

新型多季铵盐类抗菌剂的合成 及其抗菌活性研究

陈富群, 周俏婷, 王伟, 林璟*, 郑成, 陈少东, 陈春燕

(广州大学化学化工学院, 广东 广州 510006)

摘要:以4,4'-二氨基二苯甲烷四缩水甘油胺为原料,通过两步法合成制备了一系列不同季铵化度(20%、40%、60%、80%、100%)的多季铵盐抗菌剂,利用红外、核磁共振氢谱对其进行分析和表征,并测定其临界胶束浓度(CMC)、临界表面张力(γ_{CMC})、最小抑菌浓度(MIC)、最小杀菌浓度(MBC)等。研究表明,随着季铵化度的增大,临界胶束浓度和临界表面张力减小,抗菌性增强,且都优于常规型抗菌剂十二烷基二甲基苄基氯化铵。季铵化度为100%的多季铵盐B-100的CMC为10.22 g/L, γ_{CMC} 为29.46 mN/m,对金色葡萄球菌的MIC为7.813 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对大肠杆菌的MIC为15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对金色葡萄球菌的MBC为15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对大肠杆菌的MBC为31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。该抗菌剂可应用于织物、地板、卫生间、家电、汽车等抗菌装饰材料。

关键词:季铵盐;抗菌剂;表面活性

中图分类号:TQ455.4+9

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2016)12-0078-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2016.12.019

Synthesis of novel multi-quaternary ammonium salts as antibacterial agent and its antibacterial activities

CHEN Fu-qun, ZHOU Qiao-ting, WANG Wei, LIN Jing*, ZHENG Cheng,
CHEN Shao-dong, CHEN Chun-yan

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, Guangdong)

Abstract: A series of antibacterial quaternary ammonium salts with different quaternization degree (20%, 40%, 60%, 80%, 100%) are prepared by two-step synthesis method using 4,4'-diaminodiphenylmethane tetraglycidylamine as raw material. Their structures are characterized by Fourier transform infrared spectrometer and ^1H nuclear magnetic resonance ($^1\text{H NMR}$). Surface activities in aqueous solution are evaluated by determining their critical aggregation concentration (CMC) and the corresponding surface tensions (γ_{CMC}). Antimicrobial activities are also evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The results show that increasing the degree of quaternization leads to the decrease of both critical micelle concentration and the critical surface tension, but the increase of antibacterial activity. Moreover, the antibacterial activity of all the antibacterial quaternary ammonium salts in this study is better than the conventional antibacterial agent (dodecyldimethylbenzylammonium chloride). The CMC and γ_{CMC} of polyquaternium B-100 with the quaternization degree of 100% are 10.22 g/L and 29.46 mN/m, respectively. B-100 also has best antibacterial activity against *S. Aureus* and *E. Coli*. MIC and MBC for *S. Aureus* is 7.813 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. MIC and MBC for *E. Coli* is 15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

Key words: quaternary ammonium salts; antibacterial agent; surface activity

人们在日常生活中不可避免地接触到各种各样的微生物,由于纺织品、家具用品等材料表面具有一定的粗糙度,细菌更容易附着在其上,致使病菌传递至皮肤表面,致病菌大量繁殖并通过皮肤、呼吸道、消化道以及血液对人体健康造成极大的危害。材料的抗菌处理是有效防止各种细菌生长繁殖、杀死细菌和防止细菌传播感染的重要手段^[1-5]。常规型季铵盐类抗菌剂由于成本低而成为主导产品,但由于其分子质量较小具有一定的生理毒性且对细菌有一

定的耐药性。为此,高效、毒性小、环境友好型的新抗菌材料是未来的研究方向^[6-12]。

笔者从分子结构设计出发,以4,4'-二氨基二苯甲烷四缩水甘油胺为原料,通过合成工艺调控及两步法得到系列不同季铵化度的多季铵盐抗菌剂。利用红外和核磁对其结构进行了表征,测定抗菌剂的水溶液性质,研究并分析了季铵化度对临界胶束浓度和临界表面张力的影响。并通过测试MIC和MBC研究季铵化度对抗菌性能的影响。

收稿日期:2016-08-19

基金项目:国家自然科学基金(21303026);广东省自然科学基金(2015A030313506);广东省科技计划项目(2014A010105052);广州市科技计划项目(201510010131);广州市南沙区科技计划项目(2015KF001)

作者简介:陈富群(1998-),女,本科生,研究方向为抗菌剂的研究开发,469021047@qq.com;林璟(1981-),男,博士,副教授,研究方向为高分子材料,通讯联系人,linjin00112043@126.com。

1 实验部分

1.1 实验原料

4,4'-二氨基二苯甲烷四缩水甘油胺 (AG80), 环氧值为 0.8 mol/100 g, 湖南岳阳石化有限公司生产; 二乙醇胺, AR, 上海南翔试剂有限公司生产; 氯化苄, AR, 常州海润化工有限公司生产; 十二烷基二甲基苄基氯化铵 1227, 上海楚星化工有限公司生产; 乙二醇单丁醚, AR, 天津市大茂化学试剂厂生产; 无水乙醇, AR, 国药集团化学试剂有限公司生产; 二甲基甲酰胺, AR, 天津市致远化学试剂有限公司生产; 石油醚, AR, 天津市大茂化学试剂厂生产; 无水乙醇, AR, 天津市大茂化学试剂厂生产; 盐酸, AR, 广州市东红化学厂生产; 铁氰化钾, AR, 天津市大茂化学试剂厂生产; 溴酚蓝, AR, 天津百世化工有限公司生产; 氯化钠, AR, 天津市大茂化学试剂厂生产; MHB 培养液, BR, 北京奥博星生物技术有限责

任公司生产; 营养肉汤, BR, 广东环凯微生物科技有限公司生产; TTC 营养琼脂, BR, 广东环凯微生物科技有限公司生产。

1.2 实验步骤

1.2.1 改性 4,4'-二氨基二苯甲烷四缩水甘油胺的制备

在装有恒压滴液漏斗、蛇形冷凝管、磁力搅拌和温度计的平底三口烧瓶中加入溶解于 0.2 mol 乙二醇单丁醚的 4,4'-二氨基二苯甲烷四缩水甘油胺 (0.2 mol), 油浴加热到 80℃, 搅拌速度为 500 r/min, 在 2 h 内滴加溶解在 0.2 mol 乙二醇单丁醚里的二乙醇胺 (0.8 mol), 保温 3 h 进行第 1 步完全开环反应后即得改性 4,4'-二氨基二苯甲烷四缩水甘油胺粗产物, 环氧值的测定参见文献 [13]。将得到的粗产物进行减压蒸馏去除溶剂, 重结晶提纯得到改性 4,4'-二氨基二苯甲烷四缩水甘油胺 (简称改性 AG80), 如图 1 所示。

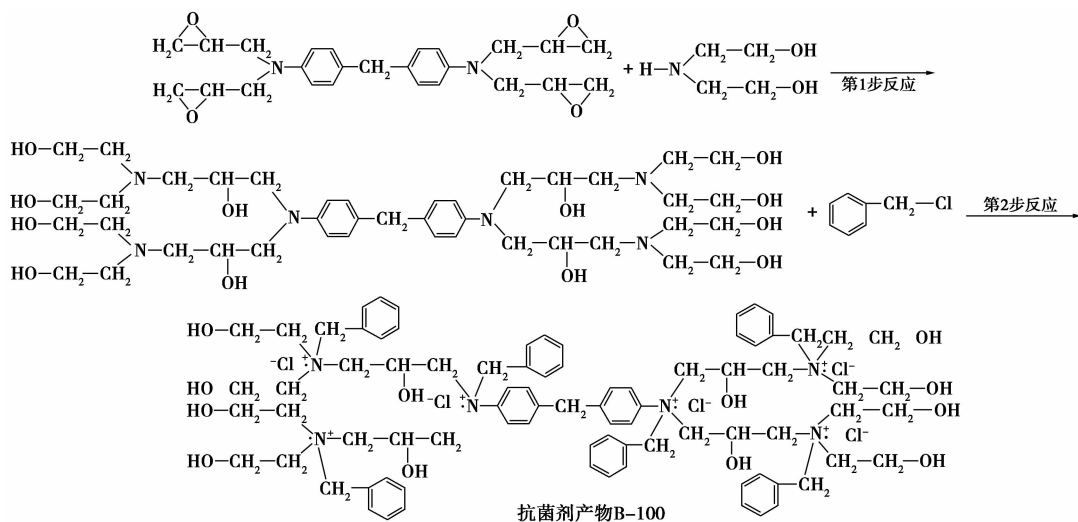


图 1 多季铵盐抗菌剂合成示意图

1.2.2 不同季铵化度的多季铵盐抗菌剂的制备

在相等于步骤 1 的实验装置中, 通过调控反应物组分比调节季铵化反应程度进行第 2 步反应。将 AG80 和一定摩尔比的氯化苄充分溶解于二甲基甲酰胺 (质量分数为 50%) 加入三口烧瓶中, 在温度 (90℃) 和时间 (12 h) 一定的情况下, 调整反应原料氯化苄与改性 AG80 中 N 原子的摩尔比分别为 0.22:1、0.45:1、0.68:1、0.92:1、1.2:1 得到不同季铵化度的多季铵盐抗菌剂产品 B-20 (20% 季铵化度)、B-40 (40% 季铵化度)、B-60 (60% 季铵化度)、B-80 (80% 季铵化度)、B-100 (100% 季铵化度), 季铵化度的测定参见文献 [14]。

1.3 测试表征

改性 AG80 与一系列不同季铵化度多季铵盐抗菌剂的分子结构通过傅里叶红外光谱 (德国 Bruker Vector 33)、核磁共振氢谱 (德国 Bruker Avance DRX-400 NMR) 等进行表征; 抗菌剂的临界胶束浓度 (CMC) 利用界面张力仪 (德国 KRUSS 全自动表面张力仪 K100) 进行测试; 抗菌性能分别通过比浊法与均匀涂布法对多季铵盐进行最小抑菌浓度 (MIC)、最小杀菌浓度 (MBC) 测定, 所用菌种为金色葡萄球菌 (*S. aureus*) 和大肠埃希杆菌 (*E. coli*), 菌液浓度为 5×10^6 CFU/mL; MIC 和 MBC 按照国际标准 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility

Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Seventh Edition (ISBN 1-56238-587-9) 进行测试;季铵盐的定性通过配制 0.003 g/mL 的铁氰化钾溶液进行化学滴定。

2 结果与讨论

2.1 反应条件对产物的季铵化度的影响分析

反应温度、反应时间和反应摩尔比对第 2 步反应生成产物季铵化度的影响分别如图 2 和表 1 所示。

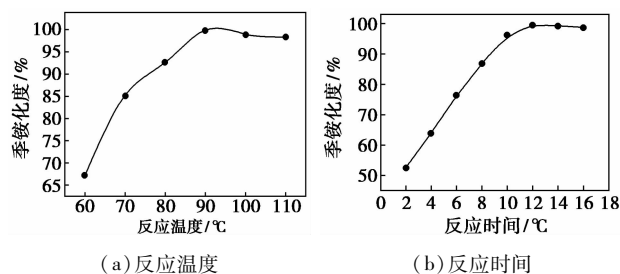


图 2 反应条件对产物的季铵化度的影响

表 1 反应摩尔比对季铵化度的影响

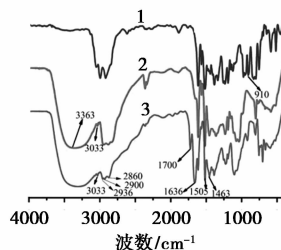
氯化苄与改性 AG80 中 N 原子的摩尔比	0.22:1	0.45:1	0.68:1	0.92:1	1.20:1
抗菌剂的季铵化度 / %	20	40	60	80	100

氯化苄与改性 AG80 中 N 原子的摩尔比为 1:1,反应时间为 12 h 的条件下,反应温度对产物季铵化度的影响如图 2(a)所示。结果表明:反应温度升高加速反应活化分子的碰撞,增大其反应速率,从而提高叔胺的转化率,相应增大产物季铵化度。反应温度为 60°C 时,产物季铵化度只有 67.2%;反应温度为 90°C 时,产物季铵化度升高至 99.8%;当反应温度为 110°C 时,产物季铵化度反而下降至 98.3%,其原因是由于多季铵盐产物在长时间处于高温条件下会部分分解,导致季铵化度的下降,因此最佳反应温度为 90°C。在氯化苄与改性 AG80 中 N 原子的摩尔比为 1:1,反应温度为 90°C 的条件下,反应时间对产物季铵化度的影响如图 2(b)所示,结果表明:反应初期反应速率较大,反应 2 h 后,产物季铵化度达到 52.4%,随着时间的增加,反应速率变得缓慢,反应 12 h 后,产物季铵化度达到 99.8%,再增加反应时间,季铵化度增加缓慢,其原因是反应初期由于大量的叔胺反应活性点可与氯化苄有效碰撞,随着季铵化度的增加,叔胺反应活性点减少,可与氯化苄有效碰撞反应的几率减少,为此,反应速率

减缓。在反应时间为 12 h,反应温度为 90°C 的条件下,反应原料摩尔比对产物季铵化度的影响如图 2(c)所示,分别调控氯化苄与改性 AG80 中 N 原子的摩尔配比为 0.22:1、0.45:1、0.68:1、0.92:1、1.2:1 的反应体系,得到产物季铵化度分别为 20%、40%、60%、80%、100%。结果表明:增大氯化苄与改性 AG80 中 N 原子的反应摩尔比可提高产物季铵化度,通过调控反应摩尔比可实现产物季铵化度的精确控制。

2.2 抗菌季铵盐产物的表征

B-100 与 AG80、改性 AG80 的红外光谱如图 3 所示。



1—AG80;2—改性 AG80;3—B-100

图 3 B-100 与 AG80、改性 AG80 的红外光谱图

由图 3 可以看出,改性 AG80 在 3363 cm^{-1} 处出现—OH 振动吸收峰,且 AG80 中 910 cm^{-1} 处的环氧基特征吸收峰在改性 AG80 中消失了,说明 AG80 与二乙醇胺成功开环反应完全。 3033 cm^{-1} 为苯环上 C—H 伸缩振动吸收峰, 2936 cm^{-1} 为—CH₂ 的反对称伸缩振动吸收峰, 2900 cm^{-1} 为—CH 的对称伸缩振动吸收峰, 2860 cm^{-1} 为—CH₂ 的对称伸缩振动吸收峰, 1636 、 1505 、 1463 cm^{-1} 为苯环的骨架特征吸收峰。此外,100% 季铵度的季铵盐 B-100 在 1700 cm^{-1} 左右出现明显的季铵盐吸收峰。以上说明通过 AG80 为原料经过二步改性成功得到季铵盐产物。B-100 抗菌剂的 ¹H 核磁谱图如图 4 所示。由图 4 可以看出,在 $\delta = 2.37\text{ ppm}$ 处为连接伯醇羟基上的氢(—CH₂CH₂OH), $\delta = 2.58\text{ ppm}$ 处为连接 N 原子上亚甲基上的氢(N—CH₂CH₂OH)和仲醇羟

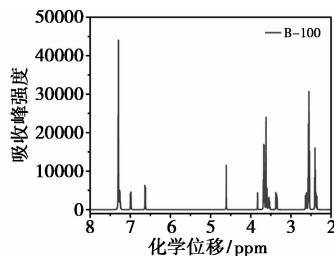


图 4 B-100 抗菌剂的 ¹H 核磁谱图

基上的氢($\text{CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH(OH)}$), $\delta = 3.35$ ppm 处为连接 N 原子上亚甲基上的氢($\text{C}_6\text{H}_5\text{-N-CH}_2\text{-CH(OH)}$), $\delta = 3.63$ ppm 处为连接羟基上的氢($\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), $\delta = 3.82$ ppm 处为叔碳基上的氢($\text{N-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-N}$), $\delta = 4.61$ ppm 处为苄基中亚甲基上的氢($\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$), δ 为 6.64、 $\delta 7.01$ ppm 和 $\delta 7.29$ ppm 3 处为苯环上的氢。

2.3 不同季铵化度季铵盐溶液的性质分析

多季铵盐抗菌剂溶液的表面张力与质量浓度的变化关系如图 5 所示。由图 5 可以看出,随着质量浓度的增加其表面张力减小。由图得到的临界胶束浓度和临界表面张力如表 2 所示。由表 2 可以看出,随着季铵化度的增加,其所得季铵盐溶液的 CMC 值减小, γ_{CMC} 也相应减小,说明增大季铵化度更加有效地增加多季铵盐抗菌剂的表面活性,在溶液中更易形成胶束和更易吸附在气/液界面,从而显著降低其表面张力,有助于实现其在材料表面的润湿铺展。

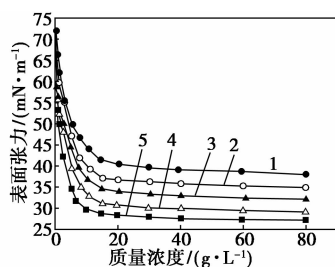


图 5 多季铵盐抗菌剂溶液的表面张力

表 2 多季铵盐抗菌剂的溶液性质

抗菌剂	季铵化度/%	CMC/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\gamma_{\text{CMC}}/(\text{mN}\cdot\text{m}^{-1})$
B-20	20	16.43	40.78
B-40	40	15.13	37.04
B-60	60	13.89	34.68
B-80	80	12.93	31.70
B-100	100	10.22	29.46

2.4 不同季铵化度季铵盐的抗菌性分析

1227、B-20、B-40、B-60、B-80 和 B-100 对金色葡萄球菌和大肠杆菌季铵化度对 MIC 和 MBC 的测定值如表 3 所示。研究结果表明,随着季铵化度的增大,MIC 和 MBC 的值减小,说明随着季铵化度的增大,所得抗菌剂的抗菌能力增强。且 B-100 的抗菌性能最好,多季铵盐抗菌剂对金色葡萄球菌的杀菌效果略好于大肠杆菌。其原因是随着季铵化度的增大,抗菌剂所带的正电荷增加,且有效的抗菌基团增多,又由于前面所述表面张力更低,在容易接触微生物细胞表面,破坏细胞膜,使得蛋白质变性或破坏细胞结构,使得更多的细胞死亡,体现出杀菌性更强^[15-16]。

表 3 1227、B-20、B-40、B-60、B-80、和 B-100 对金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 测定值 $\mu\text{g}/\text{mL}$

抗菌剂	金黄色葡萄球菌		大肠杆菌	
	MIC	MBC	MIC	MBC
1227	1000	1000	1000	1000
B-20	500	500	500	500
B-40	125	250	250	250
B-60	62.5	125	125	125
B-80	31.25	62.5	31.25	62.5
B-100	7.813	15.625	15.625	31.25

3 结论

以 4,4'-二氨基二苯甲烷四缩水甘油胺为原料,通过对合成工艺条件的影响分析和调控,采用两步法得到系列不同季铵化度的多季铵盐抗菌剂。并利用红外和核磁对其结构进行表征,研究分析了抗菌剂的水溶液性质和其季铵化度对临界胶束浓度和临界表面张力的影响规律。随着季铵化度的增大,临界胶束浓度和临界表面张力减小,季铵化度为 100% 的多季铵盐 B-100 的 CMC 为 10.22 g/L , γ_{CMC} 为 29.46 mN/m 。MIC 和 MBC 测试结果表明:随着季铵化度的增大,抗菌剂的 MIC 和 MBC 的值减小,对金色葡萄球菌的杀菌效果略好于大肠杆菌,所有抗菌剂的抗菌性能优于市面上的抗菌剂(十二烷基二甲基苄基氯化铵),且季铵化度为 100% 的 B-100 表现出最好的抗菌性能,其对金色葡萄球菌的 MIC 和 MBC 低于其对大肠杆菌的 MIC 和 MBC。B-100 对金色葡萄球菌的 MIC 为 $7.813 \mu\text{g}/\text{mL}$,对大肠杆菌的 MIC 为 $15.625 \mu\text{g}/\text{mL}$,对金色葡萄球菌的 MBC 为 $15.625 \mu\text{g}/\text{mL}$,对大肠杆菌的 MBC 为 $31.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

参考文献

- [1] 司孟华,张继军.人造功能大理石环境净化和抗菌性能的研究[J].现代化工,2014,30(6):54-56.
- [2] 张文涛,张庆华,张庆华,等.季铵盐修饰有机硅改性聚氨酯的制备与杀菌性能[J].化工新型材料,2012,(40):116-119.
- [3] 张葵花,林松柏,谭绍早.有机抗菌剂及发展趋势[J].涂料工业,2005,(35):45-49.
- [4] 陈仕国,郭玉娟,陈少军,等.纺织品抗菌整理剂研究进展[J].材料导报,2012,(26):89-94.
- [5] 李晓林,成晓莉,李琳,等.N-羟甲基丙烯酰胺在棉织物抗菌整理中的应用[J].材料导报,2015,(29):23-27.
- [6] Massi L, Guittard F, Gèribaldi S, et al. Antimicrobial properties of highly fluorinated bis-ammonium salts[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2003, 21(1): 20-26.
- [7] Lionel Massi, Fre'de'ric Guittard, Richard Levy, et al. Preparation and antimicrobial behaviour of gemini fluorosurfactants[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2003, 38: 519-523.

(下转第 83 页)

50 min,得到棕榈酸钠,待用。

1.3 硫酸钡的表面改性

向烧杯中加入固液比 1:6 的硫酸钡悬浊液,固定在一定温度的恒温槽中,在一定的转速下进行搅拌,加入一定量的改性剂并搅拌 50 min,趁热过滤硫酸钡悬浮液,干燥,研磨,筛分得到改性产品。

1.4 产品性能测定

1.4.1 活化度测定方法

向 250 mL 梨形漏斗中加入 200 mL 水,加入 5.00 g 产品(精确至 0.01 g),缓慢振荡 1 min 后,放在漏斗架上静置约 20 min,待溶液固液明显分层后,将下沉的产品粉末从梨形漏斗下端放出,放入预先干燥且已知质量的砂芯漏斗中进行抽滤,干燥,放入干燥器至恒温后,反复称重至恒重(2 次差值不大于 0.003 g)。

活化度表达式为:

$$x = [1 - (m_2 - m_1) / m] \times 100\%$$

式中: x 为所得产品的活化度,%; m_2 为烘干后砂芯漏斗和改性产品的质量,g; m_1 为砂芯漏斗质量,g; m 为硫酸钡产品质量,g。

利用 PN-48B 白度仪对产品的白度进行测定;利用 OCA30 型视频接触角测量仪测定产品的疏水角;利用 LS-POP(6)激光粒度分析仪对硫酸钡颗粒的粒度分布进行定量分析;利用 Vector-22 傅里叶红外光谱仪对产品化学组成进行初步分析。

2 结果分析与讨论

影响硫酸钡改性的因素包括改性剂的质量分数、改性时间和改性温度等。根据单因素实验的探究结果,选取适当的条件进行正交试验,探讨棕榈酸的质量分数(A)、反应时间(B)、反应温度(C)和搅

拌速度(D) 4 个因素对产品改性效果的影响,结果如表 1 所示。

表 1 棕榈酸改性正交分析

序号	棕榈酸质量分数/%	反应温度/℃	反应时间/min	搅拌速度/(r·min ⁻¹)	白度/%	活化度/%
1	1.5	60	40	300	96.8	99.80
2	1.5	70	60	400	96.7	99.89
3	1.5	80	80	500	96.5	99.89
4	1.0	60	60	500	96.5	96.28
5	1.0	70	80	300	96.5	95.29
6	1.0	80	40	400	96.2	95.21
7	0.5	60	80	400	96.8	93.91
8	0.5	70	40	500	96.7	93.67
9	0.5	80	60	300	96.3	93.78
K_I	299.71	290.12	288.81	289		
K_{II}	286.78	288.85	289.95	289.01		
K_{III}	281.36	288.88	289.09	289.84		
k_1	99.90	96.71	96.27	96.33		
k_2	95.59	96.28	96.65	96.34		
k_3	93.79	96.29	96.36	96.61		
R	6.11	0.43	0.38	0.28		

由正交实验极差分析结果可知,影响硫酸钡表面改性效果的因素大小顺序依次为:棕榈酸质量分数>反应温度>反应时间>搅拌速度。本实验中,活化度为首要考察因子,正交实验所得最优组合为 A1B1C2D3,即棕榈酸质量分数为 1.5%,反应温度为 60℃,反应时间为 60 min,搅拌速度为 500 r/min。按正交实验所确定的最佳条件进行实验,改性后硫酸钡的活化度为 99.90%。而当单一棕榈酸钠时质量分数为 2.5%,反应温度为 75℃,其产品的活化度为 99.6%,因此,采用棕榈酸钠改性,反应温度和质量分数有所下降,达到了节能、环保的目的。

(上接第 81 页)

- [8] 吴萌,陈雁南,孙立田,等.一种合成季铵盐阳离子瓜尔胶的新方法[J].现代化工,2014,34(7):113-115.
- [9] 贾卫红,饶小平,宋湛谦,等.松香基季铵盐 Gemini 表面活性剂的合成及性能研究[J].现代化工,2008,(28):390-392.
- [10] 朱文杰,张谨,朱忠其,等.改性季铵盐抗菌剂的制备及性能研究[J].功能材料,2005,(36):1872-1874.
- [11] 林松,杨荆泉,田涛,等.高分子季铵盐抗菌材料研究进展[J].高分子通报,2012,(05):55-60.
- [12] 周盛全,辛梅华,李明春,等.新型壳聚糖季铵盐抗菌剂的合成及其性能[J].化工进展,2012,(31):1801-1805.
- [13] Jing Lin, Xu Wu, Cheng Zheng, et al. Synthesis and properties of epoxy-polyurethane/silica nanocomposites by a novel sol method and in-situ solution polymerization route[J]. Applied Surface Sci-

ence, 2014, 303: 67-75.

- [14] Peng Zhao-Xiang, Wang Ling, Du Lin, et al. Adjustment of the antibacterial activity and biocompatibility of hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan by varying the degree of substitution of quaternary ammonium[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81: 275-283.
- [15] Hironobu Murata, Richard R Koepsel, Krzysztof Matyjaszewski, et al. Permanent, non-leaching antibacterial surfaces—2: How high density cationic surfaces kill bacterial cells [J]. Biomaterials, 2007, 28: 4870-4879.
- [16] Shuji Ye, Partha Majumdar, Bret Chisholm, et al. Antifouling and antimicrobial mechanism of tethered quaternary ammonium salts in a cross-linked poly (dimethylsiloxane) matrix studied using sum frequency generation vibrational spectroscopy[J]. Langmuir, 2010, 26(21): 16455-16462. ■