



冯昌寅,聂芳,田梦飞,等. 磁性分子印迹聚合物制备及其对松果菊苷的分离富集[J]. 黑龙江农业科学, 2021(8):65-68.

磁性分子印迹聚合物制备及其对松果菊苷的分离富集

冯昌寅,聂芳,田梦飞,孟宪明,李春英

(东北林业大学 化学化工与资源利用学院/森林植物生态学教育部重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:为促进磁性分子印迹聚合物的应用,本研究制备了一种磁性分子印迹聚合物用于分离富集肉苁蓉提取液中松果菊苷。使用四氧化三铁纳米粒子合成磁性 MCM-41 介孔分子筛,松果菊苷作为模板分子,4-乙烯基吡啶(4-VP)作为功能单体,偶氮二异丁腈(AIBN)作为致孔剂制备磁性 MCM-41 介孔分子筛分子印迹聚合物(Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs)。为研究该聚合物的结构形态,采用红外光谱、透射电镜进行表征分析,通过吸附动力学试验、等温吸附试验考察聚合物的吸附性能。结果表明: Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 制备成功且对松果菊苷具有较好的选择吸附性,经分离后松果菊苷的收率为 93.27%,纯度为 33.5%。

关键词:磁性分子印迹聚合物;介孔分子筛;松果菊苷;肉苁蓉

肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Y. C. Ma)是管状花目列当科(Orobanchaceae)肉苁蓉属的一种寄生植物^[1]。其干燥鳞叶肉质茎为名贵中药材,自古用药已有很长的历史,具有补肾阳、益精血、润肠通便之功效。在我国主要分布在内蒙古自治区(阿拉善盟)、宁夏(阿左旗)、甘肃(昌马)等地的荒漠地区,故被誉为“沙漠人参”^[2-3]。

松果菊苷是肉苁蓉中最重要的化学成分之一,现代药理研究表明,松果菊苷具有抗神经衰弱、预防骨质疏松、抗炎症、护肝和护心血管等药理活性^[4-6]。

分子印迹技术(MIT)是一种针对性识别特定目标分子的多功能且量身定制的新技术^[7]。分子印迹聚合物(MIP)是新型的可定制聚合材料,其价格低廉、易于制备并具有高识别性和可重复使用性^[8]。由于其对模板分子的特异性识别,MIP已作为一种吸附材料应用在药用植物活性物质分离、农药残留分析等方面^[9-11]。目前,分子印迹技术大多通过结合固相萃取的方法运用在分离药用植物活性物质上,提取液中的目标化合物首先通过与印迹聚合物表面的印迹位点结合,然后再通过溶剂洗脱从印迹聚合物上回收目标化合物。但

因为分子印迹聚合物粒径较小,其洗脱液分离也困难,且分离效率低。磁分离技术与分子印迹技术的结合,通过外部磁场可以简单、快速地把磁性分子印迹聚合物与样品溶液分离,提高了分离效率。本文制备了磁性分子印迹聚合物,并通过红外光谱、透射电镜、吸附动力学试验和等温吸附试验评估聚合物的性能,并探究了其对于肉苁蓉中松果菊苷的分离富集效果,为进一步磁性分子印迹聚合物的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Aglient 1260 型高效液相色谱仪,美国 Aglient 公司;IRAffinity-1 傅里叶变换红外光谱仪,日本岛津国际贸易(上海)有限公司;HT7800 透射电子显微镜(TEM),日本日立公司。

肉苁蓉购自哈尔滨市北棵头道街药材批发市场;松果菊苷(98%)购自上海源叶生物科技有限公司;其他试剂均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Fe_3O_4 纳米粒子的制备 采取共沉淀法制备四氧化三铁纳米粒子(Fe_3O_4),将六水合氯化铁 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.057 g)、硫酸亚铁 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.148 g)和超纯水(30 mL)置于三颈烧瓶中,待完全混匀后加入 10 mL 聚乙二醇,并放入 30 ℃ 水浴搅拌加热 5 min,氮气保护下加入 25% 氨水调节混合溶液 pH9~10。将水浴锅升温至

收稿日期:2021-05-30

基金项目:黑龙江省留学归国人员科学基金(LC2017005)。

第一作者:冯昌寅(1995—),男,在读硕士,从事药用植物学研究。E-mail:392887947@qq.com。

通信作者:李春英(1976—),女,博士,副教授,从事植物资源学研究。E-mail:ley@nefu.edu.cn。

60 ℃反应 30 min 后取出。超声 5 min,通过施加磁力分离 Fe_3O_4 纳米粒子,用超纯水和乙醇反复洗涤直至中性,最后 40 ℃真空干燥 Fe_3O_4 纳米粒子 24 h,备用。

1.2.2 磁性 MCM-41 介孔分子筛的制备 磁性 MCM-41 介孔分子筛通过水热法制备,称取 1.38 g CTAB 于烧杯中加入 75 mL 超纯水,40 ℃水浴加热至充分溶解后,加入一定量的氢氧化钠使溶液的 pH 为 10~11。然后将 1.90 g 的气相二氧化硅缓慢加入到 CTAB 溶液中,水浴加热 1 h,将 1.2 中制备的 Fe_3O_4 纳米粒子 604 mg 加入混合溶液中,室温搅拌 2 h 后移入反应釜中,在 100 ℃下进行水热反应 36 h。过滤并用超纯水和乙醇反复洗涤产物直至中性后,60 ℃干燥 24 h。马弗炉 550 ℃煅烧 5 h 除 CTAB,即得磁性 MCM-41 介孔分子筛。

1.2.3 磁性 MCM-41 介孔分子筛印迹聚合物的制备 将松果菊苷(20 mg)溶于装有 50 mL 乙腈的三颈烧瓶中,然后加入 50 mg 4-乙烯基吡啶(4-VP)和 200 mg MCM-41 磁性介孔分子筛,超声 5 min 混匀,室温静置 12 h 进行预聚合反应。在氮气保护下,向混合溶液中加入 4 mL 二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA)和 100 mg 偶氮二异丁腈(AIBN),60 ℃水浴加热 24 h。通过使用磁体收集制备的印迹聚合物(Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs),真空干燥 12 h 后进行模板洗脱。洗脱液为甲醇:乙酸(9:1,v:v)溶液,收集洗脱液进行 HPLC 检测,直至洗脱液中检测不出松果菊苷。最后用甲醇冲洗除去残留乙酸,50 ℃真空干燥,备用。作为对照试验,在不存在模板分子的情况下,也以相同的步骤制备了磁性 MCM-41 介孔分子筛非印迹聚合物(Fe_3O_4 @MCM-41-NIPs)。

1.2.4 动力学吸附试验 将 10 mg Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 分别与 10 mL 松果菊苷($0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)标准品溶液混合,室温放置于振荡培养箱中,用磁铁分离 Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs,在 90 min 内测定不同时间间隔上清液中松果菊苷的浓度直至吸附平衡,绘制动力学曲线。

平衡吸附容量 $Q(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$ 公式如下:

$$Q = \frac{(C_0 - C_e)V}{m} \quad (1)$$

式中: C_0 是松果菊苷溶液的初始浓度, $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; C_e 是松果菊苷溶液平衡浓度, $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; V 是松果菊苷溶液的体积,mL; m 是 Fe_3O_4 @MCM-41-

MIPs 的质量,g。

1.2.5 等温吸附试验 将 10 mg 的聚合物(Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 和 Fe_3O_4 @MCM-41-NIPs)分别添加到 10 mL 不同浓度的松果菊苷($0.02\sim0.20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)标准品溶液中,室温放置于振荡培养箱中,达到吸附平衡时,外部施加磁力分离聚合物,HPLC 法测定上清液中松果菊苷的浓度。平衡吸附容量 $Q(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$ 计算方式见公式(1),绘制吸附等温曲线。

1.2.6 Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 对肉苁蓉中松果菊苷的吸附 称取 2.0 g 肉苁蓉粉末于 50 mL 离心管中并以液固比 $10:1(\text{mL}\cdot\text{g}^{-1})$ 加入 50%乙醇溶液,于室温条件下超声提取 30 min,提取完成后离心,并将上清液转移到蒸馏烧瓶中进行旋蒸浓缩。HPLC 测定浓缩液中松果菊苷浓度。将 10 mg Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 加入到 10 mL 浓缩液中,室温放置于振荡培养箱中振荡 50 min。外部施加磁场分离 Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs,并用 10 mL 乙醇:乙酸(9:1,v:v)洗脱 30 min。最后,将洗脱液旋蒸至干,称重,然后重新溶于 1.0 mL 甲醇中,过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜以进行进一步的高效液相分析。

2 结果与分析

2.1 Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 制备优化

由表 1 可知,本研究测试了制备的 4 种磁性印迹聚合物对松果菊苷的吸附能力,以确定最优制备单体及溶解溶剂。最终确定致孔溶剂为乙腈,功能单体为 4-VP。

表 1 分子印迹聚合物的制备

编号	功能单体	交联剂	溶剂	吸附量/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$
1	4-VP	EGDMA	乙腈	4.18
2	甲基丙烯酸(MAA)	EGDMA	乙腈	3.56
3	4-VP	EGDMA	甲醇	3.74
4	MAA	EGDMA	甲醇	2.98

2.2 Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 的表征

2.2.1 Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 红外光谱分析

在图 1 中显示了 Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 和 Fe_3O_4 @MCM-41-NIPs 的 FTIR 光谱。 $\text{Fe}-\text{O}$ 在 570 cm^{-1} 处的强峰表明存在 Fe_3O_4 纳米粒子。在 $875, 962$ 和 $1\,159 \text{ cm}^{-1}$ 处观察到 $\text{Si}-\text{O}$, $\text{Si}-\text{OH}$ 和 $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ 的特征拉伸峰,在 $2\,982 \text{ cm}^{-1}$ 处的振动峰与 $\text{C}-\text{H}$ 的拉伸振动相对应,以上结果表明磁性 MCM-41 制备成功。 $\text{C}=\text{O}=\text{O}$ 伸缩带在 MMIPs

中的 $1\,730\text{ cm}^{-1}$ 和在 MNIPs 中的 $1\,733\text{ cm}^{-1}$ 的 EGDMA 吸附峰表明印迹聚合物层已覆盖到磁性粒子上。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-NIPs}$ 的 FT-IR 光谱几乎相同,因为从 MMIP 中移出模板后他们的化学组成相似。

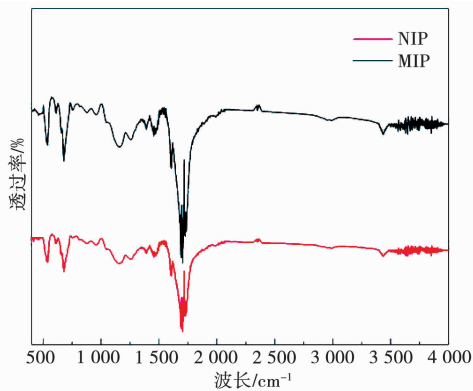


图 1 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-NIPs}$ 的红外光谱图

2.2.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 的透射电镜分析

使用 TEM 评估 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 的形态。如图 2 所示,深色的 Fe_3O_4 纳米粒子被 SiO_2 覆盖,呈现出球形和狭窄分布,合成的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 大约 400 nm 。聚合过程增加了分子印迹聚合物的活性表面积,这导致了聚合物提取能力的提高。定性结果表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 已成功合成。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIP}$ 的核-壳结构将有利于溶液与 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 表面之间的传质。

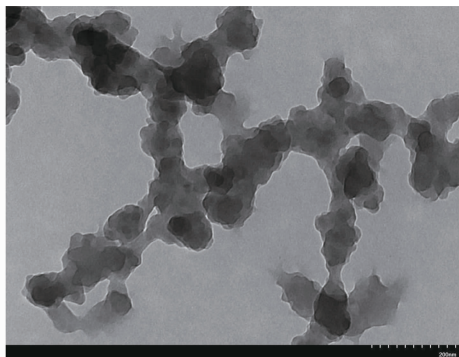


图 2 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 的透射电镜图像

2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 吸附能力

2.3.1 印迹因子 通过印迹因子进一步评估了 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-NIPs}$ 对松果菊苷的吸附特性。公式如下:

$$\alpha = Q_{\text{MIP}}/Q_{\text{NIP}} \quad (2)$$

式中: Q_{MIP} 和 Q_{NIP} 分别为 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$

和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-NIPs}$ 的吸附容量, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结果表明:松果菊苷印迹因子为 4.60,所获得的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 对松果菊苷具有良好的选择性。

2.3.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIP}$ 吸附动力学 由图 3 可知,随着吸附时间的延长, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 对松果菊苷的吸附容量迅速增加,在 50 min 时, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 表面的大部分印迹位点被松果菊苷填充,达到吸附平衡。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 对松果菊苷的最大吸附量为 $4.27\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 具有明显的快速传质特性,易使松果菊苷扩散到印迹位点上。

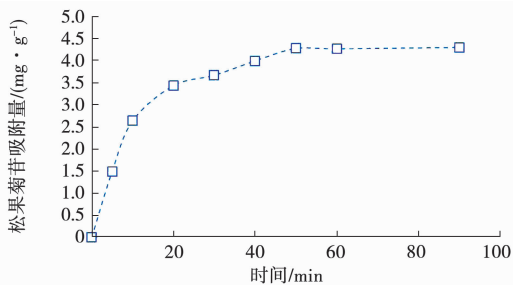


图 3 松果菊苷在 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 上的动力吸附曲线

2.3.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIP}$ 等温吸附曲线

通过改变松果菊苷的浓度对 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-NIPs}$ 的等温吸附曲线进行了研究。如图 4 所示,当浓度低于 $0.18\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 对松果菊苷的吸附容量随着溶液浓度的增加迅速增加,当初始浓度超过 $0.18\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,吸附能力达到饱和。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 对松果菊苷的平衡吸附容量为 $4.28\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-NIPs}$ 对松果菊苷的平衡吸附容量为 $0.93\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 表面上目标分子印迹位点会增加平衡吸附容量,其特殊的空间结构适用于松果菊苷,而 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-NIPs}$ 中没有特殊印迹位点,所以其吸附能力可能弱于 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 。

2.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 纯化松果菊苷

应用制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ @ MCM-41-MIPs}$ 对肉苁蓉提取液中松果菊苷进行分离富集,结果表明肉苁蓉提取液中松果菊苷的浓度为 $1.78\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,最终松果菊苷的回收率为 93.27% ,松果菊苷的纯度可达 33.5% 。

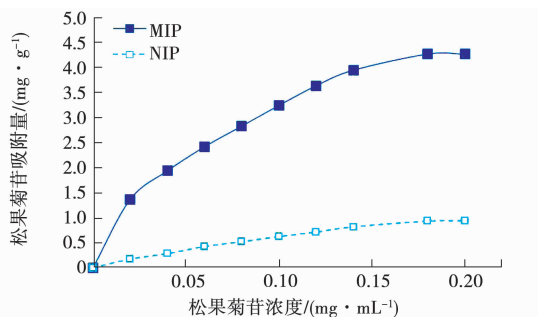


图4 松果菊苷在 Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 上的等温吸附曲线

3 结论

本研究制备了4种磁性分子印迹聚合物,考察了单体和溶解溶剂对 Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 的影响。并通过红外光谱和透射电镜验证 Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 的制备结果,且本研究制备的 Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 对松果菊苷具有较高选择吸附性。与常规的分子印迹法相比,可通过外磁场快速分离样品溶液与 Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs,省去了固相萃取的繁琐操作,并且少量的 Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 对松果菊苷也具有较高的吸附效果,磁分离技术与分子印迹技术的结合提高了分子印迹法的分离效率。 Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs 洗脱液经纯化后,松果菊苷的纯度可达33.5%。

参考文献:

[1] 钟平. 沙漠人参肉苁蓉[J]. 森林与人类, 2004(11): 25.

- [2] 中国科学院植物研究所. 中国植物志, 第六十九卷[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [3] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [4] YAMADA P, IJIMA R, HAN J, et al. Inhibitory effect of acteoside isolated from *Cistanche tubulosa* on chemical mediator release and inflammatory cytokine production by RBL-2H3 and KU812 cells [J]. *Planta Medica*, 2010, 76(14): 1512-1518.
- [5] TU P F, SONG Z H, SHI H M, et al. Arylethyl(=Phenylethanoid) glycosides and oligosaccharide from the stem of *Cistanche tubulosa* [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2006, 89(5): 927-935.
- [6] YOSHIKAWA M, MATSUDA H, MORIKAWA T, et al. Phenylethanoid oligoglycosides and acylated oligosugars with vasorelaxant activity from *Cistanche tubulosa* [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006, 14(22): 7468-7475.
- [7] 王江干, 徐伟箭. S(-)- α -苯乙胺分子印迹聚合物的制备及性能[J]. 功能高分子学报, 2007, 19-20(4): 393-398.
- [8] 贾玉香, 朱若华, 陈惠敏. 安定分子印迹聚合物的制备及应用[J]. 分析测试学报, 2012(1): 15-21.
- [9] 杨靓, 刘小姐, 郭玉双. 农药残留快速检测技术研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2012(10): 150-153.
- [10] 李硕, 常月月, 程芳芳, 等. 多模板分子印迹固相萃取及其在中药多组分提取分离中的应用[J]. 药科学报, 2021, 56(3): 751-760.
- [11] 王素素, 张月, 李辉, 等. 芦丁-槲皮素双模板印迹聚合物的制备、表征及识别 [J]. 应用化学, 2015, 32(11): 1290-1298.

Preparation of Magnetic Molecular Imprinting Polymer and Its Application in Separation and Enrichment of Echinacoside

FENG Chang-yin, NIE Fang, TIAN Meng-fei, MENG Xian-ming, LI Chun-ying

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University / Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Harbin 150040, China)

Abstract: In order to promote the application of magnetic molecular imprinting polymer, in this study, a magnetic molecularly imprinted polymer was synthesized for the separation and enrichment of echinacoside from *Cistanche deserticola* Y. C. Ma. Using Fe_3O_4 nanoparticles to synthesize magnetic MCM-41 mesoporous molecular sieve. Magnetic MCM-41 mesoporous molecular sieve molecularly imprinted polymer (Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs) was synthesized using echinacoside as a template molecule, 4-vinylpyridine (4-VP) as a functional monomer and azobisisobutyronitrile (AIBN) as a porogen. In order to study the structural morphology of the polymer, infrared spectroscopy and transmission electron microscopy were used for characterization analysis. The adsorption performance of the polymer was investigated through adsorption kinetics test and isothermal adsorption test. The results showed that the Fe_3O_4 @MCM-41-MIPs was successfully prepared and had good selective adsorption to echinacoside. The recovering yield of echinacoside was 93.27%, the purity of echinacoside was 33.5%.

Keywords: magnetic molecularly imprinted polymer; mesoporous molecular sieve; echinacoside; *Cistanche deserticola* Y. C. Ma