

因此测得的 CUR-NS 的 Zeta 电位绝对值较低^[11]。

CUR-NS 在后一时段(1~6 h)细胞摄取量的降低可能是由于药物在细胞内的代谢^[12]，而姜黄素原药溶液细胞摄取量的快速下降除了来自于 MCF-7 细胞对药物的代谢，还可能受到姜黄素本身不稳定因素的影响。Wang 等^[13]将姜黄素置于含有 10 % FBS 的细胞培养液中，37 ℃下孵育 1 h 后，有不到 20 % 的姜黄素发生降解；而在孵育 8 h 后，大约 50 % 的姜黄素已被分解成香草醛、阿魏酸等降解产物。因此随着时间的推移，姜黄素原药溶液的细胞摄取量下降趋势明显。而将姜黄素制成 CUR-NS 后，药物细胞摄取量明显得到提高，由此说明纳米混悬液能增加姜黄素的稳定性和提高药效，使其更好地发挥作用。

药物对肿瘤细胞的增殖抑制率与药物的细胞摄取及其在细胞内的累积相关。与姜黄素原药相比，肿瘤细胞 MCF-7 对 CUR-NS 具有更高的药物摄取量。这可能是 CUR-NS 的细胞毒性明显强于姜黄素原药的主要原因之一。

本实验将难溶性药物姜黄素制成纳米混悬液，在一定程度上改善了其稳定性，增加了肿瘤细胞对其的摄取，从而增强了其抗癌活性。纳米混悬技术是改善包括姜黄素在内的诸多难溶性及化学不稳定药物的理化及生物活性的重要途径。

参考文献：

- [1] Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IM, et al. Curcumin—from molecule to biological function[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2012, 51(22): 5308–32.
- [2] Hatcher H, Planalp R, Cho J, et al. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(11): 1631–1652.
- [3] Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively[J]. AAPS J, 2009, 11(3): 495–510.
- [4] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, et al. Bioavailability of curcumin: Problems and promises [J]. Mol Pharm, 2007, 4(6): 807–818.
- [5] Rabinow BE. Nanosuspensions in drug delivery[J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3(9): 785–796.
- [6] Müller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals—Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2011, 78(1): 1–9.
- [7] Li W, Das S, Ng KY, et al. Formulation, biological and pharmacokinetic studies of sucrose ester-stabilized nanosuspensions of oleanolic Acid[J]. Pharm Res, 2011, 28(8): 2020–2033.
- [8] Sun M, Gao Y, Pei Y, et al. Development of nanosuspension formulation for oral delivery of quercetin[J]. J Biomed Nanotechnol, 2010, 6(4): 325–332.
- [9] Gao L, Liu G, Wang X, et al. Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology[J]. Int J Pharm, 2011, 404(1–2): 231–237.
- [10] Choi J, Yoo J, Kwak H, et al. Role of polymeric stabilizers for drug nanocrystal dispersions[J]. Curr Appl Phys, 2005, 5(5): 472–474.
- [11] Rachmawati H, Al Shaal L, Müller RH, et al. Development of curcumin nanocrystal: physical aspects[J]. J Pharm Sci, 2013, 102(1): 204–214.
- [12] Yuan H, Miao J, Du YZ, et al. Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells[J]. Int J Pharm, 2008, 348(1–2): 137–145.
- [13] Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products[J]. J Pharm Biomed Anal, 1997, 15(12): 1867–1876.

(编辑：修春)

正交试验优选合成缬沙坦分子印迹聚合物的实验条件

袁小红^{1,2}, 赵 怡², 廖晓琼²(1. 广东省中医药科学院, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510120)

摘要：目的 优选合成缬沙坦分子印迹聚合物的实验条件。**方法** 采用正交试验法筛选缬沙坦分子印迹聚合物的合成条件，以结合率和聚合物的硬度为评价指标。**结果** 优选出制备该聚合物的最佳条件为缬沙坦：2-乙烯基吡啶 (2-VPY)=1：4，2-VPY：乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EDMA)=1：2.5，(缬沙坦+2-VPY)：偶氮二异丁腈

收稿日期：2013-02-17

作者简介：袁小红，女，研究员，研究方向：中药新剂型及新技术的研究工作。Email: mier-yuan@163.com。

基金项目：广东省教育厅项目(2012KJX0035)；广东省中医院院内研究专项(第二批)(092YTS16)。

(AIBN)=1:10 (mmol:mg)。结论 采用优选的合成条件所制备的聚合物,对模板分子有良好的吸附性能而且硬度合适。

关键词:缬沙坦;分子印迹聚合物;正交试验法;合成条件

中图分类号:R284.1 文献标志码:A 文章编号:1003-9783(2013)04-0420-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.04.025

Optimization of Preparation Technique of Valsartan Molecularly Imprinted Polymer by Orthogonal Experiment

YUAN Xiaohong^{1,2}, ZHAO Yi², LIAO Xiaoqiong² (1. Guangdong Provincial Academy of Chinese Medical Sciences, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2.The Second Clinical Medicine College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120 Guangdong, China)

Abstract: Objective To optimize the conditions for synthesizing the molecularly imprinted polymer(MIP) of valsartan (Val - MIP). **Methods** With binding ratio and Val-MIP polymer hardness as the evaluation indexes, the preparation conditions of the Val - MIP were optimized by orthogonal experiment. **Results** The optimal preparation conditions for Val-MIP was as follows: the ratio of Valsartan to 2-VPY being 1:4, ratio of 2-VPY to EDMA being 1:2.5, and the ratio of Valsartan and 2-VPY to AIBN being 1:10. **Conclusion** The Val- MIP polymer synthesized by the optimized preparation technology has good adsorption performance and appropriate hardness.

Keywords: Valsartan; Molecularly imprinted polymer; Orthogonal design; Synthesis conditions

中药是一个复杂的体系,含有丰富的分子结构,包括有许多已知的或未知的活性化合物,从中药中寻找活性化合物已成为国内外研究的热点。而采用活性化合物为模板分子制备分子印迹聚合物(Molecularly imprinted polymer, MIP)来筛选与模板分子具有相似活性的结构类似物是行之有效的方法之一。目前, MIP 在中药研究中的应用日益增多,不但可作为固相萃取以及高效液相色谱的柱填料用于中药有效成分的分离、富集、分析等^[1-5],还可以利用其交叉反应性进行结构类似物的筛选^[6]。缬沙坦(Valsartan)作为一种强效和特异性较强的血管紧张素受体拮抗剂(ARB),常用于慢性肾病的治疗。因此,我们以缬沙坦作为模板分子制备 MIP,以期利用 MIP 对模板分子的特异性吸附能力以及其交叉反应性,从中药中筛选与缬沙坦具有相似药效的活性成分。

MIP 的识别性能与其制备过程密切相关,而影响 MIP 聚合过程的参数又比较多,如功能单体、交联剂的种类及用量、致孔剂的类型、引发剂的用量以及采用的聚合方法等。为了达到较好的印迹效率,对 MIP 制备过程中的参数进行优化是非常必要的。本实验在前期筛选功能单体、交联剂的种类等实验条件的基础上^[7],对其聚合反应的条件进行进一步的优化。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂 缬沙坦(Valsartan,江苏中邦制药有限公司),甲基丙烯酸(MAA,国药集团化学试剂有限公司);乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)、2-乙基吡啶(2-VPY),百灵威化学技术有限公司;偶氮二异丁腈(AIBN)、乙腈等试剂均为分析纯,天津市福晨化学试剂厂。BS224S 电子天平,北京赛多利斯仪器有限公司;双列六孔电热恒温水浴箱,广东省汕头市医用设备厂;UV-2450 紫外分光光度计,日本岛津公司。

1.2 正交试验筛选 Val-MIP 的制备工艺 根据前期试验^[7]及预实验的结果,考察模板分子和功能单体的比例,功能单体和交联剂的比例,引发剂的用量等因素,具体的因素水平安排见表 1。选择 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验, MIP 的制备方法按 1.3 项下方法进行。分别以聚合物与缬沙坦的结合率以及综合评分法(结合率+MIP 硬度)为考核指标,考察不同评价指标所得到的制备条件的差异,为下一步试验提供依据。

综合评分法是以结合率(K)和聚合物硬度(U)为评价指标进行综合评分。结合率以最好的 5.000 为 100 分,用公式 $20 \times K$,把各号试验的结合率转化为

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal design

水平	因 素		
	模板：功能单体(A)	功能单体：交联剂（模板 + 功能单体）： (B)	引发剂(C)/mmol：mg
1	1：4	1：2.5	1：5
2	1：5	1：5	1：10
3	1：6	1：7.5	1：15

注：功能单体为 2-VPY，交联剂为 EDMA，引发剂为 AIBN。

分数；聚合物硬度以 5 为 100 分，用公式 $20 \times U$ ，把各号试验的硬度评分转化为分数。结合率与硬度的权重比例分别为 70 %和 30 %，计算综合评分。

聚合物硬度 U 的评分标准为：质地坚硬者为 5 分；质地较软者为 3 分；质地过软者为 0 分。

1.3 Val-MIP 及空白聚合物(BP)的制备 分别称取一定质量的缬沙坦和 2-VPY 于试管中，加入乙腈，使之溶解，再加入交联剂 EDMA 和引发剂 AIBN，充分溶解、混匀后，向该混合液中通氮气 3 min，密封，于 60 ℃水浴锅中反应 24 h，得到棒状的聚合物，将该聚合物研磨过 500 目筛，所得的 Val-MIP 用滤纸包裹，放入索氏提取器中，以甲醇：醋酸(9：1)溶液为溶媒提取 24 h，除去 MIP 中的模板分子后，将 Val-MIP 放置通风橱中挥干溶剂，备用。

空白聚合物(Blank Polymer, BP)的合成方法和步骤同 Val-MIP，只是不加缬沙坦。

1.4 Val-MIP 吸附能力的评价 通过测定 Val-MIP 对缬沙坦的结合率来评价 Val-MIP 对模板分子的吸附能力。根据文献^[7]方法，分别称取 50 mg 已除去模板分子的 Val-MIP、BP 于不同的离心管中，分别加入 0.14 mg·mL⁻¹ 缬沙坦乙腈溶液 5 mL，涡旋混合 10 min 后再振荡 10 min，2500 r·min⁻¹ 离心 30 min，静置 3 h，吸取上清液 500 μL 于量瓶中，用乙腈定容至 5 mL，于 254 nm 处测定吸光度并计算吸附平衡后溶液中缬沙坦的浓度，根据结合前后溶液中缬沙坦浓度的变化，计算 Val-MIP 对缬沙坦的结合率 K。

$$Q=(C_0-C_1) \times V/M \quad (1)$$

$$K=(Q_{MIP}-Q_{BP})/Q_{BP} \quad (2)$$

公式(1)中 C₀ 为所加入的缬沙坦溶液的浓度，C₁ 为吸附平衡后所测得的缬沙坦的浓度，V 为加入的缬沙坦溶液的体积，M 为 Val-MIP 的质量。

公式 (2) 中，Q_{MIP} 为 Val-MIP 与缬沙坦的结合量，Q_{BP} 为空白聚合物与缬沙坦的结合量。

2 结果

2.1 正交试验结果 正交试验方案及结果见表 2，以结合率 K 对所制得的聚合物进行评价，方差分析见表 3；以综合评分(结合率 + 硬度)进行评价，方差分析见表 4。

表 2 正交试验安排及结果

Table 2 Arrangement and results of orthogonal design

试验号	因素				评价指标				综合评分 P
	A	B	C	D	U 值	U 评分	K 值	K 评分	
1	1	1	1	1	1.0	20	3.115	62.30	49.61
2	1	2	2	2	2.0	40	1.750	35.00	36.50
3	1	3	3	3	5.0	100	3.185	63.70	74.59
4	2	1	2	3	2.0	40	5.000	100.00	82.00
5	2	2	3	1	4.0	80	0.000	0.00	24.00
6	2	3	1	2	5.0	100	0.000	0.00	30.00
7	3	1	3	2	1.5	30	1.660	33.20	32.00
8	3	2	1	3	0.5	10	0.000	0.00	3.00
9	3	3	2	1	5.0	100	3.500	70.00	79.00
K ₁	8.050	9.775	3.115	6.615					
K ₂	5.000	1.750	10.250	3.410					
K ₃	5.160	6.685	4.845	8.185					
R _k	3.050	8.025	7.135	4.775					
P ₁	160.70	163.61	82.61	152.61					
P ₂	136.00	63.50	197.50	98.50					
P ₃	114.00	183.59	130.59	159.59					
R _p	46.00	120.09	114.89	61.09					

表 3 以结合率为指标的方差分析

Table 3 Variance analysis of orthogonal design based on combinative rate

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 值	P
A	1.964	2			
B	10.922	2	5.461	3.695	>0.1*
C	9.235	2	4.618	3.124	>0.1*
D	3.949	2			
误差(A+D)	5.913	4	1.478		

注：*F_{0.05}(2, 4)=6.94；F_{0.1}(2, 4)= 4.32。

表 4 以综合评分为指标的方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal design based on comprehensive score

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 值	P
A	363.887	2			
B	2760.313	2	1380.157	4.977	<0.1*
C	2219.860	2	1109.93	4.002	>0.1*
D	745.400	2			
误差(A+D)	1109.287	4	277.322		

注：*F_{0.05}(2, 4)=6.94；F_{0.1}(2, 4)=4.32。

由表 2 直观分析可知,无论是以结合率还是以综合评分为指标,因素 B、C 的 R 值较大而且接近,而因素 A 的 R 值较小,说明 B、C 为试验的主要影响因素,各因素的影响程度依次为 $B > C > A$; 因素 B 的影响最大,即功能单体和交联剂的比例对试验指标影响最大。方差分析的结果表明,当 $\alpha=0.1$ 时,因素 B 有显著性差异(以综合评分为指标时);而以结合率为指标时,各因素的影响没有显著性差异。

在试验范围内,以结合率为指标优选出最佳的制备工艺为 $A_1B_1C_2$,即模板分子和功能单体的摩尔比为 1:4,功能单体和交联剂的比为 1:2.5,引发剂的用量是模板分子与功能单体用量的 10 倍($\text{mg}:\text{mmol}$);而以综合评分为指标优选出的较佳的制备工艺为 $A_1B_3C_2$,即模板分子和功能单体的摩尔比为 1:4,功能单体和交联剂的比为 1:7.5,引发剂的用量是模板分子与功能单体的用量的 10 倍($\text{mg}:\text{mmol}$)。

2.2 正交试验结果分析 从正交试验的结果可以看出,采用不同的评价指标,所得到的最佳的工艺条件会有所差异,增加了硬度指标所得到的最佳工艺条件与以结合率为指标所优选出的工艺条件的差别仅在于交联剂的用量上,说明 MIP 的硬度主要与交联剂的用量有关,采用 $A_1B_1C_2$ 条件所制备出的 Val-MIP 质地较软,容易溶胀,用其作为固定相填装的 HPLC 柱在使用过程中由于颗粒溶胀而导致压力过高无法使用;而采用 $A_1B_3C_2$ 条件所制备出的 Val-MIP 质地较硬,溶胀程度较小,在 HPLC 使用过程中压力会有所上升但幅度不大。但是,由于交联剂增多,模板分子在反应体系中的含量降低,导致所制备的 MIP 的载量下降,结合率也有所降低。因此,对于制备 Val-MIP 而言,采用哪种条件制备 MIP,要根据需要而定,如果是作为色谱柱的填料,则采用 $A_1B_3C_2$ 条件,防止因颗粒溶胀而导致压力过高无法使用;如果是用于作为固相萃取的填料,则可选择 $A_1B_1C_2$ 条件,以提高 MIP 的结合率。不同的模板分子的情况并不相同,具体的制备条件应根据试验而定。

3 讨论

MIP 的分子识别能力受多种因素的影响,影响较大的是功能单体的种类和数量,我们已在前期的试验中进行了筛选^[7];其次是交联剂的用量、致孔剂及溶剂的选择等。交联剂在整个 MIP 的组成中所占比

例最大,它的作用是固化模板分子和功能单体所形成的复合物。在 MIP 制备过程中,为了将模板分子固定在聚合物中并保持聚合物孔穴的空间构型,要求聚合物有较高的硬度,因此,交联剂的用量不能过小;同时,为了便于目标分子进入孔穴,又要求聚合物要有一定的柔性,交联剂的用量也不能太大。交联剂如果比例太小,则客体键合点彼此间将相距太近,以至于使它们不能独立完成工作,在极端情况下,当体系中的某一位点和客体相键合后将会引起相邻其他位点的功能完全阻抑;然而比例太大,模板分子的比例相对降低,MIP 的载量相应减少,甚至没有印迹作用。

功能单体的用量是影响 MIP 印迹效率的重要因素,但在本试验范围内,该因素 3 个水平所制备的 MIP 没有显著性差异,这是因为本次所选的 3 个水平是在前期基础上确定的^[7],这 3 个比例的功能单体和模板分子的结合都比较好;通过正交试验筛选得到的结果与采用紫外分光光度法测定不同比例的模板分子与功能单体的混合液所得到的结果一致,说明可以根据测定不同比例的模板分子与功能单体的混合液的紫外吸收值来选择功能单体的用量。

参考文献:

- [1] 李礼,胡树国,何锡文,等.应用分子印迹-固相萃取法提取中药活性成分非瑟酮[J].高等学校化学学报,2006,27(4):608-611.
- [2] 向海艳,周春山,钟世安,等.白藜芦醇分子印迹聚合物合成及其对中药虎杖提取液活性成分的分离[J].应用化学,2005,22(7):739-743.
- [3] 雷启福,钟世安,向海艳,等.儿茶素活性成分分子印迹聚合物的分子识别特性及固相萃取研究[J].分析化学,2005,33(6):857-860.
- [4] 潘浪胜,刘敏敏,田红锦,等.木犀草素分子印迹聚合物的分子识别特性及固相萃取研究[J].高校化学工程学报,2009,23(2):360-364.
- [5] 许志锋,刘岚,何剑锋,等.以桑色素为模板的分子烙印聚合物的制备、结合特性及其在薄层色谱固定相方面的应用[J].高等学校化学学报,2005,26(11):2031-2036.
- [6] 袁小红,徐筱杰,朱伟.柯里拉京分子印迹聚合物固相萃取叶下珠中的柯里拉京及结构类似物[J].中国药理学杂志,2010,45(8):15-18.
- [7] 廖晓琼,丘小惠,袁小红,等.缬沙坦分子印迹聚合物的制备条件研究[J].中华中医药杂志,2011,26(10):2396-2398.

(编辑:宋威)