

黄芩苷分子印迹聚合物制备及其机制分析

邱磊, 黄姣姣, 顾小丽, 何宏亮, 高艳坤, 陈立娜*
(南京医科大学药学院, 南京 210029)

[摘要] 目的:采用沉淀聚合法制备黄芩苷分子印迹聚合物并评价其性能。方法:以黄芩苷为模板分子,丙烯酰胺为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂,偶氮二乙丁腈为引发剂,采用沉淀聚合法制备黄芩苷分子印迹聚合物。用透射电镜和红外光谱分别对聚合物形态和结构进行表征分析。用静态吸附、动态吸附及选择性试验考察聚合物对模板分子吸附性。结果:使用沉淀聚合法得到的分子印迹聚合物具有较好的分散性,形态均匀,粒径分布较好,并且对黄芩苷具有较高的吸附量、较快的吸附速率和高度的选择性。结论:黄芩苷分子印迹聚合物为从黄芩中高效分离活性成分黄芩苷提供新方法。

[关键词] 黄芩苷; 分子印迹聚合物; 沉淀聚合法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)23-0012-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015230012

Preparation and Evaluation of Baicalin Molecularly Imprinted Polymer QIU Lei, HUANG Jiao-jiao, GU Xiao-li, HE Hong-liang, GAO Yan-kun, CHEN Li-na* (School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** Preparation and evaluation of baicalin molecularly imprinted polymer prepared by precipitation polymerization. **Method:** The molecularly imprinted polymers (MIPs) microsphere which using baicalin as template molecule, acrylamide (AM) as function monomer, ethyleneglycol dimethacrylate (EGDMA) as cross-linker were synthesized by precipitation polymerization. The surface morphologies and characteristics of the MIPs were characterized by transmission electron microscope (TEM) and infrared spectroscopy (IR). The adsorption properties of the polymers for the template molecule, baicalin, were determined respectively by the static adsorption equilibrium experiments, dynamic adsorption equilibrium experiments and selective experiments. **Result:** The results of above experiments show that dispersivity which using the precipitation polymerization of polymer molecules is excellent, the morphology have a high quality, and the particle size distribution is uniform. On the other hand, the experiment shows that molecular imprinted polymers have higher selective ability and stronger binding capacity for baicalin by precipitation polymerization. **Conclusion:** The molecular imprinting technology (MIT) provide a new way for the efficient separation and enrichment from the natural product of baicalin.

[Key words] baicalin; precipitation polymerization; molecularly imprinted polymers

黄芩具有清热燥湿,泻火解毒,安胎等功效^[1-2]。黄芩及其体内代谢物化学成分复杂,种类繁多,含量低且结构类似,普通的提取方法难以达到高效提取分离、纯化目标化合物的效果^[3]。因此发展针对黄芩活性成分的高选择性和高亲和力的分离纯化技术,在天然药物研究与开发等方面具有紧迫

的需求。

分子印迹技术是将模板分子印迹到某种基质上,使得基质对模板分子具有特异的选择性及结合能力,可以形象地描绘为制造识别“分子钥匙”的“人工锁”技术^[4]。由于分子印迹聚合物(molecular imprinted polymers, MIPs)是为目标分子“度身制作”

[收稿日期] 20150417(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30801558,81373895,81173538)

[第一作者] 邱磊,从事临床药师工作,Tel:13621892413,E-mail:407726586@qq.com

[通讯作者] *陈立娜,副教授,硕士生导师,从事现代药物分析研究,Tel:025-86868478,E-mail:chenlina@njmu.edu.cn

的,对模板分子具有特异识别性,并且具有抗恶劣环境能力强、稳定性好、使用寿命长等优点,使得分子印记技术在临床药物分析、环境分析、手性物质的分离、免疫分析、生物传感器、模拟酶催化等领域都有广泛的应用^[5-6]。分子印迹聚合物的制备方法主要有本体聚合、悬浮聚合、沉淀聚合等^[7]。沉淀聚合因其方法简便,不需加入稳定剂,可直接合成微球,无复杂的后处理过程,产率高且粒径均匀等优点逐渐引起人们的重视^[8]。本实验将以黄芩苷为模板分子,采用沉淀聚合法制备黄芩苷 MIPs,并利用红外光谱、扫描电镜、对产物进行表征;通过静态吸附、动态吸附、选择性吸附实验考察 MIPs 的吸附性能。

1 材料

JEM-1010 型透射电镜(日本 JEOL 公司), ZHLY-180 型振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司),UV2450 型紫外光谱扫描仪(日本岛津公司), TENSOR27 型傅立叶红外光谱仪(德国 Bruker 公司), SHZ-D(Ⅲ)型 1/1 万天平(日本岛津公司)。

黄芩苷(中国食品药品检定研究院,批号 110715-200212),丙烯酰胺(AM,国药集团化学试剂有限公司),乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA, Sigma-Aloric 公司),偶氮二异丁腈(AIBN,上海晶纯化学试剂有限公司),*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF,江苏晚晴化学试剂有限公司),4-乙烯基吡啶(4-VP,江苏晚晴化学试剂有限公司),三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸(TRIM,江苏晚晴化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 黄芩苷分子印迹聚合物的制备及工艺优选 精密称取黄芩苷 0.3 mmol,共 6 份(工艺优选见表 1)溶于乙醇或 DMF 50 mL 中,加入功能单体 AM 或 4-VP,超声 10 min,充分溶解,室温放置 6 h。分别加入交联剂 EGDMA 或 TRIM, AIBN (AIBN 的质量为前三者总质量的 3%),超声 10 min,充分溶解。抽真空,通氮气,密封,60 °C,200 r·min⁻¹振荡培养箱中反应 24 h。反应结束后,将得到的分子印迹聚合物以甲醇-冰乙酸(9:1)洗脱直至上清液在紫外分光光度计上检测无黄芩苷的吸收峰(280 nm)。再用甲醇洗至中性,45 °C 真空干燥 24 h,得到黄芩苷分子印迹聚合物(MIPs)。非印迹聚合物(NIPs)除不加模板分子外,制备方法同上。

由表 1 可以看出,不同条件下合成的分子印迹聚合物对黄芩苷的吸附量具有较明显的差异。基于所选致孔剂要对模板分子有较高的溶解能力又不能

表 1 不同条件下合成的 MIPs 吸附量情况

Table 1 Adsorption of MIPs prepared under different conditions

No.	合成比例	功能单体	交联剂	致孔剂	吸附量 / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
MIP-1	1:5:25	AM	EGDMA	乙醇	54.08
MIP-2	1:5:25	AM	EGDMA	DMF	27.85
MIP-3	1:5:25	4-VP	EGDMA	乙醇	31.47
MIP-4	1:5:25	AM	TRIM	乙醇	41.69
MIP-5	1:6:30	AM	EGDMA	乙醇	53.96
MIP-6	1:8:40	AM	EGDMA	乙醇	68.44

注:合成比例为模板分子-功能单体-交联剂。

影响模板分子与功能单体之间形成复合物的稳定性的原则,本实验分别选择乙醇和 DMF 为致孔剂。结果表明 MIP-1 的 *Q* 大于 MIP-2,说明乙醇更适合作为分子印迹的溶剂,这可能是由于 DMF 的极性较大,会破坏功能单体与模板分子之间的氢键作用。

比较 MIP-1 和 MIP-3,当采用乙醇为致孔剂,分别选用 AM 和 4-VP 为功能单体时,吸附量的差异可能是在预聚合时 AM 与模板分子所形成的复合物更稳定。

评价 2 种交联剂,实验表明由 EGDMA 合成的 MIP 的吸附量高于由 TRIM 合成的聚合物,其差异可能来自于 2 种交联剂结构的不同(TRIM 比 EGDMA 多了 2 个酯键的结构)。

进一步优化模板分子,功能单体和交联剂三者的比例,可以发现不同合成比例吸附量具有较明显差异,这可能是由于同时升高功能单体与交联剂的比例可以在聚合物上形成更多的结合位点和几何空穴。综上所述,选用乙醇为致孔剂,AM 为功能单体,EGDMA 为交联剂,并且控制合成比例在 1:8:40 时为最佳工艺。

2.2 黄芩苷分子印迹聚合物的结构分析

2.2.1 黄芩苷分子印迹聚合物的透射电镜表征 取黄芩苷分子印迹聚合物 1 mg 超声分散在乙醇溶液 2 mL 中。取 10 μL 溶液滴于铜网上,自然挥干后,置于透射电镜下观察并拍照。见图 1。制得的印迹聚合物粒径分布均匀,表面光滑,单分散性好。

2.2.2 黄芩苷分子印迹聚合物的红外光谱表征 使用 FT-IR 光谱仪分别对 NIP(a),未脱模板的 MIP (b)以及黄芩苷(c)进行红外扫描,溴化钾片中样品与溴化钾的质量比为 1:14,红外扫描的光谱范围为 4 000 ~ 500 cm^{-1} ,结果见图 2。

相比较 NIP(a)的红外图谱,未脱模板的 MIP (b)明显表现出黄芩苷(c)的红外特征峰(例如

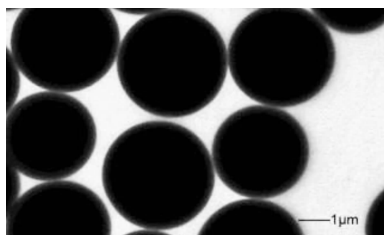


图 1 黄芩苷分子印迹聚合物的透射电镜 ($\times 70\ 000$)
Fig. 1 TEM images of MIP ($\times 70\ 000$)

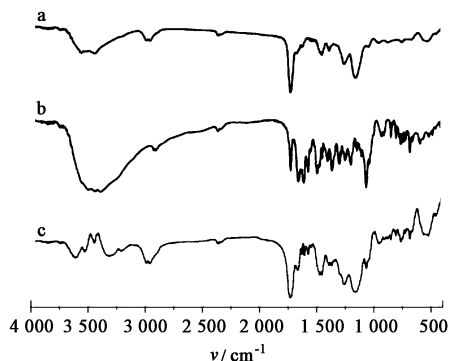


图 2 NIPs (a), 未脱模板的 MIPs (b) 和黄芩苷 (c) 的红外光谱
Fig. 2 Infrared absorption spectrum of NIPs (a), MIPs (b) and baicalin (c)

850.92, 807.64, 756.25, 682.52 cm^{-1} 处的苯环取代吸收特征峰), 这说明在合成的分子印迹聚合物中印迹黄芩苷分子成功。

2.3 分子印迹机制研究

2.3.1 紫外光谱分析 在质量浓度为 $0.05\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的黄芩苷的乙醇溶液 10 mL 中, 渐增 AM 的浓度 ($0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 混合溶液静置 6 h, 以相应的 AM 溶液作空白, 测定混合溶液的紫外吸收光谱, 并绘制差示紫外吸收光谱。

模板分子-功能单体之间的相互作用的研究主要通过差示紫外吸收光谱来测定, 求得模板分子与功能单体复合物之间的最佳结合比。主要采用摩尔比法, 即固定一个组分的浓度不变, 改变另一组分的浓度, 根据 Lambert-Beer 定律, 求得模板分子 (黄芩苷) 和功能单体 (AM) 之间的结合比。见图 3。以功能单体与模板分子作用前后的吸光度 (A) 差值绘制紫外吸收差光谱, 黄芩苷与 AM 的摩尔比为 $1:0 \sim 1:9$ 。随着 AM 浓度的增加黄芩苷吸收光谱中特征吸收峰 ($280\ \text{nm}$) 吸光度逐渐减弱, 部分吸收峰发生红移。这是因为随着 AM 的加入, 黄芩苷与 AM 分子之间形成更多的氢键, 他们之间的作用力发生了自组装, 能量逐步降低, 形成了较稳定的复合

物, 所以其光谱性质发生了显著的变化。但随着第 9 份 AM 加入后, 吸收峰强度的减弱开始变得不明显, 这意味着 $1:8$ 的模板分子功能单体比例是最优的。

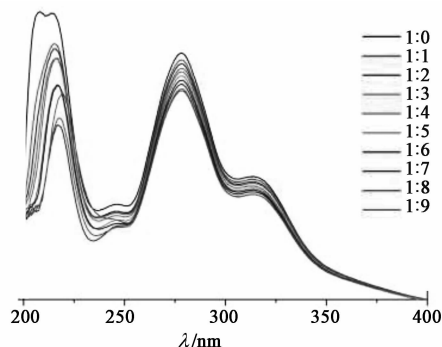


图 3 黄芩苷与不同比例的丙烯酰胺的在乙醇中的紫外吸收
Fig. 3 Ultraviolet absorption spectra of baicalin and different proportions of acrylamide in ethanol

2.3.2 红外光谱分析 分别配制黄芩苷、丙烯酰胺的乙醇溶液、黄芩苷与丙烯酰胺 ($1:8$) 的混合乙醇溶液, 静置 6 h 后, 进行红外扫描。见图 4。

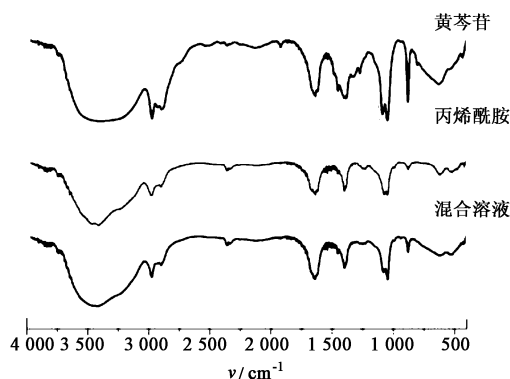


图 4 黄芩苷与丙烯酰胺的在乙醇中的红外光谱
Fig. 4 Infrared absorption spectrum of baicalin and acrylamide in ethanol

从图 4 中可以看出黄芩苷和丙烯酰胺混合后, 丙烯酰胺的羰基峰从 $1\ 716\ \text{cm}^{-1}$ 移到了 $1\ 712\ \text{cm}^{-1}$, 黄芩苷中的 3 种羟基峰分别从 $3\ 382\ \text{cm}^{-1}$ 移到了 $3\ 419\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 384\ \text{cm}^{-1}$ 移到了 $1\ 398\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 274\ \text{cm}^{-1}$ 移到了 $1\ 250\ \text{cm}^{-1}$, 这一系列变化可能是丙烯酰胺的羰基和黄芩苷分子中的羟基氢形成氢键作用而产生的。黄芩苷的羰基峰从 $1\ 626\ \text{cm}^{-1}$ 移到了 $1\ 620\ \text{cm}^{-1}$, 可能是丙烯酰胺中的氨基氢和黄芩苷的羰基形成了氢键。黄芩苷糖苷键的 C-O-C 吸收峰从 $1\ 088\ \text{cm}^{-1}$ 移到了 $1\ 080\ \text{cm}^{-1}$, 可能是黄芩苷中糖苷键的氧原子与丙烯酰胺的氨基中的氢形

成了氢键。

2.4 分子印迹聚合物的吸附性能评价

2.4.1 动态吸附试验

称取 MIP 与 NIP(20.0 mg) 各 5 份, 分别加入 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的黄芩苷溶液 5 mL, 超声分散, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 室温振摇, 20, 40, 60, 80 和 100 min 时取上清液, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 的尼龙膜过滤, 取续滤液, 过膜, 稀释定容后, 280 nm 处测定溶液吸光度, 计算 MIPs 和 NIPs 对黄芩苷的吸附量, 平行测定 3 次, 并绘制印迹聚合物吸附量随时间的变化图。

聚合物吸附量(Q)是指在一定温度下, 单位质量的印迹聚合物达到吸附平衡时所吸附的模板分子的质量。

$$Q = V(C_0 - C_e) / W$$

式中 Q 为印迹聚合物吸附黄芩苷的量, C_0 和 C_e 分别为模板分子的起始浓度和平衡浓度, V 为加入的吸附母液的体积, W 为实验中使用的印迹聚合物的质量。

为测定 MIPs 对黄芩苷的吸附速率, 本实验采用静态平衡结合法, 测定在室温下不同时间内的 MIPs 对黄芩苷的吸附量。见图 5。从图可以看见 MIPs 在 3 h 内吸附量迅速增加, 此后增加幅度逐渐下降, 4 h 后基本达到吸附平衡, 表明印迹材料 MIPs 对黄芩苷具有较快的吸附速率。

2.4.2 静态吸附试验

称取 MIP 与 NIP(20.0 mg) 各 5 份, 分别加入 $1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩苷溶液 5 mL, 超声分散, 室温振摇 100 min, 取续滤液, 过膜, 稀释定容后, 280 nm 处测定溶液吸光度, 对照法计算 MIPs 和 NIPs 对黄芩苷的吸附量, 平行测定 3 次。并绘制印迹聚合物吸附量随浓度的变化图。

MIP 和 NIP 对不同浓度黄芩苷的吸附等温线见图 5B, 静态吸附的浓度范围为 $1.0 \sim 3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。MIPs 和 NIP 的最大吸附量分别约为 $34.19, 18.01 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$, MIPs 的吸附量是 NIPs 的 1.90 倍。表明 MIPs 对黄芩苷的吸附不同于 NIPs 的物理吸附, 而是一种有特异性识别位点的选择性吸附。这种分子识别特性来自于该聚合物的结合基团与模板分子的功能基团之间的氢键作用和空穴的几何选择性。MIPs 存在较多记忆型的识别空穴, 从而对模板分子及其结构类似物表现出高度的特异性识别性能。

2.4.3 选择性试验

为评价 MIPs 的分子选择性, 本试验选用与黄芩苷(A) 结构相似的汉黄芩苷(B), 黄芩素(C), 黄酮(D) 作为结构类似物, 对所制

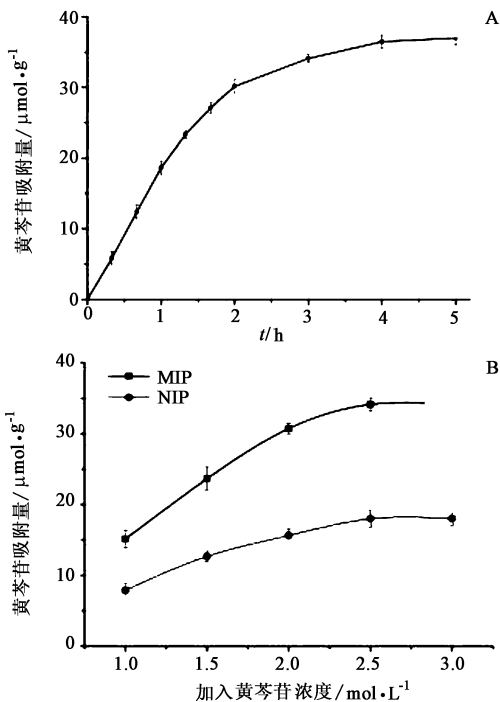


图 5 MIPs 与 NIPs 对黄芩苷的动态平衡吸附实验吸附曲线(A) 和静态平衡吸附实验吸附曲线(B)

Fig. 5 Dynamic adsorption curve for MIPs and NIPs(A) and Static adsorption curve of MIPs and NIPs(B)

备的 MIP 进行选择性吸附试验。称取 MIP 与 NIP (20.0 mg) 各 4 份, 分别加入结构类似物黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、黄酮的乙醇溶液 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 各 5 mL, 超声分散 5 min, 室温振摇 100 min, 取续滤液, 过膜, 稀释定容后, 在 280 nm 处测定溶液吸光度。计算 MIPs 和 NIPs 对上述 4 种结构类似物的吸附量, 平行测定 3 次。结果见图 6。

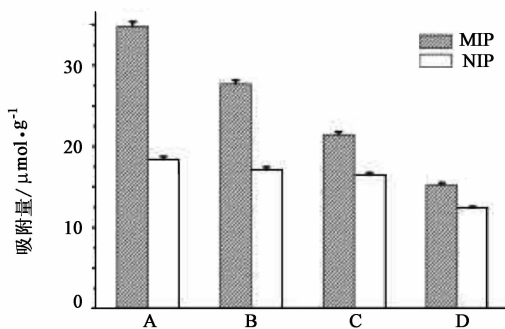


图 6 MIPs 和 NIPs 对黄芩苷及其结构类似物的选择性

Fig. 6 Selectivity of MIPs and NIPs for baicalin and its structural analogues

从图中可以看出 MIP 对黄芩苷的吸附量分别是汉黄芩苷, 黄芩素和黄酮的 1.3, 1.6, 2.3 倍, MIP 对黄芩苷显示了很强的选择性结合能力, 而 NIP 对

所有的化合物均显示了较低的结合能力。从化学结构上看,由于汉黄芩苷与目标化合物黄芩苷结构极为相似,并且有相同的功能基团,能够比较容易进入黄芩苷的印记空穴中,因此 MIP 对汉黄芩苷表现了较强的吸附能力。然而,黄芩素分子尺寸和空间结构上与黄芩苷均有较大不同,MIP 对黄芩素显示了较低的吸附容量。黄酮母核缺少功能基团,且分子尺寸相差较大,因此 MIP 对其吸附容量最低。而在 NIP 中,功能基团的分布是任意的,聚合过程中也没有形成于黄芩苷的形状和大小相匹配的孔穴,因此对模板分子吸附量均较低,且不显示特异的选择性。

3 讨论

黄芩苷 MIPs 的制备主要与预聚合时间、聚合温度、聚合时间、聚合时振摇的频率等因素有关。分子印迹的预聚合是指模板分子黄芩苷与功能单体丙烯酸胺之间形成氢键的过程,所以黄芩苷和丙烯酸胺的混合溶液需要静置充分的时间以保证氢键的充分形成。另外,在聚合时,需保证交联剂和引发剂的充分溶解,以免发生自聚。

本实验发现,用沉淀聚合法制备黄芩苷时,选用乙醇作为致孔剂,AM 作为功能单体,EGDMA 作为交联剂得到的分子聚合物透射电镜下形态较好,粒径分布均匀,并且吸附量优于其他条件下制备得到的聚合物。

通过控制黄芩苷的浓度不变,逐步升高丙烯酸胺的浓度,能够增加功能单体与模板分子之间氢键作用。氢键作用主要是发生在丙烯酸胺的羰基或氨基与黄芩苷上的羟基及黄芩苷苷元上的羟基之间。实验发现,并不能简单的通过氢键的形成多少来判断模板分子与功能单体之间的最佳结合比,必须通过计算机模拟并结合实验的手段进行进一步的确定。本实验通过黄芩苷与丙烯酸胺作对照,研究两者相互作用后的各红外吸收峰的变化,实验结果表明在黄芩苷与丙烯酸胺形成氢键以后,黄芩苷与丙烯酸胺相互作用基团的红外吸收特征峰会发生移动。

动态吸附、静态吸附、选择性分别从时间、浓度、选择性 3 个角度评价 MIPs 对模板分子的选择性和吸附容量。结果显示 MIPs 在 4 h 左右时达到饱和

吸附,当黄芩苷浓度在 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,MIPs 吸附量不再变化。并且 MIPs 对黄芩苷的吸附量高于其结构类似物。

本文应用光谱法对分子印迹的机制进行了探讨。性能评价实验表明合成的黄芩苷分子印迹聚合物具有良好的吸附性能和较高的选择性,适合作为天然药物活性成分分离的填料,为天然药物活性成分的提取分离提供了新方法和新技术。

[参考文献]

- [1] 李先端,顾雪竹,程立平,等. 黄芩的不同规格及不同部位质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(19):99-104.
- [2] Tian J L, Wang L, Wang L, et al. A wogonin-loaded glycyrrhetic acid-modified liposome for hepatic targeting with anti-tumor effects[J]. Drug Delivery,2014,21(7):553-559.
- [3] Wang R, Zhu X H, Sun A L, et al. Preparative isolation baicalin and wogonoside from Scutellariae Radix by high speed counter-current chromatography by using ionic liquid chromatography as the modifier of two-phase solvent system[J]. J Liq Chromato Relat Technol, 2014, 37(16):2275-2286.
- [4] Xie Y, Chen D J, Zhao J W, et al. An efficient hybrid design to prepare highly dense imprinted layer-coated silica particles for selective uptake of trace metsulfuron-methyl from complicated matrices [J]. RSC Advances, 2012, 2(1):273-283.
- [5] Robert W, Alexandra M, Michael J, et al. Molecular imprinting and solid phase extraction of flavonoid compounds [J]. Bioseparation,2002,10(6):379-387.
- [6] Lai J P, He X W, Guo H S, et al. A review on molecular imprinting technique [J]. Chin J Anal Chem, 2001, 29(7):836-844.
- [7] Levi R, Mcniven S, Piletsky S A, et al. Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers [J]. Anal Chem,1997,69(11):2017-2022.
- [8] Zhu Q Z, Degelmann P, Niessner R, et al. Selective trace analysis of sulfonyleurea herbicides in water and soil samples based on solid-phase extraction using a molecularly imprinted polymer [J]. Environ Sci Technol, 2002,36(24):5411-5420.

[责任编辑 顾雪竹]