

端羧基季铵化壳聚糖的制备及抗菌性能研究

王 飞^{1,2} 张轶胜^{1,2} 薛文曼^{1,2} 郭睿劼^{1,3} 牛宝龙^{1,3} 王慧芳^{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.太原理工大学新材料工程技术研究中心,太原 030024;

3.太原理工大学材料科学与工程学院,太原 030024)

摘 要 以脱乙酰度 90%的壳聚糖为原料,采用两步合成方法,得到 *N,N,N*-三甲基壳聚糖(TMC),将 TMC 与氯乙酸反应,得到端羧基季铵化壳聚糖(CTMC),利用傅里叶变换红外光谱仪和核磁共振氢谱仪对产物进行了表征并研究其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌性能。结果表明:通过两步法成功合成了 CTMC,实现了对壳聚糖分子结构的改性;CTMC 的溶解性得到明显提高,其可以溶解于任意 pH 的水溶液中,且在中性溶液中表现出一定的抗菌性。CTMC 的抗菌机理可能主要是带正电的壳聚糖分子链与带负电的细菌细胞壁存在静电作用,改变了细胞壁的通透性,影响细胞内外物质传递从而杀死细菌。

关键词 壳聚糖,结构表征,溶解性,抗菌性,抗菌机制

Preparation and antibacterial performance of CTMC

Wang Fei^{1,2} Zhang Yisheng^{1,2} Xue Wenman^{1,2} Guo Ruijie^{1,3} Niu Baolong^{1,3} Wang Huifang^{1,2}

(1.Key Laboratory of Interface Science and Engineering in Advanced Materials,Ministry of Education,Taiyuan University of Technology,Taiyuan 030024;2.Research Center of Advanced

Materials Science and Technology,Taiyuan University of Technology,Taiyuan 030024;

3.College of Materials Science and Engineering,Taiyuan University of Technology,Taiyuan 030024)

Abstract *N,N,N*-trimethyl chitosan (TMC) was successfully synthesized making use of two steps method, and carboxymethyl-quaternized chitosan(CTMC) was further obtained by TMC reacted with monobromoacetic acid. The products were characterized and their performance against *E.coli* and *S.aureus* were studied.The results indicated that CTMC was successfully synthesized and the molecular structure of CS was modified,CTMC could dissolve in aqueous solution with any pH value and exhibited antibacterial activity in neutral solution.In addition,the antibacterial mechanism may be that the positive charged chitosan can adsorb to the negative charged surface of bacterial,which changed the permeability of the cell wall,influenced the cytoplasm flow of the cell,and finally kill bacteria.

Key words chitosan,structure characterization,solubility,antibacterial property,antibacterial mechanism

壳聚糖(CS)来源广泛,具有无毒、优良的生物相容性和生物可降解性等优点,是应用潜力巨大的天然抗菌剂^[1-2]。但是,与传统抗菌剂相比,CS 的抗菌活性较低,同时含有大量的氨基和羟基,分子间和分子内含有大量氢键,使得其只能溶于某些酸性水溶液,因而应用受到限制。CS 的分子结构中含有大量的氨基和羟基,可以通过与氨基或羟基进行化学反应将一些亲水性基团引入 CS 的主链中对其进行

化学改性,以改善其水溶性和抗菌性能^[3-7]。对 CS 进行修饰改性的方法主要包括烷基化、氨基化、季铵盐化、羧甲基化、酯化、硫脲化等^[8-9]。烷基化改性是常用的改性方法且改性反应易于进行。此外,增加 CS 分子链上氨基的数量或提高正电荷强度,或者引入其他活性官能团来提高其抗菌活性和溶解性也是修饰改性 CS 的主要方法。借鉴 Patrúlea 等^[10]的研究成果,本研究采用两步合成法改性 CS,制备了端

基金项目:国家自然科学基金(51703152,31700689);山西省自然科学基金(201701D121044,201701D121030);太原理工大学校青年基金(2016QN87)

作者简介:王飞(1993-),男,硕士研究生,主要从事咕吨酮类化合物的合成及抗菌性能研究工作。

联系人:王慧芳(1981-),女,博士,讲师,主要从事抗菌材料研究工作。

羧基季铵化壳聚糖(CTMC);利用多种表征手段对其结构和物理特性进行了分析,并采用平板菌落计数法测试产物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌性能。

1 实验部分

1.1 原料与仪器

CS(脱乙酰度 $>90\%$,相对分子质量 $<1\times 10^5$),分析纯,浙江金壳有限公司;无水乙醇、甲醛、甲酸、丙酮、二甲基亚砜,均为分析纯,成都科龙化工试剂厂;异丙醇,分析纯,天津市天力化学试剂有限公司;氯乙酸、氢氧化钠,均为分析纯,天津市福晨化学试剂厂;固体培养基,太原科瑞斯克商贸有限公司;大肠杆菌(*E.coli*, ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(*S.aureus*, ATCC6538),上海鲁微科技有限公司。

傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, Nicolet 710 型),德国布鲁克公司;核磁共振氢谱仪($^1\text{H-NMR}$, Avance III 型 400MHz 窄腔液体核磁),德国布鲁克公司;扫描电子显微镜(SEM, JSM-6700F 型),日本电子公司。

1.2 CTMC 的制备过程

1.2.1 *N,N*-二甲基壳聚糖的制备

在恒温加热磁力搅拌器中放置 150mL 的圆底烧瓶,将 36mL 水、12mL 甲酸、8mL 甲醛加入到烧瓶中,升温至 70°C ,加入 2g CS 回流搅拌 118h,再加入一定体积的 NaOH 溶液沉淀,过滤并反复水洗,冷冻干燥即得淡黄色的 *N,N*-二甲基壳聚糖(DMC)。

1.2.2 *N,N,N*-三甲基壳聚糖的制备

将 40mL 二甲基亚砜和 1g DMC 依次加入到 100mL 圆底烧瓶中,将烧瓶置于恒温加热磁力搅拌器,升温至 45°C 并将悬浊液搅拌均匀,吸取 1mL 碘甲烷滴加到烧瓶中,反应 12h,冷却至室温,随后用乙醇和丙酮的混合溶液(两者体积比 1:2)沉淀,过滤并用混合溶液洗涤 3 次,用去离子水透析 3d(透析袋截留分子量 $M_w=3500$),冷冻干燥即得白色 *N,N,N*-三甲基壳聚糖(TMC)。

1.2.3 CTMC 的制备

将 30mL 异丙醇和 0.5g 干燥的 TMC 依次加入到 100mL 圆底烧瓶中,搅拌均匀后,加入一定量 NaOH 调节 $\text{pH}=12$,室温下搅拌 24h,随后将 2mL 质量浓度 0.3g/mL 的氯乙酸的异丙醇溶液逐滴加到烧瓶中,于 45°C 氮气氛围下搅拌反应 6h,过滤、

依次用体积分数 70% 的乙醇和无水乙醇洗涤,用去离子水透析 3d(透析袋截留分子量 $M_w=3500$),冷冻干燥即得白色 CTMC 产物。

1.3 分析与测试

采用傅里叶变换红外光谱仪对产物进行红外光谱测试;采用核磁共振氢谱仪对产物进行核磁氢谱测试;采用扫描电子显微镜观察产物的微观形貌。

溶解性测试:采用吸光光度法测试样品的溶解性,观察 1mg CTMC 在 pH 不同的水溶液中的溶解情况,并用酶标仪 M3 测试溶液在 600nm 处的吸光度^[11],分析其溶解性,CS 与 TMC 的溶解性测试方法同 CTMC。

1.4 抗菌实验

分别将纯的第二代大肠杆菌和金黄色葡萄球菌落移种到 50mL 灭菌后的固体培养基 MH(B) 中培养 24h,直至菌液变浑浊,离心洗涤 3 次,然后用磷酸缓冲液(PBS)稀释成一系列浓度梯度的细菌悬液备用。

取 4 支试管(试管编号为 1—4),每个试管中加入 PBS 缓冲液 2.5mL、 $1\times 10^6\text{CFU/mL}$ 细菌悬液 100 μL 以及对倍稀释后不同浓度的 CTMC 2.4mL。编号 1—4 试管中 CTMC 的质量浓度分别为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 、125 $\mu\text{g/mL}$,另取 1 支试管不加 CTMC,作为空白对照。将 5 支试管置于摇床中,于 37°C 振荡培养 24h,然后将混合液涂覆到固体培养基 MH(A) 平板上,放入 37°C 培养箱培养 24h,观察细菌生长情况。CS 与 TMC 的抗菌实验方法同 CTMC。

2 结果与讨论

2.1 FT-IR 分析

CS、TMC 和 CTMC 的 FT-IR 谱图见图 1。从图可以看出:与 CS 的 FT-IR 谱图相比,TMC 在 1060cm^{-1} 和 1148cm^{-1} 处分别出现了仲胺和叔胺上 C—N 的伸缩振动吸收峰;在 1373cm^{-1} 处出现了一 CH_3 的对称伸缩振动峰;在 1458cm^{-1} 处出现

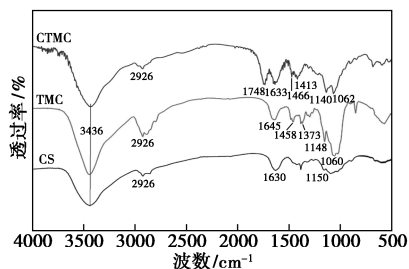


图 1 CS、TMC 和 CTMC 的 FT-IR 谱图

了 $-\text{CH}_3$ 的不对称伸缩振动峰。CTMC的FT-IR谱图中既有CS的特征吸收峰,也有TMC的特征吸收峰,而且在 1748cm^{-1} 处出现了羧酸羰基的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动,在 1413cm^{-1} 处出现了与羧基相连的 $-\text{CH}_2-$ 的变角振动,说明成功地实现了CS的季铵化和羧甲基化改性。

2.2 ^1H -NMR 分析

DMC、TMC 和 CTMC 的 ^1H -NMR 谱图见

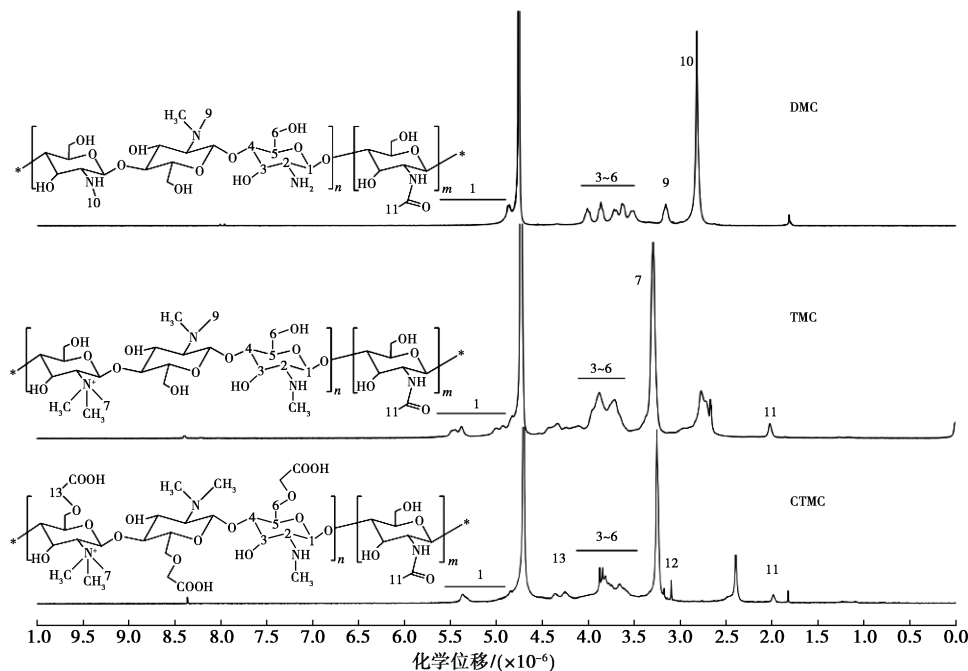


图2 DMC、TMC 和 CTMC 的 ^1H -NMR 谱图

2.3 SEM 分析

TMC 和 CTMC 的 SEM 图见图 3。从图可以看出,TMC 与 CTMC 在表面微观形貌上存在明显

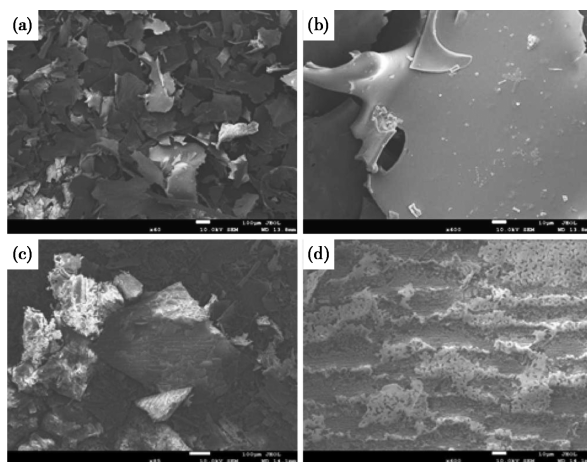


图3 TMC 和 CTMC 的 SEM 图

[(a)TMC($\times 60$);(b)TMC($\times 600$);(c)CTMC($\times 60$);
(d)CTMC($\times 600$)]

图2。从图可以看出:DMC 化学位移 $\delta=2.9$ 处出现的特征峰为仲胺上甲基的氢;在 $\delta=3.1$ 处出现 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 基团上甲基的氢;TMC 在 $\delta=3.1$ 附近无特征峰,而在 $\delta=3.3$ 处出现了一个新的特征峰,这个峰归属于 $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 基团上甲基的氢;CTMC 在 $\delta=4.25\sim 4.45$ 之间出现了一个新的特征峰,为 $-\text{OCH}_2\text{COOH}$ 基团上亚甲基的氢,表明成功合成了 CTMC。

差异,TMC 在微观上呈均匀的片层结构,表面光滑致密无裂纹,而 CTMC 为不均匀的片层结构,表面粗糙有褶皱,比表面积增加。这可能是由于 TMC 与氯乙酸反应不充分所致,说明反应发生在 TMC 的表面^[12]。

2.4 溶解性能分析

CS、TMC 及 CTMC 分散溶解于不同 pH 水溶液的照片见图 4。由图可知;CS 在 $\text{pH}=2$ 的水溶液中澄清透明,CS 分散溶解于 $\text{pH}=7,12$ 的水溶液后,溶液比较浑浊,而 TMC 和 CTMC 无论是分散溶解于 $\text{pH}=2,7$ 还是 $\text{pH}=12$ 时,溶液均澄清透明。

图 5 为 CS、TMC 和 CTMC 在不同 pH 水溶液中的吸光度。由图可知,在 pH 不同条件下,TMC 和 CTMC 的吸光度都较小,在中性环境下 CTMC 的吸光度最小,表明具有亲水性端羧基的 CTMC 在中性环境中具有更好的溶解性。

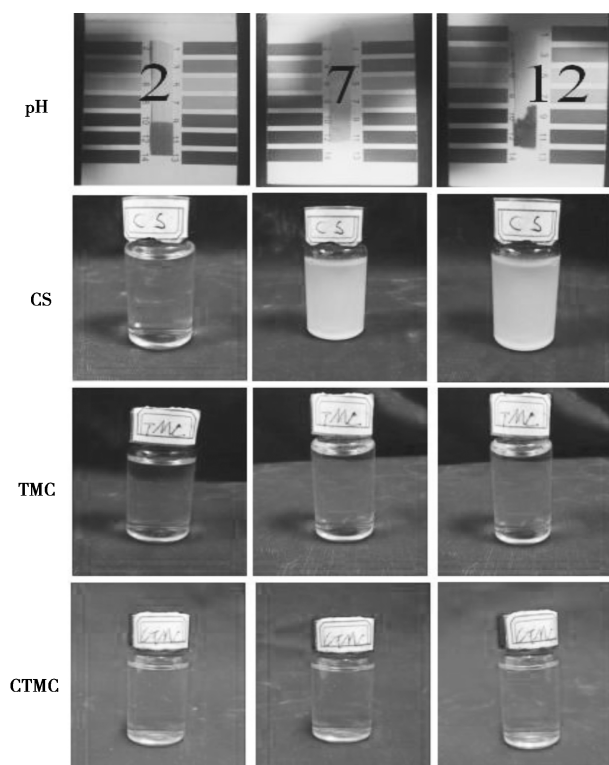


图 4 CS、TMC 及 CTMC 分散溶解于不同 pH 水溶液的照片图

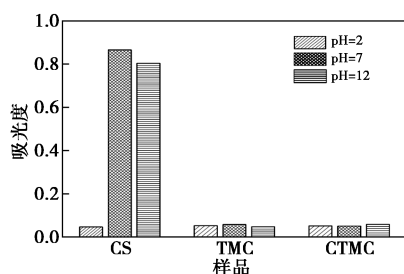


图 5 CS、TMC 和 CTMC 在不同 pH 水溶液中的吸光度

2.5 抗菌性能研究

质量浓度不同的 CTMC 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌效果图见图 6。从图可以看出：CTMC 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌活性随着 CTMC 质量浓度的提高而增强，CTMC 质量浓度为 $500\mu\text{g/mL}$ 时对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抗菌效果显著；CTMC 质量浓度下降到 $125\mu\text{g/mL}$ 时对大肠杆菌仍有较为明显的抗菌作用，而对金黄色葡萄球菌则没有明显的抗菌效果。对 TMC 的抗菌性能也进行了测试，结果显示 TMC 的抗菌性能比 CTMC 抗菌性能差。通过对比发现 CTMC 具有更好的抗菌效果，且对大肠杆菌的抗菌效果比金黄色葡萄球菌的抗菌效果更好。

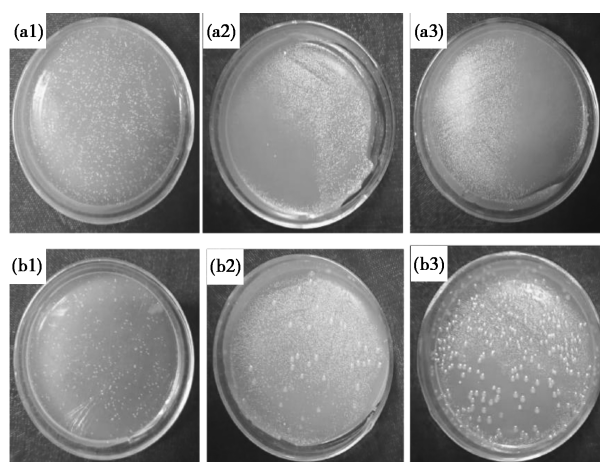


图 6 质量浓度不同的 CTMC 对金黄色葡萄球菌 (a1— a3) 和大肠杆菌 (b1— b3) 的抗菌效果图
[(a1) $500\mu\text{g/mL}$; (a2) $250\mu\text{g/mL}$; (a3) $125\mu\text{g/mL}$;
(b1) $500\mu\text{g/mL}$; (b2) $250\mu\text{g/mL}$; (b3) $125\mu\text{g/mL}$]

2.6 抗菌机理

基于一般有机抗菌剂的作用机理^[13-16]，我们推测 CTMC 的抗菌机理主要是作用于细菌的细胞壁。具有良好水溶性和较大比表面积的 CTMC 有利于与细菌的相互作用，CTMC 会吸附在细菌表面，形成一层能够阻挡物质进出的分子膜，影响细菌正常的代谢繁殖，从而杀死细菌。

3 结论

利用两步法成功实现了 CS 季铵化改性和羧甲基化改性。随着 CS 氨基季铵化，分子内氢键的作用力被削弱，水溶性得到明显的提高，且溶解性不再受到酸碱条件的限制。抗菌测试结果表明，CTMC 抗菌性能明显提高，推测其抗菌机理为带正电的聚合物吸附于带负电的细菌表面，形成一层分子膜阻碍了细菌正常的物质传递，从而杀死细菌。CTMC 在临床医药、纺织和环境保护等领域具有潜在的应用前景。

[致谢：感谢国家青年科学基金 (51703152, 31700689)，山西省自然科学基金 (201701D121044, 201701D121030) 和太原理工大学青年基金 (2016QN87) 的资助。]

参考文献

- [1] Kumirska J, Weinhold M X, Jorg Thoming J, et al. Biomedical activity of chitin/chitosan based materials— influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation[J]. Polymers, 2011, 3(4): 1875-1901.

(下转第 249 页)