

• 药剂与工艺 •

基于表面光化学反应偶联多种药物分子制备磁性粒子靶点“钓钩”研究

汪火成¹, 郝苏敏¹, 刘瑜琦¹, 郑晓曼², 姚璐³, 刘莲英^{1*}, 曾克武^{3*}

1. 北京化工大学材料科学与工程学院, 北京 100029

2. 上海烟草集团有限责任公司技术中心北京工作站, 北京 101121

3. 北京大学药学院, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

摘要: 目的 制备表面接枝含二苯甲酮 (BP) 聚合物的磁性纳米粒子, 并通过 BP 基团的光化学反应偶联各种药物分子, 获得多成分靶点“钓钩”。方法 水热法制备表面含羧基磁性纳米粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$), 通过置换获得表面含巯基 (-SH) 磁性纳米粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SH}$), 考察不同置换时间所得粒子表面-SH 含量; 通过接枝聚合向磁性粒子表面引入含 BP 基团的聚合物, 研究接枝聚合单体配比和用量对 BP 基团含量的影响; 扫描电子显微镜 (SEM) 观察粒子形貌, 傅里叶变换红外光谱仪 (FT-IR) 和 X 射线光电子能谱技术 (XPS) 分析粒子表面组分, 热失重 (Tg) 法测定粒子表面成分含量; 紫外 (UV) 光照下偶联链接不同药物分子, 采用聚合物降解、脱除药物方法及光照前后上清液含量测试方法确定磁性粒子表面偶联药物分子含量。结果 制备了平均粒径约 100 nm 的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$ 粒子, 置换时间延长, 表面-SH 含量增加; 提高接枝聚合反应中含 BP 基团单体的比例和用量, 粒子表面 BP 基团含量增加; 优选分散性好、表面 BP 基团含量较高的粒子, 利用 BP 基团光化学反应偶联不同药物分子, FT-IR、紫外-可见分光光度计 (UV-Vis) 测试分析证实了药物分子的偶联和选择性。结论 为制备中药成分芯片并用于中药靶点群“钓钩”提供了有效方法和依据。

关键词: 二苯甲酮; 表面接枝改性; 药物分子偶联; 靶点“钓钩”; 聚合物; 磁性纳米粒子; 光化学反应; 水热法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)16-4142-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.006

Multiple target fishing hook prepared by photochemically coupling molecules in medicines onto magnetic nanoparticles

WANG Huo-cheng¹, HAO Su-min¹, LIU Yu-qi¹, ZHENG Xiao-man², YAO Lu³, LIU Lian-ying¹, ZENG Ke-wu³

1. College of Materials Science and Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

2. Beijing Work Station, Technology Center, Shanghai Tobacco Group Co., Ltd., Beijing 101121, China

3. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract: Objective To achieve multiple target fishing hook by efficiently grafting polymers containing benzophenone (BP) groups and photochemically coupling molecules in medicines onto magnetic nanoparticles (MNPs). **Methods** MNPs attached carbonyl groups ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$) were prepared through a hydrothermal process. Then they were modified with DMSA, forming MNPs with thiol groups ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SH}$). $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SH}$ nanoparticles were grafted with polymer containing BP groups by surface-initiated condensation polymerization. Effects of monomer feed ratios and contents on the amounts of BP groups were investigated. The molecules in medicines were covalently coupled onto MNPs via photochemical reactions of BP groups. The contents of coupled molecules were determined by FT-IR and UV-Vis spectra analyses. **Results** MNPs with average size of 100 nm were produced, modified with DMSA,

收稿日期: 2020-03-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773932)

作者简介: 汪火成, 硕士, 主要从事磁性靶点“钓钩”研究。E-mail: 2017200342@mail.buct.edu.cn

*通信作者 刘莲英, 副教授, 主要从事表面改性制备功能材料研究。Tel: (010)64443801 E-mail: lyliu@mail.buct.edu.cn

曾克武, 副研究员, 主要从事中药靶点及分子药理机制研究。Tel: (010)82801404 E-mail: ZKW@bjmu.edu.cn

and decorated by grafting polymer containing photosensitive BP groups. When the content of monomer containing BP groups was increased in grafting polymerizations, more BP groups were incorporated onto MNPs. This was conducive to the subsequent photocoupling. FT-IR and UV-Vis spectra analyses confirmed the coupling of molecules in medicines. The active H and steric hinderance of the molecules affected their coupling. **Conclusion** The resultant magnetic target fishing hook is ready as a probe for targets identification of traditional Chinese medicine (TCM).

Key words: benzophenone; surface grafting; coupling molecules in medicine; target fishing hook; polymer; magnetic nanoparticle; photochemical reaction; hydrothermal method

中药作用靶点 (drug target) 的阐明对揭示中药药理机制、诠释传统功效、推动创新药物研发、促进中医药现代化和国际化等具有重要科学意义。目前, 研究者们已发展、建立了多种中药作用靶点鉴定方法^[1-9], 其中, 分子靶点“钩钓”技术是识别药物靶点的一项重要技术^[1], 其基本原理: 通过固相凝胶或微球表面连接的药物分子去选择、特异性结合-钩取细胞裂解液中的靶点蛋白, 将靶点蛋白富集到微球上; 然后, 利用凝胶电泳分离纯化、高分辨质谱分析等手段鉴定靶点蛋白的名称和属性。制备“微球-中药分子”探针或“钩钓”时, 需要不影响中药分子活性的基团与微球上官能基团发生化学反应^[10], 将中药分子固定在微球表面。同时, 为追踪该探针或“钩钓”与靶点蛋白的作用、发现靶蛋白, 通常需要对中药分子进行化学修饰, 在不影响中药分子活性的基团处进行特征标记^[6]。

然而, 中药成分多样、复杂, 复方中药的多种活性成分常通过多靶点协同发挥作用^[11-12], 对结构复杂、种类多样的天然中药成分进行化学修饰, 难度较大, 且修饰方法适用范围窄或具有单一针对性, 不适合多种中药成分作用的靶点群鉴定。为应对中药化学成分的复杂性、促进分子靶点“钩钓”技术发展, 需要建立一种对复杂中药化学成分普适、操作简单的微球探针或靶点群“钩钓”制备方法。

二苯甲酮 (BP) 及其衍生物在 UV 光照下可夺取蛋白质或细胞^[13-15]、聚合物分子链或基材表面的活泼 H^[16-17], 产生半频哪醇自由基和其他分子自由基, 然后两自由基偶合, 使蛋白质、聚合物分子链等与基材以化学键连接, BP 起到交联、偶联作用。中药分子普遍含有 -C-H、-N-H 等活泼 H, 如果将 BP 基团负载到微球表面, 如磁性粒子表面^[18-20], 则可通过 BP 与中药分子间的光化学偶联反应, 将中药中的不同成分都键合到微球表面, 从而获得集成中药成分的芯片-“钩钓”。利用该“钩钓”可捕获、鉴定靶点蛋白群, 分析靶点群的生物学功能、诠释中药复杂体系的作用机制, 由此建立一种针对复杂

中药作用靶点群鉴定的“钩钓”技术, 促进中药作用新靶点、新途径的发现和诠释。

利用 BP 光化学反应偶联药物分子时, 明确药物分子的键含量及选择性等问题, 是基于微球开展靶点群“钩钓”的基础。已有研究^[19-20]应用此靶点群“钩钓”策略成功实现了多种药物分子的靶点鉴定, 但在开展靶点群“钩钓”过程中, 所用微球表面 BP 基团含量及中药分子结构等是否对中药分子偶联造成影响尚不清楚, 有待进一步研究。

本实验利用表面修饰巯基的磁性纳米粒子 (Fe₃O₄-SH, 图 1-a) 进行赖氨酸异氰酸酯 (LTI) 与含羟基 BP 单体 (DHBP) 的逐步缩合聚合, 在磁性纳米粒子表面接枝含 BP 基团的聚合物 (图 1-b), 考察单体组份、配比对 BP 基团及后续光照偶联中药分子的影响 (图 1-c), 为有效制备磁性中药成分芯片并用于靶点群“钩钓”、生物学功能和中药分子药理机制研究奠定基础。

1 试剂及原料

柠檬酸三钠二水合物 (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O), 质量分数 99%, 百灵威科技有限公司; 氯化铁 (FeCl₃·6H₂O, 质量分数 99%), 乙酸钠 (C₂H₃NaO₂·3H₂O, 质量分数 99%), 阿法埃莎 (中国) 化学有限公司; 内消旋-二巯基丁二酸 (DMSA, 质量分数 98%)、L-赖氨酸三异氰酸酯 (LTI, 质量分数 98%), 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 4,4-二羟基二苯甲酮 (DHBP), 质量分数 99%, 湖北襄阳福润达化工有限公司; 氢氧化钠 (NaOH, 质量分数 99%)、1,8-重氮双环[5.4.0]十一碳烯 (DBU, 质量分数 99%), 北京伊诺凯科技有限公司; 甲醇 (MeOH)、乙醇 (EtOH)、乙二醇 (EG)、丙酮 (AC)、二甲基亚砜 (DMSO), 北京化工厂; 苏尼替尼碱 (质量分数 ≥ 98%), ARK 试剂有限公司; 五味子醇甲 (质量分数 ≥ 98%, HPLC), Sigma-Aldrich 化学有限公司; 中药苏木提取物、雷公藤提取物、鸡血藤提取物, 实验室自制 (使用 70% 乙醇提取, 回流加热 1 h, 最后趁热抽滤, 烘干。质量分数 ≥ 85%)。

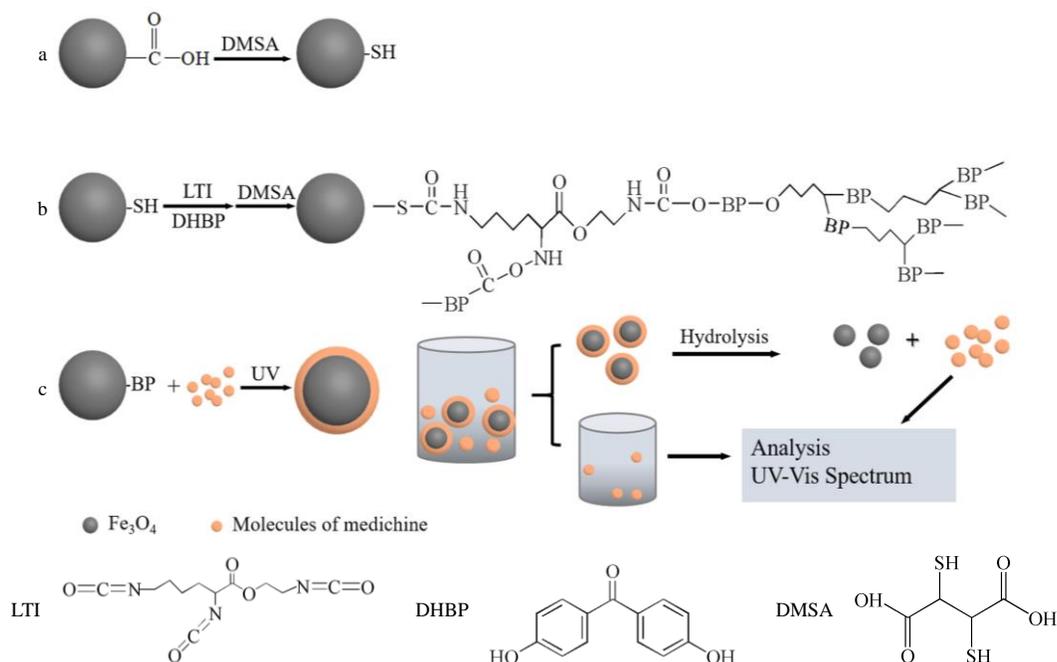


图 1 巯基功能化磁性纳米粒子制备 (a)、磁性粒子表面接枝含 BP 聚合物 (b) 以及药物分子偶联及分析流程示意图 (c)
 Fig. 1 Schematic illustration for attaching thiol groups (a), grafting polymers containing BP groups (b) and subsequent coupling and analyzing molecules of medicines (c) on magnetic nanoparticles

2 方法

2.1 磁性粒子制备

2.1.1 羧基功能化磁性粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$) 采用溶剂热法制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$ 粒子: 将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.325 g) 溶于 20 mL EG 中, 加入 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.300 g)、 $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1.200 g); 将所得溶液转移至内衬为四氟乙烯的不锈钢高压釜 (50 mL) 中, 于 200 °C 烘箱中反应 8 h, 冷却至室温。所得产物用乙醇和去离子水洗涤至少 3 次, 用磁铁分离、分散于乙醇中保存备用。

2.1.2 巯基功能化磁性粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SH}$) 将 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$ 粒子 (15 mg) 再分散于 DMSO 中, 加入 DMSA (15 mg), 超声混合均匀后放入恒温震荡摇床 (50 °C) 中处理不同时间 (15、45、80、120 min), 使粒子表面羧基逐渐被巯基取代^[21] (图 1-a), 然后磁铁分离并用丙酮清洗数次, 得到 -SH 修饰的磁性粒子 (对应不同处理时间, 记为 1、2、3、4- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SH}$), 分散于丙酮中备用。

2.1.3 光敏磁性粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$) 利用 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SH}$ 粒子表面 -SH 基团进行接枝聚合, 如图 1-b 所示。在一 100 mL 三口烧瓶中加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SH}$ 粒子在丙酮中的分散液 50 mL, 开启搅拌 (200 r/min), 加入单体 LTI、DHBP 和引发剂 DBU (200 μL), 室温反应 0.5 h 后, 加入 DMSA, 继续反应 2.5 h。反应结束

后, 用磁铁分离产物, 甲醇洗涤至少 3 次, 得到表面接枝 LTI、DHBP 和 DMSA 聚合物 -Poly (LTI-DHBP-DMSA) 的磁性粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ 粒子), 将该粒子分散于甲醇中, 备用。

2.2 磁性粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$) 表面链接药物分子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ -药物)

2.2.1 链接反应 在一直管光反应器中, 加入苏尼替尼碱(I)、五味子醇甲(II)或中药苏木提取物(III)、雷公藤提取物(IV)、鸡血藤提取物(V)的甲醇溶液 (0.25 mg/mL) 20 mL, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ 粒子 (15 mg); 通 N_2 除氧 30 min, 置于 UV 光下辐照, 除非特别说明, 光照时间 1 h (375 W 汞灯, 光强 12.5 W/m^2 , $\lambda = 254 \text{ nm}$), 得到表面偶联药物的靶点“钓钩”。

2.2.2 磁性粒子偶联药物分子的含量分析

(1) 聚合物降解分析法: 将 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ 粒子 (对照样)、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ -药物粒子分散在 NaOH 的甲醇溶液 (0.05 mol/L) 中, 室温搅拌 2 h, 磁铁分离磁性粒子, 取上清液, 利用 UV-Vis 分光光度计 (U-3900H 型, 日本 Hitachi 公司) 测试上清液中的药物分子含量^[22]。

(2) 上清液分析法: 磁铁分离 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ -药物粒子, 取上清液, 利用 UV-Vis 分光光度计 (U-3900H 型, 日本 Hitachi 公司) 测试光照反应前、后上清液

中的药物分子含量，由此确定磁性粒子上偶联的药物分子含量 (Q)， $Q=(m_0-m_1)/m_{Fe}$ ，其中 m_0 是光照前加入的药物分子质量浓度 (mg/mL)， m_1 是光照结束后上清液中残留药物分子质量浓度 (mg/mL)， m_{Fe} 是所用磁性粒子质量浓度 (mg/mL)。

2.3 表征

利用扫描电子显微镜 (Hitachi SEM-4700, 日本 Hitachi 公司, 加速电压 20 kV) 观察磁性粒子形貌, 采用 Nano Measure 软件统计 SEM 照片上至少 30 个粒子的尺寸, 得到平均粒径; 采用红外光谱仪 (FT-IR, Nexus 670, Thermo Nicolet 公司) 分析粒子组分, 扫描范围 $4\ 000\sim 400\text{ cm}^{-1}$, 分辨率 4 cm^{-1} ; 采用 X 射线光电子能谱仪 [XPS, AXIS Supra, 岛津企业有限公司, 样品室真空度为 10^{-7} Pa (10^{-9} mbar)] 分析粒子表面组成; 采用紫外分光光度计 (UV-Vis, U-3900H 型, 日本 Hitachi 公司) 测定上清液中的药物分子含量; 采用热重分析仪 (DSC-TGA, TA-SDT-Q600, TA 公司, N_2 体积流量 50 mL/min , 升温速率为 10 K/min , 温度范围 $100\sim 800\text{ }^\circ\text{C}$) 测定磁性粒子的热失重。

3 结果

3.1 功能磁性粒子制备

采用溶剂热法制备了分散性较好、平均粒径约为 100 nm 的磁性粒子 (图 2-a), FT-IR 分析表明, 590 cm^{-1} 处出现 Fe-O-Fe 键的特征吸收峰, $1\ 610\text{ cm}^{-1}$ 处出现磁性粒子表面羧基的特征吸收峰; 巯基改性粒子 ($Fe_3O_4\text{-SH}$) 上未出现明显-SH 的特征吸收峰 ($2\ 570\text{ cm}^{-1}$, 图 2-b), 可能是-SH 吸收峰较弱的原因。XPS 分析 DMSA 处理 80 min 所得巯基功能化磁性粒子表面的硫元素含量约为 4.4% (图 2-c); 为增加磁性粒子表面巯基含量, 延长 DMSA 置换羧基所用时间, 得到表面巯基含量不同的功能粒子, 热失重分析表明, 随置换时间延长, 热失重增大 (图 2-d)。以上分析充分说明, 制备了表面巯基含量较高的功能磁性纳米粒子, 这为后续表面接枝光敏聚合物提供了良好基础。综合考虑, 后续采用 80 min 所得 $Fe_3O_4\text{-SH}$ 粒子进行表面接枝聚合、制备光敏磁性纳米粒子。

$Fe_3O_4\text{-SH}$ 粒子表面接枝聚合中, 选用了单体 LTI、DHBP 及 DMSA, 一方面使单体易于在磁性

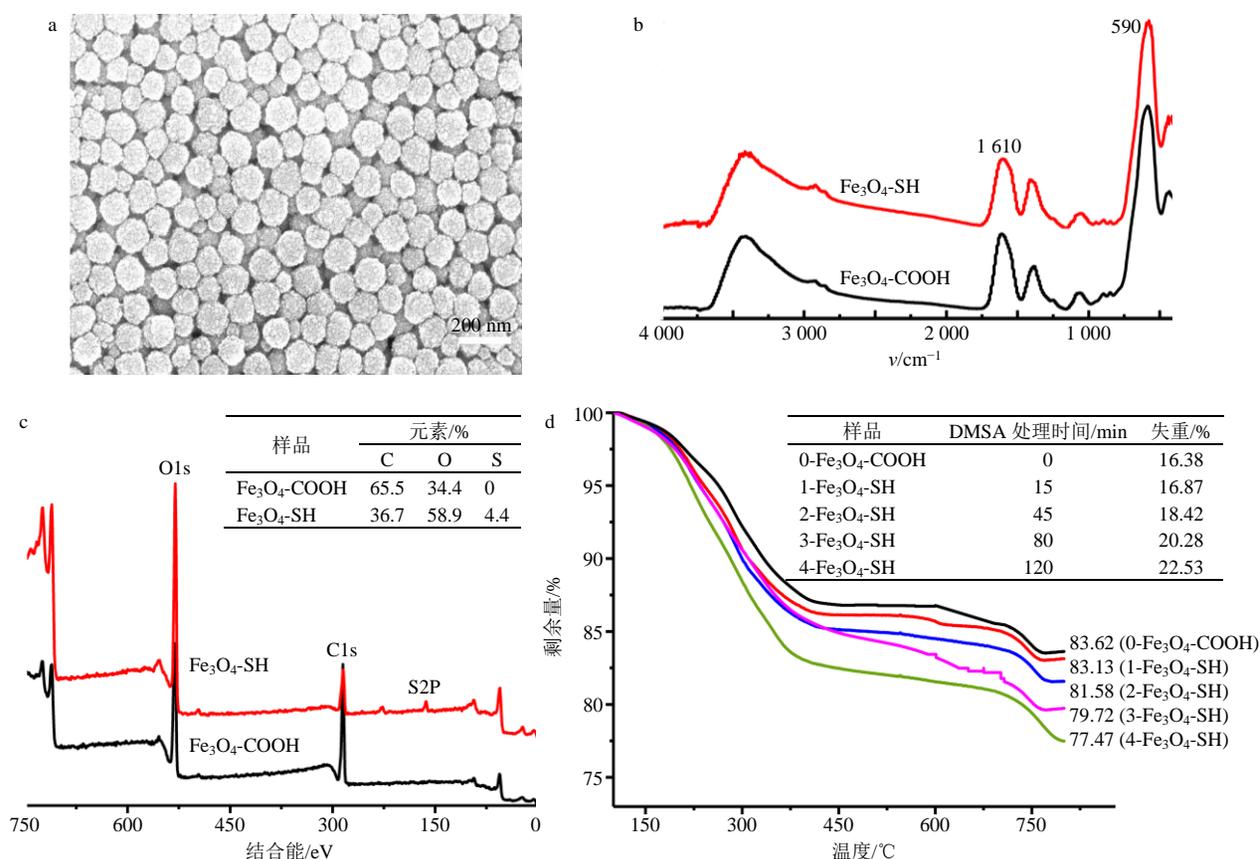


图 2 磁性粒子的 SEM 照片 ($Fe_3O_4\text{-COOH}$, a)、FT-IR 分析结果 (b)、XPS 分析结果 (c) 及热失重分析结果 (d)
Fig. 2 SEM image (a), FT-IR spectra (b), XPS (c) and thermal weight loss (d) of magnetic nanoparticles

粒子表面进行接枝聚合, 另一方面使接枝聚合物具有含 BP 基团的疏水链段以及含 DMSA 结构、氨基甲酸酯 (-NH-COO-) 基团的亲水链段, 有利于后续药物分子接触、偶联, 同时又可减少或减弱药物分子的吸附。为了能在 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SH}$ 粒子表面引入较多 BP 光敏基团, 接枝聚合过程中, 考察了单体 LTI、DHBP 和 DMSA 的功能基团物质的量配比

(LTI/DHBP/DMSA) 及用量对表面 BP 基团含量的影响。SEM 观察到, 接枝改性后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ 粒子, 平均粒径由约 100 nm 增长到了约 120 nm, 表面出现了一些细小纳米粒子 (图 3-a~e); DHBP 含量增加或单体用量较高时, 粒子间出现了一些粘连 (图 3-d、f)。这些现象说明, 接枝聚合后, 形成的接枝聚合物会引起粒子表面形貌发生变化。

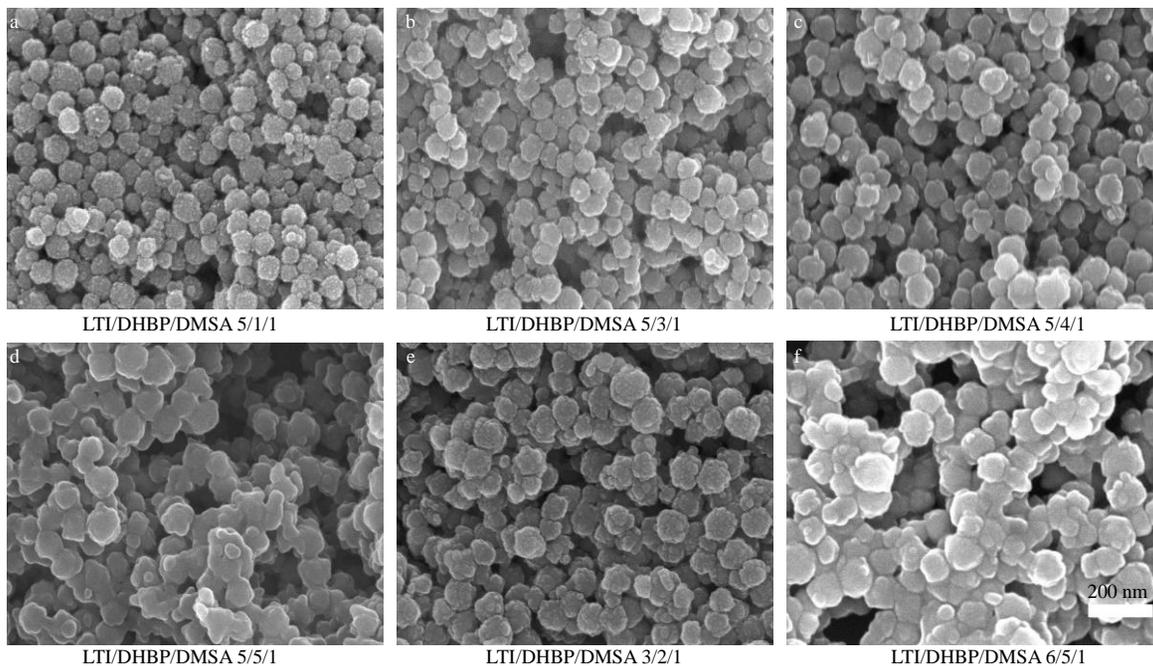


图 3 不同 LTI/DHBP/DMSA 配比所得 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ 粒子的 SEM 照片

Fig. 3 SEM images of magnetic nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$) grafted with polymers using various mol ratios

FT-IR 分析 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ 粒子组成, 可以看到, 1650 cm^{-1} 处出现 BP 基团上酮羰基 (-C=O) 的特征吸收峰 (图 4-a、b), 说明磁性粒子表面实现了含 BP 聚合物的接枝。以 590 cm^{-1} 处 Fe-O-Fe 的吸收峰为基准, 计算 1650 cm^{-1} 处吸收峰的面积 (A_2) 与 590 cm^{-1} 处吸收峰的面积 (A_1) 之比 A_2/A_1 , 以此考察单体配比和用量对粒子表面 BP 基团含量的影响 (图 4-c), 可以看到, 保持 LTI 和 DMSA 的用量不变, 提高 DHBP 含量 (图 4-a), A_2/A_1 逐渐增加 (图 4-c), 说明较高 DHBP 用量有利于磁性粒子表面接枝聚合物中引入较高含量的 BP 基团; 此外, 保持 LTI/DHBP/DMSA 中反应基团的比例不变, 增加单体总量, 粒子表面接枝聚合物中的 BP 基团含量也增加。

考虑磁性粒子的分散性以及粒子表面的 BP 基团含量, 优选分散性较好、同时表面具有较高含量 BP 基团的磁性粒子, 即 LTI/DHBP/DMSA=5/4/1 时所得 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ 粒子, 进行后续药物分子的偶联, 以期获得较好偶联效果。

3.2 磁性粒子表面链接药物分子

利用 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ 粒子表面的 BP 基团, 在 UV 光照下, BP 基团夺取药物分子上甲基 (-CH₃)、亚甲基 (-CH₂)、次甲基 (-CH) 或 -NH 上的活泼 H, 形成药物分子自由基和半频哪醇自由基, 这两自由基偶合, 使药物分子链接到磁性粒子表面。为便于测试、分析, 选取了已知明确结构的化学药物苏尼替尼碱、中药活性成分五味子醇甲 (图 5) 以及中药苏木、雷公藤、鸡血藤提取物进行偶联链接, 以期通过结构明确药物分子的单组份、两组份偶联链接来说明利用 BP 基团偶联药物分子的普适性和选择性, 同时考察药物分子在所制磁性粒子表面的吸附情况。

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ 粒子表面偶联不同药物分子后, FT-IR 分析: 以 590 cm^{-1} 处 Fe-O-Fe 吸收峰为基准, 考察 1650 cm^{-1} 处 BP 基团中酮羰基 (-C=O) 的特征吸收峰, 可以看到该峰强度相比偶联之前明显降低 (图 6-a), 说明 BP 基团与药物分子间发生了光化学偶联

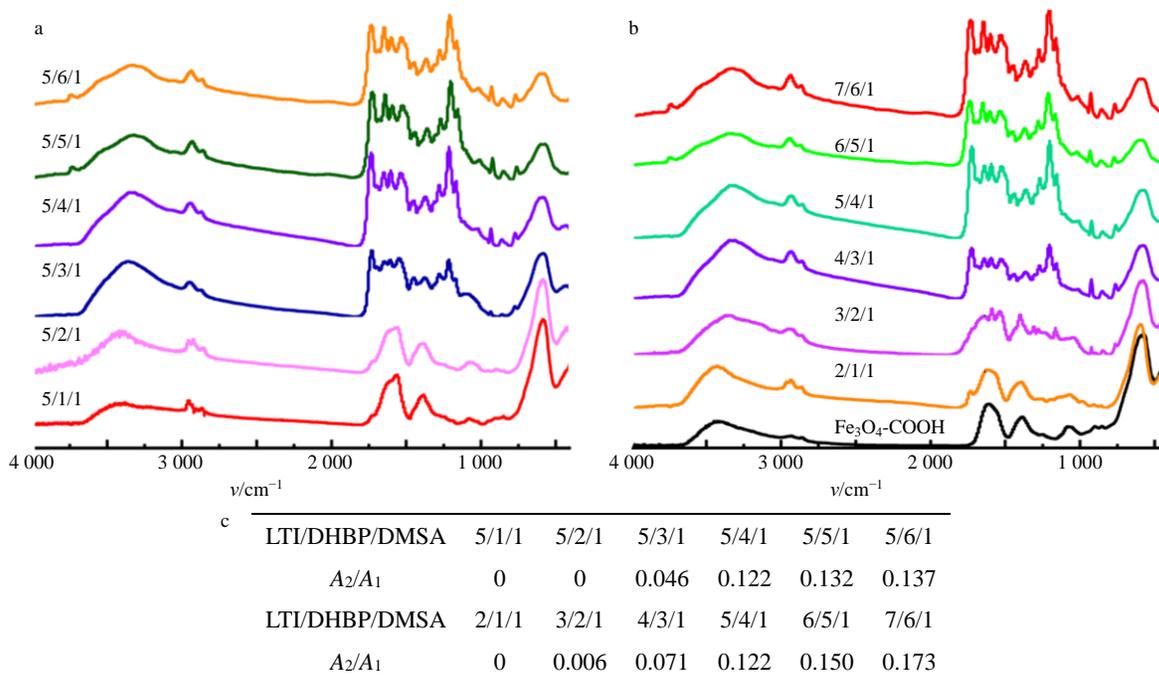


图 4 FT-IR 分析不同 LTI/DHBP/DMSA 配比 (a) 和单体 (LTI、DHBP、DMSA) 用量 (b) 对 Fe_3O_4 -BP 粒子中 BP 基团含量 (c) 的影响

Fig. 4 Effects of various mol ratios (a) and contents (b) of LTI/DHBP/DMSA on corresponding ratios of A_2/A_1 (c) of BP groups of magnetic nanoparticles (Fe_3O_4 -BP) by FT-IR

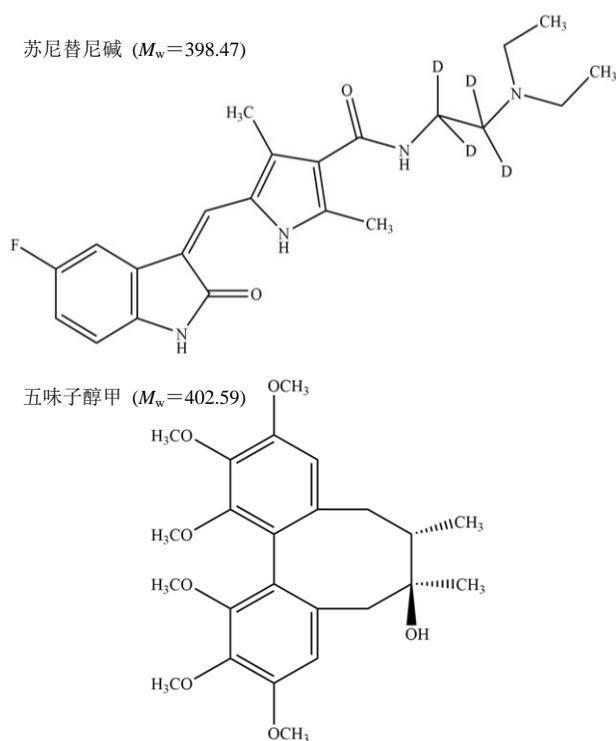


图 5 苏尼替尼碱和五味子醇甲的分子结构

Fig. 5 Chemical structures of sunitinib and schisandrin

反应；但该吸收峰并未完全消失，说明仍有 BP 基团残留，这主要是粒子表面 BP 基团发生偶联反应，内部 BP 基团因位阻等原因而得以保留。

为进一步分析磁性粒子表面偶联的药物分子，采取了聚合物降解法，即：通过碱水解脱除磁性粒子表面的接枝聚合物及偶联的药物分子，然后利用 UV-Vis 光谱分析磁性粒子表面键接的药物分子。可以看到：接枝聚合物中 BP 基团在 280~300 nm、350 nm 附近有明显吸收峰（图 6-b~d）；化学药物苏尼替尼碱在 430 nm 附近有明显吸收峰，磁性粒子经碱水解处理后的上清液，其 UV-Vis 光谱中出现明显 BP 基团在 350 nm 附近吸收峰、以及苏尼替尼碱在 430 nm 附近吸收峰（图 6-b），说明碱水解脱除物中含聚合物和苏尼替尼碱，证实了苏尼替尼碱在磁性粒子表面的偶联。

将该方法用于分析中药苏木提取物时，可以看到苏木提取物在 285 nm 附近吸收峰很强，445 nm 和 520 nm 附近吸收峰较弱（图 6-c），碱处理后上清液的光谱中可看到 520 nm 附近苏木提取物的弱吸收峰，也说明了苏木提取物在磁性粒子表面的偶联。然而，上述方法用于分析五味子醇甲和中药雷公藤、鸡血藤提取物时，由于它们的 UV 吸收峰与 BP 基团的吸收峰有重叠（图 6-d），不能有效鉴定磁性粒子表面是否偶联这些药物分子。

为此，采用上清液分析法，即分析 Fe_3O_4 -BP 粒子和药物分子的分散液在光照前后所得上清液的

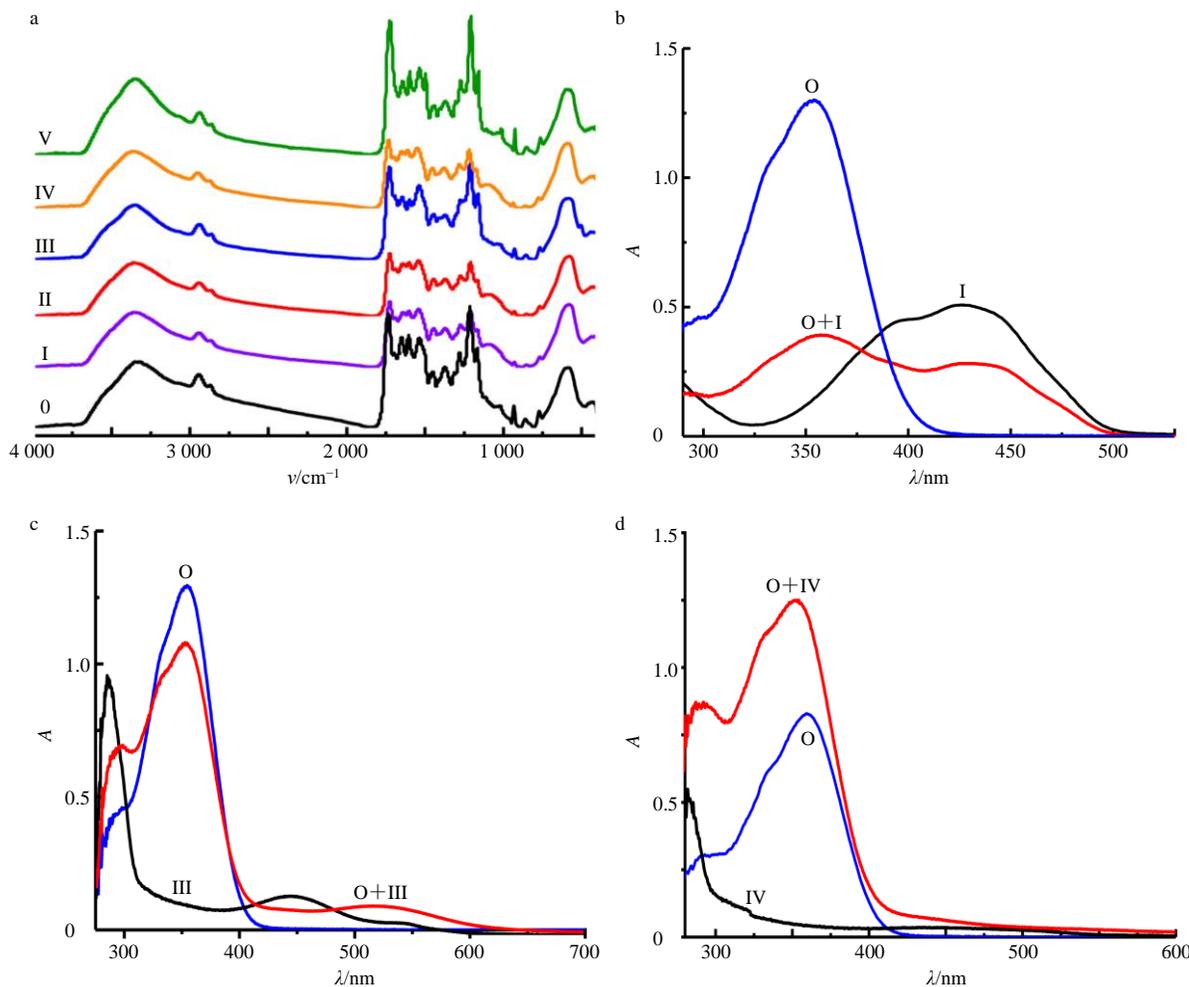


图 6 Fe_3O_4 -BP 粒子 (0) 及表面偶联苏尼替尼碱 (I)、五味子醇甲 (II) 及苏木 (III)、雷公藤 (IV) 和鸡血藤 (V) 提取物后磁性粒子的 FT-IR 光谱 (a) 和碱水解后从磁性粒子表面脱除聚合物 (O) 及聚合物和苏尼替尼碱 (O+I)、苏木 (O+III)、雷公藤 (O+IV) 提取物的 UV-Vis 光谱 (b~d)

Fig. 6 FT-IR spectra (a) of magnetic nanoparticles coupled with various molecules of medicines, and UV-Vis spectra (b~d) of supernatants containing molecules of medicines removed from nanoparticle by hydrolysis

UV-Vis 光谱, 根据不同药物分子的标准曲线, 分析光照前后上清液中的药物分子含量差别 (图 7), 由此确定偶联到磁性粒子表面的药物分子含量 (每克磁性粒子表面键接的药物分子质量)。

考虑药物分子在粒子表面的物理吸附, 对比光照实验, 考察了未光照、不同时间吸附五味子醇甲的情况。UV-Vis 光谱分析不同吸附时间后所得上清液在 285 nm 处出现吸收峰 (图 7-a), 该吸收峰强度仅有微弱变化, 说明五味子醇甲仅有微弱吸附。

考察苏尼替尼碱和五味子醇甲吸附不同时间后在上清液中含量的下降值, 即磁性粒子表面药物分子的吸附量, 可以看到, 与光照偶联的药物分子含量相比, 粒子表面吸附的药物分子含量很低 (图 8-a、b)。这与表面接枝聚合物的组成和性能有关: 接枝

聚合物中含有氨基甲酸酯 (-NH-COO-) 基团和 DMSA 带来的羟基 (-OH) 基团, 赋予聚合物一定的亲水性, 从而减少、减弱了药物分子的吸附。

光照后, 上清液中不同药物分子的含量都有下降 (图 7-b~f), 但下降的程度不同, 其中苏尼替尼碱和五味子醇甲的含量下降幅度较大。这些结果说明, 不同药物分子都可基于 BP 的光化学反应有效偶联到磁性粒子表面, 但不同药物分子中活泼 H 的含量及反应活性不同, 借助 BP 偶联中药分子的效果不同; 同等条件下, 苏尼替尼碱和五味子醇甲的偶联效果较好。

进一步, 考察不同光照时间、光照前后上清液中药物分子的含量, 同时做对照吸附实验, 由此测定磁性粒子表面偶联药物分子的含量 (图 8), 可以

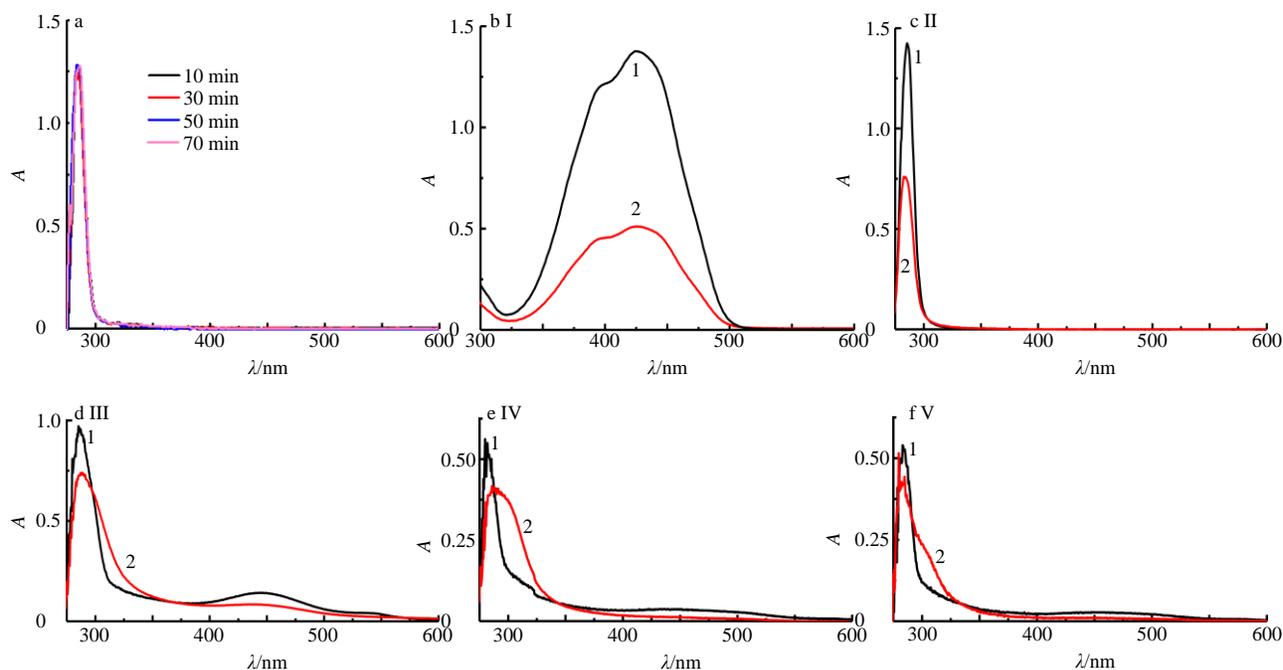


图 7 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ 粒子表面吸附五味子醇甲 (a) 及光照偶联苏尼替尼碱 (I)、五味子醇甲 (II) 及苏木 (III)、雷公藤 (IV) 和鸡血藤 (V) 提取物前 (1)、后 (2) 上清液的 UV-Vis 光谱 (b~f)

Fig. 7 UV-Vis spectra of supernatants before (1) and after (2) coupling of medicines onto nanoparticles

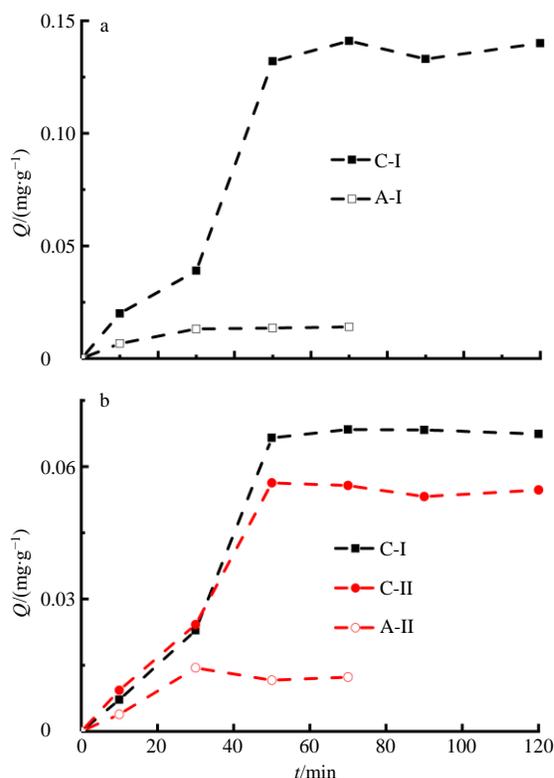


图 8 不同光照时间时 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ 粒子偶联 (C-I)、吸附 (A-I) 苏尼替尼碱的含量 (a) 及同时偶联苏尼替尼碱 (C-I)、五味子醇甲 (C-II) 和吸附五味子醇甲 (A-II) 的含量 (b)

Fig. 8 Amounts of schisandrin or/and sunitinib coupled on magnetic nanoparticles using various irradiation time

看到：光照 50 min 之前，磁性粒子表面偶联药物分子含量快速上升，50 min 之后变化不大。使用 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-BP}$ 粒子同时偶联苏尼替尼碱和五味子醇甲 (1 : 1) 2 种药物分子时 (图 8-b)，可以看到：前 30 min，2 种药物分子的偶联含量差别不大，30 min 后，苏尼替尼碱偶联含量要高于五味子醇甲偶联含量。这一结果说明：偶联过程与药物分子上的活泼 H 及空间位阻有关，苏尼替尼碱分子中含有甲基 (-CH₃)、亚甲基 (-CH₂)、次甲基 (-CH) 及 -NH 上的活泼 H (图 5)，且 -NH 上活泼 H 的反应活性更大，而五味子醇甲中只含甲基 (-CH₃)、次甲基 (-CH) 活泼 H，与 BP 基团的光化学偶联反应程度不及苏尼替尼碱；其次，苏尼替尼碱的相对分子质量较小，分子呈线形展开，活泼 H 与 BP 接触的空间位阻较小，也有利于 BP 基团的夺 H、偶联反应。在此基础上，考虑基于 BP 光化学反应偶联不同药物成分的选择性，可知不同药物成分的有效偶联利于后续靶点蛋白群的“钩钓”鉴定和分析^[19-20]。

4 讨论

本研究通过调节表面接枝聚合条件制备了表面光敏基团含量较高的磁性纳米粒子，然后在 UV 光照下利用粒子表面 BP 基团的夺氢-偶联光化学反应偶联不同药物分子，制备了磁性药物成分芯片。采用不同方法分析、证实了药物成分的偶联。磁性纳

米粒子表面接枝聚合物中含有亲水链段,有利于减少药物分子在粒子表面的吸附。药物分子的结构,尤其是活泼氢的含量和反应活性、以及空间位阻等因素影响其在粒子表面的偶联,使药物分子的偶联具有一定选择性。不同药物成分均可有效偶联在磁性粒子表面,有利于后续靶点蛋白的“钩钓”鉴定和分析。本研究为基于中药成分芯片的靶点“钩钓”与鉴定研究提供了理论基础和技术支持,对推动中药功效的现代科学诠释具有重要意义。

参考文献

- [1] 曾克武,屠鹏飞. 中药作用靶点方法学研究进展 [J]. 中国科学: 化学, 2018, 48(11): 136-144.
- [2] 李煦照,朱魁元,张帅男. 生物标签的探索: 中药药性研究的新模式 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(1): 14-18.
- [3] 袁枝花,于 潇,段雅迪,等. 蛋白质组学在中药作用靶点研究中的方法和应用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(5): 1034-1038.
- [4] 李 根,曹世杰,张继超,等. 点击化学在中药活性成分靶点鉴定中的应用进展 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 984-991.
- [5] Wang Y, Chen Y J, Xiang C, *et al.* Discovery of potential asthma targets based on the clinical efficacy of traditional Chinese medicine formulas [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 252: 112635-112646.
- [6] 葛跃伟,王淑美,张陆勇. 无标记小分子探针技术与中药靶点发现 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(19): 4152-4157.
- [7] 钱 慧,韩清华,刘 丹,等. 合欢皮总皂苷抗肿瘤作用靶点鉴定与分子机制解析 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3661-3665.
- [8] 王丽超,刘 丹,姜 勇,等. 基于分子亲和色谱技术的肉苁蓉低分子糖巨噬细胞激活作用靶点群鉴定与机制分析 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3666-3671.
- [9] 曾克武,廖理曦,万彦军,等. 基于靶点“钩钓”策略的肉苁蓉苯乙醇苷药理靶点鉴定及功效解析 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 173-178.
- [10] 曹雪晓,栗焕焕,邱喜龙,等. 氨基表面修饰磁性纳米粒子(MNP-NH₂)对黄酮类和有机酸类成分选择吸附研究 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4816-4823.
- [11] 王 超,李元滨. 中药复方多靶点逆转肺癌化疗多药耐药机制效应的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(2): 258-261.
- [12] 鲍昱含,王垂杰,姜 巍. 中药治疗功能性消化不良多靶点作用机制研究现状 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(1): 194-197.
- [13] Yin B C, Mendez R, Zhao X Y, *et al.* Automated spatially targeted optical micro proteomics (autoSTOMP) to determine protein complexity of subcellular structures [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(2): 2005-2010.
- [14] Gopal A, Herr A E. Multiplexed in-gel microfluidic immunoassays: Characterizing protein target loss during reprobation of benzophenone-modified hydrogels [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1-12.
- [15] Mishra P K, Yoo C M, Hong E, *et al.* Photo-crosslinking: An emerging chemical tool for investigating molecular networks in live cells [J]. *ChemBioChem*, 2020, 21(7): 1-10.
- [16] Wang S, Yue K, Liu L Y, *et al.* Photoreactive, core-shell cross-linked/hollow microspheres prepared by delayed addition of cross-linker in dispersion polymerization for antifouling and immobilization of protein [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2013, 389(1): 126-133.
- [17] Dayyoub T, Maksimkin A V, Senatov F S, *et al.* Treating UHMWPE surface for enhancing the adhesion properties by cellulose grafting [J]. *Int J Adhes Adhe*, 2020, 98: 102535-102542.
- [18] Oukhatar F, Eliseeva S V, Bonnet C S, *et al.* Toward MRI and optical detection of zwitterionic neurotransmitters: near-infrared luminescent and magnetic properties of macrocyclic lanthanide (iii) complexes appended with a crown ether and a benzophenone chromophore [J]. *Inorg Chem*, 2019, 58(20): 13619-13630.
- [19] 万彦军,廖理曦,刘瑜琦,等. 保元汤心肌保护作用靶点群的鉴定与功能分析 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3650-3655.
- [20] 曾克武,万彦军,廖理曦,等. 加味五子衍宗丸神经保护作用靶点群的鉴定与功能分析 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3656-3660.
- [21] 田 露,宋 波,袁景利. 荧光-磁共振双模式多功能纳米生物成像探针的制备及应用 [J]. 中国科技论文, 2017, 12(6): 627-632.
- [22] 张卓琦,耿浩然,宣瑞飞,等. 磁性介孔纳米粒子的制备及对抗癌药紫杉醇的传输 [J]. 高等学校化学学报, 2014, 35(7): 1509-1514.