

Synthesis and Evaluation of Molecularly Imprinting Polymer Using Ursolic Acid as Template

Jianxin Wang, Jia Wang, Yongzhi Liu, Hudong Liu, Caihong Liu*

College of Pharmaceutical, Taishan Medical University, Tai'an Shandong
Email: *liuch7688@163.com

Received: Sep. 25th, 2017; accepted: Oct. 6th, 2017; published: Oct. 12th, 2017

Abstract

This study aims to prepare ursolic acid molecularly imprinting polymer (MIPs) by surface polymerization method at the surface of modified silica particles by using ursolic acid (UA) as the template molecule, α -methacrylic acid as functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate as the crosslinker. The adsorption and recognition properties of the obtained polymers were evaluated by static binding test, dynamic binding test and selective binding test. The results showed that MIPs displayed higher recognition ability and adsorption capacity to the template molecule-UA.

Keywords

Surface Molecularly Imprinted Polymer, Ursolic Acid, Adsorption Properties

熊果酸分子印迹聚合物的合成及其特性研究

王建新, 王 佳, 刘勇志, 刘沪东, 刘彩红*

泰山医学院药学院, 山东 泰安
Email: *liuch7688@163.com

收稿日期: 2017年9月25日; 录用日期: 2017年10月6日; 发布日期: 2017年10月12日

摘 要

采用表面分子印迹技术, 以熊果酸(UA)为模板分子, α -甲基丙烯酸(MAA)为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 制备熊果酸分子印迹聚合物。通过静态吸附平衡实验、动态吸附实验及选择性吸附实

*通讯作者。

验,考察了分子印迹聚合物的吸附性能,结果显示MIPs表面形成了能与模板分子相匹配且具有特异识别位点的孔穴结构, MIPs对UA具有良好的吸附性能和特异选择识别能力。

关键词

表面分子印迹聚合物, 熊果酸, 吸附性能

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

熊果酸(ursolic acid, UA)又名乌索酸、乌苏酸,是一种三萜类化合物,广泛存在于多种天然植物中。熊果酸具有抗炎、护肝、降血脂、抗突变、抗氧化等多种生物学活性[1] [2] [3],并且作为天然的抗氧化剂被广泛应用于食品、药品和保健品中。因此,从天然植物中快速、高效地提取高纯度的熊果酸具有重要意义。目前,从天然植物中获得熊果酸的方法主要采用常规的溶剂萃取和柱层析技术[4] [5],这些方法存在有机溶剂消耗量很大,操作繁琐,分离效率低等问题。分子印迹技术(molecular imprinting technique, MIT)是近年来发展的一项制备具有高度选择性和亲和能力的聚合物的新型技术,在环境、食品、医药等领域得到广泛应用[6] [7] [8]。近来,分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)因具有特异识别性、广泛实用性和构效预定性等优点,作为一种固相萃取吸附剂也越来越多地用于复杂样品的分离纯化,实现了对目标分子及其结构类似物的选择性富集和分离。因此,本研究采用表面印迹聚合技术,以熊果酸为模板分子合成MIPs并对其特性进行研究,以期建立一种简便、快速、高效地分离纯化天然植物中熊果酸的方法。

2. 仪器与试剂

熊果酸(UA)、齐墩果酸(OA)由上海同田生物技术股份有限公司提供;、甲基丙烯酸(MAA)、乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)、偶氮二异丁腈(AIBN)均购于国药集团化学试剂有限公司;3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)。MAA和EDMA使用前均经过纯化处理。甲苯、乙酸、甲醇和氯仿均为分析纯试剂。

2300 II 高效液相色谱仪(大连伊利特分析仪器有限公司);SHA-C 型水浴恒温振荡器(江苏省金坛市医疗仪器厂);UV-2450PC 型紫外可见分光光度计(日本岛津设备公司);KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

3. 方法

3.1. 硅胶的活化及改性

称取6 g 硅胶分散于50 mL 50%的硝酸溶液中,常温静置24 h,然后用蒸馏水冲洗至中性,抽滤,60℃下干燥24 h,置于干燥器中保存备用。

取活化硅胶5 g和50 mL 甲苯置于圆底烧瓶中,缓慢加入硅烷偶联剂 APTES 2 mL 和三乙胺 1 mL,90℃下磁力搅拌回流24 h。反应后用甲醇多次洗涤,60℃下真空干燥24 h。

3.2. 熊果酸表面分子印迹聚合物的合成

称取0.1 mmol 熊果酸置于6 mL 甲醇中,超声溶解,加入0.4 mmol 功能单体 MAA 和0.4 g 改性硅胶,

25℃恒温振荡 6 h 进行预组装。再加入交联剂 EDMA 1.6 mmol 和引发剂 AIBN 20 mg, 超声 25 min 后, 通 N₂ 30 min, 密封后 50℃反应 48 h。反应后, 减压抽滤, 用甲醇/冰醋酸溶液(体积比为 9:1)洗涤 3 次, 以除去模板分子熊果酸, 用丙酮冲洗, 再用蒸馏水洗至中性, 真空干燥即得熊果酸表面分子印迹聚合物。

非印迹聚合物(non-imprinted polymers, NIPs)的制备, 除不加入模板分子熊果酸外, 其它步骤同上。

3.3. 色谱条件

实验中含量测定采用 HPLC, 色谱柱: Hypersil BDS C 18 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-甲醇-0.5%醋酸铵溶液(67:12:21); 检测波长: 210 nm; 柱温: 25℃; 流速: 1.0 mL·min⁻¹。

3.4. 聚合物的静态吸附实验

精密称定 MIPs 20.0 mg 放入锥形瓶中, 加入不同浓度的熊果酸甲醇溶液, 充分混合后于 25℃恒温空气振荡器内振荡 12 h。高速离心沉淀, 吸取上清液, 用 HPLC 测定平衡质量浓度, NIPs 按同样操作进行。平衡吸附量(Q)按公式(1)计算[9]。

$$Q(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = (C_0 - C_t) \times V \times 10^{-3} / m \quad (1)$$

式中: C_0 为吸附前熊果酸的质量浓度(mg·mL⁻¹); C_t 为吸附后 t 时间溶液中熊果酸的平衡质量浓度(mg·mL⁻¹); V 为熊果酸溶液体积(mL); m 为 MIPs 或 NIPs 的质量(g)。

3.5. 聚合物的动态吸附试验

精密称定 20.0 mg MIPs 和 NIPs 各 8 份于锥形瓶中, 加入一定浓度的熊果酸溶液, 25℃恒温空气振荡器内振荡, 分别于 10、30、50、70、90、110、130、150、170 min 取样, 离心, 测定上清液中游离熊果酸的含量。

3.6. 聚合物的吸附选择性实验

分别精密称定 20.0 mg MIPs 和 NIPs 于锥形瓶中, 分别加入一定量的熊果酸溶液和齐墩果酸溶液, 25℃恒温空气振荡器内振荡 12 h, 离心, 取上清液, 测定游离含量。

4. 结果

4.1. 分子印迹聚合物的制备

利用硝酸活化处理硅胶颗粒, 以使硅胶颗粒表面含有羟基基团。硅烷偶联剂 APTES 可化学键合于硅胶微粒表面, 将氨基基团接枝在硅胶表面。加入的模板分子 UA 和功能单体 MAA 通过羧基与硅胶表面的氨基相互作用, 在硅胶表面发生聚合反应, 使聚合物层包覆在硅胶表面, 洗脱模板分子后, 形成表面分子印迹聚合物。

合适的模板分子-功能单体摩尔比有利于聚合物具有更好的特异识别能力和吸附特性; 模板分子和功能单体在交联剂的作用下聚合形成刚性的聚合物, 在选择模板分子-功能单体摩尔比时, 既要使聚合物具有一定的刚性以保持良好的空间构型, 又要具有一定的柔韧性以便易于接近其识别位点, 从而具有良好的识别性能。当 MAA 用量较少时, 只有少量的 UA 能与 MAA 形成稳定配合物, 且部分 UA 仍处于游离状态, 这样分子印迹中形成的与 UA 结构相匹配的立体孔穴的密度较低, 识别位点少, 结合容量低; 随 MAA 用量的增加, UA 与 MAA 之间形成稳定配合物的量增多, 与 UA 结构相匹配的立体孔穴就多, 吸附量变大。随着 MAA 与 UA 摩尔比的增加, MIPs 的吸附量逐渐增加, 当达到 4:1 时, 吸附量达到最大; 但当 MAA 用量过多时, 聚合物的吸附性能反而下降。因此, MAA 与 UA 的最佳摩尔比为 4:1。交联剂

使模板分子和功能单体聚合形成高度交联、刚性的聚合物，实验中交联剂与模板分子摩尔比为 16:1 时所制得的聚合物对 UA 的结合特性最佳。

4.2. 聚合物静态吸附实验

聚合物的静态吸附实验结果如图 1 所示。随着 UA 溶液初始质量浓度从 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 升高到 $1.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，MIPs 对 UA 的吸附量先呈明显的增加趋势，当溶液浓度增加至 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后，聚合物对 UA 的吸附处于平衡状态。在实验浓度范围内，MIPs 和 NIPs 对 UA 的最大吸附量分别 $27.15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $9.17 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在整个吸附过程中，随 UA 浓度的增大，MIPs 的吸附量明显高于 NIPs 的吸附量。这说明 MIPs 对模板分子 UA 有明显的富集吸附的作用，具有较好的印迹效果，硅胶表面形成了能与 UA 分子相匹配且具有特异识别位点的三维孔穴结构，而 NIPs 没有形成特异性结合位点，对模板分子没有选择性，因而吸附能力差。

4.3. 聚合物动态吸附实验

为研究 MIPs 达到吸附平衡所需的时间和吸附速率，在不同的时间内测定了 MIPs 和 NIPs 对 UA 的吸附量，吸附动力学曲线见图 2。MIPs 对 UA 的吸附量在短时间有很大的增加，随着时间的延长，吸附量增加变缓，110 min 后吸附量变化趋于平缓，基本达到吸附平衡；且在任何时间段 MIPs 对 UA 的吸附量均明显高于 NIPs。这说明能够与模板分子 UA 相互匹配且带有识别位点的三维空穴大都存在于聚合物的表面，从而可以快速地吸附目标化合物。

4.4. 聚合物吸附选择性实验

为考察 MIPs 对模板分子 UA 的特异性识别能力，实验选用模板分子 UA 及与其结构类似的齐墩果酸 OA 为底物，采用平衡吸附法测定 MIPs 和 NIPs 对底物的结合量，并通过静态吸附分配系数 K_D 和分离因子 α 来表征[10]。

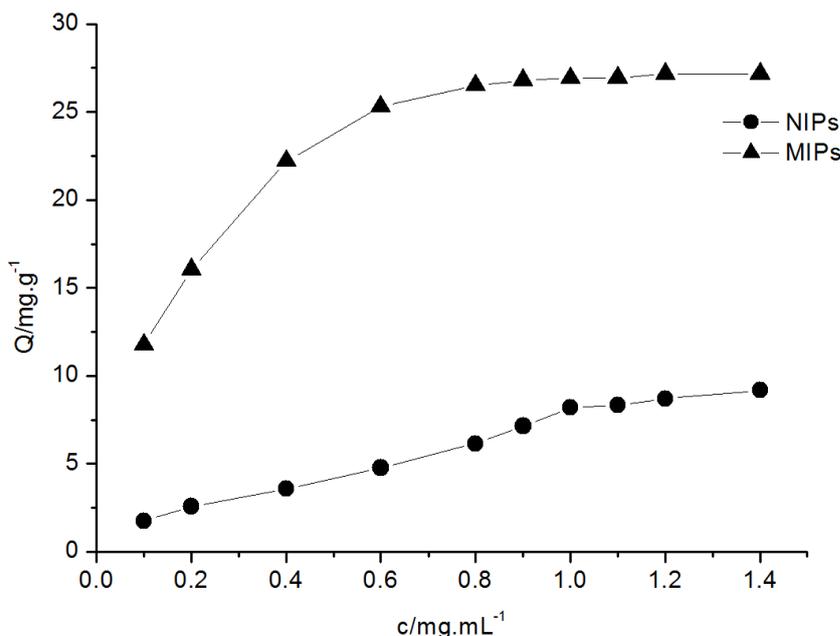


Figure 1. Adsorption isotherms of MIPs and NIPs

图 1. 聚合物的吸附等温线

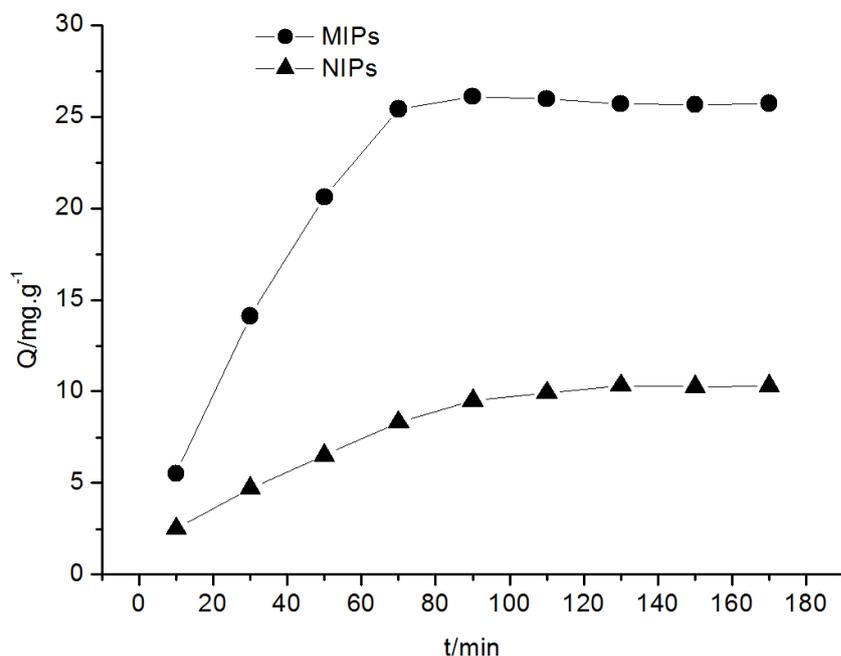


Figure 2. Adsorption dynamic curves of MIPs and NIPs
图 2. 聚合物的动态吸附曲线

Table 1. The recognizing ability of MIPs and NIPs
表 1. MIPs 和 NIPs 分子识别性能

聚合物	底物	K_D	α
MIPs	UA	25.7	1
	OA	12.3	1.7
NIPs	UA	6.2	1
	OA	4.9	1.05

静态吸附分配系数 K_D 定义为

$$K_D = C_p / C_s$$

式中, C_p 表示底物在聚合物中的浓度, C_s 表示底物在溶液中的浓度。 K_D 越大说明 MIPs 对底物的吸附能力越强。

分离因子 α 的定义为

$$\alpha = K_{Di} / K_{Dj}$$

式中, i 和 j 分别表示模板分子和底物, $i=j$ 时, $\alpha=1$ 。 α 越大表明 MIPs 对模板分子的选择专一性越好。若 $\alpha < 1$, 则表明 MIPs 对底物没有选择性; 若 $\alpha > 1$ 则表明, MIPs 对底物有一定的选择性。

由表 1 可见, 模板分子 UA 在 MIPs 中的 K_D 明显大于 OA 的 K_D , 说明 MIPs 对模板分子 UA 的吸附能力更强。MIPs 中 UA 的 K_D 明显大于 NIPs 中 UA 的 K_D , 表明 MIPs 对 UA 分子产生了明显的印迹效应。 α 的数值表明 MIP 对模板分子 UA 有一定的选择性, 对 OA 没有选择性。

5. 结论

本实验采用表面分子印迹技术, 制备了熊果酸分子印迹聚合物, 并考察了 MIP 对模板分子 UA 的特异性吸附作用, 结果表明 MIP 对模板分子能产生良好的选择性和吸附作用, 用于选择性分离、富集天然

产物中的熊果酸是可行的。

基金项目

国家级大学生创新创业训练计划(201610439138), 泰山医学院学生科研计划课题(201601006)。

参考文献 (References)

- [1] Checker, R., Sandur, S.K., Sharma, D., *et al.* (2012) Potent Anti-Inflammatory Activity of Ursolic Acid, a Triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. *PLoS ONE*, **7**, e31318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031318>
- [2] 王博, 武利强, 叶宝东, 等. 白花蛇舌草熊果酸诱导白血病耐药 K562/ADM 细胞凋亡及其作用机理的研究[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(4): 921-924.
- [3] 朱建勤, 陈晖, 王少戎, 等. 熊果酸半乳糖苷偶联物的合成及保肝活性[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(7): 1660-1666.
- [4] Wei, M.C. and Yang, Y.C. (2014) Extraction Characteristics and Kinetic Studies of Oleanolic and Ursolic Acids from *Hedyotis Diffusa* under Ultrasound-Assisted Extraction Conditions. *Separation and Purification Technology*, **130**, 182-192. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.04.029>
- [5] 陈鸿英, 马雪梅. 泽兰中齐敦果酸和熊果酸的提取、分离[J]. 天津中医药, 2003, 20(5): 74-75.
- [6] Mehdinia, A., Kayyal, T.B., Jabbari, A., *et al.* (2013) Magnetic Molecularly Imprinted Nanoparticles Based on Grafting Polymerization for Selective Detection of 4-Nitrophenol in Aqueous Samples. *Journal of Chromatography A*, **1283**, 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.093>
- [7] Xiao, D.L., Dramou, P., Xiong, N.Q., *et al.* (2013) Preparation of Molecularly Imprinted Polymers on the Surface of Magnetic Carbon Nanotubes with a Pseudo Template for Rapid Simultaneous Extraction of Four Fluoroquinolones in Egg Samples. *Analyst*, **138**, 3287-3296. <https://doi.org/10.1039/c3an36755j>
- [8] Wang, X., Mu, Z.D., Liu, R., *et al.* (2013) Molecular Imprinted Photonic Crystal Hydrogels for the Rapid and Label-Free Detection of Imidacloprid. *Food Chemistry*, **141**, 3947-3953. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.024>
- [9] Schwarz, L.J., Danylec, B. and Yang, Y.Z. (2011) Enrichment of (E)-Resveratrol from Peanut by Product with Molecularly Imprinted Polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 3539-3543. <https://doi.org/10.1021/jf104230f>
- [10] Yanmamura, H.I. and Kuhar, M.J. (1985) Neurotransmitter Receptor Binding. Raven Press, New York, 485-489.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2163-1557, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: aac@hanspub.org