

柚皮苷分子印迹膜的水相制备与识别*

马秀玲 陈日耀 郑曦 陈力勤 陈震**

(福建师范大学化学与材料学院 福州 350007)

摘要 以柚皮苷为印迹分子, PEG 为致孔剂, 在水相中制备了柚皮苷分子印迹壳聚糖膜. 分别讨论了交联剂、致孔剂和印迹分子的用量对印迹膜结构和性能的影响. 用 SEM 观察了致孔剂对印迹膜形貌及孔径的影响. 紫外吸收光谱分析、柚皮苷在不同体系中的溶解度变化, 以及红外光谱分析的结果表明功能聚合物壳聚糖和模板分子柚皮苷间形成了氢键. 膜的渗透实验结果表明, 在水相中, 柚皮苷分子印迹膜能有效地从新橙皮苷和柚皮苷的混合液中分离出印迹分子柚皮苷, 选择透过率为 11.16%.

关键词 壳聚糖, 柚皮苷, 水相识别, 分子印迹膜

分子印迹膜(molecularly imprinted membrane, MIM)兼具分子特异识别和膜分离的双重优点, 在高新科技领域受到了越来越多的关注^[1~3]. 目前, 分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer, MIP)的制备和应用大都局限在有机溶剂中进行. 然而天然的识别系统, 以及分子印迹聚合物所面临的实际应用环境多是水性体系. 随着分子印迹聚合物的研究重点从亲脂性的有机小分子转移到亲水性化合物, 水环境下(包括含水的有机环境下)的分子识别问题日益受到重视^[4,5].

柚皮苷(naringin 简称 NG)是一种双氢黄酮类化合物, 具有抗炎镇痛、抗病毒、抑菌及抑制眼醛糖还原酶等多种生物学活性和药理作用. NG 在其它领域中也有广泛的应用, 例如用以制备食品加工业的甜味剂. 由于 NG 味苦, 故应对食品工业(如甜味剂、果汁)中的 NG 含量加以控制. 去除 NG 的方法主要有化学法和离子交换树脂法. 化学法易产生污染, 离子交换树脂法会影响产品感官^[6]. 利用分子印迹膜选择性分离 NG, 分离过程简单条件温和且环境友好. 迄今为止, 尚鲜见有关 NG 分子印迹膜的水相制备与识别的报道^[7,8].

天然高分子壳聚糖(壳聚糖 chitosan, 简称 CS)是一种碱性多糖, 具有生物相容性好、生物可降解、无毒、价廉等优点, 在药物释放、环保和膜分离领域有着广泛的应用^[9,10]. CS 上含有大量羟基和氨基, 具有离子交换、螯合和吸附等作用. 但是, CS 本身与物质的这种结合是没有方向性的, 不具备选择性. 利用分子印迹技术, 将 CS 制成分子印

迹膜后具有构效预定性、特异识别性和吸附选择性. 以 CS 作为分子印迹膜材料, 印迹分离氨基酸已有文献报道^[11]. 本文以 CS 作功能聚合物, NG 为印迹分子, 利用 CS 中氨基直接与含羟基的 NG 印迹分子形成氢键作用力, 制备分子印迹 CS 膜. 研究了印迹分子 NG 和功能聚合物 CS 之间的相互匹配作用, 并将其应用于从新橙皮苷/柚皮苷混合溶液中识别分离出 NG.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

以 NICOLET380 FT-IR 傅立叶变换红外光谱仪(美国尼高力)对膜及产物进行官能团特征分析; 以 CARY 50 型 UV-Vis(美国瓦里安)研究溶液的紫外吸收变化; 以 Prostar 240 型 HPLC(美国瓦里安)分析混合溶液中 NG 的含量; 以 XL30ESEM/TMP 环境扫描电镜(日本 PHILIPS 公司)作印迹膜形貌分析.

柚皮苷(含量大于 98%, 购于南京泽朗医药公司); 壳聚糖(DD > 90%, 国药集团化学试剂有限公司), 其余试剂均为分析纯.

1.2 膜的制备

含致孔剂 PEG 印迹膜的制备是称取 2.0 g CS 和一定量 NG 加入到 100 mL 2% 的醋酸水溶液中, 60℃ 水浴下搅拌 4 h 后, 加入 10 mL 1 wt% 的 PEG20000, 继续搅拌 2 h 后, 静置脱泡得到铸膜液. 将铸膜液流延于水平放置的洁净玻璃板上, 60℃ 下干燥 12 h. 继而将膜置于 0.5 mol/L 的硫

* 2009-04-13 收稿, 2009-05-25 修稿; 福建省科技厅福建省自然科学基金(基金号 D0710009)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: zc1224@publ. fz. fj. cn

酸溶液(或戊二醛水溶液)中浸泡 24 h. 将处理后的膜用 80% 乙醇水溶液反复冲洗, 脱去印迹分子 NG, 直至冲洗溶液中用紫外光谱检测不出印迹分子 NG 为止.

非印迹膜及无 PEG 印迹膜的制备方法同上, 只是分别不加入印迹分子和 PEG.

1.3 溶解度测定

实验测定了 NG 分别在乙酸 (Acetic acid, HAc)-H₂O、CS-HAc-H₂O 体系中的溶解度随温度变化曲线.

测定过程是准确量取 20 mL 2% HAc 溶液, 加入 0.40 g 的 CS 后, 置于带磨口玻璃塞的三角瓶中, 加入过量的 NG 固体粉末后, 分别在 30、40、50、60、70、80℃ 水浴中保温 6 h 以上, 当溶液饱和后, 离心分离, 取上清液稀释一定倍数后, 用 HPLC 分析混合液中 NG 的含量. HAc-H₂O 体系中, 除不加入 CS, 其余操作同上.

色谱分析采用 Microsorb-MV 100-5 C-18 柱 (150 × 4.6 mm), 紫外检测波长 283 nm, 以甲醇: 2% HAc (38:62) 为流动相, 流速为 1.0 mL/min; 采用外标标准曲线法进行分析.

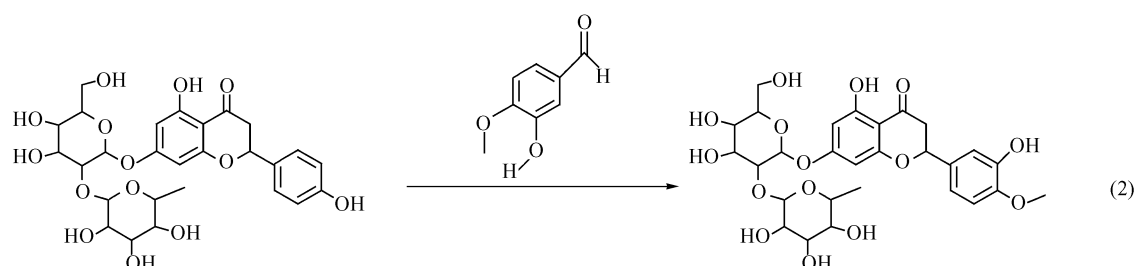
1.4 膜的溶胀度测定

以干湿膜称重法测定膜的溶胀度^[12]. 取干膜称重 (m_d) 后将该膜浸于一定浓度的乙醇水溶液中, 充分溶胀后, 用滤纸迅速吸去膜表面水分, 称得湿重 (m_s). 溶胀度 (S_w) 按下式计算:

$$S_w = \frac{m_s - m_d}{m_d} \times 100\% \quad (1)$$

1.5 膜的选择透过性能

新橙皮苷 (neohesperidin, 简称 NHD) 是一种无毒、低能量、高甜度的新一代甜味剂 (甜度是二氢查耳酮甜度的 950 倍). 以 NG 与异香兰素为原料制备 NHD 的反应式如式 (2) 所示.



在制备 NHD 甜味剂时, 常因含有少量的反应物 NG, 而使产品甜度下降. 利用印迹技术从 NHD 产品中分离出 NG, 具有实际应用意义.

实验渗透池如图 1 所示. 将 CS-NG 印迹膜固定于两渗透池 (每个池的容积为 25 mL) 中间. 原料池 (左室) 中加入 25 mL NG 和 NHD 的 20% 乙醇水溶液 (浓度均为 500 μg/mL), 透过池 (右室) 中加入 25 mL 20% 乙醇水溶液, 电磁搅拌. 左室

中的插图为 NG 和 NHD 的混合乙醇水溶液的高效液相色谱 (HPLC) 图, 右室为透过液的 HPLC 图. 每隔 1 h 从透过池取样口取出 30 μL 溶液, 用 HPLC 分析其组成 (分析条件同 1.3 节), 并计算其各组分的透过量. 从左插图中可以看出, NHD (a) 和 NG (b) 的 HPLC 峰面积相差不大, 而透过 CS-NG 分子印迹膜后的 HPLC 图中 (右插图), NG 的峰面积明显大于 NHD, 选择分离效果显著.

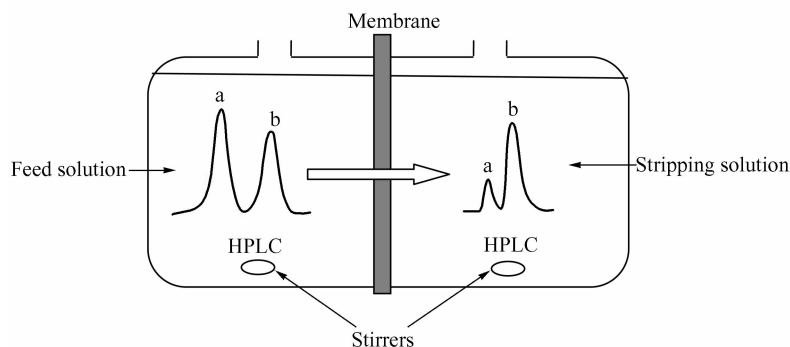


Fig. 1 Schematic diagram of imprinted membrane
a) NHD; b) NG

2 结果与讨论

2.1 CS-NG 分子印迹膜的制备

2.1.1 印迹膜的形成机制 CS 中富含氨基—NH₂和羟基—OH, 容易与 NG 分子上的—OH 和 C=O 形成氢键. NG 分子上有较大的苯环, 对

空间构型有控制作用, 有利于印迹分子周围的聚合物网络稳定地结合印迹分子, 以提高 MIP 膜的选择性识别作用. 形成的预组装复合物通过交联剂处理后, 其印迹结构被固定下来. 去除印迹分子后, 与印迹分子在大小和形状上相匹配的孔穴被留在 CS 网络中. 印迹膜的形成过程如图 2 所示.

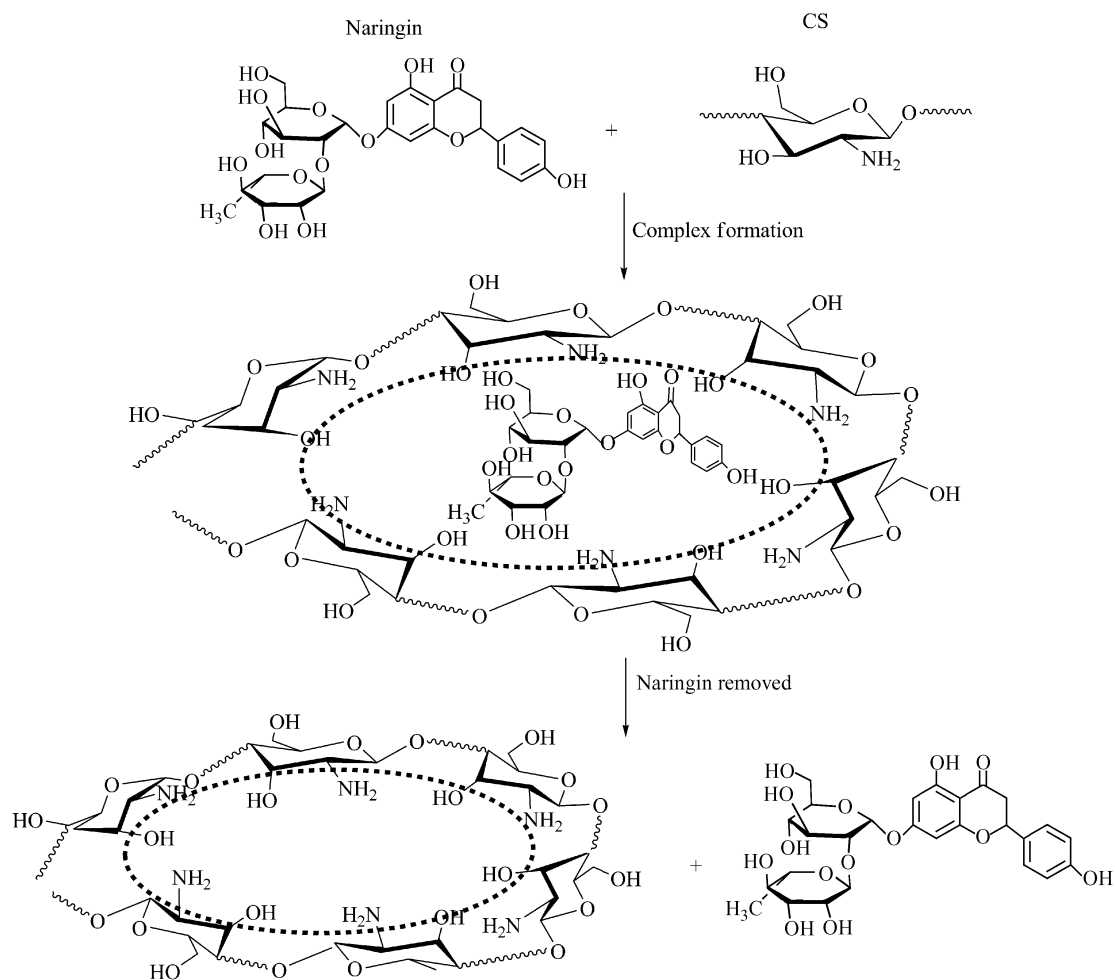


Fig. 2 Schematic diagram of the formation process of naringin imprinted CS membrane

2.1.2 交联剂对膜溶胀性能的影响 CS 作为一种亲水性材料, 在水中溶胀度较大, 膜的分离选择性低. 将其作为分子印迹膜材料, 使用前必须通过交联改性抑制其溶胀, 使印迹分子与 CS 形成的主客体配合物能够在聚合物中保持良好的形状以形成“记忆”的空穴结构.

本研究分别选用戊二醛和硫酸作交联剂, 并测定了膜的溶胀性能.

在分离 NG 和 NHD 时, 膜处于乙醇水溶液中, 故本文考察了膜在不同醇水比溶液中的溶胀情况. 壳聚糖具有良好的耐有机溶剂如乙醇的性

能, 通过调节溶液的醇水比, 可以调节印迹膜的抗溶胀性能与透过性能. 图 3 为不同交联剂(硫酸—□—, 戊二醛—○—)交联后制得的印迹膜在乙醇水溶液中的溶胀度变化曲线. 从图 3 中可以看出, 二者的溶胀度均随着乙醇含量的增大而下降, 抗溶胀性能提高.

如式(3)所示, 戊二醛用作交联剂时, 因其极易与壳聚糖上的—NH₂ 形成高交联度的共价键聚合物. 高交联度的印迹聚合物将导致印迹分子 NG 的洗脱与回收困难; 同时, 高的交联度将使印迹位点的可接近性变差, 传质速率降低, 从而使分

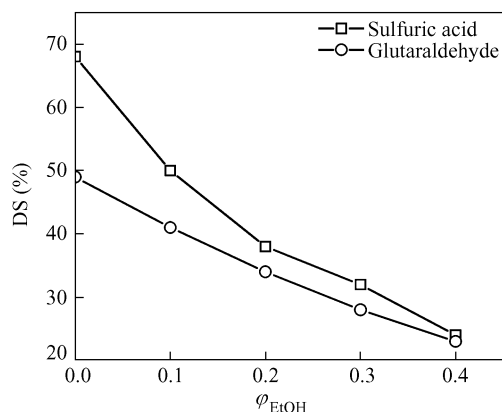


Fig. 3 Swelling degree of membrane in ethanol-water solution

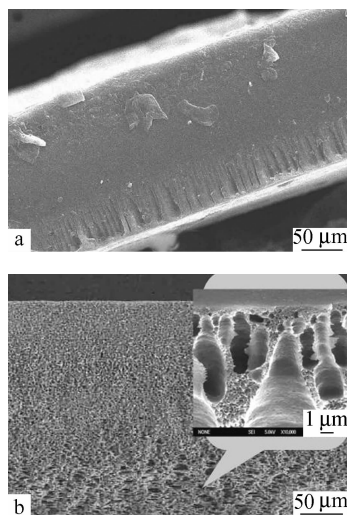
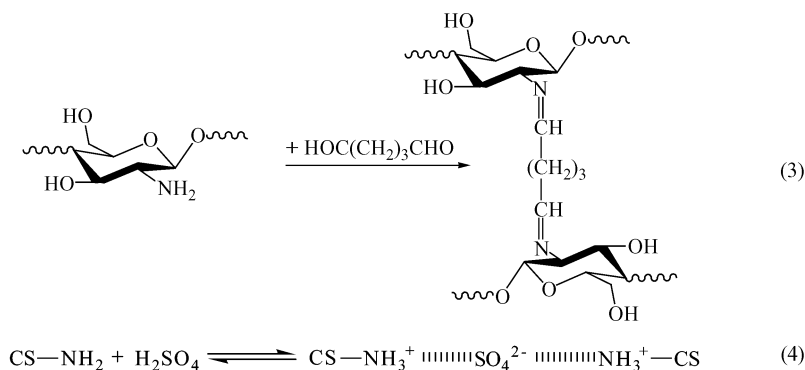


Fig. 4 SEM images of imprinted membranes
a) Non-PEG; b) Including PEG

高柔顺性的 PEG 后减弱了 CS 分子链之间的作用有利于链段运动^[15], 增加 CS 膜内的自由体积从而使膜通量增加; 当致孔剂含量太高, 原液的凝胶化将导致黏度上升, 降低了扩散速度, 使膜结构紧促, 膜通量下降。

子印迹技术的实际应用受到限制. 而以硫酸交联 CS 膜时, 如式 (4) 所示, CS 膜上的 -NH_2 被质子化为 -NH_3^+ , 与 SO_4^{2-} 以离子键相交联, 有利于膜结构的稳定及离子透过^[13].

2.1.3 致孔剂 PEG 对膜结构的影响

Mohammad 等^[14]认为, 聚合物的孔洞结构及大小会极大地影响分子印迹的效果. 实验比较了有无致孔剂 PEG 对膜结构的影响. 图 4 为印迹膜的电扫描电镜照片. 体系不加 PEG 时, 膜呈致密结构 (图 4a, 膜厚度约 $120 \mu\text{m}$); 当体系中加入致孔剂时, 体系黏度降低, 溶剂的扩散速度加快从而形成疏松 (图 4b)、沟壑状的膜结构 (图 4b 的插图), 孔径约 $3 \mu\text{m}$. 当体系引入无侧基且具有很

2.1.4 印迹分子含量对膜渗透性能的影响

印迹分子含量是影响分子印迹膜分离性能的重要因素之一. 印迹分子含量太少时所形成的识别位点也少, 分子印迹聚合物的识别能力低; 印迹分子含量太高时, 聚合物功能团含量的相对缺少将可能导致膜内结构形成缺陷. 测定了 CS 与印迹分子 NG 不同质量比制得的印迹膜的渗透量 (PQ), 实验结果表明, 当 $m_{\text{CS}}:m_{\text{NG}}$ 为 15:1 时, 每克干膜渗透 NG 的量最大, 膜渗透效果好 (见图 5).

2.2 印迹分子与功能聚合物间的相互作用

2.2.1 紫外分析 图 6(A) 中, NG 分子在 233、283 nm 处有两个苯环的特征吸收峰 (曲线 a), 而功能聚合物 CS 在该处无吸收 (曲线 b). 洗脱液的 UV 吸收如曲线 (c) 所示, 与曲线 (a) 相比, 吸收峰位置不变, 由此可见洗脱出的分子为 NG. 将 NG 分子洗脱出后, 在硫酸交联 CS 膜中留下了与印迹分子 NG 完美匹配的孔穴。

用 UV-Vis 研究了模板分子与功能聚合物相互结合情况. 固定 NG 的浓度加入不同量 CS 溶液, 检测 NG 的紫外光谱图的变化, 结果如图 6(B) 所示. 从图 6(B) 可见, 随着加入功能聚合物

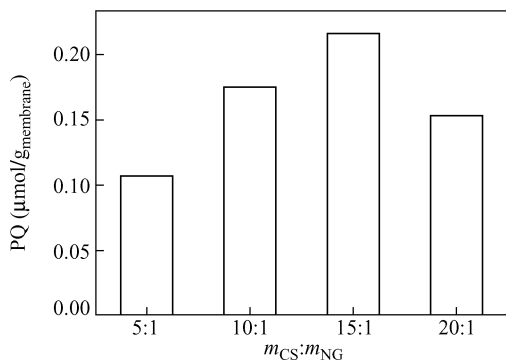


Fig. 5 Effect of imprinting molecule content on the permeation quantity

量的增大, NG 的紫外吸收值降低, 这是因为模板分子与功能聚合物之间的结合量增大, 溶液中的 NG 含量减小所致. 但并不是功能聚合物的用量越多越好, 大大过量的功能聚合物将导致自身缔合或产生非组装的功能聚合物残基, 使得非选择性的结合位点增加, 选择性的结合位点降低.

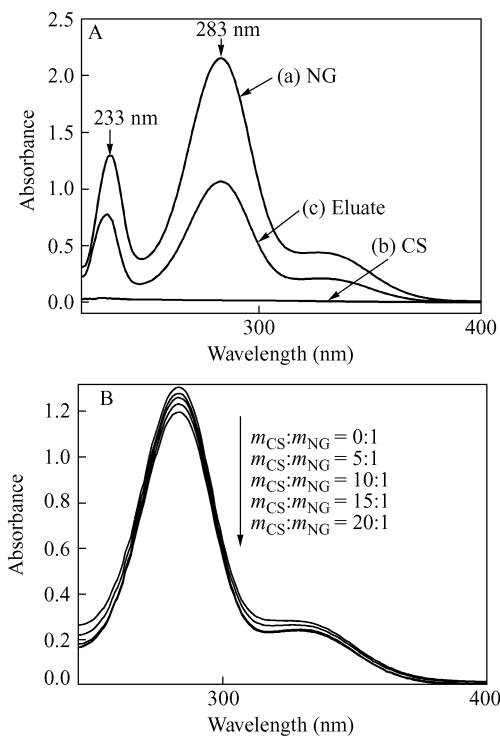


Fig. 6 UV-Vis absorption spectra

2.2.2 溶解度实验 实验测得不同温度下, 2 种体系中 NG 的溶解度曲线. 由图 7 可见, 2 种体系中, NG 的溶解度均随温度的升高而增大, 这一现象在 CS-HAc-H₂O 体系中较为明显. 溶解理论认为, 当溶液中除药物溶质和溶剂外还有第 3 种物质时, 常使其溶解度及溶出速度受到影响, 这主

要是因为第 3 种物质会与药物溶质或溶剂形成氢键、离子键, 从而增加或降低其溶解度. 对于酰胺类助溶剂, 易与多羟基类药物分子以氢键等相结合形成可溶性缔合物, 从而增加其溶解度.

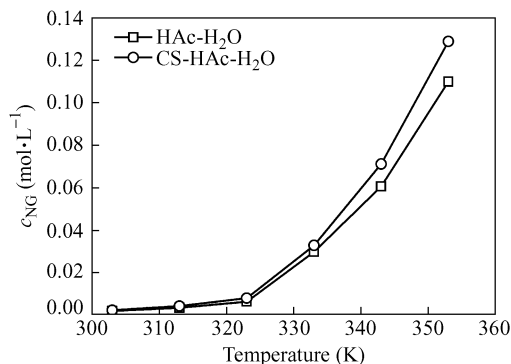


Fig. 7 Solubility curves of naringin in two systems

2.2.3 红外分析 图 8 是非印迹膜 (a)、NG (b) 及印迹膜 (采用 $m_{CS}:m_{NG}$ 为 15:1、硫酸交联的印迹膜, 且未除去印迹分子) 的红外光谱图. 图 8 (a) 中, 3435 cm^{-1} 为 CS 的 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{OH}$ 伸缩振动吸收峰, 2920 、 2881 cm^{-1} 为脂肪族 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动峰, 1630 cm^{-1} 为交联后 CS 残余的 NH_2CO 吸收峰, 1031 cm^{-1} 为 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动峰; 图 8 (b) 中, 3422 cm^{-1} 为 $-\text{OH}$ 伸缩振动吸收峰, 1643 cm^{-1} 为 $\text{C}=\text{O}$ 吸收峰, 1063 cm^{-1} 为 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 吸收峰, 1579 、 1518 、 1450 cm^{-1} 为苯环吸收峰; 图 8 (c) 中, $3500\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰变宽, 这些吸收峰的强度与氢键强度密切相关. 在印迹膜形成体系中, 氢键发生了明显变化, 氢键的形成使得模板分子中的 $\text{C}=\text{O}$ 吸收峰从 1643 cm^{-1} 红移至 1628 cm^{-1} , $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 吸收峰从 1063 cm^{-1} 红移至 1058 cm^{-1} . 以上分析表明功能聚合物 CS 上的 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{OH}$ 与模板分子 NG 中的 $-\text{OH}$ 、 $\text{C}=\text{O}$ 和 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 形成了氢键.

2.3 膜的透过性实验

被分离分子的尺寸匹配效应将直接影响到选择透过性. 如图 9 所示, 尺寸匹配的孔穴通道, 可使模板分子顺利地通过并形成一种连续、快速的传递过程. 在非印迹膜中, 由于不存在印迹效应, 孔穴是不规则的, 因而分子通过孔穴时易被堵塞, 导致模板分子透过非印迹膜的速率和透过量均较小^[16, 17].

选用 NHD 作为分离相似物, 测定了两者共存时透过印迹膜 (IM) (采用 $m_{CS}:m_{NG}$ 为 15:1、硫酸交联的印迹膜) 和非印迹膜 (non-IM) 的透过率

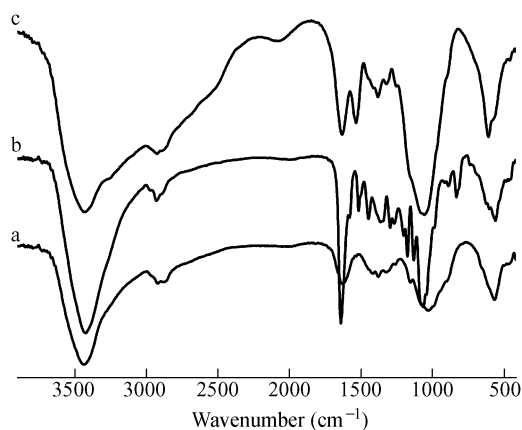


Fig. 8 FT IR spectra of non-imprinted membrane (a), NG (b) and imprinted membrane (c)

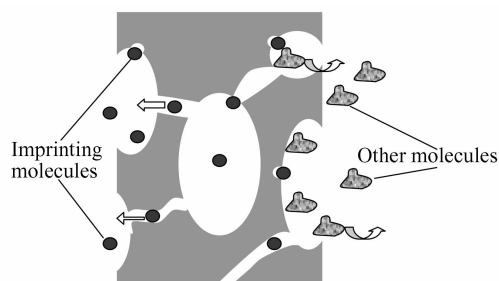


Fig. 9 “Gates” model on transport properties of molecularly imprinted (only template molecules and molecules with smaller size than template can pass through the imprinted channels) [17]

(PR)随透过时间(PT)变化的曲线。

从图 10 可以看出,在相同的时间内,NG 分子透过加致孔剂印迹膜(a)和未加致孔剂印迹膜(b)的速率和透过量均远大于加致孔剂非印迹膜(g)和未加致孔剂非印迹膜(h)。当渗透时间为 8 h 时,NG 分子透过印迹膜的透过率分别为 11.16% (a)、8.38% (b),而透过非印迹膜的透过率为 0.78% (g)、0.38% (h)。这是因为印迹膜中形成了与印迹分子相匹配的孔穴,NG 分子优先

被吸附到印迹膜中,并不断的通过膜障碍层,扩散到渗透池中;另一方面,优先吸附在膜中的模板分子将改变孔的网状结构,以至于减少膜渗透率^[3]。而新橙皮苷 NHD 分子透过印迹膜(c 和 d)和非印迹膜(e 和 f)的速率和透过量则相差不大。加致孔剂的 CS-NG 分子印迹膜对 NG 分子具有良好的选择透过性。

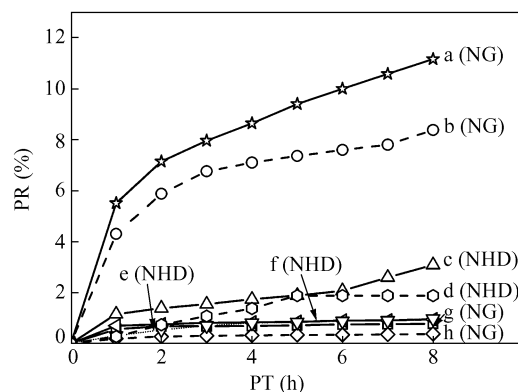


Fig. 10 Permeation curves of the mixture solutes through IM and non-IM
—— Including PEG; ---- Non-PEG

3 结论

以天然高分子 CS 为功能聚合物,药物分子 NG 为印迹分子,通过交联剂在水相中制备 NG-CS 分子印迹膜,并把该印迹膜用于水相识别 NG 分子。初步探讨了交联剂种类,印迹分子的用量和致孔剂对印迹膜结构和性能的影响。结果表明,采用硫酸作交联剂、CS 与 NG 的质量比为 15:1、且在一定量致孔剂的存在下制备出的印迹膜的性能较好。紫外光谱分析、溶解度实验和 FTIR 证实功能聚合物 CS 与模板分子 NG 形成了氢键。该印迹膜对相似物存在时在水相中表现出较好的选择透过性能。8 h 后,从新橙皮苷/柚皮苷混合水溶液中选择分离出 NG,透过率为 11.16%。

REFERENCES

- Silvestri D, Barbani N, Cristallini C. *J Membr Sci*, 2006, 282: 284 ~ 295
- Reza P, Ebrahim V F, Seyed A S. *Biochem Eng J*, 2007, 35: 352 ~ 356
- Mathias U. *J Chromatogr B*, 2004, (804): 113 ~ 125
- Kohei T, Takaomi K. *J Membr Sci*, 2006, 275: 61 ~ 69
- Wang Xuejun (王学军), Xu Zhenliang (许振良), Yang Zuoguo (杨座国). *Progress in Chemistry (化学进展)*, 2007, 19(5): 805 ~ 812
- Pu M R, Banerjee U C. *Biotechnol Adv*, 2000, 18(3): 207 ~ 217
- Trotta F, Drioli E, Baggiani C, Lacopo D. *J Membr Sci*, 2002, 201: 77 ~ 84
- Tasselli F, Donato L, Drioli E. *J Membr Sci*, 2008, 320: 167 ~ 172

- 9 Song Rui(宋锐), He Linghao(何领好), Xue Rui(薛瑞), Liu Ying(刘莹). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2008, (4): 355 ~ 360
- 10 Chen Nina(陈妮娜), Chen Riyao(陈日耀), Zheng Xi(郑曦), Chen Xiao(陈晓), Chen Zhen(陈震). *Acta Polymerica Sinica*(高分子学报), 2008, (11): 1068 ~ 1075
- 11 Wu Hong(吴洪), Zhao Yanyan(赵艳艳), Yu Yingxia(喻应霞), Jiang Zhongyi(姜忠义). *Journal of Functional Polymers*(功能高分子学报), 2007, 19 - 20(3): 262 ~ 266
- 12 Xu C X, Chen R Y, Zheng X, Chen X, Chen Z. *J Membr Sci*, 2008, 307: 218 ~ 224
- 13 Cui Zheng(崔铮), Xiang Yan(相艳), Zhang Tao(张涛). *Acta Chimica Sinica*(化学学报), 2007, 65(17): 1902 ~ 1906
- 14 Mohammad A K, Margaret T, Colin R. *Adsorption*, 2007, 13: 315 ~ 321
- 15 Zhang X G, Teng D Y, Wu Z M. *J Mater Sci; Mater Med*, 2008, 19: 3525 ~ 3533
- 16 Lu Chunyang(卢春阳), Ma Xiangxia(马向霞), He Xiwen(何锡文), Li Wenyong(李文友), Chen Langxing(陈朗星). *Acta Chimica Sinica*(化学学报), 2005, 63(6): 479 ~ 483
- 17 Piletsky S A, Panasyuk T L, Piletskaya E V. *J Membr Sci*, 1999, 157: 263 ~ 278

PREPARATION AND RECOGNITION OF NARINGIN MOLECULARLY IMPRINTED MEMBRANES IN AQUEOUS MEDIA

MA Xiuling, CHEN Riyao, ZHENG Xi, CHEN Liqin, CHEN Zhen

(*College of Chemistry and Materials Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350007*)

Abstract The main objective of this work is the preparation and recognition of naringin(NG) molecularly imprinted membranes in aqueous media. The chitosan(CS) -NG molecularly imprinted membrane(MIM) was prepared in aqueous phase using CS as a functional polymer, NG as an imprinting molecule, polyethylene glycol(PEG) as a porogen. The CS-NG MIM was used to separate NG from neohesperidin in aqueous media. The effects of linkage reagent, porogen and imprinting molecule on membrane structure and properties were discussed. The MIM morphologies before and after modification of the porogen were observed by SEM. The imprinted membrane showed a good performance when sulfuric acid was used as the cross-linking agent and the mass ratio of CS and NG was 15:1. The measurements of UV-Vis, FTIR and solubilities of naringin in acetic acid(HAc)-H₂O and CS-HAc-H₂O confirmed the formation of hydrogen bonds between bulk polymer CS and template molecule NG. The permeation rate of NG was 11.16%.

Keywords Chitosan, Naringin, Recognition in aqueous phase, Molecularly imprinted membrane