

L-酪氨酸印迹聚合物的本体聚合法制备及性能

王锦, 谢迟, 董新荣, 雷孝

(湖南农业大学 理学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 运用本体聚合法制备 L-酪氨酸分子印迹聚合物, 并考察了聚合物的性能。在单因素试验考察功能单体的种类及用量、交联剂的种类及用量、溶剂种类和反应温度对制备分子印迹聚合物影响的基础上, 进一步以 3 水平 4 因素的正交试验优化反应条件。利用傅立叶红外光谱分析聚合物的结构, 通过荧光分光光度法分析聚合物对 L-酪氨酸的选择性吸附、萃取效率和饱和吸附量。结果表明: 在氯仿溶剂中, 以 α -甲基丙烯酸(MAA)为功能单体, 二甲基丙烯酸乙二醇酯(EDMA)为交联剂, 偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂, 其物质的量比为 10 40 200 1.5, 60 °C 水浴加热, 洗脱剂萃取后, 得到对 L-酪氨酸分子有选择性吸附性能的印迹聚合物。

关键词: L-酪氨酸; 分子印迹; 吸附性能; 红外检测

中图分类号: O631.1⁺1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)02-0211-04

Preparation of imprinted polymers of L-Tyr by bulk polymerization and its property

WANG Jin, XIE Chi, DONG Xin-rong, LEI Xiao

(College of Sciences, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: This paper is an attempt to study the method of preparing the L-Tyr imprinted polymer by bulk polymerization, and investigated the property of the polymer. Based on the studying of the type and amount of functional monomer, crosslinking agent and the solvent and temperature which affected the preparation of molecularly imprinted polymer, further study was made to optimize the reaction conditions by doing orthogonal experiments of four factors in three levels. The structure of the polymer was analysed by fourier infrared spectrum; The selective adsorption of L-tyr was found by analysing polymers and extraction efficiency and adsorption capacity by fluorescence spectrometry. The results showed that in chloroform solvents, MAA was functional monomer; EDMA was crosslinker and AIBN was initiator. The molecular imprinted polymer which can selectively adsorb the L-Tyr could be obtained after being heated to 60 °C in water bath, extracting eluting solven according to the molar ratio: 10 40 200 1.5.

Key words: L-Tyr; molecular imprinting; adsorption; infrared detection

分子印迹聚合物(MIPs)是以化合物的分子结构为模板(模板分子或印迹分子)制备的聚合物, 是一种具有“记忆”功能的高分子材料。由于MIPs具有选择性地吸附印迹分子的性能, 被广泛应用于各种选择性分离与检测方法中^[1-3]。

L-酪氨酸(L-Tyr)是合成多肽类激素、抗生素、L-多巴等药物的主要原料, 还常用作食品添加剂和配制人工昆虫饲料。L-Tyr主要从含蛋白质的物质(废丝、酪蛋白和玉米等)的水解液中提取, 以葡萄糖为原料, 经短杆菌出发诱导的L-酪氨酸生

产菌发酵而得^[4-5]。由于产品组成复杂或L-Tyr含量低, 分离纯化、富集检测都较困难。目前L-Tyr的分离纯化及分析检测仍沿用传统方法, 试剂用量大, 效率低。笔者用本体聚合法制备的L-Tyr印迹聚合物, 能从复杂的体系中选择性吸附L-Tyr, 有利于对L-Tyr的快速分离纯化及检测。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

L-Tyr (国药集团化学试剂有限公司); α -甲基

收稿日期: 2010-06-25

基金项目: 湖南省财政厅科技专项(湘财教指[2009]172号)

作者简介: 王锦(1978—), 女, 湖南邵阳人, 博士研究生, 讲师, ljawj@163.com

丙烯酸(MAA)(天津科密欧化学试剂开发中心);偶氮二异丁腈(AIBN)(天津科密欧化学试剂开发中心);二甲基丙烯酸乙二醇酯(EDMA)(美国CIBA公司,交联度、双酯度98.80%,酯度99.70%,酸度0.08%);甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)(上海华谊丙烯酸有限公司);4-乙烯基吡啶(4-VP)(Alfa Aesar, Johnson Matthey Company);氮气(含量>99.5%)。

日立2500荧光分光光度计(日立公司);恒温水浴振荡器(江苏大地自动化仪器厂);DL-360A超声清洗仪(上海之信仪器有限公司);高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);AL-204电子天平(梅特勒-托利多);索氏提取器;分样筛(74 μm);84-1磁力搅拌控温电热套(河南巩义市昌旺仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 L-Tyr 印迹聚合物的合成

称取0.3646 g L-Tyr于锥形瓶中,加入功能单体和15 mL溶剂,磁力搅拌3 h。再加入交联剂、引发剂AIBN 0.06 g,在超声波清洗仪中活化20 min,通氮气5 min,抽真空,置于水浴中热引发并反应24 h,得白色块状聚合物固体,搅碎,取出固体,洗涤,干燥,粉碎,过74 μm 分样筛,得粒径为74 μm 微球,用醋酸-醋酸钠缓冲溶液清洗模板分子和未聚合的功能单体和交联剂,得到L-Tyr印迹聚合物。

1) 单因素试验。考察功能单体^[6](MAA、4-VP)及用量(模板分子与功能单体量比分别为1/1、1/2、1/4、1/6)、交联剂(EDMA、HEMA)^[7-8]及用量(模板分子与功能单体和交联剂量比分别为1/4/10、1/4/20、1/4/30、1/4/40)、反应溶剂^[9-10](乙腈、乙醇、氯仿)和引发温度^[11](0、20、40、60、80 $^{\circ}\text{C}$)变化对制备L-Tyr印迹聚合物的影响。以印迹聚合物的萃取效率、选择性吸附L-Tyr的饱和吸附量为指标考察聚合物的性能。

2) 正交试验。用3水平4因素设计正交试验 $L_9(3^4)$,以L-Tyr印迹聚合物的萃取效率、选择性吸附L-Tyr的饱和吸附量为指标,考察功能单体MAA用量(4、8、12 mmol/L)、交联剂EDMA用量(20、40、60 mmol/L)、溶剂种类(乙腈、乙醇、氯仿)、温度(40、60、80 $^{\circ}\text{C}$)对制备L-Tyr印迹聚合物的影响。

1.2.2 L-Tyr 印迹聚合物的红外光谱分析

分别将模板分子L-Tyr、L-Tyr印迹聚合物MIPs及萃取去除模板分子L-Tyr后的聚合物、空白印迹

聚合物NMIPs(不加模板分子L-Tyr的聚合物)与KBr(质量比1/100)混合压片,用傅立叶红外光谱仪在4000~400 cm^{-1} 范围扫描^[12],绘制透光光谱。

1.3 L-Tyr 印迹聚合物的性能评价

1.3.1 测定 MIPs 模板分子萃取效率

将所制备的74 μm 微球聚合物MIPs置于真空干燥箱充分干燥后,准确称取其质量,用100 mL醋酸-醋酸钠缓冲溶液于索式提取器中萃取,除去模板分子,每隔24 h取萃取液测定其荧光强度和荧光值后,更换1次醋酸-醋酸钠缓冲溶液,用荧光分析方法测定L-Tyr的质量浓度,待质量浓度低于1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时停止萃取,干燥萃取后的固体,并准确称取其质量,计算萃取效率。

1.3.2 测定 MIPs 饱和吸附量

分别准确称取50 mg已萃取的印迹分子聚合物MIPs放入具塞的小试管中,加入2.5 mL 6 mmol/L的L-Tyr的醋酸缓冲溶液,置于恒温水浴振荡器中25 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡24 h,离心10 min,取上清液,用荧光分析方法测定L-Tyr的浓度,计算对L-Tyr的饱和吸附量(被吸附的L-Tyr的量与吸附前聚合物的量的比值)。

1.3.3 MIPs 对 L-Tyr 的选择性吸附

称取已萃取的50 mg MIPs置于具塞小试管中,分别加入5 mL 0.4、0.8、1.2、1.6、1.8、3.0、4.0、5.0、6.0 mmol/L的L-Tyr和L-Phe醋酸缓冲溶液,置于恒温水浴振荡器中,25 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡24 h后,离心10 min,取上清液,用荧光分析方法测定L-Tyr的浓度,计算对L-Tyr的吸附量。

2 结果与分析

2.1 功能单体对合成印迹聚合物吸附性能的影响

以4-VP为功能单体时,萃取效率、饱和吸附量只能达到36.36%和22.04 $\mu\text{mol}/\text{g}$,而以MAA为功能单体,其用量为8 mmol/L时,萃取效率87.78%,饱和吸附量71.87 $\mu\text{mol}/\text{g}$,达到最大值,因而MAA适于L-Tyr印迹聚合物的制备。

2.2 交联剂对合成印迹聚合物吸附性能的影响

在交联剂HEMA的作用下没有聚合物生成,而功能单体MAA与交联剂EDMA的量比为1/4/20时,生成的L-Tyr印迹聚合物的萃取效率和饱和吸

附量分别可达到为87.46 %和76.01 $\mu\text{mol/g}$ 。

2.3 溶剂对合成印迹聚合物吸附性能的影响

结果表明,氯仿极性较弱,为溶剂时所得印迹聚合物的萃取效率、饱和吸附量比另2种溶剂要好,分别为87.73 %和71.87 $\mu\text{mol/g}$,而乙腈及乙醇为溶剂时,其萃取效率、饱和吸附量仅为55.41 %、52.59 $\mu\text{mol/g}$ 和50.04 %、31.30 $\mu\text{mol/g}$ 。

2.4 引发温度对合成印迹聚合物吸附性能的影响

试验结果显示,0、20 $^{\circ}\text{C}$ 时制备反应不能进行;40 $^{\circ}\text{C}$ 时制备反应进行不完全,只生成少量的白色聚合物;80 $^{\circ}\text{C}$ 时制备得到的聚合物热稳定性差,呈黄色。60 $^{\circ}\text{C}$ 时制备得到的白色印迹聚合物热稳定好,且萃取效率、饱和吸附量能达到87.31 %、76.97 $\mu\text{mol/g}$ 。

单因素试验结果表明,在氯仿溶剂中,以MAA为功能单体,EDMA为交联剂,AIBN为引发剂,L-Tyr与MAA、EDMA、AIBN的量比为10 40 200 1.5,在60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴引发聚合制备得到的印迹聚合物萃取效率、饱和吸附量最大。

2.5 正交试验结果

正交试验结果(表1)显示,影响萃取效率、饱和吸附量的因素大小依次为交联剂用量、功能单体用量、温度、溶剂种类;最优化理论条件为 $B_2A_2C_1D_2$,即功能单体MAA用量8 mmol,交联剂EDMA 40 mmol,其量比为1 5,溶剂为氯仿,引发温度60 $^{\circ}\text{C}$,为L-Tyr印迹聚合物最佳制备条件,与单因素分析结果一致。

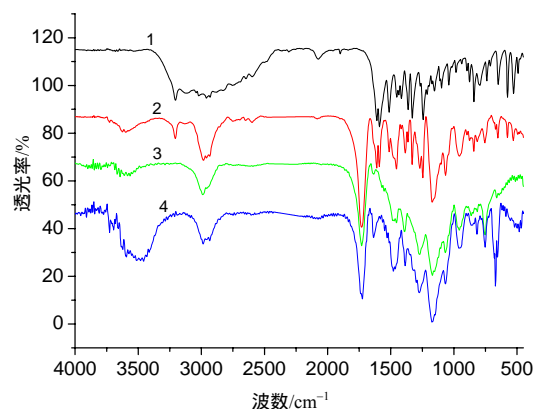
表 1 MIPs 印迹聚合物制备 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal result sand analysis of MIPs synthesis

试验号	A(功能单体用量)	B(交联剂用量)	C(溶剂种类)	D(温度)	萃取效率/%	饱和吸附量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$
1	4	20	氯仿	40	22.76	11.23
2	4	40	乙醇	60	46.73	32.39
3	4	60	乙腈	80	38.67	20.15
4	8	20	乙醇	80	30.46	20.37
5	8	40	乙腈	40	50.54	32.16
6	8	60	氯仿	60	57.62	39.28
7	12	20	乙腈	60	24.59	12.54
8	12	40	氯仿	80	47.68	30.43
9	12	60	乙醇	40	32.17	21.22
K_1	108.16	77.81	128.06	105.47	—	—
K_2	138.62	144.95	109.36	128.94	—	—
K_3	104.44	128.48	113.80	116.81	—	—
R	34.18	67.14	18.70	23.47	—	—
K_1	63.77	44.14	80.94	64.61	—	—
K_2	91.81	94.98	73.99	84.21	—	—
K_3	64.19	80.65	64.85	70.95	—	—
R	28.04	50.84	16.09	19.60	—	—

2.6 L-Tyr 印迹聚合物红外分析

将模板分子L-Tyr、萃取前L-Tyr印迹聚合物、萃取后L-Tyr印迹聚合物、空白聚合物进行红外光谱分析^[10]并比较(图1)发现,模板分子L-Tyr在3 300 cm^{-1} 左右处有氨基($-\text{NH}_2$)的N-H伸缩振动峰,在1 450、1 580、1 512、1 600 cm^{-1} 左右处有苯的4个特征吸收峰(谱线1)。谱线2为萃取前L-Tyr印迹聚合物的红外图谱,3 300 cm^{-1} 处也有氨基($-\text{NH}_2$)的N-H伸缩振动峰,1 450~1 600 cm^{-1} 处也有苯的4个特征吸收峰,显示出模板分子L-Tyr已经与功能单体MAA结合形成了聚合物。经过洗脱剂萃取后得



1 L-Tyr; 2 萃取前聚合物; 3 MIPs; 4 NMIPs。

图 1 L-Tyr、萃取前聚合物、MIPs、NMIPs 的红外图谱

Fig.1 IR spectra of L-Tyr, the polymer before extracting, MIPs and NMIPs

到印迹聚合物MIPs(谱线3), $3\ 300\ \text{cm}^{-1}$ 处没有氨基($-\text{NH}_2$)的N-H伸缩振动峰,在 $1\ 450\sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 处也没有苯的4个特征吸收峰,与空白聚合物NMIPs红外图谱(谱线4)显示一致,表明模板分子L-Tyr已被完全洗脱,得到具有空腔结构的印迹聚合物MIPs。

2.7 L-Tyr 印迹聚合物对 L-Tyr 的选择性吸附及吸附等温线

用结构与L-Tyr相似的苯丙氨酸L-Phe,考察L-Tyr印迹聚合物特异性吸附情况,如图2所示。结果表明,在MIPs对L-Tyr的吸附等温线中,随着L-Tyr标准溶液浓度的升高,MIPs的吸附量逐渐增大,这表明MIPs有固定排列且大小及空间位置与L-Tyr互补的空穴。这种空穴对L-Tyr分子具有“记忆”功能,因而选择性高,吸附能力强。在MIPs对L-Phe的吸附等温线中,L-Phe的吸附量低,这是因为L-Phe的结构与MIPs中印迹空穴不互补,不能与空穴上的位点形成较强的作用力,而造成MIPs对其结合性不强。在NMIPs对L-Tyr的吸附等温线中,随着L-Tyr标准溶液浓度的升高,NMIPs的吸附量则迅速达到饱和,对于相同浓度的L-Tyr标准溶液,MIPs的吸附量均大于NMIPs的吸附量,且二者的吸附量之差随溶液浓度的增加而增大,这表明组成相同的2种聚合物的空间结构存在明显的差异,NMIPs的吸附主要是非特异性吸附,没有选择性,吸附能力弱。

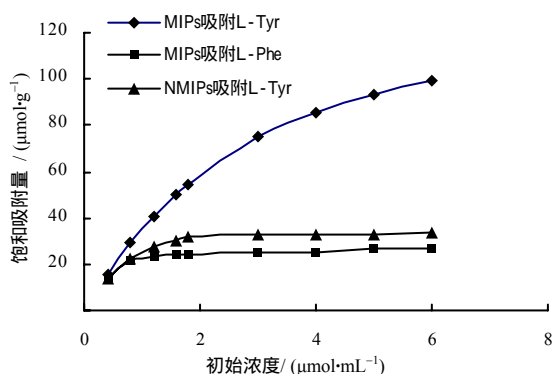


图2 MIPs、NMIPs的吸附等温线

Fig.2 Adsorptive isotherm of MIPs and NMIPs

从图2可以看出,在MIPs对L-Tyr的吸附等温线中,印迹分子的吸附等温线的形状类似Langmuir模型^[12]。随着浓度的增大,MIPs对L-Tyr的吸附量逐渐增大,且在6 mmol/L附近趋于饱和。MIPs对L-Tyr的吸附的数据可用于Scatchard^[13]方

程,其中MIPs各点的回归方程为 $Q/C=73.81-0.5972Q$, $R^2=0.9912$,为一线性方程,说明MIPs表面具有均一选择性的吸附位点。由Scatchard方程求得 $K_d=1.6747\ \mu\text{mol}/\text{mL}$,最大表观结合位点数 $Q_{\text{max}}=123.5934\ \mu\text{mol}/\text{g}$ 。

参考文献:

- [1] Wulff G, Sarhan A, Zabrocki K. Enzyme analogue built polymers and their use for the resolution of racemates [J]. Tetrahedron Lett, 1973, 44: 4329-4335.
- [2] Norrlof O, Glad M, Mosbach K. Acrylic polymer preparation containing recognition sites obtained by imprinting with substrates[J]. J Chromatogr, 1984, 299 (1):29-38.
- [3] 张立永, 成国祥. 分子印迹聚合物微球的制备及应用研究进展[J]. 功能高分子学报, 2002, 15(2):214-218.
- [4] 王筱婧, 徐江平. 作用于蛋白酪氨酸激酶的天然抗肿瘤药物研究进展[J]. 中南药学, 2005, 3(10): 53-57.
- [5] 张志华, 黄彦, 王晓明. 小分子靶向抗癌药物——蛋白酪氨酸激酶抑制剂研究进展[J]. 药学实践, 2006, 6(8): 50-54.
- [6] 胡小刚, 汤又文. 分子印迹聚合物制备技术研究进展[J]. 华南师范大学学报: 自然科学版, 2003, 50(3): 150-157.
- [7] 汪国松, 朱秀芳, 王颖臻, 等. 制备分子模板聚合物的影响因素及控制措施[J]. 云南化工, 2006, 33(1): 24-25.
- [8] Vlatakis G, Andersson Li, Moller R, et al. Drug assay using a antibody mimics made by molecular imprinting [J]. Nature, 1993, 36(1): 645.
- [9] Mayes A G, Mosbach K. Molecularly imprinted polymer beads: Suspension polymerization using a liquid perfluoro carbon as the dispersing phase[J]. Anal Chem, 1996, 68(8): 3769-3774.
- [10] 蒋宇翔, 赫丽萍, 赖承钺, 等. 头孢氨苄分子印迹聚合物制备及其性能研究[J]. 化学研究与应用, 2009, 21(9): 1286-1289.
- [11] 邴乃慈, 许振良, 杨座国, 等. 热聚合制备左氧氟沙星分子印迹聚合物的分子识别特性[J]. 应用化学, 2006, 23(10): 1085-1089.
- [12] 董文国, 闫明, 吴国是, 等. 溶剂分子对分子印迹聚合物分子识别能力的影响: 实验研究与计算量子化学分析[J]. 化工学报, 2005, 56(7): 1247-1252.
- [13] 张延红, 程国斌, 马伟. 利用Origin软件对吸附等温线拟合进行分析[J]. 计算机与应用化学, 2005, 28(10): 75-78.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 易来宾