

聚己内酯-聚铵盐抗菌材料的制备*

胡少东¹ 王川² 蔡孟锁¹ 翟树英¹ 罗祥林^{1,3**}

(四川大学¹高分子科学与工程学院² 生命科学学院³ 高分子材料工程国家重点实验室(四川大学) 成都 610065)

摘要 通过开环聚合(ROP)和原子转移自由基聚合(ATRP)制备了一类聚己内酯-聚阳离子酯嵌段共聚物(LPCL-*b*-PJDMA)。聚合物的制备通过四步反应合成:(1)月桂醇引发开环引发 ϵ -己内酯合成LPCL;(2)以2-溴异丁酰溴(BIBB)封端LPCL制备大分子引发剂;(3)用氯乙酸甲酯对甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMA)进行季铵化反应制备阳离子小分子(命名为JDMA);(4)用五甲基二乙烯三胺(PMDETA)/溴化亚铜为催化剂,催化不同链段数的LPCL与JDMA发生ATRP反应制得LPCL-*b*-PJDMA。通过核磁共振(¹H-NMR)对聚合物的化学结构进行表征,确认合成目标产物。利用示差扫描量热仪(DSC)对其热性进行研究,并用水接触角的方法测量聚合物膜亲水性,最后通过测试细菌在聚合物膜上的存活率的方法测定其抗菌性能。结果表明,LPCL与PJDMA共聚后,随着PCL重复单元数增加,共聚物结晶温度相对于纯PCL出现明显的先降低后升高趋势。LPCL-*b*-PJDMA的亲水性都比纯PCL好,且与LPCL/PJDMA的比例有关。所有的LPCL-*b*-PJDMA膜对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌都具有抗菌能力。

关键词 聚己内酯,聚季铵盐,嵌段聚合物,抗菌材料

随着生活水平的提高,人们开始广泛关注阻止细菌传播的途径和材料。目前应用较多的抗菌剂是无机抗菌剂^[1,2]。其缺点在于小分子和重金属离子存在着毒性,而且价格比较昂贵,所以有机抗菌材料发展起来。有机抗菌材料包括含氮或磷阳离子表面活性抗菌剂以及高分子抗菌剂,而后者性能更稳定,不挥发,使用寿命长,易于加工,易于贮存,不会渗入人或动物表皮,因此近年来的研究较多^[3,4]。对于水不溶性聚合物抗菌剂,通常将抗菌剂小分子通过物理或化学方法固定在高分子载体上制得聚合物抗菌剂^[5,6]。而对于水溶性聚合物抗菌剂,则通常是通过表面接枝等化学方法固定在材料表面^[7-9]。

聚己内酯是FDA认证的生物友好材料,非水溶性,可降解为无毒无害的小分子。但是由于链段较强的疏水性和缺乏可修饰性功能基团,限制了它的应用。所以目前对聚己内酯的改性是形成嵌段聚合物,例如PCL-PEG, PCL-PHEMA等两亲性聚合物结构^[10-12]。含阳离子和聚己内酯的两亲聚合物如PDMAEMA-PCL-PDMAEMA, PEG-PCL-PDMAEMA, PEG-PCL-PU等也有报道^[13-19]。在这

些研究中通常是将聚合物中叔胺质子化得到含季铵盐的PCL,且这些共聚物主要在药物载体/基因载体等方面,基本没看到用于做抗菌膜的研究。而单纯作为抗菌表面的季铵盐聚合物,多为亲水性材料,主要通过表面接枝等化学反应到表面。本文将聚己内酯与季铵盐结合,制备成具有抗菌能力的聚己内酯-聚阳离子酯嵌段共聚物膜材料,并对其抗菌性能做了相关研究。据我们所知,将聚己内酯通过ATRP法聚合季铵盐单元的方法鲜有报道,聚己内酯-聚季铵盐是一种新型抗菌材料。

1 实验部分

1.1 实验试剂

ϵ -己内酯(ϵ -CL), ABCR公司, 纯度>99%, 使用前先经过减压蒸馏处理; 辛酸亚锡, Sigma公司, 纯度95%; 甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMA), 阿拉丁试剂公司, 纯度99%; 氯乙酸甲酯, 西亚试剂公司, 纯度97%; 五甲基二乙烯三胺(PMDETA), TCI试剂公司, 纯度98%; 2-溴异丁酰溴(BIBB), TCI试剂公司, 纯度97%; 溴化亚铜, 成都科龙试剂公司, 使用前先用乙酸、乙醇各

* 2013-10-23 收稿, 2013-11-25 修稿; 国家自然科学基金(基金号 51273125, 51073103)资助项目。

** 通讯联系人, E-mail: luoxl@scu.edu.cn

doi: 10.3724/SP.J.1105.2014.13364

洗涤 3 次, 最后再用丙酮洗 3 次. 其余溶剂和试剂均购自成都科龙试剂公司, 纯度为分析纯; 用于合成的试剂均经过蒸馏处理; 所用水为二次蒸馏水.

1.2 聚合物的表征

核磁共振氢谱¹H-NMR 在 Bruker 上 20 °C 测定, 分别以 CDCl₃ 和 DMSO 为溶剂, 四甲基硅烷为内标, 测试频率为 400 MHz.

差热扫描数据由 Universal V4.5A TA Instruments 示差扫描量热仪(DSC) 在 10 mL/min 的氮气流下测得. 以 10 K/min 的速度从 40 °C 升温到 100 °C, 稳定 3 min 消除热历史, 然后再以 10 K/min 的速度降至 -20 °C, 稳定 3 min, 测定结晶过程, 最后再以 10 K/min 的速度升温至 100 °C, 测定熔融过程.

水接触角数据由 Drop Shape Analysis System DSA100(Hamburg, Germany) 测得. 用血盖片作为基底材料, 使用前经铬酸洗液浸泡过夜, 用双蒸水冲洗干净后, 用乙醇洗涤后真空烘箱中烘干后涂膜.

细菌菌落计数数据由 MF2 全自动菌落分析仪提供. 细菌实验具体步骤如下: (1) 在含有 4 mL 的 LB 培养液的试管中活化原菌 16 h, 测试其 CFU 值. (2) 用甲醇/四氢呋喃的混合溶剂溶解待测聚合物, 使其浓度为 10 mg/mL. (3) 分别吸取 100 μL 聚合物溶液滴加在 24 mm × 24 mm 的干净玻璃片上. (4) 采用溶剂挥发法使聚合物成膜. (5) 用 75% 酒精擦拭容器, 再与待测膜一起紫外灭菌后, 取 200 μL 菌液分别涂覆在灭菌膜玻璃片和空白玻璃片上, 37 °C 下接触培养 18 h. (6) 用 5 mL 无菌水洗脱, 取 10 μL 洗脱液, 用无菌水稀释至 1 mL, 取 100 μL 稀释后菌液加入直径 9 cm 的含 20 mL 的 LB 培养液平板中混匀, 37 °C 下培养 12 h 后进行菌落计数.

1.3 合成部分

1.3.1 ε-己内酯的开环聚合(ROP)

在烧瓶中加入 ε-己内酯(11.414 g, 0.1 mol), 引发剂月桂醇(0.932 g, 0.005 mol), 催化剂辛酸亚锡(0.012 g, 1% ε-CL 质量), 将反应瓶接到双排管上抽真空—充氮气—抽真空循环 3 次, 在真空条件下将反应瓶放在 125 °C 的油浴锅中反应 24 h. 反应完后用二氯甲烷溶解, 冰乙醇沉淀, 过滤得到白色粉末固体.

1.3.2 ATRP 大分子引发剂 LPCL-Br 的合成

瓶中加入 LPCL(5.478 g, 0.002 mol), 连接到

双排管上进行抽真空—通氮气—抽真空循环 3 次, 在氮气保护下加入 15 mL 甲苯溶解, 并加入三乙胺(0.606 g, 0.003 mol), 在 -10 °C 下缓慢加入 2-溴异丁酰溴(1.234 g, 0.003 mol). 低温条件下 1 h 后于室温下反应 24 h. 反应完后滤去不溶性盐, 旋蒸掉部分甲苯, 用冰乙醇沉淀得到白色固体.

1.3.3 季铵盐的合成

在烧瓶中加入 DMA(12.576 g, 0.08 mol), 用 10 mL 醇做溶剂, 然后在恒压漏斗中加入氯乙酸甲酯(5.425 g, 0.05 mol), 用 5 mL 醇做溶剂, 将恒压漏斗中液体缓慢地加入烧瓶中, 反应温度控制在 40 °C, 反应 6 h. 反应完成后旋蒸部分醇, 用冰冻乙醚沉淀得到白色固体产物, 命名为 JDMA.

1.3.4 大分子引发剂与季铵盐的 ATRP 反应

瓶中加入 LPCL-Br(0.5 g, 2.2×10^{-4} mol), 在另一个瓶中加入 JDMA(1.16 g, 4.4×10^{-3} mol), 都进行抽真空—通氮气—抽真空循环 3 次, 在氮气保护下加入 10 mL DMSO 将 LPCL-Br 溶解, 醇将 JDMA 溶解, 然后将溶有 JDMA 的醇溶液迅速倒入装 LPCL-Br 的瓶中. 最后在氮气保护下加入 PMDETA(0.076 g, 4.4×10^{-4} mol), 溴化亚铜(0.047 g, 3.3×10^{-4} mol). 在 30 °C 下反应 36 h. 产物在透析袋中透析 3 天, 冷冻干燥后得到产物.

2 结果与讨论

2.1 线形两亲嵌段聚合物合成

采用开环聚合(ROP) 结合原子转移自由基聚合(ATRP) 反应合成线形两亲嵌段聚合物 LPCL-*b*-PJDMA. 合成的具体流程图如图 1. 己内酯的 ROP 反应能够通过控制己内酯和引发剂的用量比及温度得到设计链段数的聚己内酯. 通过 ATRP 反应, 能够合成出低分散度和确定分子量及分子结构的聚合物. 在合成过程中, 通过控制 JDMA 和大分子引发剂 PCL-Br 的比例来控制亲水链段的长度. 聚合物的组成由核磁氢谱特征峰确定.

图 2(A) 为 PCL 在氘代氯仿中的核磁图. 通过 PCL 重复单元中亚甲基($\delta = 2.34$, ϵ 峰) 与链段末端—CH₂OH($\delta = 3.65$, ϵ' 峰) 特征峰面积比值可以算出 PCL 链段长度和平均分子量. 以上述典型方法制得产物 LPCL₂₀ 共 10.527 g, 产率为

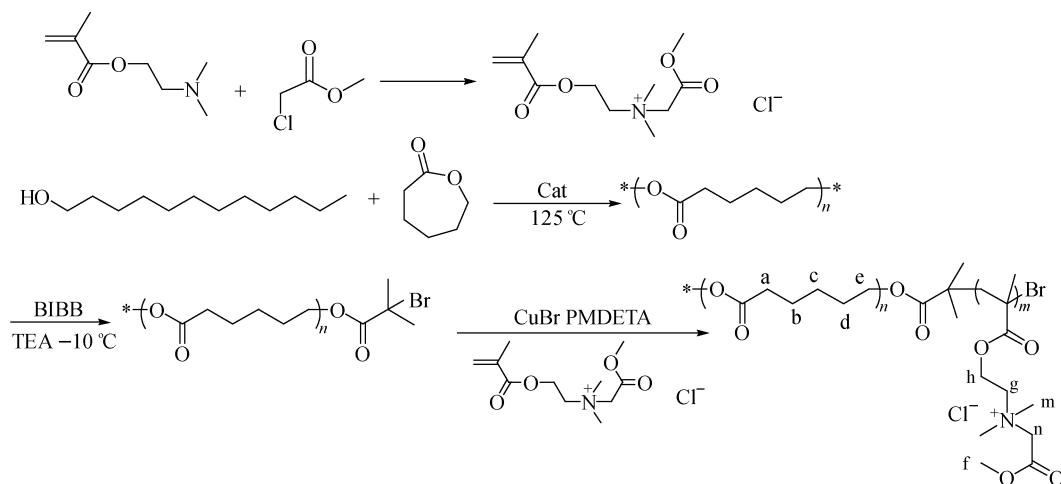
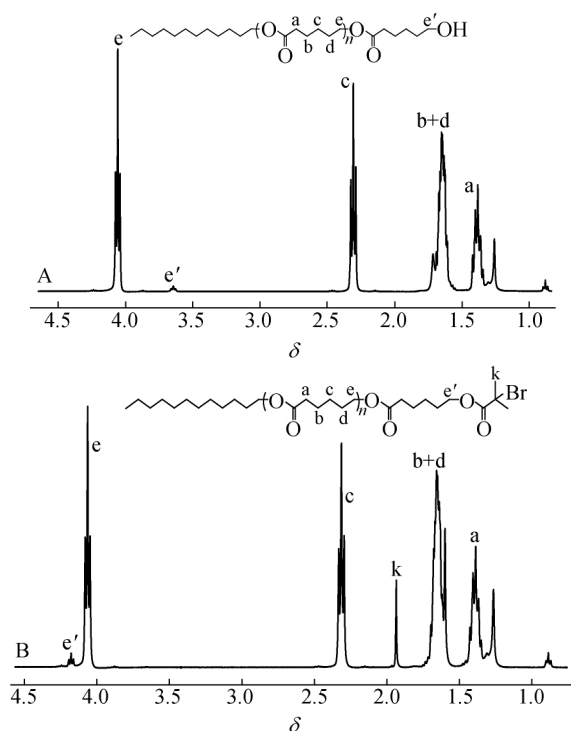


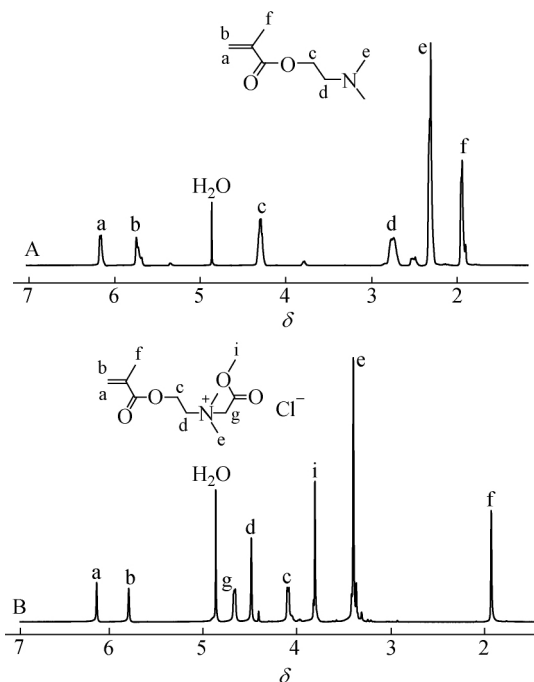
Fig. 1 Synthesis route to LPCL-PJDMA diblock copolymer

Fig. 2 (A) $^1\text{H-NMR}$ spectrum of LPCL_{20} in CDCl_3 and (B) $^1\text{H-NMR}$ spectrum of $\text{LPCL}_{20}\text{-Br}$ in CDCl_3

92.2%. L20, L40 和 L60 分别表示单体与引发剂配比分别为 20, 40 和 60 得到的 PCL, 实际得到的链段长度分别是 22, 43 和 62, 产率均大于 90%。图 2(B) 为 PCL-Br 在氘代氯仿中的核磁图。接溴后, 与末端羟基相连的 CL 的亚甲基峰 $-\text{CH}_2\text{OH}$ ($\delta = 3.65$) 消失, 新出现了与相连的 CL 的亚甲基峰 $-\text{CH}_2-\text{Br}$ ($\delta = 4.25$), 且 $\delta = 1.92$ 处出现末端溴旁边甲基的特征峰, 再通过计算 e' 峰与 $\delta = 0.9$ 处的月桂醇末端甲基峰面积比例为 2:3, 完全符

合比例, 说明接溴反应是完全进行了的。纯化后得到接溴产物 4.872 g, 产率 88.9%。

图 3(A), 3(B) 分别是甲基丙烯酸二甲氨基乙酯(DMA), DMA 与氯乙酸甲酯季铵化后产物(命名为 JDMA) 在重水中的核磁图。从两图中均可看出双键上的特征 a, b 峰分别在 6.2, 5.8 处出现, 且完全满足 1:1 的比例, 说明在 50 °C 下反应 6 h DMA 的双键没有断裂。而图 3(B) 中 N 正离子旁特征峰 e, d 与图 3(A) 中 e, d 峰相比, 均有明显偏移, 且图 3(B) 中 e, d 峰在 $\delta = 2 \sim 3$ 处完全无显示, 证明季铵化反应基本完全。实验过程中 DMA

Fig. 3 (A) $^1\text{H-NMR}$ spectrum of DMA in D_2O and (B) $^1\text{H-NMR}$ spectrum of JDMA in D_2O

过量,以氯乙酸甲酯为计算标准,反应完成提纯后得到白色固体产物 3.718 g,产率 68.5%.

图 4 是 PCL-*b*-PJDMA 在氘代二甲基亚砜中的核磁图. 图 4 中 $\delta = 3.60$ 及 $\delta = 3.80$ 处出现季氮原子旁边亚甲基的特征峰,并且原本 $\delta = 1.92$ 处的溴旁甲基峰移至 $\delta = 1.75$ 处,说明反应进行. 通过计算新出现的氮旁边的亚甲基特征峰 ($\delta = 3.82$),以及 PCL-Br 中不变的亚甲基 ($\delta = 2.34$) 特征峰比例,再利用已知 PCL-Br 的链段数,可以计算得出亲水段 PJDMA 部分的链段数. 通过所得嵌段产物质量与投料 JDMA 质量的比值,可以得到 JDMA 的聚合率为 35.7%.

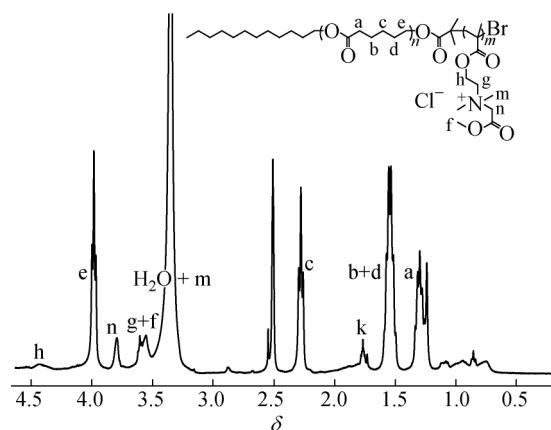


Fig. 4 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of LPCL₂₀-PJDMA₅ in DMSO

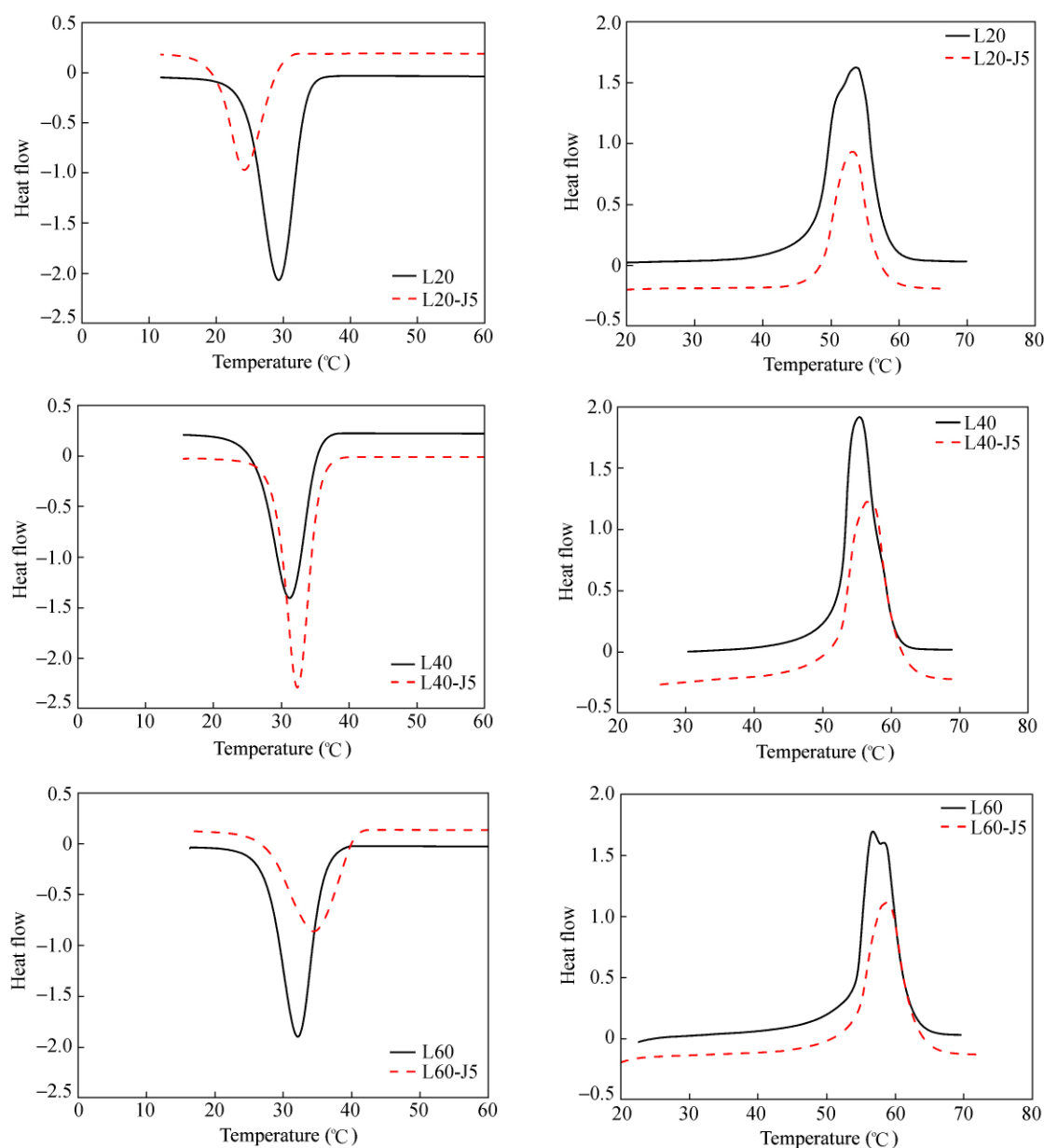


Fig. 5 DSC curves of LPCL and LPCL-PJDMA

2.2 聚合物的热性能研究

聚合物的热性能通过 DSC 得到. 图 5 给出了 PCL 设计重复单元数分别为 20(实际 22) 40(实际 43) 60(实际 62) 的聚合物的升温 and 降温曲线. 随着 PCL 重复单元数增加, 共聚物结晶温度相对于纯 PCL 出现明显的先降低后升高趋势. 众所周知 2 种链段的嵌段共聚物的结晶可能有 2 种情况: (1) A 链段起成核作用, 促进 B 链段的结晶. (2) A 对 B 链段结晶有限制作用, 阻碍 B 规整排列进入晶格从而抑制晶体形成. 对于我们的 PCL-*b*-PJMDA 嵌段共聚体系, 在 PCL 链段数较低的情况下, PJMDA 对 PCL 的结晶主要起限制作用, 抑制了共聚物结晶, 造成结晶温度下降. 而随着 PCL 链段数目的增加, PJMDA 部分主要起成核作用, 限制作用变小, 所以结晶温度增加, 结晶更完善, 熔融温度也随之增加^[20~22].

2.3 聚合物的亲水性研究

图 6 为聚合物涂膜的水接触角, 从图中可知, 3 种聚合度的 PCL 的接触角都在 70°左右, 说明其具有很强的疏水性, 这是由于 PCL 链段本身具有极强的疏水性. 而在聚合物引入 PJMDA 部分后, L20-J5 的接触角为 27°, L40-J5 和 L60-J5 的接触角分别为 55°, 58°. 这是因为 PJMDA 为离子聚合物, 在水中可电离. 当膜表面滴上水后, 内部的离子基团会迁移到表面. 所以它的引入会增加嵌段聚合物的亲水性. 其中 L20-J5 的亲水性最好, 其余嵌段聚合物中由于离子部分所占比例较少, 所以聚合物接触角虽然有所变小, 但是整体依然显现出一定的疏水性, 而一定的疏水性是有利于形成聚合物膜的.

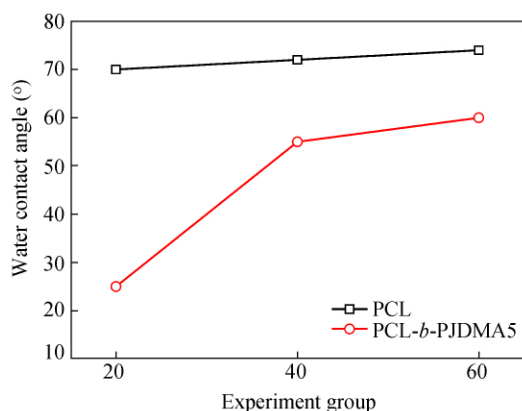


Fig. 6 Water contact angle of LPCL and LPCL-PJMDA

2.4 聚合物的抗菌性能研究

参照国标“纳米无机材料抗菌性能检测方

法”(GB/T 21510-2008), 并结合材料特点, 分别采用了大肠杆菌(革兰氏阴性菌) 和金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌) 进行抗菌实验. 下图中纵坐标表示每个直径 9 cm LB 平板中培养实验菌存活菌落数. 需要指出的是, 活化 16 h 后测得大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的浓度分别为 3×10^9 和 2.4×10^9 CFU/mL, 而所得菌落计数结果是活化后实验菌液稀释 5×10^5 倍后在直径 9 cm LB 平板中培养 12 h 得到的. 图 7 为聚合物膜抗大肠杆菌的情况, 图 8 为聚合物膜抗金黄色葡萄球菌的情况. 从空白对照组和实验组的细菌存活数目统计数据可以看出, 对于大肠杆菌来说, 相比空白对照组, LPCL-PJMDA 都显示了明显的抗菌能力, 且 L20-J5 的抗菌效果最好. 这是因为该聚合物中 JDMA 比例最高, 季铵盐含量最高, 抗菌效果最明显. 图 7 中分别算出 L20-J5, L40-J5, L60-J5 实验组相比对照组, 存活菌落百分比为 14.8%, 70.5%, 63.4%. 对于金黄色葡萄球菌来说, 同样也得到类似的实验结果. 图 8 中分别算出 L20-J5, L40-J5,

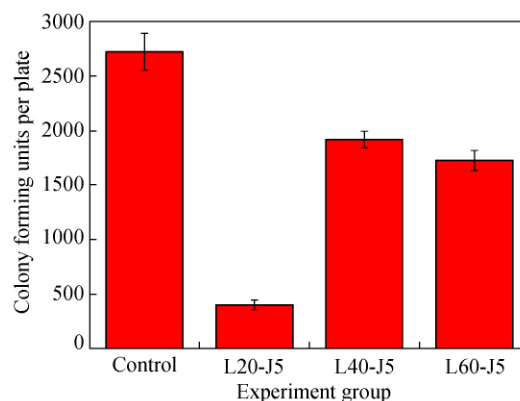


Fig. 7 Survived colony forming units of *E. coli* on different material

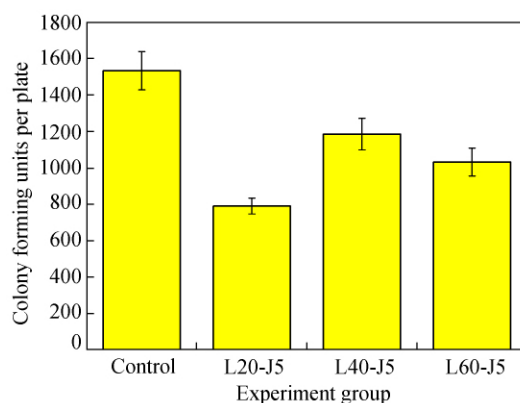


Fig. 8 Survived colony forming units of *S. aureus* on different material

L60-J5 实验组相比对照组,存活菌落百分比为 51.5%、77.3%、67.3%。其抗菌的机理是阳离子对细菌的阴离子细胞膜进行结合,导致其内部细胞质等物质流出,从而导致细菌死亡,达到抗菌效果。但是由于金黄色葡萄球菌容易产生变异,本身的耐药性较强,所以对材料的抵抗性相比大肠杆菌强^[23-25]。研究同时也显示,如果继续增加 JDMA 在聚合物中的比例,尽管得到的聚合物仍具有抗菌性能,但聚合物成膜已经较困难。

3 结论

采用开环聚合和原子自由基转移聚合的方法成功合成了聚己内酯-聚季铵盐嵌段聚合物。随着季铵盐的引入,聚合物的亲水性增加,显示出抗菌性能。其中 LPCL₂₀-PJDMA₅ 聚合物膜的抗菌能力最好。这类新型的抗菌材料为人们的抗菌提供了新选择。

REFERENCES

- 1 Xu Ruikun(徐瑞锷). Liaoning Chmical Industry(辽宁化工) 2013 42(4): 371~373
- 2 Tang Ge(汤戈), Wang Zhenjia(王振家). Materials Science & Engineering(材料科学与工程) 2002 20(2): 298~301
- 3 Chen Yining(陈一宁), Dan Nianhua(但年华), Xiao Shixiong(肖世雄), Chen Jiao(陈娇). West Leather(西部皮革) 2013 35(8): 13~21
- 4 Lin Song(林松), Yang Jingquan(杨荆泉), Tiao Tao(田涛), Hao Limei(郝丽梅), Wu Jinhui(吴金辉), Qi Jiancheng(祁建城). Polymer Bulletin(高分子通报) 2011 4(5): 55~60
- 5 Jiang Shan(江山), Wang Li(王立), Yu Haojie(俞豪杰), Chen Ying(陈英). Petrochemical Technology(石油化工) 2003 32(7): 620~625
- 6 Feng Decai(冯德才), Liu Xiaolin(刘小林), Yang Qi(杨其), Li Guangxian(李光宪). China Synthetic Fiber Industry(合成纤维工业), 2005 28(4): 40~42
- 7 Cheng G, Li G Z, Xue H, Chen S F, James B D, Jiang S Y. Biomaterials 2009 30: 5234~5240
- 8 Sui Y, Gao X L, Wang Z N, Gao C J. J Membr Sci 2012 394: 107~119
- 9 Sun Q, Su Y L, Ma X L, Wang Y Q, Jiang Z Y. J Membr Sci 2006 285: 299~305
- 10 Andrew M S, Christine A. Biomacromolecules 2010 11: 1273~1280
- 11 Sinha V R, Bansal K, Kaushik R, Kumria R, Trehan A. Int J Pharm 2004 278: 1~23
- 12 Wang Beilei(王蓓蕾), Tu Song(涂松), Qiu Yongbing(邱永兵), Chen Yuanwei(陈元维), Luo Xianglin(罗祥林). Acta Polymerica Sinica(高分子学报) 2011 4(10): 1151~1156
- 13 Yue X Y, Qiao Y, Guo S T, Xing J F, Deng L D, Xu J Q, Dong A J. Biomacromolecules 2010 11: 2306~2312
- 14 Zhu C H, Jung S, Luo S B, Meng F H, Zhu X L, Park T G. Biomaterials 2010 31: 2408~2416
- 15 Wu H, Zhang J, Xiao B, Zan X L, Gao J, Wan Y. Carbohydr Polym 2011 83: 824~830
- 16 Ding M M, Li J H, Fu X T, Zhou J, Tan H, Gu Q, Fu Q. Biomacromolecules 2009 10: 2857~2865
- 17 Zhang W L, He J L, Liu Z, Ni P H, Zhu X L. J Polym Sci Part A 2009 47: 1079~1091
- 18 Bilensoy E, Sarisozen C, Esendagli G, Dogan A L, Akatas Y, Sen M, Mungan N A. Int J Pharm 2009 371: 170~176
- 19 Duan K R, Zhang X L, Tang X X, Yu J H, Liu S Y, Wang D X, Li Y P, Huang J. Colloids Surf B 2010 76: 475~482
- 20 Jenkins M J, Harrison K L. Polym Adv Technol 2006 17(6): 474~478
- 21 Skoglund P, Fransson A. J Appl Polym Sci 1996 61(13): 2455~2465
- 22 Albuerne J, Marquez L, Muller A J. Macromolecules 2003 36(5): 1633~1644
- 23 Hancock R, Diamond G, Tren Micr 2000 8(9): 402~410
- 24 Bengt E H, Wenche S, Trine S, John S S. J Med Chem 2004 47: 4159~4162
- 25 Morten B, Bengt E H, Merete L S, Wenche S, Trine S, John S S. J Med Chem 2003 46(9): 1568~1570

Synthesis of Poly(ϵ -caprolactone) -Poly(quaternary ammonium salt) as an Anti-bacteria Material

Shao-dong Hu¹, Chuan Wang², Meng-tan Cai¹, Shu-ying Zhai¹, Xiang-lin Luo^{1,3*}

(¹ College of Polymer Science and Engineer, ² College of Life Science of Sichuan University, Sichuan University, ³ National Key Laboratory of Polymer (Sichuan University), Chengdu 610065)

Abstract The block polymer poly(ϵ -caprolactone) -poly(quaternary ammonium salt) (PCL-*b*-PJDMA) was synthesized through ring opening polymerization (ROP) and atom transfer radical polymerization (ATRP) reaction. The synthesis procedure was composed of following 4 steps: (1) LPCL was synthesized *via* ROP reaction of ϵ -caprolactone using laurinol as an initiator; (2) LPCL was functionalized to get a macroinitiator PCL-Br for ATRP by the reaction with 2-bromine butyryl bromine (BIBB); (3) the quaternary ammonium salt named with JDMA was synthesized by quaternarization of methyl chloroacetate and dimethylaminoethyl methacrylate; (4) LPCL-*b*-PJDMA with different unit ratios were synthesized through ATRP reaction of JDMA using PMDETA/Cu(I) Br as a catalyst and different unit number PCL-Br as the macroinitiator. The molecular structure was mainly confirmed by ¹H-NMR. Thermal behavior and hydrophilicity of polymers were measured by differential scanning calorimetry (DSC) and water contact angle experiments of the polymer membrane, respectively. The anti-bacterial property of the polymer films was measured by testing the survival rate of bacteria living on the films. The results showed that the T_c of obtained PCL-*b*-PJDMA first reduced and then increased with the increase of PCL units in PCL-*b*-PJDMA. All LPCL-*b*-PJDMA displayed better hydrophilicity than pure PCL and the hydrophilicity of LPCL-*b*-PJDMA was related to the ratio of PCL to PJDMA. The bacterial experiment result showed that all the polymer films had anti-bacterial ability to both gram-negative bacteria and gram-positive bacteria.

Keywords Poly(ϵ -caprolactone), Poly(quaternary ammonium salt), Block polymer, Anti-bacterial material

* Corresponding author: Xiang-lin Luo, E-mail: luoxl@scu.edu.cn