

**NGHIÊN CỨU TĂNG ĐỘ BỀN CHỐNG RỬA TRÔI
CỦA VẬT LIỆU KHÁNG KHUẨN NANOCOMPOZIT
Fe₃O₄/POLYHEXAMETYLEN GUANIDIN HYDROCLORIT**

Đến tòa soạn 22-02-2021

**Lê Thị Thu Hà, Lê Thị Ngát, Lê Thị Mỹ Hạnh, Phạm Thị Lan,
Vũ Xuân Minh, Lê Trọng Lư, Trần Đại Lâm, Nguyễn Tuấn Dung**
Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

SUMMARY

**ENHANCEMENT OF WASHING RESISTANCE OF ANTIBACTERIAL
NANOCOMPOSITE Fe₃O₄/POLYHEXAMETHYLEN
GUANIDINE HYDROCHLORIDE**

The contamination of water resources by pathogenic bacteria can cause transmission of disease in community, so development of the effective and safe disinfectants is especially important. Guanidine-based polymers are well-known strong antimicrobial agents against a wide range of microorganisms. However, the high water solubility restricted their potential applications in the field of water treatment. In this study, Magnetic nanoparticles were prepared from spent pickling liquors and used for nanocomposite synthesis with polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG) in presence of epichlorohydrin (Ep) and then used for synthesis of nanocomposite with Fe₃O₄ nanoparticles. The measurements of PHMG release from nanocomposite showed that washing resistance of Fe₃O₄/PHMG nanocomposite has been clearly improved by using modifying agent Ep. As-prepared nanocomposite Fe₃O₄/PG-Ep demonstrated very good antibacterial activity against Escherichia coli (E.coli). With 2 ppm of Fe₃O₄/PHMG-Ep, after 5 minutes of exposure, they can kill 100% of E.coli with initial concentration $\sim 7.7 \cdot 10^5$ CFU/mL. Furthermore, this material showed also a good reusability, with the bactericidal effect obtained 100% and 99.99%. for the 2nd and 3rd test, respectively, of the same material.

Key words: antibacterial nanocomposite, polyhexamethylene guanidine hydrochloride, washing resistance, epichlorohydrin.

1. MỞ ĐẦU

Trong số các tác nhân gây ô nhiễm nước thì vi sinh vật gây bệnh có tác hại nghiêm trọng nhất, do chúng có thể lan truyền dịch bệnh trong cộng đồng rất nguy hiểm. Phương pháp khử trùng nước được áp dụng phổ biến nhất hiện nay là phương pháp hóa học, dựa trên việc sử dụng các chất oxi hóa mạnh (ozon, hydro peoxit, clo hoạt tính...), có khả năng tiêu diệt vi khuẩn nhanh và hiệu quả. Trong số đó các hợp chất clo hoạt tính được sử dụng rộng rãi

nhất, ở mọi quy mô. Tuy nhiên biện pháp này cũng tiềm ẩn nhiều rủi ro, chủ yếu liên quan đến việc hình thành các sản phẩm phụ độc hại (chlorophenol, axit haloaxetic, trihalometan ...), thậm chí một số chất có khả năng gây ung thư [1,2]. Việc tìm kiếm các tác nhân kháng khuẩn an toàn hơn đang thu hút mạnh mẽ sự quan tâm của các nhà khoa học trên toàn thế giới. Thời gian gần đây, polyme gốc guanidin thu hút được sự quan tâm của đông đảo các nhà khoa học nhờ có khả năng khử khuẩn

manh trên một phổ rộng và có độc tính thấp [3-5]. Hầu hết các nghiên cứu ứng dụng polyguanidin trong xử lý nước đều sử dụng trực tiếp vào nguồn nước nhiễm khuẩn, một số công bố mới đây đã nghiên cứu đưa polyguanidin lên các chất mang với mục đích gia tăng hiệu quả ứng dụng của vật liệu [6-8]. Trong lĩnh vực xử lý nước, vật liệu oxit sắt từ nano gần đây được quan tâm rất mạnh mẽ nhờ có ưu điểm là an toàn môi trường và dễ dàng tách loại, thu hồi sau khi xử lý [9]. Mặt khác, hạt oxit sắt từ nano còn có khả năng dễ dàng biến tính, chức năng hóa bề mặt tạo ra các vật liệu nanocompozit có tính năng đa dạng và hấp dẫn. Với đối tượng nước ô nhiễm các loại được phẩm và vi khuẩn, oxit sắt từ nano có thể biến tính với các hợp chất có tác dụng kháng khuẩn hay hấp thụ được phẩm [10]. Việc sử dụng chất mang là oxit sắt từ có lợi thế vượt trội về khả năng thu hồi sau khi xử lý, tránh việc thải các tác nhân kháng khuẩn ra ngoài môi trường một cách không kiểm soát.

Trong các công bố mới đây, chúng tôi đã nghiên cứu sử dụng dung dịch tẩy giết thải bỏ của nhà máy chế biến thép để tổng hợp oxit sắt từ nano [11], và ứng dụng vật liệu này để chế tạo nanocompozit với polyguanidin thương mại [12]. Các kết quả thu được đã chứng tỏ vật liệu có hoạt tính kháng khuẩn rất tốt và dễ dàng tách loại khỏi dung dịch nước bằng cách áp dụng từ trường ngoài. Tuy nhiên, do polyguanidin tan rất mạnh trong nước, nên nanocompozit có độ bền hạn chế. Để khắc phục điều này cần phải biến tính polyguanidin với các tác nhân khác nhau. Trong báo cáo này chúng tôi nghiên cứu sử dụng tác nhân biến tính epichlorhydrin để cải thiện khả năng chống rửa trôi của nanocompozit Fe_3O_4 /polyguanidin. Vật liệu được nghiên cứu đặc trưng cấu trúc, độ bền trong nước và hoạt tính kháng khuẩn với chủng đại diện là *Escherichia coli* (*E.coli*).

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Tổng hợp vật liệu

Trong nghiên cứu này polyhexa-metylen guanidin hydroclorit (PHMG) được tổng hợp bằng phản ứng trùng ngưng nóng chảy từ tiền chất guanidin hydroclorit (GHC) và hexametylen diamin (HMDA) đã công bố

trong các tài liệu [13]. Quá trình được thực hiện với tỷ lệ mol $\text{GHC:HMDA} = 1:1$, gia nhiệt ở 100°C trong 1 giờ, 170°C trong 4 giờ.

Vật liệu Fe_3O_4 và nanocompozit Fe_3O_4 /PHMG tổng hợp theo quy trình đã công bố [12]: Fe_3O_4 được tổng hợp từ dung dịch tẩy giết thải bỏ của nhà máy thép Hòa Phát bằng phương pháp oxi hóa đồng kết tủa trong dung dịch $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bão hòa, tại nhiệt độ phòng. Hạt Fe_3O_4 nano sau khi chế tạo được phân tán trong dung dịch PHMG, khuấy liên tục, sau 6 giờ thu được nanocompozit Fe_3O_4 /PHMG. Để cải thiện độ bền chống rửa trôi của vật liệu, trong quá trình này chúng tôi cho thêm epichlorhydrin (Ep) vào dung dịch PHMG với tỷ lệ khối lượng $\text{PHMG:Ep} = 5:1$ và thực hiện phản ứng ở 60°C . Sản phẩm nanocompozit không biến tính (Fe_3O_4 /PHMG) và biến tính (Fe_3O_4 /PHMG-Ep) được thu hồi bằng nam châm, rửa sạch bằng nước cất (5 lần) và sấy khô trong tủ sấy chân không ở 60°C trong 24 giờ.

2.2. Nghiên cứu đặc trưng vật liệu

Cấu trúc hóa học của vật liệu được phân tích bằng phổ hồng ngoại trên thiết bị Nicolet iS10 FT-IR Spectrometer. Hàm lượng polyme trong thành phần nanocompozit được xác định bằng phương pháp phân tích nhiệt trọng lượng (TGA) trên thiết bị NETZSCH TG 209 F1 Libra.

Độ rửa trôi PHMG từ vật liệu nanocompozit được khảo sát bằng cách xác định lượng PHMG tan nhả trong dung dịch nước theo thời gian. Cho 5g nanocompozit vào 500 ml nước cất, khuấy với tốc độ 300 vòng/phút. Xác định nồng độ PHMG trong dung dịch sau những khoảng thời gian xác định bằng phương pháp đo quang phổ UV-Vis.

2.3. Khảo sát khả năng kháng khuẩn

Khả năng kháng khuẩn của vật liệu được đánh giá bằng phương pháp tiếp xúc trực tiếp: Vi khuẩn *E.coli* được nuôi cấy và chuẩn bị dung dịch có nồng độ khoảng $1,2 \cdot 10^7$ CFU/mL. Phân tán vật liệu Fe_3O_4 /PHMG-Ep trong 198 mL nước cất, cho thêm 2 ml dịch vi khuẩn *E.coli*, khuấy với tốc độ 500 v/p. Sau khi xử lý, thu hồi vật liệu bằng nam châm và định lượng vi khuẩn còn lại trong dung dịch bằng phương pháp pha loãng theo dãy thập phân trong nước muối sinh lý 0,85%. Hiệu lực diệt khuẩn được

tính theo công thức:

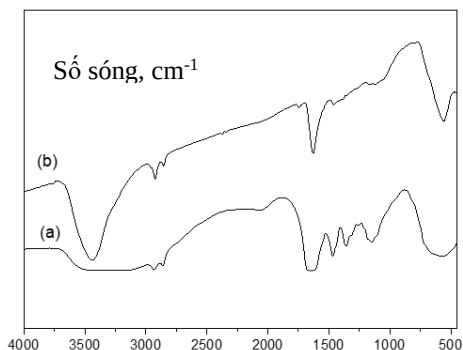
$$H (\%) = \left(1 - \frac{N}{A}\right) \times 100\%$$

trong đó: N là mật độ vi khuẩn sau tiếp xúc; A là mật độ vi khuẩn ban đầu.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đặc trưng vật liệu nanocompozit

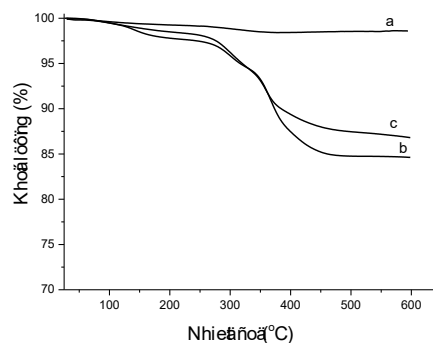
Cấu trúc hóa học của sản phẩm trùng ngưng giữa GHC và HMDA được phân tích bằng phổ hồng ngoại và trình bày trên hình 1 (đường a). Có thể quan sát thấy các pic hấp thụ đặc trưng của PHMG: pic tại số sóng 1645 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của liên kết $C=N$; pic tại 1467 cm^{-1} tương ứng với dao động của nhóm amin bậc hai; các pic tại 2936 và 2857 cm^{-1} tương ứng với dao động hóa trị bất đối xứng và đối xứng của các nhóm amin NH_2 ; pic tại 1357 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của liên kết $C-N$ [3]. Phổ hồng ngoại của nanocompozit Fe_3O_4 /PHMG-Ep thể hiện chủ yếu là các pic hấp phụ đặc trưng của Fe_3O_4 (đường b): pic tại số sóng 573 cm^{-1} tương ứng dao động hóa trị của liên kết $Fe-O$ của phân tử Fe_3O_4 , pic tại số sóng 3446 và 1634 cm^{-1} tương ứng với dao động hóa trị và dao động biến dạng của nhóm OH^- [13]. Ngoài ra ta cũng quan sát được một số pic hấp thụ đặc trưng của PHMG với cường độ yếu tại số sóng 1467 , 2930 và 2857 cm^{-1} , có thể do hàm lượng PHMG chiếm tỷ lệ nhỏ trong thành phần nanocompozit.



Hình 1. Phổ IR của (a) PHMG và (b) nanocompozit Fe_3O_4 /PHMG biến tính epiclohydrin.

Để xác định hàm lượng polyme trong thành phần nanocompozit, vật liệu đã được tiến hành phân tích TGA, kết quả trình bày trên hình 2. Ta thấy trong trường hợp Fe_3O_4 , trong khoảng nhiệt độ khảo sát hầu như không có sự sụt khối

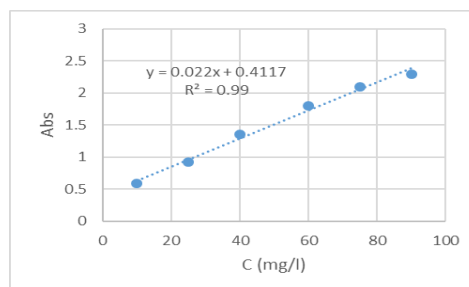
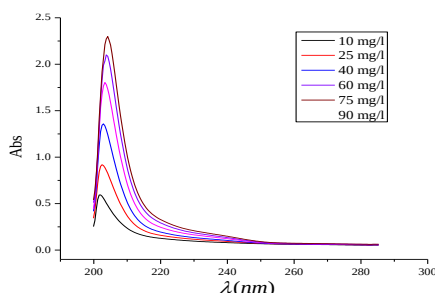
lượng mẫu, chỉ 1,56%, liên quan đến mất nước vật lý (đường a). Trong khi đó mẫu nanocompozit suy giảm khối lượng rõ nét bắt đầu từ khoảng 250°C , liên quan đến quá trình phân hủy PHMG. Từ kết quả TGA có thể xác định được lượng polyme trong thành phần nanocompozit, trường hợp không biến tính là 12,5% (đường b) và trường hợp biến tính với epiclohydrin là 11,1% (đường c).



Hình 2. Giảm đồ TGA của (a) Fe_3O_4 ; (b) Fe_3O_4 / PHMG và (c) Fe_3O_4 /PHMG-Ep.

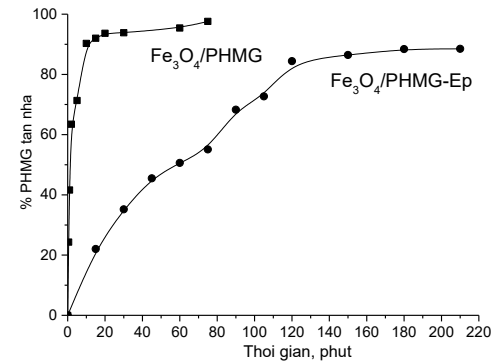
3.2. Khảo sát sự tan nhả PHMG từ nanocompozit

Lượng PHMG tan nhả trong nước được xác định bằng phương pháp phân tích phổ UV-Vis. Hình 3 trình bày kết quả xây dựng đường chuẩn xác định nồng độ PHMG với độ tin cậy khá cao, hệ số hồi quy $R^2 = 0,9900$.



Hình 3. Xây dựng đường chuẩn phân tích PHMG

Khả năng rửa trôi PHMG được đánh giá bằng cách cho vật liệu nanocompozit vào trong nước, khuấy với tốc độ 300 v/p, sau từng thời gian xác định đo nồng độ PHMG tan ra trong dung dịch bằng phương pháp trắc quang. Kết quả phần trăm PHMG tan nhả từ nanocompozit theo thời gian được trình bày trên hình 4.



Hình 4. Lượng PHMG tan nhả theo thời gian từ nanocompozit.

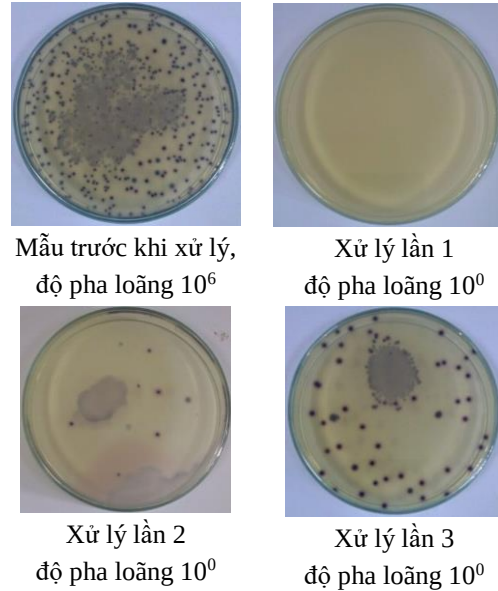
Các kết quả trình bày trên hình 4 đã chứng tỏ Ep có tác dụng cải thiện rõ rệt độ bền chống rửa trôi của vật liệu. Với mẫu Fe₃O₄/PHMG không biến tính, PHMG tan ra rất nhanh, chỉ sau khoảng 10 phút đã đạt ~90%. Trong khi đó mẫu biến tính phải sau 2 giờ lượng PHMG tan ra mới đạt ~80%.

3.3. Khảo sát khả năng kháng khuẩn

Hoạt tính kháng khuẩn và khả năng thu hồi, tái sử dụng của vật liệu nanocompozit Fe₃O₄/PHMG-Ep được khảo sát với đối tượng là vi khuẩn *E.coli*, đại diện cho vi khuẩn gram (-), mật độ ban đầu là $\sim 7,7.10^5$ CFU/mL. Điều kiện thử nghiệm được mô tả trong phần 2.3, hàm lượng chất diệt khuẩn Fe₃O₄/PHMG-Ep là 2 ppm, thời gian tiếp xúc 5 phút. Sau khi xử lý, vật liệu nanocompozit được thu hồi bằng nam châm và tiếp tục sử dụng để xử lý lần thứ 2 và lần thứ 3. Kết quả xác định mật độ vi khuẩn sau xử lý và hiệu lực kháng khuẩn trình bày trên bảng 1 và hình 5 đã chứng tỏ hoạt tính kháng khuẩn khá mạnh của vật liệu, hiệu lực diệt khuẩn sau 2 lần sử dụng đạt 100%, lần thứ 3 đạt 99,99%.

Bảng 1. Kết quả diệt khuẩn *E. coli* bằng Fe₃O₄/PHMG-Ep.

	Mật độ <i>E.coli</i> sau xử lý (CFU/mL)	Hiệu lực diệt khuẩn (%)
Lần 1	0	100 %
Lần 2	7	100 %
Lần 3	45	99,99 %



Hình 5. Ảnh chụp kết quả xác định mật độ *E.coli* trước và sau khi xử lý bằng Fe₃O₄/PHMG-Ep.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này polyme kháng khuẩn, polyhexametylen guanidin hydroclorit (PHMG), được tổng hợp bằng phương pháp trùng ngưng nóng chảy từ guanidin hydroclorit và hexametylen diamin; hạt nano Fe₃O₄ được chế tạo bằng phương pháp oxi hóa đồng kết tủa từ dung dịch tẩy gỉ của nhà máy thép thái bò. Nanocompozit Fe₃O₄/PHMG được tổng hợp bằng cách phân tán hạt Fe₃O₄/PHMG trong dung dịch PHMG, có sử dụng thêm epiclohydrin (Ep) để cải thiện độ bền chống rửa trôi của vật liệu. Kết quả khảo sát độ tan nhả PHMG từ nanocompozit cho thấy với mẫu Fe₃O₄/PHMG-Ep sau khoảng 2 giờ ngâm trong nước và khuấy 300 vòng/phút, lượng PHMG tan ra là ~ 80%, bền hơn đáng kể so với mẫu không biến tính (tan ~ 90% lượng PHMG sau khoảng 10 phút).

Kết quả khảo sát hoạt lực diệt khuẩn *Escherichia coli* đã chứng tỏ nanocompozit Fe₃O₄/PHMG-Ep có khả năng kháng khuẩn tốt, với hàm lượng 2 ppm, sau 5 phút tiếp xúc có thể diệt 100% *E.coli* nồng độ đầu $\sim 7,7.10^5$ CFU/mL. Do độ bền chống rửa trôi được cải thiện, vật liệu Fe₃O₄/PHMG-Ep có khả năng tái sử dụng, hiệu lực diệt khuẩn lần thứ 2 đạt

100% và lần thứ 3 đạt 99,99%. Các kết quả thu được bước đầu rất khả quan, vật liệu Fe₃O₄/PHMG-Ep có triển vọng phát triển thành vật liệu từ tính kháng khuẩn, ứng dụng trong xử lý khử trùng nước thải.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 104.02-2019.331.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. E. Feliziania, A. Lichter, J. L. Smilanick, A. Ippolito, *Disinfecting agents for controlling fruit and vegetable diseases after harvest*, Postharvest Biology and Technology, **2016**, 122, 53–69.
2. N. Hamidin, Q.J. Yu, D.W. Connell, *Human health risk assessment of chlorinated disinfection by-products in drinking water using a probabilistic approach*, Water Resour, **2008**, 42(13), 3263-3274.
3. Y. Zhang, J. Jiang, Y. Chen, *Synthesis and antimicrobial activity of polymeric guanidine and biguanidine salts*, Polymer, **1999**, 40, 6189–6198.
4. F.C. Krebs, S.R. Miller, M.L. Ferguson, M. Labib, R.F. Rando, B. Wigdahl, *Polybiguanides, particularly polyethylene hexamethylene biguanide, have activity against human immunodeficiency virus type 1*, Biomedicine and Pharmacotherapy, **2005**, 59, 438-445.
5. H. Choi, K.-J. Kim, D.G. Lee, *Antifungal activity of the cationic antimicrobial polymer-polyhexamethylene guanidine hydrochloride and its mode of action*, Fungal biology, **2017**, 121, 53-60.
6. J. Nikkila, X. Liu, Y. Li, M. Raulio, H.L. Alakomi, J. Wei, C.Y. Tang, *Surface modification of thin film composite RO membrane for enhanced anti-biofouling performance*, Journal of Membrane Science, **2013**, 444, 192–200.
7. X. Li, Y. Cao, H. Yu, G. Kang, X. Jie, Z. Liu, Q. Yuan, *A novel composite nanofiltration membrane prepared with PHGH and TMC by interfacial polymerization*, Journal of Membrane Science, **2014**, 466, 82–91.
8. P. Li, S. Sun, A. Dong, Y. Hao, S. Shi, Z. Sun, Ge Gao, Yuxin Chen, *Developing of a novel antibacterial agent by functionalization of graphene oxide with guanidine polymer with enhanced antibacterial activity*, Applied Surface Science, **2015**, 355, 446–45.
9. P. Xu, G.M. Zeng, D.L. Huang, C.L. Feng, S. Hu, M.H. Zhao, C. Lai, Z. Wei, C. Huang, G.X. Xie, Z.F. Liu, *Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: A review*, Science of the Total Environment, **2012**, 424, 1–10.
10. Borlido L., Azevedo A.M., Roque A.C., Aires-Barros M.R., *Magnetic separation in biotechnology*, Biotechnology Advances, **2013**, 31, 1374-1385.
11. Minh X. Vu, Ha T.T. Le, Lam T. Pham, Nam H. Pham, Huong T. M. Le, Lu T. Le, Dung T. Nguyen. *Synthesis of magnetic nanoparticles from spent pickling liquors in aqueous saturated solution of calcium hydroxide*, Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol., 61(9-10), **2018**, 59-63.
12. Dung T. Nguyen, Lan T. Pham, Ha T. T. Le, Minh X. Vu, Hanh T. M. Le, Huong T. M. Le, Nam H. Pham, Le T. Lu. *Synthesis and antibacterial properties of a novel magnetic nanocomposite prepared from spent pickling liquors and polyguanidine*, RSC. Advances, **2018**, 8, 19707-19712.
13. D. Wei, Q. Ma, Y. Guan, F. Hu, A. Zheng, X. Zhang, Z. Teng, H. Jiang, *Structural characterization and antibacterial activity of oligoguanidine (polyhexamethylene guanidine hydrochloride)*, Materials Science and Engineering C, **2009**, 29, 1776–178.