

文章编号:1001-6880(2017)8-1409-07

余甘多糖绿色合成纳米银复合粒子的制备及响应面优化

廖正萍¹,王芳¹,王文婷¹,刘靖媛¹,马鑫瑞¹,吴少华^{2*},李永裕^{2*}¹福建农林大学园艺学院; ²福建农林大学园艺植物天然产物研究所,福州 350002

摘要:为了优化绿色合成的余甘多糖制备纳米银复合粒子的制备,以余甘多糖为还原剂和稳定剂,将 AgNO_3 中的 Ag^+ 还原为纳米级别的银单质。以 AgNPs 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈为响应值,研究 AgNO_3 与多糖体积比、 NaCl 体积、紫外照射时间对 AgNPs 制备工艺的影响,根据 Box-Behnken 中心组合实验的原理采用三因素三水平的分析方法确定最佳工艺。研究结果表明:绿色合成的 AgNPs 粒子对金黄色葡萄球菌有显著的抑菌效果,最终确定最优 AgNPs 制备条件为: AgNO_3 与多糖体积比 2:1 (mL/mL)、 NaCl 体积为 1.5 mL、紫外照射时间为 1 h, 测得抑菌圈直径大小为 2.79 ± 0.01 cm。

关键词:余甘多糖;纳米银;响应面;抑菌

中图分类号:S667.9

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.8.025

Optimization of Preparation Process for Emblic Polysaccharide-Silver Nanoparticles by Response Surface Methodology

LIAO Zheng-ping¹, WANG Fang¹, WANG Wen-ting¹, LIU Jing-yuan¹,
MA xin-rui¹, WU Shao-hua^{2*}, LI Yong-yu^{2*}

¹College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University; ²Institute of Natural Products of Horticultural Plants, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: The aim of this study was to optimize the green synthesis process of emblicpolysaccharide-silver nanoparticles. The Ag^+ of AgNO_3 was reduced to the silver level of nano-grade using emblic polysaccharide as reducing agent and stabilizer. On the basis of single factors, the inhibitory rate of AgNPs against *Staphylococcus aureus* was the response value, the effects of AgNO_3 and polysaccharide volume ratio, NaCl volume and UV irradiation time on the preparation of AgNPs was studied. According to the principle of Box-Behnken center combination test, three factors and three levels were used to determine the optimal process. The results showed: the AgNPs particles had significant bacteriostatic effect on *S. aureus*. The optimal preparation conditions of AgNPs were as follows: the ratio of AgNO_3 to polysaccharide was 2:1 (mL/mL), the volume of NaCl was 1.5 mL, and the UV irradiation time was 1 h. Under these conditions, the diameter of the inhibition zone was 2.79 ± 0.01 cm.

Key words: *Phyllanthus emblica* crude polysaccharide; silver nanoparticles; response surface methodology; antibacterial

纳米银作为一种新型的优异杀菌材料而被各个领域的科研工作者所熟知,如在医疗保健、食品卫生、保鲜贮藏、生活用品等方面均有广泛的应用^[1-4]。目前,纳米银的制备方法主要采用化学还原的方法,常用的化学还原剂有柠檬酸钠、硼氢化物、抗坏血酸以及肼等化合物^[5,6]。这些化学还原剂可能会带来环境污染或者具有生物毒性。随着绿色化学概念的提出和发展,人们期待利用更加环保、更加绿色的合

成方法来制备纳米银^[7]。

余甘(*Phyllanthus emblica*)是大戟科叶下珠属的落叶果树,果实属于药食两用水果。而余甘多糖是余甘中有效的活性成分之一,有研究表明,余甘中多糖提取得率约为 10.33%^[8,9]。多糖中含有较多的羧基和羟基,可以作为合成纳米银的还原剂,同时对生成的纳米银起到稳定作用^[10]。

纳米银的制备受多种因素影响,其中 AgNO_3 与多糖体积比例、紫外照射时间、 NaCl 体积这三因素不仅会影响纳米银生成的形状及粒径大小,而且在各因素的互作下会影响生成纳米银的抑菌性。本文用天然产物余甘多糖作为还原剂绿色合成纳米银,

来探讨各因素如何影响纳米银制备以及纳米银的抑菌效果，并利用响应面分析的方法来优化纳米银的制备工艺。希望本文实验的研究方法和研究结果可以为纳米银的生物制备和应用提供科学的理论基础和技术支撑。

1 材料与仪器

1.1 材料

余甘(粉甘)样品采自福建省泉州市惠安县紫山镇蓝田村。余甘多糖(Emblica Polysaccharide, EPS)的制备^[8],首先选新鲜无病害的余甘果实,洗净、晾干、去核、冻干、过40目筛得到余甘粉末,热水浸提5小时离心取上清液得到余甘提取液,在经旋蒸浓缩,乙醇脱水、乙醚反复干燥得到余甘粗多糖,最后经冻融分级、Sevage法除蛋白、透析、旋蒸浓缩冻干制得余甘多糖。

1.2 试剂

硝酸银,氨水,乙酸,乙醇,乙醚,氯化钠等均为国产分析纯(购自国药集团化学试剂有限公司);细菌学蛋白胨,酵母提取物,琼脂(购自广东环凯微生物科技有限公司);实验用水为超纯水。

1.3 仪器

电子分析天平(BAS224S,德国Sartorius公司),离心机(5810R,德国Eppendorf公司),紫外分析仪(ZF-1,海门市其林贝尔仪器制造有限公司),全温度摇瓶柜(HYG-B,太仓市实验设备厂),超净工作台(SW-CJ-2FD,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司),多点磁力搅拌器(MS-15SV,美国精骐),霉菌培养箱(BPMJ-150F,上海一恒科学仪器有限公司),微波炉(G80F20CN2L-B8(R0),佛山市顺德区格兰仕微波炉电器有限公司)。

2 实验方法

2.1 纳米银制备方法

称取一定量的AgNO₃、多糖、NaCl分别配成0.05 mol/L、1 mg/mL、1 mg/L的溶液各100 mL备用。每次实验取不同体积的AgNO₃、多糖和NaCl溶液混合,将混合后的溶液加入适量氨水调节pH为8.7。室温下把混合液置于磁力搅拌器上反应一定的时间,并用波长365 nm的紫外线照射辅助生成AgNPs。反应完成后,反复离心收集沉淀,将沉淀进行水洗,再次反复离心直到上清液变澄清,去除澄清液得到棕褐色沉淀,沉淀部分冻干后置于-4℃冰箱

备用。

2.2 单因素抑菌实验

本实验选取AgNO₃与多糖体积比例、反应时间、NaCl体积三个因素进行单因素抑菌实验,每个因素分别取五个水平。其中AgNO₃与多糖体积比选取1:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1(单位mL/mL)五个水平,反应时间选取0.5、1、1.5、2、2.5(单位:h)五个水平,NaCl体积选取0.5、1、1.5、2、2.5(单位:mL)五个水平,每个实验水平重复三次。

2.3 平板法检测抑菌实验

取金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为实验菌株,采用平板法进行抑菌实验检测AgNPs抑菌能力。分别将不同条件制备好的AgNPs粉末,用双蒸水配成10 μg/mL的AgNPs溶液,超声30 min,使溶液均匀分散,待用。在抑菌实验中,将已活化好的菌液按1%的比例加入LB固体培养基中,待培养基平板凝固后,将6 mm的圆形滤纸片置于LB培养基正中央,并在滤纸片上方分别点样15 μL配制好的不同AgNPs溶液。最后置于30 ℃的恒温培养箱中倒置培养24 h,从培养箱中取出后,用游标卡尺测量抑菌圈大小并记录。每个处理重复实验3次。

2.4 响应面实验

根据单因素的实验结果和Box-Behnken中心组合实验设计原理,继续在实验范围内优化余甘多糖制备AgNPs的条件。其中以抑菌圈的大小(Y)为响应值,以AgNO₃与多糖体积比(A)、NaCl体积(B)、时间(C)为三个因素,采用3因素3水平进行响应面优化实验,每个实验重复三次。响应面分析实验共有17个实验点,其中包括5个零点和12个分析点实验,用来估计实验误差。实验因素和水平见表1。

表1 响应面分析因素及水平

Table 1 The factors and levels of response surface analysis

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
A: AgNO ₃ 与多糖体积比 AgNO ₃ /Polysaccharide ratio (mL/mL)	1.5:1	2:1	2.5:1
B: NaCl 体积 NaCl volume (mL)	1.0	1.5	2.0
C: 反应时间 Reaction time (h)	0.5	1.0	1.5

2.5 数据分析

单因素实验数据采用SPSS19.0版软件进行分

析,采用 Duncan 法进行多重比较分析,显著性差异 $P < 0.05$ 。响应面优化实验数据采用 Design Expert 8.06 版软件进行分析。每组实验均重复 3 次。

3 结果与讨论

3.1 单因素实验结果与讨论

3.1.1 AgNO_3 与多糖的体积比对纳米银抑制金黄色葡萄球菌的影响

在 NaCl 浓度和反应时间不变的条件下,在室温环境下,研究不同的 AgNO_3 与多糖体积比制备出的纳米银粒子对金黄色葡萄球菌抑制效果的影响。实验结果表明,随着 AgNO_3 与多糖溶液体积比的升高,抑菌圈直径的呈现出先减小后显著地升高的趋势,当体积比为 2:1 (mL/mL) 时,制备出的 AgNPs 对金黄色葡萄球菌的抑制效果最好,之后随着体积比的升高,抑菌圈直径显著下降(如图 1)。可能是因为当 AgNO_3 与多糖溶液体积比为 1:1 (mL/mL) 时, Ag^+ 迅速被还原成银粒子,短时间内各晶核间,或晶核与纳米颗粒间还未发生团聚,生成纳米银的粒径较小,表现出较强的抑菌效果,与之前宋永辉^[11]等人所研究的,在保护剂 PVP 的作用下,利用水合肼作还原剂,较高浓度的硝酸银溶液体系中,制备出的纳米银粉表现的结果相一致。当 AgNO_3 浓度小幅度增加时,大量生成的纳米银粒子使得粒子间发生严重的团聚,粒子的直径快速增大,抑菌性下降。Zhu JJ^[12]等人研究随着多糖作为还原剂的浓度越来越低,较低浓度下的还原剂生成的纳米银粒子分散比较均匀,纳米银粒径容易控制不易团聚。所以当 AgNO_3 与多糖溶液体积比为 2:1 (mL/mL), 反应生成的纳米粒子的稳定性好,抑菌效果佳。 AgNO_3 与多糖溶液体积比持续升高时,反应溶液中 Ag^+ 浓度过高,多糖浓度偏低,无法持续生成 AgNPs, 抑菌效果显著下降。

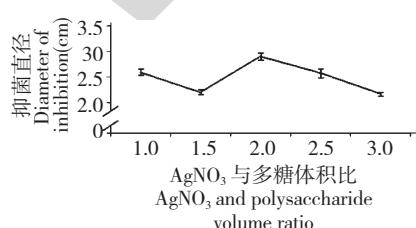


图 1 AgNO_3 与多糖不同体积比合成的 AgNPs 的抑菌效果

Fig. 1 Bacteriostatic effect of AgNPs under different AgNO_3 and Polysaccharide volume ratios

3.1.2 NaCl 的投放量对纳米银抑制金黄色葡萄球菌的影响

NaCl 中的氯离子是影响纳米银制备的一个重要因素,因此在其他制备条件不变的情况下,研究不同 NaCl 的投放量制备出来的纳米银对金黄色葡萄球菌抑制效果的影响。实验结果显示,随着制备过程中 NaCl 的投放量增加,所制备得到纳米银粒子的抑菌效果显著增加,当 NaCl 的投放量为 1.5 mL 时抑菌圈直径为 3.35 ± 0.08 cm,此时合成的 AgNPs 对金黄色葡萄球菌的抑制效果最好;随后再增加 NaCl 的投放量,AgNPs 的抑菌效果显著减小,并趋于稳定(如图 2)。Herman^[13]等人研究在制备不同形态纳米银时,结果显示当 NaCl 投放量增加时,纳米银粒子从准球形变成立方形再变成棒形和线性,而立方体形的纳米粒子抑菌性大于球形的大于棒形和线性,这与本实验抑菌效果呈现先上升后下降的趋势相一致,因此氯离子可能是合成不同形态纳米银的主要因素之一。

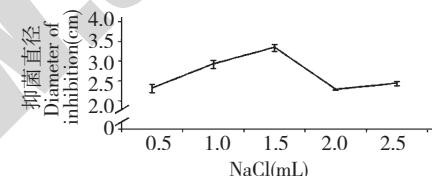


图 2 不同体积 NaCl 条件下合成 AgNPs 的抑菌效果

Fig. 2 Bacteriostatic effect of AgNPs under different volumes of NaCl

3.1.3 光照时间对纳米银抑制金黄色葡萄球菌的影响

在其它的制备条件不变的情况下,研究 365 nm 紫外灯照射不同时间制备出来的纳米粒子对金黄色葡萄球菌抑制效果的影响(如图 3)。实验结果显示,当光照时间从 1 h 增加到 2 h 时,制备得到的纳米银,抑菌效果显著增加,随着光照时间从 2 h 增加到 4 h 时,抑菌效果没有显著性差异,光照时间继续

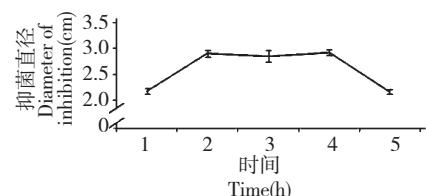


图 3 不同光照时间条件下合成 AgNPs 的抑菌效果

Fig. 3 Bacteriostatic effect of AgNPs under different lighting times

增加到 5 h 时,抑菌效果显著下降。MorrowBH^[14]等人在研究多糖制备纳米银结果显示随着反应时间增加,粒子间的碰撞几率增大,粒子间就容易发生团聚,降低纳米银的抑菌性。随着时间的延长晶粒的生长过程中也会发生奥斯特瓦尔熟化现象,即尺寸小的晶粒易溶解,溶解后释放出的单体 Ag₀重新在尺寸大的晶粒表面生长^[15]。

3.2 响应面优化实验结果与讨论

3.2.1 抑菌圈的响应面回归方程方差分析

响应面分析方案中 17 个实验点数据结果见表 2,在此基础上得到的回归方程为:

$$Y = +2.86 + 0.021 \times A + 0.100 \times B - 0.064 \times C - 0.037 \times A \times B + 0.055 \times A \times C - 0.012 \times B \times C - 0.025 \times A^2 - 0.32 \times B^2 - 0.24 \times C^2$$

回归方程各项的方差分析结果见表 3,失拟项

为 0.5802,不显著。说明模型适用于模拟响应值与各因素之间的关系,且通过对响应面图和等高线图进行分析得到回归拟合方程的决定性系数 R₂ 为 0.9648 说明回归方程拟合度很好,表明响应面模型真实可靠。F 值为 21.34,表明该模型显著,即所选因素显著影响抑菌圈的变化。由 P 值可知,模型的 P 值为 0.0003 说明方程模型达到极显著,且 B (NaCl 体积)、C(反应时间)、B₂ 和 C₂ 均显著,其他的均不显著,说明 NaCl 的投放量和光照时间对所制备 AgNPs 的抑制金黄色葡萄球菌效果影响显著。一般回归系数越大而 P 值越小则对结果影响程度越大^[16]。根据这个原则,从表 2 可以看出 NaCl 的投放量的二次项、光照时间的线性项和二次项对响应值的影响都比较大,而各项的互作项影响都比较小。

表 2 抑菌圈响应值结果

Table 2 The scheme and results of response surface tests

验证序号 Run	A	B	C	Y 抑菌圈直径 Diameter of inhibition (mm)
1	1	0	1	26.5 ± 0.0880
2	-1	0	1	24.3 ± 0.1211
3	0	1	1	23.3 ± 0.0516
4	0	0	0	27.8 ± 0.0408
5	0	0	0	28.5 ± 0.0516
6	0	0	-1	22.5 ± 0.0548
7	0	0	0	28.0 ± 0.0816
8	-1	1	0	26.5 ± 0.0983
9	0	-1	1	21.3 ± 0.1211
10	0	1	-1	25.0 ± 0.1414
11	0	0	0	29.0 ± 0.0516
12	0	0	0	29.5 ± 0.1033
13	-1	0	-1	26.5 ± 0.1225
14	-1	-1	0	24.0 ± 0.1095
15	1	1	0	25.5 ± 0.1033
16	1	-1	0	24.5 ± 0.0752
17	1	0	-1	26.5 ± 0.0548

表 3 响应面回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance of the response surface regression equation

方差来源 Source	平方和 Sum of Squares	自由度 df	均方 Mean Square	F 值 F Value	P 值 P Value
模型 Model	0.8400	9	0.0940	21.340	0.0003
A	0.0036	1	0.0036	0.8200	0.3942

方差来源 Source	平方和 Sum of Squares	自由度 df	均方 Mean Square	F 值 F Value	P 值 P Value
B	0.0800	1	0.0800	18.240	0.0037
C	0.0330	1	0.0330	7.4100	0.0296
AB	0.0056	1	0.0056	1.2800	0.2947
AC	0.0120	1	0.0012	2.7600	0.1406
BC	0.0063	1	0.0063	0.1400	0.7170
A ²	0.0027	1	0.0027	0.6200	0.4554
B ²	0.4300	1	0.4300	97.100	<0.0001
C ²	0.2300	1	0.2300	53.250	0.0002
残差 Residual	0.0310	7	0.0044		
失拟项 Lack of Fit	0.0110	3	0.0037	0.7400	0.5802
纯误差 Pure Error	0.0200	4	0.049		
总离差 Cor Total	0.8700	16			

3.2.2 抑菌圈响应面结果与讨论

在方差分析的基础之上,利用国际通用统计软件 Design Expert8.06 绘制变量之间对抑菌效果的响应面和等高线图,从响应面分析图上可形象的看出最佳参数及各参数之间的相互作用。各因素之间的相互作用如图 4~6 所示,从响应面的图中直观的看出各因素之间的相互作用对金黄色葡萄球菌抑菌圈的影

响,响应值的大小则表现在响应面曲线的陡峭程度上,侯学敏^[17]等人研究结果显示曲线越陡峭,说明该因素对抑菌圈的影响越大。由响应面图可知,AgNO₃ 与多糖体积比(A)、NaCl 体积(B)、照射时间(C)之间存在显著性差异,其中时间对纳米银抑菌性的影响最为显著,NaCl 体积对抑菌圈的影响次之,这也与响应面回归方程方差分析的结果相符。

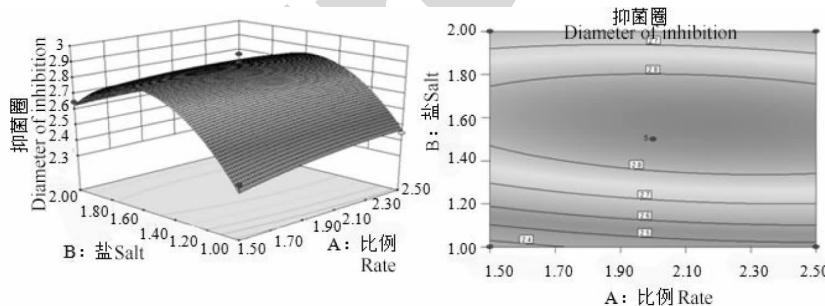


图 4 $Y = f(A, B)$ 的响应面与等值线

Fig. 4 Response surface plot and contour plot of $D = f(A, B)$

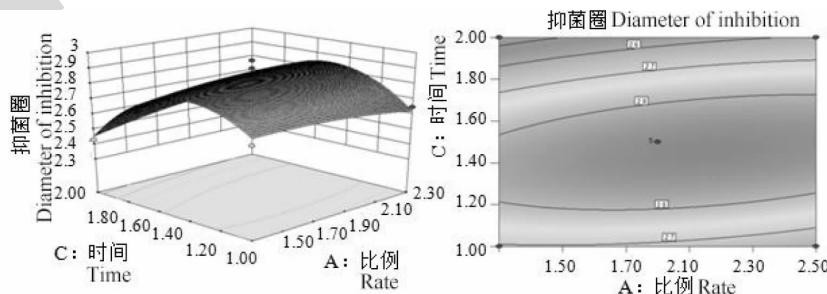
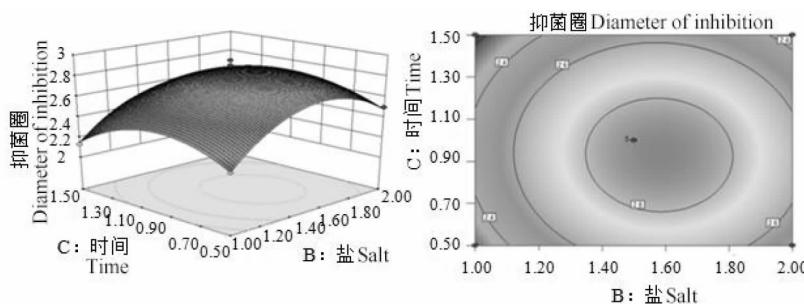


图 5 $Y = f(A, C)$ 的响应面与等值线

Fig. 5 Response surface plot and contour plot of $D = f(A, C)$

图 6 $Y = f(B, C)$ 的响应面与等值线Fig. 6 Response surface plot and contour plot of $D = f(B, C)$

4 结论

应用响应面法制备纳米银粒子在国内外鲜有人报道,而响应面实验的设计相对与正交实验的设计更加灵活和全面,能反应出各个因素之间的互作关系。在实验范围内,通过对回归方程的一阶偏导求解可以得出 AgNPs 制备工艺的最佳条件,当 AgNO_3 与多糖体积比 2.09:1 (mL/mL)、 NaCl 体积为 1.57 mL、紫外照射时间为 0.94 h, 响应值抑菌圈的理论值达到最大,为 2.87 cm。根据仪器条件和实际情况进行验证实验,将上述条件调整为 AgNO_3 与多糖体积比 2:1 (mL/mL)、 NaCl 体积为 1.5 mL、紫外照射时间为 1 h,为了验证理论值的可靠性,按照最佳条件进行验证实验,实验重复三次,测得抑菌圈直径大小为 2.79 ± 0.01 cm,理论值与实验值基本吻合,说明利用响应面优化法得到的 AgNPs 制备工艺可靠。

本实验用余甘多糖绿色合成的纳米银粒子对金黄色葡萄球菌有很强的抑菌性,从而通过响应面法优化出制备纳米银的最佳条件。但是由于每个菌种活性不同,因此在之后纳米银抑菌性的实验中,可以采用多个菌种来进行,使其抑菌性更有说服力。在之后的研究中,可以进一步研究纳米银粒子的抑菌机理,为纳米银产品的抑菌性提供理论依据。

参考文献

- Huang H, Yang X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. *Carbohydr Res*, 2004, 339:2627-2631.
- Zhang F, Wu J, Zhang H. Construction of hyaluronan-silver nanoparticle-hemoglobin multilayer composite film and investigations on its electrocatalytic properties. *J Solid State Electrochem*, 2012, 16:1683-1692.
- Shi C(石川), Cheng MJ(程漠杰), Qu ZP(曲振平), et al. Study on selective catalytic reduction of NO by nano silver catalyst. *J Fudan Univ, Nat Sci*(复旦学报, 自科版), 2002, 41(3):269-273.
- Zhang Y(张燕), Wang QB(王强斌). Advances in biomedical applications of silver nanoparticles. *Acta Biophys Sin*(生物物理学报), 2010, 26:673-679.
- Fan X(樊新), Huang KL(黄可龙), Liu SQ(刘素琴), et al. Preparation and characterization of silver nanoparticles by chemical reduction method. *J Funct Mater*(功能材料), 2007, 38:996-999.
- Wang XY(王小叶), Liu JG(刘建国), Cao Y(曹宇), et al. Preparation of nano silver particles and nano silver conductive paste by chemical reduction method. *Precious Metals*, 2011, 32(2):14-19.
- Elsheikh MA, Elrafie SM, Abdelhalim ES, et al. Green synthesis of hydroxyethylcellulose-stabilized silver nanoparticles. *J Polymers*, 2013, 2013;1-11.
- Li YY(李永裕). Study on isolation, purification, structure and antioxidant activity of polysaccharides from *Phylanthus emblica*. Fuzhou: Fujian Agriculture And Forestry University(福建农林大学), MSc. 2010.
- Liu XL(刘晓丽), Zhao MM(赵谋明), Yang B(杨宝), et al. Study on the active component content and antioxidant activity of *Phylanthus emblica* L. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2007, 19:188-192.
- Gao MJ(高敏杰), Wang ZQ(王志强), Sun L(孙磊), et al. Preparation and antibacterial properties of chitosan modified silver nanoparticles. *J Funct Mater*(功能材料), 2012, 43:1038-1041.
- Song YH(宋永辉), Liang GY(梁工英), Zhang QL(张秋利), et al. Study on preparation of spherical nano silver powder. *Rare Metal Mater Eng*(稀有金属材料与工程), 2007, 36:709-712.
- Zhu JJ, Liu S, Palchik O, et al. Shape-controlled synthesis of silver nanoparticles by pulse sonoelectrochemical methods. *Langmuir*, 2000, 16:231-236.

(下转第 1384 页)