

甲壳素/季铵化甲壳素微球的制备与性能研究

谭晓龙,王思雨,聂静雨,周 斐,彭 娜*
(武汉科技大学化学与化工学院,湖北 武汉 430081)

摘要:以甲壳素为原料,制备了甲壳素基微球新型卫生材料;采用核磁氢谱、红外和扫描电镜对其结构进行表征,测试并分析了甲壳素基微球的溶胀性、生物相容性和抗菌性能。结果表明,微球 Qc1~Qc6 均具有很强的吸水性能;Qc3 的分散度为 0.337,相对其他甲壳素基微球在水中的分散性更小,不易聚集成团。因 Qc3 所含的季铵化甲壳素的质量分数更大,展现的抑菌效果更好。各方面的评测结果显示,该可降解甲壳素基微球有望替代不可降解的尿不湿填料。

关键词:甲壳素;季铵盐;可降解;抗菌;生物相容性;微球;溶胀性能

中图分类号:0629.9

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2022)S2-0127-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2022.S2.027

Preparation of chitin/quaternized chitin microspheres and study on their properties

TAN Xiao-long, WANG Si-yu, NIE Jing-yu, ZHOU Fei, PENG Na*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Wuhan University of Science and Technology,
Wuhan 430081, China)

Abstract: In order to solve the problem that super absorbent polymer, the main material of diapers on the market, is difficult to degrade, chitin is used to prepare chitin-based microspheres as a new sanitary material. The structure of chitin-based microspheres is characterized by nuclear magnetic resonance ($^1\text{H NMR}$), infrared absorption spectrum (IR) and scanning electron microscope (SEM). The swelling performance, biocompatibility and antibacterial properties of chitin-based microspheres are measured and analyzed. It is shown that the microspheres from Qc1 to Qc6 have strong water absorption properties. The polymer dispersity index of Qc3 microspheres in water is 0.337, lower than that of other chitin-based microspheres. Qc3 microspheres are not easy to agglomerate. Because Qc3 microspheres contain a larger percentage of quaternized chitin, they show good antibacterial efficacy. It is shown through various test and evaluation that these degradable chitin-based microspheres are expected to replace non-degradable diaper filler.

Key words: chitin; quaternary ammonium salt; degradable; antibacterial; biocompatibility; microsphere; swelling performance

目前市场上尿不湿的填充材料主要是高吸水性树脂(SAP),传统的高吸水树脂主要为聚烯炔类,是以石油资源为原料,产品不能被生物降解。在全球尿不湿市场需求越来越庞大的形势之下,不能被降解的废弃树脂材料将对环境造成很大的污染^[1]。

甲壳素(Chitin)是地球上储量最丰富的天然高分子之一,广泛存在于低等微生物(生物菌类、藻类)细胞、节肢动物(虾、蟹、昆虫)外壳、软体动物(如鱿鱼、乌贼)的内壳和软骨以及高等植物的细胞壁中,其来源十分丰富^[2],是取之不尽、用之不竭的可再生资源。与合成高分子相比,甲壳素还具有可完全生物降解、无毒、无污染、易于改性、生物相容性好等优势。

甲壳素良好的生物学特性使其在生物医学领域

具有巨大的潜在应用价值。它能够被修饰成低取代度、低脱乙酰度的热敏羧甲基甲壳素(Carboxymethyl chitin, CMCH)。在不使用任何有毒交联剂的情况下,通过高温物理交联可制备出具有规则球形和多孔结构的甲壳素基微球,这种微球具有良好的生物降解性且无细胞毒性,可用作止血材料^[3]。以甲壳素为原料制备的甲壳素水凝胶,具有无毒、生物相容性好、可生物降解等特性,可在生物医用材料中得到应用和开发^[4]。此外,通过一定的方法^[5]制备的水溶性叠氮甲壳素衍生物,具有高抗菌活性,与商业抗生素氨基苄西林和庆大霉素的抗菌活性相当;而且叠氮基与甲壳素骨架的结合明显降低了叠氮基药效团的毒性,这为开发新型高效食品薄膜和涂层奠定了基础。有研究证明,从银耳菌丝体中分离出的一种

收稿日期:2022-04-29;修回日期:2022-06-01

基金项目:湖北省煤转化与新型炭材料重点实验室开放基金(WKDM201901);国家级大学生创新创业训练计划(201910488009)

作者简介:谭晓龙(2000-),男,本科生,研究方向为分子生物学,1767385956@qq.com;彭娜(1983-),女,博士,副教授,研究方向为功能胶体材料的性能调控及生物医用,通讯联系人, pengna@wust.edu.cn。

新型真菌甲壳素-葡聚糖复合物具有良好的热稳定性和有效的大肠杆菌抑制能力,可作为一种潜在的食品包装材料^[6]。

以甲壳素为原材料,制备高吸水性水凝胶以开发环保型纸尿裤的填充材料具有很好的应用前景。在本研究中,通过 NaOH/尿素水溶液体系在低温下溶解甲壳素^[7],再与 3-氯-2-羟丙基三甲基氯化铵(3-Chloro-2-hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride, CHPTAC)反应合成甲壳素季铵盐,以乳液法制备甲壳素/甲壳素季铵盐微球。这种微球具有良好的吸水性、生物相容性和抗菌性能,有望替代传统的石油基高吸水性树脂。

1 试剂与仪器

1.1 试剂

甲壳素(脱乙酰度<10%)、CHPTAC(质量分数 60%)均来自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;NaOH、尿素、异辛烷、司班(Span-80)、二甲亚砜(DMSO)均来自上海国药集团化学试剂有限公司;RPMI1640 完全培养基和 MTT、药物培养基(1640 培养基加 10% 血清 FBS 和 1% 双抗)均来自美国 GIBCO invitrogen 公司;小鼠成纤维细胞(3T3)来自中国典型培养物保藏中心。

1.2 仪器

90plus PALS 型高灵敏 Zeta 电位及粒度分析仪(美国布鲁克海文仪器公司);VERTEX 70 型傅里叶红外变换光谱仪(美国布鲁克公司);IX51 型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);K-Alpha+型 X 射线光电子能谱仪、K3 型酶标仪(美国赛默飞世尔公司);JSM-6610 型扫描电子显微镜(日本电子公司)。

2 实验方法

2.1 微球的制备

将甲壳素溶解于 11%(质量分数,下同)NaOH+4%尿素+85%水的溶液中,通过调整甲壳素和 CHPTAC 反应的物质的量比、甲壳素质量浓度、反应时间,合成不同取代度的季铵化甲壳素,定义为 QC。将 450 mL 的异辛烷与 9 mL 的 Span-80 在冰浴中机械搅拌 20 min,再将甲壳素与季铵化甲壳素溶液以一定比例混合,并用 50 mL 注射器分次加入其中,继续搅拌 40 min;然后再撤去冰浴,使其凝胶 2 h。倒入 1 000 mL 乙醇与水比例为 6:4 的乙醇水溶液,搅拌 1 h,再静置分层,保留白色层。先用乙醇洗涤两

次,再水洗 3 次,静置并分离出微球层。最后,在蒸馏水中透析 5 d($M_w = 15\ 000$, USA),得到湿态甲壳素基微球,经冻干得到白色甲壳素基微球。不同条件下制备的微球分别编码为 Qc1、Qc2、Qc3、Qc4、Qc5、Qc6。

2.2 表征

通过多种分析手段对制备的甲壳素基微球的性能进行表征。

在 X 射线光电子能谱仪上测定其碳、氮百分含量,由样品中碳氮比值计算出季铵化甲壳素样品的反应取代度(DS),计算公式为^[8]:

$$C/N = (C_{QCS}/14)(1-m) + (C_{QCN}/28)m \quad (1)$$

式中:C 和 N 分别表示碳、氮百分含量;m 表示取代度; C_{QCS} 表示取代前甲壳素单体中碳原子的含量, C_{QCN} 表示取代后季铵盐型甲壳素单体中碳原子的含量。

2.3 溶胀性能测试

取 0.02 g 微球浸泡在蒸馏水中,间隔一定时间后取出样品并除去表面的水,称重记录。溶胀度计算公式为^[9]:

$$WU = [(W_t - W_d)/W_s] \times 100\% \quad (2)$$

式中:WU 为溶胀度; W_s 是平衡后吸水微球的质量(g), W_t 为水凝胶在时间 t 的质量(g),而 W_d 是微球在干燥状态下的质量(g),以上数据为 3 次测量的平均值。

2.4 抗菌性能测试

抗菌性能测试采用圆盘扩散法。将配制好的牙龈卟啉单胞菌单菌落菌液取 100 μ L 滴加在 BHI 琼脂培养基表面,用 L 型涂布棒均匀涂布琼脂培养基表面;待琼脂表面菌液干燥后,将直径 6 mm、浸泡不同浓度 QCs 溶液(0.1、0.3、0.6、0.9 g/L)30 min 的药敏片依次放上。将琼脂平板倒置于厌氧培养箱,37 $^{\circ}$ C 培养 3 d,然后测量并记录各组抑菌环直径的大小。

2.5 生物相容性测试

分别称取 2 mg 冻干的 Qc1、Qc2、Qc3,并先用紫外光照射 30 min 灭菌。加入 1 mL RPMI1640 完全培养基配成 2 mg/mL 的培养液,将该培养液分别稀释成 20、40、60、80、100、120、140、160、180、200 μ g/mL。将小鼠体细胞(5×10^3 个/孔)接种于 96 孔板中,加入 100 μ L 含 10% FBS 和 1% 双抗的 RPMI1640 完全培养基,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的条件下培养 24 h 后,将孔内培养液吸弃。分别取 100 μ L

不同浓度的 Qc1、Qc2、Qc3 配成的培养液加入到不同的 96 孔板中,继续培养 48 h。随后,每个孔内加入 20 μL 的 MTT 溶液再培育 4 h,然后将 96 孔板中的培养液吸弃。再向 96 孔板中加入 100 μL 的二亚甲砷,用酶标仪检测在 492 nm 波长处样品的吸光度,根据酶标仪结果确定细胞存活率并计算细胞毒性。

3 结果与分析

3.1 季铵化甲壳素的合成

季铵化甲壳素的碳氮含量、电位以及取代度随着甲壳素质量浓度、CHPTAC 与甲壳素摩尔比、反应时间的变化见表 1。

表 1 QC 元素分析和电位

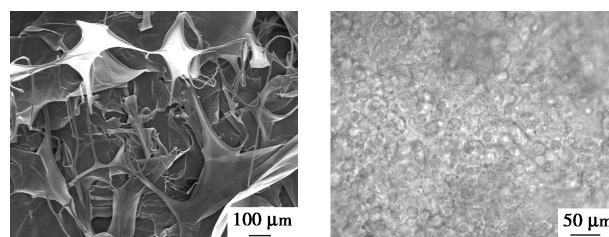
样品	浓度 ^① / %	季铵化 物质的量比 ^②	季铵化 反应时 间/h	氮/ %	碳/ %	Zeta 电位/ mV	取代度/ %
QC1	1.0	6	24	7.99	52.52	14.0	1.50
QC2	1.0	8	24	7.77	55.02	25.1	1.55
QC3	1.0	16	60	7.56	54.74	28.4	1.93
QC4	1.5	8	60	7.19	62.95	38.3	2.79
QC5	1.5	16	60	6.64	64.82	47.7	3.51
QC6	1.5	16	74	6.07	63.24	52.1	3.78
QC7	2.0	16	74	6.71	58.97	36.9	2.59
QC8	2.0	8	24	8.03	60.27	32.5	1.95

注:①在 11% NaOH+4% 尿素+85% 水的溶液中甲壳素的质量浓度;②CHPTAC 与甲壳素单体物质的量比。

由表 1 可见,甲壳素质量浓度、物质的量比和反应时间对取代度有影响。由 QC1 与 QC2、QC4 与 QC5 可以看出,在甲壳素质量浓度和反应时间相同的条件下,它们取代度大小分别为 QC2>QC1、QC5>QC4,说明取代度随着摩尔比的增大而增大;由 QC3 和 QC5 可以看出,在摩尔比和反应时间相同的条件下,取代度 QC5>QC3,说明取代度随着甲壳素质量浓度的增大而增大,但由 QC6 和 QC7 看出,取代度并不会随着质量浓度的增大而一直增大;由 QC5 和 QC6 可以看出,在甲壳素质量浓度和摩尔比相同的条件下,取代度 QC6>QC5。通过比较 8 个样品的数据,得出合成条件为 1.5% 甲壳素质量浓度、物质的量比为 16、反应时间为 74 h 时所合成的 QC6 具有最大的取代度。

3.2 甲壳素基微球结构表征

选择 QC6 为研究对象,与甲壳素溶液混合,通过乳液法制备一系列甲壳素基微球,并命名为 Qc。图 1 为微球 Qc3 的表面结构扫描电镜图以及它在倒置显微镜下的形态图。由图 1 可以看出,微球表面粗糙,由微米纤维编织而成,并呈现多孔结构,这可能是因为在冻干的过程中微球表面收缩^[10-11]以及季铵化甲壳素分子间正电荷的静电斥力作用引起的,这种多孔网状结构有利于微球吸水膨胀。



(a) 表面形貌 SEM 图

(b) 光学显微镜图

图 1 Qc3 的表面结构扫描电镜图以及它在倒置显微镜下的形态图

表 2 为不同微球的粒径和分散度。由表 2 可知,微球的粒径和分散性并没有随着体积比的变化而有规律地变化,但转速越高微球在以水作为分散剂的体系中分散性越差,可能是搅拌器的转轴叶子对微球造成了机械损伤,导致微球破损,从而使得破损的微球不规则地聚集成团,这也是 Qc5 和 Qc1 粒径异常的原因。Qc1~Qc6 的粒径都为微米级,粒径过小作为尿不湿填料存在被人体摄入的风险,过大也不利于充分填充,所以 Qc2、Qc3、Qc4 和 Qc6 更适合作为填充材料。

表 2 微球的粒径和分散性

微球 样品	体积比 ^①	转速/ ($\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)	Zeta 电位/ mV	粒径/ nm	分散性
Qc1	1:1	450	50.7	67634.52	0.476
Qc2	3:1	450	20.6	9471.93	0.385
Qc3	1:3	450	38.7	7334.12	0.337
Qc4	1:1	600	58.4	2657.13	0.343
Qc5	1:1	750	25.0	31875.76	0.542
Qc6	1:1	300	57.8	2408.05	0.268

注:①甲壳素与季铵化甲壳素的体积比。

甲壳素、QC6 以及甲壳素微球的红外光谱见图 2。图 2(a)中,在 1650 cm^{-1} 左右表现为单峰^[11], 1654 cm^{-1} 的酰胺 I 波段($\text{C}=\text{O}$)和 1560 cm^{-1} 的酰胺 II 波段($\text{N}-\text{H}$)表明是 β -甲壳素^[12]。甲壳素和

QC6 在 $3\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 处的宽强峰为 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{OH}$ 的吸收峰^[10], 而且 QC6 出现了 $1\ 480\ \text{cm}^{-1}$ 新的吸收峰, 与铵的甲基相对应, 说明甲壳素成功引入季铵基团^[13-14]。图 2(b) 为微球 Qc1~Qc6 的红外光谱图, 可以看出它们不仅具有甲壳素的特征峰也有季铵基团的特征峰, 证明成功制备了甲壳素与季铵化甲壳素微球。

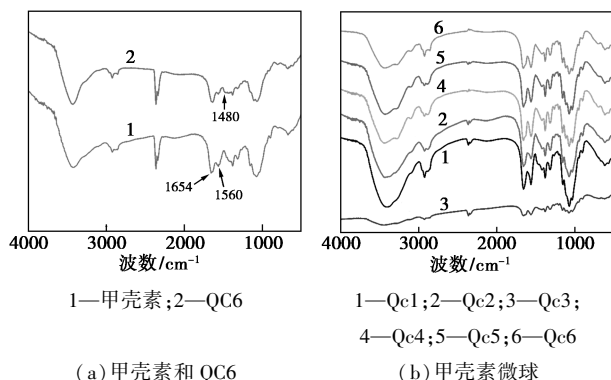


图 2 甲壳素、QC6 以及甲壳素微球的红外光谱图

QC6 的核磁共振氢谱如图 3 所示。乙酰基 $-\text{COCH}_3$ 的质子峰出现在 $\delta\ 1.92$ 处, 表明该温和反应条件保留了甲壳素的乙酰氨基, 没有导致甲壳素明显地去乙酰化。质子峰出现在 $\delta\ 3.08$, 为季铵盐组分中的甲基, 表明 CHPTAC 通过醚化被键合到甲壳素上。结果表明, 在 NaOH /尿素水溶液中溶解甲壳素后, 在碱性条件下, 季铵盐基团可以成功键合引入到甲壳素上。

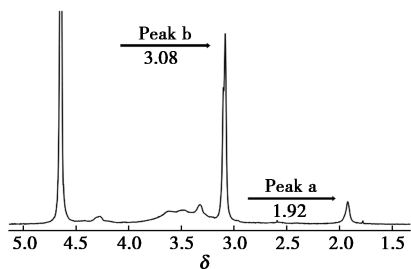
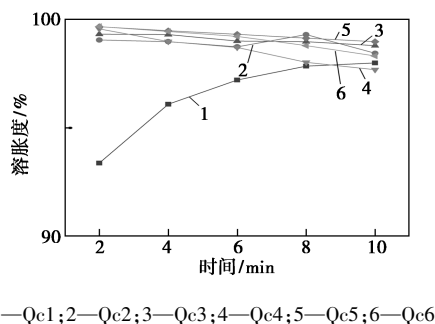


图 3 QC6 的 ^1H NMR 谱图

3.3 溶胀性能测试

图 4 是甲壳素基微球的溶胀性能测试结果。微球 Qc1~Qc6 均表现出高吸水性, 经过 2 min 吸水后, Qc1~Qc6 的溶胀度均达到 90% 以上, 这是因为冻干后的微球聚集呈絮状, 里面形成的毛细结构对水具有很强的浸润效果, 加上微球表面的多孔结构能让水分子自由进入, 进一步提高了溶胀速度。整体上看, 微球 Qc2~Qc6 在 2 min 左右达到溶胀饱和, 但 2 min 后不再出现明显增长, 而 Qc1 在 2 min

后还在进行小幅度地增长。总的来说, Qc1~Qc6 都具有良好的溶胀性能, 并且其不同季铵化甲壳素与甲壳素的体积比例对溶胀能力无明显的影响。



1—Qc1; 2—Qc2; 3—Qc3; 4—Qc4; 5—Qc5; 6—Qc6

图 4 甲壳素基微球的溶胀性能测试

3.4 抗菌性能测试

本研究着重对 Qc3 进行了抗菌性测试, 图 5 为 4 种不同质量浓度 Qc3 的抑菌结果。由图 5 可以看出有着明显的抑菌圈, 说明 Qc3 对牙龈卟啉单胞菌有抑菌效果; 随着质量浓度的增大抑菌圈也逐渐增大。甲壳素基微球之所以能有抑菌效果, 是因为正电季铵基团与细菌表面所带负电荷产生静电作用, 从而抑制了细菌的生长繁殖。

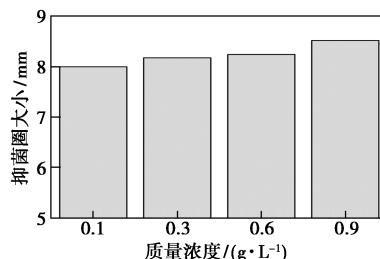
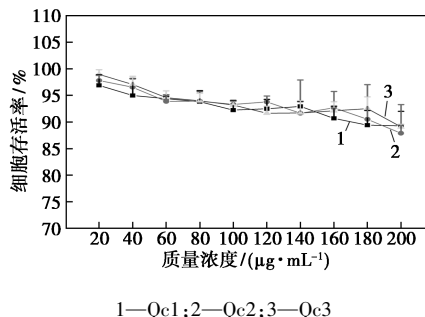


图 5 Qc3 抗菌测试结果

3.5 生物相容性测试

本实验采用 MTT 法对甲壳素/季铵化甲壳素复合微球进行细胞毒性测试, 结果见图 6。由图 6 可知, 随着甲壳素基微球质量浓度增加, 3T3 存活率略有下降, 但存活率均高于 90%, 表明该甲壳素基微球对小鼠正常体细胞具有良好的生物相容性。



1—Qc1; 2—Qc2; 3—Qc3

图 6 不同质量浓度微球对 3T3 存活率的影响

4 结论

本项目制备甲壳素基微球的方法简单易行,且产品主要应用于环保卫生用品。按照不同的甲壳素与季铵化甲壳素的质量比例制备了不同的可生物降解甲壳素基微球 Qc1~Qc6,这些产品都具有很强的吸水能力和良好的生物相容性;其中 Qc3 的粒径为 7 334.12 nm,大小适中,分散性也相对较小,约为 0.337,而且有着很强的抑菌效果,其溶胀后质量会增大 20 倍左右,可为开发尿不湿新型填料并进一步研究其机械性能和生物活性奠定基础。

参考文献

- [1] 张西标,李涛,路文学.高吸水性树脂市场和技术发展近况[J].山东化工,2020,49(17):85-86,95.
- [2] Ding B B, Huang S S, Shen K, *et al.* Natural rubber bio-nanocomposites reinforced with self-assembled chitin nanofibers from aqueous KOH/urea solution[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 225(C):115230.
- [3] Zhao Y, Li J Z, Leng F, *et al.* Degradable porous carboxymethyl chitin hemostatic microspheres[J]. Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition, 2020, 31(11):1369-1384.
- [4] Chen B, Wu S Q, Ye Q F. Fabrication and characterization of biodegradable KH560 crosslinked chitin hydrogels with high toughness and good biocompatibility [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 259:117707.
- [5] Kritchenkov A S, Kletskoy A V, Egorov A R, *et al.* New water-

soluble chitin derivative with high antibacterial properties for potential application in active food coatings [J]. Food Chemistry, 2021, 343:128696.

- [6] Chen A J, Pan F, Zhang T, *et al.* Characterization of chitin-glucan complex from tremella fuciformis fermentation residue and evaluation of its antibacterial performance [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 186:649-655.
- [7] Chang C Y, Chen S, Zhang L N. Novel hydrogels prepared via direct dissolution of chitin at low temperature: Structure and biocompatibility [J]. Journal of Materials Chemistry, 2011, 21:3865-3871.
- [8] 褚春莹.季铵化壳低聚糖的合成及性能研究[D].青岛:中国海洋大学,2003.
- [9] 常春雨.新型纤维素、甲壳素水凝胶的构建、结构和性能[D].武汉:武汉大学,2011.
- [10] Pei X L, Li Y, Deng Y, *et al.* Chitin microsphere supported Pd nanoparticles as an efficient and recoverable catalyst for CO oxidation and Heck coupling reaction [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 251:117020.
- [11] 吴启静,王怡仁,周彤,等.高透明度 β -甲壳素纳米纤维薄膜的制备与性能[J].包装工程,2021,42(9):79-85.
- [12] Shang Y, Ding F Y, Xiao L, *et al.* Chitin-based fast responsive pH sensitive microspheres for controlled drug release [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102:413-418.
- [13] Gao H M, Zhong Z B, Xia H Y, *et al.* Construction of cellulose nanofibers/quaternized chitin/organic rectorite composites and their application as wound dressing materials [J]. Biomaterials Science, 2019, 7(6):2571-2581.
- [14] Peng N, Ai Z Y, Fang Z H, *et al.* Homogeneous synthesis of quaternized chitin in NaOH/urea aqueous solution as a potential gene vector [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 150:180-186. ■

(上接第 126 页)

(3) 硝酸浓度、液固比以及反应温度对重金属及氟的迁移率均有显著影响,液固比对 As、Ni、Zn 迁移率显著性影响最大,硝酸浓度对 Cr、Cu、Pb、F 迁移率显著性影响最大。

(4) 通过 Design-Expert 软件优化分析,得到最佳工艺参数为:反应时间 1.5 h、硝酸浓度 35%、液固比 12、反应温度 65℃。在最优条件下 As、Cr、Cu、Ni、Pb、Zn、F 迁移率的模型预测值为 82.13%、80.15%、80.68%、50.77%、86.26%、63.77%、81.33%;3 组验证实验的迁移率平均值分别为 82.51%、80.34%、80.39%、50.12%、86.88%、63.62%、81.75%,与模型预测值的偏差很小,说明模型预测与优化的可信度高。

(5) 在最佳工艺参数条件下,重金属及氟在气液固三相中的分布率分别为 0、78.74%、21.14%和

13.43%、86.14%、0.43%。

参考文献

- [1] 贾旭宏,李军.硝酸法制备工业净化磷酸[J].无机盐工业,2015,(8):56-59.
- [2] 何为,唐斌,薛卫东.优化试验设计方法及数据分析[M].北京:化学工业出版社,2012.
- [3] Mo X, Li X, Wen J. Optimization of bioleaching of fluoride-bearing uranium ores by response surface methodology [J]. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2019, 321(1):579-590.
- [4] 李莉,张赛,何强,等.响应面法在试验设计与优化中的应用[J].实验室研究与探索,2015,34(8):41-45.
- [5] 刘伟,刘子龙,刘畅.响应曲面法优化低品位铜钼矿生物浸出工艺[J].中南大学学报(自然科学版),2021,52(9):3111-3120.
- [6] 杨臻昊,陈为亮,张栋,等.响应曲面法优化铜阳极泥选择性浸出砷锑工艺[J].有色金属工程,2020,10(9):41-49.
- [7] Peng H, Wang F, Li G, *et al.* Highly efficient recovery of vanadium and chromium optimized by response surface methodology [J]. ACS Omega, 2019, 4(1):904-910. ■