

荧光分子印迹膜选择性检测 7-氨基-4-甲基香豆素^①

王惠芸 高云玲 姚克俭^②

(浙江工业大学化学工程与材料学院绿色合成技术国家重点实验室培育基地 杭州市朝晖六区潮王路 18 号 310032)

摘 要 合成了以 7-氨基-4-甲基香豆素为模板分子, 聚偏氟乙烯微孔滤膜为支撑介质的分子印迹复合膜。采用荧光光度法, 研究了荧光分子印迹膜的吸附动力学、吸附容量和选择性吸附性能。研究表明, 该印迹膜对模板分子具有良好的识别功能。

关键词 荧光; 分子印迹技术; 分子印迹膜; 香豆素

中图分类号: O657.32

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2011)06-2779-05

1 引言

香豆素广泛存在于车叶草、草木犀和董衣草油、芸香科等植物中, 具有重要的药用价值, 也可作为增香剂用于食品行业中^[1,2]。因此, 研制对香豆素具有高度亲和性和选择性的分子印迹聚合物用于香豆素的检测、提取具有重要意义。

分子印迹聚合物对模板分子具有特定的记忆功能、较高的亲和性和选择性, 同时制备简单、造价低廉、使用寿命长、稳定性好、易保存, 在生物、环境、食品、医药等领域^[3-7]展现出良好的应用前景。本文以聚偏氟乙烯(PVDF)膜为支撑体, 7-氨基-4-甲基香豆素为模板, 以乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)为交联剂, 偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂制备了对香豆素具有较高吸附选择性的分子印迹聚合物复合膜, 并对其吸附性能进行了研究, 为分子印迹聚合物复合膜作为传感器识别元件用于复杂体系中检测模板分子奠定了理论和实验基础。

2 实验部分

2.1 实验仪器与材料

Ultraspec 3300pro 紫外分光光度计(英国 Biochrom 公司); Kq5200b 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司); SLO-BLO 多功能酶标仪(美国分子仪器公司); XW-80A 微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器有限公司); DZF-6020MBE 真空干燥箱(上海博迅实业有限公司); ZF7 三用紫外分析仪(巩义予华仪器有限责任公司)。

乙醇(分析纯)、2-乙烯吡啶(97%)、7-氨基-4-甲基香豆素(98%)、7-羟基-4-甲基香豆素(98%)、偶氮二异丁腈(98%), 均来自上海晶纯试剂有限公司; EGDMA(98%)、DMSO(分析纯)、乙酸(分析纯), 均来自无锡海硕生物有限公司; 96 孔荧光酶标板(美国康宁公司); 聚偏氟乙烯(PVDF, 孔径 0.45 μ m)、parafilm 膜(上海亚东核级树脂有限公司)。

① 国家自然科学基金资助(NO. 20807037)

② 联系人, 电话: (0571) 88320951; E-mail: yaokj@zjut.edu.cn

作者简介: 王惠芸(1984—), 女, 浙江省湖州市人, 硕士, 主要从事分子印迹材料和荧光检测分析工作。

收稿日期: 2011-02-24; 接受日期: 2011-04-06

2.2 实验方法

2.2.1 7-氨基-4-甲基香豆素印迹复合膜的制备

0.04mmol 7-氨基-4-甲基香豆素溶解于 1.5mL DMSO 溶剂中,并依次加入 0.16mmol 2-乙烯吡啶(2-VP),乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA) 0.8mmol 和 0.003g 偶氮二异丁腈(AIBN) 引发剂混合超声 15min,然后将预先浸于 0.15mol/L AIBN 溶液 10min 的 PVDF 膜放入上述溶液,静置 20min 后取出,用石英板夹住,赶出气泡用 Parafilm 膜密封,紫外灯照射 16h。非印迹膜(NIP)采用与印迹膜(MIP)相同的制备方式,但不加入模板分子。制备的印迹膜用乙醇:乙酸(V/V,4:1)洗脱^[8]至荧光强度趋于稳定,再用乙醇洗去残留的乙酸。最后,将印迹复合膜保存在乙醇溶液中以备

2.2.2 7-氨基-4-甲基香豆素荧光印迹膜的吸附特性

将保存于乙醇溶液中的印迹复合膜取出,甩干后放入 96 孔荧光酶标板中,加入 10^{-4} mol/L 的 7-氨基-4-甲基香豆素溶液,每隔 20min 扫描一次印迹膜的荧光强度变化,直至荧光强度稳定不变为止,测量分子印迹膜的吸附动力学。印迹膜的吸附能力是分别取不同浓度的 7-氨基-4-甲基香豆素溶液 250 μ L 加入含印迹复合膜的荧光孔板中,测其荧光强度变化,直至荧光强度不变为止。7-氨基-4-甲基香豆素荧光印迹膜的选择性实验,是选择和模板分子结构类似的 7-羟基-4-甲基香豆素作为竞争分子,采用先将印迹复合膜于 7-羟基-4-甲基香豆素溶液中吸附 10min,然后再于相应浓度的 7-氨基-4-甲基香豆素溶液中反应 10min,测量吸附过程的荧光强度变化。为了得知模板分子在溶液和吸附材料中的分配,常采用富集率 E 、分配系数 K_d 、选择性系数 k 等参数来评价 MIP 膜材料的吸附性能^[9]。

$$E\% = [(C_A - C_B) / C_A] \times 100\% \quad (1)$$

$$K_d = [(C_A - C_B) / C_B] \times [\text{溶液体积(mL)}] / [\text{MIP 质量(g)}] \quad (2)$$

$$k = K_{dx1} / K_{dx2} \quad (3)$$

式中: C_A 、 C_B —— 吸附前后吸附分子的量($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); x_1 —— 目标分子; x_2 —— 竞争分子。

3 结果与讨论

3.1 7-氨基-4-甲基香豆素印迹复合膜的制备

分子印迹采用 7-氨基-4-甲基香豆素为模板分子,经溶剂去除模板分子后可获得对模板分子有效识别的三维立体空穴。实验探索了洗脱溶剂对模板分子的去除效果。图 1 表明采用乙醇和 4:1 乙醇/乙酸溶液循环洗脱 7-氨基-4-甲基香豆素印迹聚合物复合膜,随着洗脱的进行印迹膜的荧光强度不断下降。采用 4:1 的乙醇/乙酸洗脱荧光强度下降趋势较乙醇快,说明含有乙酸的乙醇溶液更有利于洗脱模板分子 7-氨基-4-甲基香豆素。这可能由于乙酸较乙醇更易与 7-氨基-4-甲基香豆素形成氢键,使得模板分子 7-氨基-4-甲基香豆素从印迹聚合物复合膜中洗脱出来。

3.2 7-氨基-4-甲基香豆素印迹复合膜的荧光特性

荧光光谱法检测 7-氨基-4-甲基香豆素印迹聚合物复合膜(图 2),7-氨基-4-甲基香豆素印迹聚合物复合膜(MIP)在 366nm 激发波长下,发射波长为 430nm,荧光较强。在同样条件下,非印迹聚合物膜(NIP)由于不含荧光分子,其荧光强度极弱。

3.3 7-氨基-4-甲基香豆素印迹复合膜的吸附动力学

印迹复合膜的吸附动力学测量表明吸附效率随吸附时间变化(图 3)。实验表明,开始的一段时

间内印迹膜对 7-氨基-4-甲基香豆素的吸附比较快。这是因为初始膜上 7-氨基-4-甲基香豆素浓度较低, 溶液与膜上 7-氨基-4-甲基香豆素的浓度差较大, 传质推动力较大, 从而加快了印迹分子快速的传质。分子传质一定时间后, 印迹膜的浅层孔穴被模板分子占据, 扩散向膜的深层进行传递, 浓度差的降低与传质阻力的增加导致传质速度降低, 吸附 4h 达到平衡。

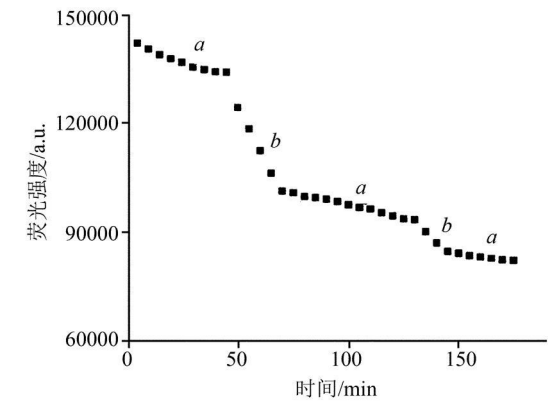


图 1 7-氨基-4-甲基香豆素印迹复合膜解吸
荧光强度变化
a——乙醇洗脱; b——乙醇/乙酸(4:1, V/V)洗脱。

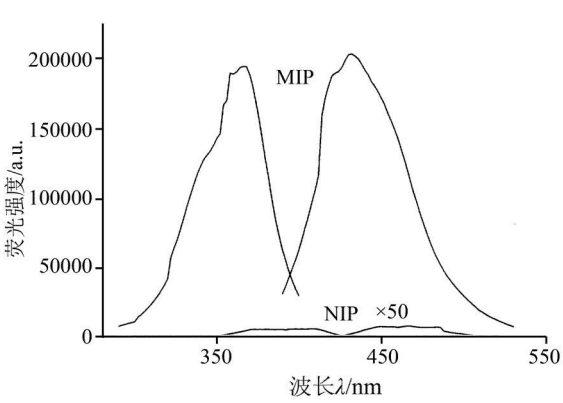


图 2 印迹复合膜与非印迹复合膜的荧光光谱
NIP×50——图中的曲线是非印迹聚合膜(NIP)
荧光强度放大 50 倍的曲线。

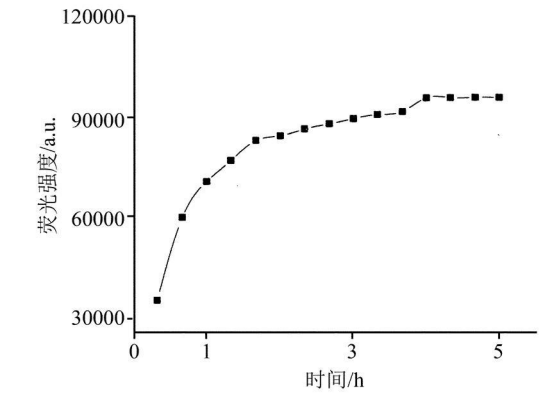


图 3 7-氨基-4-甲基香豆素印迹复合膜
吸附动力学曲线

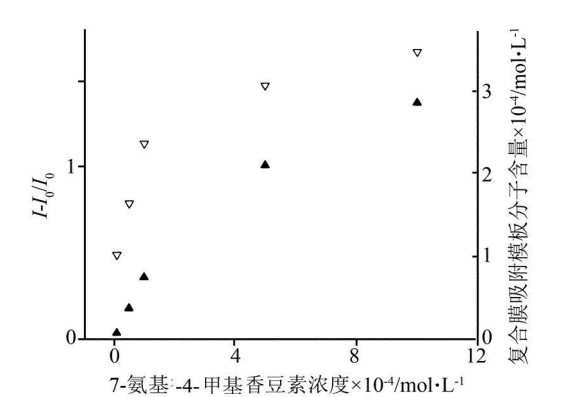


图 4 7-氨基-4-甲基香豆素印迹膜荧光强度变化曲线
▽——膜上荧光变化; ▲——吸附的香豆素量。

3.4 7-氨基-4-甲基香豆素印迹复合膜的吸附能力

为了评价印迹膜的吸附能力, 通过测定印迹膜吸附不同浓度 7-氨基-4-甲基香豆素溶液, 用荧光光谱分别检测吸附前后溶液与膜的荧光强度来表征。图 4 表明, 当加入 7-氨基-4-甲基香豆素时, 分子印迹膜在 430nm 的荧光强度不断提高, 并随 7-氨基-4-甲基香豆素浓度增加印迹膜的荧光强度逐渐增大。同时, 分子印迹膜上的荧光强度变化与其吸附的 7-氨基-4-甲基香豆素的量变化趋势相同, 表明 7-氨基-4-甲基香豆素分子印迹膜的荧光强度变化直接相应于分析物浓度的变化, 与分析介质直接相关。

3.5 荧光印迹膜的选择性

为了评价材料的选择性, 采用结构类似的 7-羟基-4-甲基香豆素作为竞争分子测试印迹膜的选

择性吸附。在相同条件下, 7-氨基-4-甲基香豆素聚合物复合膜对 7-氨基-4-甲基香豆素的富集率、分配系数明显高于 7-羟基-4-甲基香豆素的富集率和分配系数; 印迹膜对模板分子的选择性是结构类似物的 2—4 倍(见表 1)。

相对于 7-羟基-4-甲基香豆素, 印迹聚合物复合膜对 7-氨基-4-甲基香豆素表现出更大的亲和性能, 显示出了优先选择性吸附。选择性的提高可归因于印迹膜制备过程中模板分子 7-氨基-4-甲基香豆素与单体发生了氢键作用, 使分子定向排列, 形成了一定的立体化学结构, 聚合后将这种三维立体结构得以固定。模板分子洗去后, 聚合物中立体结构所形成的三维立体空穴与 7-氨基-4-甲基香豆素的分子结构相匹配, 因而表现出更高的选择性。

表 1 香豆素印迹复合膜的竞争吸附

溶液浓度(10 ⁻⁴ mol/L)		吸附量(10 ⁻⁴ mol/L)		E(%)		K _d (mL·g ⁻¹)		k
X 1	X 2	X 1	X 2	X 1	X 2	X 1	X 2	
0.6	0.6	0.39	0.19	0.66	0.32	107.84	27.15	3.97
0.8	0.8	0.48	0.29	0.61	0.37	77.03	29.25	2.63
1.0	1.0	0.41	0.24	0.41	0.24	45.90	21.00	2.18

注: X 1——7-氨基-4-甲基香豆素; X 2——7-羟基-4-甲基香豆素; E——富集率; K_d——分配系数; k——选择性系数。

4 结论

以聚偏氟乙烯(PVDF)为支撑膜, 7-氨基-4-甲基香豆素为模板分子, 2-乙烯吡啶为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)为交联剂, 偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂, 通过紫外光引发合成印迹聚合物复合膜, 并对印迹复合膜的荧光特性、吸附时间、吸附容量、竞争吸附等性能进行了测试, 制备的印迹膜对模板分子具有良好的识别功能。

参考文献

[1] Sun Y F, Li B Y, Song H C. Synthesis of s-Triazolo[3, 4-b]-1, 3, 4-Thiadiazole Derivatives Containing Coumarin and Furan[J]. *Chin. J. Appl. Chem.*, 2005, **22**(3): 316—319.

[2] Cheng M W. *Organic Heterocyclic Compounds*[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990. 91—92.

[3] Andersson L I. Molecular Imprinting for Drug Bioanalysis A Review on the Application of Imprinted Polymers to Solid-Phase Extraction and Binding Assay[J]. *J. Chromatogr. B*, 2000, **739**(1): 163—173.

[4] Caro E, Marce R M, Cormack P A G *et al.* On-Line Solid-Phase Extraction with Molecularly Imprinted Polymers to Selectively Extract Substituted 4-Chlorophenols and 4-Nitrophenol from Water[J]. *J. Chromatogr. A*, 2003, **995**(1—2): 233—238.

[5] Wulff G. Enzyme-Like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers[J]. *Chemical Review*, 2001, **102**(1): 1—27.

[6] Nilsson J, Spegel P, Nilsson S. Molecularly Imprinted Polymer Formats for Capillary Electrochromatography[J]. *J. Chromatogr. B*, 2004, **804**(1): 3—12.

[7] Yoshikawa M, Izumi J, Guiver M D *et al.* Recognition and Selective Transport of Nucleic Acid Components Through Molecularly Imprinted Polymeric Membranes [J]. *Macromol. Mater. Eng.*, 2001, **286**(1): 52—59.

[8] Ma X X, He X W, Zhang M *et al.* Studies on Binding of Molecularly Imprinted Polymer Composite Membranes to Coumarin-3-Carboxylic Acid as Template and Permeable Selectivity[J]. *Chem. J. Chinese Universities*, 2007, **27**(7): 1237—1241.

[9] Dai S, Burleigh M C, Shin Y *et al.* Imprint Coating: a Novel Synthesis of Selective Functionalized Ordered Mesoporous Sorbents[J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1999, **38**(9): 1235—1239.

Selective Determination of 7-Amino-4-Methyl-Coumarin by Fluorescence Molecularly Imprinted Membrane

WANG Hui-Yun GAO Yun-Ling YAO Ke-Jian

(State Key Laboratory Breeding Base of Green Chemistry Synthesis Technology, College of Chemical Engineering
and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, P. R. China)

Abstract With 7-amino-4-methyl-coumarin as a template molecular and polytetrafluoroethylene microfiltration membrane as support medium, molecular imprinted polymer was synthesized. The adsorption kinetics, adsorption capacity and selective adsorption performance of molecular imprinted polymer were investigated by fluorescence spectrometry. The imprinted membrane shows the good recognition function for template molecules.

Key words Fluorescence; Molecular Imprinted Technique; Molecular Imprinted Membrane; Coumarin

欢迎您投稿 “高效、保质、宽容”的中文核心期刊
《光谱实验室》

这是您的发明、发现获得“优先权”的可靠保障!

发表周期多数(50% - 75%)为 5—9 个月,

少数(20% - 45%)为 1—5 个月,极少数(0 - 7%)为 15—30 天

及时发表科技论文,是尽快实现其社会效益的前提,也是作者创造性劳动得到尊重、为在世界上取得“优先权”的可靠保障,因为发明、发现的“优先权”通常是以出版时间为准的。因此,本刊把尽快(“高效、保质、宽容”)发表作者的论文,视为自己的神圣职责。

确保论文质量是论文早日发表的条件。作者发表论文总是要反映自己在工作中有所发明、有所发现和有所创造的成绩,而不是去暴露自身的“缺欠”和“毛病”,换言之,作者发表论文总是要为自己“争光”;而不是让自己“蒙羞”。因此,作者投稿之前,除了自己要反复检查外,一定要多请您周围的同事、专家挑“毛病”,把“毛病”消灭在投稿之前,再投本刊才能发表得快。如果本刊挑出毛病,再请作者修改,反复“折腾”,不仅消耗双方精力,而且必然延长发表时间。保证质量的基本要求就是论文要做到“齐、清、定”。“齐”即文字、表格、图片等齐全,并符合本刊《投稿须知》的各项要求;“清”即文字、图片打印清楚,不得有模糊不清的图片(包括上面的文字和数字);若有彩色图片及彩色曲线,请转化为清晰的黑白图片和黑色曲线,并清除图片和曲线上的背景,便于排版和复制;“定”即做到稿件内容(文字、表格、图片等)完整,无需再作增删修改。

来稿请用 Word 排版,用电子邮件发到本部电子信箱(E-mail: gpsys@263.net)。

本刊收到作者来稿后,都会在 3 日(遇公休日顺延)内发出“收稿通知”。因此,作者发送稿件后 7 日以上都没有消息,一定要及时来电查询。

一篇论文出版,常常需要反复沟通“作者→编辑部→审者→编辑部→作者”之间的联系,其中与作者的联系是最重要的一环,一旦脱节,必然中断编辑过程。因此作者来稿时,务必将联系人的正确的姓名和详细地址、办公室电话、手机号码、传真号码和电子信箱等(通讯方式要尽可能全)告诉编辑部,以便能与您及时联系。否则,由此而产生的后果由作者自己负责。

本刊发表论文的宗旨是交流学术,而不是为了应付“职称”、“拿文凭”。

《光谱实验室》编辑部