

一种硫离子响应杀菌材料的制备及应用研究

张沪伟^{1,2,3}, 王鹏^{1,3}, 张盾^{1,3}

(1.中国科学院海洋研究所海洋环境腐蚀与生物污损重点实验室, 山东 青岛 266071; 2.中国科学院大学, 北京 100049; 3.中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘要: **目的** 制备硫离子响应杀菌材料, 研究它在不同浓度铜离子条件下的封装效果, 以及在不同浓度硫离子条件下的释放行为。**方法** 选择埃洛石纳米管为载体并用透射电镜进行表征、采用真空负载的方式, 将甲硝唑和苯骞三氮唑(BTA)分步填充到埃洛石纳米管内部, 使用紫外分光光度法测试不同浓度铜离子对纳米管中甲硝唑的封堵效果, 以及材料在不同浓度硫离子条件下的释放情况。**结果** 实验中通过调整铜离子浓度发现, 铜离子浓度越大对甲硝唑的封堵效果越好, 当铜离子浓度达到160 mmol/L时, 对甲硝唑的封堵效果最好。杀菌材料在外界硫离子达到0.1 mmol/L后, 甲硝唑的释放浓度迅速提高, 进一步提高硫离子浓度, 释放情况改变不明显。**结论** 铜离子浓度达到160 mmol/L时, 材料的封装效果是最好的。材料能够对硫离子实现响应释放, 且对应的临界浓度为0.1 mmol/L。

关键词: 埃洛石纳米管; 硫离子响应释放; 络合物膜层; 甲硝唑

DOI: 10.7643/issn.1672-9242.2018.10.011

中图分类号: TG174

文献标识码: A

文章编号: 1672-9242(2018)10-0067-05

Preparation and Research of a Sulfide Ion Responsive Antiseptic Material

ZHANG Hu-wei^{1,2,3}, WANG Peng^{1,3}, ZHANG Dun^{1,3}

(1. Key Laboratory of Marine Environmental Corrosion and Biofouling, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

ABSTRACT: Objective To prepare sulfide ion responsive antiseptic materials and study the effect of its packaging in different concentration of copper ion and the release behavior in different concentration of sulfide ion. **Method** Halloysite nanotubes were chosen as the carrier and characterized by transmission electron microscopy. Under vacuum conditions, metronidazole and benzotriazole (BTA) were loaded into the internal of the halloysite nanotubes in order. The sealing effect of metronidazole in the nanotubes under different concentration of copper ion and the release circumstance of metronidazole under different concentration of sulfide ion was tested with ultraviolet spectrophotometry. **Results** The higher copper ion concentration was, the better sealing effect of metronidazole was. When the copper ion concentration was 160 mmol/L, the sealing effect of metronidazole reached the best; the release concentration of metronidazole increased rapidly after the external concentration of sulfide ion reached 0.1 mmol/L and the release concentration of metronidazole didn't change a lot when the concentration of sulfide ion was further increased. **Conclusion** The best encapsulation conditions of metronidazole in the nanotube were ensured by adjusting the concentration of copper ion to 160 mmol/L. The antiseptic materials can respond to the sulfide ions and the corresponding criti-

收稿日期: 2018-07-13; 修订日期: 2018-08-13

作者简介: 张沪伟(1994—), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要研究方向为硫离子响应杀菌材料的制备与应用。

通讯作者: 张盾(1965—), 女, 辽宁沈阳人, 博士, 研究员, 主要研究方向为海洋腐蚀与防护。

cal concentration is 0.1 mmol/L.

KEY WORDS: halloysite nanotubes; sulfide ion responsive release; complex film; metronidazole

微生物腐蚀是造成海洋环境工程设施加速破坏的重要因素,而硫酸盐还原菌(SRB)是其中一种典型的腐蚀微生物。在海洋钻井平台和输油管线、冷凝水循环系统、污水处理设备和管线等都存在SRB引起的多种材料失效,诸如碳钢、不锈钢、铝合金等^[1-7]。

目前SRB的防治方法主要包括物理法、化学法等,而传统的化学防治法就是将杀菌剂投放到环境中去,这种措施的副作用也很明显,会导致环境生态的破坏,增强细菌的耐药性。后来人们发现通过将杀菌剂包覆到多孔材料中去,可以起到一定的缓释作用,延长材料的使用寿命,但是由于这种缓释是没有针对性的,会对包覆的杀菌剂造成浪费。考虑到这一点,设计一种在SRB存在条件下能够实现响应释放的材料,成为解决问题的关键。响应释放并不是一个新的概念,目前响应释放材料主要包括光响应型、pH响应型等,主要是通过外界条件的改变,刺激功能材料的结构发生变化,从而使得包覆在材料内部的功能分子释放出来。SRB存在的环境中,由于SRB的代谢会特异性地产生硫离子,所以要针对这点来考虑材料的响应释放机理。Lvov^[8]组已证明了溶液体系中不溶性的Cu-BTA络合物膜层在注入氨气后,由于不同类型难溶物之间溶度积的差异,Cu-BTA会被 $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{+2}$ 取代。溶度积越低说明难溶物越稳定,越容易形成,而硫离子与铜离子形成的Cu-S溶度积相较于Cu-BTA也低很多,所以在硫离子存在条件下,Cu-BTA络合物膜层被Cu-S取代破坏掉可以作为一种响应释放机制。在众多的纳米材料中,埃洛石纳米管具有价格优势和资源优势,且常作为包覆材料,用来实现药物、生物活性分子或其他添加剂的缓释或控释^[9-19]。

文中以埃洛石纳米管为载体,采用分步填充的方式将杀菌剂分子(甲硝唑)和BTA填充到埃洛石纳米管中,通过比较不同浓度铜离子溶液对材料的封孔效果,优化了封孔条件。利用甲硝唑与BTA在溶液中的最大紫外吸收峰位置不同,定量地分析在加入硫离子前后甲硝唑的释放情况,进而判断载药系统是否能对硫离子实现响应释放,并测量了材料能够实现响应释放对应的最低硫离子浓度。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

实验所用主要试剂:埃洛石纳米管(南昱矿产品加工厂);甲硝唑(上海麦克林生化科技有限公司);硫化钠(阿拉丁试剂有限公司);乙醇、丙酮、苯腈

三氮唑(BTA)等均购于国药集团;实验用水均为超纯水。

实验所用主要仪器:真空泵(郑州长城科工贸有限公司);低速离心机、高速离心机(湘仪仪器有限公司);紫外-可见分光光度计(日本Hitachi公司);高倍透射电子显微镜(日本电子株式会社)。

1.2 埃洛石的表征以及甲硝唑浓度与吸光度关系的确立

将购买的埃洛石纳米管浸泡在乙醇中,经过超分散等步骤处理后,在透射电镜下观察内部的孔道结构和尺寸。

选用甲硝唑作为杀菌剂分子,用250 mL规格的容量瓶配制质量浓度分别为5、10、15、20、25、30 mg/L的甲硝唑水溶液,测试其吸光度,绘制其浓度与吸光度的标准曲线。

1.3 负载和封装

由于甲硝唑在水中的溶解度较低,为了提高甲硝唑的溶解度,利用潜溶作用,按一定比例配制乙醇和水的混合溶液200 mL,溶解了甲硝唑8 g。配制了160 mmol/L的硫酸铜溶液100 mL,80 g/L的BTA丙酮溶液200 mL。

将3 g的埃洛石纳米管放入甲硝唑的水醇混合溶液中,在真空条件下填充20 min,填充结束后低速离心10 min将上清液倒出。将离心管放入干燥箱中50 °C干燥2 h,干燥结束后取出压成原先的粉末形态。该负载步骤重复两遍,然后将干燥的纳米管放入BTA的丙酮溶液中,处理步骤与甲硝唑的负载过程相同。在干燥的粉末表面滴加一定浓度的硫酸铜溶液,使纳米管端口处形成Cu-BTA络合物膜层,然后在50 °C烘箱中干燥2 h。

1.4 封装条件的优化

为了减少甲硝唑的自流失现象,得到最优的封装条件,配制20、40、80、100、160 mmol/L浓度的铜离子溶液,分别滴加到端口处存在BTA的载药纳米管上进行封孔处理。然后放入50 °C烘箱中干燥2 h,结束后取出粉末碾平,各组称取等质量的粉末放入含有40 mL超纯水的烧杯中,每隔2 h移取适当溶液测试吸光度。

1.5 检测响应释放情况

使用铜离子浓度优化后的溶液对端口处存在BTA载药纳米管进行封孔处理,经过一系列离心干燥步骤后,得到2.5 g载药纳米管。将其放入盛有40 mL

超纯水的烧杯中，每隔 2 h 移取 0.5 mL 的溶液（高速离心取上层清液），用超纯水配成 2 mL 溶液测试其吸光度。在 24 h 时，加入硫化钠使溶液中的硫离子浓度达到 0.4 mmol/L，之后选择适当的时间点移取溶液测试吸光度。

1.6 临界浓度的测量

在确认载药纳米管能在 0.4 mmol/L 硫离子浓度下实现响应释放后，下一步为了测量硫离子响应释放临界浓度，将封孔处理后的载药埃洛石纳米管分成等质量的 6 组，放入含有 40 mL 超纯水的烧杯中，加入不同量的硫化钠溶液，使溶液体系中的硫离子浓度分别为 0、0.01、0.05、0.1、0.5、1 mmol/L。2 h 后移取适当溶液测试其吸光度，之后每隔 2 h 移取适当溶液测试其吸光度。

2 结果与分析

2.1 材料的制备和响应释放原理

以 Cu-BTA 络合物为封堵膜层的硫离子响应释放载药纳米管的制备和控制释放原理如图 1 所示。将埃洛石纳米管置于甲硝唑的水醇溶液中，在真空条件下，将甲硝唑溶液填充到纳米管内，经过离心干燥等步骤的处理，在管内形成甲硝唑粉末。经过同样的负载处理，将 BTA 填充到管内（由于甲硝唑不溶于丙酮，负载 BTA 的过程中甲硝唑基本不会流失）。然后在粉末表面滴加硫酸铜溶液，使其表面形成 Cu-BTA 络合物膜层。当体系中加入一定量的硫离子后，在纳米管端口处的 Cu-BTA 络合物膜被溶解度更小的 Cu-S 等难溶物取代破坏掉，使甲硝唑快速释放到溶液中去。

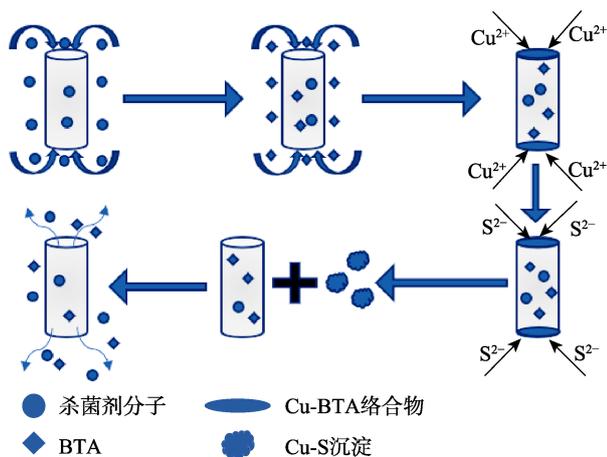


图 1 载药体系分步构建以及在硫离子条件下响应释放原理

2.2 埃洛石的表征和甲硝唑吸光度与浓度标准曲线

如图 2 所示，埃洛石纳米管长度在 500 nm 左右，

其内径平均尺寸约为 16 nm，其他参数如孔容为 0.16 mL/g，埃洛石纳米管较小的内径尺寸有利于 Cu-BTA 膜层在端口处稳定存在。甲硝唑的紫外吸收光谱如图 3 所示，它的最大紫外吸收峰在 320 nm 处。以此为依据，配制不同浓度的甲硝唑溶液，测试其在 320 nm 处的紫外吸收峰。绘制了甲硝唑浓度与吸光度的标准曲线，如图 4 所示。结果表明，甲硝唑浓度与吸光度存在较好的线性关系，进一步拟合得到了标准曲线方程： $A=0.051C-0.0260$ ， $R^2=0.99973$ （ A 代表吸光度， C 代表浓度）。

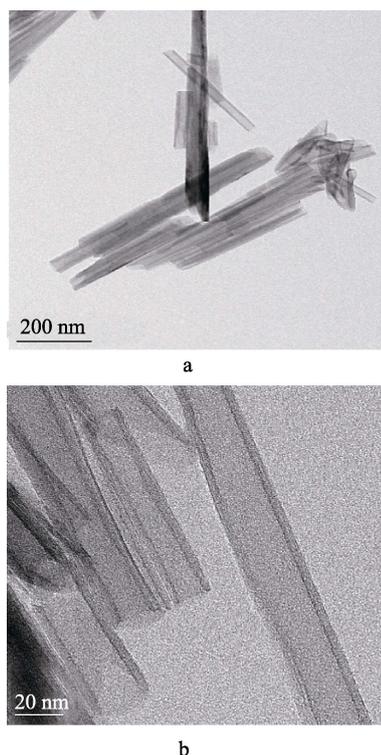


图 2 埃洛石纳米管的透射电镜表征

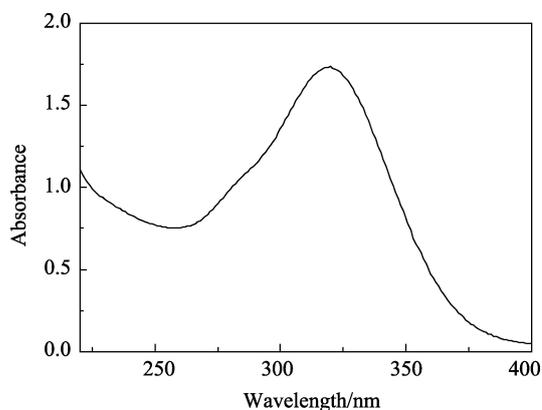


图 3 甲硝唑的紫外吸收光谱

2.3 封装条件的优化

不同铜离子浓度处理下待测液中甲硝唑的释放浓度随时间的变化情况如图 5 所示。随着铜离子浓度

的升高, Cu-BTA 络合物膜层对载药纳米管的封堵效果越来越好。当铜离子浓度达到 160 mmol/L 时, Cu-BTA 络合物膜层对载药纳米管的封堵效果最好, 甲硝唑的自流失现象也最少。在后续的实验, 也验证了继续增大铜离子浓度不会进一步提升封孔效果。

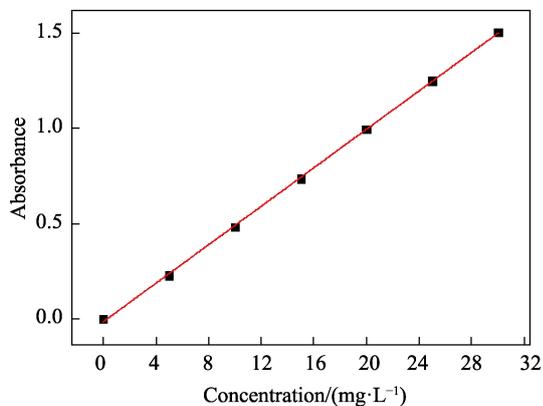


图 4 甲硝唑浓度-吸光度的标准曲线

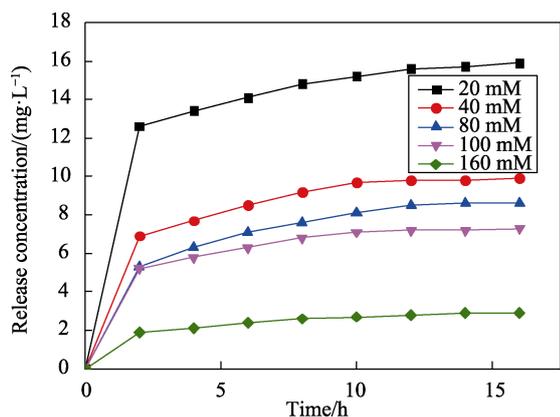


图 5 不同铜离子浓度处理下待测液中甲硝唑的释放浓度随时间的变化曲线

2.4 载药纳米管在硫离子条件下的响应释放

载药体系中的甲硝唑在加入硫离子前后的释放浓度随时间的变化情况如图 6 所示。当体系中的硫离

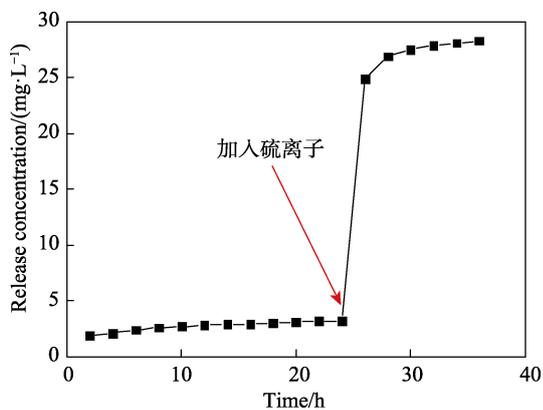


图 6 载药体系中的甲硝唑在加入硫离子前后的释放浓度随时间的变化曲线

子浓度达到 0.4 mmol/L 后, 载药纳米管内的甲硝唑的释放浓度明显提高, 之后的释放速率逐渐减缓。这时可以判断 Cu-BTA-甲硝唑载药纳米管能够实现对应硫离子的响应释放。

2.5 硫离子响应释放临界浓度

载药体系中的甲硝唑在加入不同浓度硫离子后的释放浓度随时间的变化情况如图 7 所示。当溶液中的硫离子的浓度为 0.01、0.05 mmol/L 时, 其释放情况与未加入硫离子的实验组相比没有明显的变化。当溶液中的硫离子浓度达到 0.1 mmol/L 时, 甲硝唑的释放浓度明显提高。进一步提高硫离子浓度后, 效果一致。因此可以初步确认 0.1 mmol/L 是 Cu-BTA-甲硝唑载药纳米管在溶液中实现响应释放对应的硫离子的临界浓度。

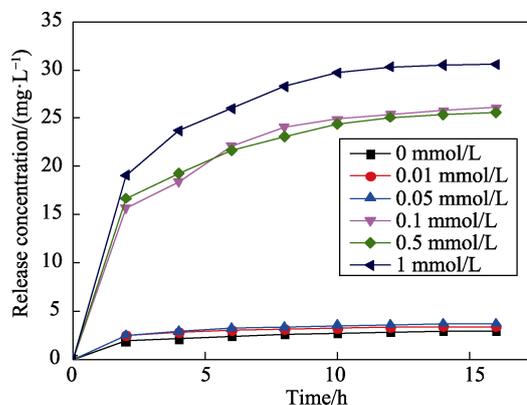


图 7 载药体系中的甲硝唑在加入不同浓度硫离子后的释放浓度随时间的变化曲线

3 结论

该研究以埃洛石纳米管为载体, 甲硝唑作为杀菌剂, Cu-BTA 络合物作为封孔剂, 制备了一种响应释放杀菌材料。该材料基于 Cu-BTA 络合物膜与 Cu-S 难溶物间溶度积差异的原理, 实现了对环境中硫离子的响应释放。研究证明, 在一定范围内, 铜离子浓度越大, Cu-BTA 络合物膜层对甲硝唑的封堵作用越好, 最优条件是 160 mmol/L。同时, 通过比较加入硫离子前后甲硝唑的释放情况, 验证了材料能够在一定浓度的硫离子条件下实现响应释放, 硫离子响应释放的临界浓度为 0.1 mmol/L。该材料的开发可为海洋环境硫酸盐还原菌腐蚀防护提供新的途径。

参考文献:

[1] LIU H, WANG M, HUANG Z, et al. Study on Biological Control of Microbiologically Induced Corrosion of Carbon Steel[J]. Materials and Corrosion, 2004, 55(5): 387-391.

- [2] SUN C, HAN E. Effects of SRB on Corrosion of Q235 Steel during Vaporation of Water in Soil[J]. Journal-Chinese Society for Corrosion and Protection, 2005, 25(5): 307.
- [3] LIU J, XU L M, ZHENG J S. A Study on Corrosion Behavior under the Biofilm of Sulfate-reducing Bacteria on Cu-Zn Alloy[J]. Journal-Chinese Society for Corrosion and Protection, 2001, 21(6): 345-348.
- [4] XU C M, ZHANG Y H, CHENG G X, et al. Investigation of Sulfate-reducing Bacteria on Pitting of 316L Stainless Steel in Cooling Water System for Oil Refinery [J]. Journal-Chinese Society for Corrosion and Protection, 2007, 27(1): 48-53.
- [5] SUN C, HAN E H. Effect of SRB on Corrosion of 1Cr18-Ni9Ti Stainless Steel in Soil of Cl⁻[J]. Journal-Chinese Society for Corrosion and Protection, 2003, 23(1): 46-51.
- [6] LIN J, YAN Y G, CHEN G Z, et al. Application of Atomic Force Microscopy in Study of Sulfate-reducing Bacteria to A3 Steel[J]. Journal-Chinese Society for Corrosion and Protection, 2007, 27(2): 70-73.
- [7] DONG Z H, GUO X P, LIU H F, et al. Study on Electrochemistry Characteristics in MIC by Wire Beam Electrode[J]. Journal-Chinese Society for Corrosion and Protection, 2002, 20(1): 48-53.
- [8] LVOV Y M, SHCHUKIN D G, MOHWALD H, et al. Halloysite Clay Nanotubes for Controlled Release of Protective Agents[J]. ACS nano, 2008, 2(5): 814-820.
- [9] DU M, GUO B, JIA D. Newly Emerging Applications of Halloysite Nanotubes: A Review[J]. Polymer International, 2010, 59(5): 574-582.
- [10] LECOUVET B. Natural Mineral Nanotubes[M]. Oakville, Canada: Apple Academic Press, 2015: 383-406.
- [11] LVOV Y M, PRICE R R. Halloysite Nanotubules, a Novel Substrate for the Controlled Delivery of Bioactive Molecules[J]. Bio-inorganic hybrid Nanomaterials: Strategies, Syntheses, Characterization and Applications, 2008, 12(12): 419-441.
- [12] SMITH A W. Biofilms and Antibiotic Therapy: Is There a Role for Combating Bacterial Resistance by the Use of Novel Drug Delivery Systems[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2005, 57(10): 1539-1550.
- [13] KELLY H M, DEASY P B, ZIACA E, et al. Formulation and Preliminary in Vivo Dog Studies of a Novel Drug Delivery System for the Treatment of Periodontitis[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2004, 274(1-2): 167-183.
- [14] LEVIS S R, DEASY P B. Use of Coated Microtubular Halloysite for the Sustained Release of Diltiazem Hydrochloride and Propranolol Hydrochloride[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2003, 253(1-2): 145-157.
- [15] SHCHUKIN D G, SUKHORUKOV G B, PRICE R R, et al. Halloysite Nanotubes as Biomimetic Nanoreactors[J]. Small, 2005, 1(5): 510-513.
- [16] DU M, GUO B, JIA D. Newly Emerging Applications of Halloysite Nanotubes: A Review[J]. Polymer International, 2010, 59(5): 574-582.
- [17] VEERABADRAN N G, MONGAYT D, TORCHILIN V, et al. Organized Shells on Clay Nanotubes for Controlled Release of Macromolecules[J]. Macromolecular Rapid Communications, 2009, 30(2): 99-103.
- [18] WU Y, YANG Y, LIU H, et al. Long-term Antibacterial Protected Cotton Fabric Coating by Controlled Release of Chlorhexidine Gluconate from Halloysite Nanotubes[J]. Rsc Advances, 2017, 31(7): 18917-18925.
- [19] ABDULLAYEV E, LVOV Y. Halloysite Clay Nanotubes as a Ceramic "Skeleton" for Functional Biopolymer Composites with Sustained Drug Release[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2013(1): 2894-2903.