



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103406548 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201310343154. 6

(22) 申请日 2013. 08. 08

(73) 专利权人 广西大学

地址 530004 广西壮族自治区南宁市大学路
100 号

(72) 发明人 冯家勋 杜良伟 曾素梅 徐秋红

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

B22F 9/24(2006. 01)

A01N 59/16(2006. 01)

A01P 1/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102669179A 2012. 09. 19,

CN 102697806 A, 2012. 10. 03,

CN 102935521 A, 2013. 02. 20,

CN 102935521A 2013. 02. 20,

CN 102941354 A, 2013. 02. 27,

CN 103042227 A, 2013. 04. 17,

CN 103172775 A, 2013. 06. 26,

CN 103212720 A, 2013. 07. 24,

EP 2281646 A1, 2011. 02. 09,

KR 20100115201 A, 2010. 10. 27,

WO 2011/041458A1 2011. 04. 07,

审查员 常磊

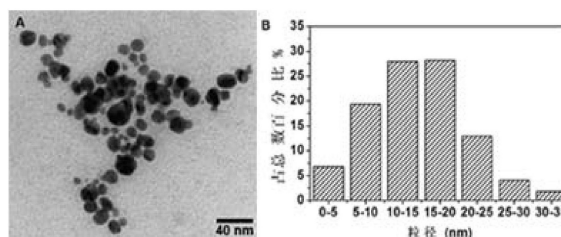
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

银纳米粒子及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种银纳米粒子及其制备方法与应用。该方法,包括如下步骤:将木薯粉糊化液用水稀释后,与银盐的水溶液进行反应,反应完毕得到含有所述银纳米粒子的溶液。该方法条件温和,工艺简单,环境友好,有利于实现银纳米粒子的工业化生产。本发明的实验证明,所得银纳米粒子溶液性质稳定,且该银纳米粒子对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有良好的抑制效果,在抑制病原细菌上具有应用潜力。



1. 一种制备银纳米粒子的方法,包括如下步骤:将木薯粉的糊化液用水稀释后,与银盐的水溶液进行反应,反应完毕得到含有所述银纳米粒子的溶液;

所述木薯粉的糊化液为按照如下方法制备而得:将木薯粉与水混匀糊化后,离心取上层清液而得;

制备所述木薯粉的糊化液步骤中,木薯粉与水的用量比为 5-45g:100mL;

木薯粉的目数为 20-300 目;

糊化步骤中,温度为 50-100℃;时间为 5 分钟-24 小时;

反应步骤中,温度为 15-37℃;

时间为 1-6 小时。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:

制备所述木薯粉的糊化液步骤中,木薯粉与水的用量比为 3g:10mL;

木薯粉的目数为 80 目;

糊化步骤中,温度为 85℃;时间为 1 小时。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述银盐选自硝酸银、二氨合银和硫代硫酸银中的至少一种;

所述银盐在反应体系的浓度为 0.1-5mmol/L;

稀释步骤中,稀释的倍数为 2-80 倍;

稀释后的木薯粉的糊化液与银盐的用量比为 100mL: 10^{-5} - 5×10^{-4} mol。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于:所述银盐在反应体系的浓度为 1mmol/L;

所述稀释步骤中,稀释的倍数为 40 倍;

稀释后的木薯粉的糊化液与银盐的用量比为 10mL: 10^{-5} mol。

5. 根据权利要求 1-4 任一所述的方法,其特征在于:

所述反应步骤中,温度为 25℃;

时间为 2 小时。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述银纳米粒子的平均粒径为 10-30nm;

所述银纳米粒子的表观形态为球形。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其特征在于:所述银纳米粒子的平均粒径为 11-15nm。

银纳米粒子及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米生物技术领域,尤其涉及一种银纳米粒子及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 纳米粒子因具有独特的物化性质而受到越来越多的关注,其在光学、电学、磁学、催化、能源、环境和生物医学等领域有着广泛的应用。金属纳米粒子的有效合成对其发展和应用具有重要的意义,目前的合成方法常分为物理法、化学法和生物法。物理法是应用各种分散技术将固体块状金属单质直接转变为纳米粒子,此法所得的纳米材料纯度高、活性大,但设备要求较高,能源消耗大。化学法操作简单,分散性好,尺寸可控性高,但此法涉及有毒试剂的使用或危险次级产物的产生,且反应过程易引入杂质而得不到高纯度产物。生物法是利用生物活性分子还原金属离子而得到纳米级的金属单质粒子。与物理法和化学法相比,生物法是一种清洁、无毒、环保、绿色的纳米合成方法 (Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. 2010. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine NBM*, 6:257 - 262)。

[0003] 目前,生物法合成纳米粒子用到的生物主要有病毒、细菌、真菌和植物等。微生物被认为是有效的环境友好型纳米工厂,细菌是最早也是最多次被用于合成纳米粒子的生物。但是,微生物合成法存在着一些缺点,如菌株筛选过程复杂、微生物培养周期长和易染菌等。相比而言,植物是较为理想的合成原料,植物合成法也更有利于实现纳米粒子的大规模生产 (Iravani S. 2011. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem*, 13:2638 - 2650)。

[0004] 某些植物可在活体内合成金属纳米粒子。Gardea-Torresdey 等用紫花苜蓿合成了金纳米粒子,这是在植物活体内合成纳米粒子的首次报道 (Gardea-Torresdey JL, Parsons JG, Gomez E, Peralta-Videa J, Troiani HE, Santiago P, Yacaman MJ. 2002. Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. *Nano Lett*, 2:397 - 401)。然而,目前发现能在活体内合成纳米粒子的植物种类还很少,而且从植物体内分离出纳米粒子的工序复杂,实际应用价值不高。

[0005] 相继证明植物提取物可以被用来合成纳米粒子,如天竺葵叶子提取液、麻疯树籽提取液、肉桂树皮提取物、番木瓜愈伤组织提取物、香蕉皮提取物等 (Iravani S. 2011. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem*, 13:2638 - 2650)。Kumar 等用植物衍生产物即来自于工业生产线上的甜高粱糖浆在室温下合成了纳米粒子 (Kumar CG, Mamidyala SK, Reddy MN, Reddy BVS. 2012. Silver glyconanoparticles functionalized with sugars of sweet sorghum syrup as an antimicrobial agent. *ProcBiochem*, 47:1488 - 1495)。近年来的这些用植物生物质合成纳米粒子的报道,说明了植物生物质在纳米材料合成上的巨大潜力,但适合于大规模合成的报道还很少。

发明内容

- [0006] 本发明的目的是提供一种银纳米粒子及其制备方法与应用。
- [0007] 本发明提供的制备银纳米粒子的方法,包括如下步骤:将木薯粉的糊化液用水稀释后,与银盐的水溶液进行反应,反应完毕得到含有所述银纳米粒子的溶液。
- [0008] 上述方法中,所述木薯粉的糊化液可为自制的木薯粉糊化液或用取自工业生产线上木薯粉糊化后的悬浮液制备而得;
- [0009] 其中,自制的木薯粉糊化液为按照如下方法制备而得:将木薯粉与水混匀糊化后,离心取上层清液而得。
- [0010] 所述木薯粉与水的用量比为 5-45g:100mL,具体为 3g:10mL。
- [0011] 所述木薯粉的目数为 20-300 目,具体为 80 目。
- [0012] 所述糊化步骤中,温度为 50-100℃,具体为 85℃,时间为 5 分钟-24 小时,具体为 1 小时。
- [0013] 所述银盐选自硝酸银、二氨合银和硫代硫酸银中的至少一种;
- [0014] 所述银盐在反应体系的终浓度为 0.1-5mmol/L,具体为 1mmol/L;
- [0015] 所述稀释步骤中,稀释的倍数为 2-80 倍,具体为 40 倍;
- [0016] 稀释后的木薯粉的糊化液与所述银盐的用量比为 100mL: 10^{-5} - 5×10^{-4} mol,具体为 10mL: 10^{-5} mol。
- [0017] 所述反应步骤中,温度为 15-37℃,具体为 25℃;
- [0018] 时间为 1-6 小时,具体为 2 小时。
- [0019] 另外,按照上述方法制备得到的银纳米粒子或含有银纳米粒子的溶液,也属于本发明范围。上述含有银纳米粒子的溶液呈现银纳米粒子的特征色—黄褐色,在 440nm 左右有等离子共振 (surface Plasmon resonance, SPR) 峰。其中,所述银纳米粒子的平均粒径为 10-30nm,具体为 11-15nm;所述银纳米粒子的表观形态为球形。
- [0020] 该含有银纳米粒子的溶液在室温下,避光保存 4-8 周无明显沉淀,即合成的银纳米粒子溶液是比较稳定的。
- [0021] 上述本发明提供的银纳米粒子在抑制病原细菌中的应用及含有该银纳米粒子的消毒剂,也属于本发明的保护范围。其中,所述病原细菌为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中的至少一种。
- [0022] 本发明提供的合成银纳米粒子的方法,条件温和,工艺简单,环境友好,有利于实现银纳米粒子的工业化生产。本发明的实验证明,所得银纳米粒子溶液性质稳定,且该银纳米粒子对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有良好的抑制效果,在抑制病原细菌上具有应用潜力。

附图说明

[0023] 图 1A 为银纳米粒子合成反应过程中反应液的紫外-可见 (UV-Vis) 吸收光谱,其中曲线 a 为稀释液的吸收光谱,曲线 b-r 为反应液分别反应 2、4、7、10、15、20……130min (反应 20min 后间隔 10min) 时的吸收光谱。图 1B 为反应液的最大吸收峰值随反应时间的变化图。

[0024] 图 2 为木薯粉糊化液的稀释液与 1mmol/L 的 AgNO_3 反应 2h 后合成的银纳米粒子的 X 射线衍射 (XRD) 分析图谱。

[0025] 图 3 为木薯粉糊化液的稀释液与 1mmol/L 的 AgNO_3 反应 2h 后合成的银纳米粒子的 X 射线能量散射 (EDX) 分析图谱。

[0026] 图 4 为木薯粉糊化液的稀释液与 1mmol/L 的 AgNO_3 反应 2h 后合成的银纳米粒子的透射电镜 (TEM) 图。其中,图 4A 为在透射电镜下观察到的银纳米粒子颗粒形貌图;图 4B 为银纳米粒子粒度分布统计分析图。

[0027] 图 5 为合成的银纳米粒子对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌性能的微量肉汤稀释法的分析结果。在 96 孔微孔板上, A 列为 H_2O +MH 培养基;B/F 列为 2 倍系列稀释的银纳米粒子溶液+金黄色葡萄球菌/大肠杆菌+MH 培养基;C/G 列为 2 倍系列稀释的木薯粉糊化液的稀释液+金黄色葡萄球菌/大肠杆菌+MH 培养基;D/H 列为 H_2O +金黄色葡萄球菌/大肠杆菌+MH 培养基;E 列为 2 倍系列稀释的氨苄青霉素溶液+大肠杆菌+MH 培养基。培养一定时间后,各孔中加入刃天青溶液后再继续培养,用以指示菌体的生长情况。

具体实施方式

[0028] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0029] 下述实施例中所用到的材料包括:

[0030] AgNO_3 购自上海化学试剂有限公司;

[0031] 大肠杆菌(编号:DH5 α)和金黄色葡萄球菌(缩写:NICBPB,编号:26003)均购自中国药品生物制品检定所;

[0032] 氨苄青霉素购自北京索莱宝科技有限公司;

[0033] 刃天青购自上海如吉生物科技发展有限公司;

[0034] 其它所有试剂均属分析纯。

[0035] 实施例 1、用木薯粉糊化液稀释液绿色合成银纳米粒子

[0036] 将木薯粉的糊化液用去离子水稀释 40 倍,得到的淡黄色的稀释液后,取该稀释液 10mL 于指形瓶中,边搅拌边滴入 100 μL 的 0.1mol/L 的 AgNO_3 溶液使得 AgNO_3 终浓度为 1mmol/L,温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,反应 2h 后淡黄色的稀释液呈现稳定的黄褐色,该颜色是银纳米粒子的特征色,表明了反应液中银纳米粒子的形成,即在反应液中得到了本发明提供的银纳米粒子。

[0037] 该实施例中,所用木薯粉的糊化液是按照如下方法制备而得:将目数为 80 目的木薯粉与水以 3g:10mL 的比例混匀,于 85 $^{\circ}\text{C}$ 糊化 1 小时后,离心取上层清液而得。

[0038] 实施例 2、合成的银纳米粒子的表征

[0039] 按照实施例 1 合成银纳米粒子的步骤,在反应过程中,分别于反应的第 2、4、7、10、15、20……130min(反应 20min 后间隔 10min) 时取出 500 μL 反应液置于 1cm 光程长度的石英比色皿中,用 UV-2102PCS 紫外可见分光光度计(上海龙尼柯仪器有限公司)进行 UV-Vis 分析,扫描波长范围为 250 - 900nm。

[0040] 结果如图 1A 所示。

[0041] 反应至 2min 时的吸收曲线 b 和稀释的木薯粉糊化液的吸收曲线 a 相比,在 430nm

波长处出现了银纳米粒子的特征吸收峰即表面等离子共振峰,说明了反应液中银纳米粒子的合成。随着反应时间从 4min 到 120min 的增加,溶液颜色不断加深,从曲线 c 到曲线 q 吸收峰的强度也增加,表明了溶液中生成的银纳米粒子数目在增加;同时,SPR 峰的最大吸收波长(λ_{\max})由 430nm 红移至 445nm,说明在溶液中银纳米粒子在持续地生长。反应至 120min 后,纳米溶液的颜色不再发生变化,同时吸收峰的强度也不再增加,120min 时的吸收曲线 q 与 130min 的吸收曲线 r 几乎重合在一起,表明银纳米粒子的合成已经完成。

[0042] 图 1B 是最大吸收波长处的吸光度随反应时间的变化图,在反应过程的前 20min 内,银纳米粒子的合成速度较快,吸光度随时间的增加几乎是呈直线上升的,接着反应速度变慢,曲线趋于平缓,到 120min 后,曲线到达平台,这表明合成反应已经完成,总反应时间是 2h。

[0043] 2、X 射线衍射(XRD)表征

[0044] 向实施例 1 所得含有银纳米粒子的溶液中加入等量的无水乙醇,室温下静置至银纳米粒子沉淀下来,弃去上清液,得到银纳米粒子后,再用去离子水将收集到的银纳米粒子清洗三次,自然晾干后进行 XRD 分析,所用 X 射线衍射仪的型号为 D/MAX2500V(日本理学株式会社)。

[0045] XRD 分析结果如图 2。

[0046] 由图 2 可看出,在 38.2° 、 44.0° 、 64.6° 和 76.9° 处,有四个明显的衍射峰,分别对应面心立方的银纳米晶的 (111)、(200)、(220) 和 (311) 晶面。此外,在 46.3° 位置的衍射峰有可能来自于样品中的有机杂质。由 XRD 表征结果可知,实施例 1 所得银纳米粒子的结构为晶体结构。取 (111) 衍射峰的半高峰宽,用 Scherrer 方程计算出银纳米晶体的尺寸是 11nm。

[0047] 3、X 射线能量色散表征

[0048] X 射线能量色散分析是在 Hitachi S-3400N 扫描电镜附带的能量色散 X 射线光谱仪(日本日立高新技术公司)上进行。测试所用的样品是将实施例 1 所得含有银纳米粒子的溶液滴在氧化铟锡(ITO)导电玻璃上自然晾干后进行 EDX 分析。

[0049] 所得结果如图 3。

[0050] 由此图谱可知,样品中主要存在 Ag、C、O、Si 四种元素。在约 3keV 处的强峰是金属 Ag 的特征吸收峰;C、O 两元素峰可能是来自于包裹在银纳米粒子表面的木薯粉糊化液的组分;而 Si 元素峰则来自于制样基底即 ITO 导电玻璃。

[0051] 4、透射电镜表征

[0052] TEM 表征的样品是将实施例 1 所得含有银纳米粒子的溶液滴到镀碳铜网上并自然晾干,在 Hitachi H-7650 透射电镜仪(日本日立高新技术公司)上进行分析,仪器加速电压为 80kV。

[0053] 所得结果如图 4A。

[0054] 在图上可清晰地看到许多黑色的颗粒即为银纳米粒子,其形貌大多为球形。

[0055] 图 4B 是统计了多张 TEM 图像上的银纳米粒子的直径得到的粒径分布图。

[0056] 由图可知,合成的银纳米粒子的粒径主要分布在 10 - 20nm 之间,其平均粒径为 15nm,与 XRD 分析的纳米粒子尺寸基本吻合。

[0057] 实施例 3、合成的银纳米粒子的稳定性

[0058] 将实施例 1 所得含有银纳米粒子的溶液分别避光与见光保存于实验室中,观察其稳定情况。

[0059] 对照:按照实施例 1 的步骤,仅在稀释步骤之后和滴入 100 μL 的 0.1mol/L 的 AgNO_3 溶液之前,添加如下步骤:将所得木薯粉的糊化液的稀释液用 Whatman1 号滤纸过滤一次;

[0060] 再将如上对照试验所得含有银纳米粒子的溶液避光保存。

[0061] 结果发现,用没有进行过滤处理的木薯粉糊化液合成的银纳米粒子溶液暴露在实验室内 3 天后便出现明显的聚集并沉淀至瓶底;而避光保存的溶液 4 个星期后无明显的聚集,仅有极少量的沉淀,说明光对木薯粉糊化液合成的银纳米粒子的稳定性具有重要的影响。所以,木薯粉糊化液合成的银纳米粒子溶液需避光保存。

[0062] 对于对照来说,由于过滤后的木薯粉糊化液黏性会明显降低,与 AgNO_3 反应能合成银纳米粒子,但该溶液在避光保存 2 天后便明显聚集,出现沉淀现象。由此推断过滤是去除了木薯粉糊化液中的部分组分,这样虽不影响银纳米粒子的合成,但会使银纳米粒子溶液不稳定,而银纳米粒子溶液的稳定性会影响到银纳米粒子的性质及其后的应用。

[0063] 实施例 4、合成的银纳米粒子对病原细菌抑制效果的检测

[0064] 本实施例中的受试菌株为革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) NICPBP26003。

[0065] 银纳米粒子对这两种细菌的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 通过微量肉汤稀释法、以刃天青为指示剂获得。

[0066] 具体操作如下:

[0067] 将大肠杆菌在 LA 固体培养基平板上培养 16h。其中 LA 培养基每升含有: NaCl 10.0g,胰蛋白胨 10.0g,酵母提取物 5.0g,琼脂 15.0g,自然 pH,经 121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30min 后使用。

[0068] 将金黄色葡萄球菌在 LA+1% 葡萄糖固体培养基平板上培养 24h。该培养基在每升 LA 培养基中加入 10.0g 葡萄糖。

[0069] 分别从平板上挑取金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的单菌落接种于 MH 肉汤培养基中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中分别培养 24h 和 5h,再用 MH 肉汤培养基将其稀释至初始接种浓度为 $1.5 \times 10^8 \text{CFU/mL}$,然后取 20 μL 的上述菌液加到 10mL 的 2 \times MH 肉汤培养基中,混匀后得到浓度为 $3 \times 10^5 \text{CFU/mL}$ 的菌液,待用。

[0070] 向微孔板上每个孔加入溶液的总容积为 100 μL ,其详细加样信息如下:A 列,先加 50 μL 无菌去离子水,再加 50 μL 的 2 \times MH 培养基,做为无菌对照;B/F 列,先用无菌去离子水 2 倍系列稀释银纳米粒子溶液,各取 25 μL 加到对应孔中,然后向各孔加入 25 μL 无菌去离子水和 50 μL 的上述 $3 \times 10^5 \text{CFU/mL}$ 的金黄色葡萄球菌 / 大肠杆菌菌液,此时每个孔中菌的浓度为 $1.5 \times 10^5 \text{CFU/mL}$;C/G 列,对木薯粉糊化液稀释液按上述方法进行 2 倍系列稀释,作为空白对照;E 列,加 2 倍系列稀释的氨苄青霉素溶液 (板上初始浓度是 128 $\mu\text{g/mL}$) 作为针对大肠杆菌的抗生素对照;D/H 列,加入 50 μL 无菌去离子水和 50 μL 上述 $3 \times 10^5 \text{CFU/mL}$ 的金黄色葡萄球菌 / 大肠杆菌菌液,做试剂空白。加样操作完成后,将微孔板盖上,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养。上述操作均在无菌条件下进行。

[0071] 当微孔板上的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别培养至 20h 和 24h 时,向对应各孔

加入 25 μ L 的 3.38mg/mL 的刃天青溶液。通过观察微孔板上各孔中刃天青颜色的变化便可获得 MIC 值。

[0072] 其中,所用 MH 肉汤培养基每升含有:牛肉浸出粉 2.0g,可溶性粉 1.5g,水解酪蛋白 17.5g, pH7.4。2×MH 肉汤培养基每升含有:牛肉浸出粉 4.0g,可溶性粉 3.0g,水解酪蛋白 35.0g, pH7.4。经 121℃ 灭菌 30min 后使用。

[0073] 由于蓝色的刃天青会被细菌生长产生的氧化还原酶还原而变成粉红色,因此在微孔板上加入刃天青后,蓝色的孔表明该孔没有细菌生长或细菌生长被抑制,粉红色则表明该孔有细菌生长。

[0074] 图 5 是抑菌性实验的结果图。其中,带数字“1”的孔的颜色均为粉红色,不带数字的孔的颜色均为蓝色。

[0075] 其中,无菌对照(A列)无颜色变化;无药物对照(D/H列)和空白对照(C/G列)全变粉红色,这表明木薯粉糊化液对受试菌的生长无抑制作用;而加入了银纳米粒子的 B/F 列和氨苄青霉素的 E 列仅部分孔的颜色变成蓝色,说明这部分蓝色孔中的细菌的生长被抑制了。从上到下,即银纳米粒子和氨苄青霉素的浓度由高至低,有颜色变化的孔中的最高浓度值便是对受试菌的 MIC 值。

[0076] 由图 5 中得出的 MIC 值可知,氨苄青霉素对大肠杆菌的 MIC 值为 4 μ g/mL,此数值在美国临床与实验室标准化协会(The Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)的抗菌药物敏感性试验标准的相关数据范围内,说明所用试验方法可行;银纳米粒子对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的 MIC 值分别是 3.38 μ g/mL Ag 和 0.84 μ g/mL Ag,银纳米粒子对受试菌特别是对革兰氏阴性菌大肠杆菌有良好的抑菌效果,对革兰氏阴性菌大肠杆菌的抑制作用强于革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌,这可能是由于革兰氏阴性细菌与革兰氏阳性细菌细胞壁组成的差异所致。

[0077] 按照与上相同的步骤,将实施例 1 所用木薯粉的糊化液替换为广西中粮生物质能源有限公司工业生产线上获得的木薯粉糊化液,所得结果与上相同,不再赘述。

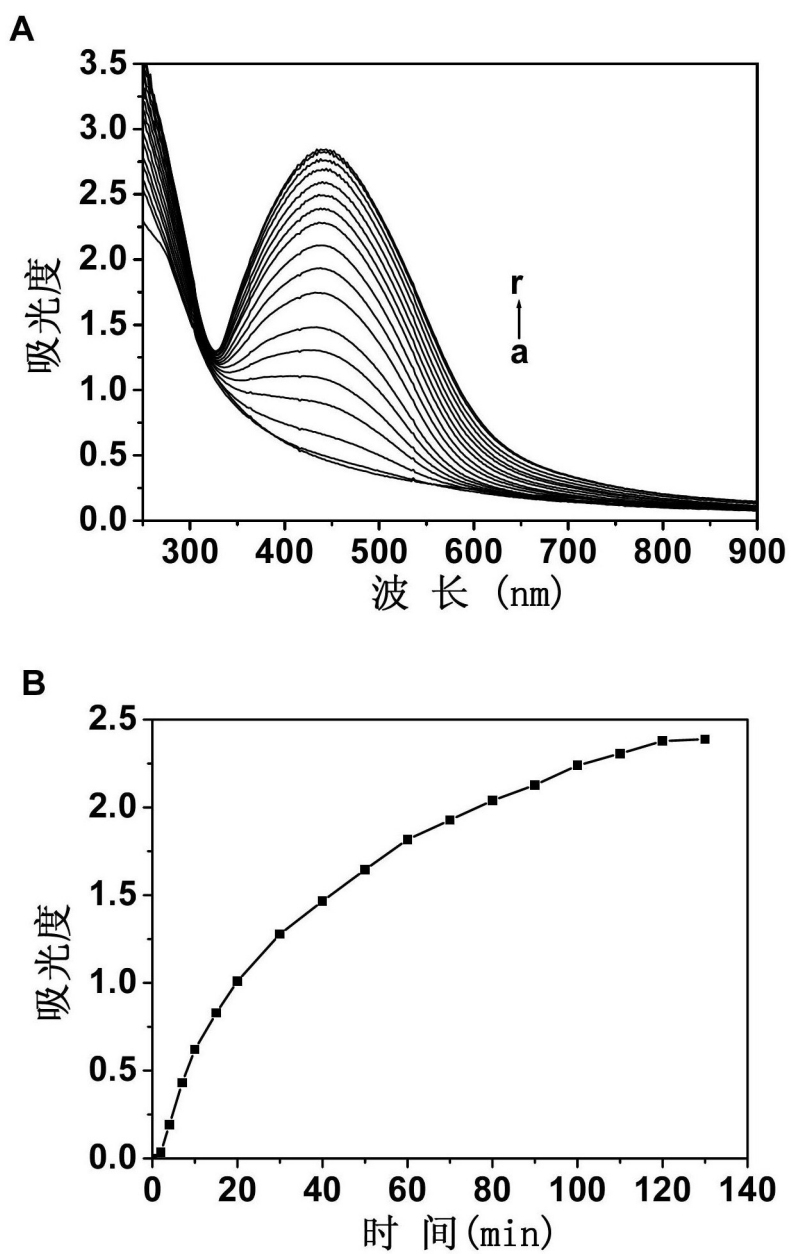


图 1

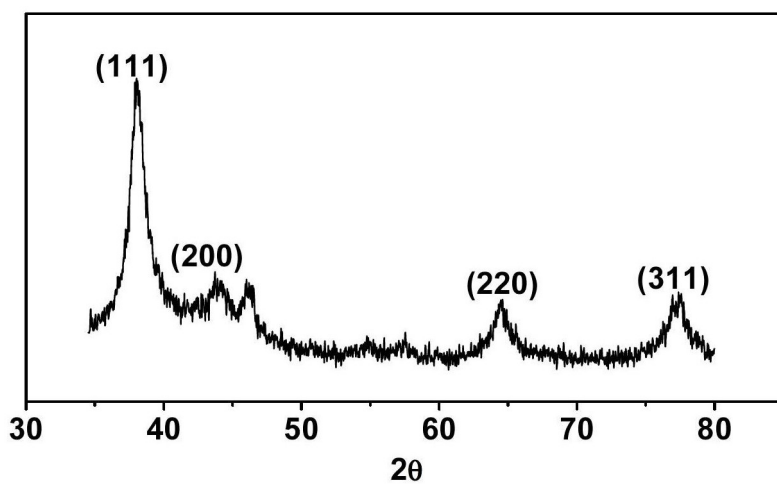


图 2

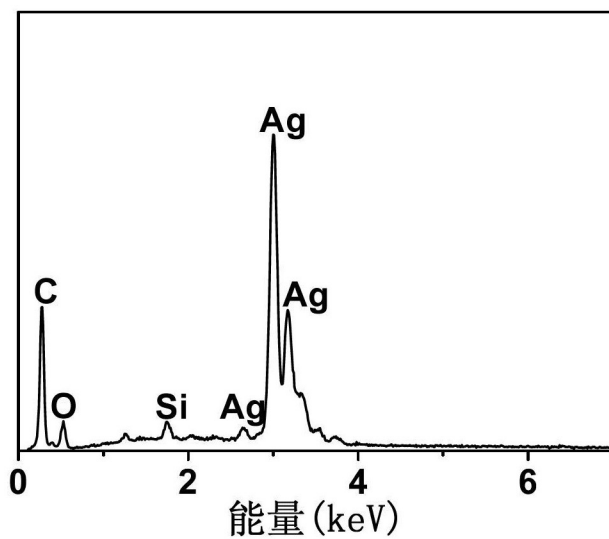


图 3

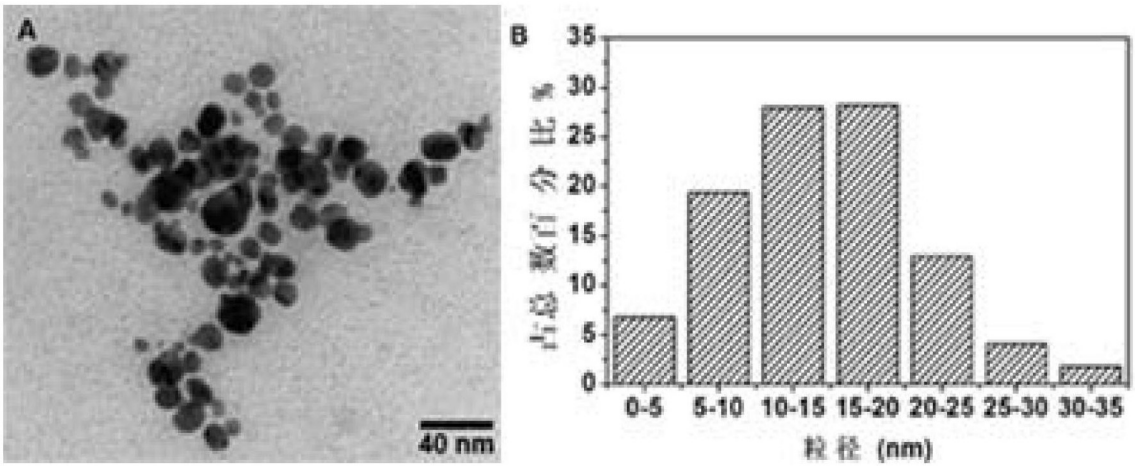


图 4

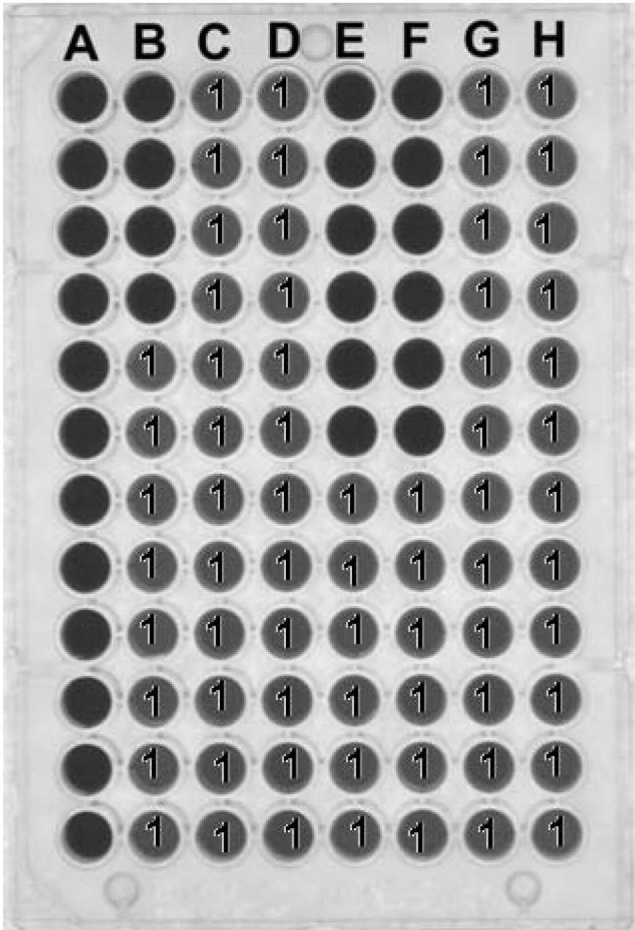


图 5