

青蒿素分子印迹聚合物分子识别性研究

李小燕^{1,2}, 仝海娟¹, 雷福厚^{1,2}, 庞洁¹, 俸吉¹, 李梅¹

1. 广西民族大学化学与生态工程学院, 广西 南宁 530006

2. 广西林产化学品开发与应用重点实验室, 广西 南宁 530006

摘要: **目的** 合成对青蒿素具有特异识别能力的分子印迹聚合物。**方法** 采用分子印迹技术合成了以青蒿素为模板分子, 丙烯酰胺为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂的青蒿素分子印迹聚合物。运用平衡结合试验研究了聚合物的吸附特性和选择识别能力。**结果** Scatchard 模型分析表明, 该分子印迹聚合物在识别青蒿素分子的过程中存在两类不同的结合位点。高亲和力结合位点的离解常数 $K_{d1}=1.87$ mmol/L, 最大表观结合常数 $Q_{MAX1}=27.99$ μ mol/g; 低亲和力结合位点的离解常数 $K_{d2}=48.5$ mmol/L, 最大表观结合常数 $Q_{MAX2}=334.4$ μ mol/g。**结论** 结合底物的实验结果表明, 青蒿素分子印迹聚合物对青蒿素具有良好的特征吸附和选择识别性能, 为天然产物中高效分离纯化活性成分青蒿素提供了一种新型材料。

关键词: 青蒿素; 分子印迹聚合物; 分子识别; 离解常数; 最大表观结合常数

中图分类号: 284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)04-0795-04

Study on recognition properties of artemisinin molecular imprinted polymer

LI Xiao-yan^{1,2}, TONG Hai-juan¹, LEI Fu-hou^{1,2}, PANG Jie¹, FENG Ji¹, LI Mei¹

1. College of Chemistry and Ecological Engineering, Guangxi University for Nationalities, Nanning 530006, China

2. Key Laboratory of Development & Application of Forest Chemicals of Guangxi, Nanning 530006, China

Abstract: **Objective** To prepare a molecular imprinted polymer with specific recognition ability for artemisinin. **Methods** A molecular imprinted polymer was prepared by the molecular imprinting technique using artemisinin as the template molecular, acrylamide as the functional monomer, and ethylene glycol dimethacrylate as the cross-linking agent. The molecular imprinted polymer was investigated in equilibrium binding experiment to evaluate its adsorption property and selective recognition. **Results** Scatchard analysis showed that two classes of binding sites were formed in the artemisinin molecular imprinted polymer under the studied concentrations. The dissociation constant (K_d) and the apparent maximum binding constant (Q_{max}) were $K_{d1}=1.87$ mmol/L, $Q_{max1}=27.99$ μ mol/g for high affinity binding sites and $K_{d2}=48.5$ mmol/L, $Q_{max2}=334.4$ μ mol/g for low affinity binding sites, respectively. **Conclusion** The experiments of binding different substrates indicate that the imprinted polymer possess a high selectivity and a high recognition ability for artemisinin. It's likely to be a novel material for separation and purification of active ingredients from natural products.

Key words: artemisinin; molecular imprinted polymer; molecular recognition; dissociation constant; apparent maximum binding constant

分子印迹技术(molecular imprinting technique, MIT)是近年来发展起来的一种新型分离技术。分子印迹聚合物(molecular imprinted polymer, MIP)是由模板分子(印迹分子)与功能单体通过静电作用、疏水作用、氢键等非共价作用力形成分子复合物,加入交联剂引发聚合,使该分子复合物结合在聚合物中,得到包含有模板分子的高分子聚合物。去除模板分子后,聚合物母体中留下与模板分子结

构互补的立体空穴和能与模板分子相互作用的功能基团,从而对模板分子表现出特异选择性和吸附能力^[1]。分子印迹聚合物凭借其稳定的物理化学性能以及对印迹分子的特异识别能力在环境、医药、化工、食品卫生等诸多领域显现出广泛的应用前景,近年来在天然药物活性成分分离纯化中的应用受到广泛关注^[2-4]。

青蒿素是我国科学家从菊科蒿属植物青蒿中提

收稿日期: 2011-08-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960306, 21165003); 广西自然科学基金资助项目(2010GXNSFA013047); 广西教育厅科研项目(200911LX84)

作者简介: 李小燕(1961—), 女, 广西人, 研究员, 主要从事现代分离分析的教学和科研工作。Tel: (0771)3260558 E-mail: lixiaoyan73515@163.com

取, 并获得国际承认的具有自主知识产权的强效抗疟特效药。随着对青蒿素类药物药理作用研究的不断深入, 证实青蒿素类药物均具有抗疟、抗孕、抗纤维化、抗血吸虫、抗弓形虫、抗心律失常和抗肿瘤细胞毒性等作用^[5-8]。因此, 青蒿素类药物具有广阔的开发前景和重大科学研究价值。青蒿素的提取分离方法主要有水蒸气蒸馏、有机溶剂浸提、索氏提取、超声波提取、微波辅助提取、超临界流体提取等; 青蒿素的纯化一般用重结晶法^[9-14], 而采用分子印迹技术分离纯化青蒿素的研究尚未见报道。

本实验以青蒿素为模板分子, 丙烯酰胺为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 采用分子印迹技术首次合成出具有分子识别能力的青蒿素分子印迹聚合物; 运用平衡结合试验研究了该分子印迹聚合物的吸附特性和选择识别能力; 通过 Scatchard 模型, 对该分子印迹聚合物形成的结合位点进行了分析, 为后续研究青蒿素的分离纯化提供了实验依据。

1 材料

1.1 仪器

752 型紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); HY-2A 型数显多用调速振荡器 (江苏金坛市医疗仪器厂); KQ-100DE 数控型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 800 型离心沉淀器 (上海手术器械厂)。

1.2 试剂

青蒿素购于广西金秀寇峰青蒿开发有限公司, 质量分数为 99.0%; 青蒿素对照品 (批号 100202-200603) 购于中国药品生物制品检定所; 双氢青蒿素对照品 (批号 100184-200401) 购于中国药品生物制品检定所; 十二烷基硫酸钠 (SDS), 分析纯, 购于广东汕头市西陇化工厂; 偶氮二异丁腈 (AIBN), 分析纯, 购于广东光华化学有限公司; 丙烯酰胺 (AM), 化学纯, 购于国药集团化学试剂有限公司; 乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EGDMA), 分析纯, 购于抚顺安信化学有限公司; 其余试剂均为分析纯; 青蒿素分子印迹聚合物及非印迹聚合物由本课题组自主研制。

2 方法

2.1 MIP 的制备及处理

分别对模板分子、功能单体、交联剂的投料比例、反应时间和反应温度、SDS 浓度、转速等 MIP 的反应条件及聚合物处理方法进行优化^[4,15], 得到

最佳制备方法及处理方法如下: 准确称取 0.282 3 g 青蒿素、0.284 3 g AM、3.964 g EGDMA、0.25 g AIBN 置于 100 mL 烧杯, 加入 20 mL 醋酸乙酯、5 mL 大豆油, 超声溶解, 将其缓缓加入到装有 150 mL 的 0.05% SDS 溶液的三颈瓶中, 在搅拌速度为 300 r/min, 温度为 75~80 °C 下反应 1 h 后, 加热至 95 °C 继续反应 1 h, 停止反应, 将产物冷却至室温, 抽滤, 聚合物为白色圆球状颗粒 (40~60 目)。用蒸馏水洗涤聚合物, 装入索氏提取器中, 分别用冰醋酸和甲醇洗脱 24 h 和 12 h, 除去模板分子。取出聚合物, 保存于乙醇中, 备用。制备非分子印迹聚合物 (non-molecular imprinted polymer, NMIP) 的方法除不加模板分子外, 其他与制备 MIP 相同。

2.2 平衡结合量的测定

取聚合物 0.2 g, 精密称定, 置具塞三角瓶中, 准确加入 20 mL 已知浓度底物的 60%乙醇溶液, 在室温下振荡 3 h, 将吸附后的底液高速离心后, 取上清液, 用紫外分光光度法^[16]测定溶液中青蒿素的浓度。根据结合前后底液浓度的变化, 按下式计算 MIP 及 NMIP 对底物的结合量 (Q) = $(C_0 - C_1) \times V/W$ 。式中 C_0 为结合前青蒿素溶液的浓度, C_1 为结合后青蒿素溶液的浓度, V 为底液体积, W 为聚合物质量。

2.3 分子识别试验

2.3.1 MIP 对模板分子的特异识别性能 MIP 的特异识别性能用静态结合分配系数 (K_D) 和识别因子 (θ) 表征。 $K_D = Q/C_e$, 其中 Q 表示底物在聚合物上的结合量; C_e 表示底物在溶液中的平衡浓度。 $\theta = K_{MIP}/K_{NMIP}$ ^[17], 其中 K_{MIP} 和 K_{NMIP} 分别表示 MIP 与 NMIP 的分配系数。

2.3.2 MIP 的选择性评价 用选择因子 (α) 表征 MIP 的选择性能^[18]。以结构类似物 B (双氢青蒿素) 作为模板分子 A (青蒿素) 的竞争底物, 分别以 MIP 和 NMIP 作固相萃取剂, 通过平衡结合试验对分子印迹聚合物的选择性进行表征。

分别取 MIP 和 NMIP 各 0.2 g, 精密称定, 置具塞三角锥形瓶中, 分别准确加入 20 mL 青蒿素和双氢青蒿素的 60%乙醇溶液, 按“2.2”项下进行结合试验, 计算 MIP 和 NMIP 对青蒿素和双氢青蒿素的结合量。

将 MIP 对底物最大结合量 Q 减去 NMIP 最大结合量 Q_0 作为 MIP 对底物的特异性结合量, 将 MIP 对青蒿素的特异性结合量与 MIP 对双氢青蒿素的特

异性结合量的比值定义为 α , $\alpha = (Q_A - Q_{A0}) / (Q_B - Q_{B0})$, 式中 α 为 MIP 对青蒿素的选择因子; Q_A 为 MIP 对模板 A 的最大结合量, Q_{A0} 为 NMIP 对模板 A 的最大结合量, Q_B 为 MIP 对竞争物 B 的最大结合量, Q_{B0} 为 NMIP 对竞争物 B 的最大结合量。

3 结果

3.1 模板分子与功能单体的作用方式

研究分子印迹聚合物的识别机制, 对于解释聚合物的印迹过程和识别现象非常重要。印迹原理基于自组装过程中的主客体复合物的识别位点的相互作用。青蒿素分子中的氧原子可以和功能单体丙烯酸上的氨基以氢键或分子间作用力的形式结合, 形成单体-模板分子复合物, 加入交联剂, 引发聚合后此单体-模板分子复合物被固定在聚合物网络中。除去模板分子, 聚合物母体中便留下与模板分子大小相同、在空间结构上完全匹配的立体空穴, 成为结合模板分子“预定”的识别位点。模板分子与功能单体可能的自组装过程和印迹聚合物的识别过程见图 1。

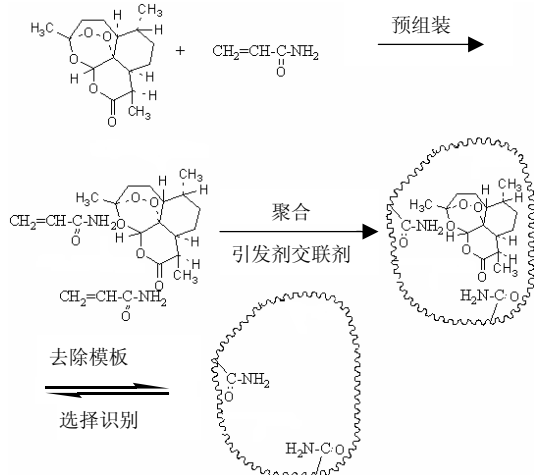


图 1 青蒿素印迹示意图

Fig. 1 Imprinting process of artemisinin

3.2 聚合物对青蒿素的结合行为及 Scatchard 模型分析

运用平衡结合试验研究青蒿素在 MIP 和 NMIP 上的结合行为。取一组质量相同的 MIP 和 NMIP, 按“2.2”项下方法在室温下测定它们对不同浓度青蒿素的结合量, 绘制结合等温线, 结果见图 2。

MIP 的平衡结合量明显大于 NMIP 的结合量。说明组成相同的两种聚合物的空间存在明显的差异, MIP 包含有固定排列的功能基空间空穴, 两种

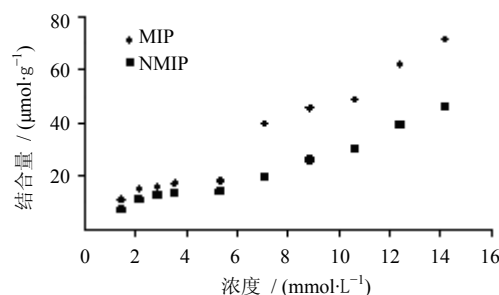


图 2 青蒿素 MIP 及 NMIP 的结合等温线

Fig. 2 Binding isotherm curves of artemisinin-MIP and NMIP

聚合物吸附量上的差值主要来源于这种空穴的选择吸附性。

分子印迹研究中常用 Scatchard 模型来评价聚合物的结合特性, 通过 Scatchard 模型分析可获得吸附位点的结合类型, 平衡离解常数及最大表观结合量等重要信息。Scatchard 方程如下。

$$\frac{Q}{C_e} = \frac{Q_{\max} - Q}{K_d}$$

式中 Q 为平衡结合量; $Q_{\max}$ 为最大表观结合量; C_e 为溶液中平衡浓度; K_d 为结合位点的平衡离解常数

当以 Q/C_e 对 Q 作图时, 根据线性关系的斜率和截距可求得 K_d 和 $Q_{\max}$ 两个参数。结果见图 3。

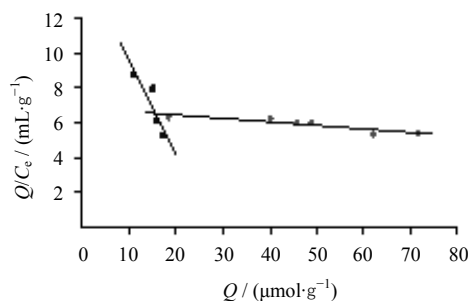


图 3 青蒿素 MIP 结合性质的 Scatchard 图

Fig. 3 Scatchard plot of binding nature of artemisinin-MIP

在 Scatchard 图中 Q/C_e 对 Q 是非线性关系, 表明分子印迹聚合物对模板分子的结合位点并不完全等价。在图 3 中两端有两个部分是呈线性关系的, 这说明在所研究的浓度范围内, 功能单体与印迹聚合物存在两类不同的特异性结合位点, 由它们的斜率与截距求得亲和力较高和较低的结合位点的离解常数分别为 $K_{d1} = 1.87 \text{ mmol/L}$ 和 $K_{d2} = 48.5 \text{ mmol/L}$, 最大表观结合常数 $Q_{\max1} = 27.99 \text{ μmol/g}$ 和 $Q_{\max2} = 334.4 \text{ μmol/g}$ 。两类结合位点产生的原因可能是在聚合前或聚合期间的反应混合物溶液中功能单体与

印迹分子间存在多种相互作用,可以形成两类不同组成的复合物,这些复合物经交联剂交联均可进入聚合物母体中,因此在印迹聚合物中形成不同性质的特异性空穴。

3.3 MIP 对模板分子的特异识别性

采用 K_D 和 θ 表征印迹聚合物对模板分子的识别性。准确称取聚合物 0.2 g,在底液浓度为 2.0 mg/mL,按“2.3.1”项下方法进行特异识别性试验,MIP 的 Q 和 K_D 分别为 11.58 mg/g、6.27; NMIP 分别为 5.49 mg/g、2.90; θ 为 2.16。结果表明,所合成的 MIP 对模板分子具有较强的特异识别性。

3.4 MIP 的选择性评价

MIP 对模板分子的选择性用 α 表征。以结构类似物双氢青蒿素作为模板分子青蒿素的竞争底物,分别以 MIP 和 NMIP 作为固相萃取剂,按“2.3.2”项下方法对印迹聚合物的选择性进行评价。MIP 对青蒿素的结合量为 48.77 $\mu\text{mol/g}$,对双氢青蒿素的结合量为 37.63 $\mu\text{mol/g}$; NMIP 对青蒿素的结合量为 13.00 $\mu\text{mol/g}$,对双氢青蒿素的结合量为 9.39 $\mu\text{mol/g}$; α 为 1.27。

4 讨论

竞争底物双氢青蒿素的结构与模板分子青蒿素的结构极为相似,双氢青蒿素仅比青蒿素多二个氢原子。实验结果表明,MIP 对模板分子青蒿素的结合量明显大于对竞争底物双氢青蒿素的结合量,且 α 较大,说明双氢青蒿素分子的形状和大小与 MIP 的内部空穴有差异,较难顺利进入空穴内部并与其识别位点发生作用;而 MIP 有着与模板分子青蒿素相互匹配的空间结构,因而能够有效且有选择性地结合模板分子,从而表征了 MIP 对印迹分子青蒿素的特异选择性。

运用静态平衡结合试验研究了青蒿素分子印迹聚合物的特征吸附性和选择识别能力。识别因子达 2.16。Scatchard 模型分析表明,在本实验所研究的浓度范围内,分子印迹聚合物形成两类不同的结合位点。印迹聚合物对青蒿素的结合量明显大于对竞争底物双氢青蒿素的结合量,选择因子为 1.27,说明分子印迹聚合物具有与模板分子相匹配的空穴结构,因而能有效地选择性结合模板分子。证实了所合成的青蒿素分子印迹聚合物对青蒿素具有明显的特异识别性和选择吸附性,而非印迹聚合物则无此

分子选择性,提示 MTP 可用于天然产物中青蒿素的分离纯化。

参考文献

- [1] 丁明玉. 现代分离方法与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [2] 马秀玲, 陈日耀, 郑 曦, 等. 柚皮苷分子印迹传感器的制备与应用 [J]. 分析化学, 2010, 38(1): 100-104.
- [3] 周媛媛, 孟子晖, 董美伶. 分子印迹技术在天然产物有效成分分离纯化中的应用 [J]. 色谱, 2009, 27(3): 359-363.
- [4] 李小燕, 雷福厚, 黄安宝, 等. 以改性松香为交联剂的盐酸川芎嗪分子印迹聚合物吸附性能研究 [J]. 化学研究与应用, 2009, 21(10): 1397-1403.
- [5] 温 悦, 孟德胜. 青蒿素类药物药理作用研究进展 [J]. 医药导报, 2007, 26(10): 1193-1195.
- [6] 李秀萍, 郭 伟, 何 琳. 青蒿素及其衍生物的药用研究进展 [J]. 疾病监测与控制杂志, 2008, 2(7): 449-450.
- [7] 王建平. 青蒿素的应用及其作用机理 [J]. 医药化工, 2008, 11(11): 11-14.
- [8] 陈立军, 靳秋月, 于利人, 等. 青蒿素及其衍生物抗肿瘤研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(11): 1754-1755.
- [9] 赵 兵, 王玉春, 欧阳潘. 青蒿药用成分提取分离技术现状 [J]. 中草药, 1998, 29(11): 784-786.
- [10] 郝金玉, 韩 伟, 施超欧, 等. 黄花蒿中青蒿素的微波辅助提取 [J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(8): 385-387.
- [11] 梁成钦, 苏小建, 李 俊, 等. 超声波提取薄层扫描法快速测定青蒿中青蒿素含量的研究 [J]. 大众科技, 2004(8): 27-28.
- [12] 李子颖, 李士雨, 齐向娟. 青蒿素提取技术研究进展 [J]. 中药研究与信息, 2002, 4(2): 17-21.
- [13] 张 玲, 杜小英, 姜锦花. 青蒿素提取分离工艺研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(6): 57-58.
- [14] 梅 林, 石开云, 苏建华, 等. 青蒿素国内研究进展 [J]. 激光杂志, 2008, 29(2): 95-96.
- [15] 雷福厚, 赵慷, 李小燕, 等. 脱氢枞胺分子印迹聚合物的吸附性能研究 [J]. 精细化工, 2010, 27(1): 11-15.
- [16] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [17] 雷启福, 钟世安, 向海艳, 等. 儿茶素活性成分分子印迹聚合物的分子识别特性及固相萃取研究 [J]. 分析化学, 2005, 33(6): 857-860.
- [18] 刘梵岩, 刘 磊, 张 丽, 等. 环丙沙星分子印迹聚合物的制备及其吸附特性的研究 [J]. 化学通报, 2008, 71(2): 132-137.