

## 银翘解毒合剂药渣还原制备纳米银及抗氧化和抑菌活性研究

魏思敏<sup>1</sup>, 王英辉<sup>2\*</sup>, 唐志书<sup>1\*</sup>, 王哲<sup>1</sup>, 张珍<sup>1</sup>, 苏瑞<sup>1</sup>, 靳如意<sup>1</sup>, 宋忠兴<sup>1</sup>

1. 陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心/秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育)/陕西省创新药物研究中心, 陕西 咸阳 712083
2. 长安大学理学院, 陕西 西安 710064

**摘要:** **目的** 使用银翘解毒合剂药渣水提液制备纳米银, 评价生物合成参数对还原反应及生成纳米银的影响, 并研究其抗氧化和抑菌活性。**方法** 超声法制备纳米银, 紫外可见光谱监测纳米银生成和生长, 激光粒度仪和透射电镜表征纳米银粒径、分散性、表面性质和形貌, DPPH法评价抗氧化活性, 酶标仪测 600 nm 处的 A 值 ( $A_{600}$ ) 研究抑菌活性。**结果** 在使用银翘解毒合剂药渣水提液制备纳米银时, 生物合成参数对纳米银的粒径和分散性有很大影响, 平均粒径分布在 14.2~94.8 nm, pH 6.0 时分散性最好; 在 pH 10.0, 料液比 3:1, 超声反应 2 h 可高效制得近球形纳米银, 平均粒径 ( $24.0 \pm 0.3$ ) nm, 60 d 内保持稳定, 表面带负电 ( $-23.1 \pm 0.2$ ) mV; 制得的纳米银对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌有很好的抑制作用, 最小抑菌浓度分别为 50.0、25.0  $\mu\text{g/mL}$ ; 对 DPPH 有很好的清除作用, 当纳米银质量浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  时清除率可达 71.1%。**结论** 银翘解毒合剂药渣水提液可在室温条件下制备不同粒径和分散性质的纳米银, 生物合成参数对纳米银的平均粒径和分散性有较大影响, 制得的纳米银具有很强的抗氧化和抗菌活性, 可作为潜在的抗氧化和抗菌试剂。

**关键词:** 银翘解毒合剂; 药渣; 纳米银; 生物合成参数; 抗菌活性; 抗氧化; 还原反应; 分散性; 表面性质; DPPH 法; 大肠杆菌; 金黄色葡萄球菌; 最小抑菌浓度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)16-4169-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.009

## Preparation of silver nanoparticles by extract of Yinqiao Jiedu Mixture waste and its antioxidative and antibacterial activity evaluation

WEI Si-min<sup>1</sup>, WANG Ying-hui<sup>2</sup>, TANG Zhi-shu<sup>1</sup>, WANG Zhe<sup>1</sup>, ZHANG Zhen<sup>1</sup>, SU Rui<sup>1</sup>, JIN Ru-yi<sup>1</sup>, SONG Zhong-xing<sup>1</sup>

1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, State Key Laboratory of Research, Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation), Shaanxi Innovative Drug Research Center, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China
2. College of Science, Chang'an University, Xi'an 710064, China

**Abstract: Objective** To develop a novel method to synthesize silver nanoparticles (AgNPs) by using the extract of Yinqiao Jiedu Mixture waste, evaluate the effects of biosynthesis parameters on the formation and polydispersity of AgNPs, and investigate the antioxidative and antibacterial activity. **Methods** The formation of AgNPs was confirmed by UV-visible spectroscopy; The size, polydispersity, surface and morphology features of AgNPs were characterized by laser granularity analyzer and transmission electron microscopy; The antioxidative and antibacterial activities of AgNPs were evaluated by calculating the scavenging rate for DPPH and  $A_{600}$  for both *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively. **Results** By using Yinqiao Jiedu Mixture waste, the AgNPs could be prepared at ambient temperature. The size and polydispersity index of the synthesized AgNPs were sensitive to the biosynthesis parameters, such as pH of extract and material proportion with the average size distribution was 14.2—94.8 nm, offering a size-controlled synthetic method for AgNPs. And when the pH was 6.0, the polydispersity could reach the best. The AgNPs could be

收稿日期: 2020-04-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21705029); 陕西中医药大学校级基金资助项目(123010185); 陕西中医药大学博士科研启动金(10408001); 陕西省高校科协青年人才托举计划(20190307); 长安大学中央高校基本科研业务费专项资金(300102120303)

作者简介: 魏思敏(1989—), 女, 博士, 讲师, 主要从事新型纳米材料制备和应用的研究。E-mail: weismiccas@163.com

\*通信作者: 唐志书(1972—), 男, 硕士生导师, 教授, 主要从事中药制剂制备技术的研究。E-mail: tzs6565@163.com

王英辉(1989—), 男, 博士, 讲师, 主要从事纳米材料制备和应用的研究。E-mail: wangyinghui@chd.edu.cn

obtained with high yield and small size at pH 10.0, material proportion 3:1 after reacting 2 h, which were quasi-spherical in shape with average size of  $(24.0 \pm 0.3)$  nm and covered by anion [Zeta potential:  $(-23.1 \pm 0.2)$  mV]. The synthesized AgNPs also revealed significant inhibition activities for the growth of *E. coli* and *S. aureus* with MIC 50.0 and 25.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, and potent antioxidative activity with scavenging rate for DPPH 71.1% when adding 100  $\mu\text{g/mL}$  of AgNPs. **Conclusion** The extract of Yinqiao Jiedu Mixture waste can be used to synthesize AgNPs with small size at ambient temperature; The biosynthesis parameters have significant effects on the average size and polydispersity index of AgNPs; The synthesized AgNPs have potent antioxidative and antibacterial activity.

**Key words:** Yinqiao Jiedu Mixture; drug residue; silver nanoparticles; biosynthetic parameters; antibacterial activity; anti-oxidative activity; reduction reaction; polydispersity; surface state; DPPH method; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; minimum inhibition concentrations

纳米银是一类功能性金属纳米材料, 由于具有大的比表面积, 抗菌能力是微米级银的 200 倍以上, 是一类理想的抗菌材料, 因此, 纳米银的制备及性质研究已成为各国科研工作者关注的焦点<sup>[1-3]</sup>。根据文献报道<sup>[4-5]</sup>, 植物中的活性还原成分, 如萜类、黄酮、酮类、醛类、酰胺、羧酸、糖类、蛋白质和维生素等, 可以还原  $\text{Ag}^+$  得到具有不同粒径和生物活性的纳米银。该方法因利用植物水提液中含有的活性成分作为稳定剂和还原剂, 具有成本低、绿色无污染、操作简单、合成的纳米银生物活性多样等优点, 因而备受科研工作者的关注。近年来有报道显示, 如果植物本身具有较高的生物活性, 因为协同效应, 制备得到的纳米银也将会有很好的生物活性。

中药是天然的植物资源, 也是我国重要的战略资源, 为我国人民的健康事业做出了巨大的贡献, 但在中药产业化过程中会产生大量的废弃物, 比如非药用部位、中药渣和废气等<sup>[6]</sup>。据统计, 我国中药企业每年要消耗药材数百万吨<sup>[7]</sup>; 近些年随着中药产业的快速发展, 中药渣的排放量也在逐年增加, 中药渣的处理已成为行业发展中亟待解决的问题。目前已有研究对中药废弃物实现了再利用, 取得了一些成果<sup>[8-18]</sup>, 比如用于堆肥<sup>[8-9]</sup>、饲料添加剂<sup>[11]</sup>、食用菌栽培<sup>[12]</sup>、乙醇制造<sup>[14]</sup>以及制备活性炭<sup>[15]</sup>等, 很明显这些研究是利用了中药废弃物中的营养成分以及木质素等物质。根据文献报道<sup>[16]</sup>, 在中药废弃物中, 除过已被利用的这些物质外还包含有大量具有生物活性的物质, 比如生物碱、黄酮、脂质、多糖、蛋白质和氨基酸等, 这些物质是有可能还原  $\text{Ag}^+$  制备纳米银的, 但是目前还未见有相关报道。

银翘解毒合剂是一种常用的临床中成药, 辛凉解表, 对扁桃体炎、上呼吸道感染等具有较好的疗效<sup>[19-20]</sup>。该合剂由 9 味药组成, 君药为连翘和金银花, 臣药有薄荷、牛蒡子、荆芥和淡豆豉, 而淡竹

叶、桔梗和甘草则为佐使之药<sup>[21-22]</sup>。本研究就是利用银翘解毒合剂药渣水提液中活性成分作为还原剂和保护剂, 硝酸银作为银源, 在室温条件下将  $\text{Ag}^+$  还原制备纳米银; 探讨了生物合成参数对还原反应、纳米银粒径和分散性的影响, 确立了最高效的反应条件, 并研究了纳米银的抗氧化和抗菌活性。该研究结果不仅为纳米银的制备提供了一种新的方法, 也为银翘解毒合剂药渣的再利用提供了新的思路。

## 1 试剂与材料

UV-2600 型紫外可见分光光度计, 岛津 (日本) 公司; ZEN 3600 激光粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司; JEM-2010 型透射电子显微镜, 东京理化株式会社 (日本); SW-CJ-2FD 型超净工作台, 苏净集团安泰公司; Thermo Multiskan GO 多功能酶标仪, 美国 Thermo 公司。

硝酸银 (质量分数 >99%)、胰蛋白胨、氯化钠、酵母粉、琼脂粉均为分析纯, 购于成都科隆化学品有限公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 为分析纯购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 银翘解毒合剂 (国药准字 Z20064708) 药渣由陕西中医药大学制药厂提供; 供试菌种大肠杆菌 *Escherichia coli* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 购于陕西乐博生化有限科技公司, 由陕西中医药大学刘世军教授经过形态学和生化学鉴定。

## 2 方法

### 2.1 银翘解毒合剂药渣水提液的制备

准确称取干燥银翘解毒合剂药渣 5.0 g, 粉碎过 300 目筛后得粉末, 随后加入 100 mL 超纯水超声提取 4 h, 滤过得滤液, 备用, 经测定银翘解毒合剂药渣水提液原液 pH 值为 4.0。

### 2.2 银翘解毒合剂药渣水提液制备纳米银

取 5.0 mL 银翘解毒合剂药渣水提液 (原液), 向其中加入 10 mmol/L 的  $\text{AgNO}_3$  溶液 5.0 mL, 室

温下超声；在评价反应参数对还原反应影响时，AgNO<sub>3</sub> 和总混合液的量保持不变；反应过程中使用紫外-可见光谱监测纳米银的生成。待反应完成后取反应悬浮液，9 000 r/min 离心 30 min，弃上清液取沉淀，用超纯水洗涤 3 次，收集沉淀，冷冻干燥 12 h 至恒定质量。

### 2.3 纳米银的表征

使用 UV-2600 型紫外-可见分光光度计、ZEN 3600 激光粒度仪和 JEM-2010 型透射电子显微镜对纳米银进行表征。

### 2.4 纳米银抗氧化活性研究

准确称取 2.5 mg DPPH 溶解于 100 mL 乙醇中，于冰箱避光保存。将纳米银配制成不同质量浓度梯度的样品液，精密量取 1.0 mL 样品溶液加入 5.0 mL 试管中，再加入 1.0 mL DPPH 溶液，将上述反应液置于室温下暗反应 30 min，测量 517 nm 处吸光度 (A) 值，重复 3 次，计算清除率。

$$\text{清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_0$$

A<sub>0</sub> 为 1.0 mL DPPH + 1 mL 超纯水在 517 nm 处 A 值；A<sub>1</sub> 为 1.0 mL DPPH + 1.0 mL 样品在 517 nm 处 A 值；A<sub>2</sub> 为 1.0 mL 样品 + 1.0 mL 乙醇在 517 nm 处 A 值

### 2.5 纳米银抗菌性能研究

**2.5.1 菌悬液的制备** 将测试用的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别接种于 LB 固体培养基的培养皿中划线，37 °C 培养 18 h。取灭菌好的试管 2 支分别加入 LB 液体培养基约 15.0 mL，用接种环挑取一环单菌落于试管中，放置于水浴摇床，37 °C、150 r/min 培养 18 h。超净工作台上，取少许活化的菌体置于生理盐水试管中，摇匀，制备成 1 × 10<sup>5</sup> cfu/mL 的菌悬液备用。

**2.5.2 纳米银抑菌活性的测定** 称取一定量 AgNPs 配制质量浓度为 1 000 μg/mL 的母液，随后用无菌水逐步稀释其质量浓度至 100.0、50.0、25.0、12.5、6.3、3.1、0.8 μg/mL；将待测样品溶液分别加入 96 孔板上，每个孔中均加入 100 μL 样品液和 100 μL 制备好的菌悬液，每个样品重复 3 次，每次都加有无菌水 200 μL 阴性对照和 200 μL 菌悬液作为阳性对照。将 96 孔板置于 37 °C 的培养箱中培养，经特定时间间隔测量 600 nm 处的 A 值。

## 3 结果与讨论

### 3.1 银翘解毒合剂药渣水提液制备纳米银及生物合成参数对纳米银生成的影响

首先，将 5.0 mL 银翘解毒合剂药渣水提液原液

(pH 4.0) 与 5.0 mL AgNO<sub>3</sub> (10 mmol/L) 水溶液混合，在室温下超声反应 2 h，反应液颜色并没有明显变化 (图 1-A)，表明在此条件下银翘解毒合剂药渣水提液原液与 AgNO<sub>3</sub> 的反应可以忽略。根据文献报道<sup>[23-24]</sup>，纳米银在 420 nm 附近有明显的表面等离子体共振吸收峰 (SPR 峰)；而银翘解毒合剂药渣水提液和硝酸银水溶液在 400 nm 之后无明显吸收，因此可以利用 UV-Vis 吸收光谱监测纳米银的生成和生长。如图 2-A 所示，银翘解毒合剂药渣水提液原液与 AgNO<sub>3</sub> 反应 2 h 后，UV-Vis 光谱在 400 nm 之后并没有明显吸收，进一步证实银翘解毒合剂药渣水提液原液在室温超声条件下不能高效还原 Ag<sup>+</sup> 生成纳米银。

根据文献报道<sup>[25-26]</sup>：在植物还原法中，升高溶液 pH 值至碱性条件更利于纳米银的生成，且碱性条件下生成的纳米银粒径更小。因此，尝试提高银翘解毒合剂药渣水提液的 pH 值至 5.0 进行反应。虽然经过 2 h 反应，混合液的颜色变化并不大 (图 1-A)，但是在 UV-Vis 光谱 450 nm 附近已有微弱的吸收峰 (图 2-A)，结果表明，有纳米银生成，银翘解毒合剂药渣水提液在室温下是可以还原 Ag<sup>+</sup> 生成纳米银的。随后，继续提高反应液的 pH 值发现，反应 2 h 后，随着反应液 pH 值升高，反应液颜色由土黄色变至深棕色 (图 1-A)，结果表明，反应液 pH 值越高生成的纳米银越多，这与文献报道结果一致<sup>[25-26]</sup>。UV-Vis 光谱测量也发现，随着反应液 pH 值升高，在 400~500 nm 代表纳米银 SPR 吸收的峰

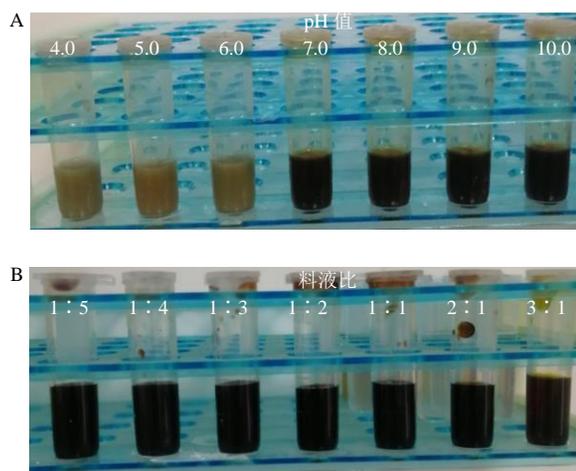


图 1 银翘解毒合剂药渣水提液与 AgNO<sub>3</sub> 在不同 pH 值 (A) 和料液比 (B) 反应 2 h 后的混合液状态

Fig. 1 Pictures of reaction mixtures at different pH values (A) and material proportion (B) after 2 h reaction

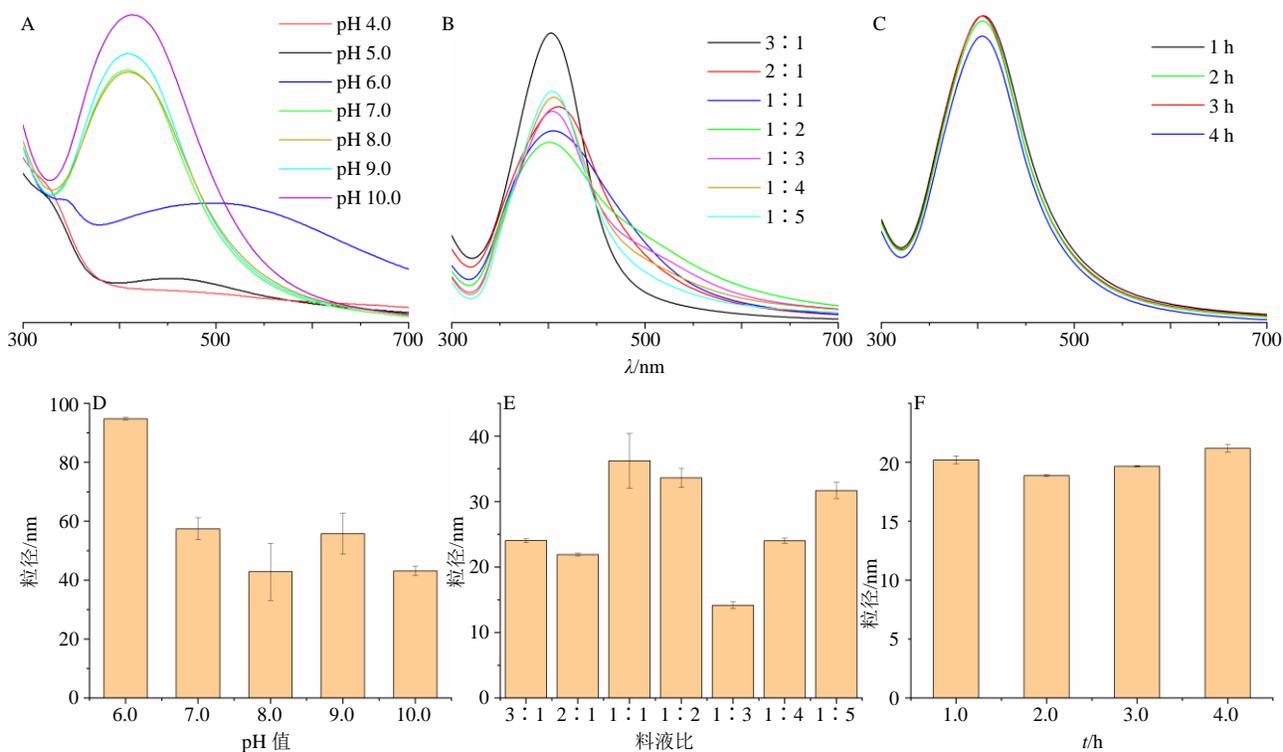


图 2 不同 pH 值 (A)、料液比 (B) 和反应时间 (C) 时的紫外-可见光谱及对应各条件下制得纳米银的平均粒径 (D、E、F)  
 Fig. 2 UV-Vis spectrum of mixtures of Yinqiao Jiedu Mixture waste extract and AgNO<sub>3</sub> at different pH (A), material proportion (B) and reaction time (C); and average sizes (D, E and F) of AgNPs obtained from different conditions, respectively

强度逐渐增强 (图 2-A); 此外, 还发现在不同 pH 值时, UV-Vis 光谱上代表纳米银 SPR 峰最大吸收的位置并不相同, 推测这可能是由于生成纳米银的粒径不同导致。为了证实这一猜想, 利用动态光散射 (DLS) 对不同 pH 值时生成的纳米银平均粒径进行了测量, 结果如图 2-D 所示。从图 2-D 可以看出, 不同 pH 值时得到的纳米银粒径的确不同, 分布在 42.9~94.8 nm, 在碱性条件下相对较小 (pH 为 10.0 时, 粒径为 43.1±1.6 nm), 与文献报道的结果一致<sup>[25-26]</sup>。

根据文献报道<sup>[24,27]</sup>, 在植物还原法中, 生物合成参数, 比如料液比和反应时间, 会对还原反应效率及纳米银的粒径等产生重要影响。因此, 对生物合成参数对还原反应的影响进行了评价。首先, 在 pH 10.0, 不同料液比超声条件下进行了反应, 反应时间为 2 h, 反应混合液颜色如图 1-B 所示都变成深棕色, 表明有大量的纳米银生成。UV-Vis 光谱显示, 420 nm 附近有很强的吸收峰, 当银翘解毒合剂药渣水提液与 AgNO<sub>3</sub> 体积比为 3:1 时, 吸收峰强度最大, 1:2 时强度最小 (图 2-B), 表明在 3:1 时生成的纳米银最多, 而 1:2 时最少。此外, 实验中也注意到, 在不同料液比时, 纳米银在 420 nm 附近

的 SPR 吸收最大峰位置并不相同, 表明纳米银粒径不同。DLS 测平均粒径结果显示, 在不同料液比时, 生成的纳米银平均粒径分布在 14.2~36.2 nm, 其中在 1:3 时平均粒径最小 (14.2±0.5) nm, 1:1 时最大为 (36.2±4.2) nm, 如图 2-E 所示。

随后, 在 pH 10.0, 料液比为 3:1 时对反应时间进行了考察。结果如图 2-C 所示, 当反应 1 h 后在 UV-Vis 光谱上就有很强的吸收, 表明有大量的纳米银生成; 反应 2 h 后, 代表纳米银 SPR 峰在 420 nm 附近的吸收已无明显增强, 表明 2 h 时内已完全反应。在不同反应时间, 并没有观察到代表纳米银 SPR 最大吸收峰的移动, 这可能是由于在不同反应时间时, 生成的纳米银粒径基本相同。DLS 测量结果显示, 不同反应时间生成的纳米银粒径分布在 18.9~21.2 nm (图 2-F), 反应时间对纳米银粒径影响不大, 和通过 UV-Vis 光谱观察到的结果一致。很明显, 可以通过控制合成参数获得不同粒径大小的纳米银, 在 pH 10.0, 料液比为 3:1, 且反应时间 2 h 时反应效率最高, 且粒径较小。

因为纳米银的分散性会影响其理化性质, 所以本实验对不同条件下生成的纳米银分散性进行了进一步评价。有文献报道<sup>[24]</sup>, 如果纳米粒子的多分散

指数 (PDI) 小于 0.3, 那么纳米粒子将会有很好的单分散性, 所以本实验对不同合成参数下得到的纳米银 PDI 进行了测量。首先在料液比为 1:1 时对不同 pH 值, 反应不同时间后得到的纳米银 PDI 进行了测量, 结果如表 1 所示。结果发现, 随着 pH 值增加, 所合成的纳米银其分散性有很大不同, 在酸性条件下分散性很好, 而在碱性条件下分散性相对较差, 其中在 pH 6.0 时分散性最好; 并且 PDI 随反应时间的变化很小。随后, 对 pH 10.0, 不同料液比 (3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5) 反应 2 h 后得到的纳米银 PDI 进行了评价, 结果纳米银的 PDI 分别为  $0.498 \pm 0.014$ 、 $0.540 \pm 0.050$ 、 $0.676 \pm 0.201$ 、 $0.546 \pm 0.028$ 、 $0.571 \pm 0.016$ 、 $0.700 \pm 0.006$ 、 $0.589 \pm 0.042$ 。结果发现在料液比为 3:1 时其 PDI 值最小, 为  $0.498 \pm 0.014$ , 但是大于 0.3, 表明在此条件下合成的纳米银中可能存在聚集体, 该结论被后续的 TEM 表征所证实。

### 3.2 纳米银的表征

本实验对 pH 10.0, 料液比为 3:1, 反应时间为 2 h 时得到的纳米银进行了表征及生物活性测试。首先使用透射电子显微镜 (TEM) 对制得的纳米银形貌进行了表征, 结果如图 3-A 所示。从图中可以

看出, 制备得到的纳米银呈近球形, 分散较均匀, 有小部分聚集, 和通过 PDI 分析得到的结果一致; 粒径主要分布在 20~30 nm, 与使用 DLS 测得的平均粒径 [ $(24.0 \pm 0.3)$  nm, 图 3-B] 基本吻合。随后, 对合成的纳米银表面性质进行了评价。因为 Zeta 电位可以反映纳米粒子表面吸附分子所带电荷, 并且可以根据其数值是否大于 +25.0 mV 或者小于 -25.0 mV 判断纳米粒子的稳定性<sup>[24]</sup>, 所以本实验使用激光粒度仪对制得的纳米银 Zeta 电位进行了测量。结果如图 3-C 所示, 为  $(-23.1 \pm 0.2)$  mV, 说明纳米银表面吸附的物质带有负电荷, 这些物质可能是生物碱、黄酮、脂质、多糖、蛋白质和氨基酸等; 此外, 因其 Zeta 电势数值接近 -25.0 mV, 表明其具有较好的稳定性。正是因为纳米银表面吸附的带有负电性的物质, 才使得其不容易发生团聚而以分散的形式存在。将此条件下合成的纳米银放置 60 d 后其粒径并没有明显变化 [ $(24.7 \pm 0.3)$  nm], 进一步证明其很好的稳定性。

### 3.3 纳米银的生物活性评价

本实验对合成的纳米银抗氧化和抑菌活性进行了研究。如图 4-A 所示, 当加入 0.8  $\mu\text{g/mL}$  纳米银后对 DPPH 自由基捕获率可达 44.8%; 增大纳米银

表 1 不同 pH 值和反应时间后得到纳米银的多分散指数 (PDI)

Table 1 Polydispersity index (PDI) obtained at different biosynthesis parameters

t/h	PDI						
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
1	$0.302 \pm 0.003$	$0.242 \pm 0.008$	$0.175 \pm 0.004$	$0.443 \pm 0.009$	$0.480 \pm 0.008$	$0.445 \pm 0.010$	$0.473 \pm 0.020$
2	$0.254 \pm 0.001$	$0.203 \pm 0.005$	$0.175 \pm 0.008$	$0.417 \pm 0.015$	$0.350 \pm 0.004$	$0.245 \pm 0.031$	$0.442 \pm 0.030$
3	$0.238 \pm 0.005$	$0.225 \pm 0.013$	$0.171 \pm 0.017$	$0.563 \pm 0.055$	$0.512 \pm 0.117$	$0.844 \pm 0.126$	$0.581 \pm 0.103$
4	$0.226 \pm 0.014$	$0.234 \pm 0.007$	$0.174 \pm 0.010$	$0.427 \pm 0.063$	$0.468 \pm 0.013$	$0.986 \pm 0.024$	$0.407 \pm 0.003$
5	$0.216 \pm 0.002$	$0.240 \pm 0.004$	$0.173 \pm 0.018$	$0.381 \pm 0.081$	$0.404 \pm 0.082$	$0.461 \pm 0.168$	$0.327 \pm 0.033$
7	$0.211 \pm 0.017$	$0.264 \pm 0.004$	$0.173 \pm 0.016$	$0.497 \pm 0.022$	$0.504 \pm 0.007$	$0.464 \pm 0.023$	$0.474 \pm 0.062$

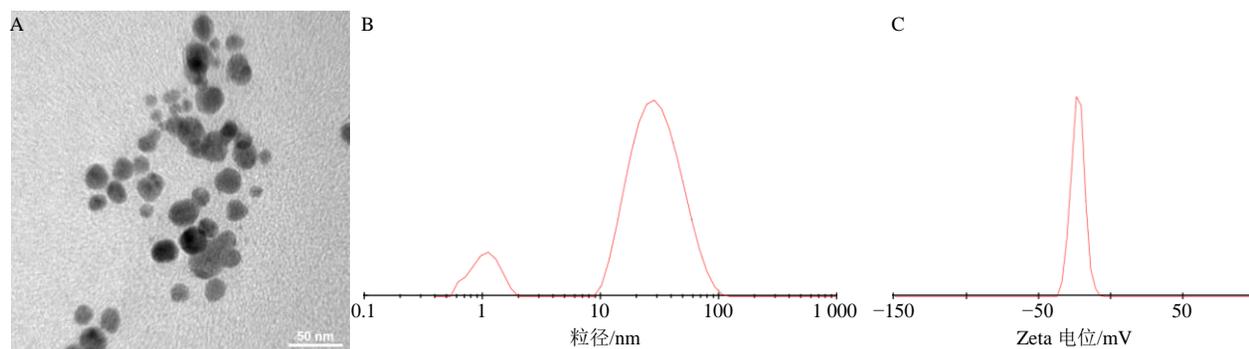


图 3 纳米银的 TEM 图 (A)、平均粒径 (B) 和 Zeta 电位 (C)

Fig. 3 TEM image (A), average size (B) and Zeta potential (C) of synthesized AgNPs

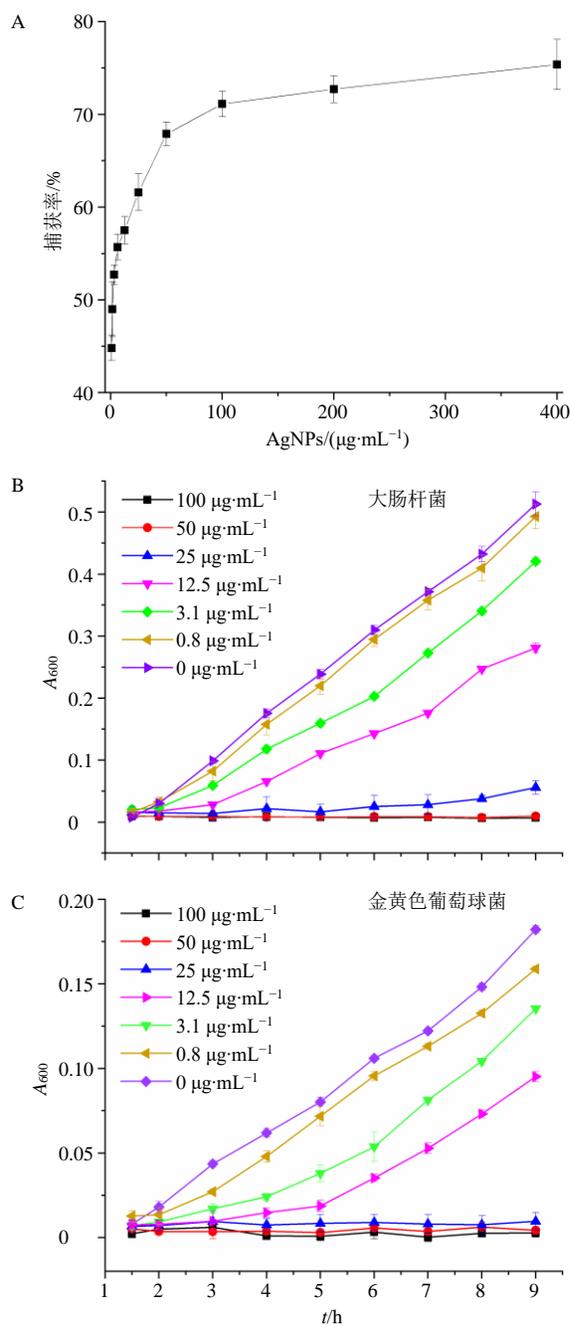


图 4 纳米银对 DPPH 自由基的捕获率 (A)、大肠杆菌 (B) 和金黄色葡萄球菌 (C) 的抑制活性

Fig. 4 Free radical scavenging rate (A), antibacterial activity of synthesized AgNPs against *E. coli* (B), and *S. aureus* (C)

质量浓度至 100.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 捕获率可达 71.1%, 表明合成的纳米银具有很好的抗氧化活性; 但是继续增大纳米银的质量浓度 (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 对 DPPH 自由基捕获率影响不大 (75.4%)。

细菌培养液的 A 值可以反映培养液中细菌的增殖速度, 本实验通过测量细菌培养液在 600 nm 处的 A 值 ( $A_{600}$ ) 来确定所合成的纳米银对大肠杆菌

和金黄色葡萄球菌生长的抑制作用。如图 4-B 和 4-C 所示, 随着培养时间增加, 加入生理盐水对照组的菌液其  $A_{600}$  值不断增大; 将不同质量浓度的纳米银加入包含有大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的培养液后其  $A_{600}$  值发生了明显的变化, 与对照组相比明显变小, 表明纳米银可以有效抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长。对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 当将纳米银质量浓度分别增大至 50.0、25.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  后, 在 9 h 内其  $A_{600}$  值不发生变化, 表明在此质量浓度下, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长被完全抑制。用银翘解毒合剂药渣水提液制备的纳米银和 Alsammarraie 等<sup>[28]</sup>使用姜黄提取液制得的纳米银一样, 都具有很好的杀菌效果。

#### 4 讨论

利用银翘解毒合剂药渣水提液在室温下超声反应可以成功制备纳米银, 因为反应液的 pH 值和料液比都会影响反应体系中的还原性物质的含量和形式, 因此极大影响纳米银的平均粒径和分散性。在 pH 10.0, 料液比为 3 : 1, 反应 2 h 后可高效制得小粒径纳米银。本研究制备得到的纳米银呈近球形, 分散较均匀, 有少量聚集体, 稳定性好, 表面带有负电荷。生物活性研究结果显示本研究制备得到的纳米银具有很强的抗氧化性, 但是浓度进一步提高其抗氧化性不变, 这可能是由于纳米银对 DPPH 吸附达到饱和。抗菌活性实验表明, 相较于大肠杆菌, 制得的纳米银对金黄色葡萄球菌的抑制作用更为明显, 这可能是由于 2 种细菌对纳米银不同的吞噬能力, 纳米银更易进入金黄色葡萄球菌, 因此对其具有更好的杀菌效果<sup>[29]</sup>。生物活性实验表明制得纳米银可以作为抗菌和抗氧化试剂应用于生物医学领域。本课题组后续还将对银翘解毒合剂药渣水提液中还原性物质基础进行研究。这些研究结果不仅提供了一种制备纳米银的新方法, 也为银翘解毒合剂药渣的再利用提供了新思路。

#### 参考文献

- [1] Joachim C. To be nano or not to be nano [J]. *Nat Mater*, 2005, 4(2): 107-109.
- [2] Wiley B J, Im S H, Li Z Y, *et al*. Maneuvering the surface plasmon resonance of silver nanostructures through shape-controlled synthesis [J]. *J Phys Chem B*, 2006, 110(32): 15666-15675.
- [3] Powers C M, Badireddy A R, Ryde I T, *et al*. Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12

- Cells: Critical contributions of silver ion, particle size, coating and composition [J]. *Environ Health Persp*, 2011, 119(1): 37-44.
- [4] Tarannum N, Divya, Gautam Y K. Facile green synthesis and applications of silver nanoparticles: A state-of-the-art review [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(60): 34926-34948.
- [5] Roy A, Bulut O, Some S, *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles: Biomolecule nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(5): 2673-2702.
- [6] 段金殿, 周荣汉, 宿树兰, 等. 我国中药资源科学发展现状及展望 [J]. *自然资源学报*, 2009, 24(03): 378-386.
- [7] 张伯礼. 中医药事业发展于中药材资源 [A] // 2014 中药及天然药物资源国际学术研讨会暨 CSNR 天然药物专业委员会第十一届学术年会 [C]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [8] 陈美兰, 申业, 杨光, 等. 中药渣有机肥对丹参的促生作用以及土壤酶活性的影响 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2016, 46(11): 1296-1303.
- [9] Ma J F, Chen Y P, Wang H, *et al.* Traditional Chinese medicine residue act as a better fertilizer for improving soil aggregation and crop yields than manure [J]. *Soil Tillage Res.*, 2019, 195: 104386.
- [10] Zhou Y, Selvam A, Wong J W C. Chinese medicinal herbal residues as a bulking agent for food waste composting [J]. *Bioresource Technol*, 2018, 249: 182-188.
- [11] 吴华, 张辉, 康愿. 饲料中添加甘草药渣对肉鸡生产性能的影响 [J]. *当代畜牧*, 2007, 11: 29-31.
- [12] 金茜, 曾启华, 李华刚, 等. 中药渣栽培食用菌中氨基酸含量的测定与分析 [J]. *遵义师范学院学报*, 2015, 17(1): 103-105.
- [13] Kong W P, Huang C S, Shi J, *et al.* Recycling of Chinese herb residues by endophytic and probiotic fungus *Aspergillus cristatus* CB10002 for the production of medicinal valuable anthraquinones [J]. *Microb Cell Fact*, 2019, 18: 102.
- [14] Ma H Z, Li H G, Zhang F Y, *et al.* Effects of nitrogen substitute and *Hypericum perforatum* extract on the ethanol fermentation of traditional Chinese medicine dregs [J]. *Ind Crop Prod*, 2019, 128: 385-390.
- [15] Yang J A, Qiu K Q. Development of high surface area mesoporous activated carbons from herb residues [J]. *Chem Eng J*, 2011, 167(1): 148-154.
- [16] Guo F Q, Dong Y P, Dong L, *et al.* An innovative example of herb residues recycling by gasification in a fluidized bed [J]. *Waste Manage*, 2013, 33(4): 825-832.
- [17] 吴薛明, 许婷婷, 何冰芳, 等. 非水相生物转化体系的建立及其在中药废弃物资源化中的应用 [J]. *中草药*, 2015, 46(3): 313-319.
- [18] Xin S Z, Huang F, Liu X Y, *et al.* Torrefaction of herbal medicine wastes: Characterization of the physicochemical properties and combustion behaviors [J]. *Bioresource Technol*, 2019, 287: 121408.
- [19] 中华人民共和国卫生部药品标准 (中药成方制剂第十四册) [S]. 1997.
- [20] 周远鹏, 江京莉, 严少敏. 银翘解毒片的药理研究 [J]. *中成药*, 1990, (01): 22-25.
- [21] 赵海平, 廖正根, 朱根华. 银翘散类方中成药系统性再评价的探讨 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(11): 2779-2781.
- [22] 张莉, 周娟娟. UPLC 法同时测定银翘解毒剂中 10 种成分 [J]. *中成药*, 2018, 40(8): 1748-1751.
- [23] 魏思敏, 唐志书, 李慧敏, 等. 山茱萸水提液银纳米颗粒的制备及其抑菌活性的研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(1): 52-58.
- [24] Wei S M, Wang Y H, Tang Z S, *et al.* A size-controlled green synthesis of silver nanoparticles by using the berry extract of Sea Buckthorn and their biological activities [J]. *New J Chem*, 2020, 44(22): 9304-9312.
- [25] Sathishkumar M, Sneha K, Won S W, *et al.* Cinnamon *zeylanicum* Bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity [J]. *Colloid Surf B*, 2009, 73(2): 332-338.
- [26] Heydari R, Rashidipour M. Green synthesis of silver nanoparticles using extract of oak fruit hull (jaft): synthesis and *in vitro* cytotoxic effect on MCF-7 cells [J]. *Int J Breast Cancer*, 2015, 2015: 846743-846749.
- [27] 魏思敏, 王英辉, 唐志书, 等. 紫外光辐射山茱萸水提液制备纳米银及生物活性研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2020, 41(6): 1391-1398.
- [28] Alsammarraie F K, Wang W, Zhou P, *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using turmeric extracts and investigation of their antibacterial activities [J]. *Colloid Surf B*, 2018, 171: 398-405.
- [29] Wang Y H, Wei S M, Wang K, *et al.* Evaluation of biosynthesis parameters, stability and biological activities of silver nanoparticles synthesized by *Cornus Officinalis* extract under 365 nm UV radiation [J]. *RSC Adv*, 2020, 10(45): 27173-27182.