

## 壳聚糖铜(II)配合物的制备及其抑菌性能

冯小强<sup>1</sup>, 李小芳<sup>1</sup>, 伏国庆<sup>2</sup>, 杨声<sup>1,\*</sup>, 王廷璞<sup>1</sup>

(1.天水师范学院生命科学与化学学院, 甘肃天水 741001;

2.天水市中医医院, 甘肃天水 741001)

**摘要:**制备了水溶性壳聚糖与 Cu(II) 的配合物, 运用 FT-IR、UV、TG-DTA 对壳聚糖铜配合物进行了表征, 考察了壳聚糖铜(II) 配合物对 *E.coli*、*St.aureus* 的抑菌性能。结果表明: Cu(II) 能与水溶性壳聚糖较好地配位, 其配合物对 *E.coli* 和 *St.aureus* 均有显著的抑菌性能, 水溶性壳聚糖铜配合物与水溶性壳聚糖对 *E.coli* 和 *St.aureus* 的抑菌性能之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

**关键词:**水溶性壳聚糖, 壳聚糖铜配合物, 表征, 抑菌性能

## Study on synthesis, characterization and antibacterial activity of chitosan-Cu(II)

FENG Xiao-qiang<sup>1</sup>, LI Xiao-fang<sup>1</sup>, FU Guo-qing<sup>2</sup>, YANG Sheng<sup>1,\*</sup>, WANG Ting-pu<sup>1</sup>

(1.College of Biology and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China;

2.Tianshui Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tianshui 741001, China)

**Abstract:** Chitosan-Cu(II) was synthesized by the reaction between water-soluble chitosan and cupric chloride in acidic medium. The structure of chitosan-Cu(II) complex was characterized by IR, UV and TG-DTA. Moreover, the antibacterial activity of Chitosan-Cu(II) toward *E.coli* and *St.aureus* were tested in vitro. The results showed that Cu(II) had chelated with chitosan, and which had by far better antibacterial activity than water-solubility chitosan alone ( $P < 0.05$ ).

**Key words:** water-soluble chitosan; chitosan-Cu(II); characterization; antimicrobial activity

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)07-0119-03

近年来, 壳聚糖(chitosan, CTS)对金属离子的吸附性能研究和应用空前活跃<sup>[1]</sup>。壳聚糖具有广谱抗菌性, 对人体无毒副作用<sup>[2]</sup>, 研究表明, 由于其单独使用时存在机械强度差的缺点, 而在一定程度上限制了它的应用<sup>[3]</sup>。另外, 重金属离子具有较好的抑菌性能<sup>[4]</sup>。本文以水溶性壳聚糖(water-soluble chitosan)为配体, 与氯化铜在酸性介质中反应, 制备了壳聚糖铜配合物[CTS-Cu(II)]。运用红外光谱(FT-IR)、紫外光谱(UV)、差热-热重(TG-DTA)对CTS-Cu(II)的结构进行了表征, 以期研制一种壳聚糖重金

属离子吸附剂, 来清除人体内过量的Cu(II), 同时为新型杀菌剂的合成以及食品防腐剂的合成提供新的途径和理论依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料与仪器

水溶性壳聚糖 济南海德贝海洋生物工程有限公司; CuCl<sub>2</sub>、95%乙醇、无水乙醇及其它试剂 均为国产分析纯; 大肠杆菌(*Eschetichia coli*, *E.coli*) ATCC 35218、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *St.aureus*) ATCC 26113 由天水市中医医院化验科提供。

ALVD4F-02 型台式冷冻高速离心机 Beckman coul-tercoulter; 2K-82A 型真空干燥箱 上海实验仪器总厂; DSX-280B 型不锈钢自动手提式压力蒸汽灭菌锅 上海申安医疗器械厂; ZDP-2120 型全自动新

收稿日期: 2008-11-07 \* 通讯联系人

作者简介: 冯小强(1980-), 男, 讲师, 主要从事天然高分子生物活性研究。

基金项目: 天水师范学院物理无机化学重点学科资助项目及天水师范学院院立项目。

[8] 艾志录, 王育红. 苹果渣中多酚物质的抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 160~163.

[9] Free radical-scavenging capacity and inhibitory activity on rat erythrocyte hemolysis of fertloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fiber [J]. LWT, 2005, 38: 877~883.

[10] 项光亚, 杨瑜, 阮金兰, 等. 金丝桃抗脂质过氧化作用研究[J]. 同济医科大学学报, 2001, 30(3): 211~213.

[11] Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban [J]. Food Chemistry, 2003, 575~581.

型电热培养箱 上海智城分析仪器制造有限公司; UV-9200 型紫外可见分光光度计 北京瑞利分析仪器公司; UV-9200 紫外光谱仪 北京瑞利; Perkin Elmere TG-DTA 分析仪 Pyris Diamond Analyzer; ZHJH-2109B 超净工作台, Spectrum One 傅立叶红外光谱仪。

## 1.2 实验方法

1.2.1 壳聚糖铜配合物的制备 取 1.0g 水溶性壳聚糖加入到 100mL 0.1mol/L 的  $\text{CuCl}_2$  溶液中, 在 pH3.5 的条件下搅拌 8h。抽滤后, 用蒸馏水淋洗至无  $\text{Cl}^-$  检出, 无水乙醇洗涤至无  $\text{Cl}^-$ , 真空干燥, 得蓝色粉末状产物。

1.2.2 壳聚糖铜配合物的表征

1.2.2.1 红外吸收光谱测定 采用 Spectrum One 傅立叶红外光谱仪 (Perkin Elmere), KBr 压片法测定 CTS 及 CTS-Cu(II) 的红外吸收光谱, 扫描波长范围为 400~4000 $\text{cm}^{-1}$ 。

1.2.2.2 紫外吸收光谱测定 分别以重蒸水和 0.3% (v/v) 盐酸溶液为试剂空白, 于 200~500nm 波长范围内测定 CTS 及 CTS-Cu(II) 配合物的紫外吸收光谱。

1.2.2.3 差热-热重分析 采用 Perkin Elmere TG-DTA 分析仪 (Pyris Diamond Analyzer), 以  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  为参比, 升温速率 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ , 对 CTS 及 CTS-Cu(II) 配合物进行热力学分析。

1.2.3 菌悬液的制备 各挑取一环标准 *E.coli* 与 *St.aureus* 菌株, 无菌条件下在牛肉膏蛋白胨培养基上划线进行纯培养。再把已活化的 *E.coli* 与 *St.aureus* 各挑取一环, 分别用生理盐水洗下菌苔, 稀释菌液至  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.001$ , 标号备用。

1.2.4 壳聚糖铜配合物的抑菌性能测定 CTS-Cu(II) 用 0.3% (v/v) 盐酸溶液加热溶解, 配成 20g/L 的溶液, 灭菌后加入无菌牛肉膏蛋白胨培养基中<sup>[5]</sup> 倒平板, 使药品最终浓度分别为 2.0、1.75、1.5、1.25、1.0、0.5、0.25mg/mL, 对照为 0.3% 的盐酸。每个平板接种 0.1mL 已备好的菌悬液, 每组平行做两个。37 $^\circ\text{C}$  培养, *E.coli* 培养 24h, *St.aureus* 培养 48h, 统计平板生长的菌落数。抑菌率% = (对照菌落数 - 各药品浓度下的菌落数) / 对照菌落数  $\times 100\%$

## 2 结果与讨论

### 2.1 红外吸收光谱 (FT-IR)

CTS 和 CTS-Cu(II) 的红外光谱如图 1 所示。3400 $\text{cm}^{-1}$  左右是形成氢键缔合的 -OH 与 -NH<sub>2</sub> 的伸缩振动吸收峰, 在 CTS-Cu(II) 中该缔合峰由 3422 $\text{cm}^{-1}$  移向 3442.99~3632.96 $\text{cm}^{-1}$ 。CTS 中的 N-H 吸收峰为 1590.85 $\text{cm}^{-1}$ , 在配合物中吸收峰消失, 说明 -NH<sub>2</sub> 发生了配位。1381.20 $\text{cm}^{-1}$  是酰胺 II 谱带, 在配合物中移动至 1385.26 $\text{cm}^{-1}$ 。壳聚糖伯、仲羟基吸收分别在 1091.03 $\text{cm}^{-1}$  和 1155.29 $\text{cm}^{-1}$  处。CTS 的 -OH 的吸收峰在配合物中由 1322.40 $\text{cm}^{-1}$  位移至 1325.09 $\text{cm}^{-1}$ 。CTS 中 C-O-C 的吸收峰 1155.29 $\text{cm}^{-1}$  在配合物中移动至 1160.5 $\text{cm}^{-1}$ 。C-O 键的不对称伸缩振动由原来的 1091.03 $\text{cm}^{-1}$  移至 1062.01 $\text{cm}^{-1}$  处, 且峰形变宽, 吸收变弱, 说明壳聚糖上的仲羟基也可能

参与了配位。1630 $\text{cm}^{-1}$  处的乙酰氨基的特征吸收峰在配合物中向高波数 1663 $\text{cm}^{-1}$  移动, 说明乙酰氨基参与了配位。另外, CTS-Cu(II) 配合物在 546.97 $\text{cm}^{-1}$  处出现了一个新的吸收峰, 这是 N-Cu(II) 的吸收峰。以上说明壳聚糖分子中的氨基、乙酰氨基、羟基均参与了配位。

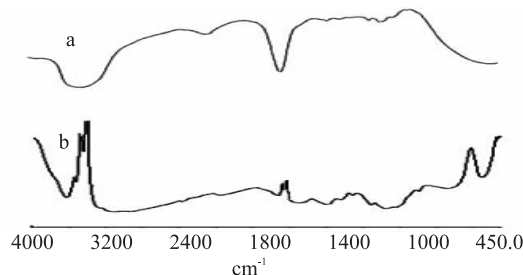


图 1 CTS(a) 和 CTS-Cu(II) (b) 的红外光谱分析

### 2.2 紫外吸收光谱 (UV)

如图 2 所示, CTS 在扫描范围内无吸收峰出现, CTS-Cu(II) 在 200.12nm 处有一强的吸收峰且峰形较窄。由此可证明 Cu(II) 与 CTS 发生了配位反应, 且 C-N 键由于 -NH<sub>2</sub> 与 Cu(II) 的结合, 在一定程度上使该键有所削弱, 从而可推断 -NH<sub>2</sub> 是 CTS 分子中的主要配位部位<sup>[5-7]</sup>。

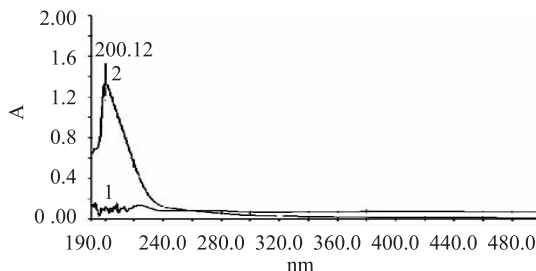


图 2 CTS(1) 和 CTS-Cu(II) (2) 的紫外吸收光谱

### 2.3 差热-热重分析 (TG-DTA)

由图 3 可知, CTS 的差热曲线分为三个变化阶段: 第一阶段, CTS 放热, 放热峰为 59.0 $^\circ\text{C}$ ; 第二阶段, 吸热峰为 235.8 $^\circ\text{C}$ , 放热峰为 202.1 $^\circ\text{C}$ ; 第三阶段, 吸热峰为 676.0 $^\circ\text{C}$ , 放热峰为 440.2 $^\circ\text{C}$ 。壳聚糖与铜形成配合物后, 吸热和放热峰都发生了较大的变化, 在第一阶段, 放热峰由 59.0 $^\circ\text{C}$  移动至 70.9 $^\circ\text{C}$ ; 第二阶段, 吸热峰消失, 放热峰则移至 200.4 $^\circ\text{C}$ ; 第三阶段, 吸热峰发

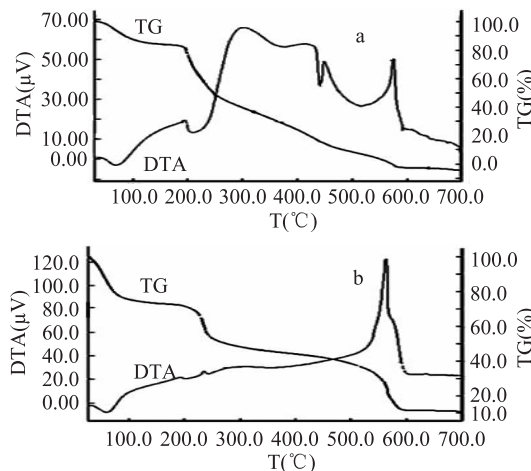


图 3 CTS(a) 和 CTS-Cu(II) (b) 的 TG-DTA 曲线

表1 CTS和CTS-Cu(II)对*E.coli*抑菌性能的测试

浓度 (mg/mL)	壳聚糖平板菌落数 (个)	壳聚糖抑菌率 (%)	配合物平板菌落数 (个)	配合物抑菌率 (%)	差数 d	d <sup>2</sup>
2.0	0	100	0	100	0	0
1.75	0	100	0	100	0	0
1.5	5	98	0	100	5	25
1.25	79	72	31	89	48	2304
1.0	108	62	87	69	21	441
0.75	145	49	128	56	17	289
0.5	193	33	176	39	17	289
0.25	256	10	241	17	15	225
0	286	0	290	0	4	16
Σ					127	3589

表2 CTS和CTS-Cu(II)对*St.aureus*抑菌性能的测试

浓度 (mg/mL)	壳聚糖平板菌落数 (个)	壳聚糖抑菌率 (%)	配合物平板菌落数 (个)	配合物抑菌率 (%)	差数 d	d <sup>2</sup>
2.0	0	100	0	100	0	0
1.75	0	100	0	100	0	0
1.5	25	91	0	100	25	625
1.25	84	73	17	95	67	4489
1.0	101	67	77	75	24	576
0.75	146	53	115	63	31	961
0.5	206	33	170	46	18	324
0.25	287	7	245	21	42	1764
0	309	0	312	0	-3	9
Σ					204	8748

生了明显的变化,由 676.0℃ 移动至 662.6℃,放热峰消失。壳聚糖形成金属配合物后,吸热和放热峰均发生了较大的变化,如第一阶段的放热峰均有一定的上升,除氢键作用外,可能和壳聚糖金属配合物更容易与湿存水分子结合有关<sup>[7]</sup>。第二阶段的吸热峰变为放热峰,第三阶段的放热峰温度亦完全不同于原来的壳聚糖。这种结构稳定性变化表明,壳聚糖与金属离子配合后,分子中不同金属离子与含有孤对电子的活性基团-NH<sub>2</sub>、-OH 的配合作用,不仅改变了聚合物的部分化学键性质及其原子之间的相互作用,必然要改变它们稳定的空间构象<sup>[7]</sup>。

CTS 和 CTS-Cu(II) 的 TG 曲线显示,可分为三个阶段:第一阶段,0~140℃,CTS 与 CTS-Cu(II) 分别失重 26.1% 和 16.2%;第二阶段,140~330℃,CTS 和 CTS-Cu(II) 分别失重 27.0%、47.6%;第三阶段,330~640℃,CTS 和 CTS-Cu(II) 分别失重 34.8%、59.6%。分析可知,140℃ 以前的失重是失水所致;CTS 和 CTS-Cu<sup>2+</sup> 在 140~320℃ 出现失重,是由于 CTS 和 CTS-Cu<sup>2+</sup> 的降解;第三阶段的失重可能是由于 CTS 与铜配位后,其分子内的氢键结合被破坏,结晶度发生改变,热稳定性减小<sup>[6-8]</sup>。

## 2.4 CTS 与 CTS-Cu(II) 的抑菌性能

由表 1、表 2 可以看出:CTS-Cu(II) 对 *E.coli* 和 *St.aureus* 的抑菌性比单一的水溶性壳聚糖都要高,CTS 对 *E.coli* 和 *St.aureus* 的抑菌浓度为 1.75mg/mL,CTS-Cu(II) 对 *E.coli* 和 *St.aureus* 的抑菌浓度为 1.5mg/mL。双尾检验<sup>[9]</sup>说明,CTS-Cu(II) 与水溶性 CTS 对 *E.coli* 和 *St.aureus* 的抑菌性能之间存在显著性差异(P<0.05)。

## 3 结论

3.1 水溶性壳聚糖能与铜在酸性介质中形成配合物,壳聚糖中氨基、乙酰氨基、羟基均参与了配位。

3.2 水溶性 CTS-Cu(II) 对 *E.coli* 和 *St.aureus* 均有显著的抑菌性能,其抑菌性能强于水溶性壳聚糖(P<0.05)。

## 参考文献

- [1] 李佳,徐金瑞,孙向英.基于壳聚糖膜固定双酶的胆碱传感器的研究[J].分析化学,2002,30(2):206~209.
- [2] 刘艳如,余萍,郑怡.水溶性壳聚糖的抑菌作用研究[J].中国海洋药物杂志,2001(2):41~44.
- [3] 魏婷婷,黄雅钦.明胶/壳聚糖共混物的制备及抑菌活性研究[J].化工科技,2007,15(4):21~23.
- [4] 魏永锋,张苏敏,杭超伦,等.壳聚糖 Cu(II) 配合物的合成及吸附性能[J].西北大学学报(自然科学版),2005,35(4):413~415.
- [5] 吴慧清,吴清平,石立三,等.壳聚糖及其金属锌配位络合物的抑菌性能研究[J].食品科学,2006,27(12):75~78.
- [6] 张苏敏,魏永锋,郎惠云.壳聚糖银(I)配合物的合成及吸附动力学[J].化学通报,2005(4):296~300.
- [7] 张海容,郭祀远,李琳,等.壳聚糖与五种过渡金属离子形成配合物的研究[J].光谱实验室,2006,23(5):1035~1038.
- [8] 孙兰萍,许晖,赵大庆,等.壳聚糖铁(III)配合物的合成及结构表征[J].中国农学通报,2007,23(1):53~56.
- [9] 李春喜,王志和,王文林.生物统计学(第二版)[M].北京:科学出版社,2004.