

大豆分离蛋白对单壁碳纳米管的功能化修饰及其性能研究

王 寒¹ 郭 军² 郭 霞¹ 贾剑红¹ 李文凤^{1,3} 牛宝龙^{1,3*}

(1.太原理工大学新材料界面科学与工程教育部重点实验室,太原 030024;
2.山西大医院乳腺外科,太原 030024;3.太原理工大学材料科学与工程学院,太原 030024)

摘 要 采用生物表面活性剂大豆分离蛋白(SPI)功能化修饰经酸化提纯的单壁碳纳米管(O-SWCNTs),得到纳米复合材料(SPI-O-SWCNTs)。对 SPI-O-SWCNTs 及其性能进行了测试和表征。透射电子显微镜(TEM)观察表明:SPI 有效提高了 O-SWCNTs 的分散性。X 射线光电子能谱(XPS)和拉曼光谱分析表明:SPI 通过物理作用吸附到了 O-SWCNTs 表面,导致 O-SWCNTs 表面的 C 原子混乱度少许增加以及电化学性能降低。药物体外释放实验和细胞毒性检验实验表明:SPI 修饰后的 O-SWCNTs,能够提高药物的缓释效果,并且降低了对细胞的毒性。

关键词 单壁碳纳米管,大豆分离蛋白,纳米复合材料,分散性

Functionalization and characterization of SWCNTs with soy protein isolate

Wang Han¹ Guo Jun² Guo Xia¹ Jia Jianhong¹ Li Wenfeng^{1,3} Niu Baolong^{1,3}

(1.Key Laboratory of Interface Science and Engineering in Advanced Materials,Ministry of Education,Taiyuan University of Technology,Taiyuan 030024;2.Breast Surgery of Shanxi Hospital,Taiyuan 030024;3.College of Materials Science and Engineering,Taiyuan University of Technology,Taiyuan 030024)

Abstract Nanosized composites (SPI-O-SWCNTs) were obtained by functionalization of acid-purified single-walled carbon nanotubes (O-SWCNTs) with biosurfactant soy protein isolate (SPI). SPI-O-SWCNTs and their performance were tested and characterized. Transmission electron microscopy (TEM) showed that SPI effectively improved the dispersibility of O-SWCNTs. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and raman spectra analysis showed that the SPI adsorbed onto the surface of O-SWCNTs by physical action, resulting in a little increase of C atom confusion on the surface of O-SWCNTs and a decrease of electrochemical performance. The vitro drug release experiments and cytotoxicity tests showed that SPI-modified O-SWCNTs can improve the drug release effect and reduce the toxicity to cells.

Key words single-walled carbon nanotube, soy protein isolate, nanocomposite, dispersibility

自 1991 年,碳纳米管(CNTs)被发现以来,就被认定是一种新型纳米材料。CNTs 因具有一维中空管状结构^[1-2]而具有独特性质,比如:较高的比表面和优异的电子、机械、光学和化学性能^[3-6]。因此,CNTs 被广泛应用在纳米医学、电子科技、生物传感器以及高强度复合材料等领域^[7-11]。CNTs 按结构可分为多壁碳米管(MCWNTs)和单壁碳纳米管(SWCNTs)。SWCNTs 作为 CNTs 的一种极限形式,相比 MWCNTs 具有更加极致的性能,这种纯粹

经典的一维结构为一维化学、物理和量子效应的研究提供了理想的环境^[12]。

尽管 SWCNTs 具有许多优异的性能,但是其本身也存在致命缺陷。SWCNTs 在水或有机溶剂中,溶解度非常低,并且容易发生聚集沉淀,尤其是当 SWCNTs 作为药物载体时,SWCNTs 在人体或动物细胞内极易发生聚集,并产生毒性,致使组织发生病变^[13-14]。

为了解决 SWCNTs 溶解度低的问题,通常使

基金项目:国家自然科学基金委青年科学基金(51303124);山西省基础研究计划项目(2014021020-3);山西省高等学校科技创新基金(153030141-S)

作者简介:王寒(1991-),男,硕士研究生,主要从事生物材料的研究。

联系人:牛宝龙,博士,副教授,硕士研究生导师。

用物理或化学方法对 SWCNTs 进行功能化修饰^[15-17],以提高其在介质中的水溶性和分散性。而化学修饰法会破坏纳米管的共轭 π - π 系统,且对电子和光学性质都有一定影响^[18-19]。因此,物理改性被认为是提高 SWCNTs 溶解度的理想方法,既可以提高 SWCNTs 在水溶液的分散性,又可以减少对 SWCNTs 结构的破坏。由于特殊 sp^2 杂化,SWCNTs 的表面积高达 $2600\text{m}^2/\text{g}$,这使 SWCNTs 具有非常高的载药能力^[20]。

大豆分离蛋白(SPI)是去除大豆中油脂和碳水化合物类的蛋白质,其含量在大豆组合物中占 90% 甚至更多^[21]。作为一种重要的植物蛋白产品,SPI 具有很高的营养价值和良好的加工特性,被广泛应用于食品加工领域。SPI 具有良好的表面结合和修饰活性,在生物医学表面改性等方面表现出优异的性能。在水中 SPI 可以通过自组装形成疏水核心和亲水壳结构的纳米粒子,作为表面活性剂,SPI 能够提高不溶性固体颗粒的水溶性和分散性^[22]。此外,SPI 还具有高度的生物相容性,可以保持生物分子的良好活性^[23-24]。

因此,本研究拟利用 SPI 对 SWCNTs 进行修饰,达到改善 SWCNTs 的水溶性、降低其细胞毒性的目的,从而为 SWCNTs 作为药物载体的研究提供理论依据。

1 实验部分

1.1 主要材料

单壁碳纳米管(SWCNTs,纯度 90%),中国科学院成都有机化学研究所 SWCNTs 发展中心;大豆分离蛋白(SPI),上海江莱生物科技有限公司;姜黄素(纯度 99%),天津市光复精细化工研究所;无水乙醇,天津市致远化学试剂有限公司;浓硫酸(95%~98%)、浓硝酸(65%~68%),中国医药上海试剂公司;磷酸盐缓冲溶液(PBS,pH=7.2~7.4),北京索莱宝科技有限公司;MC3T3 细胞,四川移植大学免疫实验室;DMEM/F12 培养基、胎牛血清,美国 Gibco 公司;超纯水。

1.2 SPI-O-SWCNTs 复合材料的制备

将 50mg SWCNTs 加入混酸中(浓硫酸与浓硝酸的体积比为 3:1)进行纯化,在 80°C 下冷凝回流 24h,用超纯水洗去 SWCNTs 表面的杂质离子,烘干后备用,从而得到酸化后的 SWCNTs,用 O-SWCNTs 表示。

将 1mg O-SWCNTs 和 30mg SPI 加入 20mL

PBS 中,探头超声(功率 350W,超声 3s,间歇 2s,冰水浴)30min,离心 30min(转速 10000r/min,室温)后取上清液,冷冻干燥, 4°C 下保存,所得试样记做 SPI-O-SWCNTs。

1.3 姜黄素(Cur)加载 SPI-O-SWCNTs

Cur 通过探头超声混合加载到 SPI-O-SWCNTs 上。依次将 3mg SPI-O-SWCNTs 粉末和 2mg Cur 加入到 20mL 超纯水中,冰浴下超声处理 1h。用 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜除去未包被的 Cur,然后用 100mL 超纯水洗涤冷冻干燥, 4°C 下保存,所得试样记做 SPI-O-SWCNTs-Cur。

采用同样的方法将 Cur 加载到 O-SWCNTs 上,所有试样记做 O-SWCNTs-Cur。

1.4 SPI-O-SWCNTs 纳米复合材料的表征

采用透射电子显微镜(TEM,JEM2010 型,日本 JEOL 公司)观察样品形貌,分辨率 0.19nm ,工作电压 200kV;采用 X 射线光电子能谱(XPS,Amicus Budget 型,日本岛津公司)分析 SPI 与 O-SWCNTs 的结合方式;采用拉曼光谱(RL,Hololab 5000R 型,Kaiser 公司)分析 O-SWCNTs 经 SPI 修饰后,其表面原子有序度的变化。

1.5 SPI-O-SWCNTs 载体的体外释放效果

用超纯水将 10mg SPI-O-SWCNTs-Cur 粉末溶于 10mL 容量瓶中,用流动相定容至刻度,用孔内径为 $0.45\mu\text{m}$ 微孔过滤膜过滤。将 SPI-O-SWCNTs-Cur(1mg)、Cur(1mg)以及 O-SWCNTs-Cur(1mg)分散于 PBS(pH=7.4,30%乙醇)中,转移到透析袋内^[13],浸入含 100mL PBS(pH=7.4,30%乙醇)溶液的锥形瓶中,在 37°C 、100r/min 振荡条件下进行透析。在预定时间点取样 1mL,再加入 1mL PBS(pH=7.4,30%乙醇)以维持透析溶液的体积不变。采用高效液相色谱仪(ULTIMATE 3000 型,美国 Thermo Fisher Scientific 公司)检测透析液中 Cur 的量,重复 3 次。以时间百分比做 SPI-O-SWCNTs-Cur 的释放曲线。

1.6 SPI-O-SWCNTs-Cur 纳米颗粒体外细胞毒性的研究

采用细胞毒性检测法-噻唑蓝比色法(MTT 法)考察 SPI-O-SWCNTs 对细胞的毒性。收集对数期的 MC3T3 细胞,调整细胞悬浮液的浓度,以每孔 3000~10000 个的密度接种于 96 孔板,置 37°C 、5% CO_2 温箱培养,使细胞贴壁,培养 12h^[14]。加入含有不同浓度的 O-SWCNTs 和 SPI-O-SWCNTs 作为受试化合物继续培养 24h 或 48h。小心吸取上清

液,加入 90 μ L 新鲜培养液,再加入 10 μ L MTT 溶液,继续培养 4h。然后吸掉上清液,每孔加入 110 μ L Formazan 溶解液,置摇床低速振荡 10min,使结晶物充分总结。在酶标仪 490nm 处测量各孔的吸光值。

细胞存活率按细胞存活率(%)=(测量值-空白组)/(对照组-空白组) $\times$ 100%计算。

2 结果与讨论

2.1 分散性分析

SWCNTs、O-SWCNT 和 SPI-O-SWCNTs 经超声处理 5min 后及静置 3d 后的静置情况见图 1。由图可知,SWCNTs、O-SWCNTs 和 SPI-O-SWCNTs 经过超声处理后都得到了均一分散液。而在 37 $^{\circ}$ C 下,静置 3d 后,未经任何处理的 SWCNTs 沉淀完全,O-SWCNTs 只有非常少的一部分溶解在水中,其余绝大部分也都沉淀下来,这是因为经过酸化处理,SWCNTs 在两端产生一些亲水基团(如羟基、羧基),从而提高了小部分 SWCNTs 的溶解性,且 SWCNTs 中的金属催化剂以及无定形碳等杂质也被除去达到提纯的效果^[25]。SPI-O-SWCNTs 没有产生沉淀,说明其具有良好的分散性,且具有较高的稳定性。

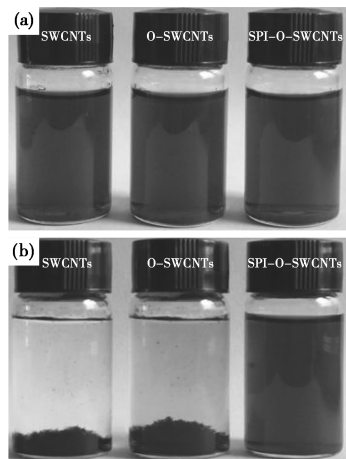


图 1 SWCNTs、O-SWCNT 和 SPI-O-SWCNTs 经超声处理 5min 后的静置图(a)及静置 3d 后的静置图(b)

2.2 TEM 分析

SPI-O-SWCNTs 纳米复合材料的 TEM 图见图 2。由图可见,未经任何处理的 SWCNTs 聚集成簇,分散性较差。当 SWCNTs 经酸化处理后,SWCNTs 产生短化现象^[25],尽管其分散性有所改善,但聚集仍然严重。而 SPI-O-SWCNTs 分散均匀,且视野中纳米管的数量显著增加,表明 SPI 可以

提高 O-SWCNTs 的分散性。

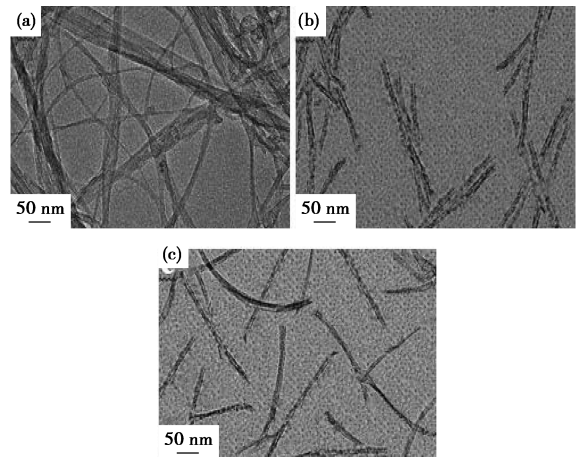


图 2 SWCNTs(a)、O-SWCNT(b)和 SPI-O-SWCNTs(c)的 TEM 图

2.3 XPS 分析

当 SPI 修饰 O-SWCNTs 疏水的表面时,SWCNTs 表面的化学组成会改变。通过 XPS 分析其表面的化学组成,结果见图 3。由图可知,O-SWCNTs 的表面显示典型的 SWCNTs 能谱。广谱显示非常高强度的 C 1s 元素信号和低强度的 O 1s 信号,O-SWCNTs 表面 O 1s 的信号可能是由于 SWCNTs 经酸化后产生的一些含 O 基团。当 O-SWCNTs 经 SPI 修饰后,SPI-O-SWCNTs 表面出现 O 1s、N 1s、C 1s 和低强度 S 2p 信号,很显然 N、S 元素都包含在 SPI 所含的 N、S 中,O-SWCNTs 中没有 N、S 元素,结果表明 SPI 结合到 O-SWCNTs 表面,改变了其表面的成分。

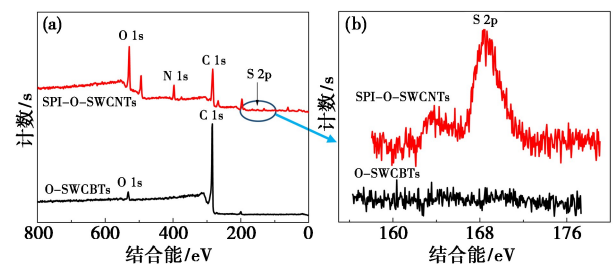


图 3 O-SWCNT 和 SPI-O-SWCNTs 的 XPS 谱图

(图 b 为图 a 的局部放大图)

图 4 为 O-SWCNTs 经 SPI 修饰的 C 1s 高分辨率窄谱图。C 1 的特征峰被高斯洛伦兹函数分解。由图可知,经过分解和拟合,高能 5 个主峰分别显示 284.5eV、285.2eV、286.1eV、288.4eV 和 289.2eV,5 个主峰分别对应于 C—C、C—N、C—O、C=O 和 O=C=O 基团的 C 1s 原子发射光电子能谱。从 SPI 修饰的 O-SWCNTs 的 XPS 能谱可以

看出,没有旧共价键的消失,也没有新共价键的产生,即 C、O、S 元素的价态在修饰过程没有任何变化,这说明 SPI 是通过物理作用吸附在 O-SWCNTs 表面,在修饰过程中并没有发生化学反应。

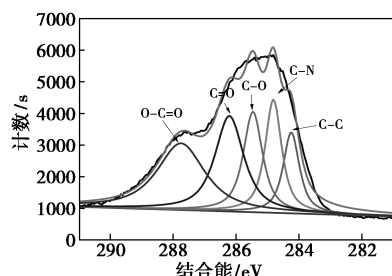


图 4 SPI-O-SWCNTs 的 C 1s 高分辨率窄谱图

2.4 RL 分析

O-SWCNTs 和 SPI-O-SWCNTs 的 RL 谱图见图 5。由图可见,未被 SPI 改性的 O-SWCNTs 的 G 峰(1581cm^{-1})和 D 峰(1336cm^{-1})分别由切向 C—C 伸缩振动和有缺陷的碳晶格产生,经过修饰后, O-SWCNTs 的 G 峰(1586cm^{-1})和 D 峰(1342cm^{-1})的波数向紫外区发生了偏移,说明 O-SWCNTs 经过 SPI 修饰都增加了其表面碳原子的混乱度。ID/IG 表示 SWCNTs 具有较高的有序性或者结构完整性,通过计算 ID/IG 比值可知, O-SWCNTs 的比值为 0.18, SPI-O-SWCNTs 为 0.27, ID/IG 比值没有较大提高。尽管 SPI 改性导致 O-SWCNTs 表面上的 C 原子混乱度增加,但这种增加是非常有限的,并不足以造成整个 O-SWCNTs 性能发生根本性破坏。从较小的 ID/IG 值还可以看出, SPI 物理吸附在 O-SWCNTs 表面上,仅些许增加了 O-SWCNTs 表面的 C 原子混乱度。

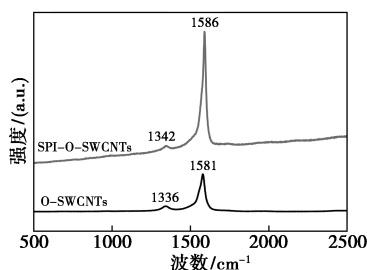


图 5 O-SWCNTs 和 SPI-O-SWCNTs 的 RL 谱图

2.5 SPI-O-SWCNTs-Cur 的体外释放性能分析

Cur 具有良好的抗癌功能,但其水溶性较差,治疗效果受到限制,一般需要将 Cur 负载到一定载体上来达到缓释效果。在 $\text{pH}=7.4$ 的 PBS 中, Cur、O-SWCNTs-Cur 和 SPI-O-SWCNTs-Cur 的释放曲线见图 6。由图可见, Cur 在缓释系统中的释放速

率较快,在释放近 10h 内达到释放极限,累计释放率达到 88.5%。当 Cur 被装载到 O-SWCNTs 上时, Cur 的缓释率有所减缓但依然很快,约 15h 内达到 83.2% 的释放极限,这可能是由于 O-SWCNTs 对 Cur 具有一定的吸附作用,延缓了 Cur 的释放,但 O-SWCNTs 中可能残留少量的 Cur,所以累积释放量相对较小。当 Cur 被负载到 SPI 修饰的 O-SWCNTs 上时, SPI 吸附在 O-SWCNTs 表面上,所以 Cur 只能从 O-SWCNTs 两端或者没有被 SPI 覆盖的表面释放出来,这就降低了单位时间内 Cur 的释放量,这也增加了释放时间,同时减小了 Cur 的释放率,从而达到缓释效果,所以 SPI-O-SWCNTs-Cur 纳米复合材料在 30h 左右累计释放不再变化,而是在纳米管中的 Cur 中残留较多,累积释放量也会相对减少。

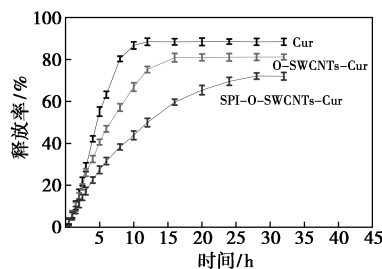


图 6 Cur、O-SWCNTs-Cur 和 SPI-O-SWCNTs-Cur 的缓释曲线图

2.6 SPI-O-SWCNTs 体外细胞毒性的检测

考察不同时间下,检测 O-SWCNTs 和 SPI-O-SWCNTs 对 MC3T3 细胞毒性的影响,结果见图 7。由图可知, O-SWCNTs 对 MC3T3 细胞有着明显的细胞抑制作用,并且随着浓度和时间的增加,对

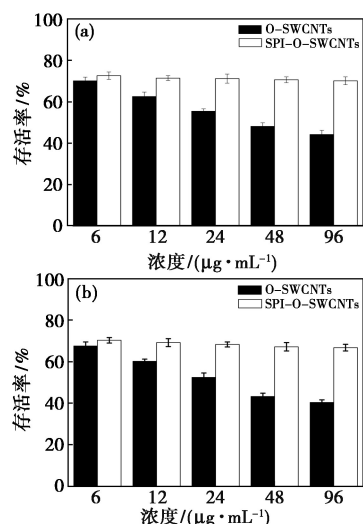


图 7 O-SWCNTs 和 SPI-O-SWCNTs 分别在 24h(a) 和 48h(b) 下对 MC3T3 细胞毒性的检测结果示意图

MC3T3 细胞的毒性逐渐增强。而 SPI-O-SWCNTs 对 MC3T3 细胞无明显的抑制作用,说明 SPI-O-SWCNTs 对细胞产生的毒性较小。

3 结论

当酸化提纯的 SWCNTs 经 SPI 修饰后,稳定性实验和 TEM 分析表明,O-SWCNTs 分散性有较大提高且稳定性较好。XPS 分析表明 SPI 修饰 O-SWCNTs 是通过物理吸附的方式结合在 O-SWCNTs 表面,且改变了其表面性质。通过 RL 分析,当 O-SWCNTs 经过 SPI 功能化修饰后,其表面原子混乱度增加,电化学性能有所下降。Cur 的体外缓释实验表明,当 SPI-O-SWCNTs 作为难溶性药物载体时,能有效提高药物的缓释效果,提高利用率。通过 MTT 细胞毒性检测实验证明,分散性极差的 O-SWCNTs 有较强的细胞毒性,当 O-SWCNTs 经过 SPI 功能化改善后,有效地提高了 O-SWCNTs 的分散效果,从而对细胞产生的毒性较小。

参考文献

- [1] Monthieux M, Kuznetsov V L. Who should be given the credit for the discovery of carbon nanotubes? [J]. Carbon, 2006, 44(9): 1621-1623.
- [2] Ajayan P M, Lijima S. Smallest carbon nanotube [J]. Nature, 1992, 358(6381): 23.
- [3] Ouyang M, Huang J L, Lieber C M. Fundamental electronic properties and applications of single-walled carbon nanotubes [J]. Accounts of Chemical Research, 2002, 35(12): 1018-1025.
- [4] Ostapenko S. Defect passivation using ultrasound treatment: fundamentals and application [J]. Applied Physics A, 1999, 69(2): 225-232.
- [5] Wan X, Dong J, Xing D Y. Optical properties of carbon nanotubes [J]. Phys Rev B, 1998, 58(11): 6756-6759.
- [6] Tasis D, Tagmatarchis N, Bianco A, et al. Chemistry of carbon nanotubes [J]. Chemical Reviews, 2006, 106(3): 1105-1136.
- [7] Martel R. Sorting carbon nanotubes for electronics [J]. Acs Nano, 2008, 2(11): 2195.
- [8] Qiu J D, Zhou W M, Guo J, et al. Amperometric sensor based on ferrocene-modified multiwalled carbon nanotube nanocomposites as electron mediator for the determination of glucose [J]. Analytical Biochemistry, 2009, 385(2): 264-269.
- [9] Kam N W S, Liu Z, Dai H. Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing [J]. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(36): 12492.
- [10] Wu Y, Phillips J A, Liu H, et al. Carbon nanotubes protect DNA strands during cellular delivery [J]. Acs Nano, 2008, 2(10): 2023-2028.
- [11] Bianco A, Sainz R, Li S, et al. Medicinal chemistry and pharmacological potential of fullerenes and carbon nanotubes [M]. Netherlands: Springer, 2008, 571.
- [12] Liu J, Wu S, He C, et al. Structure, property and application of carbon nanotubes and carbon microtubes [J]. Journal of Shenzhen University Science & Engineering, 2013, 30(1): 1-11.
- [13] Maynard A D, Baron P A, Foley M, et al. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material [J]. Journal of Toxicology & Environmental Health, 2004, 67(1): 87-107.
- [14] Ding L, Stilwell J, Zhang T, et al. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast [J]. Nano Letters, 2005, 5(12): 2448.
- [15] Hong C Y, Pan C Y. Functionalized carbon nanotubes responsive to environmental stimuli [J]. Journal of Materials Chemistry, 2008, 18(16): 275-284.
- [16] Hong C Y, You Y Z, Pan C Y. A new approach to functionalize multi-walled carbon nanotubes by the use of functional polymers [J]. Polymer, 2006, 47(12): 4300-4309.
- [17] You Yezi, Hong Chunyan, Pan C Y. Covalently immobilizing a biological molecule onto a carbon nanotube via a stimuli-sensitive bond [J]. Journal of Physical Chemistry C, 2007, 111(44): 16161-16166.
- [18] Hirsch Andreas. Functionalization of single-walled carbon nanotubes [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2010, 41(11): 1853-1859.
- [19] Liu Z, Sun X, Nakayama-Ratchford N, et al. Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery [J]. Acs Nano, 2007, 1(1): 50-56.
- [20] Bahr J L, Tour J M. Covalent chemistry of single-wall carbon nanotubes [J]. Journal of Materials Chemistry, 2002, 12(7): 1952-1958.
- [21] 李玉珍, 肖怀秋, 兰立新. 大豆分离蛋白功能特性及其在食品工业中的应用 [J]. 中国食品添加剂, 2008(1): 121-124.
- [22] Mackay J A, Chen M, McDaniel J R, et al. Self-assembling chimeric polypeptide-doxorubicin conjugate nanoparticles that abolish tumours after a single injection [J]. Nature Materials, 2009, 8(12): 993-999.
- [23] Li M, Xiao Y, Chen Y, et al. Soy protein-modified waterborne polyurethane biocomposites with improved functionality [J]. Rsc Advances, 2016, 6(16): 12837-12849.
- [24] 王欣, 乔玲. 大豆分离蛋白的营养、功能特性及应用研究 [J]. 农业科技与装备, 2013(5): 55-56.
- [25] Xin Y, Liu X. Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by mixed acid [J]. Journal of East China Institute of Technology (Natural Science), 2010, 1: 16.

收稿日期: 2017-12-22

修稿日期: 2018-02-07