

# 介孔分子筛SBA-15表面印迹聚合物的制备及应用研究<sup>△</sup>

何宏亮\*, 顾小丽, 史丽英, 高艳坤, 陈立娜<sup>#</sup>(南京医科大学药学院, 南京 210029)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4827-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.25

**摘要** 目的:制备介孔分子筛SBA-15表面印迹聚合物(SBA-15@MIP),并探讨其在微量活性成分测定中的应用。方法:以黄芩素为模板分子、丙烯酰胺为功能单体、四氢呋喃/乙醇(3:2, V/V)为溶剂、乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂、偶氮二异丁腈为引发剂,在SBA-15表面进行分子印迹,合成SBA-15@MIP;通过透射电子显微镜和傅里叶红外光谱仪对其进行形态和结构表征;另将SBA-15@MIP作为固相萃取填料,结合高效液相色谱法检测血浆中的黄芩素。结果:合成的SBA-15@MIP仍保留了SBA-15的有序一维孔道结构,成功印迹黄芩素分子;血浆中黄芩素的检测限和定量下限分别为3.5、11.6 ng/ml,其平均回收率为94.4%,RSD为2.9%。结论:成功制得SBA-15@MIP,可用于复杂样品中微量活性成分的测定。

**关键词** 表面分子印迹;介孔分子筛SBA-15;黄芩素;固相萃取;高效液相色谱法

## Study on Preparation and Application of Surface Molecularly Imprinted Polymer Based on Mesoporous Molecular Sieve SBA-15

HE Hong-liang, GU Xiao-li, SHI Li-ying, GAO Yan-kun, CHEN Li-na (School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare mesoporous molecular sieve SBA-15 surface molecularly imprinted polymer (SBA-15@MIP), and analyze the application of SBA-15@MIP in the determination of active micro-component. METHODS: Using baicalin as the template molecule, acrylamide (AM) as the function monomer, tetrahydrofuran/ethanol (3:2, V/V) as the polymerization solvent, ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as the cross-linker, and 2,2-azobisisobutyronitrile (AIBN) as the initiator, SBA-15@MIP was synthesized on the surface of mesoporous molecular sieve SBA-15. The surface morphology and structure of the obtained polymer were characterized by TEM and FT-IR. Finally, the imprinted polymer was used as an adsorbent for solid-phase extraction (SPE) to detect baicalin in plasma samples by HPLC. RESULTS: It revealed that the well-ordered one-dimensional pore structure of SBA-15 was still preserved in the successfully synthesized SBA-15@MIP, and baicalin molecule was imprinted successfully. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for baicalin in plasma were 3.5 ng/ml and 11.6 ng/ml, respectively; the average recovery was 94.4% (RSD=2.9%). CONCLUSIONS: SBA-15@MIP is prepared successfully, and can be applied for the determination of active micro-component.

**KEYWORDS** Surface molecular imprinting; Mesoporous molecular sieve SBA-15; Baicalin; Solid-phase extraction; HPLC

出院带药医嘱按照患者分包调配。运行半年的经验表明,我院自动化和信息化住院药房的建立不仅提高了住院药房药品调剂的效率,提高了药品调配的准确性,且将药师从繁重的调配工作中解放出来,使其更加关注药品的管理和临床使用,提高了住院药房的药学服务水平。

### 参考文献

- [1] 沈爱宗,胡世莲,许戈良,等.我院基于整体设计的自动化药房建设[J].中国药房,2014,25(13):1 183.
- [2] 顾继红,缪丽燕.自动化药房系统在门诊药房的应用[J].医药导报,2013,32(2):273.

- [3] 马琳,沈敏德,魏晓琴,等.订单分析方法在自动化药房建设中的应用[J].中国药房,2012,23(1):41.
- [4] 刘许媛,陈维红,张智灵.自动化药房对药品调剂工作的影响[J].中国医药指南,2013,11(3):31.
- [5] 赵雪峰,负超,刘相权,等.自动化药房系统调度的优化[J].计算机工程,2009,35(10):193.
- [6] 李成群,王伟,负超,等.自动化药房的现状和新进展[J].机器人技术与应用,2007(5):27.

(收稿日期:2015-02-11 修回日期:2015-05-05)

(编辑:刘萍)

## 本栏目协办

南京伊登生物医学科技有限公司

地址:江苏省南京市玄武区龙蟠中路29号珠江路都市经济园312室  
邮编:210018

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30801558; 81373895;81173538)

\* 硕士研究生。研究方向:药物分析。E-mail: 570774317@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:天然药物及中药活性成分。电话:025-86868478。E-mail: chenlina@njmu.edu.cn

分子印迹聚合物(Molecular imprinted polymers, MIPs)是利用分子印迹技术制备的具有与模板分子在空间结构和结合位点上完全匹配的高分子聚合物。其对模板分子具有特异识别性,并且具有抗恶劣环境能力强、稳定性好、使用寿命长等优点,使得分子印迹技术在色谱分离、生物传感器、催化合成等诸多领域都得到应用,尤其在中药成分分离检测中的应用令人瞩目<sup>[1-3]</sup>。

黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 的干燥根,具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎等功效,是我国常用的中药材之一<sup>[4-6]</sup>。自20世纪30年代以来,人们对黄芩单味药及其复方的化学成分、药理作用进行了大量的研究工作,在血浆、尿及粪便中的代谢成分研究也已有报道<sup>[7-10]</sup>,大多采用气相色谱-质谱(GC-MS)、液相色谱-质谱(LC-MS)、高效毛细管电泳-质谱(HPCE-MS)等方法,但是这些方法在测定中往往忽略了微量的代谢产物。

MIPs既能够对黄芩给药血浆中黄酮类化合物进行富集,又可对不同结构的代谢产物进行分离纯化,实现对微量成分的高效分离和检测,从而有望发现黄芩体内代谢生物样品中一些高活性的微量代谢产物。虽然MIPs在中药活性成分分离中具有良好的应用前景,但普通的MIPs在应用时仍然存在亲和力不够和吸附量小的问题<sup>[11-12]</sup>;同时,印迹结合点处于材料的内部,降低了聚合物的吸附量。因此,本研究采用介孔分子筛表面印迹法制备了具有高选择性和吸附性的黄芩素介孔分子筛SBA-15表面印迹聚合物(SBA-15@MIP),并探讨其在微量活性成分测定中的应用。

## 1 材料

### 1.1 仪器

UV-2450紫外分光光度计、LC-20AT高效液相色谱仪(日本岛津公司); TENSOR27傅里叶红外光谱仪(德国Bruker公司); TG16-WS离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); JEM-2100透射电子显微镜(简称透射电镜,日本JEOL公司)。

### 1.2 药品与试剂

黄芩药材购于上海虹桥中药饮片有限公司,经鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 的干燥根;黄芩素(批号:111595-200905,纯度:98%)、黄芩苷(批号:110715-200212,纯度:98%)购自中国食品药品检定研究院;聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯(PEO-PPO-PEO)三嵌段共聚物(P123,德国Sigma公司);3-(异丁烯酰氧)丙基三甲基硅烷(MPS,美国Aladdin Chemistry公司,分析纯);丙烯酰胺(AM,化学纯)、正硅酸四乙酯(TEOS,分析纯)均由国药集团化学试剂有限公司提供;乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA,美国Sigma-Alorich公司,分析纯);偶氮二异丁腈(AIBN,上海试四赫维化工有限公司,化学纯);其余试剂为分析纯,试验用水为超纯水。

### 1.3 动物

SPF级SD大鼠,♂,体质量为372~500 g,由南京医科大学实验动物中心提供,实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2015-0015。

## 2 方法

### 2.1 SBA-15的制备与结构修饰

2.1.1 SBA-15的制备 将P123 2 g加入到60 g 2 mol/L的盐酸和15 g超纯水中,在40℃下搅拌溶解,600 r/min持续搅拌4 h后,缓慢加入TEOS 4.25 g,40℃下900 r/min持续搅拌24 h,

于100℃放入高压釜中静置24 h,滤过。将得到的白色粉末于室温自然晾干,于550℃煅烧5 h,得白色粉末状产物,即为SBA-15。

2.1.2 介孔分子筛SBA-15的硅烷化 称取SBA-15 0.5 g加入甲苯25 ml,超声处理(150 W、40 kHz)20 min后,补加甲苯25 ml、MPS 10 ml,氮气密闭环境中于55℃下500 r/min搅拌24 h,14 700×g离心10 min,用甲苯洗涤3次,甲醇洗涤3次,最后40℃真空干燥至恒质量,得SBA-15的硅烷化产物(SBA-15-MPS)。

### 2.2 SBA-15@MIP的制备

将黄芩素0.08 g和AM 0.11 g加入到四氢呋喃-乙醇(3:2, V/V,下同)25 ml中,充分摇匀,放置4 h,制得预组装溶液。将SBA-15-MPS 0.1 g、EGDMA 1.13 ml和AIBN 0.07 g超声分散于四氢呋喃-乙醇25 ml中,然后加入到上述制得的预组装溶液中,通氮气除氧,以转速200 r/min在60℃聚合24 h。反应结束后离心除去上清液,沉淀物用甲醇-冰醋酸(9:1, V/V,下同)的混合溶液反复超声洗涤,至上清液经紫外检测不出黄芩素为止。沉淀物40℃真空干燥至恒质量,得到黄芩素SBA-15@MIP。另制备空白分子印迹聚合物(SBA-15@NIP),制备方法与制备SBA-15@MIP相同,只是在聚合时未加入模板分子。

### 2.3 表征

2.3.1 透射电镜表征 使用JEM-2100透射电镜观察SBA-15和SBA-15@MIP的形态结构。

2.3.2 红外表征 使用红外光谱仪分别对SBA-15、MPS、SBA-15-MPS、黄芩素、SBA-15@NIP和脱模板前的SBA-15@MIP进行红外扫描,红外扫描的光谱范围为500~4 000 cm<sup>-1</sup>。

### 2.4 分子印迹-固相萃取

2.4.1 黄芩素血浆样品溶液的制备 取粉碎后过三号筛的黄芩药材约50 g于500 ml茄形瓶中,加入70%乙醇400 ml,于80℃条件下在水浴锅上加热回流3 h,放冷,重复提取3次,合并提取液,滤过,将滤液浓缩至10 ml,用生理盐水稀释到50 ml,作为样品溶液。

在给药之前,将12只大鼠禁食12 h。将样品溶液以9 g/kg的量ig给药,30 min后眼眶取血,3 675×g离心10 min,取上清液,用4倍体积的乙酸乙酯萃取3次,14 700×g离心15 min,合并3次萃取液,水浴蒸干溶剂,用甲苯重新溶解,得到黄芩素血浆样品溶液。

2.4.2 分离纯化血浆样品溶液中黄芩素 将SBA-15@MIP、SBA-15@NIP和SBA-15 500 mg聚合物分别装入固相萃取(SPE)柱,用甲苯10 ml平衡柱子,分别取黄芩素血浆样品溶液10 ml,慢慢通过提取柱,然后用甲苯10 ml淋洗柱子,消除非选择性吸附,继用10 ml甲醇-冰醋酸溶液洗脱目标物。收集淋洗液、洗脱液,水浴蒸干,残渣加甲醇2 ml溶解并定容,作为供试品溶液,用于定量分析。

2.4.3 色谱条件与方法学考察 色谱柱为Shimadzu Shim-pack C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测器为SPD-M20A;流动相为甲醇-2%磷酸水(60:40, V/V),流速为1.0 ml/min;柱温为35℃;进样量为20 μl。在色谱条件下,考察线性范围、检测限、定量限和精密度。

## 3 结果

### 3.1 SBA-15的制备与结构修饰

3.1.1 SBA-15的制备 合成的SBA-15孔道排列规则,孔径大

小均一,其透射电镜图见图1。

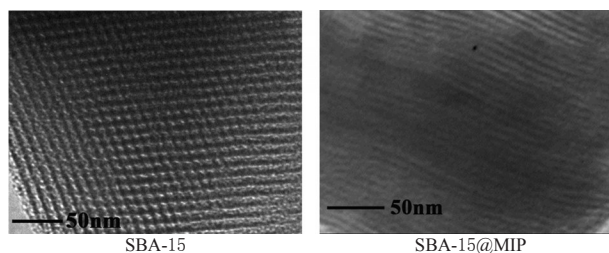


图1 透射电镜图

Fig 1 TEM images

3.1.2 SBA-15 的结构 MPS 的结构图见图 2, SBA-15、SBA-15-MPS、MPS 的红外图谱见图 3。

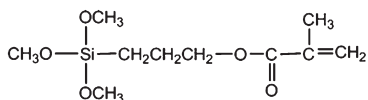


图2 MPS 的结构图

Fig 2 The structure of MPS

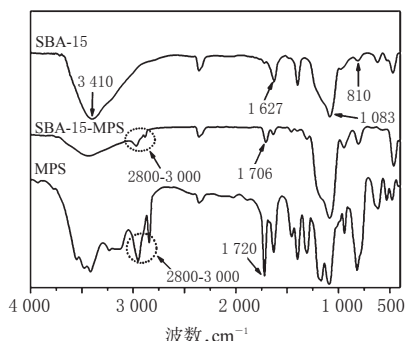


图3 SBA-15、SBA-15-MPS、MPS 的红外图谱

Fig 3 IR spectra of SBA-15, SBA-15-MPS and MPS

由图3可见,3 410  $\text{cm}^{-1}$ 和1 627  $\text{cm}^{-1}$ 为SBA-15表面硅羟基的伸缩和弯曲振动,1 083  $\text{cm}^{-1}$ 和810  $\text{cm}^{-1}$ 属于Si—O—Si的伸缩振动,这些表明了SBA-15骨架的形成。经过修饰之后,相比较于SBA-15,SBA-15-MPS明显表现出MPS的红外特征峰,如1 706  $\text{cm}^{-1}$ 处的C=O峰,2 800~3 000  $\text{cm}^{-1}$ 处的C—H、—CH<sub>2</sub>或—CH<sub>3</sub>的伸缩振动,这说明MPS已成功键合到SBA-15的表面。

### 3.2 SBA-15@MIP 的结构分析

3.2.1 SBA-15@MIP 的透射电镜表征 黄芩素SBA-15@MIP中,表面修饰过的SBA-15仍然保持完好的介孔结构,同时表面附有一层印迹层。SBA-15@MIP的透射电镜图见图1。

3.2.2 SBA-15@MIP 的红外表征 黄芩素、SBA-15@NIP、脱模板前SBA-15@MIP的红外图谱见图4。

由图4可知,相比较SBA-15@NIP的红外图谱,脱模板前的SBA-15@MIP中明显出现了黄芩素的红外特征峰,如3 380  $\text{cm}^{-1}$ 处的酚羟基峰和1 618  $\text{cm}^{-1}$ 处的苯环骨架振动,同时酚羟基峰向低波数移动,也证明了氢键的存在。这说明合成黄芩素SBA-15@MIP分子成功。

### 3.3 分子印迹-SPE

3.3.1 方法学考察 黄芩素检测质量浓度的线性范围为

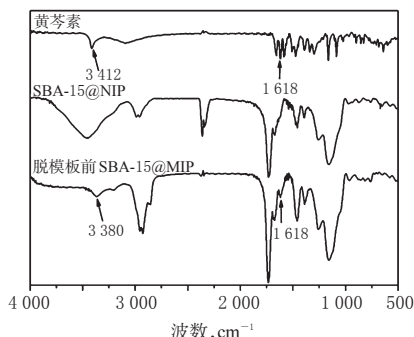


图4 黄芩素、SBA-15@NIP、脱模板前SBA-15@MIP的红外图谱

Fig 4 IR spectra of baicalein, SBA-15@NIP and SBA-15@MIP before eluting templates

0.02~7.99  $\mu\text{g/ml}$ ,质量浓度( $c$ )对峰面积( $A$ )的回归方程为 $A = 1\ 695.522\ 44 + 35\ 847.845\ 47c$ ( $r = 0.999\ 9$ );检测限和定量下限分别为3.5、11.6  $\text{ng/ml}$ ;精密度RSD为3.6%( $n = 5$ )。

3.3.2 样品分析 结果表明,经过SBA-15@MIP-SPE(MISPE)处理后,大部分干扰物被去除,目标物黄芩素色谱峰面积明显增大,并且达到了定量要求,表明富含印迹空穴和识别位点的SBA-15@MIP对目标化合物具有明显的选择性吸附作用。黄芩素血浆样品经过SBA-15@NIP-SPE(NISPE)和SBA-15-SPE处理后,由于二者对黄芩素没有特异的选择性吸附,因此达不到富集的目的。利用液质联用对样品进行定性分析发现,经过MISPE处理后,黄芩素的回收率高达94.4%(RSD=2.9%, $n = 6$ ),而经过NISPE、SBA-15-SPE处理后的回收率较低,分别为22.7%(RSD=2.6%, $n = 6$ )和10.7%(RSD=3.6%, $n = 6$ )。这主要是由于在SBA-15@NIP中,功能基团的分布是随机的,聚合过程中也没有形成与黄芩素的形状和大小相匹配的孔穴,而SBA-15的作用主要是物理吸附,因此SBA-15@NIP和SBA-15对模板分子吸附量均较低,且未显示出特异的选择性。不同SPE柱处理后血浆样品中黄芩素的测定结果见表1。

表1 不同SPE柱处理后血浆样品中黄芩素的测定结果( $n = 3$ )

Tab 1 Determination result of baicalein in plasma samples after treated with different SPE column( $n = 3$ )

SPE柱	上样, $\mu\text{g}$	淋洗, $\mu\text{g}$	洗脱, $\mu\text{g}$	平均回收率, %	RSD, %
MISPE	3.74	0.06	3.53	94.4	2.9
NISPE	3.74	2.60	0.85	22.7	2.6
SBA-15-SPE	3.74	2.91	0.40	10.7	3.6

## 4 讨论

为了提高普通MIPs的亲合力,部分学者试图制备无机-有机杂化的硅胶表面分子印迹聚合物,其中,SBA-15作为无机支撑材料引起了巨大的关注。首先,SBA-15具有均一的孔道直径分布、高比表面积、较大的孔径和孔容以及较厚的孔壁<sup>[13-15]</sup>,这些有利于目标分子扩散到SBA-15@MIP中,从而发生特异性吸附。其次,SBA-15的六边形多孔结构为模板分子与SBA-15@MIP的特异性结合提供了良好的环境。再次,SBA-15表面可以耦合多种的硅烷化试剂,从而可以在无机物的结构中得到许多预期的官能团。最后,介孔二氧化硅材料具有良好的热稳定性、生物相容性和机械强度,并且在可见光

区具有光学透明性。因此,SBA-15表面印迹聚合物的设计、合成以及应用具有重要的意义。

为了在SBA-15表面引入有机物,接枝分子印迹聚合物,首先在其表面键合含有末端双键的MPS硅烷化试剂,并以其为桥梁,通过自由基引发反应,使交联剂、模板分子-功能单体复合物发生聚合,将分子印迹聚合物接枝到SBA-15表面。如图2所示,在MPS的末端存在O=C—C=C的共轭体系。由于羰基的吸电子作用,羰基上O的电子云密度会升高,而末端C=C上的电子云密度会降低,进而使得末端C=C表现出亲电子性,而发生在溶液中的自由基聚合反应是一个亲核性反应,这就使得自由基聚合反应更容易在SBA-15表面进行,从而有利于将分子印迹聚合物的接枝到其表面。

黄芩中黄酮类化合物成分复杂,且其代谢物含量低,基质干扰组分多,因此对黄芩代谢物中有效成分的分选富集,需要一种高灵敏和高效的方法。采用分子印迹功能化技术将黄芩素分子引入到介孔分子筛SBA-15体系中,制备无机-有机杂化的SBA-15@MIP,大大提高了的机械强度和耐用性,可更好地应用于色谱分析和分离;并且介孔分子筛比表面积大,大大地提高了有效的识别位点。同时,新型MIPs的识别位点建立在聚合物微球表面,减少了印迹位点被“包埋”的现象,印迹分子能很快靠近识别位点,其结合速率和分离效率较高。因此,合成的MIPs将对黄芩素具有高度的亲和力和选择性,有望成功富集检测黄芩素的体内代谢物。

本试验以SBA-15为基质、黄芩素为模板分子、AM为功能单体、EGDMA为交联剂、四氢呋喃-乙醇为溶剂,在AIBN的引发下进行热聚合,合成了识别位点建立在聚合物微球表面的新型SBA-15@MIP。将该聚合物应用于SPE,结合高效液相色谱法,建立了测定血浆中黄芩素的定性定量方法。结果表明,本方法能够有效地消除血浆中基质的干扰,具有较低的检测限和较高的回收率,为复杂样品中微量活性成分的测定提供了一种有效的分析手段。

## 参考文献

[1] 张慧,何华,李洁,等.分子印迹水相分离技术及其在分析化学中的应用[J].化学进展,2011,23(10):2140.

[2] Pan J, Xue XH, Wang JH, *et al.* Recognition property and preparation of *Staphylococcus aureus* protein A-imprinted polyacrylamide polymers by inverse-phase suspension and bulk polymerization[J]. *Polymer*, 2009, 50(11): 2365.

[3] 靳亚峰,刘坤峰,张裕平.邻苯二甲酸二正辛酯分子印迹聚合物微球的制备及表征[J].河南科技学院学报:自然科学版,2012,40(6):48.

[4] Yoon SB, Lee YJ, Park SK, *et al.* Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages[J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 125(2):286.

[5] Wang CZ, Li XL, Wang QF, *et al.* Selective fraction of *Scutellaria baicalensis* and its chemopreventive effects on MCF-7 human breast cancer cells[J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(1):63.

[6] 康杰芳,任婷婷.中药黄芩的研究进展[J].陕西农业科学, 2009, 55(4):128.

[7] Feng J, Xu W, Tao X, *et al.* Simultaneous determination of baicalin, baicalein, wogonin, berberine, palmatine and jatrorrhizine in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and application in pharmacokinetic studies after oral administration of traditional Chinese medicinal preparations containing *scutellaria-coptis* herb couple[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(3):591.

[8] Zeng MF, Pan LM, Zhu HX, *et al.* Comparative pharmacokinetics of baicalin in plasma after oral administration of Huang-Lian-Jie-Du-Tang or pure baicalin in MCAO and sham-operated rats[J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(6):490.

[9] 王方.黄芩素对人肝癌HepG2细胞生长的抑制作用[J].中国药房,2014,25(47):4430.

[10] 周锡钦,梁鸿,路新华,等.中药黄芩主要黄酮类成分及其生物活性研究[J].北京大学学报:医学版,2009,41(5):578.

[11] Cheng W, Liu Z, Wang Y. Preparation and application of surface molecularly imprinted silica gel for selective extraction of melamine from milk samples[J]. *Talanta*, 2013, doi:10.1016/j.talanta.2013.05.067.

[12] Jia XJ, Li H, Luo J, *et al.* Rational design of core-shell molecularly imprinted polymer based on computational simulation and doehlert experimental optimization: application to the separation of tanshinone II A from *Salvia miltiorrhiza* Bunge[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403(9): 2691.

[13] Wang YQ, Yang YY, Xu L, *et al.* Bisphenol a sensing based on surface molecularly imprinted, ordered mesoporous silica[J]. *Electrochim Acta*, 2011, 56(5):2105.

[14] Takahashi S, Ikkai Y, Sakamoto K, *et al.* Preparation of rectangular and 2d-hexagonal mesostructured silica at neutral conditions using poly(oxyethylene) cholesteryl ethers and a water-soluble silica precursor[J]. *J Colloid Interf Sci*, 2009, 335(1):70.

[15] Mehdinia A, Ahmadifar M, Aziz-Zanjani MO, *et al.* Selective adsorption of 2,4-dinitrophenol on molecularly imprinted nanocomposites of mesoporous silica SBA-15/polyaniline[J]. *Analyst*, 2012, 137(18):4368.

(收稿日期:2015-04-10 修回日期:2015-07-17)

(编辑:邹丽娟)