

分子印迹技术

姜忠义

(天津大学化工学院 天津 300072)

摘 要 简要综述了分子印迹技术的基本原理和特点、分子印迹聚合物的制备途径和方法、分子印迹技术取得的进展和面临的挑战,并对分子印迹技术未来发展趋势进行了简单展望。

关键词 分子印迹 分子印迹聚合物

The Molecular Imprinting Technique

Jiang Zhongyi

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract The basic principle and feature of molecular imprinting technique, the approaches and methods of preparing molecularly imprinted polymers, and the recent developments and challenges of molecular imprinting technique are briefly overviewed. The future development tendency of molecular imprinting technique is simply described.

Key words Molecular imprinting, Molecularly imprinted polymers

分子印迹技术 (Molecular Imprinting Technique, MIT) 的出现起源于 Pauling 在免疫学研究中提出的抗体形成学说^[1],即用抗原作为模板来操纵抗体多肽链的重组,使抗体形成与抗原分子互补的空间构型。虽然该学说已经被“克隆选择”理论所否定,但化学家们却由此受到启发而发明了分子印迹技术。1949 年 Dickey^[2]首次实验了染料在硅胶上的印迹,1972 年 Wulff 等^[3]在聚合物上成功地实现了印迹。

随着 Wulff^[4]、Mosbach^[5]和 Whitcombe^[6]等在共价、非共价和共价-非共价混合型分子印迹聚合物制备技术方面的创新性工作,分子印迹技术得到了广泛研究和迅猛发展。自 1997 年起,开始召开分子印迹技术的专题学术会议并成立了专门的学术组织。据 Piletsky 等^[7]的报道,仅在 1999 年,有关分子印迹的论文约有 120 多篇,研究课题组有 70 个左右,获准专利约有 15 项。

1 分子印迹的基本原理

1.1 基本原理

当模板分子(印迹分子)与聚合物单体接触时会形成多重作用点,通过聚合过程这种作用就会被“记忆”下来,当模板分子除去后,聚合物中就形成了与模板分子空间构型相匹配的具有多重作用点的空穴,这样的空穴将对模板分子及其类似物具有选择识别特性^[8]。

目前,根据模板分子和聚合物单体之间形成多重作用点方式的不同,分子印迹技术可以分

姜忠义 男, 36 岁, 博士, 副教授, 主要从事酶和蛋白质工程研究。 E-mail: zhyjiang@mail.zlnet.com.cn

2002-01-07 收稿, 2002-02-25 修回

为两类：(1)共价法(预组织法)。印迹分子先通过较强的共价键与单体结合，然后交联聚合，聚合后再将共价键断裂而去除印迹分子。共价法印迹过程复杂，且需用化学方法除去模板分子，由于可供选用的化学反应非常有限，从而限制了此法的广泛应用。

(2)非共价法(自组织法)。印迹分子与功能单体之间预先自组织排列，以较弱的非共价键形成多重作用位点，聚合后这种作用保存下来。常用的非共价作用有：氢键、络合作用、静电引力、偶极作用、疏水作用以及范德华力等，以氢键应用最多。与共价法相比，非共价法简单易行，模板分子易于除去，其分子识别过程也更接近于天然的分子识别系统，如“抗体-抗原”和“酶-底物”等。在印迹过程中还可以同时采用多种单体，以提供给模板分子更多的相互作用，改善印迹效果。

分子印迹技术具有三个特点：构效预知性、特异识别性和广泛适用性。

1.2 分子印迹过程机理

目前，分子印迹过程机理还缺乏定量和系统的研究。从本质上讲，分子印迹聚合物(MIPs)对分子的识别源于它与模板分子之间在化学基团以及三维空间结构上的相互匹配，即 MIP 的选择性与模板分子和功能单体之间相互作用的数量与强度以及模板分子的形态与刚性有关。Nicholls 等^[9]认为，MIPs 复合物的形成过程以及 MIPs 与印迹分子之间识别过程均受热力学定律制约，相应的自由能变化可通过下式计算：

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{t+r}} + \Delta G_{\text{r}} + \Delta G_{\text{h}} + \Delta G_{\text{vib}} + \Sigma \Delta G_{\text{p}} + \Delta G_{\text{conf}} + \Delta G_{\text{vdw}}$$

式中， ΔG_{bind} 是形成复合物时 Gibbs 自由能的变化； $\Delta G_{\text{t+r}}$ 是分子转动引起的自由能减少； ΔG_{r} 是分子内旋受限引起的自由能减少； ΔG_{h} 是疏水作用引起的自由能增加； ΔG_{vib} 是基团振动引起的自由能变化； $\Sigma \Delta G_{\text{p}}$ 是极性基团相互作用对自由能的贡献； ΔG_{conf} 是由构型变化引起的自由能变化； ΔG_{vdw} 是由非范德华力引起的自由能减少。

由上式可以分析影响 MIPs 形成和识别过程的因素，并进而改善 MIPs 的设计与制备。

2 分子印迹聚合物的制备

分子印迹聚合物的制备通常包括以下步骤^[10,11]。

2.1 印迹分子与单体发生相互作用

根据单体与印迹分子作用力的类型和大小预测，合理地设计、合成带有能与印迹分子发生作用的功能基的单体。印迹分子主要有糖、氨基酸、核酸、生物碱、维生素、蛋白质和酶、抗原、杀虫剂、除草剂、染料等。单体的选择主要由印迹分子决定，它首先必须能与印迹分子成键，且在反应中它与交联剂分子处于合适的位置才能使印迹分子恰好镶嵌于其中。常用的共价单体主要有含乙烯基的硼酸或二醇以及含硼酸酯的硅烷混合物等。常用非共价键单体主要有甲基丙烯酸(MAA)、2-乙烯基吡啶、4-乙烯基吡啶三氟甲基丙烯酸(TFMAA)等。

2.2 聚合反应

在印迹分子和交联剂存在的条件下对单体进行聚合，交联剂有二乙烯基苯(DVB)、二甲基丙烯酸乙二醇酯(EGDMA)、丙烯酸三甲氧基丙烷三甲基酯(TRIM)。聚合方式有本体聚合、悬浮聚合、原位聚合、表面聚合等。影响聚合反应的因素包括浓度、温度、压力、光照、溶剂种类和极性等。一般来说，低温下单体与印迹分子能形成更为有序和稳定的聚合物，且选择性也好。

由于非共价作用的强弱主要取决于溶液的极性, 故非共价法一般在有机溶液如氯仿、甲苯中进行, 而共价法一般在极性较强的水、醇等溶液中进行。

2.3 印迹分子的去除

采用萃取、酸解等物理或化学方法把占据在识别位点上的绝大部分印迹分子洗脱下来。

2.4 后处理

在适宜温度下对印迹分子聚合物进行真空干燥和研磨等成型加工。

3 分子印迹技术的应用现状、进展和面临的挑战

分子印迹技术在分离纯化、化学与生物传感器以及催化等方面显示出重要和广泛的应用前景, 分别介绍如下。

3.1 亲和分离

迄今为止, 亲和分离(主要包括色谱分离、膜分离、固相萃取等)是分子印迹技术应用最多的领域^[12,13]。

以分子印迹聚合物作为色谱分析固定相, 在用来分离对应的印迹分子及其结构类似物分子方面得到了广泛运用。早期主要用在液相色谱分离, 分离的分子主要集中在药物、氨基酸及其衍生物、肽和抗体分子等。后来, 也用于毛细管电泳。1986 年, Wulff 等^[14]利用共价法成功地制备出聚苯乙烯分子印迹聚合物, 分离了苯基甘露吡喃糖苷对映体, 其分离系数为 4.3。Mosbach 等^[15~17]利用非共价法制备的分子印迹聚合物分离了苯丙氨酸衍生物, 其分离系数为 1.2。而后, 又制备出分离 *N*-乙酰基-L-苯丙酰基-L-色氨酸甲酯的印迹聚合物, 其分离系数达 17.8。Rachkov 等^[16]以短肽为模板, 借用免疫学中抗原决定部位的概念制备出对多肽和蛋白质具有特异选择性的 MIPs, 对催产素等肽类分子的消旋混合物进行了色谱分离实验, 分离系数可以达到 4.0 以上。Lin 等^[19]采用以 MIP 填充的毛细管电泳, 分离了 D, L-苯丙氨酸, MIP 以 L-苯丙氨酰苯胺或 L-苯丙氨酸为模板分子, 以甲基丙烯酸为功能单体制备而成。Allender 等^[20]用分子印迹麻黄定聚合物作为色谱固定相来进行(1*S*,2*R*)麻黄定和(1*R*,2*S*)麻黄定的分离, 得到了较高的分离系数和吸附容量。Petcu 等^[21]通过分子印迹方法, 建立了血液中 2,6-二异丙基苯酚简便、快速和准确的色谱测定方法。

将 MIPs 应用于膜分离的物质有氨基酸及其衍生物、肽、9-乙基腺嘌呤、莠灭净、阿特拉津、茶碱等^[22~25]。Kobayashi 等^[22]采用相转化技术制备了茶碱的 MIP 薄膜。这个薄膜是丙烯腈、丙烯酸的共聚物。通过吸附实验发现, 茶碱的吸附量远大于咖啡因, 这表明在相转化的过程中, MIP 记录下了茶碱分子的形状。通过对薄膜的表征, 发现了茶碱和共聚物间相互作用的证据。Yoshikawa 等^[23]制备了 MIP 薄膜, 通过 *N*-乙酰-D,L-色氨酸的电渗析实验发现该薄膜对 L-异构体有很好的选择性。Shea 等^[24]则研究了能选择性地透过某些天然产物分子的 MIP 薄膜。基于分子印迹技术制备的分离膜为分子印迹技术走向规模化和商业化提供了很好的示范。这种分离膜不仅具有处理量大, 易放大的特点, 而且对目标分子吸附的选择性和容量均很高。

基于分子印迹技术的固相萃取代替传统的液液萃取, 选择性好, 操作简便, 既可在有机溶剂中使用, 又可在水溶液中使用。自从 Sellergren^[26]首次报道了将 MIPs 用于戊脒的固相萃取以后, 这方面的研究报道便相继出现较多, 涉及的化合物主要有 2-氨基吡啶、苯达松、吡啶-3-乙醇、S-萘普生、尼古丁、萘心安、三嗪类、沙玛尔丁、它莫西芬等^[27~29], 涉及的实验体系主要

有各种生物流体和生物组织(如人、牛、狗、兔等血浆、血清、尿、胆汁等)的有机萃取物(氯仿萃取物、己烷萃取物、乙酸乙酯萃取物等)。萃取过程的选择性可以通过模板分子和印迹分子的选择来灵活调变,高选择性使固相萃取可以用于痕量分析;缺点是印迹分子的泄漏有时会污染样品,从而干扰测定的精确度,在生物样品方面的研究工作不够系统化。

需要指出的是,由于 MIPs 的良好理化特性,它在极端环境(有机溶剂、有毒、强酸强碱、高温高压等)分离过程将显现出明显优势。

3.2 仿生传感器

生物传感器虽然具有极高的灵敏度和特异性,但由于用作分子识别元件的生物活性组分极易变性失活,传感器成本高,生物活性组分的种类有限,其大规模的应用便受到了严重的限制。现在 MIP 已经具备了与自然界中存在的某些天然分子识别系统,如单克隆抗体,相似的选择性和亲和力,如果能用作分子识别元件,就会使传感器在保持较高的选择性和灵敏度的同时,提高耐受性,延长寿命。分子印迹聚合物制成的仿生传感器已经用于除草剂、糖类、核酸和氨基酸及其衍生物、医药、毒素、溶剂和蒸汽等的检测。Kriz 等^[30,31]研制的以吗啡印迹聚合物修饰的安培型生物传感器在 pH6.0 的柠檬酸缓冲溶液中,恒电位条件下能选择性地识别吗啡,其检测范围为 0.1~10mg/L,比普通的生物传感器更灵敏。

3.3 模拟酶

分子印迹最富挑战性的应用研究是对酶的人工模拟。同抗体酶一样,人们试图用分子印迹来获得酶的结合部位和催化基团,从而显示酶的活性^[32]。Sarhan 以吡多醛为印迹分子,用 4-乙烯基吡啶为单体制备出分子印迹聚合物,它促进了氨基酸衍生物的质子转移。应用聚乙烯吡啶作为印迹聚合物能促进模板分子的酯水解能力。由于过渡态能促进产物的形成,所以印迹过渡态类似物成为最普遍的制备模拟酶的方法。此外,分子印迹对酶的活性调控也将具有重要作用^[33]。

Davis 等^[34,35]综述了分子印迹的纳米级催化材料的应用性能。Mori-hara 等分别以(*R*)-和(*S*)-*N*-苄基- α -甲苄胺为模板在硅胶表面形成了一个分子印迹的空穴,这种材料对苯甲酸的乙酰基有催化转移功能。当手性的印迹分子重新结合到有关的空穴上后,催化活性消失。这说明空穴的手性识别来源于用于印迹空间结构。

3.4 抗体结合模拟

由分子印迹制备的人工抗体或受体对其印迹分子具有互补性,分子印迹聚合物可以作为天然抗体的描述模型,它用于放射免疫测定时所引起的交叉反应同单克隆抗体一致。由于其物理化学性质稳定,保证了识别性质的高度稳定性。Mosbach 等用印迹聚合物代替抗体,在放射免疫测定中可检测药物中的吗啡、茶碱等^[36-38]。同单抗一样,相似结构的药物有交叉反应发生。

最近几年,分子印迹技术在组合库筛选(Combinatorial library screening)、固相萃取和促进合成(Facilitated synthesis)等方面都取得了显著的进展。

目前分子印迹技术存在 MIP 结合容量低、结合位点不均一、模板分子发生泄漏等突出问题。面临的挑战体现在下述方面:首先,如何从分子水平上更好地理解分子印迹过程和识别过程;其次,目前使用的功能单体、交联剂和聚合方法都有很大的经验性和局限性,具体表现在:功能单体的种类太少以至于不能满足某些分子识别的要求,分子印迹聚合物大多只能在有机相中进行聚合和应用,能用于分子印迹的大多是像药物、氨基酸、农药、金属离子这样的小分子。

4 展望

在未来一段时间, 分子印迹技术的研究有可能主要集中在如下几个方面: (1) 分子印迹和识别过程的机理将从目前的定性和半定量描述向完全定量描述发展, 从分子水平上认识印迹和识别过程; (2) 合成种类更多、性能更好的功能单体和交联剂, 提高分子印迹聚合物的吸附行为和吸附容量; (3) 分子印迹和识别过程将从有机相转向水相; (4) 手性分离和固相萃取氨基酸、手性药物将步入产业化阶段; (5) 印迹技术将从氨基酸、药物等小分子、超分子过渡到核苷酸、多肽、蛋白质等生物大分子, 甚至生物活体细胞; (6) MIPs 用于辅助合成和仿生传感器将获得较快发展。

可以预计, 随着化学、生物学、材料学和现代分析技术的不断发展, 分子印迹技术将会在分离、分析和催化等诸多领域发挥越来越大的作用。

参考文献

- [1] Pauling L. J. Am. Chem. Soc., 1940, 62: 2643~2657.
- [2] Dickey F H. Proc. Natl. Acad. Sci., 1949, 35: 227~229.
- [3] Wulff G, Sarhan A. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1972, 11: 341~344.
- [4] Wuff G, Sarhan A, Zabrocki K. Tetrahedron Lett., 1973, 44: 4329~4332.
- [5] Norrlow O, Glad M, Mosbach K. J. Chromatography, 1984, 299(1): 29~41.
- [6] Whitcombe M J, Rodrihuez M E, Villar P. J. Am. Chem. Soc., 1995, 117: 7105~7111.
- [7] Piletsky S A, Alcock S, Turner A P F. TETECH, 2001, 19(1): 9~12.
- [8] Haupt K, Mosbach K. Chem. Rev., 2000, 100: 2495~2504.
- [9] Nocholls, Adlbo K, Andersson K. Analytica Chimica Acta, 2001, 435: 9~18.
- [10] Cormack P, Mosbach K. Reactive&Functional Polymers, 1999, 41: 115~124.
- [11] Yan M D, Kapua A. Analytica Chimica Acta, 2001, 435: 163~167.
- [12] Andersson H S, Karlsson J G, Piletsky S A. J. Chromatography A, 1999, 848: 39~49.
- [13] Bruggemann O, Haupt K, Ye L, Yilmaz E, Mosbach K. Journal of Chromatography A, 2000, 889: 15~24.
- [14] Wulff G, Heide B, Helfmeier G. J. Am. Chem. Soc., 1986, 108: 1089~1091.
- [15] Mosbach K, Ramstrom O. Biotechnology, 1996, 14(2): 163~170.
- [16] Ye L, Mosbach K. J. Am. Chem. Soc., 2001, 123: 2901~2902.
- [17] Mosbach K. ACS Symp. Ser., 1998, 703: 29~48.
- [18] Rachkov A, Minoura N. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1544: 255~266.
- [19] Lin J M, Uchiyama K, Hobo T. Chromatographia, 1998, 47: 625~629.
- [20] Allender C J, Richardson C, Woodhouse B, Heard C M, Brain K R. International J. Pharmaceutics, 2000, 195: 39~43.
- [21] Petcu M, Cooney J, Cook C, Lauren D, Schaare P, Holland P. Analytica Chimica Acta, 2001, 435: 49~55.
- [22] Wang H Y, Kobayashi T, Fujii N. Langmuir, 1996, 12: 4850~4856.
- [23] Yoshikawa M, Izumi J, Kitao T. Chem. Lett., 1996, 8: 611.
- [24] Jainamma M K, Shea K J. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118: 8154~8155.
- [25] Piletsky S A. J. Memb. Sci., 1999, 157: 263~278.
- [26] Sellergren B. J. Anal. Chem., 1994, 361(3): 645~647.
- [27] Matsui J, Okada M, Tsuruoka M. Anal. Commun., 1997, 34(3): 85~87.
- [28] Vlatakis G, Andersson L, Muller R. Nature, 1993, 361(3): 645~647.
- [29] Muldoon M T, Stanker L H. Anal. Chem., 1997, 69: 803~808.
- [30] Kriz D, Mosbach K. Anal. Chem., 1994, 66: 2636~2638.
- [31] Kriz D, Ramstrom O, Svensson A et al. Anal. Chem., 1995, 67: 2141~2144.
- [32] Leonhardt A, Mosbach K. Reac. Funct. Polym., 1987, 6(3): 285~290.
- [33] Ramstrom O, Mosbach K. Current Opinion in Chemical Biology., 1999, 3: 759~764.
- [34] Ahmad W R, Davis M E. Catal. Lett., 1996, 40: 109~114.
- [35] Davis M E, Katz A, Ahmad W R. Chem. Mater., 1996, 8: 1820~1839.
- [36] Haupt K, Mosbach K. Chem. Rev., 2000, 100: 2495~2504.
- [37] Haupt K, Mosbach K. TIBTECHN, 1998, 15(11): 468~475.
- [38] Ye L, Mosbach K. Reactive&Functional Polymers, 2001, 48: 149~157.