

AMS-8-NH₂的合成及其对 ODN 的负载释放

陈敏敏¹, 邹永存², 孟云君¹, 张琪¹, 张卓琦³, 曹希传¹

(1. 中国矿业大学材料科学与工程学院, 徐州 221008; 2. 吉林大学无机合成与制备化学国家重点实验室, 长春 130012; 3. 徐州医学院附属医院心内科, 徐州 221002)

摘要 以阴离子表面活性剂肉豆蔻酰基谷氨酸钠(C₁₄GluA-Na)为模板剂, 3-氨丙基三甲氧基硅烷(APS)为辅助结构导向剂, 合成了介孔材料 AMS-8-NH₂, 并结合 XRD 分析、N₂ 吸附/脱附技术及 ²⁹Si 魔角旋转核磁共振(MAS NMR)等技术手段对纳米孔洞材料 AMS-8-NH₂ 进行了表征. 结果表明, AMS-8-NH₂ 是高度有序的纳米孔洞材料, 其孔径和比表面积分别为 3.2 nm 和 706 m²/g; 有机胺基团通过化学键连接在材料内表面, 这些基团的覆盖度达到 25%. 以 AMS-8-NH₂ 为载体, 寡核苷酸(ODN)为模型生物分子研究在不同条件下 AMS-8-NH₂ 对 ODN 的吸附和释放性能, 实验结果表明, 当 ODN 浓度一定时, 溶液的 pH 值越低, 对 ODN 的吸附量越大, pH = 4.7 时对 ODN 的最大负载量可达 214 mg/g; 在释放过程中, 材料对 ODN 具有较高的缓释能力, 随环境 pH 值增加, 释放量增加.

关键词 介孔材料 AMS-8-NH₂; 寡核苷酸; 吸附; 释放

中图分类号 O611; O647

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2010)04-0649-04

1992 年, Mobil 公司研究人员以阳离子表面活性剂为模板剂, 原硅酸乙酯为硅源成功合成了有序介孔分子筛二氧化硅 M41S^[1,2], 由此可以根据需要剪裁制备出不同结构特征的介孔分子筛材料; 随后 Pinnavaia^[3,4] 和 Zhao^[5] 分别以中性伯胺或非离子型表面活性剂、三嵌段型高分子共聚物表面活性剂(PEO-PPO-PEO)为模板剂合成了 HMS, MSU 和 SBA 系列介孔材料. Che^[6,7] 等以阴离子类型表面活性剂作为模板剂并引入辅助结构导向剂 CSDA(Co-structure directing agent)的概念, 制备出不同结构的二氧化硅系列介孔材料 AMS(Anionic surfactant templated mesoporous silica). 自 2001 年, Vallet-Regi^[8] 等将介孔材料的应用研究拓展到药物载体以来, 人们开始尝试以各种有序介孔分子筛作为药物载体, 目前已有系列介孔材料诸如 MCM^[9], SBA^[10,11], MSHS^[12] 和 MSU^[13] 在药物分子运输方面的应用报道. 而利用 AMS 介孔材料作为药物载体的研究还很少, 用作基因运载的研究更少. ODN 是一类仅有不到 20 个碱基对的短链脱氧核糖核酸, 是遗传物质 DNA 最基本的组成部分, 呈螺旋状结构, 其直径在 2 nm 左右, 是开展治疗人类遗传病研究的基础物质. 本文精选肉豆蔻酰基谷氨酸钠(C₁₄GluA-Na)阴离子表面活性剂作为模板剂, 3-氨丙基三甲氧基硅烷(APS)作为辅助结构导向剂合成了介孔材料 AMS-8, 经萃取处理后制得具有纳米孔结构的 AMS-8-NH₂, 借助 XRD、N₂ 吸附/脱附及 ²⁹Si 魔角旋转核磁共振(MAS NMR)对其进行表征. 进一步以 AMS-8-NH₂ 为载体, ODN 为模型分子, 研究了 AMS-8-NH₂ 对 ODN 的吸附释放性质, 探讨了浓度和 pH 值对 ODN 固定量和释放量的影响规律.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

3-氨丙基三甲氧基硅烷(APS, 日本 TCI 公司), 正硅酸乙酯(TEOS, 国药集团化学试剂公司), C₁₄GluA-Na 阴离子表面活性剂为本实验室合成, 无水乙醇和乙醇胺(国药集团化学试剂公司), Oligodeoxynucleotide(ODN 鲑鱼精子, 美国 Sigma 公司).

收稿日期: 2009-08-13.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30670557)、江苏省自然科学基金(批准号: BK2008132)和中国矿业大学科技基金(批准号: 2006B029)资助.

联系人简介: 曹希传, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事无机纳米生物材料研究. E-mail: xichuancao@yahoo.com.cn

pHS-3C 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司), AB-S 型电子天平(上海梅特勒-托利多公司), 超纯水系统(法国 Milli-Q Academic 公司), 5810R 型离心机(德国 Eppendorf 公司), THZ-22 型台式恒温振荡器(江苏太仓实验设备厂), E-60 型 UV-Vis(美国 Thermo 公司). 日本 Rigaku X 射线衍射仪(X-ray diffractometer D/MAX-2200/PC), 利用 Cu $K\alpha$ 射线(40 kV, 20 mA), 以 $1.0^\circ/\text{min}$ 的扫描速度, 扫描范围为 $2\theta = 1^\circ \sim 6^\circ$, 记录数据并作图; 美国 Micromeritics 公司的 ASAP2010 型 N_2 吸附系统, 于 77 K 温度下测定 N_2 吸附/脱附等温线; 比表面积依照 Brunauer-Emmett-Teller(BET) 公式计算, 孔径和孔容通过 Barrett-Joyner-Halenda(BJH) 公式计算; 美国 Varian 公司 Infinity plus 400 固体核磁共振谱仪, 用 7.5 mm 魔角探头, 共振频率为 79.4 MHz, 转速为 4 KHz, 脉冲延迟为 3 s.

1.2 实验过程

1.2.1 AMS-8-NH₂ 的合成 称取 0.379 g C₁₄GluA-Na 加入到 38 g 超纯水中, 80 °C 下搅拌使之溶解, 加入 3.4 g 1 mol/L 的 HCl 之后, 将 0.716 g 的 APS 和 3.12 g 的 TEOS 加入反应体系, 生成白色沉淀, 停止搅拌, 将体系转移至 80 °C 的水浴锅中陈化, 真空过滤, 分别用超纯水、无水乙醇洗去表面残留的酸和表面活性剂, 放入 80 °C 恒温烘箱中烘干, 再用无水乙醇/乙醇胺作为萃取剂索氏提取, 得到目标产物 AMS-8-NH₂.

1.2.2 AMS-8-NH₂ 对 ODN 的吸附实验 分别称取 5 mg 的 AMS-8-NH₂ 加入到浓度为 1 mg/mL, 不同 pH 值(4.7, 7.0, 9.5) 或 pH = 4.7, 浓度为 0.125, 0.25, 0.5 和 1.0 mg/mL 的 ODN 磷酸盐缓冲液(PBS) 中. ODN 与 AMS-8-NH₂ 的质量比为 1:2. 室温下将混合液置于摇床以 150 r/min 的速度振荡. 在特定的时间点将反应体系离心, 取一定体积的上清液测定吸光度 {ODN 吸附量 (mg/g) = [初浓度 (mg/mL) - 上清液浓度 (mg/mL)] × 溶液体积 (mL) / AMS-8-NH₂ 质量 (g)}.

1.2.3 AMS-8-NH₂ 对 ODN 释放实验 称取 4 mg 的 AMS-8-NH₂ 加入到 ODN 浓度为 1 mg/mL 的 0.1 mol/L 的 pH = 4.7 的 PBS 缓冲溶液中, 吸附 72 h. 而后将混合液以 7000 r/min 离心 5 min, 去除上清液. 用超纯水清洗沉淀去除未吸附的 ODN. 再分别加入 1.5 mL, 不同 pH 值(4.7, 7.0, 9.5) 的 PBS 和超纯水, 放入恒温摇床中摇晃 (150 r/min), 控制温度在 37 °C. 在不同的时间点离心吸除全部上清液, 加入新的洗脱液, 释放量是从 0 到 168 h 之间各时间点的累积释放量.

2 结果与讨论

2.1 AMS-8 的表征

图 1 示出了萃取除去模板剂之后所得到的纳米孔洞材料的粉末 XRD 衍射图. 样品材料的 2θ 分别在 1.44° 和 1.64° 出现衍射峰, 其中在 1.64° 衍射强度非常的强, 同时 2θ 在 2.6° 处也出现一个较清楚的衍射峰, 结合文献[14] 结果, 确认样品材料是具有三维笼状管式结构的 AMS-8-NH₂ 型介孔分子筛, 而且它具有很高的结构有序性.

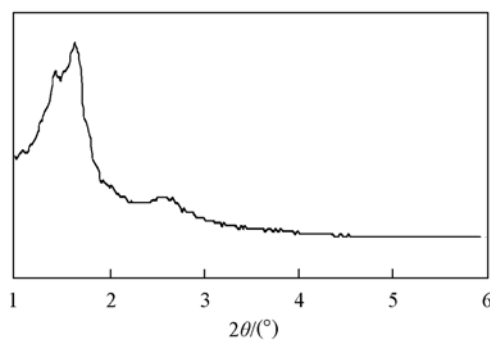


Fig. 1 Powder X-ray diffraction patterns of AMS-8-NH₂

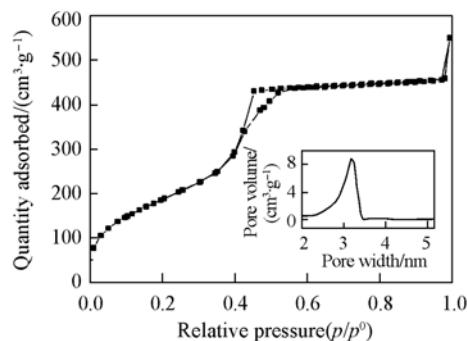


Fig. 2 Nitrogen adsorption-desorption isotherms and pore size distribution of AMS-8-NH₂ (inset)

图 2 给出了 AMS-8-NH₂ 的 N_2 吸附/脱附等温曲线. 该吸附等温线呈现出典型的 IV 型, 由于其吸附和脱附曲线围成一个类似三角形滞后环, 且在脱附曲线中有台阶出现 (即呈 H2 型), 说明材料具有笼状连接而成的介孔结构分布. 进一步结合 XRD 相关衍射数据, 可以推断出样品的孔结构是由笼状介孔

连接的三维立体结构. 通过计算得出其 Brunauer-Emmett-Teller (BET) 比表面积为 706 m²/g. 根据 Barrett-Joyner-Halenda (BJH) 模型计算了材料的孔径分布 (见图 2 插图), 即材料 AMS-8-NH₂ 平均孔径约 3.2 nm.

通过固态²⁹Si 魔角旋转核磁共振技术对样品进一步表征 (见图 3), 分别在 $\delta = -93$, -101 和 -114 处出现 3 个化学位移峰, 可归结为 Q^n 特征位移 $\text{Si}(\text{OSi})_n(\text{OH})_{4-n}$, $n = 2 \sim 4$; Q^4 在 $\delta = -114$, Q^3 在 $\delta = -101$, Q^2 在 $\delta = -93$; 同样在 $\delta = -75 \sim -55$ 范围内还有另外 3 个峰, 根据文献[15]指定为 $T^m = [\text{RSi}(\text{OSi})_m(\text{OH})_{3-m}]$, $m = 1 \sim 3$; T^3 在 $\delta = -75$, T^2 在 $\delta = -60$ 和 T^1 在 $\delta = -55$, 表明胺基化合物成功地以化学键的方式连接在孔表面上. 对谱图曲线进行积分, 并且运用代数式 $\alpha = T^m / (T^m + Q^n)$ (其中 T^m 是 AMS-8 表面与有机基团连接的硅成分, Q^n 为表面的所有的硅组分) 进行计算, 结果发现, 有相当的硅表面被成功修饰, 其修饰度 α 高达 25%.

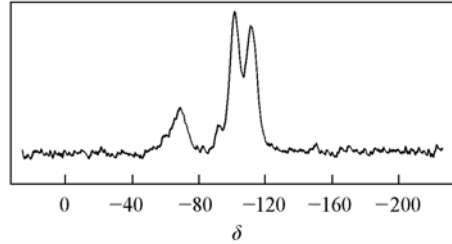


Fig. 3 ²⁹Si MAS NMR spectrum of AMS-8-NH₂

2.2 AMS-8 对 ODN 的吸附

测定了 ODN 的浓度为 1.0 mg/mL 时在不同酸碱条件下的吸附性质. 结果表明, pH = 9.5 时吸附量仅有 89 mg/g, 72 h 达到平衡. pH 降低到 7.0 时吸附量升高到 164 mg/g, pH = 4.7 时吸附量已经增加到 214 mg/g, 且基本都在 96 h 达到平衡. ODN 等电点在 3~4 之间, 在选择 pH 条件下, ODN 显负电性. AMS-8-NH₂ 表面覆盖着很多氨基, 有机胺的等电点在 11 附近, 所以该有机基团的电性受溶液 pH 值的调控, pH 值低于 11 时, 氨基质子化使得基团表面带正电性, 溶液 pH 值越低, 氨基正电性越强, 材料表面的正电荷越多, 对带负电的 ODN 吸引力越强, 所以 pH = 4.7 时吸附量最大.

图 4 显示了在 pH = 4.7, ODN 的浓度分别为 0.125, 0.25, 0.50 和 1.00 mg/mL 时 AMS-8-NH₂ 对 ODN 的吸附行为. 结果表明, ODN 初始浓度为 0.125 mg/mL 时, 吸附量为 155 mg/g, 72 h 基本达到吸附平衡; ODN 浓度增加到 0.25 mg/mL 时, 附载量没有发生明显变化, 约 96 h 达到平衡; 继续增加浓度到 0.5 和 1.0 mg/mL 时, 都需要 120 h 左右才能达到平衡, 此时的吸附量分别为 189 和 209 mg/g. 这说明初始浓度越高, AMS-8-NH₂ 对 ODN 的吸附达到平衡的时间越长, 且均为缓慢达到吸附平衡的曲线.

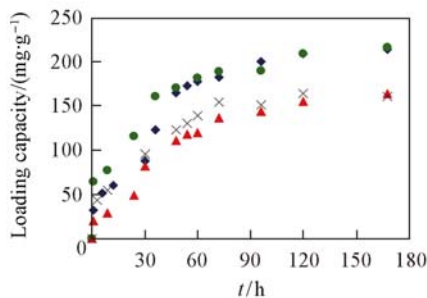


Fig. 4 Loading of ODN on AMS-8-NH₂ at pH = 4.7 with various concentrations

● 1 mg/mL; ◆ 0.5 mg/mL; ▲ 0.25 mg/mL;
× 0.125 mg/mL.

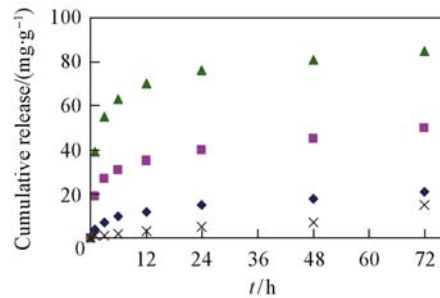


Fig. 5 Release of ODN from AMS-8-NH₂ at various pH PBS buffer and ultrapure water at 37 °C

◆ pH = 4.7; ■ pH = 7.0; ▲ pH = 9.5; × ultrapure water. Samples were loaded at pH = 4.7 with (200 ± 5) mg/g loading capacity.

2.3 AMS-8 对 ODN 的释放

图 5 示出了以不同 pH 值的 PBS 和纯水作洗脱液时 ODN/AMS-8-NH₂ 中 ODN 的释放性质. 结果表明, 对于 pH = 9.5 和 7 而言, 初始释放速度都很大, 以后的时间范围释放速度逐渐减小. 在最初 6 h, 二者的释放量分别为 63 和 31 mg/g, 当时间从 6 h 到 72 h 时其释放量仅仅为 22 和 19 mg/g. 当 pH = 4.7 时, 其释放速度相对很小, 经过 72 h 仅有 21 mg/g ODN 被释放. 从²⁹SiMAS NMR 数据可知材料 AMS-8-NH₂ 表面被大量的氨基覆盖, 由于有机胺类的水解作用导致材料表面电性受溶液 pH 值的影响. 氨基基团的等电点为 11, 当溶液的 pH 值升高, 氨基表面的正电荷密度下降, 对 ODN 分子的吸引

力减弱,产生了较高的释放量.为了研究溶液中离子对 ODN 释放性能的影响,用纯水代替 PBS 作为洗脱液进行释放实验,发现 72 h 后 ODN 的释放量仅为 15 mg/g.由于 PBS 缓冲液中较高浓度的阴离子(如 H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} 等)靠电性引力作用与 ODN 分子竞争,定向移动到材料表面被质子化的氨基附近,从而替换了一部分 ODN 分子,促进了 ODN 的释放.

上海交通大学化工学院车顺爱教授在 AMS-8 合成方面给予了帮助,特此致谢.

参 考 文 献

- [1] Kresge C. T. M., Leonowicz E., Roth W. J., *et al.*. Nature[J], 1992, **359**: 710—712
- [2] Beck J. S., Vartuli J. C., Roth W. J., *et al.*. J. Am. Chem. Soc. [J], 1992, **114**(27): 10834—10843
- [3] Tanev P. T., Pinnavaia T. J.. Science[J], 1995, **267**(5199): 865—867
- [4] Bagshaw S. A., Prouzet E., Pinnavaia T. J.. Science[J], 1995, **269**(5228): 1242—1244
- [5] Zhao D. Y., Feng J. L., Huo Q. S., *et al.*. Science[J], 1998, **279**: 548—552
- [6] Che S., Garcia-Bennett A. E., Yokoi T., *et al.*. Nature Mater. [J], 2003, **2**: 801—805
- [7] Jin H., Liu Z., Ohsuna T., *et al.*. Adv. Mater. [J], 2006, **18**: 593—596
- [8] Vallet-Regi M., Rmila A., del Real R. P., *et al.*. Chem. Mater. [J], 2001, **13**(2): 308—311
- [9] QU Feng-Yu(曲凤玉), CUI Ling-Fei(崔凌飞), HUANG Shi-Ying(黄世英), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(8): 1440—1442
- [10] Doadrio A. L., Sousa E. M. B., Doadrio J. C., *et al.*. J. Controlled Release[J], 2004, **97**: 125—132
- [11] Yu H., Zhai Q. Z.. Micropor. Mesopor. Mater. [J], 2009, **123**: 298—305
- [12] Cao Z. X., Zhang J., Zeng J. L., *et al.*. Talanta[J], 2009, **77**: 943—947
- [13] Tourné-Péteilh C., Lerner D. A., Chamay C., *et al.*. Chem. Phys. Chem. [J], 2003, **4**(3): 281—286
- [14] Garcia-Bennett A. E., Terasaki O., Che S., *et al.*. Chem. Mater. [J], 2004, **16**(5): 813—821
- [15] Wang X., Lin K., Chan J. C., *et al.*. J. Phys. Chem. B[J], 2005, **109**: 1763—1769

Synthesis of AMS-8-NH₂ and Its Loading-release of Oligodeoxynucleotide

CHEN Min-Min¹, ZOU Yong-Cun², MENG Yun-Jun¹, ZHANG Qi¹, ZHANG Zhuo-Qi³, CAO Xi-Chuan^{1*}

(1. School of Materials Science and Engineering, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221008, China;

2. State Key Laboratory of Inorganic Synthesis & Preparative Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China;

3. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)

Abstract Mesoporous silicas of AMS-8-NH₂ have been synthesized with the anionic surfactant *N*-myristoyl-*L*-glutamic acid sodium (C₁₄ GluA-Na) and 3-amino propyltrimethoxy silane (APS) as co-structure-directing agents(CSDA). The materials were characterized by powder X-ray diffraction(XRD), N₂ adsorption/desorption analysis and ²⁹Si magic angle spinning nuclear magnetic resonance(MAS NMR). The results exhibit that the structure of AMS-8-NH₂ has a long range order of three-dimensional cage-like connecting aperture with about 3.2 nm pore diameter and 706 m²/g special surface area respectively nano-hole material. Organic amine groups have anchored chemically to the surface of material through chemical bonding, whose coverage has reached 25%. The resulting AMS-8-NH₂ materials were used as vehicles and herring sperm oligodeoxynucleotide(ODN) as a model biological molecule for discussing the loading and release character of ODN on AMS-8-NH₂. The loading experiment shows that when the solution concentration is fixed, the higher solution acidity, the higher loading capability and the maximum amount can reach 214 mg/g at pH = 4.7. Among the release process, high sustained release effect of ODN on materials is displayed, which is controlled by environmental pH value. The greater the pH value, the higher the release amount.

Keywords Mesoporous silicas of AMS-8-NH₂; Oligodeoxynucleotide(ODN); Adsorption; Release

(Ed.: F, G)