

TỔNG HỢP HẠT COMPOSITE KHÁNG KHUẨN TRÊN CƠ SỞ ALGINATE VÀ POLYHEXAMETHYLENE GUANIDINE HYDROCHLORIDE

Đến tòa soạn 22-03-2024

Hà Minh Nguyệt¹, Đỗ Lê Phương Hoa¹, Lê Thị Mỹ Hạnh¹,
Vũ Xuân Minh¹, Ngô Hồng Ánh Thu², Nguyễn Tuấn Dung^{1*}

¹Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Khoa Hóa học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

*Email: ndung65@gmail.com

SUMMARY

SYNTHESIS OF ANTIBACTERIAL COMPOSITE BEADS BASED ON ALGINATE AND POLYHEXAMETHYLENE GUANIDINE HYDROCHLORIDE

Polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG) is an antibacterial polymer compound of increasing interest in water treatment, thanks to its strong activity and low toxicity. In this study, PHMG was synthesized by hot-melt polycondensation and used to prepare antibacterial composite beads with sodium alginate. The IR analysis results indicated that alginate/PHMG composite beads were successfully synthesized, and there is a chemical interaction between alginate and PHMG. Therefore, the composite has high stability, only 6.2% (wt.) of PHMG was released from the composite when it was soaked in water. The synthesized PHMG has excellent antibacterial activity against gram-positive (+) and gram-negative (-) bacteria and fungi, with a MIC value not exceeding 32 $\mu\text{g/mL}$. The water disinfection test showed that alginate/PHMG composite beads can material 100% of $\sim 10^3$ CFU/mL *E.coli* have been killed, and that composite can be reused 3 times.

Keywords: polyguanidine, antimicrobial composite beads, sodium alginate.

1. MỞ ĐẦU

Hiện nay, nguồn nước phục vụ cho sinh hoạt của người dân ở các vùng nông thôn vẫn đang được lấy chủ yếu từ nguồn nước mặt và nước ngầm. Tuy nhiên, tốc độ công nghiệp hóa, đô thị hóa mạnh mẽ đã khiến những nguồn nước này đang ngày càng bị ô nhiễm trầm trọng. Bên cạnh các chất ô nhiễm phổ biến như các kim loại nặng, các hợp chất hữu cơ... thì vi trùng, vi khuẩn gây bệnh cũng là các tác nhân ô nhiễm đặc biệt nguy hiểm, có thể lan truyền dịch bệnh trong cộng đồng. Phương pháp

khử trùng nước phổ biến nhất hiện nay là phương pháp hóa học, sử dụng các chất oxi hóa mạnh (ozone, hydrogen peroxide, chlorine hoạt tính...). Trong đó, các hợp chất chlorine hoạt tính hiện được ứng dụng rộng rãi nhất. Tuy nhiên, phương pháp này dễ tạo ra các sản phẩm phụ độc hại (chlorophenol, haloacetic acid, trihalomethane ...), thậm chí, một số chất có khả năng gây ung thư. Do đó, việc phát triển các tác nhân kháng khuẩn an toàn gần đây đang được tập trung nghiên cứu rất mạnh mẽ.

Theo hướng nghiên cứu này, các hợp chất polyme gốc guanidine đã được nhiều nghiên cứu công bố có tính năng kháng khuẩn mạnh phổ rộng và độc tính thấp. Trong số đó, polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG) được quan tâm nhất do có hoạt tính mạnh và ổn định [1,2]. Cho đến nay, hầu hết các nghiên cứu đều sử dụng PHMG ở dạng tự do, cho trực tiếp vào nguồn nước nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, để gia tăng hiệu quả ứng dụng của loại vật liệu này, PHMG có thể được đưa lên các chất mang [3]. Trong một nghiên cứu trước đây, nhóm chúng tôi đã tổng hợp vật liệu nanocomposite kháng khuẩn sắt từ/ polyguanidine, nhưng độ bền của vật liệu chưa cao do đặc tính tan mạnh trong nước của PHMG [4].

Trong lĩnh vực xử lý nước, alginate - một chế phẩm chiết xuất từ tảo nâu, cũng đang được ưa chuộng vì có đặc tính thân thiện với môi trường. Đây là một loại polysaccharide tự nhiên có chứa nhiều nhóm chức carboxylic và hydroxyl trong cấu trúc nên có khả năng hấp phụ rất tốt các loại tác nhân ô nhiễm trong môi trường nước [5]. Với mục đích ứng dụng để khử trùng nước, alginate đã được biến tính với các tác nhân khác có khả năng kháng khuẩn như tinh dầu [6], hạt ZnO nano [7], hạt bạc nano [8].

Bài báo này tiến hành nghiên cứu tổng hợp vật liệu composite dạng hạt trên cơ sở alginate với tác nhân kháng khuẩn là PHMG, định hướng ứng dụng khử trùng nước cấp sinh hoạt.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Chế tạo hạt composite alginate/PHMG

PHMG được điều chế theo quy trình như công bố trong các tài liệu [9]. Hexamethylene diamine (HMDA) và guanidine hydrochloride (GHC) với tỷ lệ mol 1:1 được trùng ngưng nóng chảy ở các chế độ gia nhiệt như sau: 100°C trong 3 giờ, 150°C trong 2 giờ và cuối cùng giữ ở 180°C và trong 1 giờ.

Hạt alginate được chế tạo bằng cách cho dung dịch sodium alginate 1% kl. vào xi lanh, rồi nhỏ giọt vào dung dịch CaCl₂ 0,3 M. Để hạt già hóa trong 24 giờ, sau đó, lọc rửa hạt nhiều lần bằng nước cất [10].

Cho 10 g hạt alginate vào 100 mL dung dịch PHMG 2%, khuấy trong 1 giờ sẽ thu được hạt composite alginate/PHMG, lọc rửa hạt nhiều lần

bằng nước cất, sau đó sấy khô ở 105°C trong 24 giờ. Thành phần PHMG trong vật liệu composite được xác định bằng cách cân hạt alginate trước và sau khi biến tính, giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm là 4,1% kl.

2.2. Đặc trưng tính chất của vật liệu

2.2.1. Phân tích phổ hồng ngoại:

Cấu trúc hóa học của PHMG và composite alginate/PHMG được khảo sát thông qua phương pháp phổ hồng ngoại trên thiết bị NEXUS 670 (NICOLET).

2.2.2. Thử nghiệm khả năng kháng khuẩn:

Khả năng kháng khuẩn của PHMG được xác định bằng chỉ số nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) theo tiêu chuẩn DIN 58940-6:2007, trên các dòng vi khuẩn và nấm: *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*), *Lactobacillus fermentum* (*L.fermentum*), *Salmonella enterica* (*S.enterica*), *Escherichia coli* (*E.coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) và nấm *Candida albican* (*C.albican*). Dung dịch vi khuẩn/nấm được chuẩn bị với nồng độ 5.10⁵ CFU/mL. Mẫu PHMG được pha thành dãy các nồng độ khác nhau. Lấy 10 µL dung dịch PHMG, thêm 200 µL dung dịch vi khuẩn/nấm và tiến hành ủ 24 giờ ở 37°C. Cho thêm 50 µL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 1 mg/mL vào các giếng thử và quan sát sự chuyển hóa MTT thành MTT formazan có màu tím. MIC là nồng độ thấp nhất mà giếng thử không đổi màu.

Khả năng kháng khuẩn của vật liệu composite alginate/PHMG được thử nghiệm trên chủng vi khuẩn đại diện *E.coli* bằng phương pháp tiếp xúc trực tiếp [11]. Dịch *E.coli* được nuôi cấy và pha loãng tới mật độ ~ 10³ CFU/mL. Cho 1 g vật liệu vào cốc chứa 10 mL dung dịch chứa vi khuẩn *E.coli*, sau 30 phút xác định mật độ vi khuẩn bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Hiệu lực kháng khuẩn được xác định thông qua mật độ vi khuẩn xuất hiện ban đầu và sau khi tiếp xúc với vật liệu, áp dụng công thức:

$$H (\%) = (1 - \frac{N}{A}) \times 100\%$$

Trong đó, A và N tương ứng là mật độ vi khuẩn ban đầu và sau khi tiếp xúc với vật liệu.

2.2.3. Khảo sát độ tan nhả PHMG từ hạt composite:

Quá trình tan nhả PHMG từ hạt composite được khảo sát trong môi trường nước. Cho 50 g composite alginate/PHMG vào 500 mL nước cất, khuấy nhẹ (300 v/p). Sau các khoảng thời gian khác nhau, hút 5 mL dung dịch để phân tích hàm lượng PHMG tan ra. Nồng độ PHMG được phân tích bằng phương pháp trắc quang trên thiết bị UV-Vis S80 (Biochrom) [12].

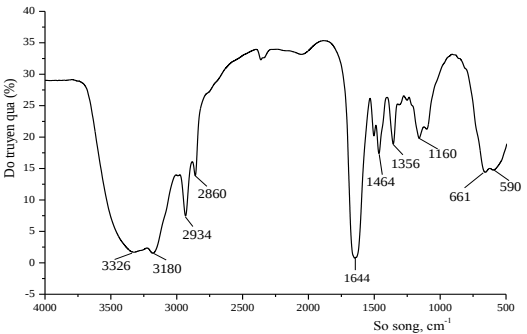
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc trưng tính chất của PHMG

Cấu trúc hóa học của PHMG được phân tích bằng phổ hồng ngoại và trình bày trên hình 1.

Có thể quan sát thấy trên hình 1 các pic điển hình tại số sóng 3180cm^{-1} tương ứng với dao động hóa trị và 1464cm^{-1} ứng với dao động biến dạng của amin bậc 2. Hai đỉnh hấp thụ tại số sóng 2934 và 2860cm^{-1} được quy cho dao động đối xứng và bất đối xứng của liên kết CH_2 . Một pic có cường độ mạnh tại 1644cm^{-1} tương ứng với liên kết $\text{C}=\text{N}$, pic hấp thụ tại 1356cm^{-1} ứng với liên kết $\text{C}-\text{N}$ của

nhóm amin bậc 2. Ngoài ra, còn quan sát thấy các pic tại 3326cm^{-1} và 1160cm^{-1} đặc trưng cho dao động hóa trị và biến dạng của nhóm OH , Cl^- . Đây chính là các nhóm chức đặc trưng của PHMG [13].



Hình 1. Phổ hồng ngoại của PHMG

PHMG được thử nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) với các chủng vi sinh vật khác nhau: *S.aureus*, *B.subtilis*, *L.fermentum*, *S.enterica*, *E.coli*, *P.aeruginosa* và nấm *C.albican*. Kết quả trình bày trên bảng 1 cho thấy PHMG tổng hợp được có hoạt tính kháng khuẩn mạnh đối với các khuẩn gram dương (+) cũng như gram âm (-) và nấm, giá trị MIC không vượt quá $32\text{ }\mu\text{g/mL}$. Chỉ riêng với chủng *S.enterica* MIC cao hơn các chủng khác ($64\text{ }\mu\text{g/mL}$), nhưng vẫn là một giá trị khá tốt.

Bảng 1. Kết quả xác định MIC ($\mu\text{g/mL}$) với vi khuẩn và nấm của PHMG

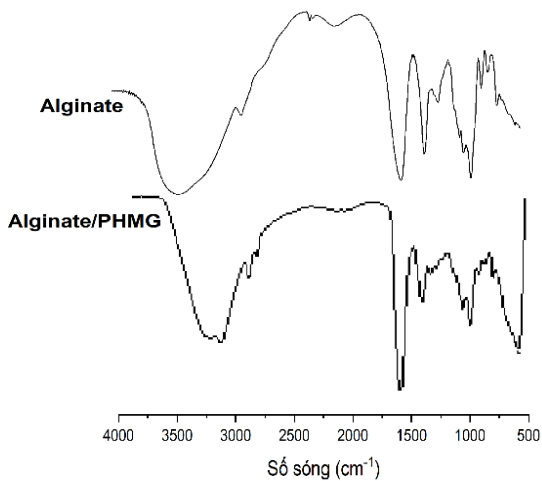
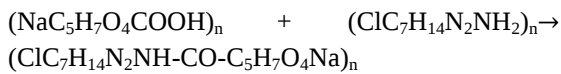
Chủng vi sinh vật						
Gram dương (+)			Gram âm (-)			Nấm
<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>L.fermentum</i>	<i>S.enterica</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albican</i>
16	16	16	64	16	32	32

3.2. Đặc trưng tính chất của hạt composite alginate/PHMG

Hạt composite alginate/PHMG được đặc trưng cấu trúc bằng phương pháp đo phổ hồng ngoại, so sánh với phổ hồng ngoại của mẫu hạt alginate thuần, kết quả trình bày trên hình 2.

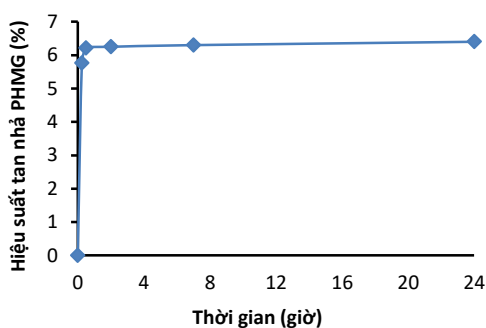
Ta thấy phổ hồng ngoại của vật liệu composite alginate/PHMG xuất hiện chủ yếu các đỉnh đặc trưng của alginate: đỉnh tại 1020cm^{-1} tương ứng với dao động của nhóm $\text{C}-\text{CH}$, đỉnh tại 1304cm^{-1} phản ánh dao động của liên kết $\text{C}-\text{O}$ trong nhóm chức carboxylic acid [14]. Ngoài ra, còn quan sát thấy sự xuất hiện các pic hấp thụ hồng ngoại đặc

trung của PHMG: trong đó, pic ở vị trí 3299 và $3162,7\text{cm}^{-1}$ được cho là của dao động hóa trị và dao động biến dạng nhóm amin bậc hai; liên kết $\text{C}-\text{H}$ được xác định bởi pic hấp thụ tại 2933 và 2870cm^{-1} . Đồng thời, trên phổ hồng ngoại của vật liệu composite ta thấy có sự dịch chuyển pic hấp phụ tại 1609 và 1417cm^{-1} của alginate, tương ứng với dao động đối xứng và bất đối xứng của COO^- , tới vị trí số sóng lớn hơn: 1618 và 1429cm^{-1} . Các đỉnh pic trong khoảng $2153-2363\text{cm}^{-1}$, tương ứng với liên kết $\text{C}-\text{O}$ của nhóm COOH của alginate thì không còn quan sát thấy trên phổ IR của composite. Điều này có thể lý giải do nhóm chức COOH đã tham gia phản ứng với nhóm NH_2 trong phân tử PHMG:



Hình 2. Phổ hồng ngoại của hạt alginate và composite alginate/PHMG

Quá trình tan nhả PHMG từ hạt composite alginate/PHMG khi ngâm trong nước được khảo sát theo thời gian, kết quả xác định phần trăm PHMG tan nhả được thể hiện trên hình 3. Kết quả thu được cho thấy lượng polymer tan ra rất ít, sau 30 phút ngâm trong nước, lượng PHMG tan ra chiếm khoảng 6,2% và sau đó không tan nữa. Như vậy, PHMG không chỉ hấp phụ vật lý lên bề mặt hạt alginate, mà giữa hai hợp chất này đã xảy ra tương tác hóa học, giữa nhóm $-\text{COOH}$ của alginate và nhóm $-\text{NH}_2$ của PHMG.



Hình 3. Hiệu suất tan nhả PHMG từ hạt composite alginate/PHMG.

3.3. Thử nghiệm đánh giá khả năng kháng khuẩn của vật liệu composite alginate/PHMG

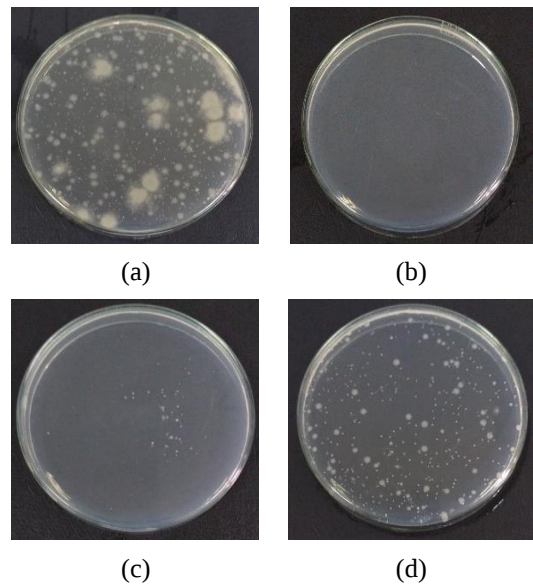
Vật liệu composite alginate/PHMG được thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn theo phương pháp

tiếp xúc trực tiếp với chủng đại diện là *E.coli*, mật độ đầu là $2,0 \cdot 10^3$ CFU/mL, thời gian tiếp xúc 30 phút. Sau khi xử lý lần thứ nhất, hạt composite được thu hồi và tiếp tục thử nghiệm lần xử lý thứ 2 và thứ 3. Kết quả xác định mật độ vi sinh sau xử lý và khả năng kháng khuẩn (H%) được trình bày trên bảng 2.

Bảng 2. Khả năng kháng khuẩn *E.coli* của vật liệu composite alginate/PHMG

Thử nghiệm	Mật độ <i>E.coli</i> (CFU/mL)	H (%)
Đối chứng	$2,0 \cdot 10^3$	-
Lần 1	0	100
Lần 2	$1,4 \cdot 10^1$	99,3
Lần 3	$1,2 \cdot 10^2$	94,0

Kết quả trên bảng 2 cho thấy vật liệu composite có thể xử lý được hoàn toàn *E.coli* trong trường hợp này. Tái sử dụng lần 2, khả năng kháng khuẩn vẫn còn đạt khá cao, 99,3%, lần thứ 3 chỉ còn 94% (hình 4).



Hình 4. Ảnh xác định mật độ *E.coli* trước (a) và sau khi xử lý lần 1 (b), lần 2 (c) và lần 3 (d).

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, polyhexa-methylene guanidine hydrochloride được điều chế bằng quá trình trùng ngưng nóng chảy và ứng dụng để chế tạo composite kháng khuẩn với hạt alginate. Kết quả phân tích phổ hồng ngoại đã chứng tỏ cấu trúc

vật liệu composite gồm hai thành phần alginate và PHMG, tương tác giữa chúng không đơn thuần là hấp phụ vật lý mà còn có liên kết hóa học. Điều này đã được chứng minh thêm thông qua việc phân tích độ tan của PHMG từ hạt composite, sau 30 phút ngâm trong nước, chỉ có 6,2% PHMG tan ra và sau đó không tan nữa.

Khả năng kháng khuẩn của PHMG được xác định bởi giá trị MIC, kết quả thu được cho thấy PHMG tổng hợp được có hoạt tính kháng khuẩn rất tốt đối với các khuẩn *gram dương* (+) cũng như *gram âm* (-) và nấm. Thử nghiệm khử trùng nước sử dụng hạt composite alginate/PHMG cho thấy vật liệu có khả năng kháng khuẩn *E.coli* đạt 100% với mật độ đầu $\sim 10^3$ CFU/mL và có thể tái sử dụng 3 lần. Các kết quả nghiên cứu ban đầu đã mở ra triển vọng phát triển ứng dụng vật liệu thân thiện môi trường này trong xử lý nước sinh hoạt.

Lời cảm ơn: Công trình này nhận được sự hỗ trợ từ đề tài Nafosted mã số 104.02-2019.331.

Cam kết: Tôi xin cam đoan đây là công trình của nhóm tác giả và chưa gửi đăng nội dung này ở bất kỳ tạp chí nào.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Oulé MK, Azinwi R, Bernier AM, Kablan T, Maupertuis AM, Mauler S, Nevry RK, Dembélé K, Forbes L, Diop L, (2008). Polyhexamethylene guanidine hydrochloride-based disinfectant: a novel tool to fight methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and nosocomial infections. *Journal of Medical Microbiology*, **57**, 1523-1528.
- [2] Choi H, Kim K-J, Lee DG, (2017). Antifungal activity of the cationic antimicrobial polyhexamethylene guanidine hydrochloride and its mode of action. *Fungal Biology*, **121**, 53-60.
- [3] P. Li, S. Sun, A. Dong, Y. Hao, S. Shi, Z. Sun, G. Gao, Y. Chen, (2015). Developing of a novel antibacterial agent by functionalization of graphene oxide with guanidine polymer with enhanced antibacterial activity. *Applied Surface Science*, **355**, 446-452.
- [4] Nguyen T Dung, Pham T Lan, Le T T Ha, Vu X Minh, Le M T Hanh, Le M T Huong, Pham H Nam, Lu T Le, Vu X Minh, Le T T Ha, Pham T Lan, Pham H Nam, Le M T Huong, Le T Lu, Nguyen T Dung, (2018). Synthesis and antibacterial properties of a novel magnetic nanocomposite prepared from spent packing liquors and polyguanidine. *RSC Advances*, **8**, 19707-19712.
- [5] B. Wang, Y. Wan, Y. Zheng, X. Lee, T. Liu, Z. Yu, J. Huang, Y.S. Ok, J. Chen, B. Gao, (2019). Alginate-based composites for environmental applications: a critical review. *Journal Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **49**, 1-39.
- [6] Han Y, Yu M, Wang L, (2018). Physical and antimicrobial properties of sodium alginate/carboxymethyl cellulose films incorporated with cinnamon essential oil. *Food Packaging Shelf Life*, **15**, 35-42.
- [7] Motshekga, S.C., Sinha Ray, S., Maity, A., (2018). Synthesis and characterization of alginate beads encapsulated zinc oxide nanoparticles for bacteria disinfection in water. *Journal of Colloid Interface Science*, **512**, 686-692.
- [8] Gomez Chabala, L.F., Cuartas, C.E.E., Lopez, M.E.L., (2017). Release behavior and antibacterial activity of chitosan/ alginate blends with aloe vera and silver nanoparticles. *Marine Drugs*, **15**, 328.
- [9] L. Qian, Y. Guan, B. He, H. Xiao, (2008). Modified guanidine polymers: Synthesis and antimicrobial mechanism revealed by AFM. *Polymer*, **49**, 2471-2475.
- [10] R. Aravindhana, N.N. Fathima, J.R. Rao, B.U. Nair, (2007). Equilibrium and thermodynamic studies on the removal of basic black dye using calcium alginate beads. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **299**, 232-238.
- [11] ASTM E2149-13a, (2013). Standard test method for determining the antimicrobial activity of immobilized antimicrobial agents under dynamic contact conditions 1, 11-14.
- [12] X. Ding, F. Chen, Y. Guan, A. Zheng, D. Wei, X. Xu, (2020). Preparation and properties of an antimicrobial acrylic coating modified with guanidinium oligomer. *Journal of Coatings Technology and Research*, **17**(5), doi: 10.1007/s11998-020-00370-z.

[13] M. N. Grigor'eva, S. A. Stel'makh, S. A. Astakhova, I. M. Tsenter, L. U. Bazarov, V. B. Batoev, D. M. Mogonov, (2014). Biocidal Action of Copolymers Based on Aliphatic Diamines and Guanidine Hydrochloride. *Journal of Applied Polymer Science*, 40319 (6 pages).

[14] J. Nastaj, A. Przewłocka, M. Rajkowska-Myśliwiec, (2016). Biosorption of Ni(II), Pb(II) and Zn(II) on calcium alginate beads: equilibrium, kinetic and mechanism studies. *Polish Journal of Chemical Technology*, **18(3)**, 81-87.