

手性拆分 *L*-脯氨酸分子印迹聚合物的制备及其性能

魏 俊 孙向英 刘 斌*

(华侨大学材料科学与工程学院 泉州 362021)

摘 要 以壳聚糖 (CTS) 为功能基体, 以 *L*-脯氨酸 (*L*-Pro) 为模板分子, 采用分子印迹技术, 在水溶液中合成了在空间结构和结合位点上与 *L*-脯氨酸匹配的分子印迹聚合物 (*L*-Pro MIPs)。利用红外、扫描电镜和热失重分析, 对相关化合物进行了表征, 并对合成机理进行初步探索; 通过对 pH 值、反应时间、交联剂用量的调节, 获得最佳的反应条件为: 制备壳聚糖-*L*-脯氨酸复合物的 pH = 10.7 干复合物 1.0 g 交联剂 8 mL 室温下反应 18 h。结果表明, 在水相中, *L*-Pro MIPs 对 *L*-Pro 具有良好的吸附选择性和高效分离特性, 分离因子为 4.67。

关键词 手性分离, 分子印迹, 壳聚糖, 脯氨酸

中图分类号: O658.4; O631

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2006)12-1336-06

在分子印迹技术中, 模板分子与功能单体之间依靠共价^[1]和非共价键^[2]预组装后进行聚合, 除去模板分子以后, 聚合物中就留下了与模板分子构型相匹配的结合位点, 这些位点对模板分子具有特异选择性, 从而可以形成对模板分子的选择性识别。因此, 分子印迹技术成为手性识别研究中强有力的手段之一^[3]。但利用分子印迹技术在水溶液中直接手性拆分氨基酸的研究还较少^[4]。本文以壳聚糖 (CTS) 为功能基体, 以 *L*-脯氨酸 (*L*-Pro) 为模板分子在水相中发生非共价作用, 形成复合物。并用戊二醛交联此复合物, 以使 *L*-脯氨酸“铸造”在聚合物的结合部位, 最后将 *L*-脯氨酸洗脱, 合成了对 *L*-脯氨酸具有“记忆”特性的分子印迹聚合物。该法合成过程简单, 条件温和, 制备的 MIPs 对模板分子具有优良的识别能力, 能在水相中直接手性拆分脯氨酸, 因而在色谱分离及固相萃取等方面具有潜在的应用价值。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

UV-2102 型尤尼柯紫外可见分光光度计; Hitachi S-3500N 型扫描电子显微镜 (日本); Nicolet Nexus 470 型傅里叶变换红外光谱仪 (美国); KBr 压片; SDT2960 V3.0F 型热重分析仪 (美国); N₂ 气气氛; CREST 超声波 (美国); ZK-8A 型真空干燥箱。

壳聚糖 (浙江玉环县化工厂), 脱乙酰度 ≥ 90%; *L*-脯氨酸, BR 99%; *D*-脯氨酸 (瑞士 Fluka AG, CH-9470 Buchs), BR 99%; 茚三酮, AR 95%; 戊二醛, BR 25%; MilliQ 基础型纯化水系统 (美国 Millipore 公司) 提供的二次纯净水。其它试剂均为分析纯。

1.2 氨基酸模板交联壳聚糖分子印迹聚合物的制备

1.2.1 壳聚糖-*L*-脯氨酸复合物的制备 取 10 g 壳聚糖, 加水溶胀 2 h 其间利用超声波振荡多次。抽滤后的壳聚糖加入 5 mmol/L 稀 HCl 质子化 24 h 再抽滤。取此溶胀酸化后的壳聚糖, 置于 pH = 10.7 的 *L*-脯氨酸溶液中, 在搅拌条件下进行吸附, 18 h 后抽滤, 真空干燥, 则制得白色壳聚糖-*L*-脯氨酸复合物 (CTS-*L*-Pro)。

1.2.2 交联壳聚糖-*L*-脯氨酸聚合物的合成 取 10 g 壳聚糖-*L*-脯氨酸复合物, 加入戊二醛水溶液中, 在室温下搅拌 18 h 进行交联, 抽滤, 水洗。制得褐绿色颗粒状交联壳聚糖-*L*-脯氨酸聚合物。

1.2.3 *L*-脯氨酸模板交联壳聚糖分子印迹聚合物的制备 用 0.01 mol/L NaOH 溶液洗脱上述合成的交联壳聚糖-*L*-脯氨酸聚合物中的 *L*-脯氨酸, 12 h 后抽滤, 再洗脱。直至洗脱液中不含有 *L*-脯氨酸, 即制得黄褐色颗粒状 *L*-脯氨酸模板交联壳聚糖分子印迹聚合物 (*L*-Pro MIPs), 真空干燥, 备用。

2006-01-14 收稿, 2006-04-22 修回

国家自然科学基金 (20575023) 和福建省自然科学基金 (D0310016 和 D0410019) 资助项目

通讯联系人: 刘斌, 男, 教授; Email: liubiny@hqu.edu.cn 研究方向: 电分析化学和环境化学

1.3 Pro的分光光度法定量分析

取含脯氨酸的滤液,加入 1 mL浓度为 50 mmol/L茚三酮溶液,再用 pH=5.0的 HAc-NaAc缓冲溶液定容至 10 mL。在沸水浴中加热 15 min,冷却至室温,紫外可见分光光度法^[5]测定(λ=440 nm)脯氨酸的含量。

1.4 L-ProMIPs识别性能的测定

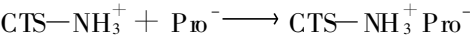
称取 2份干燥壳聚糖-L脯氨酸印迹聚合物各 0.5 g置于 2 mmol/L的 HCl溶液中,电磁搅拌酸化 24 h后抽滤,然后分别置于 50 mL pH=10.7 质量浓度为 20 mg/L的 L,D-脯氨酸溶液中,在搅拌条件下进行吸附 18 h,抽滤,测定滤液中脯氨酸的浓度,根据下式计算吸附容量^[6]: $Q=(c_0-c)V/m$ 。式中, Q 为吸附容量 (mg/g); c_0 和 c 分别为吸附前后 Pro浓度 (g/L); m 为 MIPs的质量 (g), V 为溶液体积 (mL)。

2 结果与讨论

2.1 L-ProMIPs的最佳合成条件选择

2.1.1 pH值对壳聚糖吸附 L-脯氨酸的影响 常温下,活化 L-脯氨酸的 pH值对壳聚糖吸附 L-脯氨酸的影响如图 1所示。图中可见,用 0.1 mol/L NaOH溶液调节 pH值,在 pH值为 9.6~10.7范围内, L-脯氨酸在壳聚糖中的吸附量随着 pH值的增大而增大。pH值约为 10.7时,吸附量达到最大;此后,吸附量随着 pH值的增大而减小。

壳聚糖含有一NH₂、—OH等功能基团,对许多化合物具有较强的吸附能力^[7]。质子化后的壳聚糖可以通过静电作用吸附阴离子化的 L-脯氨酸:



L-脯氨酸为两性离子,在溶液中随着酸度的降低可以 Pro⁺、Pro[±]、Pro⁻离子形式存在,由它们的电离常数 pK₁=1.95, pK₂=10.64可计算出 3种离子各自所占百分率随 pH值变化的情况。当 pH值高于等电点, L-脯氨酸的阴离子的量开始增多,将会被质子化的壳聚糖吸附;当溶液的 pH值高于 10.7后,由于 OH⁻与 Pro⁻形成明显的竞争交换吸附,这时 Pro⁻在 L-脯氨酸解离的基团中所占百分率虽然更高,但竞争交换吸附的结果却使得总的吸附量下降。因此,壳聚糖吸附 L-脯氨酸适宜的 pH值为 10.7。

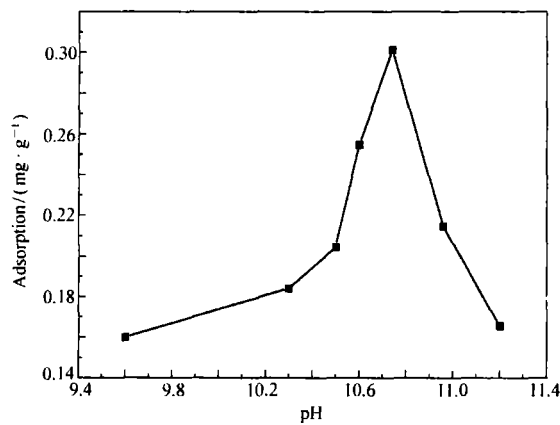


图 1 pH 值对壳聚糖吸附 L-脯氨酸的影响
Fig.1 The effect of pH on adsorption capacity of CTS for L-Pro

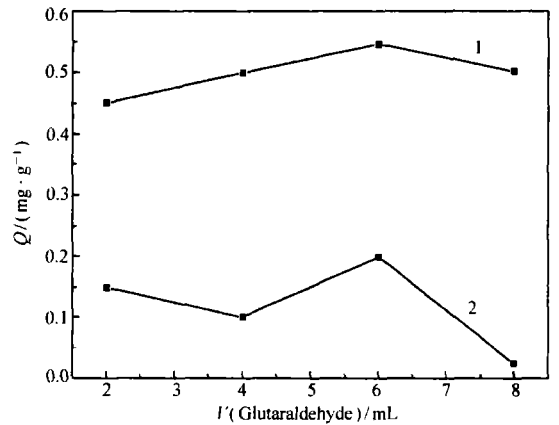


图 2 戊二醛用量对 MIPs 吸附 L-脯氨酸选择性的影响
Fig.2 Effect of concentration of Glutaraldelyde on adsorbent selectivity for L-Proline
1. L-Pro; 2. D-Pro

2.1.2 交联剂用量的选择 取 4份干燥过的壳聚糖-L脯氨酸复合物各 1 g 分别加入 2、4、6、8 mL的质量分数 25%戊二醛水溶液,所合成的 MIPs吸附选择性结果如图 2所示。图中可见, L-Pro-MIPs的吸附量随着交联剂用量的增加而增加,当交联剂用量为 6 mL时,印迹聚合物对 L-脯氨酸吸附量最大,同时对 D-脯氨酸的吸附量也最大,其手性选择性较低。当交联剂用量为 8 mL时,手性选择性最高。这是由于随着交联剂用量的增加,交联聚合物的一NH₂基团减少,导致吸附量降低;同时也使聚合物印迹空穴

的结构更加紧密,识别能力增强,因此手性选择吸附性增强。

2.1.3 交联时间对 *L*-ProMIPs 吸附选择性的影响 取 5 份干燥过的壳聚糖-*L*脯氨酸复合物各 1 g 分别加入 8 mL 质量分数为 25% 戊二醛水溶液,交联时间分别为 6、12、18、24、30 h 所合成的 MIPs 吸附选择性结果如表 1 所示。

表 1 交联时间对 *L*-ProMIPs 吸附选择性的影响

Table 1 Effect of crosslinking time on adsorbent selectivity for *L*-Proline

Crosslinking time/h	6	12	15	18	21	24	30
Q_L /(mg·g ⁻¹)	0.468 0	0.668 8	0.734 1	0.826 6	0.684 5	0.507 0	0.332 6
Q_D /(mg·g ⁻¹)	0.021 4	0.052 4	0.053 7	0.037 5	0.034 7	0.032 0	0.045 8

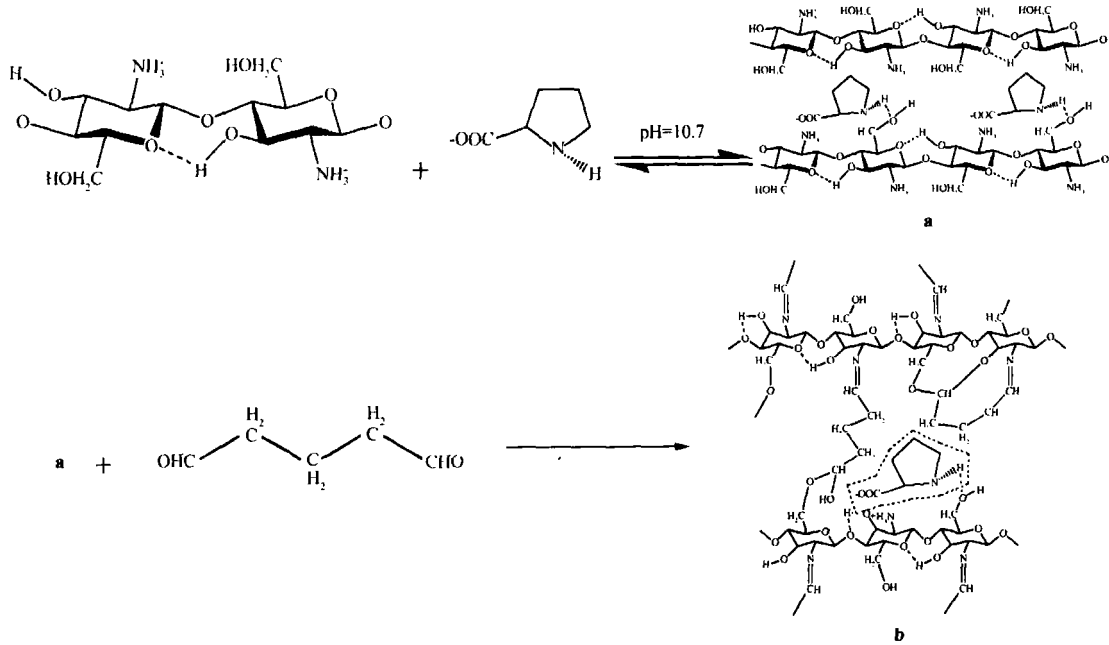
表中可见,当交联时间为 18 h 时,印迹聚合物对 *L*-脯氨酸的吸附量最大。这可能是因为交联时间过长,导致交联剂戊二醛与 CTS 上未与 *L*-脯氨酸反应的 -NH₂ 和 -OH 基团充分发生交联反应,交联聚合物结构过于紧密,通道减少,*L*-脯氨酸难于被洗脱下来,使得印迹聚合物中 *L*-脯氨酸的结合位点减少,吸附量降低;而交联时间过短,交联不完全,影响印迹聚合物的选择性,并导致对目标分子的吸附量降低。所以最佳的合成条件为:在 pH=10.7 的条件下制备壳聚糖-*L*-脯氨酸复合物,每 1.0 g 干复合物与 8 mL 质量分数 25% 戊二醛交联 18 h。

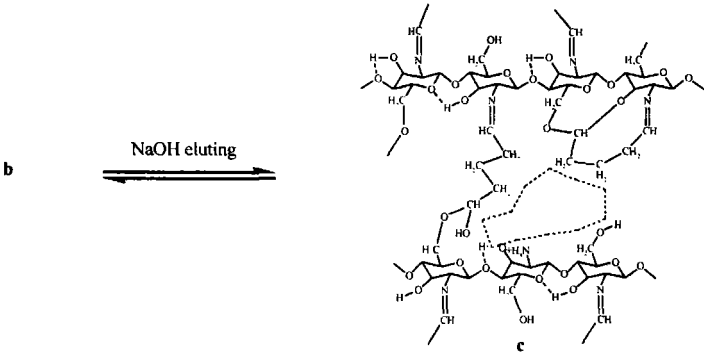
2.2 合成机理探讨

复合物的形成:在酸性条件下,壳聚糖链上的一 NH₂ 基团质子化形成带 -NH₃⁺ 的聚阳离子,有很强的吸附性。阴离子化的 *L*-脯氨酸与壳聚糖聚阳离子发生静电吸附作用;同时,*L*-脯氨酸上的仲氨基与壳聚糖分子上的羟基形成氢键,将 *L*-脯氨酸协同预固定在壳聚糖上。此时 *L*-脯氨酸与壳聚糖的功能团 (NH₃⁺, OH) 的相对位置是固定的,形成壳聚糖-*L*-脯氨酸复合物 (a)。

交联:用戊二醛原位高度交联 a 合成 *L*-脯氨酸模板交联壳聚糖聚合物 (b),使未与 *L*-脯氨酸相互作用的功能团 (NH₃⁺, OH) 和戊二醛发生反应,生成疏水作用区域,从而使线性高分子壳聚糖转化成立体交联的聚合物,固定了模板分子,并提高了壳聚糖的化学稳定性和机械强度。

分子印迹聚合物的形成:利用离子交换脱附原理,用碱性溶液洗脱 *L*-脯氨酸,合成 *L*-脯氨酸模板交联壳聚糖分子印迹聚合物 (c)。当 MIPs 酸化后,其手性印迹位点具有静电、氢键和疏水等作用,使之具有高度的手性识别能力。





2 3 分子印迹聚合物的结构表征

2 3 1 红外光谱分析 真空干燥的 CTS(a)、CTS-*L*-Pro 复合物 (b)、CTS-*L*-Pro 交联聚合物 (c) 和 *L*-Pro-

MIPs(d) 的红外光谱如图 3 所示。由图 3 谱线 a 可见, 1 596 cm^{-1} 处有氨基的变形振动吸收峰; 2 932 和 2 872 cm^{-1} 处分别是残糖基上的甲基或亚甲基伸缩振动吸收峰; 1 658 cm^{-1} 处无酰胺 I 带的吸收, 可认为壳聚糖脱乙酰度很高。在 895 cm^{-1} 处出现吸收峰, 说明了壳聚糖的糖苷键是 β 构型, 其分子链之间以平行式排列。比较图 3 谱线 a 和图 3 谱线 b 可以看出, 壳聚糖与 *L*-脯氨酸复合后, 由于 *L*-脯氨酸含量很低, 特征峰位没有明显变化。但 1 596 cm^{-1} 处氨基的变形振动吸收峰强度稍有增强, 并且 1 030 和 1 090 cm^{-1} 处的 C_6 上的一级羟基和 C_2 上二级羟基的 C—O 键伸缩振动吸收峰强度增强, 峰形变宽, 可认为有氢键形成。综合分析可知, 阴离子化的 *L*-脯氨酸与壳聚糖分子上的氨基发生离子吸附反应; 同时, *L*-脯氨酸上的仲氨基与壳聚糖分子上的羟基形成氢键, 从而固定了 *L*-脯氨酸与壳聚糖的功能基团 ($-\text{NH}_3^+$, $-\text{OH}$) 的相对位置。在图 3 谱线 c 中, 1 662 cm^{-1} 处出现了 Schiff 碱的吸收峰, 证明戊二醛确实与壳聚糖发生了交联反应。比较图 3 谱线 b 和图 3 谱线 c 可以看出, 3 450 cm^{-1} 左右的多重吸收峰强度明显减弱, 峰宽变窄, 1 596 cm^{-1} 处氨基变形振动吸收峰明显减弱, 并低移到 1 577 cm^{-1} , 可能是脯氨酸与壳聚糖的氨基变形振动吸收峰叠加的结果, 可认为脯氨酸及其复合的氨基未参与交联反应。1 155 cm^{-1} 处的氧桥反对称伸缩振动吸收峰的强度显著增强, 1 258、1 090 和 1 030 cm^{-1} 处吸收峰强度明显减弱, 峰宽变窄, 位置都有些低移, 说明戊二醛也与壳聚糖上的羟基发生反应, 生成缩醛或半缩醛。最后比较图 3 谱线 c 和图 3 谱线 d 可以看出, 聚合物经 NaOH 溶液洗脱后, 1 662 cm^{-1} 处吸收峰减弱, 低移到 1 652 cm^{-1} , 说明未完全交联的戊二醛被洗脱下来; 1 577 cm^{-1} 处的氨基变形振动吸收峰减弱, 并高移到 1 589 cm^{-1} , 可认为 *L*-脯氨酸被洗脱下来。在 895 cm^{-1} 处还出现 β 构型糖苷键的特征吸收峰, 说明交联反应和洗脱都未破坏壳聚糖分子链节中吡喃苷的六元环结构。综合分析可知, 聚合物经氢氧化钠溶液处理后, 脯氨酸被洗脱下来使印迹聚合物存在与印迹分子相互匹配的官能团 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{OH}$ 。

2 3 2 扫描电子显微镜观察 CTS(a)、CTS-*L*-Pro 复合物 (b)、CTS-*L*-Pro 交联聚合物 (c) 和 *L*-Pro-MIPs (d) 表面形貌的 SEM 照片如图 4 所示。由图可见, CTS-*L*-Pro 复合物表面疏松, 有很多孔隙, *L*-脯氨酸就被吸附在空隙中的表面上 (图 4b); CTS-*L*-Pro 交联聚合物表面变得致密, 立体感降低 (图 4c); *L*-Pro-MIPs 为多孔的交联物 (图 4d), 并且在聚合物表面的大孔中存在较小的通道, 说明所合成的印迹聚合物是具有一定孔径分布的多孔结构, 有利于 *L*-脯氨酸的吸附和分离, 也为 *L*-脯氨酸的扩散或交换提供了良好的通道。

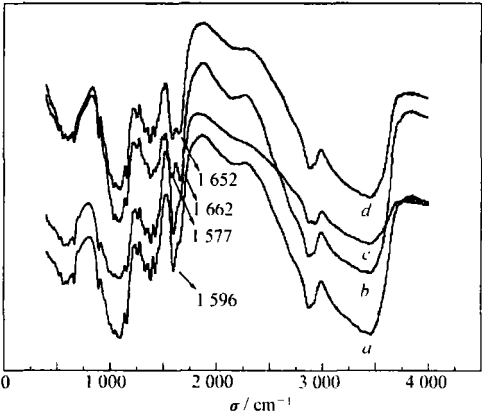


图 3 壳聚糖、壳聚糖-*L*-脯氨酸复合物、交联聚合物和 *L*-脯氨酸印迹聚合物的红外光谱图

Fig 3 FTIR spectra of samples
a. CTS b. CTS-*L*-Pro composite
c. crosslinking CTS-*L*-Pro d. *L*-Pro MIPs

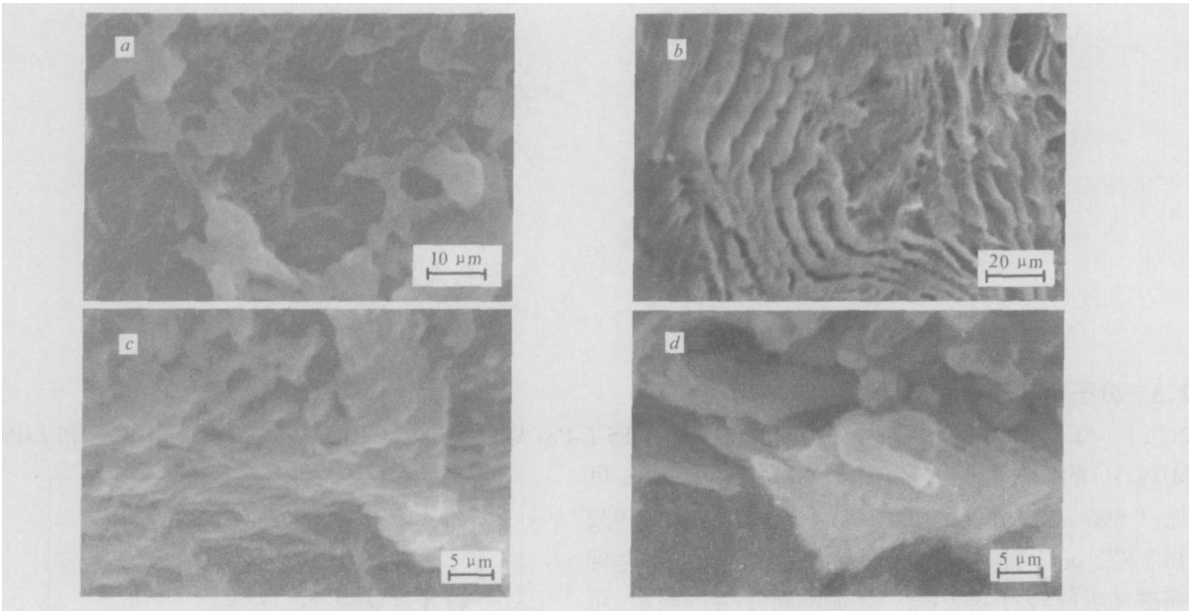


图 4 壳聚糖、壳聚糖-*L*脯氨酸复合物、交联聚合物和 *L*脯氨酸印迹聚合物的扫描电子显微镜图

Fig. 4 SEM images of samples

a. CTS b. CTS-*L*-Pro composite c. crosslinking CTS-*L*-Pro d. *L*-Pro MIPs

2.4 *L*-Pro MIPs 的性能

2.4.1 选择性和重复使用性 将 MIPs 颗粒干法装入玻璃柱中(自制色谱柱,柱高 15 cm,内直径 1.2 cm)。用 pH=2 的盐酸溶液灌注 48 h 排除柱内空气,活化 MIPs。根据色谱出峰体积计算容量因子 $k_L=(V_L-V_0)/V_0$, $k_D=(V_D-V_0)/V_0$; 分离因子 $\alpha=k_L/k_D$; 分离度 $R=2(V_L-V_D)/(w_L+w_D)^{[8]}$ 。式中, V_0 为死体积 (mL), V_L 和 V_D 分别为 *L*-、*D*-的保留体积 (mL), w_L 和 w_D 分别为 *L*-、*D*-的峰宽。

进质量浓度为 1 g/L 的脯氨酸外消旋混合物 (*D*-, *L*-Pro) 1 mL, 以 pH=11 的氢氧化钠溶液为流动相, 柱温 20 ℃, 流速 0.27 mL/min。每 5 mL 流出液 (E_L) 取 1 mL 用分光光度法测定脯氨酸含量, 结果如图 5 所示。可以看出, *L*-Pro 分子印迹聚合物对脯氨酸的外消旋混合物显示出良好的手性拆分能力, 完全达到了基线分离。分离因子达到 4.67 分离度达到 2.2。过柱后, 用 pH=2 的盐酸酸化 48 h, 重新活化, 再进样, 重复 3 次。分离因子均大于 4.0 分离度均大于 2.0 说明 *L*-Pro MIPs 具有良好的重复使用性。

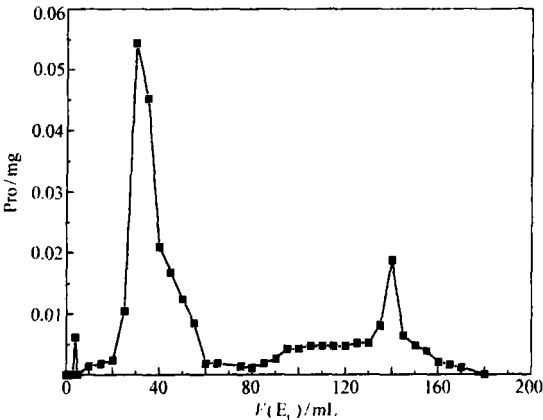


图 5 *L*-脯氨酸分子印迹聚合物的色谱评价

Fig. 5 Evaluation of LC on MIPs of *L*-Pro

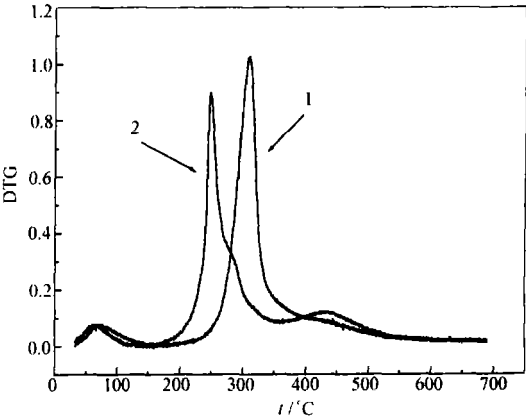


图 6 壳聚糖(1)和印迹聚合物(2)的差重曲线

Fig. 6 DTG curves of (1) CTS and (2) MIPs

2.4.2 热稳定性 在 N_2 气氛中对 CTS 和 MIPs 进行差热 (DTA) 和热重 (TG) 分析, 结果如表 2 所示。

TG 结果 (图 6 与表 2) 表明, 失重分为 2 个阶段。100 ℃ 左右失去结晶水和吸附水。MIPs 的失重比 CTS 大, 说明 MIPs 的孔隙较多, 更易吸附水; 200 ℃ 后急剧失重, 这是分子链的降解。本实验使用的 β -壳

表 2 壳聚糖和印迹聚合物的差热和热重分析

Table 2 DTA and TG of CTS and MIPs

	DTA		TG	
	Temp of peak /℃	Illustration	Mass loss %	Explanation
CTS	73.2	endotherm	0~3.5	dehydration
	318.1	exotherm	3.5~63	decomposition
	574.2	exotherm	63~66.5	carbonization
MIPs	90.4	endotherm	0~4.5	dehydration
	250.7	exotherm	4.5~61	decomposition
	595.1	exotherm	61~64.5	carbonization

聚糖分子链间以相互平行的方式排列, 大分子间强氢键作用导致壳聚糖很稳定, 不熔化, 到 200 ℃以上才开始分解, 主要为无规则断链反应和碳化。从 DTA 可看出, 壳聚糖交联后, 分子间强氢键遭到破坏, 使 MIPs 的热稳定性有所下降, 分解峰温降低了 67 ℃; 从 DTG 曲线可看出, MIPs 在 445 ℃处出现新的失重峰, 可能是戊二醛交联引入的氢, 使 MIPs 碳化时失去更多的氢分子。MIPs 的分解温度为 206 ℃。综合分析可知, MIPs 已交联成功并具有较好的热稳定性。

参 考 文 献

1 Shea K J, Sasaki D Y. *J Am Chem Soc* [J], 1989 **111**: 3 442

2 HE Jian Feng(何建峰), LIU Lan(刘岚), LUO Yong(罗勇), YANG GuiLan(杨桂兰), *et al Chinese J Appl Chem*(应用化学) [J], 2005 **22**: 1 161

3 Masakaza Y, Jun-ichiro I, Toshio K. *Reactive Func Polym* [J], 1999 **42**: 93

4 Mahony J O, Nolan K, Smyth M R. *et al Anal Chim Acta* [J], 2005 **534**: 31

5 Troll W, Lindsley J. *J Biol Chem* [J], 1955 **215**: 655

6 HE Xiao Jin(贺小进), TAN Tian Wei(谭天伟), LI Wei(李伟). *Ion Exch Ads*(离子交换与吸附) [J], 2000 **16**(1): 47

7 JIANG Ting Da(蒋挺大). Chitin(甲壳素) [M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2003: 168

8 GUO Tian Ying(郭天瑛), ZHANG Li Ying(张丽影), HAO Guang Jie(郝广杰), *et al Chinese J Anal Chem*(分析化学) [J], 2004 **32**: 705

Preparation and Properties of Molecular Imprinting Polymer for Chiral Separation of Proline

WEI Jun SUN Xiang Ying LIU Bin*

(College of Materials Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021)

Abstract With chitosan as the functional matrix (FMx) and L-Proline (L-Pro) as the template molecule, molecularly imprinting polymer with both the spatial configuration and bonding sites matching to L-Proline was synthesised by means of the molecularly imprinting technology in water. The polymer product was characterized by IR, SEM and TG. Furthermore, the mechanism was explored preliminarily. The effects of pH, the amount of cross-linking agent and reaction time were studied. The optimum conditions were pH = 10.7, composite 1.0 g cross-linking agent 8 mL, 18 h at ambient temperature. The experimental results show that L-Pro-MIP has a superior selective adsorption capacity and efficient chiral separation of L-Proline in water phase; the resolution factor is 4.67.

Keywords chiral separation, molecular imprinting, chitosan, L-Proline