核-壳型白藜芦醇分子印迹微球研制及应用

张明磊[1] 张朝晖*[1,2] 刘 丽[1] 张立吉[1] 聂丽华[2]
[1](吉首大学化学化工学院，吉首 416000) [2](化学传感与计量国家重点实验室，长沙 410082)

摘 要 以表面修饰乙烯基团的 SiO_2 微球为基体，白藜芦醇为模板分子，丙烯酰胺(AA)为功能单体，乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)为交联剂，采用表面印迹技术制备核-壳型白藜芦醇印迹微球。采用红外光谱(IR)、扫描电子显微镜(SEM)对该分子印迹微球进行表征，结果表明，SiO_2 表面成功接枝一层厚度为 200 nm 的印迹聚合物，该印迹微球颗粒分散均匀。采用高效液相色谱技术对印迹微球的吸附性进行研究表明，此印迹微球具有良好的识别性能，利用 Scatchard 模型分析得出印迹微球的最大吸附量分别为 Q_{max1} = 9.087 mg/g 和 Q_{max2} = 13.80 mg/g。此印迹微球成功用于分离虎杖提取液中白藜芦醇。

关键词 分子印迹微球; 白藜芦醇; 吸附性能; 核-壳型

1 引 言

近年来，新型印迹技术不断涌现，包括采用溶胶-凝胶技术进行本体聚合[1,2]，在硅胶表面进行表面聚合[3~5]。前者聚合物存在模板分子包埋过深、难以洗脱、形状不规则、机械性能低等缺点；后者的表面印迹材料的大小可控，颗粒均匀，容易洗脱，尤其通过控制表面聚合壳层的厚度，可有效减少包埋现象。

虎杖系蓼科属多年生草本植物，具有祛风利湿、散瘀定痛、止咳化痰的作用，主要含有蒽醌类和芪类化合物，其中芪类成分白藜芦醇(Resveratrol)具有抗癌、抗氧化、抗自由基、抗细菌和真菌等作用[6]。目前，提取分离白藜芦醇的方法主要有溶剂提取和酶法提取[7]及印迹技术[8~10]。向海燕等[8]以溶胶-凝胶法合成白藜芦醇印迹聚合物，但是其印迹聚合物模板分子包埋过深，难以洗脱，粒径不规则、不均匀。为了克服这些缺陷，本研究以 SiO_2 微球为载体，通过接枝乙烯基三甲氧基硅烷(VTMOS)，在 SiO_2 微球表面引入双键，合成核-壳型的白藜芦醇分子印迹微球，并用于分离虎杖提取液中的白藜芦醇。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LC-2010AHT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司)；WGH-30A 型双光束红外分光光度计(天津港东科技发展有限公司)；KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；LG10-2.4A 台式高速离心机(北京医用离心机厂)。正硅酸乙酯(TEOS，Sigma 公司)；丙烯酰胺(AA，分析纯)；白藜芦醇(标样，中国药检所)；乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA，Sigma 公司)；偶氮二异丁腈(AIBN，分析纯)；乙烯基三甲基硅烷(VTMOS，Sigma 公司)；乙腈(色谱纯)；乙酸、无水乙醇、氨水、HCl(分析纯)；虎杖(采自湖南张家界)粉末。

2.2 印迹微球的制备

2.2.1 SiO_2 微球的制备[11] 向装有 49.5 mL 乙醇的烧瓶中加入 2.0 mL 氨水、6.3 mL 蒸馏水和 2.23 mL TEOS，室温下以 700 r/min 的速度搅拌，反应 12 h。收集产品，用乙醇冲洗，放入真空干燥箱中干燥，备用。

2.2.2 SiO_2 微球的表面修饰 称取 SiO_2 微球 2.0 g，加入 8.0 mol/L HCl 60.0 mL，60 ℃回流 12 h，过滤，滤饼用蒸馏水洗涤至中性后，140 ℃下干燥 8 h，即可得表面活化的 SiO_2 微球。

取 0.5 g 表面活化的 SiO_2 微球，分散于 10.0 mL 50% 乙醇的水溶液中，加入 0.75 mL VTMOS，50 ℃下反应 24 h。硅烷化后，用乙醇在超声下洗去未反应的 VTMOS，然后于 100 ℃下干燥 3 h，使 VTMOS 与 SiO_2 表面的羟基充分交联键合，得到乙烯基修饰的 SiO_2 微球(VTM-SiO_2)。

2009-06-02 收稿；2009-07-31 接受
本文系湖南省自然科学基金(No. 08JJ4004)，湖南省教育厅优秀青年项目(No. 07B061)，化学生物传感与计量国家重点实验室开放基金以及湖南省大学生创新基金资助
* E-mail: zhaohuizhang77@hotmail.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2.3 白藜芦醇分子印迹微球(MIPs)的制备[3] 取200 mg VTM-SiO_2颗粒分散于100 mL乙腈溶液中,加入170 mg(2.40 mmol)AA,1.83 mL(9.2 mmol)EGDMA,300 mg(1.3 mmol)白藜芦醇,和100 mg(0.6 mmol)AIBN,在冰水浴下通入氮气10 min。在50 ℃下聚合6 h,然后升温至60 ℃下再聚合24 h,控制搅拌速度为300 r/min。产物在85 ℃下再反应6 h,沉淀,最后用乙腈和乙醇洗涤,120 ℃下干燥,将收集的白藜芦醇印迹微球(MIPs)用V(甲醇):V(乙酸)=9:1混合溶液在索式提取器中反复洗涤24 h除去模板分子,120 ℃下干燥。非印迹微球(Nonimprinted polymers, NIPs)的合成方法与分子印迹微球合成方法完全一致,只是在合成时不加入模板分子。

2.3 印迹微球的吸附性能研究及其表征

2.3.1 静态吸附 取印迹微球20.0 mg,8份,分别置于吸附管中,各自加入10.0 mL浓度为0.1~0.4 mol/L的白藜芦醇的乙醇溶液,置于25 ℃恒温水浴超声波振荡器中,振荡12 h后,以9000 r/min速度离心分离,取上层清液用高效液相色谱测定平衡时白藜芦醇的浓度。检测波长303 nm,流动相为V(甲醇):V(水)=41:59,流速为1.0 mL/min。根据吸附前后浓度变化,计算对白藜芦醇的吸附量Q。

2.3.2 红外分析 采用WGH-30A型双光束红外分光光度计,对SiO_2微球、VTM-SiO_2微球、洗脱脱模板分子(白藜芦醇)前、后的MIPs进行红外表征。

2.4 实际样品检测

取1.0 g洗脱后的分子印迹微球,装入直径为1.0 cm、容量为10.0 mL的聚丙烯柱中,柱子的下端口用棉花塞住,从上口装入印迹微球,再塞上棉花,加入乙醇抽滤,使印迹微球在柱内排布紧密。

取3.0 g虎杖原料粉末投入100 mL圆底烧瓶中,加入30.0 mL V(甲醇):V(乙酸)=8:2混合溶液,超声30 min,80 ℃下回流3 h,然后进行过滤,蒸出溶剂,用甲醇重新溶解,得虎杖提取液。取5.0 mL虎杖提取液,注入提取柱,抽滤,收集过柱液,先用5.0 mL甲醇冲洗提取柱,然后用5.0 mL V(甲醇):V(乙酸)=9:1混合溶液洗脱,收集洗脱液,用HPLC检测白藜芦醇的含量。

3 结果与讨论

3.1 印迹微球的制备及形貌表征

以VTMOS为连接SiO_2和AA的媒介,采用热聚合技术,以白藜芦醇为模板分子,AA为功能单体,EGDMA为交联剂,经过ABIN引发,在温和的条件下制备出包覆了白藜芦醇的印迹聚合薄层。经过甲醇-乙酸溶液洗脱后,白藜芦醇从印迹微球聚合薄层中洗脱出来,在印迹微球的薄层中留下对白藜芦醇具有特异吸收的空隙。

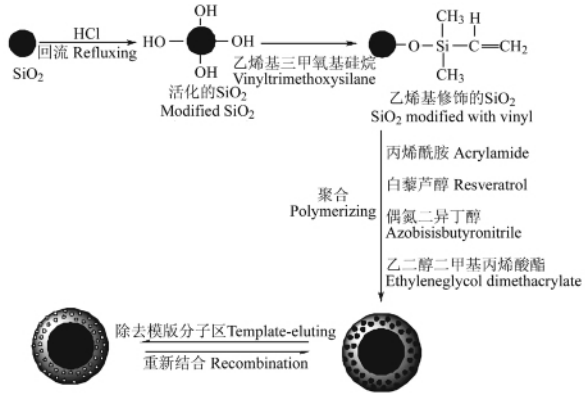

图1 SiO_2微球表面印迹制备路线图

Fig. 1 Synthesis routine of SiO_2 moleculary imprined polymers

SiO_2微球表面印迹微球制备路线如图1所示。制备的分子印迹聚合物微球有以下特点:在SiO_2微球表面引入了双键,增强了分子印迹聚合物薄层与载体之间的共价键作用力,使聚合物薄层牢固地聚合在微球表面;通过改变VTM-SiO_2,AA和EGDMA的比例,控制壳层厚度,有效减少了包埋,利于洗脱。研究表明,当VTM-SiO_2,AA和EGDMA的质量比为1:1:9,其壳层厚度可控制在200 nm以下;可增强分子印迹聚合物微粒表面的记忆效应和机械性能。

扫描电镜对SiO_2微球和MIPs进行形貌分析的结果见图2。SiO_2微球粒径均匀(约为200 nm)、规则。MIPs表面光滑,粒径均匀,粒径约为600 nm。由此可估算表面印迹聚合物壳层厚度约为200 nm。

3.2 吸附实验

采用静态吸附法,通过HPLC检测,分别得出MIPs和NIPs对白藜芦醇的吸附等温线,如图3a所示。结果表明,MIPs对白藜芦醇具有较强的吸附能力,而NIPs对白藜芦醇的吸附能力小,这表明MIPs对白藜芦醇具有较强的印迹效应。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

进一步利用 Scatchard 模型[7]分析,Scatchard 方程为:$Q/C = (Q_{max} - Q)/K_d$。式中,K_d 是接合位点的平衡解离常数;Q_{max} 是结合位点的最大表观结合量(mg/g);C 表示吸附平衡液的平衡浓度(g/L)。以 Q/C 对 Q 作图可得两条不同斜率的直线(图 3b),MIPs 在研究浓度范围内对模板分子存在两种吸附的结合位点。根据斜率和截距可以得出亲和位点解离常数和最大表观结合量分别为 $K_{d1} = 0.1724$ g/L, $Q_{max1} = 9.087$ mg/g; $K_{d2} = 0.6018$ g/L, $Q_{max2} = 13.80$ mg/g。

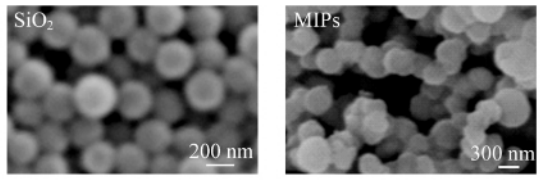

图 2　SiO_2 和印迹微球的扫描电镜图

Fig. 2　Scanning electron microscopic (SEM) images of SiO_2 and molecularly imprinted polymers (MIPs)

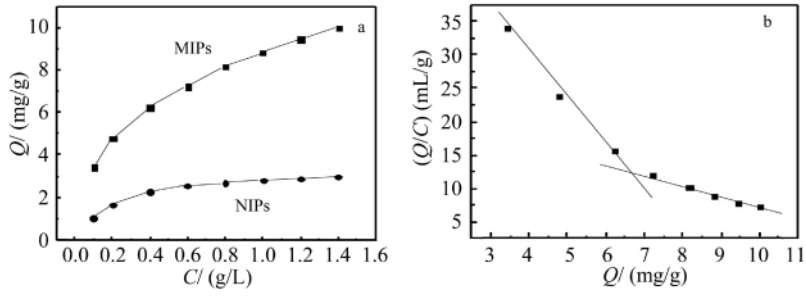

图 3　印迹微球和非印迹微球的吸附等温线(a)及 Scathchard 曲线(b)

Fig. 3　Adsorption isotherms (a) and Scatchard plots (b) of adsorption isotherms of MIPs and nonimprinted polymers (NIPs)

3.3　红外光谱分析

将 SiO_2, VTM-SiO_2, MIPs(模版洗脱后)、MIPs(未洗脱模版)分别进行红外光谱分析(图 4)。比较图 4a 和 4b 可见,在 1413 和 1637 cm^{-1} 有吸收峰,其中 1413 cm^{-1} 处是甲基的弯曲振动,1637 cm^{-1} 是 C═C 的伸缩振动,这表明乙烯基硅烷成功的修饰到 SiO_2 微球表面。在图 4c 和 4d 中,3500 cm^{-1} 是—OH 的吸收峰,3150 ~ 3400 cm^{-1} 是 N—H 键的伸缩振动区域,1725 cm^{-1} 属于 C═O 的伸缩振动。图 4d 中,1450 ~ 1660 cm^{-1} 属于苯环的伸缩振动,3100 cm^{-1} 是苯环 C—H 和乙烯基 C—H 的伸缩振动,而图 4c 却没有这些峰,这表明白藜芦醇分子可以从印迹微球表面洗脱干净。

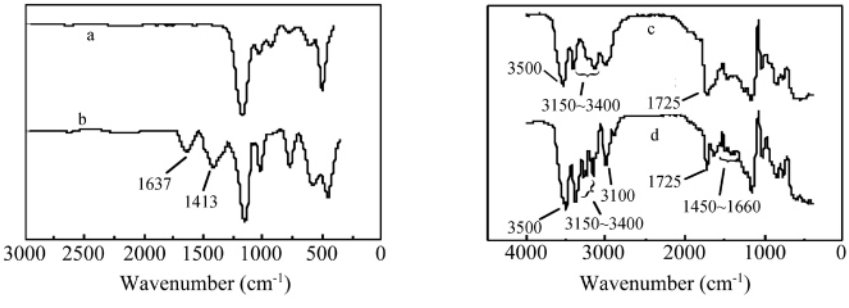

图 4　SiO_2(a)、乙烯基修饰的 SiO_2(b)、MIPs (模板洗脱后)(c)、MIPs (未洗脱模板)(d) 的红外图谱

Fig. 4　IR spectra of SiO_2 (a), SiO_2 modified with vinyl (b), MIPs (after eluting the template) (c), MIPs (before eluting template) (d)

3.4　印迹微球对虎杖提取液中白藜芦醇的分离

采用 HPLC 检测白藜芦醇标准溶液,确定白藜芦醇的出峰时间,分别检测虎杖提取液、过柱液、洗脱液中白藜芦醇的含量,如图 5 所示。对比虎杖提取液(图 5b)和过柱液(图 5c)的色谱图,计算提取液中白藜芦醇的含量为 45.7%,过柱后溶液中白藜芦醇含量为 5.4%,这表明虎杖提取液通过印迹分离柱,白藜芦醇容易被印迹填充物吸附。用甲醇冲洗印迹柱后,再用 V(甲醇):V(乙酸) = 9:1 混合溶液洗脱,收集洗脱液、检测,得色谱图 5d,柱洗脱液中白藜芦醇含量为 89.3%。结果表明,本印迹填充材料具有较强的吸附性

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

能,白藜芦醇与印迹微球的结合键比较牢固,能够将虎杖溶液中的白藜芦醇得到较好的分离。

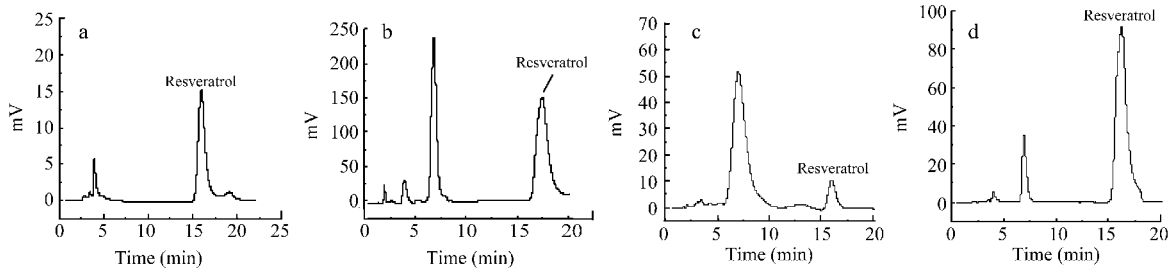

图5 白藜芦醇标准液(a)、虎杖提取液(b)、过柱后溶液(c)和柱洗脱液(d)的液相色谱图

Fig. 5 Liquid chromatograms of resveratrol standard solution(a), extracting solution of rhizoma polygoni cuspidati(b), after passing column(c) and eluate of column (d)

References

1 Malaisamy R, Ulbricht M. *Sep. Purif. Technol.*, **2004**, 39(3): 211 ~ 219

2 Wang S, Xu Z X, Fang G H, Duan Z J, Zhang Y, Chen S. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55(10): 3869 ~ 3876

3 Gao D M, Zhang Z P, Wu M H, Xie C G, Guan G J, Wang D P. *Anal. Chem.*, **2007**, 129(25): 7859 ~ 7866

4 Hua X G, Pan J L, Hua Y L, Huo Y, Li G K. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1188(2): 97 ~ 107

5 Luo W, Zhua L H, Yua C, Tang H Q, Yu H G, Li X, Zhang X. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 618(2): 147 ~ 156

6 GAO Shou-Hong(高守红), YANG Shao-Lin(杨少麟), FAN Guo-Rong(范国荣). *China J. Pharm. Pract.*(药学实践杂志), **2005**, 23(3): 145 ~ 147

7 González B R, Vidal G M L, Tomás B F A, Espín J C. *Innov. Food Sci. Emerg.*, **2009**, 10(3): 374 ~ 382

8 XIANG Hai-Yan(向海燕), ZHOU Chun-Shan(周春山), ZHONG Shi-An(钟世安), LEI Qi-Fu(雷启福). *Chinese J. Appl. Chem.*(应用化学), **2005**, 22(7): 739 ~ 743

9 Wang L, Zhang Z J. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 592(2): 115 ~ 120

10 Ma S J, Zhuang X L, Wang H B, Liu H M, Li J, Dong X H. *Anal. Letters*, **2007**, 40 (2): 321 ~ 333

11 Lu C H, Zhou W H, Han B, Yang H H, Chen X, Wang X R. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(14): 5457 ~ 5461

Preparation and Evaluation of Core-Shell Resveratrol Molecularly Imprinted Microspheres

ZHANG Ming-Lei[1], ZHANG Zhao-Hui*[1,2], LIU Li[1], ZHANG Li-Ji[1], NIE Li-Hua[2]

[1](*College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou* 416000)

[2](*State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, Hunan University, Changsha* 410082)

Abstract Employing resveratrol as template molecule, acrylamide as functional monomer and ethyleneglycol dimethacrylate as cross-linkers, a core-shell resveratrol imprinted microspheres was prepared based on the surface of SiO_2 with a surface imprinting technique. The molecularly imprinted microsphere was characterized by infrared spectroscopy and scanning electron microscopy, and the results showed that the surface grafting of molecularly imprinted polymer-shell particle on SiO_2 was successful and the particles were evenly distributed. High performance liquid chromatography was also used to investigate the imprinted microsphere adsorption performance, and the results showed that the imprinted microsphere exhibited good recognition performance. The maximum adsorption capacities were $Q_{max1} = 9.087$ mg/g and $Q_{max2} = 13.80$ mg/g by the model of Scatchard analysis. The imprinted micospheres was applied to separate resveratrol from the extraction of rhizoma polygoni cuspidate successfully.

Keywords Molecularly imprinted microsphere; Resveratrol; Adsorption property; Core-shell

(Received 2 June 2009; accepted 31 July 2009)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net