

山奈酚分子印迹聚合物微球的制备及性能研究

陈红艳¹ 宋可珂¹ 俞延滨² 胡伟武³

(1. 北京林业大学 理学院, 北京 100083; 2. 北京林业大学 环境科学与工程学院, 北京 100083;
3. 中国地质大学(北京) 期刊中心, 北京 100083)

摘要 为有效分离天然活性黄酮物质山奈酚, 制备山奈酚分子印迹聚合物微球, 以山奈酚为模板分子, 4-乙烯基吡啶为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 乙腈为溶剂, 采用扫描电镜、傅里叶红外光谱和热重分析进行表征, 对其进行吸附性能测定。得到了最优的聚合反应条件是: 反应温度 60 °C, 功能单体与溶剂的体积比为 1:20, 模板分子和功能单体的摩尔比为 1:8。合成的聚合物微球颗粒均匀, 耐热性能好, 对山奈酚具有良好的吸附能力, 实际最大饱和吸附量是 1.053 mg/g。Scatchard 分析表明聚合物对山奈酚存在特异性吸附性能。

关键词 山奈酚; 4-乙烯基吡啶; 分子印记聚合物; 微球; 吸附性能

中图分类号 O 63 文章编号 1007-4333(2014)01-0150-06 文献标志码 A

Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer microsphere for kaempferol

CHEN Hong-yan¹, SONG Ke-ke¹, YUN Yan-bin², HU Wei-wu³

(1. College of Science, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
2. College of Environmental Science and Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
3. The Journal Center, China University of Geosciences (Beijing), Beijing 100083, China)

Abstract In order to effectively separate the active natural flavonoids kaempferol (KAE), a molecularly imprinted polymer (MIP) microsphere was prepared in acetonitrile using KAE, 4-vinyl pyridine (4-VP) and ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as the template, functional monomer and cross-linker respectively. Afterwards, the synthesized MIP was analyzed by SEM, FTIR and TG. The parameters studied for kaempferol include adsorption kinetics and adsorption isotherm. The optimum synthesis conditions of the MIP microsphere were as follows: synthesis temperature was at 60 °C, the ratio of functional monomer to solvent was 1:20, and the ratio of template to functional monomer was 1:8. The experimental results showed that the MIP exhibited a favorable affinity for kaempferol, and the saturated capacity could reach to 1.053 mg/g. The Scatchard analysis revealed that the specific adsorption of kaempferols existed in MIP.

Key words kaempferol; 4-vinyl pyridine; molecular imprinting polymer; microsphere; adsorption properties

山奈酚是黄酮类化合物, 是一种天然活性物质, 具有提高免疫力, 抗肿瘤, 抗氧化等功效^[1-3]。如何从复杂的中草药体系中高效提取、分离黄酮类物质, 提高选择性, 适合工业生产是当今研究的重点。有关黄酮类化合物的分离纯化方法常用的有层析法, 高速及高效逆流色谱, 大孔树脂吸附法, 双水相萃取法, 毛细管电泳法和分子印迹法等^[4-9]。分子印迹技

术是制备印迹聚合物, 用洗脱的方法脱除去包埋在聚合物复合体中的模板分子。聚合物被洗脱后, 模板分子与功能单体的特异性结合位点被暴露出来, 留下和模板分子相匹配的“空穴”^[10]。聚合物就是利用这些特异性的“空穴”, 通过空间结构和相互作用力选择性地结合模板分子, 从含有模板分子的混合物中将模板分子提取出来。

收稿日期: 2013-05-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31070490); 国家林业局 948 项目(2009-4-62)

第一作者: 陈红艳, 副教授, 博士, 主要从事物质结构和性能研究, E-mail: chyxfu@sina.com

分子印迹技术已被用于分离生物碱、中草药的活性成分等天然产物的分离和提取^[11-12]。有研究表明采用本体聚合法合成出山奈酚分子印迹聚合物^[13]，但以这种方法合成出的山奈酚聚合物需要研碎打磨，不仅耗时耗力，而且聚合物可用率较低。本研究拟改进山奈酚印迹聚合物的合成方法，以山奈酚为模板分子，4-乙烯基吡啶为功能单体，采用沉淀聚合法，对合成温度、溶剂用量及模板分子和功能单体的摩尔比进行考察，直接合成出山奈酚聚合物微球，提高聚合物的利用率和吸附性能，旨在为分子印迹技术在山奈酚等中草药天然产物活性成分的分离和提取领域的进一步应用提供理论基础，使其适合于工业上的分离提纯。

1 试验材料与仪器

山奈酚(KAE)，分析纯(天津百灵威有限公司)；4-乙烯基吡啶(4-VP)，分析纯(意大利 Alfa 公司)；乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)，分析纯(美国 Acros 公司)；偶氮二异丁氰(AIBN)，分析纯(国药集团北京试剂公司)。

UNICO UV-2000 型紫外分光光度计(UNICO 公司(上海))；QUANTA 200 型扫描电子显微镜(美国 FEI 公司)；VECTOR 22 FTIR 型傅里叶红外光谱仪(瑞士 Bruker 公司)；Perkin-Elmer Pyris-1 型热重分析仪(美国 Perkin 公司)。

2 试验方法

2.1 山奈酚印迹聚合物(MIP)的制备

称取适量模板分子 KAE 和功能单体 4-VP 溶解于一定量的溶剂乙腈中，将上述溶液置于三口瓶中常温振荡 3 h 后，加入适量交联剂 EDMA 和引发剂 AIBN，充分混溶，通氮气 30 min，将三口瓶密封。将密封好的三口瓶在油浴中聚合 24 h。采用索氏提取器进行洗脱，以 V(甲醇)：V(乙酸)=9：1 的溶液为洗脱剂，除去模板分子，干燥至恒重，所得聚合物即为山奈酚分子印迹聚合物(MIP)。空白聚合物(non-imprinted polymer, NIP)的制备除不加模板分子 KAE 外，其他均与印迹聚合物相同。

2.2 聚合条件的优化

设定不同的反应温度、溶剂用量及模板分子和功能单体的摩尔比，探讨这 3 个变量对聚合物合成及吸附性能的影响。吸附性能以最大平衡吸附量 Q 为考察指标，确定最优的聚合条件。

2.3 山奈酚印迹聚合物微球的表征及吸附性能测定

2.3.1 聚合物表征

在最佳聚合反应条件下，合成出山奈酚聚合物微球，采用扫描电子显微镜，对洗脱干燥后的 MIP 和 NIP 的表面形态进行分析观察。

采用 KBr 压片制样，在分辨率为 4 cm^{-1} ， $4\ 000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 区间内用傅里叶变换红外光谱仪扫描 MIP 和 NIP 的吸收。

采用 Perkin-Elmer Pyris-1 型热重分析仪，测试条件为：流动氮气气氛，升温速率 $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 。

2.3.2 吸附动力学测定

称取一系列等量的 MIP(每份 30 mg)，置于磨口锥形瓶中，分别加入相同浓度的 KAE 乙醇溶液，恒温摇床密闭振荡，从振荡开始时计时，分别在 3、5、10、20、30、40、50、60、80、120、240 和 300 min 时测定室温下不同吸附时间内 MIP 对 KAE 的吸附量，以吸附量 Q 对时间作图。计算公式如下

$$Q = \frac{(C_0 - C_e) \times V}{W}$$

式中：Q 为吸附量，mg/g； C_0 为起始质量浓度，mg/L； C_e 为平衡质量浓度，mg/L；V 为溶液体积，L；W 为吸附剂的质量，g。

2.3.3 吸附等温线测定

称取 30 g MIP 和 NIP 各 10 份，置于锥形瓶中，分别加入 10 mL 质量浓度为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 mg/L KAE 乙醇溶液，恒温摇床密闭振荡 24 h 后，离心，取上清液于 370 nm 处测定其质量浓度。

3 结果与分析

3.1 最佳聚合条件的优化结果

3.1.1 反应温度的选择结果

分别在 55、60、65 和 70 $^\circ\text{C}$ 的温度下，按照表 1 的加料方式，模板分子 KAE 0.5 mmol，功能单体 4-VP 2 mmol，进行聚合物合成试验，分别记为 MIP 1、MIP 2、MIP 3 和 MIP 4。

试验结果，在 55 和 70 $^\circ\text{C}$ 的温度下，合成出液态的 MIP 1 和 MIP 4；在 60 和 65 $^\circ\text{C}$ 温度下，合成出固态的 MIP 2 和 MIP 3。原因是：温度过低时，达不到聚合所需的温度，导致聚合反应不能发生；而温度升高时，引发剂半衰期缩短，分解速率常数增大，链引发、链增长速率随之增加。同时，温度增加，链转移常数增加，使平均聚合度降低，即聚合物相对分子

表1 不同温度对MIP合成的影响

Table 1 Effect of different reaction temperature on MIP synthesis

聚合物 Polymer	MIP 1	MIP 2	MIP 3	MIP 4
模板分子 KAE/(mmol) Template molecule kaempferol	0.5	0.5	0.5	0.5
功能单体 4-VP/(mmol) Functional monomer 4-vinyl pyridine	2.0	2.0	2.0	2.0
溶剂乙腈量/mL Solvent acetonitrile	40	40	40	40
反应温度/℃ Synthesis temperature	55	60	65	70
最大平衡吸附量/(mg/g) Maximum adsorption capacity	—	0.507	0.315	—

质量降低。综合以上情况,聚合温度选择为 60 ℃。

3.1.2 溶剂量的选择

选择以乙腈为溶剂,按照表 2 的投料方法,合成出聚合物,分别记为 MIP 5、MIP 6、MIP 7 及 MIP 8,并考察了 4 种聚合物的最大平衡吸附量。

由表 2 可以看出:随着溶剂乙腈量的加大,聚合

物的最大平衡吸附量逐渐的增大,当功能单体与溶剂体积比为 1:20 和 1:25 时,最大平衡吸附量差别不是很大。制得的聚合物 MIP 5 和 MIP 6 质地偏硬,有块状固体,质地不均匀,说明溶剂乙腈量的较小时,反应物分散不好,不利于微球的形成。所以综合考虑功能单体与溶剂合适的体积比为 1:20。

表2 不同溶剂量对MIP合成的影响

Table 2 Effect of different dosage solvent on MIP synthesis

聚合物 Polymer	MIP 5	MIP 6	MIP 7	MIP 8
模板分子 KAE/(mmol) Template molecule kaempferol	0.5	0.5	0.5	0.5
功能单体 4-VP/(mmol) Functional monomer 4-vinyl pyridine	2.0	2.0	2.0	2.0
溶剂乙腈量/mL Solvent acetonitrile	20	30	40	50
V(功能单体)/V(溶剂体积) Functional monomer/solvent	1:10	1:15	1:20	1:25
反应温度/℃ Synthesis temperature	60	60	60	60
最大平衡吸附量/(mg/g) Maximum adsorption capacity	0.262	0.407	0.515	0.526

3.1.3 模板分子及功能单体不同摩尔比的试验结果

按照表 3 的投料方式,合成出聚合物,分别记

为 MIP 9、MIP 10、MIP 11 及 MIP 12,并考察了 4 种聚合物的最大平衡吸附量。

表3 模板分子及功能单体不同摩尔比对MIP合成的影响

Table 3 Effect of ratio of template to functional monomer on MIP synthesis

聚合物 Polymer	MIP 9	MIP 10	MIP 11	MIP 12
模板分子 KAE/(mmol) Template molecule kaempferol	0.5	0.5	0.5	0.5
功能单体 4-VP/(mmol) Functional monomer 4-vinyl pyridine	2.0	3.0	4.0	5.0
模板分子/功能单体摩尔比 Template/functional monomer	1:4	1:6	1:8	1:10
溶剂乙腈量/mL Solvent acetonitrile	40	40	40	40
反应温度/℃ Synthesis temperature	60	60	60	60
最大平衡吸附量/(mg/g) Maximum adsorption capacity	0.797	0.863	1.052	0.936

由表 3 可以看出:模板分子和功能单体摩尔比是 1:8 时,所合成的聚合物的吸附量最大,达到 1.052 mg/g。功能单体量过高或是过低,吸附量下降。原因可能是 KAE 中含有 4 个酚羟基,5-位上的酚羟基与 4-位上的羰基形成分子内氢键,3,7,4'-位

的酚羟基呈弱酸性,与碱性功能单体 4-VP 产生静电作用(图 1)。当 4-VP 用量过少时,二者所发生的酸碱作用少,模板分子不能固定,所以吸附量比较低;但如果 4-VP 含量太高时,单体本身会发生聚合反应,具有记忆的“空穴”印迹聚合物减少,导致吸附

量下降。所以,选择模板分子和功能单体的摩尔比是 1 : 8。

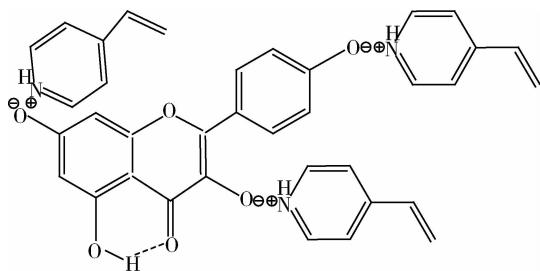


图1 模板分子(KAE)和功能单体(4-VP)的相互作用
Fig. 1 Proposed interaction between monomer (KAE) and the template (4-VP)

综合以上几点因素,选择的最优反应条件是:反应温度 60 ℃;溶剂和功能单体的体积比为 1 : 20;模板分子和功能单体的摩尔比为 1 : 8,在最佳试验条件下合成的聚合物吸附性能好。

3.2 聚合物微球的形貌表征及吸附性能测定结果分析

分别使用电镜扫描、傅里叶红外光谱仪及热比重分析仪对最佳试验条件下合成的聚合物进行表征,并对其进行吸附动力学和吸附等温线测定,测定结果采用 Scatchard 曲线进行分析。

3.2.1 电镜扫描结果

图 2 显示了在不同的放大倍数下聚合物 MIP 的形貌特征(图 2(a)、(b)分别为 MIP 洗脱后放大不同数倍)。从图中可以看出:聚合物呈微球状,且颗粒较均匀,说明在选择的最佳试验条件下能制备得到球状颗粒。

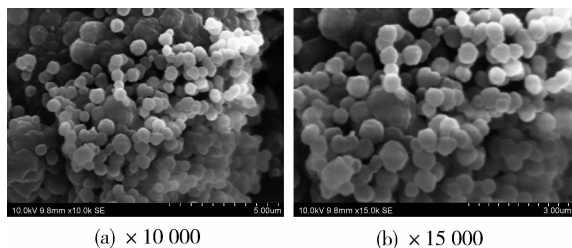


图2 扫描电镜分析

Fig. 2 Surface morphologies of MIP

3.2.2 红外扫描结果

测得的 MIP 及相应的空白聚合物 NIP 的红外光谱图如图 3 所示。IR 吸收峰指配如下:1 750 cm^{-1} 为 C=O 的伸缩振动吸收峰,1 600 cm^{-1} 左右是吡啶环的骨架振动吸收,2 900 cm^{-1} 处为 C-H

伸缩振动吸收峰,3 400 cm^{-1} 是羟基 O-H 的伸缩振动吸收峰。比较 MIP 和 NIP 的红外吸收图谱可知,二者的特征吸收峰没有太大的差别,说明模板分子的加入并没有改变聚合物的主要官能种类。在 3 400 cm^{-1} MIP 有微弱的吸收,原因可能是在模板分子的洗脱过程中,有微量的模板分子会包埋在聚合物中。

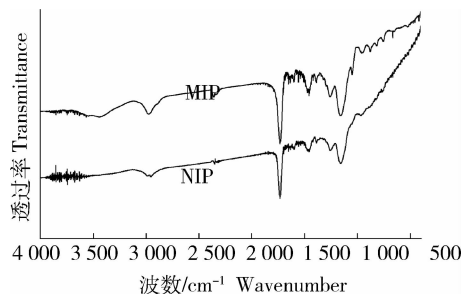


图3 球状 MIP 及相应的空白聚合物 NIP 的红外光谱图

Fig. 3 FTIR spectra of MIP and NIP

3.2.3 热比重分析结果

为研究球形聚合物 MIP 的热稳定性,TG-DTG 热分析方法测定了在氮气气氛、线性升温条件下,其重量随温度变化的特性,所得 TG-DTG 曲线如图 4 所示。

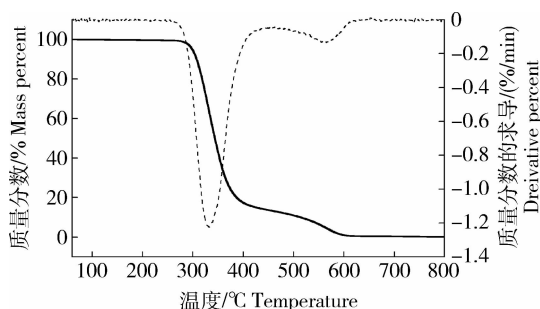


图4 球状 MIP 的 TG-DTG 图

Fig. 4 TG-DTG of MIP

在 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 等速升温条件下,TG-DTG 分析结果表明,在 250 $^{\circ}\text{C}$ 之前聚合物对热是稳定的,耐热性能好。TG 曲线上有 2 个失重阶段,第 1 次主要失重在 280~410 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,失重量达 87%。第 2 次主要失重在 550~600 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,失重量达 11%。温度高于 600 $^{\circ}\text{C}$ 时,聚合物已经完全分解成气体。

3.2.4 吸附动力学试验

按照 2.3.2 的试验方法,对 MIP 进行吸附动力学测定,测定结果如图 5 所示。

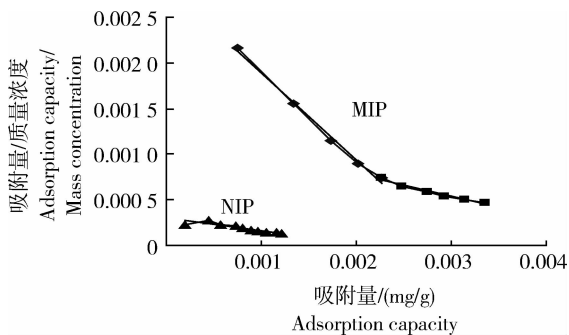


图5 MIP与NIP对KAE的吸附动力学曲线

Fig. 5 Dynamic curves for KAE adsorption on MIP and NIP

从图中可以看出, MIP对KAE的吸附量在40 min内增加很快, 随着吸附时间的增加, 其吸附量增速逐渐降低, 在80 min后基本接近饱和。这可能是由于聚合物表面的孔穴有利于聚合物对KAE的快速吸附, 因而在开始阶段聚合物的吸附速率较快, 在40 min时吸附量达到70%以上, 但表面孔穴达到吸附饱和后, KAE向聚合物内部孔穴的传质受到一定的阻力, 其吸附速度下降, 在较长时间后达到吸附平衡。从图4可以看出, MIP平衡吸附量达到1.052 mg/g。

3.2.5 吸附等温线测定

吸附等温线能很好的反映聚合物的吸附性能^[14], 为研究MIP对山奈酚的结合特异性, 按照2.3.3的方法, 分别采用MIP及NIP对10种不同初始质量浓度的山奈酚乙醇溶液进行吸附试验, 试验结果如图6所示。

从图6可以看出, 对于相同浓度的山奈酚溶液, 和相应的空白对照物相比, MIP的吸附量比较高, 原因是每种MIP聚合物上, 有模板分子山奈酚留下的和其结构特征相对应的记忆性的“空穴”, 通过这些空穴, MIP可对模板分子进行特异性吸附; 然而, 空白聚合物NIP合成时, 没有加入山奈酚, 合成的聚合物上自然不具有这种特异性吸附能力的位点, 吸附均为非特异性吸附, 吸附能力比较低。

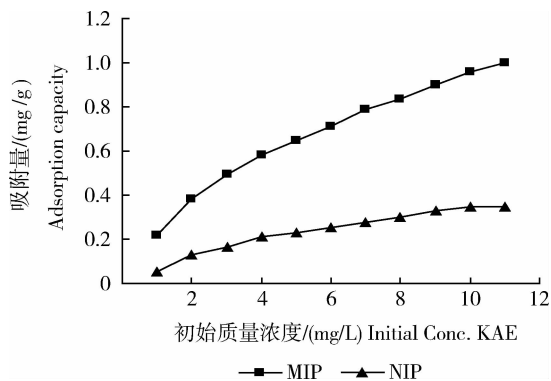


图6 MIP与NIP吸附等温线测定

Fig. 6 Adsorption isotherm of MIP and NIP

对吸附等温线所得数据进行Scatchard分析, 吸附数据经分析得到平衡常数及最大吸附量等重要参数, 对聚合物吸附性能高低进行评价^[15-16]。Scatchard方程方程式如下

$$Q/C_e = (Q_{max} - Q)/K_D$$

式中: Q 为吸附量; C_e 为平衡浓度; Q_{max} 为最大表观吸附量; K_D 为平衡常数。

K_D 的大小是评价聚合物吸附能力高低的一个重要指标, K_D 越小, 特异性吸附能力越强。以 Q/C_e 对 Q 作图可得到图7, 图中 Q/C_e 对 Q 呈非线性关系。但图7中高浓度和低浓度时分别存在不同的线性关系。由线性方程的斜率和截距可求得相应的参数如表4, 从表可以看出, MIP对山奈酚高亲和位点

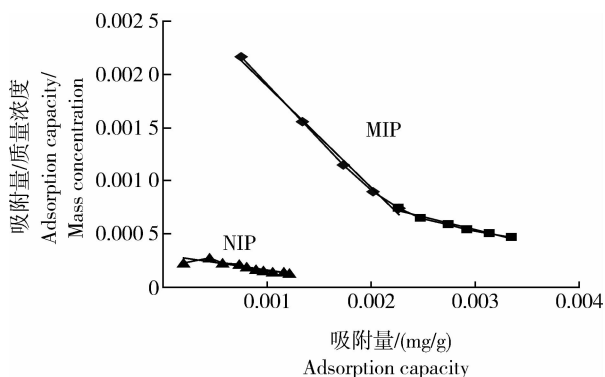


图7 KAE在MIP和NIP上的Scatchard曲线

Fig. 7 Scatchard plots of KAE on MIP and NIP

表4 Scatchard曲线的分析结果

Table 4 Results of scatchard analysis

结合位点 Binding site	线性方程 Linear equation	$K_D/(mmol/L)$	$Q_{max}/(mg/g)$
高亲和力 High affinity binding	$Y = -0.9612X + 0.0029 (R^2 = 0.9946)$	1.040	0.8589
低亲和力 Low affinity binding	$Y = -0.2405X + 0.0013 (R^2 = 0.9259)$	4.158	1.4315

的 K_D 值为 1.040 mmol/L, 低亲和位点的 K_D 值为 4.158 mmol/L, 最大表观吸附量是 1.431 5 mg/g。这表明聚合物 MIP 对山奈酚具有特异性吸附性能。

3.2.6 印迹聚合物对底物吸附选择性

选用山奈酚结构相似的槲皮素(图 8)为底物, 以乙醇为溶剂, 研究山奈酚印迹聚合物对底物的选择结合特性, 使用平衡结合试验测定最大吸附量, 结果见表 5。可得山奈酚印迹聚合物分离因子 α (聚合物对模板的吸附量/印迹聚合物对其他底物的吸附量)为 1.75, 印迹效率 β (印迹聚合物分离因子/空白聚合物分离因子)为 1.65, 表明山奈酚印迹聚合物相比空白聚合物具有更强的对底物的选择吸附性能。

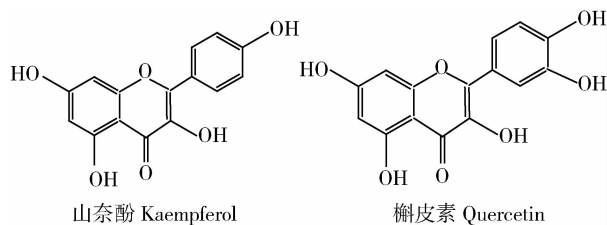


图 8 山奈酚与槲皮素相似的分子结构

Fig. 8 Similar structures of kaempferol and quercetin

表 5 MIP 与 NIP 对山奈酚和槲皮素的吸附性能

Table 5 Adsorption capabilities of MIP and NIP to kaempferol and quercetin

聚合物 Polymer	吸附量/(mg/g) Adsorption capacity		α	β
	山奈酚 Kaempferol	槲皮素 Quercetin		
	MIP	1.26		
NIP	0.35	0.33	1.06	—

4 结 论

以山奈酚为模板分子, 4-VP 为功能单体, 乙腈为溶剂, 采用沉淀聚合法合成山奈酚分子印迹聚合物微球的最佳聚合条件是: 反应温度 60 °C, 功能单体与溶剂合适的体积比为 1 : 20, 模板分子和功能单体的摩尔比为 1 : 8, 在此条件下合成出的分子印迹聚合物对山奈酚具有特异性吸附能力, 最大表观吸附量 1.431 5 mg/g, 最大平衡吸附量 1.052 mg/g。与本体聚合法合成的 MIP 相比, 其在外貌形态上呈微球状, 为均匀颗粒, 对山奈酚进行吸附试验不需要

打碎研磨, 提高了聚合物的利用率, 节省了时间; 聚合物微球耐热性好, 特异性吸附能力较高, 印迹聚合物微球易于制备且便宜, 表明分子印迹技术在山奈酚的富集和痕量分析领域具有潜在的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 慕静静. 山奈酚对小鼠免疫功能的影响及对海仁酸致痛小鼠的免疫调节作用[D]. 广州: 暨南大学, 2010
- [2] 陈育华, 周克元, 袁汉尧. 山奈酚抑制人鼻咽癌 CNE-2 细胞增殖及诱导其凋亡的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2011 (34): 4265-4268, 4274
- [3] 覃惠敏, 陈全斌, 梁永生. 葫芦科植物叶黄酮成分分析及抗氧化能力研究[J]. 广西热带农业, 2009(4): 25-28
- [4] 余婷婷, 鲁晓翔, 连喜军, 等. 玉米须黄酮类化合物的薄层层析及紫外光谱研究[J]. 食品科学, 2008, 29(348): 477-481
- [5] Yuan Y, Hou W, Tang M, et al. Separation of flavonoids from the leaves of *oroxylum indicum* by HSCCC [J]. *Chromatographia*, 2008, 68, 885-892
- [6] 林天慕, 管清香, 张三奇, 等. 大孔吸附树脂分离纯化独一味总黄酮的研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 39(4): 264-266
- [7] 赵晓莉, 岳红, 张颖, 等. 柿叶黄酮在双水相体系中的分配行为[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(1): 83-86
- [8] Yang H P, Yue M E, Shi Y P. CZE Determination of flavonoids in *halenia elliptica*, *Chromatographia*[J]. 2006, 63: 449-452
- [9] 陈移姣. 生物碱分子印迹聚合物的制备与其性能研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2005
- [10] Xie J, Chen L, Li C, et al. Selective extraction of functional components derived from herb in plasma by using a molecularly imprinted polymer based on 2,2-bis(hydroxymethyl) butanol trimethacrylate[J]. *Journal of Chromatography B*, 2003, 788 (2): 233-242
- [11] 林喆, 罗艳, 原忠. 分子印迹技术在中药活性成分分离纯化中的应用[J]. 中草药, 2007 (03): 457-460
- [12] 陈立娜, 都述虎, 马坤芳, 等. 分子印迹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(3): 18-22
- [13] 贺敏强, 万金城, 孟敏佳, 等. 山奈酚分子印迹聚合物的制备及其性能表征[J]. 化学世界, 2010 (11): 670-674
- [14] Wang J, Huang C, Allen H E, et al. Adsorption characteristics of dye onto sludge particulates[J]. *J Colloid Interface Sci*, 1998, 208(2): 518-528
- [15] Schwarz G. Some general aspects regarding the interpretation of binding data by means of a Scatchard plot[J]. *Eur Biophys J*, 1976, 2(1): 1-12
- [16] Vieira A. ELISA-based assay for scatchard analysis of ligand-receptor interactions[J]. *Mol Biotechnol*, 1998, 10(3): 247-250