

亲水性分子印迹纳米球的合成及 药物识别与释放性能研究*

徐莉¹, 何建峰²

(1. 华南农业大学理学院, 广东 广州 510642;
2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 以 *s*-萘普生为模板分子(T), 以甲基丙烯酸(MAA)为功能单体, 甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)为药物识别与释放的调节剂, 二乙烯基苯(DVB)为交联剂, 利用沉淀聚合法和环氧开环两步反应制备出亲水性的均匀球形纳米分子印迹聚合物。当 $n(T) : n(MAA) : n(GMA) : n(DVB) = 1 : 4 : 4 : 24$ 时制备的印迹聚合物粒径均一, 单分散性好, 平均粒径约 832 nm, 吸附实验表明该聚合物不仅可以在含水介质中对药物进行特异性识别, 而且还具有良好的药物缓释性能。

关键词: *s*-萘普生; 沉淀聚合反应; 分子印迹聚合物; 识别与缓释性能

中图分类号: O632 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2010)03-0061-05

Preparation of Hydrophilic Molecularly Imprinted Nano-spheres and the Properties on the Drug Release and Recognition

XU Li¹, HE Jianfeng²

(1. College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China;
2. College of Chinese Traditional Medicine, Guangzhou University of
Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The orbicular molecularly imprinted polymer (OC-MIP) was prepared by two steps including the precipitation polymerization and the opening the GMA epoxide ring. Then the hydrophilic external layer on the surface of OC-MIP was formed. The OC-MIP was characterized by infrared spectra and scanning electron microscopy (SEM). Water absorption measurement showed the OC-MIP had stronger water compatible than MIP. When the proportion of MAA/GMA was 1:1, and DVB is 3 times of MAA co GMA, the particle shapes of MIPs were uniform and the recognition and release of OC-MIP in polar solvent were satisfactory. The results showed GMA added in the polymers could adjust the capability of release of the polymers certainly. After the GMA epoxide ring was opened, OC-MIP synthesized was more suitable to be employed in biological media because of the reduction of non-specific hydrophobic interactions. In addition, the polymers had the capability of recognition, also could satisfy the study of both drug recognition and sustained-release in polar solvent.

Key words: *s*-naproxen; precipitation polymerization; molecularly imprinted polymers; recognition and release

* 收稿日期: 2009-08-24

基金项目: 广东省教育厅青年创新基金资助项目(K5090006); 华南农业大学校长基金资助项目(4900-K04162)

作者简介: 徐莉(1972年生), 女, 讲师; E-mail: lindafeng_xul@163.com

分子印迹是一种制备对特定的模板分子具有专一识别性能聚合物的实验技术, 由此技术制备的分子印迹聚合物 (molecularly imprinted polymer, MIP) 主要应用于色谱分离、固相萃取、化学传感器及分子识别等方面^[1-5]。由于 MIP 对印迹分子的高度亲和性, 应用于给药系统中能增加载药量, 提高药物的稳定性, 因此, 开发兼有药物识别与药物释放双重特性的 MIP 在新型药物载体材料研究领域具有十分重要的应用前景。

在医药领域, 纳米药物载体容易通过受体介导的内吞作用被细胞吞噬, 具有被动靶向性。如果赋予纳米粒子表面亲水性能, 则不仅可以延长药物在体内的循环时间, 提高药物生物利用度, 而且亲水纳米粒可以改变膜运转机制, 增加药物对生物膜的透过性, 有利于药物透皮吸收与细胞内药效发挥。因而亲水纳米粒子是一类非常优良的药物载体, 在生物医药领域应用非常广泛^[6-7]。

本研究以临床消炎、镇痛药 S-(+)-萘普生作为印迹分子, 甲基丙烯酸为功能单体, 甲基丙烯酸缩水甘油酯作为聚合物亲水调节修饰剂, 采用沉淀聚合和环氧开环两步反应, 制备得到一种新型的亲水性的均匀球形纳米分子印迹聚合物, 该聚合物可应用于极性较强的溶剂, 其对印迹分子不仅具有药物专一识别性能, 而且具有持续的药物缓释效果。

1 实验药品与测试仪器

S-萘普生 (化学纯, Fluka 试剂); α -甲基丙烯酸 (MAA, 分析纯, 天津博迪化工有限公司); 甲基丙烯酸缩水甘油酯 (GMA, 分析纯, 广州双键贸易有限公司); 二乙烯苯 (DVB, 化学纯, 天津光复精细化工研究所)。MAA, GMA, DVB 在使用前进行减压蒸馏。偶氮二异丁腈 (分析纯, 天津福晨化学试剂厂, 使用前经乙醇重结晶); 其它试剂均为分析纯。

紫外光谱仪 (岛津 UV-2550), AVATAR 360 FT2IR 型红外光谱仪 (KBr 压片) (美国 Nicolet 公司), 高效液相色谱仪 (Agilent 1100), C₁₈ 色谱柱 (4.5 mm × 150 mm, Agilent)。环境扫描电子显微镜 XL230ESEM (荷兰飞利浦电子光学有限公司); 激光粒度分析仪 Zetasizer 3000HS (Malvern, UK)。

2 实验方法

2.1 分子印迹聚合物的制备^[8]

称取 s-萘普生 0.230 6 g 于三口烧瓶中, 加入 0.344 3 g MAA, 摇匀, 静止 10 min, 使其与模板

分子充分作用, 然后依次加入 0.568 6 g GMA、3.124 3 g DVB、加入乙腈和苯的混合溶剂 40 mL (乙腈/苯体积比为 7:3), 在冰水浴中超声 5 min 后加入 50 mg 偶氮二异丁腈, 通入氮气 5 min, 密封。将反应瓶置于油浴中, 在 65 °C 中反应 24 h, 得到白色浑浊溶液。将溶液离心倾去上层清液, 得到聚合物粒子置于索氏抽提器中用无水乙醇洗涤 24 h, 60 °C 真空干燥得 MIP。取 3.00 g MIP 置于锥形瓶中, 加入 20 mL $\varphi = 10\%$ 高氯酸水溶液, 室温下磁力搅拌 24 h 后得到的聚合物用无水乙醇洗涤, 然后同样 60 °C 干燥得 OC-MIP。

采用相同方法 (除不加模板分子), 制备得到相应的空白聚合物 (NIP) 和开环空白聚合物 (OC-NIP)。

2.2 聚合物的性能研究实验

2.2.1 印迹聚合物亲水性能 为了比较聚合物开环前后亲水性的差异, 本研究测试了聚合物在水溶液中的溶胀性能。称约 50 mg 的聚合物填充至干净的固相萃取柱 (1 cm × 6 cm) 中, 称量总的质量, 得 m_q , 然后分别用 0.1 mol/L HCl (pH 1) 和磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.8) 过柱, 过量的水通过适当加压除去。将固相萃取柱外围擦干, 再次称量, 得 m_h 。按下列方程计算出聚合物的水含量:

$$m(\text{H}_2\text{O}) = (m_h - m_q) / m_q \times 100\%$$

其中, m_h 和 m_q 分别是溶胀后和溶胀前聚合物质量。

2.2.2 对模板分子的吸附性能 称取各聚合物 20 mg, 分别置于 10 mL 的锥形瓶中, 加入 3.0 mL 浓度为 3 mmol/L 的萘普生标准溶液 ($\varphi = 90\%$ 乙腈 + $\varphi = 10\%$ 水的混合溶剂), 室温下振荡吸附 24 h, 用 HPLC 测定吸附后溶液的平衡浓度。色谱条件: 甲醇/水, 体积比为 7:3; 检测波长为 245 nm; 流速为 1 mL/min; 进样体积为 20 μL 。

2.2.3 动力学吸附 称取 OC-MIP 50 mg, 置于锥形瓶中, 加入 3 mmol/L 的萘普生标准溶液 7.5 mL, 置于振荡器中室温振荡, 将吸附溶液分别在 10、30、60、120、180、240 min 后离心, 取上清液 1 mL (然后往原吸附液中补充 1 mL 标准液)。用 0.45 μm 过滤膜过滤后, 用 HPLC 测量吸附液的浓度, 计算其吸附量。

2.2.4 药物释放性能 称取 OC-MIP 50 mg, 放入锥形瓶中, 加入 7.5 mL 上述的萘普生标准溶液, 置于振荡器中室温振荡 4 h, 取其上清液过滤, 进行 HPLC 分析, 求出聚合物的饱和吸附量。倒掉锥形瓶上清液, 待 MIP 干燥后加入 pH 为 6.5 的磷酸盐缓冲溶液 7.5 mL, 继续振荡, 用 HPLC 分别在

1、5、24、48、72、100 h 测量溶液中萘普生的浓度，计算出释放量。

3 结果与讨论

3.1 聚合物的合成与表征

该研究探讨了沉淀聚合法合成分子印迹聚合物纳米球 (图 1)，该反应中使用 MAA 作功能单体与印迹分子进行组装，GMA 作为聚合物亲水调节剂，通过二乙烯苯交联聚合后可在聚合物纳米球表面引入环氧键，然后将聚合物用高氯酸处理，使环氧键水解生成 2 个羟基，增加聚合物表面的亲水性。

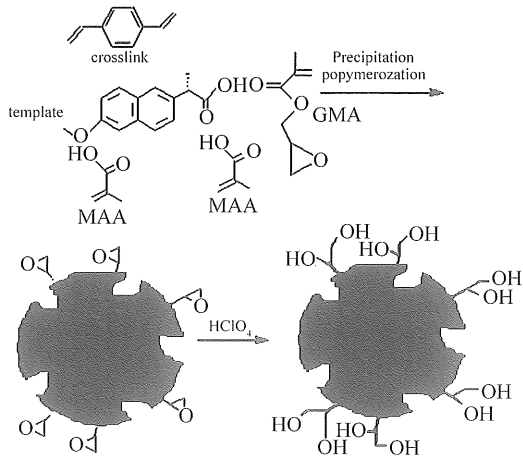


图 1 OC-MIP 的制备过程示意图

Fig. 1 Schematic illustration of OC-MIP preparation

该聚合工艺的优点是不需要任何稳定剂，制备的聚合物微球不仅表面洁净，而且粒径均匀，单分散性较好^[9-10] (图 2)，平均粒径在 832 nm。

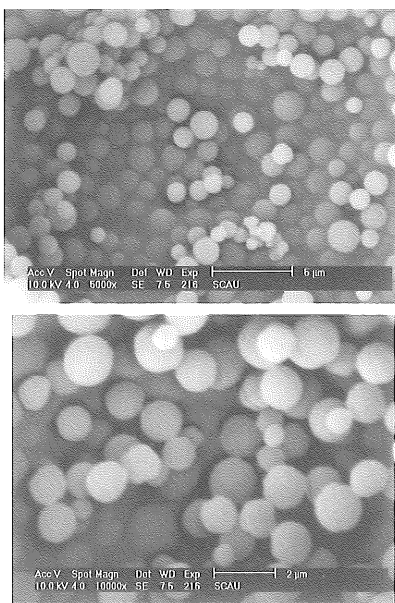


图 2 OC-MIP 的扫描电镜图

Fig. 2 Scanning electron microscopy of OC-MIP

图 3 出示了 MIP 与 OC-MIP 聚合物的红外光谱图，由图 3 可知，OC-MIP 在 1120 cm^{-1} 处增加了明显的 C-O 伸缩振动吸收峰。这说明由于三元氧环开环水解生成羟基，减弱了三元环对 C-O 键的束缚作用，使得 C-O 的伸缩振动明显增强。

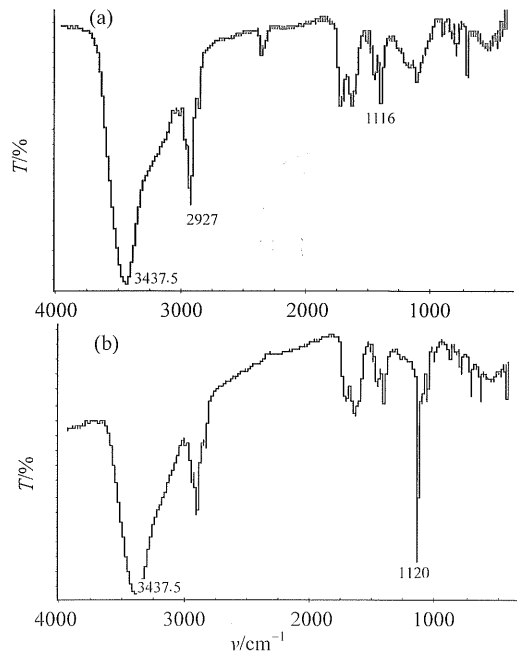


图 3 MIP (a) 和 OC-MIP (b) 的红外光谱图

Fig. 3 IR spectra of MIP (a) and OC-MIP (b)

由于羟基的亲水性能，开环后聚合物的吸水性能比开环前明显增加 (结果见表 1)。从表 1 可知，OC-MIP 和 MIP 对印迹分子的吸附量两者相差不大，表明聚合物中亲水基团对模板分子与印迹孔穴之间的三维作用 (包括氢键、孔穴匹配等协同作用) 无明显干扰作用，但两者的吸附量明显比空白聚合物大，印迹效果明显。而亲水 OC-NIP 对模板分子吸附量比 NIP 低，这是由于 OC-MIP 环氧开环成羟基后，亲水性增强，减少了模板分子中萘环与聚合物之间的疏水作用，从这结果也可反映疏水作用在非特异性吸附中占据主导地位。

表 1 聚合物的吸水率和对模板分子的吸附率

Table 1 Absorption ratios of water and imprinted molecules by polymers

聚合物	吸水率/%		吸附率/%
	pH = 0.1	pH = 6.8	
MIP	5.1	3.3	82.12
NIP	6.3	5.7	62.1
OC-MIP	39.5	43.3	84.1
OC-NIP	43.3	50.2	51.7

3.2 动力学吸附

图 4 为萘普生溶液的标准曲线, 线性方程为 $Y = 195.07565 + 23.0363X$ ($R = 0.99533$)。图 5 出示了 OC-MIP 和 OC-NIP 对萘普生动力学吸附曲线, 由图 5 可见, 印迹聚合物的吸附量比空白聚合物大, 其在前 60 min 吸附量可达到总的饱和吸附的 74%, 而空白吸附量只达到总吸附量的 42%, 90 min 后两者吸附增加量明显减少, 约 100 min 逐渐达到饱和, 印迹聚合物饱和吸附量可达到 78 mg/g, 而空白聚合物饱和吸附量为 56 mg/g。动力学实验可说明该聚合物结合药物的动力学速率较快, 适合于做药物传输的载体材料。

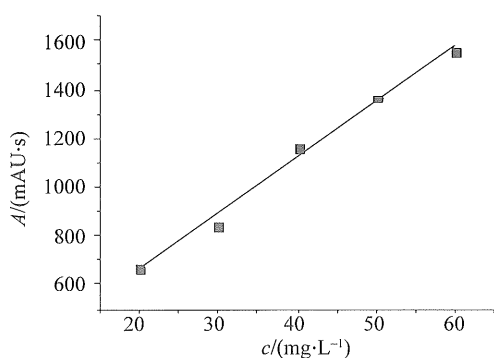


图 4 萘普生溶液标准曲线

Fig. 4 Calibration curve of s-naproxen standard solution

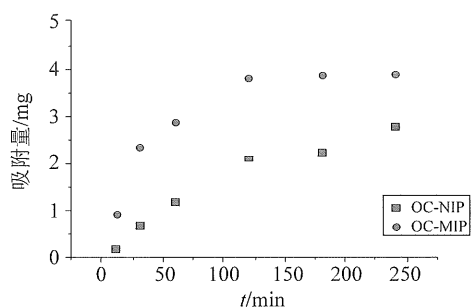


图 5 OC-MIP 和 OC-NIP 对 s-萘普生标准溶液的动力学吸附

Fig. 5 Kinetics of adsorption on the OC-MIP and OC-NIP

3.3 MIP 的释放性能

按 2.3.4 考察了 OC-MIP 和 OC-NIP 分别饱和吸附模板分子之后在 pH 为 6.5 的磷酸盐缓冲溶液中的释放性能。结果如图 6, 从图 6 可知, OC-NIP 只需 10 h 就达到最大的释放量, 而 OC-MIP 具有较好的缓释效果。在开始的 1 h 内, OC-MIP 中药物释放量为原吸附量的 38.7%, 随着时间延长, 药物分子从聚合物中后来释放越来越缓慢, 约 10 h 后慢慢趋向平衡。最大释放量为 63.3%。药物释

放不完全是由于溶液与模板聚合物之间存在一种吸附和释放的平衡, 这在药物释放领域具有重要意义, 当病灶部位周围药物浓度过稀的时候, 药物从聚合物中释出, 而当病灶部位周围溶液中药物浓度过高的时候, 聚合物不释放药物, 甚至可以重新吸附溶液中的药物分子, 从而可以使药物浓度保持在一个合理的范围。

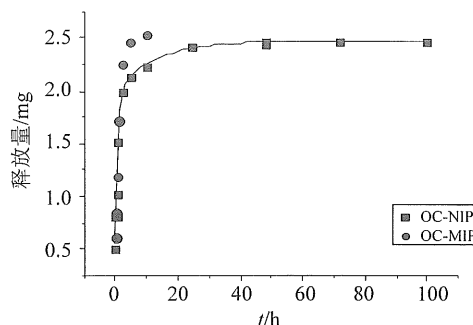


图 6 萘普生随时间的释放曲线

Fig. 6 Release profiles of s-naproxen from OC-MIP and OC-NIP

4 结论

以 MAA 为印迹的功能单体, GMA 为亲水单体, DVB 为交联剂, 乙腈为溶剂, 采用沉淀聚合制备了相应球形分子纳米印迹聚合物, 然后将所得的聚合物在高氯酸溶液中开环, 得到了表面亲水性的球形聚合物 OC-MIP。当 $n(T) : n(MAA) : n(GMA) : n(DVB) = 1 : 4 : 4 : 24$ 时做出来的 OC-MIP 在强极性溶剂中具有较好的药物识别及药物释放性能。这种 OC-MIP 不仅可以在含水介质中对药物进行特异性吸附, 而且具有缓慢释放功能, 因而在药物控释载体方面具有美好的应用前景。

参考文献:

- [1] CARO E, MARCÉ R M, BORRULL F, et al. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples [J]. Trends Anal Chem, 2006, 25 (2): 143 - 154.
- [2] SUEDEE R, BODHIBUKKANA C, TANGTHONG N, et al. Development of a reservoir-type transdermal enantioselective controlled delivery system for racemic propranolol using a molecularly imprinted polymer composite membrane [J]. J Controlled Release, 2008, 129 (3): 170 - 178.

方法相比, HSCCC 简便、快速、节省溶剂和时间,基本上实现了短时间内高纯度、高得率产品的制备, 具有较好的实际应用价值。此外, 本方法所得苦茶碱纯度高, 可为其进一步的生物活性研究提供必要的物质基础。

参考文献:

- [1] ASHIHARA H, KATO M, YE C X, et al. Biosynthesis and metabolism of purine alkaloids in leaves of cocoa tea [J]. *J Plant Research*, 1998, 111(4): 599 - 604.
- [2] ZHENG X Q, YE C X, KATO M, et al. Theacrine (1, 3, 7, 9-tetramethyluric acid) synthesis in leaves of a Chinese tea, kucha (*Camellia assamica* var. *kucha*) [J]. *Phytochemistry*, 2002, 60(2): 129 - 134.
- [3] 石祥刚, 郑新强, 宋晓虹, 等. 关于苦茶的新组合 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2008, 47(6): 129 - 130.
- [4] XU J K, KURIHARA H, ZHAO L, et al. Theacrine, a special purine alkaloid with sedative and hypnotic properties from *Camellia assamica* var. *kucha* in mice [J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2007, 9(7): 665 - 672.
- [5] 叶创兴, 林永成, 苏建业, 等. 苦茶的嘌呤生物碱 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 1999, 38(5): 82 - 86.
- [6] YANG X R, YE C X, XU J K, et al. Simultaneous analysis of purine alkaloids and catechins in *Camellia sinensis*, *Camellia ptilophylla* and *Camellia assamica* var. *kucha* by HPLC [J]. *Food Chemistry*, 2007, 100(3): 1132 - 1136.
- [7] XU J K, ZHANG W K, SU Y B, et al. Chemical constituents from the leaves of *Camellia assamica* var. *kucha* Chang et Wang [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2009, 7(2): 111 - 114.
- [8] 戴德舜, 王义明, 罗国安, 等. 高速逆流色谱研究进展 [J]. *分析化学*, 2001, 29(5): 586 - 591.
- [9] 袁黎明, 傅若农, 张天佑, 等. 高速逆流色谱在植物有效成分分离中的应用 [J]. *药物分析杂志*, 1998, 18(1): 60 - 65.
- [10] 胡江涌, 梁勇, 谢亚, 等. 土豆叶中茄尼醇的高速逆流色谱法分离纯化及质谱解析 [J]. *色谱*, 2007, 25(4): 528 - 531.
- [11] 刘云, 俞桂新. 高速逆流色谱法分离制备乌药叶中的黄酮类成分 [J]. *色谱*, 2007, 25(5): 735 - 739.
- [12] 孙印石, 刘政波, 王建华, 等. 高速逆流色谱分离制备陈皮中的黄酮类化合物 [J]. *色谱*, 2009, 27(2): 244 - 247.
- [13] 李艳, 肖凯军, 郭祀远, 等. 高效逆流色谱研究进展——在天然产物有效成分分离方面的应用 [J]. *现代食品与药品杂志*, 2006, 16(4): 78 - 80.

(上接第64页)

- [3] PRASAD B B, SHARMA P S, LAKSHMI D. Molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction combined with molecularly imprinted polymer-based sensor for detection of uric acid [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1173(1-2): 18 - 26.
- [4] SCHWEITZ L, ANDERSSON L I, NILSSON S. Rapid electrochromatographic enantiomer separations on short molecularly imprinted polymer monoliths [J]. *Anal Chim Acta*, 2001, 435(1): 43 - 47.
- [5] 何建峰, 刘岚, 杨桂兰, 等. 水相中奎宁分子印迹聚合物的制备、表征及识别性质的研究 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 2005, 44(3): 58 - 62.
- [6] 钱倩, 王伯瑶. 纳米药物载体在医药领域中的研究进展 [J]. *济宁医学院学报*, 2006, 29(2): 82 - 84.
- [7] 田威, 范晓东, 陈卫星, 等. 药物控制释放用高分子载体的研究进展 [J]. *高分子材料科学与工程*, 2006, 22(4): 19 - 23.
- [8] FRANCESCO P, FRANCESCA I, GIUSEPPE C. New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media [J]. *European Polymer J*, 2009, 45(6): 1634 - 1640.
- [9] SAMBE H, HOSHINA K, MOADDEL R, et al. Uniformly-sized molecularly imprinted polymers for nicotine by precipitation polymerization [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1134(1-2): 88 - 94.
- [10] CHAITIDOU S, KOTROTSIOU O, KOTTI K, et al. Precipitation polymerization for the synthesis of nanostructured particles [J]. *Materials Science and Engineering B*, 2008, 152(1-3): 55 - 59.