

芦丁- Cu^{2+} 配位印迹聚合物的制备与吸附作用研究

成洪达¹, 邢占芬², 张平平²

1. 齐鲁医药学院 山东省生物医学工程技术重点实验室, 山东 淄博 255213

2. 齐鲁医药学院药学院, 山东 淄博 255213

摘要: 目的 制备芦丁- Cu^{2+} 配合物印迹聚合物, 验证其吸附性能。方法 功能单体为 α -甲基丙烯酸, 在极性环境中制备芦丁- Cu^{2+} 配位分子印迹聚合物; 采用紫外光谱和红外光谱研究聚合物结构及制备机制; 以平衡吸附试验及对芦丁类似物的吸附试验研究聚合物的特异性吸附能力。结果 制备的聚合物与芦丁- Cu^{2+} 配位分子通过配位键及分子间作用力结合, 具有明显的特异性吸附作用。结论 制备的芦丁- Cu^{2+} 配位分子印迹聚合物对芦丁- Cu^{2+} 配位分子具有特异性识别作用, 可用于中药有效成分芦丁的分离和富集。

关键词: 芦丁; Cu^{2+} 配合物; 分子印迹聚合物; α -甲基丙烯酸; 紫外光谱; 红外光谱; 吸附; 分离; 富集

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)24-3666-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.24.009

Preparation of rutin- Cu^{2+} complex imprinted polymer and its adsorption character

CHENG Hong-da¹, XING Zhan-fen², ZHANG Ping-ping²

1. Key Laboratory of Biomedical Engineering and Technology in Universities of Shandong, Qilu Medical University, Zibo 255213, China

2. Department of Pharmacy, Qilu Medical University, Zibo 255213, China

Abstract: **Objective** To prepare rutin- Cu^{2+} complex imprinted polymer and study its adsorption ability. **Methods** The polymer was prepared in mixed polar solvent, using α -methacrylic acid as functional monomer. The structure and preparation mechanism were studied by UV-vis spectroscopy and IR spectroscopy. **Results** The polymer and rutin- Cu^{2+} complex were combined by coordinate bond and intermolecular force, the polymer had remarkably specific adsorption to complex of rutin- Cu^{2+} . **Conclusion** Rutin- Cu^{2+} complex molecularly imprinted polymer has great adsorption and specific identification to rutin- Cu^{2+} , and can be used in extraction and separation of Chinese medicine effective constituent rutin.

Key words: rutin; Cu^{2+} complex; molecular imprinted polymer; α -methacrylic acid; UV-vis spectroscopy; IR spectroscopy; adsorption; separation; enrichment

芦丁是一种重要的黄酮类化合物, 具有消炎、镇痛、抗病毒、抗肿瘤等各种生物活性^[1-2], 主要用于治疗脑出血、出血性肾炎、高血压、慢性支气管炎等症。芦丁广泛存在于芸香科和石楠科植物中, 植物资源丰富, 提取方法主要有碱提取酸沉淀法、热水提大孔吸附树脂法等^[3-5], 由于药用植物中黄酮类物质繁多, 结构相似, 芦丁的分离提取不理想。

分子印迹技术具有锁钥特点和选择性识别功能, 近年来在中药有效成分提取中应用越来越多^[6-9]。

目前分子印迹聚合物(molecular imprinted polymer, MIP)的识别位点大多通过静电引力、氢键、范德华力等非共价作用, MIP需在非水的弱极性有机溶剂中制备, 分子印迹技术存在印迹聚合物稳定性差、耗费有机溶剂多及毒性大等不足^[10]。金属配位键强度高于氢键及范德华力, 具有方向性, 可制备出结构更稳定, 选择性更好的MIP^[11]。同时, 金属配位键在极性溶剂中可保持稳定, 可有效克服印迹聚合物只能在弱极性溶剂中制备的不足, 减少有机溶剂

收稿日期: 2015-06-30

基金项目: 山东省科学技术发展计划项目(2013YD19004)

作者简介: 成洪达(1981—), 男, 讲师, 研究方向为天然药物。E-mail: chd_98766@163.com

的使用,拓展分子印迹技术的应用。

本实验以芦丁- Cu^{2+} 为模板,通过配位键在强极性环境中合成了芦丁- Cu^{2+} 配合物印迹聚合物。芦丁- Cu^{2+} 配合物印迹聚合物环境耐受性好,对目标分子吸附能力强,选择性好,可用于中药有效成分芦丁的分离与富集。

1 仪器与材料

CU600 型电热恒温水箱,精慧智能仪表公司;IR Prestige-21 傅里叶变换红外光谱仪、UV-2550 型紫外可见分光光度计,岛津公司;DZF-6050 真空干燥箱,巩义市予华仪器有限公司;D-05R 高速离心机,北京安必升科技发展有限公司;THZ-22 台式恒温振荡仪,江苏太仓市实验设备厂;AS3120 型超声清洗机,天津奥特赛恩斯仪器有限公司。

芦丁对照品,质量分数为 98%,批号 135042,北京万佳首化生物科技有限公司; α -甲基丙烯酸(MAA)、乙二醇二丙烯酸酯(EDMA)、偶氮二异丁腈(AIBN)均为百灵威试剂,硫酸铜购自济宁恒泰化工有限公司。

2 方法与结果

2.1 芦丁- Cu^{2+} 配位 MIP 的制备

精密称取 710 mg 芦丁和 480 mg 硫酸铜溶于 15 mL 四氢呋喃-甲醇(1:3)溶液,超声震荡 3 h,使芦丁和 Cu^{2+} 配位完全。向金属配合物中加功能单体 MAA 4 mmol,超声 3 h 使配合物与功能单体充分作用;加入 EDMA 20 mmol、AIBN 50 mg;通氮除氧 20 min,水浴 60 °C 加热反应 24 h。所得棒状聚合物研钵磨碎过 300 目筛,用乙酸、甲醇体积比 1:9 混合溶液索氏提取除去模板分子。用 EDTA 溶液洗涤除去 Cu^{2+} ,然后用甲醇、水反复洗涤,60 °C 干燥至恒定质量。

不加芦丁和硫酸铜,以上步骤制备非印迹聚合物(NIP)。

2.2 芦丁- Cu^{2+} 配位分子紫外光谱研究

芦丁紫外光谱有 2 个强吸收峰,分别在 220、365 nm,其中 220 nm 属于 A 环 $n-\pi^*$ 电子跃迁,365 nm 属于 B 环 $\pi-\pi^*$ 电子跃迁。B 环中 3',4'-二羟基和 C 环中的 5-羟基-4-酮都容易与金属离子配位,形成稳定的环状配合物,芦丁与铜饱和配位比为 1:2。以四氢呋喃-甲醇(1:3)为溶剂,配制浓度为 0.02 mmol/L 的芦丁溶液 5 份,向溶液中分别加入 CuSO_4 固体,配制芦丁和 Cu^{2+} 的浓度比依次为 1:0、1:0.3、1:0.5、1:1.2、1:2 的系列溶液。将溶液放

入恒温振荡器,恒温振荡(300 W, 150 r/min) 4 h,测定紫外光谱。

由图 1 可知,芦丁浓度固定不变,逐渐增大 Cu^{2+} 的浓度,芦丁 220 nm 处的吸收峰强度整体呈下降趋势,365 nm 处的吸收峰强度渐次减小。当芦丁与 Cu^{2+} 浓度比为 1:2 时,365 nm 吸收峰已非常弱,接近消失,同时,芦丁与 Cu^{2+} 浓度比为 1:2 时吸收曲线在 420 nm 吸收明显增强。说明芦丁与 Cu^{2+} 形成了一种配合物。

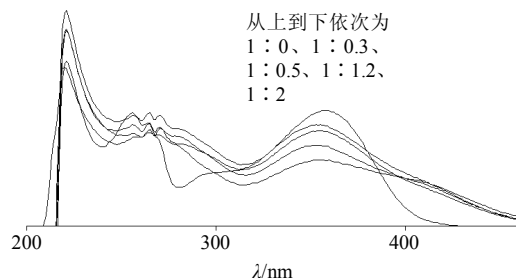


图 1 芦丁- Cu^{2+} 配位分子紫外吸收曲线

Fig. 1 Ultra-violet absorption curves of rutin- Cu^{2+}

2.3 红外光谱分析

分别测定芦丁及芦丁- Cu^{2+} 聚合物红外光谱,研究聚合物的生成及芦丁结构的变化。图 2-a 为芦丁红外光谱图,3 422 cm^{-1} 吸收峰为苯环羟基伸缩振动,1 652 cm^{-1} 为羰基吸收峰,1 592、1 507 cm^{-1} 吸收峰对应苯环骨架伸缩振动;1 457 cm^{-1} 为亚甲基的剪式振动吸收峰,1 011~1 203 cm^{-1} 对应碳氧键的伸缩振动。图 2-b 为芦丁- Cu^{2+} 聚合物红外光谱,从图中可以看出,芦丁由于配位聚合物的形成,羟基峰明显减弱并向低波数移动,说明芦丁羟基参与了配位;羰基峰有所加强并向高波数移动;由于聚合物的形成,限制了苯环的伸缩振动,其对应吸收峰减弱并合并为 1 个。

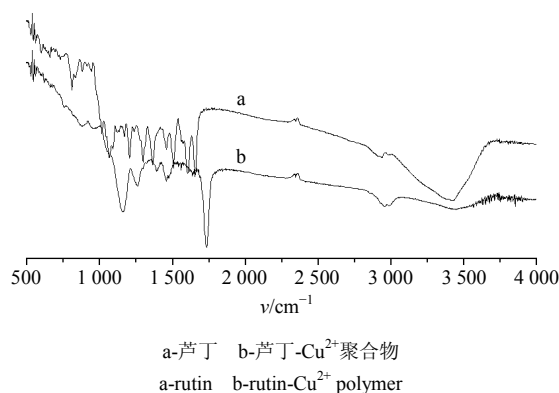


图 2 红外光谱

Fig. 2 Infrared spectra of rutin and polymer

2.4 芦丁-Cu²⁺配位 MIP 结合性能分析

精密称取 8 份印迹聚合物, 分别置于 5 mL 系列浓度变化的芦丁溶液(0.2~5 mmol/L, 含有 Cu²⁺, $c_{\text{Cu}^{2+}}:c_{\text{芦丁}}=2:1$) 中, 将溶液放入恒温振荡器中于 30 °C 下振荡, 然后离心分离, 测定芦丁浓度, 按照下式求印迹聚合物对芦丁的吸附量 (Q), 绘制结合曲线。

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

c_0 为芦丁的初始浓度 (mmol/L), c_t 为吸附后芦丁的平衡浓度 (mmol/L), V 和 m 分别为溶液的体积 (mL) 和聚合物的质量 (g)

由图 3 可知, 随着芦丁-Cu²⁺浓度逐渐增大, MIP、NIP 对芦丁-Cu²⁺的吸附量均呈现增加趋势, 但在整个浓度范围内, MIP 吸附量均大于 NIP, 对底物吸附能力更强, 说明印迹聚合物对芦丁-Cu²⁺具备了一定的印迹功能, 可以依靠配位键位点作用及结构匹配实现对芦丁-Cu²⁺的特性吸附。而对于 NIP, 虽然芦丁也能与聚合物上的羧基形成氢键, 但由于结构及位置关系, 不具有作用位点的匹配性, 每个芦丁分子往往只能与吸附剂形成 1 个氢键, 这样作用力远小于 MIP 对芦丁的作用力, 因此 NIP 对芦丁吸附力很弱。

采用 Scatchard 方程对吸附特点进行进一步分析: $Q/C=(Q_{\max}-Q)/K_d$, C 为吸附平衡浓度, 根据 Q/C 、 Q 线性关系, 由斜率和截距可求得平衡解离常数 (K_d) 和最大表观结合量 ($Q_{\max}$)。如图 4 所示, Scatchard 曲线包含 2 条直线, 2 条直线斜率不同但线性良好, 说明印迹聚合物与模板分子具有 2 种不同的特异性结合作用。根据直线斜率与截距求出结合能力较强和较弱的 K_d 分别为 1.69、2.90 mmol/L, $Q_{\max}$ 分别为 31.77、346.20 $\mu\text{mol/g}$ 。

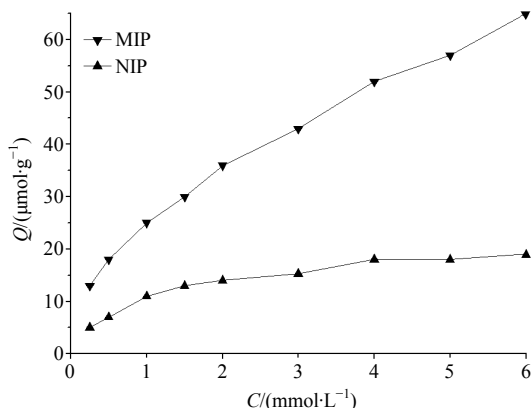


图 3 聚合物吸附等温线

Fig. 3 Adsorption isotherms of polymer

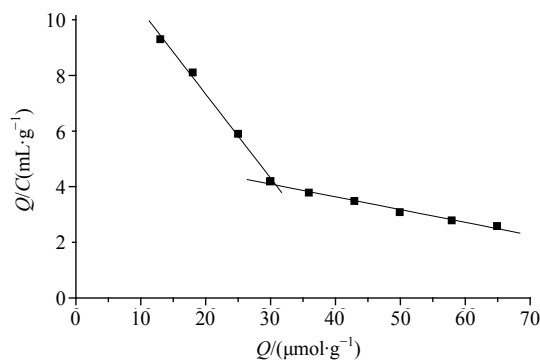


图 4 聚合物 Scatchard 曲线

Fig. 4 Scatchard curve of of polymer

2.5 芦丁-Cu²⁺配位 MIP 对底物的选择性

选取与芦丁结构相似的黄芩素、葛根素、儿茶素作为对照物, 按照“2.1”项所示方法制备相应 Cu²⁺配合物, 配制相同浓度芦丁-Cu²⁺、黄芩素-Cu²⁺、葛根素-Cu²⁺和儿茶素-Cu²⁺配合物溶液, 计算结合量, 研究芦丁-Cu²⁺印迹聚合物的吸附选择性。

由表 1 可见, MIP 对芦丁的结合量明显大于 NIP 的结合量, 并且比 MIP 对其他 3 种物质的结合量都大, 均达到 2 倍以上, 表现出了较好的选择性。同时, MIP 对黄芩素、儿茶素的吸附量反而比 NIP 小, 原因是 MIP 形成的三维立体构形适合于芦丁-Cu²⁺的空间结构, 虽然黄芩素、儿茶素与芦丁结构相似, 但二者金属配合物与芦丁金属配合物结构差异较大, MIP 对黄芩素-Cu²⁺、儿茶素-Cu²⁺的结合量比非印迹聚合物小说明 MIP 具有良好的选择性。

表 1 聚合物对不同底物吸附量

Table 1 Adsorption of polymer to different substrates

聚合物	吸附量/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)			
	芦丁	黄芩素	葛根素	儿茶素
MIP	58.3	23.0	18.4	21.4
NIP	32.1	32.6	16.7	24.9

2.6 MIP 稳定性研究

配制 5 mL 浓度为 0.8、2.5 mmol/L 的芦丁溶液 (含有 Cu²⁺, $c_{\text{Cu}^{2+}}:c_{\text{芦丁}}=2:1$) 各 1 份, 分别加入 MIP 30 mg, 按“2.4”方法计算聚合物吸附量; 过滤掉聚合物, 用乙酸-甲醇 (1:9) 溶液洗脱模板分子, 重复上述吸附试验, 连续吸附 5 次, 记录聚合物每次吸附量, 结果见表 2, 经过 5 次吸附后, 所制备 MIP 吸附量没有明显下降, 表现出较好的吸附稳定性。

表2 聚合物稳定性
Table 2 Stability of MIP

初始浓度/ (mmol·g ⁻¹)	吸附量/(μmol·g ⁻¹)				
	1次吸附	2次吸附	3次吸附	4次吸附	5次吸附
0.8	24.2	23.8	23.1	23.6	23.0
2.5	37.4	36.7	37.1	37.0	36.8

3 讨论

本实验在极性溶剂中制备了芦丁-Cu²⁺配位印迹聚合物, EDMA 为交联剂, MAA 为功能单体。紫外光谱、红外光谱实验证实, 芦丁-Cu²⁺与功能单体通过配位键相结合, 形成了结构稳定的聚合物; 通过静态吸附试验及对结构类似物的吸附表明, 印迹聚合物对芦丁-Cu²⁺具有良好的特异性吸附。所制备的印迹聚合物可用于中药有效成分芦丁的提取与富集。

参考文献

- [1] 臧志和, 曹丽萍, 钟 铃. 芦丁药理作用及制剂的研究进展 [J]. 医药导报, 2007, 26(7): 758-761.
- [2] 马 溶, 庞光昌. 芦丁对现代文明病的作用 [J]. 食品科学, 2013, 34(7): 307-312.
- [3] 王光霞, 李国靖, 高雅黛, 等. 超声波辅助提取柠条叶

中芦丁含量的测定 [J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学, 2015, 36(1): 65-67.

- [4] 黄 菊, 翟淑敏. 正交设计和响应面法优化荞麦中芦丁提取工艺的比较 [J]. 粮食与油脂, 2014, 27(9): 45-49.
- [5] 赵海福, 魏彦明, 董晓宁, 等. 响应面法优化玉米须中芦丁的提取工艺及检测 [J]. 草业科学, 2013, 30(6): 964-971.
- [6] 向海艳, 范银洲, 李 曼, 等. 选择性富集分离虎杖中白藜芦醇苷的分子印迹聚合物的制备及分子识别性能研究 [J]. 分析测试学报, 2013, 32(1): 45-50.
- [7] 李小燕, 仝海娟, 雷福厚. 青蒿素分子印记聚合物分子识别性研究 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 795-799.
- [8] 倪付勇, 刘 露, 宋亚玲, 等. 分子印迹技术定向分离桂枝茯苓胶囊中活性成分去氢土莫酸 [J]. 中草药, 2015, 46(6): 853-856.
- [9] 程绍玲, 杨迎花. 利用分子印迹技术分离葛根异黄酮 [J]. 中草药, 2006, 28(10): 1484-1489.
- [10] 刘亚强, 王大伟, 周德锋, 等. 分子印迹技术的应用研究进展 [J]. 渭南师范学院学报, 2005, 20(2): 43-47.
- [11] 范培民, 王 兵. 槲皮素金属配位分子印迹聚合物的识别性能 [J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(12): 2514-2521.