

壳聚糖衍生物改性磷酸锆自组装纳米材料的制备及抑菌性能研究

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2017.06.003

李知函^{1,2,3} 姚进^{1,3}
黄海波^{1,3} 赵田^{1,3}
曾广胜^{1,3} 朱和平³

1. 湖南工业大学
包装与材料工程学院
湖南 株洲 412007
2. 齐鲁工业大学
制浆造纸科学与技术教育部/
山东省重点实验室
山东 济南 250353
3. 湖南工业大学
先进包装材料研发技术
国家地方联合工程研究中心
湖南 株洲 412007

摘要:以 α -ZrP为载体,通过微波辐射法,将3种水溶性壳聚糖衍生物羧甲基壳聚糖、N-三甲壳聚糖季铵盐和N-对苯甲氧基甲基壳聚糖季铵盐插层进入 α -ZrP层间,制备得到3种壳聚糖衍生物/磷酸锆纳米复合抑菌材料。通过红外光谱、X射线衍射、扫描电镜、透射电镜、电动电位分析和热重分析,对纳米复合材料的组成、结构和热稳定性进行表征。X射线衍射及电动电位分析实验结果表明:相较于 α -ZrP,壳聚糖衍生物/磷酸锆纳米复合材料的层间距随着壳聚糖衍生物插层而明显增大,壳聚糖衍生物的正电性越强,复合材料的层间距越大,这表明壳聚糖衍生物与 α -ZrP通过离子交换、氢键结合,已经成功地插层进入 α -ZrP层间。热重分析结果显示复合材料的热稳定性较天然壳聚糖有显著提高。抑菌试验结果表明,复合材料对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都具有很好的抑菌效果。

关键词:壳聚糖衍生物; α -ZrP; 纳米复合材料; 抑菌性能

中图分类号: TB332 **文献标志码:** A

文章编号: 1674-7100(2017)06-0016-09

0 引言

磷酸锆(zirconium phosphate, ZrP)类化合物是近年来逐步发展起来的一类具有层状结构的多功能材料^[1]。相较于黏土类化合物,磷酸锆具有组成成分单一、合成简单和设计性强的特点^[2],同时磷酸锆具有良好的离子交换性能和一定的择形吸附与催化性能^[3],故已引起科研工作者的关注并被应用于多个领域,包括金属离子交换^[4-6]、吸附^[7-8]、催化反应^[9-10]与光电子传导^[11]等,具有广阔的应用前景。此外,磷酸锆还具有良好的热稳定性和三维网络骨架结构,

可利用其层板上的氢质子,与银、铜、锌和稀土元素等具有良好抑菌性能的金属离子进行交换、负载与固定^[12-14],从而制得复合抑菌材料。但存在着以下问题:1)贵金属离子价格高昂;2)金属离子易氧化失去抑菌性能。因此,针对目前磷酸锆/金属离子复合材料的缺陷,研发具有长效广谱抑菌性和热稳定性的低成本新型抑菌材料,具有重要的理论与应用价值。

壳聚糖(chitosan, CS)是仅次于纤维素的第二大天然可再生生物质多糖^[15],广泛地存在于虾、蟹、昆虫的外壳和藻类、菌类的细胞壁中。作为自然界中唯一一种带正电的天然阳离子多糖,壳聚糖具有广谱

收稿日期:2017-09-20

基金项目:湖南省科技厅重点研发计划基金资助项目(2017WK2042),湖南省教育厅基金资助项目(17C0461),制浆造纸科学与技术教育部/山东省重点实验室开放基金资助项目(KF201620)

作者简介:李知函(1987-),男,湖南洞口人,湖南工业大学讲师,博士,主要研究方向为生物质资源绿色应用,
E-mail: lizh@hut.edu.cn

通信作者:曾广胜(1975-),男,湖南洞口人,湖南工业大学教授,博士,主要从事生物质材料改性加工及产业化研究,
E-mail: guangsheng_zeng@126.com

抑菌活性, 但其只溶于部分无机酸溶液、不溶于水的缺点极大地限制了壳聚糖的应用范围^[16-18]。

本文首先通过对壳聚糖进行接枝改性得到具有良好水溶性和抑菌性能的壳聚糖衍生物, 然后在微波辐射环境中对正丁胺预撑后的磷酸锆进行嵌入插层自组装反应, 从而制得壳聚糖衍生物/磷酸锆纳米复合材料, 并对其抑菌及耐热性能进行研究。

1 实验

1.1 试剂与设备

1) 试剂

壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 95\%$), 购自于山东省济南市海德贝生物工程有限公司, 通过黏度法测得黏均分子量为 1.0×10^6 ; 八水氯化锆($ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$), 购自于上海萨恩化学技术公司; 碘甲烷, 购自于上海金山化工厂; 正丁胺、氯化铵、香草醛, 购自于天津市科密欧化学试剂有限公司; 氢氧化钠、盐酸、磷酸、甲酸、甲醇、无水乙醇、异丙醇、甲醛, 购自于广州化学试剂厂; 所有试剂均为分析纯, 未经进一步纯化。

2) 设备

X射线衍射仪(X-ray diffraction, XRD): D8型, 德国Bruker公司; 傅里叶红外光谱仪(fourier transform infrared spectrometer, FTIR): Nicolet FTIR 5700, 美国Nicolet公司; 热重分析仪(thermogravimetric, TG): SDT-Q600型, 美国TA公司; 电位分析仪: 3000HSA, 英国Malven公司; 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM): EVO-18型, 德国Zeiss公司; 场发射透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM): JEM-2100F, 日本电子株式会社。

1.2 实验过程

1.2.1 回流法制备 α -ZrP

磷酸锆通过溶胶回流法制得^[19]。首先, 将11.0 g $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ 溶于200 mL浓度为2 mol/L的盐酸中, 磁力搅拌下, 缓慢滴加200 mL浓度为4 mol/L的磷酸溶液, 制得凝胶; 然后, 将此凝胶置于恒温加热磁力搅拌器中于120 °C恒温回流7 d; 反应结束后将凝胶用去离子水离心洗涤至pH为中性, 弃去上层清液, 沉淀物于65 °C下真空干燥24 h, 研磨成粉末状, 即得 α -ZrP晶体。

阳离子交换容量(cation exchange capacity, CEC)是指pH值为7的条件下所吸附的 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、

Mg^{2+} 等阳离子的总量。本实验中 α -ZrP晶体的CEC通过氯化铵-乙醇法进行测定^[20], 为195.42 mmol/100 g。

1.2.2 壳聚糖衍生物的制备

1) 羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMCS)的制备

参照文献[21], 将3 g壳聚糖分散于5 mL质量分数为40%的氢氧化钠溶液中, 在-18 °C环境中碱化溶胀24 h后自然解冻。加入100 mL异丙醇, 磁力搅拌至分散均匀, 转移至微波合成仪中, 于800 W、60 °C微波辐射条件下, 加入6 g氯乙酸, 磁力搅拌反应20 min。反应结束后转移至去离子水中透析, 冷冻干燥得到CMCS。CMCS上的羧基取代度(degree of substitution, DS)通过电导率滴定法测得, DS为0.64。

2) N-三甲基壳聚糖季铵盐(N-trimethyl quaternary ammonium chitosan, TMCS)的制备

参照文献[22], 将3 g壳聚糖溶于100 mL体积分数为2%的甲酸溶液中, 然后加入9 mL甲醛, 转移至微波合成仪中, 于800 W、60 °C微波辐射条件下反应20 min, 加碱液至pH>10析出沉淀, 过滤后真空干燥得到N,N-烷基壳聚糖。将2 g N,N-烷基壳聚糖分散于40 mL N-甲基-2-吡咯烷酮中, 室温搅拌12 h后滴加10 mL硫酸二甲酯, 800 W、45 °C微波辐射条件下反应20 min。反应结束后将反应液倾入至过量丙酮中沉淀, 沉淀物移至去离子水中透析, 冷冻干燥得到TMCS。TMCS上N-位的取代度通过硝酸银溶液进行滴定测得, DS为0.66。

3) N-对苯甲氧基甲基壳聚糖季铵盐(N-phenyl methoxy methyl quaternary ammonium chitosan, MBMCS)的制备

参照文献[23], 将3 g壳聚糖溶于100 mL体积分数2%的甲酸溶液中, 滴加50 mL乙醇继续搅拌10 min, 再加入6 g香草醛, 室温搅拌2 h后加入9 g硼氢化钠, 继续反应2 h。其后, 将反应液倾入至过量的丙酮中沉淀, 过滤, 于60 °C下真空干燥得到N-烷基壳聚糖。称取2 g N-烷基壳聚糖, 将其分散于10 mL的N-甲基-2-吡咯烷酮中, 室温搅拌1 h后加入4 mL碘甲烷、4 g碘化钠和0.3 mL浓度为1 mol/L的氢氧化钠, 于5 800 W、45 °C微波辐射条件下反应45 min。反应结束后倾入至过量丙酮中沉淀, 透析后冷冻干燥得到MBMCS。MBMCS上N-位的取代度通过硝酸银溶液进行滴定测得, DS为0.66。

1.3 壳聚糖衍生物 / 磷酸锆纳米复合材料的制备

由于 α -ZrP 的层间距 (0.76 nm) 较小, 为使壳聚糖衍生物能够快速进入 α -ZrP 层间, 可以采用正丁胺对 α -ZrP 进行“预撑”^[24]。在 100 mL 去离子水中加入 3.3 mmol α -ZrP 与 3.3 mmol 正丁胺, 50 °C 水浴振荡 4 h 后离心洗涤、真空干燥即可得到正丁胺柱撑的 α -ZrP (以下简称为 B-ZrP)。再分别将 CEC 为 0.5 的 CMCS、TMCS 和 MBMCS 加入 B-ZrP 溶液中, 于微波 800 W、60 °C 下搅拌 1 h。产物经去离子水和乙醇洗涤、离心后在 60 °C 下真空干燥 24 h, 得到 3 种壳聚糖衍生物 / 磷酸锆纳米复合材料, 分别记为 CMCS-ZrP、TMCS-ZrP 和 MBMCS-ZrP。其制备过程如图 1 所示。

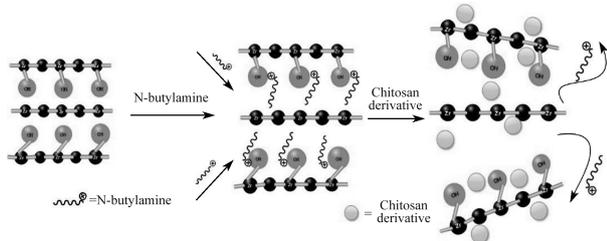


图 1 α -ZrP/壳聚糖衍生物复合材料制备示意图
Fig. 1 Preparation of α -ZrP/chitosan derivative nanocomposites

1.4 抑菌性能测试

本实验选取金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 和大肠杆菌 (*E. coli*) 分别作为革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的代表菌种; 采用最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 法对制得的纳米复合材料的抑菌性能进行测试。

所有培养基和实验用材均在灭菌锅中于 121 °C 环境中灭菌 30 min, 通过添加无菌营养肉汤溶液配制成含有 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL *E. coli* 或 *S. aureus* 的悬浮液; 将 ZrP、B-ZrP、CMCS-ZrP、TMCS-ZrP 和 MBMCS-ZrP 分散于磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 中, 并配置成一定浓度, 与上述细菌悬浮液共混后置于生化培养箱中, 于 (37 ± 1) °C 下培养 24 h, 以未见细菌生长的最低浓度作为复合材料的最小抑菌浓度。

1.5 检测与表征

本文使用 D8 型 X 射线衍射仪对样品的物相进行 X 射线测试, $\text{Cu K}\alpha$, $\lambda=1.5405$ nm, 扫描速度为 $1^\circ/\text{min}$, 扫描范围为 $5^\circ \sim 40^\circ$; 使用红外光谱仪对样品的特征官能基团进行红外光谱测试, KBr 压片, 扫描范围为 $500 \sim 4\,000$ cm^{-1} ; 使用热重分析仪对样品

的热稳定性能进行测试, 升温速率为 $10^\circ\text{C}/\text{min}$, N_2 保护, 升温范围为 $50 \sim 600^\circ\text{C}$; 使用电位分析仪对样品的 Zeta 电位和粒径进行测定; 使用扫描电镜对样品的表面形貌进行观察分析; 使用场发射透射电子显微镜对样品的结构进行观察分析。

2 结果与讨论

2.1 α -ZrP 的结构与形貌分析

图 2 是回流法制备得到的 α -ZrP 的 XRD 图谱。

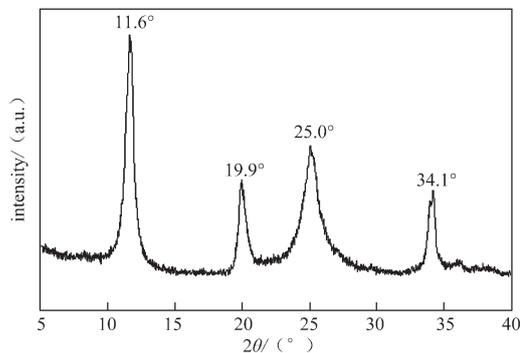


图 2 α -ZrP 的 XRD 图谱
Fig. 2 XRD patterns of α -ZrP

从图中可以清楚看到, α -ZrP 在 $2\theta=11.6^\circ$, 11.9° , 25.0° 和 34.1° 处具有 4 个主要的衍射峰, 峰形规整, 峰尖而窄, 表明制得的 α -ZrP 的结晶度很高, 同时具有规整的层状结构。根据布拉格方程和衍射首峰 $2\theta=11.6^\circ$, 计算得到对应的层间距为 0.76 nm。

图 3 是 α -ZrP 的 TEM 图。由图可以清楚看到, α -ZrP 呈片装结构, 形状较为规整; 粒径较为均一, 平均粒径在 200 nm 左右; 并且 α -ZrP 层与层之间相互叠合排列, 具有很好的层状结构, 可作为壳聚糖衍生物插层的母体材料。

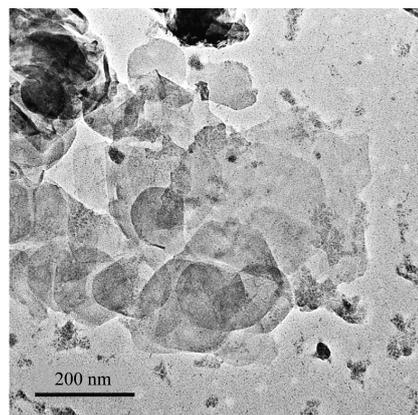


图 3 α -ZrP 的 TEM 图
Fig. 3 TEM image of α -ZrP

2.2 壳聚糖衍生物/ α -ZrP 的 FTIR 分析

图 4 为壳聚糖及其衍生物的 FTIR 谱图。

由图可看出, 壳聚糖谱图中位于 $3\ 425\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰是其氨基和羟基的伸缩振动吸收峰以及分子内和分子间氢键的特征吸收峰, $2\ 877\ \text{cm}^{-1}$ 处的弱峰对应的是壳聚糖上亚甲基的振动峰, $1\ 651\ \text{cm}^{-1}$ 为 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动 (酰胺 I), $1\ 598\ \text{cm}^{-1}$ 为 $\text{N}-\text{H}$ 的面内弯曲振动 (酰胺 II), $1\ 381\ \text{cm}^{-1}$ 为 $\text{N}-\text{H}$ 的面外弯曲振动 (酰胺 III)。CMCS 在 $1\ 500\sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 处未出现亚氨基的振动峰, 表明壳聚糖的 $-\text{NH}_2$ 没有被修饰, 在 $1\ 625$ 和 $1\ 415\ \text{cm}^{-1}$ 处出现两个强峰, 这是新接入的 $-\text{COOH}$ 基团的对称伸缩振动和反对称伸缩振动峰; 同时 $1\ 080\ \text{cm}^{-1}$ 附近仲羟基的特征吸收峰没有明显改变, 证明主要是 C6 位的羟基上发生羧甲基化。与壳聚糖相比, TMCS 的谱线中 $1\ 598\ \text{cm}^{-1}$ 处的氨基特征峰消失, $1\ 481\ \text{cm}^{-1}$ 处出现新的 $-\text{CH}_3$ 的 $\text{C}-\text{H}$ 弯曲振动吸收峰, 这说明在氨基上发生了高取代度的甲基化反应。MBMCS 的谱线中, $1\ 521, 810$ 和 $615\ \text{cm}^{-1}$ 左右的吸收峰为苯环的吸收振动峰, $1\ 480\ \text{cm}^{-1}$ 处是引进了 $-\text{CH}_3$ 的弯曲振动峰, 证明 MBMCS 制备成功。

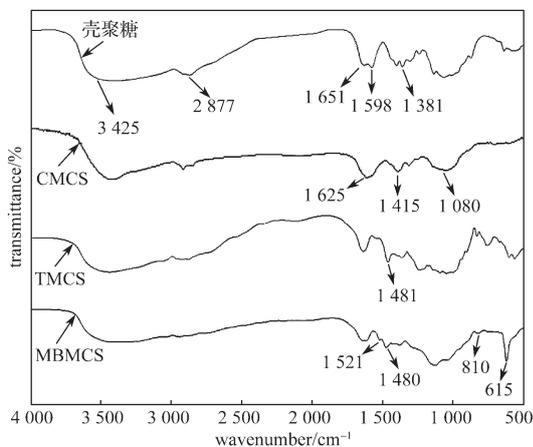


图 4 壳聚糖、CMCS、TMCS 和 MBMCS 的 FTIR 谱图

Fig. 4 FTIR spectra of CS, CMCS, TMCS and MBMCS

α -ZrP、B-ZrP、CMC-ZrP、TMCS-ZrP 和 MBMCS-ZrP 的 FTIR 谱图如图 5 所示。

根据 MacLanchian^[25] 的归属: α -ZrP 在 $3\ 597$ 和 $3\ 512\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的是层间水羟基的伸缩振动峰, $1\ 620\ \text{cm}^{-1}$ 处为水羟基的弯曲振动峰, $1\ 260$ 和 $599\ \text{cm}^{-1}$ 处为 PO_4 的伸缩振动峰^[26]。与 α -ZrP 的红外谱

图相对比, B-ZrP 的红外光谱中, $2\ 970\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 475\ \text{cm}^{-1}$ 处的新吸收峰是由于正丁胺上甲基的对称和非对称振动产生的。在复合材料 CMCS-ZrP 中, 新出现的 $3\ 425\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰位归属于 CMCS 中 $\text{O}-\text{H}$ 伸缩振动和 $\text{N}-\text{H}$ 伸缩振动的吸收峰。TMCS-ZrP 的谱线中 $1\ 477\ \text{cm}^{-1}$ 为甲基上的 $\text{C}-\text{H}$ 弯曲振动峰。MBMCS-ZrP 的谱线中, $1\ 521, 810, 615\ \text{cm}^{-1}$ 左右的吸收峰为苯环的吸收振动峰, $1\ 470\ \text{cm}^{-1}$ 处是引进了 $-\text{CH}_3$ 的弯曲振动峰。在复合材料 CMCS-ZrP、TMCS-ZrP 和 MBMCS-ZrP 的谱线中, 羟基伸缩振动谱带均明显向低频发生了移动, 而且层间羟基吸收峰的峰强变低, 这表明: 在复合材料中, α -ZrP 层状结构使其可以作为主体, 壳聚糖衍生物水溶液通过离子交换力, 在微波辐射条件下发生自组装反应, 插层进入磷酸锆层间形成氢键; 磷酸锆层间水分子则大部分被取代出层间, 导致羟基的峰强变弱, 同时导致羟基伸缩振动谱带向低频移动^[27]。

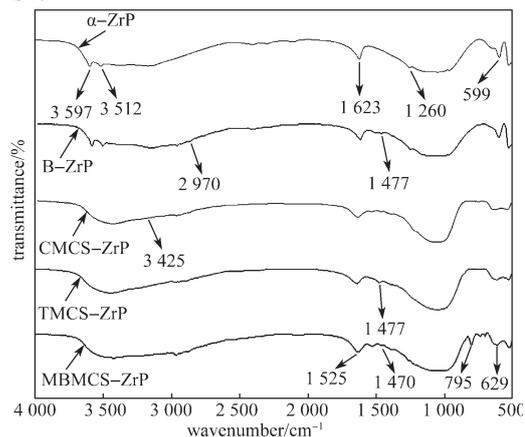


图 5 α -ZrP、B-ZrP、CMCS-ZrP、TMCS-ZrP、MBMCS-ZrP 的 FTIR 图谱

Fig. 5 FTIR spectra of α -ZrP、B-ZrP、CMCS-ZrP、TMCS-ZrP and MBMCS-ZrP

2.3 壳聚糖衍生物/ α -ZrP 的 XRD 分析

图 6 是 α -ZrP、B-ZrP、CMCS-ZrP、TMCS-ZrP 和 MBMCS-ZrP 的 XRD 图谱。

其中 α -ZrP 衍射峰尖而窄, 峰行规整, 说明制得的 α -ZrP 结晶度很高, 而通过 CEC 为 0.5 的正丁胺预撑后的 B-ZrP, 衍射峰首峰前移到 8.47° , 层间距增加至 $1.04\ \text{nm}$, 说明正丁胺预撑成功地扩大了磷酸锆的层间距。与 α -ZrP 的 XRD 谱图相比, 复合材料 (c~e) 的图谱发生了明显的改变, 它们的衍射首峰分别向低角度偏移至 $5.76^\circ, 5.54^\circ, 5.32^\circ$; 对应的层间距分别扩大至 $1.53, 1.60, 1.66\ \text{nm}$ 。在壳聚糖

衍生物用量相同时,复合材料的层间距高度依次为 MBMCS-ZrP > TMCS-ZrP > CMCS-ZrP, 这可能是 CMCS、TMCS 和 MBMCS 通过接枝改性引入季铵盐正电基团,增大了壳聚糖季铵盐衍生物的正电性,同时 MBMCS 通过苯环共轭体系发生电子诱导效应较 TMCS 具有更高的正电性,而磷酸锆层间带有大密度的负电荷, TMCS 和 MBMCS 通过电荷作用插层更加明显,层间距也更大。综合 FTIR 和 XRD 的检测结果,可确知已经成功制备得到 α -ZrP, 且壳聚糖衍生物铵盐对预撑后的磷酸锆插层成功,制备得到壳聚糖季铵盐 / 磷酸锆自组装复合纳米材料。

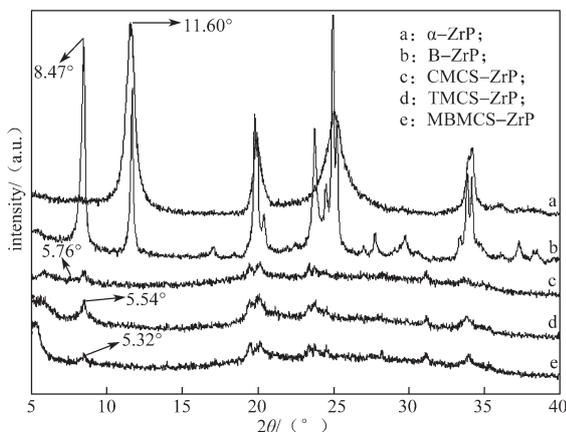


图6 α -ZrP、B-ZrP、CMCS-ZrP、TMCS-ZrP、MBMCS-ZrP 的 XRD 图谱

Fig. 6 XRD patterns of α -ZrP, B-ZrP, CMCS-ZrP, TMCS-ZrP and MBMCS-ZrP

2.4 壳聚糖衍生物 / α -ZrP 的 Zeta 电位分析

表 1 是 α -ZrP、B-ZrP、CMCS-ZrP、TMCS-ZrP 和 MBMCS-ZrP 的 Zeta 电位和平均粒径。

表 1 α -ZrP, B-ZrP, CMCS-ZrP, TMCS-ZrP, MBMCS-ZrP 的 Zeta 电位和平均粒径

Table 1 Zeta potential of α -ZrP, B-ZrP, CMC-ZrP, TMCS-ZrP and MBMCS-ZrP

样品	Zeta 电位 / mV	平均粒径 / nm
α -ZrP	-40.5 ± 0.5	290
B-ZrP	-27.9 ± 1.5	290
CMC-ZrP	+1.3 ± 1.0	392
TMCS-ZrP	+9.5 ± 1.5	435
MBMCS-ZrP	+12.5 ± 1.0	476

由表可知, α -ZrP 的表面呈负电状态, 平均粒径为 290 nm。经正丁胺改性后的 B-ZrP 的负电性有所减弱, 但粒径并无变化。CMCS 由于壳聚糖单元上具有正电荷的氨基, 对 α -ZrP 进行插层复合后, CMCS-ZrP 复合材料的 Zeta 电位已经转变为正电位。

TMCS 分子结构上具有强正电荷的三甲基季铵盐基团, 随着 TMCS 对 ZrP 插层复合, TMCS-ZrP 复合材料的 Zeta 电位呈现较大程度的提高。而 MBMCS 通过苯环共轭体系发生电子诱导效应, 较 TMCS 具有更高的正电性^[25], 因此 MBMCS-ZrP 复合材料的 Zeta 电位进一步升高。同时复合材料的粒径逐渐增大, 这是由于壳聚糖在磷酸锆间发生桥联作用, 产物相互交联, 分散性变差, 产生了粒子的团聚。

2.5 壳聚糖衍生物 / α -ZrP 的 TG 分析

图 7 是 CS、 α -ZrP、B-ZrP、CMCS-ZrP、TMCS-ZrP 和 MBMCS-ZrP 的 TG 曲线。

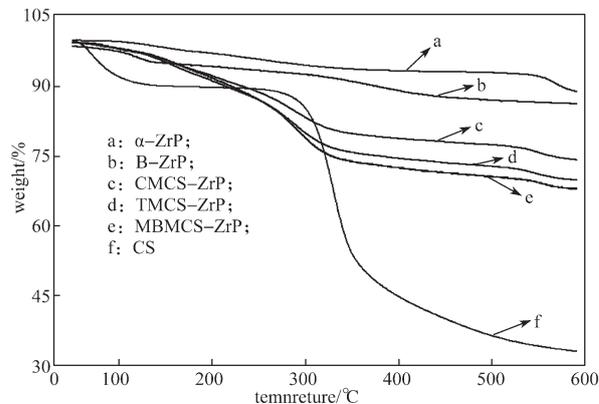


图7 α -ZrP、B-ZrP、CMCS-ZrP、TMCS-ZrP、MBMCS-ZrP 和 CS 的 TG 曲线

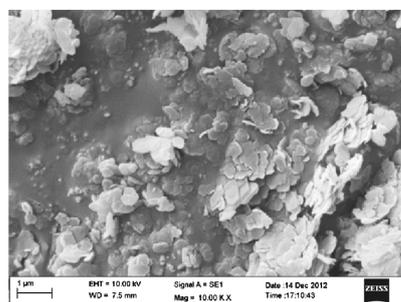
Fig.7 TGA curves of α -ZrP, B-ZrP, CMC-ZrP, TMCS-ZrP, MBMCS-ZrP and CS

从图中可以看出, α -ZrP 在 90~300 $^{\circ}\text{C}$ 温度区域内有一较为平缓的失重过程, 为 α -ZrP 层间结合水的挥发^[3]; 在 500~600 $^{\circ}\text{C}$ 温度区间失重 4%, 为 α -ZrP 中磷羟基的缩合失水。相比较于 α -ZrP, B-ZrP 热降解的起始温度略有前移, 且在 400~600 $^{\circ}\text{C}$ 温度区间有更多的失重, 这是由于正丁胺的热分解和挥发所引起的。CS 的热重曲线分两个阶段: 第一阶段开始于 70 $^{\circ}\text{C}$, 为壳聚糖失去吸附水和结合水所致; 第二阶段发生在 298~354 $^{\circ}\text{C}$ 间, 这是由于壳聚糖分子中葡萄糖主链结构的降解和热氧分解所致, 最大失重率为 66%。与 α -ZrP 和 CS 相比较, CMC-ZrP、TMCS-ZrP 和 MBMCS-ZrP 复合材料的 TG 曲线斜率变大, 在 200~325 $^{\circ}\text{C}$ 之间的热降解失重主要是由于壳聚糖分子链受热断裂引起的; 其质量损失为复合材料中壳聚糖衍生物的含量, 其热重残余率分别为 84.2%、74.12% 和 70.5%, 热损失率较 CS 变小, 这是由于 α -ZrP 的层状结构使壳聚糖衍生物进入 α -ZrP 的层间后, 自由体积减少, 因此被加热时, 链的移动更加

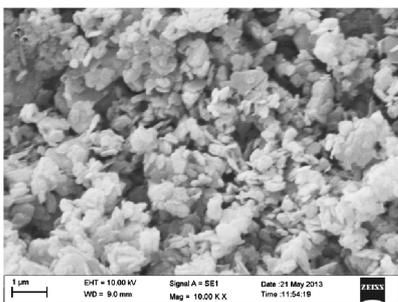
困难, 导致热稳定性提高, 而且, α -ZrP 的层状结构极大地阻碍了热分解过程中分解产物的蒸发, 并进一步限制了壳聚糖 / 磷酸锆复合材料的连续分解^[28]。这证明了水溶性的壳聚糖衍生物通过插层 α -ZrP 自组装形成复合材料后确实提高了壳聚糖衍生物的高温性能。

2.6 壳聚糖衍生物 / α -ZrP 的 SEM 分析

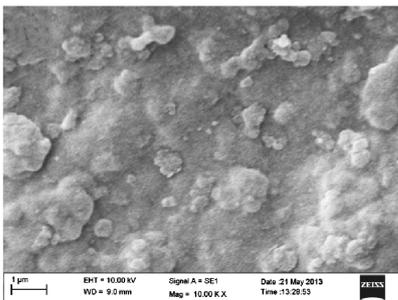
利用 SEM 对壳聚糖衍生物 / ZrP 复合材料的微观结构进行表征, 结果如图 8 所示。



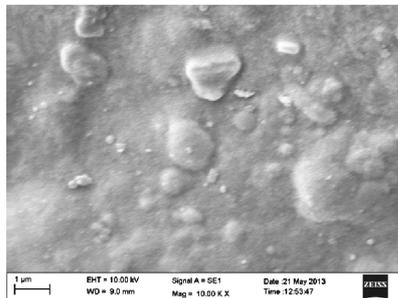
a) α -ZrP



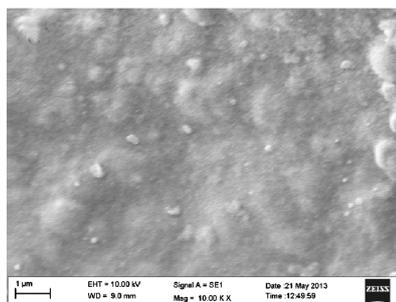
b) B-ZrP



c) CMCS-ZrP



d) TMCS-ZrP



e) MBMCS-ZrP

图 8 α -ZrP、B-ZrP、CMCS-ZrP、TMCS-ZrP、MBMCS-ZrP 的 SEM 图

Fig. 8 SEM micrographs of α -ZrP, B-ZrP, CMCS-ZrP, TMCS-ZrP and MBMCS-ZrP nanocomposite

图 8a 中, α -ZrP 晶体为典型的层状薄片结构, 堆积较为密集。图 8b 中, 经正丁胺改性后的 α -ZrP 片状结构明显, 且层状结构较为松散, 层间距明显增大, 表明已实现 α -ZrP 的预撑改性, 利于后期与壳聚糖季铵盐的插层制备具有层状结构的纳米复合材料。图 8c~e 中, 由于壳聚糖具有良好的成膜性^[29], 壳聚糖衍生物插层预撑磷酸锆形成复合材料后, 预撑磷酸锆被壳聚糖衍生物均匀地包裹, 片层结构不再明显, 再次证明壳聚糖衍生物 / 磷酸锆纳米复合材料制备成功。

2.7 抑菌性能测试

表 2 为 α -ZrP、B-ZrP、CMCS-ZrP、TMCS-ZrP 和 MBMCS-ZrP 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的 MIC 值。

表 2 复合材料对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的最小抑菌浓度
Table 2 Minimized inhibited concentration for *S. aureus* and *E. coli*

Sample	MIC/(mg·L ⁻¹)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
ZrP	-	-
B-ZrP	-	-
CMCS-ZrP	75	40
TMCS-ZrP	45	25
MBMCS-ZrP	30	20

注: - 表示不具有抑菌性能。

从表 2 中可以看到, 天然 α -ZrP 和 B-ZrP 并不具备抑菌性能; 但是随着具有良好水溶性的壳聚糖衍生物的插层复合, CMCS-ZrP 复合材料在一定程度上可以抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长, 而 TMCS-ZrP 和 MBMCS-ZrP 复合材料的抑菌性能则进一步提升, 说明 α -ZrP 与壳聚糖衍生物插层的

复合材料, 已经具备较好的抑菌性能。

目前, 被广泛接受的壳聚糖抑菌机制是带正电的壳聚糖分子与带负电的微生物细胞膜之间发生静电相互结合作用, 质子化的 $-NH_3^+$ 在负电荷的微生物细胞膜表面上产生干扰, 从而一方面引起细胞壁膜的渗透压失衡, 抑制微生物的生长; 另一方面水解微生物壁的肽聚糖, 引起细胞内的电解质和其他低分子量蛋白成分发生泄漏, 最终导致微生物的死亡^[30]。天然层状结构的 α -ZrP具有良好的吸附能力, 能够实现对细菌的有效负载与固定。结合表1中的Zeta电位分析结果可知, CMCS-ZrP、TMCS-ZrP和MBMCS-ZrP等纳米复合材料均是表面带正电荷的聚电解质, 能够与带负电荷的细菌膜表面结合, 改变细胞膜壁的通透性, 导致菌体内重要物质如蛋白质、核酸、葡萄糖、乳酸脱氢酶的流失, 最终抑制细菌的生长和死亡。此外壳聚糖衍生物/磷酸锆纳米复合材料对金黄色葡萄球菌具有更强的抑菌效果, 这是由于革兰氏阳性细菌的细胞壁肽聚糖层上有大量孔洞, 使得外部分子可以更加容易地进入细胞体内。但革兰氏阴性细菌的细胞壁外膜是由酯多糖、酯蛋白和磷脂构成的复杂结构, 可以抵御外部分子的进入。因此, 与 α -ZrP相比, 壳聚糖衍生物/磷酸锆纳米复合材料的抑菌性有显著提高, 并随着Zeta电位的升高而增强。

3 结论

微波辐射条件下, 利用3种水溶性壳聚糖衍生物对预撑后的 α -ZrP进行插层自组装, 从而制得3种不同的壳聚糖衍生物/ α -ZrP纳米复合抑菌材料。FTIR和XRD结果表明具有良好水溶性的壳聚糖衍生物通过离子交换成功地插层进入预撑后的 α -ZrP的层间, 其层间距、平均粒径和Zeta电位随着壳聚糖衍生物的种类而变化。TG结果表明通过与 α -ZrP插层复合, 壳聚糖衍生物的耐高温性能得提高, 呈现出良好的热稳定性。抑菌实验证明了纳米复合材料具有良好的抑菌性能, 从而为 α -ZrP负载具有抑菌性能的生物材料制备新型抑菌复合材料提供了新的研究方向。

参考文献:

- [1] CLEARFIELD A, STYNES J A. The Preparation of Crystalline Zirconium Phosphate and Some Observations on Its Ion Exchange Behaviour[J]. Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 1964, 26(1): 117-129.
- [2] 王海燕, 韩大雄, 相明辉, 等. 水溶性阳离子型卟啉对层状磷酸锆插层行为的研究[J]. 化学学报, 2005, 63(14): 1361-1364.
WANG Haiyan, HAN Daxiong, XIANG Minghui, et al. Study on the Different Layered Zirconium Phosphates Hosts for Intercalating Soluble Cationic Porphyrins[J]. Acta Chimica Sinica, 2005, 63(14): 1361-1364.
- [3] 杜以波, 李峰, 何静. 层状化合物 α -磷酸锆的制备和表征[J]. 无机化学学报, 1998, 14(1): 79-83.
DU Yibo, LI Feng, HE Jing. Preparation and Characterization of Layered Compounds α -Zirconium Phosphate[J]. Journal of Inorganic Materials, 1998, 14(1): 79-83.
- [4] ZHANG Q R, DU Q, JIAO T F, et al. Selective Removal of Phosphate in Waters Using a Novel of Cation Adsorbent: Zirconium Phosphate (Zrp) Behavior and Mechanism[J]. Chemical Engineering Journal, 2013, 221: 315-321.
- [5] THAKKAR R, CHUDASAMA U. Synthesis and Characterization of Zirconium Titanium Phosphate and Its Application in Separation of Metal Ions[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 172(1): 129-137.
- [6] PICA M, DONNADIO A, TRONI E, et al. Looking for New Hybrid Polymer Fillers: Synthesis of Nanosized α -Type Zr (IV) Organophosphonates Through an Unconventional Topotactic Anion Exchange Reaction[J]. Inorganic Chemistry, 2013, 52(13): 7680-7687.
- [7] BRUNET E, ALHENDAWI H M H, CERRO C, et al. Hydrogen Storage in a Highly Porous Solid Derived from γ -Zirconium Phosphate[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2006, 45(41): 6918-6920.
- [8] WANG H, LIU W, YAO W, et al. Quaternary Ammonium Salts Intercalated α -Zrp Compounds for Adsorption of Phenolic Compounds[J]. Applied Surface Science, 2013, 268: 179-187.
- [9] ZHANG F, XIE Y, LU W, et al. Preparation of Microspherical α -Zirconium Phosphate Catalysts for Conversion of Fatty Acid Methyl Esters to Monoethanolamides[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2010, 349(2): 571-577.
- [10] 李颖, 刘可, 华伟明, 等. 苯磺酸修饰的层状磷酸锆的制备及催化应用[J]. 高等化学学报, 2011, 32(3): 731-737.
LI Ying, LIU Ke, HUA Weiming, et al. Preparation and Catalytic Application of Phenylsulfonic Acid

- Functionalized Porous Phosphate Heterostructure Materials.[J] Chemical Journal of Chinese Universities, 2011, 32(3): 731-737.
- [11] LIU Q, YAN H J, SU Y M, et al. Energy Transfer Studies of Dye Chromophores in Modified Zirconium Phosphate Framework[J]. Journal of Luminescence, 2014, 152: 238-240.
- [12] 贾云洁, 李明磊, 崔纪利, 等. 三维介孔氨基三亚甲基磷酸锆的合成及其负载铁催化剂的甲醛催化氧化活性[J]. 无机化学学报, 2013, 29(3): 465-473.
JIA Yunjie, LI Minglei, CUI Jili, et al. 3D-Mesoporous Zirconium Phosphonate NTAZP: Synthesis and Formaldehyde Oxidation by Its Supported Fe^{3+} Catalyst.[J] Chinese Journal of Inorganic Chemistry, 2013, 29(3): 465-473.
- [13] HUANG J, ARTHANAREESWARAN G, ZHANG K. Effect of Silver Loaded Sodium Zirconium Phosphate (Nanoagz) Nanoparticles Incorporation on PES Membrane Performance[J]. Desalination, 2012, 285: 100-107.
- [14] DAIG J, YU A L, CAI X, et al. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Zinc and Cerium Co-Doped A-Zirconium Phosphate[J]. Journal of Rare Earths, 2012, 30(8): 820-825.
- [15] MUZZARE R A A. Chitin[M]. Oxford: Pergamon Press, 1977: 220.
- [16] WANG J, WANG H. Preparation of Soluble P-aminobenzoyl Chitosan Ester by Schiff's Base and Antibacterial Activity of the Derivatives[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48(3): 523-529.
- [17] 兰霜, 黎厚斌, 吴习宇. 壳聚糖复合涂膜对板栗保鲜效果的影响研究[J]. 包装学报, 2017, 9(1): 85-92.
LAN Shuang, LI Houbin, WU Xiyu. Research on Preservation of Chestnut with Chitosan Blend Liquid Film Treatment[J]. Packaging Journal, 2017, 9(1): 85-92.
- [18] 张纪娟, 王建华, 郭天雨. 羟乙基纤维素/壳聚糖涂膜液对蓝莓的保鲜效果研究[J]. 包装学报, 2015, 7(4): 38-42.
ZHANG Jijuan, WANG Jianhua, GUO Tianyu. Effects of Hydroxyethyl Cellulose/Chitosan Blending Coating on Quality of Blueberries[J]. Packaging Journal, 2015, 7(4): 38-42.
- [19] 张华, 徐金锁. 层状磷酸锆的合成与性质研究[J]. 高等学校化学学报, 1997, 18(2): 172-176.
ZHANG Hua, XU Jinsuo. Studies on Synthesis and Properties of Layered Zirconium Phosphate[J]. Chemical Journal Chinese Universities, 1997, 18(2): 172-176.
- [20] XU J, LI R K Y, XU Y, et al. Preparation of Poly (Propylene Carbonate)/Organo-Vermiculite Nanocomposites Via Direct Melt Intercalation[J]. European Polymer Journal, 2005, 41(4): 881-888.
- [21] 霍美蓉, 周建平, 张勇, 等. 新型两性性壳聚糖衍生物的合成, 表征及对难溶性药物的增溶性[J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(10): 1995-1999.
HUO Meirong, ZHOU Jianping, ZHANG Yong, et al. Synthesis and Characterization of Novel Amphiphilic Chitosan Derivatives and Its Solubilizing Abilities for Water-Insoluble Drugs[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2007, 28(10): 1995-1999.
- [22] DE BRITTO D, ASSIS O B G. A Novel Method for Obtaining a Quaternary Salt of Chitosan[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 69(2): 305-310.
- [23] WIARACHAI O, THONGCHUL N, KIATKAMJORN-WONG S, et al. Surface-Quaternized Chitosan Particles as an Alternative and Effective Organic Antibacterial Material[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012, 92: 121-129.
- [24] 张蕤, 胡源, 汪世龙. 原位插层聚合法制备聚丙烯酰胺/ α -磷酸锆纳米复合材料及其结构表征[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(11): 2173-2175.
ZHANG Rui, HU Yuan, WANG Shilong. Synthesis of Polyacrylamide/ α -Zirconium Phosphate Nanocomposite by In-Situ Intercalative Polymerization and the Characterization of Its Structure[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2005, 26(11): 2173-2175.
- [25] MACLACHLAN D J, MORGAN K R. ^{31}P Solid-State NMR Studies of the Structure of Amine-Intercalated α -Zirconium Phosphate. 2. Titration of α -Zirconium Phosphate with n-Propylamine and n-Butylamine[J]. The Journal of Physical Chemistry, 1992, 96(8): 3458-3464.
- [26] 李丹, 陈运法. 离子液体/磷酸锆抗菌材料的制备及耐热性研究[J]. 无机材料学报, 2011, 26(11): 1193-1198.
LI Dan, CHEN Yunfa. Formation and Thermal Stabilities Research of Ionic Liquids/ α -ZrP Antibacterial Materials[J]. Journal of Inorganic Materials, 2011, 26(11): 1193-1198.
- [27] XI Y F, FROST R L, HE H P. Modification of the Surfaces of Wyoming Montmorillonite by the Cationic Surfactants Alkyl Trimethyl, Dialkyl Dimethyl, and Trialkyl Methyl Ammonium Bromides[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2007, 305(1): 150-158.
- [28] WANG X Y, LIU B, REN J L, et al. Preparation and Characterization of New Quaternized Carboxymethyl

- Chitosan/Rectorite Nanocomposite[J]. Composites Science and Technology, 2010, 70(7): 1161–1167.
- [29] BONILLA J, ATARÉS L, VARGAS M, et al. Properties of Wheat Starch Film-Forming Dispersions and Films as Affected by Chitosan Addition[J]. Journal of Food Engineering, 2013, 114(3): 303–312.
- [30] MOHAMED N A, EL-GHANY N A A. Preparation and Antimicrobial Activity of Some Carboxymethyl Chitosan Acyl Thiourea Derivatives[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 50(5): 1280–1285.

Preparation and Antimicrobial Property of Self-Assembly Nanocomposites of Chitosan Derivatives/Zirconium Phosphate

LI Zhihan^{1,2,3}, YAO Jin^{1,3}, HUANG Haibo^{1,3}, ZHAO Tian^{1,3}, ZENG Guangsheng^{1,3}, ZHU Heping³

(1. School of Packaging and Materials Engineering, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China; 2. Key Laboratory of Pulp and Paper Science & Technology of Ministry of Education/Shandong Province, Qilu University of Technology, Jinan 250353, China; 3. National & Local Joint Engineering Research Center of Advanced Packing Materials and Technology, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China)

Abstract: Three chitosan derivatives, including carboxymethyl chitosan, N,N,N-trimethyl chitosan and N-methoxybenzenemethyl quaternary ammonium salt of chitosan, were intercalated into the layer of α -ZrP to prepare the nanocomposite materials by the method of microwave irradiation. The structures and morphologies of nanocomposites were characterized by FTIR, XRD, SEM, TEM, TG and zeta potential analysis. The XRD patterns showed that the interlayer spacing of nanocomposites was larger than the original α -ZrP, and the basal spacing of nanocomposites was enlarged with the increasing positive charge of chitosan derivative. It indicated that the chitosan derivative was intercalated into the layer of α -ZrP via hydrogen bonding. The TG experiments showed that the thermal stability of the nanocomposites was improved significantly and much better than that of chitosan. The antibacterial results showed that the nanocomposites had a good antibacterial effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: chitosan derivatives; α -ZrP; nanocomposites; antibacterial activity