

丝蛋白多肽原位制备金纳米粒子的研究

刘素美, 朱晶心, 陈 松, 贾 兰*
(太原理工大学 材料学院, 太原 030024)

摘 要: 用来自丝素蛋白的 GAGAGAGY 序列多肽原位还原氯金酸制备了粒径小于 12 nm 的球形金纳米粒子, 用紫外-可见吸收光谱和透射电子显微镜对反应过程和产物进行了表征分析, 探索制备条件对产物的影响。结果表明, 多肽可发挥稳定剂的作用, 使合成的金纳米溶液具有较好的稳定性; 多肽和氯金酸的摩尔比为 10:4 时合成的粒子粒径大小合适且分布均匀; 溶液碱性越强, 还原反应速度越慢但金纳米粒径不受影响; 反应温度升高, 反应速率变快, 紫外吸收峰蓝移。

关键词: 纳米材料; 多肽; 金纳米粒子; 原位还原

中图分类号: O614.123, TB383.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0676(2017)03-0028-06

Preparation of Gold Nanoparticles by Using Peptide from Silk Fibroin in situ Reduction

LIU Sumei, ZHU Jingxin, CHEN Song, JIA Lan*

(College of Materials Science and Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

Abstract: Spherical gold nanoparticles with a particle size of less than 12 nm were prepared by in situ reduction of chloroauric acid with GAGAGAGY, a peptide derived from silk fibroin. The reaction process and product were characterized by UV-Vis absorption spectroscopy and transmission electron microscopy, and the influence of preparative conditions on the product was explored. The results showed that the peptide could act as a stabilizer, endowing the synthesized gold nanoparticles with good stability. When the molar ratio of the polypeptide to chloramic acid is 10 to 4, the size of particles obtained will be uniform. With the increment of alkaline of the solution, the reaction slowed down, but the particle size of the gold nanoparticles was not affected. The rising of temperature could accelerate the reaction, as evidenced by a blue shift of the absorption peak of the reaction solution.

Key Word: nanomaterials; peptide; gold nanoparticles; in-situ reduction

金纳米粒子除了具有量子尺寸效应、表面效应、体积效应等纳米材料的性能外, 还具有表面等离子体共振(SPR)和表面增强拉曼等特殊性质。其中 SPR 效应是金纳米粒子一个重要的光学特征, 金纳米粒子表面受到入射光电磁波影响而产生电子云共振, 在可见光区域内出现表面等离子共振^[1], 进而在紫外-可见光谱上会显示出较强的吸收峰, 形成其特征吸收光谱。金纳米粒子的特征等离子体吸收峰在 500~550 nm 处, 宏观上表现为鲜亮的酒红色^[2]。随

尺寸增大或纳米颗粒间距变小, 吸收波长红移, 溶液颜色呈紫色、蓝色或灰色, 甚至发生聚沉^[3]。这些特殊的物理和化学特性, 使其在生物医学、传感器、催化剂和电化学等领域具有广阔的应用前景^[4]。自诊断治疗的概念被提出后^[5], 人们开始研究金纳米粒子在生物学领域的应用, 需要寻找一种合适的方法, 使其能够同时满足合成物生物相容、反应条件温和, 并合成粒径可控的金纳米粒子等条件。

生物合成法能够在温和条件下制备金纳米粒

收稿日期: 2016-09-27

基金项目: 国家自然科学基金(51303124)。

第一作者: 刘素美, 女, 硕士研究生, 研究方向: 多肽自组装。E-mail: 1052619573@qq.com

*通讯作者: 贾 兰, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 超分子组装和生物分子光学方法检测。E-mail: jialan@tyut.edu.cn

子, 并使其具有一定的生物相容性。陈国宝等^[6]用酵母菌还原制得了粒径约为 8.69 nm 且大小比较均匀的金纳米粒子。这类方法有很多, 包括使用淀粉样蛋白原纤维、牛血清白蛋白和真菌, 此外还有香茅、褐藻、柚子和丝状真菌的提取物。但这些还原剂的成分比较复杂, 导致合成反应的变量较多^[7]。陈文兴等^[8]以具有良好生物降解性和生物相容性的丝素蛋白作为还原剂和保护剂, 合成了纳米贵金属胶体。由于结构相对简单、生物相容性好和具有生物活性, 多肽已经成为生物医学、纳米科技、材料科学等众多学科研究的热点^[9]。

天然纺丝过程中, 丝素蛋白中富含甘氨酸(G)和丙氨酸(A)的重复氨基酸序列可自组装形成反平行的 β -折叠机构, 这是丝纤维具有稳定性和独特机械性能的重要因素。为了解这些多肽序列的自组装机制, 我们选取来源于 α -糜蛋白酶水解丝素蛋白的一段重复序列 GAGAGAGY 进行研究^[10]。该多肽末端的酪氨酸(Y)具有还原氯金酸的能力, 拟将金纳米粒子固定得多肽上作为探针, 通过溶液颜色和紫外吸收峰的改变来研究多肽的组装行为。为达到此目标, 首先需要利用多肽制备稳定的金纳米粒子。基于这一目的, 本文探究了该多肽合成金纳米粒子的条件及影响因素。

1 实验

1.1 主要药品及仪器

四氯金酸($\omega(\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}) > 99\%$), 百灵威科技有限公司, 配制成 0.004 mol/L 的水溶液; 多肽(GAGAGAGY, $\omega = 90.4\%$), 吉尔生化(上海)有限公司, 用 0.04 mol/L NaOH 水溶液配制成 0.005 mol/L 的水溶液; 氢氧化钠, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司, 配制成 0.04 mol/L 和 0.5 mol/L 的水溶液; 实验用水为超纯水(电阻率为 18.2 M Ω ·cm)。pH 计, 上海精密科学仪器有限公司 PHS-30 型。

1.2 金纳米粒子的制备

取一定体积的氯金酸溶液, 将其逐滴加入一定体积的多肽溶液中, 用 0.04 mol/L NaOH 溶液调节反应物最终摩尔比, 避光条件下磁力搅拌反应 6 h, 然后将溶液装入 3500 分子量透析袋中于烧杯中透析, 直至透析液电导率不变为止。此时金纳米以粒子状态存在于透析液中。为考察不同反应条件对最终合成的金纳米粒子的影响, 分别采用以下条件进行制备:

1) 反应物摩尔比影响: 室温下(约 30℃), 固定氯金酸总滴加体积(2 mL)不变, 改变多肽溶液体积, 使多肽和氯金酸的摩尔比分别为 9:4、10:4 和 11:4; 固定多肽溶液体积(4 mL)不变, 改变氯金酸加入体积, 使多肽和氯金酸摩尔比分别为 10:3、10:4 和 10:5。

2) pH 值影响: 选取多肽和氯金酸摩尔比为 10:4 的制备条件, 用 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液将反应溶液 pH 分别调至 9、10、11 和 12。

3) 温度影响: 选取多肽和氯金酸摩尔比为 10:4 的制备条件, 分别将溶液的反应温度设定为 20、30、40 和 50℃。

1.3 测试及表征

使用 UV-8000S 型紫外-可见分光光度计(上海元析)测试所合成的金纳米粒子的紫外-可见吸收光谱, 波长范围 200~800 nm, 研究不同反应条件对金纳米粒子的影响。

将合成的金纳米粒子溶液滴在碳膜覆盖的铜网上, 干燥后用 JEM-1200EX 型(JEOL)透射电子显微镜(TEM)观察粒子形貌和分散情况, 通过统计相同条件下的多张 TEM 图像中超过 200 个粒子的粒径计算金纳米的平均粒径。

2 结果与讨论

2.1 反应时间的确定

多肽 GAGAGAGY 末端含有酪氨酸残基, 可以原位还原氯金酸制备金纳米粒子, 但还原性比较温和, 并不能在短时间内将溶液中的氯金酸完全还原。首先进行了确定反应时间的实验, 测定不同反应时刻(间隔 10 min)溶液的紫外可见光谱, 结果如图 1 所示。

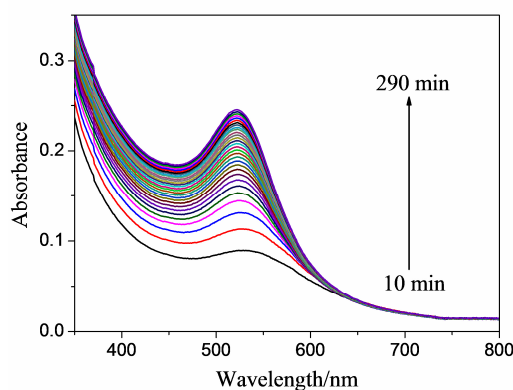


图1 金纳米粒子还原制备过程中的紫外-可见吸收光谱

Fig.1 The UV-Vis spectra of gold nanoparticles in the preparative process

由图 1 可见, 随反应进行, 溶液最大吸收峰的位置在反应 4 h 后基本不发生变化, 在约 520 nm 处; 但最大吸光度一直在增强。根据朗伯-比尔定律, 吸光度的变化代表溶液中金纳米粒子浓度的变化。反应 290 min 后, 最大吸光度增速明显变缓, 表明金纳米粒子浓度趋于稳定。为使实验更具可靠性, 后续实验将反应时间设定为 6 h, 然后进行透析以除去未反应的氯金酸。

2.2 反应物摩尔比对金纳米粒子制备的影响

金纳米微粒粒径、形状与紫外-可见吸收谱之间有一定的关系, 如水相金溶胶的颜色随着粒径变大

由深红色(50 nm)变至红色(80 nm)直至浑浊的黄泥紫色(>120 nm)^[11]。Mie 理论认为, 随着金粒子直径增大, 金溶胶的紫外-可见吸收谱峰红移展宽^[12]。因此, 根据紫外吸收光谱的变化, 可以大致确定颗粒的尺寸变化和分散聚集情况。在实验过程中发现反应中多肽与氯金酸的比例对合成的金纳米粒子有影响, 因此, 通过改变多肽的浓度和氯金酸的加入量, 研究不同摩尔比下合成的金纳米粒子的不同。固定氯金酸加入量、改变多肽的体积, 不同摩尔比条件下反应 6 h 后的实验结果如图 2 所示。

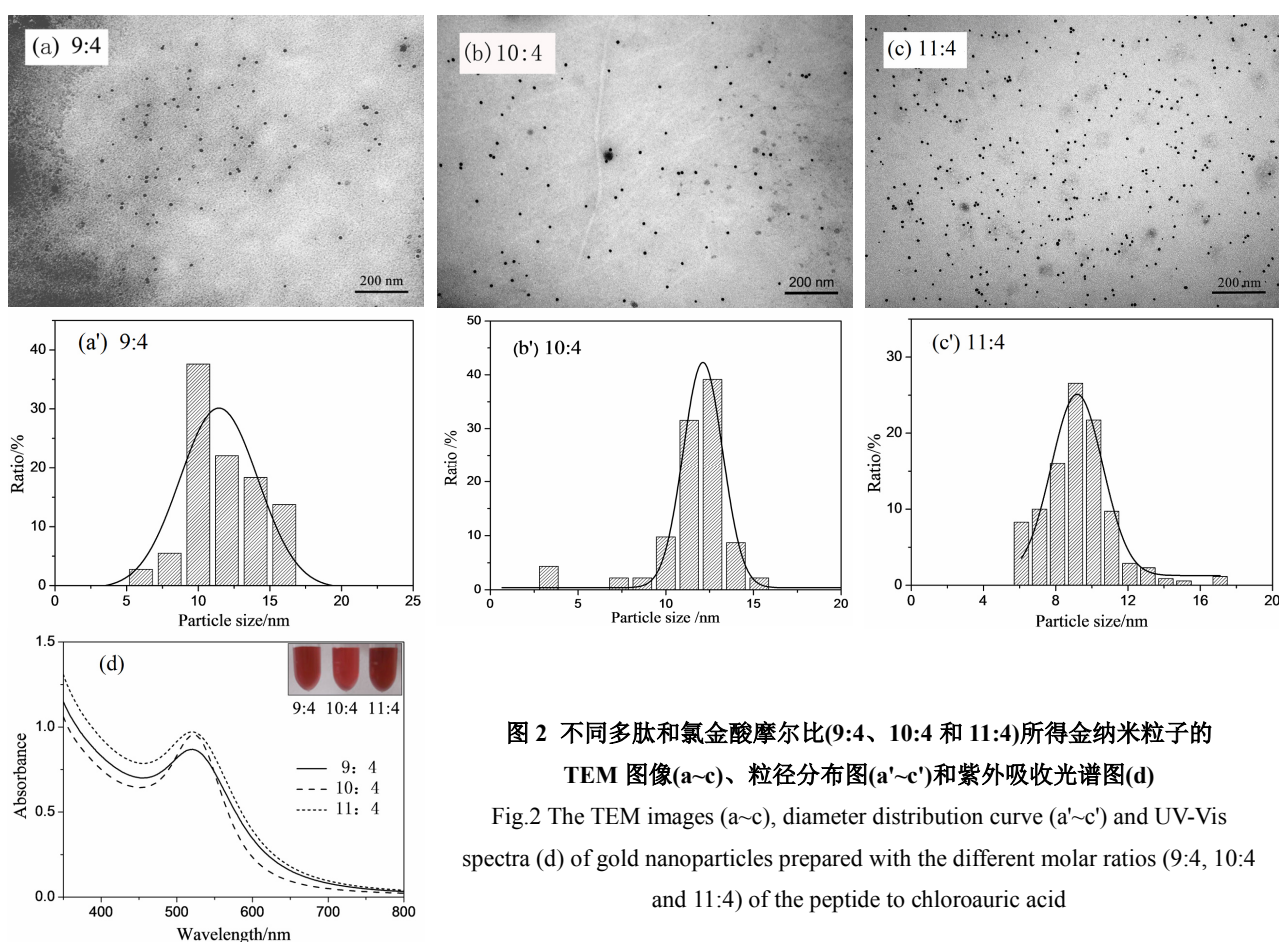


图 2 不同多肽和氯金酸摩尔比(9:4、10:4 和 11:4)所得金纳米粒子的 TEM 图像(a~c)、粒径分布图(a'~c')和紫外吸收光谱图(d)

Fig.2 The TEM images (a~c), diameter distribution curve (a'~c') and UV-Vis spectra (d) of gold nanoparticles prepared with the different molar ratios (9:4, 10:4 and 11:4) of the peptide to chloroauric acid

由图 2(a~c)的 TEM 图像可以粗略地看出在不同摩尔比条件下, 合成的金纳米粒子都为球形且分散性很好, 粒径相差不大。对 TEM 图像进行粒径分析(如图 2(a'~c')), 摩尔比为 9:4、10:4 和 11:4 时, 金纳米粒子粒径分别为 11.82 ± 2.31 nm、 11.56 ± 2.25 nm 和 9.23 ± 1.89 nm。摩尔比为 9:4 和 10:4 时粒径相差不大, 摩尔比为 11:4 时粒径最小, 分布最窄。图 2(d)中显示, 金纳米粒子溶液的颜色在多肽和氯金酸摩尔比为 10:4 时最浅, 3 份样品最大吸收峰峰位

分别在 521、523 和 520 nm 处, 与 TEM 粒径分析的规律一致。

固定多肽体积, 改变氯金酸加入量, 不同摩尔比条件下反应 6 h 后的实验结果如图 3 所示。从图 3(a~c)可以看出, 得到的金纳米粒子分散都比较均匀。图 3(a'~c')得到多肽和氯金酸摩尔比为 10:3、10:4 和 10:5 时粒径分别为 11.24 ± 2.36 nm、 11.56 ± 2.25 nm 和 11.96 ± 3.36 nm, 摩尔比为 10:4 时粒径大小适中。图 3(d)中最大吸收峰分别在 520、523 和 519 nm 处。

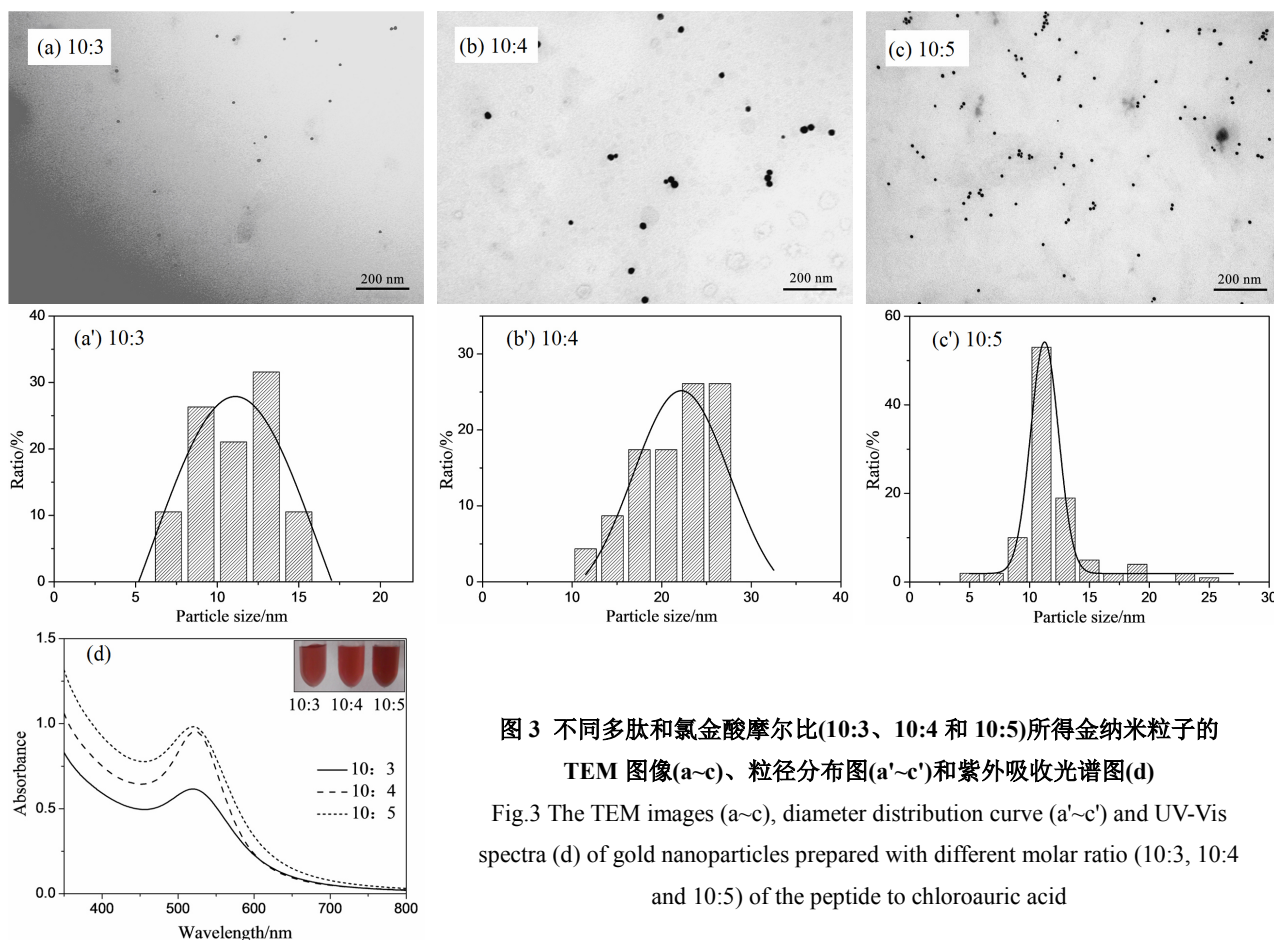


图 3 不同多肽和氯金酸摩尔比(10:3、10:4 和 10:5)所得金纳米粒子的 TEM 图像(a~c)、粒径分布图(a'~c')和紫外吸收光谱图(d)

Fig.3 The TEM images (a~c), diameter distribution curve (a'~c') and UV-Vis spectra (d) of gold nanoparticles prepared with different molar ratio (10:3, 10:4 and 10:5) of the peptide to chloroauric acid

将制备的金纳米粒子溶液室温下静置存放 2 个月, 没有观察到聚沉。文献[13-14]曾报道酪氨酸在碱性条件下具有供电子的能力, 可以将 Au^{3+} 还原为 Au^0 。其机理是在碱性条件下, 酪氨酸上的酚羟基解离成为良好的电子供体, 同时由于 Au^{3+} 具有较高的氧化-还原势能, 两者之间可以发生氧化还原反应。氧化还原反应发生后, 酚羟基被氧化成醌, Au^{3+} 被还原为 Au^0 原子, 这些原子进一步聚集形成金纳米颗粒。氧化形成的醌可以通过羰基与金纳米颗粒表面发生作用, 从而起到稳定剂的作用^[9]。因此可

以推测多肽通过与金纳米粒子表面发生相互作用而吸附于粒子表面, 起到了稳定剂的作用, 得到尺寸相对均一的纳米颗粒。基于上述研究, 后续实验采用多肽和氯金酸摩尔比为 10:4 的制备条件。

2.3 不同 pH 对金纳米粒子制备的影响

由于多肽需在碱性条件下溶解, 且酪氨酸在碱性条件下才具有还原性, 金纳米的制备宜在碱性条件下进行。考察了 pH 值分别为 9、10、11 和 12 时, 所得金纳米溶液的紫外可见吸收光谱, 结果如图 4 所示。

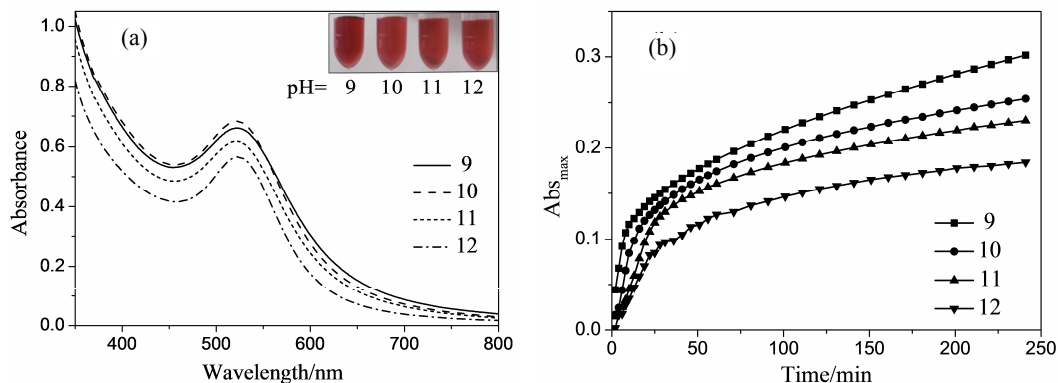


图 4 反应溶液不同 pH 时金纳米粒子的紫外吸收光谱(a)和最大吸光度(522 nm)随时间变化的曲线(b)

Fig.4 The UV-Vis spectra of the gold nanoparticles at different pH(a) and Abs_{max} (522 nm) in the preparative process (b)

由图 4(a)可知, 4 种不同 pH 条件下得到的金纳米粒子溶液的最大吸收峰位置并没有变化, 在 522 nm 附近。其吸收光谱变化主要表现为峰宽和吸收峰强度的不同, pH=9 和 10 时, 最大吸收峰及其强度基本没有差别。这一结果表明碱性强弱对合成的金纳米粒子粒径影响较小。进一步考察最大吸光度随反应时间的变化, 由图 4(b)可以看出, 随着碱性增强, 反应速率逐渐降低, pH=9 时反应速率最快。

综上, 碱性条件下, 金纳米粒子的粒径基本不随碱性强弱发生变化, 反应速率会随碱性的降低而

增加。原因可能是随着反应体系 pH 值的逐渐增加, $[\text{OH}^-]$ 增加, HAuCl_4 中的 Cl^- 逐渐被溶液中的 OH^- 取代而形成更稳定的多羟基化合物 $(\text{HAuCl}_x(\text{OH})_{4-x})$, 游离在体系溶液中, 使得体系中的 HAuCl_4 浓度降低进而降低反应速度^[15]。基于上述研究, 后续实验采用的 pH 值为 9。

2.4 温度对金纳米粒子制备的影响

升高温度可加快反应速度, 但多肽是生物分子, 过高的温度会使其失活。考察了 20、30、40 和 50℃ 时温度对制备金纳米的影响, 结果如图 5 所示。

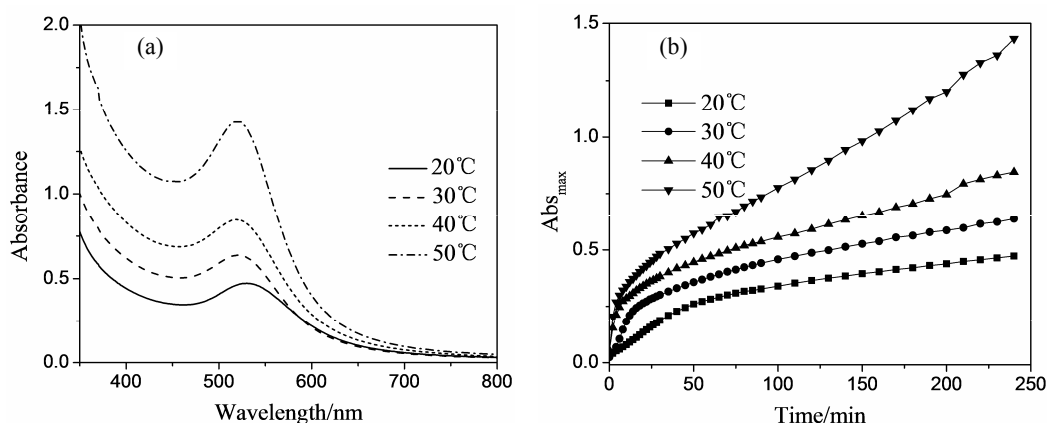


图 5 反应温度不同时金纳米粒子的紫外吸收光谱(a)和最大吸光度(520 nm)随时间变化的曲线(b)

Fig.5 The UV-Vis spectra of gold nanoparticles at different reaction temperatures (a) and the maximum absorbance (520 nm) during the preparative process (b)

由图 5(a)可以看出, 不同反应温度下合成的金纳米粒子的最大吸收峰峰位不同, 且峰宽会随着温度而逐渐变窄。随着温度升高, 最大吸收峰依次为 530、521、518 和 519 nm, 发生了一定的蓝移, 表明金纳米的粒径有变小趋势。图 5(b)进一步证实温度对反应速率的影响较大, 温度越高, 反应越快。

分析其原因, 反应温度不同, 生成晶核的速率不一样, 温度越高, 生成晶核的速率越快^[16], 溶液中剩余的 AuCl_4^- 越少, 吸附的可能性小, 所以生成的金颗粒的粒径小, 并且更均一^[17], 从而使溶液中金纳米粒子的浓度更高。但是当实验温度为 50℃ 时, 金纳米的粒子过小, 不利于后续实验中其他表征方式的研究。因此, 基于上述研究, 制备反应的温度以 40℃ 为宜。在金纳米粒子作为探针的研究中, 需进一步优化金纳米的制备条件。

3 结论

1) 序列为 GAGAGAGY 的多肽溶液还原氯金

酸可制备得到粒径小于 12 nm 的球形金纳米粒子, 多肽在反应中同时作为稳定剂, 使得金纳米具有较好的稳定性。

2) 反应液中多肽和氯金酸的摩尔比不同, 合成的金纳米粒子的粒径也会不同, 摩尔比为 10:4 时合成的粒子粒径适中且均一。

3) 反应溶液的碱性强弱基本不会对金纳米的粒径产生影响, 但随着碱性增强, 反应速率变小。

4) 反应温度越高, 反应速率越快, 紫外吸收峰发生蓝移, 峰宽变窄。

参考文献:

- [1] 姚素薇, 邹毅, 张卫国. 金纳米粒子的特性、制备及应用研究进展[J]. 化工进展, 2007, 26(3): 310-314.
YAO S W, ZOU Y, ZHANG W G. Research progress of the properties, preparation and application of Au nanoparticles[J]. Chemical industry and engineering progress, 2007, 26(3): 310-314.
- [2] 赵于文. 超细粉的性能、制备及应用[J]. 现代化工,

- 1991(5): 52-58.
- ZHAO Y W. Properties, preparation and application of ultrafine powder[J]. *Modern chemical industry*, 1991(5): 52-58.
- [3] MAYER K M, HAFNER J H. Localized surface plasmon resonance sensors[J]. *Chemical reviews*, 2011, 111, 3828-3857.
- [4] 王莹, 焦体峰, 谢丹阳, 等. 金纳米颗粒制备及应用研究进展[J]. *中国无机分析化学*, 2012, 2(4): 15-21.
- WANG Y, JIAO T F, XIE D Y, et al. Research progress on preparation and application of gold nanoparticles[J]. *Chinese journal of inorganic analytical chemistry*, 2012, 2(4): 15-21.
- [5] PICARD F J, BERGERON M G. Rapid molecular theranostics in infectious disease[J]. *Drug discovery today*, 2002, 7(21): 1092-1101.
- [6] 陈国宝, 悟洪意, 苟德海, 等. 酵母菌还原制备纳米金颗粒[J]. *贵金属*, 2016, 37(1): 42-46.
- CHEN G B, WU H Y, GOU D H, et al. Biological synthesis of gold nanoparticles by *saccharomyces*[J]. *Precious metals*, 2016, 37(1): 42-46.
- [7] FANG G, YANG Y, YAO J, et al. Formation of different gold nanostructures by silk nanofibrils[J]. *Materials science and engineering C*, 2016, 64: 376-382.
- [8] 陈文兴, 吴雯, 陈海相, 等. 丝素蛋白质原位还原制备纳米贵金属胶体及表征[J]. *中国科学(B 辑)*, 2003, 33(3): 185-191.
- CHEN W X, WU W, CHEN H X, et al. Preparation and characterization of nanometer metal colloid by silk fibroin in situ reduction[J]. *Science in China(Series B)*, 2003, 33(3): 185-191.
- [9] HOSSEINKHANI H, HONG P D S. Self-assembled proteins and peptides for regenerative medicine[J]. *Chemical reviews*, 2013, 113(7): 4837-4861.
- [10] 张金明. 基于丝蛋白降解产物的两亲性多肽自组装及其应用[D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- ZHANG J M. Research on preparation and assembly behavior of silk peptides[D]. Shanghai: Fudan University, 2012.
- [11] 朱梓华, 朱涛, 刘忠范. 大粒径单分散金纳米粒子的水相合成[J]. *物理化学学报*, 1999, 15(11): 966-970.
- ZHU Z H, ZHU T, LIU Z F. Preparation of gold sols of large size particles[J]. *Acta physico-chemica sinica*, 1999, 15(11): 966-970.
- [12] VAN DE HULST H C. Light scattering by small particles[M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 1957: 397.
- [13] SI S, BHATTACHARJEE RR, BANERJEE A, et al. A mechanistic and kinetic study of the formation of metal nanoparticles by using synthetic tyrosine-based oligopeptides[J]. *Chemistry - a European journal*, 2006, 12(4): 1256-1265.
- [14] HUANG X, WU H, LIAO X, et al. One-step, size-controlled synthesis of gold nanoparticles at room temperature using plant tannin[J]. *Green chemistry*, 2010, 12(3): 395-399.
- [15] 宋香宁. 柠檬酸钠还原法制备金纳米粒子的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- SONG X N. The research of the preparation of gold nanoparticles by the reduction of citrate sodium[D]. Changchun: Jilin University, 2007.
- [16] 郑海霞, 黄博能, 胡君曼, 等. 制备特定尺寸的纳米金颗粒方法及性能表征[J]. *北京大学学报: 自然科学版*, 2011, 47(5): 1-9.
- ZHENG H X, HUANG B N, HU J M, et al. Synthesis and characterization of gold nanoparticles with various diameters[J]. *Acta scientiarum naturalium Universitatis Pekinensis*, 2011, 47(5): 1-9.
- [17] 丰荣娟, 李敏, 刘家祥. 化学还原法制备小粒径金纳米粒子[J]. *材料工程*, 2013(5): 28-32.
- FENG R J, LI M, LIU J X. Reproduction of small size Au colloid by chemical reduction[J]. *Journal of materials engineering*, 2013(5): 28-32.