

热碱解改性 UiO-66 材料对槲皮素的装载、释放及抗氧化作用研究

畅瑞苗^{1,2,3}, 张艳洋⁴, 康安娟¹, 张广彬¹, 余彦平¹, 任俊照¹, 陈安家¹, 李 勇^{2,3*}

(1. 山西医科大学药学院, 山西 太原 030001; 2. 山西白求恩医院 (山西医学科学院同济山西医院), 山西医科大学第三医院, 山西 太原 030032; 3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北 武汉 430030; 4. 山西立业制药有限公司, 山西 太原 030021)

摘要: UiO-66 (University of Oslo 66) 可以提高难溶性中药活性成分的释放率和生物利用度, 是一种具有临床应用前景的金属有机骨架材料。然而原型 UiO-66 对槲皮素的装载不理想。将 UiO-66 置于碱性溶液中加热后获得了“热”碱解改性材料 UiO-66-BH (UiO-66-blend-heating)。UiO-66-BH 维持着 UiO-66 八面体结构的轮廓, 但表面出现明显粗糙不平的孔隙。UiO-66-BH 对槲皮素的饱和吸附量为 $138.92 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 对槲皮素的吸附属于单分子层吸附, 吸附过程受控于化学吸附作用。UiO-66-BH 可控制槲皮素在模拟胃肠液中的释放, 并在长时间释放后模拟肠液中药物浓度明显高于原料药 (36% vs 9%)。与槲皮素相比, 载有槲皮素的 UiO-66-BH@槲皮素载药系统对 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt, ABTS) 自由基的清除能力有所下降, 而对 1,1-二苯基-2-苦味基肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基的清除能力几乎不变, 显示了载药系统类似槲皮素的抗氧化作用。研究表明, 本文合成的 UiO-66-BH 可控制槲皮素在模拟胃肠液中的释放, 有望改善槲皮素的生物利用度。

关键词: 槲皮素; UiO-66; 热碱解技术; 吸附行为; 抗氧化活性; 体外释放

中图分类号: R944 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)09-2802-09

Study on release and antioxidant activity of quercetin after loaded by hot alkali hydrolysis modified UiO-66 material

CHANG Rui-miao^{1,2,3}, ZHANG Yan-yang⁴, KANG An-juan¹, ZHANG Guang-bin¹, YU Yan-ping¹, REN Jun-zhao¹, CHEN An-jia¹, LI Yong^{2,3*}

(1. School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Shanxi Bethune Hospital (Shanxi Academy of Medical Sciences, Tongji Shanxi Hospital), Third Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030032, China; 3. Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 4. Shanxi Liye Pharmaceutical Co., Ltd., Taiyuan 030021, China)

Abstract: UiO-66 (University of Oslo 66) is a kind of promising material that can improve the release and bioavailability of poorly water-soluble bioactive compounds of traditional Chinese medicine. However, the loading of quercetin in raw UiO-66 was not ideal. In this study, UiO-66-BH (UiO-66-blend-heating) was obtained by heating UiO-66 and KOH solution following blended them. UiO-66-BH maintained the outline of octahedral structure of UiO-66 but with obvious rough and uneven pores on the surface. UiO-66-BH had good adsorption of quercetin with saturation adsorption was $138.92 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, the adsorption process belonged to single molecular layer adsorption and was controlled by chemisorption. UiO-66-BH can control the release of quercetin in simulated

收稿日期: 2023-02-02; 修回日期: 2023-05-16.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32200323); 山西省基础研究计划 (20210302124190).

*通讯作者 Tel: 86-351-8379618, E-mail: yong5130@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0101

gastrointestinal fluid, and the drug concentration was significantly higher than that of free quercetin after long-term release (36% vs 9%). Compared with quercetin, the ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt) radical scavenging activity of UiO-66-BH@quercetin drug delivery system decreased, while the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity remained almost unchanged. The drug delivery system showed a strong antioxidant effect similar to quercetin. The findings indicated that UiO-66-BH could control release of quercetin and was expected to be used as a drug carrier material for some insoluble active components of traditional Chinese medicine such as quercetin.

Key words: quercetin; UiO-66; thermal alkaline hydrolysis; adsorption performance; antioxidant activity; *in-vitro* release

槲皮素是一种自然界中广泛存在的黄酮物质,具有良好的抗氧化^[1]、抗炎^[2]、抗肿瘤^[3]、抗流感^[4]等功效。但由于槲皮素分子为平面结构,堆砌较紧密,分子间引力较大,不易被溶剂分散^[5],导致槲皮素在水中溶解度仅为 0.01 mg·mL⁻¹^[6]。另外,槲皮素易受氧、pH、温度、金属离子等因素的影响,在胃肠道中稳定性差,使其口服生物利用度极低^[7,8]。为增加槲皮素的生物利用度,研究者开发了脂质体^[9]、介孔二氧化硅载药系统^[10,11]等纳米载药系统提高槲皮素的溶解度,然而,这些载药系统具有载药量低、材料不稳定或生物相容性欠佳等问题,当前仍需开发新型的槲皮素载药制剂。

UiO-66 (University of Oslo 66) 是一种锆基金属有机骨架材料 (metal-organic frameworks, MOFs), 是 [Zr₆O₄(OH)₄] 金属团簇与 12 个对苯二甲酸配位形成的^[12], 是 MOFs 中金属团簇与有机配体配位数最高的, 其结构耐高温、耐高压, 而且具有很强的耐酸性和一定的耐碱性。UiO-66 极高的比表面积和孔隙率有利于多种类型药物的大量负载, 可以作为一种良好的药物载体。如 Dang 等^[13] 以 UiO-66 为药物载体, 吸附中药活性成分姜黄素, 吸附量可达 392.22 mg·g⁻¹。然而, 本研究前期实验结果表明, 直接以 UiO-66 吸附槲皮素效果不理想, 需要选择适宜的方法对 UiO-66 进行改性, 改善 UiO-66 对槲皮素的吸附性能。

热碱解技术是一种新型、环保的 MOFs 改性策略。该策略通过高温碱解去除 MOFs 的配体, 同时改变 MOFs 的组成、晶型、密度、表面结构和吸附性能, 在调节 MOFs 性能方面显示出巨大潜力^[12]。据报道, 通过碱解技术得到的材料比前驱体 MOFs 具有更好的稳定性和更大的比表面积^[14]。本研究之前的工作发现, 适宜的热碱解处理可以明显改善 UiO-66 对中药活性成分没食子酸的装载和释放^[15]。在此基础上, 作者发现 UiO-66 经另一种热碱解方法处理后具有装载槲皮素的潜力。

因此, 本研究以 UiO-66 作为前驱体, 以适宜的热碱解技术制备新材料 UiO-66-BH (UiO-66-blend-heating),

表征其理化性质, 考察其细胞毒性, 探讨 UiO-66-BH 对槲皮素的吸附过程和机制; 制备 UiO-66-BH@槲皮素载药系统, 考察载药系统中槲皮素的释放行为, 并评价载药系统的抗氧化能力, 为槲皮素载药制剂的研发提供理论基础。

材料与方法

仪器 DV215CD 十万分之一天平 (上海奥豪斯仪器有限公司); BZF-30 真空干燥箱 (上海博迅医疗生物仪器股份有限公司); SB-5200DTDN 超声清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); TGL16M 高速离心机 (长沙湘智离心机仪器有限公司); HY-4 调速多用振荡器 (常州国华电器有限公司); pHS-3C 型 pH 计 (上海仪电科学仪器股份有限公司); SU8100 扫描电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); X' Pert Pro MPD 多功能 X 射线衍射仪 (英国 Malvern Panalytical 公司); Tensor II 红外光谱仪 (德国 Bruker 公司); ZCT-B 综合热分析仪 (北京精仪高科仪器有限公司); ZEN3690 粒度分析仪 (英国 Malvern Panalytical 公司); TriStar II 3020 全自动比表面与孔隙度分析仪 (美国 Micromeritics 公司); SHA-BA 气浴恒温振荡器 (金坛荣华仪器制造有限公司); UV-1200 型紫外-可见分光光度仪 (上海美谱达仪器有限公司); HERA cell 150i CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Spectra Max Plus 384 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); SW-CJ-2D 超净工作台 (苏州净化设备有限公司)。

药品和试剂 槲皮素 (纯度 > 97.0%, 批号 C10623828) 和 Dulbecco 改良培养基购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 氯化锆 (纯度 > 98.0%, 批号 C2003120)、对苯二甲酸 (纯度 > 99.0%, 批号 D2030030)、噻唑蓝溴化四唑 (thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT, 纯度 > 98.0%, 批号 530R0512) 和 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt, ABTS, 纯度 > 98.0%, 批号 F2218097] 购自上海阿拉丁生化

科技有限公司; *N,N*-二甲基甲酰胺 (*N,N*-dimethylformamide, DMF), 纯度 > 99.5%, 批号 RH195472, 购自上海易恩化学技术有限公司; 1,1-二苯基-2-苦味基胍 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH, 纯度 > 98.0%, 批号 523F021) 购于北京索莱宝科技有限公司; 人正常肝细胞株 (L02)、人正常结肠上皮细胞 (NCM460) 购自上海生命科学研究院; 其他试剂均为分析纯。

UiO-66的合成 采用溶剂热法制备 UiO-66: 称取氯化锆 1.06 g 和对苯二甲酸 0.76 g 溶于 50 mL DMF 中, 室温搅拌至溶液澄清后, 加入 7.59 mL 乙酸超声处理 5 min, 转移至具有聚四氟乙烯内衬的高压釜中, 置于烘箱中 120 °C 反应 24 h, 自然冷却至室温后, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集白色沉淀物。将获得的白色产物分别用 DMF 和乙醇洗涤数次, 过滤后, 60 °C 真空干燥 12 h, 得到 UiO-66。

UiO-66 碱解物的制备 取 UiO-66 100 mg 与 30 mL KOH 溶液 (0.2 mol·L⁻¹) 在具有聚四氟乙烯内衬的高压釜中混合均匀后, 密封, 于 120 °C 反应 3 h, 待溶液自然冷却至室温后, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集下层沉淀物, 分别以超纯水和乙醇洗涤数次, 过滤后于 60 °C 真空干燥 12 h, 即得 UiO-66-BH。另取 UiO-66 100 mg 与 30 mL KOH 溶液 (0.2 mol·L⁻¹) 分别加热到 120 °C 后迅速混合于具有聚四氟乙烯内衬的高压釜, 密封, 在 120 °C 反应 3 h, 待溶液自然冷却至室温后, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集下层沉淀物, 洗涤、过滤后真空干燥, 得到 UiO-66-SH (UiO-66-separated heating)。最后取 100 mg UiO-66 加入到 30 mL KOH 溶液 (0.2 mol·L⁻¹) 中, 混合均匀后室温反应 3 h, 离心、洗涤、过滤、真空干燥后得到 UiO-66-RT (UiO-66-room temperature)。

材料表征 扫描电子显微镜: 对材料进行喷金处理后, 在 5.0 kV 电压下进行扫描; X 射线衍射: 2θ 的记录范围为 5~70°, 步长和持续时间分别为 0.02° 和 12 s; 傅里叶变换红外光谱: 设置扫描范围为 4 000~400 cm⁻¹; 热重分析: 准确称取干燥后的样品, 以氮气为测试载气, 温度测试范围为 30~800 °C, 升温速率为 10 °C·min⁻¹; 粒度分析: 用甲醇分散材料后, 选择以下工作参数进行测定: 红色激光 633 nm, 粒径范围 0.3 nm~5 μm, 散射角 90°, 测试温度 25 °C, 折射率 1.33, 平衡时间 120 s, 自动循环次数; 氮吸附-解吸测量: 在 -195.85 °C、0.05~1 P/P₀ 相对压力范围内进行。

标准曲线的建立 准确称取槲皮素适量, 以乙醇溶解并定容至 50 mL, 得槲皮素储备液。取系列体积储备液以乙醇依次稀释后, 得到质量浓度分别为 1.73、2.58、3.43、4.28、5.12 μg·mL⁻¹ 的槲皮素溶液。以溶剂

为空白, 在 200~500 nm 范围内进行紫外扫描, 确定最大吸收波长。以标准溶液浓度 (*C*) 为横坐标, 最大吸收波长处吸光度 (*A*) 为纵坐标, 绘制标准曲线。

等温吸附实验 为了探索材料对槲皮素的吸附过程和原理, 采用等温吸附实验对各材料平衡吸附容量与溶液中药物浓度之间的关系进行研究^[15]。精密称取干燥至恒重的材料约 5.0 mg, 分别加入 5 mL 系列浓度槲皮素溶液, 封口膜密封后, 于 25 °C、300 r·min⁻¹ 振荡 2 h。滤过, 取上清液, 按上述所建方法测定其中槲皮素的浓度。

以公式 1 计算各吸附介质对槲皮素的吸附量并绘制等温吸附曲线:

$$Q_e = (C_0 - C_e) \times V/W \quad (1)$$

其中, Q_e (mg·g⁻¹) 为单位质量吸附介质对槲皮素的平衡吸附量; C_0 (μg·mL⁻¹) 为吸附前溶液中槲皮素的质量浓度; C_e (μg·mL⁻¹) 为吸附后平衡溶液中槲皮素的质量浓度; V (mL) 为槲皮素溶液的体积; W (mg) 为材料的质量。

为了进一步描述 UiO-66-BH 对槲皮素的吸附过程, 采用 Langmuir (公式 2) 与 Freundlich (公式 3) 两种模型对等温吸附曲线进行拟合。

$$C_e/Q_e = C_e/Q_m + 1/(K_1 \times Q_m) \quad (2)$$

$$\lg Q_e = m \lg C_e + \lg K_f \quad (3)$$

式中, Q_e (mg·g⁻¹) 是平衡吸附容量; C_e (mg·L⁻¹) 是吸附后平衡溶液中槲皮素的质量浓度; K_1 (L·mg⁻¹) 是 Langmuir 常数; Q_m 是最大理论吸附容量; K_f (mg·g⁻¹) 是 Freundlich 常数; m 是异质性因子 ($m = 1/n$)。

吸附动力学实验 采用吸附动力学实验对材料平衡吸附容量与吸附时间之间的关系进行研究^[15]。精密称取干燥至恒重的材料约 5.0 mg, 加入 1 000 μg·mL⁻¹ 槲皮素乙醇溶液 5 mL, 密封后置于恒温振荡器中振荡, 分别在 1、10、30、60、90 和 120 min 取出其中一个离心管, 滤过后, 取上清液, 通过测定上清液中槲皮素的浓度计算材料对槲皮素的吸附量, 以吸附时间为横坐标, 吸附量为纵坐标绘制吸附动力学曲线。为了进一步研究材料对槲皮素的吸附机制, 采用准一级动力学方程 (公式 4) 与准二级动力学方程 (公式 5) 对吸附动力学数据进行拟合。

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - k_1 t \quad (4)$$

$$t/Q_t = 1/(k_2 \times Q_e \times Q_e) + t/Q_e \quad (5)$$

式中, Q_e (mg·g⁻¹) 是平衡时的吸附容量, Q_t (mg·g⁻¹) 是时间“*t*”的吸附容量, k_1 为准一级动力学方程吸附速率常数, k_2 为准二级动力学方程吸附速率常数。

细胞毒性考察 考察不同浓度材料对 NCM460 和 L02 细胞的细胞毒性。在 96 孔板中按每孔 100 μL

($5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) 接种细胞, 37 °C 培养 24 h 后, 加入 100 μL 材料质量浓度分别为 0、0.1、1、10、100、1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的培养基, 继续培养 24 h 之后, 用 100 μL MTT 溶液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 替换培养基, 继续培养 4 h 后, 去除上清液, 每孔加入 100 μL 二甲基亚砷裂解, 振荡至孔内颗粒完全溶解后, 于 490 nm 波长处测定各孔吸光度。以公式 6 计算细胞活力 (cell viability, CV)。

$$CV = (A/A_c) \times 100\% \quad (6)$$

其中, A_c 为经材料处理后细胞裂解液对应的吸光度值, A 为对照组细胞裂解液对应的吸光度值。

槲皮素装载 根据实验计算得到的 UiO-66-BH 对槲皮素的吸附量, 并参考文献方法装载槲皮素^[10,11], 简而言之: 将 UiO-66-BH 和槲皮素按照质量比 20:3, 分别投入至 1 mL 无水乙醇中, 室温下搅拌均匀后继续搅拌至溶剂完全挥发, 超纯水洗涤 3 次后, 40 °C 真空干燥 12 h, 即得 UiO-66-BH@槲皮素载药系统。

载药量的计算: 取 2 mg 载药系统分散在适量体积的乙醇中, 室温搅拌 2 h 后, 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离上清液, 置换新鲜乙醇继续搅拌; 重复上述操作数次。测定所有上清液中槲皮素的含量, 按公式 7 计算载药系统的药物负载能力 (drug loading capability, DLC):

$$DLC (\%) = W_A/W_B \times 100\% \quad (7)$$

其中, W_A 为载药系统中槲皮素的质量 (mg), W_B 为载药系统的质量 (mg)。

载药系统中槲皮素释放行为考察 参考文献^[15]考察载药系统中槲皮素在模拟胃液 (simulated gastric fluid, SGF, pH 1.2) 和模拟肠液 (simulated intestinal fluid, SIF, pH 7.4) 中的释放情况。取载药系统 2 mg, 分散于 1 mL 1% 吐温 80 溶液中, 迅速转入透析袋中密封, 之后将透析袋移入 40 mL SGF (含 1% 吐温 80) 中, 37 °C 孵育 2 h。然后, 将透析袋从 SGF 中取出, 置于含 40 mL SIF (含 1% 吐温 80) 中, 37 °C 孵育 4 h。在整个释放实验过程中, 在 SGF 中每隔 15 min, 在 SIF 中每隔 30 min, 取 1 mL 释放介质测定药物浓度, 同时加入等温等量新鲜释放介质, 保持释放体积的恒定。同时称取与 2 mg 载药系统中所含槲皮素等质量的槲皮素原料药, 按上述方法考察槲皮素原料药的释放情况。

按公式 8 计算槲皮素的累积释放百分比:

$$Q_n = \left(C_n \times V_0 + V_i \sum_{i=1}^{n-1} C_i \right) \times 100\% / m \quad (8)$$

其中 Q_n 表示第 n 次取样时的累积释放率 (%); C_n 表示第 n 次取样时释放介质中药物的质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); C_i 表示第 i 次取样时释放介质中药物的质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); V_0 表示释放介质的体积 (mL); V_i 表示第 i 次取样体积 (mL); m 表示总药物装载量 (mg)。

ABTS 自由基清除能力测定 取槲皮素储备液, 以无水乙醇稀释成 19.98、39.96、59.94、79.92、99.90 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为槲皮素样品溶液; 精密称定 UiO-66-BH@槲皮素载药系统, 以无水乙醇分散成 153.33、306.67、461.33、613.33、766.67 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为载药系统样品溶液, 临用现配。参考 Meng 等^[16]的方法, 以超纯水配制 7.4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABTS 和 2.6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过硫酸钾溶液, 二者等体积混合后于 25 °C 避光反应 16 h, 得到产生 ABTS 自由基的基液。取适量 ABTS 基液, 以磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS 溶液) 稀释至在 734 nm 处吸光度为 0.70 ± 0.02 , 得到 ABTS 工作液。取 40 μL 样品与 4 mL ABTS 工作液混合反应 5 min, 以 PBS 为空白, 按公式 9 检测样品的 ABTS 清除能力:

$$\text{ABTS 清除能力} (\%) = [(A_c - A_s)/A_c] \times 100 \quad (9)$$

式中, A_c 为等量无水乙醇与 ABTS 工作液反应后的吸光度, A_s 为样品溶液与 ABTS 工作液反应后的吸光度。

DPPH 自由基清除能力测定 根据文献^[16]方法, 称取 DPPH 适量, 以无水乙醇配制成浓度为 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DPPH 溶液。分别取 DPPH 溶液 4 mL 与各样品溶液 4 mL 充分混合后, 置于暗处反应 30 min, 通过紫外-可见分光光度计在 517 nm 处测定混合溶液的吸光度, 并按公式 10 计算样品的 DPPH 自由基清除能力 (%):

$$\text{DPPH 清除能力} (\%) = [1 - (A_t - A_b)/A_c] \times 100 \quad (10)$$

式中, A_t 为样品溶液与 DPPH 溶液反应后的吸光度, A_b 为样品溶液与等量无水乙醇反应后的吸光度, A_c 为等量乙醇与 DPPH 溶液反应后的吸光度。

结果与讨论

1 热碱解条件的选择

1.1 槲皮素标准曲线 经紫外扫描, 槲皮素在 374 nm 具有最大吸收。拟合得到回归方程: $A = 0.073 0C + 0.006 0$, $R^2 = 0.999 6$, 线性范围 1.73~5.12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2 等温吸附实验 有文献^[14]报道称, 不同的碱解反应条件将影响 MOFs 所得材料的表面形态和孔隙率。不同的碱解反应条件包括原料混合与加热顺序、碱液浓度等。根据预实验结果, 实验选择 120 °C 为反应温度, KOH 溶液浓度为 0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。UiO-66 与碱液在室温条件下反应、混合后于 120 °C 反应、各加热至 120 °C 混合后继续在 120 °C 反应, 得到的产物分别为 UiO-66-RT、UiO-66-BH 和 UiO-66-SH。

各材料对槲皮素的等温吸附曲线如图 1 所示, 由图可知, UiO-66、UiO-66-RT、UiO-66-BH 和 UiO-66-SH 4 种材料对槲皮素的吸附量随溶液中槲皮素浓度的增大呈现不同的增长趋势。其中, UiO-66、UiO-66-

RT对槲皮素的吸附行为基本类似,均呈现出较低的吸附能力。而经加热碱解处理得到的UiO-66-BH和UiO-66-SH对槲皮素的吸附量明显增加。可能是因为室温条件下,配体对苯二甲酸解离不完全,此时在UiO-66-RT表面形成的孔道空间不足^[14],仍不足以充分地装载槲皮素。经过加热碱解处理后获得的UiO-66-BH和UiO-66-SH表面的孔隙比UiO-66-RT变大,足够装载摩尔质量为302.236 g·mol⁻¹的槲皮素,所以UiO-66-BH和UiO-66-SH对槲皮素的吸附能力明显改善。与UiO-66-SH相比,UiO-66-BH对槲皮素的吸附量更优,可能是由于与碱液混合后加热获得的材料具有更适于槲皮素的孔隙大小和更多的吸附位点,因此,选择UiO-66-BH作为槲皮素的吸附材料进行后续表征及吸附实验考察。

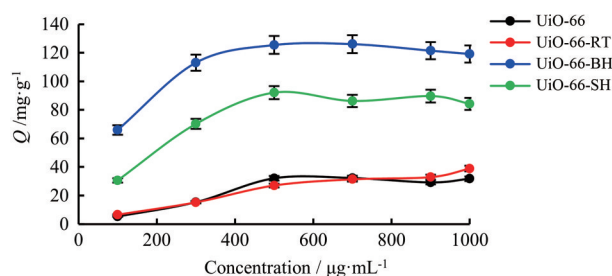


Figure 1 The adsorption isotherms of different materials for quercetin. UiO-66-RT: UiO-66-room temperature; UiO-66-BH: UiO-66-blend-heating; UiO-66-SH: UiO-66-separated heating. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2 材料的表征

2.1 扫描电子显微镜 (scanning electron microscopy, SEM) 分析 UiO-66和UiO-66-BH的表面结构和形貌结果见图2A。如图所示,UiO-66为对称的正八面体,表面较光滑,粒径在300 nm左右,整体形貌与文献^[17]报道相似。UiO-66-BH表面形态发生了明显的变化,仅维持正八面体的轮廓,配体的解离使粒径明显减小且原本光滑的表面变得粗糙,粗糙的表面为后续药物的装载提供了空间和结合位点。

2.2 X射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 分析 UiO-66和UiO-66-BH的XRD图谱如图2B所示,UiO-66分别在 2θ 为7.40°、8.53°、25.75°和30.74°处观测到明显的晶体衍射峰,与文献^[15]报道一致。而在UiO-66-BH的XRD图谱中,上述位置的晶体衍射峰明显减弱,甚至趋向于无定型状态的低矮、宽阔波形^[15],表明混合后加热碱解明显破坏了UiO-66的晶体结构,产生的UiO-66-BH具有完全不同的晶体形态。

2.3 傅里叶变换红外光谱 (fourier-transform infrared, FT-IR) UiO-66和UiO-66-BH的FT-IR结果如图2C

所示,UiO-66光谱中666、743和1 400 cm⁻¹位置处强的吸收峰可分别归因于配体对苯二甲酸结构中苯环C-H面外弯曲振动和-COOH中-OH的面内弯曲振动,结果与文献^[18]报道基本一致。相比之下,UiO-66-BH光谱中对苯二甲酸的特征吸收峰均消失,且在2 400 cm⁻¹附近出现明显的Zr-O吸收峰,可能是由于混合后加热解离配体对苯二甲酸导致的。

2.4 热重分析 (thermogravimetric analysis, TGA)

UiO-66和UiO-66-BH的热稳定性考察结果如图2D所示。随着温度的升高,UiO-66分别出现了3次明显的质量丢失,其中:100~150 °C区间的失重最有可能是由于其中残留水分的蒸发;200~300 °C左右的失重可归因于材料孔隙中残留的DMF的损失,在500~550 °C左右观察到的幅度最大的失重可能是由于对苯二甲酸配体在高温环境下分解成CO和CO₂所致^[19]。经过热碱解处理得到的UiO-66-BH比较稳定,加热至800 °C仍未出现明显的失重,这可能是由于UiO-66材料中对苯二甲酸配体经过混合后加热碱解被清除。TGA结果表明,混合后加热碱解处理得到的材料比UiO-66具有更优异的热稳定性。

2.5 粒度分析 UiO-66和UiO-66-BH的粒径分布结果见图2E。从图中可知,UiO-66粒径分布范围在120~1 280 nm之间,而UiO-66-BH粒径分布范围在60~1 100 nm之间,结果表明,经混合后加热碱解处理得到的材料粒径减小。结合SEM和TGA结果可推测,混合后加热碱解消除了材料中的对苯二甲酸配体,导致UiO-66-BH粒径减小。

2.6 氮气吸附-解吸附 UiO-66和UiO-66-BH的氮气吸附-解吸附等温线如图2F所示。UiO-66和UiO-66-BH中均可观察到IV型等温线且伴有明显的H1型迟滞回线。IV型等温线对应的是多孔吸附剂出现毛细凝聚现象的体系,在中等相对压力时UiO-66和UiO-66-BH均发生毛细凝聚,IV型等温线上升得很快,随后毛细凝聚结束后,等温线出现吸附终止平台^[20,21]。IV型等温线还反映UiO-66和UiO-66-BH均与吸附质相互作用力强,且这两种材料的孔径分布均在2~50 nm之间^[20]。H1型迟滞回线表明UiO-66和UiO-66-BH均是孔径分布相对较窄或尺寸较均匀的介孔材料^[21]。所得材料的表面积、孔隙容量和孔隙大小结果也印证了这一点。如表1示,UiO-66的Brunauer-Emmett-Teller (BET)表面积为216.94 m²·g⁻¹,而UiO-66-BH的BET表面积为107.34 m²·g⁻¹;UiO-66的孔隙容量为0.13 m³·g⁻¹,孔隙大小为5.19 nm;UiO-66-BH的孔隙容量为0.30 m³·g⁻¹,孔隙大小为11.48 nm。UiO-66-BH的表面积比UiO-66小,但孔隙容量和孔隙大小有明显提高,这可能是由于

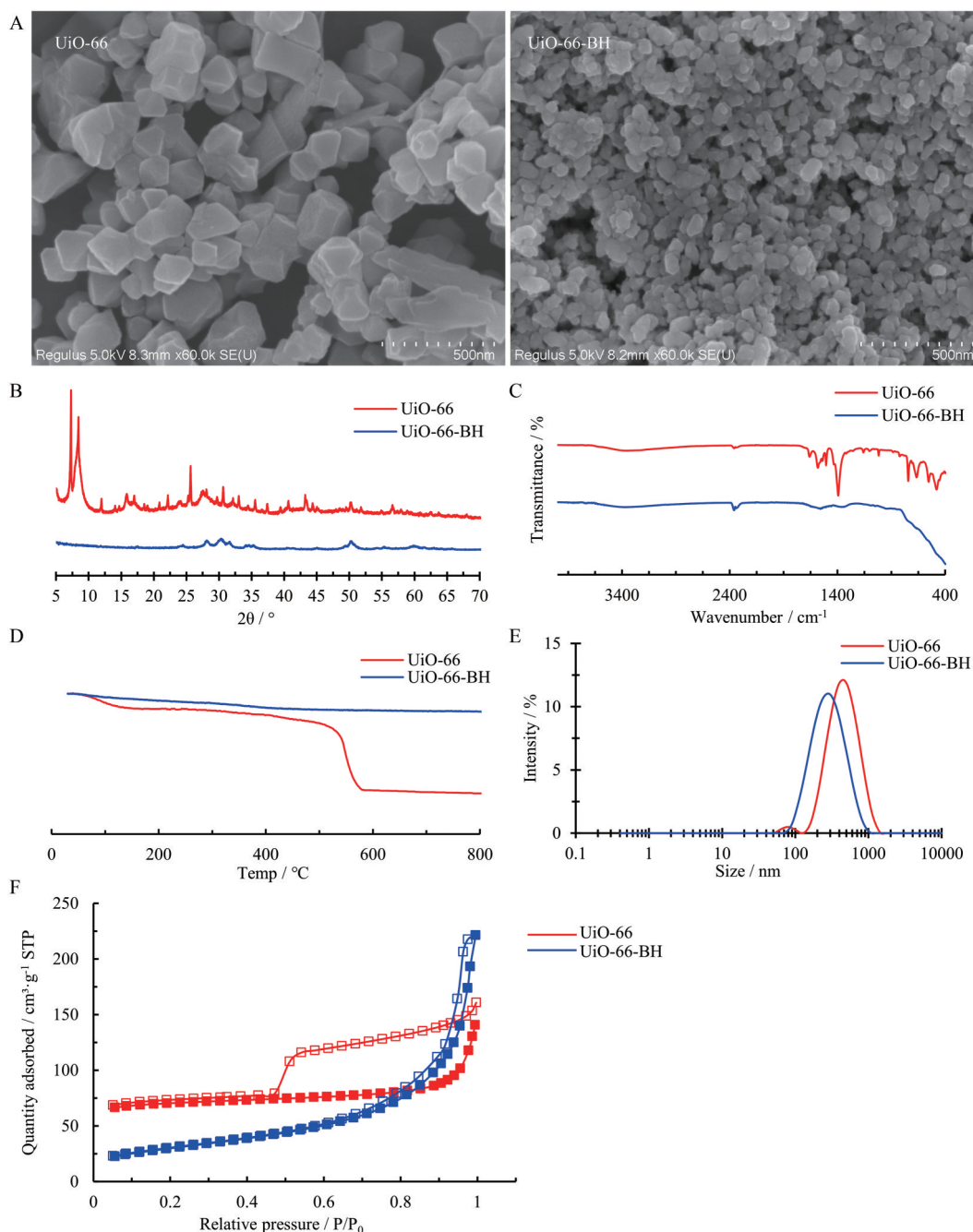


Figure 2 SEM images (A), XRD patterns (B), FT-IR profiles (C), TGA profiles (D), particle size distribution (E), nitrogen adsorption-desorption (F, closed symbols = adsorption, open symbols = desorption) of UiO-66 and UiO-66-BH. SEM: Scanning electron microscopy; XRD: X-ray diffraction; FT-IR: Fourier-transform infrared; TGA: Thermogravimetric analysis; STP: Stader temperature pressure

混合后加热碱解使对苯二甲酸配体解离导致的。

3 吸附性能研究

3.1 吸附过程研究 为了描述 UiO-66-BH 对槲皮素的吸附过程, 采用 Langmuir 与 Freundlich 模型对等温吸

Table 1 Surface area and porosity of the materials

Material	Surface area /m ² ·g ⁻¹	Pore volume /m ³ ·g ⁻¹	Pore size /nm
UiO-66	216.94	0.13	5.19
UiO-66-BH	107.34	0.30	11.48

附数据进行拟合, 拟合所得相关参数如表 2 所示。结果显示, UiO-66-BH 对槲皮素的吸附更倾向于 Langmuir 模型 ($R^2: 0.8823 > 0.6698$), 表明 UiO-66-BH 对槲皮素的吸附倾向于单分子层吸附行为^[22]。

3.2 吸附动力学实验 UiO-66-BH 对槲皮素的吸附动力学曲线如图 3 所示。从图中可以看出, 随着吸附时间的延长, UiO-66-BH 对槲皮素的吸附量也逐渐增加。

Table 2 Adsorption models and their statistical parameters. $Q_{e,f}$ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) is the calculated value of Q_e by pseudo-first-order equation; $Q_{e,s}$ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) is the calculated value of Q_e by pseudo-second-order equation

Sorbent	Langmuir isotherm equation			Freundlich isotherm equation			Pseudo-first-order model			Pseudo-second-order model		
	$Q_m/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$K_L/\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$	R^2	$K_f/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	n	R^2	$Q_{e,f}/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	K_1/min^{-1}	R^2	$Q_{e,s}/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	k_2/min^{-1}	R^2
UiO-66-BH	138.92	0.010 9	0.882 3	30.38	4.75	0.669 8	137.96	0.030 0	0.901 2	173.56	0.000 2	0.911 8

为考察 UiO-66-BH 对槲皮素的吸附机制, 分别采用准一级动力学方程与准二级动力学方程拟合所得的吸附动力学参数。结果如表 2 所示, 准二级吸附动力学方程拟合所得相关系数优于准一级吸附动力学方程。表明 UiO-66-BH 对槲皮素的吸附动力学更符合准二级动力学模型, 该吸附过程受控于化学吸附作用, 吸附剂与相应药物之间可能存在电子对共用或转移^[23]。

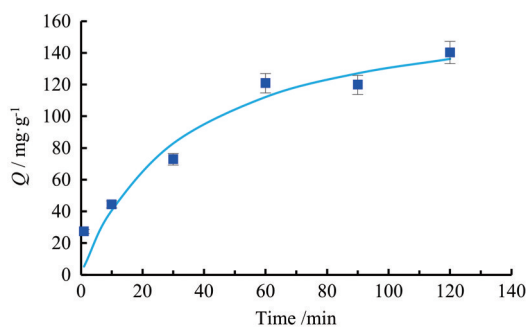


Figure 3 The adsorption kinetic of UiO-66-BH for quercetin (the points represent measured values and the curve was fitted with pseudo-second order kinetic mode). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

4 细胞毒性考察

采用 MTT 法考察 UiO-66-BH 对 NCM460 和 L02 细胞的生物安全毒性, 如图 4 所示, 与对照组相比, 不同浓度的 UiO-66-BH 不会降低两种细胞的活力, 表明 UiO-66-BH 可以作为安全的载药材料使用。

5 载药系统中槲皮素释放行为考察

经计算, UiO-66-BH 对槲皮素的载药量为 $13.20\% \pm 0.07\%$ ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)。

释放介质的 pH 值对释放情况有显著影响。为了更好地模拟体内真实情况, 释放前期使用酸性介质, 释放后期改用碱性介质^[24]。载药系统中槲皮素的累积释放率情况如图 5 所示。槲皮素原料药在模拟人体胃液环境中释放量随时间延长明显增加, 在 120 min 达到 23% 左右。相比之下, 载药系统中槲皮素在模拟人体胃液环境中释放速率较慢, 在模拟人体胃液环境中滞留 120 min (食物在胃中留滞的时间) 后释放量仅达到 3% 左右。这可能是由于载药系统中槲皮素与 UiO-66-BH 之间的化学作用力在酸性条件下不容易被破坏, 从而抑制了其中槲皮素在模拟胃液中的释放。

转移到模拟肠液中后, 槲皮素原料药的累积释放

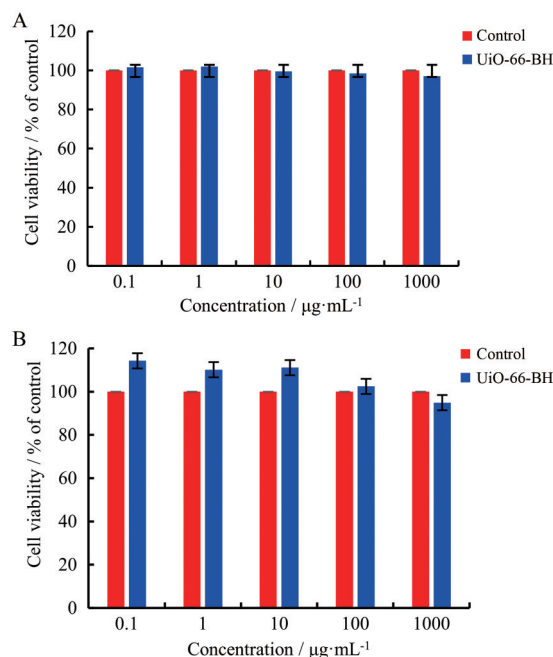


Figure 4 Cell viability value of NCM460 (A) and L02 (B) cells estimated by MTT assay treated with different concentration of UiO-66-BH ($n = 3$). MTT: Thiazolyl blue tetrazolium bromide

率在 360 min 内突增到 31.56%, 随后显著下降, 最终的累积释放率维持在 11% 左右。槲皮素含量下降的原因可能是在碱性的 SIF 环境中, 槲皮素 C 环受到羟基离子的攻击, 从而发生降解导致^[25]。相比之下, UiO-66-BH 载药系统中槲皮素在 SIF 中的释放速度较慢, 并在达到峰值 (38.87%, 1 440 min) 后维持在相对稳定的水平 (~38%)。可能原因是槲皮素持续从载药系统中释放, 药物的释放速度与降解速度相互博弈, 最终表现为一个相对稳定的槲皮素释放速率。由于小肠是槲皮素吸收的主要场所, 这种释放特性可能将大幅度地提高槲皮素的口服生物利用度。

6 抗氧化能力测试

6.1 ABTS 自由基清除能力 槲皮素原料药及载药系统对 ABTS 自由基清除能力结果见图 6A。槲皮素原料药对 ABTS 自由基清除能力随槲皮素浓度增加而增强, 相比之下, 槲皮素载药系统对 ABTS 自由基清除能力有所下降, 但仍表现出明显的清除 ABTS 自由基的能力, 该清除能力随载药系统浓度增加而增大, 呈现出类似槲皮素的变化趋势。

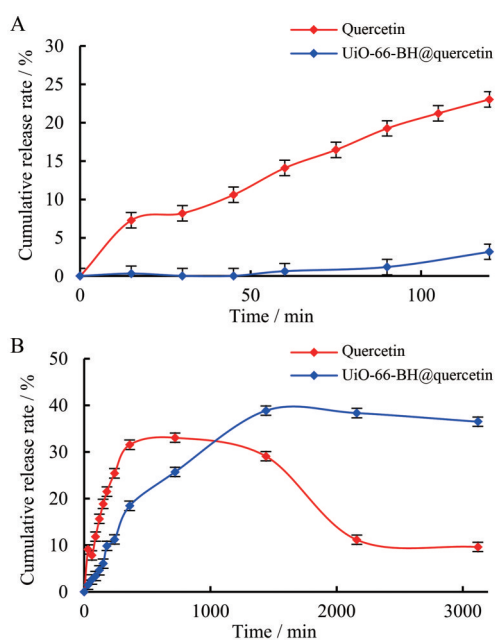


Figure 5 Release profile of encapsulated quercetin in simulated gastric fluid (A) and simulated intestinal fluid (B) conditions. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

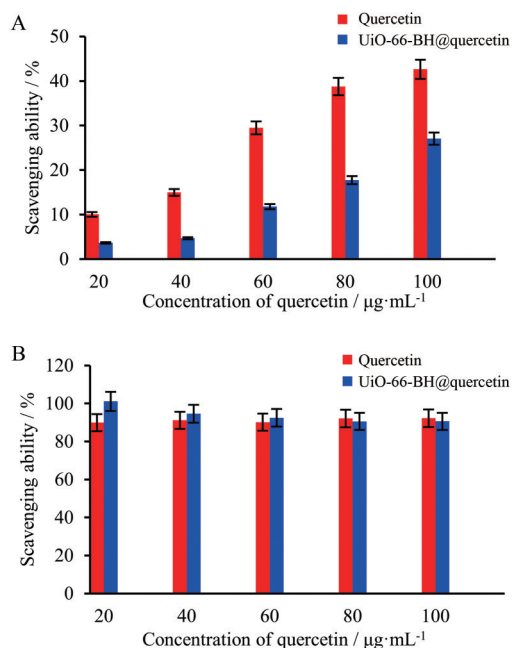


Figure 6 ABTS scavenging activity (A) and DPPH scavenging activity (B) of encapsulated quercetin ($n = 3$). ABTS: 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt; DPPH: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

6.2 DPPH 自由基清除能力 槲皮素原料药及载药系统对 DPPH 自由基清除能力结果见图 6B。与文献^[26]报道一致, 槲皮素原料药显示出良好的 DPPH 自由基清除能力, 而实验制备的载药系统对 DPPH 自由基的清除能力与游离槲皮素相差不多, 表明 UiO-66-BH 的

装载不会影响槲皮素对 DPPH 自由基的清除能力。

结论

本文通过采用混合后加热碱解方法处理 UiO-66, 得到的 UiO-66-BH 具有良好的热稳定性、高孔隙率和优良的生物安全性, 实现了对溶解度低、口服生物利用度差的槲皮素的成功负载。UiO-66-BH 对槲皮素的吸附表现出单分子层吸附行为, 且其吸附过程受控于化学吸附作用。UiO-66-BH 可以控制槲皮素在模拟胃液和模拟肠液中的释放, 并可以使模拟肠液中槲皮素浓度维持在一个较高水平, 有希望作为吸附材料提高槲皮素的口服生物利用度。另外, 该载药系统表现出在胃中抑制药物释放的潜力, 可能为在胃液中不稳定的中药活性成分的装载提供不错的选择。

致谢: 山西医科大学药学院周江韬教授为本研究提供 NCM460 细胞。

作者贡献: 畅瑞苗、李勇负责研究思路的提出、撰写文章并负责修改; 张艳洋、康安娟、张广彬、余彦平、任俊照参与实验实施及数据处理; 陈安家负责论文写作指导。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Duenas M, Surco-Laos F, Gonzalez-Manzano S, et al. Antioxidant properties of major metabolites of quercetin [J]. *Eur Food Res Technol*, 2011, 232: 103-111.
- [2] Wang L, Wang B, Li H, et al. Quercetin, a flavonoid with anti-inflammatory activity, suppresses the development of abdominal aortic aneurysms in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 690: 133-141.
- [3] Dajas F. Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143: 383-396.
- [4] Ganesan S, Faris AN, Comstock AT, et al. Quercetin inhibits rhinovirus replication *in vitro* and *in vivo* [J]. *Antiviral Res*, 2012, 94: 258-271.
- [5] Wang WY, Sun CX, Mao L, et al. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: a review [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2016, 56: 21-38.
- [6] Wang Z, Hu F, Che ZH, et al. Preparation and *in vitro* release of quercetin nanocrystals self-stabilized Pickering emulsion [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2022, 47: 1230-1236.
- [7] Chen X, Yin OQP, Zuo Z, et al. Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites [J]. *Pharm Res*, 2005, 22: 892-901.
- [8] Lesjak M, Beara I, Simin N, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives [J]. *J Funct Foods*, 2018, 40: 68-75.
- [9] Sun M, Nie SF, Pan X, et al. Quercetin-nanostructured lipid carriers: characteristics and anti-breast cancer activities *in vitro*

- [J]. Colloids Surf B, 2014, 113: 15-24.
- [10] Popova M, Trendafilova I, Szegedi Á, et al. Experimental and theoretical study of quercetin complexes formed on pure silica and Zn-modified mesoporous MCM-41 and SBA-16 materials [J]. Micropor Mesopor Mater, 2016, 228: 256-265.
- [11] Popova M, Trendafilova I, Tsacheva I, et al. Amino-modified KIT-6 mesoporous silica/polymer composites for quercetin delivery: experimental and theoretical approaches [J]. Micropor Mesopor Mater, 2018, 270: 40-47.
- [12] Fast CD, Woods J, Lentchner J, et al. Stabilizing defects in metal-organic frameworks: pendant Lewis basic sites as capping agents in UiO-66-type MOFs toward highly stable and defective porous materials [J]. Dalton Trans, 2019, 48: 14696-14704.
- [13] Dang YT, Hoang HT, Dong HC, et al. Microwave-assisted synthesis of nano Hf- and Zr-based metal-organic frameworks for enhancement of curcumin adsorption [J]. Micropor Mesopor Mater, 2020, 298: 110064.
- [14] Zhang HB, Xu B, Mei H, et al. "Hot" alkaline hydrolysis of amorphous MOF microspheres to produce ultrastable bimetal hydroxide electrode with boosted cycling stability [J]. Small, 2019, 15: e1904663.
- [15] Chang RM, Zhang YY, Zhang GB, et al. Application of thermal alkaline hydrolysis technology to improve the loading and *in-vitro* release of gallic acid in UiO-66 [J]. Food Chem, 2022, 391: 133238.
- [16] Meng R, Wu ZZ, Xie QT, et al. Preparation and characterization of zein/carboxymethyl dextrin nanoparticles to encapsulate curcumin: physicochemical stability, antioxidant activity and controlled release properties [J]. Food Chem, 2021, 340: 127893.
- [17] Yin XC, Dou LN, Yao XL, et al. Controllable assembly metal-organic frameworks and gold nanoparticles composites for sensitive immunochromatographic assay [J]. Food Chem, 2022, 367: 130737.
- [18] Hu ZG, Lin JJ, Ogiwara NK, et al. A pH-responsive phase transformation of a sulfonated metal-organic framework from amorphous to crystalline for efficient CO₂ capture [J]. CrystEngComm, 2016, 18: 2803-2807.
- [19] Molavi H, Zamani M, Aghajanzadeh M, et al. Evaluation of UiO-66 metal organic framework as an effective sorbent for curcumin's overdose [J]. Appl Organomet Chem, 2018, 32: e4221.
- [20] Xin Q, Luo MF. Modern Catalytic Research Methods (现代催化研究方法) [M]. Beijing: Science Press, 2009: 17-25.
- [21] Coasne B, Grosman A, Ortega C, et al. Adsorption in noninterconnected pores open at one or at both ends: a reconsideration of the origin of the hysteresis phenomenon [J]. Phys Rev Lett, 2002, 88: 256102.
- [22] Ghosal PS, Gupta AK. Development of a generalized adsorption isotherm model at solid-liquid interface: a novel approach [J]. J Mol Liq, 2017, 240: 21-24.
- [23] Shu H, Ge YH, Xu XY, et al. Hybrid-type carbon microcoil-chitosan composite for selective extraction of aristolochic acid I from Aristolochiaceae medicinal plants [J]. J Chromatogr A, 2018, 1561: 13-19.
- [24] Wu HM, Zhang J, Luo MQ, et al. Recent progress on dissolution and absorption of amorphous solid dispersions [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 1312-1321.
- [25] Mukhopadhyay P, Maity S, Mandal S, et al. Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of pH sensitive, safe quercetin-succinylated chitosan-alginate core-shell-corona nanoparticle for diabetes treatment [J]. Carbohydr Polym, 2018, 182: 42-51.
- [26] Zhang CK, Bai J, Yu H, et al. Effect of quercetin on serum lipid metabolism of mice and its antioxidant activity *in vitro* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2012, 24: 663-667.