

螢光黃於 N-二丙基幾丁聚醣衍生物之抗菌性及抗氧化性

Antibacterial Activity and Antioxidant Activity of Fluorescein Grafted with N-diallylammonium Chitosan Derivate

周啟雄, 梁芳誠, 蔡雁靈, 吳宗翰, 蘇楠雄, 傅菴濡, 王啟忠, 黃俛婷, 鄭棋尹
C. H. Jou, F. C. Liang, Y. T. Tsai, J. H. Wu, N. X. Su, R. C. Fu, C. C. Wang, W.T. Huang, C.Y. Cheng
亞東技術學院材料與纖維系
Department of Materials and Textiles, Oriental Institute of Technology
F. C. Liang : frank62112003@yahoo.com.tw

摘要

本研究係以自行合成的 N-(2-羥基)丙基-3-甲基二丙烯基四級銨鹽 glycidyl-methyl-diallyl ammonium salt (GMDAS)修飾幾丁聚醣，進行 N-(2-羥基)丙基-3-甲基二丙烯基四級銨鹽幾丁聚醣衍生物(HMDC)合成，再將螢光黃(fluorescein)與 HMDC 進行修飾反應，而得 HMDC-FL 具光感性螢光幾丁聚醣衍生物。以傅立葉紅外線光譜分析儀(FT-IR)分析螢光黃、HMDC 及 HMDC-FL 光感性螢光幾丁聚醣衍生物，紫外光/可見光吸收光譜儀(UV/Vis Spectrophotometer)計算出螢光染料的接枝率及測定 DPPH 自由基清除能力。HMDC 及 HMDC-FL 分別以金黃色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) 和肺炎桿菌 (Klebsiella pneumonia) 測試最小殺菌濃度 (MBC)來評估抗菌活性。研究結果發現 HMDC-FL 對金黃色葡萄球菌及肺炎桿菌的抗菌活性高於 HMDC。

關鍵字: 幾丁聚醣、螢光黃、抗菌性、抗氧化

Abstract

In this research, the N-(2-hydroxyl) propyl-3-methyl diallyl quaternary ammonium chitosan salts (HMDC) of modified chitosan derivatives, which were synthesized by chitosan with glycidyl methyl diallyl ammonium salt (GMDAS). Furthermore, HMDC was modified by the reaction with fluorescein of fluorescent dyes to produce HMDC-FL of photosensitive fluorescent chitosan derivatives. HMDC-FL of photosensitive fluorescent chitosan derivatives was examined by using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) to determine the chemical structures. The grafted ratio of fluorescein grafted with HMDC was determined and calculated by UV/Vis Spectrophotometer, and antioxidant activity were evaluated by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay. The antibacterial activities of HMDC and HMDC-FL tested against two bacteria: Staphylococcus aureus and Klebsiella pneumonia. Antibacterial activity was evaluated by minimum bactericidal concentration (MBC). The results showed the antibacterial activity of HMDC-FL was higher than HMDC.

Keywords : chitosan, fluorescein, antibacterial activity, antioxidant activity

1. 前言

幾丁聚醣四級銨鹽化為幾丁聚醣的衍生物之一，四級銨鹽化幾丁聚醣衍生物係將幾丁聚醣的胺基轉換成四級銨鹽或把一個低分子四級銨鹽接到胺基上而得，亦或是利用苯甲醛與幾丁聚醣的胺基反應，四級銨化合物則與幾丁聚醣 C5 上羥基反應而得。幾丁聚醣為陽離子型高分子，具有抗菌效果。然而幾丁聚醣因其為聚多醣體，要達到較佳的抗菌效果所添加的劑量當對地提高，四級銨鹽化幾丁聚醣衍生物係將幾丁聚醣的胺基轉換成四級銨鹽，或把一個低分子四級銨鹽接到胺基而得，提高幾丁聚醣的抗菌效果。因此國內業界、學術單位及研究單位不虞餘力分別投入大量資源開始生產幾丁聚醣改質及相關衍生產品，幾丁聚醣對於國內紡織、生物醫學材料或化妝品產業的發展而言，是一項非常重要的材料。

螢光是自然界的一種常見的發光現象，當含有螢光的化合物受到紫外光或可見光照射時，這些物質就會發射出波長和強度各不相同的光線，停止照射光照射時，這種光線就會馬上或逐漸消失，這就是螢光。螢光物質並非主動發光體，而是「光致發光」的現象，本身並不放出熱量，所以是一種冷發光。螢光黃及其衍生物是重要的螢光探針材料，螢光黃(fluorescein)又稱螢光黃，由於氧當架橋鍵把兩個苯環固定在一個平面上，使分子具有剛性共平面結構，在激發光的作用下能產生強烈的螢光。外表呈橙色/暗紅色結晶粉末。熔點 314~316°C。不溶於水、乙醚、氯仿和苯。溶於稀鹼液、沸乙醇和稀酸。通常應用在蛋白質和 DNA 的螢光標記、顯微鏡所使用的螢光染料激光增益介質的類型、取證和血清學檢測潛在的血跡及染料追蹤。

本研究利用自行合成之 N-(2-羥基) 丙基-3-甲基二丙烯基四級銨鹽來修飾幾丁聚醣，所得之 N-(2-羥基) 丙基-3-甲基二丙烯基四級銨鹽化幾丁聚醣(HMDC)，再以 Fluorescein 螢光染料與四級銨鹽化幾丁聚醣(HMDC)反應而得 HMDC-FL，期望能改善幾丁聚醣衍生物的抗菌性及抗氧化性，增加幾丁聚醣在生物醫學及紡織領域的應用。

2. 理論

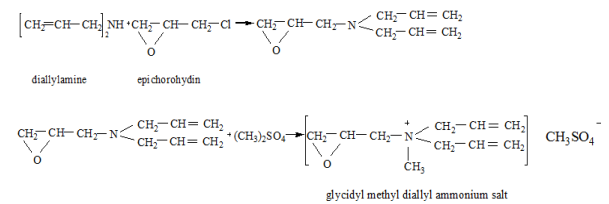
幾丁聚醣抗菌原理

幾丁聚醣為多價陽離子聚合物(polycationic polymer)，在酸性條件下，幾丁聚醣的胺基會變成帶正電的 $-NH_3^+$ ，與細菌表面陰電荷分子因靜電作用互相吸引，產生附著作用，形成凝聚現象，導致細胞壁組織鬆散而改變其通透性，使細菌內部物質如蛋白質、核苷酸等外流造成細胞死亡。幾丁聚醣的去乙酰度越高，帶正電的 $-NH_3^+$ 與細菌表面陰電性物質作用力會越強，其抑菌效果越佳。

3. 實驗

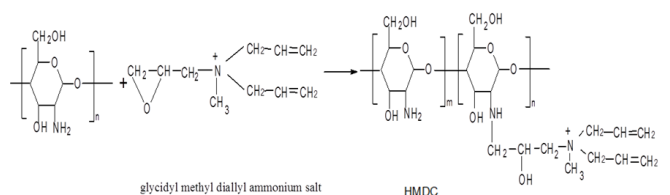
3-1 四級銨鹽化合物之合成

本研究先合成製備具有不飽和二丙烯基的四級銨鹽化合物，以二丙烯胺與 3-氯-1,2-環氧丙烷反應合成二丙烯胺-3-氯-2-氫氧丙烷之中間體。之後取二甲基磺酸混合加入中間體後，攪拌反應而獲得具有硫酸基及不飽和雙丙烯基之四級銨鹽化合物(縮水-甲基-二丙烯基, GMDAS)，其化學反應式如下所示：



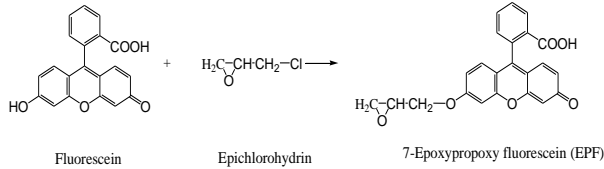
3-2 HMDC 幾丁聚醣修飾反應

將 6 g 幾丁聚醣分散於 85°C 的 120 ml 水中，25.5mL 的 GMDAS 分批加於幾丁聚醣水溶液中，在反應 10 小時後過濾，過濾後之溶液倒入丙酮析出，留下的膠狀產物置於 100 mL 的甲醇溶液中溶解，將上述甲醇溶液倒入 4 : 1 丙酮/乙醇的 250 mL 混合溶液中析出及過濾，析出物以乙醇溶液索氏萃取法萃取 24 小時後，萃取物以 70°C 真空乾燥後即可得 HMDC。



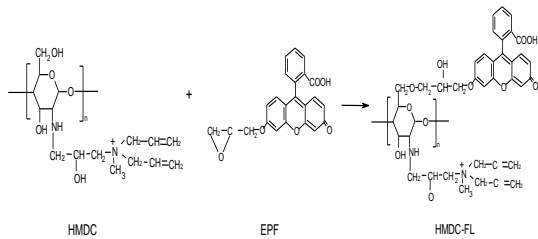
3-3 製備 EPF

將碘化鉀、環氧氯丙烷 (EP)和 10 mL 乙醇以至於 50°C 混合攪拌，另外，螢光黃(Fluorescein)加入含有碳酸鉀的 20 mL 乙醇中攪拌。分別將上述溶液混合於 50°C 攪拌 7 小時，最後濃縮後即得 EPF，其化學反應式如下所示：



3-4 製備含螢光黃幾丁聚醣衍生物

將四級銨鹽化幾丁聚醣(HMDC)溶於 DMSO 在 80°C 攪拌 24 小時，再將含有 EPF 的 DMSO 溶液緩慢的倒入，以 80°C 攪拌 50 小時，經濃縮而得 HMDC-FL，其化學反應式如下所示：



3-5 傅立葉紅外線光譜分析 (FT-IR)

以傅立葉轉換紅外線光譜儀(Fourier Transform Infrared Spectrometers)測試 Fluorescein、HMDC 及 HMDC-FL 之紅外線光譜，藉以分析官能基特徵峰的消長與出現位置，研判其化學構造。

3-6 Fluorescein 於 HMDC 之接枝率分析

以紫外光/可見光吸收光譜儀先對不同濃度的 Fluorescein 作一檢量線，利用外插法計算 Fluorescein 螢光染料於 HMDC 的接枝率。

3-7 抗氧化活性測試

以 50 vol% 甲醇水溶液為溶劑，製備 50 M 的 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 甲醇溶液，2 mL 的 DPPH 甲醇溶液分別與 2 mL 濃度為 0.1 mg/mL 的 Fluorescein、HMDC 及 HMDC-FL 混合均勻後避光靜置 2 小時，再將 Fluorescein、HMDC 及

HMDC-FL 溶液以紫外線/可見光分光光譜儀以波長 523 nm 為標準測定之吸光值。DPPH 自由基抑制率 (%)=(1-(實驗組吸收值/對照組吸收值))×100%

3-8 抗菌活性

3-8-1 對照組

本實驗測試菌株為金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538P) 及肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*, ATCC 4352)，將菌株於斜面培養基上進行劃線培養，以 37°C 培養 24 小時後加入 5 mL 生理食鹽水，從斜面培養基中各取 1 mL 加入含有 9 mL 液態培養基 (nutrient broth)，植菌數直接進行 10 倍稀釋，各稀釋列取出 0.1 mL 菌液到 9 cm 平板培養皿上，加入 nutrient agar (45°C) 充分混合後冷卻成固態，最後將平板培養皿置於 37°C 培養箱中培養 24 小時後取出，計算植菌數。另外，將液態培養基於 37°C 培養 24 小時後，依上述步驟來推算植菌數經 24 小時培養後之菌數。細菌活性值係判定實驗菌株的活性是否達實驗所需之生理活性要求，本實驗的細菌活性值 [log(24 小時培養後菌數-植菌數)] 控制在 1.5~2.5 內，此乃避免使用過低或過高活性之細菌，而影響實驗的準確性。

3-8-2 最小殺菌濃度

分別吸取 1 mL 不同濃度之 HMDC 和 HMDC-FL 溶液加至含有金黃色葡萄球菌 $1.0 \pm 0.3 \times 10^5$ CFU (colony-forming units) 的菌液(植菌數)之離心管內，將離心管放置於 37°C 培養箱培養 24 小時後以 10 倍稀釋，隨後將由各稀釋列取 0.1 mL 菌液到 9 cm 平板培養皿上，加入 nutrient agar (45°C) 充分混合後冷卻成固態，最後將平板培養皿置於 37°C 培養箱中培養 24 小時後取出並計算數菌。最小殺菌濃度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 為測試樣本於菌液中經 18 小時培養後，菌數為 0 時表示細菌完全死滅。

4. 結果與討論

4-1 FT-IR 光譜分析

圖 1 為 Chitosan、GMDAS 及 HMDC 的紅外線光譜圖，由圖中可看到幾丁聚醣的吸收帶在 1650 cm^{-1} 為一級胺的吸收帶，主要是由於幾丁聚醣上的 NH_2 或 NH 發生振動；在 3420 cm^{-1} 處的吸收帶變較寬，說明 OH 的吸收變強，表現出醣類的結構。HMDC 在 1643 cm^{-1} 處為醯胺的吸收帶，在 1537 cm^{-1} 處的吸收代表四級胺鹽基團上的甲基 C-H 鍵的伸縮振動。

圖 2 為 Fluorescein、HMDC 及 HMDC-FL 的紅外線光譜圖，HMDC、Flourescein 及 HMDC-EPF 的 FT-IR 紅外線光譜圖，由圖中發現 HMDC-EPF 的吸收帶在 3433 cm^{-1} 為 OH 強烈吸收峰，在 1120 cm^{-1} 與 1028 cm^{-1} 為 C-O 伸展吸收帶，在 680 cm^{-1} 的吸收帶為芳香性不同平面的 C-H 彎曲所造成。

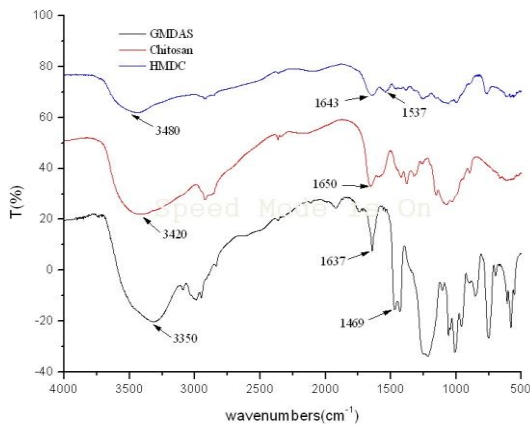


圖 1 Chitosan、GMDAS 及 HMD 的紅外線光譜圖

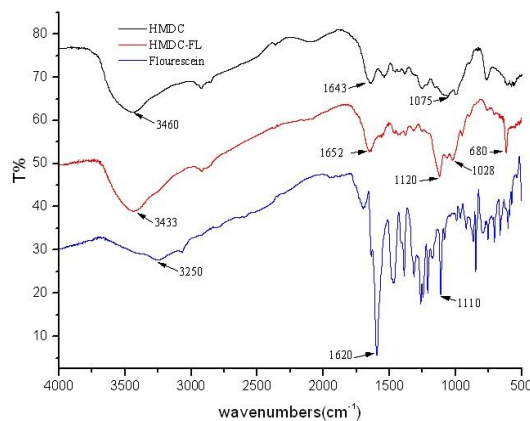


圖 2 Fluorescein、HMDC 及 HMDC-FL 的紅外線光譜圖

4-2 螢光黃於 HMDC 之置換率分析及其抗氧化活性

圖 3 為 Fluorescein 於 HMDC 的接枝率。

以 Fluorescein 為標準品，使用五種不同的濃度進行測定，並以紫外光可見光分光光譜儀測量波長 485 nm 之吸收值，並根據此吸收值與 Fluorescein 濃

度之關係作一檢量線。將自行合成的 HMDC-FL 稀釋為 5×10^{-4} 之吸收值以外插法代入上述檢量線，並計算出接枝率為 0.84%。

表 1 為四級胺鹽化幾丁聚醣衍生物之抗氧化活性，測試樣本在相同濃度條件下 DPPH 自由基清除能力依次為 HMDC-FL > HMDC > Fluorescein。

HMDC-FL 其自由基清除率為 83% 較 Fluorescein 自由基清除率為 59% 和 HMDC 自由基清除率為 63% 分別增加 24% 及 20%，其原因可能是 HMDC-FL 染料結構本身含有 -OH 及 -COOH 的結構與 HMDC 結構上含有 -OH 、 NH_2 及 -NH_3^+ 的緣故，HMDC-FL 可提供氫與 DPPH 結合的末端基團較 Fluorescein 及 HMDC 多而提高自由基清除的能力。

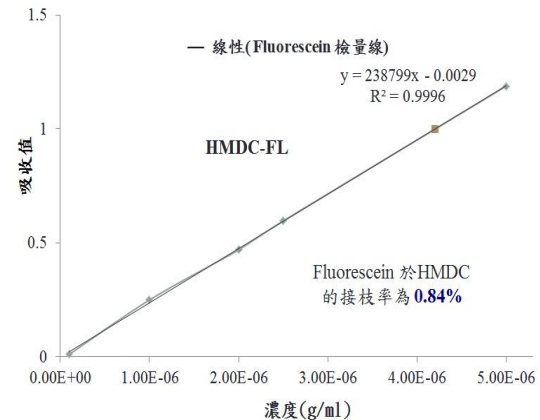


圖 3 Fluorescein 於 HMDC 的接枝率

表 1 幾丁聚醣衍生物之抗氧化活性

Samples	DPPH清除率(%)
Fluorescein	59
HMDC	63
HMDC-FL	83

4.3 抗菌活性

由表 2 實驗結果顯示 HMDC 及 HMDC-FL 對金黃色葡萄球菌的最小殺菌濃度(MBC)分別為 0.54 mg/mL 及 0.21 mg/mL ，對肺炎桿菌的最小殺菌濃度(MBC)分別為 0.62 mg/mL 及 0.37 mg/mL 。HMDC 對金黃色葡萄球菌及肺炎桿菌抗菌性低於 HMDC-FL 可能是受到 HMDC-FL 中的螢光黃的末端酮基(C=O)影響。HMDC-FL 對金黃色葡萄球菌及肺炎桿菌的 MBC 較 HMDC 分別減少約 2.6 倍及 1.7 倍，即表

HMDC-FL 對金黃色葡萄球菌的抗菌效果遠高於 HMDC，當 Fluorescein 接枝於 HMDC 後會增加對金黃色葡萄球菌及肺炎桿菌的抗菌性，因此 HMDC-FL 對金黃色葡萄球菌和肺炎桿菌達到完全殺菌時的最小劑量因此隨之降低。另外，HMDC-FL 及 HMDC 對肺炎桿菌的 MBC 值遠大於對金黃色葡萄球菌的 MBC 值，HMDC-FL 及 HMDC 對肺炎桿菌的 MBC 分別為金黃色葡萄球菌約 1.1 倍及 1.8 倍，可能是格蘭式陰性菌的肺炎桿菌較格蘭式陽性菌的金黃色葡萄球菌其細胞壁多了一層細胞外膜，此細胞外膜阻礙 HMDC-FL 及 HMDC 對肺炎桿菌之作用，因此要完全殺死肺炎桿菌所需的 HMDC-FL 及 HMDC 劑量較金黃色葡萄球菌所投入的劑量需增加約 1-2 倍左右，即表示 HMDC-FL 及 HMDC 對肺炎桿菌的抗菌效果低於金黃色葡萄球菌。

表2 幾丁聚醣衍生物之最小殺菌濃度

Samples	金黃色葡萄球菌 (mg/mL)	肺炎桿菌 (mg/mL)
HMDC	0.54	0.62
HMDC-FL	0.21	0.37

5. 結論

本研究以螢光黃接枝於四級銨鹽化幾丁聚醣修飾物 HMDC，合成所得含螢光黃的四級銨鹽化幾丁聚醣修飾物 HMDC-FL。

HMDC-FL 的抗氧化活性，由 DPPH 整合效能中發現自由基整合能力約為 83%。HMDC-FL 將金黃色葡萄球菌和肺炎桿菌完全殺死的最小殺菌濃度較 HMDC 減少約 38% 和 66%，即表示 HMDC-FL 的抗菌效果遠高於 HMDC。

本研究結果顯示螢光黃接枝於幾丁聚醣衍生物 HMDC-FL 係兼具抗氧化及抗菌性能的複合機能性染料型加工劑，經螢光黃改質之幾丁聚醣衍生物其抗菌性及抗氧化性較未經改質之幾丁聚醣衍生物有顯著增加。

建議

HMDC-FL 若用於棉織物染色，經一次加工後兼具著色、抗菌性及抗氧化性，螢光黃隸屬於光敏感性染料，在日光下（含紫外線波長）有光動力殺菌效果，可應用於一般衣著用紡織品，在消費端使用時織物在日光下照射增加殺菌效果，應用生物醫學領域如齒科填充物減少手術感染問題、抗腫瘤細胞以及運用螢光阻斷技術，顯示特定的 DNA 片段的存在等。

HMDC-FL 於紡織產業應用時，染色及抗菌加工僅需一次加工，減少 50% 加工製程工段及藥劑用量，大幅減少廢水排放，除賦予紡織品多機能性、環保減廢及降低使用加工劑成本等特色，亦可衍生應用於農業應用及化妝品領域，創造多面向產業應用效益。

參考文獻

1. R.A.A. Muzzarelli, E.N. Tanfani, *Carbohydr. Polym.*, 5, 297 (1985).
2. V. A. Spinelli, M. C. M. Laranjeira, V. T. Favere. *React. Funct. Polym.*, 61, 347 (2004).
3. 黃國豪、劉富雄，幾丁聚醣薄膜的製備及其性質之研究。雲林科技大學 工業化學與災害防治研究所碩士論文，(2004)
4. V. A. Spinelli, M. C. M. Laranjeira, V. T. Favere. *React. Funct. Polym.*, 61, 347 (2004)
5. Z. Jia, D. Shen, W. Xu, *Carbohydr. Res.*, 1333, 1 (2001)
6. D. Zhao, X. Gao, *染料工業*, 32, 1 (1995).
7. D. L. Harris, M. Mutz, *Debunking the Myth: Validation of fluorescein for testing the precision of nanoliter dispensing*. Technical Brief, Labcyte, Inc., Sunnyvale, CA (2006)
8. W. C. Sun, K. R. Gee, D. H. Klaubert, R. P. Haugland, *J. Org. Chem.*, 62, 6469 (1997)
9. K. Burgess, Y. Ueno, G. S. Jiao, *Synthesis*, 15, 2591 (2004).