

右旋邻氯扁桃酸分子印迹聚合物的制备及结合特性研究*

李 萍** 戎 非 朱馨乐 胡濬喆 袁春伟***

(东南大学生物医学工程系 吴健雄实验室 南京 210096)

摘 要 以右旋邻氯扁桃酸为模板分子合成了具有高选择性的分子印迹聚合物作为手性分离材料.紫外光谱研究说明在聚合开始之前模板分子与功能单体形成了配合物,并用 Hyperchem 软件模拟其分子结构,结合能分别为 $-1.6437 \times 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $-4.2799 \times 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$.分子印迹聚合物对模板分子的结合量高于其它类似物,手性分离因子 α 达 1.76.Scatchard 分析表明分子印迹聚合物在识别右旋邻氯扁桃酸分子过程中存在两类结合位点,与配合物模拟结构数目一致.

关键词 右旋邻氯扁桃酸,分子印迹聚合物,配合物模拟,Scatchard 分析

含有手性中心的药物,往往是一种立体异构体有药效,而它的对映体药效很低,甚至没有药效,或引起严重的毒副作用.美国食品和药物管理局(FDA)要求今后所有在美国上市的消旋体药物必须以对映体形式上市,这使得手性药物的拆分及检测技术得到很大发展.采用分子印迹技术合成仿生高分子材料,即分子印迹聚合物(类似于大孔吸附树脂的高分子吸附材料^[1]),应用于手性分子识别的研究^[2-6],正逐渐受到人们的重视.分子印迹聚合物是由模板分子(待测或待分离分子)、可聚合的功能单体、交联剂和引发剂聚合成固状材料后,洗脱除去模板分子而得.聚合物中模板分子留下的孔穴及孔穴上活性基团与模板分子的形状及官能团互补,对难以分离的手性异构体可进行较好的检测和分离.

右旋邻氯扁桃酸(*L*-2-chloromandelic acid, *L*-2-MDA)是一种手性药物中间体,作为手性源可以进一步合成多种光学活性的药物.本文合成了 *L*-2-MDA 分子印迹聚合物(Molecularly imprinted polymer, MIP),研究其对 *L*-2-MDA 的识别特性.分别分析了不同浓度的 *L*-2-MDA 对功能单体丙烯酰胺的紫外吸收的影响及不同的功能单体对 *L*-2-MDA 的紫外吸收的影响.模板分子与功能单体的配合物的分子结构用 Hyperchem 软件进行了模拟.检测了分子印迹聚合物对模板分子 *L*-2-MDA 及其对映异构体 *D*-2-MDA 的选择性结合能力,并计算了分离因子 α .分子印迹聚合物对 2-MDA 的衍生物,如对氯扁桃酸(4-chloromandelic acid, 4-

MDA)及扁桃酸(Mandelic acid, MDA)的识别能力也分别做了研究.用 Scatchard 分析法评价了 MIP 的结合等温线,并表征了聚合物的孔结构.

1 实验部分

1.1 试剂及仪器

右旋邻氯扁桃酸(*L*-2-MDA)、左旋邻氯扁桃酸(*D*-2-MDA)、右旋扁桃酸(*L*-MDA)、左旋扁桃酸(*D*-MDA)、右旋对氯扁桃酸(*L*-4-MDA)及左旋对氯扁桃酸(*D*-4-MDA)由江苏省张江新宇化工厂提供.交联剂二丙烯酸丁二酯(BDDA)及光引发剂 2,4,6-三甲苯基甲酰次磷酸乙酯(LR 8893X)由德国 BASF 公司提供.丙烯酰胺(AM)、甲基丙烯酸(MAA)、乙腈、甲醇及乙酸等试剂购自上海化工厂.

2201 型紫外可见分光光度仪(日本 Shimadzu 公司);THZ-82 型恒温振荡器(江苏太仓实验设备厂);100CX 液氮 N_2 吸附仪(美国 Omnisorp 公司);Hyperchem 7.0 软件(Hypercube, Inc.).

1.2 紫外分析

固定功能单体 AM 的浓度为 0.2 mmol/L,加入不同量的模板分子 *L*-2-MDA(浓度为 0 ~ 2.0 mmol/L),配成系列溶液,在恒温器中振荡 12 h 后,用相应浓度的 *L*-2-MDA 溶液作为参比液,扫描这系列溶液的紫外吸收变化.

观察 2.0 mmol/L AM 或 MAA 和 0.5 mmol/L *L*-2-MDA 的混合液的紫外吸收,分别以 2.0 mmol/L AM 或 MAA 为参比液.

* 2002-12-06 收稿,2003-03-06 修稿;高校博士学科点专项科研基金(基金号 20010286006)和江苏省自然科学基金(基金号 BK2001015)资助项目; ** 现在北京航空航天大学大学生物工程系,邮编 100083; *** 通讯联系人

1.3 分子结构模拟

用 Hyperchem 7.0 模拟模板分子和功能单体 AM 形成的配合物分子结构. 首先分别用 MM + 方法模拟 *L*-2-MDA 及 AM 的最低能量构象的分子结构, 然后经过系统能量优化得到配合物的分子结构.

1.4 聚合物的制备

取模板分子 *L*-2-MDA (0.746 g) 和功能单体 AM (1.137 g) 溶解于乙腈中, 再加入交联剂 BDDA (15.840 g) 和引发剂 LR 8893X (0.05 g), 通 N_2 10 min 后, 于 4℃, 紫外灯光照下进行自由基聚合 48 h, 得到白色固状聚合物. 研磨后取通过 75 μm 筛板的 MIP 颗粒, 用乙酸-甲醇 (8:2, V/V) 溶液洗至无模板分子, 最后用甲醇洗去残留乙酸, 真空干燥至恒重. 空白聚合物如上法所制备, 只是不加入模板分子.

1.5 结合实验

取聚合物 20.00 mg 放入 10 mL 锥形瓶中, 加入 2.0 mL 已知浓度的 *L*-2-MDA 或其它底物的乙腈溶液, 于室温下在恒温振荡器中振荡 24 h. 然后

将此混合物转入离心机中以 10,000 r/min 的转速离心 10 min. 用紫外分光光度计测定 *L*-2-MDA 或其它底物的平衡浓度. 根据结合前后溶液中浓度的变化计算聚合物对底物的结合量. 平行测定 3 次取平均值.

结合分配系数由下式计算: $K_D = c_p/c_s$, 其中 c_p ($\mu mol/g$) 表示聚合物结合底物的浓度; c_s ($\mu mol/mL$) 表示溶液中底物的平衡浓度. 分离因子 α 定义为两种不同底物的结合分配系数之比.

2 结果和讨论

2.1 紫外分析结果

如图 1(a) 所示, 随着 *L*-2-MDA 浓度的增加, AM 的最大紫外吸收波长出现红移, 而且波峰强度在不断降低, 这说明在模板和单体之间形成了配合物. 根据模板分子和功能单体的结构, 两者之间的作用力可能是氢键. 功能单体也同样会影响模板分子的紫外吸收. 由图 1(b) 可知, AM 对 *L*-2-MDA 的紫外吸收光谱的影响要比 MAA 产生的影响要大, 说明 AM 可能与模板分子形成更强的作用力.

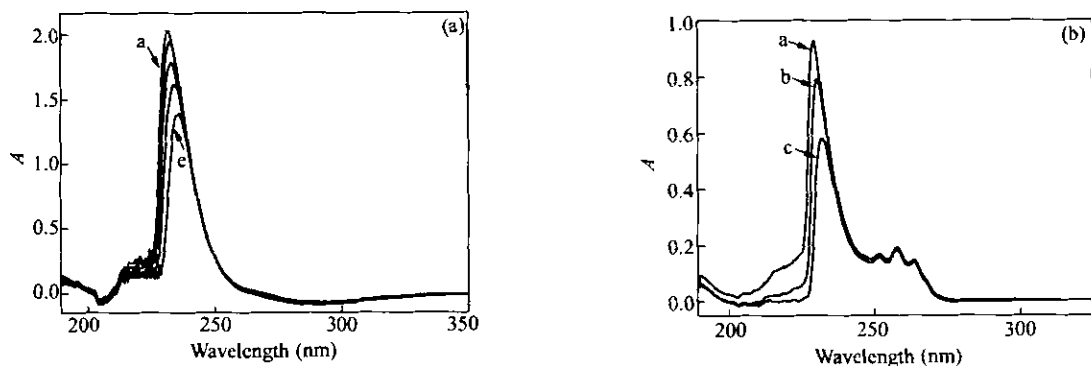


Fig. 1 (a) Influence of different concentrations of *L*-2-MDA on UV absorption of acrylamide in acetonitrile:

c (AM): 2.0 mmol/L; c (*L*-2-MDA) (mmol/L): a) 0; b) 0.25; c) 0.5; d) 1.0; e) 2.0

(b) Influence of different monomers on UV absorption of *L*-2-MDA:

c (*L*-2-MDA): 0.5 mmol/L; a) 0; b) (MAA): 2.0 mmol/L; c) (AM): 2.0 mmol/L

2.2 Hyperchem 模拟

因为现代计算方法还难以模拟高度交联的 MIP 的结构, 目前主要着重于 MIP 制备的第一步, 即模拟模板分子和功能单体分子形成较强的配合物. *L*-2-MDA 与 AM 形成的配合物的可能结构用 Hyperchem 软件模拟, 如图 2 所示. 图中较大的分子为 *L*-2-MDA, 旁边的小分子为 AM. *L*-2-MDA 与 AM 的组装模型一为一分子 AM 与一分子 *L*-2-MDA 的羧基形成两个氢键; 模型二为两分子 AM 与一分子 *L*-2-MDA 结合, 除了两分子间的羧基形

成氢键外, AM 与 *L*-2-MDA 的羟基之间也形成氢键. 这两种配合物都有可能出现在高分子母体中, 经过模板洗脱后, 能形成两种识别模板分子 *L*-2-MDA 的印迹空穴. 这与下面的 Scatchard 分析结果是一致的. 一分子 AM 与一分子 *L*-2-MDA 的结合能计算为 $-1.6437 \times 10^4 J \cdot mol^{-1}$, 而两分子 AM 与一分子 *L*-2-MDA 的结合能计算得到 $-4.2799 \times 10^4 J \cdot mol^{-1}$. 前者将形成低亲和力的结合位点, 而后者将形成高亲和力的结合位点.

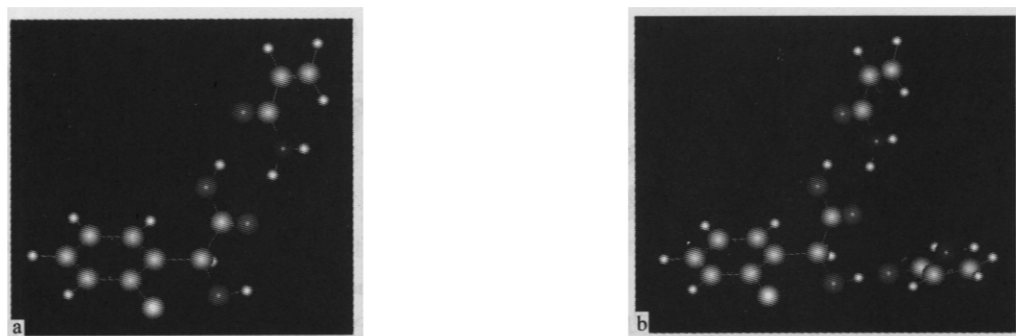


Fig. 2 Molecular models of (a) one *L*-2-MDA interacting with one AM, (b) one *L*-2-MDA interacting with two AM

2.3 MIP 的结合特性研究

测定了 *L*-2-MDA MIP 的结合等温线, 其中 *L*-2-MDA 的浓度从 0 变化到 5.0 mmol/L, 如图 3 中曲线(a). MIP 对 *D*-2-MDA 及空白聚合物对 *L*-2-MDA 的结合等温线分别见图 3 中曲线(b)和(c). 比较曲线(a)与(c)可知, MIP 对模板分子的结合量要明显高于空白聚合物. 这说明印迹过程中, 模板分子在 MIP 中留下的印迹空穴及空穴上的活性结合位点决定了 MIP 对模板分子的高度亲和力 and 特异识别性.

在底物浓度为 2.0 mmol/L 时, 测定了结合分配系数 K_D , 见表 1. MIP 对 *L*-2-MDA 的 K_D 为 31.58 mL/g, 明显高于空白聚合物对 *L*-2-MDA 的 K_D .

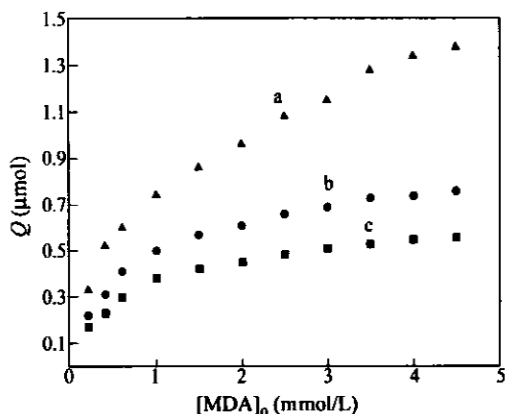


Fig. 3 Binding isotherms of (a) *L*-2-MDA to imprinted polymer, (b) *D*-2-MDA to imprinted polymer, (c) *L*-2-MDA to blank polymer

Table 1 K_D (mL/g) of tested substrates and the relevant separation factors α for MIP and blank polymer

Polymer	K_D		α	K_D		α	K_D		α
	<i>L</i> -2-MDA	<i>D</i> -2-MDA		<i>L</i> -MDA	<i>D</i> -MDA		<i>L</i> -4-MDA	<i>D</i> -4-MDA	
MIP	31.58	17.99	1.76	15.37	12.92	1.19	10.35	9.57	1.08
Blank polymer	12.66	11.96	1.06	12.36	11.53	1.07	9.47	9.88	0.96

Polymer: 20.0 mg; c (Initial substrate) = 2.0 mol/L; V = 2.00 mL; Adsorption time: 24 h

曲线(a)和(b)表明 *D*-2-MDA 在 MIP 上的结合量要比 *L*-2-MDA 低, 这是因为 *D*-2-MDA 的分子结构不能与 MIP 中的印迹空穴的形状吻合, 并同 *L*-2-MDA 一样和空穴上的结合位点形成较强的作用力. 由表 1 可知, MIP 对 *D*-2-MDA 的 K_D 值为 17.99 mL/g, 手性分离因子 α 为 1.76, 表明 MIP 对模板分子及其对映异构体有较好的选择性.

MDA 及 4-MDA 的分子结构也难以与 MIP 的空穴匹配, 其 K_D 值均低于 MIP 对 2-MDA 的 K_D 值, 说明分子与 MIP 空穴结构相吻合是高识别的必要因素之一.

2.4 Scatchard 分析

MIP 对 *L*-2-MDA 的结合等温线可用 Scatchard

法分析^[7], 其等式如下: $Q/[L-2-MDA] = (Q_{\max} - Q)/K_d$, 其中 Q 是 MIP 对 *L*-2-MDA 的吸附量, $[L-2-MDA]$ 是溶液中 *L*-2-MDA 的浓度, $Q_{\max}$ 是表观最大结合位点数, K_d 是结合位点的平衡离解常数. 以 $Q/[L-2-MDA]$ 对 Q 作图得到图 4. Scatchard 曲线是非线性的, 表明 MIP 对 *L*-2-MDA 的结合位点是各向异性的. 图中的点分布在两个部分, 并分别具有明显的线性关系. 这表明 MIP 中可能存在两种结合位点^[8].

图 4 中左边的实验点的回归直线方程是 $y = -27.85x + 18.56$, 其回归常数 r 为 0.9975. 由回归模型的斜率和截距, 计算 $K_{d,1}$ 和 $Q_{\max,1}$ 分别为 35.8 $\mu\text{mol/L}$ 和 33.19 $\mu\text{mol/g}$. 右边实验点的回归直

线方程是 $y = -0.7177x + 1.35$, 其回归常数 r 为 0.9707. $K_{d,2}$ 和 $Q_{\max,2}$ 分别为 1.39 mmol/L 和 93.76 $\mu\text{mol/g}$.

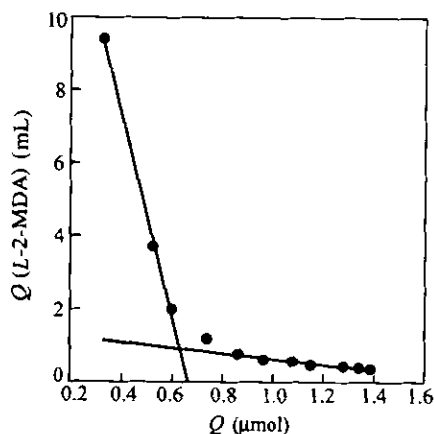


Fig. 4 Scatchard plots of *L*-2-DA binding to imprinted polymer

MIP 中存在两种结合位点主要是由于模板分子和单体在聚合过程之前可形成两种配合物

(如前所示), 在聚合过程中被固定下来, 并随后因洗脱而在 MIP 中形成两种结合位点.

2.5 MIP 孔结构的表征

用液氮吸附仪多点 BET 法测得 MIP 的总孔体积为 0.1006 cm^3/g , 比表面积为 116.36 m^2/g , 均高于空白聚合物的总孔体积 0.00506 cm^3/g 及比表面积 0.5564 m^2/g . 可以看出 MIP 为多孔材料, 而空白聚合物中孔结构相比要少得多. 正是这种孔结构上的差异, 造成 MIP 对模板分子的良好选择性, 而这孔结构是由于聚合过程中模板分子的存在而形成的.

通过紫外研究了模板与单体之间的作用力, 利用 Hyperchem 模拟了两者形成的配合物的分子结构. 在 MIP 中留下的两种结合位点, 由 Scatchard 分析得到证实. 由于有特异识别性的结合位点, MIP 对 *L*-2-MDA 具有较高的识别能力. MIP 颗粒有望作为高效液相色谱柱材料, 用于拆分 2-MDA 的外消旋混合物.

REFERENCES

- 1 Chen Tianhong(陈天红), Zhang Yang(张杨), He Bingling(何炳林). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 1999, (4): 398 ~ 403
- 2 Kempe M, Mosbach K. J Chromatogr A, 1995, 694: 3 ~ 13
- 3 Wistuba D, Schurig V. J Chromatogr A, 2000, 875(1-2): 255 ~ 276
- 4 Sellergren B. J Chromatogr A, 2001, 906(1-2): 227 ~ 252
- 5 Dzgoev A, Haupt K. Chirality, 1999, 11(5-6): 465 ~ 469
- 6 Haginaka J, Takekura H, Hosoya K, Tanaka N. J Chromatogr A, 1999, 849(2): 331 ~ 339
- 7 Matsui J, Miyoshi Y, Doblhoff-Diero, Takuchi T. Anal Chem, 1995, 67: 4404 ~ 4408
- 8 Heny A F. Anal Biochem, 1972, 48: 317 ~ 322

STUDIES ON THE PREPARATION OF *L*-2-CHLOROMANDELIC ACID-IMPRINTED POLYMER AND ITS SELECTIVE BINDING CHARACTERISTICS

Li Ping, RONG Fei, ZHU Xinle, HU Junzhe, YUAN Chunwei

(Department of Biomedical Engineering, Chien-Shiung Wu Lab., Southeast University, Nanjing 210096)

Abstract A molecularly imprinted polymer (MIP) was synthesized from the photoinduced polymerization of acrylamide and butylene diacrylate in the presence of *L*-2-chloromandelic acid (*L*-2-MDA) as template and was used as a highly selective separation materials for *L*-2-MDA. UV analysis showed the template *L*-2-MDA and functional monomer acrylamide formed complexes before polymerization. The structures of complexes were simulated by using Hyperchem and the binding energies were calculated as $-1.6437 \times 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $-4.2799 \times 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$. The binding capacity of MIP to *L*-2-MDA was higher than that of other analogs and the chiral separation factor α was 1.76. Scatchard analysis suggested that the MIP recognized *L*-2-MDA with two classes of binding sites, which is accordant with the two kinds of complex simulation models.

Key words *L*-2-chloromandelic acid, Molecularly imprinted polymer, Complexes simulation, Scatchard analysis