

# 氨基酸多金属氧酸盐纳米粒子复合膜的制备及抗菌活性

孔育梅<sup>1</sup>, 彭军<sup>1</sup>, 薛博<sup>1</sup>, 潘丽娜<sup>2</sup>, 辛志峰<sup>1</sup>, 李丽<sup>1</sup>, 陆军<sup>2</sup>

(1. 东北师范大学化学学院, 多酸科学教育部重点实验室;

2. 东北师范大学生命科学院遗传与细胞研究所, 长春 130024)

**摘要** 用水热微乳法制备了 Keggin结构  $(\text{CTA})_{0.2}(\text{HGly})_{2.8}[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$  (1) 纳米粒子 (nano-1), 并通过元素分析, XPS, IR, XRD, TEM 和 CV 进行表征. 利用层层自组装技术, 将已制备的纳米粒子装配成纳米复合膜, 用紫外-可见光谱监测膜的生长, 用电化学方法分析膜的成分. 测定了纳米粒子对致病 *Escherichia coli* (*E. coli*) 的拮抗性, 结果显示, 纳米粒子及其复合膜具有显著的抗菌活性.

**关键词**  $(\text{CTA})_{0.2}(\text{HGly})_{2.8}[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ ; 纳米粒子; 合成; 自组装多层膜; 抗菌活性

**中图分类号** O614

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2006)05-0801-04

近年来, 纳米材料的定向组装和功能开发利用已成为最受关注的焦点之一<sup>[1]</sup>. 经典 Keggin 结构多金属氧酸盐 (POMs) 以其独特的氧化还原性、酸性、抗肿瘤抗病毒活性等优异性能, 在催化、药学、电子和磁性材料等领域具有广阔的应用前景<sup>[2,3]</sup>. 将具有功能活性的 POMs 做成纳米粒子, 定向组装成多层膜, 并对其功能做进一步探究, 有望拓展其应用领域<sup>[4]</sup>.

Keggin 结构  $\text{H}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$  具有微弱的抗菌活性<sup>[5]</sup>. 甘氨酸 (Gly) 和十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 是常见的抗菌剂, 由于甘氨酸易溶于水, 其应用范围受到限制. 引入多酸可形成难溶于水的固体物质<sup>[6]</sup>, 但抗菌活性较差, 在实际应用中容易团聚、难以重复使用和回收<sup>[7]</sup>. 本文合成的钼磷酸-甘氨酸纳米粒子, 不仅溶解性得到了提高, 而且由于多种离子的协同作用, 使其抗菌效果显著, 且可实现固体材料缓慢释放离子和持久抑菌的效果. 尤其是将纳米颗粒组装成薄膜, 不仅依然保持抗菌活性, 而且还能够起到固化粒子、防止纳米粒子团聚、提高药效比的作用.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

甘氨酸 (Gly) 为生化试剂, 其它试剂均为分析纯. 将聚阳离子 PEI ( $M_w = 25\,000$ , Sigma Inc) 溶解在去离子水中配制成摩尔浓度为  $5 \times 10^{-3}$  mol/L 的溶液, 并用稀盐酸调节溶液的 pH 为 7, 石英片从江苏省白塔石英和玻璃器械公司购买. ITO 基片由中国科学院长春光学精密机械研究所提供.

Perkin-Elmer 240C 元素分析仪. ESCALAB 250 型光电子能谱分析仪. Alpha Centauri 型红外光谱仪. Rigaku D/max-B 型 X 射线衍射仪. Hitachi H-7500 型和 JEM-2010 型透射电镜. CRT 756 UV-V 型分光光度计. CH 1660 型电化学综合分析仪, 测试采用常规三电极体系: 以 (nano-1)-CPE (碳糊电极) 或 ITO 电极为工作电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝为对电极. Olympus BH-2 光学显微镜.

### 1.2 纳米粒子的制备

称取一定量的十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB), 加入 100 mL 环己烷和 2 mL 水, 在磁力搅拌下, 用正丁醇滴至透明, 配成微乳液. 量取 1 mL 3 mol/L Gly 溶液 (pH < 1) 和 1 mL 1 mol/L  $\text{H}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$  溶液 (pH < 1) 分别加入到 3 mL 上述制备的微乳液中, 于室温下搅拌 30 min, 将两种液体混合后继续搅拌

收稿日期: 2006-02-23

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 20271001) 资助.

联系人简介: 彭军 (1952 年出生), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事多酸化学研究. E-mail: jpeng@nenu.edu.cn

10 min, 转移到内衬聚四氟乙烯的不锈钢反应釜中, 于 140 °C 加热 12 h, 自然冷却至室温, 产生沉淀, 用无水乙醇和环己烷清洗所得沉淀后, 高速离心分离, 并在室温下干燥, 得纳米粒子 (nano-1).

### 1.3 膜的制作

将石英和 ITO 基片预先分别用甲醇、丙酮和去离子水清洗, 再用  $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$  (体积比为 7:3) 溶液加热处理, 使之成为亲水表面, 用去离子水冲洗, 在氮气保护下干燥. 然后, 通过层接层的方法将 nano-1 与聚乙烯亚胺 (PEI) 组装到石英和 ITO 基片上, 具体制作过程如下: 将处理过的基片浸入  $1 \times 10^{-3}$  mol/L PEI 溶液中 20 min, 取出后用去离子水冲洗, 于氮气保护下干燥. 而后将这种覆有 PEI 的石英基片再浸入到 pH = 4~5 的质量分数为 0.1% 的 nano-1 悬浮液中 20 min, 每次吸附之后, 都要重复水洗和氮气保护的步骤. 重复上述操作  $n$  次即得到  $n$  个双层膜 ( $\{\text{PEI/nano-1}\}_n$ ).

### 1.4 抗菌活性测试

用去离子水配制质量分数为 0.1% 的 nano-1 悬浮液, 备用. 将营养琼脂 (质量分数为 1% 的蛋白胨, 0.5% 的酵母提取物, 1% 的 NaCl, 2% 的琼脂) 于 121 °C 灭菌 20 min, 并制成平板. 将活化好的 *E. coli* 菌悬液接种在营养琼脂平板上, 固定菌落 1 h. 在超净工作台中于平板上放置已灭菌的牛津杯, 在杯中注入已制备的纳米粒子悬浮液, 于 37 °C 下培养 24 h, 用普通照相机拍摄抑菌圈照片. 同时, 从抑菌圈内外分别取出少许样品, 用营养琼脂稀释, 结晶紫染色, 分别在光学显微镜下观察 *E. coli* 的残存量. 膜的抗菌实验采用同样的方法进行.

## 2 结果与讨论

### 2.1 纳米粒子的制备和表征

合成 nano-1 纳米粒子时, 乳液中水对 CTAB 的摩尔比  $n$  不同可能会得到不同形貌的纳米结构材料, 如纳米棒和纳米须等<sup>[8]</sup>. 其中获得纳米棒的较适宜的  $n$  值约为 10~30. 为了得到 nano-1, 加大了  $n$  值, 经多次尝试, 在  $n$  为 100 左右时, 得到了平均直径为 400 nm 的亚微米棒 (smr-1), 而在  $n$  为 200 左右时得到了粒径较小的纳米粒子. 分析结果表明, smr-1 和 nano-1 只是形貌不同.

从图 1 的 XRD 谱图可以看出, nano-1 和非纳米颗粒  $(\text{HGly})_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$  (Gly- $\text{PMo}_{12}$ ) (按文献[6]方法合成) 的衍射峰相似, 但 nano-1 的衍射峰强度变弱且明显宽化, 说明合成产物主体是  $(\text{HGly})_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}] \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , 且为纳米尺度. nano-1 的透射电镜照片见图 2. 结果显示, 粒子呈球状, 粒径分布范围较窄, 平均直径约为 30 nm. 其选区电子衍射 (SAED) 照片呈现晶体的电子衍射图案.

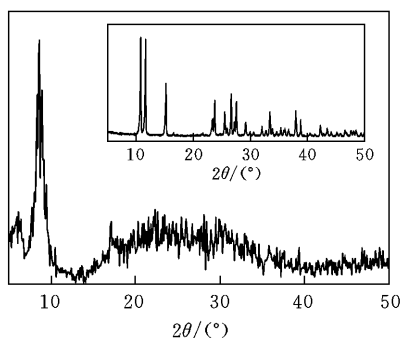


Fig 1 XRD pattern of nano-1 and bulk crystal Gly- $\text{PMo}_{12}$  (the inset pattern)

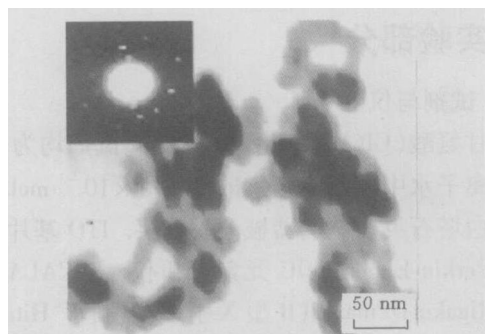


Fig 2 TEM image of nano-1  
Inset is its SAED image

与  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40} \cdot 13\text{H}_2\text{O}$  的红外光谱相比<sup>[9]</sup>, nano-1 的红外光谱 (见图 3) 中杂多阴离子的特征频率基本不变, 说明纳米粒子仍保持 Keggin 杂多阴离子结构<sup>[10]</sup>. 与 Gly- $\text{PMo}_{12}$  的红外光谱比较可以看出,  $1642\text{ cm}^{-1}$  处是羧基  $\text{C}=\text{O}$  的伸缩振动,  $2360\text{ cm}^{-1}$  处是  $\text{N}-\text{H}$  的伸缩振动,  $1063\text{ cm}^{-1}$  处是  $\text{C}-\text{N}$  的伸缩振动,  $2925\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}$ ) 和  $2853\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{s}}$ ) 处的峰尖锐且强度较大, 归属于  $-\text{CH}_2$  的饱和碳氢伸缩振动,  $1467\text{ cm}^{-1}$  处的峰归属于  $-\text{CH}_2$  的弯曲振动, 初步确定 nano-1 中可能含有少量的 CTAB.

纳米粒子表面的 XPS 全谱见图 4, 各元素的相对含量见表 1. 由表 1 可以看出, 碳原子的相对含量较高 (57.84%),  $n_{\text{C}}/n_{\text{N}}$  比值约为 3.1, 比纯甘氨酸理论比值 ( $n_{\text{C}}/n_{\text{N}}=2$ ) 高, 说明除了甘氨酸以外, 还

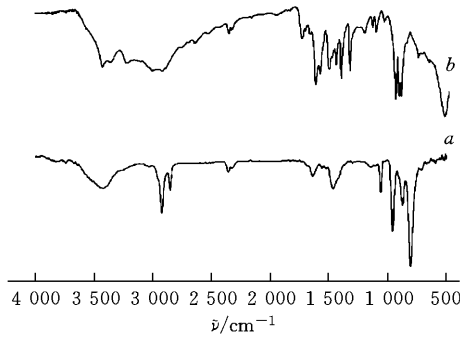


Fig 3 IR spectra of nano-1 (a) and Gly-PMo<sub>12</sub> (b)

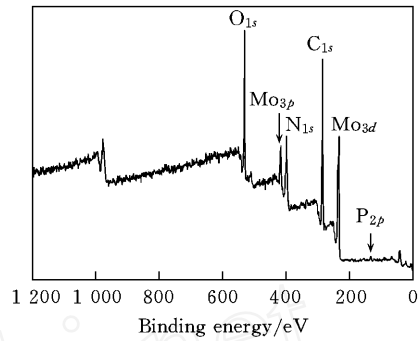


Fig 4 XPS patterns of nano-1

有 CTAB 存在. XPS 能谱未测到溴, 说明 CTAB 是以阳离子的形式与多酸结合的. 进一步的元素分析结果得到 N 和 C 元素的质量分数分别为 1.85% 和 5.01%. 由此可以推算 nano-1 的化学组成为 (CTA)<sub>0.2</sub> (HGly)<sub>2.8</sub> [PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>] · nH<sub>2</sub>O.

Table 1 The elemental content on nano-1 surface

Element	C	Mo	O	P	N
Content (%)	57.84	4.82	18.24	0.46	18.65

2.2 膜的组装和表征

在每一个 {PEI/nano-1} 双层沉积之后, 测定其 UV-V is 光谱<sup>[11]</sup>. 结果表明, 膜的层接层生长是呈线性增长的 (图 5). 图 6 显示了 ITO 电极上制备的多层膜在 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液中的扫速为 100 mV/s 时所得到的循环伏安图, 与插图中相同测试条件下 nano-1 的循环伏安图比较可以发现, 杂多酸盐的循环伏安性质在膜中依然保持.

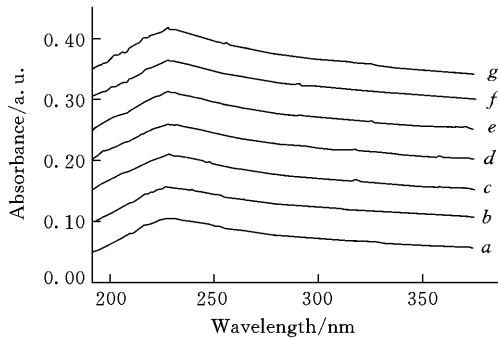


Fig 5 UV-V is spectra of the self-assembled {PEI/nano-1}<sub>n</sub>

a—g: Bilayer 1 to bilayer 7, respectively

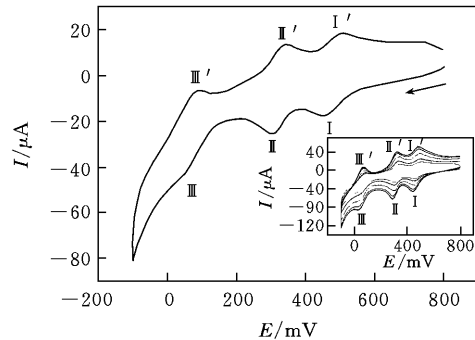


Fig 6 CV curves of {PEI/nano-1}<sub>n</sub> on ITO electrode in 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution at 100 mV/s

Inset is CV curves of (nano-1)-CPE

2.3 抗菌活性

确定一种抗菌药物对抗菌菌株的抗菌敏感性, 可以通过测量抑菌圈的直径 (D) 和单位面积上细菌残存量来确定<sup>[12]</sup>. 在相同条件下测定所合成样品的抗菌活性, 并与 Gly 和 CTAB 对照, 其抗菌环的大小顺序为 H<sub>3</sub> [PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>] · nH<sub>2</sub>O ~ Gly-PMo<sub>12</sub> < Gly < Smr-1 < CTAB < nano-1 (表 2). 比较发现, H<sub>3</sub> [PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>] · nH<sub>2</sub>O 与 Gly 的抗菌活性相当, nano-1 与 CTAB 的抗菌活性相近, 优于前两者. 但 CTAB 的抑菌环在放置之后又有菌落产生, 24 h 之后新的菌环直径可达到 8.7 mm, 说明抗菌的持久性不好. 相比之下, nano-1 的抗菌活性优于其它三者.

另外, Gly-PMo<sub>12</sub> 和 Smr-1 的抗菌活性相近, 但远不如 nano-1. 由此可见, 引起 nano-1 具有显著抗菌活性的主要原因是纳米尺寸效应<sup>[13, 14]</sup>. 我们试图将 Gly-PMo<sub>12</sub>, Smr-1

Table 2 The morphologies and diameters of the antibacterial zone of samples

Sample	Morphology	D/mm
Gly	Macro-scale	6.5
CTAB	Macro-scale	11.4
H <sub>3</sub> [PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> ] · nH <sub>2</sub> O	Macro-scale	6.0
(HGly) <sub>3</sub> [PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> ] · nH <sub>2</sub> O	Macro-scale	6.0
Smr-1	Submicrorods	7.0
Nano-1	Nanoparticles	12.0

和 nano-1 均做成膜, 结果只有纳米粒子可以实现, 原因可能是纳米粒子表面易于吸附电荷, 有利于膜的组装<sup>[11]</sup>. 在原子力显微镜下观察 nano-1 的多层膜表面平坦, 粒子分布较均匀, 膜仍然保持了与纳米粒子相当的抗菌活性. 由于 PEI 在此条件下的抗菌活性不显著, 所以其抗菌活性应该归因于所制备的纳米粒子<sup>[15]</sup>.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Liu Z , Zhang D , Han S *et al.* J. Am. Chem. Soc [J], 2005, **127**: 6 7
- [ 2 ] Kozhevnikov I V. . Chem. Rev. [J], 1998, **98**: 171—198
- [ 3 ] Mizuno N , Misono M. . Chem. Rev. [J], 1998, **98**: 199 217
- [ 4 ] Kang Z , Wang E , Mao B. *et al.* J. Am. Chem. Soc [J], 2005, **127**: 6534 6535
- [ 5 ] Inoue M , Segawa K , Matsunaga S *et al.* J. Inorg Biochem. [J], 2005, **99**: 1023 1031
- [ 6 ] GUO Shu-Rong(郭树荣) , YOU Wan-Sheng(由万胜) , WAN En-Bo(王恩波) *et al.* J. Mol Sci (分子科学学报) [J], 2000, **16**(1): 1 4
- [ 7 ] Alivisatos A. P. . Science[J], 1996, **271**: 933 937
- [ 8 ] HE Xiao-Yan(何晓燕) , CAO Min-Hua(曹敏花) , WU Xing-Long(吴兴隆) *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2005, **26**(6): 1024 1026
- [ 9 ] WANG Rui-Ying(王瑞英) , LU Lang(刘浪) , JIA Dian-Zeng(贾殿赠) *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2004, **25**(12): 2208 2211
- [ 10 ] WANG En-Bo(王恩波) , HU Chang-Wen(胡长文) , XU Lin(许林) . A Concise of Polyoxometalates(多酸化学导论) [M] , Beijing: Chemical Industry Press, 1998: 15—16
- [ 11 ] Xue B. , Peng J , Xin Z F *et al.* J. Mater Chem. [J], 2005, **15**: 4793—4798
- [ 12 ] LU Xue-Feng(刘雪峰) , ZHANG Li(张利) , TU Ming-Jing(涂铭旌) *et al.* The Chinese Journal of Process Engineering(过程工程学报) [J], 2004, **4**(3): 256—260
- [ 13 ] Huang L , Li D. Q. , Lin Y. J. *et al.* J. Inorg Biochem. [J], 2005, **99**: 986—993
- [ 14 ] Cioffi N. , Torsi L , Ditaranto N. *et al.* Chem. Mater [J], 2005, **17**(21): 5255—5262
- [ 15 ] Lin J , Qiu S , Lewis K *et al.* Biotechnol Prog [J], 2002, **18**: 1082—1086

## Preparation and Antibacterial Activity of Amino Acid Polyoxometalate Self-assembled Multilayer Films

KONG Yu-Mei<sup>1</sup> , PENG Jun<sup>1\*</sup> , XUE Bo<sup>1</sup> , PAN Li-Na<sup>2</sup> , XIN Zhi-Feng<sup>1</sup> , LIL<sup>1</sup> , LU Jun<sup>2</sup>

(1. Key laboratory of Polyoxometalate Science of Ministry of Education, Faculty of Chemistry, Northeast Normal University, Changchun, 130024, China;

2. Institute of Genetics and Cytology, College of Life Science, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

**Abstract** (CTA)<sub>0.2</sub> (HGly)<sub>2.8</sub> [PM<sub>12</sub>O<sub>40</sub>] · nH<sub>2</sub>O nanoparticles (nano-1) with an average diameter of 30 nm were prepared by using reverse micelles under mild hydrothermal conditions and characterized by TEM (HRTEM), IR, XRD, XPS and CV. To enhance the application of the nanoparticles, multilayer films of nano-1 and polycation polyethyleneimine (PEI) were prepared by the layer-by-layer (LBL) self-assembled technique. UV-Vis spectroscopy was used to monitor the layer-by-layer assembling process of the films which were also verified by CV. The antibacterial activities of the nanoparticles and the as-prepared multilayer films against *Escherichia coli* (*E. coli*) were investigated. Antibacterial tests indicate that both the nanoparticles and the multilayer films exhibited an efficient antibacterial activity, and the films have more merit.

**Keywords** Polyoxometalate; Nanoparticle; Synthesis; Self-assembled multilayer films; Antibacterial activity (Ed : M, G)