

• 药剂与工艺 •

中药材生物质还原制备银纳米颗粒及其抑菌活性研究

蔡伟¹, 马月², 方杰², 吴方³, 余陈欢^{2*}

1. 浙江医药高等专科学校中药学院, 浙江 宁波 315100

2. 浙江省医学科学院 浙江省实验动物与安全性研究重点实验室, 浙江 杭州 310013

3. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 利用中药材提取液来还原 Ag^+ 获得相应的银纳米材料, 并对其抑菌活性进行研究。方法 利用大黄等 15 种中药材提取液还原制备了银纳米溶液, 采用激光粒度仪 (HPPS)、透射电镜 (TEM)、紫外可见分光光度计 (UV) 测定了银纳米颗粒的尺寸和分布。采用纸片琼脂扩散法和倍比稀释法, 测定了银纳米颗粒的抑菌作用。结果 大黄、制首乌、香薷水提液还原制备的银纳米颗粒得率和反应速率较理想。制备所得的银纳米粒径为 100 nm 左右, 均匀性好, 分散性好, 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长均有明显的抑制作用, 其中, 以制首乌-银纳米抑菌作用最强。结论 中药材作为天然生物还原剂, 可用于银纳米颗粒的制备。

关键词: 银纳米; 绿色合成; 中药材; 抑菌作用; 大黄; 制首乌; 香薷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)07-0977-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.07.008

Study on preparation of silver nanoparticles by biomass reduction of traditional Chinese medicinal materials and their antibacterial activity

CAI Wei¹, MA Yue², FANG Jie², WU Fang³, YU Chen-huan²

1. Department of Chinese Materia Medica, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China

2. Zhejiang Key Laboratory of Experimental Animal and Safety Evaluation, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China

3. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To use the extracts from traditional Chinese medicinal materials (TCMM) for reduction of Ag^+ to obtain the corresponding silver nanomaterials and study its antibacterial activity. **Methods** Nano-silver solution was prepared by *Rhei Radix et Rhizoma* and other 15 kinds of TCMM extracts, the size and distribution of silver nanoparticles were studied using HPPS, TEM, and UV. The antibacterial activities of silver nanoparticles were investigated by disk agar diffusion method and double dilution method. **Results** Preparation rate and reaction rate of silver nanoparticles prepared with the water extract of *Rhei Radix et Rhizoma*, *Polygoni Multiflori Radix Praeparata*, *Moslai Herba* were ideal. Prepared silver nanoparticles with diameter about 100 nm, good uniformity, and good dispersibility have the obvious inhibitory effect on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Among them, *Polygoni Multiflori Radix Praeparata*-silver nano has the strongest bacteriostatic effect. **Conclusion** TCMM as a natural bio-reducing agents, can be used to prepare the silver nanoparticles.

Key words: silver nano; green synthesis; traditional Chinese medicinal materials; bacteriostatic effect; *Rhei Radix et Rhizoma*; *Polygoni Multiflori Radix Praeparata*; *Moslai Herba*

收稿日期: 2014-11-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202977); 浙江省新苗人才计划 (2010R410055)

作者简介: 蔡伟 (1984—), 男, 江西南昌人, 博士, 讲师, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (0574)88222790 E-mail: 46482125@qq.com

*通信作者 余陈欢 (1982—), 男, 浙江绍兴人, 副研究员, 从事抗病原微生物药效物质及药效机制研究。

Tel: (0571)88215498 E-mail: yuchenhuan2002@163.com

近年来, 抗生素因耐药性、药物残留等问题使其应用受到限制, 银纳米颗粒因良好的抗菌性能, 已应用于导尿管等各种医疗器材及抗菌织物等的抗感染, 目前对其研究日趋活跃^[1]。制备银纳米颗粒的方法有物理法、化学法和生物法等。物理、化学法因成本、污染等原因其应用受限^[2-3]; 植物生物还原法, 具有成本低、能耗低、污染小等优点, 可获得稳定性较高的银纳米颗粒^[4]。植物生物还原法自 Gardea-Torresdey^[5]采用紫花苜蓿研究制备银纳米颗粒以来, 至今已筛选出天竺葵^[6]、芳樟^[7]等多种植物用于制备银纳米颗粒。

中药材属于典型的植物资源, 现代研究发现, 中药材中多羟基类化合物在金属纳米材料的还原过程中起主导作用, 其在还原制备金属纳米颗粒方面具有广阔的发展前景^[8]。由于采用的材料为中药材, 所得的银纳米颗粒具有更好的生物相容性^[9], 更适于临床应用。但有关中药材生物还原法制备银纳米颗粒及其抗菌活性研究国内外少有报道。

本研究选择不同功效、不同药用部位的 15 种中药材, 利用中药材提取液来还原 Ag^+ 获得相应的银纳米抗菌颗粒材料。通过对中药材的筛选, 以及中药材还原过程的工艺路线的优化, 进一步探讨中药材银纳米颗粒的抗菌活性, 为具有中药材生物活性特性的新型银纳米抗菌颗粒的开发提供理论基础。

1 仪器与材料

UV-2600A 型紫外可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; HANGPING FA1104 型电子天平, 上海仪器厂; TecnaiG220 型透射电镜, 美国 FEI 公司; Mastersizer 2000 激光粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司。硝酸银, 批号 20071009, 质量分数 > 98%, 购于上海试剂一厂; 其他试剂均为分析纯。

实验所用中药材(大黄 *Rhei Radix et Rhizoma*、制首乌 *Polygoni Multiflori Radix Praeparata*、金银花 *Lonicerae Japonicae Flos*、连翘 *Forsythiae Fructus*、黄连 *Coptidis Rhizoma*、香薷 *Moslae Herba*、筋骨草 *Ajugae Herba*、桂枝 *Cinnamomi Ramulus*、银杏叶 *Ginkgo Folium*、银耳 *Tremella fuciformis*、灵芝 *Ganoderma lucidum*、玄参 *Scrophulariae Radix*、山楂 *Crataegi Fructus*、厚朴 *Magnolia Officinalis Cortex*、紫苏叶 *Perillae Folium*) 均经浙江中医药大学资源鉴定教研室俞冰副教授鉴定为正品。供试菌种大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 均由浙江中医药大学生物工

程学院微生物实验室提供。

2 方法与结果

2.1 中药材提取液的制备

取干燥药材粉末(粉碎机粉碎)10 g, 加 500 mL 去离子水或 95%乙醇浸泡 30 min, 沸水浴回流提取 1.0 h, 减压抽滤, 临用前取滤液适量, 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 作为供试品溶液, 备用。

2.2 中药材生物物质银纳米颗粒的制备与筛选

取 1 mL 中药材水提或醇提供试品溶液, 加入 0.01 mol/L 的银氨溶液 4 mL, 37 °C 加热至液体颜色加深, 反应 6 h 后 4 °C 放置 12 h, 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液; 于上清液中加入 0.1 mol/L 的稀盐酸溶液, 观察 AgCl 的生成量。评分方法: (1) 反应速率: 1~2 h 内反应完全为“++++”, 2~3 h 内反应完全为“+++”, 3~4 h 内反应完全为“++”, 4~5 h 内反应完全为“+”, 5~6 h 内反应完全为“0”; (2) 反应得率: 无 AgCl 白色沉淀为“++++”, 微乳白色为“+++”, 少量白色沉淀为“++”, 大量白色沉淀为“0”; (3) 纳米颗粒品质: 管壁无银镜附着为“++++”, 管壁少量银镜附着为“+++”, 管壁大量银镜附着为“++”, 管底黑色大颗粒沉淀为“0”。结果见表 1。

结果表明, 各中药材醇提液反应得率、反应速率均不及水提液, 仅是纳米颗粒品质稍好于水提液, 考虑到实际生产过程中乙醇成本及醇提工艺操作的安全性, 综合考虑优选去离子水作为提取溶剂。经观察比较, 大黄、制首乌、香薷水提液所形成的银纳米溶液在反应速率、反应得率和纳米颗粒品质 3 个指标方面总体优于其他中药材提取物(表 1); 且溶液外观较厚朴、银杏等纳米溶液更澄清透明(图 1), 因此本研究选择大黄、制首乌、香薷供进一步实验。

2.3 银纳米颗粒的表征分析

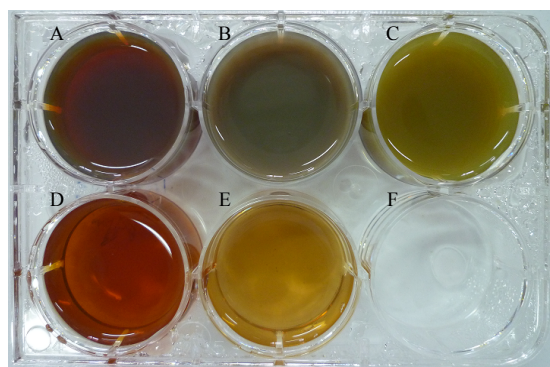
2.3.1 银纳米颗粒粒径的测定 取 5~10 mL 制备的纳米银溶液在激光粒度仪(HPPS)的测试皿中于 25 °C 下测试。结果如图 2 所示, 大黄-银纳米颗粒、香薷-银纳米颗粒、制首乌-银纳米颗粒的粒径分别为 106.4、140.7、77.67 nm。

2.3.2 银纳米溶液的透射电镜(TEM)分析 取一定量大黄、制首乌、香薷-银纳米溶液, 滴加于一面覆有碳膜的铜网上, 铜网自然晾干 2 h 后, 用 TEM 在加速电压为 200 kV, 点分辨率 0.24 nm, 线分辨率 0.14 nm 条件下观察(图 3)。由图 3 可知, 大黄、

表 1 15 种中药材提取液反应速率及反应得率的比较

Table 1 Comparison on reaction rate and yield in 15 kinds of herbs

批号	供试品 (水提液)	反应速率	反应得率	纳米颗粒品质	批号	供试品 (醇提液)	反应速率	反应得率	纳米颗粒品质
90806	大黄	++++	++++	+++	90806	大黄	+	+	+++
100918	制首乌	++++	++++	+++	100918	制首乌	+	+	+++
90623	金银花	++++	++++	++	90623	金银花	+	0	++
90506	连翘	+++	++++	+	90506	连翘	+	0	++
80112	黄连	++	++++	0	80112	黄连	+	0	++
80711	香薷	++++	++++	+++	80711	香薷	+	+	+++
100413	筋骨草	0	++++	+	100413	筋骨草	+	0	++
90423	桂枝	0	++++	+++	90423	桂枝	+	0	++
101126	银杏	++++	++++	++	101126	银杏	+	0	++
90626	银耳	+++	++++	+++	90626	银耳	+	0	++
101009	灵芝	++	++++	+	101009	灵芝	+	0	++
100726	玄参	++++	0	0	100726	玄参	+	0	++
100114	山楂	0	+	+++	100114	山楂	+	0	++
100926	厚朴	++	+	+	100926	厚朴	+	0	++
90914	紫苏	+++	++++	+++	90914	紫苏	+	0	+++



A-大黄-银纳米溶液 B-厚朴-银纳米溶液 C-银杏-银纳米溶液
D-制首乌-银纳米溶液 E-香薷-银纳米溶液 F-空白
A-*Rhei Radix et Rhizoma*-silver nano solution B-*Magnolia Officinalis Cortex*-silver nano solution C-*Ginkgo Folium*-silver nano solution D-*Polygoni Multiflori Radix Praeparata*-silver nano solution E-*Moslae Herba*-silver nano solution F-blank

图 1 银纳米溶液外观特征

Fig. 1 Appearance feature of silver nano solution

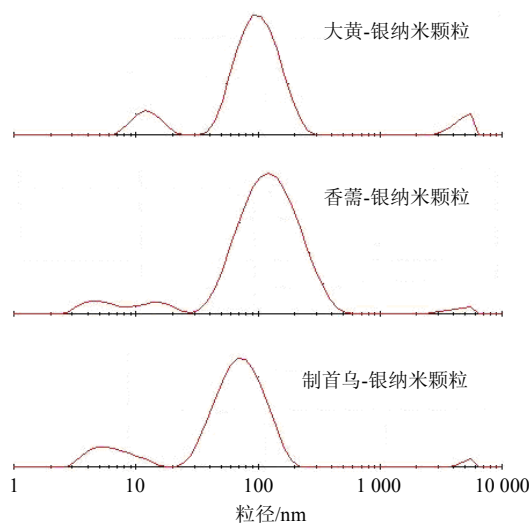


图 2 银纳米颗粒的激光粒度分析

Fig. 2 Analysis of laser particle size of silver nanoparticles

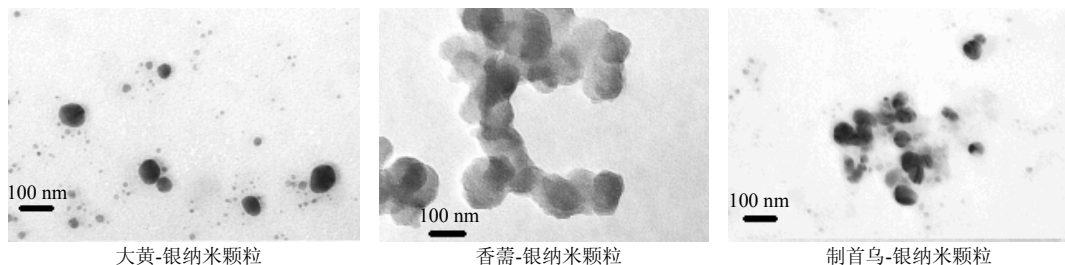


图 3 银纳米颗粒的 TEM 照片

Fig. 3 TEM photographs of silver nanoparticles

制首乌、香薷还原制得的纳米银颗粒近球形,粒径在 100 nm 左右,该结果与 HPPS 测定结果一致,且均匀性、分散性好,说明大黄、制首乌、香薷中可能既有可将银离子还原成单质的还原性物质,同时还含有稳定性物质。

2.3.3 银纳米溶液的紫外-可见吸收光谱特征分析 取 1 mL 大黄、制首乌、香薷供试品水提液,加入 0.01 mol/L 的银氨溶液 4 mL, 37 °C 水浴加热,分别于 0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 h 取 0.1 mL 反应溶液,加去离子水 4 mL,分别于分光光度计 210~600 nm 波长下扫描(图 4),同时以不加中药材水提液做一空白对照,随行实验。由图 4 可知,不同时间点尤其在 1 h 后扫描的紫外-可见吸收光谱峰形基本一致,说明在 1 h 之后,纳米颗粒基本形成,且在 4 h 内,大黄、制首乌、香薷还原制备的纳米材料具有良好的稳定性。

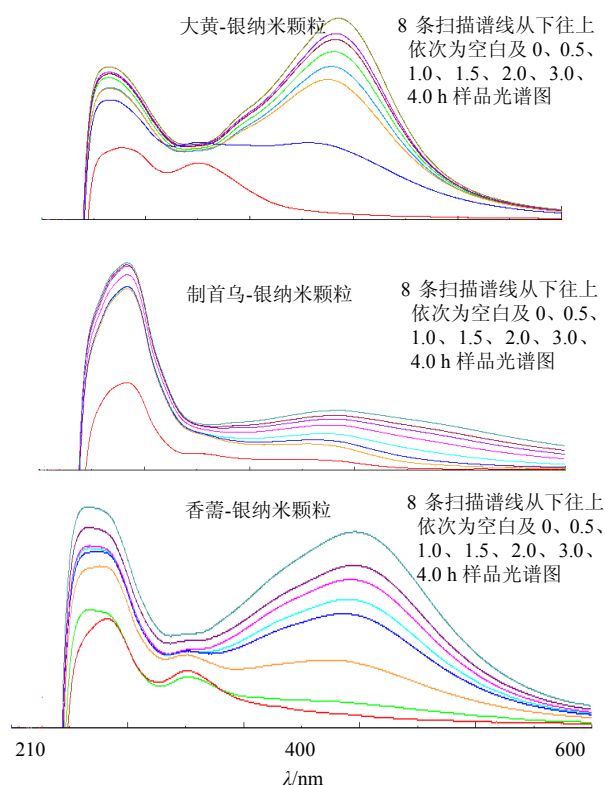


图 4 银纳米颗粒的紫外-可见光谱

Fig. 4 UV-visible spectrum of silver nanoparticles

2.4 抑菌活性实验

2.4.1 菌悬液的制备 将测试用细菌 *E. coli*、*S. aureus* 分别接种于无菌的牛肉膏蛋白胨培养基(NA)上,在 35 °C 下培养 24 h,挑取少许活化的菌体置于生理盐水试管中,摇匀,配制成 $1 \times 10^6 \sim$

1×10^7 CFU/mL 的菌悬液。

2.4.2 最低抑菌浓度(MIC)的测定 采用 2 倍稀释法测定 MIC^[10]。中药材-银纳米供试品溶液(生药量 4 mg/mL)、银氨溶液、普通银纳米溶液(含有 8 mmol/L 的银离子),为便于比较抑菌强弱,中药材溶液质量浓度(生药量 4 mg/mL)按含等浓度中药材的中药材-银纳米溶液计相当于 8 mmol/L;而阳性对照药卡那霉素用无菌水配成 0.34 mmol/L 的溶液。将待测溶液和阳性对照溶液分别在 96 孔板上连续稀释 2 倍配成一系列的浓度梯度,每孔含 50 μ L 溶液。每孔中加入 50 μ L 预先培养的菌悬液,每个样品重复 3 次,随行无菌水阴性对照及细菌对照。将 96 孔板在 28 °C 下培养,待培养 24 h 后观察。MIC 结果判断:以不产生浑浊的最低浓度孔对应的浓度作为该样品对该菌的 MIC。结果见表 2。

2.4.3 最小杀菌浓度(MBC)的测定^[10] 获取 MIC 结果后,将 MIC 孔、2 $\times$ MIC 孔、4 $\times$ MIC 孔、8 $\times$ MIC 孔 4 个孔中的培养物各吸取 10 μ L,接种到新鲜的 NA 培养液中(0.2 mL/孔),每个样品重复 3 次,随行无菌水阴性对照和细菌对照,置于 37 °C 培养箱中培养 48 h,观察结果。MBC 结果判断:以细菌生长阴性孔对应的浓度为 MBC。结果见表 2。

由表 2 结果可知,中药材-银纳米颗粒具有较强的抑菌和杀菌作用,虽然抗菌活性远低于阳性对照卡那霉素,但显著强于普通银纳米颗粒(普通银纳米颗粒是以羧甲基纤维素钠作为还原剂制备的银纳米颗粒,制备方法同“2.2”项)及中药材溶液。其中,制首乌-银纳米颗粒作用最强,其 MIC 和 MBC 分别为 0.125、0.250 mmol/L。

3 讨论

本研究首次利用大黄、制首乌、金银花等 15 种临床常用中药材提取物,还原制备银纳米颗粒,拓宽了中药材生物质的应用范围,证明了许多中药材(不同功效、不同药用部位)可用作新型的植物生物还原剂。利用中药材水提物在常温条件下制备银纳米颗粒材料,纳米颗粒呈现近球形,粒度均匀,稳定性好,分散度高。

所制得的银纳米颗粒对 *E. coli*、*S. aureus* 均有很强的抑制作用,这种抑制作用强于普通银纳米颗粒、银氨溶液及各个中药材单独应用时的效果,原因可能是中药材还原制备银纳米颗粒,中药材本身的抑菌效果与银纳米材料的抑菌效果产生了叠加效应,但为何是抑菌效果最差的制首乌制备的银纳米

表2 中药材-银纳米溶液的抗菌活性结果
Table 2 Results of antibacterial activity in TCMM-silver nano solution

供试品	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	MIC/(mmol·L ⁻¹)	MBC/(mmol·L ⁻¹)	MIC/(mmol·L ⁻¹)	MBC/(mmol·L ⁻¹)
大黄-银纳米	0.250	0.50	0.50	1.00
制首乌-银纳米	0.125	0.25	0.25	0.25
香薷-银纳米	0.250	0.50	0.25	0.50
普通银纳米	1.000	1.00	1.00	1.00
银氨溶液	1.000	1.00	1.00	1.00
大黄溶液	2.000	4.00	2.00	4.00
制首乌溶液	4.000	8.00	4.00	8.00
香薷溶液	1.000	4.00	2.00	4.00
卡那霉素	1.33×10 ⁻³	2.66×10 ⁻³	2.66×10 ⁻³	2.66×10 ⁻³

颗粒作用最强,是否由其粒径决定,具体机制有待深入研究。采用中药材所制得的银纳米颗粒相比普通化学还原制备的银纳米颗粒具有更好的生物相容性^[9],更适合临床应用,因此在抗菌作用方面具有广阔的应用价值。

参考文献

- [1] Tripathi A, Chandrasekaran N, Raichur A M, *et al.* Antibacterial applications of silver nanoparticles synthesized by aqueous extract of *Azadirachta indica* (Neem) leaves [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2009, 5(1): 93-98.
- [2] Yin B, Ma H, Wang S, *et al.* Electrochemical synthesis of silver nanoparticles under protection of poly (*N*-vinylpyrrolidone) [J]. *J Phys Chem B*, 2003, 107(34): 8898-8904.
- [3] Shankar S S, Rai A, Ahmad A, *et al.* Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2004, 275(2): 496-502.
- [4] LoPez M L, Parsons J G, Videá J P, *et al.* An XAS study of the binding and reduction of Au (III) by hopbiomass

[J]. *Microchem J*, 2005, 81(1): 50-56.

- [5] Gardea-Torresdey J L, Gomez E, Peralta-Videa J R, *et al.* Alfalfa sprouts: A natural source for the synthesis of silver nanoparticles [J]. *Langmuir*, 2003, 19(4): 1357-1361.
- [6] Shankar S S, Ahmad A, Sastry M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles [J]. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(6): 1627-1631.
- [7] Huang J L, Li Q B, Sun D H, *et al.* Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf [J]. *Nanotechnology*, 2007, 18(10): 105-109.
- [8] Huang J L, Wang W T, Lin L Q, *et al.* A general strategy for the biosynthesis of gold nanoparticles by traditional Chinese medicines and their potential application as catalysts [J]. *Chem-Asian J*, 2009, 4(7): 1050-1054.
- [9] Shankar S S, Rai A, Ahmad A, *et al.* Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2004, 275(2): 496-502.
- [10] 王海青, 阚红卫, 靳康, 等. 浙贝止咳颗粒镇咳祛痰及抗菌作用研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(16): 207-210.