

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

唐宗贵,王 静,陈 霞,王国红,卢春霞*

(新疆农垦科学院分析测试中心/农业部食品质量监督检验测试中心(石河子),石河子 832000)

摘要:以齐墩果酸(OA)为模板分子,三氟甲基丙烯酸(TFMAA)、 α -甲基丙烯酸(MAA)、丙烯酰胺(AM)、4-乙烯基吡啶(4-VP)为功能单体,三氯甲烷、四氢呋喃、乙醇、甲醇和丙酮为溶剂,基于量子化学密度泛函理论(DFT)和 ONIOM 方法,采用 Gaussian09 软件模拟计算了模板分子与不同功能单体的印迹聚合物预组装体系的构型,探讨了模板分子与功能单体在不同印迹比例时所形成复合物的成键情况以及反应过程中的结合能,并采用自洽反应场极化连续模型(CPCM)计算了功能单体与模板分子在不同溶剂中的溶剂化能。结果表明,TFMAA 与模板分子 OA 以 1:1 摩尔比形成复合物的结合能 ΔE 最高($-70.99 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$),结构最稳定,模板分子和功能单体在三氯甲烷中的溶剂化能最小。同时,采用实验方法验证模拟结果,并利用扫描电镜、傅里叶红外光谱仪和静态吸附实验对印迹聚合物的形貌、化学基团和吸附性能等进行表征。结果表明,模拟结果与实验结果完全一致,计算机模拟对分子印迹体系的筛选和机理研究提供了理论依据。

关键词:分子模拟;齐墩果酸;分子印迹聚合物

引言

齐墩果酸(Oleanolic acid, OA)是一种五环三萜类化合物,以游离或结合形式存在于多种植物中。研究表明,OA 具有保肝、降血脂、诱导肿瘤细胞凋亡、抗氧化、抗炎、降血糖等多种药理活性^[1]。因此,OA 被广泛用于保健食品和药品中。由于 OA 结构复杂,难以用合成法获得,所以从植物中提取是制备 OA 的常用方法。如何从复杂的植物组织中简便、高效地提取 OA 具有重要的意义。

分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)是通过分子印迹技术制备的对特定目标分子具有选择性识别的聚合物材料。因其对目标分子具有特异性的识别能力和良好的物理化学性质,可作为固相吸附材料选择性地分离富集复杂基质中的目标成分,因此,在天然产物活性成分分离纯化领域得到广泛关注及应用^[2, 3]。

目前,已有利用印迹聚合物分离富集 OA 的研究报道^[4~6]。但是,以上文献在 MIPs 制备过程中均采用传统的实验方法优化合成条件,实验针对性和预见性差,制备效率低,对分子识别机理的研究也不够深入。近年来,随着计算机技术与量子化学理论的快速发展,计算机模拟技术被广泛应用到 MIPs 的理论设计与研究中。通过计算机模拟取代部分常规的实验,大大减少了试剂和人工消耗,对于提高 MIPs 的研发效率,以及 MIPs 的亲和性和选择性均具有指导作用^[7, 8]。在 OA 分子印迹聚合物制备过程中,李敏婷利用 Hyperchem 7.5 软件优化并计算了 OA 与 MAA、AM 的分子最低能量构型和结合能,但模板与功能单体的摩尔比以及溶剂的选择没有涉及。

本文研究以齐墩果酸(OA)为模板分子,分别以三氟甲基丙烯酸(TFMAA)、 α -甲基丙烯酸(MAA)、丙烯酰胺(AM)、4-乙烯基吡啶(4-VP)为功能单体,三氯甲烷、四氢呋喃、甲醇、乙醇和丙酮为溶剂,运用量子化学方法模拟模板分子与不同功能单体的分子印迹聚合物预组装体系的构型、能量及复合反应的结合能 ΔE ,以及单体与模板分子在不同溶剂中的溶剂化能,以此作为筛选功能单体和溶剂理论依据。同时

10.14028/j.cnki.1003-3726.2017.06.007

收稿:2016-06-14;修回:2017-02-24;

基金项目:国家自然科学基金项目(31260412),新疆生产建设兵团博士基金项目(2014BB007);

作者简介:唐宗贵(1981—),男,实验师,学士,主要从事食品质量安全研究。E-mail:zongguitang@163.com;

* 通讯联系人:卢春霞(1978—),女,副研究员,博士,主要从事食品营养与安全研究。E-mail:shzlcx2002@163.com.

根据理论计算结果制备 OA 印迹聚合物,利用扫描电镜、红外光谱和吸附实验表征聚合物的形貌和吸附性能,探讨理论计算和实验结果的相符性。

1 实验部分

1.1 仪器设备

S-4800 扫描电子显微镜(日本 Hitachi 公司);Spectrum Two 傅里叶红外光谱仪(美国 PerkinElmer 公司);2695 型液相色谱仪(美国 Waters 公司),Waters 2498 紫外检测器,Waters C18 柱色谱柱(5 μ m, 3.9mm $\times$ 150mm);KQ-500DB 超声波清洗器(昆山市超声仪器公司);N-EVAP112 氮吹仪(美国 Organomation 公司);SHZ-82A 水浴恒温振荡器(金坛市医疗仪器厂);BSA224S-CW 天平(德国 Sartorius 公司);ZK-82B 真空干燥箱(上海市实验仪器厂);MS3 basic 涡旋混合器(德国 IKA 公司)。

1.2 试剂与耗材

OA、熊果酸(UA)、大黄酸(纯度 $\geq 98\%$,北京世纪奥科生物技术有限公司);TFMAA、MAA、4-VP、DVB(纯度 $\geq 80\%$),二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA)、偶氮二异丁腈(AIBN)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);色谱纯甲醇、三氯甲烷(德国 Merck 公司);其余试剂为分析纯。DVB 使用前用 5%的氢氧化钠溶液洗涤以除去阻聚剂。

1.3 实验方法

1.3.1 分子模拟 构型优化和量子化学计算是通过 Gaussian 09 软件执行^[9]。

1.3.1.1 模板与功能单体结构优化 模板分子和功能单体分子的气相几何构型优化均使用密度泛函方法 b3lyp^[10],在 6~31G(d)^[11]级别下进行。为确定每个优化的结构是极小点,对计算的分子结构进行频率分析,所有分子均无虚频。在同一水平下,计算了分子的自然键轨道(NBO)电荷分布,用于分析模板和功能单体的可能结合位点。

1.3.1.2 模板与功能单体相互作用能计算 由于模板与功能单体相互作用后的体系较大,且模板分子中只有少部分基团与功能单体有相互作用,故本文采用 ONIOM (Our own N-layered integrated MO and MM)方法^[12]优化模板与各功能单体相互作用,并计算结合能 ΔE ,以此表征模板和不同功能单体间的相互作用强弱。计算模型分为两层:第一层为模板的羧基、羟基部分和功能单体组成的相互作用关键区域,采用密度泛函 b3lyp 方法在 6-311++g(d, p)基组水平计算;第二层为模板其余部分,采用半经验方法 PM3 来处理。结合能 ΔE 的计算如式(1)所示:

$$\Delta E = E_{\text{complex}} - E_{\text{template}} - nE_{\text{monomer}} \quad (1)$$

式中, E_{complex} 为复合物能量, E_{template} 为模板能量, E_{monomer} 为功能单体能量。

1.3.1.3 溶剂化能的计算 使用自洽反应场极化连续模型(CPCM)^[13]对模板与功能单体分子的几何结构进行优化,以此计算这些分子在四氢呋喃、三氯甲烷、乙醇、甲醇和丙酮等溶剂中的溶剂化能。所有计算在 b3lyp/6-31g* 水平下进行,分子的初始构型采用气相优化后的稳定构型。溶剂化能($E_{\text{solvation}}$)计算公式如下:

$$\Delta E_{\text{solvation}} = E_{\text{gas}} - E_{\text{solvent}} \quad (2)$$

式中, E_{gas} 为分子在气相中的能量, E_{solvent} 为分子在溶剂中的能量。

1.3.2 OA-MIPs 的制备 称取 0.1mmol 和 0.3mmol 的 TFMAA 溶于 3.3mL 三氯甲烷中,混合溶液预混合 4h 后,加入 1.5mmol 的交联剂($m(\text{DVB})/m(\text{EGDMA})=4:1$)和 5.2mg 的 AIBN(相对于单体总量 2%(wt)),通氮气 5min 除氧,密封后置于恒温水浴箱,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下,200r/min,聚合 24h。将产物干燥,研磨过筛,以甲醇/乙酸(V/V, 8:2)为提取剂,索式抽提 24h,最后甲醇洗涤除去残留的乙酸,50 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥。非印迹聚合物(NIPs)的制备不加模板分子。

1.3.3 OA-MIPs 表征 将干燥的聚合物粘在双面胶上,真空中用离子溅射器对微球喷金钼,然后用 S-

4800 扫描电子显微镜观测微球的形貌。

采用 KBr 压片法,用 Spectrum Two 傅里叶红外光谱仪对印迹聚合物进行傅里叶红外光谱分析,红外光谱的扫描范围为 $400\text{cm}^{-1}\sim 4000\text{cm}^{-1}$ 。

采用静态吸附法测定印迹聚合物的吸附性能。分别取 200mgMIPs 和 NIPs 加入玻璃瓶中,再分别加入 5mL 不同浓度($0.1\sim 0.8\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 OA 溶液,于转速为 150r/min 的恒温气浴摇床中 25°C 振荡 12h,8000r/min 离心 10min,吸取上清液用 HPLC 测定 OA 浓度,根据吸附前后溶液中 OA 的浓度变化,计算 MIPs 对 OA 的吸附量 Q_e 和印迹因子 IF 。计算公式如下:

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

(3)

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

(4)

$$K_d = \frac{Q_e}{C_e}$$

(5)

式中 Q_e 为平衡吸附量($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$); C_0 和 C_e 为吸附前后溶液中 OA 浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); 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($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)。

吸附动力学实验如下,取定量(200mg)MIPs 或 NIPs,悬浮于 5mL 含有 OA($1.0\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的溶液中,放置振荡器中,间隔不同时间取样用 HPLC 检测 OA 含量。

选择性吸附实验如下,取定量(200mg)MIPs 或 NIPs,悬浮于 5mL 含有 OA、UA 和大黄素(各 $1.0\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的混合溶液中,于恒温气浴摇床中 25°C 振荡 12h 后,检测 OA、UA 和大黄素的含量。

2 结果与讨论

2.1 分子模拟

2.1.1 模板与功能单体构型优化及电荷分布 本研究使用密度泛函方法分别对模板分子齐墩果酸(OA)和功能单体 TFMAA、MAA、AM、4-VP 的气相几何构型进行优化。五个分子的优化结构如图 1 所示。

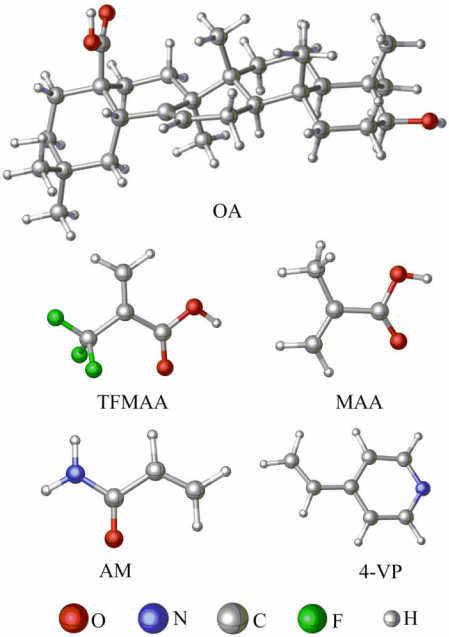


图 1 模板(OA)与功能单体分子(TFMAA, MAA, AM, 4-VP)的优化构型图
Figure 1 The optimized conformations of OA, TFMAA, MAA, AM and 4-VP

图 2 为模板 OA 及功能单体 TFMAA、MAA、AM、4-VP 的分子结构及其 NBO 电荷分布图。由图 2 可知,OA 中含有一个羧基和一个羟基,两个基团中的两个 H 原子可以作为质子给体,其电荷分别为 0.50 和 0.47,电正性越强的 H 原子越容易与功能单体中的电负性原子形成氢键。此外,两个基团所含三个 O 原子可作为质子受体,其电荷密度分别为-0.71、-0.61 和-0.76,电负性越强的原子越容易与功能单体中的 H 原子形成氢键。功能单体 TFMAA、MAA 均含有一个羧基,MAA 羧基 H 电荷为 0.50,羧基上两个 O 原子的电荷分别为-0.60 和-0.71。单体 TFMAA 羧基上两个 O 原子的电荷分别为-0.57 和-0.71,相比 MAA,TFMAA 含有一个电负性较强的三氟甲基,具有强烈的吸电子效应,因此羧基 H 电荷数更大(0.51)^[14]。单体 AM 氧原子电荷为-0.62,氨基上两个 H 电荷分别为 0.41 和 0.42,与 MAA 和 TFMAA 两个单体相比,酸性最弱。以上结果表明,MAA、TFMAA 和 AM 三种功能单体既可作为氢键供体又可作为氢键受体与模板分子形成氢键,但也可以通过自身分子间作用形成氢键。4-VP 分子吡啶环上的 N 原子电荷数为-0.45,可作为质子受体与模板结合形成氢键。模板-单体复合物之间作用力的强弱除与功能基团的电荷分布有关外,还与化合物的空间结构及功能基团所处的空间位阻的大小有关,空间位阻大的功能基团,即使电荷密度再大,也会受空间位阻的影响而难以形成氢键等作用力^[14]。

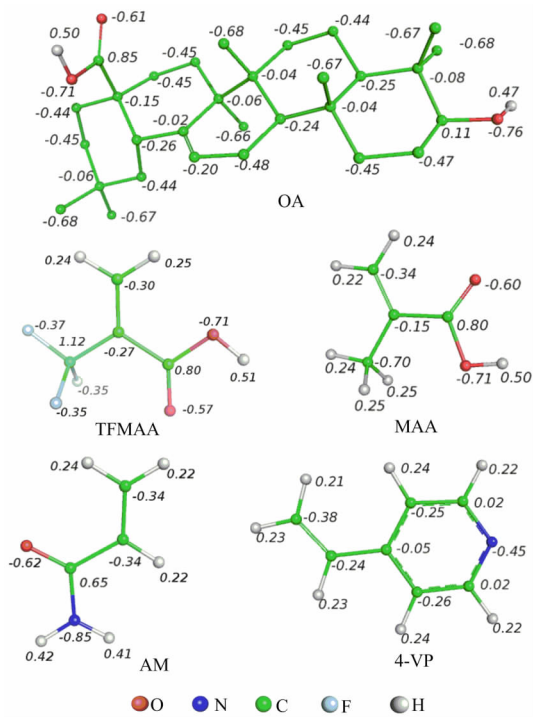


图 2 模板与功能单体分子的 NBO 电荷分布

Figure 2 NBO charges of OA, TFMAA, MAA, AM and 4-VP.

2.1.2 模板分子与功能单体复合物构型优化及结合能 利用 ONIOM 方法模拟 OA 与各功能单体以 1:1 摩尔比形成的复合物构型及成键情况,结合能为负值的几种可能的复合物构型如图 3 所示。从复合物构型优化结果可以看出,模板分子与单体 MAA 形成氢键的作用位点较多,有四种氢键作用模式,从而生成四种复合物,其中 MAA 羧基与 OA 羧基形成 OA/MAA-1 复合物有 2 个氢键作用位点,形成的氢键作用力最强。单体 TFMAA 和 AM 与模板分子均有两种氢键作用模式,分别形成两种复合物。4-VP 吡啶环上的 N 可以与 OA 上的羧基和羟基上的 H 原子发生作用,形成两种氢键复合物,其中复合物 OA/VP-1 是 4-VP 吡啶 N 原子与 OA 羧基 H 原子形成氢键,该构型是 4-VP 与 OA 最可能的结合方式。

表 1 为模拟得到的模板分子、功能单体和二者形成复合物的能量 E 以及结合能 ΔE 。由表 1 可以看

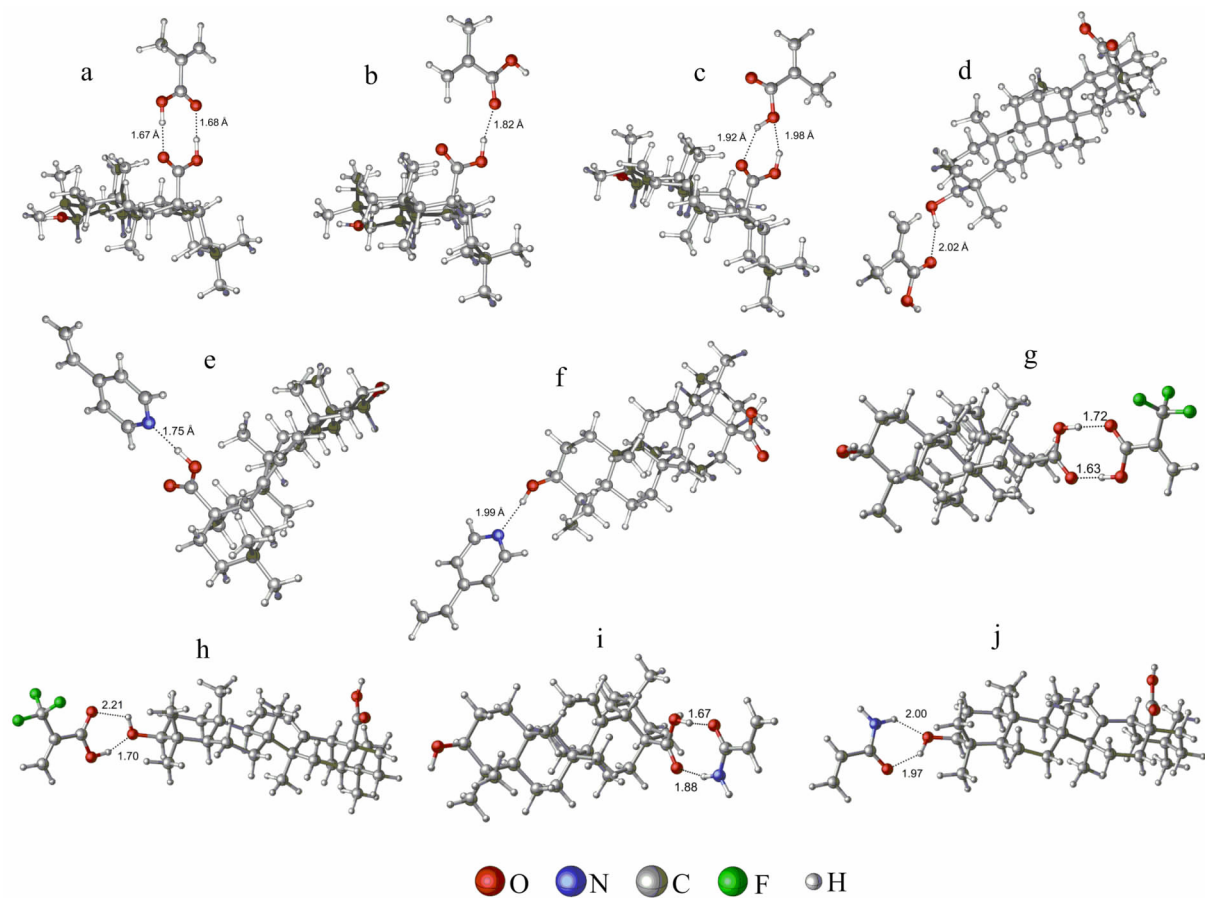


图 3 模板与单体以 1:1 摩尔比形成的复合物构型:

(a) OA/MAA-1, (b) OA/MAA-2, (c) OA/MAA-3, (d) OA/MAA-4, (e) OA/VP-1, (f) OA/VP-2, (g) OA-TFMAA-1, (h) OA-TFMAA-2, (i) OA-AM-1, (j) OA-AM-2.

Figure 3 Structures of complexes formed between template and monomer at molar ratio of 1:1,

(a) OA/MAA-1, (b) OA/MAA-2, (c) OA/MAA-3, (d) OA/MAA-4, (e) OA/VP-1, (f) OA/VP-2, (g) OA-TFMAA-1, (h) OA-TFMAA-2, (i) OA-AM-1, (j) OA-AM-2.

出,模板分子与四种功能单体相互作用能大小顺序为:OA-TFMAA>OA-MAA>OA-AM>OA-4-VP, OA-TFMAA-1 复合物结合能($-70.99\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)最高,可能由于 TFMAA 结构上含有一个电负性较强的三氟甲基,具有强烈的吸电子效应,因此,形成的氢键作用力最强,复合物最稳定。单体 MAA 与 OA 形成复合物的最高结合能 $\Delta E(-66.40\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$ 稍低于单体 TFMAA($-70.99\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$),但两者均显著高于 AM 和 4-VP 与模板分子的相互作用。以上结果表明,当模板与单体摩尔比 1:1 时,TFMAA 和 MAA 与 OA 作用力较强,对齐墩果酸的印迹效果更好。此外,研究发现功能单体与 OA 结合能的大小与氢键的键长具有一致性,同一单体与模板相互作用越强,氢键越短。另外,单体在 OA 羧基上的结合能均大于在羟基上的结合能,这是因为羧基上 H 的电正性大于羟基上 H。虽然 OA 的羧基 C 原子电荷为 0.85,远大于羧基 H 原子,但该 C 原子却无法与单体之间形成氢键,可能是由于此位点与单体结合时空位阻较大所致。

运用同样方法计算模板与单体摩尔比 1:2 时的结合能,并优化复合物构型。由图 4a 中可以看出,当 4-VP 与 OA 以 2:1 的摩尔比反应时,可以形成 1 种构象,即 2 分子 4-VP 的吡啶环 N 分别与 OA 中羧基和羟基 H 形成氢键,该复合物的结合能为 $-68.93\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (见表 1),说明此复合体系较稳定,有望合成高选择性和吸附性能的 MIPs。但在 MIP 实际制备中,由于聚合反应是一个放热过程,不是所有的功

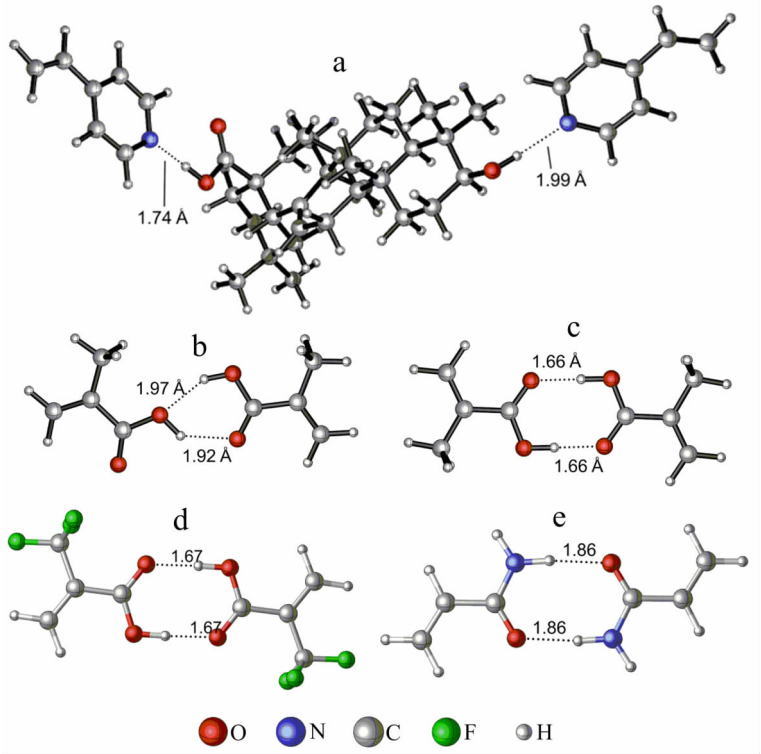


图 4 OA 与 4-VP 以 1:2 摩尔比形成的复合物(a); 功能单体自身缔合结构: 2MAA-1(b), 2MAA-2(c), 2TFMAA(d), 2AM(e)

Figure 4 Structure of complex formed between OA and 4-VP at molar ratio of 1:2 (a); Structure of the self-association complexes of monomers: (b) 2MAA-1, (c) 2MAA-2, (d) 2TFMAA, (e) 2AM

表 1 ONIOM(b3lyp/6-311++g(d, p):pm3)计算的模板、单体及二者复合物的能量 E 和结合能 ΔE

Table 1 Energies and binding energies of template, monomers and complexes at ONIOM(b3lyp/6-311++g(d,p):pm3) level

化合物	<i>E</i> (a. u.)	Δ <i>E</i> (a. u.)	Δ <i>E</i> (kJ•mol ⁻¹)
OA	−345.0083		
VP	−325.7714		
MA	−306.5815		
TFMAA	−604.3950		
AM	−247.3775		
OA-MAA-1	−651.6151	−0.0253	−66.3958
OA-MAA-2	−651.6019	−0.0121	−31.7567
OA-MAA-3	−651.6009	−0.0111	−29.2255
OA-MAA-4	−651.5993	−0.0096	−25.1453
OA-TFMAA-1	−949.4307	−0.0274	−70.9944
OA-TFMAA-2	−949.4239	−0.0206	−53.9562
OA-AM-1	−592.4094	−0.0237	−60.1578
OA-AM-2	−592.4004	−0.0146	−38.3117
OA-VP-1	−670.7972	−0.0175	−45.8866
OA-VP-2	−670.7887	−0.0090	−23.5536
2MA-1	−613.1744	−0.0115	−30.2615
2MA-2	−613.1890	−0.0261	−68.6198
2TFMAA	−1208.8165	−0.0264	−69.4432
2AM	−494.7765	−0.0216	−56.6189
OA-2VP	−996.5774	−0.0263	−68.9311

能单体都参与了结合位点的形成,如使用 4-VP 为功能单体,可适当增加其摩尔比例,以确保 4-VP 与 OA 充分结合^[15]。同理,MAA 与 OA 以 1:1 的摩尔比反应时有 4 种可能的稳定结合构型,理论上以 2:1 摩尔比反应时,可以形成 3 种稳定构型。然而,通过理论计算发现,2 个 MAA 分子可以通过分子间氢键作用结合在一起,形成稳定的复合物,结合方式包括 2MAA-1 和 2MAA-2 两种结构(见图 4b、c)。其中,2MAA-2 结构的结合能($-68.62\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)比 MAA 与 OA 所形成复合物的结合能($-25.15\sim-66.40\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)均高,表明反应中 MAA 分子容易以 2MAA-2 构型发生自身缔合。对于 TFMAA 和 AM 两个单体,模拟结果显示,两个单体分子随着摩尔比增大也容易发生自聚,其自聚的结合能分别为 $-69.44\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 和 $-56.62\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,略小于该单体与 OA 羧基的结合能,但远大于该单体与 OA 羟基的结合能,这说明 TFMAA 或 AM 单体分子容易以 1:1 比例结合到模板分子 OA 的羧基基团上。

2.1.3 溶剂的选择 溶剂的选择不仅影响印迹过程,还会影响到印迹聚合物的物理形态^[16]及吸附性能^[17]。在非共价印迹体系中,溶剂的选择原则是在保证对试剂溶解性的情况下应尽可能选用与模板和单体作用力小的溶剂,以免削弱或破坏模板-单体间的氢键作用。本研究根据模板和单体的溶解性能,选择不同极性的溶剂(甲醇、乙醇、丙酮、四氢呋喃、三氯甲烷)进行进一步研究,并依据溶剂化能来判断溶剂与组分相互作用强度, $\Delta E_{\text{solvation}}$ 越小,表示组分与溶剂相互作用越小,对印迹聚合物越有利。模板和功能单体在不同溶剂中溶剂化能见表 2,五种分子溶剂化能大小顺序为:甲醇>乙醇>丙酮>四氢呋喃>三氯甲烷,在三氯甲烷中溶剂化能最小,说明模板分子和功能单体与三氯甲烷的作用最小。不管是模板分子或功能单体,这些分子和溶剂的强烈作用会屏蔽其分子上作用位点,使其模板分子和功能单体的相互作用变弱,进而影响印迹聚合物的分子识别效果。因此,根据计算结果,三氯甲烷更适合作为反应溶剂。但在实际实验过程中,溶剂的选择还与分子印迹聚合方法有关^[16]。

表 2 OA、4-VP、MAA、TFMAA 和 AM 在不同溶剂中的溶剂化能

Table 2 Solvation energy of OA, 4-VP, MAA, TFMAA and AM in different solvents

溶剂	OA		4-VP		MAA		TFMAA		AM	
	E/a. u.	$\Delta E(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	E/a. u.	$\Delta E(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	E/a. u.	$\Delta E(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	E/a. u.	$\Delta E(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	E/a. u.	$\Delta E(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
气相	-1397.7724		-325.6850		-306.4797		-604.1920		-247.2915	
三氯甲烷	-1397.7806	21.4976	-325.6893	11.2647	-306.4847	12.9185	-604.1982	16.3960	-247.2996	21.3067
四氢呋喃	-1397.7815	23.8456	-325.6898	12.5347	-306.4852	14.3187	-604.1989	18.2564	-247.3006	23.7807
丙酮	-1397.7825	26.5021	-325.6903	13.9808	-306.4858	15.9016	-604.1997	20.3818	-247.3017	26.6178
乙醇	-1397.7826	26.7704	-325.6904	14.1273	-306.4859	16.0610	-604.1998	20.5976	-247.3018	26.9064
甲醇	-1397.7827	27.0710	-325.6904	14.2919	-306.4859	16.2400	-604.1999	20.8396	-247.3019	27.2309

2.2 OA-MIP 的制备

为了验证上述计算模拟的准确性,实验分别选择 TFMAA、MAA、4-VP 为功能单体,三氯甲烷为溶剂,DVB/EGDMA(4:1, mol/mol)为交联剂,AIBN 为引发剂,采用本体聚合制备 OA-MIPs,通过吸附量 Q_e 和吸附因子 IF 表征 MIPs 的吸附性能。实验结果表明(见图 5),以 TFMAA、MAA 和 4-VP 为单体制备的 OA-MIP 的吸附量分别为 $13.6\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $11.8\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $11.3\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,吸附因子 IF 分别为 6.61、5.67 和 5.2。TFMAA 作为功能单体制备的 MIP 具有较高的吸附性能,与理论计算结果一致。

模板/功能单体的比例对 MIPs 性能有很较大影响,理论计算结果表明,模板与 TFMAA 摩尔比 1:1 时结合能最高。但聚合反应是一个放热过程,不是所有的功能单体都参与了结合位点的形成,为确保模板与功能单体充分结合,在 MIPs 制备过程中往往加入过量的功能单体^[15]。因此,本研究以 TFMAA 功能单体,固定其余合成条件,考察模板与单体的不同摩尔比(1:1,1:2,1:3,1:4)对 MIPs 吸附性能的影响。实验结果见图 6,吸附量和印迹因子随着两者摩尔比增大而增大,当大于 1:3 时,印迹因子减小,表明

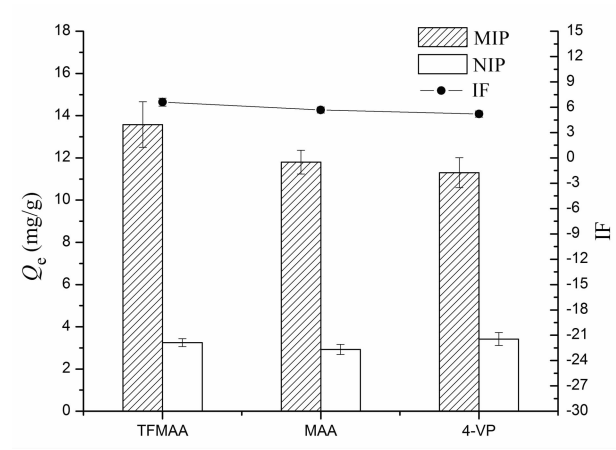


图 5 不同功能单体对 MIPs 吸附性能的影响

聚合条件:OA:单体:交联剂(1:3:15, mol/mol/mol),交联剂 DVB/EGDMA(4:1, mol/mol),
AIBN 浓度占单体总量的 2%(wt),反应总体积占溶剂 7%,聚合温度 60℃,

Figure 5 Effect of different functional monomer on adsorption properties of MIPs. Polymerization conditions:
OA/functional monomer/crosslinker (1:3:15, mol/mol/mol), crosslinker DVB/EGDMA (4:1, mol/mol),
weight fraction of AIBN 2%, volume fraction of reaction system 7%, polymerization temperature 60℃.

非特异性吸附增加。其原因在于过量的功能单体造成聚合物中单体的功能基团过剩而产生大量的非选择性结合位点,从而造成非特异性吸附增加;再者,过量功能单体会发生自身缔合,也会导致选择性结合位点减少。因此,模板/功能单体摩尔比选择 1:3。

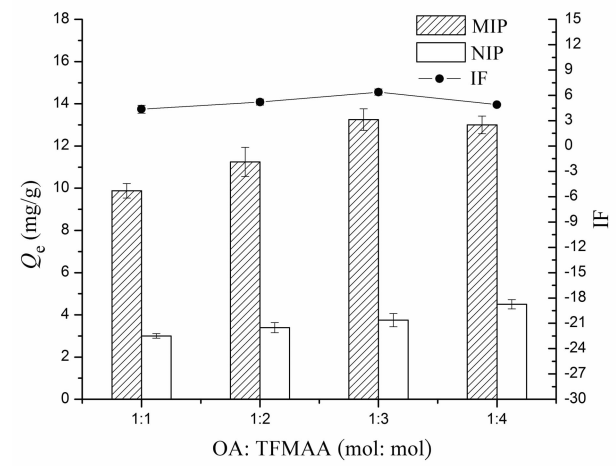


图 6 模板与功能单体摩尔比对 MIPs 吸附性能的影响

聚合条件:TFMAA:交联剂(1:5, mmol/mmol),交联剂 DVB/EGDMA(4:1, mol/mol),
AIBN 浓度占单体总量的 2%(wt),反应总体积占溶剂 7%,聚合温度 60℃,

Figure 6 Effect of different molar ratios of the template to the functional monomer on adsorption properties of MIPs. Polymerization conditions: TFMAA/crosslinker (1:5, mol/mol) crosslinker DVB/EGDMA (4:1, mol/mol),
weight fraction of AIBN 2%, volume fraction of reaction system 7%, polymerization temperature 60℃.

在非共价印迹体系中,溶剂的性质如极性、介电常数等会影响聚合物对模板分子再结合的亲和性和选择性^[16, 18, 19]。考虑到 OA 的溶解性以及计算机模拟结果,实验选择三氯甲烷、四氢呋喃、甲醇、乙醇、丙酮作为溶剂制备印迹聚合物。结果显示(见图 7),以三氯甲烷作为溶剂制备的 MIPs 具有最大的吸附量和吸附因子,吸附性能顺序为三氯甲烷>四氢呋喃>丙酮>甲醇>乙醇,实验结果与理论计算基本一致。

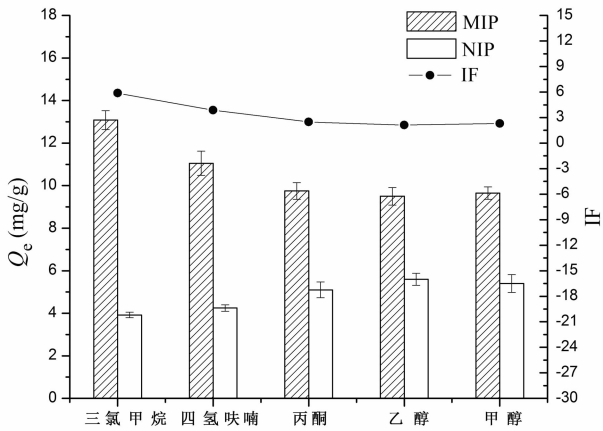


图 7 不同溶剂对印迹聚合物吸附性能的影响

聚合条件：OA:TFMAA:交联剂(1:3:15, mmol/mmol/mmol),交联剂 DVB/EGDMA(4:1, mol/mol), AIBN 浓度占单体总量的 2%(wt),反应体系占溶剂 7%,聚合温度 60℃,

Figure 7 Effect of different solvent on adsorption properties of MIPs. Polymerization conditions:

OA/TFMAA/crosslinker (1:3:15, mol/mol/mol), crosslinker DVB/EGDMA (4:1, mol/mol),

weight fraction of AIBN initiator 2%, volume fraction of reaction system 7%, polymerization temperature 60℃.

2.3 OA-MIPs 表征

2.3.1 扫描电镜表征 在优化条件下制备 OA-MIPs,采用扫描电镜对 MIPs 的表面形貌进行表征。从图 8 可以看出,印迹聚合物呈不规则的无定形状,表面呈现高度交联的微孔结构。

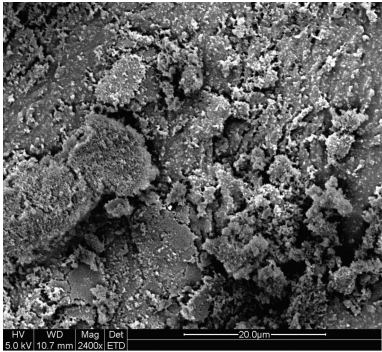


图 8 本体聚合制备的 OA-MIPs 扫描电镜图

Figure 8 The SEM images of OA-MIPs prepared by bulk polymerization

2.3.2 红外光谱分析 图 9 为 OA、MIPs 和去除 OA 后的印迹聚合物(N-MIPs)的红外光谱图。从图 9a 和 9b 中可以看出,3445cm⁻¹和 1697cm⁻¹为 OA 分子 O—H 和 C=O 伸缩振动,2941cm⁻¹、2868cm⁻¹为聚合体系中 C—H 伸缩振动,1731cm⁻¹交联剂 EGDMA 酯基 C=O 伸缩振动,1459cm⁻¹、1450cm⁻¹和 1385cm⁻¹分别为聚合体系中—CH₂ 基和—CH₃ 变形振动,1171cm⁻¹、1106cm⁻¹为 EGDMA 的 C—O—C 伸缩振动,833cm⁻¹、796cm⁻¹和 712cm⁻¹为交联剂 DVB 的 C—H 的面外变形振动及芳环骨架 δ 振动,功能单体三氟甲基丙烯酸 的 C—F 键在 MIPs 和 N-MIPs 中没有明显特征吸收峰,这与 Ding^[20] 的报道基本一致。以上结果表明,模板、单体及交联剂充分聚合。N-MIP(图 9c)与 MIP(见图 9a)比较,3445cm⁻¹吸收消失,吸收峰 2941cm⁻¹、2863cm⁻¹明显减弱,说明模板已经洗脱除去,其它吸收峰与 MIPs 基本一致。

2.3.3 吸附等温线 MIPs 和 NIPs 对 OA 分子的吸附等温线见图 10,如图所示,OA 在 0.1~0.8mg·mL⁻¹ 的浓度范围内,MIPs 吸附量随着 OA 浓度的增加而增大,当 OA 浓度大于 0.7mg·mL⁻¹ 后吸附量

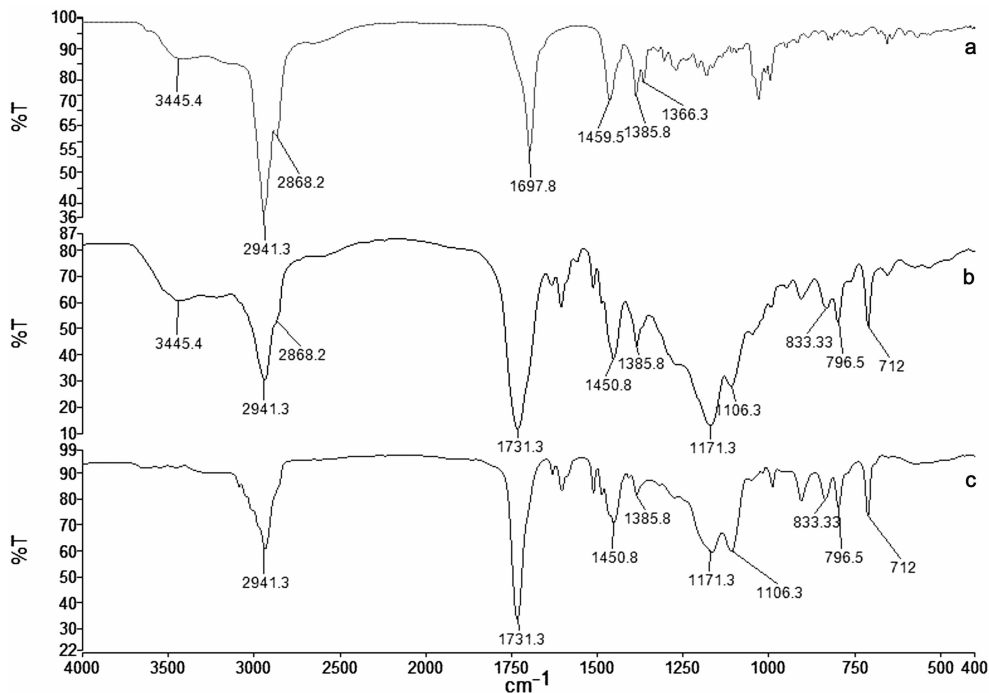


图 9 模板分子 OA (a)、MIPs (b) 和去除 OA 后的聚合物 N-MIPs (c) 的红外光谱图
Figure 9 FT-IR spectra of OA (a), MIPs (b) and N-MIPs (c)

逐渐趋于饱和。同时,NIPs 吸附量明显小于 MIPs,表明 MIPs 对 OA 具有较好的印迹效果。

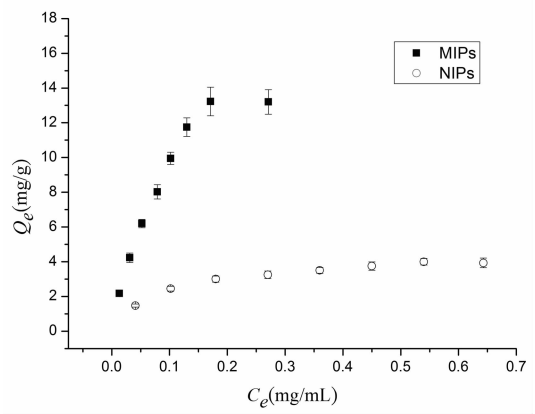


图 10 印记聚合物对 OA 分子的吸附等温线
Figure 10 Adsorption isotherms of OA on MIPs and NIPs at room temperature (25°C)

2.3.4 吸附动力学 图 11 为聚合物对 OA 吸附动力学曲线。初始阶段,MIPs 吸附速率较快,在 80min 内达到吸附平衡,而 NIPs 为 120min。原因可能是 MIPs 的空间结构和官能团完全互补于模板分子,故具有较高的结合能力和快的传质速度^[20]。

2.3.5 选择性吸附 为了表征 MIPs 的对模板分子的选择性吸附性能,实验选择 OA 及竞争底物 UA 和大黄酸进行吸附实验。MIPs 对分子的选择识别性能用印迹因子 IF 来表征, IF 越大表明 MIPs 对其模板分子的选择性和亲和力越高。实验结果显示(见图 12),MIPs 对 OA 的吸附量明显高于其它竞争结合底物,OA、UA 和大黄素的 IF 值分别为 5.86、3.52 和 1.24。以上结果说明,MIPs 对 OA 有高的吸附能力和选择性,而 NIPs 则反之。

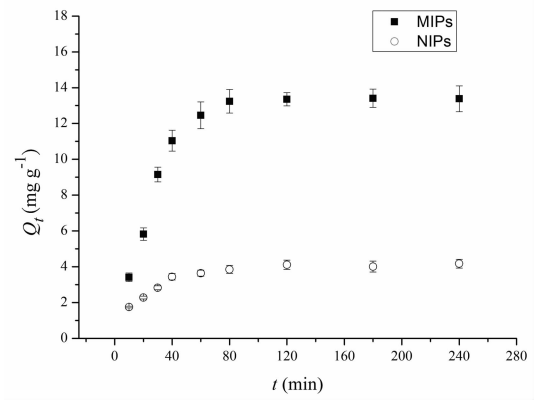


图 11 MIPs 对 OA 吸附动力学曲线

Figure 11 Adsorption kinetic curve of OA on MIP

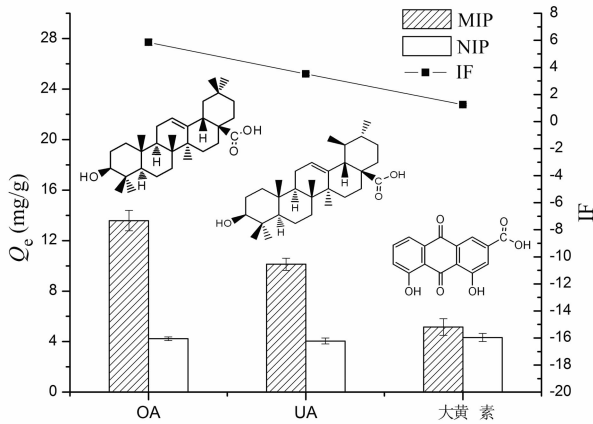


图 12 MIPs 选择性吸附能力

Figure 12 Selectivity adsorption of MIPs

3 结论

采用量子化学计算法模拟了模板分子 OA 与单体 MAA、TFMAA、AM 和 4-VP 之间的成键情况及反应的结合能,以及在不同溶剂中的溶剂化能,以此作为单体和溶剂筛选的理论依据。计算结果显示,当 TFMAA 或 MAA 与 OA 摩尔比 1:1 及 4-VP 与 OA 摩尔比 2:1 时均可形成稳定的氢键复合物,有望合成识别性能较好的 OA-MIPs。模板和功能单体在三氯甲烷中的溶剂化能最小,理论上可作为理想的溶剂。通过实验验证,理论计算和实验结果基本一致,采用本体聚合法制备的 MIPs 对 OA 具有良好的吸附选择性。上述结果表明,分子模拟技术在印迹聚合物的设计和制备中可提供理论参考,具有良好的应用前景。

参考文献:

[1] 田丽婷, 马龙, 堵年生. 中国中药杂志, 2002, 27(12): 884~886, 901.
[2] Saad EM, Madbouly A, Avoub N, Nashar RME. Anal Chim Acta, 2015, 877: 80~89.
[3] Miura C, Li H, Matsunaga H, Haginaka J. J Pharmaceut Biomed, 2015, 114: 139~144.
[4] 张辉. 基于分子印迹技术提取光皮木瓜中的齐墩果酸. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2014.
[5] Zhang WC, Zhang HT, Zhang Q, Cui YF, Wu ZY, Zheng RJ, Liu L. Sep Purif Technol, 2011, 81(3): 411~417.
[6] Chen X, Zhang ZH, Yang X, Li JX, Liu Y, Chen H J, Rao W, Yao S Z. Talanta, 2012, 99(17): 959~965.

- [7] Karimian N, Gholivand MB, Taherkhani F. J Electroanal Chem, 2015, 740: 45~52.
- [8] Schauerperl M, Lewis DW. J Phys Chem B, 2015, 119(2): 563~571.
- [9] Frisch GWTMJ, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery JA Jr, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam JM, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Dapprich S, Daniels AD, Farkas O, Foresman JB, Ortiz JV, Cioslowski J, Fox DJ. Gaussian 09, 2009, Gaussian, Inc., Wallingford, CT.
- [10] Becke AD. J Chem Phys, 1993, 98(7): 5648~5652.
- [11] Ditchfield R, Hehre WJ, Pople JA. J Chem Phys, 1971, 54(2): 724~728.
- [12] Vreven T, Morokuma K, Farkas Ö, Bernhard SH, Frisch MJ. J Comput Chem, 2003, 24(6): 760~769.
- [13] Cossi M, Rega N, Scalmani G, Barone V. J Comput Chem, 2003, 24(6): 669~681.
- [14] 李文静, 胡艳云, 韩芳, 徐慧群, 宋伟, 吕亚宁, 郑平. 高等学校化学学报, 2013, 34(5): 1291~1225.
- [15] Sergeeva TA, Piletska OV, Piletsky SA, Sergeeva LM, Brovko OO, Elska G. Mat Sci Eng C-Mater, 2008, 28(8): 1472~1479.
- [16] Zhu QH, He JF, Feng JY. Eur Polym J, 2007, 43 (9): 4043~4051.
- [17] Wu LQ, Zhu KC, Zhao MP, Li Y. Anal Chim Acta, 2005, 549(1/2): 39~44.
- [18] Yoshizako K, Hosoya K, Iwakoshi Y, Kimata K, Tanake N. Anal Chem. 1998, 70 (2): 386~389.
- [19] Bai F, Yang XL, Huang WQ. Eur Polym J, 2006, 42, 2088~2097.
- [20] Ding MJ, Wu XL, Yuan LH, Wang S, Li Y, Wang RY, Wen TT, Du SH, Zhou XM. J Hazard Mater, 2011, 191(1/3): 177~183.

Computational Strategies for the Design and Study of Oleanolic Acid-imprinted Prepolymerization Mixtures

TANG Zong-gui, WANG Jing, CHEN Xia, WANG Guo-hong, LU Chun-xia*

(Analysis and Testing Center, Xinjiang Academy of Agriculture and Reclamation Science/Supervision and Testing Center Food Quality, Ministry of Agriculture (Shihezi), Shihezi 832000, China)

Abstract: In this study, the pre-organization system of molecularly imprinted polymer with oleanolic acid as template, 2-(trifluoromethyl) acrylic acid (TFMAA), methacrylic acid (MAA), acrylamide (AM), and 4-vinylpyridine (4-VP) as functional monomers, chloroform, tetrahydrofuran (THF), ethanol, methanol, and acetone as solvents was studied by computational methods. The density functional theory (DFT) and ONIOM method was used to investigate the geometry optimization, active sites, natural bond orbital charges, binding energies of the imprinted molecule. The solvation energy of template and monomer in different solvent was calculated using self-consistent reaction field of polarizable continuum model approach (CPCM). The theoretical results showed that the compound of the ratio of OA-TFMAA (1:1) had the highest binding energy ($-70.99\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) and the most stable structure, and the solvation energy for template and monomer in chloroform were lower than that in THF, ethanol, methanol, and acetone. The corresponding experimental results were used to verify the simulation results. Meanwhile, the polymers were characterized by using scanning electron microscopy, fourier transform infrared spectrum, and adsorption experiments. The experimental result is completely consistent with the theoretic analysis, which indicates that the computer simulations can provide a route to more efficient MIP design strategies.

Key words: Molecular simulation; Oleanolic acid; Molecularly imprinted polymer