

纳米银颗粒在模拟体液中的表面吸附特性

汤京龙^{1,2} 奚廷斐^{*,1,2} 魏丽娜² 熊 玲² 王 硕²

(¹ 北京科技大学材料科学与工程学院, 北京 100083)

(² 中国药品生物制品检定所医疗器械监督检验中心, 北京 100050)

摘要: 为了了解纳米银颗粒在体内是以 Ag^+ 还是以纳米银颗粒的形式存在, 本研究设计了体外模拟试验, 考察纳米银颗粒在模拟体液中所发生的表面化学反应。将纳米银颗粒放在模拟体液中反应 5 min, 30 min, 1 h 和 4 h, 反应结束后利用 ICP-MS 测定溶解到模拟体液中的银离子浓度, 利用 TEM 观察纳米银颗粒在模拟体液中的分散状态, 利用 XPS 分析与模拟体液反应后纳米银颗粒表面化学元素组成。结果显示, 纳米银颗粒与体液接触后, 体液中的蛋白质会吸附到纳米银颗粒表面, 绝大部分纳米银颗粒转化成覆蛋白膜的颗粒, 这些覆膜颗粒可以均匀的分散在模拟体液中。只有极小一部分(小于 0.01%)的纳米银颗粒会在初始阶段溶解为 Ag^+ 。这一结果说明纳米银颗粒在模拟体液中主要是以覆蛋白膜的纳米银颗粒形式存在, 预示着在体内纳米银颗粒能够以颗粒形态在全身分布。这一特性可能会导致一些生物负效应的发生。

关键词: 纳米; 银; 颗粒; 表面; 吸附

中图分类号: O614.122; TG146.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2008)11-1827-05

Surface Adsorption of Silver Nanoparticles in Simulated Body Fluids

TANG Jing-Long^{1,2} XI Ting-Fei^{*,1,2} WEI Li-Na² XIONG Ling² WANG Shuo²

(¹ School of Materials Science and Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083)

(² National Institute for the Control of Pharmaceutical & Biological Products, Beijing, 100050)

Abstract: The present study was designed to investigate the chemical reactions on the surface of silver nanoparticles (SNPs) in simulated body fluids (SBFs) to make sure that if SNPs are in the form of Ag^+ or particles in vivo. SNPs dispersed in SBFs by a shaker for 5 min, 30 min, 1 h and 4 h. Then the silver content in SBF was analyzed by ICP-MS, the size and state of SNPs in SBFs were observed by TEM, and the constitution of SNPs in SBFs was measured by XPS, respectively. Results show that proteins in SBFs could adsorb on the surface of most SNPs and a proteinic membrane is formed outside the nanoparticles. These SNPs with a proteinic membrane could disperse in SBFs. Only a small quantity of SNPs (<0.01%) would dissolve to Ag^+ in initial 30 minutes. So we suggest that silver nanoparticles could distribute systemic in the form of particles with a proteinic membrane in vivo and these characteristics must be study in vivo.

Key words: nano; silver; particle; surface; adsorption

近年来的研究与发展表明, 纳米银颗粒具有很稳定的物理化学性能, 而且具有比普通银更优异的抗菌活性, 所以在医疗卫生领域有着广泛的应用前景^[1-4]。纳米银颗粒在医学领域的应用已经成为一个

研究热点^[5,6]。

但是, 已有一些报道称纳米颗粒具有一种普通颗粒所不具有的生物特性, 它能够以纳米颗粒状态(而不是颗粒溶解后的离子状态)进入生物体的循环

收稿日期: 2008-05-30。收修改稿日期: 2008-09-017。

国家自然科学基金(No.30770579)和“973”计划(No.2007C13936101)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: xitingfei@tom.com

第一作者: 汤京龙, 男, 32 岁, 博士研究生; 研究方向: 纳米生物材料。

系统并分布于全身,有时还能通过某些生理屏障(如血脑屏障、血睾屏障)进入到普通颗粒所无法到达的组织或脏器中,即纳米颗粒在生物体内的分布途径及靶器官具有特殊性^[7-11]。纳米颗粒的这种生物特性一方面可能带来某些正效应,例如可以利用纳米颗粒制成具有特殊靶向性的药物释放体系(如脑部药物载体)^[12-14];但是同时这种纳米颗粒独有的生物特性也可能会导致某些生物负效应的发生,如纳米颗粒能够到达某些普通颗粒无法达到的器官,并对这些器官产生毒性效应。因此有必要研究不同的纳米颗粒是否具有这种可以在体内迁移的生物特性^[15]。

现有研究显示,纳米银颗粒能够通过呼吸道进入肺部,然后从肺泡隔迁移到邻近毛细血管内的血液中并最终进入血液循环,在全身分布^[16]。研究者推测,这些经血液分布到全身的纳米银可能是以 Ag^+ 或纳米银颗粒的形式存在的,但并没有给出确定的结论,因此并不能确定纳米银颗粒具有在体内迁移的生物特性。因此,本研究通过体外模拟试验,观察纳米银颗粒与模拟体液接触后发生的化学变化,来确定纳米银颗粒是以 Ag^+ 或纳米银颗粒的形式在全身分布的,即考察是否具有以颗粒状形态在体内迁移的生物特性。

1 实验部分

1.1 试验材料

纳米银颗粒(silver nanoparticles, SNPs, 标示粒径 100 nm, 银含量超过 99.5%), 购自美国 Sigma 公司, 产品号: 576832。胎牛血清(Gibco, Beijing, China, 0.1 μm 滤膜过滤除菌)。

1.2 模拟体液(simulated body fluids, SBFs)的配制

在试验中用作模拟体液的是胎牛血清的去离子水溶液。血清中含有大量的蛋白质和氨基酸,如白蛋白、免疫球蛋白等。将血清和去离子水按照一定的比例混合制成的溶液,含有与体液相似的生物活性物质和化学组成,而且具有相似的 pH 值和渗透压,因此是一种已得到广泛使用的模拟体液。模拟体液的配制参考了 ISO 14242-1 中模拟体液的配制方法^[17],即将胎牛血清用去离子水稀释,配制成含胎牛血清 25%±2%(V/V)的模拟体液。使用前用 0.1 μm 的滤膜过滤。

1.3 纳米银颗粒在模拟体液中的反应

实验分为纳米银组和空白对照组 2 组。其中纳米银组是称量 4 份 0.1 g 纳米银颗粒,分别向每份样品中加入 12 mL 模拟体液,制成 4 份混悬液,分

别标记为 1[#]~4[#]。立刻将 1[#]~4[#] 溶液放在超声振荡仪(600 W;北京金星超声波设备技术有限公司)上超声分散 3 min,使纳米银颗粒在模拟体液中悬浮并分散均匀,之后再将 1[#]~4[#] 溶液放在摇床上,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 150 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速振荡。在 5 min、30 min、1 h 和 4 h 时(从开始超声分散时开始计时)从摇床上依次取下 1[#]~4[#] 混悬液,立刻将取下的试液经 0.050 μm 的滤膜抽滤,分别收集各样品的抽滤液和残留在滤膜上的颗粒。另外准备 4 份 12 mL 空白模拟体液,作为对照组,与 1[#]~4[#] 溶液采用同样的工艺处理,编号为 5[#]~8[#]。将 1[#]~8[#] 残留在滤膜上的颗粒连滤膜一起真空干燥,干燥后称重,减去滤膜重量后记为经模拟体液反应后剩余纳米银颗粒的质量。整个试验重复 4 次,结果按平均值±标准偏差表示。

1.4 模拟体液中纳米银颗粒的形态和尺寸

在 1.3 工艺中的抽滤步骤前,吸取少许 4[#] 混悬液,滴加 1 滴于铜网上;将铜网真空干燥后在日立 JEM-100CX 透射电子显微镜(TEM)上对纳米银颗粒尺寸和形态进行观测。

1.5 过滤后模拟体液中的银含量测定

分别吸取 1 mL 1[#]~8[#] 抽滤液,转移到 8 个消解瓶中,然后向每个消解瓶中添加 3 mL 高纯 HNO_3 静置消解;24 h 后,将消解瓶放在通风橱中低温加热,直至溶液变为澄清,再加热至近干,取下冷却。冷却后用双蒸水溶解消解瓶中残余物,并定容至 5 mL。利用等离子质谱仪(Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer, ICP-MS)测量定溶液中的银元素含量,以 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 表示。

整个试验重复 4 次,结果按平均值±标准偏差表示。

1.6 与模拟体液反应后剩余纳米银颗粒的质量及其表面元素组成的测试

将残留在滤膜上的颗粒真空干燥后,在千分之一天平上称重。称重后将 4[#] 残留颗粒和未经任何处理的纳米银颗粒分别在 X 射线光电子能谱仪(PHI Quantera 型 X-ray Photoelectron Spectrometer, ULVAC-PHI, Inc., Japan)上测定颗粒表面元素的组成,测试时用 Al 的 $K\alpha$ 射线作光源,真空室压力为 10^7 Pa,能谱用 C1s 的结合能 284.8 eV 为参比。

2 结果与讨论

2.1 在模拟体液反应后纳米银颗粒的形态和尺寸

图 1 是在模拟体液反应后纳米银颗粒的 TEM

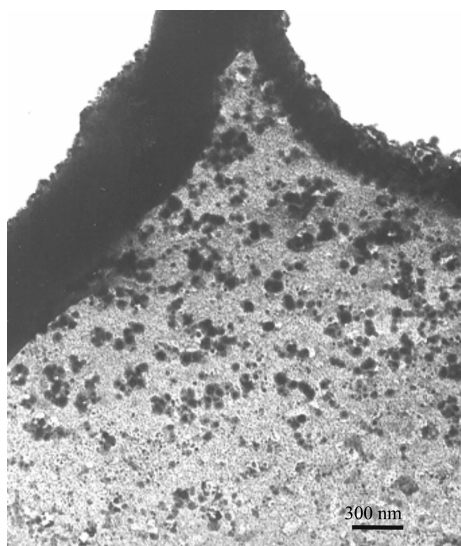


图 1 在模拟体液中纳米银颗粒的 TEM 照片

Fig.1 TEM image of SNPs in SBFs

照片,由图可知经 4 h 反应后,纳米银颗粒在模拟体液中基本上是以单分散颗粒的形式存在,分散比较均匀,单个纳米银颗粒为球形,粒径在 50~100 nm 之间。

2.2 经模拟体液反应后剩余纳米银颗粒的质量

图 2 是经模拟体液反应后剩余纳米银颗粒的质量随时间的变化曲线图。由图可以看出各时间点剩余纳米银颗粒的质量变化不大,数值均在 95.0 mg 以上。这说明在模拟体液中反应后,大部分的纳米银颗粒并没有发生溶解,而是依然以颗粒状态存在。根据 2.1 的结果,这些颗粒可以以单颗粒形式在模拟体液中均匀分散。

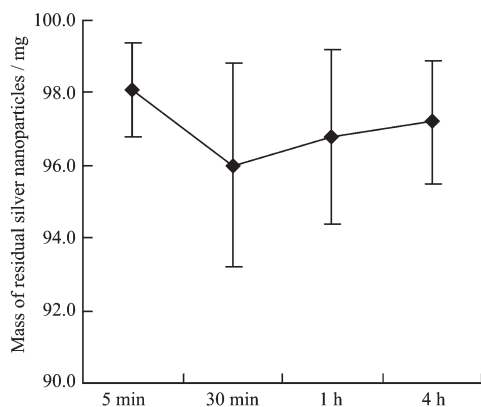


图 2 剩余纳米银颗粒质量随时间变化曲线

Fig.2 Mass of residual SNPs as a function of time

2.3 与模拟体液反应后剩余纳米银颗粒的表面元素变化

由图 3 可以看出,与模拟体液反应后,纳米银颗

粒的表面除了原有的 C、O、Ag 元素外,还出现了一种新元素——氮。表 1 的结果也显示,纳米银颗粒在反应模拟体液后,表面碳元素、氮元素的含量明显上升,而银元素的含量明显下降。此外,由图 3 内的局部放大图可以看出体液反应后的纳米银颗粒表面氮元素的峰位置为 399.8 eV,查阅 X 射线光电光谱手册可知,当氮元素以氨基形式存在时,其氮元素的峰位置为 398.8~399.8 eV^[18],故可以推测,在模拟体液中反应后,纳米银颗粒表面形成了一层新的结构,这层结构主要由碳元素、氮元素和氧元素组成,其中氮元素主要以氨基形式存在。

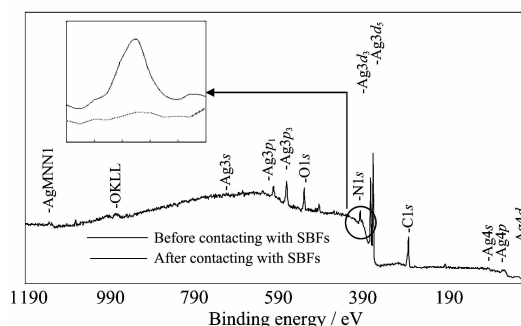


图 3 与模拟体液中蛋白反应前后纳米银颗粒的 XPS 谱图

Fig.3 XPS spectra of SNPs before and after contacting with SBFs

表 1 纳米银颗粒与模拟体液反应前后(4 h)表面主要元素组成列表(w%)

Table 1 Surface constitution of SNPs before and after(4 h) contacting with SBFs(wt %)

	C	O	Ag	N
Before contacting with SBFs	34.20	26.84	38.96	None
After contacting with SBFs	60.18	17.61	11.00	11.21

由 XPS 的检测结果可以看出,当纳米银颗粒接触体液后,表面出现了氮元素(图 3),从峰值位置来看,这些氮元素主要是以氨基存在;而且颗粒表面的碳元素百分比也大大增加(表 1)。因为模拟体液中含有大量的蛋白质和氨基酸,这些具有大量氨基主要由碳、氢、氧、氮元素组成的物质很容易吸附在体内的异物上。所以可以推断在纳米银颗粒表面发生了蛋白质的吸附,形成了覆蛋白膜的银颗粒。又因为利用 XPS 检测,只能检测到金属表面约 1~5 nm 左右厚度的元素组成,因此当纳米银颗粒和微米银颗粒表面覆上一层蛋白膜后,在可检测的厚度范围内银元素的含量就会明显减少。这一结果和一些报道相符,即纳米银颗粒接触含蛋白质的溶液后,在其表面

会发生蛋白吸附,形成覆蛋白膜的纳米银颗粒^[19-21]。

2.4 过滤后模拟体液中的银含量测定

图 4 是纳米银组(1#~4#)和空白对照组(5#~8#)模拟体液中银含量随时间的变化曲线图。因为这部分试液在测试前经过了 0.050 μm 滤膜过滤,而根据 2.1 节的结果,所使用的纳米银颗粒粒径在 50~100 nm 之间,所以可以认为此时残存在溶液中的银大部分是以 Ag^+ 形式存在,所以这部分银含量代表的是在反应过程中从纳米银颗粒上溶解到模拟体液中的银离子浓度。由图中可以看出,空白对照组中各时间点的银含量数值很小且变化不大,远低于纳米银组的测试值,这说明实验操作过程中从外界引入模拟体液中的银数量很少,纳米银组模拟体液中的银是由向体液中添加的纳米银颗粒所带来的。而由纳米银组模拟体液中银含量的变化趋势可以看出,在 0~30 min 时,体液中银的含量不断增加,30 min 以后,体液中银含量基本上趋于稳定,变化幅度不大。达到稳定时,纳米银组血清中残余银含量约为 700~770 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,因为在试验中使用了约 12 mL 模拟体液,经计算可知纳米银组模拟体液中银质量约为 8.4~9.2 μg ,不到银使用量(100 mg)的万分之一。

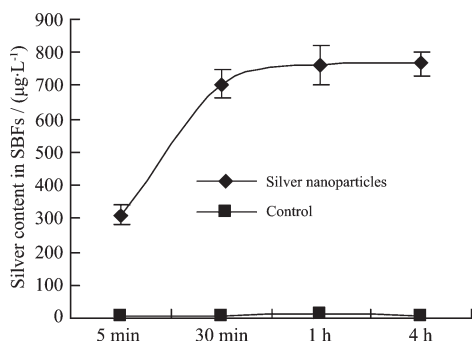


图 4 模拟体液中银含量随时间变化曲线

Fig.4 Silver content in SBFs as a function of time

一些研究已推测,纳米银颗粒在体液中会溶解为 Ag^+ ^[22,23],本研究的结果部分验证了这一推测,但是我们认为只有很少一部分纳米银颗粒能够溶解为 Ag^+ 。因为从图 4 纳米银组曲线的变化趋势可以看出,当纳米银颗粒接触体液后,会立即发生溶解反应,并不断的在体液中溶解出 Ag^+ ,但模拟体液中的蛋白质的吸附反应也开始同时进行,蛋白质不断的吸附在银颗粒的表面;到 30 min 后,一方面可能由于银的溶解反应达到平衡,但更主要的可能是由于银颗粒表面基本上被蛋白质所包覆,形成覆蛋白质膜的银颗粒,此时银离子就很难从银颗粒上溶解到

模拟体液中,此时模拟体液中的银含量就趋于稳定。从总量上分析,只有不到 0.01% 的纳米银颗粒溶解 Ag^+ ,而大部分的纳米银颗粒是以覆蛋白膜颗粒的形式存在。

2.5 纳米银颗粒在模拟体液中的变化

综合以上的实验结果可以看出,当纳米银颗粒接触模拟体液后会立刻同时发生两种变化,第一,发生溶解,迅速的向体液中逸出 Ag^+ ;第二,发生吸附,蛋白质不断的吸附在纳米银颗粒表面。因为第二个反应可以抑制第一个反应,因此,30 min 后,第一个反应基本停止,此后,随着蛋白质吸附的增加,最终使大部分的纳米银颗粒(超过 99.99%)表面形成一层蛋白质膜。这些覆蛋白质膜的纳米银颗粒相互之间没有形成硬团聚,在模拟体液中可以以单颗粒形式均匀分散。根据这一结果,可以初步断定,纳米银颗粒是以颗粒状态在全身分布,可能具有在体内迁移的生物特性。

但是本研究只采用了体外模拟的试验方法,而实际的体外试验环境和体内实际环境还是有一定差距的^[24],例如在体内环境下,纳米银颗粒可能不会均匀的接触到体液,因此,不会象体外试验那样形成完全分散的覆蛋白膜颗粒。还例如由于体液循环的存在,反应初期形成的 Ag^+ 可以被迅速的从溶解位置附近清除出去,因此也就可能溶解出更多的 Ag^+ 。因此,有必要进行进一步的体内试验,并将体外和体内的试验结果相结合,才能确定纳米银颗粒是否具有以颗粒状态在体内迁移的生物特性。

3 结 论

(1) 接触模拟体液后,只有不到万分之一的纳米银颗粒溶解为 Ag^+ 。

(2) 大部分的纳米银颗粒表面会发生蛋白质吸附,最终形成覆蛋白质膜的纳米银颗粒。这些覆蛋白质膜的纳米银颗粒可以均匀的分散在体液中。因此,纳米银颗粒可能具有在体内迁移的生物特性。有必要通过进一步的体内试验,来确定纳米银颗粒是否能以颗粒状态在体内迁移,如果可以,它会迁移到何处,是否会产生负效应。

参考文献:

- [1] Furno F, Morley K S, Wong B, et al. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2004, 54(6):1019~1024

- [2] Alt V, Bechert T, Steinrucke P, et al. *Biomaterials*, **2004**,**25** (18):4383~4391
- [3] ZHANG Wen-Zheng(张文钲), WANG Wen-Guang(王广文). *New Chemical Materials(Huagong Xinxing Cailiao)*, **2003**,**31** (2):42~44
- [4] Fu J, Ji J, Fan D, et al. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, **2006**,**79** (3):665~674
- [5] Luo C, Zhang Y, Zeng X, et al. *J. Colloid Interface Sci.*, **2005**, **288**(2):444~448
- [6] Baker C, Pradhan A, Pakstis L, et al. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2005**,**5**(2):244~249
- [7] Hoet PH, Bruske-Hohlfeld I, Salata O V. *J. Nanobiotechnology*, **2004**,**2**(1):12
- [8] Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, et al. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, **2002**,**65**(20):1531~1543
- [9] Kato T, Yashiro T, Murata Y, et al. *Cell Tissue Res.*, **2003**, **311**(1):47~51
- [10] Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, et al. *Circulation*, **2002**,**105**(4):411~414
- [11] YUAN Yuan(袁媛), LIU Chang-sheng(刘昌胜). *Bull. Chinese Ceram. Soc.(Guisuanyan Tongbao)*, **2003**,**31** (6):55~59
- [12] Kreuter J. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2004**,**4**(5):484~488
- [13] Lockman P R, Koziara J M, Mumper R J, et al. *J. Drug Targeting*, **2004**,**12**(9):635~641
- [14] Koziara J M, Lockman P R, Allen D D, et al. *J. Controlled Rel.*, **2004**,**99**(2):259~269
- [15] Oberdorster G, Finkelstein J N, Johnston C, et al. *Res. Rep. Health Eff. Inst.*, **2000**,**(96)**:5~74
- [16] Takenaka S, Karg E, Roth C, et al. *Environ. Health Perspect.*, **2001**,**109**(Suppl 4):547~551
- [17] ISO 14242-1, **2002**. Implant for surgery-Wear of total hip-joint prostheses-Part 1: Loading and displacement parameters for wear-testing machines and corresponding environmental conditions for test
- [18] Jill C, Roger C K. *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*. Published by Physical Electronics, Inc. **1995**,43
- [19] Donaldson K, Stone V, Tran CL, et al. *Occup. Environ. Med.*, **2004**,**61**(9):727~728
- [20] Takenaka S, Karg E, Möller W, et al. *Inhal. Toxicol.*, **2000**, **12**(suppl 3):291~299
- [21] JIANG Zhi-Liang(蒋治良), CHEN Yuan-Yuan(陈媛媛), LIANG Ai-Hui(梁爱惠), et al. *Science in China Ser. B Chem.(Zhongguo Kexue B ji Huaxue)*, **2006**,**36**(5):419~424
- [22] Lippmann M, Yeates D B, Albert R E. *Br. J. Ind. Med.*, **1980**,**37**(4):337~362
- [23] Ernst E, Runghy J, Baatrup E. *J. Appl. Toxicol.*, **1991**,**11**(5): 317~321
- [24] Christine V, Catherine D, Elias F, et al. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2003**,**55**(4):519~548