• 研究论文 •

银掺杂纳米羟基磷灰石抗菌粉体的水热合成及结构表征

陈华军* 徐伏秋 薛冬 阳永福 张秋芬

(洛阳理工学院 环境工程与化学系 洛阳 471023)

摘要 采用水热法,以硝酸钙($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、硝酸银(AgNO_3)和磷酸氢二铵($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)为主要原料,制备纳米级银掺杂羟基磷灰石(Ag-HA)抗菌粉体.考察了硝酸银加入量、反应温度、反应时间对产物结构和形貌的影响.XRD分析结果显示 Ag-HA 与 HA 具有相同的晶体结构.EDS 和 XRF 分析结果说明 Ag^+ 取代 Ca^{2+} 在 HA 晶体中的位置,生成 $\text{Ag}_x\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.抗菌试验结果表明,所制备的 Ag-HA 抗菌粉体具有良好的抗菌性能,最小抑菌浓度 MIC 值 $\leq 50 \mu\text{g/mL}$ (对大肠杆菌、黄色葡萄球菌).

关键词 银-羟基磷灰石;固溶体;水热合成;结构表征;抗菌性

Hydrothermal Synthesis and Characterization of Ag-doped Hydroxyapatite Antibacterial Agent

Chen, Huajun* Xu, Fuqiu Xue, Dong Yang, Yongfu Zhang Qiufen

(Department of Environment and Chemistry, Luoyang Institute of Science and Technology, Luoyang 471023)

Abstract Silver doped hydroxyapatite (HA) antimicrobial powders were synthesized by hydrothermal method using $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ as raw materials. The effects of addition of AgNO_3 , reactive temperature and time on the microstructure and constituent of Ag-HA were investigated. The XRD patterns indicate that HA and Ag-HA have the same crystal structure. The calculation results of energy dispersive spectrometer (EDS) and X-ray fluorescence spectrum (XRF) indicate that Ca^{2+} in HA crystals is displaced by Ag^+ and $\text{Ag}_x\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ was produced at hydrothermal condition. The antibacterial test results indicate that Ag-HA have favourable antibiotic property and $\text{MIC} \leq 50 \mu\text{g/mL}$ against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords Ag-HA; solid solution; hydrothermal method; characterization; antibiotic property

在日常生活中,为了防止由细菌引起的疾病和食物中毒,最有效的手段是杀菌.大的方面来看,杀菌可分为加热杀菌和冷杀菌,前者主要是利用水蒸气、热风、远红外线、微波等,后者主要是利用抗菌剂^[1].抗菌剂可分为有机和无机两大类,有机抗菌剂安全性和化学稳定性较差,会产生微生物耐药性;而无机抗菌剂安全、长效、无耐药性,具有良好的耐热性($600 \sim 1000^\circ\text{C}$),克服

了有机抗菌剂的缺点,受到广泛的重视,成为抗菌材料领域研究的热点内容之一^[2].

无机抗菌剂的有效成分是银、锌、铜等金属离子及化合物,通过物理吸附或离子交换等方法,将银、锌、铜等金属或其离子固定于沸石、磷酸盐、硅胶等多孔材料的表面或孔道内^[3-6],然后将其加入到制品中获得具有抗菌性的材料,通过抗菌剂有效成分的缓释作用以提

* E-mail: chj790118@163.com; Tel.: 0086-0379-65928271

Received January 14, 2012; revised and accepted April 16, 2012.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 41101222) and Henan Provincial Natural Science Research Funds (No. 2006430025).

国家自然科学基金(No. 41101222)和河南省教育厅自然科学基金(No. 2006430025)资助项目.

高抗菌长效性^[7~9]. 由于银、锌、铜等金属担持在载体上, 因此本质上是安全的. 目前国内外对银系抗菌剂的研究主要集中在硅酸盐系、磷酸盐系以及氧化物等为载体的抗菌剂方面, 相关的报道也较多^[10~13], 而以羟基磷灰石为载体的抗菌剂研究相对较少. 以羟基磷灰石为载体的抗菌剂制备方法以离子交换法为主^[14], 该方法的缺点是银离子与载体的结合较弱, 导致银离子快速游离而不能保持制品长久的抗菌性. 此外使用初期游离出的银离子浓度太大也具有毒性, 因而不宜采用离子交换法制造抗菌剂. 本文以水热法直接制备 Ag-HA 抗菌剂, 研究了 Ag-HA 抗菌材料的水热合成条件, 采用 XRD、TEM 等手段对材料进行表征, 并探讨了纳米粉体的抗菌性能.

1 实验

1.1 主要试剂和仪器

实验所用试剂为硝酸钙($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, AR)、磷酸氢二铵($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, AR)、硝酸银(AgNO_3 , AR)、十二烷基苯磺酸钠(SDS, AR)、氨水(AR, $\varphi=50\%$)、无水乙醇(AR)等, 水为去离子水. 大肠杆菌(ATCC 1818)、金黄色葡萄球菌(ATCC 1811)临床株型及琼脂培养皿.

水热反应在带有聚四氟乙烯内衬的不锈钢反应釜中进行, 反应釜的规格为 $\Phi 50 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$; 合成样品用北京大学的 BD86 型 X 衍射仪(XRD)、FEI 公司的 Philips CM200 透射电镜(TEM)分析其结构并观察其形貌. 采用 FEI 公司的 EDAXGenesis 2000 能谱仪(EDS)对 Ag-HA 进行元素分析, 采用德国 spectro 公司的 X 射线荧光光谱分析仪(XRF)测定各元素的质量百分含量.

1.2 Ag-HA 的水热合成

将 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 溶于去离子水, 加 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 调节 pH > 10 后得溶液 I. 将 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 AgNO_3 溶于去离子水中, 加 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 调至澄清, 加表面活性剂十二烷基苯磺酸钠, 超声波分散均匀后得溶液 II. 在搅拌条件将溶液 I 滴加到溶液 II 中, 继续搅拌 30 min 后转移到反应釜中, 填充度为 70%~80%, 在不同温度下水热处理一定时间. 反应产物自然冷却后抽滤, 分别用去离子水和无水乙醇洗涤, 于 80~90 °C 进行烘干, 研细.

1.3 Ag-HA 银含量的测定

采用福尔哈德法测定样品中银含量, 准确称取一定量粉体, 加水 100 mL, 加 HNO_3 ($\varphi=50\%$) 5 mL, 加热溶解. 冷却后加 2 mL 铁铵矾指示剂, 以 NH_4SCN 标准溶液滴定, 先生成 AgSCN 白色沉淀, 当有红色的 $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ 出现即为终点. 粉体中银含量的计算:

$$\text{Ag}\% = \frac{n_{\text{Ag}}}{n_{\text{Ca}}} = \frac{c_{\text{NH}_4\text{SCN}} \cdot V_{\text{NH}_4\text{SCN}} \times 10^{-3}}{\frac{m_s}{M_{\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}}} \times 5} \times 100$$

即 Ag^+ 取代 Ca^{2+} 百分比, 式中: $c_{\text{NH}_4\text{SCN}}$: NH_4SCN 标准溶液浓度, mol/L; $V_{\text{NH}_4\text{SCN}}$: 滴定消耗 NH_4SCN 标准溶液体积, mL; m_s : 称取粉体的质量, g; $M_{\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}}$: 羟基磷灰石 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ 相对分子质量, 502.37 g/mol.

1.4 Ag-HA 的抗菌性实验

粉体的抗菌性能用最低抑菌浓度(MIC, 指在体外培养细菌 24 h 后能抑制培养基内病原菌生长的最低药物浓度)表示. 实验所用的菌种为金黄色葡萄球菌和大肠杆菌. 实验方法如下:

将一定量的 Ag-HA 抗菌粉体加入到 25 mL 的 LB 琼脂培养基中, 灭菌, 得溶液 I.

在无菌条件下, 用移液枪向无菌培养皿中加入 25 μL 已培养好的原始菌液(采用稀释法确定其浓度), 再倒入溶化并冷却至 50 °C 左右的溶液 I, 平放于桌面上迅速旋摇培养皿, 使菌液、培养基和抗菌粉体三者充分混匀, 冷凝后成平板. 将平板置于 37 °C 培养 24~28 h, 然后观察结果进行计数, 确定残余细菌的数目(菌落数), 结合加入的 25 μL 菌液中所含细菌的数目, 计算粉体的抗菌率.

根据下式计算杀(抑)菌率:

$$\text{粉体杀(抑)菌率} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

式中: A —对照样品平均回收菌数; B —试验样品平均回收菌数.

2 结果与讨论

2.1 水热反应条件的影响

固定 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 用量分别为 6.36 g, 2.13 g, 即 Ca/P 为 1.67, AgNO_3 加入量为 0.10 g, 表面活性剂十二烷基苯磺酸钠用量为 0.10 g, 考察反应时间和反应温度对 Ag-HA 结构的影响. 不同合成条件下产物的 XRD 如图 1 所示.

由图 1 可知, 首先, 结晶程度随水热温度提高而逐渐趋于完善. 当温度较低时(100 °C), HA 三强峰的强度很小, HA 结晶度低且出现磷酸银的衍射峰. 水热温度在 180 °C, 反应时间为 5 h 时, 各衍射峰位置与 HA 的标准卡片(JCPDS, No.9-432)对应较好, 且峰型尖锐清晰. 其次, 反应时间对产物也有较大影响, 当反应时间增至 7.5 h, 开始有 Ag_3PO_4 和 $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 的特征衍射峰出

图1 不同水热合成条件 Ag-HA 的 XRD 谱图

Figure 1 XRD patterns of the silver doped nano-hydroxyapatite powders synthesized at different conditions

现, HA 含量降低, 其三强峰的强度很小. 所以适宜反应条件为: 反应温度: 180 °C, 反应时间: 5 h.

2.2 银掺杂量的影响

固定 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 用量分别为 6.36 g, 2.13 g, 表面活性剂十二烷基苯磺酸钠用量为 0.10 g, 通过上述实验确定反应时间为 5 h, 反应温度为 180 °C, 改变 AgNO_3 加入量. 采用 1.3 节实验方案测定当 AgNO_3 加入量为 0.04, 0.08 和 0.10 g 时, Ag-HA 抗菌粉体的实际载银量分别为 0.35%, 0.55% 和 0.65%.

图2 不同含银量样品的 XRD 图谱

Figure 2 XRD patterns of the products with various Ag fraction

图2为 HA 和 Ag-HA 的 XRD 图. $2\theta = 25.80^\circ$, 31.68° , 32.84° 和 33.96° 处的 4 个峰是 HA 的特征峰. 从图2可以看出, 随着银掺杂量的增加, 衍射峰的形状变化不大, 主晶相仍为 HA, 但晶面间距 d 值变小, 从而衍射角变大. 通过 XRD 实验测定样品的 d 值, 不同掺银量 HA 在 002 面和 211 面的 d 值和峰位见表 1.

表1 不同含银量的 HA 的 d 值与峰位

Table 1 The lattice fringes and peak value of HA with various Ag fraction

Sample	HA	0.35%Ag-HA	0.55%Ag-HA	0.65%Ag-HA
Lattice fringes and peak value of 002 interface	3.4530/ 25.800	3.442/ 25.880	3.442/ 25.880	3.442/ 25.880
Lattice fringes and peak value of 211 interface	2.824/ 31.680	2.821/ 31.720	2.817/ 31.760	2.810/ 31.840

由表1的数据可知, 沿 c 轴方向的 002 面当 d 值减小至 3.442, 继续增加银掺杂量 d 值不再发生变化. 而在 211 面 d 值随着银掺入量的增加而不断减小, 衍射角也不断变大. Ca^{2+} 的离子半径为 0.106 nm, Ag^+ 的离子半径随其在晶体中的配位数变化而变化, 当其配位数 ≥ 6 , 离子半径为 0.115 nm. Ag^+ 取代 Ca^{2+} 后配位数大于 6, 此时 Ag^+ 半径大于 Ca^{2+} 半径, 因此造成了取代后 HA 的晶格发生一定的畸变.

图3是不同银掺杂量 HA 用 TEM 获得的晶粒形貌图. 由图3可见, 随着银掺入量的增大, 粉体的直径变化不大, 但棒的长度逐渐增大. HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) 属六方晶系, $P6_3/m$ 空间群. OH^- 位于晶胞四个角上, 10 个 Ca^{2+} 分别占据 2 种位置: 4 个 Ca^{2+} 占据 Ca(I) 位置, 该位置处于 6 个 O 组成的 Ca-O 八面体的中心; 6 个 Ca^{2+} 处于 Ca(II) 位置, 该位置处于 3 个 O 组成的三配位体中心. HA 在结晶结构上存在平行于 c 轴的通道, Ca^{2+} 很容易被 Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} 等金属离子替代, 形成更为复杂的结构. 在 HA 中引入 Ag^+ 后, Ag^+ 沿 c 轴进入晶胞取代 Ca^{2+} 位置, 由于 Ag^+ (0.115 nm) 半径比 Ca^{2+} (0.106 nm) 半径大, 可能发生的是 1:1 取代, 生成 $\text{Ag}_x\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 该推断已通过下面的 EDS 和 XRF 分析证实. 由于二者价态上的差异, 所以结构中存在未饱和的电场力, 导致晶体生长变形, 表1数据也表明, 当 Ag^+ 取代 Ca^{2+} 时, 沿 c 轴方向的 002 及 211 面晶面间距变小, 即晶胞变大, 沿 c 轴方向的微晶尺寸的增加幅度较大, 而沿 a 轴方向的微晶尺寸基本不变. 故当银掺入量增大时, HA 晶体是沿晶轴方向生长的, 样品的长度增加.

2.3 粉体的 EDS 和 XRF 分析

采用 FEI 公司的 EDAX Genesis 2000 能谱仪对 0.65% Ag-HA 型抗菌剂进行元素分析, 采用德国 spectro 公司的 X 射线荧光光谱分析仪测定 O, P, Ca 和 Ag 的质量百分含量, 实验结果如图4所示.

纯 HA 的 Ca 与 P 的原子个数比(Ca/P)为 1.67, 图4的 X 射线能谱分析(EDS)和 X 射线荧光光谱分析(XRF)计算得出 0.65% Ag-HA 的 Ca/P 为 1.56, 小于纯

图3 不同银含量HA的TEM照片。(a) HA; (b) 0.35% Ag-HA; (c) 0.65% Ag-HA

Figure 3 TEM images of the products with various Ag fraction: (a) HA; (b) 0.35% Ag-HA; (c) 0.65% Ag-HA

HA的Ca/P(1.67), 这说明一部分 Ca^{2+} 已经被 Ag^+ 取代。另外通过X射线荧光光谱分析(XRF)计算Ag-HA的(Ca+Ag)/P为1.67, 与纯HA的Ca/P相同, 说明在水热条件下 Ag^+ 取代了 Ca^{2+} 在HA晶体中的位置, 形成离子固溶体, 从而生成 $\text{Ag}_x\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 结构的物质, 未形成其它物质, 这与XRD的分析结果相同。因为若有 Ag_3PO_4 或 Ag_2O 等其它物质生成, 均会使(Ca+Ag)/P大于1.67。

图4 0.65% Ag-HA的EDS分析图

Figure 4 The EDS analysis of 0.65% Ag-HA

2.4 粉体的抗菌性能

采用1.4节实验方案测定粉体的抗菌性能, 粉体的抗菌结果如表2所示。可以看出, HA粉体分别与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌于37℃作用24h后, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的菌落数几乎没有变化, 说明未掺杂纳米HA基本不具有抗菌性能; 而Ag-HA与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌于37℃作用24h后, 剩余菌落数随银含量的增加而降低, 杀抑率均>99.9%, 此时抗菌粉体的MIC值均为50 μg/mL。这表明Ag-HA对这两种菌都有很强的抑杀作用。因为 Ag^+ 带正电荷, 吸引载负电荷的细菌, 并与蛋白质的中的巯基(-SH)结合形成牢固的共价键, 从而使酶失活。细菌机体结构被破坏, 导致迅速死亡。另外, 从24h后残余细菌的浓度可以看出, 粉体的抗菌效果随银掺杂量的增大而增大。

选取0.35% Ag-HA和0.55% Ag-HA型抗菌粉体与日本同类产品相比较, Japan AG300和Japan AGZ330对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的MIC值分别为125和250 μg/mL, 而0.35% Ag-HA和0.55% Ag-HA型抗菌粉体对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的MIC值低至85和50 μg/mL, 可见所制备的无机抗菌材料对二种典型的病菌具有优异的抗菌性能。

3 结论

以硝酸钙、硝酸银和磷酸氢二铵为主要原料, 制备

表2 样品的抑菌效果

Table 2 The antibacterial activity of samples

Microorganism species	Concentration and antibiotic rate without HA	Concentration and antibiotic rate with HA	Concentration and antibiotic rate with 0.35% Ag-HA	Concentration and antibiotic rate with 0.65% Ag-HA
<i>Escherichia coli</i>	1.39×10^7 (cfu/mL) 0%	1.38×10^7 (cfu/mL) 0%	960 (cfu/mL) >99.9%	400 (cfu/mL) >99.9%
<i>Golden staphylococcus</i>	4.32×10^6 (cfu/mL) 0%	4.22×10^6 (cfu/mL) 0%	320 (cfu/mL) >99.9%	0 (cfu/mL) >99.9%

Ag-HA 抗菌粉体, 考察了硝酸银加入量、反应温度、反应时间对产物结构和形貌的影响. 实验结果表明:

(1) 水热温度在 180 °C, 反应时间为 5 h 时, 产物各衍射峰位置与 HA 的标准卡片(JCPDS, No.9-432)对应较好, 且峰型尖锐清晰. 当反应温度低于 180 °C 或反应时间超过 5 h, 开始有 Ag_3PO_4 和 $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 的特征衍射峰出现.

(2) XRD 分析表明 Ag-HA 与 HA 具有相同的晶体结构. EDS 和 XRF 分析说明在水热条件下 Ag^+ 取代了 Ca^{2+} 在 HA 晶体中的位置, 形成离子固溶体, 从而生成 $\text{Ag}_x\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 结构的物质.

(3) Ag-HA 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀抑率均 > 99.9%, 抗菌粉体的 MIC 值 $\leq 50 \mu\text{g/mL}$.

References

- 1 Steens, W.; Schneeberger, A. G.; Skripitz, R.; Fennema, P.; Goetze, G. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **2010**, *130*, 921.
- 2 Iwai, T.; Harada, Y.; Imura, K.; Iwabuchi, S.; Murai, J.; Hiramatsu, K.; Myoui, A.; Yoshikawa, H.; Tsumaki, N. *J. Bone Miner. Metab.* **2007**, *25*, 392.
- 3 Nath, S.; Kalmodia, S.; Basu, B. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2010**, *21*, 1273.
- 4 Zhang, Y.; Yin, Q. S.; Zhang, Y.; Xia, H.; Ai, F. Z.; Jiao, Y. P.; Chen, X. Q. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2010**, *21*, 2453.
- 5 Silver, S.; Phung, L. T.; Silver, G. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 627.
- 6 Liu, L.; Kong, X. D.; Cai, Y. R.; Yao, J. M. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*, 1919 (in Chinese).
(刘琳, 孔祥东, 蔡玉荣, 姚菊明, 化学学报, **2008**, *66*, 1919.)
- 7 Kim, T. N.; Feng, Q. L.; Kim, J. O.; Wu, J.; Wang, H.; Chen, G. C.; Cui, F. Z. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **1998**, *9*, 129.
- 8 Ulkuseven, B.; Tavman, A.; Otuk, G.; Birteksoz, S. *Folia Microbiol.* **2002**, *47*, 481.
- 9 Coleman, N. J. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2009**, *20*, 1347.
- 10 Hwang, K. S.; Hwangbo, S.; Jin-Tae Kim, J. T. *J. Nanopart. Res.* **2008**, *10*, 1337.
- 11 Tuan, W. H.; Chen, W. R. *J. Mater. Sci. Lett.* **1994**, *13*, 658.
- 12 Xiao, X. F.; Liu, R. F.; Zheng, Y. Z. *Chin. J. Inorg. Chem.* **2005**, *21*, 965 (in Chinese).
(肖秀峰, 刘榕芳, 郑炆曾, 无机化学学报, **2005**, *21*, 965.)
- 13 Sun, L.; Liu, A. X.; Huang, H. Y.; Tao, X. J.; Zhao, Y. B.; Zhang, Z. J. *Acta Phys.-Chim. Sin.* **2011**, *27*, 722 (in Chinese).
(孙磊, 刘爱心, 黄红莹, 陶小军, 赵彦保, 张治军, 物理化学学报, **2011**, *27*, 722.)
- 14 Lü, G. Y.; Li, Y. B.; Wei, J.; Zhang, L.; Yang, A. P.; Zhou, G. J. *Funct. Mater.* **2005**, *36*, 888 (in Chinese).
(吕国玉, 李玉宝, 魏杰, 张利, 杨爱萍, 周钢, 功能材料, **2005**, *36*, 888.)

(A1201143 Cheng, F.)