



二烯丙基胺为功能单体的分子印迹聚合物合成 及分子识别性能

戴玉杰, 卢战胜, 焦良, 窦苓

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 以槲皮素为模板, *N,N*-二甲基甲酰胺为致孔剂, 偶氮二异丁腈为引发剂条件下, 二烯丙基胺作为功能单体与苯乙烯骨架单体和交联剂二乙烯苯共聚合成了含有碱性功能基的分子印迹聚合物, 并用红外光谱和元素分析对聚合物的结构进行了表征. 静态吸附实验结果表明: 该分子印迹聚合物对模板分子具备很好的结合能力和特征识别性能, 其饱和吸附量为 179.11 $\mu\text{g/g}$, 在有相同质量浓度的芦丁干扰条件下, 静态吸附分配系数为 43.54 mL/g, 与芦丁分离因子达 2.78.

关键词: 分子印迹聚合物; 二烯丙基胺; 苯乙烯; 静态吸附; 双波长法

中图分类号: O063.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2009)03-0001-05

Synthesis and Molecular Recognition Property of the Molecular Imprinting Polymer Using Diallylamine as the Functional Monomer

DAI Yu-jie, LU Zhan-sheng, JIAO Liang, DOU Ling

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education,

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

Abstract: By using quercetin as the template and *N,N*-dimethylformamide as the porogen, diallylamine was copolymerized with styrene and *p*-divinyl benzene to form a molecular imprinting polymer (MIP) containing basic functional groups. The copolymer was characterized with FTIR and elemental analysis. The static adsorption test shows that the MIP has a good affinity and recognition with the template. The saturated adsorptive capacity is 179.11 $\mu\text{g/g}$. The static adsorption partition coefficient can come up to 43.54 mL/g and the separation factor reaches 2.78 with the interference of same concentration rutin.

Keywords: molecularly imprinting polymer; diallylamine; styrene; static absorption; double wave-lengths

分子印迹聚合物 (Molecular Imprinting Polymer, MIP) 是将要分离的目标分子与交联剂在聚合物单体溶液中进行聚合得到固体介质, 然后通过物理或化学手段除去介质中的目标分子, 便得到含有目标分子“印迹”的聚合物^[1]. 这样制得的聚合物, 在立体空穴和功能基排布上与目标分子具有互补的结构. 因此, 分子印迹分离技术是一种有着特殊专一选择性的新型分离技术. 与天然抗体相比, 由于其具有高选择性、高强度 (即耐热、耐有机溶剂、耐酸碱)、制备简单

而且模板分子可回收和重复使用的特点, 近年来引起人们的广泛关注. 该技术已成功用于色谱分离、固相萃取、抗体或受体模拟、化学仿生传感器以及酶的模拟和催化合成等诸多领域^[2-4], 应用于天然产物分离中也显示出良好的前景^[5].

天然产物中有许多活性成分含有羧基和酚羟基等酸性基团, 如黄酮、甘草酸、银杏酸等^[6]. 为了增加与这些物质的亲和力, 本文采用含碱性氨基基团的二烯丙基胺为功能单体制备槲皮素分子印迹聚合

物^[7-8],考察其从槲皮素-芦丁混和溶液中对槲皮素分子选择性吸附性能,并用双波长法进行测定^[9],以探索烯丙基胺类化合物作为碱性功能单体对酸性天然产物分离的可行性.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

二烯丙基胺(纯度>99.5%),山东鲁岳化工有限公司;苯乙烯(St)和二乙烯苯(DVB),天津元立化工有限公司. 苯乙烯在使用前减压蒸馏以除去其中的阻聚剂. 槲皮素(纯度>98%),西安小草植物科技有限责任公司;芦丁(纯度>98%),成都鑫光生物技术有限公司. 槲皮素和芦丁使用前均用甲醇重结晶. 其他试剂均为分析纯,水为去离子水.

VECTOR22 型傅里叶变换红外光谱仪,德国 Bruker 公司;SP-2000UV 型紫外-可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;VANIO-EL 型元素分析仪,德国贺利氏公司;KQ3200DE 数控超声波清洗器,昆山超声仪器有限公司;HNY-82 敞开式恒温摇床,天津欧诺仪器仪表有限公司;FA-100 手提式高速粉碎机,浙江温岭林大机械有限公司.

1.2 芦丁和槲皮素的测定方法

1.2.1 槲皮素溶液浓度的测定及标准曲线的绘制

采用紫外分光光度法^[6]. 分别取含 1.68~25.2 μg 的槲皮素乙醇溶液定容于 50 mL 容量瓶中,在 371 nm 处测其吸光度. 以吸光度(A)对质量浓度(C)进行线性回归,其回归方程为

$$A = 0.0692C - 0.0044, R = 0.9991 \quad (1)$$

1.2.2 槲皮素和芦丁混和溶液中二者浓度的测定

(1) 槲皮素和芦丁等吸收波长确定

采用等吸收紫外分光光度法^[9]. 分别配制槲皮素 16.8 μg/mL 和芦丁 8.60 μg/mL 的单组分乙醇溶液,测定它们在波长 240~380 nm 范围内的吸光度,经过粗选和细选,分别确定槲皮素具有相同吸收的两个波长为 247 nm 和 266 nm,而芦丁的等吸收波长为 340 nm 和 380 nm.

(2) 标准曲线的绘制

由于槲皮素在 247 nm 和 266 nm 处有相同的吸收,在此二波长处混和溶液吸光度差($\Delta A_1 = A_{266} - A_{247}$)只与芦丁的质量浓度有关,而槲皮素对其无影响. 而芦丁在 340 nm 和 380 nm 处有相同吸收,在此二波长处混和溶液吸光度差($\Delta A_2 = A_{380} - A_{340}$)只与槲皮素的质量浓度有关.

分别配制 50 μg/mL 槲皮素和芦丁的乙醇储备液,再分别精密移取 2.50、3.00、5.00、6.00、7.50、8.50 和 10.00 mL 的槲皮素和芦丁标准溶液至 25 mL 容量瓶,用乙醇稀释至刻度. 分别在上述等吸收波长处测定其吸光度,计算吸光度的差值 ΔA_1 和 ΔA_2 ,作标准曲线并回归得线性方程:

$$\Delta A_1 = 0.01527C_{\text{芦丁}} - 0.0195, R = 0.9993 \quad (2)$$

$$\Delta A_2 = 0.0256C_{\text{槲皮素}} + 0.037, R = 0.9991 \quad (3)$$

由此计算可不用分离即可分别求出未知物样品中芦丁和槲皮素的含量.

1.3 MIP(NMIP)的制备

以二烯丙基胺为功能单体,苯乙烯为结构单体,二乙烯苯为交联剂,N,N-二甲基甲酰胺(DMF)为溶剂和致孔剂,偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂制备槲皮素分子印迹聚合物. 具体制备方法为:准确量取 1.0 mL 二烯丙基胺,8.0 mL 质量浓度为 1.5 g/mL 的槲皮素的 DMF 溶液,2.0 mL 的二乙烯苯和 10.0 mL 的苯乙烯于 25 mL 的大试管中,加入 0.20 g 的 AIBN,充分混合后超声除氧,通入氮气 5 min,然后封闭,在 75 °C 水浴中聚合 24 h.

空白聚合物(NMIP)制备时,除不加模板分子外,其他方法同上.

1.4 分子印迹聚合物模板分子和致孔剂的洗脱

将所得 MIP(NMIP)用 100 mL 乙醇浸泡使之变硬后用 FA-100 手提式高速粉碎机粉碎,过 100 目筛,再置于索氏提取器中用乙醇和乙酸的混合液(体积比 9:1)反复提取以脱除模板分子和致孔剂 DMF,并采用紫外-可见分光光度计在 371 nm 处测定洗脱液的吸光度,以检测槲皮素脱除的程度. 当吸光度不再变化后停止洗脱,再用 50 mL 的 5% NaOH 溶液浸泡洗涤,以除去结合的乙酸,最后用去离子水洗涤至中性,真空干燥,得 MIP(NMIP)微球,备用.

1.5 静态吸附量的测定方法

取 8 支 25 mL 具塞比色管,分别加入 0.3 g 的 MIP 微球,再依次加入质量浓度分别为 1.68、3.36、5.04、6.72、8.40、10.08、11.76、16.80 μg/mL 槲皮素乙醇溶液 20 mL. 另取 1 支 25 mL 具塞比色管加入等量的 NMIP 微球,再加入 20 mL 乙醇溶液. 在 25 °C、100 r/min 的摇床上恒温振荡 8 h,过滤,以溶剂为空白,在 371 nm 下分别测定 MIP 和 NMIP 滤液的吸光度.

1.6 MIP对槲皮素吸附的选择性能测定

精密称取 0.3025 g 的 MIP 置于 25 mL 具塞比色管中,再加入 10.00 mL 槲皮素-芦丁乙醇混和溶液

(两者质量浓度均为 3.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$);称量 0.303 0 g 的 NMIP 置于另一 25 mL 具塞比色管中,加入 10.00 mL 无水乙醇,将两管在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 摇床上恒温振荡 8 h,过滤,以后者滤液为参比,分别在 247、266、340、380 nm 下测定前者吸附平衡后溶液的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 二烯丙基胺-苯乙烯-二乙烯苯共聚反应及产物的元素分析

根据文献^[7]二烯丙基胺聚合在进行自由基链增

长反应①时,同时也存在自由基链转移反应②(如图 1)。因此,其自身聚合很难得到高分子质量的聚合物。

但无论是自由基链增长反应①,还是自由基链转移反应②,自由基均未减少,因此自由基反应可持续进行到单体基本消耗完为止,只是由于副反应②而不能形成分子质量大的长链聚合物。往其中加入苯乙烯和二乙烯苯,由于苯乙烯和二乙烯苯均不会发生副反应②,这就使得自由基转移副反应②在自由基反应中所占比例随着混和物中苯乙烯和二乙烯苯比例的增大而减小。因此,控制二烯丙基胺的比例(实验发现最多体积比不超过 1/3)时,苯乙烯和二乙烯苯与二

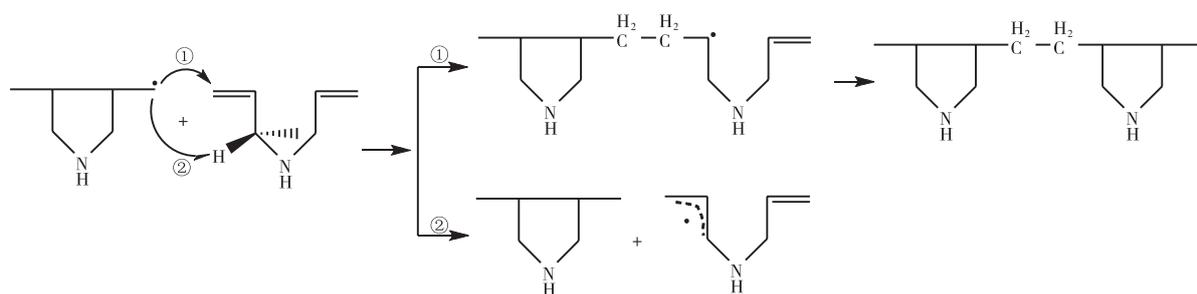


图 1 二烯丙基胺的自由基聚合和链转移反应

Fig.1 Free radical polymerization and chain transfer of diallylamine

烯丙基胺混和物可聚合得到高分子质量的固体聚合物。在偶氮异丁腈引发剂引发下,苯乙烯、二乙烯苯与二烯丙基胺进行自由基共聚而生成立网状结构的大分子,其反应如图 2 所示。

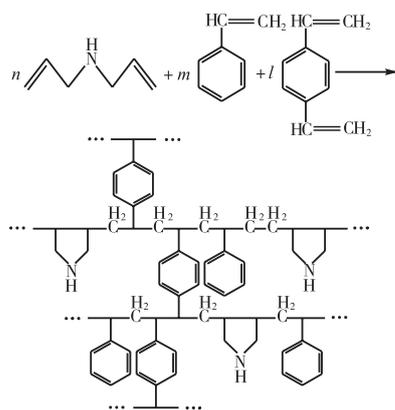


图 2 二烯丙基胺-苯乙烯-二乙烯苯共聚反应

Fig.2 Copolymerization of diallylamine with styrene and p-divinyl benzene

NMIP 微球经南开大学中心实验室 VANIO-EL 型元素分析仪检测,得到 C、H、N 三元素在聚合物中所占比例(见表 1)。根据表中共聚物的含氮量,可近似折算出共聚物中二烯丙基胺含量至少为 4.64%。

表 1 聚合物的组成和元素分析结果

Tab.1 Results of elemental analysis of the polymer

聚合物	颜色	检测结果		
		氮/%	碳/%	氢/%
苯乙烯和二烯丙基胺共聚物	淡黄色	1.16	63.42	8.40

2.2 二烯丙基胺-苯乙烯-二乙烯苯共聚物及分子印迹聚合物的红外光谱分析

2.2.1 二烯丙基胺-苯乙烯-二乙烯苯共聚物的红外光谱分析

将 NMIP 粉碎后过 100 目筛,按 1.4 洗脱方法以除去未反应的单体和致孔剂 DMF,用 VECTOR22 傅里叶变换红外光谱仪 KBr 压片法在 4 000 ~ 400 cm^{-1} 范围测其红外光谱,结果见图 3。

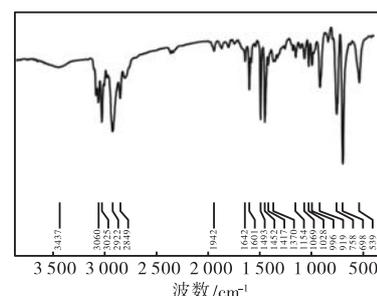


图 3 二烯丙基胺-苯乙烯-二乙烯苯共聚物的红外光谱
Fig.3 FTIR of copolymerization of diallylamine with styrene and p-divinyl benzene

在 3 081、3 060 和 3 025 cm^{-1} 处为苯环 C—H 键的伸缩振动吸收峰, 1 601、1 493 cm^{-1} 处为苯环 C—C 伸缩振动吸收峰, 698、758 cm^{-1} 处为苯环 C—H 键的面外弯曲振动吸收峰, 2 922、2 849、2 805 cm^{-1} 处为烷基链的 C—H 键伸缩振动吸收峰. 1 452 cm^{-1} 处为 CH_2 的 C—H 面内弯曲振动, 在 3 437 cm^{-1} 处为仲胺 N—H 键的伸缩振动吸收峰, 而在 1 642 cm^{-1} 处出现弱的 N—H 键变形振动吸收峰. 从 NMIP 的红外光谱分析结果可以看出, 聚合物中含有仲胺基, 证明二烯丙基胺参与了聚合反应.

2.2.2 分子印迹聚合物的红外光谱

将含模板 MIP 粉碎后过 100 目筛, 经用去离子水反复洗涤以除去其中的致孔剂 DMF, 70 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥至恒重后, 用 VECTOR22 傅里叶变换红外光谱仪 KBr 压片法在 4 000 ~ 400 cm^{-1} 范围测其红外光谱, 结果见图 4(a). 与 NMIP 相比, MIP 在 3 440 cm^{-1} 处有 O—H 伸缩振动吸收峰, 是槲皮素酚羟基的主要特征吸收峰, 1 660 cm^{-1} 处为槲皮素 C=O 伸缩振动吸收峰, 在 1 383 cm^{-1} 和 1 263 cm^{-1} 处分别为槲皮素 C—OH 和 C—O—C 的伸缩振动吸收峰^[10].

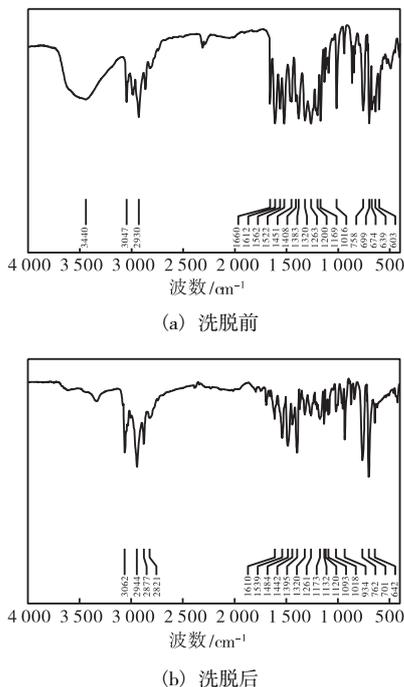


图 4 分子印迹聚合物的红外光谱
Fig.4 FTIR copolymerization of MIP

经过洗脱后的 MIP 红外光谱分析结果见图 4(b). 根据文献[11]可知, 模板分子在洗脱后一般会有 5% 左右永久包封于分子印迹聚合物中. 本实验制备的 MIP 经洗脱后, 在 3 440、1 660、1 382、1 260 cm^{-1} 附近处的槲皮素特征吸收峰明显减弱, 但并未完全消

失, 表明有少量槲皮素分子被永久包封于分子印迹聚合物中, 由于这部分模板分子在随后的吸附实验中不会发生变化, 故不会干扰分子印迹聚合物的吸附作用和选择性实验.

2.3 MIP 的静态吸附量

静态吸附量 (Q , $\mu\text{g/g}$) 是指在一定温度下, 单位质量的分子印迹聚合物达到吸附平衡时所吸附的模板分子的质量. 可通过下式计算:

$$Q = \frac{(C_0 - C_e) \cdot V}{1000 W} \quad (4)$$

式中: C_0 和 C_e 分别为模板分子的起始浓度和平衡浓度 ($\mu\text{g/L}$); V 为溶液的体积 (mL); W 为分子印迹聚合物的质量 (g).

在恒定温度下, Q 随 C_0 增大而升高, 达到最大值后不再变化, 此时吸附量为分子印迹聚合物对目标分子的饱和吸附量.

为了加速分子印迹聚合物的吸附平衡和维持温度的恒定, 静态吸附实验在 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴摇床上进行, 聚合物在摇床上振荡时与器壁摩擦, 可能产生一些透过滤纸的微小颗粒, 会对溶液吸光度的测定造成一定的影响. 为消除由此产生的误差, 在对槲皮素-MIP 静态吸附量测定时, 将槲皮素-MIP 加入到槲皮素乙醇溶液作为供试样, 而将等量空白分子印迹聚合物 (NMIP) 加入到相同体积的乙醇溶液中同时在摇床上振荡, 将其用滤纸过滤后的滤液的吸光度作为二次对照, 在 371 nm 下测定, MIP 的吸附结果见表 2. 从表中可以看出, MIP 的静态饱和吸附量为 179.11 $\mu\text{g/g}$.

表 2 单位 MIP 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下的吸附量
Tab.2 Adsorption of MIP (per gram) at 25 $^{\circ}\text{C}$

聚合物质量/g	起始浓度 $C_0/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	吸附后浓度 $C_e/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	MIP 吸附量 $Q/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
0.302 3	1.68	0.728	62.96
0.302 3	3.36	2.260	72.77
0.303 4	5.04	3.503	101.33
0.302 1	6.72	4.616	139.32
0.301 4	8.40	5.873	167.70
0.304 2	10.08	7.361	178.75
0.304 0	11.76	9.037	179.11
0.303 6	16.80	14.081	179.11

2.4 MIP 对槲皮素吸附的选择性

通过分子印迹聚合物在槲皮素和芦丁混和溶液中对二者吸附的差异性来考察分子印迹聚合物的选择性. 所测得的吸附平衡溶液及对照液的紫外吸收数据见表 3.

表3 槲皮素-芦丁混合溶液吸附前后的吸光度

Tab.3 Absorbences of the quercetin-rutin solution before and after the adsorption

A_{247}	A_{266}	ΔA_1	A_{340}	A_{380}	ΔA_2
0.198	0.215	0.017	0.207	0.283	0.076

分子印迹聚合物的选择特性可以用静态吸附分配系数 K_D 和分离因子 α 来进行表征^[8-9]. 静态吸附分配系数 K_D 的定义为

$$K_D = C_p / C_s \quad (5)$$

式中: C_p 表示模板分子在底物上的质量摩尔浓度 (mmol/g), C_s 表示底物在溶液中的浓度 (mmol/mL).

分离因子 α 的定义为

$$\alpha = K_{D_i} / K_{D_j} \quad (6)$$

其中 i 和 j 分别表示模板分子和干扰分子, 规定 $K_{D_i} = K_{D_j}$ 时, $\alpha = 1.00$.

槲皮素的吸附量可由 ΔA_2 吸附前后变化求得. 代入式(3)得其吸附后的平衡浓度为

$$C = \frac{0.076 - 0.037}{0.0256} = 1.52 \mu\text{g/mL}$$

则由式(4)得单位 MIP 槲皮素吸附量为

$$Q = \frac{(3.52 - 1.52) \times 10}{0.3025} = 66.27 \mu\text{g/g}$$

其在分子印迹聚合物上的浓度为:

$$C_{p1} = \frac{Q}{M} = \frac{66.27 \times 10^{-3}}{302.23} = 2.19 \times 10^{-4} \text{ mmol/g}$$

其中 M 为槲皮素模板分子摩尔质量 (g/mol).

由式(5)可得槲皮素静态吸附分配系数:

$$K_{D1} = \frac{2.19 \times 10^{-4}}{1.52 \times 10^{-3} / 302.23} = 43.54 \text{ mL/g}$$

同理, 可求出芦丁在分子印迹聚合物上的浓度 C_{p2} . 静态吸附分配系数 K_{D2} 分别为 $6.11 \times 10^{-5} \text{ mmol/g}$ 和 15.61 mL/g .

由式(6)可得分离因子:

$$\alpha = \frac{K_{D1}}{K_{D2}} = \frac{43.54}{15.61} = 2.78$$

由此结果可以看出, 制备所得的分子印迹聚合物对模板分子槲皮素有较好的选择性吸附效果, 其吸附能力显著高于干扰物分子芦丁, 表现了所制得的分子印迹聚合物对模板分子有高度的选择性识别能力. 这主要是因为尽管槲皮素分子和芦丁分子在结构上很相似, 但芦丁比槲皮素分子中多了一个香芸糖结构^[12], 分子体积较槲皮素大, 致使其在吸附过程中不能和模板分子洗脱后留下的“印迹”有效匹配, 因此, 与 MIP 结合能力比槲皮素弱得多.

3 结论

以槲皮素为模板, N,N -二甲基甲酰胺为致孔剂, 偶氮二异丁腈为引发剂条件下, 二烯丙基胺作为功能单体可与苯乙烯骨架单体和交联剂二乙烯苯共聚制备含有碱性功能基的槲皮素的分子印迹聚合物, 该分子印迹聚合物对槲皮素具备很好的结合能力和特征识别性能. 在有芦丁干扰条件下, 其静态吸附分配系数为 43.54 mL/g , 分离因子达 2.78.

参考文献:

- [1] 姜忠义. 分子印迹聚合物制备与应用[J]. 化学世界, 2003, 44(2): 105-108.
- [2] Hosoya K, Yoshizako K, Shirasu Y, et al. Molecularly imprinted uniform-size polymer-based stationary phase for high-performance liquid chromatography structural contribution of cross-linked polymer network on specific molecular recognition[J]. J Chromatography A, 1996, 728(1/2): 139-147.
- [3] Piletsky S A, Alcock S, Turner A P F. Molecular imprinting: at the edge of the third millennium[J]. Trends and Chemistry, 2001, 19(1): 9-12.
- [4] Ansell R, Kriz D, Mosbach K. Molecularly imprinted polymers for bioanalysis: chromatography, binding assays and biomimetic sensor[J]. Current Opin Biotechnol, 1996, 7(1): 89-94.
- [5] 雷建都. 分子印迹分离技术[D]. 北京: 北京化工大学, 2002.
- [6] 赵文彬, 樊莲莲, 刘杜花, 等. 精制槲皮素的制备及其含量测定方法研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(12): 2541-2542.
- [7] Timofeeva L M, Kleshcheva N A, VasiGeva Y A, et al. Synthesis of novel polymers based on monomers of the diallylamine series: mechanistic and kinetic study[J]. Polymer Science, Ser A, 2005, 47(6): 551-565.
- [8] 周兴国. 分子印迹聚合物原位合成及性质研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2005.
- [9] 李满秀, 张静, 张海容, 等. 等吸收紫外光度法同时测定槐米中的芦丁和槲皮素[J]. 光谱实验室, 2005, 22(1): 42-45.
- [10] 余燕影, 俞梅兰, 曹树稳. 槲皮素铬(III)配合物合成及清除自由基活性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 29-32.
- [11] 张立永, 成国祥. 分子印迹聚合物微球的制备及应用[J]. 高技术通讯, 2002, 07: 108-110.
- [12] 戴云, 董学畅, 罗娅, 等. 芦丁的谱学性质及其测定烟草中的铁[J]. 云南民族学院学报: 自然科学版, 2001, 10(2): 338-339.