

• 药剂与工艺 •

穿心莲纳米银制备及抗氧化和抑菌活性研究

魏思敏¹, 刘 强¹, 苏思琪¹, 王英辉^{2*}

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), 陕西咸阳 712083
2. 长安大学理学院, 陕西 西安 710064

摘要: 目的 使用穿心莲 *Andrographis paniculata* (AP) 绿色合成纳米银 (AP@silver nanoparticles, AP@AgNPs), 确定最佳合成工艺; 研究 AP@AgNPs 理化性质、抗氧化和抑菌活性及杀菌机制。方法 使用穿心莲提取液在超声加热条件下合成 AP@AgNPs, 以 AP@AgNPs 粒径、还原反应效率及多分散性为指标, 通过评价生物合成参数确定最佳合成工艺, 激光粒度仪、透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM)、X 射线晶体衍射 (X-ray crystal diffraction, XRD) 和傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 表征 AP@AgNPs 粒径、多分散性、表面性质、形貌、晶型和还原机制, 计算 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH) 自由基捕获率评价抗氧化能力, 测量细菌生长动力学评价抑菌活性, 流式细胞术评价 AP@AgNPs 内吞作用, 初步揭示杀菌机制。结果 穿心莲提取液 pH 10.0、AgNO₃ 浓度 10.0 mmol/L、50 °C 反应 6.0 h 可得近球形、分散均匀、表面带负电荷、粒径在 30~40 nm、晶型为面心立方、至少 2 个月内稳定的 AP@AgNPs。合成的 AP@AgNPs 对 DPPH 自由基具有很强的捕获能力, 150.0 µg/mL 时捕获率为 95.1%; 对大肠杆菌 *Escherichia coli* 的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 为 20.0 µg/mL, 而金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 的 MIC 大于 100.0 µg/mL; AP@AgNPs 可被 2 种细菌内吞, 其中大肠杆菌可能通过细胞内机制死亡, 而金黄色葡萄球菌的细胞膜会被损伤导致细胞内物质流出。结论 使用穿心莲可绿色制备性质稳定、具有抗氧化和选择性抑制大肠杆菌活性的 AP@AgNPs, 其可被大肠杆菌和金黄色葡萄球菌内吞。

关键词: 穿心莲; 纳米银; 绿色合成; 生物合成参数; 抑菌活性; 抗氧化

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)19-6508-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.19.006

Preparation of silver nanoparticles by *Andrographis paniculata* and antioxidant and antibacterial activitiesWEI Simin¹, LIU Qiang¹, SU Siqu¹, WANG Yinghui²

1. State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation), Co-Construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Resources Industrialization by Shaanxi & Education Ministry, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China
2. College of Science, Chang'an University, Xi'an 710064, China

Abstract: Objective To fabricate silver nanoparticles (AP@AgNPs) by Chuanxinlian (*Andrographis paniculata*, AP) with optimization of biosynthesis parameters. To character the AP@AgNPs followed by disclosing the antioxidation, antibacterial activity and the mechanism of sterilization. **Methods** To biosynthesize AP@AgNPs under ultrasound and heating. To confirm optimal biosynthesis parameters by evaluating the influence on reaction efficiency, average size and polydispersity. To characterize AP@AgNPs by laser

收稿日期: 2024-04-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274753); 国家自然科学基金资助项目 (22103007); 陕西省创新能力支撑计划 (2023KJXX-063); 陕西省重点研发计划 (2024SF-YBXM-517); 陕西省重点研发计划 (2024SF-YBXM-426); 陕西中医药大学 2023 年度科技创新人才体系建设计划 (2023-LJRC-03); 秦药特色资源研究开发重点实验室开放课题项目 (SUCM-QM202207)

作者简介: 魏思敏 (1989—), 女, 硕士生导师, 副教授, 从事纳米材料的合成与表征研究。E-mail: weismiccas@163.com

***通信作者:** 王英辉 (1989—), 男, 博士, 副教授, 从事纳米材料合成与表征研究。E-mail: wangyinghui@chd.edu.cn

granularity analyzer, transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). To evaluate antioxidation activity by calculating the scavenging rate of DPPH. To evaluate antibacterial activity by mapping the curves of growth kinetics and to disclose the mechanism of sterilization by calculating the mean of side scattering channel (SSC) measured by flow cytometry. **Results** At pH 10.0 and with 10.0 mmol/L of AgNO_3 , the AP@AgNPs could be synthesized by AP at 50 °C under ultrasonic, where the AP@AgNPs are spherical shape with average size 30—40 nm and a face-centered cubic structure, and exist in monodispersed form covered by negatively charged complex with long-term stability (2 months). The AP@AgNPs display superior antioxidation activity, where the 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) scavenging rate is 95.1% after adding 150.0 $\mu\text{g/mL}$ of AP@AgNPs. And AP@AgNPs prefer to inhibit the growth of *Escherichia coli* rather than *Staphylococcus aureus*, where the minimum inhibitory concentration (MIC) of *E. coli* is 20.0 $\mu\text{g/mL}$ but for *S. aureus*, it is higher than 100.0 $\mu\text{g/mL}$. The AP@AgNPs reveal significant uptake into both *E. coli* and *S. aureus*, and may damage the cell membrane of *S. aureus*. **Conclusion** AP could act as a proper substance to fabricate AgNPs with long-term stability and superior antioxidation and antibacterial activity.

Key words: *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees; silver nanoparticles; green fabrication; biosynthesis parameter; antibacterial; antioxidation

纳米银 (silver nanoparticles, AgNPs) 是一种新型的金属纳米材料, 为粒径在 1~100 nm 的金属银单质, 因具有较大的比表面积和较小尺寸显示出优异的抗菌能力, 杀菌性能比银离子 (Ag^+) 强 200 倍以上, 可用作抗菌剂, 因而被广泛关注^[1-2]。大量研究表明, AgNPs 对革兰阴性菌和阳性菌均具有治疗效果, 表现出广谱的抗菌活性^[3]。杀菌机制研究发现, 其可通过多途径杀菌, 比如氧化应激、破坏细胞膜等, 不易产生细菌耐药性, 已成为当前研究的热点^[4]。近期研究发现, AgNPs 除有优良的抗菌性能, 还具有抗真菌、抗病毒、抗感染、抗炎、促伤口愈合和抗癌等生物活性^[5-7], 并可被用于污水处理、化学催化、电化学等领域^[8-13], 因此其制备方法, 特别是大规模制备方法备受关注。

常见的 AgNPs 合成手段有物理法、化学法以及生物合成法^[14]。其中物理法原理简单, 制备的 AgNPs 生物安全性高, 但需使用大型仪器, 能耗大, 反应条件苛刻; 而化学法虽对设备要求简单且合成 AgNPs 产率高, 但有毒化学试剂可能残留, 造成毒性增加, 阻碍在生物医药领域应用。生物合成法一般使用微生物或者植物提取液作为还原剂和保护剂, 操作简单, 不需使用大型仪器和有毒化学试剂, 被认为是一种环境友好、绿色节能的 AgNPs 制备方法^[15]; 植物合成法因原料便宜易得, 在近年来已被用于大规模制备 AgNPs^[16-17]。在植物合成法中, 由于药用植物包含大量生物活性物质, 可协同增加 AgNPs 的生物活性, 引起了众多研究者关注^[18]。本课题组已使用山茱萸^[19-21]、薄荷^[22]、大枣^[23]、沙棘^[24]等成功制备了生物活性 AgNPs, 并进一步将该体系拓展至中药废弃物, 以银翘解毒合剂药渣^[25]、八正合剂药渣^[26]、肿节风药渣^[27]以及红花非药用部

位^[28]等为原料合成 AgNPs, 降低成本, 为大规模制备 AgNPs 提供可能。

穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees (AP) 为爵床科穿心莲属一年生植物, 药用部位为干燥地上部分, 味苦, 性寒, 具有清热解毒、消炎退肿等药效, 是我国大力发展的紧缺中药之一。穿心莲中包含超过 120 种化学组分^[29-30], 药用组分为二萜内酯类化合物, 在临床上常被用于抗病毒、抗真菌、消炎、治疗糖尿病和肿瘤等^[31-32]; 也包含黄酮类物质, 可作为还原剂将 Ag^+ 还原制备 AgNPs。基于以上背景, 本实验拟利用穿心莲提取液中活性组分作为还原剂和保护剂, 绿色制备穿心莲纳米银 (AP@silver nanoparticles, AP@AgNPs), 通过考察穿心莲提取液 pH 值、 AgNO_3 浓度、反应温度及时间等, 以 AP@AgNPs 粒径、反应效率及多分散性等为指标确定最佳合成工艺; 最后对最佳工艺合成的 AP@AgNPs 形貌、表面性质、晶型和稳定性表征, 阐明还原反应机制, 并评价抗氧化及抑菌活性, 初步揭示抑菌机制。本实验的结果不仅提供了一种绿色制备 AgNPs 的方法, 也为穿心莲综合开发利用提供了新思路。

1 试剂与材料

AgNO_3 (质量分数 >99%)、氯化钠、胰蛋白胨、酵母粉、琼脂粉等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, 分析纯) 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 穿心莲购于陕西兴盛德药业有限公司, 由陕西中医药大学刘世军教授鉴定, 为爵床科穿心莲属植物穿心莲 *A. paniculata* (Burm. f.) Nees 的干燥地上部分, 符合《中国药典》2020 年版的相关规定; 供试菌种大肠杆菌 *Escherichia coli* 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus*

aureus 购于陕西乐博生化科技有限公司。

UV-2600 型紫外可见分光光度计, 岛津(日本)公司; ZEN 3600 型激光粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司; XRD-7000S 型 X 射线晶体衍射仪, 日本岛津株式会社; Cary630 型傅里叶变换红外光谱仪, 安捷伦科技有限公司; JEM-2010 型透射电子显微镜(TEM), 东京理化株式会社; Thermo Multiskan GO 型多功能酶标仪, 美国 Thermo 公司。

2 方法

2.1 穿心莲水提液的制备及纳米银合成

准确称取粉碎并过 300 目筛后的穿心莲粉末 2.5 g, 加入 50 mL 超纯水超声提取 4.0 h, 滤过, 滤液储存于 4 °C 冰箱备用, 经测定穿心莲水提液原液 pH 值为 7.8。本实验中不同 pH 值水提液均使用 10 mol/L NaOH 溶液调节, 确保不同 pH 值水提液中各组分浓度相同。

向 1.5 mL 穿心莲提取液中加入 1.5 mL 所需浓度 AgNO_3 , 超声或加热超声反应, 本实验中提到 AgNO_3 浓度为混合前数值, 所有反应中混合液总体积保持不变(3.0 mL); 反应中取 300 μL 反应混合液稀释至 3.0 mL, 使用 UV-2600 紫外-可见光谱仪监测 AP@AgNPs 生成; ZEN 3600 激光粒度仪测量平均粒径、多分散指数(polydispersity index, PDI)及 ζ 电势; 本实验中数值均为 3 次测量平均值。

将反应混合液 12 000 r/min 离心(离心半径为 13.5 cm) 10 min, 弃上清液取沉淀, 用超纯水洗涤, 重复上述操作 3 次, 可得 AP@AgNPs, 加入 0.5 mL 超纯水在涡旋仪上使其分散均匀, 4 °C 冷藏, 备用, 浓度使用差量法确定。

2.2 纳米银表征

使用 TEM 表征 AP@AgNPs 微观形貌; X 射线晶体衍射(X-ray crystal diffraction, XRD)表征 AP@AgNPs 晶型; 傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)初步揭示穿心莲提取液还原 Ag^+ 生成 AP@AgNPs 的机制。

2.3 纳米银抗氧化活性研究

称取 2.5 mg DPPH 溶于 100 mL 乙醇中, 避光, 置于 4 °C 冰箱保存。将 AP@AgNPs 及其他样品配制成不同质量浓度梯度样品溶液, 在 96 孔板中加入 100 μL 样品溶液, 随后加入 100 μL DPPH 溶液, 室温避光反应 0.5 h, 每个质量浓度重复 3 次, 使用多功能酶标仪测量 517 nm 处吸光度(A)值, 重复 3 次, 使用下式计算清除率^[33]。

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

A_0 为 100 μL DPPH+100 μL 超纯水在 517 nm 处 A 值; A_1 为 100 μL DPPH+100 μL 样品溶液在 517 nm 处 A 值; A_2 为 100 μL 样品溶液+100 μL 乙醇在 517 nm 处 A 值

2.4 纳米银抑菌性能研究

将测试用的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 按照文献报道的方法制备成 1×10^5 cfu/mL 的菌悬液备用^[24]。随后将预先配置好的 100 μL 不同质量浓度 AP@AgNPs 加入放置有 100 μL 菌悬液的 96 孔板, 置于 37 °C 培养箱中培养, 经预定时间使用酶标仪测量 600 nm 处的 A 值。每个样品重复 3 次, 每次测量都加无菌水 200 μL 作为阴性对照和 200 μL 菌悬液作为阳性对照。

2.5 纳米银抑菌机制研究

通过流式细胞分析研究细菌对 AP@AgNPs 的内吞作用, 初步揭示 AP@AgNPs 抑菌机制。具体过程为将 500 μL 浓度为 1×10^7 cfu/mL 的细菌与 500 μL 不同质量浓度的 AP@AgNPs 在 37 °C 共培养 12.0 h, 随后将混合液于 3 000 r/min 下离心(离心半径为 13.5 cm) 5 min, 弃去上清液收集菌体后用 500 μL 无菌水重悬后, 使用流式细胞仪进行分析, 激发光波长为 488 nm。数据使用 FlowJo 7.6.1 程序包处理。

3 结果与分析

3.1 穿心莲水提液制备纳米银及生物合成参数对反应效率影响

首先, 室温将穿心莲原液(按照“2.1”项的步骤制备原液)与 10.0 mmol/L AgNO_3 混合, 超声反应 0.5 h, 观察体系颜色变化, 初步判断穿心莲水提液是否可以将 Ag^+ 还原为 AgNPs; 发现混合液颜色几乎无变化, 继续延长反应时间稍有变化(图 1), 结果表明, 穿心莲原液可将 Ag^+ 还原生成 AP@AgNPs, 但穿心莲原液还原能力弱, 体系中生成的

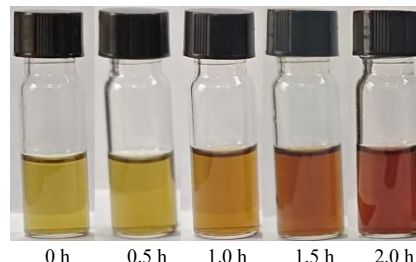


图 1 室温下穿心莲原液与 AgNO_3 反应不同时间后混合液照片

Fig. 1 Image of mixture after reacting with AgNO_3 at different times at room temperature

AP@AgNPs 很少。

因为 AgNPs 在 400 nm 附近会产生明显的等离激元共振 (surface plasmon resonance, SPR) 吸收峰, 所以进行紫外-可见光谱测量, 结果如图 2-B~D 所示, 反应 0.5、3.0、5.0 h 后, 紫外-可见吸收光谱在 400 nm 附近并没有出现代表 AgNPs 生成的 SPR 吸收峰, 进一步证实了该结论。

根据文献报道, 生物合成参数 (穿心莲提取液 pH 值、AgNO₃ 浓度等) 会影响植物提取液合成

AgNPs 反应^[20], 所以评价穿心莲提取液 pH 值对还原反应的影响。室温反应 0.5 h 时, 随着反应液 pH 值逐渐增大至 10.0, 反应混合液颜色明显变化 (图 2-A), 该变化源于体系中 AP@AgNPs 生成; 图 2-B 紫外-可见吸收光谱显示在 385 nm 附近有弱吸收峰, 吸收峰强度随 pH 值变大逐渐增加 (图 2-E), 表明在 pH 值 10.0 时生成更多的 AP@AgNPs。为了进一步提高穿心莲提取液还原 Ag⁺ 反应效率, 拟继续增大提取液 pH 值。

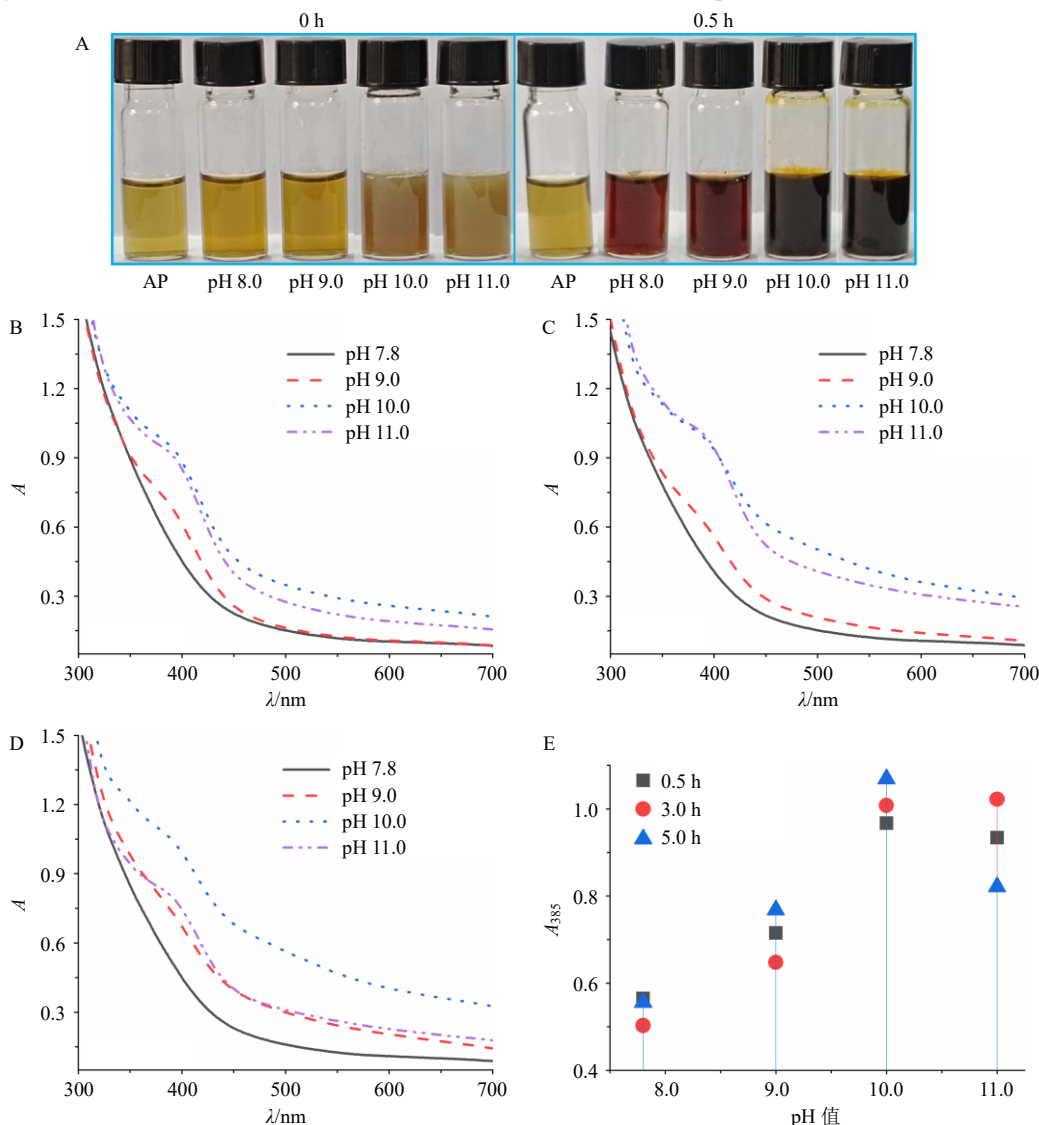


图 2 室温下不同 pH 值反应混合液照片 (A) 和反应 0.5 h (B)、3.0 h (C)、5.0 h (D) 混合液紫外-可见吸收光谱以及不同反应时间及 pH 值时反应混合液 385 nm 吸收值 (E)

Fig. 2 Image of mixture (A), ultraviolet visible absorbance spectroscopy of mixtures after reacting 0.5 h (B), 3.0 h (C), 5.0 h (D) with AgNO₃ at different pH, and absorbance at 385 nm obtained by reacting with AgNO₃ at different pH and time (E)

将提取液 pH 值增大至 11.0, 虽然反应混合液颜色与 pH 值 10.0 变化类似, 紫外-可见吸收光谱在 385 nm 附近也有吸收峰, 但吸收峰强度比 pH 值

10.0 时略低, 结果表明, 在 pH 值 11.0 时, 体系中生成的 AP@AgNPs 略少于 pH 值 10.0, 继续提升提取液 pH 值不利于还原反应。该结论被反应 3.0、5.0

h 时不同穿心莲提取液 pH 值评价实验证实。

如图 2-D、E 所示, 在反应 5.0 h, pH 值 11.0 时, 反应混合液在 385 nm 附近吸收值急剧下降, 这可能源于 pH 值改变导致穿心莲提取液中可作为保护剂和还原剂的黄酮类物质及氨基酸和蛋白质等存在形式发生变化。pH 值评价实验清楚的显示, 通过改变穿心莲提取液 pH 值, 可以使其还原活性增加, 还原 Ag^+ 生成 AP@AgNPs , 与文献报道的反应液 pH 值对还原反应的影响结论一致; 但也需注意, 紫外-可见吸收光谱在 385 nm 处的吸收峰并不强, 表明体系中生成 AP@AgNPs 量还很少, 反应需进一步优化。

为了提高还原反应效率, 尝试改变 AgNO_3 浓度。在 AgNO_3 浓度为 1.0、5.0、10.0、20.0 mmol/L 时分别进行实验, 反应 1.0 h 后, 随着 AgNO_3 浓度增大, 体系颜色由深灰色变为深褐色 (图 3-A), 提示 AgNO_3 浓度大的体系中生成 AP@AgNPs 量多; 如图 3-B~D 所示, 紫外-可见吸收光谱结果也显示了相同的趋势, 当体系中 AgNO_3 浓度大于 10.0 mmol/L 时, 391 nm 附近具有很明显的 AgNPs SPR 吸收峰, 在 20.0 mmol/L AgNO_3 时 391 nm 处吸收峰强度最大, 生成 AP@AgNPs 最多, 但与 10.0 mmol/L AgNO_3 比变化不大; 值得注意, 图 3-C 中 10.0、20.0 mmol/L AgNO_3 时反应混合液吸光度差距较大, 可能

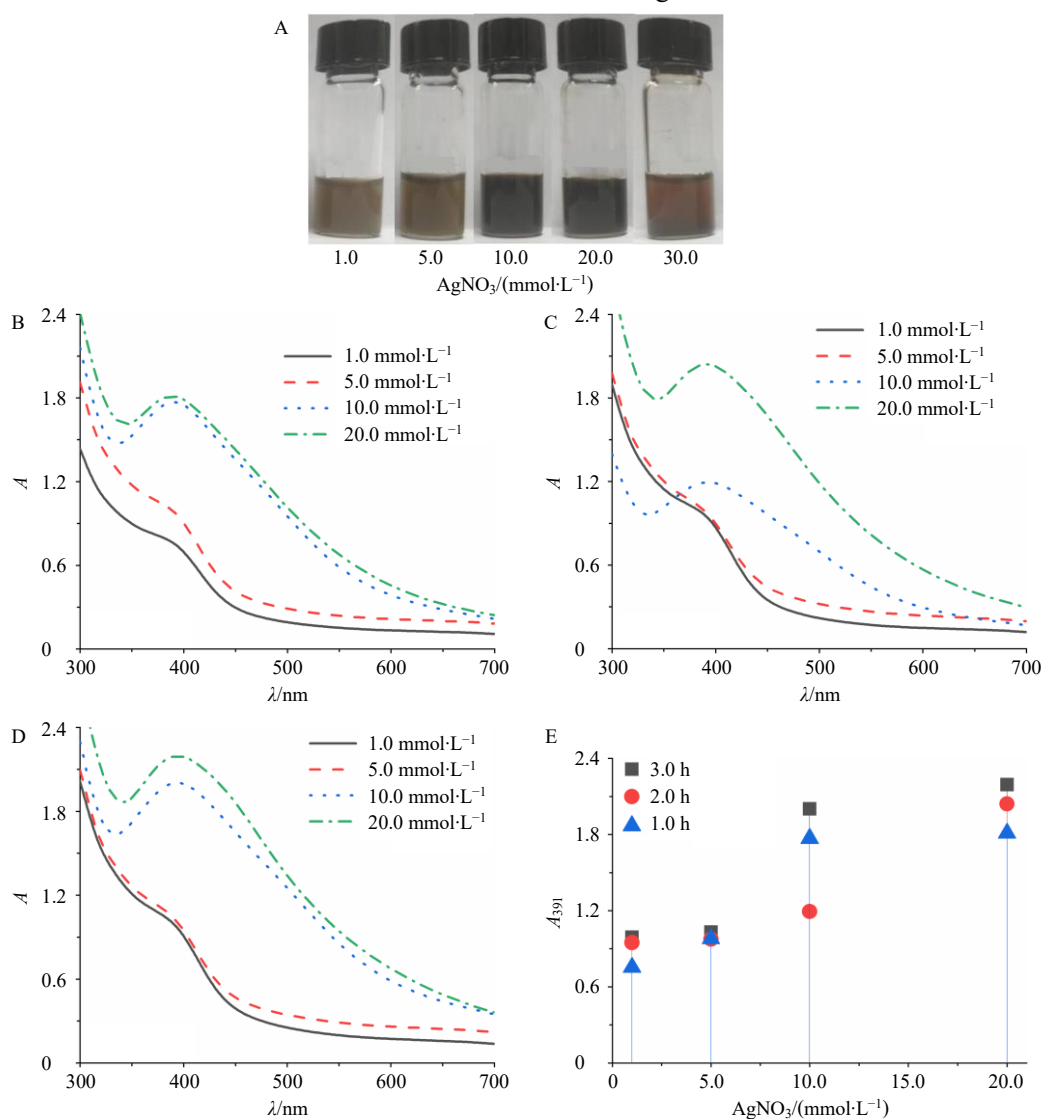


图 3 室温下 pH 10.0 时不同 AgNO_3 浓度反应混合液照片 (A) 及反应 1.0 h (B)、2.0 h (C)、3.0 h (D) 混合液紫外-可见吸收光谱以及不同反应时间及 AgNO_3 浓度反应混合液 391 nm 吸收值 (E)

Fig. 3 Image of mixture (A), ultraviolet visible absorbance spectroscopy of mixtures after reacting 1.0 h (B), 2.0 h (C), 3.0 h (D) with different concentrations of AgNO_3 at pH 10.0, and absorbance at 391 nm obtaining by reacting with different concentrations of AgNO_3 and time at pH 10.0 (E)

源于 10.0 mmol/L 时体系搅拌不均匀导致的局部浓度较小所致。

同时还发现，在低浓度时，随着反应时间增加反应混合液在 391 nm 附近的吸收变化不大，而高浓度时，反应时间越长，391 nm 附近吸收峰强度越大（图 3-E），生成 AP@AgNPs 越多，这可能是因为穿心莲提取液中还原性物质过量导致低浓度时 Ag⁺ 反应完全。随后，拟通过增大 AgNO₃ 浓度继续提高还原反应效率，但在 30.0 mmol/L AgNO₃ 体系中，有大量沉淀生成，这可能由于 AgNO₃ 浓度增大导致生长速率过快而引起聚集。因此，并未在 AgNO₃ 浓度大于 20.0 mmol/L 时进行实验。

随后，期望通过改变反应温度继续优化反应条件。在穿心莲提取液 pH 值 10.0 和 AgNO₃ 浓度为

10.0 mmol/L 时，分别控制反应温度在 30、40、50 °C 时反应。如图 4-A 所示，反应 1.0 h 后，反应混合液为深褐色，体系在 391 nm 附近具有很明显的吸收峰，但是随着反应温度升高，并未观察到期望的吸收峰强度增加，而是在 50 °C 时，吸收峰强度急剧下降（图 4-B），表明升高温度不利于还原反应进行；反应 2.0 h 后的紫外-可见吸收光谱显示出相同的趋势（图 4-C），进一步证实该结论。从反应效率来看，穿心莲提取液 pH 值 10.0，AgNO₃ 浓度 20.0 mmol/L 且室温反应为最佳合成工艺。然而，因为纳米粒子粒径及多分散性会影响其生物活性，所以对于纳米粒子的合成，除反应效率外，还需综合考虑粒径及多分散性等因素。因此，考察了生物合成参数对平均粒径和多分散性的影响。

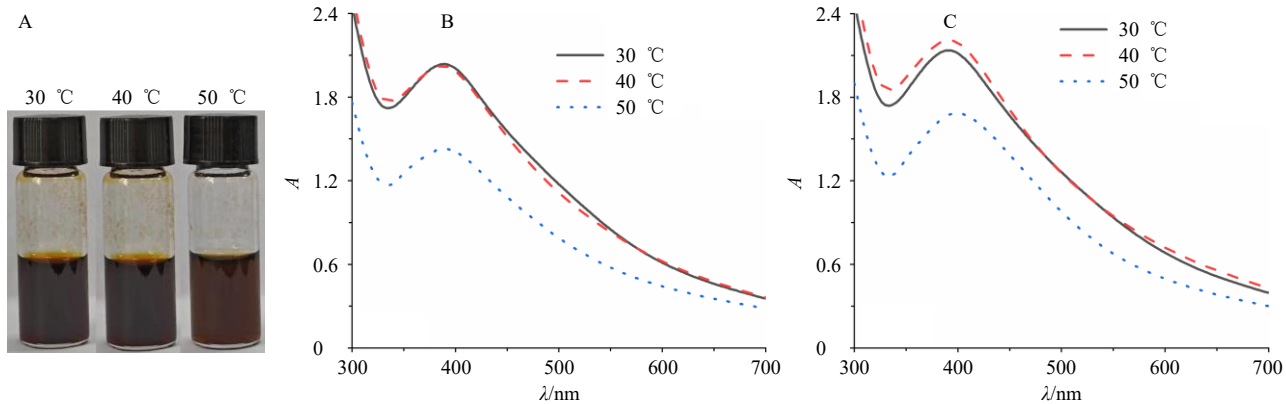


图 4 pH 10.0、10.0 mmol·L⁻¹ AgNO₃ 在不同温度反应混合液照片 (A) 及反应 1.0 h (B)、2.0 h (C) 混合液紫外-可见吸收光谱
Fig. 4 Photograph of mixture (A), ultraviolet visible absorbance spectroscopy of mixtures after reaction 1.0 h (B), 2.0 h (C) with 10.0 mmol·L⁻¹ of AgNO₃ at pH 10.0 at different temperature

3.2 生物合成参数对纳米银粒径及多分散性影响

室温下 AgNO₃ 浓度为 10.0 mmol/L 考察穿心莲提取液 pH 值对合成的 AP@AgNPs 粒径及多分散性影响。结果如表 1 所示，pH 值 9.0，反应 3.0 h 得到粒径最小 AP@AgNPs (61.3±1.3 nm)，但随着反应时间变化，粒径变化明显；而在 pH 10.0 时得到的 AP@AgNPs 粒径虽有增加，但随着反应进行变化不大；多分散性测量发现，在 pH 10.0 时得到的 AP@AgNPs 分散性最好，表现为其 PDI 最小。

室温下，pH 10.0 时考察 AgNO₃ 浓度对 AP@AgNPs 粒径及多分散性影响。结果如表 2 所示，在 AgNO₃ 浓度为 10.0 mmol/L 时，可得粒径较小的 AP@AgNPs，且随着反应进行，粒径变化不大。而 AgNO₃ 浓度对于生成的 AP@AgNPs 多分散性影响与粒径不同，在 5.0 mmol/L AgNO₃ 时生成的 AP@AgNPs 分散性最好，10.0 mmol/L AgNO₃ 次之。

pH 10.0、AgNO₃ 浓度 10.0 mmol/L 时在不同温度下实验，发现 50 °C、反应 2.0 h 合成的 AP@AgNPs

表 1 不同 pH 值、不同时间获得 AgNPs 的平均粒径和 PDI
Table 1 Average size and PDI of AgNPs obtained at different pH and incubation time

pH 值	平均粒径/nm			PDI		
	0.5 h	3.0 h	5.0 h	0.5 h	3.0 h	5.0 h
9.0	106.7±0.8	61.3±1.3	92.7±1.9	0.475±0.004	0.437±0.013	0.467±0.022
10.0	—	90.3±0.6	96.9±0.6	—	0.254±0.007	0.246±0.006
11.0	89.7±0.8	173.6±26.2	156.0±2.0	0.425±0.014	0.479±0.125	0.404±0.019

表 2 不同 AgNO₃ 浓度、不同时间获得 AgNPs 的平均粒径和 PDI

AgNO ₃ / (mmol·L ⁻¹)	平均粒径/nm			PDI		
	1.0 h	2.0 h	3.0 h	1.0 h	2.0 h	3.0 h
1.0	87.1±3.1	100.0±1.7	143.0±1.7	0.427±0.034	0.425±0.005	0.436±0.012
5.0	111.9±1.3	113.8±2.1	131.1±0.6	0.220±0.012	0.235±0.011	0.275±0.006
10.0	57.0±1.0	70.7±1.9	64.7±1.3	0.380±0.049	0.449±0.012	0.421±0.030
20.0	124.7±1.8	85.3±3.7	69.6±1.2	0.470±0.004	0.421±0.018	0.452±0.013

粒径最小，为 (41.9±0.3) nm；但是温度对多分散性影响不大，具体结果如表 3 所示。

因为纳米粒子粒径对其生物活性具有较大影响，所以在保证获得小粒径 AgNPs 的前提下，综合考虑反应效率和 AP@AgNPs 多分散性等因素得到使用 AP 提取液制备 AP@AgNPs 最佳工艺：穿心莲提取液 pH 10.0，AgNO₃ 浓度 10.0 mol/L，反应温度 50 ℃；该条件下，反应需要 6.0 h 才能完成（图 5）。随后，对最佳合成工艺下制备的 AgNPs 进行表征及生物活性测试。

3.3 纳米银形貌、表面性质、晶型及稳定性表征

使用 TEM 对 AP@AgNPs 微观形貌表征，如图

表 3 不同温度、不同时间获得 AgNPs 的平均粒径和 PDI
Table 3 Average size and PDI of AgNPs obtained at different temperature and incubation time

T/℃	平均粒径/nm		PDI	
	1.0 h	2.0 h	1.0 h	2.0 h
30	68.9±2.1	74.0±0.6	0.532±0.029	0.506±0.008
40	64.2±1.8	74.5±1.0	0.544±0.034	0.536±0.006
50	47.9±0.4	41.9±0.3	0.495±0.002	0.546±0.006

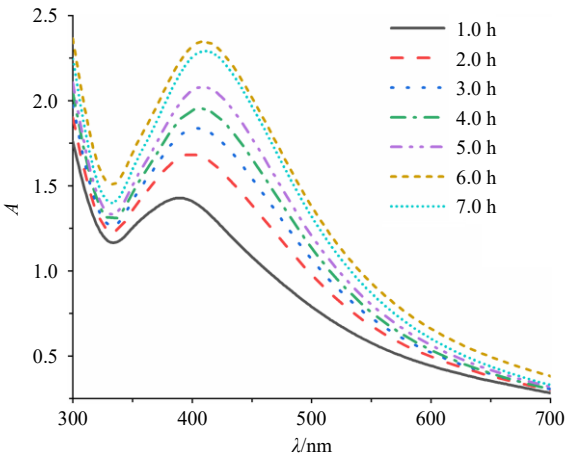


图 5 最佳制备工艺反应不同时间混合液紫外-可见吸收光谱
Fig. 5 Ultraviolet visible absorbance spectroscopy of mixtures at different time under optimal biosynthesis parameters

6-a、b 所示，AP@AgNPs 呈近球形，分散均匀，粒径在 30~40 nm，比使用动态光散射（dynamic light scattering, DLS）法测量得到的水合直径 (41.9±0.5) nm 稍小，PDI 为 0.504±0.005，粒径分布见图 6-c。使用 DLS 测量合成的 AP@AgNPs ζ 电势表征其表面性质，结果如图 6-d 所示，ζ 电势为 -15.8 mV，表明 AP@AgNPs 表面被带负电荷的分子保护，可防止其聚集，增加了稳定性。实际上，将 AP@AgNPs 放置 2 个月后并未观察到聚集现象，其水合直径为 (44.3±0.3) nm（表 4），表现出良好的稳定性。

使用 XRD 对 AP@AgNPs 晶型进行表征。如图 7 所示，在 2θ 角度为 38.0°、44.1°、64.4°、77.4°时观察到 4 个衍射峰，分别源于 AgNPs 的 (111)、(200)、

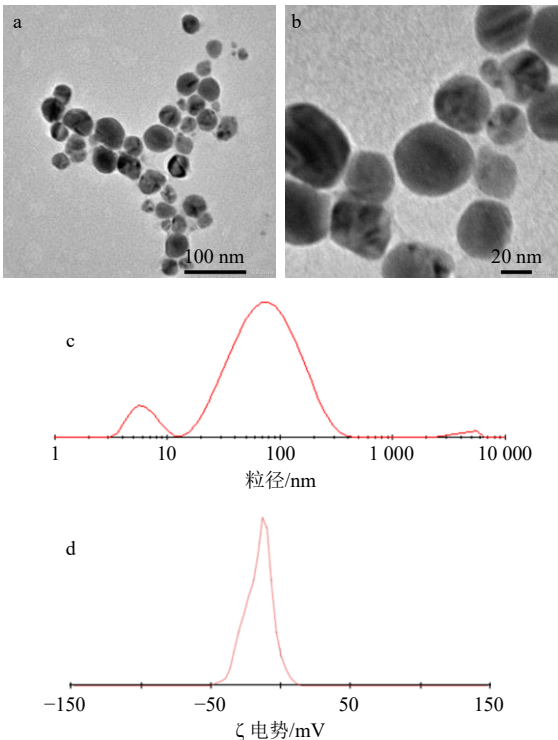


图 6 最佳制备工艺合成的纳米银的 TEM 图 (a, b)、平均粒径 (c)、ζ 电势 (d) of AP@AgNPs under optimal biosynthesis parameters

表 4 最佳制备工艺合成的纳米银放置不同时间后平均粒径和 PDI

Table 4 Average size and PDI of AP@AgNPs obtained under optimal biosynthesis parameters after a period of storage

t/d	平均粒径/nm	PDI	t/d	平均粒径/nm	PDI
0	41.9±0.5	0.504±0.005	50	40.8±0.4	0.461±0.004
1	41.6±0.3	0.504±0.004	60	44.3±0.3	0.465±0.003

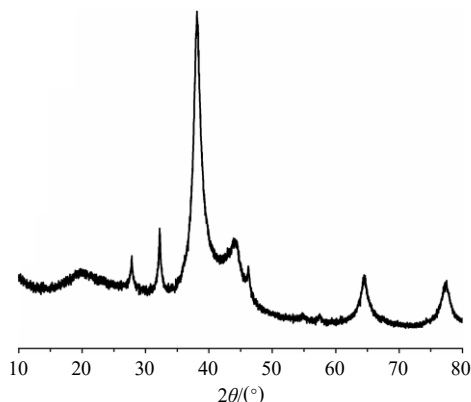


图 7 AP@AgNPs 的 XRD 图
Fig. 7 XRD image of AP@AgNPs

(220) 和 (310) 面 (JCPDS, 04-0783), 由此确认 AP@AgNPs 为面心立方结构。

使用红外光谱初步揭示穿心莲提取液还原 Ag^+ 得 AP@AgNPs 机制。结果如图 8 所示, 穿心莲提取液红外吸收主要位于 $3\ 360\ \text{cm}^{-1}$, 归属为蛋白质/酶类酰胺 I 及 O-H 伸缩振动和分子内氢键, $2\ 923$ 、 $2\ 851\ \text{cm}^{-1}$ 源于 C-H 伸缩振动, $1\ 733$ 、 $1\ 645\ \text{cm}^{-1}$ 源于蛋白质/酶类酰胺 II 吸收, $1\ 385$ 、 $1\ 322$ 、 $1\ 246$ 、 $1\ 035\ \text{cm}^{-1}$ 归属为脂肪胺和芳胺类 C-H 弯曲和 C-N 伸缩振动及多糖类、醇类和酚类等的 C-O 伸缩振动, 与文献报道的结果一致^[34]。然而, 在 AP@AgNPs 中, $3\ 360$ 、 $1\ 645$ 、 $1\ 246$ 、 $1\ 035\ \text{cm}^{-1}$ 吸收峰分别移动至

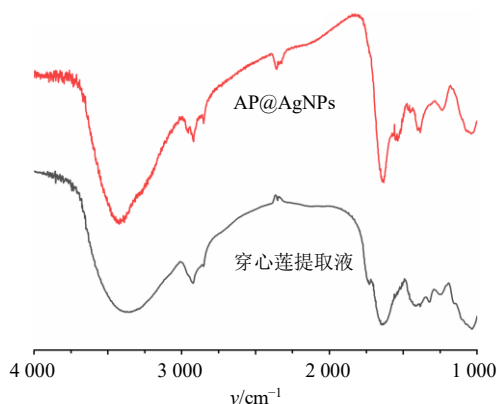


图 8 穿心莲提取液和 AP@AgNPs 的红外光谱
Fig. 8 FT-IR spectra of AP and AP@AgNPs

$3\ 423$ 、 $1\ 633$ 、 $1\ 238$ 、 $1\ 040\ \text{cm}^{-1}$, 并且在 $2\ 961$ 、 $1\ 537\ \text{cm}^{-1}$ 出现新峰, $1\ 733$ 、 $1\ 322\ \text{cm}^{-1}$ 吸收峰消失, 这些变化可能源于穿心莲提取液中包含的蛋白质、酶、多糖、醇和酚类等物质与 AgNPs 作用导致, 这些物质作为保护剂和还原剂使 Ag^+ 还原为 AP@AgNPs。

3.4 纳米银抗氧化活性

如图 9 所示, $1.3\ \mu\text{g/mL}$ AP@AgNPs 就可捕获 DPPH 自由基, 捕获率为 19.6%, 虽小于抗氧化剂维生素 C (VC, 36.2%), 但显示出自由基捕获能力; 继续增大 AP@AgNPs 质量浓度, 其捕获率逐渐增大, 10.0 、 50.0 、 $100.0\ \mu\text{g/mL}$ 时分别为 34.5%、60.4%、88.6%, 在这些质量浓度下, 其自由基捕获能力弱于 VC; 加入 $150.0\ \mu\text{g/mL}$ AP@AgNPs 时捕获率可达 95.1%, 表现出比 VC (92.9%) 更好的抗氧化活性; 增大 AP@AgNPs 质量浓度至 $200.0\ \mu\text{g/mL}$, 其自由基捕获率增大至 96.6%, 稍高于 VC (96.2%)。这些结果说明, 使用 AP@AgNPs 可作为抗氧化剂, 且高质量浓度时抗氧化能力很强。

此外, 测量化学法合成的 AgNPs 和穿心莲提取液对 DPPH 自由基的捕获率发现: 其捕获率远小于 AP@AgNPs, 结果如图 9 所示, 这可能源于在 AP@AgNPs 中 AgNPs 和穿心莲协同抗氧化作用。

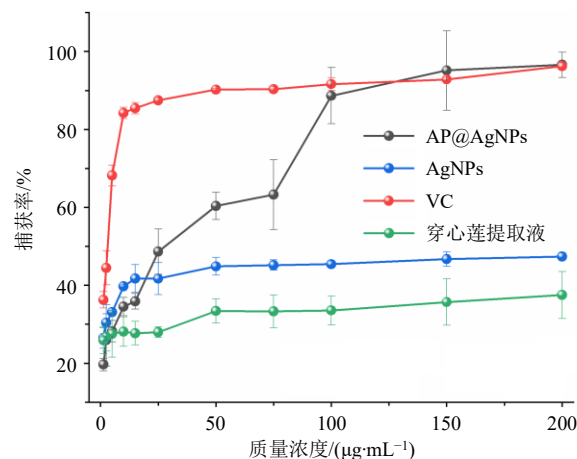


图 9 AP@AgNPs、VC、AgNPs 和穿心莲提取液对 DPPH 自由基的捕获率

Fig. 9 Scavenging rate of DPPH for AP@AgNPs, VC, AgNPs and AP extract

3.5 纳米银抑菌活性及机制初步探索

通过测量细菌培养液在 $600\ \text{nm}$ 处的吸收评价 AP@AgNPs 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用。结果如图 10 所示, 随着培养时间增加, 对照组 (大肠杆菌和金黄色葡萄球菌) 菌液在 $600\ \text{nm}$ 处吸收逐渐增大; 而在菌液中加入 AP@AgNPs $1.0\ \mu\text{g/mL}$

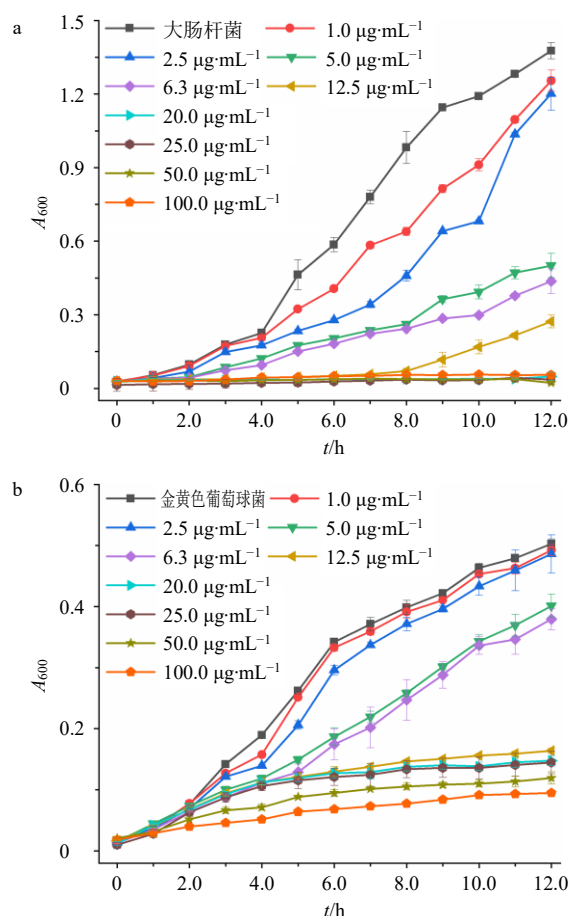


图 10 纳米银对大肠杆菌 (a) 和金黄色葡萄球菌 (b) 的抑制活性

Fig. 10 Antibacterial activity of AP@AgNPs against *E. coli* (a) and *S. aureus* (b)

后, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长会被抑制, 但是大肠杆菌被抑制程度更大, 结果表明, AP@AgNPs 可抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长。增大 AP@AgNPs 质量浓度至 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 12.0 h 内大肠杆菌组在 600 nm 处的吸收无明显变化, 表明在此质量浓度下, 大肠杆菌生长被完全抑制, 由此可确定 AP@AgNPs 对大肠杆菌的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 为 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。令人意外的是, 在金黄色葡萄球菌中加入 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AP@AgNPs, 菌液在 600 nm 处有吸收, 金黄色葡萄球菌生长未被完全抑制; 继续增加 AP@AgNPs 质量浓度至 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 虽然菌液在 600 nm 处的吸收有下降, 但仍有一定吸收, 结果表明, 在该质量浓度下, 金黄色葡萄球菌的生长仍未被完全抑制, AP@AgNPs 对金黄色葡萄球菌的抑制作用较弱。细菌生长动力学研究表明: AP@AgNPs 可选择性抑制大肠杆菌生长, 且 MIC 很小, 可作为抑菌剂用于治

疗由大肠杆菌引起的感染。

根据文献报道, 纳米粒子导致的细菌死亡主要由 (1) 细胞壁/膜的损伤; (2) 细胞内穿透和损伤; (3) 氧化应激等引起^[4]。显然, 可研究细菌对纳米粒子的内吞作用初步评价细菌的死亡机制。流式细胞术借助光学系统, 当细胞通过激光束时, 检测器会检测到细胞的散射光, 其中侧向散射光 (side scattering channel, SSC) 的数值代表细胞的颗粒度, 细胞内能够引起激光散射的颗粒性物质越多, 其 SSC 值就越大。有文献提出, 纳米粒子进入细胞会导致细胞内颗粒增加, 引起 SSC 散射增强^[35]。因此, 本研究使用流式细胞术测量 SSC 值的变化评价细菌死亡机制。如图 11 所示, 当在大肠杆菌和金黄色葡萄球菌中加入 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AP@AgNPs 后, SSC 的平均值分别由 1.03×10^4 和 1.15×10^4 增加至 1.64×10^4 和 2.33×10^4 , 表明纳米离子通过内吞作用进入细菌。有趣的是, 当向大肠杆菌和金黄色葡萄球菌中加入 15.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AP@AgNPs 后, 2 种细菌 SSC 平均值变化趋势不同; 在大肠杆菌中 SSC 平均值继续增加至 2.21×10^4 , 表明随着纳米离子浓度增大, 进入细菌内的粒子增多; 而在金黄色葡萄球菌中, SSC 平均值减少至 1.47×10^4 , 表明细胞内的粒子减少, 这可能源于纳米粒子破坏细菌细胞膜使细菌内物质流出。通过这些数据可初步推测 AP@AgNPs 与 2 种细菌的作用机制, 其中大肠杆菌可能通过细胞内作用机制, 如细胞内穿透和损伤以及氧化应激, 导致大肠杆菌死亡; 而对于金黄色葡萄球菌, 除细胞内作用机制外, 可能还会通过破坏细胞膜的方式导致金黄色葡萄球菌死亡。

4 讨论

本实验通过使用穿心莲提取液作为保护剂和还原剂, 以 AgNO_3 作为银源绿色合成 AgNPs。通过评价穿心莲提取液 pH 值、 AgNO_3 浓度及温度对还原反应效率, AP@AgNPs 粒径和多分散性的影响确定最佳制备工艺, 具体为穿心莲提取液 pH 值 10.0, AgNO_3 浓度 10.0 mmol/L, 50 $^\circ\text{C}$ 超声反应。在该条件下, 还原反应需 6.0 h 完成, AP@AgNPs 呈近球形, 分散均匀, 表面带负电荷, 粒径为 30~40 nm, 晶型为面心立方, 至少 2 个月内保持稳定; 具有良好的抗氧化活性, 可作为抗氧化剂; 表现出对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用, 其中对大肠杆菌的抑制作用更强, MIC 为 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而对于金黄色葡萄球菌, MIC 大于 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 可作为选择

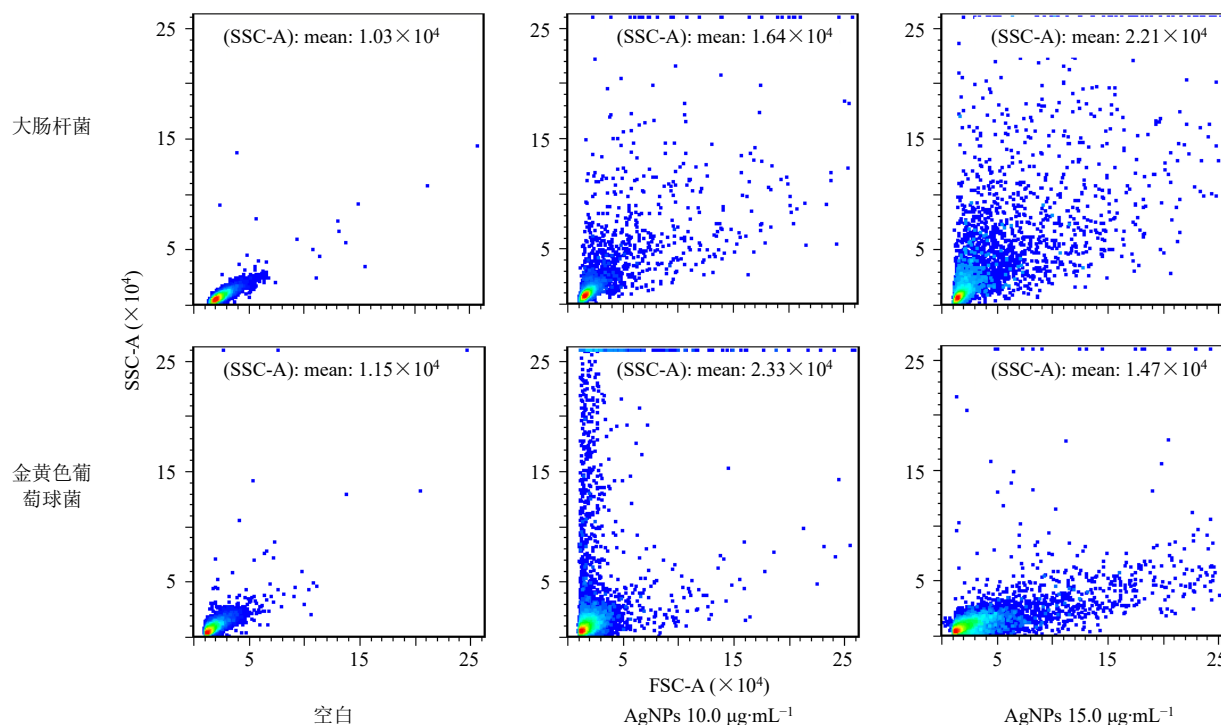


图 11 流式细胞术研究细菌对 AP@AgNPs 的内吞作用

Fig. 11 Uptake analysis of AP@AgNPs into *E. coli* and *S. aureus* assessed by flow cytometry

性抑制大肠杆菌的试剂。

杀菌机制初步探索显示, AP@AgNPs 主要通过细胞内作用机制杀死大肠杆菌, 但通过细胞内作用机制及破坏细胞膜等方式, 导致金黄色葡萄球菌死亡。需要强调的是纳米粒子导致细胞死亡的机制很复杂, 而本实验只是通过简单评价其内吞作用初步揭示导致细菌死亡的机制, 要全面揭示 AP@AgNPs 导致的细菌死亡机制, 还需要进一步深入的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52(6): 1636-1653.
- [2] Kędziora A, Speruda M, Krzyżewska E, et al. Similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 444.
- [3] Backx B P, Dos Santos M S, Dos Santos O A L, et al. The role of biosynthesized silver nanoparticles in antimicrobial mechanisms [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2021, 22(6): 762-772.
- [4] Yin I X, Zhang J, Zhao I S, et al. The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 2555-2562.
- [5] Patil S M, Tandon R, Tandon N. Recent developments in

silver nanoparticles utilized for cancer treatment and diagnosis: A patent review [J]. *Pharm Pat Anal*, 2022, 11(6): 175-186.

- [6] Ovais M, Ahmad I, Khalil A T, et al. Wound healing applications of biogenic colloidal silver and gold nanoparticles: Recent trends and future prospects [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(10): 4305-4318.
- [7] Arjun P N J, Sankar B, Shankar K V, et al. Silver and silver nanoparticles for the potential treatment of COVID-19: A review [J]. *Coatings*, 2022, 12(11): 1679.
- [8] Islam M A, Jacob M V, Antunes E. A critical review on silver nanoparticles: From synthesis and applications to its mitigation through low-cost adsorption by biochar [J]. *J Environ Manage*, 2021, 281: 111918.
- [9] Pagliaro M, Della Pina C, Mauriello F, et al. Catalysis with silver: From complexes and nanoparticles to MORALs and single-atom catalysts [J]. *Catalysts*, 2020, 10(11): 1343.
- [10] Iriarte-Mesa C, López Y C, Matos-Peralta Y, et al. Gold, silver and iron oxide nanoparticles: Synthesis and bionanoconjugation strategies aimed at electrochemical applications [J]. *Top Curr Chem (Cham)*, 2020, 378(1): 12.
- [11] Shaker Ardakani L, Surendar A, Thangavelu L, et al. Silver nanoparticles (Ag NPs) as catalyst in chemical reactions [J]. *Synth Commun*, 2021, 51(10): 1516-1536.
- [12] Singh K R, Natarajan A, Pandey S S. Bioinspired multifunctional silver nanoparticles for optical sensing

- applications: A sustainable approach [J]. *ACS Appl Bio Mater*, 2023, 6(11): 4549-4571.
- [13] Flores-López L Z, Espinoza-Gómez H, Somanathan R. Silver nanoparticles: Electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects. Mini review [J]. *J Appl Toxicol*, 2019, 39(1): 16-26.
- [14] Noga M, Milan J, Frydrych A, *et al.* Toxicological aspects, safety assessment, and green toxicology of silver nanoparticles (AgNPs)-critical review: State of the art [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5133.
- [15] Guilger-Casagrande M, de Lima R. Synthesis of silver nanoparticles mediated by fungi: A review [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 287.
- [16] Mustapha T, Misni N, Ithnin N R, *et al.* A review on plants and microorganisms mediated synthesis of silver nanoparticles, role of plants metabolites and applications [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(2): 674.
- [17] Roy A. Plant derived silver nanoparticles and their therapeutic applications [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2021, 22(14): 1834-1847.
- [18] Dhir R, Chauhan S, Subham P, *et al.* Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles: Unlocking their pharmacological potential-a comprehensive review [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11: 1324805.
- [19] Wei S M, Wang Y H, Tang Z S, *et al.* Novel biosynthesis method of silver nanoparticle by UV radiation of *Cornus Officinalis* aqueous extract and biological activities [J]. *Chem J Chinese Universities*, 2020, 41(6): 1391-1398.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Wang Y H, Wei S M. Green fabrication of bioactive silver nanoparticles using *Mentha pulegium* extract under alkaline: An enhanced anticancer activity [J]. *ACS Omega*, 2021, 7(1): 1494-1504.
- [23] 魏思敏, 王英辉, 唐志书, 等. 大枣水提液还原制备纳米银材料及抗氧化和抗菌活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(2): 182-189.
- [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] 魏思敏, 王英辉, 唐志书, 等. 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 [J]. 中草药, 2020, 51(16): 4169-4175.
- [26] Wei S M, Wang Y H, Tang Z S, *et al.* A novel green synthesis of silver nanoparticles by the residues of Chinese herbal medicine and their biological activities [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(3): 1411-1419.
- [27] 王英辉, 邹太艳, 苏瑞, 等. 肿节风药渣绿色制备纳米银及体外抗癌作用研究 [J]. 中草药, 2022, 53(7): 1964-1972.
- [28] Wei S M, Hao M K, Tang Z S, *et al.* Non-medicinal parts of safflower (bud and stem) mediated sustainable green synthesis of silver nanoparticles under ultrasonication: Optimization, characterization, antioxidant, antibacterial and anticancer potential [J]. *RSC Adv*, 2022, 12(55): 36115-36125.
- [29] 靳鑫, 时圣明, 张东方, 等. 穿心莲化学成分的研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 47-50.
- [30] 陈娟, 谷巍, 段金殿, 等. 不同生长期穿心莲活性成分及关键酶基因差异表达研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3149-3152.
- [31] 安丽丽, 孙贺军, 孔永红, 等. 具有线粒体靶向功能的穿心莲内酯 TPP-PEG-PE 脂质体的制备及其作用于胃癌模型小鼠的机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(7): 1945-1956.
- [32] 蔡楠, 李云鹃, 周桂荣, 等. 穿心莲内酯类制剂抗新型冠状病毒肺炎的相关理论依据和作用特点 [J]. 中草药, 2020, 51(5): 1159-1166.
- [33] Rumpf J, Burger R, Schulze M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 233: 123470.
- [34] Bettin Thomas T, Thirumalaikumar E, Sathishkumar R, *et al.* Effects of dietary *Andrographis paniculata* extract on growth, haematological, immune responses, immune-related genes expression of ornamental goldfish (*Carassius auratus*) and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection [J]. *Aquac Rep*, 2023, 33: 101850.
- [35] Kumari M, Shukla S, Pandey S, *et al.* Enhanced cellular internalization: A bactericidal mechanism more relative to biogenic nanoparticles than chemical counterparts [J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2017, 9(5): 4519-4533.

[责任编辑 郑礼胜]