

低分子量壳聚糖季铵盐的制备及抗菌性能研究

程国君^{1,2,3} 陈水平¹ 吴国忠¹ 林宝凤² 钟磊¹

¹ (中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

² (广西大学化学化工学院 南宁 530004)

³ (安徽理工大学材料科学与工程系 淮南 232001)

摘要 通过 γ 射线辐照壳聚糖降解, 得到低分子量壳聚糖, 并采用环氧丙基三甲基氯化铵对低分子量壳聚糖进行季铵化改性, 制备了低分子量壳聚糖季铵盐, 并测试其抗菌性。用傅立叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 和核磁共振碳谱 (^{13}C Nuclear magnetic resonance, ^{13}C NMR) 表征壳聚糖和壳聚糖季铵盐的结构, 结果表明, 经 γ 射线辐照过的壳聚糖, 其季铵盐的取代度比未辐照的高, 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌效果也得到明显改善, γ 射线辐照没有破坏壳聚糖的分子结构。

关键词 壳聚糖, 辐照降解, 壳聚糖季铵盐, 抗菌性

中图分类号 O636.9, O623.734

壳聚糖 (Chitosan, CTS) 是甲壳素脱乙酰基后得到的一种天然高分子多糖^[1], 其无毒、可生物降解及良好的生物相容性, 使壳聚糖在医药、食品、化妆品、污水处理等方面得到广泛的应用。由于壳聚糖只在少数酸性水溶液中溶解, 不能直接溶于水, 因而极大限制了它的推广应用。 ^{60}Co γ 射线辐照对壳聚糖进行降解, 射线不会对壳聚糖的分子结构和脱乙酰度产生影响^[2], 故本工作应用 ^{60}Co γ 射线辐照降解的低分子量壳聚糖为原料, 并引入羟丙基三甲基氯化铵对低分子量壳聚糖进行化学结构修饰, 可以得到完全水溶的壳聚糖季铵盐, 其抗菌试验显示: 低分子量壳聚糖季铵盐对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌效果明显好于未降解的壳聚糖。

1 实验材料和方法

1.1 材料和仪器

粉末状壳聚糖(脱乙酰度为 95%, 浙江玉环海洋生物化学有限公司提供)。环氧丙基三甲基氯化铵(山东烟台三贡化工有限公司), 其它试剂均为分析纯。

红外光谱在 Nicolet-170SX FT-IR 谱仪上得到 (KBr 压片), ^{13}C NMR 谱用 $\text{D}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOD}$ 作溶剂在 ARX300 核磁共振仪 (300MHz, 德国 Bruker 公司) 上记录。Waters 高效液相凝胶渗透色谱仪 (R12150 示差折光监测器) 记录分子量。中国科学

院上海应用物理研究所 ^{60}Co γ 射线辐照装置。

1.2 壳聚糖的辐射降解

将完全干燥的壳聚糖粉末样品装于辐照管内, 除氧, 在室温条件下置于 $4.4 \times 10^{15} \text{Bq}$ 的 ^{60}Co 辐射源中进行辐照, 剂量率为 $6.5 \text{Gy}/\text{min}$, 辐照 100kGy 。

1.3 低分子量壳聚糖季铵盐的制备

将辐照 100kGy 的壳聚糖粉末 10g 放置于 500mL 三口瓶中, 加入适量的蒸馏水, 在略高于室温下搅拌分散均匀, 批量加入适量的环氧丙基三甲基氯化铵水溶液, 在一定温度下搅拌反应 10h 以上, 得到暗黄色透明液体, 产物用过量的乙醇沉淀, 过滤, 得到粗产品^[3]。将粗产品溶解到甲醇中, 用 3G 砂芯漏斗过滤, 滤液用丙酮沉淀, 过滤, 重复几次, 再将产品用水溶解, 用透析袋透析 2d , 溶液在真空下浓缩干燥, 得到淡黄色粉末。

1.4 分子量的测定

用凝胶渗透色谱仪在 30°C 测定 γ 射线辐照后壳聚糖和壳聚糖季铵盐的分子量, 流动相为 $0.25 \text{mol}/\text{L}$, $\text{CH}_3\text{COOH}/0.25 \text{mol}/\text{L}$, $\text{CH}_3\text{COONa}/0.25 \text{mol}/\text{L}$, NaCl , 流速为 $0.6 \text{mL}/\text{min}$ 。

1.5 取代度 (Degree of Substitution, DS) 的测定

1.5.1 壳聚糖季铵盐取代度^[4] (DS) 的测定 准确

第一作者: 程国君, 男, 1979年1月出生, 2002年于长春工业大学高分子材料专业获学士学位, 现为上海应用物理研究所与广西大学联合培养硕士

通讯联系人: 吴国忠

收稿日期: 初稿 2007-01-24, 修回 2007-03-14

称量纯化后的壳聚糖季铵盐的样品,溶于定量的水中,用 AgNO_3 标准溶液滴定样品中 Cl^- ,按下式计算壳聚糖季铵盐的取代度: $\text{DS} = \frac{V \cdot C}{1000 + [V \cdot C / 1000 + (W_1 - W_2) / 162]} \times 100\%$ 。其中, V 为消耗的 AgNO_3 的体积 (mL); C 为 AgNO_3 的标准摩尔浓度 (mol/L); W_1 为样品重量 (g), W_2 为被取代的样品重量 (g), $W_2 = V \cdot C \times 314 / 1000$; 162 为单元壳聚糖分子量, 314 为单元壳聚糖季铵盐的分子量。

1.6 抗菌性测定

用琼脂平板法对壳聚糖和壳聚糖季铵盐的最小抑菌浓度 (Minimal inhibitory concentration, MIC) 进行测定。具体操作方法为: 将壳聚糖 (0kGy) 和辐照降解后壳聚糖合成的季铵盐分别溶解到 1% (V/V) 的醋酸溶液中配成 1% (w/v) 的溶液, 将壳聚糖和壳聚糖季铵盐依次按照浓度为 0.1%、0.05%、0.025%、0.0025%、0.00125%、0.00025% 分别加入到培养基中 (牛肉膏 5g, 蛋白胨 10g, 蒸馏水 1000mL, pH 为 7.0), 用 0.1% (v/v) 的醋酸溶液作为对照物, 在 120°C 下高温灭菌 25min, 将要接种的大肠杆菌 (*E.coli*) 和金黄色葡萄球菌 (*S.aureus*) 用无菌水稀释到 10^5 CFU/mL 后, 再接种到加有样品和对照物的培养基中, 在 37°C 下培养 72h, 通过对菌落计数, 从而得到每种化合物的 MIC 值。

2 结果和讨论

2.1 低分子量壳聚糖季铵盐的结构表征

壳聚糖及壳聚糖季铵盐的红外光谱见图 1 和图 2, 在壳聚糖的红外光谱图中, 辐照降解过的壳聚糖

和未降解的壳聚糖的主要吸收峰几乎完全相同, 在 1650cm^{-1} 和 1585cm^{-1} 附近处都出现了酰胺带的吸收峰和氨基的 N-H 伸缩振动峰。这表明壳聚糖通过 γ 射线辐照降解后只降低了其分子量, 而没有破坏壳聚糖的原有结构。而在图 2 中的壳聚糖季铵盐的红外光谱中, 1585cm^{-1} 附近处的吸收峰消失, 同时在 1484cm^{-1} 处出现 $-\text{CH}_3$ 的 C-H 的弯曲振动吸收峰^[5], 表明壳聚糖的氨基上引入了羟丙基三甲基氯化铵的侧链。应用 ^{13}C NMR 谱进一步证实壳聚糖季铵盐的结构变化, 谱图如图 3 所示。

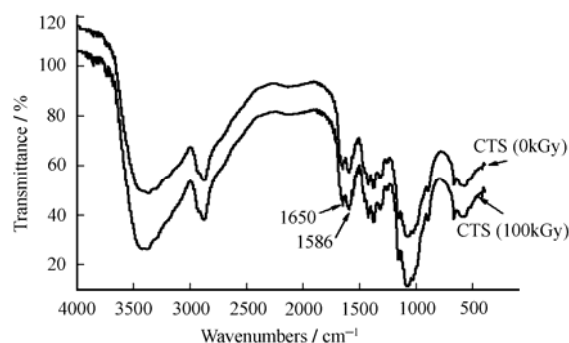


Fig.1 FT-IR spectra of CTS(0kGy) and CTS(100kGy)

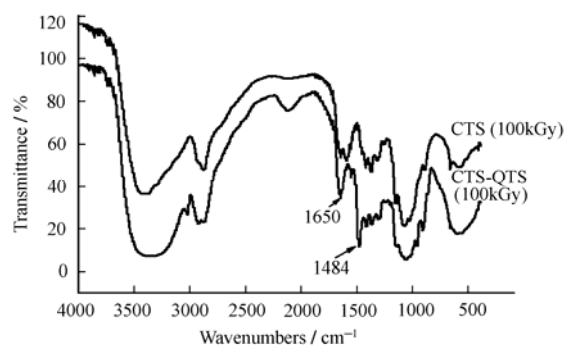


Fig.2 FT-IR spectra of CTS and CTS-QTS

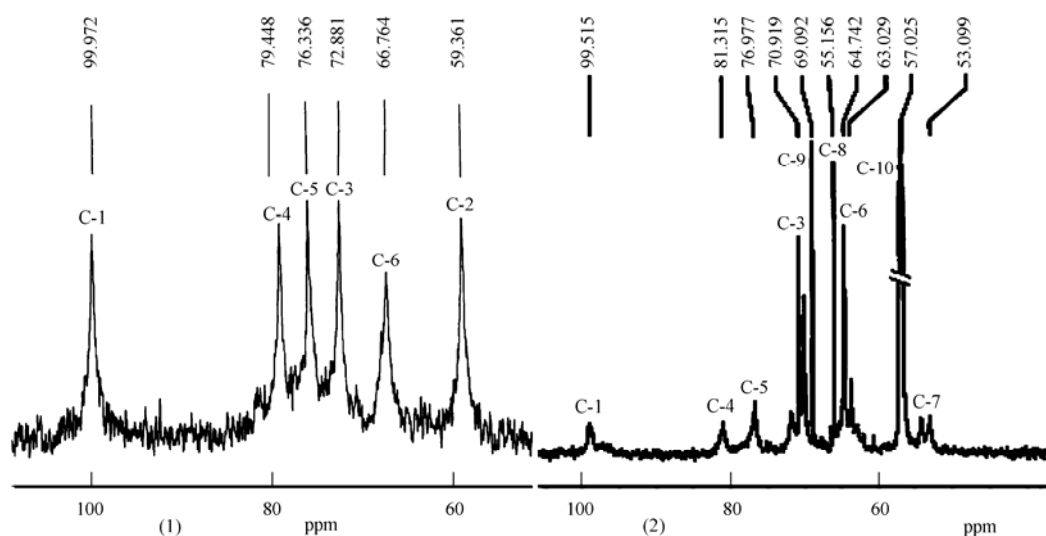


Fig.3 ^{13}C NMR spectra of CTS(1) and CTS-QTS(2)

壳聚糖的 ^{13}C NMR 谱图如图 3 (1) 所示, 壳聚糖的氨基葡萄糖吡喃环中的各个碳原子的化学位移 δ 归属如下: 99.97 (C-1), 59.36 (C-2), 72.88 (C-3), 79.44 (C-4), 76.33 (C-5), 66.76 (C-6) ppm。在图 3 (2) 中, 化学位移 δ 为 99.51, 63.02, 70.91, 81.31, 76.97, 64.76 ppm 处吸收峰分别归属于壳聚糖季铵盐的氨基葡萄糖吡喃环中的 C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6。壳聚糖季铵盐侧链上的各个碳原子的归属如

下: 最强的峰出现在化学位移 $\delta=57.0\text{ppm}$, 是与季铵盐基团相连的三个甲基上的 C-10; 化学位移出现在 $\delta=53.09, 66.15$ 和 69.09ppm , 分别归属于季铵盐支链上的 C-7, C-8, C-9, 与文献[6]报道相一致。

2.2 低分子量壳聚糖季铵盐的抗菌性

壳聚糖及低分子量壳聚糖季铵盐的抗菌活性如表 1 所示。

Table 1 Antimicrobial Property of CTS and CTS-QTS

Sample	Irradiation dose /kGy	DS /%	Mw /kDa	MIC /%	
				E.coli	S. aureus
CTS	0	0	60.26	0.05	0.05
CTS-QTS1	0	78	65.54	0.05	0.05
CTS-QTS2	100	87.4	8.09	0.025	0.025

从表 1 数据中可以看出, 壳聚糖辐照 100kGy 后, 分子量降低的幅度比较大, 几乎降低了一个数量级, 而得到壳聚糖季铵盐的取代度也有明显的增加, 说明低分子量的壳聚糖比较容易形成壳聚糖季铵盐, 可能由于壳聚糖的长链被打断, 使其侧链的氨基受到长链的制约力减小, 从而更容易受到亲电试剂的进攻, 导致季铵盐的取代度相对提高; 另一方面, 反应前的充分分散、溶胀, 也使得壳聚糖的氢键等被削弱, 也有利于反应的进行。

低分子量壳聚糖季铵盐对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度均为 0.025%, 比未辐照的壳聚糖及其季铵盐的抑菌效果优异。由于低分子量壳聚糖季铵化程度相对较高, 更容易形成正电荷的离子, 且分子量相对较低, 更容易进出细胞而破坏细菌的细胞壁^[7], 从而对菌类的抑制效果将会有一定幅度的提高。

3 结论

壳聚糖经过 γ 射线辐照后, 并没有破坏壳聚糖的分子结构, 且可以根据辐照剂量的大小控制壳聚糖的分子量。通过壳聚糖的降解, 在壳聚糖氨基上更易引入羟丙基三甲基氯化铵, 得到一定分子量的壳聚糖季铵盐, 其在整个 pH 值范围内都是水溶的,

同时其抗菌性也较未辐照壳聚糖的抗菌性有明显的增加。

参考文献

- 1 蒋挺大. 壳聚糖. 北京: 化学工业出版社, 2001. 1-2
JIANG Tingda. Chitosan. Beijing: Chemical Industry Press, 2001. 1-2
- 2 WU G Z, LONG D W, CHEN S P, *et al.* Carbohydr Polym, 2005, **60**(1): 61-65
- 3 Sang-Hoon Lim, Samuel M Hudson. Carbohydr Res, 2004, **339**(2): 313-319
- 4 樊木, 肖玲, 杜予民. 武汉大学学报(理学版), 2003, **49**(2): 205-208
FAN Mu, XIAO Ling, DU Yumin. Journal of Wuhan University (Natural Science Edition), 2003, **49**(2): 205-208
- 5 Loubaki E, Ourevitch M, Sicsic S. Eur Polym J, 1991, **27**(3): 311-317
- 6 Kenji Suzuki, DAISUKE Oda. Polym J, 2000, **32**(4): 334-338
- 7 吴迪, 蔡伟民. 哈尔滨工业大学学报, 2005, **37**(7): 1014-1018
WU Di, CAI Weimin. Journal of Harbin Institute of Technology, 2005, **37**(7): 1014-1018

Preparation and antibacterial property of low molecular weight chitosan quaternary ammonium salt

CHENG Guojun^{1,2,3} CHEN Shuiping¹ WU Guozhong¹ LIN Baofeng² ZHONG Lei¹

¹(Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

²(School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004)

³(Department of Material Science and Engineering, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001)

ABSTRACT Low molecular weight chitosan, product of γ -ray degradation, was modified by introducing glycidyl trimethyl ammonium chloride group and its antibacterial property was tested against different bacteria. The structure of chitosan and chitosan quaternary ammonium salt are characterized by FT-IR and ^{13}C NMR. The results showed that the degree of substitution of the quaternary ammonium salt of chitosan with γ -ray irradiation was higher than original and its antibacterial effect to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureate* was also improved obviously, and molecular structure of chitosan wasn't destroyed by γ -ray.

KEYWORD Chitosan, Radiation degradation, Chitosan quaternary ammonium salt, Antibacterial property

CLC O636.9, O623.734