

# 取代基不同的吡啶盐离子液体的合成及抗菌性能研究

## Preparation and Study the Antibacterial Activities of

## Pyridinium-based Ionic Liquids with Different Substituents

朱立俊 郭江娜<sup>[通讯作者]</sup> 孙哲 严锋<sup>[通讯作者]</sup>

(苏州大学材料与化学化工学部, 江苏 苏州 215123)

Zhu Lijun Guo Jiangna<sup>[Corresponding author]</sup> Sun Zhe Yan Feng<sup>[Corresponding author]</sup>

(Department of Materials and Chemical Engineering, Suzhou University, Jiangsu Suzhou 215123)

**摘要:** 离子液体可通过静电和疏水作用与细菌作用, 表现出良好的抗菌性能。本研究设计合成取代基不同的吡啶盐离子液体: N-苄基吡啶氯盐([BePy][Cl]), N-二苯甲基吡啶溴盐([DBMPy][Br])和甲基苄基吡啶溴盐([NTHPy][Br])。通过核磁共振氢谱对其化学结构进行表征并进一步采用最小抑菌浓度法, 活/死细菌染色法等对所合成的取代基不同的吡啶盐离子液体对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌性能进行研究, 并研究其对生物膜的抑制性能。实验结果表明, 不同取代基的吡啶盐离子液体的抗菌性受其结构的影响表现为[NTHPy][Br] > [DBMPy][Br] > [BePy][Cl]; 同时, 对大肠杆菌生物膜形成具有一定抑制作用。

**关键词:** 离子液体; 抗菌; 取代基; 生物膜

**Abstract:** Ionic liquids (ILs) can interact with bacteria through electrostatic and hydrophobic interactions, showing good antibacterial properties. This study designed and synthesized a series of pyridinium-based ILs ([NTHPy][Br], [DBMPy][Br], [BePy][Cl]) with different substituents. The structure of the synthesized ILs was characterized by hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy. Minimum inhibitory concentration method and live/dead staining assay were used to study and compare the antibacterial activities of the synthesized ILs against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The biofilm formation inhibition of the synthesized ILs was also studied. The results showed that the antibacterial properties of the synthesized ILs were affected by the chemical structures, as [NTHPy][Br] > [DBMPy][Br] > [BePy][Cl]. In addition, the synthesized ILs showed a certain inhibitory effect on the formation of *E. coli* biofilm.

**Key words:** ionic liquid; antibacterial; substituents; biofilm

细菌感染会引起数以千万计的人员伤亡, 且随着细菌耐药性的出现和细菌耐药性的增加, 细菌感染已经成为全球医疗卫生体系面临的严峻问题。此外, 细菌大量增殖会进一步形成生物膜, 导致细菌难以杀死, 且易造成慢性细菌感染。因此, 研发具有良好抗菌性且不产生细菌耐药性的抗菌材料对消除细菌感染具有重要意义<sup>[1-2]</sup>。

离子液体(Ionic liquids, ILs)是一类由正负电荷构成的有机盐, 具有高离子电导率, 宽电化学窗口和良好的热稳定性, 被广泛应用于能源, 新材料, 生物医药等领域。<sup>[3]</sup>ILs具有良好的结构可设计性, 通过设计不同的化学结构的阴、阳离子, 可获得性质不同且可调控的ILs。近年来, ILs在抗菌材料领域的研究方兴未艾。<sup>[4]</sup>ILs的阳离子可通过静电和疏水作用与细菌电负性的细菌细胞膜作用, 吸附并扰动细菌细胞膜, 破坏细菌细胞膜的完整性, 导致细菌内容物泄露并死亡, 表现出良好

的抗菌性。近年来研究人员对咪唑盐、吡咯烷盐、胍盐ILs的进行广泛研究, 并发现其具有高效、广谱的抗菌活性。Yan等系统研究咪唑盐、吡咯烷盐ILs小分子、均聚物的化学结构与抗菌活性之间的构效关系。其研究表明N<sub>3</sub>, N位置取代基的碳链长度以及相应咪唑盐、吡咯烷盐的电荷密度对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌活性具有显著影响。首先, ILs小分子和均聚物的抗菌性与其烷基取代基的链长度成正相关, 且同浓度的均聚物的抗菌活性高于相应小分子。此外, ILs及其均聚物的抗菌性随电荷密度的增加而加强。<sup>[5-6]</sup>此外, (聚)离子液体的抗菌性受阳离子结构的影响, Qin等研究表明阳离子对抗菌性的影响表现为: 咪唑盐 > 季铵盐 > 三乙二胺盐。<sup>[7]</sup>

为进一步研究离子液体结构与抗菌性间的构效关系, 本工作合成了一系列取代基结构不同的吡啶盐ILs: N-苄基吡啶氯盐, N-二苯甲基吡啶溴盐和N-二苯甲

基吡啶溴盐, 并对其对大肠杆菌 (*Escherichia coli*, E.coli) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, S.aureus) 的抗菌性进行研究, 进一步探究了其对生物膜的抑制性能。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

吡啶, 2-溴甲基萘, 氯化苄, 二苯基溴甲烷, 乙酸乙酯, 乙醚, 结晶紫, 乙醇均购自国药集团化学试剂有限公司。金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538) 和大肠杆菌 (8099) 为实验模型菌株。

### 1.2 实验仪器

核磁共振波谱仪 (Varian, 400MHz); 酶标仪 (Thermo Fisher Scientific Multiskan GO), 正置荧光显微镜 (Leica DM2500), 医用型洁净工作台 (SW-CJ-IF), 数显气浴恒温振荡器 (SHZ-82), 立式压力蒸汽灭菌锅 (LDX-50FBS), 电热恒温培养箱 (DNP-9052BS-III)。

### 1.3 吡啶盐离子液体的合成

将吡啶 (0.79mol) 溶于乙酸乙酯 (10mL) 中并分别加入等摩尔量的氯化苄, 二苯基溴甲烷和 2-溴甲基萘, 在 80℃ 下 N<sub>2</sub> 氛围中避光搅拌反应。48h 后, 旋蒸除去乙酸乙酯, 并用乙醚洗涤三次除去未反应的原料。旋除去乙醚得 N-苄基吡啶氯盐 ([BePy][Cl], 产率: 85%), N-二苯甲基吡啶溴盐 ([DBMPy][Br], 产率: 78%) 和甲基萘基吡啶溴盐 ([NTHPy][Br], 产率: 82%)。

### 1.4 抗菌性能测试

采用最小抑菌浓度 (MIC) 法测试所合成吡啶盐离子液体的抗菌性。将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌接种与 LB 培养基中, 在 37℃ 恒温摇床中培养 24h。采用酶标仪对其光密度值 (OD) 进行测试。采用梯度稀释法将所合成离子液体梯度稀释成不同浓度, 并将 100uL 稀释的离子液体溶液和等体积的大肠杆菌或金黄色葡萄球菌 (OD<sub>λ=600</sub>=0.1) 加入到 96 孔板中。将孔板在 37℃ 的恒温培养箱中培养, 分别采用酶标仪测试 0h 和 24h 额 OD 值, 并计算 MIC<sub>50</sub> (Minimum Inhibitory Concentration, 即 50% 细菌被杀死对应的离子液体浓度)。

### 1.5 活/死细菌染色测试

将 5mL 细菌溶液 (OD<sub>λ=600</sub>=0.1) 在 5000rpm 转速条件下离心 2min, 细菌沉淀以 PBS 洗涤 3 次。用 PBS 将获得的细菌稀释至 2mL。以 MIC<sub>50</sub> 浓度的不同吡啶盐离子液体的 PBS 溶液与细菌分散液共培养并在 37℃ 下孵育。4h 后将处理后的细菌离心 (5000rpm, 2min), 并分散于 PBS 溶液中。将细菌分散液与 SYTO9/碘化丙啶染料混合, 黑暗条件下染色 10min, 并以 PBS 离心洗涤 2-3 次。将细菌重新悬浮于 PBS 中, 并在荧光显微镜观察细菌。

### 1.6 细菌微观形貌表征

将细菌悬浮液滴在 PET (0.5\*0.5cm) 膜上, 并加入等体积的 2\*MIC 浓度的结构不同的吡啶盐离子液体, 在 37℃ 下培养 4h。在培养板中加入 2.5% 的戊二醛固定细菌 2h, 并依次用 10%, 30%, 50%, 70%, 90% 和 100%

的乙醇溶液梯度脱水, 每次 10min。

## 1.7 结晶紫测试

将等体积大肠杆菌溶液与 2\*MIC 浓度的离子液体溶液在 96 孔板中 37℃ 下共培养。24h 后, 弃去 LB 培养基, 并用 PBS (100μL) 洗涤 2-3 次去除浮游细菌。在孔板中加入 95% 乙醇溶液浸泡孔板底部的生物膜, 15min 后用 0.1% 结晶紫染色 15min。染色后用去离子水洗涤 2-3 次并加入 10% 乙酸溶液。采用酶标仪测试样品在 590nm 处的吸光度。无任何样品加入的细菌为对照组。

## 2 结果与讨论

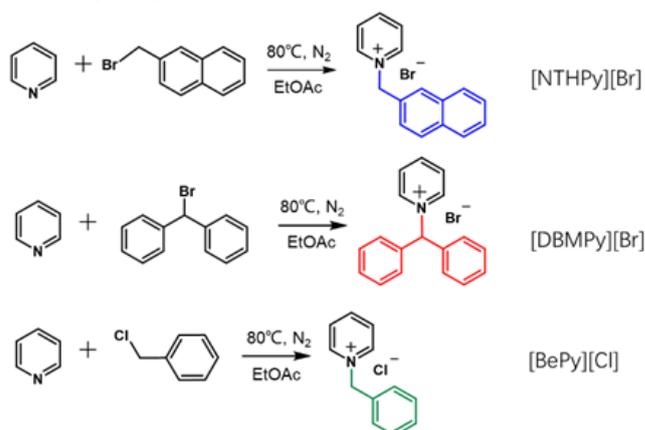


图 1 合成的取代基团不一样的吡啶盐离子液体

如图 1 所示, 本工作通过利用吡啶分别与氯化苄, 2-苯基溴甲烷, 二溴甲基萘在 80℃ 条件下反应制备相应离子液体。通过核磁对所合成的吡啶盐离子液体的化学结构进行表征, 如图 2 所示, 核磁图谱表明目标离子液体均已制备成功。

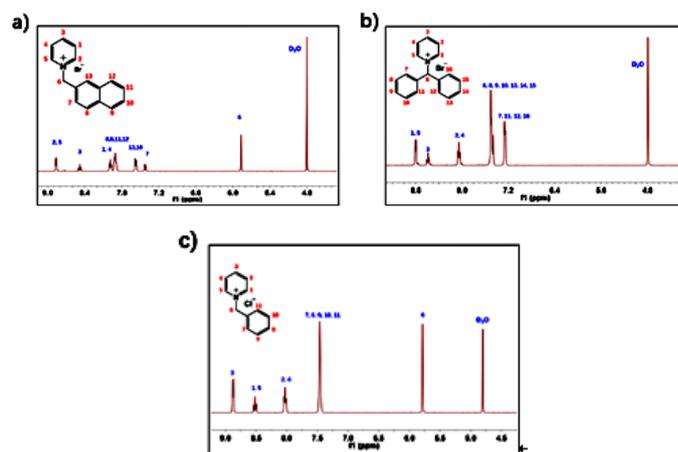


图 2 合成的取代基团不同

的吡啶盐离子液体的核磁表征图片

采用最低抑菌浓度法 (MIC) 对所合成的吡啶盐离子液体对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抗菌性进行测试。不同离子液体对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 MIC 如表 1 所示。不同取代基对吡啶盐的抗菌性有显著影响, 表现为 [NTHPy][Br] > [DBMPy][Br] > [BePy][Cl]。吡啶阳离子部分会通过静电作用与细菌电负性的细菌细胞膜作用, 贴附到细菌表面; 而不同的取代基可通过疏水作用插入到细菌磷脂双层中, 扰动细菌细胞膜, 并最终导致细菌

死亡。本工作所选择的三种取代基均为芳香性化合物，环内的  $\pi$  电子共轭不同使其疏水性不同，表现为萘基 > 二苯基 > 苄基，而疏水作用有利于与细菌间的作用，因而不同的取代基与细菌间的疏水作用不同，最终导致抗菌性间的差异。此外，不同吡啶盐离子液体的对大肠杆菌的抗菌性优于金黄色葡萄球菌。大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的细胞膜结构不同，金黄色葡萄球菌的细胞膜主要由多孔肽聚糖层（约 20–80Nm）和负电性磷酸组成，而大肠杆菌的细胞膜包括富含负电荷的脂多糖外膜（约 7–8Nm）和肽聚糖层（约 2–7Nm），<sup>[8]</sup> 电负性更强，更有利于与离子液体间的静电作用，从而导致吡啶盐离子液体对大肠杆菌的抗菌性更好。

表 1 合成的取代基结构不同的吡啶盐离子液体的最低抑菌浓度

ILs	MIC ( $\text{mmol mL}^{-1}$ )	MIC ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ )
	S.aureus	E.coli
[BePy][Cl]	12.929	9.738
[DBMPy][Br]	3.34	2.52
[NTHPy][Br]	2.00	0.772

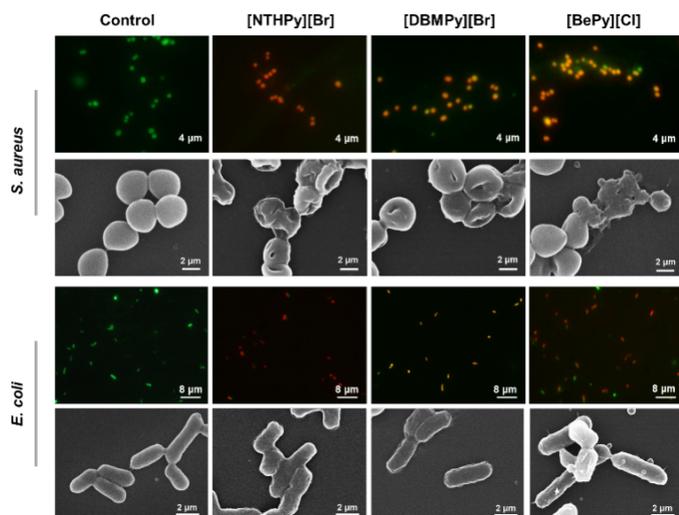


图 3 合成的取代基结构不同的

吡啶盐离子液体处理后的金黄色葡萄球菌和  
大肠杆菌的荧光染色荧光图像和扫描电子显微镜图像

离子液体对细菌的抗菌性要来自于膜破坏作用机制，本工作采用活/死细菌染色法进一步评价吡啶盐离子液体的抗菌性及作用机制。SYTO9 是一种绿色荧光核酸染色剂可同时染色活和死细菌。碘化丙啶不能通过活细胞膜，但却能穿过破损的细胞膜，使死细菌呈现红色荧光。<sup>[9]</sup> 如图 3 所示，对照组的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌呈现明亮的绿色荧光，表明细菌存活。经过不同吡啶盐离子液体处理后，细菌发出红色荧光，即表明细菌细胞膜破损，碘化丙啶进入细菌并染色细菌 DNA，细菌死亡。扫描电子显微镜显示对照组的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌保持正常的完整光滑状态，而经过不同吡啶盐离子液体处理后，细菌表面出现了塌陷，褶皱，细菌形

貌明显改变，表明细菌死亡。上述结果进一步表明吡啶盐离子液体的膜破坏抗菌作用机制。

细菌大量增殖会形成细菌生物膜导致细菌更难以杀死。本工作进一步研究了 MIC 浓度下，不同吡啶盐离子液体对生物膜形成的抑制性能。将 MIC 浓度的不同吡啶盐离子液体分别与大肠杆菌共培养 24h，并通过结晶紫测试其对生物膜的抑制性能。如图 4 所示，[NTHPy][Br]、[DBMPy][Br] 和 [BePy][Cl] 对生物膜的抑制效率分别为  $57.4 \pm 4.3\%$ 、 $44.2 \pm 3.1\%$ 、 $28.4 \pm 2.15\%$ ，即所合成的吡啶盐离子液体可以抑制大肠杆菌生物膜的形成。

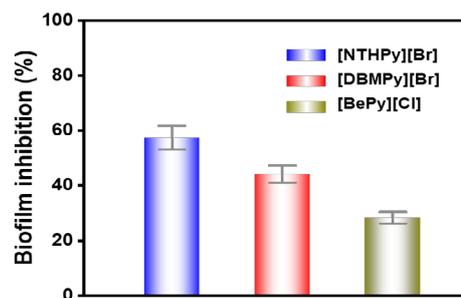


图 4 通过结晶紫染色测定的不同取代基的离子液体处理后的大肠杆菌生物膜抑制性能

### 3 结论

本工作设计合成了吡啶盐离子液体 [NTHPy][Br]、[DBMPy][Br] 和 [BePy][Cl]，并通过核磁共振氢谱分析表征了其化学结构特征。抗菌性研究表明吡啶盐离子液体可通过膜破坏机制杀死细菌，且取代基结构对吡啶盐离子液体对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抗菌性有显著影响，表现为  $[\text{NTHPy}][\text{Br}] > [\text{DBMPy}][\text{Br}] > [\text{BePy}][\text{Cl}]$ 。此外，吡啶盐离子液体能够抑制生物膜的形成。

#### 参考文献：

- [1] Zubris, D. L. Minbiole, K. P. C. Wuest, W. M. Curr. Top. Med. Chem. 2017, 17, 305-318.
- [2] Zhu, J. Han, H. Li, F. Wang, X. Yu, J. Qin, X. Wu, D. Chem. Mater. 2019, 31, 4436-4450.
- [3] Qian, W. Texter, J. Yan, F. Chem. Soc. Rev. 2017, 46, 1124-1159.
- [4] Duan, N. Sun, Z. Ren, Y. Liu, Z. Liu, L. Yan, F. Polym. Chem. 2020, 11, 867-875.
- [5] Zheng, Z. Xu, Q. Guo, J. Qin, J. Mao, H. Wang, B. Yan, F. ACS Appl. Mater. Interfaces 2016, 8, 12684-12692.
- [6] Qin, J. Guo, J. Xu, Q. Zheng, Z. Mao, H. Yan, F. ACS Appl. Mater. Interfaces 2017, 9, 10504-10511.
- [7] Guo, J. Qin, J. Ren, Y. Wang, B. Cui, H. Ding, Y. Mao, H. Yan, F. Polym. Chem. 2018, 9, 4611-4616.
- [8] Guo, J. Qian, Y. Sun, B. Sun, Z. Chen, Z. Mao, H. Wang, B. Yan, ACS Appl. Bio Mater. 2019, 2, 4418-4426.
- [9] Wang, Q. Wang, H. Zhang, T. Hu, Z. Xia, L. Li, L. Chen, J. Jiang, S. J. Agr. Food Chem. 2021, 69, 1068-1078.

#### 基金项目：

江苏省大学生创新创业训练计划 (202110285004Z)。