

松香骨架结构分子印迹聚合物的制备及其对竹节参皂苷 IVa 吸附性能研究

孙璇¹, 杨媛媛¹, 胡乔¹, 李瑾², 唐于平¹, 孙静¹, 袁普卫¹, 宋小妹¹, 郭东艳³, 雷福厚⁴, 左振宇^{1,3*}

1. 陕西中医药大学, 陕西 西安 712046

2. 西北工业大学生命学院, 陕西 西安 710072

3. 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 西安 712046

4. 广西林产化学与工程重点实验室, 广西 南宁 530006

摘要:目的 为了减少非特异性结合位点, 制备了松香大分子骨架的竹节参皂苷 IVa 分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs) 并研究其吸附性能, 为开发选择性更高的竹节参皂苷 IVa 分离材料提供理论基础。方法 以脱氢枞酸丙烯酸乙二醇酯为功能单体制备了竹节参皂苷 IVa 分子印迹聚合物。使用红外光谱、扫描电子显微镜、比表面积测试仪、热重分析仪对聚合物进行表征; 通过吸附动力学实验、静态吸附实验、重复再生实验、解吸附实验考察聚合物的吸附性能, 并将聚合物应用于珠子参提取液的分离。结果 制备的聚合物形貌规整, 具有介孔结构; 吸附实验表明 MIPs 的印迹因子为 1.58, 通过 Scatchard 方程分析, 聚合物存在 2 种结合位点, 其中高亲和力位点最大结合量为 270 mg/g, 低亲和位点的最大结合量为 142.01 mg/g; 重复使用 5 次后聚合物的吸附量仅降低了 13%; 解析率为 83.7%。与 C₁₈ 萃取小柱相比, MIPs 对珠子参粗提物具有明显的分离效果。结论 制备的聚合物对竹节参皂苷 IVa 具有良好的吸附性能, 可多次重复使用, 是一种极具潜力的竹节参皂苷 IVa 分离新材料。该研究也可作为其他皂苷类化合物的分离提供前期理论基础。

关键词: 竹节参皂苷 IVa; 分子印迹; 脱氢枞酸丙烯酸乙二醇酯; 松香骨架结构; 吸附性能; 热重分析; 珠子参

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)05-1392-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.05.014

Preparation of molecularly imprinted polymer with rosin skeleton structure and its adsorption performance for chikusetsusaponin IVa

SUN Xuan¹, YANG Yuan-yuan¹, HU Qiao¹, LI Jin², TANG Yu-ping¹, SUN Jing¹, YUAN Pu-wei¹, SONG Xiao-mei¹, GUO Dong-yan³, LEI Fu-hou⁴, ZUO Zhen-yu^{1,3}

1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

2. School of Life, Northwest University of Technology, Xi'an 710072, China

3. Shaanxi Key Laboratory of Basic and New Herbal Medicament Research, Xi'an 712046, China

4. Guangxi Key Laboratory of Chemistry and Engineering of Forest Products, Nanning 530006, China

Abstract: Objective In order to reduce non-specific binding sites, the molecularly imprinted polymer (MIPs) of chikusetsusaponin IVa (CS-IVa) with rosin macromolecular skeleton was prepared and its adsorption performance was studied. The research provided a theoretical basis for the development of separation material with higher selectivity. **Methods** The MIPs of CS-IVa was prepared using dehydroabietic acid [2-(acryloyloxy)ethyl] ester as functional monomer. The polymer was characterized by IR, SEM, BET and TGA. The adsorption performance of MIPs was investigated by adsorption kinetics experiment, static adsorption experiment, repeated regeneration experiment and desorption experiment. MIPs was applied to the separation of CS-IVa from *Panacis Majoris Rhizoma* (PMR) extract. **Results** The prepared polymer has regular morphology and mesoporous structure. According to the results of static adsorption experiment, the imprinting factor was 1.58. The Scatchard analysis reveals that there were two binding sites in the MIPs.

收稿日期: 2021-06-14

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1706903); 陕西省重点研发计划一般项目(2021SF0366); 陕西省教育厅重点项目(20JS033); 中国博士后基金面上项目(2016M602994); 广西林产化工重点实验室开放基金项目(GXFC16-06)

作者简介: 孙璇, 女, 硕士研究生, 主要从事中药化学和中药分析研究。E-mail: 219040012342@email.sntcm.edu.cn

*通信作者: 左振宇, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药化学和中药分析研究。E-mail: zuozhenyu666@sina.cn

The apparent maximal combination amount was 270 mg/g in high affinity recognition sites, with 142.01 mg/g in low affinity recognition sites. After repeated use for 5 times, the maximum adsorption capacity of the polymer was only reduced by 13%. The resolution was 83.7%. Compared with the C₁₈ column, the MIPs showed a significant separation effect on extracts of PMR. **Conclusion** The prepared polymer has good adsorption properties for CS-IVa and can be reused for several times. It is a potential new material for the separation of CS-IVa. This study can also provide a preliminary theoretical basis for the separation of other saponins.

Key words: chikusetsusaponin IVa; molecular imprinting; dehydroabiestic acid [2-(acryloyloxy)ethyl] ester; rosin macromolecular skeleton; adsorption performance; thermogravimetric analysis; *Panax Majoris Rhizoma*

珠子参来源于五加科人参属植物珠子参 *Panax japonicas* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng 或羽叶三七 *P. japonicas* C. A. Mey. var. *bipinnatifidus* (Seem.) C. Y. Wu et K. M. Feng 的干燥根茎^[1], 主要分布于陕西、四川、云南等地。其药理活性多样, 主要有保肝^[2]、抗炎^[3-4]、抗肿瘤^[5]、抗血栓^[6]、抗氧化^[7]等作用。竹节参皂苷 IVa (chikusetsusaponin IVa, CS-IVa) 是珠子参的指标成分, 目前针对该成分的分离纯化主要有柱色谱法、HPLC 等^[8-9]。以上分离方法虽能得到纯度较高的 CS-IVa, 但是其分离工艺复杂, 制备时间长, 制备量小, 溶剂需求量大^[10], 其原因在于传统的分离材料对 CS-IVa 不具有选择性。

近年来分子印迹技术越来越多的被应用于天然活性成分的分离中^[11-14]。分子印迹聚合物 (molecularly imprinted polymers, MIPs) 的孔穴中含有与模板分子匹配的功能基团, 因而可以实现对模板分子的特异性识别^[15]。制备高选择性的分子印迹聚合物其关键在于选择合适的功能单体。传统单体由于分子骨架较小, 在交联聚合过程中用量大, 容易产生较多非特异性结合位点, 降低了聚合物对待分离成分的选择性吸附。松香是松科松属植物 *Pinaceae* 的树干中渗出的油树脂, 经蒸馏除去松节油后制得, 天然无毒, 取之不尽, 用之不竭, 其主要成分是枞酸。由于分子骨架含有菲环结构, 有较好的力学刚性, 其衍生物充当大分子骨架来构建聚合物能够用于植物成分的分离应用, 并获得了较好

的分离纯化效果, 是一种极具潜力的新功能单体材料^[16-18]。针对 CS-IVa (图 1) 四环三萜类的母核结构特征, 开发一种大骨架的聚合单体来支撑印迹空穴, 松香是良好的选择之一, 除了与模板分子产生分子间氢键作用外, 可能还存在其他的多重作用, 如环与环间的范德华力等, 因此使用松香衍生物作为功能单体可适当降低非特异性结合位点^[19-20], 提升聚合物对 CS-IVa 选择性吸附。

本实验使用脱氢枞酸 (歧化松香的主要成分) 为起始原料, 合成了脱氢枞酸丙烯酸乙二醇酯 (dehydroabiestic acid [2-(acryloyloxy)ethyl] ester, DAAEE, 图 1)。与小分子功能单体相比, 通过紫外分析计算机模拟和吸附量比较得出 DAAEE 与 CS-IVa 具有最强作用力。再以 CS-IVa 为模板分子, DAAEE 为功能单体, 采用沉淀聚合法制备了 CS-IVa 分子印迹聚合物 (CS-IVa-MIPs) 和非印迹聚合物 (non-imprinted polymer, NIPs), 并系统研究了 MIPs 对 CS-IVa 的吸附性能, 同时研究了 CS-IVa-MIPs 对珠子参粗提物的分离效果, 以期后续开发选择性更高的 CS-IVa 吸附树脂提供理论基础。同时该研究也可为其他皂苷类化合物的分离提供方法参考。

1 仪器与试剂

UV2550 紫外分光光度计, 岛津分析技术研发 (上海) 有限公司; FTIR-27 红外光谱仪, 布鲁克 (北京) 科技有限公司; 蔡司 Sigma 300 扫描电子显微镜 (SEM), 卡尔蔡司 (上海) 管理有限公司; 康塔

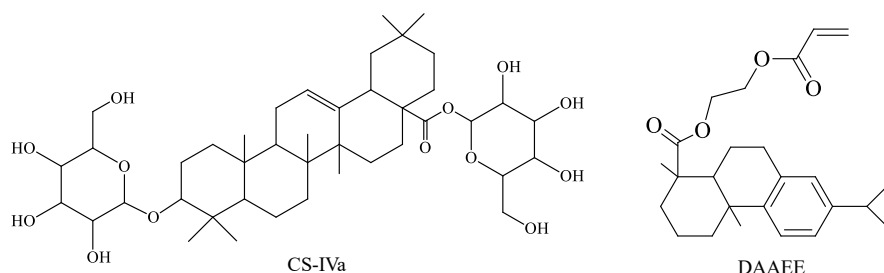


图 1 CS-IVa 和 DAAEE 的结构

Fig. 1 Structure of CS-IVa and DAAEE

AUTOSORB IQ 比表面积测定仪, 美国康塔仪器公司; TG (TGA 5500), 美国 TA 仪器; Bruker AVANCE III 400 核磁共振仪, 布鲁克(北京)科技有限公司; PL-SL00T 超声, 东莞康士洁超声波科技有限公司; LC-LX-H165A 离心机, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; Agilent 1260 高效液相色谱, 安捷伦科技(中国)有限公司。

CS-IVa (HPLC>98%, 批号 MUST-20102710, 购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 乙二醇二甲基丙烯酸酯、2,2'-偶氮二异丁腈购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 脱氢枞酸、丙烯酸羟乙酯、丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酰胺购自萨恩化学技术(上海)有限公司; 乙醇、甲醇、色谱乙腈、色谱磷酸购自天津市富宇精细化工有限公司; 乙酸购自天津市大茂化学试剂厂; 甲苯购自成都市科隆化学品有限公司; 石油醚、醋酸乙酯购自天津市富宇精细化工有限公司; 珠子参饮片购自陕西龙海医药有限公司, 经陕西中医药大学杨新杰副教授鉴定为五加科人参属植物珠子参 *P. japonicas* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 DAAEE 的合成与核磁表征

2.1.1 DAAEE 的合成 称取脱氢枞酸 5 g (0.016 mol) 置于 250 mL 三口瓶, 加入 50 mL 甲苯, 缓慢滴加 4.76 g (0.04 mol) 氯化亚砷, 110 °C 回流 42 h, 冷却至室温, 低温 (60 °C) 蒸去甲苯, 得到的红褐色液体为酰氯化脱氢枞酸。

称取酰氯化脱氢枞酸 6.4 g (0.02 mol)、丙烯酸羟乙酯 6.97 g (0.06 mol)、三乙胺 2.05 g (0.02 mol) 置于 250 mL 三口瓶中, 加入 50 mL 甲苯, 60 °C 回流 12 h, 产物用硅胶柱色谱 (100~200 目) 纯化, 洗脱剂为醋酸乙酯-石油醚 (1:8), 得到白色固体为 DAAEE。

2.1.2 DAAEE 的核磁表征 结果见图 2。δ 7.10、6.90、6.80 归属于分子中苯环上的 3 个质子, δ 6.39~6.29、6.09~5.99、5.77 归属于分子中丙烯酸酯双键上的 3 个质子, δ 4.32~4.22 归属于分子中 2 个氧之间的亚甲基上的 4 个质子。核磁数据表明 DAAEE 合成成功。核磁数据: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.10 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-11), 6.93 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-13), 6.80 (1H, s, H-14), 6.39~6.29 (1H, m, H-24), 6.09~5.99 (1H, m, H-25), 5.77 (1H, dd, *J* = 10.4, 1.2 Hz, H-25), 4.32~4.22 (4H, m, H₂-21 22), 2.81~

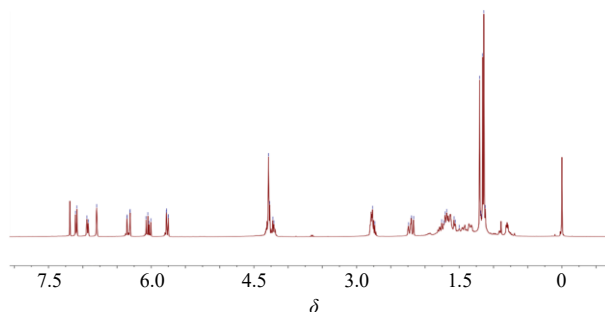


图 2 DAAEE 的核磁谱图

Fig. 2 ¹H-NMR spectra in CDCl₃ of DAAEE

2.69 (3H, m, H₂-9, H-15), 2.26~2.13 (2H, m, H₂-3), 1.73~1.65 (4H, m, H₂-1, 2), 1.63 (2H, s, H₂-10), 1.57 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, H-5), 1.21~1.13 (12H, m, Me-16, 17, 18, 20)。

2.2 分子印迹预聚体系的筛选

2.2.1 模板分子与功能单体混合物的紫外吸收光谱扫描分析 取具塞试管, 每个试管加入 2 mL 0.1 mg/mL 的 CS-IVa 乙醇溶液, 并依次加入相同体积和浓度的功能单体 (丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酰胺、DAAEE) 乙醇溶液, 定容至 10 mL, 超声 4 h, 在 200~350 nm 扫描紫外吸收光谱。一般认为, 特征吸收峰偏移越多说明模板分子与功能单体形成的复合物间的作用力越强。

由图 3 可知, CS-IVa 在 203 nm 处有特征吸收, 该吸收峰在加入功能单体后出现了不同程度的变化, 说明 CS-IVa 与 4 种功能单体间存在不同程度的相互作用。CS-IVa 与 DAAEE 的相互作用力最强, 甲基丙烯酸次之, 丙烯酸最弱。

2.2.2 分子动力学计算机模拟 分子模拟采用 Materials Studio 2019 软件, 计算机配置为 Intel Core i9-9900 K (16 核, 主频 3.6 GHz) CPU, 64 GB RAM Inspur 服务器, 使用的操作系统是 Win 10_x 64。

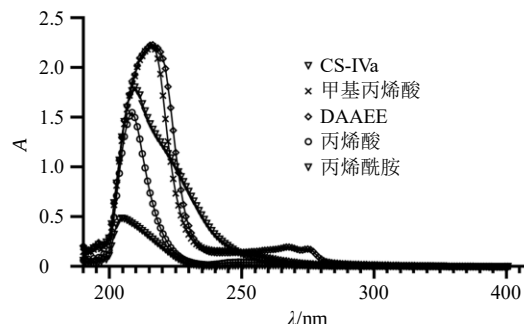


图 3 CS-IVa 与 4 种功能单体混合溶液紫外光谱

Fig. 3 UV spectra of mixtures of four functional monomers and CS-IVa

采用 DMOL3 模块对 CS-IVa (模板分子) 和功能单体进行结构优化, 力场为 Compass II。通过 Amorphous Cell 模块建立包含有模板分子和不同功能单体 (1:1) 的初始模型, 各模型中溶剂分子均为 50。然后采用 Forcite 模块对建立的初始模型进行结构优化, 采用正则系综 (NVT) 对模型进行 500 PS 的动力学模拟。待模型达到平衡状态后, 计算模板分子与功能单体的相互作用能 (ΔE)。模板分子与单体的结合能越低, 说明二者的结合性能越好, 形成的复合物越稳定。

$$\Delta E = E_{\text{复合物}} - E_{\text{模板分子}} - E_{\text{功能单体}} - E_{\text{溶剂分子}} \quad (1)$$

ΔE 为模板分子与功能单体的相互作用能, $E_{\text{复合物}}$ 为溶剂中模板分子与单体的势能, $E_{\text{模板分子}}$ 为溶剂中模板分子的势能, $E_{\text{功能单体}}$ 为溶剂中功能单体的势能, $E_{\text{溶剂分子}}$ 为溶剂中分子的势能

由图 4 可知, DAAEE 被选为最佳功能单体用

于制备 CS-IVa-MIPs, 这与紫外光谱扫描结果一致。以 DAAEE 为例说明功能单体与 CS-IVa 的相互作用力。键长范围在 0.15~0.22 nm 属于中等强度氢键, 0.22~0.32 nm 属于弱氢键^[22]。从图 5 中可以看出, DAAEE 与 CS-IVa 共形成 5 个氢键 (表 1)。

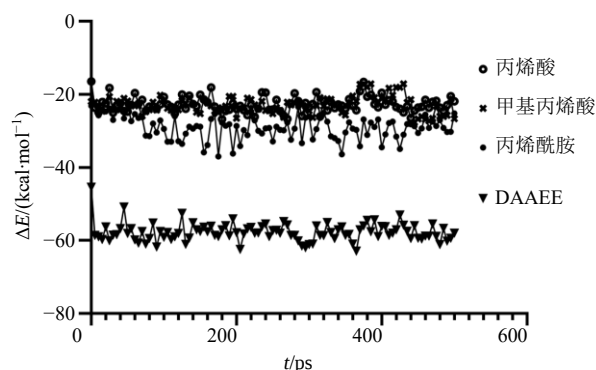
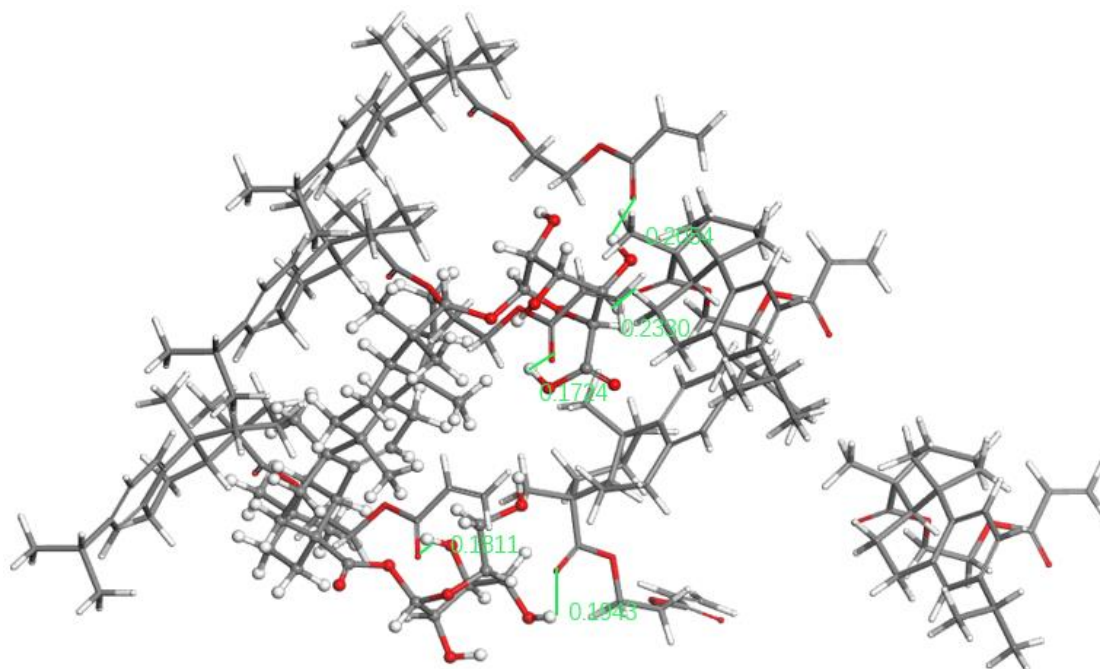


图 4 功能单体与 CS-IVa 的结合能

Fig. 4 Binding energy of functional monomers and CS-IVa



球棍模型表示 CS-IVa, 棍棒模型表示 DAAEE
the ball stick model represents CS-IVa, and the stick model represents DAAEE

图 5 DAAEE 与 CS-IVa 的相互作用力图

Fig. 5 Interaction between DAAEE and CS-IVa

表 1 氢键参数

Table 1 Hydrogen bond parameter

模板分子	功能单体	键长/nm	模板分子	功能单体	键长/nm
H121	O29	0.172 4	H119	O29	0.181 1
H115	O29	0.205 4	H108	O20	0.233 0
H120	O20	0.194 3			

2.2.3 不同功能单体印迹聚合物的吸附量比较 为进一步验证“2.1.1”项结果的可靠性, 本实验分别以丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酰胺以及 DAAEE 为功能单体 (固定交联剂和引发剂用量), 制备了 4 种印迹聚合物, 以对 CS-IVa 的吸附量为指标, 优选最佳的功能单体。称取 4 种印迹聚合物各 20 mg, 分

别加入 10 mL 0.25 mg/mL 的 CS-IVa 乙醇溶液, 振荡吸附 3 h, 离心, 取上清液测定吸光度 (A), 按照式 (2) 计算吸附量。由表 2 可知, DAAEE 为最佳功能单体, 其对 CS-IVa 吸附量高于普通功能单体的吸附量。

$$Q_e = (C_0 - C_e)V/m \quad (2)$$

Q_e 为吸附平衡时 CS-IVa 的吸附量, C_0 为 CS-IVa 乙醇溶液的初始质量浓度, C_e 为吸附平衡时上清液中 CS-IVa 的质量浓度, V 为溶液体积, m 为聚合物的质量

表 2 不同功能单体的 MIPs 吸附量

Table 2 Adsorption capacity of MIPs of different functional monomers

功能单体	吸附量/(mg·g ⁻¹)	功能单体	吸附量/(mg·g ⁻¹)
丙烯酸	25.18	DAAEE	37.28
甲基丙烯酸	27.77	丙烯酰胺	26.97

2.2.4 模板分子 CS-IVa 与 DAAEE 比例的优化 取具塞试管, 每个试管加入 2 mL 0.1 mg/mL 的 CS-IVa 乙醇溶液, 并依次加入 2 mL 0.1、0.2、0.4、0.6 mg/mL 的 DAAEE 的乙醇溶液, 定容至 10 mL, 超声 4 h, 在 200~350 nm 扫描紫外吸收光谱, 结果见图 6。模板分子与功能单体的物质的量比是影响吸附量的重要因素。随着功能单体浓度增加, CS-IVa 的特征吸收峰红移。特征吸收峰偏移越多说明模板分子与功能单体形成的复合物间的作用力越强^[23]。物质的量比 1:1 红移了 14 nm, 1:2 红移了 15 nm, 1:4 红移了 19 nm, 1:6 红移红移了 21 nm, 因此选择 1:6 作为最佳物质的量比。

2.3 CS-IVa-MIPs 和 NIPs 的制备

称取模板分子 CS-IVa 79.9 mg (0.1 mmol), 功能单体 DAAEE 245.8 mg (0.6 mmol) 溶于 80 mL 乙

醇中, 磁力搅拌 12 h, 然后加入乙二醇二甲基丙烯酸酯 0.89 g (4 mmol) 和 60 mg 2,2'-偶氮二异丁腈, 70 °C 引发聚合 12 h, 得到白色聚合物。用甲醇-乙酸 (9:1) 反复清洗聚合物, 直至上清液检测不到 CS-IVa。将聚合物置于 50 °C 真空干燥 8 h。NIPs 的制备方法与 MIPs 基本相同, 只是在制备过程中不加入模板分子。

2.4 CS-IVa-MIPs 和 NIPs 的表征

采用溴化钾压片法对 MIPs 进行红外光谱分析 (4000~400 cm⁻¹); 对聚合物进行喷金处理, 采用 SEM 观测形貌; 比表面积测试法 (brunner-emmett-teller measurements, BET) 测量 MIPs 和 NIPs 的比表面积和孔径; 热重分析仪 (thermal gravimetric analyzer, TGA) 检测 MIPs 的热稳定性。

2.4.1 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 对 CS-IVa, DAAEE 和 MIPs 进行红外光谱扫描, 图 7-c 曲线中 2945、2875 cm⁻¹ 为 -CH₃、-CH₂- 的伸缩振动峰, 1726 cm⁻¹ 是 C=O 吸收峰, 1627 cm⁻¹ 是双键吸收峰, 1454、1407 cm⁻¹ 为苯环上的骨架振动吸收峰。b 曲线中 3575 cm⁻¹ 宽峰为 -OH 吸收, 推测有氢键存在, 2989、2968 cm⁻¹ 为 -CH₃、-CH₂- 的伸缩振动峰, 1731 cm⁻¹ 为 C=O 吸收峰。1596、1473 cm⁻¹ 为苯环骨架吸收峰。1257 cm⁻¹ 为羧基上 C-O 吸收峰。此外 1627 cm⁻¹ 双键吸收峰消失, 表明 DAAEE 成功聚合在 MIPs 上。a 曲线上, 3446 cm⁻¹ 处有一宽吸收峰, 为 CS-IVa 分子中糖上的羟基吸收峰, 2945 cm⁻¹ 为分子骨架上 -CH₃、-CH₂- 的伸缩振动峰, 1726 cm⁻¹ 处为 C=O 吸收峰, 1604 cm⁻¹ 处的吸收归属于分子中的双键。MIPs 吸收曲线 b 上, 与 CS-IVa 吸收曲线对应的位置有相同的吸收峰, 表明 CS-IVa 成功印

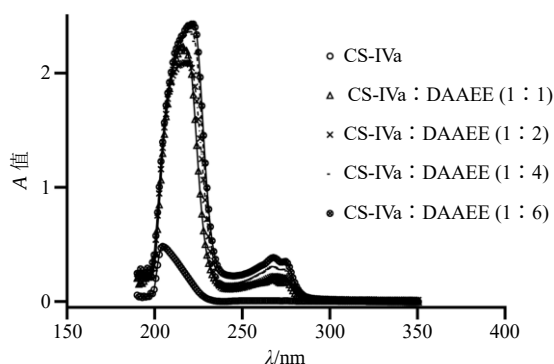


图 6 CS-IVa 与 DAAEE (不同物质的量比) 混合溶液的紫外光谱

Fig. 6 UV spectra of CS-IVa and DAAEE with different ratios in EtOH

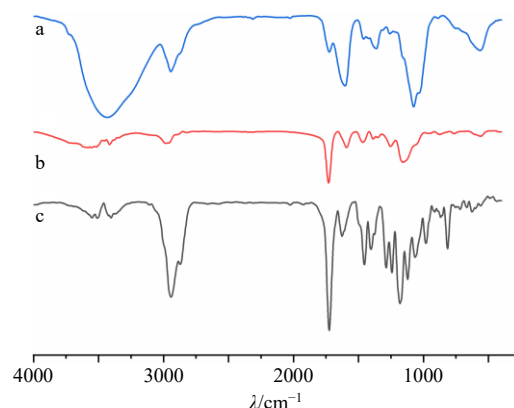


图 7 CS-IVa (a)、MIPs (b) 和 DAAEE (c) 的 FT-IR 图

Fig. 7 FTIR spectra of CS-IVa (a), MIPs (b) and DAAEE (c)

迹在聚合物上。

2.4.2 SEM 分析 本实验制备了以 DAAEE 为功能单体的 CS-IVa-MIPs 和 NIPs, 采用 SEM 对二者形貌进行表征。由图 8 可知, MIPs 形貌规整, 类球形, 表面粗糙有凹陷, 颗粒粘连程度较小。NIPs 形貌较为规整, 存在不规则颗粒, 表面无明显粗糙, 粘连现象严重。

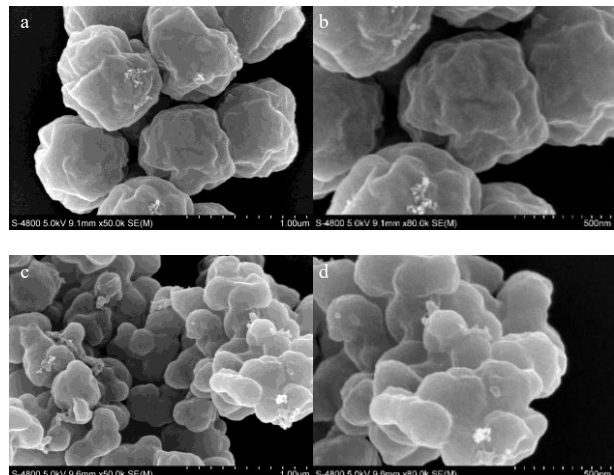


图 8 沉淀聚合制备的 MIPs (a, b) 和 NIPs (c, d) 的 SEM 图
Fig. 8 SEM images of MIPs (a, b) and NIPs (c, d)

2.4.3 BET 分析 氮气吸附脱附曲线 (图 9), 在低压段 (相对压力 0~0.1), MIPs 和 NIPs 的吸附曲线更偏向于 X 轴, 与氮气的相互作用较弱, 表明聚合物中不存在微孔。在中压段 (相对压力 0.3~0.8), MIPs 和 NIPs 的吸附曲线与脱附曲线不重合, 出现回滞环, 表明聚合物中存在介孔, 由 BJH 理论 (Barrett-Joyner-Halenda, BJH) 计算 MIPs 的平均孔径为 3.407 nm, NIPs 的平均孔径为 3.405 nm, 均属于介孔孔径范围 (2~50 nm) [24]。在高压段 (相对压力 0.9 左右), MIPs 和 NIPs 均出现拐点且曲线继续上扬没有出现平台, 说明聚合物粒子大小可能不均一, 存在大孔。

由表 3 可知, MIPs 的总孔容和孔径 (0.013 mL/g 和 3.407 nm) 与 NIPs (0.016 mL/g 和 3.405 nm) 相比差异不大, 表明吸附是由印迹引起的。MIPs 的比表面积 (5.436 m²/g) 小于 NIPs (9.158 m²/g) 可能是由于模板分子 CS-IVa 参与了聚合体系 [25]。

2.4.4 TG 分析 从 MIPs 的 TGA 曲线 (图 10) 可知, 聚合物在 284 °C 以内, 质量仅损失 10%, 表明 MIPs 在 280 °C 以内具有良好的热稳定性。超过该温度后, 聚合物开始分解, 在 460 °C 质量损失达 95%, 几乎完全分解。

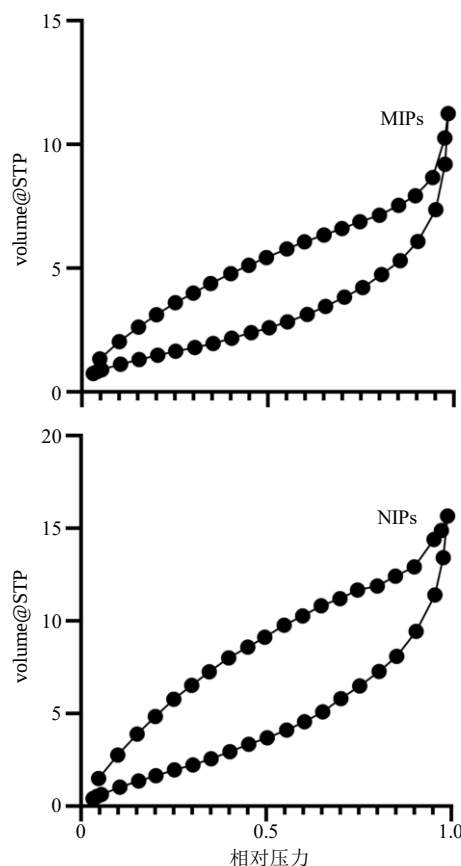


图 9 MIPs 和 NIPs 的氮气吸附脱附曲线

Fig. 9 Nitrogen adsorption-desorption curves of MIPs and NIPs

表 3 MIPs 和 NIPs 的 BET 测试数据

Table 3 BET data of MIPs and NIPs

参数	比表面积/(m ² ·g ⁻¹)	平均孔径/nm	孔容/(mL·g ⁻¹)
MIPs	5.436	3.407	0.013
NIPs	9.158	3.405	0.016

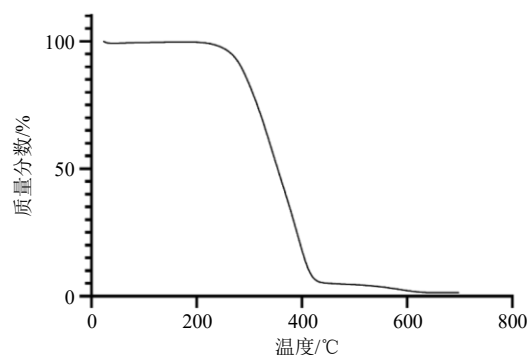


图 10 MIPs 的 TG 分析

Fig. 10 TG analysis of MIPs

2.5 MIPs 和 NIPs 的吸附性能研究

2.5.1 吸附动力学实验 准确称取 20 mg MIPs 和 NIPs 各 7 份于 10 mL 的离心管中, 加入 0.25 mg/mL

的 CS-IVa 乙醇溶液 9 mL。室温下震荡 10、20、30、60、90、120、180 min 后,离心 10 min (4000 r/min),取上清液过 0.22 μm 膜 (尼龙 6),用紫外分光光度计测定其 A 值,根据式 (3) 计算聚合物在不同时间点对 CS-IVa 的吸附量。平行 3 次实验,取平均值。

$$Q_t = (C_0 - C_t)V/m \quad (3)$$

运用准一级动力学方程、准二级动力学方程分析吸附动力学过程,见式 (4)、(5)。

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - K_1 t \quad (4)$$

$$t/Q_t = 1/K_2 Q_e^2 + t/Q_e \quad (5)$$

Q_t 为 t 时刻对 CS-IVa 的吸附量, C_0 为 CS-IVa 乙醇溶液的初始浓度, C_t 为 t 时刻时上清液中 CS-IVa 的浓度, V 为溶液体积, m 为聚合物的质量, Q_e 为吸附平衡时 CS-IVa 的吸附量, K_1 为准一级吸附速率常数, min^{-1} ; K_2 为准二级吸附速率常数, $\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$

MIPs 和 NIPs 对 CS-IVa 的吸附动力学结果如图 11 所示, MIPs 在 0~90 min 吸附量随时间增加,在 90 min 达到吸附平衡。NIPs 在 0~120 min 吸附量随时间增加,在 120 min 达到吸附平衡。MIPs 的吸附量明显高于 NIPs。

对吸附动力学数据进行拟合,得到准一级动力学方程和准二级动力学方程。由表 4 数据可知,对于

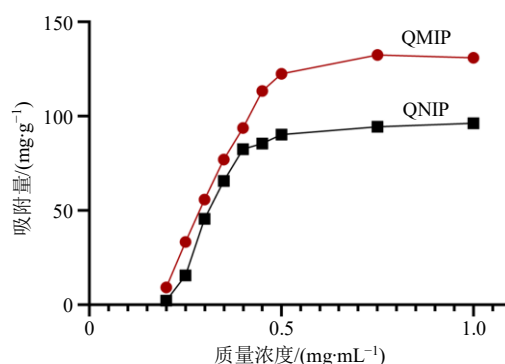


图 11 MIPs 和 NIPs 的吸附动力学曲线

Fig. 11 Adsorption kinetic curve of MIPs and NIPs

MIPs, 准一级动力学方程的线性相关系数 ($R^2 = 0.9374$) 大于准二级动力学, 由准一级动力学方程得到的平衡吸附量 ($Q_{e \text{ 计算}} = 36.04 \text{ mg/g}$) 与实验值 ($Q_{e \text{ 实验}} = 33.49 \text{ mg/g}$) 更接近, 表明 MIPs 对 CS-IVa 的吸附以物理吸附为主, 吸附是由于分子间作用力引起的。

对于 NIPs, 虽然准二级动力学方程的线性相关系数较低 ($R^2 = 0.9131$), 但是由准二级动力学方程计算得到的平衡吸附量 ($Q_{e \text{ 计算}} = 14.35 \text{ mg/g}$) 更接近实验值 ($Q_{e \text{ 实验}} = 15.51 \text{ mg/g}$), 所以 NIPs 对 CS-IVa 的吸附过程更符合准二级动力学。

表 4 动力学拟合参数

Table 4 Kinetic fitting parameters

聚合物	$Q_{e \text{ 实验}}/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	准一级动力学			准二级动力学		
		R^2	K_1/min^{-1}	$Q_{e \text{ 计算}}/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	R^2	$K_2/(\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	$Q_{e \text{ 计算}}/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$
MIPs	33.49	0.9374	0.0656	36.04	0.9050	0.0211	28.93
NIPs	15.51	0.9485	0.0141	11.71	0.9131	0.0440	14.35

2.5.2 静态吸附实验 准确称取 20 mg MIPs 和 NIPs 各 9 份于 10 mL 的离心管中,依次加入 0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、1.00 mg/mL 的 CS-IVa 乙醇溶液 9 mL。室温振荡 3 h 后,离心 10 min (4000 r/min),取上清液过 0.22 μm 膜,用紫外分光光度计测定其吸光度,根据式 (2) 计算聚合物对不同浓度的 CS-IVa 吸附量,并根据式 (6) 计算印迹因子 (imprint factor, IF)。平行 3 次实验,取平均值。

$$\text{IF} = Q_{\text{MIPs}}/Q_{\text{NIPs}} \quad (6)$$

运用式 (7) Scatchard 模型评价聚合物的结合特性。

$$Q/C_e = (Q_{\text{max}} - Q_e)/K_d \quad (7)$$

Q_e 为吸附平衡时 CS-IVa 的吸附量, C_e 为吸附平衡时上清液中 CS-IVa 的质量浓度, Q_{max} 为最大表现吸附量, K_d 为平衡

解离常数

由图 12 可知,在 0.2~1.0 mg/mL 时, MIPs 和 NIPs 对 CS-IVa 都有吸附。随着 CS-IVa 质量浓度增大, MIPs 和 NIPs 对 CS-IVa 的吸附量迅速增加。在质量浓度为 0.5 mg/mL 时,吸附趋于饱和,且 MIPs 的吸附量明显大于 NIPs ($Q_{\text{MIPs max}} = 135.57 \text{ mg/g}$, $Q_{\text{NIPs max}} = 85.55 \text{ mg/g}$), IF 为 1.58。

用 Scatchard 模型来评价聚合物对 CS-IVa 的结合特性,由图 13 可知, MIPs 的 Scatchard 曲线可以拟合出 2 条线性曲线: $Y_1 = 5.0214X_1 - 1357.1$, $R^2 = 0.9918$; $Y_2 = -26.187X_2 + 3737.2$, $R^2 = 0.9607$, 表明 MIPs 对 CS-IVa 有 2 种结合方式,特异性结合和非特异性结合。相应的 K_d 值和 Q_{max} 分别为 0.199 1 mg/mL 和 270 mg/g、0.038 mg/mL 和 142.01 mg/g。

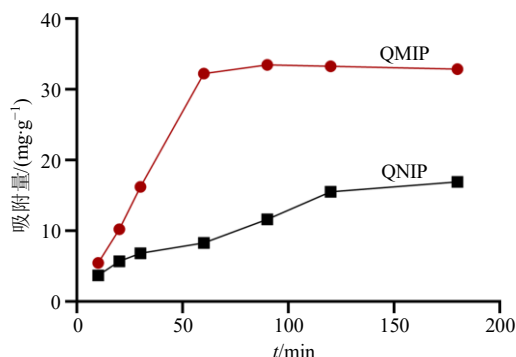


图 12 MIPs 和 NIPs 的吸附等温线

Fig. 12 Adsorption isotherm curves of MIPs and NIPs

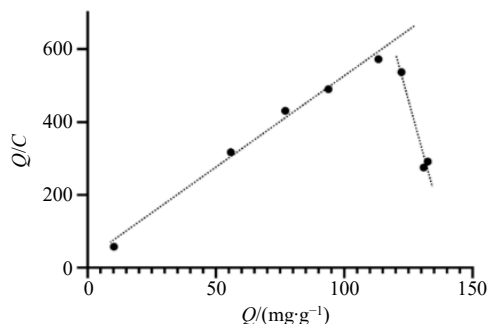


图 13 MIPs 的 Scatchard 曲线

Fig. 13 Scatchard curve of MIPs

2.5.3 重复再生实验 取同一批次制备的聚合物 20 mg, 加入 5 mL 0.5 mg/mL CS-IVa 乙醇溶液中, 振荡吸附 3 h, 加入 10 mL 甲醇-乙酸 (9:1), 超声 30 min, 离心 10 min (4000 r/min), 重复 3 次, 再用乙醇清洗掉乙酸, 洗脱完毕后再次进行吸附, 重复此操作 5 次, 收集上清液过 0.22 μ m 膜, 用紫外分光光度计检测 CS-IVa 的 A 值并计算吸附量。平行 3 次实验, 取平均值。

为了进一步考察 MIPs 对 CS-IVa 的吸附性能, 本实验对 MIPs 进行了 5 次重复吸附实验, 结果如表 5 所示, MIPs 印迹聚合物在 5 次吸附后, 吸附量由 122.40 mg/g 降低到 105.40 mg/g, 降低了 13%, 表明 MIPs 具有较好的重复使用性能。

2.5.4 解吸附实验 将 50 mg MIPs 加入 9 mL 0.5 mg/mL 的 CS-IVa 乙醇溶液中, 振荡吸附 3 h。离心 10 min (4000 r/min), 取上清液过 0.22 μ m 膜, 测定吸光度, 计算吸附量; 取吸附后的 MIPs 加入 3 mL 甲醇-乙酸 (9:1) 超声 (180 W, 40 kHz) 1 h, 静置 24 h 让其充分解吸, 再次离心 10 min (4000 r/min), 取上清液过 0.22 μ m 膜, 测定 A 值, 计算解吸量。根据式 (8) 计算解吸率。平行 3 次实验, 取平均值。

表 5 MIPs 的重复再生性能

Table 5 Repeated regeneration performance of MIPs

MIPs 的重 复次数	吸附量/ (mg·g ⁻¹)	MIPs 的重 复次数	吸附量/ (mg·g ⁻¹)
1	122.40	4	106.44
2	119.27	5	105.40
3	106.04		

$$\text{解吸率} = (C_0 - C_e) V_1 / V_2 C \quad (8)$$

V_1 为加入 CS-IVa 乙醇溶液的体积, C 为解吸后上清液的浓度, V_2 为解吸溶液的体积

MIPs 对 CS-IVa 的对模板分子 CS-IVa 的解吸率为 83.7%, 表明 MIPs 对 CS-IVa 没有造成死吸附, 易于解吸。

2.6 MIPs 在珠子参粗提物中的应用

2.6.1 珠子参供试品溶液的制备 称取 20 g 珠子参粉末, 用 70%乙醇回流提取 3 次^[21], 合并提取液并浓缩成浸膏, 然后加入 70%乙醇配制成每毫升含 100 mg 浸膏的溶液。

2.6.2 MIPs 固相萃取 称取适量 MIPs, 用乙醇溶胀后填充成径高比 1:2.5 的固相萃取小柱。用甲醇 (5 mL), 水 (5 mL) 依次淋洗萃取小柱, 取 0.1 g/mL 的浸膏溶液 5 mL 上样, 用 6 mL 70%乙醇作为洗脱液, 每 0.5 mL 收集 1 次, 将洗脱液过 0.22 μ m 滤膜, HPLC 检测洗脱情况。

2.6.3 色谱条件^[1]: 色谱柱为 Thermo Scientific™ Hypersil™、ODS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) 柱; 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液 (35:65); 检测波长 203 nm; 进样量 10 μ L; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C。

为了考察 MIPs 对珠子参粗提物中 CS-IVa 的分离效果, 本实验将 MIPs 填充成固相萃取小柱应用于珠子参提取液的分离并建立了 CS-IVa 标准曲线 $Y=2\,432.6 X+405.04$, $R^2=0.999\,7$ 。HPLC 结果表明, 与 C₁₈ 萃取小柱 (洗脱液 0.44 mg/mL) 相比, MIPs 柱 (洗脱液 0.89 mg/mL) 对珠子参提取液中 CS-IVa 具有明显分离效果 (图 14)。

3 讨论

相比丙烯酸、丙烯酰胺、甲基丙烯酸等直链小分子, DAAEE 具有菲环结构, 其充当功能单体合成的聚合物能够提供更高强度刚性的印迹空穴。此外, DAAEE 可能与 CS-IVa 存在环与环间的范德华力等非共价作用力, 使识别位点的选择性增强。因而

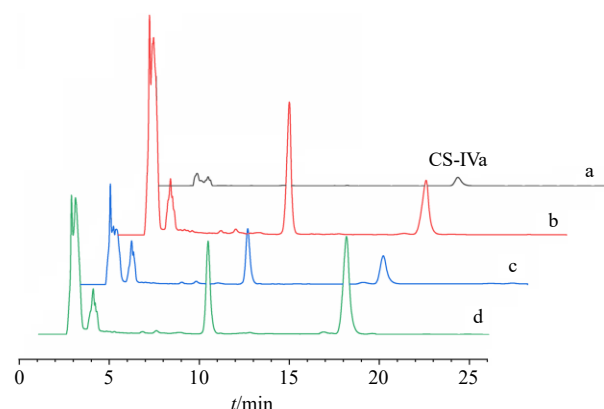


图 14 CS-IVa 对照品 (a)、珠子参提取液 (b)、 C_{18} 柱洗脱液 (c)、MIPs 柱洗脱液 (d) 的 HPLC 图

Fig. 14 HPLC of the standard of CS-IVa reference substance (a), extract of the *Panacis Majoris Rhizoma* (b), CS-IVa obtained after elution from C_{18} , and CS-IVa obtained after elution from MIPs (d)

DAAEE 作为功能单体制备的 MIPs 对 CS-IVa 的吸附量高于其他单体 (丙烯酸、丙烯酰胺、甲基丙烯酸)。

本实验以 DAAEE 作为大骨架功能单体, 通过沉淀聚合法成功合成了 CS-IVa 新型分子印迹聚合物。吸附性能研究表明 MIPs 对 CS-IVa 具有较大的吸附量 ($Q_{\max}=135.57 \text{ mg/g}$), IF 达到 1.58, 可多次重复使用。

HPLC 结果表明与 C_{18} 萃取小柱相比, MIPs 对珠子参提取液中 CS-IVa 具有选择吸附性, 有望开发为固相萃取及液相色谱柱填料。虽然沉淀法合成的聚合物其制备工艺简单, 但部分识别位点存在一定的包埋现象, 重复使用后, 吸附量会相应的降低, 后续研究将进一步改进和完善。本研究为后续开发更高选择性的 CS-IVa 吸附新材料提供理论基础, 同时为其他皂苷类化合物的分离纯化提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 283.
- [2] 许苗苗, 张旋, 宋蓓, 等. 珠子参抗肝损伤药效的物质基础研究 [J]. 西北药学杂志, 2014, 29(5): 486-489.
- [3] Yang J, Ling Y Y, Hua D, *et al.* IL-6R blockade by chikusetsusaponin IVa butyl ester inhibits Th17 cell differentiation and ameliorates collagen-induced arthritis [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(6): 1584-1586.
- [4] Xin Y, Yuan Q, Liu C Q, *et al.* MiR-155/GSK-3 β mediates anti-inflammatory effect of chikusetsusaponin IVa by

inhibiting NF- κ B signaling pathway in LPS-induced RAW264.7 cell [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 1-13.

- [5] Lee K M, Yun J H, Lee D H, *et al.* Chikusetsusaponin IVa methyl ester induces cell cycle arrest by the inhibition of nuclear translocation of β -catenin in HCT116 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 459(4): 591-596.
- [6] Dahmer T, Berger M, Barlette A G, *et al.* Antithrombotic effect of chikusetsusaponin IVa isolated from *Ilex paraguariensis* (Maté) [J]. *J Med Food*, 2012, 15(12): 1073-1080.
- [7] Ma Q, Cai S B, Liu X J, *et al.* Characterization of phytochemical components and identification of main antioxidants in *Crateva unilocularis* Buch. shoots by UHPLC-Q-Orbitrap-MS² analysis [J]. *Food Res Int*, 2021, 143: 110264.
- [8] 宋蓓, 徐悦, 李玉泽, 等. “太白七药”珠子参化学成分及抗肿瘤活性研究 [J]. 中南药学, 2019, 17(08): 1210-1214.
- [9] 李敏. 珠子参化学成分及生物活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [10] Gao D, Wang D D, Fu Q F, *et al.* Preparation and evaluation of magnetic molecularly imprinted polymers for the specific enrichment of phloridzin [J]. *Talanta*, 2018, 178: 299-307.
- [11] 廖辉, 金晨, 何玉琴, 等. 槲皮素分子印迹聚合物的合成及表征 [J]. 中草药, 2017, 48(08): 1537-1543.
- [12] 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.
- [13] Wang D D, Gao D, Xu W J, *et al.* Magnetic molecularly imprinted polymer for the selective extraction of hesperetin from the dried pericarp of *Citrus reticulata* Blanco [J]. *Talanta*, 2018, 184: 307-315.
- [14] Cheng Y, Nie J Y, Liu H D, *et al.* Synthesis and characterization of magnetic molecularly imprinted polymers for effective extraction and determination of kaempferol from apple samples [J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1630: 461531.
- [15] Tang W Y, Li G Z, Row K H, *et al.* Preparation of hybrid molecularly imprinted polymer with double-templates for rapid simultaneous purification of theophylline and chlorogenic acid in green tea [J]. *Talanta*, 2016, 152: 1-8.
- [16] 周菊英, 张玲玉, 李鹏飞, 等. 以马来松香丙烯酸乙二醇酯为交联剂的分子印迹聚合物对槲皮素的选择吸附性能 [J]. 精细化工, 2016, 33(03): 314-319.
- [17] 李梅. 含松香基的碱性橙分子印迹固相萃取材料的制备及其在食品安全检测中的应用研究 [D]. 南宁: 广西民族大学, 2012.

- [18] 刘敏, 吴宗远, 李小燕, 等. 以改性松香为交联剂的甲硝唑磁性分子印迹固相萃取材料的制备、表征及分子识别性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(1): 23-29.
- [19] 王雯静. 松香基高效液相色谱固定相的制备及对天麻素的分离研究 [D]. 恩施: 湖北民族学院, 2017.
- [20] Li P F, Wang T, Lei F H, et al. Preparation and evaluation of paclitaxel-imprinted polymers with a rosin-based crosslinker as the stationary phase in high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1502: 30-37.
- [21] 李凤英, 王英姿, 王晴, 等. 正交试验法优化珠子参总皂苷提取工艺 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(2): 151-154.
- [22] 郝娇娇. 快速准确预测 O-H-O 型氢键复合物的氢键键长和作用能 [D]. 大连: 辽宁师范大学, 2015.
- [23] 李季. 生物分子印迹模板印迹聚合物的设计合成及机理研究 [D]. 西安: 西北工业大学, 2016.
- [24] 张伟庆, 黄滨, 余小岚, 等. 对 BJH 方法计算孔径分布过程的解读 [J]. 大学化学, 2020, 35(2): 98-106.
- [25] 李玲. 苯醚甲环唑亲水性分子印迹微球的制备、表征及应用 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.

[责任编辑 郑礼胜]