

一种二维 C_3N_4 纳米片用于水溶性药物丹酚酸 B 的高负载及缓释作用

梁咏诗^{1,2,3}, 丁陈陈^{1,2,3}, 罗培⁴, 张志锋⁴, 温露^{1*}, 陈钢^{1,2,3*}

(1. 广东药科大学药学院, 广东广州 510006; 2. 广东药科大学, 广东省药物新剂型重点实验室, 广东广州 510006; 3. 广东药科大学, 广东省局部精准递药制剂工程技术研究中心, 广东广州 510006; 4. 澳门科技大学, 中药质量研究国家重点实验室, 澳门 000853)

摘要: 利用载体输送水溶性药物常存在负载量低及释放迅速的问题, 构建一种高负载量的缓释递药系统是水溶性药物临床应用的迫切需要。二维层状纳米材料比表面积高, 在药物递送中具有巨大的潜力。本研究由尿素煅烧得到块状氮化碳 (bulk graphitic carbon nitride, b- C_3N_4), 使用碱化学-超声辅助剥离法制备氮化碳纳米片 (graphitic carbon nitride nanosheets, g- C_3N_4 -NS), 采用扫描电镜、透射电镜和原子力显微镜考察 g- C_3N_4 -NS 的形貌特征, X-射线衍射仪和红外光谱解析 g- C_3N_4 -NS 的结构特征, 紫外光谱法和荧光光谱法研究 g- C_3N_4 -NS 的光学性质, 并应用扫描电镜及 X-射线衍射仪探究 g- C_3N_4 -NS 稳定性。利用聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI) 对 g- C_3N_4 -NS 进行功能化修饰, 以丹酚酸 B (salvianolic acid B, Sal B) 为水溶性药物模型, 探讨 g- C_3N_4 -NS 的负载能力及释药行为。结果显示, g- C_3N_4 -NS 呈片状结构, 在离子环境中易层层自组装导致絮凝沉降, PEI 修饰可实现 g- C_3N_4 -NS 表面电荷切换并明显改善其稳定性。细胞毒性实验和斑马鱼胚胎发育毒性实验结果表明 PEI-g- C_3N_4 -NS 质量浓度低于 $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时毒性较低。作为药物载体, PEI-g- C_3N_4 -NS 巨大的比表面积及表面电荷作用使其对 Sal B 的最大负载率可达到 327.4%, 并能持续缓慢释放药物, 7 天累积释放率达 79.2%, 体外释药过程符合 Higuchi 方程。综上, 本研究制备的 PEI 修饰的 g- C_3N_4 -NS 具有良好的生物相容性和高稳定性, 在水溶性药物的高负载和缓释应用方面展现出良好的前景。

关键词: 石墨相氮化碳; 丹酚酸 B; 二维层状材料; 水溶性药物; 缓释

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)06-1296-10

A two-dimensional g- C_3N_4 nanosheet for high loading and sustained release of water-soluble drug salvianolic acid B

LIANG Yong-shi^{1,2,3}, DING Chen-chen^{1,2,3}, LUO Pei⁴, ZHANG Zhi-feng⁴, WEN Lu^{1*}, CHEN Gang^{1,2,3*}

(1. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. Guangdong Provincial Engineering Center of Topical Precise Drug Delivery System, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 4. State Key Laboratory for Quality Research in Chinese Medicines, Macau University of Science and Technology, Macau 000853, China)

Abstract: Delivering water-soluble drugs *via* carriers often causes problems such as low loading and rapid releasing, so it is an urgent need to construct a high-load sustained-release drug delivery system for the clinical application of water-soluble drugs. Two-dimensional layered nanomaterials exhibit great potential in drug delivery due to their high specific surface area. In this study, bulk graphitic carbon nitride (b- C_3N_4) was obtained by calcination of urea. Graphitic carbon nitride nanosheets (g- C_3N_4 -NS) were made from an alkali chemical-ultrasonic-

收稿日期: 2019-11-06; 修回日期: 2020-01-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773917).

*通讯作者 Tel: 86-20-39352070, E-mail: cg753@126.com;

Tel: 86-20-39352141, E-mail: gywenl@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0878

assisted stripping process. Scanning electron microscopy, transmission electron microscopy and atomic force microscopy were adopted to observe the morphological characteristics of g-C₃N₄-NS, while the structural characteristics of g-C₃N₄-NS were analyzed by X-ray diffractometer and Fourier transform infrared spectroscopy. Ultra-violet spectrometry and fluorescence spectrometry were used to investigate the optical properties of g-C₃N₄-NS, and scanning electron microscopy and X-ray diffractometer were employed to investigate the stability of g-C₃N₄-NS. Polyethyleneimine (PEI) was applied in the study to functionally modify g-C₃N₄-NS, and salvianolic acid B (Sal B) was used as a water-soluble drug model to investigate the loading capacity and drug releasing behavior of g-C₃N₄-NS. The results showed that g-C₃N₄-NS had a sheet structure, and it is easy to self-assemble in layers in the ionic environment to create flocculating settling. PEI modification can lead to the switching in the surface charge of g-C₃N₄-NS and significantly improve its stability. The results of cytotoxicity test and zebrafish embryo toxicity test showed that the toxicity was low when the concentration of PEI-g-C₃N₄-NS was less than 800 μg·mL⁻¹. The large specific surface area and surface charge of PEI-g-C₃N₄-NS allow the maximum load factor over Sal B to reach 327.4%. In addition, PEI-g-C₃N₄-NS can continuously release drugs slowly, with a cumulative release rate of 79.2% in seven straight days. The release process conforms to the Higuchi equation. In summary, g-C₃N₄-NS modified by PEI exhibits good biocompatibility and high stability, and shows great potential in high-load and sustained-release applications of water-soluble drugs.

Key words: graphitic carbon nitride; salvianolic acid B; two-dimensional layer material; water-soluble drug; sustained release

水溶性药物临床应用广泛,能在体内快速溶解、扩散^[1],但在体内应用起始阶段容易出现药物释放过快、局部浓度过高等现象,有可能增加药物的毒副作用。研究发现,一些载体如微球、微囊、脂质体、水凝胶和纳米粒等对水溶性药物能起到一定的缓释作用,但这些载体对水溶性药物的负载能力有限,载药量大多不超过20%^[2-9]。因此,构建高负载能力的缓释递送系统对充分发挥水溶性药物的疗效、降低毒副作用具有重要意义。

二维(two-dimensional, 2D)纳米材料具有层状结构、高比表面积、高度各向异性等独特性质,是提高药物负载量非常有前景的纳米载体之一^[10]。氮化碳(carbon nitride, C₃N₄)是一种新兴的2D纳米材料,分为α相、β相、立方相、准立方相及类石墨相5种结构,其中石墨相氮化碳(graphitic phase carbon nitride, g-C₃N₄)的结构最为稳定^[11]。g-C₃N₄主要以3-*s*-三嗪环作为结构单元,延展形成高聚C-N链,同时各高聚链间存在氢键网络并构筑类似二维石墨烯的π-π共轭电子结构,再以类石墨形式堆叠成2D片层结构^[12],所形成的单原子厚度和二维平面可提供较大的比表面积。此外,g-C₃N₄具有电荷迁移距离短、溶解性高、电子结构可调、半导体光催化活性更好及通过表面修饰能够调节结构表面化学性质等优点,在光催化、传感器及生物医药等领域有着广泛的应用前景^[13]。Liu等^[14]以罗丹明B为模型药物通过静电力吸附和氢键作用负载在氮化碳纳米片(graphitic carbon nitride nanosheets, g-C₃N₄-NS)上,当罗丹明B质量浓度为20 mg·L⁻¹时载药量可达

108.6 mg·g⁻¹。利用g-C₃N₄-NS与药物之间产生的多种作用力,g-C₃N₄-NS对药物负载量有可能得到进一步提高。

丹酚酸B(salvianolic acid B, Sal B)是丹参提取物中具有芳香结构的酚酸类化合物,由咖啡酸与丹参素通过酯键缩合而成,含有2个羧基与7个酚羟基,具有很强的抗氧化、抑制细胞凋亡、抑制血小板聚集和血栓形成等多种药理作用,临床应用主要有注射用丹参多酚酸盐和注射用丹参总酚酸等。但是Sal B亲水性极好,难以达到长期稳定的释放和理想的治疗效果^[15]。本研究先制备块状g-C₃N₄(bulk graphitic carbon nitride, b-g-C₃N₄),再使用碱化学-超声辅助剥离法得到g-C₃N₄-NS,并对g-C₃N₄-NS的稳定性进行探究;采用聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)对g-C₃N₄-NS进行修饰,以增加g-C₃N₄-NS的稳定性并实现表面电荷的反转,进一步考察了g-C₃N₄-NS对Sal B的负载能力和释放行为,期望得到一种能够实现水溶性药物缓慢释放、稳定可控的具有高载药量递送系统。

材料与方法

主要仪器 KSL-1200X 马弗炉(合肥科晶材料技术有限公司); DelsaTM Nano C 激光粒度电位仪(美国 Beckman Coulter 公司); LC-20A 高效液相色谱仪、RF-5301PC 荧光分光光度计、Perkin Elmer Spectrum One 傅里叶红外光谱仪、UV-2500PC 紫外-可见分光光度计(日本 Shimadzu 公司); S-4800 扫描电镜、H-7650 透射电镜(日本 Hitachi 公司); Empyrean 瑞影 X-射线粉

末衍射仪(荷兰 PANalytical B.V. 公司); Multiskan FC 型酶标仪(上海赛默飞世尔仪器有限公司); Observer A1 倒置显微镜(德国 Zeiss 公司)。

药品和试剂 尿素(ACS, 99.0%~100.5%, 美国 Alfa Aesar 化学有限公司); 稀 HCl(分析纯, 天津致远化学试剂厂); 聚乙烯亚胺(M_w 70 000, 50% 水溶液, 上海阿拉丁试剂有限公司); 甘露醇(分析纯, 天津福晨化学试剂厂); 丹酚酸 B(含量 \geq 98.0%, 上海历鼎生物科技有限公司); α -MEM 培养基(美国 Gibco 公司); NaOH、氯化钠(分析纯, 天津大茂化学试剂厂); 2-脱氧-5-氟尿苷(含量 \geq 98.0%, 上海九鼎化学试剂有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 北京迪马科技有限公司); 甲酸(分析纯, 广州化学试剂厂); 无水乙醇(分析纯, 天津百世化工有限公司); 蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司); 透析袋(MWCO: 3 000, 纤维素酯膜, 美国 Spectrum 公司)。

细胞和动物 L929 细胞(小鼠成纤维细胞, 购自中国科学院上海细胞库); 野生 AB 系斑马鱼(中山大学医学院惠赠)。

g-C₃N₄-NS 的制备

b-g-C₃N₄ 的制备 参考文献^[16]采用高温热分解尿素法制备 b-g-C₃N₄。称取尿素 20 g 放入坩埚中, 置于马弗炉以 10 °C·min⁻¹ 阶梯式升温至 500 °C 保温 4 h。降至室温后, 取出坩埚, 将浅黄色的 b-g-C₃N₄ 进行研磨, 水洗 3 次, 备用。

g-C₃N₄-NS 的制备 参考文献^[17]对制备方法加以改进, 称取 b-g-C₃N₄ 1 g, 加入 NaOH 溶液 50 mL, 100 °C 加热回流 12 h, 得到黄色的悬浮液, 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃去上清多余的 NaOH 溶液, 沉淀加入蒸馏水超声分散。悬浮液继续 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 保留上清, 底部沉淀加入蒸馏水使分散均匀, 重复数次直至无沉淀出现。合并上清, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤去除体系多余的 OH⁻, 用蒸馏水重新分散滤膜上的沉淀, 即得 g-C₃N₄-NS 胶体溶液。

g-C₃N₄-NS 冻干复溶 取 g-C₃N₄-NS 5 mL 直接冻干, 余下 g-C₃N₄-NS 平均分为 4 组, 以 2% 的乳糖、甘露醇、牛血清白蛋白和蔗糖作为冻干保护剂, -60 °C 预冻 6 h, 冷冻干燥后加入蒸馏水复溶。

g-C₃N₄-NS 的表征

透射电镜、扫描电镜及原子力显微镜观察 g-C₃N₄-NS 的形貌 取适量 g-C₃N₄-NS 样品滴在覆膜的铜网上, 用 2% 磷钨酸负染干燥后置于透射电镜下观察; 取少量 g-C₃N₄-NS 溶液烘干, 涂布在黏有导电胶的样品座上喷金处理, 置于扫描电镜下观察; 取少量 g-C₃N₄-NS 溶液滴在云母片上过夜烘干, 置于原子力显微镜下

观察。

X-射线粉末衍射仪及红外光谱仪解析 g-C₃N₄-NS 的结构特征 使用 X-射线粉末衍射仪以 Cu-K α 靶为发射源($\lambda = 0.154$ nm), 记录 g-C₃N₄-NS 粉末及 b-g-C₃N₄ 扫描角度为 10°~70° 的衍射强度曲线; 分别取少量 g-C₃N₄-NS 粉末及 b-g-C₃N₄ 混合溴化钾压片, 使用红外光谱仪测定样品特征峰, 扫描波段为 400~4 000 cm⁻¹。

紫外-可见光分光光度计及荧光分光光度计测定 g-C₃N₄-NS 的光学性质 使用紫外分光光度计测定 g-C₃N₄-NS 溶液的特征吸收峰, 扫描范围为 200~800 nm, 另使用紫外可见漫反射光谱仪在相同条件下测定 b-g-C₃N₄ 特征吸收峰; 室温下取适量 g-C₃N₄-NS 溶液, 最大激发波长为 365 nm, 使用荧光分光光度计测定荧光发射光谱。

g-C₃N₄-NS 稳定性考察

g-C₃N₄-NS 在离子环境下的稳定性 向 g-C₃N₄-NS 胶体溶液中分别加入等量的细胞培养基 DMEM、NaCl、pH 调节剂(用 HCl 和 NaOH 溶液将体系 pH 值分别调节为 1、3、7、10 和 14)、水溶性非离子型试剂氟尿苷和水溶性离子型药物 Sal B, 经 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 观察 g-C₃N₄-NS 在离子环境下的稳定性。

g-C₃N₄-NS 在离子环境中的荧光特性 将 g-C₃N₄-NS 分别置于不同 pH 值环境(pH 1、3、9 和 14) 和离子环境(NaCl、Sal B), 以 g-C₃N₄-NS 原液(pH 7) 作对照, 在 1、3、5、24、48、72、96 和 120 h 分别测定上清液的荧光强度($\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm), 考察 g-C₃N₄-NS 在离子环境中荧光特性的变化。

g-C₃N₄-NS 在离子环境下产生的絮凝物表征 收集 g-C₃N₄-NS 在离子环境(NaCl、Sal B) 中产生的絮凝物, 分别用蒸馏水洗涤 3 次, 干燥后使用透射电镜和扫描电镜观察絮凝物的形貌, 使用 X-射线衍射仪测定絮凝物晶体结构特征。

PEI-g-C₃N₄-NS 的制备与表征

PEI-g-C₃N₄-NS 的制备 取适量 g-C₃N₄-NS 经 8 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液加入 50% PEI 水溶液, 调节 pH 至 7, 超声 30 min, 即得 PEI-g-C₃N₄-NS。

PEI-g-C₃N₄-NS 的表征 取适量 PEI-g-C₃N₄-NS 溶液, 采用激光粒度电位仪测定粒径、多分散指数(polydispersity index, PDI) 及 zeta 电位; 分别取少量 PEI-g-C₃N₄-NS 粉末及 PEI 混合溴化钾压片测定样品特征峰, 扫描波段为 400~4 000 cm⁻¹。

PEI-g-C₃N₄-NS 的稳定性 取 PEI-g-C₃N₄-NS 2 mL, 分别与 2 mL 的细胞培养基 DMEM、pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS) 和 0.9% 生理盐水等混合, 于 37 °C 孵育, 在 0、1、4、12、24、48 及 72 h 分别测定 PEI-g-C₃N₄-NS 的粒径分布。

PEI-g-C₃N₄-NS的体外评价

Sal B的HPLC含量测定 精密称取Sal B 2 mg, 用80%甲醇水溶液溶解, 然后转移到10 mL棕色量瓶中, 摇匀, 定容至刻度, 得到280 μmol·L⁻¹ Sal B母液。再用80%甲醇水溶液依次稀释, 得到浓度分别为1.4、2.8、14.0、28.0、56.0 μmol·L⁻¹的系列标准溶液。各取样品20 μL, 用HPLC进行分析, 测得的色谱峰面积(Y)对Sal B标准溶液浓度(X)进行线性回归得出标准曲线方程, 建立HPLC分析Sal B的色谱条件及绘制标准曲线。

Sal B负载率的测定 取PEI-g-C₃N₄-NS溶液(约50 μg·mL⁻¹) 4 mL, 加入20 mL不同浓度(0.35、0.70、2.00、4.00、6.00、10.00、20.00和50.00 μmol·L⁻¹)的Sal B溶液, 避光搅拌12 h, 25 000 r·min⁻¹低温高速离心35 min, 弃上清, 沉淀、水洗、离心, 循环3次, 即得。沉淀中加入80%甲醇水溶液20 mL, 超声20 min使Sal B从载体上脱落, 再于25 000 r·min⁻¹低温高速离心35 min, 取上清1 mL, HPLC分析Sal B含量(W), 并通过下式计算药物负载率(DL)。

$$DL(\%) = W_{\text{drug in nanomaterial}}/W_{\text{nanomaterial}} \times 100\% \quad (1)$$

Sal B的释放 采用透析袋扩散法考察Sal B的体外释放。取负载Sal B的PEI-g-C₃N₄-NS的重悬液2 mL, 置于透析袋内并完全浸入10 mL蒸馏水中, 保持37 °C、100 r·min⁻¹振摇。分别在5、10、15、30 min和1、2、4、6、8、12、24、48、72、96、108、120、144、168 h将透析袋取出并置于新鲜的等量释放介质中, 取1 mL含药物的释放介质加入等量甲醇, 用HPLC分析药物含量, 计算Sal B的累积释放率, 绘制PEI-g-C₃N₄-NS的药物体外累积释放曲线。另称取等量的Sal B, 用2 mL蒸馏水溶解, 置于透析袋中作为游离药物对照组。

PEI-g-C₃N₄-NS体外细胞毒性实验 取对数生长期的L929细胞, 以每孔约1.0×10⁵个细胞数接种在96孔板, 置于37 °C、5% CO₂培养箱孵育24 h。实验分2组, 即游离PEI组和PEI-g-C₃N₄-NS组。加入含不同浓度药液的培养基100 μL, 同时设置阴性对照孔和空白调零孔, 每个浓度设6个复孔。孵育24 h后弃去药液, 每孔加入5 mg·mL⁻¹ MTT液100 μL, 37 °C继续培养4 h后, 吸弃上清, 每孔再加入DMSO 100 μL, 避光震荡10 min, 以酶标仪检测490 nm处的吸光度值(A), 计算细胞存活率(SR):

$$SR(\%) = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})/(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) \times 100\% \quad (2)$$

斑马鱼的繁殖及其受精卵的采集 当日下午喂食后将雌雄鱼按1:2比例放入繁殖盒内, 并用透明隔板将雌雄鱼隔开。次日早上8点左右, 将布罩和隔板撤走, 在光照刺激下鱼开始追尾交配, 受精卵则会落入繁

殖盒内。30 min后, 将雌雄亲鱼捞出并将受精卵吸出转移至新鲜的胚胎培养液中。

PEI-g-C₃N₄-NS斑马鱼胚胎发育毒性实验 受精卵用胚胎培养液轻轻清洗1次, 在显微镜下挑选成功受精的受精卵, 用于胚胎发育毒性暴露实验。胚胎发育毒性实验参考OECD指导文件^[18]并对实验方法加以改进。实验设置1个对照组和7个药物组, 药物组分别为12.5、25、50、100、200、400和800 μg·mL⁻¹ PEI-g-C₃N₄-NS溶液。胚胎在2 hpf (hours past fertilization) 转移到24孔板内, 每组60个胚胎(n=60), 每孔20个胚胎, 重复3孔, 每孔加入药液2 mL。24孔板在28 °C恒温培养箱内静置培养, 14 h/10 h光暗循环, 每24 h更换新鲜的药液, 胚胎发育至96 hpf时停止处理。PEI-g-C₃N₄-NS使用时用胚胎培养液溶解并稀释至工作浓度。在暴露过程中, 显微镜下统计24、48、72、96 hpf死亡胚胎数和48、72、96 hpf孵化胚胎数, 倒置显微镜观察并记录胚胎发育过程中出现的形态变化。

$$\text{死亡率}(\%) = \text{死亡胚胎数} / 60 \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{孵化率}(\%) = \text{孵化胚胎数} / 60 \times 100\% \quad (4)$$

统计学分析 使用SPSS 16.0软件的单因素方差分析检验实验组之间的统计分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, P<0.05被认为具有统计学意义。

结果

1 g-C₃N₄-NS的制备与表征

1.1 b-g-C₃N₄的合成 由图1A的a图可见热分解尿素得到b-g-C₃N₄呈疏松多孔的骨架, 且内部有许多致密无序的孔道及材料本身明显的褶皱结构。

1.2 g-C₃N₄-NS的制备 采用碱化学-超声辅助剥离法对b-g-C₃N₄进行剥离, 得到g-C₃N₄-NS可通过延长超声时间控制尺寸(图1B), 最终g-C₃N₄-NS在超声8 h后尺寸可达88 nm。冷冻干燥后得到g-C₃N₄-NS固体粉末难以再均匀分散, 冻干前后尺寸从150.8 nm变为1 428 nm, 增大了近10倍(图1C)。冻干保护剂可使样品均能重新均匀分散, 提高g-C₃N₄-NS再分散性能。

1.3 g-C₃N₄-NS的形貌特征 g-C₃N₄-NS胶体溶液外观呈蓝色乳光, 并具有强烈的丁达尔效应, 如图1A的b图所示扫描电镜下样品呈不规则的片状结构, 从材料的局部边缘放大看是由几层薄片堆叠而成。扫描电镜液体样品的制备方法是在锡箔纸上滴样, 在后续样品干燥过程中, g-C₃N₄-NS之间因失水作用使片层之间范德华引力作用增强而趋向团聚, 并发生层层堆积, 导致冷冻干燥后g-C₃N₄-NS的再分散性能较差^[19]。因此, 在图1A的c图透射电镜视野下难以观察到纳米尺寸的单个g-C₃N₄-NS。使用原子力显微镜进一步检测

$g-C_3N_4$ -NS的高度和微观尺寸,如图1D所示 $g-C_3N_4$ -NS横向尺寸约100 nm,高度约4 nm。从以上结果均可看出,碱化学-超声辅助剥离法可将 $b-g-C_3N_4$ 剥离成横向尺寸较小、厚度较薄的 $g-C_3N_4$ -NS。

1.4 $g-C_3N_4$ -NS的结构特征 图1E为 $b-g-C_3N_4$ 和 $g-C_3N_4$ -NS的X-射线衍射曲线, $b-g-C_3N_4$ 在 2θ 为 13.1° 和 27.4° 附近有明显的衍射峰,分别对应共轭芳香体系层间堆积和层内基元结构周期性排列的特征峰。剥离后 $g-C_3N_4$ -NS中观察到 13.1° 处的衍射峰消失且 27.4° 处的衍射峰减弱,说明 $g-C_3N_4$ 的层间堆积结构遭到破坏,形成单层或较薄的纳米片^[20]。红外光谱结果(图1F)显示, $b-g-C_3N_4$ 与 $g-C_3N_4$ -NS图谱基本一致,3 200~3 500 cm^{-1} 宽带归属于三嗪环上的N-H的伸缩振动峰,1 200~1 600 cm^{-1} 归属于氮杂环化合物中的C-N和C=N的伸缩振动峰,810 cm^{-1} 归属于三嗪环骨架振动特征峰^[21],说明剥离后 $g-C_3N_4$ 的分子结构并未受到破坏。

1.5 $g-C_3N_4$ -NS的光学性质 $g-C_3N_4$ -NS在365 nm激发下发出强烈的蓝色荧光, $g-C_3N_4$ -NS的荧光光谱发生蓝移如图1G所示,这可能是由于碱化学处理造成了 $g-C_3N_4$ 的光学性质的变化。在紫外光谱中, $g-C_3N_4$ -NS在224和296 nm处出现尖锐的吸收峰(图1H),而 $b-g-C_3N_4$ 的紫外可见光漫反射最大吸收波长位于400 nm。 $g-C_3N_4$ -NS的最大吸收发生蓝移,这是由于量子尺寸效应所致^[22,23]。

2 $g-C_3N_4$ -NS稳定性考察

2.1 $g-C_3N_4$ -NS在离子环境的稳定性及荧光特性 如图2A所示, $g-C_3N_4$ -NS在强酸条件下稳定性较差,底部有沉淀生成。随着时间的增加, $g-C_3N_4$ -NS荧光强度逐渐降低。在弱酸性、中性及碱性条件下 $g-C_3N_4$ -NS均可稳定存在,未出现沉淀现象且荧光性能稳定,进一步说明 $g-C_3N_4$ -NS在弱酸性、中性及碱性环境中的化学稳定性较好。 $g-C_3N_4$ -NS在强电解质NaCl、弱酸性解离型药物Sal B环境中均会出现沉淀,在水溶性非解离型试剂氟尿苷中未出现沉淀,初步证明 $g-C_3N_4$ -NS在离子环境下稳定性差。在NaCl溶液中随着时间的增加, $g-C_3N_4$ -NS的荧光强度逐渐降低;在Sal B溶液中1 h后荧光骤降,往后时间点荧光强度持续降低(图2B)。总体来看,在不同离子环境下 $g-C_3N_4$ -NS的荧光强度降幅速率为Sal B > NaCl,表明不同离子对 $g-C_3N_4$ -NS稳定性变化的诱导能力不同,这可能是由于各离子的电荷密度不同,与荷电 $g-C_3N_4$ -NS之间产生的静电相互作用强弱也不同。

2.2 $g-C_3N_4$ -NS在离子环境下絮凝物的表征 $g-C_3N_4$ -NS在两种离子环境中所生成的沉淀物是由许多片层

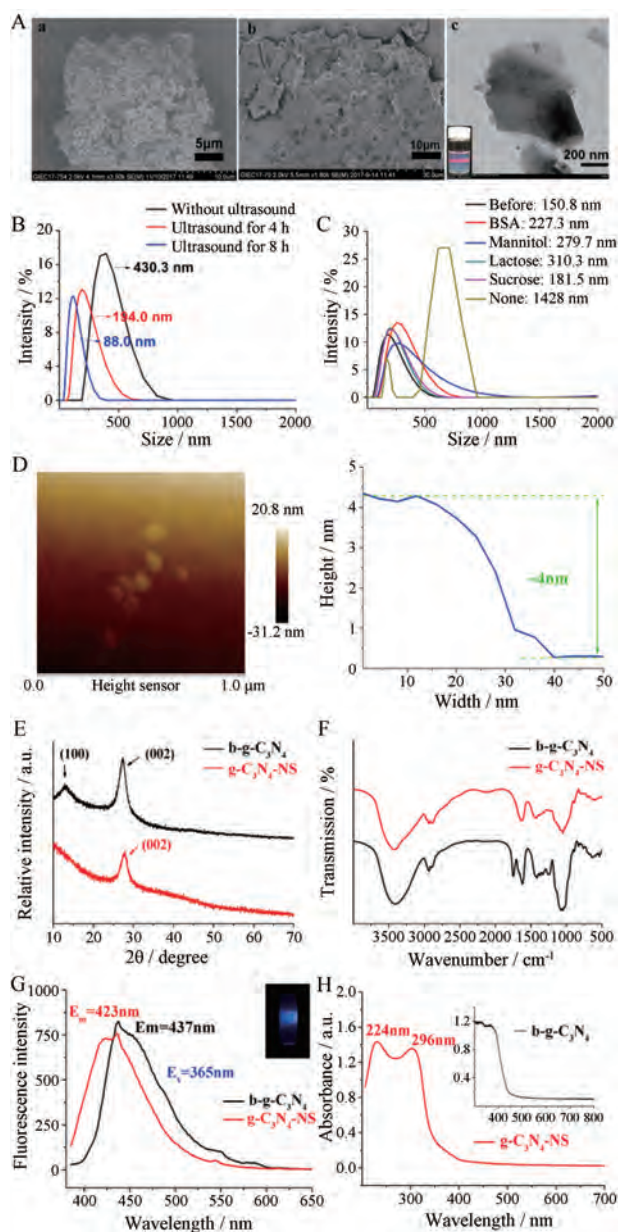


Figure 1 Characterization of graphitic carbon nitride ($g-C_3N_4$). A: Scanning electron microscope (SEM) images of bulk graphitic carbon nitride ($b-g-C_3N_4$) (a), graphitic carbon nitride nanosheets ($g-C_3N_4$ -NS) (b) and transmission electron microscope (TEM) image of $g-C_3N_4$ -NS (c); B: Effect of ultrasonic time on particle size of $g-C_3N_4$ -NS; C: Particle size of $g-C_3N_4$ -NS reconstituted after lyophilization using different lyoprotectants; D: Atomic force microscope (AFM) image of $g-C_3N_4$ -NS; E: X-ray diffraction (XRD) of $g-C_3N_4$ -NS; F: Fourier infrared spectrum (FTIR) of $g-C_3N_4$ -NS; G: Fluorescence spectrum of $g-C_3N_4$ -NS; H: Ultraviolet spectrophotometer (UV-Vis) for $g-C_3N_4$ -NS compared to diffuse reflection spectroscopy (DRS) for $b-g-C_3N_4$

错落堆叠而形成块状,如图2C所示,沉淀物应是 $g-C_3N_4$ -NS层层堆积或层层自组装的聚集体。 $g-C_3N_4$ -NS的X-射线衍射曲线中在 $2\theta = 27.6^\circ$ 时有1个衍射峰

对应层间堆积作用, 絮凝物在相同角度处也存在相应衍射峰(图2D), 且峰强明显高于 $g-C_3N_4$ -NS, 进一步说明沉淀物是 $g-C_3N_4$ -NS聚集体。不同离子环境下生成的絮凝物衍射峰强大小为 $Sal\ B > NaCl$, 表明不同离子对层层自组装的诱导能力不同。经振摇后絮凝现象可分散, 提示其层层自组装行为是可逆的(图2E)。

3 PEI- $g-C_3N_4$ -NS的制备及体外评价

3.1 PEI- $g-C_3N_4$ -NS的表征 $g-C_3N_4$ -NS修饰前的粒径为88.0 nm, 带负电, 经PEI修饰后粒径增大为133.7 nm, 且电位由-32.1 mV转为43.4 mV(图3A)。在FTIR结果中(图3B), $1\ 462\ cm^{-1}$ 处归属于PEI的仲胺基N-H面内弯曲振动峰^[24]。 $g-C_3N_4$ -NS的特征峰分别为 $809\ cm^{-1}$ 归属于三嗪环弯曲振动峰和 $1\ 619\ cm^{-1}$ 处归属于CN杂环的拉伸峰。相较于 $g-C_3N_4$ -NS, PEI- $g-C_3N_4$ -NS归属于 $g-C_3N_4$ 中三嗪环的弯曲振动峰发生红移, 以及在 $1\ 462\ cm^{-1}$ 处出现归属于仲胺基团N-H的面内弯曲振动峰, 表明PEI与 $g-C_3N_4$ -NS之间存在相互作用^[25]。以上结果表明PEI成功修饰 $g-C_3N_4$ -NS并实现了电荷切换。

3.2 PEI- $g-C_3N_4$ -NS在生理介质中的稳定性 生理介质中粒径稳定性考察(图3C)结果显示, PEI- $g-C_3N_4$ -NS与 $g-C_3N_4$ -NS相比, 在 $37\ ^\circ C$ 与生理盐水、PBS或DMEM

中孵育72 h粒径较稳定, 不会产生聚集现象, 说明修饰后的PEI- $g-C_3N_4$ -NS稳定性增加, 满足药物载体的要求。

3.3 PEI- $g-C_3N_4$ -NS的体外细胞毒性 PEI对 $g-C_3N_4$ -NS进行修饰后, 细胞毒性与PEI自身相比具有显著性降低的趋势(图3D), 并且PEI- $g-C_3N_4$ -NS在 $3.125\sim 800\ \mu g\cdot mL^{-1}$ 内生物相容性良好。

3.4 Sal B的负载 如图3E所示, 随着Sal B浓度的增加, 载药率也会随之增大, 随药物浓度继续增加至 $50\ \mu mol\cdot L^{-1}$ 时, 载药率逐渐趋向饱和, PEI- $g-C_3N_4$ -NS对Sal B的最大负载率可达327.4%。

3.5 Sal B的释放 PEI- $g-C_3N_4$ -NS载体组的药物释放速度明显慢于游离药物组(图3F), 直到168 h药物释放完全。在体外释放的前12 h中, 游离Sal B在5 min时即有释放, 在第6~8 h释放完全, 游离Sal B组的累积释放率约80.4%。PEI- $g-C_3N_4$ -NS载体组呈现缓慢释放Sal B的趋势, 在168 h的累积释放率达79.2%。因此, PEI- $g-C_3N_4$ -NS作为水溶性药物Sal B递送载体具有更好的缓释性能。分别采用零级动力学方程、一级动力学方程和Higuchi方程进行拟合, 探讨Sal B的体外释药机制, 见表1。结果显示, Higuchi模型对Sal B

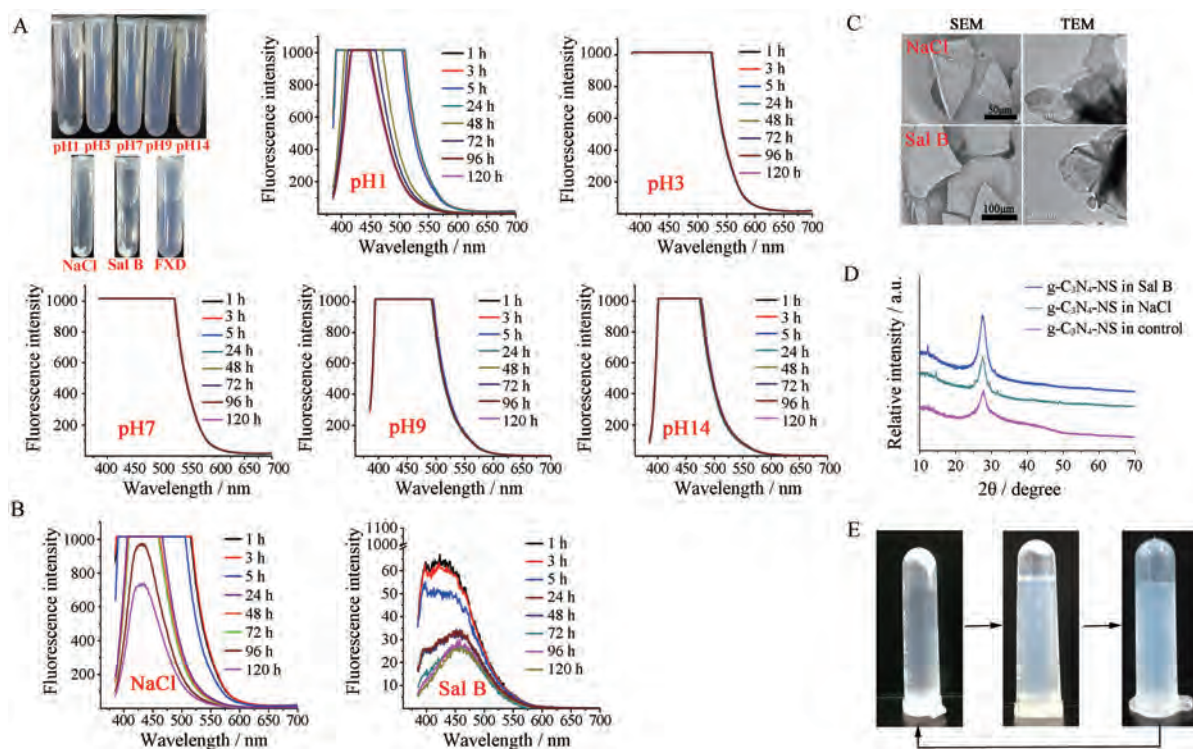


Figure 2 Compatibility and stability of $g-C_3N_4$ -NS in ion environment and characterization of flocs produced by $g-C_3N_4$ -NS in ion environment. A: Compatibility of $g-C_3N_4$ -NS in acid-base or ionic and non-ionic environments; B: Fluorescence intensity changes of $g-C_3N_4$ -NS in ionic environment; C: SEM and TEM images of flocculation caused by the contact between $g-C_3N_4$ -NS and ion; D: XRD of flocculation caused by $g-C_3N_4$ -NS in ionic environment; E: Reversibility of flocculation

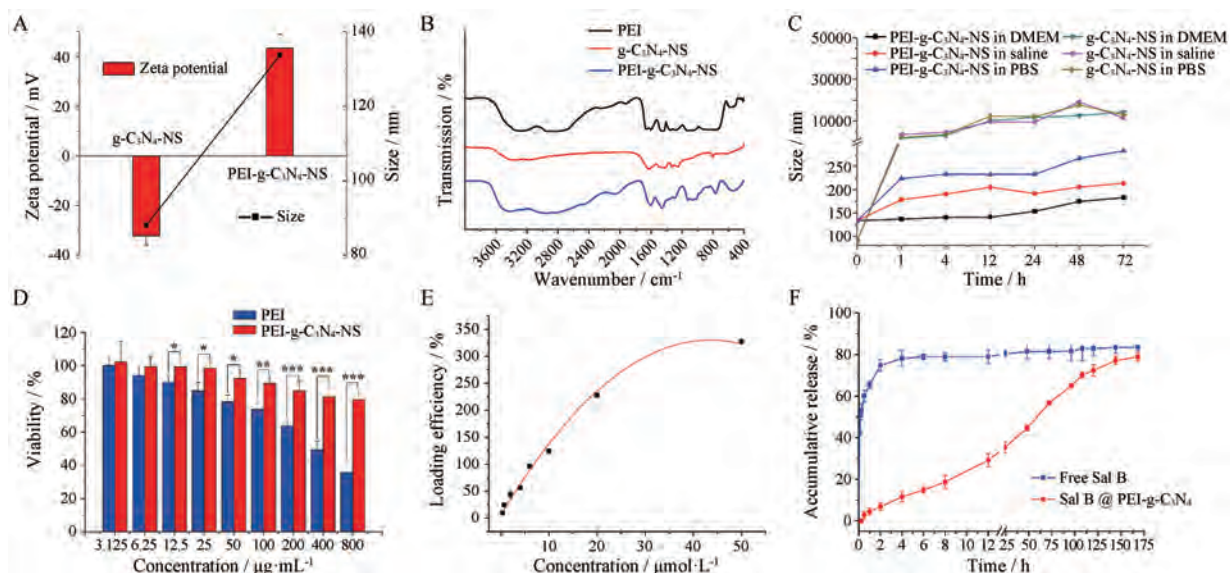


Figure 3 Characterization of PEI-g-C₃N₄-NS (carbon nitride nanosheets modified by polyethyleneimine). A: Zeta potential and particle size; B: FTIR; C: Particle size change of PEI-g-C₃N₄-NS and g-C₃N₄-NS in cell culture medium (DMEM), saline and phosphate buffer saline (PBS); D: The cytotoxicity of PEI-g-C₃N₄-NS in L929 cells. $n = 6, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; E: Loading efficiency of salivianolic acid B (Sal B) in different concentration; F: Cumulative release of Sal B from PEI-g-C₃N₄-NS in distilled water at 37 °C in 168 h. $n = 6, \bar{x} \pm s$

的释放具有最优的拟合程度,提示药物释放可能主要依照扩散机制。

Table 1 The fit curves of Sal B release from PEI-g-C₃N₄-NS

Type	Equation	R ²
Zero-order	$Q = 0.48156t + 12.32977$	0.90832
First-order	$Q = 75.70128(1 - e^{-0.02462t})$	0.97248
Higuchi	$Q = 6.50625t^{1/2} + 0.10181$	0.99055

4 PEI-g-C₃N₄-NS 斑马鱼胚胎发育毒性考察

4.1 PEI-g-C₃N₄-NS 对斑马鱼胚胎死亡率、孵化率的影响 28 °C 下受精 2 h 的斑马鱼胚胎在梯度浓度 PEI-g-C₃N₄-NS 的暴露条件下,斑马鱼胚胎在 24、48、72 和 96 hpf 的死亡率,见图 4A。结果显示,在 24 及 48 hpf 阶段,质量浓度在 50 μg·mL⁻¹ 以内的 PEI-g-C₃N₄-NS 对斑马鱼胚胎的死亡率没有影响,在 100~800 μg·mL⁻¹ 时斑马鱼胚胎随着浓度的升高死亡率有上升的趋势,并于 72 及 96 hpf 阶段趋于稳定,在高质量浓度 800 μg·mL⁻¹ 时 96 hpf 阶段斑马鱼胚胎累积死亡率为 18.33%。由图 4B 显示,在 48~96 hpf 经不同质量浓度 PEI-g-C₃N₄-NS 处理后,随着 PEI-g-C₃N₄-NS 浓度增加,各组胚胎呈现不同的孵化程度,其中质量浓度在 12.5 及 25 μg·mL⁻¹ 时累积孵化率与对照组相当;在 50~800 μg·mL⁻¹ 时累积孵化率出现轻微下降;在 800 μg·mL⁻¹ 时累积孵化率为 81.67%。以上结果说明 PEI-g-C₃N₄-NS 在浓度低于 800 μg·mL⁻¹ 时对斑马鱼胚胎的死亡率及孵化率影响较小。

4.2 PEI-g-C₃N₄-NS 对斑马鱼胚胎发育形态的影响

由图 4C 表示,在梯度质量浓度 12.5~400 μg·mL⁻¹ 的 PEI-g-C₃N₄-NS 处理 24 hpf 时,受精卵外观较为圆润,无外膜畸变,外膜亦无破损和杂质黏附,卵内胚胎发育正常,无明显延迟,但在浓度为 800 μg·mL⁻¹ 处理 24 hpf 时斑马鱼胚胎与对照组相比出现轻微的发育迟缓现象;48 hpf 时结果显示,经各浓度 PEI-g-C₃N₄-NS 处理后,与对照组比较,药物组的幼鱼孵化后体长、大小等正常,腹部、尾部等无弯曲、缺失等明显畸形发生,形态发育良好,但质量浓度为 400 和 800 μg·mL⁻¹ 处理的斑马鱼胚胎仍有少部分未完全脱膜;在 72 和 96 hpf 阶段中,12.5~400 μg·mL⁻¹ PEI-g-C₃N₄-NS 处理后的斑马鱼幼鱼在显微镜视野下心脏起搏有力,血液通畅,尾部、节间等血管发育良好,且无心包囊肿等现象的出现。以上结果显示,PEI-g-C₃N₄-NS 在质量浓度 800 μg·mL⁻¹ 时对斑马鱼胚胎的发育有轻微延缓作用,但不影响斑马鱼胚胎的孵化及形态的变化。

讨论

在 b-g-C₃N₄ 中, C 原子和 N 原子以共价键紧密相连形成聚合三嗪环单元并构成 g-C₃N₄ 片层,片层之间的范德华作用力又会进一步层层堆积成块体。g-C₃N₄ 在碱溶液中进行剥离时有两种可能发生的反应: ① OH⁻ 和 -NH₂ 在 g-C₃N₄ 层间形成氢键; ② OH⁻ 与 -NH₂ 末端连接的杂环 C 原子之间发生亲电取代,导致部分 -NH₂ 基团被 OH⁻ 取代。g-C₃N₄ 表面会被强碱所侵蚀,

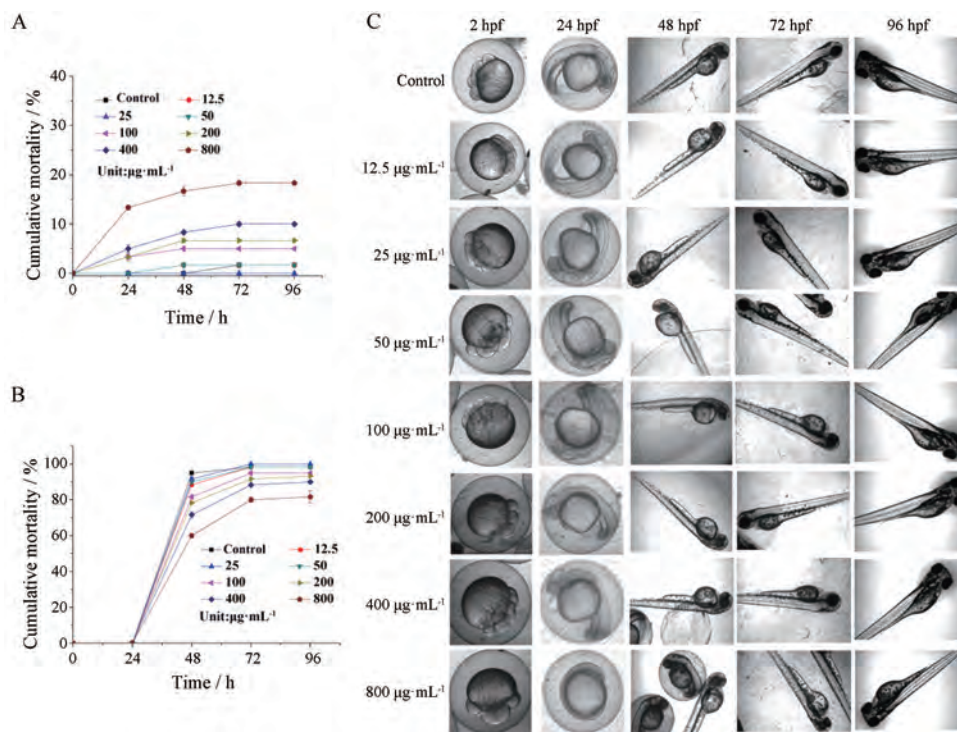


Figure 4 Acute toxic effect of PEI-g-C₃N₄-NS on zebrafish embryo. $n = 60$, $\bar{x} \pm s$. A: Effect of PEI-g-C₃N₄-NS on embryo mortality of zebrafish; B: Effect of PEI-g-C₃N₄-NS on embryo hatchability of zebrafish; C: Effect of PEI-g-C₃N₄-NS on the embryonic development of zebrafish. hpf: Hours past fertilization

使g-C₃N₄表面带负电, 同时也会插到g-C₃N₄的层间, 层间的弱范德华力被破坏, 导致片层分离, 形成g-C₃N₄-NS^[26]。但对于获得尺寸更小的g-C₃N₄-NS还存在一定难度, 因此本文借助超声对g-C₃N₄-NS进一步剥离。超声辅助剥离主要依靠超声过程中会有微气泡的生成与炸裂, 在介质中产生振荡, g-C₃N₄表面的气泡使得分散在溶剂中的g-C₃N₄被压碎; 而在g-C₃N₄附近但不接触的地方产生的振荡会在介质中形成微射流冲击g-C₃N₄表面, 形成剪切力进而使g-C₃N₄层与层之间分离, 进一步得到更小尺寸的纳米片^[13]。通过探究g-C₃N₄-NS在不同离子环境下的外观稳定性以简单探讨g-C₃N₄-NS的稳定性是否与离子的诱导有关, 进一步利用荧光半定量分析以明确不同离子诱导对纳米片稳定性造成的不同影响。最后通过收集沉淀物采用透射电镜、扫描电镜、X-射线衍射仪以说明沉淀物产生的机制可能是基于电荷驱动纳米片层层自组装。

PEI是一类应用广泛的生物降解的聚合物, 可修饰石墨烯等材料以提高其在生理环境中的稳定性。利用PEI修饰g-C₃N₄-NS, 有助于提高g-C₃N₄在生理介质中的稳定性, 使其成为具有前景的药物载体。本研究利用PEI-g-C₃N₄-NS负载Sal B, 既提高了Sal B的载药量又能使其缓慢释放, 从而有望解决这种亲水性药物“剂量突释”的问题, 为开发水溶性药物缓释制剂提

供借鉴。本研究制备的g-C₃N₄-NS与b-g-C₃N₄相比, 具有更大的比表面积、更多的活性位点, 如图5所示PEI-g-C₃N₄-NS的两面均可负载药物, 其中Sal B带负电, PEI-g-C₃N₄-NS带正电, 两者通过静电力结合, 使得药物在PEI-g-C₃N₄-NS表面大量积聚。此外, PEI-g-C₃N₄-NS还可通过 π - π 堆积作用, 从而进一步提高对具有芳香结构的Sal B药物分子的吸附量, 两种作用力的结合使得PEI-g-C₃N₄-NS对Sal B的负载率可达327.4%, 而且Sal B无突释效应, 7天累积释放率达79.2%, 缓释作用明显。

斑马鱼是一类热带淡水鱼, 其具有尺寸小、实验中并易于观察, 且与人类基因具有87%同源性的特点, 因而常被用来作为评估纳米材料环境毒性或作为生物纳米材料毒性的基本生物模型^[27]。已有研究应用斑马鱼胚胎毒性实验评估石墨烯^[28]、3D打印材料的生物相容性^[29], 考察氧化锌纳米粒的毒性机制^[30]等。在本研究中, 除了用L929细胞考察PEI-g-C₃N₄-NS的体外毒性外, 还利用斑马鱼动物模型进一步考察其毒性作用。实验结果显示, PEI-g-C₃N₄-NS浓度低于800 µg·mL⁻¹时对斑马鱼胚胎毒性较低。因此, 综合细胞毒性及斑马鱼胚胎发育毒性实验结果, PEI-g-C₃N₄-NS浓度低于800 µg·mL⁻¹时具有较好的生物相容性。

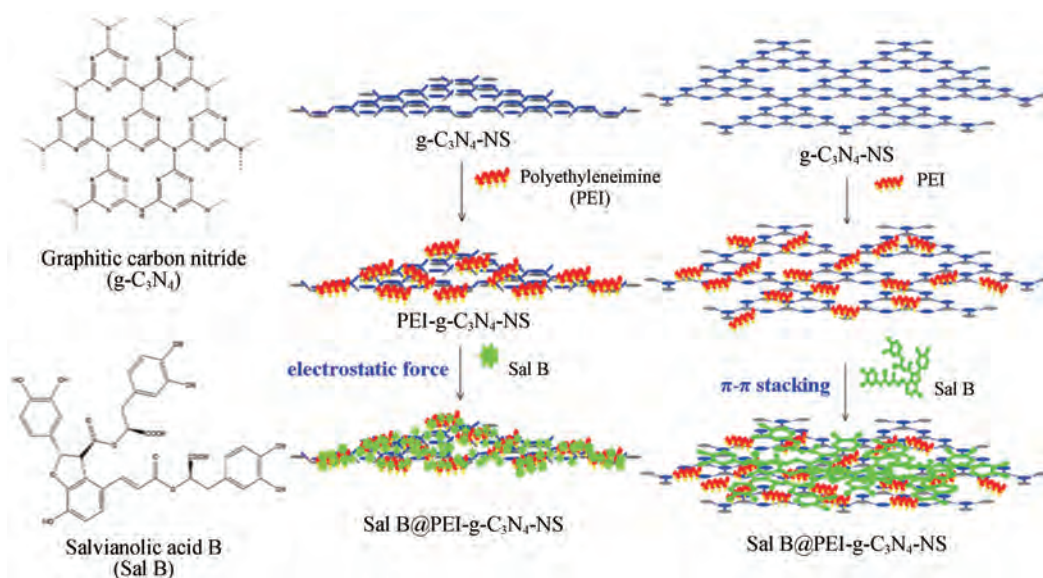


Figure 5 Illustration of Sal B loading mechanism on g-C₃N₄-NS

References

- [1] Du HH, Guan QX, Zhu T, et al. Advances in new technologies for improving the stability of water-soluble drugs [J]. J China Pharm (中国药房), 2017, 28: 994-997.
- [2] Jiang Y, Zhang XM, Mu HJ, et al. Preparation and evaluation of injectable rasagiline mesylate dual-controlled drug delivery system for the treatment of Parkinson's disease [J]. Drug Deliv, 2018, 25: 143-152.
- [3] Abulatefeh SR, Alkawareek MY, Alkilany AM. Tunable sustained release drug delivery system based on mononuclear aqueous core-polymer shell microcapsules [J]. Int J Pharm, 2019, 558: 291-298.
- [4] Li WZ, Han WX, Zhao N, et al. The effects of essential oils of traditional Chinese medicine on the pharmaceutical properties of flexible nano-liposomes loaded with palmitine chloride [J]. Acta Pharm Sin (药学期报), 2017, 52: 992-997.
- [5] Jian YF, Bu W, Li WW, et al. Preparation and stability investigation *in vitro* of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin hydrochloride by double emulsion method [J]. China Pharm (中国药师), 2018, 21: 2096-2100.
- [6] Zhu Q, Cheng HB, Huo YN, et al. Sustained ophthalmic delivery of highly soluble drug using pH-triggered inner layer-embedded contact lens [J]. Int J Pharm, 2018, 544: 100-111.
- [7] Zhang Y, Fei WD, Tao JY, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of arsenic trioxide-loaded phospholipid capped mesoporous silica nanoparticles modified with Angiopep-2 as targeting drug delivery system [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 1289-1297.
- [8] Mondal L, Mukherjee B, Das K, et al. CD-340 functionalized doxorubicin-loaded nanoparticle induces apoptosis and reduces tumor volume along with drug-related cardiotoxicity in mice [J]. Int J Nanomed, 2019, 14: 8073-8094.
- [9] Wang QQ, Chen ML, Hu X, et al. Preparation and characterization of timolol maleate cubic nanoparticles for ocular administration [J]. Acta Pharm Sin (药学期报), 2018, 53: 1894-1900.
- [10] Chimene D, Alge DL, Gaharwar AK. Two-dimensional nanomaterials for biomedical applications: emerging trends and future prospects [J]. Adv Mater, 2015, 27: 7261-7284.
- [11] Qie J, Li M, Liu L, et al. Research of photocatalyst g-C₃N₄ using first principles hyaluronic acid and its derivatives as drug carriers [J]. Prog Chem (化学进展), 2016, 28: 1569-1577.
- [12] Zheng X, Yu PY, Wang JP. Intramolecular vibrational energy transfer in carbon nitride examined by ultrafast 2D infrared spectroscopy [J]. Spectrosc Spect Anal (光谱学与光谱分析), 2018, 38: 117-118.
- [13] Li JY, Liang F, Tian L, et al. Progress in preparation method of g-C₃N₄ nanosheets [J]. Chem Bull (化学通报), 2018, 81: 387-393.
- [14] Liu CG, Wu XT, Li XF, et al. Synthesis of graphene-like g-C₃N₄/Fe₃O₄ nanocomposites with high photocatalytic activity and for drug delivery [J]. RSC Adv, 2014, 4: 62492-62498.
- [15] Yuan CP, Hou HM, Ou SY. Progress in the pharmacokinetics and relative studies of salvianolic acid B [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2015, 24: 791-799.
- [16] Liu J, Liu Y, Liu N, et al. Metal-free efficient photocatalyst for stable visible water splitting *via* a two-electron pathway [J]. Science, 2015, 347: 970-974.
- [17] Cheng F, Yan J, Zhou C, et al. An alkali treating strategy for the colloidalization of graphitic carbon nitride and its excellent photocatalytic performance [J]. J Colloid Interface Sci, 2016, 468: 103-109.
- [18] OECD. Test No.236: fish embryo acute toxicity (FET) test [S]. Paris: OECD, 2013.

- [19] Amiri M, Salehniya H, Habibi YA. Graphitic carbon nitride/chitosan composite for adsorption and electrochemical determination of mercury in real samples [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2016, 55: 8114-8122.
- [20] Xu QC, Wang J, Zhang XM, et al. Preparation and photocatalytic performance of g-C₃N₄ nanosheets with high specific surface area [J]. *Chem Bioeng (化学与生物工程)*, 2018, 35: 20-25, 31.
- [21] Yin J, Liao GZ, Zhu DY, et al. g-C₃N₄ preparation and photocatalytic activity of g-C₃N₄/rGO composite [J]. *J Environ Sci-China (中国环境科学)*, 2016, 36: 735-740.
- [22] Chai B, Peng TY, Mao J, et al. Graphitic carbon nitride (g-C₃N₄)-Pt-TiO₂ nanocomposite as an efficient photocatalyst for hydrogen production under visible light irradiation [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2012, 14: 16745-16752.
- [23] Cao SW, Yu JG. g-C₃N₄-based photocatalysts for hydrogen generation [J]. *J Phys Chem Lett*, 2014, 5: 2101-2107.
- [24] Wang JH, Yin XL, Ji YF. Cr (VI) adsorption on polyethyleneimine modified graphite oxide [J]. *Chin J Inorg Chem (无机化学学报)*, 2015, 31: 1185-1193.
- [25] Huang Y, Fu M, He T. Synthesis of g-C₃N₄/BiVO₄ nanocomposite photocatalyst and its application in photocatalytic reduction of CO₂ [J]. *Acta Phys Chim Sin (物理化学学报)*, 2015, 31: 1145-1152.
- [26] Ma HC, Liu JJ, Yu YC, et al. Preparation of two-dimensional graphite phase carbon nitride nanosheets and research progress in photocatalysis [J]. *Chin J Appl Chem(应用化学)*, 2019, 36: 259-268.
- [27] Li LM. Preliminary Evaluation of the Biological Toxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes by Using Zebrafish Embryos (利用斑马鱼胚胎初步评价单壁碳纳米管的生物毒性) [D]. Guangxi: Guangxi Medical University, 2013.
- [28] Liu XT, Mu XY, Wu XL, et al. Toxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and reduced graphene oxide to zebrafish embryos [J]. *Biomed Environ Sci*, 2014, 27: 676-683.
- [29] Macdonald NP, Zhu F, Hall CJ, et al. Assessment of biocompatibility of 3D printed photopolymers using zebrafish embryo toxicity assays [J]. *Lab Chip*, 2016, 16: 291-297.
- [30] Bai W, Zhang ZY, Tian WJ, et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism [J]. *J Nanopart Res*, 2010, 12: 1645-1654.