



(S)-腺苷蛋氨酸分子印迹毛细管电色谱整体柱制备与评价

李燕丽, 刘雁红, 邓启良
(天津科技大学理学院, 天津 300457)

摘要: 以(S)-腺苷蛋氨酸为模板分子, 采用热引发一步法制备具有手性识别能力的分子印迹毛细管整体柱. 在电色谱模式下, 考察该色谱柱的识别性能. 结果表明: 制备的分子印迹整体柱在电色谱模式下具有良好的手性识别能力.

关键词: 毛细管电色谱; 整体柱; 分子印迹; 腺苷蛋氨酸

中图分类号: O658 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2010)01-0024-04

Preparation and Evaluation of Molecularly Imprinted Monolith for (S)-Adenosylmethionine in Capillary Electrochromatography

LI Yan-li, LIU Yan-hong, DENG Qi-liang

(College of Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Molecularly imprinted monolith based on (S)-adenosylmethionine was developed by in situ thermal initiation polymerization in capillary. The resulted monolith was further evaluated in capillary electrochromatography. The results indicated that the monolith showed well chiral recognition ability.

Keywords: capillary electrochromatography; monolithic column; molecular imprinting; adenosylmethionine

分子印迹是近年发展起来的人工合成分子识别材料技术. 其分子识别性能是基于结合位点与模板分子在尺寸大小、形状和功能基团排列等方面的相互匹配. 由于分子印迹聚合物(MIPs)具有预定性、识别性和实用性三大特点, 近年来分子印迹技术发展非常迅速, 针对不同分子制备的MIPs在分离提纯、免疫分析、抗体-受体模拟以及生物模拟传感器等方面显示出广泛的应用前景^[1-3], 成为近年来最具潜力的新材料之一, MIPs因此被誉为“万能的分子识别材料”.

毛细管电色谱(CEC)是毛细管电泳(CE)和高效液相色谱(HPLC)的融合技术. 它既具有HPLC高选择性的优点, 又具有CE高柱效、高分辨率、快速、微量的优势. 在CEC分离时, 色谱和电泳两种机理同时作用, 增加了分离效率, 克服了CE选择性差, 难以分离中性物质的困难, 开辟了高效微分离技术的新途径. 因此, 将分子印迹技术与CEC相结合, 发展CEC

分子印迹整体柱已经引起人们的极大研究兴趣^[4-6].

(S)-腺苷蛋氨酸是一种重要生理活性物质, 具有多种功效. 可防止酒精、药物和细胞素对肝脏的损伤; 同时具有消炎、减轻疼痛及组织修复功能, 对关节病疗效显著. 因此, 人们对其进行了广泛的科学研究和应用研究. 目前, 未见有关(S)-腺苷蛋氨酸分子印迹的公开报道. 本研究以其为模板化合物, 通过原位分子印迹技术制备了毛细管分子印迹整体柱, 在电色谱模式下, 评价了整体柱的识别性能.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

P/ACE 毛细管电泳仪, 美国 Beckman 公司, 配有紫外检测器; 熔融石英毛细管(内径 100 μm, 外径 375 μm), 河北永年光导纤维厂.

收稿日期: 2009-04-15; 修回日期: 2009-06-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20605024); 天津科技大学自然科学基金资助项目(20040103)

作者简介: 李燕丽(1974—), 女, 山西太古人, 讲师, jijl_lyl@sina.com.

腺苷蛋氨酸、(S)-腺苷蛋氨酸、 γ -甲基丙烯酰氧丙基三甲氧基硅烷(γ -MPS),美国 Sigma 公司; α -甲基丙烯酸,分析纯,北京东环联合化工厂;乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA),美国 Sigma 公司,使用前用质量分数 10%的氢氧化钠溶液萃取除去阻聚剂;偶氮二异丁腈(AIBN),分析纯,南开大学分校特种试剂实验厂;其余试剂均为分析纯。

1.2 毛细管内壁预处理

用 1 mol/L NaOH 溶液冲洗毛细管内壁 10 min,保持 10 min,然后用二次蒸馏水、1 mol/L 盐酸、二次蒸馏水各冲洗 5 min,接着注入含 0.5% γ -MPS 的 6 mmol/L 乙酸溶液,保持 2 h,用二次蒸馏水冲洗至中性,高纯 N_2 吹干。毛细管两端用橡胶塞密封保存。

1.3 分子印迹毛细管整体柱的制备

将模板分子 0.03 mmol,甲基丙烯酸 0.12 mmol,EDMA 0.66 mmol 与 1.0 mL 甲苯、0.5 mL 甲醇混合,超声混匀,用高纯 N_2 吹 5 min,放置在 4 °C 冰箱冷藏 2 h,然后加入 AIBN,超声溶解使之混合均匀。用注射器将预聚混合液注入长度为 40 cm 处理过的毛细管中,两端用橡胶塞封闭。其中一端中放入 60 °C 恒温水浴反应 12 h,另一端露出水面约 15 cm,聚合反应完成后依次用甲醇、乙酸/乙酸盐缓冲液冲洗毛细管柱,以除去模板分子和致孔剂。在聚合物与空管的结合处烧灼 2 mm 的检测窗口,将毛细管柱装入电泳仪,用理想缓冲液冲洗,待仪器基线平稳后测定。

非印迹整体柱除不加模板分子外,其余均按上述方法制备和处理。

1.4 电色谱实验

所有电色谱实验均在 P/ACE 毛细管电泳仪上进行,流动相为含有不同质量分数乙腈的乙酸/乙酸盐缓冲液,用相同浓度的乙酸调至所需的表观 pH。样品用流动相溶解。所有实验均在 25 °C 下进行。紫外检测器检测波长 254 nm。分离度 $R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$,其中: t_{R1}, t_{R2} 分别为 (R)-, (S)-腺苷蛋氨酸保留时间; W_1, W_2 为相应的峰底的宽度。硫脲用于测定电渗流(electroosmotic flow, EOF)。

2 结果与讨论

2.1 整体柱的制备

由于整体柱两端没有筛板,所以固定相必须与毛细管壁结合,这里选用 γ -MPS 为偶联剂,其一端与毛细管壁结合,另一端连接聚合物。另外,要使流动相通过聚合物,所制备的聚合物必须是多孔的,在以

前的研究中已经证明,甲苯是理想的致孔溶剂^[6],所以本研究中仍然以甲苯为致孔剂,甲醇为溶剂溶解模板分子。非共价印迹中,形成识别位点的特异性主要取决于功能单体与模板分子之间相互作用的种类与强弱,因此,功能单体的选择非常重要。根据功能基团互补的原则^[7],碱性的模板分子选用酸性功能单体,而酸性的模板分子应选用碱性功能单体;中性的模板分子既可以选取酸性,也可以选取碱性功能单体。这样可以保证模板分子与功能单体之间通过离子间相互作用或者是氢键相互作用形成稳定的复合物。同时,毛细管电色谱以电渗流为驱动力,因此要求制备的整体柱表面必须有可离子化基团以产生电渗流。综合以上因素,这里选用甲基丙烯酸为功能单体。由于 EDMA 为交联剂制备的印迹聚合物具有较好的识别效果,在此以其为交联剂。通过原位热引发聚合在毛细管中制备了手性印迹整体柱。

2.2 电渗流影响因素

电渗流是电色谱整体柱评价的重要指标,通过对它的考察可以获得驱动力大小以及焦耳热对色谱柱的影响。其中电渗流线速度的大小可表示为

$$v_{\text{EOF}} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \xi}{\eta} E = \mu_{\text{EOF}} E \quad (1)$$

式中: ϵ_0 和 ϵ_r 分别是真空和溶液的介电常数; ξ 是 Zeta 电势; η 是溶液的黏度; μ_{EOF} 是电渗流淌度, E 是施加电场强度。

从上式可以看出,在有效消除焦耳热的情况下,电渗流与电压成正比。实验考察了 2.5 ~ 20 kV 范围内电压对电渗流的影响。图 1 为电压变化对电渗流的影响。从图中可以看出,当电场强度从 125 V/cm 增加到 2 000 V/cm,电渗流随电场强度的增大而呈线性升高。线性回归 $R^2=0.9987$ 。这一现象表明由电压升高而引起的焦耳热在体系中不太明显,可以在该色谱柱上实现快速分离。

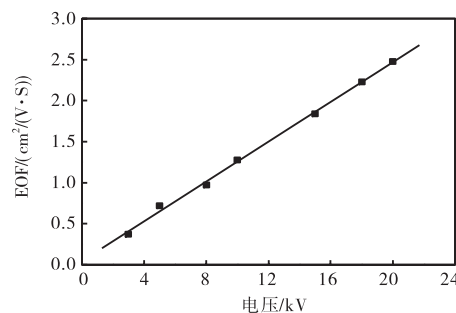


图 1 电压对电渗流的影响

Fig.1 Effect of voltage on EOF

实验考察了有机溶剂对电渗流的影响,如图 2 所示. 可以看出:随着溶液中乙腈质量分数的增加,电渗流逐渐增大. 但是进一步增加乙腈的含量柱内容易产生气泡,使分离中断,因此本研究中乙腈的最高质量分数限制在 85%.

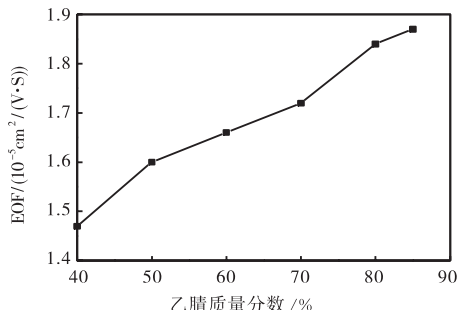


图 2 乙腈质量分数对电渗流的影响
Fig.2 Effect of acetonitrile on EOF

而 Cikaló 等^[8]则报道了乙腈质量分数在 20% ~ 70% 范围内,电渗流随乙腈质量分数增加而下降;超过 70%时,电渗流随乙腈质量分数增加而增大. Yan 等^[9]的研究则表明随着溶液中有有机溶剂含量的增加,电渗流逐渐减小;可能的原因在于:一方面有机溶剂乙腈的加入会降低离子强度,使扩散层变厚,Zeta 电势增大,同时,还会使流动相黏度降低,导致 EOF 速度增大;另一方面,有时有机溶剂会通过氢键或偶极相互作用键合到管壁或填料表面,导致表面净电荷或双电层的局部黏度发生改变,反而使 EOF 速度减小. 因此,有机溶剂的影响是这些因素综合作用的结果. 我们得到的结果与 Leliver 等^[10]得到的结果类似. 他们的研究表明,在反相柱上乙腈质量分数在 40% ~ 80% 的范围内电渗流随乙腈含量的增加而增大.

缓冲溶液的 pH 对电渗流也有较大影响,实验考察了 pH 在 2.50 ~ 8.00 的范围内变化对电渗流的影响. 结果表明,电渗流随着 pH 的增大而增大. 这可能是由于随着 pH 的增大,固定相表面羧基以及管壁表面的硅羟基的解离度增大,从而改变它们的表面电荷密度和电势,使得电渗流增大.

2.3 影响分离的因素

随着电压的增加,分离度 (R_s) 变化如图 3 所示. 随着电压从 3 kV 增加到 10 kV,分离度逐渐增大,而进一步增加电压,则分离度减小,这可能是由于随着电压增大电渗流增大,传质速率加快,有利于目标分子与印迹位点之间相互作用,因此分离度增加,若进一步增加电压,则目标分子有可能来不及与印迹位点作用,从而使分离度减小.

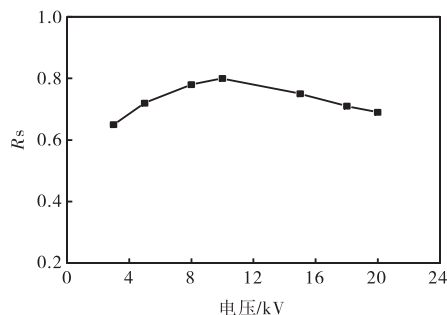


图 3 电压对分离度的影响
Fig.3 Effect of voltage on R_s

乙腈含量对分离度的影响如图 4 所示. 随着流动相中乙腈质量分数从 40%增大到 70%,分离度逐渐增大,继续增大乙腈的含量分离度则减小. 这可能是由于随着乙腈质量分数增加,电渗流增大,使得传质速率加快,同时随着乙腈质量分数的增加,溶液的极性减小,有利于模板分子与印迹位点之间的相互作用,因此,分离度逐渐增大;但是随着乙腈质量分数的进一步增加,电渗流增大,这时不利于模板分子与印迹位点之间的相互作用,因此分离度减小.

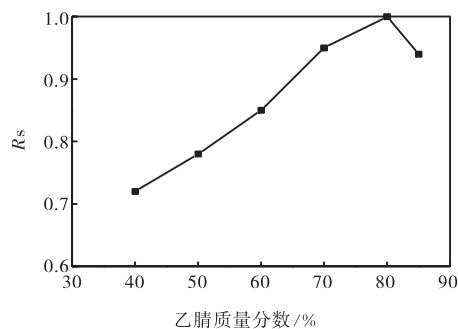


图 4 乙腈含量对分离度的影响
Fig.4 Effect of acetonitrile on R_s

2.4 最佳条件下对腺苷蛋氨酸的手性分离

通过优化分离条件,在印迹整体柱上实现了对消旋体腺苷蛋氨酸的手性分离,从图 5 中可以看出,该整体柱具有良好的手性识别效果. 可以在 8 min 内完成对消旋体的分离.

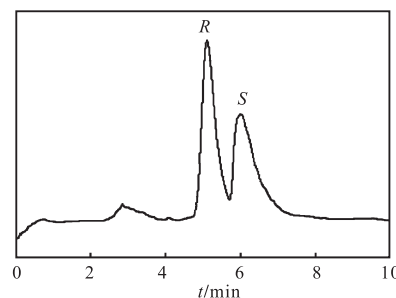


图 5 印迹整体柱对腺苷蛋氨酸的手性识别
Fig.5 Chiral recognition of racemic adenosylmethionine

3 结 语

本研究以(S)-腺苷蛋氨酸为模板分子,甲基丙烯酸为功能单体,通过原位分子印迹热引发聚合制备了毛细管电色谱分子印迹整体柱. 考察了该整体柱的电渗流以及分离性能,从影响分离的因素可以推测,该整体柱对模板分子的识别是基于模板分子与印迹位点之间疏水作用以及离子间相互作用. 在优化的条件下,该整体柱可以在 8 min 内实现对腺苷蛋氨酸的手性分离.

参考文献:

- [1] Alexander C, Andersson H S, Andersson L I, et al. Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003 [J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2006, 19(2): 106–180.
- [2] Zhang H Q, Ye L, Mosbach K. Non-covalent molecular imprinting with emphasis on its application in separation and drug development [J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2006, 19(4): 248–259.
- [3] Ye L, Mosbach K. Molecular imprinting: Synthetic materials as substitutes for biological antibodies and receptors [J]. *Chemistry of Materials*, 2008, 20(3): 859–868.
- [4] Deng Q L, Lun Z H, Gao R Y, et al. (S)-Ibuprofen-imprinted polymers incorporating γ -methacryloxypropyl-trimethoxysilane for CEC separation of ibuprofen enantiomers [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(21): 4351–4358.
- [5] Ou J J, Li X, Feng S, et al. Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymer derivatized silica monolithic column for capillary electrochromatography and capillary liquid chromatography [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(2): 639–646.
- [6] Deng Q L, Lun Z H, Shao H, et al. Molecularly imprinted polymers as tools for the screening of felodipine from dihydropyridine calcium antagonists by pressurized capillary electrochromatography [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 382(1): 51–58.
- [7] Sellergren B. Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 1999, 18(3): 164–174.
- [8] Cikalo M G, Bartle K D, Myers P. Influence of the electrical double-layer on electroosmotic flow in capillary electrochromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 836(1): 35–51.
- [9] Yan C, Schaufelberger D, Erni F. Electrochromatography and micro high-performance liquid chromatography with 320 μ m I. D. packed columns [J]. *Journal of Chromatography A*, 1994, 670(1/2): 15–23.
- [10] Lelièvre F, Yan C, Zare R N, et al. Capillary electrochromatography: Operating characteristics and enantiomeric separations [J]. *Journal of Chromatography A*, 1996, 723(1/2): 145–156.