

乙酸薄荷酯分子印迹聚合物的制备及其吸附特性

张文成, 崔艳芳, 洪礼乐, 任少伟

(合肥工业大学农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽合肥 230009)

摘要: 本文分别考察了不同单体、反应溶剂、充氮时间、反应温度、单体添加量、交联剂添加量对乙酸薄荷酯分子印迹聚合物制备的影响。结果表明, 以乙酸薄荷酯为模板分子, 丙烯酰胺为单体, 以N,N-二甲基甲酰胺为反应溶剂制备的聚合物, 其选择性比较好, 通过聚合物的吸附分离, 可以将薄荷素油中乙酸薄荷酯的含量提高到 14.65%; 而当单体、交联剂添加量与模板分子量的比例为 1:4:16 时, 制备的聚合物对模板分子有较高的结合性能, 结合量为 5.09 mg/g, 对乙酸薄荷酯和薄荷醇的分离因子为 1.46, 说明印迹聚合物对乙酸薄荷酯具有良好的吸附选择性。

关键字: 分子印迹聚合物; 乙酸薄荷酯; 功能单体; 交联剂; GC-MS

文章篇号: 1673-9078(2013)7-1627-1631

Preparation and Adsorption Properties of Molecular Imprinted Polymers of Menthyl Acetate

ZHANG Wen-cheng, CUI Yan-fang, HONG Li-le, REN Shao-wei

(Engineering Research Centre of Bio-Process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: The influence of the monomer substance, reaction solvent, nitrogen filling time, reaction temperature, monomer amount and cross linker dosage on the preparation of the molecular imprinted polymers were investigated. The results showed that the molecular imprinted polymers prepared using menthyl acetate as the template molecules showed better selectivity using acrylamide as the monomer and N,N-dimethyl formamide as reaction solvent. After adsorption separation by the polymers, the menthyl acetate content of peppermint oil was improved to 14.65%. When the mass ratio of the template molecular, monomer and cross linker was 1:4:16, the polymers had a higher binding capacity of 5.09 mg/g and its separation factor for menthyl acetate and menthol was 1.46, showing that the imprinted polymers had good adsorption selectivity for menthyl acetate.

Key words: molecular imprinted polymers; menthyl acetate; functional monomer; cross linker; GC-MS

分子印迹技术(Molecular imprinting technique, MIP), 是指以某一特定的目标分子(模板分子)为模板, 制备对该分子具有特异选择性聚合物的过程^[1]。分子印迹技术是一种很有发展前景的分离技术。其广泛应用于固相萃取^[2-5]、生物传感器^[6-7]、食品检测^[8]、膜分离^[9-11]等诸多领域中。利用分子印迹技术所制得的聚合物称分子印迹聚合物(Molecular imprinted polymers, MIPs)。模板分子与其印迹聚合物的关系常被形象地描述为人工“钥匙”与“锁”的关系或者人工的抗体抗原关系。MIPs的制备过程主要可分为模板与单体形成配合物、共聚形成交联聚合物以及除去模

收稿日期: 2013-02-22

基金项目: 安徽省“十一五”科技攻关课题(09020303086)

作者简介: 张文成(1973-), 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向:

农产品超级加工新技术、新方法研究。

通讯作者: 崔艳芳

板分子形成结合位点3个阶段^[12]。

乙酸薄荷酯(FEMA为2668)具有薄荷和玫瑰的清凉气味, 而且气味比薄荷脑柔和, 不存在薄荷脑易挥发的缺点^[13-15]。在食用、烟用、日化等香精中有着广泛的应用。而目前乙酸薄荷酯单体的获得主要依靠化学合成, 化学合成普遍存在副反应多、反应条件苛刻、设备要求高等缺点^[16]。目前高纯度的天然乙酸薄荷酯主要通过减压蒸馏法制得, 此方法耗能大, 生产工艺复杂。因此一种简单易行的从天然薄荷素油中获得纯度较高的乙酸薄荷酯或者提高薄荷素油中乙酸薄荷酯的含量的方法具有很高的研究价值。

本文拟通过制备分子印迹聚合物, 对薄荷素油中的乙酸薄荷酯进行吸附洗脱, 以提高乙酸薄荷酯含量。以乙酸薄荷酯为模板分子, 分别以丙烯酰胺、甲基丙烯酸为单体, 以N,N-二甲基甲酰胺、甲醇、氯仿为反应溶剂, 以二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA)为交

联剂, 偶氮二异丁氰 (AIBN) 为引发剂, 合成乙酸薄荷酯分子印迹聚合物, 并用吸附实验研究了它们对目标分子的特异选择性和结合性能。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

乙酸薄荷酯 (MA) 纯度 99.8%, 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 丙烯酰胺 (AM)、二甲基丙烯酸乙二醇酯 (EDGMA) 分析纯, 阿法埃莎 (天津) 化学有限公司; 甲基丙烯酸 (MAA) 化学纯, 国药集团化学试剂有限公司; 偶氮二异丁氰 (AIBN)、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、甲醇、氯仿、冰乙酸均为分析纯; 薄荷素油, 合肥丰乐香料有限公司; 氮气 99.9%, 合肥金旺氮气有限公司。

JA2003 电子天平, 上海良平仪器仪表有限公司; 气浴恒温摇床, 江苏金坛市金城国胜实验仪器厂; 离心机, SIGMA; Clarus 600 GC-MS 气相色谱-质谱联用仪, 美国 PerkinElmer 公司。

1.2 方法

1.2.1 乙酸薄荷酯分子印迹聚合物的制备

称取 0.1 mmol (0.020 g) 乙酸薄荷酯溶于 25 mL DMF 溶剂中, 加入 0.4 mmol (0.028 g) 丙烯酰胺, 放置于冰箱低温 4 °C 预聚合 6 h。加入交联剂 1.6 mmol (0.317 g) EGDMA 以及引发剂 0.020 g AIBN, 充分混合后, 通 N₂ 除氧 10 min, 密封后放入恒温气浴摇床中, 50 °C、200 r/min 反应 48 h, 生成沉淀聚合物; 然后 10000 r/min 离心取沉淀物, 用甲醇:乙酸 (9:1) 溶液洗掉模板分子, 直至在洗脱液中模板分子的浓度不再增加为止, 再用甲醇洗去过量的乙酸, 真空干燥箱中 40 °C 干燥, 得到以丙烯酰胺为功能单体的乙酸薄荷酯分子印迹聚合物, 制备非印迹聚合物除不加模板分子外, 其余操作步骤同上。

以不同溶剂为反应溶剂, 以不同单体为反应单体的分子印迹聚合物制备方法同上。

1.2.2 GC-MS 分析条件

色谱条件: Elite-5MS 毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 程序升温:初始温度 65 °C, 以 2 °C/min 速度升到 105 °C; 进样口温度 250 °C; 载气为氦气, 流速 1 mL/min, 分流 40:1; 进样量 0.5 μL。

质谱条件: 离子源 EI, 电子轰击能量为 70 eV, 传输线温度 220 °C, 离子源温度 200 °C, 质量扫描范围: 50~400 Da, TIC 时间 5.0~20.0 min。

1.2.3 聚合物在薄荷素油中的吸附特性

聚合物的吸附选择性由洗脱液中各物质的百分含量表征, 其中乙酸薄荷酯的百分含量越高则说明该聚

合物对目标物质的选择性越强。

称取分子印迹聚合物 0.06 g, 置于 10 mL 离心管中, 加入 9 mL 薄荷素油的 DMF 溶液, 气浴恒温摇床中 25 °C、120 r/min 吸附 36 h, 10000 r/min 离心弃去上清液, 加入 9 mL 甲醇溶液洗涤 1 min, 10000 r/min 离心弃去上清液。加入甲醇乙酸混合溶液 (V_{甲醇}:V_{乙酸}=9:1) 洗脱 24 h, 10000 r/min 离心得上清洗脱液。用 GC-MS 测定洗脱液中乙酸薄荷酯的相对百分含量。相对百分含量由峰面积归一化法计算。

1.2.4 聚合物对乙酸薄荷酯的结合量

准确配制浓度为 0.66 g/L 的乙酸薄荷酯底物溶液。称量聚合物 0.06 g 置于 10 mL 离心管中, 加入上述溶液 10 mL, 置于气浴恒温振荡摇床中 25 °C, 120 r/min 吸附 36 h, 10000 r/min 离心测定上清液中乙酸薄荷酯的含量。

GC-MS 测定溶液中乙酸薄荷酯的含量采用内标法, 选取内标物为 1-辛醇。加入定量的内标物, 分别配制一系列浓度的乙酸薄荷酯溶液。绘制以乙酸薄荷酯浓度为横坐标, 乙酸薄荷酯与 1-辛醇峰面积比值为纵坐标的标准曲线。以相同的方法制备乙酸薄荷酯的样品。测定其峰面积比值计算其浓度。

印迹聚合物的结合量的计算。结合量 (S) 的计算公式为:

$$S = \frac{(C_1 - C_2) \times V}{m}$$

注: C₁-吸附前溶液浓度, C₂-吸附后溶液浓度, V-溶液体积, m-印迹聚合物质量

1.2.5 聚合物的特异选择性实验

分别配制初始浓度为 0.66 g/L 的乙酸薄荷酯/薄荷醇 DMF 溶液, 加入质量为 0.06 g 的聚合物, 加入上述溶液 10 mL, 分别测定了印迹聚合物 (MIPs) 和空白分子印迹聚合物 (NMIPs) 对底物乙酸薄荷酯和薄荷醇的结合量 S。

2 结果与讨论

2.1 单体以及反应溶剂对聚合物吸附特性的影响

2.1.1 单体与模板之间相互作用能的理论计算

通过 Chem 3D 软件模拟功能单体与模板分子复合物的构象, 选出最低能量构象。采用 PM3 半经验方法, 计算利用能量优化得到的功能单体、模板分子、功能单体/模板分子复合物的最稳定构象的能量^[7]。然后代入公式计算功能单体与模板分子之间的相互作用

$$\Delta E = E_{\text{complex}} - E_{\text{monomer}} - E_{\text{template}}。E_{\text{complex}}、E_{\text{monomer}}、$$

E_{template} 分别为复合物、功能单体和模板分子的生成热。

表 1 不同单体与模板之间的相互作用能

Table 1 Interaction energy between the monomer and template

| 功能 单体 | E_{complx} /(KJ/mol) | E_{monomer} /(KJ/mol) | E_{template} /(KJ/mol) | ΔE /(KJ/mol) |
|----------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| AM | -653.9 | -97.69 | -540.75 | -15.46 |
| MAA | -901.74 | -350.24 | -540.71 | -10.79 |

由公式计算出了乙酸薄荷酯与 AM、MAA 形成复合物的 ΔE 。一般来说，对于给定的模板分子，选择与模板分子形成高结合能(ΔE)的单体作为较优单体。从表中可以看出，相比于 MAA，用 AM 制备乙酸薄荷酯分子印迹聚合物有可能使制的聚合物有更高的亲和性与选择性。

2.1.2 不同单体以及反应溶剂制备的印迹聚合物对模板吸附的影响

以丙烯酰胺/甲基丙烯酸为单体，分别选择溶剂 DMF/甲醇/氯仿(重蒸)为反应溶剂制备分子印迹聚合物，按 1.2.3 制备洗脱液测定其洗脱液中乙酸薄荷酯的百分含量。薄荷素油中乙酸薄荷酯的含量为 6.71%。

表 2 洗脱液中乙酸薄荷酯的百分含量

Table 2 Menthyl acetate content of the eluate

| 乙酸薄荷酯含量/% | DMF | 甲醇 | 氯仿 |
|-----------|-------|------|-------|
| 丙烯酰胺 | 14.65 | 8.20 | 15.05 |
| 甲基丙烯酸 | 12.32 | 7.39 | 14.61 |

由表 2 可以看出，用不同单体反应制备的分子印迹聚合物对目标分子的选择性吸附有所不同，以丙烯酰胺为单体制备的聚合物的选择性吸附稍大于甲基丙烯酸为单体制备的分子印迹聚合物。这同上面的理论分析一致。由于甲基丙烯酸呈酸性，丙烯酰胺呈中性，丙烯酰胺与甲基丙烯酸比较而言，与乙酸薄荷酯形成复合物较稳定。而反应溶剂方面，以 DMF、氯仿为反应溶剂得到的聚合物的选择性明显高于以甲醇为反应溶剂的聚合物的选择性。原因可能是甲醇的 -OH 可能会干扰模板分子与单体之间形成非共价键-氢键，从而形成特异性结合位点较少。综合选择性的优劣和实验的可操作性，安全性，选择 DMF 为反应溶剂，丙烯酰胺为单体制备乙酸薄荷酯分子印迹聚合物。

薄荷素油以及选定条件下洗脱液色谱图见图 1 和图 2。

2.2 反应条件对聚合反应的影响

2.2.1 充氮气时间对聚合反应的影响

聚合反应为自由集聚合。引发剂偶氮二异丁氰分解形成的自由基通过对单体的攻击生长出链增长自由基。因为氧气能够捕获自由基，所以聚合之前除去氧气是必须的。实验中，通过氮气瓶向液体中通入氮气

吹扫而除去氧气。控制减压阀使氮气流量控制在浸入水中可以排出连续较剧烈气泡为准。充氮时间分别设为 5、8、10、13、15 min。测定生成分子印迹聚合物的质量。结果见图 3。

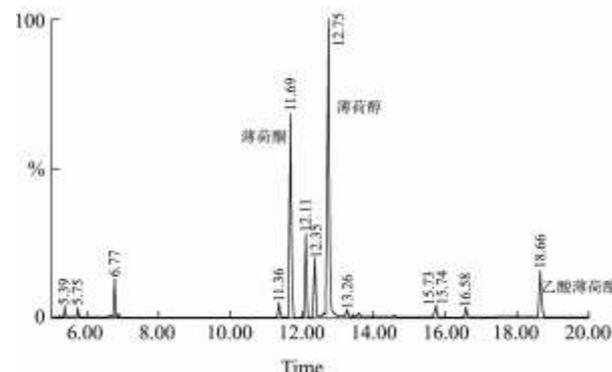


图 1 薄荷素油 GC-MS 色谱图

Fig.1 GC-MS spectrum of peppermint oil

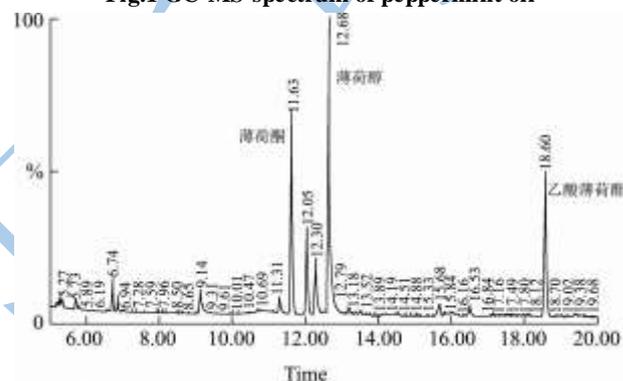


图 2 洗脱液色谱图

Fig.2 Elution chromatogram of the elute

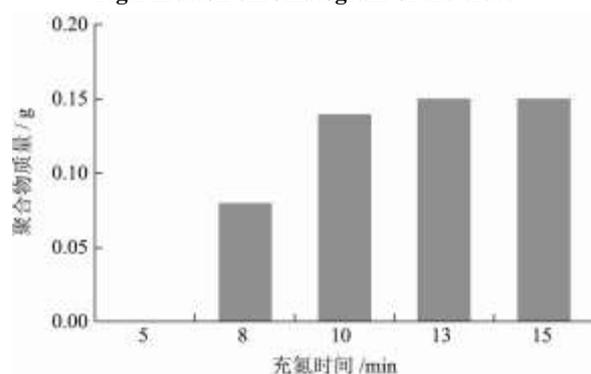


图 3 充氮时间对聚合物生成量的影响

Fig.3 Influence of the nitrogen time on the yield of polymers

由图 3 可以看出，随着充氮时间的延长，聚合物的生成量增加，时间超过 10 min，聚合物质量增加不明显。充氮时间短时，氧气排除不完全，阻碍聚合反应的进行；充氮时间过长，则造成氮气的浪费。因此确定充氮时间为 10 min。

2.2.2 引发剂添加量以及温度对聚合反应的影响

偶氮二异丁氰的浓度不同，会影响引发聚合的速

度,且 AIBN 浓度越大,聚合反应的速度越快。但是聚合速度过快会导致生成的聚合物发生粘连。本实验中采用引发剂的常用添加量即与模板分子等量。

本实验采用热引发聚合。AIBN 的引发温度为 40 °C~60 °C。反应温度与聚合物生成量的关系如图 4。

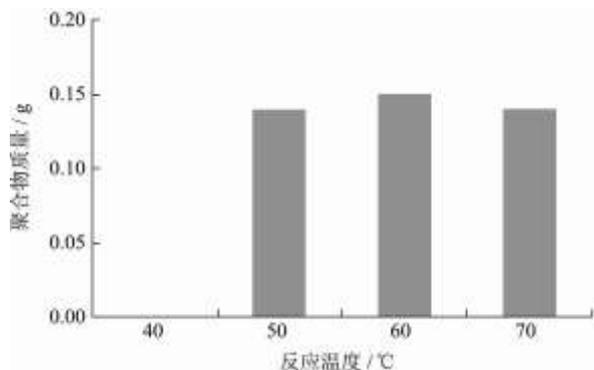


图 4 反应温度对聚合物生成量的影响

Fig.4 Influence of the reaction temperature on yield of the polymers

从图中可以得出,大于等于 50 °C 的反应温度都可以引发聚合反应的进行生成分子印迹聚合物。温度过低,聚合反应的速度较慢,聚合物的生成速度较慢,导致聚合物制备时间较长;温度过高,聚合反应的速度较快,但聚合速度过快,会导致生成的聚合物发生粘连。而且在某些情况下,聚合反应生成的非共价加成物,在高温下不稳定。因此,在保证聚合反应以一定速度进行的情况下,温度越低越好。反应温度取为 50 °C。

2.2.3 单体添加量对聚合物吸附量的影响

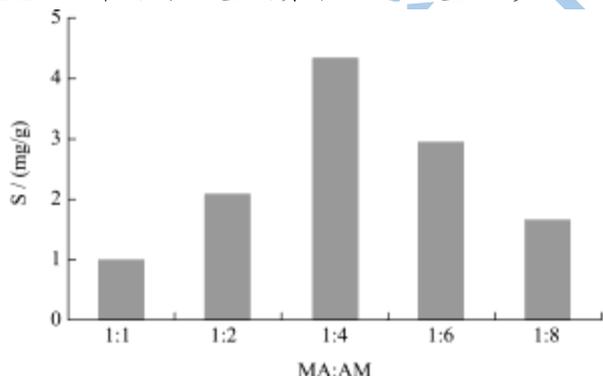


图 5 单体添加量对聚合物吸附量的影响

Fig.5 Influence of the ratio of MA and AM on the adsorption amounts of the polymers

在印迹聚合物的反应体系中,分别加入与模板分子乙酸薄荷酯摩尔比为 1:1、1:2、1:4、1:6 及 1:8 的单体丙烯酰胺,然后按照 1.2 的步骤制备分子印迹聚合物。测定聚合物对模板分子的吸附量 (S)。

分子印迹聚合物对模板分子识别的特异性来自于其中存在的特异功能基团,而这些功能基团是由功能

单体提供的。在一定范围内,增加功能单体的浓度,有利于得到识别性能较好的分子印迹聚合物。继续增加功能单体的浓度,会导致聚合物的团聚程度增加,聚合产物对模板分子的结合性能反而下降。从图中可以看出,随着单体添加量的增加,聚合物对模板的吸附结合量呈现先增大后减小的趋势。在 1:4 时出现最大值。

2.2.4 交联剂添加量对聚合物吸附量的影响

在印迹聚合物的反应体系中,改变交联剂的添加量,分别加入与模板分子乙酸薄荷酯及单体丙烯酰胺摩尔比为 1:4:8、1:4:12、1:4:16、1:4:20 的 EGDMA,然后按照 1.2 的步骤制备分子印迹聚合物。GC-MS 测定聚合物在吸附过程中对乙酸薄荷酯的吸附量 (S)。

体系中,交联剂的添加量十分重要。如果添加量太少,则结合位点彼此间将相距太近,以致它们不能独立工作;而且形成的聚合物交联度不够,在洗脱模板分子的过程之中难以保持其空间结构保留其结合位点。相反,添加量太大,交联度过大,模板分子难以洗脱,聚合物成为块状,影响印迹效率。

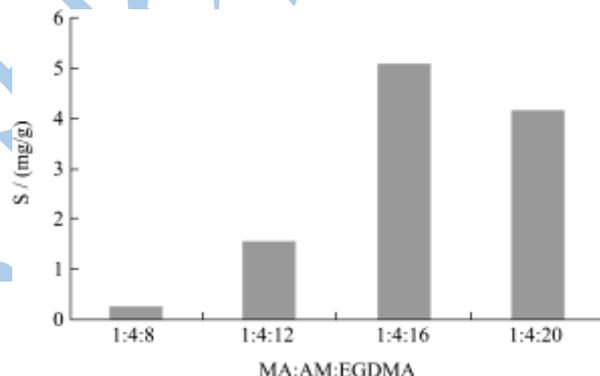


图 6 交联剂添加量对聚合物吸附量的影响

Fig.6 Influence of the EGDMA amount on the adsorption amounts of the polymers

由图 6 可以看出当乙酸薄荷酯、丙烯酰胺与二甲基丙烯酸乙二醇酯的添加比例为 1:4:16 时,聚合物对模板分子的结合效果较好,因此选择这一比例为制备时的添加比例。而在这一添加比例条件下制备出的分子印迹聚合物对模板分子的吸附量为 5.09 mg/g。

2.3 分子印迹聚合物的特异选择性

底物在聚合物和溶液之间的结合分配系数 K_D (mL/g)计算方法如下式:

$$K_D = C_p / C_s$$

注: C_p 为聚合物结合底物的浓度, mg/g; C_s 为平衡吸附液中底物的浓度, mg/mL。

两种底物的分离因子 α 可由下式计算:

$$\alpha = K_{D1} / K_{D2}$$

注: K_{D1} 为乙酸薄荷酯在分子印迹聚合物吸附后的分配系

数, mL/g; K_{D2} 为薄荷醇在分子印迹聚合物吸附后的分配系数, mL/g。

表3 不同底物在聚合物上的结合量

Table 3 Combined amounts of various substrates in the polymers

| 聚合物 | S/(mg/g) | |
|-------|----------|------|
| | 乙酸薄荷酯 | 薄荷醇 |
| MIPs | 5.09 | 3.53 |
| NMIPs | 2.29 | 2.16 |

由表3可知, MIPs对乙酸薄荷酯的结合量明显高于NMIPs对乙酸薄荷酯的结合量, 且高于MIPs对薄荷醇的结合量。根据聚合物对底物的结合量计算其分配系数, 再根据分配系数计算聚合物的分离因子, 结果见下表。

表4 不同底物在聚合物上的分配系数(KD)及分离因子(α)Table 4 Distribution coefficient (KD) and separation factor (α) of various substrates in the polymers

| 聚合物 | KD/(mL/g) | | α |
|-------|-----------|------|----------|
| | 乙酸薄荷酯 | 薄荷醇 | |
| MIPs | 8.09 | 5.53 | 1.46 |
| NMIPs | 3.54 | 3.34 | 1.06 |

注: 底物初始浓度: 0.66 g/L; V=10 mL; 聚合物质量: 0.06 g。

分子印迹聚合物对两底物的分离因子 α 为1.46, 印迹效率 β (聚合物的分离因子/空白聚合物的分离因子)为1.38, 表明该分子印迹聚合物对两底物具有良好的拆分能力。

3 结论

3.1 本文以乙酸薄荷酯为模板分子、丙烯酰胺为功能单体、DMF为反应溶剂通过沉淀聚合法制备了乙酸薄荷酯分子印迹聚合物, 其最佳工艺条件为: 充氮时间10 min, 反应温度50℃, 模板分子、单体及交联剂的添加比例为1:4:16。制备的乙酸薄荷酯分子印迹聚合物具备较高的结合性能, 通过对薄荷素油中的乙酸薄荷酯进行吸附洗脱, 提高了乙酸薄荷酯含量, 说明了制备的分子印迹聚合物对乙酸薄荷酯具有良好的选择分离性。

3.2 本文研究结果或为乙酸薄荷酯的分离纯化提供一种新思路新方法。

参考文献

[1] 谭天伟. 分子印迹技术及应用[M]. 北京: 化工出版社, 2010
 [2] 黄怡, 张青杰, 刘敏, 等. 分子印迹固相萃取-高效液相色谱法测定饲料中莱克多巴胺[J]. 色谱, 2012, 30(1): 56-61

[3] 胡江, 罗凯, 阚建全. 分子印迹固相萃取技术及其在食品分析中的应用[J]. 中国调味品, 2012, 37(6): 95-102
 [4] Georgios Theodoridis, Andreas Kantifes, Panagiotis Manesiotis, et al. Preparation of a molecularly imprinted polymer for the solid-phase extraction of scopolamine with hyoscyamine as a dummy template molecule [J]. Journal of Chromatography A, 2003, 987(1-2): 103-109
 [5] Mehran Javanbakht, Mohammad Hadi Namjumanesh, Behrouz Akbari-adegani. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of bromhexine in human serum and urine with high performance liquid chromatography [J]. Talanta, 2009, 80(1): 133-138
 [6] R Thoelen, R Vanswevelt, J Duchateau, et al. A MIP-based impedimetric sensor for the detection of low-Mw molecules [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2008, 23(6): 913-918
 [7] Yiguang Tan, Hui Peng, Chengdou Liang, et al. A new assay system for phenacetin using biomimic bulk acoustic wave sensor with a molecularly imprinted polymer coating [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2001, 73(2-3): 179-184
 [8] 赵晓娟, 陈海光. 分子印迹技术及其在食品分析检测中的应用[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(8): 166-169
 [9] 王超丽, 胡小玲, 管萍, 等. L-色氨酸分子印迹膜的表征、识别性能及识别机理[J]. 膜科学与技术, 2012, 32(2): 70-75
 [10] Qing Zhang, Xingyuan Zhang, Wencheng Zhang. Preparation and Adsorption Properties of PA6/PSMA-OA Molecularly Imprinted Composite Membranes in Supercritical CO₂ [J]. Bull. Korean Chem. Soc, 2011, 32(9): 3348-3354
 [11] Zhongyi Jiang, Yingxia Yu, Hong Wu. Preparation of CS/GPTMS hybrid molecularly imprinted membrane for efficient chiral resolution of phenylalanine isomers [J]. Journal of Membrane Science, 2006, 280(1-2): 876-882
 [12] 李景景, 郭玉蓉, 池霞蔚, 等. 分子印迹技术研究进展[J]. 2011, 12: 89-93
 [13] 丁养军. 乙酸薄荷酯的合成工艺研究[J]. 化学工程师, 1995, 49: 47-48
 [14] 伍怡邨, 阚健全. 1-薄荷醇的制备及检测方法研究进展[J]. 现代食品科技, 2005, 21(1): 144-146
 [15] 陈磊, 晏日安. 新型凉味剂薄荷酰胺(WS-3)[J]. 现代食品科技, 2006, 22(4): 269-270
 [16] 肖海鸿, 但东明, 肖友检. 合成乙酸薄荷酯的新方法[R]. 2004年中国香料香精学术研讨会.
 [17] 马娟娟, 王新龙, 许兴友. 不同功能单体制备的 S-萘普生印迹聚合物材料的性能[J]. 精细化工, 2007, 24(2): 133-135, 153

现代食品科技