

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202210005



胍基化壳聚糖季铵盐的 制备及其抗菌性能

王林, 辛梅华, 李明春, 雷嘉华

(华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 以三聚氯氰(TCT)为中间桥梁,将聚六亚甲基双胍(PHMB)接枝到 *N*-(2-羟丙基-3-甲基氯化铵)壳聚糖(HTCC)上,制备胍基壳聚糖季铵盐(HCP). 研究制备 HCP 的最佳反应条件,采用元素分析、傅里叶变换红外光谱(FTIR)和核磁共振氢谱(^1H NMR)对产物的结构进行表征,并测试其抗菌性能. 得到 HCP 的最佳反应条件为 HTCC 和 TCT 的摩尔比 1.0 : 2.5, HTCC 和 PHMB 的质量比 1.0 : 1.2, 缚酸剂为三乙胺, TCT 一取代的反应时间 8 h, 二取代的反应时间 14 h, 反应温度 40 $^{\circ}\text{C}$. 结果表明: 制得的 HCP 对大肠杆菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的最低抑菌质量浓度分别为 0.020, 0.005 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 质量浓度为 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 HCP 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑菌率分别为 89.8% 和 100.0%, 高于相同质量浓度下 HTCC 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑菌率 18.2% 和 18.7%.

关键词: 壳聚糖; 季铵盐; 聚六亚甲基双胍; 三聚氯氰; 抗菌活性

中图分类号: O 636.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2023)01-0079-08

Preparation and Antibacterial Properties of Guanidine Chitosan Quaternary Ammonium Salt

WANG Lin, XIN Meihua, LI Mingchun, LEI Jiahua

(College of Materials Science and Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Guanidine chitosan quaternary ammonium salt (HCP) was prepared by grafting poly(hexamethylene biguanide) (PHMB) onto *N*-(2-hydroxypropyl trimethylammonium chloride) chitosan (HTCC) using cyanuric chloride (TCT) as the intermediate bridge, and the optimum reaction conditions for the preparation of HCP were studied. The structure of the product was characterized by elemental analysis, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy (^1H NMR), and its antibacterial properties were tested. The optimum reaction conditions of HCP were obtained as follows: the molar ratio of HTCC and TCT was 1.0 : 2.5, the mass ratio of HTCC and PHMB was 1.0 : 1.2, the acid binding agent was triethylamine, the reaction time of one substitution of TCT was 8 h, the reaction time of two substitution was 14 h, and the reaction temperature was 40 $^{\circ}\text{C}$. The results showed that the minimum inhibitory mass concentrations of HCP against *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) were 0.020 and 0.005 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The inhibition rates of HCP with mass concentration of 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ on *E. coli* and *S. aureus* were 89.8% and 100.0%, respectively, which were higher than those of HTCC at the same mass concentration on *E. coli* and *S. aureus* by 18.2% and 18.7%.

收稿日期: 2022-10-12

通信作者: 李明春(1962-),男,教授,博士,博士生导师,主要从事功能高分子材料的研究. E-mail: mcli@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省科技计划项目(2019H6014, 2020Y4012)

Keywords: chitosan; quaternary ammonium salt; poly(hexamethylene biguanide); cyanuric chloride; antibacterial activity

聚六亚甲基双胍(PHMB)由于水溶性高、化学性质稳定、抗菌活性优异和毒性低等优点,在胍盐中占有突出的地位^[1]. PHMB 在生理 pH 值下具有高的正电荷,对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和白色念珠菌都有疗效,用 PHMB 处理伤口还有利于伤口愈合^[2]. 目前,PHMB 常用于添加到水凝胶中,赋予水凝胶抗菌性能^[3-5],以制备抗菌涂层^[1,6-7]. PHMB 在水中具有良好的溶解性能,附着在材料表面的耐久性差,为解决这一问题,Song 等^[8]首先合成丙烯酸-PHMB,通过碳碳双键和羟基的加聚反应接枝到纤维素上,制备的纤维素膜对大肠杆菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)具有良好的抑制作用.

天然高分子壳聚糖具有良好的生物相容性、可降解性和广谱抗菌性^[9],但是,壳聚糖的溶解性限制了其应用. 壳聚糖季铵化改性不仅可以提高壳聚糖的溶解性能,还可以提升壳聚糖的抗菌性能,扩展壳聚糖的应用^[10]. Oyervides-Muoz 等^[11]将制备的苯扎溴铵、溴化吡啶和溴化三乙基铵分别与壳聚糖进行接枝反应得到 3 种不同的壳聚糖季铵盐,抗菌结果表明,壳聚糖季铵盐的抗菌性能显著提高. Wang 等^[12]在壳聚糖季铵盐(HACC)缓冲液中添加 PHMB 制备复合抗菌剂,抗菌实验和细胞毒性结果表明,复合抗菌剂的抗菌效果和生物安全性均优于单一的 HACC 或 PHMB. Abri 等^[13]通过肝素和壳聚糖之间的离子相互作用制备载 PHMB 的纳米粒子,PHMB 的持续可控释放超过 10 d,制备的载药纳米粒子可以直接杀死革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌. Xu 等^[14]将壳聚糖和 PHMB 固定在聚丙烯腈纳米纤维上,得到具有耐洗性和持久抗菌活性的纳米纤维.

为提高季铵化壳聚糖的抗菌性能,本文将聚六亚甲基双胍接枝到 *N*-(2-羟丙基-3-甲基氯化铵)壳聚糖(HTCC)上,制备胍基壳聚糖季铵盐(HCP),并测定产物的最低抑菌质量浓度和抑菌率.

1 实验部分

1.1 主要试剂及仪器

壳聚糖(CS,分子质量为 50 ku,脱乙酰度为 89%),山东省青岛市海汇生物工程有限公司;2,3-环氧丙基-3-甲基氯化铵(ETA),山东省东营市国丰精细化工有限公司;聚六亚甲基双胍(PHMB),北京市桑普生物化学技术有限公司;三聚氯氰(TCT)、*N,N*-二异丙基乙胺(DIPEA),上海市安耐吉化学技术有限公司;*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、三乙胺(TEA),上海市国药集团化学试剂有限公司;1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、琼脂、蛋白胨、酵母浸粉,上海市阿拉丁生化科技有限公司. 其他试剂为市售分析纯.

IS50 型傅里叶变换红外光谱仪,美国 Nicolet 公司;AVANCE III 500 MHz 型核磁共振波谱仪,德国 Bruker 公司;Vario MICRO cube 型元素分析仪,德国 Elementar 公司;FD-1B-50 型冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司.

1.2 胍基壳聚糖季铵盐的制备

1.2.1 壳聚糖季铵盐的制备 将 25.0 g ETA 溶解在 20 mL 水中得 ETA 溶液,5.0 g 壳聚糖溶解在 200 mL 体积分数为 2%的醋酸水溶液中,将 ETA 溶液缓慢滴加到壳聚糖溶液中,升温至 70 ℃,恒温反应 8 h,蒸馏水透析,冷冻干燥得 *N*-(2-羟丙基-3-甲基氯化铵)壳聚糖(HTCC).

1.2.2 壳聚糖季铵盐接枝聚六亚甲基双胍的制备 采用正交实验法对壳聚糖季铵盐接枝聚六亚甲基双胍的反应条件进行优化,接枝反应的正交因素水平,如表 1 所示. 表 1 中: t_1 , t_2 分别为第一、第二阶段

表 1 正交因素水平表
Tab. 1 Table of orthogonal factor level

水平	t_1 /h	$n(\text{HTCC}) : n(\text{TCT})$	$m(\text{HTCC}) : m(\text{PHMB})$	缚酸剂	t_2 /h	$\theta/^\circ\text{C}$
1	2	1.0 : 1.0	1.0 : 0.6	DIPEA	6	30
2	4	1.0 : 1.5	1.0 : 0.8	DBU	10	35
3	6	1.0 : 2.0	1.0 : 1.0	TEA	14	40
4	8	1.0 : 2.5	1.0 : 1.2	DMAP	18	45
5	12	1.0 : 3.0	1.0 : 1.5	NaHCO ₃	24	50

反应时间; $n(\text{HTCC}) : n(\text{TCT})$ 为 HTCC 和 TCT 的物质的量之比; $m(\text{HTCC}) : m(\text{PHMB})$ 为 HTCC 和 PHMB 的质量比; θ 为第二阶段反应温度.

取 5 mL DMF 置于烧瓶中,0~5 ℃下加入 0.36 g TCT,完全溶解后,滴加 0.76 g PHMB 溶液,用缚酸剂调节反应的 pH 值使之维持在中性,恒温反应 8 h,得溶液 1.称取 0.24 g HTCC 溶解在 30 mL 水中,将溶液 1 加入 HTCC 溶液中,调节 pH 值使之维持在中性,40 ℃反应 14 h,透析后冷冻干燥得到胍基壳聚糖季铵盐(HCP). HCP 的制备路线,如图 1 所示.

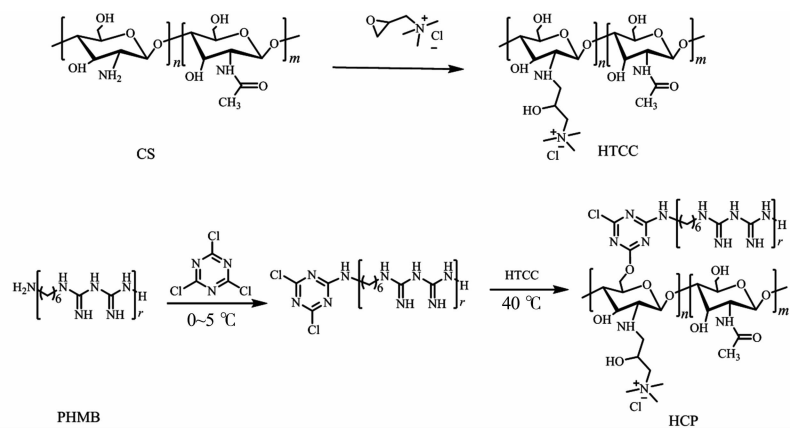


图 1 HCP 的制备路线
Fig.1 Preparation route of HCP

1.3 元素分析(EA)

壳聚糖及其改性产物在 80 ℃真空干燥至恒质量,采用 Vario MICRO cube 型元素分析仪进行测定.壳聚糖的脱乙酰度(DD)和壳聚糖季铵盐的季铵化取代度(DS)通过 C 的质量分数 $w(\text{C})$ 和 N 的质量分数 $w(\text{N})$ 之比计算.由于 PHMB 是聚合物,胍基壳聚糖季铵盐的胍基化取代度无法通过 $w(\text{C})/w(\text{N})$ 计算得出,因此,用 N 的质量分数的变化表示^[15].

1.4 傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析

采用溴化钾压片法,在 IS50 型傅里叶变换红外光谱仪上测定壳聚糖及其改性产物的红外光谱,扫描范围为 4 000~500 cm^{-1} ,扫描 32 次.

1.5 核磁共振氢谱(¹H NMR)分析

PHMB、壳聚糖季铵盐和胍基壳聚糖季铵盐溶解在 D_2O 中,用 AVANCE III 500 MHz 型核磁共振波谱仪测定产物的¹H NMR,测定温度为 22 ℃,采样 64 次,弛豫时间为 2 s.

1.6 抗菌性能测试

1.6.1 培养基的配制 LB 液体培养基的配制^[10]:取 1.0 g 胰蛋白胍,0.5 g 酵母浸粉,1.0 g 氯化钠至锥形瓶中,加入 100 mL 去离子水溶解,用浓度为 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0,固体培养基另加入 2.0 g 琼脂,高温灭菌后使用.

1.6.2 最低抑菌质量浓度和最低杀菌质量浓度 冷冻保存的菌液先在 37 ℃摇床中培养 18~24 h,再用梯度稀释法稀释菌液备用.将样品溶解在无菌水中,配制质量浓度为 5.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液,倍半稀释后,各取 100 μL 依次加入 96 孔板中,然后在各孔中加入 100 μL 稀释后的菌液.将 96 孔板放置在 37 ℃培养 18 h,观察浊度,取无明显浊度变化对应的质量浓度记为该样品的最低抑菌质量浓度(ρ_{MI}),设置 3 组平行实验.取大于最低抑菌质量浓度的孔板中的混合液 100 μL 涂覆在琼脂板培养基上,37 ℃培养 18 h,琼脂板上菌落数小于或等于 5 个对应的质量浓度记为最低杀菌质量浓度(ρ_{MB}).

1.6.3 抑菌率测定 无菌水配制样品溶液,样品质量浓度分别为 5.0,2.0,1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.取等体积的样品溶液和稀释后的菌液混匀后置于摇床中动态培养 30 min,取 100 μL 混合液均匀涂覆在琼脂板上,以无菌水为对照组,37 ℃培养 18~24 h,读取各培养皿上细菌的菌落数,根据菌落数计算抑菌率,重复 3 次取平均值.抑菌率的计算公式为

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照组菌落数} - \text{实验组菌落数}}{\text{对照组菌落数}} \times 100\%.$$

2 实验结果与讨论

2.1 不同反应条件对聚六亚甲基双胍取代度的影响

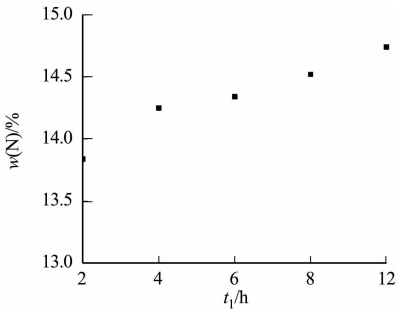
由于 PHMB 聚合物中 N 的质量分数较高,将 PHMB 接枝到 HTCC 上得到的产物中 N 的质量分数也随之增加.采用正交实验,以产物中 N 的质量分数为指标,通过各水平对应的 N 的质量分数的平均值间接选择最佳反应条件,最后综合考虑取代度和生产成本得出最佳的反应条件^[16].不同反应条件下制备的胍基壳聚糖季铵盐的实验结果,如表 2 所示.

表 2 不同反应条件下制备的 HCP 的实验结果

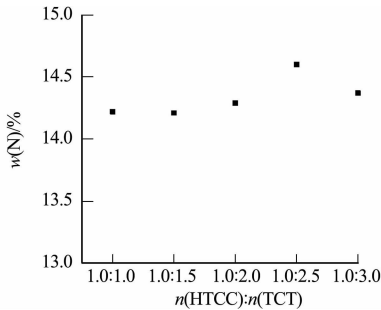
Tab. 2 Experimental results of HCP prepared under different reaction conditions

序号	t_1/h	$n(\text{HTCC}):n(\text{TCT})$	$m(\text{HTCC}):m(\text{PHMB})$	缚酸剂	t_2/h	$\theta/^\circ\text{C}$	$w(\text{N})/\%$
1	2	1.0:1.0	1.0:0.6	DIPEA	6	30	11.88
2	2	1.0:1.5	1.0:0.8	DBU	10	35	12.85
3	2	1.0:2.0	1.0:1.0	TEA	14	40	14.74
4	2	1.0:2.5	1.0:1.2	DMAP	18	45	14.42
5	2	1.0:3.0	1.0:1.5	NaHCO ₃	24	50	15.31
6	4	1.0:1.0	1.0:0.8	TEA	18	50	13.81
7	4	1.0:1.5	1.0:1.0	DMAP	24	30	12.97
8	4	1.0:2.0	1.0:1.2	NaHCO ₃	6	35	15.11
9	4	1.0:2.5	1.0:1.5	DIPEA	10	40	16.09
10	4	1.0:3.0	1.0:0.6	DBU	14	45	13.27
11	6	1.0:1.0	1.0:1.0	NaHCO ₃	10	45	14.10
12	6	1.0:1.5	1.0:1.2	DIPEA	14	50	15.26
13	6	1.0:2.0	1.0:1.5	DBU	18	30	15.31
14	6	1.0:2.5	1.0:0.6	TEA	24	35	13.65
15	6	1.0:3.0	1.0:0.8	DMAP	6	40	13.19
16	8	1.0:1.0	1.0:1.2	DBU	24	40	15.90
17	8	1.0:1.5	1.0:1.5	TEA	6	45	16.25
18	8	1.0:2.0	1.0:0.6	DMAP	10	50	12.09
19	8	1.0:2.5	1.0:0.8	NaHCO ₃	14	30	14.19
20	8	1.0:3.0	1.0:1.0	DIPEA	18	40	14.17
21	12	1.0:1.0	1.0:1.5	DMAP	14	35	15.23
22	12	1.0:1.5	1.0:0.6	NaHCO ₃	18	40	13.74
23	12	1.0:2.0	1.0:0.8	DIPEA	24	45	14.18
24	12	1.0:2.5	1.0:1.0	DBU	6	50	14.66
25	12	1.0:3.0	1.0:1.2	TEA	10	30	15.90

不同反应条件对 HCP 取代度的影响,如图 2 所示.由图 2(a)可知:三聚氯氰和 PHMB 发生一取代的取代度随着反应时间的延长而增大;前 4 h,随着反应时间的延长,反应速率增加较快,4 h 后反应速率增加缓慢.这是因为初始溶液中单体质量浓度较高,分子之间发生碰撞的几率较大;随着反应时间的延长,溶液中单体逐渐被消耗,反应速率逐渐降低.因此,选择第一阶段反应时间为 8 h.



(a) 第一阶段反应时间



(b) $n(\text{HTCC}):n(\text{TCT})$

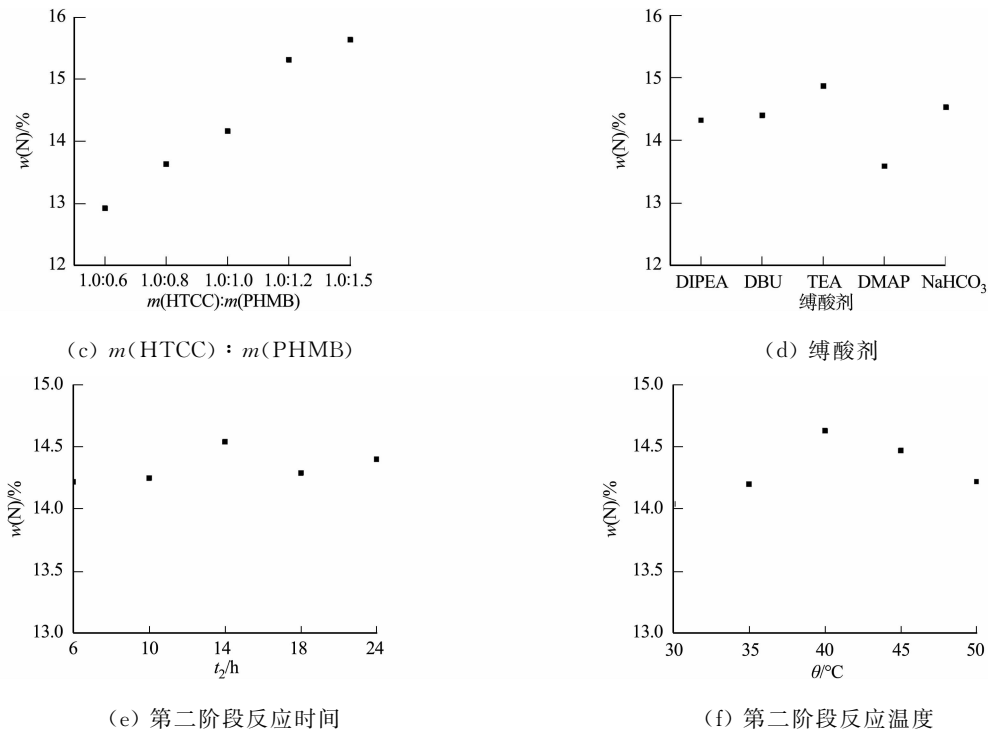


图 2 不同反应条件对 HCP 取代度的影响

Fig. 2 Effect of different reaction conditions on substitution degree of HCP

由图 2(b)可知:HTCC 和 TCT 的最佳物质的量之比为 1.0 : 2.5. 在实验过程中,PHMB 溶解在水中,三聚氯氰在水溶液中会发生一定程度的水解而被消耗,生成三聚氰酸^[17],因此,反应过程中三聚氯氰应适当过量,但过量太多会造成原料的浪费.

由图 2(c)可知:HTCC 和 PHMB 的质量比对取代度的影响最大;随着 PHMB 质量的增加,取代度呈增大趋势;当 $m(\text{HTCC}) : m(\text{PHMB})$ 达到 1.0 : 1.2 时,进一步增大 PHMB 的量,由于反应位阻的增大,取代度增加不大. 因此,选取 HTCC 和 PHMB 的质量比为 1.0 : 1.2.

缚酸剂在一定程度上会影响 PHMB 的取代度. 由图 2(d)可知:三乙胺的缚酸效果高于其他缚酸剂. 这是因为 DIPEA,DMAP,TEA 等均会和 TCT 发生反应,在缚酸的同时也会和原料发生反应^[18],从而 影响 PHMB 的取代度. 因此,选择实验的最佳缚酸剂为 TEA.

由于位阻的影响,三聚氯氰发生二取代的温度需适当增加^[19]. 由图 2(e),(f)可知:最佳反应时间为 14 h,最佳反应温度为 40 $^\circ\text{C}$;随着第二阶段反应温度和反应时间的增加,取代度呈现先增加后减小的趋势. 这是因为反应以水为溶剂,三聚氯氰在水溶液中会发生部分水解,随着温度的升高和反应时间的延长,三聚氯氰的水解程度加剧^[10].

2.2 元素分析

采用元素分析仪对壳聚糖、壳聚糖季铵盐和胍基壳聚糖季铵盐进行测定,壳聚糖衍生物的元素分析结果,如表 3 所示. 表 3 中: $w(\text{H})$ 为 H 的质量分数. 由表 3 可知:壳聚糖的脱乙酰度为 86.00%;壳聚糖季铵盐的季铵化取代度为 43.59%;胍基壳聚糖季铵盐中 N 的质量分数为 15.51%,高于壳聚糖季铵盐中 N 的质量分数.

表 3 壳聚糖衍生物的元素分析与取代度

Tab. 3 Elemental analysis and substitution degree of chitosan derivatives

样品	$w(\text{C})/\%$	$w(\text{N})/\%$	$w(\text{H})/\%$	DD/ $\%$	DS/ $\%$
CS	41.69	7.75	7.14	86.00	—
HTCC	41.11	7.74	8.30	—	43.59
HCP	41.57	15.51	8.26	—	—

2.3 FTIR 分析

采用溴化钾压片法,在 IS50 型傅里叶变换红外光谱仪上测得 CS,HTCC 和 HCP 的红外光谱,如图

3 所示. 图 3 中: ν 为波数.

由图 3 可知:与 CS 相比,HTCC 的红外光谱图中,1 477 cm^{-1} 处出现明显的尖峰为季铵盐中甲基的 C—H 弯曲振动峰,且在 1 599 cm^{-1} 处的伯胺 N—H 的弯曲峰减弱,表明季铵盐基团已引入到壳聚糖的氨基上^[20];在 HCP 的红外光谱图中,1 604 和 1 587 cm^{-1} 处的吸收峰为 C=N 的伸缩振动和 N—H 的弯曲振动^[8],2 921 和 2 853 cm^{-1} 处出现的吸收峰为饱和甲基和亚甲基的伸缩振动峰,在 720 cm^{-1} 处出现了 $(-\text{CH}_2-)_n(n\geq 4)$ 基团的特征吸收峰^[21],表明 PHMB 已通过三聚氰氯桥梁接枝到 HTCC 上.

2.4 ^1H NMR 分析

PHMB,HTCC 和 HCP 的 ^1H NMR 谱图,如图 4 所示.图 4 中: δ 为化学位移.由图 4 可知:4.70 对应的是溶剂 D_2O 的特征峰;在 PHMB 的 ^1H NMR 谱图中,3.03 处出现的特征峰为 PHMB 与氨基相连的亚甲基的质子峰,1.40 和 1.20 处的特征峰对应的是远离氨基的 4 个亚甲基的质子峰;在 HTCC 的 ^1H NMR 谱图中,3.14 处出现的尖而强的峰为三甲基季铵盐中甲基的质子峰,1.95 处的特征峰为壳聚糖中未脱除乙酰氨基上的甲基质子峰^[20];在 HCP 的 ^1H NMR 谱图中,与图 4(b)相比,在 1.40 和 1.20 处出现 PHMB 的特征吸收峰,表明胍基已接枝到壳聚糖季铵盐上.由 ^1H NMR 谱图进一步说明已制得胍基壳聚糖季铵盐.

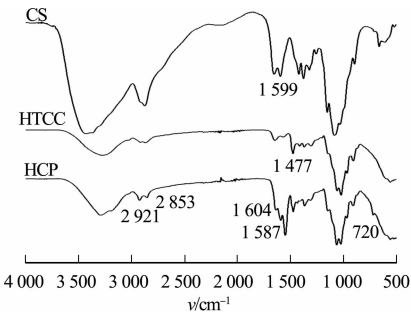


图 3 CS,HTCC 和 HCP 的 FTIR 图
Fig. 3 FTIR spectra of CS, HTCC and HCP

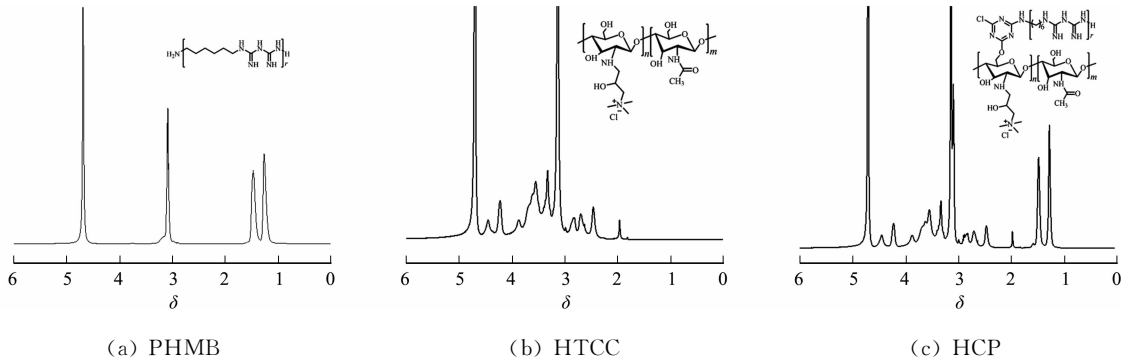


图 4 PHMB,HTCC 和 HCP 的 ^1H NMR 谱图
Fig. 4 ^1H NMR spectra of PHMB, HTCC and HCP

2.5 抗菌性能

2.5.1 最低抑菌、最低杀菌质量浓度 最低抑菌质量浓度通常用来评价样品对微生物的生长抑制效果.测得两种壳聚糖衍生物 HTCC 和 HCP 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的最低抑菌质量浓度(ρ_{MI})和最低杀菌质量浓度(ρ_{MB}),如表 4 所示.

由表 4 可知:HTCC 和 HCP 对 *E. coli* 的最低抑菌质量浓度分别为 0.625,0.020 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,对 *S. aureus* 的最低抑菌质量浓度分别为 0.020,0.005 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;而 HTCC 和 HCP 对 *E. coli* 的最低杀菌质量浓度分别为 2.500,0.156 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,对 *S. aureus* 的最低杀菌质量浓度分别为 0.156,0.010 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.结果表明,HCP 的最低抑菌质量浓度明显低于 HTCC,说明 PHMB 的引入显著提高了 HTCC 对两种细菌生长的抑制作用.这是因为 PHMB 具有高活性和正电荷,增加了壳聚糖的电荷密度,容易被带负电荷的微生物吸收,进而抑制细菌的活性^[8].HTCC 和 HCP 对 *S. aureus* 的抑菌效果优于对 *E. coli* 的抑菌效果,这可能与细菌的结构有关,*E. coli* 的外壳由外膜和内膜组成,两层膜之间有肽聚糖,而*S. aureus*由于缺乏外膜,更有利于抗菌剂的进攻,容易被破坏,导致内容物流出,从而使细菌死亡^[22].

2.5.2 抑菌率 为进一步评价 HTCC 和 HCP 的抗菌活性,分别测定了不同质量浓度(ρ)下 HTCC 和

表 4 HTCC 和 HCP 的 ρ_{MI} 和 ρ_{MB}
Tab. 4 ρ_{MI} and ρ_{MB} of HTCC and HCP

样品	$\rho_{\text{MI}}/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$		$\rho_{\text{MB}}/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
HTCC	0.625	0.020	2.500	0.156
HCP	0.020	0.005	0.156	0.010

HCP 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑菌率(η),结果如图 5 所示.

由图 5 可知:HTCC 的抑菌效果较差,尤其是对 *E. coli*,当 HTCC 的质量浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对 *E. coli* 的抑菌率为 18.2% ,当 HTCC 的质量浓度达到 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其抑菌率仅为 39.3% ;HTCC 对 *S. aureus* 的抑菌效果稍优于 *E. coli*,且抑菌率随着 HTCC 质量浓度的增加而增加,当 HTCC 的质量浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对 *S. aureus* 的抑菌率为 18.7% ,当 HTCC 的质量浓度达到 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其抑菌率可达 73.3% ,这与最低抑菌质量浓度的结果一致. HTCC 接枝 PHMB 后,可以明显增加其抑菌能力;质量浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HCP 对 *E. coli* 的抑菌率为 81.1% ,当 HCP 质量浓度增加到 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其对 *E. coli* 的抑菌率可达 89.8% ;质量浓度为 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HCP 对 *S. aureus* 的抑菌率可达 96.1% ,质量浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HCP 对 *S. aureus* 的抑菌率为 100% ,均高于相同质量浓度下 HTCC 的抑菌率,这与表 4 的测定结果一致.

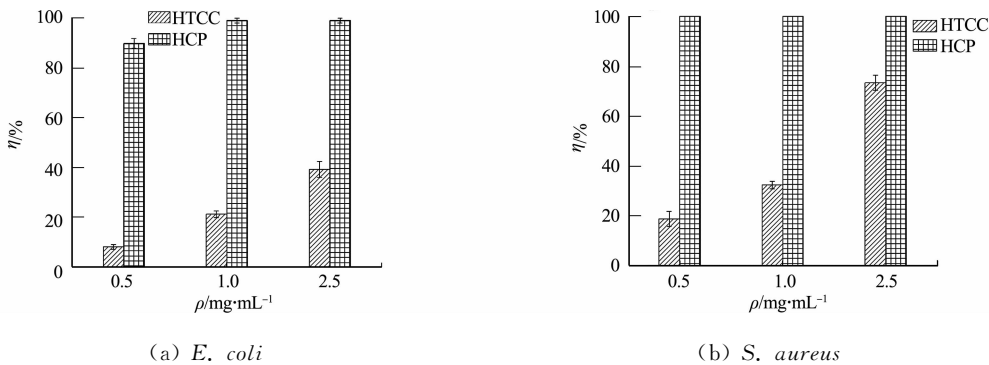


图 5 HTCC 和 HCP 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑菌率

Fig. 5 Antibacterial rate of HTCC and HCP on *E. coli* and *S. aureus*

3 结论

以 *N*-(2-羟丙基-3-甲基氯化铵)壳聚糖和聚六亚甲基双胍为原料,三聚氯氰为桥梁,制备胍基壳聚糖季铵盐衍生物,采用元素分析、傅里叶变换红外光谱和核磁共振波谱对产物的结构进行表征,并测定其抗菌性能. 正交实验结果表明,胍基壳聚糖季铵盐的最佳反应条件为 HTCC 和 TCT 的物质的量比 $1.0:2.5$,HTCC 和 PHMB 的质量比 $1.0:1.2$,缚酸剂为三乙胺,三聚氯氰一取代的反应时间 8 h ,二取代的反应时间 14 h ,反应温度 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

抗菌性能测定结果表明,壳聚糖季铵盐经胍基化改性后,可以明显提高其抗菌效果;质量浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HCP 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑菌率分别为 89.8% 和 100.0% ,高于相同质量浓度下 HTCC 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑菌率 18.2% 和 18.7% . 胍基化壳聚糖季铵盐优异的抗菌性能在环境消毒、抗菌纺织面料开发等领域具有潜在的应用前景.

参考文献:

[1] YU Huan, LIU Lin, YANG Huawei, *et al.* Water-insoluble polymeric guanidine derivative and application in the preparation of antibacterial coating of catheter[J]. ACS Applied Materials Interfaces, 2018, 10(45): 39257-39267. DOI:10.1021/acsami.8b13868.

[2] ALVES P J, BARRETO R T, BARROIS B M, *et al.* Update on the role of antiseptics in the management of chronic wounds with critical colonisation and/or biofilm[J]. International Wound Journal, 2021, 18(3): 342-358. DOI:10.1111/iwj.13537.

[3] MASSARELLI E, SILVA D, PIMENTA A. F. R, *et al.* Polyvinyl alcohol/chitosan wound dressings loaded with antiseptics[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2021, 593: 120110. DOI:10.1016/j.ijpharm.2020.120110.

[4] NI Yunzhou, QIAN Zhixiang, YIN Yu, *et al.* Polyvinyl alcohol/chitosan/polyhexamethylene biguanide phase separation system: A potential topical antibacterial formulation with enhanced antimicrobial effect[J]. Molecules, 2020, 25(6): 1334-1346. DOI:10.3390/molecules25061334.

[5] LIN Y J, CHANG CHIEN B Y, LEE Y H. Injectable and thermoresponsive hybrid hydrogel with Antibacterial, An-

- ti-inflammatory, oxygen Transport, and enhanced cell growth activities for improved diabetic wound healing[J]. *European Polymer Journal*, 2022, 175: 111364. DOI: 10. 1016/j. eurpolymj. 2022. 111364.
- [6] NG I S, OOI C W, LIU B L, *et al.* Antibacterial efficacy of chitosan- and poly(hexamethylene biguanide)-immobilized nanofiber membrane[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 844-854. DOI: 10. 1016/j. ijbiomac. 2020. 03. 127.
- [7] PENG Wan, YIN Hua, LIU Peiming, *et al.* Covalently construction of poly(hexamethylene biguanide) as high-efficiency antibacterial coating for silicone rubber[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 412: 128707. DOI: 10. 1016/j. cej. 2021. 128707.
- [8] SONG Xiaoming, ZHANG Luyao, WANG Yan, *et al.* Long term antibacterial effect cellulose film was modified with polyhexamethylene biguanide (PHMB) [J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 184: 115038. DOI: 10. 1016/j. indcrop. 2022. 115038.
- [9] BAKSHI P S, SELVAKUMAR D, KADIRVELU K, *et al.* Chitosan as an environment friendly biomaterial: A review on recent modifications and applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150: 1072-1083. DOI: 10. 1016/j. ijbiomac. 2019. 10. 113.
- [10] 车秋凌, 辛梅华, 李明春, 等. *O*-一氯均三嗪-*N,N,N*-三甲基壳聚糖的合成及其在羊毛织物抗菌中的应用[J]. *化工进展*, 2018, 37(3): 1098-1104. DOI: 10. 16085/j. issn. 1000-6613. 2017-1955.
- [11] OYERVIDES-MUNOZ E, POLLET E, ULRICH G, *et al.* Original method for synthesis of chitosan-based antimicrobial agent by quaternary ammonium grafting[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 157: 1922-1932. DOI: 10. 1016/j. carbpol. 2016. 11. 081.
- [12] WANG Huafu, YAO Chen, QIAN Kun, *et al.* Balance of disinfection and cytotoxicity of hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan with polyhexamethylene biguanide at low concentrations[J]. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 2017, 54(12): 923-930. DOI: 10. 1080/10601325. 2017. 1381922.
- [13] ABRI S, GHATPANDE A, RESS J, *et al.* Polyionic complexed antibacterial heparin-chitosan particles for antibiotic delivery[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2019, 2: 5848-5858. DOI: 10. 1021/acsabm. 9b00833.
- [14] XU Fanxuan, OOI C W, LIU Binglan, *et al.* Antibacterial efficacy of poly(hexamethylene biguanide) immobilized on chitosan/dye-modified nanofiber membranes[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 181: 508-520. DOI: 10. 1016/j. ijbiomac. 2021. 03. 151.
- [15] ZHANG Kai, HELM J, PESCHEL D, *et al.* NMR and FT Raman characterisation of regioselectively sulfated chitosan regarding the distribution of sulfate groups and the degree of substitution[J]. *Polymer*, 2010, 51: 4698-4705. DOI: 10. 1016/j. polymer. 2010. 08. 034.
- [16] 王林, 辛梅华, 李明春, 等. 催化氢化还原法制备的 *N,N*-双烷基化壳聚糖[J]. *华侨大学学报(自然科学版)*, 2019, 40(3): 350-355. DOI: 10. 11830/ISSN. 1000-5013. 201903029.
- [17] 李雪菲. 基于薄荷醇的新型抗菌高分子材料[D]. 北京: 北京化工大学, 2019.
- [18] SCHMIDT A, MORDHORST T. Synthesis of 4-(dimethyl)pyridinium-substituted pyrazine, pyridazine, 1,3,5-triazine, purine, and imidazole[J]. *Heterocycles*, 2006, 68(7): 1393-1400. DOI: 10. 3987/COM-06-10748.
- [19] 张月华, 光善仪, 郝娇娇, 等. 一种以三聚氯氰为桥基的新型小分子功能活性染料的合成[J]. *合成化学*, 2016, 24(9): 804-807. DOI: 10. 15952/j. cnki. cjsc. 1005-1511. 2016. 09. 15394.
- [20] 李玮, 李明春, 辛梅华. 糠醛改性 *O*-季铵化壳聚糖衍生物的合成及其抗菌性能[J]. *化工进展*, 2014, 33(4): 966-970, 987. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-6613. 2014. 04. 030.
- [21] 王贝, 王仲, 刘桂艳, 等. 环境友好型消毒剂 PHMB-HCl 的合成工艺优化[J]. *生物化工*, 2022, 8(4): 112-116.
- [22] ZHOU Z X, WEI D F, GUAN Y, *et al.* Damage of *Escherichia coli* membrane by bactericidal agent polyhexamethylene guanidine hydrochloride: Micrographic evidences[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(3): 898-907. DOI: 10. 1111/j. 1365-2672. 2009. 04482. x.

(责任编辑: 黄晓楠 英文审校: 刘源岗)