

季铵化聚乙烯亚胺的抗菌性能研究*

张 昕 高保娇** 朱 勇 刘 青

(中北大学化学工程系 太原 030051)

摘 要 采用叔胺化反应与季铵化反应两步高分子反应过程,制备了季铵化的聚乙烯亚胺(QPEI)以大肠杆菌(*E. coli*)为致病菌体,重点研究了高分子季铵盐 QPEI 的抗菌活性.采用平板活菌记数法考察了季铵化度及 pH 值等因素对其抗菌性能的影响规律.并采用 β -半乳糖苷酶活性测定法,研究了 QPEI 的抗菌机理.研究结果表明,QPEI 具有很强的抗菌能力,对浓度为 10^9 CFU/mL 的菌悬液,在药剂量为 15 mg/L、接触时间为 4 min 的条件下,杀菌率可达 100%. QPEI 的季铵化度对其抗菌性能影响很大,季铵化度越高,抗菌性能越好.在一定的 pH 值范围内,pH 值越高,抗菌性能越好. β -半乳糖苷酶活性测定结果表明,QPEI 的抗菌机理是基于杀菌过程,而不只是抑菌作用.

关键词 高分子抗菌剂,聚乙烯亚胺,季铵盐,抗菌性能,抗菌机理

高分子抗菌剂是在大分子链上键合有抗菌基团(或键合有可水解产生抗菌剂的基团)的聚合物,全球范围内对传染疾病的密切关注极大地促进了高分子抗菌剂的研究与发展^[1~3].目前用于水体或医用消毒的杀菌剂大多为小分子物质,小分子杀菌剂不但会残留余毒,造成对环境的危害,而且消毒时效短^[4,5].与小分子杀菌剂相比,高分子抗菌剂具有抗挥发与抗分解稳定性、消毒时效长及残留余毒小等优点^[6,7],更重要的是由于抗菌基团浓集在大分子链上,高分子抗菌剂具有很强的抗菌能力,尤其是聚阳离子抗菌剂(聚季铵盐或聚季磷盐),大分子链上高度的正电荷密度与良好的可接近性(亲水性),使其具有优良的抗菌活性^[4,8],可用于各种消毒处理过程.目前研究者们正在研究制备具有各种结构的高分子抗菌剂^[1,9,10],以满足社会的需求.

聚乙烯亚胺(PEI)是一种水溶性聚胺,其分子链中拥有大量的胺基 N 原子,商品化的 PEI 往往是带有支链的大分子(见图 1),分子链上的伯、仲、叔胺基的比例一般为 1:2:1.聚乙烯亚胺作为一种水溶性功能大分子,其特性引起了国内外学者的广泛关注,已将其应用于多个研究领域,尤其在生物医学领域,如生物大分子的分离纯化、酶的固定化、生物传感器的构建、药物释放等多个方面都有重要的应用^[11~14].对于用 PEI 来制备高分子抗菌剂的可能性,本文进行了探索研究.通过叔胺

化与季铵化两种高分子反应步骤实施了聚乙烯亚胺的季铵化^[15],制备了季铵化的聚乙烯亚胺(QPEI),重点研究了 QPEI 的抗菌活性.研究发现,作为一种聚季铵盐,QPEI 具有十分优良的抗菌性能,浓度仅为 15 mg/L 时,短时间内与浓度为 10^9 CFU/mL 的大肠杆菌菌悬液接触,抗菌率便可达到 100%.本文还探索研究了大分子 QPEI 的抗菌机理,研究结果表明,由于 QPEI 大分子链上密集的季铵盐基团,在静电相互作用下,QPEI 大分子与菌体之间会产生强烈的吸附作用,进而穿透菌体细胞壁,与细胞膜结合并破坏细胞膜,使细胞内物质泄露,致使细菌死亡,因此,季铵盐型大分子 QPEI 的抗菌机理与小分子季铵盐是相同的,是基于杀菌过程,所不同的是由于季铵基团浓集的高分子效应,使 QPEI 与菌体之间的吸附作用力比小分子季铵盐更强,因而杀菌效能更高.本研究将功能大分子聚乙烯亚胺进行化学改性,制备出具有强抗菌活性的高分子抗菌剂,较深入地研究了高分子抗菌剂的抗菌机理,对于促进功能大分子在微生物科学与防疫消毒领域的应用具有一定的理论参考价值.

1 实验部分

1.1 原料与仪器

聚乙烯亚胺(武汉强龙化学工业有限公司, $M_r = 2 \times 10^4$,含量为 25% 的水溶液),化学纯,在

* 2006-07-20 收稿,2006-09-22 修稿;* 山西省工业攻关项目(项目号 051208);** 通讯联系人,E-mail: gaobaojiao@126.com

使用前采用紫外分光光度法准确测定其浓度。环氧丙烷(北京化学试剂公司),分析纯;氯化苄(北京化学试剂公司),分析纯;菌体:大肠杆菌(*E. Coli*),由山西省微生物研究所提供,牛肉膏蛋白胨培养基培养 16 h;牛肉膏蛋白胨培养基含有牛肉膏、蛋白胨、琼脂及 NaCl,均为市售试剂;邻硝基苯酚- β -D-半乳糖苷(ONPG, Aldrich 产品);磷酸盐缓冲液(PBS),自行配制。

UV2602 型紫外分光光度计(美国 UNIC 公司);PHS-2 酸度计(上海第二分析仪器厂);250B 生化培养箱;不锈钢高压灭菌锅;THZ-82 型水浴恒温振荡器(金坛市富华仪器有限公司)。

1.2 季铵化聚乙烯亚胺的制备与表征

按文献[15]制备季铵化的聚乙烯亚胺,典型的制备过程为(1)叔胺化反应,往聚乙烯亚胺溶液中滴加环氧丙烷(叔胺化试剂),于搅拌下维持低温反应,反应结束后,将产物混合液升温至 35℃,蒸出未反应的环氧丙烷,即得叔胺化产物溶液;(2)在叔胺化产物溶液中加入过量的氯化苄,恒温搅拌反应一定时间,结束反应,用乙醚萃取出未反应的氯化苄,即得季铵化的产物溶液,将产物溶液在真空烘箱中蒸发干燥,即得 QPEI,通过控制反应时间制得不同季铵化度的 QPEI。用红外光谱与紫外光谱表征产物的化学结构(谱图从略),并使用硝酸银沉淀滴定法测定产物的季铵化度(PEI 大分子链中 N 原子发生季铵化的摩尔百分数即为季铵化度, mol%)。

1.3 QPEI 对大肠杆菌抗菌能力的测定

1.3.1 测定原菌液的菌浓 取活化后的大肠杆菌,接种于液体营养培养基,37℃ 摇床培养 16 h。备若干支洁净试管,内加灭菌蒸馏水 9 mL。取 1 mL 大肠杆菌浓度约为 10^9 CFU/mL 的菌悬液(将此菌悬液浓度梯度记为 10^0),采用逐级稀释法制成不同梯度菌液,取 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 梯度菌液各 0.1 mL 分别铺平板,于 37℃ 下在固体营养培养基上培养 24 h,对菌落数在 10~100 左右的平板做活菌计数,得原菌悬液的活菌浓度(即菌落形成数, CFU/mL, 与原菌数成正比)。

1.3.2 测定不同剂量下 QPEI 的抗菌能力 在若干支洁净试管中分别加入 1 mL 菌龄为 16 h、浓度约为 10^9 CFU/mL 的大肠杆菌菌悬液,再分别加入不同体积的水,并加入浓度为 0.5 mg/mL 的不同体积的 QPEI 溶液,使最终的试液体积为 10 mL,得 QPEI 浓度不同的试液。振荡各试液,使接

触时间均为 4 min,然后分别逐级稀释,对 QPEI 浓度不同的试液,在不同梯度进行平板活菌计数,得各试液的活菌浓度(即菌落形成数,与活菌数成正比)。抗菌率按下式计算:

$$\text{抗菌率(antibacterial ratio)}(\%) = \left(\frac{\text{原菌数} - \text{活菌数}}{\text{原菌数}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

1.3.3 测定不同接触时间下 QPEI 的抗菌能力

取 1 mL 菌龄为 16 h、浓度约为 10^9 CFU/mL 的大肠杆菌菌悬液,分别加入到若干支含 8.7 mL 水的洁净试管中,再分别加入 0.3 mL 浓度为 0.5 mg/mL 的 QPEI 溶液,振荡各混合液,接触不同时间后分别逐级稀释,针对不同接触时间的试液,在不同梯度进行平板活菌计数,得各试液的活菌浓度,抗菌率仍按(1)式计算。

1.4 季铵化度不同的 QPEI 的抗菌性能的测定

将 5 种季铵化度不同的 QPEI 均配成浓度为 0.5 mg/mL 的水溶液,再按 1.3.2 步骤测定 5 种不同季铵化度的 QPEI 在分别加入不同剂量时的抗菌能力。使各试液接触时间均为 4 min,然后分别逐级稀释,对 5 种不同季铵化度的 QPEI 的试液,在不同梯度进行平板活菌计数,得各试液的活菌浓度,抗菌率仍按(1)式计算。

1.5 不同 pH 条件下 QPEI 抗菌性能的测定

在若干个洁净经灭菌后的小锥形瓶中先分别加入 44 mL 水,再分别加入 5 mL 菌龄为 16 h、浓度约为 10^9 CFU/mL 的大肠杆菌菌悬液(同时平行测定此原菌悬液的菌浓),最后加入 1 mL 浓度为 0.5 mg/mL 的 QPEI 溶液,通过加入稀盐酸与氢氧化钠溶液,分别调节各试液的 pH 值,使它们处于不同的数值,振荡各混合液并使接触时间均为 10 min,然后分别逐级稀释,对不同 pH 值的试液,在不同梯度进行平板活菌计数,得各试液的活菌浓度,抗菌率仍按(1)式计算。

1.6 β -半乳糖苷酶活性测定

以 ONPG 为底物,测定 β -半乳糖苷酶催化 ONPG 水解成产物邻硝基苯酚(ONP)的反应情况,以判断大肠杆菌内膜是否遭到破坏。在 3 份 5.5 mL PBS 缓冲溶液中(pH 为 7.4),同时加入 0.75 mL 浓度为 10^9 CFU/mL 菌液和 0.75 mL 浓度为 25 mmol/L 的底物 ONPG,振荡 15 min 后分别在两只试管中加入不同体积的浓度为 0.5 mg/mL 的 QPEI 溶液,并用缓冲液将 3 只试管的总体积调成 10 mL,用分光光度计检测各试液在 420 nm 处吸光度

值随时间的变化.

2 结果与讨论

2.1 季铵化聚乙烯亚胺的制备过程

以环氧丙烷为叔胺化试剂,使 PEI 大分子链

上的伯胺与仲胺基团发生烷基化反应,同时环氧丙烷发生开环加成反应,生成叔胺化的聚乙烯亚胺,然后以氯化苄为季铵化试剂,使 PEI 大分子链上的叔胺基团发生季铵化反应,生成季铵化的聚乙烯亚胺,反应过程如图 1 所示.

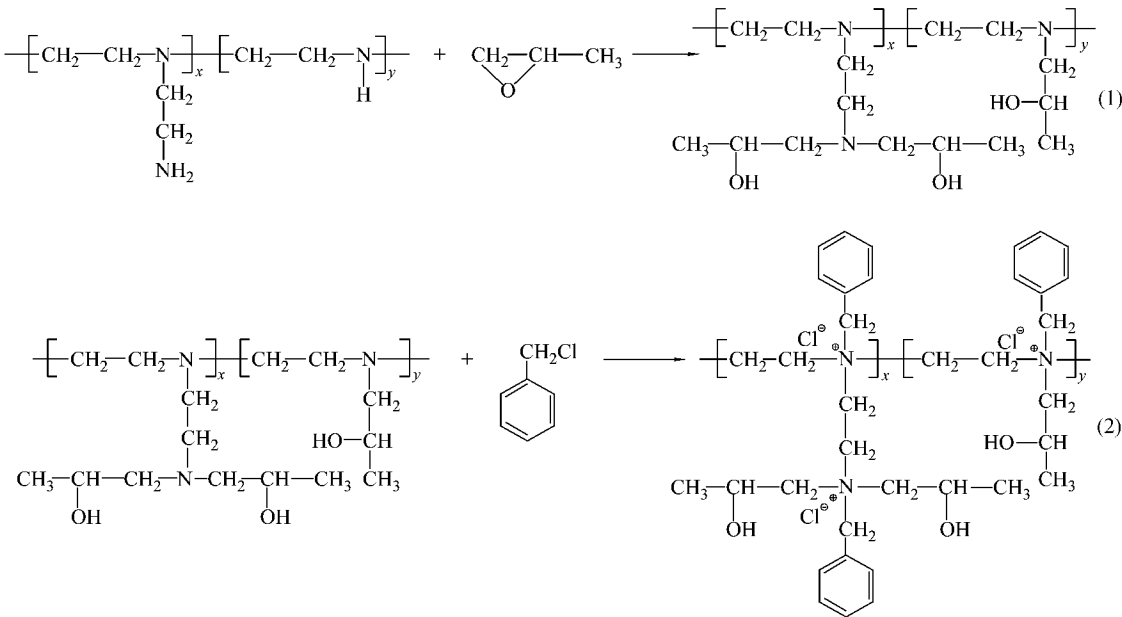


Fig. 1 Schematic representation of preparing process for QPEI

2.2 PEI 季铵盐对大肠杆菌的抗菌能力

使 QPEI 在不同剂量及不同接触时间条件下与大肠杆菌菌悬液作用,其抗菌率的变化曲线如图 2 与图 3 所示.

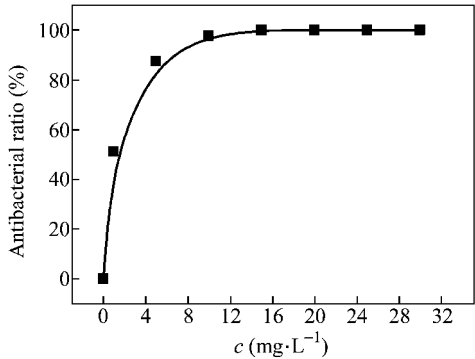


Fig. 2 Antibacterial ability of QPEI at different concentrations

Contact time 4 min ; Cationic degree (mol%) of QPEI : 54.9%

从图中可以看出,QPEI 溶液在小剂量下(约 5 mg/L)、短时间内(约 2 min)即可使活菌数迅速下降,对于季铵化度为 54.9% 的 QPEI 样品,浓度为

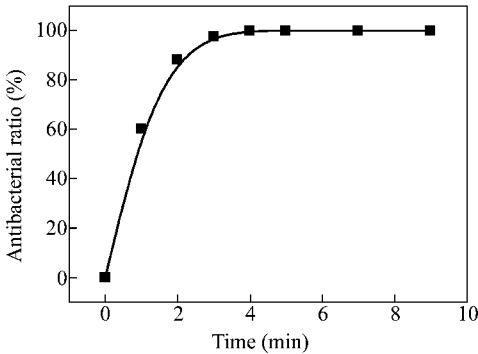


Fig. 3 Antibacterial ability of QPEI at different contact times
Concentration of QPEI 15 mg/L ; Cationic degree (mol%) of QPEI : 54.9%

15 mg/L、接触时间为 4 min 的条件下,抗菌率可达 100%. 实验结果表明,PEI 季铵盐与小分子季铵盐相比,具有很强的抗菌能力. QPEI 大分子链上季铵盐抗菌基团很集中,抗菌基团的这种‘浓集效应’导致了 QPEI 具有快的抗菌速度与高的抗菌活性. 而且与其它类型的高分子抗菌剂相比,QPEI 也具有更强的抗菌活性,比如 Zhang 等制备的高分子胍盐,其最小抑菌浓度为 20 mg/L^[16]; Jones 等

制备的聚乙烯吡咯烷酮-碘络合物,其最小抑菌浓度为 0.0156 g/g^[17].

2.3 季铵化度对 QPEI 抗菌性能的影响

考察了具有不同季铵化度的 QPEI 的抗菌性能,图 4 和图 5 为测定结果.

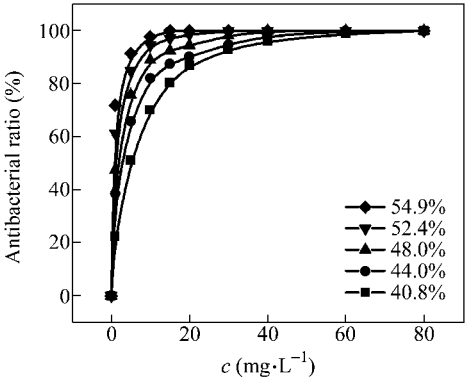


Fig. 4 Antibacterial ability of QPEI with different cationic degrees at different concentrations
Contact time : 4 min

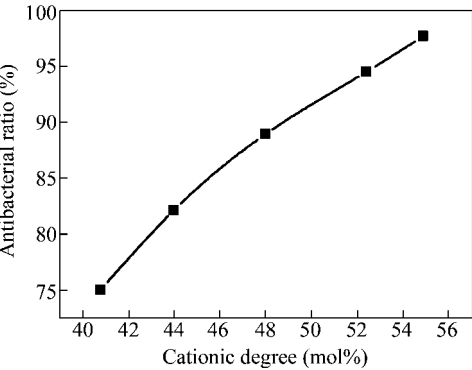


Fig. 5 Effect of cationic degree on bactericidal ratio
Concentration of QPEI : 10 mg/L ; Contact time : 4 min

从图 4 可以看到,季铵化度对 QPEI 的抗菌性能影响很大.季铵化度最大的 QPEI 溶液,在小剂量下即可达到很高的抗菌率.随着季铵化度的逐渐减小,曲线逐渐变得平缓,并且在较大药剂量时抗菌率才可达到 100%.从图 4 中取 10 mg/L 的剂量,作抗菌率与季铵化度的关系曲线,示于图 5,图中能更清楚地显示季铵化度对 QPEI 的抗菌性能影响. QPEI 凭借季铵离子的正电荷与带负电荷的菌体之间会产生强的静电相互作用,因而大分子 QPEI 对菌体会产生强烈的吸附作用,其分子链上的季铵化度越高,正电荷密度越大,对菌体的吸附能力就越强,抗菌能力就越强.

2.4 pH 值对 QPEI 抗菌性能的影响

在不同的 pH 条件下试验了 QPEI 的抗菌性能,图 6 为抗菌率随 pH 变化曲线.

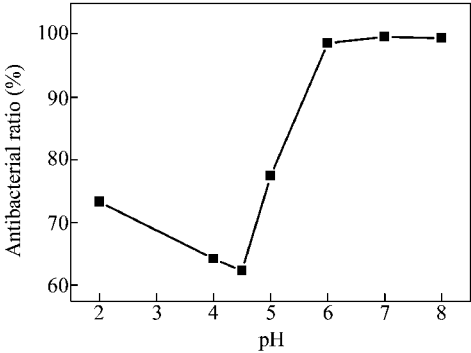


Fig. 6 Effect of pH value on bactericidal ratio
Concentration of QPEI : 10 mg/L ; Contact time : 10 min

从图 6 看出,曲线具有最低点,对应的 pH 值为 4.5. 本研究认为该最低点可能对应着大肠杆菌菌体蛋白质的等电点,即在 pH = 4.5 时,菌体表面不带电荷,此时 QPEI 与菌体之间失去了吸附推动力,故抗菌率低.等电点以右,随着 pH 的增大,细菌蛋白质的主要成分氨基酸中的羧基中和度逐渐增大,细菌表面的负电性变强, QPEI 对菌体的吸附力增强,故抗菌率随 pH 值增大而提高;而当 pH 值增至 6 后,抗菌率几乎不再升高,这可能是当 pH > 6 以后,氨基酸中的羧基全部被中和,细菌表面的负电性不再变化, QPEI 对菌体的吸附力维持不变,故抗菌率不再提高.等电点以左,菌体表面带正电荷,同性电荷相斥,不利于 QPEI 对菌体的吸附,故 QPEI 的抗菌率应当很低,但(表观)抗菌率却随 pH 值减小而提高.对于这种现象,本文认为在 pH < 4.5 的酸性溶液中,存在有两种抗菌作用,其一为 QPEI 的作用,其二为 H⁺ 离子对微生物的作用,且后者随 pH 的减小而增强,此两种抗菌作用的协同,导致等电点以左(表观)抗菌率随 pH 值减小而提高.在不同 pH 值范围内, QPEI 对大肠杆菌抗菌性能的变化规律将有待于进一步研究.

2.5 PEI 季铵盐的抗菌机理

β -半乳糖苷酶对糖脂、乳糖等中的 β -D-半乳糖苷键有特异的水解作用,尤其是大肠杆菌细胞内所含的 β -半乳糖苷酶,对 ONPG 的水解反应具有底物特异性^[18].若大肠杆菌细胞发生破裂,则 β -半乳糖苷酶会泄露到溶液中,催化溶液中的 ONPG 发生水解反应,产生 ONP,而 ONP 在 420 nm

处有特征吸收,因此可通过分光光度法检测出大肠杆菌细胞是否破裂^[19]。本实验在含有 ONPG 的菌液中分别加入两种体积量的 QPEI 溶液,测定了试液吸光度随时间的变化,同时也测定了空白体系(不加 QPEI 溶液的菌液)的吸光度,测定结果如图 7 所示。从图中曲线看出未加 QPEI 溶液的菌液吸光度几乎为零,表明活细菌细胞内膜完好,无 β -半乳糖苷酶释放。而加入 QPEI 溶液的菌液其吸光度值随时间推移而大幅度增大,且 QPEI 溶液加入量大的试液,吸光度值上升幅度更大。这表明 QPEI 溶液的加入,破坏了细菌细胞内膜,释放出了 β -半乳糖苷酶,且 QPEI 溶液加入量越多,对菌体细胞内膜的破坏作用越大,释放出的酶量越多,故对 ONPG 的水解作用越强。细胞内膜的破坏意味着细菌的死亡,由此可以判断, QPEI 的抗菌作用其实质在于杀菌,而不只是抑菌。

结合 β -半乳糖苷酶活性测定结果, QPEI 的抗

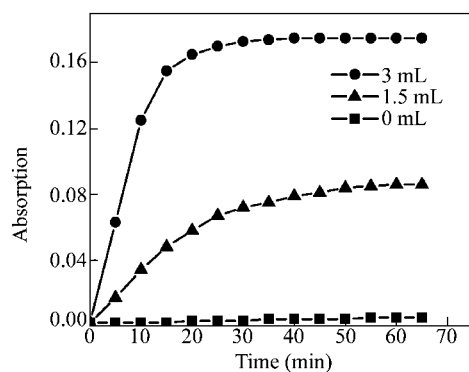


Fig. 7 Absorption of ONP at different times

菌机理可分析如下,带正电的 QPEI 首先被吸附到菌体表面,穿透细胞壁,与细胞膜的类脂层和蛋白质层结合,阻碍细菌对外界的正常离子交换和物质交换,并破坏控制细胞渗透作用的原生质膜,使细胞内物质外渗,致使细菌死亡。

REFERENCES

- Kenawy E R, Abdel-Hay F I, El-Magdi A A, Mahmoud Y. React Funct Polym, 2006, 66: 419 ~ 429
- Dizman B, Elasmri M O, Mathias L J. J Appl Polym Sci, 2004, 94: 635 ~ 642
- Sun Y, Sun G. J Polym Sci Part A: Polym Chem, 2001, 39: 3348 ~ 3355
- Kenawy E R, Abdel-Hay F I, El-Shanshoury A E R, El-Newehy M H. J Controlled Release, 1998, 50: 145 ~ 152
- Cakmak I, Ulukanli Z, Tuzcu M. Eur Polym J, 2004, 40: 2373 ~ 2379
- Jeong J H, Byoun Y S, Lee Y S. React Funct Polym, 2002, 50: 1257 ~ 1263
- Kenawy E R. J Appl Polym Sci, 2001, 82: 1364 ~ 1374
- Sawada H, Tanba K I, Tomita T, Kawase T, Baba M, Ide T. J Fluorine Chem, 1997, 84: 141 ~ 144
- Sawada H, Tanta Y, Inaba Y, Sugiya M, Kawase T, Tomita T. Eur Polym J, 2001, 37: 1433 ~ 1439
- Park E S, Moon W S, Song M J, Kim M N, Chung K H, Yoon J S. Int Biodeter Biodegr, 2001, 47: 209 ~ 214
- Vakurov A, Simpson C E, Daly C L, Gibson T D, Millner P A. Biosens. Bioelectron, 2004, 20: 1118 ~ 1125
- Pessela B C C, Fernández-Lafuente R, Fuentes M, Vián A, García J L, Carrascosa A V, Mateo C, Guisán J M. Enzyme Microb Tech, 2003, 32: 369 ~ 374
- Unsal E, Bahar T, Tuncel M, Tuncel A. J Chromatogr A, 2000, 898: 167 ~ 177
- Rosa G D, Bochot A, Quaglia F, Besnard M, Fattal E. Int J Pharm, 2003, 254: 89 ~ 93
- Zhang Xin(张昕), Gao Baojiao(高保娇), Wang Ruixin(王蕊欣), Li Gang(李刚). Chinese Journal of Synthetic Chemistry(合成化学), 2007, 15(3): 275 ~ 279
- Zhang Y, Jiang J, Chen Y. Polymer, 1999, 40: 6189 ~ 6198
- Jones D S, Djokic J, Gorman S P. Biomaterials, 2005, 26: 2013 ~ 2020
- Qin Y, Ning Z X. Journal of South China University of Technology(Natural Science Edition), 2002, 30(1): 59 ~ 62
- Lehrer R I, Barton A, Ganz T. J Immunol Meth, 1988, 108: 153 ~ 158

ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF QUATERNARY POLYETHYLENE IMINE

ZHANG Xin, GAO Baojiao, ZHU Yong, LIU Qing

(Department of Chemical Engineering, North University of China, Taiyuan 030051)

Abstract Quaternary polyethyleneimine (QPEI) was prepared *via* two procedures of macromolecular reactions, tertiary amination and quaterisation, and the antimicrobial properties of this polymeric quaternary ammonium salt were mainly studied by using *Escherichia Coli* as a disease-leading bacterium. The effects of quaternary degree and pH value on the antimicrobial properties were examined with the method of plate counting living bacterium, and the antimicrobial mechanism of QPEI was studied more deeply *via* measuring the activities of β -D-galactosidase. The experimental results indicates that QPEI possesses very strong antimicrobial ability, and the antimicrobial ratio can reach 100% when QPEI is contacting with a bacterium suspension of 10^9 CFU/mL under the conditions of a contacting time of 4 min and a dose of 15 mg/L. The cationic degree of QPEI influences its antimicrobial properties to a great extent, and the higher the cationic degree is, the stronger the antimicrobial activity. In a certain region of pH values, the higher the pH, the stronger the antimicrobial ability is. The results of measuring activities of the enzyme of β -D-galactosidase shows that the antimicrobial mechanism of QPEI is based on a sterilizing bacterium process, and is not only based a restraining action.

Key words Polymeric antimicrobial, Polyethyleneimine, Quaternary ammonium salt, Antimicrobial property, Antimicrobial mechanism