

含季磷阳离子的抗菌改性蒙脱土的制备及表征

谭绍早¹, 郑佳¹, 陈茵¹, 谢瑜珊¹, 施庆珊², 欧阳友生², 陈仪本²

(1. 暨南大学 化学系, 广州 510632; 2. 广东省微生物研究所, 广州 510070)

摘要: 采用离子交换法将十六烷基三苯基插入到钠基蒙脱土的层间得到4种不同季磷阳离子含量的改性蒙脱土, 通过热重分析(TGA)、X射线衍射法(XRD)和扫描电镜(SEM)表征了结构, 并测试了其Zeta电位和抗菌活性。发现4种改性蒙脱土中季磷阳离子的热分解起始温度都高于230℃, 具有较好的热稳定性。并且随着改性蒙脱土中季磷阳离子含量的增加, 其层间距变大、Zeta电位升高、抗菌活性增强。钠基蒙脱土为片状结构, 粒子之间相互缠绕在一起, 而改性蒙脱土显示不规则形状。对季磷阳离子含量为23.55wt%的QPC/MMT-3样品, 其对大肠杆菌(*E. coli*) and金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的最低抑菌浓度(MICs)分别为1.2和0.1g/L; 与细菌接触24h后, 1.0g/L的样品可杀死99.9%以上的*E. coli*, 0.1g/L的样品可杀死所有的*S. aureus*。QPC/MMT-3还具有较好的耐水性。

关键词: 季磷阳离子; 改性蒙脱土; 制备; 表征; 抗菌活性

中图分类号: TB34; TD985; TQ047

文献标识码: A

Preparation and Characterization of the Antibacterial Modified Montmorillonites Containing Quaternary Phosphonium Cations

TAN Shao-Zao¹, ZHENG Jia¹, CHEN Yin¹, XIE Yu-Shan¹, SHI Qing-Shan²,
OUYANG You-Sheng², CHEN Yi-Ben²

(1. Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

Abstract: Four kinds of modified montmorillonites were prepared by introducing different content of hexadecyltriphenyl phosphonium cations into sodium montmorillonite (Na/MMT) through an ion-exchange method, and characterized using thermogravimetry (TGA), X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscope (SEM). Also the Zeta potentials and antibacterial activity of the modified montmorillonites were investigated. The onset temperatures of the decomposition for quaternary phosphonium cations in modified montmorillonites are all higher than 230℃, which have good thermal stability. For the montmorillonites, the interlayer spacings enlarge, the Zeta potentials increase and the antibacterial activity improves with the increase of the content of quaternary phosphonium cations. Na/MMT displays flake shape with the particles adhered and interwinded each other, while the modified montmorillonites are in irregular shape. QPC/MMT-3 containing 23.55wt% quaternary phosphonium cations, possesses the minimal inhibitory concentration (MICs) against *E. coli* and *S. aureus* of 1.2g/L and 0.1g/L, respectively. After contacting the bacteria for 24h, 1.0g/L of QPC/MMT-3 is able to kill more than 99.9% *E. coli*, and nearly all the *E. coli*. Moreover, QPC/MMT-3 has good water resistance.

Key words: quaternary phosphonium cation; modified montmorillonite; preparation; characterization; antibacterial activity

载银无机抗菌剂具有高效、广谱和长效抗菌活性, 并且耐热性好、安全性高, 是当前长效抗菌材料中

的首选抗菌剂^[1-4]。但是, 它存在成本高、易变色、防霉效果差等缺点。因此, 寻找载银无机抗菌剂的替代

收稿日期: 2008-07-21, 收到修改稿日期: 2008-10-12

基金项目: 国家自然科学基金(20676049, 20871058); 广东省自然科学基金(05200555, 06104481); 省部产学研合作专项资金(2007B090400105); 广东省应用微生物开放实验室项目(SWK200704); 暨南大学本科生科技创新工程项目(cx07050)

作者简介: 谭绍早(1966-), 男, 研究员。E-mail: tanshaozao@163.com

者成为当前抗菌材料研究的热点。

蒙脱土是典型的 2:1 型层状硅酸盐,层间具有可交换的水合阳离子,同时具有很强的吸附性能,是功能材料的理想载体^[5-7]。将有机阳离子插入蒙脱土中制备改性蒙脱土,可以通过有机阳离子与蒙脱土间分子级复合,使层间的有机阳离子的耐热性较大幅度提高、毒性下降,成为较稳定的长效复合材料。Herrera 等^[8]将十六烷基吡啶盐插入蒙脱土的层间,所制备的改性蒙脱土对沙门氏菌具有良好的抗菌效果,并且颜色稳定性好。2004 年,作者在国内率先研究了季铵阳离子改性蒙脱土的抗菌活性,发现其抗菌活性和耐水性优良,但由于其耐热温度低于 200℃,使它的应用范围受到限制^[9,10]。2005 年,实验将与季铵阳离子结构相似、但耐热性相对更好的季磷阳离子插入蒙脱土层间,所得到的改性蒙脱土的耐热性有较大的改善,其耐热温度可达到 220℃ 以上。同时较系统地研究了十四烷基三甲基(或丁基、苯基)季磷阳离子改性蒙脱土的制备和抗菌活性^[11]。为了进一步提高季磷阳离子改性蒙脱土的稳定性,本工作制备了十六烷基三苯基季磷阳离子改性蒙脱土,并对其结构和抗菌活性等进行了研究。

1 实验部分

1.1 原料

钠基蒙脱土(Na/MMT),浙江宇宏粘土有限公司,阳离子交换容量(CEC)为 1.0mmol/g;十六烷基三苯基溴化磷,氰特化工(上海)有限公司;水解酪蛋白胨肉汤(Mueller-Hinton Broth, MH)和营养琼脂培养基,广东环凯微生物有限公司;大肠杆菌(*E. coli*, ATCC25922)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*, ATCC6538),广东省微生物所提供。

1.2 改性蒙脱土的制备

通过离子交换反应制备改性蒙脱土。在 4 个 500mL 的圆底烧瓶中,各加入 285 g 去离子水和 15 g 钠基蒙脱土,先在室温下机械搅拌成 5.0wt% 的悬浮液,接着在 50℃ 加热搅拌 1h;再按 QPC(十六烷基三苯基季磷阳离子)与 Na/MMT 的 CEC 的摩尔比为 0.25:1.00、0.5:1.0、0.75:1.00 和 1:1 的添加量计算,将 3.75、7.50、11.25 和 15.00mmol 的十六烷基三苯基溴化磷分别加入至上述含 5.0wt% 的 Na/MMT 悬浮液中,升温至 65℃ 并搅拌反应 3h;然后将反应物抽滤,得白色沉淀物,用热水反复洗涤、过滤,直至无 Br⁻ 检出(用 0.1mol/L 的 AgNO₃ 检验);最后将得到的产品在 65℃ 真空干燥箱中干燥 48h,研磨,过 300 目筛,即得到季磷阳离子改性蒙脱土(QPC/MMT-1、QPC/MMT-2、QPC/MMT-3 和 QPC/MMT-4)。

1.3 结构表征

热重分析:使用美国 TA 公司的 SDT-Q600 型差示扫描量热仪对样品进行分析,升温速率 10℃/min,在 N₂ 气氛中进行。

XRD 测试分析:使用德国 BRUKER/AXS 公司的 D8 Advance 型 X 射线衍射仪对样品进行分析, Cu Kα 射线, λ = 0.1541nm, 扫描速度为 1°/min, 扫描范围 2θ 为 2° ~ 10°。

SEM 分析:采用日本电子 JSM-6360 型扫描电镜对样品的表面形貌进行观察,加速电压为 15kV。

1.4 Zeta 电位的测定

称取一定量的样品添加到去离子水中配成 0.01wt% 的悬浮液,加入一定量的分散剂,用盐酸或氢氧化钠调节 pH 值后超声分散 15min,采用 Brookhaven Instruments Corporation 生产的 PALS 型 Zeta 电位分析仪测定悬浮液的 Zeta 电位。

1.5 抗菌活性测试

测试样品对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的最低抑菌浓度(MICs)。改性蒙脱土用 MH 肉汤对倍系列稀释到不同浓度,再分别加入到含有一定菌量的培养液中,使最终菌液的浓度控制在 10⁶cfu/mL;然后在 37℃ 振荡培养 24h,以不长菌管的抗菌剂最低浓度计为该抗菌剂的 MIC^[12]。

用改良振荡法^[13]测试改性蒙脱土对细菌的杀灭率。各称取 50、100、150mg 的改性蒙脱土,分别加入到 100mL 含 10⁵cfu/mL *E. coli* 的 0.9wt% 无菌生理盐水中;同时,各称取 5、10、15mg 的改性蒙脱土,分别加入到 100mL 含 10⁵cfu/mL *S. aureus* 的 0.9wt% 无菌生理盐水中。将上述各样品分别在 37℃ 振荡培养不同的时间,然后取出 2mL 以 50r/min 的速率离心 10min,再取上层清液 10 倍稀释至不同的梯度,将 100μL 涂布于琼脂平板上,最后在 37℃ 培养 24h,计活菌落数,每个梯度做三个平行培养平板,取平均值。

1.6 改性蒙脱土的耐水性研究

各取 1.0g 干燥的改性蒙脱土分散在 100mL 去离子水和 0.9wt% 的生理盐水中,在 50℃ 水浴中加热搅拌,并分别在搅拌 6、12、24、36、48、60 和 72h 后取样,过滤、洗涤、干燥,用热重分析法测出浸泡一定时间后改性蒙脱土样品中季磷阳离子的含量,从而计算出季磷阳离子(QPC)的析出量。

2 结果与讨论

2.1 热重分析

图 1 为钠基蒙脱土和改性蒙脱土的热失重曲线图,由此得出的结构和性能参数如表 1 所示。可以看

出,钠基蒙脱土的失重主要发生在两个区域,一个是在 150℃ 以前,主要是脱去表面吸附水和层间的自由水;一个是在 500 ~ 700℃ 之间,主要是硅酸盐晶片中的一 OH 脱去而失重^[14]. 钠基蒙脱土在 150 ~ 500℃ 失重很小,而改性蒙脱土在 230 ~ 450℃ 有明显的失重,说明插入蒙脱土中的季磷阳离子主要在 230 ~ 450℃ 分解. 所以,改性蒙脱土中的季磷阳离子显示出较好的热稳定性. 同时,在 200℃ 以前改性蒙脱土的失重比钠基蒙脱土的失重少,并且随着季磷阳离子含量的增加,改性蒙脱土的失重越来越少,这是由于钠基蒙脱土层间的水合钠离子部分被季磷阳离子置换的缘故. 季磷阳离子含量越多,置换的水合钠离子也越多,故改性蒙脱土的失重也越少. 从表 1 还可以看出,随着反应液中季磷阳离子添加量的增加,改性蒙脱土中季磷阳离子含量增加. 但是当季磷阳离子的添加量达到 0.75:1.00 (QPC 与 Na/MMT 的 CEC 的摩尔比)后,进一步添加季磷阳离子对改性蒙脱土中季磷阳离子含量的影响不大. 因此,反应液的 QPC 与 Na/MMT 的 CEC 的最佳摩尔比为 0.75:1.00,可得到季磷阳离子含量为 23.55wt% 的改性蒙脱土 QPC/MMT-3 样品.

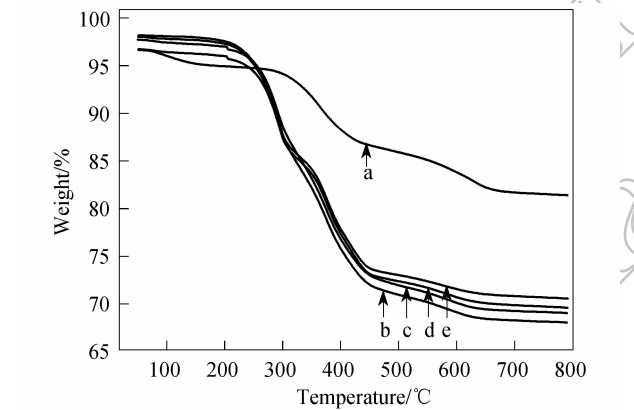


图1 钠基蒙脱土与改性蒙脱土的热失重曲线图
Fig.1 TGA curves of Na-MMT and modified montmorillonites
a-Na/MMT; b-QPC/MMT-1; c-QPC/MMT-2; d-QPC/MMT-3; e-QPC/MMT-4

表 1 钠基蒙脱土和改性蒙脱土的结构和性能参数 Table 1 Structure and property parameters of Na-MMT and modified montmorillonites				
Samples	Mol ratios of QPC to CEC	Contents of QPC	d_{001} /nm	Onset decomposition temperatures/℃
Na/MMT	—	—	1.227	—
QPC/MMT-1	0.25 : 1.00	8.24	1.507	230
QPC/MMT-2	0.50 : 1.00	15.92	1.774	230
QPC/MMT-3	0.75 : 1.00	23.55	2.133	235
QPC/MMT-4	1 : 1	23.77	2.154	232

2.2 X 射线衍射分析

钠基蒙脱土和改性蒙脱土的 XRD 图谱如图 2 所示,其 d_{001} (层间距)的变化如表 1 所示. 钠基蒙脱土的层间距为 1.227nm. 当反应液中 QPC 与 Na/MMT 的 CEC 的摩尔比分别为 0.25:1.00、0.5:1.0、0.75:1.00 和 1:1 时,改性蒙脱土的层间距依次扩大到 1.507、1.774、2.133 和 2.154nm. 这是由于随着反应液中季磷阳离子添加量的增加,插入到蒙脱土中的季磷阳离子的量也增加,从而导致层间距扩大. 但是,当反应液中 QPC 与 Na/MMT 的 CEC 的摩尔比超过 0.75:1.00 后,层间距的变化很小. 说明其摩尔比为 0.75:1.00 时,插入蒙脱土层间的季磷阳离子已基本接近饱和. 因此,在本文后面的研究中,主要以反应液中 QPC 与 Na/MMT 的 CEC 的摩尔比为 0.75:1.00 时所制备的改性蒙脱土 QPC/MMT-3 样品为研究对象.

根据文献报道^[14,15],长链季铵阳离子在层间的排列方式主要有:单层平行排列、双层平行排列、单层石蜡状排列、双层石蜡状排列以及平行和石蜡状杂化排列导致的假三层. 当短链取代基为甲基,长链烷基阳离子完全伸展,分子链取反式-反式构象并直立于粘土层表面时,按式(1)可以计算层间距^[16]:

$$d_{001} = 0.126(n - 1) + d_c + d_m \tag{1}$$

式中 n 为链中碳原子数,0.126 为链方向上每一个 C—C 键的贡献长度, d_c 和 d_m 分别为粘土的底面间距 (0.96nm) 和甲基末端范德华直径 (0.4nm). 可以计算出十六烷基三甲基季磷阳离子改性蒙脱土的 $d_{001} = 2.998\text{nm}$. 因为苯基比甲基的体积大,所以 d_{001} 应大于 2.998nm. 若单层或双层排列,则 d_{001} 为 0.4 或 0.8nm 左右. 而实测的 d_{001} 是 1.507 ~ 2.154nm,说明该改性蒙脱土中的季磷阳离子可能在硅酸盐层间以石蜡状排列.

2.3 电镜观察

通过扫描电镜观察了钠基蒙脱土和改性蒙脱土 QPC/MMT-3 的表面形貌,其结果如图 3 所示. 发现钠基蒙脱土 (图 3(a)) 为片状结构,粒子之间相互缠

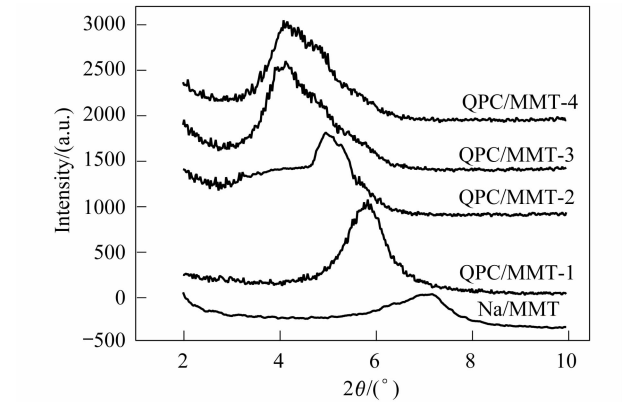


图2 钠基蒙脱土和改性蒙脱土的 XRD 图谱
Fig.2 XRD patterns of Na-MMT and modified montmorillonites

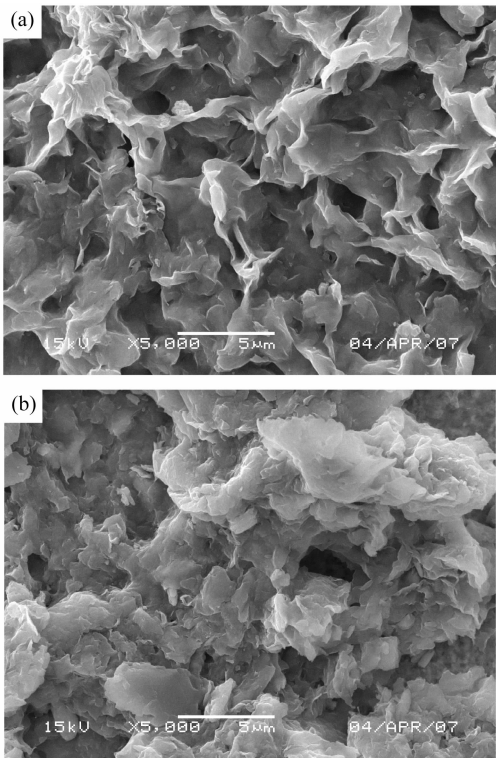


图3 钠基蒙脱土(a)和QPC/MMT-3(b)的SEM照片
Fig. 3 SEM photographs of Na/MMT (a) and QPC/MMT-3 (b)

绕在一起. 而插入季磷阳离子的改性蒙脱土 QPC/MMT-3 (图 3(b)) 的片状结构受到破坏, 表面粒子显示不规则的形状.

2.4 抗菌活性研究

表 2 列出了钠基蒙脱土和改性蒙脱土的 Zeta 电位和抗菌活性. 发现随着改性蒙脱土中季磷阳离子含量的增加, 其 Zeta 电位增大、抗菌活性增强. 这是因为有机阳离子插入蒙脱土层间, 中和了其中的部分负电, 使它的 Zeta 电位增大. 同时, 由于细菌表面通常带负电荷^[9], Zeta 电位越正的改性蒙脱土与细菌表面的作用力越强, 因此季磷阳离子含量越高的改性蒙脱土的抗菌活性越强. 对于 QPC/MMT-3 和 QPC/MMT-4 样品, 由于两者的季磷阳离子含量差不多, 故抗菌活性相同, 它们对 *E. coli* 和 *S. aureus* 的 MICs 都分别为 1.2 和 0.1 g/L, 显示出良好的抗菌效果.

表 2 钠基蒙脱土和改性蒙脱土的 Zeta 电位和抗菌活性
Table 2 Zeta potentials and antibacterial activity of Na/MMT and modified montmorillonites

Samples	Zeta potentials / mV	MICs / (g · L ⁻¹)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Na-MMT	-23.28	>10.0	>10.0
QPC/MMT-1	-21.01	2.0	0.5
QPC/MMT-2	-19.23	1.5	0.3
QPC/MMT-3	-16.85	1.2	0.1
QPC/MMT-4	-16.82	1.2	0.1

从表 2 还可以看出, 改性蒙脱土对 *S. aureus* 的抗菌效果比对 *E. coli* 的好. 这是因为 *E. coli* 是革兰氏阴性菌, 而 *S. aureus* 是革兰氏阳性菌. 从细胞壁结构来看, 革兰氏阳性菌具有比革兰氏阴性菌厚得多的肽聚糖细胞壁, 但其结构粗糙, 很难阻止小分子扩散. 而革兰氏阴性菌比革兰氏阳性菌的细胞壁更复杂, 且有一层像筛子一样的荚膜, 抗菌活性物质很难越过荚膜^[17]. 因此, 季磷阳离子改性蒙脱土对 *S. aureus* 比对 *E. coli* 的抗菌活性更好.

图 4 为不同浓度的改性蒙脱土 QPC/MMT-3 与细菌接触不同时间后的活菌落数的变化. 可以看出, 随着 QPC/MMT-3 浓度的增大、接触时间的延长, *E. coli* 和 *S. aureus* 的活菌落数逐步减少. 当 1.0 g/L 的 QPC/MMT-3 与 *E. coli* 接触 24 h 后, 99.9% 以上的 *E. coli* 被杀死; 而 0.1 g/L 的 QPC/MMT-3 与 *S. aureus* 接触 24 h 后, 所有的 *S. aureus* 被杀死. 所以, QPC/MMT-3 显示出良好的抗菌效果.

2.5 耐水性研究

图 5 为改性蒙脱土 QPC/MMT-3 分别在去离子水和 0.9 wt% 的生理盐水中于 50℃ 浸泡不同时间后季磷阳离子含量的变化曲线. 可以看出, 随着浸泡时间的增加, 改性蒙脱土中季磷阳离子含量逐渐减少. 当浸泡时间相同时, 在 0.9 wt% 的生理盐水中析出的季磷阳离子量相对要多, 表明浸泡介质中离子的存在对改性蒙脱土中季磷阳离子的析出有一定影响. 当浸泡时间达到 60 h 后, 改性蒙脱土 QPC/MMT-3 中的季磷阳离子在去离子水和 0.9 wt% 的生理盐水中的析出都趋于稳定; 并且季磷阳离子在这两种介质中的析出量都不大, 分别为 7.9 wt% 和 9.2 wt%. 因此, 改性蒙脱土中的季磷阳离子相当稳定, 其原因可能是季磷阳

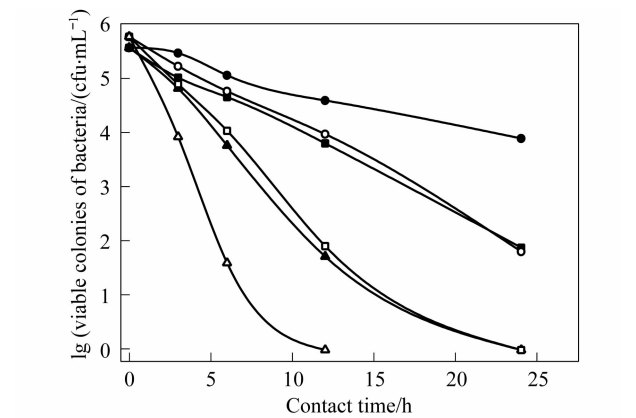


图 4 不同浓度的 QPC/MMT-3 与细菌接触不同时间后的活菌落数的对数曲线
Fig. 4 Plots of lg (viable colonies of bacteria) versus contact time for QPC/MMT-3 with different concentrations against bacteria
●, ■ and ▲ - 0.05, 1.0 and 1.5 g/L of QPC/MMT-3 against *E. coli*; ○, □ and △ - 0.05, 0.1 and 0.15 g/L of QPC/MMT-3 against *S. aureus*

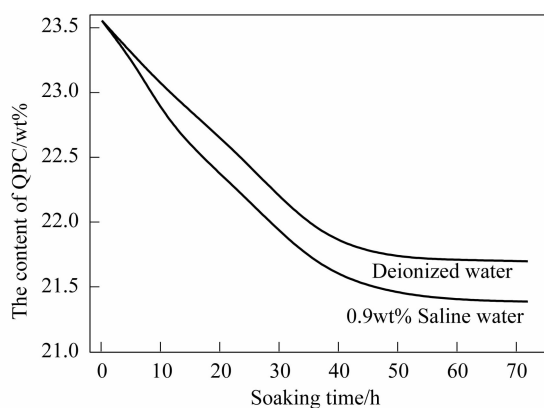


图5 浸泡时间对QPC/MMT-3中季磷阳离子含量的影响

Fig. 5 Effect of soaking time on the QPC content in QPC/MMT-3

离子与硅酸盐片层之间存在较强的静电作用力以及季磷阳离子之间强烈的范德华力^[15],使季磷阳离子能较稳定地存在于蒙脱土的层间. EI-Nahhal 等^[18]报道了在5.0wt%的氯化钠溶液中于25℃时搅拌72h,季铵阳离子的析出小于8.0wt%,说明季铵阳离子非常缓慢地从改性蒙脱土中解吸出来. 而本文研究的季磷阳离子比季铵阳离子的分子更大,在蒙脱土中的稳定性更好. 所以,实验制备的改性蒙脱土在热生理盐水中浸泡60h后,季磷阳离子的析出量小于9.5wt%,因而该改性蒙脱土具有较好的耐水性能.

3 结论

采用离子交换法将十六烷基三苯基插入到钠基蒙脱土的层间得到4种不同季磷阳离子含量的改性蒙脱土. 研究结果发现:改性蒙脱土中季磷阳离子的热分解起始温度高于230℃,显示较好的热稳定性;随着反应液中季磷阳离子添加量的增加,改性蒙脱土中季磷阳离子含量增加、层间距变大、Zeta电位升高、抗菌活性增强;钠基蒙脱土为片状结构,其粒子之间相互缠绕在一起,而改性蒙脱土显示不规则的形状. 对于季磷阳离子含量为23.55wt%的QPC/MMT-3样品,其对*E. coli*和*S. aureus*的MICs分别为1.2和0.1g/L;与细菌接触24h后,1.0g/L样品可杀死

99.9%以上的*E. coli*,0.1g/L样品可杀死所有的*S. aureus*. 此外,QPC/MMT-3还具有较好的耐水性能. 因此,季磷阳离子改性蒙脱土具有稳定性较高、抗菌活性优良的特点,将在抗菌材料及制品中获得广泛应用.

参考文献:

- [1] Ayben T, Semra Ü. *Applied Clay Science*, 2004, **27**(1-2):13-19.
- [2] Tan S Z, Ding L C, Liu Y L, et al. *Chinese Chemical Letters*, 2007, **18**(1): 85-88.
- [3] River-Garza M, Olgufn M T, Garcia-Sosa I, et al. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2000, **39**(3): 431-444.
- [4] Zhang L, Yu J C, Yip H Y, et al. *Langmuir*, 2003, **19**(24): 10372-10380.
- [5] Kwolek T, Hodorowicz M, Stadnicka K, et al. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, **264**(1): 14-19.
- [6] Fan L P, Chen M, Zhang Y G, et al. *Chinese Journal of Chemistry*, 2007, **25**(5): 666-669.
- [7] Saso N, Yamamoto T, Umemura Y, et al. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, **317**(1-3): 309-315.
- [8] Herrera P, Burghardt R C, Phillips T D. *Veterinary Microbiology*, 2000, **74**(3): 259-272.
- [9] 张葵花, 谭绍早, 刘应亮. *硅酸盐学报*, 2006, **34**(1): 87-93.
- [10] 张葵花, 谭绍早, 刘应亮. *化工新型材料*, 2005, **33**(11): 44-47.
- [11] 谭绍早, 张葵花, 李笃信, 等. *中南大学学报(自然科学版)*, 2006, **37**(2): 280-285.
- [12] Tan S Z, Zhang L L, Huang L H, et al. *Journal of the Ceramic of Society of Japan*, 2007, **115**(4): 269-271.
- [13] 谭绍早, 张葵花, 刘应亮. *复合材料学报*, 2006, **23**(3): 82-86.
- [14] Xie W, Gao Z M, Pan W P, et al. *Chemistry of Materials*, 2001, **13**(9): 2979-2990.
- [15] Viva R A, Teukolsky R K, Giannelis E P. *Chemistry of Materials*, 1994, **6**(7): 1017-1022.
- [16] 柯扬船. [美]皮特·斯壮. *聚合物-无机纳米复合材料*. 北京: 化学工业出版社, 2003: 65-76.
- [17] 王艳萍, 赵虎山. *化妆品微生物学*. 北京: 中国轻工业出版社, 2002: 24-27.
- [18] El-Nahhal Y Z, Safi J U. *Applied Clay Science*, 2004, **24**(3-4): 129-136.