

基于分子印迹电位传感器的八角茴香中莽草酸测定

蓝尉瑜¹, 陈田斌^{1,2}, 黄荣华³, 王鸽¹, 陈敏婷¹, 张玮^{1*}

(1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004; 2. 海南成大药业有限公司, 海口 571000;
3. 如皋市综合检验检测中心, 江苏 如皋 226500)

[摘要] **目的:**制备并优化分子印迹电位传感器,考察电极的性能和适用性,并应用于八角茴香中莽草酸的测定。**方法:**以莽草酸为模板分子,2-乙烯吡啶(2-VPY),4-乙烯吡啶(4-VPY), α -甲基丙烯酸(MAA)为功能单体,采用本体聚合法分别制备分子印迹聚合物(MIP),负载于聚氯乙烯(PVC)膜中,构成电极敏感膜,制备并优化离子选择性电极;利用扫描电子显微镜(SEM)观察最优电极材料及印迹膜的形貌特征;分别考察电极的pH适用性、校正曲线、选择性、响应时间和稳定性;应用电势分析法,测定八角茴香中莽草酸的含量,并采用紫外分光光度法对测定结果进行验证。**结果:**在最优实验条件下,筛选出2-乙烯吡啶(2-VPY)为功能单体,制得分子印迹离子选择性电极,电极材料的粗糙多孔结构以及电极的pH耐受性、选择性、响应时间和稳定性均有利于实际样品分析,方法的检测限可达 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,线性范围为 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,能斯特响应斜率为 $38.7 \text{ mV} \cdot \text{decade}^{-1}$,响应时间3 min,与紫外分光光度法相比,药材含量测定结果一致。**结论:**分子印迹离子选择性电极应用于莽草酸测定,具较高灵敏度、选择性、准确性和精密度,稳定性良好,适用于八角茴香样品分析。

[关键词] 分子印迹聚合物; 电势法; 八角茴香; 莽草酸; 抗病毒

[中图分类号] R284.1;R282.6;R2-031;R2-03 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)10-0067-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181016

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1603.060.html>

[网络出版时间] 2018-03-09 17:23

Potentiometric Sensor for Determination of Shikimic Acid in *Illicium verum* Fructus Based on Molecular Imprinting

LAN Wei-yu¹, CHEN Tian-e^{1,2}, HUANG Rong-hua³, WANG Ge¹, CHEN Min-ting¹, ZHANG Wei^{1*}

(1. Guilin Medical University, Guilin 541000, China;

2. Hainan Chengda Pharmacy Ltd., Haikou 571000, China;

3. Rugao Comprehensive Testing Center, Rugao 226500, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare and optimize a kind of molecular imprinted sensor, investigate its performance and applicability, and use it for the determination of shikimic acid in *Illicium verum* fructus. **Method:** The molecular imprinted polymers (MIPs) were prepared by bulk polymerization with shikimic acid as a template molecule, with 2-vinylpyridine (2-VPY), 4-vinylpyridine (4-VPY) and methacrylic acid (MAA) as functional monomers, and then they were loaded in polyvinyl chloride (PVC) membrane as sensing component of ion-selective electrode (ISE). The morphologies of the optimal MIP and imprinted membrane were studied by scanning electron microscopy (SEM). A series of electrode performances, including the pH applicability, standard curve, selectivity, response time and stability, were investigated. The potentiometry was employed to detect shikimic acid in *I. verum* fructus, and the test result was verified by UV-visible spectrometry. **Result:** Under the optimized

[收稿日期] 20171201(025)

[基金项目] 广西高校中青年教师基础能力提升项目(KY2016YB314);国家自然科学基金项目(81760718)

[第一作者] 蓝尉瑜,从事药物分析新技术研究,E-mail:1823290465@qq.com

[通信作者] *张玮,博士,讲师,从事药物分析新技术研究,E-mail:22437564@qq.com

conditions, 2-VPY was screened as functional monomer to prepare MIP ISE, as the rough porous structure of the electrode material and the pH tolerance, selectivity, response time and stability of the electrode were beneficial to the actual samples analysis. The detection limit of this method was $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, with linear range of $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, slope of $38.7 \text{ mV} \cdot \text{decade}^{-1}$, and electrode response time of 3 min. The real sample test results were consistent with those provided by UV spectrophotometry. **Conclusion:** The novel MIP ISE was applicable to the determination of shikimic acid in *I. verum fructus* because of its high sensitivity, selectivity, accuracy, precision and stability.

[Key words] molecularly imprinted polymer; potentiometry; *I. verum fructus*; shikimic acid; antiviral

八角茴香,又名八角,是广西的道地药材之一,主产于广西西部和南部,桂林雁山和江西上饶陡水镇都有引种。八角茴香含有的重要成分莽草酸(shikimic acid, SA)是工业生产抗甲型流感病毒(H5N1和H2N1)一线药物“奥司他韦”(又名“达菲”)的关键原料^[1]。虽然,工业上获得SA的途径包括化学合成和工业发酵,但是,在一些发展中国家和地区,植物(特别是八角)提取依然是获取SA原料的主要途径,因此,建立一种准确、快速、低成本的药材质控方法显得尤为重要。

目前,植物中SA的检测包括高效液相(HPLC)^[2],毛细管电泳(CE)^[3],液-质联用(LC-MS)^[4]等技术。但是,商品化仪器的检测方法要么过分依赖于分子中的生色基团(如紫外检测)^[5],要么专属性不强而灵敏度有限(如示差折光检测),又或者成本较高、操作繁琐、设备体积庞大、可移动性差(如GC-MS)^[6]。因此,建立一种灵敏、高效、专属、便捷的检测方法仍是该药材乃至中药分析的一大挑战。

电势分析法建立在电化学池热力学基础上,定量关系符合能斯特(Nernst)方程,结合离子选择性电极(ion-selective electrode, ISE),构成了电化学分析的一个重要分支。电势分析法操作简单、分析迅速、成本低廉,在中药分析中具有一定潜力。该法分析的关键在于ISE,而传统的ISE主要用于无机离子检测,分子印迹技术(molecularly imprinted technique, MIT)的出现使电势分析法的应用拓展到有机离子分析领域。MIT是指合成对模板分子或其他目标分子具有特异性识别能力的分子印迹聚合物(molecular imprinted polymer, MIP)的新技术。通过MIT所获得的MIP是一种人工合成的高分子材料,其特点是对目标分子具有类似于抗原与抗体、酶与底物之间的立体选择性。目前为止,MIT应用于伏安分析法已有大量研究,但是,该技术在电势分析法中的应用报道较少^[7]。电势分析法相较伏安法具

有更佳稳定性、准确性和适用性,于MIT结合,将进一步提高分析方法的选择性,因而也更具有现场分析的实用价值。本研究以SA MIP作为离子载体,成功制备出MIP离子选择性电极,采用电势法,低成本的实现了八角茴香中SA的快速、灵敏、选择性分析。

1 材料

pH-3C型离子计(上海越平科学仪器有限公司),UV-1600PC型紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),JSM-6390A型场发射扫描电子显微镜(日本电子株式会社)。

SA对照品(西安天宝生物科技有限公司,批号20170709,纯度99.9%);2-乙烯吡啶(2-VPY),4-乙烯吡啶(4-VPY), α -甲基丙烯酸(MAA),偶氮二异丁腈(AIBN),三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯(TMP-TMA),苯二甲酸二辛脂(DOP),磷酸三(2-乙基己基)酯(TEHP),癸二酸二辛脂(DOS),高分子量聚氯乙烯(PVC),三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)均购自上海阿拉丁生化科技有限公司;甲苯(AR),甲醇(AR),乙腈,四氢呋喃(THF)均为分析纯,购自西陇科学股份有限公司;八角茴香(广东亿凡星医药科技有限公司,批号20171108,产地广西),经桂林医学院药学院吴卫教授鉴定为八角 *Illicium verum* 的干燥成熟果实。

2 方法

2.1 SA MIP的合成 采用本体聚合法制备MIP:取一个5 mL离心管,将甲醇1.86 mL和乙腈0.93 mL加入其中,混合均匀,加入SA 0.75 mmol溶解,再加入甲苯0.41 mL混合,得混合液A。另取一个5 mL离心管,加入2-VPY(或4-VPY或MAA)1.12 mmol, AIBN 0.22 mmol, TMP-TMA 4.29 mmol,混合均匀并溶解后,加入混合液A,充分混匀,即得反应液,超声30 s(80 W),密封,于60 °C水浴中反应12 h,即可。所得MIP研磨成粉后,通过药典9号筛(孔径75 μm),得细粉,用甲醇-乙酸溶液(9:1)

于索氏提取器中多次洗涤,直至洗脱液于紫外光谱 214 nm 处无吸收峰为止。非印迹聚合物(NIP)的制备按照上述同样方法进行,除了不加模板分子 SA 外,其余操作相同。模板分子 SA 以及功能单体 2-VPY,4-VPY,MAA 的分子结构见图 1。

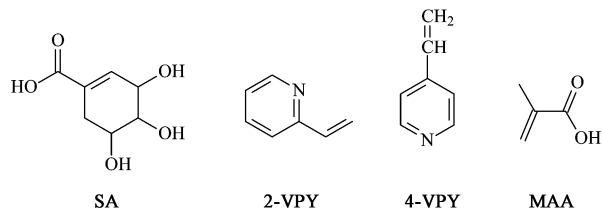


图 1 SA,2-VPY,4-VPY,MAA 的分子结构

Fig. 1 Molecular structures of shikimic acid, 2-VPY, 4-VPY and MAA

2.2 MIP ISE 的制备 精密称取 PVC 30 mg,置于 5 mL 离心管中,加入 THF 2 mL,密封,待 PVC 完全溶解后,开盖,于室温下挥发至 0.3 mL,加入增塑剂 DOS(或 DOP 或 TEHP)0.07 mL,再加入 MIP 或 NIP 6 mg,搅拌混匀,取一个 75 mm 长聚四氟乙烯管(外径 6 mm,内径 4 mm)蘸取混合溶液,在室温下放置至成膜。电极管中充入 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA 水溶液作为内充液,插入 Ag/AgCl 丝作为内参比电极,构成 SA MIP ISE。

2.3 检测方法 以自制 MIP ISE 为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,采用 pH-3C 型离子计记录电极电位。测试电池的结构为 $\text{Hg}_2\text{Cl}_2, \text{Hg} | \text{KCl}(\text{饱和溶液}) | \text{待测液} | \text{PVC 敏感膜} | \text{Ag}, \text{AgCl}(\text{SA 水溶液 } 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol})$ 。

3 结果与讨论

3.1 电极膜的成分优化 电极敏感膜的组成对电极响应性能有重要影响。据文献[5]报道,PVC 电极膜至少应包含 PVC,MIP(或 NIP)和增塑剂 3 种成分。PVC 是膜的基体部分,能保证聚合物膜具有良好的机械稳定性;MIP 是 ISE 的核心成分,负责选择性富集模板分子(即目标检测物);增塑剂使 MIP 均匀溶解于膜中,促进膜内离子的迁移。一般而言,为提高 MIP 的模板分子富集性能,碱性模板分子应选用酸性功能单体制备 MIP,反之,酸性模板分子应选用碱性功能单体。

本研究考察了电极膜成分种类以及组成比例对电极响应线性范围、斜率的影响,以优选最佳 MIP ISE。如表 1 所示,MIP 分别选择了 MAA,2-VPY 和 4-VPY 进行比较,增塑剂分别选用 DOP,DOS 和 TEHP 进行考察。结果显示,当功能单体为 2-VPY,

增塑剂选用 DOS 时,线性范围最宽,且有最大的响应斜率,提示该电极具有最宽的浓度范围适应性和最佳的灵敏度。据文献[8]报道,2-VPY 是一种碱性较弱的功能单体,但依靠分子中的 =N—,可与酸性模板分子(此为 SA)中的-COOH 形成很强的氢键,因而对 SA 具有较强的富集性能。MIP 的组分比例同样对电极响应有一定影响。由表 1 可见,在 2-VPY-MIP 传感膜中,当 MIP 与 PVC 的比例为 1:5 时,电极线性范围和斜率同样是最大值。MIP 含量较小时,敏感膜对目标检测分子富集性能有限,进而影响电极灵敏度;而 MIP 含量过大时,会出现聚合物颗粒在膜中分布不均匀的堆叠现象,同样影响电极的检测性能。因此,经筛选,电极膜的最优处方为,功能单体选用 2-VPY,且 2-VPY-MIP 为 6 mg,PVC 为 30 mg,增塑剂 DOS 为 70 μL 。

表 1 电极膜成分优化

Table 1 Optimization of electrode film composition

传感器	MIP /mg	增塑剂/ μL			线性范围 / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	斜率 / $\text{mV} \cdot \text{decade}^{-1}$
		DOP	TEHP	DOS		
MAA-MIP	6	70			$1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-1}$	13
	6		70		$1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-1}$	31.7
	6			70	$1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-1}$	28.3
	6	70			$1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-1}$	39.9
4-VPY-MIP	6		70		$1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-1}$	13.3
	6			70	$1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-1}$	35.2
	6	70			$1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-1}$	39.3
2-VPY-MIP	6		70		$1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-1}$	23.4
	3			70	$1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-1}$	21.7
	6			70	$1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-1}$	38.7
	10			70	$1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-1}$	26.4
	15			70	$1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-1}$	17.6

注:PVC 均为 30 mg。

3.2 2-VPY-MIP 材料和印迹膜形貌特征 采用扫描电子显微镜(SEM)对优选出的 2-VPY-MIP 粉末颗粒与制得的印迹膜进行形貌表征,从超微形态结构上揭示材料和电极膜的分析适用性。图 2(A)为 MIP 粉末颗粒群外观,可见,经粉碎过筛后,MIP 颗粒粒径分布总体均匀,平均粒径约 50 μm 。图 2(B)为单个颗粒表面形态,可见,颗粒表面粗糙多孔,为药物吸附提供了较大的比表面积。图 2(C)为制得的 2-VPY-MIP 印迹膜表面形态,可见,MIP 颗粒均匀镶嵌在 PVC 膜中,这种结构有利于提高电极电势感应的灵敏度与稳定性。

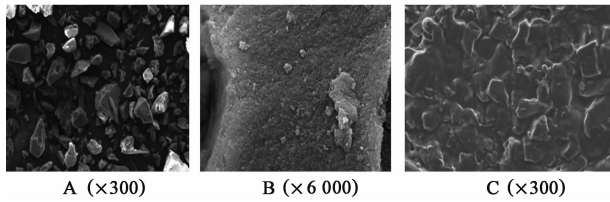


图 2 2-VPY-MIP 粉末颗粒 (A), 2-VPY-MIP 颗粒表面 (B) 和 2-VPY-MIP (C) 电极膜扫描电镜

Fig. 2 SEM images of 2-VPY-MIP particles (A), 2-VPY-MIP (B) particle surface and 2-VPY-MIP (C) based membrane

3.3 溶液 pH 的影响 溶液的 pH 对电极响应性能亦有重要影响。pH 适用性研究在于确定电极测试适用的 pH 范围。样品溶液为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA 的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液, 并以 HCl 或 NaOH 调节 pH 在 2.5 ~ 11.0, 考察在不同 pH 下 SA 溶液的电极电位响应。测试结果如图 3 所示, 在 pH 6.0 ~ 8.5, 电极电位响应值相对恒定, 提示在该范围内电极具有较好的适用性。当 $\text{pH} > 8.5$ 时, 电极电位稍有下降, 其原因可能是强碱性条件下 SA 发生酯化反应, 导致其浓度降低; 当 $\text{pH} < 6$ 时, 电极电位值下降明显, 这是因为在酸性条件下 SA 是以分子形式存在, 所以电极电位值响应较低。

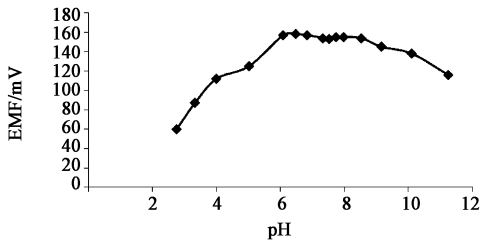


图 3 pH 对 2-VPY-MIP 电极电位响应的影响

Fig. 3 Effect of pH on 2-VPY-MIP-based electrode response

3.4 电极校正曲线 电极校正曲线是实际样品分析的计算依据。如图 4 所示, 以 SA 溶液浓度的负对数 pC 为横坐标, 响应电位值为纵坐标, 考察 MIP (2-VPY-MIP), NIP, 空白膜电极电位响应的线性情况。其中, 最优 MIP 膜电极的线性范围 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检出限 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 斜率为 $38.7 \text{ mV} \cdot \text{decade}^{-1}$, 线性方程为 $Y = -38.7X + 355.3$ ($R^2 = 0.98$)。同时, 也考察了 NIP 与空白电极膜 (PVC 膜) 的电极响应, 对比可见, MIP 膜电极比 NIP, 空白膜电极的线性响应范围更宽、检出限更低。因为 2-VPY-MIP 中存在大量的模板分子印迹孔穴, 所以 MIP 膜电极有更强的选择性富集作用, 线性更佳, 电位响应, 而 NIP, 空白电极膜与 SA 仅存在非特异性结合, 线性较差, 电位响应也较弱。

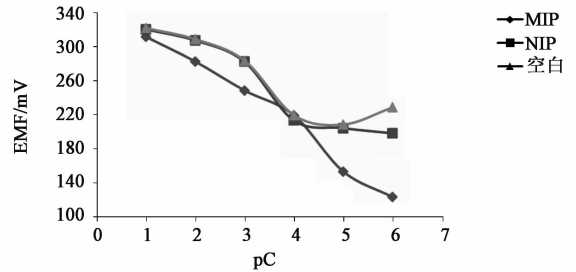


图 4 SA 的 MIP, NIP 以及空白膜电极的电位响应曲线

Fig. 4 Potential response curves of MIP, NIP and blank membranes toward shikimic acid

3.5 选择性试验 当测定药材提取液中 SA 的电势值时, 溶液中除了主要响应离子外, 其他共存离子可能会影响电势值, 因此, 有必要研究 MIP ISE 的分析选择性。实验选用药材提取液中可能存在的干扰物, 采用分别溶液法^[9]测定电极的选择性, 并由 Nicolsky-Eisenman 方程^[9]计算选择性系数 $\log K$ 。

由表 2 可见, 电极对所有干扰物的选择性系数皆小于 -2, 即电极对目标分析物 SA 比对各干扰物敏感性至少高 100 倍, 提示所采用的电极适用于药材提取液中 SA 分析。同时, 由 MIP 膜电极对乙酸、没食子酸的选择性系数与 NIP 膜电极对比可知, MIP 膜电极具有更高的选择性, 更适用于真实样品分析, 提示 MIT 技术应用于 ISE 的有效性。

表 2 SA MIP 膜电极电位选择性系数

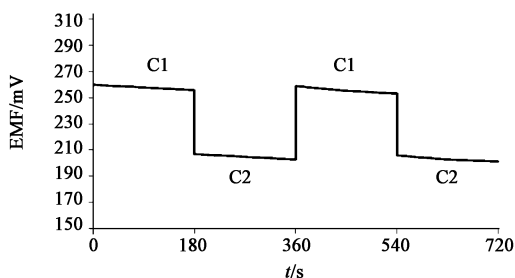
Table 2 Potentiometric selectivity coefficients for MIP based SA ISE

干扰物	选择性系数 $\log K$	干扰物	选择性系数 $\log K$
CH_3COOH	-4.93 (-1.89)	Na_2SO_4	-2.32
没食子酸	-4.52 (-1.63)	Na_2CO_3	-3.10
维生素 C	-2.81	$(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$	-2.89
NaCl	-2.35	柠檬酸	-3.23

注: 括号中表示 NIP 膜电极的选择性系数。

3.6 电极响应时间与稳定性 响应时间用于描述电极从一种浓度试液转入另一种浓度试液时, 建立平衡电势所需的时间, 此处为电极达到稳态值的 95% 所需时间。MIP 电极响应时间的测定结果如图 5 所示, 当 SA 浓度在 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 变化时, 电势读数在 3 min 内稳定。MIP 电极不论是从低浓度换到高浓度 ($1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 还是从高浓度换到低浓度 ($1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 电极电位均能在 3 min 达到相应的平衡电位值, 由此可见, 电极具有良好的可逆性。电

极的稳定性考察中,将电极置于常温下暴露于空气中储存 3 个月后,电位响应变化的 RSD 为 5.5% ($n=3$)。



C1. $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; C2. $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 5 MIP ISE 响应时间测定

Fig. 5 Potential response time of MIP based ISE

3.7 实际样品分析及验证 八角茴香中 SA 的提取:取八角茴香粉末 1.5 g 置于圆底烧瓶中,加入纯化水 50 mL 后加热,混合液沸腾 30 min 后停止加热。提取液用脱脂棉过滤,再用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,将滤液稀释 100 倍,得到 SA 待测提取液。

将上述自制的 MIP ISE 作为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,浸入上述提取液中直接测定,电势值由两电极连接的 pH-3C 离子计读出,并根据电极校正曲线和 Nernst 方程计算药材中 SA 含量。同时,为验证方法的准确性,采用紫外分光光度法并结合标准加入法,测定提取液中 SA 含量。将 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ SA 对照液逐量加入待测液中,于 214 nm 波长处测得系列吸光度,根据标准加入法计算

表 3 八角茴香中莽草酸的电势法和紫外分光光度法测定值比较 ($n=3$)

Table 3 Comparison between potentiometry and UV spectrophotometry based on determination of shikimic acid in SA ($n=3$)

No.	电势法 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD /%	紫外分光光 度法/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD /%
1	6.8	4.9	7.0	3.2
2	6.9	5.6	7.1	4.1
3	7.0	4.5	6.7	2.7

提取液及药材中 SA 的含量,测定结果与新方法进行对比。如表 3 所示,电势法测定结果与紫外分光光度法接近,RSD 都在 6% 以下,提示新方法具有较好的准确性和精密度。因此,电势法联用新制备的 2-VPY-MIP 基 ISE 有望用于八角茴香中莽草酸的快速、准确分析。

[参考文献]

[1] Widmer N, Meylan P, Ivanyuk A, et al. Oseltamivir in seasonal, avian H5N1 and pandemic 2009 A/H1N1 influenza [J]. Clin Pharmacokinet, 2010, 49 (11): 741-765.

[2] 俞静静,李风华,陈素红,等. HPLC 测定不同产地马尾松等松叶中莽草酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 52-55.

[3] Claudia Mardones, Hitschfeld A, Contreras A, et al. Comparison of shikimic acid determination by capillary zone electrophoresis with direct and indirect detection with liquid chromatography for varietal differentiation of red wines [J]. J Chromatogr A, 2005, 1085(2): 285-292.

[4] Avula A, WANG Y H, Smillie T J, et al. Determination of shikimic acid in fruits of illicium species and various other plant samples by LC-UV and LC-ESI-MS [J]. Chromatographia, 2009, 69(3/4): 307-314.

[5] 艾光丽,曾桢,王维,等. 金银花提取物的质量分析方法评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 22-26.

[6] 袁绿益,陈娟,常颜,等. GC-MS 研究含天然麝香小金丸与含人工麝香小金丸特征化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 43-47.

[7] Ayman H Kamel, Felismina T C Moreira, Sofia A A Almeida, et al. Novel potentiometric sensors of molecular imprinted polymers for specific binding of chlormequat [J]. Electroanalysis, 2008, 20(2): 194-202.

[8] 傅强,曾爱国,杜玮,等. 分子印迹技术与药物分析[M]. 西安:西安交通大学出版社, 2014: 9-10.

[9] 吴守国,袁倬斌. 电分析化学原理[M]. 2 版. 合肥:中国科学技术大学出版社, 2012: 19-21.

[责任编辑 顾雪竹]