科学通报 2011 年 第 56 卷 第 1 期: 27 ~ 34
论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

典型环境及生物因子对商品化纳米银颗粒稳定性的影响

刘伟, 周群芳, 刘稷燕, 傅建捷, 江桂斌*

中国科学院生态环境研究中心环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085
* 联系人, E-mail: gbjiang@rcees.ac.cn

2010-05-25 收稿, 2010-12-11 接受
国家自然科学基金(B20977100)、国家重点基础研究发展计划(2009CB421605)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-420-21)资助

摘要 纳米银在商品化产品中的广泛应用使其潜在环境风险备受关注. 纳米银在环境中的危害程度与其在环境中的分散性以及颗粒稳定性密切相关. 目前, 关于纳米银稳定性的研究数据还非常匮乏. 本文探讨了离子强度、价态、生物分子成分、pH 等环境及生物因素对纳米银颗粒特征吸收峰、粒径、Zeta 电位、银离子释放率等性质的影响. 发现离子强度、价态、无血清培养基、温度及多种环境因子的联合作用会破坏纳米银颗粒的稳定性. 而在含有血清成份的培养基环境中(生物小分子、盐类、蛋白质、37℃), 纳米银可以保持稳定的纳米尺度特性. 本文的工作为纳米银生态环境效应及毒性的研究提供了重要的参考.

关键词
纳米银
环境因素
生物因素
稳定性

纳米材料是结构中至少有一维处于纳米尺寸范围内的材料的统称. 在纳米尺度范围内, 材料具有异于常规材料的物理化学性质(如高比表面积、粒径调控荧光、电子隧道效应等)[1~3]. 由于这些特殊的物理化学性质, 纳米材料在光学、电子、生物、医药等领域具有重要的应用价值[4,5]. 目前, 纳米材料作为药物载体、催化剂、分子诊断标记物等已经得到实际的应用[6]. 纳米银是应用最为广泛的纳米材料之一, 主要应用于抗菌剂、催化剂、医药、生物传感器等产品中[7~11]. 这些应用使纳米银跟人体密切接触并被释放到环境中[12,13]. 因此, 纳米银的健康效应以及环境安全性引起了人们的关注.

纳米银的生物活性依赖于多种因素, 如粒径大小[14]、表面修饰基团[15]以及银离子释放率[16]等. 研究表明, 在纳米尺度内, 粒径较小的纳米银颗粒更容易进入细胞内, 从而导致更强的生物活性及生物损伤[17]. 在颗粒表面进行不同的修饰可以改变纳米银颗粒的生物活性, 如在纳米银表面包裹可生物降解的多聚体可以降低其毒性作用[18]. 另外, 有研究表明, 颗粒表面银离子的释放是纳米银产生毒性的主要原因之一[16]. 在本文中, 纳米银的稳定性主要包括其粒径大小、银离子释放率等物理化学性质的稳定性[19]. 当纳米银的稳定性遭到破坏, 纳米银颗粒将发生团聚现象, 颗粒粒径增加, 部分或全部失去纳米材料的特征性质. 颗粒的团聚将影响细胞对颗粒的吸收和吞噬作用[20], 从而影响颗粒的生物可利用性和毒性. 因此, 纳米颗粒发生团聚后, 其生物活性和毒性将发生改变[21]. 在对纳米材料毒性效应的研究中, 纳米颗粒在实验介质(细胞、菌类培养基)中的团聚现象是普遍存在的[22]. 介质中的离子、蛋白质、实验温度、pH 等条件均有可能导致纳米颗粒的稳定性被破坏, 从而发生聚集和团聚的现象. 因此, 弄清纳米银在环境介质及生物环境中的分散状态和存在形式是研究纳米银环境健康效应以及解释其毒性机理的前提. 纳米银在环境介质、生物体微环境中的稳定性决定了其生物有效性和生物毒性的大小, 而目前纳米银在环境中的稳定性及其影响因素的研究还未见报道.

英文版见: Liu W, Zhou Q F, Liu J Y, et al. Environmental and biological influences on the stability of silver nanoparticles. Chinese Sci Bull, 2011, 56, doi: 10.1007/s11434-010-4332-8

基于以上研究背景, 本文研究了离子强度、离子价态、温度、pH、生物分子等环境及生物因素对纳米银稳定性的影响, 为纳米银生物学效应的研究及毒性机理的阐释提供了依据.

1 实验

1.1 实验试剂

纳米银为棕黄色溶胶, 购自上海沪正纳米技术有限公司. 将纳米银溶胶于 12000 r/min 离心 20 min, 弃去上层清液, 用二次去离子水重新冲悬. 重悬纳米银用 ICP-MS 标定摩尔浓度为 4.89 mmol/L, 作为存储液避光保存在 4℃. 存储液可稳定分散 3 个月以上.

盐类试剂(NaCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $FeCl_3$ 等, 分析纯)购自北京化学试剂公司. 细胞培养基 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glucose)购自美国 Hyclone 公司. 胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司.

1.2 仪器

透射电子显微镜(TEM, Hitachi H-7500, Japan)用于观察纳米银颗粒形貌; 核酸蛋白分析仪(Beckman Coulter DU 800, USA)用于扫描纳米银的紫外吸收光谱并测定其特征吸收峰值; 激光粒度分析仪(Malvern nano ZS, UK)用于测定纳米银粒径及 Zeta 电位; 银离子选择性电极(Ag-ISE; JENCO, China)用于测定纳米银在介质中的银离子释放率; 电感耦合等离子体-质谱(ICP-MS, Agilent 7500, USA)用于测定纳米银溶胶中银的含量.

1.3 实验方法

(1) 纳米银在不同离子强度与价态溶液中的分散. 利用二次去离子水配制 1 mol/L NaCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $FeCl_3$ 溶液. 稀释至不同浓度的工作液 10 mL. 浓度梯度为 100 μmol/L, 1 mmol/L, 10 mmol/L 以及 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 mol/L. 向各工作液中加入 20 μL 纳米银存储液, 使纳米银的浓度为 100 μmol/L. 旋涡振荡 10 min, 室温放置 30 min 和 8 h, 扫描各溶液的紫外吸光光谱并测定 400 nm 处的吸光度值.

(2) 纳米银在不同 pH 溶液中的分散. 利用 1 mol/L HCl 和 NaOH 调节二次去离水的 pH, 使其 pH 分别为 4.2, 5.4, 6.4, 7.6, 8.4, 取不同 pH 溶液 10 mL, 加入 20 μL 纳米银存储液, 使纳米银的浓度为 100 μmol/L. 旋涡振荡 10 min, 室温放置 30 min 和 8 h, 测定 400 nm 处的吸光度值.

(3) 纳米银在细胞培养基中的分散. 分别向 10 mL 无血清培养基(DMEM)和含10%胎牛血清培养基(DMEM+FBS)中加入 20 μL 纳米银存储液, 使纳米银的浓度为 100 μmol/L. 旋涡振荡 10 min, 室温放置 30 min 和 8 h, 扫描各溶液的紫外吸光光谱并测定 400 nm 处的吸光度值.

(4) 纳米银溶液在不同温度下的分散. 根据上述方法配制 0.2 mol/L NaCl, $CaCl_2$ 以及 DMEM, DMEM+FBS, 加入 20 μL 纳米银存储液, 旋涡振荡 10 min, 分别放入 4, 20, 37℃温箱, 放置 8 h, 扫描各溶液的紫外吸光光谱并测定 400 nm 处的吸光度值.

2 结果与讨论

2.1 纳米银的表征

利用 TEM 测定纳米银的形貌, 如图 1 所示. 纳米银呈规则球形, 均匀分散. 利用 ICP-MS 标定摩尔浓度为 4.89 mmol/L. 测定其粒径为 23.8±6.7 nm. 在 400 nm 处具有特征吸收峰.

2.2 离子强度和离子价态对纳米银稳定性的影响

纳米银在 400 nm 处的特征吸收峰可以用来表示纳米银颗粒在溶液中的稳定性. 当峰值降低或半峰宽增加时, 说明纳米银颗粒在溶液中发生聚集现象, 小颗粒聚合成较大颗粒. 当特征峰消失时, 说明纳米银颗粒在溶液中的稳定分散状态被破坏, 颗粒形成微米级大颗粒并产生团聚现象[23]. 在 NaCl 浓度为

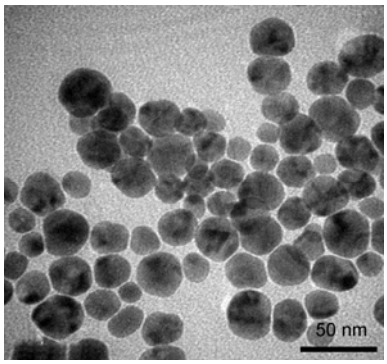

图 1 纳米银的 TEM 图像

0.5 mol/L 的溶液中，溶液离子强度为 0.5 mol/L，纳米银的特征吸收峰值有小幅度降低，半峰宽没有发生改变(图 2(a)和(b))．而在 0.5 mol/L 的 $CaCl_2$ 溶液中，离子强度为 2 mol/L，纳米银特征峰值从 1.8 降低至 0.5，半峰宽明显增加(图 2(c)和(d))．这一结果揭示了溶液的离子强度增加会促进纳米银的团聚，破坏其分散体系的稳定性．同时也可以看出，与一价离子相比，二价离子更容易增加纳米银溶液的不稳定性．为了验证价态对纳米银稳定性的作用，利用二价的 Mg^{2+}进行重复实验，发现 Mg^{2+}与 Ca^{2+}具有相似的作用，并且会使纳米银在 500 nm 产生明显的团聚峰(图 3)．团聚峰的位置是与纳米银团聚后形成的颗粒大小有关的，形成的颗粒越大，其吸收的波长越长，因此其吸收峰的位置会红移．Fe^{3+}对纳米银稳定性的影响更为显著，在 200 μmol/L 就能使纳米银分散体系彻底瓦解(图 4)．这是由于 Fe^{3+}不仅具有较高的价态，同时也具有较强的氧化性导致的．

在自然环境和生物体环境中，以上金属离子都是普遍存在的．纳米银在含有高价态离子的介质中更容易发生团聚，丧失其纳米特性．这与纳米 TiO_2 的报道结果是一致的[24]．这一结果在纳米银的生态环境影响评价中需要予以考虑．

2.3 生物分子对纳米银稳定性的影响

体外毒性实验是毒性评价的一种重要方法和手段．培养基是体外生物学实验中经常用到的介质，培养基中含有大量的盐类和多种氨基酸，通常还会添加血清成分，其成分和性质接近于体内液体．在对纳米材料的体外毒性评价中，纳米材料悬浮于培养基中对细胞或细菌进行暴露．因此，纳米颗粒在培养基中的稳定性将影响毒性结果及其机理的探讨．本文选用一种常用的细胞培养基 DMEM，研究了纳米银在其中的稳定性．

从图 5 可以看到，纳米银加入无血清培养基 DMEM 中 8 h 后，特征峰完全消失，在 680 nm 处出现团聚颗粒的峰，说明无血清培养基中的成分(氨基酸和盐类)能够促使纳米银发生沉淀．而在加有 10% 胎牛血清的培养基中，8 h 后纳米银依然能够以稳定的分散状态存在，说明培养基中的血清成分能够很好地保护纳米银颗粒的稳定性．这与纳米银在另一种典型培养基 RPMI 中的结果是完全相同的[25]．这是由于血清中的蛋白质分子与纳米银颗粒结合，使纳

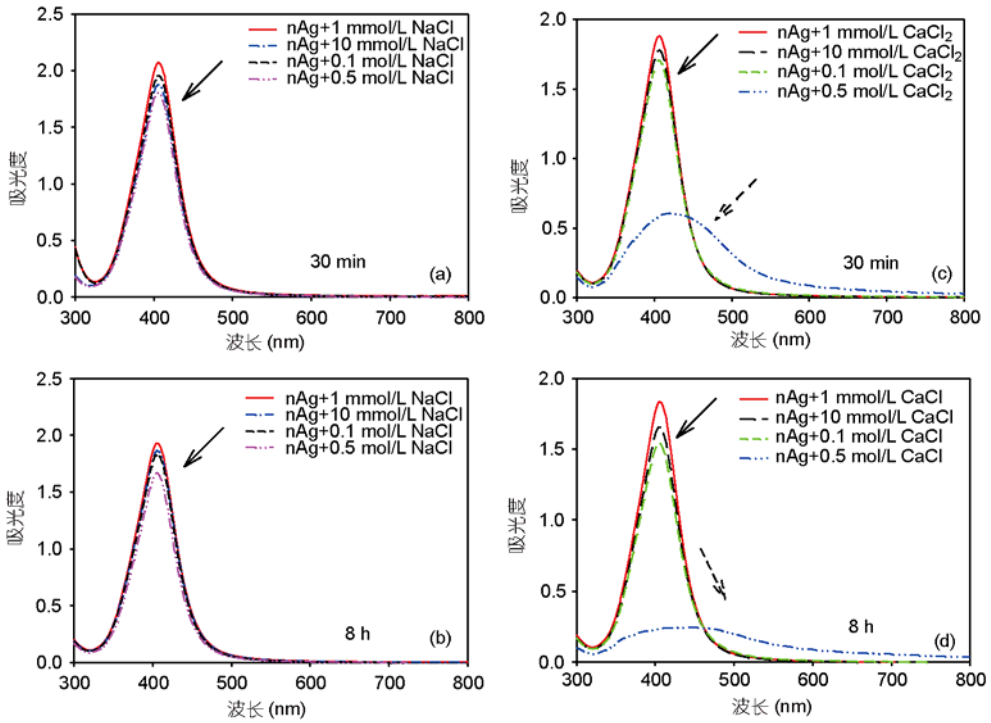

图 2 NaCl 和 $CaCl_2$ 对纳米银特征吸收峰的影响

实箭头指示纳米银特征峰，虚箭头指示特征峰降低并变宽

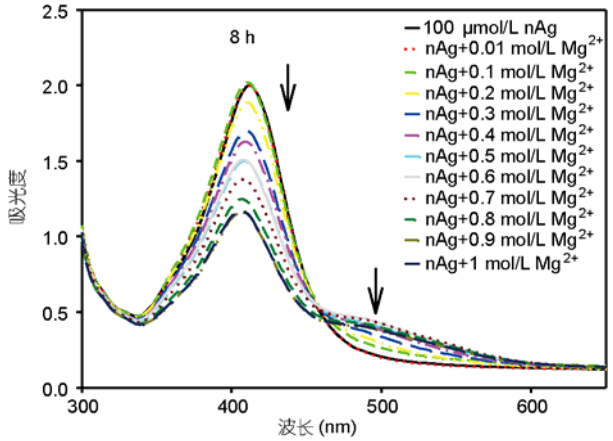

图 3 $MgCl_2$ 对纳米银特征吸收峰的影响

箭头指示纳米银特征峰值降低并于 500 nm 处出现团聚颗粒产生的谱峰

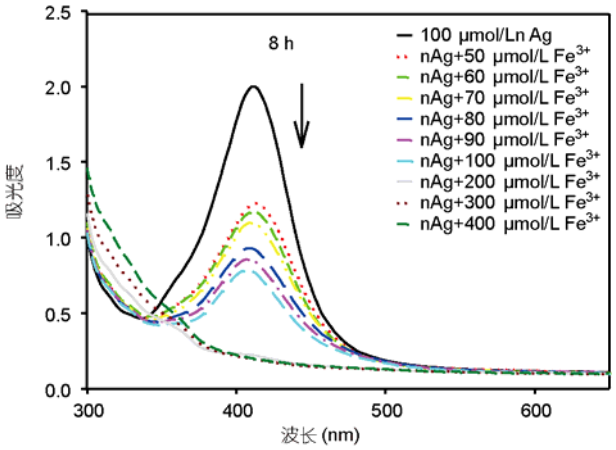

图 4 $FeCl_3$ 对纳米银特征吸收峰的影响

米银颗粒表面电荷不受培养基中的离子干扰[26]. 因此, 在纳米银的细胞毒性研究中, 使用含有血清成分的培养基进行毒性评价, 能够保证纳米银维持分散状态. 可以推测, 由于体内含有大量的蛋白质分子, 纳米银进入生物体内后将能够维持其纳米状态.

2.4 温度对纳米银稳定性的影响

温度是环境中影响物质稳定性以及化学、生物活性的重要因素. 本实验选取了 3 个典型的环境温度: 4, 20, 37℃, 研究温度对纳米银稳定性的影响. 从图 6 中可以看出, 温度升高至 37℃时, 纳米银在二次去离子水中的稳定不受影响, 但是在离子强度较高的溶液以及培养基中均能产生团聚现象, 说明温度升高能够促进纳米银在不稳定体系中的团聚. 而在含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 即使在 37℃下, 纳米银仍然能够保持良好的稳定性.

2.5 pH 对纳米银稳定性的影响

pH 在 4.2~8.4 范围内是自然环境与生物体内的常见 pH 范围, 在此 pH 范围内, pH 的改变不会造成纳米银特征峰的改变(图 7), 也不会造成其他吸收峰的生成, 纳米银能够保持稳定的分散状态. 推测形成这一结果的原因是: 本实验使用的纳米银为溶胶, 因此颗粒表面具有稳定的双电层结构, 在 pH 4.2~8.4 的变化范围内, H^+浓度的改变幅度较小, 不足以引起纳米银颗粒表面双电层结构的破坏, 因此颗粒稳定性不发生改变.

2.6 环境因素对纳米银粒径和 Zeta 电位的影响

利用激光粒度分析仪测定纳米银的粒度变化. 可以看出, 在 0.2 mol/L $CaCl_2$, DMEM 体系中, 37℃下, 纳米银的粒径增加至微米级(图 8), 而在含有

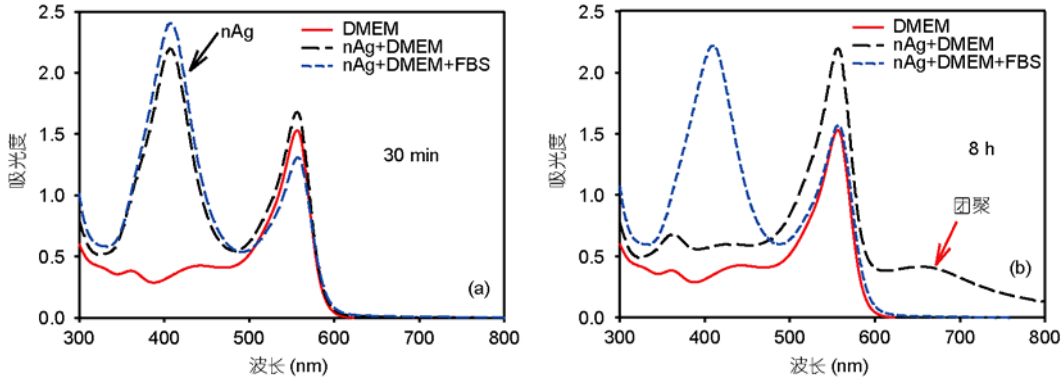

图 5 纳米银在培养基中的稳定性

400 nm 处是纳米银的特征吸收峰, 550 nm 处是培养基中酚红的吸收峰

(a) 30 min; (b) 8 h

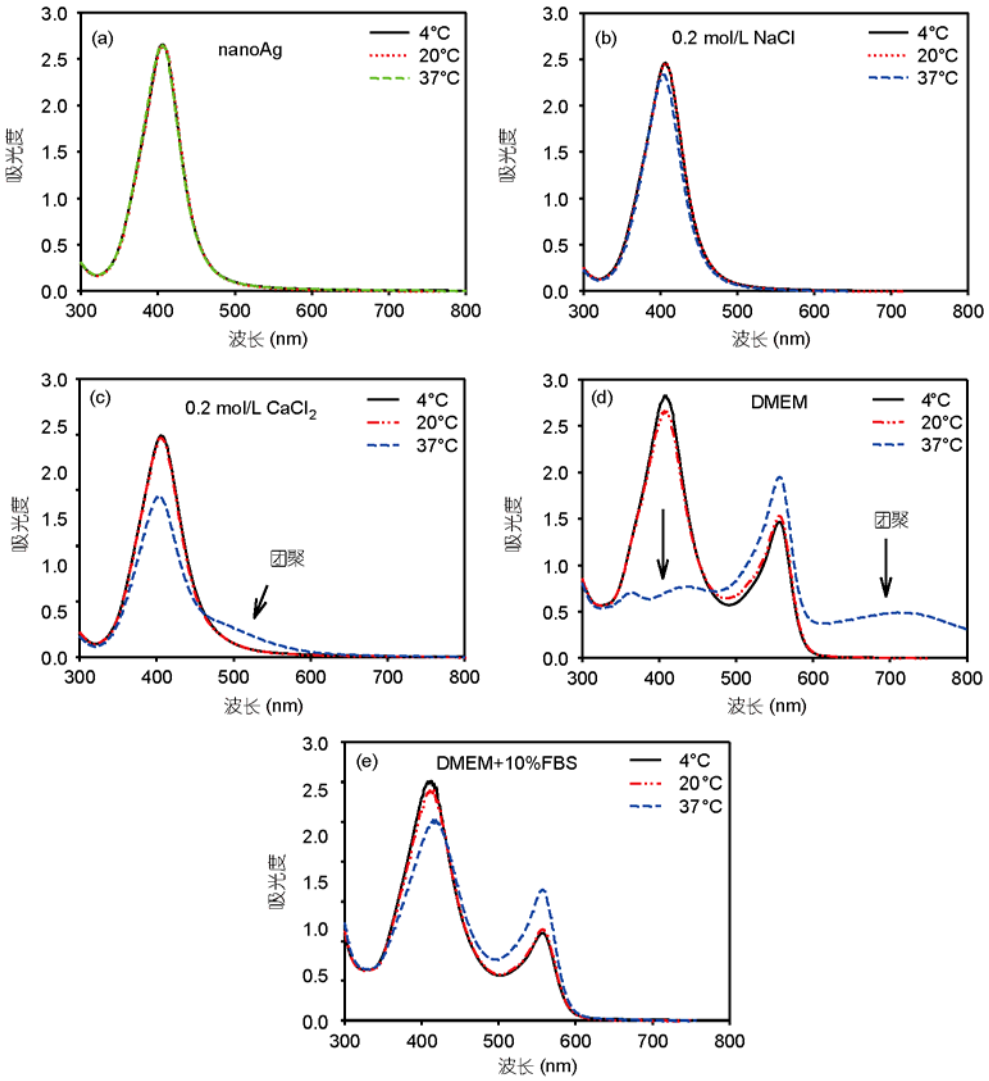

图 6　不同体系中温度对纳米银稳定性的影响

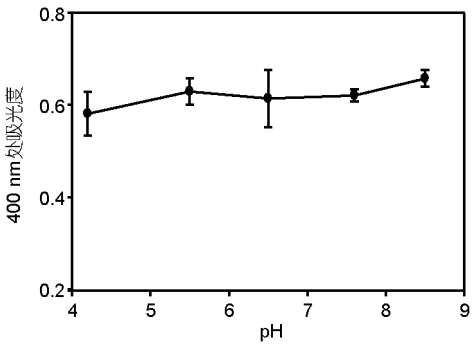

图 7　纳米银在 400 nm 处的吸光度随 pH 变化而产生的改变

各组数据间无显著性差异

FBS 的 DMEM 体系中，纳米银的粒径保持不变，并且不随温度的增加而改变，这与紫外吸收峰的结果是一致的.

利用激光粒度仪可测定颗粒的 Zeta 电位. 由于生物分子会对仪器测定结果产生较大影响，因此仅测定了不同离子强度下盐溶液对纳米银颗粒 Zeta 电位的影响. 如图 9 所示，在 0~0.5 mol/L 的 $CaCl_2$ 和 NaCl 中，由于 Ca^{2+} 和 Na^{+} 对纳米银颗粒表面双电层的影响，纳米银的 Zeta 电位均增加 10 mV，而粒径的变化却有明显的差异. 其中 $CaCl_2$ 使纳米银颗粒的粒径增加至 900 nm，而 NaCl 溶液中纳米银粒径基本保持不变.

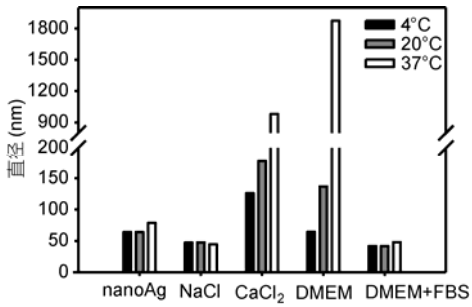

图 8 离子强度、价态、温度、生物分子对纳米银颗粒粒径的影响

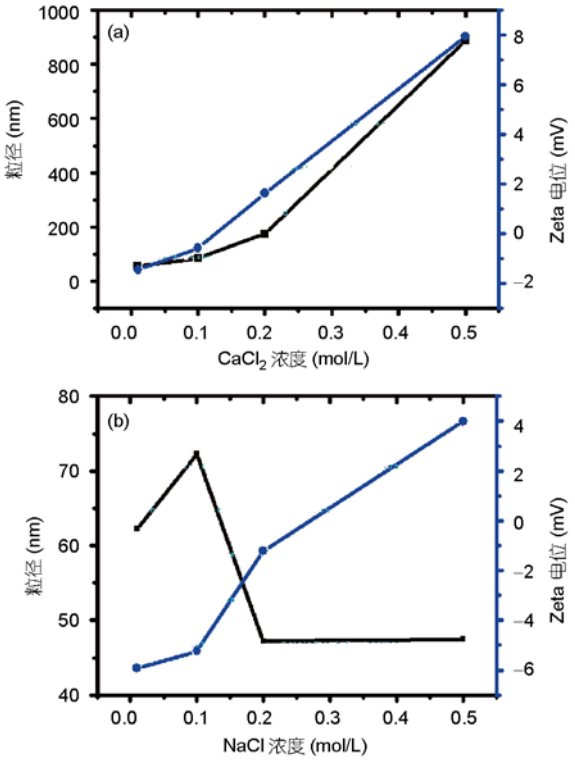

图 9 在 $CaCl_2$(a)和 NaCl (b)体系中，随着盐浓度的增加纳米银 Zeta 电位的变化

2.7 不同体系中的银离子释放率

银离子释放率也是影响纳米银的环境以及生物安全性的重要因素. 有研究报道推测，纳米银颗粒的毒性可能与其在体内释放银离子有关[27]. 而体内环境中含有大量离子、氨基酸分子以及蛋白质分子. 实验结果看出，在 0~1 mol/L 的 $CaCl_2$ 和 NaCl 以及 DMEM, DMEM+FBS 体系中，纳米银的银离子释放率均从 3.0%下降至 0.5%，说明在这些体系中，纳米银颗粒释放银离子的活性降低，这可能是纳米银发生一定程度的团聚或者与蛋白质分子相结合造成的. 说明在含有较高离子强度、氨基酸分子以及蛋白质分子的环境中，银离子的释放并非纳米银产生毒性的主要原因.

以上所研究体系对纳米银颗粒的稳定性产生影响的机理可由图 11 概括显示. 对于一价离子(如 Na^+)体系，离子对纳米银双电层结构影响不大；而高价离子(如 Ca^{2+})由于对纳米银表面离子具有较强的吸引，从而能够破坏其双电层结构，造成纳米银稳定分散体系的瓦解. 在无 FBS 的培养基 DMEM 中，由于含有大量二价阳离子(Ca^{2+}等)以及多种氨基酸分子，因此纳米银的稳定性受到破坏，颗粒很快形成团聚；而添加 10% FBS 的 DMEM 中，由于 FBS 中含有大量蛋白质分子，能够保护纳米银颗粒不受离子的影响而发生团聚，因此在这种体系中纳米银颗粒能够保持很好的稳定性.

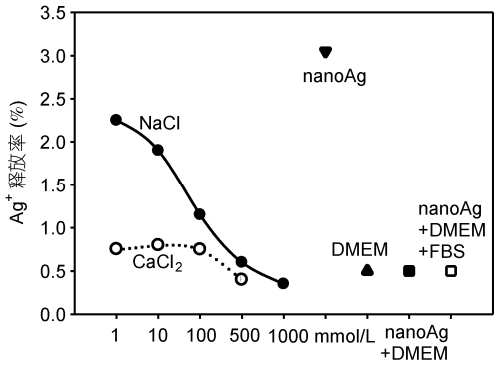

图 10 各种体系中纳米银的银离子释放率

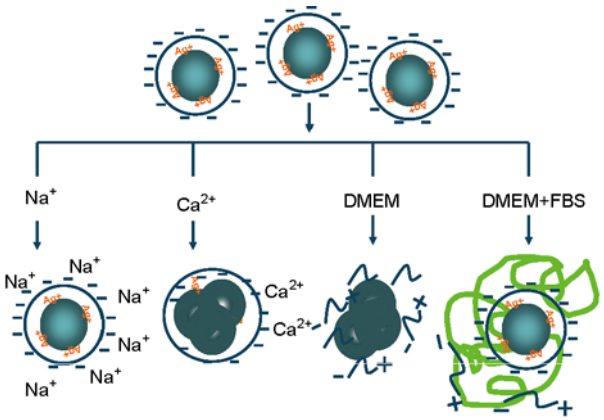

图 11 Na^+, Ca^{2+}, DMEM 以及 DMEM+FBS 体系中纳米银颗粒稳定性变化机理示意图

3 结论

离子强度、离子价态、温度以及生物分子均可以影响纳米银颗粒的稳定性. 离子强度越高、价态越高越容易造成纳米银的团聚和沉淀. 生物分子如蛋白质分子的存在会使纳米银分散体系更稳定, 温度的升高能够促进纳米银的团聚. pH 在 4.2~8.4 范围内不会影响纳米银颗粒的稳定性. 另一方面, 离子强度的增加以及纳米银与蛋白质的结合均可以降低纳米银的银离子释放率. 通过分析以上因素对纳米银稳定性的影响, 可以看出, 在含有较高价态的离子如 Ca^{2+} 的水体中, 纳米银将难以长期稳定存在, 而在体外培养细胞的典型环境(盐度、氨基酸、pH、蛋白质分子, 37℃)中, 纳米银可以维持稳定的纳米尺度性质, 这种环境条件在一定程度上可以模拟体内的环境, 由此我们推测在体内环境中, 纳米银也是可以保持纳米尺度性质的, 而且纳米银的体内生物学效应将不依赖于银离子的释放. 基于纳米银的广泛使用及其在类体内环境中良好的稳定性, 纳米银在体内的生物学效应将在今后的工作中进行深入的研究.

参考文献

1 McNeil S E. Nanotechnology for the biologist. J Leukocyte Biol, 2005, 78: 585–594

2 Fu C C, Lee H Y, Chen K, et al. Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 727–732

3 Mann D, Kato Y K, Kinkhabwala A, et al. Electrically driven thermal light emission from individual single-walled carbon nanotubes. Nat Nanotechnol, 2007, 2: 33–38

4 Kim J H, Kim J S, Choi H, et al. Nanoparticle probes with surface enhanced raman spectroscopic tags for cellular cancer targeting. Anal Chem, 2006, 78: 6967–6973

5 Geho D H, Jones C D, Petricoin E F, et al. Nanoparticles: Potential biomarker harvesters. Curr Opin Chem Biol, 2006, 10: 56–61

6 Chen X, Schluesener H J. Nanosilver: A nanoproduct in medical application. Toxicol Lett, 2008, 176: 1–12

7 Yan W J, Wang R, Xu Z Q, et al. A novel, practical and green synthesis of ag nanoparticles catalyst and its application in three-component coupling of aldehyde, alkyne, and amine. J Mol Catal A Chem, 2006, 255: 81–85

8 Deng J P, Shih W C, Mou C Y. Electron transfer-induced hydrogenation of anthracene catalyzed by gold and silver nanoparticles. J Phys Chem C, 2007, 111: 9723–9728

9 Yu K N, Lee S M, Han J Y, et al. Multiplex targeting, tracking, and imaging of apoptosis by fluorescent surface enhanced raman spectroscopic dots. Bioconj Chem, 2007, 18: 1155–1162

10 Cho K H, Park J E, Osaka T, et al. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochim Acta, 2005, 51: 956–960

11 Rezaei-Zarchi S, Saboury A A, Norouzi P, et al. Use of silver nanoparticles as an electron transfer facilitator in electrochemical ligand-binding of haemoglobin. J Appl Electrochem, 2007, 37: 1021–1026

12 Blaser S A, Scheringer M, MacLeod M, et al. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. Sci Total Environ, 2008, 390: 396–409

13 Benn T M, Westerhoff P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. Environ Sci Technol, 2008, 42: 4133–4139

14 Choi O, Hu Z Q. Size Dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. Environ Sci Technol, 2008, 42: 4583–4588

15 Lu W T, Senapati D, Wang S G, et al. Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. Chem Phys Lett, 2010, 487: 92–96

16 Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, et al. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. Environ Sci Technol, 2008, 42: 8959–8964

17 Liu W, Wu Y, Wang C, et al. Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. Nanotoxicology, 2010, 4: 319–330

18 Lu W T, Senapati D, Wang S G, et al. Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. Chem Phys Lett, 2010, 487: 92–96

19 Wang G, Zhang Y, Cui Y P, et al. Study on the behavior of hyper-rayleigh scattering for silver nanoparticles with aggregation effects. J Phys Chem B, 2005, 109: 1067–1071

20 Gilbert B, Ono R K, Ching K A, et al. The effects of nanoparticle aggregation processes on aggregate structure and metal uptake. J Colloid Interf Sci, 2009, 339: 285–295
21 Wick P, Manser P, Limbach L K, et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. Toxicol Lett, 2007, 168: 121–131
22 Carlson C, Hussain S M, Schrand A M, et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. J Phys Chem B, 2008, 112: 13608–13619
23 Su X D, Kanjanawarut R. Control of metal nanoparticles aggregation and dispersion by pNA and pNA-DNA complexes, and its application for colorimetric DNA detection. Acs Nano, 2009, 3: 2751–2759
24 French R A, Jacobson A R, Kim B, et al. Influence of ionic strength, pH, and cation valence on aggregation kinetics of titanium dioxide nanoparticles. Environ Sci Technol, 2009, 43: 1354–1359
25 Kittler S, Greulich C, Gebauer J S, et al. The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. J Mater Chem, 2009, 20: 512–518
26 Greulich C, Kittler S, Epple M, et al. Studies on the biocompatibility and the interaction of silver nanoparticles with human mesenchymal stem cells (Hmscs). Langenb Archives Surg, 2009, 394: 495–502
27 Bar-Ilan O, Albrecht R M, Fako V E, et al. Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. Small, 2009, 5: 1897–1910

·书 讯·

《无机化学热力学》



作者: 唐宗薰
出版单位: 科学出版社
出版时间: 2010 年 7 月
书号: 978-7-03-028194-4

本书根据人们在长期实践中得到的热力学规律, 用能量转化的观点定量地或半定量地阐明物质的性质、物理和化学反应的方向和限度; 运用热力学的知识, 寻求影响反应进行的因素, 指导无机合成. 全书共 7 章, 分别介绍无机化学热力学的基本知识和基本理论、热力学稳定性和反应的自发性、晶格能及其应用、离子型化合物的热力学性质、水合离子的热力学性质及离子型化合物的溶解性、电极电势与氧化还原反应、键焓及共价键型物质的热力学性质、配体场稳定化能及过渡元素化学的热力学性质等, 特别是对在无机化学课程中常出现的与实验数据相关的元素电势图、自由能-温度图、自由能-氧化态图、电势-pH 图、溶解度-pH 图做了较深入的介绍.

本书可作为高等学校化学专业高年级本科生的无机化学教材, 也可供研究生和相关专业研究人员参考.