

# 磷酸胆碱两性离子修饰的水溶性纳米银

金桥, 刘湘圣, 徐建平, 计剑\*, 沈家骢

浙江大学高分子科学与工程学系, 教育部高分子合成与功能构造重点实验室, 杭州 310027

\* 联系人, E-mail: [jjian@zju.edu.cn](mailto:jjian@zju.edu.cn)

收稿日期: 2008-03-09; 接受日期: 2008-04-29

国家自然科学基金(批准号: 20774082, 50703036)和国家高技术研究发展计划(编号: 2006AA03Z329, 2006AA03Z444)资助项目

**摘要** 用硼氢化钠还原硝酸银的方法制备了磷酸胆碱两性离子修饰的纳米银. 通过紫外可见光谱研究显示磷酸胆碱两性离子修饰的纳米银在高盐浓度和血浆体系中均具有良好的稳定性. 通过与硫普罗宁和柠檬酸钠修饰纳米银对比, 磷酸胆碱两性离子修饰的纳米银在聚电解质和蛋白质溶液中显示出更好的生物稳定性, 磷酸胆碱两性离子可能是一种更好的金属纳米微球稳定试剂.

**关键词**  
纳米银  
磷酸胆碱  
两性离子  
仿生

## 1 研究背景

纳米银作为一种纳米材料, 由于其粒径小、比表面积大、表面反应活性高, 具有较高催化性和抗菌性能, 在催化、电极材料、分子生物学、医药卫生和生物医学等领域具有广阔的应用前景<sup>[1,2]</sup>. 但由于纳米银表面能高, 易氧化或团聚, 使其研究和应用受到了限制, 因此必须对其进行表面修饰. 常用的纳米银表面修饰剂有巯基乙酸、巯基乙胺、半胱氨酸和多肽等. 虽然通过表面修饰可以提高纳米银在水中的稳定性, 但在更接近生理环境的电解质溶液体系中, 纳米银的稳定性却并不理想. 如Li等人<sup>[3]</sup>研究发现, 在巯基乙酸修饰的纳米银溶液中加入 0.5 mol/L KCl 溶液, 会降低修饰粒子的稳定性, 加速粒子的团聚, 并且其光学性质随时间有很大变化. 通过噬菌体表面表达技术(phage display technique)<sup>[4,5]</sup>, 多肽被广泛应用于纳米银的合成和稳定. 但在电解质溶液中, 多肽稳定纳米银的聚集还是不可避免.

血红细胞具有由磷脂分子自组装形成的双层膜. 细胞生物学研究表明, 细胞膜外层带有等量正电荷

和负电荷的卵磷脂不会激活内源性凝血途径<sup>[6]</sup>. 因此人们设计了磷酸胆碱基细胞膜仿生物材料, 有效地改善了材料的血液相容性<sup>[7,8]</sup>. 近几年, 磷酸胆碱基可聚合单体, 2-(甲基丙烯酰氧基)乙基-2-(三甲基氨基)乙基磷酸酯(MPC), 开始被应用于纳米粒子的表面改性, 以提高纳米粒子的稳定性和生物相容性<sup>[9-11]</sup>. 本研究利用巯基和金属的强相互作用, 合成了巯基化的磷酸胆碱, 探索采用两性离子代替离子性或非离子性基团, 实现金属纳米微球的稳定性和生物相容性.

## 2 实验部分

### 2.1 试剂及仪器

巯基化的磷酸胆碱(HS-PC, 分子式见图 1)参照文献<sup>[12]</sup>合成. 硝酸银(AgNO<sub>3</sub>), 上海试剂一厂; 硼氢化钠(NaBH<sub>4</sub>), 天津市化学试剂研究所; 硫普罗宁, 武汉远大制药集团有限公司; 鱼精DNA、小牛血清白蛋白(BSA)、溶菌酶(Lys), 上海生工生物工程技术有限公司; 聚苯乙烯磺酸钠(PSS)、聚烯丙基胺

(PAH)、聚丙烯酸(PAA), Sigma-Aldrich公司. 其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司. 所有试剂均为分析纯.

抗凝血浆, O型, 含 ACD 抗凝剂, 贮存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中, 使用前在 $37^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中解冻. 由杭州市血液中心提供.

傅里叶转换红外(TF-IR)是在 Vector2, BRUKER 型红外光谱仪上测; 用日本电子株式会社(JEOL)生产的 JEM-1200EX 型透射电子显微镜观察纳米银的尺寸和分布, 操作电压为 200 kV, 用统计平均的方法计算粒径; 用日本 Shimadzu 公司生产的 UV-2550 型紫外光谱仪测定吸收光谱.

## 2.2 HS-PC 稳定的纳米银的制备

HS-PC稳定的纳米银的制备参照文献[13]进行. 反应前, 所有玻璃仪器都用王水( $\text{HNO}_3/\text{HCl}$  1:3)洗. 在冰浴冷却下, 将 30 mL三蒸水加入到单口烧瓶中, 再加入 2.2 mg  $\text{NaBH}_4$ . 在剧烈搅拌下, 向溶液中逐滴滴加 $\text{AgNO}_3$ 水溶液(1.7 mg, 10 mL), 得到亮黄色溶液. 滴完后, 向纳米银溶液中加入 0.2 mmol的HS-PC, 继续搅拌 24 h. 反应结束后, 对纳米银溶液透析, 透析液为磷酸盐缓冲液(PB, 10 mmol/L, pH7.4).

## 2.3 硫普罗宁和柠檬酸钠稳定的纳米银的制备

硫普罗宁和柠檬酸钠稳定的纳米银的制备与 HS-PC 稳定的纳米银的制备相同, 只是所用的稳定剂是硫普罗宁或柠檬酸钠.

## 2.4 纳米银溶液的稳定性测试

纳米银溶液在不同盐浓度下的稳定性测试: 将纳米银溶液和 PB 溶液(10 mmol/L, pH7.4)等量混合, 再加入需要量的 NaCl, 静置 10 min, 再进行紫外测试(图 1).

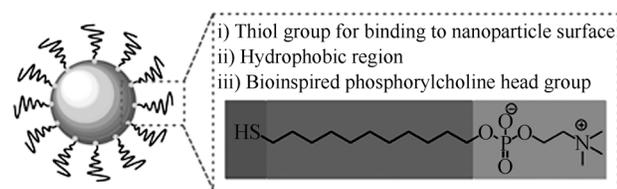


图 1 HS-PC 稳定的纳米银的示意图

纳米银溶液在生理磷酸盐缓冲液(PBS, 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 2.9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶于 1000 mL 三蒸水中, pH7.4)中的稳定性测试: 将纳米银溶液离心, 再分散于一定量的 PBS 中, 静置 10 min, 再进行紫外测试. 10 min 后, 再用紫外跟踪一次.

纳米银溶液在血浆中的稳定性: 抗凝血浆在 $37^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中解冻后, 与纳米银溶液等量混合, 在 $37^{\circ}\text{C}$ 下静置 10 min 后, 进行紫外测试. 10 min 后, 再用紫外跟踪一次. 在进行紫外测试时, 用血浆溶液作基线.

纳米银溶液在聚电解质溶液中的稳定性: 将聚电解质(PSS, PAA, PAH)溶于 10 mmol/L PB 溶液中(pH7.4), 使聚电解质浓度为 20 mg/mL. 将纳米银溶液和聚电解质溶液等量混合, 使纳米银分散于 10 mg/mL 的聚电解质中, 静置 24 h 后, 观察是否有沉淀产生.

纳米银溶液在蛋白质和 DNA 溶液中的稳定性: 将蛋白质(BSA, Lys)或 DNA 溶于 10 mmol/L PB 溶液中(pH7.4), 使其浓度为 2 mg/mL. 将纳米银溶液和蛋白质或 DNA 溶液等量混合, 使纳米银分散于 1 mg/mL 的蛋白质或 DNA 溶液中, 静置 24 h 后, 观察是否有沉淀产生.

## 3 结果与讨论

湿化学还原法制备的纳米粒子, 往往经历了成核和生长的形成过程. HS-PC 作为稳定剂加入到纳米银溶液后, 立即结合到其表面, 形成 HS-PC 稳定的纳米银. 通过透射电镜(TEM)观察, 所获得的纳米银大小为 $(7.8 \pm 2.4)$  nm, 分布较为均匀, 没有团聚现象(图 2).

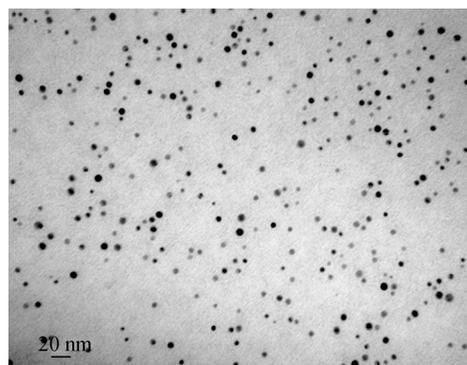


图 2 HS-PC 稳定的纳米银的 TEM 照片

本研究通过傅立叶转换红外(FT-IR)跟踪了 HS-PC 对纳米银的改性过程. 不加稳定剂的纳米银参照实验部分 2.2 制得, 滴加  $\text{AgNO}_3$  得到亮黄色溶液后, 继续搅拌 0.5 h, 然后离心, 再抽真空干燥后, 用 KBr 压片做红外. 对于 HS-PC 稳定的纳米银(图 3(b)) 谱图上  $1185, 1120 \text{ cm}^{-1}$  来源于  $-\text{POCH}_2-$  的吸收峰,  $2928$  和  $2853 \text{ cm}^{-1}$  来源于  $-\text{CH}_2$  和  $-\text{CH}_3$  的特征吸收峰. 这些特征峰同样存在于 HS-PC 的 FT-IR 谱图中(图 3(a)), 但却不存在于不加稳定剂的纳米银的 FT-IR 谱图中(图 3(c)). 因此, 由 FT-IR 谱图表明, HS-PC 成功地对纳米银进行了修饰.

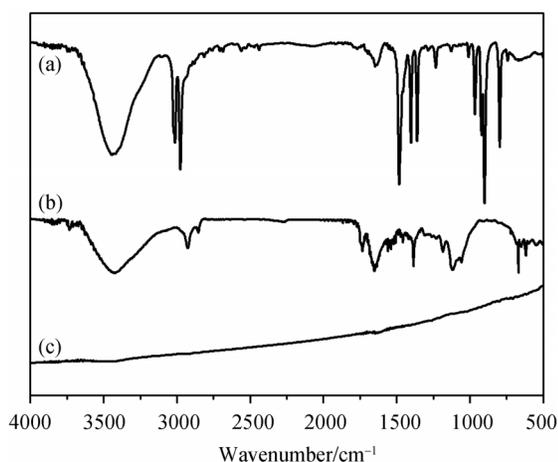


图 3 HS-PC (a)、HS-PC 稳定的纳米银 (b)、不加稳定剂的纳米银(c)的 FT-IR 谱图

将纳米粒子应用于医药卫生和生物医学领域, 纳米粒子在高盐浓度和蛋白质下的稳定性是必不可少的. 纳米银是一种具有很大的Hamaker常数的高度可极化的金属. 在高离子强度的情况下, 纳米银粒子之间的范德华吸引力往往会强于表面配体(如柠檬酸钠)的静电或空间排斥力, 从而导致纳米银的聚集. 研究发现<sup>[14,15]</sup>, 仿细胞膜的磷酸胆碱极性基团能结合大量的水, 可以与水分子形成非常牢固的水合层. Whitesides课题组<sup>[16]</sup>也发现, 由于静电相互作用, 两性离子具有强的水合能力. 这为两性离子作为稳定剂稳定纳米粒子提供了理论基础. 同时, 由于磷酸胆碱基团的独特的仿细胞膜特性, 也为磷酸胆碱修饰的纳米粒子在高盐浓度下的稳定提供了可能. 本实验研究了HS-PC修饰的纳米银在不同NaCl浓度下的

稳定性. 由图 4, 在高达  $2000 \text{ mmol/L}$  的NaCl浓度下, HS-PC修饰的纳米银仍然具有良好的稳定性. 同时, 纳米银在生理PBS和血浆中, 同样具有优异的稳定性(图 5).

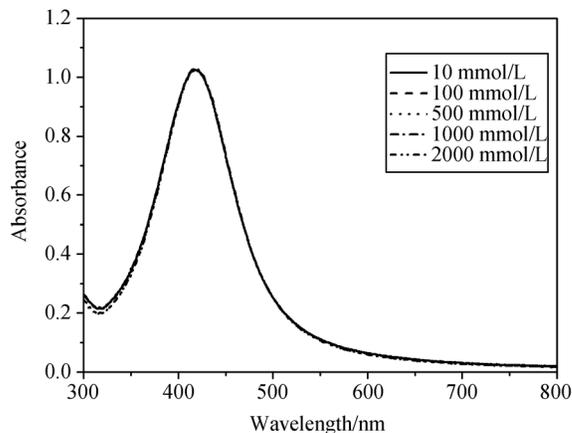


图 4 HS-PC 修饰的纳米银在不同 NaCl 浓度下的稳定性 (10~2000 mmol/L)

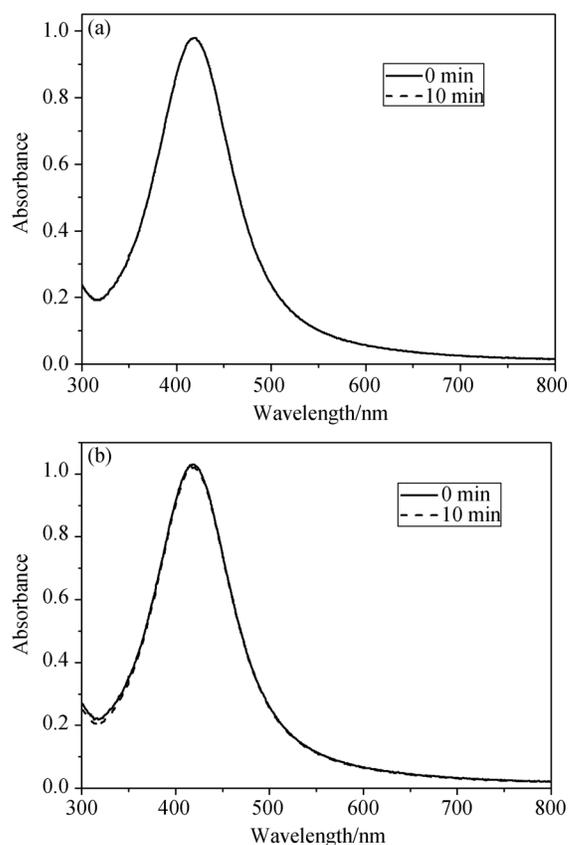


图 5 HS-PC 修饰的纳米银在生理 PBS(a)和血浆(b)中的 UV 谱图

我们还对 HS-PC 修饰的纳米银在聚电解质和蛋白质溶液中的稳定性进行了研究. 本研究制备了硫普罗宁和柠檬酸钠修饰的纳米银, 用来和 HS-PC 修饰的纳米银进行对比. 由表 1 可以看出, 基于 HS-PC 的磷酸胆碱两性离子修饰纳米银不仅在聚阳离子溶液中(PAH)具有很好的稳定性, 在聚阴离子溶液中(PSS, PAA)也具有很好稳定性, 同时在 DNA 溶液中也不会引起聚集. 与传统的硫普罗宁和柠檬酸钠相

比, 基于磷酸胆碱两性离子的 HS-PC 稳定的金属纳米微粒具有在更广环境范围中的稳定性. 进一步, 向 HS-PC 修饰的纳米银溶液中加入带正电的蛋白质溶菌酶(Lys)或带负电荷的蛋白质小牛血清白蛋白(BSA), 也不会引起纳米粒子的聚集, 表明了 HS-PC 修饰的纳米银可有效抵抗不同蛋白质的非特异性作用, 为进一步通过活性配体交换和固定制备高选择性的功能纳米微粒提供了可能手段.

**表 1 不同稳定剂稳定的纳米银在聚电解质和蛋白质溶液中的稳定性比较**

溶液组成	所选用的稳定剂		
	HS-PC	硫普罗宁	柠檬酸钠
PAH	稳定	稳定	稳定
PAA	稳定	聚集	稳定
PSS	稳定	聚集	聚集
DNA	稳定	聚集	稳定
Lys	稳定	聚集	聚集
BSA	稳定	聚集	稳定

## 4 结论

本文通过湿化学法制备了磷酸胆碱修饰的纳米银. 由于其仿细胞膜特性, 磷酸胆碱修饰的纳米银在高盐浓度下(2000 mmol/L NaCl)和血浆环境中仍具有良好的生物稳定性. 与传统的硫普罗宁和柠檬酸钠相比, HS-PC 稳定的金属纳米微粒具有在更广环境范围中的稳定性, 在聚阳离子和聚阴离子电解质溶液均表现出良好的稳定性, 并可有效抵抗带正电荷和负电荷的蛋白质的非特异性吸附, 因此可能在生物医学领域显示出广阔的应用前景.

## 参考文献

- 1 Wu S, Zhao H T, Ju H X, Shi C G, Zhao J W. Electrodeposition of silver DNA hybrid nanoparticles for electrochemical sensing of hydrogen peroxide and glucose. *Electrochem Commun*, 2006, 8: 1197—1203 [\[DOI\]](#)
- 2 Malick K, Witcomb M, Scurrell M. Silver nanoparticle catalysed redox reaction: An electron relay effect. *Mater Chem Phys*, 2006, 97: 283—287 [\[DOI\]](#)
- 3 Li X L, Zhang J H, Xu W Q, Jia H Y, Wang X, Yang B, Zhao B, Li B F, Ozaki Y. Mercaptoacetic acid-capped silver nanoparticles colloid: formation, morphology, and SERs activity. *Langmuir*, 2003, 19: 4285—4290 [\[DOI\]](#)
- 4 Naik R R, Jones S E, Murray C J, McAuliffe J C, Vaia R A, Stone M O. Peptide templates for nanoparticle synthesis derived from polymerase Chain Reaction-Driven phage display. *Adv Funct Mater*, 2004, 14: 25—30 [\[DOI\]](#)
- 5 Naik R R, Stringer S J, Agarwal G, Jones S E, Stone M O. Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles. *Nat Mater*, 2002, 1: 169—172 [\[DOI\]](#)
- 6 Ishihara K, Nomura H, Mihara T, Kurita K, Iwasaki Y, Nakabayashi N. Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption? *J Biomed Mater Res*, 1998, 39: 323—330 [\[DOI\]](#)
- 7 徐建平, 计剑, 陈伟东, 范德增, 孙福玉, 沈家骥. 磷酸胆碱基细胞膜仿生药物缓释涂层材料的研究. *高等学校化学学报*, 2004, 25: 188—190
- 8 Morimoto N, Watanabe A, Iwasaki Y, Akiyoshia K, Ishihara K. Nano-scale surface modification of a segmented polyurethane with a phospholipid polymer. *Biomaterials*, 2004, 25: 5353—5361 [\[DOI\]](#)
- 9 吴楠, 金桥, 计剑. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒子的磷酸胆碱仿细胞膜修饰. *材料研究学报*, 2007, 21: 589—591
- 10 Xu J P, Ji J, Chen W D, Shen J C. Novel biomimetic polymersomes as polymer therapeutics for drug delivery. *J Control Release*, 2005, 107: 502—512 [\[DOI\]](#)

- 11 Xu J P, Ji J, Chen W D, Shen J C. Novel biomimetic surfactant: synthesis and micellar characteristics. *Macromol Biosci*, 2005, 5: 164—171 [\[DOI\]](#)
- 12 Chen S, Zheng J, Li L, Jiang S. Strong resistance of phosphorylcholine self-assembled monolayers to protein adsorption: insights into nonfouling properties of zwitterionic materials. *J Am Chem Soc*, 2005, 127:14473—14478 [\[DOI\]](#)
- 13 Schofield C L, Haines A H, Field R A, Russell D A. Silver and gold glyconanoparticles for colorimetric bioassays. *Langmuir*, 2006, 22: 6707—6711 [\[DOI\]](#)
- 14 van der Heiden A P, Goebbels D, Pijpers A P, Koole L H. A photochemical method for the surface modification of poly(etherurethanes) with phosphorylcholine-containing compounds to improve hemocompatibility. *J Biomed Mater Res*, 1997, 37: 282—290 [\[DOI\]](#)
- 15 Chapman D. Biomembranes and new hemocompatible materials. *Langmuir*, 1993, 9: 39—45 [\[DOI\]](#)
- 16 Holmlin R E, Chen X, Chapman R G, Takayama S, Whitesides G M. Zwitterionic SAMs that resist nonspecific adsorption of protein from aqueous buffer. *Langmuir*, 2001, 17: 2841—2850 [\[DOI\]](#)