

· 药物制剂与药品质量控制 ·

冬凌草甲素-单壁碳纳米管 载药体系的制备及其吸附动力学*

刘晓红, 郭波红, 许丹翹, 邱焕然, 易军

(广东药科大学药学院, 广州 510006)

摘要 目的 探讨冬凌草甲素-单壁碳纳米管载药体系的制备方法及其吸附动力学特征。方法 采用溶液共混法制备冬凌草甲素-单壁碳纳米管载药系统,并用激光粒径仪、电镜、红外光谱、差示扫描量热仪(DSC)、X射线衍射等对其进行表征,进行吸附动力学的研究。结果 冬凌草甲素-单壁碳纳米管载药体系的包封率为 $(70.23 \pm 2.1)\%$,载药量为 $(27.29 \pm 1.2)\%$,Zeta电位为 (-34.29 ± 1.2) mV,平均粒径为 (458 ± 18) nm,冬凌草甲素在羧基化单壁碳纳米管(SWCNTs-COOH)表面的吸附符合准二级动力学吸附模式。结论 冬凌草甲素-单壁碳纳米管载药体系制备工艺简单,储存稳定性好,载药量和包封率高。

关键词 冬凌草甲素;单壁碳纳米管;动力学;吸附

中图分类号 R943

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)10-1170-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.10.020

Preparation of Oridonin-Single-Walled Carbon Nanotubes and Study on Its Adsorption Kinetics

LIU Xiaohong, GUO Bohong, XU Danqiao, QIU Huanran, YI Jun (School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT Objective To investigate the method for preparing oridonin-single-walled carbon nanotubes (ORI-SWCNTs) nanocomposite and study its adsorption kinetics. **Methods** ORI-SWCNTs nanocomposite was prepared by using the method of solution mixing. The synthesized ORI-SWCNTs nanocomposite was characterized by using Laser particle size analyzer, Fourier transform infrared, DSC analysis, powder X-ray diffraction and electron microscopy techniques. **Results** The encapsulation efficiency and loading capacity of ORI in SWCNTs-COOH nanocarrier was estimated to be about $(70.23 \pm 2.1)\%$ and $(27.29 \pm 1.2)\%$, respectively. The Zeta potential was (-34.29 ± 1.2) mV, particle size was about (458 ± 18) nm. The absorption of ORI on SWCNTs-COOH could be explained by pseudo-second-order model. **Conclusion** The established preparation process of ORI-SWCNTs nanocomposite by solution mixing is feasible, with higher loading efficiency and encapsulate efficiency..

KEY WORDS Oridonin; Single-walled carbon nanotubes; Kinetics, adsorption

冬凌草甲素(oridonin, ORI)为唇形科香茶菜属植物冬凌草的主要抗癌有效成分,抗癌谱较广,可通过多种途径诱导癌细胞凋亡,对人肝癌 BEL-7402 细胞、人白血病 HL-60 细胞、食管癌 CaES-17 细胞及结肠癌 HCT8 细胞等均有明显细胞毒作用^[1-3]。然而由于其水溶性差、生物利用度低等原因^[4],其临床应用一直受到限制。因此,寻找合适的药物载体,对于提高 ORI 的生物利用度具有重要的意义。碳纳米管(carbon

nanotubes, CNTs)是一种新型纳米碳材料,分为单壁碳纳米管(single-walled carbon nanotubes, SWCNTs)和多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs)。SWCNTs 是纳米制剂中性能较优越的一种,为单层中空小管,直径 1~2 nm,它所有原子都暴露在表面上,具有非常大的表面积,可有效的沿碳纳米管侧壁装载多个分子,且研究表明,SWCNTs 有较强的跨膜能力,能够被动穿过多种细胞膜,而且 SWCNTs 表面含有 sp^2 杂化的碳原子,能够通过 $\pi-\pi$ 堆积作用与生物分子、药物小分子相结合,因此 SWCNTs 广泛被用作基因转运体、靶向给药等^[5-9]。笔者在本研究以 SWCNTs 装载 ORI 有望提高 ORI 的水溶性,为 SWCNTs 作为 ORI 转运载体提供一定的理论基础。报道如下。

1 材料与仪器

1.1 仪器 NEXUS FT-IR 型傅里叶变换红外测定仪

收稿日期 2016-09-09 修回日期 2016-11-30

基金项目 * 国家自然科学基金资助项目(81403111)

作者简介 刘晓红(1993-),女,江西萍乡人,在读硕士,从事药物制剂研究。E-mail:752019150@qq.com。

通信作者 郭波红(1976-),女,湖南长沙人,副教授,从事药物制剂研究工作。电话:020-39352117, E-mail:bohong-g@163.com。

(美国 Thermo Nicolet 公司); SCIENTZ-II D 超声波细胞粉碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); DSC-60 差示热扫描量热仪(日本岛津公司); Smart 1000 CCD 型 X-射线单晶衍射仪(德国 Bruker 公司); JEM-1400 高衬度透射电子显微镜(日本电子公司); 1430VP 扫描电镜(德国 LEO 公司); Delsa Nano S 粒度分析仪(美国 Beckman 公司); PKZ-1 电热恒温振荡水槽(上海精密实验设备有限公司); 752 紫外-可见分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); SZCL-2 型数显智能控温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司); H/T18MM 台式高速离心机(湖北赫西仪器装备有限公司); Sartorius BS110S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司, 感量: 0.1 mg)。

1.2 药品与试剂 ORI(西安旭煌生物科技有限公司, 批号: 110914, 含量 $\geq 98\%$); 单壁碳纳米管(SWCNTs, 直径 1~2 nm, 长度 5~30 μm , 含量 $>95\%$, 中国科学院成都有机化学有限公司); 水为纯化水, 其余试剂为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 SWCNTs 的酸处理 称取 SWCNTs 0.8 g 置于锥形瓶中, 加入混合酸(硫酸-硝酸 = 3 : 1) 160 mL 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下超声 4 h, 冷却至室温, 加入大量去离子水稀释, 滤过, 洗至中性, 将残渣于 65 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 24 h, 即得 SWCNTs-COOH^[10]。

2.2 冬凌草甲素-单壁碳纳米管(ORI-SWCNTs) 载药体系的制备 称取处方量的 ORI, 溶于适量甲醇-水(1 : 1)中, 加入处方量的 SWCNTs 中(ORI 与 SWCNTs 的重量比为 1 : 1), 经细胞破碎仪探头超声(超声功率 400 W, 工作时间 3 s, 间隔 6 s, 超声时间 15 min), 将上述溶液置于离心管中, 以 11 000 $\times g$ 离心 10 min, 弃去上清液, 将沉淀用甲醇洗涤 3 次, 置真空干燥箱中 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘干, 得到 ORI-SWCNTs 固体^[11]。

2.3 ORI-SWCNTs 载药体系的载药性能测定 用分光光度计对 ORI 溶液进行全谱扫描, 发现 ORI 在 238 nm 处出现吸收峰(SWCNTs-COOH 溶液在此波长处无吸收)。通过测量不同已知浓度 ORI 溶液在 238 nm 处吸光度值, 以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 线性回归得标准曲线为: $Y = 0.023\ 46X + 0.034\ 82$ ($r = 0.999\ 5$), 表明 ORI 溶液浓度与吸光度间线性关系良好。测定“2.2”项中上清液浓度和洗涤后甲醇溶液的吸光度值, 根据标准曲线计算得未被包封 ORI 的质量, 按下式计算 SWCNTs-COOH 装载 ORI 的包封率与载药量。包封率(%) = (ORI 质量 - 未被包封 ORI 质量) / ORI 总质量 $\times 100\%$; 载药量(%) = (ORI 总质

量 - 未被包封 ORI 总质量) / 载药系统总质量 $\times 100\%$ 。结果 ORI-SWCNTs 复合物包封率为 $(70.23 \pm 2.10)\%$, 载药量为 $(27.29 \pm 1.20)\%$ 。

2.4 测试与表征

2.4.1 粒径和 Zeta 电位测定 用激光粒径仪测定载药体系的粒径和 Zeta 电位。结果粒径为 $(458 \pm 18)\text{nm}$, 多分散系数 PDI 为 (0.289 ± 0.020) , Zeta 电位为 $(-34.29 \pm 1.20)\text{mV}$, 这是因为碳纳米管表面带有羧基而呈现负电性, 见图 1。

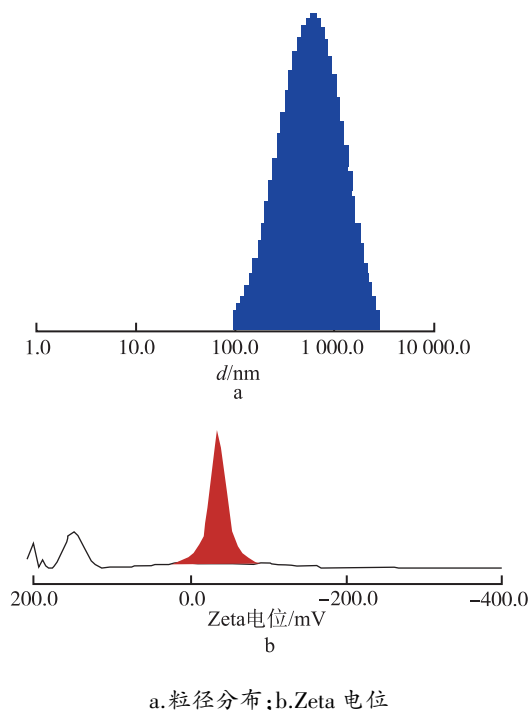


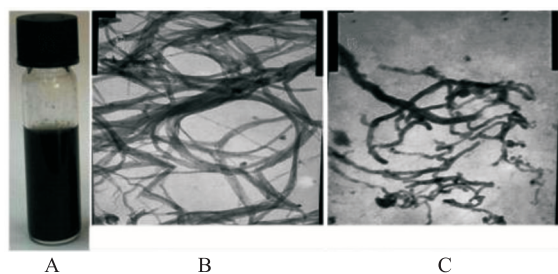
图 1 ORI-SWCNTs 载药体系的粒径分布和 Zeta 电位图
a. particle size distribution; b. Zeta potential

Fig. 1 Image of particle size distribution and Zeta potential of ORI-SWCNTs

2.4.2 形态分析 将 ORI-SWCNTs 载药体系用水分散成适当浓度, 摄像。采用扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜(TEM)观察载药体系的形貌和结构特征, 结果见图 2。ORI-SWCNTs 载药体系溶液分散均匀, 放置 1 个月无沉淀现象。从图 2 中可以看出, SWCNTs-COOH 呈丝状束状分布, 管壁较薄而且光滑, 装载 ORI 后的碳纳米管, 碳纳米管仍然是管状结构, 但是碳纳米管的空心管外层局部包覆或内部装载了药物, 遮挡透明的管芯, 大部分管壁变厚而且表面比较粗糙, 从形貌上证明 ORI 已经装载到 SWCNTs-COOH 上。

从图 3 可以看出, 电镜扫描观察到 SWCNTs-COOH 与透射电镜图类似, 呈丝状束状分布, 装载 ORI

后碳纳米管表面形状发生改变,不再呈丝状束状分布,而是以颗粒团聚状态分布,比 SWCNTs-COOH 呈现更好的分散状态。表明碳纳米管之间存在范德华力,使得碳纳米管团聚在一起。

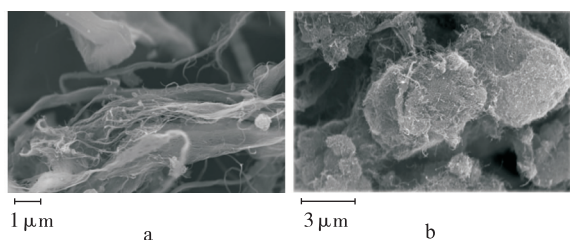


A. 复合物外观照片; B. 单壁碳纳米管; C. 冬凌草甲素-单壁碳纳米管

图2 ORI-SWCNTs 载药体系的外观和透射电镜图

A. appearance of the compound; B. single-walled carbon nanotube; C. oridonin-single-walled carbon nanotube

Fig.2 Appearance and TEM image of ORI-SWCNTs



a. 单壁碳纳米管; b. 冬凌草甲素-单壁碳纳米管

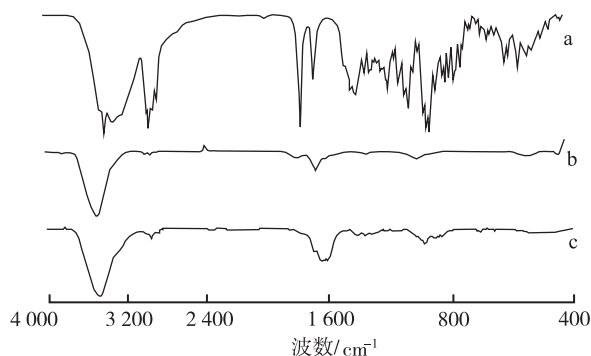
图3 ORI-SWCNTs 载药体系的扫描电镜图

a. single-walled carbon nanotube; b. oridonin-single-walled carbon nanotube

Fig.3 Scanning electron microscope image of ORI-SWCNTs

2.4.3 红外光谱分析 采用傅立叶红外光谱仪 (FTIR) 进行相关基团的定性分析,测试分辨率为 2.0 cm^{-1} ,扫描范围 $4\,000.0 \sim 400.0\text{ cm}^{-1}$,对 ORI、SWCNTs、ORI-SWCNTs 载药体系进行红外光谱分析,结果见图 4。由图 4 可以看出,ORI 的红外光谱图中, $3\,381\text{ cm}^{-1}$ 处是 -OH 伸缩振动峰, $2\,941\text{ cm}^{-1}$ 处是 $-\text{CH}_2$ 的对称伸缩振动吸收峰, $1\,711\text{ cm}^{-1}$ 处是 $-\text{C}=\text{O}$ 的振动吸收峰, $1\,645\text{ cm}^{-1}$ 处为 $-\text{C}=\text{C}$ 的伸缩振动峰, $1\,015\text{ cm}^{-1}$ 是 C-O 的振动吸收峰; SWCNTs-COOH 的红外光谱图中,在 $1\,717\text{ cm}^{-1}$ 和 $3\,436\text{ cm}^{-1}$ 处分别是羧基中 $-\text{C}=\text{O}$ 的特征吸收峰和 -OH 的伸缩振动峰; ORI-SWCNTs 载药体系中可见 $2\,941\text{ cm}^{-1}$ 处是 ORI 中 $-\text{CH}_2$ 的对称伸缩振动吸收峰, $1\,015\text{ cm}^{-1}$ 是 ORI 中 C-O 的

振动吸收峰, $1\,683\text{ cm}^{-1}$ 处是 ORI 和 SWCNTs-COOH 中 $-\text{C}=\text{O}$ 的振动吸收峰合变为一个宽峰,因 ORI-SWCNTs 载药体系已用甲醇洗涤过 3 次,说明 ORI 已成功装载于 SWCNTs-COOH 中。



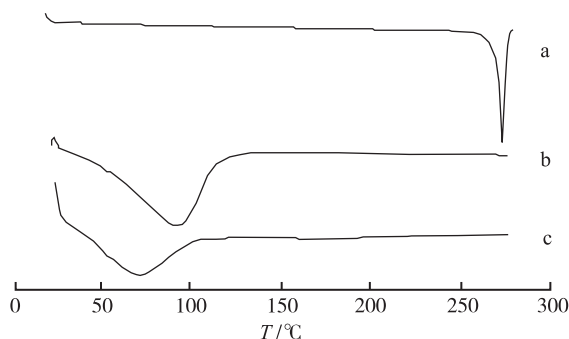
a. 冬凌草甲素; b. 单壁碳纳米管; c. 冬凌草甲素-单壁碳纳米管

图4 ORI-SWCNTs 载药体系的红外图谱

a. oridonin; b. single-walled carbon nanotube; c. oridonin-single-walled carbon nanotube

Fig.4 Infrared spectrogram of ORI-SWCNTs

2.4.4 DSC 结果分析 采用差示扫描量热仪测定载药体系的 DSC 图谱,样品质量 5.0 mg ,升温速率 $10.0\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$,升温范围 $40.0 \sim 300.0\text{ }^{\circ}\text{C}$,气氛 N_2 ,结果见图 5。



a. 冬凌草甲素; b. 单壁碳纳米管; c. 冬凌草甲素-单壁碳纳米管

图5 ORI-SWCNTs 载药体系的 DSC 图

a. oridonin; b. single-walled carbon nanotube; c. oridonin-single-walled carbon nanotube

Fig.5 DSC image of ORI-SWCNTs

ORI 在其熔点 $272.30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 出现尖锐的熔化吸热峰, $\Delta H = 329.899\text{ (J} \cdot \text{g}^{-1})$; 在 ORI-SWCNTs 中未出现该吸热峰; 单壁碳纳米管吸热峰在 $94.14\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta H = 87.208\text{ (J} \cdot \text{g}^{-1})$, ORI-SWCNTs 载药体系中碳纳米管的吸热峰移至 $70.80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta H = 92.154\text{ (J} \cdot \text{g}^{-1})$,表明 ORI

被 SWCNTs 吸附后,不是以晶体形式存在,验证 SWCNTs 对药物的成功装载。

2.4.5 X 射线结果分析 检测条件:Cu 靶 K α 1 射线,电压 40 kV,电流 40 mA,衍射角(2 θ)测定范围:3 $^{\circ}$ ~50 $^{\circ}$,对 ORI、单壁碳纳米管、ORI-SWCNTs 载药体系进行 X-射线衍射分析,结果见图 6。

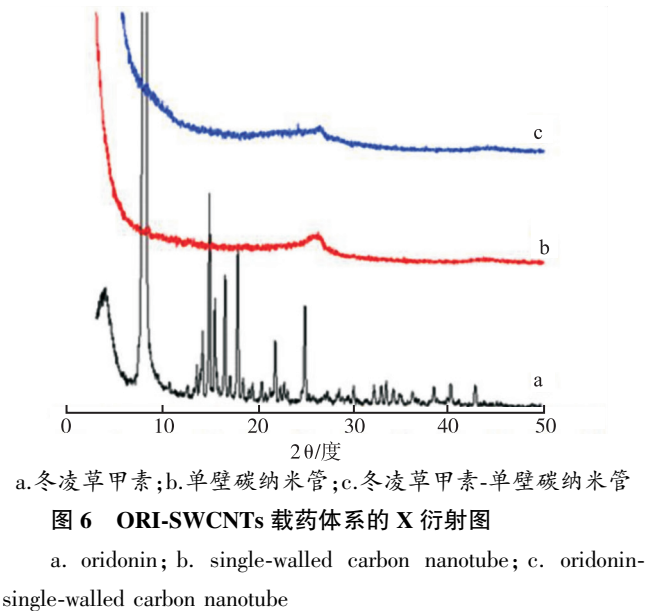


Fig.6 X ray diffraction graph of ORI-SWCNTs

从图 6 可以看出,ORI 为结晶性药物,晶体衍射角为 8.26 $^{\circ}$ 、14.9 $^{\circ}$ 、15.48 $^{\circ}$ 、16.53 $^{\circ}$ 、17.87 $^{\circ}$ 、22.72 $^{\circ}$ 、24.91 $^{\circ}$, ORI-SWCNTs 载药体系在相应位置均无晶体衍射峰,说明 ORI 是以分子状态存在于 SWCNTs 载药体系中。此外,ORI-SWCNTs 载药体系的衍射状态与羧基化 SWCNTs 的状态一致,说明 ORI 的载入并未改变碳纳米管材料的晶体状态。这与文献[12]研究一致。

2.5 吸附动力学研究 称取 SWCNTs-COOH 0.03 g 置于 100 mL 圆底烧瓶中,加入 ORI 溶液(300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 50 mL,25 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温搅拌 4 h,在不同时间取样,离心,取上清液 0.5 mL 置于 5 mL 量瓶中,稀释至刻度,在 238 nm 波长处测定吸光度值,计算其吸附量,见公式(1),并绘制吸附动力学曲线,确定平衡时间和吸附速率等参数。

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t)V}{m} \tag{1}$$

式中, q_t 为 t 时刻 ORI 在 SWCNTs-COOH 上的吸附量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); C_0 和 C_t 分别为 ORI 在吸附前和吸附 t 时刻质量浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); V 为 ORI 溶液的体积(L); m 为 SWCNTs-COOH 的质量(g)。

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{m} \tag{2}$$

式中, q_e 为 ORI 的平衡吸附量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); C_0 为 ORI 在吸附前的质量浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); C_e 为吸附平衡后 ORI 的质量浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); V 为 ORI 溶液的体积(L); m 为 SWCNTs-COOH 的质量(g)。

ORI 在 SWCNTs-COOH 表面的吸附曲线见图 7。从图 7 可见,初始吸附阶段,ORI 在 SWCNTs-COOH 表面吸附速率较快,约 150 min 吸附达到平衡。吸附过程中解吸附现象不明显,可忽略不计。

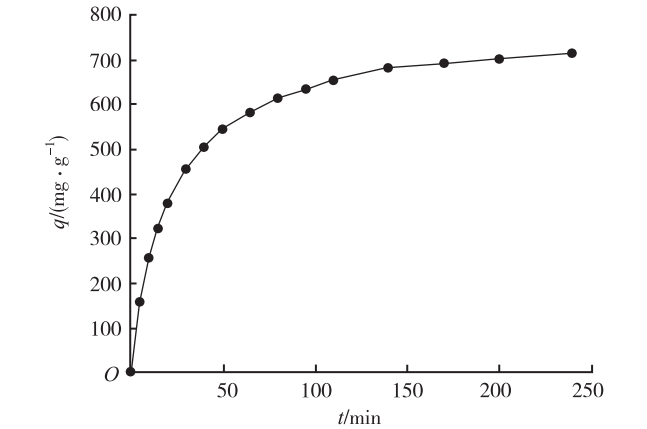


图 7 ORI-SWCNTs 的吸附动力学曲线

Fig.7 Absorption kinetic curve of ORI-SWCNTs

准一级动力学方程和准二级动力学方程是在液相吸附方面应用最为广泛的两个关系式。从两个方程中可以获取回归系数 r 和 q_e 值,用于判断 SWCNTs-COOH 的吸附动力学模式。准一级动力学方程式^[13]可以表示为:

$$\lg(q_e - q_t) = \lg q_e - \frac{k_1}{2.303}t \tag{3}$$

准二级动力学方程式^[14]如下:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e}t \tag{4}$$

式(3)和(4)中, q_e 和 q_t ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)分别为平衡时间和 t 时间(min)的吸附量, k_1 和 k_2 分别为准一级和准二级吸附速率常数。

以 $\lg(q_e - q_t)$ 对 t 作曲线,结果为非直线,表明 ORI 在 SWCNTs-COOH 表面的吸附不符合准一级动力学,化学吸附在该吸附过程中有一定的作用^[15-16]。ORI 在 SWCNTs-COOH 上的准二级吸附动力学曲线见图 8,准二级吸附线性方程为 $Y = 0.000\,92X + 0.023\,61$, $k_2 = 7.47 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $q_e = 757.58 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,

$r=0.9978$ 。 r 值接近于 1, 获取 q_e 值与实验所测值接近, 这表明 ORI 在 SWCNTs-COOH 表面的吸附符合准二级动力学吸附模式。

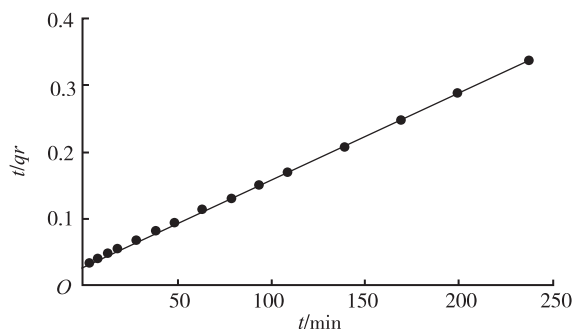


图 8 ORI-SWCNTs 的准二级吸附动力学曲线

Fig. 8 Pseudo-second-order absorption kinetic curve of oridonin-single-walled carbon nanotube

3 讨论

本实验依据溶液共混法原理, 制备 ORI-SWCNTs 载药体系。制备过程中比较磁力搅拌与探头超声对包封率的影响, 结果表明用探头超声制备的碳纳米管复合物包封率高, 另对探头超声功率和次数、药物与碳纳米管的比例等方面对复合物制备进行考察, 结果发现超声功率和次数对载药量影响不大, 药物与碳纳米管的质量比为 1:1 时载药量最高, 最终选择药物与碳纳米管的质量比为 1:1。实验结果表明, 该方法制备的 ORI-SWCNTs 载药体系载药量和包封率高, 粒径大小均匀, Zeta 电位稳定。并用激光粒径仪、电镜、红外光谱、DSC、X 射线衍射等验证 SWCNTs 对 ORI 的成功装载。

碳纳米管具有丰富的纳米空隙结构和巨大的比表面积的特点, 决定碳纳米管优异的吸附能力。SWCNTs-COOH 对 ORI 的吸附能力的研究结果表明: ORI 主要通过 π - π 堆积作用吸附于 SWCNTs-COOH 表面, 且 SWCNTs-COOH 表面基团对其吸附能力存在影响; ORI 在 SWCNTs-COOH 的吸附动力学满足准二级模型, 为进一步研发碳纳米管载药体系提供了有价值的实验基础。

参考文献

- [1] 左海军, 李丹, 吴斌, 等. 冬凌草的化学成分及其抗肿瘤活性[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(4): 258-262.
- [2] CHEN S, GAO J, HALICKA H D, et al. The cytostatic and cytotoxic effects of oridonin (Rubescenine), a diterpenoid from *Rabdosia rubescens*, on tumor cells of different lineage[J]. Int J Oncol, 2005, 26(3): 579-588.
- [3] IKEZOE T, CHEN S S, TONG X J, et al. Oridonin induces growth inhibition and apoptosis of a variety of human cancer

- cells[J]. Int J Oncol, 2003, 23(4): 1187-1193.
- [4] LOU H, ZHANG X, GAO L, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-tumor activity of oridonin nanosuspension[J]. Int J Pharm, 2009, 379(1): 181-186.
- [5] CHEN H L, MA X Y, LI Z, et al. Functionalization of single-walled carbon nanotubes enables efficient intracellular delivery of siRNA targeting MDM2 to inhibit breast cancer cells growth[J]. Biomed Pharmacother, 2012, 66(5): 334-338.
- [6] MENG L J, ZHANG X K, LU Q H, et al. Single walled carbon nanotubes as drug delivery vehicles: targeting doxorubicin to tumors[J]. Biomaterials, 2012, 33(6): 1689-1698.
- [7] WANG L, ZHANG M Y, ZHANG N, et al. Synergistic enhancement of cancer therapy using a combination of docetaxel and photothermal ablation induced by single-walled carbon nanotubes[J]. Int J Nanomedicine, 2011, 6: 2641-2652.
- [8] KAWAGUCHI M, YAMAZAKI J, OHNO J, et al. Preparation and binding study of a complex made of DNA-treated single walled carbon nanotubes and antibody for specific delivery of a "molecular heater" platform[J]. Int J Nanomedicine, 2012, 7: 4363-4372.
- [9] YUAN J F, GAO H C, CHING C B. Comparative protein profile of human hepatoma HepG2 cells treated with graphene and single walled carbon nanotubes: an iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS proteome analysis[J]. Toxicol Lett, 2011, 207(3): 213-221.
- [10] LI C C, LIN J L, HUANG S J, et al. A new and acid-exclusive method for dispersing carbon multi-walled nanotubes in aqueous suspensions[J]. Colloids Surf A, 2007, 297(1): 275-281.
- [11] 张艳艳, 付旭东, 刘康栋, 等. NGR-单壁碳纳米管-紫杉醇复合物的制备及其靶向性研究[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(20): 1748-1754.
- [12] TAN J M, KARTHIVASHAN G, ARULSELVAN P, et al. Characterization and *in vitro* studies of the anticancer effect of oxidized carbon nanotubes functionalized with betulinic acid[J]. Drug Des Devel Ther, 2014, 8: 2333-2343.
- [13] LAGERGREN S. About the theory of so-called adsorption of soluble substances[J]. Kun Sven Vetén Hand, 1898, 24(4): 1-39.
- [14] HO Y S. Adsorption of heavy metals from waste streams by peat[D]. Birmingham: University of Birmingham, 1995.
- [15] HO Y S, MCKAY G. Pseudo-second order model for sorption processes[J]. Process Biochem, 1999, 34(5): 451-465.
- [16] BOPARAI H K, JOSEPH M, O'CARROLL D M. Kinetics and thermodynamics of cadmium ion removal by adsorption onto nano zerovalent iron particles[J]. J Hazard Mater, 2011, 186(1): 458-465.