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

冯小强*　李小芳　杨　声
(天水师范学院生命科学与化学学院　天水 741001)

摘　要　合成了硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物,运用红外光谱、紫外光谱和差热热重分析对配合物进行了表征,研究了其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌性能及与血清白蛋白(BSA)的相互作用。结果表明,硫脲壳聚糖能与 Co(Ⅱ)发生配位反应而生成硫脲壳聚糖-Co(Ⅱ)配合物,该配合物的抑菌性能较壳聚糖和硫脲壳聚糖有显著提高,并能有规律地猝灭 BSA 的内源荧光。

关键词　硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物,抑菌性能,血清白蛋白
中图分类号:O632.6　　文献标识码:A　　文章编号:1000-0518(2011)09-1012-05
DOI:10.3724/SP.J.1095.2011.00375

从分子水平阐述生物大分子与具有生物活性的小分子间的相互作用特征,是生命科学中的核心问题之一。血清白蛋白在体内起着酸度保持、金属离子、氨基酸、脂肪酸和药物等的贮存、运载等重要作用,可与许多内源及外源性化合物结合,是基础科学研究中最常用的药物靶蛋白之一[1-2]。研究药物与血清白蛋白的作用有助于阐明药物在体内的存储和转运过程,也能为药物的设计与开发及药理研究提供有价值的信息。

壳聚糖作为一种天然的阳离子型聚合物,具有无毒、生物相溶、可降解和抑菌等特性,因而在医学、食品营养学、环境保护和轻工业等领域有着极为广泛的应用。壳聚糖 C_2 位上的—NH_2 及 C_3 位上的—OH 是典型的 Lewis 碱性基团,这种特殊的结构使其对 Cu^{2+}[3]、Fe^{3+}[4]、Zn^{2+}[5] 和 Ca^{2+}[6] 等金属离子具有很强的螯合作用。硫脲壳聚糖与壳聚糖一样,其分子中含有大量活性基团(如—NH_2,—C═S),可与多种金属离子配位形成金属配合物。金属离子具有抗炎、杀菌、抗癌和抗凝血等药理作用和发光性质,故具有生物活性的天然高分子改性产物硫脲壳聚糖与金属离子的配合物的抗菌性能将可能结合二者的共同优点,以发挥出抗菌抑菌的协同作用。本文合成了硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物,考察了配合物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌性能,并运用紫外和荧光光谱研究了配合物与血清白蛋白的相互作用,为进一步开发壳聚糖在医学及食品领域的应用提供更加有力的理论依据,该研究还没有报道。

1　实验部分

1.1　仪器和材料

Spectrum One 型傅里叶红外光谱仪(美国 Perkin Elmere);Perkin Elmere 型 TG-DTA 分析仪(美国 Pyris Diamond Analyzer);RF-5301PC 型荧光分光光度计(日本岛津); UV-2450 型紫外可见分光光度计(日本岛津)。

壳聚糖(CS,浙江玉环壳聚糖有限公司),M_w = 50 kDa,脱乙酰度(DD.)90%;牛血清白蛋白(BSA,北京奥博星生物技术责任有限公司),用 50 mmol/L NaCl 溶液溶解,$c = 5 \times 10^{-5}$ mol/L;大肠杆菌(*E. coli*,ATCC 35218)和金黄色葡萄球菌(*St. aureus* ATCC 26113)均由天水市中医医院化验科提供。其它试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

2010-06-28 收稿,2010-10-10 修回
甘肃天水师范学院"青蓝"人才工程及物理无机化学重点学科基金资助项目(ZD0840)
通讯联系人:冯小强,讲师; Tel/Fax:0938-8350899; E-mail:fengxiaoq04@lzu.cn; 研究方向:天然高分子生物活性

1.2　硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物的制备

将 3.4 g(0.1 mol)硫脲和 3.1 g(0.2 mol)壳聚糖及 30 mL 无水乙醇加入到三颈烧瓶中,65 ℃回流搅拌 12 h,产物冷至室温,过滤、反复用乙醇洗涤,将过滤物溶解于 100 mL 体积分数为 1% 的乙酸溶液中,加入质量浓度 10% NaOH 溶液后过滤并收集沉淀,用水洗净、干燥,得淡黄色硫脲壳聚糖(TUCS)[7]。

称取上述制备的硫脲壳聚糖 0.52 g,溶于 40 mL 体积分数为 0.5% HAc 的锥形瓶中,搅拌溶解 50 min。将溶解了 0.91 g 氯化钴的水溶液缓慢加入锥形瓶中,室温下搅拌 3 h 后,加入 200 mL 丙酮,出现絮状沉淀,静置后过滤,用无水乙醇洗涤,沉淀烘干得粉红色硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物(TUCS-Co)。

1.3　配合物的表征

采用 KBr 压片法,扫描波长范围为 400 ~ 4 000 cm^{-1},测定 CS、TUCS 及 TUCS-Co 的红外光谱;用体积分数为 1% 乙酸分别配制 1 g/L 的 CS、TUCS 和 TUCS-Co 溶液,于 200 ~ 500 nm 波长范围内测定紫外吸收光谱;以 α-Al_2O_3 为参比,升温速率 10 ℃/min,对 CS、TUCS 和 TUCS-Co 进行热力学分析。

1.4　硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物对 *E. coli* 和 *St. aureus* 的抑菌活性

将已灭菌的直径为 6 mm 的圆滤纸片浸泡在浓度为 1 g/L 硫脲壳聚糖-Co 配合物、硫脲壳聚糖和壳聚糖溶液中备用。取 100 μL 菌悬液涂布在培养基平板上,用无菌镊子取浸泡过的圆滤纸片贴于培养皿中,每皿贴 5 片。以体积分数 1.0% HAc 溶液为空白对照。37 ℃恒温培养 24 ~ 48 h 后测定抑菌圈直径。

1.5　硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物与 BSA 的作用

在 10 mL 比色管中依次加入 2.0 mL Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 缓冲液、2.0 mL BSA 溶液及一定浓度的硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物溶液,二次蒸馏水定容后室温下作用 12 h,于 190 ~ 500 nm 波长范围内扫描紫外吸收光谱;并在设定激发波长 280 nm、激发和发射狭缝宽度均为 3 nm 的条件下测定荧光光谱。

2　结果与讨论

2.1　硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物的表征

2.1.1　*红外光谱*　由图 1 可知,壳聚糖、硫脲壳聚糖及硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物的红外吸收光谱大体上相似,因为三者的主要成分均为壳聚糖。壳聚糖中位于 3 446 cm^{-1} 左右的 N—H、O—H 缔合峰形,改性后发生位移且峰形变窄;壳聚糖原位于 1 664 cm^{-1} 处较强的酰胺吸收峰和 1 600 cm^{-1} 左右的—NH_2 面内弯曲振动吸收峰,在硫脲壳聚糖中分别位移至 1 639 和 1 616 cm^{-1} 处,且峰形变窄;硫脲壳聚糖在 1 494 cm^{-1} 处出现一弱的新峰,表明在壳聚糖结构中的—NH_2 上引入硫脲基团[5]。与硫脲壳聚糖相比,硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ) 在 1 494 cm^{-1} 处出现的新峰几乎消失,而在 1 417 cm^{-1} 处出现一强的新峰,在 1 030 cm^{-1} 处的伯醇吸收峰强度减弱,说明硫脲壳聚糖中的硫脲基团和伯羟基参与了与Co(Ⅱ)的配位反应。

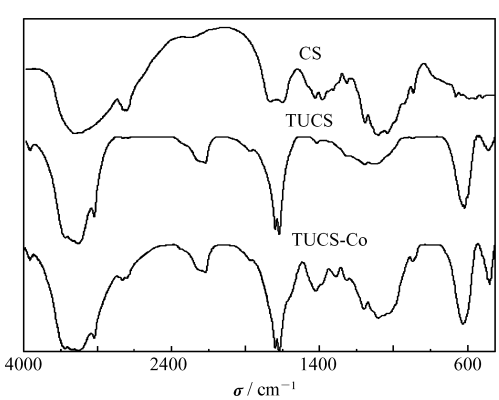


图 1　壳聚糖、硫脲壳聚糖和硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物的红外光谱

Fig. 1　IR spectra of chitosan, thiourea chitosan and thiourea chitosan cobalt complex

2.1.2　*紫外光谱(UV)*　相同浓度的壳聚糖、硫脲、硫脲壳聚糖和硫脲壳聚糖钴配合物的紫外光谱如图 2 所示。硫脲、壳聚糖和硫脲壳聚糖分别在 253、224.50 和 235.00 nm 有强吸收峰;而硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物在 223.00 nm 附近有一弱吸收峰,与硫脲、壳聚糖、硫脲壳聚糖相比,发生了较大的位移且吸收强度发生了变化,这是由于配合物中氮、氧的孤对电子发生 $n\rightarrow\sigma^*$ 跃迁和 $\pi\rightarrow\pi^*$ 跃迁,导致电子光谱发生的变化所致。紫外光谱表明配位作用发生。

2.1.3　*差热-热重分析*　壳聚糖、硫脲壳聚糖和硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物的 TG-DTA-DTG 曲线如图 3 所示。壳聚糖的降解分为 2 个阶段[8]:第一个阶段在 80 ℃开始,质量损失 10%,主要是失去水分子;第二个阶段质量损失在 250 ℃开始,当温度升至 280 ℃有一强的放热峰,到 500 ℃质量损失达最大,达

55%;最终分解温度为688 ℃。硫脲壳聚糖热分析表明,随着质量损失的进行,差热曲线出现多个放热峰,是硫脲壳聚糖分解、氧化和燃烧的结果。在98.2~150 ℃之间有明显失重并伴有2个低矮的放热峰,质量损失达4.7%,当温度升至245 ℃左右有一强的放热峰,峰形尖而高,与之相应的热重线又有明显的质量损失拐点。这是由于硫脲壳聚糖减弱了壳聚糖分子的规整度和氢键网络,从而降低了壳聚糖的结晶程度,导致分解温度降低。对于硫脲壳聚糖Co(Ⅱ)配合物,当温度升至270 ℃左右有1强的放热峰,峰形尖而高,与之相应的热重线又有明显的质量损失拐点。可能是由于TUCS与Co^{2+}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。这种结构稳定性变化表明,硫脲壳聚糖分子上部分的—C═S和—OH基团参与了配位,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,一定程度上更加减弱了壳聚糖分子间氢键的形成,结晶度发生改变,进而此次级转变的温度略有降低,必然要改变它们的稳定的空间构象。它们的不稳定性是由于缺少自由的氨基,在制备衍生物时氨基被取代,而壳聚糖因其有自由的氨基而更稳定。

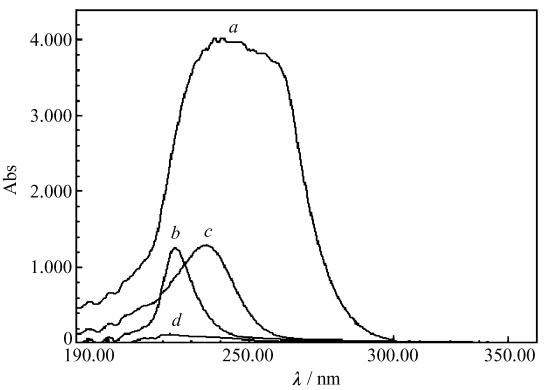


图2 壳聚糖、硫脲、硫脲壳聚糖和硫脲壳聚糖钴配合物的紫外光谱

Fig. 2 UV spectra of chitosan (*a*), thiourea (*b*), thiourea chitosan (*c*) and its cobalt complex (*d*)

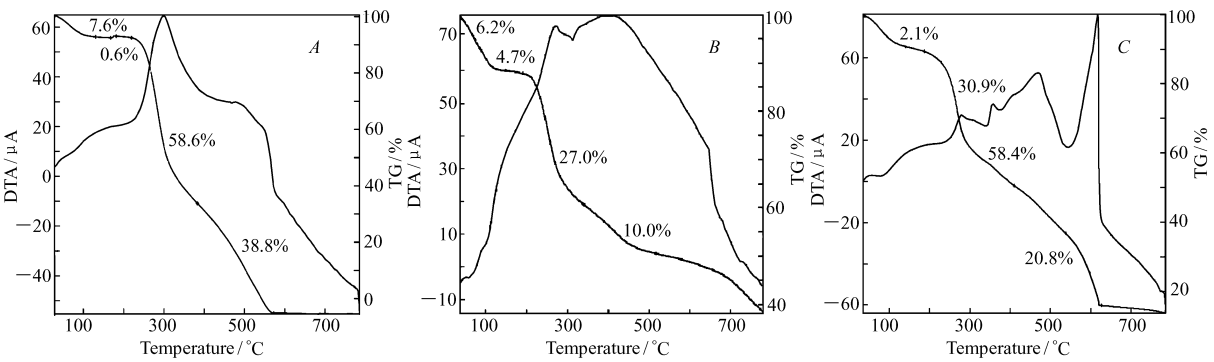


图3 壳聚糖(*A*)、硫脲壳聚糖(*B*)和硫脲壳聚糖Co(Ⅱ)配合物(*C*)的TG-DTA-DTG曲线

Fig. 3 TG-DTA-DTG curves of chitosan (*A*), thiourea chitosan (*B*), thiourea chitosan cobalt complex (*C*)

2.2 抑菌试验

如果抑菌剂能杀死或抑制皿中供试菌的生长,则在滤纸片的周围会出现一个无菌生长的透明圈,即抑菌圈。抑菌圈直径越大,说明该抑菌剂对此种供试菌的抑制效果越好,反之则抑制效果越差。壳聚糖、硫脲壳聚糖和硫脲壳聚糖Co(Ⅱ)配合物对*E. coli*和*St. aureus*对应的抑菌圈如图4所示。从图4可以看出,壳聚糖、硫脲壳聚糖和配合物作用*E. coli*和*St. aureus*后,均具有明显的抑菌圈,且硫脲壳聚糖Co(Ⅱ)配合物的抑菌圈直径比壳聚糖、硫脲壳聚糖显著增大,说明硫脲壳聚糖Co(Ⅱ)配合物对*E. coli*和*St. aureus*的生长有较大的抑制作用。金属钴离子可称为"超级酸"。硫脲壳聚糖和金属钴离子配位后,分子表面正电荷密度增加,从而增强了聚阳离子吸附到带负电荷的细菌表面的能力,且金属阳离子Co^{2+}也具抑菌性能,故硫脲壳聚糖Co(Ⅱ)配合物的抑菌性能较壳聚糖、硫脲壳聚糖增强。

2.3 硫脲壳聚糖Co(Ⅱ)配合物与BSA的作用

2.3.1 *紫外光谱分析* 由图5可见,BSA在275 nm处有1个强吸收峰,是其肽链上的色氨酸和酪氨酸的苯杂环π-π^*跃迁引起的。随着加入的硫脲壳聚糖钴配合物浓度增大,BSA在275 nm的吸收强度逐渐增强,说明硫脲壳聚糖钴配合物诱导BSA分子发生类似降pH值所出现的蛋白质肽链伸展现象[9],使包围在BSA分子内部的色氨酸和酪氨酸残基的芳杂环疏水基团裸露出来,吸收强度增强,同时疏水基团之间的疏水作用减弱,π-π^*跃迁能量增大。

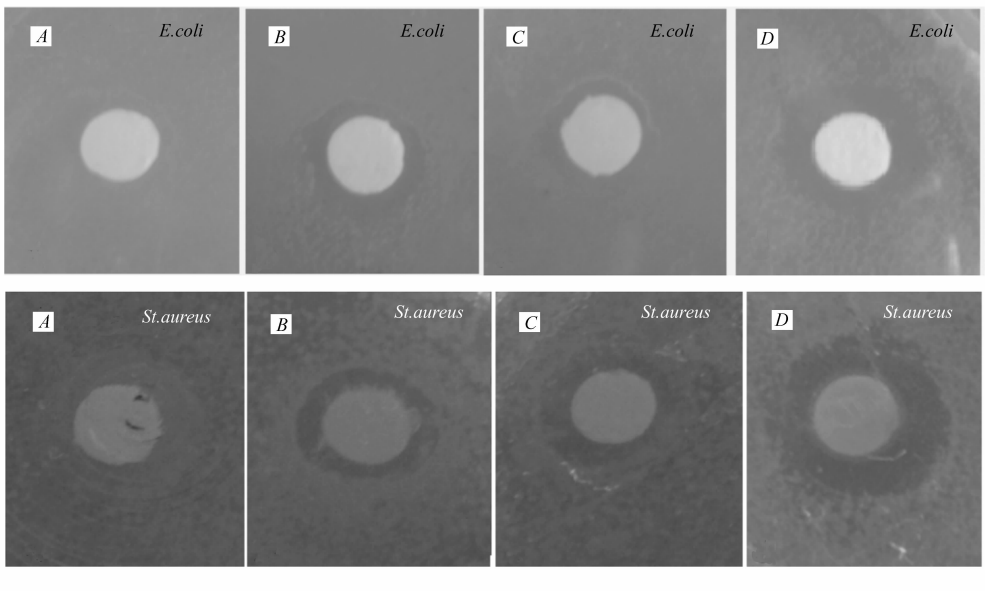


图 4　壳聚糖、硫脲壳聚糖和配合物对 *E. coli* 和 *St. aureus* 的抑菌圈

Fig. 4　Inhibition zones of chitosan, thiourea-chitosan, complex against *E. coli* and *St. aureus*

A. control; *B*. chitosan; *C*. thiourea-chitosa; *D*. thiourea chitosan cobalt complex

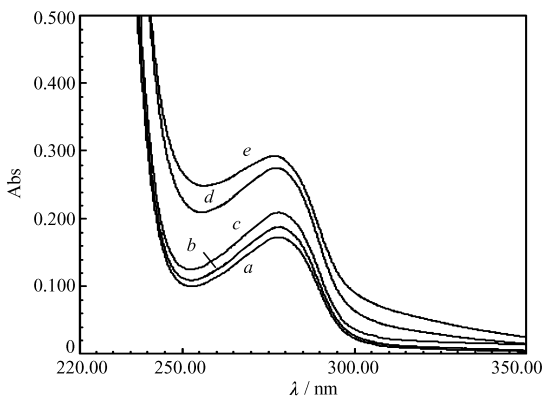


图 5　硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物对 BSA 紫外吸收光谱的影响

Fig. 5　UV absorption spectra of BSA with various mass concentrations of complex

from *a* to *e*, the final concentration of complex was 0, 0.2, 0.6, 0.8 and 1.0 g/L, respectively

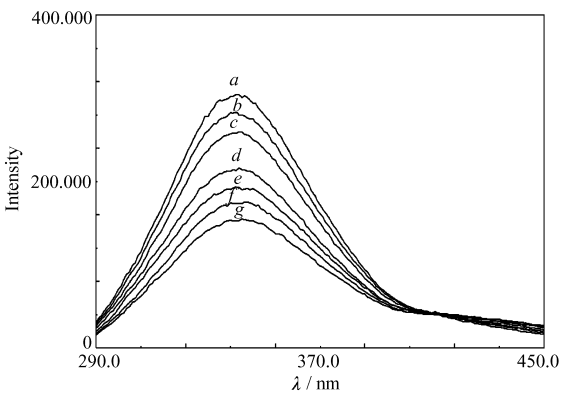


图 6　硫脲壳聚糖 Co(Ⅱ)配合物对 BSA 荧光光谱的影响

Fig. 6　Fluorescence spectra of BSA with various concentrations of complex

from *a* to *g*, the final concentration of complex was 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 and 1.2 g/L, respectively

2.3.2　荧光光谱　蛋白质分子中因含有色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸等氨基酸残基而产生内源性荧光。由于这些氨基酸具有不同的结构,荧光强度比为 100:9:0.5,故在大多数情况下,认为蛋白质的荧光主要来自色氨酸残基的贡献,而且含色氨酸残基的蛋白质的天然荧光及其变化直接反映了蛋白质中色氨酸残基本身及其周围环境的变化。蛋白质的荧光猝灭可用于研究药物与蛋白质的结合信息。BSA 在激发波长 λ_{ex} = 280 nm 时,最大发射波长 λ_{em} = 348 nm。在同一条件下,测定了分别向 BSA 溶液中滴加硫脲壳聚糖钴配合物溶液前后的荧光光谱如图 6 所示。在激发波长为 280 nm 时,BSA 的最大发射波长为 334 nm。随着硫脲壳聚糖钴配合物浓度的增加,BSA 荧光强度有规律地降低,但发射峰的位置和形状基本不变,说明硫脲壳聚糖钴配合物对 BSA 的荧光具有猝灭作用。

3　结　论

FT-IR、UV、TG-DTA 结果表明,硫脲壳聚糖与 Co(Ⅱ)离子之间发生了配位反应。硫脲壳聚糖

Co(Ⅱ)配合物对 *E. coli* 和 *St. aureus* 的抑菌性能比单一的壳聚糖、硫脲壳聚糖显著提高。硫脲壳聚糖-Co(Ⅱ)能诱导 BSA 分子发生蛋白质肽链伸展现象,可有规律地猝灭 BSA 的内源荧光。

参 考 文 献

[1] Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, *et al*. Crystal Structure of Human Serum Albumin at 2.5 A Resolution[J]. *Protein Eng*, 1999, **12**(6): 439-446.

[2] Li Famei, Qiao Mingxi, Guo Xingjie. Specific Determination of Unbound Oxacillin in Protein Solution with Cefoperazone by High-performance Frontal Analysis with Chemiluminescence Detection[J]. *Biomed Chromatogr*, 2003, **17**(1): 53-57.

[3] FENG Xiaoqiang, LI Xiaofang, FU Guoqing, *et al*. Study on Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Chitosan-Cu(Ⅱ)[J]. *Sci Technol Food Ind*, 2009, **30**(7): 119-121(in Chinese).
冯小强,李小芳,伏国庆,等. 壳聚糖铜(Ⅱ)配合物的制备及其抑菌性能[J]. 食品工业科技,2009,**30**(7):119-121.

[4] FENG Xiaoqiang, LI Xiaofang, YANG Sheng, *et al*. Synthesis, Characterization and Antibacterial Properties of Chitosan-Fe(Ⅲ) Complex[J]. *Nat Prod Res Develop*, 2009, **21**(6): 922-925(in Chinese).
冯小强,李小芳,杨声,等. 壳聚糖 Fe(Ⅲ)配合物的合成、表征及抑菌性能[J]. 天然产物研究与开发,2009,**21**(6):922-925.

[5] WANG Aiqin, ZHOU Jingfang, YU Xianda. Coordination of Fully Deacetylated Chitosan with Zn(Ⅱ) Ions[J]. *Acta Polym Sin*, 2000, **6**: 688-691(in Chinese).
王爱勤,周金芳,俞贤达. 完全脱乙酰化壳聚糖与 Zn(Ⅱ)的配位作用[J]. 高分子学报,2000,**6**:688-691.

[6] ZHOU Yuanzhen, WEI Yongfeng, ZHANG Weiping, *et al*. Synthesis and Characteristics of Chitosan-Ca as Coordination Polymer[J]. *Food Sci*, 2003, **24**(1): 36-39(in Chinese).
周元臻,魏永锋,张维平,等. 壳聚糖-Ca(Ⅱ)配位聚合物的合成及其性能表征[J]. 食品科学,2003,**24**(1):36-39.

[7] Chen Shuiping, Wu Guozhong, Zeng Hongyan. Preparation of High Antimicrobial Activity Thiourea Chitosan-Ag^+ Complex [J]. *Carbohydr Polym*, 2005, **60**(1): 33-38.

[8] LIU Xiaoyu, FU Tianxia. Study Progress on Antibacterial Activities of Chitin and Chitosan[J]. *Toothpaste Ind*, 2007, **2**: 40-42(in Chinese).
刘晓宇,付田霞. 甲壳素-壳聚糖的抑菌性能研究进展[J]. 牙膏工业,2007,**2**:40-42.

[9] XUAN Guangshan, WU Xiaonan, LI Yuping. Fluorescence Study on the Interaction of Acetylsalicylic Acid and Bovine Serum Albumin[J]. *Chinese J Spectrosc Lab*, 2005, **22**(4): 861-864(in Chinese).
玄光善,吴效楠,李玉平. 荧光光谱法研究乙酰水杨酸和牛血清蛋白的相互作用[J]. 光谱实验室,2005,**22**(4):861-864.

Preparation, Antibacterial Activities of Thiourea-chitosan-Co(Ⅱ) Complex and Interaction with Bovine Serum Albumin

FENG Xiaoqiang*, LI Xiaofang, YANG Sheng

(*College of Life Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui* 741001)

Abstract Thiourea-chitosan-Co(Ⅱ) complex was prepared and characterized by FT-IR, UV-Vis absorbance spectra and TG-DTA methods, the antibacterial activities of thiourea-chitosan-Co(Ⅱ) complex against *E. coli* and *St. aureus* were studied *in vitro*. Moreover, the interaction between thiourea-chitosan-Co(Ⅱ) complex and bovine serum albumin(BSA) was also studied by ultraviolet and fluorescence spectroscopies. The results confirm that the complex is formed, and the antibacterial activities of thiourea-chitosan-Co(Ⅱ) complex is obviously enhanced comparing to its ligands and the complex can quench the intrinsic fluorescence of BSA.

Keywords thiourea-chitosan-Co(Ⅱ) complex, antibacterial activity, bovine serum albumin