

- [8] Wierzbicki A S, Chowieniczek P J, Cockcroft J R, et al. Cardiovascular risk factors and endothelial dysfunction[J]. *Clin Sci*, 2004, 107(6): 609-615.
- [9] 张娜, 王鹏, 潘桂湘, 等. 丹参多酚酸体内吸收分布代谢排泄研究进展[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(2): 436-440.
- [10] 李珊, 王晓峰, 党悦方. 枣仁安神颗粒中主要成分在大鼠体内的药动学研究[J]. *西北大学学报: 自然科学版*, 2014, 44(2): 252-255.
- [11] 王胜春, 赵惠萍, 皇甫孟军, 等. 五味子与丹参配伍对其成分五味子乙素、醇甲的药代动力学影响[J]. *中成药*, 2004, 26(12): 987-991.
- [12] Zhang C Y, Zhang H, Dong Y, et al. Study on compatibility of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma* and *Chuanxiong Rhizoma* based on pharmacokinetics of effective components salvianolic acid B and ferulic acid in rat plasma[J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2015, 40(8): 1589-1593.
- [13] 于丹, 柴建国, 曹彦光, 等. 丹参注射液中丹酚酸B对丹参素药代动力学的影响[J]. *中国药科大学学报*, 2009, 40(3): 258-262.
- [14] 刘建群, 王雪梅, 刘一文, 等. 基于影响药物代谢的中药配伍研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(19): 221.
- [15] 祁文秀, 马太芳, 赵焕新. L-精氨酸对家兔生理及失血性休克后尿量的影响[J]. *山西医科大学学报*, 1999, 30(1): 1.
- [16] 王洋, 卢晓帆, 李航洁, 等. 大鼠连续尾静脉采血方法研究[J]. *局解手术学杂志*, 2015, 24(5): 505-507.

## 翻白草提取物银纳米粒制备及其抗菌活性评价

赵海军<sup>1</sup>, 赵维英<sup>1</sup>, 洪泽辉<sup>2\*</sup>

(1. 东南大学附属中大医院妇产科, 江苏南京 210009; 2. 东南大学医学院遗传与发育生物学系, 发育与疾病相关基因教育部重点实验室, 江苏南京 210009)

**摘要:** **目的** 制备翻白草 *Potentilla discolor* Bge. 提取物银纳米粒, 并评价其抗菌活性。**方法** 将翻白草提取物缓慢加入 AgNO<sub>3</sub> 溶液中, 离心后沉淀分散于蒸馏水中以制备银纳米粒, 并表征其理化性质。以提取时间、提取液用量、AgNO<sub>3</sub> 溶液用量为影响因素, 优化制备工艺。通过测定银纳米粒的抑菌圈直径、抑菌率和最低杀菌浓度 (MBC) 来考察其抗菌活性。**结果** 最佳条件为提取时间 30 min, 提取液 (生药量) 与 Ag<sup>+</sup> 比例 1:0.016 2。翻白草提取物银纳米粒呈近球形, 粒径小, 分布均匀, 性质稳定, 对多药耐药型大肠艾希氏菌、金黄色葡萄球菌、加德纳杆菌和白色念珠菌的抑制作用显著高于翻白草提取物、空白银纳米粒和没食子酸银纳米粒 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 并呈量效关系, 而氨基青霉素和左氧氟沙星无明显抗菌活性。其最低杀菌浓度 (MBC) 分别为 0.5、1.0、1.0、1.5 mg/mL, 是空白银纳米粒和没食子酸银纳米粒的 2~4 倍。**结论** 所建立的翻白草提取物银纳米粒制备工艺稳定合理, 在应对多药耐药菌引起的阴道炎有很好的治疗前景。

**关键词:** 翻白草提取物; 银纳米粒; 制备工艺; 抗菌活性; 阴道炎

**中图分类号:** R944

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1528(2016)10-2141-08

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2016.10.010

## Preparation of silver nanoparticles loaded with *Potentilla discolor* extract and evaluation of their antimicrobial activities

ZHAO Hai-jun<sup>1</sup>, ZHAO Wei-ying<sup>1</sup>, HONG Ze-hui<sup>2\*</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China; 2. Department of Genetics and Developmental Biology, Medical School of Southeast University; Key Laboratory of Ministry of Education for Developmental Genes and Human Disease, Nanjing 210009, China)

**收稿日期:** 2016-02-01

**作者简介:** 赵海军 (1975—), 女, 博士生, 主治医师, 研究方向为妇科抗菌药物递送系统。Tel: 15305142185, E-mail: 350638241@qq.com

\* **通信作者:** 洪泽辉 (1974—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为新型抗妇科炎症药物递送。Tel: (025) 52612185, E-mail: 714282628@qq.com

**ABSTRACT:** **AIM** To prepare silver nanoparticles loaded with *Potentilla discolor* Bge. extract and to evaluate their antimicrobial activities. **METHODS** The *P. discolor* extract was slowly added into AgNO<sub>3</sub> solution. After centrifugation, the precipitation was dispersed in distilled water for preparing the silver nanoparticles, then the physicochemical properties were characterized. With extraction time, extract amount and AgNO<sub>3</sub> solution volume as influencing factors, the preparation was optimized. The antimicrobial activities of silver nanoparticles were determined through the investigation of their antimicrobial circle diameters, inhibition rates and minimal microcidal concentrations. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 30 min for extraction time, and 1 : 0.016 2 for ratio of extract (crude drug) to Ag<sup>+</sup>. The near spherical silver nanoparticles loaded with *P. discolor* extract, found to be with small particle size, uniform distribution and stable property, exhibited significantly stronger inhibitory effects against multi-resistant *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus gardiner* and *Candida albicans* for vaginitis than those of *P. discolor* extract, blank silver nanoparticles and gallic acid-loaded silver nanoparticles ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) in a dose-dependent manner, while Ampicillin and Levofloxacin displayed no such obvious activities. Their respective minimal microcidal concentrations of 0.5, 1.0, 1.0 and 1.5 mg/mL were 2–4 times of the blank silver nanoparticles and gallic acid-loaded silver nanoparticles. **CONCLUSION** The *P. discolor* silver nanoparticles prepared by the aforementioned stable and reasonable preparation process hold more promise to treat vaginitis due to multi-resistant microbes.

**KEY WORDS:** *Potentilla discolor* Bge. extract; silver nanoparticles; preparation; antimicrobial activities; vaginitis

阴道炎是妇科门诊最常见的下生殖道感染性疾病,主要有细菌性阴道病、外阴阴道假丝酵母菌病和滴虫阴道炎等类型<sup>[1]</sup>,该妇科疾病易感染,复发率高,根治困难,严重影响妇女的生活质量<sup>[2]</sup>。目前,相关治疗的效果并不理想,其最主要的原因是抗生素滥用,造成多种多药耐药菌的产生,如大肠艾希氏菌、金黄色葡萄球菌、加德纳杆菌以及白色念珠菌等,使得阴道炎治愈困难<sup>[3]</sup>,故高效快速,安全稳定的治疗多药耐药型阴道炎的药物亟待发掘。

银纳米粒是由几个到几十个银原子团聚在一起形成的银簇,粒径在1~100 nm之间<sup>[4]</sup>,具有独特的热、光、力学性能和催化性能,在多个领域有着广泛应用<sup>[5]</sup>。在医学领域中,银纳米粒对多种细菌,如大肠杆菌、绿脓杆菌和表皮葡萄球菌等表现出良好的抑制活性<sup>[6-8]</sup>,而且对耐药型菌有杀伤作用,但有关其对多药耐药型病菌的作用,以及不同制备方法和表面修饰物对其抗菌活性影响的报道仍较少。另外,银纳米粒制备方法多样,如化学还原法、绿色合成法等,目前较受关注的是以含多羟基化合物的天然植物提取液为还原剂的绿色制备方法<sup>[9-11]</sup>,具有绿色、安全、适合大规模生产的特点<sup>[12]</sup>。

翻白草为蔷薇科植物翻白草 *Potentilla discolor*

Bge. 的干燥全草,为我国常用中药,具有抗菌、降糖和止血等药理活性,含有多酚类、黄酮类等多羟基化合物,其中没食子酸和槲皮素具有较强的抑菌活性<sup>[13-15]</sup>。本研究选用柠檬酸钠、翻白草主要抗菌成分没食子酸和翻白草提取物为还原剂,分别制备空白、没食子酸、翻白草提取物银纳米粒,探究不同反应条件对翻白草提取物银纳米粒形成的影响,并以没食子酸银纳米粒和空白银纳米粒为对照,以多药耐药型阴道炎常见菌(大肠艾希氏菌、金黄色葡萄球菌、加德纳杆菌和白色念珠菌)为研究对象,考察其抗菌能力,同时分析其抗菌作用主要影响因素,为中药银纳米粒在治疗多药耐药型菌所引起妇科炎症方面的应用提供参考。

## 1 仪器与材料

Nano-ZS 型马尔文粒径测定仪(英国马尔文公司); Tecnai 12 型透射电子显微镜(荷兰飞利浦公司); UV-1800 型紫外可见分光光度计(上海奥析科学仪器有限公司); BenchTop Pro 型台式冻干机(美国 VirTis 公司)。

大肠艾希氏菌、金黄色葡萄球菌、加德纳杆菌为细菌,用牛肉膏蛋白胨培养基;白色念珠菌为真菌,用沙氏培养基。上述耐药菌株相应的标准型菌株均从 ATCC 处购买(大肠埃希氏菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、加德纳氏菌 ATCC

49145、白色念球菌 ATCC 10231), 均以次抑菌浓度的氨苄青霉素诱导法制备收集所得, 由东南大学附属中大医院检验科友情提供。

翻白草产地山东, 批号 20150307, 购于亳州市沪谯药业有限公司, 经南京中医药大学吴德康教授鉴定为蔷薇科植物翻白草 *Potentilla discolor* Bge. 的干燥全草。

## 2 方法和结果

### 2.1 银纳米粒的制备

2.1.1 翻白草提取液 取翻白草细粉 10 g, 加水 100 mL, 煮沸 20 min, 冷却后纱布粗滤, 将粗滤液抽滤得到滤液, 蒸馏水定容至 100 mL, 得含生药 0.1 g/mL 的翻白草提取液, 冷藏保存, 备用。

2.1.2 AgNO<sub>3</sub> 溶液 精密称取 AgNO<sub>3</sub> 晶体 425 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 蒸馏水定容, 即得 100 mmol/L AgNO<sub>3</sub> 溶液。

2.1.3 空白银纳米粒 根据文献 [16], 量取 1% 柠檬酸钠溶液 10 mL, 逐滴加至 300 mg/L AgNO<sub>3</sub> 溶液中, 沸水浴反应 10 min, 稀磷酸调节溶液 pH 至 4.0~6.0, 即得。

2.1.4 没食子酸银纳米粒 根据文献 [17], 称取三聚磷酸钠 0.02 g, 加 19 mL 水和 1 mL 0.01 mol/L 没食子酸溶液, 磁力搅拌混合均匀, 稀 HNO<sub>3</sub> 溶液调节混合液 pH 至 9.0, 加入 0.1 mL 0.2 mol/L AgNO<sub>3</sub> 溶液, 使没食子酸与 Ag<sup>+</sup> 比例为 1:2, 沸水浴下反应 60 min, 反应液 13 000 r/min 离心 15 min, 吸去上清液, 沉淀用蒸馏水洗涤 3 次, 超声分散于蒸馏水中, 即得。

2.1.5 翻白草提取物银纳米粒 吸取翻白草提取液 10 mL, 磁力搅拌下缓缓加至 100 mL 1 mmol/L AgNO<sub>3</sub> 溶液中, 25 °C 下反应 3 h, 反应液 13 000 r/min 离心 15 min, 吸去上清液, 沉淀用蒸馏水洗涤 3 次, 以去除银纳米粒表面的 Ag<sup>+</sup> 及部分剩余药液, 充分分散于 100 mL 蒸馏水中, 即得。

### 2.2 银纳米粒的表征

2.2.1 紫外-可见吸收 (UV-Vis) 吸取 3 种银纳米粒溶液适量, 置于比色皿中, 以蒸馏水为空白, 采用紫外-可见分光光度计在 300~800 nm 范围内进行全波长扫描, 结果见图 1。由图可知, 3 种银纳米粒均具有明显的吸收峰, 即其等离子体共振吸收峰, 表明制备成功。

2.2.2 动态光散射 (DLS) 将 3 种银纳米粒溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 动态激光散射 (DLS) 考察其粒径、多分散指数 (PDI) 及 Zeta

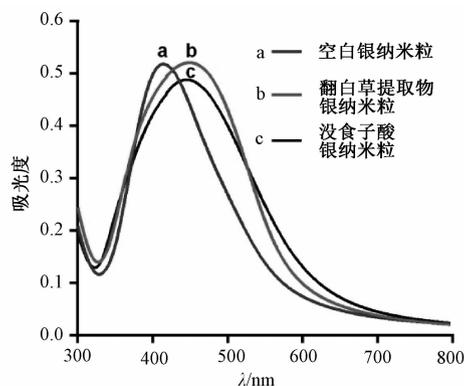


图 1 紫外-可见 (UV-Vis) 吸收图谱

Fig. 1 Ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption spectra

电位, 结果见表 1。由表可知, 3 种银纳米粒的粒径均小于 50 nm, PDI 依次为空白银纳米粒 > 没食子酸银纳米粒 > 翻白草提取物银纳米粒, Zeta 电位绝对值依次为翻白草提取物银纳米粒 > 没食子酸银纳米粒 > 空白银纳米粒。由于 PDI 越小, 粒子分散越均匀; Zeta 电位绝对值越高, 体系越稳定<sup>[18]</sup>, 故翻白草提取物银纳米粒的分散均匀性及稳定性均最好, 这主要是由于其中含有大量多羟基化合物, 还原反应中可键合在银纳米粒表面以分散银纳米粒, 减少其团聚, 并增大其分散性和稳定性<sup>[19]</sup>。

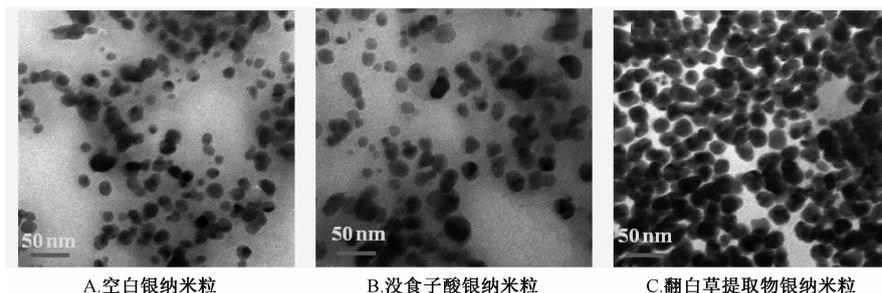
表 1 动态光散射 (DLS) 表征结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Results of dynamic light scattering (DLS) characterizations ( $\bar{x} \pm s$ )

样品	平均粒径/ nm	PDI	Zeta 电位/ mV
空白银纳米粒	27.22 ± 4.4	0.236 ± 0.028	-12.4 ± 2.7
没食子酸银纳米粒	33.77 ± 3.6	0.135 ± 0.023	-20.8 ± 2.4
翻白草提取物银纳米粒	35.53 ± 1.9	0.098 ± 0.017	-25.9 ± 3.8

2.2.3 透射电子显微镜 (TEM) 取 3 种银纳米粒溶液少量, 滴加到铜网上, 干燥后以 Tecnai 12 型透射电镜观察其外观形态, 结果见图 2。由图可知, 3 种银纳米粒为球形或类球形, 其中翻白草提取物银纳米粒颗粒大小较均匀, 其余两者粒度大小不一, 这可能由于翻白草多羟基化合物对银纳米粒的分散稳定作用较强, 并且优于没食子酸。

2.2.4 傅里叶红外 (FT-IR) 光谱 将没食子酸、翻白草提取物、没食子酸银纳米粒和翻白草提取物银纳米粒溶液冷冻干燥, 得到相应粉末, 在 4 000~600 cm<sup>-1</sup> 范围进行红外扫描, 结果见图 3。由图可知, 没食子酸、翻白草提取物银纳米粒的表面红外吸收均与其相应反应物相似, 可能是由于银纳米粒表面键合有没食子酸和翻白草提取物, 而且



A. 空白银纳米粒 B. 没食子酸银纳米粒 C. 翻白草提取物银纳米粒

图2 透射电子显微镜 (TEM) 图

Fig. 2 Transmission electron microscope (TEM) graphs

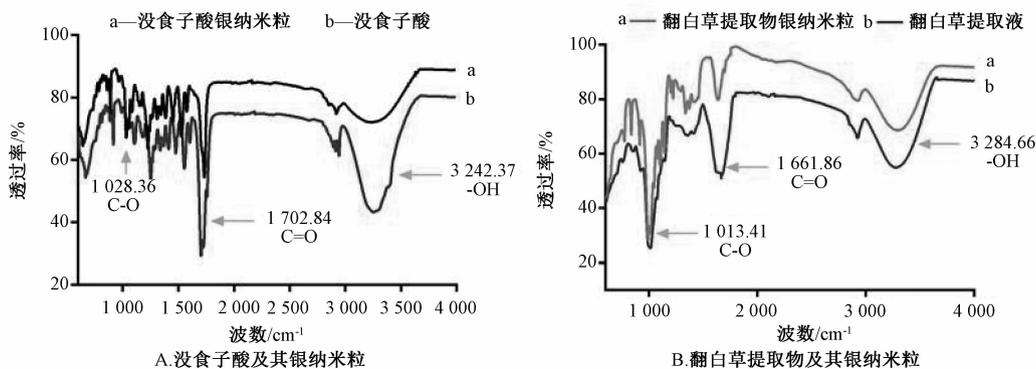


图3 傅里叶红外 (FT-IR) 图谱

Fig. 3 Fourier transform infrared (FT-IR) spectra

均存在 -OH、C=O、C-O 等基团的吸收变化 (表 2), 经分析, 主要是由于这两种提取物中的羟基参与还原反应, 使羟基伸缩振动峰减弱<sup>[20]</sup>, 而羰

基中的 O 原子可提供电子对来填充 Ag 原子空轨道, 与 Ag 配位, 使原来分子中的 C=O 变为 C-O, 导致其伸缩振动峰增强, 同时羰基吸收峰减弱<sup>[21]</sup>。

表 2 红外吸收变化

Tab. 2 Infrared absorption changes

没食子酸银纳米粒	相对于没食子酸	翻白草提取物银纳米粒	相对于翻白草提取物	所属官能团
吸收峰/cm <sup>-1</sup>	吸收变化	吸收峰/cm <sup>-1</sup>	吸收变化	
3 242. 37	减弱	3 284. 66	减弱	- OH
1 702. 84	减弱	1 661. 86	减弱	C = O
1 028. 36	增强	1 031. 41	增强	C-O

2. 2. 5 稳定性考察 将新制 3 种银纳米粒溶液于常温下存放 60 d, 每隔 7 d 取样测定粒径, 并于第 60 天采用紫外-可见分光光度计进行 300 ~ 800 nm 全波长扫描, 检测其紫外可见吸收, 以考察其稳定性, 结果见图 4。由图 4A 可知, 空白银纳米粒随时间增大, 粒径急剧变大, 在第 42 天时已超过 1 200 nm, 而且有少量沉淀出现; 没食子酸银纳米粒粒径变化较明显, 而且第 60 天后接近 200 nm, 有团聚现象; 翻白草提取物银纳米粒在 60 d 内的粒径变化不明显。图 4B 显示,

60 d 前后翻白草提取物银纳米粒的紫外可见吸收无显著变化, 表明其稳定性较好, 即翻白草提取液对银纳米粒的稳定作用强于没食子酸和柠檬酸钠。

### 2. 3 制备工艺优化

2. 3. 1 提取时间 称取翻白草粉末 10 g, 共 5 份, 均加入 10 倍量水, 提取 10、20、30、40、50 min, 冷却后纱布粗滤, 将粗滤液抽滤得到滤液, 蒸馏水定容至 100 mL, 按“2. 1. 5”项下方法制备 5 组翻白草提取物银纳米粒溶液, 采用紫外可见分光光度

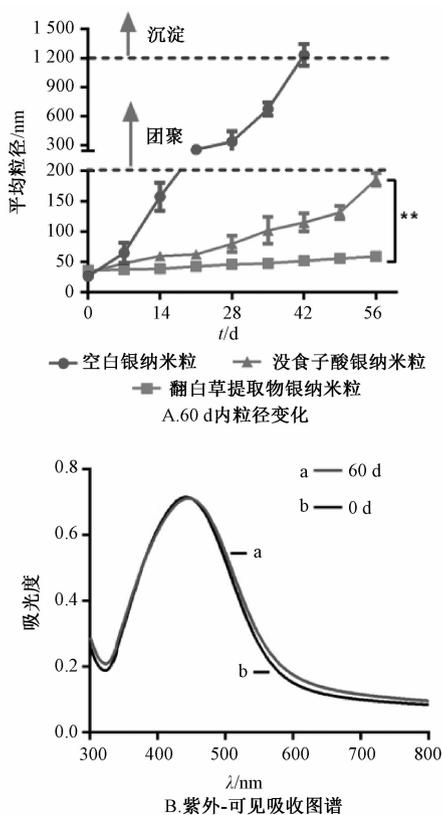


图4 稳定性考察结果

Fig. 4 Results of stability investigation

计在 300 ~ 800 nm 范围内全波长扫描, 结果见图 5A。由图可知, 提取时间为 30 min 时, 银纳米粒的吸光度最大, 说明此条件下合成的银纳米粒最多, 故最佳提取时间为 30 min。

**2.3.2 提取液用量** 将 2.5、5、10、25、50 mL (生药量分别为 0.25、0.5、1.0、2.5、5 g) 提取液提取 30 min, 与 5 份 100 mL 1.0 mmol/L  $\text{AgNO}_3$  溶液反应, 按“2.1.5”项下方法制备翻白草提取物银纳米粒, 采用紫外可见分光光度计在 300 ~ 800 nm 范围内全波长扫描, 结果见图 5B。由图可知, 银纳米粒吸光度随着提取液用量的增加而升高, 当用量大于 10 mL 时, 吸光度趋于稳定, 表明 100 mL 1.0 mmol/L  $\text{AgNO}_3$  溶液、10 mL 提取液即可使  $\text{AgNO}_3$  充分反应, 此时提取液中生药量为 1 g,  $\text{Ag}^+$  量为 10.8 mg。

**2.3.3  $\text{AgNO}_3$  溶液用量** 量取翻白草提取液 10 mL, 共 5 份, 加到 100 mL 0.1、0.5、1、1.5、2 mmol/L  $\text{AgNO}_3$  溶液中, 按“2.1.5”项下方法制备翻白草提取物银纳米粒, 采用紫外可见分光光度计在 300 ~ 800 nm 范围内全波长扫描, 结果见图 5C。由图可知, 最大吸光度随着  $\text{AgNO}_3$  溶液浓度

增加而增大, 当大于 1.5 mmol/L 时趋于稳定, 表明 10 mL 提取液、1.5 mmol/L  $\text{AgNO}_3$  溶液可与提取液完全反应, 此时提取液中生药量为 1 g,  $\text{Ag}^+$  量为 16.2 mg。

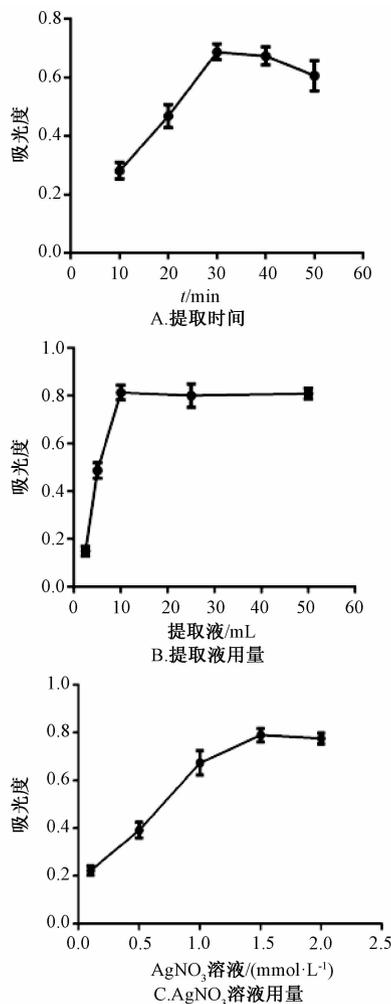


图5 吸光度曲线

Fig. 5 Absorbance curves

**2.3.4 验证试验** 取翻白草药液 3 份, 煮沸时间均为 30 min, 提取液生药量与  $\text{Ag}^+$  量比例 1 : 0.016 2, 常温下反应 3 h, 所得反应液 13 000 r/min 离心 15 min, 吸去上清液, 沉淀用蒸馏水洗涤 3 次, 超声溶解, 即得翻白草提取物银纳米粒溶液, 采用紫外可见分光光度计检测其在 300 ~ 800 nm 范围内的吸收情况, 测得最大吸光度分别为 0.796、0.803、0.799, RSD 小于 2%, 表明该工艺稳定性、重复性良好。

**2.4 翻白草提取物银纳米粒抗菌活性**

**2.4.1 抑菌圈直径的测定**<sup>[22]</sup> 将灭菌后的滤纸片 (6 mm) 放入低、中、高质量浓度的翻白草提取物

(以生药量计, 分别为 25、50、100 mg/mL), 空白银纳米粒, 没食子酸银纳米粒和翻白草提取物银纳米粒 (3 种样品中银纳米粒含有量分别为 0.1、0.5、1.0 mg/mL) 溶液中, 浸泡 1 h 后取出。吸取大肠艾希氏菌、金黄色葡萄球菌、加德纳杆菌和白色念球菌悬浮液适量, 置于无菌平皿中, 均匀涂

布于凝固培养基表面。将含样品的纸片贴于平板上, 以氨苄青霉素和左氧氟沙星 (1.5 mg/mL) 为对照, 平行 3 次试验, 放入培养箱中, 大肠艾希氏菌、金黄色葡萄球菌、加德纳杆菌于 37 °C 下培养 24 h, 白色念球菌于 28 °C 下培养 48 h, 取出, 测定抑菌圈直径, 取其平均值。结果见表 3。

表 3 抑菌圈直径测定结果 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 Results of antimicrobial circle diameter determination (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

样品	质量浓度/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	抑菌直径/mm			
		大肠艾希氏菌	金黄色葡萄球菌	加德纳杆菌	白色念球菌
翻白草提取物	25	—	—	—	—
	50	6.74 ± 0.76	6.20 ± 0.44	—	—
	100	8.51 ± 0.57	7.10 ± 0.37	6.80 ± 0.54	6.50 ± 0.65
空白银纳米粒	0.1	7.42 ± 0.44	—	—	—
	0.5	8.79 ± 0.83	7.14 ± 0.58	6.94 ± 0.59	6.99 ± 0.77
	1.0	11.16 ± 0.71	9.32 ± 0.61	8.87 ± 0.81	8.78 ± 0.86
没食子酸银纳米粒	0.1	8.25 ± 1.01	7.96 ± 0.77	7.13 ± 0.27	6.91 ± 0.54
	0.5	10.31 ± 0.34 *	9.21 ± 0.49 **	8.99 ± 0.51 *	7.92 ± 0.58
	1.0	13.80 ± 0.41 *	12.67 ± 0.82 **	11.17 ± 0.55 *	10.37 ± 1.00 *
翻白草提取物银纳米粒	0.1	8.85 ± 1.00 *	8.19 ± 0.39	10.14 ± 0.63	8.93 ± 0.56
	0.5	14.72 ± 1.11 **	13.32 ± 1.06 **	13.97 ± 0.72 **	12.27 ± 0.37 **
	1.0	16.61 ± 0.52 **	15.73 ± 1.10 **	15.99 ± 0.69 **	14.66 ± 1.02 **
氨苄青霉素	1.5	—	—	—	—
左氧氟沙星	1.5	6.33 ± 0.38	—	—	—

注: —表示未检测出。与空白银纳米粒比较, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

2.4.2 抑菌率的测定<sup>[23]</sup> 取不同质量浓度 3 种银纳米粒适量, 加入到盛有马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基的三角瓶中, 混匀后倒入培养皿 (翻白草提取物含有量以生药量计, 分别为 25、50、100 mg/mL; 3 种银纳米粒含有量分别为 0.1、0.5、1.0 mg/mL), 每皿接入一个生长一致的菌饼 (直径 4.0 mm), 以氨苄青霉素和左氧氟沙星

(1.5 mg/mL) 为对照组, 大肠艾希氏菌、金黄色葡萄球菌、加德纳杆菌于 37 °C 下培养 24 h, 白色念球菌于 28 °C 下培养 48 h, 十字交叉法测量菌落生长直径 (去菌饼的直径), 计算抑制百分率, 公式为抑制百分率 = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径] × 100%。每批实验平行 3 次, 求平均值, 全部操作均在无菌条件下进行。结果见表 4。

表 4 抑菌率测定结果 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 4 Results of antibacterial rate determination (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

样品	质量浓度/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	抑菌率/%			
		大肠艾希氏菌	金黄色葡萄球菌	加德纳杆菌	白色念球菌
翻白草提取物	25	—	—	—	—
	50	19.41 ± 1.44	10.3 ± 0.79	—	—
	100	40.82 ± 3.20	26.2 ± 0.94	21.4 ± 1.00	13.6 ± 1.03
空白银纳米粒	0.1	31.25 ± 2.71	—	—	—
	0.5	57.67 ± 1.94	29.67 ± 1.39	20.22 ± 2.14	23.52 ± 2.11
	1.0	79.93 ± 1.76	68.26 ± 4.17	58.41 ± 5.01	57.33 ± 3.02
没食子酸银纳米粒	0.1	49.52 ± 3.33 **	39.14 ± 2.41	39.84 ± 3.90	39.14 ± 2.17
	0.5	81.45 ± 2.17 **	65.19 ± 2.37 **	63.18 ± 1.89	65.19 ± 4.22
	1.0	92.16 ± 0.99 *	84.44 ± 2.16 **	89.25 ± 4.71	85.44 ± 1.93
翻白草提取物银纳米粒	0.1	53.22 ± 3.18 **	51.24 ± 3.02	60.11 ± 2.38	51.24 ± 4.09
	0.5	91.96 ± 1.06 **	90.77 ± 1.37 **	92.18 ± 3.14 **	90.77 ± 3.28 **
	1.0	99.36 ± 0.57 **	98.92 ± 1.02 **	99.34 ± 0.78 **	95.92 ± 2.33 **
氨苄青霉素	1.5	—	—	—	—
左氧氟沙星	1.5	15.11 ± 1.22	—	—	—

注: —表示未检测出。与空白银纳米粒比较, \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

2.4.3 最低杀菌浓度的测定<sup>[24]</sup> 配置各菌株(大肠艾希氏菌、金黄色葡萄球菌、加德纳杆菌和白色念珠菌)的液体培养基,每管精密量取10.0 mL分装试管,121 °C下湿热灭菌30 min。将4个样品配制成不同质量浓度培养基(翻白草提取液分别为20、40、80、160、320、640、1 280 mg/mL,3种银纳米粒分别为0.05、0.1、0.5、1.0、1.5、

2.0、4.0 mg/mL),每一系列接种一种菌,平行3次试验,置于培养箱中,大肠艾希氏菌、金黄色葡萄球菌、加德纳杆菌于37 °C下培养24 h,白色念珠菌于28 °C下培养48 h,观察生长现象。无菌落生长的最低浓度作为供试品的最低杀菌浓度。结果见表5。

表5 最低杀菌浓度测定结果 (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 5 Results of minimal microcidal concentration determination (n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

样品	最低杀菌浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )			
	大肠艾希氏菌	金黄色葡萄球菌	加德纳杆菌	白色念珠菌
翻白草提取物	320	640	640	1 280
空白银纳米粒	2.0	4.0	4.0	>4.0
没食子酸银纳米粒	1.5	2.0	2.0	4.0
翻白草银提取物纳米粒	0.5	1.0	1.0	1.5

注:各样品最低杀菌浓度均在同一质量浓度下测定,标准差为零

2.4.4 测定结果 由表3和表4可知,4个样品的抗菌活性依次为翻白草提取物银纳米粒>没食子酸银纳米粒>空白银纳米粒>翻白草提取液,并随其质量浓度增大而增强。对于同一个供试样品,翻白草提取物银纳米粒对各供试菌均具有较强的抑制作用,并显著优于其他样品,对于不同供试菌的抑制效果依次为大肠艾希氏菌>金黄色葡萄球菌、加德纳杆菌>白色念珠菌。表5显示,翻白草提取物银纳米粒的最低杀菌浓度值最小,并且当其质量浓度为1.0 mg/mL时,抑菌率可达95%以上,而空白银纳米粒和没食子酸银纳米粒为其2~4倍,即翻白草提取物银纳米粒抗菌活性最强,为空白银纳米粒和没食子酸银纳米粒的2~4倍。另外,临床常用抗生素氨苄青霉素和左氧氟沙星对这4种供试菌没有明显的抑制作用。

### 3 讨论

3.1 银纳米粒形态和粒径对杀菌效果的影响 研究表明,三角型银纳米粒抗菌活性强于球形和棒型;形态类型一致时,粒径越小,杀菌能力越强<sup>[25]</sup>。就本实验而言,柠檬酸钠、没食子酸、翻白草银纳米粒的形状均为类球形,但柠檬酸钠、没食子酸银纳米粒放置后易团聚,粒径增大,不利于穿透细菌胞壁和胞膜,限制了其进入细胞发挥药效,从而减弱了杀菌效果。

3.2 不同表面修饰物对杀菌效果的影响 Sun等<sup>[3]</sup>报道,键合在银纳米粒表面的中药有效成分在分散银纳米粒的同时,与后者达到协同抗菌作用。本实验中没食子酸、翻白草提取物银纳米粒表面分别含有相应成分,这些成分在分散银纳米粒的

同时,可能与后者协同抗菌,表现出较好的抗菌效果。没食子酸是翻白草主要抗菌成分,但翻白草提取物银纳米粒的抗菌效果显著强于没食子酸银纳米粒,表明翻白草中其他成分也起着一定作用。另外,翻白草提取物对银纳米粒的稳定作用更强,可有效防止其团聚,并维持其纳米特性。

3.3 不同菌种对杀菌效果的影响 细菌根据其细胞壁结构的不同,大致可分为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。多项研究表明,银纳米粒对革兰氏阴性菌的抑制效果更好,因为其细胞壁更薄,银粒子更易穿透进细胞内而发挥药效<sup>[26]</sup>。本实验所用加德纳杆菌为阴性,而金黄色葡萄球菌为阳性,但抗菌实验显示,同一种银纳米粒对两者的抑制效果无显著性差异,可能是由于其对加德纳杆菌细胞外膜上脂多糖结合的牢固程度较大,限制了其抗菌作用<sup>[27]</sup>。

### 4 结论

综上所述,本研究成功制备了翻白草提取物银纳米粒,制备方法绿色安全、稳定可行,而且所制银纳米粒对多药耐药型阴道炎常见菌(大肠艾希氏菌、金黄色葡萄球菌、加德纳杆菌和白色念珠菌)具有较强的抑制作用,可为中药银纳米粒的开发利用提供方法和依据,同时也为其在治疗多药耐药型菌所引起妇科炎症方面的应用提供参考。

#### 参考文献:

[1] 薛凤霞,李小平,李志英,等. 女性生殖道感染的诊断与处理[J]. 现代妇产科进展, 2006, 15(1): 1-17.  
[2] 王娜梅,崔琳,马春芬,等. 苦参凝胶联合氟康唑胶囊治疗霉菌性阴道炎的临床观察[J]. 中国中药杂志, 2015,

- 40(5): 978-980.
- [ 3 ] 吴幼丽, 邴伟华, 吴春芳, 等. 假丝酵母菌性阴道炎联合治疗的疗效分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(17): 4036-4038.
- [ 4 ] Satyavani K, Gurudeeban S, Ramanathan T, et al. Biomedical potential of silver nanoparticles synthesized from calli cells of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad [J]. *J Nanobiotechnol*, 2011, 9(1): 43-50.
- [ 5 ] Chandran S P, Chaudhary M, Pasricha R, et al. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe Vera* plant extract[J]. *Biotechnol Prog*, 2006, 22(2): 577-583.
- [ 6 ] He Q, Liu J, Huang C, et al. Synthesis and characterization of a silver incorporated magnetic nanocomposite with enhanced antibacterial activity[J]. *Sci Adv Mater*, 2014, 6(2): 366-376.
- [ 7 ] Sun W, Qu D, Ma Y. Enhanced stability and antibacterial efficacy of a traditional Chinese medicine-mediated silver nanoparticle delivery system[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9(1): 5491-5502.
- [ 8 ] Niraimathi K L, Sudha V, Lavanya R, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera sessilis* (Linn.) extract and their antimicrobial, antioxidant activities[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 102(2): 288-291.
- [ 9 ] Jha A K, Prasad K, Kumar V, et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Eclipta* leaf[J]. *Biotechnol Prog*, 2009, 25(5): 1476-1479.
- [ 10 ] Kumar V, Yadav S K. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications[J]. *J Chem Technol Biot*, 2009, 84(2): 151-157.
- [ 11 ] 孙文杰, 陈彦, 高霞, 等. 地榆银纳米粒复合物的制备与表征[J]. 中草药, 2013, 44(24): 3465-3470.
- [ 12 ] Parashar U K, Kumar V, Bera T, et al. Study of mechanism of enhanced antibacterial activity by green synthesis of silver nanoparticles [J]. *Nanotechnology*, 2011, 22(41): 415104-415116.
- [ 13 ] 薛培凤, 尹婷, 梁鸿, 等. 翻白草化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(14): 1052-1054.
- [ 14 ] 李杨, 高贺, 谷晓策. 翻白草化学成分及药理活性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 612-614.
- [ 15 ] 伍贤进, 毛倩, 刘胜贵, 等. 翻白草提取物的抑菌作用研究[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(9): 1295-1296.
- [ 16 ] Qu D, Sun W, Chen Y, et al. Synthesis and *in vitro* antineoplastic evaluation of silver nanoparticles mediated by *Agrimoniae herba* extract [J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9(1): 1871-1882.
- [ 17 ] 王芳. 银纳米粒的没食子酸还原制备研究[D]. 天津: 天津大学, 2010.
- [ 18 ] Gengan R M, Anand K, Phulukdaree A, et al. A549 lung cell line activity of biosynthesized silver nanoparticles using *Albizia adianthifolia* leaf[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 105(4): 87-91.
- [ 19 ] 林源, 林丽萍, 林文爽, 等. 中草药还原法制备银纳米颗粒及其抗菌性能[J]. 精细化工, 2011, 28(8): 744-749.
- [ 20 ] Doty R C, Tshikhudo T R, Brust M, et al. Extremely stable water-soluble Ag nanoparticles[J]. *Chem Mater*, 2005, 17(18): 4630-4635.
- [ 21 ] 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 Interface Sci*, 2004, 275(2): 496-502.
- [ 22 ] 冯黎莎, 陈放, 白洁, 等. 金荞麦的抑菌活性研究[J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(3): 240-244.
- [ 23 ] 衣秀娟. 川楝素的稳定性及其抑菌效果研究[D]. 济南: 山东大学, 2009.
- [ 24 ] 古丽巴哈尔·托乎提, 李海芳, 贺金华, 等. 芩榆烧伤凝胶体外抑菌试验及杀菌曲线的测定[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(12): 2047-2050.
- [ 25 ] 曲锋, 许恒毅, 熊勇化, 等. 纳米银杀菌机理的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 422-424.
- [ 26 ] Huang L, Dai T, Xuan Y, et al. Synergistic combination of chitosan acetate with nanoparticle silver as a topical antimicrobial: efficacy against bacterial burn infections[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(7): 3432-3438.
- [ 27 ] Leid J G, Ditto A J, Knapp A, et al. *In vitro* antimicrobial studies of silver carbene complexes: activity of free and nanoparticle carbene formulations against clinical isolates of pathogenic bacteria [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(1): 138-148.