

基于 ATRP 技术制备姜黄素分子印迹复合膜及应用

苏立强, 靳岩爽, 陈嘉琪, 王 颖, 翟明翠

齐齐哈尔大学化学与化学工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

摘要:目的 利用原子转移自由基聚合(ATRP)技术制备姜黄素分子印迹复合膜(MIM),并建立一种实际样品中姜黄素分离富集的方法。方法 以姜黄素为模板分子,甲基丙烯酸为功能单体,氯化亚铜为催化剂,五甲基二乙烯三胺为配体,聚偏氟乙烯微孔滤膜为基膜,采用热聚合法制备姜黄素 MIM;通过扫描电镜(SEM)考察了 MIM 的微观结构;采用静态和动态吸附实验对 MIM 的最大吸附量和吸附平衡时间进行考察,并对选择性渗透能力进行研究;以 MIM 为渗透装置中的膜材料,结合 HPLC 法对样品中的姜黄素进行分离、富集、检测。结果 制备的 MIM 孔穴分布规则且大小均匀;最大吸附量达 3.81 mg/g,且 15 min 即可达到吸附平衡;在阿魏酸、槲皮素和姜黄素的选择性渗透过程中,MIM 对姜黄素具有较高的选择渗透能力;对生姜、姜黄、咖喱中的姜黄素进行加标回收试验,其平均回收率分别为 $(94.100 \pm 3.952)\%$ 、 $(98.300 \pm 3.637)\%$ 、 $(97.900 \pm 3.133)\%$,RSD 均小于 4.2%,检出限为 1.76 $\mu\text{g/kg}$ 。结论 制备的姜黄素 MIM 吸附速度快、选择性强,为姜黄素的分离、富集提供一种新的材料,同时也为其他中药化学成分的研究提供借鉴。

关键词: 分子印迹技术;原子转移自由基聚合;姜黄素;分子印迹复合膜;膜分离;选择性渗透

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)06-1348-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.013

Preparation and application of curcumin molecularly imprinted composite membrane based on ATRP technique

SU Li-qiang, JIN Yan-shuang, CHEN Jia-qi, WANG Ying, ZHAI Ming-hui

Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China

Abstract: **Objective** To prepare the molecularly imprinted composite membrane of curcumin by the atom transfer radical polymerization (ATRP) technique and develop a method for the separation and enrichment of curcumin in actual samples. **Methods** Curcumin MIM were prepared by thermal polymerization method using curcumin as template molecule, methylacrylic acid as functional monomers, cuprous chloride as catalyst, pentamethyldiethylenetriamine as ligand, and polyvinylidene fluoride as base membrane. The microstructure of MIM was investigated by SEM. The maximum adsorption and adsorption equilibrium time of MIM were investigated by static and dynamic adsorption experiment, and the selective permeation capacity was studied. The MIM as membrane material of osmotic device combined with HPLC was used for separation, enrichment and determination of curcumin in samples. **Results** The results showed that the prepared curcumin MIM had a regular distribution of pores and a uniform size. The maximum adsorption capacity was 3.81 mg/g, and the adsorption equilibrium could be achieved in 15 min. In the selective permeation process of ferulic acid, quercetin and curcumin, MIM had a high selective permeability to curcumin. The average recovery rates of curcumin in ginger, turmeric and curry were $(94.100 \pm 3.952)\%$, $(98.300 \pm 3.637)\%$, and $(97.900 \pm 3.133)\%$, respectively. The RSD was less than 4.2%. The limit of detection was 1.76 $\mu\text{g/kg}$. **Conclusion** The prepared MIM is a new material for strong selectivity, separation and enrichment of Chinese medicine curcumin with fast adsorption speed. At the same time, it also provides reference for chemical composition research of other Chinese materia medica.

Key words: molecular imprinting technique; atom transfer radical polymerization; curcumin; molecularly imprinted composite membrane; membrane separation; selective permeation

姜黄素(curcumin, Cur)是一种天然多酚类化合物,具有抗氧化、抗炎、保护神经等多种功效^[1-6],

已广泛用于医疗、食品和化妆品领域中^[7]。Cur 主要存在于姜科植物的根茎中,因其在植物中含量低、

收稿日期: 2018-10-22

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(QC2018073); 黑龙江省教育厅科研项目(135109201); 黑龙江省教育厅科研项目(135209224); 齐齐哈尔大学研究生创新项目(YJSCX2018-016X); 齐齐哈尔大学研究生创新项目(YJSCX2017-020X)

作者简介: 苏立强, 硕士生导师, 教授, 主要从事色谱理论与应用研究。Tel: (0452)2738214 E-mail: slq202@163.com

干扰物质繁多^[8-11],给 Cur 的分离、提纯等带来了困难,研制一种可选择性分离富集 Cur 的方法十分必要。

采用分子印迹技术制备的分子印迹聚合物(molecular imprinting polymers, MIP)可对目标物进行选择性的分离富集。有关 Cur MIP 的研究已有报道^[12-13],Thongchai 等^[14]采用沉淀聚合法制得 Cur MIP,将其作为固相萃取填料,对 Cur 有较高的吸附量,结合 HPLC 法测定中药中的 Cur。袁波等^[15]采用沉淀聚合法和本体聚合法制得了 Cur MIP,对 Cur 有良好的特异识别能力。Liu 等^[16]采用表面印迹法制备了磁性 Cur MIP,将其用于固相萃取填料,结合紫外光谱法对食品中 Cur 进行分离与检测,检出限达 1.31 $\mu\text{g/mL}$,回收率为 79.37%~88.89%。近年来,分子印迹膜(molecular imprinting membrane, MIM)受到了广泛关注,因其不仅保留了传统 MIP 的优点,还展现了包括吸附平衡时间短、去除模板分子简单等优异的新性能^[17-21]。

原子转移自由基聚合(atom transfer radical polymerization, ATRP)作为活性/可控自由基聚合之一,可以控制活性链的增长过程从而实现聚合物的可控生长,得到结构均匀和相对分子质量分布窄的材料^[22]。本实验采用 ATRP 方法,以 Cur 为模板分子,甲基丙烯酸为功能单体,聚偏氟乙烯微孔滤膜为基膜,制备 Cur MIM,考查其吸附能力和选择渗透性能。以此膜作为渗透装置中的膜材料,对实际样品中 Cur 进行分离富集,采用 HPLC 法分析。

1 仪器与材料

TU-1901 型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;AS3120 超声波清洗器,天津奥特塞恩斯仪器有限公司;ZK-30S 型电热真空干燥箱,天津市三水科学仪器有限公司;DK-98-1 电热恒温水浴锅,北京泰克仪器有限公司;800 离心机,常州国华电器有限公司;S-4300 扫描电子显微镜,日本 Hitachi 公司;P230 型高效液相色谱仪,大连依利特分析仪器有限公司;Frontier 傅里叶红外光谱仪,美国 PE 公司;STA449F3 同步热分析仪,德国 Netzsch 公司。

聚偏氟乙烯(PVDF)微孔滤膜(孔径 0.22 μm),海宁市益博过滤器材厂;Cur (RS2871B102,质量分数 99%)、阿魏酸(FA, L1411067,质量分数 99%)、槲皮素(Que, J1325065,质量分数 99%),上海阿拉丁生化公司;氯化亚铜(CuCl),天津市光复精

细化工研究所;五甲基二乙烯基三胺(PMDETA),上海联硕生物科技有限公司; α -甲基丙烯酸(MAA)、乙腈、甲醇、冰乙酸均为分析纯,天津市科密欧化学试剂中心;二甲基丙烯酸乙二醇酯(EDMA)为分析纯,东京化成工业株式会社;聚乙二醇 2000(PEG2000)为分析纯,天津市凯通化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 MIM 的制备

称取 0.37 g(1 mmol)模板分子 Cur,加入 50 mL 乙腈作为溶剂。超声充分溶解后加入 0.34 g(4 mmol)的功能单体 MAA,室温静置 8 h 使二者充分预聚合。依次加入 3.96 g(20 mmol)的交联剂 EDMA、质量分数为 5%的分散剂 PEG2000、0.02 g 的催化剂 CuCl 、40 μL 的配体 PMDETA 和 PVDF 基膜,超声使其充分混合后通入 15 min N_2 充分排除 O_2 ,密封。60 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴聚合 24 h。聚合完成后,冷却至室温。取出膜后将其浸泡于甲醇中除去膜上没有反应的化学物质,获得聚合膜,用甲醇-乙酸(8:2)为洗脱液进行超声洗涤 60 min,移除模板分子,真空干燥,得到 Cur MIM。

非印迹膜(NIM)的制备除不加模板分子外,其他步骤同 MIM。

2.2 红外光谱(IR)研究

采用 IR 法对 3 种膜的结构进行分析,见图 1。与 PVDF 对比,MIM 和 NIM 在 1 713 cm^{-1} 处出现了交联剂 EDMA 中 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动吸收峰,表明聚合反应成功。且 MIM 和 NIM 的 IR 谱图几乎一样,说明 MIM 中的模板分子 Cur 被成功洗脱。

2.3 扫描电镜(SEM)图像分析

为了考察膜的表观形貌,对 PVDF 基膜、MIM 和 NIM 进行电镜表征,见图 2。可以看到,3 种膜均为多孔结构,其中 PVDF 基膜的孔径最大。当以其为支撑膜进行印迹后,孔径明显减小,说明在基膜的表面发生了聚合反应,对膜的孔结构产生了影响。同时也可看到,MIM 表面形成的印迹孔穴比 NIM 更加规则和均一,这可能是由于模板分子 Cur 对聚合反应的预组织作用,使得到的 MIM 具有与 Cur 大小和形状相匹配的孔穴。

2.4 Cur MIM 的吸附行为研究

2.4.1 静态吸附实验 配制质量浓度为 0~50 $\mu\text{g/mL}$ Cur 乙腈对照品溶液,紫外分光光度计测定其吸光度(A)值,以 A 值对 Cur 的质量浓度(C)进行线

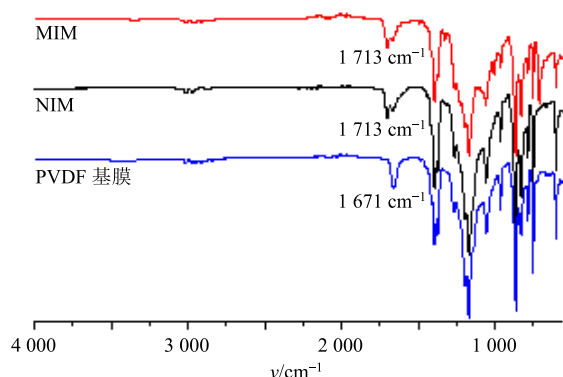


图 1 MIM、NIM 和 PVDF 基膜的 IR

Fig. 1 IR of MIM, NIM, and PVDF membrane

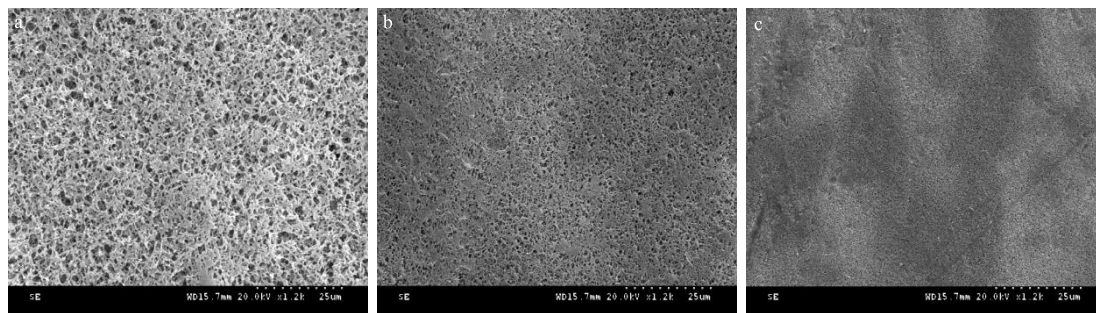
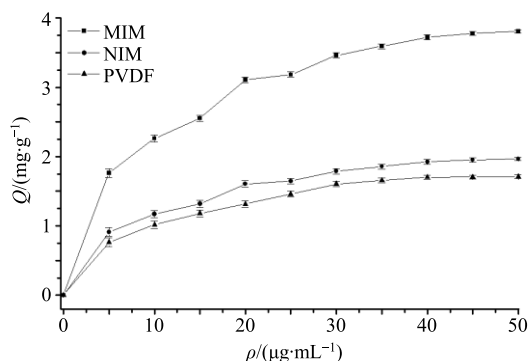


图 2 PVDF 基膜 (a)、MIM (b) 和 NIM (c) 的 SEM 图像

Fig. 2 SEM images of PVDF membrane (a), MIM (b), and NIM (c)

图 3 MIM、NIM 和 PVDF 基膜的等温吸附曲线 ($n=3$)Fig. 3 Adsorption isotherm of MIM, NIM, and PVDF membrane ($n=3$)

最大吸附量分别为 3.81、1.97、1.71 mg/g ($n=3$, $RSD<2.7\%$)。这是由于 MIM 中存在与 Cur 结构相匹配的印迹孔穴, 所以吸附量最大; NIM 的吸附量略高于基膜, 是由于与基膜相比, 印迹层具有更加均匀的多孔结构, 利于吸附。

2.4.2 动态吸附实验 称取 0.02 g PVDF 基膜、MIM 和 NIM 于吸附瓶中, 配制质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cur 溶液置于瓶中, 使其充分摇匀。在 1、2、3、4、5、10、15、30、60、120、180 min 时, 取上层清液并测其质量浓度, 计算出 Q 。动力学吸附

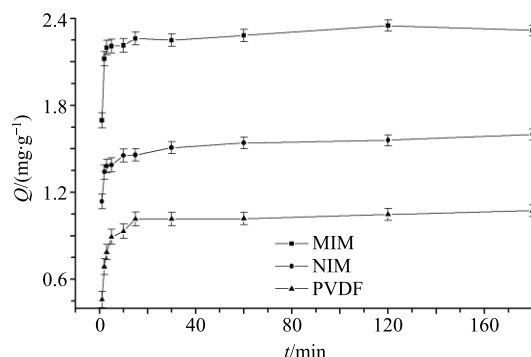
性回归, 得回归方程 $A=0.149 C+0.003$, $r=0.9999$ 。分别称取 0.02 g 的 PVDF 基膜、MIM 和 NIM, 向其中加入 10 mL 不同质量浓度的 Cur 溶液, 室温振荡后静置 2 h, 取上层清液, 用紫外分光光度计测定其 A 值, 利用标准曲线法计算 Cur 的质量浓度。利用公式 $Q=(C_0-C)V/m$ 计算聚合物对 Cur 的吸附量 (Q , mg/g)。

MIM、NIM 和 PVDF 基膜对模板分子的吸附等温线见图 3。从图中可见, 随着溶液中 Cur 质量浓度的逐渐增大, 3 种膜的吸附量均随之提高, MIM 的吸附量明显高于 NIM 和 PVDF 基膜的吸附量,

曲线见图 4。可以看出, 印迹膜在 15 min 左右即可达吸附平衡, 而传统方法制备的聚合物平衡时间一般需要 1~10 h^[19-20,23-24], 这是由于印迹膜的识别位点位于其表面, 利于质量传递, 也避免了模板分子向聚合物内部传质的过程; 而且 ATRP 技术制备的膜更加均匀有序, 平衡速度更快, 这一快速平衡特性对于实际应用十分有利。

2.5 Cur MIM 的选择渗透行为研究

将 2 个 200 mL 的玻璃池连通, 分别使 MIM 和 NIM 固定于两玻璃池中间, 组成渗透装置。一池加

图 4 MIM、NIM 和 PVDF 基膜的动态吸附曲线 ($n=3$)Fig. 4 Dynamic adsorption of MIM, NIM, and PVDF membrane ($n=3$)

入 150 mL 含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cur、FA 和 Que 的乙腈溶液，另一池加入等体积的乙腈，进行渗透实验，每隔一段时间取样，测定透过膜的各物质质量浓度，计算膜的渗透量。

根据目标分子在膜中传递方式的不同，膜的传质机制可分为 2 类^[23]：一类是溶解-扩散机制，即目标分子被膜中的孔穴所结合而不能通过膜，与孔穴没有作用的其他分子则能顺利扩散到膜的另一侧；另一类是 Piletsky 的“门”模型，认为在质量浓度梯度的作用下，所有分子都有向同一方向扩散的可能，但不被识别的分子的扩散受到膜孔的阻挡，只有目标分子和孔穴相互作用，才能从一个结合位点到另一个结合位点，最终通过印迹膜。

采用膜渗透装置，研究 MIM 和 NIM 对 Cur 及其结构类似物（FA、Que）的渗透性。各组分在 11 h 内通过不同膜的渗透量见图 5。由图可见，在相同时间里 Cur 透过 MIM 的量和速度都高于 FA 和 Que，这可能是由于 MIM 的功能基团优先吸附了 Cur 并进入与之结构相匹配的印迹孔穴中，加快了 Cur 透过 MIM 的速率，而 FA 和 Que 的结构与印迹孔穴并不匹配，不能顺利通过孔穴，因此它们透过 MIM 的速率小，渗透量也相对较少。而 NIM 对 3 种物质的渗透量差别不大，这是由于 NIM 内形成的孔穴无选择性。由以上分析可知，Cur 透过 MIM 的机制符合 Piletsky 的“门”模型。

2.6 HPLC 测定 Cur 条件与线性关系考察

色谱条件：大连依利特 SinoChrom-BP ODS 色谱柱 (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)，流动相为乙腈-0.5%

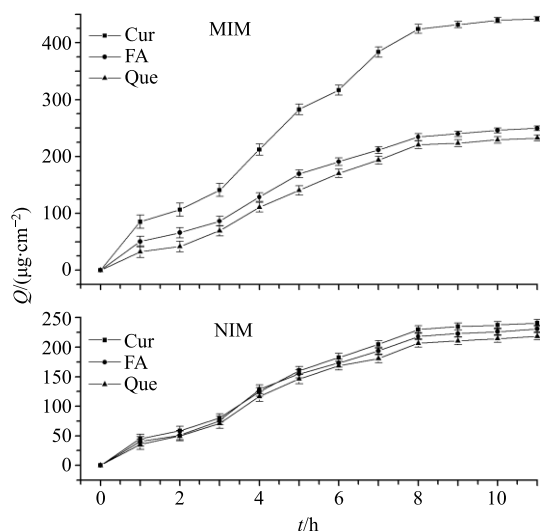


图 5 MIM 和 NIM 的选择渗透曲线 ($n=3$)

Fig. 5 Selective penetration curves of MIM and NIM ($n=3$)

乙酸水溶液 (40:60)，进样量为 20 μL ，体积流量为 0.80 mL/min，检测波长为 430 nm^[24]。

线性关系考察：配制质量浓度为 0.5~5.0 mg/mL 的 Cur 系列对照品溶液，进行 HPLC 分析，得峰面积 (A) 与质量浓度 (C) 的回归方程为 $A=346.88 C+1\ 070.09$ ， $r^2=0.999\ 3$ 。

2.7 应用渗透装置分离 Cur 验证实验

称取 4 g 干燥生姜粉末，装入 50 mL 离心管内，加入 20 mL 乙腈，振荡均匀，超声提取 10 min，4 000 r/min 离心 10 min，得样品溶液。取样品溶液 5 mL 稀释至 100 mL，得待测样品溶液。上述待测样品溶液经 0.25 μm 滤膜滤过 2 次，除去悬浮杂质。取 50 mL 待测样品溶液，分别经带有 MIM 和 PVDF 基膜的渗透装置处理后，得到待测液，对其进行色谱分析，结果见图 6。结果显示，样品经 MIM 和 PVDF 基膜渗透后，均可有效去除基质干扰，但 MIM 去除干扰效果更好，对目标物富集效果更佳，这是由 MIM 选择性的特点决定的。由此说明，MIM 可有效的从生姜中分离出 Cur。按照上述方法对待测样品溶液进行加标实验。实验重复 3 次。结果见表 1，检出限为 1.76 $\mu\text{g/kg}$ 。

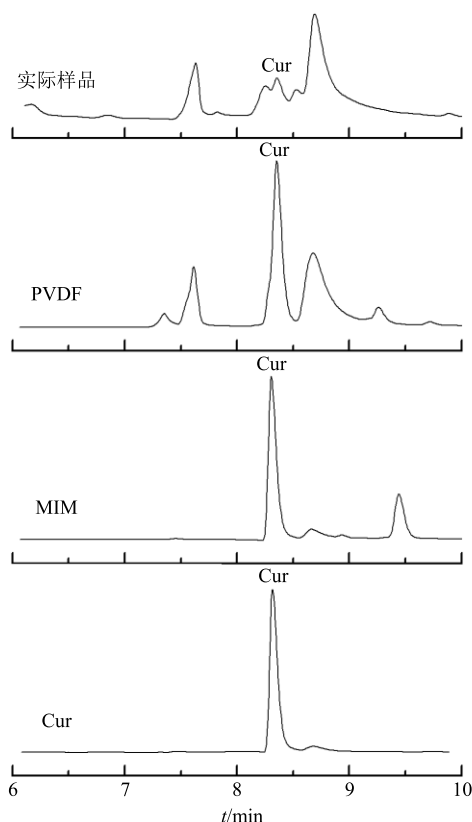


图 6 生姜中 Cur 的分析色谱图

Fig. 6 Chromatograms of Cur in ginger

表 1 生姜、姜黄、咖喱样品中 Cur 的测定结果及回收率考察 ($n=3$)

Table 1 Results of determination and recoveries in ginger samples

样品	测定值/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	加标量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	加标值/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	平均回收率/ %	RSD/ %
生姜	1.96	0.50	2.440 ± 0.090	94.100 ± 3.952	4.2
		2.00	3.770 ± 0.132		
		4.00	5.780 ± 0.237		
姜黄	4.33	0.50	4.820 ± 0.140	98.300 ± 3.637	3.7
		2.00	6.320 ± 0.215		
		4.00	8.220 ± 0.255		
咖喱	1.21	0.50	1.720 ± 0.046	97.900 ± 3.133	3.2
		2.00	3.170 ± 0.105		
		4.00	4.950 ± 0.173		

由于 MIM 具有选择性的特点, 将其应用于实际样品生姜中 Cur 的分离, 结果令人满意, 为验证方法的实用性, 本研究又对姜黄和咖喱中的 Cur 进行回收率试验, 结果见表 1, 表明回收率良好。该研究为中药材中特定化学成分的分离、富集与检测提供了新的思路和方法。

3 讨论

本实验将膜分离技术和分子印迹技术结合, 采用了 ATRP 和热聚合的方法, 以 PVDF 膜为基膜, Cur 为模板分子, MAA 为功能单体, CuCl 为催化剂, PMDETA 为配体, 合成 Cur MIM, 并利用红外光谱和电镜扫描对其进行结构和形貌的表征, 结果表明, PVDF 基膜的表面成功引发聚合反应; MIM 表面的孔穴规则均一。

静态吸附实验中, MIM 具有较多记忆性的识别孔穴, 对 Cur 分子具有特异性识别能力, 而 NIM 和 PVDF 膜表面并不存在此类孔穴, 因此, 在相同的研究质量浓度范围内, MIM 对目标分子具有更强的亲和能力和更高的吸附量。

传统方法制备的印迹聚合物, 识别位点位于聚合物内部, 吸附平衡时间较长。而本实验采用 ATRP 技术制备的印迹膜的识别位点处于其表面, 提高了印迹效率, 缩短了吸附平衡时间。

膜的选择渗透实验中, 模板分子 Cur 透过 MIM 主要有 3 个步骤: (1) Cur 分子靠近印迹膜表面并与识别位点相结合; (2) Cur 分子离开孔穴并向相邻孔穴移动; (3) Cur 分子通过印迹层后进而透过基膜。该透过机制符合 Piletsky 的“门”模型, 模

板分子通过该机制优先透过 MIM, 从而达到与竞争分子有效分离的效果。

参考文献

- [1] 胡晨, 汪玉馨, 孟长虹. 姜黄素下调 NF- κ B 信号通路抑制化学缺氧诱导的 U87 细胞炎症反应 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(11): 1989-1993.
- [2] 刘芳, 张倩, 李锐, 等. 表面活性剂对姜黄素类成分水溶性与抗肝纤维化作用的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1809-1815.
- [3] 韩伟, 雷勇胜. 姜黄素治疗泌尿生殖系统癌症的作用机制研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(2): 260-264.
- [4] 张红果, 曹军平, 树俊莲, 等. 姜黄素对小鼠皮肤移植排斥反应的影响 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(8): 1082-1085.
- [5] 杨雪梅, 邱红梅, 田蜜, 等. 姜黄素对人过氧化物酶体增殖物激活受体 γ_1 激活作用的研究 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3122-3126.
- [6] 郝东明, 张丽. 姜黄素联合伊立替康对结肠癌 SW620 细胞的体外抑制作用 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(6): 731-735.
- [7] 郭诗雨. 姜黄素的分离纯化及药物抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 科技经济导刊, 2016(21): 101.
- [8] 黄容, 陆昕怡, 韩加伟, 等. 姜黄素-胡椒碱固体分散体的制备与生物利用度研究 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4528-4534.
- [9] Mahmood K, Zia K M, Zuber M, et al. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 81: 877-890.
- [10] 孙永, 彭明利. 姜黄素及其衍生物在肝脏相关疾病中防治作用的研究进展 [J]. 药学学报, 2014(11): 1483-1490.
- [11] Zhang L, Qi Z, Huang Q, et al. Imprinted-like biopolymeric micelles as efficient nanovehicles for curcumin delivery [J]. *Colloid Surf B*, 2014, 123: 15-22.
- [12] 刘玉楠, 张朝晖, 黄小花, 等. 姜黄素磁性印迹固相萃取材料的制备及其应用研究 [J]. 林产化学与工业, 2014, 34(6): 37-43.
- [13] You Q P, Zhang Y P, Zhang Q W, et al. High-capacity thermo-responsive magnetic molecularly imprinted polymers for selective extraction of curcuminoids [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1354: 1-8.
- [14] Thongchai W, Fukngoen P. Synthesis of curcuminoid-imprinted polymers applied to the solid-phase extraction of curcuminoids from turmeric samples [J]. *J Pharm*

- Anal*, 2018, 8(1): 61-70.
- [15] 袁波, 付廷明, 阚春. 姜黄素分子印迹聚合物的制备与表征及其吸附性能的研究 [J]. 华西药学杂志, 2017, 32(1): 5-8.
- [16] Liu X, Zhu L, Gao X, *et al.* Magnetic molecularly imprinted polymers for spectrophotometric quantification of curcumin in food [J]. *Food Chem*, 2016, 202: 309-315.
- [17] 吕俊杰, 薛燕斌, 乔华, 等. 硅胶表面高良姜素分子印迹聚合物的制备及其吸附性能 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 5093-5099.
- [18] 李鸣芳, 王兵. 氯霉素印迹聚合物膜的制备及其吸附性能研究 [J]. 天津工业大学学报, 2012, 31(2): 10-14.
- [19] 马秀玲, 陈日耀, 郑曦, 等. 柚皮苷分子印迹膜的水相制备与识别 [J]. 高分子学报, 2010, 1(4): 416-422.
- [20] 蔡良根, 徐小艳, 庞杰, 等. 苏丹红多孔分子印迹复合膜的制备及其性能研究 [J]. 食品科学, 2013, 34(18): 70-74.
- [21] Wu X, Wu Y, Dong H, *et al.* Accelerating the design of molecularly imprinted nanocomposite membranes modified by Au@polyaniline for selective enrichment and separation of ibuprofen [J]. *Appl Surf Sci*, 2018, 428: 555-565.
- [22] Sunil K, Paramita K, Rashmi M, *et al.* Designing of fluorescent and magnetic imprinted polymer for rapid, selective and sensitive detection of imidacloprid via activators regenerated by the electron transfer-atom transfer radical polymerization (ARGET-ATRP) technique [J]. *J Phys Chem Solids*, 2018, 116: 222-233.
- [23] 王靖宇. 分子印迹膜制备及其膜色谱的应用研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2010.
- [24] 刘春叶, 张剑, 尤静, 等. 生姜中姜黄素的高效液相色谱-质谱法检测 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7): 1637-1639.