

万洪善,刘 妍. 奥沙利铂-壳聚糖-海藻酸钠-多壁碳纳米管复合物的体外缓释行为[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):299-302.

奥沙利铂-壳聚糖-海藻酸钠-多壁碳纳米管复合物的体外缓释行为

万洪善,刘 妍

(连云港职业技术学院,江苏连云港 222006)

摘要:以奥沙利铂为模型药物研究多壁碳纳米管作为缓释载体的可行性,通过水溶性高分子修饰处理羧基化碳纳米管(MWCNT—COOH),改善其表面性质,利用透射电子显微镜表征修饰后的多壁碳纳米管的表面形貌,并且探讨了奥沙利铂-壳聚糖-海藻酸钠-多壁碳纳米管(OHP-CS-SAL-MWCNT)复合物在人工结肠液中的缓释行为。结果显示,多壁碳纳米管经过修饰后制备得到的奥沙利铂-壳聚糖-海藻酸钠-多壁碳纳米管复合物缓释效果良好,释放动力学基本符合 Higuchi 模型。说明多壁碳纳米管可作为药物缓释载体材料。

关键词:奥沙利铂;水溶性高分子;多壁碳纳米管;缓释

中图分类号:R944 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)07-0299-03

碳纳米管(CNTs)自 1991 年被日本科学家饭岛发现以来,因其独特的结构和性质受到了广泛的关注,而在生命及医药科学等领域的应用是碳纳米管领域中的热门话题之一。由于其中空结构,内部空腔可容纳大量药物,更重要的是碳纳米管可将其载运的治疗药物与环境隔离,从而在药物的载送过程中有效避免药物被体内环境所降解或因静电作用产生聚集,将治疗药物安全载运到细胞内^[1]。迄今为止,碳纳米管已成为全球科学家致力研究的、极有吸引力的、应用前景广泛的一种新型药物载体^[2]。碳纳米管不溶于有机溶剂和水,从而限制了它在药物载体领域的应用^[3],而功能化修饰碳纳米管则可改善其溶解性,并可提高其生物相容性,是将碳纳米管成功用作药物载体的重要举措^[4-5]。海藻酸钠(alginate sodium, SAL)和壳聚糖(chitosan, CS)是自然界中广泛存在的多糖,是常见的天然高分子,由于它们具有出色的生物相容性,近来被广泛地应用于生物医药领域^[6]。本研究以 1-乙基-3(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)为相偶联剂,以人工结肠液(RCM)为介质,采用超声辅助法接枝水溶性高分子,得到修饰的碳纳米管复合物。利用水溶性高分子对碳纳米管进行化学修饰,一方面可以提高碳纳米管在水中的分散性,另一方面可以实现缓释和载药功能的结合。

奥沙利铂(oxaliplatin, OHP)化学名为(1R-反式)-(1,2-环己二胺-N,N')[草酸(2-)-O,O']合铂,属于新的铂类抗癌药,常用于转移性结直肠癌治疗,结构式见图 1。本研究选择奥沙利铂作为模型药物,水溶性高分子修饰的多壁碳纳米管(SAL-MWCNT-CS)作为药物载体,考察其体外缓释性能,为进一步研究开发以碳纳米管作为药物载体的缓释制

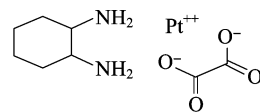


图1 奥沙利铂的化学结构式

剂提供依据^[7]。

1 材料与方法

1.1 材料

羧基化多壁碳纳米管(MWCNT—COOH, 直径 10 ~ 20 nm, 长度 10 ~ 30 μm, 纯度 ≥ 95%, 南京先丰纳米科技材料有限公司);奥沙利铂原料药(江苏恒瑞医药股份有限公司);海藻酸钠(国药集团化学试剂有限公司);壳聚糖(脱乙酰度 ≥ 90%, 上海伯奥生物科技有限公司);碳二亚胺盐酸盐(EDC, Sigma-aldrich 公司);其他试剂均为分析纯。

Nicolet5700 型智能傅立叶红外光谱仪(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR, 美国尼高力公司);JEM-100CXII 透射电镜(transmission electron microscope, TEM, 日本电子株式会社);S-3000N 型扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM, 日本日立公司);79HW-1 型恒温加热磁力搅拌器(上海维城仪器有限公司);KQ-100KDB 型高功率数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司);RC-8 溶出度测试仪(天津天光光学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 海藻酸钠-碳纳米管复合物(MWCNT-SAL)的制备

量取 40 mL 2 mg/mL MWCNT—COOH 混悬液加入 250 mL 圆底烧瓶,超声 20 min,将配制好的 2 mg/mL 海藻酸钠水溶液 80 mL 加入上述圆底烧瓶,混合超声 40 min,室温磁力搅拌 12 h,反应完成后离心分离,倒去上清液。剩下的固体反复用水清洗和离心分离,以除去未包裹在 MWCNT—COOH 上的海藻酸钠,室温条件下,变色硅胶干燥 24 h,得 MWCNT-SAL。

1.2.2 海藻酸钠-多壁碳纳米管-壳聚糖复合物(SAL-MWCNT-CS)的制备 取 2 mg/mL MWCNT-SAL 的磷酸缓

收稿日期:2012-12-28

基金项目:江苏省高等学校大学生实践创新项目;江苏省连云港市农业攻关(编号:CN1211);江苏省连云港市工业攻关(编号:CG1111)。

作者简介:万洪善(1970—),女,江苏连云港人,硕士,副教授,主要研究方向是生物制药。E-mail:wanhs9799@126.com。

冲液 20 mL, 加入 100 mL 圆底烧瓶, 超声 20 min, 将等量壳聚糖溶液和适量 EDC 加入上述圆底烧瓶, 混合超声 20 min, 室温磁力搅拌 12 h, 反应完成后离心分离, 倒去上清液。剩下的固体用缓冲溶液反复洗涤, 以除去未包裹在产物 1 上的壳聚糖, 室温条件下变色硅胶干燥 24 h, 得 SAL-MWCNT-CS。

1.2.3 奥沙利铂-壳聚糖-海藻酸钠-多壁碳纳米管复合物(OHP-CS-SAL-MWCNT)的制备 取 3 mg/mL SAL-MWCNT-CS 的磷酸缓冲液 10 mL 加入 100 mL 圆底烧瓶, 超声 10 min, 加入等量奥沙利铂溶液, 混合超声 20 min, 室温磁力搅拌 12 h, 反应完成后离心分离, 倒去上清液。剩下的固体用缓冲溶液反复洗涤, 以除去未包裹在 SAL-MWCNT-CS 上的奥沙利铂, 室温条件下, 变色硅胶干燥 24 h, 得 OHP-CS-SAL-MWCNT, 该纳米管载药率(载药前后 SAL-MWCNT-CS 的质量差为载药量, 载药量与 SAL-MWCNT-CS 质量的比值即为载药率)为 $(89 \pm 2)\%$ 。

1.2.4 测试与表征^[8] FTIR 图谱采用 FTIR 以溴化钾压片法测得。复合物的形貌分析在 TEM 电镜上完成。

1.2.5 药物的溶出试验

1.2.5.1 溶出介质的选择 以人工结肠液(模拟结肠环境的介质, pH 值 7.6 磷酸盐缓冲液, 含 30% 大鼠结肠内容物)为释放介质。人工结肠液的制作参考文献[9]。

1.2.5.2 高效液相色谱法^[10] 高效液相色谱条件: 色谱柱 C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-水(10:90), 流速 1 mL/min, 检测波长 250 nm, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 进样量 20 μ L。分别取 1.0 mg/mL OLP 储备液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 置 50 mL 量瓶中, 以流动相稀释至刻度, 精确量取 20 μ L 注入高效液相色谱仪, 测定波长 250 nm 处峰面积(A), 以奥沙利铂溶液质量浓度(C)对 A 进行线性回归, 得线性回归方程: $A = 6.935C + 3.52$, $r = 0.9996$, 表明在浓度 20 ~ 100 μ g/mL 范围内线性关系良好。

1.2.5.3 体外释放度测定 取样品, 采用转篮法, 以 RCM

1 000 mL 为释放介质, 在 (37.0 ± 0.5) $^{\circ}$ C、100 r/min ($r = 15$ cm) 条件下依法操作, 在不同时间分别取溶液 5 mL 过滤, 并及时补加等量介质, 以 0.45 μ m 微孔滤膜过滤。HPLC 法测定释药量, 并计算累积释放度 $Q(\%)$ 。释放介质中持续通入 CO_2 , 以维持 pH 值的稳定和厌氧生理环境, 绘制 OHP-CS-SAL-MWCNT 复合物的体外释放曲线。

1.2.5.4 释药过程的动力学方程拟合 采用多种数学模型对溶出结果进行拟合度分析, 寻找描述药物释放的最佳模型。

2 结果与分析

2.1 SAL-MWCNT-CS 的表征

对于纯羟基化碳纳米管来说, 红外光谱几乎是一条直线, 没有可以辨别的吸收峰。由图 2-c 可知, MWCNT-SAL 在 3434.15 cm^{-1} 处存在 O—H 基团的吸收峰。从图 2-b 可以看出, 海藻酸钠中—COO—的反对称伸缩振动和对称伸缩振动吸收峰分别位于 $1620 \sim 1500$ 、 $1500 \sim 1420\text{ cm}^{-1}$ 之间^[11]; 而海藻酸钠和 MWCNT—COOH 发生交联后, —COO—峰形变弱且偏移, 说明海藻酸钠与 MWCNT—COOH 发生了交联反应(图 2-c)。由图 2-d 可知, SAL-MWCNT-CS 复合物在 2923.03 、 2852.81 cm^{-1} 处分别对应于—CH₃ 和—CH₂ 的 C—H 不对称吸收峰, 并且在 1637.34 cm^{-1} 附近有强的由—NHCO—伸缩振动产生的吸收峰, 在 1401.08 cm^{-1} 附近的是由—COO—伸缩振动产生的吸收峰, 在 1137.41 cm^{-1} 处为 α -吡喃糖的 C—O—C 伸缩振动吸收峰, 在 1066.01 cm^{-1} 处为 α -吡喃糖的 C—O—H 伸缩振动吸收峰, IR 光谱表明 MWCNT—COOH 上的—COOH 与壳聚糖的—NH₂ 在 EDC 的作用下, 反应生成了—NHCO—。由于 MWCNT—COOH 结构复杂及其红外吸收极弱, 所以不能准确指认每一个峰的位置和振动基团, 但与纯 MWCNT—COOH 相比, 修饰后 FTIR 的变化从另外一个角度证明了水溶性高分子成功修饰了 MWCNT—COOH^[12]。

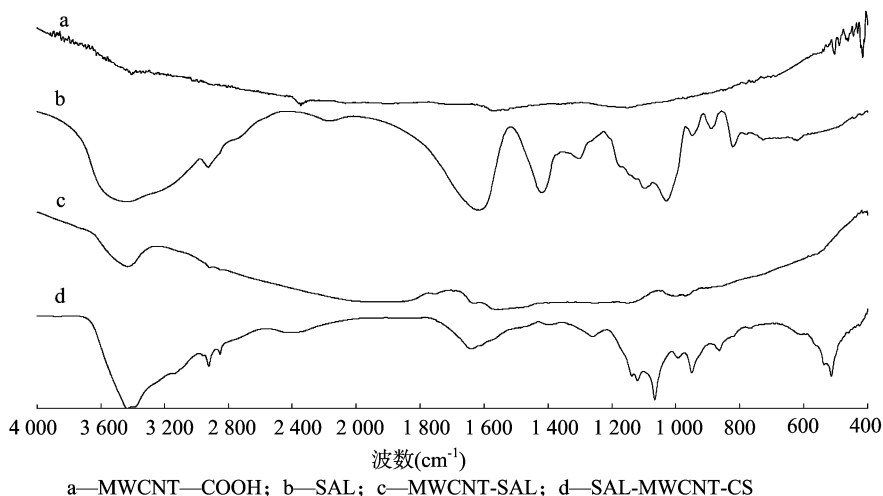


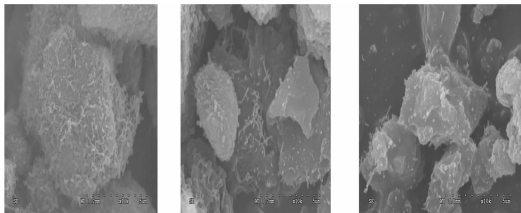
图2 样品的红外光谱图示

2.2 透射电子显微镜分析^[13]

从图 3-b、图 3-c 可以看出, MWCNT—COOH 外有复合物包裹。为了进一步观察, 又进行了透射电子显微镜分析。

从图 4-a 中可以看出, MWCNT—COOH 相互缠绕扭结

在一起, 分散效果不好; 而水溶性高分子修饰的碳纳米管(图 4-b)的分散性明显提高, 可以观察到无缠绕的单独碳纳米管或是以较细的管束形式存在的碳纳米管的形貌。这说明水溶性高分子的加入提高了碳纳米管在水溶液中的分散, 从而达

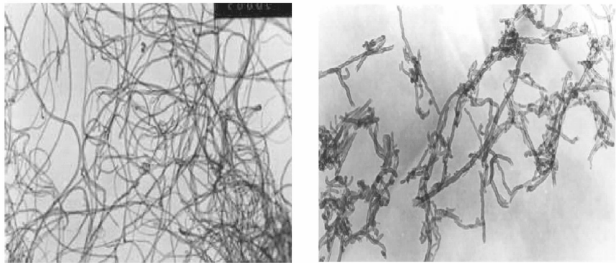


a. MWCNT—COOH b. MWCNT-SAL c. SAL-MWCNT-CS

注：标尺为 5 mm

图3 样品的SEM图示

到一个良好的稳定分散的效果。另外从图 4 - b 可以较清晰地看出,与 MWCNT—COOH 相比(图 4 - a),复合物的表面变得较为粗糙,管径变粗,这表明水溶性高分子已成功修饰至 MWCNT—COOH 表面。



a. MWCNTs—COOH b. SAL-MWCNTs-CS

注：标尺为 100 nm

图4 样品的TEM图示

2.3 SAL - MWCNT - CS - OHP 复合物的体外释放曲线

由图 5 可知, OHP - CS - SAL - MWCNTs 复合物和 OHP - SAL - MWCNTs 复合物在 37 ℃、pH 值 7.6 的 RCM 溶液中释放,奥沙利铂累积释放率为 83.1%,约释放持续 140 h。这 2 种复合物在开始释药时都有暴释现象,这是由于一部分药物只是简单附着在复合物表面,一旦放入缓冲介质中,由于复合物内外的药物浓度差,药物很容易从复合物表面脱离,处于自由扩散状态。而碳纳米管内的药物分子之间排

列紧密,且相互引力较大,更容易与修饰后的 MWCNT 内壁、外壁产生比较强烈作用,通过相互之间堆积形成紧密的复合物,而且由于管外被海藻酸钠和壳聚糖水溶性高分子双层包裹,在 RCM 介质中,水溶性高分子由外而内不断发生溶胀,药物分子随水溶性高分子的溶胀而不断向外缓慢扩散和溶解。因此,药物分子的进一步扩散溶解不会很快地发生在自由扩散阶段初期,而是表现为在“暴释”之后的一段较长时间段内较平缓地增大,释药速率最后也恒定。因而释放较慢,形成缓释阶段^[14]。

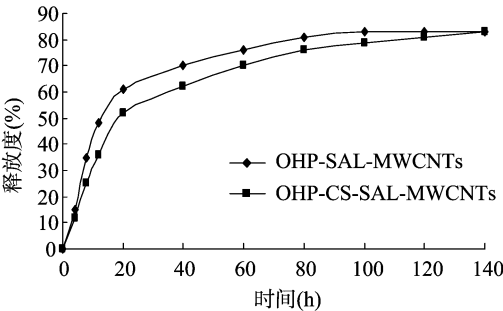


图5 体外释放曲线

从图 5 还可以看出, OHP - CS - SAL - MWCNTs 复合物的暴释现象比 OHP - SAL - MWCNTs 复合物缓和,20 h 后两者的药物释放率分别为 52%、61%,且 OHP - SAL - MWCNTs 复合物中的药物 100 h 后已基本完全释放,而 OHP - CS - SAL - MWCNTs 复合物中的药物 140 h 才达到最大释放度,这进一步说明了 MWCNT—COOH 经海藻酸钠和壳聚糖双重修饰后具有很好的药物控释载体的性能。

2.4 释放动力学模型拟合

由表 1 可见,各模型间释放度与时间均有较好的相关性,经 Peppas 方程拟合得时间 t 的指数 $n=0.778\ 2$, Higuchi 方程拟合说明累计释放度 Q 与时间的 $1/2$ 次方存在很好的线性相关,表明 SAL - MWCNT - CS - OHP 基本以恒定速率主动释放,受介质浓度影响较小,符合长效制剂要求^[15]。

表 1 各模型拟合方程及拟合相似度数据

模型	拟合方程	r	n
零级方程	$M_t/M_\infty = 0.068\ 9t + 0.154\ 6$	0.935\ 2	
一级方程	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.227\ 5t + 0.187\ 6$	0.965\ 9	
Higuchi 方程	$M_t/M_\infty = 0.317\ 5t^{1/2} - 0.212\ 3$	0.983\ 4	
Ritger - Peppas 方程	$\ln(M_t/M_\infty) = 0.772\ 2\ln t - 1.651$	0.972\ 3	0.778\ 2

3 结论

FT - IR 测试结果显示 MWCNT—COOH 在水溶性高分子修饰后结构有所改变,证明 MWCNT—COOH 表面成功包裹了水溶性高分子。TEM 结果更直观的表明 MWCNT—COOH 在水溶性高分子修饰化后,碳纳米管的管径变大,且表面粗糙,表面明显包覆了聚合物。改性后的碳纳米管在水溶剂中的溶解性变大,可以较好地分散。SAL - MWCNT - CS 作为载药载体,对奥沙利铂的载药率为 $89\% \pm 2\%$ 。体外释药试验能使药物缓慢释放,释放时间达 140 h,累积释放率达到 83.1%。同时, OHP - CS - SAL - MWCNT 释药行为符合 Higuchi 模

型,基本以恒定的速率释放药物,符合长效制剂要求。

碳纳米管由于其一维结构在体外被用作生物活性分子(药物、蛋白质、核酸等)的智能载体,已取得了大量令人振奋的研究成果。修饰碳纳米管以改善其分散性能及生物相容性,是将碳纳米管成功用作药物载体的重要举措。试验结果证明,经过修饰即可有效改善碳纳米管生物相容性。因此,碳纳米管在载体领域的应用前景越来越开阔。

参考文献:

[1]于金刚,黄笃树,黄可龙,等. 碳纳米管在药物载体领域的进展[J]. 化学通报,2011,74(8):715 - 719.

魏松红,王娟,李兴海,等. 二氯喹啉酸人工抗原的合成[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):302-304.

二氯喹啉酸人工抗原的合成

魏松红,王娟,李兴海,东琴,王振

(沈阳农业大学植物保护学院,辽宁沈阳 110866)

摘要:以 3,7-二氯-8-喹啉羧酸、草酰氯、5-氨基戊酸(Q-5)为原料合成二氯喹啉酸半抗原,再采用碳二亚胺法将半抗原与载体蛋白[牛血清蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)]偶联合成相应的人工抗原。将半抗原用红外(IR)和核磁共振(^1H -NMR)进行结构表征,通过紫外扫描证明二氯喹啉酸人工抗原(Q-5-BSA、Q-5-OVA)合成成功,且 Q-5-BSA、Q-5-OVA 的结合比分别为 21:1、17:1。人工抗原的合成成为研制二氯喹啉酸多克隆抗体及免疫试剂盒奠定了基础。

关键词:二氯喹啉酸;半抗原;人工抗原

中图分类号:S481.8 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)07-0302-03

二氯喹啉酸(quinclorac,3,7-二氯-8-喹啉羧酸,商品名快杀稗),是 80 年代德国巴斯夫公司研发的激素型喹啉酸类除草剂,主要用于稻田防治单子叶杂草,对稗草防治效果突出。但二氯喹啉酸是长残效除草剂,在水田中的降解方式主要是光解,微生物降解作用非常弱,几乎无水解也不挥发,导致它在土壤中的残留较大,对后茬蔬菜及早田作物产生药害^[1]。

目前,二氯喹啉酸残留检测的常用方法为仪器分析法,包括气相色谱法(GC)和高效液相色谱法(HPLC)^[2-3]。近年来,免疫分析法以其特异性强、灵敏度高、准确性好、快速方便等特点在农药残留检测中得到了快速发展^[4]。我们拟通过二氯喹啉酸与氨基戊酸反应增加 4 个碳链长度的间隔臂合成半抗原,与载体蛋白偶联获得人工抗原,为进一步建立二氯喹啉酸免疫分析提供基础。

收稿日期:2012-12-28

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201203098);辽宁省自然科学基金(编号:201202195)。

作者简介:魏松红(1974—),女,博士,副教授,主要从事农药学研究。

E-mail:songhongw125@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 二氯喹啉酸(Q)原药(95%,新沂中凯农用化工有限公司产品)、二氯甲烷、草酰氯、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、1,4-二氧六环(A.R.级,国药集团化学试剂有限公司产品)、5-氨基戊酸、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,B.R.级,国药集团化学试剂有限公司产品)、二环己基碳二亚胺(DCC,B.R.级,国药集团化学试剂有限公司产品)、牛血清蛋白(BSA,SIGMA 公司产品)、鸡卵清蛋白(OVA,华美生物工程公司产品)。

1.1.2 仪器设备 旋转蒸发器(R210,BUCHI)、红外光谱分析仪(Spectrum 65,PerkinElmer)、高效液相色谱-质谱联用仪(HPLC1100/MSD Trap S L,布鲁克光谱仪器公司产品)、 ^1H 核磁共振(Bruker AM500,安捷伦公司产品)等。

1.2 方法

1.2.1 半抗原的合成 合成路线如图 1 所示。

在 100 mL 三颈烧瓶中,加入 1 210 mg 二氯喹啉酸,并加入 25 mL 无水二氯甲烷和 7 mL 草酰氯,在磁力搅拌下缓慢滴

[2]Prato M,Kostarelos K,Bianco A. Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery[J]. Acc Chem Res,2008,41(1):60-68.

[3]Nakashima N. Solubilization of single walled carbon nanotubes with condensed aromatic compounds[J]. Science and Technology of Advanced Materials,2006,7(7):609-616.

[4]Bianco A. Carbon nanotubes for the delivery of therapeutic molecules[J]. Expert Opin Drug Deliv,2004,1(1):57-65.

[5]于金刚,黄可龙,杨巧勤,等. 碳纳米管作为药物载体的研究进展[J]. 药学学报,2008,43(10):985-991.

[6]张晓科,孟令杰,路庆华,等. 壳聚糖或海藻酸钠改性碳纳米管靶向缓释载体的制备方法:中国,200910054316[P]. 2009-12-02.

[7]万洪善. 阿德福韦酯-海藻酸钠多壁碳纳米管复合物的体外缓释行为[J]. 中国生化药物杂志,2012,33(4):358-360,364.

[8]丁赞立,王庚超,王贵友,等. 水性聚氨酯/聚邻氨基苯磺酸修饰碳纳米管复合材料的制备与性能[J]. 高分子材料科学与工程,

2010,26(8):128-130,133.

[9]刘辉,潘卫三,聂淑芳,等. 布地奈德结肠定位片的体外释放度实验方法及其释药机制研究[J]. 药学学报,2008,43(11):1147-1151.

[10]谢建峰. 奥沙利铂几种新型脂质体的制备及对大肠癌靶向性与药动学研究[D]. 长沙:中南大学,2008.

[11]崔园园,陈红,周丰,等. 海藻酸钠-胰蛋白酶微球的制备及药物释放性能[J]. 复合材料学报,2011,28(2):117-122.

[12]李含. 水溶性碳纳米管的合成、性质及生物效应研究[D]. 南京:南京大学,2011.

[13]李英. 水溶性壳聚糖功能化碳纳米管的研究[D]. 北京:北京化工大学,2010.

[14]吕春祥,凌立成,袁淑霞,等. 硝苯地平在球状活性炭中的吸附及缓释行为[J]. 新型炭材料,2007,22(1):17-22.

[15]慕春海,李超鹏,韩博,等. 异甘草素-多壁碳纳米管复合物的体外缓释行为[J]. 中国药学杂志,2010,45(1):36-40.