

• 基础研究 •

不同粒度羧甲基壳聚糖基复合抗菌剂抑菌性能的研究^{*}

宋廷二 夏金兰 聂珍媛 吴川

(中南大学资源加工与生物工程学院 湖南长沙 410083)

摘要:为增加固体制剂的水溶性以及考查研磨后其抗菌性能的变化,制备了低银含量和低噻苯咪唑含量的羧甲基壳聚糖银噻苯咪唑(Ag-CMCTS-TBZ)复合抗菌剂,通过研磨和粒度分级将其分成C₁(150-74 μ m)、C₂(74-45 μ m)和C₃(-45 μ m)三种制剂,采用粒度分析、紫外、红外光谱及最小抑菌浓度(MIC)对其进行分析。研究表明,低含量银、噻苯咪唑的Ag-CMCTS-TBZ均具有良好的水溶性,其溶解度都大于0.4%,其0.2%(w/v)的抗菌水溶液中的表观粒度在13-250nm之间;但在研磨分级之后,三种制剂中分子间的络合或者氢键键合状况发生了变化,而且导致其抗菌性能发生改变;其中C₁对E. coli和S. aureus有较强的抑制,而其抑制A. niger的能力较弱;C₃抗菌活性最低,对E. coli, S. aureus, C. albicans和A. niger的MIC值皆>1000 mg/L; C₂的抗菌效果则介于其间。

关键词:复合抗菌剂;羧甲基壳聚糖银噻苯咪唑;抗菌;粒度

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A

Study on antimicrobial Activity of complex agents Ag- Carboxymethyl Chitosan- thiabendazole with different size distribution

SONG Ting-er, XIA Jin-lan, NIE Zhen-yuan, WU Chuan

(Department of Bioengineering, School of Resources Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha 410083, Hunan China)

ABSTRACT: To increase the solubility and trace its variation in antimicrobial activity after powdering process, Ag- Carboxymethyl Chitosan- thiabendazole (Ag-CMCTS-TBZ) with low concentration of Ag⁺ and thiabendazole (TBZ) was prepared and powdered into three agents with size distribution of 150-74 μ m, 74-45 μ m and -45 μ m by standard sieves separating system and marked with C₁, C₂ and C₃ respectively. Particle size analysis shows the apparent diameter of the three agents varies from 13-250 nm and all possess good solubility of higher than 0.4%. FT-IR and UV spectroscopy show that binding among Ag⁺ and TBZ to the skeleton of CMCTS changed under the powdering process and led to decreasing in antimicrobial activity. The minimum inhibitory concentration (MIC) assessment shows C₁ presented the better antimicrobial activity to E. coli and S. aureus but with poorer performance to A. niger. The antimicrobial activity of C₂ is secondary to C₁ and C₃ presented the worst antimicrobial performance with MICs all higher than 1000 mg/L for all microbes in tests.

Key words: Complex antimicrobial agents; Ag- Carboxymethyl chitosan- thiabendazole; Antimicrobial; Size

由于天然产物具有安全低毒、生物相容性好及资源丰富等优势,目前对纤维素、甲壳素类天然产物及其功能复合物的研究与开发越来越多^[1-4]。羧甲基壳聚糖银噻苯咪唑(Ag-CMCTS-TBZ)是本课题组研发的一种新型广谱复合抗菌剂,其在改善银离子容易氧化变色和噻苯咪唑(TBZ)水溶性差的同时,还结合了银(Ag⁺)和噻苯咪唑(TBZ)的抗菌特点,其对细菌、酵母、真菌的代表性菌株都有很好的抗菌活性,并且成功应用于丙烯酸水性乳胶漆涂料中^[5]。但是,该固态抗菌剂须研磨到微米级粒度才利于溶解分散。为此,本文制备了低含量银及低噻苯咪唑含量的羧甲基壳聚糖银噻苯咪唑复合抗菌剂以增加其水溶性,通过研磨和粒度分级将其分成150-74 μ m、74-45 μ m和-45 μ m三种不同粒度分布的制剂,以最小抑菌浓度指标表征其抑菌性能,用紫外、红外光谱分析研磨后不同粒

度分布的抗菌剂的结构变化,并探讨了研磨分级实验工艺对其抗菌性能的影响及其粒度与抑菌性能之间的关系。

1 实验材料和方法

1.1 材料

壳聚糖(脱乙酰度为90%,相对分子质量为305kDa,浙江玉环海洋生物化学有限公司);噻苯咪唑(纯度为95%,徐州诺恩农化有限公司);硝酸银、氯乙酸、氢氧化钠、乙醇、丙酮、二甲基甲酰胺(DMF),均为分析纯试剂。

大肠杆菌(Escherichia coli)与黑曲霉(Aspergillus niger)由中南大学资源加工与生物工程学院提供;金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)与白色念珠菌(Candida albicans)由湖南师范大学生命科学院提供;牛肉膏蛋白胨固、液培养基(培养

* 基金项目:国家自然科学基金委员会创新群体基金(50321402)资助

作者简介:宋廷二(1979-),男,硕士,主要研究方向:从事生物功能材料研究

通讯作者:夏金兰,男,教授,从事生物功能材料与药物研究, E-mail: jlxia@mail.csu.edu.cn

(收稿日期:2006-05-09 接受日期:2006-06-10)

E. coli, *S. aureus*); 马铃薯固、液培养基(培养 *A. niger*); 豆芽汁蔗糖固、液培养基(培养 *C. albicans*)。

Nexus740 FT-IR 傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet, US); UV-3000 紫外光谱仪(岛津, 日本); ZetaPlus 电位粒度分析仪(Brookhaven, UK); Olympus CX-31 显微镜(TOKYO, Japan); GHP29050 隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 羧甲基壳聚糖的制备: 按类似陈西广等人报道的方法制备羧甲基壳聚糖(CMCTS)^[6]。即称取 20g 壳聚糖(CTS)于 100mL 圆底三口瓶中, 加入 150mL 乙醇浸并向反应器中加入 120mL 10mol/L 的 NaOH 溶液, 搅拌均匀后浸泡过夜, 得碱化壳聚糖。然后将 24g 氯乙酸的乙醇液滴加到碱化壳聚糖中, 在 60℃ 反应 2.5h 后, 用冰醋酸调节 pH 至中性, 制得粗产品。将粗产品溶于水, 用丙酮沉淀后, 再用 80% 乙醇反复洗涤, 除去醋酸钠等盐类, 并用 0.1mol/L 的 AgNO₃ 检测至无白色沉淀。然后于 60℃ 真空干燥得产品。

羧甲基壳聚糖的取代度则采用电位滴定法测定^[7]。

1.2.2 羧甲基壳聚糖银噻苯咪唑的制备: 称取 10g 羧甲基壳聚糖, 溶于体积为 100mL 水溶液中, 用硝酸调节 pH 值为 2, 保持磁力搅拌; 加入 AgNO₃ (CMCTS 与 AgNO₃ 的质量比为 1:0.0075) 反应 1h; 再将一定量 TBZ (CMCTS 与 TBZ 的质量比为 1:0.01) 加于反应器中, 反应 1h; 接着用浓度为 1mol/L 的 NaOH 调反应液 pH 至中性, 并用丙酮结晶沉析, 然后真空过滤, 取滤上物, 再分别用乙醇和 DMF 试剂反复洗涤多次, 真空干燥即得纯净复合抗菌剂(Ag-CMCTS-TBZ)^[8]。**1.2.3 粒度的分级和分析:** 将所得的复合抗菌剂加入球磨罐, 在室温及空气氛围条件下研磨 1h, 再通过 150 μ m、74 μ m 和 45 μ m 的三个不同筛孔尺寸的泰勒标准筛将抗菌剂粉末分成 150-74 μ m、74-45 μ m 和小于 45 μ m 的三种不同粒度分布的复合抗菌剂, 并分别对应标记为 C₁、C₂ 和 C₃。

对于抗菌原液的 0.2% (w/v) 溶液, 用 ZetaPlus 电位粒度分析仪测定其粒度组成, 并用 ZetaPlus Particle Sizing 软件对数据进行处理。

1.2.4 紫外可见光谱: 用岛津 UV-3000 监测样品的紫外可见吸收。扫描步幅为 10nm/cm, 扫描范围为 200-800nm。全部样品的浓度为 0.2% (w/v), 除了 CMCTS 以 0.1% HNO₃ 为参比, 其它的以蒸馏水(dH₂O)为参比。(结果中只给出 200-600nm 的图谱)

1.2.5 傅立叶红外光谱: 采用 KBr 压片法在 Nexus740 红外仪和记录样品的红外谱图。分辨率为 2cm⁻¹, 记录范围为 4000-500cm⁻¹。

1.2.6 抗菌测试: 以最小抑菌浓度(MIC) 指标来检测 C₁、C₂ 和 C₃ 对 *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* 和 *A. niger* 的抗菌性能。按 Gerasimenko D V 等报道的方法改进后进行^[9], 具体步骤如下: 下述器材除抗菌剂外都经过高压蒸汽灭菌, 试验操作在无菌条件下进行; 将 C₁、C₂ 和 C₃ 配制成 0.4% 的抗菌测试原液待用; 将活化后细菌在 37℃ 下培养 24h, 活化后真菌在 28℃ 下培养 48h, 然后用血细胞计数板和在显微镜下将菌液稀释至 1-4 × 10⁶CFU/mL, 试验菌悬液临时制备待用; 用无菌试管将 Ag-CMCTS-TBZ 的 1% 的原液系列稀释成从 50-1000mg/L 的测试浓度, 其中相应两倍浓缩培养基 2mL, 相应抗菌剂若干, 菌悬液 0.1mL, 最后用无菌蒸馏水补足至 4mL, 此外以无菌蒸馏水替代抗菌剂做空白对照抗菌测试; 然后将上述细菌的测试试管置于 37℃ 下培养 24h, 真菌则在 28℃ 下培养 48h, 记录生长情况; 到了相应培养时间后, 从各测试试管吸出 0.1mL 涂布到相应的营养琼脂平板并且将细菌的琼脂平板置于 37℃ 下培养 24h, 真菌则在 28℃ 下培养 48h。最后以无可见菌落生长的营养琼脂平板对应的抗菌剂的浓度为最小抑菌浓度。

2 结果与讨论

2.1 羧甲基壳聚糖的取代度

由于原料及微观反应条件的差异, 壳聚糖(CTS) 羧甲基化后可能为 O-CMCTS、N-CMCTS 或 O,N-CMCTS。经测定, 本实验所制备的 CMCTS 的取代度(DS) 为 0.99, 其中在 O- 位上的取代度为 0.50, 在 N- 位上的取代度为 0.49, 游离-NH₂ 为 0.41, 属于 O,N-CMCTS。

表 1 C₁、C₂、C₃ 和其溶液的物理参数

Table 1 Some physical parameters for C₁, C₂, C₃ and their solutions

Agents	Size distribution by standard	Apparent diameter in	Solubility
	seizes/ μ m	solution of 0.2% (w/v) / nm	g/100g dH ₂ O
C ₁	150-74	247.7	> 0.4
C ₂	74-45	13.2	> 0.4
C ₃	-45	155.6	> 0.4

2.2 抗菌剂的粒度分级和分析

表 1 给出了抗菌剂 C₁、C₂ 和 C₃ 粉末和其在 0.2% (w/v) 的抗菌水溶液中的粒度分布、表观粒度以及其在蒸馏水中的溶解度。三种抗菌剂都有较高的溶解度^[8,10]。而从图 1 的各抗菌剂溶液的粒度分布数据看, 三种溶液的粒度分布都主要分成大、小两部分。C₁ 的多峰粒度分布中 800-1200nm 的较大颗粒约占 60%, 粒度及粒度分布都比 C₂ 和 C₃ 的大。C₂ 的多峰粒度分布中 45-90nm 的部分约占 70%, 余下的约 30% 的粒

度更小, 说明 C₂ 的溶解情况良好。C₃ 的多峰粒度分布中 300-500nm 的部分约占 70%。C₃ 的粒度分布反而比 C₂ 的大, 说明 C₃ 的溶液可能发生了分子聚集^[11]。此外, 实验中 C₃ 的溶解情况也支持了这个推断, 在水溶剂中刚添加 C₃ 时, C₃ 粉末连成一面团状, 搅拌不容易分散, C₁ 和 C₂ 则溶解较快, 这说明 C₃ 具有较大的比表面活性能, 在搅拌溶解后, 其分子间或小粒子间更易于聚集。

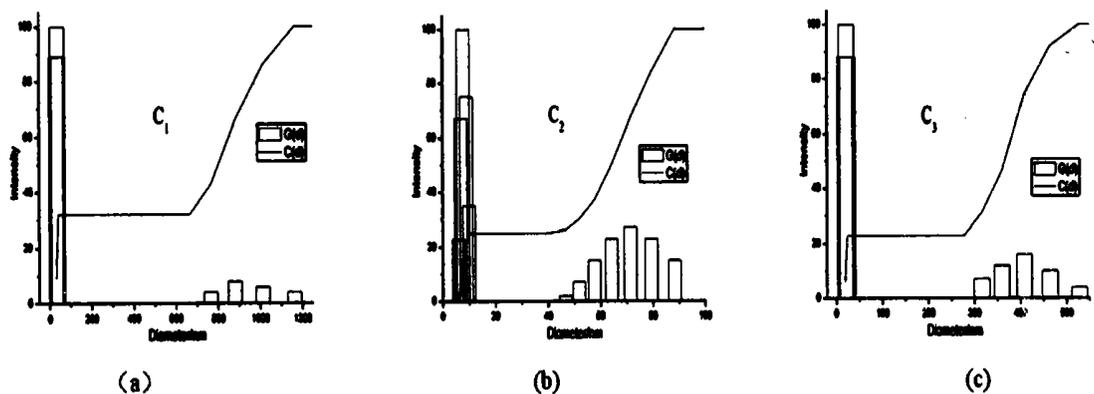


图1 各液态抗菌剂的多峰粒度分布

Fig. 1 Size distribution of solutions of C₁, C₂ and C₃

2.3 紫外可见光谱分析

图2给出了CMCTS、C₁、C₂和C₃的紫外吸收谱。四种物质的主要吸收峰的位置都在240nm和300nm左右。240nm处的吸收可以归结为胺基的n-σ*跃迁或者羰基和TBZ的π-π*跃迁。

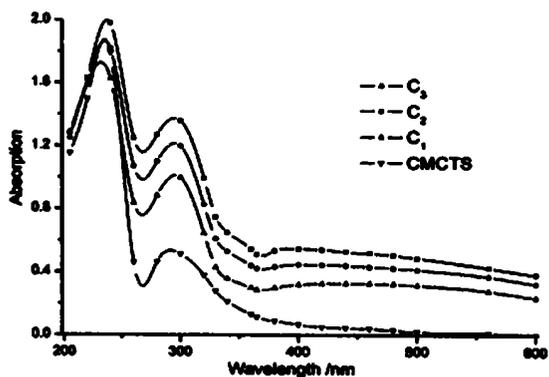


图2 CMCTS、C₁、C₂和C₃的紫外可见吸收曲线

Fig. 2 UV-Vis spectra of CMCTS, C₁, C₂ and C₃

300nm处的吸收可以归结为羰基和TBZ的n-π*跃迁^[12]。C₁、C₂和C₃的紫外吸收与CMCTS的相比较,主要是240nm和300nm处两吸收峰比值的减小;对于CMCTS,吸光度比值A(λ240nm):A(λ300nm)为2.68,而C₁、C₂和C₃的则分别为1.63, 1.52, 1.46;这间接表明CMCTS的氨基和羧基上不同程度发生了与Ag⁺的络合及与TBZ的氢键键合,而且,随着分级粒度的减小,TBZ可能进一步与活性基团键合,从而导致n-π*跃迁部分吸收的减弱,使得比值A(λ240nm):A(λ300nm)降低。总的比较,C₁、C₂和C₃的吸收谱线非常相似,只是随着抗菌剂分级粒度的减小,其吸收随着增强;这可能是因为随着分级粒度的减小,分子链中曝露于表面的活性基团增多。

2.3 傅立叶红外光谱分析

图3给出了CTS、CMCTS和C₁的红外图谱。CTS的谱线与以前报道的相似^[12,13],其中3425cm⁻¹处的宽吸收归结于N-H和O-H的伸缩振动,2881cm⁻¹,1599cm⁻¹,1381cm⁻¹三处的吸收则分别对应于C-H的伸缩振动,氨基的弯曲振动和乙酰胺基上-CH₃的对称变形振动,1658cm⁻¹处的肩峰属于酰胺iv谱带,1154-898cm⁻¹处的重叠吸收则是多糖类结构的特征

吸收。

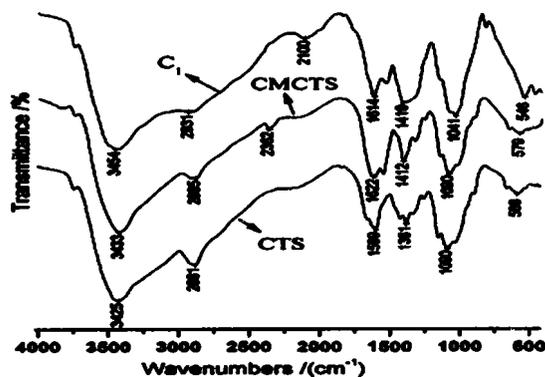


图3 CTS、CMCTS和C₁的红外图谱

Fig. 3 FT-IR spectra of CTS, CMCTS and C₁

CMCTS的谱线与CTS的相比,在1412cm⁻¹和1622cm⁻¹处的吸收分别对应比较强的-COO-对称伸缩振动和对称伸缩振动。在1554cm⁻¹的新峰对应于仲胺的N-H弯曲振动,说明在氨基上发生羧甲基取代,而1090cm⁻¹附近的C-O峰强度的减弱表明O-上也发生了羧甲基取代。但1027cm⁻¹的一级羟基肩峰尚未消失,说明O-上发生的羧甲基取代度不大,这与DS的结果一致。

C₁的红外吸收与CMCTS的相比,出现了1614cm⁻¹和1530cm⁻¹处的吸收峰,分别对应于胺盐的反对称和对称变形振动,在累积双键区2100cm⁻¹处的弱峰和1410cm⁻¹附近的较宽的峰包则可能是TBZ键合到CMCTS骨架后引起的。另外,-COO-基团的对称伸缩振动吸收峰消失,在1090cm⁻¹附近的C-O伸缩振动减弱,而N-H或O-H的伸缩振动吸收紫移到了3454cm⁻¹,而且1300-1410cm⁻¹之间出现了较宽峰包。这表明羟基、氨基和羧基基团参与了与Ag⁺的络合或者与TBZ的氢键键合,与紫外可见光谱分析的情况一致^[5]。

C₁、C₂和C₃的红外吸收差异见图3。三者都在1400cm⁻¹附近的都有一较大峰包,其中C₁和C₂主要吸收较相似。参照C₁的红外吸收,C₂和C₃在于1040cm⁻¹处的闭合环振动的吸收减弱,二级羟基C-O伸缩振动则在1070和1080cm⁻¹处相对突出,说明参与络合或氢键键合的二级羟基减少。此外,C₃的1630cm⁻¹的羧基团(C=O)的特征吸收峰与由于从1531cm⁻¹红移到1526cm⁻¹处的峰有分离趋势并相对1400cm⁻¹附近的峰

强有所降低,说明 CMCTS 骨架与 TBZ 的氢键键合方式发生改变,可能使得参与与 TBZ 键合的部分羰基暴露了出来或 TBZ 被包埋于团块的中心领域,而与 Ag⁺ 的配位则可能进一步饱和^[5, 13, 14]。研磨及粒度分级工艺导致的这些分子间的络合或氢键键合状况的变化,可能会引起 Ag⁺ 与 TBZ 抗菌活性的降低。

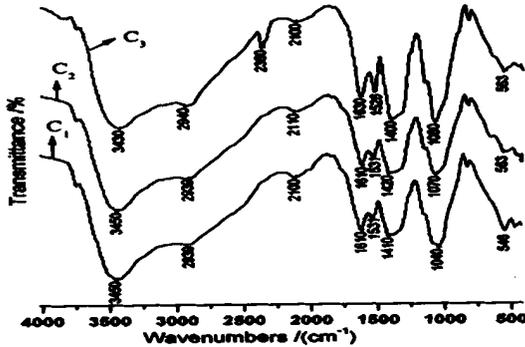


图4 CMCTS、C₁、C₂和C₃的傅立叶红外图谱

Fig. 4 FT-IR spectra for CMCTS, C₁, C₂ and C₃

2.4 抑菌性能评估

此前以 1:5:100 (AgNO₃:TBZ:CMCTS, w/w) 的投料比制备的同类抗菌剂中 TBZ 和 Ag⁺ 对 CMCTS 的物质的量之比都是 1:100, 其对 E. coli, S. aureus, C. albicans 和 A. niger 的 MIC 值分别为 80, 60, 55 和 250 mg/L^[8]。而由表 2 可知, 三种抗菌剂对 A. niger, S. aureus 的 MIC 都大于 1000mg/L, 其中抗菌效果较好的 C₁ 对 E. coli 的 MIC 值为 400mg/L, 是此前报道的同类抗菌剂的 MIC 值的五倍左右。可见, 当抗菌剂中 TBZ 和 Ag⁺ 的含量降低后, 抗菌剂对 E. coli, S. aureus, C. albicans 和 A. niger 的抗菌活性降低。说明要确保对 E. coli, A. niger 等菌的高效抑制, 须保证此类抗菌剂中 TBZ 和 Ag⁺ 一定浓度的含量。而较低的 1:5:100 (AgNO₃:TBZ:CMCTS, w/w) 的投料比和抗菌剂中 TBZ 及 Ag⁺ 对 CMCTS 的物质的量之比 (皆 1:100) 可以确保 Ag-CMCTS-TBZ 具有较高的抗菌活性。

表2 抗菌剂对四种菌的最小抑菌浓度

Table.2 MICs of antimicrobial agents C₁, C₂ and C₃

Agents	MIC/ (mg/L)			
	E. coli	S. aureus	C. albicans	A. niger
C ₁	400	> 1000	800	> 1000
C ₂	800	> 1000	900	> 1000
C ₃	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000

从抗菌剂对 E. coli, C. albicans 的 MIC 比较, C₁、C₂ 和 C₃ 抑菌作用依次减弱。说明研磨和粒度分级过程对抗菌剂的抗菌性能有显著影响。结合紫外和红外吸收光谱的分析, Ag⁺ 和 TBZ 分别键合在 CMCTS 的氨基和羧基上, 提高了 Ag⁺ 和 TBZ 在复合抗菌剂中的化学稳定性, 而随着研磨时间的延长, Ag⁺ 和 TBZ 在复合抗菌剂中的化学稳定性可能得到了增强, 继而影响如因 Ag⁺ 产生的活性氧的生成以及减少了 CMCTS 的有效作用活性基团的数量^[1, 15]。另外, 对片状、颗粒状抗菌剂的研磨过程中, 复合物的 CMCTS 枝臂部分可能更容易因研磨剪力从母体解离出来, 成为较细粒级抗菌剂如 C₂ 和 C₃ 的组成。

从而与含 Ag⁺ 和 TBZ 的 CMCTS 颗粒比, 其抗菌性能相对减弱。因而, C₁ 的抗菌活性应该最强, 这与所得 MIC 结果一致。

3 结论

研究结果表明, 低银含量和低噻苯咪唑含量的复合抗菌剂羧甲基壳聚糖银噻苯咪唑 (Ag-CMCTS-TBZ) 复合抗菌剂 C₁、C₂ 和 C₃ 具有良好的水溶性。

研磨和粒度分级工艺使得 Ag-CMCTS-TBZ 三种制剂中分子间的络合或者氢键键合状况发生了变化, 而且导致其抗菌性能发生改变; 其中 C₁ 对 E. coli 的 MIC 为 400 mg/L, 对 S. aureus 的 MIC 为 800mg/L, 而其抑制 A. niger 的能力较弱; C₃ 抗菌活性则显著降低, 对 E. coli, S. aureus, C. albicans 和 A. niger 的 MIC 值皆大于 1000 mg/L; C₂ 的抗菌效果则介于其间。

致谢

本研究感谢来自国家创新群体科学基金 (50321402) 和中南大学教育部生物冶金重点实验室的支持。

参考文献

- [1] 夏金兰, 王春, 刘新星. 抗菌剂及其抗菌机理[J]. 中南大学学报 (自然科学版), 2004, 35(1): 31- 38
- [2] 庄旭品, 李治, 刘晓非, 等. 壳聚糖/纤维素抗菌纤维的研究与展望[J]. 化工进展, 2002, 21(5): 310- 313
- [3] ZHENG Lian-ying, ZHU Jiang-feng. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 54: 527- 530
- [4] WANG Xiao-hui, DU Yu-min, LIU Hui. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex[J]. Carbohydrate Polymers, 2004, 56: 21- 26
- [5] XIA Jin-lan, WANG Chun, NIE Zhen-yuan, et al. Structure, properties and application to water-soluble coatings of complex antimicrobial agent Ag-Carboxymethyl chitosan-thiabendazole[J]. Journal of Central South University of Technology, 2005, 12(5): 526- 530
- [6] CHEN Xi-guang, Park Hyun-jin. Chemical characteristics of O-Carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 53: 355- 359
- [7] 陈凌云, 杜予民, 肖玲, 等. 羧甲基壳聚糖的取代度及保湿性[J]. 应用化学, 2001, 18(1): 5- 8
- [8] 王春. 壳聚糖基复合抗菌剂的研究及应用[D]. 长沙: 中南大学, 2004
- [9] Gerasimenko D V, Avdienko I D, Bannikova G E, et al. Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2004, 40(3): 253- 257
- [10] 赵爱杰, 原续波, 常津. O-羧甲基壳聚糖的制备及应用研究进展[J]. 高分子通报, 2004, 5: 59- 63
- [11] 吴刚, 沈玉华, 谢建安, 等. N, O-羧甲基壳聚糖的合成和性质研究[J]. 化学物理学报, 2003, 16(6): 499- 503
- [12] WANG Shu-ming, HUANG Qun-zeng, WANG Qiong-sheng. Study on the synergistic degradation of chitosan with ultraviolet light and hydrogen peroxide[J]. Carbohydrate Research, 2005, 340: 1143- 1147
- [13] 蒋挺大. 甲壳素[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 33- 41
- [14] 苏克曼, 张铁英, 张玉兰. 波谱解析法[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2002: 80- 132
- [15] LIU Xiao-fei, GUAN Yun-lin, YAND Dong-zhi, et al. Antibacterial action of chitosan and Carboxymethylated chitosan[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2001, 79(7): 1324- 1335