

## 石榴果皮提取物纳米氧化铜抑菌纸的制备及性能研究

黄杰锋<sup>1</sup>, 韩玉婷<sup>1</sup>, 余家琳<sup>1</sup>, 钟慕仪<sup>2\*</sup>, 程帆<sup>1</sup>, 钟国亮<sup>2</sup>, 钟文<sup>3</sup>, 刘建强<sup>1\*</sup> (1. 广东医科大学医用新材料研究与开发重点实验室//药学院, 广东东莞 523808; 2. 东莞市乳腺肿瘤精准诊疗与康复重点实验室//南方医科大学第十附属医院(东莞市人民医院)乳腺科, 广东东莞 523000; 3. 中国人民解放军第32268部队, 云南大理 671000)

**摘要:** 目的 制备石榴果皮提取物的纳米氧化铜(CuO)抑菌纸并分析其性能。方法 采用索氏提取法提取突尼斯软籽石榴皮中的多酚类物质, 利用石榴果皮中的主要多酚类物质安石榴苷与Cu<sup>2+</sup>产生共沉淀, 使纳米CuO固定化; 采用水热法制备具有金属+多酚类物质联合抗菌活性的纳米氧化铜抑菌纸; 采用抑菌圈测试方法测试所合成抑菌纸的抗菌性能。结果 成功制备了基于石榴皮甲醇提取物(10 g石榴皮粉末+100 mL甲醇)纳米CuO抑菌纸。其中, 抑菌性能最优制备方案为: 所浸渍硫酸铜溶液浓度1.0 mol/L, 浸渍温度60 °C, 浸渍时间600 s。此条件下合成的抑菌纸对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌均有较好的抑制作用, 平均抑菌圈直径分别为(20.5±0.8) mm与(18.2±0.4) mm。结论 基于石榴皮甲醇提取物混合物所合成的纳米CuO抑菌纸对大肠埃希菌及金黄色葡萄球菌都有良好的抑菌效果。

**关键词:** 石榴; 多酚; 安石榴苷; 纳米氧化铜; 抑菌纸

中图分类号: TS 761

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 06-0590-09

## Preparation and property of nano-copper oxide antibacterial paper of pomegranate pericarp extract

HUANG Jiefeng<sup>1</sup>, HAN Yuting<sup>1</sup>, YU Jialin<sup>1</sup>, ZHONG MUYI<sup>2\*</sup>, CHENG Fan<sup>1</sup>, ZHONG Guoliang<sup>2</sup>, ZHONG Wen<sup>3</sup>, LIU Jianqiang<sup>1\*</sup> (1. Key Laboratory of Research and Development of New Medical Materials, School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 2. Dongguan Key Laboratory of Breast Cancer Care and rehabilitation, Breast Department, the Tenth Affiliated Hospital of Southern Medical University/Dongguan People's Hospital, Dongguan 523000, China; 3. The 32268th unit of the Chinese People's Liberation Army, Dali 671000, China)

**Abstract:** Objective To prepare nano-copper oxide (CuO) antibacterial paper from pomegranate peel extract and analyze its properties. Methods The polyphenols in Tunisian soft-seeded pomegranate pericarp were extracted by Soxhlet extraction method, and the main polyphenolic compound, punicalagin, was co-precipitated with Cu<sup>2+</sup> to immobilize nano-CuO. A nano-CuO antibacterial paper was prepared with antibacterial activity of metal and polyphenol substances using hydrothermal method. The antibacterial properties of the synthesized antibacterial paper were tested by inhibition circle test. Results The nano-CuO antibacterial paper was successfully prepared with methanol extract of pomegranate peel (10 g pomegranate peel powder + 100 mL methanol). The optimal preparation scheme of antibacterial performance was: 1.0 mol/L impregnated copper sulfate solution at 60 °C for 600 s. The antibacterial paper synthesized under these conditions showed good inhibitory effects on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, with average inhibition zone diameters of (20.5±0.8) mm and (18.2±0.4) mm, respectively. Conclusion The nano-CuO antibacterial paper synthesized from the mixture of pomegranate peel methanol extract has good antibacterial effects on *E. coli* and *S. aureus*.

收稿日期: 2024-09-11

基金项目: 广东省自然科学基金(2023A1515011536), 广东医科大学“创新强校工程”青年创新人才项目(2020KQNCX024), 大学生创新创业训练计划项目(S202310571046, S202310571058, S202310571080, S202310571088, S202310571089), 广东省科技创新战略专项资金项目(pdjh2024a182, pdjh2023a0028, pdjh2023b0232, pdjh2023b0234, pdjh2023b0237, pdjh2022a0216, pdjh2022b0225, pdjh2022b0224), 广东医科大学“百项青年研究项目资助计划”项目(GDMUD2022002)

作者简介: 黄杰锋, 男, 在读本科生, E-mail: hjf791616775@126.com

通信作者: 钟慕仪, 女, 硕士, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: zmyok0769@163.com

刘建强, 男, 博士, 教授, E-mail: jianqiangliu2010@126.com

**Key words:** pomegranate; polyphenol; punicalagin; nano-copper oxide; antibacterial paper

纳米氧化铜(CuO)以及多酚类物质在抑菌领域已有广泛的研究<sup>[1-6]</sup>。研究表明,纳米CuO对于革兰阴性菌以及革兰阳性菌均有良好的抑制效果。通过绿色工艺合成的纳米CuO有望实现更高效的抗菌性能和环境友好性<sup>[7-10]</sup>。石榴果皮含有许多活性成分,其中的多酚类物质(如安石榴苷、单宁和类黄酮等)表现出对革兰阳性和革兰阴性细菌的广谱抗菌活性(AMA)<sup>[11-14]</sup>。此外,多酚类物质还可以作为还原剂和稳定剂介导纳米CuO的生物合成。因此,通过石榴皮中的多酚类物质介导纳米CuO合成具有潜在的应用价值。本研究从废弃石榴皮中提取多酚类物质,利用石榴果皮中的主要多酚类物质安石榴苷与Cu<sup>2+</sup>产生共沉淀,将纳米CuO种植到纸基纤维素上,从而实现纳米CuO的固定化处理,以制备具有金属+多酚类物质双效抑菌的抗菌纸。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 原料 采购自市场上的天然突尼斯软籽石榴,取其表皮(表皮外表无变质、无虫蛀现象);定性滤纸;甲醇试剂(西陇科学);硫酸铜(天津百世化工);无水乙醇;槲皮素(麦瑞尔);安石榴苷(MedChemExpress);芦丁(阿拉丁);无水柠檬酸(Merck);纳米氧化铜标

准品(Merck);纳米氧化锌(麦克林)。

1.1.2 仪器 高速粉碎机(凌生 2500 C);分析天平;数显恒温水浴锅(上海博迅 HHS-11-1);索氏提取器;电热鼓风干燥箱;SWCJ-1F 无菌操作台(中国);XRD 仪(岛津 6100);SEM 扫描电镜;粒径分析仪(Nanotrac Wave II W3895 Microtrac);质谱仪(AB Sciex Triple TOF 5600+)。

1.1.3 细菌培养皿以及供试菌种 琼脂营养培养皿(购于比克曼生物公司);金黄色葡萄球菌(ATCC25923,广东医科大学药学院提供);大肠埃希菌(ATCC25922,广东医科大学药学院提供)。

### 1.2 方法

1.2.1 实验材料合成流程 本实验材料合成流程如图1、2所示。

1.2.2 石榴果皮中活性成分的提取 (1)石榴皮粉末的制备:回收石榴皮,用自来水对其进行数次冲洗,以洗去其表面浮尘以及明显的杂质。随后使用去离子水进行洗涤,洗涤完毕后放入托盘随后将其放入烘箱中,设定温度为40℃烘干。随即得到干净且干燥的石榴皮。将洗净且干燥后的石榴皮放入粉碎机中进行粉碎处理,得到均匀的石榴皮(PGP)粉末(图3)。(2)从PGP中提取PPE:在室温下用100 mL甲醇通过索氏提取法提取10 g PGP粉末状样品8 h,过滤所得滤液

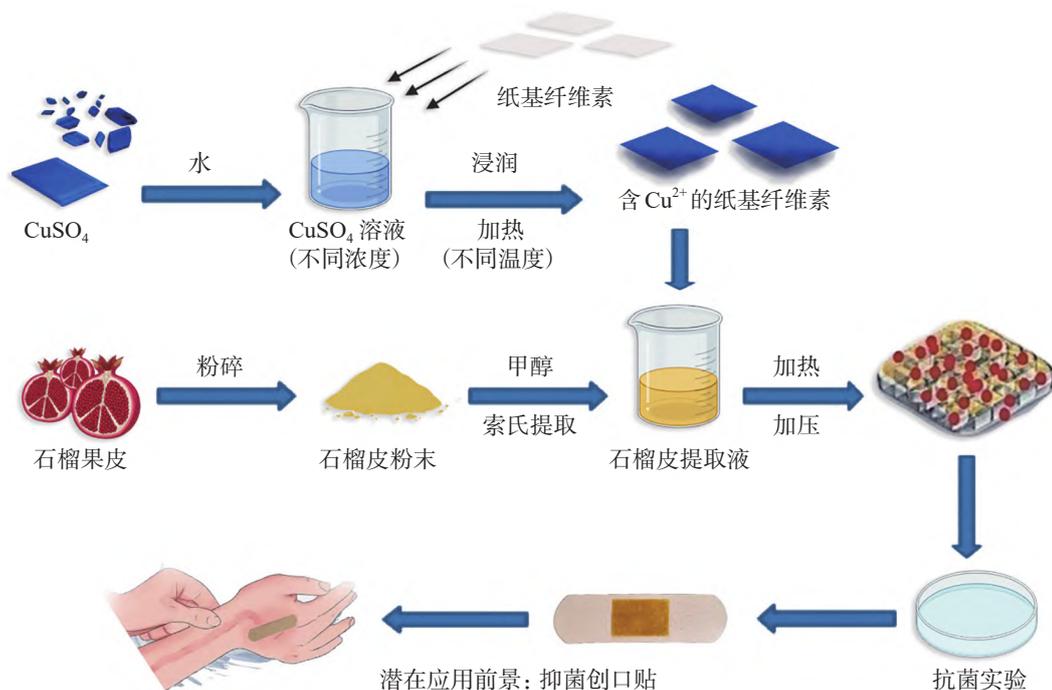


图1 材料合成实验流程示意图

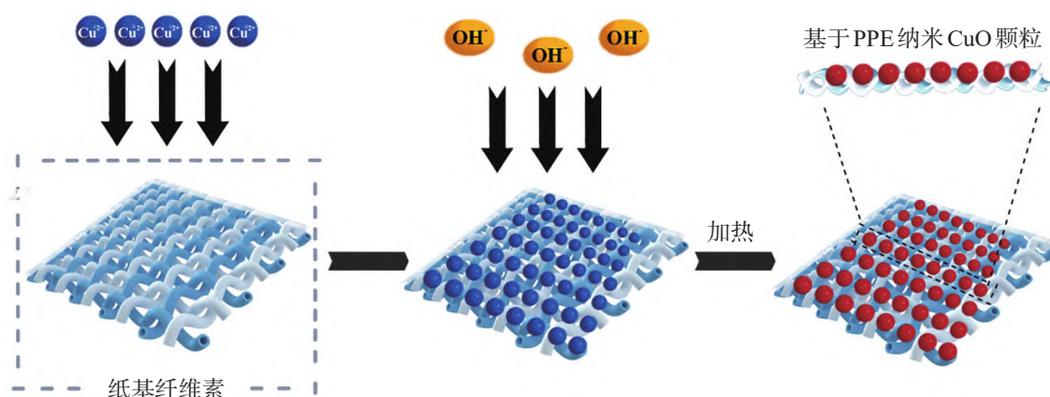


图2 基于石榴皮甲醇提取物(PPE)纳米CuO抑菌纸合成机制图

记为PPE(图4)。

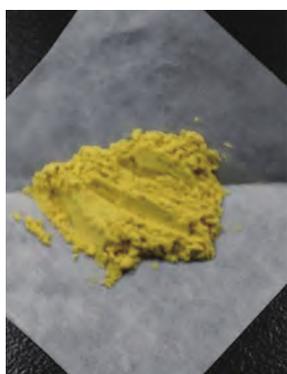


图3 石榴皮粉末(PGP)



图4 基于石榴皮甲醇提取物(PPE)

1.2.3 PPE的质谱分析 离子化模式为电喷雾正离子模式,离子源电压为5 500 V,离子源温度为600 °C,去簇电压(DP)为100 V,碰撞能量(CE)为35 eV,碰撞能量扩展(CES)分别为15 eV。雾化气体为氮气,辅助气1为60 PSI,辅助气2为50 PSI,气帘气为40 PSI。一级质谱母离子扫描范围为100~1 500,IDA设置响应值超过100 cps的6个最高峰进行二级质谱扫描,子离子扫描范围为100~1 500,开启动态背景扣除(DBS)。

1.2.4 纳米CuO抑菌纸的制备 称取1.25、2.50、3.75、5.00 g的CuSO<sub>4</sub>粉末,溶解在10 mL去离子水中,分别配制成0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L的CuSO<sub>4</sub>溶液。将定量滤纸裁剪成合适规格,浸渍在不同浓度的CuSO<sub>4</sub>溶液中不同时间,之后取出洗涤,洗去纤维表面残余的CuSO<sub>4</sub>溶液,即可得到被CuSO<sub>4</sub>溶液润胀的滤纸片。在连续搅拌下,所制备的CuSO<sub>4</sub>溶液润胀的滤纸片加入到50 mL果皮提取物中。在80 °C下加热10 min后,在40 °C下连续搅拌4 h。冷却至室温后取出滤纸,用去离子水清洗其表面,干燥,即可得到基于PPE的纳米CuO抗菌纸<sup>[15-18]</sup>。

1.2.5 不同条件下浸渍纸基纤维素对所制备抗菌纸的影响 采用浸渍法使得Cu<sup>2+</sup>能够有效附着在滤纸片纤维内,探索不同浸渍条件(如表1所示)对于Cu<sup>2+</sup>在纸基纤维素上的附着情况。

表1 基于石榴皮活性提取物纳米CuO抑菌纸制备方案

实验编号	浸渍温度 /°C	浸渍时间 /s	CuSO <sub>4</sub> 溶液浓度 / (mol/L)
1	40	300	0.5
2	40	600	1.0
3	40	900	1.5
4	40	1 200	2.0
5	50	300	0.5
6	50	600	1.0
7	50	900	1.5
8	50	1 200	2.0
9	60	300	0.5
10	60	600	1.0
11	60	900	1.5
12	60	1 200	2.0

1.2.6 基于石榴皮甲醇提取物中主要成分纯物质的CuO抑菌纸合成 称取2.5 g的CuSO<sub>4</sub>粉末,溶解在10 mL去离子水中,配制成1.0 mol/L的CuSO<sub>4</sub>溶液,将滤纸片在CuSO<sub>4</sub>溶液中60 °C下浸渍600 s,即可得到被CuSO<sub>4</sub>溶液润胀的滤纸片。(1)基于安石榴苷CuO抑菌纸的合成:在连续搅拌下,将上述所制备的CuSO<sub>4</sub>溶液润胀的滤纸片加入到25 mL 0.1 g/L的安石榴苷溶液中。在80 °C下加热10 min后,在40 °C下连续搅拌4 h。冷却至室温后取出滤纸,40 °C干燥,即可得到基于安石榴苷的CuO抑菌纸,编号为13号安石榴苷组。(2)基于槲皮素CuO抑菌纸的合成:在连续搅拌下,将上述所制备的CuSO<sub>4</sub>溶液润胀的滤纸片加入到25 mL 0.1 g/L的槲皮素溶液中。在80 °C下加热10 min后,在40 °C下连续搅拌4 h。冷却至室温后取出滤纸,40 °C干燥,即可得到基于槲皮素的CuO抑

菌纸, 编号为 14 号槲皮素组。(3) 基于芦丁 CuO 抑菌纸的合成: 在连续搅拌下, 将上述所制备的  $\text{CuSO}_4$  溶液润胀的滤纸片加入到 25 mL 0.1 g/L 的芦丁溶液中。在 80 °C 下加热 10 min 后, 在 40 °C 下连续搅拌 4 h。冷却至室温后取出滤纸, 40 °C 干燥, 即可得到基于芦丁的 CuO 抑菌纸, 编号为 15 号芦丁组。(4) 基于柠檬酸 CuO 抑菌纸的合成: 在连续搅拌下, 将上述所制备的  $\text{CuSO}_4$  溶液润胀的滤纸片加入到 25 mL 0.1g/L 的柠檬酸溶液中。在 80 °C 下加热 10 min 后, 在 40 °C 下连续搅拌 4 h。冷却至室温后取出滤纸, 40 °C 干燥, 即可得到基于柠檬酸的 CuO 抑菌纸, 编号为 16 号柠檬酸组。

1.2.7 材料的 XRD 分析 使用 X 射线衍射仪对样品(纸基纤维素、石榴皮粉末、纳米 CuO 标准品、基于 PPE 的纳米 CuO 抑菌纸)进行 XRD 分析。测试条件:  $\text{CuK}\alpha$  射线( $\lambda=1.54184\text{\AA}$ )作为入射辐射, 试验电压、电流分别为 40 kV 和 40 mA, 扫描速度为 2 °/min, 在 5~40 °的范围内进行扫描。

1.2.8 材料的 SEM 分析 通过一台 FEI Quanta 400 FEG 场发射扫描电镜对基于 PPE 的纳米 CuO 抑菌纸的微观结构进行分析。对样品表面进行喷金处理以增强导电性, 并从 100  $\mu\text{m}$  以及 50  $\mu\text{m}$  分析材料的形貌。主要参数: 分辨率 < 25 nm, 工作距离 WD=10.6 nm, 加速电压 15 kV, 探测器为二次电子探测器。

1.2.9 基于 PPE 纳米 CuO 抗菌性能测试 将不同反应条件下(表 1 所示)制得的纳米 CuO 抗菌纸片(共 12 组)放在紫外灯下激发备用。一段时间后, 在无菌条件下用三角刮铲涂布将大肠埃希菌或金黄色葡萄球菌接种到培养基上, 将培养基平均划分成 4 份, 分别放置 4 片抗菌纸圆片, 然后把培养基放置于培养箱里控制温度 37 °C、湿度 72 %, 培养 24 h 后进行观察结果, 测量抑菌圈直径, 记录分析数据。设置以空白纸片、75 % 乙醇溶液、纳米 CuO 标准品甲醇悬浮液(100 g/L)、纳米 ZnO 标准品甲醇悬浮液、安石榴苷溶液(0.1 g/L)以及石榴皮甲醇提取液(1.2.2)作为对照组, 抑菌实验操作与上述一致。测量抑菌圈直径, 记录分析数据。

### 1.3 统计学处理

采用 Excle 软件对数据进行处理。每组进行 3 次相同的操作, 记录将所得的抑菌圈直径, 使用 Excle 软件对数据进行平均值处理, 所得平均值即为该实验组的抑菌结果。对所得数据进行偏差计算, 在大肠埃希菌实验中, 12 组数据的最大偏差均小于 1.6 mm, 最大相对偏差均小于 9.03 %。在金黄色葡萄球菌中, 12 组

数据的最大偏差均小于 1.4 mm, 最大相对偏差均小于 10.37 %。说明个别测定值与总体平均值相差较小, 测定结果精密度良好。使用 IBM SPSS 25.0 对数据进行  $t$  检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果与结论

### 2.1 PPE 质谱分析

本实验主要利用石榴皮中的多酚类物质使  $\text{Cu}^{2+}$  沉淀在纸基纤维素上生成氧化铜。由图 5 石榴皮甲醇提取液的质谱表征图谱中可以看出, 本实验成功提取出了如安石榴苷(1107.0540)等多酚类物质。

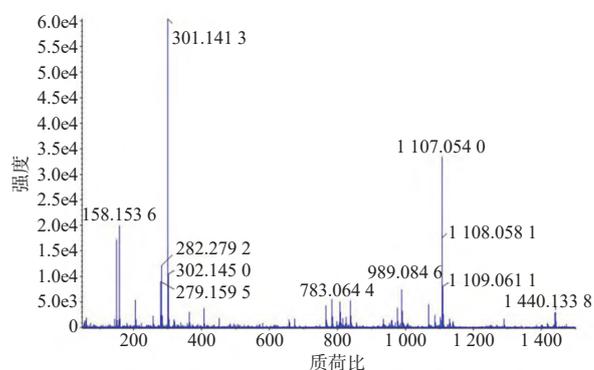


图 5 石榴皮甲醇提取液质谱表征图谱

### 2.2 材料合成

对所合成的基于 PPE 的纳米 CuO 抑菌纸进行初步的外观分析(图 6): (1) 随着硫酸铜溶液浓度的增加, 所合成的纳米 CuO 抗菌纸片的颜色逐渐由浅黄色偏向于深棕色。(2) 随着浸渍温度的升高, 铜离子更易进入到纸基纤维素当中, 所合成的抗菌纸也比其他同条件下的纸片颜色更偏向于深棕色。(3) 随着浸渍时间的增加, 相同条件下, 进入纸基纤维素的  $\text{Cu}^{2+}$  含量



图 6 不同条件下所合成的抑菌纸图片  
(1~12 分别对应表 1 的实验编号)

增加,这会导致所合成的CuO颗粒的粒径偏大,因此所得的抗菌纸片颜色偏于深棕色。(4)如图6的10号所示,初步推断当达到最适条件时,有利于纳米CuO的合成,此时纸基纤维素上的纳米CuO分布均匀,表现出了颜色更偏向于深褐色并且颜色均匀。

对所合成的基于各种石榴皮提取成分纯物质(安石榴苷、槲皮素、芦丁、柠檬酸)的纳米CuO抑菌纸进行初步的外观分析(图7):以安石榴苷取代石榴皮甲醇提取液进行合成可以看出,其表明有分布不均匀的类似纳米CuO的颗粒分布。而以槲皮素以及芦丁溶液作为基液与Cu<sup>2+</sup>纸基合成的抑菌纸,其纸表面呈现鲜黄色,与槲皮素溶液以及芦丁溶液的颜色相同,初步推断其纸基纤维素内无CuO颗粒生成。柠檬酸作为基液与Cu<sup>2+</sup>纸基合成的抑菌纸,其表面未出现有CuO颗粒的现象,初步推断其纸基纤维素内无CuO颗粒生成。



13: 安石榴苷; 14: 槲皮素; 15: 芦丁; 16: 柠檬酸

图7 基于各种石榴皮提取成分纯物质的纳米CuO抑菌纸图片

### 2.3 材料的X射线衍射仪技术(XRD)分析结果

本实验所制备的抑菌纸的XRD曲线中的特征峰基本包含了纸基纤维素、石榴皮粉末以及纳米CuO标

准品的XRD特征峰,见图8,初步说明已成功利用PPE在纸基纤维素上合成了纳米CuO。此外曲线中所含的杂峰较少,提示所合成本实验方法所合成的颗粒具有较为完整的晶体结构。

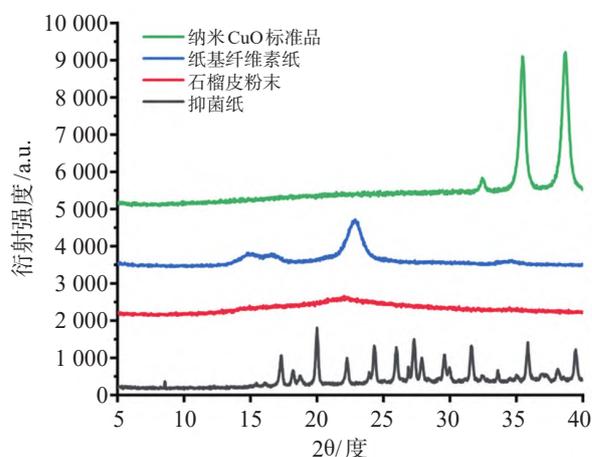


图8 材料XRD结果图谱

### 2.4 材料的扫描电子显微镜(SEM)分析结果

对在不同反应条件下所制备的12组抑菌纸进行SEM表征(图9,图中的编号与表1中的编号相对应)。由SEM表征图中可以看出,所合成的纳米CuO颗粒呈扁圆形状。其中编号1、2、5、8、9样品,其纸基纤维素表面几乎没有颗粒分布。编号4样品,其纸基纤维素表面分布的颗粒较少。编号3、6、7、11、12样品颗粒在纸基纤维素表面分布不均,出现团聚现象。编号10

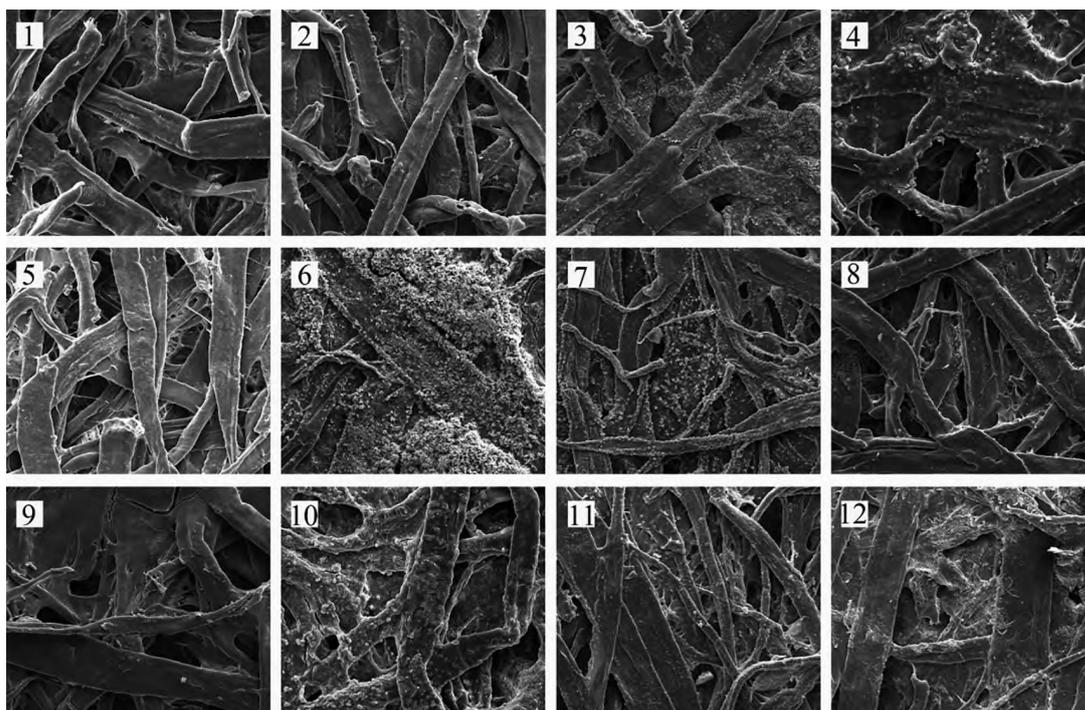
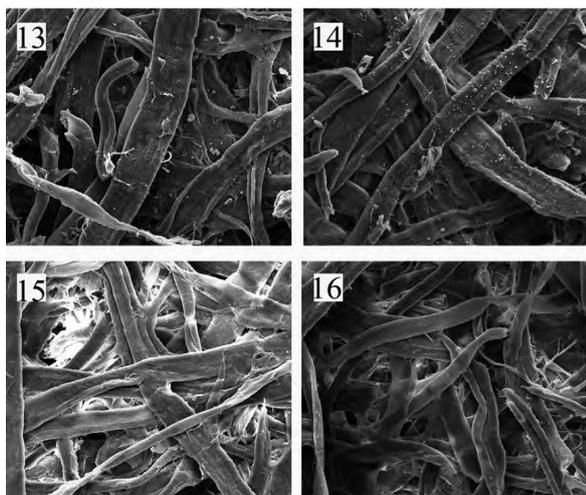


图9 基于PPE纳米CuO抑菌纸的SEM图  
(1~12 分别对应于表1中的实验编号)

样品的颗粒在纸基纤维素上分布较为均匀且颗粒数量较多,且能清晰地看到附着在纤维素上的颗粒形态。

对使用不同石榴皮主成分纯物质作为基液所制备的CuO抑菌纸进行SEM表征,测得结果如图10所示。编号13号安石榴苷组,有较多晶体颗粒在纤维素纸基内合成,但形成了一定的团聚现象。从编号14槲皮素组的SEM结果中可以看出,有少量稀疏的晶体颗粒在纸基纤维素内生成,颗粒形状成细扁形。从编号15芦丁组的SEM表征结果可以看出,基本上没有纳米氧化铜颗粒在纸基纤维素内生成。编号为16柠檬



13: 安石榴苷; 14: 槲皮素; 15: 芦丁; 16: 柠檬酸

图10 基于不同石榴皮提取成分纯物质的纳米CuO抑菌纸SEM图

酸组的SEM结果也表现出与芦丁组同样的结果,基本上没有纳米氧化铜颗粒在纸基纤维素内生成。

## 2.5 实验组抑菌圈实验结果

本实验采用了革兰阴性菌种的常见菌大肠埃希菌以及革兰阳性菌种的常见菌金黄色葡萄球菌做抑菌圈实验的实验对象。以所得抑菌圈直径为主要指标分析所合成抗菌纸的最佳制备工艺条件。以所得抑菌圈直径为主要指标,对比各组抗菌纸的抑菌性能。抑菌实验结果及分析见表2、3。

从表2可以看出,所制备的12组抑菌纸对于革兰阴性菌大肠埃希菌均有抑菌效果。分析所得数据后发现,浸渍温度对于所合成抑菌纸在大肠埃希菌的抑制效果中影响最大。其次是所浸渍的CuSO<sub>4</sub>溶液浓度以及浸渍时间。得到最优方案为:浸渍温度40℃,浸渍时间600s,所浸渍CuSO<sub>4</sub>溶液浓度1.0mol/L。从表3可以看出,所制备的12组抑菌纸对于革兰阳性菌金黄色葡萄球菌均有抑菌效果。对所得数据进行分析之后发现,所浸渍的CuSO<sub>4</sub>溶液浓度以及浸渍时间对于所合成抑菌纸在大肠埃希菌的抑制效果中影响最大,其次是浸渍温度。得到最优方案为:浸渍温度60℃,浸渍时间600s,所浸渍CuSO<sub>4</sub>溶液浓度1.0mol/L。

## 2.6 对照组抑菌圈实验结果

本实验选用了空白纸片、75%乙醇溶液、安石榴苷溶液、纳米CuO标准品、纳米ZnO标准品以及PPE作为对照组。以抑菌圈直径为主要指标,所得实验结

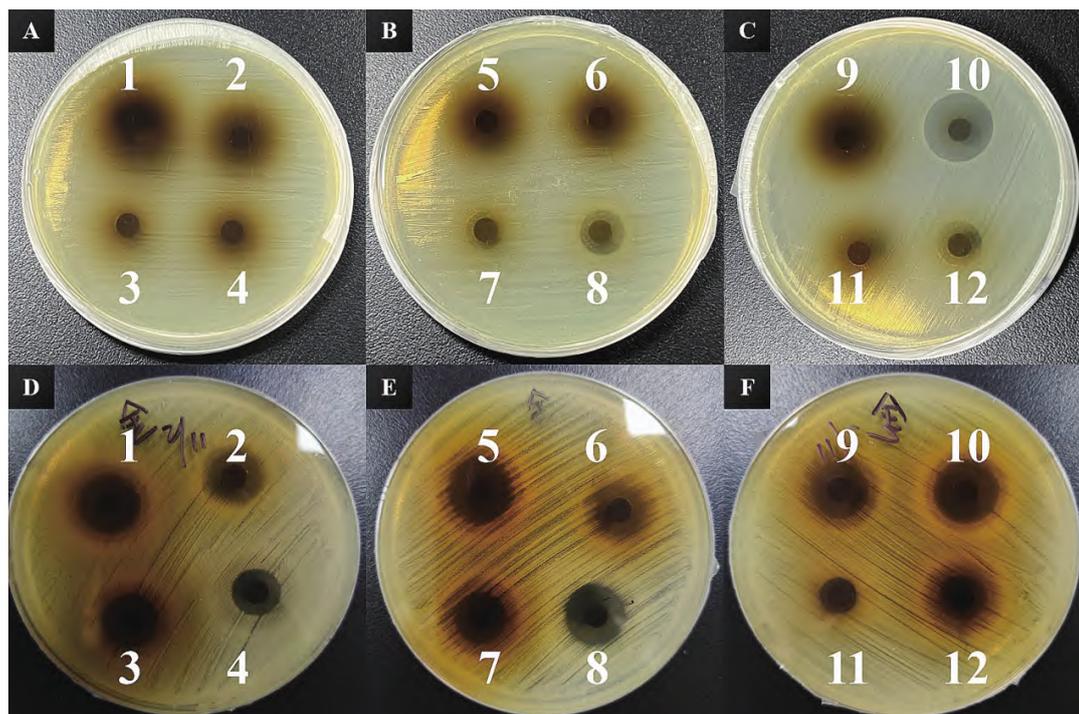


图11 所合成抑菌纸抑菌圈效果图(A~C为大腸埃希菌组,D~F为金黄色葡萄球菌组。图中1~12分别对应于表1中的实验编号)

表2 石榴皮提取物制备CuO抗菌纸对大肠埃希菌的抑制作用结果

实验编号	浸渍温度/°C	浸渍时间/s	CuSO <sub>4</sub> 溶液浓度/(mol/L)	抑菌圈直径/mm
1	40	300	0.5	17.7±1.5
2	40	600	1.0	15.2±0.4
3	40	900	1.5	12.7±0.8
4	40	1 200	2.0	17.1±0.8
5	50	300	0.5	14.8±0.6
6	50	600	1.0	14.6±0.7
7	50	900	1.5	12.3±0.4
8	50	1 200	2.0	16.2±1.0
9	60	300	0.5	15.5±0.9
10 <sup>b</sup>	60	600	1.0	20.5±0.8
11 <sup>a</sup>	60	900	1.5	12.5±0.7
12	60	1 200	2.0	12.7±0.2
K <sub>1</sub>	62.7	48.0	48.0	—
K <sub>2</sub>	57.9	50.3	50.3	—
K <sub>3</sub>	61.2	37.5	37.5	—
K <sub>4</sub>	—	46.0	46.0	—
k <sub>1</sub>	15.68	16.00	16.00	—
k <sub>2</sub>	14.48	16.77	16.77	—
k <sub>3</sub>	15.30	12.50	12.50	—
k <sub>4</sub>	—	15.33	15.33	—
极差	1.2	4.27	4.27	—

a表示组内最差抗菌效果组；b表示组内最优抗菌效果组。

表3 石榴皮提取物制备CuO抗菌纸对金黄色葡萄球菌的抑制作用结果

实验编号	浸渍温度/°C	浸渍时间/s	CuSO <sub>4</sub> 溶液浓度/(mol/L)	抑菌圈直径/mm
1	40	300	0.5	13.5±0.7
2	40	600	1.0	12.6±0.9
3	40	900	1.5	10.9±0.8
4 <sup>a</sup>	40	1 200	2.0	9.8±0.9
5	50	300	0.5	15.1±0.6
6	50	600	1.0	13.2±0.4
7	50	900	1.5	12.9±0.6
8	50	1 200	2.0	11.9±0.4
9	60	300	0.5	14.9±0.6
10 <sup>b</sup>	60	600	1.0	18.2±0.4
11	60	900	1.5	13.5±0.9
12	60	1 200	2.0	15.1±0.3
K <sub>1</sub> '	46.8	43.5	435.7	—
K <sub>2</sub> '	53.1	44.0	441.4	—
K <sub>3</sub> '	61.7	37.3	374.1	—
K <sub>4</sub> '	—	36.8	369.7	—
k <sub>1</sub> '	11.70	14.50	14.50	—
k <sub>2</sub> '	13.28	14.67	14.67	—
k <sub>3</sub> '	15.43	12.43	12.43	—
k <sub>4</sub> '	—	12.27	12.27	—
极差	3.73	2.40	2.40	—

a表示组内最差抗菌效果组；b表示组内最优抗菌效果组。

果如表4所示。对照组中对于大肠埃希菌的抑菌作用最强为纳米ZnO标准品，对金黄色葡萄球菌的抑菌作用最强也为纳米ZnO标准品。纳米CuO标准品对两种

菌的抑菌效果仅次于纳米ZnO标准品。石榴皮甲醇提取液(PPE)的抑菌效果优于单一组分的安石榴苷溶液，而安石榴苷溶液则优于75%乙醇溶液。但所有对

照组的抑菌效果均不如 10 号实验组。

表 4 对照组对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的抑菌圈直径 /mm

对照材料	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌
空白纸片	0	0
75%乙醇溶液	6.4±0.2	8.6±0.3
安石榴苷溶液	9.8±0.3	8.5±0.1
纳米 CuO 标准品	13.5±0.2	12.2±0.4
纳米 ZnO 标准品	17.2±0.1	13.2±0.2
PPE	10.4±0.3	10.7±0.2

### 3 讨论

本研究提取石榴皮中的多酚类物质,并以纸基纤维素为基质合成了纳米 CuO 抑菌纸,并对其进行了相关实验表征分析以及抑菌性能的测试。

SEM 结果表明,在本实验中,在纸基纤维素上生成纳米 CuO 主要分为两步。(1) 首先将纸基纤维素浸渍于  $\text{Cu}^{2+}$  溶液中,使纸基纤维素中含有较多的  $\text{Cu}^{2+}$ 。(2) 浸渍在纸基纤维素中的  $\text{Cu}^{2+}$  与石榴皮甲醇提取液中的多酚类物质上的酚羟基生成氢氧化铜沉淀。(3) 随后在水热的环境下,氢氧化铜再转化生成 CuO 颗粒。在氢氧化铜转化生成 CuO 这一步骤当中,需要达到一定的温度<sup>[19]</sup>。因此,若温度太低,在纸基纤维素表面所形成的颗粒大部分为未转化成 CuO 的氢氧化铜沉淀物。当浸渍在纸基纤维素中的  $\text{Cu}^{2+}$  的浓度不足时,则难以在纸基纤维素上生成较多的颗粒。相反,若纸基纤维素中的  $\text{Cu}^{2+}$  的浓度过高时,  $\text{Cu}^{2+}$  则会与石榴皮甲醇提取液中的多酚类物质产生快速的反应,使得生成颗粒的速度加快,容易导致颗粒团聚现象。同样的,当浸渍的时间太短,  $\text{Cu}^{2+}$  则无法充分进入到纸基纤维素的内层,导致只有少许颗粒在纸基纤维素表面生成。而浸渍时间过长,则会导致  $\text{Cu}^{2+}$  在纸基纤维素中的大量聚积,与石榴皮甲醇提取液中的多酚类物质产生快速的反应,最终导致生成的 CuO 颗粒出现团聚现象。此外,本研究还探讨了石榴皮甲醇提取液中的其他成分对于 CuO 抑菌纸合成的影响。由图 10 的 SEM 表征结果可以看出,安石榴苷这一类多酚类物质作为还原剂和稳定剂,有利于使纸基纤维素内的  $\text{Cu}^{2+}$  沉淀并进一步生成 CuO 颗粒;类似的,槲皮素中也有着较多的酚羟基,有利于使纸基纤维素内的  $\text{Cu}^{2+}$  沉淀并进一步生成 CuO 颗粒,但相比于安石榴苷来说效果较差,主要原因可能在于其酚羟基的数量比安石榴苷少以及槲皮素的酸性较强;芦丁组的 SEM 结果中几乎未发现有 CuO 颗粒的现象,主要原因可能在于虽然芦丁中也

有酚羟基,但由于芦丁中还连有一分子糖,增大了其空间位阻,因此使分子内的酚羟基难以与  $\text{Cu}^{2+}$  结合发生沉淀。而柠檬酸中含有的羟基数量少,主要以羧基为主,对于 CuO 颗粒的生成起抑制作用,所以在其 SEM 结果图中几乎看不到有颗粒生成的现象。

正交抑菌实验结果表明,本研究所合成的抑菌纸对革兰阴性菌的大肠埃希菌和革兰阳性菌的金黄色葡萄球菌均展现出了显著的抑菌效果。石榴皮甲醇提取液中的多酚类物质不仅能与  $\text{Cu}^{2+}$  共同作用将纳米 CuO 固定在纸基纤维素上,同时也与纳米 CuO 共同起到协同抑菌的效果。而浸渍温度、浸渍  $\text{Cu}^{2+}$  溶液的浓度、浸渍时间等因素对抑菌纸的合成有较大的影响。经过研究分析,石榴果皮提取物纳米氧化铜抗菌纸的最佳制备条件为:在 60 °C 下的 1.0 mol/L 的  $\text{CuSO}_4$  溶液中浸渍 600 s,最后再与 25 mL 石榴皮甲醇提取液反应 4 h。此条件下制备的抑菌纸其表面颗粒分布均匀且颗粒形状清晰。该条件下合成的抑菌纸在抑菌圈测试实验当中所得结果为  $D=(20.5\pm 0.8)$  mm (大肠埃希菌),  $D=(18.2\pm 0.4)$  mm (金黄色葡萄球菌)。

综上所述,本实验利用石榴皮甲醇提取液中的多酚类物质代替传统的 NaOH 用以合成纳米 CuO,并将其固定在纸基纤维素上合成纳米 CuO 抑菌纸。通过对该方法所合成抑菌纸进行实验结果分析,推断出当所合成的纳米 CuO 颗粒在纸基纤维素上分布较为均匀团聚现象较少出现,并且颗粒粒径足够小、形态清晰时,所呈现出的抑菌效果更佳。此外,该抑菌纸的良好抑菌效果不仅得益于纳米 CuO 颗粒,还得益于石榴皮甲醇提取液中的其它多酚类物质,从而起到联合增效抑菌的效果。本实验所合成的抑菌纸可望成为抑菌创口贴的基础材料。然而,由于创口环境的复杂性,本研究还需要进一步提升其作为抑菌创口贴基础材料的实用性与普适性,选取更多样的病原菌种(可导致非特异性感染与特异性感染的病原菌)进行抗菌实验,为开发高效且低成本的创口抑菌方法提供新思路。

### 参考文献:

- [1] ROMÁN L E, GOMEZ E D, SOLÍS J L, et al. Antibacterial cotton fabric functionalized with copper oxide nanoparticles[J]. *Molecules*, 2020, 25(24): 5802.
- [2] DEJENE A, BOGALE R F, YADETA L, et al. Biogenic synthesis of copper oxide nanoparticles using *Clausena anisata* leaf and *Euphorbia abyssinica* bark extracts and its comparative study of antibacterial activities[J]. *Results Chem*, 2024, 8: 101569.

- [3] MORODA M D, DERESSA T L, TIWIKRAMA A H, et al. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *rosmarinus officinalis* leaf extract and evaluation of its antimicrobial activity[J]. *Next Mater*, 2025, 7: 100337.
- [4] HABIB H M, EL-GENDI H, EL-FAKHARANY E M, et al. Antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and anticancer activities of pomegranate juice concentrate[J]. *Nutrients*, 2023, 15(12): 2709.
- [5] SINGH B, SINGH J P, KAUR A, et al. Antimicrobial potential of pomegranate peel: a review[J]. *Int J Food Sci Tech*, 2019, 54(4): 959-965.
- [6] 宋子欣, 孙倩茹, 方嘉璇, 等. 石榴皮主要活性成分及其在化妆品中的应用研究进展[J]. *日用化学工业*, 2023, 53(10): 1211-1219.
- [7] TEKLU B, KADIRI S K, VIDAVALUR S. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Balanites aegyptiaca* stem bark extract and investigation of antibacterial activity[J]. *Results Chem*, 2023, 6: 101152.
- [8] GEREMEW A, PALMER L, JOHNSON A, et al. Multi-functional copper oxide nanoparticles synthesized using *Lagerstroemia indica* leaf extracts and their applications[J]. *Heliyon*, 2024, 10(9): e30178.
- [9] KIRLANGIC B, ÇAKMAK E. Green biosynthesis and biological properties of copper oxide nanoparticles using *paulownia tomentosa* plant extracts[J]. *ChemistrySelect*, 2024, 9(33): e202402226.
- [10] CHAKRABORTY N, BANERJEE J, CHAKRABORTY P, et al. Green synthesis of copper/copper oxide nanoparticles and their applications: a review[J]. *Green Green Chem Lett Rev*, 2022, 15(1):187-215.
- [11] 李猛, 刘江涛, 魏婉倩, 等. 石榴皮中多酚类物质的组成、提取及活性研究进展[J]. *农产品加工*, 2022 (23): 54-58.
- [12] BARBIERI M, HEARD C M. Isolation of punicalagin from *Punica granatum* rind extract using mass-directed semi-preparative ESI-AP single quadrupole LC-MS[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 166: 90-94.
- [13] SUN S, HUANG S, SHI Y, et al. Extraction, isolation, characterization and antimicrobial activities of non-extractable polyphenols from pomegranate peel[J]. *Food Chem*, 2021, 351: 129232 .
- [14] 张佳浩, 李道明, 钟小荣, 等. 石榴皮多酚的提取, 制备及其应用研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(14): 8.
- [15] 朱青, 周小凡, 马金霞, 等.  $ZnCl_2$  水溶液制备纤维素膜的研究[J]. *纤维素科学与技术*, 2014, 22(1): 59-65.
- [16] 徐甜甜, 田润达, 钱立伟, 等. 纤维素抗菌纸的制备及性能研究[J]. *中国造纸*, 2021, 40(6): 21-27.
- [17] 方燕. 抗菌纸的制备及其性能探究[J]. *纸和造纸*, 2013, 32(8): 45-48.
- [18] 张静, 冯学愚, 邱树毅. 壳聚糖在抗菌纸中的应用——抗菌纸技术性能测试[J]. *贵州工业大学学报(自然科学版)*, 2006 (3): 66-69.
- [19] 冯启明, 石黎花, 吴明, 等. 纳米氧化锌抗菌纸的制备及其抗菌性能的研究[J]. *中国造纸*, 2019, 38(3): 37-43.

(责任编辑: 林加西)