

N-乙酰半胱氨酸分子印迹介孔硅聚合物的制备及识别机理研究^①

李小兰¹, 周 芸¹, 黄世杰¹, 朱晓兰²

1. 广西中烟工业公司 技术中心, 南宁 530001; 2. 中国科学技术大学 烟草与健康研究中心, 合肥 230052

摘要: 采用表面印迹法在介孔材料 SBA-15 表面合成对 N-乙酰半胱氨酸分子具有较高选择性的分子印迹聚合物小棒, 对该聚合物的形貌进行了光学表征, 并用 XRD 和 ¹³C NMR 对其识别机理做了详细的研究. 结果表明, 印迹聚合物表面存在对印迹分子选择性识别的官能团, 此项研究为 N-乙酰半胱氨酸分子的分离富集提供一种新型识别材料.

关 键 词: N-乙酰半胱氨酸; 分子印迹介孔硅聚合物; SBA-15; 表面印迹技术

中图分类号: O656

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)11-0126-06

N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)是一种用途广泛的药物, 主要用作粘痰的溶解, 并有解毒, 抗氧化和抑制由癌变引起的组织、细胞坏死的作用, 用于治疗外部损伤及过氧化损伤和由于类脂过氧化造成的帕金森疾病^[1].

分子印迹技术(MIT)是制备具有特殊分子识别性能的印迹聚合物的一种技术, 又称模板技术^[2]. 印迹聚合物(MIP)是一种能够选择性识别模板分子及其结构类似物的合成材料, 具有选择性好、稳定性高、应用范围广的特点, 广泛应用于色谱分离、固相萃取、膜分离、人工受体抗体仿生等诸多领域^[3-5]. 通过对粒子表面进行修饰制备 MIPs 材料是一个较好的方法^[6], 这种方法最大的优点是可以利用粒子的机械稳定性以及纳米结构的有序介孔氧化硅材料具有超大的孔容积和较高的比表面积, 印迹材料上大多结合位点位于或接近材料表面, 对目标分子具有高亲和力, 快速结合动力学等特点, 有望真正解决传统分子印迹遇到的困难, 从而进一步推动分子印迹技术的发展. 本实验采用表面印迹法在介孔材料 SBA-15 表面合成对 N-乙酰半胱氨酸分子印迹聚合物小棒, 对该聚合物的形貌和识别机理进行了 FTIR, XRD 和 ¹³C NMR 等光谱表征.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

正硅酸四乙酯(TEOS), EO₂₀PO₇₀EO₂₀(Pl23), 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APS, Aldrich), NAC, 3-羟丙基硫酸醇尿酸(HPMA)、双酚 A(BPA)和硅胶均购自上海百灵威化学技术有限公司. 其余试剂为分析纯.

SHZ-82 型超级恒温水浴槽(江苏省太仓医疗器械厂); LG10-2.4A 型离心机(北京医疗器械公司); Averse AV 400 核磁共振波谱仪(Bruker, Switzerland); MAGNA-IR750 红外分光光度计(Nicolet, U. S. A); H-800 透射电子显微镜(Hitachi, Japan); JSM-6700F 扫描电子显微镜(JEOL, Japan); X'Pert

① 收稿日期: 2013-12-26

基金项目: 国家质检公益性行业科研专项项目(201210071); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(WK2061020001).

作者简介: 李小兰(1971-), 女, 广西平南人, 工程师, 主要从事分析化学的研究.

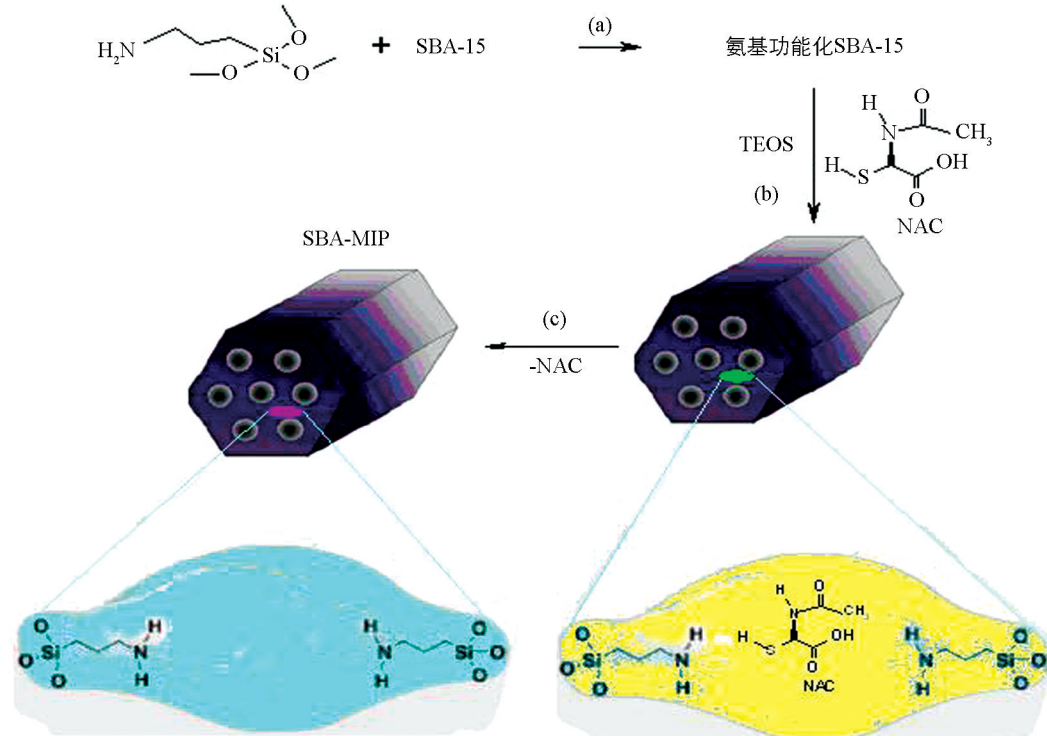
通信作者: 朱晓兰, 博士.

PROX 射线衍射仪(PANalytical, Netherlands).

1.2 印迹聚合物的合成

按文献所示方法制备 SBA-15^[7] 及氨基修饰^[8]: 2.0 g PI23, 15 g H₂O, 60 g HCl (2 mol/L), 40 °C 磁力搅拌 4 h, 然后滴加 TEOS 4.25 g, 磁力搅拌 2 h, 转入高压晶化釜 100 °C 下晶化 48 h, 抽滤, 用去离子水和乙醇反复洗涤, 将产物于 100 °C 下烘干, 550 °C 煅烧 8 h 以上. 取 1.0 g SBA-15 加入 50 mL 正己烷, 5.0 mL APS 混合, 70 °C 氮气保护下搅拌回流 12 h, 反应产物用乙醇反复洗涤, 80 °C 下干燥 12 h 以上.

0.4 g NAC 溶解在 25 mL 乙醇中, 搅拌均匀, 加入 2.0 g 氨基修饰后的 SBA-15, 回流 2 h, 然后加入 4 mL TEOS 和 3 mL (1.0 mol/L) HAc, 混合物搅拌回流 8 h, 产物过滤, 100 °C 下真空干燥 12 h, 生成物用乙醇反复洗涤 2 次, 超纯水洗涤 1 次. 残余的 SBA-15 用乙醇和 HCl 的混合液提取(体积比为 1 : 1)(HCl 浓度: 6 mol/L), 索氏萃取 24 h, 最后用 0.1 mol/L 的 KOH 溶液中和至中性, 超纯水洗涤, 移去分子模板及过量的聚合物, 100 °C 下真空干燥 12 h, 反应图(图 1). 作为对照试验, 不含模板分子的 NIP 的制备除不加 NAC 外, 其他与上述完全一致.



(a) 介孔硅氨基功能化; (b) 介孔硅印迹过程; (c) 印迹分子洗脱过程.

图 1 NAC-MIP 的合成

1.3 分子印迹介孔硅颗粒的静态吸附实验

称取一组等量的分子印迹介孔硅颗粒 MIP 和对照品 NIP(30.0 mg), 分别置于 50 mL 磨口锥形瓶中, 加入 10.0 mL 一定浓度的 NAC(HPMA 和 BPA 同理)水溶液, 放入振荡器中室温下缓慢振荡 2 h 后, 取适量吸附液离心, 过 0.45 μm 的膜后进行 HPLC 分析, 测定平衡吸附液中 NAC 的游离浓度. 根据结合前后溶液中 NAC 的浓度变化可计算 MIP 和 NIP 的结合量 Q.

1.4 固相萃取柱的制备、淋洗和洗脱程序

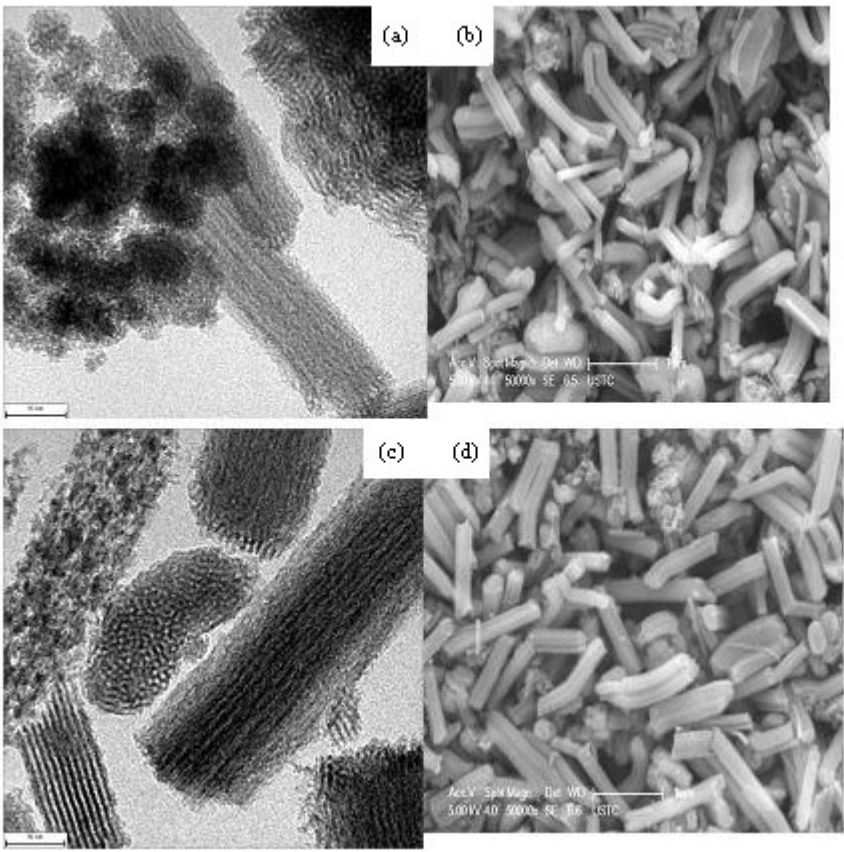
称取制备好的 NAC-MIP 和 NAC-NIP 介孔硅颗粒各 100 mg, 分别紧密填入 3 mL 的聚四氟乙烯固相萃取空柱(PTFE, Spelco, 上海)中, 萃取柱的上端和下端均用 20 μm 的 PTFE 垫密封, 以防聚合物颗粒渗漏. 浸泡于乙醇溶液中, 超声 10 min, 使萃取柱内填料均匀. 在使用之前和两次上样之间, 小柱先后用 20% 甲酸/甲醇(体积比为 70 : 30, 5 mL)和甲醇(5 mL)淋洗. 上样品之前, 先分别用 5 mL 甲醇和 5% 甲酸/甲醇(体积比为 70 : 30, 5 mL)预淋洗. 然后用 1 mL NAC(HPMA 和 BPA 同理)标准样品(1 μg/mL)溶液以约 1 mL/min 的流速缓慢通过小柱, 待小柱上方溶液基本流干时, 用 2 mL 5% 甲酸/甲醇(体积比为 70 :

30)溶液为淋洗液, 对小柱进行淋洗, 待溶液自然流干, 再用 2 mL 20% 甲酸/甲醇(体积比为 70 : 30)对小柱进行洗脱. 收集淋洗和洗脱部分溶液, 在 N₂ 流中缓慢吹干, 残留物用 1 mL 甲醇溶液, 取 10 μL 进行后续的色谱分析.

2 结果与讨论

2.1 印迹聚合物的形貌分析

采用透射电镜(TEM)和扫描电镜(SEM)对 NAC-MIP 和 NAC-NIP 进行形貌表征(图 2). NAC-MIP 和 NAC-NIP 具有明显的介孔结构, 表现为相对有序的纤维小棒和一些六方介孔结构, 但与 NAC-NIP 相比, NAC-MIP 孔结构更不规则和无序, 这些应该是印迹的效果^[9].



(a) TEM-NAC-MIP; (b) SEM-NAC-MIP; (c) TEM-NAC-NIP; (d) SEM-NAC-NIP.

图 2 分子印迹聚合物的 TEM 图和 SEM 图

2.2 印迹聚合物的有序介孔结构

分子印迹聚合物的有序六方介孔结构在 XRD 上也被得到证实. 如图 3 所示, 印记聚合物在极小的衍射角 2°左右区域存在 3 个明显吸收峰, 说明印迹介孔硅为规则的晶形排列^[8], 分别对应于晶面指数(100), (110)和(200)的衍射^[10]. 在 0.7°附近有一个强衍射峰, 说明印迹的介孔材料有较大的空间结构, 并且为六边形的有序介孔结构, 印迹和空白介孔硅面间距 d 分别为 85.0 nm 和 87.3 nm.

2.3 印迹聚合物的核磁共振波谱分析

实验还采用交叉极化固态核磁共振波谱(CP/MAS NMR)对印迹聚合物的结构进行了进一步的研究(图 4). 在 MIP-NAC 波谱(图 a)中明显存在—COOH (173.5 附近)和丙基(8, 22 和 42)吸收峰, 另外, 在 70~80 附近有模板 P₁₂₃吸收. 在受热洗脱后, 这些峰都消失了, 留下的 Si—O 骨架上 C 信号相对强度保持不变. 这些结果表明印迹分子的洗脱不影响聚合物的骨架结构^[11].

2.4 分子印迹介孔硅颗粒的吸附特性

为研究印迹介孔硅颗粒的结合特性, 实验中还挑选了两种结构类似物药物分子(NAC, HPMA 和

BPA)对印迹介孔硅颗粒的选择性进行了静态吸附实验,结果如表 1 所示,印迹介孔硅颗粒对 HPMA 也表现出类似于印迹分子 NAC 的吸附特性,NAC 的印迹因子数值最大,HPMA 次之,而双酚 A 最小.实验中还对印迹介孔硅颗粒制备了介孔硅分子印迹固相萃取小柱,对 3 种分析物(NAC, HPMA 和 BPA)进一步研究了固相萃取小柱的吸附特性.对小柱进行预处理和活化后,分别采用 1 mL (1 μ g/mL 的 NAC, HPMA 和 BPA)的标准溶液进行上样.首先,对印迹柱和空白柱采用 2 mL 5%甲酸/甲醇(体积比为 70 : 30)溶液进行淋洗,接着,用 2 mL 30%甲酸/甲醇(体积比为 70 : 30)溶液进行洗脱.如图 5 所示,在淋洗阶段,对空白小柱,3 种物质都保留不多,但对于介孔硅印迹小柱,几乎所有的 NAC 和大部分的 HPMA 都保留在介孔硅分子印迹颗粒中,这也显示出介孔硅分子印迹颗粒对 NAC 和 HPMA 具有选择性吸附,对 BPA 则两种小柱差别不大.在洗脱阶段,3 种物质全部从小柱上洗脱下来.这两项实验结果均是源自 NAC 和 HPMA 在结构上的类似性(图 5),NAC 和 HPMA 两种药物分子具有相同的官能团结构,都含有一COOH 和—NH,只是在同样的位置用 $\text{—CH}_2\text{OH}$ 代替—SH 结构,因此对官能团的印迹效果不产生很大影响,这一点与传统的分子印迹聚合物是一致的^[12],而且二者的 pKa 值非常接近(NAC3.24, HPMA3.91)^[13].而 BPA 的结构与印迹分子差别较大,分子中有两个苯环,虽然也有一OH 官能团,但位置与印迹位点已经对不上,在吸附特性上与对照介孔硅颗粒差别不大,表现为印迹因子数值最小.因此,分子印迹介孔硅颗粒对于分析物的吸附是基于 NAC 和 HPMA 分子中的一COOH 和聚合物分子中的氨基基团之间的静电作用和氢键作用^[14].图 5 中 3 种药物分子的回收率也证实了介孔硅分子印迹固相萃取小柱可选择性富集 NAC 和 HPMA 分子.

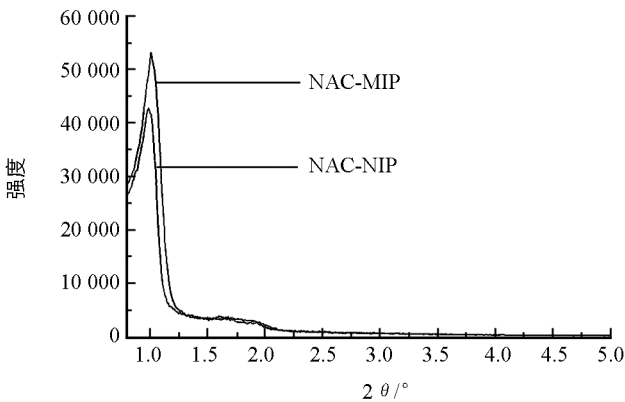
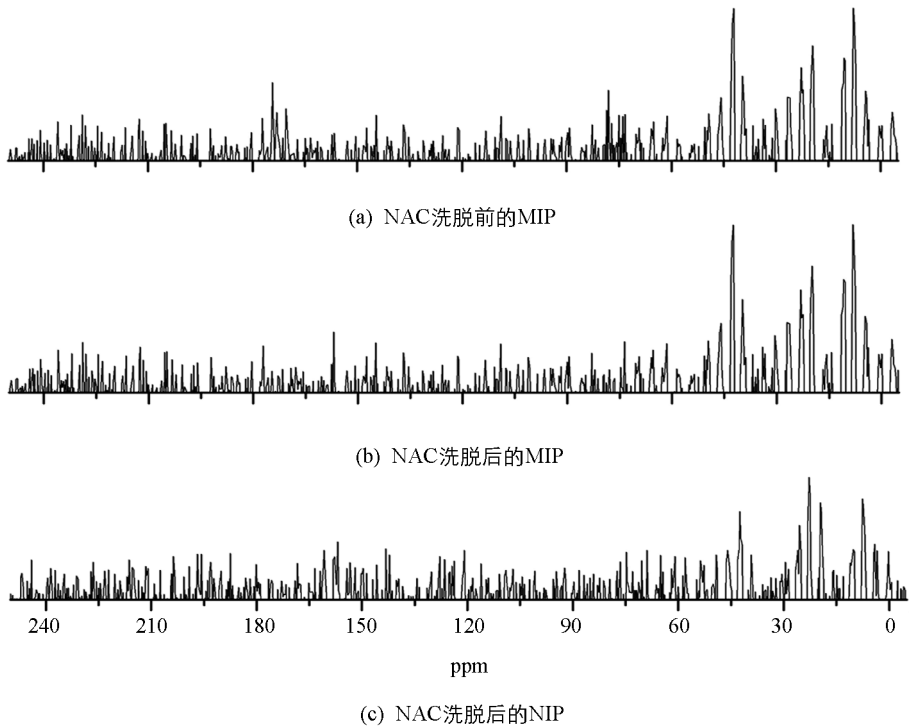


图 3 分子印迹介孔硅颗粒的 X 射线衍射 (XRD)图 ($d_m=85.0$, $d_n=87.3$)



(a) NAC 洗脱前的 MIP; (b) NAC 洗脱后的 MIP; (c) NAC 洗脱后的 NIP.

图 4 分子印迹介孔硅颗粒的固态¹³C 核磁共振波谱图

表 1 印迹介孔硅颗粒和对照介孔硅颗粒的分配系数和印迹因子

分析物	NAC	HPMA	BPA
* K_i	1.36	0.98	0.35
K_c	0.21	0.22	0.33
I_F	6.48	4.45	1.06

注：* 用分配系数 K 和印迹因子 I_F 来表示分子印迹的效果和对分析物的识别程度，定义为分配系数 $K=(\text{聚合物固体吸附分析物的摩尔数}/\text{聚合物固体质量})/(\text{溶液中留存分析物的摩尔数}/\text{溶液质量})$ ， $I_F=K_i/K_c$ 。

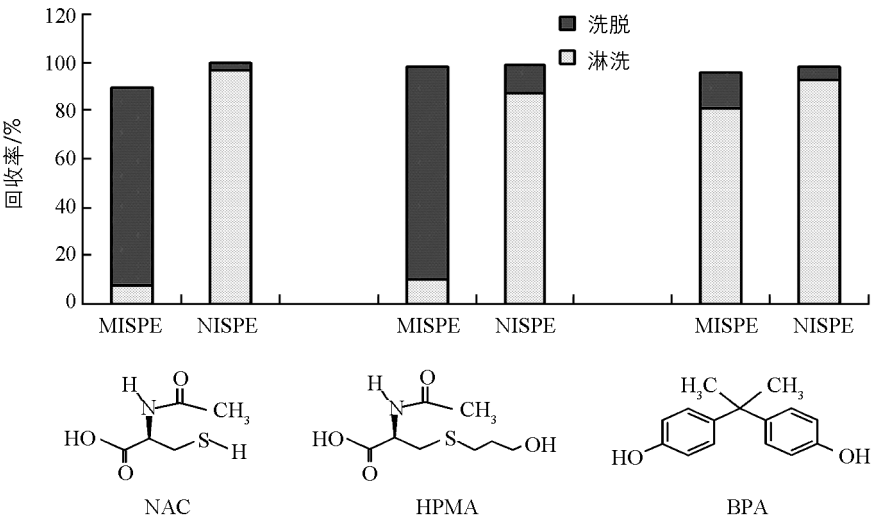


图 5 介孔硅分子印迹固相萃取小柱对 3 种分析物的吸附回收率

3 结 论

以 N-乙酰半胱氨酸为模板分子，以 SBA-15 为基质在其表面合成具有选择性识别功能的表面印迹分子聚合物. 采用电镜分析和 X 射线衍射确认了分子印迹介孔材料的有序结构. 利用¹³C 核磁共振波谱确认了在印迹聚合物表面存在可与印迹分子相互作用的官能团，为 N-乙酰半胱氨酸分子及其结构类似物的分离富集提供一种新型识别材料.

参考文献：

[1] EISENBRAND G, OTTENEDER M, TANG W. Synthesis of N-Acetyl-S-(3-Coumarinyl)-Cysteine Methylenelester and HPLC Analysis of Urinary Coumarin Metabolites [J]. Toxicol, 2003, 190: 249—258.

[2] WULFF G. Enzyme-Like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers [J]. Chem Rev, 2002, 102: 1—27.

[3] 郭婷, 张宇昊, 马良. 农药溴氰菊酯分子印迹聚合物的制备及性能研究 [J]. 西南大学学报：自然科学版, 2013, 2(8): 1—8.

[4] CHEN L, XU S, LI J. Recent Advances in Molecular Imprinting Technology: Current Status, Challenges and Highlighted Applications [J]. Chem Soc Rev, 2011, 40: 2922—2942.

[5] ZHU X, YANG J, CAI J, et al. Films Coated with Molecular Imprinted Polymers for the Selective Stir Bar Sorption Extraction of Monocrotophos [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1131(1): 37—44.

[6] LU Q, CHEN X, NIE L, et al. Tuning of the Vinly Groups' Spacing at Surface of Modified Silica in Preparation of High Density Imprinted Layer-Coated Silica Nanoparticles: A Dispersive Solid-Phase Extraction Materials for Chlorpyrifos [J]. Talanta, 2010, 81(3): 959—966.

[7] ZHAO DY, FENG JL, HUO QS, et al. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores [J]. Science, 1998, 279: 548—552.

[8] ZHENG S, GAO L, GUO J. Synthesis and Characterization of Functionalized MCM-41 with Copper-and Manganese-

- Phenanthroline Complexes [J]. J Solid State Chem, 2000, 152: 447—452.
- [9] JUNG B M, KIM M S, KIM W J, et al. Molecularly Imprinted Mesoporous Silica Particles Showing a Rapid Kinetic Binding [J]. Chem Commun, 2010, 46: 3699—3701.
- [10] BOBDE R, KARIYA K, DESHMUKH L. Acid Catalyzed Resin; Physico-Chemical and Its Thermal Degradation Studies [J]. Inter J Chem Anal Sci, 2013, 4: 9—13.
- [11] LOFGREEN J E, MOUDRAKOVSKI I L, OZIN G A. Molecularly Imprinted Mesoporous Organosilica [J]. ACS Nano, 2011, 5: 2277—2287.
- [12] 王颜红, 霍佳平, 张 红, 等. 阿特拉津分子印迹固相萃取柱的制备及应用 [J]. 分析化学, 2010, 38(5): 675—652.
- [13] EDSALL J T, WYMAN J. Biophysical Chemistry [M]. New York: Academic Press, 1958: 562.
- [14] PILETSKY S A, ANDERSSON H S, NICHOLLS I A. Combined Hydrophobic and Electrostatic Interaction-Based Recognition in Molecularly Imprinted Polymers [J]. Macromolecules, 1999, 32: 633—636.

Preparation and Selective Adsorption Behavior of Mesoporous Silica SBA-15- N-Acetylcysteine Imprinted Polymer Based on Surface Molecular Imprinting Technology

LI Xiao-lan¹, ZHOU Yun¹, HUANG Shi-jie¹, ZHU Xiao-lan²

1. Technical Center, China Tobacco Guangxi Industrial Corporation, Nanning 530001, China;

2. Research Center of Tobacco and Health, University of Science and Technology of China, Hefei 230052, China

Abstract: A new N-acetylcysteine molecularly imprinted polymer (NAC-MIP), which can be used for selective adsorption of NAC from aqueous solutions, was successfully prepared based on the supported material of ordered mesoporous silica SBA-15 with the help of the surface molecular imprinting technology. The prepared polymer was characterized by X-ray diffraction, scanning electron microscopy (SEM) and ¹³C NMR spectroscopy. The results showed that the synthesized polymer possessed high ordered mesoporous structure. The imprinted silica particles showed high selectivity and fast kinetic binding for the template due to their nanosized wall thickness and high surface area.

Key words: N-acetylcysteine (NAC); molecularly imprinted ordered mesoporous silica; SBA-15; surface molecular imprinting technology

责任编辑 潘春燕

