

羧基化多壁碳纳米管-紫杉醇复合物的制备、表征及其体外释药

陈丹萍^a, 戴海颖^a, 刘金玲^a, 林小超^a, 张涵^{b*}, 索绪斌^{a*} (广东药科大学, a. 药学院; b. 中药学院, 广州 510006)

摘要:目的 制备羧基化多壁碳纳米管-紫杉醇复合物 (PTX-MWCNTs-COOH), 并考察其体外释药性能。方法 以紫杉醇 (PTX) 为药物, 磷脂为表面活性剂, 溶剂共混法制备 PTX-MWCNTs-COOH, 用激光粒径仪、透射电镜 (TEM)、差示扫描量热仪 (DSC) 等对其进行表征, 滤膜法-HPLC 测定其载药量, 微柱分离-HPLC 测定其包封率, 反向透析法研究 PTX-MWCNTs-COOH 在 pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液 (含 1% 聚山梨酯 80) 的体外释药行为。结果 药物成功加载到多壁碳纳米管上形成 PTX-MWCNTs-COOH, 其 Zeta 电位为 (-24.5 ± 1.01) mV, 载药量为 $(50.09 \pm 0.02)\%$, 包封率为 $(76.80 \pm 0.02)\%$, 在体外的释放效果良好。结论 制备的 PTX-MWCNTs-COOH 具有良好的理化性质, 载药量与包封率较高, 反向透析法能较好地用于研究 PTX-MWCNTs-COOH 的体外释药行为。

关键词:羧基化多壁碳纳米管; 紫杉醇; 磷脂; 体外释放

doi:10.11669/cpj.2019.08.007 中图分类号:R944 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)08-0632-06

Preparation and Characterization of PTX-MWNTs-COOH and Its *in Vitro* Release

CHEN Dan-ping^a, DAI Hai-ying^a, LIU Jin-ling^a, LIN Xiao-chao^a, ZHANG Han^{b*}, SUO Xu-bin^{a*} (a. School of Pharmacy, b. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare and characterize PTX-MWCNTs-COOH complex and study its *in vitro* release properties. **METHODS** The PTX-MWCNTs-COOH complex was prepared by solvent blending method with paclitaxel as drug, phospholipid as surfactant. It was characterized by laser particle size analyzer, transmission electron microscope (TEM) and DSC analysis. The drug loading was determined by filtration membrane together HPLC method and the entrapment efficiency was determined by microcolumn separation together HPLC method. The *in vitro* release of the PTX-MWCNTs-COOH complex was studied in PBS buffer at pH 7.4 (containing 1% Tween-80) with reverse dialysis method. **RESULTS** The Zeta potential of PTX-MWCNTs-COOH complex was (-24.5 ± 1.01) mV, the drug loading was $(50.09 \pm 0.02)\%$, and the entrapment efficiency was $(76.80 \pm 0.02)\%$. The cumulative release *in vitro* was perfect. **CONCLUSION** PTX-MWCNTs-COOH showed good physicochemical properties such as high drug loading and entrapment efficiency. The method of reverse dialysis can be used to study the release behavior of PTX-MWCNTs-COOH *in vitro*.

KEY WORDS: carboxylated multi-walled carbon nanotube; paclitaxel; phospholipid; *in vitro* release

碳纳米管 (carbon nanotubes, CNTs) 由于特异的结构、电学、光学性能一直是人们关注的焦点, 被认为是潜在的生物学材料, 特别是作为药物载体在生物学领域的应用得到了广泛的研究和重视。CNTs 是由石墨层片绕中心轴按一定的螺旋角卷曲而成的直径为纳米级的无缝、中空的管体, 其两端由富勒烯半球封帽而成^[1]。根据石墨层的层数, 可分为单壁碳纳米管 (SWCNTs) 和多壁碳纳米管 (MWCNTs)。一般来说, SWCNTs 直径为 0.4 ~ 3.0 nm, 长度为 20 ~ 1 000 nm, 而 MWCNTs 的直径为 1.4 ~ 100 nm, 长度在 1 ~ 50 μm ^[2]。碳纳米管作为

一种新型的药物载体, 外表面可通过非共价吸附各种分子, 还可以共价键结合多种化学基团, 内部中空的管体也可填充各种小分子药物、多肽、DNA 及基因药物等, 具有巨大潜力的新型给药载体。碳纳米管表面光滑疏水性强, 几乎难溶于有机溶剂和水, 易在细胞中集聚产生毒性, 经功能化修饰碳纳米管则可明显改善其分散性及生物相容性, 能承载多种药物及生物分子进入细胞, 毒副作用明显降低^[3]。

多壁碳纳米管 (MWCNTs) 的多层同心结构使其具有更高的表面积、硬度和韧性, 从而提高了纳米材料的力学性能和载药性能, 即使在高药物负载条件

基金项目:国家自然科学基金项目资助 (81303288); 黑龙江省自然科学基金项目资助 (H2015107)

作者简介:陈丹萍, 女, 硕士研究生 研究方向: 纳米制剂及缓控释制剂的研究 * 通讯作者: 索绪斌, 男, 副教授, 硕士生导师 研究方向: 纳米制剂及靶向缓控释制剂的研究 Tel: (020) 39352576 E-mail: suoxubin04@163.com; 张涵, 女, 副研究员 研究方向: 中药新药研究 Tel: (020) 39352559 E-mail: zhanghan0108@163.com

仍能保持其形貌和结构^[4-5],而且与 SWCNTs 相比, MWCNTs 毒性更小^[6]及比表面积更大,能够悬浮在含有表面活性剂水溶液中,而且还能够通过表面活性剂包覆形成库仑排斥阻止碳纳米管的再聚集^[7-9]。大豆磷脂是一种天然的两性表面活性剂,以胶束、半胶束或者物理吸附的方式通过疏水基团以非共价的方式与碳纳米管表面结合,其亲水基团处于结构最外层形成水化层,降低表面张力,通过静电或者空间效应克服碳纳米管间的范德华力实现碳纳米管的分散。

紫杉醇(paclitaxel, PTX)是一种常见的二萜类抗癌化合物,1971年,Wani等^[10]从太平洋紫杉(短叶红豆杉)中分离而得,对多种实体肿瘤表现出显著的抗肿瘤活性。本实验先在超声条件下使 PTX 吸附于碳纳米管并初步形成复合物,然后用磷脂作为表面活性剂,利用其疏水端以非共价键结合的方式,吸附或缠绕至碳纳米管表面,亲水端则暴露在液体中,增加 PTX-MWCNTs-COOH 在液体中的分散性,考察其载药量、包封率及体外释药情况,为以 MWCNTs 作为药物载体的进一步研究提供借鉴^[11]。

1 实验材料

1.1 仪器

SCL-10AVP 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);Platisil-ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 迪马科技有限公司);梅特勒-托利多 ME204 分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);超声波细胞粉碎仪 JY9-IIIN(上海沪析实业有限公司);KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);贝克曼库尔特 Delsa Nano Zeta 电位/纳米粒度分析仪(贝克曼库尔特商贸有限公司);JEM-2100F 场发射透射电子显微镜(日本电子株式会社);DSC4000 综合热分析仪(Perkin Elmer 公司);pHS-3C 型精密 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);ATS T001 挤出仪[安拓思纳米技术(苏州)有限公司],TD6 医用离心机(湖南平凡科技有限公司)。

1.2 药品和试剂

短管 MWCNTs-COOH(直径约 4~6 nm,长度 0.5~2 μm,中国科学院成都有机化学有限公司,纯度>98%);紫杉醇原料药(海南紫杉园制药有限公司,批号 141001,纯度>99.0%);大豆磷脂(批号 121001,上海金伴药业有限公司);甲醇为色谱纯,

其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 短管多壁碳纳米管的氧化纯化

取 2 g MWCNTs-COOH 于圆底烧瓶,加入 60 mL 体积比为 1:3 的浓硝酸和浓硫酸混合液,磁力搅拌,60℃回流 6 h,用大量超纯水稀释,抽滤,反复用超纯水洗涤沉淀至中性,于 50℃烘箱中干燥,收集备用。

2.2 PTX-MWCNTs-COOH 的制备

精密称取处方量 MWCNTs-COOH、PTX 于小烧杯中,加入少量无水乙醇,边超声边缓慢滴加超纯水,探头超声 30 min(工作时间 5 s,间隔 3 s,功率为 150 W),再经 100 K 超滤离心管 12 000 r·min⁻¹离心,弃去清液,管内固体转移至小烧杯中,加入处方量磷脂及超纯水,探头超声 30 min(工作时间 5 s,间隔 3 s,功率为 150 W),得到 PTX-MWCNTs-COOH 分散液,于 4℃中保存备用。取 PTX-MWCNTs-COOH 分散液 0.5 mL,加入流动相 2.0 mL,超声溶解,离心取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得样品溶液。

空白对照 MWCNTs-COOH 分散液的制备除不加紫杉醇外,其余步骤与 PTX-MWCNTs-COOH 的制备相同。取空白对照 MWCNTs 分散液 0.5 mL,加入流动相 2.0 mL,超声溶解,离心取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得空白对照溶液。

2.3 PTX-MWCNTs-COOH 的含量测定及方法学考察

2.3.1 色谱条件^[12] 色谱柱:Platisil-ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(含 0.1% 三乙胺和 0.67% 冰乙酸)(80:20, V/V);流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:227 nm;柱温:室温;进样量:20 μL。

2.3.2 对照品溶液的制备及线性关系考察 精密称定 PTX 对照品 2 mg,置于 10 mL 量瓶中,加入流动相制成 0.2 mg·mL⁻¹的溶液,即得对照品储备液。精密吸取对照品储备液,配制质量浓度为 0.5, 2, 6, 12, 20, 40, 80, 200 μg·mL⁻¹的对照溶液,摇匀,分别按“2.2.1”项下色谱条件进样检测,记录峰面积;以峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(ρ)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 10\,288\rho + 27\,619$ ($r = 0.999\,3$),线性范围为 0.5~200 μg·mL⁻¹。

2.3.3 专属性、稳定性、精密度考察 分别对空白对照溶液、对照品溶液及样品溶液进样分析,分别记

录 HPLC 图(图 1),结果表明,在该色谱条件下,专属性良好。将质量浓度为 6,20 和 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PTX 对照品溶液,于 1 d 重复进样 5 次,连续进样 5 d,结果日内峰面积 RSD 分别为 0.87%、1.37% 和 0.79%,日间精密度峰面积 RSD 分别为 1.84%、1.51% 和 1.54%,表明仪器精密度良好。取 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液,分别于放置 0,2,4,8,16,24 h 时进样测定,结果对照品溶液峰面积的 RSD 为 1.91%,表明对照品溶液 24 h 内稳定性良好,能满足测定需要。

2.4 PTX-MWCNTs-COOH 载药量及包封率的测定

2.4.1 滤膜分离法的考察^[13] 精密吸取 1 mL PTX-MWCNTs-COOH 分散液,加入 1 mg 药物,经超声处理后挤过 5 μm 微孔滤膜;另取 PTX-MWCNTs-COOH 分散液 1 mL 经超声处理后挤过 5 μm 微孔滤膜,吸取两者续滤液适量,加入适量流动相稀释后经 HPLC 测定其中药物含量。加样后药物与加样前药物质量之比为 99.23%、98.28 和 100.19%;平均值为 $(99.24 \pm 0.96)\%$ ($n=3$)。结果说明增加的游离药物基本被 5 μm 滤膜截留,证明滤膜法能有效分离未吸附在 MWCNTs-COOH 的游离药物与复合物。

2.4.2 滤膜法测定载药量^[14] 精密吸取制备好的 PTX-MWCNTs-COOH 分散液以及过 5 μm 微孔滤膜后的溶液,加入液相流动相超声后,离心取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液进样,按含量测定方法进行测定,记录峰面积,代入回归方程计算载药量。

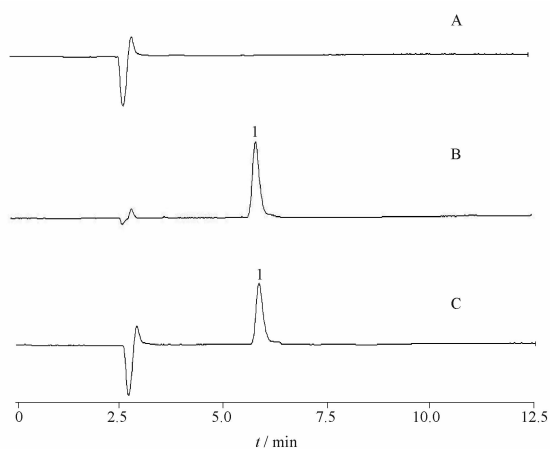


图 1 空白对照溶液(A),对照品溶液(B)和紫杉醇样品溶液(C)的 HPLC 色谱图

1 - 紫杉醇

Fig. 1 HPLC Chromatography of blank control solution (A), reference substance solution (B) and paclitaxel sample solution (C)

1 - paclitaxel

结果显示,PTX-MWCNTs-COOH 复合物载药量(drug loading, DL)为 $(50.09 \pm 0.02)\%$ ($n=3$)。

$$\text{DL}\% = \frac{W_0}{W_1} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中 W_0 为吸附至碳管上的药物总质量, W_1 为 MWCNTs-COOH 的总质量。

2.4.3 葡聚糖凝胶 G-50 微柱对空白对照 MWCNTs-COOH 的吸附作用 葡聚糖 G-50 用蒸馏水浸泡充分溶胀后填充于 5 mL 注射器中(填充柱高约 5 cm),2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 2 min 除去多余水分即得微柱。取空白对照 MWCNTs-COOH 0.5 mL 滴加到柱中心,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 1 min 使其进入柱内,加 2 mL 超纯水 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 3 min 收集离心液,再补加 2 mL 超纯水 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 3 min,收集离心液合并,用水定容至 10 mL,于 251 nm 处测定上柱前后空白对照 MWCNTs-COOH 的吸光度,考察葡聚糖 G-50 对空白对照 MWCNTs-COOH 的吸附情况,结果 3 次测定上柱后与上柱前空白对照 MWCNTs-COOH 的吸光度比值分别为 99.09%、98.66% 和 99.38%;平均值为 $(99.04 \pm 0.01)\%$ ($n=3$)。表明葡聚糖凝胶 G-50 微柱对空白对照 MWCNTs-COOH 基本无吸附。

2.4.4 葡聚糖凝胶 G-50 微柱对紫杉醇的吸附作用^[15] 精密量取紫杉醇乙醇储备液适量加入空白对照 MWCNTs-COOH 中(药物终质量浓度为 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。取 0.5 mL 滴加到柱中心,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 1 min 使其进入柱内,加 2 mL 超纯水 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 3 min 收集离心液,再补加 2 mL 超纯水 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 3 min,收集离心液合并,用流动相定容至 10 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液进液相检测 3 次,上样后游离药物与上样前的药物质量之比分别为 0.47%、0.42% 和 0.53%;平均值为 $(0.47 \pm 0.01)\%$ ($n=3$)。表明葡聚糖凝胶 G-50 基本上能将游离药物吸附截留。

2.4.5 微柱离心法测包封率 精密量取 PTX-MWCNTs-COOH 分散液 0.5 mL 滴加到柱中心,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 1 min 使其进入柱内,加 2 mL 超纯水 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 3 min 收集离心液,再补加 2 mL 超纯水 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 3 min,收集离心液合并,用流动相定容至 10 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液进样计算被包封药物含量;精密量取未过柱的 PTX-MWCNTs-COOH 分散液 0.5 mL,用流动相定容至 10 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液进样计算复合物药物总含量,并计算包封率。

结果显示, PTX-MWCNTs-COOH 复合物包封率 (entrapment efficiency, EE%) 为 $(76.80 \pm 0.02)\%$ ($n=3$)。

$$EE\% = \frac{W_{\text{分}}}{W_{\text{总}}} \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中 $W_{\text{分}}$ 为经过微柱分离后的药物含量, $W_{\text{总}}$ 为复合物总的药物含量。

2.5 PTX-MWCNTs-COOH 的表征

2.5.1 Zeta 电位与粒径分布 取稀释适当倍数后的 PTX-MWCNTs-COOH 分散液适量, 用激光粒径仪测定载药体系的 Zeta 电位与粒径 ($n=3$) (图 2, 3), 结果表明, Zeta 电位为 $(-24.5 \pm 1.01) \text{ mV}$, 粒径为 $(243.9 \pm 41.64) \text{ nm}$, PDI 为 (0.273 ± 0.02) 。

2.5.2 差示扫描分析 取 PTX、MWCNTs-COOH、冷冻干燥后的空白磷脂 MWCNTs-COOH、PTX-MWCNTs-COOH 复合物适量, 采用差式热扫描分析 (DSC), 以空铝坩埚为参比池, 升温范围 $40.0 \sim 300.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 升温速度 $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 测定载气为氮气, 对样品进行扫描, 结果见图 4。结果显示, PTX 在 $216.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 处出现相变峰, 空白磷脂 MWCNTs-COOH 在 $120.0 \sim 180.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 有吸热峰, 而 PTX-MWCNTs-COOH 复合物在 $120.0 \sim 180.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 有吸热峰,

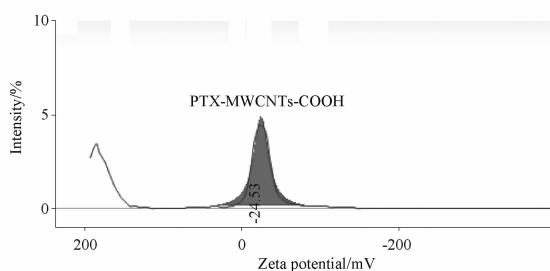


图 2 PTX-MWCNTs-COOH 电位图

Fig. 2 Zeta potential of PTX-MWCNTs-COOH

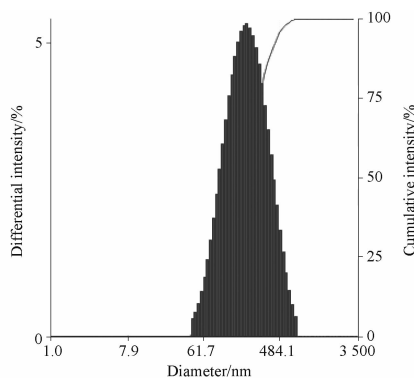


图 3 PTX-MWCNTs-COOH 粒径分布图

Fig. 3 Particle of PTX-MWCNTs-COOH

而 PTX 相变峰消失, 说明 PTX 被 MWCNTs-COOH 吸附后, 不是以晶体存在, 可能以无定型或者分子状态存在。

2.5.3 透射电镜检测 分别将 MWCNTs-COOH 与 PTX-MWCNTs-COOH 复合物分散成适当浓度, 采用透射电子显微镜观察载药体系的形貌和结构特征, 结果见图 5。从图 5 中可以看出, MWCNTs-COOH 呈丝状束状分布, 空心管壁较薄, 而 PTX-MWCNTs-COOH 复合物的空心管外层管壁变厚, 这是由于包覆 MWCNTs-COOH 的磷脂与 PTX 所致。说明 PTX 已经装载在 MWCNTs-COOH 上。

2.6 PTX-MWCNTs-COOH 的体外释药性能

采用反相透析法^[16]对 PTX-MWCNTs-COOH 及 PTX 溶液 (溶剂为无水乙醇-蓖麻油 = 1:1) 的体外释放动力学进行考察。以 250 mL 含 1% 聚山梨酯的 pH 7.4 PBS 溶液为释放介质, 于 $(37 \pm 0.5) \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温,

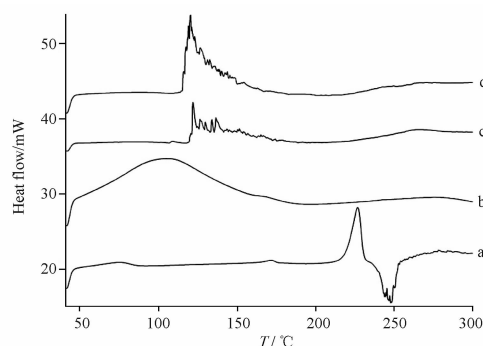


图 4 各样品差示扫描量热分析图

a - 紫杉醇; b - MWCNTs-COOH; c - 空白磷脂 MWCNTs-COOH; d - 羧基化多壁碳纳米管-紫杉醇复合物

Fig. 4 Analysis of differential scanning calorimetry

a - PTX; b - MWCNTs-COOH; c - blank phospholipids MWCNTs-COOH; d - PTX-MWCNTs-COOH

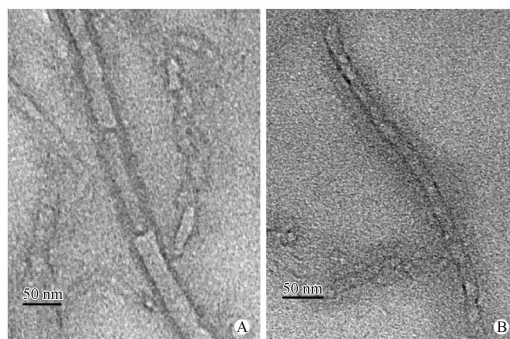


图 5 不同样品扫描电镜图 ($\times 100\ 000$)

A - MWCNTs-COOH; B - PTX-MWCNTs-COOH

Fig. 5 Scanning electron micrographs ($\times 100\ 000$)

A - MWCNTs-COOH; B - PTX-MWCNTs-COOH

将装有 1 mL 释放介质的大小形状相同的 10 个透析袋完全浸入释放介质中平衡饱和 24 h。然后向释放介质中直接加入 3 mL PTX-MWCNTs-COOH 或 PTX 溶液。转速 $100\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下搅拌, 分别于 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60 h 定时各取出 1 个透析袋, 同时补充 1 mL 同温度释放介质。将各取样点样品过滤处理后采用 HPLC 进样分析, 计算浓度, 求得累积释放百分率 (Q), 绘制释放曲线, 结果见图 6。PTX-MWCNTs-COOH 相对于 PTX 溶液的释放速度及程度有所提高, 在 12 h 前属于慢速释放阶段, 可能是吸附于碳纳米管表面的药物释放阶段, 12 h 时累积释放 30.01%, 12 至 24 h 药物释放相应加快, 而后由于膜内外浓度梯度较小从而进入慢速释放。

$$Q\% = \rho_t / \rho_0 \times 100\% \quad (3)$$

式(3)中 ρ_t 为各时间点累积释放的药物浓度, ρ_0 为介质中药物总浓度。

将释放数据分布以零级、一级、Higuchi 和 Ritger-Peppas 方程进行拟合, 结果见表 1。PTX-MWCNTs-COOH 的释药曲线最接近 Higuchi 方程: $Q = 0.163\ 7t^{1/2} - 0.183\ 2$ ($r = 0.982\ 6$)。PTX 的释放曲线最接近 Ritger-Peppas 方程: $\ln Q = 1.157\ 9\ln t - 4.640\ 9$ ($r = 0.976\ 4$)。

3 讨论

3.1 关于碳纳米管包封率的测定, 有很多文献使用超滤管或超滤头进行游离药物的分离, 但是超滤法一般适合于水溶性药物, 脂溶性药物在水中易形成较大的微晶, 从而吸附在超滤膜上, 影响包封率测定结果。微柱离心法一方面可以通过葡聚糖凝胶的分子筛作用将包封药物与游离药物进行分离, 另一方面还可以利用离心力加速分离作用, 减少对样品的稀释程度。本实验利用这种方法结合 HPLC 建立测定 PTX-MWCNTs-COOH 包封率的方法, 该方法精密度和回收率均符合要求。MWCNTs 的紫外光谱主

吸收带在 190 ~ 250 nm; 最大吸收峰位于 190 ~ 207 nm^[17], 将 MWCNTs-COOH 水溶液在 200 ~ 400 nm 波长范围进行紫外扫描, 相比 MWCNTs 的特征吸收峰, MWCNTs-COOH 在 251 nm 处出现最大吸收, 这主要是氧化后的碳纳米管上引入了羰基、羧基等不饱和基团, 使得吸收峰向短波长移动, 发生蓝移现象^[18]。故本实验选择 251 nm 作为检测波长测定空白对照 MWCNTs-COOH 的回收率。

3.2 对于脂溶性强的药物, 未吸附在碳管上的游离药物绝大多数均以微晶状态存在, 通过加药测游离回收率的方法进行分离效果考察, 发现 PTX 含量并未增加(游离加样回收率 < 2%), 说明未吸附在碳管上的游离药物粒径较大, 可被 5 μm 微孔滤膜截留, 另外由于短管 MWCNTs-COOH 长度 0.5 ~ 2 μm , 可透过 5 μm 微孔滤膜。结果表明, 滤膜法可有效分离未吸附在碳管上的游离药物, 基本不影响 PTX-MWCNTs-COOH 复合物载药量的测定。

3.3 纳米制剂溶液的体外释药试验通常采用正相透析法。本实验首先采用正相透析法, 但能检测到的浓度极小, 可能是由于 PTX-MWCNTs-COOH 溶液与相当少量的释放介质接触, 透析袋内外的药物浓度梯度较小, 导致释放较慢。反相透析法则是将

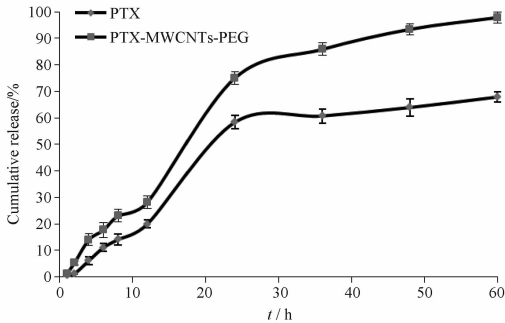


图 6 PTX-MWCNTs-COOH 的体外释放曲线. $n = 3, \bar{x} \pm s$
Fig. 6 Release curve of PTX-MWCNTs-COOH *in vitro*. $n = 3, \bar{x} \pm s$

表 1 PTX-MWCNTs-COOH 体外释药拟合方程. $n = 3$

Tab. 1 The fitting equation of PTX-MWCNTs-COOH release *in vitro*. $n = 3$

Sample	Model	Equation	r
PTX solution	Zero-order	$Q = 0.012\ 7t + 0.050\ 4$	0.938 9
	First-order	$\ln(1 - Q) = -0.000\ 1t + 4.604\ 7$	0.939 0
	Higuchi	$Q = 0.116\ 1t^{1/2} - 0.144\ 5$	0.971 3
	Ritger-Peppas	$\ln Q = 1.157\ 9\ln t - 4.640\ 9$	0.976 4
PTX-MWCNTs-COOH	Zero-order	$Q = 0.018t + 0.089\ 8$	0.954 8
	First-order	$\ln(1 - Q) = -0.000\ 2t + 4.604\ 3$	0.955 0
	Higuchi	$Q = 0.163\ 7t^{1/2} - 0.183\ 2$	0.982 6
	Ritger-Peppas	$\ln Q = 0.597\ 1\ln t + 2.678\ 8$	0.961 5

PTX-MWCNTs-COOH 溶液直接加入大量释放介质中,药物的释放不受到界面膜的控制,仅受到碳纳米管与新的外水相之间的真实浓度梯度控制^[19],所以能较好且快速地考察 PTX-MWCNTs-COOH 的体外释药行为。本实验中 PTX-MWCNTs-COOH 释药曲线最符合 Higuchi 方程,初步表明其释药行为可能是由于碳纳米管表面所吸附的 PTX 先溶解然后扩散到碳纳米管外接触释放介质,这种过程在制剂内部和释放介质中不断进行,说明 PTX-MWCNTs-COOH 有缓释作用。而 PTX 溶液也存在释放曲线,其体外释放最接近 Ritger-Peppas 方程,可能是因为溶解在蓖麻油与无水乙醇的 PTX 直接加入释放介质中后,存在溶剂转换过程,PTX 会首先析出再以扩散的方式进入样品收集透析袋中,从而显现出药物的释放曲线,同时 PTX 的释药行为受扩散速率的控制。

3.4 碳纳米管因其具有较高的比表面积,较强的穿透细胞膜能力等特点,可作为高效率的药物载体。其固有的稳定性和结构柔性可以延长碳纳米管-药物复合物的体内循环时间,提高药物的生物利用度。但作为药物载体的碳纳米管细胞毒性及生物相容性试验,还需要进行深入系统地研究以探讨其生物安全性。

REFERENCES

- [1] IJIMA S. Helical microtubules of graphitic carbon[J]. *Nature*, 1991,354(6348):56-58.
- [2] BIANCO A. Carbon nanotubes for the delivery of therapeutic molecules[J]. *Expert Opin Drug Deliv*,2004,1(1):57-65.
- [3] PRATO M, KOSTARELOS K, BIANCO A, *et al.* Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery[J]. *Acc Chem Res*, 2008,41(1):60-68.
- [4] LI Y H, CAO J M. The impact of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) on macrophages: contribution of MWCNT characteristics [J]. *Sci China Life Sci*, 2018,61(11):1333-1351.
- [5] ZHU L P, LIAO G. H, HUANG W Y, *et al.* Preparation, characterization and photocatalytic properties of ZnO-coated multi-walled carbon nanotubes[J]. *Mater Sci Eng: B*, 2009,163(3):194-198.
- [6] TRAN H V, PIRO B, REISBERG S, *et al.* Label-free and reagentless electrochemical detection of microRNAs using a conducting polymer nanostructured by carbon nanotubes: application to prostate cancer biomarker miR-141[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013,49:164-169.
- [7] PARK E J, HONG S, PARK D W, *et al.* Preparation of conductive PTFE nanocomposite containing multiwalled carbon nanotube via latex heterocoagulation approach[J]. *Colloid Polymer Sci*, 2009,288(1):47-53.
- [8] ZIYATDINOVA G K, ROMASHKINA S A, ZIGANSHINA E R, *et al.* Voltammetric determinations of thymol on an electrode modified by coimmobilized carboxylated multiwalled carbon nanotubes and surfactants[J]. *J Anal Chem*, 2018,73(1):63-70.
- [9] ISLAM M F, ROJAS E, BERGEY D M, *et al.* High weight fraction surfactant solubilization of single-wall carbon nanotubes in water[J]. *Nano Lett*,2003,3(2):269-273.
- [10] ADAMS J D, FLORA K P, GOLDSPIEL B R, *et al.* Taxol: a history of pharmaceutical development and current pharmaceutical concerns [J]. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 1993, (15):141-147.
- [11] ZHANG Y Y, FU X D, LIU K D, *et al.* Preparation and tumor targeting of NGR-SWCNTs-paclitaxel[J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*,2013,48(20):1748-1754.
- [12] YOU Y Y, SUO X B, YUE J J, *et al.* Determination of entrapment efficiency of liposomal paclitaxel by RP-HPLC[J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*,2017,37(3):535-539.
- [13] KE X, WANG C J, YAN F. Filtration by microspore film for determination of the entrapment efficiency of docetaxel liposomes [J]. *Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学)*,2008,25(4):314-316.
- [14] ZHOU M, PENG Z, LIAO S, *et al.* Synthesis of folate-decorated carbon nanotubes and its irinotecan release[J]. *J Funct Poly (功能高分子学报)*,2012,25(4):397-403.
- [15] GAO X F, DENG Y J, CAO J N, *et al.* Minicolumn centrifugation-HPLC determination of entrapment efficiency for liposomal formulation of altretamine[J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*,2009,29(2):247-249.
- [16] LIU D, LI S B, BAO J, *et al.* Preparation, *in vitro* release and pharmacokinetics of paclitaxel lipid nanoparticles for intravenous [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*,2009,44(17):1320-1326.
- [17] WU H B, LUO S, QIN D H. Characteristics of ultraviolet spectrum of multi-walled carbon nanotubes in water dispersion system and its application[J]. *New Chem Mater (化工新型材料)*, 2014,42(5):216-218.
- [18] CHENG J. Hydrophilic modification multi-walled carbon nanotubes[D]. Tianjin:Tianjin University,2014.
- [19] LEVY M Y, BENITA S. Drug release from submicronized O/W emulsion: a new *in vitro* kinetic evaluation model [J]. *Int J Pharm*,1990,66(1-3):29-37.

(收稿日期:2018-07-08)