

山奈素分子印记聚合物的制备及识别性能研究



YU Lan-zhe

于兰哲, 曲 丹, 俞延滨*

(北京林业大学 环境科学与工程学院, 北京 100083)

摘 要: 采用分子印记技术,以山奈素为模板分子,4-乙烯基吡啶(4-VP)为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)为交联剂,偶氮二异丁氰(AIBN)为引发剂,在 CHCl_3 -DMF(体积比 3:1)的溶剂体系中合成了含碱性功能基团的分子印记聚合物。通过红外光谱及扫描电镜(SEM)对聚合物进行表征,并研究印记聚合物对山奈素的吸附性能及机理。静态吸附实验结果表明:该分子印记聚合物对山奈素具备良好的吸附能力,经 Scatchard 模型分析印记聚合物存在对模板分子均一的结合位点,其最大表现吸附量(Q_{\max})为 3 938 $\mu\text{g/g}$,平衡解离常数(K_D)9.074 mg/L。选择性实验表明,分子印记聚合物在山奈素-芦丁体系中的分离因子达到 3.24。

关键词: 分子印记聚合物;山奈素;特异识别;吸附性能

中图分类号:TQ351

文献标识码:A

文章编号:0253-2417(2011)04-0019-06

Preparation and Application for Kaempferol Molecularly-imprinted Polymers

YU Lan-zhe, QU Dan, YUN Yan-bin

(College of Environmental Science and Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: A molecularly-imprinted polymer (MIP) was prepared by bulk polymerization, using kaempferol as the template molecule, 4-vinyl pyridine as the functional monomer, and ethylene glycol dimethacrylate as the cross-linker in the solvent system of CHCl_3 -DMF (3:1, volume ratio). The synthesized polymer, i. e. kaempferol-MIP, was analyzed by FT-IR and scanning electron microscopy (SEM). In addition, the adsorption properties and mechanism were studied as well. The experimental results showed that the kaempferol-MIP exhibited a favorable affinity for kaempferol. The Scatchard analysis reveals that there exists a class of homogenous recognition sites in kaempferol-MIP within the range of certain concentration. Apparent maximal combination amount (Q_{\max}) and equilibrium dissociation constant (K_D) were calculated to be 3 938 $\mu\text{g/g}$ and 9.074 mg/L, respectively. The result of selectivity study showed that the selectivity coefficient is 3.24 with respect to kaempferol-rutin system.

Key words: molecularly-imprinted polymer; kaempferol; specific recognition; adsorption properties

分子印记聚合物是将要分离的模板分子和功能单体以共价键^[1]或非共价键^[2]等作用形成复合物,后与交联剂引发聚合形成交联聚合物,聚合物中的结合点可以选择性的与模板分子再结合,从而使聚合物对模板分子具有特异识别功能^[3]。分子印记技术以其构效预定性、特异识别性及广泛实用性,已在色谱分离、固相萃取、生物模拟物及模拟酶催化剂、生物传感器等领域展现了良好的应用前景^[4-7]。近年来在天然药物活性成分分离提取中的应用也备受关注。Xie 等^[8]通过非共价键的本体聚合法,合成了槲皮素的分子印记聚合物,并从银杏叶的水解产物中成功提取了槲皮素。陈丽娜等^[9]通过合成分子印记聚合物实现了葛根素的高效分离,并采用固相萃取评价其对葛根素的选择性。山奈素为一种黄酮类化合物,具有降血压、降血脂、抗癌、增强毛细血管抵抗力等药用价值^[10],是中草药中重要的活性成分。迄今为止,关于山奈素分子印记聚合物的研究尚未见文献报道。本研究以山奈素为模板分子,采用本体聚合法制备山奈素分子印记聚合物,通过平衡吸附实验来研究该印记聚合物对山奈素的选择性吸

收稿日期:2010-11-18

基金项目:国家林业局 948 项目(2009-4-62)

作者简介:于兰哲(1985-),女,内蒙古呼伦贝尔人,硕士生,主要研究方向为分子印记技术

* 通讯作者:俞延滨,硕士生导师,主要研究领域为膜材料制备与表征及分子印记技术;E-mail:ybyunbj@sohu.com。

附性能,并采用 Scatchard 模型分析分子印记聚合物对山奈素的吸附机理。本研究可为采用分子印记技术从复杂的天然产物中高效分离富集山奈素奠定理论基础和科学依据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

山奈素(纯度>98%);4-乙烯基吡啶(4-VP);乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA),使用前经减压蒸馏纯化;偶氮二异丁氰(AIBN);氯仿、二甲基甲酰胺(DMF),以上试剂均为分析纯。

UNICO UV-2000 型紫外分光光度计,UNICO(上海)公司;VECTOR 22 型傅里叶红外光谱仪,瑞士 Bruker 公司;QUANTA 200 型扫描电子显微镜,美国 FEI 公司;DFT-50 手提式高速粉碎机,温岭市林大机械有限公司;KQ3200DE 数控超声波清洗器,昆山超声仪器有限公司;SHZ-82 型空气浴恒温振荡器,江苏国华有限公司;8411 型电动振筛机,浙江省上虞市学勤纱筛厂。

1.2 分子印记聚合物的制备

称取 0.2863 g 的模板分子山奈素溶于 7 mL 致孔剂 CHCl_3 -DMF(体积比 3:1)中,加入 0.43 mL 的 4-VP 超声波混匀脱氧 30 min,使山奈素与 4-VP 充分作用。然后加入 3.76 mL 的交联剂 EDMA 和 0.05 g 引发剂 AIBN,超声波处理 10 min 后通入氮气,并机械搅拌(转速 200 r/min),将其放入 60 ℃ 恒温油浴中加热 24 h。所得块状聚合物经粉碎后过 74 μm 的筛子,得到固体颗粒,再将其置于索氏提取器中用 200 mL 甲醇-乙酸(体积比 9:1)反复提取以脱除模板分子和致孔剂,并采用紫外分光光度计在 373 nm 处测定洗脱液的吸光度,以检测山奈素的脱除程度。当吸光度不再变化时用甲醇洗脱 24 h,以除去乙酸,所得固体粉末 60 ℃ 真空干燥 24 h,得到山奈素分子印记聚合物(山奈素-MIP,简称 MIP),备用。

空白聚合物(NIP)制备时,除不加模板分子山奈素外,其余方法同上。

1.3 分子印记聚合物的表面形态分析

采用扫描电子显微镜(SEM)对真空干燥后的 MIP 和 NIP 的表面形态进行分析,分别在 500 与 10 000 倍的放大倍数下观察。

1.4 分子印记聚合物的红外光谱分析

采用 KBr 压片制样,在 4000~400 cm^{-1} 区间内用傅里叶变换红外光谱仪扫描 MIP 和 NIP 的吸收。

1.5 聚合物对山奈素吸附性能研究

1.5.1 吸附动力学实验 分别称取 0.5 g 的 MIP 和 NIP,加入质量浓度为 6.4 mg/L 的山奈素乙醇溶液,40 ℃ 恒温摇床密闭振荡 24 h,从振荡开始计时,分别在 1、3、5、15、30 min 及 1、3、5 h 时抽取滤液,通过紫外分光光度计在 373 nm 处测定吸光度,考察聚合物对山奈素分子的吸附随时间变化的规律。吸附量(Q)由吸附前后的质量浓度差计算,计算公式如下:

$$Q = ((c_0 - c_e) \times V) / m$$

式中: Q —吸附容量,mg/g; c_0 —起始质量浓度,mg/L; c_e —平衡质量浓度,mg/L; V —溶液体积,L; m —吸附剂的质量,g。

1.5.2 静态吸附实验 精确称取 50 mg 的 MIP 和 NIP 各 6 份,置于 150 mL 磨口锥形瓶中,分别加入 50 mL 质量浓度为 2、4、6、8、10、12 mg/L 的山奈素乙醇溶液,40 ℃ 恒温摇床密闭振荡 24 h 后,离心,取上清液于 373 nm 处测定其质量浓度。

1.5.3 吸附选择性实验 精确称取 50 mg 的 MIP 和 NIP,分别加入 50 mL 山奈素-芦丁乙醇混合溶液(二者质量浓度均为 5 mg/L),40 ℃ 恒温摇床密闭振荡 24 h,离心,取上清液分别于 259 nm(芦丁最大吸收波长)和 373 nm 处测定其质量浓度。

2 结果与讨论

2.1 山奈素印记聚合物的印记机理

山奈素为黄酮类化合物,其吡喃酮环上的氧原子因含有未共用电子对,表现微弱碱性,同时山奈素

分子又含有多个酚羟基,具有一定酸性。总体而言,选择碱性的功能单体会有利于模板分子与功能单体形成稳定的非共价型主客体复合物。4-VP 中吡啶环上的 N 原子含有未成对电子,是较强的受氢基团,具有一定碱性,因此选用 4-VP 为聚合反应的功能单体。结构上模板分子有 4 个作用点,因此选用模板分子与功能单体的配比为 1:4。如果 4-VP 含量过低,那么山奈素与 4-VP 只能依靠较少的作用位点结合,另外还可能无法与 4-VP 结合的游离态山奈素分子,造成聚合物特异性空穴位点较少,识别能力降低;若 4-VP 含量过高,多余的功能单体易发生自聚,也会使特异性识别受阻。因此选择比例合适的功能单体对聚合物的识别效果至关重要^[11]。由于山奈素结构中含有 4 个羟基,具有较强极性,它难溶于甲苯和二氯甲烷。故选择极性较强二甲基甲酰胺和氯仿的混合溶剂作为聚合反应的致孔剂。印记及聚合过程见图 1。

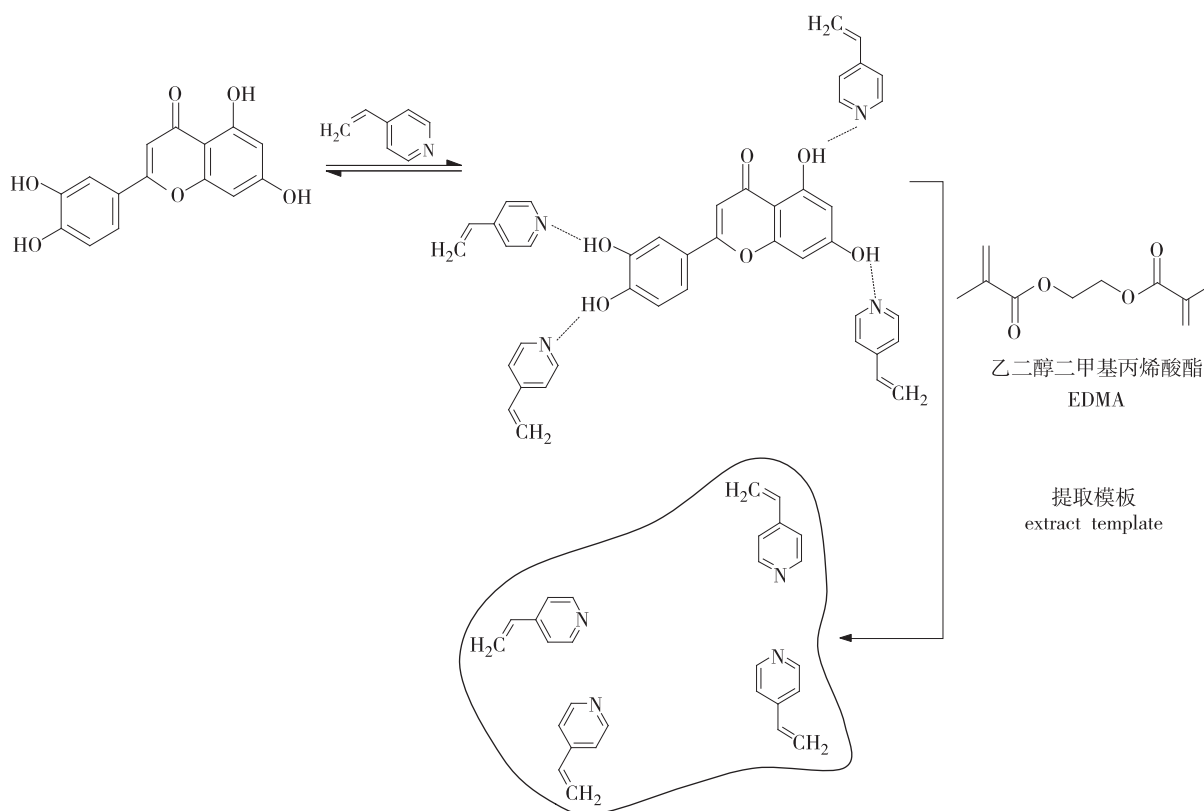


图1 山奈素分子印记聚合物的聚合机理

Fig. 1 Polymerization mechanism of the kaempferol-MIP

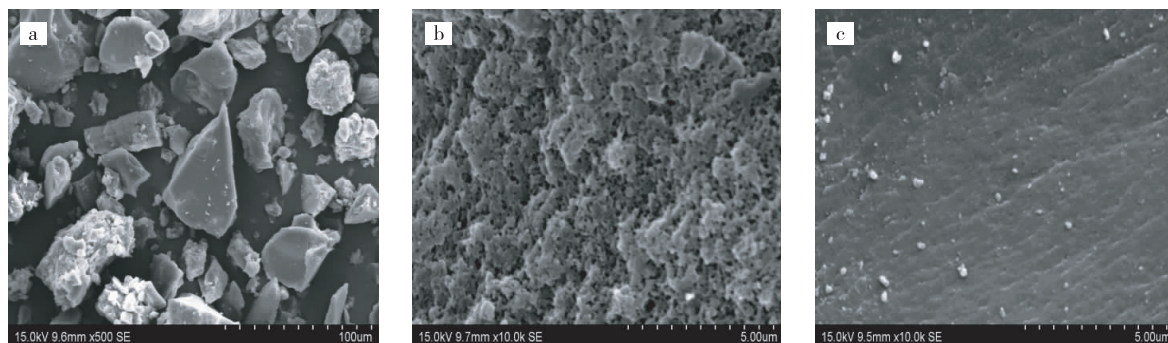
2.2 分子印记聚合物的形态分析

图2为MIP和NIP的SEM分析。图2(a)所示为粉碎后未过筛的MIP在500倍放大条件下的表面形态,其为块状颗粒,具有不规则的形貌特征。这是由于合成的印记聚合物经过粉碎研磨导致了外形的不规则。图2(b)、图2(c)分别为洗脱后MIP和NIP放大10 000倍的SEM照片。比较可知,MIP的表面较为粗糙,而NIP的表面呈现结构致密的形态。这是由于MIP中山奈素与4-VP的复合物在洗脱出模板分子后,留下了大量的立体孔穴,呈现出凹凸不平的表面形态,这有利于模板分子的传递和附着,从而增加了MIP的吸附能力。

2.3 分子印记聚合物的红外光谱分析

经过洗脱后的MIP与NIP的红外图谱见图3。由图可知,MIP与NIP具有相似的吸收峰,定性说明加入模板分子未改变本体基团的种类和位置。在3441、3521 cm⁻¹处为N—H伸缩振动吸收峰,2948、2953、2519 cm⁻¹处为C—H伸缩振动吸收峰,1728 cm⁻¹为C=O的伸缩振动吸收峰,1637、1591、1475 cm⁻¹处为吡啶环的伸缩振动吸收峰,1475~1000 cm⁻¹内的杂峰为C—H的面内弯曲振动吸收峰。

与 NIP 相比, MIP 在 3521 cm^{-1} 的吸收峰较强, 说明 4-VP 的吡啶环与山奈素的酚羟基作用时产生 N—H, 因模板分子在洗脱后一般会有 5 % 左右永久包封于分子印记聚合物中^[12], 所以 MIP 在 N—H 处存在较强吸收峰。此外, MIP 在 $1636\sim 1475\text{ cm}^{-1}$ 处吡啶环的振动吸收峰也强于 NIP, 说明洗脱后的 MIP 中存在大量含有吡啶环的官能团, 为山奈素的酚羟基提供有效识别位点。而对于 NIP, 由于其聚合过程不含山奈素, 大量 4-VP 与 EDMA 发生共聚, 于是游离态的 4-VP 较少, 存在较弱吸收峰。



MIP: a. $\times 500$; b. $\times 10\,000$; NIP: c. $\times 10\,000$

图 2 扫描电镜分析

Fig.2 SEM of MIP and NIP

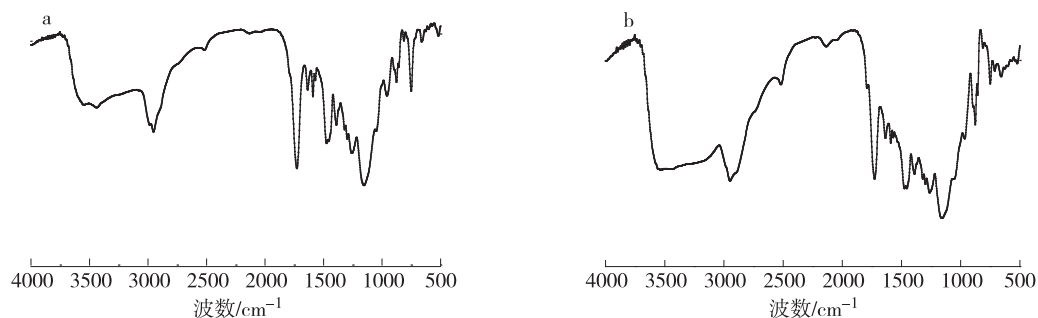


图 3 分子印记聚合物 MIP(a) 和 NIP(b) 的红外谱图

Fig.3 FT-IR spectra of MIP (a) and NIP (b)

2.4 分子印记聚合物的吸附动力学

分子印记聚合物 MIP 及空白聚合物 NIP 对山奈素的吸附动力学研究结果如图 4 所示。由图可知, MIP 在前 1 h 内吸附量迅速增加: 吸附 5 min 时, MIP 的吸附量为 $1\,080\text{ }\mu\text{g/g}$, 此时达到平衡吸附量的 72 %, 当吸附时间达到 60 min 时, MIP 的吸附量达到 $1\,500\text{ }\mu\text{g/g}$, 进入吸附平衡状态。这种现象是由于在吸附的初始阶段模板分子主要与浅层较易接近的结合点作用, 因此吸附速率较快; 当浅层结合点饱和后, 模板分子要传递到 MIP 内部与深层结合点作用, 因浅层吸附的模板分子会对传质过程产生附加的空间阻力, 吸附速率明显减慢, 达到吸附平衡时间较长^[3]。而 NIP 在 15 min 时就达到吸附平衡 ($462\text{ }\mu\text{g/g}$), 这是由于其不含与模板分子官能团相对应的立体孔穴, 因此吸附作用主要为非特异性吸附, 吸附量不大且在较短时间内达到吸附平衡。

2.5 分子印记聚合物的吸附等温线及 Scatchard 分析

为了研究分子印记聚合物 MIP 对山奈素的结合特性, 分别采用 MIP 及 NIP 对 6 种不同初始质量浓度的山奈素溶液进行吸附实验 (见图 5)。随着山奈素初始质量浓度从 2 mg/L 升高到 12 mg/L , MIP 对山奈素的吸附能力从 $543\text{ }\mu\text{g/g}$ 提高到 $2\,045\text{ }\mu\text{g/g}$, 而 NIP 对山奈素的吸附能力从 $265\text{ }\mu\text{g/g}$ 提高到 $560\text{ }\mu\text{g/g}$ 。结果表明, MIP 对模板分子的吸附量要明显高于 NIP。说明印记过程中, 山奈素可与 MIP 通过空间匹配和氢键作用加强 MIP 对模板分子的亲和力。而对于 NIP, 虽然山奈素也能与聚合物上的结合位点形成氢键, 但由于 NIP 不存在印记空穴, 作用点不具有匹配性, 因此 NIP 对模板分子的吸附能力

较弱。

分子印记研究中常用 Scatchard 模型^[13]来评定聚合物的吸附特性,其来源于生物化学中的抗体或受体动力学研究,利用饱和吸附实验结果获取吸附位点的结合类型、结合平衡常数及最大结合量等重要信息,从而定量的表示吸附过程。Scatchard 方程为:

$$\frac{Q}{c_e} = \frac{Q_{\max} - Q}{K_D}$$

式中: Q —平衡吸附量, $\mu\text{g/g}$; Q_{\max} —最大表观吸附量, $\mu\text{g/g}$; c_e —溶液中平衡质量浓度, mg/L ; K_D —结合位点的平衡解离常数, mg/L 。

将 Q/c_e 对 Q 作图,如果得到一条线性直线,说明体系存在同一类型的结合位点,根据线性关系斜率和截距可以求得 K_D 和 Q_{\max} 两个参数。如图 6 所示,将 MIP 的等温吸附实验结果代入 Scatchard 方程,经线性回归,得回归方程: $y = -0.1102x + 434$, 相关系数 $R^2 = 0.9982$, 表明 MIP 对山奈素有单一的结合位点,由线性方程的斜率和截距可求得解离常数 $K_D = 9.074 \text{ mg/L}$, 最大表观吸附量 $Q_{\max} = 3938 \mu\text{g/g}$ 。单一结合位点的产生原因是由于模板分子山奈素的酚羟基与功能单体 4-VP 的吡啶环产生 N—H 的键和作用,从而产生了特异性吸附,而且从 FT-IR 的表征结果也得到了这一推论的印证。然而 NIP 的 Scatchard 曲线只有 0.7861 的相关度,表明 NIP 对山奈素分子的吸附属于非选择性吸附。

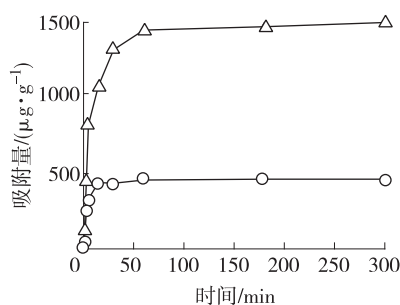


图4 MIP与NIP的吸附动力学曲线

Fig.4 Dynamic curves for the kaempferol adsorption onto MIP and NIP

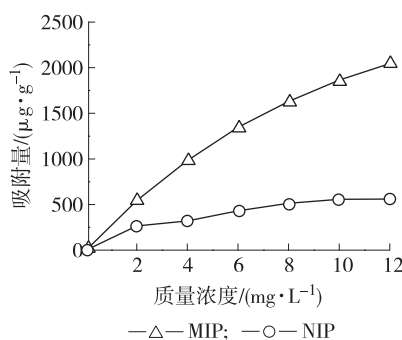


图5 MIP与NIP的吸附等温线

Fig.5 Adsorption isotherm of MIP and NIP

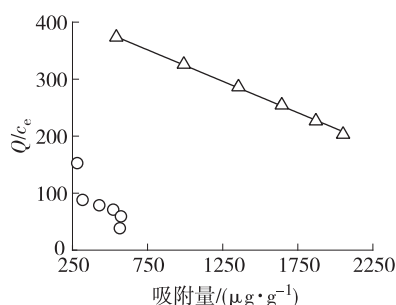


图6 山奈素在MIP与NIP上的Scatchard曲线

Fig.6 Scatchard plots of MIP and NIP

2.6 分子印记聚合物对山奈素吸附的选择性

通过分子印记聚合物在山奈素和芦丁混合液中对二者的吸附差异性来考察分子印记聚合物的选择性。

采用结合位点平衡解离常数(K_D)及分离因子(α)评价特异吸附性能。 K_D 的定义为:

$$K_D = C_p / C_e$$

式中: K_D —结合位点平衡解离常数, mL/g ; C_p —聚合物吸附底物的浓度,即聚合物对底物的吸附量 Q , mg/g ; C_e —吸附平衡时溶液中底物的浓度, g/L 。

分离因子 α 的定义为:

$$\alpha = \frac{K_{D_i}}{K_{D_j}}$$

式中: α —分离因子,一般 $\alpha > 1$ 时,才表示聚合物对模板分子具有特异吸附性能; K_{D_i} —模板分子的结合位点平衡解离常数, mL/g ; K_{D_j} —干扰分子的结合位点平衡解离常数, mL/g 。

所测得的 MIP 和 NIP 的对比吸附性能见表 1。

由此表 1 可知,制备的 MIP 对模板分子山奈素有较好的选择性吸附效果($\alpha = 3.24$),其吸附能力明显高于干扰分子芦丁($\alpha = 0.84$),这主要是因为尽管山奈素与芦丁的分子结构相似,但芦丁分子中多了一个香芸糖结构^[14],分子体积较山奈素大,致使其无法与洗脱后的印记孔穴相匹配,因此芦丁的结合

能力较山奈素弱很多。而对于 NIP,由于其不具备印记孔穴,所以无法进行山奈素与芦丁的分子识别。

表1 底物在 MIP 和 NIP 上的结合位点平衡解离常数(K_D)和分离因子(α)

Table 1 Equilibrium dissociation constant (K_D) and separation factor (α) of MIP and NIP

吸附剂 adsorbent	起始质量浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) initial mass concentration		最终质量浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) final mass concentration		K_D		α
	山奈素 kaempferol	芦丁 rutin	山奈素 kaempferol	芦丁 rutin	山奈素 kaempferol	芦丁 rutin	
MIP	5.00	5.00	3.90	4.60	282.05	86.96	3.24
NIP	5.00	5.00	4.40	4.30	136.36	162.79	0.84

3 结论

3.1 以山奈素为模板分子,4-VP 为功能单体制备的山奈素分子印记聚合物对山奈素具有较高的选择性和识别能力,在浓度为 6.4 mg/L 的山奈素乙醇溶液中,吸附量达到 1 500 $\mu\text{g/g}$,而空白聚合物虽有一定吸附能力,但不具备此印记特性。

3.2 通过 FT-IR 和 SEM 对印记聚合物进行表征,结果表明,印记过程中存在非共价键的相互作用,山奈素分子印记聚合物具有与山奈素分子相匹配的孔穴,且孔穴中含有有反应识别官能团。

3.3 采用 Scatchard 方程分析山奈素分子印记聚合物的吸附机理,结果表明印记聚合物对模板分子存在单一的结合位点,拟合分析得出其最大表观吸附量为 3 938 $\mu\text{g/g}$,解离常数为 9.074 mg/L,达到了较好的吸附效果。

3.4 通过芦丁为干扰因子的吸附特异性测定,表明印记聚合物在山奈素-芦丁体系中的分离因子达到 3.24,具备特异性分离性质,这为分离富集山奈素提供了新的方法。

参考文献:

- [1] WULFF G, SARHAN A. Use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 1972 (84): 341-345.
- [2] VLATAKIS G, ANDERSSON L I, MULLER R, et al. Drug assay using antibody mimics made by molecularly imprinting[J]. Nature, 1993, 361: 645-647.
- [3] 郑细鸣, 涂伟萍. 分子印记聚合物结合点的选择性修饰[J]. 化工学报, 2008, 59(11): 2929-2934.
- [4] FAIRHURST R E, CHASSAING C, VENN R F, et al. A direct comparison of the performance of ground, beaded and silica-grafted MIPs in HPLC and turbulent flow chromatography applications[J]. Biosens Bioelectron, 2004, 20(6): 1098-1105.
- [5] FERRER I, LANZA F, ANTAL T. Selective trace enrichment of chlorotriazine pesticides from natural waters and sediment samples using ter-butylazine molecularly imprinted polymers[J]. Anal Chem, 2000, 72(19): 3934-3941.
- [6] WULFF G. Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers[J]. Chem Rev, 2002, 102(1): 1-28.
- [7] TAN Y, YIN J, LIANG C, et al. A study of a new Tsm biomimetic sensor using a molecularly imprinted polymer coating and its application for the determination of nicotine in human serum and urine[J]. Bioelectrochem, 2001, 53(2): 141-148.
- [8] XIE J C, ZHU L L, LUO H P, et al. Direct extraction of specific pharmacophoric flavonoids from ginkgo leaves using a molecularly imprinted polymer for quercetin[J]. J Chromatogr A, 2001, 934(1/2): 1-11.
- [9] 陈丽娜, 都述虎, 马坤芳, 等. 分子印记技术在葛根素分离中的应用及溶剂对聚合物识别能力的影响[J]. 林产化学与工业, 2008, 28(6): 18-22.
- [10] RUSSO N, TOSCANO M, UCCELLA N. Semiempirical molecular modeling into quercetin reactive sites. Structural, conformational, and electronic features[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 3232-3237.
- [11] 林秋明, 何建峰, 刘岚, 等. 不同功能单体合成的分子印记聚合物识别性能的研究[J]. 化学研究与应用, 2007, 19(10): 1084-1087.
- [12] 张立永, 成国祥. 分子印记聚合物微球的制备及应用[J]. 高技术通讯, 2002(7): 108-110.
- [13] SCATCHARD G. The attractions of proteins for small molecules and ions[J]. Ann NY Acad Sci, 1949, 51: 660-672.
- [14] 戴云, 董学畅, 罗娅, 等. 芦丁的谱学性质及其测定烟草中的铁[J]. 云南民族学院学报: 自然科学版, 2001, 10(2): 338-339.