

低聚壳聚糖芳香醛席夫碱中酚羟基的抑菌活性研究

Study on antibacterial activity of phenol hydroxyl from N-aryl Schiff COS derivatives

韩永萍 龚平 李可意

HAN Yong-ping GONG Ping LI Ke-yi

(北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023)

(Biochemical Engineering College of Beijing Union University, Beijing 100023, China)

摘要:以低聚壳聚糖为对象,以苯甲醛、水杨醛、3,4-二羟基苯甲醛为改性试剂,设计合成了一系列含不同酚羟基的 O-季铵盐低聚壳聚糖席夫碱衍生物,并对其结构进行了红外光谱或¹H NMR 表征。通过抑菌圈法研究其对大肠杆菌和金色葡萄球菌的抑菌活性,结果表明,合成的各种低聚壳聚糖衍生物抑菌活性明显增强,抑菌活性大小依次为 3,4-二羟基苯甲醛改性物>水杨醛改性物>苯甲醛改性物>低聚壳聚糖。抑菌活性构效关系分析表明,低聚壳聚糖经席夫碱结构引入的酚羟基对其抑菌活性有一定贡献;其中空间位阻效应对酚羟基抑菌活性影响较大,空间位阻效应较小的间位和对位酚羟基抑菌活性较强。

关键词:低聚壳聚糖;席夫碱;酚羟基;抑菌

Abstract: The N-aryl Chitooligosaccharides (COS) derivatives were firstly synthesized with Benzaldehyde, salicylal and 3,4-two hydroxy benzaldehyde, subsequently was quaternized to enhance its water solubility. The chemical structures of all COS derivatives were characterized by ATR-FTIR or ¹H NMR. The antibacterial studies of these COS derivatives were carried out by the inhibition zone diameters methods against *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* bacteria. The antibacterial activity results showed N-3,4-two hydroxy benzaldehyde Schiff's base COS > N-salicylal Schiff's base COS > N-Benzaldehyde Schiff's base COS > COS. In comparison to the COS derivatives chemical structure, it was found that the phenol hydroxyl group from N-aryl Schiff COS could improved the antibacterial activity, and the smaller of its steric hindrance the more high of the antibacterial activity.

Keywords: chitooligosaccharides (COS); schiff; phenol hydroxyl group; antibacterial activity

壳聚糖是迄今发现的唯一天然碱性多糖,具有来源广

泛,生物相容性、成膜性、保湿性良好,可生物降解等优势。它的广谱、高效抗菌活性已被广泛证实,对哺乳动物细胞几乎没有影响的特性及各种优良的生物活性使其成为开发研制天然抗菌剂的理想对象^[1]。研究^[2]表明,壳聚糖分子结构中带正电性的 C₂-NH₂ 是抗菌活性的根源。此外,壳聚糖抑菌活性受分子量影响较大,降解后的低聚壳聚糖在溶解性和抗菌活性方面均有很大提高^[2,3]。目前,从分子结构入手,通过改性增强溶解性和抗菌活性已经成为壳聚糖开发应用的又一大研究热点^[3]。在壳聚糖众多衍生物中,季铵化改性物和席夫碱改性物的抑菌性能最为突出。赵希荣等^[4]利用肉桂醛与壳聚糖 C₂-NH₂ 形成席夫碱,再对其 C₆-OH 进行季铵盐接枝,合成具有双抗菌活性中心的新型抗菌剂。

研究^[5]发现,天然产物中提取出的大多数酚类物质(如黄酮,单酚酸等)都具有抗菌特性,而酚类物质还会在染病的植物组织中累积增加。但壳聚糖芳香醛席夫碱衍生物结构中,酚羟基基团对抑菌活性的影响规律尚不清楚。本研究拟首先通过对芳香醛改性获得一系列酚羟基取代位和数量不同的低聚壳聚糖席夫碱衍生物,为了增强其溶解性再对其接枝季铵化,最后通过对产物进行结构表征和抗菌活性比较,预期发现酚羟基与低聚壳聚糖衍生物抑菌活性之间的构效关系,为低聚壳聚糖防腐抗菌剂的设计合成提供试验依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料及试剂

低聚壳聚糖及其衍生物:相对分子量 4 000,本实验室自制;

牛肉浸膏、蛋白胨、琼脂等:山东淄博启迪生物制品有限公司;

大肠杆菌(*E. coli*, G⁻)、金色葡萄球菌(*S. aureus*, G⁺):北京奥博新生物技术责任有限公司;

基金项目:北京市科技成果提升计划(编号:53333921409)

作者简介:韩永萍(1971-),女,北京联合大学副教授,博士。

E-mail: hypyt@163.com

收稿日期:2014-07-10

苯甲醛、乙醇、水杨醛、3,4-二羟基苯甲醛、3-氯-2-羟丙基三甲基氯化铵(CTA)、乙醚、醋酸、甲醇、丙酮、NaOH、NaHCO₃等;分析纯,国药集团化学试剂公司。

1.2 仪器与设备

真空干燥箱: DZF-6050型,上海精宏设备有限公司;

数显搅拌器: DW-3-60W型,郑州南北仪器设备有限公司;

压力蒸汽灭菌器: LDZX-40A型,上海申安医疗器械厂;

生化培养箱: LRH-250A型,河南博金仪器有限公司;

医用洁净工作台: SW-CJ-1F型,上海苏净实业有限公司;

恒温振荡器: SHY-2A型,江苏金坛国胜实验仪器厂;

红外光谱仪: FTIR-650型,上海精密仪器仪表有限公司。

1.3 O-季铵盐低聚壳聚糖席夫碱的制备

低聚壳聚糖分子中 C₂-NH₂ 能与化学物中的 C=O 形成席夫碱,反应条件温和且专属性较强。

目前,壳聚糖接枝季铵化所使用的主要改性剂为环氧丙基三甲基氯化铵(又称缩水甘油基三甲基氯化铵,GTA)。但由于 GTA 在中性或碱性条件下容易水解形成 2,3-二羟基丙基三甲基氯化铵,而失去与壳聚糖成键能力,还容易在醇、水介质中发生分子间聚合,从而降低与壳聚糖的接枝率^[6]。而 CTA 是合成 GTA 的中间体,在碱性条件下可转化为 GTA,且本身作为活性阳离子醚化剂在淀粉、纤维素等高分子化合物的阳离子化改性中广泛应用。为此,本研究在低聚壳聚糖游离氨基 100% 生成席夫碱后,再以价格相对低廉的 CTA 做改性剂,在碱性条件下对其结构中的 C₆-OH 进行接枝制备季铵盐。具体合成路线见图 1。

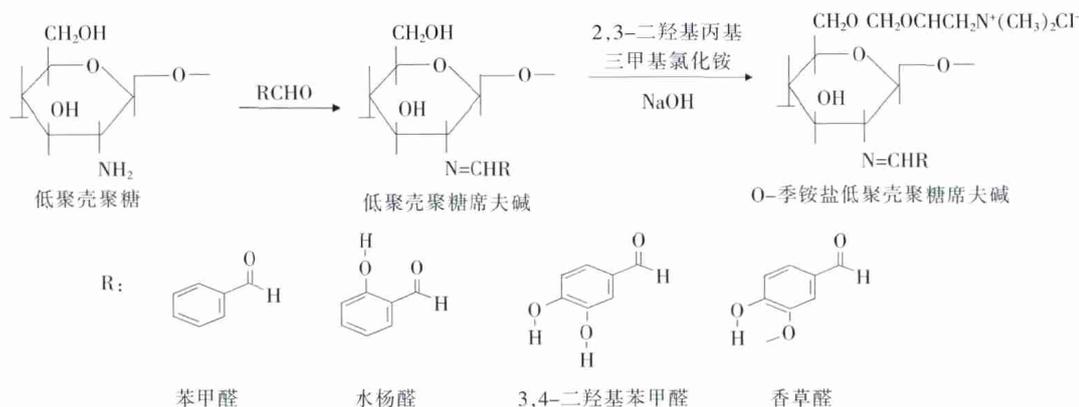


图 1 O-季铵盐低聚壳聚糖席夫碱的合成路线

Figure 1 Synthetic route for the quaternized N-aryl COS derivatives

1.3.1 低聚壳聚糖席夫碱的制备及纯化 将 2.0 g 低聚壳聚糖溶解于 60 mL 2% 的醋酸溶液中,置于装有搅拌器的三颈烧瓶中;加无水甲醇 60 mL 混匀溶胀 1 h。再向体系中加入溶解于 40 mL 无水甲醇的醛溶液,室温下搅拌反应 24 h。反应完毕用 1% NaOH 溶液调 pH 值为中性,用无水丙酮反复浸泡洗涤,除去过量的醛,用去离子水多次漂洗。40 °C 真空干燥至恒重,得到低聚壳聚糖席夫碱。

1.3.2 O-季铵盐低聚壳聚糖席夫碱的制备及纯化 取制备的低聚壳聚糖席夫碱 2 g 溶于 100 mL 无水异丙醇中,置于装有搅拌器的 25 mL 三颈瓶中,加 10 mL 40% 的 NaOH 溶液,搅拌下水浴加热,使反应体系在 55 °C 下恒温碱化 4 h。水浴加热升温至 60 °C,滴加 40% CTA 水溶液 40 mL,控制滴加速度使物料温度不高于 65 °C,反应 4 h 后。反应完毕用 1% HCl 溶液调节 pH 值为中性后过滤,再用 85% 的甲醇水溶液反复浸泡、洗涤,最后置于温度不高于 90 °C 的真空干燥箱内干燥至恒重,得 O-季铵盐低聚壳聚糖席夫碱。

1.3.3 低聚壳聚糖衍生物的结构表征

(1) 壳聚糖席夫碱的取代度:利用元素分析,通过计算 C/N 比值获得。

(2) 季铵盐接枝率:采用电位滴定法测定^[7]。

(3) 低聚壳聚糖及其衍生物的红外谱图测定:取少量干燥至恒重的低聚壳聚糖及其衍生物分别与 KBr 研磨并压片,用红外光谱分析仪分别在 4 000~400 cm⁻¹ 范围内进行红外谱图分析。

(4) 低聚壳聚糖及其衍生物的¹H NMR 测定:取少量的低聚壳聚糖及其衍生物,用 D₂O 溶解(对于溶解性不好的样品,加入少量三氟乙酸),在 30 °C 条件下用核磁共振仪分别进行¹H NMR 的分析。

1.4 低聚壳聚糖及其衍生物抑菌活性研究

采用滤纸片法测定^[5]。配制质量浓度梯度为 0.01%, 0.05%, 0.10% 的低聚壳聚糖及其衍生物溶液,过滤除菌后浸泡已灭菌直径为 5 mm 的圆形滤纸片 10 min,取出后分散贴于均匀涂布菌悬液的琼脂平板培养基表面上,每皿 3 个,翻转,37 °C 下连续培养 48 h,观察菌落生长情况,并测量计算每皿中滤纸片的抑菌圈平均直径。

2 结果与讨论

2.1 O-季铵盐低聚壳聚糖席夫碱的制备与表征

2.1.1 低聚壳聚糖席夫碱的红外光谱图和取代度测定 低

聚壳聚糖及其席夫碱衍生物的红外光谱图见图 2。

图 2 中, $1\ 532\ \text{cm}^{-1}$ 为 N—H 的红外光谱吸收特征峰, 而 $3\ 430\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 070\ \text{cm}^{-1}$ 分别为 O—H 和 C—O 的吸收特征峰。与低聚壳聚糖的红外光谱图相比, 4 种席夫碱衍生物的谱图中均在 $1\ 632\ \text{cm}^{-1}$ 处出现了 C=N 伸缩振动特征

吸收峰, 并在 $1\ 580, 1\ 498, 1\ 461\ \text{cm}^{-1}$ 处出现了苯环的骨架伸缩振动特征峰。这些说明低聚壳聚糖改性成功, 与 3 种芳香醛均形成了席夫碱。

低聚壳聚糖席夫碱衍生物经元素分析后计算获得的取代度结果见表 1。

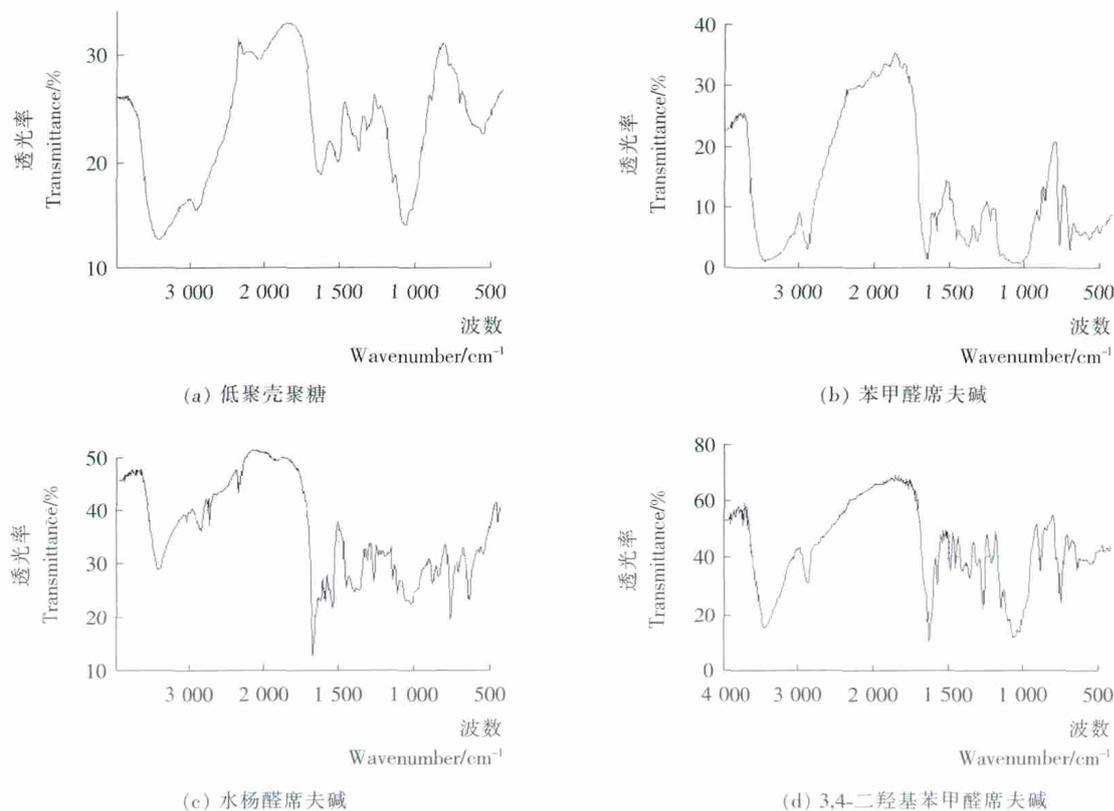


图 2 低聚壳聚糖及其席夫碱衍生物的红外光谱图

Figure 2 FTIR spectra of COS and its derivatives

表 1 低聚壳聚糖席夫碱衍生物的取代度

Table 1 ES of N-aryl COS derivatives

样品	C/%		H/%		N/%		C/N		取代度/ %
	实测值	计算值	实测值	计算值	实测值	计算值	实测值	计算值	
苯甲醛—低聚壳聚糖	58.95	58.87	5.68	5.66	5.24	5.28	11.25	11.14	99.05
水杨醛—低聚壳聚糖	57.32	55.32	5.50	5.67	5.10	4.96	11.24	11.15	99.18
3,4-二羟基苯甲醛—低聚壳聚糖	45.57	49.52	5.53	5.40	4.41	4.44	11.24	11.15	99.23

低聚壳聚糖是高分子化合物, $\text{C}_2\text{—NH}_2$ 被进攻时受空间位阻影响较大。从醛的结构来看, 空间位阻大小依次为水杨醛 > 3,4-二羟基苯甲醛 > 苯甲醛。由此得到相应的反应速率从大到小依次为: 水杨醛 < 3,4-二羟基苯甲醛 < 苯甲醛。而在反应过程中, 羰基碳上的正电荷量对反应收率也有很大的影响。除苯甲醛外的其它醛的苯环上都存在—OH 或—OCH₃ 吸电子取代基, 使得羰基碳上的正电荷密度增加, 所生成席夫碱的稳定性要比苯环上无取代基的苯甲醛强。因此, 综合作用导致了产物取代度大小依次为 3,4-二羟基苯甲醛水杨醛 > 水杨醛 > 苯甲醛。

2.1.2 O-季铵盐低聚壳聚糖席夫碱衍生物的结构表征 实验室制备的 4 种 O-季铵盐低聚壳聚糖席夫碱衍生物的红外光谱图见图 3。

低聚壳聚糖的 ¹HMR 谱图中, δ 为 3.706 ~ 3.922 和 3.096 左右代表糖环中 H 的吸收峰, 其中 δ 为 4.694 ~ 4.791 时非常突出的特征峰为重水中 H 的吸收峰。与低聚壳聚糖的 ¹HMR 谱图相比, 图 3 中 O-季铵盐低聚壳聚糖席夫碱衍生物的谱图, 均在 δ 为 7.0 和 6.5 左右出现了苯环上 H 的吸收峰, 说明其与芳香类化合物发生了改性反应。同时, 还在 δ 为 2.3, 2.7, 3.0 左右出现了分别代表 3-氯-2-羟丙基三甲基

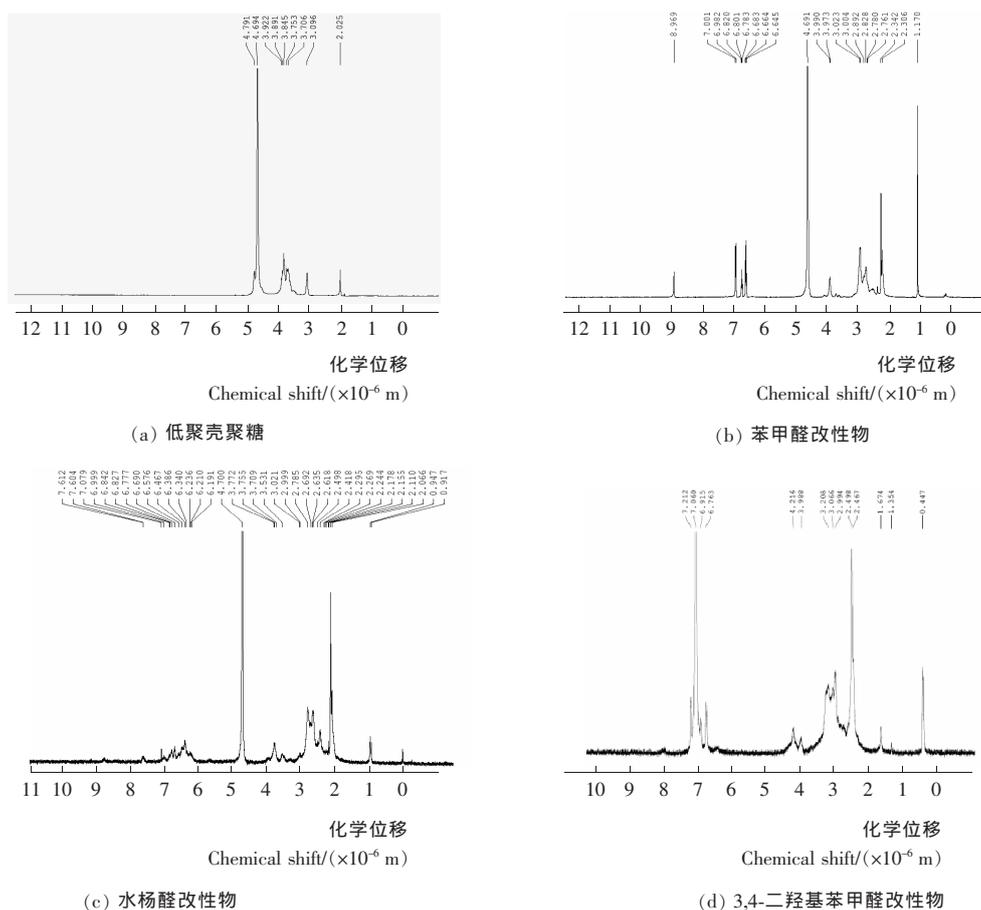


图 3 低聚壳聚糖及其衍生物的¹H NMR 谱图

Figure 3 ¹H NMR of COS and its derivatives

氯化铵结构中 C₁、C₂ 和 C₃ 上 H 的吸收峰, δ 为 3.2 左右为与季 N 相连 CH₃ 中 H 的强吸收峰。这些都表明, 低聚壳聚糖衍生物结构中已经成功接枝了季铵盐。

2.1.3 O-季铵盐低聚壳聚糖席夫碱衍生物的接枝率 由于 NaOH 浓度过高可能会导致低聚壳聚糖降解, 或引起 3-氯-2-羟丙三甲基氯化铵水解, 反应中严格控制体系中 NaOH 的浓度, 造成产物季铵化接枝率仅在 33% 左右(见表 2)。

2.2 O-季铵化低聚壳聚糖席夫碱对细菌的抑制活性研究

不同浓度下的低聚壳聚糖及其 O-季铵盐低聚壳聚糖席夫碱衍生物对这两种常见细菌的抑制活性结果见表 3。

由表 3 可知, 改性后获得的 O-季铵化低聚壳聚糖席夫碱衍生物对大肠杆菌和金色葡萄球菌的抑制活性明显提高, 且浓度越高越明显。以浓度为 0.1% 的 3,4-二羟基苯甲醛改性物为例, 与同浓度低聚壳聚糖溶液相比, 对大肠杆菌的抑

表 3 不同浓度低聚壳聚糖及衍生物对细菌的抑菌圈平均直径

Table 3 Antimicrobial activities of COS and its derivatives with difference concentration

样品	大肠杆菌抑 菌圈/cm			金色葡萄球菌抑 菌圈/cm		
	0.1%	0.05%	0.01%	0.1%	0.05%	0.01%
低聚壳聚糖	1.32	1.01	0.69	1.25	1.00	0.62
苯甲醛改性物	1.51	1.21	0.78	1.49	1.10	0.71
水杨醛改性物	1.58	1.37	0.86	1.61	1.13	0.73
3,4-二羟基苯 甲醛改性物	1.70	1.51	0.87	1.63	1.22	0.75

制活性提高了 28%, 而对金色葡萄球菌抑制活性提高了 30%。就抑菌活性大小而言, 3,4-二羟基苯甲醛改性物 > 水杨醛改性物 > 苯甲醛改性物 > 低聚壳聚糖。

分析认为, 席夫碱结构属于疏水性基团, 根据 Kim 等^[8] 的观点, 携带有疏水性基团的抗菌剂与细菌表面疏水性的磷脂和膜蛋白有较强的亲和力。而季铵盐具有较好的亲水性, 同时也具有较强的抑菌活性, 是目前普遍使用的抑菌剂。因

表 2 O-季铵盐低聚壳聚糖席夫碱的季铵化接枝率
Table 2 DQ of quaternized N-aryl COS derivatives

样品	苯甲醛改性物	水杨醛改性物	3,4-二羟基苯 甲醛改性物
取代度/%	35.12	33.14	33.12

此,低聚壳聚糖经改性修饰含席夫碱结构和接枝季铵盐基团后,其抑菌性能必将大大增强。

席夫碱结构上所连接的苯环属于不饱和烃,苯环上存在的各种取代基团可进一步增强席夫碱结构中 C=N 双键的正电性(即氨基正电性),或本身可能成为抑菌活性中心。这可能是季铵盐接枝率几乎相同的 4 种低聚壳聚糖衍生物抑菌活性存在差距的主要原因。改性用的几种芳香醛的化学结构特点见表 4。

表 4 改性用芳香醛苯环上的取代基团

Table 4 The substituent group of the aromatic aldehyde used

芳香醛种类	酚羟基	
	取代位	数量
苯甲醛	无	0
水杨醛	邻位	1
3,4-二羟基苯甲醛	间位和对位	2

与苯甲醛相比,尽管水杨醛空间位阻较大,但苯环邻位接有 1 个吸电子的羟基(即酚羟基)。羟基不仅有利于提高苯环的吸电子能力,而且酚羟基本身也是抗菌活性基团,它能破坏细胞膜,使蛋白质变性,抑制微生物细胞的呼吸系统和电子传递酶系统活性^[5]。这使得水杨醛改性物抑菌活性强于苯甲醛改性衍生物。3,4-二羟基苯甲醛不仅具有 2 个酚羟基,而且是空间位阻较小的对位和邻位,其拥有较强的抑菌活性说明,低聚壳聚糖席夫碱衍生低聚壳聚糖及其衍生物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制活性差异可能与细菌本身细胞壁结构差异有关。

3 结论

本研究将低聚壳聚糖与芳香醛反应,设计合成了一系列具有不同酚羟基的 O-季铵盐低聚壳聚糖席夫碱衍生物,并

进一步考察了它们对常见细菌的抑制活性。结果发现,合成的 O-季铵盐低聚壳聚糖席夫碱衍生物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制活性明显增强,活性大小依次为 3,4-二羟基苯甲醛改性物>水杨醛改性物>苯甲醛改性物>低聚壳聚糖。抑菌活性构效关系初步研究表明,低聚壳聚糖通过席夫碱结构引入的酚羟基对其抑菌活性有一定贡献,其中空间位阻对酚羟基抑菌活性影响较大,空间位阻较小的间位和对位酚羟基抑菌活性较强。其中酚羟基数量对抑菌活性的贡献,以及芳香醛席夫碱结构中其它取代基团对酚羟基抑菌活性的干扰,尚有待于进一步深入研究。

参考文献

- 1 赛明泽,图布新,唐阳,等. 改性壳聚糖加碘膜的制备与表征[J]. 生物技术,2014,31(1):17~20.
- 2 孙涛,刘华巍,陈春红,等. 低聚壳聚糖与葡萄糖的美拉德反应及其衍生物活性研究[J]. 海洋科学,2012,36(8):79~83.
- 3 刘振儒,赵江霞. 水溶性壳聚糖季铵盐的抗菌性能[J]. 青岛科技大学学报,2007,27(4):317~319.
- 4 赵希荣,夏文水. 二元取代壳聚糖季铵盐的抗菌活性[J]. 食品与微生物技术学报,2006,25(5):55~60.
- 5 唐小辉. 肉桂醛丁香酚及其结构类似物的抑菌活性与化学结构的关系[D]. 湘潭:湘潭大学,2013.
- 6 裴立军,蔡照胜,商士斌,等. 碱性离子液体条件下烷基化壳聚糖衍生物的制备及其抑菌性能研究[J]. 林产化学与工业,2014,34(3):44~50.
- 7 李小芳,冯小强,杨声,等. O-羧甲基化壳聚糖季铵盐的制备及抑菌活性[J]. 食品科学,2011,32(9):79~81.
- 8 Kim Y H, Choi H M, Yoon J H. Synthesis of a quaternary ammonium derivative of chitosan and its application actton antimicrobial finish[J]. Text. Res. J., 1998, 68(6): 428~434.

信息窗

农业部今年将加大打击力度确保农产品质量安全

农业部 1 月 14 日表示,2015 年将继续以违规滥用兽用抗生素、非法屠宰病死畜禽等为重点,严厉打击事关农产品质量安全的各种违法违规行。

农业部部署启动 2015 年国家农产品质量安全例行监测工作,强化春节期间农产品质量安全监管,及时发现隐患,确保农产品消费安全。农业部表示,今年将开展专项整治,保持高压严打态势,加大对农产品质量安全执法检查力度。

去年农业部组织开展了 4 次农产品质量安全例行监测,共监测全国 31 个省(区、市)151 个大中城市 5 大类农产品 117 个品种 94 项指标,抽检样品 43 924 个,总体合格率为 96.9%。其中,蔬菜、畜禽产品和水产品监测合格率分别为 96.3%、99.2%和 93.6%,水果、茶叶合格率分别为 96.8%和 94.8%。

(来源:www.foodmate.net)