

# 苯硼酸修饰材料在多糖类物质纯化分离中的应用研究进展

王诗雪<sup>a</sup>, 王庆仙<sup>a</sup>, 齐冬梅<sup>b</sup>, 程肖蕊<sup>a\*</sup> (山东中医药大学, a.中医药创新研究院, b.实验中心, 济南 250355)

**摘要:** 目的 对苯硼酸修饰材料在多糖类物质纯化分离的应用进行总结与归纳, 期望为多糖类物质纯化分离研究提供参考。方法 以“苯硼酸”“修饰材料”“多糖”“纯化分离”为检索词, 检索中国知网、万方文献数据库和 PubMed 数据库, 归纳、分析和总结苯硼酸修饰材料在多糖类物质纯化分离的应用。结果 苯硼酸修饰材料用于多糖类物质纯化分离具有特异性强、效率高的优点。结论 苯硼酸修饰材料为多糖类物质纯化分离提供了新思路。

**关键词:** 苯硼酸; 修饰材料; 多糖; 纯化分离

中图分类号: R945 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2024)15-2147-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20230865

引用本文: 王诗雪, 王庆仙, 齐冬梅, 等. 苯硼酸修饰材料在多糖类物质纯化分离中的应用研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(15): 2147-2155.

## Research Progress on the Application of Phenylboric Acid Modified Materials in the Purification and Separation of Polysaccharide Substances

WANG Shixue<sup>a</sup>, WANG Qingxian<sup>a</sup>, QI Dongmei<sup>b</sup>, CHENG Xiaorui<sup>a\*</sup> (Shandong University of Chinese Medicine, a.Chinese Medicine Innovation Research Institute, b.Experimental Center, Jinan 250355, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To summarize the application of phenylboric acid modified materials in the purification and separation of polysaccharides, hoping to provide reference for the purification and separation of polysaccharides. **METHODS** Used "phenylboric acid" "modification material" "polysaccharide" and "purification and separation" as search terms, China National Knowledge Internet, Wanfang Literature database and PubMed database were searched to analyze and summarize the application of phenylboric acid modification materials in the purification and separation of polysaccharides. **RESULTS** Phenylboric acid modified material has the advantages of strong specificity and high efficiency in the purification and separation of polysaccharides. **CONCLUSION** Phenylboric acid modified material provides a new idea for purification and separation of polysaccharides.

**KEYWORDS:** phenylboric acid; modified materials; polysaccharide; purification and separation

多糖类物质包括糖蛋白、糖脂、多糖等, 多糖类物质中存在大量的顺式邻二醇结构。研究发现多糖类物质具有抗肿瘤、抗病毒、抗衰老、抗氧化、抗凝血等重要生物活性<sup>[1]</sup>。多糖类物质广泛分布于动物及植物中<sup>[2]</sup>, 为了提取获得多糖类物质需要将其与树胶、鞣质、色素和黏液质等其他物质进行分离, 为了获得纯化的多糖类物质还需要将不同相对分子质量的多糖类物质进行分离。常见的多糖物质纯化分离方法有分步沉淀法、盐析法、透析法、纤维素阴离子交换层析法、凝胶柱色谱等<sup>[3]</sup>, 这些方法在一定程度上解决了实际中存在的问题, 但也存在分离过程繁琐, 获得的多糖类物质纯度不高等问题, 亟需研究新的分离纯化方法。基于苯硼酸及其衍生物可以与含有顺式邻二

醇结构的分子发生可逆结合/解离, 苯硼酸修饰材料在多糖类物质纯化分离中越来越受到人们的广泛关注。因此, 本文对近年来苯硼酸修饰材料在多糖类物质纯化分离中的应用研究进展进行综述, 为今后该领域的持续研究和发展提供参考。

### 1 苯硼酸

苯硼酸是一种小分子有机化合物, 分子式为  $C_6H_7BO_2$ , 相对分子质量为 121.93。苯硼酸可以与含有顺式邻二醇结构的分子发生可逆结合/解离, 这一特性使其在含邻二醇结构分子的富集和分离中得到了广泛应用。在色谱分离法中, 将苯硼酸及其衍生物单体引入固定相后对多糖、糖脂、核苷酸等物质具有较好的分离效果<sup>[4]</sup>。

苯硼酸亲和作用来源于苯硼酸配体和顺式邻

**基金项目:** 山东省自然科学基金青年基金项目 (ZR2021QH271); 西藏自治区科技计划重点研发计划项目 (XZ202201ZY0026G); 中央引导地方科技发展专项资金 (YDZX2023003)

**作者简介:** 王诗雪, 女, 硕士生 E-mail: 2807706614@qq.com

**\*通信作者:** 程肖蕊, 女, 博士, 博导, 研究员 E-mail: cxr916@163.com

二醇化合物之间可逆的结合/解离作用，机制见图1，当反应体系 pH 大于苯硼酸的 pKa 值时，苯硼酸主要以硼酸阴离子的形式存在，可与顺式 1,2 或者 1,3 二醇结合生成五元或六元环酯；当反应体系的 pH 值小于苯硼酸的 pKa 值，苯硼酸由硼酸阴离子转变为硼酸基团，苯硼酸-顺式邻二醇配合物发生解离，达到选择性富集分离的目的<sup>[5]</sup>。

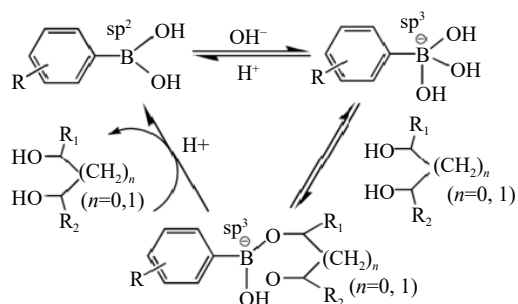


图1 取代苯硼酸和顺式 1,2 或者 1,3 二醇化合物之间的结合/解离示意图<sup>[5]</sup>

Fig. 1 Schematic diagram of binding/dissociation between substituted phenylboronic acid and *cis*-1,2 or 1,3 diol compounds<sup>[5]</sup>

## 2 苯硼酸修饰材料在多糖类物质纯化分离中的应用

多糖类物质结构复杂，分离纯化技术还存在很多不足。随着对该领域的不断研究，硼酸亲和材料能够与含有 1,2 或 1,3 二醇结构物质特异性结合，使得硼亲和材料在多糖类物质纯化分离中越来越受到人们的广泛关注。科学家开发出一系列硼亲和材料，例如硼亲和温敏材料、硼亲和纳米材料、硼亲和大孔整体柱、硼亲和分子印迹聚合物、硼亲和介孔材料等，见图2。

### 2.1 硼亲和温敏材料

随着对温敏材料的不断研究，硼亲和温敏材料在生物分离方面也有了应用，见表1。王赞等<sup>[6]</sup>利用可逆加成断裂链转移聚合反应合成了一种新型苯硼酸功能化温敏性嵌段聚合物 PEG<sub>113</sub>-b-PVBA<sub>49</sub>-b-PNIPAM<sub>105</sub>，通过调节 pH 来控制与黄芪多糖的结合和解离，共聚物通过控制温度可有效分离不同相对分子质量的黄芪多糖。实验选择 28、32、36、40 °C 作为沉淀温度，用三嵌段共聚

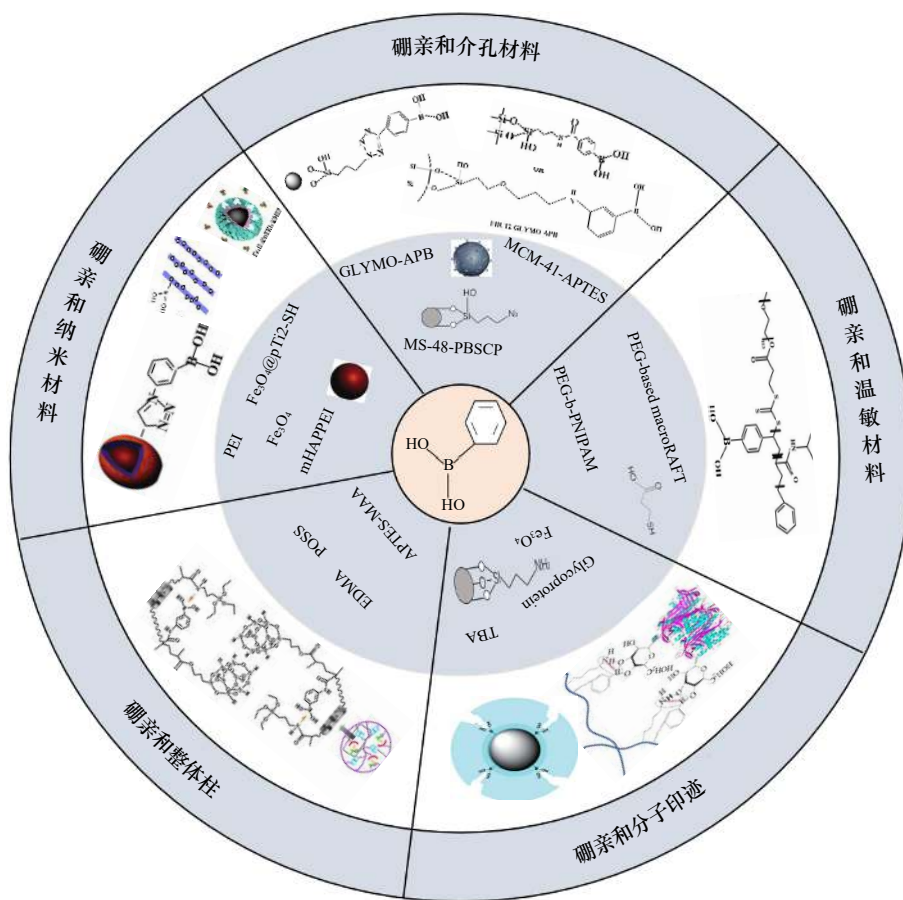


图2 5 种类型硼亲和材料

Fig. 2 Five types of boron affinity materials

表 1 用于多糖类物质纯化分离的苯硼酸修饰材料

Tab. 1 Phenyl boric acid modified materials used for purification and separation of polysaccharides

类型	制备原理	应用场景	特点
硼亲和和温敏材料	可逆加成断裂链转移	催化作用/药物输送/生物分离等方面/生物医学 (药物分析检测和传递、核酸适配体筛选、疾病检测等方面的应用)	环境温度 $\leq$ 低临界溶解温度, 溶解度较高 环境温度 $\leq$ 低临界溶解温度, 溶解度降低, 沉淀析出
硼亲和和纳米材料	共价接枝法	生物分离/生物医学 (改善肿瘤的免疫微环境, 抑制肿瘤的发转移。药物分析检测和传递、核酸适配体筛选、疾病检测等方面的应用)	易分离、吸附力强、成本低、易制备、生物相容性好等
硼亲和和整体柱	原位自由基聚合法	生物分离/生物医学	制备简单、通透性好、柱压低、优良的分 离效能、速度快等
硼亲和和分子印迹	分子印迹所构筑选择性空腔	色谱分离、固相萃取、仿生传感、模拟酶催化、临床药物分析等	预定性、可识别性、实用性等
硼亲和和介孔材料	接枝法/催化点击化学法	生物分离/生物医学	比表面积高、孔尺寸可调控、孔径大等

物控温分级沉淀出黄芪多糖 ASP1、ASP2、ASP3、ASP4。PEG<sub>113</sub>-b-PVBA<sub>49</sub>-b-PNIPAM<sub>105</sub> 与黄芪多糖最佳结合 pH 为 8, 最佳解离 pH 为 4, 结合和解离的时间均为 30 min 为最优条件。在该沉淀温度下通过凝胶渗透色谱法分别测得 ASP1、ASP2、ASP3、ASP4 的数均分子量 (Mn) 分别为 467 561、352 894、71 268、6 974, 该研究表明, 苯硼酸功能化温敏性嵌段聚合物 PEG<sub>113</sub>-b-PVBA<sub>49</sub>-b-PNIPAM<sub>105</sub> 可以有效分离多糖类物质。吴雅娇等<sup>[7]</sup> 构建了 17R4-盐双水相体系与 d-PBA-GO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI 磁性材料温敏双水相萃取体系, 在辣根粗提液中吸附辣根过氧化物酶, 设置吸附温度 35 °C、吸附时间 60 min, 计算得到辣根过氧化物酶的提取效率为 (70.30±2.08)%, 纯化因子为 1.92, 比活力为 28.93 U·mg<sup>-1</sup>, 成功实现辣根过氧化物酶的选择性分离。

## 2.2 硼亲和和纳米材料

磁性纳米材料是具有巨大发展潜力的新型材料, 具有易分离、吸附力强、成本低、易制备、生物相容性好等特点。纳米材料广泛应用于生物学、磁化学、物理学等。将苯硼酸及其衍生物修饰到磁性纳米材料, 使其在顺式邻二醇化合物分离纯化中也有了应用, 见表 1。

硼酸亲和材料作为提取、分离和富集糖蛋白的高效吸附剂, 近年来受到越来越多的关注。Li 等<sup>[8]</sup> 提出了一种高硼酸亲水性材料, 聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 辅助硼酸功能化磁性纳米颗粒 (magnetic nanoparticles, MNPs)。硼酸亲和性 MNPs 对糖蛋白表现出较高的结合亲和力, 解离常数达到 10<sup>-6</sup>~10<sup>-7</sup> M。用 PEIPBA-MNPs 从人唾液中选择性富集微量糖蛋白, 样品中共鉴定出

6 个糖蛋白。通过对人唾液中微量蛋白的选择性富集, 证明了其实际应用的可行性。

除了 PEI 外, Li 等<sup>[9]</sup> 还合成了一种用于选择性富集糖蛋白的新型双功能化磁性金属有机框架纳米颗粒 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@UiO-PBA。所制备的纳米颗粒在生理状态 (pH 7.4) 下对辣根过氧化物酶的吸附量达到 530.79 mg·g<sup>-1</sup>。此外, 该纳米颗粒在重复使用 6 次后仍具有优异的富集性能。Luo 等<sup>[10]</sup> 通过外延生长和多配体策略制备了一种新型硼酸官能化的磁性共价有机骨架, 具有亲水性强、介孔通道、磁响应快、比表面积大等特点。纳米复合材料在识别完整 N-糖肽方面表现出极高的性能。应用该材料, 从大鼠肝组织中共鉴定出 1 921 种糖蛋白的 1 154 种独特的完整糖肽, 还成功应用于健康个体和肾衰竭患者中富集外泌体的完整糖肽, 为糖蛋白组学样品制备中使用协同亲和策略的材料设计提供了新理念。Zheng 等<sup>[11]</sup> 合成了一种磁性微球 acid-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@polydopamine (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA-PBA), 合成机制见图 3。研究发现, 在相同浓度 (1 000 µg·mL<sup>-1</sup>) 下, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA-PBA 磁性微球对糖蛋白卵清蛋白和过氧化氢酶的吸附量分别达到 160、140 mg·g<sup>-1</sup>, 是非糖蛋白溶菌酶、肌红蛋白、核糖核酸酶 A 和牛血红蛋白 (分别为 25、57、47、20 mg·g<sup>-1</sup>) 的 3~8 倍。结果表明了, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA-PBA 对糖蛋白具有良好的选择性。

Sun 等<sup>[12]</sup> 将含有苯硼酸基团的印迹聚合物添加到多孔 TiO<sub>2</sub> 涂层的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 微球表面, 合成了一种新的纳米材料 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@pTiO<sub>2</sub>@MIP。花朵状的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@pTiO<sub>2</sub> 作为支撑材料, 为该纳米材料提供了更多的结合位点。此外, Ti(IV) 的强吸电子效

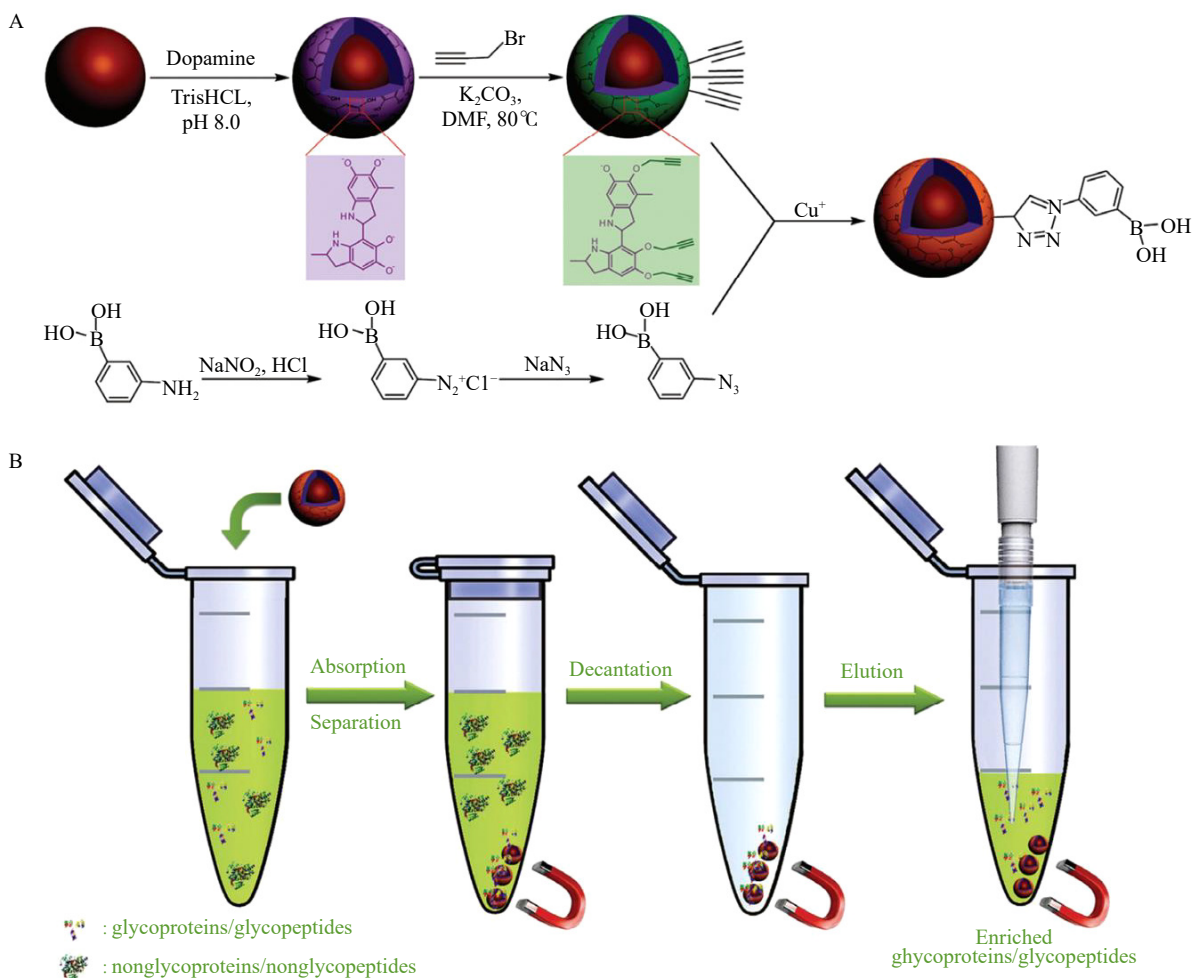


图3  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PDA-PBA 磁性微球的点击合成(A)和使用  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PDA-PBA 磁性微球糖蛋白/糖肽的富集过程(B)<sup>[11]</sup>  
**Fig. 3** Click synthesis of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PDA-PBA magnetic microspheres(A) and enrichment of glycoproteins/glycopeptides using  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @PDA-PBA magnetic microspheres(B)<sup>[11]</sup>

应赋予了硼酸在较宽 pH 范围 (6.0~9.0) 内对糖蛋白较好的亲和力。上述研究为该材料更广泛地应用于糖蛋白和相关的糖基化合物的分析奠定了基础。

Dou 等<sup>[13]</sup> 利用磁性的纳米颗粒内核, 通过在其表面包裹苯硼酸修饰的聚丙烯酸高分子网络链, 制备得到多功能磁性纳米材料 (APBA-PAA-MNPs), 该多功能磁性纳米材料的结构示意图见图 4。该材料不仅具有常规磁性材料在分离方面的基本优势, 还能提供三重预先设计的先进功能: ①尺寸排阻效应, 去除高相对分子质量蛋白质的干扰; ②对低相对分子质量糖蛋白的选择性萃取; ③保护捕获到的低相对分子质量糖蛋白不被降解和污染。为了考察 APBA-PAA-MNPs 在复杂环境中对低相对分子质量糖蛋白的富集能力以及尺寸排阻阈值和 PAA 链长的关系, Dou 等<sup>[13]</sup> 利用 nano-LC-MS/MS 分析了不同链长 PAA 修饰的

APBA-PAA-MNPs 从 HRP 酶产物中富集肽段, 发现聚合物链长或所用 PAA 的相对分子质量在确定蛋白质的相对分子质量阈值时起着关键作用。

### 2.3 硼亲和整体柱

整体柱是一种通过聚合反应形成的同质固定相, 多在毛细管内聚合, 形成毛细管整体柱。与传统的颗粒填充柱相比, 整体柱具有独特的性能, 如低背压、高传质率和易于制备, 使整体柱更具吸引力<sup>[14]</sup>。按照整体柱材质不同, 分为有机聚合物整体柱和有机-无机杂化整体柱, 见表 1。

**2.3.1 有机-无机杂化整体柱** 硼亲和和有机-无机杂化整体柱具有制备简单、pH 适用范围宽、柱效高等特点, 成为近几年研究的重点对象。Yang 等<sup>[15]</sup> 利用四氧甲基硅烷和乙烯基三甲氧基硅烷作为硅烷前躯体, 3-丙烯酰胺苯硼酸作为有机单体, 采用“一锅法”合成有机-无机杂化基质的硼酸亲和整体柱, 3-丙烯酰胺苯硼酸的加入使该硼酸亲和整体

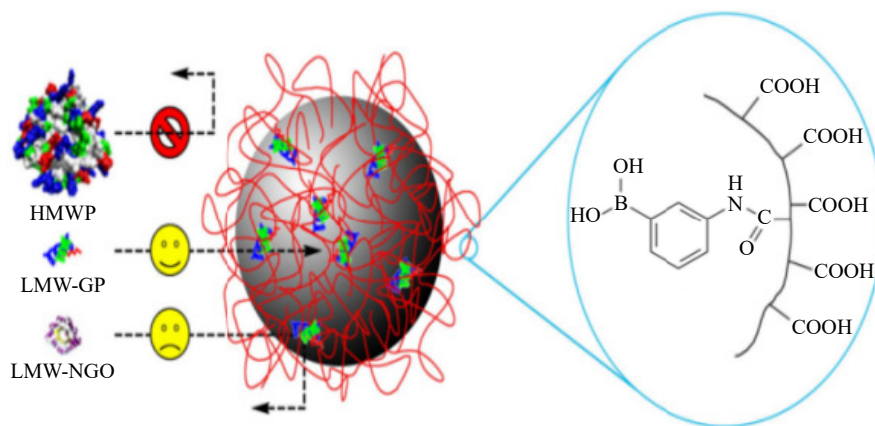


图4 APBA-PAA-MNPs 的尺寸排阻效应和聚合物链的结构示意图<sup>[13]</sup>

Fig. 4 APBA-PAA-MNPs size exclusion effect and schematic diagram of polymer chain structure<sup>[13]</sup>

柱在中性和生理 pH 下对含顺式二醇的小分子和糖蛋白(包括腺苷、辣根过氧化物酶、转铁蛋白和卵清蛋白)均具有良好的亲和性。在 pH7.0 条件下,对卵清蛋白的结合能力达到  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。为了进一步验证整体柱分离富集的能力, Yang 等<sup>[15]</sup> 将其用于牛血清中转铁蛋白的分离,进一步验证了有机-无机杂化硼酸亲和整体柱对含有顺式二醇类物质表现出特异的结合能力。

**2.3.2 有机聚合物整体柱** 制备硼亲和有机聚合物整体柱的过程相对简单,通常单体混合物及交联剂注入到空管柱中,紫外光使单体混合物聚合,获得多孔聚合物材料。Zhou 等<sup>[16]</sup> 通过原位聚合法制备了一种新型硼酸盐亲和和毛细管整体柱(AAPBA-co-eg-co-EDMA)。该材料中含有亲水性大分子单体低聚(乙二醇)甲醚甲基丙烯酸甲酯(OEG),增加了聚合物材料的亲水性。通过聚合物整体柱微萃取法对辣根过氧化物酶和卵清蛋白的提取性能进行测试,与相应的无 OEG 硼酸整体柱相比,辣根过氧化物酶和卵清蛋白的回收率分别提高到 97.51% 和 93.97%(RSD<5.0%),提高了 30.0% 以上。结果表明,将亲水性大单体引入硼酸材料是提高硼酸亲和层析对糖蛋白亲和力的有效方法。Wang 等<sup>[17]</sup> 利用聚醚醚酮合成了一种含氧化石墨烯的聚乙烯苯硼酸-乙二醇二甲基丙烯酸酯[poly(VPBA-EGDMA-GO)] 整体柱材料。将标准浓度非糖蛋白牛血清白蛋白/标准浓度糖蛋白辣根过氧化物酶=20 的浓度比混合在一起,然后将混合溶液直接注入 SPME-HPLC 系统进行分析,可以检测到辣根过氧化物酶的峰值,而牛血清白蛋白的峰值几乎不可见。结果表明,聚 VPBA-EGDMA-GO 整体柱对糖蛋白具有良好的特异性。

Liu 等<sup>[18]</sup> 合成了一种以 4-(3-丁烯基硼基)苯硼酸为功能单体、*N,N*-亚甲基双丙烯酰胺为交联剂,采用原位自由基聚合法合成了 poly(BSPBA-co-MBAA) 亲和整体柱。3-丁烯基硼基的吸电子作用降低了苯硼酸基团的 pKa 值<sup>[19]</sup>,研究发现,在 pH 值为 7.0 时整体毛细管能够捕获核苷、糖蛋白核糖核酸酶 B 和卵白蛋白,而非顺式二醇类似物脱氧腺苷和核糖核酸酶 A 则未被捕获。该亲和整体柱毛细管在中性 pH 下对顺式二醇大分子表现出强亲和力和优良特异性,实现了对糖蛋白和核苷的分离和富集。Huang 等<sup>[20]</sup> 将苯硼酸和磷酸引入整体柱,合成一种新型双功能聚合物整体柱(EDMA-co-VPBA-co-VPA)。基于硼酸和固定金属的双重亲和性,该材料通过切换不同的流动相可调节和特异性富集糖蛋白和磷酸蛋白。色谱分析表明,该聚合物整体柱对糖蛋白辣根过氧化物酶或  $\beta$ -酪蛋白的结合能力比非糖蛋白牛血清白蛋白的结合能力高 4 倍。

Shen 等<sup>[21]</sup> 制备了一种新型 APTES-MAA/POSS 硼酸亲和整体柱,见图 2,利用 APTES-MAA/POSS 单体的协同作用来提高硼酸亲和整体柱对糖蛋白的良好亲和力和选择性。与相应无 APTES-MAA/POSS 整体柱相比,新硼酸盐材料从复杂样品中的糖蛋白回收率提高了 1.7 倍。此外,500 倍稀释血清样品中的糖蛋白也可以被 APTES-MAA/POSS 硼酸亲和整体柱富集。

## 2.4 硼亲和分子印迹

分子印迹技术是利用分子印迹聚合物模拟酶-底物或抗体-抗原之间的特异性结合,对印迹分子(也称模板分子)进行专一识别的技术,见表 1。该

技术具有预定性, 可识别性和实用性等特点<sup>[22]</sup>, 使其在许多领域得到广泛应用。将硼亲和策略与分子印迹技术相结合, 使硼亲和分子印迹技术具有印迹效率高、亲和力强以及 pH 调控的结合与释放等优势, 被广泛应用于含有顺式二醇配基分子的分离与富集<sup>[23]</sup>。

基于硼酸亲和力的分子印迹材料具有优异的选择性和吸附能力。Wang 等<sup>[24]</sup>设计了一种具有硼酸亲和力的磁性纳米颗粒分子印迹策略 (MNPs@MIP), Scatchard 分析得到的数据显示, MNPs@MIP 表面存在 2 个高亲和力和低亲和力的结合位点, 而非印迹颗粒 MNPs@NIP 表面只发现了低亲和力的结合位点。研究发现 MNPs@MIP 与 MNPs@NIP 相比, 具有较高的印记效应, 印迹因子为 10.96, 表明了该材料对糖蛋白具有更好的选择性。Hu 等<sup>[25]</sup>设计合成了一种三明治结构的硼酸盐亲和和传感器, 通过磁性分离和表面增强拉曼散射探针分离和检测糖蛋白。该传感器依赖具有 pH 响应的硼酸亲和磁性分子印迹聚合物 (magnetic molecularly imprinted polymer, MMIPs) 作为糖蛋白的“捕获探针”。MMIP 确保了特定和快速的分析, 表面增强拉曼散射检测提供了高灵敏度, 对辣根过氧化物酶和酸性磷酸酶的检测限分别为 0.053、0.078 ng·mL<sup>-1</sup>。最终, 该方法成功应用于检测加标血清样本中的糖蛋白, 回收率分别为 90.6% 和 103.4%。

随着生命科学的快速发展, 许多疾病的生物标志物都是低丰度蛋白质, 如糖蛋白, 其数量少, 但对生物体具有重要意义, 因此开发新的技术来快速、准确地分析和鉴定糖蛋白非常迫切。Zhu 等<sup>[26]</sup>设计合成了一种硼酸盐亲和和磁性分子印迹聚合物 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PGMA-TBA/MIPs), 见图 2, 用于在 pH 7.4 时选择性分离糖蛋白。首先通过 1,6-六亚甲基二胺与 3-氨基苯硼酸之间的硼-氮配位形成了一组硼酸亲和物 (TBA), 然后通过开环反应将其固定在磁性聚甲基丙烯酸甘油酯 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PGMA) 表面, 最后加入模板糖蛋白卵清蛋白, 自聚合形成印迹层。Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PGMA-TBA/MIPs 不仅对卵清蛋白表现出优异的特异性识别印迹因子为 7.51, 而且对卵清蛋白吸附容量达到 230.8 mg·g<sup>-1</sup>, 该工作为生物医学领域在生理 pH 下特异性开发分离糖蛋白的可控分子印迹材料开辟了一条通用路线。Li 等<sup>[27]</sup>以 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au 多功

能纳米纤维为核心材料, 分别用苯胺、3-氨基苯硼酸和丙烯酸对其进行连续改性, 引入硼酸和可聚合双键。以标准糖蛋白辣根过氧化物酶作为模板, 在多功能纳米纤维表面利用自由基诱导单体接枝共聚合成了蛋白质印迹薄膜。合成的分子印迹聚合物印迹因子高达 7.80, 吸附容量高达 38 mg·g<sup>-1</sup>。

为了进一步提高分子印迹聚合物与糖蛋白的结合能力, Li 等<sup>[28]</sup>设计合成硼酸亲和分子印迹系统用于分离糖蛋白, 合成机制见图 5, 首先将模板分子与单体 (4-vinylphenylboronic acid, VPBA) 加入到 pH ≥ 8.0 的致孔剂溶液中, 模板分子和单体通过硼酸酯键形成自组装形成共价复合物, 再加入交联剂和光引发剂形成预聚合物溶液, 紫外光 UV 引发聚合反应得到印迹聚合物。在 pH < 3 的酸性溶液中模板将从印迹聚合物中解离出来, 留下与模板相对应的三维印记空腔。研究发现所制备的 MIP 在 pH=6 的环境下对模板分子辣根过氧化物酶、核糖核酸酶 B、甲胎蛋白、转铁蛋白和抗

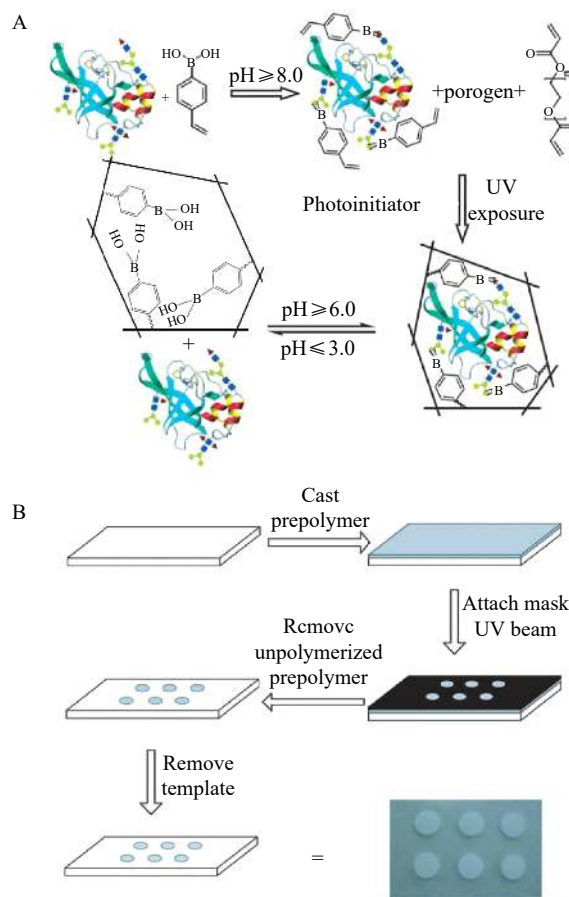


图 5 硼酸盐亲和分子印迹原理 (A) 和过程 (B)<sup>[28]</sup>  
**Fig. 5** Principle (A) and process (B) of borate affinity molecular imprinting<sup>[28]</sup>

AFP 单克隆 IgG(抗 AFP)有良好的亲和力, 印迹效率为 41%, 印迹因子为 9.1, 这些数据表明该聚合物具有较高的印迹性能。

## 2.5 硼亲和和介孔材料

介孔材料是指孔径在 2~50 nm 的一类材料, 具有比表面积高、大孔容、高装载量、易于修饰等特点<sup>[29]</sup>, 被广泛用于生物分子的分离中, 由于大量硅羟基附着于介孔硅材料表面, 因此易于被硼亲和修饰, 见表 1。

为了从生物基质中富集和分离含顺式二醇的化合物, Fu 等<sup>[30]</sup>采用一步法制备了苯硼酸改性的磁性介孔二氧化硅 (MS-48-PBSC), 见图 2。MS-48-PBSC 对含有顺式二醇结构化合物腺苷、黄嘌呤、尿苷、唾液酸和黄芩苷的吸附能力分别达到了 0.60、0.51、0.42、0.75、1.26 mg·g<sup>-1</sup>, 对顺式二醇结构化合物的选择性较高, 能够满足顺式二醇结构物质的分离富集要求。为了实现和满足高效且特异性富集糖肽的目的, Xu 等<sup>[31]</sup>设计了以介孔二氧化硅 FDU12 为基体, 通过接枝法合成了新型介孔硼酸功能化二氧化硅 FDU-12-GA, 用于糖肽的富集。MALDI 质谱分析结果显示 FDU-12-GA 可以从 5 ng·μL<sup>-1</sup> 辣根过氧化物酶消化液中富集出 4 种糖肽, 表明其结合的高效性。除了辣根过氧化物酶, Xu 还用了 FDU-12-GA 对另外 3 种

胰蛋白酶蛋白(胎蛋白、转化酶和去唾液酸胎球蛋白) 对进行富集, 结果表明不同模型蛋白的糖肽都被成功富集, 说明 FDU-12-GA 在糖肽特异性富集方面具有很大的优势。

“点击化学”具有选择性高、条件温和等特点<sup>[32]</sup>。张丽媛等<sup>[33]</sup>采用基于叠氮基-氰基的无铜催化点击化学法合成新型苯硼酸亲和硅胶 (triazocyanide boronic acid, TCNBA) 将辣根过氧化物酶、免疫球蛋白 G、核糖核酸酶 B 3 种糖蛋白均与牛血清白蛋白分别按照 1:1、1:10、1:20 的物质的量比混合, 将混合物富集前的条带与富集后对应的条带相比发现不仅去除了非糖蛋白牛血清白蛋白而且基本完全保留了糖蛋白辣根过氧化物酶、免疫球蛋白 G、核糖核酸酶 B, 这表明 TCNBA 用于富集糖蛋白具有较高的选择性。

血清中内源性糖肽的特异性分析高度倾向于疾病生物标志物的发现, 但是由于糖肽丰度相对较低, 血清蛋白的高动态范围, 低分子蛋白质的传统样品制备技术的不足等原因, 对内源性糖肽的研究还未有实质性的进展。Liu 等<sup>[34]</sup>采用接枝法合成了一种高度有序的硼酸功能化介孔二氧化硅 (MCM-41-APTES-CPB), 以克服目前糖肽类研究方法的局限性。制备方法和大鼠类源性糖肽富集流程, 见图 6。硼酸功能化介孔二氧化硅在糖肽/

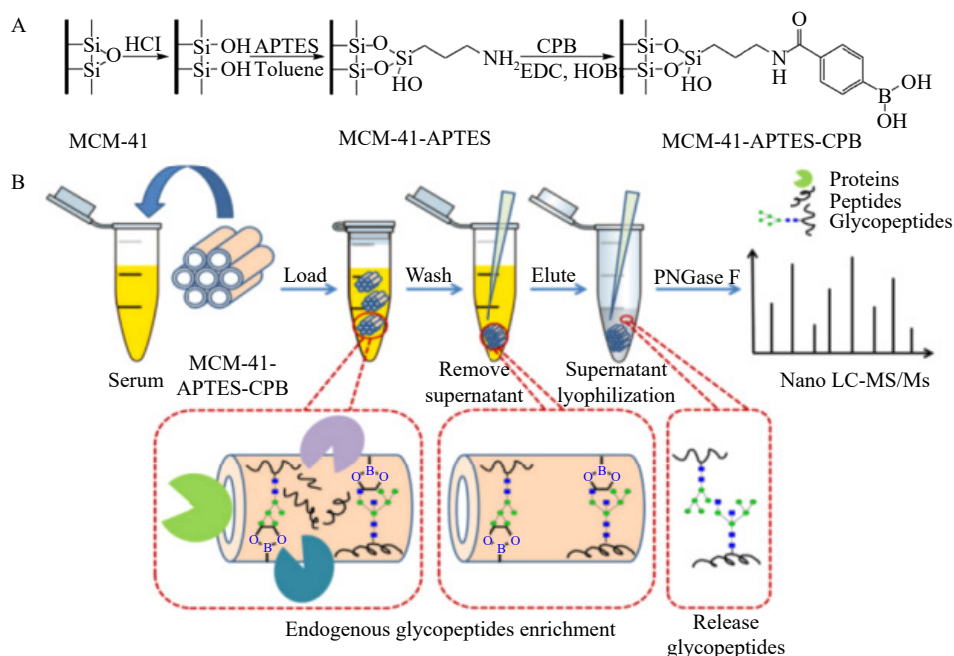


图 6 硼酸功能化介孔二氧化硅 MCM-41 的制备方法 (A) 和大鼠血清内源性糖肽类富集后纳米 LC-MS/MS 检测流程 (B)<sup>[34]</sup>  
**Fig. 6** Preparation method of boric acid functionalized mesoporous silica MCM-41(A) and Nanoscale LC-MS/MS detection process after concentration of endogenous glycopeptides in rat serum (B)<sup>[34]</sup>

非糖肽摩尔比为 1 : 100 时表现出优异的选择性, 检测限为 fmol 水平, 结合能力为  $0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 4 糖肽富集后回收率高达 88.10%, 具有非常好的富集性能。

### 3 总结与展望

随着苯硼酸修饰材料领域的不断发展, 以及生物样品分离的需要, 基于苯硼酸与含邻二醇结构分子特异性结合的特点, 硼亲和材料在多糖类物质纯化分离中的应用具有广阔的前景。目前用于多糖类物质纯化分离中的硼亲和材料有硼亲和温敏材料、纳米材料、介孔材料、整体柱、分子印迹等。

硼亲和温敏材料, 通过控温沉淀可以有效分离不同相对分子质量的多糖类物质, 而且纯度更高。该方法已被证明是一种绿色有前景的新方法, 随着生物样品分离的需要, 开发一种特异性聚合物, 可在不同体系相应的不同目标物实现同时富集多种目标物的高效分离, 也成为了该材料不断拓展的新需求。硼亲和纳米材料因其具有易分离、成本低、易制备、生物相容性好等特点。在分离富集糖蛋白/糖肽存在独特的优势, 但是硼亲和纳米材料结合能力普遍较弱, 基于此开发一种高结合力的硼亲和纳米材料尤为必要。与传统的填充柱相比, 整体柱采用原位聚合, 具有高容量、传质快、柱效高等优点, 将整体柱用于糖蛋白的分离富集研究在近年来得到了快速发展, 尽管整体柱具有诸多的优点, 但依然存在着制备复杂、使用寿命短等缺点。因此开发更稳定、选择性更高的整体柱仍是当前的研究重点。硼亲和介孔材料由于独特的介孔结构和丰富的硼酸基团覆盖内表面的尺寸排斥效应赋予了内源性糖肽富集的优越能力, 可作为临床诊断的潜在生物标志物。硼亲和分子印迹技术的迅速发展, 尤其是对核苷酸、糖蛋白、细胞和细菌识别及富集中具有显著的优势。但是该技术仍存在很多不足之处, 在制备过程中仍需加入有毒有害试剂(过硫酸铵、氟化钠等)。此外, 适用于硼亲和可控定向表面分子印迹的印迹体系较少, 开发更多精准可控且生物相容性好的印迹体系同样是该技术的重要发展方向<sup>[35]</sup>。

随着研究的不断深入, 硼亲和材料今后将在更为复杂生物样品分离/富集中发挥更大的作用。

### REFERENCES

- [1] LI C L, WANG W, ZHANG Y, et al. Research progress on extraction, separation and purification methods of polysaccharide from traditional Chinese medicine[J]. *China Pharm(中国药房)*, 2016, 27(19): 2700-2703.
- [2] ZHANG J, LI Q, ZHOU Y Y. Research progress on the mechanism of traditional Chinese medicine polysaccharide in preventing and treating Alzheimer's disease[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2022, 53(23): 7553-7565.
- [3] ZHU F R. Summary of extraction and purification technology of polysaccharide from traditional Chinese medicine[J]. *Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志)*, 2011, 31(12): 1016-1018.
- [4] XU D, CHU L Y. Research progress in the application of phenylboronic acid and its derivatives in medicine and chemical industry[J]. *Chem Ind Eng Prog(化工进展)*, 2006, 25(9): 1045-1048.
- [5] LI D J, CHEN Y, LIU Z. Boronate affinity materials for separation and molecular recognition: Structure, properties and applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(22): 8097-8123.
- [6] WANG Y, AO W, CUI X, et al. Amphiphilic temperature-sensitive block polymer base on phenylboronic acid and preparation method and application thereof: CN110669186B[P]. 2021-10-12.
- [7] WU Y J, XING Y Y, HAN J, et al. An integrated method combining aqueous two-phase extraction and boric acid affinity adsorption for separation and purification of horseradish peroxidase from horseradish roots[J]. *Food Sci(食品科学)*, 2022, 43(2): 55-61.
- [8] LI D J, BIE Z J. Branched polyethyleneimine-assisted boronic acid-functionalized magnetic nanoparticles for the selective enrichment of trace glycoproteins[J]. *Analyst*, 2017, 142(23): 4494-4502.
- [9] LI S T, QIN Y R, ZHONG G Q, et al. Highly efficient separation of glycoprotein by dual-functional magnetic metal-organic framework with hydrophilicity and boronic acid affinity[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(33): 27612-27620.
- [10] LUO B, LI G H, LI Z Y, et al. Construction of a magnetic covalent organic framework with synergistic affinity strategy for enhanced glycopeptide enrichment[J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(32): 6377-6386.
- [11] ZHENG J N, LIN Z A, ZHANG L, et al. Polydopamine-mediated immobilization of phenylboronic acid on magnetic microspheres for selective enrichment of glycoproteins and glycopeptides[J]. *Sci China Chem*, 2015, 58(6): 1056-1064.
- [12] SUN X Y, MA R T, CHEN J, et al. Magnetic boronate modified molecularly imprinted polymers on magnetite microspheres modified with porous  $\text{TiO}_2$  ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @pTiO<sub>2</sub>@MIP) with enhanced adsorption capacity for glycoproteins and with wide operational pH range[J]. *Mikrochim Acta*, 2018, 185(12): 565.
- [13] DOU P, XIANG Y M, LIANG L, et al. Preparation of multi-functional magnetic nanoparticles for harvesting low-molecular-weight glycoproteins[J]. *Chin J Chromatogr*, 2021, 39(10): 1102-1110.

- [14] YANG Q, HUANG D H, JIN S X, et al. One-step synthesis of an organic-inorganic hybrid boronate affinity monolithic column with synergistic co-monomers[J]. *Analyst*, 2013, 138(17): 4752-4755.
- [15] YANG F, MAO J, HE X W, et al. Synthesis of boronate-silica hybrid affinity monolith via a one-pot process for specific capture of glycoproteins at neutral conditions[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(21): 6639-6648.
- [16] ZHOU X J, MO C E, CHEN M, et al. Improving affinity of boronate capillary monolithic column for microextraction of glycoproteins with hydrophilic macromonomer[J]. *J Chromatogr A*, 2018(1581/1582): 8-15.
- [17] WANG R, CHEN Z. Boronate affinity monolithic column incorporated with graphene oxide for the in-tube solid-phase microextraction of glycoproteins[J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(13): 2767-2773.
- [18] LIU Y C, REN L B, LIU Z. A unique boronic acid functionalized monolithic capillary for specific capture, separation and immobilization of cis-diol biomolecules[J]. *Chem Commun*, 2011, 47(17): 5067-5069.
- [19] BAO J M, YAN Z Y, LI Y X. Research progress in boronate affinity materials[J]. *Chemistry(化学通报)*, 2018, 81(5): 394-401.
- [20] HUANG H, ZHENG Q, HE Y T, et al. Facile synthesis of bifunctional polymer monolithic column for tunable and specific capture of glycoproteins and phosphoproteins[J]. *J Chromatogr A*, 2021(1651): 462329.
- [21] SHEN Y F, YUAN F F, LIU X Y, et al. Synergistic effect of organic-inorganic hybrid monomer and polyhedral oligomeric silsesquioxanes in a boronate affinity monolithic capillary/chip for enrichment of glycoproteins[J]. *Mikrochim Acta*, 2019, 186(12): 812.
- [22] PAN Z H, TU X Y. Development and application of boron affinity materials[J]. *Guangzhou Chem Ind(广州化工)*, 2022, 50(6): 28-30, 36.
- [23] XU F, GUO M, YE T, et al. Research progress of molecular imprinting technology based on boron affinity strategy[J]. *Food Mach(食品与机械)*, 2019, 35(12): 8-13.
- [24] WANG B J, DUAN A H, XIE S M, et al. The molecular imprinting of magnetic nanoparticles with boric acid affinity for the selective recognition and isolation of glycoproteins[J]. *RSC Adv*, 2021, 11(41): 25524-25529.
- [25] HU C M, PENG F, MI F, et al. SERS-based boronate affinity biosensor with biomimetic specificity and versatility: Surface-imprinted magnetic polymers as recognition elements to detect glycoproteins[J]. *Anal Chim Acta*, 2022(1191): 339289.
- [26] ZHU H J, YAO H, XIA K X, et al. Magnetic nanoparticles combining teamed boronate affinity and surface imprinting for efficient selective recognition of glycoproteins under physiological pH[J]. *Chem Eng J*, 2018(346): 317-328.
- [27] LI Y X, HONG M, MIAOMIAO, et al. Novel composites of multifunctional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanofibers for highly efficient glycoprotein imprinting[J]. *J Mater Chem B*, 2013, 1(7): 1044-1051.
- [28] LI L, LU Y, BIE Z J, et al. Photolithographic boronate affinity molecular imprinting: A general and facile approach for glycoprotein imprinting[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52(29): 7451-7454.
- [29] LI D, FU M, QIAN H, et al. Phenylboronic acid-based glucose-responsive materials: Synthesis and applications in insulin delivery[J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2017, 48(3): 259-267.
- [30] FU H, HU J, ZHANG M, et al. One-step preparation of phenyl boron-modified magnetic mesoporous silica for selective enrichment of cis-diol-containing substances[J]. *Molecules*, 2018, 23(3): 603.
- [31] XU Y W, WU Z X, ZHANG L J, et al. Highly specific enrichment of glycopeptides using boronic acid-functionalized mesoporous silica[J]. *Anal Chem*, 2009, 81(1): 503-508.
- [32] JIANG X Y, HAO X, JING L L, et al. Recent applications of click chemistry in drug discovery[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2019, 14(8): 779-789.
- [33] ZHANG L Y, WANG L H, WANG L L, et al. Preparation of novel phenyl boronic acid functionalized silica gel using triazocyanide click chemistry and its application in glycoprotein/glycopeptide selective enrichment[J]. *Chin J Chromatogr(色谱)*, 2019, 37(3): 279-286.
- [34] LIU L T, ZHANG Y, ZHANG L, et al. Highly specific revelation of rat serum glycopeptidome by boronic acid-functionalized mesoporous silica[J]. *Anal Chim Acta*, 2012(753): 64-72.
- [35] WANG S S, LU X M, CHENG J, et al. Advance in boronate affinity-based controllable oriented surface imprinting[J]. *Chin Sci Bull(科学通报)*, 2019, 64(13): 1340-1351.

收稿日期: 2023-04-02

(本文责编: 沈倩)