

基于双咪唑离子介质制备高抗菌性聚氨酯的研究

朱丽霞^{1,2} 代金月² 陈 来¹ 王玉彬² 朱 锦² 那海宁^{2*}

(1.上海大学材料与科学学院高分子材料与工程,上海 200444;
2.中国科学院宁波材料技术与工程研究所宁波市高分子材料重点实验室,宁波 315201)

摘 要 利用阴离子交换反应合成阴离子为 PF_6^- 的双咪唑基离子二醇($[\text{BmimPF}_6^-]\text{-OH}$)新型扩链剂,并由此制备出一种双咪唑离子介质固载的聚氨酯($[\text{BmimPF}_6^-]\text{-PU}$)。通过核磁、红外光谱对其结构进行了表征,并研究了该聚氨酯的抗菌性能。结果表明:双咪唑离子介质的引入,赋予聚氨酯高效的抗菌性。在 $[\text{BmimPF}_6^-]\text{-OH}$ 含量达 22.86%(wt,质量分数)时,该类聚氨酯对大肠杆菌的抑菌率超过 99.9%,对金黄色葡萄球菌的抑菌率达到 99.4%。

关键词 双咪唑离子介质,聚氨酯,抗菌性

Preparation of high antibacterial polyurethane based on bis-imidazolium ion

Zhu Lixia^{1,2} Dai Jinyue² Chen Lai¹ Wang Yubin² Zhu Jin² Na Haining²

(1.Department of Polymer Materials,School of Materials Science and Engineering,Shanghai University,Shanghai 200444;2.Ningbo Key Laboratory of Polymer Materials,Ningbo Institute of Materials Technology and Engineering,Chinese Academy of Sciences,Ningbo 315201)

Abstract The bis-imidazolium based ionic diol with PF_6^- anion ($[\text{BmimPF}_6^-]\text{-OH}$) was synthesized through anion exchange and used as a novel chain extender to prepare a bis-imidazolium ion immobilized polyurethane ($[\text{BmimPF}_6^-]\text{-PU}$). The structure was confirmed by NMR and FT-IR, and the antibacterial property of $[\text{BmimPF}_6^-]\text{-PU}$ was evaluated. The results showed that the bis-imidazolium ion could give the polyurethane with excellent antibacterial activity. When the content of $[\text{BmimPF}_6^-]\text{-OH}$ was 22.86wt%, the percentage reduction of the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* reached 99.9% and 99.4%, respectively.

Key words bis-imidazolium ion, polyurethane, antibacterial activity

聚氨酯(PU)具有优良的物理性能、力学性能和良好的生物相容性,可作为生物医用材料,在生物医学工程领域应用广泛^[1]。但聚氨酯制品在使用或存放中,易滋生细菌或真菌,对后期使用威胁巨大。尤其近年来,越来越多的聚氨酯材料作为医疗装置与患者直接接触,容易导致炎症反应^[2]。为解决这一问题,需要对聚氨酯进行改性,使其具有高效、长期稳定的抗菌性。

制备抗菌聚氨酯的主要途径为通过物理改性、化学改性或复合改性将抗菌基团引入到聚氨酯中。目前,大量的研究将 Ag^+ 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 等金属离子、抗生素及卤素等抗菌剂载入聚氨酯中^[3],提升了聚氨酯材料的抗菌性。但这类体系会持续释放,在

长期储存时活性剂会逐渐消耗,无法维持稳定的抗菌效果。近年来,以季铵化合物为代表的抗菌剂,本身不挥发、化学稳定、抗菌效果好、不释放有毒物质,已得到科研工作者的广泛关注^[4]。当前,主要有两种方式将季铵盐引入聚合物中,一种是先合成含季铵盐官能团的阳离子单体、再聚合;另一种是先聚合、再进行季铵化。以共价键结合的方式将季铵盐固载到聚氨酯上,不仅可以长期重复利用,且抗菌基团集中在聚氨酯表面,杀菌快速高效。另外,据报道,固载的季铵盐如果具有较长的疏水烷基链,抗菌效果更佳^[5]。

研究表明,与季铵化合物有着相似结构的咪唑离子液体可作为一种抗菌剂,其抗菌机理和季铵盐

基金项目:国家自然科学基金(51403224)

作者简介:朱丽霞(1991-),女,硕士研究生,主要从事生物基功能高分子材料的合成与研究。

联系人:那海宁,副研究员。

类似,抗菌活性更为显著^[6]。而且,由咪唑离子介质组成的咪唑离子液体还具有较好的热稳定性、化学稳定性和环境友好性。由此,利用共价键结合的方法将咪唑离子介质固载在聚氨酯上,不仅能进一步提高材料的抗菌性,而且安全、无毒。因此,本研究设计合成了一种双咪唑离子介质固载的聚氨酯,利用阴离子交换反应制备阴离子为 PF_6^- 的双咪唑基离子二醇,然后与聚氨酯预聚物进行自由基聚合,最终得到含双咪唑离子介质的聚氨酯,并研究了该聚氨酯对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌性以及抗菌细菌粘附性。

1 实验部分

1.1 主要原料与试剂

二溴新戊二醇(纯度 98%),TCI 试剂有限公司;六氟磷酸铵(纯度>98%),上海共价化学科技有限公司;*N*-甲基咪唑(纯度 98%)、异佛尔酮二异氰酸酯(IPDI,纯度>99%)、1,4-丁二醇(BDO,分析纯)、二丁基锡二月桂酸酯(DBTL,化学纯),阿拉丁试剂有限公司;衣康酸基聚酯($M_n=1200\text{g/mol}$),实验室自制^[7];甲苯(分析纯)、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF,分析纯),国药集团化学试剂有限公司,经氯化钙干燥减压蒸馏处理。

1.2 含双咪唑离子介质侧基聚氨酯的制备

1.2.1 阴离子为 PF_6^- 的咪唑基离子二醇的制备

在装有磁子的 100mL 圆底烧瓶中,加入二溴新戊二醇(0.05mol)和 *N*-甲基咪唑(0.125mol), N_2 保护条件下,150℃反应 8h,得到阴离子为 Br^- 的咪唑基离子二醇。然后将其加入到溶有六氟磷酸铵的去离子水中,室温搅拌 1h,将析出的沉淀过滤,并用去离子水洗涤多次后置于 80℃真空烘箱中干燥,得到阴离子为 PF_6^- 的咪唑基离子二醇($[\text{BmimPF}_6^-]\text{-OH}$)。

1.2.2 含双咪唑离子介质侧基聚氨酯的制备

在装有机械搅拌、冷凝管、滴液漏斗、通 N_2 的四颈瓶中,按 $\text{NCO}:\text{OH}=1:1$ (摩尔比)加入 IPDI 和衣康酸基聚酯,同时加入一定量的甲苯,搅拌至完全溶解后加入总溶液质量 0.05% 的催化剂 DBTL,升温至 60℃反应 4h 得到聚氨酯预聚物。采用二正丁胺-丙酮法滴定剩余—NCO 的含量,根据—NCO 剩余含量计算相应扩链剂的量。随后将计量的扩链剂 $[\text{BmimPF}_6^-]\text{-OH}$ 和 BDO 溶解在少量 DMF 中,用滴液漏斗缓慢滴加到预聚物中,在 85℃下进行扩链反应,至—NCO 反应完全(傅里叶红外光谱监测,

2270 cm^{-1} 处无红外吸收峰)。反应结束后,将黏稠的溶液在聚四氟乙烯模具内流延成膜,自然干燥 1d,置于 50℃烘箱内干燥得到含双咪唑离子介质侧基聚氨酯膜($[\text{BmimPF}_6^-]\text{-PU}$)。表 1 给出了样品的投料比。

表 1 样品的原料投料比

样品	IPDI/ mol	聚酯 二醇/ mol	$[\text{BmimPF}_6^-]\text{-OH}:$ BDO 的摩尔 投料比	$[\text{BmimPF}_6^-]\text{-OH}$ 含量/%
$[\text{BmimPF}_6^-]\text{-PU0}$	4	1	0:3	0
$[\text{BmimPF}_6^-]\text{-PU0.5}$	4	1	0.5:2.5	10.72
$[\text{BmimPF}_6^-]\text{-PU1}$	4	1	1:2	19.68
$[\text{BmimPF}_6^-]\text{-PU1.2}$	4	1	1.2:1.8	22.86

注: $[\text{BmimPF}_6^-]\text{-OH}$ 含量为质量分数,下同。

1.3 性能测试与表征

1.3.1 核磁共振和红外光谱测试

核磁共振氢谱、碳谱和氟谱使用核磁共振光谱仪(AVANCE III 400M 型,德国 Bruker 公司)进行测量,以氘代二甲基亚砷($\text{DMSO}-d_6$)为溶剂,以四甲基硅烷(TMS)为标准物;使用傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, Nicolet 6700 型,美国 Thermo 公司)对样品进行测试,取少量样品用 DMF 溶解后滴在 KBr 片上,待液体挥发后检测,范围为 4000~500 cm^{-1} 。

1.3.2 抗菌性测试

参照标准 ASTM E2149 动态摇瓶振荡法进行抗菌性能测试。测试菌种为大肠杆菌(格兰氏阴性菌代表)和金黄色葡萄球菌(格兰氏阳性菌代表)。

将活化的两种菌种加入灭菌后的脑心浸出液肉汤(BHI)中,37℃恒温振荡培养箱培养 24h 后,菌液用离心机离心,转速 3000r/min,离心 10min。取两种离心沉淀物(细菌)用无菌磷酸(PBS)缓冲液稀释,直到 600nm 单波长紫外-可见光分度计的吸光度值为 0.1,此时对应的两种菌悬液浓度均为 10^8CFU/mL 。进一步用 PBS 缓冲液稀释 100 倍后,用无菌的 BHI 液体培养基稀释至 1000 倍配制好标准菌悬液,浓度为 10^5CFU/mL 。

将 0.2g 聚氨酯膜加入到 20mL 标准菌悬液中,37℃下摇瓶振荡培养 24h 后,取菌悬液测定吸光度值,同时进行平皿扩散,取 0.1mL PBS 缓冲液稀释相同倍数后的菌液均匀涂布在 BHI 固体培养基上,放在 37℃振荡培养箱中培养 24h 后计量菌落数。按式(1)计算不同咪唑离子介质含量聚氨酯膜的抑

菌率。

$$R = \frac{A - B}{B} \times 100\% \quad (1)$$

式中, R 为抑菌率, %; A 为对照组-空白样的菌落数、 B 为实验组-样品的菌落数, 菌落个数。

1.3.3 细菌粘附性测试

将样品浸泡在 10mL 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌标准菌悬液内, 放置于 37℃ 振荡培养箱中培养 24h 后, 取出样品用 2.5% 戊二醛溶液固定 2h, 并用去离子水反复冲洗, 自然干燥。采用场发射扫描电子显微镜(SEM, Hitachi S4800 型, 日本日立公司) 观察样品表面微观形态。

2 结果与讨论

2.1 结构分析

扩链剂[BmimPF₆]⁻-OH 的核磁谱图如图 1 所示。由图 1(a)可知, 各峰位与结构式一一对应, 且积分面积比值也与结构式保持一致。化学位移 $\delta = 5.30 \times 10^{-6}$ 和 3.11×10^{-6} 处为羟基及与羟基相邻亚甲基中的质子峰, $\delta = 3.86 \times 10^{-6}$ 和 4.22×10^{-6} 处为与咪唑环相连的甲基和亚甲基的质子峰。由于咪唑环最具正电性, 所以咪唑环上的质子化学位移最大, 出现在 $\delta = 7.60 \times 10^{-6}$ 、 7.74×10^{-6} 、 8.96×10^{-6} 。这与核磁碳谱图[图 1(b)]的结果一致, 咪唑环上 C 化学位移最大, 出现在 $\delta = 138.40 \times 10^{-6}$ 、

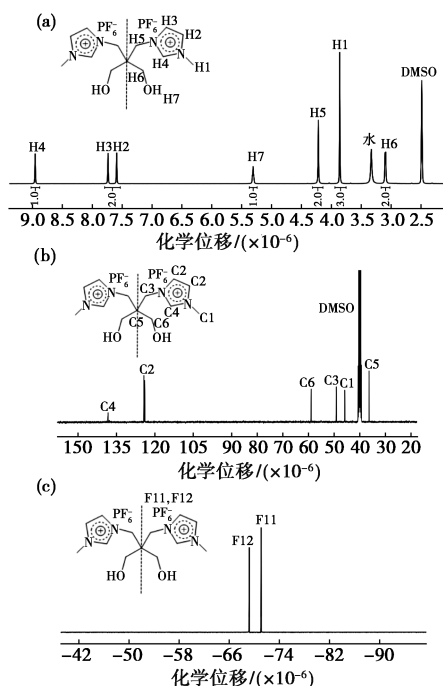


图1 扩链剂[BmimPF₆]⁻-OH 的核磁谱图
[(a)氢谱;(b)碳谱;(c)氟谱]

124.02×10^{-6} 。 $\delta = 58.91 \times 10^{-6}$ 处为与—OH 相邻的 C, $\delta = 49.13 \times 10^{-6}$ 和 45.75×10^{-6} 处分别为与咪唑环相连的亚甲基 C 和甲基 C。通过核磁氟谱图[图 1(c)]可以确定阴离子 Br⁻ 交换为 PF₆⁻, 可明显观察到 $\delta = -69.25 \times 10^{-6}$ 、 -79.10×10^{-6} 处出现了 F 的化学位移。

[BmimPF₆]⁻-OH 和 [BmimPF₆]⁻-PU 的 FT-IR 谱图如图 2 所示。由图 2(a)可知, 在 844cm^{-1} 处出现了较强的 PF₆⁻ 吸收峰, 这是由 P—H 的伸缩振动引起, 进一步证明了阴离子交换成功。由图 2(b)可知, 加入咪唑离子基扩链剂后, 在 844cm^{-1} 处出现了 PF₆⁻ 的吸收峰, 且含量越多, 吸收峰越强。 3166cm^{-1} 附近出现的较弱吸收峰为咪唑环上=C—H 的伸缩振动峰。说明双咪唑离子介质成功引入到聚氨酯中。其他主要峰的归属如下: 3340cm^{-1} 处为 N—H 的伸缩振动峰, 1716cm^{-1} 处为 C=O 的伸缩振动峰, 1536 和 1309cm^{-1} 处为 N—H 的弯曲振动峰和 C—N 的伸缩振动峰的叠合峰, 这说明产物中酰胺基和酯基的存在。

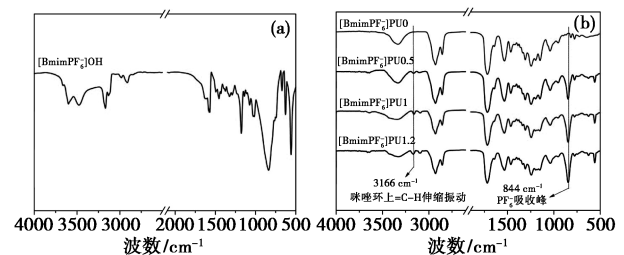


图2 [BmimPF₆]⁻-OH(a)和[BmimPF₆]⁻-PU(b)的 FT-IR 谱图

2.2 抗菌性分析

图 3 显示了聚氨酯膜在菌液中动态接触 24h 后, 菌液在 600nm 单波长紫外-可见光下测定的吸光度值。研究表明, 菌液的吸光度与细菌浓度的对数值呈现良好的线性关系。因此, 吸光度值的大小可以反映细菌的活菌数。活菌数越少, 抗菌效果越好。由图可知, 不含双咪唑离子介质的聚氨酯与两种细菌接触后, 活菌数较空白样减少较少, 说明仅由 BDO 扩链得到的聚氨酯抗菌性不好。引入双咪唑离子介质后, 聚氨酯对两种细菌均表现出了优异的抗菌效果。尤其在双咪唑离子介质含量增加到 19.68% 以上, 大肠杆菌的活菌数出现急剧降低。这是由于当双咪唑离子介质含量增加到一定程度后, 咪唑离子间会因电荷相互吸引形成离子簇, 从而更集中有效地杀死细菌。而相比之下, 金黄色葡萄球菌活菌数较大肠杆菌活菌数减少的不明显。这是由

两种细菌细胞壁结构的不同引起的。大肠杆菌的细胞壁较薄,在磷脂双分子层中只有 1—2 层的肽聚糖,荷正电咪唑离子与荷负电的细胞壁静电吸引,穿透细胞壁,同时疏水基 PF_6^- 插入磷脂双分子层中扰乱细胞膜组成,导致胞内物质泄漏,致使细菌死亡^[6]。而金黄色葡萄球菌的细胞壁具有丰富的肽聚糖,高达 50 层,且彼此间通过五肽交联桥连接形成交联结构,咪唑离子较难穿透。因此,该聚氨酯对大肠杆菌的抗菌效果更显著。

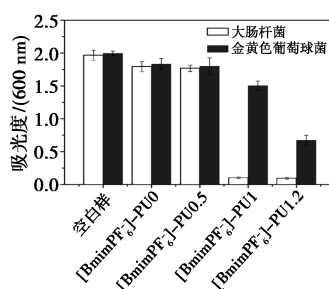


图 3 聚氨酯膜在标准菌液中振荡接触 24h 后的吸光度变化情况示意图

为更直观的反映合成的聚氨酯对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌性,采用平皿扩散定量分析了其抑菌率,结果如图 4 所示。由图可知,与图 3 结果一致,不含双咪唑离子介质的聚氨酯对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抗菌功效一般,抑菌率仅为 55.4% 和 55.1%。当引入 10.72% 的双咪唑离子介质后,抑菌率有所提高,但由于咪唑离子含量过低,所以效果不明显。而当双咪唑离子介质含量继续增加后,聚氨酯([BmimPF₆]⁻-PU1、[BmimPF₆]⁻-PU1.2)对大肠杆菌抑菌率均超过 99.9%,对金黄色葡萄球菌也分别达到 88.7% 和 99.4% 的抗菌功效。

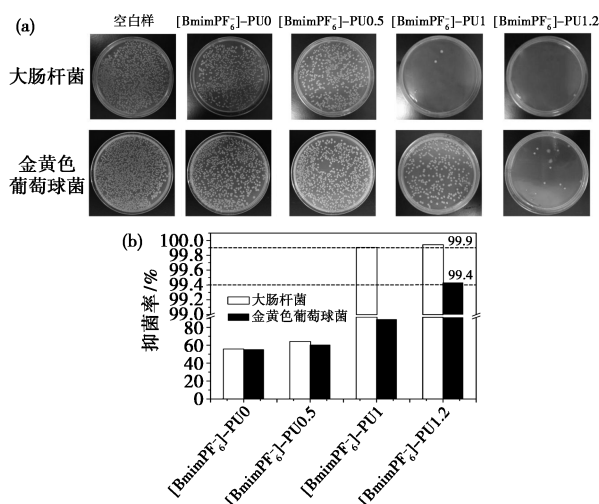


图 4 聚氨酯膜在标准菌液中振荡接触 24h 后的菌落数(a)和抑菌率(b)变化情况示意图

2.3 细菌粘附性分析

图 5 为聚氨酯膜对大肠杆菌抗粘附行为的 SEM 图。由图可知, [BmimPF₆]⁻-PU0 样品表面粘附了很多细菌,并且细菌出现了聚集现象。双咪唑离子介质固载后,聚氨酯膜对大肠杆菌的抗粘附性提高,这是由于双咪唑离子能有效抑制细菌生物膜的形成。尽管[BmimPF₆]⁻-PU0.5 样品表面仍有细菌粘附,但没有发现聚集现象。在双咪唑离子介质含量达到 19.68% 以上,聚氨酯膜对大肠杆菌的抗粘附性行为达到了 100%。

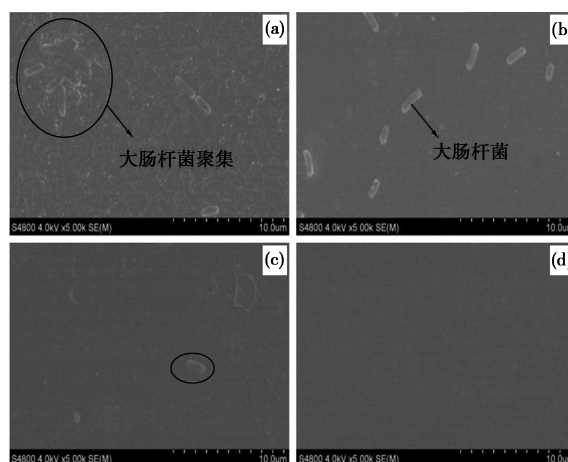


图 5 聚氨酯膜对大肠杆菌抗粘附行为的 SEM 图
[(a)[BmimPF₆]⁻-PU; (b)[BmimPF₆]⁻-PU0.5;
(c)[BmimPF₆]⁻-PU1; (d)[BmimPF₆]⁻-PU1.2]

3 结论

(1) 成功合成了一种双咪唑离子基二醇的新型扩链剂([BmimPF₆]⁻-OH), 并与 PU 预聚物聚合制备了含双咪唑离子介质侧基的聚氨酯([BmimPF₆]⁻-PU)。

(2) 抗菌性能测试表明合成的[BmimPF₆]⁻-PU 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌表现出优异的抗菌效果。随着双咪唑离子介质含量的增加,其抗菌性能显著提高。在双咪唑离子介质含量达到 22.86% 时,[BmimPF₆]⁻-PU 对两种细菌的抑菌率分别达到了 99.9% 和 99.4%。其抗菌机理是通过荷正电咪唑环与荷负电细胞壁产生静电吸引,穿透细胞壁,同时疏水基 PF_6^- 插入磷脂双分子层中,扰乱细胞膜组成,导致胞内物质泄漏,致使细菌死亡。

参考文献

- [1] Yücedag F, Atalay-Oral C, Erkal S, et al. Antibacterial oil-based polyurethane films for wound dressing applications[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2010, 115 (115): 1347-1357.

(下转第 118 页)