



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105771941 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(21)申请号 201610125967.1

(22)申请日 2016.03.04

(71)申请人 中国科学院新疆理化技术研究所
地址 830011 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市北京南路40号附1号

(72)发明人 刘照胜 孙光映
阿吉艾克拜尔·艾萨

(74)专利代理机构 乌鲁木齐中科新兴专利事务
所 65106

代理人 张莉

(51)Int.Cl.

B01J 20/285(2006.01)

B01D 15/22(2006.01)

B01D 15/10(2006.01)

G01N 30/02(2006.01)

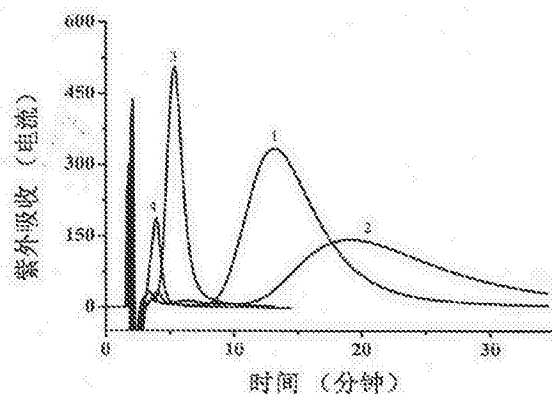
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

基于双拥挤效应的低模板消耗安石榴林印迹方法

(57)摘要

本发明涉及一种基于双拥挤效应的低模板消耗安石榴林印迹方法,该方法以聚苯乙烯、聚乙二醇为两种大分子拥挤试剂,以极少量的安石榴林为模板分子,在加入了两种拥挤试剂聚苯乙烯、聚乙二醇的四氢呋喃溶液以及甲苯所组成的混合致孔剂中,再加入功能单体、交联剂或引发剂,超声促进溶解并除去溶解在其中的氧气并引发反应,得到具有选择性的安石榴林印迹整体柱。本发明所述方法模板消耗量极少,极大地降低了安石榴林的印迹成本。在不锈钢柱管中成功合成了安石榴林印迹整体柱及其空白对照柱并进行色谱性能优化。结果表明,印迹因子最高可达3.14。该方法制备简单,且高分子聚合物耐用性好,为安石榴林的分离纯化提供了一种节约成本的方法。



1. 一种基于双拥挤效应的低模板消耗安石榴林印迹方法,其特征在于按下列步骤进行:

a、将两种拥挤试剂聚乙二醇和聚苯乙烯分别溶解在四氢呋喃溶液中,将质量百分数为0.035%的安石榴林,溶解在质量分数为68.35%的含有两种拥挤试剂的四氢呋喃溶液中;

b、再加入质量分数2.48%的丙烯酰胺、质量分数20.80%的二甲基丙烯酸乙二醇酯、质量分数6.92%的甲苯和质量分数为1.40%的偶氮二异丁腈,超声10分钟,溶解待溶液澄清,转移至长100 mm,直径4.6 mm的不锈钢管柱中,封住不锈钢柱管两端,于温度55℃恒温水浴中热引发反应24小时;

c、将合成的不锈钢柱取出,装上柱头,连接于高压输液泵,分别以150 mL四氢呋喃,100 mL甲醇-乙酸=9:1的混合液以及50 mL纯甲醇为流动相,控制流速为1.0 mL/min进行冲洗,即可得到安石榴林印迹整体柱。

2. 如权利要求1所述的基于双拥挤效应的低模板消耗安石榴林印迹整体柱的方法,其特征在于步骤a中四氢呋喃中两种拥挤试剂聚乙二醇浓度为19.4 mg/mL,聚苯乙烯的浓度为40 mg/mL。

3. 如权利要求1所述的基于双拥挤效应的低模板消耗安石榴林印迹整体柱的方法,其特征在于步骤a中聚乙二醇的平均相对分子质量为6,000,聚苯乙烯的平均相对分子质量为350,000。

4. 如权利要求1所述的基于双拥挤效应的低模板消耗安石榴林印迹整体柱的方法,其特征在于步骤a中安石榴林和步骤b中丙烯酰胺的质量比为1:70.8。

基于双拥挤效应的低模板消耗安石榴林印迹方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于双拥挤效应的低模板消耗安石榴林印迹方法,该印迹聚合物对安石榴林及其类似物安石榴昔同时展现出良好的选择性,可用于安石榴林及安石榴昔的分离纯化。

背景技术

[0002] 分子印迹是一种基于“锁钥原理”,通过模仿生物细胞中酶与底物间的相互作用,人工合成的具有特异选择性材料的新兴技术。将目标分子(又称“模板”)和功能单体溶于一定的致孔剂中进行自组装成预聚物,进而再加入交联剂,在光或热的引发下进行交联,形成高分子聚合物。用高极性溶剂如甲醇-乙酸对聚合物进行洗涤,可将模板从聚合物中释放出来,从而形成空间与电荷分布均与模板相匹配的三维孔穴。在一定条件下,该孔穴可对模板分子有再识别作用。基于这种原理,分子印迹被广泛应用于制作固相萃取填料,用以对复杂的天然产物中活性分子的纯化分离。传统的非共价印迹由于在预聚物形成过程中,目标分子与功能单体间通过较弱的超分子作用力(如氢键、疏水作用、 π - π 堆积等)结合,模板利用率很低,因此合成过程中需要消耗大量的模板分子。对于一些溶解性能较差或极难获得的化合物而言,印迹成本很高。生物体细胞内存在的“拥挤”效应,为该问题的解决提供了新思路。之前的研究认为,在酶和底物的结合过程中,细胞质中的一些分子如多糖,蛋白质等的存在造成了空间“拥挤”效应,减少了酶与底物的自由度,从而促进酶与底物的相互结合。模仿这一原理,在印迹过程中加入高分子量的线性聚合物如聚苯乙烯,聚甲基丙烯酸甲酯等作为人工的“拥挤”试剂,可促进模板和单体直接的相互作用。在这种情况下,消耗极少量的模板进行印迹,即有可能达到较好的印迹效果。

[0003] 安石榴林,一种鞣花酸单宁,具有很强的抗氧化性,是一种天然的抗氧化剂。安石榴林的生物活性很高,在科学研究及生活中需求量较大。传统的安石榴林提取分离手段主要包括层析柱色谱,制备液相,高速逆流色谱。这些手法,由于缺乏特异选择性,在提取纯化过程中溶剂消耗量大,时间长,且过程繁琐,直接导致了较高的分离纯化成本。因此,利用分子印迹技术来印迹安石榴林,得到对安石榴林具有特异选择性的高分子聚合物,对于安石榴林的分离纯化具有重要的意义。安石榴林的价格极其昂贵,而印迹过程中又会消耗大量的安石榴林,故印迹成本比较高。印迹过程中采用两种高分子量拥挤试剂聚乙二醇和聚苯乙烯为共致孔剂,可造成较强的拥挤效应。即便消耗极少量的模板,即可能获得较好的印迹效果,从而降低印迹成本。鉴于安石榴林高昂的价格,发明低模板消耗安石榴林印迹技术,具有十分重要的意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于,提供一种基于双拥挤效应的低模板消耗安石榴林印迹方法,该方法通过设计双拥挤效应,以极少量的安石榴林为模板分子,在加入了两种拥挤试剂聚苯乙烯、聚乙二醇的四氢呋喃溶液以及甲苯所组成的混合致孔剂中,再加入功能单体、交联

剂或引发剂,超声促进溶解并除去溶解在其中的氧气并引发反应,得到具有选择性的安石榴林分子印迹聚合物。本发明所述方法模板消耗量极少,极大地降低了安石榴林的印迹成本。利用原位聚合法,在不锈钢柱管中成功合成了安石榴林印迹整体柱及其空白对照柱并进行色谱性能优化。结果表明,印迹因子最高可达3.14。该方法制备简单,且高分子聚合物耐用性好,为安石榴林的分离纯化提供了一种节约成本的方法。

[0005] 本发明所述的基于双拥挤效应的低模板消耗安石榴林印迹方法,按下列步骤进行:

[0006] a、将两种拥挤试剂聚乙二醇和聚苯乙烯分别溶解在四氢呋喃溶液中,将质量百分数为0.035%的安石榴林,溶解在质量分数为68.35%的含有两种拥挤试剂的四氢呋喃溶液中;

[0007] b、再加入质量分数2.48%的丙烯酰胺、质量分数20.80%的二甲基丙烯酸乙二醇酯、质量分数6.92%的甲苯和质量分数为1.40%的偶氮二异丁腈,超声10分钟,溶解待溶液澄清,转移至长100mm,直径4.6mm的不锈钢管柱中,封住不锈钢柱管两端,于温度55℃恒温水浴中热引发反应24小时;

[0008] c、将合成的不锈钢柱取出,装上柱头,连接于高压输液泵,分别以150mL四氢呋喃,100mL甲醇-乙酸=9:1的混合液以及50mL纯甲醇为流动相,控制流速为1.0mL/min进行冲洗,即可得到安石榴林印迹整体柱。

[0009] 步骤a中四氢呋喃中两种拥挤试剂聚乙二醇浓度为19.4mg/mL,聚苯乙烯的浓度为40mg/mL。

[0010] 步骤a中聚乙二醇的平均相对分子质量为6,000,聚苯乙烯的平均相对分子质量为350,000。

[0011] 步骤a中安石榴林和步骤b中丙烯酰胺的质量比为1:70.8。

[0012] 本发明所述的基于双拥挤效应的低模板消耗安石榴林印迹方法,该方法首次采用聚苯乙烯和聚乙二醇为拥挤试剂,用极少量的安石榴林,通过原位聚合法合成了具有较好印迹效果的整体柱。该方法模板使用量极少,操作简便,印迹成本极低。

[0013] 本发明所述的基于双拥挤效应的低模板消耗安石榴林印迹方法,通过整体柱的色谱性能测试实验,检测得相比于空白对照柱,安石榴林印迹整体柱对安石榴林的保留性能较优;同时,对其结构类似物安石榴昔也表现出了出色的保留性能。因此,本发明可用于安石榴林或安石榴昔的分离纯化。

附图说明

[0014] 图1为本发明安石榴林在安石榴林印迹整体柱及其空白对照柱上的不同保留行为;

[0015] 图2为本发明安石榴林印迹整体柱上安石榴林与其类似物安石榴昔,鞣花酸,鞣云实精的色谱保留图,其中1为安石榴林,2为安石榴昔,3为鞣花酸,4为鞣云实精;

[0016] 图3为本发明空白对照柱上安石榴林与其类似物安石榴昔,鞣花酸,鞣云实精的色谱保留图,其中1为安石榴林,2为安石榴昔,3为鞣花酸,4为鞣云实精。

具体实施方式

[0017] 下面结合具体实施例,进一步详细阐述本发明。

[0018] 实施例1

[0019] 将两种拥挤试剂聚乙二醇的平均相对分子质量为6,000和聚苯乙烯的平均相对分子质量为350,000分别溶解在四氢呋喃溶液中,所得溶液聚乙二醇浓度为19.4mg/mL,聚苯乙烯浓度为40mg/mL,将质量百分数为0.035%的安石榴林,溶解在质量分数为68.35%的含有两种拥挤试剂的四氢呋喃溶液中;

[0020] 再加入质量分数2.48%的丙烯酰胺、质量分数20.80%的二甲基丙烯酸乙二醇酯、质量分数6.92%的甲苯和质量分数为1.40%的偶氮二异丁腈,超声10分钟,溶解待溶液澄清,转移至长100mm,直径4.6mm的不锈钢管柱(100×4.6mm)中,封住不锈钢柱管两端,于温度55℃恒温水浴中热引发反应24小时;

[0021] 将合成的不锈钢柱取出,装上柱头,连接于高压输液泵,分别以150mL四氢呋喃,100mL甲醇-乙酸=9:1的混合液以及50mL纯甲醇为流动相,控制流速为1.0mL/min进行冲洗,即可得到安石榴林印迹整体柱。

[0022] 高效液相色谱法对安石榴林印迹整体柱进行色谱性能评价:设置紫外吸收波长258nm,流速为1.0mL/min,柱温35℃,用乙腈-乙酸缓冲盐(pH 3.6,200mmol/L)(92:8,v/v)将安石榴林印迹整体柱及其空白柱冲洗至基线水平,进样,测定安石榴林在印迹柱上的保留时间 t_R 。用千分之一的丙酮来标定柱子的死时间 t_0 ,根据公式分别 $k' = (t_R - t_0) / t_0$,计算得安石榴林在印迹柱保留因子达到7.16。

[0023] 实施例2

[0024] 原位聚合法制备空白对照柱

[0025] 原位聚合法制备空白对照柱:将两种拥挤试剂聚乙二醇,聚苯乙烯,分别溶解在四氢呋喃溶液中,所得溶液聚乙二醇浓度为19.4mg/mL,聚苯乙烯浓度为40mg/mL;

[0026] 将质量百分数为2.49%的丙烯酰胺、质量分数20.81%的二甲基丙烯酸乙二醇酯、质量分数6.93%的甲苯、以及质量分数为1.40%的偶氮二异丁腈,超声10分钟,溶解待溶液澄清,转移至不锈钢管柱(100×4.6mm)中,封住不锈钢柱管两端,于温度55℃恒温水浴中热引发反应24小时;

[0027] 残留致孔剂,功能单体的去除:将合成的不锈钢柱取出,装上柱头,连接于高压输液泵,分别以150mL四氢呋喃,100mL甲醇-乙酸=9:1的混合液以及50mL纯甲醇为流动相,控制流速为1.0mL/min进行冲洗,即可得到空白对照柱。

[0028] 高效液相色谱法对空白对照柱进行色谱性能评价:设置紫外吸收波长258nm,流速为1.0mL/min,柱温35℃,用乙腈-乙酸缓冲盐(pH 3.6,200mmol/L)(92:8,v/v)将空白对照柱冲洗至基线水平,进样,分别测定安石榴林在空白对照柱上的保留时间 t_R ,用千分之一的丙酮来标定柱子的死时间 t_0 ,根据公式分别计算得安石榴林在空白对照柱上的保留因子 $k' = (t_R - t_0) / t_0$ 。结果表明,在该色谱条件下,安石榴林在空白对照柱上的保留值为 $k_{NIP} = 2.28$,低于安石榴林印迹柱上的保留值 $k_{MIP} = 7.16$,表明在极少量模板的存在下,安石榴林被成功印迹,印迹因子通过公式 $IF = k_{MIP} / k_{NIP}$ 计算,达到了3.14,印迹效果展现于图1。

[0029] 实施例3

[0030] 安石榴林印迹整体柱及其空白对照柱的选择性能评价

[0031] 安石榴林印迹整体柱选择性能评价:设置紫外吸收波长为258nm,流速为1.0mL/

min,柱温35℃,用乙腈-乙酸缓冲盐(pH 3.6,200mmol/L)(92:8,v/v)将安石榴林印迹整体柱冲洗至基线水平,分别进样安石榴林,安石榴昔,鞣花酸,鞣云实精样品,得到各种物质在印迹整体柱上的色谱图。如图2所示,安石榴林印迹整体柱对安石榴林和安石榴昔的保留较强,可以实现两者与鞣花酸,鞣云实精的有效分离。说明本发明具备同时分离安石榴林和安石榴昔的功能;

[0032] 空白对照柱选择性能评价:设置紫外吸收波长为258nm,流速为1.0mL/min,柱温35℃,用乙腈-乙酸缓冲盐(pH 3.6,200mmol/L)(92:8,v/v)将空白对照柱冲洗至基线水平,分别进样安石榴林,安石榴昔,鞣花酸,鞣云实精样品,得到各种物质在印迹整体柱上的色谱图。如图3所示,空白对照柱不能实现安石榴林和安石榴昔与鞣花酸,鞣云实精的有效分离。

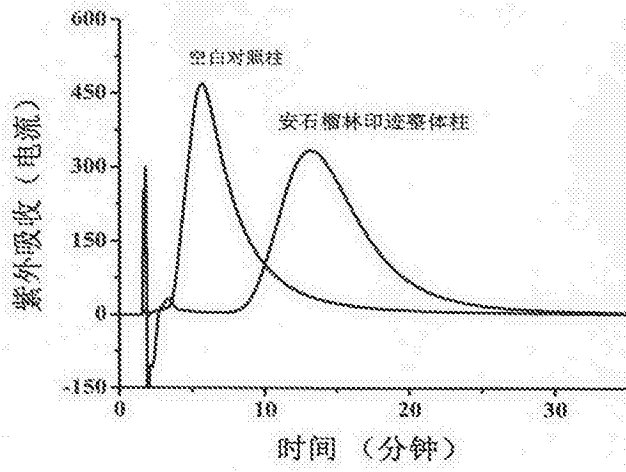


图1

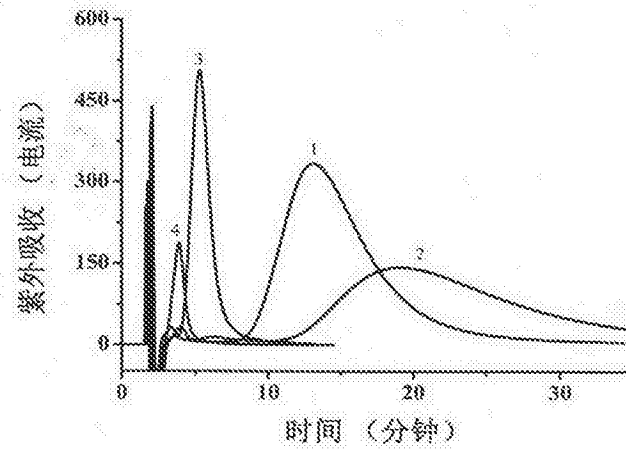


图2

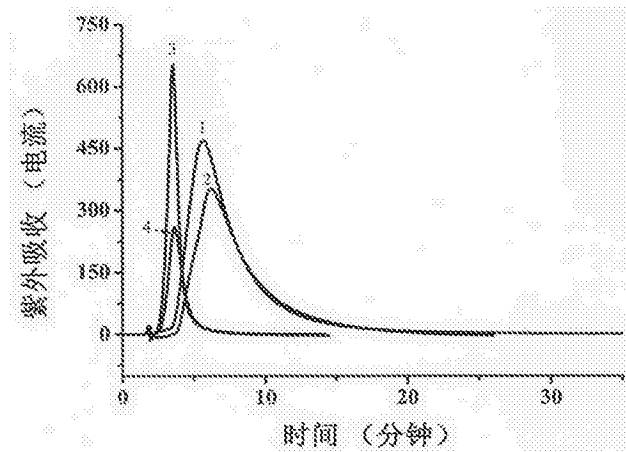


图3