

分子印迹聚合物纯化甘草酸

郝万宝^{1,2}, 郭瑞丽^{1,2*}, 张建树^{1,2}, 徐邵合^{1,2}, 裴文静^{1,2}

(1. 石河子大学 化学化工学院, 新疆 石河子 832003; 2. 新疆兵团化工绿色过程重点实验室, 新疆 石河子 832003)

摘要: 以甘草酸、不同单体(甲基丙烯酸、甲基丙烯酸羟乙酯和 4-乙烯基吡啶)和交联剂(二乙烯基苯和乙二醇二甲基丙烯酸酯)为原料,在乙腈和 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)的混合液中,以偶氮二异丁腈为引发剂,采用沉淀聚合法制备了一系列分子印迹聚合物(MIPs)。采用 FTIR、SEM 和 BET 对 MIPs 进行了表征与测试,优化了 MIPs 的制备工艺。结果表明:当交联剂为二乙烯基苯、单体为甲基丙烯酸、甘草酸(0.16 mmol)与甲基丙烯酸的物质的量比为 1:10、致孔剂为 25 mL 乙腈和 8 mL DMF 的混合液时,MIPs 对甘草酸的吸附性能最好。在 5 g/L 的甘草酸溶液中,MIPs 对甘草酸的平衡吸附量可达 398.5 mg/g,印迹因子为 3.73。并对 MIPs 的吸附动力学和吸附等温线进行了考察。利用分子印迹固相萃取技术(MISPE)对甘草提取物进行精制,将甘草提取物中甘草酸的质量分数由 11.27%提高到 73.10%,回收率为 86.87%。

关键词: 甘草酸; 分子印迹聚合物; 沉淀聚合; 氢键; 功能材料

中图分类号: O69; O658; O657 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214(2018)11-1859-08

Purification of Glycyrrhizic Acid by Molecularly Imprinted Polymers

XI Wan-bao^{1,2}, GUO Rui-li^{1,2*}, ZHANG Jian-shu^{1,2}, XU Shao-he^{1,2}, PEI Wen-jing^{1,2}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China; 2. Key Laboratory for Green Process of Chemical Engineering of Xinjiang Bingtuan, Shihezi 832003, Xinjiang, China)

Abstract: A series of molecularly imprinted polymers (MIPs) were prepared by precipitation polymerization in acetonitrile and *N,N*-dimethylformamide (DMF) mixed solvents using glycyrrhizic acid, different monomers (methacrylic acid, hydroxyethyl methacrylate and 4-vinyl pyridine) and crosslinking agents (divinyl benzene and ethylene glycol dimethacrylate) as raw materials and azodiisobutyronitrile as initiator. The MIPs were characterized by FTIR, SEM and BET. Moreover, the preparation process of MIPs was optimized. The results showed that when divinylbenzene was used as crosslinking agent, the molar ratio of glycyrrhizic acid (0.16 mmol) to methacrylic acid was 1:10, and a mixture of acetonitrile (25 mL) and DMF (8 mL) was adopted as porogen, the obtained MIPs showed the best adsorption to glycyrrhizic acid. In 5 g/L glycyrrhizic acid solution, the equilibrium adsorption capacity of MIPs to glycyrrhizic acid was 398.5 mg/g and the imprinting factor was 3.73. The adsorption kinetics and adsorption isotherm of MIPs were studied. Meanwhile, the licorice extract was refined by molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE), and the mass fraction of glycyrrhizic acid increased from 11.27% to 73.10% with 86.87% recovery yield.

Key words: glycyrrhizic acid; molecularly imprinted polymers; precipitation polymerization; hydrogen bonds; functional materials

Foundation item: National Natural Science Youth Foundation of China (21006064)

甘草酸是甘草根中的一种主要活性物质,具有抗炎、解毒、抗氧化、保肝、抗病毒等功效^[1-2]。甘

草酸的分离纯化方法有超声萃取^[3]、微波萃取^[4]、超热水萃取^[5]、超临界萃取^[6]、胶束萃取^[7]、离子液体

收稿日期: 2018-01-15; 定用日期: 2018-05-05; DOI: 10.13550/j.jxhg.20180045

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(21006064)

作者简介: 郝万宝(1987—),男,硕士生。联系人: 郭瑞丽(1978—),女,教授,电话: 0993-2057277, E-mail: grli@shzu.edu.cn。

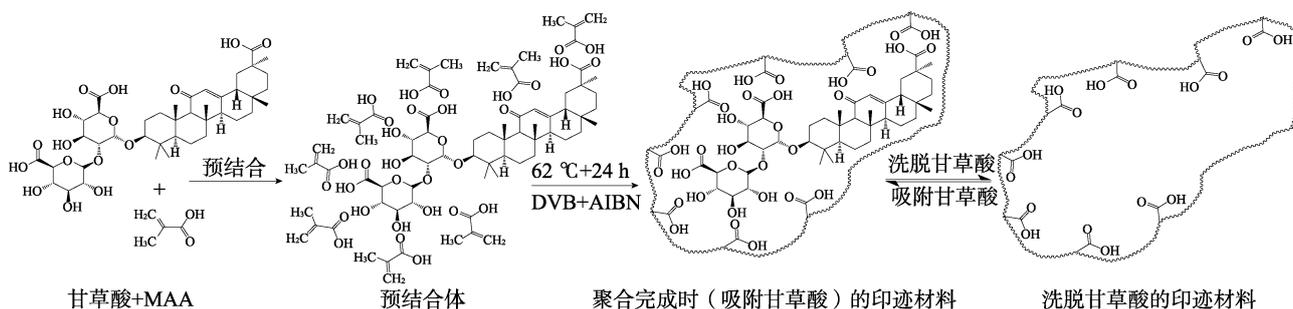
萃取^[8]、泡沫萃取^[9]、大孔树脂吸附^[10]、制备色谱^[11]等。但这些技术对甘草酸的提取和纯化不具有特异性,并且有机溶剂消耗量大,因此,开发经济、高效的提取和纯化甘草酸的方法尤为重要。

分子印迹技术是一种简单、高效的提纯方法,通过将特定的分子识别位点引入到聚合物基质中,达到特异性吸附目标分子的目的^[12-13]。分子印迹技术已经被广泛应用于手性拆分、化学传感器、抗体模拟、酶催化模拟等领域^[14-16]。甘草酸分子上含有羟基、羧基、醚基等可以形成氢键的官能团,适合当模板分子来制备分子印迹聚合物。Cirillo 等采用本体聚合法制备了 3 种甘草酸印迹聚合物,并用于药物传输系统^[17]。Tang 等同样采用本体聚合法制备了多种甘草酸印迹聚合物,考察了功能单体、模板分子和交联剂的配比对印迹聚合物吸附性能的影响,并用于甘草提取物的精制,将甘草提取物中甘草酸的质量分数由 15.03% 提高到 53.63%^[18]。但本体聚合的研磨、筛分等后续工艺会造成聚合物识别位点的破坏和聚合物的损失。近些年来新的制备分子印迹聚合物的方法相继出现并成为研究热点,如悬浮聚合、沉淀

聚合、表面印迹等^[19]。

沉淀聚合法可以制备出粒径为几微米到几百微米的聚合物微球,且模板分子的识别位点主要集中在聚合物表面,能很好地避免传统本体聚合研磨、筛分等后续工艺造成的聚合物识别位点的破坏和聚合物的损失,是一种高效的聚合方式^[20]。

本文采用沉淀聚合法制备甘草酸印迹聚合物(制备流程如下式所示)。根据甘草酸的结构特点,基于甘草酸在印迹聚合物内与单体形成氢键作用力的原理,选取甲基丙烯酸(MAA)、甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)和 4-乙烯基吡啶(4-VP)为反应单体,制备了一系列甘草酸印迹聚合物。其中,MAA 和 HEMA 具有氢键的供体和受体、4-VP 具有氢键受体,可以和甘草酸分子内的羟基、羧基、醚基等形成氢键。根据甘草酸的溶解性特点,选取乙腈和 *N,N*-二甲基甲酰胺混合液作为反应致孔剂。通过 SEM、FTIR、BET 等来考察不同聚合条件对印迹聚合物的结构、甘草酸吸附-解吸及特异选择性的影响。以期开发出经济、高效纯化甘草酸的印迹材料,并为印迹材料的研究提供科学依据。



1 实验部分

1.1 试剂

甘草根(由新疆天山制药有限公司提供,经石河子大学药学院成玉怀高级实验师鉴定为光果甘草);甲基丙烯酸(AR)、甲基丙烯酸羟乙酯(AR)和乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA, AR)购买于上海源叶生物科技有限公司;甘草酸标准品(质量分数 $\geq 98\%$)、4-乙烯基吡啶(AR)、二乙烯基苯(DVB, AR)和偶氮二异丁腈(AIBN, AR)购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;液氮(质量分数 $\geq 99.9\%$)购买于石河子大学分析测试中心;乙腈(ACN)和甲醇为色谱纯,美国 Fisher 公司;*N,N*-二甲基甲酰胺(AR)和乙醇(AR)购买于天津市光复科技发展有限公司。所有单体和交联剂都经减压蒸馏除去阻聚剂,AIBN 经重结晶处理。

1.2 分子印迹聚合物的制备

分子印迹聚合物(MIPs)的制备条件见表 1。以 MIP4 为例,制备方法如下:首先,将甘草酸(131.7 mg,

0.16 mmol)和 MAA (137.7 mg, 1.6 mmol)加入到装有 33 mL 致孔剂(25 mL 乙腈和 8 mL DMF 的混合液)的茄型瓶中,然后放入 25 °C 摇床中使两者充分混合,2 h 后取出。向上述溶液中加入 DVB(520.7 mg, 4 mmol)和 AIBN (26.3 mg, 0.16 mmol)。采用三冻三抽法除去溶液中氧气,具体方法如下:先用液氮将溶液冻住,油泵抽真空 5 min 后,放入 60 °C 左右的温水中解冻(该过程有大量气泡从溶液中排出),整个过程进行 3 次。溶液除氧后向茄型瓶中充入氮气,密封后放入 62 °C 油浴中磁力搅拌反应 24 h(反应完成后产生大量乳白色沉淀物)。以 9000 r/min 离心 12 min,移去上清液,得到甘草酸印迹聚合物。用 30 mL 甲醇-醋酸 [$V(\text{甲醇}):V(\text{醋酸})=9:1$]混合溶液超声清洗 3 次(每次超声时间为 90 min),以洗脱甘草酸分子,之后用甲醇将残留的乙酸清洗干净,放入 60 °C 烘箱中烘干,MIPs 制备完成,常温密封保存,备用。相应的非印迹聚合物(NIPs)的制备方法除不加入甘草酸外,其余步骤同上,制备条件见表 1。

表 1 印迹聚合物的制备条件及吸附性能
Table 1 Preparation conditions and adsorption properties of imprinted polymers

样品名称	甘草酸/mmol	功能单体	交联剂	致孔剂		吸附量(Q)/(mg/g)	印迹因子(IF)
				ACN/mL	DMF/mL		
NIP1	0	HEMA	DVB	25	8	146.6	—
MIP1-1	0.08	HEMA	DVB	25	8	296.2	2.02
MIP1-2	0.16	HEMA	DVB	25	8	357.5	2.44
NIP2	0	HEMA	EGDMA	25	8	185.2	—
MIP2	0.16	HEMA	EGDMA	25	8	213.6	1.15
NIP3	0	4-VP	DVB	25	8	9.2	—
MIP3	0.16	4-VP	DVB	25	8	14.7	1.60
NIP4	0	MAA	DVB	25	8	106.9	—
MIP4	0.16	MAA	DVB	25	8	398.5	3.73
NIP5	0	MAA	EGDMA	25	8	0	—
MIP5	0.16	MAA	EGDMA	25	8	0	—
NIP6	0	MAA	DVB	21	12	106.7	—
MIP6	0.16	MAA	DVB	21	12	342.5	3.20
NIP7	0	MAA	DVB	17	16	101.6	—
MIP7	0.16	MAA	DVB	17	16	241.2	2.37
NIP8	0	HEMA	DVB	17	16	129.2	—
MIP8	0.16	HEMA	DVB	17	16	268.2	2.07

注：“—”代表数据不可得或不可求。

1.3 吸附实验

1.3.1 静态吸附

称取 20 mg MIPs 和 NIPs 分别加入到 2 mL (5 g/L) 甘草酸的乙醇-水 (乙醇体积分数为 20%) 溶液中, 混合溶液放入摇床, 室温振荡 2 h 后取出, 离心收集上清液, 根据甘草酸标准曲线用液相色谱测试上清液中甘草酸的质量浓度。甘草酸的吸附量^[21-22] (Q) 和印迹因子^[23] (IF) 的计算公式如下。

$$Q = \frac{(\rho_0 - \rho_e)V}{m} \quad (1)$$

$$IF = \frac{Q_{MIP}}{Q_{NIP}} \quad (2)$$

式中: Q 为印迹聚合物对甘草酸的吸附量, mg/g; ρ_0 为溶液中甘草酸的初始质量浓度, g/L; ρ_e 为吸附平衡时甘草酸的质量浓度, g/L; V 为甘草酸溶液的体积, mL; m 为印迹聚合物的加入质量, g; Q_{MIP} 为 MIPs 对甘草酸的吸附量, mg/g; Q_{NIP} 为 NIPs 对甘草酸的吸附量, mg/g。

1.3.2 吸附动力学

称取 100 mg MIP4 和 NIP4 分别加入到 40 mL (1.25 g/L) 甘草酸乙醇-水 (乙醇体积分数为 20%) 溶液中, 混合溶液放入摇床中, 每隔一段时间取出 0.75 mL, 用液相色谱测试甘草酸的质量浓度。

1.3.3 吸附等温线

称取 10 mg MIP4 和 NIP4 分别加入到 2 mL 不

同质量浓度 (0.26、0.51、1.03、2.05、3.08、4.10、6.15 和 8.2 g/L) 甘草酸的乙醇-水 (乙醇体积分数为 20%) 混合溶液中, 混合溶液放入摇床中室温振荡 2 h, 离心收集上清液, 用液相色谱测试上清液中甘草酸的质量浓度。

1.3.4 重复性测试

称取 100 mg MIP4 加入到 40 mL 质量浓度为 1.25 g/L 的甘草酸乙醇-水 (乙醇体积分数为 20%) 混合溶液中, 混合溶液放入摇床中室温振荡 2 h, 离心收集上清液, 然后用液相色谱测试上清液中甘草酸的质量浓度。收集印迹聚合物并洗脱掉甘草酸 (洗脱步骤同 1.2 节), 按上述步骤进行吸附-解吸 5 次。

1.4 甘草酸提取与纯化

提取: 将甘草根加入到粉碎机中粉碎, 过 60 目筛, 称取 100 g 甘草根粉末加入到 1 L 乙醇体积分数为 20% 的乙醇-水溶液中, 超声, 50 °C 萃取 30 min, 萃取 2 次, 合并萃取液, 抽滤后得到甘草酸粗液。

纯化: 取 600 mg 印迹聚合物 MIP4, 用湿法装柱的方式装入直径 1 cm 的固相萃取 (SPE) 柱中。先用 10 mL 甲醇将残留的甘草酸除去, 再用 10 mL 体积分数为 20% 的乙醇-水混合溶液平衡条件。9 mL 的甘草酸粗液上样, 9 mL 的乙醇清洗, 最后 12 mL 甲醇洗脱。流速均为 0.5 mL/min。

1.5 液相色谱测试条件

采用美国 Waters 公司 2695 型高效液相色谱仪

对样品进行液相色谱测试。Symmetry C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流速 1 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 检测波长 254 nm。采用梯度洗脱的方式, 洗脱条件如表 2 所示。

表 2 梯度洗脱条件
Table 2 Conditions of gradient elution

t/min	乙腈体积分数/%	冰乙酸-水溶液体积分数/%
0~8	40~50	60~50
8~10	50~90	50~10
10~13	90	10
13~15	90~40	10~60
15~20	40	60

注: 冰乙酸-水溶液中冰乙酸与水的体积比为 1:44。

1.6 表征

采用 SU8010 型 (日本 Hitachi 公司) 扫描电子显微镜对制备的印迹聚合物进行形貌表征。首先将待测的样品均匀涂覆到导电胶上, 然后采用离子溅射仪对印迹聚合物进行喷金 30 s 后, 室温下用于 SEM 测试。

采用 Nicolet AVATAR360 型 (美国 Nicolet 公司) 红外光谱仪对制备的印迹聚合物进行 FTIR 表征, 测试温度为室温, 步长为 2 cm⁻¹, 扫描范围 400~4000 cm⁻¹。

采用 ASAP2020 型 (美国 Micromeritics 公司) BET 测试仪测定印迹聚合物的比表面积、平均孔容量和平均孔径。印迹聚合物测试前需要在 60 °C 的烘箱内烘干, 测试前脱气温度为 180 °C。

采用 Gold54 型 (上海棱光技术有限公司) 紫外-可见分光光度计对甘草酸标准溶液、MAA 溶液、HEMA 溶液、甘草酸和 MAA 的混合溶液和甘草酸和 HEMA 的混合溶液进行 190~900 nm 的全波长扫描。

2 结果与讨论

2.1 印迹聚合物制备条件的优化

在制备 MIPs 的过程中, 不同的制备工艺会使分子印迹聚合物的吸附能力不同, 因此, 为了使聚合物具有最佳的吸附性能, 对甘草酸印迹聚合物的制备工艺进行了优化, 考察了模板分子 (甘草酸) 添加量、交联剂、单体和致孔剂的种类对聚合物吸附性能的影响, 结果如表 1 所示。当甘草酸的添加量为 0.16 mmol、交联剂为 DVB、单体为 MAA、致孔剂为 25 mL 乙腈和 8 mL DMF 的混合液时, 印迹聚合物 MIP4 拥有最大的吸附量和印迹因子。因此, 选择 MIP4 应用于后续甘草酸提取液纯化实验。

2.1.1 模板分子添加量的影响

由表 1 可知, 功能单体和交联剂分别为 HEMA 和 DVB 时, 非印迹聚合物 NIP1 对甘草酸吸附量为

146.6 mg/g, 随着模板分子甘草酸添加量增加, 印迹聚合物对甘草酸吸附量增加, 当甘草酸添加量为 0.16 mmol 时 (MIP1-2), 印迹聚合物对甘草酸吸附量可达 357.5 mg/g, 印迹因子由 2.02 增加到 2.44。

模板分子添加量对印迹聚合物结构的影响见表 3。由表 3 可以看出, 随着甘草酸添加量的增加, 印迹聚合物的比表面积由 608.78 m²/g 逐步下降到 560.67 m²/g, 但其孔容量由 0.43 cm³/g 增加到 0.55 cm³/g, 平均孔径由 2.75 nm 增加到 3.78 nm。由此可以推断, 随着甘草酸添加量的增加, 单位体积印迹聚合物内甘草酸的结合位点增加, 从而造成了甘草酸吸附量和印迹因子的增大。当模板分子添加量为 0.16 mmol, 甘草酸与单体的物质的量比为 1:10 时, 继续增大甘草酸的用量使单体的摩尔分数过低, 无法满足甘草酸形成氢键所需的单体数量, 从而降低了印迹聚合物对甘草酸的吸附选择性。所以, 选择 0.16 mmol 为甘草酸的添加量。

表 3 印迹聚合物结构参数

Table 3 Structure parameters of imprinted polymers

样品名称	比表面积/(m ² /g)	孔容/(cm ³ /g)	平均孔径/nm
NIP1	608.78	0.43	2.75
MIP1-1	604.67	0.44	2.81
MIP1-2	560.67	0.55	3.78
MIP2	90.24	0.37	16.45
MIP3	5.69	0.01	6.51
MIP4	482.54	0.30	2.52

2.1.2 交联剂的影响

MIPs 的基体结构主要由交联剂和单体共同聚合而成, 当模板分子被洗脱后交联剂主要负责控制印迹位点的空间形状。选择了两种常用交联剂 DVB 和 EGDMA, 考察了交联剂种类对 MIPs 吸附性能的影响, 结果如表 1 所示, 当 HEMA 为单体时, 以 DVB 为交联剂制备出的印迹聚合物 MIP1-2 比以 EGDMA 为交联剂制备出来的印迹聚合物 MIP2 有更大的吸附量和印迹因子。猜测可能原因如下: (1) DVB 和 EGDMA 的结构和官能团有较大差异, 导致形成的印迹聚合物结构和极性有较大差别; (2) DVB 可以额外和甘草酸上的芳环形成 π-π 作用力; (3) HEMA 和 EGDMA 之间形成的氢键作用力会干扰 HEMA 与甘草酸之间的氢键作用力^[24]。结合表 3 可以看出, MIP2 不仅比表面积小, 而且平均孔径较大, 说明 HEMA 为单体时, EGDMA 作为交联剂不能提供良好的基体结构。当 MAA 为单体时, 以 EGDMA 为交联剂制备出的印迹聚合物 MIP5 和 NIP5 为透明胶状物, 烘干后为坚硬固体, 且体积大幅度减小, 对甘草酸没有吸附量, 同样不能提供良好的基体结构。因此, 选择以 DVB 为交联剂。

2.1.3 功能单体的影响

MIPs 中模板分子(甘草酸)和单体的分子间作用力对甘草酸的吸附量和选择性起着至关重要的作用。本文选择了 MAA、HEMA 和 4-VP 3 种功能单体来制备甘草酸印迹聚合物, 如表 1 所示。以 MAA 为功能单体制备出来的印迹聚合物 MIP4 和以 HEMA 为功能单体制备出来的印迹聚合物 MIP1-2 拥有较大的吸附量和印迹因子。其中, MIP4 对甘草酸的吸附量和印迹因子分别为 398.5 mg/g 和 3.73。而以 4-VP 为功能单体制备的印迹聚合物 MIP3 吸附性能较差。结合表 3 可以看出, 相比于 MIP3, MIP4 和 MIP1-2 均拥有较大的比表面积和孔容量, 而 MIP3 更像一个实心聚合体, 因此, 4-VP 单体在该聚合体系下制备出的印迹聚合物不能得到较好的吸附效果。

为进一步比较 HEMA 和 MAA 单体的优劣, 本文做了紫外吸光度测试。理论上, 当甘草酸与单体间形成氢键作用力时, 甘草酸的最大紫外吸收波长将发生红移, 并且吸光度减小^[25-26]。红移和吸光度减小的程度往往取决于甘草酸与单体间氢键作用力的强弱。但由于 MAA 和 HEMA 与甘草酸的紫外最大吸收波长极其相近, 所以只讨论吸光度变化。在 259.2 nm 下, MAA 和甘草酸溶液吸光度之和为 0.861, HEMA 和甘草酸溶液吸光度之和为 0.811。然而, MAA 和甘草酸混合溶液在 259.2 nm 的吸光度为 0.789, 降低了 0.072, HEMA 和甘草酸混合溶液在 259.2 nm 的吸光度为 0.786, 降低了 0.025。由此推断, MAA 与甘草酸有更强的氢键作用力。另外, MAA 分子具有更小的空间结构, 可能也是导致以 MAA 为单体制备出的 MIPs 拥有更好的吸附性能的原因。因此, 选择以 MAA 为单体。

2.1.4 致孔剂的影响

以 MAA 为单体、DVB 为交联剂, 选择以乙腈和 DMF 的混合溶液作为致孔剂, 考察了乙腈与 DMF 体积比分别为 25:8、21:12 和 17:16 时, 制备的印迹聚合物对甘草酸吸附性能的影响, 结果如表 1 所示。由于 DMF 的极性大于乙腈, 增大 DMF 的比例将会使致孔剂极性增大, 随着致孔剂极性的增大, NIPs 对甘草酸的吸附量未发生较大幅度上的改变, 而 MIPs 对甘草酸的吸附量由 398.5 mg/g 下降到 241.2 mg/g, 印迹因子由 3.73 下降到 2.37。这是由于致孔剂极性的增大使甘草酸与单体之间的相互作用力减弱, 形成的印迹聚合物不利于对甘草酸的识别^[13,27]。为了验证上述推论, 制备了 NIP8 和 MIP8 (见表 1)。对比 NIP1 和 MIP1-2 可以看出, 实验结果符合上述推论。但继续增大乙腈的比例将无法充分溶解反应所需的甘草酸, 因此, 选择致孔

剂为 25 mL 乙腈和 8 mL DMF 的混合溶液。故 MIP4 为最优甘草酸印迹聚合物。

2.2 甘草酸印迹聚合物表征

2.2.1 FTIR 表征

甘草酸标样、洗脱前、后的非印迹聚合物 NIP4、洗脱前、后和重新吸附甘草酸后的印迹聚合物 MIP4 的 FTIR 谱图见图 1。

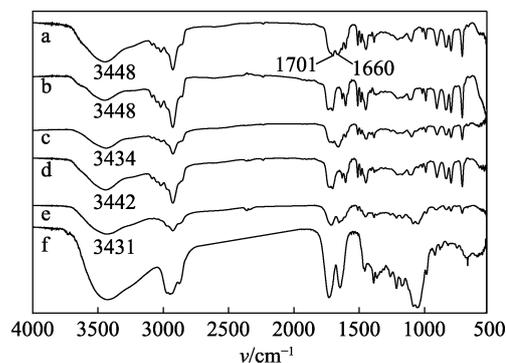


图 1 NIP4 洗脱前(a)、后(b), MIP4 洗脱前(c)、后(d), MIP4 吸附后(e)和甘草酸(f)的红外光谱图

Fig. 1 FTIR spectra of polymers: (a) NIP4 before elution; (b) NIP4 after elution; (c) MIP4 before elution; (d) MIP4 after elution; (e) MIP4 after adsorption; (f) glycyrrhizic acid

图 1 中 a 和 b 为非印迹聚合物 NIP4 的 FTIR 谱图, 在 3448 cm^{-1} 处出现—OH 的伸缩振动峰, 而交联剂 DVB 没有羟基结构, 证明单体 MAA 被成功引入到聚合物基体中。洗脱印迹分子后的 MIP4 (图 1d) 相比于洗脱前 (图 1c), —OH 峰由 3434 cm^{-1} 移动到 3442 cm^{-1} 处, 出现了蓝移, 说明甘草酸在印迹聚合物中与单体 MAA 以氢键的方式结合。当 MIP4 重新吸附甘草酸后(图 1e), —OH 峰由 3442 cm^{-1} 移动到 3431 cm^{-1} 处, 出现红移, 表明印迹聚合物内 MAA 重新与甘草酸产生氢键作用力。1701 cm^{-1} 处为 C=O 的吸收峰, 主要来自于单体 MAA 和甘草酸分子; 1660 cm^{-1} 处为 C=C 的吸收峰, 主要来自于未完全反应的交联剂 DVB 和模板甘草酸分子。

2.2.2 SEM 表征

NIP4 (a) 和 MIP4 (b) 的 SEM 谱图见图 2。

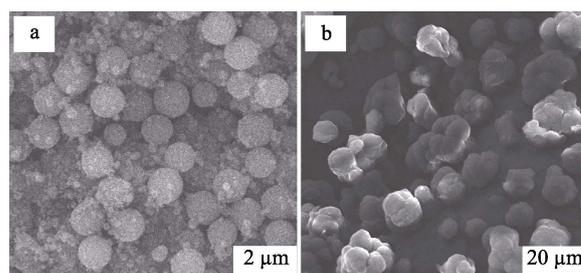


图 2 NIP4 (a) 和 MIP4 (b) 的 SEM 谱图

Fig. 2 SEM images of (a) NIP4 and (b) MIP4

如图 2 所示, 未加模板分子时, 制备的印迹聚合物 NIP4 为规则的圆球形, 尺寸大小均一; 加入模板分子之后, 制备的印迹聚合物 MIP4 形状变得不规则, 尺寸明显增大。这是由于甘草酸加入后, 会影响沉淀聚合过程粒子的成长, 使粒子的粒径分布及形态都有较大改变^[28-29]。

2.3 吸附动力学考察

为了确定吸附平衡时间, 对印迹聚合物 MIP4 做了吸附动力学实验, 结果见图 3。

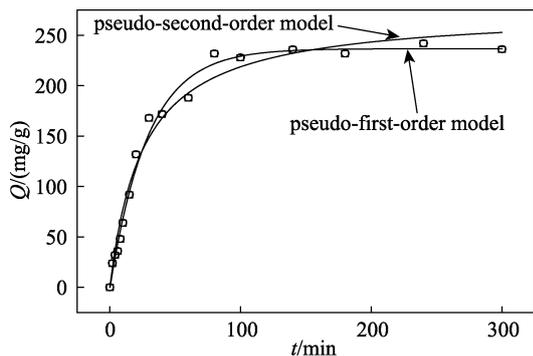


图 3 MIP4 吸附动力学曲线

Fig. 3 Adsorption dynamic curves of MIP4

由图 3 可以看出, MIP4 对甘草酸的吸附量在 50 min 内快速增加, 在 80 min 左右达到平衡, 80 min 之后吸附量基本不再增加。因此, MIP4 的吸附平衡时间确定为 80 min。为了进一步探究吸附过程的动力学机理, 对其进行了拟一级动力学模型和拟二级动力学模型拟合, 结果见表 4。

表 4 MIP4 的吸附动力学参数

Table 4 Adsorption kinetic parameters of MIP4

	$Q_{e,exp}/(mg/g)$	R^2	K
拟一级动力学模型	236.7	0.990	0.346(K_1)
拟二级动力学模型	274.1	0.979	0.000144(K_2)

注: K 、 K_1 和 K_2 分别为速率常数、拟一级速率常数和拟二级速率常数。

结合图 3 和表 4 可以看出, 拟一级动力学模型的线性相关系数 ($R^2 = 0.990$) 要大于拟二级动力学模型 ($R^2 = 0.979$), 并且拟一级动力学模型的理论吸附量 (236.7 mg/g) 比拟二级动力学模型的理论吸附量 (274.1 mg/g) 更接近实验值 (236.2 mg/g), 说明 MIP4 对甘草酸的吸附更符合拟一级动力学模型。

2.4 吸附等温线和 Scatchard 模型考察

测定了 25 °C 下 MIP4 和 NIP4 的吸附等温线, 结果见图 4a。如图 4a 所示, 随着溶液中甘草酸浓度的升高, MIP4 和 NIP4 对甘草酸的吸附量均逐渐升高, 但 MIP4 吸附量的增加幅度显著大于 NIP4。实验测得, MIP4 和 NIP4 的最大吸附量分别为 512.6 mg/g

和 137.2 mg/g, 表明印迹聚合物的吸附性能显著强于非印迹聚合物。

结合 Scatchard 模型^[25,30]讨论印迹聚合物的吸附特性, 结果见图 4b。如图 4b 所示, 对于 MIP4, 以 Q_t/ρ_c 对 Q_c 作图呈现两条不同斜率的直线, 说明 MIP4 对甘草酸的吸附存在两种不同的结合位点 (高亲和力结合位点和低亲和力结合位点)。其中, 高亲和力结合位点的存在反映出 MIP4 对甘草酸的特异性吸附^[30], 而 NIP4 只有低亲和力结合位点, 说明模板分子的加入使得印迹聚合物对甘草酸的吸附具有了特异性。

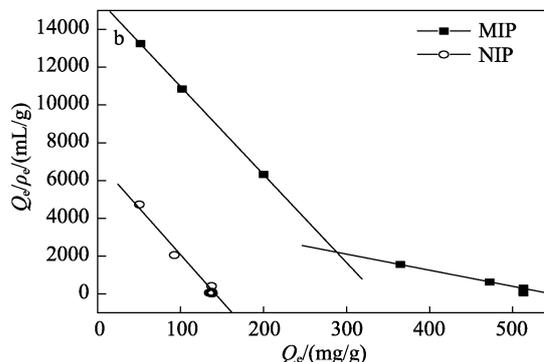
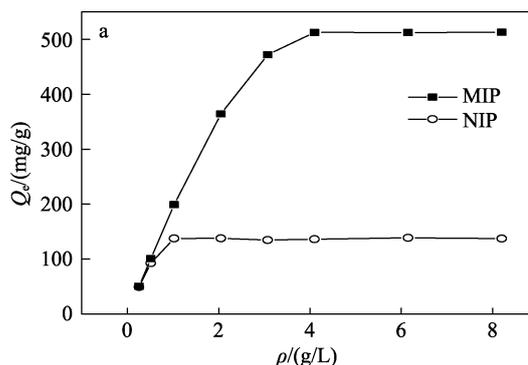


图 4 MIP4 和 NIP4 的吸附等温线 (a) 和 Scatchard 模型曲线 (b)

Fig. 4 (a) Adsorption isotherms and (b) Scatchard plots for binding of MIP4 and NIP4

2.5 重复使用性测试

吸附剂的重复使用性能对材料有非常重要的作用, 对 MIPs 做了 5 次吸附-解吸循环测试, 对甘草酸的吸附量分别为 239.2、230.0、227.9、227.6 和 233.2 mg/g。可以看出, MIPs 对甘草酸的吸附量未有明显的下降, 证明印迹材料具有良好的重复使用性。

2.6 印迹聚合物纯化甘草酸提取液

MIP4 吸附材料填充到 SPE 柱内, 进行甘草酸提取液的纯化。甘草酸上样溶液、清洗溶液和洗脱溶液的出峰情况见图 5。由图 5b 可以看出, 清洗溶液中存在大量的杂质和极少量的甘草酸, 这说明相比于杂质, MIPs 对甘草酸有更好的保留; 由图 5c 看出, 相比于上样溶液 (图 5a), 洗脱液中杂质的

出峰显著变小, 这说明甘草酸得到了较好的纯化。经外标法计算得到, 甘草酸提取液 (甘草酸质量分数为 11.27%) 经印迹聚合物吸附洗脱后其质量分数提高到 73.10%, 回收率为 86.87%。

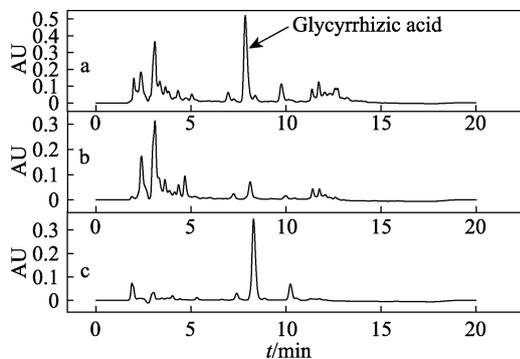


图 5 上样溶液 (a)、清洗溶液 (b) 和洗脱溶液 (c) 的液相色谱图

Fig. 5 Chromatograms of glycyrrhizic acid: (a) loading solution after SPE; (b) washing solution after SPE; (c) eluting solution after SPE

3 结论

采用沉淀聚合法制备了一系列甘草酸印迹聚合物, 当甘草酸添加量为 0.16 mmol、交联剂选择 DVB (4 mmol)、单体选择 MAA (1.6 mmol)、致孔剂为 25 mL 乙腈和 8 mL DMF 的混合溶液时, MIPs 对甘草酸的吸附性能最好。在 5 g/L 的甘草酸溶液中, MIPs 对甘草酸的平衡吸附量可达 398.5 mg/g, 吸附因子为 3.73。FTIR 结果证明, 甘草酸与印迹聚合物内单体以氢键的方式连接。SEM 表征可知, 甘草酸的加入使印迹微球的尺寸增大, 并影响微球的形状和均匀性。吸附动力学研究表明, MIPs 对甘草酸的吸附更符合拟一级动力学模型。通过对印迹聚合物的吸附等温线和 Scatchard 模型分析可知, MIPs 存在对甘草酸特异性吸附的高亲和力位点。重复性测试得出, 循环吸附-解析 5 次, MIPs 对甘草酸的吸附量未有明显的下降, 说明印迹材料具有良好的重复使用性。将印迹聚合物用于甘草提取物精制, 甘草酸的质量分数由原来的 11.27% 提高到 73.10%, 回收率达 86.87%。该方法具有快速、经济和高效的特点, 可应用于甘草提取物中甘草酸的精制和检测。

参考文献:

[1] Sun X, Duan X, Wang C, *et al.* Protective effects of glycyrrhizic acid against non-alcoholic fatty liver disease in mice[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2017, 806: 75-82.
 [2] Li B, Yang Y, Chen L, *et al.* 18 α -Glycyrrhetic acid monoglucuronide as an anti-inflammatory agent through suppression of the NF- κ B and MAPK signaling pathway[J]. *Med Chem Commun*, 2017, 8(7): 1498-1504.

[3] Charpe T W, Rathod V K. Extraction of glycyrrhizic acid from licorice root using ultrasound: Process intensification studies[J]. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2012, 54: 37-41.
 [4] Wang R, Lin C, Liu J, *et al.* Pressured microwave-assisted hydrolysis of crude glycyrrhizic acid for preparation of glycyrrhetic acid[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2012, 20(1): 152-157.
 [5] Shabkhiz M A, Eikani M H, Bashiri Sadr Z, *et al.* Superheated water extraction of glycyrrhizic acid from licorice root[J]. *Food Chemistry*, 2016, 210: 396-401.
 [6] Hedayati A, Ghoreishi S M. Supercritical carbon dioxide extraction of glycyrrhizic acid from licorice plant root using binary entrainer: Experimental optimization via response surface methodology[J]. *Journal of Supercritical Fluids*, 2015, 100: 209-217.
 [7] Sun C, Xie Y, Tian Q, *et al.* Cloud point extraction of glycyrrhizic acid from licorice root[J]. *Separation Science and Technology*, 2007, 42(14): 3259-3270.
 [8] Yang L, Li L L, Liu T T, *et al.* Development of sample preparation method for isoliquiritigenin, liquiritin, and glycyrrhizic acid analysis in licorice by ionic liquids-ultrasound based extraction and high-performance liquid chromatography detection[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(1): 173-179.
 [9] Ma J G, Xiu Z L, Zhang D J, *et al.* Concentration and separation of glycyrrhizic acid by foam separation[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2002, 77(6): 720-724.
 [10] Zheng Y F, Wei J H, Qi L W, *et al.* A green and efficient protocol for large-scale production of glycyrrhizic acid from licorice roots by combination of polyamide and macroporous resin adsorbent chromatography[J]. *Journal of Separation Science*, 2013, 36(4): 809-816.
 [11] Tian M, Yan H, Row K H. Simultaneous extraction and separation of liquiritin, glycyrrhizic acid, and glabridin from licorice root with analytical and preparative chromatography[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 13(6): 671-676.
 [12] Yang Weihai (杨卫海), Yan Shoulei (严守雷), Wei Chen (卫晨), *et al.* Preparation of melamine molecularly imprinted polymer microspheres by precipitation polymerization[J]. *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2010, 1(10): 1163-1169.
 [13] Song X, Li J, Wang J, *et al.* Quercetin molecularly imprinted polymers: Preparation, recognition characteristics and properties as sorbent for solid-phase extraction[J]. *Talanta*, 2009, 80(2): 694-702.
 [14] Quaglia M, De Lorenzi E, Massolini G, *et al.* Surface initiated molecularly imprinted polymer films: A new approach in chiral capillary electrochromatography[J]. *Analyst*, 2001, 126(9): 1495-1498.
 [15] Fan Cunhua (范存华), Yang Yiqun (杨逸群), Zhao Wei (赵伟), *et al.* Research on amphiphilic copolymer mip micelles electrochemical sensor[J]. *Acta Chim Sinica (化学学报)*, 2013, 71: 934-940.
 [16] Sui Hongyan (隋洪艳), Li Hongqi (李红旗), Shen Zhongyao (沈忠耀). Chiral separation of amino acid derivatives by molecular imprinting technique (II)-preparation of molecularly imprinted polymers, chromatographical evaluation and physical and chemical character formulation [J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2003, 20(6): 345-348, 373.
 [17] Cirillo G, Parisi O I, Curcio M, *et al.* Molecularly imprinted polymers as drug delivery systems for the sustained release of glycyrrhizic acid [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 62(5): 577-582.
 [18] Tang W, Du W, Guo P, *et al.* Molecularly imprinted solid phase extraction using bismethacryloyl- β -cyclodextrin and methacrylic acid as double functional monomers for selective analysis of glycyrrhizic acid in aqueous media[J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2017, 55(2): 166-173.
 [19] Figueiredo L, Erny G L, Santos L, *et al.* Applications of molecularly imprinted polymers to the analysis and removal of personal care products: A review[J]. *Talanta*, 2016, 146: 754-765.