

文章编号:1673-0062(2015)04-0083-05

淫羊藿苷分子印迹聚合物吸附性能研究

谭 倪,程 易,贾晓鹤,张 稳,颜雪明,侯 丹,廖 森,杨雪纯,李小龙

(南华大学 化学化工学院,湖南 衡阳 421001)

摘 要:以沉淀聚合法制备了淫羊藿苷分子印迹聚合物(MIPs).并用动态吸附、静态吸附和选择性吸附实验研究了制备的分子印迹聚合物对模板分子淫羊藿苷的吸附性能.结果表明制备的淫羊藿苷分子印迹聚合物对模板分子淫羊藿苷具有较好的吸附能力和识别能力,可以作为固相萃取材料来分离提取中草药淫羊藿中的淫羊藿苷.

关键词:分子印迹聚合物;淫羊藿苷;吸附;识别

中图分类号:0631.3 **文献标识码:**B

Study on Adsorption Properties of Icariin Molecular Imprinted Polymer

TAN Ni, CHENG Yi, JIA Xiao-he, ZHANG Wen, YAN Xue-ming,
HOU Dan, LIAO Sen, YANG Xue-chun, LI Xiao-long

(School of Chemistry and Chemical Engineering, University of South China,
Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: The icariin molecularly imprinted polymers (MIPs) were prepared by precipitation polymerization. The selective adsorption experiments were performed to study the adsorption properties of MIPs to template molecular icariin. Results showed that the resultant MIPs exhibited good adsorption and recognition abilities to icariin. So the prepared MIPs can be used as solid-phase extraction material for the separation and purification of icariin from Chinese medicinal herbs.

key words: molecularly imprinted polymers (MIPs); icariin; adsorption; recognition

分子印迹技术是近年来在生物抗原—抗体作用机理的影响下发展起来的一项制备聚合物的新技术,用分子印技术制备的聚合物即分子印迹聚合物(MIPs)对目标分子具有较强的选择性和识

别能力.其制备过程是在合适的溶剂中,加入模板分子和功能单体,使其通过非共价键作用形成复合物,然后加入交联剂和引发剂发生反应,得到聚合物,去除模板分子后得到与模板分子大小、形

收稿日期:2015-05-09

基金项目:高校国家级大学生创新创业训练基金资助项目(201410555002)

作者简介:谭 倪(1970-),男,湖南衡南人,南华大学化学化工学院教授,博士.主要研究方向:天然药物化学.

状、官能团完全互补的三维孔穴^[1],因此该聚合物对模板分子具有高亲和性和专一识别性.近年来分子印迹技术已被广泛地应用于对映体的分离^[2]、药物传递^[3-4]、人工受体^[5]、固相萃取^[6]、环境食品样品的检测^[7-8]、生物传感器^[9]等各个方面.淫羊藿属小檗科淫羊藿属植物,是我国应用历史最悠久、最广泛的中草药之一,现代药理学研究表明淫羊藿具有良好的补肝肾、强筋骨、祛风湿、提高免疫力等药理作用^[10],作为淫羊藿的质量指标,淫羊藿苷具有广泛的药理学活性,如调节心血管疾病、生殖系统和骨髓系统等,并且对破骨细胞分化有体外抑制作用,可以预防炎性骨质疏松^[11-13].然而采用传统分离技术从淫羊藿中提取分离淫羊藿苷时具有低效、耗时、选择性差等不足,这影响了淫羊藿苷的提取效率,因此发展一种新型的对淫羊藿苷具有特殊选择性的固相萃取吸附材料是必须的.

本实验以丙烯酰胺为功能单体、乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂、甲醇-乙腈($V:V=3:1$)混合溶液为溶剂,用沉淀聚合法制备了淫羊藿苷分子印迹聚合物,并对其吸附性能进行研究,结果表明制备的 MIPs 对模板分子淫羊藿苷具有较好的选择性和亲和性.

1 实验部分

本实验中所有试剂都为市售分析纯.电热真空干燥器(天津市泰斯特仪器有限公司);UV-vis 8500 紫外可见分光光度计(上海天美仪器有限公司);超声波清洗器(广州邦洁电子有限公司);SZCL-3A 数显智能控温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司).

1.1 淫羊藿苷 MIPs 的制备

本实验用沉淀聚合法制备了淫羊藿苷分子印迹聚合物(MIPs),制备过程如图 1 所示,详细步骤如下:将 10 mg 淫羊藿苷和 6.3 mg 丙烯酰胺置于 25 mL 的三口梨形瓶中,加入 10 mL 甲醇-乙腈混合液($V:V=3:1$),室温下震荡 6 h 后静置 1 h,使其充分预聚合,然后加入 225 μL 乙二醇二甲基丙烯酸酯和 10 mg 偶氮二异丁腈,超声脱气 15 min,充 N_2 30 min,密封,置于 70 $^\circ\text{C}$ 水浴中恒温反应 24 h,制备的印迹聚合物用 $V(\text{甲醇}):V(\text{乙酸})=7:3$ 的混合溶液洗脱,直至洗脱液中检测不到模板分子,最后用甲醇洗掉多余的乙酸,聚合物 60 $^\circ\text{C}$ 真空干燥 24 h 后,置于干燥器中备用.非分子印迹聚合物(NIPs)的制备除不加模板分子外,其他步骤与 MIPs 的制备相同.

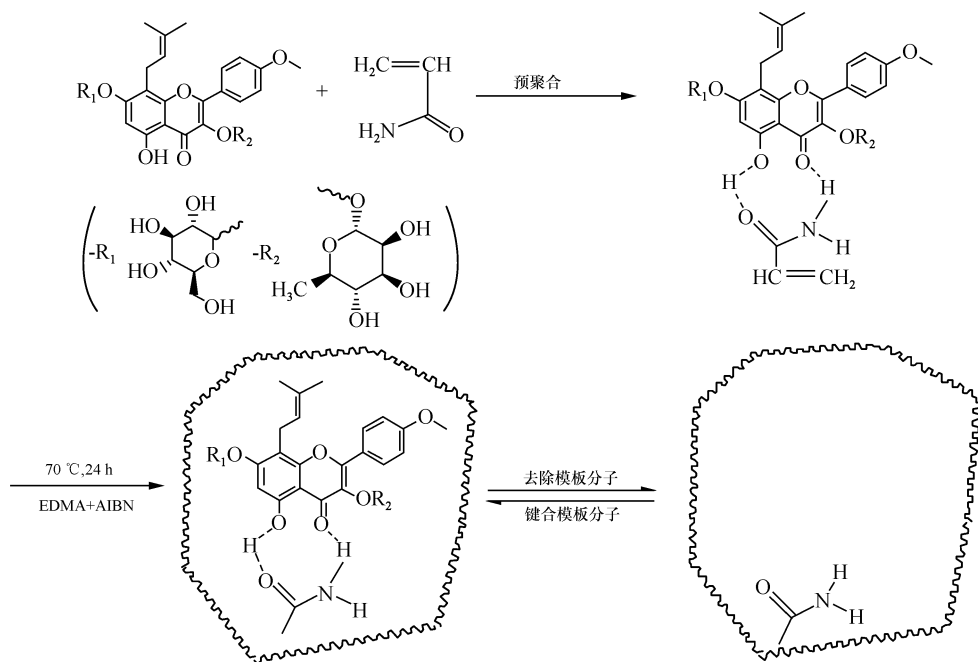


图 1 MIPs 的合成过程图

Fig. 1 Synthesis process of the MIPs

1.2 淫羊藿苷 MIPs 和 NIPs 的吸附实验

对于动态吸附实验:准确称量 40 mg MIPs 和 40 mg NIPs 各 7 份,分别加入 25 mL 浓度为 0.014 mg/mL 的淫羊藿苷甲醇溶液,室温下搅拌不同的时间(1 h,2 h,4 h,6 h,8 h,10 h,12 h),取其上清液测吸光度,计算对应的 MIPs 和 NIPs 的吸附容量. 吸附容量 Q ($\mu\text{g/g}$) 和印迹因子 β 的计算公式如下:

$$Q = (C_0 - C_s)V/W \tag{1}$$

$$\beta = Q_{\text{MIPs}}/Q_{\text{NIPs}} \tag{2}$$

其中 C_0 (mg/mL) 为淫羊藿苷甲醇溶液的起始浓度, C_s (mg/mL) 为达到吸附平衡时的浓度, V (mL) 为溶液的体积, W (mg) 为 MIPs(或 NIPs) 的质量.

静态吸附实验如下,精确称量 20 mg MIPs 和 20 mg NIPs 各 8 份,分别加入 10 mL 不同浓度的

(0.003 5 ~ 0.018 0 mg/mL) 淫羊藿苷甲醇溶液,室温搅拌 10 h 后,取上清液测吸光度, Scatchard 分析用来研究 MIPs 的吸附机理, Scatchard 方程如下

$$Q/C = (Q_{\text{max}} - Q)/K_d \tag{3}$$

其中 Q ($\mu\text{g/g}$) 为 MIPs 的吸附容量, C (mg/mL) 为达到吸附平衡时溶液中淫羊藿苷的浓度, K_d (mg/mL) 为解离常数, Q_{max} ($\mu\text{g/g}$) 为结合位点的最大吸附容量.

本实验用淫羊藿苷及其结构类似物槲皮素(结构见图 2)来研究 MIPs 的选择性,选择性吸附参数 K_d , a 及 γ 的计算如下公式所示:

$$K_d = C_p/C_s \tag{4}$$

$$\alpha = K_{d1}/K_{d2} \tag{5}$$

$$\gamma = \alpha_1/\alpha_2 \tag{6}$$

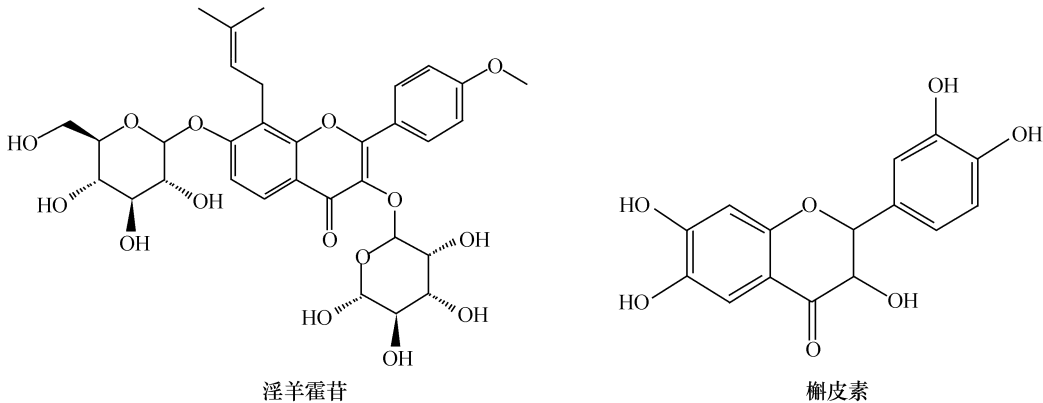


图 2 淫羊藿苷及其结构相似物的分子结构
Fig. 2 The chemical structure of icariin and structural analogs

其中 K_d 为分布系数, a 为分离因子, γ 是 MIPs 的相对选择性系数, C_p ($\mu\text{g/g}$) 和 C_s ($\mu\text{g/mL}$) 分别为 MIPs (或 NIPs) 的吸附容量和达到吸附平衡时溶液中模板分子的浓度, K_{d1} 和 K_{d2} 分别代表模板分子淫羊藿苷和槲皮素的分布系数, α_1 和 α_2 分别为 MIPs 和 NIPs 的分离因子. 实验方法如下:分别称取 20 mg MIPs 和 20 mg NIPs 各两份,分别加入 10 mL 0.014 0 mg/mL 的淫羊藿苷甲醇溶液和相同浓度的槲皮素甲醇溶液,室温下搅拌 10 h,离心,取上清液测吸光度,并计算相对应的吸附容量及选择性吸附参数. 以上每个实验均平行做三次,结果取这三组实验的平均值.

2 结果与讨论

2.1 MIPs 和 NIPs 对模板分子的动态吸附

动态吸附实验的结果如图 3 所示,由图可知,

MIPs 和 NIPs 的吸附容量都随着时间的增加而增大,分别在 10 h 和 8 h 时, MIPs 和 NIPs 基本达到吸附平衡,对应的吸附容量分别为 609 $\mu\text{g/g}$ 和 266 $\mu\text{g/g}$,而在同一条件下 MIPs 的吸附容量远远大于 NIPs 的,这表明在 MIPs 上形成了对淫羊藿苷分子具有高选择性和亲和性的特异性结合位点.

2.2 MIPs 和 NIPs 对模板分子的静态吸附

静态吸附实验结果见图 4,很明显,随着初始浓度的增加, MIPs 和 NIPs 的吸附容量都增大,当淫羊藿苷甲醇溶液的浓度分别为 0.014 0 mg/mL 和 0.008 0 mg/mL 时, MIPs 和 NIPs 分别达到平衡,在相同的条件下, MIPs 的吸附容量明显高于 NIPs 的,结果表明 MIPs 对淫羊藿苷具有特异性吸附.

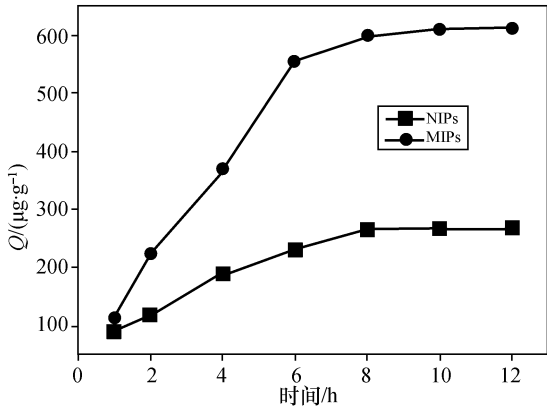


图3 MIPs 和 NIPs 的动态吸附曲线图

Fig.3 Dynamic curves for the absorption of icariin on the MIPs and NIPs

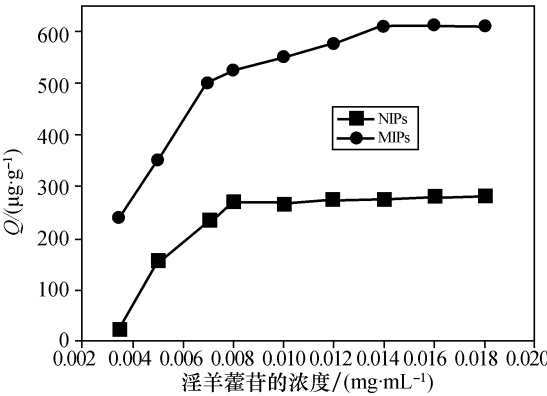


图4 MIPs 和 NIPs 的静态吸附曲线图

Fig.4 Adsorption isotherms of MIPs and NIPs

2.3 Scatchard 曲线分析

Scatchard 曲线分析的结果见图 5,很明显 MIPs 的 Scatchard 曲线图为一 条直线,线性方程为 $y = -380.643x + 273.425$ ($R^2 = 0.949$). 从该

方程的斜率和截距可以求得解离常数 K_d 和最大表观结合量 Q_{max} 分别为 0.0026 mg/mL 和 $711\text{ }\mu\text{g/g}$. 这表明在 MIPs 已经形成了结合位点. 对模板分子的吸归属于特异性吸附,相反 NIPs 的 Scatchard 曲线图为非线性关系,这是因为在 NIPs 上没有形成结合位点, NIPs 对模板分子的吸归属于非特异性吸附.

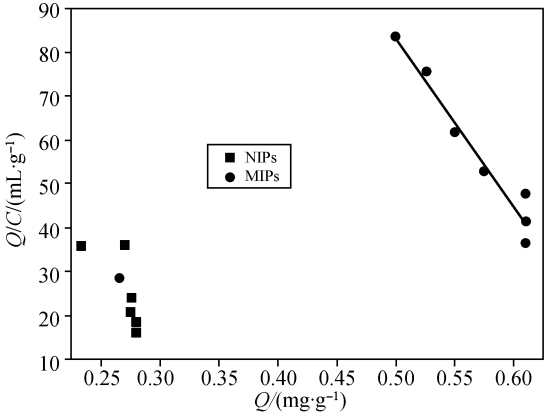


图5 MIPs 和 NIPs 的 Scatchard 曲线

Fig.5 Scatchard plots of MIPs and NIPs

2.4 选择性吸附

表 1 为淫羊藿苷 MIPs 和 NIPs 的选择性吸附实验结果,由表可知 MIPs 对模板分子的吸附容量远远大于对其结构相似物槲皮素的吸附容量, MIPs 对两种物质的分离因子 α 为 2.17,相对分离因子 γ 为 2.05,而 NIPs 对两种物质的吸附容量基本相同,分离因子 α 仅为 1.06,这表明制备的淫羊藿苷 MIPs 对淫羊藿苷分子具有较好的选择性和较强的分离能力,可以用于中草药中淫羊藿苷的分离提取.

表 1 MIPs 和 NIPs 对淫羊藿苷及结构类似物的吸附容量及选择性

Table 1 Adsorption and selectivity capabilivty of MIPs and NIPs for icariin and its structural analog												
化合物	$C_0/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$		$C_s/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$		Q_{MIPs}		Q_{NIPs}		β	$K_d/(\text{mL} \cdot \text{g}^{-1})$		γ
	MIPs	NIPs	MIPs	NIPs	$/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	$/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	MIPs	NIPs		MIPs	NIPs	
淫羊藿苷	0.0140		0.01278	0.01345	610	275	2.22	47.73	20.45			
槲皮素	0.0140		0.01341	0.01348	295	260	1.13	22.00	19.29	2.17	1.06	2.05

3 结 论

本实验以淫羊藿苷为模板分子,丙烯酸胺为功能单体,甲醇-乙腈 ($V:V=3:1$) 混合溶液为聚合溶剂,用沉淀聚合合法制备了淫羊藿苷分子印迹

聚合物,研究了淫羊藿苷 MIPs 的吸附性能,结果表明淫羊藿苷 MIPs 对模板分子淫羊藿苷具有较强的选择性和吸附能力,可以作为固相萃取材料来分离和纯化中草药淫羊藿中的淫羊藿苷.

由表 5 可看出,双中药提取物中黄酮含量明显高于单味中药提取物中黄酮含量。

3 结 论

本论文的研究结果表明,在最佳超滤提取工艺条件下,单味银杏叶提取物黄酮含量为 4.83%,单味绞股蓝提取物黄酮含量为 3.58%,银杏叶和绞股蓝双中药提取物中黄酮含量为 5.76%。银杏叶和绞股蓝单味中药超滤法提取和双中药超滤法提取相比,双中药提取物黄酮含量明显高于单味中药提取物,双中药提取既减少了溶剂量,又缩短了提取时间,提高了效率。

参考文献:

[1] 贾杰,周瑛,韦中奎. 中药治疗心血管疾病研究概况[J]. 北方药学,2014,11(2):63-64.

[2] 钟鸣. 中医药防治心血管疾病的临床特色优势[J]. 中国医药指南,2014,12(13):300-301.

[3] 王妮妮,鲍天昊. 银杏叶提取物与心血管疾病关系的研究进展[J]. 中国医药导刊,2009,10(9):1402-1403.

[4] Pietta P G,Mauri P L,Rava A,et al. Application of micellar electrokinetic capillary chromatography to the determination of flavonoid drugs[J]. Journal of Chromatography A,1991,549:367-373.

(上接第 86 页)

参考文献:

[1] Gong X Y,Cao X J. Preparation of molecularly imprinted polymers for artemisinin based on the surfaces of silica gel[J]. Journal of biotechnology,2011,153(1/2):8-14.

[2] Balamurugan K,Gokulakrishnan K,Prakasam T. Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymer liquid chromatography column for the separation of Cathine enantiomers[J]. Saudi Pharmaceutical Journal,2012,20(1):53-61.

[3] Ruela A L M,Figueiredo E C,Pereira G R. Molecularly imprinted polymers as nicotine transdermal delivery systems[J]. Chemical Engineering Journal,2014,248:1-8.

[4] 卜水,林华庆,李欣蔚. 分子印迹聚合物在缓控释给药系统中的应用[J]. 医药导报,2010,29(5):633-637.

[5] 夏建军. 分子印迹聚合物的应用[D]. 天津:南开大学,2010.

[6] 王遵臣,于海宁,沈生荣,等. 辣椒素分子印迹聚合物的制备及其在固相萃取中的应用[J]. 食品科学,2013,34(12):45-50.

[5] Cao Y,Chu Q,Fang Y,et al. Analysis of flavonoids in Ginkgo biloba L. and its phytopharmaceuticals by capillary electrophoresis with electrochemical detection[J]. Analytical and bioanalytical chemistry,2002,374(2):294-299.

[6] 李杰,杨舟. 绞股蓝化学成分与药理作用研究概况[J]. 湖北中医杂志,2012,34(10):74-76.

[7] 袁永华,汪旭. 银杏黄酮类化合物提取工艺研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版),2014,23(S1):38-40.

[8] 刘运美,何军,徐道龙,等. 绞股蓝中总黄酮提取方法比较研究[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(2):253-254.

[9] Attawish A,Chivapat S,Phadungpat S,et al. Chronic toxicity of Gynostemma pentaphyllum[J]. Fitoterapia,2004,75(6):539-551.

[10] Lv Y,Yang X,Zhao Y,et al. Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from Gynostemma pentaphyllum by HPLC with indirect UV detection[J]. Food Chemistry,2009,112(3):742-746.

[11] Kao T H,Huang S C,Inbaraj B S,et al. Determination of flavonoids and saponins in Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino by liquid chromatography - mass spectrometry[J]. Analytica chimica acta,2008,626(2):200-211.

[12] 潘晓鸥,李健,宋毅,等. 超滤法在中药分离、纯化工艺中的应用进展[J]. 华西医学,2004,19(2):351-352.

[7] 袁琳琳,宋立新,何娟,等. 磁性分子印迹聚合物在食品安全检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报,2014,5(11):3582-3586.

[8] 陈海燕. 分子印迹—固相萃取技术在食品和环境样品分析中的应用研究[D]. 长春:吉林大学,2014.

[9] Moreira F T C,Sales M G F. Biomimetic sensors of molecularly-imprinted polymers for chlorpromazine determination[J]. Materials Science and Engineering:C,2011,31(5):1121-1128.

[10] 杜婷婷,陈智. 淫羊藿有效成分淫羊藿苷的现代研究进展[J]. 齐鲁药事,2012,31(9):533-535.

[11] 夏国莲,黄兆铨. 淫羊藿对心血管系统药理作用的研究新进展[J]. 中华中医药学刊,2010,28(8):1676-1679.

[12] 宋力飞,刘常青,覃婕媛,等. 淫羊藿中淫羊藿苷的高效高压差低温连续式提取技术(HHLE)研究[J]. 亚太传统医药,2013,9(6):50-52.

[13] 翟远坤. 淫羊藿苷抗骨质疏松分子机理研究[D]. 兰州:兰州理工大学,2011.