



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105535971 B

(45)授权公告日 2019.01.15

(21)申请号 201510968976.2

A61K 49/22(2006.01)

(22)申请日 2015.12.22

A61K 47/34(2017.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61K 47/10(2006.01)

申请公布号 CN 105535971 A

A61P 35/00(2006.01)

(43)申请公布日 2016.05.04

(73)专利权人 苏州大学

地址 215100 江苏省苏州市相城区济学路8号

(56)对比文件

US 20080038626 A1,2008.02.14,

CN 105153864 A,2015.12.16,

Hui Wang et al.Ultrathin Black Phosphorus Nanosheets for Efficient Singlet Oxygen Generation.《JACS》.2015,第137卷第11376-11382页.

(72)发明人 李桢 孙彩侠 赵崇军

(74)专利代理机构 苏州市中南伟业知识产权代理事务所(普通合伙) 32257

代理人 李阳

Zhengbo Sun et al.“Ultrasmall Black Phosphorus Quantum Dots: Synthesis and Use as Photothermal Agents”,.《Angew. Chem.》.2015,第127卷摘要.

(51)Int.Cl.

A61K 41/00(2006.01)

A61K 9/14(2006.01)

审查员 郑召磊

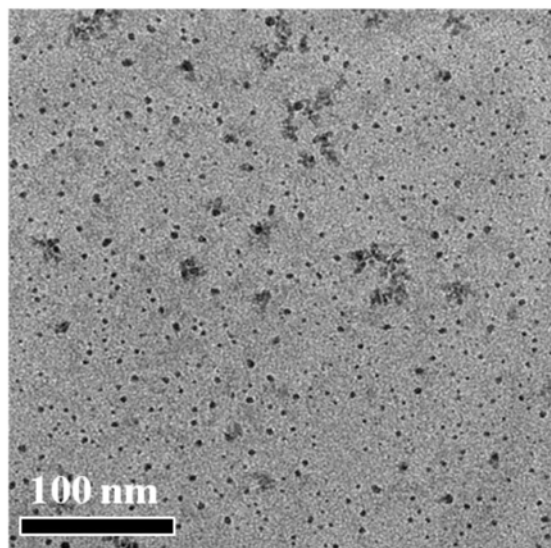
权利要求书1页 说明书5页 附图6页

(54)发明名称

一种具有生物相容性的黑磷纳米颗粒及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种具有生物相容性的黑磷纳米颗粒及其制备方法和应用,该具有生物相容性的黑磷纳米颗粒是利用生物相容性高分子在制备过程中对黑磷进行原位修饰,使其具有良好的水分散性和生物相容性,该制备方法操作简单,易于推广,产率高;同时避免了黑磷在敞开体系中与大量水、氧气长时间反应等不足,所得黑磷纳米微粒粒径均一、结晶度高和具有较高的光热转化效率,具有生物相容性的黑磷纳米颗粒可用于光声成像及光热治疗等生物医学方面。



1. 一种具有生物相容性的黑磷纳米颗粒的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

步骤(1) 将原料红磷或黑磷加入到球磨罐中,并且按照一定的质量比例加入球磨珠,密封后放入高能球磨机内进行球磨;

步骤(2) 球磨一定时间后,往球磨罐中加入一定比例的生物相容性高分子材料继续球磨,最后所得的产物为棕黑色的具有生物相容性的黑磷纳米微粒;

步骤(3) 把步骤(2)所得的产物分散到水中进行超声分散,所得分散液采用不同转速从低到高进行离心分级,每次离心后取其上层清液,将不同转速离心所得的上层清液透析除去游离的生物相容性高分子,透析一定时间后的上层清液再次按照第一次离心的转速进行离心,去除沉淀物,所得上层清液是具有生物相容性的黑磷纳米微粒溶液;

所述黑磷纳米微粒上包覆有生物相容性高分子材料;

所述的生物相容性高分子材料包括聚乙烯胺、聚乙二醇,其中聚乙二醇的分子量在200~20000之间。

2. 根据权利要求1所述的具有生物相容性的黑磷纳米颗粒的制备方法,其特征在于:步骤(1)中所述原料红磷或黑磷与球磨珠的质量比例为1:1~1:500,球磨机的转速为50~500转每分钟,球磨时间为24~200小时,所述球磨珠的尺寸范围为:0.3~50mm。

3. 根据权利要求1所述的具有生物相容性的黑磷纳米颗粒的制备方法,其特征在于:步骤(2)中所述的红磷或黑磷原料与生物相容性高分子材料的质量比例为1:1~1:20,球磨机的转速50~500转每分钟,球磨时间为24~200小时。

4. 根据权利要求1所述的具有生物相容性的黑磷纳米颗粒的制备方法,其特征在于:步骤(3)中离心速率为2000~30000转每分钟,离心时间为20~40分钟,透析袋截留分子质量为1000~100000Da,透析时间为72~120小时。

## 一种具有生物相容性的黑磷纳米颗粒及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学领域,尤其涉及一种具有生物相容性的黑磷纳米颗粒及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 磷是人体组成的重要元素之一,它有三种主要的同素异形体,即白磷、红磷和黑磷。在这些同素异形体中,白磷具有正四面体分子结构,其化学性质极不稳定,在30℃就可以燃烧起来。红磷是无定形的,相对于白磷较为稳定。黑磷是斜方晶系结构,在磷的三种同素异形体中热力学最稳定,它具有褶皱的层状结构和良好的电导率。理论表明黑磷与石墨烯的形貌、结构和性质都很相似。但与石墨烯相比,黑磷具有半导体带隙,且带隙宽度随黑磷的厚度而变化。单层的黑磷(即“磷烯”)可以通过机械剥离的方法得到。2014年,研究人员在《自然·纳米技术》杂志上发表了基于单层二维黑磷材料的新型场效应晶体管器件,使之迅速成为研究的热点。由于黑磷有类似于石墨烯的二维晶体结构和优越的电性能,它在电子学、光电设备、太阳能电池、传感器和生物医学方面都有巨大的潜在应用。

[0003] 黑磷的制备方法有以下几种:(1)机械剥离法;(2)液相剥离法;(3)利高温(200~500℃)高压(2.5~5GPa)反应法;(4)催化剂制备法。但由于这些方法所得黑磷尺寸较大、水溶性和生物相容性较差,使得黑磷在生物医学方面的应用极少报道。因此,如何合成粒径均一而且具有水溶性和生物相容性的黑磷纳米微粒是其应用于生物医学的关键。

[0004] 光声成像是利用光热效应获得生物组织或材料的断层图像或三维立体图像的一种成像方法。光声成像造影剂是提高光声成像信号的对比增强剂,它通过改变局部组织的声学 and 光学特性,提高成像对比度和分辨率,从而显著增强光声成像的效果,是当前分子影像研究的热点之一。光声造影剂要求颗粒尺寸小、稳定性好、具有良好水溶性和优异的生物相容性。

[0005] 光热治疗是采用近红外光照射病变部位,通过光热治疗剂将光转化为热,使照射部位温度升高杀死病变细胞,从而达到治疗目的。实验表明黑磷纳米微粒在近红外区具有较强的吸收和较高的光热转化效率,可以用于光热治疗。然而,由于制备水溶性和生物相容性黑磷纳米微粒较为困难,有关这一方面的报道较少。

[0006] 为了改善黑磷纳米材料的水溶性及生物相容性,我们采用生物相容性高分子进行修饰。生物相容性高分子包括天然高分子如葡聚糖及其衍生物、壳聚糖及其衍生物、果胶、羧甲基纤维素等,以及人工合成的生物相容性高分子如聚乙二醇及其衍生物、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯亚胺、聚丙烯酸、聚乙烯醇等。这些生物高分子材料具有良好的水溶性和优异的生物相容性,能溶于体内组织液中被组织迅速的排除于体外且不产生毒副作用,被广泛的应用于医药、食品、卫生、化工等领域。

[0007] 鉴于上述内容,本设计人,积极加以研究创新,以期创设一种具有生物相容性的黑磷纳米颗粒及其制备方法和应用,使其更具有产业上的利用价值。

## 发明内容

[0008] 为解决上述技术问题,本发明的目的是提供一种具有生物相容性的黑磷纳米颗粒及其制备方法和应用,该具有生物相容性的黑磷纳米颗粒具有良好的水分散性和生物相容性,该制备方法操作简单,易于推广,产率高,该具有生物相容性的黑磷纳米颗粒可用于光声成像及光热治疗等生物学方面。

[0009] 本发明提出的一种具有生物相容性的黑磷纳米颗粒,其特征在于:包括黑磷纳米微粒,所述黑磷纳米微粒上包覆有生物相容性高分子材料,所述的生物相容性高分子材料为天然高分子材料和/或人工高分子材料。

[0010] 本发明提出的一种具有生物相容性的黑磷纳米颗粒的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

[0011] 步骤(1)将原料红磷或黑磷加入到球磨罐中,并且按照一定的比例加入球磨珠,密封后放入高能球磨机内进行球磨;

[0012] 步骤(2)球磨一定时间后,往球磨罐中加入一定比例的生物相容性高分子材料继续球磨,最后所得的产物为棕黑色的具有生物相容性的黑磷纳米微粒;

[0013] 步骤(3)把步骤(2)所得的产物分散到水中进行超声分散,所得分散液采用不同转速从低到高进行离心分级,每次离心后取其上层清液,将不同转速离心所得的上层清液透析除去游离的生物相容性高分子,透析一定时间后的上层清液再次按照第一次离心的转速进行离心,去除沉淀物,所得上层清液是具有生物相容性的黑磷纳米微粒溶液。

[0014] 作为本发明方法的进一步改进,步骤(1)中所述红磷或黑磷与球磨珠的比例为1:1~1:500,球磨机的转速为50~500转每分钟,球磨时间为24~200小时,所述球磨珠的尺寸范围为:0.3~50mm。球磨罐包括不锈钢球磨罐、陶瓷球磨罐、玛瑙球磨罐、聚丙烯球磨罐、聚四氟乙烯球磨罐、聚氨酯球磨罐、氧化锆球磨罐;所述球磨珠为不锈钢球、陶瓷球、玛瑙球、聚丙烯球、聚四氟乙烯球、聚氨酯球、氧化锆球。

[0015] 作为本发明方法的进一步改进,步骤(2)中所述的红磷或黑磷与生物相容性高分子材料的质量比例为1:1~1:20,球磨机的转速50~500转每分钟,球磨时间为24~200小时。

[0016] 作为本发明方法的进一步改进,步骤(2)中所述的生物相容性高分子材料包括天然高分子材料和/或人工高分子材料;所述天然高分子材料为葡聚糖及其衍生物、壳聚糖及其衍生物、果胶、羧甲基纤维素中的一种或多种;所述人工高分子材料为聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯亚胺、聚丙烯酸、聚乙二醇及其衍生物中的一种或多种。

[0017] 聚乙二醇及其衍生物如单功能基如羟基、羧基、胺基、巯基、醛基、酯基聚乙二醇、同(异)双功能基遥爪聚乙二醇,聚乙二醇与聚丙烯酸共聚物(PEG-PAA),聚乙二醇与聚甲基丙烯酸共聚物(PEG-PMA),聚乙二醇与聚乙烯胺共聚物(PEG-PEI)和聚乙二醇与聚乳酸共聚物(PEG-PLA)中的一种或多种,其中所述聚乙二醇的分子量为200~20000。

[0018] 作为本发明方法的进一步改进,步骤(3)中离心速率为2000~30000转每分钟,离心时间为20~40分钟,透析袋截留分子质量为1000~100000,透析时间为72~120小时。

[0019] 本发明提出的一种具有生物相容性的黑磷纳米颗粒作为光声造影剂的应用。包括以下步骤:各取一定量不同转速离心而得的具有生物相容性的黑磷纳米溶液进行体外光声

成像实验,先进行多波长多位置扫描,扫描波长为680~980nm,选出最佳吸收波长;然后在此波长下进行扫描;取一定量黑磷纳米溶液通过尾静脉注射打入带有肿瘤的老鼠体内,进行体内光声实验,在最佳吸收波长下对不同脏器进行扫描,扫描的脏器包括肿瘤、脑、心、肝、脾、肺、肾,观察不同时间下光声信号强度的变化,观察时间为0~72小时。

[0020] 本发明提出的一种具有生物相容性的黑磷纳米颗粒作为光热治疗剂的应用。包括以下步骤:各取一定量不同转速离心而得的具有生物相容性的黑磷纳米溶液放入离心管或玻璃管中进行体外光热实验,体内光热治疗是将黑磷纳米溶液通过老鼠尾静脉注射或者瘤内注射,采用激光照射一定时间后,观察老鼠肿瘤的体积随时间变化,并通过病理分析判断治疗效果,所述激光照射的波长为808nm、980nm或1064nm,光照强度为0~2W,照射时间为0~30分钟,观察治疗时间0~12月。

[0021] 借由上述方案,本发明至少具有以下优点:本发明提供的具有生物相容性的黑磷纳米颗粒是利用生物相容性高分子在黑磷制备过程中对其进行原位修饰,使其具有良好的水分散性和生物相容性,本发明提供的制备方法操作简单,易于推广,产率高;同时避免了黑磷在敞开体系中与大量水、氧气长时间反应等不足,所得黑磷纳米微粒粒径均一、结晶度高和具有较高的光热转化效率,本发明提供的具有生物相容性的黑磷纳米颗粒可用于光声成像及光热治疗等生物学方面。

[0022] 上述说明仅是本发明技术方案的概述,为了能够更清楚了解本发明的技术手段,并可依照说明书的内容予以实施,以下以本发明的较佳实施例并配合附图详细说明如后。

## 附图说明

[0023] 图1为本发明实施例1中不同球磨时间下黑磷的X-射线衍射图;

[0024] 图2为本发明实施例2中不同转速离心分离所得包覆有PEG的黑磷纳米微粒的紫外吸收光谱图;

[0025] 图3为本发明实施例2不同转速离心分离所得包覆有PEG的黑磷纳米微粒的水合粒径分布图;

[0026] 图4为本发明实施例2中采用11000转每分钟离心分离所得的黑磷纳米微粒的透射电镜图;

[0027] 图5为本发明实施例2中不同转速离心分离所得包覆有PEG的黑磷纳米微粒的红外光谱图;

[0028] 图6为本发明实施例3中不同转速离心分离所得包覆有PEI的黑磷纳米微粒的紫外吸收光谱图;

[0029] 图7为本发明实施例4中乳腺癌肿瘤细胞在不同浓度黑磷纳米微粒溶液的存活率图;

[0030] 图8为本发明实施例5中稀释到不同浓度的黑磷纳米溶液的体外光声图像及其光声信号曲线图;

[0031] 图9为本发明实施例6中不同时间点小鼠肿瘤部位的光声图像及其光声信号曲线图;

[0032] 图10为本发明实施例7中不同转速离心分离所得的黑磷纳米微粒的体外光热升温曲线图;

[0033] 图11为本发明实施例8中光热治疗小鼠肿瘤的图像及其光热升温曲线图。

### 具体实施方式

[0034] 下面结合附图和实施例,对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0035] 实施例1:

[0036] 称取1.00g红磷放入100mL球磨罐中,红磷与球磨珠的质量比例为1:150,放入球磨机内以500转每分钟转速球磨24小时,48小时,72小时,96小时。得到的黑磷纳米微粒的X-射线衍射(XRD)见图1。从图中可以看出所得的黑磷纳米微粒的衍射峰与黑磷XRD的标准卡片非常一致。

[0037] 实施例2:

[0038] 称取1.00g红磷放入100mL球磨罐中,红磷与球磨珠的质量比例为1:150,放入球磨机内以500转每分钟转速球磨96小时后,再加入4g聚乙二醇(M=6000)以同样转速继续球磨72小时。把所得的产物分散到水中进行超声,用不同转速2000、5000、8000、11000转每分钟离心20分钟,所得的上层清液透析72小时(透析袋的截留分子质量为8000),透析后再次离心即可得到不同颗粒大小的具有生物相容性的黑磷纳米微粒。图2为采用不同转速分离所得的黑磷纳米微粒的紫外吸收图。图3为不同转速离心分离所得的黑磷纳米微粒的水合粒径分布图。图4为采用11000转每分钟分离所得的黑磷纳米微粒的透射电镜照片。将所得黑磷纳米微粒溶液旋转蒸发,得到固体后测其红外光谱。图5为不同转速分离的黑磷纳米微粒的红外光谱图。

[0039] 实施例3:

[0040] 称取1.00g红磷放入100mL球磨罐中,红磷与球磨珠的质量比例为1:150,放入球磨机内以500转每分钟转速球磨72小时后,再加入4g聚乙烯亚胺以同样转速继续球磨72小时。把所得的产物分散到水中进行超声,用不同转速2000、5000、8000、11000转每分钟离心20分钟,所得的上层清液透析72小时(透析袋的截留分子质量为8000),透析后再次离心即可得到不同颗粒大小的具有生物相容性的黑磷纳米微粒。图6为聚乙烯亚胺包覆的黑磷纳米微粒的紫外吸收光谱。

[0041] 实施例4:

[0042] 将小鼠的乳腺癌肿瘤细胞(4T1)铺在96孔板上,在37°C,5%CO<sub>2</sub>培养箱内进行培养24小时,之后加入实施例2中所得的黑磷纳米溶液继续培养24小时,之后用MTT进行细胞毒性测试,图7为不同黑磷浓度下肿瘤细胞的存活率。从图中我们可以看出黑磷纳米颗粒的细胞毒性较小,具有良好的生物相容性。

[0043] 实施例5:

[0044] 将实施例2中所得黑磷纳米微粒稀释到不同浓度,采用多光谱光声断层扫描成像系统测试它们的光声信号,图8为不同浓度黑磷纳米微粒溶液的光声成像图以及它们对应的光声信号值,从图中可以看出,黑磷纳米微粒具有良好的光声成像效果,可以用作光声成像造影剂。

[0045] 实施例6:

[0046] 采用实施例2中所得黑磷纳米微粒溶液进行体内光声成像实验。首先进行多波长

多位置扫描,在680~980nm中选出最佳的吸收波长。然后取200 $\mu$ L黑磷纳米微粒溶液通过静脉注射打入带有肿瘤的老鼠体内,在最佳吸收波长下对小鼠肿瘤和不同器官进行扫描,观察光声信号在这些器官中随不同时间的变化。观察时间为0~24小时。图9为小鼠肿瘤部位的光声成像图及其对应的光声信号值。

[0047] 实施例7:

[0048] 采用实施例2中所得黑磷纳米微粒溶液进行体外光热实验。各取出1mL不同转速离心分离的聚乙二醇修饰的具有生物相容性的黑磷纳米微粒放入5mL玻璃管中,用808nm, 0.75W/cm<sup>2</sup>的激光照射黑磷纳米溶液5分钟。图10为不同转速离心分离的黑磷纳米微粒的体外光热曲线,可以看出黑磷纳米微粒具有良好的光热效果和优异的光热转化效率。

[0049] 实施例8:

[0050] 采用黑磷纳米微粒溶液进行体内光热治疗肿瘤实验。往小鼠皮下注射乳腺癌肿瘤细胞,等待肿瘤长大至体积为60cm<sup>3</sup>时,往肿瘤内注射50 $\mu$ L黑磷纳米微粒,采用808nm, 2W/cm<sup>2</sup>的激光治疗10分钟。图11为小鼠肿瘤光热治疗图及光热曲线,可以看到肿瘤部位的温度能达到60 $^{\circ}$ C,足以杀死肿瘤细胞。

[0051] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,并不用于限制本发明,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和变型,这些改进和变型也应视为本发明的保护范围。

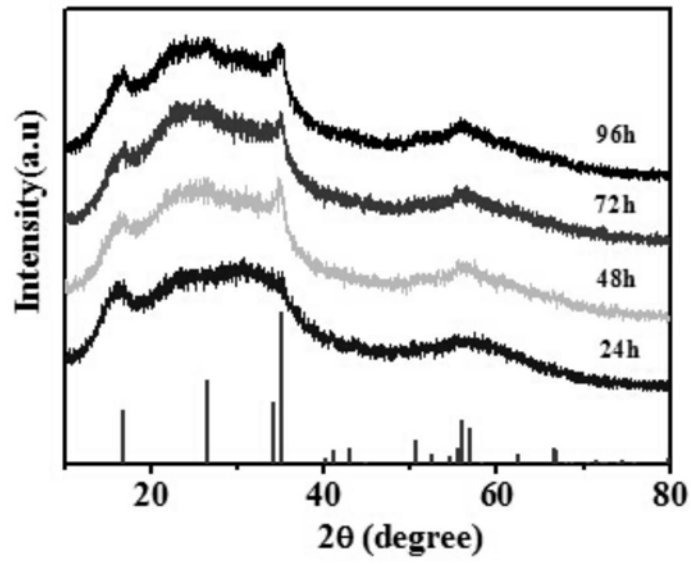


图1

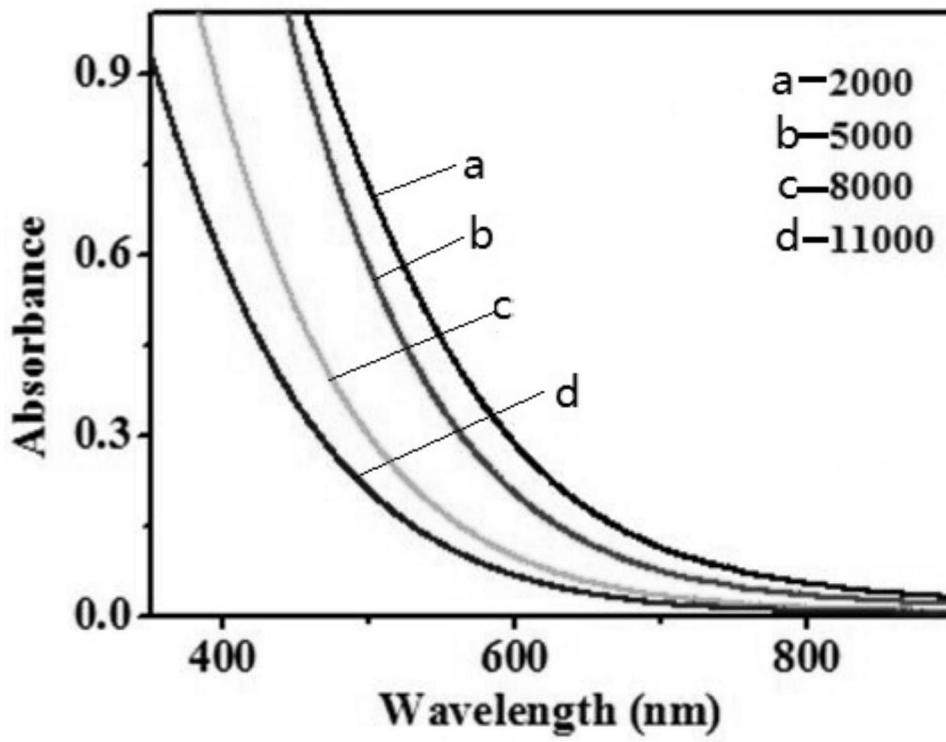


图2



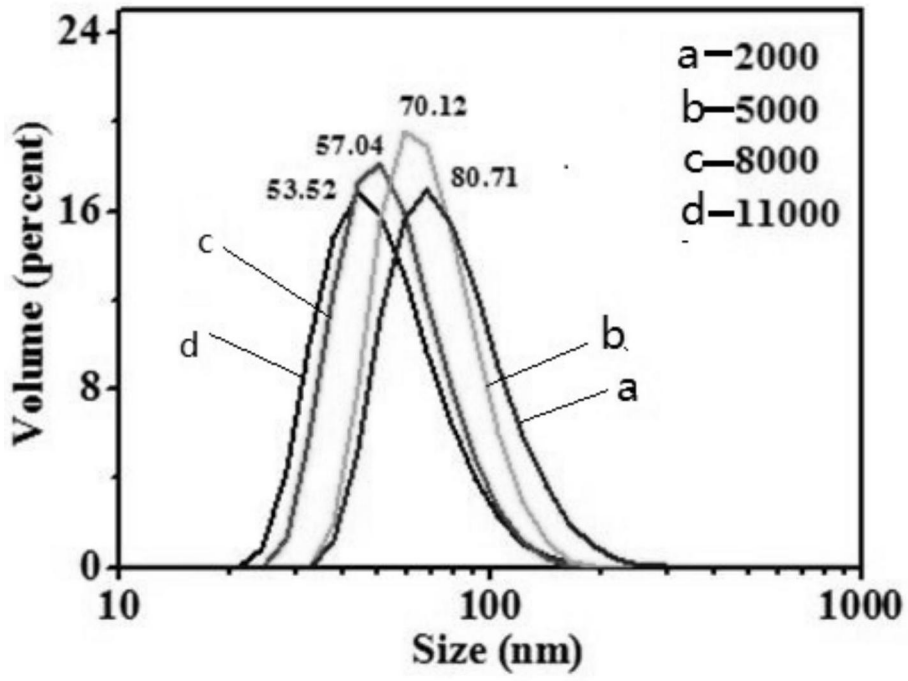


图3

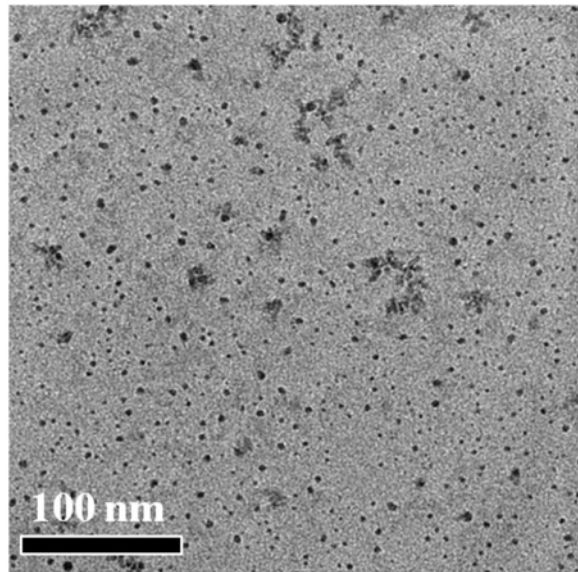


图4

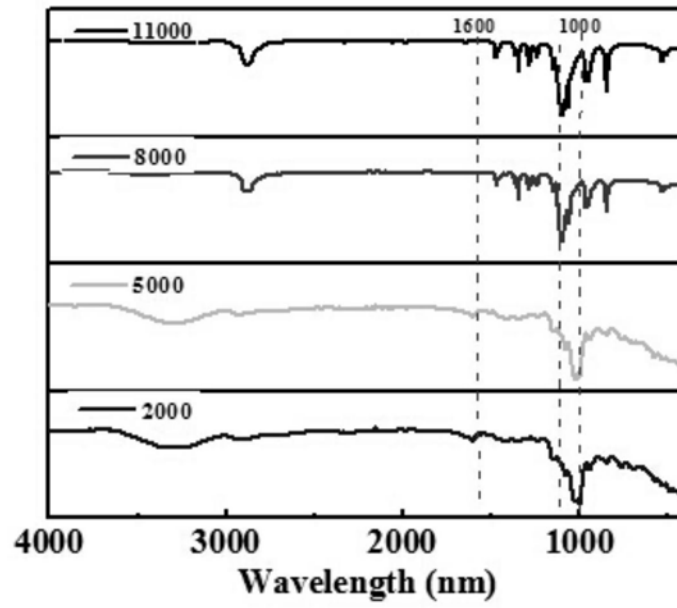


图5

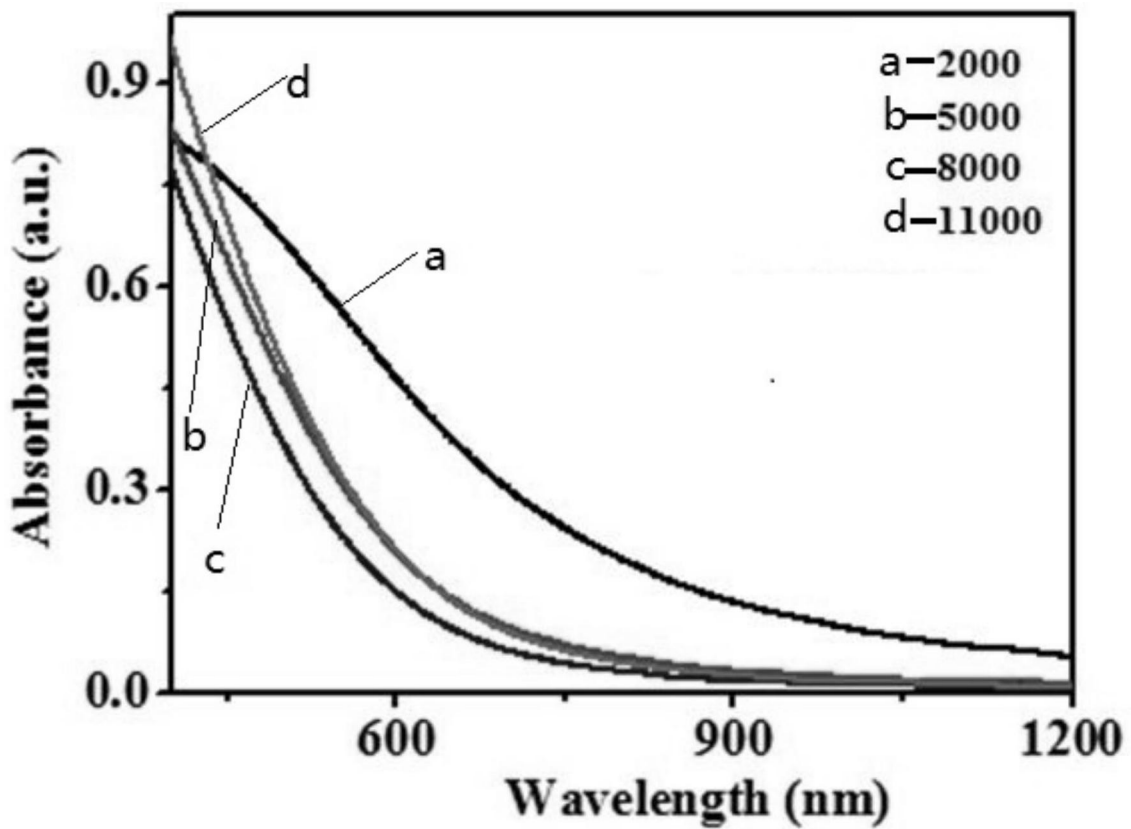


图6

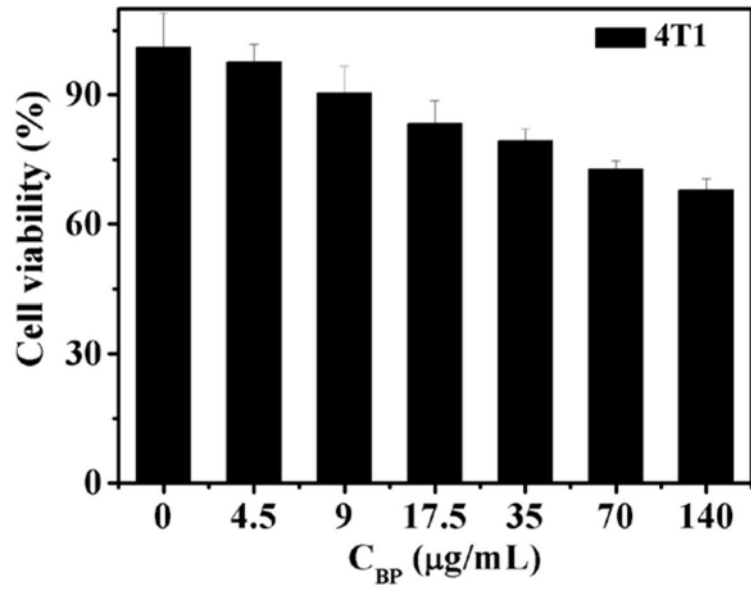


图7

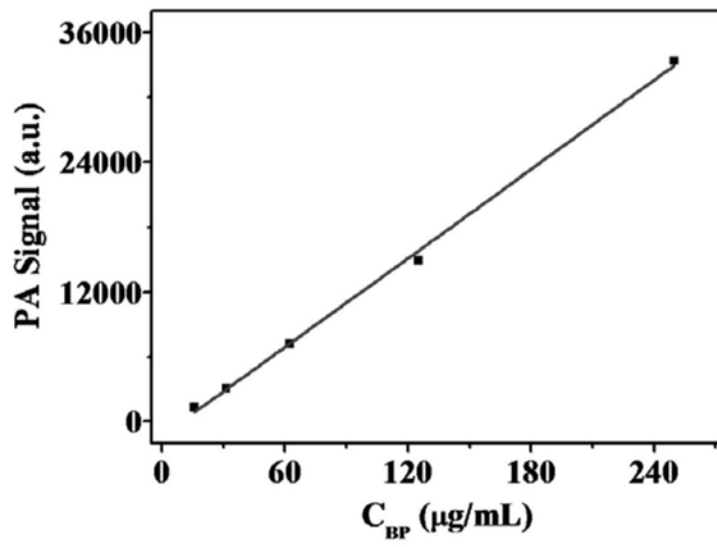
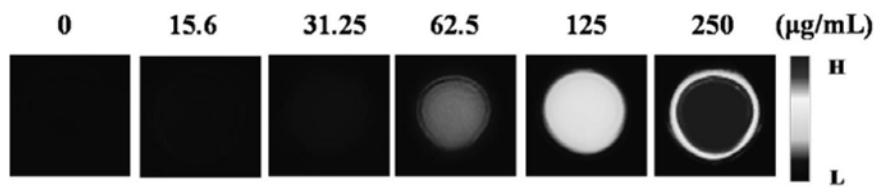


图8

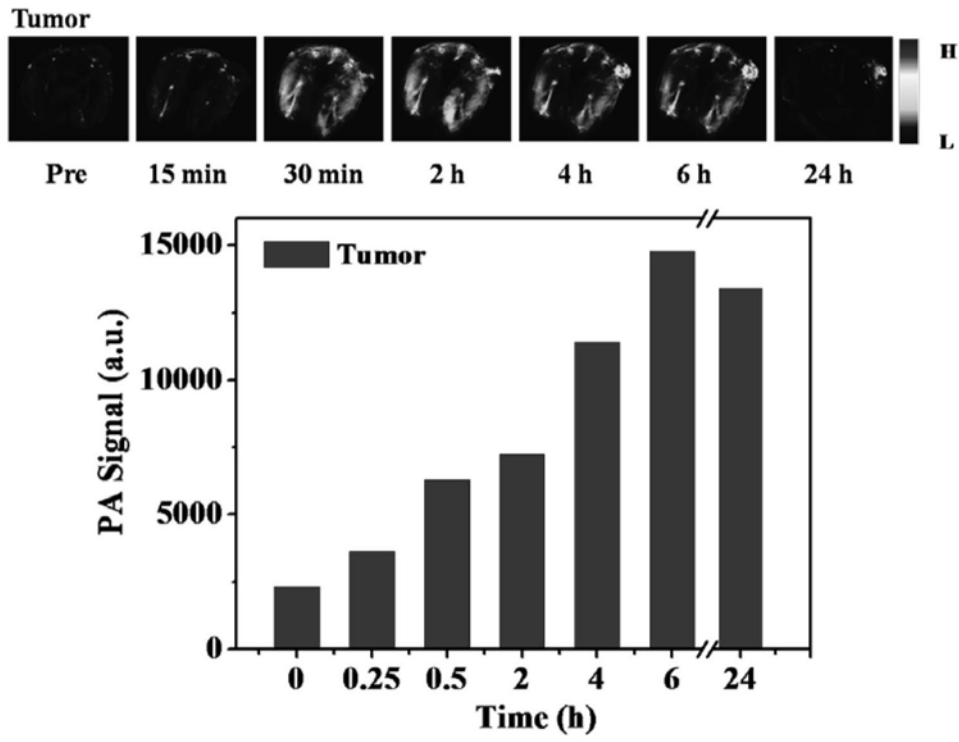


图9

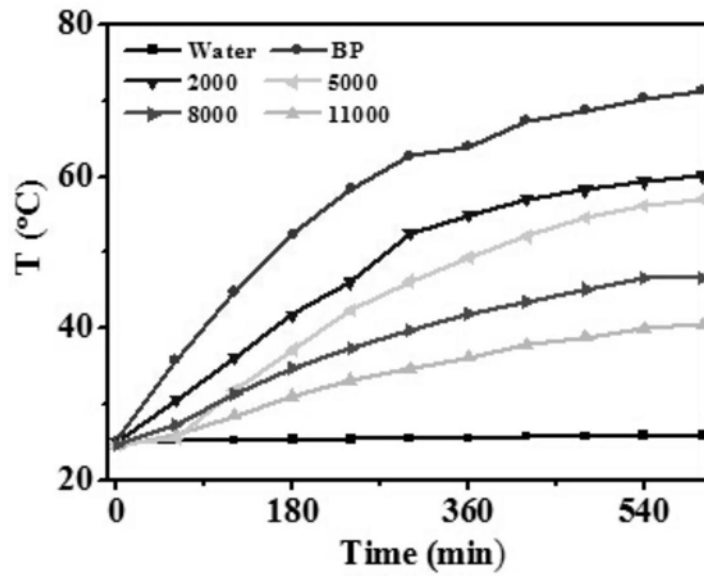


图10

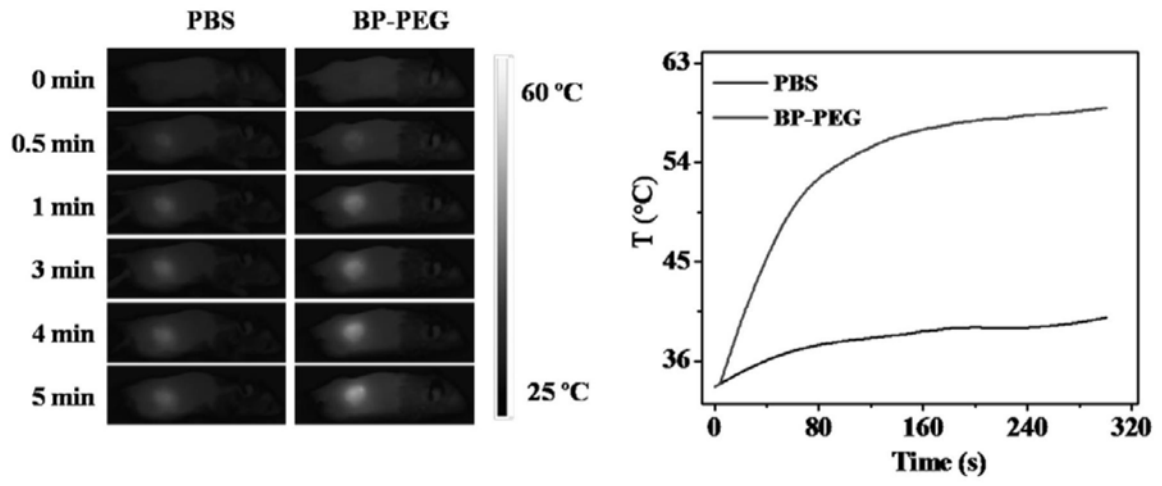


图11