

抗菌墨鱼骨转化羟基磷灰石的制备及其抗菌性能研究

刘明 王小红 刘钟馨 曹阳 王江

(海南大学材料与化工学院,海南特有资源与优势化工材料教育部重点实验室,海口 570228)

摘要 采用水热反应和离子交换法,制备了锌掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石(Zn-CBHA)和钛掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石(Ti-CBHA),以及钛与锌共掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石(TiZn-CBHA)。利用EDS、XRD、和FT-IR分别分析了掺杂抗菌墨鱼骨转化羟基磷灰石的组成、晶型和结晶度、结构;通过抑菌环和抗菌率实验,研究了抗菌墨鱼骨转化羟基磷灰石对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的抗菌性能。结果表明:采用水热反应和离子交换法可以制得掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石,Zn-CBHA、Ti-CBHA和TiZn-CBHA对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌都具有良好的抗菌性能,锌离子溶出抗菌和钛离子光催化抗菌的协同作用使TiZn-CBHA的抗菌性能增强。

关键词 墨鱼骨转化羟基磷灰石,锌掺杂,钛掺杂,共掺杂,抗菌性能

Preparation and antibacterial property of antibacterial cuttlebone-transformed hydroxyapatite

Liu Ming Wang Xiaohong Liu Zhongxin Cao Yang Wang Jiang

(Materials and Chemical Engineering department of Hainan University, Ministry of Education Key Laboratory of Application Technology of Hainan Superior Resources Chemical Materials, Haikou 570228)

Abstract Zinc-doped cuttlebone-transformed hydroxyapatite (Zn-CBHA), titanium-doped cuttlebone-transformed hydroxyapatite (Ti-CBHA) and zinc and titanium co-doped cuttlebone-transformed hydroxyapatite (TiZn-CBHA) were prepared by hydrothermal reaction and ion exchange method. The composition, crystal shape and crystallinity, structure of the samples were characterized using EDS, XRD and FT-IR. Moreover, the bacterial inhibition zone and antibacterial ratio were tested to investigate the antibacterial properties of antibacterial cuttlebone-transformed hydroxyapatite to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The results indicated that, antibacterial cuttlebone-transformed hydroxyapatite can be prepared by hydrothermal reaction and ion exchange method, Zn-CBHA, Ti-CBHA and TiZn-CBHA had good antibacterial properties to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, the synergistic effect of the titanium photocatalytic decomposition antibacterial and zinc ion dissolved out antibacterial, which enhanced the antibacterial property of TiZn-CBHA.

Key words cuttlebone-transformed hydroxyapatite, zinc-doping, titanium-doping, co-doping, antibacterial property

羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)因其与人体自然骨组成和结构极为相似,并且有优异的生物相容性和生物活性,因此被广泛作为人骨缺损修复材料^[1-3]。然而利用化工原料人工合成的羟基磷灰石结晶性和结构稳定性较高,不易生物降解,不利于骨缺损部位的骨生长^[4]。在骨修复和骨植入手术过程中,由于空气中细菌等微生物的环境产生炎症反应,在骨修复或植入部位引起细菌感染,甚至导致修复或植入失败^[5]。锌是人体必需的微量元素, Zn^{2+} 具有抗菌性,且呈浅白色,不会带来实际应用中抗菌剂填料带来的颜色问题^[6], Ti^{4+} 是光催化抗菌活性离子,大量的研究证实多相光催化杀菌在杀菌消毒领域具有很大的潜力^[7]。墨鱼骨是海洋生物墨鱼的脊梁骨,主要化学成份为文石相碳酸钙,具有良好的三维多孔房架式网状结构,易生物降解^[8-10]。为了解决羟基磷灰石的抗菌性能和生物降解能力等问题,在本研究工作中,以生物材料墨鱼骨作为原料,采用水热反应和离子交换法,制备了锌掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石(Zn-CBHA)和钛掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰

石(Ti-CBHA),以及钛与锌共掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石(TiZn-CBHA),提高了羟基磷灰石的生物降解能力,并使其具备良好的抗菌性能。

1 实验部分

1.1 材料制备

将预处理过的墨鱼骨研磨成粉体,按质量均分为16个样品,分别置于高压反应釜内胆(容量为80mL,聚四氟乙烯制作)中,再按Ca/P=1.67的配比分别加入等量磷酸氢二铵,加入适量蒸馏水,分别标号为1、2、3、4四大组,一组4个样品,在1组中按 $X_{Zn} = Zn/(Ca + Zn)$ 的值为0.4加入等量 $Zn(NO_3)_2$,在2组中按 $X_{Ti} = Ti/(Ca + Ti)$ 的值为0.4加入等量 $Ti(SO_4)_2$,在第3组中按 $X_{Zn} = Zn/(Ca + Zn)$ 值为0.4和 $X_{Ti} = Ti/(Ca + Ti)$ 值为0.4加入 $Zn(NO_3)_2$ 和 $Ti(SO_4)_2$,第4组作为对照组,在反应温度为180℃,时间为8h,进行水热反应。

基金项目:海南省重点科技计划(ZDXM20100061; ZDXM20120066);海南省自然科学基金(511106)

作者简介:刘明(1987-),男,在读硕士,从事生物材料研究。

将各产物室温陈化 48h, 用去离子水洗涤上清液呈中性, 弃去上清液, 离心分离, 80℃ 烘干, 研磨, 得到 Zn-CBHA、Ti-CBHA 和 TiZn-CBHA 抗菌粉体。

1.2 材料表征

把制备好的材料分别进行 X 射线衍射分析 (XRD, D8 Advance 型, 德国 Bruker), 傅里叶变换红外光谱分析 (FT-IR, TENSOR27 型, 德国 Bruker), X 射线能谱分析 (EDS, Esprit 1.9 型, 德国 Bruker)。

1.3 材料的抗菌性能试验

试验材料: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, 8099), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538), 营养琼脂培养基 NA, 粉体, PBS 缓冲液 (0.03mol/L, pH 7.2~7.4), 滤纸片, 培养皿, 移液枪, 烧瓶等。试验方法: 参照《消毒技术规范》(2002 版) 2.1.8.2 抑菌环试验测抑菌环和 2.1.8.7 振荡烧瓶试验测抗菌率。

1.3.1 抑菌环试验

(1) 制备抑菌片。将直径 6mm 的无菌圆形干滤纸片浸泡于浓度为 80mg/mL 经超声 30min 后的材料悬浊液中, 10min 后取出晾干。对照组则取无菌干燥滤纸片, 浸泡于无菌蒸馏水中, 10min 后取出晾干; (2) 样品贴放。待滤纸片晾干后用无菌镊子贴于相应的无菌透明培养皿底部。各样片中心相距 20mm 以上, 与平板周缘相距 10mm 以上; (3) 接种试验菌。将用相应的液态培养基 37℃, 活化 24h 后的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌菌液用无菌生理盐水稀释至标准比浊管浊度 (通过 722N 可见分光光度计 560nm 测透光率) 制成菌悬液, 用移液枪吸取 1mL 菌悬液, 加入到 40℃ 已融化的琼脂培养基中, 充分混合均匀后倒入无菌透明培养皿内, 20min 后将培养皿放置于 37℃ 恒温培养箱中培养。

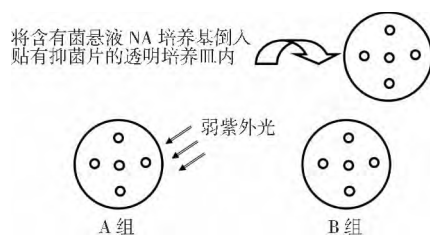


图 1 抑菌环试验示意图

每种菌种的平行 6 组中分为 A、B 两组, A 组培养时模仿自然光中的紫外含量, 采用 6uW/cm² 的紫外光强度进行照射, 24h 后观察并测量抑菌圈直径 (图 1)。

1.3.2 抗菌率试验

(1) 试验组实验。于三角烧瓶中加入 70mLPBS、5mL 菌悬液和 7.5g 试验粉体 (CBHA, Zn-CBHA, Ti-CBHA, TiZn-CBHA), 使试样测试的质量浓度为 0.1g/mL, 用比浊法估计菌悬液浓度。将烧瓶固定于振荡摇床, 在室温条件下, 以 300 r/min 振摇 2min, 取出 1mL, 用无菌滤膜过滤, 加入无菌 PBS 清洗 3 次, 用镊子把滤膜取下, 放置在平皿内, 洗下滤膜上的菌并做适当稀释, 作为振荡前试验组样液。用同样的振荡方式, 振荡 1h, 取 1mL 稀释作为振荡后试验组样液。将分别吸取的振荡前后样液各 1mL, 以琼脂倾注法接种平皿, 每个样液

接种 2 个平皿, 进行振荡前后活菌培养计数。在试验过程中, Ti-CBHA 组和 TiZn-CBHA 组在紫外光照条件下进行, (2) 对照组实验。不加试验粉体, 其它操作程序与试验组相同, 进行振荡前后活菌培养计数。按下式计算抑菌率 (μ): 抑菌率 = (样品振荡前平均菌落数 - 样品振荡后平均菌落数) × 100% / 样本振荡前平均菌落数, 试验重复 3 次, 取平均值。

2 结果与讨论

2.1 EDS 分析

根据各样品 EDS 微区化学元素成分定量分析数据得出墨鱼骨转化羟基磷灰石 (CBHA)、锌掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石 (Zn-CBHA)、钛掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石 (Ti-CBHA) 以及钛与锌共掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石 (TiZn-CBHA) 的样品表面的 Zn 和 Ti 的含量如表 1 所示。结果显示: 在 Zn-CBHA 样品中检测到了 Zn 元素, 在 Ti-CBHA 样品中检测到了 Ti 元素, 在 TiZn-CBHA 样品中检测到了 Zn、Ti 元素, 且掺杂含量与制备过程中所投含量相差不大。

表 1 CBHA、(Zn-CBHA)、(Ti-CBHA) 和 (TiZn-CBHA) 样品表面的 Zn 和 Ti 的含量

样品	Zn/wt%	Ti/wt%
CBHA	0	0
Zn-CBHA	3.54	0
Ti-CBHA	0	3.60
TiZn-CBHA	3.58	3.61

2.2 XRD 分析

图 2 是墨鱼骨转化羟基磷灰石 (CBHA)、锌掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石 (Zn-CBHA)、钛掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石 (Ti-CBHA) 以及钛与锌共掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石 (TiZn-CBHA) 样品的 XRD 图谱。图中 CBHA (a) 图谱在 26°、33°、40°、47°、50° 左右其各衍射峰与 HA (JCPDS No. 74-0566) 相符, 说明通过水热反应, 墨鱼骨主要成分文石相碳酸钙已完全转化成羟基磷灰石, Zn-CBHA (b) 的 XRD 图谱与 CBHA (a) 图谱大致相同, 说明其晶型和结晶度与 CBHA 保持一致, 相对于 CBHA (a) 和 Zn-CBHA (b), Ti-CBHA (c) 图谱和 TiZn-CBHA (d) 图谱的衍射峰位置相符, 但衍射强度明显降低, 说明钛掺杂后, 基本保持 CBHA 的基本结构, 但晶粒的结晶度有所减少。以上结果表明, CBHA 晶体中 Ca²⁺ 被等价离子 Zn²⁺ 等离子取代后, 由于 Zn²⁺ 和 Ca²⁺ 的结晶学半径相差不大, Zn²⁺ 进入晶胞, 六方对称性基本保持不变, 因此, 掺杂了 Zn²⁺ 后的墨鱼骨转化羟基磷灰石相谱峰没有明显变化。Ti⁴⁺ 掺杂后, CBHA 的结晶度减少, 由于 Ti⁴⁺ 对 CBHA 晶格中的 Ca²⁺ 进行离子交换, 结晶学半径较大的 Ti⁴⁺ 进入 CBHA 晶胞中平行于 c 轴的六边形通道, 引起晶格发生一定程度的畸变, 致使衍射峰强度降低, 结晶度减少。

2.3 FT-IR 分析

图 3 是墨鱼骨转化羟基磷灰石 (CBHA)、锌掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石 (Zn-CBHA)、钛掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石 (Ti-CBHA) 以及钛与锌共掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石 (TiZn-

CBHA) 样品的 FT-IR 图谱。图中 CBHA(a) 图谱, 含有 3439cm⁻¹、636cm⁻¹ 强的 OH⁻ 吸收峰, 以及 566cm⁻¹、1 037cm⁻¹ 强的 PO₄³⁻ 特征吸收峰, 显示其典型的羟基磷灰石结构基团吸收峰。Zn-CBHA(b)、Ti-CBHA(c) 和 TiZn-CBHA(d) 中的 OH⁻、PO₄³⁻ 吸收峰相对于 CBHA(a) 振动频率增大, 强度降低, 这种变化的主要原因在于 Zn²⁺ 的电负性为 1.65, Ti⁴⁺ 的电负性为 1.62, 而 Ca²⁺ 的电负性为 1.01, 当电负性大 Zn²⁺ 和 Ti⁴⁺ 置换电负性小的 Ca²⁺ 后, 对 OH⁻、PO₄³⁻ 离子将产生更大的诱导作用, 引起电子云密度增加, 并增大键的力常数, 使振动频率增大, 而 Zn²⁺、Ti⁴⁺ 与 OH⁻、PO₄³⁻ 结合结构振动的偶极矩发生变化, 致使振动强度降低。

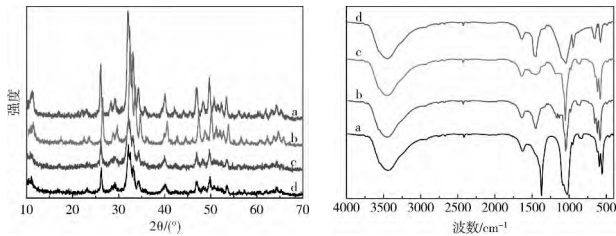


图 2 CBHA(a)、Zn-CBHA(b) 图 3 CBHA(a)、Zn-CBHA(b)、Ti-CBHA(c) 和 TiZn-CBHA(d) 样品的 XRD 谱图 Ti-CBHA(c) 和 TiZn-CBHA(d) 样品的 FT-IR 谱图

2.4 材料的抗菌性能

2.4.1 抑菌环实验结果

以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为测试菌对 CBHA、Zn-CBHA、Ti-CBHA 和 TiZn-CBHA 样品进行抑菌环试验, 结果如图 4 所示, 可以看出在 A 组中经紫外光照射, Zn-CBHA、Ti-CBHA 和 TiZn-CBHA 抗菌片周围都出现了抑菌环, 在 B 组中未经紫外光照射, 只有 Zn-CBHA 和 TiZn-CBHA 抗菌片周围出现抑菌环, 而 Ti-CBHA 抗菌片周围未出现抑菌环。经测量得出抑菌环大小结果如表 2 所示。

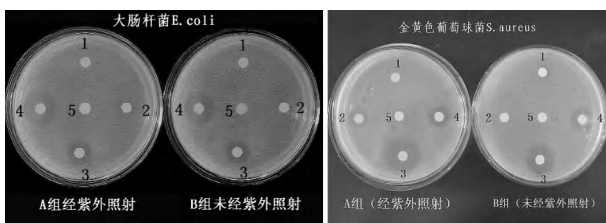


图 4 材料抗菌片在大肠杆菌和金黄色葡萄球菌中的培养 24 h 后的抑菌环照片

[大肠杆菌: 1. CBHA, 2. Ti-CBHA, 3. Zn-CBHA, 4. TiZn-CBHA, 5. 滤纸片; 金黄色葡萄球菌: 1. CBHA, 2. Ti-CBHA, 3. TiZn-CBHA, 4. Zn-CBHA, 5. 滤纸片]

2.4.2 抗菌率实验结果

以大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为测试菌对 CBHA、Zn-CBHA、Ti-CBHA 和 TiZn-CBHA 样品进行抗菌率试验, 结果如表 3 所示。

根据 GB 15979《一次性使用卫生用品卫生标准》, 抑菌环试验评价规定: 抑菌环直径大于 7 mm, 判为有抑菌作用; 抑菌环直径小于或等于 7 mm, 判为无抑菌作用。抗菌率试验评价规定: 试验样抑菌率与不加样对照组抗菌率的差值 $\Delta > 26\%$,

表 2 材料对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌环大小

抑菌环直径/mm	CBHA	Zn-CBHA	Ti-CBHA	TiZn-CBHA	滤纸片
大肠杆菌	0	11	0	16	0
大肠杆菌(UV)	0	11	10	20	0
金黄色葡萄球菌	0	15	0	18	0
金黄色葡萄球菌(UV)	0	15	12	23	0

表 3 材料对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌率

样品名称	测试菌	作用时间/h	菌悬液浓度(cfu/mL)		抗菌率
			振荡前	振荡后	
Zn-CBHA	大肠杆菌	1	2.50 × 10 ⁴	1.12 × 10 ⁴	55.2%
	金黄色葡萄球菌		3.00 × 10 ⁴	8.34 × 10 ³	72.2%
Ti-CBHA (UV)	大肠杆菌	1	2.50 × 10 ⁴	7.55 × 10 ³	69.8%
	金黄色葡萄球菌		3.00 × 10 ⁴	8.25 × 10 ³	72.5%
TiZn-CBHA (UV)	大肠杆菌	1	2.50 × 10 ⁴	1.35 × 10 ³	94.6%
	金黄色葡萄球菌		3.00 × 10 ⁴	9.60 × 10 ²	96.8%
CBHA	大肠杆菌	1	2.50 × 10 ⁴	2.38 × 10 ⁴	4.8%
	金黄色葡萄球菌		3.00 × 10 ⁴	2.82 × 10 ⁴	6.0%
对照组	大肠杆菌	1	2.50 × 10 ⁴	2.46 × 10 ⁴	1.6%
	金黄色葡萄球菌		3.00 × 10 ⁴	2.94 × 10 ⁴	2.0%

认定该样品具有抗菌作用。抑菌环试验和抗菌率试验结果表明: 经紫外光照射, Zn-CBHA、Ti-CBHA 和 TiZn-CBHA 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都具有良好的抗菌性能, 未经紫外照射 Zn-CBHA 和 TiZn-CBHA 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有良好的抗菌性能, 而 TiZn-CBHA 的抗菌性能最好。这是由于 Zn 掺杂抗菌墨鱼骨转化羟基磷灰石属于溶出型抗菌机理, CBHA 掺锌后溶解性能提高, 在一定的时间内可解离出更多 Zn²⁺, Zn²⁺ 能吸附细胞膜带负电的细菌, 并与细胞膜蛋白质中的-SH、-NH 结合, 破坏微生物细胞的能量代谢系统、呼吸系统等, 使细菌生长受阻或死亡。Ti 掺杂抗菌墨鱼骨转化羟基磷灰石属于光催化抗菌机理, 在紫外光照射条件下催化产生活性物质, 与细胞中的有机物分子发生化学反应, 分解构成细菌的有机物, 从而起到抑制细菌生长的效果。钛光催化抗菌与锌离子溶出抗菌协同作用使 TiZn-CBHA 抗菌性能得以增强。

3 结论

(1) 以墨鱼骨为原料, 通过水热反应和离子交换法, 制备了锌掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石(Zn-CBHA)和钛掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石(Ti-CBHA), 以及钛与锌共掺杂墨鱼骨转化羟基磷灰石(TiZn-CBHA)。

(2) Zn-CBHA 保持了 CBHA 的晶型结构和结晶度, Ti-CBHA 和 TiZn-CBHA 基本保持 CBHA 的基本结构, 但衍射峰强度降低, 晶粒的结晶度有所减少; Zn-CBHA、Ti-CBHA 和 TiZn-CBHA 中的 OH⁻、PO₄³⁻ 吸收峰相对于 CBHA 振动频率增大, 但振动强度降低。

(3) 经紫外光照射, Zn-CBHA、Ti-CBHA 和 TiZn-CBHA 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都具有良好的抗菌性能, 未经紫外照射 Zn-CBHA 和 TiZn-CBHA 对大肠杆菌和金黄色葡萄

(下转第 211 页)

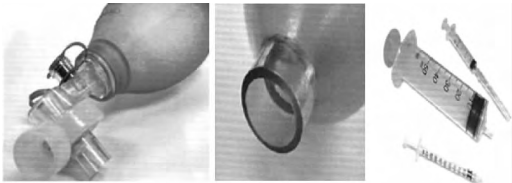
与多种塑料介面附着,易于着色,抗紫外,有欲着色的粒料,有可印字的树脂,耐高低温,无卤阻燃级别,100%可回收。



3.5 护理及医疗

Elastron TPV/TPE 医疗级产品系列有 2 个品牌,ELASTRON G 以及 ELASTRON V。V 系列的产品具有宽广的弯曲范围,应用领域更宽广。主要应用在医疗工业,口腔护理用品,卫生用品等行业。

医疗级别的 TPE 拥有以下特点:硬度范围广,有透明规格,易于着色,与聚烯烃可直接粘接,通过美国药典 VI 级认证,可用伽马射线、环氧乙烷和蒸汽杀菌,不含任何有毒物质。



3.6 消费品

在食用包装,家具用品,玩具,运动器材等应用方面,Elastron 也有自己独有的优势。这些产品大多与人体接触,而 Elastron 有食品级别的材料提供。

除了食品认证,Elastron 的 TPE 还可以与多种塑料复合,耐紫外线,还有超软级别的材料提供。



(上接第 209 页)

萄球菌具有良好的抗菌性能,钛光催化抗菌与锌离子溶出抗菌协同作用使 TiZn-CBHA 抗菌性能得以增强。

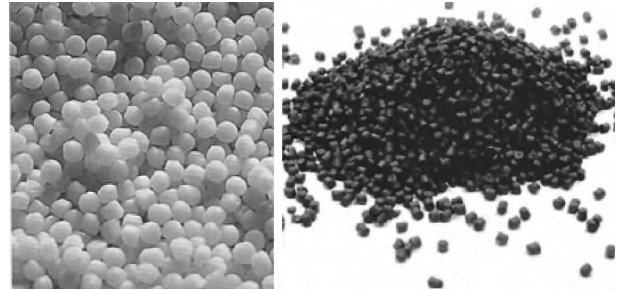
参考文献

- [1] Ozin G A, Varaksa N, Coombs N, et al. [J]. J Mater Chem, 1997, 34(7):1601-1607.
- [2] Doremus R H. [J]. J Mater Sci, 1992, 60(4):285-297.
- [3] Suchanek W, Yoshimura M. [J]. J Mater Res, 1998, 13(1): 94-117.
- [4] 林英光, 杨卓如, 程江. [J]. 化工新型材料, 2006, 34(6): 501

例如一些视频包装封件,盖头封件,家居用品防滑柄,潜水镜及蛙鞋,自行车手把等制件,都可以用到 ELASTRON 的 TPE。

3.7 抗冲击改性剂应用

Elastron 针对 PP、PS、ABS、PA 增韧有一系列的产品对应。可增加聚合物的抗冲击性能,也可增加聚合物的刚性和弹性。甚至针对材料在低温条件下也能保持所要求的抗冲击的强度。



4 展望

21 世纪是环保世纪,是资源再生利用的时代。作为最具环保性的 TPE 来说,客观上已迎来了大发展的新纪元。TPE 的生产再利用和使用后的资源再生性都强,且又节能,作为一种新材料已成为社会各界关注的焦点。事实上,凡是对耐热性要求不严的橡胶制品,都有可能逐步为 TPE 所取代,除目前已进入的制鞋、汽车、建筑、胶粘剂方面外,在电子通讯、医疗卫生等领域的应用前途也非常广阔。所以 TPE 具有强大的生命力和广阔的发展前途。

特约刊登 和氏璧化工 咨询电话: 400-888-8899 E-mail: mod@ncmchem.com

知识与智慧的管理系统

km.ncmchem.com

**一切为您
提高成效**

现在及未来市场领导者的成功伙伴 Preferred Partner for Current and Emerging Market Leaders

和氏璧化工 HERSBIT Chemical “服务制造, 忠诚相依”

和氏璧化工将有效地动员、组织我们的现有和潜在资源服务于您(及您的企业)

— 503.

- [5] 杨辉, 蔡日强, 王栋, 等. [J]. 功能材料, 2010, 41(3): 406-409.
- [6] 王昆润. [J]. 国外医学口腔医学分册, 1990, 12(5): 301-303.
- [7] 胡春, 路国忠, 郭健, 等. [J]. 环境科学学报, 2006, 26(2): 177-180.
- [8] Birchall J D, Thomas N L. [J]. J Mater Sci, 1983, 16(5): 2081-2086.
- [9] Ogasawara W, Shenton W, Davis S A, et al. [J]. Chemistry of Materials, 2000, 12(2): 2835-2037.
- [10] Liu Jinhua, Wang Dazhi. [J]. Journal of Inorganic Materials, 2006, 21(2): 433-440.

收稿日期: 2013-01-11