

刘婷婷, 卢春霞. 齐墩果酸分子印迹体系优化[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(2): 139–145.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.02.025

齐墩果酸分子印迹体系优化

刘婷婷¹, 卢春霞²

(1. 新疆石河子职业技术学院, 新疆石河子 832000; 2. 长江师范学院现代农业与生物工程学院, 重庆 408100)

摘要:采用沉淀聚合方法,以齐墩果酸为模板,系统考察了功能单体、溶剂、交联剂及引发剂等对齐墩果酸印迹聚合物(OA-MIPs)形貌以及吸附性能的影响。结果表明,分子模拟计算结果不完全适用于沉淀聚合方法,在沉淀聚合时,溶剂和功能单体对聚合物的形貌起主导作用。在以乙腈+乙醇(二者体积比为3:1)为溶剂,甲基丙烯酸为功能单体,二乙烯基苯+二甲基丙烯酸乙二醇酯(二者的物质量之比为4:1)为交联剂,模板:功能单体:交联剂为1:4:20(物质量之比),偶氮二异丁腈用量为反应单体总量的2%等优化条件下,制备的OA-MIPs形貌规则、粒径均一,对齐墩果酸具有较高吸附性能。结果可为齐墩果酸分子印迹聚合物的制备和应用提供数据参考。

关键词:齐墩果酸;分子印迹;沉淀聚合;功能单体;交联剂;引发剂;形貌;吸附性能

中图分类号: O63;R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)02-0139-07

齐墩果酸(oleanolic acid, OA),别称庆四素,为五环三萜类化合物,以游离或结合形式存在于多种植物叶、茎、根及果实中^[1]。研究表明,齐墩果酸具有护肝^[2]、抗肿瘤^[3]、抗氧化^[4]、抗炎^[5]、降血脂^[6]、降血糖^[7]等多种药理作用,是一种具有较高临床应用价值的天然产物。目前制备OA的常用方法为从植物中进行提取和纯化,但传统的制备工艺如溶剂提取和固相萃取技术等^[8-10]存在过程繁琐、有机溶剂用量大、分离效率低、产物纯度不高等缺点。

分子印迹技术(molecular imprinting technique, MIT)是指制备对某一特定目标分子即模板具有特异选择性的印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)的技术。印迹聚合物因具有与模板分子空间结构互补、官能团相互作用的孔穴,而对靶标具有特异性识别和选择性吸附能力,且物理化学性质稳定。因此,MIPs在天然产物分离纯化领域已得到广泛应用^[11-14]。

笔者所在课题组在前期研究中通过量子化学方法模拟了模板与不同功能单体的OA-MIPs预组装体系,通过理论计算筛选出功能单体和溶剂,并采用本体聚合方法制备了OA-MIPs^[15]。但采用本

体聚合法制备的OA-MIPs存在结合位点深、形貌不规则等缺点。为了改善OA-MIPs性能,方便聚合物颗粒作为固相吸附材料使用,本研究采用沉淀聚合法制备齐墩果酸印迹聚合物,并对聚合条件进行优化,以期OA-MIPs的制备提供借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

齐墩果酸(OA,纯度>98%)购自中国标准物质中心;三氟甲基丙烯酸(TFMAA)、甲基丙烯酸(MAA)、二乙烯基苯(DVB,纯度≥80%)、二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA)、三羧甲基丙烷三甲基丙烯酸酯(TRIM)、偶氮二异丁腈(AIBN)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;甲醇(色谱纯)购自德国默克(Merck)公司;乙腈、乙醇、丙酮、乙酸、四氢呋喃、三氯甲烷(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器设备

扫描电子显微镜(S-4800,日本日立公司);高效液相色谱仪(2695,美国Waters公司);氮吹仪(N-EVAP112,美国Organomation公司);电子天平(AE-200,瑞士梅特勒-托利多公司);台式真空干燥箱(DZF-6050,无锡玛瑞特科技有限公司厂)。

1.3 试验方法

1.3.1 OA-MIPs的制备 称取一定质量浓度的OA溶于有机溶剂中,加入功能单体,室温下预聚合4 h,使模板与单体充分作用。然后加入一定浓度的

收稿日期:2019-09-02

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260412)。

作者简介:刘婷婷(1980—),女,河南商丘人,硕士,讲师,主要从事化学分析与检验研究。E-mail:908282175@qq.com。

通信作者:卢春霞,博士,副研究员,主要从事食品质量安全研究。

E-mail:shzlex2002@163.com。

交联剂和引发剂,通氮气 10 min 以除去氧气,密封反应器,放入恒温水浴锅中,于 60 ℃、200 r/min 下热聚合 24 h。反应结束后,聚合物用甲醇和丙酮各洗涤 3 次,然后以甲醇+乙酸(二者体积比为 8:2)为溶剂,索氏抽提除去聚合物中的 OA,再以甲醇漂洗除去乙酸,40 ℃ 真空干燥,最终获得 OA-MIPs。非印迹聚合物(NIPs)的制备不加模板分子。

在 OA-MIPs 制备过程中,分别考察功能单体、溶剂、交联剂以及模板、单体、交联剂摩尔比和引发剂浓度等对 OA-MIPs 形貌和吸附性能的影响。

1.3.2 色谱条件 Waters 2498 紫外检测器;色谱柱: C₁₈ 柱(5 μm, 3.9 mm × 150 mm, Waters 公司);流动相为甲醇:水 = 9:1(体积比),流速为 1.0 mL/min,柱温为 40 ℃,进样量为 10 μL;检测波长为 210 nm。

1.3.3 OA-MIPs 吸附性能 称取 200 mg MIPs 或 NIPs 于三角瓶中,加入 5 mL OA 溶液(1.4 mg/mL),置于恒温振荡器中,室温(25 ℃)反应 12 h,8 000 r/min 离心 10 min,采用高效液相色谱仪测定上清液中 OA 含量,计算印迹聚合物对 OA 的平衡吸附量(Q_e)和印迹因子(IF)。 Q_e 和 IF 计算公式如下:

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e)V_i}{W}; \quad (1)$$

$$K_d = \frac{Q_e}{C_e}; \quad (2)$$

$$IF = \frac{K_d(\text{MIP})}{K_d(\text{NIP})}。 \quad (3)$$

式中: Q_e 为静态平衡吸附量,mg/g; C_0 和 C_e 为聚合物吸附前后溶液中 OA 浓度,mg/mL; V_i 为溶液体积,mL; W 为聚合物的质量,g; K_d 为静态分配系数,mL/g。

2 结果与分析

2.1 功能单体的选择

根据前期分子模拟计算结果,功能单体三氟甲基丙烯酸(TFMAA)与模板分子(OA)形成复合物的结合能(ΔE)最高,为 -70.99 kJ/mol,且结构最稳定^[15],本研究首选 TFMAA 为功能单体,AIBN 为引发剂,DVB+EGDMA 为交联剂,不同极性的三氯甲烷、四氢呋喃、甲醇、乙醇、丙酮、乙腈+甲醇、乙腈+乙醇、乙腈+三氯甲烷、乙腈+丙酮为溶剂,采用沉淀聚合法制备 OA-MIPs。结果显示,采用以上条

件制备的 OA-MIPs 均呈凝胶状。这与 Wang 等的报道基本一致,原因可能是 TFMAA 影响了沉淀过程中所形成的寡聚物的溶度参数^[16]。

理论计算结果显示,4-乙烯基吡啶(4-VP)与 OA 物质质量之比为 2:1 时也可形成稳定的氢键复合物^[15]。因此,本研究采用 4-VP 为功能单体,DVB+EGDMA 为交联剂,三氯甲烷为溶剂,通过沉淀聚合法制备 OA-MIPs,所得聚合物仍呈凝胶状(图 1),原因是三氯甲烷溶解性太强,聚合物不能从反应介质中沉淀出来。为促进微球的形成,在乙腈中添加不同助溶剂(三氯甲烷、四氢呋喃、甲醇、乙醇和丙酮)。结果显示,只有采用乙腈和丙酮(二者体积比为 3:1)为溶剂时,聚合物呈微球状,但该溶剂无法溶解 OA,当溶剂体系中丙酮体积超过 30% 时,聚合物又不成颗粒。因此,选择 4-VP 为单体时,由于无合适的溶剂,而无法获得形貌规则的 OA-MIPs。

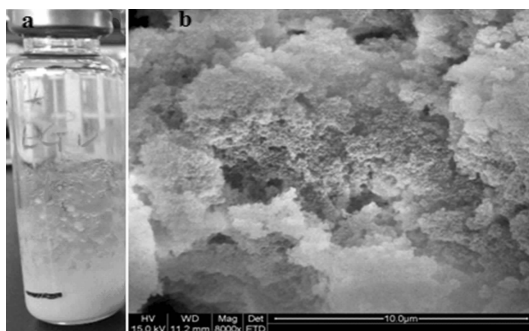


图1 沉淀聚合制备的 OA-MIPs(a)和扫描电镜图(b)

试验进一步选用弱酸性 MAA(更接近 θ 状态)为功能单体,DVB、EGDMA 和 TRIM 分别为交联剂,乙腈+乙醇(二者体积比为 3:1)为溶剂,AIBN 为引发剂,结果(图 2)显示,聚合物颗粒可以从溶剂中沉淀出来,且制备的聚合物呈规则微球状(图 3)。因此,在后续试验中选择 MAA 为功能单体。

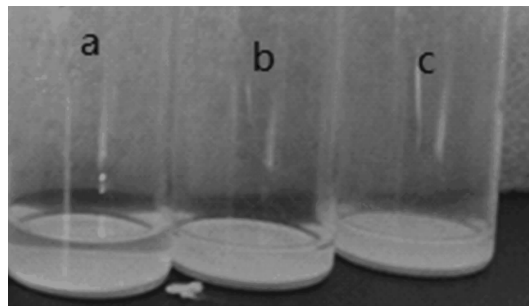


图2 交联剂分别为 DVB(a)、EGDMA(b)和 TRIM(c)时采用沉淀聚合法制备的 OA-MIPs

2.2 溶剂的选择和用量

在沉淀聚合反应中,溶剂对 MIPs 的形貌和吸附

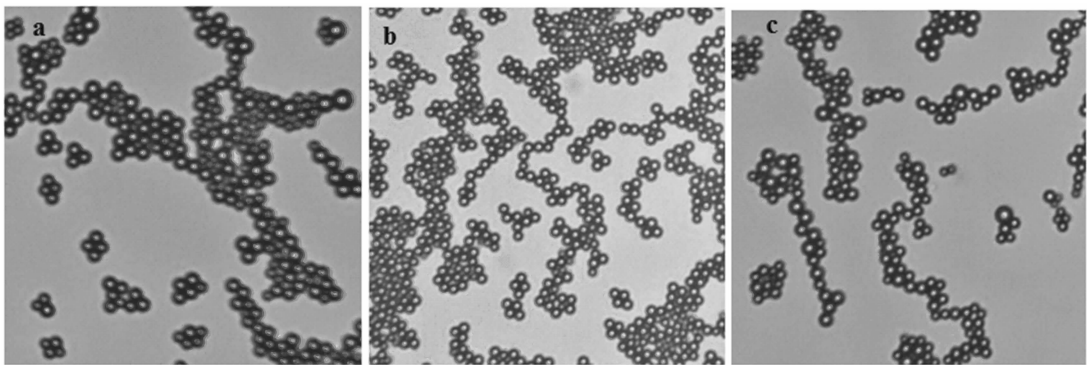


图3 交联剂分别为 DVB(a)、EGDMA(b)和 TRIM(c)时采用沉淀聚合法制备的 OA-MIPs 光学电镜扫描结果

性能有重要影响。溶剂选择的原则是对模板和单体具有较高溶解性,同时又不能溶解形成的聚合物颗粒。前期研究结果显示,在沉淀聚合过程中,采用三氯甲烷、四氢呋喃为溶剂无法制备出聚合物微粒^[17];乙腈虽然是常用的溶剂^[18-19],但 OA 分子不溶于乙腈。因此,本研究在乙腈中加入了一定比例的助溶剂,结果见表 1,添加乙醇的溶剂溶解性最大,当乙腈和乙醇体积比为 3 : 1 时,既可以充分溶解模板分子,又可制备出粒径均一的球形聚合物。故后续试验选择乙腈 + 乙醇(二者体积比为 3 : 1)

作为溶剂。
溶剂用量(32.0、16.0、10.7、8.0 mL)对 OA - MIPs 形态和吸附性能的影响见图 4 和表 1。由图 4 可知,OA - MIPs 的粒径随着溶剂用量的减小而增大,当溶剂体积为 8.0 mL 时,制备的 OA - MIPs 形貌规则、粒径均一,印迹因子 IF 也达到最大值(9.59)。虽然粒径小的聚合物会有大的比表面积和高吸附量,但作为固相吸附材料装柱时会产生大的柱压。故综合考虑,选定 8.0 mL 作为反应溶剂用量。

表 1 不同溶剂中沉淀聚合 OA - MIPs

聚合物	溶剂	溶剂体积 (mL)	OA (mmol)	MAA (mmol)	交联剂 ^a (mmol)	AIBN ^b (mg)	聚合物形貌	印迹因子 ^c (IF)
P1	乙腈 + 甲醇(体积比 3 : 1) ^d	8.0	0.1	0.4	2.0	6.44	不规则颗粒	—
P2	乙腈 + 四氢呋喃(体积比 3 : 1) ^d	8.0	0.1	0.4	2.0	6.44	不规则颗粒	—
P3	乙腈 + 丙酮(体积比 6 : 4) ^d	8.0	0.1	0.4	2.0	6.44	不规则颗粒	—
P4	乙腈 + 乙醇(体积比 3 : 1) ^d	8.0	0.1	0.4	2.0	6.44	微球	9.59
P5	乙腈 + 乙醇(体积比 3 : 1) ^d	10.7	0.1	0.4	2.0	6.44	微球	8.74
P6	乙腈 + 乙醇(体积比 3 : 1) ^d	16.0	0.1	0.4	2.0	6.44	微球	8.86
P7	乙腈 + 乙醇(体积比 3 : 1) ^d	32.0	0.1	0.4	2.0	6.44	微球	8.52

注:上标 a 表示交联剂为 DVB + EGDMA(二者的物质质量之比为 4 : 1);上标 b 表示 AIBN 用量占总反应单体的 2%;上标 c 表示 $IF = K_d(MIP)/K_d(NIP)$;上标 d 表示助溶剂低于此比例,OA 在此溶剂中不能充分溶解。

2.3 模板与功能单体摩尔比对 OA - MIPs 形貌和吸附性能的影响

模板与功能单体的比例是影响印迹聚合物性能的因素之一,若功能单体量过少,模板和功能单体之间预组装进行得不充分,导致聚合物选择性降低;而过量的功能单体有时会发生自身缔合,致使选择性结合位点反而减少^[20]。因此,本研究在固定其他条件[乙腈 : 乙醇为 3 : 1(体积比)、DVB : EGDMA 为 4 : 1(物质质量之比)、AIBN 浓度占反应单体总量的 2%、聚合温度为 60 ℃]的基础上,考察了模板 OA 与功能单体 MAA 的不同物质质量之

比(1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6)对 OA - MIPs 形貌和吸附性能的影响,结果见图 5。两者物质质量之比对 OA - MIPs 粒径及形貌没有明显影响,印迹因子(IF)随 MAA 比例的增加而增大,当两者比例大于 1 : 4 时,印迹因子逐渐减小,非特异性吸附增加。因此,后续试验中选择模板与单体物质质量之比为 1 : 4。

2.4 交联剂对 OA - MIPs 形貌和吸附性能的影响

DVB 和 EGDMA 是沉淀聚合反应中常用的交联剂。DVB 的交联度较大,制备的聚合物粒径也较大,但产率低^[21];EGDMA 虽可以提高产率,但产生的聚合物粒径较小^[22]。为获得粒径大小适中及产

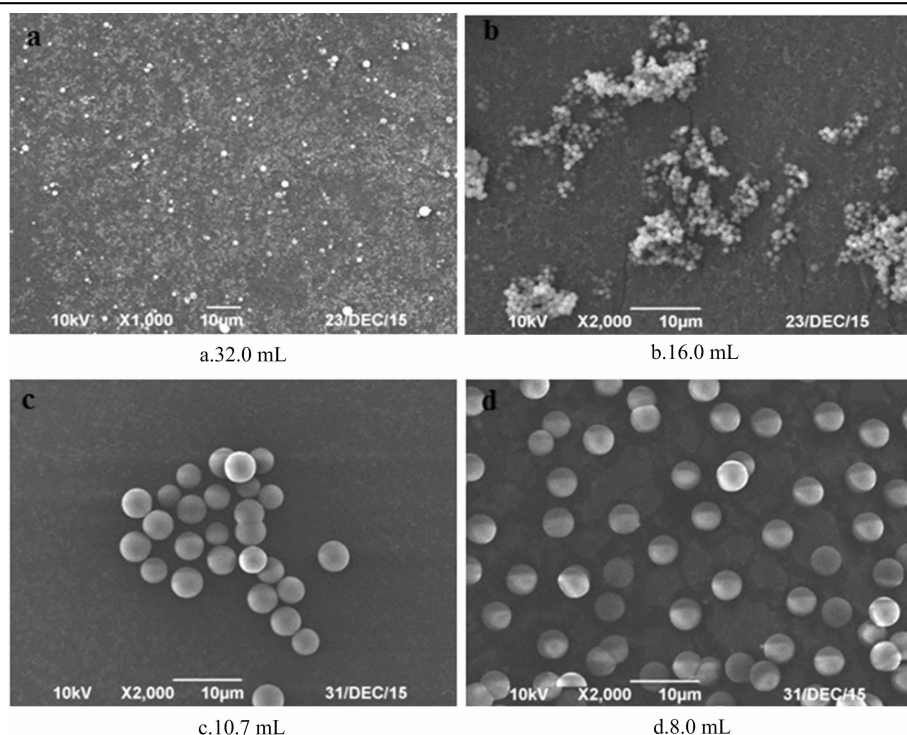


图4 不用溶剂用量对 OA-MIPs 形貌的影响

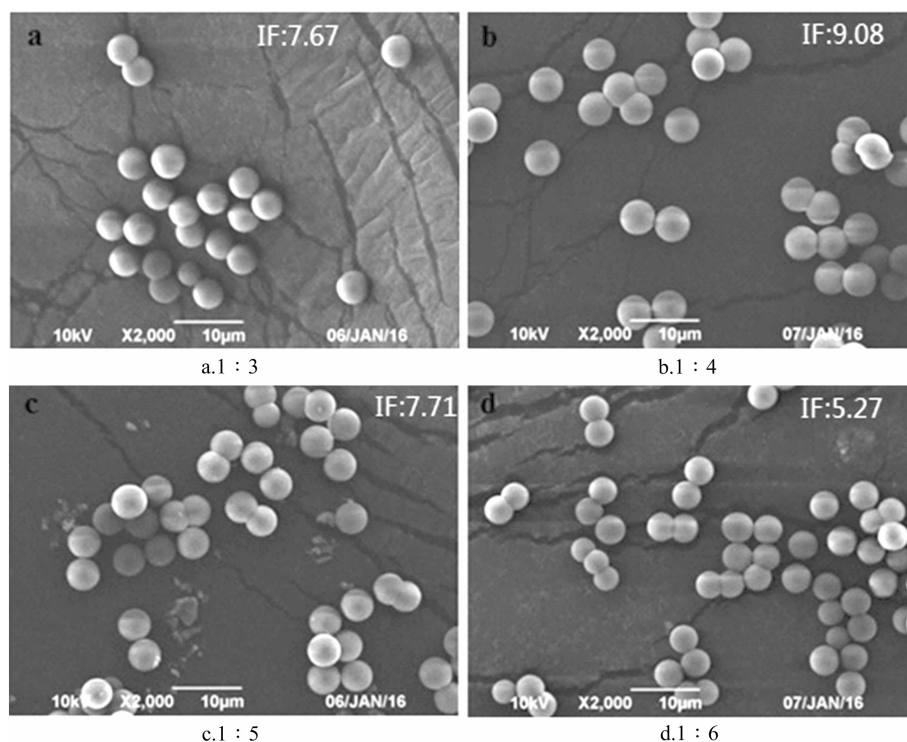


图5 模板/单体质量之比对 OA-MIPs 形貌的影响

率高的 MIPs,本试验采用 DVB 和 EGDMA 为混合交联剂,并考察两者物质质量之比对 OA-MIPs 性能的影响。结果(图 6)显示,随着 DVB 物质质量之比例的增加,聚合物粒径逐渐变大,当 DVB 与 EGDMA 物质质量之比为 4 : 1 时,所得 OA-MIPs 粒径均一,分

散最好,印迹因子较高(9.39)。因此,采用物质质量之比 4 : 1 的 DVB 和 EGDMA 为交联剂。

功能单体与交联剂不同物质质量之比(1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6)对 OA-MIPs 性能的影响见图 7,可以看出,所有 OA-MIPs 呈规则球形,其粒径随交

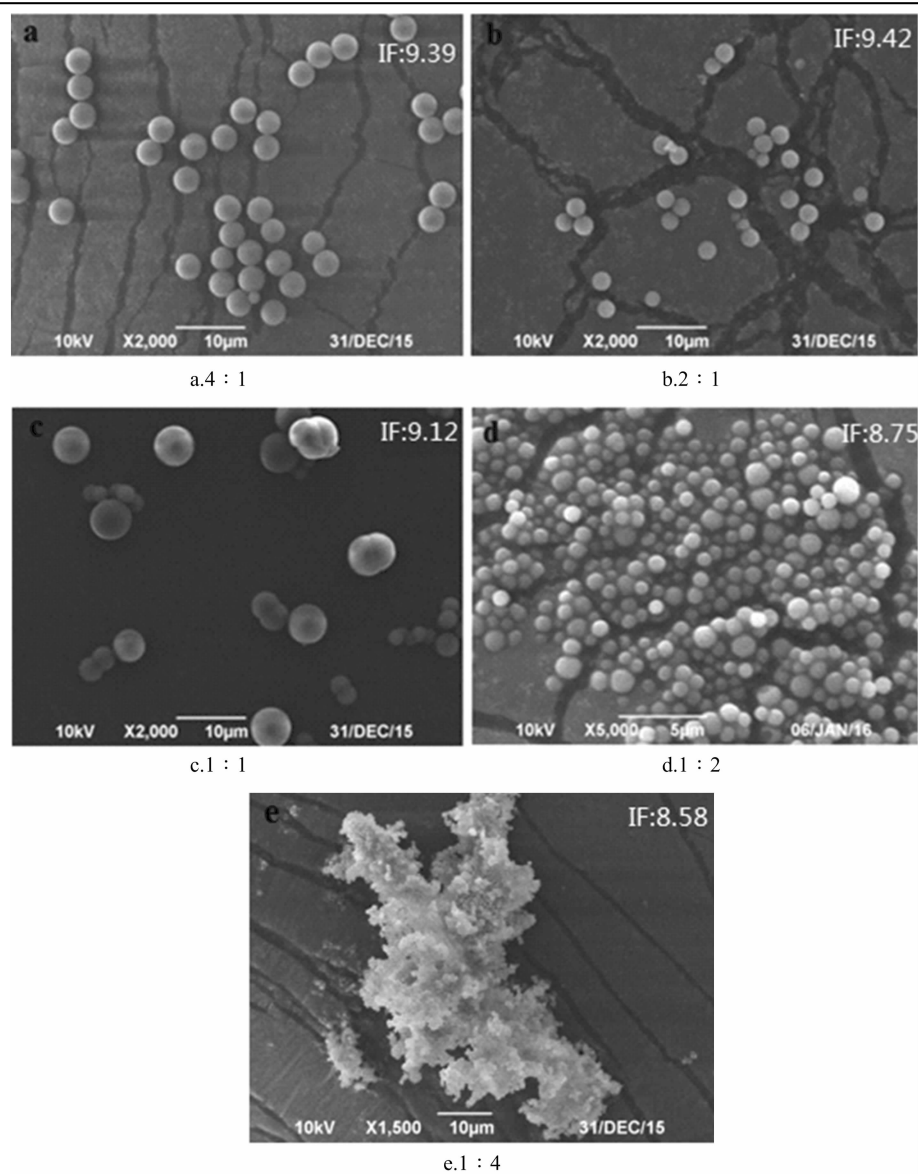


图6 交联剂(DVB/EGDMA)物质量之比对 OA-MIPs 形貌的影响

联剂物质量之比的增加而增大,当 MAA 与交联剂物质量之比为 1 : 5 时,获得的 OA - MIPs 粒径均一,分散良好,且印迹因子最大(9.51)。因此,功能单体与交联剂物质量之比选择 1 : 5。

2.5 引发剂用量对 OA - MIPs 形貌和吸附性能的影响

在沉淀聚合反应中,引发剂用量对聚合物粒径分布有一定影响。本研究在固定其他合成条件的基础上,系统考察 AIBN 用量(其质量为总反应单体的 1%、2%、4%、6%、8%)对 OA - MIPs 形貌、粒径及吸附性能的影响。从图 8 可以看出,引发剂用量在 1% ~ 8% 范围内时,均可制备出球形印迹聚合物,且聚合物粒径随着引发剂 AIBN 用量的增加而增大。当引发剂用量 ≥ 4% 时,聚合物出现黏连现象,

颗粒均一性下降。吸附试验结果表明,当 AIBN 用量为 2% 时,OA - MIPs 的印迹因子最高(9.62),因此,AIBN 浓度选择 2%。

3 结论

研究结果显示,在沉淀聚合方法中,溶剂对聚合物的形貌具有主导作用,在以乙腈 + 乙醇(二者体积比为 3 : 1)为溶剂,MAA 为功能单体,DVB + EGDMA(二者物质量之比 4 : 1)为交联剂,模板 : 单体 : 交联剂为 1 : 4 : 20(物质量之比),AIBN 用量为反应单体总量的 2% 聚合温度为 60 ℃ 的条件下,采用沉淀聚合方法制备的 OA - MIPs 形貌规则、粒径均一,同时对 OA 具有高的吸附性能。

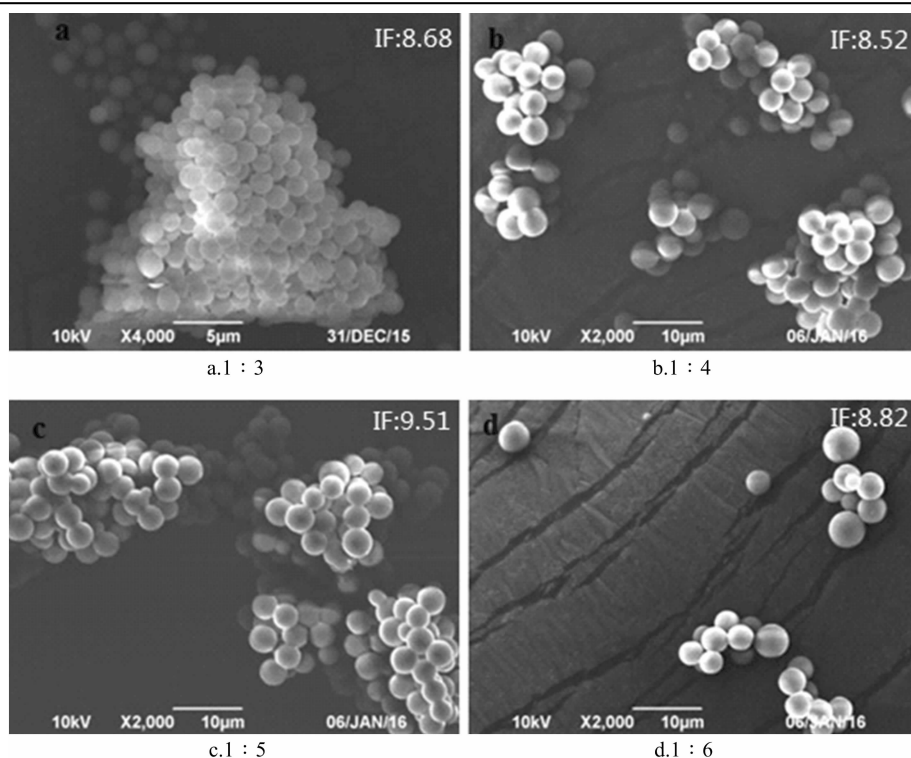


图7 功能单体与交联剂不同物质量之比对 OA-MIPs 形貌的影响

参考文献:

- [1] 张登科, 孙文基, 沙振方. 35 种植物的齐墩果酸含量比较[J]. 中药材, 1989(12): 21-23.
- [2] Gutiérrez - Rebolledo G A, Siordia - Reyes A G, Meckes - Fischer M, et al. Hepatoprotective properties of oleanolic and ursolic acids in antitubercular drug - induced liver damage[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2016, 9(7): 644-651.
- [3] Lúcio K A, da Graça Rocha G, Monção - Ribeiro L C, et al. Oleanolic acid initiates apoptosis in non - small cell lung cancer cell lines and reduces metastasis of a B16F10 melanoma model *in vivo* [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28596.
- [4] Xin W, Ye X L, Rui L, et al. Antioxidant activities of oleanolic acid *in vitro*; possible role of Nrf2 and MAP kinases [J]. Chemico - Biological Interactions, 2010, 184(3): 328-337.
- [5] Giner - Larza E M, Mániz S, Recio M C, et al. Oleanonic acid, a 3 - oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti - inflammatory activity [J]. European Journal of Pharmacology, 2001, 428(1): 137-143.
- [6] Buus N H, Hansson N C, Rodriguez - Rodriguez R, et al. Antiatherogenic effects of oleanolic acid in apolipoprotein E knockout mice [J]. European Journal of Pharmacology, 2011, 670 (2/3): 519-526.
- [7] Wang X, Li Y L, Wu H, et al. Antidiabetic effect of oleanolic acid: a promising use of a traditional pharmacological agent [J]. Phytotherapy Research, 2011, 25(7): 1031-1040.
- [8] Xia E Q, Wang B W, Xu X R, et al. Microwave - Assisted extraction of oleanolic acid and ursolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12 (8): 5319-5329.
- [9] 李 钊, 王亚楠, 万梓龙, 等. 山楂中熊果酸与齐墩果酸提取和纯化工艺的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 141-144.
- [10] 黄新苹, 王 玲, 王武朝. 大孔树脂纯化对女贞子中齐墩果酸的提取工艺优化 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(6): 1117-1122.
- [11] Ma X B, Lin H L, Zhang J Y, et al. Extraction and identification of matrine - type alkaloids from *Sophora moorcroftiana* using double - templated molecularly imprinted polymers with HPLC - MS/MS [J]. Journal of Separation Science, 2018, 41(7): 1691-1703.
- [12] Chen X L, Jin X K, Yao L, et al. Preparation and characterization of molecularly - imprinted polymers for extraction of sanshool acid amide compounds followed by their separation from pepper oil resin derived from Chinese prickly ash (*Zanthoxylum bungeanum*) [J]. Journal of Separation Science, 2018, 41(2): 590-601.
- [13] Lu C X, Tang Z G, Liu C B, et al. Surface molecularly imprinted polymers prepared by two - step precipitation polymerization for the selective extraction of oleanolic acid from grape pomace extract [J]. Journal of Separation Science, 2018, 41(17): 3496-3502.
- [14] Tang Z G, Liu C B, Jing W, et al. Preparation and characterization of monodisperse molecularly imprinted polymers for the recognition and enrichment of oleanolic acid [J]. Journal of Separation Science, 2016, 39(8): 1592-1602.
- [15] 唐宗贵, 王 静, 陈 霞, 等. 齐墩果酸分子印迹聚合物预组装体系的分子模拟及聚合物制备 [J]. 高分子通报, 2017(6):

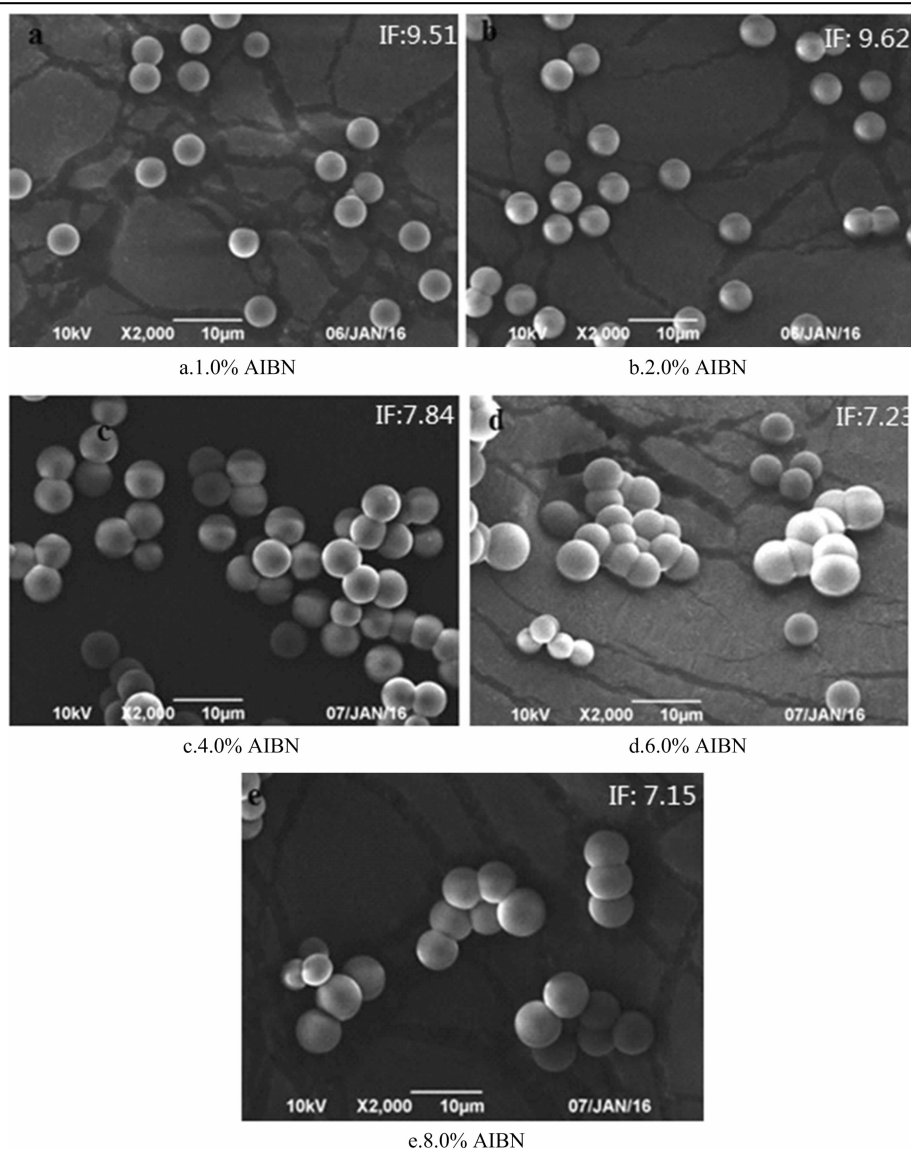


图8 引发剂用量对 OA-MIPs 形貌的影响

47-58.

- [16] Wang J F, Cormack P G, Sherrington D C, et al. Synthesis and characterization of micrometer - sized molecularly imprinted spherical polymer particulates prepared via precipitation polymerization[J]. Pure and Applied Chemistry, 2007, 79 (9): 1505 - 1519.
- [17] 卢春霞, 唐宗贵, 王 静, 等. 沉淀聚合法制备单分散聚(4-乙炔基吡啶-co-二乙烯基苯/三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯) 聚合物微球[J]. 高分子学报, 2016(11): 1538 - 1545.
- [18] Kai L, Harald D S. Synthesis of monodisperse poly (divinylbenzene) microspheres[J]. Journal of Polymer Science Part a - Polymer Chemistry, 1993, 31(13): 3257 - 3263.
- [19] Feng B, Yang X L, Huang W Q. Preparation of narrow or

monodisperse poly (ethyleneglycol dimethacrylate) microspheres by distillation - precipitation polymerization [J]. European Polymer Journal, 2006, 42 (9) : 2088 - 2097.

- [20] 郑 平, 姚 剑, 徐业平. 分子印迹固相萃取技术及其在食品安全分析中的应用 [M]. 合肥: 合肥工业大学出版社, 2011.
- [21] Yun L, Ding M J, Shu W, et al. Preparation of imprinted polymers at surface of magnetic nanoparticles for the selective extraction of tadalafil from medicines [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2011, 3 (9) : 3308 - 3315.
- [22] Li W H, Stöer HDH. Mono - or narrow disperse poly (methacrylate - co - divinylbenzene) microspheres by precipitation polymerization [J]. Journal of Polymer Science Part a - Polymer Chemistry, 1999, 37: 2899 - 2907.