

咖啡因替代物(茶碱)分子表面印迹材料的制备 及其分子识别特性研究^{*}

施雪军 高保娇^{**} 赵兴龙

(中北大学化学工程系 太原 030051)

摘 要 采用巯基-过氧化苯甲酰(BPO)氧化还原引发体系,先实现了甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)在微米级硅胶微粒表面的引发接枝聚合,制得接枝微粒 PGMA/SiO₂. 使接枝大分子 PGMA 的环氧基团与 5-氨基水杨酸(ASA)发生开环反应,将水杨酸基团键合在接枝大分子侧链,制得功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂,并对其化学结构与表面电性能进行了表征. 考察研究了功能微粒 SA-PGMA/SiO₂ 与咖啡因替代物茶碱分子之间的相互作用力. 研究表明,微粒 SA-PGMA/SiO₂ 与茶碱分子之间存在有强的次价键力(静电和氢键相互作用). 在此基础上,采用本课题组建立的新型分子表面印迹技术,以咖啡因替代物茶碱为模板分子,乙二醇二缩水甘油醚(EGDE)为交联剂,对接枝在硅胶表面的功能大分子链 SA-PGMA 进行了交联印迹,制备了茶碱分子表面印迹材料 MIP-SAP/SiO₂,深入考察研究了其分子识别特性. 实验结果表明,相对于两种对照物甘油茶碱和苦参碱,印迹材料 MIP-SAP/SiO₂ 对茶碱分子具有特异的识别选择性与优良的结合亲和性,相对于甘油茶碱,印迹材料对茶碱的识别选择性系数为 7.72.

关键词 聚甲基丙烯酸缩水甘油酯,硅胶,表面印迹,咖啡因替代物,分子识别

生物碱(alkaloids)是一大类含氮的天然有机化合物,广泛分布于很多种植物组织中,大多具有较复杂的氮杂环结构,具有显著的生理活性与药理活性,比如抗肿瘤、抗炎、抗病毒以及其他药学功能^[1-4]. 生物碱在医药学领域具有十分重要的应用价值和巨大的应用潜力,科学高效地从植物中提取、分离与纯化生物碱,备受关注. 从植物组织中提取生物碱通常采用溶剂萃取法,首先得到生物碱粗提取液(crude extract). 不过,目前已出现了不少被新技术强化与改进了的新溶剂萃取法,比如超声波辅助萃取法、微波辅助萃取法、超临界流体萃取法及加压溶剂萃取法等^[5-8].

由溶剂萃取法所得到的生物碱粗提取液,其成份十分复杂,可能同时存在多种生物碱,并含有大量的杂质物质,对生物碱提取液进行进一步的分离与纯化,以得到一定纯度的目标生物碱物质,这是从植物体组织中获得生物碱技术的关键所在. 目前分离与纯化生物碱的方法主要有液-液(有机溶剂)萃取法^[9]、固体吸附剂吸附法^[10]、高

速逆流色谱分离法^[11]、其他各种色谱分离技术^[12-14]和分子印迹固相萃取法(MIPSPE)^[15,16].

由于分子印迹聚合物(MIPs)对模板分子具有特异的识别选择性和优良的结合亲和性,各种方法相比较,以 MIPs 为固体萃取剂的 MIPSPE 法,在生物碱的分离与纯化领域极具发展前景,需要大力发展. 咖啡因是存在于茶叶、咖啡、可可等植物中的一种生物碱,有刺激呼吸系统与神经中枢系统的功能,对胃肠道系统和泌尿系统也有刺激作用^[17,18],咖啡因具有重要的药用价值. 目前从茶叶等植物中提取咖啡因的方法仍以有机溶剂萃取法为主,而从粗提取液中分离咖啡因,基于 MIPSPE 法的优点,近年来在咖啡因分子印迹聚合物的制备与应用方面,人们已开展了一些研究^[19,20],但所采用的制备印迹聚合物的方法大多为传统方法.

制备分子印迹聚合物的传统方法是包埋法,该方法具有若干明显的缺点^[21,22],所制得的是块状印迹聚合物,印迹效率不高;粉碎、研磨及筛分

^{*} 2012-11-15 收稿,2012-12-26 修稿;山西省自然科学基金(基金号 201002100843)资助项目.

^{**} 通讯联系人, E-mail: gaobaojiao@126.com

doi:10.3724/SP.J.1105.2013.12369

获得印迹聚合物微粒的过程,操作较为繁杂;而且不少印迹空穴遭到破坏,致使颗粒内印迹空穴数目有限,对模板分子(离子)结合性能不高;另外,由块状印迹聚合物为前驱体所获得的微粒,基质较厚,空穴的孔道较深,模板分子扩散阻力大,传质速度较慢,不易与识别位点结合.为有效地克服上述缺点,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].本课题组也积极致力于发展分子表面印迹方法的研究工作,建立了一种“先接枝聚合-后交联印迹”的新型分子表面印迹方法,分别用于氨基酸分子、生物代谢分子、农药分子、生物碱分子等物质的识别分离研究,得到了十分满意的结果^[25-28].本文通过分子设计,研究制备了高性能的咖啡因替代物茶碱分子表面印迹材料,深入考察了该表面印迹材料的分子识别特性.结果表明,该分子表面印迹材料,对咖啡因替代物分子具有特异的识别选择性与优异的结合亲和性.本文的研究结果,为采用 MIPSPE 法从植物组织中有效地分离提取生物碱,提供了有价值的参考.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

硅胶(100-160目,青岛海洋化工有限公司),试剂级; γ -巯丙基三甲氧基硅烷(MPMS,商品名 KH-590,曲阜市万达化工有限公司),分析纯;甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA,上海诺泰化工有限公司),分析纯,使用前经减压蒸馏提纯;过氧化二苯甲酰(BPO,上海市中利化工厂),分析纯,使用前经重结晶提纯;茶碱(theophylline,武汉欣欣佳丽生物科技有限公司),98%纯度;甘油茶碱,即二羟丙茶碱(diprophylline,西安小草植物科技有限公司),98%纯度;苦参碱(matrine,西安小草植物科技有限公司),98%纯度;5-氨基水杨酸(ASA,河南新乡天丰精细化工有限公司),分析纯;乙二醇二缩水甘油醚(EGDE,无锡方荣物资有限公司),化学纯;其它所用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);438VP 型扫描电子显微镜(SEM,英国 LEO 公司);PI201 高效液相色谱仪(HPLC,大连依利特分析仪器有限公司);UV-2602 型紫外可见分光光度计(上海尤尼柯公司);

STA449 型热重分析仪(德国耐驰公司),空气气氛,升温速度为 10 K/min;Zetasizer Nano-Z 型 zeta 电位分析仪(英国 Malvern Instrument 公司).

1.2 水杨酸型功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂ 的制备与表征

1.2.1 单体 GMA 在硅胶微粒表面的引发接枝聚合

按文献[29]所述的过程,采用新建立的“表面引发接枝聚合”法,在硅胶表面高效地实施单体甲基丙烯酸缩水甘油酯 GMA 的接枝聚合,典型的步骤如下.(1)使用含巯基的偶联剂 KH-590 对硅胶进行表面改性,将巯基引入硅胶微粒表面,制得表面改性的硅胶微粒 MPMS-SiO₂; (2)使改性微粒 MPMS-SiO₂ 表面的巯基与溶液中的 BPO 构成氧化还原引发体系,以 DMF 为溶剂,在氮气气氛中使单体 GMA 发生表面引发接枝聚合,制得接枝微粒 PGMA/SiO₂. 采用多种方法表征其化学结构并测定接枝微粒表面 PGMA 的接枝度^[29].

1.2.2 接枝微粒的水杨酸功能化转变

在装有电动搅拌器、回流冷凝管及温度计的四口瓶中,加入 1.5 g 接枝微粒 PGMA/SiO₂,再加入 30 mL DMF,将微粒浸泡溶胀 12 h.将溶有 3.35 g ASA 的 60 mL 饱和碳酸钠的水溶液转移至上述四口瓶中,于 80 °C 的恒温条件下,使接枝微粒 PGMA/SiO₂ 表面的环氧基团与 ASA 氨基之间的开环反应进行 24 h.结束反应后,分离出产物微粒,分别用乙醇和蒸馏水洗涤,真空干燥至恒重,即得水杨酸型功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂. 采用 KBr 压片法,测定其红外光谱,确定其化学结构变化;采用热重法测定开环反应后功能接枝微粒的失重程度,结合原接枝微粒的失重量^[29],计算水杨酸基团的键合量.本研究制备与使用的功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂ 其水杨酸基团的键合量为 1.33 mmol/g(接枝 PGMA 的环氧基团开环键合 SA 的键合率为 82%);使用 zeta 电位分析仪测定功能接枝微粒在不同 pH 值条件下的 zeta 电位,绘制 zeta 电位曲线.

1.3 功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂ 对咖啡因替代物分子的吸附作用

1.3.1 在不同溶剂中进行等温吸附实验

为研究功能接枝微粒表面的接枝大分子 SA-PGMA 对咖啡因替代物分子茶碱的作用力情况(受客观限制,虽曾几经努力,但未能获得咖啡因,考虑到茶碱与其分子结构十分相似,故本研究

用茶碱作为咖啡因替代物),分别在水、氯仿及乙醇 3 种溶剂中进行了功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂ 对茶碱的等温吸附实验. 先测定功能接枝微粒对咖啡因的结合动力学行为,确定吸附达平衡的时间. 实验结果表明平衡时间为在 5 h 附近. 在此基础上,在 3 种溶剂中分别进行等温吸附实验. 吸附实验在恒温振荡器中进行,采用紫外分光光度法测定吸附前后吸附液中茶碱浓度的变化. 茶碱在 3 种溶剂中的紫外特征吸收分别在 $\lambda = 272 \text{ nm}$ (水)、 $\lambda = 276 \text{ nm}$ (氯仿)及 $\lambda = 270 \text{ nm}$ (乙醇)处.

1.3.2 在 pH 不同的水介质中进行等温吸附实验

配制浓度系列变化的茶碱水溶液,并分别用稀盐酸与氢氧化钠水溶液,系列地调节茶碱水溶液的 pH 值,在不同的 pH 条件下进行功能接枝微粒对茶碱的等温吸附实验,以考察 pH 值对功能接枝微粒吸附作用力的影响,并进一步考察研究功能接枝微粒与茶碱之间的作用力情况.

1.4 咖啡因替代物分子表面印迹材料 MIP-SAP/SiO₂ 的制备与表征

称取 2 g 功能微粒 SA-PGMA/SiO₂,置于 100 mL 浓度为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的茶碱水溶液中,用稀氢氧化钠溶液调节体系的 pH 值,使 $\text{pH} = 7$. 将混合液置于恒温振荡器中,恒温振荡 6 h,使接枝微粒对茶碱的吸附达到饱和,滤出微粒,真空干燥. 取 1 g 饱和吸附了茶碱的功能微粒,置于含有浓度为 1.2 g/L 茶碱的乙醇和水混合溶液(体积比 1:1)中,调节体系的 pH 值,使 $\text{pH} = 8$,加入 10 mL 溶有交联剂 EGDE 的乙醇溶液(浓度为 8 g/L),在 50°C 下搅拌反应 24 h. 反应结束后,用含有 NaCl 的乙酸水溶液反复洗涤产物微粒,以除去模板分子咖啡因替代物,抽滤,真空干燥,即得茶碱分子表面印迹材料 MIP-SA-PGMA/SiO₂ (简称为 MIP-SAP/SiO₂).

1.5 MIP-SAP/SiO₂ 对咖啡因替代物分子的结合特性

1.5.1 等温结合性能的测定

类似于文献^[28],也分别采用静态与动态两种方法,测定表面印迹材料 MIP-SAP/SiO₂ 对水介质中茶碱的结合性能. 同样,先测定 MIP-SAP/SiO₂ 微粒对茶碱的结合动力学行为,确定结合达到平衡的时间在 5 h 附近.

(1)静态法:在 $0.2 \sim 2.0 \text{ g/L}$ 范围内配制浓

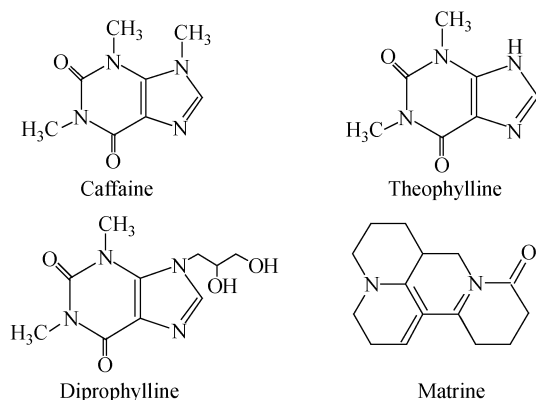
度系列变化的茶碱溶液. 分别移取 20 mL 浓度不同的茶碱溶液,置于若干具塞锥形瓶中,加入准确称取的质量为 0.1 g 的 MIP-SAP/SiO₂ 微粒,然后在水浴恒温振荡器中恒温振荡 5 h,使吸附达平衡,静置分离,测定上清液中茶碱的平衡浓度,按公式(1)计算茶碱的平衡结合量 Q_e (mg/g),绘制平衡结合量-平衡浓度之间的关系曲线,即为等温结合线.

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

式中, c_0 是茶碱溶液的初始浓度(g/L); c_e 是咖啡因平衡浓度(g/L); V 是溶液体积(mL); m 是印迹微粒 MIP-SA-P/SiO₂ 的质量(g).

依同样的方法,分别测定茶碱分子表面印迹材料 MIP-SAP/SiO₂ 对甘油茶碱和苦参碱的等温结合线,溶液中甘油茶碱和苦参碱的浓度也采用紫外分光光度法测定(两者在水溶液中的特征吸收分别为 $\lambda = 275 \text{ nm}$ 和 $\lambda = 203 \text{ nm}$).

甘油茶碱是茶碱与一氯丙二醇缩合而成的一种药物,其化学结构与茶碱咖啡因及茶碱十分相似,只是分子体积比咖啡因及茶碱稍大些;苦参碱也是一种重要的生物碱,只是其化学结构与咖啡因很是不同. 本研究选择甘油茶碱和苦参碱作为两种对照物,考察咖啡因替代物茶碱分子表面印迹材料 MIP-SAP/SiO₂ 的分子识别特性,以便从印迹空穴的空间大小与结构位点两个方面,深入分析 MIP-SAP/SiO₂ 微粒的分子识别机理. 咖啡因、茶碱、甘油茶碱及苦参碱的化学结构见示意图 1.



Scheme 1 Chemical structure of caffeine, theophylline, diprophylline and matrine

(2)动态法:室温条件下,将 2.036 g 的印迹微粒 MIP-SAP/SiO₂ 装在内径为 10 mm 的玻璃管内,使填充柱的床体积(bed volume, BV)为 2 mL.

将浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的茶碱溶液以 $4 \text{ BV} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速逆流通过填充柱,以 2 BV 的间隔收集流出液,测定流出液中茶碱的浓度,绘制动态结合曲线. 采用同法,测定 MIP-SAP/SiO₂ 对 2 种对照物的动态结合曲线.

1.5.2 结合选择性实验

为了进一步探索研究印迹材料 MIP-SAP/SiO₂ 对茶碱的结合特性,进行了 MIP-SAP/SiO₂ 对甘油茶碱/茶碱二元体系的竞争性吸附实验. 配制浓度均为 6 mmol/L 茶碱与甘油茶碱的混和溶液,取 20 mL 混和溶液于具塞锥形瓶中,加入准确称量的约 1.0 g 的印迹微粒材料 MIP-SAP/SiO₂,在恒温振荡器中振荡 5 h ,使吸附达到平衡,离心分离,测定上清液中茶碱与甘油茶碱的平衡浓度(采用高效液相色谱法测定上清液中两者的浓度),按公式(2),计算 2 种物质的分配系数^[30,31].

$$K_d = \frac{Q_e}{Q_c} \quad (2)$$

式中, K_d (mL/g) 是某物质的分配系数; c_e (mg/mL) 是上清液中该物质的平衡浓度; Q_e (mg/g) 是该物质的平衡结合量.

由茶碱与甘油茶碱的分配系数数据,按照公式(3),计算印迹微粒材料 MIP-SAP/SiO₂ 对茶碱的选择性系数.

$$k = \frac{K_d(\text{theophylline})}{K_d(\text{diprophylline})} \quad (3)$$

式中, K_d 为 2 种物质的分配系数, k 是相对于对照物而言,印迹材料 MIP-SAP/SiO₂ 对茶碱的选择性系数, k 值的大小标志着印迹材料 MIP-SAP/SiO₂ 对茶碱的结合选择性^[30,31].

2 结果与讨论

2.1 制备功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂ 的化学过程

通过分子设计,先制得高接枝度的接枝微粒 PGMA/SiO₂,然后将水杨酸基团引入接枝微粒表面,得到可能对生物碱分子产生强静电和氢键相互作用的功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂. (1) 先使用经偶联剂 MPMS 得以表面改性的硅胶微粒 MPMS-SiO₂,与溶液中的 BPO 构成巯基-BPO 氧化还原体系,在微米级硅胶微粒表面产生自由基,从而实施单体 GMA 的表面引发接合聚合,制得接

枝微粒 PGMA/SiO₂^[28]; (2) 以 5-氨基水杨酸为反应试剂,使接枝大分子 PGMA 的环氧键发生开环反应,将水杨酸(SA)作为一功能基团键合在接枝大分子 PGMA 的侧链,形成功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂. 整个化学反应过程见示意图 2.

2.2 功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂ 的表征

2.2.1 红外光谱

图 1 给出接枝微粒 PGMA/SiO₂ 与功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂ 的红外光谱. 在接枝微粒 PGMA/SiO₂ 的红外谱图中,于 908 cm^{-1} 处和 1740 cm^{-1} 处分别为 PGMA 的环氧基团和酯羰基特征振动吸收;而在 ASA-PGMA/SiO₂ 的红外谱图中,在 $1589, 1496$ 和 1460 cm^{-1} 等处出现了苯环的骨架特征振动吸收峰,更重要的是 908 cm^{-1} 处环氧基团的特征吸收峰消失,且在 3440 cm^{-1} 处出现了羟基的振动吸收峰,上述谱峰数据的变化充分表明,ASA 已与接枝大分子 PGMA 的环氧基团发生了开环反应,将水杨酸基团键联在侧链,形成了功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂. 需要指出的是,由于受 SiO₂ 强吸收背景的影响,2 种微粒的诸特征吸收都显得较弱.

2.2.2 Zeta 电位曲线

为了探索研究功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂ 对咖啡因替代物茶碱分子的吸附作用机理,使用 zeta 电位分析仪分别测定了接枝微粒 PGMA/SiO₂ 和功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂ 在不同 pH 条件下的 zeta 电位,测定结果示于图 2. 从图中可清楚地看到: (1) 在较大的 pH 范围内,接枝微粒 PGMA/SiO₂ 的 zeta 电位基本为绝对值很小的负值,或者说微粒 PGMA/SiO₂ 基本不带有电荷; (2) 接枝微粒被水杨酸功能化改性后,即形成功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂ 后, zeta 电位发生了实质性的变化,在很大的 pH 值范围内,微粒 SA-PGMA/SiO₂ 的 zeta 电位为绝对值较大的负值(水杨酸羧基电离所致),意味着接枝微粒表面带有高密度的负电荷(尤其在中性与碱性溶液中).

2.3 功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂ 与咖啡因替代物分子之间的相互作用

2.3.1 功能接枝微粒在 3 种介质中对茶碱分子的吸附性能

茶碱与咖啡因的溶解性也十分相似,它们既可溶于水及乙醇,又能溶于氯仿等亲脂性溶剂中. 在水、乙醇及氯仿 3 种性质不同的溶剂中,分别进行了功能微粒 SA-PGMA/SiO₂ 对茶碱的等温吸附

$$\text{MPMS-SiO}_2 + \text{BzOOC-OOCBz} \longrightarrow \text{MPMS-S-SiO}_2 + \text{BzCOOH} + \text{BzCOO}^\bullet$$
$$\begin{array}{c}
 \text{SiO}_2 \text{---} \text{O---Si} \begin{array}{c} \text{OCH}_3 \\ \text{OCH}_3 \end{array} \text{---CH}_2\text{CH}_2\text{C}^{\bullet}\text{---S}^{\bullet} + n \text{CH}_2=\text{C} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{O}=\text{C} \end{array} \text{---HO---CH}_2\text{---HC} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \text{CH}_2 \end{array} \text{---CH}_2 \\
 \longrightarrow \text{SiO}_2 \text{---} \text{O---Si} \begin{array}{c} \text{OCH}_3 \\ \text{OCH}_3 \end{array} \text{---CH}_2\text{CH}_2\text{C} \text{---S---} \left[\text{CH}_2\text{---C} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{O}=\text{C} \end{array} \right]_n \text{---O---CH}_2\text{---HC} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \text{CH}_2 \end{array} \text{---CH}_2 \\
 \text{PGMA/SiO}_2
 \end{array}$$

Chemical reaction scheme showing the synthesis of SA-PGMA/SiO₂. The reaction involves a SiO₂-coated poly(glycidyl methacrylate) (PGMA) prepolymer and 3-aminobenzoic acid (3-AB). The prepolymer consists of a SiO₂ particle attached to a PGMA chain with a terminal epoxide group. 3-AB, which has an amino group (NH₂), a carboxylic acid group (COOH), and a hydroxyl group (OH) in the meta positions, reacts with the epoxide group. The product is a SiO₂-coated polymer where the epoxide ring has opened, forming a hydroxyl group and a new ether linkage to the 3-aminobenzoic acid moiety. The label "SA-PGMA/SiO₂" is written in blue below the product.

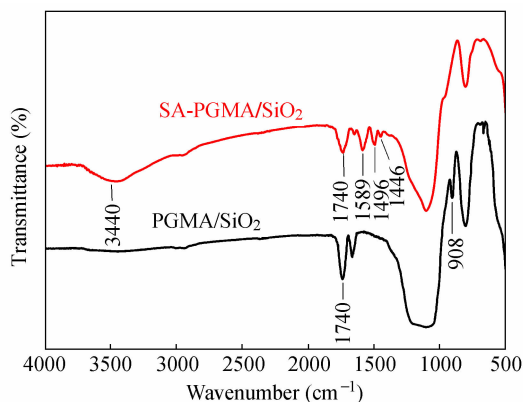
Scheme 2 Reaction process of preparing functional graft particles SA-PGMA/SiO₂

Fig. 1 IR spectra of grafted particles PGMA/SiO₂ and functional particles SA-PGMA/SiO₂.

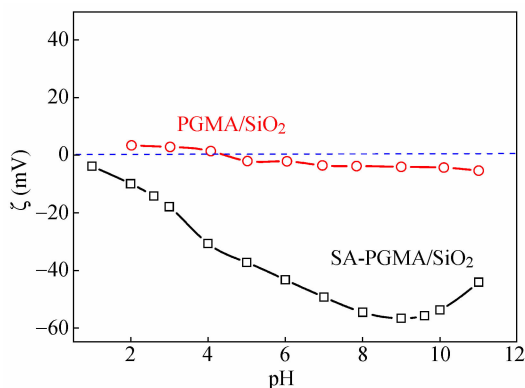


Fig. 2 Zeta potential curves of grafted particles PGMA/SiO₂ and functional grafted particles SA-PGMA/SiO₂

SiO₂ 对茶碱具有较强的吸附作用. 根据示意图 1 及示意图 2 所示的茶碱的分子结构及微粒 SA-

从图 3 中可看出,在氯仿介质中,SA-PGMA/

PGMA/SiO₂ 的化学结构分析,在氯仿介质中,SA-PGMA/SiO₂ 对茶碱的吸附驱动力只能是氢键相互作用(茶碱分子中的叔胺及亚胺 N 原子以及羰基 O 原子主要作为氢键受体,而微粒 SA-PGMA/SiO₂ 表面水杨酸基团的羟基及羧基则主要作为氢键给体)。

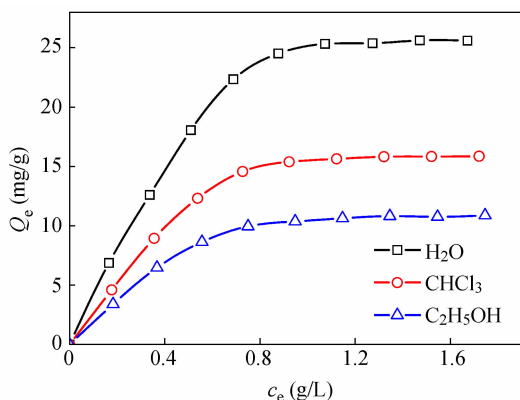


Fig. 3 Adsorption isotherms of SA-PGMA/SiO₂ for theophylline in three mediums

Temperature: 30 °C; pH = 9 (in aqueous medium)

同时从图 3 中亦可看出,在乙醇介质中,SA-PGMA/SiO₂ 对茶碱的吸附容量较在氯仿介质中要小,这是由于溶剂分子竞争吸附所导致的.乙醇分子与 SA-PGMA 大分子链上的羧基及羟基之间亦可产生强的氢键相互作用(两者的基团均可互为氢键的授受体),导致 SA-PGMA/SiO₂ 微粒表面的部分作用位点被乙醇分子占据,溶剂分子强烈的竞争吸附,会显著地抑制茶碱的吸附,导致其吸附容量的减小.

但从图 3 中可清楚地发现,在水介质中,SA-PGMA/SiO₂ 对茶碱的吸附容量远高于在氯仿介质中的吸附容量.与乙醇分子类似,凭借氢键相互作用,水分子亦可产生强烈的竞争吸附,会大幅度地抑制 SA-PGMA/SiO₂ 对茶碱分子的氢键作用,但在水介质中 SA-PGMA/SiO₂ 微粒对茶碱却能产生很强的吸附作用,表明在水介质中 SA-PGMA/SiO₂ 微粒与茶碱分子之间,即主-客体之间还存在其他形式的分子间作用力,此作用力应该是静电相互作用.在水介质中,接枝大分子侧链上水杨酸基团的羧基会发生电离作用,且随 pH 的增大,从部分电离逐渐变为完全电离,从而使微粒表面荷高密度负电荷(见图 2);而茶碱分子中的 4 个胺基氮原子会发生质子化而荷正电,显然,两者之间会产生强烈的静电相互作用,导致了强的吸附

作用.可以说,在水介质中 SA-PGMA/SiO₂ 微粒对茶碱的吸附推动力是静电相互作用与氢键相互作用的协同,且前者是主驱动力.总之,功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂ 与生物碱分子茶碱之间存在着很强的次价键力,这就为采用本课题组建立的“先接枝聚合-后交联印迹”的新表面印迹方法,在硅胶微粒表面实施茶碱分子的表面印迹奠定了充分的基础.

2.3.2 介质 pH 值对功能微粒 AS-PGMA/SiO₂ 吸附性能的影响

调节茶碱水溶液的 pH 值,使 SA-PGMA/SiO₂ 在不同 pH 条件下对茶碱进行等温吸附,图 4 为不同 pH 条件下饱和吸附量 Q_m 与 pH 的关系曲线.从图 4 中可以看到,微粒 SA-PGMA/SiO₂ 对茶碱的吸附容量,随 pH 的升高呈现先增大后减小的变化趋势,在 pH = 7,即在中性溶液中具有最大的吸附容量(29 mg/g).上述的变化趋势折射出微粒 SA-PGMA/SiO₂ 与茶碱分子相互作用力随 pH 的变化.

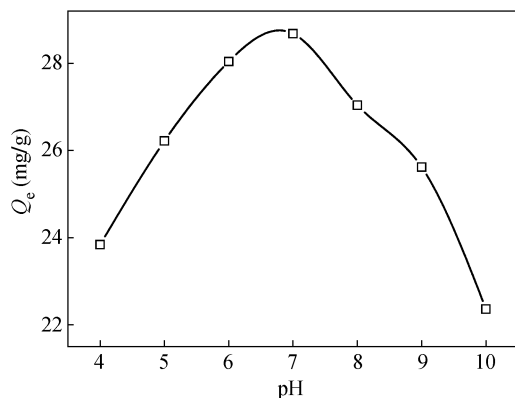


Fig. 4 Effect of pH value on adsorption property of SA-PGMA/SiO₂

Temperature: 30 °C

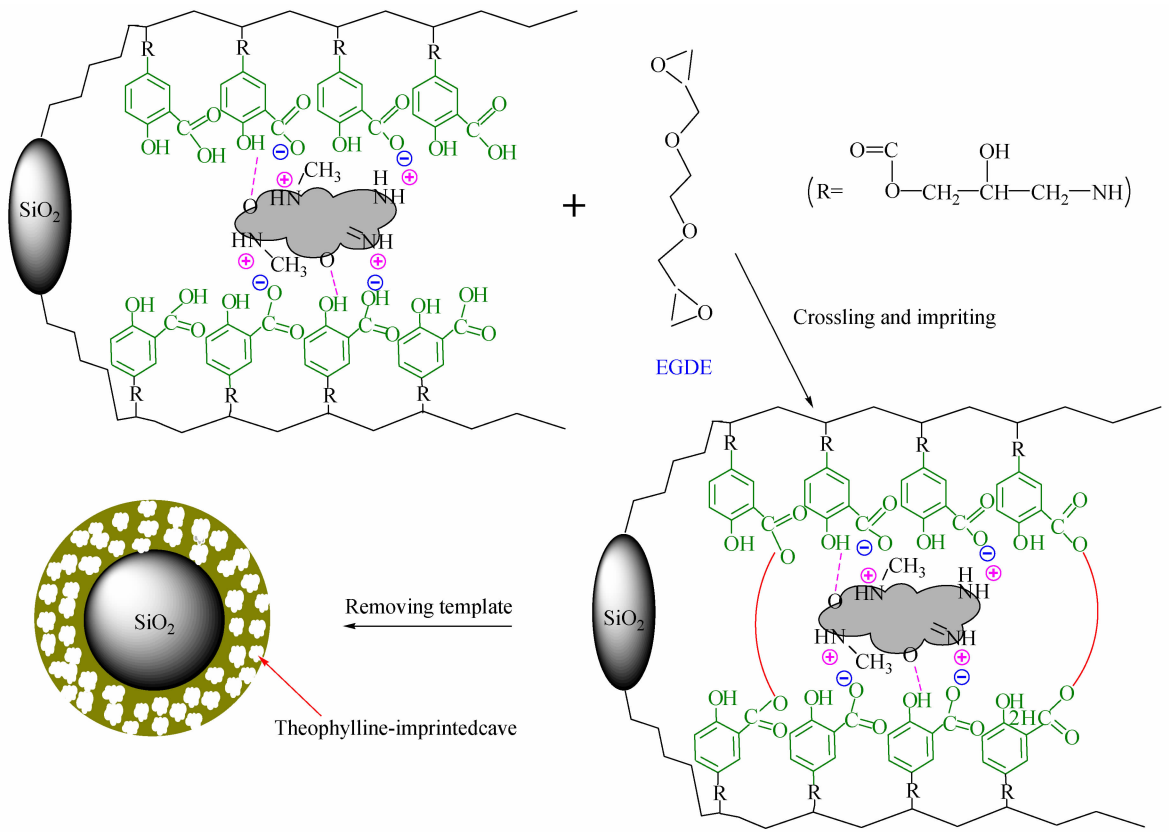
当 pH 值很低时,虽然茶碱分子中的胺基 N 原子处于高度质子化状态,但水杨酸基团羧基几乎不发生电离,微粒 SA-PGMA/SiO₂ 与茶碱分子之间的静电相互作用很弱,导致低的吸附容量,此时功能微粒对茶碱的吸附主要是由氢键作用所致;随着 pH 的升高,水杨酸基团羧基的电离度增大,微粒 SA-PGMA/SiO₂ 与茶碱分子之间的静电相互作用增强,且氢键作用依然存在,两者的协同,故吸附容量迅速增大;随着 pH 的升高,茶碱分子中氮原子质子化程度逐渐减弱,不利于主-客体之间的静电作用,当 pH < 7 时,这种负面影响

未显现出来,而当 $\text{pH} > 7$ 后,这种削弱作用则明显地显露出来,导致吸附容量随 pH 的升高转而减小. 上述实验结果表明,当 pH 在 7 附近时,功能微粒 SA-PGMA/ SiO_2 与茶碱分子之间的次价键力最强,此结果为实施分子表面印迹选择适宜的 pH 条件提供了参考.

2.4 咖啡因替代物分子表面印迹材料 MIP-SAP/ SiO_2 的制备过程

首先,在 $\text{pH} = 7$ 的条件下,使功能微粒 SA-PGMA/ SiO_2 对咖啡因替代物茶碱分子之间的次价键力(静电与氢键相互作用)达最大,且使吸附

达到饱和;然后将对茶碱吸附已达饱和的微粒置于乙醇和水混合溶液,加入交联剂乙二醇二缩水甘油醚,凭借交联剂分子中环氧基团与接枝大分子 SA-PGMA 侧链的水杨酸羧基之间的开环反应,接枝大分子 SA-PGMA 被交联,茶碱分子则被包裹在交联网络中,从而实现了茶碱的分子印迹;洗去模板茶碱分子后,在硅胶表面的聚合物薄层中留下了大量茶碱的空穴,形成了茶碱表面分子印迹材料 MIP-SAP/ SiO_2 . 表面印迹材料的制备过程可示意性地用示意图 3 表示之.



Scheme 3 Chemical reaction process to prepare molecular surface-imprinting material MIP-SAP/ SiO_2

2.5 MIP-SAP/ SiO_2 对咖啡因替代物分子的结合特性

2.5.1 等温结合线与动态结合曲线

使用功能微粒 SA-PGMA/ SiO_2 与分子印迹材料 MIP-SAP/ SiO_2 , 首先采用静态法 (batch method), 分别对水介质中的茶碱与甘油茶碱进行了等温吸附实验. 图 5 给出了 SA-PGMA/ SiO_2 对 2 种物质的等温吸附线, 图 6 给出了 MIP-SAP/ SiO_2 对 2 种物质的等温结合线.

图 5 显示, 功能接枝微粒 SA-PGMA/ SiO_2 对 2

种碱性物质都具有高的吸附容量(由于甘油茶碱分子量较高,故其吸附容量显得较大),吸附没有选择性. 高吸附容量的原因如前所述,就在于功能接枝微粒 SA-PGMA/ SiO_2 与类生物碱分子之间存在有强次价键力.

但是,图 6 中却清楚地显示,经茶碱分子表面印迹而形成的印迹材料 MIP-SAP/ SiO_2 ,对甘油茶碱的结合容量却大大减小(最大吸附量由 35 mg/g 降到 6 mg/g),或者说,印迹材料 MIP-SAP/ SiO_2 对甘油茶碱基本不选择、不识别、不结合;而

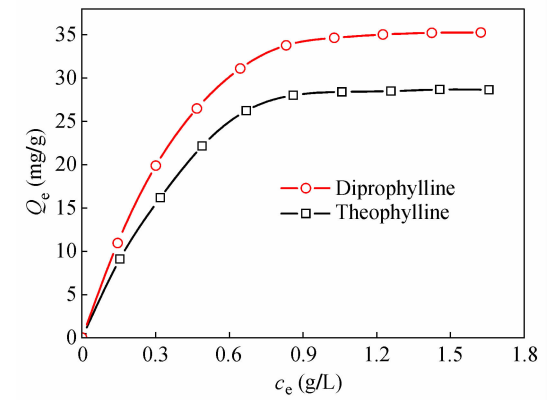


Fig. 5 Adsorption isotherms of functional particles SA-PGMA/SiO₂ for two substances
Temperature: 30 ℃ ; pH = 7

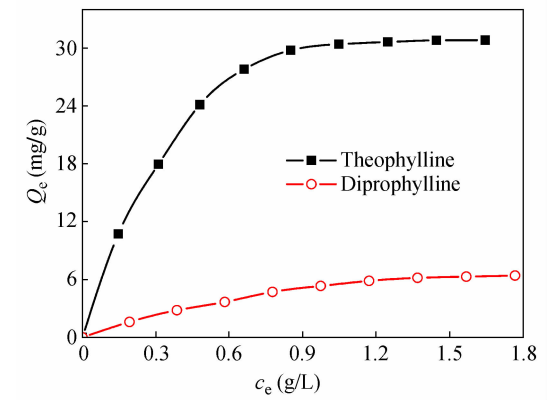


Fig. 6 Binding isotherms of imprinted particles MIP-SAP/SiO₂ for two substances
Temperature: 30 ℃ ; pH = 7

对于茶碱,不但保持了原来高的结合容量,而且有所提高(最高吸附量由 29 mg/g 上升至 31 mg/g),清楚地表明, MIP-SAP/SiO₂ 对茶碱具有的特有的识别选择性与高度的结合亲和性.

印迹微粒 MIP-SAP/SiO₂ 表面的聚合物薄层内,分布有大量茶碱分子的印迹孔穴,这些空穴在尺寸大小、空间结构和作用位点等方面与茶碱分子是高度匹配的,故对模板分子茶碱具有特有的识别能力,产生很强的结合作用,导致很高的结合容量;而对于甘油茶碱而言,虽然在空间结构和作用位点等方面,印迹空穴似乎与甘油茶碱还是较匹配的(见示意图 1),但是在尺寸大小方面,甘油茶碱分子的体积比茶碱分子大,茶碱印迹空穴难于容纳甘油茶碱分子进入其中,因此印迹空穴对甘油茶碱的基本不识别与不结合,导致很低的结合容量

图 7 给出了另一种对照物苦参碱,在功能微

粒 SA-PGMA/SiO₂ 表面的等温吸附线和在茶碱印迹微粒 MIP-SAP/SiO₂ 表面的等温结合线.

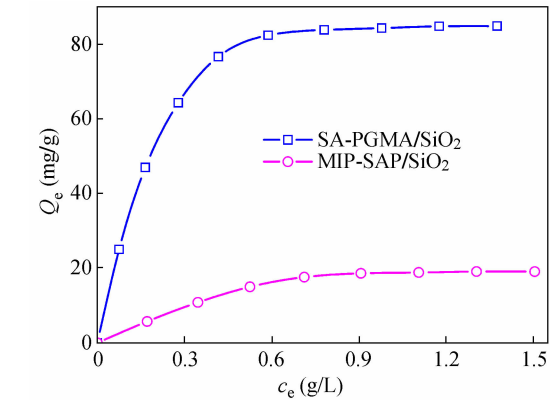


Fig. 7 Adsorption isotherm and binding isotherm of matrine
Temperature: 30 ℃ ; pH = 7

图 7 显示,功能微粒 SA-PGMA/SiO₂ 对苦参碱具有很强的吸附作用,吸附容量高达 85 mg/g (苦参碱分子中含有 2 个碱性 N 原子,而茶碱分子中含有 4 个碱性 N 原子,故接枝度相同的功能微粒 SA-PGMA/SiO₂ 对苦参碱的吸附容量势必远高于对茶碱的吸附容量). 但是,苦参碱分子的化学结构与茶碱是迥然不同的(见示意图 1),茶碱印迹空穴在空间结构和作用位点等方面与苦参碱是不匹配的,故印迹微粒 MIP-SAP/SiO₂ 对苦参碱亦是基本不识别与不结合的,导致结合容量降低至 19 mg/g.

本研究又采用动态法(column method),分别对水介质中的茶碱与甘油茶碱进行了等温吸附实验. 图 8 给出了 SA-PGMA/SiO₂ 对 2 种物质的动

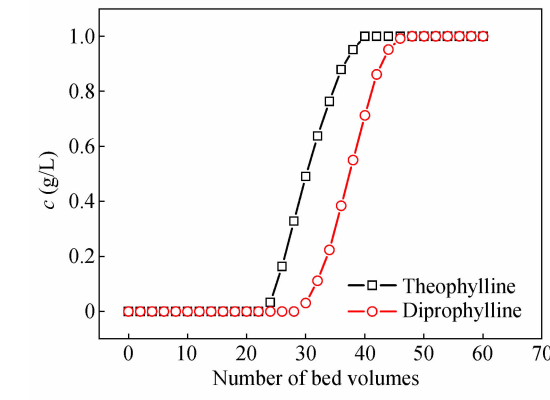


Fig. 8 Dynamic adsorption curves of functional particles SA-PGMA/SiO₂ for two substances
Temperature: 30 ℃ ; pH = 7; Initial concentration: 1 g/L;
Flow rate: 4 BV/h

态吸附曲线,图 9 给出了 MIP-SAP/SiO₂ 对 2 种物质的动态结合曲线.

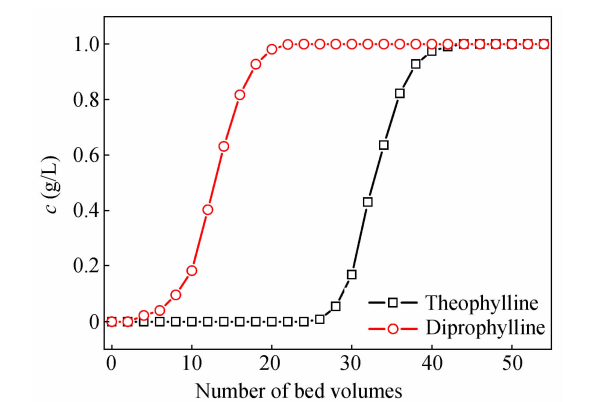


Fig. 9 Dynamic binding curves of imprinted particles MIP-SAP/SiO₂ for two substances
Temperature: 30 ℃; pH = 7; Initial concentration: 1 g/L;
Flow rate: 4 BV/h

比较图8与图9,当甘油茶碱溶液以4 BV/h

的流速分别逆流通过SA-PGMA/SiO₂ 及MIP-SAP/SiO₂填充柱时,泄漏体积由 30 BV 减少至 4 BV,充分显示茶碱印迹材料填充柱对甘油茶碱基本不选择、不识别、不结合;而茶碱溶液分别逆流通过SA-PGMA/SiO₂ 及 MIP-SAP/SiO₂ 填充柱时,泄漏体积都保持较高的数值,且通过后一填充柱时,泄漏体积还有所增加,由 24 BV 增大至 28 BV,充分表现出茶碱印迹材料填充柱对茶碱具有特异的识别选择性与优良结合亲和性.

2. 5. 2 MIP-SAP/SiO₂ 对咖啡因替代物分子的选择性系数

配制茶碱与甘油茶碱的二元混合溶液,使用茶碱印迹材料 MIP-SAP/SiO₂,进行了竞争吸附实验.茶碱与甘油茶碱的紫外吸收十分雷同,故采用高效液相色谱法对上清液进行分离,检测得出两种物质的平衡浓度,计算出它们的分配系数 K_d ,进而得到印迹材料 MIP-SAP/SiO₂ (相对于甘油茶碱)对于茶碱的选择性系数 k ,相关数据见表 1.

Table 1 Distribution coefficient and selectivity coefficient data				
Adsorb material adsorbate	SA-PGMA/SiO ₂		MIP-SAP/ SiO ₂	
	Theophylline	Diprophylline	Theophylline	Diprophylline
K_d (mL/g)	26. 87	33. 17	30. 27	3. 92
k	0. 81		7. 72	

表 1 的数据表明,(1)相对于甘油茶碱,功能微粒(非印迹材料)SA-PGMA/SiO₂对茶碱的选择性系数为 0. 81,接近于 1,这意味着 SA-PGMA/SiO₂对 2 种物质的吸附能力很相近,缺乏选择性;(2)但是,相对于甘油茶碱,茶碱印迹材料 MIP-SAP/SiO₂对茶碱的的选择性系数达 7. 72,显示高的识别选择性.上述竞争性实验数据再此揭示,咖啡因替代物茶碱分子表面印迹材料 MIP-SAP/SiO₂对于模板分子具有特异的结合选择性.

可以预估,若以其它生物碱为模板分子,仍以功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂为印迹基质,采用本文的制备路线,亦可制得高性能的其它生物碱分子的表面印迹材料,这对于从植物组织中有效地分离提取药理活性物质,具有明显的参考价值.

以含 NaCl 的盐酸水溶液为洗脱液,进行洗脱实验的结果表明,被结合在印迹材料 MIP-SAP/SiO₂表面的茶碱分子,由于分布在硅胶微粒表面的聚合物薄层中,因而很容易发生解吸作用,即表

面印迹微粒材料 MIP-SAP/SiO₂具有优良的再生与循环使用性能.

3 结论

先以 5-氨基水杨酸为试剂,对接枝有聚甲基丙烯酸缩水甘油酯的硅胶微粒 PGMA/SiO₂进行化学改性,将水杨酸基团键合在接枝大分子侧链,制得功能接枝微粒 SA-PGMA/SiO₂.该功能接枝微粒与咖啡因替代物茶碱分子之间可产生强的次价键力(静电与氢键相互作用).在此基础上以咖啡因替代物茶碱为模板分子,乙二醇二缩水甘油醚为交联剂,采用新的表面分子印迹技术,成功地在硅胶表面实施了茶碱分子的表面印迹.所制得的印迹材料 MIP-SAP/SiO₂,其表面的聚合物薄层内分布有大量的茶碱印迹空穴,因而对茶碱表现出特异的识别选择性与优良的结合亲和性.本文的研究结果为实施生物碱分子的表面印迹提供了新的分子设计思路与方法.

REFERENCES

- 1 Ling J Y,Zhang G Y,Cui Z J,Zhang C K. J Chromatogr A,2007,1145:123 ~ 127
- 2 Gao J M,Kamnaing P,Kiyota T,Watchueng J,Kubo T,Jarussophon S,Konishi Y. J Chromatogr A,2008,1208:47 ~ 53
- 3 Pereira C G,Rosa P T V,Meireles M A A. J Supercrit Fluids,2007,40:232 ~ 238
- 4 Chen J H,Wang F M,Liu J,Lee F S C,Wang X R,Yang H H. Anal Chim Acta,2008,613:184 ~ 195
- 5 Yang L,Wang H,Zu Y G,Zhao C J,Zhang L,Chen X Q,Zhang Z H. Chem Eng J,2011,172:705 ~ 712
- 6 González-Nuñez L N,Cañizares-Macías M P. Food Chemistry,2011,129:1819 ~ 1824
- 7 Cassel E,Vargas R M F,Brun G W,Almeida D E,Cogoi L,Ferraro G,Filip R. J Food Engin,2010,100:656 ~ 661
- 8 Mroczek T,Mazurek J. Anal Chim Acta,2009,633:188 ~ 196
- 9 Boyadzhiev L,Dimitrov K,Metcheva D. Chem Eng Sci,2006,61:4126 ~ 4128
- 10 Pi G P,Ren P,Yu J M,Shi R F,Yuan Z,Wang C H. J Chromatogr A,2008,1192:17 ~ 14
- 11 Zhang S J,Wang M Y,Wang C H. Sep Purif Technol,2011,76:428 ~ 431
- 12 Bian M,Zhang Z J,Yin H. J Pharm Biomed Anal,2012,58:163 ~ 167
- 13 Maurya A,Srivastava S K. J Chromatog B,2009,877:1732 ~ 1736
- 14 Heaton James,Gray N,Cowan D A,Plumb R S,Legido-Quigley C,Smith N W. J Chromatogr,2012,1228:329 ~ 337
- 15 Chen C Y,Wang C H,Chen A H. Talanta,2011,84:1038 ~ 1046
- 16 Fu Q,Fang Q,Feng B L,Sun S J,Du W,Amut E J,Xiao A P,Chang C. J Chromatogr B,2011,879:894 ~ 900
- 17 Tello J,Viguera M,Calvo L. J Supercrit Fluids,2011,59:53 ~ 60
- 18 Jun X. J Food Eng,2009,94:105 ~ 109
- 19 Farrington K,Magner E,Regan F. Anal Chim Acta,2006,566:60 ~ 68
- 20 Theodoridis G,Manesiotis P. J Chromatogr A,2002,948:163 ~ 169
- 21 Kitahara K I,Yoshihama I,Hanada T,Kokuba H,Arai S. J Chromatogr A,2010,1217:7249 ~ 7254
- 22 Pan J M,Yao H,Guan W,Ou H X,Huo P W,Wang X,Zou X H,Li C X. Chem Eng J,2011,172:847 ~ 855
- 23 Gai Q Q,Qu F,Liu Z J,Dai R J,Zhang Y K. J Chromatogr A,2010,1217:5035 ~ 5042
- 24 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
- 25 Gao B J,Chen Y X,Men J Y. J Chromatogr A,2011,1218:5441 ~ 5448
- 26 Gao B J,Liu S Y,Li Y B. J Chromatogr A,2010,1217:2226 ~ 2236
- 27 Gao B J,Wang J,An F Q,Liu Q. Polymer,2008,49:1230 ~ 1238
- 28 Gao B J,Niu Q Y,Du R K. J Sep Sci,2010,9:1338 ~ 1348
- 29 Shi Xuejun(施雪军),Gao Baojiao(高保娇),Zhao Xinglong(赵兴龙),Ma Yuan(马园). Chemical Research and Application(化学研究与应用),2012,24:1414 ~ 1522
- 30 Ersöz A,Say R,Denizli A. Anal Chim Acta,2004,502:91 ~ 97
- 31 Say R,Ersöz A,Türk H,Denizli A. Sep Purif Technol,2004,40:9 ~ 14

PREPARATION OF MOLECULARLY SURFACE-IMPRINTED MATERIAL
OF CAFFEINE SUBSTITUTION (THEOPHYLLINE) AND ITS
MOLECULE RECOGNITION CHARACTER

Xue-jun Shi, Bao-jiao Gao, Xing-long Zhao

(Chemical Engineering Department , North University of China , Taiyuan 030051)

Abstract By adopting sulfhydryl-benzoyl peroxide redox initiating system, the surface-initiated graft-polymerization of glycidyl methacrylate (GMA) on micron-sized silica gel particles was first realized , obtaining grafted particles PGMA/SiO₂ with a high grafting degree, and then the ring-opening reaction of the epoxy groups of the grafting macromolecule PGMA with 5-aminosalicylic acid (ASA) was carried out, leading to bonding salicylic acid (SA) onto the side chains of the grafting macromolecule PGMA and resulting in the functional grafting particles SA-PGMA/SiO₂. The chemical structure and surface-electrical property of SA-PGMA/SiO₂ particles were characterized. The interaction between the functional grafting particles SA-PGMA/SiO₂ and theophylline molecule as the substitute of caffeine was examined in depth. The investigation result shows that there exist strong secondary bond forces between the functional grafting particles SA-PGMA/SiO₂ and theophylline molecules, including electrostatic interaction and hydrogen bonding. On that basis, the molecular imprinting towards the grafted SA-PGMA was performed with theophylline as template molecule and ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE) as crosslinking agent by using the novel surface-molecular imprinting technique established by our research group , and the theophylline molecule-imprinted material MIP-SAP/SiO₂ was prepared. With diprophylline and matrine as two contrast compounds, both static and dynamic methods were adopted to investigate the binding properties and molecule recognition character of MIP-SAP/SiO₂ for theophylline molecule. The experiment results show that MIP-SAP/SiO₂ have specific recognition selectivity and excellent binding affinity for theophylline. Relative to the contrast substance, diprophylline, the coefficient of recognition selectivity of the imprinted material MIP-SAP/SiO₂ for theophylline is equal to 7.72, displaying excellent recognition selectivity for the template molecule.

Keywords Poly (glycidyl methacrylate) , Silica gel, Molecular surface-Imprinting, Caffeine substitute, Molecule recognition