

基于双模板磁性表面分子印迹技术高效靶向分离大豆素及柚皮素

饶青青, 王 彪, 李圆莲, 童 飞, 杨胜祥, 况 焱*

浙江农林大学化学与材料工程学院, 浙江 临安 311300

摘要: 目的 制备靶向分离大豆素及柚皮素的表面分子印迹聚合物 (surface molecularly imprinted polymers, SMIPs) 并对其结构表征和吸附性能测试。方法 以大豆素和柚皮素为模板分子, 改性的四氧化三铁纳米粒子为磁性载体, 甲基丙烯酸 (methacrylic acid, MAA) 为单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯 (ethylene dimethacrylate, EGDMA) 为交联剂, 在偶氮二异丁腈 [2,2'-azobis(2-methylpropionitrile), AIBN] 引发下进行聚合。采用傅里叶变换红外光谱仪 (Fourier transform infrared spectrometer, FT-IR)、热重分析仪 (thermal gravimetric analyzer, TG)、扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 对表面分子印迹聚合物的形貌与结构进行表征。通过动态吸附与静态吸附测试分析其吸附行为; 选择性吸附测试表征其吸附特异性; 再生吸附测试其循环使用性能。结果 溶液初始浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$ 时, 振荡吸附 20 min 后, 双模板磁性表面分子印迹聚合物 (Daidzein-Naringin/SMIPs, D-N/SMIPs) 对大豆素的吸附量可达 21.05 mg/g, 对柚皮素的吸附量为 27.45 mg/g。准一级、准二级动力学模型和 Langmuir、Freundlich 等温吸附模型拟合数据表明 D-N/SMIPs 对大豆素和柚皮素的吸附以单分子层化学吸附行为为主。D-N/SMIPs 对模板分子大豆素和柚皮素具有良好的选择性识别能力, 对大豆素的印迹因子为 2.05、对柚皮素的印迹因子为 2.43, 远高于对槲皮素的 0.88、茜素的 1.17 和芦丁的 1.26, 可以靶向吸附分离目标化合物。经 9 次吸附-解吸循环后, D-N/SMIPs 对大豆素和柚皮素的吸附能力仍维持在 16.58 mg/g 和 20.08 mg/g, 结构稳定可重复分离应用。结论 制备的表面分子印迹聚合物对模板分子具有良好的靶向吸附能力, 可用于大豆素和柚皮素的快速定向分离。

关键词: 表面分子印迹聚合物; 磁性分离; 选择性吸附; 黄酮类化合物; 大豆素; 柚皮素

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)22-7674-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.22.011

Efficient selective separation of daidzein and naringenin based on dual-template magnetic surface molecularly imprinted technology

RAO Qingqing, WANG Biao, LI Yuanlian, TONG Fei, YANG Shengxiang, KUANG Yi

College of Chemical and Materials Engineering, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300, China

Abstract: Objective To prepare surface molecularly imprinted polymers (SMIPs) with selective separation performance towards daidzein and naringenin, and characterize the structures and evaluate their adsorption properties. **Methods** The surface molecularly imprinted polymers (SMIPs) were synthesized under the initiation of 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile), using daidzein and naringenin as template molecules, modified Fe_3O_4 nanoparticles as magnetic carrier, and methacrylic acid (MAA) as monomer, and ethylene dimethacrylate (EGDMA) as crosslinking agent. The morphology and structure of SMIPs were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), thermogravimetric analyzer (TG), and scanning electron microscope (SEM). The adsorption behavior was analyzed by dynamic adsorption and static adsorption tests; adsorption specificity was evaluated by selective adsorption test; and the recycling performance was tested by regeneration adsorption experiment. **Results** At an initial concentration of 300 $\mu\text{g/mL}$, the adsorption capacities of Daidzein-Naringin/SMIPs (D-N/SMIPs) towards daidzein and naringenin was 21.05 mg/g and 27.45 mg/g, respectively. The results fitted by pseudo-first-order, pseudo-second-order, Langmuir and Freundlich models indicated that the adsorption behavior of D-N/SMIPs to daidzein and naringenin was mainly monomolecular layer chemical adsorption. D-N/SMIPs showed good selective recognition abilities to daidzein and naringenin, with an imprinting factor (IF) of 2.05 for daidzein and 2.43 for

收稿日期: 2024-03-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32271527); 国家自然科学基金项目 (32371536); 国家自然科学基金项目 (32301259); 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划 (2022C02023, 2023C02032, 2023C02015)

作者简介: 饶青青 (1994—), 女, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为天然产物化学。E-mail: qqrao@zafu.edu.cn

*通信作者: 况 焱 (1985—), 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为天然产物化学。E-mail: kuangyi@zafu.edu.cn

naringenin, which was much higher than that of 0.88 for quercetin, 1.17 for alizarin, and 1.26 for rutin and can be targeted for adsorption and separation of target compounds. Moreover, the adsorption capacity of D-N/SMIPs for daidzein and naringenin remained at 16.58 mg/g and 20.08 mg/g even after nine adsorption-desorption cycles, and the structure was stable and could be used for repeated separation. **Conclusion** The prepared SMIPs have good selective adsorption capacity to template molecules and can be used for rapid targeted separation of daidzein and naringenin.

Key words: surface molecularly imprinted polymers; magnetic separation; selective adsorption; flavonoids; daidzein; naringenin

黄酮类化合物^[1]是一类广泛分布于高等植物中的次生代谢产物^[2-3], 作为药用植物的主要活性成分之一, 具有丰富的生物活性和结构多样性, 在保健食品、食品添加剂、医疗药物和化妆品等领域应用十分广泛^[4-5]。其中, 大豆素和柚皮素作为 2 种典型的天然黄酮类化合物, 具有抗氧化^[5-6]、抗炎^[7-8]、抗癌^[9-11]等多种优异的生物活性。重要的是, 由于其对多种癌症均具有潜在的抑制活性, 并且表现出优异的多药耐药性, 正逐渐成为癌症药物开发的优异先导物^[12-13]。然而, 目前复杂植物源中黄酮类化合物的分离提取仍主要依靠溶剂提取法、硅胶柱、凝胶柱、大孔树脂、液相等常规色谱分离手段^[14-17], 不仅操作过程冗长、需要大型仪器设备, 且耗费大量溶剂、产物纯度低。不同地是, 采用吸附剂的吸附分离法因其成本低、环境友好、安全性高、操作简便等优点而备受关注。目前, 活性炭、碳纳/微米球、金属有机骨架材料、聚酰胺以及其他多种生物基材料已被用于植物提取液中黄酮类化合物的分离^[18-20], 但是其吸附量较低, 且绝大多数吸附剂对黄酮类化合物缺乏吸附选择性, 因而极大限制了该类活性化合物, 尤其是其中高价值稀缺活性物质的发展。

近年来通过分子印迹技术(molecular imprinting technology, MIT)进行目标产物分离的方法引起了广泛关注^[21-23]。通过将模板分子预先固定在聚合物网络结构中, 随后洗脱除去模板分子, 即可得到具有与目标分子空间形状、分子大小和功能基团相匹配的印迹空穴结构的分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs), 表现出优异的“分子记忆”效应, 从而可实现对某一特定目标分子的选择性吸附分离。基于此, 分子印迹聚合物在固相萃取、手性分离、痕量检测、拟酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测等领域表现出巨大的应用前景^[24-25]。然而, 目前多数 MIPs 制备时仅采用单一的模板分子, 其所得到的单模板分子印迹聚合物只能选择性地识别并分离单一化合物, 难以同时实现对多种活性物质的高效、靶向分

离, 限制了定向分离效率。针对这一问题, 学者提出在构建 MIPs 时添加多种模板分子的多模板分子印迹技术, 使印迹聚合物内存在多种特异性印迹孔穴, 实现高效识别分离多目标分子的目的。此外, 大分子拥挤理论(macromolecular crowding)表明, 多模板分子同时参与印迹聚合过程, 其分子间可形成氢键以协同提升印迹效果, 增强印迹聚合物对模板分子的吸附能力, 分离效果优于单模板印迹聚合物^[26]。曾国龙等^[27]运用多模板分子印迹法实现了对四环素、土霉素、金霉素、强力霉素的同时检测。此外, 谢德昌等^[28]成功运用多模板技术实现对多种雌激素的选择性分离。因此采用多模板分子印迹法进行黄酮类化合物的定向分离具有良好的应用前景。

本研究以大豆素和柚皮素为双模板分子, 磁性纳米粒子为载体, 甲基丙烯酸(methylacrylic acid, MAA)为单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯(ethylene dimethacrylate, EGDMA)为交联剂制备双模板磁性表面分子印迹聚合物(Daidzein-Naringin/surface molecularly imprinted polymers, D-N/SMIPs), 并运用 FT-IR、TG、SEM 等测试分析该印迹聚合物的化学成分、结构稳定性及表面微观形貌, 进一步通过动态吸附、静态吸附、选择性吸附和再生吸附性能测试 D-N/SMIPs 对大豆素和柚皮素的吸附能力、选择识别吸附性和循环吸附性能, 以实现黄酮类化合物的快速定向分离。

1 仪器与材料

1.1 仪器

JJ-1 型精密增力电动搅拌器, 江苏科析仪器有限公司; Nicolet iS 10 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国赛默飞世尔科技公司; ZEISS Sigma 300 型扫描电子显微镜, 德国蔡司公司; Netzsch TG 209 F3 型热重分析仪, 德国耐驰公司; UV-2550 型紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司; DF-101S 型恒温油浴锅, 巩义市予华仪器有限公司。

1.2 试剂

大豆素(质量分数 98%, 批号 D106438)、柚皮素(质量分数 98%, 批号 N107346)、槲皮素(质量

分数 98.5%，批号 Q111273）、偶氮二异丁腈（质量分数 99%，批号 A104256）、甲基丙烯酸（质量分数 98%，批号 M102642）、乙二醇二甲基丙烯酸酯（质量分数 98%，批号 E106223）、芦丁（质量分数 95%，批号 R189033）、六水合三氯化铁（分析纯，批号 F102739），上海阿拉丁生化科技有限公司；茜素（质量分数 97%，批号 A890350），上海麦克林生化科技有限公司；3-(甲基丙烯氧基)丙基三甲氧基硅烷（3-methacryloxypropyltrimethoxysilane, KH570，批号 U33105115），分析纯，山东优索化工科技有限公司；正硅酸四乙酯（tetraethyl orthosilicate, TEOS），分析纯，无锡亚泰联合化工有限公司；*N,N*-二甲基甲酰胺

（*N,N*-dimethylformamide, DMF，批号 81007718）、乙酸、乙醇、盐酸、乙二醇、乙酸钠等分析纯试剂均购于上海国药控股化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 双模板磁性表面分子印迹聚合物（D-N/SMIPs）的制备

制备流程见图 1。首先称取 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5.4 g)，无水乙酸钠 (14.4 g)，乙二醇 (140.0 mL) 混合均匀后于 200 °C 下加热 8 h。反应结束后滤过，采用超纯水和无水乙醇对反应产物交替洗涤 3 次，使用磁铁收集后于 45 °C 下真空干燥 12 h 后研磨备用，即得 Fe_3O_4 磁性纳米粒子。

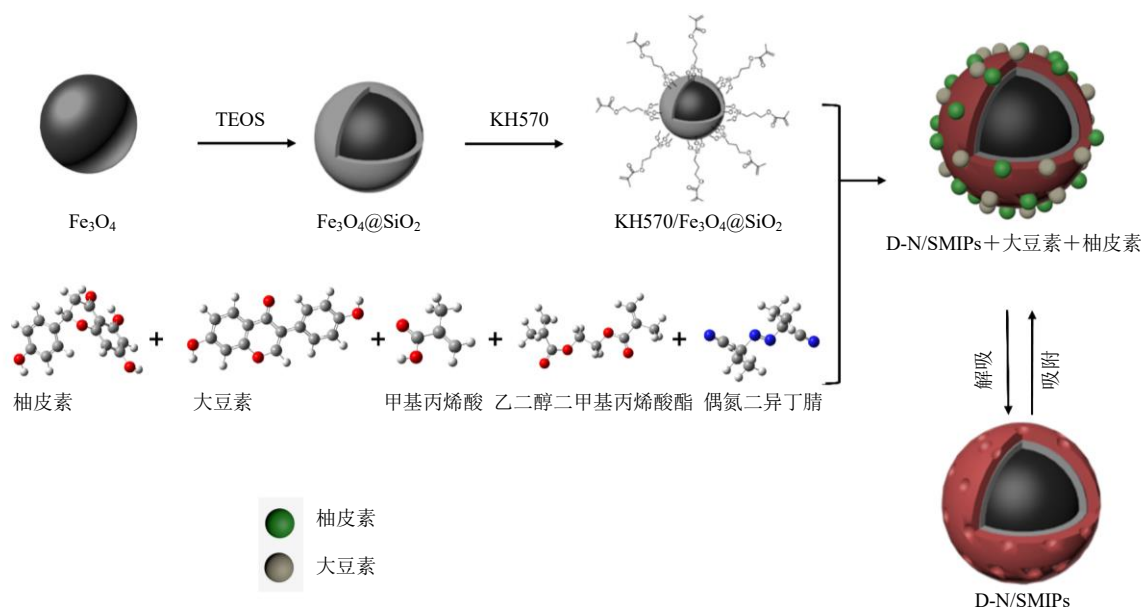


图 1 大豆素-柚皮素双模板磁性表面分子印迹聚合物制备流程

Fig. 1 Schematic illustration of preparation procedure of D-N/SMIPs

进一步将制备所得磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒 (0.1 g) 于 30 mL 超纯水中超声分散后转入三颈烧瓶中，依次将无水乙醇 (120.0 mL) 和浓氨水 (3.0 mL) 加入三颈烧瓶中，升温至 30 °C 后滴加 TEOS (2.0 mL) 并持续搅拌 20 h，整个反应于氮气氛围下进行。反应结束后，用无水乙醇与超纯水交替冲洗反应产物 3 次，于 50 °C 真空干燥箱中干燥 10 h 后研磨备用。得到 SiO_2 包裹的 Fe_3O_4 颗粒，记为 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 。将盐酸溶液 (4 mol/L, 4 mL) 与 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 颗粒 (0.5 g) 混合于 100 mL 无水乙醇中，搅拌活化 24 h，随后用超纯水洗涤至中性并于 50 °C 真空干燥 10 h 得到活化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 。随后将活化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 颗粒 (0.5 g)、KH570 (3 mL)、无水乙醇 (45 mL)

与超纯水 (15 mL) 混合并超声分散，65 °C 磁力搅拌 2 h。最后以无水乙醇洗涤反应产物 3 次，并于 45 °C 真空干燥 24 h 后研磨备用。即得硅烷化改性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 颗粒，记为 $\text{KH570}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 。

称取大豆素 (0.031 7 g)、柚皮素 (0.031 7 g) 充分溶解于乙醇/DMF 复配溶液 50.0 mL (乙醇-DMF 46:4) 中，随后加入 $\text{KH570}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (0.5 g)、MAA (0.086 1 g) 常温条件下机械搅拌 12 h 进行预聚合反应。待预聚合反应结束后加入 EGDMA (2.00 mL) 与 AIBN (0.03 g) 搅拌均匀，将混合溶液转移至 100 mL 三颈烧瓶中， N_2 保护条件下，60 °C 恒温搅拌 24 h 后停止反应，得到粗产品。待体系冷却至室温后，超纯水与无水乙醇反复冲洗反应产物

3 次以除去未反应物质, 加入无水乙醇-乙酸 (9:1) 搅拌 24 h 以洗脱印迹聚合物中的模板分子, 随后于 65 °C 下真空干燥 12 h 后研磨备用。即得大豆素/柚皮素双模板磁性表面分子印迹聚合物 Daidzein-Naringenin/SMIPs, 记为 D-N/SMIPs。除未添加模板分子外, 空白印迹聚合物 (Daidzein-Naringenin/ surface non-molecularly imprinted polymers, D-N/SNIPs) 的制备方法与上述过程相同。

2.2 结构与形貌表征

2.2.1 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 表征 分别称取适量 Fe_3O_4 、D-N/SMIPs 及 D-N/SNIPs 与溴化钾混合研磨均匀后压片制成红外待测样品, 使用傅立叶变换红外光谱仪在 400~4 000 cm^{-1} 对样品化学组成进行分析。

如图 2 所示, 样品在 623 cm^{-1} 处出现明显的 Fe-O 伸缩振动峰。同时 D-N/SMIPs 及 D-N/SNIPs 在 1 096、469 cm^{-1} 处出现强吸收峰, 分别对应为 Si-O-Si 的伸缩振动峰和 Si-O 的弯曲振动峰, 表明 SiO_2 层的成功包覆和 KH570 的成功修饰。1 720 cm^{-1} 处出现的吸收峰归属为 C=O 的特征吸收峰。此外, 3 430 cm^{-1} 处的宽峰为 -OH 的伸缩振动特征吸收峰, 由 Fe_3O_4 纳米粒子表面的羟基以及甲基丙烯酸上的 -COOH 上的羟基振动产生, 以上数据与设计的分子印迹聚合物的结构相符, 表明 D-N/SMIPs 成功制备。

2.2.2 热重分析 (TG) 使用热重分析仪对 Fe_3O_4 、D-N/SMIPs 及 D-N/SNIPs 进行热分解稳定性测试。测试条件为 N_2 氛围, 测试温度为 30~800 °C, 升温速率为 10 °C/min。

如图 3 所示, 3 组样品在 100 °C 前均存在轻微的质量损失, 由于附着在样品表面的有机溶剂 (乙醇) 和游离水的挥发。随着温度的升高, Fe_3O_4 样

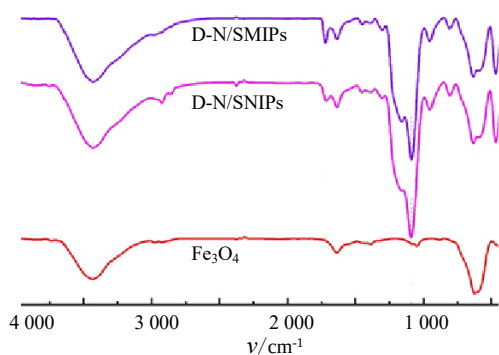


图 2 Fe_3O_4 、D-N/SMIPs 及 D-N/SNIPs 红外光谱
Fig. 2 FT-IR spectra of Fe_3O_4 , D-N/SMIPs and D-N/SNIPs

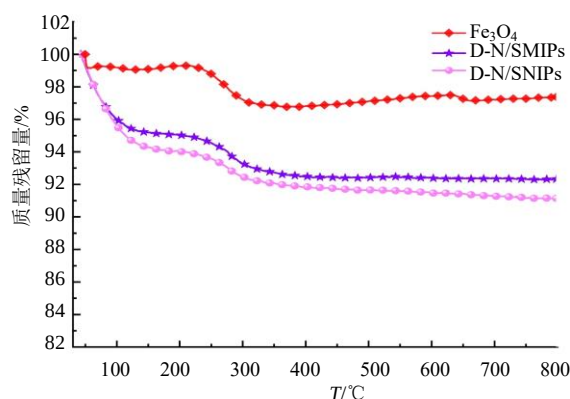


图 3 Fe_3O_4 、D-N/SMIPs 及 D-N/SNIPs 热重曲线
Fig. 3 TG diagram of Fe_3O_4 , D-N/SMIPs and D-N/SNIPs

品内的结晶水和有机溶剂 DMF 继续挥发, 同时, D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 样品中的聚合物组分开始分解, 导致样品质量进一步下降。随后样品整体质量基本维持恒定, 其中, 600~650 °C 阶段 Fe_3O_4 样品质量轻微下降, 这是由于部分 Fe_3O_4 受热分解为 FeO 和 Fe_2O_3 。总的来说, Fe_3O_4 、D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 样品的最终热质量损失率分别为 2.6%、7.7%、8.8%, 上述结果也从侧面证明了印迹层聚合物的成功包覆, 同时表明 D-N/SMIPs 具有良好的热稳定性, 可满足实际应用需求。

2.2.3 磁滞曲线 (VSM) 分析 使用 LakeShore 7404 振动磁强计对 Fe_3O_4 、D-N/SMIPs 及 D-N/SNIPs 的磁化强度进行表征, 测试条件为室温, 测试范围为 -2 T~2 T。

图 4 为样品的磁滞曲线。如结果所示, 所有测试样品的磁滞曲线均呈 S 型, 通过原点且相对原点中心对称, 并且无滞回现象, 说明其具有良好的超顺磁性。其中, Fe_3O_4 、D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 样品的饱和

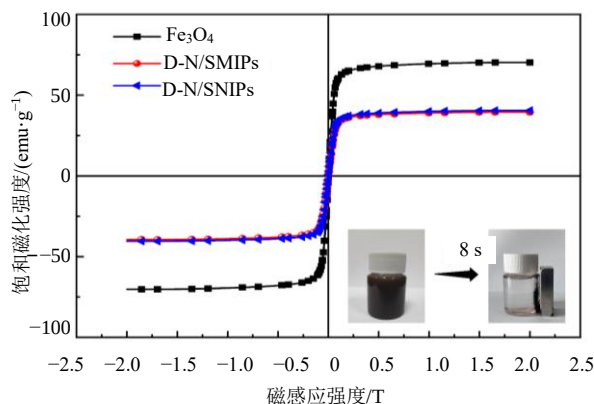


图 4 Fe_3O_4 、D-N/SMIPs 及 D-N/SNIPs 磁滞曲线
Fig. 4 VSM diagram of Fe_3O_4 , D-N/SMIPs and D-N/SNIPs

磁化强度分别为 70.24、39.50、40.49 emu/g。经二氧化硅层修饰和印迹聚合物层包裹后,吸附剂的饱和磁化强度明显下降,这一现象也从侧面证明分子印迹聚合物的制备成功。此外,如图 4 中插图所示,D-N/SMIPs 仍具有足够的磁化强度实现高效磁分离,通过磁铁吸附可在 8 s 内实现对吸附剂的快速富集。

2.2.4 扫描电子显微镜 (SEM) 表征 将真空干燥后的 D-N/SMIPs 及 D-N/SNIPs 样品喷金 60 s 后利

用 ZEISS Sigma 300 扫描电子显微镜分析其形貌特征,电压为 3 kV。

图 5 为 D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 粒子在不同放大倍数下的表面形貌图。从图中可以看出,D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 表面均具有一定的粗糙度,这为后续目标分子的吸附提供了丰富的吸附位点。此外,D-N/SNIPs 颗粒的团聚现象较 D-N/SMIPs 粒子更加明显,表明其分散性相对较差。

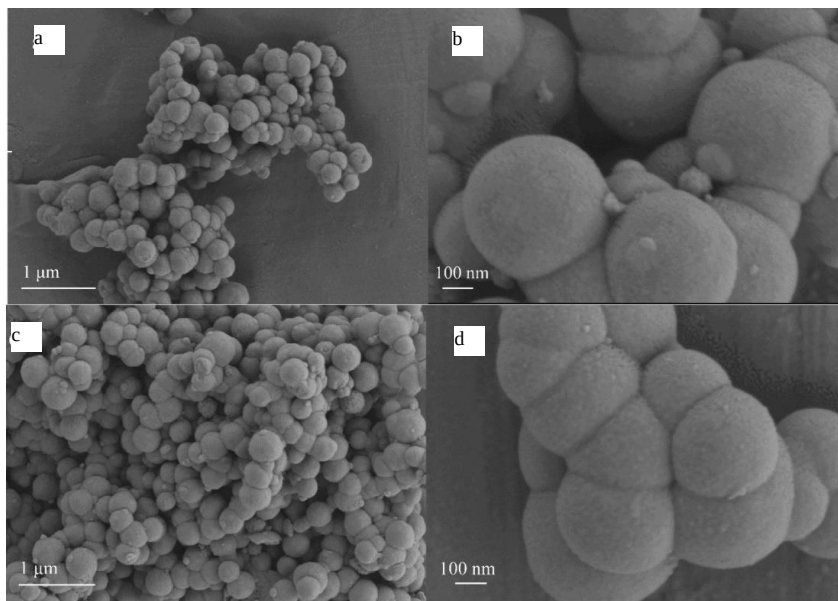


图 5 D-N/SMIPs (a、b) 和 D-N/SNIPs (c、d) 在不同放大倍数下的 SEM 图

Fig. 5 SEM images of D-N/SMIPs (a, b) and D-N/SNIPs (c, d) at different magnifications

2.3 吸附性能研究

2.3.1 动态吸附性能研究 将柚皮素和大豆素溶于无水乙醇中制成 240 μg/mL 的待测吸附溶液。取 10 mg D-N/SMIPs 与 10 mL 待吸附溶液超声混合均匀后进行振荡吸附,吸附时间为 2、5、10、20、30、40、50、60 min。吸附完成后,采用钕磁铁富集印迹聚合物,取上清液 1 mL 用无水乙醇稀释至 10 mL。使用紫外-可见分光光度计在 248 nm 与 288 nm 处检测溶液中大豆素和柚皮素的吸光度 (A),通过标准曲线计算出溶液中剩余两种目标分子的浓度,运用下列公式计算得出 D-N/SMIPs 对大豆素和柚皮素的吸附量 (q)。D-N/SNIPs 对吸附质的吸附量测试方法同上。测试均至少进行 3 次并取平均值。

$$q = (C_0 - C_t)V/W$$

q 为吸附量, C_0 为初始溶液质量浓度, C_t 为 t 时间溶液质量浓度, V 为吸附溶液体积, W 为印迹聚合物质量

如图 6 所示, D-N/SMIPs 大豆素和柚皮素的吸附量先随着接触时间的增加而快速上升,随后吸附速

率随时间延长而减慢。吸附 15 min 时,其对大豆素和柚皮素的吸附分别达到 18.12、24.22 mg/g。吸附 20 min 后,吸附量达到平衡,此时 D-N/SMIPs 对大豆素的吸附量为 21.16 mg/g,对柚皮素的吸附量为 27.74 mg/g。在吸附初始阶段,印迹物表面存在大量空余可结合位点。并且功能单体甲基丙烯酸的加入可在印迹聚合物中的表面引入丰富的羧基,从而与大豆素、柚皮素分子间可形成氢键,在吸附时将模板分子快速富集到吸附剂周围(图 7)。随着吸附时间的延长,D-N/SMIPs 表面印迹空腔逐渐被占据,从而导致后续大豆素、柚皮素分子进入未被占据的印迹空穴的传质阻力加大,吸附速率明显下降,最终达到吸附平衡。而相同条件下 D-N/SNIPs 对大豆素的饱和吸附量仅为 10.20 mg/g,对柚皮素的饱和吸附量为 11.26 mg/g,吸附效果远低于 D-N/SMIPs,表明 D-N/SMIPs 具有良好的吸附性能和优异的“分子记忆”效应。

随后采用准一级动力学模型和准二级动力学模型对吸附动力学曲线进行拟合以分析 D-N/SMIPs

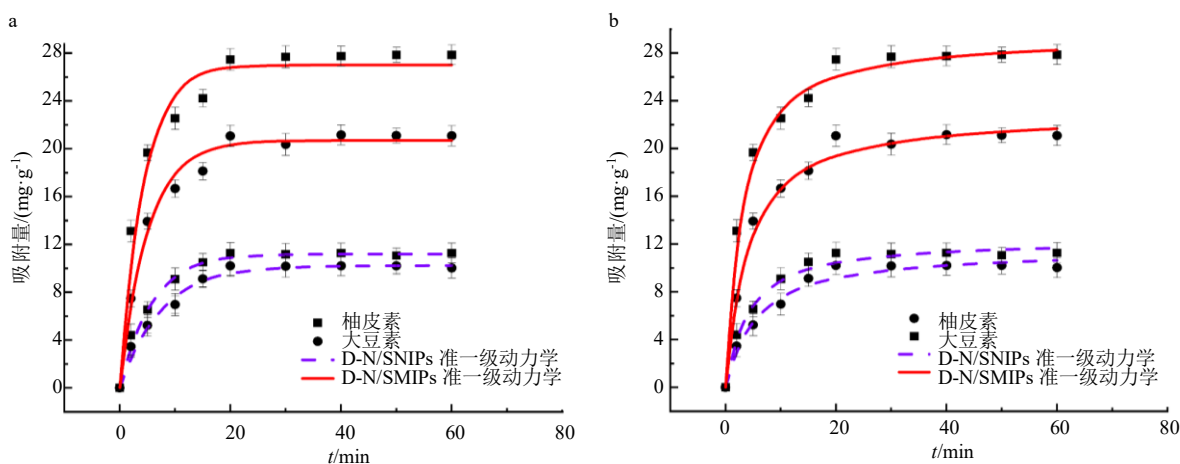


图 6 D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 的准一级动力学拟合曲线 (a) 和准二级动力学拟合曲线 (b)

Fig. 6 Adsorption kinetic curves of D-N/SMIPs and D-N/SNIPs fitted by pseudo-first-order (a) and pseudo-second-order (b)

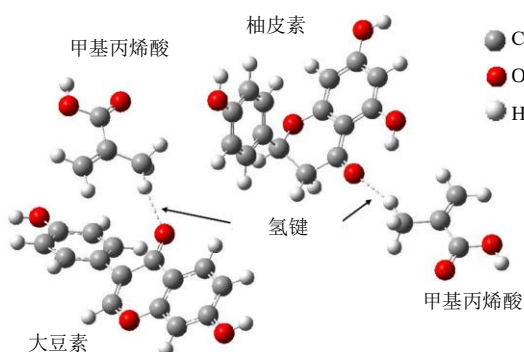


图 7 大豆素和柚皮素与甲基丙烯酸分子氢键结合示意图

Fig. 7 Schematic diagram of molecular hydrogen bonding of daidzein and naringenin with methacrylic acid

对大豆素和柚皮素的吸附行为。相关计算公式如下。

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t$$

$$\frac{t}{q_t} = \frac{t}{q_e} + 1/k_2 q_e^2$$

q_e 为吸附平衡时材料对模板分子的吸附量、 q_t 为 t 时刻材料对模板分子的吸附量、 t 为吸附时间、 k_1 和 k_2 分别为准一级

和准二级方程的速率常数

表 1 为 D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 对大豆素柚皮素的吸附动力学拟合参数。从 2 种动力学拟合曲线及相关系数 (R^2) 可知, D-N/SMIPs 的准二级动力学方程拟合曲线对大豆素和柚皮素的吸附相关系数均大于其准一级动力学模型的相关系数, 分别为 0.991 1 和 0.994 4, 且其拟合计算所得的平衡吸附量与实验测得的吸附量更接近, 这说明 D-N/SMIPs 的对大豆素和柚皮素的吸附以化学吸附为主。

2.3.2 静态吸附性能研究 以柚皮素与大豆素为溶质, 无水乙醇为溶剂, 配制质量浓度分别为 30、60、90、120、150、180、240、270、300、360 $\mu\text{g/mL}$ 的大豆素吸附溶液和柚皮素吸附溶液, 随后将 10 mg 吸附剂分别加入 10 mL 上述吸附溶液中并混合均匀, 室温条件下振荡吸附 20 min 后, 采用钕磁铁吸附分离印迹聚合物, 随后取 1 mL 上清液并用无水乙醇稀释至 10 mL, 最后采用 UV-vis 分光光度计测试溶液 A, 并根据标准曲线计算 D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 对大豆素和柚皮素的吸附量。每组试验至

表 1 准一级和准二级动力学方程拟合参数

Table 1 Fitting parameters of pseudo-first and pseudo-second order kinetic equation

吸附剂	吸附质	$q_{e, \text{exp}} / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	准一级动力学			准二级动力学		
			$q_{e, \text{cal}} / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$k_1 / (\text{min}^{-1})$	R^2	$q_{e, \text{cal}} / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$k_2 / (\text{min}^{-1})$	R^2
D-N/SMIPs	大豆素	21.16	20.697	0.198	0.986 5	21.961	0.012	0.991 1
	柚皮素	27.85	27.009	0.262	0.974 8	28.453	0.013	0.994 4
D-N/SNIPs	大豆素	11.26	11.536	0.016	0.977 7	12.375	0.022	0.987 2
	柚皮素	11.26	11.195	0.190	0.991 3	12.375	0.022	0.987 2

少重复 3 次并取平均值。

如图 8 所示, D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 对大豆素溶液和柚皮素溶液表现出相同的吸附趋势, 其吸附量均先随着吸附溶液质量浓度的增加而增加, 随后在初始溶液质量浓度为 240 $\mu\text{g/mL}$ 时达到吸附平衡。但是, 在整个测试浓度范围内, D-N/SNIPs 对大豆素和柚皮素的吸附量均明显低于 D-N/SMIPs 对于其二

者的吸附量, 表明 D-N/SMIPs 具有良好的吸附能力, 得益于 D-N/SMIPs 印迹层中丰富的结合位点。

此外, D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 对大豆素和柚皮素的吸附量差值亦随着吸附质溶液浓度的增加而逐渐增大, 直至达到平衡。因此, 在后续测试中溶质的质量浓度均为 240 $\mu\text{g/mL}$ 。

随后采用 Langmuir 等温吸附模型和 Freundlich

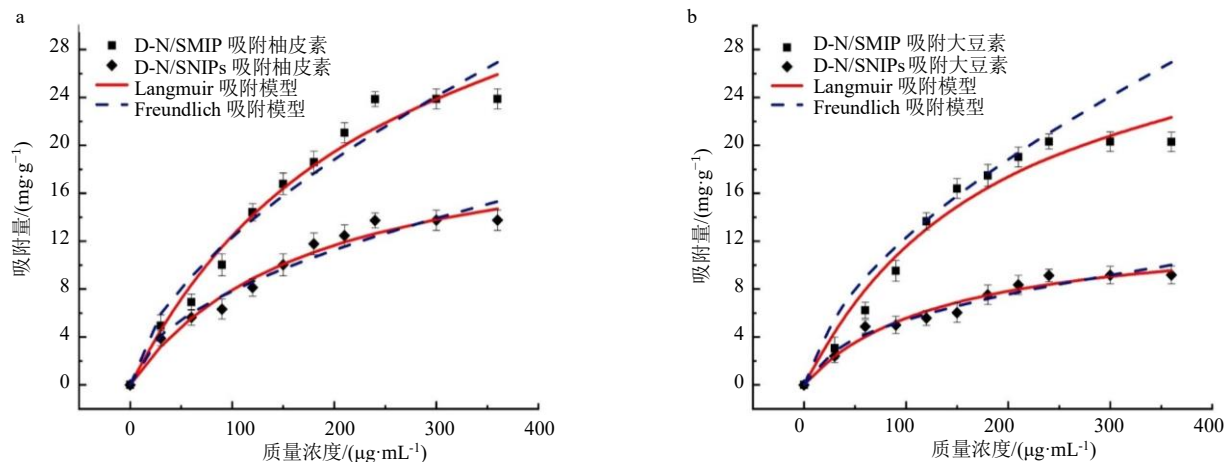


图 8 D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 对柚皮素 (a) 和大豆素 (b) 的等温吸附曲线

Fig. 8 Adsorption isotherms of D-N/SMIPs and D-N/SNIPs towards naringenin (a) and daidzein (b)

等温吸附模型对上述实验数据进行拟合。表 2 列出了 D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 对大豆素和柚皮素的等温吸附相关参数。由图 8 可见, 相较于 Freundlich 吸附模型, Langmuir 吸附模型更贴合实验数据, 且 Langmuir 吸附模型拟合的相关系数大于 Freundlich 吸附模型拟合的相关系数, 因此, 认为大豆素和柚皮素在 D-N/SMIPs 上的吸附行为更倾向于单层分子吸附。

2.3.3 选择吸附性能研究 为了进一步测试 D-N/SMIPs 对大豆素和柚皮素的吸附选择性, 选取化学结构、分子大小和功能基团相似的活性分子作为类似物进行吸附选择性测试, 类似物分别为槲皮素、茜素和芦丁。分别配制质量浓度为 240 $\mu\text{g/mL}$ 的大豆素、柚皮素、槲皮素、茜素、芦丁的乙醇溶液,

然后将 10 mg D-N/SMIPs 分别加入上述吸附溶液中 (10 mL), 室温下吸附 20 min 后用铷磁铁分离印迹聚合物, 随后取 1 mL 上清液并用无水乙醇稀释至 10 mL, 运用 UV-vis 分光光度计分别在 248、288、365、374、434 nm 处检测 A , 随后利用标准曲线计算 D-N/SMIPs 对大豆素、柚皮素、芦丁、槲皮素、茜素素的吸附量。所有测试至少重复 3 次并取平均值。

采用印迹因子 (imprinting factor, IF) 评价吸附剂的吸附选择性, 计算公式如下。

$$\text{IF} = q_{\text{D-N/SMIPs}} / q_{\text{D-N/SNIPs}}$$

$q_{\text{D-N/SMIPs}}$ 和 $q_{\text{D-N/SNIPs}}$ 分别为 D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 对吸附质的吸附量

从图 9 可以看出, D-N/SMIPs 对大豆素和柚皮

表 2 D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 的 Langmuir 模型和 Freundlich 模型拟合参数

Table 2 Langmuir and Freundlich model fitting parameters of D-N/SMIPs and D-N/SNIPs

吸附剂	吸附质	Langmuir 方程			Freundlich 方程		
		$q_{m,c}$	K_L	R^2	n	K_F	R^2
D-N/SMIPs	大豆素	34.595 4	0.005 0	0.966 6	1.761 02	0.827 0	0.930 3
D-N/SNIPs	大豆素	13.187 9	0.007 2	0.969 8	2.099 81	0.606 6	0.963 7
D-N/SMIPs	柚皮素	44.047 1	0.003 9	0.977 3	1.642 67	0.748 6	0.957 1
D-N/SNIPs	柚皮素	21.859 0	0.005 7	0.976 0	1.913 85	0.707 1	0.962 1

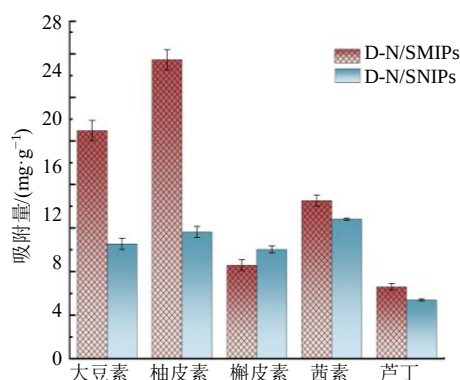


图 9 D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 的吸附选择性

Fig. 9 Selective adsorption of D-N/SMIPs and D-N/SNIPs

素的吸附量明显大于对其他 3 种类似物的吸附量，且其对槲皮素、茜素和芦丁三者的吸附量较为接近。说明 D-N/SMIPs 表面存在能特异性识别大豆素和柚皮素的印迹孔穴，因此对大豆素和柚皮素的选择性识别能力较高，为特异性吸附，而对茜素、芦丁和槲皮素的吸附均为非特异性吸附。不同于 D-N/SMIPs，D-N/SNIPs 对模板分子及类似物的吸附量基本相当，说明 D-N/SNIPs 对大豆素、柚皮素、茜素、芦丁和槲皮素的吸附均为非特异性吸附。表 3 列出了 D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 对 5 种分子的吸附选择性参数。从表中可以看出，D-N/SMIPs 对大豆素的印迹因子为 2.05、对柚皮素的印迹因子为 2.43，远高于对槲皮素 (0.88)、茜素 (1.17) 和芦丁 (1.26) 的印迹因子，表现出良好的吸附选择性。以上结果充分证明了 D-N/SMIPs 表面印迹层的成功构建，并且进一步说明了吸附剂对目标分子的选择性吸附主要依靠特定的印迹孔穴结构。

2.3.4 再生吸附性能研究 吸附剂的使用寿命是其实际应用时的重要因素之一，为此通过循环吸附-解

吸测试探究了 D-N/SMIPs 的可再生性能。将 10 mg D-N/SMIPs 与 10 mL 240 $\mu\text{g/mL}$ 的大豆素或柚皮素吸附溶液混合均匀，振动 20 min 后用钕磁铁分离印迹聚合物，随后取 1 mL 吸附后溶液的上清液并用无水乙醇稀释至 10 mL，测试其 A 并计算 D-N/SMIPs 对大豆素或柚皮素的吸附量。然后以无水乙醇-乙酸 (9:1) 复合溶液作为洗脱液对吸附后的 D-N/SMIPs 进行充分洗脱，进一步用超纯水和无水乙醇反复洗涤 3 次，50 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 12 h 后采用再生的 D-N/SMIPs-重新吸附大豆素或柚皮素溶液，依次进行 9 次吸附解吸循环试验。

如图 10 所示，D-N/SMIPs 对大豆素和柚皮素的吸附量随着循环吸附-解吸次数的增加先基本保持不变随后逐渐下降，但整体吸附量仍然较高。具体而言，在第 9 次吸附时，D-N/SMIPs 对大豆素和柚皮素的吸附量仍可达 16.58 mg/g 和 20.08 mg/g。一方面，多次酸性溶液洗脱会破坏 D-N/SMIPs 印迹层结构；另一方面，由于难以洗脱完全，从而有效吸附位点逐渐减少，因此导致 D-N/SMIPs 对目标分子的吸附量逐渐下降。但 D-N/SMIPs 经 9 次吸附-解吸循环后仍能保持较高吸附效率，表明所构建的 D-N/SMIPs 具有优异的结构稳定性，可满足实际应用过程中多次使用的需求。此外，通过引入磁性 Fe_3O_4 颗粒作为载体，可通过磁响应实现吸附剂的富集快速，使得通过 D-N/SMIPs 分离大豆素和柚皮素的过程更加快捷高效。

3 讨论

分子印迹技术源于“锁匙理论”，原理与生物学上的抗原抗体特异结合相似，通过聚合反应在聚合物上形成与模板分子结构、官能团特异性匹配的

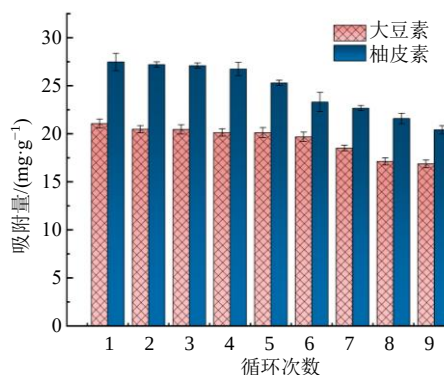


图 10 D-N/SMIPs 的再生性能

Fig. 10 Regeneration performance of D-N/SMIPs

表 3 D-N/SMIPs 和 D-N/SNIPs 的选择性参数
Table 3 Specific selectivity parameters of D-N/SMIPs and D-N/SNIPs

吸附质	$q_{\text{D-N/SMIPs}}/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	$q_{\text{D-N/SNIPs}}/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	印迹因子
大豆素	20.94	10.20	2.05
柚皮素	27.45	11.25	2.43
槲皮素	8.57	9.71	0.88
茜素	14.51	12.40	1.17
芦丁	6.59	5.21	1.26

印迹空腔实现高选择性的定向分离。但由于分子印迹制备的印迹聚合物结合点分布于聚合物内部,不利于传质、吸附后易出现洗脱不完全情况,不能满足对目标分子快速分离的要求。本研究采用表面分子印迹技术,在聚合物表面进行印迹,消除了空间位阻影响,有效的提升了吸附效率,选用的聚合单体甲基丙烯酸具有丰富的羧基,可与大豆素、柚皮素分子间可形成氢键,从而使制备后的材料印迹层中的印迹空腔对分子从结构和官能团等方面进行特异性识别并通过对应的氢键结合位点结合实现吸附。同时引入磁性 Fe_3O_4 纳米粒子为内核,可实现靶向磁性快速富集,操作更加简便。相较于色谱分离方法节省了大量的时间和试剂,有效降低了分离所需成本,无需制备液相,高速逆流色谱等大型设备,分离过程简捷高效。同时因大豆素与柚皮素在水中溶解度均极低,且多酚类化合物性质不稳定,降低了其生物利用度^[29],利用表面分子印迹技术可实现吸附-搭载的药物缓释系统,先通过靶向吸附富集活性化合物,后基于磁性载体的磁热、光热响应性能,搭载温敏材料实现对活性成分的智能控释,并且利用磁场可实现药物在病灶部位富集,提升治疗效果。

本研究首次制备了以大豆素和柚皮素为模板分子的磁性表面分子印迹聚合物,可实现对 2 种黄酮类化合物的同时高效靶向分离,成本低、选择性高,为成分复杂的天然生物样本中高价值活性化合物的快速定向富集提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Al-Khayri J M, Sahana G R, Nagella P, *et al.* Flavonoids as potential anti-inflammatory molecules: A review [J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2901.
- [2] 赵盈, 於天, 郑志刚, 等. 多酚在植物中的分布及其生物活性研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(17): 5825-5832.
- [3] 魏晓芳, 沈婉莹, 李阳芳, 等. 金银花黄酮苷类化学成分研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(11): 3424-3429.
- [4] Salama A A A, Allam R M. Promising targets of chrysin and daidzein in colorectal cancer: Amphiregulin, CXCL1, and MMP-9 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 892: 173763.
- [5] Yu Z Y, Yang L, Deng S, *et al.* Daidzein ameliorates LPS-induced hepatocyte injury by inhibiting inflammation and oxidative stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 885: 173399.
- [6] Li W S, Lin S C, Chu C H, *et al.* The gastroprotective effect of naringenin against ethanol-induced gastric ulcers in mice through inhibiting oxidative and inflammatory responses [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11985.
- [7] Morelli S, Piscioneri A, Guarnieri G, *et al.* Anti-neuroinflammatory effect of daidzein in human hypothalamic GnRH neurons in an *in vitro* membrane-based model [J]. *Biofactors*, 2021, 47(1): 93-111.
- [8] Kataoka H, Saeiki A, Hasebe A, *et al.* Naringenin suppresses Toll-like receptor 2-mediated inflammatory responses through inhibition of receptor clustering on lipid rafts [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9(2): 963-972.
- [9] Montalesi E, Cipolletti M, Cracco P, *et al.* Divergent effects of daidzein and its metabolites on estrogen-induced survival of breast cancer cells [J]. *Cancers*, 2020, 12(1): 167.
- [10] Shi X Y, Luo X P, Chen T, *et al.* Naringenin inhibits migration, invasion, induces apoptosis in human lung cancer cells and arrests tumour progression *in vitro* [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(5): 2563-2571.
- [11] Stabrauskiene J, Kopustinskiene D M, Lazauskas R, *et al.* Naringin and naringenin: Their mechanisms of action and the potential anticancer activities [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(7): 1686.
- [12] Alshehri M M, Sharifi-Rad J, Herrera-Bravo J, *et al.* Therapeutic potential of isoflavones with an emphasis on daidzein [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6331630.
- [13] El-Wafaey D I, Nafea O E, Faruk E M. Naringenin alleviates hepatic injury in zinc oxide nanoparticles exposed rats: Impact on oxido-inflammatory stress and apoptotic cell death [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2022, 32(1): 58-66.
- [14] Hsu C, Wang S T, Wu B Y, *et al.* Isolation of individual isoflavone species from soybean by solvent extraction followed by the combination of macroporous resin and aluminium oxide separation [J]. *Food Chem*, 2020, 331: 127312.
- [15] Maciejewska-Turska M, Pecio Ł, Zgórk G. Isolation of mirificin and other bioactive isoflavone glycosides from the kudzu root lyophilisate using centrifugal partition and flash chromatographic techniques [J]. *Molecules*, 2022, 27(19): 6227.
- [16] Niu H Z, Liu C M, Hou W C, *et al.* Development of a method to screen and isolate xanthine oxidase inhibitors from black bean in a single step: Hyphenation of semipreparative liquid chromatography and stepwise flow rate countercurrent chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2022, 45(2): 492-506.
- [17] Spangenberg B. New solvent systems to separate some estrogenically active compounds by high-performance

- thin-layer chromatography (HPTLC) [J]. *JPC*, 2022, 35(2): 189-195.
- [18] 李静静. GO 辅助提取竹叶黄酮的动力学研究及提取液的分离净化 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2018.
- [19] Guo H, Xue L, Yao S, *et al.* Rhein functionalized magnetic chitosan as a selective solid phase extraction for determination isoflavones in soymilk [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 165: 96-102.
- [20] Mahato N, Sinha M, Sharma K, *et al.* Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from *Citrus* wastes [J]. *Foods*, 2019, 8(11): 523.
- [21] He S N, Zhang L P, Bai S K, *et al.* Advances of molecularly imprinted polymers (MIP) and the application in drug delivery [J]. *Eur Polym J*, 2021, 143: 110179.
- [22] Chen Y R, Tang Y, Liu Y W, *et al.* Kill two birds with one stone: Selective and fast removal and sensitive determination of oxytetracycline using surface molecularly imprinted polymer based on ionic liquid and ATRP polymerization [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 434: 128907.
- [23] Ostovan A, Arabi M, Wang Y Q, *et al.* Greenificated molecularly imprinted materials for advanced applications [J]. *Adv Mater*, 2022, 34(42): e2203154.
- [24] Zare E N, Fallah Z, Le V T, *et al.* Remediation of pharmaceuticals from contaminated water by molecularly imprinted polymers: A review [J]. *Environ Chem Lett*, 2022, 20(4): 2629-2664.
- [25] Zhang Y, Zhao G L, Han K Y, *et al.* Applications of molecular imprinting technology in the study of traditional Chinese medicine [J]. *Molecules*, 2022, 28(1): 301.
- [26] Chen W J, Shang P P, Fang S B, *et al.* Origin of macromolecular crowding: Analysis of recognition mechanism of dual-template molecularly imprinted polymers by in silico prediction [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1662: 462695.
- [27] 曾国龙, 马晓国, 樊银明. 多模板分子印迹聚合物磁性固相萃取-高效液相色谱法测定环境水样中四环素类抗生素 [J]. 分析测试学报, 2020, 39(6): 749-755.
- [28] 谢德昌, 赖慧玉, 丘湫丰, 等. 雌激素多模板分子印迹磁性金属有机骨架复合材料的制备及其吸附性能研究 [J]. 环境科学学报, 2023, 43(8): 74-85.
- [29] Bhia M, Motallebi M, Abadi B, *et al.* Naringenin nano-delivery systems and their therapeutic applications [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(2): 291.

[责任编辑 王文倩]