

水相中制备硅胶表面分子印迹聚合物及色谱性能研究

田晓琴¹, 冯芳^{1,2}, 狄斌^{1,2*}, 苏梦翔³

(中国药科大学¹ 药物分析教研室; ²药物质量与安全预警教育部重点实验室; ³药学实验教学中心, 南京 210009)

摘要 目的: 结合 环糊精在水相中制备以硅胶为骨架的苯丙氨酸分子印迹聚合物, 并进行色谱性能研究。方法: 在乙烯基硅胶表面, 结合丙烯酰化 环糊精, 以苯丙氨酸为模板分子, 2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸 (AMP SA) 为功能单体, N,N-亚甲基双丙烯酰胺 (MBAA) 为交联剂, 采用热聚合法在水相中制得以硅胶为骨架的苯丙氨酸分子印迹聚合物, 并以此固定相装填不锈钢色谱柱, 以乙腈-水-甲酸 (10:90:0.1) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 200 nm 为检测波长, 进行高效液相色谱分析, 并与空白分子印迹聚合物柱进行比较。结果: 苯丙氨酸在印迹柱上的保留比在空白印迹柱上强, 与赖氨酸、脯氨酸达到基线分离。结论: 在水相中采用硅胶表面印迹法结合环糊精制备的分子印迹聚合物对模板分子具有良好的特异选择性。

关键词 硅胶; 表面聚合; 分子印迹; 热聚合; 高效液相色谱法

中图分类号 O657.7 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2009)05-0435-05

Preparation and chromatographic performance of phenylalanine molecularly imprinted polymers on silica gel in aqueous medium

TIAN Xiao-qin¹, FENG Fang^{1,2}, DI Bin^{1,2*}, SU Meng-xiang³

¹Department of Pharmaceutical Analysis; ²Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education; ³Pharmacy Experimental Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract **Aim:** To prepare phenylalanine molecularly imprinted polymers (Phe-MIPs) on a porous silica-gel support in aqueous phase and study on its chromatography. **Methods:** By copolymerizing acryloyl- β -cyclodextrin, with 2-acrylamido-2-methyl-1-propane-sulfonic acid (AMP SA) as the functional monomer, and N,N-methylene bisacrylamide (MBAA) as the cross-linker on the vinylated silica-gel in aqueous phase of phenylalanine, a thin layer of molecularly imprinted- β -cyclodextrin (β -CD) polymer was immobilized on silica-gel via thermal polymerization. The prepared Phe-MIPs were packed into an empty stainless steel column. HPLC-UV was performed on this column with a mobile phase of MeCN-H₂O-HCOOH (10:90:0.1) at a flow rate of 0.1 mL/min and a detection wavelength of 200 nm. The Phe-MIPs column were compared with the blank column. **Results:** Phenylalanine had stronger retention on Phe-MIPs column than the blank imprinted polymers column, and was well separated with lysine and proline. **Conclusion:** The MIPs prepared in aqueous medium have a strong adsorption selectivity.

Key words silica gel; surface polymerization; molecular imprint; thermal polymerization; HPLC

分子印迹技术可获得具有识别位点的高分子聚合物, 以分子印迹聚合物 (molecularly imprinted polymers, MIPs) 作为色谱固定相, 有高度选择性和可预见洗脱的优点。目前已应用于薄层色谱^[1]、毛细管电色谱^[2]、高效液相色谱^[3-5]、超临界流体色谱^[6]中。其中, 在高效液相色谱中应用最为广泛。

目前大多数分子印迹聚合物的制备和应用都

局限在有机溶剂中进行, 而天然的识别系统以及 MIPs 所面临的实际应用环境则多数是水性体系, 特别是多肽、蛋白质等生物大分子, 因此水 (包括含水有机溶剂) 环境下的分子识别问题已日益引起人们的关注。魏俊等^[7]以壳聚糖为功能基体, 以 L-脯氨酸为模板分子, 在水溶液中合成 MIPs, 对 L-脯氨酸具有良好的吸附选择性和高效分离特性。

* 收稿日期 2009-03-13 * 通讯作者 Tel: 025-83271269 E-mail: ddw888@vip.sina.com

在有机体系中氢键对识别位点起着主要作用,而在水相中氢键作用很弱,采用环糊精作为疏水作用的键合点,克服了这方面的缺点。然而,一些水相中常用的交联剂,如 *N,N*-亚甲基双丙烯酰胺,不是刚性结构,形成的聚合物存在刚性不足的缺点。通过对硅胶进行修饰后,为聚合物提供支撑点,可以增强聚合物的机械性。

制备分子印迹聚合物的方式主要有本体聚合法、分散聚合法、沉淀聚合法、悬浮聚合法、原位聚合法、表面印迹法等,针对不同模板分子,可选择不同的功能单体和聚合方式。其中,通过表面聚合法在硅胶表面制备分子印迹聚合物,可得到尺寸均一,机械性良好的聚合物颗粒,无需粉碎和筛分,克服了传统制备方法的缺点^[8]。

本文采用硅胶表面印迹法将丙烯酰化环糊精与 2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸 (AMPSA)、*N,N*-亚甲基双丙烯酰胺 (MBAA) 通过热聚合固定在硅胶上,在水相中制得以硅胶为骨架的环糊精苯丙氨酸分子印迹聚合物,以此作为固定相,进行色谱分析,初步探讨了系列氨基酸的色谱行为。

材 料

1.1 试 剂

苯丙氨酸,赖氨酸,脯氨酸,酪氨酸,色氨酸,蛋氨酸(上海华美生物工程公司);环糊精(化学纯,中国医药集团上海化学试剂公司);AMPSA, MBAA, 烯丙基三乙氧基硅烷,乙烯基三乙氧基硅烷(美国 Sigma 公司);丙烯酰氯(纯度 96%,英国 Lancaster 公司);球形硅胶(粒径 5 μm , 比表面积 270 m^2/g , 孔径 10 nm, 日本富士硅化学公司);*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF, 使用前用 4A 型分子筛筛分, 无水硫酸镁干燥), 三羟甲基氨基甲烷(上海惠兴生化试剂有限公司);乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

BS-21S 分析天平(德国 Satorius 公司); FT-R-4100 傅里叶变换红外光谱仪(日本 Jasco 公司); AV-300 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司); PHS-25 数显 pH 计(上海精密科学仪器有限公司); PL5242 实验室用超纯水系统(美国 Pall 公司); LC-2010 高效液相色谱仪(日本岛津公司); Class-VP 色谱工

作站, ELSD 检测器(法国 Sedere 公司); HS2000 色谱工作站(杭州英谱科技开发有限公司); Inertsil PH-3 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) (日本 GL 科学公司); Vario EL 元素分析仪(德国 Elementar 公司); 不锈钢柱管 (4.6 mm \times 50 mm, 江苏汉邦科技有限公司)。

方 法

2.1 乙烯基硅胶的制备

硅胶先用 1% HF 浸没放置 24 h, 以除去硅胶中少量的无机杂质并增加硅胶表面的羟基数目, 用 G5 砂芯漏斗抽滤, 用双蒸水洗至近中性, 再用 1 mmol/L EDTA- Na_2 溶液浸没 3 h, 用双蒸水洗至近中性, 真空干燥 24 h 备用。

取活化硅胶 3 g 和 DMF 30 mL 放入 100 mL 三颈烧瓶中, 氮气保护下, 加入乙烯基三乙氧基硅烷 5 mL, 110 $^\circ\text{C}$ 反应 16 h, 反应结束后抽滤, 经乙醇洗涤后, 60 $^\circ\text{C}$ 真空干燥, 得乙烯基硅胶, 产率为 60%。

2.2 丙烯酰化环糊精的制备

环糊精先用双蒸水重结晶 3 次, 干燥, 备用。取重结晶后的环糊精 4 g, 置 250 mL 三颈烧瓶中, 用 0.5 mol/L NaOH 溶液 100 mL 溶解。氮气保护下, 0 $^\circ\text{C}$ 下边搅拌边缓慢滴加丙烯酰氯 5 mL, 室温反应 16 h。50 $^\circ\text{C}$ 旋转蒸发至干, 用 DMF 超声溶解, 以除去钠盐, 抽滤。滤液用丙酮沉淀, 抽滤, 反复此操作至滤液经硝酸银试液未检出白色沉淀。所得白色固体经乙醇重结晶两次。红外灯下烘干, 得丙烯酰化环糊精 750 mg。

2.3 硅胶表面分子印迹聚合物的制备

称取丙烯酰化环糊精 70 mg, 苯丙氨酸 10 mg, AMPSA 25 mg, MBAA 80 mg, 用 Tris 缓冲液 (pH 8.05) 2 mL 溶解, 超声 2 min, 记为体系 1; 乙烯基硅胶 800 mg 均匀分散于 3 mL Tris 缓冲液中, 记为体系 2; 在搅拌状态下, 体系 1 均匀分散在体系 2 中, 在氮气保护下加入 NaHSO_3 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 搅拌数分钟后, 37 $^\circ\text{C}$ 反应 2 h。收集固体, 用大量的水、乙醇冲洗, 干燥, 得白色固体 P_1 , 聚合物反应过程及聚合物结构如图 1 所示。同样的操作条件下, 不加模板分子, 得空白分子印迹聚合物 P_0 。

2.4 色谱柱的装填及色谱研究

以乙醇为溶剂, 40 MPa 压力下将硅胶表面分

子印迹聚合物 (MIP-silica gel) 装入不锈钢柱 (50 mm \times 4.6 mm)。先后以 1.0 mL/min 的流速用甲醇、纯水各冲 1 h, 反复 3 次, 再用 1% 甲酸冲 1 h, 至基线平稳。然后用纯水冲柱至洗脱液成中性。进行 HPLC 分析, 检测波长为 200 nm, 室温, 取含苯丙氨酸、赖氨酸、脯氨酸的混合样品, 进样 10 μ L。流动相: 乙腈-水-甲酸 (10:90:0.1), 流速: 1.0 mL/min。用丙酮测死时间 t_0 。

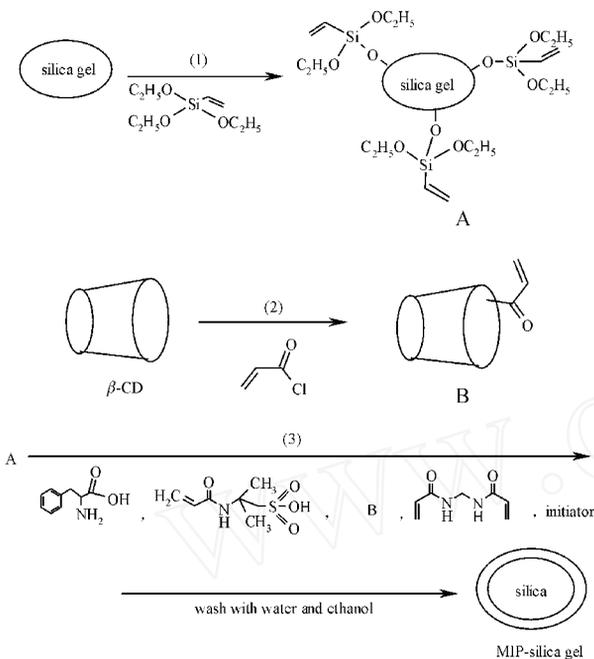


Figure 1 Schematic procedure of the immobilization of the imprinted polymer on the silica-gel support (1) Introduction of vinyl groups on the surface of silica gel; (2) Introduction of acryloyl groups on β -cyclodextrin (β -CD); (3) Immobilization of the polymers on the surface of vinylated silica gel (A) and acryloyl β -CD (B)

MIP: molecularly imprinted polymer

结果

3.1 乙烯基硅胶的表征

乙烯基硅胶的红外图谱 (图 2) 显示碳碳双键伸缩振动峰 1637 cm^{-1} , 2959 cm^{-1} , 2867 cm^{-1} 为饱和碳氢伸缩振动峰, 而且硅羟基的吸收峰强度明显降低, 表明硅胶表面的羟基数目明显减少, 结合元素分析结果 (表 1), 表明硅胶上已经成功衍生化。硅胶表面的羟基未能完全衍生化, 原因是双键衍生化基团为一长链基团, 该基团引入硅胶表面后, 将对周围的羟基起到空间屏蔽作用, 因而硅胶表面的硅羟基不可能反应完全。

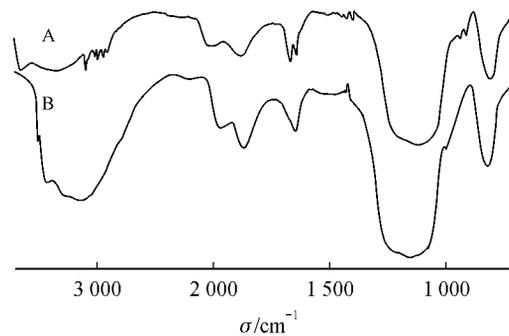


Figure 2 IR spectra of vinylated silica gel (A) and silica gel (B)

Table 1 Results of elemental analysis of silica gel and vinylated silica gel

Compd.	Elemental analysis/%	
	C	H
Silica gel	0.35	1.23
Vinylated silica gel	4.30	1.32

3.2 丙烯酰化环糊精的表征

运用 HPLC-ELSD, 以甲醇-水 (5:95) 为流动相, 苯基柱分析, 蒸发管温度为 50°C , 雾化器为氮气, 气压为 0.2 MPa。由图 3 可见, 丙烯酰化产物中不含环糊精。红外图谱 (图 4) 显示, 在 1720 cm^{-1} 处出现了羰基的伸缩振动峰 (表 2), 在核磁共振氢谱 (D_2O 为溶剂) (图 5) 中, 明确显示了烯氢的吸收峰。

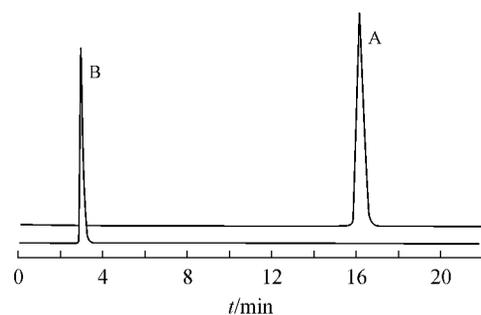


Figure 3 Chromatogram of β -CD (A) and acryloyl β -CD (B) Stationary phase: PH-3 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); mobile phase: $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (5:95); flow rate: 1.0 mL/min

Table 2 FT-IR and ^1H NMR data of acryloyl β -CD

Method	Type	Data
FT-IR (cm^{-1})	$\nu_{\text{C}=\text{C}}$	1638
	$\nu_{\text{C}=\text{O}}$	1720
^1H NMR (D_2O , δ)	$-\text{CH}=\text{C}=\text{CH}_2$	5.74 ~ 6.18 (m)
	1-H	4.99 (d)
	2-H, 4-H 3-H, 5-H, 6-H	3.49 ~ 3.91 (m)

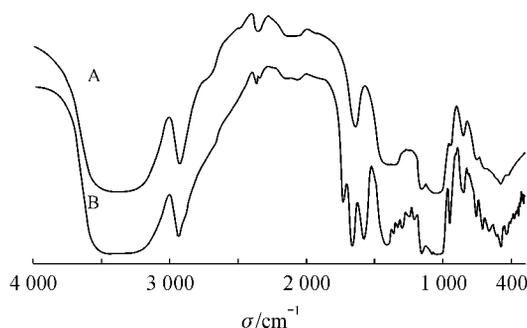


Figure 4 IR spectra of β -CD (A) and acrylyl β -CD (B)

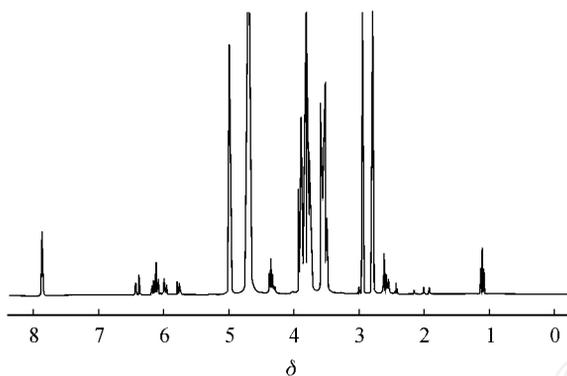
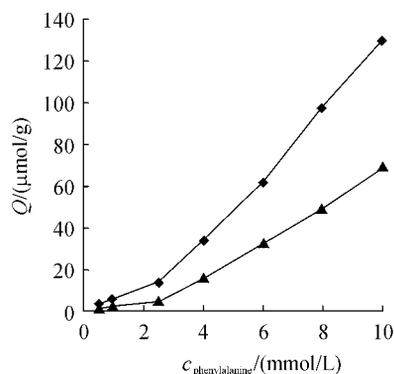


Figure 5 ^1H NMR spectrum of acrylyl β -CD

3.3 印迹聚合物的吸附性能考察

分别称取 P_1 、 P_0 聚合物 30 mg, 置于三角烧瓶中, 加入苯丙氨酸水溶液 (0.5 mmol/L ~ 10 mmol/L) 10 mL, 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡 12 h, 离心取上清液, 测定其浓度, 计算吸附容量: $Q = (c_0 - c) V / m$ 。式中 Q 为吸附容量 ($\mu\text{mol/g}$); c_0 和 c 分别为吸附前后苯丙氨酸的浓度 (mmol/L), V 为溶液体积 (mL), m 为聚合物的质量 (g)。吸附等温线如图 6, 结果显示, 聚合物对苯丙氨酸的吸附容量随浓度的增大而增大, P_1 的吸附性能明显比 P_0 强。



— P_1 ; — P_0

Figure 6 Isothermal adsorption of phenylalanine imprinted polymer-silica gel (P_1) and blank imprinted polymer-silica gel (P_0)

3.4 色谱性能分析

3.4.1 模板分子在印迹柱和空白柱上保留行为的比较 P_1 色谱柱与 P_0 色谱柱比较 (图 7), 死时间 t_0 均为 0.9 min, 苯丙氨酸在分子印迹柱上保留强, 且与脯氨酸、赖氨酸达到基线分离。

3.4.2 氨基酸与非氨基酸物质保留行为的比较 色谱条件同“2.4 项”, 对不同氨基酸和其他类物质进行比较, 结果见表 3。

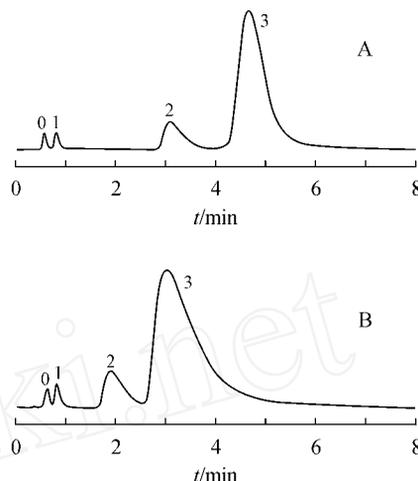


Figure 7 Chromatograms of the amino acids on P_1 (A) and P_0 (B) Stationary phase: 4.6 mm \times 50 mm, stainless-steel column; mobile phase: MeCN- H_2O -HCOOH (10 90 0.1); flow rate: 1.0 mL/min 0: Solvent; 1: lysine; 2: proline; 3: phenylalanine

Table 3 Retention times of various amino acid and other guests by the phenylalanine imprinted β -CD polymers immobilized on the silica-gel support

Guest	t_R /min	
	P_1	P_0
Tryptophan	7.46	5.03
Tyrosine	4.72	3.22
Threonine	2.99	1.86
Methionine	3.70	2.21
Benzoic acid	0.97	1.21
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	5.23	4.78
Methylparaben	0.98	1.20

讨论

本文在水相中制备了苯丙氨酸分子印迹聚合物, 主要特点是硅胶为支撑点, 增强了聚合物的刚性, 环糊精以它内疏水、外亲水的结构特点在水相中提供疏水空腔, 形成包含苯基的结合位点, 因而硅胶、环糊精的修饰是制备 MIPs 的前提。

4.1 印迹聚合物合成的影响因素

通过环糊精、AMPSA 的加入,苯丙氨酸分子印迹聚合物以疏水作用和静电作用实现了分子识别;用硅胶提供聚合物的支撑点,增强了 MIPs 的刚性。交联剂量的选择直接影响聚合物空穴的形成,量太大,导致交联太紧密,空穴很小,模板分子不易洗脱;量太小,聚合物的结构较疏松。尤其是交联剂量过大时,如模板分子与功能单体、交联剂的物质的量比例在 1:2:15,所得聚合物装成的色谱柱柱压很高,以致无法进行液相分析;当模板分子、功能单体与交联剂的物质的量之比为 1:2:9 时,柱压较低,以乙醇为流动相,1.0 mL/min 时柱压为 2.4 MPa;以水为流动相时,1.0 mL/min 时柱压为 4.2 MPa。本文通过比较两种硅烷化硅胶(烯丙基硅胶和乙烯基硅胶)在相同条件下制备的分子印迹聚合物,发现后者得到的色谱柱比前者柱效高,可能是因为链长影响了硅胶与表面聚合物层的距离。

4.2 分子识别机制的探讨

本文采用非共价键合法,利用环糊精的疏水空腔包合苯丙氨酸的苯基,苯丙氨酸的氨基和羧基分别与 AMPSA 上的磺酸基形成静电作用,再结合范德华力作用,从而实现苯丙氨酸的特异性识别。氨基酸类物质在 P_1 色谱柱比 P_0 色谱柱保留强,有氨基酸特有的官能团($-NH_2$ 和 $-COOH$ 基团一定的空间排列)的识别位点。芳香族氨基酸比脂肪族氨基酸在色谱柱上保留强,可能是存在环糊精的疏水作用和 AMPSA 的共同作用。非氨基酸类(见表 3),不具有 $-NH_2$ 和 $-COOH$ 基团或没有氨基酸的特异结构的物质在印迹柱和空白柱上的保留区别不大。同时说明了模板分子在整个聚合物体系中提供了特异的识别位点,从而影响了各物质的色谱

行为。

硅胶表面印迹法克服了传统聚合方法需要粉碎、筛分的缺点,聚合物只需用水、乙醇洗,直接装柱,而且柱压低、柱容量大。硅胶的加入大大增强了聚合物的机械性。在水相中结合环糊精制备分子印迹聚合物,为水溶性物质的分子印迹研究提供了实验基础,也为生物大分子的分子识别研究提供了参考。

参考文献

- [1] Suedee R, Songkram C, Petmoreekul A, *et al* Direct enantioseparation of adrenergic drugs via thin-layer chromatography using molecularly imprinted polymers [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1999, **19** (3-4): 519 - 527.
- [2] Nilsson S, Schweitz L, Andersson L I Capillary electrochromatography + molecular imprinting = drug analysis [J]? *Chromatogr*, 2000, **52** (S1): 24.
- [3] Borje S Imprinted chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2001, **906** (1-2): 227 - 252.
- [4] Zhen YL, Zhao SL, Qing WZ, *et al* Chiral separation by (*S*)-naproxen imprinted monolithic column with mixed functional monomers [J]. *Chin Chem Lett*, 2007, **18** (3): 322 - 324.
- [5] 吴正红 (Wu ZH). 分子印迹技术在药学中的应用 [J]. 中国药科大学学报 (*J China Pharm Univ*), 2005, **36** (5): 477 - 480.
- [6] Amdt E, Paul K, Lars K, *et al* Application of molecularly imprinted polymers in supercritical fluid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2000, **897** (1-2): 317 - 327.
- [7] 魏俊 (Wei J), 孙向英 (Sun XY), 刘斌 (Liu B). 手性拆分 L-脯氨酸分子印迹聚合物的制备及其性能 [J]. 应用化学 (*Chin J Appl Chem*), 2006, **23** (12): 1336 - 1341.
- [8] 徐伟箭 (Xu WJ), 项伟中 (Xiang WZ), 周晓 (Zhou X), 等. 基于硅胶表面修饰的分子印迹技术研究进展 [J]. 应用化学 (*Chin J Appl Chem*), 2003, **20** (10): 919 - 923.