

低分子量壳聚糖/银复合材料的制备 及其抗菌机理探讨

管路遥^{1,2} 张 杰^{1,2} 张 利³ 张 华^{1,2*} 魏丽乔^{1,2*}

(1.太原理工大学新材料界面科学与工程教育部重点实验室,太原 030024;
2.太原理工大学材料科学与工程学院,太原 030024;3.山西大医院,太原 030024)

摘 要 采用紫外光辐照法,以过氧化氢(H_2O_2)氧化降解法制备的低分子量壳聚糖(LMCS)为还原剂和稳定剂,制备了 LMCS 修饰的银纳米颗粒(LMCS-Ag)。运用 X 射线粉末衍射仪、透射电子显微镜等对所制备的样品进行了表征。结果表明:制得的纳米颗粒为球形;采用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌对其进行抗菌性能评价,LMCS-Ag 具有优异的抗菌性能,对大肠杆菌的最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC)分别为 $4\mu g/mL$ 、 $8\mu g/mL$,对金黄色葡萄球菌的 MIC、MBC 分别为 $8\mu g/mL$ 、 $16\mu g/mL$,具有优异的抑菌、杀菌性能。 β -半乳糖苷酶活性测定试验和大肠杆菌形貌表征(SEM)表明 LMCS-Ag 能有效破坏细菌细胞膜,实现抗菌功能。

关键词 银,壳聚糖,纳米复合材料,抗菌机理

Preparation of low molecular weight chitosan/silver composite and its antibacterial mechanism

Guan Luyao^{1,2} Zhang Jie^{1,2} Zhang Li³ Zhang Hua^{1,2} Wei Liqiao^{1,2}

(1.Key Laboratory of Interface Science and Engineering in Advanced Materials of Taiyuan
University of Technology,Ministry of Education,Taiyuan 030024;
2.College of Materials Science and Engineering,Taiyuan University of Technology,
Taiyuan 030024;3.Shanxi Dayi Hospital,Taiyuan 030024)

Abstract Low molecular weight chitosan modified silver nanoparticles (AgNPs) were prepared through ultraviolet (UV) irradiation used low molecular weight chitosan prepared by H_2O_2 oxidative degradation as the reductant and surface modification agent.The samples were characterized by transmission electron microscopy (TEM) and X-ray diffraction (XRD).The results showed that the LMCS-Ag were spherical.The antibacterial activity of LMCS-Ag was tested for against *S.aureus* and *E.coli* bacteria.It was found that LMCS-Ag exhibited excellent antibacterial property.The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of LMCS-Ag on *E.coli* were $4\mu g/mL$ and $8\mu g/mL$.The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of LMCS-Ag on *S.aureus* were $8\mu g/mL$ and $16\mu g/mL$. β -galactosidase activity assay and *E.coli* morphology characterization (SEM) indicated that AgNPs could destroy the integrality of cytoplasmic membrane,leading to leakage of cytoplasm.

Key words silver,chitosan,nanocomposite,antibacterial mechanism

在人们的日常生活中,有多种细菌被确定为会导致人类严重疾病的病原体。研发具有高度抗菌活性的功能材料是防止细菌感染的有效方法之一^[1-2]。壳聚糖(CS)是一种自然界广泛存在的天然抗菌材料,具有良好的生物相容性和广谱抗菌性能。但是

分子量较高的 CS 水溶性较差,不利于抗菌性能的发挥^[3]。低分子量壳聚糖(LMCS)由 CS 通过化学或物理方法解聚制成,水溶性好,除具备良好的抗菌性之外,还具备延缓细胞衰老、抗肿瘤和抗氧化等多种功能^[4]。金属银在纳米尺度下,具有许多独特的

基金项目:山西省自然科学基金面上项目(201411016-7)

作者简介:管路遥(1991-),男,硕士,主要研究方向为抗菌材料的研究。

联系人:张华,讲师。

魏丽乔,教授。

生物学特性。近年来,随着纳米材料合成技术的迅速发展,纳米银广泛应用于许多生物和医学领域,如生物传感器、伤口愈合和癌症治疗^[5-6]。

将CS与纳米银复合,制备CS-银纳米粒子复合材料。CS可作为纳米银的稳定剂防止纳米银团聚提高银离子缓释能力,并具有良好的生物相容性和生物降解性。然而,CS-银纳米粒子制备过程中存在使用有毒化学试剂、制备过程复杂繁琐和抗菌效果不佳等问题。高敏杰等^[7]采用液相化学还原法,以CS为修饰剂,制备了CS修饰的银纳米颗粒,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌显示出较高的抗菌活性,但制备过程中使用的硼氢化钠具有较高毒性。康虹等^[8]采用化学法合成了一种CS/银-铜共混的复合抗菌剂,采用少量铜来替代一部分银,有效降低了抗菌剂成本,但对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌效果都很差。

基于上述不足,本研究拟采用安全无毒的紫外光照射还原法,旨在制备抗菌功能优异、节能环保的低分子量CS修饰的银纳米颗粒(LMCS-Ag)复合抗菌材料。

1 实验部分

1.1 主要材料

CS(脱乙酰度>90%),Sinopharm集团试剂有限公司;硝酸银、双氧水、无水乙醇、乙酸、过氧化氢(H_2O_2),均为分析纯,FENGCHUAN试剂公司;pH 7.2~7.4磷酸盐缓冲溶液(PBS),北京索莱宝科技有限公司;MH(B)培养基,北京AOBOX BIOTECHNOLGY公司;邻硝基酚- β 半乳糖苷(ONPG),Sinopharm集团试剂有限公司;超纯水,实验室自制。

1.2 LMCS的制备

称取1g CS,溶于20mL乙酸溶液(浓度为2%)中,置于单口烧瓶中;另称取1g H_2O_2 溶液(浓度为30%)置于恒压分液漏斗中。连接单口烧瓶与恒压分液漏斗,调节恒压分液漏斗匀速缓慢滴加 H_2O_2 溶液开始反应,滴加时间为4h;反应在油浴中保持60℃恒温并采用电动搅拌器(RW 20型,德国IKA公司)持续搅拌。反应5h后取出反应液,用2mol/L的氢氧化钠(NaOH)溶液调节pH至7.0~7.5,抽滤并取滤液;旋蒸将反应液体积浓缩至原来的30%,加入5倍体积的无水乙醇,静置后抽滤取固体物,重复3次后真空冷冻干燥,即制得白色的LMCS。

1.3 LMCS-Ag的制备

将0.1%(wt,质量分数,下同)硝酸银水溶液与0.1% LMCS水溶液按体积配合比为1:9,采用电动搅拌器(RW 20型,德国IKA公司)进行搅拌,室温下均匀搅拌10min后置于4mL比色皿中,通氮气20s除尽空气并密封;将装有混合溶液的比色皿置于距紫外灯(波长为272nm、功率为20W)5cm处照射30min,溶液由无色透明变为金黄色;混合溶液在透析袋中透析3d,去除未被还原的银离子和未吸附到纳米银核表面的LMCS,真空冷冻干燥即制得LMCS-Ag。

1.4 LMCS-Ag的表征

采用X射线粉末衍射仪(XRD,D8 Advance型,德国布鲁克公司)测定样品的物相结构,扫描范围 $5\sim 85^\circ$,步长 0.05° 。采用透射电子显微镜(TEM,JEM2010型,日本JEOL公司)观察样品形貌,分辨率0.19nm,工作电压200kV。采用纳米激光粒度仪(S3500型,美国麦奇克公司)测定样品的Zeta电位。

1.5 抑菌、杀菌效果测试

将大肠杆菌(*E.coli*, ATCC25922)和金黄色葡萄球菌(*S.aureus*, ATCC6538)分别以划线法接种到营养琼脂上,置于恒温培养箱(HPX-9052MBE型,中国国华电器有限公司)中培养24h,取菌落移种到营养肉汤培养基中再次培养24h,离心洗涤3次后用PBS配制成一系列浓度梯度细菌悬液备用。

选取96孔聚苯乙烯板中并排的8个孔,每孔依次加入双倍浓度的MH(B)培养基100 μ L、 10^5 CFU/mL细菌悬液50 μ L和倍比稀释后不同浓度的LMCS-Ag 50 μ L。第1孔至第8孔LMCS-Ag浓度分别为16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 μ g/mL。将96孔板置于37℃培养箱内培养24h,用酶标仪检测630nm处各孔的光密度(OD)值。以培养前后OD值没有明显变化的最低LMCS-Ag浓度为最低抑菌浓度(MIC)。依次从AgNPs浓度高于MIC值(包括MIC浓度)的4个培养孔中吸取60 μ L溶液分别均匀涂布到MH(B)培养基平板上,37℃培养24h。以平板上肉眼可见无菌落生长的最低LMCS-Ag浓度确定为最低杀菌浓度(MBC)值。以上实验每组重复3次。

1.6 大肠杆菌活性测定

在4只试管中分别加入2mL 10^9 CFU/mL大肠杆菌悬液和1mL浓度为20mmol/L的底物ONPG。选取其中的3只试管分别加入0.5mL、

1mL、2mL LMCS-Ag(100 μ g/mL),最后用 PBS 缓冲液将 4 只试管内液体总体积调成 10mL,使 4 只试管 LMCS-Ag 复合材料浓度分别为 0、5、10、20 μ g/mL。4 只试管在 37 $^{\circ}$ C 摇床振荡 120min,每隔 10min 采用紫外-可见分光光度计(UV-Vis, U-3900 型,Hitachi 公司)检测各试管内混合液在 420nm 处的吸光度。

1.7 大肠杆菌微观形貌观察

取 1mL 10⁸CFU/mL 细菌悬液与 1mL LMCS-Ag(100 μ g/mL),用 PBS 缓冲液将总体积调成 5mL,置于 37 $^{\circ}$ C 摇床内培养 4h,对照组用 1mL PBS 缓冲液代替 LMCS-Ag 复合材料。培养结束后采用高速离心机(CR22G 型,日本日立公司)进行离心洗涤,用 PBS 缓冲液离心洗涤 3 次。用 2.5%戊二醛中固定在石英片上,少量 PBS 缓冲液清洗后用梯度乙醇脱水,冷冻干燥,喷金,采用扫描电子显微镜(SEM,S-4800 型,日本日立公司)观察样品形貌。

2 结果与讨论

2.1 XRD 分析

CS、LMCS 和 LMCS-Ag 的 XRD 谱图见图 1。从图可以看出,CS 在 20.9 $^{\circ}$ 、11.1 $^{\circ}$ 左右处有明显衍射特征峰,分别对应为 Form I (10 $^{\circ}$ 左右)和 Form (20 $^{\circ}$ 左右)两种晶型^[9];经 H₂O₂ 氧化降解处理得到的 LMCS 在 20.9 $^{\circ}$ 和 11.1 $^{\circ}$ 处的衍射峰已基本消失,同时在 23.6 $^{\circ}$ 和 21.1 $^{\circ}$ 处出现 2 个新衍射峰,分别对应 annealed polymorph 晶型和 tendon hydrate polymorph 晶型^[10],CS 氧化降解过程中,无定型部分首先降解成小分子,随后结晶部分也开始降解,降解得到的小分子发生了重结晶产生了新的晶形,降解后 CS 总体结晶度降低,水溶性得到改善;LMCS-Ag 复合材料在 $2\theta=38.1^{\circ}$ 、44.3 $^{\circ}$ 、64.4 $^{\circ}$ 、77.3 $^{\circ}$ 出现 4 个特征衍射峰,通过与 JCPDS(4-0781)标准卡片对比,这 4 个衍射峰分别是对应立方相金属银的(111)、(200)、(220)和(311)4 个晶面的衍射峰。研究结果表明:本研究制得的抗菌剂含有纳米银,其中的银是立方结构晶系的单质银。

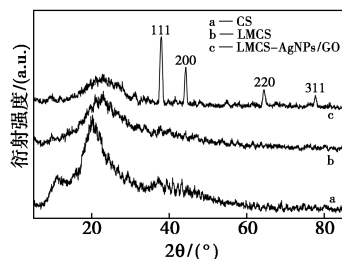


图 1 CS、LMCS 和 LMCS-Ag 的 XRD 谱图

2.2 TEM 分析

LMCS-Ag 的 TEM 图见图 2。从图可以看出,制得的 LMCS-Ag 复合材料中银纳米颗粒的分散性较好,无团聚现象,纳米银粒径在 20nm 以下。

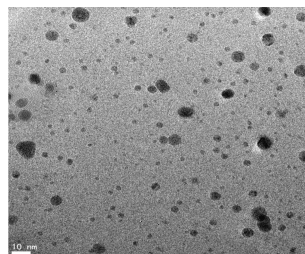
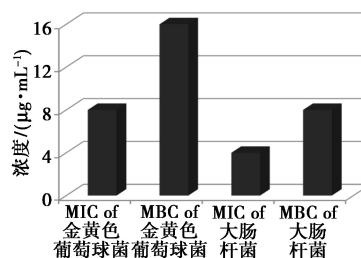


图 2 LMCS-Ag 的 TEM 图

2.3 LMCS-Ag 的抗菌性能分析

LMCS-Ag 的 MIC、MBC 值见图 3。从图可以看出,LMCS-Ag 对大肠杆菌的 MIC、MBC 分别为 4 μ g/mL、8 μ g/mL,对金黄色葡萄球菌分别为 8 μ g/mL、16 μ g/mL,抗菌活性高于大多数纳米银类抗菌材料。原因可能是传统方法制备的纳米银由于稳定剂会析出阳离子带负电荷^[11],本研究采用 LMCS 还原硝酸银制备的银纳米颗粒经激光粒度仪检测 Zeta 电位为 +19mV,这是因为一部分 LMCS 吸附在纳米银表面,LMCS 本身带有的氨基可以吸附溶液中的质子带正电,同时部分未被还原的 Ag⁺通过与 -NH₂ 的配位作用吸附在纳米银表面也可以使颗粒带正电。细菌一般带有负电性,可以通过静电作用吸附带有正电性的纳米银从而失活。



大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 MIC、MBC 值

图 3 LMCS-Ag 的 MIC、MBC 值

2.4 LMCS-Ag 的抗菌机理

比较成熟的银系抗菌剂杀菌理论是接触杀菌,银离子或含银材料与细菌接触破坏了细菌的细胞壁和细胞膜,致使细胞质流失,从而达到杀死细菌的目的^[12]。

大肠杆菌加入 LMCS-Ag 前后细胞变化的 SEM 图见图 4。从图 4(a)可以看出,没有加入 LMCS-Ag 的大肠杆菌的细胞形态完整。从图 4(b)可以看出,加入 LMCS-Ag 4h 后大肠杆菌的细胞形

态出现明显变形,细胞壁凹陷,细胞整体出现干瘪,这可能是由于细胞膜破损导致细胞液流出,细胞膜和细胞壁向内部收缩所致。

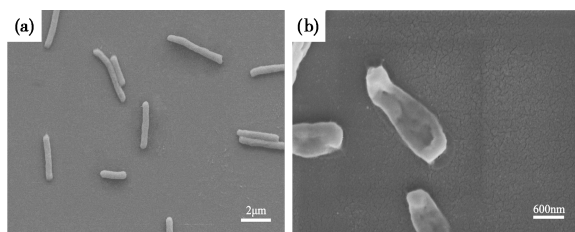


图4 大肠杆菌加入 LMCS-Ag 前(a)后(b)细胞变化的 SEM 图

3 结论

通过 H_2O_2 氧化降解法制备了低分子量 CS,再通过紫外光照射还原法,以低分子量 CS 为还原剂和修饰剂,制备了低分子量 CS 修饰的 LMCS-Ag。XRD 分析表明制备的纳米银为单质银,TEM 分析表明制得的纳米银为球形。研究结果表明:LMCS-Ag 对大肠杆菌的 MIC、MBC 分别为 $4\mu g/mL$ 、 $8\mu g/mL$,对金黄色葡萄球菌的 MIC、MBC 分别为 $8\mu g/mL$ 、 $16\mu g/mL$,具有优异的抑菌、杀菌性能。

在与 LMCS-Ag 作用后,大肠杆菌细胞表面出现凹陷,体形干瘪,表明 LMCS-Ag 能有效破坏大肠杆菌细胞膜的完整性,导致细胞质泄露,实现抗菌功能。

参考文献

- [1] Huang Y F, Wang Y F, Yan X P. Amine-functionalized magnetic nanoparticles for rapid capture and removal of bacterial pathogens[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44 (20): 7908-7913.

- [2] Berk S G, Gunderson J H, Newsome A L, et al. Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40 (23): 7440-7444.
- [3] Thomas V, Yallapu M M, Sreedhar B, et al. Fabrication, characterization of chitosan/nanosilver film and its potential antibacterial application[J]. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2009, 20(14): 2129-2144.
- [4] Bai S, Guo Z, Liu W, et al. Resolution of ($\pm$)-menthol by immobilized candida rugosa lipase on superparamagnetic nanoparticles[J]. Food Chemistry, 2006, 96(1): 1-7.
- [5] Panáček A, Kvítek L, Prucek R, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2006, 110 (33): 16248-16253.
- [6] Kalele S A, Ashtaputre S S, Hebalkar N Y, et al. Optical detection of antibody using silica-silver core-shell particles[J]. Chemical Physics Letters, 2005, 404(1): 136-141.
- [7] 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.
- [8] 康虹, 马森源, 高向华, 等. 壳聚糖/银-铜复合抗菌剂的制备及在硅橡胶基体上的应用[J]. 太原理工大学学报, 2015, 46(5): 489-494.
- [9] Samuels R J. Solid state characterization of the structure of chitosan films[J]. Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition, 1981, 19(7): 1081-1105.
- [10] Belamie E, Domard A, Giraud-Guille M M. Study of the solid-state hydrolysis of chitosan in presence of HCl[J]. Journal of Polymer Science Part A (Polymer Chemistry), 1997, 35(15): 3181-3191.
- [11] Zhu Z, Su M, Ma L, et al. Preparation of graphene oxide-silver nanoparticle nanohybrids with highly antibacterial capability [J]. Talanta, 2013, 117(22): 449-455.
- [12] Lee J S, Murphy W L. Functionalizing calcium phosphate biomaterials with antibacterial silver particles[J]. Advanced Materials, 2013, 25(8): 1173-1179.

收稿日期: 2017-01-18

修稿日期: 2018-03-09

(上接第 269 页)

- [2] 谢学辉, 朱玲玉, 刘娜, 等. 印染废水处理功能菌研究进展[J]. 化工进展, 2015, 34(2): 554-560.
- [3] 任南琪, 周显娇, 郭婉茜, 等. 染料废水处理技术研究进展[J]. 化工学报, 2013, 64(1): 84-94.
- [4] Chen Jianjun, Wang Xueli, Liu Xiuyan, et al. Removal of dye wastewater COD by sludge based activated carbon[J]. Journal of Coastal Research, 2015, 73: 1-3.
- [5] 黄广民, 姚伯元, 刘仁成. 椰壳中木聚糖含量的测定[J]. 食品科学, 2007, 28(6): 271-274.
- [6] 陈永, 周柳江, 洪玉珍, 等. 椰壳纤维基高比表面积中孔活性炭的制备[J]. 新型炭材料, 2010, 25(2): 151-155.
- [7] Luana Mattos de Oliveira Cruz, Ronaldo Stefanutti, Bruno Coraucci Filho, et al. Coconut shells as filling material for anaerobic filters[J]. Springer Plus, 2013, 4(6): 655-661.
- [8] 陈润六, 陈永, 钟杰, 等. 椰壳纤维制备活性炭纤维的研究[J].

化学工程师, 2011, 190(7): 1-6.

- [9] 徐祖伟, 于朝生, 窦烁. X-5 大孔树脂对黄芩素黄酮的吸附特性[J]. 化工进展, 2013, 32(1): 65-71.
- [10] 李曦同, 徐海红, 朱文杰, 等. 巯基修饰 MCM-41 分子筛的制备及其对 $Cr(VI)$ 的吸附动力学[J]. 环境工程学报, 2015, 9 (5): 2199-2206.
- [11] Liao Chunfa, Nie Huaping, Jiao Yunfen, et al. Study on the diffusion kinetics of adsorption of heavy rare earth with Cyanex 272-P507 impregnated resin[J]. Journal of Rare Earths, 2010, 28(1): 120-124.
- [12] 李珍珍, 罗建中, 谭广添, 等. 某工业园集中式印染污水处理工艺改造工程[J]. 环境工程, 2012, 30(6): 12-15.
- [13] 宋心远. 活性染料近代染色技术及助剂[J]. 印染助剂, 2008, 25(1): 1-8.

收稿日期: 2016-12-15

修稿日期: 2017-03-08