

# 对羟基苯甲酸壳聚糖酯的制备、表征和抗菌活性

赵希荣<sup>1,2</sup>, 夏文水<sup>1</sup>

(1.江南大学食品学院, 江苏 无锡

214036 2.淮阴工学院食品工程系, 江苏 淮安

223001)

**摘 要:** 壳聚糖经氨基保护、与对乙酰氧基苯甲酰氯发生酯化、再水合肼去保护合成得到了对羟基苯甲酸壳聚糖酯。在适宜的反应条件下, 对羟基苯甲酸壳聚糖酯酯化度可达130%、得率80%以上。产物经IR分析, 酸与壳聚糖之间生成了酯, 该酯溶解性略优于对羟基苯甲酸庚酯, 而醇溶性显著提高; 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抗菌试验表明, 该酯抗菌活性大于对羟基苯甲酸庚酯, 更优于壳聚糖。

**关键词:** 对羟基苯甲酸酯; 抗菌活性; 表征

Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Para-hydroxybenzoate Chitosan Ester

ZHAO Xi-rong<sup>1,2</sup>, XIA Wen-shui<sup>1</sup>

(1.School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi

214036, China

2.Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223001, China)

**Abstract:** After protection of amine group, chitosan reacted with 4-acetoxy-benzoate chloride to form an ester, and the ester was reacted with hydrazine hydrate to be deprotected, para-hydroxybenzoate chitosan ester was obtained. Under optimum reaction conditions, esterification degree of para-hydroxybenzoate chitosan ester was 130%, and yield reached 80%. IR spectrum showed the ester bond was formed between para-hydroxybenzoic acid and chitosan. Water solubility of the ester was slightly better than heptyl para-hydroxybenzoate, but alcohol solubility was greatly improved. The antimicrobial activity for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was better than heptyl para-hydroxybenzoate and much better than chitosan.

收稿日期: 2005-06-18

作者简介: 赵希荣(1961-), 男, 副教授, 在读博士生, 研究方向为多糖的改性和应用。

抑制三种类型。用 $[S]^{-1}$ 对 $V_0^{-1}$ 作图, 如图4所示。当有竞争性抑制剂存在时, 表观 $K_m'$ 会增大,  $K_m/V_{max}$ 也增大, 但是 $V_{max}$ 不变。图中所示结果表明, SPC对 $\alpha$ -淀粉酶的可逆性抑制属于竞争性抑制类型。由公式 $K_m' = K_m(1 + [I]/K_i)$ 可计算出抑制剂常数 $K_i = 2.71 \text{ mg/ml}$ 。

### 3 结 论

通过研究酶活性被抑制的动力学方法, 发现SPC对 $\alpha$ -淀粉酶具有明显的抑制作用, 抑制的机理是通过可逆的竞争性抑制来实现的。SPC对 $\alpha$ -淀粉酶的抑制常数 $K_i$ 是 $2.71 \text{ mg/ml}$ 。

参考文献:

- [1] 吴建平. 小曲白酒酿造法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995.
- [2] 刘睿, 潘思轶, 李涛, 等. 高粱原花青素对小曲酒酿造过程中挥发性成分影响的研究[J]. 食品科学, 2005.
- [3] 刘睿, 谢笔钧, 潘思轶, 等. 高粱种子外种皮中原花青素提取、纯化及其抗氧化活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2003, 18(4): 43-47, 51.
- [4] 刘睿, 段玉清, 谢笔钧, 等. 高粱外种皮中原花青素的提取工艺及其组分鉴定[J]. 农业工程学报, 2004, 20(1): 242-245.
- [5] 陈曾, 刘兢, 罗丹. 生物化学试验[M]. 合肥: 中国科技大学出版社, 1994.
- [6] B 施特马赫, 著. 钱嘉渊, 译. 酶的测定方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992.

Key words para-hydroxybenzoate chitosan ester; antimicrobial activity; characterization

中图分类号 TS202.3

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)09-0192-04

对羟基苯甲酸酯是一类新一代高效低毒杀菌防腐剂, 它的抗菌能力比苯甲酸和山梨酸及其盐类强, 应用 pH 范围比苯甲酸和山梨酸及其盐类广, 用量比苯甲酸和山梨酸及其盐低得多, 并且使用安全, 经济方便, 对人体刺激较小。在国内外已被广泛应用于食品、饮料、化妆品和医药等方面<sup>[1~7]</sup>。我国除了生产对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯和对羟基苯甲酸丙酯外, 其它酯类在国内尚属空白。对羟基苯甲酸酯中烷基的碳原子数越大, 其生产技术难度越大, 但杀菌作用越强, 特别是对羟基苯甲酸庚酯和对羟基苯甲酸辛酯, 生啤酒中加入  $8 \sim 12 \times 10^{-6}$  苯甲酸庚酯, 其效果与加热灭菌效果相同<sup>[8]</sup>。

壳聚糖具有一定的抗菌强度和抗菌谱, 同时壳聚糖 C-6 位羟基具有一定活性, 把壳聚糖当作多元醇, 对羟基苯甲酸作为酸, 从理论上两者之间也能发生酯化反应, 即壳聚糖与对羟基苯甲酸可合成得到对羟基苯甲酸-6-壳聚糖酯。这不仅可以显著地降低对羟基苯甲酸的毒性, 而且还可以在破坏壳聚糖原有游离氨基的基础上, 达到增强抗菌活性的目的。

查阅国内外文献, 尚无有关壳聚糖与对羟基苯甲酸制备对羟基苯甲酸-6-壳聚糖酯的资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

壳聚糖(DD=90%, 分子量 7000) 自制。

对羟基苯甲酸 CP; 邻苯二甲酸酐、无水乙醇、乙醚、NaOH、二甲基甲酰胺、乙酸酐、无水硫酸钠, 单水合肼, 氯化锌, 均为分析纯。

### 1.2 设备与器皿

D-60 型电动搅拌器, ZK-82B 电热真空干燥箱, SH2-3 型循环水多用真空泵, GX-40X 电热恒温鼓风干燥箱, FA2004N 电子天平, ZD-2 自动电位滴定仪, HH-4 型数显恒温水浴锅, PHS-3B 精密 pH 计, LDZX-40A 立式压力蒸汽灭菌器, RE52-1 旋转蒸发器, ST-250-A 生化培养箱, SW-CJ-1F 医用洁净工作台, UV2000 紫外可见光光度计, SHY-2A 水浴恒温振荡器, 带磁力搅拌的 500ml 电加热套; Nicolet 5DDXB FT-IR 光谱仪。

### 1.3 壳聚糖的氨基保护

先将 5g 邻苯二甲酸酐溶解于 40ml 二甲基甲酰胺中, 倒入装有搅拌器和回流冷凝器的三颈瓶中, 加入 2.0g 壳聚糖, 在充氮条件下, 边搅拌边将混合物加热至  $100^{\circ}\text{C}$ 。反应 10h 后, 溶液过滤, 将滤液倒入冰水中。收集沉淀物, 依次用乙醇和乙醚洗涤数次,  $60^{\circ}\text{C}$  真空干燥过夜, 得到产物<sup>[9]</sup>。

### 1.4 对羟基苯甲酸的对位羟基保护

称取 13.8g(0.1mol) 已预先干燥的对羟基苯甲酸, 倒

入装有搅拌器和回流冷凝器的三颈烧瓶中, 加入乙酸酐(13.2ml, 0.11mol), 加热至  $80^{\circ}\text{C}$ , 混合直至固体完全溶解, 加上几滴浓硫酸, 于  $80^{\circ}\text{C}$  水浴搅拌加热 1h。

反应结束后, 室温冷却, 再用冰水冷却处理, 加 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液调节 pH 值至中性, 沉淀析出, 过滤, 洗涤; 沉淀用一定体积 N,N-二甲基甲酰胺溶解, 过滤, 加入一定体积去离子水得到絮凝沉淀, 过滤, 滤饼经反复洗涤沉淀, 常压烘箱干燥, 得到白色固体。

### 1.5 对乙酰氧基苯甲酰氯的制备

在 250ml 圆底烧瓶中加入 18g 对乙酰氧基苯甲酸(0.1mol) 和摩尔比为 1:6 的亚硫酸氯( $\text{SOCl}_2$ , 43.6ml, 0.6mol/L), 装上回流冷凝管, 上接  $\text{CaCl}_2$  干燥管, 尾气通入 20% NaOH 溶液接收, 控制油浴温度在  $110^{\circ}\text{C}$ , 保持回流 60min, 结束反应。

改装置为常压蒸馏, 把  $\text{SOCl}_2$  尽量蒸出, 再经减压蒸馏将残余的  $\text{SOCl}_2$  除尽, 然后用油泵减压蒸馏装置改为减压蒸馏, 蒸出酰氯, 称重。

### 1.6 氨基保护对乙酰氧基苯甲酸-6-壳聚糖酯的合成

在装有搅拌、恒压滴液漏斗和回流冷凝管(上端接无水氯化钙干燥管)的 250ml 三口烧瓶中加入邻苯二甲酰壳聚糖胺和二甲基甲酰胺 30ml, 常温或微加热搅拌至溶液澄清, 搅拌下缓慢滴加对乙酰氧基苯甲酰氯(约需 30min), 在然后放入  $20 \sim 100^{\circ}\text{C}$  的油浴中保温  $20 \sim 100\text{min}$  使反应进行完全。

反应完成后, 在混合物中加入 50ml 蒸馏水, 用 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液调至中性, 再加入 50ml 乙醚, 机械搅拌 10min, 然后将全部液体倾入 250ml 的分液漏斗中, 静置分层后, 分出下层水层, 收集上层乙醚层, 水层再分别用 10ml 乙醚萃取三次, 合并醚层, 用无水硫酸钠干燥过夜, 过滤, 然后除去乙醚, 得到淡黄色固体。

### 1.7 壳聚糖酯衍生物的氨基和羟基去保护

将上述得到的产物溶解于 100ml 二甲基甲酰胺中, 加入 50ml 单水合肼和 80ml 水, 在充氮条件下, 边搅拌边将混合物加热至  $100^{\circ}\text{C}$ 。经反应 15h 后, 悬浮液过滤; 滤液中加入 100ml 水, 旋转式蒸发器真空浓缩后, 真空干燥。滤渣溶解于水中, 对蒸馏水透析 3d, 冷冻干燥, 得到微黄色固体对羟基苯甲酸壳聚糖酯。

### 1.8 产物的表征

#### 1.8.1 IR 光谱

KBr 压片法, 在  $4000 \sim 400\text{cm}^{-1}$  范围记录对羟基苯甲酸壳聚糖酯的 IR 图谱。

#### 1.8.2 溶解性

称取对羟基苯甲酸壳聚糖酯样品 0.1g 于 50ml 烧杯中, 在室温下分别加入蒸馏水和无水乙醇中, 搅拌后观察其溶解情况。

### 1.8.3 对羟基苯甲酸壳聚糖酯化度的测定

对准确称取 0.5g 样品于 250ml 碘量瓶中, 加入 20ml 蒸馏水, 3 滴酚酞指示剂, 混匀后用 0.1mol/L NaOH 溶液滴定至呈微红色, 再加入 25ml 0.5mol/L NaOH 标准溶液, 机械振荡 1 h 进行皂化。

用洗瓶冲洗碘量瓶的塞子及瓶壁, 将已皂化好的含过量碱的溶液用 0.5mol/L HCl 标准溶液进行滴定至红色消失为终点, 记录 HCl 消耗量, 同时做空白试验。

酯化度(%) = (1 - 反应后酸值 / 反应前酸值) × 100%

### 1.9 抑菌活性测定

采用比浊法测定对羟基苯甲酸壳聚糖酯的抗菌活性。

#### 1.9.1 试验菌种

采用室温下放置变质牛奶中的混合微生物菌群作为供试菌种。

#### 1.9.2 培养基

肉汤培养基: 牛肉膏 0.5%, 蛋白胨 1%, 葡萄糖 1%, 氯化钠 0.5%, pH7.5。

#### 1.9.3 抑菌活性实验

采用比浊法测定微生物的生长情况。分光光度计于 620nm 处测定添加防腐剂培养液后吸光度随时间的变化。

## 2 结果与讨论

### 2.1 氨基保护

壳聚糖 C-2 位氨基亲电性要大于 C-6 位羟基, 所以优先在 C-2 位氨基发生酰胺化反应, 因此必须先将氨基保护起来, 再进行 C-6 位羟基的酯化反应。保护氨基的方法很多, 如甲醛、苯甲醛与壳聚糖中游离氨基 100% 生成席夫碱<sup>[11]</sup>, 但在本研究中 C-6 位生成的是酯, 若采用酸处理去保护时, C-6 位生成的酯可能会同时发生水解, 所以不宜采用此种方法。

邻苯二甲酸酐可与壳聚糖游离氨基生成邻苯二甲酰壳聚糖亚胺, 且达到 100% 反应, 且去保护无需酸水解。所以本研究采用了邻苯二甲酸酐作为氨基保护剂。

### 2.2 乙酰氧基苯甲酸的合成

对羟基苯甲酸与乙酸酐反应产物为 4-乙酰氧基(乙酰基)苯甲酸, 经测定产物熔点为 187~189℃, 与文献值(188~189℃)相吻合<sup>[10]</sup>。

### 2.3 对乙酰氧基苯甲酰氯的合成

由于壳聚糖为大分子, 空间位阻较大, 直接酯化是可逆反应, 酯化得率很低。所以一般采用由羧酸衍生物如对羟基苯甲酸酐或酰氯等亲核试剂更为理想, 其反应机理为亲核加成消除过程, 且亲核加成反应活性是酰氯 > 酸酐 > 酯, 而从消除反应看, 其反应速率决定于离去基团本身的碱性, 碱性越弱, 越易离去, 反应活性为酰氯 > 酸酐 > 酯<sup>[11]</sup>。本研究中酸提供者采用酰氯的方式。

由于对羟基苯甲酰氯与对羟基苯甲酸的对位羟基之间会发生了自身酯化反应, 所以采用了先将对羟基苯甲

酸的对位羟基保护生成对乙酰氧基苯甲酸, 再与亚硫酰氯进行酰氯化的反应途径。该法除生成对乙酰氧基苯甲酰氯外, 只生成气态的二氧化硫和氯化氢, 无任何固态的副产物残留, 因而产品易于分离纯化, 由于亚硫酰氯及对乙酰氧基苯甲酰氯均易水解, 故反应中必须保证反应物、仪器无水干燥。

考察了原料配比、反应温度、反应时间等工艺条件, 得出当反应物摩尔比(亚硫酰氯对乙酰氧基苯甲酸摩尔比为 1:6, 体系温度控制 90℃, 保持回流 60min, 转化率可达到 95% 以上。

### 2.4 氨基保护对乙酰氧基苯甲酸壳聚糖酯的合成

经过反复试验得出酯化优化工艺条件为: 对羟基苯甲酰氯与壳聚糖摩尔比为 5:1, 反应温度 80℃, 反应时间为 80min, 酯化度可达到 1.20。

### 2.5 壳聚糖衍生物去保护

如果壳聚糖与酰氯直接反应, 得到的产物主要为与 C<sub>2</sub> 位氨基反应的 N-酰胺取代产物, 所以必须预先将游离氨基保护, 一般情况下常常采用苯甲醛等醛类化合物与壳聚糖生成席夫碱, 起到保护氨基的目的, 但是壳聚糖席夫碱去保护时常采用酸水解法, 所以在去保护过程中不仅席夫碱发生水解, 与此同时酯部分也发生水解, 所以本研究采用先生成 N-酰胺的方式, 而酰胺可与水合肼反应去保护从而得到了 O-酯化的壳聚糖酯; 对位羟基的保护基团乙酰氧基在碱性条件可去保护, 在上述氨基去保护过程中, 发现对位羟基的保护基团也脱去, 这样就无需增加去保护的反应步骤。

### 2.6 对羟基苯甲酸壳聚糖酯的 IR 图谱

从对羟基苯甲酸-6-壳聚糖酯的 IR 图谱(略)可以看出, 1712cm<sup>-1</sup> 处归属于 C=O 基伸缩振动和 1162cm<sup>-1</sup> 处归属于 C-O-C 对称伸缩振动的吸收峰显著增强, 这表明酯化反应的发生, 与文献中对羟基苯甲酸丁酯<sup>[12]</sup>很相似, 同时可以看出 3300~3400cm<sup>-1</sup> 处归属于 O-H 伸缩振动和 N-H 伸缩振动相互叠加而成的吸收峰逐渐变弱变尖。羟基和氨基吸收峰远比对羟基苯甲酸丁酯更宽, 这是因为壳聚糖分子上还有大量氨基和羟基。随着酯化度的增加, 1020cm<sup>-1</sup> 处归属于 C<sub>6</sub>-OH 的吸收峰峰值的减小略快于 1088cm<sup>-1</sup> 处归属于 C<sub>3</sub>-OH 的吸收峰的峰值的减小, 这是由于 C<sub>6</sub>-OH 为伯羟基, 转动比 C<sub>3</sub>-OH 自由, 故其酯化作用较 C<sub>3</sub>-OH 强, 酯化反应主要在 C<sub>6</sub>-OH 上进行, 待达到一定的程度后再在 C<sub>3</sub>-OH 上进行。

### 2.7 对羟基苯甲酸壳聚糖酯的溶解性

目前对羟基苯甲酸酯的最大问题是在水中溶解性甚小, 操作不便, 且随着醇的烷基链越长, 酯的溶解性越差, 但是抗菌活性越强。低分子量壳聚糖可溶解于水, 但抗菌活性不强, 持久性差, 连接上对羟基苯甲酸后可看作是烷基较长的对羟基苯甲酸酯, 应赋予了该衍生物更强的抗菌活性,

对羟基苯甲酸壳聚糖酯产品为无色或微黄色细小晶

体或结晶性粉末, 无臭, 稍有涩味, 对光和热均稳定, 无吸湿性, 难溶或微溶于水。随着对羟基苯甲酸酯中 R 基团的增大, 水溶性逐渐减小, 脂溶性逐渐增加, 见表 1, 对羟基苯甲酸壳聚糖酯水溶性优于对羟基苯甲酸丁酯。同时改变了壳聚糖不溶于醇类溶剂的缺陷, 可采取先溶解于乙醇中再加入食品体系的方式。

表1 对羟基苯甲酸酯和对羟基苯甲酸壳聚糖酯的溶解度(g/L)  
Table 1 Solubility of para-hydroxybenzoic acid esters and chitosan ester

溶剂	温度(℃)	甲酯	乙酯	丙酯	丁酯	庚酯	壳聚糖酯
水	25	0.25	0.17	0.05	0.02	0.1379	0.10
水	80	2.0	0.86	0.45	0.15	-	0.20
乙醇	25	52	70	95	210	-	150

## 2.8 抗菌活性的测定

添加 0.05% 对羟基苯甲酸壳聚糖酯后在不同培养时间肉汤培养基中微生物的生长情况如表 2 所示。由于对羟基苯甲酸庚酯分子中的烷链长, 水溶性差, 所以添加对羟基苯甲酸庚酯的微生物肉汤培养基的初始光密度值  $A_{620}$  较高。当微生物肉汤培养基的  $A_{620}$  值大于 1 时, 未添加任何防腐剂的对照所用的时间为 20h, 添加对羟基苯甲酸乙酯、丙酯和庚酯的培养所用时间分别为 35、70 和 45h, 而对羟基苯甲酸壳聚糖酯也达到了 50h。

表2 对羟基苯甲酸酯类对混合菌群生长的影响  
Table 2 Effect of para-hydroxybenzoic esters on microbial growth amount

培养时间(h)	对照	乙酯	丙酯	庚酯	壳聚糖酯
0	0.022	0.020	0.025	0.070	0.050
5	0.177	0.040	0.025	0.101	0.087
10	0.571	0.080	0.035	0.256	0.122
15	0.865	0.155	0.098	0.456	0.234
20	1.100	0.598	0.145	0.567	0.290
25	1.250	0.775	0.297	0.607	0.350
30	1.390	0.890	0.378	0.678	0.413
35	1.690	1.140	0.499	0.799	0.589
40	1.980	1.220	0.505	0.950	0.790
45	2.470	1.310	0.535	1.010	0.890
50	2.560	1.311	0.551	1.100	1.050
55	2.780	1.315	0.560	1.120	1.120
60	2.890	1.320	0.563	1.160	1.125
65	2.910	1.322	0.570	1.211	1.222
70	2.991	1.328	0.575	1.230	1.229

图 1 为添加 0.05% 对羟基苯甲酸酯类后牛奶酸败菌群的生长曲线。对羟基苯甲酸酯类分子中的抗菌活性功能域为酚氧基通过苯环与羰基共扼而形成的电子中继结构系统, 抗菌活性中心是羰基。对羟基苯甲酸壳聚糖酯分子与对羟基苯甲酸庚酯成酯烷基链中的碳原子数目多, 抗菌活性中心周围空间位阻大, 这无疑会影响抗菌活性与生物活性大分子发生有效碰撞而参与反应的概率与对羟基苯甲酸庚酯不同, 对羟基苯甲酸壳聚糖酯的

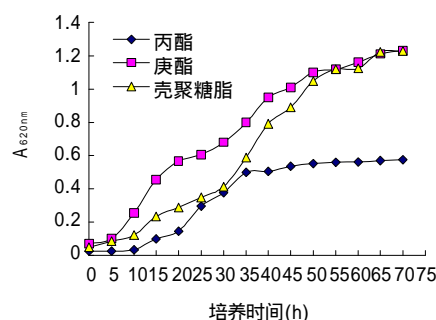


图1 对羟基苯甲酸壳聚糖酯对混合菌群生长的影响

Fig.1 Effect of para-hydroxybenzoic esters on mixture bacterials

成酯烷基为氨基葡萄糖单元, 亲水性要强于庚基, 即水溶性要强于对羟基苯甲酸庚酯, 这样, 与在水相中生长与繁殖的微生物相互作用几率高一些, 所以对羟基苯甲酸壳聚糖酯抗菌活性要强于对羟基苯甲酸庚酯。

## 3 结 论

在氨基保护的前提下, 利用壳聚糖羟基的活泼特性与对羟基苯甲酸反应制备得到了对羟基苯甲酸壳聚糖酯, 从而可在壳聚糖分子链上引入对羟基苯甲酸。对羟基苯甲酸壳聚糖酯水溶性不好, 但优于对羟基苯甲酸庚酯, 同时醇溶性显著提高; 对羟基苯甲酸壳聚糖酯具有一定的抗菌活性, 其抗菌活性强于对羟基苯甲酸庚酯, 更优于壳聚糖自身。所以对羟基苯甲酸壳聚糖酯可作为安全、低毒的防腐抗菌剂应用于食品体系中。

## 参考文献:

- [1] 林日高, 林捷, 周爱梅, 等. 对羟基苯甲酸酯类钠盐的抑菌作用及稳定性研究[J]. 中国食品添加剂, 2002, (3): 19-23.
- [2] 宁正祥, 王若峰, 谭龙飞. 食品防腐剂研究进展[J]. 食品与发酵工业, 1995, (1): 72-75.
- [3] 许文苑, 林海禄, 熊国宝, 等. 对羟基苯甲酸酯合成研究进展[J]. 食品科技, 2002, (4): 23-26.
- [4] 陈效贵. 食品防腐剂的技术发展趋势[J]. 江苏调味品, 2001, (1): 7-9.
- [5] 段杉, 彭喜春, 彭志英. 新型食品添加剂[J]. 中国食品添加剂, 2002, (4): 62-65.
- [6] 孙晓云, 单颖, 孔德珍, 等. 新型食品防腐剂——对羟基苯甲酸庚酯的合成[J]. 精细化工, 1986, 3(3): 5-10.
- [7] D Ymichu Y M. Inhibition of clostridium botulinum by p-hydroxybenzoic acid and alkyl esters[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1979, 6(15): 798-800.
- [8] 杨寿清. 对羟基苯甲酸酯衍生物的理化性质及其在食品中的应用[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2003, 9(3): 30-31.
- [9] Hanno B, Volker F. Carbohydr Res[J]. 2001, (43): 331.
- [10] 李建章, 秦圣英. 羟胺酸及其配合物的合成[J]. 四川师范学院学报(自然科学版), 1999, 20(3): 46-50.
- [11] 赵丽娟, 崔焕茹, 王雪平. 苯甲酰氯合成工艺的研究[J]. 河北化工, 2003, (3): 24-25.
- [12] 章思规. 精细有机化学品技术手册(上册)[M]. 北京: 科学出版社, 1991. 369.