

多烯紫杉醇石墨烯的制备及质量评价^{*}

申玉坤^{1,2}, 申玉璞¹, 潘一峰², 石春花^{1**}

(1. 长治医学院, 长治 046000; 2. 中南大学湘雅医学院卫生部纳米生物技术重点实验室, 长沙 410008)

摘要 目的: 合成新型的多烯紫杉醇石墨烯复合材料($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$), 并对其质量评价。方法: 利用透射电镜观察其形貌; 以高效液相色谱法(HPLC)测定多烯紫杉醇(DOC)的含量, 并对生成物的包封率、回收率以及精密度进行评价, 以低温高速离心法测定 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$ 复合材料的包封率。结果: 多烯紫杉醇检测浓度线性范围为 $20\sim 120\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 1$), 平均回收率($n=3$)为 $100.2\%\pm 0.23\%$, 在转速为 $20\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心时间为 $80\ \text{min}$ 的条件下, 包封率的值在 90% 以上。结论: $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$ 复合材料制备工艺可行, 质量控制方法简便可靠。

关键词: 多烯紫杉醇; 石墨烯复合材料; 包封率; 高效液相色谱法; 质量评价

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2020)02-0388-04

doi: 10.16155/j.0254-1793.2020.02.26

Preparation and quality evaluation of functional graphene oxied/docetaxel

SHEN Yu-kun^{1,2}, SHEN Yu-pu¹, PAN Yi-feng², SHI Chun-hua^{1**}

(1. Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China; 2. National Key Laboratory of Nanobiological Technology, Ministry of Health, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410008, China)

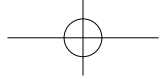
Abstract Objective: To synthesize the new-type $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$ composite materials, and evaluate their qualities. **Methods:** The morphology was observed by transmission electron microscope. The concentration of DOC was determined by high efficiency liquid chromatography. The recovery, precision and entrapment efficiency of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$ composite materials were studied, and the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$ composite materials entrapment efficiency was determined by Low temperature high speed centrifugation. **Results:** The linear detection concentration range of DOC was $20\sim 120\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 1$) with the average recovery ($n=3$) of $100.2\%\pm 0.23\%$. At a speed of $20\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ and a centrifugation time of $80\ \text{min}$, the encapsulation rate was more than 90% . **Conclusion:** The preparation technique of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$ composite materials is feasible, and the quality control method is convenient and reliable.

Keywords: docetaxel; graphene composites; entrapment efficiency; HPLC; quality evaluation

* 国家自然科学基金资助项目(81302075); 长治医学院科研启动基金项目(QDZ201629); 长治医学院博士启动基金(BS15015)

** 通信作者 Tel: 18735590472; E-mail: 82531621@qq.com

第一作者 Tel: 15835556999; E-mail: 1875724864@qq.com



多烯紫杉醇(docetaxel, DOC)是治疗乳腺癌的常用药物,通过干扰细胞有丝分裂和间期细胞功能所必需的微管网络而起到抗肿瘤的作用^[1],因其会引起诸多不良反应,故而限制了临床应用。氧化石墨烯作为1种靶向制剂,是多烯紫杉醇的1个较为理想的给药载体,通过对多烯紫杉醇包载并进行靶向给药,可以提高药物的治疗效果,大大降低药物的不良反应^[2-4]。

目前,关于多烯紫杉醇载体复合材料的研究多见于脂质体材料^[5-11],但是未见有关多烯紫杉醇石墨烯的研究,本研究利用萘磺酸钠修饰的石墨烯基 Fe_3O_4 载体材料($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}$)对DOC进行搭载,制备得到多烯紫杉醇石墨烯复合材料($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$),并对所制得复合材料的处方、工艺以及有关性质等进行研究。希望利用石墨烯载体材料的靶向性、缓释性等特点,达到提高药物疗效,减轻毒副作用的目的^[12-13]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

P680A型高效液相色谱仪(戴安公司);JEM-1230型透射电镜(日本电子JEOL公司);Sigma 2-16P超速冷冻离心机(Sigma公司);B2510E型超声破碎乳化仪(Fisher Scientific公司);BioMate 3S型紫外分光光度计(Thermo公司)。

1.2 试剂

DOC原料药,分析纯(重庆泰豪制药有限公司,批号DOC-160805);石墨粉,化学纯(国药集团化学试剂有限公司);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$ 的制备

本课题组已完成了萘磺酸钠修饰的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}$ 的制备研究^[14]。精确称取DOC 200 mg,加入到pH=7.4的磷酸盐缓冲液中(10 mL),加入适量 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}$ 并超声(功率400 W,频率40 kHz)20 min,之后搅拌过夜。制备得到质量浓度为20 mg·mL⁻¹的样品 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$,放入4℃冰箱备用。

2.2 透射电镜观察

取1滴样品,用2%磷钨酸溶液负染后滴于专用铜网上,自然晾干。用透射电子显微镜观察其形貌(80 kV电子束加速电压下),见图1。由图可见,复合材料形态规则,分散性较好。

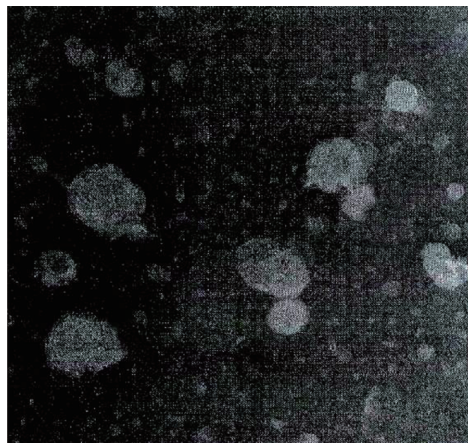


图1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$ 的透射电镜图照片

Fig. 1 The Transmission electron micrograph photograph of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$

2.3 质量评价

2.3.1 波长的确定

用紫外分光光度计测得DOC在230 nm处存在最大吸收,因此DOC测量波长被确定为230 nm。

2.3.2 色谱条件的确定

使用BDS C_{18} 柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm),流动相为甲醇-乙腈-水(35:40:25),检测波长230 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃,进样量20 μL。分别取样品 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$ 和载体材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}$ 各0.5 mL,加入双蒸水稀释100倍后,利用高效液相色谱仪进样测定,测定结果如图2所示,辅料出峰时间晚于药物DOC的出峰时间,不会对药物DOC的测定产生干扰。

2.3.3 线性关系考察

称取适量的DOC,加入双蒸水,分别制备质量浓度为20、40、60、80、100、120 μg·mL⁻¹的参比溶液,采用高效液相色谱法测定各参比溶液峰面积A。以峰面积A对DOC质量浓度C进行线性回归,回归方程:

$$A=28.1C+4.387 \quad r=0.9991$$

DOC浓度的线性范围为20~120 μg·mL⁻¹。

2.3.4 回收率试验

取3组 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}$ 药物载体分别0.3 mL,加入一定量的DOC,用双蒸水稀释,制备成质量浓度分别为10、60、120 μg·mL⁻¹的溶液,高效液相色谱仪进样测定($n=3$),计算回收率,结果见表1。平均回收率为100.2%±0.23%。

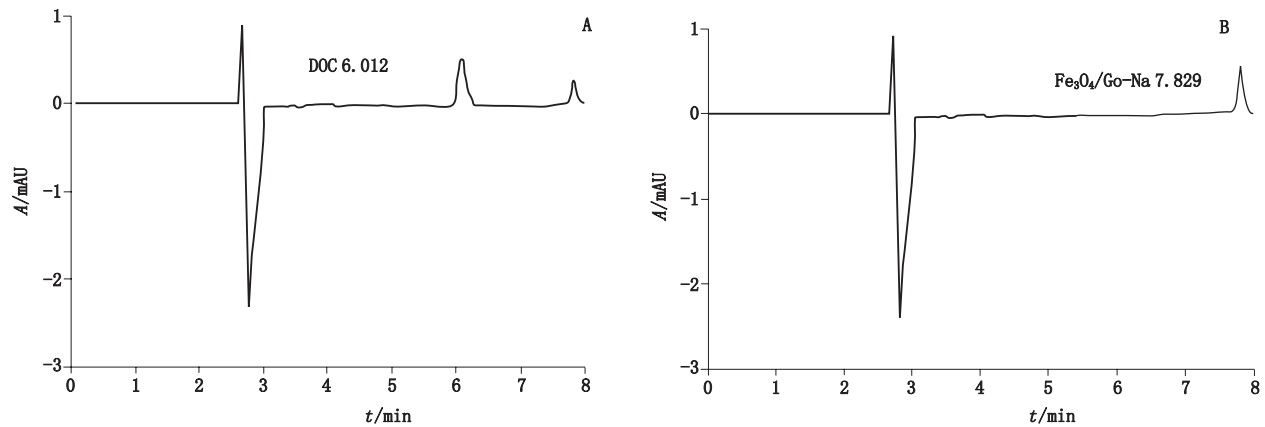


图2 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO-NA}/\text{DOC}$ 复合材料 (A) 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO-NA}$ 药物载体 (B) 色谱图
Fig. 2 Chromatograms of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO-NA}/\text{DOC}$ composite (A) and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO-NA}$ carrier (B)

表 1 回收率的测定 ($n=3$)

Tab. 1 The recovery determination

加入量 (added)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得量 (measured)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery)/ %	RSD/ %
10	10.01 ± 0.06	100.1	0.60
60	60.08 ± 0.46	100.1	0.80
120	120.59 ± 1.08	100.5	0.90

2.3.5 精密度试验

取“2.3.4”项配制的 3 个质量浓度的溶液 (10、60、120 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 通过高效液相色谱仪在 0、5、10 h ($n=3$) 测量, 计算日内 RSD。同时, 在第 1、2、3 d 连续测量样品 1 次, 并计算日间 RSD。结果日内 RSD 分别为 0.82%、0.95%、1.1%, 日间 RSD 分别为 0.88%、0.98%、1.2%。表明该方法的重复性和样品稳定性符合分析要求。

2.3.6 包封率试验

采用低温高速离心法测定包封率, 利用以下公式计算包封率:

包封率 = (系统中的总药量 - 未包封的药量) / 系统中的总药量 $\times 100\%$

2.3.6.1 离心转速的考察 取 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO-NA}/\text{DOC}$ 1 mL, 置于离心管内, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 分别以 5 000、10 000、20 000、30 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速离心 60 min, 各取等体积的上清液并用双蒸水稀释 100 倍, 取续滤液 20 μL 进样, 按外标法计算, 结果上述 4 个转速下的包封率 $\pm S$ ($n=3$) 分别为 (40.11 $\pm$ 0.58) %、(63.25 $\pm$ 0.61) %、(86.36 $\pm$ 0.83) %、(87.21 $\pm$ 0.91) %。

由以上结果可知, 在离心机转速为 5 000 和

10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 包封率较低, 结合样品外观观察, 上清液稍有浑浊; 在转速为 20 000 和 30 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 样品包封率较高, 并且二者包封率相差不大, 样品上清液均比较透明, 故可采用 20 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 以上转速进行包封率的测定。

2.3.6.2 离心时间的考察 将所制得样品分别离心 20 000 和 30 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心时间分别设置为 50、60、70、80、90、100 min, 离心后取出样品, 依次进样测定, 结果上述不同时间下, 20 000 和 30 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的包封率 $\pm S$ ($n=3$) 分别为 (66.21 $\pm$ 0.73) %、(86.36 $\pm$ 0.83) %、(88.55 $\pm$ 0.96) %、(90.36 $\pm$ 0.77) %、(90.43 $\pm$ 1.02) %、(90.39 $\pm$ 0.59) % 和 (69.37 $\pm$ 0.53) %、(87.27 $\pm$ 0.91) %、(88.91 $\pm$ 0.78) %、(90.29 $\pm$ 0.98) %、(90.36 $\pm$ 0.96) %、(90.56 $\pm$ 1.12) %。

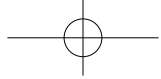
由以上结果可知, 离心时间低于 60 min, 包封率较低; 离心 80、90 和 100 min, 包封率基本一致, 因此将离心时间选定为 80 min。包封率计算结果符合《中华人民共和国药典》2010 年版规定^[15]。

2.3.7 样品含量测定

取上述制得的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO-NA}/\text{DOC}$ 复合材料 0.5 mL, 3 组, 分别加入双蒸水稀释 100 倍并进样处理, 采用高效液相色谱法测定峰面积。另外量取质量浓度为 20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DOC 参比溶液 0.5 mL, 用双蒸水稀释 100 倍。注射进样确定峰面积, 外标法计算含量。结果分别为 (99.83 $\pm$ 0.56) %、(99.79 $\pm$ 0.81) % 和 (99.92 $\pm$ 0.89) %。

2.3.8 稳定性试验

将制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO-NA}/\text{DOC}$ 复合材料密封并储存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 分别在 0、3、8、12、24、48、72 h



和 5、10、20、30 d 后取样稀释并进样测定,结果显示 DOC 峰面积的 RSD 为 1.2%。表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$ 复合材料在 4 °C 的条件下至少 1 个月内保持稳定。

3 讨论

本研究讨论了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$ 复合材料的制备方法,同时,评估复合材料的质量。研究表明,处方过程可行,质量控制方法简单可靠。使用透射电镜观察,此复合材料形态规则,分散性良好。

在质量控制研究中,分别对复合材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}/\text{DOC}$ 和载体材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}-\text{NA}$ 的稀释液进行进样处理,辅料出峰时间晚于药物 DOC 的出峰时间,说明辅料不会干扰 DOC 的测定。在回收率、精密度和稳定性等试验中,显示出良好的结果,方法的可重复性和稳定性符合分析要求。

采用低温高速离心法测定包封率。通过考察不同时间和转速,优化后得出结论:在转速为 20 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心时间为 80 min 时包封率较好,包封率的值在 90% 以上。

本研究将抗乳腺癌药物 DOC 搭载于羧酸钠修饰的石墨烯基 Fe_3O_4 载体材料,有利于将药物输送到病变部位以进行靶向给药。同时,石墨烯持续释放和控制释放特性的使用可以提高药物的生物利用度并减少药物对身体的副作用^[16]。

参考文献

- [1] SONALI S, SINGH RP, SINGH N, *et al.* Transferrin liposomes of docetaxel for brain targeted cancer applications: formulation and brain theranostics [J]. *Drug Deliv*, 2016, 23 (4): 1
- [2] LIU Z, ROBINSON JT, SUN XM, *et al.* PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130 (33): 10876
- [3] ZHANG K, ANG BT, ZHANG LL, *et al.* Pyrolyzed graphene oxide/resorcinol-formaldehyde resin composites as high-performance supercapacitor electrodes [J]. *J Mater Chem*, 2011, 21 (8): 2663
- [4] LIU J, LI Q, ZOU Y, *et al.* The dependence of graphene Raman D-band on carrier density [J]. *Nano Letters*, 2013, 13 (12): 6170
- [5] 吴卫,程怡,吴琼. 半乳糖配体介导多烯紫杉醇脂质体靶向性研

究 [J]. *南京医科大学学报*, 2012, 32 (2): 168

WU W, CHENG Y, WU Q. Targeting of polyene taxol liposomes mediated by galactose ligands [J]. *J Nanjing Med Univ (Nat Sci Ed)*, 2012, 32 (2): 168

- [6] REN G, LIU D, GUO W, *et al.* Docetaxel prodrug liposomes for tumor therapy: characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Drug Deliv*, 2016, 2017 (1): 1
- [7] SHAW TK, MANDAL D, DEY G, *et al.* Successful delivery of docetaxel to rat brain using experimentally developed nanoliposome: a treatment strategy for brain tumor [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24 (1): 346
- [8] SHIGEHITO T, ZHAI W, VAIDYANATH A, *et al.* Evaluation of glycosylated docetaxel-encapsulated liposomes prepared by remote loading under solubility gradient [J]. *J Microencapsulation*, 2016, 33 (2): 172
- [9] LI L, DI X, ZHANG S, *et al.* Large amino acid transporter 1 mediated glutamate modified docetaxel-loaded liposomes for glioma targeting [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 141: 260
- [10] CHU C, PING X, ZHAO H, *et al.* Effect of surface ligand density on cytotoxicity and pharmacokinetic profile of docetaxel loaded liposomes [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2016, 11 (5): 655
- [11] PEREIRA S, EGBU R, JANNATI G, *et al.* Docetaxel-loaded liposomes: the effect of lipid composition and purification on drug encapsulation and *in vitro* toxicity [J]. *Int J Pharm*, 2016, 514 (1): 150
- [12] MAHDOUANI M, BOURGUIGA R. Auger and carrier-surface phonon interaction processes in graphene on a substrate made of polar materials [J]. *Superl Microstruct*, 2017, 102: 212
- [13] WEI G, DONG R, DONG W, *et al.* Functional materials from the covalent modification of reduced graphene oxide and β -cyclodextrin as a drug delivery carrier [J]. *New J Chem*, 2013, 38 (1): 140
- [14] 申玉坤,龚连生,申玉璞,等. 羧酸钠修饰的石墨烯基 Fe_3O_4 复合材料的制备与载药性能评价 [J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35 (13): 1168
- SHEN YK, GONG LS, SHEN YP, *et al.* Preparation and drug loading performance evaluation of graphene-based Fe_3O_4 composites modified with sodium naphthalene sulfonate [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2015, 35 (13): 1168
- [15] 中华人民共和国药典 2010 年版. 二部 [M] 2010: 709
- ChP 2010. Vol II [M]. 2010: 709
- [16] WILSON R, SPILLER DG, BECKETT A, *et al.* Highly stable dextran-coated quantum dots for biomolecular detection and cellular imaging [J]. *Chem Mater*, 2010, 22 (23): 6361

(本文于 2019 年 1 月 22 日收到)