(4): 2106-2114.
- [18] ZHANG R Q (张瑞琪). Extraction of phyto glycogen and its application in cosmetic[D]. Wuxi: Jiangnan University (江南大学), 2019.
- [19] SONG T, XI Y J, DU J Z. Antibacterial hydrogels incorporated with poly(glutamic acid)-based vesicles[J]. Acta Polymerica Sinica, 2018, (1): 119-128.
- [20] ZHOU Z R (周正任). Medical microbiology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House (人民卫生出版社), 2003.
- [21] YU N (于宁). Preparation and properties of quaternary ammonium cationic antibacterial gelatin film[D]. Jinan: Qilu University of Technology (齐鲁工业大学), 2020.
- [22] VEDADGHAVAMI A, MINOOEI F, MOHAMMADI M H, *et al.* Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications[J]. Acta Biomaterialia, 2017, 62: 42-63.
- [23] JI Q, ZHANG H, ZHANG X H, *et al.* Hydrosoluble collagen based biodegradable hybrid hydrogel for biomedical scaffold[J]. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 2020, 31(17): 2199-2219.
- [24] YAN M Y (闫鸣艳), QIN S (秦松). Effect of gallic acid and rutin on the swelling behavior and state of water in gelatin from fish skin[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2015, 36(7): 79-82.
- [25] ORYAN A, KAMALI A, MOSHIRI A, *et al.* Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 678-688.
- [26] ZHAO Z H (赵振厚). Gelatin isoelectric point and mixing of gelatin[J]. The Science and Technology of Gelatin (明胶科学与技术), 2003, 23(2): 72-73.
- [27] ZHANG W J (张炜杰). Introduction to gelatin properties[J]. The Science and Technology of Gelatin (明胶科学与技术), 2014, 34(4): 205-209.
- [28] ZHOU C L (周长林). Experiment and guide for microbiology[M]. Beijing: The Medicine Science and Technology Press of China (中国医药科技出版社), 2015.
- [55] JIN C, SINAWANG G, OSAKI M, *et al.* Self-healing thermoplastic polyurethane linked via host-guest interactions[J]. Polymers, 2020, 12(6): E1393.
- [56] SUGANE K, SHIBATA M. Self-healing thermoset polyurethanes utilizing host-guest interaction of cyclodextrin and adamantane[J]. Polymer, 2021, 221: 123629.
- [57] ZHANG E D, SHI J, XIAO L Q, *et al.* A highly efficient bionic self-healing flexible waterborne polyurethane elastic film based on a cyclodextrin-ferrocene host-guest interaction[J]. Polymer Chemistry, 2021, 12(6): 831-842.
- [58] XIAO L Q, SHI J, WU K, *et al.* Self-healing supramolecular waterborne polyurethane based on host-guest interactions and multiple hydrogen bonds[J]. Reactive and Functional Polymers, 2020, 148: 104482.

(上接第 508 页)

- [51] NOMIMURA S, OSAKI M, PARK J, *et al.* Self-healing alkyl acrylate-based supramolecular elastomers cross-linked via host-guest interactions[J]. Macromolecules, 2019, 52(7): 2659-2668.
- [52] OKU T, FURUSHO Y, TAKATA T. A concept for recyclable cross-linked polymers: Topologically networked polyrotaxane capable of undergoing reversible assembly and disassembly[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2004, 43: 966-969.
- [53] SINAWANG G, OSAKI M, TAKASHIMA Y, *et al.* Supramolecular self-healing materials from non-covalent cross-linking host-guest interactions[J]. Chemical Communications, 2020, 56(32): 4381-4395.
- [54] WANG Y F, ZHANG D L, ZHOU T, *et al.* A reversible functional supramolecular material formed by host-guest inclusion[J]. Polymer Chemistry, 2014, 5(8): 2922-2927.