

铜纳米颗粒@富勒醇复合物的制备 及其抗氧化和修护性

万洁^{1,2}, 张立青^{1,2}, 张琼^{1,2}, 洪流^{1,2*}, 杨成^{1,2*}

(1. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 合成与生物胶体教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以富勒醇和 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 为原料, 通过光化学还原法制备了铜纳米颗粒@富勒醇复合物 (简称复合物)。利用 FTIR、TGA、TEM、XPS 和动态光散射 (DLS) 对富勒醇和复合物的组成结构、微观形貌和粒径分布进行了表征和测试。采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 自由基清除实验与斑马鱼损伤修复模型实验探究了复合物的抗氧化与生物修护性。结果表明, 富勒醇的化学分子式为 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24} \cdot 11\text{H}_2\text{O}$, 平均粒径为 8.6 nm 的铜纳米颗粒成功地包覆在富勒醇表面, 形成了平均粒径约为 534 nm 的复合物; 质量浓度为 0.1 g/L 的复合物水分散液对 DPPH 自由基抑制率趋近 100%, 半抑制质量浓度为 0.0145 g/L; 质量分数为 6.25×10^{-5} 的复合物抗炎修护功效最佳, 修护功效为 55%。

关键词: 富勒醇; 铜纳米颗粒; 抗氧化性; 自由基; 生物修护; 功能材料

中图分类号: TB332 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2025) 03-0530-07

Synthesis and antioxidative repair of copper nanoparticles@fullerenol complex

WAN Jie^{1,2}, ZHANG Liqing^{1,2}, ZHANG Qiong^{1,2}, HONG Liu^{1,2*}, YANG Cheng^{1,2*}

(1. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. Key Laboratory of Synthetic and Biological Colloids, Ministry of Education, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Copper nanoparticles@fullerenol complex (for short complex) was synthesized from photochemical reduction of fullerenol and $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. The fullerenol and complex were then characterized by FTIR, TGA, TEM, XPS and dynamic light scattering (DLS) for analyses on composition, morphology and particle size distribution. The antioxidant and biological repair properties of the complex were further analyzed through 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) free radicals scavenging experiment and zebrafish damage repair model experiment. The results showed that chemical formula of fullerenol was $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24} \cdot 11\text{H}_2\text{O}$, while copper nanoparticles with an average particle size of 8.6 nm were successfully coated on the surface of fullerenol, forming a complex with an average particle size of about 534 nm. The composite with a mass concentration of 0.1 g/L could scavenge nearly 100% DPPH free radicals, with half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.0145 g/L. And the complex with a mass fraction of 6.25×10^{-5} showed the best anti-inflammatory repair effect of 55%.

Key words: fullerenol; copper nanoparticles; antioxidant property; free radicals; bio-repair; functional materials

生物体代谢中总会不断产生包括超氧自由基 ($\cdot\text{O}_2^-$) 和羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 在内的活性氧簇 (ROS), 它们的过量存在往往会造成细胞的非特异性氧化, 干扰正常的氧化还原作用, 从而对细胞造成损害^[1],

收稿日期: 2024-03-03; 定用日期: 2024-04-01; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240180

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2017175)

作者简介: 万洁 (1978—), 女, 博士生, E-mail: 626119507@qq.com. 联系人: 洪流 (1985—), 男, 副教授, E-mail: hongliu@jiangnan.edu.cn; 杨成 (1970—), 男, 教授, E-mail: cyang@jiangnan.edu.cn.

可以通过使用自由基清除剂建立的抗氧化防御机制予以消除^[2]。因此,人们迫切需要寻找一种具有良好抗氧化性的材料,从而能够抑制 ROS,减缓细胞衰老。纳米材料因其优越的性能引起了人们的广泛关注,许多学者对能提高抗氧化活性的纳米材料的制备进行了重点研究^[3]。

富勒烯(C₆₀)^[4]是一种完全由碳组成的中空分子,具有良好的光活性及化学反应性。基于其特殊的 *p*- π 共轭结构,富勒烯可通过碳碳双键吸附自由基,从而具有较强的抗氧化、修护效果^[5]。但富勒烯易团聚,具有较强的疏水性,只溶于有限的有机溶剂(如甲苯、四氯化碳等),严重限制了其在生物医药领域的应用。经氨基化、羧基化、羟基化^[6]等官能团化改性后的富勒烯衍生物具有良好的水溶性,但其吸附自由基的效果并不佳。因此,如何在提高富勒烯亲水性的同时维持其良好的抗氧化和修护性是一大挑战。

金属纳米颗粒具有良好的抗氧化效果^[7-8],可用作低维纳米抗氧化体系的有益补充。HONG 等^[2]将银纳米颗粒与二硫化钼(MoS₂)复合后,复合材料的抗氧化性能相对单一纳米材料有较大提升。受此启发,将富勒烯的水溶性衍生物与铜纳米颗粒复合可望实现抗氧化性能的协同增益。当前,铜纳米颗粒的合成主要包括热还原法、化学还原法、气相沉积法、多元醇法、微波辐射法、微乳液法等^[9]。但如何控制铜纳米颗粒的负载量及粒径大小以减少其生物毒性,依然是一个不容忽视的问题。

本文拟通过光化学还原法将超小尺寸的铜纳米颗粒负载到羟基化富勒烯(富勒醇)表面,制备了铜纳米颗粒@富勒醇复合物(简称复合物,下同),并采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除实验与斑马鱼损伤修复模型实验分别探究了复合物的抗氧化与生物修护性。以期为新型纳米抗氧化物的开发带来新的启示。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

实验用野生 AB 品系斑马鱼,购自杭州环特生物科技股份有限公司,按照符合国际 AAALAC 认证(认证编号:001458)的要求饲养和繁殖,实验中使用的斑马鱼鱼龄为 3 dpf(受精后天数)。

富勒烯(C₆₀,质量分数 99.9%),南京牧科纳米科技有限公司;无水乙醇,上海天朗科技有限公司;四丁基氢氧化铵水溶液(TBAH,质量分数为 40%)、DPPH,上海麦克林生化科技股份有限公司;CuCl₂•2H₂O、H₂O₂、甲苯、异丙醇、正己烷、无水

乙醚等,国药集团化学试剂有限公司;十二烷基硫酸钠(SLS),上海阿拉丁生化科技股份有限公司。所有试剂均为分析纯,使用时无需进一步纯化。

人永生化角质形成细胞(HaCaT 细胞),北京北纳创联生物技术研究院;MTT 检测试剂盒,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;达尔伯克氏必需基本培养基(DMEM,含质量分数 1%青霉素-链霉素和 15%胎牛血清)、磷酸盐缓冲溶液(PBS,pH=7.4),美国 HyClone 公司。

UV5100 型紫外-可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;FALA2000104 型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR),加拿大 Boman 公司;1100SF 型热重分析仪(TGA),梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司;AXIS Supra 型 X 射线光电子能谱仪(XPS),英国 Kratos 公司;JEM-2010F 型透射电子显微镜(TEM),日本 JEOL;Zeta PALS 型粒径分析仪(DLS),美国布鲁克海文仪器公司;Spectra Max M2 型酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司;LSR660CP-3W-FC 光纤耦合激光器,宁波远明激光技术有限公司;Axio Zoom V16 型全自动变焦显微镜,德国 ZEISS 公司。

1.2 方法

1.2.1 富勒醇的制备

富勒醇参考文献[6]方法制备。首先,将 0.10 g 的富勒烯超声(功率 700 W)分散到 50 mL 甲苯中,并向分散液中加入 10 mL H₂O₂(质量分数 30%)和 500 μ L 的 TBAH 水溶液,混合后在 60 °C 下搅拌加热 16 h,得到上层清澈、下层暗黄的分层混合液。取下层液相,向其中加入 180 mL 沉淀剂〔*V*(异丙醇):*V*(正己烷):*V*(无水乙醚)=7:5:5〕后以 8000 r/min 离心 8 min,将沉淀物用无水乙醚洗涤至上清液澄清后置于 50 °C 真空烘箱内干燥 18 h,得到 0.07 g 黄色粉末,即富勒醇。

1.2.2 铜纳米颗粒@富勒醇复合物的制备

首先将 2 mg(约 0.002 mmol)富勒醇粉末与 6.67 mg(约 0.038 mmol)CuCl₂•2H₂O 加入 5 mL 去离子水中,超声(功率 700 W)分散 30 s。然后将混合溶液置于激光(波长 600 nm,功率密度 0.9 mW/cm²)下照射 0.3 h 以还原生成铜纳米颗粒。最后将溶液以 8000 r/min 离心 8 min,置于 50 °C 真空烘箱内干燥 18 h,得到 0.5 mg 棕黄色粉末,即铜纳米颗粒@富勒醇复合物。

1.3 表征和测试

FTIR 测试:对富勒醇的组成进行表征,波数范围 4000~400 cm⁻¹,分辨率 4 cm⁻¹,扫描次数 32,通过 3400、1080、1370 和 1620 cm⁻¹ 处的特征峰与文献[6]中富勒醇的特征信号对照。XPS 测试:通过

XPS 谱图观察 3 种主要元素 (C、O 和 Cu) 的信号, 以获得铜纳米颗粒@富勒醇复合物中元素的化学状态信息, 进而对铜纳米颗粒@富勒醇复合物的结构进行表征。工作功率为 600 W, 能量分辨率 0.48 eV。TEM 测试: 对复合物的形貌进行观察, 测试工作电压 200 kV。DLS 测试: 对复合物的粒径进行了测定。TGA 测试: 氮气氛围, 以 5 °C/min 的速率升温, 测试温度范围 0~800 °C。

1.4 细胞毒性测试

以 HaCaT 细胞作为模型, 通过 MTT 法^[10]测试富勒醇的细胞毒性。具体操作如下: 首先, 将 HaCaT 细胞置于 DMEM 内培养, 当细胞密度达到 1×10^5 CFU/mL 后停止培养, 并取 100 μ L 细胞悬浮液滴入 96 孔板内于 37 °C 孵育 24 h。孵育完成后小心吸除原培养液, 使用 PBS (pH=7.4) 沿孔壁冲洗两次, 并加入以质量浓度 0.5 g/L 富勒醇/DMEM 为储备液配制的一系列梯度质量浓度的 DMEM 溶液 (0.063、0.125、0.200、0.250、0.500 g/L) 后, 在含 CO₂ 体积分数 5% 的 37 °C 培养箱中培养 24 h 后, 吸除原溶液, 使用 PBS 冲洗两次。然后向每个孔内加入 100 μ L 质量浓度 0.5 g/L 的 MTT/DMEM 溶液, 再放入培养箱于 37 °C 培养 4 h。随后吸除 DMEM 溶液, 使用 PBS 冲洗培养基两次后, 向每孔内加入 100 μ L 的 DMSO。最后, 使用酶标仪振荡孔板 10 min, 并在 490 nm 处测量各孔吸光度。以仅含培养基和 MTT 的组分作为空白组, 以含有细胞的培养基、MTT 的组分作为对照组。每组样品进行 5 次平行实验。根据公式 (1) 计算细胞活力 (%)。

$$\text{细胞活力}/\% = (A_s - A_b)/(A_c - A_b) \times 100 \quad (1)$$

式中: A_s 、 A_b 、 A_c 分别为样品组、空白组、对照组的吸光度。

1.5 抗氧化性测试

基于 DPPH 自由基清除实验, 测定了铜纳米颗粒@富勒醇复合物的抗氧化性^[11]。首先将 DPPH 自由基溶解在无水乙醇中配成 DPPH 自由基乙醇溶液 (0.3 mmol/L), 取 0.5 mL 溶液与 0.5 mL 无水乙醇混合, 使用紫外-可见分光光度计测定其在 517 nm 处吸光度 (A_c); 取 DPPH 自由基乙醇溶液 (0.5 mL) 与 0.5 mL 含有不同质量浓度 (0.01~0.25 g/L) 铜纳米颗粒@富勒醇复合物的乙醇分散液混合, 在避光条件下孵育 30 min, 孵育后用紫外-可见分光光度计测定其在 517 nm 处的吸光度 (A_s); 依据相同实验流程测定无 DPPH 自由基乙醇溶液样品的吸光度 (A_b)。根据公式 (2) 计算 DPPH 自由基抑制率 (%)。

$$\text{DPPH 自由基抑制率}/\% = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_c}\right) \times 100 \quad (2)$$

进一步使用 OriginLab 软件回归分析, 计算样品

溶液对 DPPH 自由基的半抑制质量浓度 (IC_{50}) 值。

1.6 生物修护性测试

将铜纳米颗粒@富勒醇复合物用斑马鱼培养水 (按 T/ZHCA 016-2022 附 A 方法配制) 配成质量分数分别为 3.12×10^{-5} 、 6.25×10^{-5} 、 1.25×10^{-4} 的水合物, 分别记为水合物-1、水合物-2、水合物-3, 备用。

通过手术刀沿与躯干垂直方向切断斑马鱼尾鳍, 将不同质量分数的铜纳米颗粒@富勒醇复合物水合物加入斑马鱼培养水中, 作用一定时间后, 以斑马鱼尾鳍附近中性粒细胞数量来表征复合物的修护功效。设置 5 个实验组: 正常对照组 (仅添加水)、模型对照组 (SLS 质量分数 0.006% 水溶液) 及低含量复合物组 (SLS 质量分数 0.006% 的水合物-1)、中含量复合物 (SLS 质量分数 0.006% 的水合物-2)、高含量复合物组 (SLS 质量分数 0.006% 的水合物-3)。每个实验组实验样本数: 斑马鱼为 15 尾。首先用手术刀切除斑马鱼的尾鳍建立损伤炎症模型; 再将模型斑马鱼转移至 6 孔板中, 每孔 15 尾; 缓慢滴加给样, 每孔中加入 3 mL 受试样品, 同时设置正常对照组和模型对照组, 每孔容量为 3 mL; 在 28 °C 下避光孵育 5 h。每个实验组随机选取 10 尾斑马鱼 ($n=10$) 置于全自动变焦显微镜下拍照, 用图像处理软件 Image J 1.50i 分析并采集数据, 分析各实验组的斑马鱼尾鳍区域中性粒细胞数量 (N), 根据公式 (3) 计算修护功效 (%)。

$$\text{修护功效}/\% = (N_1 - N_i)/(N_1 - N_0) \times 100 \quad (3)$$

式中: N_1 和 N_0 分别为模型对照组、正常对照组的斑马鱼尾鳍区域中性粒细胞数量; N_i ($i=1, 2, 3$) 为低含量复合物组、中含量复合物组、高含量复合物组的斑马鱼尾鳍区域中性粒细胞数量。

2 结果与讨论

2.1 表征结果

2.1.1 FTIR 分析

图 1 为富勒烯和富勒醇的 FTIR 谱图。

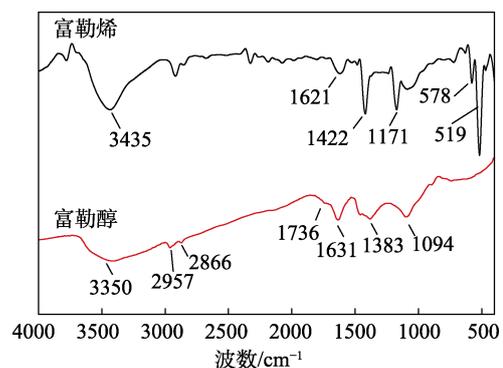


图 1 富勒烯和富勒醇的 FTIR 谱图

Fig. 1 FTIR spectra of fullerene and fulleranol

从图 1 可以看出, 富勒烯的特征吸收峰位于 1621 和 1422 cm^{-1} 处, 分别为 C=C 键和 C—H 键的伸缩振动; 富勒醇在 3350 cm^{-1} 附近显示了一个较宽的 O—H 谱带, 在 1094、1383 和 1631 cm^{-1} 处出现的 3 个特征谱带, 分别对应 C—O 键的伸缩振动、C—O—H 键的弯曲振动和 C=C 键的伸缩振动, 它们都是富勒醇的特征信号峰。同时, 在 1736 cm^{-1} 处的小峰为富勒烯本身的 C=C 键因为弯曲振动而产生了断裂, 在连接羟基后进一步被氧化形成 O=C=O 键。而在 2957 与 2866 cm^{-1} 处所观察到的两个小峰可以认为是残留的 TBAH 形成的^[6,12-14]。上述结果表明, 富勒烯被羟基化成为富勒醇。

2.1.2 TG 分析

图 2 为富勒醇的 TG 和 DTG 曲线。

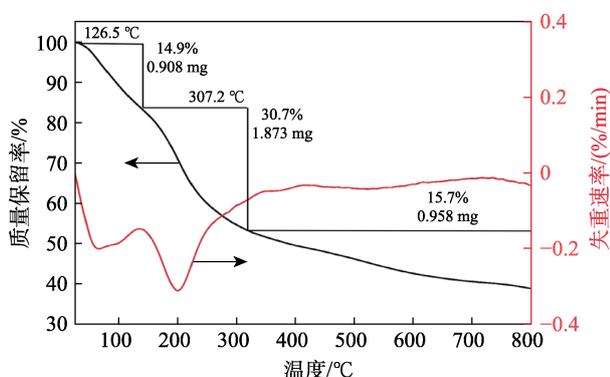


图 2 富勒醇的 TG 和 DTG 曲线
Fig. 2 TG and DTG curves of fullerol

从图 2 可以看出, 富勒醇在氮气中受热后的质量损失可分为 3 个阶段: 25.0~126.5、126.5~307.2 和 307.2 $^{\circ}\text{C}$ 以上。其中, 25.0~126.5 $^{\circ}\text{C}$ 的失重率为 14.9%, 为每个富勒烯簇上所连接的结合水的损失; 126.5~307.2 $^{\circ}\text{C}$ 的失重率为 30.7%, 对应于富勒烯簇中的羟基官能团总质量分数; 307.2 $^{\circ}\text{C}$ 以上的失重率为 15.7%, 残炭率为 38.7%。

参照文献[15]方法, 对照 TGA 数据, 可以根据公式 (4) 和 (5) 分别计算富勒醇 $[\text{C}_{60}(\text{OH})_x \cdot y\text{H}_2\text{O}]$ 的羟基数量 (x) 和结合水数量 (y)。

$$x = 720y_2 / [M(\text{—OH}) \cdot y_3] \quad (4)$$

$$y = 720y_1 / [M(\text{H}_2\text{O}) \cdot y_3] \quad (5)$$

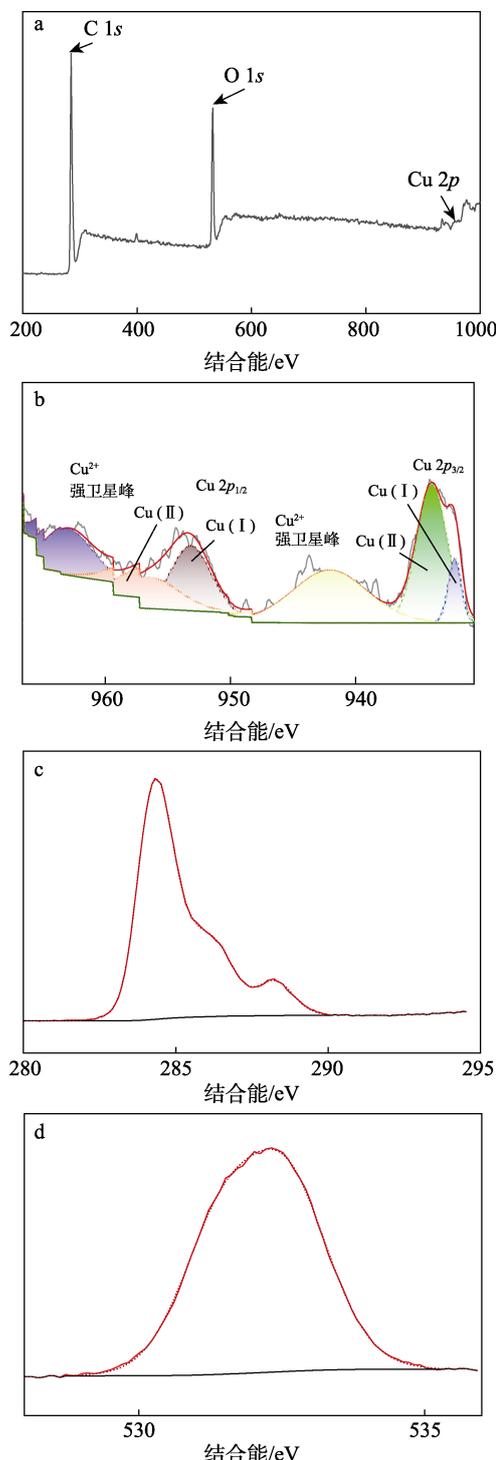
式中: y_1 为富勒醇在 25.0~126.5 $^{\circ}\text{C}$ 的失重率, 14.9%; y_2 为富勒醇在 126.5~307.2 $^{\circ}\text{C}$ 的失重率, 30.7%; y_3 为富勒醇在 307.2 $^{\circ}\text{C}$ 以上的失重率和残炭率之和, 54.4%; $M(\text{—OH})$ 为羟基的相对分子质量, 17; $M(\text{H}_2\text{O})$ 为 H_2O 的相对分子质量, 18。

经计算, $x=24$, $y=11$, 富勒醇的分子式为 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24} \cdot 11\text{H}_2\text{O}$, 即每个富勒烯分子接枝的羟基的平均数目为 24, 这保证了富勒醇和铜纳米颗粒@富

勒醇复合物的亲水性。

2.1.3 XPS 分析

图 3 为铜纳米颗粒@富勒醇复合物的 XPS 谱图。



a—XPS 全谱; b—Cu 2p 高分辨谱图; c—C 1s 高分辨谱图; d—O 1s 高分辨谱图

图 3 铜纳米颗粒@富勒醇复合物的 XPS 谱图
Fig. 3 XPS spectra of copper nanoparticles@fullerol complex

从图 3 可以看出, 铜纳米颗粒@富勒醇复合物主要存在 C、O 和 Cu 3 种元素 (图 3a); Cu 2p 高分辨 XPS 谱图中 (图 3b), 在结合能 932.6 和 952.3 eV 处

的两个峰分别为 Cu 2p_{3/2} 和 Cu 2p_{1/2}。其中, Cu 2p_{3/2} 的峰形拟合在结合能 932.1 和 934.1 eV 处峰可分别归因于 Cu⁺ 与 Cu²⁺[16]。同时, 在结合能 933.0 eV 处峰为零价 Cu 的信号与 Cu 2p_{3/2} 的重叠, 无法在图中分辨[17]。而 C 1s (图 3c) 和 O 1s (图 3d) 分别在结合能 285.0 和 533.0 eV 处出峰。XPS 谱图在一定程度上佐证了铜纳米颗粒通过范德华力成功地负载在富勒醇表面。

2.1.4 TEM 和 DLS 分析

图 4、图 5 为富勒醇和铜纳米颗粒@富勒醇复合物的 TEM 图。

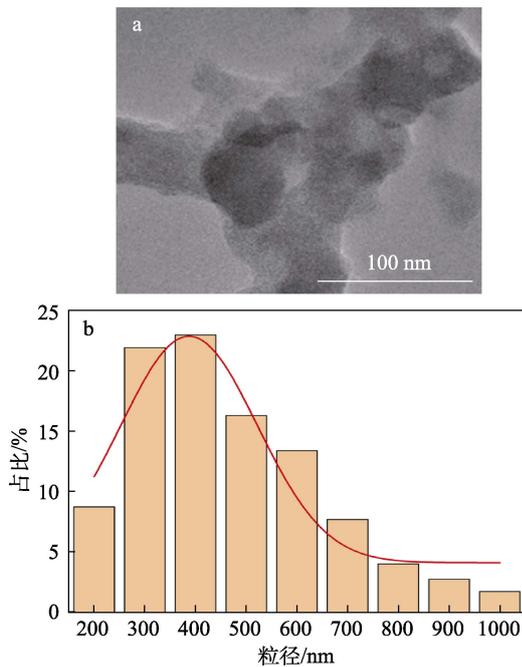


图 4 富勒醇的 TEM 图 (a) 与粒径分布图 (b)

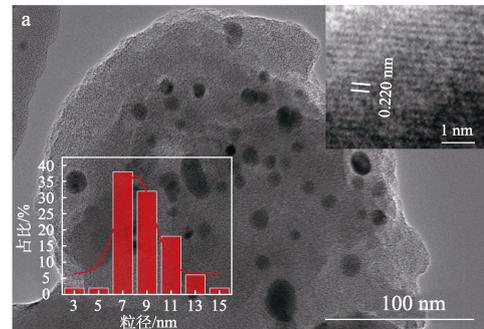
Fig. 4 TEM image (a) and particle size distribution (b) of fullerene

从图 4、5 可以看出, 相较于未负载铜纳米颗粒的富勒醇 (图 4a), 铜纳米颗粒@富勒醇复合物的纳米级颗粒 (图 5a) 具有明确的晶格条纹 ($d=0.220$ nm), 这与 Cu 的(111)晶面尺寸 (0.207 nm) 相对应[18]。经测定, 铜纳米颗粒的平均粒径为 8.6 nm (图 5a 插图)。这是因为, 铜纳米颗粒的形成机理可能涉及到相对电位差而引起的氧化还原反应。其中, 富勒醇的还原电位为 +300 mV (vs. 标准氢电极) [19], 与 CuCl₂·2H₂O (+538 mV) 相比要低得多[20], 水溶液中的 Cu²⁺ 可能会自发地接受光激发后的富勒醇的电子并还原成为铜纳米颗粒包覆在富勒醇的表面。

从图 4b 可以看出, 富勒醇的平均粒径约为 390 nm; 铜纳米颗粒@富勒醇纳米复合物的平均粒径约为 534 nm (图 5b)。

图 6 为铜纳米颗粒@富勒醇复合物的紫外-可见吸收光谱。可以看出, 质量浓度为 1 g/L 的铜纳米

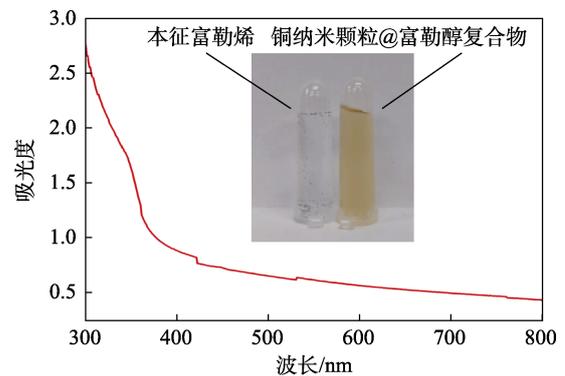
颗粒@富勒醇纳米复合物分散液的最大吸光度可达 2.7, 且分散液外观明显有别于本征富勒烯在水中的团聚状态 (图 6 插图)。上述结果表明, 铜纳米颗粒@富勒醇纳米复合物在水中具有良好的分散性。



左下插图铜纳米颗粒粒径分布直方图; 右上插图铜纳米颗粒的晶格条纹

图 5 铜纳米颗粒@富勒醇复合物的 TEM 图 (a) 与粒径分布图 (b)

Fig. 5 TEM image (a) and particle size distribution (b) of copper nanoparticles@fullerene complex



插图为本征富勒烯与铜纳米颗粒@富勒醇分散液外观图

图 6 铜纳米颗粒@富勒醇复合物的 UV-Vis 吸收光谱

Fig. 6 UV-Vis absorption spectrum of copper nanoparticle@fullerene complex

2.2 生物安全性评价

图 7 为不同质量浓度富勒醇水溶液的细胞毒性测试结果。

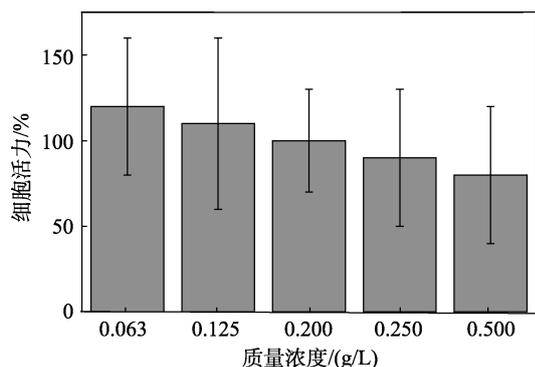


图7 不同质量浓度富勒醇水溶液的细胞毒性

Fig. 7 Cellular toxicity of fullereneol solution with different mass concentrations

从图7可以看出,随着富勒醇水溶液质量浓度的升高,细胞活力逐渐下降。但在低质量浓度(0.063~0.200 g/L)富勒醇水溶液中,HaCaT细胞出现增殖现象;此后随着富勒醇质量浓度继续升高至0.500 g/L,细胞活力降至80%以下。这表明,质量浓度小于0.500 g/L的富勒醇水溶液的生物安全性较高。

2.3 抗氧化活性评价

氧化应激反应会在一定程度上破坏生物氧化过程中的电子转移,从而导致相关组织受损^[2]。抗氧化作用有助于恢复生物体的正常机能。DPPH自由基是一种稳定的自由基,它能够破坏细胞大分子以及细胞器甚至造成更严重的损害。富勒醇因具有独特的理化性质和生物活性,能够较好地吸附DPPH自由基^[20]。图8为不同质量浓度的铜纳米颗粒@富勒醇复合物水分散液对DPPH自由基的抑制能力测试结果。

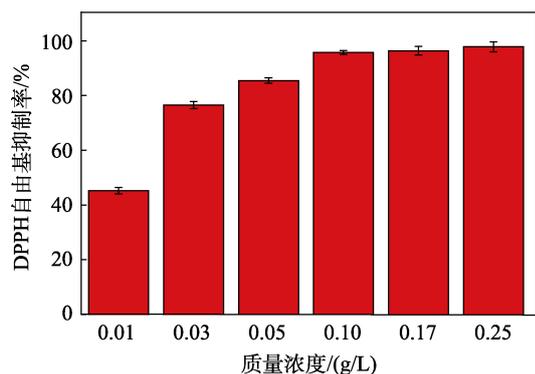
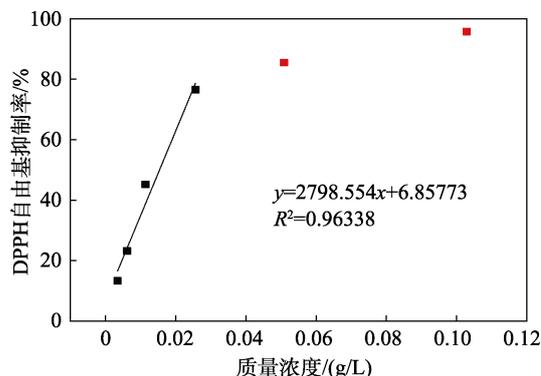


图8 不同质量浓度的铜纳米颗粒@富勒醇复合物水分散液对DPPH自由基的抑制率

Fig. 8 Inhibition rate of DPPH free radicals by aqueous dispersions of copper nanoparticles@fullereneol complex at different mass concentrations

从图8可以看出,随着铜纳米颗粒@富勒醇复合物水分散液质量浓度的提升,其抑制DPPH自由基的能力也逐渐升高;当质量浓度为0.1 g/L时对DPPH自由基抑制率趋近100%。进一步分析复合物质量浓度-DPPH自由基抑制率曲线(图9)可知,

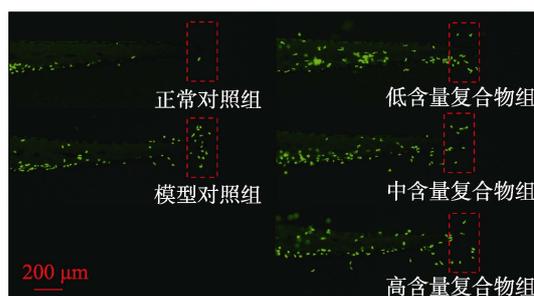
IC₅₀值约为0.0145 g/L,显著低于其他同类化合物(表1)。

图9 复合物质量浓度与DPPH自由基抑制率的拟合曲线
Fig. 9 Fitting curve between mass concentration of complex and inhibition rate of DPPH free radicals表1 铜纳米颗粒@富勒醇复合物与其他材料的DPPH自由基IC₅₀的比较Table 1 Comparison of DPPH free radical IC₅₀ of copper nanoparticles@fullereneol complex with other materials

样品	IC ₅₀ /(g/L)	参考文献
抗坏血酸	0.0189	[21]
铜纳米颗粒	1.628	[22]
CuO 纳米颗粒	0.034	[23]
富勒醇	40.4	[15]
铜纳米颗粒@富勒醇复合物	0.0145	本文

2.4 生物修护性能评价

斑马鱼尾鳍再生分为创面愈合、芽基形成、再生结局3个过程,以芽基形成最为核心。在此过程中,免疫细胞在清除死细胞、防止微生物入侵、促进受损组织再生等方面起着不可或缺的保护作用。中性粒细胞和巨噬细胞是参与这一过程的两种主要免疫系统细胞^[24]。中性粒细胞是最先到达损伤部位的免疫细胞。断尾诱导炎症反应,中性粒细胞发生免疫应答,向伤口迁移并聚集。图10为铜纳米颗粒@富勒醇复合物的生物修护功能典型图。表2为修护功效测试结果。



红色虚线部位为定量区域

图10 复合物的修护功效典型图

Fig. 10 Typical image of the repair effect of the complex

表 2 复合物的修护功效测试结果

Table 2 Test results of the repair effect of the complex

样品	均值	修护功效/%	P 值 ^①	显著性
正常对照组	1.300±0.153	—	—	
模型对照组	16.300±0.883	—	—	
低含量复合物组	11.200±1.191	34	<0.001	显著
中含量复合物组	8.000±0.715	55	<0.001	显著
高含量复合物组	11.200±0.530	34	<0.001	显著

①各样品组 P 值均为与模型组对比结果；“—”代表无数据。

从图 10 和表 2 可以看出,模型对照组的中性粒细胞数最多,与其余组均存在显著性差异 ($P < 0.001$)。相比模型对照组,低含量复合物组的修护功效为 34% ($P < 0.001$),表明质量分数 3.12×10^{-5} 的铜纳米颗粒@富勒醇复合物具有显著的抗炎修护功效;随着复合物质量分数升高至 6.25×10^{-5} ,中含量复合物组修护功效达到 55%,但高含量复合物组修护功效与低含量复合物组一致(34%)。结果表明,质量分数 6.25×10^{-5} 的铜纳米颗粒@富勒醇复合物的抗炎修护功效最佳。

3 结论

(1) 采用光化学还原法制备了铜纳米颗粒@富勒醇纳米复合物。平均粒径为 8.6 nm 的铜纳米颗粒成功地包覆在富勒醇表面,且具备良好的水分散能力。

(2) 质量浓度为 0.1 g/L 的铜纳米颗粒@富勒醇复合物水分散液对 DPPH 自由基抑制率趋近 100%, IC_{50} 值约为 0.0145 g/L。

(3) 质量分数 6.25×10^{-5} 的铜纳米颗粒@富勒醇复合物抗炎修护功效最佳,修护功效为 55%。

后续将在本文基础上,进一步研究铜纳米颗粒@富勒醇复合物在抗菌、抗肿瘤等生物学领域中的应用,并为临床应用提供实验依据。

参考文献:

- [1] YU C, BHONSLE J B, WANG L Y, *et al.* Synthetic aspects and free-radical scavenging efficiency of polyhydroxylated C_{60} [J]. *Fullerene Science and Technology*, 1997, 57: 1407-1421.
- [2] HONG L, LI J Z, LIU F G, *et al.* Morphology-controllable fabrication of Ag@MoS₂ composites with improved antioxidant activities at low Ag loading[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2020, 596: 124722.
- [3] REDDY N J, VALI D N, RANI M, *et al.* Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by *Piper longum* fruit[J]. *Materials Science & Engineering C*, 2014, 34: 115-122.
- [4] HUA Z H (华紫辉), WU B (吴波), GAN L H (甘利华), *et al.* Formation mechanism of fullerenes and metallofullerenes[J]. *Journal of the Chinese Ceramic Society (硅酸盐学报)*, 2023, 51(2): 323-331.
- [5] ANDRIEVSKY G V, BRUSKOV V I, TYKHOMYROV A A, *et al.* Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C_{60} fullerene nanostructures *in vitro* and *in vivo*[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009, 476: 786-793.
- [6] KOKUBO K, SHIRAKAWA S, KOBAYASHI N, *et al.* Facile and scalable synthesis of a highly hydroxylated water-soluble fullereneol as a single nanoparticle[J]. *Nano Research*, 2011, 42: 204-215.
- [7] LI Y Y (李有勇), GUO S L (郭森立), WANG K X (王凯旋), *et al.* Mesoscale computer simulation and its applications[J]. *Progress in Chemistry (化学进展)*, 2000, 12(4): 361-375.
- [8] ZHENG K Y, SETYAWATI M I, LEONG D T, *et al.* Antimicrobial gold nanoclusters[J]. *ACS Nano*, 2017, 117: 6904-6910.
- [9] PAZHOOH H N, BAGHERI R, ADLOO A. Fabrication of semi-conductive natural rubber nanocomposites with low copper nanoparticle contents[J]. *Polymer*, 2017, 108: 135-145.
- [10] ABE R U H, AKIYOSHI T. Evaluation of mtt assay in agarose for chemosensitivity testing of human cancers comparison with MTT assay[J]. *Oncology*, 1994, 515: 416-425.
- [11] ZAYED M F, MAHFOZE R A, EL-KOUSY S M, *et al.* *In-vitro* antioxidant and antimicrobial activities of metal nanoparticles biosynthesized using optimized *Pimpinella anisum* extract[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2020, 585: 124167.
- [12] LI J, TAKEUCHI A, OZAWA M, *et al.* C_{60} fullerol formation catalyzed by quaternary ammonium hydroxides[J]. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 1993, 23: 1784-1785.
- [13] ARRAIS A, DIANA E. Highly water soluble C_{60} derivatives: A new synthesis[J]. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 2003, 111: 35-46.
- [14] ZHANG G, LIU Y, LIANG D H, *et al.* Facile synthesis of isomerically pure fullereneols and formation of spherical aggregates from $C_{60}(OH)_8$ [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 4931: 5293-5295.
- [15] LIU F Y, XIONG F X, FAN Y K, *et al.* Facile and scalable fabrication engineering of fullereneol nanoparticles by improved alkaline-oxidation approach and its antioxidant potential in maize[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2016, 18: 338.
- [16] REZNICKOVA A, ORENDAC M, KOLSKA Z, *et al.* Copper nanoparticles functionalized PE: Preparation, characterization and magnetic properties[J]. *Applied Surface Science*, 2016, 390: 728-734.
- [17] LONGANO D, DITARANTO N, CIOFFI N, *et al.* Analytical characterization of laser-generated copper nanoparticles for antibacterial composite food packaging[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 4034: 1179-1186.
- [18] TSAI Y H, CHANDA K, CHU Y T, *et al.* Direct formation of small Cu_2O nanocubes, octahedra, and octapods for efficient synthesis of triazoles[J]. *Nanoscale*, 2014, 615: 8704-8709.
- [19] TAKAYA Y, TACHIKA H, HAYASHI T, *et al.* Performance of water-soluble fullereneol as novel functional molecular abrasive grain for polishing nanosurfaces[J]. *CIRP Annals-Manufacturing Technology*, 2009, 581: 495-498.
- [20] SIROTKIN A K, ZARUBAEV V V, POZNYIAKOVA L N, *et al.* Pristine fullerene C_{60} : Different water soluble forms-different mechanisms of biological action[J]. *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 2006, 14(2/3): 327-333.
- [21] SOARE J R, DINIS T C P, CUNHA A P, *et al.* Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*[J]. *Free Radical Research*, 1997, 26: 469.
- [22] RAJESHKUMAR S, RINITHA G. Nanostructural characterization of antimicrobial and antioxidant copper nanoparticles synthesized using novel *Persea Americana* seeds[J]. *OpenNano*, 2018, 3: 18.
- [23] REHANA D, MAHENDIRAN D, KUMAR R S, *et al.* Evaluation of antioxidant and anticancer activity of copper oxide nanoparticles synthesized using medicinally important plant extracts[J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2017, 89: 1067.
- [24] LIU X M (刘雪梅). Hybrid biomaterial initiates refractory wound healing *via* inducing transiently heightened inflammatory responses [D]. Xi'an: Air Force Medical University (空军军医大学), 2022.