DOI:10.19893/j.cnki.ydyxb.2024-0246

百香果皮纳米银的体外抗氧化活性研究

周　晶,吕　楠,贾一博,田红英*

(延安大学延安医学院,陕西 延安 716000)

摘　要:目的　百香果皮纳米银表征及其体外抗氧化活性研究。**方法**　以百香果皮醇提取液为还原剂和稳定剂合成了银纳米粒子(silver nanoparticles,AgNP),使用紫外-可见光吸收光谱、X射线衍射、透射电子显微镜、傅立叶红外光谱,探究合成AgNP的结构与表征,通过1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine,DPPH)自由基清除实验、2,2′-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid),$ABTS^+$]自由基清除实验、铁离子还原能力实验三种方法探究AgNP的体外抗氧化能力。**结果**　AgNP呈面心立方结构,近似球形,粒径分布于4~26 nm之间,平均粒径为13.25±3.20 nm,在401 nm处具有特征吸收峰,并具有良好的稳定性。对DPPH自由基和$ABTS^+$自由基的清除率达到50%时,AgNP的浓度约为105 mg/L和75 mg/L,展现出较强的体外抗氧化能力。**结论**　利用百香果皮提取液成功合成了高稳定性小尺寸AgNP,并展现出优异的抗氧化性能。

关键词:纳米银;生物合成;抗氧化活性

中图分类号:R285.5　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1672-2639(2025)01-0019-06

In vitro antioxidant activity of silver nanoparticles synthesized from passion fruit peel

*ZHOU Jing, LV Nan, JIA Yibo, TIAN Hongying**

(Yan'an Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China)

Abstract: Objective To investigate the characterization of silver nanoparticles (AgNP) from passion fruit peel and their *in vitro* antioxidant activity. **Methods** AgNP were synthesized using alcohol extract of passion fruit peels serving as the reducing agent and stabilizer. The structure and characterization of the synthesized AgNP were investigated through ultraviolet-visible absorption spectroscopy, X-ray diffraction, transmission electron microscopy, and Fourier transform infrared spectroscopy. The *in vitro* antioxidant capacity of AgNP was examined by 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) free radical scavenging assay, 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)($ABTS^+$) free radical scavenging assay, and ferric ion reducing power assay. **Results** The AgNP exhibited a face-centered cubic structure, were approximately spherical, with a particle size distribution ranging from 4 to 26 nm and an average particle size of 13.25±3.20 nm. AgNP possess a characteristic absorption peak at 401 nm and exhibit excellent stability. The scavenging rate of DPPH radicals and $ABTS^+$ radicals reached 50% with the concentration of AgNP of about 105 mg/L and 75 mg/L, which showed a strong *in vitro* antioxidant capacity. **Conclusion** Highly stable small-sized AgNP were successafully synthesized using passion fruit peel extract and demonstated excellent antioxidant properties.

Key words: Sliver nanoparticles; Biosynthesis; Antioxidant activity

基金项目:省级大学生创新创业训练计划项目(S202110719108)

作者简介:周　晶(1999—),女,重庆渝北人,在读硕士研究生。研究方向:绿色合成纳米银及其抑菌活性研究。

* **通信作者:**田红英(1976—),女,陕西渭南人,硕士,副教授。研究方向:病原微生物与免疫研究。
E-mail: feifei19890621@163.com

近年来,金属纳米粒子(metal nanoparticles, MNP)因其独特的光学性能、表面效应、小尺寸效应以及优异的生物相容性而备受关注[1],其合成方法主要包括物理、化学和生物法。基于物理和化学方法合成纳米颗粒需要使用化学还原剂、高温和真空条件,价格昂贵且易造成环境污染[2]。与之相比,生物合成法呈现出无毒、稳定性强、成本效益高以及环境友好等诸多优点,其核心原理是利用细菌、真菌、藻类和植物所含有的生物活性成分作为原料还原生成金属纳米粒子[3]。尤其是植物富含各种生物活性成分,例如酚类化合物、维生素、还原糖和萜类化合物等,这些物质不仅能够充当合成纳米银(AgNP)的还原剂,还能作为封端剂和稳定剂提高纳米银的稳定性[4]。百香果以其馥郁的香气与丰富的营养而备受人们青睐,我国百香果年产量高达百万吨,百香果鲜果皮约占整果质量的50%[5],富含黄酮、黄酮醇、花青素和黄烷-3-醇等多酚类化合物[6]。使用百香果皮作为纳米银合成的原料,不仅可降低成本,让资源得以循环利用,同时避免化学污染,实现经济效益与生态效益的双赢。

本研究以百香果皮提取物为还原剂和稳定剂,硫酸银作为前驱体制备AgNP,通过紫外-可见光吸收光谱(ultraviolet-visible spectroscopy, UV-Vis)、X射线衍射(X-ray crystal diffraction, XRD)、透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)和傅立叶红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)等手段对合成的AgNP进行表征分析,通过1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)自由基清除实验、2,2′-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐[2, 2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), $ABTS^{+}$]自由基清除实验和铁离子还原能力(ferric ion reducing antioxidant power, FRAP)实验3种方法分析百香果皮纳米银的体外抗氧化能力。

1　试验部分

1.1　药品和仪器

药品:紫皮百香果(市售),硫酸银(天津市天感化工技术),氢氧化钠、无水乙醇、七水合硫酸亚铁、三水合乙酸钠(国药集团化学试剂有限公司),冰乙酸(天津市致远化学试剂有限公司),L-抗坏血酸、ABTS(上海士锋生物科技有限公司),DPPH、氯化铁、过硫酸钾、2,4,6-三吡啶基三嗪(福州飞净生物科技有限公司)。

仪器:CQ-250超声波清洗机(上海跃进医用光学器械厂),Centrifuge 5804 R高速台式离心机(德国艾本德),UV-5100紫外-可见光分光光度计(上海元析仪器有限公司),SpectraMax 190多功能酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司),Nicolet 5700傅立叶红外光谱仪(美国赛默飞公司),JEM-2100 F高分辨场发射透射电子显微镜(日本电子),X射线衍射仪Rigaku Ultima IV(日本理学)。

1.2　百香果皮提取物生物合成AgNP

取新鲜百香果皮,使用纯水清洗去除其表面灰尘及其他杂质。将洗净的百香果皮置于60 ℃电热鼓风干燥箱中干燥12 h,将完全干燥的百香果皮取出粉碎,过40目筛。精准称取1.0 g百香果皮粉末于锥形瓶中,加入100 mL 70%乙醇溶液,置于超声波清洗仪中超声30 min,静置10 min后取孔径0.22 μm的PTFE膜过滤2次,得到淡黄色百香果皮提取液,于4 ℃冷藏备用。

取百香果皮提取液40 μL加入0.1 mmol/L Ag_2SO_4溶液中,使用NaOH溶液将pH调整至12,总体系10 mL,80 ℃加热10 min。将反应完成的纳米银溶液12 000 rpm离心并洗涤3次,冷冻干燥以备用。

1.3　AgNP结构与表征

1.3.1　UV-Vis　利用UV-Vis检测AgNP溶液的光学性质,在300~600 nm波长范围进行扫描,分辨率为1 nm。将样品4 ℃静置保存,分别于30 d、90 d各扫描1次,观察AgNP的稳定性。

1.3.2　X射线衍射(XRD)　将AgNP干燥研磨后,使用X射线衍射仪对AgNP粒子的晶型结构进行分析,扫描范围5~80°,10°/min。

1.3.3　透射电镜(TEM)　将超声分散好的AgNP滴定在超薄碳膜铜网上,室温干燥后使用透射电子显微镜对纳米颗粒的大小和形貌进行观察,加速电压200 kV。

1.3.4　傅立叶红外光谱(FTIR)　将制备好的AgNP经干燥研磨后,使用傅立叶红外光谱仪对AgNP进行分析,采用ATR法,扫描范围500~4 000 cm^{-1}。

1.4　体外抗氧化实验

1.4.1　DPPH自由基清除实验　参考张澳环等[7]的方法并适当修改,Vc溶液为阳性对照,取100 μL不同浓度的AgNP溶液,加入900 μL DPPH溶液

(0.2 mmol/L),混合均匀后,避光反应30 min,测量在波长517 nm处吸光值A_1;同时测定无水乙醇和DPPH混合液的吸光值A_0;乙醇和不同浓度样品液混合液的吸光值A_2。

$$清除率 = 1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

1.4.2 $ABTS^+$自由基清除实验 取7.4 mmol/L ABTS储存液和2.6 mmol/L过硫酸钾储存液各0.2 mL并充分混合,反应12 h后使用超纯水稀释,使$ABTS^+$工作液在波长728 nm处吸光度约为0.7±0.02。Vc溶液为阳性对照,取100 μL不同浓度的AgNP溶液,加入900 μL $ABTS^+$工作液,混合均匀后,避光反应6 min,测量波长728 nm处吸光值A_1;同时测定水和$ABTS^+$混合液的吸光值A_0;水和不同浓度样品液的吸光值A_2,清除率公式同公式(1)。

1.4.3 铁离子还原能力实验 配制0.3 mol/L pH=3.6的醋酸-醋酸钠缓冲溶液,与20 mmol/L $FeCl_3$溶液、10 mmol/L的2,4,6-三吡啶基三嗪溶液以10∶1∶1的比例混合制备FRAP工作液。取100 μL 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L $FeSO_4$溶液加入900 μL FRAP工作液,37 ℃避光反应5 min后于593 nm处测定吸光度,绘制标准曲线。以同样方式测量不同浓度AgNP吸光度A_1,Vc溶液为阳性对照,同时测定水和FRAP工作液混合液的吸光值A_0;不同浓度样品液的吸光值A_2。样品抗氧化活性以达到相同吸光度所需$FeSO_4$的毫摩尔数(FPAP值)表示。

1.5 统计学方法

通过SPSS26.0软件进行统计学分析;使用Origin 2021软件进行绘图,所有实验均重复3次。

2 结果

2.1 AgNP的表征分析

2.1.1 UV-Vis表征结果 如图1所示,反应完成后,溶液由无色变为金黄色。对制备好的AgNP溶液进行UV-Vis全波长连续光谱扫描,光谱如图2所示,AgNP在401 nm左右呈现显著的特征吸收峰,且百香果皮提取液并无特征吸收峰,由此可验证AgNP的生成。除此之外,与刚生成的AgNP的紫外-可见光吸收峰相比,放置30 d和90 d后的AgNP最大吸收峰值降低且光谱发生轻微红移,表明纳米粒子的含量降低以及粒径变大,可能是由部分银纳米粒子团聚导致的,但这种变化并不明显,表明百香果皮提取物合成的AgNP具有良好的长期稳定性。

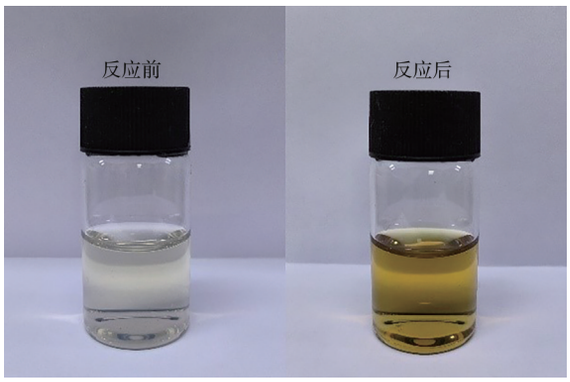

图1 AgNP的颜色变化

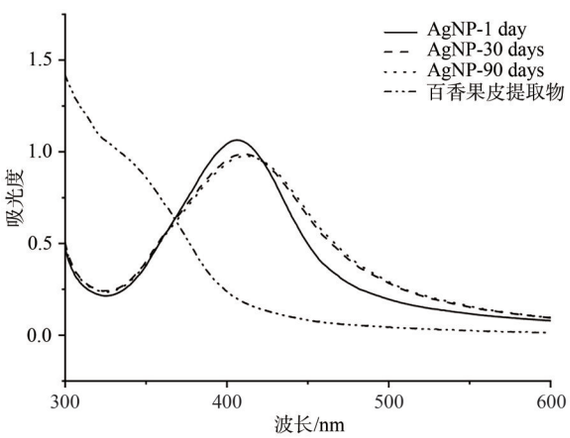

图2 百香果皮提取物合成AgNP UV-Vis

2.1.2 X射线衍射表征 通过XRD对合成的AgNP的晶形结构进行表征,XRD图谱如图3所示,制备的AgNP在38.20°、44.44°、64.50°和77.50°4个位置产生明显衍射峰,依次与标准银晶态(111)、(200)、(220)、(311)和(222)的晶面相对应(PDF#04-0783),表明合成的AgNP具有面心立方结构。在2θ角9.16°、18.18°、22.38°、27.96°、29.12°、32.28°、33.92°、34.72°、35.84°、36.82°、40.04°、41.40°(标记*)观察到相对应与天然碱(Trona)的(200)、(400)、(-402)、(-211)、(310)、(-312)、(411)、(-204)、(004)、(800)、(213)、(710)晶面相对应(PDF#011-0643),其主要成分是碳酸钠和碳酸氢钠,推测可能是溶液中的NaOH与CO_2发生反应而生成。

2.1.3 透射电镜表征 利用TEM进一步分析了AgNP的形貌与粒径,如图4所示,银纳米粒子近似球形,分散均匀,选取420个粒子进行统计计算,银纳米颗粒粒径分布于4~26 nm之间,基本呈正态分布,平均粒径为13.25±3.20 nm,粒径分布较为集中,有少量粒径较大的银纳米颗粒可能是反应过程中发生团聚造成的。

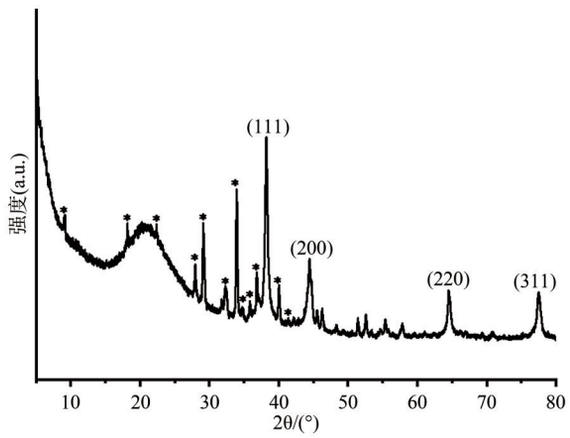

图 3　AgNP 的 XRD 图谱

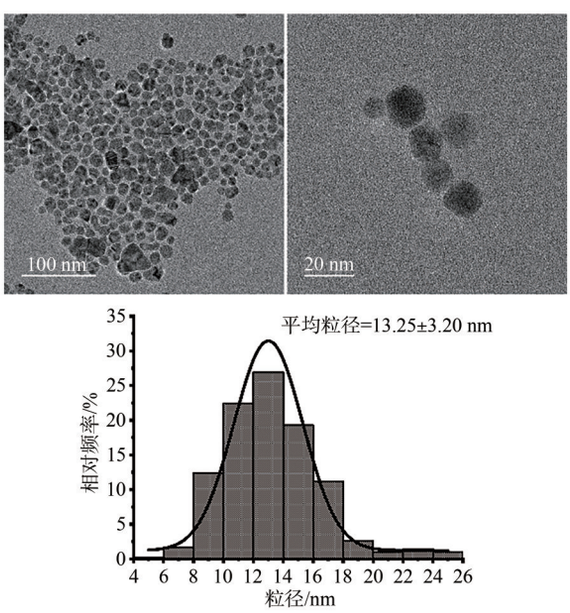

图 4　AgNP 的 TEM 表征与粒径分布图

2.1.4　傅立叶红外光谱表征　通过红外光谱图分析 AgNP 表面的官能团，如图 5 所示，AgNP 在 1 433 cm^{-1}、858.97 cm^{-1}、585.26 cm^{-1}有 3 个吸收峰，1 433.33 cm^{-1}处吸收峰可归因于芳香环的伸缩振动和=C-O-C 类黄酮基团，858.97 cm^{-1}处吸收峰源于烯烃和芳香烃中平面外的 C-H 弯曲振动，585.26 cm^{-1}处吸收峰表示 Ag-O 之间的拉伸。表明百香果皮提取液中含有的类黄酮、酚类等多种生物活性物质促进 AgNP 的合成，并作为稳定剂覆盖在 AgNP 的表面。

2.2　抗氧化实验

2.2.1　DPPH 自由基清除实验　AgNP 对 DPPH 自由基清除率随着浓度的升高而不断增大，样品浓度越高，清除效果越好。如图 6 所示，当样品浓度为 25 mg/L 时，Vc 对 DPPH 自由基的清除率达到 94.71%，此时 AgNP 对 DPPH 的清除率仅 1.22%，但是当 AgNP 浓度高于 75 mg/L 后，对 DPPH 的清除能力大幅度上升，清除率为 50% 时，AgNP 的浓度约为 105 mg/L，当 AgNP 浓度为 125 mg/L 时，清除率达到 76.96%，由此可见 AgNP 具有优秀的体外抗氧化能力。

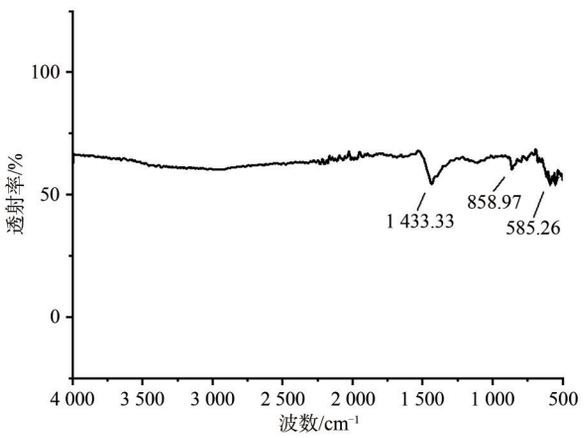

图 5　AgNP 的红外光谱图

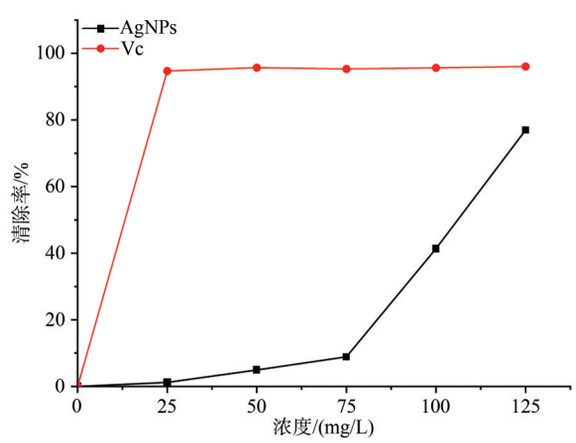

图 6　AgNP 对 DPPH 自由基清除作用

2.2.2　$ABTS^+$自由基清除实验　AgNP 对 $ABTS^+$自由基的清除能力具有明显的用量依赖性，如图 7 所示，AgNP 的浓度与 $ABTS^+$自由基清除率基本呈线性分布，随着 AgNP 浓度的上升，$ABTS^+$自由基清除率也随之上升，当 AgNP 浓度为 75 mg/L 时，对 $ABTS^+$自由基的清除率达到 50.73%，当 AgNP 浓度达到 125 mg/L 时，清除率高达 93.65%，表现出很强的体外抗氧化能力。

2.2.3　铁离子还原能力实验　AgNP 对铁离子的还原能力如图 8 所示，随着 AgNP 浓度的提高，其总抗氧化能力也随之升高。当 Vc 浓度为 25 mg/L 时，其总抗氧化能力为 1.38 个 FRAP 值，而此时 AgNP 的总抗氧化能力仅为 0.15 个 FRAP 值，但当 AgNP

浓度达到100 mg/L时，FRAP值达到0.54，当AgNP浓度达到125 mg/L时，其总抗氧化能力达到0.72个FRAP值，表明AgNP具备较强的Fe^{3+}还原能力。

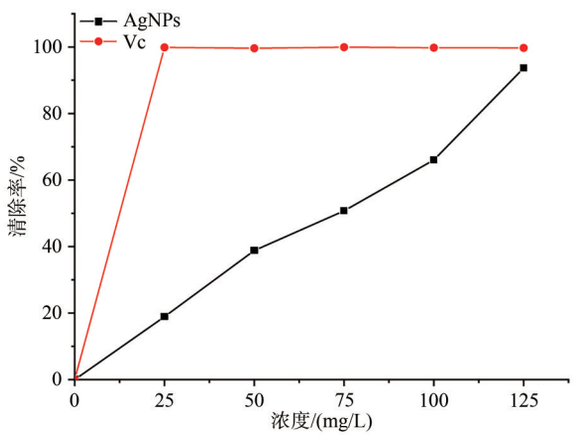

图7　AgNP对$ABTS^{+}$自由基清除作用

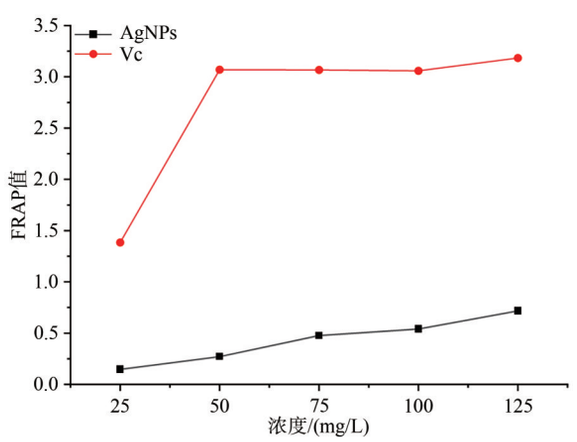

图8　AgNP的总抗氧化能力

3　讨论

随着纳米技术的进步与发展，纳米颗粒被广泛应用于疾病诊断、生物标志物、抗菌剂、药物输送和癌症治疗等生物医学领域。但这些微小的颗粒在生物体内部也会引发一系列负面的生物学效应，例如导致机体内氧化与抗氧化作用失衡，发生氧化应激。氧化应激与心血管疾病[8]、糖尿病[9]、阿尔茨海默病[10]、癌症[11]等多种疾病密切相关。而利用植物提取物合成纳米颗粒时，颗粒表面将会覆盖多种生物活性物质，形成植物抗氧化功能化的纳米颗粒，不仅能避免纳米颗粒引发氧化应激，还能有效应对氧化应激造成的不良影响，例如Iqbal等[12]通过黄瓜提取物合成的纳米银能够促进糖尿病伤口愈合，Youssif等[13]利用*Lampranthus coccineus*和*Malephora lutea*合成的纳米银可抵抗氧化应激，并可用于治疗阿尔茨海默病，Hassan等[14]合成的姜黄素纳米银能够下调糖尿病诱导的氧化应激，改变免疫反应介导的肝毒性，协同二甲双胍治疗糖尿病。可见植物抗氧化功能化的纳米颗粒不仅能够发挥纳米颗粒原有的功能，还可以防止氧化损伤，成为普通纳米颗粒的有效替代品[15]。

除此之外，在进行纳米银的生产时，应当考虑对纳米银的表征、稳定性、安全性进行评估，制定标准和质量控制体系以确保纳米银具有良好的质量和安全性。应用于口服药物、伤口敷料、栓剂等领域时，应考虑纳米银释放的Ag^{+}对人体的毒性作用，需严格控制纳米银的用量。

与常见的以硝酸银为前驱体不同，本研究选取较为稳定并安全的硫酸银为前驱体，利用百香果皮中所含的生物活性物质作为还原剂和稳定剂合成AgNP。由于纳米银的表面等离子体共振[16]，反应完成后溶液由无色变为金黄色，使用UV-Vis得到AgNP的紫外特征吸收峰在401 nm处，与纳米银在400~500 nm处会出现最大紫外-可见光吸收的特征相符[17]，通过XRD表征AgNP具有面心立方结构，TEM进一步证实AgNP的形貌近似球形且分散性良好，粒径分布于4~26 nm之间，平均粒径为13.25±3.20 nm，该尺寸分布特征有利于提高材料的比表面积和表面活性，FTIR分析[18-20]表明，AgNP表面存在类黄酮、多酚等生物活性成分的特征官能团修饰。AgNP表现出显著的剂量依赖性抗氧化能力，当浓度提升至125 mg/L时，对DPPH自由基的清除率达到76.96%，对$ABTS^{+}$自由基的清除率达到93.65%，以及0.72个FRAP值。表明AgNP在高浓度下能够高效地清除自由基，表现出强大的抗氧化活性，这种显著的抗氧化性能使得AgNP在医学领域具有广泛的应用潜力。

综上所述，本研究利用百香果皮这一天然植物资源，不仅实现了纳米银的绿色合成，还显著降低了纳米银的制造成本，并兼具安全性，产物良好的结构表征及优异的抗氧化性能，为医用材料的开发提供了新的思路。

参考文献：

[1]ZHAO R, XIANG J, WANG B, et al. Recent advances in the development of noble metal NPs for cancer therapy [J]. Bioinorganic Chemistry and Applications, 2022, 2022: 2444516.

[2]ABDALLAH B M, RAJENDRAN P, ALI E M. Potential

treatment of dermatophyte *Trichophyton rubrum* in rat model using topical green biosynthesized silver nanoparticles with *Achillea santolina* extract[J]. Molecules,2023,28(4):1536.

[3]CONSTANTIN M, RĂUT I, SUICA-BUNGHEZ R, et al. *Ganoderma lucidum*-mediated green synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial activity [J]. Materials, 2023,16(12):4261.

[4]HATIPOĞLU A, BARAN A, KESKIN C, et al. Green synthesis of silver nanoparticles based on the *Raphanus sativus* leaf aqueous extract and their toxicological/microbiological activities [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2023, DOI: https://doi.org/10.1007/s11356-023-26499-z.

[5]郭水灵,张海燕,王萌萌,等.百香果果壳水提液对小鼠体重和抗应激能力的影响[J].畜牧兽医科技信息,2024(3):36-38.

[6]SINIAWSKA M, WOJDYŁO A. Polyphenol profiling by LC QTOF/ESI-MS and biological activity of purple passion fruit epicarp extract[J]. Molecules,2023,28(18):6711.

[7]张澳环,赵子冰,王晰,等.无患子花总皂苷提取工艺优化及抗氧化、美白活性研究[J].林产化学与工业,2024,44(4):36-44.

[8]HAZUKOVÁ R, ZADÁK Z, PLESKOT M, et al. Oxidative DNA damage and arterial hypertension in light of current ESC guidelines[J]. International Journal of Molecular Sciences,2024,25(23):12557.

[9]MGWENYA PHD T N, PHD H A, HOURELD D TECH N N. Photobiomodulation studies on diabetic wound healing: An insight into the inflammatory pathway in diabetic wound healing[J]. Wound Repair and Regeneration,2025,33(1):e13239.

[10]KIM J, MOON J S. Molecular roles of NADPH oxidase-mediated oxidative stress in Alzheimer's disease: Isoform-specific contributions[J]. International Journal of Molecular Sciences,2024,25(22):12299.

[11]CHAUHAN A, KAMAL R, BHATIA R, et al. From bench to bedside: ROS-responsive nanocarriers in cancer therapy [J]. AAPS PharmSciTech,2024,26(1):10.

[12]IQBAL R, ASGHAR A, HABIB A, et al. Therapeutic potential of green synthesized silver nanoparticles for promoting wound-healing process in diabetic mice[J]. Biological Trace Element Research,2024,202(12):5545-5555.

[13]YOUSSIF K A, HAGGAG E G, ELSHAMY A M, et al. Anti-Alzheimer potential, metabolomic profiling and molecular docking of green synthesized silver nanoparticles of *Lampranthus coccineus* and *Malephora lutea* aqueous extracts[J]. PLoS One,2019,14(11):e0223781.

[14]HASSAN I, AL-TAMIMI J, EBAID H, et al. Silver nanoparticles decorated with curcumin enhance the efficacy of metformin in diabetic rats *via* suppression of hepatotoxicity[J]. Toxics,2023,11(10):867.

[15]BALKRISHNA A, KUMAR A, ARYA V, et al. Phytoantioxidant functionalized nanoparticles: A green approach to combat nanoparticle-induced oxidative stress [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021:3155962.

[16]王鑫,周卓,遇世友,等.甜玉米芯多糖纳米银的合成、表征及体外活性研究[J].食品工业科技,2024,45(13):58-66.

[17]DILSHAD E, BIBI M, SHEIKH N A, et al. Synthesis of functional silver nanoparticles and microparticles with modifiers and evaluation of their antimicrobial, anticancer, and antioxidant activity [J]. Journal of Functional Biomaterials,2020,11(4):76.

[18]MACOVEI I, LUCA S V, SKALICKA-WOŹNIAK K, et al. Silver nanoparticles synthesized from *Abies alba* and *Pinus sylvestris* bark extracts: Characterization, antioxidant, cytotoxic, and antibacterial effects [J]. Antioxidants, 2023, 12(4):797.

[19]MSC S W, PHD S P, BSC S L, et al. Biologically rapid synthesized silver nanoparticles from aqueous *Eucalyptus camaldulensis* leaf extract: Effects on hyphal growth, hydrolytic enzymes, and biofilm formation in *Candida albicans*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118(4):1578-1592.

[20]AL-OTIBI F O, YASSIN M T, AL-ASKAR A A, et al. Green biofabrication of silver nanoparticles of potential synergistic activity with antibacterial and antifungal agents against some nosocomial pathogens [J]. Microorganisms, 2023,11(4):945.

[收稿日期　2024-12-03;责任编辑　梁　毅]