

- synthesis of the phenylpropanoid glycoside, acteoside [J]. *J Org Chem*, 1999, 64(25): 9268-9271.
- [10] MIYASE T, KOIZUMI A, UENO A, et al. Studies on the acyl glycosides from *Leucopsestrum japonicum*(MIQ.) Kitamura et Murata [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(8): 2732-2737.
- [11] ZHOU B N, BAHLER B D, HOFMANN G A, et al. Phenylethanoid glycosides from *digitalis purpurea* and *Penstemon linarioides* with PKC $\alpha$ -inhibitory activity [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(11): 1410-1412.
- [12] MIAO C Q. A convenient one-pot preparation of acetoacetyl-sidase compounds [J]. *J Xixiang Univ: Nat Sci Ed*(新乡学院学报:自然科学版), 2011, 28(6): 511-512.
- [13] LAI D. Studies on synthesis of protected  $\alpha$ -D-gal(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-gluc and its analogues [D]. Xiangtan: University of Xiangtan, 2008.
- [14] ZHANG S Q, LI Z J, WANG A B, et al. Synthesis of a phenylpropanoid glycoside, Osmanthuside B6 [J]. *Carbohydr Res*, 1998, 308(3): 281-285.
- [15] LI Q, LI S C, LI H, et al. Total synthesis of syringalide B, a phenylpropanoid glycoside [J]. *Carbohydr Res*, 2005, 340(9): 1601-1604.

收稿日期: 2013-11-07

## 大分子壳聚糖对单壁碳纳米管水分散性的影响

祝侠丽<sup>1,2</sup>, 谢莹霞<sup>1</sup>, 黄胜楠<sup>1</sup>, 张慧娟<sup>1</sup>, 焦晓静<sup>1</sup>, 张英杰<sup>1</sup>, 张振中<sup>1\*</sup> (1.郑州大学药学院, 郑州 450001; 2.河南中医学院药学院, 郑州 450003)

**摘要:** 目的 利用大分子壳聚糖改善单壁碳纳米管的水分散性。方法 采用混酸氧化法(浓硫酸:浓硝酸=3:1)对单壁碳纳米管进行羧基化处理。冰浴超声分散法制备壳聚糖修饰的单壁碳纳米管并采用紫外分光光度法、红外分光光度法、差示扫描量热法等进行验证。恒温振荡法考察壳聚糖修饰单壁碳纳米管的水分散性。结果 壳聚糖修饰单壁碳纳米管在水、PBS(pH 7.4)及醋酸缓冲液(pH 4.0)中的分散度均有明显增加, 分散浓度分别为 1.99, 2.04, 1.76 mg·mL<sup>-1</sup>。结论 壳聚糖能明显改善单壁碳纳米管的水分散性。

**关键词:** 单壁碳纳米管; 壳聚糖; 水分散性

中图分类号: R914.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)04-0429-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.04.011

### Investigation on Water Dispersibility of Single-walled Carbon Nanotubes Functionalized with Macromolecular Chitosan

ZHU Xiaoli<sup>1,2</sup>, XIE Yingxia<sup>1</sup>, HUANG Shengnan<sup>1</sup>, ZHANG Huijuan<sup>1</sup>, JIAO Xiaojing<sup>1</sup>, ZHANG Yingjie<sup>1</sup>, ZHANG Zhenzhong<sup>1\*</sup> (1.School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou, 450001; 2.School of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou, 450003)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To improve the poor water solubility of single-walled carbon nanotubes(SWNTs) by using chitosan(CHI). **METHODS** Carboxyl SWNTs were obtained by mixed acid methods(sulfuric acid and nitric acid 3 : 1). CHI modified SWNTs(CHI/SWNTs) were prepared with ice bath ultrasonic dispersion method and characterized by UV, FT-IR and DSC. The dispersibility of CHI/SWNTs in water, PBS(pH 7.4) and acetic acid-sodium acetate buffer(pH 4.0) was determined with constant temperature oscillation methods. **RESULTS** The maximum dispersion concentration of CHI/SWNTs in water, PBS (pH 7.4) and acetic acid-sodium acetate buffer (pH 4.0) were 1.99, 2.04 and 1.76 mg·mL<sup>-1</sup>, respectively, much higher than SWNTs. **CONCLUSION** Chitosan can significantly improve the water dispersibility of SWNTs.

**KEY WORDS:** single-walled carbon nanotubes; chitosan; water dispersibility

单壁碳纳米管(single-walled carbon nanotubes, SWNTs)是一种具有空心管状结构的纳米材料, 具有热传导及电磁性能、较好的光学性能、体表比

大及强大的吸附性能<sup>[1]</sup>等特殊性质, 在抗癌药物靶向递药<sup>[2-3]</sup>、肿瘤显影诊断方面应用前景广阔<sup>[4]</sup>。但由于 SWNTs 不溶于水和常见的有机溶剂, 严重

基金项目: 国家自然科学基金(30973660)

作者简介: 祝侠丽, 女, 博士, 讲师 Tel: 13783470772  
Tel: (0371)67781910 E-mail: zhangzz08@126.com

E-mail: zhuxiali1980@126.com

\*通信作者: 张振中, 男, 博士, 教授, 博导

限制其应用,常需通过引入羧基(-COOH)、羟基(-OH)等功能基团,或将其与 $\beta$ -CD、PEG及氨基酸等材料交联来获得水溶性的SWNTs。壳聚糖(chitosan, CHI)是自然界唯一的天然聚阳离子碱性多糖,具有良好的生物相容性、生物可降解性、低毒性等特点,在环境保护、医药<sup>[5-7]</sup>、材料、化工等领域有着广泛的应用。CHI分子中的游离NH<sub>2</sub>可与羧基化的SWNTs上的-COOH进行酰胺化反应进行共价修饰。本课题采用CHI对SWNTs进行修饰,利用UV、IR、DSC、电位等进行表征,并对其在常用水性介质如水、pH 7.4 PBS及pH 4.0醋酸缓冲液中的分散性进行量化,为下一步SWNTs作为肿瘤靶向纳米载体的研究奠定基础<sup>[8]</sup>。

## 1 仪器和试剂

### 1.1 仪器

BP211D型电子天平(德国Sartorius公司); Z323K型高速冷冻离心机(德国HERMLE); KQ-500D型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); THZ-312型台式恒温振荡器(上海精宏实验设备有限公司); SHIMADZU AU120电子天平(广州湘仪机电设备有限公司); UV-2102P型紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司); 2.5 Plus型冷冻干燥机(Labconco Corporation, USA); DSC-60差示扫描量热仪[岛津国际贸易(上海)有限公司]; NICOLET iS10型傅里叶变换红外光谱仪(美国Thermo Fisher公司); DZF-6020型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); Nano-ZS90型激光粒度电位分析仪(英国马尔文公司)。

### 1.2 试剂

单壁碳纳米管(SWNTs, 纯度>90%, 中国科学院成都有机化学有限公司); 壳聚糖(脱乙酰度 $\geq$ 85%, 日本WOLSEN公司); 超纯水(Millipore公司超纯水机制备); 浓硫酸, 浓硝酸等均为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 CHI修饰SWNTs的制备

**2.1.1 SWNTs的羧基化** 精密称取198.95 mg的SWNTs置250 mL圆底烧瓶中,加入100 mL的浓硫酸和浓硝酸混合物(体积比3:1),置于水浴超声中处理4 h。将反应液缓慢倒入大量去离子水中稀释,经0.22  $\mu$ m微孔滤膜抽滤至中性,滤饼在60  $^{\circ}$ C下在真空干燥器中干燥得羧基化的SWNTs<sup>[9-10]</sup>。

**2.1.2 CHI修饰SWNTs的制备** 称取10 mg羧基化的SWNTs,加入10 mL超纯水,置水浴超声中

超声30 min,加入10 mL不同浓度的壳聚糖/醋酸-醋酸钠缓冲液,室温搅拌24 h,将上清液置于10 kDa超滤离心管离心(4 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>, 1 h)以除去游离的壳聚糖。将制得的CHI/SWNTs进行冷冻干燥得到冻干粉<sup>[11-12]</sup>,室温保存,备用。

### 2.2 CHI/SWCNTs的表征

**2.2.1 UV法** 取CHI溶液、羧基化SWNTs溶液、CHI/SWNTs溶液在200~900 nm波长范围内进行全波长扫描,记录UV光谱图。

**2.2.2 FT-IR法** 取适量CHI、羧基化SWNTs及CHI/SWNTs冻干粉分别用溴化钾压片后,置于傅里叶变换红外光谱仪,设置扫描范围4 000~500 cm<sup>-1</sup>,扫描次数32,分辨率2.0 cm<sup>-1</sup>,记录红外光谱图。

**2.2.3 DSC法** 取适量CHI、羧基化SWNTs及CHI/SWNTs冻干粉分别置于差示扫描量热仪中,设置扫描温度20~500  $^{\circ}$ C,升温速度20  $^{\circ}$ C $\cdot$ min<sup>-1</sup>,记录分析数据。

**2.2.4 电位的测定** 取CHI溶液、羧基化SWNTs及CHI/SWNTs分散溶液,采用Nano-ZS90型激光粒度分析仪测定其Zeta电位。

### 2.3 CHI/SWNTs水分散性的测定

**2.3.1 SWNTs标准曲线的建立** 精密称取5.09 mg羧基化SWNTs置于5 mL量瓶中,加2 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的泊洛沙姆188溶液,超声分散后定容至刻度,作为储备液。取储备液定量稀释成169.67, 162.88, 127.25, 101.80, 81.44, 50.9, 25.45, 12.73  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的溶液,于808 nm测定吸光度。以浓度和吸光度进行线性回归,建立线性回归方程。

**2.3.2 CHI/SWNTs水分散性的测定** 精密称取CHI/SWNTs冻干粉3份,分别加入到适量水、pH 7.4的PBS溶液、pH 4.0的醋酸-醋酸钠缓冲液中密塞,配制成过饱和溶液。室温超声1 h、25  $^{\circ}$ C恒温振荡24 h,12 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心0.5 h,取上清于808 nm波长下测定吸光度,代入标准曲线计算SWNTs浓度,并计算分散浓度。

## 3 结果

### 3.1 SWNTs的羧基化

已知1 700 cm<sup>-1</sup>附近强的宽峰为羧基的 $\nu_{C=O}$ 吸收峰,3 400~2 400 cm<sup>-1</sup>区间为 $\nu_{O-H}$ 的吸收峰<sup>[13-14]</sup>。SWNTs羧基化后的红外光谱图与羧基化前相比,在1 717.76 cm<sup>-1</sup>和3 440.11 cm<sup>-1</sup>出现羧基的特征吸收峰,证明SWNTs羧基化成功,结果见图1 A-B。

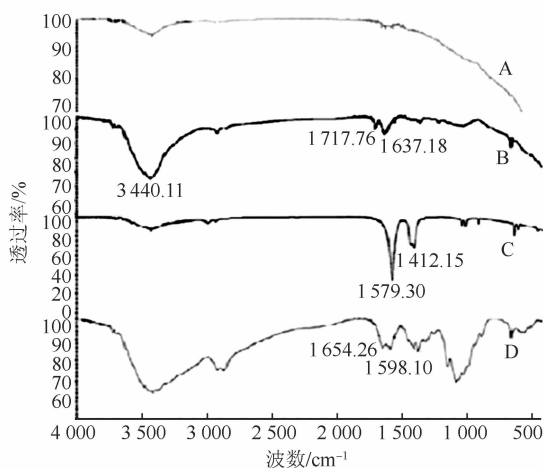


图1 FT-IR 光谱图

A-SWNTs; B-羧基化的 SWNTs; C-CHI/SWNTs; D-CHI

Fig 1 FT-IR spectrogram

A-SWNTs; B-carboxyl SWNTs; C-CHI/SWNTs; D-CHI

### 3.2 CHI/SWNTs 的制备

0.1%的 CHI 溶液所结合的碳纳米管的量最大, 最终确定选用 0.1%的 CHI 醋酸缓冲溶液。结果见图 2。单纯 SWNTs 几乎不溶于水; 经过羧基化处理以后的 SWNTs 水分散性有所增加, 但放置一段时间后会有聚沉现象; 而经过壳聚糖修饰的 SWNTs 的水分散性明显增加, 且稳定性较好。结果见图 3。

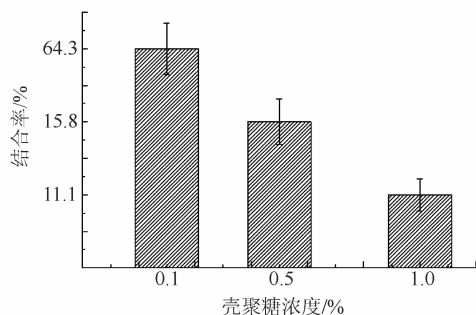


图2 不同浓度 CHI 与羧基化 SWNTs 结合率图

Fig 2 Combined rates between different concentrations of CHI and carboxyl SWNTs

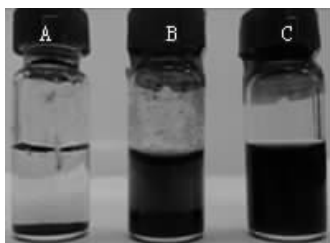


图3 水分散性比较图

A-SWNTs; B-羧基化的 SWNTs; C-CHI/SWNTs

Fig 3 Water dispersity comparison chart

A-SWNTs; B-carboxyl SWNTs; C-CHI/SWNTs

### 3.3 CHI/SWNTs 的表征

**3.3.1 UV 法** CHI 在 200~900 nm 波长内无吸收; 羧基化 SWNTs 在此范围内有吸收, 最大吸收波长为 270 nm; CHI/SWNTs 在此范围内有吸收且高于羧基化的 SWNTs, 且在 270 nm 处的吸收峰发生变化, 说明羧基化的 SWNTs 与 CHI 共价修饰成功。结果见图 4。

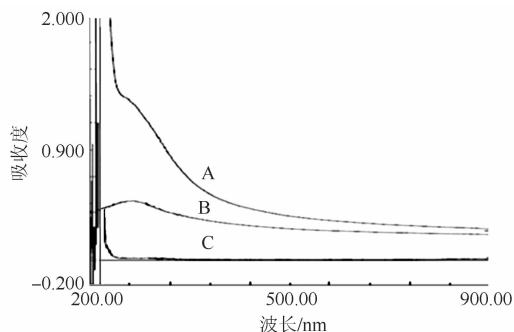


图4 UV 图谱

A-CHI/SWNTs; B-羧基化的 SWNTs; C-CHI

Fig 4 UV spectrum

A-CHI/SWNTs; B-Carboxyl SWNTs; C-CHI

**3.3.2 FT-IR 法** 由图 1 C-D 中可以看出, CHI 在 1 598.10, 1 654.26  $\text{cm}^{-1}$  处为氨基峰, CHI/SWNTs 中未出现羧基峰和氨基峰, 在 1 579.30, 1 412.15  $\text{cm}^{-1}$  处出现 2 个新的吸收峰, 此峰为酰胺键特征吸收峰<sup>[15]</sup>, 证明 CHI 和羧基化的 SWNTs 反应生成了酰胺键。

**3.3.3 DSC 法** 通过图中三者的对比可以看出, CHI/SWNTs-COOH 中仍有 CHI 的 307.02  $^{\circ}\text{C}$  左右的吸热峰, 变化不大, 68.92  $^{\circ}\text{C}$  的放热峰发生位移, 而 SWNTs-COOH 上 340.64  $^{\circ}\text{C}$  吸收峰消失, 53.04  $^{\circ}\text{C}$  放热峰移至 59.07  $^{\circ}\text{C}$ , 说明 CHI 与 SWNTs-COOH 发生了化学间的相互作用。结果见图 5。

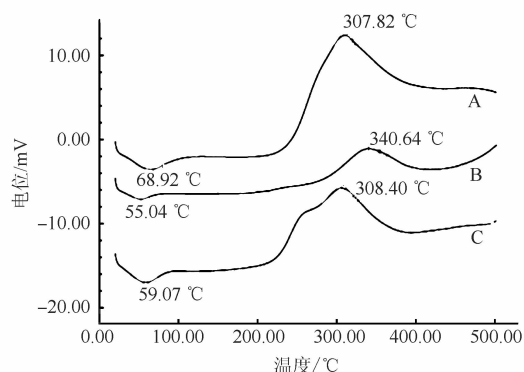


图5 DSC 图谱

A-CHI; B-羧基化的 SWNTs; C-CHI/SWNTs

Fig 5 DSC spectrum

A-CHI; B-Carboxyl SWNTs; C-CHI/SWNTs

**3.3.4 电位的测定** 电位测定结果显示, 羧基化 SWNTs 的电位为 $(-18.78 \pm 0.24) \text{mV}$ , CHI/SWNTs 平均电位为 $(+55.8 \pm 0.79) \text{mV}$ , 说明 SWNTs 经带正电荷的 CHI 修饰后, 也显正电性, 结果见图 6。

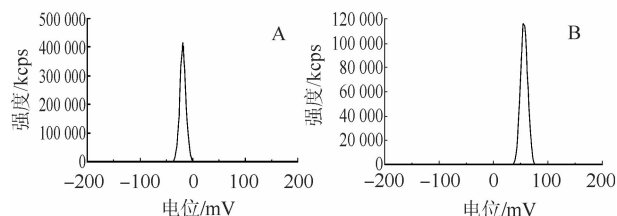


图 6 电位分布图

A-羧基化的 SWNTs; B-CHI/SWNTs

Fig 6 The Zeta potential distribution

A-Carboxyl SWNTs; B-CHI/SWNTs

### 3.4 CHI/SWNTs 水分散性的测定

羧基化 SWNTs 在  $12.73 \sim 169.67 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度范围内线性关系良好, 线性回归方程  $A=0.005 3C+0.005 3 (r=0.999 9)$ 。SWNTs 经过 CHI 功能化修饰后在水、pH 7.4 的 PBS 溶液、pH 4.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液中的分散度均有明显增加, 最大分散度分别为 1.99, 2.04,  $1.76 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

## 4 讨论

SWNTs 具有特殊的理化性质, 但水溶性差, 易团聚。提高 SWNTs 的水分散性, 有助于其纯化, 并引入新的性能, 以在生物医药领域获得应用。本文通过混酸氧化得到羧基化的 SWNTs, 再与 CHI 连接。实验结果表明, CHI/SWNTs 在水性介质中的稳定性提高, 分散度增加。另外, 由于与带正电的 CHI 连接, CHI/SWNTs 平均电位为  $(+55.80 \pm 0.79) \text{mV}$ , 能够促进 SWNTs 与表面带有负电荷细胞的结合<sup>[16]</sup>, 可望作为具有良好稳定性、细胞相容性及细胞低毒性的靶向纳米药物载体。

## REFERENCES

- [1] LIU J, RINZLER A G, SMALLEY R E. Fullerene pipes [J]. Science, 1998, 280(5367): 1253-1256.
- [2] BIANCO A, KOSTARELOS K, PARTIDOS C D. Biomedical

- applications of functionalised carbon nanotubes [J]. Chem Commun(Camb), 2005, (5): 571-577.
- [3] WU W, WIECKOW S, PASTORING. Targeted delivery of amphoteric in B to cells by using functionalized carbon nanotubes [J]. Angew Chem Int Ed Eng, 2005, 44(39): 6358-6362.
- [4] NEL A, XIA T, MAEDL L. Toxic potential of materials at the nanolevel [J]. Sci, 2006, 311(5761): 622-627.
- [5] MI F L, WU Y Y, LIN Y H. Delivery of peptide drugs using nanoparticles self-assembled by poly( $\gamma$ -glutamic acid) and a chitosan derivative functionalized by trimethylation [J]. Bioconjug Chem, 2008, 19(12): 48-55.
- [6] SMOUM R, RUBINSTEIN A, SREBNIK M. Chitosan-pentaglycine. phenylboronic acid conjugate: a potential colon-specific platform for calcitonin [J]. Bioconjug Chem, 2006, 17(10): 1000-1007.
- [7] ZHAO Z M, HE M, YIN L, et al. Biodegradable nanoparticles based on linoleic acid and poly( $\beta$ -malic acid) double grafted chitosan derivatives as carriers of anticancer drugs [J]. Biomacromolecules, 2009, 10(5): 565-572.
- [8] BEG S, RIZWAN M, SHEIKH A M. Advancement in carbon nanotubes: basics, biomedical applications and toxicity [J]. J Pharm Pharmacol, 2011, 63(2): 141-163.
- [9] ZHU W H, ZHU S Q, TIAN H. Advances in structure modification of single wall carbon nanotubes [J]. Chin J Org Chem(有机化学), 2002, 22(12): 964-973.
- [10] WANG Q, DAI J F, LI W X. Purification and characterization of carbon nanotubes [J]. J Lanzhou Univ Technol(兰州理工大学学报), 2006, 32(3): 157-160.
- [11] CHE C, XIE X X, ZHOU Q. EGF-functionalized single-walled carbon nanotubes for targeting delivery of etoposide [J]. Nanotechnology, 2012, 23(4): 045104.
- [12] LI Y. Research of carbon nanotubes functionalized by water soluble chitosan [D]. Beijing University of Chemical Technology, 2010.
- [13] ZHU S K, LI X L. The preparation of carboxyl carbon nanotube by hydrogen peroxide [J]. J Anal Sci(分析科学学报), 2012, 28(6): 775-779.
- [14] CHEN C, WANG H, ZHOU Q. Preparation and cell cytotoxicity of CHI/SWCNT-COOHs [J]. J Southeast Univ(Med Sci Ed)(东南大学学报 医学版), 2011, 30(1): 52-56.
- [15] ZHAO H Y, CHEN C, ZHU Y Z. Synthesis and spectroscopic properties of functionalized single-walled carbon nanotubes with porphyrins and phthalocyanines [J]. Chem J Chin Univ(高等学校化学学报), 2010, 31(9): 1805-1810.
- [16] SU Y H, PENG X, JIAO N C. Changes of cell surface charge of K562 cells during apoptosis induced by arsenic trioxide [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学), 2004, 9(3): 308-311.

收稿日期: 2013-06-15