

(1 3)-D-葡聚糖的季铵盐合成及其抗菌活性

王天奇 李翰祥 姚进孝 谭天伟*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 来源于 *Penicillium chrysogenum* 的碱溶性 (1 3)-D-葡聚糖与缩水甘油基三甲基季铵盐酸盐 (glycidyl trimethylammonium chloride, GTMAC) 反应, 生成葡聚糖季铵盐。IR 图谱中季铵基团上的甲基的变角振动峰 1480 cm^{-1} 、伸缩振动峰 2872 cm^{-1} 变化明显, $^1\text{H-NMR}$ 表征确定季铵基团在糖环 2、4 位连接。该葡聚糖的最低抑菌浓度对大肠杆菌为 1.0 mg/mL , 对金黄色葡萄球菌为 2.0 mg/mL 。细胞质释放检测结果显示, 葡聚糖季铵盐通过作用于细菌细胞膜而发挥抗菌作用。

关键词: (1 3)-D-葡聚糖; 季铵盐; 抗菌活性; $^1\text{H-NMR}$

中图分类号: TQ455.4

自半个多世纪前 Domagk 发现含有长链烷基的季铵盐具有强力的杀菌性能以来, 阳离子活性杀菌剂的合成一直是杀菌剂研究比较活跃的领域之一。季铵盐的碱性取代基可与微生物细胞膜作用, 具有杀灭细菌、真菌等功效^[1], 在环境、设备表面、医院消毒^[2]和防生涂料等方面具有广泛应用。然而, 由于小分子季铵盐释放速率难以控制, 保护作用寿命较短, 环境毒害较大^[3], 而且存在易挥发, 不易加工, 化学稳定性差等缺点^[4], 高分子合成季铵盐逐渐受到重视。壳聚糖与缩水甘油基三甲基季铵盐酸盐 (GTMAC) 在碱性条件下合成的季铵盐表现出较强的抗菌活性^[5], 魔芋葡甘聚糖季铵盐衍生物的抗菌性能亦有报道^[6]。来源于 *Penicillium chrysogenum* 的 (1 3)-D-葡聚糖^[7], 是一种线性结构的碱溶性葡聚糖, 分子量为 180 kD , 较壳聚糖相比更有利于在碱溶液中与 GTMAC 反应, 本文用碱溶性 (1 3)-D-葡聚糖和 GTMAC, 合成并表征葡聚糖季铵盐, 对其抗菌活性进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验原料、仪器

缩水甘油基三甲基季铵盐酸盐, Fluka 公司;

收稿日期: 2007-01-25

基金项目: 国家自然科学基金 (20636010/50373003/20406002)

第一作者: 男, 1968 年生, 博士生

*通讯联系人

E-mail: tantw@mail.buct.edu.cn

(1 3)-D-葡聚糖, 自制; 大肠杆菌 (ATCC8009), 金黄色葡萄球菌 (ATCC6538), 分别代表革兰氏阴性、阳性菌, 由本院生物工程系提供; 牛肉膏蛋白胨培养基, 北京双旋微生物培养基制品厂; 对照品丁氨基甲酸-3-碘代-2-丙炔基酯与双咪唑烷基脲复配 (Germallplus), 化大化新科技股份有限公司。

核磁共振仪 Bruker AV 600 (Germany), 傅里叶变换红外光谱仪 (Nicolet, USA), 752 分光光度计 (北京分析仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 葡聚糖季铵盐的合成 (1 3)-D-葡聚糖 2.0 g 溶解于 1 mol/L NaOH 溶液 20 mL , 置于 200 mL 圆底烧瓶中, 加 4 mL GTMAC 混匀, 在氮气保护下于 70°C 水浴反应 3 h 。反应结束时加入 3 倍体积冷丙酮, 过滤收集沉淀, 并用冷的 70% 丙酮淋洗至中性, 室温干燥, 用于 NMR 检测, 红外分析和抗菌试验。

1.2.2 红外光谱和 $^1\text{H-NMR}$ 分析 洗涤后充分干燥的样品经 KBr 压片, IR 光谱仪测定, 灵敏度 4 cm^{-1} , 扫描范围 $4000\sim 450\text{ cm}^{-1}$ 。称取 30 mg 样品, 先进行 3 次重氢交换, 冻干, 溶解在 D_2O 中, 在 310 K 条件下, $^1\text{H-NMR}$ 在 600 MHz 采集图谱。

1.2.3 MIC 试验及抑菌活性试验方法 于牛肉膏蛋白胨琼脂斜面 37°C , 培养 24 h 的供试细菌, 接种于液体培养基中, 摇匀, 37°C 培养 18 h , 然后用灭菌的生理盐水稀释成约 $10^6\sim 10^7\text{ CFU/mL}$ 的菌悬液。

最小抑菌浓度 (MIC, minimal inhibitory concentrations) 采用浊度法^[8]测定, 制备含 0.5 mL 菌悬

液,抑菌剂浓度分别为 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 mg/mL 的液体培养基系列。37 °C 培养 24 h 后,用分光光度计测其比浊度。完全抑制细菌生长的试样稀释液浓度为其最低抑菌浓度。

向 250 mL 摇瓶中加入 90 mL 液体培养基, 5 mL 菌悬液, 添加一定量 (5 mL) 葡聚糖季铵盐溶液至其最低抑菌浓度, 以同样浓度的 Germallplus 作对照。摇瓶置于 (36 ± 1) °C 恒温摇床, 180 r/min 振荡, 定时取样 5 mL, 以去离子水为空白参比, 用分光光度计于 650 nm 下测定培养液的浊度 (A_{650}), 以此表征抗菌剂的抗菌活性。

1.2.4 细胞质释放检测 含葡聚糖季铵盐 4 mg/mL 的液体培养基分别培养大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 每 20 min 取样测定 260 nm 下菌液的光吸收。

2 结果与讨论

在碱性条件下, 葡聚糖上的羟基与缩水甘油基季铵盐酸盐上的环氧基团反应, 生成稳定的醚键结构, 从而生成葡聚糖季铵盐。

2.1 红外谱图分析

合成的葡聚糖季铵盐红外谱图如图 1, 在 1480 cm^{-1} 的吸收峰变化明显, 该峰归属于季铵基团上的甲基的变角振动峰^[9]; 2872 cm^{-1} 为甲基的伸缩振动。

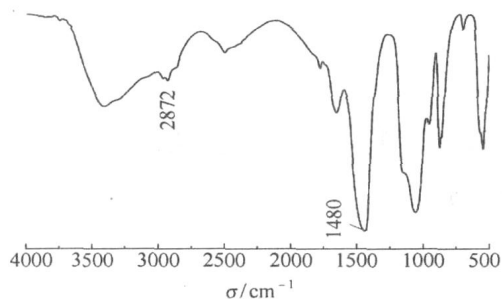


图1 葡聚糖季铵盐的红外谱图

Fig. 1 FT-IR spectrum of quaternary ammonium glucan

2.2 ^1H NMR 解析

葡聚糖季铵盐的 ^1H -NMR 谱图如图 2。季铵基团上的甲基的信号峰 值为 3.20, 而 5.48, 5.57 为结合季铵基团后 (2 位, 4 位), 引起的附近糖环上 1 位 H 电子云发生变化而引起的化学位移改变。各个位置 H 的化学位移归属如图中所示。

2.3 最低抑菌浓度及抑菌活性

经 24 h 培养, 根据 A_{650} 值判断, 该葡聚糖季铵盐对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度分

别为 2.0 和 1.0 mg/mL。Germallplus 浓度 4 mg/mL 对大肠杆菌细菌、金黄色葡萄球菌的抑制作用均达到 100 %。

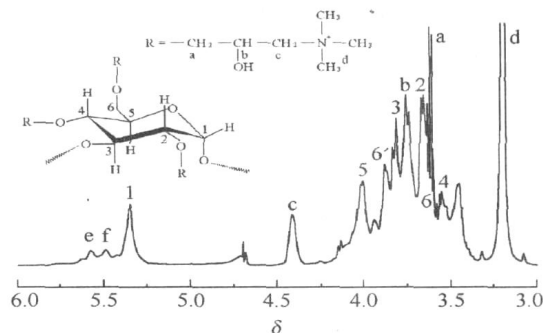


图2 葡聚糖季铵盐的 ^1H -NMR 谱图

Fig. 2 ^1H -NMR spectrum of quaternary ammonium glucan

1.0 mg/mL 的葡聚糖季铵盐和 Germallplus 对大肠杆菌的抑制作用如图 3(a) 所示; 2.0 mg/mL 对金黄色葡萄球菌的抑制作用如图 3(b) 所示。这两项试验均表明, 同样浓度下, 葡聚糖季铵盐的抗菌活性明显优于 Germallplus, 72 h 仍然保持稳定。

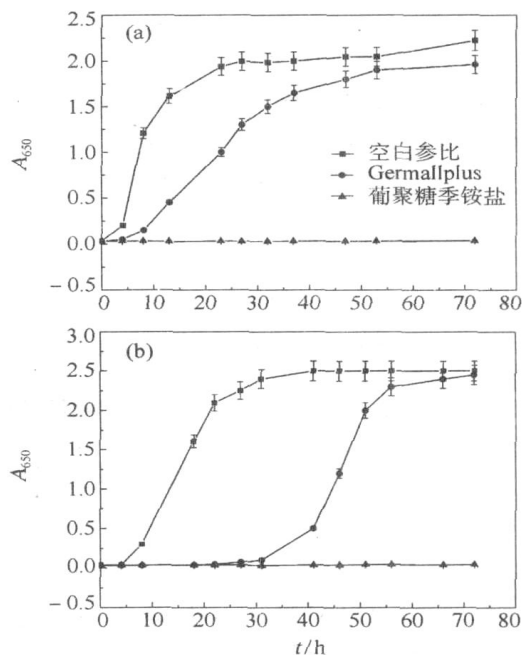


图3 葡聚糖季铵盐及 Germallplus 对大肠杆菌 (a) 和金黄色葡萄球菌 (b) 抗菌活性比较

Fig. 3 Antibacterial activity of quaternary ammonium glucan and Germallplus for *E. coli* (a) and *St. aureus* (b)

由于细胞膜受到破坏后胞内物质将释放到胞外, 而 DNA 和 RNA 的释放量可通过 260 nm 的光吸收来检测, 因此测定 260 nm 下菌液的光吸收来衡量细胞膜的破坏程度。细胞质释放监测结果如图 4 所

示,在 4.0 mg/mL 的药液作用下,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的细胞膜逐渐破坏,经过约 60 min, DNA 和 RNA 释放到细胞外,说明葡聚糖季铵盐通过作用于细菌细胞膜而发挥抗菌作用。

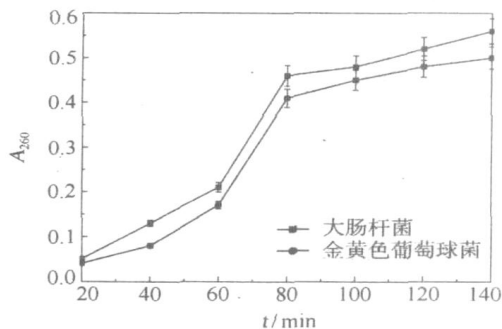


图 4 葡聚糖季铵盐对细菌细胞膜的破坏作用

Fig. 4 Disruption of bacteria membrane by quaternary ammonium glucan

参考文献:

- [1] NURDIN N, HELARY G, SAUVET G. Biocidal polymers active by contact : Ageing of biocidal polyurethane coatings in water[J]. Journal of Application Polymer Science, 1993, 50: 671 - 678.
- [2] MASSIL, GUITTARD F, GERIBALID S, et al. Antimicrobial properties of highly fluorinated bis-ammonium salts[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2003, 21: 20 - 26.
- [3] KENAWY E R, Abdel-Hay F I, El-Shanshoury A E R, et al. Biologically active polymers: Synthesis and antimicrobial activity of modified glycidyl methacrylate polymers having a quaternary ammonium and phosphonium groups[J]. Journal of Controlled Release, 1998, 50: 145 - 152.
- [4] 江山, 王立, 俞豪杰, 等. 新型有机高分子抗菌剂[J]. 高分子通报, 2002(6): 57 - 62.
- [5] JIA Zhishen, SHEN Dongfeng, XU Weiliang. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan[J]. Carbohydrate Research, 2001, 333: 1 - 6.
- [6] 徐霞, 杨秦欢, 陆爱霞, 等. 魔芋葡甘聚糖接枝共聚物的合成及其抗菌活性[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(1): 75 - 78.
- [7] WANG Tianqi, DENG Li, LI Shikun, et al. Structural characterization of a water-insoluble (1, 3)-D-glucan isolated from the *Penicillium chrysogenum* [J]. Carbohydrate Polymer, 2007, 67: 133 - 137.
- [8] 李仲兴, 郑家奇, 李家宏. 临床细菌学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986.
- [9] QIN Caiqin, XIAO Qi, LI Huirong, et al. Calorimetric studies of the action of chitosan-N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride on the growth of microorganisms[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2004, 34: 121 - 126.

Synthesis of quaternary ammonium-glucan and its antibacterial activity

WANG TianQi LI HanXiang YAO JinXiao TAN TianWei

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Quaternary ammonium-glucan has been synthesized by the reaction between glycidyl trimethylammonium chloride (GTMAC) and alkali soluble (1, 3)-D-glucan isolated from *Penicillium chrysogenum*. Quaternary ammonium-glucan showed a methyl C—H bending vibration at 1480 cm^{-1} and stretching vibration at 2872 cm^{-1} in its IR spectrum. The quaternary ammonium group is linked with the 3- and 4-positions in the glucose ring according to $^1\text{H-NMR}$ experiments. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of quaternary ammonium-glucan were 2.0 mg/mL and 1.0 mg/mL for *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Escherichia coli* ATCC8099, respectively. The antibacterial action is associated with an interaction with the cell membrane.

Key words: (1, 3)-D-glucan; quaternary ammonium salt; anti-bacterial activity; $^1\text{H-NMR}$