

多壁碳纳米管表面熊果酸印迹聚合物的制备及固相萃取*

张朝晖^{1,2**} 杨 潇¹ 张华斌¹ 张明磊¹ 罗丽娟¹ 陈 星¹ 聂利华²

(¹ 吉首大学化学化工学院 吉首 416000)(² 湖南大学化学传感与计量国家重点实验室 长沙 410082)

摘 要 以聚乙烯醇修饰的多壁碳纳米管(MWCNTs)为基材,熊果酸(UA)为模板分子,甲基丙烯酸(MAA)为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)为交联剂,采用表面印迹技术在碳纳米管表面合成对熊果酸具有良好选择性的分子印迹聚合物(MWCNTs-MIPs). 讨论了不同摩尔比例的功能单体与模板分子合成印迹聚合物的效果,得出最佳的摩尔比为 4:1. 采用红外光谱、扫描电镜对该印迹聚合物进行表面形态表征,结果表明在碳纳米管表面接枝一层稳定、均匀、20~25 nm 厚的印迹材料. 采用静态吸附和吸附动力学实验研究其吸附性能,结果表明 MWCNTs-MIPs 对熊果酸具有特异吸附性,其最大吸附量为 53.1 $\mu\text{mol/g}$,在 60 min 时达到吸附平衡. 优化固相萃取条件,结果表明采用 100% 甲醇溶液淋洗和 10% 乙酸甲醇溶液洗脱效果最好. 将该印迹聚合物装填于固相萃取柱中,可将熊果酸与其结构类似物齐墩果酸进行分离.

关键词 表面印迹, 碳纳米管, 固相萃取, 熊果酸

熊果酸(ursolic acid, UA), 其化学结构如图 1(a)所示,是一种存在于熊果、山茱萸、猕猴桃根等天然植物中的三萜类化合物,具有镇静、消炎、抗菌、抗溃疡、降低血糖、抗癌等多种生物效应^[1]. 目前,熊果酸的纯化大多采用常规的溶剂萃取和柱层析技术,操作步骤繁杂,溶剂消耗量大,对环境污染严重,并缺乏选择性^[2],尤其对复杂样品中微量熊果酸的分离、富集效果不理想. 故亟需研究新技术、新方法提高熊果酸的分离效率.

分子印迹聚合物是一种对目标分子具有特异识别能力的聚合物,因其特殊的选择识别能力,已广泛用于分析化学和分离科学等领域^[3,4],特别适用于从复杂体系如生物样品、环境样品以及植物中分离、分析特定目标分子^[5-10]. 但传统的原位聚合法所制备的印迹聚合物呈块状,颗粒较大,需研磨过筛,且聚合物的高度交联使其内部模板分子洗脱比较困难;印迹孔穴有“深埋”等现象^[4]. 因此研究新型印迹技术成了印迹领域的一个重要方向,其中核-壳型印迹聚合材料有望解决这一难题.

碳纳米管具有独特的力学性能和良好的机械性能,比表面积大,将其应用于分子印迹技术能把

所有的结合位点布置易接近的表面上,从而提高模板分子在印迹聚合物内部的传质速度,缩短平衡吸附时间,提高印迹孔穴的利用率^[11]. 目前,碳纳米管表面分子印迹技术已成了新型印迹技术重要方向之一^[12,13],但将碳纳米管作为载体应用于固相萃取熊果酸的研究鲜有报道.

本文以熊果酸为模板分子,甲基丙烯酸为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂,在多壁碳纳米管表面制备对 UA 具有特异吸附性能的印迹聚合物(MWCNTs-MIPs). 采用红外光谱技术和扫描电镜对聚合物进行表征. 将 MWCNTs-MIPs 填充至固相萃取(SPE)柱中,对其吸附性能进行探讨,结合液相色谱技术,成功分离富集猕猴桃根中的熊果酸.

1 实验部分

1.1 实验仪器和药品

LC-2010AHT 型高效液相色谱(日本岛津公司);红外光谱仪(德国 Bruker 公司);KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);台式高速离心机(北京医用离心机厂);DZF-6020 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);JSM-

* 2011-02-26 收稿,2011-05-11 修稿;国家自然科学基金(基金号 21005030)、湖南省教育厅重点项目(项目号 10A099)、湖南大学化学传感与计量国家重点实验室开放基金(基金号 2008007)和吉首大学研究生创新课题项目(项目号 JGY 201111)资助;** 通讯联系人, E-mail: zhaohuizhang77@163.com

doi:10.3724/SP.J.1105.2011.11016

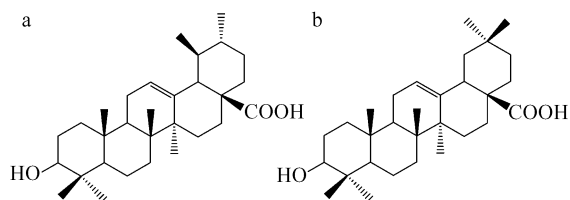


Fig. 1 Chemical structures of ursolic acid (a) and oleanic acid (b)

6700F 电子扫描显微镜(日本电子)。

多壁碳纳米管(MWCNTs, 外径为 20 ~ 25 nm, 纯度 95%) 购自深圳比尔科技公司。熊果酸(UA)和齐墩果酸(OA)购自上海万代制药有限公司。聚乙烯醇(PVA, 聚合度为 1750 ± 50 ; 醇解度为 87% ~ 89%)、甲基丙烯酸(MAA)、乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)、2, 2'-偶氮二异丁腈(AIBN)、乙腈(ACN)、氢氧化钠、醋酸、甲苯、甲醇和乙醇均购自长沙化学试剂公司。除特殊说明外, 均为分析纯试剂。实验用水均为二次蒸馏水。

1.2 羧基改性碳纳米管

取 0.5 g MWCNTs 和 0.1 g AIBN 分散于 30 mL 甲苯中, 超声 10 min, 通氮除氧 30 min 后, 75℃ 反应 4 h。反应产物用甲苯洗涤 4 遍后, 40℃ 真空干燥过夜, 得到黑色羧基改性碳纳米管。

取 0.45 g 羧基改性碳纳米管分散于 50 mL 10 mol/L NaOH 甲醇溶液中, 60℃ 下回流 48 h 后过滤; 滤饼先用 6 mol/L HCl 酸化至 pH = 3, 再用去离子水洗涤至中性。最后 40℃ 下真空干燥 12 h, 即制得羧基改性碳纳米管, 其中羧基含量为 7.4 mmol/g。

1.3 聚乙烯醇碳纳米管复合物(MWCNTs-PVA)制备

取 2 g PVA 溶解于 30 mL 去离子水中, 超声 10 min, 90℃ 下回流 4 h, 然后加入 0.4 g 羧基改性碳纳米管和 0.1 g 十二烷基磺酸钠, 超声 20 min, 在 80℃ 下回流 24 h, 反应结束后把反应液过滤, 滤饼用去离子水洗涤 3 次, 即得到 MWCNTs-PVA。

1.4 碳纳米管印迹聚合物(MWCNTs-MIPs)制备

取 0.5 mmol 熊果酸, 溶解至 250 mL 装有 15 mL 甲醇和 45 mL 水混合液的圆底烧瓶中, 再加入 200 mg MWCNTs-PVA 和 2 mmol MAA, 磁力搅拌 2 h 进行预聚合反应。然后加入 10 mmol EGDMA

和 30 mg AIBN。充氮气 10 min 后在 60℃ 的水浴中反应 24 h。模板分子用 9:1 (V: V) 甲醇和乙酸溶液在索氏提取器中抽提 24 h, 然后用丙酮漂洗, 除去少量细小的聚合物碎片, 40℃ 真空干燥 24 h 后即可制得 MWCNTs-MIPs。

采用相同方法, 不加模板分子制备空白聚合物(MWCNTs-NIPs)。

1.5 吸附性能研究

取 MWCNTs-MIPs 和 MWCNTs-NIPs 各 10 mg, 分别置于 10 mL 吸附管中, 各加入 10 mL 0.1 ~ 4.0 mmol/L 不同浓度的熊果酸甲醇-水溶液, 置于振荡器中, 室温下吸附 6 h, 在转速为 10000 r/min 下离心 10 min, 用 HPLC 检测上清液浓度, 平行测定 3 次, 取平均值。根据吸附前后溶液中熊果酸的浓度变化计算聚合物对熊果酸的结合量, 计算其吸附量, 计算公式参照文献[14]所示:

$$Q = (c_0 - c) \times V/M$$

其中, Q 为聚合物的吸附量($\mu\text{mol/g}$); c_0 为初始熊果酸溶液浓度(mmol/L); c 为样品溶液吸附饱和和后上清液中熊果酸的浓度(mmol/L); V 为溶液的体积(mL); M 为 MWCNTs-MIPs 的质量(g)。

将一系列 10 mg MWCNTs-MIPs 置于 10 mL 吸附管中, 分别加入 10 mL 2.0 mmol/L 熊果酸的甲醇-水溶液, 置于振荡器中, 每隔 10 min 收集上清液, 用 HPLC 检测熊果酸的浓度, 平行测定 3 次取平均值, 根据吸附前后溶液中熊果酸的浓度变化可计算不同吸附时间段聚合物对熊果酸的结合量。

1.6 固相萃取

参考文献[15], 自行设计固相萃取柱(150 mm × 4.6 mm)。向柱内装入 100 mg MWCNTs-MIPs, 在聚合物上方加一小团玻璃棉即可制成分子印迹固相萃取柱(MISPE)。萃取柱的流速由 N_2 气控制, 萃取过程中的溶液用高效液相色谱仪分析。选取与熊果酸(UA)具有类似结构的齐墩果酸(OA)为竞争物, 其化学结构如图 1(b) 所示。将 10 mL 熊果酸(2.0 mmol/L) 和齐墩果酸(2.0 mmol/L) 的甲醇-水混合溶液流过 MISPE 柱, 控制流速为 0.8 mL/min。然后用 6 mL 100% 甲醇液通过柱体清洗杂质和干扰物, 控制流速为 0.8 mL/min; 最后用 1:9 (V: V) 的乙酸-甲醇溶液, 流速为 0.8 mL/min, 分别收集淋洗液和洗脱液, 用 HPLC 测定。

2 结果与讨论

2.1 聚合物制备

在分子印迹技术发展过程中,减少结合位点的“深埋”一直是研究者们所关注的焦点之一,而增加“核”是最直接有效的方法之一.作为分子印迹聚合物的“核”,需满足两个条件:首先,核材料必须能与聚合材料有效结合,不容易被剥离;其次,在应用过程中具有适当的强度,印迹复合材料不会产生形变.在本试验中以多壁碳纳米管为

“核”,MWCNTs-MIPs 制备过程如图 2 所示.首先利用 AIBN 对碳纳米管进行改性,再用聚乙烯醇修饰.由于聚乙烯醇无毒,价格低廉,将其与碳纳米管复合,能提高碳纳米管与聚合物间的结合强度.然后在热引发下进行印迹聚合反应,将模板分子 UA 在碳纳米管表面聚合.由于碳纳米管具有比表面积大的特性,能提高对模板分子 UA 的吸附量.最后将模板分子 UA 洗脱出来,从而形成能够特异识别模板分子的印迹孔穴.

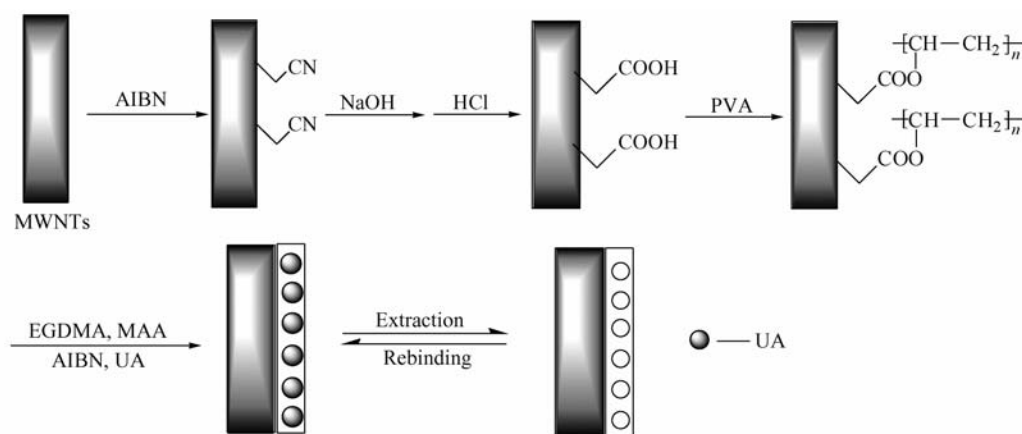


Fig. 2 Procedure for preparing MWCNTs-MIPs

一般来说,适合的功能单体与模板分子摩尔比有利于增加聚合物识别位点数量,提高特异选择性能,而过高或过低的功能单体与模板分子摩尔比却会降低特异选择性^[16].在研制过程中选择功能单体与模板分子 5 种不同比例,即 MAA:UA 分别为 2:1,3:1,4:1,5:1,6:1 来制备不同印迹材料,通过对比各种印迹材料对模板分子 UA 的回收率探讨其性能.回收率计算公式参照文献^[17]:

$$\text{Recovery}(\%) = (c_0 - c)/c_0 \times 100\%$$

其中 Recovery (%) 表示熊果酸的回收率, c_0 初始熊果酸溶液浓度 ($\mu\text{g/mL}$); c 表示样品溶液吸附饱和后上清液中熊果酸的浓度 ($\mu\text{g/mL}$). 研究结果如图 3 所示,当摩尔比为 4:1 时, MWCNTs-MIPs 的回收率为 87.5%,而相应的 MWCNTs-NIPs 的回收率为 31.2%,得到的印迹聚合物特异识别性能最好.因此在本试验中选取功能单体 MAA 与模板分子 UA 的摩尔比为 4:1.

2.2 红外分析

图 4 是 MWCNTs (a), MWCNTs-PVA (b) 和 MWCNTs-MIPs (c) 的红外光谱图.从图 4(b) 中可以看出, $800 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 间是 $-(\text{CH}_2)_n-$ 的摇摆

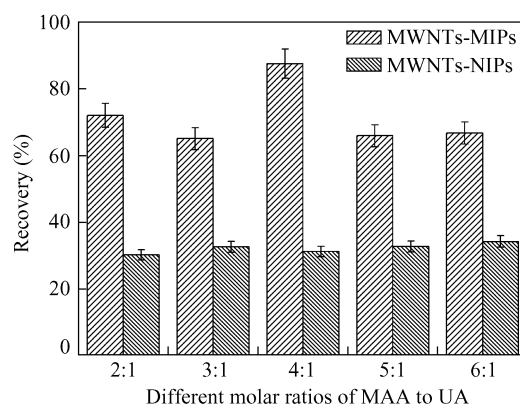


Fig. 3 Effect of different molar ratios of the functional monomer to the template on MWCNTs-MIPs adsorption performance

振动峰; 1730 cm^{-1} 处有 1 个伸缩振动峰,这是碳纳米管羧基上 $\text{C}=\text{O}$ 的吸收振动峰;在 1160 和 1050 cm^{-1} 处分别为 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 的对称和不对称伸缩振动峰,这表明聚乙烯醇已接枝到碳纳米管上.图 4(c) 为 MWCNTs-MIPs 的红外光谱图, 2951 cm^{-1} 处是饱和 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动峰,这是由于交联聚合物中带有乙二醇二甲基丙烯酸酯单元.从图中可看出 1730 cm^{-1} 处 $\text{C}=\text{O}$ 峰的强度比图 4

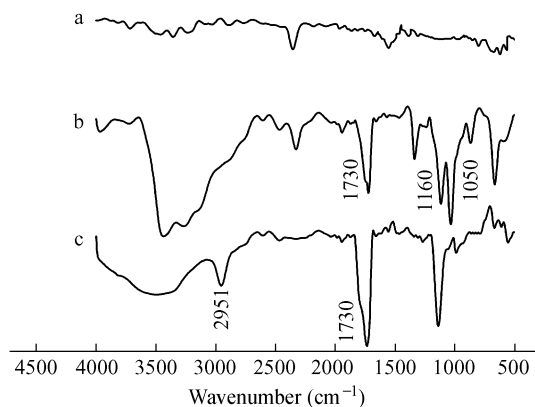


Fig. 4 IR spectra of crude MWCNTs (a), MWCNTs-PVA (b) and MWCNTs-MIPs (c)

(b)中的相应峰明显增强,这是由于 MWCNTs-MIPs 高分子层是 EGDMA 和 MAA 共聚而来。

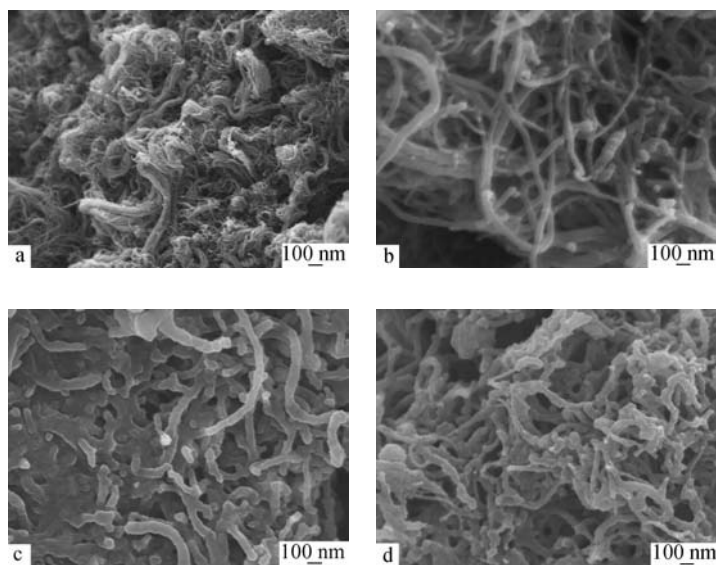


Fig. 5 SEM photographs of crude MWCNTs (a), MWCNTs-PVA (b), MWCNTs-MIPs (c) and MWCNTs-NIPs (d)

2.4 吸附性能研究

为了研究分子印迹聚合物的吸附性能,在熊果酸浓度为 0.1 ~ 4.0 mmol/L 的范围内考察此聚合物的吸附等温线.平衡吸附 6 h 以后,计算各浓度下的饱和吸附容量.结果如图 6 所示, MWCNTs-MIPs 与 MWCNTs-NIPs 聚合物吸附曲线趋势相同,吸附量也随熊果酸浓度的增加而增加,随后达到饱和.但 MWCNTs-NIPs 对熊果酸的吸附量比 MWCNTs-MIPs 小得多,这可能由于在聚合过程,非印迹聚合物内没有形成合适的识别位点及印迹孔穴,故其吸附作用力远小于 MWCNTs-MIPs 对熊果酸的吸附作用力.从图 6 中可以估算出 MWCNTs-MIPs 的最大吸附量为 53.1 $\mu\text{mol/g}$.

2.3 形貌表征

采用扫描电镜对原始 MWCNTs 和 MWCNTs-MIPs 进行形貌分析,结果如图 5 所示.图 5(a)是原始 MWCNTs 的扫描电镜图.从图中可以清晰地看到 MWCNTs 呈单一的纳米管状或小的束状,彼此之间缠绕成束,管径大约为 20 nm.图 5(b)是 MWCNTs-PVA 的扫描电镜图,同样在放大 50000 倍下观察,管径已经均匀变粗,这表明聚乙烯醇已均匀地包覆在 MWCNTs 表面.图 5(c)和图 5(d)分别是碳纳米管表面印迹聚合物与非分子印迹聚合物的扫描电镜图,从图中可观察到经过接枝修饰的分子印迹聚合物与非印迹聚合物管径都均匀增粗,但两者相差不大.与图 5(b)比较可知, MWCNTs-MIPs 的管径大于 MWCNTs-PVA 的管径,这说明聚合物已均匀地修饰在碳纳米管表面。

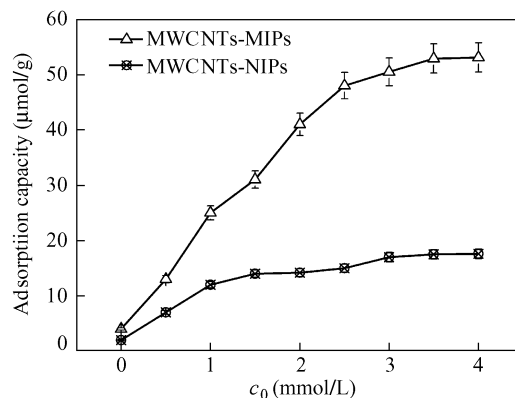


Fig. 6 Adsorption isotherms of MWCNTs-MIPs and MWCNTs-NIPs

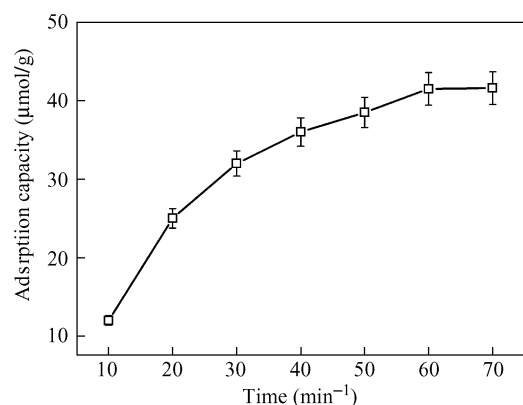


Fig. 7 Adsorption kinetics of MWCNTs-MIPs

从图 7 可以看出聚合物的吸附容量随时间变化的情况. 最初 30 min 内吸附容量快速增加, 随后吸附容量缓慢增加, 在 60 min 时吸附基本达到饱和. 由此推断模板分子首先吸附到聚合物表面的识别位点, 当表面的识别位点被结合以后模板分子进入聚合物内部的孔穴比较困难, 所以吸附容量逐渐变缓. 吸附动力学实验结果表明此碳纳米管分子印迹聚合物对模板分子具有较快的吸附速度.

2.5 固相萃取优化

固相萃取一般包括柱活化、上样、清洗和洗脱 4 个步骤. 它先将被分析物键合于填料上, 而杂质和干扰物被清洗掉, 再通过洗脱过程被分析物快速从柱体上解吸, 其关键在于清洗与洗脱. 洗涤目的是将目标物最大程度地保留在固相萃取柱而非特异性吸附杂质尽可能地被洗脱. 在淋洗步骤中, 由于甲醇极性较大, 能够除去较多的非特异吸附的杂质, 我们采用不同体积比的甲醇-水研究淋洗效果, 结果发现当采取 100% 甲醇对萃取柱进行清洗时, 淋洗效果最佳, 因此 100% 甲醇被选定为淋洗液.

选择合适的洗脱液可以有效提高洗脱效率. 由于乙酸的存在能够破坏模板与功能单体之间的氢键作用, 所以我们分别考察不同体积分数的乙酸-甲醇洗脱液对熊果酸洗脱效果的影响. 结果如图 8 所示, 用 100% 甲醇进行洗脱可使熊果酸分子在柱体上有较强保留, 随着乙酸含量的增加, 洗脱剂的极性不断增加, 熊果酸的回收率迅速增加, 但当乙酸比例超过 10% 时, 熊果酸的回收率却逐渐变小. 因此采用 10% 乙酸-甲醇溶液作为洗脱液时, MWCNTs-MIPs 洗脱液中熊果酸回收率最高, 洗脱效果最好.

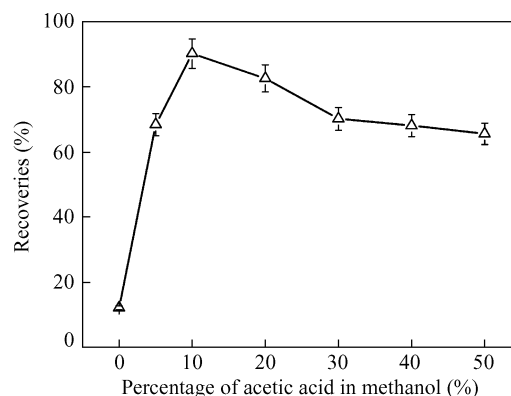


Fig. 8 Effect of recoveries of UA after washed with different percentage of acetic acid in methanol

2.6 选择性

在底物初始浓度为 2.0 mmol/L 时, 按 2.5 节实验操作收集淋洗液和洗脱液, 用 HPLC 进行检测, 结果如图 9 所示. 比较图 9(a)、9(b) 可知, MWCNTs-MIPs 吸附后的淋洗液中 UA 的含量明显降低, 而 OA 却被有效淋洗, 这表明 UA 较 OA

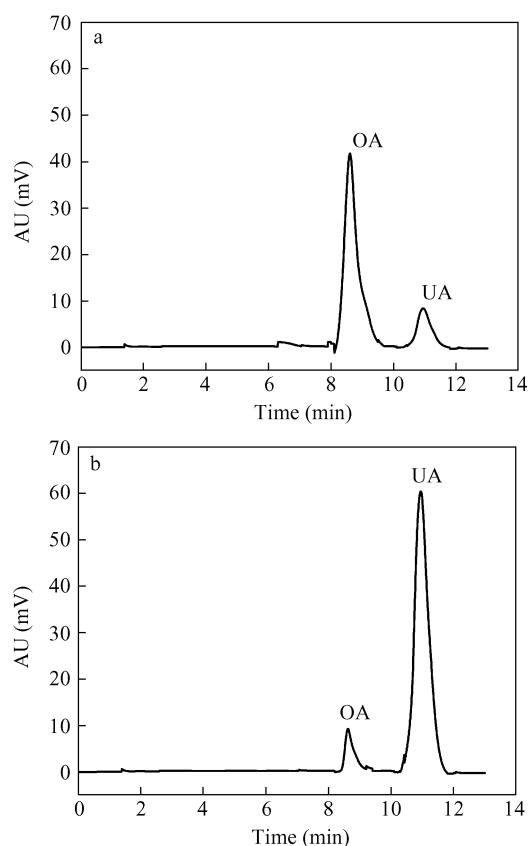


Fig. 9 Chromatograms of UA and OA mixture solution from MISPE columns (a) washing solution obtained from MISPE column and (b) eluting solution obtained from MISPE column

更多的保留在固相萃取柱上. 从图 9(b) 可看出洗脱液中含有大量的 UA 和少量的 OA, 这表明 MWCNTs-MIPs 对 UA 有特异识别性. MWCNTs-MIPs 对熊果酸分子的识别主要取决于模板分子的大小尺寸和键合位的匹配. 对两种物质结构进行比较, 可以看出 OA 的空间尺寸与印迹“孔穴”大小不配套, 而其键合位也匹配不上, 故 OA 分子结合容易脱落.

3 结论

本文采用表面分子印迹技术, 以聚乙烯醇修

饰的碳纳米管为载体合成对熊果酸具有较好选择性的印迹聚合物. 采用红外光谱和扫描电镜对聚合物进行表征, 结果表明印迹聚合层已成功接枝到碳纳米管表面. 吸附实验表明, MWCNTs-MIPs 对目标分子有较高的选择吸附性能. 将熊果酸印迹聚合物填充至固相萃取柱内, 结合高效液相色谱研究其在萃取柱上的保留行为, 使其在 MWCNTs-MIPs 柱上与其结构相似物齐墩果酸分离. MWCNTs-MIPs 将在分离、分析等领域显示出强大的应用潜力.

REFERENCES

- 1 Jang S M, Kim M J, Choi M S, Kwon E Y, Lee M K. *Metab Clin Exp*, 2010, 59: 512 ~ 519
- 2 Spela S H, Majda H, Mojca S, Zeljko K. *Food Chem*, 2003, 80: 275 ~ 282
- 3 Liu H, Shi Y, Wang D, Yang G, Yu A, Zhang H. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 32: 479 ~ 485
- 4 Yang Weihai(杨卫海), Yan Shoulei(严守雷), Wei Chen(卫晨), Wang Qinzhang(王清章). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2010, (10): 1163 ~ 1169
- 5 Hugon-Chapuis F, Mullet J U, Tuffal G, Hennion M C, Pichon V. *J Chromatogr A*, 2008, 1196-1197: 73 ~ 80
- 6 Javanbakht M, Namjumanesh M H, Akbari-adergani B. *Talanta*, 2009, 80(1): 133 ~ 138
- 7 Moullec S L, Truong L, Montauban C, Begos A, Pichon V, Bellier B. *J Chromatogr A*, 2007, 1139: 171 ~ 177
- 8 Zhang Zhaohui(张朝晖), Liu Li(刘丽), Nie Lihua(聂丽华). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2010, (6): 677 ~ 683
- 9 Sun Z, Schüssler W, Sengl M, Niessner R, Knopp D. *Anal Chim Acta*, 2008, 620: 73 ~ 81
- 10 Chang Huaichun(常怀春), Han Guangxi(韩光喜), Bai Ke(白珂), Gao Wenbin(郜文斌). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2011, (4): 340 ~ 346
- 11 Yang Lvwen(杨律文), Liu Hanmao(刘含茂), Qu Hemi(屈贺冕), Zeng Songjun(曾松军), Xiong Yuanqin(熊远钦), Xu Weijian(徐伟箭). *Chinese Journal of Applied Chemistry(应用化学)*, 2008, 25(2): 137 ~ 141
- 12 Chen P Y, Nien P C, Hu C W, Ho K C. *Sens Actuators, B*, 2010, 146(4): 466 ~ 471
- 13 Gao R X, Kong X, Su F X, He X W, Chen L X, Zhang Y K. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 8095 ~ 8102
- 14 Zhang W, Qin L, He X W, Li W Y, Zhang Y K. *J Chromatogr A*, 2008, 1187(1-2): 94 ~ 102
- 15 Jiang X M, Zhao C D, Jiang N, Zhang H X, Liu M C. *Food Chem*, 2008, 108: 1061 ~ 1067
- 16 Rachkov A, Minoura N. *J Chromatogr A*, 2000, 889: 111 ~ 118
- 17 Zhang N, Suleiman J S, He M, Hu B. *Talanta*, 2008, 75(2): 536 ~ 543

PREPARATION OF URSOLIC ACID IMPRINTED POLYMERS BASED ON MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES AND THEIR APPLICATION IN SOLID PHASE EXTRACTION

ZHANG Zhaohui^{1,2}, YANG Xiao¹, ZHANG Huabin¹, ZHANG Minglei¹,
LUO Lijuan¹, CHEN Xing¹, NIE Lihua²

(¹ College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou 416000)

(² State Key Laboratory of Chemo Biosensing and Chemometrics, Hunan University, Changsha 410082)

Abstract A novel surface molecularly imprinted polymer was synthesized using poly(vinyl alcohol) modified multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) as supporting matrix, ursolic acid (UA) as the template molecule, methacrylic acid (MAA) as the functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) as the cross-linking agent. Effect of different molar ratios of the functional monomer to the template on the performance of the synthesized MWCNTs-MIPs was discussed and the results showed that the optimum ratio was 4 : 1. The multi-walled carbon nanotubes-molecularly imprinted polymers (MWCNTs-MIPs) were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). The results showed that a stable imprinted layer was grafted on the MWCNTs surface successfully. The adsorption properties were demonstrated by static adsorption and adsorption kinetic experiments. The results demonstrated that the MWCNTs-MIPs had specific selectivity for UA, yielding a maximum adsorption capacity of 53.1 $\mu\text{mol/g}$ and the equilibrium time took about 60 min. Solid phase extraction condition was optimized, and the optimal condition was washing with 100% methanol and eluting with 10% acetic acid methanol solution. The solid-phase extraction column packed with MWCNTs-MIPs could be applied to separate ursolic acid (UA) from similar structure oleanolic acid (OA).

Keywords Surface molecular imprinting, Carbon nanotubes, Solid-phase extraction, Ursolic acid