

可天宁印迹聚合物分子识别特性的光谱与 XPS 研究

杨俊^{1,2}, 朱晓兰^{1,2}, 苏庆德^{1,2*}, 蔡继宝^{1,2}, 胡雁¹, 高芸²

1. 中国科学技术大学化学系, 安徽合肥 230026

2. 中国科学技术大学烟草与健康研究中心, 安徽合肥 230052

摘要 以可天宁(COT)为模板分子, 甲基丙烯酸(MAA)为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 合成了一种新型的分子印迹聚合物。采用紫外光谱、X射线光电子能谱、红外光谱和¹H NMR波谱研究了印迹聚合物的结合位点和识别机理。结果表明, 该聚合物通过协同氢键作用形成1:2型配合物, 专一地结合可天宁分子。MAA分子羧基上的氢原子是氢键的质子给予体; COT分子吡啶环上的氮原子以及羰基上的氧原子是质子的接受体, 是与MAA形成氢键作用的选择性识别位点。

关键词 分子印迹技术; 可天宁; 分子识别; 氢键作用; 结合位点

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)06-1152-04

引言

分子印迹技术是近年来迅速发展起来的一项技术^[1], 其基本原理是印迹分子与功能单体通过自组装形成主客体配合物, 在交联剂存在下将主客体配合物固定在高度交联的高分子母体中。洗去印迹分子后, 获得的刚性聚合物中存在具有确定空间构型的空穴, 且单体的功能基在该空穴中精确排列, 对特定目标分子表现出特异的识别能力。分子印迹聚合物既具有高度的选择性, 又有一定的机械稳定性和热稳定性, 已广泛应用于色谱分离、固相萃取、模拟酶、生物传感器及催化剂等^[2,3]。可天宁是烟草主要生物碱尼古丁在人体代谢的主要产物, 分子结构见图1。人体尿液、血液或血浆、吐液等体液中的可天宁半衰期长, 作为一种特效、高灵敏的生物学标记物, 能反映人体通过吸烟或饮食摄入尼古丁的剂量大小^[4,5]。吸烟人群和非吸烟人群暴露于烟草烟气的程度与其体液中可天宁含量呈显著的正相关关系^[6]。因此, 准确检测体液中的可天宁浓度是环境医学研究、烟草与健康研究的重要任务之一。本文以可天宁(COT)为模板分子, 甲基丙烯酸(MAA)作功能单体, 采用非共价分子印迹技术合成出对可天宁有高度选择性的印迹聚合物。通过紫外光谱、X射线光电子能谱、红外光谱和¹H NMR波谱等方法, 详细探讨了COT与MAA之间的相互作用以及目标聚合物的识别机理, 为应用该聚合物分离富集和准确测定主动吸烟或被动吸烟人群体液中的可天宁, 奠定了良好的理论和实验基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UV-2401PC紫外-可见分光光度计(Shimadzu, Japan); ESCALAB 250 X射线光电子能谱仪(Thermo Electron, USA); VECTOR22傅里叶变换红外光谱仪(Bruker, Switzerland); AVANCE AV 400核磁共振波谱仪(Bruker, Switzerland); SHZ-82型超级恒温水浴槽(江苏省太仓医疗器械厂); LG10-2.4A型离心机(北京医疗器械公司)。

可天宁购于Sigma公司(Steinheim, Germany); 甲基丙烯酸、乙二醇二甲基丙烯酸酯购于Fluka公司(Buchs, Switzerland), 使用前重新蒸馏除去阻聚剂; 偶氮二异丁腈(AIBN)购于上海第四化学试剂公司; 其余试剂均为分析纯或色谱纯。

1.2 印迹聚合物的制备

采用非共价印迹聚合物合成方法制备COT分子印迹聚合物^[7]。将1 mmol的COT, 4 mmol的MAA和5.6 mL的二氯甲烷加入到20 mL的厚壁玻璃试管中, 混合作用5 min后, 加入20 mmol的乙二醇二甲基丙烯酸酯和0.24 mmol的偶氮二异丁腈。通氮气5 min后, 密封, 置60 °C水浴中聚合。24 h后, 取出试管并破碎, 获得的块状聚合物用研钵研磨成细小颗粒。收集25~36 μm粒径的聚合物, 用丙酮反复沉降去除细小颗粒。再将所得颗粒装入玻璃层析柱中, 分别用3×100 mL的甲醇/乙酸9:1(φ)和100 mL甲醇淋洗, 直

收稿日期: 2006-01-26, 修订日期: 2006-05-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(20405013)资助

作者简介: 杨俊, 1967年生, 中国科学技术大学化学系副教授

* 通讯联系人

至最后 10 mL 酸性流出液中检测不出 COT 为止。将聚合物颗粒置于真空干燥箱中干燥 24 h, 储存备用。非印迹聚合物除不加 COT 模板分子外, 合成步骤同上述方法。

1.3 紫外光谱、X 射线光电子能谱、红外光谱和 ^1H 核磁共振波谱实验

用 H_2CCl_2 作溶剂, 固定 COT 浓度为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 于 1 cm 石英比色皿中, 渐增 MAA 的浓度, MAA 浓度变化范围为 $0.2 \sim 1.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 平衡 5 min 后, 扫描获得紫外吸收光谱图。以 H_2CCl_2 作溶剂, 分别将 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 COT 以及 COT($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 MAA($40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 混合溶液附着在 25 mg C18 修饰的硅胶颗粒 ($50 \mu\text{m}$, Supelco, USA) 表面, 氮气吹干后, 作 X 射线光电子能谱试验。以 CCl_4 作溶剂, 配制浓度为 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 COT 溶液, 以及 COT($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 MAA($40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 按 1:2 混合的溶液, 分别获得红外光谱图。以 CDCl_3 作溶剂, TMS 为内

标, 在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下测定 COT($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), MAA($40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 以及 COT($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 MAA($40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 共存时的 ^1H NMR 波谱。

2 结果与讨论

研究印迹聚合物的识别机理, 对解释聚合物印迹过程和识别现象尤为重要。印迹原理基于自组装过程中主客体配合物识别位点的相互作用。因此, 在聚合前确定模板分子与功能单体相互作用形成主客体配合物的稳定性及其识别位点非常关键^[8]。本文采用 UV, XPS, IR 以及 ^1H NMR 对聚合前的分子模板、功能单体及其相互作用的混合物进行了研究。COT 与 MAA 可能的自组装过程及印迹聚合物的识别过程见图 1 所示。

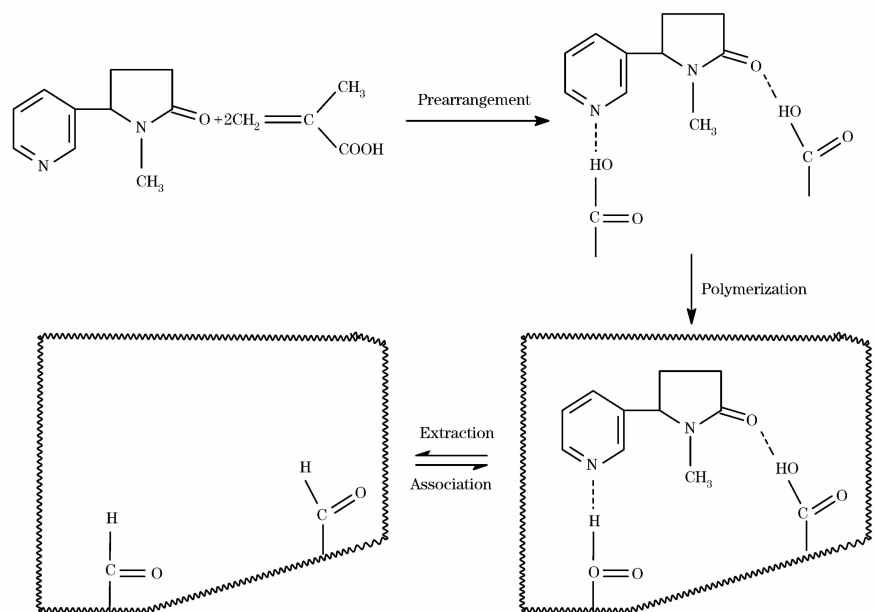


Fig. 1 Schematic illustration of the preparation and molecular recognition of cotinine imprinted polymer

2.1 紫外光谱研究

采用紫外吸收光谱法研究了二氯甲烷溶液中模板分子 COT 与功能单体 MAA 形成的主客体配合物的结合常数和化学配位比^[9]。当渐增 MAA 的量时, COT 与 MAA 反应形成配合物, 吸收光谱中最大吸收波长向长波方向移动, 且吸收峰的强度增加, 如图 2。这是氢键对生色基团作为质子给予体的分子的第一个 $\pi-\pi^*$ 吸收带的影响所致^[10,11]。假设 COT 初始浓度为 a_0 , MAA 初始浓度为 b_0 , 化学配位比为 n , 则结合反应如下



式(1)中 K 表示 COT 与 MAA 印迹反应的结合常数。

根据物料平衡

$$[\text{COT}] + [[\text{COT}][\text{MAA}]_n] = a_0 \quad (2)$$

$$[\text{MAA}] + n[[\text{COT}][\text{MAA}]_n] = b_0 \quad (3)$$

因为 b_0 远大于 a_0 , 可以忽略式(3)中的 $[[\text{COT}][\text{MAA}]_n]$, 所以

$$[\text{MAA}] = b_0 \quad (4)$$

将式(2)和式(4)代入式(1), 整理得

$$[[\text{COT}][\text{MAA}]_n] = a_0 b_0^n K / (1 + b_0^n K) \quad (5)$$

根据 Lambert-Beer 定律, 若设 ϵ_1 和 ϵ_2 分别为 COT 和 COT-MAA 配合物的摩尔吸收系数, 混合溶液的总吸光度为

$$\begin{aligned} A &= \epsilon_1 l [\text{COT}] + \epsilon_2 l [[\text{COT}][\text{MAA}]_n] \\ &= \epsilon_1 l (a_0 - [[\text{COT}][\text{MAA}]_n]) + \\ &\quad \epsilon_2 l [[\text{COT}][\text{MAA}]_n] \\ &= \epsilon_1 l a_0 + (\epsilon_2 - \epsilon_1) l [[\text{COT}][\text{MAA}]_n] \end{aligned} \quad (6)$$

选用 COT 的纯样品溶液为参比, 可得差示吸光度 ΔA

$$\begin{aligned} \Delta A &= A - A_0 = (\epsilon_2 - \epsilon_1) l [[\text{COT}][\text{MAA}]_n] \\ &= \Delta \epsilon_2 l [[\text{COT}][\text{MAA}]_n] \end{aligned} \quad (7)$$

将式(7)代入式(5), 整理得

$$\Delta A/b_0^n = -K\Delta A + K\Delta\epsilon_2 l a_0 \quad (8)$$

式(8)中 n 为配合物的化学配位比, 可取简单正整数, 用尝试法分别取 $n=1, 2, 3$ 时, 以 $\Delta A/b_0^n$ 对 ΔA 作图, 结果发现 $n=1$ 和 3 时为曲线, 但 $n=2$ 时为一良好直线, 其回归方程为 $\Delta A/b_0^2 = 0.5995 - 3.078 \Delta A$, $r = 0.9971$ 。说明此条件下 COT 和 MAA 主要形成了 $1:2$ 型氢键配合物, 由直线斜率可求得结合常数 $K = 3.078 \times 10^6 \text{ L}^2 \cdot \text{mol}^{-2}$, 表明该配合物十分稳定。由此可见, 该配合物是通过协同氢键作用形成。

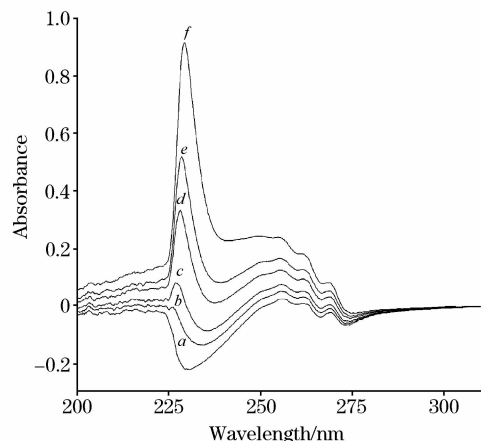


Fig. 2 Different absorption spectra of COT and MAA system in H_2CCl_2 at $25\text{ }^\circ\text{C}$

$a_0 = 0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; $b_0 / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$:

a : 0.0; b : 0.20; c : 0.40; d : 0.80; e : 1.20; f : 1.80

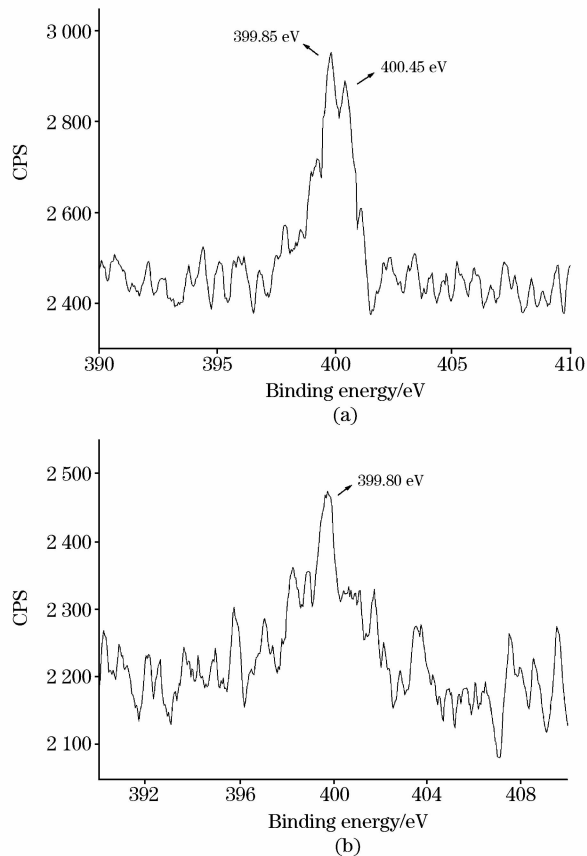


Fig. 3 $\text{N}(1s)$ XPS spectra of (a) COT and (b) COT-MAA

加入交联剂引发聚合后, 配合物能够有效地被印迹在聚合物的母体中。

2.2 X 射线能谱研究

X 射线光电子能谱是研究材料表面结构与性能的重要手段之一^[12,13], 被用于印迹聚合物分子识别机理的表征。图 3 是 COT 分子以及 COT-MAA 配合物 $\text{N}(1s)$ 的 XPS 图谱, COT 分子吡啶环以及四氢吡咯环上的 $\text{N}(1s)$ 结合能分别为 400.45 和 399.85 eV 。当 COT 与 MAA 按 $1:2$ 的化学计量比形成配合物时, COT 分子吡啶环上的 $\text{N}(1s)$ 结合能变为 399.80 eV , 并与四氢吡咯环上的 $\text{N}(1s)$ 峰重叠, 峰面积增加。实验表明, COT 吡啶环上的氮原子是与功能单体形成氢键结合的一个识别位点。

2.3 红外光谱研究

如图 4 所示, 在 COT 的红外光谱中, 1723.42 cm^{-1} 位置的吸收峰为四氢吡咯内酰胺中羰基的伸缩振动峰。内酰胺中的羰基是强的质子接受体^[7], 易与 MAA 作用形成氢键, 该谱带向低波数方向移动至 1688.93 cm^{-1} 。表明 COT 四氢吡咯内酰胺中羰基氧原子是与功能单体形成氢键结合的另一识别位点。

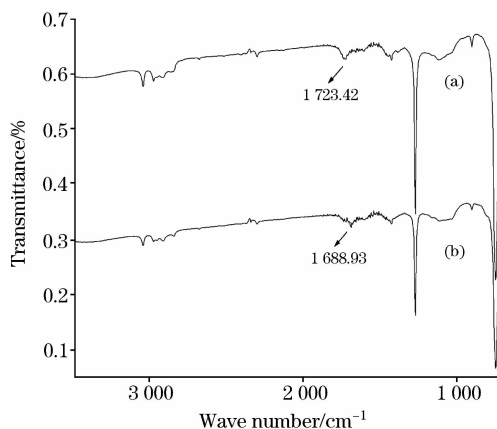


Fig. 4 Infrared spectra of (a) COT and (b) COT-MAA in CCl_4 at $25\text{ }^\circ\text{C}$

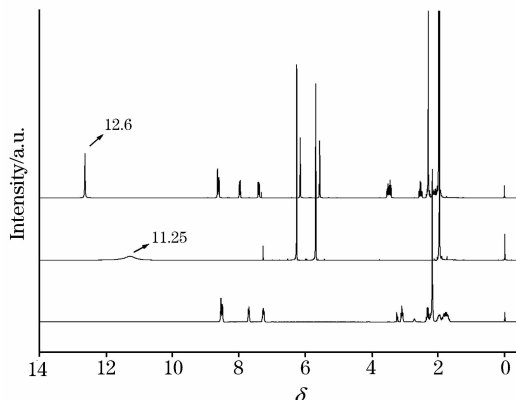


Fig. 5 ^1H NMR spectra of (a) COT, (b) MAA and (c) COT-MAA in CDCl_3 at $25\text{ }^\circ\text{C}$

2.4 ^1H 核磁共振波谱试验

采用 ^1H NMR 波谱进一步验证了 COT 印迹聚合物的识

别机理,如图 5 所示。在 MAA 的 ^1H NMR 谱图中,羧基上的活泼氢在 $\delta 11.25$ 处呈一宽峰。而在 COT 与 MAA 作用后的 ^1H NMR 谱图上,羧基上的氢质子化学位移向低场 $\delta 12.60$ 移动,并变为一个尖锐的窄峰,这是由于两分子 MAA 的 COOH 氢质子和 COT 分子的氮和氧原子作用形成氢键,对 COOH 活泼氢产生强烈的束缚作用并使其屏蔽作用变小的结果^[14,15]。

3 结 论

采用分子印迹技术制备了对可天宁分子具有特异选择性

的印迹聚合物。紫外光谱研究表明模板分子可天宁与单体之间以协同氢键作用形成稳定的配合物,化学配位比为 1 : 2。X 射线光电子能谱和红外光谱研究显示可天宁分子吡啶环上的氮原子和羰基上的氧原子是形成氢键的选择性识别位点。 ^1H NMR 波谱进一步证明,功能单体羧基上的氢原子是形成氢键的质子给予体。该聚合物通过协同氢键作用专一地结合可天宁,证实了图 1 表示的印迹过程和识别机理。本研究为可天宁印迹聚合物在生物样品中的分离应用奠定了良好的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Haginaka J. *Trac-Trend Anal. Chem.*, 2005, 24: 407.
- [2] Alexander C, Andersson H S, Nicholls I A, et al. *J. Mol. Recognit.*, 2006, 19: 106.
- [3] HU Shu-guo, LI Li, HE Xi-wen(胡树国,李 礼,何锡文). *Prog. Chem. (化学进展)*, 2005, 17: 531.
- [4] WANG Shi-long, WANG Mei, SUN Xiao-yu, et al (汪世龙,王 玫,孙晓宇,等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2003, 23(3): 481.
- [5] Dhar P. J. *Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, 35: 155.
- [6] Bazylak G, Brozik H, Sabanty W. J. *Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, 24: 113.
- [7] Yang J, Zhu X L, Cai J B, et al. *Chin. Chem. Lett.*, 2005, 16: 1503.
- [8] Matsui J, Miyoshi Y, Doblhoff-Dier O, et al. *Anal. Chem.*, 1995, 67: 4404.
- [9] Dong H, Tong A J, Li L D. *Spectrochim. Acta, Part A*, 2003, 59: 279.
- [10] LU Chun-yang, MA Xiang-xia, HE Xi-wen, et al(卢春阳,马向霞,何锡文,等). *Acta Chim. Sinica(化学学报)*, 2005, 63: 479.
- [11] CHEN Yun, KONG Xiang-rong, SHEN Xing-can, et al(陈 韵,孔祥荣,沈星灿,等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2005, 25(10): 1652.
- [12] GAO Li-hua, WANG Ke-zhi, XIN Xiu-lan, et al(高丽华,王科志,辛秀兰,等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(11): 1285.
- [13] LI Xiao-ling, XU Wei-qing, JIA Hui-ying, et al(李小灵,徐蔚青,贾慧颖,等). *Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报)*, 2004, 25(11): 1285.
- [14] Zhu X L, Yang J, Su Q D, et al. *J. Chromatogra. A*, 2005, 1092: 161.
- [15] Sellergren B, Lepisto M, Mosbach K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110: 5853.

Spectroscopy and XPS Studies on Molecular Recognition of a Molecularly Imprinted Cotinine-Specific Polymer

YANG Jun^{1,2}, ZHU Xiao-lan^{1,2}, SU Qing-de^{1,2*}, CAI Ji-bao^{1,2}, HU Yan¹, GAO Yun²

1. Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China

2. Research Center of Tobacco and Health, University of Science and Technology of China, Hefei 230052, China

Abstract In the present study, molecular imprinting technique was used to develop a method based on noncovalent interaction for the synthesis of a cotinine-specific polymer. The molecular recognition characteristics of the template polymer were evaluated by UV, IR, XPS and ^1H NMR. The results indicated that the interactions should be cooperative hydrogen bonds produced by self-assembling of the template and the monomer. The stoichiometric mole ratio of COT-MAA complex is 1 : 2. Furthermore, nitrogen atom of the pyridine ring and oxygen atom of the lactam group in cotinine molecular are hydrogen-bond acceptors, being the predominant binding sites interacting with the functional monomer.

Keywords Molecular imprinting technique; Cotinine; Molecular recognition; Hydrogen-bond interaction; Binding site

* Corresponding author

(Received Jan. 26, 2006; accepted May 8, 2006)