

N-卤胺聚合物表面修饰金纳米粒子的抗菌性能

萨仁格日乐¹, 梁靖¹, 关少钰¹, 常宇佳¹, 张佳博¹,
梁楠², 亢静¹, 董阿力德尔图¹

(1. 内蒙古大学化学化工学院, 教育部乳品质量安全控制技术工程研究中心, 呼和浩特 010021;
2. 吉林大学中日联谊医院甲状腺外科, 长春 130000)

摘要 由致病菌引发的各类疾病对人类生命健康造成持续威胁. 致病菌的耐药性逐渐增强, 导致抗生素效力逐步减弱. 然而, 目前多数纳米材料主要以单一组分抗菌为主, 其单一性和片面性阻碍了对微生物污染的全面预防和高效控制. 为了预防和遏制细菌耐药性的滋生与蔓延, 本文提出了一种有效复合多种抗菌材料构建多元抗菌体系的方法, 以实现多组分协同杀菌效果. 将高效杀菌的N-卤胺聚合物与具备光热效应(PTT)的金纳米粒子(Au NP)相结合, 开发出一种新型的Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG纳米抗菌材料. 该材料可充分发挥光热与化学抗菌机制的协同作用, 更有效地抑制细菌, 降低了抗生素耐药性的发生. 该方法为联合抗菌治疗提供了新的策略.

关键词 抗菌材料; N-卤胺; 金纳米粒子; 光热效应; 活性氯

中图分类号 O614 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20240151

Antibacterial Properties of N-halamine Modified Gold Nanoparticles

SAREN Gerile¹, LIANG Jing¹, GUAN Shaoyu¹, CHANG Yujia¹, ZHANG Jiabo¹,
LIANG Nan^{2*}, KANG Jing^{1*}, DONG Alideertu¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Inner Mongolia University, Engineering Research Center of Dairy Quality and Safety Control Technology, Ministry of Education, Hohhot 010021, China;
2. Thyroid Surgery Department of Jilin University Sino Japanese Friendship Hospital, Changchun 130000, China)

Abstract The various types of diseases caused by pathogenic bacteria pose a constant threat to human life and health. The drug resistance of pathogenic bacteria is gradually increasing, which leads to a gradual decrease in the effectiveness of antibiotics. However, most of the current nanomaterials are mainly single-component antibacterials, whose singularity and one-sidedness hinder the comprehensive prevention and efficient control of microbial contamination. In order to prevent and curb the growth and spread of bacterial resistance, this work proposed the strategy of effectively compounding multiple antibacterial materials and constructing a multifaceted antibacterial system to achieve a multi-component synergistic bactericidal effect. In the study, a novel Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG nano-antibacterial material was successfully developed by combining N-halamine polymer, which is an efficient bactericidal polymer, with gold nanoparticles (Au NP) possessing photothermal effect (PTT). The antibacterial

收稿日期: 2024-03-29. 网络首发日期: 2024-06-12.

联系人简介: 亢静, 男, 博士, 讲师, 主要从事抗菌纳米材料的制备及应用方面的研究. E-mail: 111994013@imu.edu.cn

梁楠, 女, 博士, 副教授, 主要从事细胞及肿瘤的临床转化方面的研究. E-mail: liangnan2006@jlu.edu.cn

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(批准号: 2023QN02011)和内蒙古自治区高等学校科学技术研究项目(批准号: NJZZ23091)资助.

Supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region, China(No.2023QN02011) and the Research Program of Science and Technology at Universities of Inner Mongolia Autonomous Region, China(No.NJZZ23091).

material aims to fully utilize the synergistic effect of photothermal and chemical antibacterial mechanisms to effectively inhibit bacteria and reduce the occurrence of antibiotic resistance. This research provides a new strategy for combined antibacterial therapy, which is of great theoretical significance and reference value for promoting the development and application of novel antibacterial drugs.

Keywords Antibacterial material; N-Halamine; Gold nanoparticles; Photothermal effect; Active chlorine

近年来,由致病菌引发的各类疾病正不断威胁着人类的生命健康。由于传统抗生素的滥用,导致多种能引发人类疾病的细菌逐渐产生耐药性。耐药性的发展趋势极为严重,甚至产生了几乎对所有现有抗生素均表现出耐药性的超级细菌^[1]。细菌耐药性已成为21世纪的全球热点问题,对人类生命健康构成的威胁不亚于艾滋病、癌症和心血管等疾病。滥用抗生素是许多耐药菌株产生的根本原因。细菌可通过耐药基或耐药质粒传递这种反击抗生素的本领,甚至跨菌种传递,使得细菌的耐药性变得极为复杂^[2]。随着全球范围内细菌耐药性的蔓延,传统抗生素的治疗效果不断减弱。统计数据显示,目前的抗生素存在作用机制单一的问题,容易导致细菌产生耐药性突变,从而引发更加难以治疗的感染和更高的死亡率^[3]。此外,抗菌材料的单一性和片面性也限制了其在对微生物污染的全面预防与高效控制。随着生活水平的提高和健康意识的增强,对杀菌材料的要求也逐渐提升。因此,通过有效复合多种抗菌材料,构建多元抗菌体系,实现多组分协同杀菌,对于高效抗菌和避免耐药性的滋生具有重要的实际意义和应用价值^[4]。

金纳米材料因其较高的抗病原体功效和生物相容性被广泛应用于抗菌和抗病毒药物。更为重要的是,金纳米材料降低了细菌耐药性的产生^[5]。其抗菌性能与表面性能以及核心结构密切相关,而表面配体对纳米材料的理化性质和生物医学活性产生重要影响^[6]。然而,由于金纳米粒子良好的光热效应,在光照过程中温度通常可以超过60℃^[7,8],会对活体细胞和组织的正常生命活动产生影响^[9,10]。因此,减少金纳米粒子的浓度,同时在金纳米粒子表面修饰抗菌聚合物,可以实现高效温和抗菌。新型抗菌聚合物中的卤素抗菌剂可有效预防感染性病原体引起的致命疾病,引起了科研人员广泛的研究兴趣^[11]。卤素抗菌剂主要作为消毒剂,其成本效益和迅速杀灭大多数微生物的能力得到了充分认可^[12]。在目前的卤素抗菌剂中,N-卤胺作为一种广泛使用的卤素类抗菌剂,已成为最受欢迎的生物杀灭剂之一^[13]。N-卤胺通过有效储存活性卤原子于N-X共价键中,这些键中卤素原子处于强氧化状态(+1价),能够广谱杀灭病原菌,同时避免产生耐药性。基于其独特的抗菌特性,N-卤胺在水处理、医疗保健产品和食品加工等领域得到了广泛应用^[14],本文将N-卤胺聚合物修饰在金纳米粒子表面,充分利用N-卤胺的化学抗菌和金纳米粒子的光热作用(PTT),可实现N-卤胺与PTT协同温和高效抗菌。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、氯金酸(HAuCl₄)、硼氢化钠(NaBH₄)、抗坏血酸(AA)、五水合硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃·5H₂O)和碘酸钾(KIO₃),均为分析纯、4,4'-偶氮双(4-氰基戊酸)(ACVA),纯度≥98.0%、聚(乙二醇)甲醚(4-氰基-4-戊酸十二烷基三硫代碳酸)(CTA, M_n=5000),上海西格玛奥德里奇贸易有限公司;正丙胺,分析纯,上海阿拉丁试剂有限公司;氘代水(D₂O),纯度99.8%,青岛蓝海天悦生物科技有限公司;柠檬酸钠,纯度99.0%,上海麦克林生化科技股份有限公司;次氯酸钠(NaClO)和氯化钠,分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司;酵母提取粉、胰蛋白酶、牛肉浸膏和琼脂、生化试剂级,广东环凯微生物有限公司;戊二醛,分析纯,北京雷根生物技术有限公司;无水乙醇,分析纯,天津北联精细化学品开发有限公司;2-丙烯酰胺氨基-2-甲基-1-丙烷磺酸(AMPS),纯度98.0%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;溴化钾(KI),色谱纯,天津市北联精细化学品开发有限公司;去离子水,电阻率18.3 MΩ·cm。

PerkinElmer Lambda 1050+型紫外-可见分光光度计(UV-Vis),美国珀金埃尔默公司;Bruker Avance 500型核磁共振波谱仪(NMR),瑞士布鲁克公司;Agilent 1260 Infinity型凝胶渗透色谱仪

(GPC), 美国安捷伦公司; D1524R型高速冷冻离心机, 北京大龙兴创实验仪器公司; UPT纯水仪, 四川优普超纯科技有限公司; ME104E型电子分析天平, 上海梅特勒托利多有限公司; KQ5200DE型超声波清洗机, 昆山市超声仪器有限公司; VFD-1000型冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; sX-500型高压蒸汽灭菌仪, 多美数字生物有限公司; BIOSafe12生物安全柜, 力康发展有限公司; DZF-6090型电热恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; Jem-2100F型高分辨透射电子显微镜(TEM), 日本电子株式会社; NICOLET 6700型红外光谱仪(FTIR), 美国赛默飞世尔科技有限公司; DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器, 河南省予华仪器有限公司; MDL-SN-808型激光发射器, 长春新产业光电有限公司; E8-XT型红外热成像仪, 美国菲力尔公司; s-4800型场发射扫描电子显微镜(SEM), 日立高新公司; Zetasizer型纳米粒度电位仪, 英国Malvern Panalytical公司; Eclipse Ci-e型显微镜, 日本尼康公司; MX-S型涡旋混匀仪, 大龙兴创实验仪器(北京)股份公司.

1.2 金纳米粒子的合成

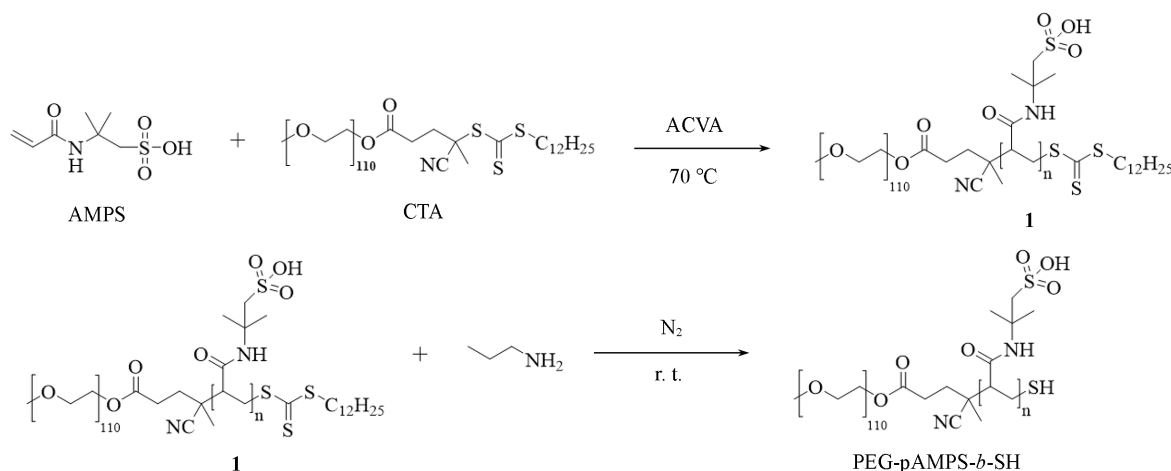
CTAB配体金纳米粒子(Au NP)参照文献[15]方法制备.

种子液制备: 将柠檬酸钠溶液(0.50 mL, 1.48 mg/mL)和HAuCl₄溶液(0.167 mL, 15 mmol/L)加入到9.33 mL去离子水中混合均匀, 维持混合溶液温度在25.5 °C下快速向溶液中加入新制的NaBH₄溶液(0.30 mL, 0.10 mol/L), 并剧烈搅拌10 min. 10 min后将棕黄色种子液移入到25.5 °C恒温水浴箱中培育, 2~5 h内可用.

生长液制备: 将3.645 g CTAB溶解到88.3 mL去离子水中, 向溶液中加入AA溶液(1.67 mL, 0.10 mol/L)和HAuCl₄溶液(5.0 mL, 15 mmol/L)并剧烈搅拌. 待溶液颜色变为无色后向溶液中加入10 mL培育后的种子液并剧烈搅拌. 10 min后, 向溶液中再次加入AA溶液(0.33 mL, 0.10 mol/L)和HAuCl₄溶液(1.0 mL, 15 mmol/L)并搅拌30 min. 最后得到紫红色Au NP溶液, 其尺寸约为15 nm.

1.3 巯基端基聚合物的合成

巯基端基聚合物(PEG-*b*-pAMPS-SH)的合成路线如Scheme 1所示. 具体步骤如下^[16]: 将0.0014 g ACVA、0.8280 g AMPS和0.54 g 聚(乙二醇)甲醚(4-氰基-4-戊酸十二烷基三硫代碳酸)加入到史朗克反应瓶中, 放入干净的磁力搅拌子, 用橡胶塞密封瓶口后, 经过3次Freeze-Pump-Thaw处理后, 将反应溶液放置于70 °C油浴中, 并在1000 r/min转速下搅拌, 反应10 h. 将粗产物在超纯水中透析3 d以去除未聚合单体AMPS, 冷冻干燥后得到0.64 g淡黄色固体产物**1**. 将0.5 g产物**1**放置于史朗克反应瓶中, 加入5 mL超纯水使其充分溶解, 将溶液放置于氮气氛围中, 加入正丙胺原液(0.5 mL), 在1000 r/min转速搅拌下反应15 min. 反应结束后再次冷冻干燥, 去除未反应的小分子正丙胺, 得到淡黄色粉末. 将0.3 g淡黄色粉末加入到5 mL超纯水中使其溶解, 此时有白色絮状不溶物析出, 在15000 r/min转速下离心15 min, 取上层清液并再次冷冻干燥, 即得到最终产物PEG-*b*-pAMPS-SH.



Scheme 1 Synthetic route of polymer PEG-*b*-pAMPS-SH

1.4 巯基端基聚合物接枝金纳米粒子的制备

巯基端基聚合物接枝金纳米粒子(Au NP@pAMPS-*b*-PEG)的制备过程如下^[17]: 将1.0 mL新合成的CTAB配体Au NPs转移到1.5 mL离心管中, 在27 °C下, 以15000 r/min的转速离心15 min. 随后将离心后的上层清液移除, 底部留下大约50 μL样品溶液, 将离心管置于超声波清洗仪内持续5 s, 使Au NPs均匀分散. 在超声条件下, 将Au NPs溶液快速打入到含有PEG-*b*-pAMPS-SH的水溶液(1.0 mL, 1.0 mmol/L)中, 将溶液置于室温下培育2 d, 即得到稳定的Au NP@pAMPS-*b*-PEG溶液.

1.5 巯基端基N-卤胺聚合物接枝金纳米粒子的制备

通过将上述N-卤胺前驱体PEG-*b*-pAMPS-SH进一步氯化反应合成N-卤胺(pAMPS-Cl).

将1.0 mL稳定的Au NP@pAMPS-*b*-PEG溶液转移到1.5 mL的离心管中, 在27 °C下, 以15000 r/min的转速离心15 min. 随后将离心后的上层清液移除, 底部留下大约50 μL样品溶液, 将离心管置于超声波清洗仪内持续5 s使得Au NPs均匀分散. 在超声条件下, 将Au NPs溶液快速打入到NaClO(0.010%, 0.025%, 0.050%, 0.100%, 0.250%和0.500%)溶液中, 将溶液置于25 °C下震荡反应2 h. 将氯化反应后的Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG溶液在27 °C下, 以15000 r/min的转速离心15 min. 随后将离心后的上层清液移除, 即得到巯基端基N-卤胺聚合物接枝金纳米粒子(Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG).

1.6 有效氯的测定

采用碘量滴定法测定N-卤胺聚合物中有效氯的含量. 首先, 将2.50 g淀粉定容于50.00 mL沸水中制得5.0%淀粉溶液, 再将Na₂S₂O₃·5H₂O(0.71 g)定容至200 mL配制其标准溶液. 质量分数为1.0%的KI溶液是由1.00 g固体KI定容至100 mL配制, KIO₃溶液是由0.50 g KIO₃固体溶于500 mL超纯水中制得. 测定前先对Na₂S₂O₃溶液进行标定, 用移液管分别移取7.0 mL KI溶液、2.0 mL H₂SO₄溶液(2 mol/L)、10 mL KIO₃溶液放于碘量瓶中, 黑暗下静置后滴加几滴淀粉溶液. 然后用滴定管小心滴入Na₂S₂O₃溶液, 直至溶液恰好变为无色.

可根据下式计算出Na₂S₂O₃的准确浓度($c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$, mol/L):

$$c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} = \frac{6c_{\text{KIO}_3}V_{\text{KIO}_3}}{V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}} \quad (1)$$

式中: c_{KIO_3} (mol/L)为碘酸钾标准溶液的物质的量浓度; V_{KIO_3} (L)为硫代硫酸钠溶液消耗碘酸钾标准溶液的体积; $V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ (L)为待测硫代硫酸钠溶液的体积.

标定后, 向N-卤胺溶液中加入2 mL H₂SO₄溶液和7 mL KI溶液, 混合均匀后滴入4~5滴淀粉溶液. 用Na₂S₂O₃标准溶液滴定至无色即为滴定终点. 样品中活性氯的百分率即氯化浓度(Chloride concentration, %)按下式计算:

$$\text{Chloride concentration} = \frac{0.03545cV}{2W} \times 100\% \quad (2)$$

式中: c (mol/L)为Na₂S₂O₃标液的浓度; V (L)为Na₂S₂O₃标液消耗的体积; W (g)为测定样品的质量.

1.7 细菌培养基的配制与灌制

根据标准菌株Luria-Bertani(LB)液体培养基配制方法, 分别配制大肠杆菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的LB标准液体培养基: (1) 对于*E. coli*培养基, 将4.50 g酵母提取粉、9.00 g胰蛋白胍和9.00 g氯化钠加入至约含900 mL蒸馏水的生化培养瓶中, 测定pH并调节至pH为7.00±0.02, 定容至900 mL, 于120 °C高压蒸汽下灭菌30 min; (2) 对于*S. aureus*培养基, 将2.70 g牛肉浸膏、9.00 g胰蛋白胍和4.50 g氯化钠加入至约含900 mL蒸馏水的生化培养瓶中, 测定pH, 并调节pH至7.00±0.02, 定容至900 mL, 于120 °C高压蒸汽下灭菌30 min.

根据标准菌株LB固体培养基配制方法, 分别配置*E. coli*和*S. aureus*的LB标准固体培养基: (1) 对于*E. coli*培养基, 将4.50 g酵母提取粉、9.00 g胰蛋白胍和9.00 g氯化钠加入至约含900 mL蒸馏水的生化培养瓶中, 测定pH, 并调节pH至7.00±0.02, 定容至900 mL, 另外加入13.5 g琼脂, 静置后放入120 °C高压蒸汽灭菌30 min. (2) 对于*S. aureus*培养基, 将2.70 g牛肉浸膏、9.00 g胰蛋白胍和4.50 g氯化钠加入至约含900 mL蒸馏水的生化培养瓶中, 测定pH, 并调节pH至7.00±0.02, 定容至

900 mL, 另外加入 13.5 g 琼脂, 静置后放入 120 °C 高压蒸汽灭菌 30 min.

固体培养基灌制前将直径为 9.0 cm 的一次性培养皿及相关备品提前放入生物安全柜, 紫外灭菌 30 min, 通风 15 min, 再将上述配制的固体培养基趁热取出, 沿培养皿内侧倒入至约 2/3 处, 培养皿盖过火后盖严静置. 全部灌制结束后, 开盖 1/3 紫外灭菌 30 min, 通风 15 min, 倒置放入 4 °C 冰箱中保存备用.

1.8 细菌的活化与扩大培养

1.8.1 菌种活化 活化前将所需备品放入生物安全柜, 紫外灭菌 30 min、通风 15 min, 将休眠的菌种从 -80 °C 冰箱中取出, 用已灭菌牙签或接种环在固体培养基表面轻轻划线, 放入 37 °C 恒温培养箱中倒置培养 12 h (*E. coli*) 或 24 h (*S. aureus*).

1.8.2 菌种复苏 用镊子夹住牙签从培养后的划线板表面挑取单独的菌落, 连同牙签共同放入装有 5 mL 液体培养基的离心管中, 置于摇床在 220 r/min 下振荡 12~16 h, 结束后放入 4 °C 冰箱中备用.

1.8.3 扩大培养 从装有 5 mL 细菌悬浊液的离心管中吸取 0.4 mL 并注入额外 40 mL 液体培养基中, 再次放入摇床于 220 r/min 下振荡 3~4 h, 结束后放入 4 °C 冰箱中备用.

1.8.4 稀释培养 取扩大培养后的菌液 0.1 mL 放至含 0.9 mL 氯化钠溶液的 1.5 mL EP 管中, 反复吸吹 15~20 次, 按此方法依次稀释至不同梯度. 取最后 1 mL 菌液均匀铺在固体培养板上, 平行 3 组, 倒置放入 37 °C 恒温培养箱中培养 12 h (*E. coli*) 或 24 h (*S. aureus*), 记录对应空白组菌落数.

1.9 光热性能测试

通过红外热成像系统(885-2 型, 德国 Testo 公司)表征样品 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 的光热特性. 将 1.0 mL 稳定的 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 溶液转移到 1.5 mL 的离心管中, 置于 660 nm 激发光(1.0 W/cm²)下照射, 通过红外热成像仪间隔 1 min 记录温度变化, 持续照射 10 min. 主要探究由 660 nm 激光照射不同功率密度(0.5, 0.8 和 1.0 W/cm²)引起的温度变化, 确定符合实验要求的光功率密度. 最后, 通过研究 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 的光热循环实验验证其光热稳定性.

1.10 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 的抗菌性能测试

通过平板计数法对 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 的抗菌活性进行测定. 在灭菌实验前, 实验中所用玻璃器皿、培养基和去离子水均在 121 °C 下灭菌 20 min, 并在无菌环境下进行微生物相关操作. 将培养后的菌液取 1 mL 活性细菌进行离心处理, 将离心成团细菌细胞用生理盐水洗涤 3 次, 逐级稀释至 10⁶ CFU/mL. 分别配制浓度(质量分数)从 0.500%~0.010% 的不同氯化浓度梯度的 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 分散液, 并与上述 100 μL 的菌悬液混合, 室温下接触 15 min 后依次稀释至 10² CFU/mL. 将稀释后的 1 mL 混合物均匀涂布在 LB 琼脂平板上, 于 37 °C 恒温培养箱中培养 12 h 或 24 h. 另外取 900 μL 氯化钠溶液与 100 μL 的菌悬液混合作为空白对照组, 所有实验均平行重复 3 次, 计算每个 LB 琼脂平板上存活的菌落数量, 按下式计算抗菌率(Antibacterial rate, %):

$$\text{Antibacterial rate} = \left(1 - \frac{B}{A}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中: *B* 为与 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 接触后剩余菌落数; *A* 为空白对照组菌落数.

为了探究不同光照条件对 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 杀菌性能的影响, 分别将上述实验步骤置于自然光和 660 nm 激发光(1.0 W/cm²)两种不同条件下进行, 分别测定 Au NP, Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 的抗菌活性.

1.11 细菌的形貌测定

利用 SEM 对在 660 nm 激发光照射下 *E. coli* 和 *S. aureus* 与 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 接触前后的形貌变化进行测定. 首先, 选取氯化浓度为 0.100% 的 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 组重复之前的杀菌操作过程. 另外制备了 1.0 mL 菌液作为空白对照组, 其中细菌悬液的浓度为 10⁶ CFU/mL. 接触 15 min 后, 实验组和对照组均以 4000 r/min 离心 7 min, 然后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次, 离心后的细菌用 2.5% (质量体积浓度) 戊二醛在 4 °C 下固定过夜. 第二天将成团的细菌分别用 PBS 洗涤、重悬, 并依次采用不同浓度无水乙醇(20%, 50%, 80% 和 100%)进行梯度脱洗, 离心弃去上层清液. 最后用叔丁醇

洗涤两次,再滴在干净的硅片上进行SEM测定.

2 结果与讨论

2.1 PEG-*b*-pAMPS-Cl-SH的制备及氯化表征

N-卤胺聚合物通过自由基聚合和氯化处理制得. 首先,以4,4'-偶氮(4-氰基戊酸)为引发剂,聚(乙二醇)甲基醚为链转移试剂,由AMPS单体通过可逆加成-断裂链转移反应(RAFT)合成PEG-*b*-pAMPS-SH^[18]. 接下来,通过N—H和N—Cl官能团间发生特殊转化反应使pAMPS的N—H基团在NaClO溶液中自发反应生成N—Cl键,形成PEG-*b*-pAMPS-Cl-SH^[19]. 图1(A)为AMPS单体与聚合后的PEG-*b*-pAMPS-Cl-SH的FTIR谱图. 可见,1620 cm⁻¹(C=C双键)处特征伸缩振动峰的消失证明了AMPS已成功聚合. 随后,使用GPC测定了聚合后的高分子N-卤胺的聚合度与分子量,结果如图1(B)所示. 聚合的PEG-*b*-pAMPS-Cl-SH的数均分子量(M_n)为8.0×10⁴,重均分子量(M_w)与 M_n 的比值为1.2,证明聚合程度较好,单分散性良好.

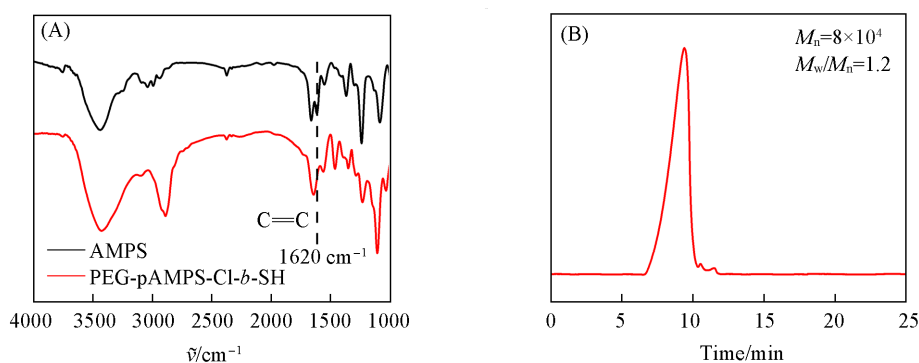


Fig. 1 FTIR spectra of the AMPS and PEG-*b*-pAMPS-Cl-SH(A), GPC analysis of the synthesis of PEG-*b*-pAMPS-Cl-SH(B)

此外,图2(A)示出了AMPS和PEG-*b*-pAMPS-Cl-SH的分子结构. 图2(B)所示的氢核磁共振波谱图(¹H NMR)再次证明了N-卤胺化合物的结构. 与单体AMPS的化学位移对比, δ 为5~6的不饱和双键在聚合后消失,这与FTIR结果一致,证明了AMPS成功聚合为pAMPS. 随后,通过氯化N—H键转化为N—Cl键制得高分子N-卤胺pAMPS-Cl. 用碘量滴定法评估了pAMPS-Cl中有效的活性氯含量,即Cl⁺的含量^[20]. 图2(C)记录了滴定过程中颜色变化的数码照片,最左侧比色皿为PEG-*b*-pAMPS-Cl-SH溶解后的照片,为无色透明的澄清溶液. 在向溶液中加入KI后,PEG-*b*-pAMPS-Cl-SH中活跃的N—Cl键会氧

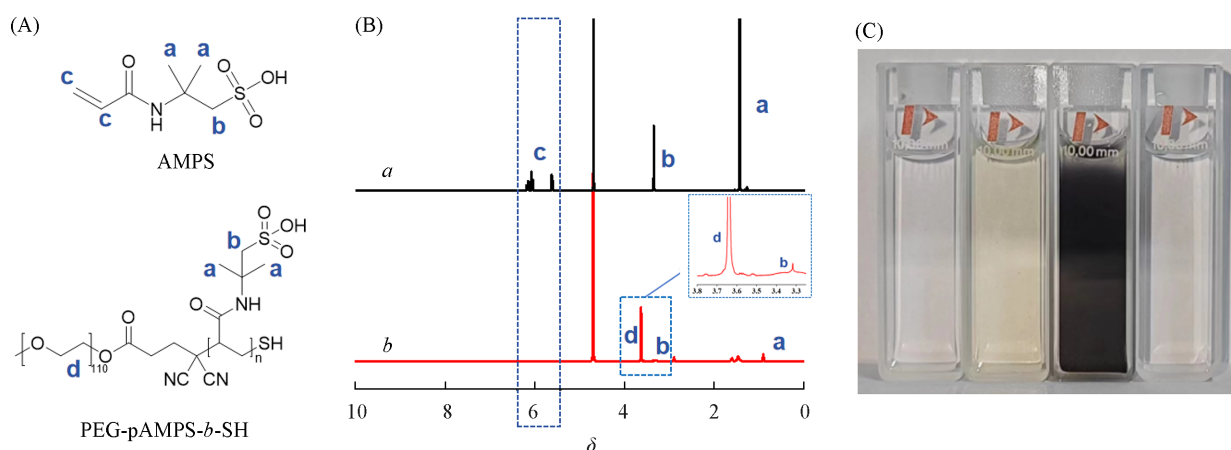


Fig. 2 Molecular structures of AMPS and PEG-*b*-pAMPS-Cl-SH(A), ¹H NMR analysis of the syntheses of AMPS(a) and PEG-*b*-pAMPS-Cl-SH(b)(B) and photograph showing the color changes in PEG-*b*-pAMPS-Cl-SH during the iodometric titration(C)

化添加的碘化钾形成碘单质,因而溶液呈现黄色. 接下来当继续加入淀粉后,颜色就会变成蓝色,随后通过逐渐加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液进行滴定后,颜色恢复为最初的无色透明状态,该颜色变化过程表明了 PEG-*b*-pAMPS-Cl-SH 中活性氯的存在,证明 pAMPS 被成功氯化为 N-卤胺. 通过各反应物的浓度、pAMPS-Cl 的添加量及 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的滴定体积等计算 Cl^+ 的百分含量, pAMPS-Cl 中活性氯含量约为 0.52%,具有较强的氧化能力.

2.2 Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG 的结构及粒径表征

首先通过种子法合成 Au NP, 然后通过 Au-S 共价键作用将 PEG-*b*-pAMPS-SH 连接在 Au NP 上, 形成 Au NP@pAMPS-*b*-PEG. 最后通过氯化作用构建 N-卤胺改性的 Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG 纳米材料. Au NP 和 Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG 的紫外-可见光谱和 TEM 照片分别如图 3(A) 和 (B) 所示. 在成功构建 Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG 后, 通过 TEM 对其形貌进行了观察测定. 单纯 Au NP 为球形小颗粒形状. 但当构建 N-卤胺改性的 Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG 纳米材料后, 发现 Au NP 颗粒可规整排布, 且存在均匀间隙[图 3(C)], 证明了 Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG 纳米材料的成功合成. 通过采集多个同一氯化浓度 (0.100%) 制得的 Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG 的 TEM 照片, 对 Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG 的实际尺寸进行了测量, 其平均尺寸为 (20.04 ± 0.21) nm [图 3(D)].

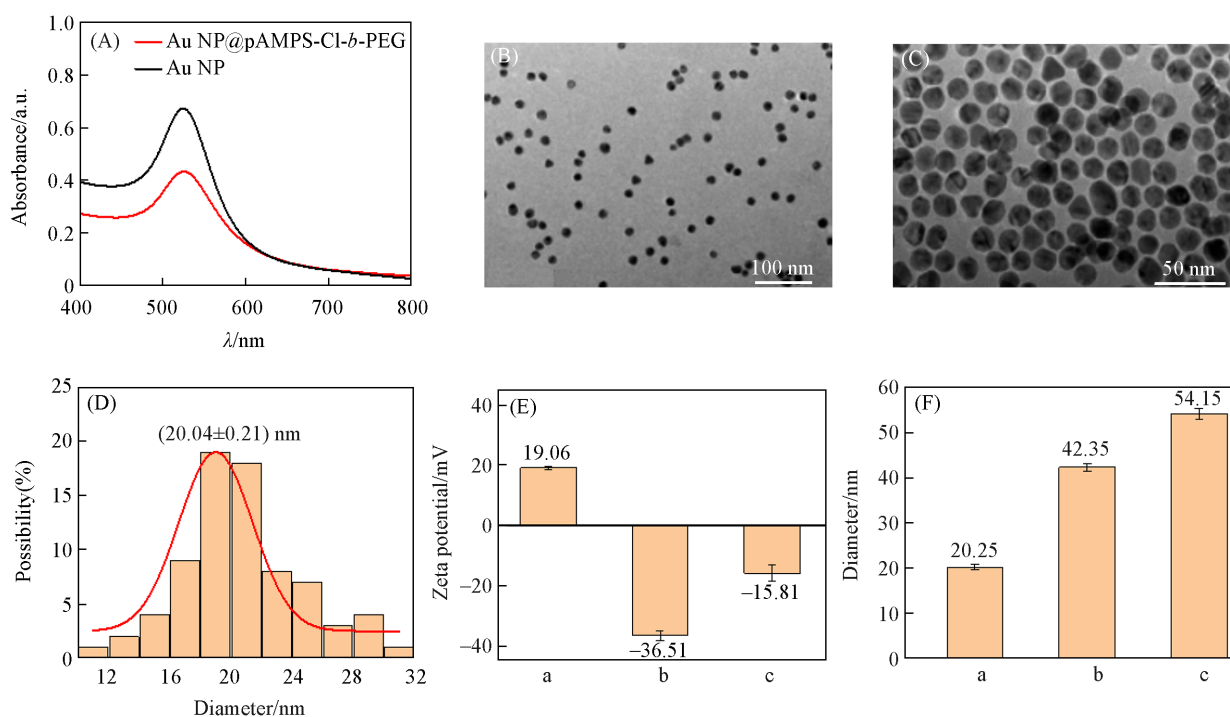


Fig. 3 UV-vis spectra of Au NP and Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG(A), TEM images of Au NP(B) and Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG(C), size distribution of Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG(D), Zeta potential(E) and DLS potential(F) analysis of Au NP(a), Au NP@pAMPS-*b*-PEG(b) and Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG(c)

图 3(E) 的 Zeta 电位表征了合成过程中表面电荷的变化情况, 首先在合成 Au NP 纳米粒子后, 由于 CTAB 的存在使得材料表面呈现正电性, Zeta 电位为 19.06 mV, 在包覆 PEG-*b*-pAMPS-SH 后, pAMPS 的结构仍使得该纳米粒子呈现 -36.51 mV 的负电性. 氯化反应后, 由于活性氯 (Cl^+) 的存在, Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG 的表面电位上升为 -15.81 mV. 与此同时, 实验通过动态光散射技术进一步验证其水合粒径和尺寸分布. 图 3(F) 显示聚合物未修饰的 Au NP 纳米颗粒的水合粒径约为 20.25 nm. 在修饰 PEG-*b*-pAMPS-SH 后, 聚合物的结构使得该纳米粒子水合粒径显著增大至 42.35 nm. 而动态光散射 (DLS) 测定的氯化反应后的 Au NP@pAMPS-Cl-*b*-PEG 水合粒径约为 54.15 nm, 这是由于氯化后, 氯离子可能与水分子相互作用导致尺寸偏大^[21].

2.3 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 的光热性能

通过光热曲线和热成像进一步研究了 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 的光热性能. 在 660 nm 的不同光密度 (0.3, 0.5, 0.8 和 1.0 W/cm²) 照射下, 红外热成像仪监测并记录温度的变化. 结果如图 4(A) 所示. 可见, Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 的温度随着光功率的增加及激光照射时间的延长逐渐升高. 当照射到 10 min 时, 最高温度可达 48 °C. 因此, 后续研究中使用 1.0 W/cm² 的激光照射. 为了验证 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 的光热稳定性, 用 1.0 W/cm² 的激光照射的 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 进行光热循环. 图 4(B) 所示为经过 5 个周期的近红外光(NIR)开/关照射测试, Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 保持了类似的温度峰值变化模式, 最高温度没有明显下降, 表明它具有良好的热稳定性. 图 4(C) 为 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 的一个光热循环温度升降变化结果, 其与图 4(B) 保持一致.

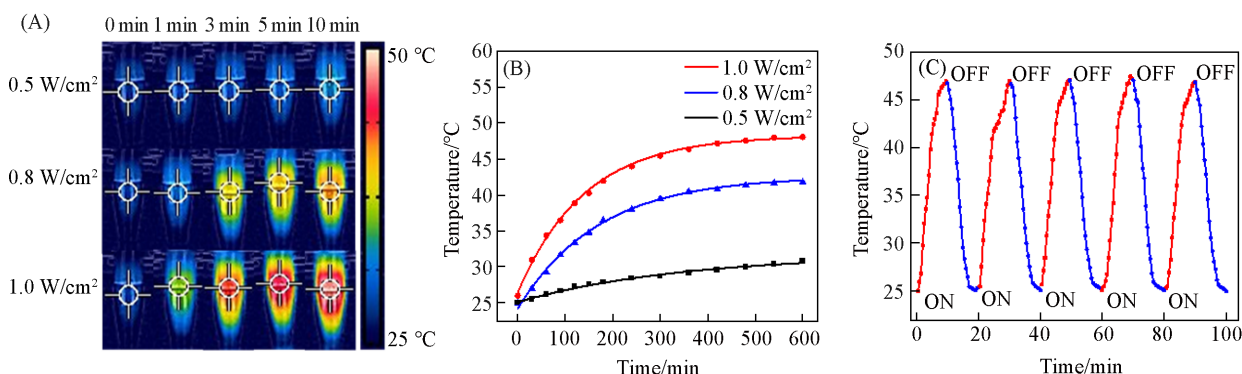


Fig. 4 Thermal image of Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG under different laser power irradiation(A), corresponding temperature curve(B), thermal curves of Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG under 660 nm laser irradiate for 0—10 min(C)

2.4 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 的杀菌性能

通过对样品制备的相关表征, 证明了 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 的成功合成及优异特性, 以 *E. coli* 和 *S. aureus* 作为模板菌评估了其抗菌性能. 首先, 检测了不同氯化浓度 (0.010%, 0.025%, 0.050%, 0.100%, 0.250% 和 0.500%) 的 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的抗菌作用. 如图 5 所示, 随着氯化时间的延长, 溶液的颜色产生明显变化. 当氯化浓度达到 0.250% 时, Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 溶液颜色由红色变为紫色. 当氯化浓度为 0.500% 时, Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 溶液的颜色由红色变为深蓝色, 表明有大量 Au NP 团聚沉积.



Fig. 5 Digital photos of solutions with different chloride concentrations(chlorination for 2 h)

通过将不同氯化浓度的样品 (0.010%~0.500%) 与 10⁵ CFU/mL 的细菌进行共培养 10 min 后, 采用平板计数法对细菌的存活率进行了测定. 图 6(A) 和 (B) 分别提供了杀菌后 *E. coli* 和 *S. aureus* 相应存活率 (C/C_0) 的定量结果, 结果表明, Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 对 *E. coli* 具有更好的抗菌作用. 当氯化浓度为 0.100% 时可达到 99.99% 的杀菌效果, 即消除 5 个数量级的 *E. coli*; 当氯化浓度大于 0.100% 时, Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 的杀菌效果随氯化浓度的增加而降低, 这是由于 NaClO 浓度增加导致 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 失去交替稳定性. 如图 6(C)~(E) 所示, 随着氯化浓度升高, 部分

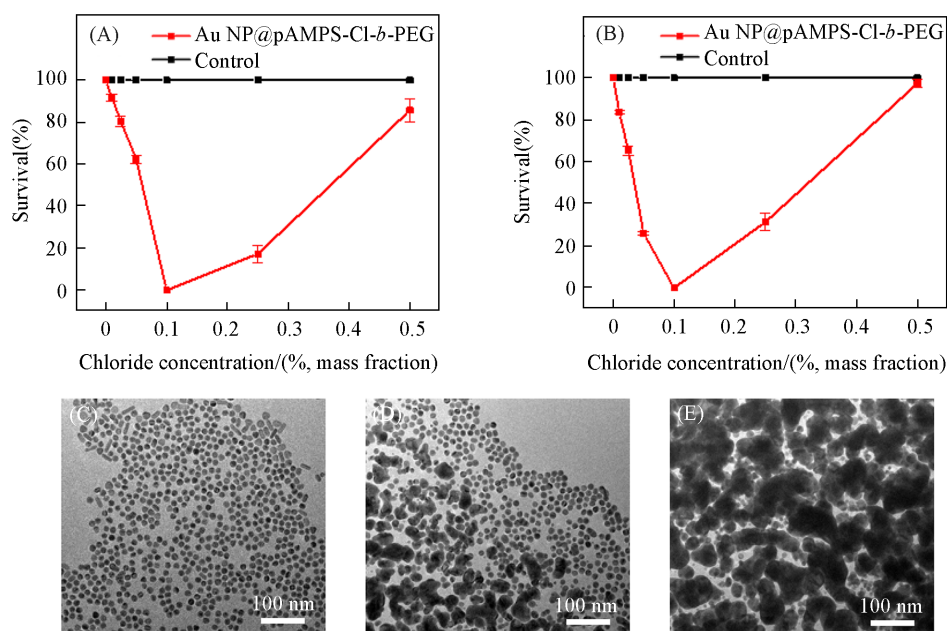


Fig. 6 Survival rates of *E. coli*(A) and *S. aureus*(B) treated with different chloride concentrations of Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG, TEM images of Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG with chlorination concentrations of 0.100%(C), 0.250%(D) and 0.500%(E)

Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 发生团聚, Au NP 和细菌接触的总表面积下降, 细菌存活率增高. 上述实验结果证明了 N-卤胺的引入赋予了 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 一定的抗菌活性. 在此基础上, 实验选择氯化浓度为 0.100% 的 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 进行后续的探究.

由于 Au NP 具有良好的光热性能, 因此, 进一步探究了在自然光及 660 nm 激光照射下不同样品 (Au NP 和 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG) 的杀菌性能. 图 7 是不同条件处理后存活的 *E. coli* 和 *S. aureus* 在 LB 琼脂平板上培养的数码照片, 对照组 (PBS 处理) 的细菌数量为 10^6 CFU/mL. 结果表明, 单纯的激光照射对细菌生长无明显影响, PTT 对 Au NP 和 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 的杀菌效果都具有促进作用, 提高了杀菌效率. 值得注意的是, Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 中 N-卤胺的引入和光热效应产生了协同作用, 显著增强了抗菌活性, 使得细菌的存活率显著降低.

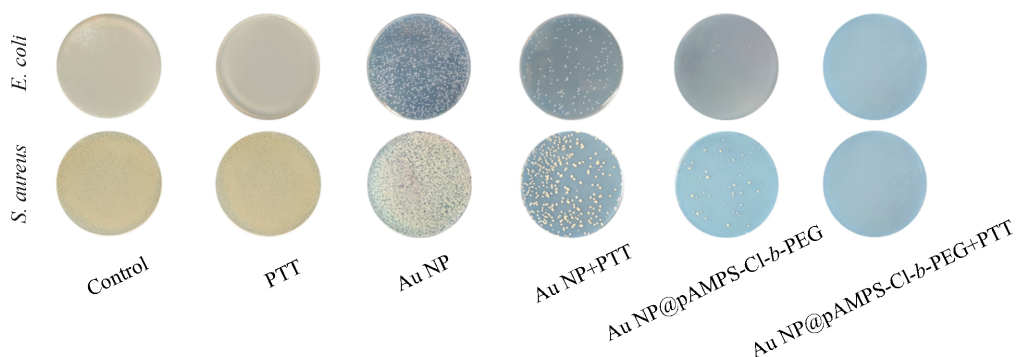


Fig. 7 Digital photographs of *E. coli* and *S. aureus* under different conditions

如图 8(A) 和 (B) 所示, 在没有 660 nm 激光照射的情况下, 单纯的 Au NP 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 几乎不具有杀菌作用. 在 660 nm 激光照射下, 单纯的 Au NP 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 可以降低 3 个数量级. 在没有 660 nm 激光照射的情况下, Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 对 *E. coli* 和 *S. aureus* 可以降低 4 个数量级. 在 660 nm 激光照射下, Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 对 *E. coli* 可以降低接近于 6 个数量级, 对 *S. aureus* 可以降低 5.7 个数量级. 很显然, Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 对 *E. coli* 具有更好的杀菌效果. 基于 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 优异的杀菌能力. 进一步使用 Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG 对抗耐甲氧西林的金

黄色葡萄球菌(*MRSA*)和耐氨苄西林的大肠杆菌*pUC19*(*E. coli pUC19*)(10^6 CFU/mL). 如图8(C)所示, 在黑暗中暴露于1.0 mg/mL的VPNS/AuNR后, 结果表明, 在没有任何激光照射的情况下, Au NP对模型细菌几乎没有杀菌作用. PTT组和Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG组的细菌存活率分别约为80%和40%, 而Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG+PTT组几乎没有细菌存活, 表明其协同作用可以大大提高抗菌效率.

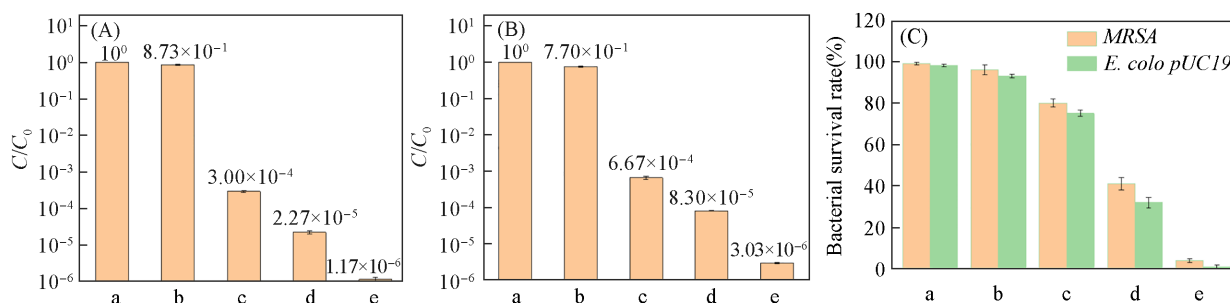


Fig. 8 Survivals of *E. coli*(A) and *S. aureus*(B) treated with Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG under different conditions, the bacterial survival rate in different conditions against *E. coli pUC19* and *MRSA*(C)

a. Control; b. AuNP; c. AuNP+PTT; d. AuNP@pAMPS-Cl-b-PEG; e. AuNP@pAMPS-Cl-b-PEG+PTT.

随后, 利用SEM观察两种细菌(*E. coli*和*S. aureus*)在660 nm激光照射下用Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG处理10 min后的形态变化. 如图9所示, 未经处理的大肠杆菌是典型的杆状结构, 金黄色葡萄球菌呈典型的球形结构. 所有细菌的细胞壁表面光滑完整. 而经Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG处理的*E. coli*和*S. aureus*则表现为胞膜褶皱且裂解、内容物丢失, 细胞完整性完全丧失. 根据上述实验结果, Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG通过破坏细胞膜促进细菌死亡^[22], 其抗菌机理主要来自两部分: (1) pAMPS-Cl的N—Cl共价键中强氧化性氯(Cl^+)通过与细菌静电相互作用后, 利用强氧化性对细菌进行杀灭; (2) Au NP良好的光热作用, 在光照条件下产生热, 进而实现了有效杀菌.

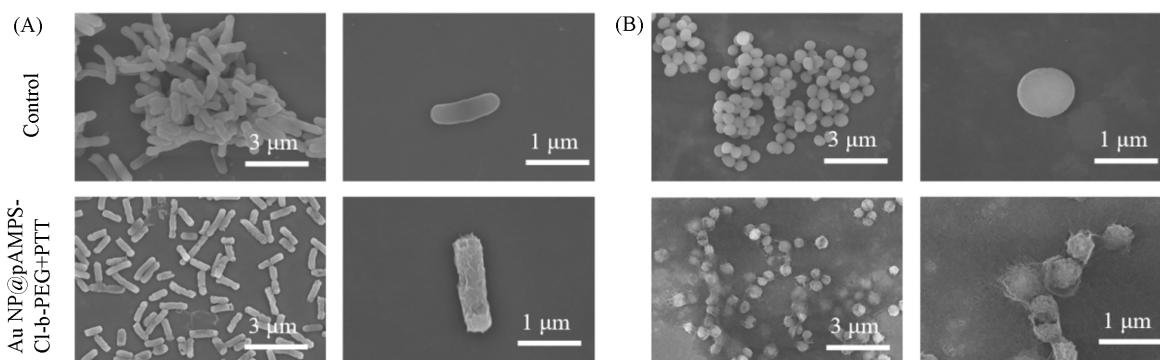


Fig. 9 SEM images of bacterial morphological changes of *E. coli*(A) and *S. aureus*(B) under 660 nm laser irradiate for 0—10 min

3 结 论

研发了一种新型的Au NP@pAMPS-Cl-b-PEG纳米抗菌材料. 该材料充分结合了Au NP的稳定PTT疗效和N-卤胺高效活性氯释放的特性, 具备协同抗菌机制, 更加有效地实现了对细菌的杀灭. 结果表明, 这一纳米抗菌材料在短时间内能够迅速达到99.99%的抑菌率. 值得注意的是, 该平台通过物理杀菌与化学杀菌的协同作用, 能够有效地抑制耐药菌的增长. 综合实验结果显示, 这一纳米抗菌平台表现出理想的抗菌特性, 为未来抗菌材料的研发提供了有益参考, 对推动新型抗菌药物的研发与应用具有重要的理论意义和参考价值.

参 考 文 献

- [1] Morris A., Kellner J. D., Low D. E., *Curr. Opin. Microbiol.*, **1998**, *1*, 524—529
- [2] Reygaert W. C., *AIMS Microbiol.*, **2018**, *4*, 482—501
- [3] Sultan I., Rahman S., Jan A. T., Siddiqui M. T., Mondal A. H., *Front. Microbiol.*, **2018**, *9*, 2066
- [4] Zhang M. S., Wang L., Jin H., Zhan N., Lan S. J., Liu S. W., Zhang H., *J. Control. Release*, **2023**, *358*, 612—625
- [5] Rahman M., Rebrov E. V., *Processes*, **2014**, *2*, 466—493
- [6] Jiang J., Ye G., Lorandi F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, *58*, 12096—12101
- [7] Arami H., Kananian S., Khalifehzadeh L., Patel C. B., Chang E., Tanabe Y., Zeng Y., Madsen S. J., *Nat. Nanotechnol.*, **2022**, *17*(9), 1015—1022
- [8] Depciuch J., Stec M., Klebowski B., Baran J., Parlinska-Wojtan M., *Nanobiotechnology*, **2019**, *17*(1), 107
- [9] Wei Q., Arami H., Santos H. A., Zhang H., Li Y., He J., Zhong D., Ling D., Zhou M., *Adv. Sci.*, **2021**, *8*(5), 2002788
- [10] Tabish T. A., Dey P., Mosca S., Salimi M., Palombo F., Matousek P., Stone N., *Adv. Sci.*, **2020**, *7*(15), 1903441
- [11] Liu S. W., Zhang M. G., Jin H., Wang Z., Liu Y., Zhang S. L., Zhang H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, *145*(1), 160—170
- [12] Sun Y., Zhang Y., Xia Y., Fan T., Xue M., Bulgan E., Harnood C., Dong A., *Lwt-Food. Sci. Technol.*, **2014**, *59*, 1068—1074
- [13] Chen W., Zhu Y., Zhang Z., *Chem. Eng. J.*, **2020**, *379*, 122238
- [14] Su C., Huang K., Li H. H., Lu Y. G., Zheng D. L., *J. Nanomater.*, **2020**, *7*, 1—13
- [15] Wilcoxon J. P., Abrams B. L., *Chem. Soc. Re.*, **2006**, *35*, 1162—1194
- [16] Barner-Kowollik C., Junkers T., *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, **2011**, *49*, 1293—1297
- [17] Zhu H., Prince E., Narayanan P., *Chem. Commun.*, **2020**, *56*, 8131—8134
- [18] Kocer H. B., Cerkez I., Worley S. D., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2011**, *3*, 3189—3194
- [19] Armesto X. L., Moisés C. L., Fernández M. I., *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2001**, *2*, 608—612
- [20] Gao Y., Song N., Liu W., *Macromol. Biosci.*, **2019**, *19*, 1970010
- [21] Song L., Zhang W., Chen H., *Int. J. Nanomed.*, **2019**, *14*, 921—936
- [22] Xia Y., Cheng C., Wang R., *Polym. Chem.*, **2014**, *5*, 5906—5919

(Ed.: V, K, S)