

安石榴甙分子印迹聚合物微球的制备及识别性能

张 笑 付志峰* 石 艳 董志佼

(北京化工大学 材料科学与工程学院, 北京 100029)

摘 要: 以安石榴甙为模板分子, 丙烯酰胺为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂, 乙腈为溶剂, 使用沉淀聚合方法, 制备分子印迹聚合物, 得到纳米级微球。等温吸附实验研究表明, 印迹聚合物与空白聚合物相比, 对目标分子具有更好的吸附性能, 在研究浓度范围内, 印迹聚合物对目标分子的最大吸附量为 $32.6 \mu\text{mol/g}$; Scatchard 分析表明, 印迹聚合物具有两种不同性能的结合位点, 空白聚合物有一种结合位点, 印迹聚合物的最大表观结合量为 $243 \mu\text{mol/g}$, 空白聚合物的最大表观结合量为 $25.3 \mu\text{mol/g}$; 底物选择实验表明分子印迹聚合物对安石榴甙具有更高的选择性能。

关键词: 安石榴甙; 微球; 分子印迹; 沉淀聚合

中图分类号: O631

引 言

安石榴甙(punicalagin)为石榴皮的提取物, 具有优良的生物活性, 其抗氧化性和抗癌作用的研究也越来越多, 在医疗保健、化妆品、功能性食品等行业有很好的应用前途。目前它的分离提纯方法主要还是依赖于制备色谱, 该方法最大的缺点是成本高, 产量低。因此, 研制一种对安石榴甙具有高选择性的提纯新方法具有重要意义。

分子印迹聚合物(MIP)是指一种对目标分子有特定选择性吸附的聚合物, 它具有高选择性、成本低、寿命长、热力学和化学性能稳定、抗恶劣环境能力强等优点, 已经在色谱分离、仿生传感器、生物酶模拟和临床药物分析等领域展现了很好的应用前景^[1-4]。分子印迹技术分为共价键法和非共价键法。1993 年 Vlatakis 等^[5]首次发表了非共价键法制备茶碱分子印迹的报道, 印迹分子与功能单体预先自组装, 以非共价键作用力形成多重位点, 这种非共价键作用包括氢键、静电引力、疏水作用、范德华力等, 其中以氢键应用最多。该分子印迹技术在分子量几百的有机小分子^[6]和分子量为几万的生物大分子^[7]方面的应用都已有大量报道, 而分子量为 1084.72 的安石榴甙的分子印迹技术未见报道。因

而对安石榴甙分子印迹聚合物的研究既为安石榴甙的提取提供一种新方法, 又丰富了分子印迹技术的广泛适用性。

目前制备分子印迹聚合物的聚合方法有本体聚合^[5-6]、悬浮聚合^[8]、分散聚合^[9]、种子聚合^[10]、沉淀聚合^[11]等。由于本体聚合需经研磨粉碎过筛处理, 最终得到的聚合物颗粒均匀性差且研磨过筛过程中有大量损失; 悬浮聚合和分散聚合都要使用一定量的表面活性剂进而增加了产物的后处理, 并且表面的残留表面活性剂也影响了聚合物的识别位点; 种子聚合和表面印迹聚合又需要多步操作, 因此本文使用沉淀聚合^[12-13]制备了安石榴甙的分子印迹聚合物, 该聚合方法既操作简便又能得到粒径单分散性良好的聚合物微球。通过平衡吸附实验和 Scatchard 分析对该分子印迹聚合物的结合作用和选择性能进行了研究。

1 实验部分

1.1 原材料

安石榴甙, 纯度 30%, 陕西天一生物技术有限公司, 通过柱层析洗脱法制备得到 80% 的纯度后备用; 丙烯酰胺(AM), 化学纯, 天津博迪化工有限公司; 乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA), 分析纯, 苏州安利化工有限公司; 偶氮二异丁腈(AIBN), 分析纯, 北京化工厂, 用甲醇重结晶精制; 乙腈、甲醇、乙醇均为化学纯, 北京化学试剂厂。

1.2 安石榴甙分子印迹聚合物的制备

称取安石榴甙 0.1084 g (0.1 mmol), 丙烯酰胺

收稿日期: 2010-05-11

第一作者: 男, 1984 年生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: fuzf@mail.buct.edu.cn

0.0711 g (1 mmol), 乙腈 50 mL 加入反应烧瓶中, 常温 25 ℃ 超声分散 1 h, 然后依次加入 0.99 g (5 mmol) EGDMA, 引发剂 AIBN 0.0212 g, 充分溶解混合, 通入 N₂ 20 min, 密封, 磁力搅拌下 60 ℃ 油浴中反应 24 h, 得到单一、均匀分散的混合物。将混合物高速离心 20 min, 去除离心液, 将所得聚合物放入索氏抽提器中, 加入甲醇/乙酸 (体积比为 8:2) 的混合溶液进行抽提 48 h, 去除模板分子, 直至用紫外分光光度计检测不到模板分子, 然后用甲醇洗至中性, 将抽提后的产品在 50 ℃ 下烘干 24 h 至恒重, 得到 MIPs。空白聚合物 (BP) 制备方法除了不加入安石榴甙模板分子外, 其余步骤同上。

1.3 平衡吸附量的测定

称取 20.0 mg 印迹或空白聚合物, 置于 10 mL 磨口锥形瓶中, 加入 5 mL 已知浓度的含有安石榴甙或者其他参考物质的乙腈溶液, 密封, 常温下放入振荡器中振荡 24 h, 然后将该混合液转移至密封离心试管中, 高速离心 20 min, 取适量离心液分别稀释到一定体积, 充分摇匀, 用紫外分光光度计 (CITRA-200, 澳大利亚 GBC 公司) 在 254 nm 波长下测定吸附液中底物的平衡浓度, 结合吸附前后溶液中底物浓度的变化计算出 MIP 与 BP 对底物的结合量 *Q*。

1.4 聚合物形貌表征

扫描电子显微镜 (JSM-6701F, 日本电子公司) 分析聚合物微球的粒径大小和微球的表面形态。

2 结果与讨论

2.1 聚合物的形貌

图 1 为印迹聚合物 (模板分子与功能单体物质的量比为 1:10) 和空白聚合物的扫描电镜图。从图 1 可以清楚看到, 印迹聚合物微球的粒径分布窄且粒径较小, 平均粒径为 200 nm, 而空白聚合物的微球粒径分布也很窄, 但粒径较大, 平均粒径为 2 μm。印迹聚合物的粒径小于空白聚合物, 推测是由于模板分子拥有大量的酚羟基, 可能对聚合反应产生抑制作用。从表 1 中聚合物的产率可知, 随着模板分子加入量的增加, 印迹聚合物 (MIP) 的产率逐渐减小, 而空白聚合物 (BP) 的产率则基本没有变化, 且均高于印迹聚合物的产率, 表明模板分子对聚合反应确实有抑制作用。此外模板分子的加入使反应体系极性增大, 印迹聚合物在反应体系中的溶解度降低, 过早的从反应体系中沉淀出来, 这是印迹聚合物微球粒径小于空白聚合物粒径的另一原因^[14]。这

两种作用中, 模板剂对溶剂极性的影响比阻聚影响应该更大一些, 因为 $n_{\text{安石榴甙}}/n_{\text{丙烯酸胺}} = 1:20$ 和 $2:20$ 得到的粒径结果几乎一致。

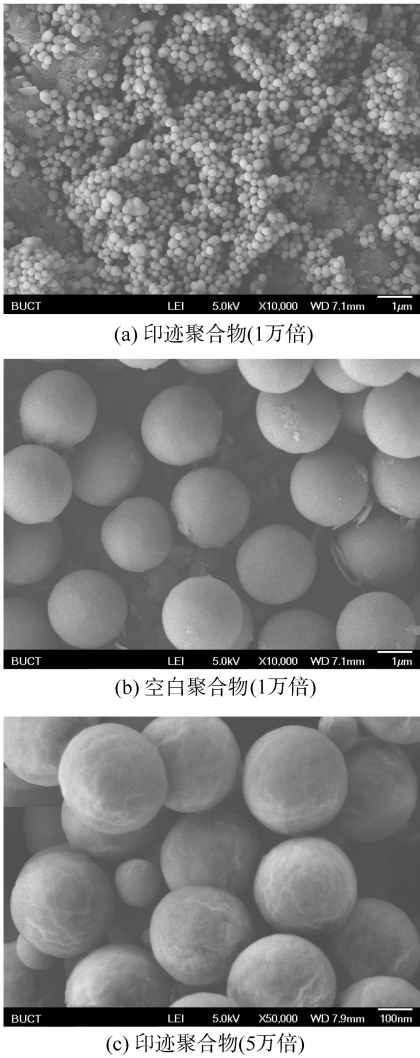


图 1 印迹聚合物和空白聚合物的扫描电镜图
Fig. 1 SEM micrographs of imprinted polymers and blank polymers

表 1 安石榴甙与丙烯酸胺不同物质的量比下制备聚合物的各组分量与产率
Table 1 The results of molecularly imprinted and blank polymers using different molar ratios of punicalagin and acrylamide

$n_{\text{安石榴甙}}/n_{\text{丙烯酸胺}}$	聚合物	产率/%
1:20	MIP	76.1
—	BP	82.6
2:20	MIP	71.2
—	BP	82.2
4:20	MIP	41.4
—	BP	82.0

2.2 模板分子与功能单体的对比对吸附量的影响

制备分子印迹聚合物时,模板分子与功能单体的用料比会对聚合物的性能产生影响。增加功能单体的用量,会使模板分子和单体的预组装更加充分,但不是比例越大越好,如果单体用量过大,会使得单体自身发生缔合,影响印迹聚合物的合成,导致特异性结合位点减少,还有可能因单体自缔合而产生非特异性的结合位点。模板分子与功能单体的物质的量对比对吸附量的影响见图2。可以看到当 $n_{\text{安石榴甙}} : n_{\text{丙烯酸胺}} = 1:10$ 时,吸附量最大,表明该条件下合成的 MIP 性能较好。

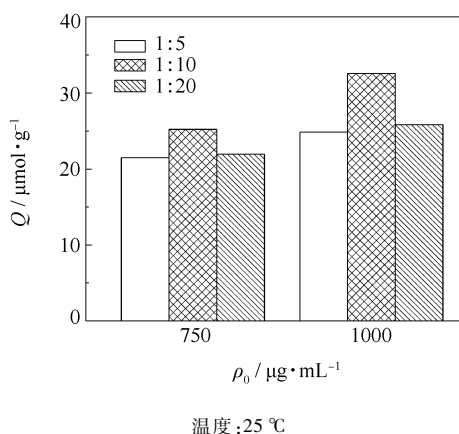


图2 安石榴甙/丙烯酸胺的物质的量对比对吸附量的影响

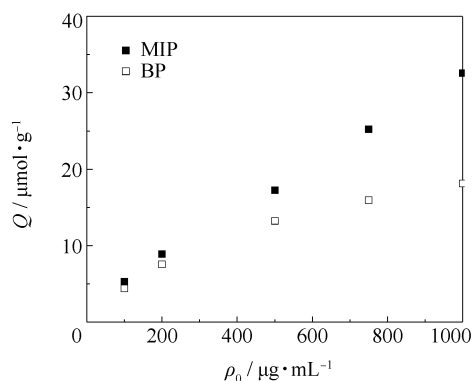
Fig. 2 Effect of molar ratio of punicalagin/acrylamide on adsorption

2.3 聚合物的等温吸附

聚合物对安石榴甙分子的等温吸附如图3所示。可以看到,在相同的初始浓度下,MIP和BP相比,具有更高的吸附量,而且随着浓度增大,MIP吸附量也显著增大,而BP吸附量则随浓度的变化不大。推测MIP对安石榴甙具有特异性吸附,而BP对安石榴甙的吸附只是一种非特异性吸附。

2.4 Scatchard 分析

在分子印迹技术中常采用 Scatchard 模型来评价 MIP 的结合特性^[15]: $Q/c = (Q_{\max} - Q)/K_d$, 式中 K_d 为结合位点的平衡离解常数, Q_{\max} 为结合位点的最大表观结合量 ($\mu\text{mol/g}$), c 为吸附达到平衡后安石榴甙的游离浓度 (mmol/L), Q 为聚合物对安石榴甙的吸附量 ($\mu\text{mol/g}$)。以 Q/c 对 Q 作图(图4)可见,对于 MIP 来说, Q/c 对 Q 明显是非线性关系,说明 MIP 对安石榴甙的结合位点是不等价的,但 MIP 的 Scatchard 曲线的两部分却呈现很好的线性关系,推测 MIP 存在有两类不同的吸附。而 BP 的 Scat-



吸附时间: 24 h; 温度: 25 °C

图3 聚合物的吸附等温曲线

Fig. 3 Plot of the adsorption of punicalagin for different initial concentrations of punicalagin

chard 曲线是线性关系,说明只存在一种类型的吸附。由图4中MIP的两段直线的截距和斜率可以得到: $K_{d1} = 0.414 \text{ mmol/L}$ 和 $K_{d2} = 5.10 \text{ mmol/L}$, 结合位点的最大表观结合量分别为 $Q_{\max1} = 35.1 \mu\text{mol/g}$ 和 $Q_{\max2} = 243 \mu\text{mol/g}$; 而由图4中BP的直线的截距和斜率可以得到: $K_{d3} = 0.358 \text{ mmol/L}$, 结合位点的最大表观结合量为 $Q_{\max3} = 25.3 \mu\text{mol/g}$ 。很明显, $Q_{\max2} > Q_{\max1} > Q_{\max3}$ 。空白聚合物的 $Q_{\max3}$ 是由非特异性吸附造成的,印迹聚合物的 $Q_{\max1}$ 和 $Q_{\max2}$ 由非特异性吸附和特异性吸附共同造成的结果,其中 $Q_{\max1}$ 是以非特异性吸附为主, $Q_{\max2}$ 是以特异性吸附为主,随着印迹聚合物吸附量的增大,特异性吸附在吸附过程中逐渐起主导作用。由此可知印迹聚合物具有很大的特异性吸附,而空白聚合物则没有特异性吸附,同时也证明,印迹聚合物对模板分子的吸附量大于空白聚合物的吸附量,是由印迹聚合物的特异性

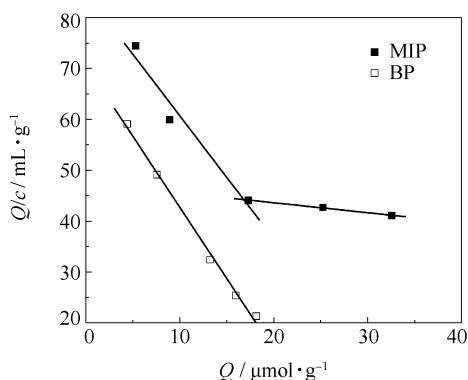


图4 聚合物的 Scatchard 曲线

Fig. 4 Scatchard plot analysis of the binding affinity of the polymers

吸附而非聚合物微球的比表面积决定。

2.5 聚合物的选择性吸附

为了考察印迹聚合物的选择性吸附, 采用双酚-A 作为参照物与安石榴甙进行比较。因为酚羟基是安石榴甙的主要功能基团, 而双酚-A 具有的酚羟基同安石榴甙类似, 以此作为对印迹聚合物的选择性吸附的初步探索。双酚-A 如若与该分子印迹聚合物的识别位点发生作用, 应该同安石榴甙类似。印迹聚合物对两者的吸附实验测定结果如图 5 所示, 印迹聚合物对安石榴甙的吸附量高于对双酚-A 的吸附量。由于印迹聚合物的选择性吸附是由识别位点和空穴两者决定, 而双酚-A 的功能基团同安石榴甙类似, 但分子体积小于安石榴甙的分子体积, 其立体构象与印迹聚合物中的空穴无法吻合, 印迹聚合物对双酚-A 不具有特异性吸附, 从而导致了两者的吸附量差异, 以此证明了印迹聚合物对模板分子的选择性吸附。

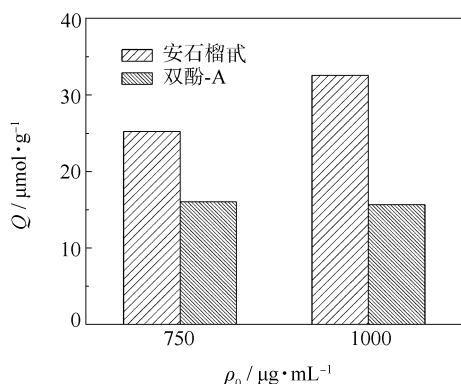


图 5 印迹聚合物对不同底物的吸附图

Fig. 5 Adsorption of the different substrates on the imprinted polymer

3 结论

以安石榴甙为模板分子, 以丙烯酰胺为功能单体, EGDMA 为交联剂, AIBN 为引发剂, 乙腈为溶剂, 采用沉淀聚合制备出安石榴甙分子印迹聚合物微球。在模板分子与功能单体摩尔比为 1:10 的情况下合成出的 MIPs 对模板分子具有更好的吸附效果, 在研究浓度范围内, MIPs 具有良好的特异性选择吸附能力, 其最大吸附量为 32.6 $\mu\text{mol/g}$ 。

参考文献:

[1] Haginaka J, Takehira H, Hosoya K, et al. Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (s)-naproxen selective-

ly modified with hydrophilic external layer[J]. J Chromatogr A, 1999, 849(2): 331-339.

- [2] Shoji R, Takeuchi T, Kubo L. Atrazine sensor based on molecularly imprinted polymer-modified gold electrode[J]. Anal Chem, 2003, 75: 4882-4886.
- [3] Kriz D, Ramström O, Svensson A, et al. Introducing biomimetic sensors based on molecularly imprinted polymers as recognition elements[J]. Anal Chem, 1995, 67: 2142-2144.
- [4] Wulff G. Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted Polymers[J]. Chem Rev, 2002, 102(1): 1-28.
- [5] Vlatakis G, Andersson L I, Müller R, et al. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting[J]. Nature, 1993, 361: 645-647.
- [6] Ye L, Weiss R, Mosbach K. Synthesis and characterization of molecularly imprinted microspheres[J]. Macromolecules, 2000, 33: 8239-8245.
- [7] Hawkins D M, Trache A, Ellis E A, et al. Quantification and confocal imaging of protein specific molecularly imprinted polymers[J]. Biomacromolecules, 2006, 7: 2560-2564.
- [8] Mayes A G, Mosbach K. Molecularly imprinted polymer beads suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase[J]. Anal Chem, 1996, 68: 3769-3774.
- [9] Sellergren B. Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer[J]. Anal Chem, 1994, 66: 1578-1582.
- [10] Yilmaz E, Ramström O, Möller P, et al. A facile method for preparing molecularly imprinted polymer spheres using spherical silica templates[J]. J Mater Chem, 2002, 12: 1577-1581.
- [11] Wang J F, Cormack P A G, Sherrington D C, et al. Monodisperse molecularly imprinted polymer microspheres prepared by precipitation polymerization for affinity separation applications[J]. Angew Chem Int Ed, 2003, 42: 5336-5338.
- [12] 蒋旭红, 涂伟萍. 沉淀聚合制备窄分散聚(甲基丙烯酸缩水甘油酯-CO-乙二醇二甲基丙烯酸酯)功能聚合物微球[J]. 高分子学报, 2009(1): 84-87.
- Jiang X H, Tu W P. Narrow-disperse poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) microspheres via precipitation polymerization[J]. Acta Polymerica Sinica, 2009(1): 84-87. (in Chinese)
- [13] 李辉, 李亚男, 张朝晖, 等. 绿原酸印迹聚合物微球沉淀聚合制备及其性能[J]. 吉首大学学报: 自然科学版, 2008, 29(6): 88-91.

- Li H, Li Y N, Zhang Z H, et al. Preparation and behavior test of chlorogenic acid imprinted polymer microspheres by precipitation polymerization technique [J]. Journal of Jishou University: Natural Science, 2008, 29 (6): 88-91. (in Chinese)
- [14] 戎非, 李萍, 袁春伟. 沉淀聚合法制备右旋邻氯扁桃酸分子印迹聚合物微球[J]. 功能高分子学报, 2005, 18(4): 607-612.
- Rong F, Li P, Yuan C W. Preparation of molecularly imprinted microspheres using *L*-2-chloromandelic acid as template by precipitation polymerization [J]. Journal of Functional Polymers, 2005, 18(4): 607-612. (in Chinese)
- [15] Matsui J, Miyoshi Y, Doblhof-Dier O, et al. A molecularly imprinted synthetic polymer receptor selective for atrazine [J]. Anal Chem, 1995, 67: 4404-4408.

Preparation of molecularly imprinted microspheres and their recognition properties for punicalagin

ZHANG Xiao FU ZhiFeng SHI Yan DONG ZhiJiao

(College of Materials Science and Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Molecularly imprinted polymers (MIPs) for recognition of punicalagin were prepared by precipitation polymerization using punicalagin as template, acrylamide (AM) as the functional monomer, ethylene dimethacrylate (EDMA) as the cross-linker, azoisobutyronitrile (AIBN) as the initiator and acetonitrile as the solvent. The MIPs prepared formed spherical beads with nanometer sizes. The results of equilibrium adsorption experiments showed that the MIPs had a high affinity to the template in comparison with the blank polymers (BPs), and the max adsorption of MIPs was 32.6 $\mu\text{mol/g}$ under the studied concentration; Scatchard analysis showed that two kinds of binding sites were formed in the MIPs and one kind of binding site in the BPs, the apparent maximum binding capacity was 243 $\mu\text{mol/g}$, whilst for the BPs, the apparent maximum binding capacity were 25.3 $\mu\text{mol/g}$; the selective binding experiment showed that the MIPs had higher selectivity and affinity.

Key words: punicalagin; microsphere; molecular imprinting; precipitation polymerization