

功能材料

利用二醛木聚糖一锅法制备纳米银抗菌水凝胶

陈 功¹, 项舟洋¹, 宋 涛^{1,2*}

[1. 华南理工大学 纸浆造纸工程国家重点实验室, 广东 广州 510640; 2. 齐鲁工业大学 (山东省科学院) 生物基材料与绿色造纸国家重点实验室 山东 济南 250353]

摘要: 利用二醛木聚糖 (DAX) 可与羧甲基壳聚糖 (CMCS) 及银氨溶液同时反应的特性, 以聚乙烯醇 (PVA) 为结构稳定剂, 一锅法制备了具有优异抗菌性能的 CMCS/PVA 纳米银抗菌水凝胶。采用 FTIR、TGA、TEM、XRD 和 SEM 对 DAX, 纳米银粒子 (SNPs) 和水凝胶的形貌、结构进行了表征。结果表明, DAX 在整个反应中起到了双功能作用, 成功地与 CMCS 和 PVA 发生反应, 共同构成了双网络结构的水凝胶, 提高了水凝胶的热稳定性及力学性能。DAX 在室温条件下能快速还原出 SNPs, SNPs 粒径在 20~80 nm 之间, 具有较好的分散性。SNPs 的参与使 CMCS/PVA 水凝胶对大肠杆菌和金色葡萄球菌抗菌效果显著提高。此外, 制备的水凝胶具有良好的细胞相容性, 其对 L929 细胞的细胞相对存活率都在 95% 以上。

关键词: 二醛木聚糖; 银纳米粒子; 羧甲基壳聚糖; 抗菌活性; 水凝胶; 功能材料

中图分类号: TQ427.26 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2022) 10-2027-08

One-pot preparation of antibacterial nanosilver hydrogels from dialdehyde xylan

CHEN Gong¹, XIANG Zhouyang¹, SONG Tao^{1,2*}

[1. State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China; 2. State Key Laboratory of Biobased Materials and Green Papermaking, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250353, Shandong, China]

Abstract: Carboxymethyl chitosan (CMCS)/polyvinyl alcohol (PVA) nanosilver antibacterial hydrogels were successfully synthesized by one-pot reaction of dialdehyde xylan (DAX) with CMCS and silver ammonia solution using PVA as structural stabilizer. The morphology and structure of DAX, silver nanoparticles (SNPs) and hydrogels obtained were characterized by FTIR, TGA, TEM, XRD and SEM. The results showed that DAX, playing a dual function in the whole process, successfully reacted with CMCS and PVA forming a double network, which improved the thermal stability and mechanical properties of hydrogels. Meanwhile, SNPs, produced by the quick reduction reaction between DAX and silver ammonia at room temperature, showed a particle size distribution between 20 and 80 nm, good dispersity, and significant enhancement of the antibacterial efficacy of CMCS/PVA hydrogels against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In addition, the hydrogels exhibited good cytocompatibility with the cell relative survival rate of L929 cells cultured in medium containing hydrogel above 95%.

Key words: dialdehyde xylan; silver nanoparticles; carboxymethyl chitosan; antibacterial activity; hydrogels; functional materials

银纳米粒子 (SNPs) 具有粒径小、比表面积大、广谱抗菌能力强大和药物耐受性好等优势^[1-2], 其大小是影响其抗菌活性的关键参数^[3-4]。在实际应用

中, 应避免 SNPs 的聚集, 因为聚集会增加 SNPs 的大小, 相应地降低其有效比表面积, 导致沉降并对其抗菌活性产生负面影响^[5-6]。此外, SNPs 的大小

收稿日期: 2022-03-10; 定用日期: 2022-04-08; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220209

基金项目: 纸浆造纸工程国家重点实验室开放基金资助项目 (202104); 生物基材料与绿色造纸国家重点实验室开放基金资助项目 (GZKF202123); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2020A1515010823)

作者简介: 陈 功 (1994—), 男, 硕士生, E-mail: 2363796797@qq.com。联系人: 宋 涛 (1980—), 男, 副教授, E-mail: songt@scut.edu.cn。

分布应尽可能均匀。然而,现阶段 SNPs 大小及其分布还难以控制^[7]。团聚、分散不均匀、渗漏、快速释放和容易进入细胞仍然是亟待解决的关键问题^[8-9]。

近年来,开发高效的绿色化学方法合成金属纳米颗粒已成为研究热点。OUNKAEW 等^[10]利用羧甲基淀粉一步还原 AgNO_3 溶液来制备羧甲基淀粉/聚乙烯醇/纳米银的纳米复合水凝胶,尽管避免了还原剂的加入,但反应条件苛刻,需要在 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH } 5.5\sim 6.5$ 的条件下搅拌反应 12 h,而且得到的 SNPs 有絮聚现象发生。NAZERUDDIN 等^[11]利用芫荽籽提取物木犀草素制备 SNPs,木犀草素中的黄酮类物质将银离子还原为 SNPs,自身变成烯醇的形式。BHARTI 等^[12]在研究白杨素功能化高稳定性的 SNPs 时发现,白杨素通过将羟基氧化成羰基,形成 SNPs 的机制。上述研究虽然都是利用多糖来还原稳定 SNPs,但存在反应效率低下、原料分布不广泛的问题。自然界广泛分布的木聚糖通过简单氧化改性即可得到二醛木聚糖(DAX),反应能在常温下几分钟之内完成^[13]。DAX 是常用的交联剂,可与羧甲基壳聚糖(CMCS)的氨基发生席夫碱反应形成亚胺键,同时,DAX 含有的大量醛基与银氨溶液发生银镜反应。

受此启发,本文拟利用 DAX 作为交联剂与水凝胶前体溶液[CMCS/聚乙烯醇(PVA)混合液]形成 CMCS/PVA 水凝胶,还借助其醛基同时从 SNPs 前体溶液(银氨溶液)还原出 SNPs,一锅法来制备含有 SNPs 的 CMCS 水凝胶。此外,由于 CMCS 水凝胶具有较弱的机械性能,因此加入生物相容性良好的 PVA,通过冻融与 CMCS 形成双网络结构来提高水凝胶的结构稳定性。最后系统研究水凝胶的热稳定性、机械性能、纳米粒子分布、抗菌作用等重要的物理和生物学特性,以评估和验证其在伤口敷料领域的潜力。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

聚乙烯醇(1799 型)、硝酸银标准溶液(0.1 mol/L)、羧甲基壳聚糖(取代度 $\geq 80\%$)、氨水(质量分数为 3%)、乙二醇、 NaIO_4 , AR, 上海麦克林生化科技有限公司;木聚糖(质量分数为 85%), BR, 上海源叶生物科技有限公司;胎牛血清,沃卡威生物技术有限公司;胰酶-EDTA,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;磷酸盐缓冲溶液(PBS, $\text{pH } 7.0$), 武汉博士德生物工程有限公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四氮唑(MTT), 美国 MedChemExpress 生物科技公司;透析膜(截留相对分子质量为 14 kDa), 中科瑞泰生物技术有限公司;去离子水,自制。

Vertex 70 型傅里叶变换红外光谱仪、Avance III HD 600 MHz 核磁共振波谱仪、D8 型 X 射线多晶衍射仪,德国 Bruker 公司;Carl Zeiss 型场发射扫描电子显微镜,德国 Merlin 公司;INSTRON 5565 型电子万能材料试验机,美国 INSTRON 公司;Netzsch TG 209 F1 型热重分析仪,德国 Netzsch 公司;JEM-2100 型透射电子显微镜,日本电子株式会社;SCO6WE 二氧化碳恒温培养箱,美国 SHELLAB 公司;EPOCH2 酶标检测仪,美国安捷伦公司;Alpha-1900SPlus 双光束多带宽紫外-可见分光光度计,上海谱元仪器有限公司;Shimadzu EDX-GP 能量色散型 X 射线荧光光谱仪,日本岛津公司;BK-EL10B 博科 8 通道酶标仪,山东欧莱博医疗器械有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 银氨溶液的配制

在洁净的玻璃瓶中加入 5 mL 硝酸银标准溶液,然后加入 1 mL 质量分数为 10%的 NaOH 水溶液,振荡玻璃瓶,可以看到黑色沉淀。逐滴加入质量分数为 2%的氨水,直到最初产生的沉淀恰好溶解为止,将得到的银氨溶液避光保存。

1.2.2 DAX 的制备

DAX 基于先前描述的方法制备^[13],但稍作修改。将木聚糖(3 g)分散在去离子水(100 mL)中。将 NaIO_4 (6 g)加入分散体中,在黑暗中搅拌 8 h (300 r/min , $70\text{ }^\circ\text{C}$)。将乙二醇(5 mL)添加到上述反应混合物中并搅拌 2 h。然后在去离子水中使用透析膜对反应混合物进行透析,直到渗透液的电导率接近去离子水的电导率。通过旋转蒸发器将滞留物浓缩至 100 mL 并真空过滤以除去未溶解的剩余物,得到质量浓度为 30 g/L 的 DAX 溶液。

1.2.3 水凝胶的制备

将 PVA 溶解在 $90\text{ }^\circ\text{C}$ 的去离子水中制成 PVA 溶液(质量分数为 5%),取不同质量的 CMCS 加入到 PVA 溶液中并搅拌 1 h (800 r/min),分别得到 CMCS 的质量分数为 1%、2%、3%的 CMCS/PVA 混合溶液,CMCS 的质量分数按式(1)计算:

$$w/\% = \frac{m_1}{m_1 + m_2} \times 100 \quad (1)$$

式中: w 为 CMCS 的质量分数,%; m_1 和 m_2 分别为 CMCS 和 PVA 溶液的质量, g。

分别取质量分数分别为 1%、2%、3%的 CMCS/PVA 混合溶液 5 mL,各 3 份,分别加入 0.7 mL 银氨溶液并搅拌 30 min (800 r/min),将得到的 3 组分混合液在搅拌条件下 (800 r/min) 分别加入 0.1、0.2、0.3 mL 质量浓度为 30 g/L 的 DAX 溶液直至形成水凝胶 CMCS/PVA,最后将所得水凝胶放入 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 的冰箱中冷冻 24 h 后解冻,循环 3 次。为了评估 DAX

对水凝胶性能的影响,还制备了不添加 DAX 和银氨溶液的水凝胶作为参考。各水凝胶中 PVA、银氨溶液、DAX 和 CMCS 的用量见表 1。

表 1 水凝胶中 CMCS/PVA 混合溶液, CMCS, 银氨溶液, DAX 溶液的用量

Table 1 Dosages of CMCS/PVA mixing solution, carboxymethyl chitosan, silver ammonia solution and DAX solution in hydrogels

样品编号	CMCS/PVA 混合溶液 /mL	CMCS/mg	银氨溶液/mL	DAX 溶液/mL
100	5	50	0	0
117	5	50	0.7	0.1
127	5	50	0.7	0.2
137	5	50	0.7	0.3
200	5	100	0	0
217	5	100	0.7	0.1
227	5	100	0.7	0.2
237	5	100	0.7	0.3
300	5	150	0	0
317	5	150	0.7	0.1
327	5	150	0.7	0.2
337	5	150	0.7	0.3

1.3 结构表征与性能测试

1.3.1 木聚糖的氧化度测试

木聚糖的氧化度通过 KI-Thyodene (可溶性淀粉) 指示剂方法测定^[14]。通过在 PBS (pH 7.0) 中混合等体积的 KI 溶液 (质量分数为 20%) 和可溶性淀粉溶液 (质量分数为 1%) 来制备指示剂。每隔一段时间 (0.25、0.50、0.75、1、2、4 和 8 h) 定期取样, 以确定反应过程中氧化度的变化。该反应是通过检测高碘酸盐和木聚糖之间氧化还原过程中形成的产物碘酸盐实现的。测量前, 将取出的 DAX 样品按质量比 1:250 稀释, 将 3 mL 稀释样品与 1.5 mL 新鲜指示剂溶液混合, 并用蒸馏水补充至 5 mL。通过将 3 mL 蒸馏水与 2 mL 指示剂溶液混合制备空白对照。采用双光束多带宽紫外-可见分光光度计在 486 nm 波长下测量吸光度。根据初始吸光度和最终吸光度之间的差异, 通过式 (2) 和 (3) 计算木聚糖的氧化度和 NaIO₄ 的残留量:

$$OD / \% = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100 \quad (2)$$

$$PR / \% = 1 - \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100 \quad (3)$$

式中: OD 和 PR 分别为木聚糖的氧化度和 NaIO₄ 残留量, %; A_i 和 A_f 分别为空白对照的吸光度和氧化一定时间后的吸光度。

1.3.2 ¹HNMR 测试

利用核磁共振波谱仪对 DAX 的形成进行了表征, 测试条件: 共振频率 600 MHz, 持续 1 h。该仪

器配备了一个 5 mm 的观测宽带探头 (BBFO), 在室温下使用标准 Bruker 脉冲程序记录 z 梯度。木聚糖和 DAX 均溶于 0.6 mL 氘代二甲基亚砷 (DMSO-d₆) (成分为质量分数为 99.9% DMSO 和 0.03% 四甲基硅烷) 中。加入二甲基亚砷 (DMSO) 作为参照, δ 2.5 作为内标峰。

1.3.3 FTIR 测试

采用 KBr 压片法, 波数范围为 4000~400 cm⁻¹, 分辨率为 4 cm⁻¹ 的条件下使用 32 次扫描的累积。

1.3.4 XRD 测试

水凝胶的晶体结构在 XRD 上记录, 衍射角 (2θ) 为 5°~90°, Cu K_α 辐射 (λ = 0.154 nm)。

1.3.5 SEM 测试

通过 SEM 研究了水凝胶的形貌结构。将水凝胶在 -20 °C 冷冻干燥 12 h, 然后溅射镀金。使用能量色散型 X 射线荧光光谱仪检测水凝胶的元素组成。

1.3.6 TEM 测试

首先将样品 (5 mg) 加入到无水乙醇 (10 mL) 中制成极稀的悬浮液, 过滤后将少量悬浮液滴在 200 目碳膜上进行测定。使用 Image J 软件确定样品的粒度。

1.3.7 TGA 测试

使用热重分析仪在 N₂ 气氛中 (流速 50 mL/min) 以 10 °C/min 的扫描速率把样品从室温加热到 600 °C。使用空的铝坩埚作为参考, 将样品 (6~10 mg) 放入铝坩埚中。

1.3.8 机械性能测试

水凝胶的抗压强度由电子万能材料试验机测定。圆盘形水凝胶 (直径 22 mm, 厚度 11 mm) 以 10 mm/min 的恒定速率压缩。水凝胶的强度是根据同一水凝胶的 5 个样品的平均值计算得到的。

1.3.9 抗菌性能测试

采用抑菌圈法测定水凝胶对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性^[15]。将浓度约为 6×10⁸ CFU/mL 的 0.5 mL 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌溶液包被在 Luria-Bertani (LB) 固体琼脂培养基上。待细菌溶液干燥后, 将圆盘状、经紫外线消毒 (照射 3 h) 的水凝胶样品 (直径 22 mm) 置于 LB 固体琼脂培养基中。将培养基在 37 °C 下培养 24 h, 用游标卡尺测量抑菌圈直径。

1.3.10 细胞毒性测定

通过 MTT 法分析评估 6 组水凝胶 (样品编号为 200、117、127、137、217、317) 对 L929 细胞的细胞毒性^[16]。将 L929 细胞在体积分数为 95% 空气和 5% CO₂ 气氛下于 37 °C 在质量分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养。首先, 将水凝胶样品紫外线灭菌 30 min, 然后分别制备质量浓度为 2 g/L 的水凝胶提取液, 然后将其浸入无血清培养基 (SFM:

包含 DMEM 和质量分数为 1% 抗生素-抗真菌制剂) 中 24 h, 以产生提取培养基。将细胞在 6 孔板中以每孔 1×10^4 个细胞的浓度在含血清的 DMEM 中培养 24 h, 以使细胞附着。用 SFM 将细胞饥饿 12 h。之后, 将培养基替换为提取培养基, 并将细胞再温育 24 h。最终通过 MTT 测定法确定用每种提取培养基培养的细胞的活力。对于 MTT 分析, 首先去除每个平板中的培养基, 并在每孔加入 100 μ L 质量分数为 10% MTT 培养基。之后, 将板在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 4 h。然后除去溶液, 每孔加入 100 μ L DMSO 以溶解蓝紫色结晶甲臞晶体。使用酶标仪在 570 nm 的波长下测量溶液的吸光度。用新鲜的 SFM 培养的细胞的活力作对照。细胞相对存活率按式 (4) 计算:

$$L / \% = \frac{OD_1}{OD_0} \times 100 \quad (4)$$

式中: L 为细胞相对存活率, %; OD_1 和 OD_0 分别为待测溶液和对照组的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 木聚糖的氧化度

木聚糖的氧化度见图 1。

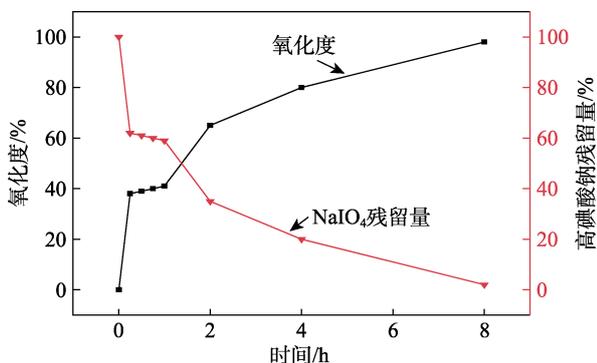


图 1 木聚糖的氧化度
Fig. 1 Oxidation degree of xylan

由图 1 可知, 木聚糖的氧化度高达 98%, 但是高碘酸盐的副反应通常会导致对氧化度的高估。虽然如此, 氧化度高于 90% 是非常可能的。如图 1 所示, 木聚糖的氧化度在前 2 h 急剧增加, 然后增加得缓慢。由于木聚糖的相对分子质量相对较低, 木聚糖的氧化度对所制水凝胶的强度影响较小, 但其更高的氧化度将有利于 DAX 与 CMCS 有效交联的提高。

2.2 DAX 和 CMCS 相互作用的表征

图 2 为木聚糖和 DAX 的 ^1H NMR 谱图。由图 2a 可知, 主要质子信号分别为 δ 4.23、4.11、3.39、2.99 和 2.63, 分别对应于 H-1、H-5、H-4、H-3 和 H-2^[17]。由于使用的原料为甘蔗渣木聚糖, 质量分数为 85%, 含有较多杂质。 δ 4.41 和 4.46 处的弱峰可能是其他半纤维素特征峰。这种现象在氧化后获得的 DAX

上更为明显。DAX ^1H NMR 谱中 (图 2b) 有更多杂质峰, 但基本特征峰保持不变, 在 δ 8.41 处出现一个新峰, 表明存在游离醛结构。

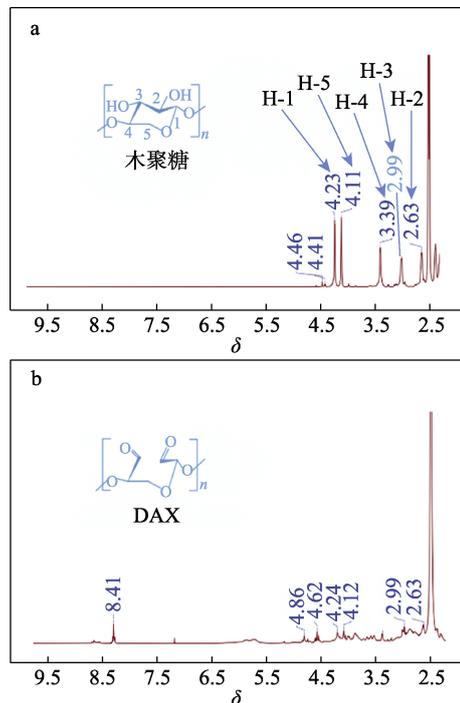


图 2 木聚糖 (a) 和 DAX (b) 的 ^1H NMR 谱图
Fig. 2 ^1H NMR spectra of xylan (a) and DAX (b)

图 3 为木聚糖、DAX、CMCS/DAX、PVA、CMCS、200 和 217 的 FTIR 谱图及水凝胶的 XRD 谱图。

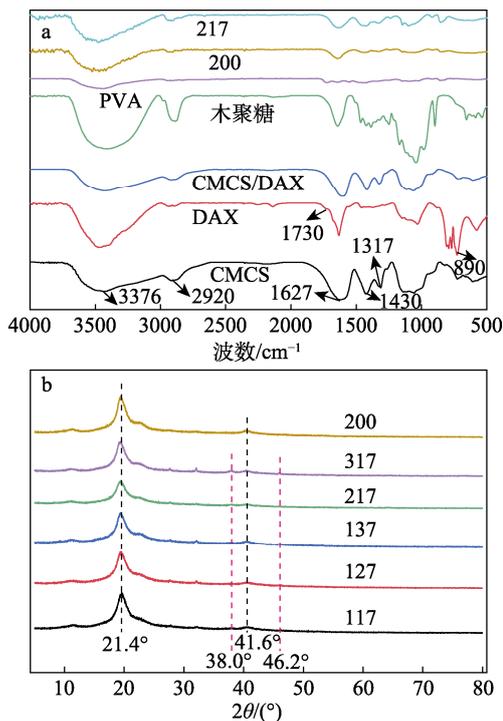


图 3 样品的 FTIR (a) 及水凝胶样品的 XRD (b) 谱图
Fig. 3 FTIR spectra (a) of samples and XRD patterns (b) of hydrogel samples

由图 3a 可知, 与木聚糖原料相比, NaIO_4 氧化后的木聚糖, 即 DAX, 在 890 和 1730 cm^{-1} 处出现了两个新的吸收峰, 分别归属于木聚糖的高碘酸盐

氧化引入的半缩醛和羰基的特征峰, 证明了一部分木聚糖被成功氧化成 DAX。该反应如图 4 所示, 木聚糖的六元环上的 C2—C3 键断开, 形成醛基。

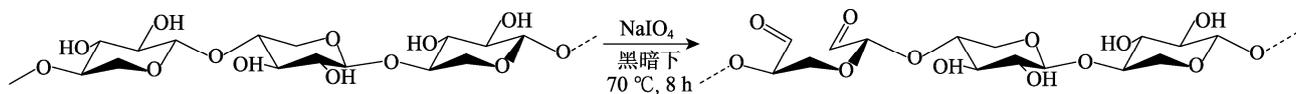


图 4 木聚糖的氧化

Fig. 4 Oxidation of xylan

CMCS 是在碱性条件下通过与一氯乙酸的化学反应合成的, COO^- 在 1627 和 1430 cm^{-1} 处的不对称和对称伸缩振动的存在表明羧基的存在, 这证实了壳聚糖的羧甲基化。此外, 1064 cm^{-1} 处的吸收峰为伯醇反应的 C—O 键的伸缩振动, 表明羧甲基化反应主要发生在 C6 位。最后, 2920 和 1317 cm^{-1} 处的吸收峰分别为 C—H 键的伸缩振动和弯曲振动, 3376 cm^{-1} 处的强宽吸收峰为 O—H 和 N—H 键的伸缩振动。DAX 与 CMCS 混合后, 1730 cm^{-1} 处的醛基峰消失, 表明 CMCS 与 DAX 发生了反应, 但 $1650\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为席夫碱 C=O 键的伸缩振动, 与 CMCS 的 COO^- 不对称伸缩振动峰重叠, 因此, 无法看到 C=N 键的特征吸收峰。PVA 的特征峰出现在 1740 cm^{-1} (C=O 键)、 1431 cm^{-1} (C=O—OR 键)、 1240 cm^{-1} (C—O 键拉伸)、 1096 cm^{-1} (C—O—C 键) 和 3300 cm^{-1} (O—H 键), 而样品 200 的 FTIR 谱图与 PVA 几乎一致, 原因是 CMCS 与 PVA 直接混合冻融后, PVA 质量分数为 5%, 而 CMCS 质量分数仅为 2%。当 DAX 加入到 CMCS、PVA 和银氨溶液的混合物后, 虽然 DAX 与 CMCS 和银氨溶液发生了化学反应, 但同样由于 DAX 和银氨溶液的含量极低, 再加上其他化学键的重叠, 所以无法观察到新的吸收峰, 样品 217 的 FTIR 光谱与样品 200 基本一致。

由图 3b 可知, 样品 200 衍射图谱在 $2\theta=21.4^\circ$ 、 41.6° 处出现衍射峰, 这与文献^[18]报道的 PVA 典型结晶无规立构一致。当 DAX 加入后, 所有的水凝胶都在 $2\theta=38.0^\circ$ 、 46.2° 处出现了新的衍射峰, 归属于 (111)、(200) 晶面^[19], 与 (JCPDS No. 00-004-0783) 一致。

2.3 水凝胶的表观形貌

样品 200、217、227、237 的 FESEM 图见图 5。由图 5 可知, 未添加 DAX 的水凝胶 200 只有 PVA 形成的单一网络; 加入 DAX 后水凝胶中形成了新的网络, 与原来的 PVA 网络相互交错, 且交联密度随 DAX 用量的增加而增加, 由于 SNPs 粒径较小, 所以在 FESEM 中观察不到其的存在^[20]。

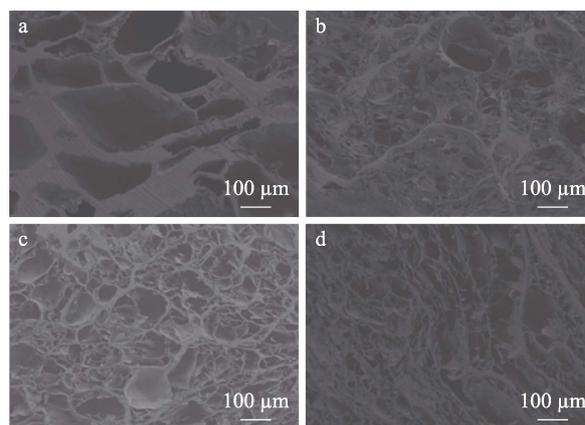


图 5 样品 200 (a)、217 (b)、227 (c)、237 (d) 的 FESEM 图
Fig. 5 FESEM images of samples 200 (a), 217 (b), 227 (c), 237 (d)

5 组水凝胶中 C、O、Na、Ag 的元素映射如图 6 所示。由图 6 可以看出, Ag 元素在水凝胶中分布非常均匀。结果表明, 通过原位合成法成功使 SNPs 均匀分布在了整个水凝胶基质上, 并且 PVA 和 CMCS 对 SNPs 具有良好的稳定作用, 原因是 PVA、CMCS 可溶性高分子可以吸附在粒子上, 带电高分子吸附后会增加粒子间的静电斥力势能; 高分子吸附层通常能减少 Hamaker 常数, 因此能降低粒子间的 Vander Waals 引力势能; 此外, 带有高分子吸附层的胶粒相互接近时, 吸附层的重叠会产生一种新的斥力势能阻止颗粒聚集^[21]。

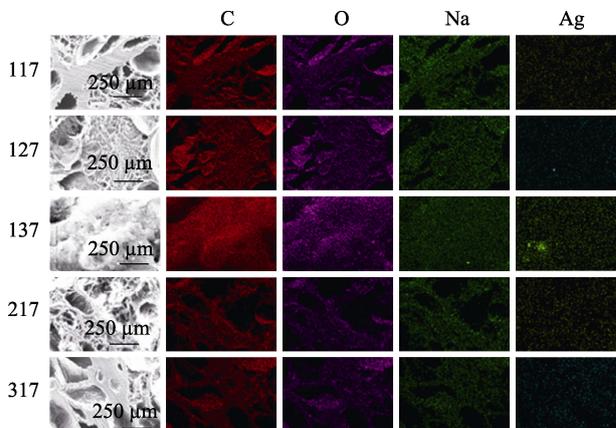
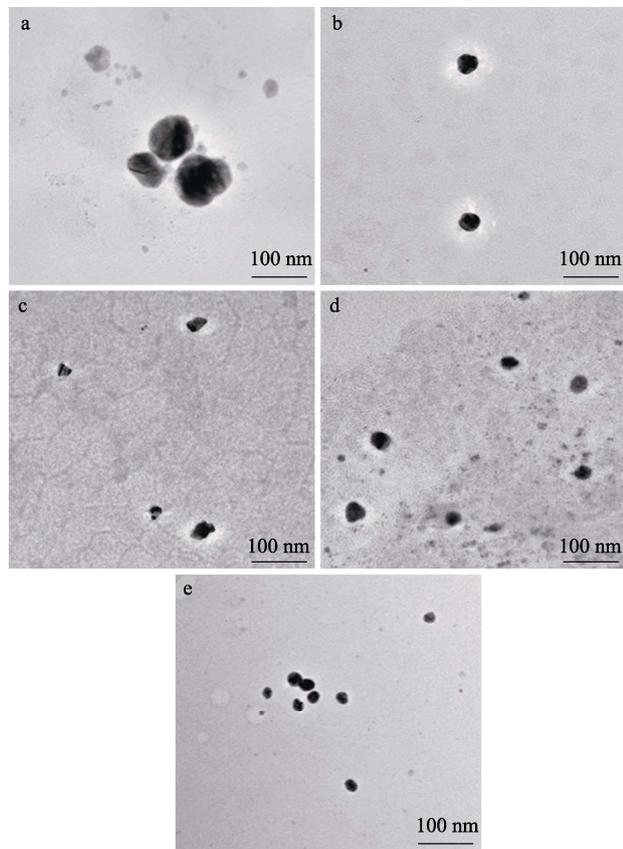


图 6 样品 117、127、137、217、317 中 C、O、Na、Ag 的元素映射

Fig. 6 Elemental mapping images of C, O, Na, Ag in samples 117, 127, 137, 217, 317

2.4 SNPs 的尺寸分析

5 组水凝胶 (137、127、117、217 及 317) 还原得到的 SNPs 的 TEM 图如图 7 所示。



a—137; b—127; c—117; d—217; e—317

图 7 5 组水凝胶中还原得到的 SNPs 的 TEM 图

Fig. 7 TEM images of reduced SNPs in 5 groups of hydrogels

由图 7 可知, DAX 还原得到的 SNPs 为球形, 并且在水凝胶中分布均匀, 没发生絮聚现象, 进一步证明了利用 DAX 一锅法从银氨溶液还原出分布均匀 SNPs 的优势。对比 137、127、117 水凝胶, 发现随着交联剂用量的减少, SNPs 的粒径也逐渐减小, 从 137 的大约 80 nm 降低到 117 的约 50 nm, 原因是同时充当还原剂的 DAX 用量减少了。分析 3 组水凝胶 (117、217、317), 发现 SNPs 的尺寸进一步减小, 从约 50 nm 下降到 20 nm 左右, 原因是 CMCS 用量的增加导致用于交联 CMCS 的 DAX 增加, 间接导致用于还原 SNPs 的 DAX 减少。

2.5 水凝胶的热稳定性分析

通过 TGA 进一步分析了水凝胶的热稳定性, 结果见图 8。由图 8 可知, 所有水凝胶样品的 TGA 曲线都显示出类似的热诱导转变。在第一阶段, 当温度升高到 100 °C 时, 水分蒸发导致所有样品的初始质量减少; 在第二阶段, 质量损失可归因于暴露的 CMCS 和 PVA 侧链的降解; 在最后阶段, 质量损失

与 CMCS 和 PVA 主链基团的分解有关^[22]。从图 8 还可以看出, 随着温度的升高, 样品 200 首先出现质量下降的现象, 而添加 DAX 延迟了水凝胶的质量损失, 说明 DAX 与 CMCS 形成的新键 C=N 提高了水凝胶的热稳定性。

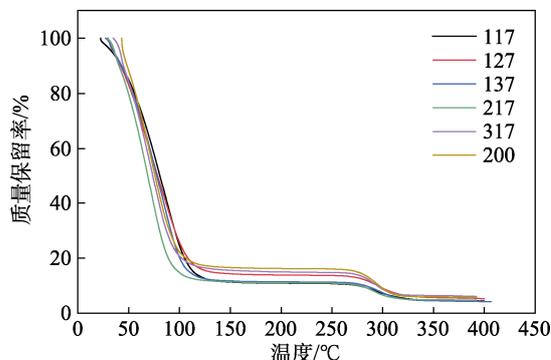
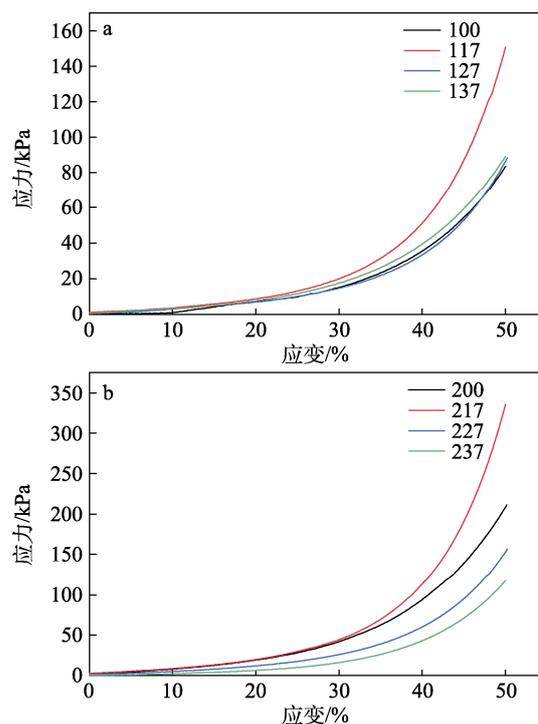


图 8 水凝胶样品的 TGA 曲线

Fig. 8 TGA curves of hydrogel samples

2.6 水凝胶的机械性能分析

为了研究 DAX 用量对水凝胶机械性能的影响, 控制其他条件不变, 只改变 DAX 用量得到图 9 结果。从图 9 可以看出, 3 组结果都有相同的规律, 当应变为 50%, DAX 用量为 0.1 mL 时, 应力达到最大值, 超过该用量时, 应力逐渐降低, 说明交联剂用量存在最佳值。原因可能是: 加入适量的 DAX 会使 CMCS 形成的网络结构与 PVA 经过冻融形成的网络结构形成互穿网络, 从而增强机械性能。当 DAX 过量时, 形成的 CMCS 网络结构与增加的 SNPs 会阻碍冻融过程中 PVA 网络的形成。



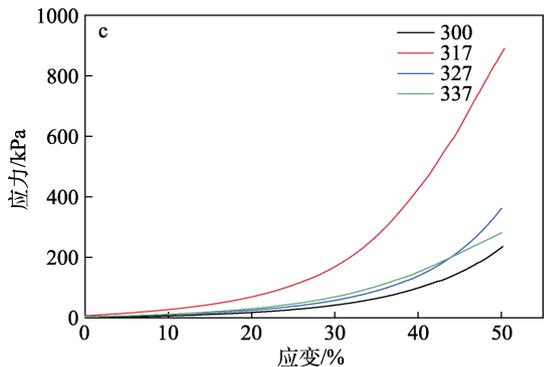


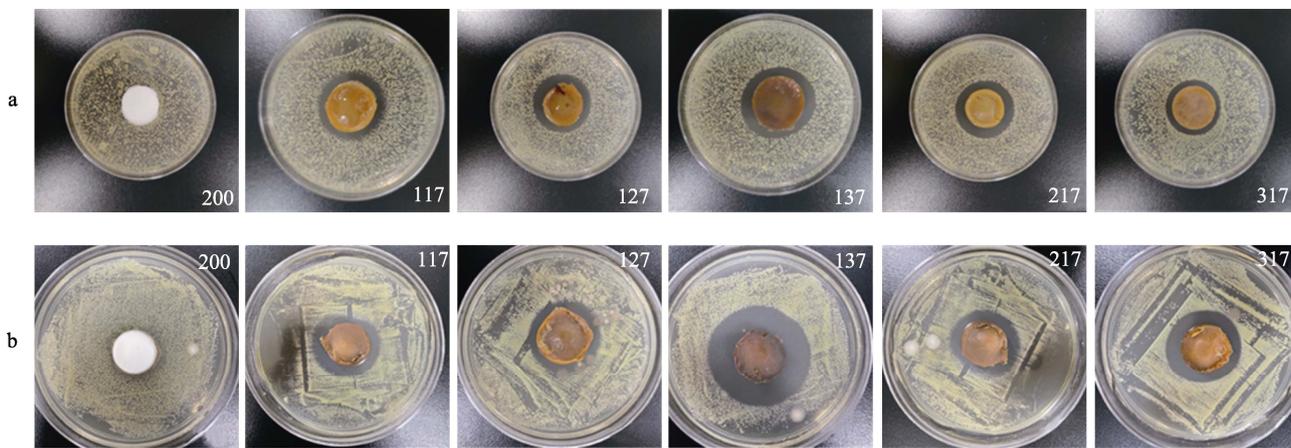
图 9 3 组水凝胶样品的应力-应变曲线

Fig. 9 Stress-strain curves of three groups of hydrogel samples

2.7 水凝胶的抗菌性能分析

考察了 6 组水凝胶对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用, 结果见图 10。从图 10 可以看出,

纯 PVA/CMCS 水凝胶对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌几乎没有抗菌作用, 而形成 SNPs 后, 抗菌作用显著提高, 以 117、127、137 为一组, 控制交联剂 DAX 的用量, 发现随着交联剂用量的增加, 水凝胶的抗菌作用略有提高, 原因在于其他条件不变时交联剂越多, 还原得到的 SNPs 越多, 抗菌能力也越强。从水凝胶的颜色上也能初步判断 SNPs 的含量, 颜色越深说明 SNPs 越多。以 117、217、317 为一组可以考察 CMCS 用量对水凝胶抗菌能力的影响。发现随着 CMCS 用量的增加, 水凝胶抗菌能力略有下降, 原因是过多的 CMCS 和银氨溶液竞争 DAX, 导致用于还原 SNPs 的 DAX 的量减少, 而 CMCS 自身的抗菌能力远不及 SNPs, 最终导致水凝胶的抗菌效果略有下降。



a—大肠杆菌; b—金黄色葡萄球菌

图 10 水凝胶的抗菌作用

Fig. 10 Antibacterial effect of hydrogels

2.8 水凝胶的细胞毒性分析

由于伤口敷料直接与人体组织接触, 所以水凝胶必须具有良好的生物安全性并且对细胞无毒, 因此, 细胞毒性分析是生物材料能否应用的重要指标。水凝胶的细胞毒性通过 MTT 方法对 L929 细胞进行评估来测试, 结果见图 11。

从图 11 可以看出, 6 组水凝胶提取物的质量浓度为 2 g/L 时, 细胞相对存活率都在 95% 以上, 表明本研究制备的水凝胶具有良好的细胞相容性^[23]。

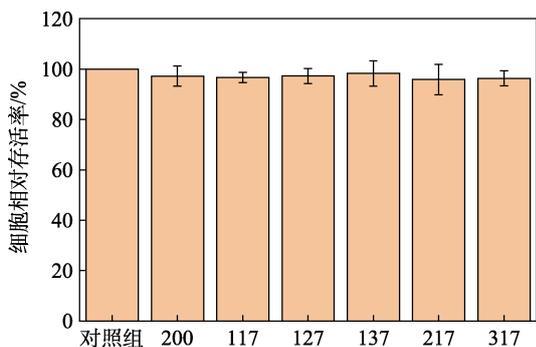


图 11 6 组水凝胶提取物培养 72 h 后对 L929 细胞的细胞毒性
Fig. 11 Cytotoxicity of six groups of hydrogel extracts on L929 cells after 72 h culture

3 结论

利用 DAX 的双重功能性, 作为交联剂与 CMCS 和 PVA 进行交联的同时, 发生银镜反应将银氨溶液中的 SNPs 还原出来并均匀分布, 一锅法制备了具有良好抗菌性能、热稳定性、力学性能的水凝胶。其中, 木聚糖的氧化度高达 90% 以上, 为交联反应和还原 SNPs 提供了大量的醛基; 还原出的 SNPs 粒径在 20~80 nm 之间, 并且均匀分散在水凝胶体系中, 因此极大提高了水凝胶的抗菌性能; DAX 的最佳用量为 0.1 mL (质量浓度 30 g/L), CMCS 与 PVA 经过冻融形成了互穿聚合物网络结构, 从而增强水凝胶的机械性能和热稳定; 最后, SNPs 的参与使 CMCS/PVA 水凝胶对大肠杆菌和金色葡萄球菌抗菌

效果显著提高, 细胞毒性实验表明, 制备的水凝胶具有良好的细胞相容性。综上所述, 本研究所获得的水凝胶在伤口敷料领域具有十分广阔的应用潜力。

参考文献:

- [1] LI Q, LU F, YE H L, *et al.* Silver inlaid with gold nanoparticles: Enhanced antibacterial ability coupled with the ability to visualize antibacterial efficacy[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(8): 9813-9821.
- [2] SHAHVERDI A, FAKHIMI A, SHAHVERDI H R, *et al.* Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*[J]. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 2007, 3(2): 168-171.
- [3] LEOUAY B, STELLACCI F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight[J]. *Nano Today*, 2015, 10(3): 339-354.
- [4] ZHANG N Y (张宁仪), WANG C X (王潮霞). Preparation of nano silver particle polyurethane conductive fiber and its tensile sensing application[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(6): 1170-1177, 1189.
- [5] PORTER G C, SCHWASS D R, TOMPKINS G R, *et al.* AgNP/alginate nanocomposite hydrogel for antimicrobial and antibiofilm applications[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 251: 117017.
- [6] ZHANG J W (张金伟), WANG Y (王瑶), WEN Y H (温永汉), *et al.* Influence of environmental factors on the stability of nano-silver colloid system[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(1): 91-96.
- [7] ZHU J L (朱炯霖), LI H (李红), QIN Y (秦圆), *et al.* Nano-silver multifunctional finishing of cotton fabric[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2020, 37(6): 1274-1281.
- [8] LI Z Y, MI W Y, WANG H L, *et al.* Nano-hydroxyapatite/polyacrylamide composite hydrogels with high mechanical strengths and cell adhesion properties[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 123: 959-964.
- [9] CHU Y Y, SONG X F, ZHAO H X. Water-swallowable, tough, and stretchable inorganic-organic sulfoaluminate cement/polyacrylamide double-network hydrogel composites[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2019, 136(35): 47905.
- [10] OUNKAEW A, KASEMSIRI P, JETSRISUPARB K, *et al.* Synthesis of nanocomposite hydrogel based carboxymethyl starch/polyvinyl alcohol/nanosilver for biomedical materials[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 248: 116767.
- [11] NAZERUDDIN G M, PRASAD N R, PRASAD S R, *et al.* Coriandrum sativum seed extract assisted *in situ* green synthesis of silver nanoparticle and its anti-microbial activity[J]. *Industrial Crops and Products*, 2014, 60: 212-216.
- [12] BHARTI R, JHA P K. Dietary flavone chrysin (5, 7-dihydroxyflavone chR) functionalized highly-stable metal nanoformulations for improved anticancer applications[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 56: 245-324.
- [13] BÖRJESSON M, LARSSON A, WESTMAN G, *et al.* Periodate oxidation of xylan-based hemicelluloses and its effect on their thermal properties[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 202: 280-287.
- [14] AMER H, NYPELÖ T, SULAEVA I, *et al.* Synthesis and characterization of periodate-oxidized polysaccharides: Dialdehyde xylan (DAX)[J]. *Biomacromolecules*, 2016, 17(9): 2972-2980.
- [15] ZHAO X, LI P, GUO B L, *et al.* Antibacterial and conductive injectable hydrogels based on quaternized chitosan-graft-polyaniline/oxidized dextran for tissue engineering[J]. *Acta Biomaterialia*, 2015, 26: 236-248.
- [16] XU Q N (徐群娜), YANG Y X (杨羽西), YAN W F (闫文飞), *et al.* Preparation of casein-based nanocomposite hydrogel with antibacterial and adhesion properties[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(3): 496-504.
- [17] GUAN Y, CHEN J H, QI X M, *et al.* Fabrication of biopolymer hydrogel containing Ag nanoparticles for antibacterial property[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2015, 54(30): 7393-7400.
- [18] CHEN S, WANG H, JIAN Z W, *et al.* Novel poly(vinyl alcohol)/chitosan/modified graphene oxide biocomposite for wound dressing application[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2020, 20(3): e1900385.
- [19] KHANA U, WEI Y, KHAN Z U H, *et al.* Electrochemical and antioxidant properties of biogenic silver nanoparticles[J]. *International Journal of Electrochemical Science*, 2015, 10(10): 7905-7916.
- [20] DENG S Y (邓孙艳), HUANG Y P (黄毅萍), ZHAO Q R (赵庆仁), *et al.* Preparation and properties of PU/PAM double network hydrogels loaded with *Bletilla striata* polysaccharide[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(12): 2515-2522.
- [21] LEUNG T, CHUN Y, WONG C K, *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using biopolymers, carboxymethylated-curdlan and fucoidan[J]. *Materials Chemistry and Physics*, 2010, 121(3): 402-405.
- [22] JIANG S Q (蒋山泉), DENG X H (邓小红), HU C B (胡承波), *et al.* Synthesis and evaluation of self-healing pH-sensitive hydrogel based on dynamic covalent bond[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(10): 2012-2018.
- [23] SONG G (宋鸽), ZHANG M (张敏), SONG J (宋洁), *et al.* Preparation and properties of a core-shell hydrogel loaded with yeast and TiO₂ nanoparticles[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(3): 518-524.