

# 石杉碱甲分子印迹聚合物的制备及其缓释特性

贾朝<sup>1,2</sup>, 温惠云<sup>1</sup>, 黄赛朋<sup>1</sup>, 郭鹏琦<sup>1</sup>, 曹波<sup>1</sup>,  
陈欣<sup>1</sup>, 王雅茹<sup>1</sup>, 薛伟明<sup>1\*</sup>

(1. 西北大学 化工学院, 陕西 西安 710069; 2. 商洛学院, 陕西 商洛 726000)

**摘要:** 用分子印迹和沉淀聚合技术, 以石杉碱甲 (Hup A) 为模板、 $\alpha$ -甲基丙烯酸为功能单体、乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂成功制备了分子印迹聚合物 (MIP)。采用 FTIR、SEM、TGA 对 MIP 进行了表征。通过静态吸附、动态吸附、体外释药和 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 法对 MIP 性能进行了评价。结果表明, MIP 对 Hup A 存在特异性和非特异性两种结合位点。市售 Hup A 片在 1 h 内快速释放, 累积释放率达 90% 以上, 有明显的突释现象。而 MIP 在 1 h 后释放平缓, 在 24 h 附近达到平衡, 可以达到缓慢释放的效果。释放动力学符合 Peppas 模型, 释放指数为 0.48, 为非 Fickian 扩散机理。MIP 生物相容性良好, L929 小鼠成纤维细胞对 MIP 的细胞毒性数据显示, 细胞存活率 >93%。

**关键词:** 石杉碱甲; 分子印迹; 沉淀聚合; 药物缓释; 功能材料

中图分类号: O631.3 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2022) 08-1612-07

## Preparation and sustained release characteristics of huperzine A molecularly imprinted polymer

JIA Zhao<sup>1,2</sup>, WEN Huiyun<sup>1</sup>, HUANG Saipeng<sup>1</sup>, GUO Pengqi<sup>1</sup>, CAO Bo<sup>1</sup>,  
CHEN Xin<sup>1</sup>, WANG Yaru<sup>1</sup>, XUE Weiming<sup>1\*</sup>

(1. School of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China; 2. Shangluo University, Shangluo 726000, Shaanxi, China)

**Abstract:** Molecularly imprinted polymer (MIP) was prepared by molecular imprinting and precipitation polymerization using huperzine A (Hup A) as template,  $\alpha$ -methacrylic acid (MAA) as functional monomer, and ethylene glycol dimethyl acrylate as crosslinking agent. The synthesized MIP were then characterized by FTIR, SEM and TGA, followed by property evaluation by static adsorption, dynamic adsorption, *in vitro* drug release and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The results showed that Hup A was polymerized in MIP through specific and nonspecific binding. The commercially available Hup A tablets was rapidly released within 1 h showing cumulative release rate of more than 90% with obvious sudden release phenomenon, while MIP showed sustained release of Hup A after the first hour and reached equilibrium about 24 h, demonstrating slow release effect. The release kinetics conformed to the Peppas model with a release index of 0.48, implying a non Fickian diffusion mechanism. Moreover, *in vitro* cytotoxicity assay indicated that the survival rate of L929 mouse fibroblasts was higher than 93% when treated with MIP, which suggested good biocompatibility.

**Key words:** huperzine A; molecular imprinting; precipitation polymerization; drug delivery; functional materials

阿尔茨海默病 (AD) 是老年痴呆最常见的病因。目前, 世界上约有 AD 患者 4500 万, 且其数目随人

口老龄化呈增加的趋势, 这种不可逆转的神经退行性痴呆症已经成为全世界医学、社会关注的主要健

收稿日期: 2021-11-11; 定用日期: 2022-04-01; DOI: 10.13550/j.jxhg.20211146

基金项目: 陕西省自然科学基金 (2018JM2037, 2020JQ-609); 陕西省教育厅项目 (20JK0610); 陕西省重点研发计划 (2020GY-313); 中国博士后科学基金 (2020M683701XB)

作者简介: 贾朝 (1985—), 男, 博士生, E-mail: chunjia\_111@163.com。联系人: 薛伟明 (1966—), 女, 教授, E-mail: xue\_wm@126.com。

康问题<sup>[1-2]</sup>。但目前还没有确切治疗 AD 症的方法, 只能通过乙酰胆碱酯酶抑制剂来改善疾病症状<sup>[3-4]</sup>。

石杉碱甲 (Hup A) 是一种可逆的乙酰胆碱酯酶抑制剂 (AChEI), 其在临床上被证明是最有治疗潜力的药物<sup>[5]</sup>。它是从中药蛇足石杉中提取的天然生物碱, 具有相对分子质量小、半衰期短、脂溶性强、易透过血脑屏障等优点。目前, Hup A 市售产品多为快速释放的胶囊或片剂, 需要频繁给药来维持药物治疗水平<sup>[6]</sup>。对大多数的病患者来说, 每日重复口服给药是最方便的治疗方式, 但是由于阿尔茨海默病患者的记忆力功能障碍, 很容易造成漏服或者过量给药, 影响治疗效果<sup>[7-8]</sup>。此外, 过量给药也会引起胃部和肠道的不良反应。因此, 开发 Hup A 的缓控剂是提高其治疗效果的最佳方式。同时, 缓控剂型能提高药物的有效性和安全性, 降低药物的达峰浓度, 减少突释造成的血药浓度不稳定, 也能有效避免药物的不良反应。因此, 许多研究者尝试利用水凝胶对 Hup A 进行物理包封, 从而达到缓控释效果。例如, 高璇等<sup>[9]</sup>利用羟丙基甲基纤维素制备了 Hup A 缓控释水凝胶微球; SOLAK 等<sup>[10]</sup>制备了聚乙烯醇-丙烯酰胺气复合膜 (PVA-g-AAm) Hup A 水凝胶微球; CHEN 等<sup>[11]</sup>制备了鼻腔给药的 Hup A 水凝胶。但文献报道的这些水凝胶载体材料只是对 Hup A 进行简单的包埋, 容易存在突释和药物模板泄漏的问题。

分子印迹技术 (MIT) 是指制备对某一模板分子具有特异性选择、识别能力的分子印迹聚合物 (MIP) 的技术<sup>[12-13]</sup>。MIP 一般是由功能单体与交联剂在模板分子存在下共聚而成。聚合完成后, 去除模板分子后的印迹空腔在几何尺寸、形状和化学功能上与模板分子互补<sup>[14-15]</sup>。这种特定的空腔结构与模板药物的相互作用可以达到对药物的缓释效果, 而且印迹聚合材料具有很好的热稳定性、化学稳定性和机械强度。因此, MIP 正受到越来越多药物释放领域研究者的重视<sup>[16-17]</sup>。余宇燕等<sup>[18]</sup>以 Hup A 作为模板分子、羟丙基甲基纤维素 (HPMC) 为功能单体、四甲基乙二胺 (TEMED) 为催化剂, 二乙烯基砷 (DVS) 为交联剂, 采用反向悬浮聚合法制得具有缓释功能的 Hup A 分子印迹水凝胶微球。

本研究基于分子印迹技术, 采用沉淀聚合法, 以 Hup A 为药物模板,  $\alpha$ -甲基丙烯酸 (MAA) 为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EGDMA) 为交联剂, 成功制得具有缓控释功能的 Hup A 药物载体, 为未来发展 Hup A 缓释新剂型奠定基础。在聚合过程中,  $\alpha$ -甲基丙烯酸的羧基与 Hup A 的酰胺和伯胺通过氢键自组装聚合, 在聚合完成后脱附模板, 形成具有立体空穴和官能团精确匹配的聚合物, 这种

特定官能团识别的立体结构增加了药物模板和聚合物的相互作用, 使聚合物具有高选择性、缓控释的特点。能够延长药物释放时间, 也能有效避免上述凝胶载体存在的突释和模板分子泄漏问题。MIP 的制备示意图如图 1 所示。

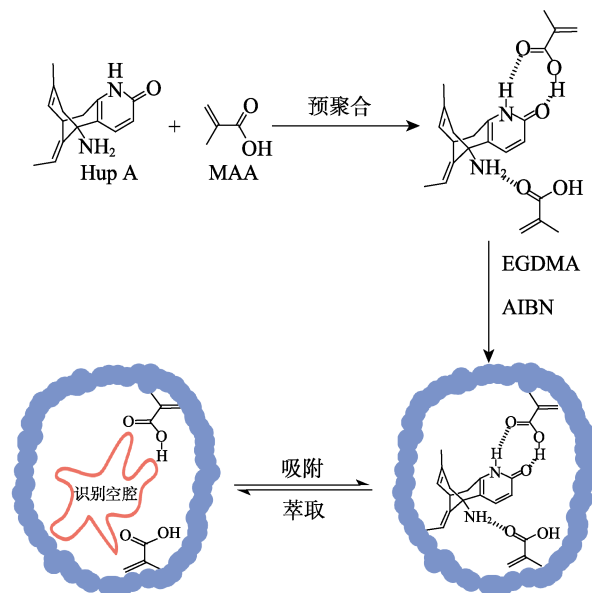


图 1 MIP 的制备示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the preparation of MIP

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

Hup A (质量分数 98%, 宝鸡市方晟生物开发有限公司); MAA (质量分数 98%, 使用前减压蒸馏以除去稳定剂)、EGDMA ( $C_{10}H_{14}O_4$ , 质量分数 98%)、AIBN (质量分数 99%), 上海阿拉丁试剂有限公司; 磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钾、无水乙醇、二甲基亚砷、甲醇、乙腈、冰乙酸, 天津市大茂化学试剂厂。以上化学试剂均为分析纯, 使用前未经任何处理。DMEM 培养基、牛血清 (FBS)、甲醇 (色谱纯)、3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT, 分析纯), 德国 Merck 公司; 双抗 (青霉素 G 钠盐 10 kU/mL, 硫酸链霉素 10 g/L), 武汉普诺赛生命科技有限公司。

Frontier 型傅里叶变换红外光谱仪、TGA7 热重分析仪 (美国 Perkin Elmer 公司); MV-3600 紫外-可见分光光度计 (日本岛津公司); Carl Zeiss SIGMA 扫描电子显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司); MltiMate3000 高效液相色谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司); F200 Pro 多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); 3H2ORI 型智能台式高速冷冻离心机 (湖南赫西仪器装备有限公司); WGL-3OB 电热鼓风干燥箱 (天

津泰斯特仪器有限公司); Nuair 二氧化碳培养箱 (美国 Nuair 公司); Airtech 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 MIP 的制备

采用沉淀聚合法<sup>[19]</sup>制备 MIP 和空白聚合物 (NIP)。准确称取 Hup A 48.46 mg (0.2 mmol) 和 MAA 68.87 mg (0.8 mmol) 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 30 mL 甲醇-乙腈溶液 [V(甲醇): V(乙腈)=1:4], 超声溶解, 密封, 室温下静置 2 h, 使模板和功能单体充分作用, 通过氢键形成稳定的预聚合物; 加入交联剂 EGDMA 594.6 mg (3 mmol) 和引发剂 AIBN 20 mg (0.12 mmol), 超声 5 min, 充分混匀溶解后, 通 N<sub>2</sub> 使体系无氧后密封, 将烧瓶置于集热式恒温加热磁力搅拌器中, 60 °C 下反应 24 h, 生成白色乳液状聚合物, 用无水乙醇反复洗涤沉淀 3 次, 在 8000 r/min 下离心收集白色聚合物, 冻干, 得到含 Hup A 的 MIP 白色粉末, 待用。

模板洗脱处理: 将含 Hup A 的 MIP 置于甲醇/乙酸 [V(甲醇): V(乙酸)=9:1] 溶液中, 室温条件下振荡 30 min, 离心分离上清液, 重复 3 次, 直至用紫外-可见分光光度计在 312 nm 下检测不到洗脱液中 Hup A, 停止洗脱, 再用去离子水洗涤 3 次, 制得 MIP。

空白聚合物 NIP 的制备: 不加模板分子 Hup A, 其余操作步骤同上。

### 1.2.2 表征

对 Hup A、NIP、MIP、MAA 和 EGDMA 进行红外光谱分析, KBr 压片法。

利用扫描电子显微镜 (SEM) 拍摄电子显微照片以评估样品形态。将样品粉末附着到硅片上, 干燥并用金溅射。

用同步热分析仪对 Hup A、MIP 和 NIP 的热稳定性进行评价, 测定温度为 20~600 °C, 升温速率为 10 °C/min。

### 1.2.3 MIP 的吸附性能测试

MIP 和 NIP 各称取 10 份, 每份 20 mg, 分别放在 50 mL 具塞离心管中, 加入 5 mL Hup A 质量浓度为 200 mg/L 的甲醇/水 [V(甲醇): V(水)=4:1] 溶液中, 超声分散, 室温下分别振荡 0.167、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12 h。高速离心 6 min (8000 r/min), 将上清液过 0.22 μm 滤膜, 用 HPLC 测上清液中 Hup A 含量, 计算吸附前后溶液中的 Hup A 质量浓度, 从而计算 MIP 的单位吸附量。绘制吸附动力学曲线。NIP 也如上操作, 作为空白对照组。

根据式 (1) 计算 MIP 对 Hup A 的吸附量 ( $Q$ ):

$$Q = (\rho_0 - \rho_t) V / m \quad (1)$$

式中:  $Q$  为每单位质量聚合物对 Hup A 的吸附量 (mg/g);  $\rho_0$  为 Hup A 初始质量浓度 (mg/L);  $\rho_t$  为吸附  $t$  (min) 时间后 Hup A 质量浓度 (mg/L);  $V$  为吸附介质体积 (L);  $m$  为聚合物的质量 (g)。

按式 (1) 计算 NIP 的吸附量。

将上述方法中的 Hup A 质量浓度分别替换为 12.5、25、50、100、150、200、250、300、350、400 mg/L, 其余步骤同上, 振荡 6 h, 按公式 (1) 计算吸附量。绘制等温吸附曲线。

### 1.2.4 药物负载实验

称取 50 mg 干燥的 MIP 粉末置于锥形瓶中, 加入 5 mL 300 mg/L 的 Hup A 甲醇/水 [V(甲醇): V(水)=4:1] 溶液, 密封锥形瓶, 置于恒温振荡器上振荡 720 min, 8000 r/min 离心 6 min, 上清液过 0.45 μm 滤膜, 用 HPLC 测定上清液中游离 Hup A 的含量, 按公式 (1) 计算 MIP 吸附量。将沉淀干燥后得到 MIP 载药粉末, 置于干燥器中, 待用。

### 1.2.5 体外释放实验

参照《美国药典》配制模拟肠液 (不含蛋白酶): 取磷酸二氢钾 6.8 g, 加水 250 mL 使其溶解, 加 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 77 mL 和 500 mL 水, 用 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液调节体系 pH 至 6.8, 再加水稀释至 1000 mL, 即得模拟肠液。

称取 50 mg 1.2.4 节制得的载有 Hup A 的 MIP 粉末和市售 Hup A 片置于离心管中, 分别加入 5 mL 模拟肠液, 在 37 °C 水浴中振荡释药, 在一定时间间隔移取上清液 500 μL, 再加入 500 μL 新的模拟肠液。过 0.45 μm 滤膜, 用 HPLC 测上清液中 Hup A 含量, 按公式 (2) 计算 Hup A 的累积释放率。

$$\text{Hup A 累积释放率}/\% = \frac{\rho_t V_0 + \sum \rho_{t-1} V'}{m_{\text{Hup A}}} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $\rho_t$  和  $\rho_{t-1}$  分别为  $t_t$  和  $t_{t-1}$  时刻所取上清液的 Hup A 质量浓度 (g/L);  $V_0$  为释放介质的体积, 5 mL;  $V'$  为每次所取上清液的体积 (mL);  $m_{\text{Hup A}}$  为聚合物所载石杉碱甲的总质量 (mg)。

### 1.2.6 细胞毒性实验

采用 MTT 法<sup>[20]</sup>在 L929 细胞系上进行 MIP 细胞毒性实验。NIP 作为对照组。

市售 Hup A 片、MIP 和 NIP 在灭菌锅中灭菌 15 min 后用 DMEM 培养基配成所需质量浓度 (6.25、12.5、25、50、100、200 mg/L)。取对数期生长的小鼠成纤维细胞, 用含有体积分数为 12% FBS 和体积分数为 1% 双抗的 DMEM 培养基稀释成  $4 \times 10^4$  个/mL, 加入到 96 孔板中, 每孔加入 100 μL。将孔板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中, CO<sub>2</sub> 体积分数为 5%, 37 °C 下培养 24 h。取出培养了 24 h 的 96 孔板, 分别加 100 μL 市售 Hup A 片、MIP 和 NIP 样品, 继续培养 24 h。

取出培养后的 96 孔板, 移走培养液, 加 25  $\mu\text{L}$  MTT 试剂 (5 g/L), 继续培养 4 h。取出孔板, 移走 MTT 溶液, 加 100  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解甲瓩晶体。采用酶标仪于 490 nm 处测定吸光度。所有数据平行重复 3 次。由公式 (3) 计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{\text{OD}_{\text{treated}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}}} \times 100 \quad (3)$$

式中:  $\text{OD}_{\text{treated}}$  为样品孔的吸光度;  $\text{OD}_{\text{blank}}$  为空白孔的吸光度;  $\text{OD}_{\text{control}}$  为对照孔的吸光度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 红外光谱分析

红外光谱可以评估聚合物官能团的变化和推测聚合物与模板的结合位点。图 2 是 Hup A、MIP、NIP、MAA、EGDMA 的红外光谱图。

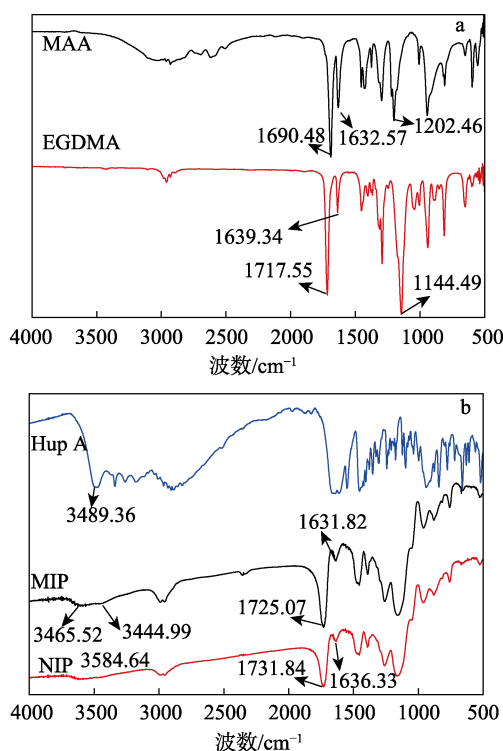


图 2 MAA、EGDMA、Hup A、MIP 和 NIP 的 FTIR 谱图  
Fig. 2 FTIR spectra of MAA, EGDMA, Hup A, MIP and NIP

如图 2a 所示, MAA 在 1690.48  $\text{cm}^{-1}$  附近较强的吸收峰为 C=O 的伸缩振动峰, 1632.57  $\text{cm}^{-1}$  处为 C=C 的伸缩振动峰, 1202.46  $\text{cm}^{-1}$  处为 C—O 的不对称伸缩振动吸收峰。EGDMA 在 1717.55  $\text{cm}^{-1}$  附近较强的峰为 C=O 的伸缩振动峰, 1639.34  $\text{cm}^{-1}$  处为 C=C 的伸缩振动峰, 1144.49  $\text{cm}^{-1}$  处为 C—O 的不对称伸缩振动吸收峰。这些峰在图 2b 的 MIP 和 NIP 中均被发现。图 2b 中, MIP 在 1725.07  $\text{cm}^{-1}$  附近较强的峰为 C=O 的伸缩振动峰, 1631.82  $\text{cm}^{-1}$  处为 C=C 的伸缩振动峰; NIP 在 1731.84  $\text{cm}^{-1}$  附近

较强的峰为 C=O 的伸缩振动峰, 1636.33  $\text{cm}^{-1}$  处为 C=C 的伸缩振动峰。对比 MAA 和 EGDMA 的 C=C 峰发现, MIP 和 NIP 的 C=C 峰明显变小, 表明 MIP 和 NIP 中 MAA 和 EGDMA 均成功交联, 且聚合后功能基团均未受到明显影响。

由图 2b 可知, Hup A 在 3000~3500  $\text{cm}^{-1}$  附近的吸收峰为酰胺和伯氨基的 N—H 伸缩振动峰。MIP 和 NIP 的红外吸收大致类似, 但在 3200~3600  $\text{cm}^{-1}$  处有明显差异。NIP 在 3584.64  $\text{cm}^{-1}$  附近仅有 MAA 的 O—H 伸缩振动峰, 而 MIP 在 3465.52 和 3444.99  $\text{cm}^{-1}$  附近有两个吸收峰, 且向小波数方向移动。这是因为游离 MAA 的 O—H 伸缩振动吸收峰为单峰, 而形成聚合物后, 氢键的缔合作用使 O—H 的伸缩振动受到限制, 会向低波数方向移动, 形成宽而散的峰。所以可推测出在聚合过程中 Hup A 与 MAA 间发生相互作用<sup>[21]</sup>。以上结果表明, Hup A 被成功负载在印迹微球上, 且没有影响印迹微球的基本结构。

### 2.2 SEM 表征

按 1.2.1 节制备样品, 采用扫描电子显微镜观察聚合物 MIP 的表面形貌及粒径分布, 结果见图 3。如图 3 所示, MIP 和 NIP 聚合物呈明显的微球形状, 且大小均一, 尺寸分布均匀, 单分散性较好。

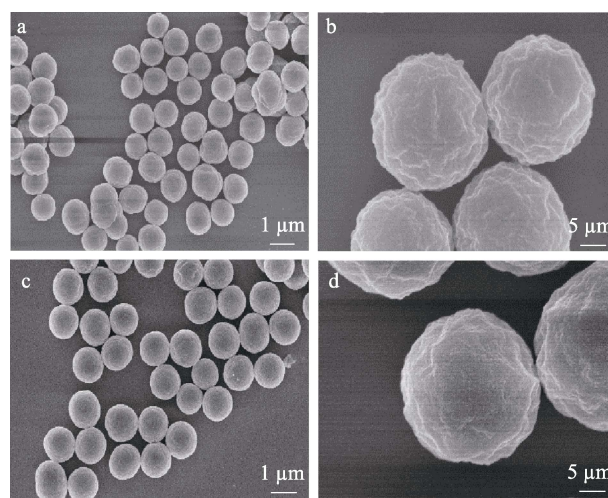


图 3 MIP (a、b) 及 NIP (c、d) 的 SEM 图  
Fig. 3 SEM images of MIP (a, b) and NIP (c, d)

### 2.3 热稳定性分析

图 4 是 Hup A、MIP 和 NIP 的热重曲线。

由曲线 a 可知, Hup A 在 210  $^{\circ}\text{C}$  左右开始大量热分解, 在 340  $^{\circ}\text{C}$  热分解达到平衡, 失重率为 90.04%, 残留率为 2.64%。曲线 c 热分解分为 3 个阶段: 第 1 阶段 25~210  $^{\circ}\text{C}$ , 只有微量的热损失, 为聚合物表面吸附水分的脱附, 失重率为 1.37%; 第 2 阶段 210~320  $^{\circ}\text{C}$  的失重是由 Hup A 的热熔解造成, 此部分失重还有 MIP 表面未反应完全的自由单体、交联剂及部分残留溶剂, 失重率为 8.94%; 第 3



阶段为 310~480 °C，此阶段聚合物先缓慢分解而后迅速加快，结构崩塌，失重率为 84.2%。500 °C 以后分解达到平衡，残留率为 3.8%。对比曲线 b、c 可知，NIP 和 MIP 的热失重情况类似，但在第 2 阶段 MIP 失重率为 8.94%，NIP 失重率为 7.05%，MIP 比 NIP 失重更多是因为模板分子 Hup A 的存在。以上结果表明，所制备的聚合物热稳定性良好。

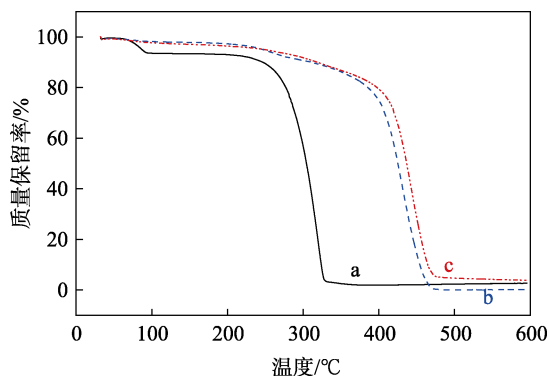


图 4 Hup A (a)、NIP (b) 和 MIP (c) 的 TGA 曲线  
Fig. 4 TGA curves of Hup A (a), NIP (b) and MIP (c)

### 2.4 吸附性能分析

采用动态吸附法评估 MIP 对模板分子 Hup A 的吸附随时间的变化特性。固定 MIP 的质量和加入的 Hup A 溶液的初始质量浓度，在不同时间间隔下测量 MIP 对 Hup A 的吸附量。NIP 作为空白对照，实验操作步骤与 MIP 相同，结果如图 5 所示。

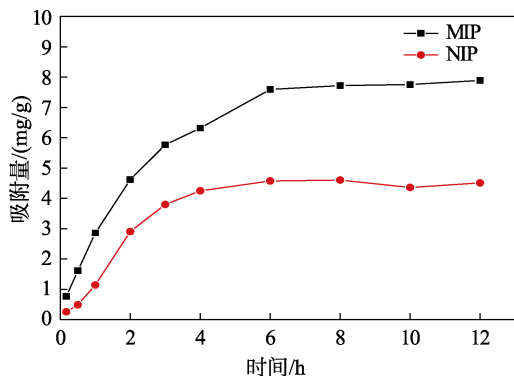


图 5 MIP 和 NIP 的动态吸附曲线  
Fig. 5 Dynamic adsorption curves of MIP and NIP

由图 5 可知，印迹分子 MIP 在初始阶段有一个较快的结合速率，而后随着时间的延长，吸附速率比初始阶段有所下降，在 6 h 后达到吸附平衡。这是因为 MIP 表面有大量可以和 Hup A 相匹配的功能基团，在吸附初始阶段，Hup A 分子可以快速进入印迹空穴，结合在 MIP 表面上，当表面吸附达到平衡时，Hup A 分子由 MIP 表面转向内部更深的印迹结合位点，这一过程需要克服传质阻力，导致吸附速率有所下降，最终达到吸附饱和状态。非印迹分

子 NIP 在初始阶段也有较快的结合速率，在 3 h 后吸附趋于饱和状态。在整个吸附过程中，NIP 的吸附量明显低于 MIP，且更快达到饱和状态。结果表明，MIP 对模板分子 Hup A 有较高的吸附性能。

通过静态吸附实验进一步探究 MIP 对模板分子的吸附性能。固定 MIP 的质量，加入不同初始浓度的 Hup A，为了保证吸附平衡，吸附时间为 12 h，吸附完成后测量 MIP 对 Hup A 的吸附量。NIP 作为空白对照，实验操作步骤与 MIP 相同，结果如图 6 所示。由图 6 可知，在 12.5~300 mg/L 质量浓度范围内，MIP 对 Hup A 的吸附量随着 Hup A 初始浓度的增加而增加。比较曲线斜率可知，在初始质量浓度较低范围内吸附速率较快 (0~150 mg/L，MIP 吸附曲线斜率为 0.036，NIP 吸附曲线斜率为 0.029)；在初始质量浓度较高范围内 (150~300 mg/L)，吸附缓慢且随着浓度的增加吸附速率逐渐降低；Hup A 质量浓度达 300 mg/L 后吸附达到平衡。在相同的 Hup A 初始浓度下，MIP 表现出比 NIP 更高的吸附量，主要原因是 MIP 内部存在与模板分子尺寸大小一致、几何结构相同、功能基团匹配的空穴。吸附特性实验结果表明，MIP 可以特异性结合 Hup A 分子。

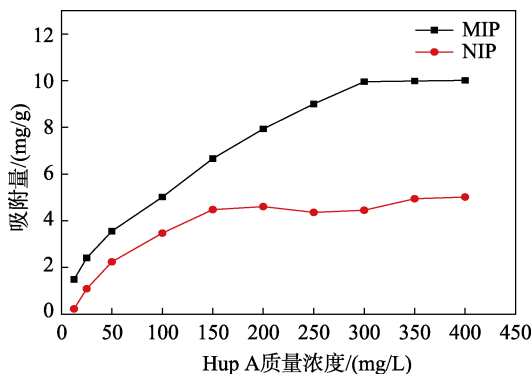


图 6 MIP 和 NIP 的等温吸附曲线  
Fig. 6 Adsorption isotherms of MIP and NIP

通过 Scatchard 方程对图 6 等温吸附曲线进行 Scatchard 线性分析，考察 MIP 的结合特性<sup>[22]</sup>。Scatchard 方程模型如下：

$$Q/\rho = (Q_{\max} - Q)/K_d \quad (4)$$

式中： $Q_{\max}$  为聚合物在结合位点上的最大吸附量 (mg/g)； $\rho$  为加入的 Hup A 溶液的初始质量浓度 (mg/L)； $K_d$  是结合位点的平衡解离常数 (mg/L)。

以吸附量/质量浓度 ( $Q/\rho$ ) 对吸附量 ( $Q$ ) 作图，结果如图 7 所示。对所得散点图进行线性拟合得到两条拟合度较高的直线，从图 7 可以看出，整体上吸附量/质量浓度对吸附量是非线性的，说明 MIP 中的结合位点不是等价的，不同类型的结合方式会形成具有不同性质的结合位点。从图 7 可以看出，有两个线性较好的部分，说明主要存在两类不同的

结合位点, 即: 特异性和非特异性两类结合位点<sup>[23]</sup>。高浓度下拟合方程为  $Q/\rho=0.15195-0.02281Q$  ( $R^2=0.9985$ , a 线); 低浓度下拟合方程为  $Q/\rho=0.06754-0.00348Q$  ( $R^2=0.9984$ , b 线), MIP 对 Hup A 的结合是通过表面物理吸附和特定化学官能团识别协同完成的<sup>[24]</sup>。由斜率和截距可得, 高浓度下平衡解离常数  $K_d=43.8596$  mg/L, 最大吸附量  $Q_{max}=6.6644$  mg/g; 低浓度下平衡解离常数  $K_d=287.3563$  mg/L, 最大吸附量  $Q_{max}=19.4080$  mg/g。

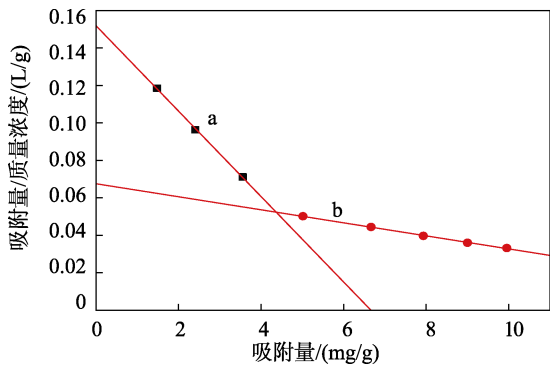


图 7 高浓度 (a) 和低浓度 (b) 下 MIP 的 Scatchard 分析图

Fig. 7 Scatchard plot analysis of MIP at high concentration (a) and low concentration (b)

### 2.5 体外释药性能

采用 MIT 和沉淀聚合法制备的 MIP 对药物模板分子具有高亲和力和特异性识别的特点。与传统的胶囊、片剂缓释药物相比, MIP 具有更强的包封效果和更长时间缓释效果。因此, MIP 是缓控释药物的优良载体材料。本实验将 MIP 置于模拟人体肠液中, 分析 MIP 在模拟肠液中的释放行为和缓释效果, NIP 和市售 Hup A 片作为对照组采用相同方法进行研究。MIP、NIP 和市售 Hup A 片的累积释放曲线如图 8 所示。

由图 8 可以看出, 市售 Hup A 片在 1 h 内快速释放, 累积释放率达 90% 以上, 有明显的突释现象。NIP 在前 1 h 和 MIP 释放曲线基本相同, 在 1 h 后 MIP 释放较为平缓, 在 24 h 附近达到平衡; 达到释放平衡后, MIP 的累积释放率在 60%~70% 之间。MIP 中的 Hup A 不能完全释放可能是由于部分印迹位点被包埋。NIP 在 1 h 后仍释放较快且快速达到释药平衡。在整个释放过程中, NIP 的累积释放率始终高于 MIP, 这是由于 NIP 对药物的释放只受扩散作用影响, MIP 释药是由扩散作用和印迹作用协同控制。实验结果表明, MIP 比市售 Hup A 片和 NIP 释放缓慢, 有明显的缓释效果。

Korsmeyer-Peppas 模型是半经验式, 常被用来分析缓控释药物的释放机理。Peppas 模型如下:

$$M_t/M_\infty=kt^n \quad (5)$$

式中:  $M_t$  为  $t$  时刻时药物累积释放量 (mg/g);  $M_\infty$  为平衡时药物累积释放量 (mg/g);  $k$  为扩散系数;  $n$  为释放指数。对于球形颗粒, 当释放指数  $n \leq 0.45$  时, 药物释放机理为 Fickian 扩散; 当  $0.45 < n < 0.89$  时, 药物释放机理为非 Fickian 扩散, 是由扩散控制和骨架溶胀协同作用; 当  $n \geq 0.89$  时, 药物释放机理为 Case II 扩散, 主要由骨架溶蚀作用引起。Peppas 模型对 MIP 在模拟肠液 (pH=6.8) 中药物释放数据进行分析, 计算得出释放指数  $n=0.48$ , 为非 Fickian 扩散机理。结果表明, MIP 在模拟肠液中对药物分子 Hup A 的释放不仅受扩散作用影响, 还受到药物分子和 MIP 之间功能基团印迹作用的控制, 从而达到缓释效果。

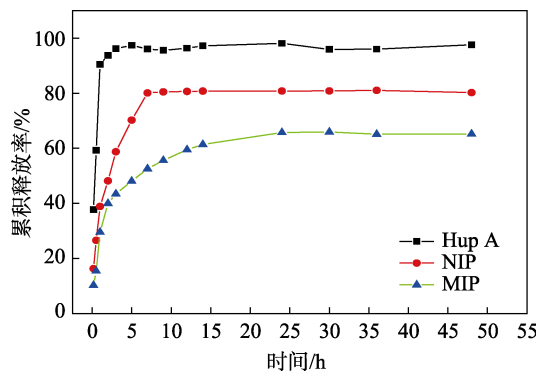


图 8 Hup A 片、NIP 和 MIP 的体外释药曲线  
Fig. 8 *In vitro* Hup A release profiles of Hup A tablets, NIP and MIP

### 2.6 细胞毒性分析

图 9 为被不同浓度的 MIP、NIP 和市售 Hup A 片培养 24 h 后 L929 小鼠成纤维细胞的生物活性。

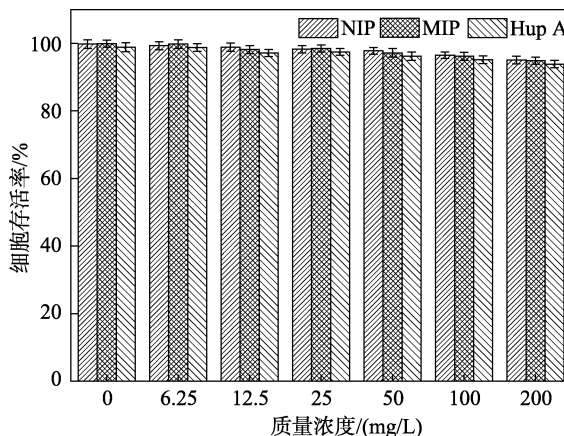


图 9 不同质量浓度 MIP、NIP 和 Hup A 片溶液培养后 L929 的细胞存活率

Fig. 9 Cell viability of L929 cells after being treated by MIP, NIP and Hup A tablets with different mass concentrations

由图 9 可知, MIP、NIP 和市售 Hup A 片存在下 L929 细胞的细胞存活率均大于 93%。随着浓度

的增加, 细胞存活率稍有下降, MIP、NIP 和市售 Hup A 片趋势一致, 而且 MIP、NIP 的细胞存活率略高于市售 Hup A 片组, 表明 MIP 和 NIP 具有良好的生物相容性, 适合作为缓释药物载体。

### 3 结论

基于分子印迹和沉淀聚合技术, 以 Hup A 为模板分子, MAA 为功能单体, EGDMA 为交联剂, AIBN 为引发剂, 通过热引发聚合成功制备了 MIP 微球, 微球尺寸分布均匀, 单分散性良好。通过等温吸附实验和 Scatchard 方程对 MIP 上的结合位点进行分析, 结果表明, MIP 对 Hup A 具有特异性吸附性能, 高浓度下平衡解离常数  $K_d=43.8596$  mg/L, 最大吸附量  $Q_{\max}=6.6644$  mg/g; 低浓度下平衡解离常数  $K_d=287.3563$  mg/L, 最大吸附量  $Q_{\max}=19.4080$  mg/g。MIP 在 1 h 后释放平缓, 在 24 h 附近达到平衡, 可以达到缓慢释放的效果, 避免了传统方法存在的突释和药物模板泄漏的问题。释放动力学符合 Peppas 模型, 释放指数  $n=0.48$ , 为非 Fickian 扩散机理。MIP 生物相容性良好, L929 小鼠成纤维细胞对 MIP 的细胞毒性数据显示, 细胞存活率高于 93%。生物相容性良好, 安全低毒。因此, 本研究制备的 MIP 适合作为药物缓控释载体材料。

### 参考文献:

- [1] MALVE H O. Management of Alzheimer's disease: Role of existing therapies, traditional medicines and new treatment targets[J]. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 79(1): 2-15.
- [2] AMELIA S M, CHAND K, CHAVES S. Recent progress in repositioning Alzheimer's disease drugs based on a multitarget strategy [J]. Future Medicinal Chemistry, 2016, 8(17): 2113-2142.
- [3] DOS S, THAIANE C, GOMES T M, *et al.* Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's disease therapy[J]. Frontiers in Pharmacology, 2018, 9: 1-14.
- [4] JAVIER F, BETARI N, VIAYNA A, *et al.* Design synthesis and multitarget biological profiling of second-generation anti-Alzheimer rhin-huprine hybrids[J]. Future Medicinal Chemistry, 2017, 9(10): 965-981.
- [5] SUN L X (孙玲霞). Pharmacokinetic study of sustained-release microspheres huperzine A *in vivo*[D]. Changchun: Jilin University (吉林大学), 2017.
- [6] CMI X, GMO Y E, FANG J H, *et al.* Donepezil, a drug for Alzheimer's disease, promotes oligodendrocyte generation and remyelination[J]. Acta pharmacologica Sinica, 2019, 40(11): 1386-1393.
- [7] PENG T T, YANG P P, ZHM C N, *et al.* Mechanistic investigation on the performance of huperzine A loaded microparticles based on ultra-fine particle processing system[J]. Powder Technology, 2018, 326: 370-378.
- [8] DAMAR M, GERSNER R, JOHNSTONE J T, *et al.* Huperzine A: A promising anticonvulsant, disease modifying, and memory enhancing treatment option in Alzheimer's disease[J]. Medical Hypotheses, 2017, 99: 57-62.
- [9] GAO X (高璇), CHEN Y Y (陈媛媛), LIU Y Y (刘媛媛), *et al.* Preparation and *in vitro* release evaluation of huperzine A hydrogel microspheres [J]. Chemical Reagents (化学试剂), 2019, 41(1): 13-17.
- [10] SOLAK E K, ASMAN G, MMHAMMET S M, *et al.* Controlled release of huperzine A from biocompatible copolymer microspheres [J]. Bulletin of Materials Science, 2019, 42(2): 1-7.
- [11] CHEN Y F, CHENG G, HM R F, *et al.* A Nasal temperature and pH dual-responsive *in situ* gel delivery system based on microemulsion of huperzine A: Formulation, evaluation, and *in vivo* pharmacokinetic study[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2019, 20(7): 1-12.
- [12] ZHANG M X, GM L L, KONG G H, *et al.* Comparative analysis of atrazine molecularly imprinted polymers using acetonitrile and toluene as solvents[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2019, 136(11): 1-8.
- [13] WEI P J, SONG R M, CHEN C, *et al.* A pH-responsive molecularly imprinted hydrogel for dexamethasone release[J]. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials, 2019, 29(3): 659-666.
- [14] ZHANG S Z, ZHAO Y. Tuning surface-cross-linking of molecularly imprinted cross-linked micelles for molecular recognition in water[J]. Journal of Molecular Recognition, 2019, 32(4): 1-19.
- [15] CHEN H Q, ZHANG W, YANG N, *et al.* Chitosan-based surface molecularly imprinted polymer microspheres for sustained release of sinomenine hydrochloride in aqueous media[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019, 185(2): 370-384.
- [16] LU P P (鲁佩佩), WANG B (王兵), ZHANG Y Y (张英英). Synthesis of aspirin imprinted polymer on silica gel surface and appreciation on drug sustained release[J]. Polymer Materials Science & Engineering (高分子材料科学与工程), 2017, 33(1): 130-136.
- [17] ZHANG W, SHE X H, WANG L P, *et al.* Preparation, characterization and application of a molecularly imprinted polymer for selective recognition of sulphiride[J]. Materials, 2017, 10(5): 1-16.
- [18] YU Y Y (余宇燕), GAO X (高璇), ZHANG H Y (张红艳), *et al.* Preparation of huperzine A molecularly imprinted hydrogel microspheres: CN109662954B[P]. 2021-07-06.
- [19] YAO W (姚伟), GAO Z X (高志贤), FANG Y J (房彦军), *et al.* Preparation of caffeine molecularly imprinted polymer microspheres by precipitation polymerization[J]. Chemical Industry and Engineering Progress (化工进展), 2007, 26(6): 869-872.
- [20] PLUMB J A. Cell sensitivity assays: The MTT assay[J]. Methods in Molecular Medicine, 2004, 88: 165-169.
- [21] XU J H (许建和), SUN X D (孙贤达), LU W Q (卢为琴), *et al.* Quantitative study on hydrogen bond association of alcohols in *n*-alkanes by infrared spectroscopy[J]. Acta Physico-Chimica Sinica (物理化学学报), 1992, 8(3): 358-362.
- [22] WANG D D (王丹丹). Synthesis of metal ion imprinted polymer and its application in analysis[D]. Xi'an: Northwest University (西北大学), 2007.
- [23] LI C L (李春丽). Preparation and characterization of imprinted polymers for small and medium molecular pollutants in food[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University (华中农业大学), 2016.
- [24] ZHAO M P (赵美萍), LI Y Z (李元宗), ZHANG X X (张新祥), *et al.* Preparation and recognition of bisphenol A molecularly imprinted polymer[J]. Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报), 2003, 24(7): 1204-1206.