

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202305007



# 酚基壳聚糖季铵盐的结构对抗菌和 抗生物被膜活性的影响

王林, 辛梅华, 李明春, 石露露, 赖旺坤

(华侨大学 材料科学与工程学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 制备邻羟基苯甲酰化壳聚糖(OPC)、间羟基苯甲酰化壳聚糖(MPC)、对羟基苯甲酰化壳聚糖(PPC)、3,5-二羟基苯甲酰化壳聚糖(DPC)、3,4,5-三羟基苯甲酰化壳聚糖(TPC)、*O*-(2-羟丙基三甲基氯化铵)壳聚糖(QACS)和 *O*-(2-羟丙基三甲基氯化铵)-*N*-对羟基苯甲酰化壳聚糖(QAPPC) 7 种壳聚糖衍生物,采用核磁共振氢谱和元素分析表征产物的结构,并测试产物的抗菌活性和抗生物被膜活性。结果表明:产物的抗菌活性和抗生物被膜活性排序为 PPC>OPC>MPC;质量浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 PPC 对大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的抑菌率分别为 78.2%,100.0%,质量浓度为  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 PPC 对 *E. coli*, *S. aureus*形成的生物被膜的清除率分别为 75.3%,87.7%;将对羟基苯甲酸接枝到 QACS 的氨基上,制备的 QAPPC 的抗菌活性和抗生物被膜活性均优于 QACS 和 PPC,酚基和季铵盐具有协同抗菌效果;质量浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 QAPPC 对 *E. coli*, *S. aureus* 的抑菌率分别为 83.3%,100.0%,质量浓度为  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 QAPPC 对 *E. coli*, *S. aureus* 生物被膜的清除率分别为 77.4%,92.4%。

**关键词:** 酚基壳聚糖;壳聚糖季铵盐;抗菌;生物被膜

**中图分类号:** O 636.1; R 378

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1000-5013(2023)06-0719-08

## Effect of Structure of Phenol-Based Chitosan Quaternary Ammonium Salt on Antibacterial and Antibiofilm Activities

WANG Lin, XIN Meihua, LI Mingchun,  
SHI Lulu, LAI Wangkun

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

**Abstract:** Seven chitosan derivatives were prepared including *o*-hydroxybenzoylate chitosan (OPC), *m*-hydroxybenzoylated chitosan (MPC), *p*-hydroxybenzoylated chitosan (PPC), 3,5-dihydroxybenzoylated chitosan (DPC), 3,4,5-trihydroxybenzoylated chitosan (TPC), *O*-(2-hydroxypropyltrimethylammonium chloride) chitosan (QACS) and *O*-(2-hydroxypropyltrimethylammonium chloride)-*N*-*p*-hydroxybenzoylated chitosan (QAPPC). Nuclear magnetic resonance spectra and elemental analysis were used to characterize the structure of the product, and the antibacterial activity and antibiofilm activity of the product were tested. The results showed that the order of antibacterial activity and antibiofilm activity of the product was PPC>OPC>MPC. The antibacterial rates of PPC at mass concentration of  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  against *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) were 78.2% and 100.0%, respectively. The biofilm removal rates of PPC at mass concentration of  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  against *E. coli* and *S. aureus* were 75.3% and

**收稿日期:** 2023-05-29

**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)

87.7%, respectively. 4-hydroxybenzoic acid was grafted onto the amino group of QACS, the antibacterial activity and antibiofilm activity of the prepared QAPPC were both superior to those of QACS and PPC, and the phenolic group and quaternary ammonium salts had synergistic antibacterial effects. The antibacterial rates of QAPPC at mass concentration of  $0.5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  against *E. coli* and *S. aureus* were 83.3% and 100.0%, respectively, and the biofilm removal rates of QAPPC at mass concentration of  $2.5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  against *E. coli* and *S. aureus* were 77.4% and 92.4%, respectively.

**Keywords:** phenol-based chitosan; chitosan quaternary ammonium salt; antibacterial; biofilm

细菌生物被膜是多种表面附着的细菌细胞包裹在自分泌的细胞外聚合物中的多细胞三维组合,顽固的生物被膜广泛存在。与独立的、自由游动的浮游细菌相比,被包裹在生物被膜中的细菌对抗生素表现出更强的抵抗力,因此,一旦细菌生物被膜感染形成,就很难根除或治愈<sup>[1-2]</sup>。

酚类化合物在自然界中广泛存在,且酚类化合物具有一定的抗菌活性,如香芹酚、没食子酸、丁香酚和水杨酸等,将天然酚酸接枝到壳聚糖上可以改善壳聚糖的抗菌活性<sup>[3]</sup>。常见的酚基壳聚糖的制备方法有自由基接枝法、酶介导反应、EDC/NHS 缩合反应、席夫碱反应等<sup>[4-8]</sup>。Kim 等<sup>[9]</sup>研究了咖啡酸、阿魏酸和芥子酸接枝的壳聚糖对铜绿假单胞菌和单核细胞增多性李斯特菌的抗菌和抗生物被膜活性,制备的壳聚糖衍生物在 0.5MIC(最低抑菌质量浓度)可以显著降低生物被膜的黏附,具有抗菌和抗生物被膜的潜力。Yang 等<sup>[10]</sup>采用碳二亚胺法制备壳聚糖接枝绿原酸(CS-g-CA),产物对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的 MIC 为  $0.625\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,MIC 能显著抑制生物被膜的形成,2MIC 可以清除 77.53%的成熟生物被膜。Khan 等<sup>[11]</sup>采用离子凝胶化技术将间苯三酚(PG)封装到壳聚糖纳米颗粒(CSNP)中,制备的 PG-CSNP 对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、变形链球菌具有抑制作用,且 PG-CSNP 抑制生物被膜形成和清除生物被膜能力优于间苯三酚。

酚类改性壳聚糖可以得到具有良好抗菌活性的酚类壳聚糖衍生物,但各种酚基结构对抗菌活性、抗生物被膜活性的影响缺乏系统的比较。基于此,本文以壳聚糖为原料,制备邻羟基苯甲酰化壳聚糖(OPC)、间羟基苯甲酰化壳聚糖(MPC)、对羟基苯甲酰化壳聚糖(PPC)、3,5-二羟基苯甲酰化壳聚糖(DPC)、3,4,5-三羟基苯甲酰化壳聚糖(TPC)5 种酚基壳聚糖,研究酚基壳聚糖中酚基位置、酚基数量对壳聚糖抗菌活性及抗生物被膜活性的影响,在此基础上制备酚基壳聚糖季铵盐,并对抗菌活性和抗生物被膜活性进行比较。

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

壳聚糖(CS,脱乙酰度为 89%,分子质量为 50 ku),山东省青岛市海汇生物工程有限公司;2,3-环氧丙基三甲基氯化铵,山东省东营市国丰精细化工有限公司;水杨酸、苯甲醛、对羟基苯甲酸,上海市国药集团化学试剂有限公司;间羟基苯甲酸、3,5-二羟基苯甲酸,上海市安耐吉化学技术有限公司;没食子酸,上海市阿拉丁生化科技股份有限公司。其他试剂均为市售分析纯。

Avance III 500 MHz 型核磁共振波谱仪,德国 Bruker 公司;Vario EL 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 壳聚糖衍生物的制备

1.2.1 酚基壳聚糖的制备<sup>[12]</sup> 将 1.6 g 壳聚糖机械搅拌溶解于 50 mL 体积分数为 2%的醋酸溶液中,称取和壳聚糖氨基等物质的量的酚酸溶解于 50 mL 甲醇中,加入 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)和 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS),搅拌至完全溶解。将酚酸溶液缓慢滴加到壳聚糖溶液中,30 ℃ 反应 24 h,反应结束后经透析、冷冻干燥,可得酚基壳聚糖。

1.2.2 酚基季铵化壳聚糖的制备<sup>[13]</sup> 经苯甲醛和壳聚糖的氨基反应得到 *N*-苯亚甲基壳聚糖(CS-BA),在 CSBA 的羟基上引入季铵盐制备 *O*-(2-羟丙基三甲基氯化铵)-*N*-苯亚甲基壳聚糖(QACSBA),经脱保护,可得 *O*-(2-羟丙基三甲基氯化铵)壳聚糖(QACS)。

将 1.6 g QACS 搅拌溶解于 50 mL 去离子水中,称取 0.7 g 对羟基苯甲酸溶解于 50 mL 甲醇中,加入 1.0 g 的 EDC 和 0.6 g 的 NHS,搅拌至完全溶解。将对羟基苯甲酸溶液缓慢滴加到 QACS 溶液中,

30 ℃ 搅拌反应 24 h, 反应结束后经透析、冷冻干燥, 可得 *O*-(2-羟丙基三甲基氯化铵)-*N*-对羟基苯甲酰化壳聚糖(QAPPC)。酚基壳聚糖季铵盐的制备路线, 如图 1 所示。

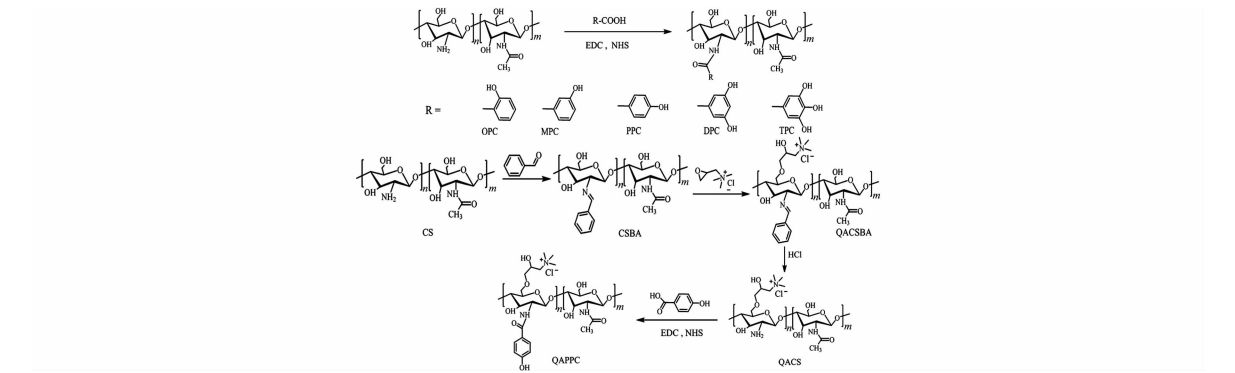


图 1 酚基壳聚糖季铵盐的制备路线

Fig. 1 Preparation route of phenol-based chitosan quaternary ammonium salt

### 1.3 产物的表征

1.3.1 核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H NMR)分析 将制备的壳聚糖衍生物溶解于 D<sub>2</sub>O 中, 使用 Avance III 500 MHz 型核磁共振波谱仪测定产物的<sup>1</sup>H NMR, 测试温度为 22 ℃, 采样次数为 64 次。

1.3.2 取代度测定 壳聚糖及其衍生物经真空干燥至恒质量, 使用 Vario EL cube 型元素分析仪测定其 C, N, H 的质量分数, 依据碳氮比计算壳聚糖的脱乙酰度和产物的取代度<sup>[12]</sup>。

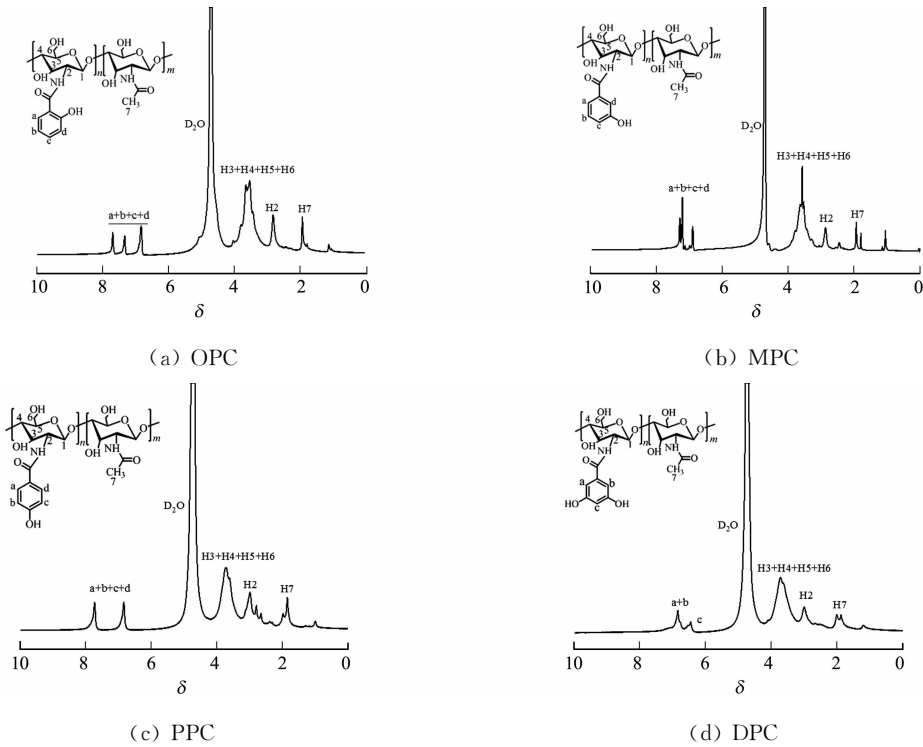
### 1.4 产物的抗菌活性测试

通过最低抑菌质量浓度、最低杀菌质量浓度(MBC)、抑菌率表征产物的抗菌活性; 通过最低生物被膜形成抑制质量浓度(MBIC)、最低生物被膜杀灭质量浓度(MBBC)、生物被膜抑制率和生物被膜清除率表征产物抗生物被膜活性, 具体测试参照文献<sup>[12]</sup>。

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 产物的<sup>1</sup>H NMR

壳聚糖衍生物的<sup>1</sup>H NMR 谱图, 如图 2 所示。图 2 中: δ 为化学位移; 4.7 对应的是 D<sub>2</sub>O 的溶剂峰。



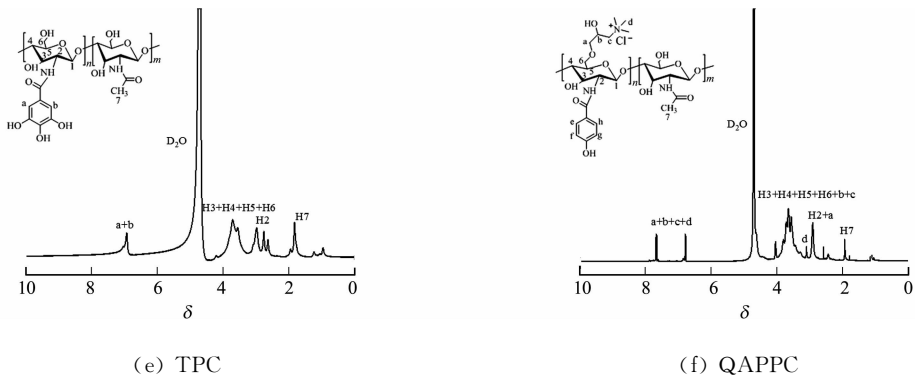


图 2 壳聚糖衍生物的<sup>1</sup>H NMR 谱图

Fig. 2 <sup>1</sup>H NMR spectra of chitosan derivatives

由图 2 可知:不同结构酚基壳聚糖的<sup>1</sup>H NMR 谱图主要区别在于 6~8 处的苯环氢质子的特征峰; OPC 和 MPC 由于酚基取代基位于苯环的邻位或间位上,空间不对称,在核磁氢谱上苯环的特征峰的位置存在偏差;PPC 和 DPC 产物的<sup>1</sup>H NMR 谱图在 6~8 处出现的氢质子特征峰有两个,这是因为两种产物上接枝的苯酚基团属于对称结构,PPC 的<sup>1</sup>H NMR 谱图在结构上出现的两个氢质子特征峰的峰面积一致,DPC 的<sup>1</sup>H NMR 谱图虽然也有两个苯环上的氢质子特征峰,但这两个特征峰的峰面积比例为 1:2;TPC 的<sup>1</sup>H NMR 谱图中 3 个酚基占用苯环上的 3 个氢,剩余的 2 个氢在空间属于对称结构,在核磁共振氢谱上有相同的化学位移,故只有 1 个特征峰<sup>[14]</sup>;QAPPC 的<sup>1</sup>H NMR 谱图在 3.1 处出现季铵盐上甲基的质子峰,此外,在 6~8 处出现 2 个氢质子的特征峰,对应苯环上的氢质子,表明 QAPPC 分子结构中含有苯环。核磁共振氢谱表明酚基壳聚糖季铵盐已成功制备。

2.2 产物的取代度

壳聚糖衍生物的元素分析和取代度,如表 1 所示。表 1 中:ω 为质量分数;DD 为脱乙酰度;DS 为取代度。由表 1 可知:壳聚糖的脱乙酰度为 86.0%;OPC,MPC,PPC,DPC 和 TPC 的取代度相近;CSBA 中用于保护壳聚糖氨基的苯亚甲基的取代度为 64.9%,进一步在 CSBA 的羟基进行季铵化得到的 QACCSBA 中季铵盐的取代度为 20.1%,经脱保护后发现,用于保护氨基的苯亚甲基并未完全脱除,未脱除的苯亚甲基的残余量仅为 1.6%,以此为原料制备的 QAPPC 对羟基苯甲酰的取代度为 16.9%,与 PPC 中对羟基苯甲酰的取代度基本一致(15.4%),相近的取代度有利于后续性能的比较。

表 1 壳聚糖衍生物的元素分析和取代度

Tab. 1 Elemental analysis and substitution degree of chitosan derivatives

样品	w(C)/%	w(N)/%	w(H)/%	DD/%	DS/%
CS	41.69	7.75	7.06	86.0	—
OPC	42.06	6.14	6.58	—	24.4
MPC	42.35	6.34	6.51	—	21.6
PPC	41.36	6.56	6.57	—	15.4
DPC	42.27	6.29	6.14	—	22.3
TPC	42.07	6.31	6.17	—	21.5
CSBA	53.55	6.05	5.69	—	64.9
QACCSBA	52.68	6.39	7.46	—	20.1
QACS	34.83	6.87	6.64	—	1.6
QAPPC	37.26	6.30	6.39	—	16.9

2.3 酚基季铵化壳聚糖的抗菌活性

2.3.1 最低抑菌质量浓度和最低杀菌质量浓度 大肠杆菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)生物被膜形成前后耐药性变化,如表 2 所示。

由表 2 可知:酚基壳聚糖对 *E. coli* 的 MIC 均为 625 μg·mL<sup>-1</sup>,MBC 均为 1 250 μg·mL<sup>-1</sup>; PPC,TPC 对 *E. coli* 的 MBIC 为 1 250 μg·mL<sup>-1</sup>,而 OPC,MPC 和 DPC 的 MBIC 为 2 500 μg·mL<sup>-1</sup>;清除 *E. coli* 生物被膜需要的 PPC,TPC 的最低质量浓度为 5 000 μg·mL<sup>-1</sup>,清除 *E. coli* 生物

被膜需要的 OPC, MPC 和 DPC 的最低质量浓度均大于  $5\,000\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; QACS, PPC 对 *E. coli* 的 MIC, MBIC 相同, 分别为  $625, 1\,250\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 而 QAPPC 对 *E. coli* 的 MIC 和 MBIC 均低于 QACS, PPC, 分别为  $313, 625\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; QACS 对 *E. coli* 的 MBC 为  $2\,500\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 而 PPC, QAPPC 对 *E. coli* 的 MBC 均为  $1\,250\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , QACS, PPC 对 *E. coli* 的 MBBC 均为  $5\,000\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 而 QAPPC 的 MBBC 为  $2\,500\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 将季铵盐和对羟基苯甲酰基同时引入壳聚糖分子结构中, 得到的 QAPPC 对 *E. coli* 的抑菌效果优于 PPC, QACS。

由表 2 可知: 除 PPC 外, 其余 4 种酚基壳聚糖对 *S. aureus* 的 MIC 和 MBC 一致, 分别为  $78, 313\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 而 PPC 对 *S. aureus* 的 MIC 为  $39\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 当形成生物被膜后, 最低杀菌质量浓度出现差异, 当 PPC 质量浓度为  $1\,250\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 可以完全清除 *S. aureus* 形成的生物被膜, 而清除 *S. aureus* 形成的生物被膜的 OPC, MPC, DPC 和 TPC 需要的最低质量浓度为  $2\,500\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

表 2 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生物被膜形成前后耐药性变化  
Tab. 2 Changes of drug resistance before and after biofilm formation in *E. coli* and *S. aureus*

样品	大肠杆菌/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$				金黄色葡萄球菌/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$			
	MIC	MBIC	MBC	MBBC	MIC	MBIC	MBC	MBBC
OPC	625	2 500	1 250	10 000	78	625	313	2 500
MPC	625	2 500	1 250	10 000	78	625	313	2 500
PPC	625	1 250	1 250	5 000	39	625	313	1 250
DPC	625	2 500	1 250	10 000	78	625	313	2 500
TPC	625	1 250	1 250	5 000	78	625	313	2 500
QACS	625	1 250	2 500	5 000	39	625	313	2 500
QAPPC	313	625	1 250	2 500	39	625	156	1 250

2.3.2 产物的抑菌率 不同质量浓度( $\rho$ )的酚基壳聚糖季铵盐的抑菌率( $\eta_1$ ), 如图 3 所示。

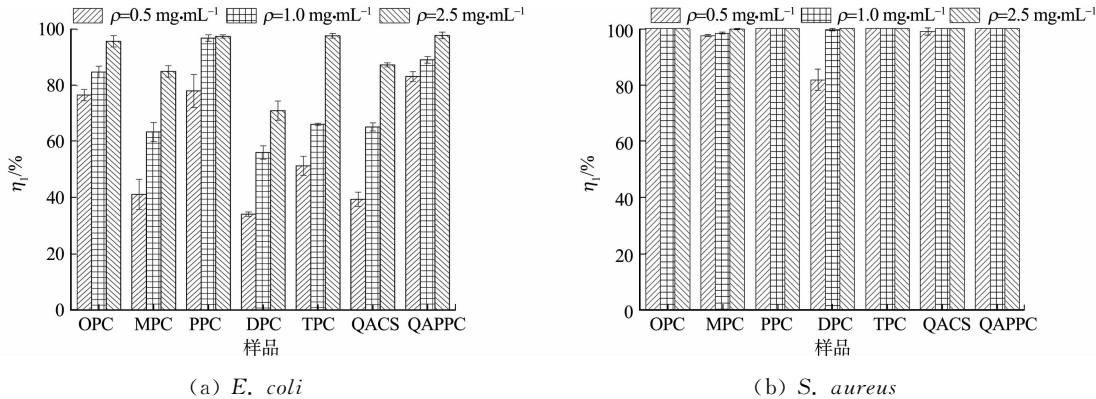


图 3 酚基壳聚糖季铵盐的抑菌率

Fig. 3 Antibacterial rates of phenol-based chitosan quaternary ammonium salt

由图 3 可得以下 3 点结论。

1) 酚基的位置和数量均能影响壳聚糖的抗菌活性。在相同质量浓度时, 单酚基壳聚糖衍生物的抗菌活性排序为  $\text{PPC} > \text{OPC} > \text{MPC}$ ; 酚基壳聚糖的抗菌活性不仅与酚基的位置有关, 还与酚基的数量有关, 这是因为酚基壳聚糖是通过酰胺键将苯酚接枝到壳聚糖的氨基上, 将壳聚糖的单元糖苷链看成是一个整体, 酰胺基团是吸电子基团, 吸电子的取代基可以增强苯酚的酸性, 酰胺基团位于酚基的邻位和对位时, 苯氧基负离子的负电荷可以分散到酰胺基团上, 使苯酚的酸性强于间位异构体<sup>[15]</sup>, 当酚基位于取代基的对位时, 空间位阻较小, 暴露在外面的酚基与细菌接触几率增加, 抗菌活性优于邻位酚基, 这与抗菌活性变化趋势一致。

2) 酚基的数量发生改变时, 抗菌活性排序为  $\text{TPC} > \text{MPC} > \text{DPC}$ , 并不随酚基数量变化呈现规律性变化, 酚基的数量对壳聚糖抗菌活性的影响还与酚基的位置有关。DPC 的抗菌活性弱于 MPC, 虽然增加了酚基的数量, 但这两个酚基均可视为间位酚基, 进一步弱化了苯酚的酸性, 表现出较差的抗菌活性。TPC 的抗菌活性较 DPC 得到增强, 尽管 TPC 有两个酚基位于间位上, 但对位酚基的存在增强了苯酚

的酸性,表现出的抗菌活性优于 DPC。由酚基季铵化壳聚糖对 *S. aureus* 的抑菌率可知,除 MPC,DPC 外,其余 3 种酚基壳聚糖对 *S. aureus* 的抑菌率均为 100.0%。在制备的 5 种酚基壳聚糖中,PPC 的抗菌活性最强,质量浓度为  $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 PPC,TPC 对 *E. coli* 的抑菌率分别为 78.2%,51.4%。

3) 对比相同质量浓度下的 PPC,QACS 和 QAPPC 的抑菌率,QAPPC 的抗菌活性优于 QACS 和 PPC,QAPPC 是将对羟基苯甲酸通过缩合反应接枝到 QACS 的分子结构中,故季铵盐基团和酚基对提升壳聚糖的抗菌活性具有协同作用,质量浓度为  $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 QAPPC 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑菌率分别为 83.3%,100.0%。

2.3.3 菌悬液中的蛋白质含量 通过考马斯亮蓝法测定菌悬液中的蛋白质含量,因受标准曲线误差、细菌培养批次等的影响,故实验中以波长 595 nm 下的 OD 值(*D*)表示蛋白质含量。将壳聚糖衍生物与细菌共培养 30 min 后,可得酚基壳聚糖季铵盐作用后菌悬液中蛋白质含量,如图 4 所示。由图 4 可知:在酚基数量相同时,MPC 处理后的菌悬液中蛋白质含量最低,这与抑菌率测试结果一致;当酚基的数量发生改变时,TPC 处理后的菌悬液中蛋白质含量最高;对于 *E. coli*,经 PPC 处理后的菌悬液中蛋白质含量高于 DPC,而 *S. aureus* 却出现相反的结果,这与细菌结构及抗菌机理有关。

结合抑菌率的数据可知,在相同质量浓度下,抑菌率排序为 PPC>TPC>DPC,然而,菌悬液中蛋白质含量的变化并不完全相符,这可能是酚基壳聚糖与细菌相互作用时,不仅与破坏细胞膜结构改变细胞膜通透性有关,还可能与抑制胞内酶的活性有关<sup>[16]</sup>。QAPPC 与细菌接触后的菌悬液中蛋白质含量高于 PPC,QACS,菌悬液中蛋白质含量的变化趋势与抑菌率的变化趋势一致。

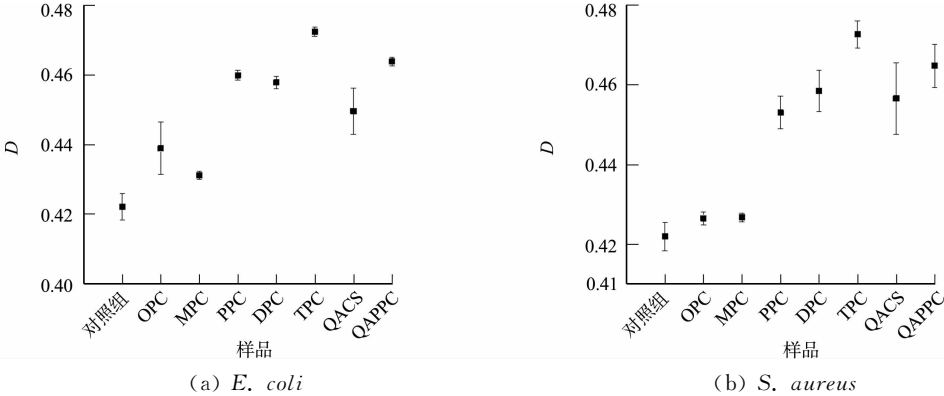


图 4 酚基壳聚糖季铵盐作用后菌悬液中蛋白质含量

Fig. 4 Content of protein effected by phenol-based chitosan quaternary ammonium salt

2.3.4 产物对生物被膜形成的抑制率 酚基壳聚糖季铵盐对生物被膜形成的抑制率( $\eta_z$ ),如图 5 所示。由图 5 可得以下 3 点结论。

1) 酚基壳聚糖季铵盐对两种细菌的生物被膜形成的抑制率出现相同的趋势,当酚基数量相同时,对生物被膜形成的抑制效果排序为 PPC>OPC>MPC,与抑菌率和蛋白质含量变化趋势一致;1/2MIC 的 PPC 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 生物被膜形成的抑制率分别为 70.7%,76.3%。

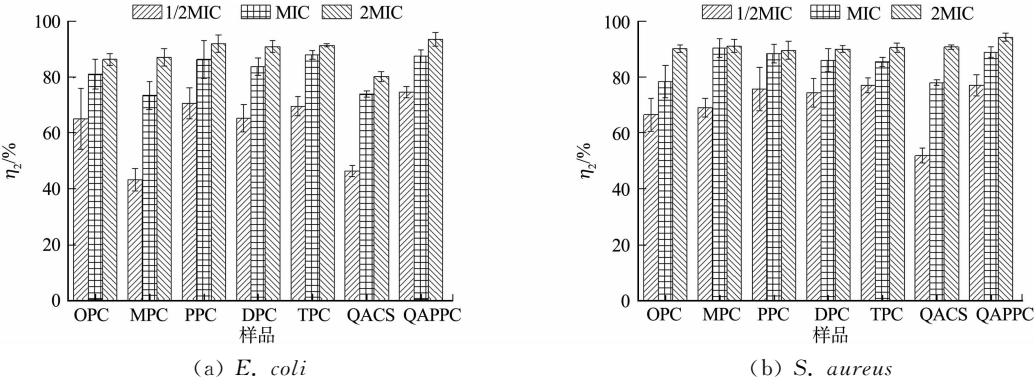


图 5 酚基壳聚糖季铵盐对生物被膜形成的抑制率

Fig. 5 Inhibition rates of phenol-based chitosan quaternary ammonium salt on biofilm formation

2) 增加酚基的数量可以改善壳聚糖衍生物对生物被膜的抑制效果。对生物被膜形成的抑制率排序为 TPC>DPC>MPC, 1/2MIC 的 TPC 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 生物被膜形成的抑制率分别为 69.7%, 77.7%。生物被膜的形成不仅与外界环境有关还与细菌多种基因的表达有关<sup>[10]</sup>。

3) 在相同质量浓度下, 对生物被膜形成的抑制率排序为 QAPPC>PPC>QACS, 表明将对羟基苯甲酰引入 QACS 中可以提高 QACS 对生物被膜形成的抑制率。1/2MIC 的 QAPPC 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 生物被膜形成的抑制率分别为 74.7%, 77.6%。

2.3.5 产物对生物被膜的清除率 酚基壳聚糖季铵盐对生物被膜的清除率( $\eta_3$ ), 如图 6 所示。由图 6 可知以下 2 点结论。

1) 产物对 *S. aureus* 形成的生物被膜的清除率优于对 *E. coli* 的生物被膜的清除率, 这与抑菌率的结果一致; 酚基的位置改变对生物被膜的清除效果与抑菌率的变化趋势一致, 对生物被膜的清除效果的排序为 PPC>OPC>MPC, 质量浓度为 2.5 mg·mL<sup>-1</sup> 的 PPC 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 形成的生物被膜的清除率分别为 75.3%, 87.7%。值得注意的是, 增加酚基的数量并不能够提高壳聚糖对生物被膜的清除效果。

2) 在相同质量浓度下, 对生物被膜的清除效果排序为 QAPPC>PPC>QACS, 这表明将对羟基苯甲酸接枝到 QACS 的分子结构中可以进一步提高 QACS 对生物被膜的清除率, 季铵盐基团和酚基具有协同作用; 质量浓度为 2.5 mg·mL<sup>-1</sup> 的 QAPPC 对 *E. coli*, *S. aureus* 形成的生物被膜的清除率分别为 77.4%, 92.4%。

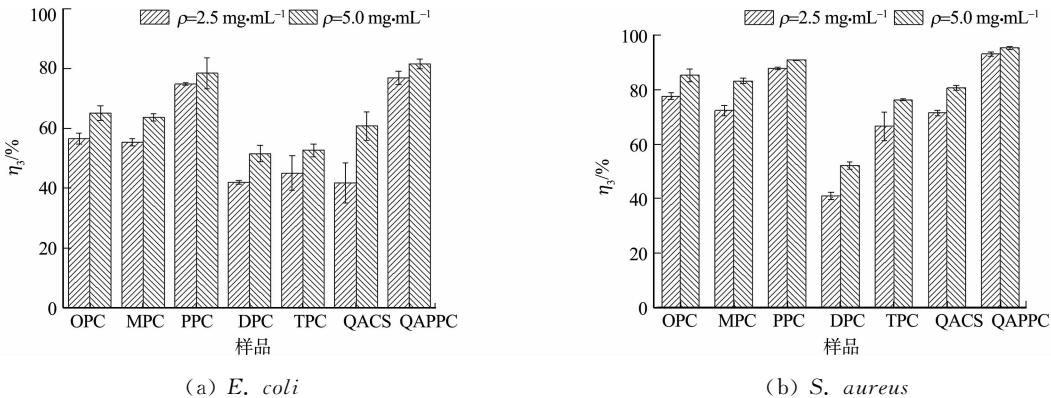


图 6 酚基壳聚糖季铵盐对生物被膜的清除率  
Fig. 6 Biofilm removal rates of phenol-based chitosan quaternary ammonium salt

### 3 结论

1) 制备酚基壳聚糖季铵盐, 通过核磁共振氢谱表征产物的结构。通过元素分析计算得出 QACS 季铵盐取代度为 20.1%, 酚基的取代度为 15.4%~24.4%。OPC, MPC, PPC, DPC 和 TPC 的取代度分别为 24.4%, 21.6%, 15.4%, 22.3% 和 21.5%。以取代度为 20.1% 的 QACS 季铵盐为原料制备的 QAPPC 中, 对羟基苯甲酰基的取代度为 16.9%。

2) 抗菌测试和抗生物被膜测试结果表明, 影响酚基壳聚糖抗菌活性的主要因素是酚基的位置, 其次是酚基的数量, PPC 的抗菌活性和抗生物被膜活性最佳。抗菌活性和清除生物被膜的能力排序为 PPC>OPC>MPC。酚基的数量对壳聚糖抗菌活性的影响与酚基的位置有关, 增加酚基的数量并不一定能够提高酚基壳聚糖的抗菌活性。质量浓度为 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 的 PPC 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抑菌率分别为 78.2%, 100.0%, 1/2MIC 的 PPC 对 *E. coli*, *S. aureus* 生物被膜形成的抑制率分别为 70.7%, 76.3%, 质量浓度为 2.5 mg·mL<sup>-1</sup> 的 PPC 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 所形成的生物被膜的清除率分别为 75.3%, 87.7%。

3) QAPPC 的抗菌活性和抗生物被膜活性均优于单一改性的壳聚糖衍生物(QACS 和 PPC), 季铵盐和酚基具有协同抗菌活性。质量浓度为 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 的 QAPPC 对 *E. coli* 的抑菌率为 83.3%, 高于相同质量浓度下 QACS 对 *E. coli* 的抑菌率(39.5%)和 PPC 对 *E. coli* 的抑菌率(78.2%)。1/2MIC

的 QAPPC 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 生物被膜形成的抑制率分别为 74.7%, 77.6%。质量浓度为  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 QAPPC 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 形成的生物被膜的清除率分别为 77.4%, 92.4%。

## 参考文献:

- [1] FLEMMING H C, WINGENDER J, SZEZYK U, *et al.* Biofilms: An emergent form of bacterial life[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 563-575. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.
- [2] LIU Peiyang, LI Danxia, KANG Miaomiao, *et al.* Emerging applications of aggregation-induced emission luminogens in bacterial biofilm imaging and antibiofilm theranostics[J]. *Small Structures*, 2023, 4(5): 220329. DOI: 10.1002/ssstr.202200329.
- [3] LIU Jun, PU Huimin, LIU Shuang, *et al.* Synthesis, characterization, bioactivity and potential application of phenolic acid grafted chitosan: A review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 174: 999-1017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.07.014.
- [4] CURCIO M, PUOCI F, IEMMA F, *et al.* Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(13): 5933-5938. DOI: 10.1021/jf900778u.
- [5] BOZIC M, GORGIEVA S, KOKOL V. Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87: 2388-2398. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.11.006.
- [6] SCHREIBER S B, BOZELL J J, HAYES D G, *et al.* Introduction of primary antioxidant activity to chitosan for application as a multifunctional food packaging material[J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 33(2): 207-214. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.03.006.
- [7] KIM K, KIM K, RYU J H, *et al.* Chitosan-catechol: A polymer with long-lasting mucoadhesive properties[J]. *Biomaterials*, 2015, 52: 161-170. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.010.
- [8] BARBOSA H F G, ATTJIOU M, LEITAO A, *et al.* Characterization, solubility and biological activity of amphiphilic biopolymeric schiff bases synthesized using chitosans[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 220: 1-11. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.05.037.
- [9] KIM G, DASAGRANDE C, KANG E H, *et al.* *In vitro* antibacterial and early stage biofilm inhibitory potential of an edible chitosan and its phenolic conjugates against *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes*[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(10): 439-439. DOI: 10.1007/s13205-018-1451-4.
- [10] YANG Xin, LAN Weiqing, XIE Jing. Antimicrobial and anti-biofilm activities of chlorogenic acid grafted chitosan against *Staphylococcus aureus* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 173: 105748. DOI: 10.1016/j.micpath.2022.105748.
- [11] KHAN F, OH D, CHANDIKA P, *et al.* Inhibitory activities of phloroglucinol-chitosan nanoparticles on mono- and dual-species biofilms of *Candida albicans* and bacteria[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2022, 211: 112307. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.112307.
- [12] WANG Lin, XIN Meihua, LI Mingchun, *et al.* Effect of the structure of chitosan quaternary phosphonium salt and chitosan quaternary ammonium salt on the antibacterial and antibiofilm activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 242: 124877. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124877.
- [13] 明如镜, 辛梅华, 李明春, 等. *O*-季铵化-*N,N*-双十二烷基壳聚糖/胆固醇的混合单分子膜性质研究[J]. *材料研究学报*, 2010, 24(3): 254-258.
- [14] WU Chunhua, TIAN Jinhu, LI Shan, *et al.* Structural properties of films and rheology of film-forming solutions of chitosan gallate for food packaging[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 146: 10-19. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.03.027.
- [15] 胡宏纹. 有机化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2014.
- [16] YAN Chunchao, XIAO Feng, QIU Tong, *et al.* Preparation of gallic acid-chitosan copolymer and its antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*[J]. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater Sci Ed*, 2021, 36(6): 934-941. DOI: 10.1007/s11595-021-2490-y.

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)