

迷迭香酸金属有机骨架纳米粒的制备与表征

龙苗苗^{1,2}, 王博³, 王曹甘泓³, 邱立朋³, 程贤^{1*}, 毕良武^{1*}

1. 中国林业科学研究院林产化学工业研究所, 南京林业大学江苏省林业资源高效加工利用协同创新中心, 江苏 南京 210042
2. 江苏联合职业技术学院无锡卫生分院, 江苏 无锡 214028
3. 江南大学, 江苏 无锡 214122

摘要: **目的** 采用溶剂法制备负载迷迭香酸金属有机骨架纳米粒, 并考察其体外性能。**方法** 通过单因素实验制备沸石咪唑酯骨架-8 (ZIF-8) 空白纳米粒, 并采用正交试验优化制备了透明质酸修饰的迷迭香酸纳米粒 (hyaluronic acid-modified rosmarinic acid nanoparticles, RZH)。并利用傅里叶变换红外光谱分析、热重分析等分析手段对 RZH 进行表征。采用透析法考察了载药系统的体外释药行为, 对纳米粒进行体外抗氧化探究和溶血试验。**结果** 通过处方和工艺筛选, 选择乙酸锌为锌源, 10 min 为最优反应时间, 制备 ZIF-8 纳米粒。在此基础上, 正交试验筛选最适投药量、药物与载体比例和透明质酸比例, 制备出负载迷迭香酸的 RZH 纳米粒。外观形态、红外图谱和热重分析结果均表明成功制备了 RZH。制备得到的 RZH 纳米粒粒径为 (190.1 ± 28.0) nm, ζ 电位为 (-18.6 ± 0.8) mV, 包封率为 (90.75 ± 1.53) %, 载药量为 (39.47 ± 1.22) %。RZH 纳米粒在 pH 7.4 的生理条件下表现出药物缓慢释放效果, 48 h 时的累积释放率超过 60%, 具有一定的缓释效果。此外, RZH 对 DPPH 表现出浓度相关性的清除能力, 清除率达到了 97% 以上。透明质酸修饰后的 RZH 溶血率显著降低, 具有良好的血液相容性。**结论** 通过处方工艺的筛选制备得到载迷迭香酸的金属有机骨架纳米粒, 载药量高, 具有一定的缓慢释药行为、抗氧化能力和血液相容性, 为迷迭香酸的医学应用提供了新思路。

关键词: 迷迭香酸; 金属有机骨架; 纳米粒; 透明质酸; 傅里叶变换红外光谱分析; 热重分析; 体外释药行为

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)18-6612-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.18.011

Preparation and characterization of rosmarinic acid-loaded metal-organic framework nanoparticles

LONG Miaomiao^{1,2}, WANG Bo³, WANGCAO Ganhong³, QIU Lipeng³, CHEN Xian¹, BI Liangwu¹

1. Co-Innovation Center of Efficient Processing and Utilization of Forest Resources, Nanjing Forestry University, Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF, Nanjing 210042, China
2. Jiangsu Union Technical Institute, Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214028, China
3. Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: Objective To prepare rosmarinic acid-loaded metal-organic framework nanoparticles by solvent method and investigate its properties *in vitro*. **Methods** Single factor test was used to prepare blank ZIF-8 nanoparticles, and hyaluronic acid-modified rosmarinic acid nanoparticles (RZH) were optimized and prepared through orthogonal experiments. The RZH was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy and thermogravimetric analysis. The *in vitro* drug release behavior of the drug loading system was investigated by dialysis. The nanoparticles were subjected to *in vitro* antioxidant exploration and hemolysis test. **Results** ZIF-8 nanoparticles were prepared by selecting zinc acetate as the zinc source and 10 min as the optimal reaction time through prescription and process screening. And orthogonal experiments were conducted to screen the optimal drug amount, the ratio of drug to carrier, and

收稿日期: 2025-04-23

基金项目: 无锡市卫生健康委科研项目 (M202323); 江苏高校青蓝工程项目 (苏教师函[2024]14号); 江苏省生物质能源与材料重点实验室面上项目 (JSBEM-S-202318)

作者简介: 龙苗苗, 女, 博士研究生, 副教授, 研究方向为天然药物开发与创新制剂。Tel: (0510)81199221 E-mail: longmiaomiao@163.com

*通信作者: 程贤, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为天然产物化学与利用研究。Tel: (0258)54828534 E-mail: gudaoxifeng13@163.com
毕良武, 男, 博士, 研究员, 研究方向为天然产物化学与利用研究。Tel: (0258)54828534 E-mail: biliangwu@126.com

the ratio of hyaluronic acid, and to prepare rosmarinic acid-loaded RZH nanoparticles. RZH was successfully prepared by characterization of the appearance morphology, infrared spectrum and thermogravimetric analysis. The particle size of RZH was (190.1 ± 28.0) nm, and the ζ potential was (-18.6 ± 0.8) mV. The encapsulation efficiency and drug loading were $(90.75 \pm 1.53)\%$ and $(39.47 \pm 1.22)\%$, respectively. RZH nanoparticles exhibited a slow drug release effect under physiological conditions of pH 7.4, with a cumulative release rate exceeding 60% at 48 h, demonstrating a certain sustained release behavior. Moreover, RZH showed a concentration-dependent scavenging ability on DPPH with about 97%. Hyaluronic acid-modified RZH showed the lowest hemolysis and had good blood compatibility. **Conclusion** The rosmarinic acid-loaded metal-organic framework nanoparticles were successfully prepared through the prescription and process screening. The nanoparticles have high drug loading rate, slow drug release behavior, antioxidant capacity and blood compatibility, which provides a new idea for the medical application of rosmarinic acid.

Key words: rosmarinic acid; metal-organic framework; nanoparticles; hyaluronic acid; Fourier transform infrared spectrum analysis; thermogravimetric analysis; drug testing behavior *in vitro*

迷迭香酸 (rosmarinic acid, RA) 是一种从迷迭香等植物中分离得到的天然酚酸类抗氧化剂, 同时还具有很好的抗炎作用^[1], 但目前迷迭香酸的临床使用主要为粉末和水溶液, 剂型较少, 且其自身溶解度不高, 限制了其研究与应用^[2]。药物递送系统 (drug delivery system, DDS) 在改善药物的理化性质、保护药物稳定性、发挥更佳给药方式和提高生物利用度等方面具有显著优点^[3]。其中, 金属有机骨架材料 (metal organic frameworks, MOFs) 是一类由金属或者金属簇与有机连接体通过配位键自组装形成的三维多孔配位聚合物^[4]。与传统材料相比, MOFs 具有更多样且可调控的结构、更大的比表面积和更高的孔隙率等特点, 这使其在催化反应、化学传感、气体吸附、储存分离和药物输送等领域极具发展前景和应用潜力^[5]。沸石咪唑酯骨架 (zeolitic imidazolate frameworks, ZIFs) 是 MOFs 的一种亚家族结构, 由钴、锌等二价金属离子和咪唑及其衍生物组装而成。沸石咪唑酯骨架-8 (ZIF-8) 是 ZIFs 材料家族中最具代表性的一类, 由 Zn^{2+} 和 2-甲基咪唑构成^[6], 具有较大的比表面积和优异的热稳定性, 并且因其多孔性和酸敏感性, 在药物递送方面展现出广阔的应用前景^[7]。

本实验设计了载迷迭香酸的金属有机骨架纳米粒 (RA/ZIF-8, RZ), 并在纳米粒表面修饰透明质酸 (hyaluronic acid, HA), 制备功能化纳米粒。透明质酸的修饰不但能够提高 RA/ZIF-8 的稳定性, 而且可与炎症部位过表达的分化簇 44 受体 (cluster of differentiation 44, CD44) 结合^[8], 实现主动靶向作用^[9], 增强迷迭香酸的抗炎作用。本实验通过单因素考察和正交试验筛选筛选了最优处方, 并对纳米粒进行了体外性质表征, 为迷迭香酸的药用开发和应用研究提供了参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

B13-3 型智能恒温定时磁力搅拌器, 上海司乐仪器有限公司; AX224ZH/E 型电子分析天平, 奥豪斯仪器 (上海) 有限公司; Centrifuge 5920R 型离心机, 德国 Eppendorf 公司; KQ5200DV 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Zetasizer Nano ZS 型纳米粒度分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; Freezone 型冷冻干燥机, 美国 Labconco 公司; Nexus 870 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国尼高力仪器公司; UV-2550 型紫外可见分光光度计, 日本岛津仪器有限公司; DHG-9050A 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海慧泰仪器制造有限公司; TGA/1100SF 型热重分析仪, 瑞士梅特勒-托利多集团; Su1510 型扫描电子显微镜 (SEM), 日本日立公司; Spectra Max M2 型酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司。

1.2 试剂

迷迭香酸, 批号 L2405571, 质量分数 $\geq 97\%$, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 乙酸锌、氯化锌、硫酸锌、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾, 国药集团化学试剂有限公司; 2-甲基咪唑, 上海阿达玛斯试剂有限公司; 透明质酸钠, 相对分子质量为 45 000, 批号 J201240944, 华熙生物科技股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 ZIF-8 空白纳米粒的处方工艺筛选

2.1.1 ZIF-8 空白纳米粒的制备方法 采用溶剂法制备 ZIF-8 空白纳米粒^[10]。准确称取 0.1 mmol 锌盐, 配制成 2 mL 水溶液, 并滴加进 6 mL 溶有 0.5 mmol 2-甲基咪唑的水溶液中, 12 000 r/min 搅拌 10 min。将混合溶液以 15 000 r/min 离心 (离心半径 15.5 cm) 10 min, 弃去上清, 水洗 3 次除去残留试

剂, 冻干 24 h 后得到白色固体粉末, 即为 ZIF-8 空白纳米粒。

2.1.2 锌源的筛选 分别称取 0.1 mmol 的乙酸锌、硫酸锌、氯化锌作为锌源, 保持其他合成条件不变, 制备不同锌源的纳米粒。使用傅里叶变换红外 (Fourier transform infrared, FTIR) 光谱仪在测量范围内进行光谱扫描, 波数设置为 $4\ 000\sim 400\ \text{cm}^{-1}$ 。FTIR 谱图结果如图 1 所示, $3\ 127\ \text{cm}^{-1}$ 处的特征吸收峰属于甲基中 C-H 的伸缩振动峰, $2\ 926\ \text{cm}^{-1}$ 处的特征吸收峰属于咪唑环中 C-H 的伸缩振动峰, 而归属于 2-甲基咪唑的 $2\ 621\ \text{cm}^{-1}$ 处的 N-H··H 氢键和 $1\ 840\ \text{cm}^{-1}$ 处的 N-H 的振动吸收峰没有显示^[11], 这表明 3 种不同锌源均可成功合成 ZIF-8 纳米粒。

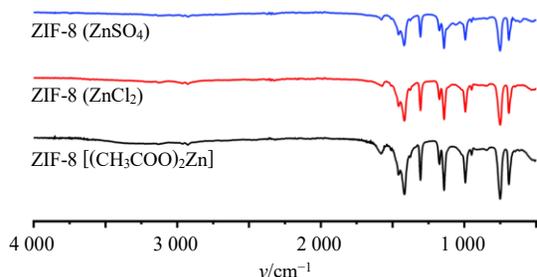


图 1 不同锌源合成的 ZIF-8 纳米粒的 FTIR 图

Fig. 1 FTIR of ZIF-8 nanoparticles with different zinc sources

采用动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 法测定了不同锌源纳米粒的粒径、多分散系数 (polymer dispersity index, PDI) 和 ζ 电位, 结果如表 1 所示。以硫酸锌为锌源的纳米粒的粒径约为 800 nm, 而乙酸锌和氯化锌作为锌源合成的 ZIF-8 粒径均在 100 nm 左右, 但是乙酸锌为锌源合成的纳米粒 PDI 值较小, 分布范围更窄, 且 3 种不同锌源制备的纳米粒 ζ 电位均在 12~29 mV。故选择乙酸锌为锌源, 制备粒径均一的 ZIF-8 纳米粒。

2.1.3 反应时间的筛选 以筛选所得的乙酸锌为锌源, 于合成反应的第 5、10、20、40、60 分钟取

表 1 不同锌源合成 ZIF-8 纳米粒的粒径、PDI 和 ζ 电位 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Partical size, PDI and ζ potential of ZIF-8 nanoparticles synthesized with different zinc sources

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

锌源	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
ZIF-8 [(CH ₃ COO) ₂ Zn]	105.9±3.8	0.060±0.002	27.9±0.7
ZIF-8 (ZnSO ₄)	830.5±18.5	0.259±0.015	13.1±0.7
ZIF-8 (ZnCl ₂)	103.2±2.4	0.143±0.029	22.4±0.8

1 mL 反应液, 并用去离子水稀释后测定各时间点的粒径、PDI 和 ζ 电位, 筛选最优反应时间。由表 2 结果可以看出, 反应时间对 ZIF-8 空白纳米粒的粒径影响较小, 以乙酸锌为锌源所合成的 ZIF-8 纳米粒粒径均一, 均为 150 nm 左右, 尺寸分布窄。结合 PDI 和 ζ 电位, 反应 10 min 的 ZIF-8 纳米粒的 PDI 值最小且 ζ 电位最高, 因此选择 10 min 为最优反应时间。

表 2 不同时间制备 ZIF-8 纳米粒的粒径、PDI 和 ζ 电位 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Partical size, PDI and ζ potential of ZIF-8 nanoparticles at different prepared times ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/min	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
5	180.7±4.4	0.224±0.020	12.1±1.3
10	152.5±0.8	0.142±0.013	29.1±0.9
20	156.0±2.7	0.188±0.015	11.8±1.7
40	162.3±0.6	0.172±0.028	13.1±1.2
60	168.6±3.7	0.239±0.022	26.9±0.3

2.2 透明质酸修饰 RA/ZIF-8 (RZ) 纳米粒 (RZH) 的制备

药物摩尔量决定载药量上限, 药物-载体摩尔比调控装载效率和载体利用率, 透明质酸质量比主导靶向性, 三者协同优化载药 MOF 的载药性能、递送功能及稳定性, 是正交试验的核心调控参数。因此在空白纳米粒制备和预实验的基础上, 制备通过采用 3 因素 3 水平的正交试验设计法, 以纳米粒的载药率为指标, 优化 RZH 的处方和工艺。正交试验设计因素及水平见表 3。对实验数据进行极差分析和方差分析, 极差 R 的大小反应了各个影响因素对载药量的影响程度。从正交试验结果 (表 3、4) 可以看出, 各因素对纳米粒载药量的影响大小顺序为 $A > B > C$, 即投药量对纳米粒的载药率影响最大, 透明质酸的质量比影响最小。RZH 的最佳处方工艺为 $A_2B_2C_2$, 即迷迭香酸为 0.05 mmol, 迷迭香酸与 ZIF-8 质量比为 1:2, 透明质酸的质量分数为 10%。

2.3 纳米粒的表征

2.3.1 外观形态观察 观察并拍照记录制备过程前后的 ZIF-8、RZ 和 RZH 纳米粒的外观形态及颜色变化。结果如图 2 所示, ZIF-8 纳米粒呈现为白色粉末, 成功负载迷迭香酸的 RZ 纳米粒呈现为黄色粉末, 在表面修饰透明质酸后, RZH 呈现为黄绿色粉末, 且 ZIF-8、RZ、RZH 纳米粒均能均匀地分散在水溶液中。

表3 正交试验设计与结果

Table 3 Design and results of orthogonal test

序号	A/mmoll	B	C/%	D (误差)	载药量/%
1	0.03 (1)	1 : 1 (1)	5 (1)	(1)	40.33±0.59
2	0.03 (1)	1 : 2 (2)	10 (2)	(2)	40.72±0.68
3	0.03 (1)	1 : 3 (3)	15 (3)	(3)	37.04±0.51
4	0.05 (2)	1 : 1 (1)	10 (2)	(3)	41.28±0.34
5	0.05 (2)	1 : 2 (2)	15 (3)	(1)	39.99±0.17
6	0.05 (2)	1 : 3 (3)	5 (1)	(2)	39.10±0.46
7	0.07 (3)	1 : 1 (1)	15 (3)	(2)	36.48±2.45
8	0.07 (3)	1 : 2 (2)	5 (1)	(3)	38.16±0.62
9	0.07 (3)	1 : 3 (3)	10 (2)	(1)	37.04±0.19
<i>K</i> ₁	118.09	118.09	117.59	117.36	
<i>K</i> ₂	120.37	118.87	119.04	116.30	
<i>K</i> ₃	111.68	113.18	113.51	116.48	
<i>R</i>	8.69	5.69	5.53	1.06	

表4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

误差来源	偏差平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	显著性
A	13.533 6	2	6.766 8	63.097 1	<i>P</i> <0.05
B	6.343 6	2	3.171 8	29.575 5	<i>P</i> <0.05
C	5.481 1	2	2.740 5	25.554 2	<i>P</i> <0.05
D(误差)	0.214 5	2	0.107 2	1.000 0	



图2 ZIF-8、RZ 和 RZH 水分散液的离心前、离心后及冻干的外观形态图

Fig. 2 Morphology of ZIF-8, RZ and RZH water dispersions before centrifugation, after centrifugation and freeze-drying

通过 SEM 对 RZH 的形貌进行表征, 将纳米粒分散液滴加于硅片基底, 经干燥后溅射镀覆金/铂

层, 以增强导电性, 在 3 kV 加速电压下观察纳米粒的形貌及分布。结果如图 3 所示, RZH 呈现出球形, 与 ZIF-8 标准的菱形十二面体形貌有明显差异, 推测这是由于在 ZIF-8 的合成过程中加入迷迭香酸以及通过透明质酸后修饰双重作用下的结果。

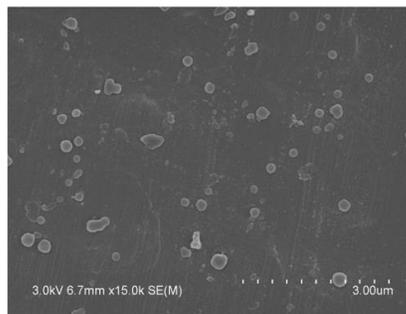


图3 RZH 的 SEM 图

Fig. 3 SEM image of RZH

2.3.2 粒径、PDI 与 ζ 电位 称取适量 ZIF-8、RZ 和 RZH 分散于去离子水中, 超声 10 min 使其分散均匀, 3 次测定所制备纳米粒的粒径、PDI 和 ζ 电位, 结果见表 5。RZ 较 ZIF-8 空白纳米粒粒径增加, 且 ζ 电位由正变负, 表明迷迭香酸成功负载到 ZIF 中。透明质酸修饰后的 RZH 较 RZ 纳米粒粒径略有提高, 表明透明质酸成功吸附在纳米粒表面从而导致粒径增大。由于透明质酸带负电荷且通过静电吸附在 RZ 纳米粒上, 故经过透明质酸修饰后其 ζ 电位有所降低。

表5 不同纳米粒的粒径、PDI 和 ζ 电位 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Particle sizes, PDI and ζ potentials of different nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
ZIF-8	105.7±14.4	0.142±0.013	27.9±0.7
RZ	164.2±26.0	0.286±0.022	-13.7±1.5
RZH	190.1±28.0	0.263±0.029	-18.6±0.8

接下来考察了 RZH 的粒径及 ζ 电位的稳定性, 重复 3 次实验, 结果如表 6 所示。经透明质酸修饰后, RZH 的粒径在 7 d 内无明显变化, 证明 RZH 具有良好的分散性以及粒径稳定性。同时, RZH 的 ζ 电位在 7 d 内只出现轻微的波动, 证明其电位可保持稳定。

2.3.3 包封率和载药量的测定

(1) 迷迭香酸标准曲线的绘制: 精密称取适量迷迭香酸溶于 pH 5.0 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 配制成 1 mg/mL 的迷迭香酸溶液, 4 °C 避光保存待用。通过紫外分光光度计于波长 200~500 nm 扫描

表 6 RZH 在 7 d 内的粒径及 ζ 电位变化情况

Table 6 Change of particle size and ζ potential of RZH in

7 d					
t/d	粒径/nm	ζ 电位/mV	t/d	粒径/nm	ζ 电位/mV
1	189.2±5.9	-18.3±0.8	5	192.1±7.0	-19.5±0.6
2	182.8±7.1	-17.5±0.4	6	191.6±9.6	-17.9±1.0
3	192.7±2.7	-19.2±1.0	7	195.8±6.1	-19.1±0.3
4	198.6±6.7	-18.1±0.1			

UV-Vis 图谱, 确定最大吸收波长。然后, 将 1 mg/mL 迷迭香酸母液分别稀释成 5~25 μg/mL 的系列质量浓度溶液。通过 UV-Vis 测定迷迭香酸最大吸收波长下不同质量浓度的迷迭香酸溶液的吸光度 (A) 值, 以迷迭香酸对照品质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 进行线性回归分析并绘制标准曲线。各质量浓度迷迭香酸紫外全波长曲线如图 4 所示, 迷迭香酸在 325 nm 处有最大紫外吸收, 故选用 325 nm 为检测波长。对迷迭香酸质量浓度与 A 值进行线性回归分析, 得到其线性回归方程为 $Y=38.47X+0.014$, $R^2=0.9994$, 结果表明迷迭香酸在 5.00~25.00 μg/mL 线性关系良好。

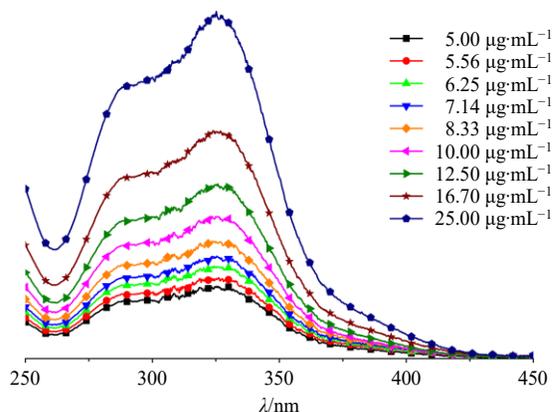


图 4 不同质量浓度的迷迭香酸溶液的紫外吸收光谱

Fig. 4 Ultraviolet absorption spectra of rosmarinic acid solutions of different mass concentrations

(2) 包封率和载药量测定: 采用超速离心法测定载药纳米粒的包封率和载药量。精密称取 3 批 RZ 和 RZH 冻干粉, 加入 pH 5.0 的 PBS 配制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的待测溶液, 搅拌 48 h 后离心, 取上清测定 A 值, 按照公式计算载药纳米粒的包封率和载药量。

包封率 = 载药纳米粒中迷迭香酸质量 / 迷迭香酸投药量

载药量 = 载药纳米粒中迷迭香酸质量 / 载药纳米粒质量

RZ 纳米粒的载药量和包封率分别为 (40.86±2.38)% 和 (89.44±1.68)%, 经透明质酸表面修饰

后, RZH 纳米粒的载药量和包封率分别为 (39.47±1.22)% 和 (90.75±1.53)%, 表明多糖的表面修饰不影响纳米粒对药物的包封。

2.3.4 FTIR 表征 取适量 ZIF-8、RZ 和 RZH 纳米粒, 扫描获得 FTIR 图谱如图 5 所示, 2 917 cm⁻¹ 处的特征吸收峰为 RZH 中透明质酸中 C-H 的伸缩振动峰; 1 613 cm⁻¹ 处的特征吸收峰为 RZH 中透明质酸中羧基的伸缩振动峰。通过分析比较, RZH 的主要吸收峰都能够与透明质酸和 RZ 的吸收峰相吻合, 这说明透明质酸成功修饰在 RZ 纳米粒表面, 而吸收峰的位移可能是与氢键的影响有关。

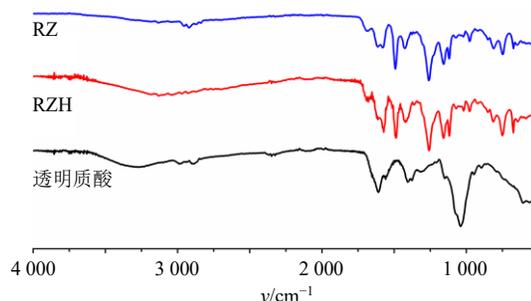


图 5 透明质酸、RZ 和 RZH 的 FTIR 图

Fig. 5 FTIR of hyaluronic acid, RZ and RZH

2.3.5 热重分析表征 取适量 ZIF-8、RZ 和 RZH 纳米粒于铝坩锅中进行热重分析测量, 检测温度范围为 25~700 °C, 升温速率为 20 °C/min。结果如图 6 所示, ZIF-8 空白纳米粒在 400 °C 前仅损失了少量水分和杂质, 400 °C 后 ZIF-8 的有机配体快速分解, 600 °C 左右质量趋于稳定, 推测此时 ZIF-8 已分解为碳和氧化锌。在 200 °C 之前, RZH 分解速度较 RZ 略快, 可认为是修饰在 RZH 纳米粒表面的透明质酸分解导致的; 200~400 °C, RZ 和 RZH 质量的损失是由于负载在纳米颗粒上的迷迭香酸的分解

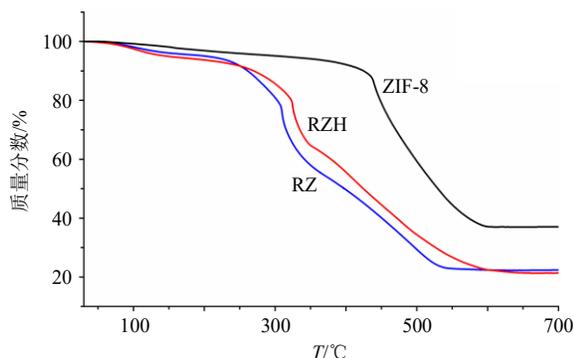


图 6 透明质酸、RZ 和 RZH 的热重分析曲线

Fig. 6 Thermogravimetric analysis curves of hyaluronic acid, RZ and RZH

解引起的。因此，与 RZ 和 RZH 相比，ZIF-8 具有最好的热稳定性，也表明迷迭香酸和透明质酸负载到 ZIF-8 纳米粒体系中。

2.4 体外释放实验

采用透析法对 RZH 纳米粒进行体外释放行为研究。将 5 mg 的 RZH 冻干粉分散于 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中，置于 (37.0±0.5) °C 恒温振荡培养箱 100 r/min 震荡 48 h 考察药物释放性能。在各时间点分别取样 1.5 mL，取样后立即补充新鲜同体积的 PBS。取得的样品装入 2 mL EP 管中，离心取上清，通过 UV-vis 在迷迭香酸最大吸收波长处测定其吸光度，实验重复 3 次。RZH 的累积释放率 (Q_n) 根据公式计算，并绘制释放曲线。

$$Q_n = (V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n) / m_{\text{迷迭香酸}}$$

V_e 为取样体积， V_0 为释放介质总体积， C_i 为第 i 次取样时释放介质中药物的质量浓度， C_n 为第 n 次取样时释放介质中药物的质量浓度， $m_{\text{迷迭香酸}}$ 为 RZH 中迷迭香酸的质量

RZH 纳米粒体外释放曲线如图 7 所示。初始阶段药物有较快的释放，这可能是纳米粒外层结合力较弱的药物容易进入释放介质中。随后，药物的释放速率逐渐减缓，48 h 时 RZH 纳米粒的累积释放率达到 60% 以上，表明制备的纳米粒具有一定的缓释效果。以上结果表明，RZH 纳米粒前期能够释放部分药物达到较高质量浓度，然后缓慢控制药物释放，实现长效治疗作用。

2.5 体外抗氧化能力

将不同质量浓度 (0、50、100、150、200、250 $\mu\text{g/mL}$) 的 RZH 与 DPPH 乙醇溶液 (200 $\mu\text{g/mL}$) 按体积比 1:1 混合。随后测定不同时间溶液在 517 nm 处的紫外吸光度，以评估对 DPPH 的清除能力。实验重复 3 次，并通过方差分析法统计组间显著性

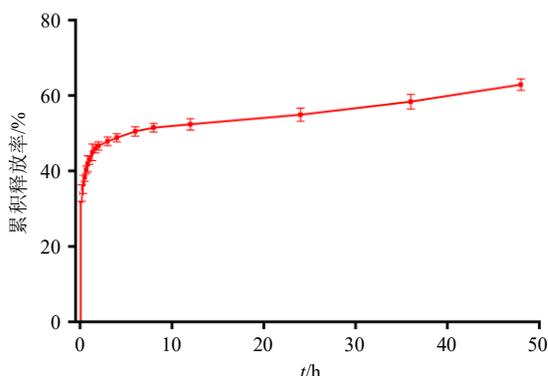


图 7 RZH 纳米粒体外药物释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 *In vitro* drug release curve of RZH nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

差异， $P < 0.05$ 代表统计学上的显著差异。

RZH 纳米粒抗氧化结果如图 8 和表 7 所示。结果表明 RZH 对 DPPH 表现出质量浓度相关性的清除能力。质量浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 时，DPPH 的清除率达到 97% 以上，且在 10 min 内，不同质量浓度的 RZH 对 DPPH 清除率均有较大增长，突出了 RZH 的快速和有效的抗氧化能力。

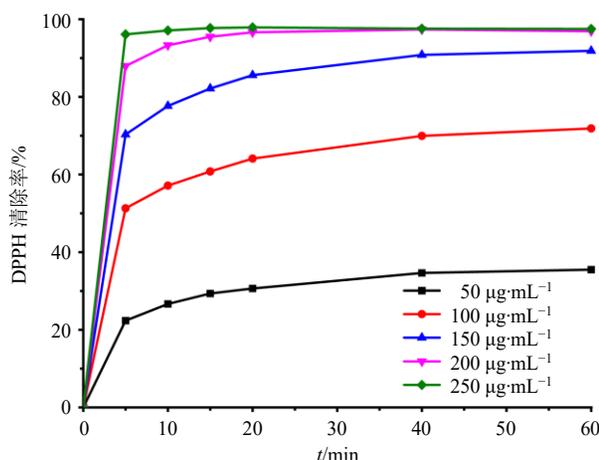


图 8 不同时间下 DPPH 清除动力学曲线 ($n = 3$)

Fig. 8 Kinetic curves of DPPH scavenging at different time ($n = 3$)

表 7 各质量浓度下 RZH 在 60 min 对 DPPH 的清除活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 DPPH scavenging activity of RZH at various concentrations in 60 min ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DPPH 清除率/ %	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DPPH 清除率/ %
50	35.487 ± 0.799 ^d	200	96.896 ± 1.202 ^a
100	71.873 ± 1.041 ^c	250	97.492 ± 1.061 ^a
150	91.872 ± 1.378 ^b		

同行数据不同字母表示差异达到 0.05 显著水平；表 8、9 同。

Different letters in peer data indicate a significant difference of 0.05; same as tables 8 and 9.

2.6 溶血试验

将 ZIF-8、RZ 和 RZH 分别分散在 pH 7.4 的 PBS 中，使其质量浓度均为 2 mg/mL，超声分散混匀，各自取出 300 μL ，置于 1.5 mL 离心管中，加入 325 μL PBS 混匀，再加入 625 μL 红细胞稀释液，轻微混匀后，于 37 °C 水浴孵育 2 h。然后将样品 3 000 r/min 离心 (离心半径 15.5 cm) 10 min。最后测量上清液在 540 nm 波长下的 A 值。PBS 和去离子水分别作为阴性对照和阳性对照。不同质量浓度的 RZH 溶血试验操作同上，溶血率根据公式计算。实验重复 3 次，并通过方差分析法统计组间显著性差

异, $P < 0.05$ 代表统计学上的显著差异。溶血试验结果如表 8、9 所示。ZIF-8、RZ 和 RZH 引起的红细胞溶血率分别为 7.00%、2.87% 和 1.72%, 可见迷迭香酸和透明质酸包载后的 RZH 纳米粒溶血率显著降低。在 640 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的高质量浓度下, RZH 表现出仅 2.66% 的溶血率, 表明其对血液具有较高安全性。

$$\text{溶血率} = (A_n - A_{\text{PBS}}) / (A_w - A_{\text{PBS}})$$

A_n 、 A_{PBS} 、 A_w 分别代表样品 (ZIF-8、RZ、RZH)、PBS 和去离子水

表 8 各制剂组的溶血情况

Table 8 Hemolysis of each preparation group

样品	溶血率/%	样品	溶血率/%
H ₂ O	100.000 ± 1.549 ^a	RZ	2.873 ± 0.259 ^c
PBS	0.000 ^d	RZH	1.984 ± 0.658 ^c
ZIF-8	7.007 ± 0.205 ^b		

表 9 不同质量浓度 RZH 的溶血情况

Table 9 Hemolysis of RZH in different concentrations

质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	溶血率/%	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	溶血率/%
160	0.106 ± 0.097 ^c	480	1.660 ± 0.130 ^b
240	0.463 ± 0.092 ^d	560	2.441 ± 0.278 ^a
320	0.592 ± 0.320 ^d	640	2.656 ± 0.256 ^a
400	0.891 ± 0.058 ^c		

3 讨论

迷迭香酸是从迷迭香等植物中分离得到的一种多酚类化合物, 具有显著的抗氧化、抗炎、抗微生物、抗肿瘤及神经保护等作用^[12-14]。然而, 因理化性质等因素致使迷迭香酸的应用受限^[15]。纳米粒介导的迷迭香酸给药系统在提高溶解性、稳定性和治疗效果等方面具有广阔的前景^[16]。本研究选用 ZIF-8 金属有机骨架, 通过单因素和正交试验筛选得到最优 RZH 纳米粒, 粒径较小、分布均匀、表面带有负电荷, 热稳定较好, 在生理 pH 值环境中具有一定缓释效果, 且有良好的抗氧化能力和血液相容性。此外, 基于 ZIF-8 的迷迭香酸递送系统的载药量达到约 40%, 高于已报道的脂肪酸脂质体^[17]和聚多巴胺纳米载体^[18]。这种差异可能源于 MOF 的多孔径和比表面积对药物的强吸附能力。在释药行为方面, García-Melero 等^[19]利用 PLGA 为载体包载迷迭香酸在 4 h 内几乎完全释放, 而 RZH 在 48 h 内释放了 60% 左右药物, 表现出良好的缓释特性。因此, ZIF-8 可用于制备载迷迭香酸的递送系统, 具备高载药量和缓释的特性。

随着中草药提取纯化工艺的不断成熟, 现如今, 迷迭香酸已逐渐凭借其独特多元的药用特性成为医药、食品、化妆品等行业的开发热点, 有着非常广阔的开发及应用前景^[20-21]。本研究针对迷迭香酸理化性质的问题, 设计制备的迷迭香酸纳米缓释递药系统, 也旨在为迷迭香酸的药用开发和临床应用提供一种新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Petersen M, Simmonds M S. Rosmarinic acid [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(2): 121-125.
- [2] Baek J, Lee M G. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology [J]. *Redox Rep*, 2016, 21(4): 164-169.
- [3] 肖箫, 陈俊宇, 李彩霞, 等. 纳米载体作为药物递送系统的临床应用和药代动力学研究 [J]. *药学学报*, 2023, 58(4): 856-866.
- [4] Yaghi O M, Li G M, Li H L. Selective binding and removal of guests in a microporous metal-organic framework [J]. *Nature*, 1995, 378: 703-706.
- [5] Sun C Y, Qin C, Wang X L, et al. Metal-organic frameworks as potential drug delivery systems [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2013, 10(1): 89-101.
- [6] 姚宇, 蔡梦如, 覃柳莹, 等. 金属有机骨架材料沸石咪唑酯骨架-8 在药物递送系统中的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2021, 30(18): 1680-1686.
- [7] Yang K, Yang K, Chao S, et al. A supramolecular hybrid material constructed from pillar[6]arene-based host-guest complexation and ZIF-8 for targeted drug delivery [J]. *Chem Commun*, 2018, 54(70): 9817-9820.
- [8] Solier S, Müller S, Cañeque T, et al. A druggable copper-signalling pathway that drives inflammation [J]. *Nature*, 2023, 617(7960): 386-394.
- [9] Kim S, Li S J, Jangid A K, et al. Surface engineering of natural killer cells with CD44-targeting ligands for augmented cancer immunotherapy [J]. *Small*, 2024, 20(24): e2306738.
- [10] Yin H, Kim H, Choi J, et al. Thermal stability of ZIF-8 under oxidative and inert environments: A practical perspective on using ZIF-8 as a catalyst support [J]. *Chem Eng J*, 2015, 278: 293-300.
- [11] 刘婷, 王怡, 李冰辉, 等. TMZ@ZIF-8 纳米粒的制备、表征及体内外抗肿瘤研究 [J]. *中国药房*, 2024, 35(9): 1100-1107.
- [12] Dahchour A. Anxiolytic and antidepressive potentials of rosmarinic acid: A review with a focus on antioxidant and

- anti-inflammatory effects [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 184: 106421.
- [13] Lefebvre T, Destandau E, Lesellier E. Sequential extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and pigments (carotenoids and chlorophylls) from rosemary by online supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1639: 461709.
- [14] 初旭, 姜华茂, 虢中强, 等. 迷迭香酸对前列腺癌细胞生物行为学的影响 [J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(1): 59-64.
- [15] 丁丽敏, 赵紫燕, 刘茜茜, 等. 迷迭香酸烷基酯的来源及药理活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(3): 525-531.
- [16] 龙苗苗, 程贤, 赵振东, 等. 迷迭香酸药理作用及其递送系统的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(11): 3715-3724.
- [17] Subongkot T, Ngawhirunpat T, Opanasopit P. Development of ultradeformable liposomes with fatty acids for enhanced dermal rosmarinic acid delivery [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(3): 404.
- [18] 朱辰奇, 顾依, 周琴, 等. 利用聚多巴胺制备丹参注射液缓释制剂的研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(15): 2245-2248.
- [19] García-Melero J, López-Mitjavila J J, García-Celma M J, et al. Rosmarinic acid-loaded polymeric nanoparticles prepared by low-energy nano-emulsion templating: Formulation, biophysical characterization, and *in vitro* studies [J]. *Materials*, 2022, 15(13): 4572.
- [20] 陈艳, 蒋星月, 杨琼, 等. 迷迭香酸的生物活性及其在食品领域的应用研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(22): 318-325.
- [21] 娄净, 陆仲夏, 俞雅蓉, 等. 迷迭香酸对人结肠癌 HCT-8 细胞增殖和凋亡的影响及分子机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3051-3055.

[责任编辑 郑礼胜]