

对羟基苯甲酸、水杨酸分子印迹聚合物分子识别性质的研究

张铁莉 刘 锋* 王 俊 李克安

(北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

摘要 以对羟基苯甲酸(4-HBA)为模板分子,4-乙烯吡啶(4-Vpy)为功能单体,制备得到了4-HBA分子印迹聚合物 P(4-HBA),研究了该聚合物的分子识别机理,并与在同样条件下制备的水杨酸(SA)分子印迹聚合物 P(SA)进行了分子识别能力的比较.结果表明:P(SA)比 P(4-HBA)具有更好的分子识别能力.这是由于 SA 的酸性较 4-HBA 强,因此与碱性功能单体 4-Vpy 之间的静电作用更强,从而得到的复合物更稳定.本实验结果证明:功能单体与模板分子形成稳定的复合物是得到分子识别能力高的模板聚合物的前提条件.本文将有助于对分子印迹的过程以及分子印迹聚合物分子识别机理的进一步理解,并且对于根据模板分子的性质预测 MIP 的分子识别能力也将具有一定的指导意义.

关键词 对羟基苯甲酸,水杨酸,分子识别,分子印迹聚合物

Study on the Molecular Recognition Properties of 4-Hydroxybenzoic Acid-Imprinted Polymer and Salicylic Acid-Imprinted Polymer

ZHANG Tie-Li LIU Feng* WANG Jun LI Ke-An

(College of Chemistry & Molecular Engineering, Peking University, Beijing, 100871)

Abstract A molecularly imprinted polymer (MIP) for 4-hydroxybenzoic acid [P(4-HBA)] was prepared using 4-vinylpyridine (4-Vpy) as a functional monomer. Its molecular recognition mechanism was studied. And a comparison was made to evaluate its molecular recognition ability with that of salicylic acid-imprinted polymer [P(SA)]. The result shows that the molecular recognition ability of P(SA) is higher than that of P(4-HBA). The reason is that SA is stronger than 4-HBA in acidity and SA can form a more stable complex with 4-Vpy, which makes P(SA) have a higher molecular recognition ability. This study confirms that it is a prerequisite that the template should form a stable complex with the functional monomer in the preparation of MIP in order to obtain a MIP with high molecular recognition ability. Furthermore, this study will be helpful for us to understand the mechanism of molecular imprinting and molecular recognition of MIPs. Also, it will be of instructive significance for us to predict the selectivity of MIPs according to the properties of templates.

Keywords 4-hydroxybenzoic acid, salicylic acid, molecular recognition, molecularly imprinted polymer

分子印迹聚合物(MIP)是具有分子识别能力的新型功能高分子材料^[1]. MIP 是在模板分子、功能单

体及大量交联剂存在下聚合得到的合成聚合物. 除掉模板分子后, 聚合物中就留下了一些大小、形状及

* E-mail: liufeng@chem.pku.edu.cn

收稿日期: 2001-06-28, 修回日期: 2001-08-17, 定稿日期: 2001-08-23

(Received June 28, 2001. Revised August 17, 2001. Accepted August 23, 2001.)

功能基排列与模板分子互补的孔穴,因此对模板分子具有特异选择性的结合能力.由于MIP具有优越的分子识别性能(对模板分子具有预定的选择性),加之其制备简单、经济、耐有机溶剂、耐酸碱、耐高温等优良性能,因此,近年来在亲和色谱固定相^[2,3]、固相萃取^[4,5]、传感器^[6,7]、模拟抗体^[8,9]、模拟酶催化^[10]等方面得到了广泛的应用.MIP的研究已引起了各国化学工作者的普遍关注.近几年,MIP的研究工作在我国也已逐渐展开,并已有一些研究论文发表^[7,11~15].尽管有关MIP的研究发展较快,但是MIP分子识别机理的研究还不够深入.为此本课题组曾制备了几种具有不同功能基团的药物分子的MIPs,研究了它们的分子识别机理^[16,17].为了研究模板分子的性质对MIP分子识别能力的影响,本文选择功能基相同但酸性不同的位置异构体对羟基苯甲酸(4-HBA)和水杨酸(SA)作为模板分子,以4-乙烯吡啶(4-Vpy)为功能单体,制备了相应的分子印迹聚合物P(4-HBA)和P(SA),研究了P(4-HBA)的分子识别机理,比较了模板分子4-HBA,SA的酸性对其MIP分子识别能力的影响.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

对羟基苯甲酸(4-HBA)和水杨酸(SA)(分析纯,北京化工厂),偶氮二异丁腈(AIBN,上海试剂厂),乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA,98%,北京百灵威化学技术有限公司),4-乙烯吡啶(4-Vpy,96%,Merck公司),4-Vpy和EGDMA使用前减压蒸馏除去阻聚剂.乙腈为色谱纯,其它试剂均为分析纯.

Waters ILC-1型高效液相色谱仪(美国Millipore公司),包括Waters 590泵,Waters 486紫外可见检测器,U6K进样阀(100 μ L).

Shimadzu UV-265紫外可见分光光度计(日本岛津),1 cm石英比色皿.

1.2 聚合物的合成

P(4-HBA)的合成.将1 mmol(138 mg)模板化合物4-HBA,6 mmol(0.64 mL)功能单体4-Vpy,30 mmol(5.70 mL)交联剂EGDMA和30 mg引发剂AIBN加入到试管中,用10 mL乙腈溶解,通 N_2 10 min,真空封管,60℃水浴中反应24 h.将所得聚合物破碎、研磨、过筛,用丙酮反复沉降聚合物颗粒,倾

泻法除去过细的粉末,得到粒径小于30 μ m的聚合物颗粒.60℃下真空干燥,放入保干器中备用.以SA为模板化合物,同上方法制备得到SA的分子印迹聚合物P(SA).空白聚合物BP的制备除不加模板化合物4-HBA外,其它步骤同上.

1.3 色谱法评价聚合物的分子识别性能

将聚合物用干法装填于150 mm \times 4.6 mm的色谱柱中,以V(HAc):V(CH₃OH)=2:8溶液为洗脱液,将聚合物中的模板分子以及未反应的单体、交联剂等从聚合物中洗出.空白聚合物的洗脱过程与MIP相同.然后改变流动相,以1.6 mL/min的流速测定模板分子及其结构类似物在色谱柱中的保留值.以丙酮测量死时间.在各组分的最大吸收波长处检测组分峰.组分浓度和进样量分别为0.1 mmol/L和100 μ L.容量因子 k' 按公式 $k' = (t_R - t_0)/t_R$ 计算,其中 t_R 为组分的保留时间, t_0 为死时间.分离因子 α 按公式 $\alpha = k'/k'_i$ 计算,其中 k' 和 k'_i 分别为模板分子和各种结构类似物的容量因子.

1.4 紫外分光光度法研究4-HBA,SA与功能单体4-Vpy的作用

取一系列10 mL比色管,加入1.0 mmol/L的4-Vpy溶液0.50 mL,然后加入不同量的4-HBA或SA的乙腈溶液,用乙腈稀释至刻度.用相应浓度的4-HBA或SA的乙腈溶液为参比,在190~350 nm波长范围内扫描得到相应的吸收光谱.

2 结果和讨论

2.1 P(4-HBA)的分子识别性质

选用不同HAc含量的乙腈溶液为色谱流动相,考察HAc含量对P(4-HBA)及BP对4-HBA及其结构类似物(图1)结合能力的影响(图2).由图2可知,在所实验的不同HAc含量的流动相中,4-HBA在P(4-HBA)上的容量因子 k' 均显著大于其在BP上的 k' 值,说明P(4-HBA)对4-HBA产生了分子印迹效应.随着流动相中HAc含量的增大,4-HBA及其结构类似物的容量因子均变小,P(4-HBA)的选择性下降.这是由于HAc作为一种酸性配体与4-HBA及其结构类似物竞争结合聚合物上的吡啶基团,故随着流动相中HAc含量的增大,4-HBA及各结构类似物的容量因子均减小.这说明静电作用在P(4-HBA)的分子识别过程中起了重要作用.

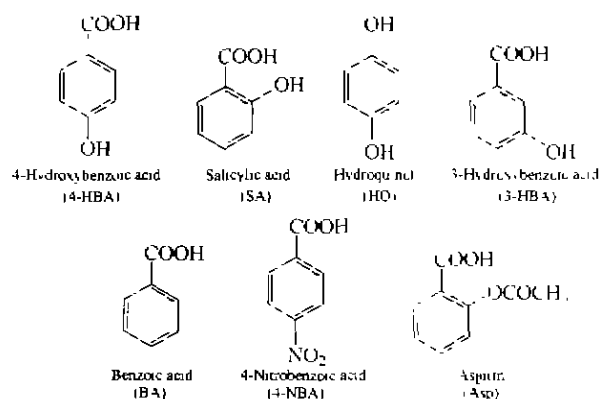


图1 4-HBA, SA 及其结构类似物的结构式

Fig.1 The structures of 4-HBA, SA and structurally related compounds

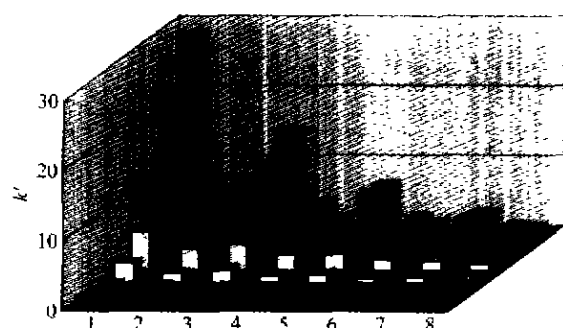


图2 乙腈中醋酸含量对4-HBA 及其结构类似物在 P(4-HBA) 及 BP 色谱柱上的容量因子的影响

P(4-HBA): 1,3,5,7; 1,3,5,7 对应的 HAc

体积分数: 1%, 2%, 4%, 8%

BP: 2,4,6,8; 2,4,6,8 对应的 HAc

体积分数: 1%, 2%, 4%, 8%

从后到前化合物依次是

4-HBA, SA, 3-HBA, 4-NBA, BA, Asp 和 HQ

Fig.2 Influence of HAc contents on the retention of compounds on P(4-HBA) and BP

P(4-HBA): 1,3,5,7; Volume fraction of

HAc corresponding to 1,3,5,7: 1%, 2%, 4%, 8%

BP: 2,4,6,8; Volume fraction of

HAc corresponding to 1,3,5,7: 1%, 2%, 4%, 8%

The compounds: 4-HBA, SA, 3-HBA, 4-NBA, BA,

Asp and HQ (from back to front)

在 BP 上, 各组分的保留主要是聚合物上随机分布的吡啶基团靠静电作用与组分的非特异性结合。酸性强、作用基团多的组分在 BP 上的保留值较大。如: 模板分子 4-HBA ($pK_{a1} = 4.58$) 在 BP 上的保留小于酸性比其强的 3-HBA ($pK_{a1} = 4.08$), 4-NBA ($pK_{a1} = 3.43$) 及 SA ($pK_{a1} = 2.97$) 的保留值。但对于 Asp ($pK_{a1} = 3.0$), 尽管其酸性较 BA ($pK_{a1} = 4.20$)

更强, 但其保留值比 BA 的小, 这是由于 Asp 的羧基邻位有乙酰基, 具有较大的空间位阻, 从而减弱了其于聚合物骨架上吡啶基团的作用, 因此其保留值较小。

在 P(4-HBA) 上, 由于 4-HBA 产生了分子印迹效应, 使得 P(4-HBA) 中存在与 4-HBA 的分子形状及功能基排列互补的孔穴即识别位点。组分在 P(4-HBA) 上的保留是基于其分子的形状以及功能基排列与识别位点相互匹配的程度。由于 P(4-HBA) 上的识别位点是对 4-HBA “量身定做” 的, 因此 4-HBA 在 P(4-HBA) 上的保留值最大。由 4-HBA 的保留值大于 3-HBA 和 4-NBA 等酸性比其强的结构类似物的保留值, 充分说明 P(4-HBA) 在对 4-HBA 的保留中, 4-HBA 作用基团的酸性及其分子形状同时发生了作用。在 P(4-HBA) 中确实存在对 4-HBA “量身定做” 的识别位点。由图 2 可知, 在所实验的 HAc 浓度范围内, 当 $\varphi(\text{HAc}) \geq 4\%$ 时, SA 在 P(4-HBA) 上的 k' 值比模板分子 4-HBA 在 P(4-HBA) 上的 k' 值还大, 这是由于 SA 的酸性较强, 它在 P(4-HBA) 上的非特异性结合也相应较强造成的。

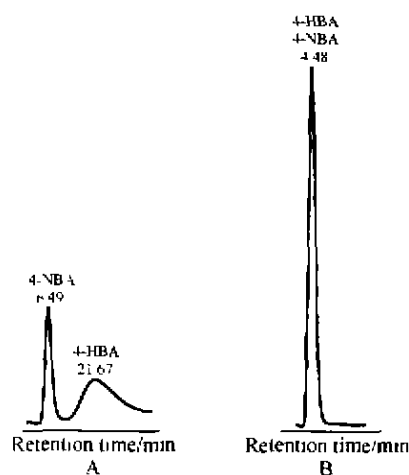


图3 4-HBA (0.20 mmol/L) 和 4-NBA (0.15 mmol/L)

在 P(4-HBA) 柱(A) 和 BP 柱(B) 上分离的色谱图

流动相: $V(\text{HAc}): V(\text{CH}_3\text{CN}) = 2:98$; 流速: 1.6 mL/min ;检测波长: 254 nm ; 进样体积: $100 \mu\text{L}$

Fig.3 Chromatograms of the mixture of

4-HBA (0.20 mmol/L) and 4-NBA (0.15 mmol/L)

on P(4-HBA) column (A) and BP column (B)

Mobile phase: $V(\text{HAc}): V(\text{CH}_3\text{CN}) = 2:98$; Flow rate: 1.6 mL/min ;Detection wavelength: 254 nm ; Sample volume: $100 \mu\text{L}$

图 3 是结构非常类似的 4-HBA 和酸性较强的 4-NBA 二组分混合物溶液在 P(4-HBA) 及 BP 色谱柱上分离的色谱图。在 BP 柱上(图 3, B), 只有一

个峰,显然二者不能分离.而在 P(4-HBA)柱上(图 3,A),4-HBA 和 4-NBA 达到了基线分离.这进一步说明由于 4-HBA 的分子印迹效应, P(4-HBA)中产生了识别位点,其孔穴中功能基团的排列方式对 4-HBA 的保留起了重要作用,使得 P(4-HBA)具有很好的分子识别能力.

2.2 P(4-HBA)与 P(SA)分子识别能力的比较

为了比较模板分子的酸性对 MIP 分子识别能

力的影响,我们以酸性比 4-HBA 强的 SA 为模板分子.在与制备 P(4-HBA)的同样条件下,聚合得到了 SA 的分子印迹聚合物 P(SA),对 P(4-HBA)和 P(SA)的分子识别能力进行了比较.用分离因子 α 表示 MIP 的分子识别能力.表 1 列出了 SA,4-HBA 及其结构类似物在 P(4-HBA)及 P(SA)色谱柱上的分离因子.

表 1 4-HBA,SA 及其结构类似物在 P(4-HBA)及 P(SA)色谱柱上的分离因子

Table 1 The separation factors of 4-HBA, SA and structurally related compounds on P(4-HBA) and P(SA)

化合物	4-HBA	SA	3-HBA	4-NBA	BA	Asp
P(4-HBA)上的分离因子 α	1.00	1.43	2.41	5.10	10.3	18.2
P(SA)上的分离因子 α	5.56	1.00	4.68	7.36	14.7	21.7

Mobile phase: V(HAc):V(CH₃CN) = 1:99

由表 1 可见,各种结构类似物在 P(SA)上的分离因子均大于其在 P(4-HBA)上的值,即 P(SA)比 P(4-HBA)具有更好的分子识别能力.这是由于 SA 的酸性($pK_a = 2.97$)比 4-HBA($pK_a = 4.58$)强,SA 与 4-Vpy 在聚合时通过静电作用形成了更稳定的复合物,从而 P(SA)具有更好的分子识别能力.另外,由 P(4-HBA)和 P(SA)分别对各自的模板分子具有选择性的识别能力,而 4-HBA 和 SA 的分子结构的差异只是苯环上—COOH 和—OH 的相对位置不同,充分说明在 P(4-HBA)和 P(SA)的分子识别过程中孔穴中功能基团的排列方式起了重要作用.

2.3 模板分子 4-HBA,SA 与功能单体 4-Vpy 的相互作用的研究

图 4 分别是 4-HBA 与 4-Vpy 及 SA 与 4-Vpy 作用的紫外光谱图.实验时固定功能单体 4-Vpy 的浓度,改变模板分子 4-HBA 或 SA 的浓度,即可得到 4-HBA 及 SA 与 4-Vpy 相互作用的 UV 谱.根据加入模板分子 4-HBA 或 SA 后 4-Vpy 本身的 UV 谱的变化情况即可比较 4-HBA 及 SA 与功能单体 4-Vpy 作用的强弱,从而研究 4-HBA 或 SA 与 4-Vpy 形成复合物的稳定性.由图 4 可知,4-Vpy 中加入 SA 后,4-Vpy 的 UV 谱的变化比 4-Vpy 中加入 4-HBA 后 UV 谱的变化显著,前者随 SA 的加入量增大,197 nm 的吸收峰强度迅速降低,当 $[SA]/[4-Vpy] \geq 4$ 时,此峰消失了,而后者在 $[4-HBA]/[4-Vpy] \geq 6$ 时,此峰才消失.这说明 SA 与 4-Vpy 的作用比 4-HBA 与 4-Vpy 的作用更强,即 SA 与 4-Vpy 形成了更稳定的复合物.这一结果与 SA 的酸性($pK_a = 2.97$)比 4-HBA($pK_a = 4.58$)强,因此 SA 与碱性功能单体 4-Vpy 之间的静电作用更强,

得到的复合物更稳定的推论是一致的.

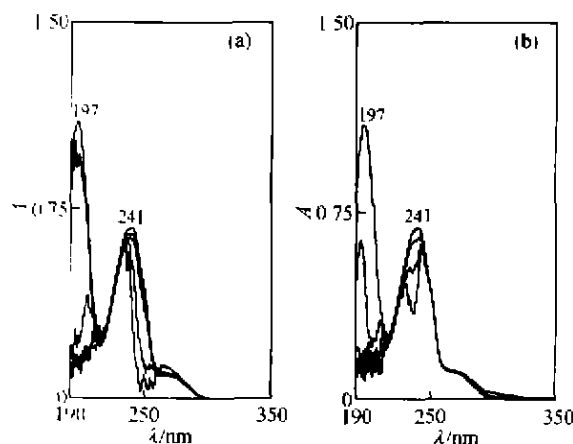


图 4 4-HBA,SA 与 4-Vpy 作用的紫外光谱图

$[4-Vpy] = 0.050 \text{ mmol/L}; [4-HBA]/[4-Vpy]$
或 $[SA]/[4-Vpy]: 0, 2, 4, 6, 8$ (自上至下)

Fig. 4 UV spectra of 4-HBA or SA with 4-Vpy systems in acetonitrile solution

$[4-Vpy] = 0.050 \text{ mmol/L}; [4-HBA]/[4-Vpy]$ or
 $[SA]/[4-Vpy]: 0, 2, 4, 6, 8$, from top to bottom, respectively
(a) 4-Vpy and 4-HBA system;
(b) 4-Vpy and SA system

3 结论

本文选择酸性不同的位置异构体 4-HBA 和 SA 分别作为模板分子,研究了模板分子的性质对其 MIP 分子识别能力的影响.当以碱性的 4-Vpy 为功能单体时,由于 SA 的酸性比 4-HBA 强,因此 SA 与 4-Vpy 能形成更稳定的复合物,其 MIP 具有更好的

分子识别能力.这一实验结果证实了功能单体与模板分子形成稳定的复合物是得到具有高识别能力的MIP的前提条件.另外,由酸性不同的位置异构体4-HBA及SA分别在各自的模板聚合物上有最大的保留值,有助于我们对MIP分子识别机理的理解.即MIP中存在与模板分子的功能基排列及分子形状互补的孔穴即识别位点,组分在MIP上的保留是基于其分子的形状及功能基排列与识别位点相互匹配的程度.本文实验结果对于根据模板分子的性质预测MIP的分子识别能力将有一定的指导意义.

本文为“庆祝邢其毅教授九十华诞暨执教六十年”征文

References

- 1 Bruggemann, O.; Haupt, K.; Ye, L.; Yilmaz, E.; Mosbach, K. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 889, 15.
- 2 Matsui, J.; Doblhoff-Dier, O.; Takeuchi, T. *Chem. Lett.*, **1995**, 489.
- 3 Fischer, L.; Müller, R.; Ekberg, B.; Mosbach, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 9358.
- 4 Mullett, W. M.; Lau, E. P. C. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 3636.
- 5 Mullett, W. M.; Dine, M. F.; Lau, E. P. C.; Guo, H. S.; He, X. W. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 414, 123.
- 6 Yano, K.; Karube, I. *Trends Anal. Chem.*, **1999**, 18, 199.
- 7 Fan, Y. G.; Nie, L. H.; Yao, S. Z. *Analyst*, **2001**, 126, 664.
- 8 Vlatkovic, G.; Andersson, L. I.; Müller, R.; Mosbach, K. *Nature*, **1993**, 361, 645.
- 9 Muldoon, M. T.; Stanker, L. H. *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43, 1424.
- 10 Byström, S. E.; Borje, A.; Åkermark, B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 2081.
- 11 Zhou, J.; Han, H. Y.; He, X. W.; Shi, H. M. *Chin. J. Anal. Chem.*, **1999**, 27, 5 (in Chinese).
- 12 Guo, H. S.; He, X. W.; Gan, Y.; Li, W. Y.; Lang, H. *Acta Chem. Sinica*, **2001**, 59, 262 (in Chinese).
- 13 Meng, Z. H.; Wang, J. F.; Zhou, L. M.; Wang, Q. H.; Zhu, D. Q. *Chin. J. Chromatogr.*, **1999**, 17, 323 (in Chinese).
- 14 Liu, Q.; Zhou, Y. X.; Men, Z. H.; Wang, Q. Q.; Hu, X. Y.; Liu, Y. T. *Chin. J. Anal. Chem.*, **2001**, 29, 387 (in Chinese).
- 15 Chen, W.; Liu, F.; Li, K. A.; Tong, S. Y. *Talanta*, **2001**, 55, 29.
- 16 Chen, W.; Liu, F.; Xu, Y. T.; Li, K. A.; Tong, S. Y. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 432, 277.
- 17 Chen, W.; Liu, F.; Li, K. A.; Yang, Y. H.; Tong, S. Y. *Anal. Lett.*, **2000**, 33, 809.

(Ed. PAN Bing - Feng)

(ZHENG Guo - Cheng)