

• 药剂与工艺 •

高良姜素分子印迹聚合物分子识别性研究

姚杰, 乔华, 吕俊杰, 孙体健*

山西医科大学基础医学院, 山西 太原 030001

摘要: 目的 探讨高良姜素分子印迹聚合物(GMIP)的特异性分子识别能力。方法 以高良姜素为模板分子, 分别采用四氢呋喃、乙腈、丙酮为致孔剂, 以丙烯酰胺(AM)为功能单体, 以乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)为交联剂, 采用热引发聚合的方法合成 GMIP; 采用扫描电子显微镜(SEM)、傅里叶红外光谱(FTIR)扫描对其进行性能表征; 运用平衡结合试验研究聚合物的吸附特性和选择识别能力。结果 Scathard 模型分析表明, 该 GMIP 在识别高良姜素分子的过程中存在 2 类不同的结合位点; 高亲和力结合位点的离解常数(K_{d1})=0.961 mmol/L, 最大表观结合常数(Q_{max1})=19.79 μ mol/g; 低亲和力结合位点的离解常数(K_{d2})=0.101 mmol/L, 最大表观结合常数(Q_{max2})=51.09 μ mol/g。结论 GMIP 对高良姜素分子具有特异的吸附和识别能力, 为天然产物中高效分离纯化活性成分高良姜素提供了一种新型材料。

关键词: 高良姜素; 分子印迹聚合物; 分子识别; 离解常数; 最大表观结合常数; 分子印迹技术

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)18-2614-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.18.008

Molecular recognition of galangin molecular imprinting polymer microsphere

YAO Jie, QIAO Hua, LV Jun-jie, SUN Ti-jian

College of Basic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: Objective To investigate the specific molecular recognition ability for galangin molecular imprinting polymer (GMIP). **Methods** GMIP was prepared through the method of thermal polymerization with galangin as template molecular, acrylamide (AM) as functional monomer, ethyleneglycol dimethacrylate (EGDMA) as cross-linker, and tetrahydrofuran, acetonitrile, and acetone as pore forming agents, respectively. The GMIP was characterized by infrared spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). In addition, the GMIP was investigated in equilibrium binding experiment to evaluate its adsorption property and selective recognition. **Results** The Scathard model analysis showed that two kinds of binding sites existed in the GMIP. The dissociation constant (K_d) and apparent maximum binding constant (Q_{max}) were $K_{d1} = 0.961$ mmol/L, $Q_{max1} = 19.79$ μ mol/g for high affinity binding sites and $K_{d2} = 0.101$ mmol/L, $Q_{max2} = 51.09$ μ mol/g for low affinity binding sites, respectively. **Conclusion** GMIP has the specific adsorption and recognition capabilities to the galangin molecules. It can be a novel material for the separation and purification of the active ingredients from natural products.

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

高良姜为姜科山姜属植物高良姜 *Alpinia officinarum* Hance 的干燥根茎, 是我国传统中草药, 其味辛, 性温, 具有温胃祛寒、理气祛风、消食止痛的功效; 主治脘腹疼痛、胃寒吐泻、噎气吞酸、消积食滞、消化不良等症, 是中医临床上常用的温

里药^[1]。高良姜素(galangin, 3, 5, 7-三羟基黄酮)是高良姜最主要的药理活性成分, 对高良姜的鉴别具有独特的专属性。临床药理研究表明, 高良姜素具有抗氧化、抗细菌、抗病毒、抗炎、抗致畸、抗突变、抗肿瘤等多种生理活性^[2-5], 具有良好的临床

收稿日期: 2014-03-04

基金项目: 山西医科大学科技创新基金资助项目(C01201005); 山西医科大学青年基金资助项目(02201309)

作者简介: 姚杰(1984—), 女, 助教, 硕士, 研究方向为天然药物有效成分研究。Tel: 18234023651 E-mail: yaojiebs@sina.com

*通信作者 孙体健, 教授, 研究方向为天然药物化学。Tel: 15034078999 E-mail: suntijian@163.com

应用价值和研究前景。目前,从天然产物中提取分离高良姜素的方法主要有传统的溶剂提取法、柱色谱法、逆流色谱与硅胶柱色谱相结合的方法等^[6-7],这些方法操作繁杂、加之溶剂及时间的消耗,使得该方法分离效率差、回收率低、成本高。

分子印迹技术(molecular imprinting technique, MIT)指合成在空间结构上和结合位点上具有与某一分子(模板分子)完全匹配的聚合物的一种技术,是以目标分子为模板分子,制备对该分子具有特异选择性的交联聚合物,即分子印迹聚合物(molecular imprinting polymer, MIP)^[8-10]。MIT提供了一种简单的直接具有分子识别能力的方法,MIP因其具有制备简单、稳定性好(耐高温、耐酸碱、耐有机溶剂)、使用寿命长等特点,因而在临床药物分析、手性拆分、固相萃取、生物传感器等方面得到广泛应用^[11-12]。

近年来,科研工作者们又成功地将MIT应用到天然产物有效成分的分离纯化中^[13-14],为其有效成分的分离富集提供了新的途径和方法^[15]。目前,采用MIT分离纯化高良姜素的研究尚未见报道。本实验以高良姜素为模板分子,采用MIT合成了对高良姜素具有特异选择性吸附的MIP,并对其性能特性进行研究。以期建立一种从天然产物中提取纯化高良姜素的新方法。

1 仪器与材料

FTIR—8300 傅里叶红外光谱仪,日本岛津公司;HH—S 型恒温水浴锅,江苏省金坛市医疗仪器厂;760CRT 双光束紫外-可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;KQ—250DE 型超声波清洗器(40 kHz),昆山市超声仪器有限公司;BS—210S 电子天平,北京赛多利斯天平有限公司;800 型离心沉淀器,上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂;电热真空干燥箱,上海实验仪器厂有限公司。

高良姜素,成都锦泰和医药化学技术有限公司,批号 110501,质量分数 99%;丙烯酰胺,成都市科龙化工试剂厂,质量分数≥99%;甲基丙烯酸,天津市登峰化学试剂厂;偶氮二异丁腈(AIBN),上海试四赫维化工有限公司;乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA),阿拉丁试剂公司,批号 30184;四氢呋喃,天津化学试剂三厂;丙酮、乙醇,天津市北辰方正试剂厂;乙腈、甲醇、冰醋酸,南京化学试剂有限公司;所有试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 高良姜素 MIP (GMIP) 的制备及处理

分别对模板分子、功能单体、交联剂的投料比、反应时间和反应温度等 GMIP 的反应条件及聚合物处理方法进行优化^[16-17],得到最佳制备及处理方法:称取 0.27 g(1.0 mmol)高良姜素和 0.28 g(4.0 mmol)功能单体丙烯酰胺充分溶解于 4 mL 丙酮中,于 10 mL 比色管中超声 2 h,使模板分子与功能单体充分发生作用,再加入 3.8 mL(20 mmol)交联剂 EGDMA 和 0.022 g 引发剂 AIBN,充分混溶后,通 N₂ 脱氧 10 min,在真空状态下密封。将密封好的比色管于 60 °C 下聚合 24 h,所得的棒状聚合物用研钵磨碎并过筛,用体积比为 9:1 的甲醇-乙酸混合溶液于索氏提取器中提取 24 h,以除去模板分子及未反应的化合物,然后用甲醇洗涤除去残留的乙酸至中性,聚合物颗粒经丙酮反复沉降,除去悬浮的细颗粒后,真空干燥至恒定质量,即为 GMIP。空白 MIP (NMIP)的合成除不加高良姜素外,其余方法同上。

在非共价型 MIP 的制备过程中,溶剂的极性对反应过程中氢键的形成和离子键作用力的影响较大,因为极性溶剂能与 MIP 的空间识别位点的功能基结合,从而使其失去与模板分子结合的能力。为了提高 MIP 的识别性能常选用非极性或弱极性的非质子溶剂,如二氯甲烷、氯仿、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)等。高良姜素中含有 3 个酚羟基,具有一定的极性,在氯仿中的溶解性较差。为此本实验比较了丙酮、四氢呋喃、乙腈等弱极性溶剂中高良姜素和功能单体的溶解效果,结果溶解效果均良好。如图 1 所示,对比合成的 MIP 的紫外吸收,丙酮组的紫外吸收较强,且最大吸收波长未发生红移,与高良姜素的最大吸收波长相同,均为 355 nm,故选择丙酮作为溶剂。

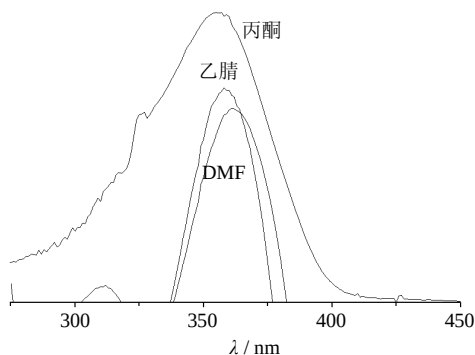


图 1 GMIP 在不同溶剂中的紫外光谱

Fig. 1 UV absorption spectra of GMIP in different solvents

2.2 GMIP 的扫描电子显微镜 (SEM) 表征

将制备的 GMIP 及 NMIP 分别作 SEM 观察, 对比其形貌异同。聚合物的形状、表面形态、颗粒大小及均匀度等特征会影响聚合物的吸附性能。由 SEM 图 (图 2) 可见, NMIP (图 2-B) 表面看起来更光滑, 但形状不规则, 而 GMIP (图 2-A) 空隙均匀, 粒度大小基本一致; 通过 SEM 可以比较直观的分析聚合物的形貌特征, 为解释聚合物的吸附性能提供依据。

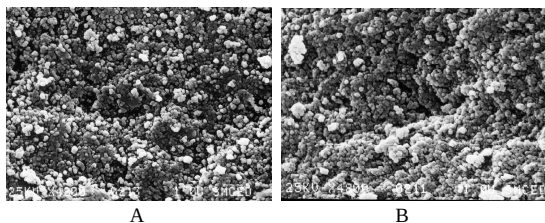


图 2 GMIP (A) 和 NMIP (B) 的 SEM 图 ($\times 4\ 800$)

Fig. 2 SEM of GMIP (A) and NMIP (B) ($\times 4\ 800$)

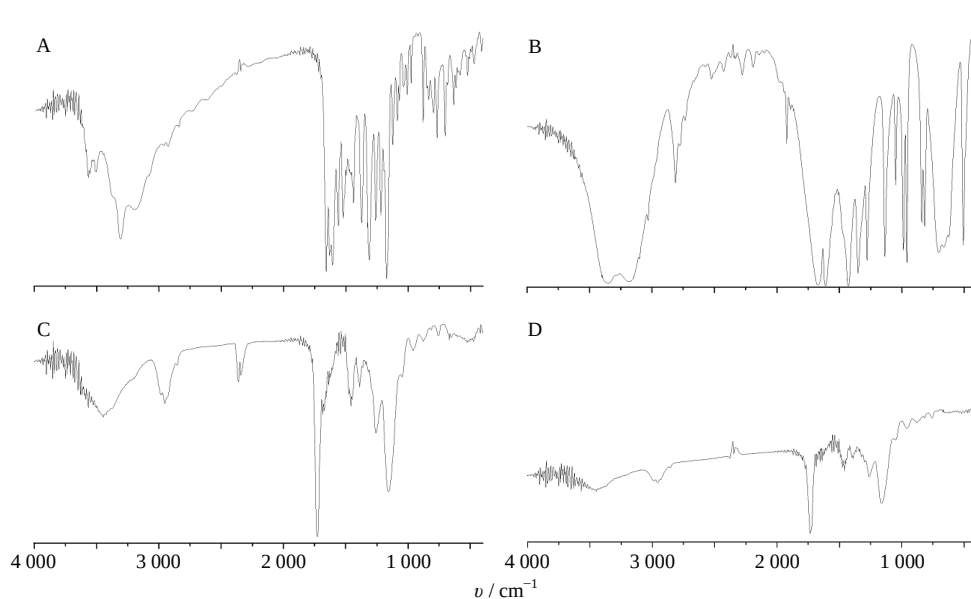


图 3 高良姜素 (A)、丙烯酰胺 (B)、GMIP (C) 和 NMIP (D) 的 FTIR 图

Fig. 3 FTIR of galangin (A), acrylamide (B), GMIP (C), and NMIP (D)

和功能单体丙烯酰胺之间发生了相互作用, 形成了氢键。GMIP 和 NMIP 为同一路线合成, 只是聚合物的内部结构存在差别, 导致吸收峰的位置和强度略有区别。

2.4 GMIP 平衡吸附性能表征

分别称取 8 份 10.0 mg GMIP 装于 25 mL 锥形瓶中, 加入 1.0 mL 系列不同浓度的高良姜素丙酮的标准溶液, 在振荡器上避光、恒温振荡 24 h 后, 转入高速离心机中离心 5 min, 取适量的上层离心液,

2.3 GMIP 的傅里叶红外光谱 (FTIR) 扫描表征

将高良姜素、丙烯酰胺、制备的 GMIP 及 NMIP 分别用溴化钾压片, 测定 FTIR 图, 分析对比其结构异同。

将所得的聚合物进行 FTIR 表征 (KBr 压片法), 如图 3 所示由各种聚合物的 FTIR 图可见, 制备的聚合物都有明显的羟基 ($3\ 310\text{ cm}^{-1}$)、羰基 ($1\ 731\text{ cm}^{-1}$)、酯基 ($1\ 265$ 和 $1\ 161\text{ cm}^{-1}$) 的特征吸收峰。在 $1\ 500\sim 1\ 600\text{ cm}^{-1}$ 没有出现苯环的多重特征吸收峰, 则表明该 MIP 没有模板分子存在, 说明通过充分清洗, 已经将模板分子清洗干净。高良姜素聚合前的分子内氢键吸收带在 $3\ 310\text{ cm}^{-1}$ 附近, 聚合后被更强且宽的吸收峰在 $3\ 467\text{ cm}^{-1}$ 处取代, 说明有大量分子间氢键形成。NMIP 的谱图与清洗后的 GMIP 谱图大体相似, 只是相对于 NMIP 酰胺基在 $3\ 448\text{ cm}^{-1}$ 的伸缩振动, GMIP ($3\ 467\text{ cm}^{-1}$) 红移了 19 cm^{-1} 。这说明在 GMIP 合成过程中高良姜素

用孔径为 45 nm 的微孔滤膜滤过, 用丙酮稀释至一定体积, 用紫外-可见分光光度计在一定波长下测定平衡吸附液中模板分子高良姜素的游离浓度, 根据吸附前后的溶液中高良姜素的浓度变化, 计算 GMIP 对模板分子高良姜素的结合量, 绘制吸附等温线, 用同样的方法对 NMIP 进行实验, 计算公式为 $Q=(C_0-C)\times V/m$, 其中 Q 为聚合物的吸附量 ($\mu\text{mol/g}$), C_0 为平衡实验中底物初始浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), C 为达吸附平衡后上层清液中底物的

浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), V 为吸附溶液的体积 (mL), m 为聚合物的质量 (g)。

为了研究 GMIP 的结合特性,测定它对不同浓度高良姜素甲醇溶液的结合量,同样的方法对 NMIP 进行实验,对比反应的结合量,绘制吸附等温线 (图 4)。

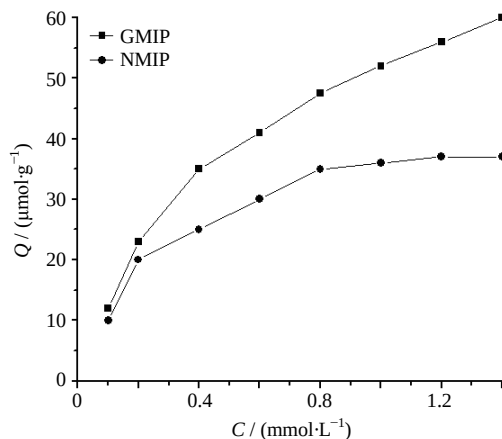


图 4 GMIP 和 NMIP 的吸附等温线

Fig. 4 Adsorption isotherm of GMIP and NMIP

由图 4 可见,吸附开始时,随着溶液浓度的增加,GMIP 和 NMIP 对模板分子的吸附量都迅速增加。当浓度达到一定时吸附量达最大值,之后曲线逐渐趋于平缓,吸附量达饱和。相同浓度下,GMIP 对高良姜素的吸附量明显高于的 NMIP 的吸附容量,这是由于高良姜素与 GMIP 中的空穴结构要比 NMIP 中的空穴更加匹配,所以对高良姜素的吸附量大;而且在 NMIP 中功能团的分布是任意的,没有形成形状与高良姜素互补的分子识别位点。因此,尽管 NMIP 有着与 GMIP 相同的化学组成,但它对模板分子高良姜素不显示特异选择性,仅仅依靠弱的非特异性吸附作用来与底物结合,选择性比较低,吸附量相对较少。GMIP 相对于 NMIP 有较高的结合容量,说明在 GMIP 内存在着由印迹作用形成的分子空穴。

在 MIP 的研究中常采用 Scatchard 模型来评价分子印迹聚合物的吸附特性,用于确定反应平衡键合常数以及键合位的数目,是对受体的平衡键合进行分析的一种数学方法^[18]。Scatchard 方程: $Q/C = (Q_{\max} - Q)/K_d$, 其中 K_d 为结合位点的平衡离解常数 (mol/L); $Q_{\max}$ 为结合位点的最大结合量 ($\mu\text{mol/g}$), C 为底物在上清液中的平衡浓度。

以 Q/C 对 Q 作图 (图 5),可得到聚合物的平

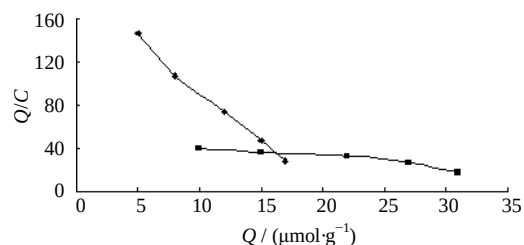


图 5 MIP 的 Scatchard 方程曲线

Fig. 5 Scatchard equation curves of MIP

衡力加常数 K_d 和最大表观结合位点数 $Q_{\max}$ 。通过回归分析获得 2 条直线,计算出 2 类键合位点的离解常数和最大表观键合常数。高亲和力结合位点的离解常数 $K_{d1} = 0.961 \text{ mmol/L}$, $Q_{\max1} = 19.79 \mu\text{mol/g}$; 低亲和力结合位点: $K_{d2} = 0.101 \text{ mmol/L}$, $Q_{\max2} = 51.09 \mu\text{mol/g}$ 。

3 结论

本实验以黄酮类化合物高良姜素为模板分子,分别采用乙腈、丙酮、四氢呋喃为致孔剂,丙烯酸酰胺为功能单体,以 EGDMA 为交联剂,制备了一系列 MIP,并通过电镜扫描、红外光谱对 GMIP 进行性能表征。运用平衡结合试验研究了 GMIP 的特征吸附性。Scatchard 模型分析表明,在本实验所研究的浓度范围内,GMIP 对高良姜素的吸附量明显高于 NMIP,说明 GMIP 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 GMIP 对高良姜素具有特异的选择性识别性能,而 NMIP 无此分子选择性。本实验的研究结果对从复杂的天然产物中高效分离富集高良姜素具有一定的理论指导意义。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Zhang Y F, Shi C H. The Extracting techniques and analysis methods for flavonoids in plant [J]. *J Anal Sci*, 2009, 25(1): 102-107.
- [3] 李彩君. 高良姜质量标准研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2000.
- [4] 张文静, 黄启来, 华子春. 高良姜素的生物学活性研究进展 [J]. *中国医药生物技术*, 2012, 7(4): 294-297.
- [5] 霍仕霞, 彭晓明, 高 莉, 等. 不同质量分数高良姜素对人黑色素瘤 A375 细胞黑色素合成及相关基因表达的影响 [J]. *中草药*, 2014, 45(2): 244-249.
- [6] 徐 静, 曹学丽, 尹 鹭, 等. 逆流色谱与硅胶柱色谱相结合分离纯化高良姜中高良姜素 [J]. *食品科学*, 2013, 34(4): 55-58.

- [7] 侯红瑞, 陈玲, 冯毅凡, 等. 大孔吸附树脂分离纯化高良姜黄酮类化合物的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(10): 258-260.
- [8] 谭天伟. 分子印迹技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [9] 蒋旭红, 吴嫦秋, 刘展眉. 茶碱分子印迹聚合物微球的合成及其性能研究 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2055-2058.
- [10] 李小燕, 仝海娟, 雷福厚, 等. 青蒿素分子印迹聚合物分子识别性研究 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 795-798.
- [11] 小宫山真. 分子印迹学—从基础到应用 [M]. 吴世康, 汪鹏飞, 译. 北京: 科学出版社, 2006.
- [12] 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.
- [13] 郭秀春, 李欢欢, 周文辉. 染料木素分子印迹聚合物的制备及其识别性能 [J]. 化学研究, 2013, 24(3): 252-255.
- [14] 冯建涌. 长春碱分子印迹聚合物的制备、表征及性能评价研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2007.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Pauling L J. A theory of the structure and process of formation of antibodies [J]. *J Am Chem Soc*, 1940, 62(3): 2643-2657.