



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111166931 A

(43)申请公布日 2020.05.19

(21)申请号 202010070862.7

(22)申请日 2020.01.21

(71)申请人 海南卓瑞生物医药有限公司

地址 570216 海南省海口市龙华区域西镇
海口保税区6号厂房

(72)发明人 马小平 陈华奇

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

代理人 颜希文

(51)Int.Cl.

A61L 26/00(2006.01)

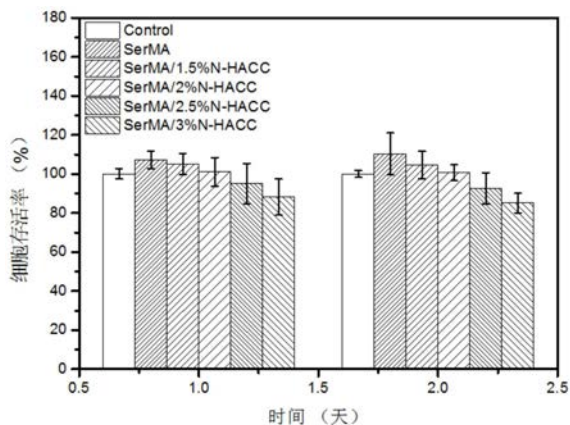
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

一种甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶及其制备方法和应用。该水凝胶包括甲基丙烯酸改性丝胶和壳聚糖季铵盐,所述甲基丙烯酸改性丝胶和壳聚糖季铵盐的质量比8~12:1.5~3。本发明以甲基丙烯酸改性丝胶和壳聚糖季铵盐为基础,在紫外光照射条件下合成了甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶,该水凝胶具有稳定的流变性、良好的降解能力、生物相容性和固有的抗菌性能,能有效地促进伤口愈合过程,在皮肤创面愈合敷料中有很大的应用前景。



1. 一种甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶,其特征在于,包括甲基丙烯酸改性丝胶和壳聚糖季铵盐,所述甲基丙烯酸改性丝胶和壳聚糖季铵盐的质量比为8~12:1.5~3,优选为10:2。

2. 权利要求1所述的甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶的制备方法,其特征在于,将甲基丙烯酸改性丝胶溶液与壳聚糖季铵盐溶液混合,加入光引发剂,经紫外光照射后固化,得到所述甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶。

3. 根据权利要求2所述的甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶的制备方法,其特征在于,所述甲基丙烯酸改性丝胶溶液中甲基丙烯酸改性丝胶的浓度为8w/v%~12w/v%,优选为10w/v%。

4. 根据权利要求2或3所述的甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶的制备方法,其特征在于,所述甲基丙烯酸改性丝胶的制备方法为:将甲基丙烯酸酐溶液滴入丝胶溶液中,反应7~12h,反应液经透析、冷冻干燥后,得到甲基丙烯酸改性丝胶,其中,甲基丙烯酸酐与丝胶的质量比为0.6~0.8:0.6~1.2,优选为0.786:1。

5. 根据权利要求4所述的甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶的制备方法,其特征在于,反应的时间为8h,透析所用的透析袋的截留分子量8000~12000Da。

6. 根据权利要求2所述的甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶的制备方法,其特征在于,所述壳聚糖季铵盐溶液中壳聚糖季铵盐的浓度为1.5w/v%~3w/v%,优选为2w/v%。

7. 根据权利要求2或6所述的甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶的制备方法,其特征在于,所述壳聚糖季铵盐的制备方法为:将壳聚糖加入至乙醇溶液中分散,加热至55~65℃后,逐滴加入3-氯-2-羟丙基三甲基氯化铵溶液,调节溶液pH至7.0,在55~65℃反应4~7h,将反应液倒入丙酮中,并在冰浴中搅拌洗涤过夜,经透析、冷冻干燥,得到所述壳聚糖季铵盐,其中,壳聚糖与3-氯-2-羟丙基三甲基氯化铵的质量比为2~4:2.1~3.6,优选为3:0.3。

8. 根据权利要求7所述的甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶的制备方法,其特征在于,反应的温度为60℃,反应的时间为5h。

9. 根据权利要求2所述的甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶的制备方法,其特征在于,紫外光照射的时间为2~4min,优选为3min。

10. 权利要求1所述的甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶在皮肤创面愈合敷料中的应用。

一种甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医用生物材料技术领域,具体涉及一种甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 皮肤是一个重要的器官,具有复杂的结构,包括表皮层和真皮层皮肤,具有多种重要的保护功能,比如阻挡紫外线、防止有害微生物入侵、减少体液蒸发等,但它很容易受到急性创伤、慢性溃疡和糖尿病的伤害,每年有数百万人遭受无法自我修复的皮肤创伤,导致需要花费大量医疗费用。严重的皮肤创伤,特别是涉及表皮、真皮层、附属物(汗腺、皮脂腺和毛囊),以及皮下组织损伤的全层损伤,通常会导致无功能性瘢痕的形成。瘢痕主要由无序的胶原和弹性纤维网形成,缺乏功能性皮肤附属物,如毛囊和皮脂腺,给患者带来身体不适,包括瘙痒、热不耐受、感觉和体温调节障碍,然而,有效地再生这些皮肤附属物是很困难的。为了使全层损伤后的皮肤在形态和功能上得到再生,目前临床上的金标准是植皮,但植皮面积、供者来源和昂贵的医疗费用等因素都限制了植皮的应用。因此,组织工程创面敷料已成为一种很有前途的替代材料,人们迫切需要新的功能性和形态性的全层皮肤再生敷料。

[0003] 目前使用的大多数伤口敷料无法实现无疤痕皮肤再生,因此,具有修复全层皮肤损伤的新型创面敷料水凝胶受到了生物材料研究人员的广泛关注。水凝胶具有高含水量、良好的生物相容性和灵活的力学性能,被认为是有潜力的临床应用的候选材料。首先,通过提供多孔结构和合适的溶胀比,水凝胶基质可以允许氧的存在,去除伤口渗出液,维持潮湿的伤口床以促进伤口愈合。其次,传统敷料需要通过在基质中添加抗生素提高其抗菌性,而某些水凝胶具有固有的抗菌性能。与纱布、脱脂棉等传统的伤口敷料不同,生物降解的水凝胶敷料易于剥离和自发降解,避免了换药过程中的疼痛和继发性创伤。

[0004] 在伤口愈合修复概念的启发下,研究者设计了许多新的水凝胶,在各种伤口的治疗中发挥了重要作用。目前,水凝胶是由天然高分子材料,如海藻酸钠、羧甲基纤维素、右旋糖酐、明胶、胶原和透明质酸,以及合成高分子材料,如甲氧基聚乙二醇、聚乙烯醇、肽和聚酰胺等制备得到的,具有良好的生物相容性和可生物降解性。其中,丝胶(Ser)是一种来源于蚕丝的天然生物材料,具有良好的生物相容性、低免疫原性、促增殖作用和可调节的力学性能,可用于制备水凝胶,但单纯的丝胶分子构象为无规则卷曲,空间结构松散无序,所成的水凝胶不稳定。壳聚糖是一种具有生物降解性、生物相容性和抗菌活性的天然聚合物。它符合环保要求,是天然抗菌剂研究的热点之一,可用于制备抗菌水凝胶。然而,壳聚糖不溶于pH大于6.5的中性和碱性水溶液,大大限制了其应用。因此,有必要对丝胶和壳聚糖进行改性处理,并以改性后的丝胶和壳聚糖为基础,制备具有优异的生物降解、力学性能、修复性能和抗菌性能的新型水凝胶。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术的不足之处而提供一种甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶及其制备方法和应用,该水凝胶具有优异的生物降解、力学性能、修复性能和抗菌性能。

[0006] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案如下:

[0007] 一种甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶,包括甲基丙烯酸改性丝胶和壳聚糖季铵盐,所述甲基丙烯酸改性丝胶和壳聚糖季铵盐的质量比为8~12:1.5~3。

[0008] 优选地,所述甲基丙烯酸改性丝胶和壳聚糖季铵盐的质量比为10:2,制备得到的水凝胶具有更优异的生物相容性和力学性能。

[0009] 本发明还提供了上述甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶的制备方法,将甲基丙烯酸改性丝胶溶液与壳聚糖季铵盐溶液混合,加入光引发剂,经紫外光照射后固化,得到所述甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶。

[0010] 本发明以甲基丙烯酸改性丝胶和壳聚糖季铵盐为基础,并优选二者配比,在紫外光照射条件下成功地合成了甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶,所制备的水凝胶具有优异的生物降解和力学性能,能够显著促进伤口的愈合,促进胶原沉积,降低伤口处细菌数目和炎症水平。

[0011] 优选地,所述甲基丙烯酸改性丝胶溶液中甲基丙烯酸改性丝胶的浓度为8w/v%~12w/v%,优选为10w/v%,制备得到的水凝胶具有良好的生物相容性和力学性能。

[0012] 优选地,所述光引发剂为苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基膦酸锂(LAP),所述光引发在甲基丙烯酸改性丝胶与壳聚糖季铵盐的混合溶液中的用量为0.08w/v%~0.15w/v%。

[0013] 优选地,所述甲基丙烯酸改性丝胶的制备方法为:将甲基丙烯酸酐溶液滴入丝胶溶液中,反应7~12h,反应液经透析、冷冻干燥后,得到甲基丙烯酸改性丝胶,其中,甲基丙烯酸酐与丝胶的质量比为0.6~0.8:0.6~1.2,优选为0.786:1。

[0014] 优选地,反应的时间为8h,透析所用的透析袋的截留分子量8000-12000Da。

[0015] 丝胶分子有较多氨基,可通过甲基丙烯酸接枝改性,甲基丙烯酸分子中具有双键,在少量光交联剂存在下,通过紫外光照射下可快速交联,甲基丙烯酸改性丝胶光交联所成的水凝胶提高了其稳定性。

[0016] 虽然丝素蛋白也可以用于制备抗菌水凝胶,但丝素蛋白溶解性较差,丝胶具有更好的溶解性,且丝素蛋白用于生物医学材料可能产生致敏性,而丝胶生物相容性比丝素蛋白好,丝胶本身可以作为一种营养来源,促进某些类型细胞的生存和增殖。因此,本发明选用丝胶作为原料,更有利于改善水凝胶的生物相容性。

[0017] 优选地,所述丝胶的制备方法为:将蚕茧剪成片段,清洗后放入烘箱中烘干;将烘干的蚕茧加入到煮沸的 Na_2CO_3 溶液中,煮沸反应1~3h后,将蚕茧捞出沥干,剩余溶液离心后取上清液,将上清溶液过滤后,经透析、冷冻干燥,得到丝胶粉末。

[0018] 优选地,所述 Na_2CO_3 溶液中 Na_2CO_3 的浓度为2M, Na_2CO_3 溶液与蚕茧的添加比例为150~250ml:5g,优选为200mL:5g。

[0019] 优选地,煮沸反应的时间为1.5h。

[0020] 本发明制备得到丝胶具有良好的促增殖作用和良好的生物相容性。

[0021] 所述反应时间为1~3h,优选为1.5h。

[0022] 优选地,所述壳聚糖季铵盐溶液中壳聚糖季铵盐的浓度为1.5w/v%~3w/v%,优选为2w/v%。

[0023] 优选地,所述壳聚糖季铵盐的制备方法为:将壳聚糖加入至乙醇溶液中分散,加热至55~65℃后,逐滴加入3-氯-2-羟丙基三甲基氯化铵溶液,调节溶液pH至7.0,在55~65℃反应4~7h,将反应液倒入丙酮中,并在冰浴中搅拌洗涤过夜,经透析、冷冻干燥,得到所述壳聚糖季铵盐,其中,壳聚糖与3-氯-2-羟丙基三甲基氯化铵的质量比为2~4:2.1~3.6,优选为3:0.3。本发明以3-氯-2-羟丙基三甲基氯化铵为季铵化试剂,对壳聚糖进行季铵化改性,制备得到具有良好抗菌活性和生物相容性的壳聚糖季铵盐。

[0024] 优选地,反应的温度为60℃,反应的时间为5h。

[0025] 优选地,紫外光照射的时间为2~4min,优选为3min。

[0026] 本发明提供了上述甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶在皮肤创面愈合敷料中的应用。

[0027] 体外结果表明,本发明的水凝胶具有良好的抗菌性和生物相容性。本发明采用体内大鼠伤口模型,对创面收缩面积、创面细菌、组织病理学检查、胶原分析、促炎因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)和抗炎症因子(TGF- β 1)对其进行体内治疗评价,结果表明,该水凝胶能够显著促进伤口的愈合,促进胶原沉积,降低伤口处细菌数目和炎症水平。可见,本发明所制备的水凝胶在皮肤创面愈合敷料中有很大的应用前景,特别是在严重创伤愈合和开放性创伤感染的创面愈合方面。

[0028] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0029] 本发明以甲基丙烯酸改性丝胶和壳聚糖季铵盐为基础,在紫外光照射条件下成功地合成了甲基丙烯酸丝胶/壳聚糖季铵盐水凝胶,该水凝胶具有稳定的流变性、良好的降解能力、生物相容性和固有的抗菌性能,能有效地促进伤口愈合过程,在皮肤创面愈合敷料中有很大的应用前景。

附图说明

[0030] 图1为CS及实施例1的N-HACC的溶解度测试结果。

[0031] 图2为CS及实施例1的N-HACC的核磁氢谱图。

[0032] 图3为实施例2的Ser和实施例3的SerMA的红外光谱图。

[0033] 图4为实施例4的SerMA水凝胶和实施例5的SerMA/2%N-HACC水凝胶的体外溶胀测试结果。

[0034] 图5为实施例4和实施例5的水凝胶的水蒸气透过率测试结果。

[0035] 图6为实施例4和实施例5的水凝胶的压缩强度测试结果。

[0036] 图7为实施例4和实施例5的水凝胶的生物相容性测试结果。

具体实施方式

[0037] 为更好地说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合具体实施例对本发明进一步说明。本领域技术人员应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0038] 实施例中,所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法,所用的材料、试剂等,

如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0039] 实施例1:壳聚糖季铵盐(N-HACC)的制备

[0040] 先称取3g壳聚糖粉末于15mL纯水及5mL乙醇中分散,混合溶液加入三颈烧瓶中预热至60℃,逐滴加入10mL浓度为30%wt的3-氯-2-羟丙基三甲基氯化铵(GTMAC)水溶液,用NaOH调节pH至7.0,在60℃反应5h后,将混合液倒入冷丙酮中,在4℃冰浴中搅拌洗涤过夜,之后用冷丙酮反复洗涤两次,用8000-12000Da透析袋在纯水进行透析,-50℃冷冻后干燥,得到壳聚糖季铵盐产物N-HACC,其季氨化程度为98.1%。

[0041] 实施例2:丝胶(Ser)的制备

[0042] 将5g蚕茧剪成片段,用纯水清洗干净,然后放入烘箱中烘干。将烘干的蚕茧加入到200mL煮沸的0.02M Na₂CO₃溶液中,煮沸1.5h后,将蚕茧捞出沥干,溶液用离心机以3500rpm的转速离心10min,将上清溶液过滤后,用截留分子量为3500Da的透析袋透析3天,透析完将溶液于-50℃冷冻后干燥,得到丝胶粉末。

[0043] 实施例3:甲基丙烯酸改性丝胶(SerMA)的制备

[0044] 将1g实施例2制备的Ser溶解在20mL PH=7.4的PBS溶液中,称取甲基丙烯酸酐0.786g,将其溶于10mL PH=7.4的PBS溶液中;在磁力搅拌条件下,将甲基丙烯酸酐溶液缓慢滴入Ser溶液中,反应10h;反应完毕,将溶液用截留分子量为3500Da的透析袋透析3天,透析完将溶液于-50℃冷冻后干燥,得到SerMA。

[0045] 实施例4:SerMA水凝胶制备:

[0046] 将实施例3制备的SerMA溶于10w/v%的PBS溶液配制SerMA溶液,SerMA溶液的浓度为10w/v%,将0.2mL SerMA溶液置于48孔细胞孔板中,加入苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基膦酸锂,苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基膦酸锂在SerMA溶液中的用量为0.1w/v%,使用枪头轻轻搅拌混合物,然后用紫外灯照射3min,得到SerMA水凝胶。

[0047] 实施例5:SerMA/N-HACC水凝胶制备

[0048] 将实施例3制备的SerMA溶于10w/v%的PBS溶液配制SerMA溶液,SerMA溶液的浓度为10w/v%;将实施例1制备的N-HACC溶于2w/v%的PBS溶液配制N-HACC溶液,N-HACC溶液的浓度为2w/v%;将0.2mL SerMA(10%w/v的PBS溶液)和0.2mL N-HACC(2%w/v的PBS溶液)置于48孔细胞孔板中,加入苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基膦酸锂,苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基膦酸锂在混合溶液中的用量为0.1w/v%,使用枪头轻轻搅拌混合物,然后用紫外灯照射3min,得到SerMA/N-HACC(w/w=10:2)水凝胶,记为SerMA/2%N-HACC水凝胶。

[0049] 同上步骤,并分别调整N-HACC溶液的浓度为1.5w/v%、2.5w/v%、3w/v%,制得w/w=10:1.5、w/w=10:2.5、w/w=10:3的SerMA/N-HACC水凝胶,依次记为SerMA/1.5%N-HACC水凝胶、SerMA/2.5%N-HACC水凝胶、SerMA/3.0%N-HACC水凝胶。

[0050] 对本发明制备的样品进行如下性能测定:

[0051] 1、N-HACC的溶解度

[0052] 取0.01gCS分别溶于1ml中性水和1ml 1%的乙酸溶液中,另取0.01g合成的N-HACC溶于1ml中性水中,观察溶液的澄清度。

[0053] 图1为CS及N-HACC的溶解度测试结果,从图中可看到,CS在中性水中为白色浑浊状,在1%的乙酸溶液中完全溶解,而N-HACC在中性水中完全溶解,表明CS在接枝季铵盐后,对其溶解度大有改善。

[0054] 2、核磁

[0055] 称取N-HACC样品20mg,溶于氘代重水,壳聚糖20mg溶于氘代乙酸,核磁共振仪检测¹H NMR。

[0056] 图2为CS和N-HACC的核磁氢谱图,与初始壳聚糖相比,在 $\delta=3.2-3.5\text{ppm}$ (ppm (d, -N + (CH₃)₃) 的强场区有一个新的特征峰,表明大分子结构中存在季氨盐基团。

[0057] 3、FT-IR表征

[0058] 用溴化钾压片法制备待测样品 (Ser、SerMA),使用傅里叶红外光谱仪测定红外光谱。

[0059] 图3为实施例2的Ser和实施例3的SerMA的红外光谱图,与Ser相比,SerMA红外光谱图中,3072cm⁻¹处出现新的吸收峰,为丙烯酸的碳碳双键中C-H的伸缩振动吸收峰,1589cm⁻¹处为C=O键的伸缩振动吸收峰,表明丙烯酸键成功接在Ser上。

[0060] 4、溶胀率测试

[0061] 用天平称量水凝胶的重量,记为W₀,将水凝胶置于PBS (0.01M, pH=7.4) 溶液中,在特定的时间点,用稍微润湿的滤纸 (润湿不易损伤凝胶) 迅速拭去水凝胶表面水分,称重,记为W_s。每个样品平行做三次实验,求其平均值,样品溶胀率按照如下公式计算:

$$[0062] \quad X = \frac{W_s - W_0}{W_0} \times 100\%$$

[0063] 其中,W₀为水凝胶的重量 (g);W_s为吸水后水凝胶的重量 (g);X为水凝胶的溶胀率 (%)。

[0064] 图4为实施例4的SerMA水凝胶和实施例5的SerMA/2%N-HACC水凝胶的体外溶胀测试结果,从图中发现,两者的溶胀率相差不大,在65~70%之间,溶胀率适中,既可以吸收伤口表面过多的水分,又不至于吸收太多水分导致伤口处缺水。

[0065] 5、水蒸气透过率

[0066] 水凝胶的水蒸气透过率 (WVTR) 根据美国标准局的ASTM E96-00方法测定。具体步骤如下:首先,将水凝胶置于已装有5mL去离子水的小瓶瓶口 (直径9.67mm) 处,用凡士林密封水凝胶与瓶口之间的间隙,防止水汽逸散,称量其初始重量。其次,将覆盖水凝胶的样品瓶放入恒温恒湿培养箱 (温度为37℃,相对湿度为79%) 中,以只装有5mL去离子水的样品瓶为空白对照组。24h后取出,称其重量。水蒸气透过率按照如下公式进行计算:

$$[0067] \quad WVTR = \frac{\Delta m / \Delta t}{A}$$

[0068] 其中, $\Delta m / \Delta t$ 为24小时的水分损失重量 (g/day),A为瓶口的表面积 (m²)。

[0069] 图5为实施例4和实施例5的水凝胶的水蒸气透过率测试结果,结果表明,所选比例的水凝胶具有较好的水蒸气透过率,具有良好的透水、透气功能,能使使创面保持高湿环境,以促进其快速愈合。

[0070] 6、凝胶的压缩模量测试

[0071] 使用游标卡尺测量水凝胶的直径和长度,在40%形变内,以1mm/min的形变速率,采用电子万能试验机测试样品的压缩弹性模量。

[0072] 图6为实施例4和实施例5的水凝胶的压缩强度测试结果,结果发现添加了N-HACC的水凝胶相对于纯SerMA压缩强度略有增强,应该是两者之间氢键相互作用的结果,当控制

SerMA浓度不变时(10%w/v),N-HACC浓度为2%时的压缩强度最大。

[0073] 7、生物相容性测试

[0074] 将培养的L929细胞用0.25%胰酶消化悬浮后,以每孔密度为 2×10^4 个/mL的细胞悬液接种在48孔板上。培养12h后取出原培养液,并分别在每孔皿中加入加入500 μ L实验材料浸提液,以只添加500 μ L完全培养基为空白对照组。每组至少设5孔。每隔24h换液一次,实验设置24h、48h两个时间点。具体操作方法如下:

[0075] 细胞存活率:采用CCK8定量分析细胞的存活率。在指定的时间间隔取出相应的孔板,每孔加100 μ L CCK8工作液,在37 $^{\circ}$ C恒温二氧化碳培养箱(含5%的CO₂)中孵育1~2h后,用酶标仪在450nm波长处测定吸光度(OD),按照公式计算细胞存活率:

[0076] 细胞存活率(%) = $OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{对照组}} \times 100\%$

[0077] 图7为实施例4和实施例5的水凝胶的生物相容性测试结果,结果表明,纯SerMA对于细胞存活具有一定的促进作用,而当添加了N-HACC之后,细胞存活率随N-HACC浓度增加而逐渐下降,当控制N-HACC浓度为2%时,具有较好的细胞存活率。

[0078] 8、抑菌圈试验

[0079] 将制备的水凝胶(直径8mm)的圆型试样,在超净工作台紫外照射30min灭菌。在固体LB培养基上滴取100 μ L上述菌悬液,用涂布棒均匀涂布贴上待测样品,正置15min后将培养皿放置于37 $^{\circ}$ C生化培养箱中倒置培养。培养24h后取出观察培养基上的细菌生长情况并记录抑菌圈直径(D)。

[0080] 表1为实施例4和实施例5的水凝胶的抗菌实验测试结果,结果表明单纯的SerMA水凝胶并不具有抗菌效果,随着N-HACC的浓度增加,水凝胶抗菌效果增强。

[0081] 表1水凝胶抗菌实验

水凝胶		抑菌圈直径 (mm)		
细菌种类	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	
SerMA	0	0	0	
SerMA/1.5%N-HACC	8.74 \pm 0.02	8.23 \pm 0.07	9.12 \pm 0.02	
SerMA/2%N-HACC	9.61 \pm 0.13	9.24 \pm 0.03	10.91 \pm 0.11	
C				
SerMA/2.5%N-HACC	11.25 \pm 0.08	11.17 \pm 0.36	12.90 \pm 0.18	
C				
SerMA/3%N-HACC	12.72 \pm 0.773	12.43 \pm 0.09	14.1 \pm 0.42	
C				

[0084] 9、N-HACC最小抑菌浓度(MIC)测试

[0085] 用接种环轻轻划取一环菌种菌落至100mL LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C恒温摇床上150r/min培养18~24h,配制无菌生理盐水将菌悬液稀释至 3.0×10^6 CFU/mL,以备抗菌测试。

[0086] 分别配制质量分数1%壳聚糖(溶于1%醋酸中)溶液、N-HACC水溶液,121 $^{\circ}$ C高温灭菌25min后,用2倍稀释法溶于高温灭菌后的营养肉汤中,配制最终浓度为0.1%、0.05%、0.025%、0.012%、0.00625%、0.00313%溶液,取0.1mL浓度约 3.0×10^6 CFU/mL的菌悬液于0.9mL上述各个浓度样品中,震荡均匀后取0.1mL涂平板,37 $^{\circ}$ C培养72h,数菌落的最低抑菌

浓度 (minimum inhibition concentration, MIC)。

[0087] 表2为CS及N-HACC的最小抑菌浓度测试结果,结果表明,在CS接上季铵盐基团后,其最小抑菌浓度减小,说明N-HACC相对于CS具有更好的抗菌效果。

[0088] 表2季铵盐壳聚糖最低抑菌浓度

样品	最低抑菌浓度 MIC%		
	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌
CS	0.06	0.11	0.07
N-HACC	0.049	0.073	0.041

[0090] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

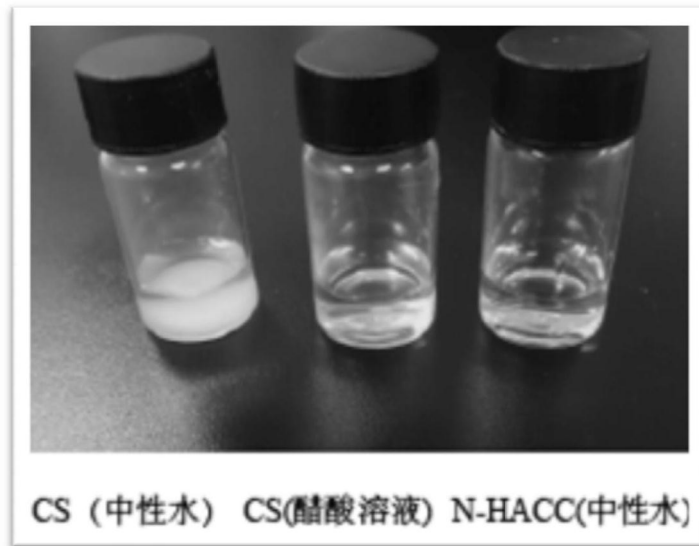


图1

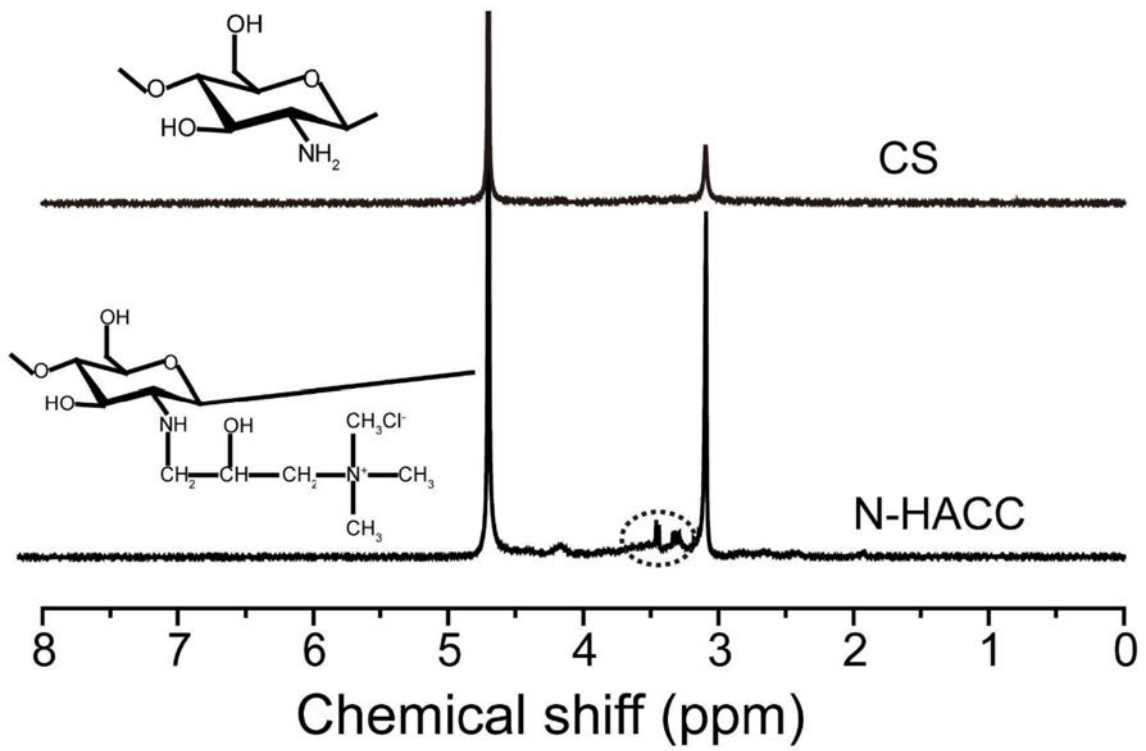


图2

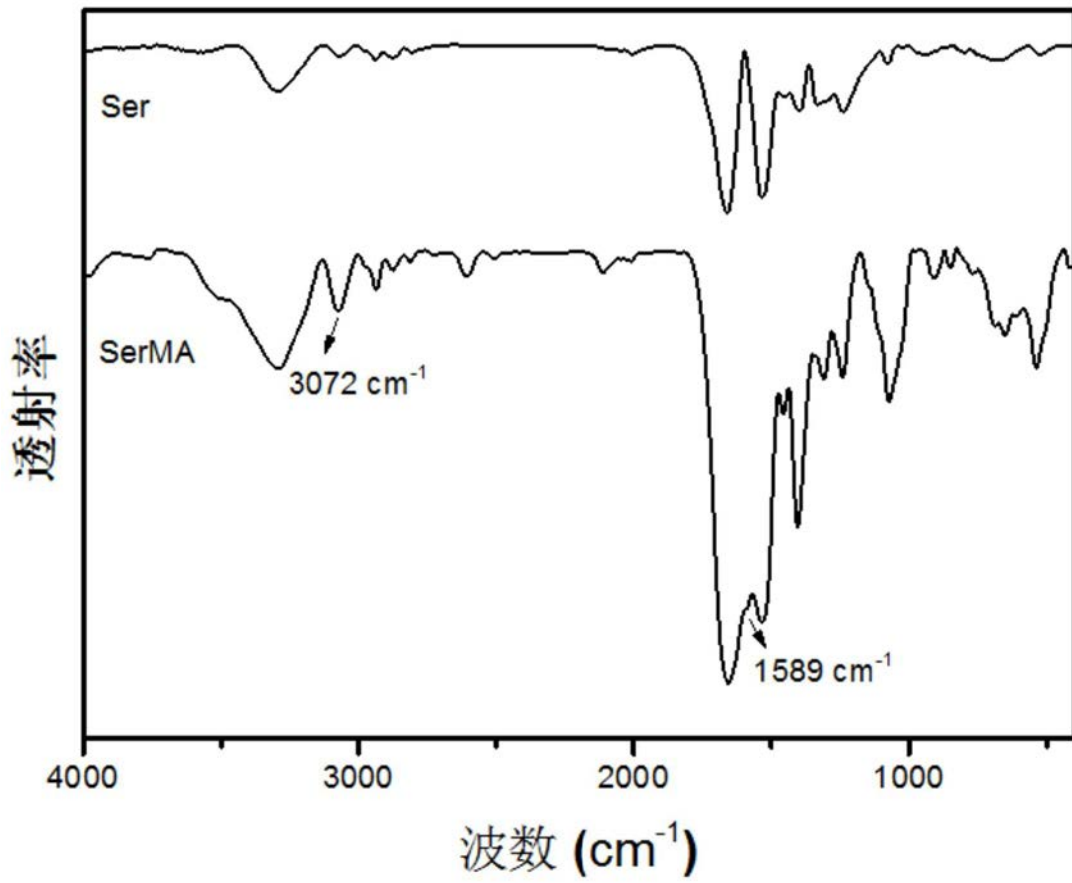


图3

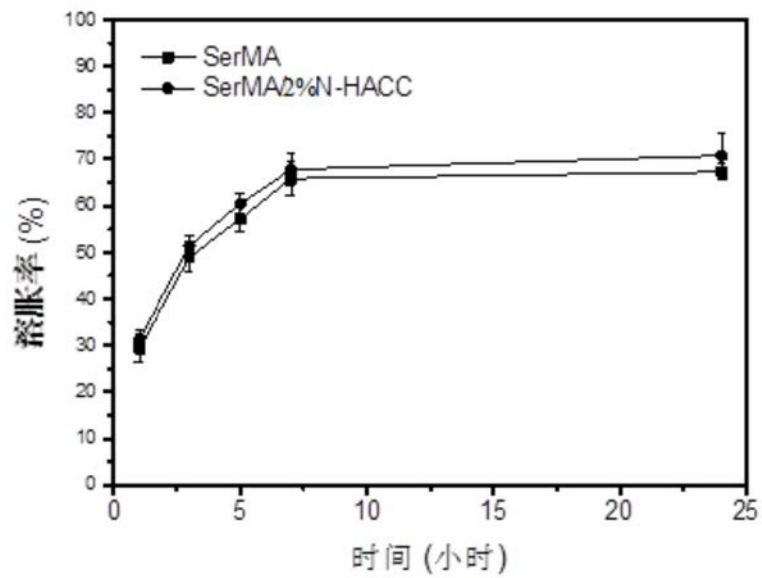


图4

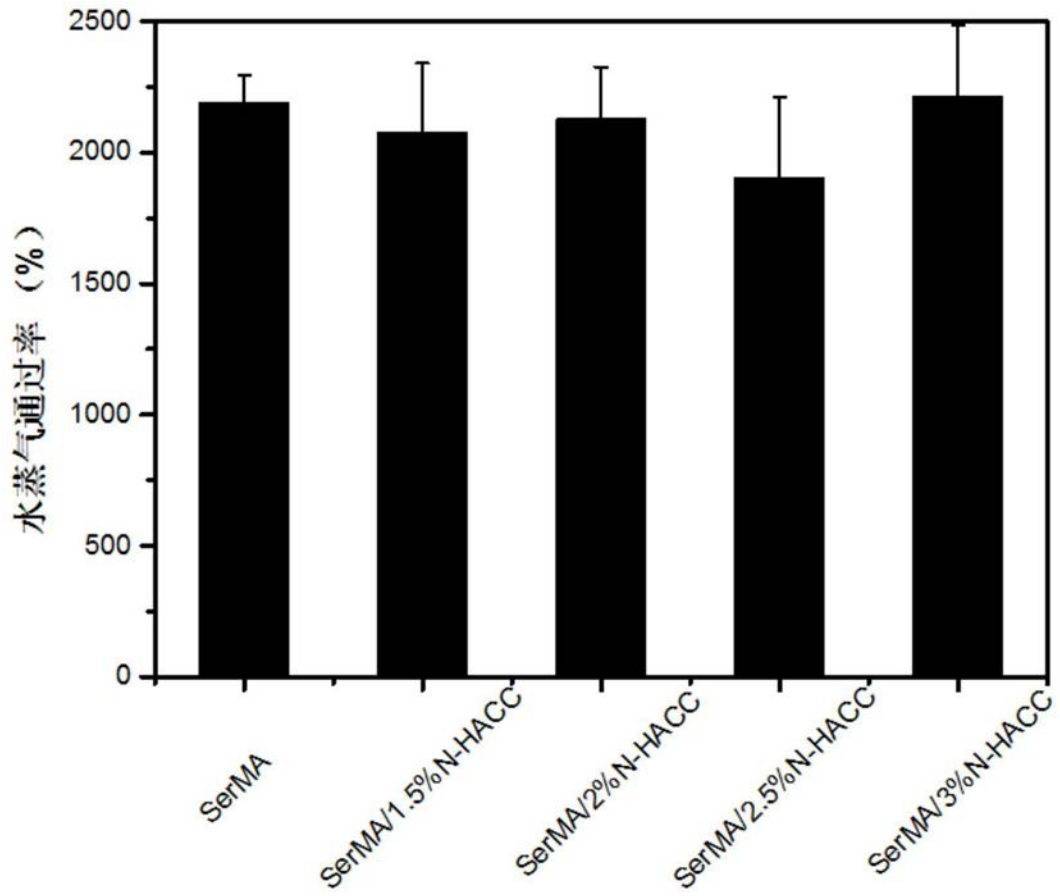


图5

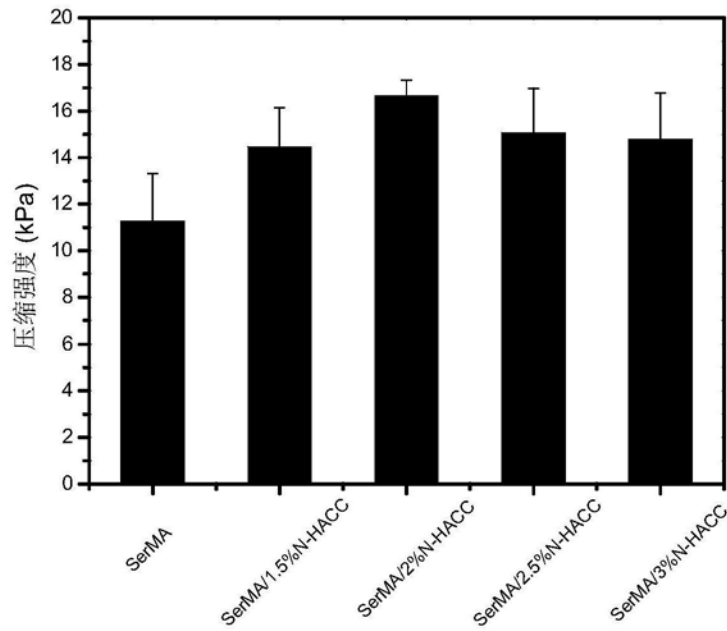


图6

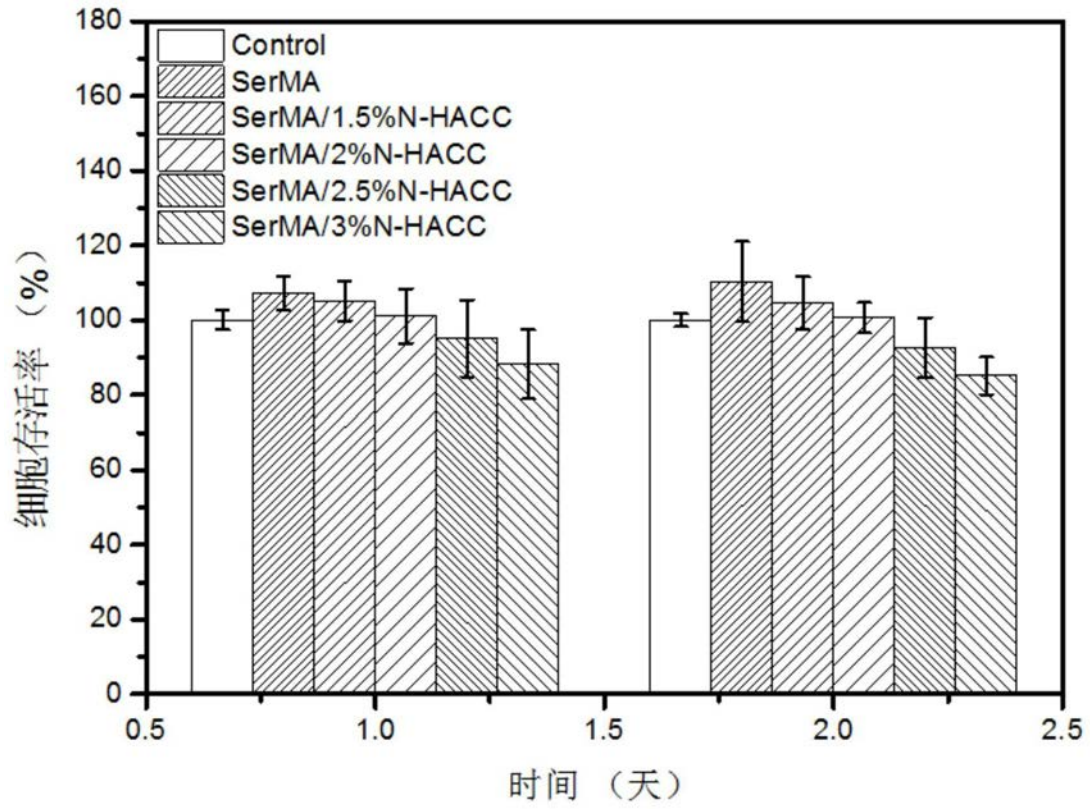


图7