

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047766**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.09.06**

**(51)** Int. Cl. **C01B 32/17 (2017.01)**

**(21)** Номер заявки  
**202300073**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2023.12.22**

---

**(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ ОДНОСЛОЙНЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК**

---

**(31)** 2023103987

**(32)** 2023.02.21

**(33)** RU

**(43)** 2024.08.30

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
АВТНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ  
МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА  
МИНИСТЕРСТВА  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)**

**(ФГАОУ ВО ПЕРВЫЙ МГМУ ИМ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНЗДРАВА  
РОССИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ)) (RU)**

**(72)** Изобретатель:  
**Власова Ирина Ивановна,  
Сулейманов Шакир Камилевич,  
Ключерев Тимофей Олегович,  
Кошелева Настасья Владимировна,  
Тимашев Петр Сергеевич (RU)**

**(56)** US-A1-2009048386  
RU-C2-2528985  
RU-C1-2802348  
CN-A-109867274  
CN-A-110104631

MASYUTIN A.G. et al. Wall Thickness of Industrial Multi-Walled Carbon Nanotubes is not a Crucial Factor for Their Degradation by Sodium Hypochlorite. NANOMATERIALS, 2018, 8(9):715, doi:10.3390/nano8090715, the whole document

**(57)** Изобретение относится к области нанотехнологий, а именно к способу очистки и "мягкого" окисления поверхности однослойных углеродных нанотрубок (ОУНТ). Изобретение может быть использовано для очистки поверхности нанотрубок для последующей их функционализации различными биологически активными молекулами с целью биомедицинских применений для терапии ряда патологий, а также для использования ОУНТ в изготовлении точных диагностических приборов и зондов. Способ очистки однослойных углеродных нанотрубок заключается в том, что проводят диспергирование ОУНТ в воде, затем их разводят в буфере при нейтральном pH до концентрации 100 мкг/мл, после чего начинают обработку ОУНТ гипохлоритом, добавляя его до концентрации 50-250 мкМ, при этом отслеживают окисление путем приборного измерения оптических спектров поглощения не ранее чем через 7-8 ч после каждой добавки гипохлорита, которые проводят до уменьшения амплитуды спектра суспензии в ближней инфракрасной области на 12-20% относительно контрольной пробы, к которой вместо гипохлорита добавляют эквивалентный объем воды. Техническим результатом изобретения является повышение эффективности очистки ОУНТ.

**B1**

**047766**

**047766**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области нанотехнологий, а именно к способу очистки и "мягкого" окисления поверхности однослойных углеродных нанотрубок (ОУНТ). Изобретение может быть использовано для очистки поверхности нанотрубок для последующей их функционализации различными биологически активными молекулами с целью биомедицинских применений для терапии ряда патологий, а также для использования ОУНТ в изготовлении точных диагностических приборов и зондов.

### Уровень техники

В последнее десятилетие произошел существенный прогресс в области использования наноматериалов для биомедицины, особенно быстро развивается сфера применения углеродных нанотрубок (УНТ). Углеродная нанотрубка - это цилиндр из одного слоя графена (однослойные нанотрубки, ОУНТ) или нескольких соосных цилиндров (многослойные). Благодаря своему строению и размерам углеродные нанотрубки обладают уникальными физико-химическими свойствами. Они в 20 раз прочнее стали, химически инертны, электропроводность в 1000 раз выше, чем у меди, имеют особые свойства проводимости и т.д. Это делает их перспективными для применения в различных областях наукоемких технологий. Кроме того, высокое соотношение площади поверхности по сравнению с длиной, высокая теплопроводность и хорошая способность проникать внутрь клетки делают УНТ перспективными наночастицами для применения в медицине для адресной доставки лекарств, тканевой инженерии, биоимиджинга, биосенсоров и терапии опухолей (Thakur A., et al. Carbon nanotubes: Types, synthesis, cytotoxicity and applications in biomedical. *Materials Today: Proceedings*, 2022; 50(5):2256-2268, doi: 10.1016/j.matpr.2021.10.002). С целью улучшения биосовместимости ОУНТ их функционализируют, т.е. химически модифицируют поверхность нанотрубок для улучшения их растворимости, снижения токсичности и придания специальных свойств для использования в таргетной терапии. УНТ окисляют сильными кислотами, модифицируют полигликолами и др., присоединение к поверхности наночастиц таргетных молекул и лекарственных препаратов позволяет обеспечить направленную терапию различных локальных патологий. Функционализация нанотрубок может быть ковалентной, тогда к ним химически присоединяют различные молекулы, улучшающие их биосовместимость (PEG, PEI), а также лекарственные препараты или таргетные молекулы. В случае нековалентной функционализации биомолекулы, поверхностно-активные вещества, полимеры и другие химические вещества сорбируются на поверхности УНТ. Образование нековалентной связи происходит за счет сил, обеспечивающих адсорбцию, таких как электростатическая сила, водородные связи, силы Ван-дер-Ваальса и взаимодействия  $\pi$ -стэкинга (Murjani, B.O., et al. Carbon nanotubes in biomedical applications: current status, promises, and challenges. *Carbon Lett.* 2022; 32:1207-1226, doi: 10.1007/s42823-022-00364-4). С другой стороны, эти же силы обеспечивают сорбцию различных посторонних веществ на поверхности нанотрубок, таких как белки, липиды, бактериальные липополисахариды и др. Например, связывание белков с УНТ очень сильное - константы диссоциации комплексов белков с нанотрубками лежат в диапазоне 1-0.1 мкМ. Поскольку в производстве нанотрубок и в дальнейшей лабораторной работе с ними стерильность не соблюдается, на поверхности наночастиц могут сорбироваться различные активные вещества, которые изменяют свойства наночастиц. Удаление органики, а также примесных остатков аморфного углерода, оставшихся после каталитических процессов синтеза УНТ, возможно с помощью ряда физических методов, а также с использованием растворителей, таких как спирт и  $H_2O_2$  (Алексашина Е.В. и др. Кислотная активация углеродных нанотрубок. *Конденс. среды и межфазные границы*, 2009; 11(2):101-105; Жерлицин А.Г. и др. Получение углеродных нанотрубок из природного газа. *Вестник науки Сибири*, 2012; 3(4):30-36). Однако эти вещества сложно удалить из нанотрубок, они могут оставаться во внутренней полости наночастиц и влиять на их свойства.

Химикам также известен стандартный методический подход для очистки, модификации и укорочения нанотрубок - это их окисление в результате озвучивания или кипячения в смеси пероксида водорода и сильной кислоты ( $HNO_3$ ,  $HCl$ ) (Strong, K.L., et al. Purification process for single-wall carbon nanotubes. *Carbon*. 2003; 41(8):1477-1488. DOI: 0.1016/S0008-6223(03)00014-9). Окисление нанотрубок позволяет избавиться от примесей металлов и аморфного углерода, а также приводит к появлению на их поверхности заряженных карбонильных и гидроксильных групп, что улучшает растворимость и биосовместимость наночастиц. Такая процедура очистки проводится для большинства нанотрубок при их коммерческом производстве.

Авторами изобретения также проводились исследования, в которых изучали окисление поверхности УНТ активными формами кислорода и гипохлоритными кислотами. Было показано, что наиболее эффективным окислителем, способным окислять и деградировать (разрушать) нанотрубки является хлорноватистая кислота ( $HOCl$ ) - основной продукт миелопероксидазы нейтрофилов. Для доказательства возможности биodeградации УНТ *in vivo* в очаге воспаления проводили длительную обработку УНТ, как однослойных (5-7 дней) так и многослойных (10-15 дней), высокими концентрациями гипохлорита  $NaOCl$  (1-10 мМ) - натриевой соли  $HOCl$ , которая при нейтральных pH существует в растворе в равновесии с  $HOCl$  (Vlasova I.I. et al. PEGylated single-walled carbon nanotubes activate neutrophils to increase production of hypochlorous acid, the oxidant capable of degrading nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 264(1):131-142, doi: 10.1016/j.taap.2012.07.027; Masyutin A.G., Bagrov D.V., Vlasova I.I., et al. Wall Thickness of Industrial Multi-Walled Carbon Nanotubes is not a Crucial Factor for Their Degradation by

Sodium Hypochlorite. *Nanomaterials*. 2018; 8(9):715, doi: 10.3390/nano8090715).

В работах других авторов также применялся гипохлорит для окисления и деградации нанотрубок. Обработка нативных (as produced) УНТ гипохлоритом для улучшения их растворимости была предложена ранее (заявка US 2009/0048386 A1, публ. 19.02.2009. METHOD FOR TREATMENT OF CARBON NANOTUBES). Авторы использовали экстремально высокие концентрации гипохлорита (0.1-10% или до 1.2 М), а следовательно, щелочные pH раствора и малые времена инкубации (от минут до 24 ч). При таких высоких концентрациях NaOCl модификация УНТ происходит неконтролируемо. Авторы заявки измеряли образование заряженных групп на поверхности УНТ, однако только этот параметр не является характеристикой модификации нанотрубок - в результате окисления на их поверхности могут образовываться дефекты (дырки), и в местах этих дефектов УНТ становятся ломкими и теряют свои уникальные свойства.

В заявке US 2010/0190239 A1, публ. 29.07.2010, предложена обработка нанотрубок пероксидазами - пероксидазой хрена или миелопероксидазой - в присутствии пероксида водорода (Star A., Kagan V.E., Allen B.L. DEGRADATION OF NANOMATERIALS, 2010, Pub. No.: US 2010/0190239 A1). Продуцируемые ферментами оксиданты реагируют с нанотрубками (публикация авторов: Kagan V.E., Konduru N.V., Feng W., Allen B.L., Conroy J., Volkov Y., Vlasova I.I. et al. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. *Nat Nanotechnol*. 2010; 5(5):354-359, doi: 10.1038/nnano.2010.44), модифицируют их поверхность, что облегчает деградацию УНТ в организме, а также может быть использовано для удаления УНТ, накопившихся в окружающей среде в месте их производства. Однако добавляемые пероксидазы сами являются биологически активным материалом, могут оставаться на поверхности НТ и реагировать с другими молекулами.

Другие физико-химические подходы также использовались для очистки и модификации свойств УНТ. Комбинированное использование микроволнового излучения и Cl<sub>2</sub> газа позволяет эффективно удалять примеси катализаторов - переходных металлов, используемых при синтезе УНТ (Gomez V., et al. Enhanced purification of carbon nanotubes by microwave and chlorine cleaning procedures. *RSC advances*. 2016; 6(14):11895-11902, doi: 10.1039/C5RA24854J). В патенте RU 2296046 C1 предложен нагрев нанотрубок до температуры 1500-1600°C в парах сульфида цинка для увеличения сорбционной емкости наночастиц.

Известно, что хлорноватистая кислота взаимодействует с аморфным углеродом. Активированный уголь используется для дехлорирования воды ( $C^*+HOCl=C^*O+Cl^-+H^+$ ) (<https://aquaboss.ru/poleznvestati/udalenie-hlora-i-hloramina-na-aktivirovannom-ugle.html>), поэтому можно ожидать, что аморфный углерод, сорбированный на углеродных нанотрубках, будет окисляться в присутствии гипохлорита.

Следует отметить, что все известные методы обработки нанотрубок не позволяют решить проблему увеличения их биосовместимости, поскольку в них не учитывается необходимость поверхностной очистки и отсутствует постоянный контроль за процессом окислительной модификации НТ, что имеет важное значение для сохранения баланса между свойствами НТ и их растворимостью/биосовместимостью. Сорбированные на поверхности УНТ органические молекулы, не прошедшие очистку, могут оказывать неблагоприятное воздействие на клетки и ткани, и особенно на клетки иммунной системы.

#### **Раскрытие сущности изобретения**

Техническим результатом изобретения является повышение эффективности очистки ОУНТ. В результате осуществления способа получают нанотрубки, не содержащие органических примесей на поверхности и сопутствующего аморфного углерода, при непрерывном контроле за процессом окислительной модификации ОУНТ.

Технический результат достигается за счет того, что проводят диспергирование ОУНТ в воде, затем их разводят в буфере при нейтральном pH до концентрации 100 мкг/мл, после чего начинают обработку ОУНТ гипохлоритом, добавляя его до концентрации 50-250 мкМ, при этом отслеживают окисление путем приборного измерения оптических спектров поглощения не ранее чем через 7-8 ч после каждой добавки гипохлорита, которые проводят до уменьшения амплитуды спектра суспензии в ближней инфракрасной области на 12-20% относительно контрольной пробы, к которой вместо гипохлорита добавляют эквивалентный объем воды.

При этом для каждого типа нанотрубок необходимо подбирать свое время обработки (количество добавок NaOCl к ОУНТ), так чтобы уменьшение амплитуды спектров поглощения суспензии ОУНТ составляло 12-20%.

Предложенный способ очистки поверхности ОУНТ основан на разнице в несколько порядков величин скорости реакции HOCl с аморфным углеродом или органическими веществами и с прочными ОУНТ. Константа скорости реакции NaOCl с большинством химических соединений, в том числе с белками и липидами составляет  $\sim 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Pattison D.I., et al. Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases. *Curr Med. Chem.*, 2006; 13(27):3271-3290, doi:10.2174/092986706778773095), что позволит очистить поверхность УНТ от возможных примесей. Ранее в работе авторов изобретения было показано, что скорость реакции окислителя с ОУНТ очень медленная, например, для карбоксилированных ОУНТ (к-ОУНТ) она состав-

ляет ( $450 \pm 50$ ) нмоль  $\text{HOCl}$  в час на 1 мг к-ОУНТ (Власова И.И. и др. Индуцированная миелопероксидазой деградация однослойных углеродных нанотрубок определяется синтезом гипохлорита. Биоорг. химия, 2011; 37(4):510-521).

#### Краткое описание чертежей

Изобретение поясняется чертежами, где:

на фиг. 1 представлена фотография суспензий к-ОУНТ (100 мкг/мл) после обработки гипохлоритом в суммарной концентрации: 1-0 мкМ, 2-100 мкМ, 3-1.5 мМ;

на фиг. 2 представлены соответствующие спектры поглощения образцов. Образец 3 иллюстрирует, что к-ОУНТ можно полностью разрушить, добавляя высокие концентрации гипохлорита;

на фиг. 3 представлены рамановские спектры к-ОУНТ после обработки гипохлоритом в суммарной концентрации: 1-0 мкМ, 2-250 мкМ, 3-1.5 мМ G-band  $1597 \text{ cm}^{-1}$ , D-band  $1350 \text{ cm}^{-1}$ . Спектры нормализованы по амплитуде G-полосы.

#### Осуществление изобретения

Предлагаемый способ очистки однослойных углеродных нанотрубок осуществляется следующим образом.

Авторами экспериментально были установлены основные режимные характеристики способа.

Нанотрубки диспергируют в деионизированной воде с помощью ультразвукового соникатора (Sonicator Q55, Qsonica, США) при мощности 10 Вт в течение 30 с несколько раз с перерывами 15 с (пробирка помещается на лед) или в ультразвуковой ванне (Elma Ultrasonic, Германия) при  $4-10^\circ\text{C}$  по несколько часов, так что суммарное время составляет не менее 10 ч. Использование ультразвуковой сонакации позволяет получить суспензию одиночных или собранных в пучки по несколько штук агрегатов ОУНТ. Вариант использования ультразвуковой ванны предпочтительнее, так как лучше сохраняется нативная структура наночастиц. Затем суспензию ОУНТ центрифугируют при 5000g в течение 30 мин для осаждения крупных агрегатов наночастиц, супернатант используют для дальнейшей обработки. Стоковые суспензии УНТ в воде (0.8-1.5 мг/мл) хранятся в темноте при  $4^\circ\text{C}$ . При длительном хранении (более 1 месяца) необходимо проводить повторное центрифугирование.

При этом концентрацию нанотрубок определяют, используя коэффициент экстинкции в ближней инфракрасной области (1050-1080 нм), известный от производителя или измеренный по стандартной методике (Liu Z., et al. Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery. ACS Nano, 2007; 1(1):50-56, doi: 10.1021/nm700040t).

Затем ОУНТ растворяют в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.2 до концентрации 100 мкг/мл для дальнейшей обработки гипохлоритом.

$\text{NaOCl}$  стабилен в виде раствора 10-15% хлора в воде, содержащей  $\text{NaOH}$ . Концентрацию  $\text{NaOCl}$  в исходном растворе определяют путем измерения оптической плотности при 290 нм ( $\epsilon=350 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) после последовательных разведений реагента в 5 мМ  $\text{NaOH}$ . Концентрация коммерческих растворов  $\text{NaOCl}$  составляет от 1 до 2 М.

Аликвоты  $\text{NaOCl}$  добавляют к ОУНТ, ресуспендированным в буфере, до концентрации реагента 50-250 мкМ. В случае, если для достижения заданной концентрации  $\text{NaOCl}$  к суспензии ОУНТ надо добавлять менее 5 мкл исходного раствора гипохлорита, непосредственно перед добавкой необходимо приготовить промежуточный раствор  $\text{NaOCl}$  в буфере с мМ концентрацией. К контрольным не модифицированным образцам ОУНТ добавляют эквивалентное количество воды.

При осуществлении способа очистки однослойных углеродных нанотрубок авторы отслеживали окисление ОУНТ, измеряя их спектры поглощения, что возможно делать с помощью спектрофотометра, позволяющего проводить измерения в ближней инфракрасной области (например, спектрофотометр Cary-50, Varian, США). Измерение оптических спектров суспензии ОУНТ проводят не ранее, чем через 7-8 ч после каждой добавки  $\text{NaOCl}$ . Этого времени достаточно, чтобы гипохлорит прореагировал с ОУНТ, если в них нет примесей. Инкубацию можно проводить дольше (например, инкубация в ночь). Инкубацию проводят в темном месте при комнатной температуре. Если в суспензиях видны агрегаты нанотрубок или поглощение в контроле изменилось более чем на 10%, перед записью спектров суспензии ОУНТ подвергаются ультразвуковой обработке по 15 с два раза с интервалом 10 с с помощью ультразвукового гомогенизатора (Sopopuls HD 2070, Bandelin Electronic, Германия) при 10 Вт, 20 кГц. Для измерения оптических спектров ОУНТ разводят в воде, так чтобы проводить измерения в оптимальном диапазоне поглощения, которое рекомендовано для прибора. Для регистрации рамановских спектров каплю раствора высушивают на стекле. Исследование образцов методом спектроскопии комбинационного рассеяния проводят с использованием лазера 514 нм (Ar, 20 мВт) с помощью ND (neutral density) фильтров с варьируемой мощностью в интервале 0.1-1 мВт.

Общее количество добавленного гипохлорита, необходимого для удаления примесей и начала мягкого окисления поверхности УНТ, зависит от количества примесей, но обычно не превышает 1 мМ. Очистку нанотрубок от примесей и окисление их поверхности можно считать завершенными, когда поглощение суспензии на 1060 нм уменьшалось на 12-20%. Уменьшение оптического поглощения означает, что начинается модификация углеродной поверхности ОУНТ, дальнейшая обработка может привести к

модификации структуры ОУНТ и их деградации.

Изобретение поясняется примерами.

Пример 1.

Карбоксилированные однослойные УНТ (к-УНТ) покупали у фирмы Carbon Solutions Inc. (США). 5 мг к-ОУНТ помещали в пробирку типа Эппендорф и добавляли 1 мл mQ воды. Соникацию нанотрубок проводили с помощью ультразвукового соникатора Sonicator Q55, Qsonica, США, помещая зонд прибора в пробирку, которая устанавливалась в стакан со льдом. Ультразвуковую обработку проводили при мощности 10 Вт в течение 30 с 5 раз с 15 с перерывами. Полученную суспензию центрифугировали при 5000g 30 мин, отбирали супернатант и его опять центрифугировали при тех же условиях. Для определения концентрации к-ОУНТ использовали коэффициент экстинкции  $13.2 \text{ ml mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Vlasova I.I., et al. PEGylated single-walled carbon nanotubes activate neutrophils to increase production of hypochlorous acid, the oxidant capable of degrading nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 264(1):131-142, doi: 10.1016/j.taap.2012.07.027). Концентрация составила  $(1.5\pm 0.2)$  мг/мл. Суспензию нанотрубок добавляли к 2 мл 50 mM Na-фосфатного буфера, pH 7.2 так, чтобы конечная концентрация к-ОУНТ была 100 мкг/мл. Суспензию распределяли по 1 мл в пробирки - контроль и проба для обработки NaOCl. Коммерческий раствор NaOCl имел концентрацию 1.5 M гипохлорита, его добавляли в 150 раз для приготовления рабочего 10 mM раствора NaOCl в буфере. К пробе добавляли 5 мкл этого раствора для приготовления концентрации 50 мкМ. К контрольной пробе добавили 5 мкл воды. После первой добавки инкубировали суспензии в течение 8 ч при комнатной температуре в темном месте, после инкубации измеряли поглощение при 1060 нм. Для этого брали аликвоту суспензии к-ОУНТ и добавляли к ней дистиллированную воду в соотношении 1:2. Измерения повторяли 3 раза, для измерений использовали спектрофотометр Cary-50, Varian, США. Поглощение обработанной гипохлоритом пробы достоверно не изменилось (поглощения в пробе с гипохлоритом уменьшилось менее, чем на 10% относительно контроля). После чего к суспензии добавили еще 5 мкл 10 mM NaOCl и инкубировали суспензию 16 ч (в ночь), после чего измеряли поглощение: изменения поглощения составили  $(18\pm 4)\%$  от значений в контрольной суспензии. Для контроля за модификацией НТ записывали спектры. Фото суспензий ОУНТ представлено на фиг. 1, соответствующие спектры поглощения приведены на фиг. 2. Дальнейшие добавки реагента приводят к деградации (разрушению) наноструктур (фиг. 1, 2, образец 3). Деградация наночастиц сопровождается не только уменьшением оптического поглощения растворов, но и исчезновением характерных полос поглощения ОУНТ - металлической (M1) и полупроводниковой (S2). В случае очистки и слабого окисления поверхности ОУНТ добавки гипохлорита возможны только при полном сохранении полос M1 и S2 (фиг. 2, кривая 2).

Характеризовать деградацию УНТ можно с помощью других методов, например динамическое рассеяние света и рамановская спектроскопия. Однако эти методы более трудоемки, чем измерение спектров поглощения, менее достоверны и требуют специального оборудования. На фиг. 3 приведены рамановские спектры нанотрубок с разной степенью деградации, полученные с помощью многофункциональной системы исследования методом спектроскопии рамановского рассеяния (Инсайт солшунс, Россия). Основное отличие спектров - деградация нанотрубок сопровождается увеличением соотношения амплитуды пиков G и D, что служит стандартным маркером окисления ОУНТ (Russier J. et al. Oxidative biodegradation of single-and multi-walled carbon nanotubes. *Nanoscale.* 2011; 3(3):893-896, doi: 10.1039/c0nr00779j)

Полученные ОУНТ не содержат органических примесей и аморфного углерода, они могут быть далее осаждены ультрацентрифугированием (не менее 200000g) и высушены, в таком виде нанотрубки хранятся в холодильнике в течение нескольких лет, и в дальнейшем могут быть использованы для функционализации целевыми молекулами.

Пример 2.

В качестве примера контаминации нанотрубок органическими соединениями мы использовали липополисахариды (ЛПС), которые добавляли к суспензии к-ОУНТ. к-ОУНТ были приготовлены, как описано в примере 1. Далее нанотрубки разводили в 1 мл 50 mM Na-фосфатного буфера, pH 7.2, содержащем 1 мг/мл ЛПС (около 200 мкМ). Раствор распределяли в пробирки по 0.5 мл - контроль и проба для обработки. Готовили рабочий раствор 10 mM NaOCl в буфере. Гипохлорит быстро взаимодействует с ЛПС, как и с любой органической молекулой, можно ожидать, что часть добавленного гипохлорита уйдет на взаимодействие с ЛПС. Поэтому добавки концентрацию гипохлорита в пробах увеличили. Добавка 75 мкМ NaOCl с последующей инкубацией 7 ч не привела к изменению поглощения пробы относительно контрольной (проба, к которой добавлена вода). После второй добавки 75 мкМ и последующей инкубации 16 ч также не наблюдали достоверных (более 10%) отличий в поглощении пробы и контроля. После третьей добавки 75 мкл поглощение суспензии уменьшилось на  $(15\pm 2)\%$ . При этом форма спектров не изменилась, специфические полосы поглощения M1 и S2 имели такую же форму, как в контрольной пробе. Суммарная концентрация добавленного гипохлорита составила 225 мкМ, это выше, чем в примере 1, что говорит о взаимодействии NaOCl с добавленным ЛПС.

## Пример 3.

Амидированные ОУНТ (ам-ОУНТ) имеют в своем составе ковалентно связанные с поверхностью нанотрубок амидные группы. Не более 1% атомов углерода УНТ связаны с амидными группами. 3 мг к-ОУНТ помещали в пробирку типа Эппендорф и добавляли 500 мкл mQ воды. Чтобы не нарушить функционализацию ОУНТ, в этом случае использовали более мягкую ультразвуковую обработку. Соникацию нанотрубок проводили в ультразвуковой ванне (Elma Ultrasonic, Германия) при 4-10°C в течение 2 ч 8 раз с перерывами в течение нескольких часов. Полученную суспензию центрифугировали при 5000g 30 мин, отбирали супернатант и опять центрифугировали при тех же условиях. Для определения концентрации ПЭГ-ОУНТ использовали коэффициент экстинкции  $15 \text{ ml mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Спектры поглощения этих УНТ выглядят также как спектры к-ОУНТ (фиг. 2). Гипохлорит реагирует с амидными (пептидными) группами с образованием хлорамидов (Hawkins C.L. et al. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino acids*, 2003; 25:259-274. DOI: 10.1007/s00726-003-0016-x), поэтому концентрацию гипохлорита в суспензии после каждой добавки увеличили до 100 мкМ. После первой и второй добавок 100 мкМ NaOCl и инкубации проб 8 и 16 ч соответственно не наблюдали различий в поглощении при 1060 нм между контрольным образцом и пробой, обработанной гипохлоритом. Третья добавка 100 мкМ NaOCl привела к уменьшению поглощения пробы на  $(10 \pm 2)\%$  относительно контроля. После четвертой добавки поглощения контроля и пробы отличались на  $(19 \pm 2)\%$ . Спектры контрольной и обработанной гипохлоритом проб не отличались по форме. Таким образом, обработку ам-ОУНТ завершили после добавления 400 мкМ NaOCl.

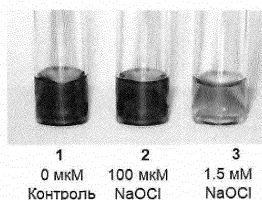
## Пример 4.

Пегилированные ОУНТ (ПЭГ с молекулярной массой 600 Да) получали из Carbon Solutions Inc. (США). Используемый тип ПЭГ-УНТ представляет собой кополимер, в котором не более 1% атомов углерода УНТ связаны с молекулами ПЭГ, и содержание ПЭГ составляет 10-25 мас.%. Аналогично примеру 3, для диспергирования ОУНТ использовали ультразвуковую баню. Для определения концентрации ПЭГ-ОУНТ использовали коэффициент экстинкции  $20.2 \text{ ml mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Спектры поглощения этих УНТ выглядят также как спектры к-ОУНТ (фиг. 2). Для очистки ПЭГ-ОУНТ к ним добавляли NaOCl так, что концентрация реагента после каждой добавки составляла 250 мкМ. Гипохлорит не реагирует с ПЭГ. Для уменьшения амплитуды спектра суспензии ПЭГ-ОУНТ в фосфатном буфере pH 7.2 в области 1060 нм на  $(20 \pm 2)\%$  понадобилось сделать две добавки гипохлорита, суммарная концентрация составила 500 мкМ NaOCl.

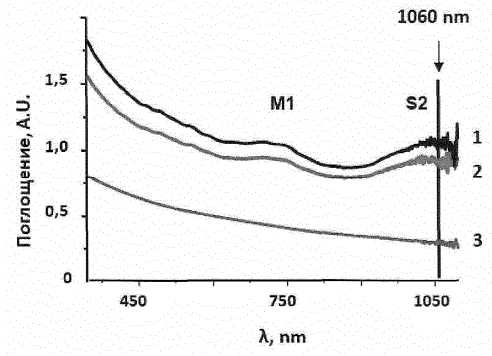
Таким образом, предложенным способом достигается полное удаление из суспензии ОУНТ возможных примесей, таких как органические молекулы и аморфный углерод, с последующим частичным окислением поверхности ОУНТ (уменьшение поглощения на 12-20%), что способствует улучшению биосовместимости и биodeградируемости наночастиц.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

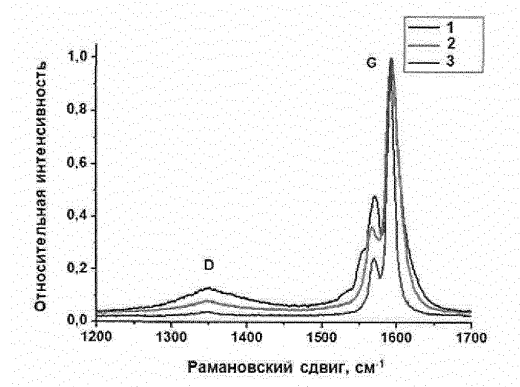
Способ очистки однослойных углеродных нанотрубок (ОУНТ), заключающийся в том, что проводят диспергирование ОУНТ в воде, затем их разводят в буфере при нейтральном pH до концентрации 100 мкг/мл, после чего начинают обработку ОУНТ гипохлоритом, добавляя его до концентрации 50-250 мкМ, при этом отслеживают окисление путем приборного измерения оптических спектров поглощения не ранее чем через 7-8 ч после каждой добавки гипохлорита, которые проводят до уменьшения амплитуды спектра суспензии в ближней инфракрасной области на 12-20% относительно контрольной пробы, к которой вместо гипохлорита добавляют эквивалентный объем воды.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

