

# 季铵盐型魔芋葡甘聚糖衍生物的合成、表征及生物学活性

雷万学<sup>1,2</sup>, 徐霞<sup>3</sup>, 林芳<sup>1</sup>, 杨秦欢<sup>1</sup>, 李正军<sup>1</sup>, 张廷有<sup>1\*</sup>

1. 四川大学皮革化学与工程教育部重点实验室, 四川 成都 610065
2. 河南教育学院化学系, 河南 郑州 450001
3. 郑州大学药学院, 河南 郑州 450052

**摘要** 以魔芋葡甘聚糖为载体, 以硝酸铯铵作引发剂, 用甲基丙烯酰氧乙基-十四烷基-二甲基溴化铵为活性单体进行接枝共聚反应制备季铵盐型魔芋葡甘聚糖衍生物。用核磁共振, 红外光谱, DSC 和激光粒度 Zeta 电位仪对接枝产物进行了表征和测定, 用悬菌定量实验研究了其抗菌性能。结果表明: (1) 甲基丙烯酰氧乙基-十四烷基-二甲基溴化铵通过其双键接枝到魔芋葡甘聚糖表面, 接枝率随着季铵盐单体的用量增加而提高; (2) 魔芋葡甘聚糖的零电位在 pH 4.5, 魔芋葡甘聚糖季铵盐衍生物的零电位在 pH 9.9, 季铵基的引入使其零电位发生了较大的位移; (3) 所制备的魔芋葡甘聚糖季铵盐衍生物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌以及白色念珠菌在振荡作用 15 min 后, 平均杀菌率分别为 99.99%, 99.99% 和 98.13%。

**关键词** 魔芋葡甘聚糖; 季铵盐; <sup>1</sup>H NMR; FTIR; DSC; 抗菌

**中图分类号:** TQ91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2008)05-1030-05

## 引言

魔芋葡甘聚糖(KGM)是从魔芋块茎中分离、提取出的一种水溶性、非离子型纯天然高分子多糖。它是由 D-葡萄糖和 D-甘露糖按 1:1.6~2.0, 主要通过 -1,4-糖苷键结合而成<sup>[1-4]</sup>, 其分子式为 (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>, 相对分子量因品种和产地不同而存在差异。由于 KGM 的水溶液粘度高、成膜性好<sup>[5]</sup>, 同时具有价廉易得、无毒、不产生二次污染、生物降解性好等特点<sup>[6]</sup>, 使其在制药<sup>[7-10]</sup>、生物技术<sup>[11,12]</sup>、精细化工<sup>[13-17]</sup> 等领域具有很好的发展前景。而研究 KGM 与季铵盐的接枝共聚反应, 给天然高分子表面接枝抗菌基团, 合成高分子消毒剂或者高分子抗菌材料, 为扩大魔芋葡甘聚糖的应用范围开辟了新的途径。作者研究了 KGM 与甲基丙烯酰氧乙基-十四烷基-二甲基溴化铵(DMAM-TB)的接枝反应, 得到魔芋葡甘聚糖季铵盐衍生物(KGM-g-DMAM-TB), 并将它作为高分子消毒剂进行了抗菌性能测试。有关 KGM 与甲基丙烯酰氧乙基-十四烷基-二甲基溴化铵的接枝共聚反应及其抗菌性能尚未见文献报道。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet, USA), 核磁共振波谱仪(Bruker AV 600 MHz, Switzerland), 激光粒度 Zeta 电位仪(MALVERN 公司), 差示扫描量热仪(德国 NETZSH), KGM(购自成都市圣特蒙魔芋微粉有限责任公司), 甲基丙烯酰氧乙基-二甲基氨基乙酯(DMAM)(购自山东淄博化工有限公司), 卵磷脂(美国 Sigma 公司), 1-溴代正十四烷(TB), 吐温-80, 硝酸铯铵, 对苯二酚等均为分析纯试剂。

### 1.2 菌种

大肠杆菌 *Escherichia coli* (8099), 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) 以及白色念珠菌 *Candida albicans* (ATCC10231), 均为河南省防疫站所赠。伊红美蓝培养基(北京奥博新生物技术责任有限公司), LB 液体和固体培养基(自配)。

### 1.3 魔芋葡甘聚糖季铵盐衍生物的合成

#### 1.3.1 甲基丙烯酰氧乙基-十四烷基-二甲基溴化铵的合成

称量 15.72 g DMAM 和 27.73 g TB, 加入 90 mL 丙酮和少量的对苯二酚, 在 40 °C 搅拌反应 20 h, 冷却结晶、过滤, 用无水乙醚洗涤、无水乙酸乙酯重结晶, 室温真空干燥, 得到纯净的白色针状晶体 DMAM-TB。

#### 1.3.2 魔芋葡甘聚糖季铵盐衍生物的合成

称量 3 g KGM, 加入 300 mL 蒸馏水充分溶胀, 通入 N<sub>2</sub>, 加热至 60 °C, 30 min 后, 在搅拌的状态下加入硝酸铯

收稿日期: 2007-10-06, 修订日期: 2007-12-29

基金项目: 教育部博士点基金项目(20050610047)和河南省自然科学基金项目(0611020600)资助

作者简介: 雷万学, 1964 年生, 河南教育学院化学系副教授 \*通讯联系人 e-mail: lwxscu@163.com

铵的硝酸溶液 ( $0.0007 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 然后分别滴加  $0.0023$ ,  $0.0046$ ,  $0.0069$ ,  $0.0092$  和  $0.0115 \text{ mol}$  的 DMAM-TB (使用前配成 20% 水溶液), 反应 3 h, 用 50% ( ) 的乙醇溶液沉淀, 过滤, 洗涤, 真空干燥后置于索氏萃取器中用三氯甲烷萃取 24 h, 除去均聚物, 真空干燥, 得到纯净的接枝共聚物。

在本实验中, 用微量定氮仪测定接枝产物 KGM-g-DMAM-TB 的含氮量, 并用下式计算接枝率  $Y$ :

$$Y = \frac{434.52 \times N \%}{14.01 - 434.52 \times N \%} \times 100 \%$$

#### 1.4 测试和表征

采用 BRUKER 核磁共振波谱仪, NICOLET FTIR 红外光谱仪和 NETZSH 差示扫描量热分析仪分别对产物进行核磁, 红外和差示扫描量热测试。并采用 MALVERN 激光粒度 Zeta 电位仪测定分散系的 Zeta 电位。

#### 1.5 抗菌实验

分别称取  $0.5 \text{ g}$  所研制的杀菌剂 ( $Y=39.6\%$ ) 于 3 个  $250 \text{ mL}$  锥形瓶中, 各加入  $90 \text{ mL}$  无菌水和  $10 \text{ mL}$   $10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  的菌悬液, 置入  $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  的振荡摇床上分别振荡作用至 5, 15, 30 min 时, 加入中和剂, 继续振荡 10 min, 取  $0.5 \text{ mL}$  作用后的菌悬液 10 倍梯度稀释后作活菌计数, 于 37 培养 48 h, 计算存活菌数和杀菌率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DMAM-TB, KGM 和 KGM-g-DMAM-TB $^1\text{H}$ NMR 分析

在常温下, DMAM-TB, KGM 和 KGM-g-DMAM-TB 的  $^1\text{H}$  NMR 波谱如图 1、图 2 和图 3 所示。

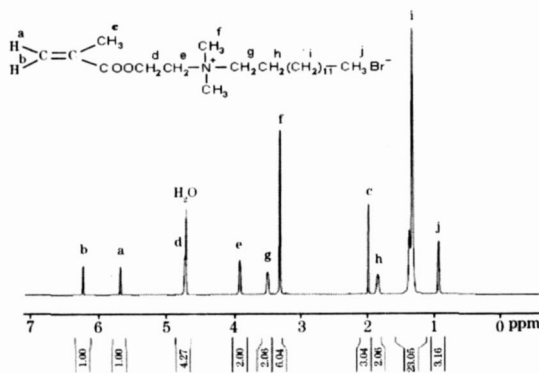


Fig 1  $^1\text{H}$  NMR spectrum of DMAM-TB

通过分析图 1 中各峰的化学位移及积分面积, 结合 DMAM-TB 分子中各种氢原子所处的化学环境, 确定了各峰的归属, 这表明 DMAM 与 TB 发生了季铵化反应生成了 DMAM-TB。

通过比较图 1、图 2 和图 3 可见: 在 KGM-g-DMAM-TB 的波谱中, 除了出现 KGM 主链上的质子共振峰外, 还出现了 DMAM-TB 侧链上的质子共振峰, 在  $0.89$  处出现了甲基 (j) 的质子共振峰, 在  $1.26 \sim 1.36$  处出现了亚甲基 (i) 的质子共振峰, 在  $1.75$  处出现了亚甲基 (h) 的质子共振峰, 在  $2.34$  处出现了甲基 (c) 的质子共振峰等, 这表明 DMAM-TB

已经接枝到 KGM 上。

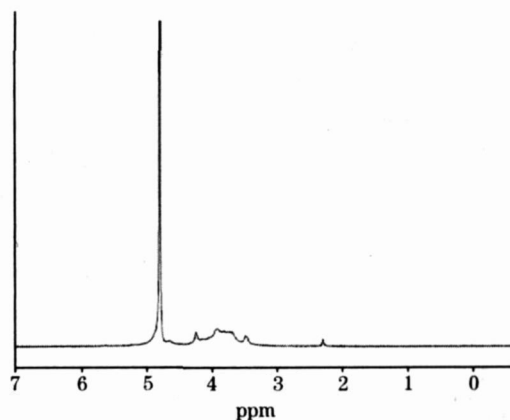


Fig. 2  $^1\text{H}$  NMR spectrum of KGM

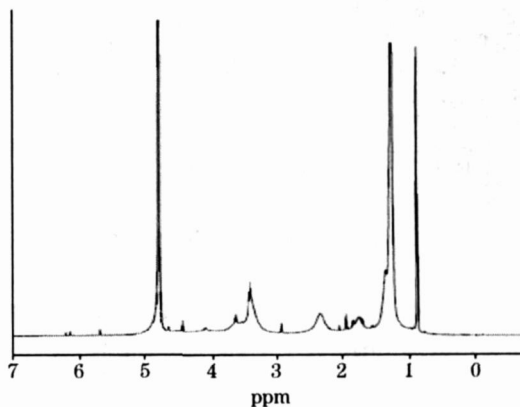


Fig. 3  $^1\text{H}$  NMR spectrum of KGM-g-DMAM-TB

### 2.2 KGM 和 KGM-g-DMAM-TB 红外光谱分析

在常温下, KGM 和 KGM-g-DMAM-TB 红外光谱如图 4 所示。

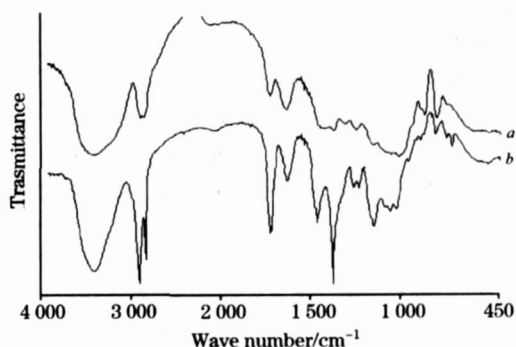


Fig 4 IR spectra of KGM and KGM-g-DMAM-TB

a: KGM; b: KGM-g-DMAM-TB

通过比较图 4 中的 a 和 b 可见: 反应产物 KGM-g-DMAM-TB 除了保留 KGM 的特征吸收峰外, 在  $1730 \text{ cm}^{-1}$  处有一个羰基的强吸收峰; 在  $2925$ ,  $2854$  和  $1468 \text{ cm}^{-1}$  处出现  $\text{CH}_2$  的  $\text{a}, \text{c-H}$ ,  $\text{s}, \text{c-H}$  和  $\text{c-H}$  吸收峰; 在  $1384 \text{ cm}^{-1}$  处出现了  $\text{CH}_3$  的  $\text{s}, \text{c-H}$  特征吸收峰; 在  $721 \text{ cm}^{-1}$  处出现  $\text{c-H}$

吸收峰,说明产物中至少有 4 个  $\text{CH}_2$  相连接。这表明 KGM 与 DMAM-TB 发生了接枝共聚反应生成了季铵盐衍生物。

为了测定加入 DMAM-TB 的量与 KGM 反应的程度的关系,根据参考文献[18, 19]的方法,定量测定了甲基的吸收峰的峰面积与加入 DMAM-TB 的量的关系。准确称取 0.002 00 g KGM-g-DMAM-TB,加入 0.200 00 g 研成细粉的 KBr,混匀后压片,测定压片厚度,然后进行红外光谱分析,结果如图 5 所示。从图 5 可以看出,在相同的反应条件下,加入的 DMAM-TB 的量越大,接枝到 KGM 上的 DMAM-TB 就越多,产物中甲基、亚甲基和羰基吸收相应增大。

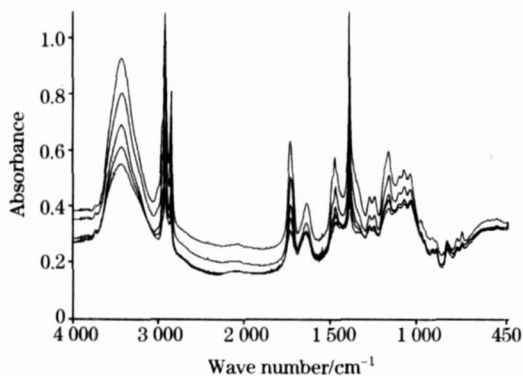


Fig 5 IR spectra of a series of KGM-g-DMAM-TB

根据 Lambert-Beer 定律计算得到接枝产物中甲基的吸收峰的峰面积与 DMAM-TB 用量的关系如图 6 所示。

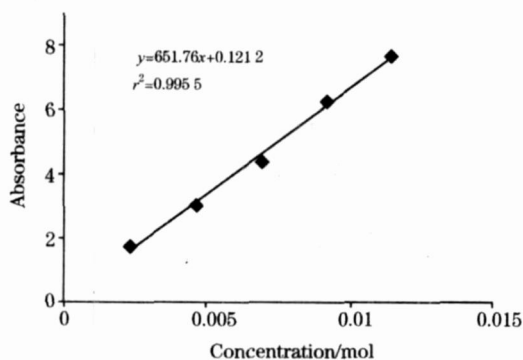


Fig 6 Relationship between the quantity of DMAM-TB and the IR absorption peak area of methyl of KGM-g-DMAM-TB

在 0.002 3 和 0.011 5 mol 的范围内,加入 DMAM-TB 的量与 IR 吸收峰面积成正比,由此,可以通过测定甲基的吸收峰的面积确定接枝上的季铵盐的量,从而确定接枝程度。

### 2.3 KGM 和 KGM-g-DMAM-TB 的热稳定性

图 7 中的 a 和 b 分别为 KGM 和 KGM-g-DMAM-TB 的 DSC 图。二者明显不同,KGM 在 164.2 有 1 个很强的吸热峰,在 271.2 和 316.2 各有 1 个放热峰,而和 DMAM-TB 反应后的产物的强吸热峰在 188.2,放热峰分别在 242.6 和 275.2,这是形成新的化合物的表现。

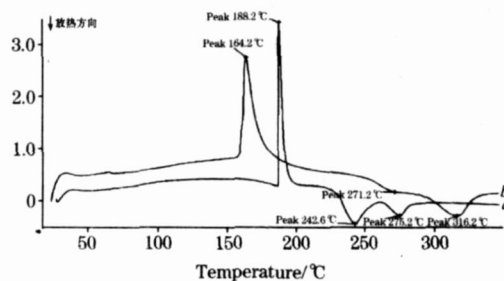


Fig 7 Diagram of DSC of KGM and KGM-g-DMAM-TB  
a: KGM; b: KGM-g-DMAM-TB

### 2.4 Zeta 电位分析

图 8 反映了悬浮液的 pH 值对 KGM 和 KGM-g-DMAM-TB 的 Zeta 电位的影响。由图 8 可以看出,KGM 的零电位的 pH 值约为 4.5,当溶液的  $\text{pH} < 4.5$  时,KGM 的表面带正电;当溶液的  $\text{pH} > 4.5$  时,KGM 的表面带负电,随着 pH 值增大,Zeta 电位绝对值增大。同样可以看出,KGM-g-DMAM-TB 的零电位的 pH 值约为 9.9,并且它的表面所带的电荷的变化规律与 KGM 相似。

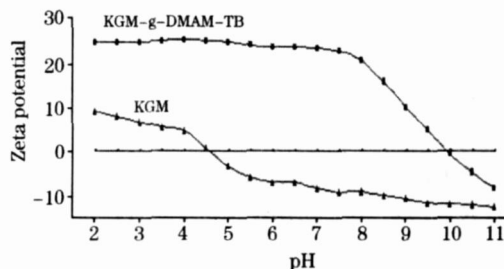


Fig 8 pH titration graph of KGM and KGM-g-DMAM-TB

由图 8 可以看出:由于 KGM 的零电位在 pH 4.5,故粒子在水介质中通常带负电,并且随 pH 的增高,负电荷增多。而 KGM-g-DMAM-TB 的零电位在 pH 9.9 附近,故粒子在水介质中通常带正电,这是由于 KGM-g-DMAM-TB 表面键合有季铵阳离子的缘故。

### 2.5 KGM-g-DMAM-TB 抗菌实验

悬菌实验表明,KGM-g-DMAM-TB 与大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌作用不同的时间,其杀菌效果不同,结果见表 1。

Table 1 Bactericidal efficacy of KGM-g-DMAM-TB after exposure for different periods of time

微生物	对照组平均菌数	作用不同时间的平均杀菌率/ %		
		5 min	15 min	30 min
大肠杆菌	653 000 000	99.51	99.99	99.99
金黄色葡萄球菌	761 000 000	99.95	99.99	99.99
白色念珠菌	89 500 000	93.27	98.13	99.64

注:实验温度为 20,实验结果为 3 次实验平均值

从表 1 可以看出:随着微生物与合成的抗菌材料的作用时间的变化,其杀菌率发生相应的变化,与作用时间呈正相

关,所合成的抗菌材料对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀菌性优于对白色念珠菌。

细菌细胞膜是在细胞壁与细胞质之间的一层柔软而富有弹性的具有高度选择性的半渗透性薄膜,由蛋白质和磷脂组成,基本结构为双层磷脂,其中镶嵌蛋白质,带负电荷。季铵盐阳离子表面活性剂本身就是抗菌性能较强的抗菌剂,其作用机理主要是正负电荷吸引,产生吸附作用,季铵盐小分子吸附到细菌表面,然后穿透细胞壁,与细胞膜结合,扰乱细胞膜组成,使胞内物质如 RNA, DNA 和  $K^+$  等泄漏使细菌死亡<sup>[20]</sup>。

高分子化后的季铵盐型抗菌材料的灭菌机理目前尚不十分清楚,但一般认为,其作用过程是由于季铵盐分子带正电,经高分子化后,相对分子质量增大,电荷密度提高,更易将细胞表面带负电荷的细菌吸附到其表面,然后与细胞膜结合,使细胞破裂、菌体死亡。

季铵盐改性的魔芋葡甘聚糖属于高分子化的季铵盐化合物,其作用机理也应该服从上述步骤,本文合成的 KGM-g DMAM-TB 在水溶液中(pH 7)其 Zeta 电位为 9.9,因此有较

强的杀菌作用。

### 3 结 论

(1)利用甲基丙烯酰氧乙基-十四烷基-二甲基溴化铵上的双键,以硝酸铈铵作引发剂,与魔芋葡甘聚糖进行接枝共聚反应可以制备魔芋葡甘聚糖季铵盐衍生物抗菌材料。

(2)核磁共振、红外光谱和 DSC 证明了甲基丙烯酰氧乙基-十四烷基-二甲基溴化铵已接枝到魔芋葡甘聚糖上;魔芋葡甘聚糖的零电位在 pH 4.5,魔芋葡甘聚糖季铵盐衍生物的零电位在 pH 9.9,季铵基的引入使其零电位发生了较大的位移。

(3)悬菌定量实验方法测定魔芋葡甘聚糖季铵盐衍生物抗菌材料对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的 15 min 杀菌率分别为 99.99%,99.99%,98.13%,魔芋葡甘聚糖季铵盐衍生物对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌有很强的杀菌效果,对真菌的杀菌效果略弱一些。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Kaname K, Kohsaku O, Kenichi H, et al. Carbohydrate Polymer, 2003, 53: 183.
- [ 2 ] Kato K, Matsuda K. Agricultural and Biological Chemistry, 1969, 33: 1446.
- [ 3 ] Maeda M, Shimahara M, Sugiyama N. Agric. Biol. Chem., 1980, 44: 245.
- [ 4 ] Cescutti P, Campa C, Delben F, et al. Carbohydrate Research, 2002, 337(24): 2505.
- [ 5 ] YANG Guang, XIONG Xiao-peng, ZHANG Li-na. Journal of Membrane Science, 2002, 201: 161.
- [ 6 ] PANG Jie, LIN Qiong, ZHANG Pu-sheng, et al (庞杰, 林琼, 张普生, 等). Chinese Journal Structure Chemistry (结构化学), 2003, 22(6): 633.
- [ 7 ] WANG Kang, HE Zhi-min. International Journal of Pharmaceutics, 2002, 244: 117.
- [ 8 ] CHEN Hsiao-Ling, Ph D. R. D. Nutrition, 2006, 22: 112.
- [ 9 ] Pathak C P, Barman S P, Philbrook M C, et al. US Patent, 6 639 014, 2003.
- [ 10 ] CHEN Li-gui, LIU Zhi-lan, ZHUO Ren-xi. Polymer, 2005, 46: 6274.
- [ 11 ] ZHANG Ying-qing, XIE Bi-jun, GAN Xin. Carbohydrate Polymer, 2005, 60: 27.
- [ 12 ] Nussinovitch A. US Patent, 6 680 184, 2004.
- [ 13 ] YU Hui-qun, HUANG Yi-hong, YING Hou, et al. Carbohydrate Polymers, 2007, 69: 29.
- [ 14 ] TANG R P, DU Y M, ZHENG H, et al. Journal of Applied Polymer Science, 2003, 88(5): 1095.
- [ 15 ] GAO S J, ZHANG L N, CAO J L. Journal of Applied Polymer Science, 2003, 90(8): 2224.
- [ 16 ] YANG G, HUANG Q L, ZHANG L N, et al. Journal of Applied Polymer Science, 2004, 92(1): 77.
- [ 17 ] YU Hui-qun, HUANG Yi-hong, YING Hou, et al. Carbohydrate Polymers, 2007, 69: 29.
- [ 18 ] XU Xia, YANG Qin-huan, LEI Wan-xue, et al (徐霞, 杨秦欢, 雷万学, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2006, 26(3): 444.
- [ 19 ] MA Guo-xin, WANG Cheng-long, FAN Duo-wang, et al (马国欣, 王成龙, 范多旺, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2006, 26(3): 434.
- [ 20 ] LU Dian-nan, ZHOU Xuan-rong, XING Xiao-dong, et al (卢滇楠, 周轩榕, 邢晓东, 等). Acta Polymeric Sinica (高分子学报), 2004, (1): 107.

## Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Konjac Glucomannan Derivative with Quaternary Ammonium Salts

LEI Wan-xue<sup>1,2</sup>, XU Xia<sup>3</sup>, LIN Fang<sup>1</sup>, YANG Qin-huan<sup>1</sup>, LI Zhen-jun<sup>1</sup>, ZHANG Ting-you<sup>1\*</sup>

1. The Key Laboratory of Leather Chemistry and Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610065, China

2. Department of Chemistry, Henan Institute of Education, Zhengzhou 450001, China

3. College of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

**Abstract** Methacryloxyethyl tetradecyl dimethyl ammonium bromide was grafted onto konjac glucomannan using ceric ammonium nitrate as an initiator, and the konjac glucomannan derivative with quaternary ammonium salts was obtained. The konjac glucomannan derivative was investigated by hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>H NMR), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimeter (DSC), and Zeta sizer nano series. The antimicrobial properties of the konjac glucomannan derivative against selected microorganisms were tested by the quantitative suspension method. The results revealed that (1) methacryloxyethyl tetradecyl dimethyl ammonium bromide can be grafted onto the surface of the konjac glucomannan, and the percentage grafting increases with increasing the amount of methacryloxyethyl tetradecyl dimethyl ammonium bromide. (2) The Zeta potential showed that the isoelectric point of the konjac glucomannan and the modified konjac glucomannan is pH 4.5 and pH 9.9, respectively. The shift of the isoelectric point is due to the quaternary ammonium groups. (3) The obtained konjac glucomannan derivative has significant inhibition effect on the growth of microorganisms, and the bactericidal rates in 15 min for *E. coli* (8099), *S. aureus* (ATCC 6538) and *C. albicans* (ATCC10231) were 99.99%, 99.99% and 98.13%, respectively.

**Keywords** Konjac glucomannan; Quaternary ammonium salt; <sup>1</sup>H NMR; FTIR; DSC; Antimicrobial

(Received Oct. 6, 2007; accepted Dec. 29, 2007)

\*Corresponding author