

研究报告

活性 / 可控自由基聚合制备恩诺沙星 印迹微球及识别性能研究

张 毅, 董襄朝

(南开大学 化学学院, 天津 300071)

摘 要: 研究了一种以活性 / 可控自由基聚合 (可逆加成 - 断裂链转移自由基聚合, reversible addition - fragmentation chain transfer radical polymerization, RAFT polymerization) 制备分子印迹微球的方法。结合沉淀聚合, 以二硫代苯甲酸异丙苯酯 (cumyl dithiobenzoate, CDB) 为可逆加成 - 断裂链转移剂, 恩诺沙星为印迹化合物, 甲基丙烯酸 (MAA) 和乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EDMA) 分别为功能单体和交联剂, 偶氮二异丁腈 (A BN) 为引发剂, 乙腈为分散剂, 考察了温度、单体浓度等反应条件对微球制备的影响。通过改变 A BN 和 CDB 的比例, 可以达到控制分子印迹微球粒径和分散性的目的。扫描电镜结果显示, 以 RAFT 聚合方法得到的分子印迹微球粒径可达 $2.0 \sim 2.2 \mu\text{m}$, 并具有良好的分散性。平衡吸附实验结果说明印迹聚合物微球对印迹化合物的结合能力优于非印迹聚合物。分子印迹微球对于恩诺沙星及其结构类似物洛美沙星的饱和吸附量分别为 37.3 和 $19.5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$, 证明分子印迹微球有很好的识别能力。

关键词: 分子印迹聚合物微球; 活性 / 可控自由基聚合; 可逆加成 - 断裂链转移自由基聚合; 恩诺沙星; 沉淀聚合

中图分类号: O652.6; S859.79 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2008)10 - 1025 - 06

Evaluation of Enrofloxacin Imprinted Polymeric Microspheres Synthesized with Living/Controlled Radical Polymerization

ZHANG Yi, DONG Xiang-chao

(College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: The method of using one living/controlled radical polymerization (reversible addition - fragmentation chain transfer radical polymerization, RAFT polymerization) for the synthesis of molecularly imprinted microspheres was developed. Combined with the precipitation polymerization, the MIP microspheres were prepared using acetonitrile as the dispersant, enrofloxacin as the template molecule, methacrylic acid (MAA) as the functional monomer, ethylene dimethacrylate (EDMA) as the crosslinker, cumyl dithiobenzoate (CDB) as the RAFT agent and azobisisobutyronitrile (A BN) as the initiation agent. The effects of the reaction conditions including the temperature and monomer concentration on the preparation were studied. The diameter and dispersity of MIP microspheres could be controlled through the ratio of A BN and CDB. The results of scanning electron microscopic images showed that better particle size distribution of MIP microspheres with a diameter range of $2.0 - 2.2 \mu\text{m}$ was obtained. The equilibrium adsorption experiment showed that the binding ability of MIP for the template molecule was superior to that of non-imprinted polymer. The amount of saturation adsorption for enrofloxacin and lomefloxacin were 37.3 and $19.5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively, indicating that the MIP microspheres could well recognize the template molecule.

Key words: molecularly imprinted polymeric microsphere; living/controlled radical polymerization;

收稿日期: 2008 - 03 - 21; 修回日期: 2008 - 04 - 30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20575030)

第一作者: 张 毅 (1978 -), 男, 天津人, 讲师, 硕士研究生

通讯作者: 董襄朝, Tel: 022 - 23504694, E - mail: xcdong@nankai.edu.cn

reversible addition - fragmentation chain transfer polymerization; enrofloxacin; precipitation polymerization

恩诺沙星即 1-环丙基-7-(4-乙基-1-哌嗪基)-6-氟-1,4-二氢-4-氧代-3-喹啉羧酸, 是畜禽常用的氟喹诺酮类药物^[1]。该类药被广泛应用, 其在动物源性食品中的残留直接威胁到人体健康, 因此, 对其残留的检测和监督非常必要。

分子印迹是获得在结合位点上与某一特定分子立体结构完全匹配的聚合物的制备技术, 已经被成功地应用于色谱分离、固相萃取、模拟酶和传感器等领域^[2-6]。分子印迹可以方便而有效地制备对待测物具有可预定选择性的分子印迹聚合物 (molecularly imprinted polymer, MIP)。封管聚合为传统的 MIP 制备方法, 产物需经研碎、过筛后用作色谱固定相, 浪费较多, 且研磨会破坏部分结构, 使 MIP 的选择性能下降^[7]。悬浮聚合往往要用含水分散剂, 影响 MIP 合成中印迹分子-功能单体的氢键作用。沉淀聚合也被用于制备分子印迹聚合物微球 (molecularly imprinted polymer microspheres, MIPMS), 与悬浮聚合和种子聚合相比, 可避免稳定剂或表面活性剂对印迹分子-功能单体相互作用产生干扰。同时, 由于无需研磨、过筛等步骤, 减少了对结合位点的破坏和聚合物的损失^[8]。但一般的沉淀聚合得到的微球颗粒较小, 不适合用作常规的液相色谱固定相。

活性/可控自由基聚合是可以控制聚合物结构和性能的自由基聚合方法。该法通过钝化大量可反应的自由基, 建立一个微量的增长自由基与大量的休眠自由基之间的快速动态平衡, 减少了双基终止及链转移的可能性, 可以对聚合产物的相对分子质量及其分布、序列结构进行很好的控制, 至今仍是自由基聚合的研究热点^[9]。可逆加成-断裂链转移 (reversible addition fragmentation chain transfer, RAFT) 自由基聚合是一种活性/可控自由基聚合^[10]。在 RAFT 反应中, 通常加入双硫酯衍生物作为链转移试剂, 同时加入其它引发剂, 如偶氮二异丁腈。在聚合中链转移试剂与增长链自由基形成休眠的中间体, 该中间体可自身裂解, 释放出新的活性自由基, 结合单体形成增长链, 双硫酯衍生物在活性与休眠自由基之间迅速转移 (图 1), 限制了增长链自由基之间的不可逆双基终止副反应, 使聚合反应得以有效控制, 相对分子质量分布降低, 聚合体现“活性”可控特征。

为了增加印迹聚合微球的粒径及均匀性, 采用 RAFT 法合成恩诺沙星印迹微球, 以二硫代苯甲酸异丙苯酯 (cumyl dithiobenzoate, CDB) 为 RAFT 试剂, CDB 可以和自由基形成可逆加成-断裂过程 (图 2), 对聚合进行控制。在溶剂一定的条件下, 反应速率是影响颗粒大小的重要因素, 可以通过改变 A BN/RAFT 的浓度改变反应速率, 进而改变聚合物粒径, 有效地控制聚合物大小及其分布, 进而合成粒径均匀、大小可控的 MIPMS^[11]。此外, 这种方法

所得聚合物链端含有 RAFT 试剂基团, 如再加入单体, 可生成嵌段、星形和其它特殊结构的聚合物, 用于制备多模式固定相^[12]。因此运用 RAFT 聚合方法得到的分子印迹材料, 具有特殊的优越性。本文研究了实验条件和微球大小及颗粒分散性的关系, 并对印迹微球的分子识别性能进行了分析。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

甲基丙烯酸 (methacrylic acid, MAA)、四氢呋喃 (THF)、溴苯 (bromobenzene), 均为分析纯, 购于天津市化学试剂二厂; 乙二醇二甲基丙烯酸酯 (ethylene dimethacrylate, EDMA, 宿州华润化工有限责任公司); 偶氮二异丁腈 (2, 2'-azobis(2-methylpropionitrile), A BN, 分析纯, 天津光复精细化学有限公

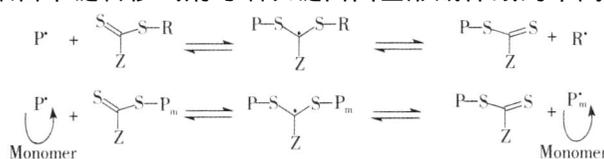


图 1 RAFT 活性/可控自由基聚合反应机理
Fig. 1 Schematic illustration of the reaction mechanism of reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization

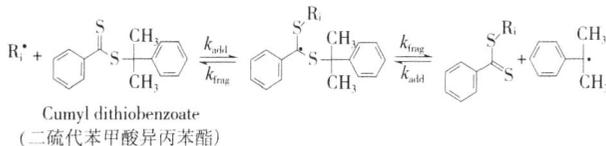


图 2 二硫代苯甲酸异丙苯酯的可逆加成-断裂链转移过程示意图

Fig. 2 Schematic illustration of RAFT process of cumyl dithiobenzoate

司); 甲基苯乙烯 (2-phenylpropene, 分析纯, 上海试剂有限公司); 水为二次蒸馏水, 其它试剂均为分析纯。

UV-2401型双光束紫外可见分光光度计 (岛津公司, 日本); X-650扫描电子显微镜 (日立公司, 日本)。

1.2 二硫代苯甲酸异丙苯酯的合成

在 500 mL三口瓶中加入镁条、少许碘颗粒, 再滴加入少许溴苯和四氢呋喃混合液 (体积比 1 : 1), 待反应瓶中的褐色消失后, 加入 23 mL溴苯和 60 mL THF溶液, 30 °C 恒温。镁条反应完全后, 滴加 6.4 mL二硫化碳, 室温搅拌 4 h后, 加水中和残余的格氏试剂, 然后经过滤、加盐酸酸化、二氯甲烷萃取, 得到紫红色溶液, 经无水硫酸镁干燥后蒸出溶剂, 得到二硫代苯甲酸。将二硫代苯甲酸与精制后的 甲基苯乙烯混合, 并加入四氯化碳, 65 °C 恒温反应 10 h。蒸出溶剂, 得到粗产品。以石油醚为洗脱剂、硅胶为固定相进行柱色谱分离, 得到纯品, 经 $^1\text{H NMR}$ 测定并与文献对照, 得到二硫代苯甲酸异丙苯酯, 产率约为 48%。

1.3 分子印迹微球的制备

称取恩诺沙星 (印迹化合物, 1 mmol)和 MAA (功能单体, 4 mmol)加入乙腈 (分散剂)中, 室温下振荡 5 h, 再依次加入交联剂 EDMA (20 mmol)、引发剂 (A BN)和 RAFT试剂 (CDB), 在旋转蒸发器上反复抽真空、通氮气后, 密封, 60 °C 水浴中以 20 r/min反应 24 h。聚合完成后, 用乙酸 - 甲醇 (体积比 2 : 8)洗去印迹化合物, 用甲醇洗涤后真空干燥。空白聚合物制备方法同上, 但不加入印迹化合物。

1.4 平衡吸附法测定分子印迹微球结合性能

准确称取聚合物 10 mg, 用移液管加入一定量的恩诺沙星乙腈溶液 ($100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 室温下振荡 24 h。离心分离, 上层清液用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。以乙腈与聚合物振荡并同样处理后的滤液为参比, 紫外光度法检测滤液中待测物的浓度。测定 5次取均值。依下式计算吸附量, $Q = (c_0 - c) V / m$, 式中 Q : 吸附量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); c_0 : 吸附前溶液中吸附物的质量浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); c : 吸附后溶液中吸附物的质量浓度 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); m : 印迹聚合物的质量 (g); V : 吸附液的体积 (mL)。

2 结果与讨论

2.1 反应条件对聚合物微球粒径及形态的影响

2.1.1 (MAA + EDMA) - A BN - CDB 比例的影响 固定恩诺沙星 - MAA - EDMA的摩尔比 (1 : 4 : 20)和单体 (MAA + EDMA) - 分散剂的体积比 (1 : 25), 考察 (MAA + EDMA) - A BN - CDB 间的摩尔比对微球粒径的影响。结果表明 (表 1), CDB 和 A BN 的不同比例对分子印迹聚合物的形态、颗粒大小有很大的影响。CDB 的加入使得颗粒增大, 推测原因: CDB 的加入使得聚合反应速率减慢, 聚合物链增长均匀, 形成的核粒子数目减小, 导致最后形成的聚合物微球粒径大于传统自由基聚合所得产物, 而且更加均匀。从分子印迹聚合物的扫描电子显微镜图 (图 3)还可以看出, 在 (MAA + EDMA) - A BN - CDB 摩尔比为 100 : 3 : 5 的研究条件下 (P5), 所合成的分子印迹聚合物微球的形状比较规整, 相同条件下, 当无印迹分子存在时, 所得的非分子印迹聚合物为团块状。这可能是由于印迹化合物的加入改变了聚合体系的溶解能力所致。

表 1 恩诺沙星分子印迹聚合物的结构与合成条件^{*}
Table 1 Synthetic condition and configuration of the enrofloxacin imprinted polymers^{*}

Polymer	n_{Monomer} ^{**}	$n_{\text{A BN}}$	n_{CDB}	Configuration	$d / \mu\text{m}$
P1	100	2	1	Microsphere with large size distribution (微球但不均匀)	0.7 ~ 0.8
P2	100	2	2	Microsphere (微球)	1 ~ 2
P3	100	3	1	Microsphere with small size (小粒径微球)	0.6 ~ 0.7
P4	100	3	3	Irregular microsphere (不规则颗粒)	1 ~ 1.5
P5	100	3	5	Microsphere with better size distribution (比较均匀的微球)	2.0 ~ 2.2
P5 - NIP	100	3	5	Coagulum (团聚)	-

^{*} reaction temperature was 60 °C; the ratio of monomer (MAA + EDMA) / acetonitrile was 4.3 g / 100 mL; ^{**} the monomer was the sum of MAA and EDMA

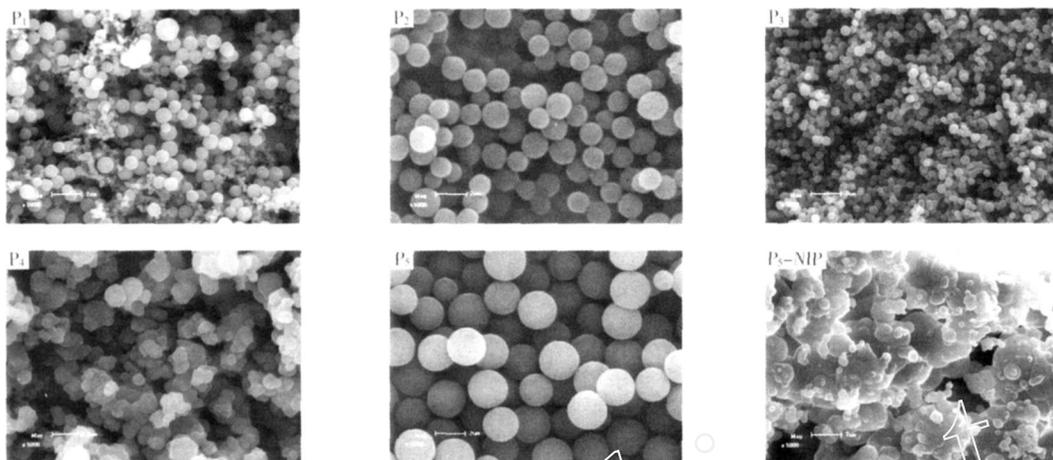


图 3 分子印迹聚合物的扫描电子显微镜图

Fig. 3 SEM images of molecularly imprinted polymer(MIP)

2.1.2 单体 (MAA + EDMA)与分散剂比例的影响 在恩诺沙星 - MAA - EDMA的摩尔比为 1 : 4 : 20, (MAA + EDMA) - A BN - CDB摩尔比为 100 : 3 : 5, 反应温度为 60 的条件下, 考察了单体 (MAA + EDMA)与分散剂比例对聚合物粒径的影响。结果表明, 随着单体浓度的降低, 聚合物的粒径逐渐减小, 因为体系中溶剂量的增加使得聚合物临界链长减小, 因此导致聚合物粒径随单体浓度的减小而减小。当单体 (MAA + EDMA)质量为 4.3 g, 乙腈体积为 100 mL时得到的微球有良好的均匀度和分散性。

2.1.3 聚合温度对印迹聚合物粒径的影响 在上述优化条件下, 研究了温度 (60 ~ 90)对印迹聚合物粒径的影响。结果表明, 温度增高, 粒径减小, 其原因可能为: 体系温度升高, 聚合物反应速度加快, 使得聚合核的浓度增加, 导致微球的粒径减小。因此选择 60 为反应温度。

2.2 恩诺沙星分子印迹微球吸附等温线

图 4为恩诺沙星分子印迹聚合物中的结合位点形成示意图。在印迹中, MAA 可能与恩诺沙星分子结构中的 4个位置形成 5个氢键。

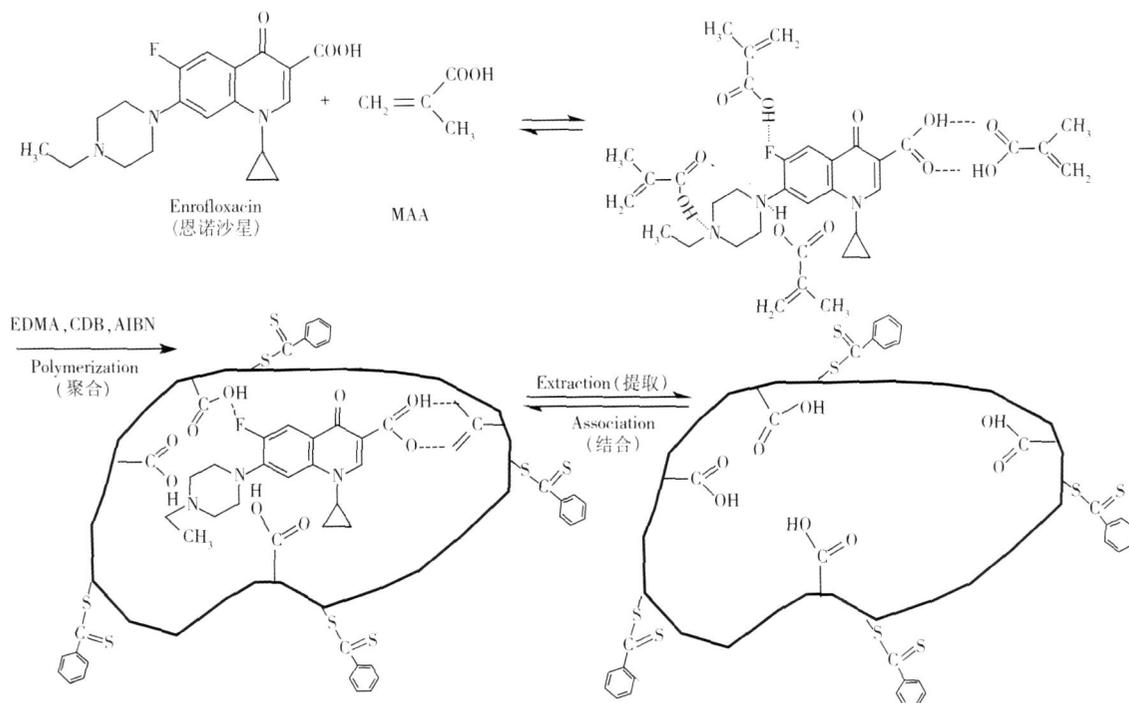


图 4 恩诺沙星分子印迹聚合物中的结合位点形成示意图

Fig. 4 Schematic illustration of the formation of binding sites of enrofloxacin imprinted polymeric microspheres

为了测定印迹微球的识别能力, 用平衡吸附实验测定了印迹聚合物 P5 和非印迹聚合物 P5 - NIP 对于恩诺沙星的结合等温线 (图 5)。可以看出, P5 的平衡吸附量明显高于 P5 - NIP 的平衡吸附量, 说明所合成的分子印迹聚合物微球对印迹分子具有特异的亲和能力。

用 Scatchard 分析^[13-14]对结合位点进行了评价, Scatchard 方程式: $Q/c_0 = (Q_{\max} - Q)/K_d$, 式中 K_d 为结合位点的平衡解离常数, Q_{\max} 是结合点的最大表现吸附位点数, c_0 是印迹分子在吸附液中的平衡浓度。作 Q/c_0 随 Q 的变化曲线 (图 6)。由图 6 可见, 聚合物主要存在 2 类不同的结合位点, 2 条直线方程分别为 $Q/c_0 = 73.3191 - 3.23418Q$, $Q/c_0 = 16.21512 - 0.24859Q$, 均有良好的线性关系。由斜率和截距求得, 亲和力较高和亲和力较低的结合位点的解离常数分别为 $K_{d1} = 0.309 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $K_{d2} = 4.022 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 最大表现结合吸附位点数分别为 $Q_{\max1} = 22.6 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $Q_{\max2} = 65.2 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。2 类结合位点产生的原因可能是在聚合前或聚合期间的反应混合物溶液中, 功能单体与印迹分子可以不同的功能单体 - 印迹分子结合比例形成 2 类不同的复合物, 这些复合物经交联剂交联进入聚合物中, 因此在印迹聚合物中形成 2 种不同性质的结合位点。

2.3 聚合物微球的选择性评价

通过平衡吸附法测定了印迹聚合物 P5 和非印迹聚合物 P5 - NIP 对恩诺沙星和洛美沙星的饱和吸附量 (图 7)。MIPMS 对恩诺沙星和洛美沙星的吸附量分别为 37.3 和 $19.5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$, MIPMS 对恩诺沙星的吸附能力明显优于对洛美沙星的吸附能力, 而 P5 - NIP 对各种底物的吸附量基本相同。表明 MIPMS 中包含有固定排列功能基的空穴, 其在空间结构上与印迹分子互补, 因而选择性好, 吸附能力强。而 P5 - NIP 对各种底物的吸附主要是非特异性的结合, 相互作用较弱, 无选择性。

3 结论

采用可逆加成 - 断裂链转移活性 / 可控自由基聚合法制备了分子印迹聚合物微球 MIPMS, 微球具有良好的选择性, 避免了传统的本体聚合法中繁琐的研磨、筛选等步骤。通过改变 RAFT 试剂 CDB 和引发剂 AIBN 的比例, 可以得到不同粒径的比较均匀的微球, 同时制备的分子印迹聚合物微球仍然具有“活性”, 可以再进行新的接枝反应以制备新型的高聚物, 显示了很好的应用前景。

参考文献:

- [1] 杨玉社, 赵善荣, 嵇汝运, 等. 喹诺酮化合物研究最新进展——抗肿瘤喹诺酮 [J]. 1998, 31 (2): 157.
- [2] WULFF G. Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates - A way towards artificial antibodies [J]. Angew Chem Int Ed, 1995, 34 (17): 1812 - 1832.
- [3] WULFF G, SCHAHOFF S. Enzyme - analog - built polymers 27. Racemic resolution of free sugars with macroporous

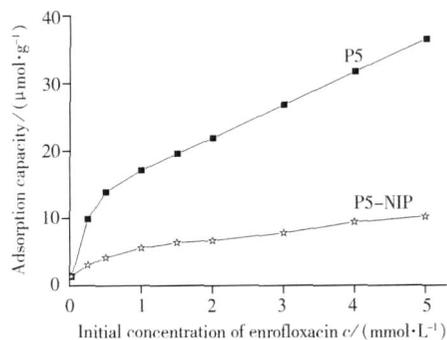


图 5 分子印迹微球 (P5) 与非印迹微球 (P5 - NIP) 的等温吸附曲线

Fig. 5 Adsorption isothermal curve of molecularly imprinted polymer microspheres (MIPMS) (P5) and P5 - NIP

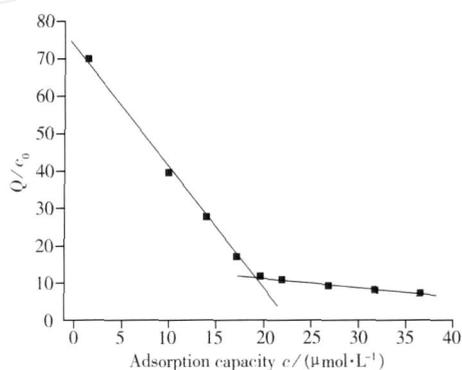


图 6 恩诺沙星分子印迹微球 (P5) 的平衡吸附 Scatchard 曲线

Fig. 6 Scatchard plot of enrofloxacin - MIPMS (P5)

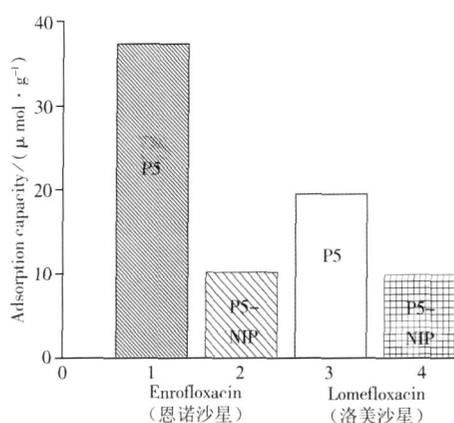


图 7 分子印迹微球 (P5) 与非印迹微球 (P5 - NIP) 对恩诺沙星和洛美沙星的平衡吸附量

Fig. 7 Adsorption capacity of MIPMS (P5) and P5 - NIP for enrofloxacin and lomefloxacin in equilibrium binding experiment

- polymers prepared by molecular imprinting Selectivity dependence on the arrangement of functional groups versus spatial requirements[J]. *J Org Chem*, 1991, 56: 395 - 400.
- [4] ZOU Hanfa, HUANG Xiaodong, YEMingliang, et al Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography[J]. *J Chromatogr. A*, 2002, 954: 5 - 32
- [5] SHOJIR, TAKEUCHIT, KUBO I Atrazine sensor based on molecularly imprinted polymer-modified gold electrode[J]. *Anal Chem*, 2003, 75(18): 4882 - 4886
- [6] MATHIASU. Membrane separations using molecularly imprinted polymers[J]. *J Chromatogr. B*, 2004, 804: 113 - 125.
- [7] 董赫, 董爱军, 李隆弟. 发光性分子印迹聚合物的合成及其对组胺的识别性能研究 [J]. *高等学校化学学报*, 2002, 23(6): 1018 - 1021.
- [8] 戎非, 李萍, 袁春伟. 沉淀聚合法制备右旋邻氯扁桃酸分子印迹聚合物微球 [J]. *功能高分子学报*, 2005, 18(4): 607 - 612
- [9] 陈小平, 丘坤元. “活性”控制自由基聚合的研究进展 [J]. *化学进展*, 2001, 13(3): 224
- [10] CHIEFARI J, CHONG Y K, ERCOLE F, et al Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer[J]. *The RAFT Process Macromol*, 1998, 31(16): 5559.
- [11] MONTEIRO M J, BUSSELS R, BEUERNABB S, et al High-pressure “living” free-radical polymerization of styrene in the presence of RAFT[J]. *Australian J Chem*, 2002, 55(7): 433 - 437.
- [12] VANA P, ALBERTIN L, BARNER L, et al Reversible addition - fragmentation chain-transfer polymerization [J]. *J Polym Sci Part A: Polym Chem*, 2002, 40(22): 4032 - 4037.
- [13] L D E D R. CRC handbook of chemistry and physics[M]. Boca Raton: CRC Press, 1994: 9.
- [14] MATSU I J, MIYOSH I Y, DOBLHOFF D, et al Molecularly imprinted synthetic polymer receptor selective for atrazine[J]. *Anal Chem*, 1995, 67(23): 4404 - 4408

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

《分析测试学报》

国内刊号: CN 44 - 1318 /TH

国际刊名代码 CODEN: FCEXES

国外代号: BM 6013

国际标准刊号: ISSN 1004 - 4957

邮发代号: 46 - 104

广告经营许可证: 440000100186

《分析测试学报》是由中国分析测试协会、中国广州分析测试中心共同主办的全国性学术刊物, 中文核心期刊。刊登质谱学、光谱学、色谱学、波谱学、电化学、电子显微学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术的研究成果, 介绍新仪器装置及在生物、医药、化学化工、商检、食品检验等方面实用性强的实验技术。适合科研院所、高等院校、检测机构、医药、卫生以及厂矿企业分析测试工作和管理人员阅读。

经过多年的发展, 本刊已成为国内知名的化学类核心期刊。2006年, 影响因子在全国分析学科刊物排名中列第 1 名, 被引频次每年递增约 30%, 稿源丰富, 基金论文比超过 70%。近几年, 本刊发表的论文被 CA (美国化学文摘) 收录率达 94%, 2006 年引文频次在 CA 千种表中国部分中列第 38 名, 并被国际上其它知名的数据库如日本科技文献速报、俄罗斯文摘、英国分析文摘 (AA)、《质谱公报》等收录。中文核心期刊 (入选《中文核心期刊要目总览》2004 年版); 进入由全国 8000 种期刊遴选出的 500 种科技期刊组成的“中国科技期刊精品数据库”; 中国学术期刊综合评价数据库 (CAJCED) 统计刊源; 中国科技论文统计源期刊 (中国科技核心期刊); 《中国科学引文数据库》来源期刊; 中国期刊全文数据库 (CJFD) 收录期刊; 《中国核心期刊 (遴选) 数据库》收录; 《中国学术期刊 (光盘版)》全文收录期刊; 《中国期刊网》全文收录期刊; 《中国学术期刊文摘 (中、英文版)》收录为源期刊等。

本刊为月刊, 国内外公开发行人。大 16 开, 单价: 12.00 元 / 册, 全年 144 元。请在全国各地邮局订阅。未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。补订办法: 请从邮局汇款至广州市先烈中路 100 号《分析测试学报》编辑部, 邮编: 510070, 写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数 (全年或某期), 电话: (020) 87684776 或 37656606, <http://www.fxcspb.com>, E-mail: fxcspb@china.com。