

# 壳聚糖—盐酸胍纳米微球的制备 及其在抗菌纸中的应用

林新兴, 刘凯, 陈礼辉, 黄六莲, 曹石林  
(福建农林大学材料工程学院, 福建福州 350002)

**摘要:** 利用离子交联法制备壳聚糖—盐酸胍纳米微球, 并通过红外光谱 (FTIR) 与热失重 (TG) 对微球的化学结构、热稳定性进行检测。结果表明: 壳聚糖与盐酸胍复合后壳聚糖的酰胺键发生位移, 其强度也有所增加, 两者之间并未产生新的化学键, 而是以物理交联的方式相结合。通过 Zeta 电位的测定及吸附动力学研究可知, 纳米微球的 Zeta 电位为 +23.6 mV, 竹浆纤维的 Zeta 电位达到 -203.4 mV; 该纳米微球可通过静电和氢键作用吸附在竹浆纤维上, 其吸附平衡时间仅为 8 min。添加该纳米微球的抗菌纸对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都具有较好的抑制作用。

**关键词:** 壳聚糖; 盐酸胍; 抗菌纸; 抗菌性能

**中图分类号:** TS727+.3      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1671-5470(2014)02-0209-06

## Preparation of chitosan-guanidine hydrochloride nanospheres and their application in antibacterial paper

LIN Xin-xing, LIU Kai, CHEN Li-hui, HUANG Liu-lian, CAO Shi-lin

(School of Materials Engineering, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

**Abstract:** In order to prepare a novel and efficient antibacterial agent and antibacterial paper, the chitosan-guanidine hydrochloride complex was prepared by ionic gelation method, and the characterization of the complex was determined by infrared spectroscopy (FTIR) and thermogravimetry (TG). The results showed that the amide bonds of chitosan had shifted and the strength was also increased after the complex of chitosan and guanidine hydrochloride, and there were no new chemical bonds between chitosan and guanidine hydrochloride, the guanidine hydrochloride was only physically crosslinked with the chitosan. According to determination of Zeta potential and the adsorption kinetics, it was found that the Zeta potential of the nanospheres was +23.6 mV, while the Zeta potential of bamboo fiber reached -203.4 mV; The nanospheres could be adsorbed on the bamboo fiber by electrostatic and hydrogen bonding interactions, and the adsorption equilibrium time was only 8 minutes. The antibacterial tests indicated that the paper sheets exhibited remarkable antibacterial property against both *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* after adding the complex into the paper.

**Key words:** chitosan; guanidine hydrochloride; antibacterial paper; antibacterial property

纸制品是人们生产和生活中不可或缺的产品。纸张中的纤维能够吸附很多微生物, 如果温度适宜, 就会迅速繁殖, 进而对人体产生危害。为了防止纸张使用过程中有害细菌的传播和交叉感染所引起的各种传染病, 研究和开发具有多功能及高效抗菌性能的生活和医疗用纸具有重要意义<sup>[1-2]</sup>。

目前, 国内外一些研究者主要研究单一组分抗菌剂在纸张中的抗菌作用。例如, Janjic et al<sup>[3]</sup> 将不同分子质量的壳聚糖通过希夫碱反应接枝到纤维上制得改性纤维。抗菌实验研究表明, 随着壳聚糖分子质量的增大, 改性纤维对微生物的抑制作用增强。杨飞等<sup>[4]</sup> 研究了载银抗菌沸石在纸张表面涂布中的应用及其用量对涂布抗菌纸性能的影响。结果表明, 载银抗菌沸石可使纸张具有比较好的抗菌效果, 并且对纸张色调、色差、印刷适性及表面微观结构没有明显影响。由于单一组分抗菌剂在纸张中的抗菌性能单一<sup>[5-7]</sup>, 因此, 研究并开发具有多功能抗菌效果的抗菌剂和抗菌纸将具有重要应用价值和广泛的应用前景。

壳聚糖是从海洋甲壳类动物的外壳中提取得到的一种天然抗菌材料, 其抗菌性能已被广泛研究, 并被

收稿日期: 2013-06-19      修回日期: 2013-09-18

基金项目: 福建省科技计划重大项目(2011H61010032, 2012H61010049, 2012H0003), 福建省林业厅林业科学技术推广项目([2013]14-2), 福州市科技局市校科技合作项目(2013-G-81), 福建农林大学科研启动基金(6211C0813)。

作者简介: 林新兴(1987-), 男, 硕士。研究方向: 多功能生物质材料, Email: 814658831@qq.com。通讯作者陈礼辉(1966-), 男, 教授, 博士生导师。研究方向: 植物资源化学与材料, Email: lihuichen@263.net。

证实具有抗菌作用、安全性好等优点<sup>[8,9]</sup>,但是也受到耐热性较差,有效时间不长,应用范围较窄等方面的限制<sup>[10,11]</sup>.而盐酸胍因其强碱性、高稳定性、较好的生物活性等优良特性,同时具有很好的抗菌性能,被广泛应用在化学医疗、农产品防护、食品、日用品、纺织品以及橡胶等方面.为了同时发挥壳聚糖与盐酸胍的抗菌性能,本研究通过离子交联法,将壳聚糖与盐酸胍制备成具有多功能抗菌效果的复合纳米抗菌剂,并将其用于抄造新型高效抗菌纸,为我国抗菌纸的工业化生产提供一种新的工艺方法.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

恒温磁力搅拌器(德国 IKA 公司); Zeta 电位仪(德国 BTG 公司); 胶体电荷测定仪( PCD-04 德国 BTG 公司); 激光粒度仪( Zetasizer Nano-ZS 英国马尔文仪器公司); 傅立叶红外光谱仪( Thermo Nicolet 360 美国热电尼高力公司); 热失重分析仪( Netzsch STA 449F3 德国耐驰仪器公司). 壳聚糖(分子质量为  $7 \times 10^5$  u, 脱乙酰度为 95%) 购于浙江金壳生物化学有限公司; 盐酸胍和琼脂粉均为上海阿拉丁试剂有限公司; 漂白硫酸盐竹浆(打浆度为 40°SR) 购于福建邵武中竹纸业有限责任公司; 其它试剂为分析纯.

### 1.2 方法

1.2.1 壳聚糖—盐酸胍微球的制备 称取 0.4 g 壳聚糖粉末充分溶解于 100 mL 1% 乙酸溶液中, 将 50 mL 盐酸胍溶液(  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ) 与 40 mL 三聚磷酸钠溶液(  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ) 混合均匀后, 缓慢滴入壳聚糖溶液, 在室温下搅拌 4 h 后, 制得 190 mL 壳聚糖—盐酸胍纳米微球乳液.

1.2.2 壳聚糖—盐酸胍微球的特性检测 取一定量壳聚糖—盐酸胍微球置于真空冷冻干燥机中, 干燥后取一定量微球, 利用 KBr 压片法进行红外光谱检测. 另外, 取一定量干燥微球进行热失重分析. 壳聚糖—盐酸胍微球的电荷密度测定: 量取 1 mL 壳聚糖—盐酸胍微球乳液, 并加入 9 mL 蒸馏水后, 通过胶体电荷测定仪, 利用标准阴离子滴定液( 聚乙烯硫酸钾溶液, PVSU ) 滴定至终点. 微球的粒径分布与 Zeta 电位可利用马尔文激光粒度仪进行测定.

1.2.3 壳聚糖—盐酸胍微球在纤维上的吸附动力学 量取 190 mL 壳聚糖—盐酸胍微球乳液于 250 mL 的锥形瓶中, 同时加入 0.5% 的浆料 20 mL, 在室温下置于恒温振荡器中不断震荡, 然后在不同时间段( 0、2、4、6、8、10、20、30、60 min ) 取一定量上层清液, 再利用凯式定氮仪测定其氮含量, 其计算公式如下所示<sup>[12]</sup>:

$$N\% = \frac{V \times C \times 14.007 \times 10^{-3} \times 100}{W}$$

式中:  $V$  为滴定微球乳液所消耗的标准盐酸体积( mL ),  $C$  为标准盐酸浓度(  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ),  $W$  为样品质量( g ).

1.2.4 抗菌纸的抄造 取浓度为 0.5% 的浆料 250 mL 于 500 mL 的烧杯中, 分别加入不同量的壳聚糖—盐酸胍微球, 在室温下震荡 10 min 后, 利用纸页成型器( Labtech-4001 加拿大) 抄造抗菌纸.

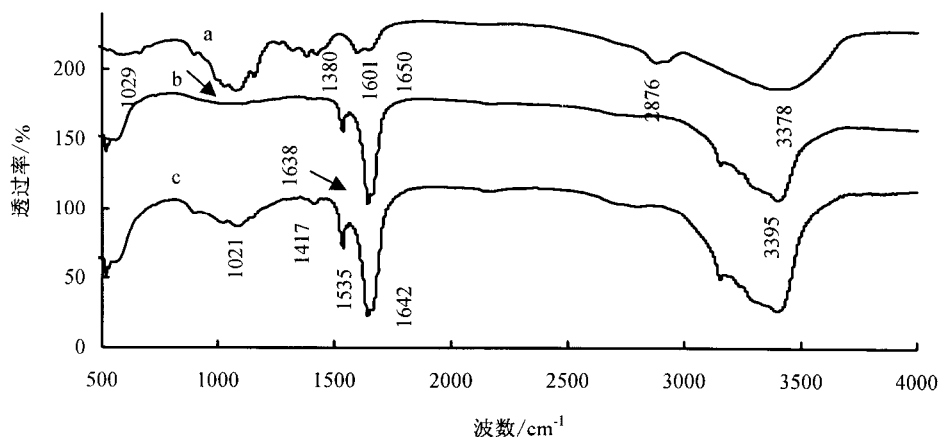
1.2.5 抗菌纸的抗菌性能检测 将抗菌纸裁剪成直径为 6 mm 的圆片. 菌种在 LB 培养液中培养 24 h 后, 用移液管移取 2 mL 到灭菌好的 LB 培养基中, 摇匀后倒入预先灭过菌的培养皿中, 再将圆片贴在含菌的培养基上, 置于 37 °C 的培养箱中培养 24 h 后, 观察圆片周围的抑菌圈.

## 2 结果与分析

### 2.1 红外光谱分析

壳聚糖由于具有大量氨基, 在酸性溶液中呈现正电性, 可通过离子交联法与许多药物交联形成纳米微粒, 因此被广泛地用做药物载体, 用以控制药物的释放速率. 本研究首先利用离子交联法, 将壳聚糖与盐酸胍制备成纳米微球. 从图 1 可知, 壳聚糖的特征吸收峰在 1650( 酰胺键 I )、1601( 酰胺键 II ) 和 1380  $\text{cm}^{-1}$  ( 酰胺键 III )<sup>[13,14]</sup>. 另外, 壳聚糖的 -OH 和 C-H 伸缩振动分别出现在 3387 和 2876  $\text{cm}^{-1}$ . 而盐酸胍分子结构中的氨基特征吸收峰则分别出现在 1638 和 3395  $\text{cm}^{-1}$ . 当壳聚糖与盐酸胍进行交联复合后, 其微球的红外光谱与壳聚糖的相比, 主要差别在于壳聚糖在 1665( 酰胺键 I )、1592( 酰胺键 II ) 和 1380  $\text{cm}^{-1}$  ( 酰胺键 III ) 的特征吸收峰分别转移到 1642、1535、1417  $\text{cm}^{-1}$ . 另外, 壳聚糖在 1029  $\text{cm}^{-1}$  处的羟基转移到 1021

$\text{cm}^{-1}$ . 红外光谱图 c 与 a 和 b 相比,并未出现新的吸收峰,只是壳聚糖主要特征峰发生了位移,说明壳聚糖与盐酸胍之间并未产生新的化学键,而是以物理交联的方式相结合<sup>[15]</sup>,壳聚糖与盐酸胍在三聚磷酸钠的作用下形成凝胶微球.



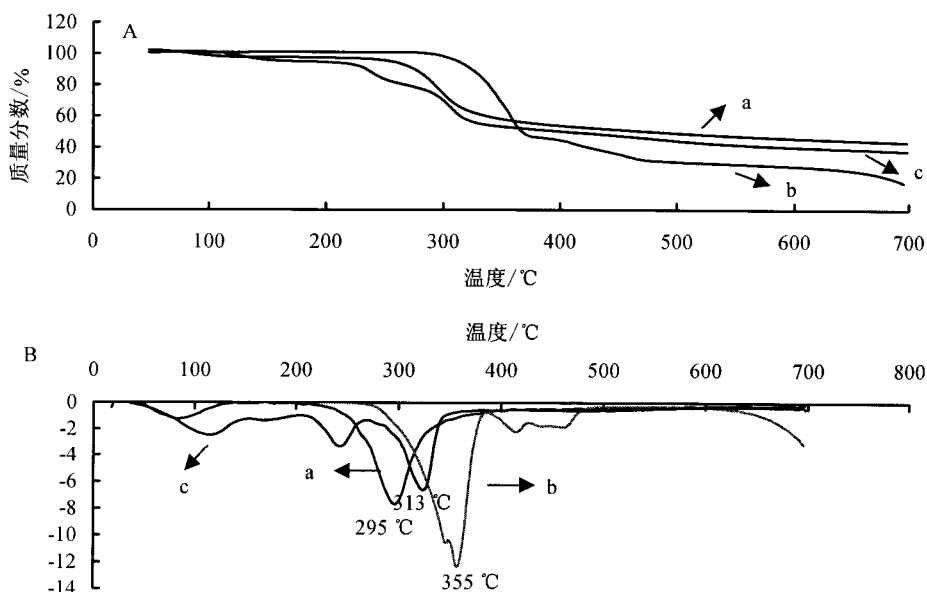
a: 壳聚糖; b: 盐酸胍; c: 壳聚糖—盐酸胍.

图1 壳聚糖—盐酸胍微球的红外光谱

Fig. 1 FTIR spectra of chitosan, guanidine hydrochloride and complex

## 2.2 热失重分析

分别对壳聚糖、盐酸胍及其微球进行了热失重分析,以了解其热稳定性.壳聚糖与盐酸胍的热失重主要分为3个阶段进行(图2).在这3个阶段中,壳聚糖的质量分别损失4%、36%和16%,而盐酸胍的失重分别为53%、16%和3%.与壳聚糖和盐酸胍的热失重不同,微球的热失重分为4个阶段,并且其质量分别损失6%、16%、21%和17%.壳聚糖和盐酸胍在第3阶段就已经基本分解,但微球的全部分解发生在第4阶段,说明微球的热稳定性比原料更好.从DTG曲线可以观察到壳聚糖与盐酸胍的热分解温度分别为295和355 $^{\circ}\text{C}$ ,而壳聚糖—盐酸胍微球的热分解温度为323 $^{\circ}\text{C}$ ,介于两者原料之间.这也进一步说明了壳聚糖与盐酸胍确实发生交联作用,并形成了复合微球.



A: TG; B: DTG; a: 壳聚糖; b: 盐酸胍; c: 壳聚糖—盐酸胍.

图2 壳聚糖—盐酸胍微球的TG与DTG曲线

Fig. 2 TG (A) and DTG (B) spectra of chitosan, guanidine hydrochloride and complex

## 2.3 壳聚糖—盐酸胍微球的粒径分布

利用激光粒度仪检测壳聚糖—盐酸胍微球的粒径分布(图3).微球的粒径主要集中在10-110 nm,

其平均粒径为 94.5 nm,明显小于竹浆纤维的长度. 因此该微球较容易通过静电吸附作用留而存在于竹浆中,并起到抗菌作用.

### 2.4 壳聚糖—盐酸胍微球在竹浆纤维上的吸附动力学

为了研究壳聚糖—盐酸胍微球在竹浆纤维上的吸附,首先利用 Morfi Compact 纤维形态分析仪对竹浆纤维的形态进行分析. 结果表明(图 4),竹浆纤维的平均长度和宽度分别为 1.9090 和 0.0324 mm,纤维长度主要分布在 0.68 – 5.31 mm,纤维宽度主要分布在 0.02 – 0.06 mm 的范围内. 与壳聚糖—盐酸胍纳米微球的粒径相比,竹浆纤维的长度较大,有利于微球在纤维上的大量吸附.

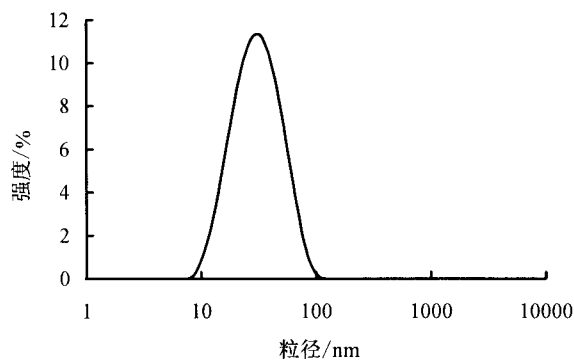
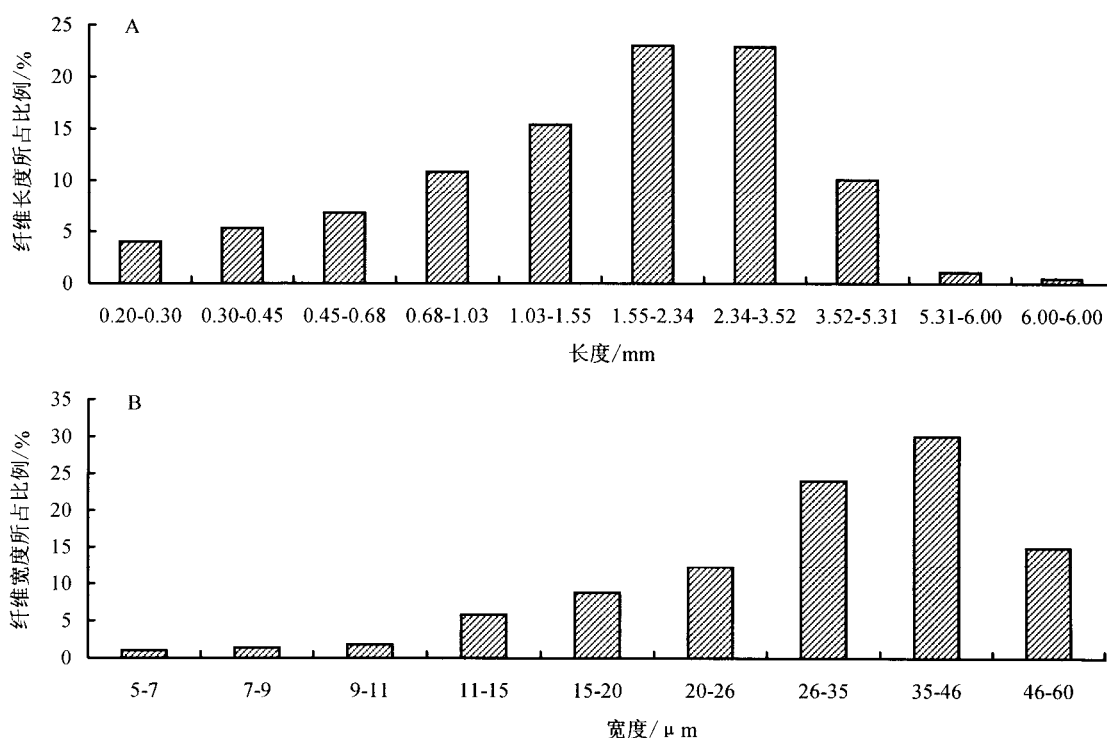


图 3 壳聚糖—盐酸胍微球的粒径分布  
Fig. 3 Particle size distribution of the chitosan-guanidine hydrochloride complex



A: 竹浆纤维长度; B: 竹浆纤维宽度.

图 4 竹浆纤维长度与宽度分布

Fig. 4 Distribution of the length and width of bamboo fiber

壳聚糖—盐酸胍微球与竹浆纤维所具有的表面电荷大小对于两者的吸附起重要作用,为此对纳米微球与纤维的 Zeta 电位与电荷密度进行测定. 结果表明(表 1) 纳米微球的 Zeta 电位为 +23.6 mV,电荷密度为 0.9 meq · L<sup>-1</sup>. 该纳米微球带有较大的正电荷,主要是由于所使用的壳聚糖具有高脱乙酰度

表 1 壳聚糖—盐酸胍微球与竹浆纤维的表面电荷特性  
Table 1 Surface charge density of the fiber and chitosan-guanidine hydrochloride complex

	壳聚糖—盐酸胍微球	竹浆
Zeta 电位/mV	+23.6	-203.4
电荷密度/meq · L <sup>-1</sup>	0.9	-

(95%),分子结构中带有大量 -NH<sub>2</sub> 在酸性溶液中,-NH<sub>2</sub> 被质子化生成 -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> 并形成聚阳离子而带有大量正电荷. 另外,竹浆纤维的 Zeta 电位达到 -203.4 mV,这是由于竹浆经过打浆到 40°SR 后,使得竹浆纤维表面暴露出更多的 -COO<sup>-</sup>,并形成聚阴离子而带有大量负电荷. 因此,两者之间具有较大的反电荷差,容易发生离子间的静电吸附作用,这有利于两者之间的快速吸附. 此外,竹浆纤维还带有大量的 -OH,会与壳聚糖的 -NH<sub>2</sub> 发生分子内与分子间的氢键作用. 张锐等<sup>[16]</sup> 制备了羧甲基纤维素(CMC)与壳聚糖

(CS)的共混膜,并证实CMC与CS混合时,存在静电吸附作用与氢键作用,两者生成了聚电解质复合物。

通过对纳米微球在纤维表面的吸附动力学可以确定出吸附平衡时间(图5)。纳米微球在纤维表面的吸附速度快,当吸附8 min时,上清液的含氮量已经保持恒定,此时纤维对纳米微球的吸附达到饱和状态<sup>[17]</sup>。因此,可以确定两者的吸附平衡时间为8 min。

## 2.5 抗菌性能

为研究该新型抗菌纸的抗菌性能,选择大肠杆菌(一种革兰氏阴性细菌)和金黄色葡萄球菌(一种革兰氏阳性细菌)为抗菌对象,并采用抑菌圈法进行检测。其中,抗菌剂加入量(相对于绝干浆):a与a'为0%、b与b'为1%、c与c'为2%、d与d'为3%。图6A为抗菌纸对大肠杆菌的抑制作用,可观察到原纸周围无出现抑菌圈,当添加1%壳聚糖—盐酸胍微球时,抗菌纸周围开始出现抑菌圈。随着抗菌剂用量的增加,抗菌纸周围的抑菌圈也开始增大,当抗菌剂添加量为3%时,其抑菌圈也达到最大。这主要是由于随着抗菌剂添加量的增加,存在于竹浆中的抗菌剂也随之增多,故抗菌纸的抗菌作用增强。而图6B为抗菌纸对金黄色葡萄球菌的抑制作用图,可以观察到该抗菌纸周围出现的抑菌圈更大,表明对金黄色葡萄球菌具有更强的抑制作用。这些结果说明该抗菌纸同时对大肠杆菌和葡萄球菌具有较好的抑制作用,这主要是由于该抗菌纸同时结合了壳聚糖与盐酸胍两种抗菌剂。

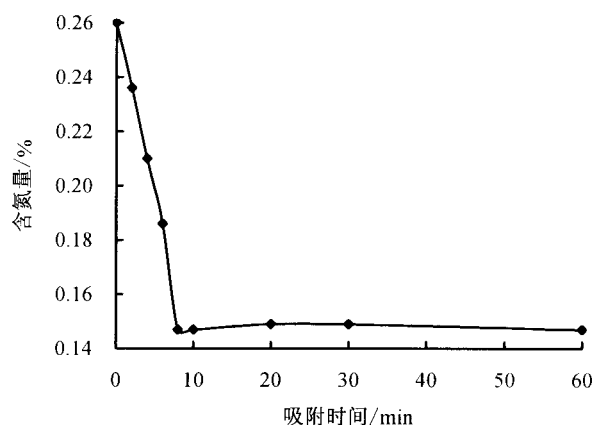
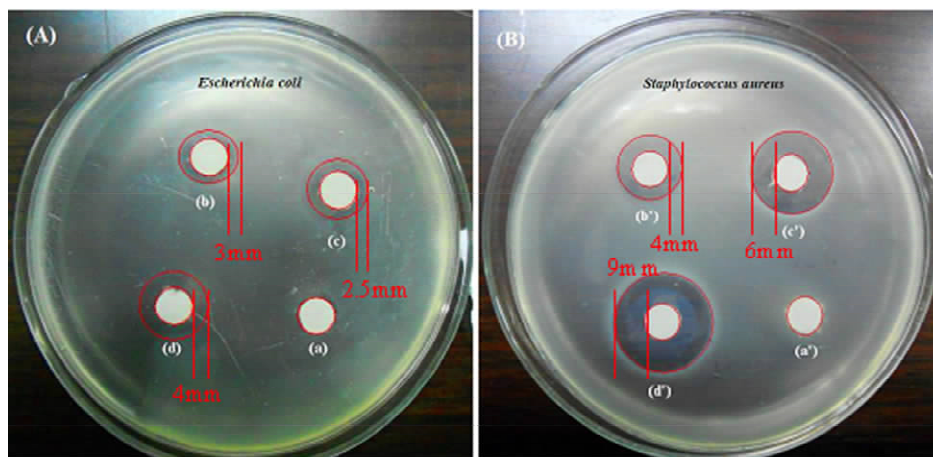


图5 壳聚糖—盐酸胍微球在纤维上的吸附动力学  
Fig. 5 The adsorption kinetics of chitosan-guanidine hydrochloride complex on fibers



(A): 大肠杆菌; (B): 金黄色葡萄球菌; 抗菌剂加入量: a与a'为0%、b与b'为1%、c与c'为2%、d与d'为3%绝对干浆。  
图6 抗菌纸对大肠杆菌与金黄色葡萄球菌的抗菌作用

Fig. 6 Antibacterial property of the antibacterial paper against *E. coli* and *S. aureus*

## 3 结论

本研究通过离子交联法将壳聚糖与盐酸胍制备成壳聚糖—盐酸胍纳米微球。通过红外光谱与热失重分析表明壳聚糖与盐酸胍之间发生复合,并形成一种凝胶化纳米颗粒。该纳米微球与竹浆纤维具有相反电荷,可通过静电吸附留着在纤维表面,其吸附平衡时间仅为8 min,从而可抄造出高效抗菌纸。由于该抗菌纸同时具有壳聚糖与盐酸胍两种抗菌剂,可同时对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌起到较强的抑制作用。

## 参考文献

- [1] 杨飞, 陈克复, 杨仁党, 等. 抗菌剂及其在抗菌纸中的应用[J]. 中国造纸, 2006, 25(8): 51-55.
- [2] 杨开吉, 苏文强, 陈京环. 多功能抗菌纸的开发与应用[J]. 中国造纸, 2007, 26(9): 44-46.
- [3] JANJIC S, KOSTIC M, VUCINIC V, et al. Biologically active fibers based on chitosan-coated lyocell fibers[J]. Carbohydrate Polymers, 2009(78): 240-246.
- [4] 杨飞, 陈克复, 杨仁党, 等. 载银抗菌沸石对涂布抗菌纸性能的影响[J]. 中国造纸, 2010, 29(6): 19-23.

- [5] LEE H J , YEO S Y , JEONG S H. Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics [J]. *Journal of Materials Science* , 2003 , 38( 10) : 2199 – 2204.
- [6] YAZDANSHENAS M E , SHATERI-KHALILABAD M. The effect of alkali pre-treatment on formation and adsorption of silver nanoparticles on cotton surface [J]. *Fibers and Polymers* , 2012 , 13( 9) : 1170 – 1178.
- [7] BORDENAVE N , GRELIER S , COMA V. Hydrophobization and antimicrobial activity of chitosan and paper-based packaging material [J]. *Biomacromolecules* , 2010 , 11( 1) : 88 – 96.
- [8] 马滢 , 刘鹏涛 , 刘忠. 羧甲基壳聚糖的制备及其在抗菌纸中的应用 [J]. *功能材料* 2010 , 41( 4) : 648 – 651.
- [9] 唐艳军 , 刘晓峰 , 夏军 等.  $\text{TiO}_2$  /壳聚糖纳米复合涂料制备及其在抗菌纸中的应用 [J]. *功能材料* 2012 , 43( 17) : 2416 – 2420.
- [10] 高敏杰 , 王志强 , 孙磊 等. 壳聚糖修饰银纳米颗粒的制备及抗菌性能研究 [J]. *功能材料* 2012 , 43( 8) : 1038 – 1041.
- [11] 范冰 , 刘成圣 , 刘寒 等. 壳聚糖衍生物的制备及其抑菌活性的研究 [J]. *功能材料* 2011 , 42( S3) : 544 – 548.
- [12] HOU Q X , LIU W , LIU Z H , et al. Characteristics of antimicrobial fibers prepared with wood periodate oxycellulose [J]. *Carbohydrate Polymers* , 2008 , 74: 235 – 240.
- [13] BHATTARAIA N , RAMAYA H R , GUNN J , et al. Peg-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release [J]. *Journal of Controlled Release* , 2005 , 103: 609 – 624.
- [14] PAPADIMITRIOU S A , ACHILIAS D S , BIKIARIS D N. Chitosan-g-peg nanoparticles ionically crosslinked with poly ( glutamic acid) and tripolyphosphate as protein delivery systems [J]. *International Journal of Pharmaceutics* , 2012 , 430: 318 – 327.
- [15] 薛昌刚 , 董春义 , 肖苏尧 等. 诺氟沙星—壳聚糖微球的制备及释药性能 [J]. *中南大学学报: 自然科学版* 2008 , 39( 3) : 480 – 485.
- [16] 张锐 , 方桂珍 , 马英梅 等. 羧甲基纤维素—壳聚糖共混膜的性能表征 [J]. *林产化学与工业* 2010 , 30( 1) : 43 – 48.
- [17] MESQUITA J P , DONNICI C L , PEREIRA F V. Biobased nanocomposites from Layer-by-layer assembly of cellulose nanowhiskers with chitosan [J]. *Biomacromolecules* , 2010( 11) : 473 – 480.

( 责任编辑: 吴显达)