

由图 3 可以看出,采用正向透析扩散法 10 h 累积释放率只有 60.17%,反向透析扩散法 10 h 累积释放率可达 93.15%。由此可见,采用正向透析扩散法的释药速率显著低于反向透析扩散法,因此采用反向扩散法方便快捷,且能较好地模拟灯盏花素微乳凝胶剂的释药行为。

2.5 灯盏花素微乳凝胶剂释药模型拟合

将灯盏花素微乳凝胶剂采用反向透析扩散法进行体外释放度实验,体外释药数据经零级、一级、Higuchi 方程、Ritger-Pappas 方程和 Weibull 方程 5 种数学模型拟合,灯盏花素微乳凝胶剂体外释药符合一级释放模型,见表 3。

表 3 不同方程拟合灯盏花素微乳凝胶剂的体外释放度($n=6$)
Tab. 3 Different equation fitting the microemulsion gels of breviscapine *in vitro* release($n=6$)

名称	方程	r^2
零级方程	$Q=0.048\ 9t-0.477\ 8$	0.846 5
一级方程	$\ln(1-Q)=-0.210\ 1t-0.440\ 2$	0.958 8
Higuchi 方程	$Q=0.2133t^{1/2}+0.2737$	0.914 8
Ritger-Pappas 方程	$\ln Q=0.323\ 1\ln t-0.791\ 2$	0.918 2
Weibull 方程	$\ln[1/(1-Q)]=0.627\ 4\ln t-0.559\ 2$	0.955 6

3 讨论

为满足所需的漏槽条件,本实验测定了灯盏花素在候选释放介质中的溶解度,最终选择 PBS (pH 6.8)作为释放介质。此释放介质对透析袋并无影响,且可较好满足药物释放所需的漏槽条件。

灯盏花素微乳凝胶剂是将灯盏花素制备 O/W 型微乳后,再分散于水性凝胶基质中制得。药物要从微乳凝胶基质中释放后,再穿透鼻黏膜才能进入血液及脑组织中起治疗作用,所以本实验对

微乳凝胶剂进行了体外释放度的考察,并对其释放机制进行初步探讨。

微乳凝胶剂的释放度实验尚无统一的方法。本实验考察了正向透析法和反向透析法对药物释放的影响,结果发现采用反向透析扩散法测得的药物释放速率显著高于正向透析扩散法。采用正向透析法时,微乳凝胶与透析袋内少量的释放介质接触,药物从微乳凝胶中扩散至袋内少量的释放介质后,再通过透析袋扩散至大量释放介质中,由于透析袋内外的药物浓度梯度较小,使得释药速率偏小;而采用反向透析法时,微乳凝胶直接与大量释放介质接触,此时药物从微乳凝胶中扩散至释放介质,仅受到微乳凝胶和释放介质间的真实浓度梯度的控制,符合漏槽条件,此种情况下药物释放速率较快。

REFERENCES

- [1] ZHANG W D, CHEN W S, WANG Y H, et al. Studies on the flavone glycosides from the extract of *Erigeron breviscapus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2000, 31(8): 565-566.
- [2] YANG X P, LI Q F. Clinical observation on the therapeutic effect of Brevisca Pine in treatment of acute cerebral infarction [J]. Chin J Pract Ner Dis(中国实用神经疾病杂志), 2007, 10(2): 11-13.
- [3] SHI S L, XU L Y, MAO Z K, et al. Sudy on physicochemical properties and influence factors on stability of breviscapine [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2009, 34(7): 843-847.
- [4] SHI S L, WU J J, DAI W Y, et al. Evaluation of brain-targeted trendence of scutellarin nasal administration [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35(18): 2453-2456.
- [5] WANG H J, SONG H T, PENG B W, et al. Content determination and *in vitro* release characteristic of cyclosporin A submicron emulsion for ocular administration [J]. Pharm J Chin PLA(解放军药科学学报), 2008, 24(1): 72-75.

收稿日期: 2014-02-09

功能化氧化石墨烯负载氟尿嘧啶制备及体外释放研究

方加龙, 许军*, 张雁雯, 刘燕华, 黄黎敏, 胡越(江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

摘要: 目的 通过 β 环糊精(β -CD)功能化氧化石墨烯(graphene oxide, GO)负载氟尿嘧啶(5-Fu), 以增加 5-Fu 释放时间。方法 采用改进 Hummers 方法制备 GO,使 GO 与 β -CD 酯化得到功能化 GO- β -CD 负载 5-Fu。采用高效液相色谱法(HPLC)测定 GO- β -CD-5-Fu 的体外释放度。利用紫外、傅立叶变换红外、透射电镜、扫描电镜和拉曼光谱分别对 GO, GO- β -CD, GO- β -CD-5-Fu 表征测定。结果 GO 功能化、负载均成功,负载率为 105%。HPLC 测定结果表明 GO- β -CD-5-Fu 突释放

基金项目: 江西省教育厅 2013 年科学研究项目(GJJ13608)

作者简介: 方加龙,男,硕士生 Tel: 15079098139 E-mail: fangjialong1988@163.com *通信作者: 许军,男,教授 Tel: (0791)87118908 E-mail: xujun881@163.com

应减弱,呈梯度释放。 $T_{1/2}$ 为 $(4.5\pm0.08)d$ 。结论 GO- β -CD 负载 5-Fu 成功,体外释放时间增加, $T_{1/2}$ 提高了 324 倍。

关键词:功能化石墨烯;氟尿嘧啶;纳米粒;体外释放

中图分类号: R943

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)10-1215-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.10.013

Preparation and *in Vitro* Release of Functionalized Graphene Oxide Loading Fluorouracil

FANG Jialong, XU Jun*, ZHANG Yanwen, LIU Yanhua, HUANG Limin, HU Yue(Pharmacy College, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prolong the release time of 5-Fluorouracil(5-Fu) *in vitro*, β -cyclodextrin(β -CD) was used to functionalize graphene oxide(GO) and then loaded with 5-Fu. **METHODS** By using a modified hummers method to prepare GO, and the resulting GO could subsequently be esterified with β -CD to afford the β -CD functionalized GO(GO- β -CD). In addition, *In vitro* release of functionalized graphene oxide loading fluorouracil(GO- β -CD-5-Fu) could be determined by high performance liquid chromatography(HPLC). The structures and morphologies of GO, GO- β -CD and GO- β -CD-5-Fu were characterized by ultraviolet-visible(UV-vis) absorption spectroscopy, Fourier transform infrared(FTIR) spectroscopy, Transmission Electron Microscopy(TEM), Scanning Electron Microscopy(SEM) and Raman spectroscopy(Raman). **RESULTS** GO- β -CD were prepared and characterized successfully. GO- β -CD had a high drug loading capacity for 5-Fu, with a loading rate of 105%. The results of HPLC analysis showed the burst release effect of GO- β -CD-5-Fu was weakened in a gradient-release pattern, and the elimination half-life ($T_{1/2}$) was $(4.5\pm0.08)d$. **CONCLUSION** GO- β -CD was successfully loaded with 5-Fu and resulted in increase of the release time. Furthermore, GO- β -CD-5-Fu had a 324-fold longer $T_{1/2}$ than 5-Fu.

KEY WORDS: functionalized graphene; fluorouracil; nanoparticles; *in vitro* release

据 2011 年《中国卫生统计年鉴》数据,肿瘤成为我国居民死亡率最高的疾病,约占 26.15%。目前肿瘤的治疗药物主要有烷化剂类、金属铂类、抗代谢类、抗菌药物类、植物提取类、激素类和小分子靶向药物及单抗等。50 多年来,氟尿嘧啶(5-Fu)始终作为肿瘤治疗首选抗代谢药(作用于 DNA 合成期),对结直肠癌、胃癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤有明显抑制作用。但 5-Fu 存在用量较大、胃肠道反应大、骨髓抑制、排泄快(半衰期仅为 10~20 min)^[1]、口服吸收不完全、生物利用度很低、需频繁给药等问题。

自 2004 年 Andre .K.Geim 研究小组首次成功获得的石墨烯^[2]以来,石墨烯凭借其导热性能、力学性能、较高的电子迁移率,较高的比表面积和量子霍尔效应等优良性质,成为各研究领域的明星材料。氧化石墨烯(graphene oxide, GO)是由石墨氧化所得到的一种层状材料,GO 表面及边缘具有大量含氧基团(如羟基、羧基等)^[3]。

β -环糊精(cyclodextrin, β -CD)是由 7 个椅型构象的 β -吡喃葡萄糖单元经 α -1,4 糖苷键结合而成的一类环状低聚物,表面分散着众多反应性羟基。 β -CD 作为一种碳水化合物可参与机体内代谢,避免了体内累积;同时还可改善药物稳定性,降低对胃肠道的刺激性。

本实验通过 β -CD 对 GO 进行功能化得到功能化石墨烯,生成 β -环糊精/氧化石墨烯超分子纳米材料(GO- β -CD),并考察负载 5-Fu 的效果。GO- β -CD 具有较大的比表面积,对药物的负载率较高,同时兼具了 β -CD 的众多优点,能起到一定的缓释作用。

1 仪器和材料

1.1 仪器

RM-1000 型激光共聚焦拉曼光谱仪(英国 RENISHAW 公司); SIGMA 型扫描电子显微镜(SEM, 德国 ZEISS 公司); JEM-2100(HR)型透射电子显微镜(TEM, 日本 JEOL 公司); Nano-ZS-90 型马尔文激光粒度仪(英国马尔文仪器有限公司);傅立叶红外光谱仪(德国 Bruker 公司); Agilent 1260 型液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

1.2 试剂及药品

5-Fu(安耐吉化学,批号: SN1592,含量>98%); 石墨粉(阿拉丁); β -CD(上海楷洋技术有限公司);透析袋 MD34(美国 Sigma); 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 GO 的制备

采用改良 Hummers 方法:称取 1.0 g 石墨粉置于 500 mL 三口瓶中,加入 120 mL 浓硫酸、14 mL 磷酸^[4],在 45~60 °C 反应 3 h,加入 6.0 g 高锰酸钾,

继续反应 16 h。然后加入 2 mL 30% 双氧水和 200 mL 冰水, 继续反应 15 min, 趁热抽滤。得到固体分别用 10% 盐酸 200 mL、双蒸水 200 mL、乙醇 200 mL、乙醚 200 mL 各洗涤 2 次。所得产物置 40 °C 烘箱中烘 0.5 h, 即得到 GO。

2.2 GO-β-CD 的制备

取 1.5 g GO 溶于 50 mL 吡啶超声 4 h, 将超声溶液倒到 250 mL 三口瓶中。取 30 mg 4,4'-二甲基吡啶(DMAP)、50 mg *N,N'*-二环己基碳二亚胺(DCC)^[5]加入到上述三口瓶, 在 30 °C 条件下反应 2 h。取 4.5 g β-CD 加入到上述三口瓶, 升温至 60 °C 反应 24 h。抽滤得粗品, 依次用 2% 盐酸冰水、4% 氢氧化钠洗涤, 抽滤得到固体, 柱层析纯化, 产率为 68%。

2.3 GO-β-CD-5-Fu 的制备及载药率测定

2.3.1 GO-β-CD-5-Fu 的制备 取 20 mg GO-β-CD 溶解于 100 mL 双蒸水中, 于 40 °C 超声 4 h(60 W)。将 100 mg 5-Fu 加到上述溶液中于 40 °C 超声 6 h(60 W)。然后将溶液多次离心、过滤除去不溶物, 直至紫外检测不到滤液中 5-Fu 的特征吸收峰, 显示载药体系稳定。

2.3.2 GO-β-CD 载药率测定 配制不同浓度(2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 g·L⁻¹)的 5-Fu 溶液, 测其在 265 nm 处的吸光度, 计算浓度-吸光度的标准曲线。通过 265 nm 处的吸光度减去该波长处 GO-β-CD 的吸光度可以推算出 5-Fu 的吸光度, 对照标准曲线得到 5-Fu 的浓度, 计算载药率。

2.4 GO-β-CD-5-Fu 中 5-Fu 含量测定方法

2.4.1 色谱条件^[6] 色谱柱: VP-ODS(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 水-甲醇(95:5, 用 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸调节 pH 为 3.5); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 40 °C; 检测波长: 265 nm。

2.4.2 标准曲线制作 用流动相配成 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 g·L⁻¹ 5-Fu 对照品。每个浓度分别进样 3 次, 以峰面积-进样量作图, 得标准曲线。并测定仪器精密度和重复性。

2.4.3 回收率试验 精密称取 5-Fu 对照品适量, 加 50% 甲醇制成 0.8001 g·L⁻¹。精取已知含量的制备供试液 6 份, 精密加入上述 5-Fu 对照品溶液 1 mL。分别进行测定, 计算回收率。

2.4.4 含量测定 精取 GO-β-CD-5-Fu 供试品 2 μL 及 5-Fu 对照品 2 μL, 注入液相色谱仪, 按“2.4.1”项下色谱条件测定。

2.5 GO-β-CD-5-Fu 释放性能考察

取 20 mL 粉碎 GO-β-CD-5-Fu 纳米粒溶液加至透析袋中(20 cm), 溶液约占透析袋 2/3。将两端扎好的透析袋浸没(大约超出透析袋 2~3 cm)在盛有 PBS(pH 7.4)的烧杯中, 然后将其置于 37 °C 恒温震荡箱中, 于 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 h, 1, 2, 5, 10, 20, 30 d 从烧杯中取 1 mL 溶液, 采用 HPLC 测定取出液中 5-Fu 的含量, 计算溶液的累积释放度。

3 结果

3.1 GO 的表征

TEM 表征的 GO 片层结构见图 1。从 TEM 图中可以看到透明性较强的部分为 GO 单层结构, 褶皱部为自聚的 GO 的多片层结构。GO 大部分呈现透明片状, 但片层由于透光性及片层数等原因深浅不同, 可能是由于 GO 在制备过程中的插层阶段插层不充分或超声未能完全引起的。GO 的单层结构具备无可比拟的比表面积, 和其他负载药物载体相比较有较大优势。

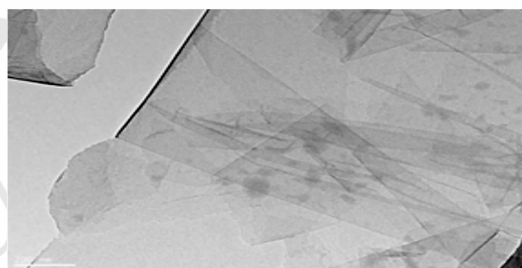


图 1 氧化石墨烯透射电镜图
Fig. 1 TEM of graphene oxide

SEM 表征 GO 表面平整度见图 2。从 SEM 图中可以看出, GO 表面褶皱呈薄翼状, 伴随不同程度的卷曲, 出现了部分折痕^[7], 折痕状结构使 GO 可以增加对药物的包埋和吸附。SEM 表征 GO-β-CD 发现表面更光滑, 整洁, 可能会使负载量加大。通过比较可以得出 SEM 不能准确地表征出氧化石墨烯是否为单层。因此, 必须结合 TEM 和 SEM 才能充分表征出片层结构和平整度, 解释 GO 超强的负载率。

用 Raman 表征 GO 的规整性, 见图 3。根据文献[8-9], 1 607 cm⁻¹ 处的 G 峰表示 GO 的 sp² 杂化碳原子特征峰, 而 1 355 cm⁻¹ 处的 D 峰为 sp³ 杂化碳原子特征峰。与石墨相比较, GO 的 I_D/I_G 的峰强比值变大, 这与氧化过程中形成的 -OH、-COOH 等 sp³ 杂化增加有关, 也说明石墨表面的 sp² 杂化的 C=C 双键破坏。

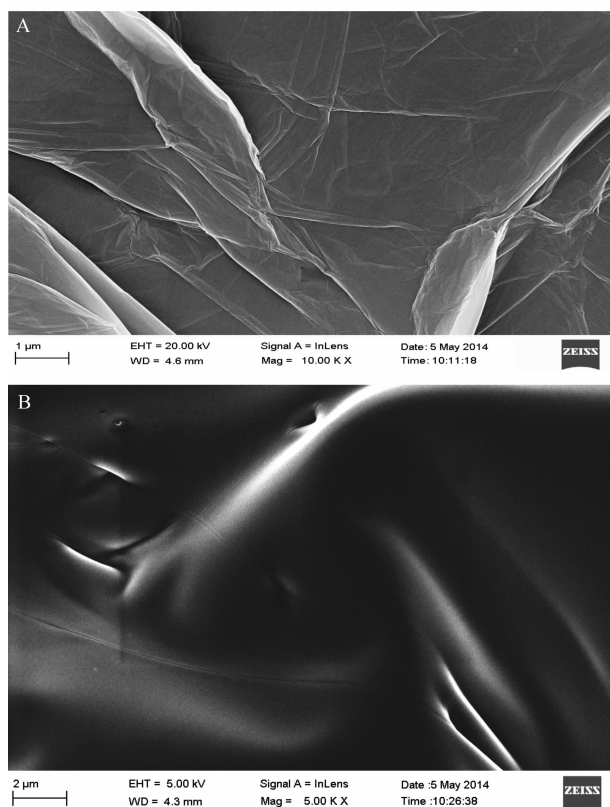


图2 GO(A)和GO-β-CD(B)的扫描电镜图

Fig. 2 Graphene oxide(A), GO-β-CD(B) scanning electron micrographs

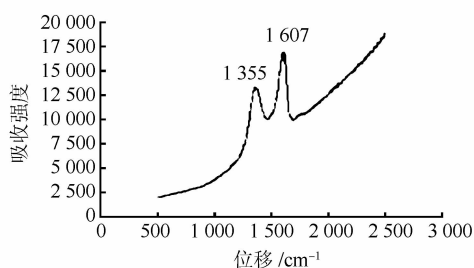


图3 氧化石墨烯拉曼光谱图

Fig. 3 Raman spectrum of the graphene oxide

马尔文激光粒度仪测定 GO 水溶液粒径为 190.1~295.3 nm, pdi 约为 0.234 ± 0.004 。GO-β-CD 水溶液粒径为 122~255 nm, pdi 约为 0.356 ± 0.102 。说明其功能化后粒径有所减小, 通过观察 GO-β-CD 的 SEM 图像推测功能化后可能出现褶皱或减少 GO 自聚。结果见图 4。

3.2 GO-β-CD 的红外测定结果

GO-β-CD 的合成路线如图 5, 加入酰化催化剂 DMAP 和脱水剂 DCC 加快反应速率和程度, 计算含量得接枝率为 37%。FTIR 表征 GO: $3\ 100 \sim 3\ 400\text{ cm}^{-1}$ 的宽强峰带为 -OH; $1\ 738\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 100\text{ cm}^{-1}$ 处分别对应 C=O 及 C-O 的吸收峰^[8], 证实石

墨已被氧化。β-CD: $3\ 366\text{ cm}^{-1}$ 处为 -OH 吸收峰; $2\ 920\text{ cm}^{-1}$, $1\ 630\text{ cm}^{-1}$, $1\ 600\text{ cm}^{-1}$ 为 -CH₂ 吸收峰; $1\ 037\text{ cm}^{-1}$ 为 C-O 吸收峰。GO-β-CD: $3\ 415\text{ cm}^{-1}$ 为 β-CD 的 -OH 吸收峰和 $2\ 923\text{ cm}^{-1}$ (-CH-), $1\ 030\text{ cm}^{-1}$ (C-O-C) 的吸收峰, 及 $1\ 209\text{ cm}^{-1}$ (C=O) 峰宽而强的酯基峰, 表明 β-CD 以成功接枝到 GO 上。FT-IR(KBr)v: $2\ 923$, $1\ 250$, $1\ 030\text{ cm}^{-1}$ 。结果见图 6。

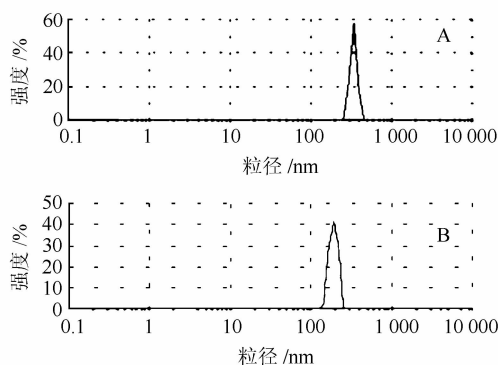


图4 GO 水溶液粒径(A)与 GO-β-CD 水溶液粒径(B)

Fig. 4 Particle size of graphene oxide(A) and Particle size of 5 Functionalized Graphene(B)

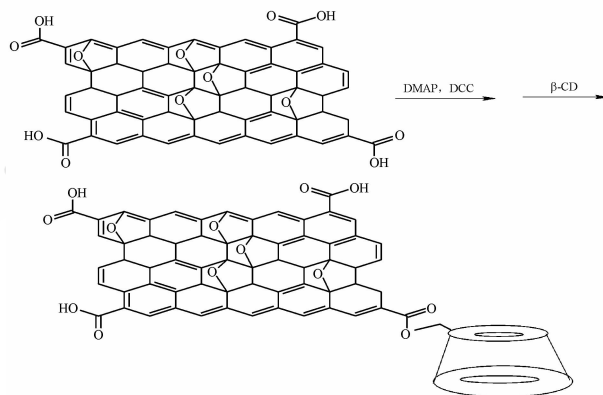


图5 GO-β-CD 的合成路线

Fig. 5 Synthesis route of GO-β-CD

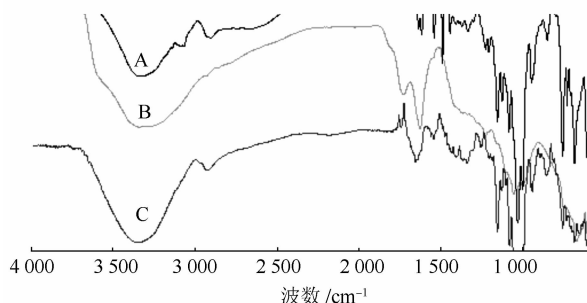


图6 β-CD(A), GO(B), GO-β-CD(C)红外测定结果

Fig. 6 Infrared data of β-CD, GO, GO-β-CD

3.3 GO- β -CD-5-Fu 的紫外测定结果

在 265 nm 处测定其吸光度, 计算 5-Fu 标准曲线为 $A=0.032\ 3X-0.011\ 3$ 。结果表明氟尿嘧啶在 $1\sim100\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内与吸光度 A 呈良好线形关系。通过 265 nm 处的吸光度减去该波长处 GO- β -CD 的吸光度可以推算出 5-Fu 的吸光度, 对照标准曲线得到 5-Fu 的浓度, 由此可以算出载药率^[9], 计算公式为: 载药率=负载药物的质量/载体质量 $\times 100\%$ 。

GO- β -CD 载体由于具备单层结构、边缘效应等原因可大量负载 5-Fu。通过计算得出 GO- β -CD 载药率为 105%。

5-Fu, GO- β -CD-5-Fu 溶液的紫外波长扫描结果表明 GO- β -CD-5-Fu 最大吸收峰波长仍为 265 nm, 未发现吸收峰波长漂移现象, 未造成 5-Fu 的药物性能的变化。

3.4 5-Fu 含量测定结果

在 265 nm 测定 5-Fu 吸收峰面积做标准曲线, 得到标准曲线回归方程为 $Y=0.022\ 6X+1.113\ 0$, 结果表明氟尿嘧啶在 $1\sim100\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 与吸收峰面积呈良好线性关系。含量为 51.03%(RSD=0.14%); 重复性, 精密度良好(RSD 分别为 0.12%和 0.28%); 9 h 内稳定性良好(RSD=2.2%); 回收率为 98.21%(RSD=0.05%)。

3.5 GO- β -CD-5-Fu 体外释放结果

β -CD-5-Fu, GO- β -CD-5-Fu 的体外释放曲线见图 7。 β -CD-5-Fu 在 2 h 内基本释放完毕, 与 5-Fu 在体外释放时间无太大差异($n=5$)。通过 HPLC 吸收峰面积可计算出 5-Fu 的量, 由此可以得出释放度。释放情况如下: GO- β -CD-5-Fu 的 $T_{1/2}$ 为 $(4.5\pm0.08)\text{d}$, 为普通制剂的 $T_{1/2}(20\ \text{min})$ 的 324 倍。同时突释现象明显减弱, 在体外 30 d 累积释药量(Q) 为 $(98.87\pm0.03)\%$, 按 Higuchi 方程^[10]以累积释药量百分率对时间 $t^{1/2}$ 回归, 得方程: $y=3.233\ 9\ t^{1/2}+14.375$, $r^2=0.9697$, 说明功能化石墨烯负载氟尿嘧啶体外释药性能符合长效制剂特征。

4 讨论

本实验成功的制备了药物载体 GO- β -CD, 该载体较 GO 粒径更小, 在水中的分散效果更好, 亲水性也更强。目前解释这些现象的原因尚未定论,

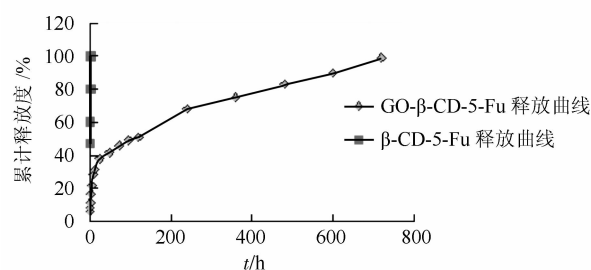


图 7 β -CD-5-Fu, GO- β -CD-5-Fu 的体外释放曲线

Fig. 7 β -CD-5-Fu and Functionalized Graphene load fluorouracil in vitro release curve

有待进一步研究。GO- β -CD 与 5-Fu 主要通过氢键相互作用与 π - π 堆积作用, 载药率高达 105%。体外模拟释放证明该载药体系符合体外释药性能长效特征。但目前功能化石墨烯能否在体内代谢, 及是否能成功制备成缓释剂型应用于实际生活中仍有待研究。

REFERENCES

- [1] REITER C, WIMMER S, SCHULTHEISS A, et al. Corneal epitheliopathy following trabeculectomy with postoperative adjunctive 5-fluorouracil [J]. Klin Monbl Augenheilkd, 2010, 227(11): 887-891.
- [2] NOVOSELOV K S, GEIM A K, MOROZOV S V, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films [J]. Science, 2004, 306(5696): 666-669.
- [3] DREYER D R, PARK S, BIELAWSKI C W, et al. The chemistry of graphene oxide [J]. Chem Soc Rev, 2010, 39(1): 228-240.
- [4] MARCANO D C, KOSYNKIN D V, BERLIN J M, et al. Improved synthesis of graphene oxide [J]. ACS Nano, 2010, 4(8): 4806-4814.
- [5] EL-FAHAM A, ALBERICIO F. Peptide coupling reagents, more than a letter soup [J]. Chem Rev, 2011, 111(11): 6557-6602.
- [6] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: 540-541.
- [7] XU Z Y, LI Y J, SHI P, et al. Functionalized graphene oxide as a nanocarrier for loading and delivering of eriocalyxin B [J]. Organic Chem(有机化学), 2013, 33 (10): 2162-2168.
- [8] KAR T, SCHEINER S, ADHIKARI U, et al. Site preferences of carboxyl groups on the periphery of graphene and their characteristic IR spectra [J]. J Phys Chem C, 2013, 117(35): 18206-18215.
- [9] HU Y J, JIN J, ZHANG H, et al. Graphene: synthesis, functionalization and applications in chemistry [J]. Acta Phys Chim Sin, 2010, 26(8): 2073-2086.
- [10] BI X Z, PAN W H, NAN K H, et al. Preparation and in vitro release test of slow-release 5-fluorouracil [J]. Chin Tiss Eng Res(中国组织工程研究), 2012, 16 (8): 1430-1434.

收稿日期: 2014-01-24