

硫脲壳聚糖微量银配合物的制备及抑菌活性

孙新枝* 马传利

(青岛农业大学化学与药学院 青岛 266109)

摘要 由硫脲壳聚糖和微量的 AgNO_3 反应得到硫脲壳聚糖- Ag^+ 配合物。通过红外光谱对其结构进行了表征。研究了壳聚糖、硫脲壳聚糖、硫脲壳聚糖- Ag^+ 配合物及 AgNO_3 对大肠杆菌和金黄葡萄球菌的抑菌活性,并测定了其最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)。结果表明,硫脲壳聚糖- Ag^+ 配合物的抑菌活性强于壳聚糖和硫脲壳聚糖,且其 MIC 和 MBC 均为 100 mg/L(游离 Ag^+ 含量为 0.032 mg/L),低于 AgNO_3 的 MIC 和 MBC(均为 120 mg/L)。

关键词 壳聚糖,硫脲壳聚糖,抑菌活性,微量 Ag^+

中图分类号:O636.1

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2013)06-0633-05

DOI:10.3724/SP.J.1095.2013.20356

银或者银离子具有高的抗菌活性^[1-2],广泛应用于医学领域^[3]。壳聚糖-银离子配合物具有一定的抗菌活性^[4]。但是由于银离子及壳聚糖-银离子配合物^[5]均不稳定,限制了其在医学上的应用。据 Chen 等^[6]报道,日常生活中常用的防腐保鲜剂二乙酸钠和苯甲酸钠的最低抑菌浓度(MIC)分别是硫脲壳聚糖银配合物的 100 倍和 200 倍。这是因为硫脲基团的存在使硫脲壳聚糖能很好的与金属离子螯合,而达到很好的抑菌效果^[7-8]。

本文合成了硫脲壳聚糖微量银配合物,首次系统地测定了壳聚糖、硫脲壳聚糖、硫脲壳聚糖微量银配合物以及 AgNO_3 的 MIC 和 MBC。与文献^[6]相比,参与反应 AgNO_3 的用量(0.002 g)更小,降低了硫脲壳聚糖微量银配合物中自由 Ag^+ 的含量,减少了环境污染,对生物体的毒副作用很小;同时分析了不同物质 MIC 和 MBC 的差别原因,可以为有选择性地对壳聚糖进行改性以制备高抑菌活性的壳聚糖基衍生物提供指导。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

壳聚糖(CTS,浙江玉环海洋生物化学有限公司),脱乙酰度 92.5%,相对分子质量 1.1×10^5 ;细菌菌种大肠杆菌(*E. coli*, ATCC25922)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*, ATCC29213)均由青岛农业大学食品科学学院提供。硫脲、硝酸银(天津化学试剂公司),分析纯;乙酸、乙醇、丙酮等其它试剂均为分析纯。

IR200 型傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo 公司),KBr 压片;HK TG-DTA 型分析仪(北京恒久科学仪器厂),以 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 为参比,升温速率 $10^\circ\text{C}/\text{min}$;AA-6800 型原子吸收分光光度计(日本 Shimadzu 公司),火焰法,Ag 灯测定。

1.2 硫脲壳聚糖(TU-CTS)的制备

按文献^[6]方法,将 15.2563 g(0.1 mol)硫氰酸氨和 16.1903 g(0.2 mol)壳聚糖及 150 mL 无水乙醇加入到三颈烧瓶中,室温回流磁力搅拌反应 12 h,产物冷却至室温,过滤、反复用无水乙醇洗涤,将过滤物溶于 500 mL 体积分数为 1% 乙酸溶液中,溶解均匀后,在快速搅拌下缓慢加入质量分数为 10% NaOH 溶液形成沉淀,过滤,沉淀用蒸馏水洗至中性,50 $^\circ\text{C}$ 干燥,得到硫脲壳聚糖。

1.3 硫脲壳聚糖-Ag⁺配合物的制备

将0.4109 g 硫脲壳聚糖溶于50 mL 体积分数为1% 乙酸溶液中。将10 mL 质量浓度为0.2 g/L AgNO₃溶液缓慢加入溶解均匀的硫脲壳聚糖乙酸溶液中,同时用黑色物品将烧瓶遮光防止Ag⁺被还原,室温下搅拌反应4 h后,向反应液中加入丙酮,析出白色沉淀,用95% 乙醇多次洗涤沉淀,过滤,用1 mol/L NaCl 检验滤液中是否有Ag⁺残留。50 ℃干燥,得到硫脲壳聚糖-Ag⁺配合物。用原子吸收分光光度计测定Ag⁺质量分数。在硫脲壳聚糖-Ag⁺配合物中被吸附Ag⁺的量为0.32 mg/g。

1.4 纸片琼脂扩散法测定抑菌活性

将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌用营养琼脂平板培养基进行活化后,取其中一环于生理盐水中充分震荡制成菌悬液,通过平板计数法^[9],确定菌悬液的稀释度,使菌悬液所含活菌量为10⁵~10⁶ CFU/mL。

用体积分数为1% HAc 溶液配制质量浓度为5 g/L 壳聚糖、硫脲壳聚糖和硫脲壳聚糖-Ag⁺配合物溶液,对照组用无菌水配制1.6 mg/L AgNO₃溶液(相当于硫脲壳聚糖-Ag⁺配合物中游离Ag⁺的量)和体积分数为1% HAc 溶液。

按文献[7]方法,将6 mm 灭菌圆形滤纸片浸入上述各溶液,充分浸泡后用无菌镊子将滤纸片放在已均匀涂布菌悬液的平板上,每皿放3片,每个浓度做5组平行,放入37 ℃培养箱中倒置培养16~48 h。十字交叉法测量抑菌圈直径,取平均值。

1.5 液体培养基稀释法测定最低抑菌浓度和最低杀菌浓度

采用液体培养基稀释法^[10]测定最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)。将灭菌后的10 mL 液体培养基与一定体积不同浓度的样品溶液混合,加入100 μL 菌悬液(10⁵~10⁶ CFU/mL),将样品稀释至一定浓度。以不加样品不加菌悬液的培养基为阴性对照,以不加样品加菌悬液的培养基为阳性对照。37 ℃下,摇床震荡培养16~48 h后观察,开始澄清的浓度为MIC;取100 μL 澄清液涂在平板上,置入37 ℃培养箱中培养16~48 h,以无菌生长的起始浓度作为MBC。

2 结果与分析

2.1 硫脲壳聚糖-Ag⁺配合物的表征

2.1.1 红外光谱 CTS、TU-CTS 和 TU-CTS-Ag⁺配合物的红外光谱如图1所示。CTS 中位于3446 cm⁻¹左右的N—H 和O—H 缔合峰,改性后发生位移且峰形变窄。CTS 中位于1664 cm⁻¹处较强的酰胺吸收峰和1599 cm⁻¹左右的一NH₂面内弯曲振动吸收峰^[11],在TU-CTS 中分别位移至1638 和1616 cm⁻¹处,峰形变窄;且TU-CTS 在1493 cm⁻¹处出现弱的新峰,表明在CTS 结构中的一NH₂上接入了硫脲基团^[12]。与TU-CTS 相比,TU-CTS-Ag⁺的红外光谱在613 cm⁻¹^[13]、825.4 cm⁻¹^[14]处出现新的吸收峰,归属为S—Ag伸伸缩振动峰。

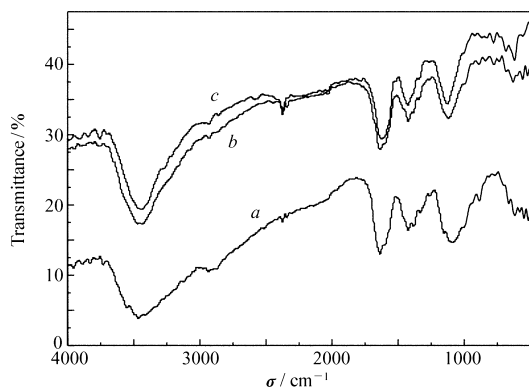


图1 壳聚糖(a)、硫脲壳聚糖(b)和硫脲壳聚糖-Ag⁺配合物(c)的红外光谱

Fig.1 IR spectra of CTS(a), TU-CTS(b) and TU-CTS-Ag⁺(c)

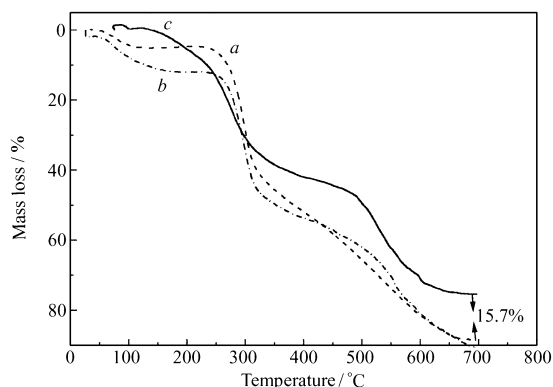


图2 壳聚糖(a)、硫脲壳聚糖(b)和硫脲壳聚糖-Ag⁺(c)的TGA曲线

Fig.2 TGA curves of CTS(a), TU-CTS(b) and TU-CTS-Ag⁺(c)

2.1.2 热重分析 CTS、TU-CTS 和 TU-CTS-Ag⁺ 的 TGA 如图 2 所示。壳聚糖和硫脲壳聚糖的的初始分解温度均为 303 ℃,与文献^[13]所报道的数据吻合,高于硫脲壳聚糖-Ag⁺ 配合物的初始分解温度(285 ℃)。TU-CTS-Ag⁺ 失重 5% 的温度(185.6 ℃)明显高于 CTS(123 ℃)和 TU-CTS(91.5 ℃)。可见 TU-CTS-Ag⁺ 的热稳定性高于 CTS 和 TU-CTS。700 ℃ 时壳聚糖与硫脲壳聚糖的失重率(91.1%)和硫脲壳聚糖-Ag⁺ 配合物的失重率(75.4%)相差 15.7%。

2.2 抑菌活性

2.2.1 纸片琼脂扩散法测定抑菌活性 如表 1 所示,用体积分数为 1% HAc 溶解的壳聚糖、硫脲壳聚糖和硫脲壳聚糖-Ag⁺,对大肠杆菌和金黄葡萄球菌的抑菌圈直径均大于 7 mm,说明有抑菌效果。硫脲壳聚糖的抑菌圈直径比壳聚糖的小,可能是硫脲壳聚糖中自由氨基减少,能够形成的阳离子减少,抑菌效果稍差。硫脲壳聚糖-Ag⁺ 配合物的抑菌圈直径远远大于壳聚糖和硫脲壳聚糖的抑菌圈直径,甚至比 AgNO₃ 的还大,说明硫脲壳聚糖-Ag⁺ 配合物的抑菌效果不仅仅是 Ag⁺ 的作用,还有壳聚糖中游离氨基形成的阳离子正电荷起到的协同作用。

表 1 不同样品对大肠杆菌和金黄葡萄球菌的抑菌圈直径
Table 1 Inhibition zone diameters of different samples against *E. coli* and *St. aureus*

	Inhibition zone diameters/mm				
	HAc	CTS	TU-CTS	AgNO ₃	TU-CTS-Ag ⁺
<i>E. coli</i>	6.5	8.0	7.0	10.5	11.0
	6.5	7.8	7.3	10.8	12.0
	6.3	7.7	7.3	10.5	12.2
<i>St. aureus</i>	6.2	7.0	7.0	10.0	11.5
	6.1	7.3	7.6	10.5	12.0
	6.2	7.5	7.4	9.4	11.8

2.2.2 液体培养基稀释法测定 MIC 和 MBC MIC 定义为体外培养细菌 18~24 h 后能抑制培养基内细菌生长的最低浓度。MBC 定义为某抗菌药物杀灭接种检测菌量的 99.9% 以上的最低药物浓度^[10]。由表 2 可以看出,AgNO₃ 对大肠杆菌和金黄葡萄球菌的 MIC 和 MBC 均为 120 mg/L,与 Wang^[15] 的报道接近。而壳聚糖对大肠杆菌和金黄葡萄球菌的 MIC 均为 500 mg/L, MBC 分别为 525 和 550 mg/L,这与 Chen^[6] 报道的结果基本相吻合,但是与 Wei 等^[5]、Sudarshan 等^[16]、Wang 等^[15] 和 Ali 等^[17] 所报道的 MIC 均有明显差异,其原因可能是所用壳聚糖的来源、相对分子质量、粘度、溶液 pH 值以及所用培养基的不同。不同银含量硫脲壳聚糖-Ag⁺ 配合物的 MIC 和 MBC 不同,说明配合物中的 Ag⁺ 具有抑菌和杀菌作用。将硫脲壳聚糖-Ag⁺ 中 Ag⁺ 的含量换算成自由 Ag⁺,其质量浓度为 0.032 mg/L,比 AgNO₃ 中自由 Ag⁺ 的质量浓度小很多,这样小的 Ag⁺ 含量对环境的污染和对人的伤害很小。进一步说明了硫脲壳聚糖-Ag⁺ 具有的抑菌和杀菌作用不仅仅是 Ag⁺ 的作用,还与壳聚糖分子中游离氨基形成的阳离子的协同作用有关。

表 2 不同样品对大肠杆菌、金黄葡萄球菌的 MIC 和 MBC
Table 2 MIC and MBC values of samples against *E. coli* and *S. aureus*

		CTS	TU-CTS	TU-CTS-Ag ⁺ (m(AgNO ₃)=0.002 g)	TU-CTS-Ag ⁺ (m(AgNO ₃)=0.01 g)	CS-AgNP ^[18]	Ag-CS-nano ^[17]	AgNO ₃
<i>E. coli</i>	MIC/(mg·L ⁻¹)	500/48 ^[5] /500 ^[6] / 500 ^[15] /100 ^[17]	625	100	25/25 ^[6]	2.2	—	120
	MBC/(mg·L ⁻¹)	525/48 ^[5]	650	100	25			120
<i>S. aureus</i>	MIC/(mg·L ⁻¹)	250/100 ^[17] / 250 ^[15] /24 ^[5]	650	100	25/25 ^[6]	2.6	10	120
	MBC/(mg·L ⁻¹)	250/250 ^[15] / 24 ^[5] /500 ^[6]	650	100	25			120

金属银离子本身具有强的抑菌和杀菌能力。如果直接使用 Ag⁺ 作为抑菌剂,存在重金属离子残留

的问题,能加速渗入细胞内部,与有机物形成配合物或盐,将干扰各种酶的作用,最后导致细胞的死亡^[19];而使用硫脲壳聚糖- Ag^+ 作为抑菌剂,具有和游离 Ag^+ 相同的抑菌能力,但其中游离 Ag^+ 的含量更低,仅为0.032 mg/L,且无以上副作用。

3 结 论

将微量(0.002 g) AgNO_3 加入0.4 g 硫脲壳聚糖中反应生成硫脲壳聚糖- Ag^+ 配合物。纸片琼脂扩散法抑菌实验表明,硫脲壳聚糖- Ag^+ 配合物的抑菌能力远大于单一的壳聚糖和硫脲壳聚糖,是银离子和壳聚糖中氨基阳离子的协同作用所致;通过液体培养基稀释法测定的硫脲壳聚糖- Ag^+ 配合物的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)均为100 mg/L,小于壳聚糖和硫脲壳聚糖;与等量游离 Ag^+ 的抑菌能力相比更强。其中游离 Ag^+ 的含量仅为0.032 mg/L,对生物体的毒副作用很小。

参 考 文 献

- [1] Feng Q L, Wu J, Chen G Q, *et al.* A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, **52**:662-668.
- [2] McDonnell G, Russell A D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance[J]. *Clinic Microbiol Rev*, 1999, **12**:147-179.
- [3] Kang H Y, Jung M J, Jeong Y K. Antibacterial Activity and the Stability of an Ag^+ Solution Made Using Setallic Silver[J]. *Korean J Biotechnol Bioeng*, 2000, **15**:521-524.
- [4] Zhan X J, Xiong Y Z, Liu Z, *et al.* Synthesis of Silver Carboxymethyl Chitosan and Its Experimental Study on Its Bacteriostasis[J]. *China J Biochem Pharmacol*, 2002, **22**(3):142-144.
- [5] Wei D W, Sun W Y, Qian W P, *et al.* The Synthesis of Chitosan-based Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Activity [J]. *Carbohydr Res*, 2009, **344**:2375-2382.
- [6] Chen S P, Wu G Z, Zeng H Y. Preparation of High Antimicrobial Activity Thiourea Chitosan- Ag^+ Complex[J]. *Carbohydr Polym*, 2005, **60**:33-38.
- [7] LI Xiaofang, FENG Xiaoqiang, YANG Sheng, *et al.* Preparation, Characterization and Antibacterial Activity of Thiourea-chitosan-copper(II) Complex[J]. *Food Sci*, 2011, **7**(32):57-60(in Chinese).
李小芳,冯小强,杨声,等. 硫脲壳聚糖-Cu配合物的制备、表征及其抑菌活性[J]. 食品科学, 2011, **7**(32):57-60.
- [8] FENG Xiaoqiang, LI Xiaofang, YANG Sheng, *et al.* Preparation, Antibacterial Activities of Thiourea-Chitosan-Co(II) Complex and Interaction with Bovine Serum Albumin[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2011, **28**(9):1012-1016(in Chinese).
冯小强,李小芳,杨声,等. 硫脲壳聚糖 Co(II)配合物的制备、抑菌活性及与血清白蛋白的作用[J]. 应用化学, 2011, **28**(9):1012-1016.
- [9] LI Hua. Improvement Method of Fflat Colony Counts[J]. *Bull Biol*, 2006, **43**(1):51-52(in Chinese).
李华. 平板菌落计数的改进方法[J]. 生物学通报, 2006, **43**(1):51-52.
- [10] XU Shuyun, BIAN Rulian, CHEN Xiu, *et al.* Methodology of Pharmacological Experiment Handbook[M]. Beijing: People's Medical Press, 2001:1651-1653, 1657-1662(in Chinese).
徐淑云,卞如濂,陈修,等. 药理实验方法学手册[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001:1651-1653, 1657-1662.
- [11] Pearsom F G, Marchessault R H, Liang C Y. Infrared Spectra of Crystalline Polysaccharides. V. Chitin[J]. *J Polym Sci*, 1960, **43**(141):101-116.
- [12] Padhye S. Transition Metal Complexes of Semicarbazones and Thiosemicarbazones[J]. *Coord Chem Rev*, 1985, **63**:127-135.
- [13] LI Ming, ZHAO Beijun, ZHU Shifu, *et al.* IR Spectra Studies of AgGaS_2 Single Crystal[J]. *J Funct Mater*, 2004, **35**:3387-3389(in Chinese).
黎明,赵北君,朱世富,等. AgGaS_2 晶体红外光谱的研究[J]. 功能材料, 2004, **35**:3387-3389.
- [14] Lobana T S, Bhargava G, Sharma V, *et al.* Thiosemicarbazones of Silver(I): Synthesis, Spectroscopy and Reactivity Towards Triphenylphosphine[J]. *Indian J Chem*, 2003, **42a**:309-312.
- [15] Wang X H, Du Y M, Fan L H, *et al.* Chitosan-Metal Complexes as Antimicrobial Agent; Synthesis, Characterization and Structure-activity Study[J]. *Polym Bull*, 2005, **55**:105-113.
- [16] Sudarshan N R, Hoover D, Knorr G D. Antibacterial Action of Chitosan[J]. *Food Biotechnology*, 1992, **6**(3):257-272.
- [17] Ali S W, Rajendran S, Joshi M. Synthesis and Characterization of Chitosan and Silver Loaded Chitosan Nanoparticles for Bioactive Polyester[J]. *Carbohydr Polym*, 2011, **83**:438-446.
- [18] Sanpui P, Murugadoss A, Durga Prasad P V, *et al.* The Antibacterial Properties of a Novel Chitosan-Ag-nanoparticle

Composite[J]. *Int J Food Microbiol*,2008,**124**:142-146.

[19] KANG Zhanying,LI Ruizeng,CHE Chengbin. The Mode of the Fungicidal Action of Heavy Metal Ions[J]. *J Harbin Univ Sci Technol*,1995,**19**(3):103-105(in Chinese).

康湛莹,李瑞增,车承斌. 重金属离子杀菌作用的机理[J]. 哈尔滨科学技术大学学报,1995,**19**(3):103-105.

Preparation and Antimicrobial Activity of Thiourea Chitosan- Ag^+ Complex

SUN Xinzhi*, MA Chuanli

(College of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract Thiourea(TU) chitosan(CTS)- Ag^+ complex was prepared by the reaction of thiourea chitosan with a trace amount of silver ion in homogeneous solution, and was characterized by FT-IR. Antimicrobial activities of CTS, TU-CTS, TU-CTS- Ag^+ complex and AgNO_3 were evaluated against *E. coli* and *S. aureus* *in vitro*, and the minimum inhibition concentration(MIC) and the minimum bactericidal concentration(MBC) were determined. The results show that the complex has stronger antimicrobial activities than chitosan and thiourea chitosan. The MIC and MBC of thiourea chitosan Ag^+ complex are both 100 mg/L(free silver ion content 0.032 mg/L), lower than the MIC and MBC for AgNO_3 , which are both 120 g/L.

Keywords chitosan, thiourea chitosan, antimicrobial activity, trace amounts of silver ion

第十三届应用化学年会组委会第一轮通知

由中国化学会应用化学专业委员会主办,中国科学院长春应用化学研究所承办的“应用化学与社会和谐发展”第十三届全国应用化学年会将于2013年8月23~26日在长春召开,这是中国应用化学界学者的一次盛会。本届学术会议旨在促进应用化学的学术交流与发展。届时来自全国各地的著名科学家及青年学者将汇聚一堂,报道应用化学领域的最新研究成果,研讨应用化学领域的发展趋势、学科前沿与研究热点。热诚欢迎各高等院校、科研院(所)以及企事业单位的科研、工程技术人员和管理人员与研究生踊跃参加。

会议主题:(A)应用化学与环境友好材料;(B)应用化学与绿色储能及转换材料;(C)应用化学与社会安全;(D)应用化学与化工新材料;(E)应用化学与教育;(F)应用化学企业论谈。

征文要求:(1)符合会议主题、未公开发表的论文均可应征。(2)应征论文须提供1~2页中文摘要,同时接受英文撰写稿件。组委会聘请专家对论文进行审核,录用后,将发通知告知作者。优秀论文将推荐在《应用化学》发表。(3)应征论文请用E-mail投到《应用化学》编辑部邮箱 yyhxn@ciac.jl.cn,投稿时主题中请注明论文所属征文范围(征文领域编号)。征文请用Word文件保存以便编排收录在光盘中。版面24 cm×16 cm(A4纸),作图尺寸8 cm×6 cm,论文标题用小二号黑体;作者用小四号仿宋体(报告人用下划线标明),工作单位、邮编及摘要均用小五号宋体,正文均用五号宋体,采用单倍行距。(4)摘要首页脚注注明通讯作者职称、电话、E-mail和简介。

会议联系地址:长春市人民大街5625号 中国科学院长春应用化学研究所 2013年全国应用化学年会秘书组

邮编:130022 E-mail:yyhxn@ciac.jl.cn 联系人:孙智权 电话:0431-85262016 传真:0431-85262881

详情请登录 <http://www.ciac.jl.cn/yyhxn>