

采用分子表面印迹技术构建手性空穴 实现对天冬氨酸对映体的识别拆分*

郭建峰 高保娇**

(中北大学化工与环境学院 太原 030051)

摘 要 在溶液聚合体系中,采用“接出”法(“graft from” method)将功能单体 4-乙烯基吡啶(4VP)接枝聚合于微米级硅胶表面,制得了功能接枝微粒 P4VP/SiO₂,采用本课题组建立的新型分子表面印迹技术,以天冬氨酸(Asp)的一种对映体 L-Asp 为模板分子,二溴乙烷为交联剂,对接枝在硅胶表面的大分子 P4VP 实施了分子印迹,制备了 L-Asp 分子表面印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂. 以天冬氨酸另一种对映体 D-Asp 为对比物,采用静态与动态两种方法深入研究了 MIP-P4VP/SiO₂ 对 L-Asp 分子的识别性能,重点探索了采用 MIP-P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸两种对映体进行拆分的可行性. 实验结果表明,印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 对模板分子 L-Asp 具有良好的识别选择性与结合亲和性,相对于 D-Asp,识别选择性系数为 3.85,对天冬氨酸的外消旋体具有良好的拆分性能. 印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 也具有良好解吸性能,以稀 NaOH 水溶液作为洗脱液,12 个床体积内解吸率即可达到 98.52%.

关键词 天冬氨酸,手性拆分,分子表面印迹,4-乙烯基吡啶,接枝聚合,分子识别

构成生命体的基本物质,如蛋白质、酶、抗体、激素、核苷酸、多糖等,几乎都毫无例外地具有手性,手性识别是生命过程的基本属性之一. 氨基酸是组成蛋白质的基本单元,且存在于生命体内的游离态氨基酸,在有机体的代谢与机能调节中也发挥着很重要的作用. 在生命体内高度不对称的环境中,氨基酸两种对映体的生理作用是迥然不同的. 具有生物活性的天然氨基酸均为 L-型,而化学合成制备的氨基酸则一般为 DL-型的外消旋体. 显然,在生命科学研究领域,氨基酸对映体的拆分具有十分重要的科学意义;另一方面,氨基酸在药物合成(手性药物前驱体的合成)、食品与饲料工业、日用化工品等领域中应用正在快速发展,对化学合成的氨基酸进行手性拆分,制备光学纯的氨基酸又具有重要的应用价值.

目前,氨基酸对映体分离虽然已有一些方法,比如结晶法(经典法)、酶法、化学拆分法、膜分离法以及色谱法^[1~5](包括气相色谱(GC)^[6]、高效液相色谱(HPLC)^[7]、毛细管电泳(CE)^[8]法及手性配基交换色谱(CLCE))等法^[9]. 但前面几种非色谱方法,有的适用范围窄;有的步骤繁多、处

理效率低;有的则成本高,放大过程成本昂贵;而各种色谱法,虽然分离效率高及选择性好(尤其是 CLCE 法^[10,11]),但都局限于分析化学领域(以分离分析为目标),难以达到工业化规模的拆分过程. 因此,在氨基酸对映体的拆分方面,尽管人们做了大量的努力,但是在实现低成本、高效的规模化分离等方面依然存在着很大困难^[12,13]. 因此,设计与发展识别选择性高、效率高、成本低的新颖拆分方法,是一项极具挑战性的科技难题. 如果能制备选择性地结合氨基酸的某一对映体的固体吸附剂,即可通过固相萃取,实现规模化的氨基酸对映体的高效拆分,但迄今为止,具有此性能的固体吸附剂是难以寻找的^[14].

分子印迹聚合物(MIPs)是被精心裁制的一类功能聚合物材料,其内部分布有大量模板分子的印迹空穴,这些空穴与模板分子在尺寸大小、空间结构、结合位点等方面高度地相匹配,使得分子印迹聚合物对模板分子具有特异的识别选择性与优良的结合亲和性,被人们称为人工抗体或人工接受器^[15,16]. 目前,分子印迹聚合物已被广泛地用于各种高科技领域,尤其在物质的分离、纯化与

* 2011-03-11 收稿,2011-04-29 修稿;山西省自然科学基金(基金号 2008021013)和山西省研究生优秀创新项目(项目号 20103085)资助; ** 通讯联系人, E-mail: gaobaojiao@126.com

doi:10.3724/SP.J.1105.2012.11061

富集浓缩领域,以分子印迹聚合物为固体吸附剂的分子印迹固相萃取法(MIPSPE)应运而生,得到了广泛的应用^[17,18].在手性氨基酸的拆分领域,虽然分子印迹聚合物也受到了很大关注,已有较多研究^[19,20],但在这方面存在两个明显的局限:制备印迹聚合物的方法大多为传统方法(包埋法),该方法具有若干明显的缺点,所制得的印迹聚合物的性能较差^[21,22];目前印迹聚合物大多只用作色谱固定相,用来研究氨基酸对映体的(分离)分析,其性能还远达不到固相萃取剂的水平,无法用于氨基酸对映体的规模化固相萃取.

能否制备高性能的分子印迹材料,用作固相萃取剂,采用 MIPSPE 法对氨基酸对映体进行有效的识别分离、从而实现规模化的氨基酸手性拆分,正是本研究探索的目标所在.为有效地克服制备印迹聚合物传统方法的诸缺点,研究者们提出了不同的分子表面印迹方法,试图将印迹空穴置于固体颗粒表面,从而提高分子印迹的效率^[23,24].在前期的研究中,本课题组建立了一种新型的分子表面印迹方法,以微米级微粒(无机微粒及聚合物微球)为基质,在其表面接枝功能大分子,实施表面印迹,制得了高性能的分子表面印迹聚合物材料,分别用于农药分子、生物代谢分子、生物碱分子、重金属及稀土离子的识别分离研究,都得到了十分满意的结果^[25~29].本研究试图将该新型分子表面印迹技术引入氨基酸的分子印迹,在基质微粒表面构建手性空穴,制备高性能固相萃取剂,以期在分子构型水平上实现对氨基酸对映体的高效拆分.

本研究先在硅胶微粒表面实施了功能单体 4-乙烯基吡啶(P4VP)的接枝聚合;然后利用接枝大分子链 P4VP 与酸性氨基酸天冬氨酸分子之间的强静电与氢键相互作用,采用表面印迹方法,在硅胶微粒表面构建 L-天冬氨酸(L-Asp)手性空穴,实施了 L-Asp 的分子印迹,制得了印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂;并以 D-天冬氨酸(D-Asp)为对照物质,深入考察了印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 对模板分子 L-Asp 的识别特性以及对天冬氨酸外消旋体的拆分性能.初步的探索研究结果表明,采用新型分子表面印迹技术制备的印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 对 L-Asp 具有明显的识别选择性,有望用作固相萃取剂,实现天冬氨酸对映体的有效拆分.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

硅胶(青岛海洋化工有限公司),120~160 目(平均粒径 125 μm),试剂级;γ-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷(MPS,商品名 KH-560,南京曙光化工集团有限公司),分析纯;4-乙烯基吡啶(4VP,英国 Alfa Aesar 公司),化学纯,使用前经减压蒸馏提纯;偶氮二异丁腈(AIBN,上海化学试剂厂),分析纯;L-天冬氨酸(L-Asp)和 D-天冬氨酸(D-Asp)(北京恒大百盛生物科技发展有限公司),分析纯;1,6-二溴己烷(北京鑫鼎鹏飞科技发展有限公司),分析纯;其余试剂均为市售分析纯试剂.

1700 型傅立叶红外光谱仪(FTIR,美国 Perkin-Elmer 公司);Autopol III 旋光仪(美国鲁道夫公司);Zetasizer Nano-Z 型 zeta 电位分析仪(英国 Malvern Instrument 公司);THZ-92C 气浴恒温振荡器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);UV-2602 紫外可见分光光度计(上海尤尼柯公司);PHS-2 型酸度计(上海第二分析仪器厂).

1.2 制备接枝微粒 P4VP/SiO₂

按照前期的研究^[30],采用“接出”法(“grafting from”)制备功能接枝微粒 P4VP/SiO₂,主要的步骤如下:先用 5% 的盐酸溶液对硅胶进行活化处理;然后以乙醇与水的混合液(体积比 1:1)为溶剂,将偶联剂 γ-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷(MPS)键合于硅胶微粒表面(50℃ 下反应 24 h),将可聚合双键引入硅胶微粒表面;以乙醇为溶剂,以 AIBN 为引发剂,在溶液聚合体系中实施单体 4VP 在硅胶表面的接枝聚合(N₂ 气保护,70℃ 下接枝聚合 7 h).将制得的接枝微粒在索氏抽提器中用乙醇抽提 24 h,以除去物理吸附在微粒表面的聚合物,真空干燥,即得接枝微粒 P4VP/SiO₂.本研究所制备与使用的接枝微粒,其表面的 P4VP 接枝度为 23 g/100g(热重法测定接枝度);用 KBr 压片法测定了接枝微粒的红外光谱,还测定了接枝微粒的 zeta 电位^[30].

1.3 考察接枝微粒 P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸的吸附作用

1.3.1 在水介质中的等温吸附实验

分别配制浓度在 0.04~0.20 g/L 范围内的 L-Asp 及 D-Asp 水溶液.在测定接枝微粒 P4VP/SiO₂ 对 Asp 两种对映体吸附动力学行为的基础

上(吸附达平衡的时间约为 3 h),进行等温吸附实验. 吸附实验在恒温振荡器中进行,采用紫外分光光度计法($\lambda = 194 \text{ nm}$)测得吸附前后的溶液中天冬氨酸的浓度变化,计算平衡吸附量,绘制吸附等温线.

1.3.2 在 pH 不同的水介质中进行等温吸附实验

分别用稀盐酸与氢氧化钠水溶液,系列地调节 L-Asp 及 D-Asp 水溶液的 pH 值,在不同的 pH 条件下进行接枝微粒对 Asp 的等温吸附实验,以考察 pH 值对接枝微粒吸附作用力的影响.

1.4 对映体 L-Asp 分子表面印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 的制备与表征

称取 0.1 g 的接枝微粒 P4VP/SiO₂,置于 200 mL 浓度为 0.20 g/L 的 L-Asp 水溶液中,用稀氢氧化钠溶液调节体系的 pH 值,使 pH = 4. 将混合液置于恒温振荡器中,恒温振荡 3 h,使接枝的 P4VP 充分溶胀,且使接枝微粒对 L-Asp 的吸附达到饱和,滤出微粒,真空干燥. 将 1.0 g 饱和吸附了 L-Asp 的接枝微粒置于含有 L-Asp (浓度为 0.20 g/L)的水和乙醇混合溶剂(V:V = 1:1)中,用稀 NaOH 溶液调节体系的 pH 值,使 pH = 4,加入 0.05 mL 的交联剂 1,6-二溴己烷,在 40℃ 下搅拌反应 6 h. 反应结束后,用稀氢氧化钠溶液反复洗涤,除去模板分子 L-Asp,再用蒸馏水洗涤,真空干燥,即得 L-Asp 分子表面印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂. 用 KBr 压片法测定其红外光谱,确认其结构变化.

1.5 考察 MIP-P4VP/SiO₂ 对两种对映体的识别性能

1.5.1 等温结合性能的测定

分别采用静态与动态两种方法,测定表面印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸两种对映体的结合性能. 同样,先测定 MIP-P4VP/SiO₂ 对 L-Asp 及 D-Asp 的结合动力学行为,确定结合达到平衡的时间(也在 3 h 附近),在此基础上,进行等温结合性能的测定.

(1)静态法:在 30℃ 的恒定温度下,将 50 mL 浓度系列变化从 0.04 ~ 0.20 g/L 的 L-Asp 溶液分别置于若干具塞锥形瓶中,加入准确称量的约 0.05 g 的印迹微粒材料 MIP-P4VP/SiO₂,在恒温振荡器中振荡 3 h,使结合达到平衡,静置分层取上清液,采用紫外分光光度法测定上清液中 L-Asp 的平衡浓度,按照公式(1),计算 MIP-P4VP/

SiO₂ 对 L-Asp 的平衡结合量 Q_e (mg/g),并绘制平衡结合量对平衡浓度关系曲线,即等温结合线.

$$Q_e = \frac{V(c_0 - c_e)}{m} \quad (1)$$

式中 c_0 (g/L)、 c_e (g/L) 分别为吸附前后溶液中 L-Asp 的浓度; V (mL) 为吸附液体积; m (g) 为印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 的质量. 依照同样的方法,测定 L-Asp 分子印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 对其对映体 D-Asp 的平衡结合量,绘制等温结合线.

(2)动态法:室温(30℃)条件下,将 2 g 的 MIP-P4VP/SiO₂ 在水中溶胀后装在内径为 10 mm 的玻璃管内,使填充柱的床体积(bed volume, BV) 为 4 mL. 使浓度为 0.2 g/L 的 L-Asp 溶液以 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速逆流通过填充柱,以 2 BV 的间隔收集流出液,测定流出液中 L-Asp 的浓度,绘制动态结合曲线,并利用流出液的浓度与床体积数,计算 MIP-P4VP/SiO₂ 对 L-Asp 的泄漏结合量与饱和结合量. 采用同法,测定并绘制 L-Asp 分子印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 对 D-Asp 的动态结合曲线.

1.5.2 拆分实验(即结合选择性实验)

首先使用 L-Asp 分子表面印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂,对外消旋体 D, L-Asp 溶液进行拆分实验(即竞争吸附实验),以进一步考察其对 L-Asp 分子的识别特性,探索其对两种对映体的拆分能力. 准确配制浓度约为 2 g/L 的 D, L-Asp 溶液(即外消旋体溶液,旋光度为零),取 20 mL 溶液于具塞锥形瓶中,加入准确称量的约 0.1 g 的印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂,在恒温振荡器中振荡 3 h,使吸附达到平衡,离心分离,采用紫外分光光度法测定上清液中天冬氨酸的总平衡浓度,并用旋光仪测定上清液的旋光度与比旋光度. 测定发现,此时上清液具有了旋光性,比旋光度 $[\alpha]$ 为 -2.75° ,其符号与 D-Asp 相同. 此结果表明 MIP-P4VP/SiO₂ 对外消旋体溶液中的 L-Asp 具有更多的吸附,使上清液中含有更多的 D-Asp,呈现出了识别与结合的选择性,即对两种对映体产生了明显的拆分效果. 再用公式(2)计算出上清液中 L-Asp 与 D-Asp 的平衡浓度,然后按公式(3),计算 L-Asp 与 D-Asp 的分配系数^[31].

$$\left. \begin{aligned} c_{D,e} &= \left\{ \frac{[\alpha]}{[\alpha]_{D,S}} + \frac{1 - \frac{[\alpha]}{[\alpha]_{D,S}}}{2} \right\} \times 100\% \times c_{T,e} \\ c_{L,e} &= c_{T,e} - c_{D,e} \end{aligned} \right\} \quad (2)$$

式中, $c_{D,e}$ (g/L) 与 $c_{L,e}$ (g/L) 分别为上清液中两对映体的平衡浓度; $[\alpha]$ 为上清液的比旋光度; $[\alpha]_{D,S}$ 为对映体 D-Asp 的标准比旋光度; $c_{T,e}$ (g/L) 为上清液的总平衡浓度;

$$K_d = \frac{Q_e}{c_e} \quad (3)$$

式中, K_d ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$) 是某一对映体的分配系数; c_e ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 是上清液中该对映体的平衡浓度; Q_e ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 是该对映体的平衡结合量。

由溶液中两种对映体的分配系数数据, 按照公式(4), 计算印迹微粒材料 MIP-4VP/SiO₂ 对 L-Asp 的选择性系数。

$$k = \frac{K_d(\text{L-Asp})}{K_d(\text{D-Asp})} \quad (4)$$

式中, k 是相对于对映体 D-Asp 而言, 印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 对 L-Asp 的选择性系数, k 值的大小标志着印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 对 L-Asp 的识别选择性的^[31]。

1.5.3 洗脱性能的考察

将已饱和吸附 L-Asp 的印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ (1.2 g) 填充装柱, 在室温条件下, 用浓度为 0.1 mol/L 的氢氧化钠作为洗脱液, 以 4 BV · h⁻¹ 的流速逆流通通过填充柱, 进行解吸实验, 以 2 BV 的间隔收集洗出液, 测定洗出液中 L-Asp 的浓度, 绘制解吸曲线, 考察印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 的洗脱性能。

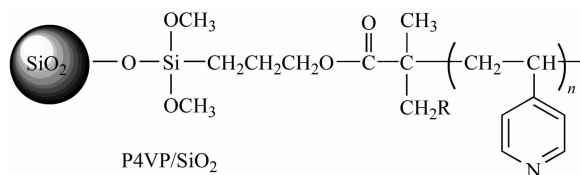
2 结果与讨论

2.1 功能接枝微粒 P4VP/SiO₂ 的化学结构与 zeta 电位

示意图 1 简略地给出了功能接枝微粒 P4VP/SiO₂ 的化学结构。在微米级硅胶微粒表面接枝有大量的大分子链 P4VP, P4VP 是一种功能大分子, 链节中含有吡啶基团, 吡啶 N 原子在酸性水溶液中会发生质子化, 因此, 在一定程度上可将 P4VP 视为阳离子聚电解质。

图 1 给出硅胶微粒与接枝微粒 P4VP/SiO₂ 的 zeta 电位曲线。从图 1 可清楚地看到: (1) 在很大的 pH 值范围内, 硅胶微粒的 zeta 电位为负值, 即在一般情况下硅胶微粒带有负电荷; (2) 而在硅胶微粒表面接枝 P4VP 大分子链后, 在酸性溶液中, 接枝微粒 P4VP/SiO₂ 的 zeta 电位为绝对值较大的正值, 意味着接枝微粒 P4VP/SiO₂ 表面带有高密度的正电荷, 这是由吡啶 N 原子质子化作用

所导致的; (3) 在 pH = 3 ~ 4 时, 微粒 P4VP/SiO₂ 的 zeta 电位最高, 然后随 pH 的增大, zeta 电位下降, 其原因可能是 pH 增大至 pH > 3 ~ 4 后, 吡啶 N 原子的质子化程度逐渐减弱所致。



Scheme 1 Schematic expression of structure of grafted particles P4VP/SiO₂

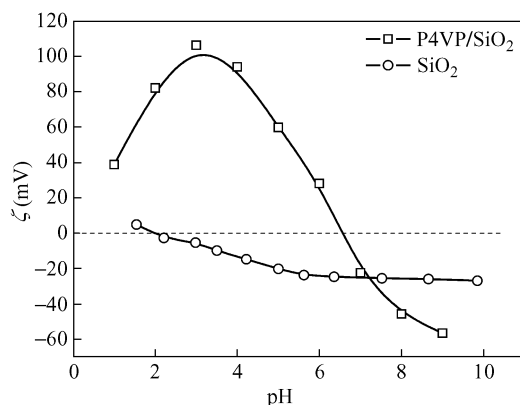


Fig. 1 Variation of zeta potential of P4VP/SiO₂ and SiO₂ particles with pH value

2.2 功能接枝微粒 P4VP/SiO₂ 与天冬氨酸分子之间的相互作用

2.2.1 在水介质中 P4VP/SiO₂ 对 Asp 的吸附作用

图 2 分别给出了硅胶微粒与接枝微粒 P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸两种对映体的等温吸附曲线。

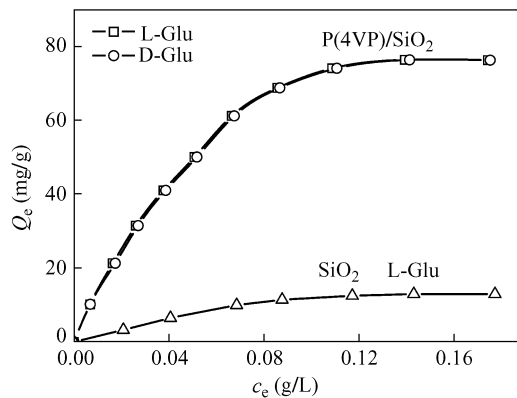
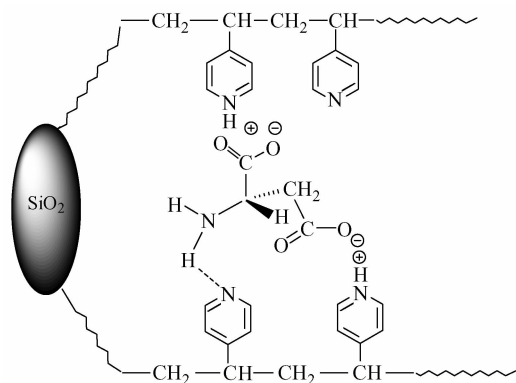


Fig. 2 Adsorption isotherm of P4VP/SiO₂ for aspartic acid
Temperature: 30 °C; pH = 4

从图 2 中清楚地显示,硅胶微粒对天冬氨酸吸附能力很弱;但是,当在硅胶微粒表面接枝 P4VP 后,接枝微粒 P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸具有了很强的吸附作用,表明 P4VP 大分子与天冬氨酸分子之间存在强相互作用,此强相互作用来自于静电相互作用与氢键作用的协同. 天冬氨酸是酸性氨基酸,其等电点为 2.97. 显然,当 pH = 4 时,天冬氨酸分子带负电荷,而接枝微粒 P4VP/SiO₂ 表面则带有高密度的正电荷,相互之间可产生强烈的静电吸引作用;同时,Asp 分子中的胺基作为氢键的给体基团,与接枝微粒表面未质子化的吡啶 N 原子之间也会形成氢键. 两种作用力的协同(静电相互作用为主驱动力),使得接枝微粒 P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸分子产生了很强的吸附作用. 接枝微粒 P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸分子的吸附作用机理可示意性地由示意图 2 表示.



Scheme 2 Schematic expression of adsorption action of particles P4VP/SiO₂ towards Asp molecule

2.2.2 介质 pH 值对接枝微粒 P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸分子吸附性能的影响

调节 Asp 水溶液的 pH 值,使 P4VP/SiO₂ 于 30℃ 下、在不同 pH 条件下对 Asp 分子进行等温吸附,图 3 为不同 pH 条件下的等温吸附线. 图 3 显示,各等温吸附线具有 Langmuir 模式,即为单分子层吸附. 为更清楚地显示介质 pH 值对吸附作用的影响,从图 3 中取各条等温吸附线上的饱和吸附量,对 pH 值作图,得到图 4 的 Q_e -pH 关系曲线.

从图 3 和图 4 中可以看到,在 pH 较低时, P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸的吸附容量很低,随 pH 的升高吸附容量增大,当 pH 升至 4,吸附容量达最大值,然后吸附容量随 pH 的升高而减小. 当 pH 值很低时,天冬氨酸分子中的两个羧基几乎不发

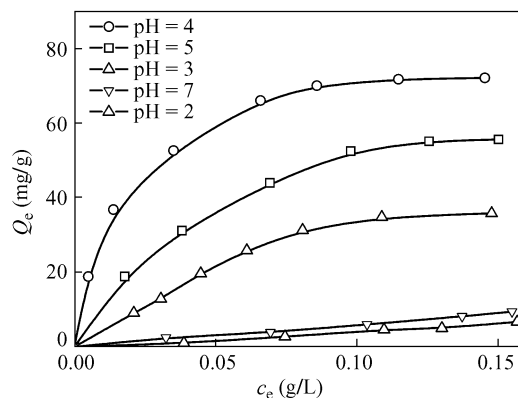


Fig. 3 Adsorption isotherm of P4VP/SiO₂ molecule at different pH values

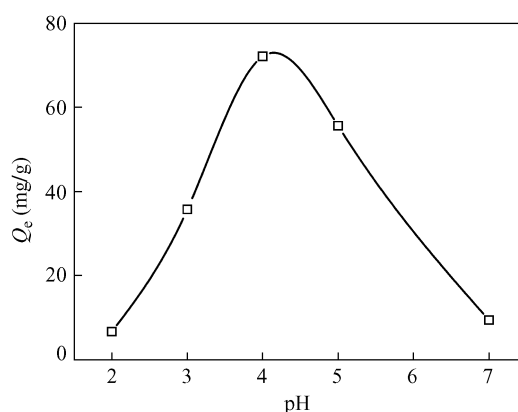


Fig. 4 Relationship curve between saturated adsorption for Asp amount and pH

生电离,虽然 4VP 大分子链中的胺基 N 原子处于高度质子化状态,但接枝微粒 P4VP/SiO₂ 与天冬氨酸分子之间的静电相互作用很弱,导致低的吸附容量,此时接枝微粒 P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸的吸附主要是由氢键相互作用所导致的(此时,氢键的授受体可能不同于示意图 2 中 pH = 4 的情况,Asp 分子中的羧基为氢键给体,P4VP 大分子链中未质子化的吡啶 N 原子为氢键受体);随着 pH 的升高,天冬氨酸分子中羧基的电离度增大,微粒 P4VP/SiO₂ 与天冬氨酸分子之间的静电相互作用增强,且氢键作用依然存在(见示意图 2),两者的协同,使吸附容量迅速增大;当 pH 超过 4, P4VP 大分子链侧基的吡啶 N 原子质子化程度逐渐减弱,接枝微粒 P4VP/SiO₂ 的 zeta 电位逐渐降低(见图 1),导致吸附容量随 pH 的升高转而减小.

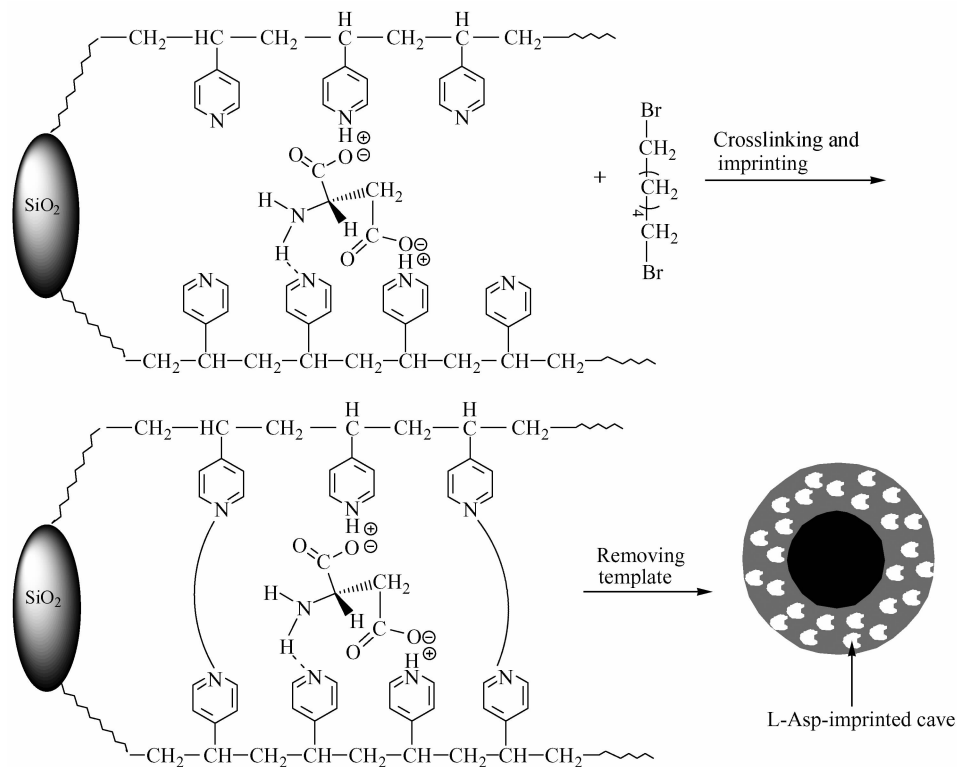
总之,接枝微粒 P4VP/SiO₂ 与天冬氨酸分子之间存在强的次价键力,且在 pH = 4 时,相互作

用最强,这就为在微粒 P4VP/SiO₂ 表面进行天冬氨酸单一对映体的分子印迹奠定了基础.

2.3 L-Asp 分子表面印迹材料的制备过程

(1)如上所述,接枝微粒 P4VP/SiO₂ 表面的功能大分子 P4VP 与天冬氨酸分子之间存在有静电相互作用与氢键作用,凭借这两种次价键力,接枝微粒 P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸分子产生强吸附作用;(2)使接枝微粒 P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸的一种对映体 L-Asp 的吸附达饱和,将此饱和吸附

了 L-Asp 的微粒置于含有交联剂二溴己烷的溶剂中,凭借交联剂分子两端的卤烷基团与 P4VP 链中吡啶 N 原子之间的季铵化反应,使 P4VP 大分子得以交联,对映体 L-Asp 分子则被包裹在交联网络中,从而实现了 L-Asp 的分子印迹;(3)洗去模板分子后,在硅胶表面的聚合物薄层中留下了大量 L-Asp 的手性空穴,形成了 L-Asp 分子表面印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂,其制备过程见示意图 3.



Scheme 3 Schematic expression of chemical reaction process to prepare MIP-P4VP/SiO₂

红外光谱测定表明,与接枝微粒 4VP/SiO₂ 的红外光谱相比较,在 MIP-4VP/SiO₂ 的红外光谱中,于 2950 cm⁻¹ 处的亚甲基—CH₂—峰明显加强(来自于二溴己烷交联桥中),表明通过季铵化反应,接枝大分子链 P4VP 已发生交联,实现了对映体 L-Asp 分子的表面印迹.

2.4 MIP-P4VP/SiO₂ 的识别特性及对 2 种对映体的结合性能

2.4.1 结合等温线与动态结合曲线

采用静态(batch method)与动态(column method)两种方法,分别使用接枝微粒材料 P4VP/SiO₂ 与 L-Asp 分子印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂,对水介质中的两种对映体 L-Asp 与 D-Asp 进行了等温吸附实验.图 2 已给出了非迹材料 P4VP/SiO₂

对两种对映体的等温吸附线(见图 2),图 5 则显示出印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 对两种对映体的等温结合线.

从图 2 中已看出,接枝微粒材料 P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸的两种对映体的吸附能力完全相同,没有任何选择性.众所周知,手性物质的各对映体,除旋光性能不同外,其它物理化学性质都是完全相同的.因此,接枝微粒材料 P4VP/SiO₂ 对 L-Asp 与 D-Asp 的吸附性能完全相同.

但是,图 5 却清楚地显示,经 L-Asp 分子表面印迹而形成的印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂,对 L-Asp 结合量为 84.39 mg/g,而对 D-Asp 的结合容量却很小,其最高结合量为 24.72 mg/g,仅为 L-Asp 结合量 29.29%,充分显示出的 MIP-P4VP/SiO₂ 对

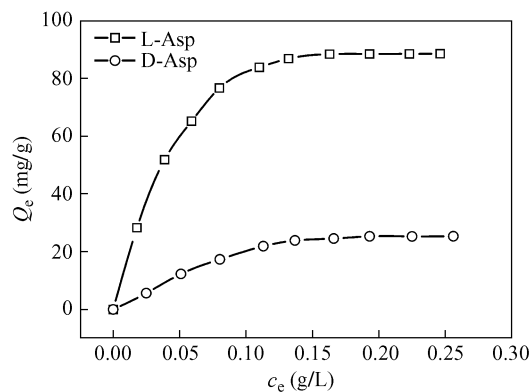


Fig. 5 Binding isotherms of MIP-P4VP/SiO₂ for L-Asp and D-Asp

模板对映体 L-Asp 具有明显的识别选择性与良好的结合亲和性. 其原因在于印迹微粒材料 MIP-P4VP/SiO₂ 表面的聚合物薄层内, 分布有大量 L-Asp 的印迹空穴, 这些空穴在空间结构和作用位点方面与 L-Asp 分子的构型是高度匹配的, 与 D-Asp 分子的构型则是不匹配的, 故这些手性空穴对 L-Asp 分子产生了特异的识别能力, 具有强的结合作用, 导致高的结合容量; 而对 D-Asp 则缺乏识别性, 结合能力较弱, 结合容量较低.

图 6 给出了非迹材料 P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸的两种对映体的动态吸附曲线, 图 7 显示出 L-Asp 分子印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 对两种对映体分子的动态结合曲线.

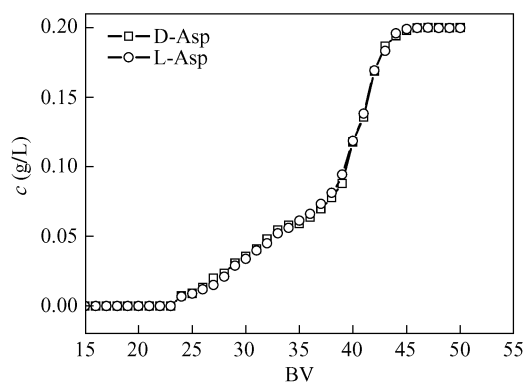


Fig. 6 Dynamic adsorption curves of P4VP/SiO₂ for L-Asp and D-Asp

BV: 2 mL; Temperature: 30°C; Initial concentration: 0.20 g/L; Flow rate: 4 BV/h

由图 6 可知, 对于 P4VP/SiO₂ 填充柱, 当两种对映体溶液以 4 BV/h 的流速分别逆流通过填充柱时, 穿透曲线完全相同; 两种溶液均在 24 BV 开始泄漏; 经计算, 两种对映体者的泄露吸附量与饱

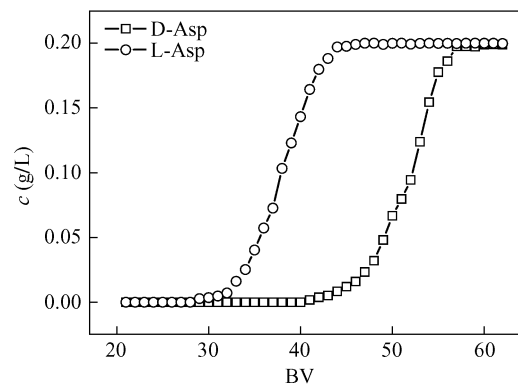


Fig. 7 Dynamic binding curves of MIP-P4VP/SiO₂ for L-Asp and D-Asp

BV: 2 mL; Temperature: 30°C; Initial concentration: 0.20 g/L; Flow rate: 4 BV/h

和吸附量相同, 分别为 36.8 mg/g 和 58.39 mg/g. 从图 7 中却看到, 对于 MIP-P4VP/SiO₂ 填充柱, L-Asp 溶液的泄露曲线明显不同于 D-Asp 溶液的泄露曲线: (1) D-Asp 溶液于 29 BV 开始泄露, 而 L-Asp 溶液的泄露体积为 41 BV, 相差 12BV; (2) D-Asp 溶液于 46 BV 完全穿透, L-Asp 溶液的穿透体积为 60BV; (3) D-Asp 的泄露吸附量与饱和吸附量为 46.40 mg/g 与 59.86 mg/g, 而 L-Asp 的泄露吸附量与饱和吸附量为 64 mg/g 与 81.43 mg/g. 上述动态实验的事实再次表明, MIP-P4VP/SiO₂ 对 L-Asp 表现出了明显的识别选择性与优良的结合亲和性, 相比较而言, 对 D-Asp 的识别与结合能力则较弱. 关于印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 对两种对映体的识别选择性, 下面将进一步讨论.

2.4.2 MIP-P4VP/SiO₂ 对模板对映体分子的选择性系数及对外消旋体的拆分性能

配制 L-Asp 与 D-Asp 浓度相同的二元混合溶液 (即外消旋溶液), 使用印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂, 进行了竞争吸附实验 (即拆分实验). 表 1 列出了 2 种物质的分配系数 K_d 与 MIP-P4VP/SiO₂ 对模板对映体 L-Asp 的选择性系数 k .

Table 1 Distribution coefficient and selectivity coefficient data

Adsorb material	MIP-P4VP/SiO ₂	
	L-Asp	D-Asp
K_d (mL/g)	46.30	12.30
k	3.85	

从表 1 的数据可以发现, 相对于 D-Asp, 印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 对 L-Asp 的选择性系数为 3.85, 表明对 L-Asp 具有明显的识别选择性. 显

然,上述竞争性实验数据也充分揭示出印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 对天冬氨酸的两种对映体具有明显的拆分能力. 因此,本课题组提出并建立的新型表面分子印迹技术,有望用于制备固相萃取材料,实现氨基酸乃至手性药物对映体的有效拆分. 期望通过进一步的分子设计,制备出更高性能的对映体分子表面印迹材料(具有更高的选择性系数),并通过分离工艺的精心设计(比如串级分离),从而实现氨基酸对映体乃至手性药物对映体的高效拆分.

2.5 MIP-PMAA/SiO₂ 的脱附性能

用浓度为 0.1 mol/L 的氢氧化钠作为洗脱液,逆流地通过已饱和吸附 L-Asp 的印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 填充柱,动态解析曲线如图 8 所示.

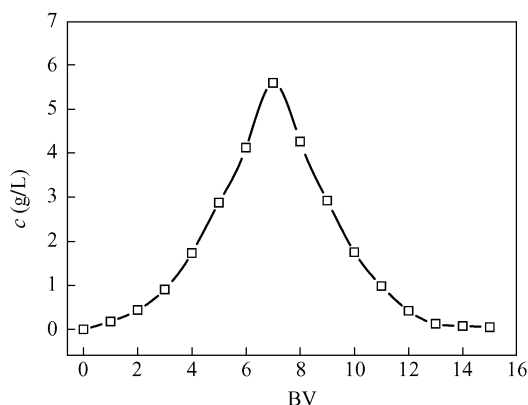


Fig. 8 Elution curve of L-Asp on MIP-P4VP/SiO₂ column
Temperature: 30°C

由图 8 可以看出,脱附曲线尖锐无拖尾,经计算,10 个床体积内解吸率达到 96.72%,12 个床体积内解吸率即可达到 98.52%. 上述实验数据充分说明被结合在印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 空穴中的 L-Asp 分子,由于分布在硅胶微粒表面的聚合物薄层中,因而具有优良的洗脱性能,有利于萃取柱的再生与重复使用.

3 结论

采用“grafting from”法,将聚 4-乙烯基吡啶接枝在微米级硅胶微粒表面,制备了功能接枝微粒 P4VP/SiO₂,以天冬氨酸的一种对映体 L-Asp 为模板分子,二溴己烷为交联剂,采用新型表面分子印迹技术,在接枝有 P4VP 大分子链的硅胶微粒表面实施了 L-Asp 分子的表面印迹. 所制得的表面印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂,由于其表面的聚合物薄层内分布有大量的 L-Asp 手性印迹空穴,因而对 L-Asp 具有的明显的识别选择性与优良的结合亲和性;这些手性空穴由于在空间结构和作用位点方面与另一种对映体 D-Asp 是不匹配的,因而对 D-Asp 的结合能力差,结合容量低;利用 L-Asp 手性印迹空穴对 L-Asp 分子的识别特性,以表面印迹材料 MIP-P4VP/SiO₂ 作为固体萃取剂,可以在分子构型水平上实现 Asp 两种对映体的有效拆分.

REFERENCES

- 1 Itou Y, Nakano M, Yoshikawa M. *J Membrane Sci*, 2008, 325: 371 ~ 375
- 2 Yoshikawa M, Murakoshi K, Kogita T, Hanaoka K, Guiver M D, Robertson G P. *Eur Polym J*, 2006, 42: 2532 ~ 2539
- 3 Higuchi A, Hayashi A, Kanda N, Sanui K, Kitamur H. *J Mol Struct*, 2005, 739: 145 ~ 152
- 4 Dimitrova P, Bart H J. *Anal Chim Acta*, 2010, 663: 109 ~ 116
- 5 Sanaie N, Haynes C A. *J Chromatogr A*, 2006, 1132: 39 ~ 50
- 6 Bertrand, Chabin A, Brack A, Westall F. *J Chromatogr A*, 2008, 1180: 131 ~ 137
- 7 André C, Thomassin M, Umrayamib A, Ismaili L, Refouvelet B, Guillaume Y C. *Talanta*, 2007, 71: 1817 ~ 1823
- 8 Tran C D, Kang J. *J Chromatogr A*, 2002, 978: 221 ~ 230
- 9 H? dl H, Schmid M G, Gübitz G. *J Chromatogr A*, 2008, 1204: 210 ~ 218
- 10 Natalini B, Sardella R, Macchiarulo A, Pellicciari R. *J Chromatogr B*, 2008, 875: 108 ~ 117
- 11 Sanaie N, Haynes C A. *J Chromatogr A*, 2006, 1104: 164 ~ 172
- 12 Tan B, Luo G S, Wang J D. *Sep Purifi Technol*, 2007, 53: 330 ~ 336
- 13 Steensma M, Kuipers N J M, Haan A B de, Kwant G. *Chem Eng Sci*, 2007, 62: 1395 ~ 1407
- 14 Francotte E R. *J Chromatogr A*, 2001, 906: 379 ~ 397
- 15 Bergmann N M, Peppas N A. *Prog Polym Sci*, 2008, 33: 271 ~ 288
- 16 Javanbakhta M, Fard S E, Mohammadi A, Abdouss M, Ganjali M R, Norouzi P, Safaraliev L. *Anal Chim Acta*, 2008, 612: 65 ~ 74

- 17 Claude B, Morin P, Lafosse M, Belmont A S, Haupt K. *Talanta*, 2008, 75: 344 ~ 350
- 18 Dias A C B, Figueiredo E C, Grassi V, Zagatto E A G, Arruda M A Z. *Talanta*, 2008, 76: 988 ~ 996
- 19 Li M, Lin X C, Xie Z H. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 5320 ~ 5326
- 20 Lu Y, Li C X, Liu X H, Huang W Q. *J Chromatogr A*, 2002, 950: 89 ~ 97
- 21 Wang Y T, Zhou Y X, Sokolov J, Rigas B, Levon K, Rafailovich M. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24: 162 ~ 166
- 22 Liu H M, Liu C H, Yang X J, Zeng S J, Xiong Y Q, Xu W J. *Anal Chim Acta*, 2008, 628: 87 ~ 94
- 23 Luo W, Zhu L H, Yu C, Tang H Q, Yu H X, Li X, Zhang X. *Anal Chim Acta*, 2008, 618: 147 ~ 156
- 24 Zhang Zhaozhui(张朝晖), Liu Li(刘丽), Nie Lihua(聂丽华). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2010, (6): 677 ~ 683
- 25 Gao B J, Lu J H, Chen Z P, Guo J F. *Polymer*, 2009, 50: 3275 ~ 3284
- 26 Gao B J, Wang J, An F Q, Liu Q. *Polymer*, 2008, 49: 1230 ~ 1238
- 27 Gao B J, Liu S Y, Li Y B. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 2226 ~ 2236
- 28 Gao B J, Niu Q Y, Du R K. *J Sep Sci*, 2010, 33: 1338 ~ 1348
- 29 Gao Xuechao(高学超), Gao Baojiao(高保娇), Niu Qingyuan(牛庆媛), Zhao Jing(赵婧). *Acta Chemica Sinica(化学学报)*, 2010, 68: 1109 ~ 1118
- 30 Guo Jianfeng(郭建峰), Gao Baojiao(高保娇), An Fuqiang(安富强). *Journal of Functional Polymers(功能高分子学报)*, 2009, 22: 363 ~ 368
- 31 Ersöz A, Say R, Denizli A. *Anal Chim Acta*, 2004, 502: 91 ~ 97

STUDIES ON REALIZATING CHIRAL SEPARATION OF ENANTIOMERS OF ASPARTIC ACID BY CONSTITUTING CHIRAL CAVES WITH SURFACE-MOLECULAR IMPRINTING TECHNIQUE

GUO Jianfeng, GAO Baojiao

(Chemical Industry and Environment Institute, North University of China, Taiyuan 030051)

Abstract 4-Vinyl pyridine (4VP) was grafted on micron-sized silica gel particles in a manner of “graft from” in a solution polymerization system by right of the mediation of the coupling agent 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane (MPS), obtaining the grafted functional particles P4VP/SiO₂. Subsequently, the molecular imprinting towards the grafted P4VP was conducted with L-Asp that is one enantiomer of aspartic acid (Asp) as template molecule and 1,6-dibromohexane as crosslinking agent by using the novel surface-molecular imprinting technique put forward and established by our research group, and the L-Asp molecule-imprinted material MIP-P4VP/SiO₂ was prepared. With another enantiomer of aspartic acid, D-Asp, as a contrast compound, both static method and dynamic method were adopted to study the recognition character of MIP-P4VP/SiO₂ for L-Asp, and the separation ability of MIP-P4VP/SiO₂ towards L-Asp and D-Asp in the raceme was explored. The experiment results show that MIP-P4VP/SiO₂ have obvious recognition selectivity and fine binding affinity for L-Asp, and the selectivity coefficient is equal to 3.85 with respect to D-Asp, displaying the fine separation property for the enantiomers of aspartic acid. Besides, MIP-P4VP/SiO₂ has excellent elution property, with a diluted aqueous solution of NaOH as the eluent, the desorption ratios of L-Asp reach 98.52% in 12 BV.

Keywords Aspartic acid, Enantiomer separation, Surface-molecular Imprinting, 4-Vinyl pyridine, Graft polymerization, Molecular recognition