

بررسی آزمایشگاهی تأثیر پوشش دهی کیتوسان در کاهش تجمع نانولوله‌های کربنی به عنوان حامل داروی ضد سرطان کوئرستین

معصومه نبی تیر، سید فواد آقامیری*⁺، محمدرضا طلائی خوزانی

گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده: از نانولوله‌های کربنی به عنوان حامل بسیاری از داروهای گوناگون استفاده می‌شود. زیست سازگار نبودن، تجمع و نبود پراکندگی مناسب از جمله عیب‌های نانولوله‌های کربنی در کاربردهای دارورسانی می‌باشد. در این پژوهش تجمع نانولوله‌های کربنی چند دیواره به عنوان حامل داروی ضد سرطان کوئرستین پس از اصلاح با پلیمر زیست سازگار کیتوسان و بارگیری دارو بررسی شده است. ابتدا داروی کوئرستین روی نانولوله‌های اصلاح شده با کیتوسان بارگیری شد و پس از مشخصه سازی توسط آزمون‌های SEM و FT-IR، تجمع نانولوله‌های اصلاح شده و بارگیری شده با طیف گسترده مرئی - فرابنفش در بازه‌ی ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر و دستگاه کدورت سنج بررسی شد. نتیجه‌ها نشان داد که تجمع نانولوله کربنی اصلاح شده نسبت به نانولوله کربنی بهبود یافته اما در اثر بارگیری دارو این پراکندگی کاهش می‌یابد. میزان کدورت نانولوله اصلاح شده با کیتوسان ۱۷/۲۹ NTU و برای نانولوله خام ۱۱/۱۲ NTU است. پراکندگی محلول‌های سوسپانسیون تولید شده از نانولوله اصلاح شده با کیتوسان برای مدت ۲۴ ساعت به نسبت پایدار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تجمع؛ نانولوله کربنی؛ دارورسانی؛ کوئرستین؛ کیتوسان.

KEYWORDS: Aggregation; Carbon nanotube; Drug delivery; Quercetin; Chitosan.

مقدمه

همچنین شکل سوزنی نانولوله‌های کربنی و وجود خاصیت نفوذ و ماندگاری افزایش یافته^(۱) مربوط به بافت‌های سرطانی سبب افزایش نفوذ پذیری آن‌ها به درون غشا شده و تجمع درون سلولی دارو را با مکانیسم نانوسوزنی راحت‌تر می‌کند [۷]. با وجود فایده‌هایی که برای نانولوله‌های کربنی گفته شد یکی از مشکل‌های نانولوله کربنی سمی بودن آن‌ها در کاربردهای پزشکی است [۸]. برای افزایش زیست سازگاری نانولوله کربنی سطح آن با پروتئین و دیگر فراورده‌های طبیعی از جمله اسیدهای نوکلئیک و پلی ساکاریدها اصلاح می‌شود [۹]. کیتوسان از جمله پلیمرهای طبیعی است

نانولوله‌های کربنی، نانوصفحه‌های لوله شده‌ی گرافیت می‌باشند که دارای ویژگی‌های بسیاری از جمله نسبت منظر بالا^(۱)، مساحت سطح بالا و چگالی بسیار پایین هستند [۱]. داروهای گوناگونی از جمله ترکیب‌ها و مولکول‌های آلی [۲] پروتئین‌ها [۳]، DNA [۴]، مولکول‌های کوچک مانند داروهای ضد میکروبی [۵] ملکول‌های پیچیده مانند آنتی بادی‌ها [۶] روی نانولوله‌های کربنی بارگیری شده‌اند. استفاده از نانولوله کربنی به‌عنوان حامل دارویی افزون بر افزایش تأثیر دارو، سمیت ناشی از دارو را کاهش داده و موجب بهبود بخشیدن فعالیت فارماکولوژی ملکول‌های زیستی می‌شود،

*عهدہ دار مکاتبات

+E-mail: aghamiri@eng.ui.ac.ir

(۱) Aspect ratio

(۲) Enhanced permeability and retention

نانولوله‌های کربنی در محیط آبی استفاده کردند. آن‌ها برای اتصال گروه‌های عاملی کربوکسیل و هیدروکسیل روی سطح نانولوله‌های کربنی از دو محلول اسیدی گوناگون شامل نیتریک اسید - سولفوریک اسید (نسبت وزنی ۱:۳) و نیتریک اسید - سولفوریک اسید (نسبت وزنی ۱:۱:۳) استفاده کردند. از طیف سنج فرابنفش - مرئی به‌عنوان معیاری برای اندازه‌گیری میزان پراکندگی نانوذره‌ها استفاده شد، نتیجه‌ها نشان داد که ترکیب نیتریک اسید - سولفوریک اسید - هیدروکلریک اسید پراکندگی بهتری ایجاد می‌کند [۱۶].

بی و لون چن در سال ۲۰۱۱ میلادی تجمع و سینتیک رسوب دو نمونه از نانولوله کربنی چند دیواره با درجه اکسایش متفاوت در حضور سدیم کلرید و کلسیم کلرید را مطالعه کردند. تجمع و سینتیک رسوب به ترتیب با آنالیز پراکندگی نور دینامیکی^(۳) و ترازوی بلور کوارتز با دیدن پراکنش^(۴) بررسی شد. نتیجه‌های این پژوهش نشان می‌دهد که رفتار تجمع و رسوب نانولوله‌های کربنی به صورت کیفی با نظریه DLVO^(۵) مطابقت دارد. نانولوله با درجه اکسایش بالا در حضور سدیم کلرید در حد چشمگیری پایدارتر از نانولوله با درجه اکسایش پایین بود در صورتی که در حضور کلسیم کلرید نتیجه‌های به تقریب یکسانی به دست آمد [۱۷].

از آنجایی که نانولوله‌های کربنی از نظر ساختاری شباهت‌های زیادی با گرافن دارند، با بررسی پراکندگی گرافن می‌توان اطلاعات مفیدی به دست آورد. در سال ۲۰۱۳ میلادی حلالیت و پراکندگی گرافن اکسید پوشانده شده با پلیمر کیتوسان توسط رمیز و همکاران در دو حلال آب و هگزان بررسی شد. طبق نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش پراکندگی اکسید کیتوسان - گرافن به خوبی نمونه‌های اکسید شده دارای هیدروکسیل و کربوکسیل نبوده است [۱۸].

در این پژوهش ابتدا نانولوله‌های کربنی با گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل عامل‌دار شده و پس از پوشانده شدن با پلیمر زیست سازگار کیتوسان، داروی گیاهی کوئرستین^(۶) روی آن بارگیری می‌شود. این دارو تا کنون روی حامل‌های گوناگونی از جمله PVA و Eudragit® E (EE) [۱۹]، نانوذره‌های کیتوسان [۲۰]، نانوذره‌های PLGA [۲۱]، نانوذره‌های PLA [۲۲]، نانوذره‌های مغناطیسی Fe_3O_4 و کوپلیمر $E_{137}S_{18}E_{137}$ [۲۳]، نانو ذره‌های

که به عنوان اصلاح کننده‌ی نانوساختارهای کربنی برای بهبود پایداری و زیست سازگاری در کاربردهای رهایش دارویی استفاده می‌شود. این پلیمر زیست سازگار، دارای گروه‌های عاملی بسیاری و غیر سمی است و حلالیت خوبی در محیط آبی دارد [۱۲-۱۰] که از فرایند استیل زدایی بازی کیتین در حضور پتاسیم هیدروکسید به دست می‌آید [۱۳]. در سال ۲۰۱۱ میلادی هیبرید نانولوله کربنی چند دیواره - کیتوسان^(۱) توسط لی و همکاران برای حمل پروتئین تولید شد. نتیجه‌های این پژوهش نشان می‌دهد هیبرید نانولوله کربنی چند دیواره - کیتوسان به مدت ۲۴ ساعت در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر زیست سازگار است، و مقدار سمیت سلولی را در مقایسه با نانولوله چنددیواره کربوکسیلی شده حدود ۵۰ درصد کاهش می‌دهد، همچنین پراکندگی و پایداری آن در محیط‌های آبی به مدت ۳۰ روز پایدار می‌باشد [۱۴]. در پژوهش انجام شده توسط علم‌محمدی و همکاران از حامل دارویی نانولوله کربنی تک دیواره پوشیده شده با کیتوسان^(۲) برای بارگیری داروی دوکسوروبیسین استفاده شد. نتیجه‌های آزمون زیست پذیری سلول در این پژوهش نشان می‌دهد حامل NPCS-SWNT اثرهای سمی روی سلول نداشته و زیست پذیری سلول پس از ۷۲ ساعت ۹۴ درصد است در حالی که این مقدار برای حامل دارویی بارگیری شده در مدت همانند به ۶۲ درصد کاهش می‌یابد که این کاهش به دلیل اثرهای سمی خود دارو می‌باشد [۱۵]. یکی دیگر از عیب‌های نانولوله‌های کربنی تجمع آن‌ها در زمان بارگیری و انتقال دارو می‌باشد [۸]. این پدیده به دلیل وجود نیروهای واندروالسی به نسبت قوی، آب‌گریزی شدید و سطح ویژه بالا است [۱۶]. هم‌زدن محلول، فراصوت و استفاده از فعال کننده سطحی از جمله روش‌های فیزیکی برای پراکنده کردن نانولوله‌های کربنی می‌باشند. روش‌های فیزیکی افزون بر زمان بر بودن پراکندگی موقتی ایجاد می‌کند، اما عامل‌دار کردن نانولوله‌های کربنی با انواع گوناگون پلیمرها یا گروه‌های آلی آب‌دوست به صورت کوالانسی یا غیرکوالانسی می‌تواند تأثیر به‌سزایی در پراکندگی نانولوله‌های کربنی داشته باشند و با تشکیل کمپلکس و ایجاد نیروی دافعه بین نانولوله‌های منفرد با کاهش تجمع ذره‌های موجب افزایش پراکندگی در حلال شوند [۹].

برزگر بفروری و همکاران در سال ۲۰۰۹ میلادی هم‌زمان از ماده فعال کننده سطحی و روش شیمیایی برای افزایش پراکندگی

(۱) MWNT-CS NP hybrids

(۲) NPCS-SWNT

(۳) Dynamic Light Scattering (DLS)

(۴) Quartz Crystal Microbalance with dissipation Monitoring QCM)

(۵) Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO)

(۶) 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone

جدول ۱- اختصار مربوط به هر ماده.

| ردیف | نام ماده | اختصار |
|------|--|-------------|
| ۱ | کوئرستین | QC |
| ۲ | کیتوسان | CS |
| ۳ | نانولوله کربنی چند دیواره | MWNT |
| ۴ | نانولوله کربنی چند دیواره اکسید شده | OX-MWNT |
| ۵ | نانولوله کربنی چند دیواره اکسید شده اصلاح شده با کیتوسان | CS-OXMWNT |
| ۶ | کوئرستین بارگیری شده رو نانولوله کربنی چنددیواره اصلاح شده | QC-CSOXMWNT |

از دستگاه طیف سنج فروسرخ مدل FTIR-6300(400-4000 cm⁻¹) ساخت شرکت Jasco ژاپن و دستگاه SEM مدل HITACHI S-4160 با دقت ۵ نانومتر به منظور بررسی ساختار نانوحامل تولید شده از نمونه‌های QC، CS-OXMWNT و QC-CSOXMWNT و برای بررسی میزان پراکندگی و تجمع نانوحامل تولید شده، از دستگاه طیف سنج فرابنفش - مرئی مدل V-570 ساخت شرکت جاسکو ژاپن و دستگاه کدورت سنج ساخت شرکت Eutech Instruments کشور سنگاپور مدل TN-100 استفاده شد.

روش تجربی

در جدول ۱ نام موادی که در ادامه به اختصار از آن‌ها استفاده شده ارایه شده است

روش اکسایش MWNT

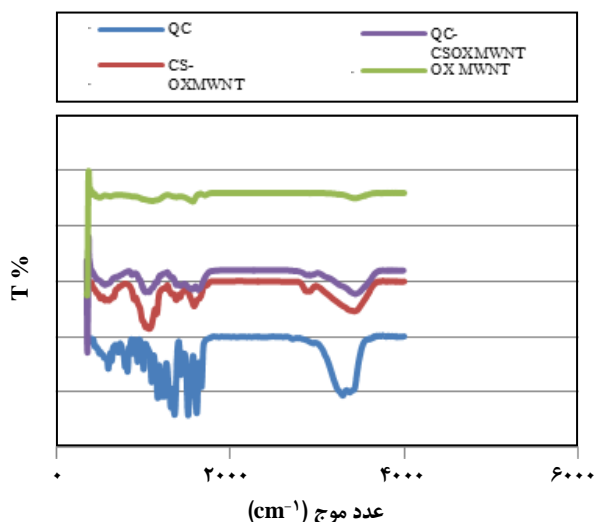
برای اکسید MWNT از سولفوریک اسید و نیتریک اسید به نسبت حجمی ۲ به ۳ با نسبت وزنی نانولوله به مخلوط اسیدی ۱ به ۴۰۰ استفاده شد، و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و ۸۰۰ دور در دقیقه روی همزن به مدت ۲۴ ساعت در شرایط رفلاکس قرار داده شد. به منظور شستشو دادن و جدا کردن نانولوله‌های اکسید شده، نمونه‌ها پس از رقیق کردن با آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه در ۸۰۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۱۰ درجه سلسیوس در سانتریفیوژ قرار داده و پس از خالی کردن آب بالاسری دوباره آب مقطر همراه سود ۰/۱ نرمال به نمونه افزوده شده و دوباره در شرایط پیشین سانتریفیوژ شد. مرحله شستشو دادن تا خنثی شدن آب بالاسری ادامه می‌یابد. پس از صاف کردن محلول به دست آمده

لسیتین - کیتوسان [۲۴]، نانو ذره‌های لیپید [۲۵]، نانوذره‌های CSO-LA/β-Ig [۲۵]، QCMNPs [۲۷]، نانو ذره‌های گرافن اکسید (GO) [۲۸] بارگیری شده است و یک آنتی اکسیدان طبیعی است [۲۱] که نقش به‌سزایی در جلوگیری از سرطان‌های سینه، انتهای روده‌ی بزرگ، پروستات، تخمدان، غشای داخلی رحم، و ریه دارد و خاصیت آنتی اکسیدانی آن در آزمایش‌های درون تنی و برون تنی به اثبات رسیده است [۲۸]. افزون بر ویژگی ضد سرطانی کوئرستین، این ماده برای کاهش سطح LDL خون و کاهش فشار خون در افرادی که فشار خون بالا دارند موثر است [۲۹]. میوه‌ها و سبزیجات به ویژه انواع مرکبات، سیب، پیاز، جعفری، چای سبز، روغن زیتون، انگور، گیلاس، توت سیاه، ذغال اخته و تمشک فراورده‌های کشاورزی اصلی دارای کوئرستین هستند [۳۰، ۲۹، ۱۹]. به منظور مشخصه سازی ساختار نانوحامل تولید شده از آزمون FT-IR استفاده شد، و تأثیر پوشش کیتوسان و بارگیری دارو بر تجمع نانولوله کربنی با استفاده از طیف فرابنفش - مرئی و دستگاه کدورت سنج بررسی می‌شود.

بخش تجربی

مواد و تجهیزات

نانولوله کربنی چند دیواره خام با قطر خارجی ۱۰ تا ۲۰ نانومتر، طول ۳۰ میکرومتر و خلوص بالای ۹۵ درصد از شرکت نوترینو خریداری شد. سولفوریک اسید [۲۵۰۰ ۰۰۷۳۱]، نیتریک اسید [۲۵۰۰ ۰۰۴۵۲] و متانول [۱۰۶۰۰۷] از شرکت مرک تهیه شدند. کوئرستین [۸-۹۷-۸۴۹۰۶۱] و کیتوسان [۴-۷۶-۹۰۱۲] از شرکت سیکما آلدريج خریداری شد. تمام مواد بدون خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۱- طیف فرسرخ مربوط به نمونه‌های QC، CS-OXMWNT، QC-OXMWNT و QC-CSOXMWNT.

در دستگاه التراسونیک قرار داده شد. سرانجام نمونه OX-MWNT چهار برابر نسبت به نمونه های دیگر رقیق شد.

نتیجه‌ها و بحث

آزمون‌های مشخصه‌سازی

نتیجه‌های آزمون FT-IR مربوط به نمونه‌های QC، CS-OXMWNT، QC-OXMWNT، OX-MWNT و QC-CSOXMWNT در شکل ۱ داده شده است.

در بررسی طیف مربوط به OX-MWNT دو پیک دیده شده در 3439 cm^{-1} و 1569 cm^{-1} وجود گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل روی این نمونه را نشان می‌دهند. با اتصال پلیمر کیتوسان به OX-MWNT ارتعاش‌های خمشی گروه N-H به صورت یک پیک در 1640 cm^{-1} در نمونه CS-OXMWNT دیده می‌شود. و ارتعاش‌های خمشی خارج از صفحه‌ای C-H متصل به حلقه اروماتیک یک پیک در 932 cm^{-1} در نمونه QC-CSOXMWNT نشان می‌دهد که به 891 cm^{-1} در نمونه QC-CSOXMWNT انتقال پیدا کرده است. بررسی ساختار QC نشان می‌دهد که بارگیری آن بر روی CS-OXMWNT سبب افزودن حلقه‌های اروماتیک و پیوندهای دوگانه C=C می‌شود، که ارتعاش‌های کششی C=C به صورت یک پیک در 1630 cm^{-1} و ارتعاش‌های C=C نیز در 1427 cm^{-1} و 1377 cm^{-1} در نمونه QC-CSOXMWNT دیده می‌شوند. همچنین ارتعاش‌های کششی

با کاغذ صافی، رسوب به دست آمده را به مدت ۲۴ ساعت در آون در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار داد تا به طور کامل خشک شود.

روش اصلاح نانولوله با CS

برای تهیه CS-OXMWNT، مقدار ۱۰ میلی‌گرم از OX-MWNT و ۲۰ میلی‌گرم CS را همراه ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت یک ساعت در حمام التراسونیک قرار داده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه روی همزن قرار داده شد، سپس رسوب موجود با آب مقطر شستشو داده شد و در آون در دمای ۵۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت خشک شد.

روش بارگیری QC

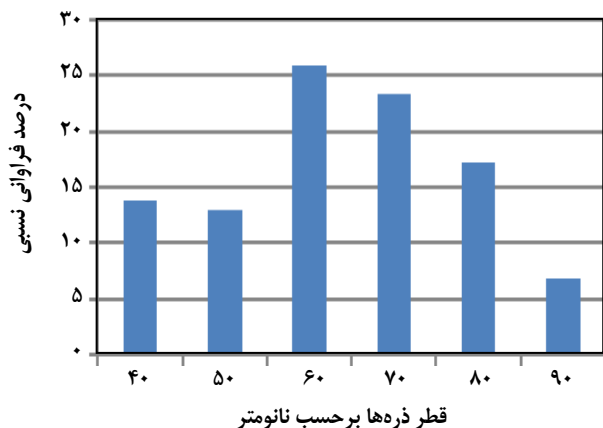
۱۰ میلی‌گرم QC و CS-OXMWNT در ۴۰ میلی‌لیتر متانول حل شد و محلول به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در حمام فراصوت قرار داده شد، سپس در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت روی همزن مغناطیسی قرار داده شد و پس از پایان زمان واکنش و صاف کردن محلول، رسوب به دست آمده در آون به مدت ۱۶ ساعت خشک شد.

روش رهائش QC

آزمایش‌های رهائش دارو برای دو حامل QC-OXMWNT و QC-CSOXMWNT در دو محیط بافر فسفات نمکی با $\text{pH} = 5.5$ و محیط بافر فسفات نمکی با $\text{pH} = 7.4$ که ۵۰٪ متانول به آن‌ها افزوده شده انجام شد. جرم مشخصی از نمونه رهائش در ۳۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات نمکی با pH مشخص درون بشر قرار داده و درون دستگاه شیکرانکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۹۶ ساعت قرارداده شد. در فاصله‌های زمانی مشخص ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۸۴ و ۹۶ ساعت از محلول‌ها نمونه‌برداری شد و به همان میزان بافر جدید جایگزین شد. میزان جذب هر نمونه توسط دستگاه UV تعیین شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها

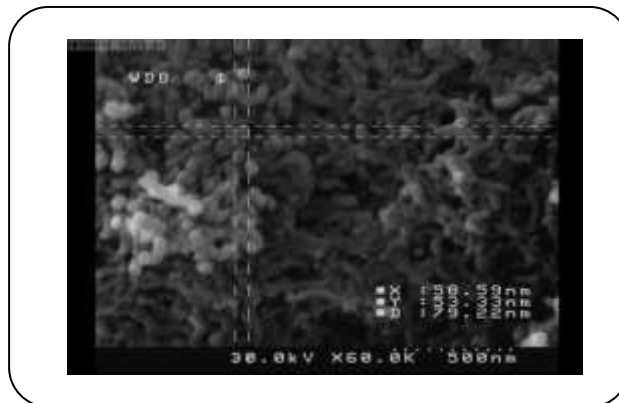
۵ میلی‌گرم از MWNT، OX-MWNT، CS-OXMWNT و QC-CSOXMWNT به ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد و به مدت ۵۰ دقیقه در دستگاه فراصوت قرار داده شد. سپس نمونه‌ها توسط دستگاه سانتریفیوژ در دور ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول به دست آمده دوباره ۱۰ دقیقه



شکل ۳- نمودار درصد نسبی فراوانی تجمعی قطر حامل QC-CSOXMWNT.

آزمایش‌های رهایش دارو برای دو حامل دارویی QC-OXMWNT و QC-CSOXMWNT در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محلول بافر فسفات/متانول ۵۰ درصد دو pH متفاوت انجام شد. شکل‌های ۴ و ۵ درصد تجمعی رهایش را نشان می‌دهد.

به طور کلی در رهایش کنترل شده‌ی دارو باید مقدار رهایش در pH اسیدی که مطابق با شرایط بافت‌های سرطانی است، بیش از شرایط خنثی باشد. سیر رهایش دارو در ۱۲ ساعت اولیه نسبت به ادامه آن تندتر است، که مربوط به جذب کوئرستین روی سطح نانولوله توسط نیروهای واندروالسی است. وجود رهایش ناگهانی در ساعت‌های اولیه در شرایطی که حامل دارویی به صورت هدفمند به محل مورد نظر منتقل شود می‌تواند در روند درمان مفید باشد. مطابق با شکل‌های ۴ و ۵ بیشینه رهایش دارو در بافر ۷٫۴ (شرایط خنثی) برای حامل QC-CSOXMWNT در طول ۹۶ ساعت به ۲۶ درصد رسید، در حالی که در شرایط بافت سرطانی (بافر ۵٫۵) این مقدار ۵۵٫۷ است و بیانگر پایداری نسبی بارگیری دارو در شرایط خنثی است. رهایش دارو در بافر ۷٫۴ تا ۹۶ ساعت اندازه‌گیری شد، از مقدار رهایش دارو پس از ۹۶ ساعت می‌توان صرف نظر کرد زیرا داروی آزاد نشده با پیوند مستحکمی به حامل متصل شده و از این به بعد فقط با تغییر قدرت یونی محلول آزاد می‌شود. از آنجا که دارو کوئرستین از طریق پیوند هیدروژنی نیز به حامل متصل شده است، در شرایطی که قدرت اسیدی محیط بیش‌تر باشد H^+ موجود در محلول بافری با گروه عاملی روی سطح نانولوله برای تشکیل پیوند هیدروژنی با دارو رقابت کرده و دارو در این شرایط آزاد می‌شود. چون اتصال دارو



شکل ۲- تصویر SEM از حامل QC-CSOXMWNT.

پیوندهای C-H متصل به الکن‌ها در فاصله $3200-3400\text{ cm}^{-1}$ با ارتعاش‌های O-H هم‌پوشانی پیدا کرده و پیوندهای هیدروژنی شکل گرفته بین کوئرستین و حامل سبب انتقال اندک پیک‌ها به سمت راست شده است.

برای محاسبه قطر نانوذره‌های QC-CSOXMWNT از آزمون SEM استفاده شد. شکل ۲ تصویر SEM با بزرگ‌نمایی ۶۰ برابر را نشان می‌دهد.

نمودار فراوانی تجمعی نسبی بر اساس نتیجه‌های به دست آمده از آزمون SEM برای تعیین اندازه قطر ۱۲۰ نانوذره که به صورت تصادفی انتخاب شده‌اند در شکل ۳ نشان داده شده است.

با توجه به نمودار ۳ قطر حدود ۶۰ درصد از نانوذره‌های بین ۵۰ تا ۹۰ نانومتر است.

نتیجه‌های بارگیری و رهایش نانو حامل سنتز شده

مقدار درصد بارگیری دارو از معادله‌ی ۱ محاسبه شد.

$$(1) \times 100 = \left(\frac{\text{جرم اولیه دارو} - \text{جرم داروی باقیمانده}}{\text{جرم حامل}} \right) = \text{درصد بارگیری دارو}$$

برای یافتن جرم داروی باقیمانده پس از صاف کردن محلول دارای نانولوله بارگیری شده، غلظت محلول داروی جذب نشده زیر صافی، پس از تعیین میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر با توجه به منحنی‌های واسنجی تعیین شد به این ترتیب مقدار داروی جذب شده روی حامل‌های OX-MWNT و CS-OXMWNT به ترتیب ۳۱ و ۱۶ درصد به صورت تقریبی محاسبه شد.

روی CS-OXMWNT ضعیف‌تر از OX-MWNT است، مقدار داروی آزاد شده در حامل QC-CSOXMWNT بیشتر از QC-OXMWNT است.

نتیجه‌های پراکندگی نانولوله‌ی کربنی

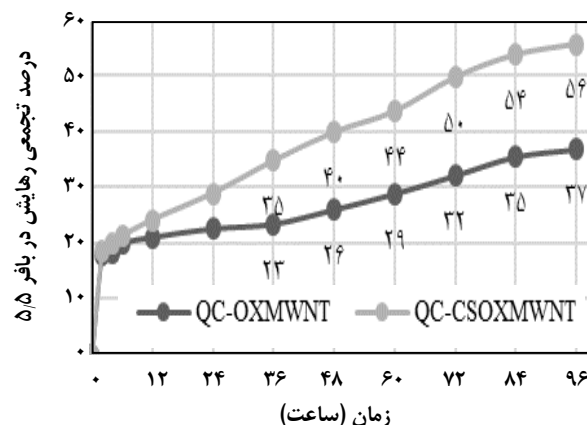
پیش از این‌که نمونه‌ها سانتریفیوژ شوند، ذره‌های به نسبت درشتی در محلول وجود دارند که به خوبی پراکنده نشده‌اند و پس از زمان کوتاهی به دلیل وزنشان ته نشین می‌شوند. میزان کدورت این نمونه‌ها در این مرحله مشخص شد. به دلیل این‌که OX-MWNT به خوبی در فضای حلال پراکنده می‌شود، محلول کدوری را تشکیل داده و کدورت این نمونه بالاتر از ۱۰۰۰ NTU بوده که توسط دستگاه کدورت سنج قابل اندازه‌گیری نیست. با اتصال گروه کیتوسان به OX-MWNT میزان کدورت این نمونه به شدت کاهش می‌یابد. در شکل ۶ میزان کدورت نمونه‌های اندازه‌گیری شده با هم مقایسه شده است.

به منظور بررسی میزان پراکندگی و تجمع نمونه‌های سوسپانسیون بی‌درنگ پس از قرار دادن نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ و ۲۴ ساعت پس از آن با دستگاه طیف سنج مرئی - فرابنفش طیف گسترده از طول موج ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر گرفته شد. از آن‌جا که تنها نانولوله‌هایی که به خوبی پراکنده شده‌اند توانایی جذب در ناحیه نور فرابنفش دارند، [۱۴] بنابراین میزان جذب مربوط به هر نمونه می‌تواند معیاری از پراکندگی آن باشد. مقدار جذب نمونه‌های

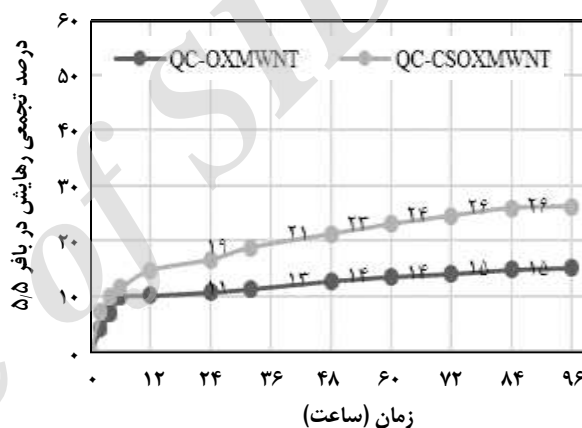
MWNT, CS-OXMWNT و QC-CSOXMWNT بلافاصله پس از آماده‌سازی در شکل ۸ گزارش شده است. به دلیل بالا بودن غلظت مربوط به نمونه سوسپانسیون OX-MWNT، غلظت این نمونه چهار برابر نسبت به نمونه‌های دیگر رقیق شده است. شکل ۷ میزان جذب نمونه‌ی رقیق شده‌ی OX-MWNT را نشان می‌دهد.

با توجه به میزان جذب این نمونه پراکندگی بالایی را نسبت به سایر نمونه‌ها نشان می‌دهد. گروه‌های آلدوست کربوکسیل و هیدروکسیل متصل به OX-MWNT با ملکول‌های حلال پیوند هیدروژنی برقرار کرده و سبب پراکندگی خوب این نمونه شده است. میزان جذب این نمونه پس از ۲۴ ساعت تغییر محسوسی نداشته و پایداری خوبی را نشان می‌دهد.

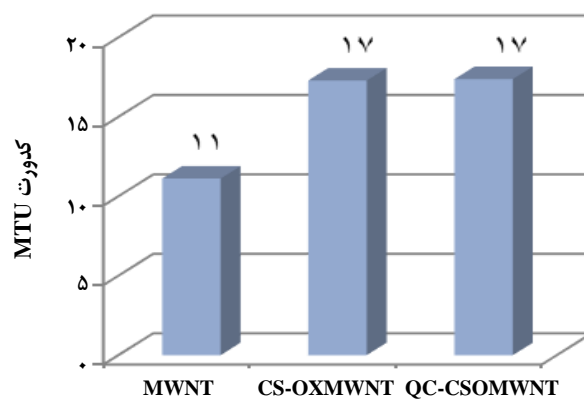
شکل ۸ میزان جذب اولیه سایر نمونه‌ها را نشان می‌دهد.



شکل ۴- نمودار درصد تجمعی رهائش دارو در بافر ۵/۵.



شکل ۵ - نمودار درصد تجمعی رهائش دارو در بافر ۷/۴.



شکل ۶ - کدورت نمونه‌های MWNT، CS-OXMWNT و QC-CSOXMWNT.

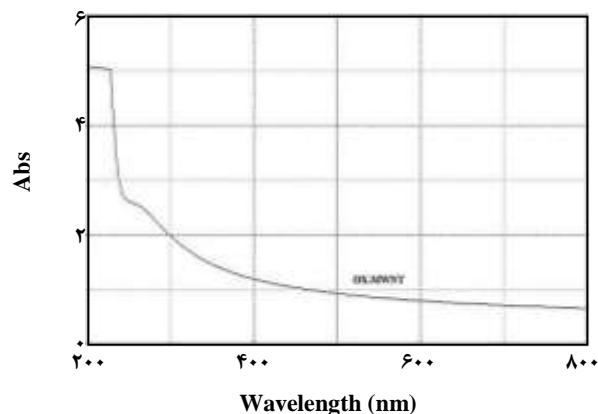
با اتصال گروه کیتوسان به نانولوله اکسید شده و تشکیل CS-OXMWNT میزان جذب و پراکندگی این نمونه کاهش یافته اما جذب آن نسبت به MWNT بیش‌تر است که با بارگیری داروی کوئرستین و تشکیل QC-CSOXMWNT کاهش می‌یابد. نتیجه‌های به دست آمده از کدورت سنجی نیز این روند را نشان می‌دهد. زمانی که OX-MWNT با پلیمر کیتوسان پوشیده می‌شود دسترسی گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل برای ایجاد جاذبه‌ی هیدروژنی با ملکول‌های آب کاهش یافته و با جاذبه‌ی ضعیف‌تر گروه آمین موجود در کیتوسان جایگزین شده که موجب کاهش پراکندگی CS-OXMWNT می‌شود. ماهیت آب‌دوستی گروه کیتوسان به دلیل داشتن گروه‌های آمینی دلیلی برای افزایش جذب این نمونه نسبت به MWNT می‌باشد.

شکل ۹ طیف مربوط به جذب نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد. کاهش میزان جذب نمونه‌ها نشان می‌دهد که نیروی جاذبه‌ی واندروالسی بین نانوذره‌ها موجب به هم پیوستن ذره‌ها شده و با تشکیل ذره‌ها با قطر بزرگ‌تر ته نشین می‌شوند و با کاهش تعداد ذره‌های معلق در سوسپانسیون میزان جذب کاهش یافته است. با توجه به این که تمامی نمونه‌ها پس از قرار گرفتن به مدت ۵۰ دقیقه در حمام فراصوت سانتریفیوژ شده و دوباره در حمام فراصوت به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت، میزان پراکندگی نمونه‌ها کاهش زیادی ندارد.

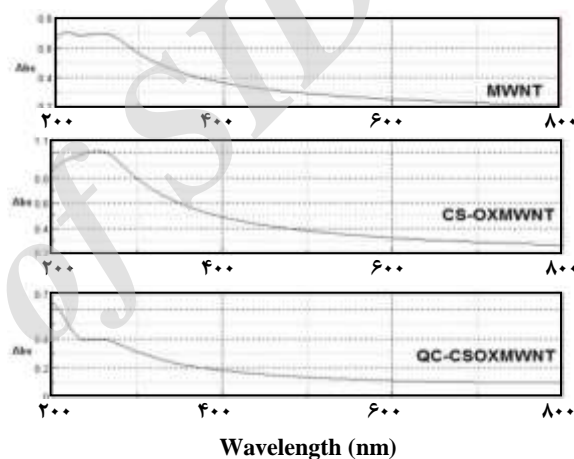
نتیجه‌گیری

در این پژوهش پس از بارگیری داروی کوئرستین روی CS-OXMWNT و مشخصه‌سازی توسط آزمون‌های SEM و FT-IR و انجام آزمایش‌های ره‌ایش دارو از نانو حامل سنتز شده، تجمع و پراکندگی نمونه‌های MWNT، OX-MWNT، CS-OXMWNT و QC-CSOXMWNT از طریق طیف گسترده فرابنفش- مرئی در بازه‌ی ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر و دستگاه کدورت سنج بررسی شد. نتیجه‌ها نشان داد که تجمع نانولوله اصلاح شده نسبت به نانولوله کربنی بهبود یافته اما در اثر بارگیری دارو این پراکندگی کاهش می‌یابد. پراکندگی محلول‌های سوسپانسیون تولید شده از نانولوله اصلاح شده با کیتوسان برای مدت ۲۴ ساعت به نسبت پایدار می‌باشد. بهبود پراکندگی حامل یکی از عامل‌هایی است که می‌تواند سبب افزایش مقدار بارگیری و ره‌ایش بهتر دارو باشد.

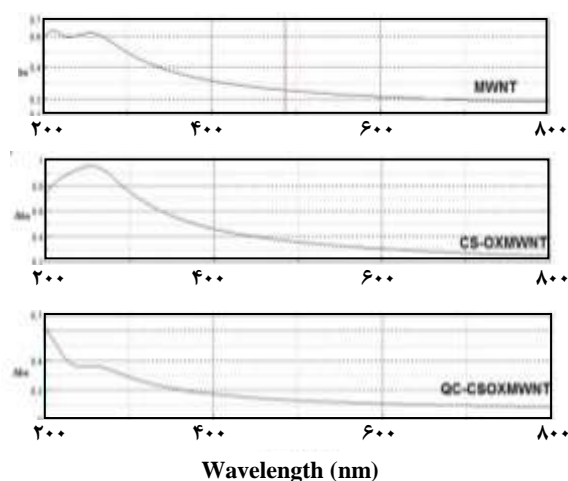
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۶



شکل ۷- طیف جذب مرئی - فرابنفش برای OX-MWNT دقیق شده.



شکل ۸ - طیف فرابنفش - مرئی اولیه نمونه‌ها.



شکل ۹ - طیف مربوط به جذب نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت.

مراجع

- [1] Madani S.Y., Naderi N., Dissanayake O., Tan A., Seifalian A.M., [A New Era of Cancer Treatment: Carbon Nanotubes as Drug Delivery Tools](#), *International Journal of Nanomedicine*, **6**: 2963-2977 (2011).
- [2] Lay C. L., Liu H.Q., Tan H.R., Liu Y., [Delivery of Paclitaxel by Physically Loading Onto Poly \(ethylene glycol\)\(PEG\)-Graftcarbon Nanotubes for Potent Cancer Therapeutics](#), *Nanotechnology*, **21**(6): 065101-065111 (2010).
- [3] Kam N.W.S., Dai H., [Carbon Nanotubes as Intracellular Protein Transporters: Generality and Biological Functionality](#), *Journal of the American Chemical Society*, **127**(16): 6021-6026 (2005).
- [4] Liu Y., Wu D.C., Zhang W.D., Jiang X., He C.B., Chung T.S., Leong K.W., [Polyethylenimine Grafted Multiwalled Carbon Nanotubes for Secure Noncovalent Immobilization and Efficient Delivery of DNA](#), *Angewandte Chemie*, **117**(30): 4860-4863 (2005).
- [5] Benincasa M., Pacor S., Wu W., Prato M., Bianco A., Gennaro R., [Antifungal Activity of Amphotericin B Conjugated to Carbon Nanotubes](#), *ACS Nano*, **5**(1): 199-208 (2010).
- [6] McDevitt M.R., Chattopadhyay D., Kappel B.J., Jaggi J.S., Schiffman S.R., Antczak C., Scheinberg D.A. [Tumor Targeting with Antibody-Functionalized, Radiolabeled Carbon Nanotubes](#), *Journal of Nuclear Medicine*, **48**(7): 1180-1189 (2007).
- [7] Liu Z., Chen K., Davis C., Sherlock S., Cao Q., Chen X., Dai H., [Drug Delivery with Carbon Nanotubes for in Vivo Cancer Treatment](#), *Cancer Research*, **68**(16): 6652-6660 (2008).
- [8] Wong B.S., Yoong S.L., Jagusiak A., Panczyk T., Ho H.K., Ang W.H., Pastorin G., [Carbon Nanotubes for Delivery of Small Molecule Drugs](#), *Advanced Drug Delivery Reviews*, **65**(15): 1964-2015 (2013).
- [9] Garmaroudi F.S., Vahdati R.A.R., [Functionalized CNTs for Delivery of Therapeutics](#), *International Journal of Nano Dimension*, **1**(2): 89-102 (2010).
- [10] Venkatesan J., Kim S., [Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering—An Overview](#), *Mar. Drugs*, **8**: 2252–2266 (2010).
- [11] Yang L., Yang B., Zeng D., Wang D., Wang Y., Zhang L., [Formation and Properties of a Novel Complex Composed of an Amylose-Grafted Chitosan Derivative and Single-Walled Carbon Nanotubes](#), *Carbohydr. Polym.*, **85**: 845–853 (2011).
- [12] Chung T., Limpanichpakdee T., Yang M., Tyan Y., [An Electrode of Quartz Crystal Microbalance Decorated with CNT/Chitosan/fibronectin for Investigating Early Adhesion and Deforming Morphology of Rat Mesenchymal Stem Cells](#), *Carbohydr. Polym.*, **85**: 726–732 (2011).
- [13] Khor E., "Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise", Department of Chemistry, National University of Singapore, Republic of Singapore (2001).

- [14] Li C., Yang K., Zhang Y., Tang H., Yan F., Tan Liang, Yao S., [Highly Biocompatible Multi-Walled Carbon Nanotube–Chitosan Nanoparticle Hybrids as Protein Carriers](#), *Acta biomaterialia*, **7**(8): 3070-3077 (2011).
- [15] Ali Mohammadi Z.A., Aghamiri S.F., Zarrabi A., Talaie M. R., [A Comparative Study on Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes by Chitosan and Its Derivatives for Delivery of Doxorubicin](#), *Chemical Physics Letters*, **642**: 22-28 (2015).
- [۱۶] برزگر بفرویی، هادی؛ امین، محمد حسن؛ عبادزاده، تورج؛ جعفری پورمبیدی، جعفر؛ طباطبائی بفرویی، سید بهزاد؛ دیسپرز کردن نانولوله های کربنی در محیط های آبی با استفاده از سورفکتنت و روش شیمیایی، هفتمین کنگره سرامیک ایران، شیراز، ۱۳۸۸
- [17] Yi P., Chen K.L., [Influence of Surface Oxidation on the Aggregation and Deposition Kinetics of Multiwalled Carbon Nanotubes in Monovalent and Divalent Electrolytes](#), *Langmuir*, **27**(7): 3588-3599 (2011).
- [18] Bustos-Ramírez K., Martínez-Hernández A.L., Martínez-Barrera G., Icaza M.D., Castaño V.M., Velasco-Santos C., [Covalently Bonded Chitosan on Graphene Oxide via Redox Reaction](#), *Materials*, **6**(3): 911-926 (2013).
- [19] Wu T.H., Yen F.L., Lin L.T., Tsai T.R., Lin C.C., Cham T.M., [Preparation, Physicochemical Characterization, and Antioxidant Effects of Quercetin Nanoparticles](#), *International Journal of Pharmaceutics*, **346**(1): 160-168 (2008).
- [20] Zhang Y., Yang Y., Tang K., Hu X., Zou G., [Physicochemical Characterization and Antioxidant Activity of Quercetin-Loaded Chitosan Nanoparticles](#), *Journal of Applied Polymer Science*, **107**(2): 891-897 (2008).
- [21] Song X., Zhao Y., Hou S., Xu F., Zhao R., He J., Chen Q., [Dual Agents Loaded PLGA Nanoparticles: Systematic Study of Particle Size and Drug Entrapment Efficiency](#), *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **69**(2): 445-453 (2008).
- [22] Kumari A., Yadav S.K., Pakade Y.B., Singh B., Yadav S.C., [Development of Biodegradable Nanoparticles for Delivery of Quercetin](#). *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, **80**(2): 184-192 (2010).
- [23] Barreto A.C.H., Santiago V.R., Mazzetto S.E., Denardin J.C., Lavín R., Mele G., Fachine P.B.A., [Magnetic Nanoparticles for a New Drug Delivery System to Control Quercetin Releasing for Cancer Chemotherapy](#), *Journal of Nanoparticle Research*, **13**(12): 6545-6553 (2011).
- [24] Tan Q., Liu W., Guo C., Zhai G., [Preparation and Evaluation of Quercetin-Loaded Lecithin-Chitosan Nanoparticles for Topical Delivery](#), *International Journal of Nanomedicine*, **6**: 1621- (2011).
- [25] Chen-yu G., Chun-fen Y., Qi-lu L., Qi T., Yan-wei X., Wei-na L., Guang-xi Z., [Development of a Quercetin-Loaded Nanostructured Lipid Carrier Formulation for Topical Delivery](#), *International Journal of Pharmaceutics*, **430**(1): 292-298 (2012).

- [26] Ha H.K., Kim J.W., Lee M.R., Lee W.J., [Formation and Characterization of Quercetin-Loaded Chitosan Oligosaccharide/ \$\beta\$ -Lactoglobulin Nanoparticle](#), *Food Research International*, **52**(1): 82-90 (2013).
- [27] Junrong Yu, Nadia Grossiord, Cor E. Koning and Joachim Loos, [Controlling the Dispersion of Multi-Wall Carbon Nanotubes in Aqueous Surfactant Solution](#), *Carbon*, **45**: 618-23 (2007).
- [28] Rahmanian N., Hamishehkar H., Dolatabadi J.E.N., Arsalani N., [Nano Graphene Oxide: A Novel Carrier for Oral Delivery of Flavonoids](#), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **123**: 331-338 (2014).
- [29] Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L., [Flavonoids: Promising Anticancer Agents](#), *Medicinal Research Reviews*, **23**(4): 519-534 (2003).
- [30] Kumar S.R., Priyatharshni S., Babu V.N., Mangalaraj D., Viswanathan C., Kannan S., Ponpandian N., [Quercetin Conjugated Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles for in-Vitro Analysis of Breast Cancer Cell Lines for Chemotherapy Applications](#), *Journal of Colloid and Interface Science*, **436**: 234-242 (2014).