

[制 剂]

介孔二氧化硅纳米粒对黄酮类化合物载药性能及药物释放的影响

刘亚男, 裴高升, 邱喜龙, 戚爱棣, 任晓亮*

(天津中医药大学中药学院, 天津 300193)

摘要: 目的 制备介孔二氧化硅纳米粒, 并研究其对黄酮类化合物(芹菜素、槲皮素、橙皮素)载药性能及药物释放的影响。方法 制备负载黄酮类化合物的介孔二氧化硅纳米粒, 扫描/透射电镜、傅里叶红外光谱仪、X射线衍射、氮气吸附-脱附解析对其进行表征, 高效液相色谱仪测定纳米粒的载药量。结果 所得纳米粒形状大小均一, 平均粒径230~250 nm, 比表面积为1 045 cm²/g, 孔径2.8 nm。橙皮素、槲皮素和芹菜素的载药量分别为27%、23%和18%, 40 min时的释放量分别为84%、80%和76%。结论 介孔二氧化硅纳米粒可实现黄酮类化合物的高负载, 并显著提高其在水溶液中的溶出度。

关键词: 介孔二氧化硅; 纳米粒; 芹菜素; 槲皮素; 橙皮素; 载药性能; 药物释放

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)03-0528-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.03.011

Effects of mesoporous silica nanoparticles on the drug loading and release of flavonoid compounds

LIU Ya-nan, PEI Gao-sheng, QIU Xi-long, QI Ai-di, REN Xiao-liang*

(College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT: AIM To prepare mesoporous silica nanoparticles and to study their impacts on flavonoid compounds' (apigenin, quercetin and hesperetin) drug loading and release. **METHODS** The characters of prepared mesoporous silica nanoparticles loaded with flavonoid compounds were determined by scan electron microscopy, transmission electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction and nitrogen adsorption-desorption analysis. The drug loadings of nanoparticles were then measured by high performance liquid chromatography (HPLC). **RESULTS** Found in a homogeneous shape, the obtained nanoparticles demonstrated their average particle sizes within the range of 230 - 250 nm, with a specific surface area of 1 045 cm²/g and pore size of 2.8 nm. In addition, for hesperetin, quercetin and apigenin, their releases at 40 min were 84%, 80% and 76% with the corresponding drug loadings of 27%, 23% and 18%, respectively. **CONCLUSION** The mesoporous silica nanoparticles can help to achieve a high drug loading of flavonoid compounds, and significantly increase their dissolution rates in aqueous solutions.

KEY WORDS: mesoporous silica; nanoparticles; apigenin; quercetin; hesperetin; drug loading; drug release

现代中药筛选的活性成分有相当一大部分为疏水性药物, 在水中溶解度极微, 药物不易被胃肠道吸收, 导致生物利用度低, 进而影响治疗效果, 极大地限制了其临床应用^[1-3]。目前, 虽然

已有多种新制剂技术, 如水溶性前体药物的合成^[4]、包合物^[5-6]、纳米晶^[7]、自乳化^[8]等, 分别通过减小药物粒径、使药物以分子状态存在、改变药物与胃肠黏膜的亲合性和透过性等方法提

收稿日期: 2015-09-21

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81473543)

作者简介: 刘亚男(1984—), 女, 讲师, 从事中药药代动力学、药效学评价、胃肠道稳定性方面的研究。Tel: 13752728350, E-mail: tianyanan2007@163.com

* 通信作者: 任晓亮(1980—), 男, 副教授, 从事中药化学、中药质量控制方法和药代动力学方面的研究。Tel: (022) 59596221, E-mail: xiaoliang_ren@sina.com

高其溶出度和生物利用度,但这些技术要求药物必须具备特定的物理化学性质^[9-11],使常规纳米技术在中药制剂中应用受到极大限制。因此,迫切需要寻找符合中药特点的高载药量、适用范围广的给药系统。

与传统的药物载体,如脂质体、乳剂、聚合物纳米粒相比,无机载体具有物理稳定性好、粒子大小及形态控制简单、易于表面功能化等优势^[12-14],在医药领域显示出巨大的应用前景。近年来,许多不同结构特性的无机材料,如金属纳米粒子^[15]、纳米阀门^[16-19]、量子点^[20]、MOF体系^[21-22]在药物传递中的应用受到广泛关注与重视。其中,介孔二氧化硅纳米粒^[23]由于其较大的比表面积、较高的孔隙率、较好的稳定性、表面易被功能化修饰、良好的生物相容性,能渗透到细胞内而达到药物靶向释放的固有属性^[24]等特点,作为药物载体已引起了生物医药领域研究人员的极大关注。例如,喜树碱^[25]、紫杉醇^[26]等疏水性药物包封在介孔硅中,当受到外界刺激时,可以从孔道中很好地释放出来。Wang等基于介孔二氧化硅的生物相容性和细胞渗透性,将替米沙坦药物包裹在介孔硅内,再结合制剂工艺,使其溶出速率加快,生物利用度提高^[27],在改善难溶性药物的生物利用度方面具有较大优势。鉴于此,本实验以介孔二氧化硅纳米粒为优良载体,负载黄酮类活性成分,并对芹菜素、槲皮素和橙皮素的增溶作用进行考察。

1 材料

1.1 仪器 Shimadzu LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); Bruker 550 红外光谱仪(德国 Bruker 公司); Rigaku Ultima IV 粉末 X 射线衍射仪(日本 Rigaku 公司); JEOL JSM 6700F 扫描电镜(日本 JEOL 公司); Hitachi H-800 透射电镜(日本 Hitachi 公司); DF-101S 集热式磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司); THZ-82 恒温水浴振荡器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); 台式离心机(美国 Beckman 公司); Sartorius BT125D 天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司); AX205 分析天平、pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司); 超纯水系统(美国 Millipore 公司); Varian Cary 50 UV-Vis 分光光度计(美国 Varian 公司)。

1.2 药品与试剂 芹菜素、橙皮素对照品购自南京泽朗医药科技有限公司(纯度 $\geq 98\%$); 槲皮素对照品购自中国食品药品检定研究院(批号 100081-200907)。十六烷基三甲基溴化铵

(CTAB)、正硅酸乙酯(TEOS)购自阿拉丁公司。盐酸、氢氧化钠等试剂购自国药集团化学试剂有限公司; 磷酸缓冲盐(pH = 6.8)根据《中国药典》2010 版附录 XV 制备; 超纯水(18.2 M Ω cm, Millipore 超纯水净化系统制得)。

2 方法

2.1 介孔二氧化硅纳米粒的制备^[28-29] 称取十六烷基三甲基溴化铵(CTAB) 1.0 g, 加入 240 mL 蒸馏水和 2 mol/L NaOH 溶液 3.5 mL, 超声溶解。80 °C 下磁力搅拌 30 min (转速 800 r/min) 以活化 CTAB 模板剂, 得到澄清溶液。逐滴加入 5 mL TEOS, 剧烈搅拌 15 min, 再在 80 °C 油浴条件下继续反应 2 h。将得到的白色沉淀纳米粒趁热过滤, 大量水和甲醇洗涤, 真空干燥过夜, 得到含有 CTAB 的二氧化硅纳米粒子。再取制备的未脱模板剂的二氧化硅纳米粒子 1.0 g, 置于圆底烧瓶中, 加入 100 mL 甲醇和 1 mL 浓盐酸, 60 °C 下磁力搅拌 12 h, 重复 1 次, 除去模板剂 CTAB, 再用大量蒸馏水和甲醇反复冲洗, 常温下真空干燥, 即得。

2.2 介孔二氧化硅纳米粒的表征测试

2.2.1 扫描电镜分析 采用扫描电镜测定介孔二氧化硅纳米粒的形貌特征, 真空度大于 1.33×10^{-9} kPa, 加速电压 10.0、20.0 kV, 放大倍数 $\times 3$ 、 $\times 6$ 、 $\times 10$ 、 $\times 20$ k。

2.2.2 透射电镜分析 通过透射电镜分析介孔二氧化硅纳米粒内部孔道的特征, 真空度大于 1.33×10^{-9} kPa, 加速电压 200.0 kV, 放大倍数 $\times 80.0$ 、 $\times 100.0$ 、 $\times 200.0$ k, 拍摄介孔材料的粒子形貌及孔结构。

2.2.3 红外分析 采用红外光谱分析测定介孔二氧化硅纳米粒的结构及官能团特征, KBr 压片, 波数范围 $400 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$, 分辨率 4 cm^{-1} , 扫描次数 32 次。

2.2.4 氮气吸附/脱附分析 采用氮气吸附-脱附法, 分析介孔二氧化硅纳米粒的比表面及孔径分布。样品于 250 °C 下真空脱气 2 h, 进行预处理, 然后在 77 K, 实验压力与初始压力比 (P/P_0) 为 0.01 ~ 0.99 的条件下进行氮吸附-脱附实验。根据 BET、BJH 公式, 分别计算介孔硅纳米粒子的比表面积及孔体积。

2.2.5 X-射线粉末衍射分析 通过 X-射线粉末衍射分析介孔二氧化硅纳米粒的晶型结构, 管电压 40 kV、管电流 40 mA, 铜靶、低角及高角扫描范围 2θ 分别为 $1 \sim 10^\circ$ 及 $10 \sim 75^\circ$, 狭缝宽 $(1/6)^\circ$, 扫

描速率分别为2°/min及5°/min, 波长0.154 10 nm。

2.3 载药体系的制备 称取槲皮素、芹菜素和橙皮素适量, 溶于20 mL乙醇中, 配制成1 mol/L标准品溶液。称取介孔硅纳米粒子50 mg, 加到乙醇溶液中, 超声分散20 min后, 置于磁力搅拌器上, 600 r/min下室温避光搅拌24 h, 10 000 r/min离心10 min, 分离沉淀, 水和乙醇各洗涤3次, 常温下真空干燥12 h, 得到介孔硅负载黄酮类化合物的复合微球(MSN@槲皮素、MSN@芹菜素和MSN@橙皮素)。合并所有上清液和洗涤液, 定容至50 mL, HPLC法于各自最大吸收波长处测定并计算药物的含有量。

2.4 载药量的测定

2.4.1 HPLC色谱条件 Waters Symmetry Shield™ RP C₁₈色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(A) - 0.1% 甲酸水(B), 条件及检测波长见表1; 体积流量1.0 mL/min; 柱温室温; 进样量10 μL。

表1 流动相条件及检测波长

Tab. 1 Mobile phase conditions and detection wavelengths

化合物	甲醇: 0.1% 甲酸	检测波长/nm
槲皮素	45: 55	254
芹菜素	70: 30	338
橙皮素	70: 30	287

2.4.2 黄酮类化合物的测定 精密称取槲皮素、芹菜素、橙皮素对照品适量, 置于10 mL棕色量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 配制对照品储备液。按倍数用甲醇逐级稀释, 置于10 mL棕色量瓶中, 摇匀, 配制成一系列标准溶液。按“2.4.1”项下色谱条件进样10 μL, 进行分析, 记录峰面积(图1)。以峰面积为纵坐标(Y), 各对照品质量浓度(μg/mL)为横坐标(X)进行线性回归, 得到回归方程(表2), 表明各对照品在一定范围内均具有良好的线性关系。另外, 槲皮素、芹菜素、橙皮素在水溶液中的饱和和质量浓度分别为0.088 8、0.112 1、0.926 1 μg/mL, 表明其在水溶液中的溶解度较低, 在体内很难达到有效药物浓度以发挥药效。通过介孔二氧化硅纳米粒对槲皮素、芹菜素、橙皮素的负载, 可提高其在水溶液中的溶出度, 载药量计算公式为^[30]载药量 = $[(m_1 - m_2) / m] \times 100\%$ 。其中, m 、 m_1 、 m_2 分别为MSN@药物的质量、总投药量、上清液和洗涤液中的剩余药量。

2.4.3 药物的体外释放^[28] 分别精密称取各载药样品适量, 置于渗析袋(分子质量≤8 000 Da)中,

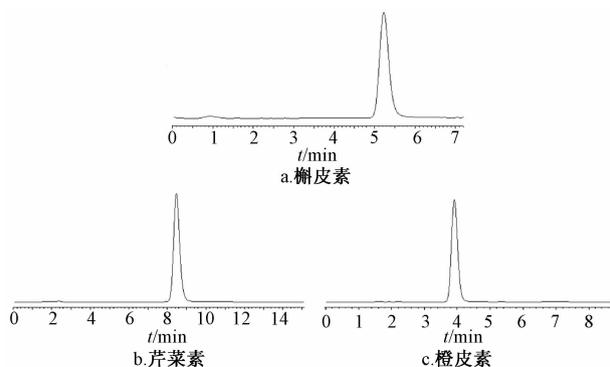


图1 槲皮素、芹菜素、橙皮素的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of apigenin, quercetin and hesperetin

表2 黄酮类化合物的标准曲线

Tab. 2 Standard curves of flavonoid compounds

化合物	回归方程	相关系数 r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
槲皮素	$Y = 49\ 786X - 25\ 472$	0.999 5	0.768 8 ~ 12.300 0
芹菜素	$Y = 56\ 938X + 330.04$	0.999 5	0.628 1 ~ 10.050 0
橙皮素	$Y = 67\ 333X - 70\ 287$	0.999 6	3.484 4 ~ 55.750 0

然后放置在盛有3 mL磷酸盐缓冲溶液(pH = 6.8)的比色皿中, 100 r/min磁力搅拌, 间隔一定时间取样。然后, 将比色皿置于紫外-可见分光光度计在各药物的最大吸收波长处, 测定其载药样品的药物释放吸光度。

3 结果与讨论

3.1 扫描电镜和透射电镜的表征结果 如图2所示, 从扫描电镜图片中可见制备的纳米粒呈近圆形, 大小均一, 粒径230 ~ 250 nm。而且, 从透射电镜图片中可以明显地看到其狭长的孔道、六边形蜂窝状介孔结构和高度有序的排列。

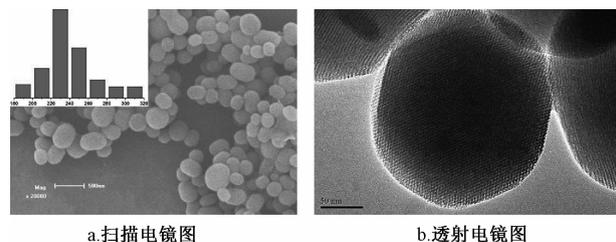


图2 介孔二氧化硅纳米粒的扫描电镜图及透射电镜图

Fig. 2 Images of mesoporous silica nanoparticles revealed by scan electron microscopy and transmission electron microscopy

3.2 红外表征结果 对介孔二氧化硅纳米粒进行FT-IR表征, 结果见图3。由图可知, 793、460 cm⁻¹处为Si-O-Si的伸缩振动和弯曲振动吸收峰; 3 460 cm⁻¹处是硅羟基Si-OH的弯曲振动峰;

954 cm^{-1} 处是硅羟基 Si-OH 对称伸缩振动吸收峰; 2 950 cm^{-1} 处的振动吸收峰与介孔硅的 C-H 伸缩振动吸收峰一致^[28]。

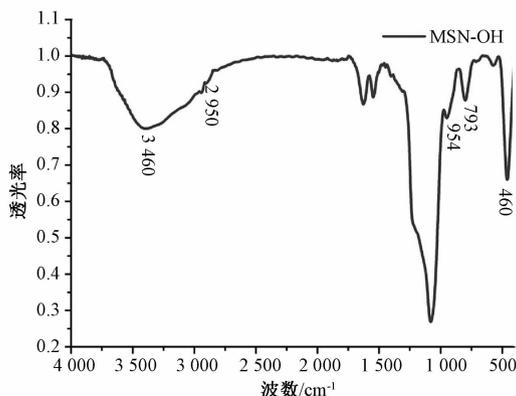


图3 介孔二氧化硅纳米粒的红外光谱图

Fig. 3 Infrared spectrum of mesoporous silica nanoparticles

3.3 介孔硅载体比表面积和孔径的表征结果 如图4所示, 吸附等温线处有明显的回滞环, 为IV型等温线, 表明所制备的载体孔径在介孔范围内。由孔径分布图可知, 孔径集中在2.8 nm左右, 与透射电镜表征结果一致, 而且非常均一。BET的测定结果表明, 纳米粒的比表面积达1 045 m^2/g , 孔容为1.2 cm^3/g 。

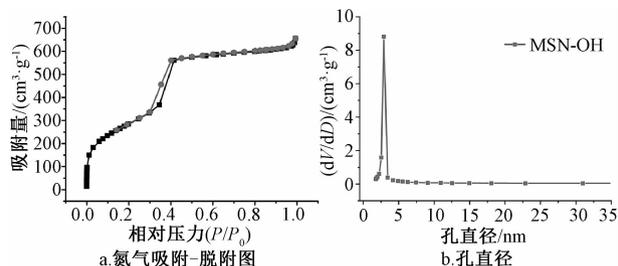


图4 介孔二氧化硅纳米粒的氮气吸附-脱附图和孔径分布
Fig. 4 N₂ adsorption-desorption curve and pore size distribution of mesoporous silica nanoparticles

3.4 粉末X射线衍射表征结果 对制备的纳米粒进行X射线衍射, 结果见图5。由图可知, 在低衍射角处有1个吸收很强的衍射峰, 而在较高衍射角处有3个吸收较弱的衍射峰, 分别为100°、110°、200°、220°典型峰, 表明采用溶胶-凝胶法制备的纳米粒具有六方结构, 属于MCM-41型^[28]。

3.5 药物的体外释放 在药物浓度为1 mmol/L, 常温载药24 h时, 纳米粒负载橙皮素、槲皮素和芹菜素的载药量分别为27%、23%和18%, 三者于磷酸缓冲盐(pH = 6.8)中的释放曲线见图6。

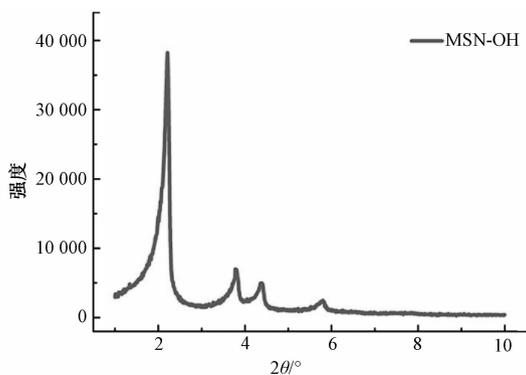


图5 介孔二氧化硅纳米粒的X射线衍射谱图
Fig. 5 X-ray diffraction pattern of mesoporous silica nanoparticles

起初, 药物根据浓度差从纳米粒中缓慢释放, 在40 min时达到平衡状态, 橙皮素、槲皮素和芹菜素从纳米粒中的释放量分别为84%、80%和76%。

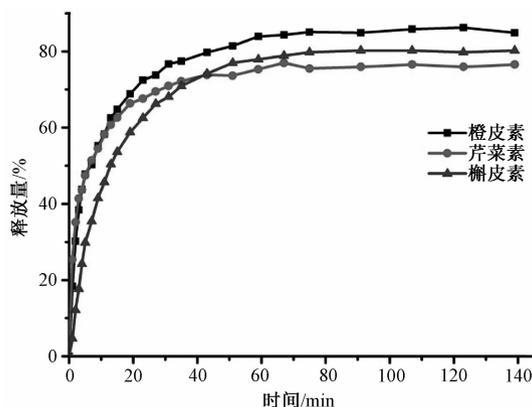


图6 载药(槲皮素、芹菜素和橙皮素)释放曲线
Fig. 6 Release curves of loaded drugs (quercetin, apigenin and hesperetin)

4 结论

本实验采用溶胶-凝胶法, 制备有序介孔二氧化硅纳米粒子。采用溶剂吸附平衡法, 使黄酮类化合物成功载入载体孔道结构中, 由于其刚性结构能完全保护进入孔道中的药物, 实现水难溶性中药的增溶效果。因此, 固体分散体的载药量可以满足口服制剂的需要, 有望成为药物的优良载体, 对提高难溶性药物口服吸收具有潜在的应用价值^[31]。

参考文献:

[1] Wang Z X, Deng Y J, Zhang X P. The novel application of tertiary butyl alcohol in the preparation of hydrophobic drug-HP beta CD complex [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2006, 58(3): 409-414.

- [2] Ferris D P, Lu J, Gothard C, *et al.* Synthesis of biomolecule-modified mesoporous silica nanoparticles for targeted hydrophobic drug delivery to cancer cells [J]. *Small*, 2011, 7(13): 1816-1826.
- [3] Aryal S, Hu C M J, Fu V, *et al.* Nanoparticle drug delivery enhances the cytotoxicity of hydrophobic-hydrophilic drug conjugates[J]. *J Mater Chem*, 2012, 22(3): 994-999.
- [4] Dahan A, Zimmermann E M, Ben-Shabat S. Modern prodrug design for targeted oral drug delivery[J]. *Molecules*, 2014, 19(10): 16489-16505.
- [5] Shi J, Chen Y, Wang Q, *et al.* Construction and efficient radical cation stabilization of cyclodextrin/aniline polypseudorotaxane and its conjugate with carbon nanotube [J]. *Adv Mater*, 2010, 22(23): 2575-2578.
- [6] Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin drug carrier systems[J]. *Chem Rev*, 1998, 98(5): 2045-2076.
- [7] Meyers M A, Mishra A, Benson D J. Mechanical properties of nanocrystalline materials[J]. *Prog Mater Sci*, 2006, 51(4): 427-556.
- [8] Mercuri A, Passalacqua A, Wickham M S, *et al.* The effect of composition and gastric conditions on the self-emulsification process of ibuprofen-loaded self-emulsifying drug delivery systems: A microscopic and dynamic gastric model study [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(7): 1540-1551.
- [9] Liu Y, Chen Y. Cooperative binding and multiple recognition by bridged bis (β -cyclodextrin) s with functional linkers[J]. *Acc Chem Res*, 2006, 39(10): 681-691.
- [10] Chen Y, Liu Y. Cyclodextrin-based bioactive supramolecular assemblies[J]. *Chem Soc Rev*, 2010, 39(22): 495-505.
- [11] Kusari S, Tatsimo S J, Zühlke S, *et al.* Tramadol-A true natural product? [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(45): 12073-12076.
- [12] Tarn D, Ferris D P, Barnes J C, *et al.* A reversible light-operated nanovalve on mesoporous silica nanoparticles [J]. *Nanoscale*, 2014, 6(6): 3335-3343.
- [13] Li H, Chen D X, Sun Y L, *et al.* Viologen-mediated assembly of and sensing with carboxylatopillar [5] arene-modified gold nanoparticles [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(4): 1570-1576.
- [14] Ho D, Sun X L, Sun S H, *et al.* Monodisperse magnetic nanoparticles for theranostic applications[J]. *Acc Chem Res*, 2011, 44(10): 875-882.
- [15] Hao R, Yu J, Ge Z, *et al.* Developing Fe₃O₄ nanoparticles into an efficient multimodality imaging and therapeutic probe[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(23): 11954-11963.
- [16] Ambrogio M W, Thomas C R, Zhao Y L, *et al.* Mechanized silica nanoparticles; a new frontier in theranostic nanomedicine [J]. *Acc Chem Res*, 2011, 44(10): 903-913.
- [17] Li Z X, Barnes J C, Bosoy A, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2012, 41(7): 2590-2605.
- [18] Xue M, Zink J I. An enzymatic chemical amplifier based on mechanized nanoparticles [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(47): 17659-17662.
- [19] Ma X, Tian H. Stimuli-responsive supramolecular polymers in aqueous solution [J]. *Acc Chem Res*, 2014, 47(7): 1971-1981.
- [20] Chen D X, Sun Y L, Zhang Y, *et al.* Supramolecular self-assembly and photophysical properties of pillar [5] arene-stabilized CdTe quantum dots mediated by viologens[J]. *Rsc Adv*, 2013, 3(17): 5765-5768.
- [21] Tan L L, Li H, Zhou Y, *et al.* Zn²⁺-Triggered drug release from biocompatible zirconium MOFs equipped with supramolecular gates[J]. *Small*, 2015, 11(31): 3807-3813.
- [22] Tan L L, Li H, Qiu Y C, *et al.* Stimuli-responsive metal-organic frameworks gated by pillar [5] arene supramolecular switches[J]. *Chem Sci*, 2015, 6(3): 1640-1644.
- [23] Yang Y W, Sun Y L, Song N. Switchable host-guest systems on surfaces[J]. *Acc Chem Res*, 2014, 47(7): 1950-1960.
- [24] Song N, Yang Y W. Molecular and supramolecular switches on mesoporous silica nanoparticles[J]. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(11): 3474-3504.
- [25] Lu J, Liang M, Zink J I, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs [J]. *Small*, 2007, 3(8): 1341-1346.
- [26] Lu J, Liang M, Sherman S, *et al.* Mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy: energy-dependent cellular uptake and delivery of paclitaxel to cancer cells [J]. *Nanobiotechnology*, 2007, 3(2): 89-95.
- [27] Wang T Y, Zhao Q F, Han X, *et al.* Application of two kinds of mesoporous silica for preparation of nimodipine solid dispersion[J]. *Chin Pharm J*, 2014, 49(13): 1139-1145.
- [28] Sun Y L, Yang Y W, Chen D X, *et al.* Mechanized silica nanoparticles based on pillar [5] arenes for on-command cargo release[J]. *Small*, 2013, 9(19): 3224-3229.
- [29] Angelos S, Yang Y W, Patel K, *et al.* pH-Responsive supramolecular nanovalves based on cucurbit [6] uril pseudorotaxanes[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2008, 120(12): 2254-2258.
- [30] 胡坪, 邱莉苹, 宁方红, 等. 氨基表面修饰有序介孔硅对槲皮素的载药性能及药物释放影响研究[J]. *中国药学杂志*, 2013, 11(48): 894-898.
- [31] Barbé C, Bartlett J, Kong L, *et al.* Silica particles: A novel drug-delivery system [J]. *Adv Mater*, 2004, 16(21): 1959-1966.