

引发转移终止剂修饰载体表面光接枝共聚 制备分子印迹聚合物微球

戎非 冯小刚 李萍 袁春伟 付德刚*

(东南大学生物电子学国家重点实验室, 南京 210096; 北京航空航天大学生物工程系, 北京 100066.)

* 联系人, E-mail: fudegang@seu.edu.cn

摘要 以二乙烯苯(DVB)和对氯甲基苯乙烯(CMS)为单体通过沉淀聚合制备了聚苯乙烯微球载体, 表面经过引发转移终止剂(iniferter)修饰后, 采用光接枝表面印迹的方法制备了以 *D*-扁桃酸(*D*-MDA)为模板分子的分子印迹微球(MIMs)。扫描电子显微镜(SEM)研究结果显示, 分子印迹微球具有良好的单分散性和球形度, 平均粒径为 4.38 μm , 多分散系数为 1.02。采用傅里叶变换红外光谱(FT-IR)、元素分析和热重分析对聚合物微球进行了表征, 结果显示聚合物反应完全并具有良好的热稳定性。将分子印迹微球用作高效液相色谱固定相研究了其分子识别和选择性吸附性能。结果表明, 采用光接枝法制备的表面分子印迹微球对模板分子及其手性对映体呈现出良好的分离能力, 在化学传感、色谱分析和固相萃取等领域具有广阔的应用前景。

关键词 聚苯乙烯微球 光接枝 引发转移终止剂 分子印迹微球

分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)是近年来发展起来的一种新型分离材料, 是由模板分子(待分离分子)与可聚合的功能单体通过离子作用、氢键、疏水作用等超分子作用形成主-客体配合物, 再加入大量交联剂聚合制得。除去模板分子后, 聚合物中留下与模板分子空间结构匹配的空穴, 并且空穴中所带的功能基团对模板分子有特异性结合能力^[1]。由于分子印迹聚合物具有特异性的识别能力和稳定的化学物理性质, 现已广泛应用于分离和富集、酶受体模拟和传感器等方面^[2]。

传统的分子印迹聚合物采用本体聚合法制备, 虽然装置简单易于控制, 但是聚合物在使用前需经过研磨、过筛等过程来选取大小合适的颗粒, 费时费力, 收率较低, 而且颗粒的形状很不规则, 使得印迹分子难以进入吸附位点, 吸附容量也较低^[3]。相比之下, 分子印迹微球(molecularly imprinted microspheres, MIMs)的制备和应用方便、色谱效率高且便于功能设计, 近年逐渐成为研究的热点^[4]。目前制备MIMs的方法主要有悬浮聚合^[5]、多步溶胀法^[6]、沉淀聚合^[7]等。采用上述方法虽然成功制备了MIMs并将其用于色谱分离, 但所得印迹聚合物的识别位点大都在聚合物微球内部, 导致模板分子与识别位点结合困难, 分离处理效率不高, 仍然无法得到颗粒形态和吸附特性俱佳的印迹聚合物微球。采用表面印迹方法制

备的MIMs因其识别位点建立在聚合物表面, 模板分子能很快靠近识别位点, 具有较高的结合速率和解离效率, 可极大地降低非特异吸附对选择性的影响, 并减少包埋现象^[8,9]。

表面接枝技术是近年出现的一种新型的表面印迹技术, 通过在载体表面引发聚合反应形成表面印迹聚合物层。Sulitzky等^[10]报道了以硅胶微球为载体表面固定偶氮引发剂制备形状规整、具有良好色谱性能的MIMs。但是单点连接的偶氮引发剂所产生的一部分未连接于载体上的自由基会在溶液中引发聚合反应造成凝胶化。采用引发转移终止剂(initiator transfer agent terminator, iniferter)作为引发剂是解决这个问题的重要途径之一。引发转移终止剂是一种特殊的自由基引发剂, 能在聚合过程中同时起引发、转移、终止作用^[11]。在紫外光照射下, 引发转移终止剂可以断裂形成一个活性的自由基和一个惰性的自由基, 活性自由基可以引发单体聚合而惰性的自由基主要进行自由基终止反应和链转移反应^[12]。将引发转移终止剂作为分子印迹聚合反应的引发剂接枝到载体的表面, 使得活性自由基连接在载体的表面, 惰性的自由基存在于溶液中, 可以避免凝胶化的现象发生^[13]。Rukert等^[14]报道了在iniferter修饰的大孔硅胶表面接枝印迹聚合物层制备表面分子印迹微球的方法, 并将其作为高效液相色谱的填料分离*D*、*L*-苯

丙氨酰苯胺,取得了较好的效果.但是以硅胶作为载体需进行硅烷化、封端等表面处理,并且硅胶键合固定相适用pH值范围也较窄.具有足够机械强度的有机聚合物微球可克服硅胶载体的上述缺点,不但简化了制备步骤而且更适用于生命科学和环境科学的研究需要.

本文以沉淀聚合制备的聚苯乙烯微球为载体,丙烯酸胺为功能单体,EGDMA为交联剂,采用表面光接枝的方法,通过固定在载体表面的引发转移终止剂二乙基二硫代氨基甲酸钠引发聚合反应,制备了以D-MDA为模板的单分散MIMs,进行了表征并考察了印迹聚合物对模板分子的作用和手性分离性能.

1 实验

1.1 试剂及仪器

左旋扁桃酸(*D*-mandelic acid, *D*-MDA)、混旋扁桃酸(*D*, *L*-mandelic acid, *D*, *L*-MDA)(江苏省泰兴市一鸣精细化工有限公司);对氯甲基苯乙烯(4-chloromethylstyrene, CMS)、二乙烯基苯(divinylbenzene, DVB-80)(Sigma-Aldrich公司);偶氮二异丁腈(2,2'-azobis-(2-methylpropionitrile), AIBN)(南京化学试剂有限公司);二乙基二硫代氨基甲酸钠三水合物(sodium diethyldithiocarbamate trihydrate, NaD-EDTC, 上海三爱思试剂有限公司);乙二醇二甲基丙烯酸酯(ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA, 苏州安利化工有限公司);丙烯酰胺(AM)、四氢呋喃、甲醇、乙醇、乙酸、乙腈、丙酮(上海化学试剂有限公司).

紫外可见分光光度计(UV-8500, 上海分析仪器厂);热重分析仪(Q600, TA公司);傅里叶变换红外分光光度计(750型, Nicolet公司);旋转蒸发器(RE-52A, 上海亚荣生化仪器厂);元素分析仪(CHN-Rapid, Heraeus公司);扫描电子显微镜(Sirion, FEI公司);高效液相色谱仪(1100型, Agilent公司);300 W中压水银灯(北京电光源研究所).

1.2 分子印迹聚合物微球的制备

(1) 聚苯乙烯微球载体的制备. 量取二乙烯苯(8 mL)和对氯甲基苯乙烯(2 mL)溶于500 mL乙腈后置于1000 mL烧瓶中,加入引发剂AIBN(0.2 g),超声脱气后通N₂ 10 min,密封.将烧瓶连接到旋转蒸发器上,于70 °C加热24 h,转速为20 r/min.反应结束

后所得聚合物分别以四氢呋喃、丙酮和乙醇清洗3次后,50 °C下真空干燥过夜.

(2) 载体表面耦合引发转移终止剂.称取聚苯乙烯微球(4 g)超声分散于20 mL乙醇中,缓慢滴加12 mL 10%二乙基二硫代氨基甲酸钠乙醇溶液后,50 °C下搅拌过夜,所得产物分别以四氢呋喃和乙醇清洗3次,40 °C下真空干燥过夜.

(3) 载体表面的光接枝聚合.称取耦合后的微球(2 g)超声分散于80 mL乙腈中,加入模板分子D-MDA(0.20 g)、功能单体AM(0.37 g)和交联剂EGDMA(4.90 mL),充分溶解后置于石英玻璃管中,通N₂ 10 min后密封,于室温下以300 W中压汞灯光照聚合12 h,所得聚合物置于索氏提取器中,甲醇-乙酸(9:1,体积比)洗脱24 h,最后用甲醇洗去残留乙酸,真空干燥至恒重.光接枝制备表面分子印迹聚合物的过程如图1所示.空白聚合物微球(NIMs)的制备步骤同上,只是不加入模板分子.

1.3 紫外光谱分析

模板分子MDA的浓度固定为C₀ = 0.5 mmol/L,加入不同量的功能单体AM(浓度分别为0, 0.5, 1.0, 2.0 mmol/L),在恒温振荡器中振荡12 h后,用相应浓度的AM溶液作为参比,检测紫外吸收光谱的变化.

1.4 微球粒径测试

聚合物微球经干燥后,将其在乙醇中分散,将一滴分散液滴在铝箔上,用扫描电子显微镜(SEM)观察微球表面形貌.从所得到的扫描电子显微镜照片中测量约100个微球的粒径,按如下公式计算微球的分散程度:

$$d_n = \sum d_i / n, d_w = \sum d_i^4 / \sum d_i^3, d_p = d_w / d_n$$

式中d_i为微球粒径;d_n为数均粒径;d_w为重均粒径;d_p为多分散系数;n为微球数目

1.5 色谱分析

以乙醇-水(4:1,体积比)为匀浆液,乙醇为顶替液将聚合物颗粒装填到100 mm×4.6 mm(i.d.)不锈钢色谱柱中,装填压力为20 MPa.进行色谱评价时流动相为乙腈-乙酸(99:1,体积比),进样量为10 μL,样品浓度为1 mmol/L,流速为0.5 mL/min,温度为室温,检测波长254 nm.保留因子k按k = (t_R - t₀)/t₀计算,其中t_R为样品的保留时间,t₀为丙酮测定的死时间;分离因子α按α = k_D/k_L计算,其中k_D和k_L分别是D型及L型对映体的保留因子,分离度R_S = 2(t_D +

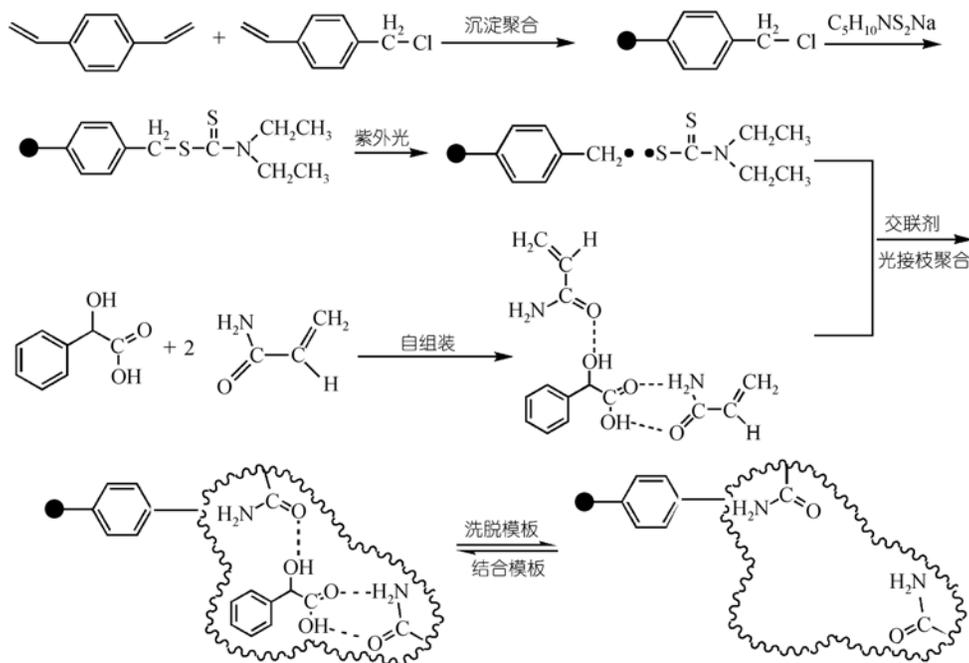


图 1 分子印迹聚合物微球的制备

$t_L)/(W_D+W_L)$, 理论塔板数 $N_R = 5.54(t_R/W_{1/2})$, W_D , W_L , $W_{1/2}$ 分别为 D 和 L 型分子色谱峰的峰宽及半峰宽.

2 结果与讨论

2.1 印迹聚合物的制备

根据分子印迹的机理, 模板分子和功能单体在溶液中先通过自组装形成主-客体配合物. 在浓度为 0.5 mmol/L 的 MDA 乙腈溶液中分别加入浓度不同的 AM, 观察 MDA 的紫外光谱变化, 研究模板分子与单体之间的作用. 如图 2 所示, 随着 AM 浓度的提高 MDA 的最大吸收波长出现红移, 并且吸收强度不断降低, 说明在模板分子和功能单体之间已经产生作用力并形成复合物, 根据模板分子和功能单体的结构分析两者间的作用力应为氢键. 氢键作用使得 MDA 分子苯环上的电子云密度和整个分子的电荷分布发生改变, 紫外光谱发生变化. 完成自组装后, 加入交联剂 EGDMA 进行聚合反应, 洗脱模板分子以后, 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(图 1), 可以对通常难以分离的手性异构体进行较好的检测和分离.

图 3 为 MIMs 的 SEM 照片, 从图中可以看见 MIMs 具有良好的球形度、粒径分布均匀, 表面平滑. 对照片进行数据处理, 得到微球粒径尺寸及分布情况(图 4). 由图 4 可知, 粒径在 4~5 μm 之间的微球占

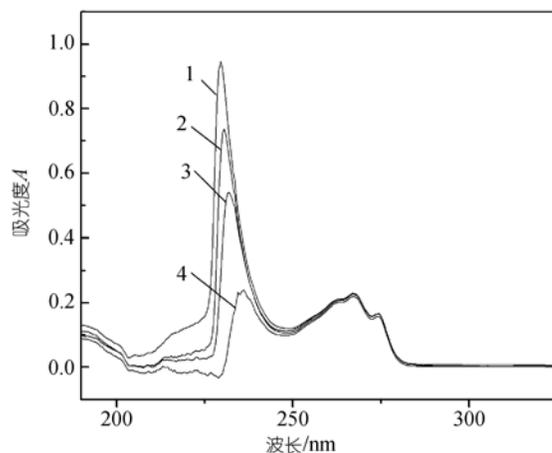


图 2 不同浓度的丙烯酰胺对 D -MDA 在乙腈中紫外光谱的影响

MDA: 0.5 mmol/L; AM: 1, 0 mmol/L; 2, 0.5 mmol/L; 3, 1.0 mmol/L; 4, 2.0 mmol/L

微球总数的 95% 以上, 少量粒径在 3 μm 以下的微球 (<3%) 形成于载体合成过程中, 平均粒径为 4.38 μm , 多分散系数 $d_p = 1.02$, 属于单分散颗粒.

用热重分析仪对 MIMs 的热稳定性进行分析, 温度范围: 50~600 $^{\circ}\text{C}$, 升温速率: 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 扫描气体: 氮气. 图 5(a)和(b)分别为 MIMs 的热失重分析(TGA)曲线和微商热重(DTG)曲线, 由图可知 TGA 曲线只有一个失重台阶, 起始失重的温度为 295 $^{\circ}\text{C}$, 在 400 $^{\circ}\text{C}$ 以上质量急剧减少, 437 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最大失重速率, 600

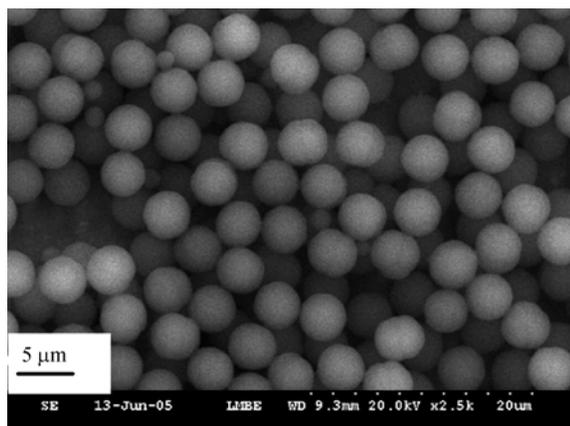


图 3 分子印迹聚合物微球 SEM 图

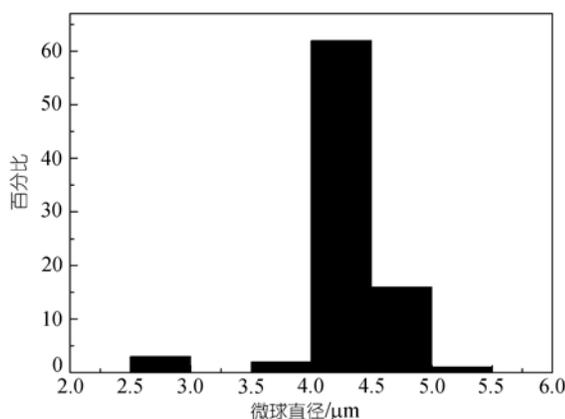


图 4 分子印迹聚合物微球粒径分布示意图

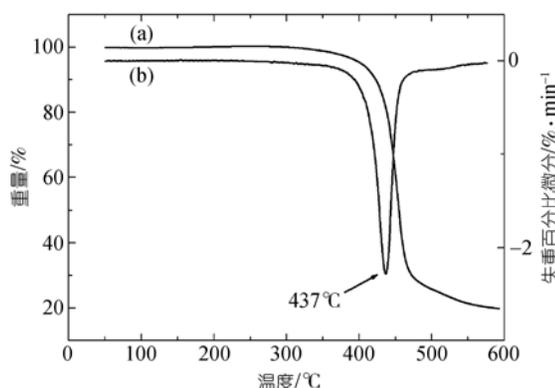


图 5 分子印迹微球热重分析曲线
(a) 热失重曲线; (b) 微商热重曲线

时最大失重率约为 81%。在高纯度氮气中测定的结果可作为印迹聚合物热稳定性的表征, 说明在 300 以下无分解失重, 印迹聚合物具有良好的热稳定性。

图 6 中(a)、(b)和(c)分别为聚苯乙烯微球载体、耦合 iniferter 的载体以及印迹聚合物的红外光

谱, 载体耦合 iniferter 后, 图 6(b)中出现了 1267 cm^{-1} 碳硫双键的伸缩振动吸收, 属于二乙基二硫代氨基甲酸钠中的硫代羰基, 同时元素分析结果显示耦合后微球中氮元素含量上升到 0.49%, 表明聚苯乙烯微球表面已成功耦合 iniferter。图 6 (c)中 1724 cm^{-1} 处出现一个明显的高强度峰, 为功能单体丙烯酰胺和交联剂 EGDMA 的羰基伸缩振动峰, 而 1153 cm^{-1} 处为 EGDMA 中 C—O—C 的反对称伸缩振动峰。此外, MIMs 的碳元素含量由聚合前的 82.95% 下降为 77.28%, 氮元素含量则上升到 0.85%, 表明功能单体丙烯酰胺和交联剂 EGDMA 均参与了反应, 分子印迹层已成功接枝于载体微球的表面。

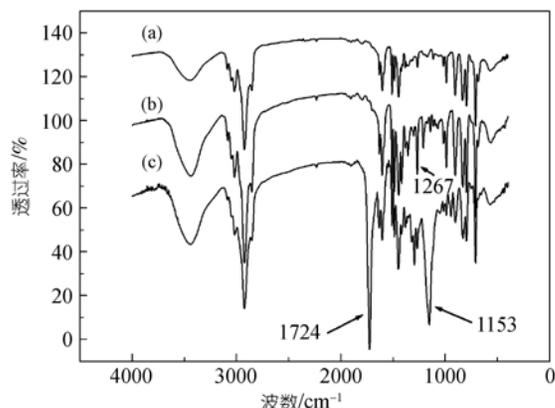


图 6 红外光谱图

(a) 聚苯乙烯微球载体; (b) 耦合 iniferter 的载体; (c) 印迹聚合物微球

2.2 分子印迹聚合物微球的手性分离能力

采用高效液相色谱法评价聚合物微球的手性分离能力, 将光接枝法制得的 MIMs 和 NIMs 用作高效液相色谱手性固定相, 考察其对 *D*、*L*-MDA 的分离能力。图 7 是 *D*、*L*-MDA 在 *D*-MDA 印迹的 MIMs 柱上的分离图。根据分子印迹原理, 图中色谱峰(a)应为 *L*-MDA, 它在 *D*-MDA 印迹的色谱柱上保留时间较短, 先流出色谱柱。色谱峰(b)为 *D*-MDA, 保留时间相对较长, 这是由于印迹空穴中与模板分子相匹配的互补性结合位点与 *D*-MDA 形成了稳定的相互作用, 使其保留时间明显加长, 说明印迹聚合物对模板分子具有较强的亲和力, 所得到的色谱峰宽较大并且有一定的拖尾现象, 归因于亲和力和可接近程度的差异造成的结合位点非均一性以及较低的传质速率 [15]。 *L*-MDA 由于与印迹空穴构型不匹配, 无法进入空穴内部与空穴内部的功能基团近距离接触产生较强的作用力。正是这种作用力强度的差异造成两种构型

的分子在固定相上保留时间的不同,使得聚合物能够有效地识别模板分子.从图中可以看出两种异构体在色谱柱上达到了很好的分离,MIMs固定相显示出良好的分子识别和手性分离性能,其保留因子分别为: $k_D = 1.38$, $k_L = 0.15$,分离因子 $\alpha = 9.2$,分离度 $R_s = 1.12$,理论塔板数 $N_D = 8$; $N_L = 51$.图7中插图(a)、(b)为D、L-MDA在MIMs装填的色谱柱上的色谱图,可以看到D、L-MDA在空白聚合物的柱上只出现一个色谱峰,没有得到拆分.这是因为没有模板分子在印迹聚合物中留下与模板分子相对应的识别空穴,两个对映异构体在聚合物中的吸附作用都属于非特异性吸附,对映异构体在其上的保留能力没有差别,因而无法得到拆分.

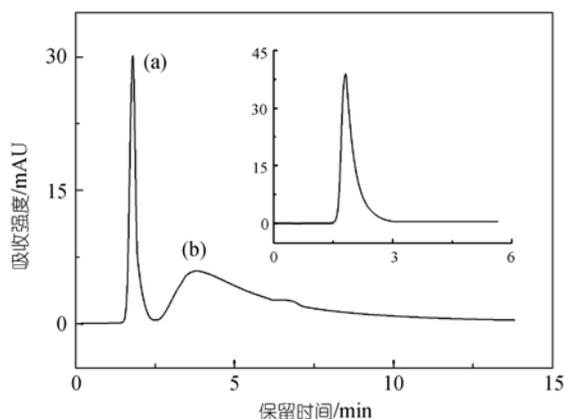


图7 分子印迹微球的高效液相色谱评价

柱尺寸: 100 mm×4.6 mm (i.d.); 淋洗液: 1%乙酸-乙腈;
流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 254 nm; 进样量: 10 nmol

3 结论

本文采用光接枝表面印迹的方法,以引发转移终止剂修饰的聚苯乙烯微球为载体,合成了具有良好的手性分离效能的MIMs,避免了传统的本体聚合中繁琐的研磨、筛选等步骤,并且克服了悬浮聚合、沉淀聚合等传统的印迹微球制备方法传质效率低下、模板分子消耗过大的缺点,不仅可以应用到手性色谱固定相领域,而且在化学传感、组合化学库、反应催化以及免疫测定等方面也有着广阔的应用前景.

致谢 本工作为国家自然科学基金资助项目(批准号:60121101).

参 考 文 献

- Dickert F L, Hayden O. Molecular fingerprints using imprinting techniques. *Adv Mater*, 2000, 12 (4): 311—314[DOI]
- Kandimalla V B, Ju H X. Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry. *Anal & Bioanal Chem*, 2004, 380(4): 587—605[DOI]
- Baggiani C, Baravalle P, Anfossi L, et al. Comparison of pyrimethanil-imprinted beads and bulk polymer as stationary phase by non-linear chromatography. *Anal Chim Acta*, 2005, 542: 125—134[DOI]
- 张立永, 成国祥. 分子印迹聚合物微球的制备及应用研究进展. *功能高分子学报*, 2002, 15(2): 214—218
- Kim K, Kim D. High-performance liquid chromatography separation characteristics of molecular-imprinted poly(methacrylic acid) microparticles prepared by suspension polymerization. *J Appl Polym Sci*, 2005, 96(1): 200—212[DOI]
- Haginaka J, Kagawa C. Uniformly sized molecularly imprinted polymer for d-chlorpheniramine—Evaluation of retention and molecular recognition properties in an aqueous mobile phase. *J Chromatogr A*, 2002, 948(1-2): 77—84[DOI]
- Li P, Rong F, Yuan C W. Morphologies and binding characteristics of molecularly imprinted polymers prepared by precipitation polymerization. *Polym Int*, 2003, 52(12): 1799—1806[DOI]
- Nicholls I A, Rosengren J P. Molecular imprinting of surfaces. *Bioseparation*, 2002, 10: 301—305[DOI]
- 张卫英, 李晓, 朱兰兰. 表面分子印迹材料的制备研究进展. *现代化工*, 2005, 12: 20—23
- Sulitzky C, Ruckert B, Hall A J, et al. Grafting of molecularly imprinted polymer films on silica supports containing surface-bound free radical initiator. *Macromolecules*, 2002, 35: 79—91[DOI]
- 钦曙辉, 丘坤元. 新型引发转移终止剂引发烯类单体活性自由基聚合及光聚合. *高分子学报*, 2002, 2: 127—136
- 陈欢, 王国建. 用引发转移终止剂制备嵌段和接枝共聚物. *高分子通报*, 2003, 4: 79—84
- Tamayo F G, Titirici M M, Esteban A M, et al. Synthesis and evaluation of new propazine-imprinted polymer formats for use as stationary phases in liquid chromatography. *Anal Chim Acta*, 2005, 542: 38—46[DOI]
- Rukert B, Hall A J, Sellergren B. Molecularly imprinted composite materials via iniferter-modified supports. *J Mater Chem*, 2002, 12: 2275—2280[DOI]
- Turiel E, Martin-Esteban A. Molecularly imprinted polymers: towards highly selective stationary phases in liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378: 1876—1886[DOI]

(2006-03-06 收稿; 2006-06-12 接受)