

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.12.005

紫草银纳米粒的绿色合成及抗浅部真菌作用研究*

杨雯雯^{1,2} 叶明琦^{1,2} 张敏新¹ 黄惠丽¹ 邱彬³ 黄爱文^{1,2Δ}

(1 福建中医药大学福总教学医院(第九〇〇医院)临床药学科 福建 福州 350025; 2 福建中医药大学药学院 福建 福州 350122;
3 福州大学化学学院 福建 福州 350108)

摘要 目的:以紫草提取液为还原剂,以硝酸银为银源,简单快速地合成银纳米粒子,并对其表征和抗浅部真菌作用研究。**方法:**以合成银纳米粒的吸光度为指标,考察紫草提取液用量、AgNO₃溶液浓度、反应 pH 对紫草银纳米粒(ZC-AgNPs)合成的影响,应用响应面优化筛选最佳合成条件。采用紫外-可见分光光度法(UV-Vis)、动态激光散射(DLS)、透射电子显微镜(TEM)、X射线粉末衍射(XRD)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)等技术对紫草-银纳米粒的理化性质进行表征。同时利用化学还原法制备化学银纳米粒(C-AgNPs),利用微量稀释法测试 ZC-AgNPs 和 C-AgNPs 对浅部真菌的最低抑菌浓度(MIC)。**结果:**ZC-AgNPs 的最佳工艺为硝酸银浓度 10 mmol/L、紫草提取液体积 1.7 mL、反应 pH 为 10.8。所得 ZC-AgNPs 形状为球形,透射电子显微镜分析平均粒径约为 12.59 nm,分布均匀、性质稳定。抗浅部真菌实验结果显示 ZC-AgNPs 均优于 C-AgNPs,ZC-AgNPs 对红色毛癣菌 MIC 为 62.5 μg/mL、对须癣毛癣菌 MIC 为 125 μg/mL、对白色念珠菌的 MIC 为 15.63 μg/mL;C-AgNPs 对红色毛癣菌 MIC 为 250 μg/mL,对须癣毛癣菌 MIC 为 500 μg/mL,对白色念珠菌的 MIC 为 250 μg/mL。**结论:**ZC-AgNPs 制备方法稳定、可行,且具有良好的抗浅部真菌效果。

关键词:绿色合成;银纳米粒;紫草;浅部真菌

中图分类号:R283;R519;R-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)12-2228-09

Green Synthesis of Silver Nanoparticles of Arnebia Euchroma and Their Anti-superficial Fungi Effects*

YANG Wen-wen^{1,2}, YE Ming-qi^{1,2}, ZHANG Min-xin¹, HUANG Hui-li¹, QIU Bin³, HUANG Ai-wen^{1,2Δ}

(1 Clinical Pharmacy Department, Fujian University of Traditional Chinese Medicine Fuzong Teaching Hospital (900th hospital), Fuzhou, Fujian, 350025, China; 2 College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian, 350122, China;
3 College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian, 350108, China)

ABSTRACT Objective: Simple and rapid synthesis of silver nanoparticles using Arnebia euchroma extract as a reducing agent and silver nitrate as a silver source for characterization and anti-superficial fungi effects. **Methods:** The absorbance of the synthesized silver nanoparticles was used as an index to investigate the effects of the amount of comfrey extract, the concentration of AgNO₃ solution, and reaction pH on the synthesis of silver nanoparticles of A. euchroma (ZC-AgNPs), and the response surface optimization was applied to screen the optimal synthesis conditions. The physicochemical properties of ZC-AgNPs were characterized by ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-Vis), dynamic laser scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM), X-ray powder diffraction (XRD), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). Chemical silver nanoparticles (C-AgNPs) were also prepared by the chemical reduction method, and the minimum inhibitory concentration (MIC) of ZC-AgNPs and C-AgNPs against superficial fungi was tested using the microdilution method. **Results:** The optimal process for ZC-AgNPs was a silver nitrate concentration of 10 mmol/L, a volume of comfrey extract 1.7 mL, and a pH of 10.8. The obtained ZC-AgNPs were spherical, with an average particle size of about 12.59 nm analyzed by transmission electron microscopy, and were uniformly distributed and stable. The results of the antifungal assay against superficial fungi showed that all ZC-AgNPs were superior to C-AgNPs. The MIC of ZC-AgNPs against *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophyte*, and *Candida albicans* were 62.5, 125, and 15.63 μg/mL, respectively. The MIC of C-AgNPs against *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, and *Candida albicans* were 250, 500, and 250 μg/mL, respectively. **Conclusions:** The preparation method of ZC-AgNPs is stable, feasible, and has a good antifungal effects against superficial fungi.

Key words: Green synthesis; Silver nanoparticles; Arnebia euchroma; Superficial fungi

Chinese Library Classification(CLC): R283; R519; R-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)12-2228-09

* 基金项目:福建省自然科学基金项目(2021J011274)

作者简介:杨雯雯(1998-),女,硕士研究生,研究方向:中药新剂型研究与开发,E-mail: yww90201@163.com

Δ 通讯作者:黄爱文,女,博士,副主任药师,研究方向:中药学、药剂学、临床药学,E-mail: hawen83@sina.com

(收稿日期:2023-12-05 接受日期:2024-01-08)

前言

纳米银(AgNPs)是指粒径在纳米级(1~100 nm)的金属银单质,纳米银可以呈现不同的形态,如球形、棒状、片状、三角、线状等^[1-4]。纳米银具有一定的稳定性,不容易聚集形成团,且纳米材料由于其微小的粒径,可以很容易地跨越细胞屏障^[5]。紫草为紫草科新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle)Johnst.或内蒙紫草 *Arnebia guttata* Bunge 的干燥根^[6]。紫草用于治疗炎症、感染和出血性疾病已有 2000 多年的历史^[7]。据研究报道,紫草具有抗浅部真菌作用^[8-11],浅部真菌感染可由皮肤癣菌、念珠菌属、马拉色菌属等引起,而尤以皮肤癣菌最为常见,浅部真菌感染困扰着世界 25%的人口,且浅部真菌感染病原耐药率不断上升、患者对现有抗真菌药物的耐受性有限,临床对抗真菌新药物的需求不断增加^[12,13]。

目前利用植物绿色合成银纳米粒的研究已经较多,研究表明银纳米粒有良好的抗菌、抗氧化、抗肿瘤等作用^[14,15],但对于银纳米粒抗浅部真菌的研究较少。本文选择紫草提取液为还原剂,以硝酸银为银源,在常温常压条件下,简单快速的合成紫草银纳米粒(ZC-AgNPs)。在单因素实验的基础上,进行 Box-Behnken 响应曲面设计,优化得出合成银纳米粒子的最佳工艺条件。对最佳工艺条件下制备的银纳米粒子的形态、粒径、电位、参与反应成分及抗浅部真菌的活性等指标进行研究,为银纳米粒子的绿色合成提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂

新疆紫草购自广东汇群中药饮片股份有限公司(批号:20210901),无水乙醇购自上海联试化工试剂有限公司(批号:20220101),硝酸银购自自达科技(泉州)有限公司(批号:20230403A),氢氧化钠购自国药集团化学试剂有限公司(批号:20210429),硼氢化钠(批号:20220415)、二水合柠檬酸三钠(批号:20211108)购自广东光华科技股份有限公司,氟康唑(批号:100314-201605)、盐酸特比萘芬(批号:100563-202103)购自中国食品药品检定研究院,RPMI 1640 液体培养基(批号:18C10A35)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基购自武汉博士德生物工程有限公司,沙保罗琼脂培养基购自法国生物梅里埃公司,细胞计数板购自日本 WATSON 公司,96 孔细胞培养板购自美国康宁公司。

1.2 菌株

红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*, BNCC340195)、须癣毛癣菌(*Trichophyton mentagrophytes*, BNCC340405),购于北京北纳创联生物技术研究院。白色念珠菌(*Candida albicans*)来自临床分离株,由中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院检验科提供。

1.3 仪器

EX225DZH 电子天平(常州奥豪斯仪器有限公司),HWS-26 电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司),FiveEasy Plus 型 pH 计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司),DM2500 生物显微镜(德国 LEICA 公司),H1850R 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),Zetasizer Lab

纳米粒度及 zeta 电位分析仪(英国 Malvern 公司),BC-J160 二氧化碳细胞培养箱(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司),INFINITE E PLEX 酶标仪(奥地利 Tecan 集团有限公司),BSC-1360 II A2 生物安全柜(北京东联哈尔仪器制造有限公司),JEOL JEM-F200 透射电子显微镜(日本电子株式会社),SmartLab SE 型 X 射线光电子能谱仪(日本 Rigaku 公司),Thermo Scientific iN10 傅立叶红外光谱(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.4 紫草提取物的制备

称取 50 g 的紫草放入圆底烧瓶中,第一次加 10 倍 75%乙醇浸泡 30 min 后置水浴锅上回流提取 2 h,过滤,留取滤液。第二次再向药渣中加 10 倍 75%乙醇回流提取 2 h,过滤合并两次滤液,减压浓缩后,用纯水定容至 100 mL。得到的样品用孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后,保存备用。

1.5 紫草-银纳米粒(ZC-AgNPs)的合成

室温条件下,将紫草提取物加入至硝酸银溶液中,以 0.1 M 的 NaOH 溶液调节 pH,磁力搅拌充分反应 1 h 后,观察溶液颜色发生变化,表明合成了纳米银(AgNPs)。合成后的 ZC-AgNPs 用高速冷冻离心机在 13000 rpm 的转速下离心 20 min,弃去上清液,取沉淀用超纯水重复清洗三次,保存备用。

1.6 单因素实验

根据基本处方制备 ZC-AgNPs,以 300-800 nm 范围紫外可见光谱扫描图谱的最高峰值为评价指标,对纳米粒进行单因素考察。

1.6.1 硝酸银浓度的考察 分别取 1 mL 的紫草提取物加入至 10 mL 的 2、4、6、8、10 mM 的 AgNO_3 溶液中,0.1 M 的 NaOH 调节 pH 至 7,常温下反应 1 h 后,测定其 300-800 nm 下的紫外可见吸收光谱。

1.6.2 提取液用量的考察 分别取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 的紫草提取物加入至 8 mM 的 AgNO_3 溶液中,0.1 M 的 NaOH 调节 pH 至 7,常温下反应 1 h 后,测定其 300-800 nm 下的紫外可见吸收光谱。

1.6.3 pH 的考察 取 7 份 1.5 mL 的紫草提取液分别加入至 8 mM 的 AgNO_3 溶液中,其中 1 份不加 NaOH,原始 pH 值为 4.28,其余 6 份用 0.1 M 的 NaOH 分别调节 pH 至 6、7、8、9、10、11,常温下反应 1 h 后,测定其在 300-800 nm 下的紫外可见吸收光谱。

1.7 响应曲面实验设计

通过单因素实验为每个因素挑选三个合适的水平,结合 Box Behnken 中心组和实验设计原理,以吸光度为响应值,选择 A(硝酸银浓度)、B(紫草提取液用量)和 C(反应 pH)为影响因素,建立数学模型,从而得到 AgNPs 合成的最佳条件。因素与水平的选取如表 1 所示。

1.8 验证实验

根据回归方程可以得到合成 ZC-AgNPs 的最佳条件,为了验证得到的优化模型的准确性和可靠性,按照最佳条件合成 AgNPs 并测量吸光度,与预测值进行比较。

1.9 ZC-AgNPs 的表征

1.9.1 紫外-可见光谱(UV-vis)分析 取适量反应后的样品用超纯水稀释后,置于 96 孔板内 100 μL ,酶标仪设定在

表 1 响应面优化试验因素水平
Table 1 The factors and levels of response surface optimization test

Level	Factors		
	Concentration of AgNO ₃ (mM)	Volume of extraction (mL)	pH
-1	6	0.5	7
0	8	1.5	9
1	10	2.5	11

300-800 nm 下紫外全波长扫描,记录其最大吸光度,评估纳米银的产量差异。

1.9.2 纳米粒粒径、PDI 以及 Zeta 电势的测定 取制备的 ZC-AgNPs 溶液适量,用去离子水稀释至一定浓度,根据动态光散射(Dynamic light scattering, DLS)原理测量银纳米颗粒粒径分布情况、聚合物分散性指数(Polydispersity index, PDI)和 Zeta 电势,25 °C 下测试三次取平均值。

1.9.3 透射电子显微镜(TEM)分析 将适量 ZC-AgNPs 溶液稀释后,滴加少量到专用铜网上,干燥后,用透射电镜分析(Transmission electron microscope, TEM),加速电压 200 kV,进行拍摄形貌和能谱点扫(Electronic differential system, EDS)。

1.9.4 傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析 将 ZC-AgNPs 纳米粒溶液和紫草提取液置于 -20 °C 预冻 24 h,再冷冻干燥 48 h,得 ZC-AgNPs 粉末。分别取适量 ZC-AgNPs 粉末与紫草提取液粉末,各加入 1% 的溴化钾粉末混合,利用傅里叶变换红外光谱扫描(Fourier transform infrared, FTIR)对参与还原过程的化合物进行分析。将烘干至恒重的纯溴化钾(KBr)粉末与 AgNPs 粉末进行研磨,压成半透明薄片。将紫草提取液干燥后研磨成粉末与纯 KBr 粉末压成半透明薄片。背景材料为光谱纯 KBr 粉末,波长范围设置为 4000-500 cm⁻¹,分辨率为 4 cm⁻¹。

1.9.5 X 射线衍射图谱(XRD)分析 采用 X 射线衍射仪(X-ray diffraction, XRD)对 ZC-AgNPs 粉末进行晶型分析。参数设置如下:扫描范围为 20° -90° 2θ, Cu 靶 Kα 射线,入射波长 0.1542 nm,扫描模式为连续,扫描速度为 2° /min。测定粉末的 XRD 谱图,与标准卡片(JCPDS No.4-0783)对比。

1.9.6 化学-银纳米粒(C-AgNPs)的合成 参照已有的化学合成银纳米粒的方法并做适当修改^{[6][7]}。配制 0.1 M 的 NaOH 溶液,用于制备浓度为 10 mM 的 NaBH₄ 溶液。取 10 mL 浓度均为 5 mM 的 AgNO₃ 溶液与柠檬酸钠溶液混合搅拌均匀后,逐滴加入 1 mL 配制的 NaBH₄ 溶液,室温条件下反应 1 h,反应后溶液变成棕色,所得产物标记为 C-AgNPs。合成后的 C-AgNPs 用高速冷冻离心机在 13000 rpm 的转速下离心 20 min,弃去上清液,取沉淀用超纯水重复清洗三次。

1.10 抗浅部真菌实验

1.10.1 抗真菌药物的制备 紫草提取物、C-AgNPs 和 ZC-AgNPs 溶液置 -20 °C 预冻 24 h,再冷冻干燥 48 h,得粉末状物质。紫草提取物用超纯水配制成 60 mg/mL 的溶液,C-AgNPs、ZC-AgNPs 用超纯水配制成 40 mg/mL,阳性对照药氟康唑、特比萘芬用 DMSO 配制成 6.4 mg/mL、0.1 mg/mL 的溶液。

1.10.2 菌悬液的配制 将红色毛癣菌、须癣毛癣菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基,28 °C 培养 7-14 天。白色念珠菌接种于

沙保罗葡萄糖琼脂培养基,28 °C 培养 24-48 h。刮取生长状态良好、无污染菌落,于生理盐水中混匀,吹打至均匀分散,用血细胞板计数,用 RPMI-1640 调整菌悬液浓度为 1×10⁵-1×10⁶ CFU/mL,备用。

1.10.3 最低抑菌浓度的测定 参照美国临床实验室标准化研究所 M38-A2 和 M27-A3 方案,测定 ZC-AgNPs 对红色毛癣菌、须癣毛癣菌和白色念珠菌最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。

在 96 孔板的第 1 列加入适量液体培养基并加入药液共 200 μL,第 1 列药液的浓度分别为:紫草提取物 4.5 mg/mL、ZC-AgNPs 0.5 mg/mL、C-AgNPs 0.5 mg/mL、氟康唑 32 μg/mL、特比萘芬 0.5 μg/mL。2-11 列每个孔中加入 100 μL RPMI-1640,1-10 列以微量稀释法倍比稀释后,向每列孔中分别加入 100 μL 制备好的菌悬液,确保最终总体积为 200 μL。

其中阳性药组第 10 列做溶剂对照,98 μL RPMI-1640+2 μL DMSO+100 μL 菌悬液。第 11 列为生长对照,含有 100 μL 液体培养基和 100 μL 菌悬液;第 12 列为空白对照,只含有 200 μL 液体培养基。

毛癣菌 28 °C 培养 7-10 天,白色念珠菌 28 °C 培养 24-48 h 后观察,以肉眼观察无菌生长的最小药物浓度作为 MIC。每组平行做三次实验。

1.11 数据处理与分析

文中每组试验数据均由 3 次重复试验所得,试验获得的数据用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用 Origin Pro 2023 软件对数据进行统计分析并绘制图表,使用 Design Expert 13.0.1.0 进行响应面分析。

2 结果

2.1 单因素考察结果

2.1.1 硝酸银浓度的选择 不同硝酸银浓度制备的银纳米粒的紫外吸收光谱如图 1 所示。从图可看出,当硝酸银浓度为 2 mM 时,吸收峰较低;硝酸银浓度为 4 mM 时,最高峰处的吸光度明显增大;当硝酸银浓度为 8 mM 时,吸光度达到最大,当硝酸银浓度继续增大到 10 mM 时,最大吸收峰的吸光度反而降低,所以选取硝酸银浓度为 8 mM 进行后续的单因素考察。

2.1.2 提取液体积的选择 不同紫草提取液制备的银纳米粒的紫外吸收光谱如图 2 所示。当提取液加入量由 0.5 mL 增加到 1.5 mL 时,溶液的紫外吸收峰的吸光度不断增加;当提取液用量继续增加时,溶液紫外吸收峰的吸光度略有下降。最终选择提取液体积用量为 1.5 mL 进行后续的单因素考察。

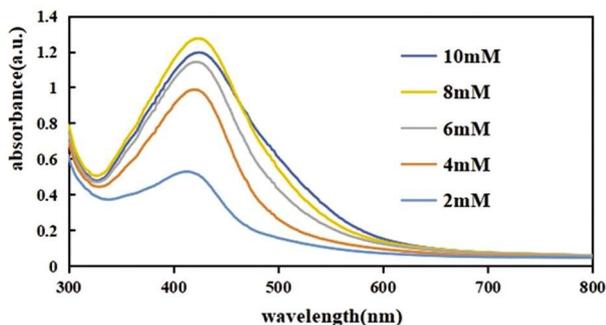


图 1 不同硝酸银浓度制备的银纳米粒的紫外吸收光谱

Fig.1 UV-vis absorption spectra of silver nanoparticles prepared with different concentrations of silver nitrate

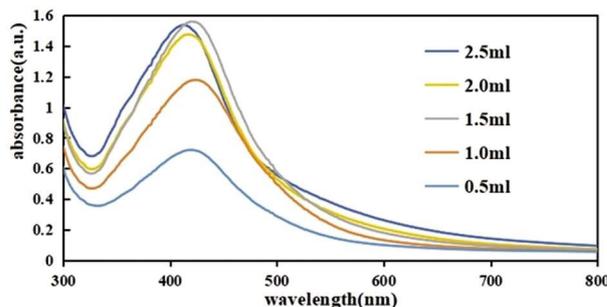


图 2 不同提取液体积制备的银纳米粒的紫外吸收光谱

Fig.2 UV-vis absorption spectra of silver nanoparticles prepared with different extraction liquid volumes

2.1.3 反应 pH 的考察 不同 pH 条件下制备的银纳米粒的紫外吸收光谱如图 3 所示。从图中可以看出,当未加入 NaOH 进行 pH 调节时,其紫外吸收峰极弱;当 pH 为 6 时,反应体系的最大吸收峰明显增高,说明合成的纳米银含量升高;当 pH=9 时,反应体系的银含量达到最大值,继续增大反应体系的 pH 值,紫外吸收峰降低,所以合成纳米银的最优 pH 为 9。

2.2 响应面实验设计结果及方差分析

本实验以硝酸银浓度(A)、紫草提取液体积(B)和反应 pH (C)为影响因子,吸光度为响应值,响应面实验设计结果见表2。

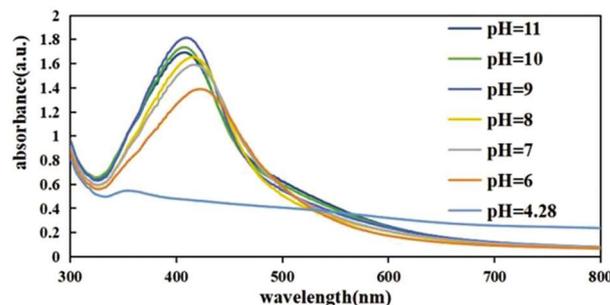


图 3 不同 pH 条件下制备的银纳米粒的紫外吸收光谱

Fig.3 UV-vis absorption spectra of silver nanoparticles prepared at different pH conditions

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Design and results of response surface experiments

Run	A: Concentration of AgNO ₃ (mM)	B: Volume of extraction (mL)	C: pH	Absorbance
1	6	0.5	9	1.044
2	6	2.5	9	1.226
3	8	0.5	11	1.798
4	8	1.5	9	1.805
5	10	1.5	11	1.995
6	8	1.5	9	1.718
7	8	2.5	11	1.525
8	8	0.5	7	0.811
9	10	1.5	7	1.740
10	8	1.5	9	1.623
11	10	0.5	9	1.115
12	8	1.5	9	1.640
13	6	1.5	7	1.378
14	8	2.5	7	1.640
15	8	1.5	9	1.730
16	6	1.5	11	1.365
17	10	2.5	9	1.824

采用 Design-Expert 13.0.1.0 软件对试验结果进行回归拟合分析,建立模型,得到硝酸银浓度(A)、紫草提取液体积(B)和反应 pH (C)3 个因素的回归方程: $Y=1.70 + 0.2077 \times A +$

$0.1809 \times B + 0.1391 \times C + 0.1318 \times AB + 0.0670 \times AC - 0.2755 \times BC - 0.1124 \times A^2 - 0.2884 \times B^2 + 0.0285 \times C^2$ 。该回归方程的决定系数 R^2 为 0.9411,说明拟合性良好。校正系数 R^2_{Adj} 为 0.8655,说明该

模型可以解释 86.55%吸光度的变化。表 3 结果显示,该模型的 $P=0.0016 < 0.01$,说明模型极显著,失拟项的 $P=0.0844 > 0.05$,表明实验误差相对较小。一次项 A、B,交互项 BC 和二次项 B^2 对合成银纳米的吸光度影响极显著,一次项 C 对合成银纳米的

吸光度影响显著,其他因素的影响不显著。参照 F 值的大小可得出去结论:3 个因素对合成银纳米的吸光度的影响程度为硝酸银浓度(A)> 紫草提取液体积(B)> 反应 pH(C)。

表 3 二次回归方程模型方差分析结果

Table 3 Results of analysis of variance of quadratic regression equation model

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	P-value	Remarks
Model	1.57	9	0.17	12.44	0.0016	significant
A	0.35	1	0.35	24.58	0.0016	significant
B	0.26	1	0.26	18.65	0.0035	significant
C	0.15	1	0.15	11.02	0.0128	significant
AB	0.07	1	0.07	4.95	0.0615	
AC	0.02	1	0.02	1.28	0.2951	
BC	0.30	1	0.30	21.62	0.0023	significant
A^2	0.05	1	0.05	3.79	0.0927	
B^2	0.35	1	0.35	24.94	0.0016	significant
C^2	0.00	1	0.00	0.24	0.6363	
Residual	0.10	7	0.01			
Lack of Fit	0.08	3	0.03	4.71	0.0844	not significant
Pure Error	0.02	4	0.01			
Cor Total	1.67	16				
$R^2=0.9411$						
$R^2_{Adj}=0.8655$						

2.2.1 响应面优化最佳合成工艺 在回归模型方差分析结果的基础上,采用 OriginPro 2023 软件绘制吸光度与硝酸银浓度、紫草提取液体积、反应 pH 的 3D 响应图见图 4。结果显示,制备 ZC-AgNPs 优选出的最佳工艺为硝酸银浓度 9.876 mM、紫草提取液体积 1.672 mL、反应 pH 为 10.787。最终结合制备实际的需要,将最佳工艺调整为硝酸银浓度 10 mM、紫草提取液体积 1.7 mL、反应 pH 为 10.8。

2.2.2 验证实验 根据响应面法优化出的最佳制备工艺合成 3 份 ZC-AgNPs,参照 "2.4.1" 项下紫外-可见光谱分析方法,测定吸光度。三次实验的吸光度分别为:1.979、2.005、2.001。平均值为 1.995,与理论预测值(2.005)相比相对误差小,说明模型拟合良好。因此,采用响应面分析方法优化得到的 ZC-AgNPs 粒子的制备条件具有可行性。

2.3 紫草银纳米(ZC-AgNPs)和化学银纳米(C-AgNPs)的合成

用紫草提取物和硝酸银水溶液,通过绿色生物合成法成功地制备了紫草银纳米,紫草银纳米(ZC-AgNPs)合成前后溶液变化如图 5(a)所示。银纳米(C-AgNPs)合成前后溶液变化如图 5(b)所示。

2.4 表征结果

2.4.1 紫外-可见光谱分析(UV-vis)结果 在 $AgNO_3$ 中加入紫草提取液后,溶液由淡黄色变为深棕色,是由于与 AgNPs 相关的表面等离子体共振,AgNPs 紫外扫描图谱如图 5(c)所示,ZC-AgNPs 在 406 nm 处出现紫外吸收峰,而紫草提取液在紫

外可见光谱扫描下无吸收峰,化学合成的 C-AgNPs 在波长 394 nm 处显示吸收峰。AgNPs 在紫外可见光扫描下的典型表面等离子体共振(Surface plasmon resonance, SPR)特征峰范围在 350~450 nm^[18],表明 AgNPs 的成功合成。

2.4.2 纳米粒径、PDI 以及 Zeta 电势结果 合成的 ZC-AgNPs 的粒径测量结果如图 6(a)。平均水合粒径为 54.28 ± 0.43 nm, PDI=0.5476, DLS 测得粒径大于 TEM 测量的粒径尺寸。C-AgNPs 的粒径测量结果如图 2.11 (b)。平均水合粒径为 34.43 ± 1.91 nm, PDI=0.5089。合成的 ZC-AgNPs 的 Zeta 电位图如 6(h)所示,电位值为 -27.06 ± 0.56 mv,电势绝对值越高,ZC-AgNPs 之间的静电斥力越大,不易聚集,使体系越稳定。进一步表明紫草提取物中的化学物质结合到了银纳米颗粒表面,产生电势稳定的纳米颗粒,zeta 的负值是由于 ZC-AgNPs 表面周围存在带负电荷的植物化学物质^[19,20]。

2.4.3 透射电子显微镜分析(TEM)结果 DLS 测量的粒径颗粒表面性质并流体动力学直径,不仅取决于金属颗粒的大小,溶液环境中的植物活性成分、离子、分子和额外的水合物层会附着在纳米颗粒的表面,从而影响粒径的测量值;而 TEM 测量的样品处于干燥状态,可以测量银纳米晶体的实际直径。透射电镜显示 ZC-AgNPs 为球形,选取不少于 100 个纳米粒通过 Image J 软件进行分析,ZC-AgNPs 的粒径大小在 3.98-24.25 nm 之间,平均粒径为 12.59 nm。

从 X 射线能谱(EDS)中(图 6g)可以看到银元素的存在,表明实验制备的纳米粒子确为纳米银粒子。

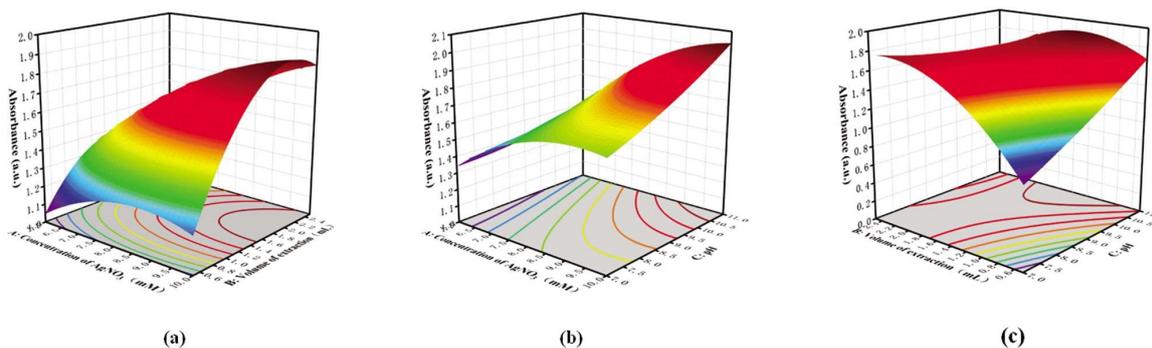


图4 (a)硝酸银浓度和紫草提取液体积对 ZC-AgNPs 吸光度的交互影响;(b)硝酸银浓度和 pH 对 ZC-AgNPs 吸光度的交互影响;(c)紫草提取液体积和 pH 对 ZC-AgNPs 吸光度的交互影响

Fig.4 (a) Interaction between concentration of AgNO_3 and volume of extraction on the absorbance of ZC-AgNPs; (b) Interaction between concentration of AgNO_3 and pH on the absorbance of ZC-AgNPs; (c) Interaction between volume of extraction and pH on the absorbance of ZC-AgNPs

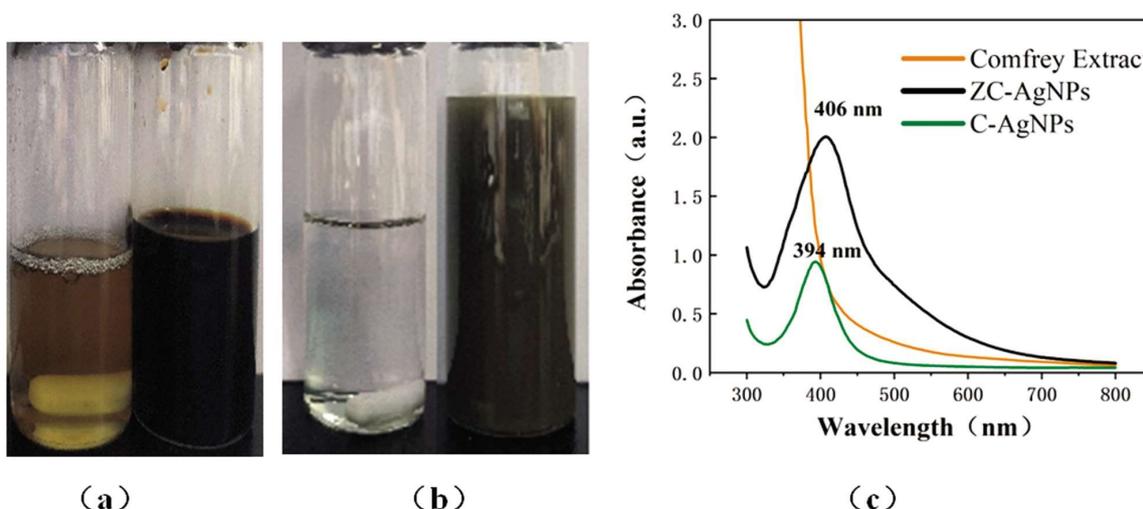


图5 (a)ZC-AgNPs 合成前后;(b)C-AgNPs 合成前后;(c)AgNPs 的 UV-vis 吸收光谱

Fig.5 (a) before and after synthesis of ZC-AgNPs; (b) before and after synthesis of C-AgNPs; (c) UV-vis absorption spectra of AgNPs

2.4.4 傅里叶变换红外光谱分析 (FTIR) 结果 利用傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 测量来估计可能参与紫草提取物介导的银纳米颗粒还原和稳定的官能团。ZC-AgNPs 和紫草提取液的 FTIR 图谱如图 7 所示, ZC-AgNPs 的 FTIR 光谱显示特征峰位于 $3440, 2920, 2843, 1634, 1384, 1066 \text{ cm}^{-1}$ 处。紫草提取物的 FTIR 图谱在 3405 cm^{-1} 和 2930 cm^{-1} 处的特征峰和银纳米颗粒在 $3440, 2920, 2843 \text{ cm}^{-1}$ 的特征峰, 是由于羟基 O-H 伸缩和烷烃 C-H 伸缩振动所致^[21], ZC-AgNPs 在 1634 cm^{-1} 处的谱带是由于分子中存在芳环, 表明芳环拉伸^[22,23]。同时, ZC-AgNPs 在 1634 cm^{-1} 和 1384 cm^{-1} 处和紫草提取液在 1632 cm^{-1} 和 1413 cm^{-1} 处的峰值对应于 C-N 拉伸振动和紫草提取物中蛋白质的酰胺 I 带^[24]。 $1116, 1168 \text{ cm}^{-1}$ 处的吸收带主要归因于多糖中 C-O 伸缩的氢键和非氢键^[25]。ZC-AgNPs 在 1066 cm^{-1} 处的吸收峰代表 C-OH 的伸缩振动^[24]。上述分析表明, 银纳米颗粒表面键合有紫草的化学成分, 使银纳米颗粒不易团聚, 表现出良好的稳定性。

2.4.5 X 射线衍射图谱分析 (XRD) 结果 图 8 为 ZC-AgNPs 的 XRD 谱图, 从图中可以观察到 X 射线衍射图中 $38.12, 44.12, 64.56, 77.44, 81.47$ 处有明显的布拉格反射峰, 分别对应于 (111)、(200)、(220)、(311) 和 (222) 晶面, 这与 Moorthy 等人的研究结果一致^[26-28]。XRD 衍射图中的其他峰可能是紫草提取物中的活性成分, 作为起到还原剂和稳定剂的作用, 防止银纳

米粒在溶液中发生聚集。

2.5 抗浅部真菌结果

各试药对浅部真菌的最低抑菌浓度 (MIC) 如表 4 所示, 其中紫草提取物自身对于浅部真菌的生长具有一定抑制作用, 但弱于化学合成的银纳米颗粒 (C-AgNPs)。而生物合成的紫草银纳米颗粒 (ZC-AgNPs) 的抗浅部真菌效果显著优于紫草提取物和化学银纳米颗粒。在三种真菌中, ZC-AgNPs 对白色念珠菌的抑制效果最好, MIC = $15.63 \mu\text{g/mL}$, 优于红色毛癣菌和须癣毛癣菌, ZC-AgNPs 对白色念珠菌的抑制效果大约是化学银纳米颗粒的 16 倍, 二者均显著优于紫草提取物的抗白色念珠菌效果; ZC-AgNPs 对红色毛癣菌的最低抑菌浓度为 $62.5 \mu\text{g/mL}$, 相比于化学银纳米颗粒抗浅部真菌活性提高了 4 倍, 比单纯的紫草提取物提高了约 9 倍; 对于须癣毛癣菌, ZC-AgNPs 的 MIC = $125 \mu\text{g/mL}$, 同样优于 C-AgNPs 和紫草提取物。氟康唑对白色念珠菌的抑制效果优于红色毛癣菌和须癣毛癣菌, 而特比萘芬对红色毛癣菌和须癣毛癣菌的较敏感, 抑制效果更好。利用生物还原法, 加入紫草提取物制备纳米银, 大大提高了纳米银的抗浅部真菌的能力。

3 讨论

AgNPs 的合成方法主要有化学法、物理法和绿色还原法

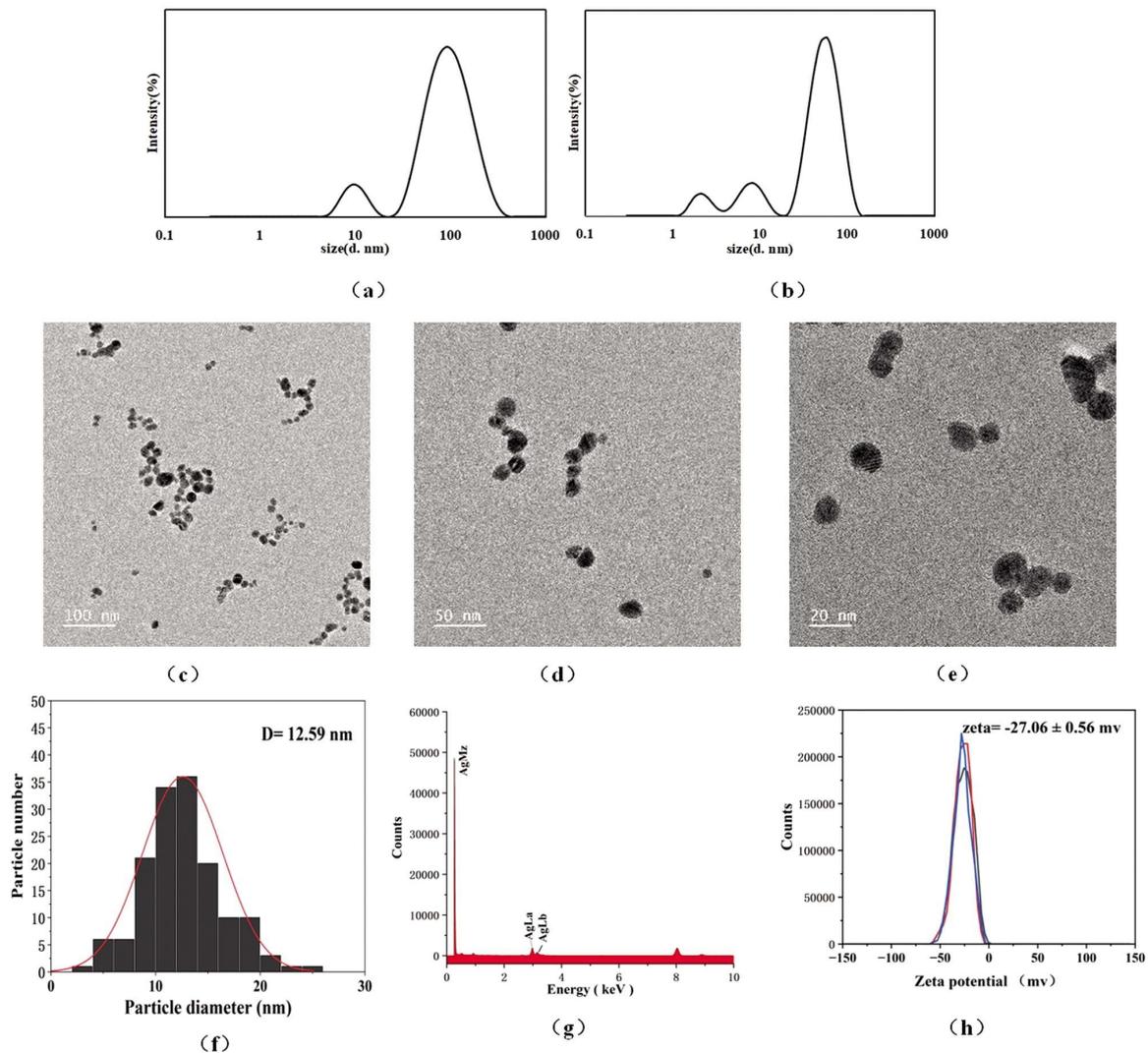


图 6 (a)ZC-AgNPs(b)C-AgNPs 的 DLS 图;(c)(d)(e)ZC-AgNPs 的 TEM 图像;(f)ZC-AgNPs 的 TEM 粒径分布图;(g)ZC-AgNPs 的 EDS 图谱;
(h)ZC-AgNPs 的 zeta 电势图

Fig.6 DLS map of ZC-AgNPs (a) and C-AgNPs (b); (c) (d) (e) TEM image of ZC-AgNPs; (f) TEM particle size distribution map of ZC-AgNPs;
(g) EDS map of ZC-AgNPs; (h) zeta potential map of ZC-AgNPs

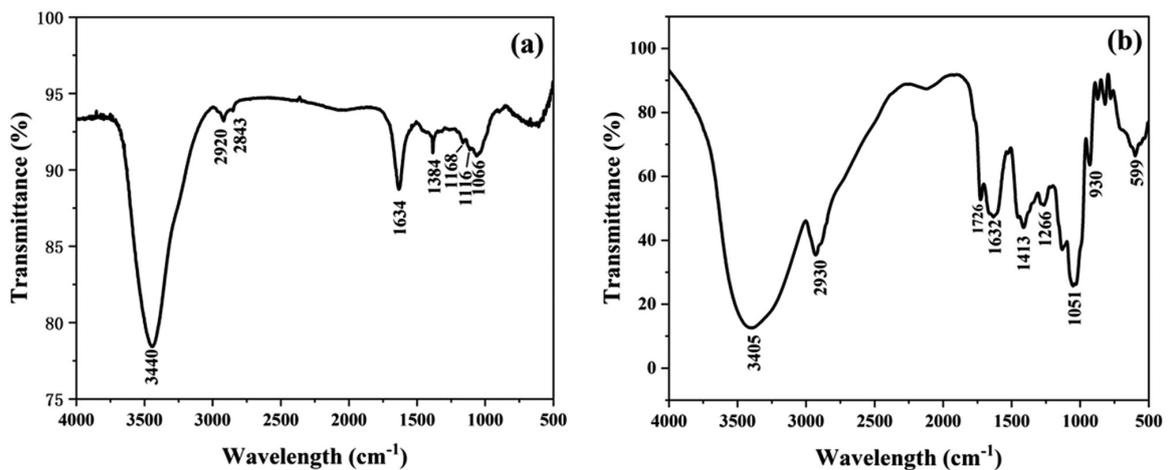


图 7 紫草 - 银纳米粒 (a)与紫草提取物(b)的 FTIR 光谱图

Fig.7 The FTIR spectra of ZC-AgNPs (a) and comfrey extract (b)

等。其中化学法应用较为广泛,但原料还原剂(如苯二酚等)通常有一定的毒性,大大限制了 AgNPs 在生物医药和食品包装等领域的应用。物理法(如物理气相沉积、激光汽化法等)制备

的 AgNPs 纯度高,但产物粒度分布较宽,易团聚,对仪器较苛刻,成本较高。近年来,绿色还原法制备 AgNPs 越来越受到人们的关注,其方法有着环保安全、原料易得、应用广泛等特点。

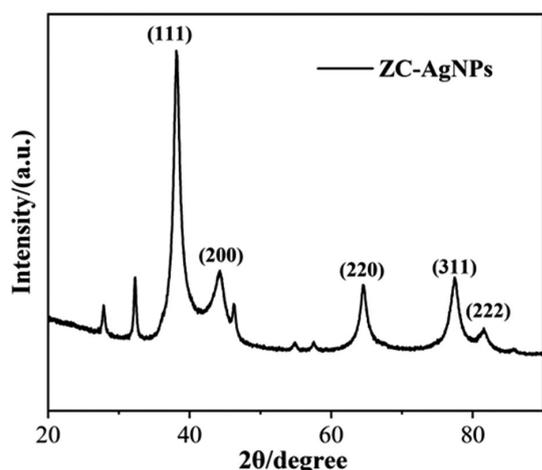


图 8 ZC-AgNPs 的 XRD 衍射图谱
Fig.8 XRD diffraction pattern of ZC-AgNPs

绿色还原法制备纳米银是利用植物提取液中的有效成分充当还原剂和保护剂,具有绿色环保、成本低、原料易得等优点。目前已有用植物的根^[29]、叶^[30]、花^[31]、果实^[24]等部位的提取物成功合成银纳米材料。草具有清热凉血、活血解毒、透疹消斑的功效,现代药理研究表明紫草可以抗浅部真菌^[9]、抗炎^[32]、抗肿瘤^[33]等作用。本文采用一种简单高效的制备方法,以紫草提取物为还原剂和稳定剂,合成了银纳米粒。利用 Box Behnken 中心组合实验设计,考察了硝酸银浓度、紫草提取液用量和反应体系 pH 值对 ZC-AgNPs 产率的影响,其中硝酸银浓度对 ZC-AgNPs 的合成影响最大,且在碱性环境下,ZC-AgNPs 的产量较高,这与王春莉^[34]等人的研究结果一致,其中可能的机制是在碱性条件 Ag₂O 更易发挥氧化作用,通过缓慢释放 Ag⁺ 形成银纳米粒^[35]。反应前后溶液颜色变化明显,由淡黄色变为深棕色,证明成功合成 AgNPs。ZC-AgNPs 在 406 nm 处出现了紫

表 4 各试药对不同的浅部真菌的 MIC 结果

Table 4 MIC results of each test against different superficial fungi

	MIC (μg/mL)		
	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Candida albicans</i>
Comfrey Extracts	560	2250	>4500
C-AgNPs	250	500	250
ZC-AgNPs	62.5	125	15.63
Fluconazole	32	32	1
Terbinafine	0.25	0.06	>0.5

外特征吸收峰,ZC-AgNPs 的 XRD 扫描谱图与标准卡片 (JCPDS No.4-0783)对比,以及 EDS 结果都进一步证明了银纳米粒的成功合成。通过比对紫草提取液和 ZC-AgNPs 的 FTIR 图谱,结果说明紫草的化学成分,可能是多糖和蛋白质等成分封盖在 AgNPs 表面,形成了稳定的银纳米粒。ZC-AgNPs 的 Zeta 电位值为 -27.06 ± 0.56 mv,表明银纳米粒子带有负电荷,原因可能是提取物中的活性物质以带负电荷的形式吸附在 ZC-AgNPs 粒子的表面,形成较稳定的体系。通过 TEM 观察银纳米的形貌和大小,显示 ZC-AgNPs 的平均粒径约 13 nm,球形颗粒,研究表明 AgNPs 的颗粒形态会影响其抗菌活性,较小尺寸的 AgNPs 通常具有更好的抗菌活性^[36]。

浅部真菌感染是致病真菌侵犯皮肤的角质层、毛发和甲板所导致的感染,引起体癣、头癣和甲癣等,并伴有不同程度的瘙痒,导致患者生活质量下降。基层部队的官兵皮肤真菌感染发病率较高,于国平^[37]等对某部队真菌镜检阳性感染者的患处标本进行了培养,共培养出的真菌有红色毛癣菌、须癣毛癣菌、絮状表皮癣菌和白色念珠菌等。在军队的生活和训练中,士兵多穿作战靴、胶鞋、尼龙袜,导致足部出汗,长时间处于湿热状态,使鞋内的真菌不断繁殖并不易杀灭。不论对于提高生活质量还是保障部队训练效率而言,抗浅部真菌都是亟需解决的一个难题,且由于浅部真菌感染病原耐药率不断升高、患者对现有抗真菌药物的耐受性有限等问题,临床对于新型抗真菌药物的需求不断提高,研制疗效确切、价格低廉、毒副作用小和安全性高的新型抗浅部真菌药物成为首要任务。本文合成的 ZC-AgNPs

对于白色念珠菌、红色毛癣菌及须癣毛癣菌有很好的抑制效果,且显著优于单独的紫草提取物和化学银纳米粒效果,与西药相比具有耐药性低、绿色环保等优势,所以紫草银纳米粒在制药工业中具有广泛的应用前景。Ronavari 等人生物合成的银纳米粒对条件致病酵母菌和浅部真菌的抑制效果优于金纳米粒,且 AgNPs 和 AuNPs 对人角质形成细胞均无毒性作用^[38]。

综上所述,利用绿色还原法,以紫草提取物为原料制备银纳米粒,既提高银纳米粒抗浅部真菌活性及稳定性,同时避免物理法和化学法还原制备纳米银时使用的有机溶剂,实现真正的绿色高效,具有良好的应用前景。

参考文献(References)

[1] Chakraborty A, Haque S M, Dey D, et al. Phytogetic silver nanoparticles from tissue-cultured *Kaempferia angustifolia* - an underutilized medicinal herb: a comparative antibacterial study on urinary pathogens[J]. J Genet Eng Biotechnol, 2022, 20(1): 131.
 [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] Wan F, Lei Y, Wang C, et al. Highly sensitive and reproducible CNTs@Ag modified Flower-Like silve nanoparticles for SERS situ detection of transformer Oil-dissolved furfural [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2022, 273: 121067.
 [4] Hasnain M S, Javed M N, Alam M S, et al. Purple heart plant leaves extract-mediated silver nanoparticle synthesis: Optimization by

- Box-Behnken design[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019, 99: 1105-1114.
- [5] Sabbagh F, Kiarostami K, Mahmoudi K N, et al. Green Synthesis of Mg (0.99) Zn (0.01)O Nanoparticles for the Fabrication of kappa-Carrageenan/NaCMC Hydrogel in order to Deliver Catechin [J]. Polymers (Basel), 2020, 12(4): 861.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [7] Feng J, Wang Y, Lv Y, et al. XA pH-Responsive and Colitis-Targeted Nanoparticle Loaded with Shikonin for the Oral Treatment of Inflammatory Bowel Disease in Mice [J]. Mol Pharm, 2022, 19(11): 4157-4170.
- [8] 胡梦婷, 杨佐君, 段慧琴. 中药提取物对皮肤癣菌的体外抑菌活性及其机制[J]. 北京农学院学报, 2023, 38(01): 53-59.
- [9] 凯赛尔·阿不都克热木, 李治建. 紫草提取物体外抗真菌作用研究 [J]. 中国中医药科技, 2011, 18(04): 315-316.
- [10] Honda G, Sakakibara F, Yazaki K, et al. Isolation of deoxyshikonin, an antidermatophytic principle from Lithospermum erythrorhizon cell cultures[J]. J Nat Prod, 1988, 51(1): 152-154.
- [11] Sasaki K, Abe H, Yoshizaki F. In vitro antifungal activity of naphthoquinone derivatives [J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25 (5): 669-670.
- [12] Brown G D, Denning D W, Gow N A, et al. Hidden killers: human fungal infections[J]. Sci Transl Med, 2012, 4(165): 113r-165r.
- [13] Khanna D, Bharti S. Luliconazole for the treatment of fungal infections: an evidence-based review[J]. Core Evid, 2014, 9: 113-124.
- [14] Algarni A, Fayomi A, Al G H, et al. Nanofabrication synthesis and its role in antibacterial, anti-inflammatory, and anticoagulant activities of AgNPs synthesized by Mangifera indica bark extract[J]. Environ Res, 2023, 231(Pt 1): 115983.
- [15] Felix-Pina P, Franco M M, Zarate T D, et al. Antitumoral and Immunogenic Capacity of beta-D-Glucose-Reduced Silver Nanoparticles in Breast Cancer[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(10): 8485.
- [16] 王悦辉, 周济, 王婷. 纳米银与表面吸附荧光素的荧光性能的影响 [J]. 光谱学与光谱分析, 2007, (08): 1555-1559.
- [17] 于嘉伦. 采用柑橘皮提取液制备纳米银的工艺优化及其性能研究 [D]. 西南大学, 2018.
- [18] Oksana V, Anna M, Renáta M. Influence of pH on green synthesis of Ag nanoparticles[J]. Mater Lett, 2016, 180: 336-339.
- [19] Salayová A, Bedlovičová Z, Daneu N, et al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles with Antibacterial Activity Using Various Medicinal Plant Extracts: Morphology and Antibacterial Efficacy [J]. Nanomaterials (Basel), 2021, 11(4): 1005.
- [20] Ashour A A, Raafat D, El-Gowelli H M, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using cranberry powder aqueous extract: characterization and antimicrobial properties.[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10: 7207-7221.
- [21] Shkryl Y, Rusapetova T, Yugay Y, et al. Biosynthesis and Cytotoxic Properties of Ag, Au, and Bimetallic Nanoparticles Synthesized Using Lithospermum erythrorhizon Callus Culture Extract[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17): 9305.
- [22] Stehfest K, Boese M, Kerns G, et al. Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid in situ [J]. J Plant Physiol, 2004, 161(2): 151-156.
- [23] Mariappan G, Sundaraganesan N, Manoharan S. Experimental and theoretical spectroscopic studies of anticancer drug rosmarinic acid using HF and density functional theory [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2012, 97: 340-351.
- [24] 曹兴业, 谢闰生, 赵志远, 等. 百香果提取液绿色制备银纳米粒子及其抗菌研究[J]. 食品与发酵工业, 2023.
- [25] Anna T, Vitaliano T, Sergio B, et al. Recent applications of vibrational mid-Infrared (IR) spectroscopy for studying soil components: a review[J]. J Cent Eur Agric, 2015, 16(1): 1-22.
- [26] Moorthy K, Chang K C, Wu W J, et al. Systematic Evaluation of Antioxidant Efficiency and Antibacterial Mechanism of Bitter Gourd Extract Stabilized Silver Nanoparticles [J]. Nanomaterials (Basel), 2021, 11(9): 2278.
- [27] Sun W, Qu D, Ma Y, et al. Enhanced stability and antibacterial efficacy of a traditional Chinese medicine-mediated silver nanoparticle delivery system [J]. Int J Nanomedicine, 2014, 9: 5491-5502.
- [28] Arokiyaraj S, Vincent S, Saravanan M, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using Rheum palmatum root extract and their antibacterial activity against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2017, 45 (2): 372-379.
- [29] Behravan M, Hossein P A, Naghizadeh A, et al. Facile green synthesis of silver nanoparticles using Berberis vulgaris leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 124: 148-154.
- [30] Qing S, Shoutian Q, Hongyan G, et al. Biosynthesis, Characterization and Biological Activities of Silver Nanoparticles from Pogostemon cablin Benth. Methanolic Leaf Extract [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2019, 19(7): 4109-4115.
- [31] Sabapathi N, Ramalingam S, Aruljothi K N, et al. Characterization and Therapeutic Applications of Biosynthesized Silver Nanoparticles Using Cassia auriculata Flower Extract [J]. Plants (Basel), 2023, 12 (4): 707.
- [32] 李渊深, 索艳晖, 谢廷平, 等. 紫草素调节 NF-κ B/ERK 信号通路对膝关节骨性关节炎大鼠炎症反应的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(12): 2577-2581.
- [33] 曹华琳, 尹昕, 梁天嵩. 紫草素调控 Hippo 信号通路抑制鼻咽癌细胞株生物学功能及其机制研究[J]. 安徽医药, 2024, (01): 31-36.
- [34] 王春莉, 陈忠琴, 徐蕾蕾, 等. 绿色合成桑叶银纳米粒及其抗菌抗癌活性[J]. 精细化工, 2021, 38(01): 130-137.
- [35] 李朋, 郭健, 张宇, 等. 基于 β- 环糊精分散银纳米粒子的绿色合成[J]. 合成化学, 2017, 25(03): 240-244.
- [36] Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy [J]. RSC Advances, 2014, 4 (8): 3974-3983.
- [37] 于国平, 王萍, 陈俭宏, 等. 驻闽某部队官兵浅部真菌病调查[J]. 华南国防医学杂志, 2015, 29(08): 642-643.
- [38] Ronavari A, Igaz N, Gopisetty M K, et al. Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes [J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13: 695-703.