

编者按: 济宁医学院药学院成立于 2001 年, 拥有药学、药物制剂、中药学、制药工程和生物制药 5 个本科专业, 均于 2016 年被批准为山东省高水平应用型专业群建设项目。其中中药学和药物制剂是山东省特色专业, 中药学是该校“十三五”特色专业重点发展专业。药学院紧紧围绕山东省生态环境和国民经济发展, 深入开展先导化合物的发现与优化、新型医药材料及药物传输系统的开发、药物分子的活性筛选与机理研究以及药物的药物分析与质量控制 4 个方向的研究。多年来, 本学科共承担上级教、研项目 85 项, 发表学术论文 200 余篇, SCI 收录 50 余篇。授权国家发明专利 5 项。目前, 该学科已形成了教学、科研和社会服务三位一体的办学格局。本期开辟“药学”专栏, 并邀请国内药学界有突出贡献的专家撰稿, 集中展示在药物合成、制剂开发、药品质量分析、药理研究等领域取得的研究成果, 以飨读者。

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.04.001

纳米银的绿色生物合成及其抗菌实验研究

王慧云 程雅芳 李嫚琪 于林萍 李昊阳

(济宁医学院药学院, 日照 276826)



王慧云, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 全国优秀教师、济宁市有突出贡献中青年专家。主持承担了国家“十一五”科技支撑项目、山东省科技攻关项目等 9 项科研课题, 主持《药剂学》省级精品课程、药物制剂省级特色专业以及山东省高水平应用型专业群的建设。发表学术论文 50 余篇, 其中第一作者及通讯作者 30 余篇, SCI/EI 收录 15 篇, 授权国家发明专利 3 项, 主编和参编教材 4 部, 获得科研奖励 9 项, 指导学生获得全国大学生课外科技学术作品挑战杯大赛三等奖等。学术兼职: 全国药学会教育研究会理事、山东省药学会本科教育教学指导委员会

会委员、济宁市药学会副理事长、济宁医学院重点实验室“药物化学与药物制剂研究所”所长。

摘要 **目的** 利用蒲公英叶提取液合成纳米银, 为纳米材料生物合成领域的研究提供依据。**方法** 利用 UV-2450 紫外分光光度计、Zetasizer Nano-ZS 型激光粒度仪考察了蒲公英提取液、硝酸银浓度、温度、反应时间、pH 等条件对纳米银的粒径、分散系数 PDI 及紫外光谱的最大吸收波长的影响, 并通过透射电子显微镜 (TEM)、红外光谱仪 (FTIR) 及 zeta 电位的测定, 对纳米银的特性进行了表征。进一步考察了所制备纳米银对革兰氏菌的抑菌活性。**结果** 得到球形的纳米银, 粒度范围为 30 ~ 60 nm; 紫外光谱的最大吸收波长为 (432 ± 20) nm; zeta 电位在 (-25.0 ± 10) mV, 所得纳米银粒子对革兰氏阳性菌具有更好的抑菌效果。**结论** 利用蒲公英提取液可实现对纳米银的可控合成。

关键词 蒲公英提取液; 生物合成; 纳米银; 抑菌活性

中图分类号: O648.15 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2017)08-229-06

The study on the Green synthesis of silver nanoparticles and their anti-bacterial activity

WANG Huiyun, CHENG Yafang, LI Manqi, YU Linping, LI Haoyang

(School of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To obtain the silver nanoparticles using the biosynthesizing method with the Taraxacum leaf extract and provide the basis of the study of the biosynthesis field of nano material. **Methods** The

influence of the concentration of silver nitrate, Taraxacum leaf extract, temperature, pH values on the particle size, PDI and maximum absorption wavelength of UV were studied using UV-vis spectra and Zetasizer Nano-ZS laser particle size analyzer. And then the characters of silver nanoparticles was also analyzed with fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), transmission electron microscopy (TEM) and X-ray diffractometer (MRD). Moreover, the antibacterial activity was confirmed by anti-bacterial activity against gram bacteria. **Results** Spherical shapes were observed for biosynthesized SNPs within the range of 30 ~ 60 nm. An intense surface plasmon resonance band at (432 ± 20) nm in the UV - visible spectrum clearly revealed the formation of silver nanoparticles. Zeta potential was (-25.0 ± 10) mV. And the obtained SNPs had good bacteriostatic effect on Gram positive bacteria. **Conclusion** The controllable synthesis of silver nanoparticle can be realized using the Taraxacum leaf extract.

Keywords: Taraxacum leaf extract; Biosynthesis; Silver nanoparticles; Anti-bacterial

纳米银(silver nanoparticles)具有广谱抗菌、安全无毒、无耐药性^[1]以及良好的生物相容性等特点,可有效预防感染^[2],而且应用纳米银标记 DNA 作为电化学探针,可应用于生物特定序列的测定^[3]。纳米银的合成包括物理方法、化学方法等。近年来纳米银的生物合成法已成为相关领域的研究热点,人们相继采用不同的植物提取物合成纳米银,如利用天竺葵叶、红茶叶等植物提取物合成纳米银^[4-11]。纳米银的生物合成简单易行,绿色环保。本研究选用简单易得的蒲公英提取液以及硝酸银为原料,生物合成具有良好抗菌活性的纳米银。在理论和实践上为纳米银的可控合成提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂

1.1.1 仪器 UV-2450 紫外分光光度计(Shimadzu corporation); SHZ-88 水浴恒温振荡器; H1650 高速台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); IRTracer-100(日本岛津制作厂); 78-1 型磁力搅拌器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); Zetasizer Nano-ZS 型激光粒度仪(英国 Malvern Instruments 公司); JEOL100CX-II 透射电子显微镜(日本电子光学公司); FDU-2110 冷冻干燥机(上海爱朗仪器有限公司); SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州净化设备有限公司); DHP-420 型电热恒温培养箱(天津市中环实验电炉有限制造公司); YM50-130302 型立式压力蒸汽灭菌器(上海三申医疗器械有限公司)。

1.1.2 试剂 硝酸银(分析纯,天津市永大化学试剂有限公司); 氨水(分析纯,烟台三和化学试剂有限公司); 乙酸(分析纯,莱阳经济技术开发区精

细化工厂); 硝酸(分析纯,莱阳经济技术开发区精细化工厂); 大肠杆菌,金黄色葡萄球菌(济宁医学院微生物实验室提供); 营养琼脂(北京奥博星生物技术有限责任公司); 阿莫西林分散片(先声药业,国药准字 H20140077)。

1.2 实验方法

1.2.1 蒲公英提取液的制备 本实验所用的玻璃仪器均用稀硝酸浸泡,再用重蒸水冲洗干净。取 5g 蒲公英干叶剪碎,置于 500ml 烧杯中,加 100ml 重蒸水,用电热套煮沸 5min。漏斗过滤,8000r/min 离心 30min,再用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤。将滤液放入 4℃ 冰箱储存备用。

1.2.2 AgNO₃ 溶液的配制 精密称取固体 AgNO₃ 0.0425g 于 50ml 烧杯中加重蒸水使其溶解,用玻璃棒引流至 250ml 容量瓶中,重蒸水冲洗烧杯 3 次引流至容量瓶,定容,混匀。8000r/min 离心 30min,再用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤。于 4℃ 冰箱储存以备用。

1.2.3 合成纳米银 取 2ml 的蒲公英提取液于 50ml 锥形瓶中,放入搅拌子,置于磁力搅拌器上,室温下边搅拌边用一次性滴管逐滴滴加 20ml AgNO₃ 溶液(用时 17min),滴加完成后继续搅拌 15min(共搅拌 32min),再置于水浴恒温振荡器(100r/min)中反应,颜色由无色到金黄色或棕黑色即为纳米银形成。

1.2.4 影响纳米银粒径的因素考察 1) 蒲公英提取液浓度: 分取 2ml 不同浓度(0.005、0.010、0.125、0.020g/ml)的蒲公英提取液于 50ml 锥形瓶中,置于磁力搅拌器上,室温下边搅拌边滴加 20ml AgNO₃ 溶液(0.001mol/L,用时 17min),反应温度 85℃,加热震荡 2h, pH 值为 6。滴加完成后继续搅拌 15min,室温在磁力搅拌器上反应 5h。颜色变为

红黄色,即为纳米银。

2)温度:取 2ml 的 0.01g/ml 的蒲公英提取液于 50ml 锥形瓶中,方法同上,于不同温度下反应。将所得纳米银混悬液用超纯水洗涤、离心后重新分散。考察温度对硝酸银粒径大小、粒度分布及紫外吸收的影响。见表 2。

3)硝酸银浓度的影响:将不同浓度硝酸银加入反应体系中,按照前述方法,考察硝酸银浓度对纳米银性质的影响。

4)pH 对纳米银特性的影响:分别取 5ml 蒲公英提取液于 4 个 50ml 烧杯中,利用醋酸或氨水调至 pH 为 4、7、9,再分别移液至 4 个 25ml 的容量瓶中。分别取 2ml 不同 pH 值的蒲公英提取液于 50ml 锥形瓶中,置于磁力搅拌器上,室温下边搅拌边用一次性滴管滴加 20ml AgNO_3 溶液(用时 17min),滴加完成后继续搅拌 15min,再置于水浴恒温振荡器(85℃,100r/min)中反应 2h,测定纳米银的特征。

5)反应时间对纳米银特性的影响:采用前述方法制备纳米银。固定其反应浓度为 85℃,考察不同反应时间对纳米银特性的影响。

6)纳米银特性的测定:采用 UV-2450 紫外分光光度计以重蒸水作为空白扫描纳米银的最大吸收波长。利用 Zetasizer Nano-ZS 型激光粒度仪测定纳米银的粒径、分散系数 PDI 和电位。将反应后的纳米银溶液及蒲公英提取液先用冰箱进行预冻 12h,再在冷冻干燥机中冷冻干燥 48h,得到固体的纳米银及蒲公英提取物,然后采用 FTIR 以样品:溴化钾为 1:100 进行测定反应前后体系官能团峰的强度及位置的变化。将制得的纳米银稀释 100 倍之后利用 JEOL100CX-II 透射电子显微镜分析纳米银的大小和形状

7)纳米银的抗菌实验:将营养琼脂按规定比例加热溶于蒸馏水,盖紧瓶塞,置于立式压力蒸汽灭菌器中高压灭菌(121.0℃,20min)。灭菌后取出,待琼脂温度降至 50~60℃时,在超净台内以无菌操作倾入一次性无菌平皿中,待琼脂凝固后即制成普通营养琼脂培养基,放置冰箱保存备用。

取所需菌种 1~2 环在普通营养琼脂培养基上连续划线,用灭菌后的吸管打孔,移液枪移取样品各 50 μl 。取阿莫西林分散片研磨成细粉,称取 0.0875g 细粉至 250ml 容量瓶中,加重蒸水定容做对照品。

2 结果与讨论

2.1 蒲公英提取液浓度对纳米银粒径的影响

见表 1。

表 1 蒲公英浓度对纳米银粒径的影响

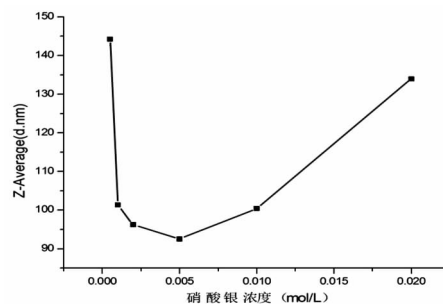
提取液浓度 /g · ml ⁻¹	Z-Average (d. nm)	PDI	最大吸收波长 /nm
0.005	59.88	0.297	491.00
0.0100	54.74	0.237	491.00
0.0125	59.28	0.206	450.00
0.0200	79.36	0.430	421.00

注:合成的纳米银未洗涤

由表 1 可知蒲公英提取液浓度不宜过高,综合粒径和 PDI 数据采用 0.01g/ml 浓度的蒲公英提取液。

2.2 硝酸银浓度对纳米银粒径的影响

固定蒲公英提取液浓度为 0.01g/ml;85℃下加热,pH 值为 6 条件下合成纳米银,将所得纳米银混悬液用超纯水洗涤、离心后重新分散,测定其粒径及 PDI 值。考察硝酸银浓度对纳米银粒径的影响。见图 1。



注:洗涤后的纳米银粒径值

图 1 硝酸银浓度对纳米银粒径的影响

由图 1 可见,硝酸银浓度在 0.005~0.010mol/L 范围内合成出的纳米银粒径较理想。由图 1 数据与表 1 数据比较可见,经过离心洗涤后的纳米银粒径较未洗涤前明显增加,说明经过洗涤后,吸附于纳米银表面的蒲公英中部分活性成分被洗脱,从而对纳米银的保护作用降低,导致部分银粒子发生聚集,从而使其粒度及 PDI 值增加。

2.3 温度对纳米银粒径的影响

固定蒲公英提取液浓度为 0.01g/ml; AgNO_3 浓度为 0.001mol/L;水浴震荡 2h,pH 值为 6,考察不同温度下硝酸银粒径大小、粒度分布及紫外吸收。见表 2。

表 2 反应温度对纳米银粒径的影响

温度/℃	Z-Average(d. nm)	PDI	电位/mV	最大吸收波长/nm
30	133.98	0.293	-21.7	422.00
35	166.7	0.361	-24.9	425.00
40	126.00	0.237	-22.3	424.00
60	89.34	0.237	-27.5	438.00
70	91.46	0.332	-40.2	427.00
80	92.00	0.282	-28.4	419.00

注:表中数据为离心洗涤后数据

由表 2 可见,当温度比较低时,所得纳米银粒径较大,随温度升高粒径减小。当温度处于 60℃~80℃ 之间时粒径及 PDI 值基本不随温度的变化而变化。但当温度为 85℃ 时,平均粒径明显减小。随着温度的升高,反应体系颜色的变化越快,粒径越来越小。而紫外光谱的最大吸收波长先增大后减小,基本稳定在 425.00nm,分散系数、电位变化不大,比较稳定。

2.4 反应时间对纳米银粒径的影响

固定蒲公英提取液浓度 0.01g/ml; AgNO_3 0.001mol/L; 85℃ 下加热震荡,考察反应时间不同对纳米银粒子及 PDI 值的影响。结果见表 3。

表 3 反应时间对纳米银性质的影响

反应时间/h	Z-Average(d. nm)	PDI	电位/mV	最大吸收波长/nm
5	92.00	0.282	-28.4	417.00
3	96.88	0.272	-18.6	423.00
2	95.52	0.297	-24.9	431.00
1	87.23	0.369	-23.0	432.00
0.5	89.24	0.254	-21.7	425.00

注:表 3 中数据为离心洗涤后数据

由表 3 可见,在 0.5~5h 时间范围内,纳米银粒子粒径及 PDI 值无明显变化,说明反应时间对纳米银的性质影响不大,而且也说明在该反应条件下纳米银粒子未发生自聚。

2.5 pH 值对纳米银粒径的影响

固定蒲公英提取液浓度为 0.005g/ml; AgNO_3 浓度为 0.001mol/L; 85℃ 下加热震荡 2h; 用氨水和乙酸调节 pH 值,考察提取液 pH 值对纳米银粒径及其分布的影响,结果见表 4。

用氨水和醋酸调 pH,发现在 85℃ 的恒温水浴振荡器中反应 2h 的条件下, pH 增大,纳米银粒径会减小。加醋酸或加氨水都会使分散系数增大。原因可能是醋酸与提取液中的多元醇发生反应生成酯类,减小了多元醇对 Ag^+ 的还原促进和保护作

用;氨水与其中的酸反应,生成了酰胺,酰胺能增强 Ag^+ 的还原有促进和保护。而通过分析数据可以得出,随着粒径的增加,紫外光谱的最大吸收波长会发生蓝移。

表 4 pH 对纳米银粒径的影响

pH	Z-Average(d. nm)	PDI	电位/mV	最大吸收波长/nm
4	62.12	0.384	-18.2	451.00
6	43.12	0.280	-20.1	428.00
8	47.05	0.503	-18.7	442.00
9	33.58	0.539	-28.8	415.00

2.6 纳米银的理化性质表征

2.6.1 纳米银粒度、电位及形态表征 利用纳米粒度激光分析仪测定纳米银粒径、电位,利用 TEM 表征其粒径大小及形态。结果见图 2~4。

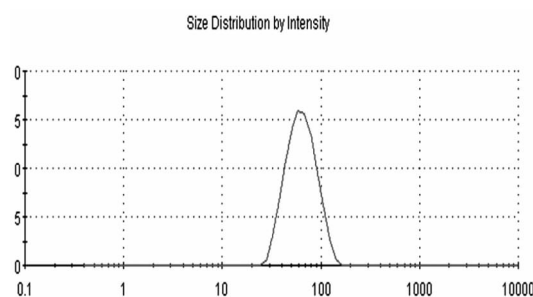


图 2 纳米银粒度分布图

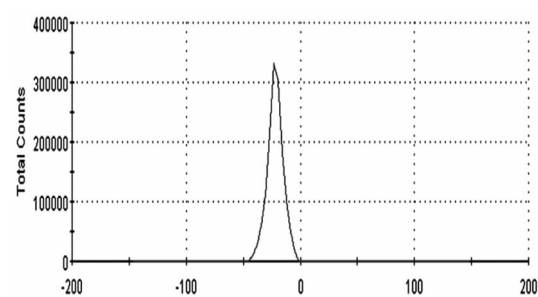


图 3 纳米银 zeta 电位图

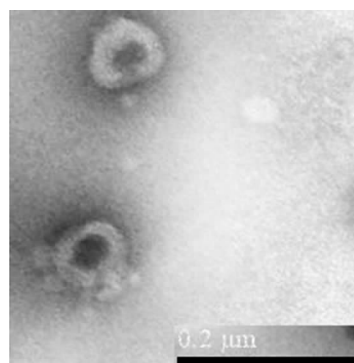
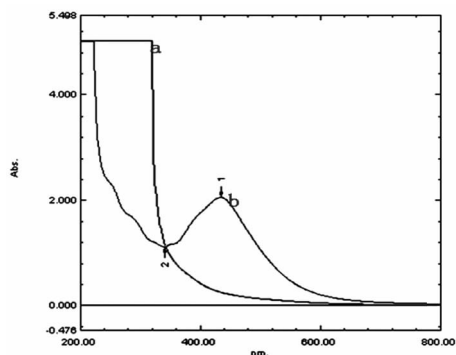


图 4 纳米银 TEM 图片

由图 2~3 可见,体系中纳米银粒子分布较为均匀,且其分布呈正态分布,PDI 值较小,其电位值 -20 mV 左右。由图 4 TEM 图片可见,所得纳米银为球形粒子。

2.6.2 纳米银紫外吸收光谱 利用 UV-2450 紫外分光光度计测纳米银紫外吸收光谱,结果见图 5。

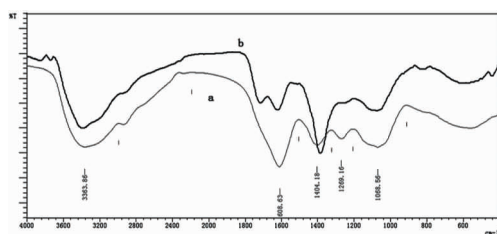


注:a. 蒲公英提取液;b. 蒲公英提取液制备的纳米银

图 5 纳米银的紫外吸收光谱图

由图 5 可知,纳米银紫外光谱的最大最大吸收波长在 $432 \pm 20\text{ nm}$ 范围。文献^[12]报道,纳米银的特征吸收峰主要在 410 nm 附近,与本文所得结果基本一致。而蒲公英提取液在此范围内则没有吸收,由此也证明了该生物合成方法所得到的纳米银。

2.6.3 纳米银红外吸收光谱 利用 FTIR 测纳米银生物还原前后的典型的官能团变化,以识别提取液中发挥作用的官能团,其红外光谱图见图 6。



注:a. 蒲公英提取液;b. 纳米银溶液

图 6 纳米银的 FTIR 光谱图

图 6 中 a,蒲公英提取液的 3363.86 cm^{-1} 可能是 $\nu\text{O-H}$ 或 $\nu\text{N-H}$, 1269.16 cm^{-1} 可能是 $\nu\text{C-O}$ 或 $\nu\text{C-O-C}$, 1404.18 cm^{-1} 可能是 $\beta\text{O-H}$, 1608.63 cm^{-1} 可能是 $\nu\text{C}=\text{C}$ 或 $\beta\text{N-H}$ 。所以提取液中的 $\nu\text{O-H}$, $\nu\text{C-O}$, $\beta\text{O-H}$ 有醇类, $\nu\text{O-H}$, $\nu\text{C-O}$, $\nu\text{C-O-C}$, $\nu\text{C}=\text{C}$ 表示含有水溶性的黄酮、酚类等物质。b,纳米银溶液中相比提取液在 1705 cm^{-1} 出现了新峰可能是 $\nu\text{C}=\text{O}$, 1608.63 cm^{-1} 处的峰减弱,说明其中含有酰胺类物

质,而原液中未出现可能是被 1608.63 cm^{-1} 处的强峰遮盖;在 1269.16 cm^{-1} 处的峰强有轻微减弱,在 1404.18 cm^{-1} 处的峰强有所增强,峰的位置也轻微的移动,这说明了蒲公英提取液中含有的醇类、酰胺类、黄酮、酚类物质在 Ag^+ 还原的过程中可能发挥还原和保护作用。

2.6.4 纳米银 X 射线衍射分析

见图 7。

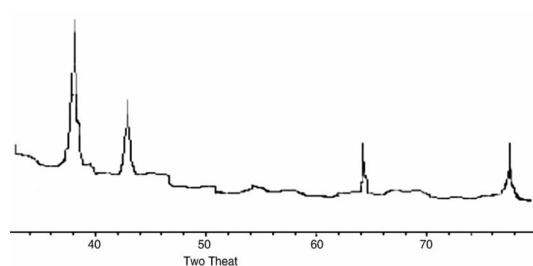
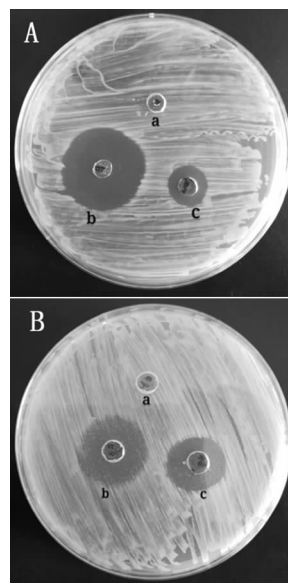


图 7 纳米银离子 XRD 衍射图谱

银的标准 XRD 图谱数据(2θ 为 38.096° 、 44.257° 、 64.406° 、 77.452°)。本文所得 XRD 图谱在相应位置均出现了相关衍射峰,说明了纳米银的形成。

2.7 纳米银的抗菌实验

取同样量的纳米银混悬液及阿莫西林分散片配制溶液,考察其对大肠杆菌及葡萄球菌的杀菌作用。见图 8。



注:a. 蒲公英原液;b. 阿莫西林溶液;c. 纳米银溶液

A. 大肠杆菌 B. 金黄色葡萄球菌

图 8 纳米银对大肠杆菌的抑菌试验

(下转第 239 页)

[22] 孙成忠,刘召芹,陈士林,等. 基于 GIS 的中药材产地适宜性分析系统的设计与实现[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2006,8(3):112-117. DOI:10.3969/j.

issn.1674-3849.2006.03.024.

(收稿日期 2017-07-03)

(责任编辑:林琳)

(上接第 233 页)

由图 8 可见,纳米银对革兰氏阳性菌及革兰氏阴性菌均具有一定的抑制效应,而且加入同样量的纳米银,对葡萄球菌的抑菌圈明显大于同等条件下大肠杆菌的抑菌圈,说明纳米银对革兰氏阳性菌的抑菌效果明显优于革兰氏阴性菌。

3 结论

在蒲公英提取液制备纳米银的过程中,最佳工艺条件为:提取液浓度 0.01g/ml、反应温度 85℃、硝酸银浓度 0.005mg/ml、pH 6、时间 2h。

利用生物合成法所得纳米银对革兰氏阳性菌较革兰氏阴性菌具有更强的杀菌效果

利用蒲公英提取液制备纳米银方案可行,且合成路线绿色环保,成本低、效率高,该方法为纳米银及其他贵金属的绿色生物合成提供了依据。

参考文献:

- [1] 吴宗山,胡海洋,任艺,等. 纳米银的抗菌机理研究进展[J]. 化工进展,2015,34(5):1349-1356,1370. DOI:10.16085/j.issn.1000-6613.2015.05.028.
- [2] Sun RW, Chen R, Chung NP, et al. Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells [J]. Chem Commun (Camb), 2005 (40): 5059-5061. DOI: 10.1039/b510984a.
- [3] 林丽,仇佩虹. 纳米银胶标记的 DNA 电化学传感器制备及应用[J]. 温州医学院学报,2008,38(2):170-171. DOI:10.3969/j.issn.1000-2138.2008.02.024.
- [4] Joy Prabu H, Johnson I. Plant-mediated biosynthesis and characterization of silver nanoparticles by leaf extracts of *Tragia involucrata*, *Cymbopogon citronella*, *Solanum verbascifolium* and *Tylophora ovata* [J]. Karbala International Journal of Modern Science, 2015, 1(4): 237-246. DOI:10.1016/j.kijoms.2015.12.003.
- [5] Ghoreishi SM, Behpour M, Khayatkashani M. Green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Rosa damascena* and its primary application in electrochemistry

[J]. Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures, 2011 (1): 97-104. DOI: 10.1016/j.physe.2011.07.008.

- [6] Shankar SS, Ahmad A, Sastry M. Geranium Leaf Assisted Biosynthesis of Silver Nanoparticles [J]. Biotechnology Progress, 2003, 19 (6): 1627-1631. DOI: 10.1021/bp034070w.
- [7] Begum NA, Mondal S, Basu S, et al. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2009, 71 (1): 113-118. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.01.012.
- [8] Patil RS, Kokate MR, Kolekar SS. Bioinspired synthesis of highly stabilized silver nanoparticles using *Ocimum tenuiflorum* leaf extract and their antibacterial activity [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2012, 91: 234-238. DOI: 10.1016/j.saa.2012.02.009.
- [9] Kasthuri J, Veerapandian S, Rajendiran N. Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apiin as reducing agent [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2009, 68 (1): 55-60. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.09.021.
- [10] Ghoreishi SM, Behpour M, Khayatkashani M. Green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Rosa damascena* and its primary application in electrochemistry [J]. Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures, 2011 (1): 97-104. DOI: 10.1016/j.physe.2011.07.008.
- [11] Vijay Kumar PPN, Pammi SVN, Kollu P, et al. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their antibacterial activity [J]. Industrial Crops and Products, 2014, 52: 562-566. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.10.050.
- [12] Li ZZ, Chen JF, Liu F, et al. Study of UV-shielding properties of novel porous hollow silica nanoparticle carriers for avermectin [J]. Pest Manag Sci, 2007, 63 (3): 241-246. DOI: 10.1002/ps.1301.

(收稿日期 2017-07-10)

(本文编辑:林琳)