

羧基化碳纳米管负载羟基喜树碱的制备、 表征及肠吸收特性考察

邓亚利¹, 林芳花², 何秀华¹, 周莉玲^{3*}

(1. 华南农业大学制药工程系, 广州 510642; 2. 惠州学院生命科学系, 广东 惠州 516007;
3. 广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] 目的: 研究羧基化多壁碳纳米管负载羟基喜树碱(HCPT)的制备工艺及负载物(HCPT-MWCNTs-COOH)的肠吸收特性。方法: 比较球磨法、超声法与振荡法的吸附量差异, 选择最优负载法; 负载物采用 FIR, 紫外光谱进行表征, 通过 HPLC 测定其含量; 采用离体外翻肠囊模型研究负载物在不同肠段的吸收特性, HPLC 测定样品质量浓度, 计算吸收速率常数(Ka)。结果: 冷冻球磨法负载量最高(12.5 mg·g⁻¹); 紫外、红外图谱变化表明碳纳米管负载了 HCPT; 肠吸收试验表明随 HCPT 质量浓度上升, 肠吸收速率常数呈线性增加; 高质量浓度在十二指肠、空肠、回肠、结肠的 Ka 分别为 150.9, 92.7, 148.9, 183.0 ng·cm⁻²·h⁻¹, 在各个肠段的 Ka 均无显著性差异。结论: 负载物中 HCPT 溶解性增加并保护了内酯环, 提高了肠透过速率; 在小肠中为被动扩散吸收。

[关键词] 羧基化碳纳米管; 羟基喜树碱; 离体外翻肠囊模型; 肠吸收

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0005-05

Investigation of Preparation, Characterization and *in vitro* Intestinal Absorption Characteristics for Carboxylated Carbon Nanotubes Load Hydroxycamptothecin

DENG Ya-li¹, LIN Fang-hua², HE Xiu-hua¹, ZHOU Li-ling^{3*}

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2. Department of Life Science, Huizhou University, Huizhou 516007, China;
3. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[收稿日期] 20120708(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30672669)

[第一作者] 邓亚利, 博士, 副主任药师, 从事药物新剂型及新技术研究, Tel: 13580399281, E-mail: xiyuandeng@scau.edu.cn

[通讯作者] * 周莉玲, 教授, 博士生导师, E-mail: zhouliling717@sina.com

[参考文献]

- [1] 王宏洁, 刘婷, 梁爱华, 等. 鲜地黄化学成分的分离鉴定及活性作用初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(1): 15.
- [2] 刘彦飞, 赵宇, 武卫红. 地黄的化学成分及其在加工炮制过程中的变化[J]. 国外医药: 植物药分册, 2007, 22(3): 102.
- [3] 江西省中药饮片炮制规范编写组. 江西省中药饮片炮制规范[S]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009: 327.
- [4] 王小平, 王进, 陈建章. 建昌帮与樟树帮、中国药典法炮制的熟地黄中多糖含量比较[J]. 陕西中医, 2009, 30(8): 1066.
- [5] 王小平, 王进, 陈建章. 建昌帮与樟树帮、中国药典法炮制的熟地黄中还原糖含量比较[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1): 90.
- [6] 李博斌, 刘兴泉, 吴坚, 等. 黄酒中糖和无机元素成分与黄酒口味品质的定量关系研究[J]. 中国酿造, 2010, 221(8): 37.

[责任编辑 仝燕]

[Abstract] Objective: To study on preparation process of carboxylated multi-walled carbon nanotubes load hydroxycamptothecin (HCPT) and intestine absorption characteristics of HCPT-MWCNTs-COOH. **Method:** Optimum load method for HCPT-MWCNTs-COOH was selected by comparing adsorption capacity of oscillation method, milling method and ultrasonic method; FIR and UV spectroscopy were used to characterize, the content of it was determined by HPLC; Isolated everted intestine model was used to investigate absorption characteristics in different regions of rat intestine (duodenum, jejunum, ileum, colon), the concentration of samples were determined by HPLC, and calculated absorption rate constant (K_a). **Result:** Ball milling method with frozen had the highest load ($12.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) for preparing HCPT-MWCNTs-COOH; FIR and UV spectroscopy changes showed carbon nanotubes had loaded HCPT. Intestine absorption test showed that K_a increased linearly along with increasing of HCPT concentration; K_a had no significant difference between different regions of intestines, K_a of the high concentration in duodenum, jejunum, ileum, colon were 150.9, 92.7, 148.9, 183.0 $\text{ng} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** Solubility of HCPT and intestine transmission rate in the load were increased and lactone ring was protected; The load in small intestine was passive diffusion absorption.

[Key words] carboxylated carbon nanotubes; hydroxycamptothecin; isolated everted intestine model; intestine absorption

羟基喜树碱(HCPT)是从我国内地特有植物喜树的皮、果实中提取得到生物碱类抗癌药物,对治疗多种恶性肿瘤具有显著疗效^[1]。其是一种黄色粉末或结晶性粉末,不溶于水,极微溶于甲醇和无水乙醇,易溶于稀碱溶液。国内常用剂型为 HCPT 钠盐,其代谢较快,半衰期短;但钠盐注射液不稳定,见光易分解,使疗效下降、不良反应增加。HCPT 剂型研究方向为增加其溶解性,实现对肿瘤组织的靶向性和缓释性,如微球、纳米粒、缓释片等。马氏等^[2]制备羟基喜树碱的环糊精包合物,突破了传统增加溶解度会破坏活性内酯结构这一难题。

碳纳米管中空的圆柱状管体结构,功能化修饰后具有小分子药物、蛋白和基因转运的潜能,使所载生物大分子更容易跨越细胞膜进入细胞核,发挥治疗疾病的作用^[3]。作为一种新型的药物载体,目前比较普遍的载药方法是共价连接和物理吸附。共价连接是利用化学反应使药物连接在碳纳米管上,药物的化学结构发生变化,可能会降低药效甚至出现副作用。物理吸附则是利用碳纳米管大的比表面积优势,先将用生物大分子或极性小分子修饰的碳纳米管分散于溶剂中,同时将载送药物用溶剂溶解后,两者以一定比例混合,放置数小时或数天,挥干溶剂即可。物理吸附可保持药物原有的结构,药物进入人体后也可维持原有的药效,也不会因结构的改变出现不必要的副作用。因此,物理吸附被认为是较为理想的载药方式^[4-5]。

本文以羧基化碳纳米管为载体,负载 HCPT,采用物理吸附法制备负载物,对其进行体外肠吸收试

验,考察负载物吸收速率,预测负载物体内吸收情况,为羧基化碳纳米管作为新型给药载体提供借鉴^[3,6]。

1 材料

600-2998 型高效液相色谱仪(美国 Waters), FA1004N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司), OM-ISP2 型行星式球磨机(南京大学仪器厂), Nicolet 6700 型傅立叶变换红外光谱仪(赛默飞世尔科技公司), UV2300 型紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司), 85-2 型恒温磁力搅拌器(常州奥华仪器有限公司), TL-18M 型台式高速冷冻离心机(上海市离心机械研究所)。

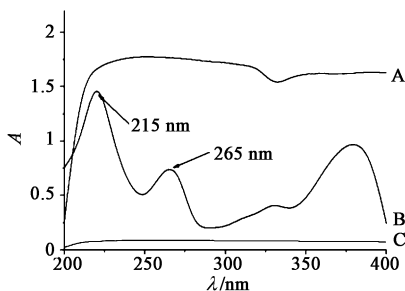
HCPT 对照品(供含量测定用,中国药品生物制品检定所,批号 100526-200301), HCPT 原料(黄石黄抗药业有限公司提供), 羧基化多壁碳纳米管(纯度 > 95%, CVD 方法生产,深圳市纳米港有限公司), 甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。Krebs-Ringers 肠营养液配制:依次称取 NaCl, KCl, NaH_2PO_4 , NaHCO_3 , 葡萄糖(临用前加入)7.8, 0.35, 0.32, 1.37, 1.4 g, 加水至 1 L。

清洁级 Wister 大鼠,雄性(250 ± 10) g,南方医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2006-0015。

2 方法与结果

2.1 MWCNTs-COOH 对 HCPT 的吸附曲线 分别考察振荡吸附法、超声吸附法及球磨吸附法,比较 3 种方法的饱和吸附量和吸附平衡时间。采用紫外分光光度计测定吸光度(A)。

2.1.1 检测波长的考察 配制 $32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCPT 溶液(甲醇-二氯甲烷 1:1 为溶剂),于 $200 \sim 400 \text{ nm}$ 扫描,确定最大吸收波长为 265 nm (图 1)。精密移取该溶液 10,8,6,4,2 mL,分别置于 5 个 10 mL 量瓶中,加甲醇定容后,在最大吸收波长处测定 A ,以 HCPT 质量浓度为横坐标, A 为纵坐标,得线性方程 $Y = 0.0235X + 0.0131 (r = 0.9996)$,表明质量浓度在 $6.40 \sim 32.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 A 线性关系良好。



A. 羟基喜树碱-CNT-COOH 负载物; B. 羟基喜树碱; C. CNT-COOH
图 1 HCPT 溶液紫外扫描

2.1.2 吸附曲线的绘制 分别精密称取 3 份羧基化碳纳米管 50 mg ,加入 $208 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HCPT 溶液 30 mL ,分别置于具塞锥形瓶中,一份直接放入振荡器中振荡($25 \text{ }^\circ\text{C}$,振频 116);一份超声 10 min 后放入振荡器中振荡;一份放入球磨罐中球磨 10 min(液氮保护下 $590 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),球磨后倒入锥形瓶,再放入振荡器中。3 份样品分别在各时间点抽取 2 mL 溶液,补加 2 mL 混合溶剂(甲醇-二氯甲烷 1:1,下同)。吸取的样品放入离心管中于 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,精密吸取上清液 1 mL ,稀释 10 倍,测定 A ,计算药物在 t 时间点的药物质量浓度(C_t)。按公式计算 $Q_t = V(C_0 - C_t)/m$,式中 Q_t 为 t 时刻溶质被吸附剂吸附的量, C_0 和 C_t 分别是初始和 t 时间点溶液中 HCPT 的质量浓度, V 为溶液体积, m 为用于吸附试验的 MWCNTs-COOH 质量,说明 Q_t 依次为球磨法 > 超声法 > 震荡法(图 2)。相平衡参数 $K = C_s/C_e$, C_s 为单位质量的碳纳米管吸附 HCPT 的量, C_e 为平衡时单位体积溶液中 HCPT 的量^[7]。结果震荡法、超声法、球磨法 3 种处理方法的 K 分别为 468.1,471.2,690.8。故确定采用冷冻球磨法。

2.2 HCPT-MWCNTs-COOH 的制备、表征及含量测定 精密称取 HCPT 4 mg ,超声溶解于 10 mL 混合溶剂中,备用。精密称取 MWCNTs-COOH 50 mg ,置于球磨罐中,分 3 次加入药液,每次约加入 3 mL ;液氮保护下 $590 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 球磨 10 min。将球磨后的混合物收集于具塞棕色锥形瓶中(避光操作),放入振荡器中振荡 0.5 h(室温,振频 116)。将未吸附的药

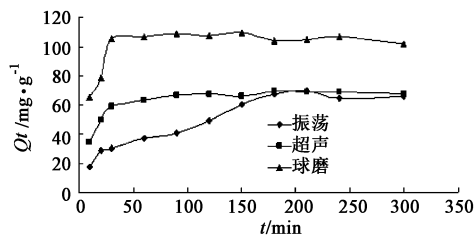
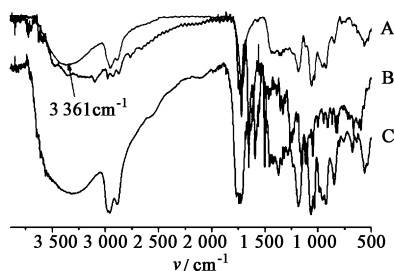


图 2 MWCNTs-COOH 经 3 种不同方法处理后对 HCPT 的吸附曲线

液过滤掉;滤饼放入培养皿,将有机溶剂挥干后加入纯水 10 mL ,研磨 5 min 后置于离心管内离心 1 h ($12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。将离心后的上清液进行冷冻干燥,得负载物,进行红外表征、紫外表征。由负载物的紫外波长扫描(图 1)可知,HCPT 的最大吸收波长为 $215, 265 \text{ nm}$,负载物则为 250 nm ;比较 HCPT 原料、羧基化碳纳米管与负载物的红外图谱(图 3)可知,红外图谱发生了明显改变,HCPT 在 $1500 \sim 1750 \text{ cm}^{-1}$ 的 3 个尖峰消失,且在 $1500 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 指纹区也发生改变,表明负载物制备成功。

精密称取负载物 10 mg ,混悬于 10 mL 混合溶剂中,超声 10 min 后混悬液在 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 4 h,取上清液过 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜,测定 HCPT 含量,色谱条件为 Waters Xbridge C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \text{ } \mu\text{m}$),流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,检测波长 266 nm ,进样量 $20 \text{ } \mu\text{L}$,流动相 甲醇-水 (48:52),理论塔板数不少于 4000。结果测得负载物质量分数为 $12.50 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。



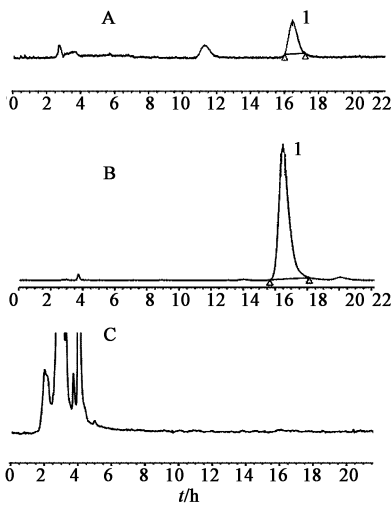
A. CNT-COOH; B. 羟基喜树碱; C. 羟基喜树碱-CNT-COOH 负载物
图 3 HCPT-MWCNTs-COOH 红外图谱

2.3 肠吸收样品 HPLC 测定

2.3.1 对照品溶液的制备及线性关系考察^[8] 配制 $36.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCPT 溶液(甲醇-二氯甲烷 1:1 为溶剂)作为储备溶液。精密吸取储备液 $2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 \text{ mL}$,分别置于 10 mL 量瓶中(高质量浓度);精密吸取储备液 $1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 \text{ mL}$,分别置于 100 mL 量瓶中(低质量浓度);分别加甲醇稀释至刻度,摇匀。高质量浓度、低质量浓度的进样量分别为 $5, 20 \text{ } \mu\text{L}$,记录色谱图,以质量浓度为横

坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,得线性方程依次为 $Y = 33\ 680X + 1\ 887.3 (r = 0.999\ 8)$; $Y = 134\ 715X + 448 (r = 0.999\ 6)$,线性范围分别为 $36 \sim 180, 7.2 \sim 36\ \text{ng}$ 。

2.3.2 专属性、精密度、稳定性考察 分别对 HCPT 对照品、空白肠营养液、肠透过后样品进样,观察在 HCPT 出峰处有无干扰以考察专属性,色谱条件同 2.2 项下方法,见图 4,说明在 HCPT 出峰位置无干扰,分离度及峰型较好,HCPT 的保留时间在 16.49 min。将配制好的对照品溶液 ($36\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 于 1 d 内重复进样 5 次,连续进样 5 d,进样量 $5\ \mu\text{L}$,记录峰面积,结果 HCPT 日内及日间峰面积 RSD 分别为 1.02%, 1.16%,表明仪器精密度良好。取十二指肠于 20 min 时的肠外翻样品,分别在 0, 1, 2, 6, 8 h 进样,记录峰面积,结果峰面积 RSD 1.56%,表明样品在 8 h 内稳定性较好。



A. 样品; B. 对照品; C. 空白肠营养液; 1. HCPT

图 4 离体外翻肠囊法中 HCPT 的 HPLC

2.4 肠吸收试验

2.4.1 供试品溶液的制备 精密称取负载物 76.82, 115.03, 300.36 mg, 分别置于 50 mL 量瓶中, 用约 30 mL 的 37 °C 的 K-R 肠营养液分散, 定容得高、中、低 3 个质量浓度溶液 (按 HCPT 计分别为 75.09, 28.76, 19.21 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 备用。

2.4.2 离体肠囊模型的肠吸收试验 大鼠随机分为 6 组, 每组 4 只, 试验前 15 h 禁食, 自由饮水, 用 20% 乌拉坦腹腔麻醉 ($5\ \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 待大鼠失去知觉后打开腹腔, 分别迅速取出约 10 cm 长的十二指肠、空肠、回肠、结肠 (十二指肠段从幽门开始, 空肠段离幽门 15 cm 处开始, 回肠段自盲肠上行 20 cm 开始, 结肠段从盲肠后端开始, 长度以试验结束后的

实测值为准)。小心将大鼠肠管同肠系膜剥离, 放入 37 °C 的 K-R 溶液中, 冲洗, 直到没有内容物流出, 小心剥离肠段表面肠系膜和脂肪, 冲洗干净后翻转, 用手术线分别将翻转后的各肠段结扎成 10 cm 长的小囊, 十二指肠、空肠、结肠、回肠的囊内分别加入 0.5, 1.5, 0.8, 2.3 mL 的 K-R 肠营养液平衡 5 min, 将翻转小肠囊分别放入 4 个装有 8 mL 相同药物质量浓度的含药 K-R 肠营养液且维持 37 °C 恒温水浴的玻璃试管中, 持续通氧及二氧化碳混合气体以保持离体肠活性。

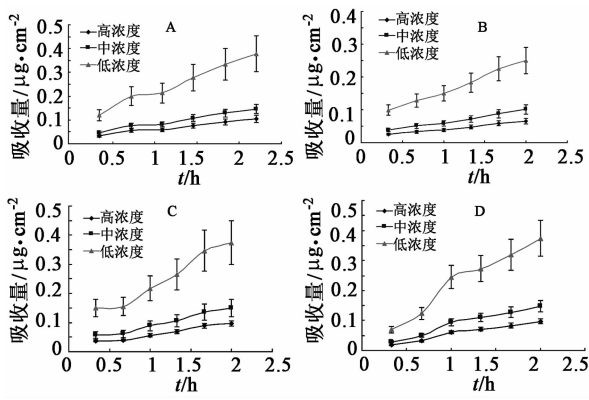
分别于 20, 40, 60, 80, 100, 120 min 用针管分别吸取各个肠囊中内液 0.2 mL, 依次置于 0.5 mL 的 Ep 管内作为样品; 肠囊中补加等体积、新鲜且 37 °C 恒温的 Krebs-Ringers 肠营养液 0.2 mL, 继续试验。离体肠外翻样品在 4 °C 条件下于 $13\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清液, 氮气吹干, 加 60% 甲醇 0.2 mL 溶解, 用 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜滤过, 取续滤液 $20\ \mu\text{L}$ 进样, 记录峰面积。试验结束后吸取试管内药液, 测定其质量浓度。被考察的肠段剪开, 测量其长度和内径, 计算不同质量浓度下各时间点的单位肠管面积累积吸收量 (Q)。

$$Q = \frac{C_n \times v + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 0.2}{A}$$

式中 C_n 为第 n 个取样点测得的药物质量浓度; C_i 为第 $i (i = n - 1)$ 个取样点测得的药物质量浓度; A 为肠管面积; V 为肠囊中加入的肠营养液体积。以 Q_n 对 t 作曲线, 并对曲线中直线部分进行回归, 求出直线斜率, 即为药物肠吸收速率常数 (K_a)。数据用 SPSS 13.0 软件进行分析, 各组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有统计学意义 (图 5, 表 1)。说明以零级拟合较好, 决定系数 (R^2) 均 > 0.9 。各肠段的 K_a 随质量浓度的增加而增加, 表明吸收机制为被动扩散。在同一质量浓度条件下, 各个肠段的吸收速率均无显著性差异, 说明负载物中 HCPT 在小肠内不存在特殊的“吸收窗”。

3 讨论

振荡法、超声法、球磨法 3 种处理方法的相平衡参数、相平衡时间表明, 球磨法负载量高, 达平衡时间短; 超声法与球磨法的达平衡时间相当, 约为 30 min, 但负载量小; 振荡法达到相平衡需要更多时间, 其载药量在平衡后与超声法相当。原因可能是在负载药物时, 碳纳米管常缠绕在一起, 不同打开缠绕的方法, 裸露的管壁面积不同, 故而载药量不同。球磨



A. 十二指肠; B. 空肠; C. 回肠; D. 结肠

图5 HCPT高、中、低3个质量浓度对各个肠段吸收速率的影响($\bar{x} \pm s$)

表1 HCPT不同质量浓度下各肠段的吸收速率常数

肠段	质量浓度 /mg·L ⁻¹	回归方程	R ²
十二指肠	19.21	$Q = 0.0420t + 0.0278$	0.9822
	28.76	$Q = 0.0528t + 0.0302$	0.9830
	75.09	$Q = 0.1509t + 0.0781$	0.9830
空肠	19.21	$Q = 0.0243t + 0.0164$	0.9905
	28.76	$Q = 0.0378t + 0.0239$	0.9899
	75.09	$Q = 0.0927t + 0.0644$	0.9925
回肠	19.21	$Q = 0.0392t + 0.0192$	0.9709
	28.76	$Q = 0.0604t + 0.0296$	0.9730
	75.09	$Q = 0.1489t + 0.0777$	0.9632
结肠	19.21	$Q = 0.0478t + 0.0046$	0.9735
	28.76	$Q = 0.0726t + 0.0085$	0.9712
	75.09	$Q = 0.1830t + 0.0205$	0.9625

的机械力大,增加碳纳米管脆性而易于截断,使纠缠在一起的碳纳米管易于充分展开;同时在液氮保护下的冷冻球磨,碳纳米管的脆性增强,更利于截断碳纳米管,使药物更容易地吸附到管壁上。超声法利用超声波的空化作用及辐射传播的高频波,使液体高速往复振动,从而使混悬在液体里面的碳纳米管

分散开,与球磨法相比,效果较差。而震荡吸附,在药物吸附前没有打开纠缠在一起的碳纳米管,故吸附量最小。

HCPT具有油水均不易溶的特点,增加其水溶解度成为需要解决的主要问题。利用羧基化碳纳米管的中空结构、水溶性,将HCPT制备成负载物后,可增加其水溶性并提高固有结构的稳定性,使不溶于肠营养液的HCPT制成负载物后能溶于肠营养液,并提高了其肠透过速率,预示其体内胃肠道给药吸收良好,可制备成口服制剂。

[参考文献]

[1] 代鲁平,宋春霞,邵先祥,等. 抗癌药物喜树碱类衍生物的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(23):1813.

[2] 马学琴,董琳,李国姗,等. 环糊精的包合作用对羟基喜树碱活性内酯结构的保护[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(14):1270.

[3] Ji S R, Liu C, Zhang B, et al. Carbon nanotubes in cancer diagnosis and therapy[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, (1806):29.

[4] Lay C L, Liu H Q, Tan H R, et al. Delivery of paclitaxel by physically loading onto poly(ethylene glycol) (PEG)-graft-carbon nanotubes for potent cancer therapeutics[J]. Nano Nanotechnol, 2010, 21(6):1.

[5] Liu Z, Chen K, Davis Corrine, et al. Drug delivery with carbon nanotubes for *in vivo* cancer treatment[J]. Cancer Res, 2008, 68(16):6652.

[6] Maurizio P, Kostas K, Alberto B. Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery [J]. Accounts Chem Res, 2008, 41(1):60.

[7] 慕春海,韩博,李超鹏,等. 碳纳米管-异甘草素复合体内外释药相关性研究[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(15):1372.

[8] 彭茗,陆丹,刘瑾,等. HPLC同时测定羟基喜树碱注射液的有关物质及含量[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(9):866.

[责任编辑 仝燕]