

УДК 539.1

В. Ю. Фокина, Е. А. Кизима, И. В. Михеев, А. И. Иваньков, В. М. Гарамус

Структурные параметры водных коллоидных дисперсий фуллерена C_{60}

Методами малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и рассеяния нейтронов (МУРН) исследованы два типа дисперсий, водных систем C_{60} , в результате чего получены структурные параметры агрегатов фуллеренов. Водные дисперсии были получены по методике замены растворителя и на основе первичного раствора фуллерена C_{60} в *N*-метилпирролидоне. Проанализирована структура водных дисперсий в зависимости от методики синтеза. Показано, что во всех дисперсиях агрегаты фуллеренов характеризуются значительной полидисперсностью по размерам. Выявлено, что фуллерены в дисперсии *son/nC*₆₀ формируют агрегаты с плотным ядром (случай поверхностного фрактала) с радиусом 58 ± 1 нм и фрактальной размерностью 2.3. В свою очередь система *ptr/nC*₆₀ характеризуется наличием бимодального распределения частиц по размерам и разветвлённой структурой агрегатов с фрактальной размерностью 1.5.

Ключевые слова: фуллерен, малоугловое рентгеновское рассеяние, малоугловое рассеяние нейтронов

Об авторах

Фокина Владислава Юрьевна – магистрант кафедры ядерной физики государственного университета «Дубна». *E-mail:* vladusich@yandex.ru 141981 Московская область, г.Дубна, ул. Университетская, 19.

Кизима Елена Анатольевна – старший научный сотрудник Лаборатории нейтронной физики Объединенного института ядерных исследований, Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко.

Михеев Иван Владимирович – инженер, Химический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова.

Иваньков Александр Игоревич – старший научный сотрудник Лаборатории нейтронной физики Объединенного института ядерных исследований, Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко.

Гарамус Василий Михайлович – сотрудник отдела структурных исследований макромолекул, Гельмгольц-центр, Геестахт.

Исследование фуллеренов для транспортировки препаратов в организме подразумевает их активное использование с противоопухолевыми [1; 2; 3], антиоксидантными [4; 5] и антибактериальными средствами [6]. Несмотря на то, что фуллерен нерастворим в воде, существует множество методик получения водных суспензий фуллеренов. Водные дисперсии получают путем модификации

поверхности фуллеренов карбоксильными группами [7], солюбилизации поверхности поверхностно-активными веществами или полимерами [8], используя метод замены растворителя [9] или путем простого длительного перемешивания порошка фуллеренов в воде [10]. Форма кластеров фуллеренов в водной среде, их распределение по размеру и величина поверхностного заряда — именно это ключевые параметры биологического взаимодействия вещества с клетками. При этом параметры водных дисперсий фуллеренов за-

висят от технологии их приготовления. В данной работе используются два типа дисперсий, приготовленных методикой замены растворителя [11] и на основе первичного растворителя N-метилпирролидона (NMP). Структурный анализ дисперсий фуллеренов проведен с использованием методов малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и метода малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН). В результате исследований получены и проанализированы структурные параметры агрегатов фуллеренов в зависимости от методики синтеза дисперсии.

1. Материалы и методы

1.1. Приготовление водной дисперсии nmp/nC₆₀

Водная система nmp/nC₆₀ была получена с помощью растворения фуллерена C₆₀ («Фуллереновые технологии», чистота > 99.5%) в N-метилпирролидоне (*Merck*, чистота > 99.5%) путем перемешивания в течение 6 ч на магнитной мешалке при комнатной температуре. В дальнейшем раствор разбавлялся дистиллированной водой (*Millipore*) таким образом, что конечная концентрация фуллерена составляла $c = 8$ мг/л, а доля NMP – 0.005 об. %.

1.2. Приготовление водной дисперсии фуллеренов son/nC₆₀

Водная дисперсия son/nC₆₀ получена по методике замены растворителя, описанной ранее [9]. Фуллерен C₆₀ («НеоТекПродукт», Россия, чистота 99.5% +) растворяли в первичном растворителе, толуоле («Реахим», Россия, химически чистый) при помощи УЗ-обработки в течение 30 минут (100 мл). Далее первичный раствор смешивали с водой *Milli-Q* (*Millipore*) в колбе Эрленмейера объемом 2000 мл так, что соотношение органической фазы в сравнении с водной составляло 1:5. Смесь подвергали ультразвуковому озвучиванию до тех пор, пока органический растворитель не испарится. Далее раствор кипятили в течение 15 минут для удаления остатков толуола, затем профильтровывали через фильтр Шотта и через микропористый фильтр с диа-

метром микропор 0.45 мкм и 0.20 мкм.

Остаточное содержание органического растворителя установлено при помощи метода ПФА-ГХ, причем содержание не превышало 1 мкг/л. Определение концентрации фуллеренов проведено при помощи анализатора общего органического углерода. Детальная информация о методе приготовления дисперсии содержится в работе [12].

1.3. Измерения МУРР

Эксперименты по малоугловому рентгеновскому рассеянию проводились на источнике синхротронного излучения PETRA III в EMBL/DESY (Гамбург, Германия), станция P12 BioSAXS. Диапазон переданных импульсов составил $Q = 0.07 - 4.6$ нм⁻¹, пролетное расстояние – 3.1 м. Для калибровки использовался образец бегената серебра [13]. Образцы объемом 20 мкл помещались в капилляр и находились при температуре 200 °С. Для уменьшения потерь интенсивности излучения образец перемещался во время экспозиции. Зарегистрировано 20 последовательных снимков (время экспозиции 0.05 с), объединяющих измерения образца и воды. Чтобы избежать радиационного повреждения во время экспозиции, все кривые рассеяния, записанные в базу данных, сравнивались с контрольной кривой (первое измерение), и, далее, интегрировались с помощью специализированной программы [14]. До и после каждого измерения кривой МУРР на образце измерялся также сигнал от воды для вычитания фона. Все полученные таким способом кривые были нормированы на спектр прямого пучка.

1.4. Измерения МУРН

Эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов проведены на малоугловых установках ЮМО импульсного реактора ИБР-2 Объединенного института ядерных исследований (Дубна, Россия). Измерялось изотропное дифференциальное сечение рассеяния на единицу объема (далее интенсивность рассеяния) в зависимости от модуля вектора рассеяния $Q = (4\pi/\lambda) \sin(\theta/2)$, где λ – длина волны нейтрона, а θ – угол рассея-

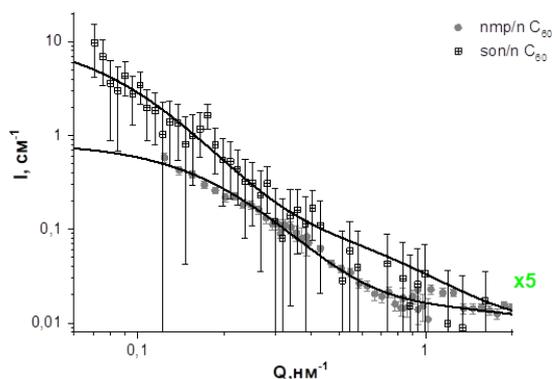


Рис. 1. Зависимость интенсивности от модуля вектора рассеяния нейтронов для систем nmp/nC_{60} — ●, son/nC_{60} — □; сплошные линии — модельные кривые, описываемые уравнением (2)

ния. Сканирование проводилось как по длине волны (импульсный источник, используемый диапазон 0.05–0.5 нм), так и по углу рассеяния (0.01–0.025 рад.) с помощью детектора большой площади, расположенного за образцом. Длина волны нейтрона определялась методом пролета [15]. Покрываемый диапазон Q , где наблюдался заметный сигнал рассеяния, составлял 0.1–1 nm^{-1} . Калибровка полученных экспериментальных данных проводилась по стандартной процедуре [16] с использованием ванадия.

2. Результаты и обсуждение

Масштабные исследования биологических свойств фуллеренов C_{60} , проведенные за последнее десятилетие, привели к пониманию существования корреляции между структурными свойствами водных дисперсий фуллеренов и их биологической активностью [17, 18]. На сегодня наиболее перспективными для биологических применений являются дисперсии фуллеренов, синтезированные по методике замены растворителя [11]. Однако до сих пор осуществляется поиск новых методов синтеза водных дисперсий фуллеренов с целью получения дисперсий с более высокой концентрацией фуллерена или другими структурными параметрами [19; 20]. Выбор методики синтеза водных дисперсий фуллеренов определяет ряд структурных парамет-

ров, таких как размер и плотность упаковки агрегатов. Как известно, малоугловое рассеяние нейтронов и рентгеновских лучей эффективно используется для оценки этих параметров в различных коллоидных системах, включая дисперсии фуллеренов [21]. Учитывая этот факт, данные методики были использованы для анализа структуры агрегатов водных дисперсий фуллеренов, полученных согласно широко используемой методике замены растворителя и с использованием первичного раствора C_{60}/NMP .

На рис. 1 и 2 представлены кривые малоуглового рассеяния для водных дисперсий фуллерена C_{60} , полученных различными методиками. Сглаженная форма кривых рассеяния указывает на полидисперсность агрегатов фуллеренов по размерам для всех исследуемых дисперсий. Различная форма кривых указывает на разную структурную организацию агрегатов фуллеренов, которая формируется в процессе синтеза дисперсий. Следует отметить, что область Гинье наблюдается только для кривой МУРР на системе son/nC_{60} , что позволяет надежно определить радиус инерции (Rg) агрегатов фуллеренов согласно формуле:

$$F^2(Q) = \exp(-Q^2 Rg^2/3), \quad (1)$$

где Q — это модуль вектора рассеяния.

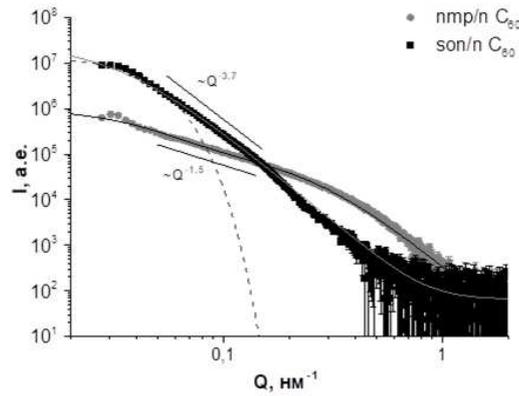


Рис. 2. Зависимость интенсивности от модуля вектора рассеяния рентгеновских лучей для систем nmp/nC₆₀ – ●, son/nC₆₀ – □; сплошные линии – модельные функции, описываются уравнением (2), пунктир – приближением Гинье (1).
Прямые линии описываются уравнением (5) и показывают наклон кривых

Отсутствие области Гинье в кривых малоуглового рассеяния указывает, что в системах присутствуют агрегаты, размер которых превышает диапазон регистрируемых данными установками размеров:

$$D = 2\pi/Q. \quad (2)$$

Следовательно, для нейтронных данных максимальный регистрируемый размер составляет ~ 85 нм, в то время как для рентгеновских кривых $D \sim 200$ нм. При этом из данных динамического рассеяния света известно, что в системах присутствуют агрегаты с малыми размерами. В связи с этим кривые малоуглового нейтронного и рентгеновского рассеяния обработаны моделью, позволяющей учитывать вклад рассеяния как от больших, так и от малых агрегатов фуллеренов [12; 22].

В данной модели интенсивность рассеяния как МУРР, так и МУРН (дифференциальное сечение рассеяния) представлена в виде:

$$I(Q) = \frac{I_a}{[1 + (Q \cdot R_a)^2]^2} + \frac{I_b}{[1 + (Q \cdot R_b)^2]^2} + bkg, \quad (3)$$

где Q – модуль вектора рассеяния; R_a, R_b – характерные размеры рассеивающих объектов на двух уровнях соответственно; I_a и

I_b – некоторые коэффициенты; bkg – остаточный фон после коррекции на рассеяние чистым растворителем. В свою очередь, коэффициенты I_a и I_b в (1) связаны соотношением:

$$\frac{I_a}{I_b} = \frac{n_a \cdot \langle V_a^2 \rangle}{n_b \cdot \langle V_b^2 \rangle}, \quad (4)$$

где n_a и n_b – концентрации агрегатов на разных масштабах; V_a и V_b – объемы рассеивающих частиц; $\langle V_a^2 \rangle$ $\langle V_b^2 \rangle$ – усредненные по размерам.

В результате аппроксимации данных согласно формулам (1) и (3) получены значения радиусов инерции $Rg1$ и $Rg2$ для исследуемых дисперсий, которые представлены в таблице 1. Так же в таблице представлены значения для характерных размеров агрегатов R , которые получены согласно приближению плотноупакованных сферических частиц с использованием формулы

$$Rg^2 = 0.6 \cdot R^2. \quad (5)$$

Следует отметить, что различия в полученных значениях размеров агрегатов методами МУРР и МУРН связаны, в первую очередь, с различным диапазоном векторов рассеяния на рентгеновской и нейтронной установках малоуглового рассеяния. Так, малоугловые рентгеновские измерения, которые имеют статистически лучший сигнал, позволили

Таблица 1. Радиусы инерции и значения характерных размеров агрегатов для двух растворов в экспериментах МУРН и МУРР

Параметр	Раствор Son/nC ₆₀ , нм		Раствор Nmp/nC ₆₀ , нм	
	Rg1/Rg2	R	Rg1/Rg2	R
МУРН	10(2)/100(30)	13(2)/129(30)	3(1)/45(8)	4(1)/58(12)
МУРР	-/45(1)	-/58(1)	4(1)/20(5)	5,16(1)/25,82(5)

получить кривые вплоть до $Q = 0.03 \text{ нм}^{-1}$ и тем самым в случае системы son/nC₆₀ зарегистрировать область Гинье, из которой непосредственно можно получить размеры агрегатов в системе. Таким образом, можно заключить, что характерный радиус агрегатов фуллеренов в системе son/nC₆₀ составляет 58 ± 1 нм. В тоже время система nmp/nC₆₀ характеризуется наличием бимодального распределения частиц по размерам, а именно агрегатов малых размеров (порядка нескольких нанометров) и более крупных агломератов, радиус которых несколько десятков нанометров.

В свою очередь, степень спада малоглоуговой кривой указывает на фрактальную размерность объектов рассеяния:

$$F(Q) = Q^{-p}, \quad (6)$$

где p – показатель наклона. В случае $1 < p < 3$ форма объектов рассеяния отвечает массовому фракталу, фрактальная размерность которого $D_m = p$. Случай $3 < p < 4$ соответствует поверхностному фракталу с фрактальной размерностью $D_S = 6 - p$.

Так, из данных рентгеновского рассеяния, которые имеют статистически лучший сигнал, было определено, что в системе son/nC₆₀ фуллерены формируют агрегаты с плотноупакованным центром, которые соответствуют поверхностным фракталам с размерностью $D_S = 2.3$, что хорошо согласуется с предыдущими результатами [21]. В свою очередь, наклон кривой рассеяния системы nmp/nC₆₀ указывает на наличие в системе разветвлённых агрегатов с фрактальной размерностью 1.5.

Заключение

При помощи методов малоуглового рентгеновского и нейтронного рассеяния бы-

ли исследованы два типа дисперсий, водных систем C₆₀. Благодаря аппроксимации с использованием двух различных моделей, найдены радиусы инерции, что позволило вычислить значения для характерных размеров агрегатов. Показано, что для всех дисперсий агрегаты фуллеренов характеризуются значительной полидисперсностью по размерам. При этом система nmp/nC₆₀ характеризуется наличием двух популяций частиц, диапазон размеров которых является несколько меньшим по сравнению с размерами агрегатов в дисперсии son/nC₆₀. Оценка фрактальной размерности агрегатов показала, что фуллерены в дисперсии son/nC₆₀ формируют агрегаты с плотноупакованным центром, фрактальная размерность которых составляет $D_S = 2.3$. В отличие от предыдущей дисперсии система nmp/nC₆₀ характеризуется разветвлённой структурой агрегатов с фрактальной размерностью 1.5. Таким образом, показано, что методика синтеза значительно определяет структурную организацию агрегатов фуллеренов в водной дисперсии, что может непосредственно влиять на их биомедицинские свойства.

Благодарности

Выражаем искреннюю благодарность Clement Blanchet (EMBL) за поддержку МУРР эксперимента.

Библиографический список

1. Panchuk R.R., Prylutska S.V., Chumak V.V., Skorokhlyd N.R., Lehka L.V., Evstigneev M.P., Prylutskiy Yu.I., Berger W., Heffeter P., Scharff P., Ritter U., Stoika R.S. Application of c60 fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment in vitro and in vivo //

- J. Biomed. Nanotechnol. 2015. V.11. P.1139.
2. Prylutsky Yu.I., Cherepanov V.V., Evstigneev M.P., Kyzyma O.A., Petrenko V.I., Styopkin V.I., Bulavin L.A., Davidenko N.A., Wyrzykowski D., Woziwodzka A., Piosik J., Kaźmierkiewicz R., Ritter U. Structural self-organization of c60 and cisplatin in physiological solution // *Phys.Chem.Chem.Phys.* 2015. V. 17. P. 26084.
 3. Prylutsky Yu.I., Evstigneev M.P., Cherepanov V.V., Kyzyma O.A., Bulavin L.A., Davidenko N.A., Scharff P. Effects of c60 fullerene – cisplatin complex on honeybee *apis mellifera* l // *J. Nanopart. Res.* 2015. V. 17. P. 45.
 4. Prylutska S.V., Burlaka A.P., Klymenko P.P., Grynyuk I.I., Prylutsky Yu.I., Schuetze Ch., Ritter U. Using water-soluble C60 fullerenes in anticancer therapy // *Cancer Nanotechnol.* 2011. V. 2. P. 105.
 5. Prylutska S.V., Burlaka A.P., Prylutsky Yu.I., Ritter U., Scharff P. Pristine c60 fullerenes inhibit the rate of f tumor growth and metastasis // *Exp. Oncol.* 2011. V. 33. P. 162.
 6. Lyon D.Y., Adams L.K., Falkner J.C., Alvarez P.J. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: effects of preparation method and particle size // *J. Environ. Sci. Technol.* 2006. V. 40. P. 4360.
 7. Kokubo K., Matsubayashi K., Tategaki H., Takada H.; Oshima T. Facile Synthesis of Highly Water- Soluble Fullerenes More Than Half-Covered by Hydroxyl Groups // *ACS Nano.* 2008. V. 2. P. 327–333.
 8. Andersson T., Nilsson K., Sundahl M., Westman G., Wennerstrom O. J. C60 embedded in gamma-cyclodextrin: a water-soluble fullerene // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1992 P. 604.
 9. Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.M. et. al. On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1995. V. 12. P. 1281.
 10. Isaacson C., Zhang W., Powell T., Ma X., Bouchard D. Temporal changes in Aqu/C60 physical-chemical, deposition, and transport characteristics in aqueous systems // *Environ. Sci. Technol.* 2011. V. 45. P. 5170.
 11. Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.M., Shelkovsky V.S., Vashchenko L.A. Temporal changes in Aqu/C60 physical-chemical, On the production of an aqueous colloidal solution of fullerenes // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1995. V. 12. P. 1281.
 12. Kyzyma E.A., Tomchuk A.A., Bulavin L.A., Petrenko V.I., Almasy L., Korobov M.V., Volkov D.S., Mikheev I.V., Koshlan I.V., Koshlan N.A., Blaha P., Avdeev M.V., Aksenov V.L. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques // *Journal of Surface Investigation.* 2015. V. 1. P. 5.
 13. Blanton T.N., Barnes C.L., Lelental M. Preparation of silver behenate coatings to provide low- to mid-angle diffraction calibration // *J. Appl. Cryst.* 2000. V. 33. P. 172.
 14. Franke D., Kikhney A.G., Svergun D.I. Automated acquisition and analysis of small angle X-ray scattering data // *Nucl. Instrum. Methods Phys. A.* 2012. V. 689. P. 52.
 15. Аксенов В.Л., Балагуров А.М. Дифракция нейтронов на импульсных источниках // *УФН.* 2016. V. 186(3) P. 293–320.
 16. Ostonevich Yu.M. Time-of-flight small-angle scattering spectrometers on pulsed neutron sources // *Macromol. Chem., Macromol. Symp.* 1988. V. 15. P. 91.
 17. Ferin J., Oberdorster G., Penney D. P. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats // *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992. V. 6. P. 535–542.

18. Baker G.L., Gupta A., Clark M.L., Valenzuela B.R., Staska L.M., Harbo S.J., Pierce J.T., Dill J.A. Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C60 fullerene nanoparticles and microparticles // *Toxicol. Sci.* 2008. V. 101. P. 122–131.
19. Andreev S. et al. // *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*. 2015. V. 23. P. 792–800.
20. Kyzyma E.A., Tomchuk A.A., Bulavin L.A., Petrenko V.I., Almasy L., Korobov M.V., Volkov D.S., Mikheev I.V., Koshlan I.V., Koshlan N.A., Blaha P., Avdeev M.V., Aksenov V.L. Structure and Toxicity of Aqueous Fullerene C60 Solutions // *J. Surf. Investigation*. 2015. V. 9(1). P. 5–9.
21. Avdeev M.V., Khokhryakov A.A., Tropin T.V. et al. Structural Features of Molecular-Colloidal Solutions of C60 Fullerenes in Water by Small-Angle Neutron Scattering // *Langmuir*. 2004. V. 20. P. 4363.
22. Brumberger H. *Modern Aspects of small-angle scattering* // Springer: Kluwer Academic Publishers. 1995. P. 449.

*Поступила в редакцию
26.12.2019*