

特约专栏

季铵盐化 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物 对表皮葡萄球菌的抗菌活性和生物相容性研究

朱佶鹏¹, 周敏¹, 陈胜^{1,2}, 江伟男^{2,3}, 宋恭华¹, 刘润辉^{2,3,4}

(1. 华东理工大学药学院, 上海 200237)

(2. 华东理工大学超细材料制备与应用教育部重点实验室, 上海 200237)

(3. 华东理工大学材料科学与工程学院, 上海 200237)

(4. 华东理工大学深圳研究院, 深圳 518063)

摘要: 设计、合成了一系列聚合度不同的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物, 并用不同链长的烷基溴对聚合物进行季铵盐化。进一步对合成的季铵盐化的聚合物进行了表皮葡萄球菌的最低抑菌浓度、表皮葡萄球菌的最低杀菌浓度以及血红细胞溶血测试。实验结果表明, 该聚合物对表皮葡萄球菌具有较好的抗菌活性, 同时对血红细胞溶血率较低, 展现出较好的选择性, 在生物材料领域显示出较为广阔的应用前景。同时该季铵盐化的聚合物对多重耐药菌株的抗菌活性略高于对标准菌株的抗菌活性, 显示了该类聚合物不仅能应用于抗普通表皮葡萄球菌, 而且在抗多重耐药菌方面也有一定的应用潜力。

关键词: 2-噁唑啉聚合物; 抗菌; 多重耐药菌; 季铵盐; 表皮葡萄球菌

中图分类号: O631 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2023)07-0575-07

引用格式: 朱佶鹏, 周敏, 陈胜, 等. 季铵盐化 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物对表皮葡萄球菌的抗菌活性和生物相容性研究[J]. 中国材料进展, 2023, 42(7): 575-581.

ZHU J P, ZHOU M, CHEN S, *et al.* Antibacterial Activity of Quaternized Poly(N,N-dimethyl-2-oxazoline) Against *Staphylococcus epidermis* and Its Biocompatibility Study[J]. Materials China, 2023, 42(7): 575-581.

Antibacterial Activity of Quaternized Poly(N,N-dimethyl-2-oxazoline) Against *Staphylococcus epidermis* and Its Biocompatibility Study

ZHU Jipeng¹, ZHOU Min¹, CHEN Sheng^{1,2}, JIANG Weinan^{2,3},
SONG Gonghua¹, LIU Runhui^{2,3,4}

(1. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

(2. Key Laboratory for Ultrafine Materials of Ministry of Education, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

(3. School of Materials Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

(4. East China University of Science and Technology Shenzhen Research Institute, Shenzhen 518063, China)

Abstract: A series of poly(N,N-dimethyl-2-oxazoline) with different degrees of polymerization were designed and synthesized. The polymers were quaternized with alkyl bromide of different chain lengths. The minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration against *Staphylococcus epidermis* and hemolysis test of the quaternized polymers were conducted. The results showed that the polymers have good antibacterial activity against *Staphylococcus epidermis*, and low hemolysis of the quaternized polymers to erythrocytes, showing its good selectivity and promising biomedical application. Moreover, the antibacterial activity of the polymers to multidrug-resistant strain is better than that of standard strain, which shows the potential of this kind of

收稿日期: 2022-12-19 修回日期: 2023-02-18

基金项目: 华东理工大学深圳研究院自由探索类基础研究项目
(2021Szvup042)

第一作者: 朱佶鹏, 男, 1989年生, 博士研究生

通讯作者: 刘润辉, 男, 1983年生, 教授, 博士生导师,

Email: rliu@ecust.edu.cn

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.202212024

polymers in treating multidrug-resistant bacterial infection.

Key words: Poly(2-oxazoline)s; antibacterial; multidrug-resistant bacteria; quaternary ammonium salt, *Staphylococcus epidermidis*

1 前言

细菌引起的微生物感染是困扰人类健康的严重问题^[1]。为了解决这一问题,研究人员发现和开发了许多治疗细菌感染的抗生素。然而,抗生素的大量和过度使用使某些细菌产生了严重的耐药性,增加了感染患者并发症和死亡的风险^[2]。美国疾病控制和预防中心 2021 年的一份报告显示,美国每年有 280 多万感染患者表现出抗生素耐药性,其中 35 000 人因感染耐药菌而死亡。因此,急需发展在医学和公共卫生领域能有效对抗耐药菌的抗感染药物和高效的抗菌手段。研究发现,抗菌肽^[3,4]和阳离子化合物^[5,6]通常不易使细菌产生耐药性^[7]。其中季铵盐是最常用的阳离子抗菌剂之一。一般认为,季铵盐的杀菌作用机制包括:① 化合物吸附和渗透至细菌细胞壁,② 化合物与细菌细胞质膜(主要是细胞膜上脂质或蛋白质)反应,导致膜破裂,③ 细菌细胞内低分子质量物质的泄漏以及蛋白质和核酸降解,④ 自溶酶引起的细菌细胞壁裂解^[7,8]。在众多季铵盐类化合物中,季铵盐化的聚合物具有无挥发性、高化学稳定性、强抗菌性和低残留毒性等优点^[9]。已有的研究表明,基于聚乙烯吡啶^[10]、聚丙烯酸酯^[11]、聚丙烯酰胺^[12]、聚甲基丙烯酸二甲氨基乙酯^[13]、聚苯撑乙炔^[14]、聚噻吩^[15]、聚硅氧烷^[16]、聚乙炔亚胺^[17]、甲基丙烯酸羧基甜菜碱^[18]、聚降冰片烯^[19]、聚乙烯基咪唑^[20]、聚(N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺)^[21]和改性天然多糖^[22]为主体骨架结构的季铵盐化的聚合物,在抗菌方面均表现出不错的潜力。

自 1960 年代以来,聚噁唑啉类化合物的聚合及应用研究受到了广泛关注^[23-28]。有大量文献报道了 2-取代噁唑啉类化合物的开环聚合反应^[29-32]。聚噁唑啉具有优异的生物相容性,聚(2-乙基-2-噁唑啉)是被美国食品与药品监督管理局批准使用的间接食品添加剂^[33]。通过侧链或链末端的取代基 *R*,可以很容易地把手性和功能性基团引入到聚噁唑啉中,其理化性质(亲水性、疏水性、手性、生物功能性等)也可以通过侧链的性质进行调整,从而为合成具有复杂层次结构的仿生自组装材料开辟了新思路。

基于聚噁唑啉类化合物的生物相容性,早在 2005 年, Tiller 课题组^[34,35]制备了接枝不同链长季铵盐末端的聚噁唑啉聚合物,该聚合物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌展现出了较好的抗菌效果。Liu 课题组^[36]以宿主防御肽为模型,发现基于聚 2-噁唑啉的甘氨酸类肽聚

合物可以模拟宿主防御肽,在体外和体内对耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌均具有较好的抗菌活性。由于该聚合物具有与活性氧物种相关的抗菌机制,所以金黄色葡萄球菌不会对合成的聚合物产生耐药性。经该聚合物处理后的金黄色葡萄球菌对常用抗生素仍然敏感,表明在常用抗菌剂和聚 2-噁唑啉的甘氨酸类肽聚合物之间没有明显的抗菌压力或交叉耐药性^[37]。在此基础上,受细胞穿透肽结构的启发,2022 年, Jiang 等^[38]又报道了侧链为胍基的聚 2-噁唑啉聚合物抗真菌剂,该抗真菌剂拥有较低的哺乳动物细胞毒性,且在治疗局部和系统性真菌感染方面具有强疗效。

如图 1 所示,本文设计、合成了一系列侧链为不同季铵盐的 N,N-二甲基-2-取代噁唑啉聚合物,并对该聚合物进行了一系列抗菌研究和生物相容性评价。该季铵盐化的聚合物具有较好的抗菌活性,对血红细胞溶血率较低,对多重耐药菌株的抗菌活性略高于对标准菌株的抗菌活性。其中优选化合物 H-(OctylMe₂NMeOx)₁₈-Pip 对表皮葡萄球菌多重耐药菌株 *S. e* 0692 的最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)为 12.5 μg/mL,且针对人血红细胞的 10% 溶血浓度(HC₁₀):MBC>160:1,显示出良好的选择性。

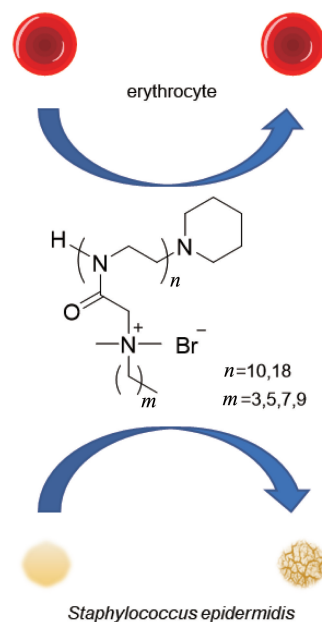


图 1 季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物对表皮葡萄球菌和血红细胞的选择性

Fig. 1 Selectivity of quaternized poly(N,N-dimethyl-2-oxazoline) between *Staphylococcus epidermidis* and erythrocyte

2 实验

2.1 原料与试剂

4-二甲氨基吡啶(DMAP)、超干 N,N-二甲基乙酰胺(DMAc)、N,N-二甲基甘氨酸、2-氯乙基异氰酸酯、四氢呋喃(THF)、叔丁醇钾、三氟甲磺酸铈($\text{Sc}(\text{OTf})_3$)、溴丙烷、溴戊烷、溴庚烷、溴壬烷、哌啶、无水硫酸镁、石油醚、甲醇均为分析纯,购自上海泰坦科技股份有限公司。酵母提取物、胰蛋白胨、Mueller-Hinton(MH)肉汤固体、琼脂、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、曲拉通(Triton)X-100 均购自上海麦克林生化科技股份有限公司。细菌 *S. e* ATCC49134 为表皮葡萄球菌标准菌株,购自 ATCC。细菌 *S. e* 0692 为耐氨苄西林、环丙沙星和四环素的多重耐药表皮葡萄球菌菌株,自瑞金康复医院临床分离。

2.2 仪器与设备

Micromass LCT KC317 型质谱分析仪(ESI),美国 Waters 公司; Bruker Magnet System 400 MHz 型核磁共振

波谱仪(NMR),德国 Bruker 公司; Super(1220/750/900)型超级净化手套箱,米开罗那(中国)有限公司; Spectra-Max M2 型酶标仪,美国 Molecular Devices 公司。

2.3 实验方法

2.3.1 单体 N,N-二甲基-2-噁唑啉的合成

单体 N,N-二甲基-2-噁唑啉(Me_2NMeOx)的合成路线如图2所示。0℃下在1L的三口瓶中依次加入91.5 mg DMAP(0.75 mmol)、3.1 g N,N-二甲基甘氨酸(30 mmol)、500 mL 二氯甲烷,进行磁力搅拌,待反应液搅拌均匀后,于30 min内缓慢滴加250 mL 含有3.9 g 2-氯乙基异氰酸酯(0.375 mmol)的二氯甲烷稀释液,滴加完成后移去冷却装置并将反应体系置于室温下反应。反应12 h后,于1 h内再向三口烧瓶中分3批加入10.1 g 叔丁醇钾(90 mmol),并继续在室温下搅拌12 h。反应结束后,使用二氯甲烷(3×500 mL)萃取,合并有机相用500 mL 饱和食盐水洗涤,二氯甲烷相用无水硫酸镁干燥后浓缩除去,再减压蒸馏得到无色油状液体 Me_2NMeOx 2.5 g,分离产率为65%。

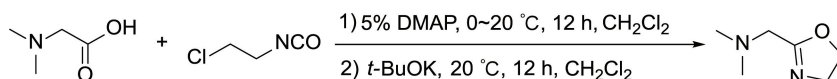


图2 N,N-二甲基-2-噁唑啉的合成

Fig. 2 Synthesis of N,N-dimethyl-2-oxazoline

2.3.2 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物的合成

2.3.2.1 N,N-二甲基-2-噁唑啉的聚合

以三氟甲磺酸铈为引发剂、 Me_2NMeOx 为单体,合成不同链长的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物,合成路线如图3所示。具体制备过程依照之前文献报道的方法进行^[39],在高纯 N_2 保护的手套箱中,称取256.4 mg Me_2NMeOx (2 mmol) 置于干燥、放有磁力搅拌子的反应瓶中,并加入4 mL 超干 DMAc 溶解。然后加入适当比例的 $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ 作为引发剂($n_{\text{引发剂}}:n_{\text{单体}} = 1:10$ 或 $1:20$ 或 $1:40$, 物质的量比)。将反应瓶从手套箱中取出,在 N_2 保护下于130℃下进行反应($n_{\text{引发剂}}:n_{\text{单体}} = 1:10$, 反应6 h; $n_{\text{引发剂}}:n_{\text{单体}} = 1:20$, 反应12 h; $n_{\text{引发剂}}:n_{\text{单体}} = 1:40$, 反应24 h)。反应完成后加入引发剂3倍当量的哌啶在室

温下搅拌12 h 进行淬灭反应,之后加入2 mL THF,进一步将反应液倒入40 mL 石油醚中混匀得到絮状沉淀,体系经过离心(4000 r/min, 3 min)后收集固体并使用氮气流进行干燥。再次向收集的固体中加入2 mL THF,溶解后将该溶液加入40 mL 石油醚中混匀,得到的含絮状沉淀混合物经离心(4000 r/min, 3 min)分离后收集固体。重复上述溶解—沉淀—离心操作6次,真空干燥后得到 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物 $\text{H}-(\text{Me}_2\text{NMeOx})_n\text{-Pip}$ 。

2.3.2.2 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物的季铵盐化

N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物 $\text{H}-(\text{Me}_2\text{NMeOx})_n\text{-Pip}$ 的季铵盐化合成路线如图4所示。称量适当比例的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物 $\text{H}-(\text{Me}_2\text{NMeOx})_n\text{-Pip}$ 和烷基溴($n_{\text{聚合物上的N,N-二甲基}}:n_{\text{烷基溴}} = 1:2$),使用2 mL 甲醇作为溶剂(烷

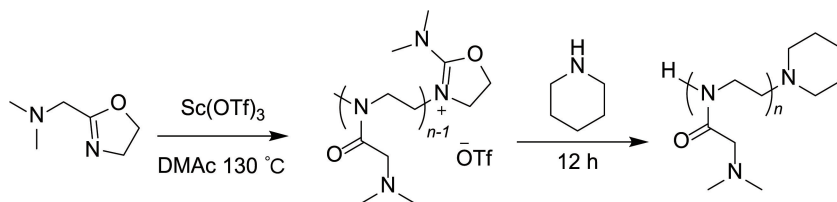


图3 N,N-二甲基-2-噁唑啉的聚合

Fig. 3 Polymerization of N,N-dimethyl-2-oxazoline

基溴的反应浓度为 0.2 mol/L) 回流反应 12 h。反应结束冷却至室温后, 加入 2 mL THF 并将反应液倒入 40 mL 石油醚中混合均匀即可得到絮状沉淀, 体系经过离心 (4000 r/min, 3 min) 后收集固体或液体并使用氮气流进行干燥 (有部分样品中的甲醇和烷基溴可能未能通过一次操作完全带走, 所以呈现液体)。再次加入 2 mL THF 溶解

后将反应液加入 40 mL 石油醚中混匀, 得到的含絮状沉淀混合物经离心 (4000 r/min, 3 min) 分离后收集固体。重复上述溶解—沉淀—离心过程 6 次, 真空干燥后得到侧链季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物产物 (H-(ButylMe₂NMeOx)_n-Pip、H-(HexylMe₂NMeOx)_n-Pip、H-(OctylMe₂NMeOx)_n-Pip、H-(DecylMe₂NMeOx)_n-Pip)。

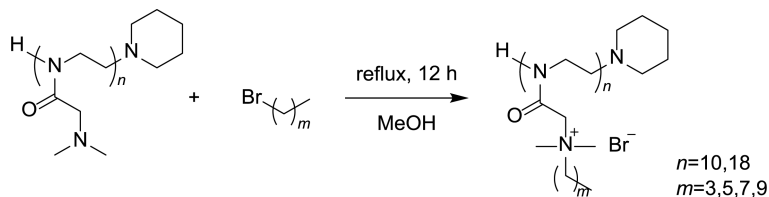


图 4 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物的季铵盐化

Fig. 4 Quaternization of poly(N,N-dimethyl-2-oxazoline)

2.4 样品检测

2.4.1 凝胶渗透色谱测试

聚合物以 2.5 mg/mL 的浓度溶于含 10 mmol/L LiBr 的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液中, 混合均匀后静置大于 12 h, 直至聚合物完全溶解。聚合物溶液用孔径为 0.22 μm 的聚四氟乙烯滤器过滤。凝胶渗透色谱 (gel permeation chromatography, GPC) 设备配有 Waters 1515 等强度高效液相色谱泵, 东曹 TSKgel Alpha-2500 柱 (粒径为 7 μm, 300×7.8 mm)、东曹 TSKgel Alpha-3000 柱 (粒径为 7 μm, 300×7.8 mm)、东曹 TSKgel Alpha-4000 柱 (粒径为 10 μm, 300×7.8 mm) 串联使用作为色谱柱, Waters 2414 示差折光检测器。柱温箱温度为 50 ℃, 检测器温度为 35 ℃。流动相为含 10 mmol/L LiBr 的 DMF, 流速为 1 mL/min。数均分子量 (number-average molecular weight, M_n)、聚合物多分散系数 (polydispersity index, \mathcal{D})、重均分子量 (weight-average molecular weight, M_w) 由软件 Breeze 计算得出, 以聚甲基丙烯酸甲酯 (poly(methyl methacrylate), PMMA) 为标准样品制作校正曲线。

2.4.2 最低抑菌浓度测试

Luria-Bertani (LB) 液体培养基的配制: 依次称量 2.5 g 酵母提取物、5.0 g 胰蛋白胨和 5.0 g NaCl, 加入 500 mL 去离子水中混合均匀, 在高压灭菌锅中 110 ℃ 下灭菌 15 min。MH 液体培养基的配制: 称量 10.5 g MH 肉汤固体, 加入 500 mL 去离子水混合均匀, 在高压灭菌锅中 110 ℃ 下灭菌 15 min。

最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 测试操作规程: 细菌用 LB 液体培养基在 37 ℃ 的摇床中以 200 r/min 转速培养 10 h, 培养所得的细菌通过离心收集并重新分散到 MH 培养基中。将菌液稀释成为 2×10^5 cfu/mL 备用。将待测样品在 96 孔板中用 MH 培养

基按两倍率逐级稀释, 孔板中的待测样品浓度范围为 1.56~200 μg/mL。在同一个 96 孔板中有 4 个孔只加入 MH 培养基作为阴性对照, 4 个孔加入 MH 培养基和菌液作为阳性对照 (不含待测样品)。向每个孔中加入 50 μL 之前稀释好的菌液, 全部加入后轻微摇晃 10 s, 并在 37 ℃ 霉菌培养箱中静置培养 9 h, 然后再用酶标仪读取波长设定为 600 nm 时样品测定得到的光密度值 (OD_{600})。在不同时间重复测试 2 次, 每次测试都设置 2 个平行样。可用式 (1) 计算每个孔细菌生长百分比, 其中不同的 A 值为酶标仪测得的对应 OD_{600} 读数:

$$\text{cell growth\%} = \frac{A_{600}^{\text{polymer}} - A_{600}^{\text{blank}}}{A_{600}^{\text{control}} - A_{600}^{\text{blank}}} \times 100 \quad (1)$$

把计算好的数据绘制成折线图, MIC 为待测样品抑制细菌生长的最低浓度。

2.4.3 最低杀菌浓度测试

LB 琼脂培养基的配制: 依次称量 2.5 g 酵母提取物、7.5 g 琼脂、5.0 g 胰蛋白胨和 5.0 g NaCl, 加入 500 mL 去离子水混合均匀, 在高压灭菌锅中 110 ℃ 灭菌 15 min。LB 固体培养皿的制备: 当 LB 琼脂培养基冷却到 70 ℃ 后, 向直径为 150 mm 的培养皿中倒入 LB 琼脂培养基 (约 28 mL), 轻微晃动使液体铺满整个培养皿。自然冷却后, 盖上培养皿盖子并倒置, 使用紫外灭菌 30 min, 最后密封保存。

细菌的 MBC 测试在完成 MIC 测试后进行。MIC 测试结束后, 从测试过 MIC 的 96 孔板的每个孔中取出 2.5 μL 菌液滴到 LB 琼脂固体培养皿内, 于 37 ℃ 的霉菌培养箱中培养大于 12 h, MBC 为可杀死大于 99.9% 细菌的最低聚合物或抗菌剂浓度。

2.4.4 溶血测试

TBS 缓冲液的配制: 称取 0.605 g 三羟甲基氨基甲

烷, 4.385 g NaCl, 加入 500 mL 去离子水, 在高压灭菌锅中 120 °C 灭菌 15 min, 所配置 TBS 缓冲液的 pH 值为 7.2。Triton X-100 溶液的配制: 称量 51.2 mg Triton X-100 置于 20 mL 离心管内, 加入 16 mL TBS 缓冲液, 震荡混合均匀后, 于 4 °C 冰箱保存备用。

将新鲜的人体血液按 1:19 的体积比分散于 pH 值为 7.2 的 TBS 缓冲液中并离心清洗 3 次 (4000 r/min, 3 min), 最后用 TBS 缓冲液稀释人血红细胞得到体积分数为 5% 的人血红细胞悬浮液。采用 TBS 缓冲液将待测聚合物配置成 4 mg/mL 的溶液, 之后在 96 孔板中用 TBS 缓冲液将聚合物溶液按 2 倍率逐级稀释, 得到的聚合物浓度为 15.6~2000 µg/mL。在同一平板上, 将含有 50 µL 体积分数为 0.1% 的 Triton X-100 溶液和 50 µL 人血红细胞体积分数为 5% 的人血红细胞悬浮液的混合液作为阳性对照, 将 100 µL 人血红细胞体积分数为 2.5% 的人血红细胞悬浮液作为阴性对照。向每个孔中加入 50 µL 稀释好的血细胞悬浮液, 全部加入后轻微摇晃 10 s 后, 置于 37 °C 霉菌培养箱中孵育 1 h。将 96 孔板以 3600 r/min 转速离心 5 min 后, 从每个孔中取 80 µL 上清液平行转移至新的 96 孔板中, 转移后若出现气泡需用牙签沾取异辛醇戳破, 然后用酶标仪读取每个孔的 OD_{405} 值。采用式 (2) 计算每个孔中聚合物的溶血百分比:

$$\text{hemolysis\%} = \frac{A_{405}^{\text{polymer}} - A_{405}^{\text{negative}}}{A_{405}^{\text{positive}} - A_{405}^{\text{negative}}} \times 100 \quad (2)$$

把计算好的数据绘制成折线图, HC_{50} 即为导致 50% 的人血红细胞不裂解的最高浓度, HC_{10} 则为导致 10% 的人血红细胞不裂解的最高浓度。每次测试设置 2 组平行样, 且在不同的时间重复测试 3 次。

3 结果与讨论

3.1 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物的表征

以 $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ 为引发剂、 Me_2NMeOx 为单体, 合成了一系列侧链为 N,N-二甲基的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物 $\text{H}-(\text{Me}_2\text{NMeOx})_n\text{-Pip}$, 聚合物的 GPC 图谱如图 5 所示, 表征数据如表 1 所示。3 种噁唑啉聚合物的聚合分散性指数在 1.05~1.13 之间。当引发剂和单体的物质的量比在 1:10 和 1:20 时, 噁唑啉聚合物的 M_n 按照理论值成倍增加, 增长趋势明显, 符合规律。当引发剂和单体的物质的量比为 1:40 时, 噁唑啉聚合物的 M_n 和 M_w 增加不明显, 通过后期分析发现大量单体没有参与聚合, 仍以单体的形式留在反应体系内, 且延长反应时间或提高反应温度后情况依旧, 说明应用于此反应体系单体的聚合度极限为 18 左右。季铵盐化的 N,N-二甲基-2-聚合物通过 NMR 进行表征, 发现 NMR 表征的聚合物聚合度与 GPC 表征的聚合度基本一致。

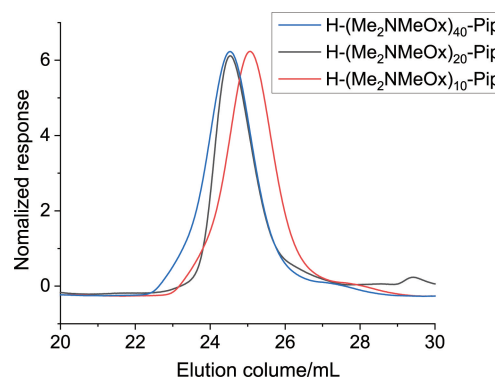


图 5 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物的凝胶渗透色谱

Fig. 5 Gel permeation chromatography spectra of poly(N,N-dimethyl-2-oxazoline)

表 1 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物的凝胶渗透色谱表征数据

Table 1 Gel permeation chromatography (GPC) characterization of poly(N,N-dimethyl-2-oxazoline)

Polymer	Ratio of initiator and monomer	GPC characterization of polymer			
	$n_{\text{Sc}(\text{OTf})_3} : n_{\text{Me}_2\text{NMeOx}}$	M_n/kDa	M_w/kDa	DP	\bar{D}
H-(Me ₂ NMeOx) ₁₀ -Pip	1 : 10	1. 4	1. 5	10	1. 13
H-(Me ₂ NMeOx) ₂₀ -Pip	1 : 20	2. 2	2. 4	18	1. 05
H-(Me ₂ NMeOx) ₄₀ -Pip	1 : 40	2. 3	2. 5	18	1. 10

Notes: M_n is the number-average molecular weight; M_w is the weight-average molecular weight; DP is the degree of polymerization; \bar{D} is the polydispersity index.

3.2 季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物的抗菌活性

3.2.1 季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物对表皮葡萄球菌的最低抑菌浓度

季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物对表皮葡

萄球菌的 MIC 如表 2 所示, 其中表皮葡萄球菌 *S. e* ATCC49134 为标准菌株, 表皮葡萄球菌 *S. e* 0692 为多重耐药菌。由表 2 可知, 季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物烷基链的增长有利于增强化合物的抗菌活性, 聚

合度较大的季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物抗菌活性也较好。季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物对于标准菌株和多重耐药菌都表现出了一定的抗菌活性。其中优选化合物 H-(OctylMe₂NMeOx)₁₈-Pip 对多重耐药的表皮葡萄球菌 *S. e* 0692 的 *MIC* 效果最好, 为 12.5 μg/mL, 优于对标准菌株 *S. e* ATCC49134 的抗菌活性(*MIC*: 50 μg/mL), 显示了该化合物在多重耐药菌抗菌方面的潜力。

表 2 季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物对表皮葡萄球菌的最低抑菌浓度

Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) of quaternized poly(N,N-dimethyl-2-oxazoline) against *Staphylococcus epidermidis*

Compound	MIC/(μg/mL)	
	<i>S. e</i> ATCC49134	<i>S. e</i> 0692
H-(ButylMe ₂ NMeOx) ₁₀ -Pip	>200	>200
H-(HexylMe ₂ NMeOx) ₁₀ -Pip	50	25
H-(OctylMe ₂ NMeOx) ₁₀ -Pip	100	50
H-(DecylMe ₂ NMeOx) ₁₀ -Pip	50	25
H-(ButylMe ₂ NMeOx) ₁₈ -Pip	>200	>200
H-(HexylMe ₂ NMeOx) ₁₈ -Pip	100	50
H-(OctylMe ₂ NMeOx) ₁₈ -Pip	50	12.5
H-(DecylMe ₂ NMeOx) ₁₈ -Pip	50	25
Ampicillin	3.13	50
Norfloxacin	12.5	1.25
Vancomycin	12.5	50

3.2.2 季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物优选化合物对表皮葡萄球菌的最低杀菌浓度

依据之前 *MIC* 测试结果, 优选了 3 种活性最好的化合物 H-(DecylMe₂NMeOx)₁₀-Pip、H-(OctylMe₂NMeOx)₁₈-Pip 和 H-(DecylMe₂NMeOx)₁₈-Pip 对表皮葡萄球菌的 2 个不同菌株进行了 *MBC* 测试, 结果如图 6 所示。图中季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物的浓度从下至上逐渐提高, 依次为 1.56、3.13、6.25、12.5、25 和 50 μg/mL。从左至右依次为 H-(DecylMe₂NMeOx)₁₀-Pip 对 *S. e* ATCC49134、H-(DecylMe₂NMeOx)₁₀-Pip 对 *S. e* 0692、H-(OctylMe₂NMeOx)₁₈-Pip 对 *S. e* ATCC49134、H-(OctylMe₂NMeOx)₁₈-Pip 对 *S. e* 0692、H-(DecylMe₂NMeOx)₁₈-Pip 对 *S. e* ATCC49134 以及 H-(DecylMe₂NMeOx)₁₈-Pip 对 *S. e* 0692 的 *MBC* 测试结果。测试结果表明, 季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物对各所测菌株的 *MBC* 和 *MIC* 基本一致, 说明该类化合物的主要抗菌机理是杀死细菌而不仅仅是抑制细菌生长。

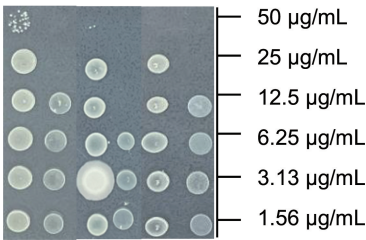


图 6 季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物优选化合物对表皮葡萄球菌 *S. e* ATCC49134 和 *S. e* 0692 的最低杀菌浓度测试结果

Fig. 6 Minimum bactericidal concentration (MBC) test result of selected quaternized poly(N,N-dimethyl-2-oxazoline) against *S. e* ATCC49134 and *S. e* 0692

3.3 季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物的溶血毒性

溶血毒性是评价生物材料生物相容性的重要指标, 溶血毒性强的生物材料应用范围将受到大大限制, 高溶血毒性将限制抗菌剂直接用于全身给药。季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物的溶血毒性测试结果如表 3 所示。总体来说, 测试所用的季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物对人血红细胞的毒性较低。对于所有被测试季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物而言, *HC*₁₀ 均高于 2000 μg/mL。其中化合物 H-(OctylMe₂NMeOx)₁₈-Pip 对多重耐药的表皮葡萄球菌 *S. e* 0692 的 *HC*₁₀ 值是其 *MIC* 和 *MBC* 值的 160 倍, 显示出优异的选择性。

表 3 季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁唑啉聚合物的半数溶血浓度和 10% 溶血浓度测试

Table 3 *HC*₅₀ and *HC*₁₀ values of quaternized poly(N,N-dimethyl-2-oxazoline)

Compounds	<i>HC</i> ₁₀ /(μg/mL)	<i>HC</i> ₅₀ /(μg/mL)
H-(ButylMe ₂ NMeOx) ₁₀ -Pip	>2000	>2000
H-(HexylMe ₂ NMeOx) ₁₀ -Pip	>2000	>2000
H-(OctylMe ₂ NMeOx) ₁₀ -Pip	>2000	>2000
H-(DecylMe ₂ NMeOx) ₁₀ -Pip	>2000	>2000
H-(ButylMe ₂ NMeOx) ₁₈ -Pip	>2000	>2000
H-(HexylMe ₂ NMeOx) ₁₈ -Pip	>2000	>2000
H-(OctylMe ₂ NMeOx) ₁₈ -Pip	>2000	>2000
H-(DecylMe ₂ NMeOx) ₁₈ -Pip	>2000	>2000

4 结 论

本文设计、合成了一系列侧链不同的季铵盐化 N,N-二甲基-2-取代噁唑啉聚合物, 并针对表皮葡萄球菌进行了抗菌测试以及生物相容性评价。实验结果表明, 此类聚合物对于表皮葡萄球菌具有较好的抗菌活性, 而对人体血红细胞的溶血率较低。其中季铵盐化的 N,N-二甲基-2-噁

唑啉聚合物 H-(OctylMe₂NMeOx)₁₈-Pip 对于多重耐药的表皮葡萄球菌 *S. e* 0692 的最低抑菌浓度和最低杀菌浓度均为 12.5 μg/mL, 且其导致 10% 的人血红细胞不裂解的最高浓度大于 2000 μg/mL, 表现出良好的选择性。

参考文献 References

- [1] GIANO M C, IBRAHIM Z, MEDINA S H, *et al.* Nature Communications[J], 2014, 5(1): 4095.
- [2] ARIAS C A, MURRAY B E. New England Journal of Medicine[J], 2015, 372(12): 1168-1170.
- [3] LIENKAMP K, TEW G N. Chemistry-A European Journal [J], 2009, 15(44): 11784-11800.
- [4] GAO G, LANGE D, HILPERT K, *et al.* Biomaterials[J], 2011, 32(16): 3899-3909.
- [5] NEDERBERG F, ZHANG Y, TAN J P K, *et al.* Nature Chemistry [J], 2011, 3(5): 409-414.
- [6] GABRIEL G J, SOM A, MADKOUR A E, *et al.* Materials Science and Engineering: R: Reports[J], 2007, 57(1-6): 28-64.
- [7] CARMONA-RIBEIRO A M, CARRASCO L D D M. Nature Communications[J], 2013, 14(5): 9906-9946.
- [8] MUÑOZ-BONILLA A, FERNÁNDEZ-GARCÍA M. Progress in Polymer Science[J], 2012, 37(2): 281-339.
- [9] XUE Y, XIAO H, ZHANG Y. International Journal of Molecular Sciences[J], 2015, 16(2): 3626-3655.
- [10] SAMBHY V, PETERSON B R, SEN A. Angewandte Chemie International Edition[J], 2008, 120(7): 1270-1274.
- [11] GOTTENBOS B, GRIJPM A D W, van der MEI H C, *et al.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy[J], 2001, 48(1): 7-13.
- [12] XU S, ZENG R, JIANG C, *et al.* Journal of Applied Polymer Science[J], 2013, 131(7): 1082-1090.
- [13] VENKATARAMAN S, ZHANG Y, LIU L, *et al.* Biomaterials[J], 2009, 31(7): 1751-1756.
- [14] CORBITT T S, DING L, JI E, *et al.* Photochemical & Photobiological Sciences[J], 2009, 8(7): 998-1005.
- [15] XING C, XU H, TANG H, *et al.* Journal of the American Chemical Society[J], 2009, 131(36): 13117-13124.
- [16] MIZERSKA U, FORTUNIAK W, CHOJNOWSKI J, *et al.* European Polymer Journal[J], 2009, 45(3): 779-787.
- [17] GAO B, ZHANG X, ZHU Y. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition[J], 2007, 18(5): 531-544.
- [18] CHENG G, LI G, XUE H, *et al.* Biomaterials[J], 2009, 30(28): 5234-5240.
- [19] GABRIEL G J, MADKOUR A E, DABKOWSKI J M, *et al.* Biomacromolecules[J], 2008, 9(11): 2980-2983.
- [20] GARG G, CHAUHAN G S, CUPTA R, *et al.* Journal of Colloid and Interface Science[J], 2010, 344(1): 90-96.
- [21] BERTAL K, SHEPHERD J, DOUGLAS C W, *et al.* Journal of Materials Science[J], 2009, 44(23): 6233-6246.
- [22] LI P, POON Y F, LI W, *et al.* Nature Materials [J], 2011, 10(2): 149-156.
- [23] KAGIYA T, NARISAWA S, MAEDA T, *et al.* Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters[J], 1966, 4(7): 441-445.
- [24] SEELIGER W, AUFDERHAAR E, DIEPERS W, *et al.* Angewandte Chemie International Edition in English[J], 1966, 5(10): 875-888.
- [25] TOMALIA D A, SHEETZ D P. Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry[J], 1966, 4(9): 2253-2265.
- [26] BASSIRI T G, LEVY A, LITT M. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters[J], 1967, 5(9): 871-879.
- [27] LEVY A, LITT M. Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry[J], 1968, 6(7): 1883-1894.
- [28] LITT M, LEVY A, HERZ J. Journal of Macromolecular Science-Chemistry[J], 1975, 9(5): 703-727.
- [29] FRUMP J A. Chemical Reviews[J], 1971, 71(5): 483-505.
- [30] SAEGUSA T, KOBAYASHI S, YAMADA A. Macromolecules [J], 1975, 8(4): 390-396.
- [31] KOBAYASHI S. Progress in Polymer Science [J], 1990, 15(5): 751-823.
- [32] AOI K, OKADA M. Progress in Polymer Science [J], 1996, 21(1): 151-208.
- [33] ONDREJ S, BRYN B M, FILIPPOV K S, *et al.* Macromolecular Rapid Communications[J], 2012, 33(19): 1648-1622.
- [34] WASHINSKI C J, TILLER J C. Biomacromolecules [J], 2005, 6(1): 235-243.
- [35] WASHINSKI C J, HERDES V, SCHUELER F, *et al.* Macromolecular Bioscience[J], 2005, 5(2): 149-156.
- [36] ZHOU M, QIAN Y, XIE J, *et al.* Angewandte Chemie International Edition[J], 2020, 59(16): 6412-6419.
- [37] DAI C, ZHOU M, JIANG W, *et al.* Journal of Materials Science & Technology[J], 2020, 59: 220-226.
- [38] JIANG W, ZHOU M, CONG Z, *et al.* Angewandte Chemie International Edition[J], 2022, 61(17): e202200778.
- [39] HU F, XIE S, JIANG L, *et al.* RSC Advances [J], 2014, 4(104): 59917-59926.

(编辑 费蒙飞)