

铜掺杂普鲁士蓝纳米材料的设计合成及其抗菌活性研究

李仁熙, 李雨橙, 付李俊, 李娴晰, 潘青山*

江西科技师范大学药学院, 江西 南昌 330013

DOI:10.61369/RSTD.2026020005

摘 要 : 随着抗生素的广泛使用, 其耐药性所带来的危害日益严重, 构成了威胁人类生命健康的关键因素之一, 是当今的研究的一个热门领域, 近年来备受关注。本文通过设计合成铜掺杂普鲁士蓝, 然后通过 SEM、EDS 等进行测定, 并进行抗菌和光热特性实验的测定。因为普鲁士蓝是一种新型的纳米抗菌材料, 而改良后的铜掺杂普鲁士蓝具有更好的光热性能、细胞杀伤力显著增强等特点, 有良好的发展前景和研究方向。最后未合成前的普鲁士蓝抑菌率为 96.3%, 实验制得的铜掺杂普鲁士蓝在光照和过氧化氢结合的情况下表现出更好的抗菌效果, 可达到 99.5%, 得出铜掺杂普鲁士蓝纳米颗粒材料在临床方面的应用有不错的发展前景。

关 键 词 : 金属掺杂普鲁士蓝; 抗菌; 光热特性

Design, Synthesis and Antibacterial Activity of Copper-Doped Prussian Blue Nanomaterials

Li Renxi, Li Yucheng, Fu Lijun, Li Xianxi, Pan Qingshan*

School of Pharmacy, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang, Jiangxi 330013

Abstract : With the widespread use of antibiotics, the harm caused by their resistance has become increasingly severe, emerging as one of the critical factors threatening human life and health. This issue is a hot topic in current research and has received significant attention in recent years. In this study, copper-doped Prussian blue was designed and synthesized, followed by characterization using techniques such as scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). Additionally, experiments were conducted to evaluate its antibacterial and photothermal properties. Prussian blue itself is a novel nano-antibacterial material, and the modified copper-doped Prussian blue exhibits enhanced photothermal performance, significantly improved cell-killing efficacy, and other advantageous characteristics, indicating promising development prospects and research directions. The results showed that the antibacterial rate of pristine Prussian blue before synthesis was 96.3%. In contrast, the experimentally prepared copper-doped Prussian blue demonstrated superior antibacterial efficacy, reaching 99.5% when combined with light irradiation and hydrogen peroxide. These findings suggest that copper-doped Prussian blue nanoparticle materials hold favorable application prospects in clinical settings.

Keywords : metal-doped prussian blue; antibacterial; photothermal properties

引言

《柳叶刀》刊载的研究证实, 常见细菌感染是仅次于心脏病的全球第二大死亡原因, 对全世界数百万人的生命健康构成严重威胁^[1]。抗生素作为治疗细菌感染极的高效药物, 凭借其杀菌与抑菌活性, 为人类攻克感染性疾病开辟了一条全新的路径, 为众多受感染困扰的患者带来了治疗希望, 现已在临床上得到广泛应用。然而, 随着抗生素的广泛使用, 诸多问题接踵而至, 其中抗生素耐药性问题尤为突出。细菌的抗药表型逐渐显现, 对于抗生素治疗的敏感性大幅下降, 多重耐药菌甚至超级细菌不断滋生, 严重威胁人类健康。遗憾的是, 以现有的科技水平和临床治疗能力, 人类尚未能找到有效阻断细菌产生耐药性产生的方法, 而对于部分严重的细菌感染, 抗生素仍是临床唯一的有效治疗选择。在此背景下, 抗生素耐药性问题日趋严峻, 不仅给临床诊疗带来了极大挑战, 也给患者造成沉重的经济负担。

项目基金:

国家自然科学基金 (22264015)

2024 年国家级大学生创新训练计划项目 (202411318031)

作者简介:

李仁熙, 2023 年 9 月就读于江西科技师范大学。现为江西科技师范大学药学院本科生, 在青山教授的指导下进行研究。目前主要研究领域为材料合成及抗菌性能研究。

通讯作者: 潘青山, 江西科技师范大学药学院教授、研究生导师。2020 年湖南大学分析化学专业博士学位毕业后到江西科技师范大学大学工作至今。目前主要从事功能生物纳米材料可控合成等方面的研究工作, 主持国家自然科学基金项目 1 项, 江西省杰出青年基金项目 1 项, 完成省自科面上项目 1 项。发表论文 30 余篇, 包括 Chemical Engineering Journal, Acta Biomaterialia 等。邮箱: pqs2016@163.com

一、细菌的耐药性

(一) 细菌的耐药性概述

多项研究证实,在特定条件下细菌仅需短短几天即可产生数十万倍的耐药性;而新型抗生素药物的研发周期长达数年甚至数十年,兼具投资大、风险高、周期长的特点^[2]。自1990年至今,全新类型的抗生素药物的研发尚未取得突破性进展,人类也因此陷入抗生素濒临枯竭的发展困境;与此同时,细菌耐药性及其引发的危害正在全球范围内持续扩散。由于人们对传染性疾病的恐惧与防范心理,过度的治疗手段被频繁使用,此类不合理的操作会促使细菌进化出相应的抗性机制,最终形成恶性循环。细菌耐药性的产生,根源在于人类对抗生素的滥用及使用不当。除抗生素滥用外,使用方式不当亦是细菌耐药性产生的重要诱因,均会持续为细菌提供进化空间,使其逐步演化为抗生素耐药菌株。

(二) 细菌耐药性的机制

抗生素具备优良的杀菌效能,其临床应用使细菌性感染所致的死亡率降低70%,但受抗生素长期不合理使用的影响,细菌已进化出多种耐药机制以抵御抗生素作用(如图2)。从细菌个体层面分析,其耐药性主要体现为四大途径:其一,通过降低细胞膜渗透性、提升抗生素外排能力,减少胞内抗生素浓度;其二,对药物作用靶点进行修饰或改造;其三,直接修饰或破坏抗生素分子本身;其四,规避抗生素靶向的代谢途径。此外,细菌在群体层面还可通过形成生物被膜的方式,增强对各类抗生素的抗性^[3]。

细菌耐药机制虽呈多样性,但其耐药性的演变与抗生素的使用密切相关。研究证实,细菌接触抗生素后,在选择性压力的作用下会发生基因突变,并通过基因转录与蛋白表达的系列调控抵御外界压力,这也是细菌产生耐药性的核心诱因^[4]。因此,抗生素的长期使用易诱导细菌产生耐药性,甚至引发交叉耐药现象;同时,细菌一旦产生耐药性,其耐药机制的消退往往需要较长周期^[5]。

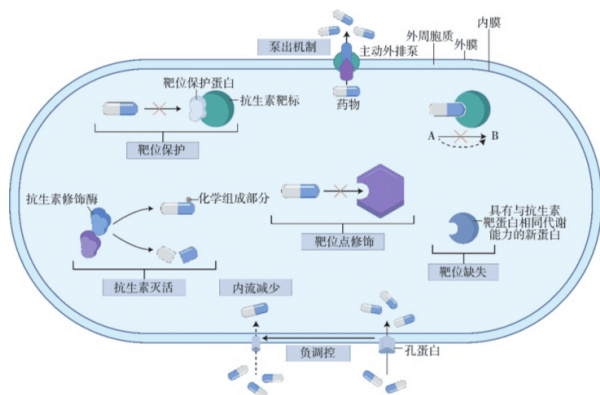


图2 细菌的耐药机制

二、普鲁士蓝纳米颗粒

(一) 普鲁士蓝纳米颗粒的发现和特点

事实上,普鲁士蓝(PB)是工业革命期间被发现的第一种合成色素,它于1704年由一位试图合成其他颜色的化学家偶然研发而成。直到1867年,德国病理学家马克斯·佩尔士(Max

Perls)描述了其原始配方后,普鲁士蓝才被应用于组织化学染色领域——这也是它通常被称为普鲁士蓝的由来。

普鲁士蓝具备优异的磁学、电学及光学性能,尤为值得关注的是,它也是经美国食品药品监督管理局(FDA)批准的、可用于治疗铊和铯中毒的解毒剂,这一特性充分证明了其优秀的生物安全性。近年来,纳米材料与生物医学领域的结合愈发紧密,相关研究表明,与传统药物相比,普鲁士蓝具有更优的分散性、低毒性、高稳定性及易降解性,目前已在生物载药、生物传感、光热治疗、放射性核素促排以及生物医学成像等多个领域,得到了研究人员的广泛关注与深入应用。

(二) 普鲁士蓝纳米颗粒的应用

在传统检测方法中,电极所需电势较高,众多易氧化物质会参与反应,进而干扰测量结果,而普鲁士蓝能够表现出更优的线性关系,非常适合用作电极传感器。此外,普鲁士蓝电催化剂相较于铂,能更高效地催化过氧化氢的还原反应,采用普鲁士蓝基修饰电极的第一代电流型葡萄糖生物传感器得以成功研制。

医学领域治疗铊中毒和排除放射性铯。20世纪清华大学发生的铊中毒事件,便是通过服用普鲁士蓝得以解救。普鲁士蓝本身为无毒色素,铊离子可置换出普鲁士蓝中的钾离子,最终形成不溶性物质,随人体粪便排出体外。2003年10月,FDA正式批准可溶性普鲁士蓝用于铊中毒的救治,使其成为治疗铊中毒的特效药。口服普鲁士蓝能够阻断铊的肝肠循环,增加铊的排泄量,且无明显不良反应。

三、铜掺杂普鲁士蓝纳米颗粒的合成

称取1.12 g 硫氰酸亚铁溶解于50 mL的0.01 mol/ml的HCL溶液中,加入PVP 6g。搅拌30 min完全溶解;再80 °C加热20 h。反应结束后离心(13000 rpm, 10 min),水洗两次,冷冻干燥得到PB纳米颗粒。

称取5 mg的PB颗粒溶解于2 mL的纯水中,加入10.8 mg的醋酸铜和21 mg的柠檬酸三钠,搅拌3 h后,再加入一硫氰酸亚铁搅拌2 h,冷冻室中静置24 h。静置时长到充分反应后,从冷冻室中拿出在常温中解冻。离心(13000 rpm, 10min),水洗两次,冷冻干燥得到CuPB纳米颗粒。

(一) 普鲁士蓝纳米颗粒的抑菌效果研究

首先进行平板涂布,将菌落从固体斜面接种到50 mL的无菌液体培养基中,在37 °C, 180 rpm恒温震荡培养6 h,直到细菌OD600= 1。然后,将等量的含菌悬浮液加入到100 mL无菌营养液中。分别将生理盐水组、PB组、CuPB、PB + 808 nm、CuPB + 808 nm、PB + 808nm + H2O2、CuPB + 808nm + H2O2与金黄色球菌在37 °C的摇床中孵育3 h,孵育完成后将菌液进行平板涂布并放在37 °C的培养箱,24 h后观察结果。

培养16 μg/ml、32 μg/ml、64 μg/ml、128 μg/ml、256

$\mu\text{g/ml}$ 的被使用波长在808 nm和光照强度为 1.1 w/cm^2 的近红外光照的PB培养皿与CuPB培养皿,与没有加入PB与CuPB被使用波长在808 nm和光照强度为 1.1 w/cm^2 的近红外光照的空白对照组进行对比。培养无光照的 $32\ \mu\text{g/ml}$ 、 $64\ \mu\text{g/ml}$ 、 $128\ \mu\text{g/ml}$ 、 $256\ \mu\text{g/ml}$ 的PB培养皿与CuPB培养皿,与无光照且没有加入PB和CuPB的空白对照组进行对比。

(二) 材料的表征分析

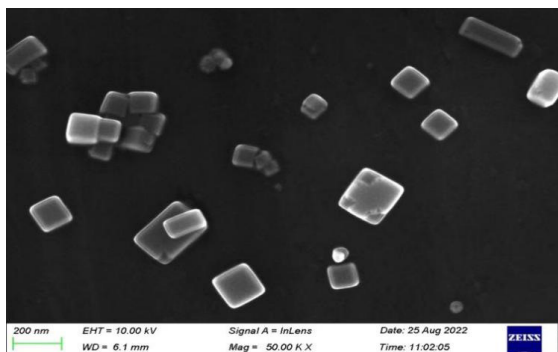


图4 标尺为200nm的普鲁士蓝 SEM图

如图4所示,为PB的SEM扫描结果图。通过图片可以看出普鲁士蓝纳米材料的微观形状呈现立方体结构,形态较为规则,纳米颗粒结构清晰,表面平整,呈现部分粘连或独立存在的分布情况,大小较为均匀,与文献中所描述的普鲁士蓝纳米颗粒的结构相吻合。根据图片可知,铜掺杂普鲁士蓝同样是较为规则的立方体结构,纳米颗粒形态清晰表面平整,部分颗粒也存在粘连情况,但是情况更为严重,形态没有普鲁士蓝更加规整,纳米颗粒粒径稍大。

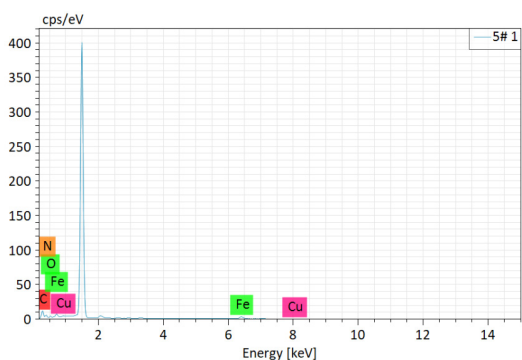


图5 铜掺杂普鲁士蓝的EDS图

如图5所示,为铜掺杂普鲁士蓝的EDS扫描结果图。EDS能谱分析仪可以分析物质的元素组成和含量,此图说明铜掺杂普鲁士蓝纳米颗粒内部的元素组成包含了C、N、O、Fe、Cu等元素。根据该图可表明合成的铜掺杂普鲁士蓝中含有铜,所含杂质较少,并且其中铜元素含量较多。

(三) 光热性能分析

本实验通过对 200 、 100 、 50 、 25 、 $12.5\ \mu\text{g/mL}$ 的普鲁士蓝以及铜掺杂普鲁士蓝与水对照,在同样的情况下进行光热研究,

探究其浓度依赖性,看其是否具有良好的光热性能。

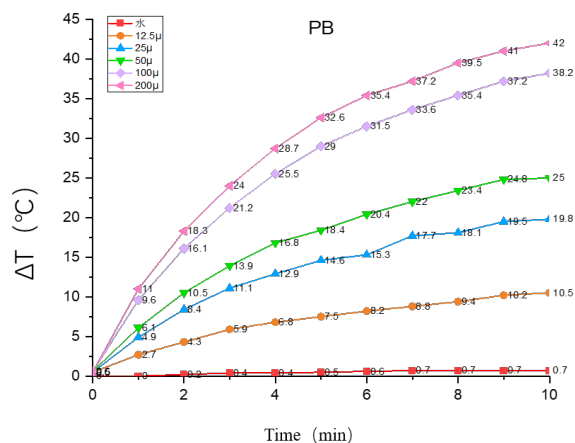


图6 PB的不同浓度的光热曲线图

按照步骤所得数据做的曲线如图6所示,从图中可以看出NIR (1.1 w/cm^2)照射下普鲁士蓝浓度发生变化时,温度变化随浓度增大而幅度增大,浓度大时增大幅度更为显著。其中 $200\ \mu\text{g/mL}$ 和 $100\ \mu\text{g/mL}$ 的普鲁士蓝比其他浓度的普鲁士蓝增大幅度更大,表明光热性能随浓度增大而逐渐增大。通过与水的对照组对比可知,综上所述浓度对普鲁士蓝纳米颗粒的光热性能有一定影响,但无论浓度多少,普鲁士蓝纳米颗粒都具有良好的光热效应。

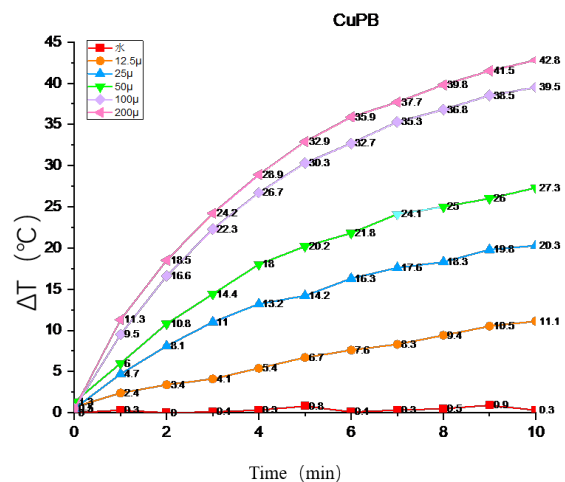


图7 CuPB的不同浓度的光热曲线图

按照上述步骤所得数据做的曲线如图7所示,从图中可知铜掺杂普鲁士蓝的光热性能总体与普鲁士蓝相似,也是随着浓度增大而增大,照射前期增长速度较快,从中后期开始趋于平缓。但是在相同浓度下铜掺杂普鲁士蓝的温度随时间的增长幅度更大,但热敏度略大于普鲁士蓝。其中同样 $200\ \mu\text{g/mL}$ 和 $100\ \mu\text{g/mL}$ 的铜掺杂普鲁士蓝的增长幅度高于其他。综上所述铜掺杂普鲁士蓝的光热性能较好于普鲁士,且蓝光热对普鲁士蓝以及铜掺杂普鲁士蓝的抑菌活性影响都不大。

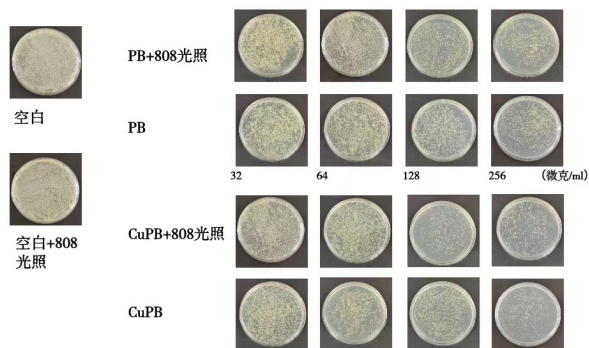


图8 培养24 h后的培养皿内细菌分布状况图

(四) 抗菌活性评价

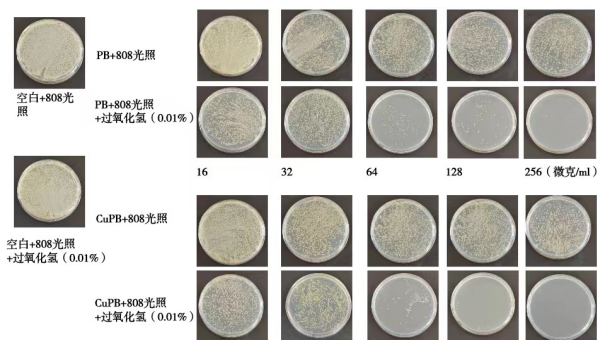


图10 培养24 h后的培养皿内细菌分布状况图

上一实验研究了光热对其抗菌活性的影响，接下来的实验是进一步研究光热与0.01%过氧化氢结合对抗菌活性的影响。第一组实验结果显示，PB在 NIR 照射和加入0.01%过氧化氢下比没有加入过氧化氢的 PB 细菌数明显减少，抑菌率也显著提高，达到 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时抑菌率为 96.3%，说明光照和过氧化氢结合有很好的抑菌效果。第二组实验结果显示，CuPB 同样在 NIR 照射和加入 0.01% 过氧化氢下比没有加入过氧化氢的 CuPB 有更好的抑菌效果，而 CuPB 在这两者结合的情况下抑菌效果更为明显，根据抑菌率 99.5% 可以看出，CuPB 的抑菌率高于 PB。总结说明在 PB，CuPB，NIR 以及加入 0.01% 过氧化氢和不加入等情况下，单进

行 NIR 照射抑菌效果不明显，但 NIR 照射同时加入过氧化氢能明显杀死细菌，其中 CuPB 被 NIR 照射以及加入 0.01% 过氧化氢的抑菌效果最好，并且 PB 和 CuPB 的杀菌效果都随着浓度的增加而增加。

(五) 实验结论

由上述各个实验数据的分析，本实验成功的合成了铜掺杂普鲁士蓝纳米颗粒，通过扫描电子显微镜 (SEM) 及 EDS 能谱分析仪，对合成产物进行表征，SEM 图可以看出其具有较为规则的立方体结构，比 PB 纳米颗粒粒径稍大，粘连状态更多，EDS 图表明合成产物确实存在铜元素。通过光热实验，证明 CuPB 有良好的光热特性，与 PB 相比增长幅度略高，但是影响不明显。应用平板涂布实验证明 CuPB 被 NIR 照射以及加入 0.01% 过氧化氢时的抑菌效果最好，可达到 99.5%，比未合成前 PB 96.3% 的抑菌率更高，它们的杀菌效果都随着浓度的增加而增加。

四、全文结论与展望

为了能够解决抗生素耐药性问题，对能够抑制细菌增长的 PB 进行进一步探索，合成 CuPB，研究其光热特性，以及在 NIR 照射和加入过氧化氢的情况下抗菌效果的变化。实验可知当这两者条件同时存在时 CuPB 的抑菌效果大大增强，能够达到 99.5%，且效果强于未合成前 PB 96.3% 的抑菌率，为增强抗菌效果提供方向。回归抗生素耐药性这一核心医学难题，超级细菌感染的危害不容忽视：轻则延长患者治疗周期、增加医疗支出成本，重则引发无药可治的危重病症，甚至直接危及患者生命。由此可见，改善抗生素耐药性现状已刻不容缓。普鲁士蓝 (PB) 兼具价格低廉、原料易得、结构易于修饰调控等多重优势，其中，金属掺杂普鲁士蓝在逆转抗生素耐药性方面展现出良好的应用潜力，该研究方向目前仍存在较大的探索空间，亟待更多科研工作者深入探索发掘，为攻克抗生素耐药性这一医学难题提供全新的思路与可行方案。

参考文献

- [1] 金冠雨. 含阳离子聚合物的水凝胶敷料制备及在 MRSA 感染创面的一体化治疗 [D]. 吉林大学, 2023.
- [2] 潘智宇, 印尤强, 苏玉斌. 常见抗生素与新型抗菌药物在临床上的研究应用进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2022, 46(09): 865-871.
- [3] 谢建平, 黄煜, 宋洁. 抗生素耐药机制与新抗感染措施研发 [J]. 四川师范大学学报 (自然科学版), 2023, 46(06): 719-730+708.
- [4] 师艳艳, 徐鹏丽, 曾聪慧, 等. 2018—2021 年我院重症监护病房抗菌药物使用与细菌耐药性分析 [J]. 临床合理用药, 2024, 17(08): 153-157.
- [5] 盛雪鹤, 许锦英, 王幼林, 等. 某三级医院常见细菌耐药性与抗菌药物使用相关性分析 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24(07): 778-785.