

提取 6-姜酚分子印迹聚合物的制备及应用

阎凤超, 彭 宁, 王 敏, 黄雪松*

(暨南大学食品科学与工程系, 广东 广州 510632)

摘 要: 为从生姜中提取高纯度的 6-姜酚, 用姜酮代替 6-姜酚作为模拟模板, 以甲基丙烯酸为功能单体(MAA), 二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA)为交联剂, 偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂, 乙醚为致孔剂, 用单甘酯作为乳化剂, 在含水乳液状态下, 合成球形的姜酮-分子印迹聚合物。将脱除模板的分子印迹聚合物(MIPs)装柱, 然后上新鲜姜汁, 吸附达到平衡后, 用清水洗脱除去杂质, 再分别用体积分数 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、95% 食用酒精依次洗脱被吸附的姜酚。收集的洗脱液分别经真空浓缩, 萃取后得到的残留物用高效液相色谱(HPLC)测定其 6-姜酚含量。结果显示 20%、25% 的洗脱液中 6-姜酚含量最高, 两者共占所获 6-姜酚总量的 79.07%, 其中 MIPs 对 6-姜酚的吸附能力为 63.35mg/g, 远远大于空白印迹聚合物(NIPs)对 6-姜酚的吸附能力 11.26mg/g, 因此合成的 MIPs 对 6-姜酚具有高度的特定选择性, 可以用于工业化生产制备 6-姜酚。

关键词: 生姜; 6-姜酚; 姜酮; 分子印迹聚合物

Preparation of Molecularly Imprinted Polymers for 6-Gingerol Separation

YAN Feng-chao, PENG Ning, WANG Min, HUANG Xue-song*

(Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Molecularly imprinted polymers (MIPs) were prepared using zingerone as the mimic template to separate 6-gingerol with a high purify from fresh ginger. The polymerization was conducted in aqueous solution using methylacrylic acid (MAA) as functional monomers, ethylene glycol dimethylacrylate (EGDMA) as the cross-linker, 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) as the initiator, ester as porogen and glycerol monostearate (GM) as the emulsifier. Resultant MIPs were loaded with fresh ginger juice until equilibrium. After the removal of impurities through water elution, loaded MIPs were sequentially eluted with 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% and 95% (V/V) ethanol solution. The residues obtained after ethanol evaporation was analyzed for 6-gingerol content by HPLC. The highest yield of total 6-gingerol was distributed mainly in fractions of 20% and 25% ethanol elution with a total amount of 79.07%. The adsorption capability of MIPs to 6-gingerol was 63.35 mg/g, much higher than that of NIPs of 11.26 mg/g. The synthesized MIPs exhibited highly specific recognition and selectivity for 6-gingerol and could be utilized to produce 6-gingerol in an industrial scale from fresh ginger.

Key words: ginger; 6-gingerol; zingerone; molecularly imprinted polymers

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)20-0227-04

生姜(*Zingiber officinale* Roscoe)属于姜科植物, 药食兼用, 具有抗氧化^[1]、抗炎^[2]、抗突变^[3]、抗风湿、抗运动病、抗肿瘤、驱寒等多种生物活性, 其提取物已被应用于治疗癌症^[4]、消化病^[5]、心血管疾病、溃疡^[6]、HIV-1^[7]等疾病。相关研究资料表明, 上述生物活性主要决定于生姜中辣味成分—姜酚类物质。姜酚类物质主要包括 6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚, 其中 6-姜酚占 60% 左右。

为了避免传统姜酚提取方法的弊端并获得高纯度的 6-姜酚, 本实验利用具有预定性、识别性和实用性等优良特点的分子印迹技术进行 6-姜酚的提取。利用分子印迹技术制备而成聚合物被称为分子印迹聚合物(MIPs), 它是一种人工合成的材料, 在形状、体积等方面与模板分子具有良好的空间互补性^[8], 对模板分子具有量身定做的专一性结合特征^[9], 因此能够有效地分离目标分子, 另外 MIPs 具有很好的稳定性、容易制备且成本

收稿日期: 2009-06-10

基金项目: 广东高校科技成果转化重大项目(cgzhzd0806); 广州市番禺区引导项目(2008-z-64-1)

作者简介: 阎凤超(1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为功能性食品。E-mail: fengchaoyan2008@163.com

* 通讯作者: 黄雪松(1957—), 男, 教授, 博士, 研究方向为功能食品。E-mail: thxs@jnu.edu.cn

低,已在传感器^[10],色谱^[11],天然产物的提纯^[12],痕量分析或检测^[13],样品的预处理^[14],药物的控制性释放^[15]等领域得到了广泛的应用,但是在食品领域相关的应用比较少。虽然MIPs在分析检测中应用较多,但具有工业上大量提取天然活性成分物质的MIPs鲜有报道,本实验利用非共价聚合法,以姜酮为模拟模板,采用不同溶剂制备球形分子印迹材料,并探讨应用MIPs工业化提取提取6-姜酚的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

姜酮、二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA)、甲基丙烯酸(MAA)、偶氮二异丁腈(AIBN)、乙醚、乙腈均为分析纯;酒精(食用级)。

1.2 仪器与设备

Equinox55型傅立叶变换红外光谱仪 Bruker公司;RE-52A旋转蒸发器;LC-20AT高效液相色谱仪 日本岛津公司;Unicam UV500紫外可见光谱扫描仪 Thermo Spectronic公司。

1.3 方法

1.3.1 姜酮标准曲线的制备

采用紫外分光光度计对姜酮标准溶液进行全波长扫描,确定最大吸收波长为281nm。在281nm的条件下对不同质量浓度的姜酮标准溶液进行扫描测定,得到如下姜酮质量浓度和吸光度的标准曲线:

$$y=63.72x-0.2902(R^2=0.9939)$$

式中: y 为姜酮溶液的质量浓度($\mu\text{g/ml}$); x 为姜酮溶液的吸光度。

1.3.2 聚合物的制备^[16]

表1 各种分子聚合物合成的配料及比例

Table 1 Component factors for the synthesis of different MIPs and NIPs

聚合物	A		B		C	
	质量或体积	质量分数	质量或体积	质量分数	质量或体积	质量分数
姜酮(g)	0.2403	0.87%	0.2403	1.9%	0.2403	0.87%
MAA(ml)	0.32	1.16%	0.32	2.6%	0.32	1.16%
EGDMA(ml)	3.17	11.53%	3.17	25.36%	3.17	11.53%
AIBN(g)	0.0391	1.4%	0.0391	3.1%	0.0391	1.4%
水(ml)	15		0		15	
单甘酯(g)	0		0		0.0275	1%
乙醚(ml)	5		5		5	

以姜酮为模拟模板的MIPs的制备过程如下:按表1配料比,将0.2403g姜酮溶于12ml乙腈,待溶解后加入0.32ml MAA,在50℃条件下进行预组装12h后,再加入3.17ml EGDMA、适量的蒸馏水和单甘酯,最后加

入0.0391g的AIBN和5ml致孔剂,用超声波除气20min,密封,在60℃恒温水浴中,引发聚合反应24h后,便可获得球形的MIPs,然后用食用酒精洗涤,直到洗脱液中检测不出姜酮(根据1.3.1节中公式),然后将颗粒放入干燥箱60℃烘干,备用。不含模拟模板分子的空白聚合物(NIPs),除不加入姜酮外,制备方法同上。

1.3.3 姜酮印迹聚合物对6-姜酚的吸附

取1.3.2节所制得的MIPs(2.56g)和NIPs(3.14g)分别装柱,然后分别用400g鲜姜汁上柱,分别用浓度10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、95%食用酒精洗脱被吸附的姜酚,然后将收集的洗脱液真空浓缩至适量,再用乙醚萃取3次,合并萃取溶液,挥去乙醚得到纯度较高的姜酚提取物。用乙腈定容后HPLC对样品检测。

1.3.4 6-姜酚的测定

色谱柱: Diamonsil C₁₈柱;在波长281nm,使用HPLC,以姜酮作为内标,用水(A)和乙腈(B)为流动相,梯度洗脱程序为:0min, 55% A; 8.00min, 50% A; 15min, 45% A; 40min, 10% A; 45min, 55% A,流速为1ml/min,进样量为10 μl 。根据参考文献^[17],计算出每部分中实际6-姜酚的含量,进而计算出每个洗脱部分所获得6-姜酚占总洗脱量的质量百分数。

2 结果与分析

2.1 蒸馏水和单甘酯对MIPs形状的影响

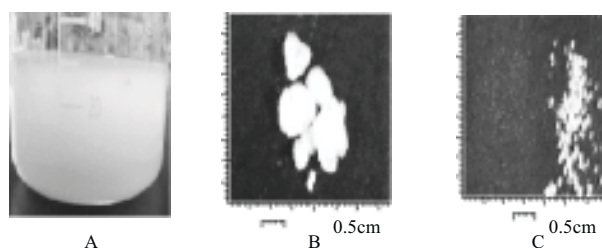


图1 不同条件下合成MIPs外观
Fig.1 Appearance of different MIPs

从图1A可以看出,最终产物为分层的乳状液,没有生成MIPs。在非共价印迹聚合过程中,一般不采用水。因为水的极性大,既是氢键的提供者,也是氢键的受体,因此少量的水就会破坏印迹过程中形成的氢键,另外,水溶性交联剂在水溶液中的刚性差,形成的印迹材料寿命短,重复利用性差^[18]。因此一般不用水作为溶剂。图1B中,在没有水和单甘酯存在条件下,得到结块的MIPs,在其应用过程中需要进行研磨,难以研磨成均一球产品而且过程耗时费力,不适于工业

化生产。合成图1C MIPs时,虽然也与图1A用了相同的水作为溶剂,但由于加入了0.0275g(1%, m/m)单甘酯,大大减小了体系中各种试剂的表面张力,形成了均匀分布的水包油微球,引发剂引发反应时,容易形成大量的球状MIPs。从图1C可以看出,球形大小肉眼可辨(颗粒直径约为0.1cm),基本均匀一致,可以直接应用于工业化提取分离6-姜酚。综合上述分析可知,单纯使用水作为溶剂或者单纯使用有机溶剂的时,都不能形成有工业应用价值的MIPs,但是使用一定量的乳化剂,形成适宜的水包油的乳化体系,可以形成具有工业应用价值的MIPs,至于水和乳化剂的适宜用量还有待进一步研究。比较图1中A、B、C3种MIPs的外观形状后,认为表1C配料适宜于制备具有工业应用价值的MIPs。

2.2 洗脱成分的分析

2.2.1 不同洗脱成分6-姜酚的含量

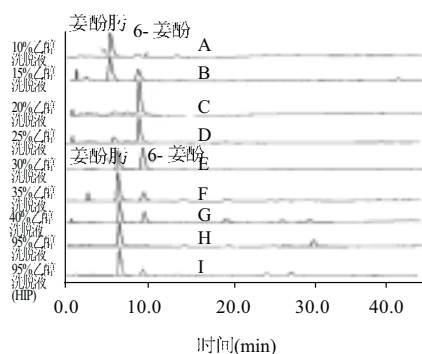


图2 不同乙醇洗脱液的HPLC图谱
Fig.2 HPLC chromatograms of different elution fractions

从图2可以看出:①从A~G,即10%~40%的乙醇洗脱液中都有6-姜酚,说明所获得MIPs从姜汁中吸附了6-姜酚,即MIPs具有吸附姜酚的能力;②虽然A~G均可洗脱6-姜酚,但是洗脱的能力大不相同,其相对洗脱能力是C>D>E>F>G>B>A,即20%乙醇洗脱液>25%乙醇洗脱液>30%乙醇洗脱液>35%乙醇洗脱液>40%乙醇洗脱液>15%乙醇洗脱液>10%乙醇洗脱液;③A~G中不仅6-姜酚的含量不同,而且其纯度也大不相同,A和B在保留时间15min以后有杂峰出现,而C、D(20%与25%乙醇)洗脱液所含的姜酚数量最多而且杂质含量最低。因此利用MIPs提取6-姜酚时,应先用15%的乙醇洗脱后,再用25%的乙醇洗脱,这样6-姜酚的得率约为79.07%(表2);④从A~G的吸附与解析情况看,用姜酮作为模拟模板制备的MIPs与6-姜酚作模板的MIPs有差异,其印记效率明显

低于使用6-姜酚作模板(90%)^[6]但考虑难以获得大量的6-姜酚作为模板,使用姜酮作为模拟模板制备的MIPs,其对6-姜酚的专一选择性也是非常好的,可以作为工业化提取6-姜酚MIPs的模板。

2.2.2 各洗脱液中6-姜酚的含量

表2 6-姜酚在不同乙醇洗脱液中的分布情况
Table 2 Distribution of 6-gingerol in different ethanol solutions

乙醇洗脱液(%)	10	15	20	25	30	35	40	95
6-姜酚的含量(mg)	0.95	3.80	77.19	41.05	14.12	6.65	5.78	0.00
占总量的百分数(%)	0.64	2.54	51.62	27.45	9.44	4.45	3.87	0.00

由图2与表2可以看出,高纯度的6-姜酚主要分布在20%和25%乙醇洗脱液中,占6-姜酚总量的79.07% (m/m),这可能是MIPs对姜酚的吸附作用比较强,乙醇洗脱不易或者洗脱时间不足以洗下所有的6-姜酚,因此在后继的洗脱中仍然出现少量的6-姜酚。

2.3 MIPs对6-姜酚的吸附评估

在实验中,制备的MIPs和NIPs分别为2.56g和3.14g;通过HPLC测定,MIPs吸附的6-姜酚总量大约149.54mg,NIPs吸附的6-姜酚总量约为35.36mg,则MIPs的吸附能力为63.35mg/g,远远大于NIPs的吸附能力为11.26mg/g,因此以姜酮为模拟模板制备的MIPs对6-姜酚具有显著的吸附效果。

3 结 论

利用模拟模板姜酮代替6-姜酚作为模板,在水和乳化剂单甘酯的作用下,合成了球形的MIPs,避免了传统制备方法中研磨、过筛的麻烦,制备的MIPs可以直接上柱,操作简单。所获MIPs对6-姜酚的吸附能力是63.35mg/g,利用15%乙醇洗脱液洗出杂质后,再利用25%乙醇洗脱可以获得约79.07%的6-姜酚。该聚合物对6-姜酚具有良好的识别性和专一性,分离效果好,可以获得高纯度的6-姜酚。

参考文献:

- [1] SINGH G, KAPOOR I P S, SINGH P, et al. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(10): 3295-3302.
- [2] LANTZ R C, CHEN G J, SARIHAN M, et al. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production[J]. Phytomedicine, 2007, 14(2/3): 123-128.
- [3] LEE H S, SEO E Y, KANG N E, et al. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2008, 19: 313-319.
- [4] AGGARWAL B B, SHISHODIA S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer[J]. Biochemical Pharmacology,

- 2006, 71(10): 1397-1421.
- [5] SHUKLA Y, SINGH M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(5): 683-690.
- [6] JOHJI Y, MICHIIKO M, HUANG Q R, et al. The anti-ulcer effect in rats of ginger constituents[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1988, 23(2/3): 299-304.
- [7] LEE H S, KIM S S, KIM G J, et al. Antiviral effect of ingenol and gingerol during HIV-1 replication in MT4 human T lymphocytes[J]. Antiviral Research, 2008, 78(2): A44.
- [8] 王庆利, 何丹, 郑晓冬, 等. 分子印迹技术及应用[J]. 食品科学, 2002, 23(9): 119-122.
- [9] PICHON V, CHAPUIS-HUGON F. Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants: areview [J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 622(1/2): 48-61.
- [10] HENRY O, CULLEN D C, PILETSKY S A. Optical interrogation of molecularly imprinted polymers and development of MIP sensors: a review[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 382(4): 947-956.
- [11] SPEGEL P, SCHWEITZ L, NILSSON S. Molecularly imprinted polymers in capillary electrochromatography: recent developments and future trends[J]. Electrophoresis, 2003, 24(22/23): 3892-3899.
- [12] 艾克白·尔买买提, 萨提瓦里地, 阿不都拉·阿巴斯. 利用分子印迹技术分离植物中的生物碱[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 75-77.
- [13] 刘海峰, 张隼, 柴春彦, 等. 分子印迹技术在食品安全检测领域中的应用[J]. 食品科技, 2007, 28(7): 23-26.
- [14] PICHON V. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1152(1/2): 41-53.
- [15] BYRNE M E, PARK K, PEPPAS N A. Molecular imprinting within hydrogels[J]. Advanced Drug Delivery Reviews. 2002, 54(1): 149-161.
- [16] 黄雪松. 用于提纯6-姜酚的分子印迹聚合物及其制备方法和应用: 中国, 200810027310.7[P]. 2008-09-03.
- [17] 曲翔, 卢晓旭, 黄雪松. 以姜酚为内标测定生姜及其制品中 6-姜酚的含量[J]. 食品与发酵工业. 2007, 33(6): 123-125.
- [18] BERGMANN N M, PEPPAS N A. Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins[J]. Progress in Polymer Science, 2008, 33(3): 271-288.