

文章编号: 1001-9731(2015)12-12110-06

卤胺改性壳聚糖/PVA 抗菌复合膜的制备及性能*

张晓红, 洪宇文, 段 颖, 殷茂力, 马 维, 李 蓉, 任学宏

(江南大学 生态纺织教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要: 壳聚糖具有良好的生物降解性、生物相容性、抗菌性等优异性能, 受到研究者的广泛关注。在前期研究的基础上, 将卤胺改性壳聚糖(CTS-GH)与聚乙烯醇(PVA)进行物理混合, 制备不同比例的复合膜, 以提高卤胺改性壳聚糖膜的实际应用价值。利用原子力显微镜(AFM)考察了两者在溶液中的混合性质; 采用扫描电镜(SEM)、示差扫描量热仪(DSC)、X射线衍射(XRD)对复合膜进行了表征; 测试了经过氯化处理后复合膜的抗菌性能。结果表明, 除 CTS-GH/PVA = 10/90 外, 均能得到混合性能良好的复合膜。经过氯化处理后, 氯含量为 0.86×10^{18} 个原子/cm² (CTS-GH/PVA = 20/80) 的复合膜可在 5 min 内杀死 98.92% 金黄色葡萄球菌和 100% 大肠杆菌, 60 min 接触后可杀死 100% 金黄色葡萄球菌。

关键词: 壳聚糖; 卤胺化合物; 聚乙烯醇; 复合膜; 抗菌性能

中图分类号: TB34

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1001-9731.2015.12.023

1 引言

随着人们生活水平的提高, 人们越来越注重自身的健康, 因此, 对食品及其它生活用品的卫生性有了更高的要求。然而在食品运输周转和贮存过程中, 由于环境以及产品本身的物理生化变化的影响, 细菌的滋生是在所难免的。李斯特菌、蜡样芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、索氏志贺菌都是与食品疾病密切相关的病原体。抗菌材料则能在运输周转和贮存过程中抑制细菌的滋生甚至杀死细菌, 在一定程度上维持了产品的鲜度和卫生性, 为食用者提供了健康的保障。抗菌剂种类很多, 目前食品包装用抗菌剂研究主要集中在以下 3 种抗菌剂上^[1]。(1) 无机抗菌剂, 包括金、银、铜、二氧化钛和二氧化锌等; (2) 有机抗菌剂, 有季铵盐类、异噻唑类、二苯醚类、有机金属和有机氮类化合物等; (3) 常用的天然抗菌剂, 包括壳聚糖、山梨酸等。

壳聚糖作为一种可生物降解的环境友好型抗菌剂, 有望在抗菌食品包装材料中占据主导地位。然而, 壳聚糖的抗菌效果温和, 需要较长时间才能杀死细菌, 还受本体分子量、脱乙酰度、外界 pH 等条件的制约。另一方面, 壳聚糖膜的韧性和强度较差。为了改善壳聚糖膜的韧性和强度, 可将壳聚糖与其它材料(例如聚乙烯醇、淀粉、明胶等)共混成膜^[2]。为了增强壳聚糖膜的抗菌性能, 目前多采用壳聚糖与其它抗菌剂共混的形式, 例如壳聚糖/Ag 共混膜^[3]、壳聚糖/Ag/ZnO 共混膜^[4]、壳聚糖/绿茶提取物共混膜^[5]等。这类型的共混膜相对纯壳聚糖膜而言抗菌性能有了很大程度的提高, 但是需要较长的接触时间(24 h 甚至更长)。有机抗菌剂中的卤胺化合物是一种理想的抗菌剂, 具有高效的抗菌性能, 且对环境无毒, 其抗菌能力源于其分子结构中的 N—Cl 键, 可使细菌快速失活。而且, 经过漂白剂处理之后, 失活的抗菌单体可以恢复。因此, 卤胺化合物作为抗菌剂受到了国外研究者的广泛关注, 主要应用在水处理、纺织品抗菌整理等方面^[6]。

在前期工作中, 我们成功地制备了 3-环氧丙基-5, 5-二甲基海因(GH)改性壳聚糖(CTS)膜, 该膜具有高效的抗菌性能^[7]。但是, 氯化处理后, 分子结构中的氢键遭到破坏, 使得其脆性增加, 增加了其在工业生产中应用的难度。聚乙烯醇(PVA)具有生物相容性、可降解性、无毒性等优点, 而且 PVA 具有很好的成膜性能^[8-9]。因此, 本文将 CTS-GH 与 PVA 进行复配, 探讨了两者比例对其混合性质的影响, 制备出具有较好力学性能的复合膜。混合溶液的可混合性通过原子力显微镜(AFM)表征; 采用扫描电镜(SEM)、示差扫描量热(DSC)、X射线衍射分析(XRD)表征了复合膜的性能; 并测试了氯化处理后抗菌膜的抗菌性能。

2 实验

2.1 实验材料

CTS-GH 的合成按照本实验室现有的方法^[7]合成, 其结构式如图 1 所示, 取代程度(DS)通过紫外光

* 基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金资助项目(BK20130128); 江南大学青年基金资助项目(JUSRP11202); 江苏省大学生创新项目资助项目(201310295021X)

收到初稿日期: 2014-08-07

收到修改稿日期: 2014-11-20

通讯作者: 李 蓉, E-mail: rong-li@jiangnan.edu.cn, 任学宏

宏

作者简介: 张晓红 (1993-), 女, 浙江宁波人, 本科在读, 师承任学宏教授, 从事抗菌材料制备。

谱法测定, 为 4.1%; 商品次氯酸钠溶液(活性氯含量为 5%)、PVA 购于上海国药集团。

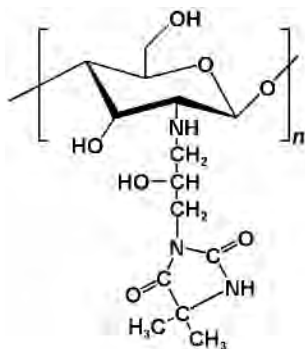


图 1 CTS-GH 的化学结构式

Fig 1 Chemical structure of CTS-GH

2.2 CTS-GH/PVA 复合膜的制备

首先将 CTS-GH 溶于 1% 的醋酸溶液中配制成质量浓度为 1% 的 CTS-GH 醋酸溶液, 将 PVA 溶于去离子水中配置成质量分数为 5% 的 PVA 溶液, 将上述两种溶液按照不同的体积比混合(CTS-GH 与 PVA 的混合比例为 10/90 20/80 30/70 40/60 和 50/50), 将混合溶液搅拌均匀后倒入聚四氟乙烯模具中, 在通风橱中自然蒸发 48 h, 然后在 60 °C 真空干燥箱中干燥 24 h 以除去残余的水和醋酸, 放入干燥器中待进一步使用。

2.3 测试方法

2.3.1 AFM

CTS-GH/PVA 在溶液中的混合性质采用中国本原公司的 CSPM 5000 型原子力显微镜表征。扫描范围为 5 μm × 5 μm, 所用探针型号为: NANOSENSORS PP-PNCHR。扫描前, 将混合溶液旋涂于新剥开的云母片上, 置于干燥器中干燥 24 h 以除去溶剂。

2.3.2 SEM

复合膜的表面形貌采用日本日立公司的 SU1510 型扫描电镜进行分析。加速电压为 10 kV, 放大倍数为 10 000 倍。测试前对样品进行喷金处理。

2.3.3 DSC

复合膜的热性能采用美国 TA 公司的 Q200 型示差扫描量热仪进行分析, 升温速度为 10 °C/min, 测试过程在氮气保护下进行, 对样品进行两次循环测试。首先将样品从 10 °C 升温至 150 °C 再冷却至 10 °C 以除去复合膜中残余的溶剂, 再将样品从 10 ~ 300 °C, 实验结果仅记录了第二次升温曲线。

2.3.4 XRD

XRD 采用德国布鲁克公司的 AXS X 射线衍射计(D8 Advance)进行测试, 2θ 角度范围为 5 ~ 35°。

2.3.5 FT-IR

傅里叶变换红外光谱采用 Thermo Fisher 公司的 NICOLET is10 测试, 采用 ATR 模式。扫描范围为 4 000 ~ 500 cm⁻¹, 分辨率为 4 cm⁻¹。

2.3.6 氯化及滴定

将 CTS-GH/PVA 复合膜置于浓度为 5% 的商品次

氯酸钠溶液中(溶液的 pH 值用稀硫酸溶液调至 7 左右), 室温下搅拌氯化 1 h。氯化处理后, 将样品用去离子水反复冲洗以彻底去除膜表面的游离氯, 在 45 °C 条件下干燥 1 h 之后保存在干燥器中待进一步的测试。经过氯化处理后, CTS-GH 分子结构中的 N—H 键可以转变为 N—Cl 键, 如图 2 所示。根据氧化还原原理, 采用碘量法对复合膜表面的氯含量进行滴定, Cl⁺ 含量可通过计算得到

$$Cl^+ \text{ (每平方厘米中原子的个数)} = \frac{N \times V \times 6.02 \times 10^{23}}{2 \times S}$$

式(1)中 *N* 表示滴定用标准溶液硫代硫酸钠的当量浓度(equiv./L); *V* 表示消耗硫代硫酸钠的体积(L); *S* 表示复合膜的面积(cm²)。

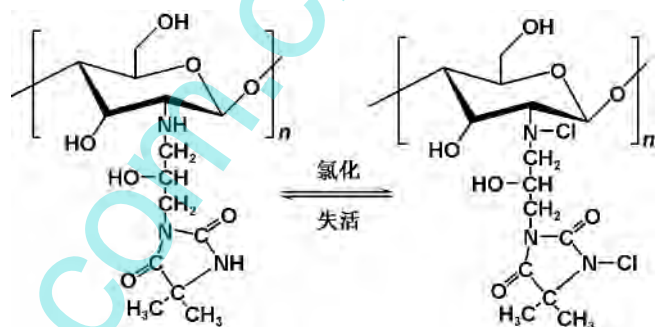


图 2 CTS-GH 的氯化及失活过程

Fig 2 The chlorination and inactivation process of CTS-GH

2.4 抗菌性能

选择 CTS-GH/PVA = 20/80 的复合膜经过氯化处理后的样品进行抗菌性能测试, 选用标准为修正的 AATCC 检测方法 100-1999, 测试使用大肠杆菌 O157:H7(ATCC 43895) 和金黄色葡萄球菌(ATCC 6538), 同时以未氯化的复合膜作为对照样品。在一片复合膜中央加入细菌悬浮液, 然后将另一片复合膜盖上, 接触 1, 5, 10, 30 和 60 min 后, 再将试样浸没于 5 mL 0.02 mol/L 的无菌硫代硫酸钠中, 以去除所有的 Cl⁺, 离心处理。再将试样用 pH 值 = 7 的缓冲液稀释, 后将其放置在培养基中, 在 37 °C 下恒温培养 24 h, 测定细菌数量, 计算细菌的减少量。

3 结果与讨论

3.1 AFM

混合溶液的可混合性质用 AFM 表征, 其结果如图 3 所示, 图 3(a) 和 (g) 分别指纯 PVA 和纯 CTS-GH 溶液涂层的 AFM 结果, (b)–(f) 指两种溶液经不同质量比混合后涂层的 AFM 结果, 所有 AFM 照片均采用三维立体图, 扫描范围为 5 μm × 5 μm。从图 3 可以看出, 当混合 CTS-GH 与 PVA 的混合比例为 10/90 时(图 3(b)), 溶液发现了明显的相分离, 说明该比例下两者的混合性质较差^[10], 因此在制备复合膜的过程中, 不再考虑该混合比例; 其余混合比例下则能得到均

匀混合的溶液,其中,当混合比例为 20/80 时(图 3 (c))其表面的平均粗糙度较小,仅为 1.51 nm,说明依

此比例制出的膜将会比较平滑^[11]。

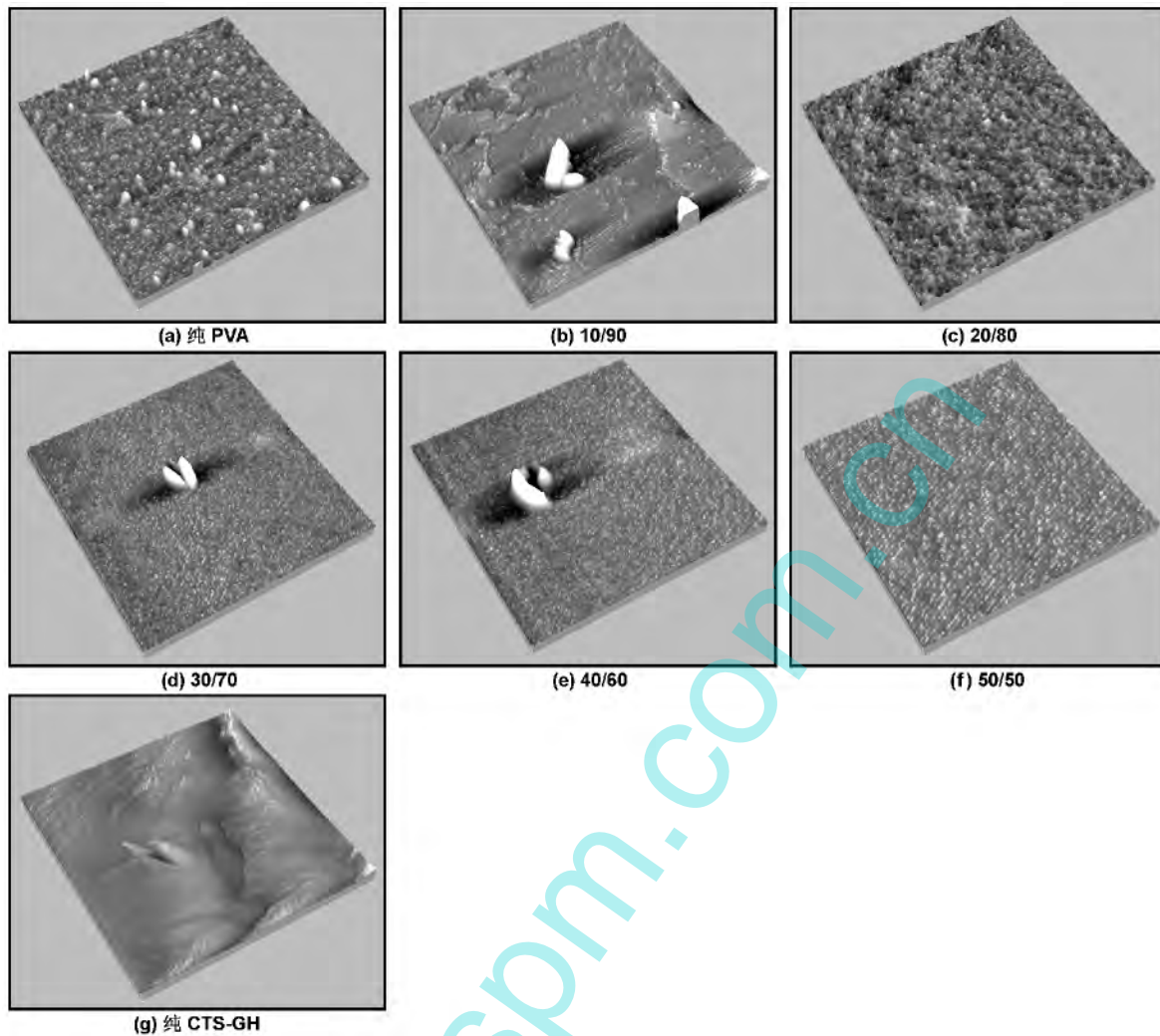


图 3 CTS-GH/PVA 不同比例复合溶液的 AFM 形貌

Fig 3 AFM images of the surface morphologies of CTS-GH/PVA composite solution with different mixing ratio

3.2 SEM

复合膜的表面形貌采用 SEM 表征,如图 4 所示,放大倍数为 10 000 倍,图 4(a)和(f)分别指纯 PVA 和纯 CTS-GH 的表面形貌,(b)-(e)指不同质量比混合后所制备的复合膜的表面形貌。从图 4 可以看出,部分膜的表面均出现了少量突起物,这可能是由于在制膜的过程中由于灰尘等杂物的掉落而引起的,但总体而言,没有发生明显相分离,也表明 CTS-GH 与 PVA 具有很好的相容性。

3.3 DSC

混合膜熔融温度的转变趋势也可用来判断混合膜的可混合性质。因此本文通过 DSC 测定出复合膜在不同比例下的熔融温度,以此判断 PVA 与 CTS-GH 的可混合性质,其结果如图 5 所示,图中的吸热峰表示复

合膜的熔融温度。从图 5 可以看出 CTS-GH 膜在温度范围 50 ~ 225 °C 没有表现任何明显吸收峰,这是由于 CTS-GH 内存在刚性结构和较强的分子内氢键。随着 CTS-GH/PVA 膜中 PVA 含量的增加,吸热峰附近变得越来越尖锐。从(b)-(f)随着 PVA 含量的增加,CTS-GH/PVA 膜的熔融温度从 198.0 °C 逐渐升高到 206.5 °C。这是因为 CTS-GH 和 PVA 混合时,破坏了 PVA 分子链内和分子链间的氢键作用,降低了 PVA 的结晶度,增加了 PVA 链段的活动性。因此降低 CTS-GH 含量,提高 PVA 比重,能够增加 CTS-GH/PVA 膜的结晶度,CTS-GH/PVA 膜的熔融温度会向纯 PVA 靠近。与此同时,可以推断 PVA 与 CTS-GH 具有优良的可混合性质^[13]。

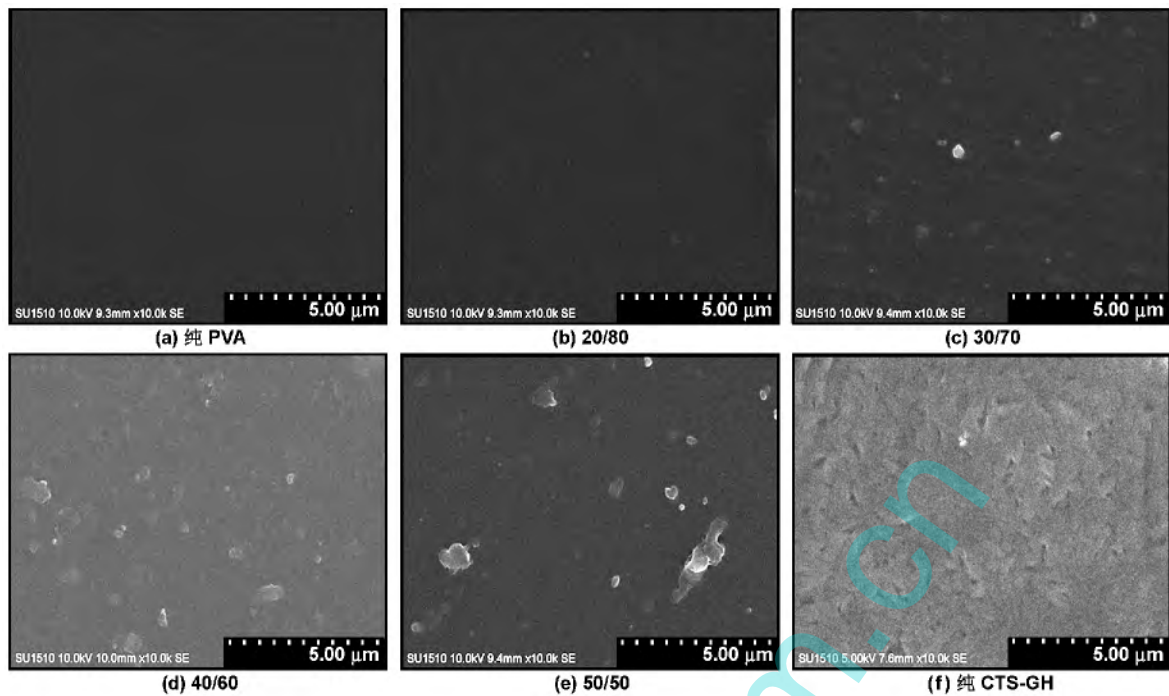


图4 CTS-GH/PVA 不同混合比例复合膜的 SEM 照片

Fig 4 SEM images of the surface morphologies of CTS-GH/PVA composite films with different mixing ratio

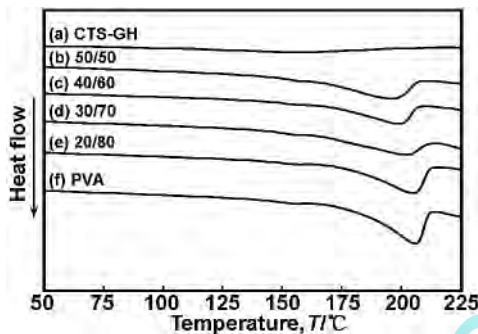


图5 CTS-GH/PVA 复合膜的 DSC 曲线

Fig 5 DSC curves of CTS-GH/PVA composite films with different mixing ratio

3.4 XRD

XRD 通常用来研究晶体材料的晶型,也可以用于研究混合物之间的相互作用。在混合体系中,如果两种物质彼此之间没有相互作用,混合体系将会呈现出单一物质各自的晶型,因此 X 射线衍射还可用来研究混合物的混合程度^[12]。CTS-GH/PVA 复合膜的 X 射线衍射图谱如图 6 所示。PVA 在 $2\theta = 19.6^\circ$ 处是一个明显的衍射峰,这是由于 PVA 结晶区的形成。纯 CTS-GH 在 $2\theta = 21.1^\circ$ 处有个较宽的衍射峰。CTS-GH/PVA 复合膜在 $2\theta = 13.7^\circ$ 处出现了一个新的衍射峰,而且复合膜衍射峰的形状也与纯 PVA 和纯 CTS-GH 不同。这说明 PVA 与 Chitosan-GH 有较强的相互作用,即较高的混合程度^[14]。

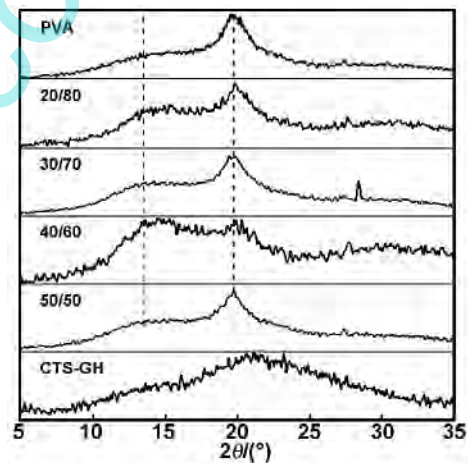


图6 Chitosan-GH/PVA 不同混合比例复合膜 XRD 图谱

Fig 6 XRD patterns of Chitosan-GH/PVA composite films with different mixing ratio

3.5 氯含量

滴定结果如图 7 所示,表示不同体积比 CTS-GH/PVA 混合膜的有效氯滴定结果,由图 7 可得,随着 CTS-GH 比例的增加,膜上有效氯含量逐渐上升。这是由于改性壳聚糖氯化后得到卤胺化合物改性壳聚糖, N-H 键转变为氧化性的 N-Cl 键,因此 CTS-GH 在溶液中所占比例越高,成膜氯化后得到 N-Cl 键的比例也会相对较高,最终导致较高的有效氯含量。

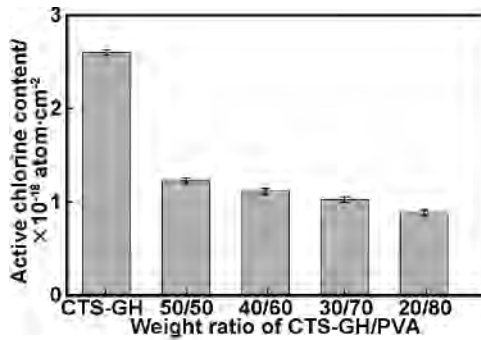


图7 Chitosan-GH/PVA 混合膜的有效氯含量

Fig 7 Active chlorine contents of Chitosan-GH/PVA composite films

3.7 抗菌性能

经过氯化处理后的 CTS-GH/PVA 复合膜的抗菌

表1 CTS-GH/PVA 复合膜的抗菌性能

Table 1 The antibacterial property of CTS-GH/PVA composite film

样品	接触时间 /min	金黄色葡萄球菌 ^a		大肠杆菌 ^b	
		/%	Log	/%	Log
CTS-GH/PVA 复合膜	30.00	61.14	0.41	24.83	0.12
	1.00	86.60	0.87	63.50	0.44
	5.00	98.92	1.97	100.00	6.09
氯化后的 CTS-GH/PVA 复合膜	10.00	99.79	2.67	100.00	6.09
	30.00	99.98	3.70	100.00	6.09
	60.00	100.00	6.00	100.00	6.09

a:细菌浓度为 1.00×10^6 cfu/sample; b:细菌浓度为 1.23×10^6 cfu/sample。

4 结 论

成功制备了不同混合比例的 CTS-GH/PVA 复合膜,在实验选择的混合比例范围内,除 CTS-GH/PVA = 10/90 外,均能得到混合性能良好的复合膜。

采用碘量法滴定了不同混合比例下复合膜的氯含量,随着复合膜中 CTS-GH 含量的增加,复合膜的氯含量从 0.86×10^6 个原子/cm 2 增加到 2.60×10^6 个原子/cm 2 。

选择 CTS-GH/PVA = 20/80 的复合膜经过氯化处理后,采用修正的 AATCC100-1999 测试了抗菌性能,可在接触 5 min 后杀死 98.92% 金黄色葡萄球菌和 100% 大肠杆菌,经过 60 min 接触后可杀死 100% 金黄色葡萄球菌。该膜可以在生物医药、食品包装、水污染处理等方面有良好的发展前景。

致谢:感谢美国奥本大学的 Tung-Shi Huang 教授为本文提供的抗菌性能测试。

参考文献:

- [1] Li Ting, Zhong Zehui, Shao Jie, et al. Developments of food packaging materials[J]. Packaging Journal, 2011, 3 (2): 34-36.
- [2] Dong W, Qu L J, Guo X Q. Study on the properties of the gelatin modified chitosan film [J]. Textile Auxiliaries,

性能如表 1 所示,CTS-GH 与 PVA 的比例为 20/80,同时以相同比例下未氯化的 CTS-GH/PVA 复合膜作为对样品。金黄色葡萄球菌的初始浓度为 1.00×10^6 cfu/sample,大肠杆菌的初始浓度为 1.23×10^6 cfu/sample。从表 1 可以看出,未氯化的 CTS-GH/PVA 复合膜可在 30 min 内杀死 61.14% 金黄色葡萄球菌和 24.83% 大肠杆菌。这主要是因为复合膜中壳聚糖对细菌有一定的杀菌作用。CTS-GH/PVA 复合膜经过氯化处理后,可在接触 5 min 后杀死 98.92% 金黄色葡萄球菌和 100% 大肠杆菌。从表中还可以看出,氯化处理后的 CTS-GH/PVA 复合膜对大肠杆菌具有更好的杀灭作用。

2012, 29(2): 36-38.

- [3] Gao Mingjie, Wang Zhiqiang, Sun Lei, et al. Preparation and antibacterial properties of chitosan modified silver nanoparticles[J]. Journal of Functional Materials, 2012, 43(8): 1038-1041.
- [4] Li Lihua, Deng Jiancheng, Deng Huiren, et al. Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan/Ag/ZnO blend films [J]. Chemical Engineering Journal, 2010, 160(1): 378-382.
- [5] Siripatrawan U, Noipha S. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 27(1): 102-108.
- [6] Hui F, Debiecme-Chouvy C. Antimicrobial N-halamine polymers and coatings: a review of their synthesis, characterization, and applications [J]. Biomacromolecules, 2013, 14(3): 585-601.
- [7] Li Rong, Hu Pei, Ren Xuehong, et al. Antimicrobial N-halamine modified chitosan films [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(1): 534-539.
- [8] Jia Yongtang, Gong Jian, Gu Xiaohua, et al. Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method [J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 67(3): 403-409.
- [9] Gao Xiping, Liu Jie, Zheng Xuejing, et al. Influence of crosslinking of formaldehyde on structure and properties of gelatin/PVA blend films [J]. Journal of Functional Materials, 2014, 45(5): 5049-5052.

- [10] Ravi K M N V ,Bakowsky U ,Lehr C M. Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers [J]. *Biomaterials* 2004 25(10) :1771-1777.
- [11] Wang Chaoyang , Ye Weihua , Zheng Ying , et al. Fabrication of drug-loaded biodegradable microcapsules for controlled release by combination of solvent evaporation and layer-by-layer self-assembly [J]. *International Journal of Pharmaceutics* 2007 338(1-2) :165-173.
- [12] Zhuang Pengyu , Li Yangfan , Fan Li , et al. Modification of chitosan membrane with poly(vinyl alcohol) and biocompatibility evaluation [J]. *International Journal of Biological Macromolecules* 2012 50(3) :658-663.
- [13] Chen Chengho , Wang Fangyu , Mao Chingfeng , et al. Studies of chitosan: II. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films [J]. *International Journal of Biological Macromolecules* , 2008 ,43(1) : 37-42
- [14] Cheng Ruihua , Qu Lijun , Guo Xiaoqing , et al. Structure and properties of chitosan/PVA blend fiber [J]. *Textile Auxiliaries* 2012 29(12) :25-27.

The preparation and property of N-halamine modified chitosan/PVA antibacterial composite film

ZHANG Xiaohong , HONG Yuwen , DUAN Ying , YIN Maoli , MA Wei ,
LI Rong , REN Xuehong

(Key Laboratory of Eco-Textile Ministry of Education , Jiangnan University , Wuxi 214122 , China)

Abstract: Chitosan has attracted researchers' wide attention due to its excellent properties such as biodegradability , biocompatibility and antibacterial property. Based on our preliminary studies , composite films in different proportions were prepared by physically mixing N-halamine modified chitosan (CTS-GH) and polyvinyl alcohol (PVA) to improve practical application of composite films. The miscibility of the mixed solution was examined by atomic force microscopy (AFM). The miscibility of the composite films was characterized by scanning electron microscopy (SEM) , differential scanning calorimetry (DSC) , X-ray diffraction (XRD). The antimicrobial property of the chlorinated composite film was evaluated. The results showed that the miscibility of CTS-GH/PVA composite film is perfect with the exception of CTS-GH/PVA = 10/90. After the chlorination treatment , the composite film with chlorine content of 0.86×10^{18} atoms/cm² (CTS-GH/PVA = 20/80) can kill 98.92% *Staphylococcus aureus* and 100% *Escherichia coli* within 5 min , and 100% *Staphylococcus aureus* within 60 min.

Key words: chitosan; N-halamine; PVA; Composite film; antibacterial property

(上接第 12109 页)

Adsorption behavior of bovine serum albumin by histidine-grafted-chitosan/poly(L-lactide) scaffolds

XIN Meihua¹ , CHEN Zhangxu^{1,2} , LI Mingchun¹ , ZHENG Dezhi¹ , CHEN Xiaodong¹

(1. College of Materials Science and Engineering , Huaqiao University , Xiamen 361021 , China;

2. College of Environmental and Biological Engineering , Putian University , Putian 351100 , China)

Abstract: Histidine-grafted-chitosan/poly(L-lactide) (NHCS/PLLA) scaffolds were prepared by the dual phase separation technique. Adsorption behavior of bovine serum albumin (BSA) by NHCS/PLLA scaffolds in simulated body fluid (SBF) was investigated , while the adsorption isotherm , adsorption kinetics and thermodynamics of behavior were studied too. The results indicated that these scaffolds were effectively to adsorb BSA , NPs3 were the better for adsorbing BSA of all NHCS/PLLA scaffolds. The adsorption capacity of them were 928.53 mg/g , which could be reused for separation and purification of BSA , and could provide a carrier for other protein and tissue engineering.

Key words: NHCS; PLLA; scaffold; bovine serum albumin; adsorption capacity