

基于金属卟啉的分子印迹聚合物的合成及其 对三唑类杀菌剂识别性能研究*

曾庆斌¹ 吴 健^{1**} 徐志康²

(浙江大学 ¹ 化学系 ² 高分子科学与工程学系 杭州 310027)

摘 要 以三唑类杀菌剂氟环唑为印迹分子, 5-(4-甲基丙烯酰氧苯基)-10, 15, 20-三苯基卟啉锌为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 合成了新型的基于金属卟啉的分子印迹聚合物. 紫外-可见光谱研究表明印迹分子与功能单体在聚合前形成 1:1 配合物. 通过选择性吸附和固相萃取表征研究了该印迹聚合物对氟环唑及具有类似化学结构的三唑类杀菌剂的识别能力, 并与非印迹聚合物进行了比较, 结果表明印迹聚合物具有良好的特异性识别性能, 同时, 印迹聚合物的交联度及吸附溶剂的极性对印迹效果有着显著影响.

关键词 分子印迹聚合物, 金属卟啉, 三唑杀菌剂, 分子识别, 选择性吸附

分子印迹聚合物是一类对特定目标化合物(印迹分子)具有特异识别位点和空间匹配结构的功能高分子材料^[1]. 其基本合成方法是通过功能单体与印迹分子的预组装, 经交联聚合后去除印迹分子, 从而在分子骨架上形成具有“记忆”功能的分子识别中心. 自 20 世纪七、八十年代 Wulff^[1]、Mosbach^[2]等的开创性工作以来, 分子印迹聚合物由于其独特的预定性、识别性和实用性而倍受关注, 并在分离纯化^[3,4]、传感器^[5]以及模拟酶催化^[6]等方面显示出广泛的应用前景. 功能单体与印迹分子的相互作用是分子印迹聚合物的合成及其识别性能的重要基础. 虽然氢键、金属配位、静电吸引等作用都可应用于分子印迹体系的设计和合成, 但目前功能单体主要局限于含羧基或吡啶基等易形成氢键的烯类单体.

金属卟啉是一类具有平面大 π 共轭骨架的化合物, 其中心金属离子与有机碱尤其是咪唑、嘌呤等含氮杂环可形成稳定的轴向配位, 同时其特征的吸收光谱可灵敏地感应这种相互作用, 从而作为人工受体广泛应用于分子识别体系, 但基于金属卟啉的分子印迹聚合物的研究却非常有限, 仅有几例以 9-乙基嘌呤^[7]、组胺^[8]等为印迹分子的报道.

本文在作者前期卟啉合成和功能化工作^[9,10]基础上, 结合农药残留检测相关的富集、分离等应用基础研究, 将金属卟啉引入广谱高效三唑类杀菌剂分子印迹体系. 合成了锌卟啉功能单体 5-(4-

甲基丙烯酰氧苯基)-10, 15, 20-三苯基卟啉锌(ZnMOTPP, 图 1), 通过紫外-可见光谱滴定法研究了它与 5 种常用三唑类杀菌剂氟环唑(epoxiconazole, ECZ)、己唑醇(hexaconazole, H CZ)、戊唑醇(tebuconazole, TCZ)、苯醚甲环唑(fenoxiconazole, FCZ)、三唑酮(triadimefon, TDF)的结合情况, 并以氟环唑(ECZ)为印迹分子, 制备了相应的分子印迹聚合物, 通过选择性吸附和固相萃取的测定, 考察了分子印迹聚合物对三唑类杀菌剂的分子识别性能, 并研究了聚合物的交联度, 聚合溶剂, 吸附溶剂的极性对印迹效果的影响.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

按照文献^[9]制备 5-(4-羟基苯基)-10, 15, 20-三苯基卟啉. 在 250 mL 烧瓶中加入 5-(4-羟基苯基)-10, 15, 20-三苯基卟啉(1.000 g, 1.59 mmol)、二氯甲烷 150 mL, 三乙胺(948 mg, 9.1 mmol), 缓慢加入甲基丙烯酰氯(864 mg, 8.3 mmol), 室温反应 0.5 h, 水洗多次至有机相中性, 分液, 取有机相, 旋转蒸除溶剂, 再真空干燥得到紫黑色固体. 将粗产品经硅胶柱以三氯甲烷/甲醇(3/1, V/V)为展开剂分离提纯, 得到 5-(4-甲基丙烯酰氧苯基)-10, 15, 20-三苯基卟啉(MOTPP)994 mg, 收率为 89%. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8.86 (m, 8H, 吡咯环 β -H), 8.20 (m, 8H, 苯环邻位), 7.75 (m, 9H, 苯环间/对位), 7.53 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, 甲基丙烯酰

* 庆祝杨士林先生 90 华诞专稿; 2009-03-09 收稿, 2009-03-31 修稿; 国家自然科学基金(基金号 50473038)资助项目; ** 通讯联系人,

E-mail: jianwu@zju.edu.cn

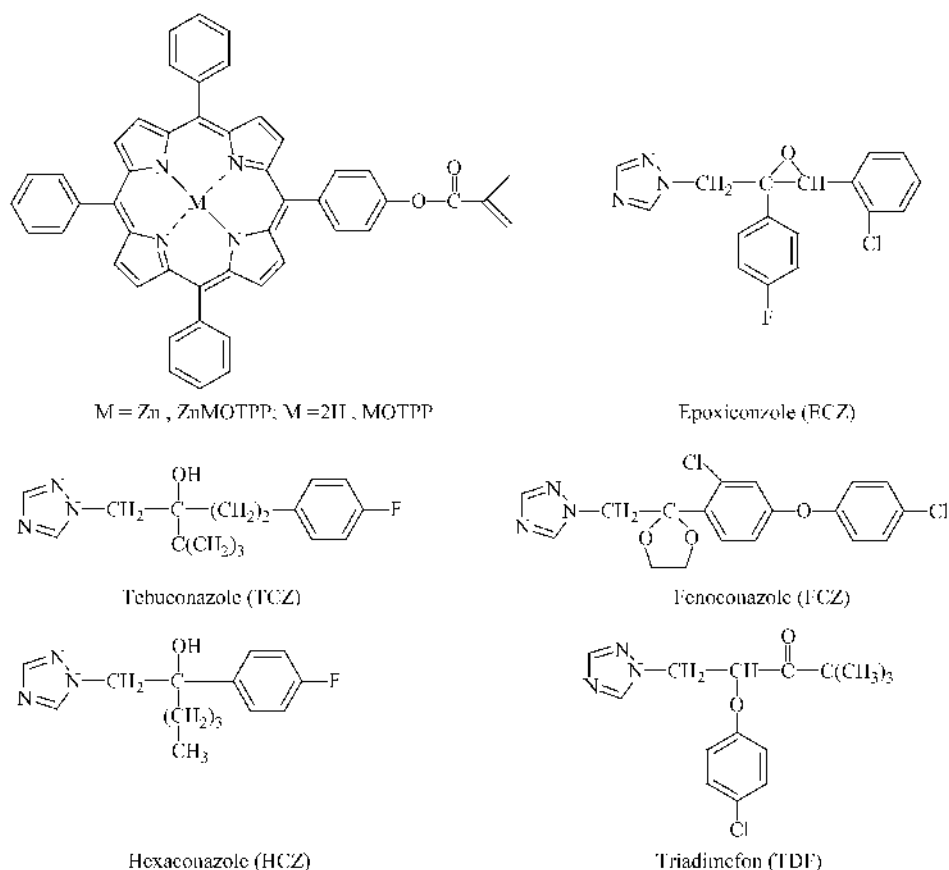


Fig. 1 Structures of zincporphyrin monomer ZnMOTPP and the triazole fungicides

氧基取代苯环间位), 6.54 (s, 1H, 末端烯基), 5.88 (s, 1H, 末端烯基), 2.21 (s, 3H, 甲基), -2.77 (s, 2H, 吡咯环 NH).

将上述制备的 MOTPP (500 mg, 0.72 mmol) 溶于 500 mL 氯仿和甲醇的混合溶剂中 (氯仿: 甲醇 = 3:1), 加热至回流, 加入 $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (787 mg, 3.6 mmol), 保持回流 0.5 h, 停止加热, 自然冷却, 反应液用水洗多次, 取有机相旋转蒸除溶剂, 再真空干燥得到紫红色固体. 将粗产品经硅胶柱以三氯甲烷/甲醇 (5/1, V/V) 为展开剂分离提纯, 得到 5-(4-甲基丙烯酰氧苯基)-10, 15, 20-三苯基卟啉锌 (ZnMOTPP) 520 mg, 产率 95%. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ): 8.80 (m, 8H, 吡咯环 β -H), 8.20 (m, 8H, 苯环邻位), 7.80 (m, 9H, 苯环间/对位), 7.60 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, 甲基丙烯酰氧基取代苯环间位), 6.50 (s, 1H, 末端烯基), 6.05 (s, 1H, 末端烯基), 2.17 (s, 3H, 甲基).

三唑类杀菌剂 (Fluka 公司). 乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EDGMA, Acros 公司), 用前经减压蒸馏去除阻聚剂. 偶氮二异丁腈为分析纯, 用前经乙醇重

结晶. 氯仿为分析纯, 用前经 P_2O_5 回流处理. 水为超纯水, 其它试剂均为分析纯或色谱纯.

Bruker DMX500 NMR 核磁共振仪; Agilent 1100 液相色谱仪, Waters XTerra RP18 色谱柱, 甲醇/水 (7/3) 为流动相, 流速 0.8 mL/min, 225 nm 紫外检测.

1.2 紫外可见滴定光谱的测定和结合常数的计算

氯仿为溶剂, 固定功能单体 ZnMOTPP 的浓度 (2.5 $\mu\text{mol/L}$), 加入不同量的三唑化合物 ECZ (浓度为 0 ~ 7.5 mmol/L), 配制成系列溶液. 在恒温器中于 25 $^\circ\text{C}$ 放置 12 h 后测定这一系列溶液的紫外可见光谱. 依据如下方程计算两者的结合常数^[11].

$$\frac{\Delta A}{[L]} = -K_b \Delta A + K_b \Delta \epsilon l c$$

其中 ΔA 为各配合物溶液相对于纯 ZnMOTPP 溶液在最大吸收波长处的吸光度变化, $[L]$ 为各溶液中 ECZ 的浓度, K_b 为结合常数, $\Delta \epsilon$ 为配合物与 ZnMOTPP 的摩尔消光系数差, l 为比色皿长度, c 为 ZnMOTPP 的起始浓度. 根据此方程我们可以得

出功能单体 ZnMOTPP 与三唑化合物 ECZ 的结合常数.用同样的方法可测出 ZnMOTPP 与其它三唑杀菌剂的结合常数.

1.3 聚合物的制备

将 ZnMOTPP, AIBN, ECZ, EDGMA 加入 Shlenk 管中,密封,超声波处理 10 min,抽真空,充氮气,重复 3 次,充分排走氧气.再注入经 P₂O₅ 回流处理的氯仿,于 50℃水浴振荡,反应 24 h,得到紫色聚合物.聚合物磨碎并通过 200 目筛.用氯仿索氏提取 12 h,再用甲醇/乙酸(7/3, V/V)索氏提取 4 h,充分洗去印迹分子 ECZ 及未聚合的单体,得到分子印迹聚合物 PP(ECZ).非印迹聚合物 PP(B)按同样的方法制备,只是不加印迹分子 ECZ,如表 1 所示.以未插入中心金属离子的卟啉 MOTPP 为单体的印迹聚合物 PPI(ECZ)按同样的方法制备,只是将单体由 ZnMOTPP 换成 MOTPP.

Table 1 Preparation of imprinted and nonimprinted polymers			
Polymer	ZnMOTPP (mg)	ECZ (mg)	EDGMA (mg)
PP(ECZ)	760	344	3564
PP(B)	760	0	3564
PPI(ECZ)*	705*	334	3564

* MOTPP was used as the monomer

1.4 选择性吸附

取 20 mg 印迹聚合物 PP(ECZ),加入 HCZ、TCZ、TDF、ECZ、FCZ 的二氯甲烷混合溶液 4 mL,各三唑类化合物的浓度均为 20 μmol/L,20℃振荡吸附 4 h,然后经微孔膜过滤,取清液用 HPLC 测定,对比吸附前后各三唑化合物的含量,计算出 PP(ECZ)对各三唑类化合物的吸附率.用同样的方法测定其它聚合物对三唑类化合物的选择性吸附.

1.5 固相萃取

取 PP(ECZ)1200 mg,装入 6 mL 固相萃取管中,经少量氯仿润洗. HCZ、TCZ、TDF、ECZ、FCZ 各 50 μg 溶于 250 mL 氯仿中,该混合液匀速通过萃取管(约 1 mL/min),测定此阶段 PP(ECZ)对各三唑化合物的吸附量.然后用 20 mL 氯仿淋洗,测定此阶段各三唑化合物的洗出量.最后用 30 mL 甲醇洗脱,测定此阶段各三唑化合物的洗脱量.三唑类化合物的含量用 HPLC 测定.

2 结果与讨论

2.1 ZnMOTPP 与三唑化合物的相互作用

功能单体 ZnMOTPP 与三唑化合物 ECZ 的紫

外可见滴定光谱如图 2 所示. ZnMOTPP 在 419 nm 处有最大吸光度,随着 ECZ 浓度的不断增加,配合溶液在 419 nm 处吸光度逐渐降低,427 nm 处吸光度不断增强,最终最大吸收波长发生红移约 8 nm,并出现等吸光点. 将各配合溶液相对于纯 ZnMOTPP 溶液在 419 nm 处的吸光度变化记为 ΔA,各配合溶液中 ECZ 浓度记为[L],当 ECZ 的加入量远大于 ZnMOTPP 时(图 2, e ~ i),其浓度 [L]可视为等同于初始浓度,计算结果显示 ΔA 与 ΔA/[L]呈线性关系,如图 2 所示,表明 ZnMOTPP 与 ECZ 形成了 1:1 的配合物,并且从直线的斜率可以得到它们之间的结合常数^[11].

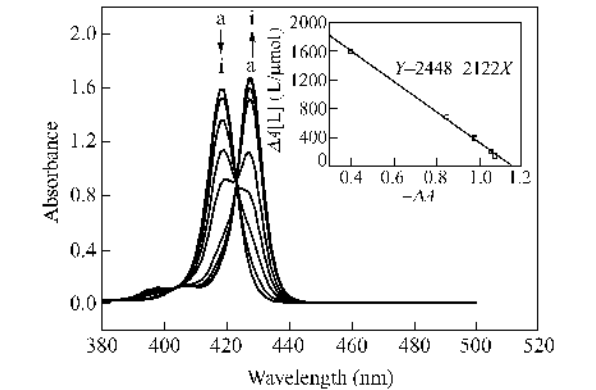


Fig. 2 UV-Visible titration spectra of ZnMOTPP (2.5 μmol/L) with ECZ in chloroform
Concentration of ECZ: a) 0, b) 12.5, c) 50, d) 125, e) 250, f) 1250, g) 2500, h) 5000, i) 7500 μmol/L; The insert shows the relationship between the change of absorbance at 419 nm (ΔA) and the concentration of ECZ ([L]).

类似变化也出现在 ZnMOTPP 与其它 4 种三唑类杀菌剂的滴定光谱中. 根据上述紫外可见滴定光谱的测定,计算得到了 ZnMOTPP 与各三唑化合物的结合常数如表 2 所示. 结果显示 ZnMOTPP 与 FCZ 的结合作用最大,而与 TDF 的结合作用最小. 当采用不含锌原子的卟啉 MOTPP 与三唑化合物混合时,紫外-可见光谱没有显著变化,因此可以推断结合作用源于锌离子与三唑环上氮原子的配位作用.

Table 2 Binding constant of ZnMOTPP between fungicides	
Fungicide	K _b (mol ⁻¹)
ECZ	2122
FCZ	4505
HCZ	1741
TCZ	1380
TDF	412

2.2 金属卟啉分子印迹聚合物的选择性吸附

分别以 ZnMOTPP、ECZ 为功能单体和印迹分子,合成了印迹聚合物 PP(ECZ),为作对比,还合成了相应的非印迹聚合物 PP(B)和以 MOTPP 为单体的类似分子印迹聚合物 PPf(ECZ),分别考察了它们对 ECZ 和其他 4 个三唑化合物的选择性吸附性能,结果如图 3 所示.

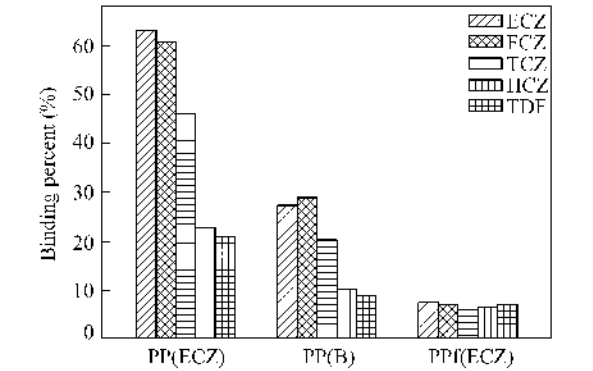


Fig. 3 Binding percent of fungicides on polymers

由图可见,印迹聚合物 PP(ECZ)对任一三唑化合物的吸附率远高于其余两个聚合物 PP(B)及 PPf(ECZ)的相应值.这一结果表明在 PP(ECZ)中形成了印迹空穴,印迹空穴不仅具有锌卟啉与三唑环的配位结合位点,而且与三唑化合物在空间结构上存在不同程度的匹配.对于 PP(B),因为聚合过程中没有印迹分子的参与,因此聚合物中未留下印迹空穴.在 PP(B)与三唑类化合物的再结合过程中,聚合物中的金属卟啉残基只能与三唑类化合物产生随机的配位作用,因此 PP(B)对三唑类化合物的吸附率较低.对于 PPf(ECZ),虽然制备过程中有 ECZ 的参与,但因为其所用的单体 MOTPP 缺乏能与三唑化合物结合的配位中心-锌原子,无法形成配合物,因而所得到的聚合物不能产生印迹空穴,且聚合物中的非金属卟啉残基不能与三唑类化合物产生配位作用,PPf(ECZ)对三唑类化合物只有物理性吸附.所以它对三唑类化合物的吸附率最低,甚至远低于 PP(B),且对于各种三唑类化合物没有明显的选择性.由图 3 还可发现,在 5 种三唑类化合物中,虽然 FCZ 与功能单体 ZnMOTPP 的配位能力远大于 ECZ,但印迹聚合物 PP(ECZ)对 ECZ 的吸附最大.这与前面的分析结果相一致,表明印迹聚合物 PP(ECZ)具有的印迹空穴在结构上与 ECZ 的匹配程度高于包括 FCZ 在内的非印迹三唑化合物,使得 PP(ECZ)对 ECZ

表现出良好的印迹效果.

2.3 影响选择性吸附性能的若干因素

分子印迹聚合物的印迹效果由多方面因素决定.在相同的印迹体系中,聚合物的交联度,吸附时所用溶剂的极性等对印迹聚合物的识别能力有较大影响.本文进一步考察了这几个因素对印迹效果的影响.

2.3.1 聚合物交联度的影响 在分子印迹聚合物合成中交联剂起着固定印迹空穴和作用位点的作用.为考察交联程度对印迹性能的影响,通过加入不同量的交联剂 EGDMA,分别制备了印迹聚合物 PP(ECZ)-1、PP(ECZ)-2 及 PP(ECZ)-3,如表 3 所示.

Table 3 Preparation of imprinted and nonimprinted polymers			
Polymer	ZnMOTPP (mg)	ECZ (mg)	EGDMA (mg)
PP(ECZ)-1	304 (0.4 mmol)	134 (0.4 mmol)	476 (2.4 mmol)
PP(ECZ)-2	304 (0.4 mmol)	134 (0.4 mmol)	1428 (7.2 mmol)
PP(ECZ)-3	304 (0.4 mmol)	134 (0.4 mmol)	4760 (24 mmol)

由于上述聚合物中功能单体的相对含量各不相同,难以直接比较它们对三唑化合物吸附率的绝对值,但可以分析比较各自的相对吸附率(以 ECZ 吸附率为基准),结果见表 4. 印迹聚合物 PP(ECZ)-1对 ECZ 及其余三唑化合物之间的选择性不如 PP(ECZ)-2 及 PP(ECZ)-3,而 PP(ECZ)-2 与 PP(ECZ)-3 之间除 FCZ 外差别不大,这表明交联达到一定程度后,选择性不会再明显增加.值得注意的是 PP(ECZ)-3 对 FCZ 的吸附率比对印迹分子 ECZ 的吸附率更高.这可能是由于高度的交联阻碍了三唑化合物进入包裹于聚合物内部的印迹空穴,而其在聚合物表面的配位作用成为主导,因此聚合物对配位能力强的 FCZ 吸附超过印迹分子 ECZ.

Polymer	Relative binding percent (other triazoles/ECZ)				
	ECZ	FCZ	TCZ	HCZ	TDF
PP(ECZ)-1	1	0.96	0.82	0.65	0.46
PP(ECZ)-2	1	0.94	0.73	0.51	0.40
PP(ECZ)-3	1	1.06	0.71	0.49	0.42

2.3.2 吸附溶剂的影响 分别选用甲醇和二氯甲烷为吸附溶剂,进行了 PP(ECZ)对三唑类分子的吸附对比实验.在两种不同溶剂中的吸附效果如图 4 所示.在极性溶剂甲醇中 PP(ECZ)对所

有三唑化合物的吸附量都非常低.文献报道,在强极性溶剂甲醇中的吸附量通常为二氯甲烷溶液中吸附量的 1/3 ~ 2/3,但在该体系中却降到了 1/10 左右.

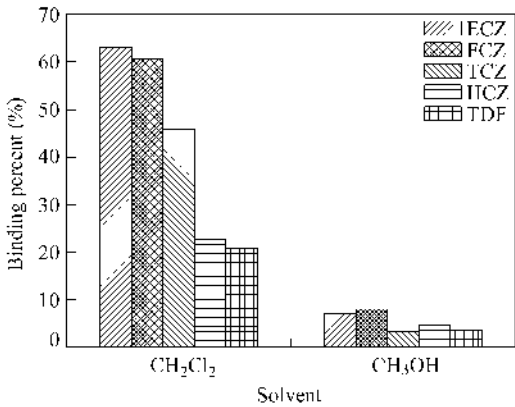


Fig. 4 Binding percent of fungicides in methanol and dichloromethane

2.4 固相萃取

表 5 列出了聚合物 PP(ECZ)对三唑化合物固相萃取的实验数据.从可以看出,在吸附阶段 PP(ECZ)对印迹分子 ECZ 的吸附率最高,接近 100%,同时对 FCZ、TCZ 的吸附率也超过 95%,而其余三唑化合物则较低,这与选择性吸附实验的

结果相吻合.吸附的三唑类化合物经过氯仿洗涤后,ECZ、FCZ 及 TCZ 的洗出量不明显,而另两个三唑化合物则 1/3 左右被洗出.最后甲醇洗脱阶段,印迹聚合物所吸附的三唑类化合物几乎全被洗脱,这也证明强极性溶剂削弱了聚合物与三唑类化合物之间的配位作用.结果表明 PP(ECZ)对印迹分子 ECZ、FCE 及 TCZ 有着良好的固相萃取效果.

Table 5 SPE property for Triazole Fungicides by PP(ECZ) *

Step	ECZ (μg)	FCZ (μg)	TCZ (μg)	HCZ (μg)	TDF (μg)
Load	50	50	50	50	50
Sorbed	49.5	48.5	46.7	21.2	22.2
Washed	0.6	0.3	4.7	6.7	6.5
Extrat	47.1	46.1	39.5	12.1	13.5

* Measurement details were described in the experimental part.

3 结论

以锌卟啉 ZnMOTPP 为功能单体,三唑类杀菌剂 ECZ 为印迹分子,合成了基于金属卟啉与三唑环配位作用的分子印迹聚合物.选择性吸附和固相萃取结果表明该印迹聚合物对 ECZ 及类似的三唑类杀菌剂具有良好的特异性识别性能,同时,印迹聚合物的交联度及吸附溶剂的极性对印迹效果有着显著影响.

REFERENCES

1 Wulff G. Angew Chem Int Ed, 1995, 34: 1812 ~ 1832

2 Haupt K, Mosbach K. Chem Rev, 2000, 100: 2495 ~ 2504

3 Kempe M, Mosbach K. J Chromatogr A, 1995, 691: 317 ~ 323

4 Sellergren B. Trends Anal Chem, 1999, 18: 164 ~ 174

5 Shoji R, Takeuchi T, Kubo I. Anal Chem, 2003, 75: 4882 ~ 4886

6 Yang J, Dewal M B, Shimizu L S. J Am Chem Soc, 2006, 128: 8122 ~ 8123

7 Matsui J, Higashi M, Takeuchi T. J Am Chem Soc, 2000, 122: 5218 ~ 5219

8 Dong He(董赫), Tong Aijun(童爱军), Li Longdi(李隆弟). Chem J Chinese Universities(高等学校化学学报), 2002, 23: 1018 ~ 1021

9 Jiang X L, Zhang H L, Wu J. Heterocycles, 2006, 68: 2153 ~ 2160

10 Wan L S, Wu J, Xu Z K. Macromol Rapid Commun, 2006, 27: 1533 ~ 1538

11 Connors K A. Binding Constants: the Measurement of Molecular Complex Stability. New York: Wiley Press, 1987. 140 ~ 168

SYNTHESIS OF METALLOPORPHYRIN-BASED MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER AND ITS RECOGNITION PROPERTIES FOR TRIAZOLE FUNGICIDES

ZENG Qingbin¹, WU Jian¹, XU Zhikang²

(¹ Department of Chemistry, ² Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract A novel kind of metalloporphyrin-based molecularly imprinted polymers was prepared to epoxiconazole, a triazole fungicide template, using 5-(4-methacryloxyphenyl)-10, 15, 20-triphenylporphinatozinc(II) as the functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate as the cross-linker. The interaction between the functional monomer and the triazole fungicide template as well as four other triazole analogs was quantitatively investigated with UV-visible titration spectroscopy, which reveals the formation of 1:1 complex in the system. The interaction was attributed to the coordination between the central zinc ion of the porphyrin and triazole ring in the fungicide. Selective rebinding and solid phase extraction measurements were used to characterize the recognition properties of the obtained polymer. It was found that the metalloporphyrin-based molecularly imprinted polymer exhibited specific affinity to the template molecule in comparison with other triazole fungicide analogs. The effect of polymer cross-linking degree on the molecular recognition properties was investigated, showing the specific affinity was enhanced with a certain extent of cross-linking. It was noted that the rebinding properties of the molecularly imprinted polymer was greatly influenced by the polarity of the binding solvent. The rebinding amount of the triazole fungicide in dichloromethane was determined to be about ten times of that in methanol.

Keywords Molecularly imprinted polymer, Metalloporphyrin, Triazole fungicides, Molecular recognition, Selective binding