

AgNPs@ZIF-67 复合纳米粒子的合成及其抗菌性能研究^{*}陈敬煌^{a,b} 孟天^{a,b} 武烈^a 石恒冲^{b,c} 杨帆^a孙健^{*,a} 杨秀荣^{*,a,b}^(a) 中国科学院长春应用化学研究所 电分析化学国家重点实验室 长春 130022)^(b) 中国科学技术大学 应用化学与工程学院 合肥 230026)^(c) 中国科学院长春应用化学研究所 高分子物理与化学国家重点实验室 长春 130022)

摘要 细菌感染和因抗生素滥用而引发的细菌耐药性问题已经成为威胁公共健康的重大隐患, 开发新型、高效的抗菌剂势在必行. 金属有机框架材料(MOFs)是当今抗菌材料研究的热点之一. 多孔的碳骨架结构能够提供有限空间避免负载的金属纳米颗粒聚集以及有利于其稳定存在. 基于 ZIF-67 的载体作用, 发展了一种新颖、绿色、简便、低成本的银纳米颗粒-沸石咪唑骨架(AgNPs@ZIF-67)复合纳米粒子的制备方法. 利用透射电子显微镜、元素分布图谱、X 射线衍射、X 射线光电子能谱、N₂ 吸-脱附等温线和 Zeta 电位等表征手段证实了小尺寸 AgNPs 均匀、稳定地分散在 ZIF-67 上. 少量的 AgNPs 沉积大幅提升了 ZIF-67 的抗菌性能, 使 AgNPs@ZIF-67 成为一种很有前途的抗菌纳米材料.

关键词 沸石咪唑骨架材料; 银纳米颗粒; AgNPs@ZIF-67; 均匀负载; 抗菌性能

Study on Synthesis and Antibacterial Properties of AgNPs@ZIF-67 Composite Nanoparticles^{*}Chen, Jinghuang^{a,b} Meng, Tian^{a,b} Wu, Lie^a Shi, Hengchong^{b,c} Yang, Fan^a
Sun, Jian^{*,a} Yang, Xiurong^{*,a,b}^(a) State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Changchun 130022)^(b) School of Applied Chemistry and Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)^(c) State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Changchun 130022)

Abstract Bacterial infection and resistance have threatened public health and it is necessary to develop a novel and efficient antibacterial agent. Metal-organic frameworks (MOFs) have been widely studied and applied in the antibacterial field. The porous carbon frameworks could provide intrinsic conditions to avoid the agglomeration and avail the stabilization of metal nanoparticles, which may be some synergies. Herein, a novel kind of AgNPs@ZIF-67 composite nanoparticles was prepared by a green, rapid, and cost-effective method, during which zeolitic imidazolate framework-67 (ZIF-67) acted as a template and small silver nanoparticles (AgNPs) could be facilely prepared *in situ* by the reduction of silver ions with fresh sodium borohydride (NaBH₄). Specifically, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) images confirmed the existence of as-prepared AgNPs with average diameters of (7.05 ± 0.09) nm and the introduction of AgNPs did not alter the size and rhombic dodecahedron-type morphology of ZIF-67. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) elemental mapping revealed that AgNPs@ZIF-67 mainly contained uniformly dispersed C, N, O, Co and Ag elements. And the loading ratio of Ag weight content was 0.98% in it. The X-ray diffraction (XRD) pattern of the AgNPs@ZIF-67 sample showed a series of typical and sharp diffraction peaks in the (011), (002), (112), and (222) planes but no obvious peaks attributed to the AgNPs, which exhibited the formation of phase-pure ZIF-67 and well-dispersed of metallic Ag in ZIF-67. Zeta potentials showed a higher potential of ZIF-67 (+25.6 mV) than AgNPs@ZIF-67 (+17.7 mV), indicating the load of negative charged AgNPs and good stability of the as-obtained AgNPs@ZIF-67. Furthermore, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ATCC 6538) was used in the antibacterial assay and the bacterial concentration was regarded as 1 × 10⁸ CFU·mL⁻¹ when the OD₆₀₀ value of the suspensions was 0.1. The *in vitro* minimum inhibitory concentration (MIC) of AgNPs@ZIF-67, ZIF-67 were 300, 350 μg·mL⁻¹, respectively. The antibacterial efficiency of AgNPs@ZIF-67, ZIF-67, and AgNPs at 24 h were 99.889%, 57.192%, and 26.433%, respectively. It was illustrated that the decoration of AgNPs could significantly improve the antibacterial ability of ZIF-67 nanomaterials. Moreover, SEM images of *S. aureus* showed that AgNPs@ZIF-67 did more serious damage to the cell membrane than ZIF-67. This work provided a facile method to fabricate

^{*} Dedicated to the 10th anniversary of the Youth Innovation Promotion Association, CAS.

^{*} E-mail: jiansun@ciac.ac.cn; xryang@ciac.ac.cn

Received November 16, 2021; published February 7, 2022.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22034006, 21974132, 21721003) and Youth Innovation Promotion Association, CAS (Nos. 2018258, 2020233, 2017269).

^{*} 庆祝中国科学院青年创新促进会十年华诞.

国家自然科学基金(Nos. 22034006, 21974132, 21721003)和中国科学院青年创新促进会(Nos. 2018258, 2020233, 2017269)资助项目.

the AgNPs@ZIF-67 composite nanoparticles, which was demonstrated as a promising antibacterial material based on the synergistic effect of AgNPs and ZIF-67.

Keywords zeolitic imidazolate framework; Ag nanoparticles; AgNPs@ZIF-67; uniformly load; antibacterial property

1 引言

近年来, 细菌感染以及因抗生素滥用而引发的细菌耐药性问题已经严重威胁公共健康与社会安全^[1-2]. 因此, 开发新型、高效的抗菌剂具有重要的研究意义和社会价值. 抗菌剂按照化学分类可以分为有机抗菌剂和无机抗菌剂两大类. 其中, 无机抗菌剂拥有安全、长效、无耐药性等优点^[3], 尤其随着纳米技术的发展, 无机抗菌纳米生物材料越来越受到研究者的重视. 由于银纳米材料具有较好的抗菌性能, 得到了广泛的研究^[4]. 但是小尺寸的银纳米颗粒(Ag nanoparticles, AgNPs)在常温或光照下容易聚集, 直接或大量使用可能存在毒性^[5-6], 因此银纳米制剂目前在临床中的实际应用仍面临很大挑战.

金属有机框架材料(Metal-organic frameworks, MOFs)是一类具有良好发展前景的晶体多孔纳米材料. 通过调控金属节点、有机配体以及反应条件, 可以制备不同拓扑结构、尺寸、比表面积和孔径的 MOFs 以及基于 MOFs 的功能材料, 用于催化、生物传感、生物医学、气体存储和吸收等领域^[7-8]. 然而, MOFs 在抗菌材料领域的应用大多只是作为载体(载药或者稳定纳米粒子), 对 MOFs 材料自身的抗菌性能研究不多. 沸石咪唑骨架材料(Zeolitic imidazolate frameworks, ZIFs)是 MOFs 的一个重要的亚家族. 相较于其他易水解的 MOFs, 基于钴的 ZIF-67 具有较好的稳定性, 在水环境中水解缓慢^[9]. 受到钴离子(Co^{2+})具有一定的抗菌作用以及促进血管生长的生物学作用的启发, 包括本课题组在内的研究人员最近研究发现, ZIF-67 自身具有一定的抗菌作用^[10-12], 如果能够再结合其载体功能制备复合材料, 将有望实现多种抗菌组分的协同作用, 开发新颖高效的抗菌材料.

目前已经有研究人员利用 MOFs 负载保护 AgNPs, 不仅可有效稳定 AgNPs, 而且 AgNPs 与 MOFs 的协同作用可增强 AgNPs@MOFs 复合物的多种性能^[13]. 例如, 李等^[14]将 ZIF-67 逐步进行溴化、羟基化、醛基化, 再通过银镜反应生成 AgNPs@ZIF-67, 该复合物具有良好的电化学性能. 孙等^[15]使用电化学沉积法将 AgNPs 稳定在 ZIF-67 上, 发展了一种简单的 H_2O_2 检测传感器. Takashima 等^[16]在 100 °C 以及氮气的氛围下使用气相还原剂(如: 胺硼烷、二甲胺基硼烷、三甲胺基硼烷等)合成了 AgNPs@MIL-101. 这些复合功能材料的制备方法一般都涉及繁琐或高风险的合成步骤, 限制了 AgNPs@MOFs 复合物的进一步生物应用.

本文借助硼氢化钠(NaBH_4)对分散在 MOFs 中银离子(Ag^+)的原位还原作用^[5], 以 ZIF-67 为载体, 发展了一

种新颖、绿色、简便、低成本 AgNPs@ZIF-67 复合纳米粒子的化学合成方法. 电子显微镜、元素分布、X 射线衍射、X 射线光电子能谱等多种技术表征显示, 小尺寸的 AgNPs 能够在 ZIF-67 上原位生成, 并且均匀稳定地分散. 对该纳米复合物的抗菌性能进行研究, 发现少量的小尺寸 AgNPs 沉积使得 ZIF-67 的抗菌性能得到了大幅的提升. 基于 AgNPs 与 ZIF-67 的协同抗菌作用, AgNPs@ZIF-67 复合纳米粒子有望成为一种很有前途的新型纳米抗菌材料(图 1).

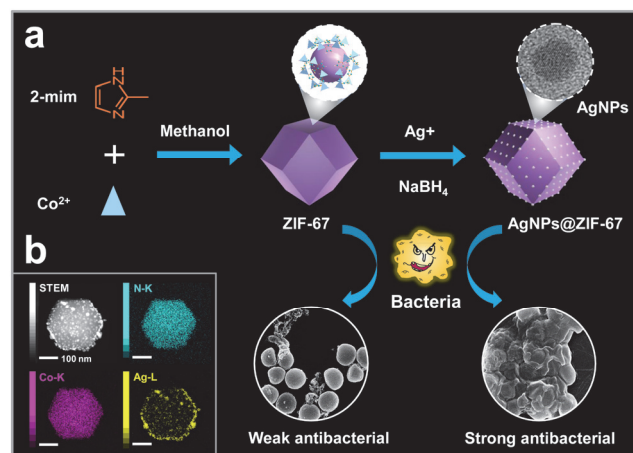


图1 银纳米颗粒-沸石咪唑骨架(Ag nanoparticles-Zeolitic imidazolate framework-67, AgNPs@ZIF-67)复合纳米粒子制备示意图及抗菌应用
Figure 1 Schematic of the preparation and antibacterial application for Ag nanoparticles-Zeolitic imidazolate framework-67 (AgNPs@ZIF-67)

2 结果与讨论

2.1 AgNPs@ZIF-67 复合纳米粒子的化学合成

首先使用 Co^{2+} 和 2-甲基咪唑(2-mim)作为前驱体制备 ZIF-67. 如图 2 所示, 所得溶液呈现肉眼可见的蓝紫色, 扫描电子显微镜(Scanning electron microscopy, SEM)图像显示, ZIF-67 呈现菱形正十二面体的形貌特征(图 2a 和 2b), 且尺寸均一(平均粒径 198.784 ± 4.90 nm) (图 2c 插图). 根据文献报道, 这种尺寸适中的纳米材料具有低的肝胆毒性和高的生物相容性, 非常适合进行生物应用^[17-18]. 能量色散 X 射线谱(Energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDS) (图 2c)以及 X 射线能谱元素分布(EDS elemental mapping) (见支持信息, 图 S1a)显示 ZIF-67 主要含有 C、N、O、Co 四种元素. 接下来在 ZIF-67 溶液中加入 AgNO_3 , 再使用 NaBH_4 还原分散在 ZIF-67 表面以及孔道里的 Ag^+ , 获得深紫红色的 AgNPs@ZIF-67 溶液(图 2f 插图). SEM 图像显示, AgNPs@ZIF-67 仍保持着原有 ZIF-67 的菱形正十二面体的形貌特征与尺寸(图 2d). 透射电子显微镜(Transmission electron mi-

croscopy, TEM)图像(图 2e)证实, AgNPs 均匀分散在 ZIF-67 表面, 且尺寸均一(平均粒径 7.05 ± 0.09 nm)(图 2f插图). EDS(图 2f)以及 EDS 元素分布(见支持信息, 图 S1b)显示 AgNPs@ZIF-67 主要含有 C、N、O、Co、Ag 五种元素. AgNPs@ZIF-67 的高角环形暗场扫描透射电子显微镜(High-Angle Annular Dark Field - Scanning Transmission Electron Microscopy, HAADF-STEM)图像以及 C、N、O、Co 和 Ag 元素的 EDS 映射图像(图 2h)也显示 AgNPs@ZIF-67 主要含有 C、N、O、Co、Ag 五种元素, 且直观地展示了 AgNPs 均匀分散在 ZIF-67 上. 采用电感耦合等离子体质谱(Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)测得 Ag 在 AgNPs@ZIF-67 中的加载量为 0.98%. 实际上, 如果没有合适的配体或载体保护, 小尺寸 AgNPs 在室温下很容易聚集(见支持信息, 图 S2 和 S3), 从而降低 AgNPs 的抗菌性能^[5,19], 且这种不稳定的抗菌制剂不适用于临床应用. 而如果把 ZIF-67 作为 AgNPs 的载体, 不仅支撑 AgNPs 的生长, 而且可能限制 AgNPs 的结晶过程, 降低表面能, 得到稳定的小尺寸 AgNPs^[5,20-21], 同时, 这种稳定的 AgNPs@ZIF-67 复合纳米粒子具有一定的潜在应用前景.

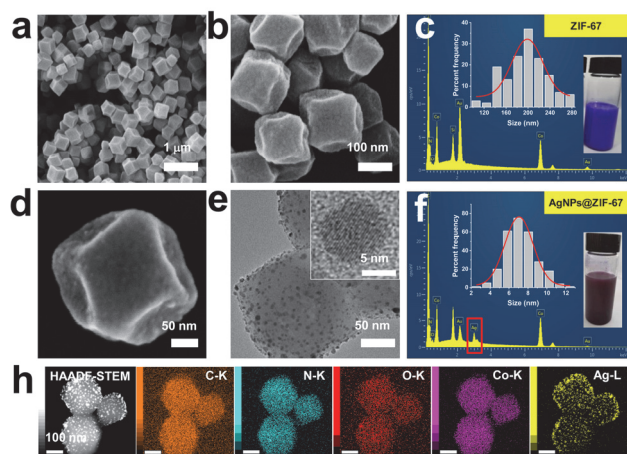


图 2 沸石咪唑框架材料-67 (ZIF-67)的扫描电镜(SEM)图像(a)和(b); (c)能量色散 X 射线谱(EDS)、粒径分布; (d)银纳米颗粒-沸石咪唑骨架纳米复合物(AgNPs@ZIF-67)的 SEM 图; (e)透射电子显微镜(TEM)图像; (f) EDS、粒径分布; (g) AgNPs@ZIF-67 的高角环形暗场扫描透射(HAADF-STEM)图像和 EDS 映射图像

Figure 2 Scanning electron microscopy (SEM) of ZIF-67 (a) and (b); (c) energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), particle size distribution of ZIF-67; (d) SEM of AgNPs@ZIF-67; (e) transmission electron microscopy (TEM) of AgNPs@ZIF-67; (f) energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) and Particle size distribution of AgNPs@ZIF-67; (g) magnified HAADF-STEM images of AgNPs@ZIF-67 and EDS mapping images of AgNPs@ZIF-67

2.2 AgNPs@ZIF-67 复合纳米粒子的性质表征

进一步对 ZIF-67 和 AgNPs@ZIF-67 的理化性质进行研究. X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)图谱(图 3a)显示, ZIF-67 在(011), (002), (112)和(222)晶面存在较强的特征衍射峰, 这与以前的报道以及 ZIF-67 的模拟峰

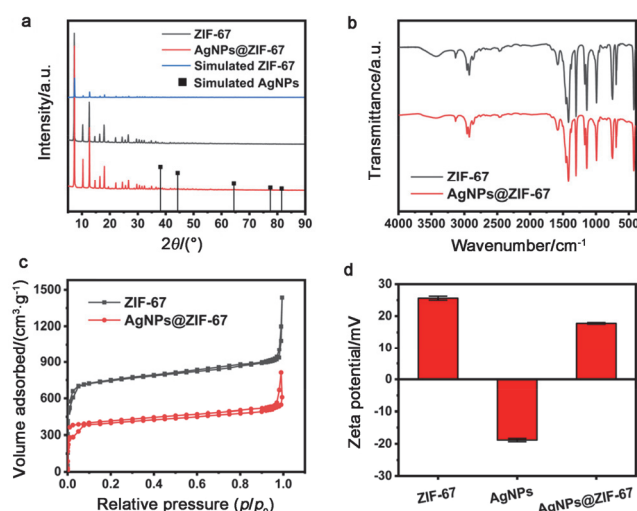


图 3 ZIF-67 和 AgNPs@ZIF-67 的(a) X 射线衍射(XRD)图谱, (b)傅立叶变换红外(FTIR)图谱, (c) N₂ 吸/脱附等温线, (d) Zeta 电位

Figure 3 (a) X-ray diffraction (XRD) patterns, (b) Fourier transform infrared (FTIR) absorption spectra, (c) N₂ adsorption-desorption isotherms and (d) zeta potential of ZIF-67 and AgNPs@ZIF-67

(CCDC: 671074)相吻合^[22]. AgNPs@ZIF-67 的 XRD 图谱与 ZIF-67 的实验和模拟峰几乎一致, 表明负载银纳米颗粒之后, 生成的 AgNPs@ZIF-67 仍然保持着 ZIF-67 的晶体结构. 此外, 未显示明显的 AgNPs 衍射峰(JCPDS 00-004-0783)表明 AgNPs 在 ZIF-67 分散地非常均匀^[5,23], 这与 EDS 映射图像结果一致. 傅立叶变换红外(Fourier transform infrared, FT-IR)图谱(图 3b)显示 AgNPs@ZIF-67 的红外吸收峰与 ZIF-67 大体一致, 说明 AgNPs@ZIF-67 中的元素化学状态与 ZIF-67 中的元素状态类似^[24]. 其中, $600 \sim 1500$ cm^{-1} 吸收峰是由咪唑环的伸缩振动和弯曲振动引起, 1580 cm^{-1} 吸收峰是由 C=N 键的伸缩振动引起, 2929 cm^{-1} 吸收峰对应于芳香环和脂肪链中的 C—H 伸缩振动^[25]. N₂ 吸-脱附等温线(N₂ adsorption-desorption isotherms)(图 3c)显示, ZIF-67 和 AgNPs@ZIF-67 呈现 I 型等温曲线^[26], 比表面积分别为 2972 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, 1619 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, 说明 AgNPs 的成功负载使 ZIF-67 的比表面积部分降低^[9]. 此外, AgNPs@ZIF-67 和 ZIF-67 均含有超小尺寸的孔道, 孔径约为 0.926 nm(见支持信息, 图 S4). ZIF-67, AgNPs, AgNPs@ZIF-67 的 Zeta 电位分别是 $+25.6$, -18.8 , $+17.7$ mV, AgNPs@ZIF-67 的 Zeta 低电位也证明负电荷的 AgNPs 成功负载在正电荷的 ZIF-67 上^[5]. 与此同时, AgNPs@ZIF-67 仍然具有较高的电位, 这也进一步证实了它具有良好的稳定性^[26]. X 射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)(图 4a)测试结果显示 AgNPs@ZIF-67 与 ZIF-67 都含有 C、N、O、Co 四种元素, 而 AgNPs@ZIF-67 还含有 Ag 元素. AgNPs@ZIF-67 的 Co 2p 高分辨 XPS 谱图(图 4b)在 781.7 eV 和 797.4 eV 有两个主峰, 分别对应 Co 2p_{3/2} 和 Co 2p_{1/2}, 在 787.0 eV

和 803.1 eV 的观察卫星峰(Sat.)^[27]. Ag 3d 的高分辨 XPS 谱图(图 4c)显示在 368.6 eV 和 374.7 eV 有两个主峰, 分别对应 Ag 3d_{5/2} 和 Ag 3d_{3/2}, 表明零价的银单质形成以及 Co-Ag 相互作用的存在^[5,28]. 不对称的 C 1s 中 284.5 eV 对应 C—C 键, 285.3 eV 对应 C—N 键(图 4d)^[29]. 以上的表征研究, 从多个角度证实了 AgNPs 均匀分散在 ZIF-67 上, 形成了结构稳定的 AgNPs@ZIF-67 复合纳米粒子.

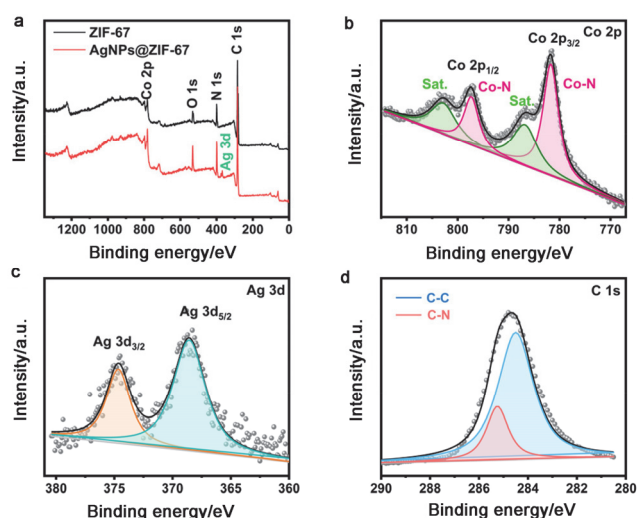


图 4 (a) ZIF-67 和 AgNPs@ZIF-67 的 X 射线光电子能谱(XPS); AgNPs@ZIF-67 的高分辨 XPS 谱图 Co 2p (b), Ag 3d (c), C 1s (d) in AgNPs@ZIF-67

2.3 AgNPs@ZIF-67 复合纳米粒子的抗菌性能

为了探究 AgNPs@ZIF-67 和 ZIF-67 的抗菌性能, 首先在试管内考察其对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) (ATCC 6538)的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC). 如图 5(a)~5(c)所示, 通过测量 24 h 内 600 nm 处的光密度(Optical density at 600 nm, OD₆₀₀), 得到 AgNPs@ZIF-67 的 MIC 为 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ZIF-67 的 MIC 为 350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 都具有一定的抗菌能力. 而金黄色葡萄球菌在相应浓度 AgNPs 溶液中的生长曲线与在磷酸盐缓冲溶液(PBS, 10 mmol/L, pH 7.4)中的生长曲线(见支持信息, 图 S4)类似, 说明该浓度的 AgNPs 抗菌能力很弱. 根据文献报道, 商用的银纳米材料在 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 256 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对金黄色葡萄球菌生长具有良好抑制效果. 然而, 在商用的银纳米材料浓度为 64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 金黄色葡萄球菌却能够缓慢生长^[30]. 使用 3.92 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的银纳米颗粒负载在 ZIF-67 上即可展现出良好的细菌抑制效果. 接下来, 使用平板菌落计数法测量了 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 AgNPs@ZIF-67, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 ZIF-67, 4.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 AgNPs 在 4, 12, 24 h 的抗菌效率. 如图 6a 所示, AgNPs@ZIF-67 的抗菌能力非常强, 该组的琼脂板在 4, 12, 24 h 几乎没有观察到细菌菌落, 抗菌效率

分别是 99.572%, 99.828%, 99.889% (图 5d). ZIF-67 组的琼脂板在 4, 12 h 也几乎没有观察到细菌菌落, 但是在 24 h 时, 观察到大量细菌菌落(图 6a), 即抗菌性能在 12 h 到 24 h 间急剧地下降, 抗菌效率分别是 97.402%, 99.481%, 57.192% (图 5d). 其可能原因是 ZIF-67 在水环境中逐渐水解, ZIF-67 在 6 h 逐渐水解, 结构崩塌, 12 h 几乎完全水解, 24 h 未观察到正十二面体结构; 相反, AgNPs 的负载提升了纳米复合物的稳定性, AgNPs@ZIF-67 在 24 h 仍能观察到少量的正十二面体结构存在(见支持信息, 图 S6). 而 AgNPs 组的琼脂板在 4, 12, 24 h 均含有大量细菌菌落(图 6a), 与 PBS 对照组类似, 其抗菌效率分别只有 18.434%, 22.663%, 26.433% (图 5d). 以上抗菌效率数据与细菌生长曲线数据相吻合. 此外, 使用 SEM 对金黄色葡萄球菌暴露在抗菌纳米材料悬液中的形态学变化进行研究(图 6b): AgNPs@ZIF-67 对金黄色葡萄球菌的细胞膜造成严重的破坏, 内容物流出; ZIF-67 组的金黄色葡萄球菌部分细菌内容物流出, 细菌表面粗糙, 细菌生长状态不佳; 而 AgNPs 组的金黄色葡萄球菌细菌生长情况与 PBS 组的情况相似, 细菌呈球形而且细菌表面光滑, 细菌生长状态良好^[31-32]. 其抗菌活性和能力展现出如下趋势: AgNPs@ZIF-67 > ZIF-67 > AgNPs. 上述结果证实, 尽管低剂量 AgNPs 自身的抗菌活性有限, 但是它的引入显著地增加了 ZIF-67 的抗菌性能.

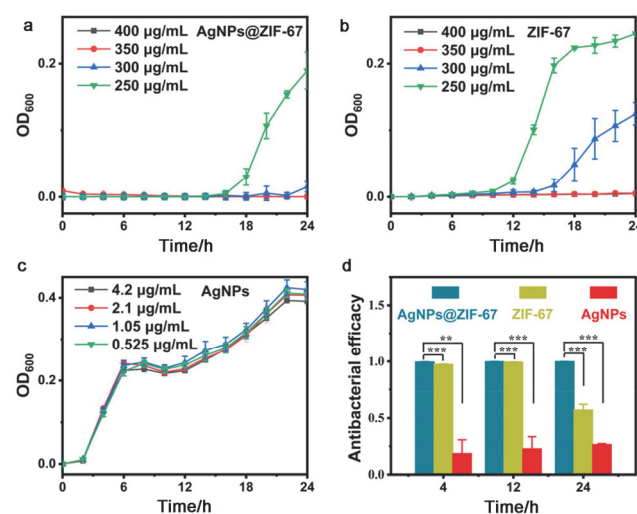


图 5 (a)~(c)金黄色葡萄球菌暴露在不同浓度的 AgNPs@ZIF-67, ZIF-67 或 AgNPs 中的生长曲线; (d) AgNPs@ZIF-67, ZIF-67 或 AgNPs 分别在 4、12、24 h 时对金黄色葡萄球菌的抗菌效率(*显著性, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Figure 5 (a)~(c) Growth curves of *S. aureus* exposed to different concentrations of AgNPs@ZIF-67, ZIF-67, or AgNPs; (d) antimicrobial efficiencies of AgNPs@ZIF-67, ZIF-67, or AgNPs after incubation with *S. aureus* for 4, 12, or 24 h, respectively (*significant, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

ZIF-67 基材料可以缓慢水解释放具有抗菌性能的钴离子和 2-甲基咪唑^[33]. 离子释放曲线(见支持信息,

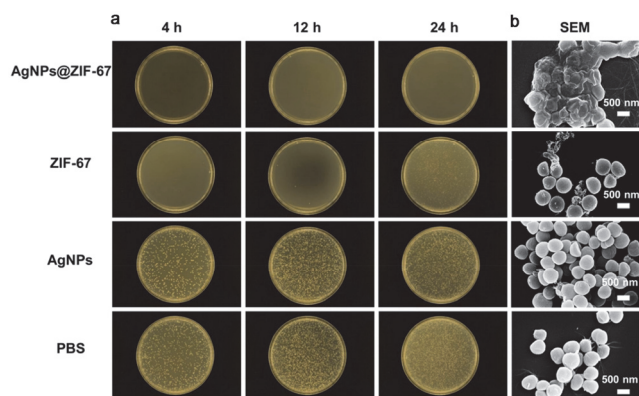


图6 (a)在琼脂板上与AgNPs@ZIF-67, ZIF-67, AgNPs或PBS共培养4, 12, 24 h后的金黄色葡萄球菌菌落图像; (b)分别与AgNPs@ZIF-67, ZIF-67, AgNPs或PBS共培养24 h的金黄色葡萄球菌采用SEM拍摄的形态学图像

Figure 6 (a) Images of surviving *S. aureus* colonies on culture plates after incubation with AgNPs@ZIF-67, ZIF-67, AgNPs, or PBS for 4, 12, and 24 h, respectively; (b) morphologies of *S. aureus* after incubation with AgNPs@ZIF-67, ZIF-67, AgNPs, or PBS for 24 h imaged using a SEM

图 S7)显示, AgNPs@ZIF-67 能够释放银离子和钴离子, 但钴离子释放速率比 ZIF-67 慢. 这表明尽管 AgNPs@ZIF-67 能够通过释放银离子和钴离子进行抗菌, 但离子释放并不是其与 ZIF-67 抗菌差异的主要原因. 另一方面, MOFs 基材料可能通过催化增强活性氧物种(ROS)的产生来实现抗菌. 因此, 利用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色反应来探究 AgNPs 与 ZIF-67 的协同作用能否增强复合物的氧化酶和过氧化物酶活性^[34-36]. 紫外-可见吸收图谱以及显色实物图(见支持信息, 图 S8)显示, ZIF-67 和 AgNPs@ZIF-67 都有微弱的氧化酶活性, 都不具有过氧化物酶活性, 而且 ZIF-67 和 AgNPs@ZIF-67 的氧化酶活性差异不大, 即 AgNPs 与 ZIF-67 没有明显协同增强 ROS 产生. 因此, ZIF-67 和 AgNPs@ZIF-67 在水溶液中会将氧气氧化为少量的 ROS 实现抗菌, 但这也不是抗菌性能差异的主要来源. 我们推测, AgNPs@ZIF-67 的抗菌性能比 ZIF-67 抗菌性能强的可能原因, 一方面是 MOFs 作为载体, 使得局部的小尺寸 AgNPs、钴离子和 2-甲基咪唑含量高^[37-38]; 另一方面, AgNPs@ZIF-67 可能对细菌细胞膜的渗透能力比 ZIF-67 更强, 能够实现更高效的抗菌^[39].

3 结论

本工作基于 ZIF-67 的载体作用, 发展一种绿色、简便、低成本的化学合成方法, 成功制备了新颖的 AgNPs@ZIF-67 复合纳米粒子. 采用多种技术方法(透射电子显微镜, 扫描电子显微镜, EDS 元素分布, X 射线衍射, X 射线光电子能谱, N₂ 吸-脱附等温线, Zeta 电位等)对其进行了表征. 硼氢化钠(NaBH₄)原位还原的小尺寸 AgNPs, 平均粒径是(7.05±0.09) nm, 能够均匀、稳

定地负载在 ZIF-67 上, 而且 ZIF-67 的菱形正十二面体形貌特征得到了保持. 在此基础上, 考察了 AgNPs@ZIF-67 复合纳米粒子的抗菌性能: 细菌生长曲线表明 AgNPs@ZIF-67 复合纳米粒子的最小抑菌浓度为 300 μg·mL⁻¹; 由平板菌落计数法得出 AgNPs@ZIF-67, ZIF-67, AgNPs 在 24 h 的抗菌效率分别是 99.889%, 57.192%, 26.433%; 扫描电子显微镜图像显示 AgNPs@ZIF-67 对金黄色葡萄球菌的细胞膜造成严重破坏. 少量的小尺寸 AgNPs 沉积大幅提升了 ZIF-67 的抗菌性能, AgNPs 与 ZIF-67 的协同抗菌作用使得 AgNPs@ZIF-67 复合纳米粒子成为一种很有前途的抗菌纳米材料.

4 实验部分

4.1 ZIF-67 的合成

采用一锅法进行 ZIF-67 的合成^[26]: 291 mg 六水合硝酸钴溶解在 15 mL 甲醇中, 记为溶液 A; 821 mg 2-甲基咪唑溶解在 15 mL 甲醇中, 记为溶液 B; 将 A 倾倒入至溶液 B 中, 快速地搅拌 15 min. 通过离心收集蓝紫色产物, 并用甲醇洗涤 6 次. 45 °C 真空过夜干燥, 产品置于阴凉干燥处保存待用.

4.2 AgNPs@ZIF-67 的合成

(1)双溶剂法进行 Ag⁺-ZIF-67 前体封装: 500 mg ZIF-67 分散在 40 mL 疏水性溶剂正己烷中, 并将混合溶液超声处理约 20 min. 搅拌一段时间后, 在不断剧烈搅拌下, 将 0.2 mL AgNO₃ 水溶液(15.75 mg)加入到上述溶液中. 然后将混合溶液搅拌 3 h. 停止搅拌后, 待产物沉降到烧杯底部, 通过倾析法除去上清液. 将收集的产物在真空下于 65 °C 干燥 10 h, 产品置于阴凉干燥处保存待用.

(2)硼氢化钠还原 Ag⁺-ZIF-67: 将步骤(1)中干燥的 Ag⁺-ZIF-67 分散在 120 mL 甲醇中, 逐滴加入 600 μL 新鲜配制的 NaBH₄ 水溶液(25 mg·mL⁻¹), 快速地搅拌 30 min. 通过离心收集深紫红色产物, 用甲醇洗涤 3 次. 65 °C 真空过夜干燥, 产品置于阴凉干燥处保存待用.

4.3 细菌培养

本研究使用金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)进行所有细菌实验^[40-41]. 使用接种环将少量菌落接种到 LB 肉汤中, 在 37 °C 轻微振荡(120 r/min)孵育 12 h. 将 8 mL 的细菌悬液使用 PBS (10 mmol/L, pH 7.4)离心洗涤(7 min, 3000 r/min)三次. 再将细菌悬液稀释到不同浓度, 使用酶标仪(Spark, TECAN, Männedorf, Switzerland)测量其在 600 nm 的光密度(OD₆₀₀). 当 OD₆₀₀ 的值为 0.1 时, 细菌悬液的浓度视为 1×10⁸ CFU·mL⁻¹.

4.4 细菌生长曲线测试

不同浓度的 AgNPs@ZIF-67, ZIF-67, AgNPs 的悬液

(100 μL)加入到 96 孔板的每个孔中, 再向每个孔中加入 100 μL 的金黄色葡萄球菌 LB 肉汤悬液(1×10^6 CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育. 每隔 2 h 使用酶标仪测量 OD₆₀₀, 所获得的数据绘制细菌生长曲线.

4.5 平板菌落计数法测试

2 mL 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 AgNPs@ZIF-67, 2 mL 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 ZIF-67, 2 mL 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 AgNPs 以及 2 mL PBS (10 mmol/L, pH 7.4) 分别加入到 2 mL 的金黄色葡萄球菌 LB 肉汤悬液(1×10^6 CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$), 放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下分别孵育 4, 12, 24 h. 获得的细菌悬液用 PBS (10 mmol/L, pH 7.4) 稀释 5000 倍或者 10000 倍. 细菌悬液(100 μL)均匀地接种到 LB 琼脂板上. 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜孵育, 菌落数量通过 LB 琼脂板的照片进行定量.

References

- [1] Qi, Y.; Ren, S.; Che, Y.; Ye, J.; Ning, G. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*, 613 (in Chinese). (齐野, 任双颂, 车颖, 叶俊伟, 宁桂玲, 化学学报, **2020**, *78*, 613.)
- [2] Han, Y.; Liu, Z.; Chen, T. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 643422.
- [3] Chen, H.; Xu, F.; Xue, D.; Yang, Y.; Zhang, Q. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 1362 (in Chinese). (陈华军, 徐伏秋, 薛冬, 阳永福, 张秋芬, 化学学报, **2012**, *70*, 1362.)
- [4] Liao, C.; Li, Y.; Tjong, S. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 449.
- [5] Zhang, Y.; Zhang, X.; Song, J.; Jin, L.; Wang, X.; Quan, C. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1579.
- [6] Braakhuis, M.; Gosens, I.; Krystek, P.; Boere, J.; Cassee, F.; Fokkens, P.; Post, J.; Loveren, H.; Park, M. *Part. Fibre Toxicol.* **2014**, *11*, 49.
- [7] Li, R.; Chen, T.; Pan, X. *ACS Nano* **2021**, *15*, 3808.
- [8] Zeng, J.; Wang, X.; Zhang, X.; Zhuo, R. *Acta Chim. Sinica* **2019**, *77*, 1156 (in Chinese). (曾锦跃, 王小双, 张先正, 卓仁禧, 化学学报, **2019**, *77*, 1156.)
- [9] Li, J.; Lv, F.; Li, J.; Li, Y.; Gao, J.; Luo, J.; Xue, F.; Ke, Q.; Xu, H. *Nano Res.* **2020**, *13*, 2268.
- [10] Chen, J.; Bao, X.; Meng, T.; Sun, J.; Yang, X. *Chem. Eng. J.* **2022**, *430*, 133091.
- [11] Aguado, S.; Quiros, J.; Canivet, J.; Farrusseng, D.; Boltes, K.; Rosal, R. *Chemosphere* **2014**, *113*, 188.
- [12] Shi, Q.; Luo, X.; Huang, Z.; Midgley, A. C.; Wang, B.; Liu, R.; Zhi, D.; Wei, T.; Zhou, X.; Qiao, M.; Zhang, J.; Kong, D.; Wang, K. *Acta Biomater.* **2019**, *86*, 465.
- [13] Abd El Salam, H. M.; Nassar, H. N.; Khidr, A. S. A.; Zaki, T. J. *Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2018**, *28*, 2791.
- [14] Li, W.; Yang, F.; Fang, X.; Rui, Y.; Tang, B. *Electrochim. Acta* **2018**, *282*, 276.
- [15] Sun, D.; Yang, D.; Wei, P.; Liu, B.; Chen, Z.; Zhang, L.; Lu, J. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 41960.
- [16] Takashima, Y.; Sato, Y.; Tsuruoka, T.; Akamatsu, K. *Dalton Trans.* **2020**, *49*, 17169.
- [17] Zhao, Y.; Sun, X.; Zhang, G.; Trewyn, B.; Slowing, I.; Lin, V. *ACS Nano* **2011**, *5*, 1366.
- [18] Recordati, C.; De Maglie, M.; Bianchessi, S.; Argenti, S.; Cella, C.; Mattiello, S.; Cubadda, F.; Aureli, F.; D'Amato, M.; Raggi, A.; Lenardi, C.; Milani, P.; Scanziani, E. *Part. Fibre Toxicol.* **2016**, *13*, 12.
- [19] Yang, M.; Shao, Z.; Liao, X.; Xu, W.; Zhang, Y. *Chin. J. Anal. Chem.* **2020**, *48*, 1674 (in Chinese). (杨梅, 邵泽宇, 廖晓玲, 徐文峰, 张园园, 分析化学, **2020**, *48*, 1674.)
- [20] Han, B.; Yan, Q.; Xin, Z.; Yan, Q.; Jiang, J. *Chin. J. Anal. Chem.* **2020**, *48*, 1025 (in Chinese). (韩冰雁, 闫琴, 辛泽, 燕琪芳, 姜静美, 分析化学, **2020**, *48*, 1025.)
- [21] Sun, Y.; Qi, Y.; Shen, Y.; Jing, C.; Chen, X.; Wang, X. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*, 147 (in Chinese). (孙延慧, 齐有啸, 申优, 井翠洁, 陈笑笑, 王新星, 化学学报, **2020**, *78*, 147.)
- [22] Huang, X.; Lin, Y.; Zhang, J.; Chen, X. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1557.
- [23] Ivanova, T.; Harizanova, A.; Koutzarova, T.; Vertruyen, B. *Superlattices Microstruct.* **2014**, *70*, 1.
- [24] Yu, Z.; Qian, L.; Zhong, T.; Ran, Q.; Huang, J.; Hou, Y.; Li, F.; Li, M.; Sun, Q.; Zhang, H. *Mol. Catal.* **2020**, *485*, 110797.
- [25] Zhao, K.; Guo, J.; Wei, H.; Yang, Y. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2019**, *46*, 4920.
- [26] Sang, Y.; Cao, F.; Li, W.; Zhang, L.; You, L.; Deng, Q.; Dong, K.; Ren, J.; Qu, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 5177.
- [27] Fan, L.; Meng, T.; Yan, M.; Wang, D.; Chen, Y.; Xing, Z.; Wang, E.; Yang, X. *Small* **2021**, e2100998.
- [28] Saghir, S.; Xiao, Z. *J. Mol. Liq.* **2021**, *328*, 115323.
- [29] Huang, X.; Xu, X.; Li, C.; Wu, D.; Cheng, D.; Cao, D. *Adv. Energy Mater.* **2019**, *9*, 1803970.
- [30] Shakya, S.; He, Y.; Ren, X.; Guo, T.; Maharjan, A.; Luo, T.; Wang, T.; Dhakhwa, R.; Regmi, B.; Li, H.; Gref, R.; Zhang, J. *Small* **2019**, *15*, e1901065.
- [31] Miao, X.; Yu, F.; Liu, K.; Lv, Z.; Deng, J.; Wu, T.; Cheng, X.; Zhang, W.; Cheng, X.; Wang, X. *Bioact. Mater.* **2022**, *7*, 181.
- [32] Zhao, J.; Bao, X.; Meng, T.; Wang, S.; Lu, S.; Liu, G.; Wang, J.; Sun, J.; Yang, X. *Chem. Eng. J.* **2021**, *420*, 129674.
- [33] Qian, L.; Lei, D.; Duan, X.; Zhang, S.; Song, W.; Hou, C.; Tang, R. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *192*, 44.
- [34] Huang, L.; Chen, J.; Wang, J.; Dong, S. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaav5490.
- [35] Chao, D.; Dong, Q.; Chen, J.; Yu, Z.; Wu, W.; Fang, Y.; Liu, L.; Dong, S. *Appl. Catal., B* **2022**, *304*, 121017.
- [36] Liu, L.; Luo, X.; Liu, J. *Small* **2020**, *16*, e2000011.
- [37] Karimi Alavijeh, R.; Beheshti, S.; Akhbari, K.; Morsali, A. *Polyhedron* **2018**, *156*, 257.
- [38] Shen, M.; Forghani, F.; Kong, X.; Liu, D.; Ye, X.; Chen, S.; Ding, T. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 1397.
- [39] Fang, G.; Li, W.; Shen, X.; Perez-Aguilar, J. M.; Chong, Y.; Gao, X.; Chai, Z.; Chen, C.; Ge, C.; Zhou, R. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 129.
- [40] Li, Z.; Gao, J.; Jian, M.; Wang, Z. *Chin. J. Anal. Chem.* **2018**, *46*, 1904 (in Chinese). (李铸衡, 高晶清, 简明红, 王振新, 分析化学, **2018**, *46*, 1904.)
- [41] Liu, T.; Yan, S.; Zhou, R.; Zhang, X.; Yang, H.; Yan, Q.; Yang, R.; Luan, S. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 42576.

(Cheng, F.)