

介孔二氧化硅包覆银纳米颗粒的制备及抗菌性能

王 彦 陈绚丽 文利雄* 陈建峰

(北京化工大学 纳米材料先进制备技术与应用科学教育部重点实验室, 北京 100029)

摘 要: 首先采用次磷酸钠液相还原方法制备了纳米银溶胶;再以正硅酸乙酯为硅源,十六烷基三甲基溴化铵为模板剂,采用溶胶-凝胶法,在制备的纳米银溶胶中的银颗粒表面原位生长二氧化硅球壳;然后利用溶剂萃取法去除有机模板剂,再经超临界干燥后制备出介孔二氧化硅包覆银纳米颗粒($\text{Ag}@m\text{SiO}_2$)。对所得样品进行了 TEM、SEM、XRD、FT-IR、 N_2 吸附/脱附等表征,结果表明此纳米复合粒子的介孔结构有序性良好、比表面积大、呈连接的球状形貌。进一步以二倍稀释法测试了 $\text{Ag}@m\text{SiO}_2$ 纳米颗粒对大肠杆菌和金色葡萄球菌的最小抑菌质量浓度(均为 $156 \mu\text{g}/\text{mL}$)和最小杀菌质量浓度(312.5 和 $625 \mu\text{g}/\text{mL}$),结果表明 $\text{Ag}@m\text{SiO}_2$ 纳米颗粒有良好的抗菌效果。

关键词: 介孔二氧化硅;银;纳米复合材料;抗菌性能

中图分类号: TQ032.41

引 言

介孔二氧化硅材料由于其自身比表面积大、孔道有序、孔径可调等特点,已经成为一种优异的载体材料,被广泛应用于催化、分离、生物等领域中。例如, Kuan 等^[1]制备了 $\text{Pt}/\text{MCM-41}$ 纳米复合材料,用于肉桂酸加氢催化反应; Monty 等^[2]制备了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@m\text{SiO}_2$ 作为靶向药物载体; Brian 等^[3]利用合成的介孔硅材料制备了控释抗菌剂。

银是一种具有广谱性和不易产生耐药性的材料^[4-5],其抗菌活性仅次于汞,所以银系抗菌材料^[6]是最常见的无机抗菌剂。Feng 等^[7]认为银系无机抗菌剂的抗菌性能是由于含 Ag 材料释放出 Ag^+ ,而 Ag^+ 依靠静电引力牢固吸附在带负电的细胞膜上,并进一步穿透细胞壁进入菌体与巯基反应,使细菌的蛋白质凝固,从而破坏细胞合成酶的活性,使细胞丧失分裂增殖能力而死亡。但目前已有文献报道,以含银离子溶液为前驱体通过离子吸附或离子交换法将银负载到沸石^[8]、蒙脱石^[9]和磷酸盐^[10]等材料上,容易导致银离子在光照下发生变色现象、释

放初期过快而较难实现抗菌持久。

本文制备了介孔二氧化硅直接包覆纳米银颗粒的复合材料($\text{Ag}@m\text{SiO}_2$),同时采用超临界二氧化碳干燥技术^[11],用于解决纳米粉体干燥过程中的收缩、坍塌和团聚问题;并进一步采用制备的 $\text{Ag}@m\text{SiO}_2$ 粉体对革兰氏阴性菌大肠杆菌和革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌进行了抗菌性能测试。为介孔结构复合材料在保持抗菌剂的长期有效提供一种研究思路。

1 实验部分

1.1 实验原料

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB),分析纯,天津市福晨化学试剂厂;正硅酸乙酯(TEOS),分析纯,汕头市西陇化工厂;硝酸银,分析纯,北京化工厂;聚乙烯吡咯烷酮(PVP),分析纯,天津市博迪化工有限公司;六偏磷酸钠,分析纯,北京化学试剂公司;次磷酸钠($\text{NaH}_2\text{PO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$),分析纯,北京化工厂;硝酸铵,分析纯,北京化学试剂公司;大肠杆菌(ATCC, 25922)和金黄色葡萄球菌(ATCC, 26112)菌株,北京中国药品生物制品检定所;自配营养肉汤培养液,培养基;LB 培养液,培养基。

1.2 实验仪器

GNP-908 OBS-III 隔水式恒温培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;ZDX-35 SBI 型座式自动电热压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;D/Max 2500 型 X 射线衍射仪,日本理学公司;S250MK3 型

收稿日期: 2010-01-25

基金项目: 国家自然科学基金(20821004/20990224);教育部科学技术研究重点项目(108009)

第一作者: 女, 1983 年生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: wenlx@mail.buct.edu.cn

扫描电子显微镜,英国剑桥科学仪器有限公司;H-800 型透射电子显微镜,日本日立公司;NEXUS-470 型红外光谱仪,美国尼高力仪器公司;ASAP 2010 型比表面与微孔分布物理吸附仪,美国麦克仪器公司;超临界流体装置,杭州华黎泵业有限公司。

1.3 表征

采用 XRD 进行物相结构分析,用 TEM 观察材料内部结构,用 SEM 观察材料的表面形貌及粒径,通过 FT-IR 了解材料的物质组成,采用 N_2 吸附/脱附等温线及孔径分布曲线分析材料的比表面积和孔径。

1.4 Ag@mSiO₂ 的制备

银溶胶的制备采用次磷酸钠液相还原方法^[12]:将 1.33 g $NaH_2PO_2 \cdot H_2O$ 、0.60 g ($NaPO_3$)₆、一定量 PVP 溶于 125 mL 去离子水中,加入 2.0 mL 浓度为 1.0 mol/L 的 H_2SO_4 溶液,配制成还原液;将 3.40 g $AgNO_3$ 溶于 20 mL 去离子水中,配制成 Ag^+ 溶液;在 50 °C 水浴下,将 Ag^+ 溶液滴加到还原液中;滴加完成后继续搅拌 30 min,制得红棕色银溶胶。

Ag@mSiO₂ 复合材料的制备:在 1000 mL 烧杯中,加入 460 mL 去离子水,3.5 mL 浓度为 2.0 mol/L 的 NaOH 溶液,恒温 80 °C 密封加热搅拌;取一定量的银溶胶,加入 1.0 g CTAB,再加入 20 mL 去离子水,经超声混合均匀后,转入上述 1000 mL 的烧杯中。5 min 后,取 5 mL TEOS 缓慢滴加到上述溶液中,滴加完成后继续剧烈搅拌 2 h,经老化、洗涤,除去可能的杂质离子。采用硝酸铵和乙醇(95%)的混合体系作为萃取剂,在 60 °C 下浸泡沉淀 15 min,去除 CTAB 和 PVP。而后,将沉淀物用无水乙醇洗涤置换出其中的水,再以 CO_2 为干燥介质采用超临界干燥工艺,温度控制在 45 °C,压力调节在 10 MPa。其合成示意图可以用图 1 表示。

1.5 抗菌性能测试

Ag@mSiO₂ 抗菌剂的抗菌性能用最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)来评价。MIC 是指能够抑制培养基内细菌生长所需药剂的最低浓度;MBC 是指培养基内细菌被完全杀灭的最低药剂浓度。实验方法如下:称取 0.2 g 抗菌剂粉末(即上述合成的介孔二氧化硅包覆银纳米颗粒)分散于 5 mL LB 液体培养基中,采用二倍稀释法^[13]稀释使最终的抗菌液浓度分别为 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156, 0.078, 0.039, 0.020 mg/mL,最终接种的细菌量约为 5×10^5 CFU/mL。另取两支试管,一

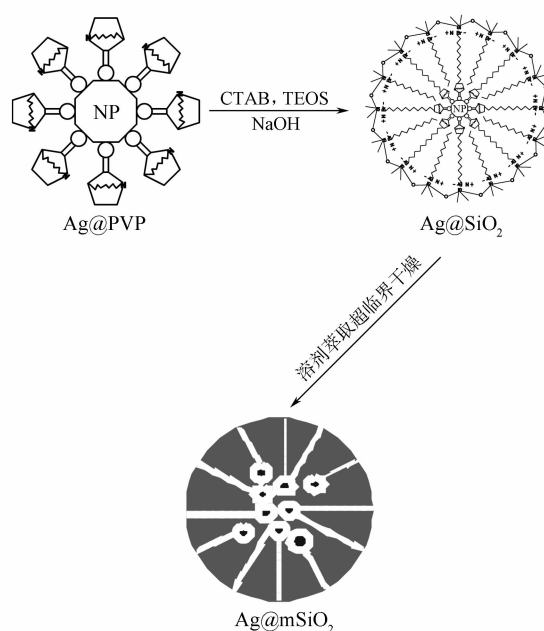


图 1 Ag@mSiO₂ 颗粒的合成示意图

Fig. 1 Schematic illustration of the synthesis of Ag@mSiO₂

支加入 1 mL 灭菌生理盐水和 1 mL 的菌液作为阳性对照组,另一支加入 1 mL 灭菌生理盐水和 1 mL 抗菌液作为阴性对照组。将所有的试管摇匀并放入 37 °C 培养箱中,孵育 20 h 后,取出观察细菌的生长情况,同阳性对照组对比浑浊度。试管内液体清亮的抗菌剂最低浓度为该抗菌剂的 MIC,用接种环挑取清亮试管中的培养物,划线接种于固体培养基平板中,孵育 20 h 后,无细菌生长的最低抗菌剂浓度为该抗菌剂的 MBC。以上实验重复 3 次,取平均值。金色葡萄球菌的抗菌性能实验步骤同上。

2 结果与讨论

2.1 Ag@mSiO₂ 的形貌

为了了解纳米银的包覆情况,本文对制备的 Ag@mSiO₂ 进行了透射和扫描电镜观察。图 2、图 3 分别为 Ag@mSiO₂ 的 SEM 图和 TEM 图。从图 2 可以看出,所合成的介孔二氧化硅包覆银纳米复合颗粒(Ag@mSiO₂)分散良好,无团聚现象,外表面没有附着纳米银粒子,说明银粒子被包覆在 SiO₂ 的内部。从图 3 可以看出,深色的粒子为纳米银颗粒,粒径在 10~20 nm 左右,制备出的 Ag@mSiO₂ 纳米材料呈连接的球形,但包覆的银粒子数目各有不同。

在研究过程中对影响合成 Ag@mSiO₂ 颗粒形貌的因素进行过系统的研究,包括温度变化、银胶浓度变化、TEOS 的滴加速度快慢等一系列实验,考察

了这些因素对产物结构形貌的影响。从银含量越高杀菌性能效果越好这个角度考虑,择优选择了包覆银粒子多的连接小球进行抗菌性能测试。

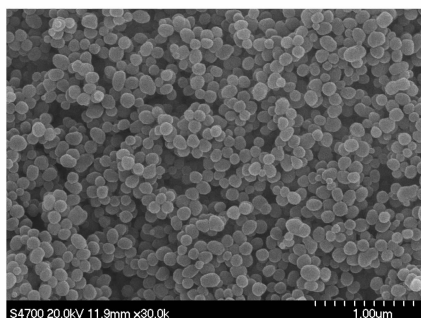


图2 Ag@mSiO₂ 的 SEM 图

Fig.2 SEM image of Ag@mSiO₂

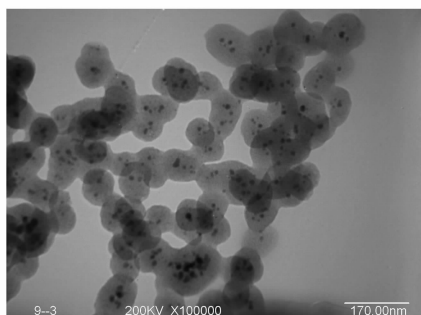


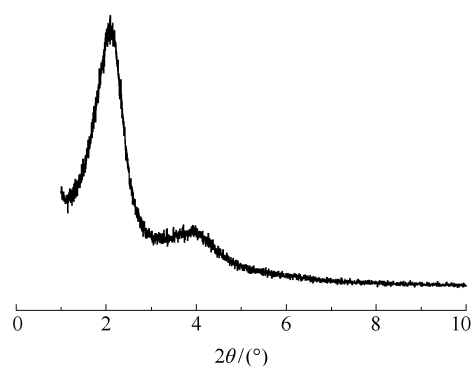
图3 Ag@mSiO₂ 的 TEM 图

Fig.3 TEM image of Ag@mSiO₂

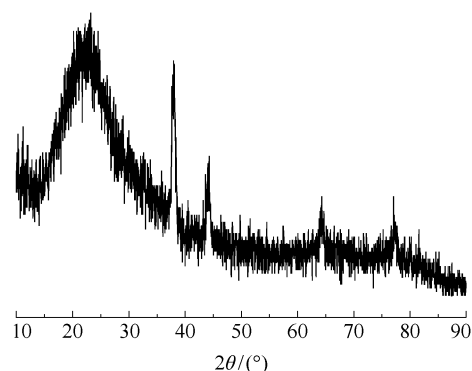
2.2 Ag@mSiO₂ 的微观结构

图4(a)是互连球形 Ag@mSiO₂ 纳米颗粒小角 XRD 谱图,可以看出材料在 $2\theta = 1^\circ \sim 10^\circ$ 范围内存在一个强特征衍射峰,这表明成功合成了含银介孔二氧化硅材料;在 $2\theta = 4^\circ$ 左右有一弱衍射峰,说明该材料的孔隙率和有序性得到较好的保持,有良好的周期性。图4(b)是大角 XRD 谱图,可以看出,在 $2\theta = 23^\circ$ 处有一个弥散峰,为 SiO₂ 标准特征峰,这说明 SiO₂ 是无定形的,其晶型与传统硅胶一样;同时可以看到以下四个峰分别对应立方晶系银的 (111), (200), (220), 以及 (311) 晶面,说明硅壳中的银以单质的形态存在。

图5中为 Ag@SiO₂ (溶剂萃取前) 和 Ag@mSiO₂ 的 FT-IR 谱图,两者在 3440 cm^{-1} 附近有一宽而强的吸收峰,这是 SiO₂ 表面羟基伸缩振动吸收峰^[14]; 1075 cm^{-1} 处的吸收峰是 Si—O—Si 键的反对称伸缩振动, 798 和 455 cm^{-1} 附近的吸收峰分别由骨架中 Si—O—Si 键的对称伸缩振动和弯曲振动引



(a) 小角衍射



(b) 大角衍射

图4 Ag@mSiO₂ 的 XRD 谱图

Fig.4 XRD patterns of Ag@mSiO₂

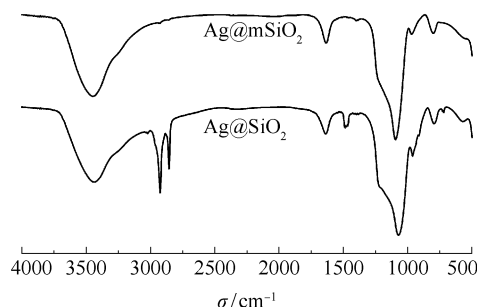


图5 Ag@SiO₂ 和 Ag@mSiO₂ 的 FT-IR 谱图

Fig.5 FT-IR spectra of Ag@SiO₂ and Ag@mSiO₂

起的。Ag@SiO₂ 的 FT-IR 谱图中 2 个窄而强的吸收峰 2919 和 2851 cm^{-1} 分别为 C—H 键变型振动吸收带和 C—H 键伸缩振动吸收带,而 1487 cm^{-1} 处的吸收带是由 CH₂ 基的剪式振动和 CH₃ 基的反对称变型振动引起的; Ag@mSiO₂ 的 FT-IR 谱图中上述 3 个吸收峰均消失,而 Ag@SiO₂ 谱图中未出现 PVP 的特征峰,可能是因为包覆在外面的二氧化硅球壳相对太厚和 PVP 含量太少造成的; Ag@mSiO₂ 的谱图中也未出现 PVP 的特征峰,这是因为 PVP 易溶于乙醇溶剂,说明模板剂 CTAB 和 PVP 可完全通过溶

剂取去除掉。

2.3 N_2 吸附/脱附等温线及孔径分布

图 6 为 $Ag@mSiO_2$ 的 N_2 吸附/脱附等温线及孔径分布曲线。此吸附等温线符合 Langmuir IV 型, 表明该材料具有介孔结构, 其 BET 比表面积高达 $851.6 \text{ m}^2/\text{g}$, 孔容为 $0.69 \text{ cm}^3/\text{g}$; 平均孔径是 3.2 nm , 孔径分布曲线在 $2 \sim 3 \text{ nm}$ 之间出现最高峰, 说明孔径在这一范围比较集中。对比文献^[15]数据, 表明活性组分 Ag 占据了介孔 SiO_2 的内部部分空间, 从而使比表面积及孔容有所下降。

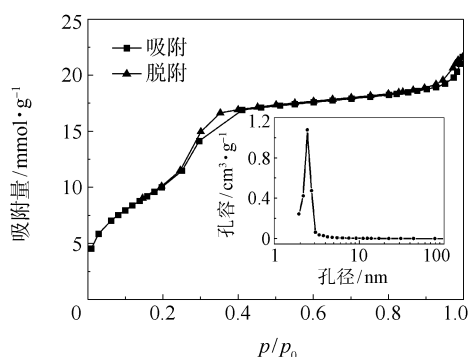


图 6 $Ag@mSiO_2$ 的 N_2 吸附/脱附等温线及孔径分布曲线

Fig. 6 N_2 adsorption-desorption isotherms and the pore size distribution of the as-prepared $Ag@mSiO_2$

2.4 $Ag@mSiO_2$ 抗菌性能

MIC 和 MBC 反映的是抗菌材料在体外的抗菌活性或抗菌潜能。据日本抗菌协会制定的《银等无机抗菌剂自主规格及其抗菌试验法》中规定^[14]: 抗菌剂的 MIC 在不高于 $800 \mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度条件下具有抑菌功能, 表示该抗菌剂有良好的抑菌效果。表 1 数据说明了在不同浓度的 $Ag@mSiO_2$ 下, 大肠杆菌和金色葡萄球菌的生长情况。按前述检测 MIC

表 1 $Ag@mSiO_2$ 抗菌活性测定结果

Table 1 Antibacterial activities of $Ag@mSiO_2$ nanoparticles

$\rho(Ag@mSiO_2)/$ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	抗菌性能		$\rho(Ag@mSiO_2)/$ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	抗菌性能	
	大肠 杆菌	金色葡 萄球菌		大肠 杆菌	金色葡 萄球菌
0	+	+	0.625	-	-
0.02	+	+	1.25	-	-
0.039	+	+	2.5	-	-
0.078	+	+	5	-	-
0.156	-	-	10	-	-
0.313	-	-			

+ : 有细菌生长; - : 无细菌生长

和 MBC 的方法, 实验获得 $Ag@mSiO_2$ 抗菌剂粉末对大肠杆菌和金色葡萄球菌的 MIC 均为 $156 \mu\text{g}/\text{mL}$, MBC 分别为 312.5 和 $625 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

$Ag@mSiO_2$ 粉体良好的抗菌性能与其本身的结构有重要关系: (1) $Ag@mSiO_2$ 的比表面积大, 分散性良好, 与细菌接触的机率大; (2) $Ag@mSiO_2$ 具有较大的规则排列孔道, 使得银离子能够顺利从抗菌剂载体中游离出来, 从而保证了其良好的抗菌能力; (3) 银粒子被包覆于介孔二氧化硅的壳层内部, 防止了银粒子快速从抗菌剂载体上脱落, 延长了抗菌效果的持久性。目前, 本实验室正在开展抗菌持久性实验的相关研究。

3 结论

本文采用溶胶-凝胶法结合溶剂萃取与 CO_2 超临界干燥技术制备的介孔二氧化硅包覆纳米银颗粒无机抗菌剂具有规则有序的介孔结构、较大的比表面积和良好的纳米颗粒分散性; $Ag@mSiO_2$ 具有良好的细菌抑制作用, 对大肠杆菌和金色葡萄球菌的 MIC 均为 $156 \mu\text{g}/\text{mL}$, 而 MBC 分别为 312.5 和 $625 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

参考文献:

- [1] Kuan J L, Lung J C, Prasad M R, et al. Core-shell synthesis of a novel, spherical, mesoporous silica/platinum nanocomposite: Pt/PVP@MCM-41[J]. Advanced Materials, 2004, 16(20): 1845-1849.
 - [2] Monty L, Jie L, Kovochich M, et al. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery[J]. ACS Nano, 2008, 2(5): 889-896.
 - [3] Brian G T, Chad M W, Victor S-Y L. Morphological control of room-temperature ionic liquid templated mesoporous silica nanoparticles for controlled release of antibacterial agents[J]. Nano Letters, 2004, 4(11): 2139-2143.
 - [4] Jia H S, Hou W S, Wei L Q, et al. The structures and antibacterial properties of nano- SiO_2 supported silver/zinc-silver materials[J]. Dental Materials, 2008, 24(2): 244-249.
 - [5] Lansdown A B, Silver I. Its antibacterial properties and mechanism of action[J]. Journal of Wound Care, 2002, 11(4): 125-130.
 - [6] 赵娣芳, 周杰, 刘宁. 含银无机抗菌材料的开发及应用[J]. 矿产保护与利用, 2005(3): 12-15.
- Zhao T F, Zhou J, Liu N. Development and application

- of inorganic antibacterial material carrying silver [J]. Conservation and Utilization of Mineral Resources, 2005 (3): 12–15. (in Chinese)
- [7] Feng Q L, Wu J, Chen G Q, et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Biomedical Materials Research, 2000, 52(4): 662–668.
- [8] Kawahara K, Tsuruda K, Morishita M, et al. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions [J]. Dental Materials, 2000, 16(6): 452–455.
- [9] Oya A, Banse T, Ohashi F, et al. An antimicrobial and antifungal agent derived from montmorillonite [J]. Applied Clay Science, 1991, 6(2): 135–142.
- [10] Tan S Z, Ouyang Y S, Zhang L L, et al. Study on the structure and antibacterial activity of silver-carried zirconium phosphate [J]. Materials Letters, 2008, 62(14): 2122–2124.
- [11] 王宝和, 于才渊, 王喜忠. 纳米多孔材料的超临界干燥新技术 [J]. 化学工程, 2005, 33(2): 13–17.
- Wang B H, Yu C Y, Wang X Z. Novel technology of supercritical drying for nano-porous materials [J]. Chemical Engineering, 2005, 33(2): 13–17. (in Chinese)
- [12] 孙红刚, 刘恒, 尹光福, 等. 液相还原法制备纳米银的固液分离研究 [J]. 稀有金属, 2006, 30(6): 153–157.
- Sun H G, Liu H, Yin G F, et al. Solid-liquid separation during preparation of silver nanoparticles by reduction in solution [J]. Chinese Journal of Rare Metals, 2006, 30(6): 153–157. (in Chinese)
- [13] 季君晖, 史维明. 抗菌材料 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- Ji J H, Shi W M. Antibiotic materials [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003. (in Chinese)
- [14] Boven G, Oosterling M, Challa G, et al. Grafting kinetics of poly(methyl methacrylate) on microparticulate silica [J]. Polymer, 1990, 31(12): 2377–2383.
- [15] Cai Q, Luo Z S, Pang W Q, et al. Dilute solution routes to various controllable morphologies of MCM-41 silica with a basic medium [J]. Chem Mater, 2001, 13(2): 258–263.

Preparation and antibacterial performance of silver nanoparticles encaged in mesoporous silica

WANG Yan CHEN XuanLi WEN LiXiong CHEN JianFeng

(Key Laboratory for Nanomaterials, Ministry of Education, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: A silver sol has been synthesized by a chemical reduction method using polyvinylpyrrolidone as the protecting agent and sodium hypophosphite as the reducing agent. By adding hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) as template and tetraethyl orthosilicate (TEOS) as silica source into the above silver sol, silica shells were grown in situ on the silver nanoparticles to form core-shell structured Ag@mSiO₂ nanocomposites. The CTAB template was then removed by solvent extraction and the Ag@mSiO₂ nanocomposites were dried by supercritical fluid drying. TEM, SEM, XRD, FT-IR and N₂ adsorption-desorption isotherm measurements indicated that the resulting Ag@mSiO₂ nanoparticles were interconnected spheres with an ordered mesoporous structure and a very high BET surface area. The antibacterial performances of Ag@mSiO₂ nanoparticles against *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) were tested using the popular twofold serial dilution method to obtain the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC), respectively. The results demonstrated that the Ag@mSiO₂ nanoparticles possess good antibacterial properties.

Key words: mesoporous silica; silver; nanocomposite materials; antibacterial performances