

科研新成果助力提升天然产物化学实验课程的高阶性 ——以盐酸小檗碱在光动力抑菌薄膜中的应用为例

王立娟*, 宁语苹, 李坚, 罗沙, 罗雄飞, 王睿文

东北林业大学材料科学与工程与学院, 哈尔滨 150040

摘要: 天然产物化学实验是基于理论课基础上的一门重要实践课程, 以验证为主的实验课缺少高阶性, 不利于学生综合能力的提升。因此, 通过将科研新成果融入课程的综合实验设计, 融入“双碳”理念, 强化课程的“两性一度”。该实验将高荧光强度的光动力抑菌食品包装膜的前沿研究融入到天然产物化学实验中, 首次将天然聚集诱导发光剂盐酸小檗碱与植酸结合成盐加入到食品包装膜中, 构建了一种具有高荧光强度的光动力抑菌膜。本实验融合了天然产物化学、聚集诱导发光和食品微生物学的内容, 并推动学生熟悉原理-实验-表征-分析的科研流程, 实质性丰富学生的综合知识, 强化学生实践能力和创新意识, 助力林产化工专业拔尖人才的培养。

关键词: 天然产物化学实验; 科教融合; 盐酸小檗碱; 荧光增强; 活性氧

中图分类号: G64; O6

Enhancing the Advanced Nature of Natural Product Chemistry Laboratory Courses with New Research Findings: A Case Study of the Application of Berberine Hydrochloride in Photodynamic Antimicrobial Films

Lijuan Wang*, Yuping Ning, Jian Li, Sha Luo, Xiongfei Luo, Ruiwen Wang

Materials Science and Engineering, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China.

Abstract: Natural products chemistry experiment courses are vital practical part built upon theoretical foundations. However, these verification-focused experiments lack depth and hinder the development of students' comprehensive abilities. To address this issue, we proposed integrating new scientific research findings into the design of comprehensive experiments, incorporating the concept of “double carbon”, and enhancing the depth of the course. In this experiment, we introduced cutting-edge research on photodynamic antimicrobial food packaging films with high fluorescence intensity into natural product chemistry experiments. Specifically, we incorporated berberine hydrochloride, a naturally occurring aggregation-induced emission agent, with phytic acid to create a salt that was added to the food packaging film, resulting in a photodynamic antimicrobial film with strong fluorescence. This experiment combined the fields of natural product chemistry, aggregation-induced emission, and food microbiology, and encouraged students to become familiar with the research process of theory-experiment-characterization-analysis. Through this integration, students could enrich their comprehensive knowledge, strengthen their practical skills, and foster their innovation consciousness, thus contributing to the cultivation of top talents in the field of forest chemical industry.

Key Words: Natural product chemistry experiments; Integration of science and education; Berberine hydrochloride; Fluorescence enhancement; Reactive oxygen species

收稿: 2024-03-05; 录用: 2024-05-20; 网络发表: 2024-05-22

*通讯作者, Email: donglinwj@163.com

基金资助: 东北林业大学教育教学改革项目(DGY2022-14)

1 实验背景

目前,天然产物化学实验课程还是以传统的验证实验为主,前沿的科研成果较少融入课程建设,使课程的先进性、创新性和挑战度以及育人效果无法满足要求,课程目标的达成度低。盐酸小檗碱(BHL)是常见的天然产物,广泛存在于黄连、黄柏和三颗针等药材中。然而,现有的教材对BHL的介绍多侧重于其基础的功能,如抗菌、抗炎和清热解毒等,缺少高阶性内容,很难引起林业工程学科学生的兴趣^[1]。

聚集诱导发光(AIE)作为一种由中国科学家首先提出并被世界所公认的前沿科学理论^[2,3],完美地解决了传统的光敏剂在聚集状态下的荧光猝灭问题。与具有大的平面共轭结构的光敏剂不同,聚集诱导发光体(AIEgen)往往具有扭曲构象,使他们在聚集状态下很难发生 π - π 堆积和分子内运动,使激发态只能通过辐射跃迁的方式消耗能量^[4]。因此,AIEgen在聚集状态会发出强荧光并产生大量的活性氧^[5]。BHL是天然AIEgen,在医学领域已有不少研究成果报道^[4,6]。然而,天然产物化学教学中几乎没有BHL聚集诱导发光的内容,不利于学生学习前沿知识,制约了学生的高阶思维。而AIE行为的机理涉及到了较为深奥的化学知识,仅通过教师在课堂上讲解知识点,很难让学生真正理解AIE行为。

基于上述问题,我们将AIE的知识融入到了天然产物化学实验中。通过复分解反应将BHL和植酸(PA)结合制备BHL/PA盐(BPA)。随后将其引入到聚乙烯醇(PVA)薄膜中制备了PVA-BPA膜。与PVA-BHL薄膜相比,该薄膜在光照条件下发射了更强的荧光并产生了更多的活性氧(ROS)。在整个实验中,以学生为主体,教师引导,鼓励学生主动思考,勤于动手,独立实验。通过对比实验引起学生对AIE行为的好奇心——为什么加入PA就会增强BHL荧光强度?通过引导式学习,激发学生探索AIE机理的热情,让学生直观地感受科技的力量,提升学生的“专业自豪感”。最后,鼓励学生分组讨论,探究该复合薄膜荧光增强的机理,完成论文的撰写并以PPT的形式展示,有效地提升学生独立思辨和创新的能力,强化团队合作意识^[7,8]。

新时代背景下,科教融合育人是培养创新型人才的重要举措^[9]。本实验将前沿科研成果融入课程内容,绿色化学的理念和科学研究的思维贯通于实验教学,不仅激发了学生的学习兴趣 and 热情,唤醒了学生的创新和环保意识,更提高了学生的实验操作水平和科研能力,显著提升课程的育人效果,为培养林产化工领域的高级人才奠定了坚实基础。

2 实验目的

- (1) 理解BHL聚集诱导发光以及小檗碱/植酸盐荧光增强的机理;
- (2) 掌握光动力抑菌膜的制备方法及抑菌实验的方法和操作;
- (3) 了解电子扫描显微镜,紫外-可见光谱仪和荧光分光光度计等仪器的操作,掌握相关实验数据的整理和分析。

3 实验原理

盐酸小檗碱是一种具有聚集诱导发光特性的天然产物,在包装材料中得到了广泛的应用^[10]。然而,在分散状态下小檗碱通过分子内振动和分子间 π - π 堆积将激发态通过非辐射弛豫转变为基态,因此无法产生荧光和充足的活性氧,从而无法达到理想的抑菌效果。

如图1所示,本实验制备了小檗碱/植酸盐(BPA),利用植酸强的电负性和非平面结构抑制了小檗碱分子内运动和分子间 π - π 堆积,使小檗碱分子只能通过辐射跃迁的方式失活,从而增强小檗碱的荧光强度和活性氧产生效率。随后,将BPA加入到聚乙烯醇薄膜中,BHL和PA通过静电作用自组装,在薄膜中产生聚集,增强了BHL的光动力抑菌效果。

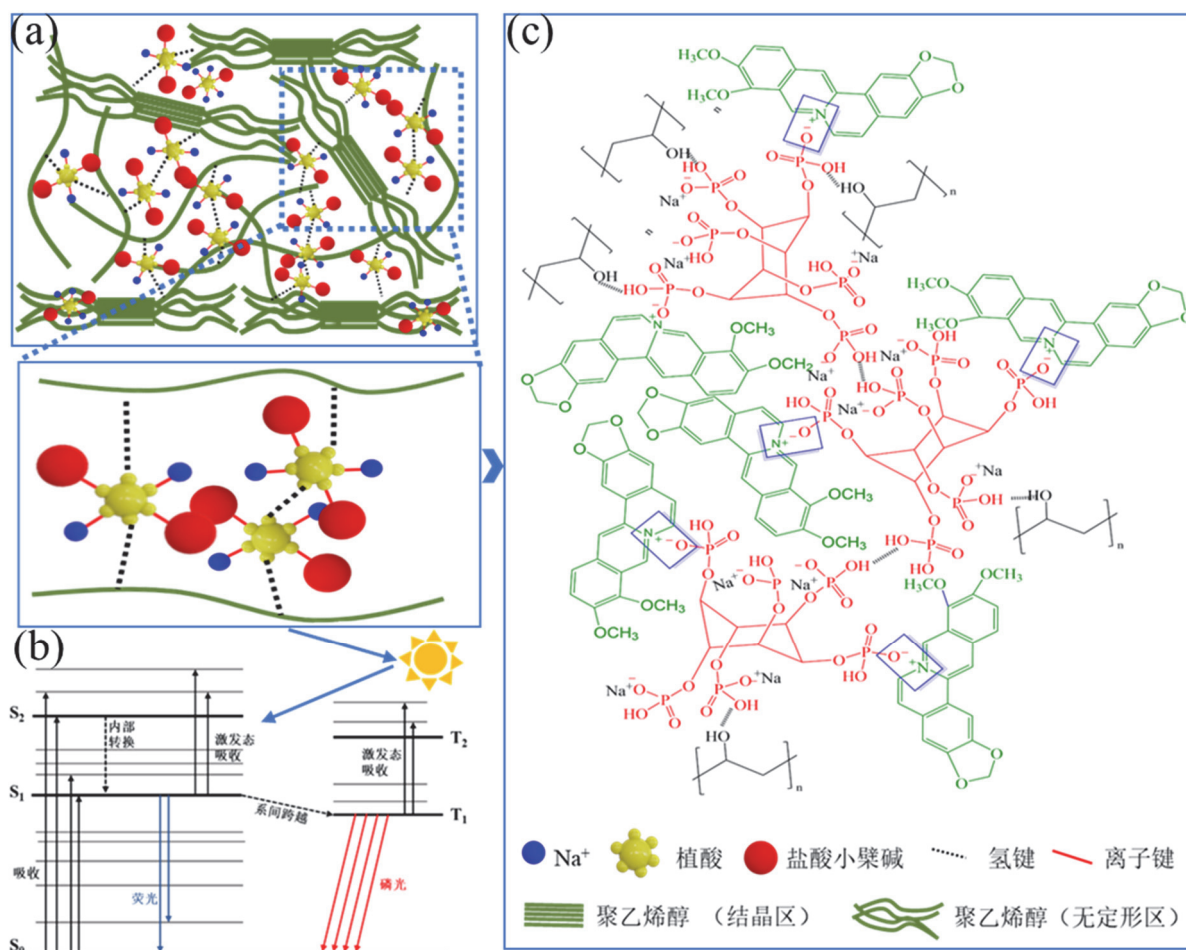


图1 荧光薄膜分子交联(a)、荧光增强(b)及活性氧产生(c)机理图

4 实验试剂与仪器

4.1 实验试剂

盐酸小檗碱标准品(98%); 植酸(分析纯); 磷酸盐缓冲液(分析纯); 氢氧化钠(分析纯); 无水乙醇(分析纯); 马铃薯葡萄糖琼脂(分析纯)。

4.2 实验仪器

电子分析天平; 恒温恒湿培养箱; 集热式恒温磁力搅拌器; 扫描电子显微镜(QUANTA 200, Philips-FEI Co., 美国); 紫外-可见光谱仪(Shimadzu, 日本); 荧光分光光度计(HITACHI, F-7100, 日本); 无菌操作台; 灭菌锅(YXQ-LB-30SII, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

5 试验方法

5.1 小檗碱/植酸盐的制备

将5 mmol盐酸小檗碱溶解于200 mL无水乙醇中, 在80 °C下搅拌至溶解, 加入等摩尔质量的氢氧化钠(NaOH)的乙醇溶液后, 于80 °C持续回流0.5 h, 过滤得到红色的小檗碱溶液。在小檗碱溶液中缓慢加入2 wt% (质量分数) PA的乙醇溶液, 直到没有沉淀产生。过滤得到黄色沉淀, 用无水乙醇反复洗涤, 在50 °C下干燥后得到小檗碱/植酸盐。

5.2 小檗碱/植酸/PVA复合薄膜的制备

将6 g PVA加入到250 mL蒸馏水中, 于80 °C下加热搅拌1 h至其全部溶解, 随后将9 mL BPA分散

在100 mL蒸馏水中倒入PVA溶液中, 于80 °C下加热搅拌30 min后倒入模具中。在60 °C下干燥24 h, 获得小檗碱/植酸/PVA复合薄膜, 复合膜记为PVA-BPA。纯PVA膜作为对照膜, 同时也通过上述方法分别制备了含9 mL PA和BHL的膜, 并分别表示为PVA-PA和PVA-BHL。

5.3 小檗碱/植酸/PVA复合薄膜的表征

5.3.1 电子扫描显微镜(SEM)

复合膜的形态使用扫描电子显微镜观察。在液氮中脆断后, 将薄膜表面镀金, 然后在5000 V的加速电压, 1000倍的放大倍数下拍摄薄膜的剖面 and 表面形态。

5.3.2 荧光光谱

使用荧光分光光度计在 $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$ 下, 在480–650 nm的范围内, 以5 nm的狭缝宽度记录薄膜的荧光光谱。

5.3.3 活性氧的测试

将20 mL $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH溶液加入5 mL 2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)乙醇溶液($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)中, 剧烈搅拌60 min后用磷酸盐缓冲液(PBS)将溶液定容至100 mL, 取4 mL滴入6孔板中, 使用复合薄膜($2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$)覆盖, 无膜溶液作为对照组。所有组均置于白光下20 min。然后用荧光分光光度计测量荧光强度($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$)。

5.4 小檗碱/植酸/PVA复合薄膜抗真菌性能测试

参照Li等人的方法进行试验^[8,9], 选择桔青霉和黑曲霉作为代表真菌。将 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 的薄膜放入6孔板中, 然后滴入100 μL 孢子悬浮液($1 \times 10^6 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$), 再使用同样的薄膜对其覆盖。实验组接受白光照射, 对照组置于黑暗条件下处理30 min后加入2 mL生理盐水混合均匀, 然后取0.2 mL涂在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)上。最后, 将它们在28 °C下培养48 h。结果以孢子存活率($\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)表示。

6 实验结果与讨论

6.1 SEM分析

使用SEM对纯PVA、PVA-BHL、PVA-PA和PVA-BPA膜的表现形貌进行了表征。如图2a1、a2所示, 纯PVA膜具有光滑的表面和连续的剖面。在图2b1、b2, c1、c2中, 可以看出将BHL或者PA加入到PVA膜中, 薄膜的微观形貌没有发生改变, 仍然是光滑且连续的, 证明了BHL和PA均与PVA有良好的相容性。而加入BPA后, 在薄膜的表面和剖面发现了大量的颗粒, 这是由于BHL和PA在薄膜中通过离子键形成了盐。

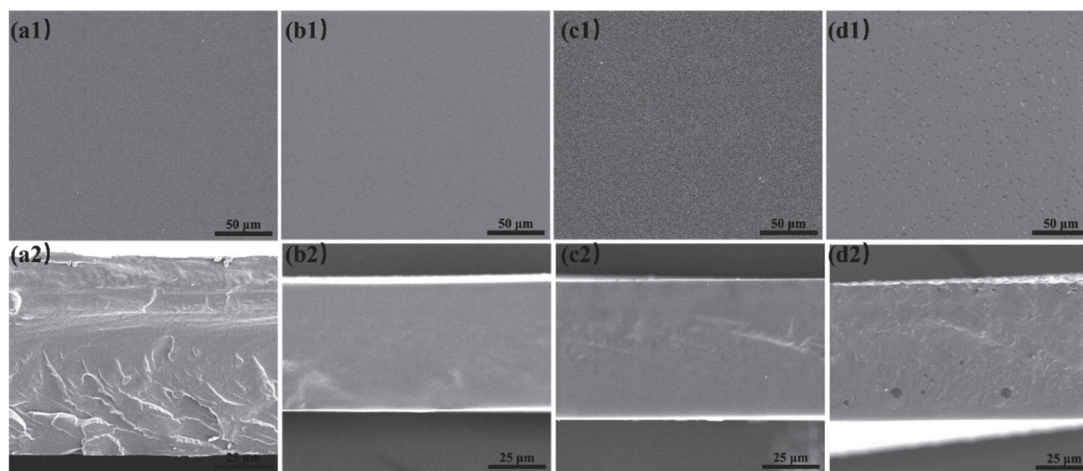


图2 SEM图

PVA膜表面(a1)和剖面(a2); PVA-BHL膜表面(b1)和剖面(b2); PVA-PA膜表面(c1)和剖面(c2); PVA-BPA膜表面(d1)和剖面(d2)

6.2 荧光性能分析

图3为PVA-BHL和PVA-BPA膜在不同的光下的外观。在日光下，PVA-BHL和PVA-BPA膜分别呈现深黄色和浅黄色。在365 nm紫外灯照射下，PVA-BHL薄膜显示了较弱的黄色荧光。在PVA-BPA膜中观察到明亮的黄绿色荧光。结合扫描电镜数据，这可能是由于BPA在薄膜中的聚集，抑制了BHL分子内的运动和分子间的 π - π 堆积，使能量主要通过辐射跃迁的形式消耗，因此增强了薄膜的荧光强度^[11,12]。

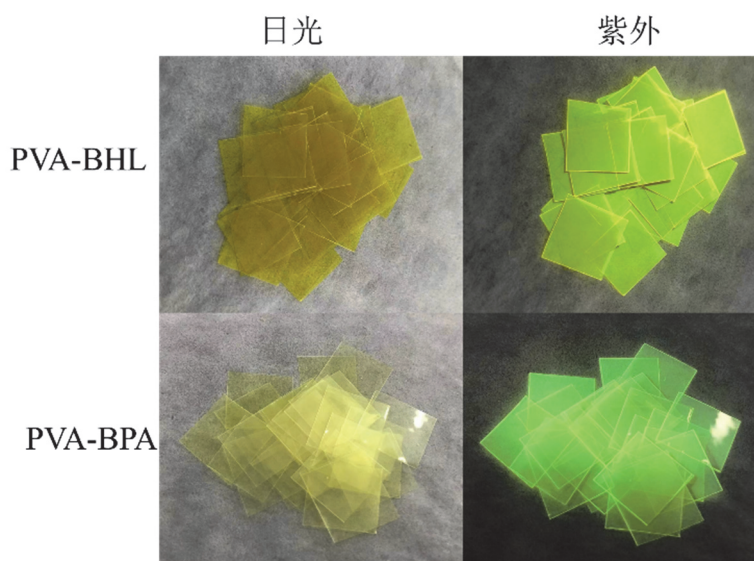


图3 复合薄膜在不同的光照下的外观照片

电子版为彩图，下同

使用荧光光谱进一步分析了薄膜的荧光性能。如图4所示，PVA和PVA-PA膜不具有荧光发射性能。PVA-BHL薄膜表现出较弱的荧光发射，在SEM图像中，我们可以看出BHL均匀分散在PVA薄膜中，这是因为其分子内运动和 π - π 堆积，使其主要通过非辐射弛豫途径消耗激发态能量，限制了它的荧光发射，这对其活性氧的产生也是不利的。与之相比，PVA-BPA薄膜的荧光强度是PVA-BHL薄膜的4.48倍，展示了更强的荧光效果。这一现象是因为BHL和PA之间的静电相互作用促进了分子聚集，从而抑制了分子运动和 π - π 堆积，使分子主要通过辐射通道耗尽激发态能量，这将增强其荧光强度^[13]，有利于活性氧的产生。

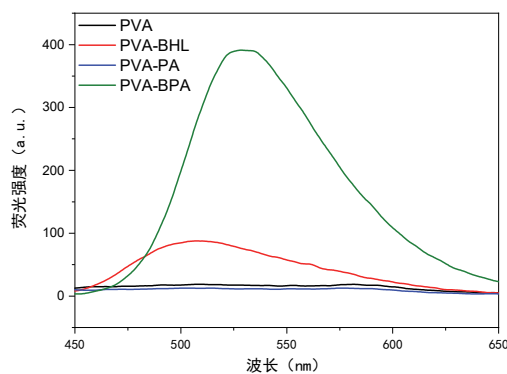


图4 复合薄膜的荧光发射光谱图

6.3 活性氧

图5显示了薄膜在光照下薄膜活性氧的产生情况。由图5可以看出,使用PVA-PA膜处理的样品几乎没有荧光发射,这说明该组在光照条件下几乎没有产生ROS。使用PVA-BHL膜处理的样品产生了较强的荧光,这是因为BHL具有光动力抑菌性能。而PVA-BPA膜处理的样品发射了最强的荧光,证明其产生了大量的活性氧。这可能是因为在薄膜中PA限制了BHL的分子内运动和分子间的聚集,使能量只能通过辐射跃迁耗散,从而增强了薄膜的活性氧产生能力。

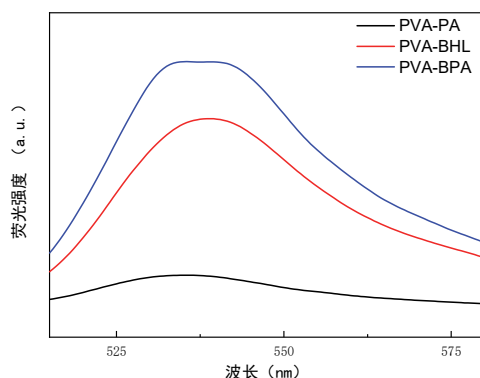


图5 复合薄膜活性氧产生情况

6.4 抑菌试验

薄膜对桔青霉和黑曲霉的抗真菌活性如图6和图7所示。在黑暗组中, PVA膜处理后桔青霉的孢子存活率达到 $863 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。与此相比, PVA-BHL、PVA-PA和PVA-BPA膜组的孢子存活率略有降低。经过光照处理后,所有薄膜组的孢子存活率都降低,这是因为白光中含有可以杀菌的紫外光。与其他薄膜相比,经过光照处理的PVA-BPA膜的组展示了最低的孢子总数,证明该薄膜具有良好的光动力抑菌性能。这是因为小檗碱/植酸盐在薄膜中产生了聚集,从而有效地抑制了BHL的分子运动和 π - π 堆积,使它只能通过辐射跃迁耗尽能量,从而促进了薄膜中活性氧的产生^[14]。

在对黑曲霉的抑菌试验中我们也发现了类似的趋势,在黑暗中, PVA膜组的孢子存活总数为 $501 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$, PVA-BHL、PVA-PA和PVA-BPA膜组的孢子存活率分别为 377 、 466 和 $298 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,三种薄膜对黑曲霉均有一定的抑制效果。在光照条件下,所有薄膜的孢子总数都有所下降,尤其在PVA-BPA膜中,黑曲霉的孢子低至 $182 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。这些结果表明光动力技术介导的PVA-BPA膜能有效抑制霉菌孢子的生长。

7 实验教学安排

实验教学安排如图8所示,分为课前导学、实验开展、课后实践、课后总结以及实践提升四个部分。依托特色学科,引入成果导向教育理念(OBE),以知识点为基础,提升实验技能,完善知识体系,最后提升学生的创新能力。此次实验将科研新成果融入了课程的综合实验设计,又以课程的知识点为基础,指导实验的进行,最后鼓励学生进入实验室,以现有的知识进行科研,实现了科教融合这一理念。

7.1 课前导学

前期预习的内容包括:天然AIEgen都有什么;他们聚集诱导发光的原理是什么;光动力抑菌技术的机理是什么;活性氧是如何产生的;活性氧为什么可以抑菌等。让学生带着问题查文献,查阅之后分小组讨论总结,并进行课上汇报。

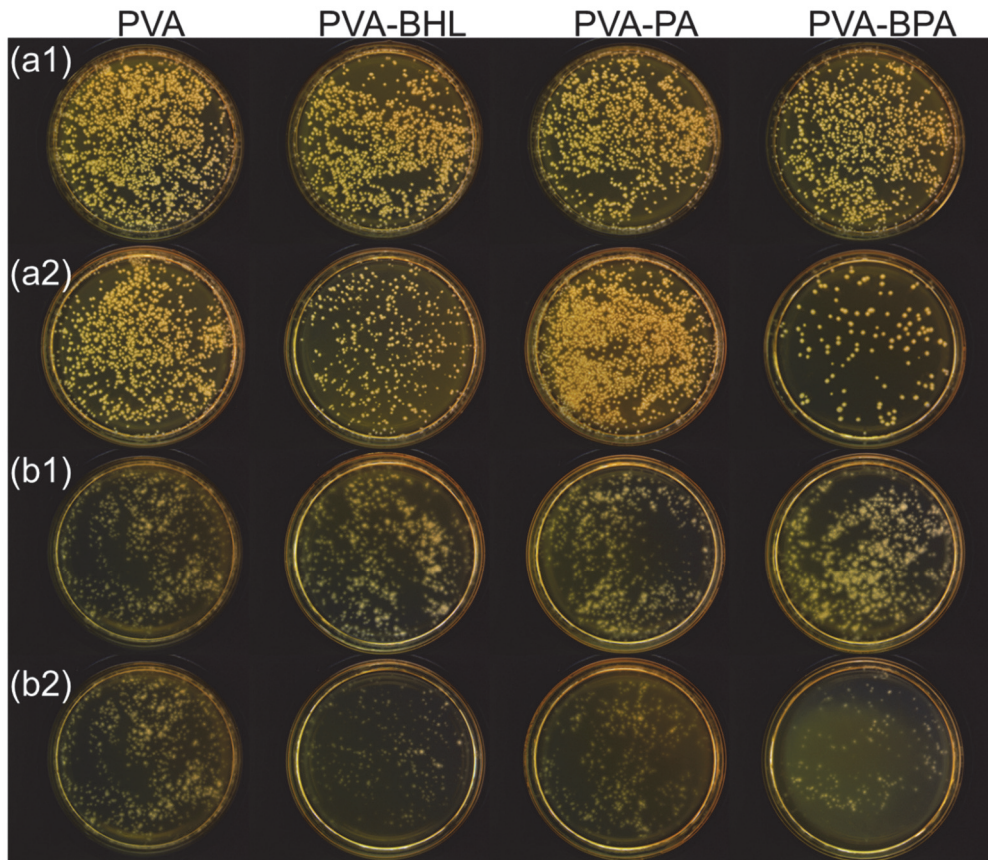


图6 复合薄膜处理后在黑暗(a1)和光照(a2)条件下桔青霉孢子的生长情况
以及在黑暗(b1)和光照(b2)条件下黑曲霉孢子的生长情况

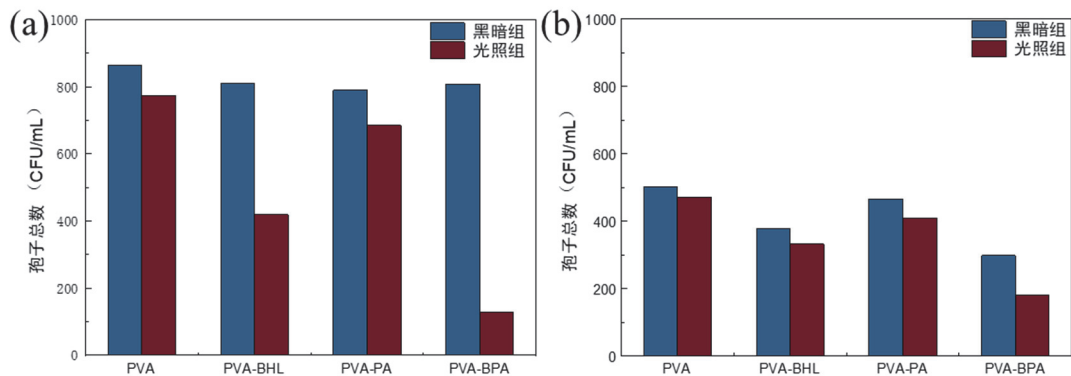


图7 桔青霉(a)和黑曲霉(b)的菌落生长总数

7.2 实验开展

实验课分班进行，每个班学生人数为20人，学生分为5组进行实验。实验总学时为16学时，分4次完成。具体安排如下：

第一次课(4学时)，进行小檗碱/植酸盐(BPA)的制备，具体操作：将BHL溶于乙醇中，在80℃下缓慢地加入氢氧化钠的乙醇溶液；过滤除去滤渣后获得小檗碱的乙醇溶液；在常温下缓慢加入植酸的乙醇溶液；使用离心机离心后使用无水乙醇反复洗涤沉淀。

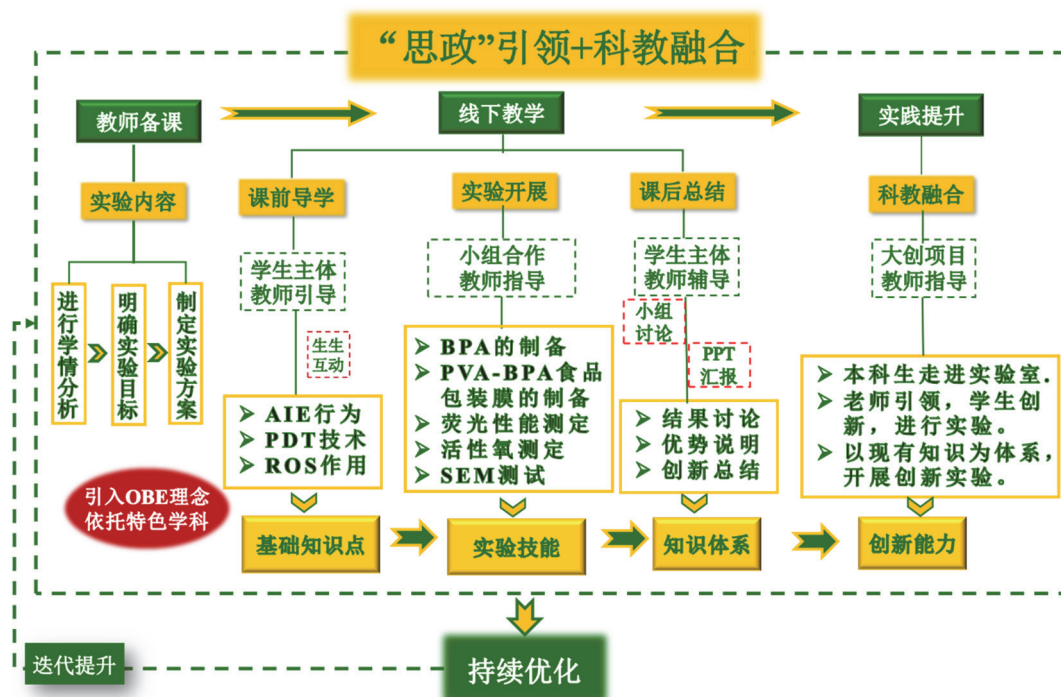


图8 实验教学安排

第二次课(4学时), 制备PVA-BPA薄膜, 同时制备对比薄膜(PVA-BHL, PVA-PA), 具体操作: 将PVA溶解于蒸馏水中, 在80 °C下搅拌1 h; 将使用蒸馏水溶解好的BPA缓慢加入PVA溶液中, 搅拌30 min后倒入模具。

第三次课(4学时), 进行薄膜的荧光测试以及活性氧的检测, 具体操作: 将上节课干燥的薄膜小心地从模具中剥离, 并裁剪出几个4 cm × 4 cm和2 cm × 2 cm的方块; 测定荧光光谱; 使用提前配制好的DCFH-DA活化液测试薄膜活性氧产生情况。

第四次课(4学时), 进行抑菌试验, 具体操作: 将提前制备好的孢子悬浮液加入到两个薄膜之间, 实验组使用氙灯照射, 对照组置于黑暗条件下; 30 min后加入2 mL生理盐水混合均匀后, 取0.2 mL在提前准备好的PDA上进行涂布, 随后将其放于培养箱中。

7.3 课后实践

在实验课程结束后, 组织同学在课余时间去学校的电镜实验室观察薄膜的表面形貌, 并探讨薄膜间表观形貌产生差距的原因。并带领同学观察抑菌实验结果, 直观感受光动力抑菌薄膜的抑菌效果。

7.4 课后总结

各个小组将实验所获得的数据进行整理汇总, 要求每个人以实验报告的形式上交作业。随后每个小组制作PPT, PPT的内容要涵盖以下内容: 对所获得结果的讨论; 与其他食品包装膜相比, 通过此次实验制备的食品包装膜的优势是什么; 绿色化学如何体现; 对本实验的创新之处的总结。PPT要在天然产物化学课程上进行汇报, 再进行学生提问, 教师总结, 共同打分, 成绩将计入最终成绩中。

7.5 实践提升

积极引导本科生进入实验室, 参与科研。由老师把关, 硕博辅助带领本科生进行实验。以现有的知识体系, 开展相关实验。鼓励本科生勇于创新, 大胆思考, 敢于沟通, 勤于动手, 致力于培养综合性拔尖人才。

8 实验特色

8.1 课程通过科教融合使学生的综合能力全面提升

本课程将前沿科技成果中的光动力抑菌薄膜引入到天然产物化学实验中,以理论知识为根基,从具体科研入手,由点及面^[15],将天然产物化学实验课的教学与科技创新相结合,激发学生的学习兴趣,引导学生主动思考,提高学生的学习效果和成就感,强化学生的灵活动手和科研创新能力。

该实验涵盖了天然产物化学、聚集诱导发光和食品微生物的相关知识,并且将先进的分析测试技术(SEM和荧光光谱)引入到了教学中,全面提升了学生的实际动手操作能力,以及对知识的掌握和综合运用能力。本实验通过鼓励学生分小组讨论,形成完善的实验报告,制作PPT进行汇报,锻炼了学生的创新思维并强化了团队合作意识。因此,本实验探索的科研新成果助力提升课程高阶性的方法,显著提升了课程质量和教学效果。

8.2 高效、绿色安全

本实验通过简单的复分解反应获得了小檗碱/植酸盐,无需任何有毒试剂,达到了安全实验的要求。通过简单的浇筑法获得了光动力抑菌包装膜,该薄膜只需要日光就产生大量ROS来杀灭细菌,无需任何设备,非常节能,符合绿色化学理念。同时该薄膜有望延长食品的保质期,有效减少食物的浪费,为贯彻落实《党政机关厉行节约反对浪费条例》贡献青年力量。该实验可以启发学生对绿色化学的思考,在今后的实践过程中大胆假设、小心求证,通过坚实的理论指导实践,培养学生“绿色”和“低碳”上做到知行合一,成为实现我国绿色可持续发展的主力军。

9 实施效果

该实验在2018年正式开展,取得了良好的教学效果。参与该实验的同学普遍反映该实验具有一定的挑战性。当观察到薄膜发出强烈荧光时,内心非常有成就感,对科研产生了极为浓烈的兴趣。学生积极走进实验室,利用天然产物制备绿色、可生物降解的多功能食品包装膜,已经完成国家级大学生创新训练项目5项,发表论文3篇,并获得奖项5项。

10 结语

通过科教融合,将前沿的科研成果引入天然产物化学实验课程的教学过程,提高课程的高阶性和育人效果。本实验设计了一个以天然产物化学为主,融合了聚集诱导发光和食品微生物学的综合性实验。紧密围绕“原理-实验-表征-分析”理论、科研和实践相融合这一主线,在开展实验过程中,指导学生以理论指导实践,实践提升思维,思维把控科研,科研夯实理论,助力完成知识扎实和科研创新型人才的培养目标。

参 考 文 献

- [1] 吴剑锋,叶桂存,王天玲,王宁,王昌利,李海燕,李端,明延波,蒋爱品,戴君武.天然药物化学.第1版.北京:人民卫生出版社,2023:263-264.
- [2] 李艳阳,张宗培,李恺,臧双全.大学化学,2024,39(2),105.
- [3] 黄申林,仲伟仁,张雪丹,李守济,蔡旭敏.林业工程学报,2022,7(6),34.
- [4] Gu, Y.; Zhao, Z.; Su, H.; Zhang, P.; Liu, J.; Niu, G.; Li, S.; Wang, Z.; Kwok, R. T. K.; Ni, X. L.; et al. *Chem. Sci.* **2018**, 9 (31), 6497.
- [5] Li, Q.; Wang, B.; Peng, S.; Wei, H.; Li, P.; Leng, Y.; Huang, X. *LWT* **2024**, 193, 115762.
- [6] Lee, M. M. S.; Eric, Y. Y.; Chau, J. H. C.; Lam, J. W. Y.; Kwok, R. T. K.; Wang, D.; Tang, B. Z. *Biomaterials* **2022**, 288, 121712.
- [7] 戴春爱,韩永生,颜鲁婷,李振,曹莹泽.大学化学,2024,39(2),34.
- [8] 高利军,文日珍,王赞,郭妍蓓,惠永海,高天明,张永飞.大学化学,2024,39(1),294.

- [9] 程涛, 李祥春, 赖文勇. 大学化学, **2024**, *39* (1), 254.
- [10] Ma, K.; Zhe, T.; Li, F.; Zhang, Y.; Yu, M.; Li, R.; Wang, L. *Food Hydrocolloid* **2022**, *123*, 107147.
- [11] Chen, Y.; Lam, J. W. Y.; Kwok, R. T. K.; Liu, B.; Tang, B. Z. *Mater. Horiz.* **2019**, *6* (3), 428.
- [12] 何亚珂, 张思怡, 黎雅珊, 何本钊. 大学化学, **2023**, *38* (4), 134.
- [13] 刘思阳, 孙宇, 李云妍, 张岩. 大学化学, **2023**, *38* (4), 269.
- [14] Su, L.; Huang, J.; Li, H.; Pan, Y.; Zhu, B.; Zhao, Y.; Liu, H. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *172*, 231.
- [15] 任保轶, 朱明昌, 孙亚光, 孙娜, 王康军, 刘颀颀, 丁获. 大学化学, **2023**, *38* (11), 1.