

季铵盐聚砜抑菌液的制备及抑菌性能研究

张本尚¹ 李玉江² 陈 阳¹ 郭文慧¹ 刘树博¹ 杨明成^{1*}

(1.河南省科学院同位素研究所有限责任公司,郑州 450015;

2.河南省科学院高新技术研究中心,郑州 450002)

摘 要 以聚砜、多聚甲醛、三甲基氯硅烷为原料,氯仿为溶剂,四氯化锡为催化剂,制备高取代度的氯甲基化聚砜,然后与三甲胺水溶液反应,经透析、冷冻干燥得到了水溶性的季铵盐聚砜白色固体粉末。利用傅里叶变换红外光谱仪、核磁共振氢谱仪、热重差分析仪对产物的结构进行分析,并将产物溶于水配制成质量分数为 0.5%、1%和 2%的抑菌液,经伽玛射线灭菌后研究其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌性能。结果表明:在聚砜、多聚甲醛、三甲基氯硅烷、四氯化锡摩尔比为 1:13.3:17.3:0.3 的条件下,通过延长反应时间得到了高取代度为 1.6 的氯甲基化聚砜,季铵化后得到水溶性聚砜季铵盐,其中 2%季铵盐聚砜抑菌液,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有较强的抑菌作用,抑菌率均可以达到 99%。

关键词 季铵盐聚砜,抑菌液,抑菌性能

中图分类号 O623.626

文献标识码 A

文章编号:1006-3536(2021)05-0227-05

DOI:10.19817/j.cnki.issn 1006-3536.2021.05.051

Study on the preparation and property of quaternary ammonium polysulfone bacteriostatic solution

Zhang Benshang¹ Li Yujiang² Chen Yang¹ Guo Wenhui¹ Liu Shubo¹ Yang Mingcheng¹

(1.Isotope Institute Co.,Ltd.,Henan Academy of Sciences,Zhengzhou 450015;

2.High and New Technology Research Center, Henan Academy of Sciences,Zhengzhou 450002)

Abstract A combination of polysulfone, paraformaldehyde and trimethylchlorosilane as raw materials in chloroform catalyzed by tin tetrachloride provided chloromethylated polysulfone with high degree of substitution, which could be further transformed into water-soluble quaternary ammonium polysulfone as a white solid powder after reaction with aqueous trimethylamine, dialysis and freeze-drying. The structure of obtained product was characterized by fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), nuclear magnetic resonance hydrogen spectrometer (¹H-NMR, HSQC) and thermogravimetry differential thermal analyzer (sd-tq600). A series of 0.5wt%, 1wt% and 2wt% bacteriostatic solutions of obtained product was prepared after gamma ray sterilization to investigate their bacteriostatic properties against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. The results showed that when the molar ratios of polysulfone, paraformaldehyde, trimethylchlorosilane and stannic chloride was set as 1:13.3:17.3:0.3 with extended reaction time, chloromethylated polysulfone with high degree of substitution (DS about 1.6) and the corresponding water-soluble quaternary ammonium polysulfone could be obtained. Specially, the highest bacteriostasis rate of 99% could be reached when using 2wt% quaternary ammonium polysulfone as bacteriostatic solution.

Key words quaternary ammonium polysulfone, bacteriostatic solution, bacteriostatic effect

收稿日期:2021-01-13;修回日期:2021-05-06

基金项目:中原科技创新领军人才项目(194200510030);河南省重点科技攻关项目(182102310824);河南省科学院基本科研费(190604016 和 190604018)

作者简介:张本尚(1979-),男,博士,副研究员,主要从事高分子材料的改性及应用,E-mail:286502065@qq.com。

通讯作者:杨明成(1973-),男,博士,研究员,主要从事功能高分子材料、辐射化工新材料及生物可降解材料研究工作,E-mail:ymch-7305@126.com。

高分子抑菌剂具有持效期长、广谱杀菌活性,结构多样、种类丰富等优点,在生物医学领域具有广泛的应用^[1-9],特别是当它们直接接触人体皮肤和粘膜时,应具有生物低毒性和生物相容性。季铵盐是一类重要的阳离子表面活性剂,同时也是一类常用的有机抑菌剂,季铵盐类阳离子聚合物作为一种常用的抑菌剂,其抑菌机理较为复杂,但一般认为,其作用过程如下:季铵盐阳离子抑菌剂带有正电荷,而微生物细胞表面的磷酸根呈现电负性,经过静电吸附作用,季铵盐阳离子抑菌剂可破坏微生物的细胞膜,并进入微生物体内,使蛋白变性和酶失活,致使微生物体内的活性物质泄漏,导致细胞解体死亡^[10-11]。

聚砜(PS)由联合碳化物公司在 20 世纪 60 年代开发的高分子材料,它的分子主链中含有砜基和亚芳基,属于热塑性树脂,其中双酚 A 聚砜是以双酚 A 和 4,4'-二氯二苯砜为原料经缩聚反应合成,因其具有良好的热稳定性和尺寸稳定性,耐水解和耐热等性能,广泛应用于电器、电子、航天航空、汽车、机械制造、医疗器具、食品加工机械和膜分离等领域。聚砜已成为现代工业中应用最广泛的高分子膜材料^[12-14],在使用过程中存在不可逆的微生物污染,通过在聚砜膜材料中引入季铵盐、季磷盐和胍盐等官能团以提高其抑菌性能或其他性能^[15-18]。经文献调研,尚未发现有关水溶性季铵盐聚砜抑菌液的文献报道,尤其是聚砜具有毒性低、与血液相容性好,在医学上也有着广泛的应用。因此,本研究拟以聚砜为原料制备高取代度的氯甲基化聚砜,与三甲胺溶液反应生成季铵盐聚砜,经透析、冷冻干燥后配制成不同浓度的季铵盐聚砜抑菌液,初步考察了其对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌性能,为下一步研究季铵盐聚砜类复合抑菌水凝胶奠定了基础。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

聚砜(PS-3500LCD, MW=77000),苏威特种聚合物公司;多聚甲醛(分析纯),上海晶纯生化科技股份有限公司;无水乙醇、四氯化锡,均为分析纯,麦克林试剂(上海)有限公司;三甲胺 30% 水溶液,国药集团化学试剂有限公司;大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923,河南省信和医疗器械

有限公司。

超导核磁共振波谱仪(¹H-NMR, Agilent Technologies 400 MR 型),美国安捷伦公司,溶剂为氘代氯仿(CDCl₃)或二甲基亚砜-d₆(DMSO-d₆),四甲基硅烷(TMS)为内标;傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, Nicolet iS10 型),美国赛默飞世尔科技公司;热重差热综合分析仪(TG, SDT-Q600 型),美国 TA 公司;钴-60 辐射源(活度 7.4×10¹⁵ Bq),河南省科学院同位素研究所有限责任公司。

1.2 实验过程

图 1 为季铵盐聚砜抑菌液制备的实验路线图。

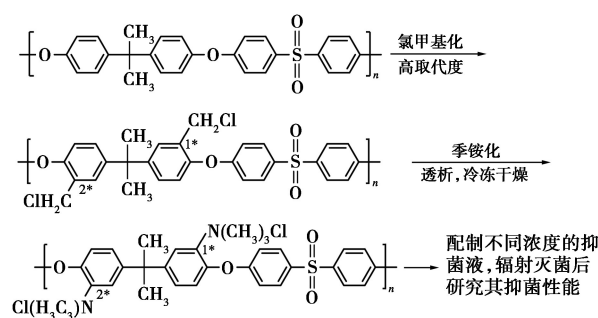


图 1 季铵盐聚砜抑菌液制备的实验路线图

1.2.1 高取代度氯甲基化聚砜的制备

采用参考文献[19]制备高取代度氯甲基化聚砜:将 100g 聚砜溶于 50℃ 的 5000mL 无水氯仿中, N₂ 保护下, 搅拌下依次加入 90g 多聚甲醛、500mL 三甲基氯硅烷和 8mL 无水四氯化锡, 反应过程中核磁检测跟踪反应, 当氯甲基化取代度大于 1.5 时, 停止反应, 将反应液倒入大量乙醇中, 沉淀析出, 过滤, 放置烘箱待用。

1.2.2 水溶性季铵盐聚砜的制备

取一定量的高取代度的氯甲基化聚砜(CMPSF)放 100mL 15% (wt, 质量分数, 下同)的三甲胺水溶液中, 在 40℃ 下搅拌反应 24h 得到水溶性的季铵盐聚砜, 减压除去大部分三甲胺, 经截留分子量为 1000Da 的透析袋除去残留的三甲胺, 透析时间为 48h, 每间隔 12h 换 1 次纯水, 最后冷冻干燥得到白色孔状结构的季铵盐聚砜固体(QAPSF), 放置烘箱待用。

1.2.3 季铵盐聚砜抑菌液的配制

分别取 0.5g、1.0g、2.0g 季铵盐聚砜固体溶于 99.5g、99g、98g 纯水中, 经 ⁶⁰Co γ 射线辐射无菌处理, 分别得到质量分数为 0.5%、1%、2% 的季铵盐聚砜抑菌液。

1.3 测试与表征

1.3.1 取代度的测定

氯甲基化聚砜的取代度可通过 $^1\text{H-NMR}$ 图中相应的积分面积计算,按式(1)计算。

$$\text{DS} = \frac{\frac{B}{2}}{\frac{A}{6}} \times 100\% \quad (1)$$

式中,DS为取代度;B为氯甲基中的质子峰的积分面积;A为聚砜骨架中甲基的质子峰的积分面积。

1.3.2 季铵盐聚砜的耐辐射性能测试

取一定量季铵盐聚砜固体溶于纯水中,经 ^{60}Co γ 射线辐射,通过 $^1\text{H-NMR}$ 计算季铵盐聚砜上与 N 原子相连的甲基上质子峰的积分面积变化,判断抑菌基团是否保留在聚砜高分子链上。

1.3.3 季铵盐聚砜抑菌液的抗菌性能测试

分别将大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 制成菌悬液,浓度为 $1 \times 10^9 \sim 9 \times 10^9$ cfu/mL,在试管 A 中加入 2mL 灭菌后胰酪大豆胨液体培养基(TSB)和 100 μL 菌悬液(阳性对照组),在试管 B 中加入 2mL 灭菌后胰酪大豆胨液体培养基(TSB)(阴性对照组),在试管 C 中加入 2mL 灭菌后胰酪大豆胨液体培养基(TSB)、100 μL 菌悬液和 200 μL 2% 的经辐射灭菌后的季铵盐聚砜水溶液(样品组),充分混匀后放入培养箱 37 $^\circ\text{C}$ 静置培养 24h,作适当稀释,然后取其中 2—3 个稀释度,分别吸取 1mL,置于 3 个平皿,用凉至 40~45 $^\circ\text{C}$ 胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)作倾注,转动平皿,使其充分均匀,琼脂凝固后翻转平板,(35 $\pm$ 2) $^\circ\text{C}$ 培养 48h,按式(2)作活菌菌落计数。

$$X = \frac{M - N}{M} \times 100\% \quad (2)$$

式中,X为抑菌率,%;M为对照样品平均菌落数;N为季铵盐聚砜抑菌液样品中平均菌落数。

2 结果与讨论

2.1 反应时间对氯甲基聚砜取代度的影响

在 1.2.1 中物料比一定的条件下,考察反应时间对氯甲基聚砜取代度的影响,结果见图 2。由图可知,随着反应时间的增加,DS 逐渐增加,当反应时间达到 72h 时,DS 达到最大 1.6;继续延长反应时间,DS 基本不再变化,无法达到 DS=2 的最大理论

取代度;反应的初始阶段,亲电反应优先发生聚砜骨架中双酚 A 结构的 1* 位^[19],随着 DS 的增加,可能是空间位阻增加、也可能是 1* 位引入氯甲基后使得 2* 位上的 C 原子电荷密度进一步下降,在聚砜高分子链上 2* 位上引入更多的氯甲基变得更加困难,即使延长反应时间,DS 也不再增加,反而增加了氯甲基聚砜分子链之间或分子链内部发生聚合反应的几率,使反应液略微浑浊,后续制备的季铵盐聚砜在水中的溶解性变差,因此,在 1.2.1 中物料比一定的条件下,最佳反应时间为 72h 左右。

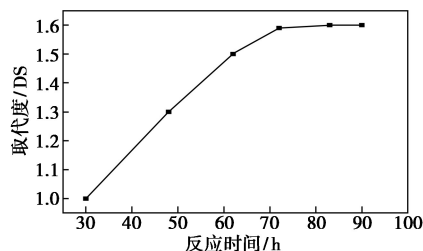


图2 反应时间对氯甲基聚砜取代度的影响

2.2 $^1\text{H-NMR}$ 分析

图 3 为 CMPSF 和 QAPSF 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图。

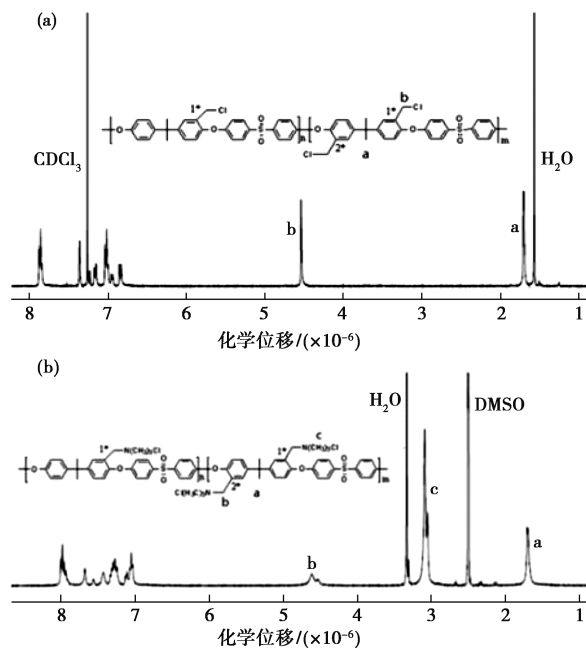


图3 CMPSF(a)和 QAPSF(b)的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图

由图 3(a)可知,聚砜引入氯甲基后 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 中的质子峰出现在 δ_{H} 0.45 处,聚砜骨架中双酚 A 的 $-\text{CH}_3$ 质子峰在 δ_{H} 1.70 处,苯环上质子峰出现在 δ_{H} 7.87~6.83 处。

聚砜上的氯甲基与三甲胺反应生成季铵盐后难溶于氯仿,易溶于水,但在水中的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图峰

形较差,因此做 $^1\text{H-NMR}$ 时选择氘代 DMSO 做溶剂,由图 3(b)可知,与 N 相连的 $-\text{CH}_3$ 质子峰出现在 δ_{H} 3.14~3.04 处。与 N 相连的亚甲基即原来氯甲基中的质子峰在 δ_{H} 4.5 附近裂分为双峰。在聚砜苯环上发生亲电取代反应引入氯甲基基团,在 $\text{DS} \leq 1$ 时优先取代双酚 A 骨架中氧原子邻位 1* 上的 H,在 $\text{DS} > 1$ 时在双酚 A 骨架中氧原子邻位 2* 上的 H 才有较大几率的被取代;在 $\text{DS} > 1$ 时,季铵化后可能因为空间位阻或其他原子的影响使与 N 相连的亚甲基中的质子,裂分为较明显的左右不对称的双峰;同理,与 N 原子相连的甲基上的质子也略微裂分。

进一步对 QAPSF 进行异核单量子关系 (HSQC) 分析,结果发现化学位移 δ_{H} 0.45 处氯甲基中质子峰的双峰形均对应化学位移 δ_{C} 62.0 处的同一个碳;而 δ_{H} 3.14~3.04 处的质子峰,与 N 相连的 3 个甲基上的质子峰对应 δ_{C} 52 处的碳,因此可以进一步证明:季铵化后与 N 相连的甲基和亚甲基上质子峰均可能由于高取代度时空间位阻或其他原子的相互作用,使得与 N 相连的甲基和亚甲基上质子峰均有不同程度的裂分。

2.3 FT-IR 分析

图 4 为 PSF、CMPSF 和 QAPSF 的 FT-IR 谱图。由图可见,PSF、CMPSF 和 QAPSF 在 1484.8cm^{-1} 和 1585.1cm^{-1} 处都有两个强吸收峰,这是 PSF 中苯环的特征峰,而且在 1151.3cm^{-1} 和 1243.8cm^{-1} 处 $-\text{SO}_2-$ 的伸缩振动峰也非常明显。与原始 PSF 曲线相比,QAPSF 曲线的 1638.2cm^{-1} 处出现了一个较强的吸收峰,这是季铵盐官能团的特征峰^[20],此处特征峰的出现说明氯甲基和三甲胺反应生成了季铵盐官能团。

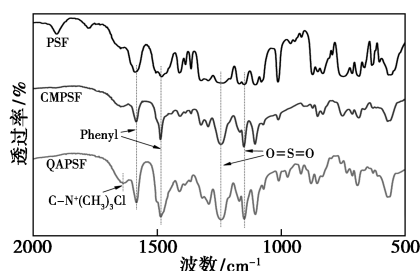


图 4 PSF、CMPSF 和 QAPSF 的 FT-IR 谱图

2.4 TG 分析

PSF 和 QAPSF 的 TG-DTG 曲线见图 5。

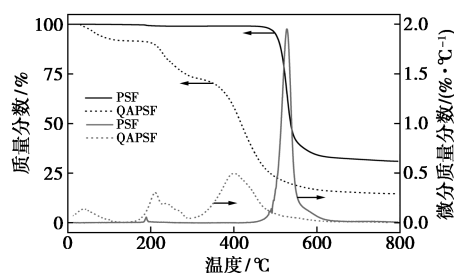


图 5 PSF 和 QAPSF 的 TG-DTG 曲线图

由图可见,PSF 的起始降解温度约为 482°C ,在 527°C 时达到最大降解速率,且只有一个失重台阶。与 PSF 不同,QAPSF 表现出 3 个失重台阶。在 100°C 左右,PSF 的质量几乎保持不变,而 QAPSF 则有约 9% 的失重,这部分质量损失由 QAPSF 吸附水的蒸发造成,因为 QAPSF 在引入季铵盐官能团后表现出了较强的亲水性。QAPSF 在 200°C 左右的失重可能是季铵盐官能团从聚砜分子链上脱落引起的。QAPSF 的第三个失重台阶从 300°C 开始,在 405°C 时降解速率达到最大,这个阶段的失重是聚砜分子链降解造成的。对比 PSF 的 TG 曲线可以发现,QAPSF 的降解温度要远低于未改性的 PSF,这可能是因为 PSF 在氯甲基化改性过程中发生了降解和交联反应,而降解反应占主导地位,从而影响了其热稳定性。

2.5 季铵盐聚砜水溶液的耐辐射性能分析

测定伽玛射线辐射后吸收剂量为 40kGy 时 QAPSF 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图,结果发现,经辐射后季铵盐抑菌官能团仍保留在聚砜骨架上,在常用的无菌吸收剂量下(低于 40kGy)是稳定的,适合后续开发末端工艺采用辐射灭菌技术手段来保证无菌的抑菌材料产品。

2.6 季铵盐聚砜水溶液的抑菌性能研究

季铵盐聚砜为高分子化合物,采用抑菌圈法测试抑菌性能时因其扩散性差,几乎观察不到抑菌圈,所以采用计数法测试其抑菌性能。2% 的季铵盐水溶液直接按照 1.3.3 中的测试方法,季铵盐水溶液未经伽玛射线辐射灭菌,测试液中大肠杆菌 ATCC 25922 的菌落数下降 2 个数量级,抑菌率达到 99%,但对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 几乎没有抑菌性。经伽玛射线辐射(吸收剂量 15kGy)灭菌后,测试液中大肠杆菌 ATCC 25922 的菌落数下降 4 个数量级,抑菌率达到 99%,金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 的菌落数下降 2 个数量级,抑菌率达到 99%。

由此可见,季铵盐聚砒水溶液经辐射灭菌后,抑菌效果明显提高,因此后续实验季铵盐聚砒抑菌液均经伽玛射线辐射灭菌,进一步降低了季铵盐聚砒水溶液的浓度研究其抑菌效果,发现1%的聚砒季铵盐抑菌液对大肠杆菌 ATCC 25922 的抑菌率为94.1%,对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 的抑菌率为73%;0.5%的聚砒季铵盐抑菌液对大肠杆菌 ATCC 25922 的抑菌率为34.5%,对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 的抑菌率为30%。

3 结论

以聚砒为原料制备了高取代度为1.6的氯甲基化聚砒与三甲胺溶液反应得到了水溶性的季铵盐聚砒,2%的季铵盐聚砒抑菌液经辐射灭菌后,对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌率均可达到99%,适合后续开发末端工艺采用辐射灭菌技术手段来保证无菌的抑菌材料产品,未来将进一步研究季铵盐聚砒类复合抑菌水凝胶,因抑菌官能团季铵盐在聚砒高分子链上,细胞毒性有可能降低,再加上聚砒本身优异的生物相容性,在医学方面有着较大的潜在应用价值。

参考文献

- [1] Xue Y, Xiao H, Zhang Y. Antimicrobial polymeric materials with quaternary ammonium and phosphonium salts[J]. International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences, 2015, 16(2): 3626-3655.
- [2] Sun D, Babar Shahzad M, Li M, et al. Antimicrobial materials with medical applications[J]. Materials Technology, 2015, 30: B90-B95.
- [3] Kamoun E, Kenawy E, Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings[J]. Journal of Advanced Research, 2017, 8(3): 217-233.
- [4] 乌日, 汪中明. 季磷型阳离子聚乙烯醇的合成及抗菌性能研究[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版) 2013, 44(3): 280-285.
- [5] Makvandi P, Jamaledin R, Jabbari M, et al. Antibacterial quaternary ammonium compounds in dental materials: a systematic review[J]. Dental Materials, 2018, 34: 851-867.
- [6] Song W, Guo Z, Zhang L, et al. Antibacterial activity of starch/ acrylamide/ allyl triphenyl phosphonium bromide copolymers synthesized by gamma irradiation [J]. Radiation Physics and Chemistry, 2013, 91: 114-119.
- [7] 林越威, 敖宁建. 利用聚乙烯醇缩醛反应接枝季磷盐制备高分子抗菌材料[J]. 功能材料, 2019, 50(9): 9001-9005.
- [8] 陈伟翰, 谭佳佳, 黄鸿章, 等. 新型眼用抑菌剂季铵盐-1 的研究进展[J]. 今日药学, 2020, 30(7): 498-500.
- [9] Jennings M, Minbiole K, Wuest W M. Quaternary ammonium compounds: an antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance[J]. ACS Infectious Diseases, 2015, 1: 288-303.
- [10] Guangyue Z, Magdalena S, Damla K, et al. Antimicrobial nanogels with nanoinjection capabilities for delivery of the hydrophobic antibacterial agent triclosan[J]. ACS Applied Polymer Materials, 2020, 2, 12: 5779-5789.
- [11] Loontjens J A. Quaternary ammonium compounds, in biomaterials associated infection: immunological aspects and antimicrobial strategies[M]. New York: Springer, 2013: 379-404.
- [12] Serbanescu O, Voicu S, Thakur V. Polysulfone functionalized membranes: properties and challenges [J]. Materials Today Chemistry, 2020, 17: 100302.
- [13] Kheirieh S, Asghari M, Afsari M. Application and modification of polysulfone membranes[J]. Reviews in Chemical Engineering, 2018, 34(5): 657-693.
- [14] 魏柯, 张道海, 秦舒浩, 等. 聚砒分离膜的亲水改性研究进展[J]. 高分子材料科学与工程. 2018, 34(8): 179-182.
- [15] Chen D, Hickner M, Wang S, et al. Synthesis and characterization of quaternary ammonium functionalized fluorene-containing cardo polymers for potential anion exchange membrane water electrolyzer applications [J]. International Journal of Hydrogen Energy 2012, 37(21): 16168-16176.
- [16] Carbone A, Pedicini R, Gatto I, et al. Development of polymeric membranes based on quaternized polysulfones for AMFC applications[J]. Polymers, 2020, 12: 283.
- [17] Cihanoglu A, Ltinkaya S A. Facile route to the preparation of antibacterial polysulfone-sulfonated polyethersulfone ultrafiltration membranes using a cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide[J]. Journal of Membrane Science, 2020, 594: 117438.
- [18] Gu S, Cai R, Yan Y. Self-crosslinking for dimensionally stable and solvent-resistant quaternary phosphonium based hydroxide exchange membranes [J]. Chemical Communications, 2011, 47(11): 2856-2858.
- [19] Pantamas N, Khonkeng C, Krachodnok S, et al. Ecofriendly and simplified synthetic route for polysulfone-based solid-state alkaline electrolyte membrane[J]. American Journal of Applied Sciences, 2012, 9(10): 1577-1582.
- [20] Avram E. Polymers with pendent functional groups. VI. a comparative study on the chloromethylation of linear polystyrene and polysulfone with paraformaldehyde/Me₃SiCl[J]. Polymer-Plastics Technology and Engineering, 2001, 40(3): 275-281.