

水相中奎宁分子印迹聚合物的制备、 表征及识别性质的研究^{*}

何建峰, 刘 岚, 杨桂兰, 邓芹英
(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 以奎宁分子为模板, 甲基丙烯酸为功能单体, 在亲水体系中, 利用两步种子溶胀和微乳液聚合的分子印迹技术, 通过条件优化, 成功制备得到一种单分散性好的球形分子印迹聚合物。用红外光谱、热重分析、电镜扫描、粒度分析等技术对聚合物进行了表征。通过聚合物在不同溶剂中的吸附量的变化, 揭示采用酸性的功能单体 MAA 制得的聚合物可与带胺基的模板分子通过氢键、离子键(静电)相互作用, 且识别机理随溶剂类型改变而改变。对不同底物的选择性实验表明该聚合物对模板分子具有良好的识别能力和选择性。

关键词: 模板; 两步种子溶胀; 微乳液聚合; 分子印迹技术

中图分类号: O632.52 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2005)03-0058-05

分子识别在生命科学中具有极其重要的生理意义, 例如抗体对抗原的结合作用, 酶对底物的专一性作用, RNA 对 DNA 的遗传信息的识别和表达等等。近几年来, 关于分子识别机制的研究、分子识别模型的建立、分子识别与药物分子选择性关系等, 已经成为化学领域与生物学领域研究的热点。分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer, MIPs)作为一种人工合成的具有三维空间结构的受体, 对印迹分子即模板有“预定”的识别能力。因此在许多领域如色谱分离^[1]、固相萃取^[2]、化学与生物传感器^[3]、不对称催化和模拟酶^[4]等方面具有广泛的应用前景。分子印迹聚合物能成功制备的先决条件是功能单体和模板之间必须能够相互识别和相互作用, 并且自动地组装成超分子, 维持和稳定超分子体系的作用力主要靠功能单体和模板之间形成的弱的非共价键, 如氢键、离子键、 $\pi-\pi$ 作用和疏水作用等, 为了不破坏这种作用力, 分子印迹聚合物的制备和识别过程大多在甲苯、二氯甲烷、三氯甲烷等非极性溶剂中, 但自然界许多分子识别系统如酶与底物、抗体与抗原、给体与受体等大多在水环境中进行的, 因而探讨在水环境中制备和能在水环境中识别的 MIPs 具有重要的科学意义和实用价值。

本研究以奎宁分子为模板, 甲基丙烯酸为功能单体, 在亲水体系中, 利用两步种子溶胀和微乳液聚合的分子印迹技术, 通过条件优化, 成功制备得

到一种单分散性好的球形分子印迹聚合物。用红外光谱、热重分析、电镜扫描、粒度分析等技术对聚合物进行了表征。通过聚合物在不同极性的氯仿、甲醇、乙腈、乙腈/水溶液体系中的吸附量的变化, 揭示以甲基丙烯酸为功能单体制得的聚合物可通过氢键、离子键同模板发生作用, 且识别机理随溶剂类型改变而改变。对不同底物的选择性实验也表明该聚合物对模板分子具有良好的识别能力和选择性。

1 实验部分

1.1 原料、试剂与仪器

乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA, 江苏安利化工厂, 使用前用 2 mol/L 的 NaOH 溶液除去阻聚剂, 然后减压蒸馏); 甲基丙烯酸(MAA, AR, 上海化学试剂公司, 使用前减压蒸馏); 奎宁(Quinine, 中国上海医药公司); 辛可宁(Cinchonine, Aldrich 公司); 三唑仑(标准品, 广州公安厅提供); 邻苯二甲酸二丁酯(DBP, AR, 广州化学试剂公司); 十二烷基磺酸钠(SDS, CP, 广州化学试剂公司); 聚乙烯醇 1788(PVA, 聚合度 1700, 醇解度 88%, 山西纤尼纶厂); 其它试剂均为 AR。

UV-2100 型紫外分光光度计(UNICO(上海)仪器有限公司); 日本电子 ZSM-6300F 型发射电子扫描显微镜; HY-4 调速振荡器(富华电器有限公司); 德国 Brucker 公司 VECTOR 型傅立叶变换红外

^{*} 收稿日期: 2004-09-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20202015); 国家教育部博士点基金资助项目(20020558026)

作者简介: 何建峰(1978年生), 男, 博士研究生, 通讯联系人: 邓芹英; E-mail: ceslgl@zsu.edu.cn

光谱仪；日本岛津 TGA-50 型热重分析仪；Mastersizer-2000 激光粒度分析仪。

1.2 两步溶胀聚合物微球的合成

1.2.1 聚苯乙烯种球乳液（PS）的制备 将 10 mL 新蒸馏的苯乙烯，0.1 g 引发剂过硫酸钾（KPA）、10 mL 乙醇加到 90 mL 蒸馏水中，通 N₂，电动搅拌（搅速 200 r/min），在 70 ℃反应 15 h 结束，最后向所得的种球乳液吹入 N₂ 20 min 以将残余的苯乙烯单体除去。移取 10 mL 乳液于烘至恒质量的坩埚中，红外灯下将溶剂挥发干，再在 105 ℃烘箱中烘至恒质量，根据坩埚前后质量差，得到种球乳液固含量为 0.055 7 g/mL。

1.2.2 两步溶胀法制备 MIPs 一定量的 DBP、100 mg AIBN、2 mL 甲苯、30 mg 十二烷基磺酸钠（SDS）与 20 mL 水配成的乳液，超声 5 min，加入到一定量的聚苯乙烯乳液、30 mg SDS 和 20 mL 蒸馏水配成的乳液中，室温下溶胀 24 h。将功能单体 MAA、奎宁模板（324 mg，1 mmol）在 8 mL 甲苯中进行超声自组装 30 min，然后加入交联剂 EDMA（5.946 6 g，30 mmol）和 20 mL 一定浓度的聚乙烯醇溶液配成的乳液，电磁搅拌下将此乳液加入到第一步溶胀液中，室温下再溶胀 24 h。将溶胀液转移到一个 250 mL 圆底三口瓶中，补加 80 mL 同样浓度的聚乙烯醇溶液，充 N₂ 除 O₂，升温到 75 ℃，电动搅拌下（搅速 200 r/min）回流反应 12 h 结束。非印迹聚合物（NMIPs）除了不加模板，其制备方法 与印迹聚合物相同。表 1 列出了制备各种聚合物的原料配比。

1.2.3 洗脱处理 将反应所得到的悬浮聚合液在电动搅拌下加入一定量的 NaCl 煮沸破乳，然后离心得到聚合物微球，用乙醚、甲醇洗掉甲苯，再将微球分散到 300 mL 水中，煮沸，再离心，如此反复 3 次，除掉表面活性剂，所得的 MIPs 在索氏抽提器中用 200 mL 甲醇/乙酸（体积比为 9：1）反复

抽提 48 h 以除去印迹分子，最后用甲醇洗涤 24 h，聚合物在 80 ℃下真空干燥 24 h 后放入干燥器备用。

1.3 聚合物的吸附性能和对底物选择性的研究

分别称取 30 mg 聚合物于三角锥型瓶中，加入 3 mL 2 mmol/L 的奎宁、辛可宁和三唑仑的氯仿溶液，振荡 7 h，用 0.45 μm 膜过滤，取 1 mL 过滤液用氯仿稀释到一定体积，用紫外分光光度计在各底物的最大吸收波长处测量平衡吸附液中各底物的游离浓度，根据结合前后溶液中底物的浓度变化，可以计算出聚合物对底物的吸附量。根据聚合物对底物的结合分配系数 $K_D = C_p / C_s$ （ C_p 为底物在聚合物上的浓度； C_s 为平衡吸附液中底物的浓度）计算 $K_D^{[5]}$ ，根据等式 $\alpha = K_D / K_{DN}$ 计算比较因子（ K_D 和 K_{DN} 分别为印迹聚合物和非印迹的结合分配系数）。

1.4 聚合物的表征

用电子扫描显微镜观察聚合物的粒子形态，热重分析仪测定聚合物的热稳定性，Sizemaster 仪测定聚合物的粒径分布。傅立叶变换红外光谱仪表征聚合物的结构。

2 结果和讨论

2.1 MIPs 微球的表征

2.1.1 红外光谱 将经过洗脱处理的印迹聚合物与空白聚合物进行红外光谱表征（溴化钾压片法），图 1a 和 1b 分别出示了抽提过的 P₂ 印迹聚合物和非印迹聚合物的红外光谱图，从图中可看出非印迹聚合物与印迹聚合物均有明显的羟基、羰基的吸收峰，并且它们的峰形基本一致，说明印迹聚合物中模板分子已基本洗脱干净。图 1a 中 3 443 cm⁻¹ 为羧酸 O—H 的伸缩振动吸收峰；2 956 cm⁻¹ 为亚甲基—CH₂— 或—CH₃ 的伸缩振动吸收峰；1 726 cm⁻¹ 为羰基的伸缩吸收峰；1 261 cm⁻¹、1 161 cm⁻¹ 为酯

表 1 制备各种聚合物的原料配比
Tab 1 The formulas for preparation of polymers

项目	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇	P ₈	P ₉	P ₁₀
V(PS)/mL	10	10	10	10	10	2	4	8	10	10
V(水)/mL	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140
m(SDS)/g	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	—	3.06
m(PVA)/g	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	4.9	—
n(MAA)/mmol	4	12	18	12	12	12	12	12	12	12
n(EDMA)/mmol	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
V(DBP)/mL	2	2	2	5	10	2	2	2	2	2
m(Quinine)/g	0.324	0.324	0.324	0.324	0.324	0.324	0.324	0.324	0.324	0.324

基 C—O—C 的不对称伸缩振动和对称伸缩振动吸收峰; 1 458 cm^{-1} 为 CH_3 的弯曲振动或 CH_2 的剪式振动吸收峰; 另外 1 633 cm^{-1} 附近的吸收峰应为未完全反应的 $\text{C}=\text{C}$ 振动吸收峰。

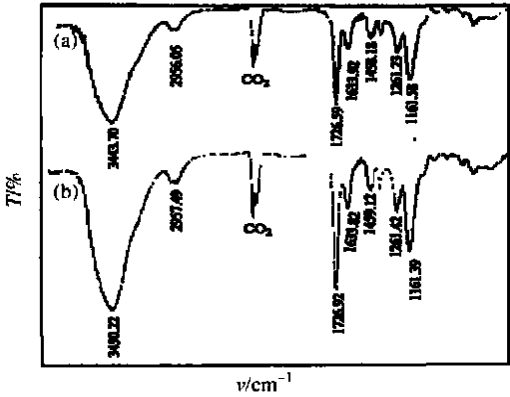


图 1 洗脱的印迹聚合物 (a) 和非印迹聚合物 (b) 的红外光谱图

Fig. 1 The IR spectra of extracted imprinted polymer (a) and non-imprinted polymer (b)

2.1.2 热重分析 将所得的模板聚合物用 NETZSCH-TG209 型热重分析仪进行测定。升温速度: 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 记录温度: 室温 $\sim 730^{\circ}\text{C}$; 气氛: 空气。结果表明, 这类聚合物具有良好的热稳定性。以 P_2 为例, 它的初始分解温度为 259, 396 $^{\circ}\text{C}$ 温度附近分解最快, 633 $^{\circ}\text{C}$ 基本分解完全。

2.2 影响 MIPs 外观形貌的因素

2.2.1 分散剂的影响 聚合物的粒子大小及形貌跟搅拌速度、单体用量、水油体积比、分散剂及致孔剂的类型和用量等因素有关。本实验控制反应的搅速约为 200 r/min , 水的用量为 140 mL。单纯用 SDS 作分散剂时, 制得的聚合物粒子碎粒较多, 单分散性较差, 且存在较为严重的凝胶现象。而用单一的 PVA 代替 SDS 作分散剂时, 制得的聚合物容易黏结, 且用量较大, 大大提高了产品的洗脱难度, 采用少量 SDS 和 PVA 复合分散体系作分散剂时, 可以减少分散剂的用量, 提高了产物粒径的单分散性, 同时使产物的转化率也有所提高, 制得的粒子较为理想。图 2 出示了单独用 SDS 为分散剂和 SDS/PVA 复合分散体系制备得到的聚合物的扫描电镜图。

2.2.2 溶胀剂用量的影响 为使油溶性的引发剂和单体充分溶胀到种球中, 保证最后产物粒径的均一性, 本研究用邻苯二甲酸二丁酯作溶胀剂将聚苯乙烯种子进行活化。当在 10 mL 种子溶液中加入 2 mL 的溶胀剂, 就可得到较好的溶胀效果, 最终形成的产物粒径比较均一, 机械性能好, 但当溶胀剂量增加到 10 mL 时, 产物碎粒增多, 粒径单分散性反而

变差, 产生这一原因可能是随着溶胀剂的增加, 种球溶胀, 体积急剧增加, 同时密度却大大下降, 抗冲击能力降低, 在机械搅拌的作用下, 微球较容易发生破裂, 同时由于这种粒子由于溶胀率大, 机械性能变差, 不耐高压, 所以也不适合作色谱的固定相。

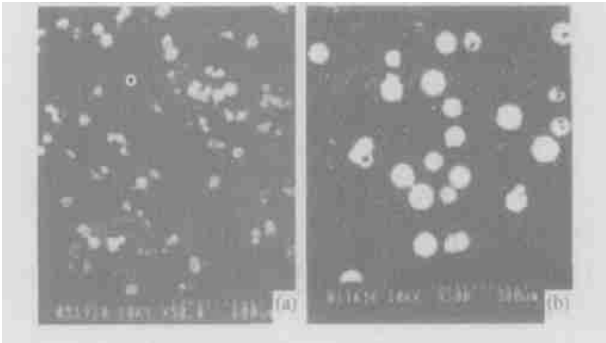


图 2 SDS(a)和 SDS/PVA(b)作分散剂 所得 MIPs 扫描电镜图

Fig. 2 SEM photographs of MIPs prepared with SDS(a) and SDS/PVA(b) as dispersants respectively

2.2.3 种球用量的影响 根据种子溶胀和悬浮聚合的机理, 反应产物的粒径大小与种球粒径的大小、种球和单体的用量等因素有关。具体的关系式可用下式表示:

$$\frac{(d_p)^3}{(d_s)^3} = K \times \left[\frac{m_M}{m_s} \times \frac{\rho_s}{\rho_M} + 1 \right] \tag{1}$$

式中, d_p 表示产物的粒径, d_s 表示种球的粒径, m_M 和 m_s 分别表示所用单体 EDMA 和种球的质量, ρ_s 和 ρ_M 分别为种球和单体的密度, K 为比例系数, 它与搅拌速度、水油体积比、分散剂等因素有关。本实验以无皂乳液聚合制备得到的聚苯乙烯种球粒径分布窄, 平均粒径约为 3~5 μm 。改变种球的用量, 固定影响聚合物粒子大小的其它因素, 反应产生的聚合物粒子通过激光粒度扫描得到的平均粒径随单体与种球质量比 (m_M/m_s) 的变化趋势如图 3, 从图 3 可看出, 当只增加种球的用量时, 聚合物的平均粒径呈现一种减少的趋势, 这是因为随着种球用量的增加, 乳液中可供反应的“晶核”越多, 分配到每个“晶核”上链增长单体的量随之减少, 聚合物最终平均粒径也出现同种子数目呈反比的关系。

2.3 功能单体用量的优化

甲基丙烯酸既是一种质子给体, 又是一种质子受体, 已有报道^[5,6] 将它作为两步种子溶胀或微乳液分子印迹聚合工艺的功能单体。本实验用的奎宁模板是含 2 个胺基和 1 个羟基的生物碱类化合物, 能通过氢键或离子键 (静电作用) 和 MAA 自组装成复

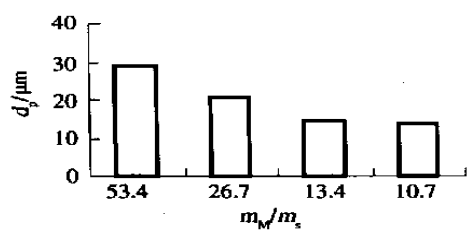


图 3 聚合物平均粒径与 m_M/m_s 变化关系
Fig. 3 The dependence of average particle size of MIPs on m_M/m_s .

合物。一般来讲，功能单体的浓度越高，越有利于和模板分子形成稳定的复合物，但反过来当功能单体大大过量时，却又导致聚合物的非特异性吸附增加。在两步种子溶胀中，由于存在水的干扰，为提高微乳中功能单体/模板复合物的浓度，MAA 的质量比常规的本体聚合要大，以便与模板分子通过氢键或离子键作用进行充分的自组装，自组装形成的复合物分散在有机相微乳液中，经过溶胀，进入疏水的聚苯乙烯种球中，在种球中游离的功能单体还可和模板进行二次自组装，这样大大提高了聚合物中分子印迹孔穴的数目，从而提高聚合物的特异性的识别能力。为了证明 MAA 量对印迹效果的影响，本实验保持交联剂的量不变，功能单体与模板的摩尔比分别为 4 :1, 12 :1, 18 :1 来制备 MIPs，通过平衡吸附实验结果发现：当功能单体/模板的摩尔比值为 4 :1 时，制得的 MIPs 同非印迹聚合物对照，识别性不大，当达到 12 :1 时，有较好的特异识别性，与非印迹聚合物的相对比较因子 α 为 2.72，当达到 18 :1 时，MIPs 的非特异识别性也大大增加，与空白聚合物的相对比较因子 α 反而降低到 2.20。

2.4 溶剂对聚合物吸附容量的影响

聚合物的识别一般在非水环境中进行的，但是许多天然识别系统如酶与底物、抗体与抗原等的识别大多是在有水的介质中进行的，因此研究在水相中制备和识别的印迹聚合物具有极为现实的意义。本实验改变溶剂种类，研究溶剂的极性和乙腈中水含量变化对聚合物的吸附容量的影响。从表 2 可看出，比较氯仿和甲醇体系，随着溶剂极性的增加，MIPs 与 NMIPs 的吸附容量都显著减少，这是因为甲醇是极性溶剂，它不但减弱了模板与聚合物的非特异性吸附，同时由于它又是质子传递溶剂，参与竞争聚合物孔穴中的活性位点，从而导致特异识别性能也降低。乙腈虽然极性比氯仿强，但是非质子传递溶剂，模板与聚合物识别位点之间的氢键虽有所削弱，但主要还是以氢键为主，同时酸性的 MAA 和模板分子环上的 2 个氮原子之间的离子键（静电作

用）作用在乙腈溶剂中得到加强，故总的吸附量反而增加。当逐步加大乙腈中水的含量，发现聚合物的吸附量呈现先减少后增加的趋势，这是因为当溶剂中有机相含量占主要的时候，氢键占主要地位，水的加入导致了聚合物与模板氢键强度的减弱，随着有机相中水含量的增加，氢键越来越弱，模板与聚合物的离子键和疏水作用却此时却变得越来越强，分子识别逐步由氢键识别机理转化为离子交换机理和疏水作用所控制，故聚合物净吸附量（MIPs 吸附量与 NMIPs 吸附量的差值）与单纯的乙腈中聚合物的净吸附量相差不大。

表 2 聚合物在不同溶剂中吸附容量
Tab. 2 The adsorption capacities of polymer in different solutions

溶剂	MIPs 吸附量 ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	NMIPs 吸附量 ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)
氯仿	63.03	28.93
甲醇	22.51	14.28
乙腈	69.16	47.76
乙腈/水（体积比为 70:30）	53.72	26.58
乙腈/水（体积比为 50:50）	79.15	56.04

结合时间：7 h；底物浓度：2.0 mmol/L； t ：25 $^{\circ}\text{C}$

2.5 印迹聚合物的识别选择性

分别选择奎宁、辛可宁、三唑仑作底物，在平衡结合条件下，通过测定印迹聚合物和非印迹聚合物对底物的结合分配系数 K_D （表 3）来对聚合物的选择性进行研究。从表 3 数据可看出，以奎宁印迹的印迹聚合物对奎宁的 K_D 最大，而且大于非印迹聚合物对奎宁的 K_D ，这充分说明在制备的印迹聚合物中，由于模板分子的加入，得到了许多与模板形状大小、官能团结构匹配的孔穴，而且这种空间形状的高度匹配反过来又加强了聚合物孔穴里的羧基与奎宁分子之间形成氢键、离子键的强度，故聚合物对奎宁分子呈现特效的选择性结合；聚合物对辛可宁也表现较高的 K_D ，这是因为从分子结构上相比，辛可宁分子比奎宁分子只是少了一个甲氧基，空间结构差别不大，而且两者分子所含的活性基团相同，辛可宁分子也可进入聚合物的立体孔穴，并和孔穴里的活性羧基作用，故聚合物对辛可宁也具有一定的交叉识别能力；聚合物对三唑仑的 K_D 最小，而且 MIPs 和 NMIPs 对之的 K_D 相差不大，这是因为三唑仑虽然在结构上也含氮原子，但它的分子形状大小与聚合物中奎宁模板留下的孔穴形状不匹配，故它不能进入聚合物孔穴中，只能和聚合物表面羧基形成普通的氢键或离子键，但这种作用力很小，因此聚合物对之只能表现出很少的非选择性

吸附。

表 3 不同的底物在印迹和非印迹聚合物上的 K_D 值

Tab 3 The K_D values of different substrates on MIPs and NMIPs

聚合物	奎宁	辛可宁	三唑仑
MIPs	46.04	36.0	6.2
NMIPs	16.91	19.65	8.5

结合时间: 7 h; 底物浓度: 2.0 mmol/L; t : 25 °C

参考文献:

[1] GLAD M, REINHOLDSSON P, MOSBACH K. Molecularly imprinted composite polymers based on trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM) particles for efficient enantiomeric separations[J]. *Reactive Polymers*, 1995, 25: 47— 54.

[2] BAGGIANI C, GIOVANNOLI C, ANFOSSI L, et al. Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up

chlorinated phenoxyacids from aqueous samples [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 938: 35— 44.

[3] KAZUYOSHI Y, ISAO K. Molecularly imprinted polymers for biosensor applications [J]. *Trends in analytical chemistry*, 1999, 18(3): 199— 204.

[4] BRUGGEMANN O. Chemical reaction engineering using molecularly imprinted polymeric catalysts[J]. *Anal Chim Acta*, 2001, 435: 197— 207.

[5] ZHANG L Y, CHENG G X, FU C. Molecular selectivity of tyrosine-imprinted polymer prepared by seed swelling and suspension polymerization[J]. *Polymer Int*, 2002, 51: 687— 692.

[6] VAIHINGER D, LANDFESTER K, KRAUTER I, et al. Molecularly imprinted polymer nanospheres as synthetic affinity receptors obtained by miniemulsion polymerization [J]. *Macromol Chem Phys*, 2002, 203: 1965— 1973.

The Preparation, Characterization and Properties Studies of Quinine-imprinted Polymers in the Aqueous Phase

HE Jian-feng, LIU Lan, YANG Gui-lan, DENG Qin-yi

(School of Chemistry and chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The uniform-sized spherical molecularly imprinted polymers were successfully prepared through molecular imprinting technology by two-step seed swelling and miniemulsion polymerization in the aqueous condition using quinine molecules as templates and methacrylic acid (MAA) as functional monomers. The polymers were characterized by IR spectra, thermal-weight analysis, scanning electron microscope and laser particle size analysis. The adsorption amounts of the polymers varied when the solution for absorption changed. The results indicated that the interaction between acidic monomer/polymer and template with amino group mainly depended on hydrogen bonding and ionic (electrostatic) interaction. And their recognizing mechanism altered as the type of the solvent changed. The experiments of binding different substrates indicated that the MIPs possessed an excellent rebinding ability and inherent selectivity to quinine.

Key words: template; two-step seed swelling; miniemulsion polymerization; molecular imprinting technology