

УДК 544.77.05+546.26+544.353.3

Эффективный способ получения водных нанодисперсий фуллерена C₆₀

С.М. Андреев¹, Д.Д. Пургина¹, Е.Н. Башкатова¹, А.В. Гаршев², А.В. Маерле¹, М.Р. Хаитов¹

¹ГНЦ Институт иммунологии, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24-2

²Московский государственный университет, факультет наук о материалах, 119991, Москва, Ленинские горы 1-3
E-mail: andsergej@yandex.ru; sandr@immune.utos.ru

Поступила в редакцию: 05.02.2014

Принята в печать: 10.04.2014

Водные растворы фуллерена C₆₀ (nC₆₀) получали простым смешиванием раствора C₆₀ в N-метилпирролидоне (МП) с деионизированной водой или с водным раствором низкомолекулярного природного вещества (L-аминокислоты, моносахариды, пептиды, глицерин) в качестве стабилизирующих агентов (СА), с последующим исчерпывающим диализом против дистиллированной воды. В процессе диализа все низкомолекулярные вещества удаляются через поры, а кластеры фуллерена остаются в растворе. Эффективность трансформации C₆₀ из кристаллического состояния в раствор приближается к количественной, при этом можно получать растворы с концентрацией C₆₀ до 250 мг/л, растворы стабильны по крайней мере 10–12 мес. Формирование нерастворимых агрегатов наблюдалось, если в качестве СА использовали основные и кислые органические соединения. УФ-ВИД-спектры растворов имеют профиль, характерный для nC₆₀, полученных другими известными способами (максимумы: 220, 265, 340 и 450 нм). Масс-спектры водных растворов и ИК-фурье-спектры высушенных образцов nC₆₀ указывали на возможное частичное гидроксирование фуллерена. Измерение размеров и ζ-потенциала частиц в растворах методом динамического светорассеяния давало средний их диаметр около 100 нм и заряд –30 мВ, между тем как электронная микроскопия демонстрировала, что частицы имеют характерный размер около 20 нм и содержат как кристаллическую, так и аморфную фазу. Предлагаемый метод перспективен для получения растворов эндофуллеренов и, вероятно, высших фуллеренов.

FACILE PREPARATION OF AQUEOUS FULLERENE C₆₀ NANODISPERSIONS

Aqueous solutions of the fullerene C₆₀ (nC₆₀) were prepared by simple mixing the C₆₀ solution in N-methylpyrrolidone (NMP) with deionized water followed by exhaustive dialysis against distilled water. Additionally, low-molecule weight natural substance (L-amino acids, monosaccharides, peptides, glycerol) were used as stabilizing agents (SA). During dialysis, all low molecular weight substances are leaving the solution, and it retains only the fullerene clusters. The conversion of C₆₀ from the crystalline state to the solution was almost quantitative, and its concentrations could reach up to 250 mg/L; the samples of nC₆₀ were stable at least 10–12 months. The formation of settleable aggregates was observed when basic and acidic organic compounds were used as a SA. The UV-VIS spectra have a shape characteristic for C₆₀ solutions, obtained by conventional procedures (peaks at 220, 265, 340 and 450 nm). FTIR and mass spectra provides evidence for the hydroxylation of fullerene in the nC₆₀. Measurement of size and zeta-potential of C₆₀ particles by the dynamic light-scattering showed a narrow particle size distribution (~100 nm) with negative charge (–30 mV), whereas an electron microscopy of the dried nC₆₀ revealed that the samples have both crystalline and amorphous phase with the typical particle size approx. 20 nm. The proposed method is promising for the preparation of solutions endofullerenes, and probably for solubilization of higher fullerenes.

ВВЕДЕНИЕ

Открытие простого способа препаративного синтеза фуллерена C₆₀ в 1990 г. [1] послужило толчком к взрывообразному росту химии фуллеренов и привело к синтезу многочисленных C₆₀-производных, многие из которых показывали интересную биологическую активность, в том числе антивирусную, антибактериальную, нейропротекторную, противовоспалительную и др. [2–6]. К уникальным параметрам фуллерена и некоторых его производных можно отнести мощную электронно-акцепторную активность, высокую поляризуемость молекулы, наличие большого числа эквивалентных реакционных центров и гидрофобность. Последнее свойство, по-видимому, имеет отношение к их способности проникать через биологические мембраны [4]. Большая поверхность C₆₀ и хорошо разработанная химия фуллерена позволяют присоединять к сфероидной молекуле различные гидрофильные адденды, создавать поливалентные структуры [7], что представляет интерес для конструирования новых биопрепаратов.

Однако фуллерен и без модификации является интересным объектом для медицины. Так, исследования показали, что водные дисперсии C₆₀ обладают радиопротекторными свойствами, способны модулировать цитокиновый ответ и снижать аллергическое воспаление [8–10]. В частности, длительные эксперименты на крысах показали, что фуллерен не проявляет хронической токсичности при пероральном и внутрибрюшинном пути введения, более того, он значительно продлевает время жизни животных [11]. Токсикология

фуллерена была предметом многих дискуссий, но большинство работ показало, что чистый фуллерен в форме водных дисперсий не обладает токсичностью [12], а иногда наблюдаемые токсические реакции можно отнести, в частности, к токсичным растворителям, используемым при получении фуллереновых растворов [13].

Поведение и свойства водных дисперсий немодифицированного фуллерена, изготовленных различными способами, изучались довольно интенсивно [14, 15]. Кристаллический фуллерен (фуллерит) практически нерастворим без специальной обработки в водной среде (растворимость менее 0.1 нг/мл) [16, 17]. Наиболее известные способы получения водных дисперсий C₆₀ основаны на переносе органического раствора C₆₀ (в бензоле, толуоле или тетрагидрофуране) в водную фазу с использованием ультразвуковой обработки или длительного перемешивания в чистой воде, часто сочетаемой с измельчением в ступке [14, 15, 18, 19]. Другие популярные методы основаны на функционализации молекул фуллерена, например с образованием фуллерола (фуллеренола), получении донорно-акцепторных комплексов [20] или вандерваальсовых комплексов с амфифильными молекулами, например с ПАВ [21]. Предполагают, что аэробные условия во время диспергирования фуллерена в воде стимулируют его растворение за счет присоединения к нему кислорода с образованием эпоксида на поверхности C₆₀-кластеров, что повышает их гидрофильность, но их концентрация при использовании этого метода довольно низкая [22]. Фуллерен можно также перевести в раствор при кипяче-

нии фуллерита с водным раствором γ -циклодекстрина (ЦД) при мольном соотношении C_{60} :ЦД = 1:2. И хотя такой комплекс можно подвергать гель-хроматографии, он все же медленно распадается, и в среде всегда будут находиться в равновесном состоянии свободные компоненты [23].

Все фуллеренсодержащие водные растворы (коллоидные дисперсии) обычно имеют цвет от желтого до красно-коричневого в зависимости от концентрации, где молекулы фуллерена всегда организуются в гидратированные отрицательно заряженные кластеры, размеры которых зависят от конкретной технологии (диапазон от 5 до 1000 нм). Такие дисперсии в различных публикациях обозначаются по-разному: nC_{60} , $папо-C_{60}$, $C_{60}FWS$, $C_{60}@H_2O_n$, молекулярно-коллоидный фуллерен (МКФ), гидратированный фуллерен (ГФ или НуFn). Заряд играет основную роль в стабилизации дисперсий C_{60} , изменение pH и особенно ионной силы приводит к агрегации кластеров и осаждению фуллеренового материала. Следует добавить, что высушенные дисперсии C_{60} обычно необратимо теряют растворимость в воде. Относительно низкая степень конверсии фуллерена из кристаллического состояния в раствор и необходимость длительного перемешивания/ультразвуковой обработки (подробности обработки часто не сообщаются) делают эти методы плохо воспроизводимыми и неэкономичными. Кроме того, обработка ультразвуком, используемая для ускорения растворения C_{60} , часто приводит к нежелательным процессам, окислению, образованию агрегатов [24]. Используемые для солюбилизации ароматические растворители являются токсичными веществами, и нет полной уверенности, что они целиком удаляются из дисперсии ввиду их специфического (π -стекинг) взаимодействия с фуллереном [25, 26]. Например, из-за следов токсичного тетрагидрофурана, присутствовавшего в такой дисперсии, делалось ошибочное заключение о токсичности самого фуллерена [27].

В этой работе мы описываем простой способ получения стабильных водных дисперсий фуллерена (nC_{60}), подходящих для использования в биомедицинских целях. Метод включает растворение кристаллического фуллерена в N-метилпирролидоне (МП), смешивание его с дистиллированной водой или с биосовместимым водным раствором низкомолекулярного природного вещества в качестве стабилизирующего агента с последующим исчерпывающим диализом против дистиллированной воды. Этот способ исключает использование токсичных растворителей, ультразвуковую обработку, длительное перемешивание и нагревание.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фуллерен C_{60} получен от SES Research (99.9 %), образец эндофуллерена $Gd@C_{82}$ предоставлен проф. Лебедевым В.Т. (Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова), N-метилпирролидон (МП) (99 %, Panreac), L-аминокислоты и другие реагенты (Fluka) использовались без дополнительной очистки. Для диализа применяли трубки SpectraPor, 6–8 кДа (Spectrum Laboratories, Inc.), для фильтрации дисперсий фуллерена – одноразовые стерильные ацетатные (AcetatePlus) шприцевые фильтры 0.45 мкм (ArtChemicals.com).

•ПОЛУЧЕНИЕ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ ФУЛЛЕРЕНА C_{60} (nC_{60})

20 мг кристаллического C_{60} растворяли в 25 мл МП, используя магнитную мешалку, и полученный коричнево-фиолетовый раствор смешивали с дистиллированной водой (от 12.5 до 100 мл) или с раствором СА (40 мг в 100 мл дистиллированной воды). Полученный темно-красный прозрачный раствор перемешивали 1 ч и затем подвергали исчерпывающему диализу против деионизованной воды. Диализат пропускали

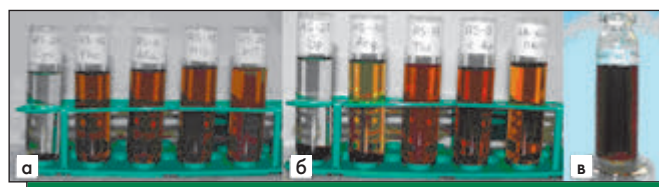


РИСУНОК 1 | Фотографии дисперсий фуллерена: а (слева направо) – nC_{60} -Cys, nC_{60} -Phe, nC_{60} -Ala, nC_{60} -His, nC_{60} ; б: nC_{60} -спермин, nC_{60} -Arg, nC_{60} -Thr, nC_{60} -E-Acp, nC_{60} -PVP; в: $nGd@C_{82}$ -Ala

через 0.45 мкм фильтр и в результате получали прозрачный коричневато-желтый раствор (рис. 1а, б). Растворы хранили при температуре 10 °С, защищенными от света.

По аналогичной схеме получали водные дисперсии эндофуллерена (ЭФ), $Gd@C_{82}$. 3 мл раствора ЭФ в МП (0.4 мг/мл) смешивали с 12 мл дистиллированной воды или с раствором СА (6 мг в 12 мл дистиллированной воды). Полученный раствор серо-буро-фиолетового цвета перемешивали в течение часа и затем проводили исчерпывающий диализ. В результате получали раствор серо-бурого цвета (рис. 1в).

•ЭЛЕКТРОННЫЙ СПЕКТР И ЭКСТИНКЦИЯ

Электронный спектр поглощения регистрировали на двухлучевом спектрофотометре Cary 100 UV-Vis (Agilent Technologies) в диапазоне от 190 до 800 нм, используя кварцевую кювету толщиной 1 см. Концентрации C_{60} в растворах определяли измерением оптической плотности при 340 нм с использованием экспериментальной калибровки. Была установлена прямая зависимость между оптической плотностью и концентрацией C_{60} в диапазоне от 1 до 50 мг/л с молярной экстинкцией $\epsilon_{340} = 46450$.

•ГЕКСАНОВЫЙ ТЕСТ (АНАЛИЗ ПРИСУТСТВИЯ СВОБОДНЫХ МОЛЕКУЛ C_{60})

10 мл дисперсии nC_{60} смешивали с 5 мл н-гексана в стеклянной пробирке с пробкой и энергично перемешивали (вортекс) в течение 1 ч. Затем смесь отстаивали 1 ч для разделения фаз, часть верхней гексановой фазы аккуратно отбирали и переносили в кварцевую кювету. Концентрацию мономера C_{60} в экстракте определяли на основании его поглощения при 328 нм ($\epsilon = 52.5 \times 10^{-3}$ [28]).

•ИНФРАКРАСНАЯ ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИЯ (FTIR)

ИК-спектры регистрировали на приборе Bruker Alpha-IR (условия нарушенного полного внутреннего отражения) с использованием лиофилизированных или высушенных в вакууме образцов дисперсий C_{60} или образцов, полученных из дисперсий, осажденных на ультрафильтрационной мембране PLTK Dia NMWL 30 kDa (Millipore).

•МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Масс-спектры регистрировали на приборе Microflex™ LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics), образцы брали в виде водных растворов (nC_{60}) или толуольного раствора кристаллического фуллерена.

•РАЗМЕР НАНОЧАСТИЦ И ζ -ПОТЕНЦИАЛ

Измерение ζ -потенциала и размеров наночастиц методом динамического светорассеяния (DLS) проводили на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Оксфорд, Великобритания).

•ПРОСВЕЧИВАЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Анализ методом просвечивающей электронной микроскопии и дифракции с выделенной области проводили на автоэмис-

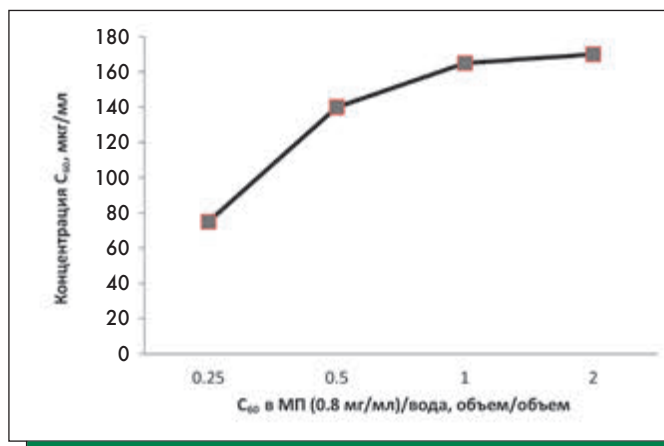


РИСУНОК 2 | Зависимость конечной концентрации C_{60} в nC_{60} в объемном соотношении раствора C_{60} в N-МП от разбавления водой (до диализа)

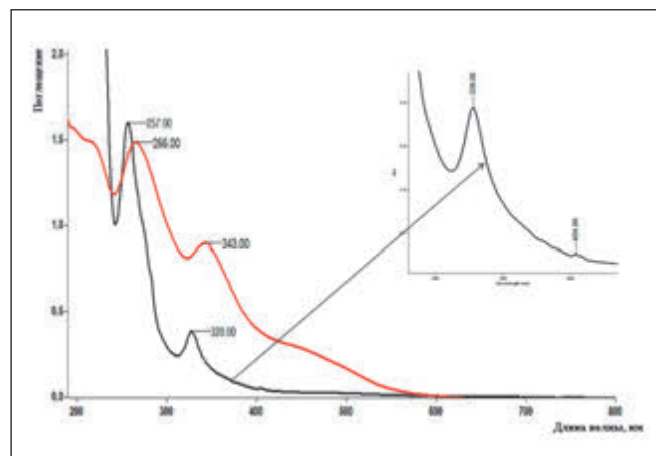


РИСУНОК 3 | Электронные спектры nC_{60} (красный) и гексанового экстракта nC_{60} (черный)

сионном просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) Libra 200 (Carl Zeiss) при ускоряющем напряжении 200 кВ.

Захват изображений и картин электронной дифракции с выделенной области проводили с высушенных образцов дисперсий C_{60} . Для этого водные дисперсии концентрации 100 мкг/мл наносили на медные сетки SPI® с поддерживающей пленкой из формвара и аморфного углерода. Сетку сушили на воздухе при комнатной температуре в течение 4 ч. Перед помещением образца в микроскоп держатель с образцом 2–2.5 ч выдерживали в устройстве для вакуумной сушки образцов и держателей Model 655 (Gatan).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

• ПОЛУЧЕНИЕ ВОДНЫХ ДИСПЕРСИЙ ФУЛЛЕРЕНА nC_{60}

Выбранная схема получения водных дисперсий C_{60} (nC_{60}) базировалась на диализе водно-органического раствора фуллера. В качестве подходящего растворителя для начального растворения фуллерита был выбран МП из-за его высокой гидрофильности и низкой токсичности [29] с учетом биомедицинского аспекта применения таких растворов. Растворимость C_{60} в МП приблизительно 0.8 мг/мл [30], в процессе растворения раствор становился пурпурно-вишневым, но со временем цвет изменялся до коричнево-вишневого, что, по-видимому, отражает изменение агрегатного состояния фуллерена (укрупнение кластеров) [24]. Наши первые попытки получения водных дисперсий путем разбавления растворов фуллерена в МП водой с традиционной обработкой ультразвуком и последующим диализом были не очень успешными. В процессе диализа часто наблюдалось образование рыхлых коричневых осадков. Однако, к нашему удивлению, мы обнаружили, что насыщенный раствор C_{60} в МП (C_{60} /МП) может быть разбавлен водой в почти любом соотношении без озвучивания и затем подвержен диализу против дистиллированной воды с образованием прозрачного раствора. Фуллерен полностью растворяется в МП в течение суток, и такой раствор после смешивания с водой можно сразу подвергать диализу (мембрана 6–10 кДа). В водной среде фуллерен всегда формирует кластеры, которые не проходят через поры диализной мембраны, в отличие от гидрофильных низкомолекулярных продуктов, в том числе и растворителя МП. Объемное соотношение воды к C_{60} /МП влияло на конечную концентрацию C_{60} , т.е. чем меньше доля воды, тем выше была концентрация C_{60} в конечном растворе, но только до определенного предела, который налагает явление эндоосмоса

(рис. 2). Полученную дисперсию nC_{60} можно концентрировать путем упаривания, но тоже до некоторого предела, после которого наблюдается образование осадка. Максимальная концентрация, которую удавалось получить, достигала примерно 250 мг/л при объемном соотношении раствора МП к воде, равном 1:2. При более низком содержании воды смесь становилась очень мутной даже после диализа.

Интересно, что при смешивании раствора C_{60} /МП с водой мы наблюдали изменение цвета раствора от темно-бардового до зеленовато-коричневого, что может указывать на процессы, связанные с появлением свободных радикалов. Конечная дисперсия nC_{60} представляет собой прозрачный раствор с pH 5–6, цвет которого в зависимости от концентрации варьирует от желтого до коричнево-оранжевого с легкой опалесценцией, что указывает на его коллоидную природу. Раствор является достаточно стабильным, и осадка не наблюдается по меньшей мере 10–12 мес после хранения при 10 °С. В то же время тест на фильтруемость через 0.45 мкм поры показал, что на размер частиц в nC_{60} влияет соотношение C_{60} /МП:вода. Дисперсия легко проходит через фильтр при объемном соотношении 1:2 и 1:1, а при соотношении 1:4 фильтрация идет плохо, и иногда легкий осадок образуется во время диализа.

Мы предположили, что устойчивость дисперсий можно повысить, вводя в нее в качестве стабилизирующих агентов амфифильные низкомолекулярные соединения типа аминокислот и сахаров, предполагая, что в водной среде с фуллереном они могут образовывать комплексы, подобно ПАВ [21]. Необходимо отметить, что ранее допускалась возможность того, что аминокислоты могут формировать комплексы с фуллереном и даже прогнозировалась энергия их взаимодействия в зависимости от структуры [31]. В качестве СА мы выбрали ряд нетоксичных соединений из различных классов – L-аминокислоты, пептиды, белки, моносахариды, глицерин, органические кислоты и основания, используя единый протокол для тестирования стабилизирующего эффекта, наличия или отсутствия осадка в финальном растворе. Для этого исходный C_{60} /МП разбавляли водным раствором СА (400 мкг/мл) при объемном соотношении 1:4 и затем полученную смесь подвергали исчерпывающему диализу против воды. Результаты приведены в таблице 1 (обозначения: если конкретный СА применялся для получения nC_{60} , то такой образец обозначен как nC_{60} -СА, например nC_{60} -Thr). Оказалось, что в зависимости от наличия и характера ионогенных групп потенциальные СА проявляют раз-

ТАБЛИЦА 1 | Влияние структуры СА на формирование осадка в процессе диализа nC_{60}

СА	Прозрачность	СА	Прозрачность
-	+ ¹	L-Asp	- ²
L-Ala	+	L-Glu	-
L-Leu	+	L-Arg	-
L-Tyr	+	L-Lys.HCl	-
L-Trp	+	L-Lys	-
L-Phe	+	L-Cys	-
Gly	+	Lys-Trp-Lys (KWK)	-
L-Pro	+	Спермин	-
L-Met	+	Спермин.HCl	-
L-Asp ³	+	Полиэтиленимин (10 kDa)	-
L-His	+	Уксусная кислота	-
L-Gln	+	Бензойная кислота	-
L-Thr	+	<i>n</i> -аминобензойная кислота	-
Arg-Lys-Asp (RKD)	+	Янтарная кислота	-
L-рамноза	+	Желатин	-
D-глюкоза	+	BSA ⁵	-
Глицерин	+		
Tris ⁴	+		
PVP (10 kDa)	+		
PEG (1 kDa)	+		

¹ «+» – прозрачный раствор.

² «-» – рыхлые агрегаты.

³ Asp – ε-аминокапроновая кислота.

⁴ Tris – трис-гидроксиметиламинометан.

⁵ BSA – бычий сывороточный альбумин.

личные эффекты. Нейтральные и гидрофобные аминокислоты и моносахариды оказывают стабилизирующее действие, при этом формируются прозрачные и стабильные растворы (10 мес наблюдений). Их электронные спектры показывают пики, типичные для водных дисперсий C_{60} , полученных путем замены растворителя (рис. 3). В то же время добавление СА, несущих сильные положительные или отрицательные заряды при нейтральном рН, таких как основные и кислые аминокислоты, алифатические и ароматические кислоты, полиамины, приводило к рыхлым осадкам в процессе диализа. Нагревание nC_{60} при 100 °С в течение одного часа не приводило к заметным визуальным изменениям раствора, лишь слегка повышалась степень прохождения частиц nC_{60} через 0.45 мкм фильтр. При использовании аминокислот, таких как Tyr, His, Thr и Met, частицы C_{60} полностью проходили через такой фильтр. Следует подчеркнуть, что сами аминокислоты при смешивании с водной суспензией фуллерена не оказывали никакого эффекта на его солубилизацию, даже при очень длительном перемешивании (3 недели перемешивания растертого фуллерита в водном растворе аминокислоты). Анализ наличия связанной аминокислоты в лиофильно высушенных дисперсиях nC_{60} нингидриновым методом (в сочетании с тонкослойной хроматографией) не показывал ее присутствия.

•СВОЙСТВА nC_{60}

Влияние рН и электролитов. Образцы nC_{60} после диализа всегда имели рН в диапазоне 5.8–6.8, однако, если рН снижали до 3–4, начиналось образование осадка. Причем этот процесс являлся обратимым, повышение рН приводило к растворению осадка. Увеличение ионной силы дисперсии nC_{60} добавлением хлорида натрия до 8–20 мМ при нейтральном рН также приводило к агрегации частиц, причем значение точки агрегации зависело от типа применяемого СА (данные не показаны). Эти результаты говорят о том, что полученные дисперсии ведут себя как типичные коллоидные растворы [15, 32, 33].

•ЭЛЕКТРОННЫЕ СПЕКТРЫ

Раствор фуллерена в МП в начальной фазе имеет фиолетовый оттенок и характерный пик около 330 нм, однако со временем электронный спектр полностью сглаживается, что, по-видимому, происходит в результате агрегации молекул C_{60} в большие кластеры и их сольватации молекулами растворителя [24]. В отличие от этого, спектры поглощения образцов водных дисперсий nC_{60} всегда характеризуются тремя интенсивными максимумами при 219, 265 и 344 нм и слабой широкой полосой между 400 и 500 нм. В отличие от спектра фуллерена в гексане, где, как считается, присутствуют только одиночные молекулы (характерные пики 213, 257, 328 и 407 нм) [28], полосы поглощения nC_{60} являются более широкими и менее интенсивными (рис. 3). Кроме того, характерный для гексана пик при 407 нм в nC_{60} исчезает, и вместо него появляется широкая слабая полоса при 450 нм. Предполагают, что эта полоса отражает агрегацию молекул C_{60} [15]. Исчезновение или наличие свободных молекул фуллерена в nC_{60} можно проверить с помощью спектрального анализа экстракции фуллерена в гексан, который не смешивается с МП [24]. Эксперимент, проведенный нами, показал, что в спектре гексанового экстракта в самом деле наблюдаются характерные острые пики при 328 и 405 нм (рис. 3), что может говорить о присутствии в nC_{60} одиночных молекул фуллерена (по расчету, около 8% от общего количества). Тем не менее они могут быть связаны с молекулами МП, так, раствор фуллерена в МП (хранившийся 6 сут), и просто разбавленный гексаном, дал спектр, который не отличался от спектра раствора чистого фуллерена в гексане (данные не показаны). Известно, что фуллерен образует с МП донорно-акцепторный комплекс [15], и не исключено, что он также может экстрагироваться в гексан. Следует подчеркнуть, что электронные спектры полученных нами nC_{60} практически не отличались от спектров, описанных ранее для дисперсий фуллерена, полученных путем замены растворителей или путем диспергирования в воде [15, 34, 35].

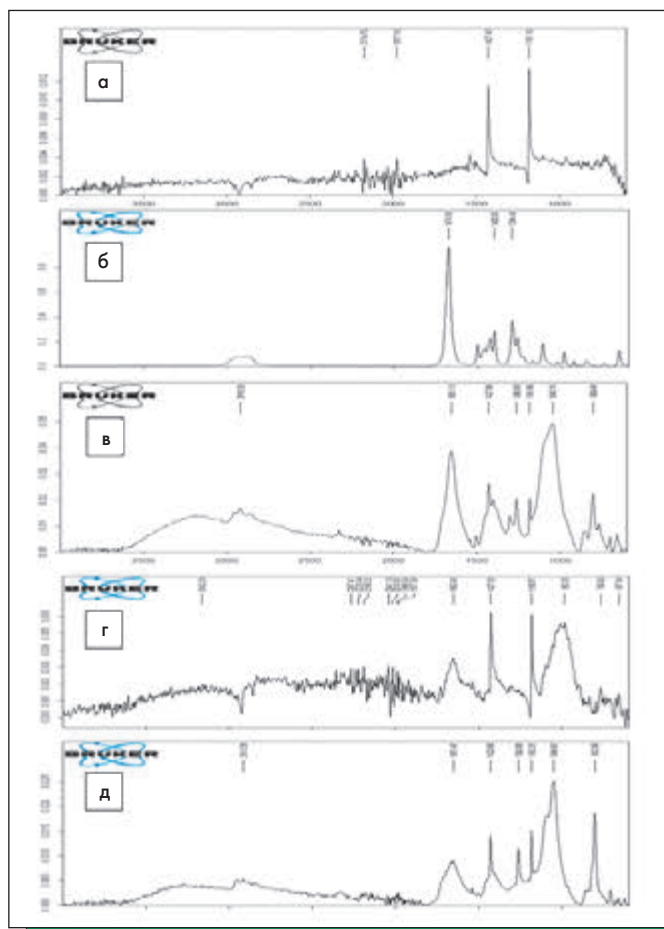


РИСУНОК 4 | ИК-фурье-спектры кристаллического C_{60} (а), N-МП (б) и nC_{60} (в): nC_{60} -Thr (г), полученная путем нанесения на ультрафильтрационную мембрану, nC_{60} -His (д), полученная путем лиофильного высушивания

•ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРЫ

На рис. 4 показаны ИК-фурье-спектры высушенных образцов nC_{60} , полученных путем лиофилизации или осаждением дисперсии на ультрафильтрационной мембране, для сравнения приведены спектры кристаллического C_{60} и МП. Две характерные узкие полосы поглощения молекул C_{60} при 1182 и 1428 cm^{-1} (C—C-связи) хорошо видны на всех спектрах, хотя они частично перекрываются другими полосами. В то же время спектры nC_{60} и nC_{60} -СА характеризуются дополнительными полосами в диапазонах 3500–3200, 1650–1660 и 1000–1100 cm^{-1} . Полосы при 3500–3200 cm^{-1} характерны для гидроксильных групп (в том числе для молекул связанной воды), 1650–1660 cm^{-1} – для карбонильной группы амида и, очевидно, отражают связанный МП, и 1000–1100 cm^{-1} характерны для C—O-колебаний. Наличие в спектрах полос C—O не связано с присутствием СА, так как они присутствуют также в спектрах nC_{60} , где СА не добавлялся; также отсутствуют полосы, характерные для аминокислот. Интересно, что наличие в ИК-спектрах полос, характерных для C—O-колебаний, наблюдали и ранее при изучении водных дисперсий C_{60} . Некоторые авторы объясняют их наличие окислением фуллерена, как результат длительной ультразвуковой обработки суспензии C_{60} [33, 35, 36]. Однако в нашей работе не использовались ни ультразвук, ни нагревание, кроме того, анаэробные условия (атмосфера аргона) не изменяли спектральный профиль полученных nC_{60} . Другая известная интерпретация полосы при 1100 cm^{-1} – гидроксילирование фуллерена, прав-

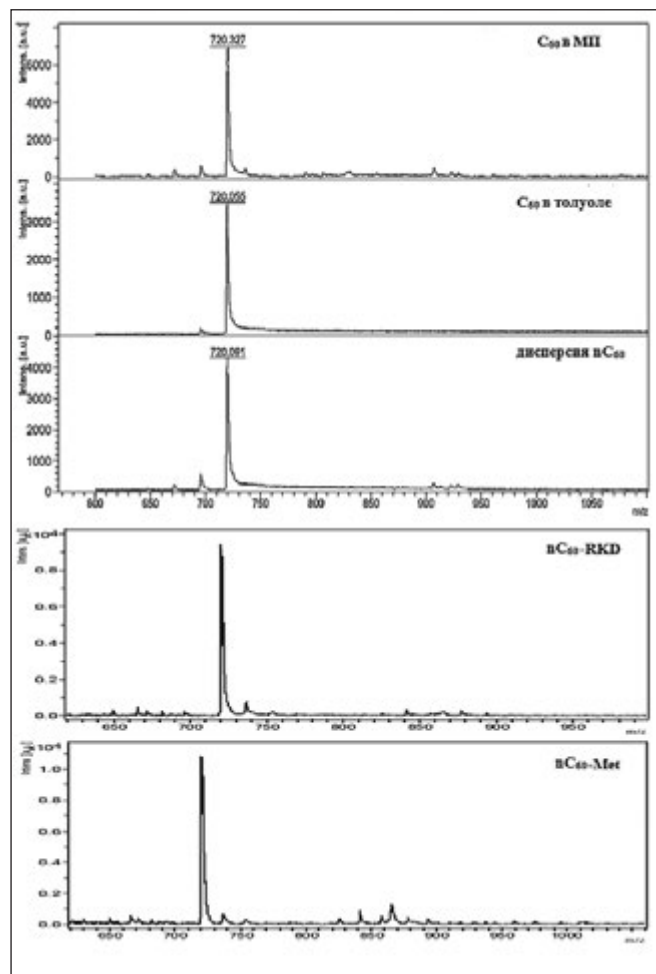


РИСУНОК 5 | Масс-спектры водных растворов nC_{60} : C_{60} в МП, C_{60} в толуоле, дисперсия nC_{60} , nC_{60} -RKD, nC_{60} -Met

да, его механизм не был объяснен [37]. Мы, в свою очередь, полагаем, что в нашем случае гидроксילирование также имеет место, поскольку данные масс-спектрометрии дают некоторые указания на присутствие OH-групп (рис. 5).

•МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ (МС)

Известно, что большинство фуллереновых аддуктов являются термически неустойчивыми, поэтому в МС-анализе необходимо применение мягкого метода ионизации. В этой работе для анализа состава полученных C_{60} -дисперсий был использован метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ), дающий молекулярные ионы с минимальной фрагментацией. На рис. 5 приведены масс-спектры для некоторых образцов дисперсий, полученных в разных условиях: nC_{60} , nC_{60} -Met и nC_{60} -RKD. Все спектры имеют общие закономерности, пик молекулярного иона C_{60} ($m/z = 720 \pm 1$) является доминирующим на всех спектрах, предполагая отсутствие существенных ковалентных модификаций фуллерена, в том числе наличия присоединенных аминокислот. Во многих спектрах имеются минорные пики, их позиция зависит также от наличия и структуры СА. Причем значения некоторых масс хорошо соответствуют массам полигидроксильрованных C_{60} , например: m/z 806–808 ($C_{60}(OH)_5$), 907 ($C_{60}(OH)_{11}$), 924 ($C_{60}(OH)_{12}$), 1077 ($C_{60}(OH)_{21}$). Указанные пики отсутствуют в спектре исходного кристаллического C_{60} . Можно полагать, что формирование nC_{60} данным методом сопровождается частичным полигидроксиль-

ТАБЛИЦА 2 | Размер и заряд (ζ) nC_{60} , измеренных DLS

nC_{60} -CA	Концентрация, мг/л	Размер, нм	PDI	ζ , мВ
nC_{60}	10.8	103	0.177	-28.4
nC_{60} -Ala	10.9	110	0.176	-36.0
nC_{60} -рамноза	10.7	124	0.172	-27.2
nC_{60} -RKD	10.1	100	0.210	-27.3
nC_{60} -His	10.0	112	0.377	-28.7

рованием молекулы фуллерена, что подтверждают данные ИК-фурье-спектроскопии.

•РАЗМЕР НАНОЧАСТИЦ И ζ -ПОТЕНЦИАЛ

Измерения гидродинамического размера частиц в разбавленных растворах nC_{60} путем динамического светорассеяния (NanoSizer, Malvern) показали, что их размер лежит в районе 100–120 нм, причем с достаточно узким распределением (PDI). Их ζ -потенциалы также имели практически одинаковое значение, около -28 мВ, лишь препарат C_{60} -Ala имел несколько больший отрицательный заряд (табл. 2). Таким образом, найденные значения, размеры и ζ -потенциалы nC_{60} очень близки к значениям водных C_{60} -дисперсий, полученных другими способами [14].

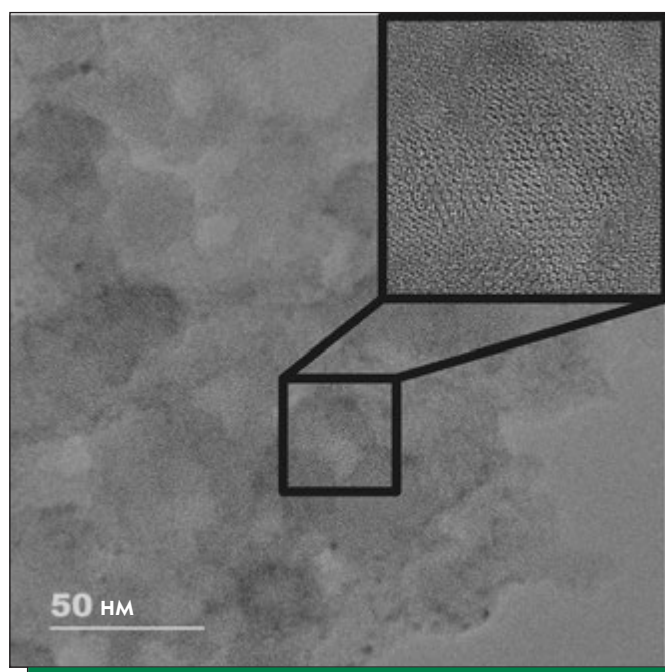
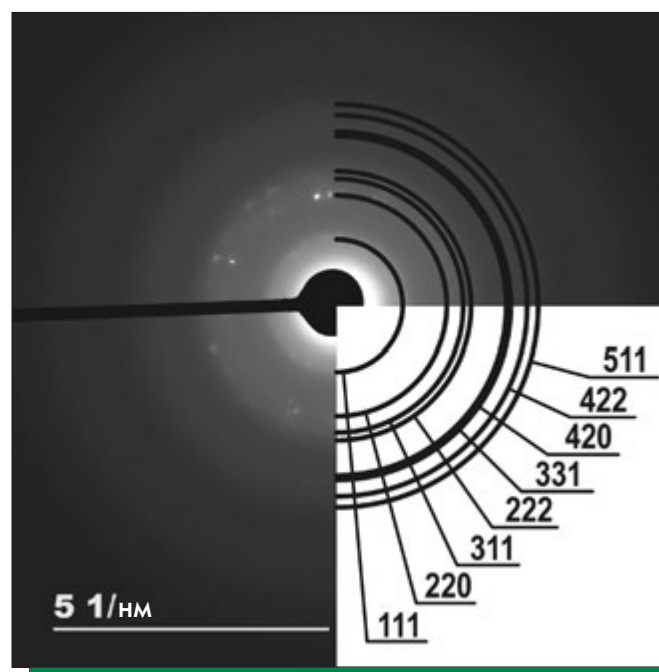
•ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

На рис. 6 (а–в) представлены электронно-микроскопические фотографии препаратов высушенной нефильрованной (0.45 мкм) дисперсии nC_{60} с концентрацией около 100 мкг/мл. На представленных фотографиях наблюдаются агрегаты разного размера, как большие агрегаты диаметром до ~ 500 нм, так и небольшие агрегаты, около 20 нм. Крупные агломераты имеют мелкозернистую структуру и инкапсулируют большое количество частиц и мелких агрегатов. Микроструктура высу-

шенных дисперсий сходна с микроструктурой высушенных гелей, часть фуллеренов в которых упорядоченно упакована (рис. 7). По данным ПЭМ высокого разрешения, размер областей с упорядоченным расположением фуллеренов составляет от 2–5 нм до 150–200 нм.

В образцах высушенных дисперсий nC_{60} -RKD, nC_{60} -His, по данным кольцевой электронной дифракции с выделенной области, межплоскостные расстояния в кристаллах, образованных фуллеренами, близки по значениям к указанным в карточке №44-0558 базы данных ICDD/JCPDS PDF-2 (рис. 8) [38]. Более детальное исследование кристаллических областей затруднено в связи с разрушением упорядочения областей при воздействии электронного пучка, вероятно, из-за испарения фуллеренов в условиях вакуума прибора даже при минимальных яркостях электронного пучка.

Пока затруднительно ответить на вопрос, существуют ли кристаллы фуллерена изначально в nC_{60} или образуются при подготовке проб в результате высыхания растворов на углеродной сетке. Однако, оценивая наши данные просвечивающей электронной микроскопии и учитывая накопленную обширную информацию по структуре фуллереновых водных дисперсий, мы предполагаем, что полученные нами дисперсии nC_{60} изначально содержат частицы с упорядоченным расположением фуллеренов.


РИСУНОК 7 | Микроструктура высушенной дисперсий nC_{60}

РИСУНОК 8 | Кольцевая электронная дифракция nC_{60} -RKD, nC_{60} -His

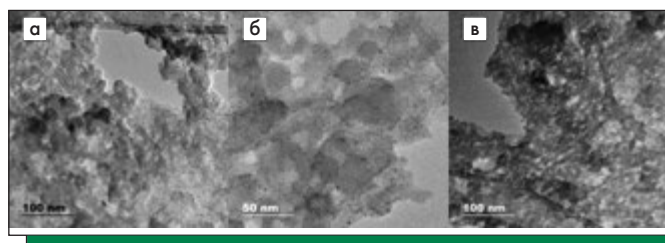


РИСУНОК 6 | ПЭМ образцов высушенных дисперсий C_{60} : а – nC_{60} , б – nC_{60} -Ala, в – nC_{60} -RKD

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе предлагается новый простой способ получения водных растворов фуллеренов без применения токсичных растворителей, ультразвуковой обработки и нагревания, что делает их пригодными для использования в медицине. Эффективность трансформации C_{60} из кристаллического состояния в раствор приближается к количественной, при этом можно получить растворы с концентрацией C_{60} до 250 мг/л. Аминокислоты и ряд других природных веществ оказывают стабилизирующий эффект на водные дисперсии C_{60} и в ряде случаев снижают размер частиц. В этих условиях гидродинамический размер частиц C_{60} колеблется на уровне 100 ± 20 нм, хотя, по данным ПЭМ, наблюдаются частицы

размером около 20 нм. Устойчивость к нагреванию позволяет стерилизовать дисперсии nC_{60} .

Данный метод пригоден и для получения растворов эндофуллеренов. Так, предварительные эксперименты с $Gd@C_{82}$ приводили к прозрачным растворам серо-бурого цвета, легко фильтрующимся через 0.45 мкм мембраны. Мы предполагаем, что солубилизация и более тяжелых фуллеренов также возможна этим способом. Пока мы не знаем механизма солубилизации фуллерена, однако можно предположить, что основная схема включает первичное комплексование молекул (и кластеров) C_{60} с молекулами МП [24] с последующей их гидратацией и частичным гидроксилированием поверхности наночастиц. В последнем процессе, возможно, участвуют свободные радикалы. ■

Авторы благодарят профессора Лебедева В.Т. (Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова) за предоставленный образец эндофуллерена $Gd@C_{82}$ и Н.С. Осипову (НПО Наносистема) за анализ размера частиц. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства России. Электронно-микроскопические исследования выполнены с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kratschmer W., Lamb L.D., Fostiropoulos K., Hoffman D.R. Solid C_{60} : a new form of carbon // Nature. 1990. № 347. P. 354–356.
- Bianco A., Da Ros T., Prato M., Toniolo C. Fullerene-based amino acid and peptides // J. Pep. Sci. 2001. № 7(4). P. 208–219.
- Bosi S., Da Ros T., Spalluto G., Prato M. Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications // Eur. J. Med. Chem. 2003. № 38. P. 913–923.
- Pantarotto D., Briand J.P., Prato M., Bianco A. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes // Chem. Commun. A. 2004. № 1. P. 6–17.
- Пиотровский Л.Б., Киселев О.И. Фуллерены в биологии. СПб, 2006.
- Gilmore J.L., Yi X., Quan L., Kabanov A.V. Novel nanomaterials for clinical neuroscience // J. Neuroimmune Pharmacol. 2008. № 3(2). P. 83–94.
- Andreev I., Petrukhina A., Garmanova A., Andreev S., Romanova V., Troshin P., Troshina O., DuBuske L. Penetration of fullerene C_{60} derivatives through biological membranes // Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures. 2008. № 16. P. 89–102.
- Dellinger A., Zhou Z., Lenk R., MacFarland D., Conrad D., Kopley C.L. Fullerene nanomaterials inhibit phorbol myristate acetate-induced inflammation // Exp. Derm. 2009. V. 18. № 12. P. 1079–1081.
- Satoh M., Matsuo K., Kiriya H. et al. Inhibitory effect of a fullerene derivative, monomaleic acid C_{60} , on nitric oxide-dependent relaxation of aortic smooth muscle // Gen. Pharmacol. 1997. V. 29. № 3. P. 345–351.
- Roursgaard M., Poulsen S.S., Kopley C.L., Hammer M., Nielsen G.D., Larsen S.T. Polyhydroxylated C_{60} fullerene attenuates neutrophilic lung inflammation in mice // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2008. № 103(4). P. 386–388.
- Baati T., Bourasset F., Gharbi N., Njim L., Abderrabba M., Kerkeni A., Szwarc H., Moussa F. The prolongation of the lifespan of rats by repeated oral administration of [60] fullerene // Biomaterials. 2012. № 33. P. 4936–4946.
- Венгерович Н.Г., Тюнин М.А., Антоненкова Е.В., Коньшаков Ю.О., Болехан А.В., Зайцева О.Б., Стуков А.Н., Бояркин М.Н., Попов В.А. Биологическая активность нанообъектов фуллерена C_{60} // Иммунология. 2012. № 12. С. 161–177.
- Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson S.R., Moussa F. Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity // Nano Lett. 2005. № 5(12). P. 2578–2585.
- Мчедлов-Петросян Н.О. Растворы фуллерена C_{60} : коллоидный аспект // Химия, физика та технология поверхні. 2010. Т. 1. № 1. С. 19–37.
- Mchedlov-Petrosyan N.O. Fullerenes in liquid media: an unsettling intrusion into the solution chemistry // Chem. Rev. 2013. DOI: 10.1021/cr3005026.
- Ruoff R.S., Tse D.S., Malhotra R., Lorents D.C. Solubility of fullerene (C_{60}) in a variety of solvents // J. Phys. Chem. 1993. № 97. P. 3379–3383.
- Безмельницын В.Н., Елецкий А.В., Окунь М.В. Фуллерены в растворах // Успехи физ. наук. 1998. № 168. P. 1195–1120.
- Deguchi Sh., Mukai S.A. Top-down preparation of dispersions of C_{60} nanoparticles in organic solvents // Chemistry Letters. 2006. № 35(4). P. 396–397.
- Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.M., Shelkovsky V.S., Vashchenko L.A. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes // J. Chem. Soc. 1995. № 12. P. 1281–1282.
- Konarev D.V., Lyubovskaya R.N. Donor–acceptor complexes and radical ionic salts based on fullerenes // Russ. Chem. Rev. 1999. № 68(1). P. 19–38.

- Torres V.M., Posac M., Srdjenovic B., Simplicio A.L. Solubilization of fullerene C_{60} in micellar solutions of different solubilizers // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2011. № 82. P. 46–53.
- Murdianti B.S., Damron J.T., Hilburn M.E., Maples R.D., Koralege H.R.S., Kuriyavar S.I., Ausman K.D. C_{60} oxide as key component of aqueous C_{60} colloidal suspensions // Environ. Sci. Technol. 2012. № 46. P. 7446–7453.
- Andersson T., Nilsson K., Sundahl M., Westman G., Wennerström O. C_{60} embedded in γ -cyclodextrin: a water-soluble fullerene // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1992. P. 604–605.
- Avdeev M.V., Aksenov V.L., Tropin T.V. Models of cluster formation in solutions of fullerenes // Russ. J. Phys. Chem. A. 2010. № 84. P. 1273–1283.
- Konarev D.V., Litvinov A.L., Kovaltvsky A.Yu., Driчко N.V., Coppens R.N., Lyubovskaya R.N. Molecular complexes of fullerene C_{60} with aromatic hydrocarbons: crystal structures of (TPE) $2C_{60}$ and DPA- C_{60} // Synthetic Metals. 2003. № 133–134. P. 675–677.
- Shukla M.K., Leszczynski J. Fullerene (C_{60}) forms stable complex with nucleic acid base guanine // Chem. Phys. Letters. 2009. № 469. P. 207–209.
- Oberdörster E., Zhu S., Blickey T.M., McClellan-Green P., Haasch M.L. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: effects of fullerene (C_{60}) on aquatic organisms // Carbon. 2006. № 44. P. 1112–1120.
- Bemasson R.V., Bienvenue E., Dellinger M., Leach S., Setat P. C_{60} in model biological systems. A visible-UV absorption study of solvent-dependent parameters and solute aggregation // J. Phys. Chem. 1994. № 98. P. 3492–3500.
- N-Methyl-2-pyrrolidone. Concise International Chemical Assessment Document 35. World Health Organization, 2001.
- Semenov K.N., Charykov N.A., Keskinov V.A., Piartman A.K., Blokhin A.A., Kopyrin A.A. Solubility of Light Fullerenes in Organic Solvents // J. Chem. Eng. Data. 2010. № 55. P. 13–36.
- Leon A.de, Jalbout A.F., Basiuk V.A. Fullerene-amino acid interactions. A theoretical study // Chem. Phys. Lett. 2008. № 452. P. 306–314.
- Mchedlov-Petrosyan N.O. Fullerenes in molecular liquids. Solutions in «good» solvents: another view // J. Mol. Liquids. 2011. № 161. P. 1–12.
- Chen K.L., Smith B.A., William P.B., Fairbrother D.H. Assessing the colloidal properties of engineered nanoparticles in water: case studies from fullerene C_{60} nanoparticles and carbon nanotubes // Environ. Chem. 2010. № 7. P. 10–27.
- Andrievsky G.V., Klochkov V.K., Karyakina E.L., Mchedlov-Petrosyan N.O. Studies of aqueous colloidal solutions of fullerene C_{60} by electron microscopy // Chem. Phys. Lett. 1999. № 300. P. 392–396.
- Pospíšil L., Gál M., Hromádová M., Bulířková J., Kolivoška V., Cvačka J., Nováková K., Kavan L., Zukalová M., Dunsch L. Search for the form of fullerene C(60) in aqueous medium // Phys. Chem. Chem. Phys. 2010. № 12(42). P. 14095–14101.
- Chen K.L., Elimelech M. Relating colloidal stability of fullerene (C_{60}) nanoparticles to nanoparticle charge and electrokinetic properties // Environ. Sci. Technol. 2009. № 43. P. 7270–7276.
- Labille J., Masion A., Ziarelli F., Rose J., Brant J., Villieras F., Pelletier M., Borschneck D., Wiesner M.R., Bottero J.Y. Hydration and dispersion of C_{60} in aqueous systems: The nature of water–fullerene interactions // Langmuir. 2009. № 25(19). P. 11232–11235.
- International Centre for Diffraction Data JCPDS card #44-0558.