

# 阿特拉津分子印迹固相萃取柱的制备及应用

王颜红\*<sup>1</sup> 霍佳平<sup>1,2</sup> 张红<sup>1</sup> 王世成<sup>1</sup>  
司士辉<sup>2</sup> 林桂凤<sup>1</sup> 李国琛<sup>1</sup> 刘伟<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016) <sup>2</sup>(中南大学化学化工学院, 长沙 410083)

**摘要** 以阿特拉津为模板分子,  $\alpha$ -甲基丙烯酸为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 偶氮二异丁腈为引发剂, 65 °C 聚合 17 h 制备了对阿特拉津具有特异性识别的分子印迹聚合物。将聚合物研磨、过筛、洗涤并装柱, 制备分子印迹固相萃取柱, 其最大结合量比游离态的聚合物微球高 600 倍, 结合时间为游离态的 1/60。采用液相色谱法检测其回收率达 90%; 用于富集水样中含量低于  $2 \times 10^{-8}$  mol/L 的待测物, 其回收率也可达到 89.3%。与市售  $C_{18}$  柱相比, 分子印迹固相萃取柱回收时间仅为  $C_{18}$  柱的 1/3, 试剂用量为其 1/4, 但回收率更好, 净化更彻底, 减少了杂质峰对分析的影响, 提高了灵敏度, 利于仪器的保护和保养。应用此方法对实际农业水样进行了检测, 结果满意。

**关键词** 分子印迹聚合物; 阿特拉津; 模板分子; 固相萃取; 液相色谱

## 1 引言

分子印迹技术 (Molecularly imprinted technology, MIP) 多用于合成具有识别特性的印迹聚合物。由于印迹过程是将与目标分子 (TM) 具有结构互补的功能化聚合单体通过共价键或非共价键与目标分子结合, 反应完全后洗脱目标分子, 从而形成有固定孔穴大小和形状及确定功能团排列顺序的交联高聚物<sup>[1]</sup>, 并具有专一识别性强、可再生等优势, 有广泛的应用前景。目前, MIP 已应用于传感器<sup>[2]</sup>、人工抗体模拟<sup>[3]</sup>及色谱固相分离<sup>[4~6]</sup>等方面, 已成为化学和生物学交叉的新兴领域之一。

阿特拉津是一种广泛使用的三嗪类除草剂, 其在土壤中半衰期较长, 甚至残留于部分地区的地下水和地表水中, 被列为环境荷尔蒙的可疑物质<sup>[7]</sup>, 对人体有潜在的“致畸、致癌、致突变”作用<sup>[8]</sup>。因此, 对此类除草剂的分析 and 研究具有重要意义。Amalric 等<sup>[9]</sup>在 2008 年利用光聚合制备了分子印迹物质, 并将其应用于固相萃取, 以二氯甲烷为溶剂, 检测了农业集水区土壤中残留的阿特拉津及其代谢物的含量。胡玉玲等<sup>[10]</sup>制备了另一种三嗪类除草剂特丁津分子的印迹整体萃取棒, 并对其萃取性能进行了研究。本研究在水质中将阿特拉津富集和分离, 热聚合 17 h 制备分子印迹固相萃取柱。与市售  $C_{18}$  柱相比, 本萃取柱具有回收时间短, 试剂用量少, 回收率高, 净化效果好等优点。应用此方法对实际农业水样进行了检测, 结果满意。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Waters 600-2487 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); S-450 扫描电子显微镜、EKOIB-5 离子溅射仪 (日本日立公司); ASE-12 固相萃取仪 (天津奥特赛思仪器有限公司); KQ-250B 超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司)。

阿特拉津 (97%, 浙江长兴中山第一化工有限责任公司); 偶氮二异丁腈 (AIBN, 化学纯, 天津博迪化工有限公司);  $\alpha$ -甲基丙烯酸 (MAA, 分析纯, 天津市瑞金特化学品有限公司); 乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EDMA, 98%, 上海晶纯试剂有限公司); 甲醇、甲苯 (分析纯, 天津市康科德科技有限公司); 去离子水, MilliQ 超纯水。

2009-09-29 收稿; 2009-12-14 接受

本文获中科院重要方向项目 (No. KSCX2-YW-N-035)、财政部专项绿色农业科学研究与示范项目 (No. LSNY-2007-10) 及沈阳市大型仪器专项 (No. 2008GX-034) 的资助

\* E-mail: wangyh@iae.ac.cn

## 2.2 分子印迹聚合物的制备

将 154  $\mu\text{L}$  MAA, 0.08 g 阿特拉津溶于甲苯中, 超声混匀, 加入 3.04 mL EDMA 和 6.96 mg AIBN<sup>[11]</sup> 至 10 mL 硬质试管中, 超声混匀, 氮吹 10 min 除去溶解氧, 密封, 在 65  $^{\circ}\text{C}$  水浴聚合 17 h 得棒状聚合物。将聚合物研碎, 过 400 目筛, 用甲醇-乙酸 (9:1, V/V) 洗至紫外检测不到阿特拉津, 继续用甲醇索式抽提洗至中性, 丙酮反复沉降至少 3 次, 除去悬浮粉末, 得到分子印迹聚合物 (MIPs), 50  $^{\circ}\text{C}$  真空干燥至恒重。空白聚合物除不加阿特拉津目标物外, 其余与印迹聚合物合成条件相同。

## 2.3 MIPs 结合能力的测定

称取 20.0 mg MIPs 置于 10 mL 具塞三角瓶中, 加入 1 mL 不同浓度阿特拉津的甲醇溶液, 放入恒温振荡器中振荡 16 h 分别离心。取适量上清液, 用 HPLC 测定阿特拉津的游离浓度, 根据结合前后浓度的变化计算聚合物对目标分子的最大结合量  $Q_{\text{max}}$ 。

## 2.4 MIPs 萃取柱的性能研究

取 50 mg MIPs 干法装柱, 制得固相萃取柱, 依次用 3 mL 甲苯、1 mL 1.88  $\mu\text{mol/L}$  阿特拉津的甲苯溶液、纯甲苯、1 mL 甲醇过柱, 收集洗脱液, 用  $\text{N}_2$  吹干, 以甲醇定容至 1 mL, 进行 HPLC 检测 (液相色谱检测前, 样品保存在 -70  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中)。

## 2.5 MIPs 柱、 $\text{C}_{18}$ 柱对水质中阿特拉津的富集和分离

取 2.4 中制得的 MIPs 柱, 用 3 mL 甲苯活化柱子, 再用 3 mL 甲醇和 3 mL 水润洗, 将 100 mL  $2 \times 10^{-8}$  mol/L 阿特拉津的水溶液以 1 mL/min 的流速过柱, 用 1 mL 水淋洗, 阿特拉津用 1.5 mL 甲醇洗脱。过柱后的残余液在旋转蒸发仪上蒸至近干, 用 1 mL 甲醇复溶, 进行 HPLC 检测, 甲醇洗脱液用  $\text{N}_2$  吹干并重新定容, 再进行 HPLC 检测, 样品平行测定 3 次。

取市售的  $\text{C}_{18}$  固相萃取柱, 依次用 5 mL 乙酸乙酯、5 mL 丙酮和 5 mL 去离子水润洗  $\text{C}_{18}$  柱, 将 100 mL  $2 \times 10^{-8}$  mol/L 阿特拉津的水溶液以 1 mL/min 的流速过柱,  $\text{N}_2$  吹干  $\text{C}_{18}$  柱, 再用 6 mL 乙酸乙酯淋洗柱子<sup>[12]</sup>, 收集洗脱液,  $\text{N}_2$  吹干并用 1 mL 甲醇定容, 进行 HPLC 检测, 样品平行测定 3 次。

## 2.6 液相色谱测定阿特拉津条件

Symmetry  $\text{C}_{18}$  色谱柱 (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 流动相为  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$  (1:1, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 20  $\mu\text{L}$ , 检测波长为 220 nm。

# 3 结果与讨论

## 3.1 模板分子与功能单体的作用机理

阿特拉津 MIPs 是通过阿特拉津和 MAA 间的非共价作用力 (氢键、静电作用等) 形成的具有可逆特性的高聚物。阿特拉津分子中乙氨基和异丙氨基上与 N 相连的  $\text{H}^+$  与 MAA 形成氢键, 从而形成分子结构印迹 (见图 1)。

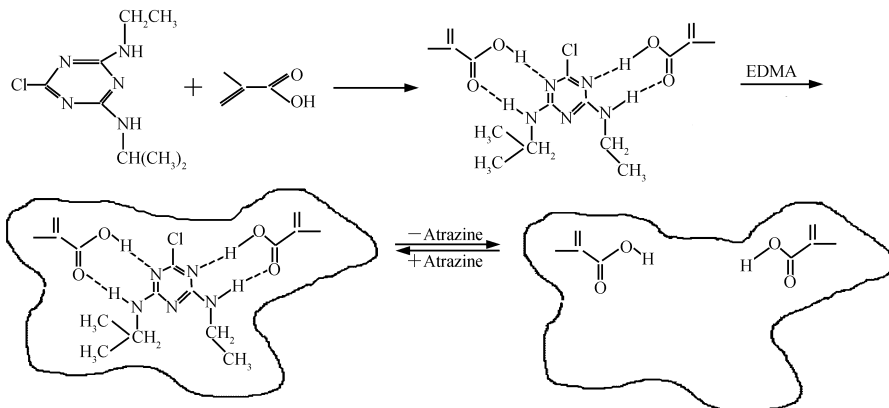


图 1 阿特拉津分子印迹聚合物的聚合反应原理示意图

Fig 1 Polymerization of atrazine molecularly imprinted polymer

在此反应中, EDMA 即作为溶剂又作为交联剂 (CL), 甲苯即作为溶剂又充当致孔剂, 在引发剂 AIBN 存在的条件下, 高聚物出现网状结构, 扫描电镜测试结果可以表征其整体聚合物的形态 (见图 2)。运用化学方法除去目标分子, 可以形成具有特殊空穴的支架结构。这种特殊空穴具有记忆能力, 存在与目标化合物特异性的结合作用, 聚合物内部存在着一些官能团和构型与目标分子相匹配的位点。

### 3.2 溶剂用量选择

确定  $n_1$  (TM) :  $n_2$  (FM) :  $n_3$  (CL) = 1:4:20<sup>[13]</sup> 后, 用甲苯作溶剂, 取不同溶剂配比 (见表 1) 制备 MIPs 柱。

表 1 不同溶剂配比的 MIPs 柱的作用效果

Table 1 Effect of extraction for different solvents proportion during the preparation of MIPs

$n_1:n_2:n_3:n_4$	流出液中阿特拉津绝对量 Absolute content of atrazine after extraction (mol)	洗脱液中阿特拉津的绝对量 Atrazine in eluent (mol)	萃取时间 Time of extraction (min)	回收率 Recovery (%)
1 <sup>st</sup> Group 1:4:20:24	ND	$1.80 \times 10^{-9}$	15	90
2 <sup>nd</sup> Group 1:4:20:56	$1.9 \times 10^{-10}$	$1.70 \times 10^{-9}$	30	85
3 <sup>rd</sup> Group 1:4:20:88	$1.7 \times 10^{-10}$	$1.66 \times 10^{-9}$	48	83

$n_1:n_2:n_3:n_4$  (Target molecule: function molecule: cross-linker: toluene)。样液中阿特拉津绝对量 (Atrazine in sample):  $2 \times 10^{-9}$  mol

结果表明, 第一组的萃取时间分别是第二组和第三组的 50% 和 31%; 第一组的回收率较第二组和第三组提高了 5% 和 6%。由此可见, 第一组 (1:4:20:24) 的溶剂配比可使 MIPs 柱萃取时间最短, 过柱后的流出液中未检出阿特拉津, 洗脱后回收率最高, 达到 90%, 实现较好的柱效。

### 3.3 结合能力比较

在 2.3 和 2.4 节的条件下分别进行结合量的测定, 装柱前的最大结合量可以通过 Scatchard 方程<sup>[14]</sup> 进行计算:

$$Q/C = (Q_{\max} - Q) K_d$$

式中,  $K_d$  是结合位点的平衡离解常数,  $Q_{\max}$  是结合位点的最大表观结合量,  $C$  为吸附液中的目标分子的平衡浓度。根据上式, 以  $Q/C$  对  $Q$  作图, 可求得最大结合量。装柱后 MIPs 的最大结合量则可通过上柱前后的目标物含量的变化计算得出 (见表 2)。

装柱后的最大结合量为  $16.8 \text{ mmol/g}$  是装柱前的 600 倍, 结合时间为 15 min, 仅为装柱前的 1/60。由此可见, 装柱过程显著提高了 MIPs 的结合能力和效率。

### 3.4 MIPs 柱与 $C_{18}$ 柱的萃取效果比较

比较 MIPs 柱与  $C_{18}$  柱的萃取作用效果, 前者在过柱后的流出液中几乎不再含目标分子, 洗脱试剂的用量仅是后者的 25%, 浓缩时间是后者的 2/3 且取得了满意的回收率 (见表 3)。

MIPs 柱以分子印迹物上留下的记忆空穴作为结合位点, 对目标分子产生特异性的吸附, 并以一种较弱的化学键相作用。  $C_{18}$  柱则是基于简单的物理吸附, 因此 MIPs 柱吸附目标分子更有选择性, 当 MIPs 改变溶剂极性时, 这种较弱的化学键较易断裂, 目标分子则更易洗脱, 而物理吸附对目标化合物的吸附虽与洗脱溶剂的极性有关, 但其对化合物的选择性不强。

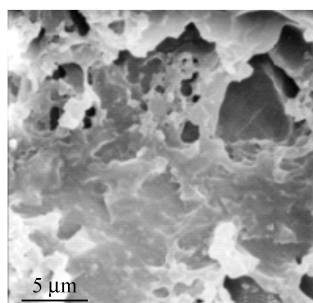


图 2 MIP 扫描电镜图

Fig 2 Scanning electron micrographs of atrazine molecularly imprinted polymer

表 2 不同状态 MIPs 结合作用效果

Table 2 Effect of adsorption for different state of MIPs

MIPs 状态 State of MIPs	悬浮态 MIPs MIPs in suspension	MIPs 柱 MIPs extraction column
结合耗时 Time of adsorption (min)	960	15
最大结合量 Maximum adsorption (mmol/g)	0.027	16.8

MIPs 用量 (Content of MIPs): 20 mg

表 3 MIPs柱及 C<sub>18</sub>柱的作用效果Table 3 Effect of extraction for MIPs and C<sub>18</sub>

萃取柱 Column	流出液中阿特拉津量 Atrazine in eluent (mmol)	洗脱剂用量 Washing reagent (mL)	洗脱 + 浓缩时间 Time of washing and concentration (min)	回收率 Recovery (%)
MIPs column	ND	1.5	30	90
C <sub>18</sub> column	ND	6	90	88

样液中阿特拉津绝对量 (Atrazine in sample):  $2 \times 10^{-6}$  mmol; ND: Not detected.

### 3.5 MIPs柱的富集和净化作用效果

MIPs柱和 C<sub>18</sub>柱分别对 100 mL 含有  $2 \times 10^{-8}$  mol/L 目标分子的水样进行富集, 洗脱液中被检测到的目标分子含量分别为  $1.785 \times 10^{-9}$  mol 和  $1.816 \times 10^{-9}$  mol, 回收率分别达 89.3% 和 90.8%。与 C<sub>18</sub>柱相比, MIPs柱对样品的净化效果更佳 (见图 3), 干扰峰更少, 提高了检测灵敏度, 也利于延长色谱柱的使用寿命。

### 3.6 实际农业用水的分析

采用此方法对实际农业灌溉用水中的残留阿特拉津进行固相萃取, 取 100 mL 水样进行富集, 洗脱并浓缩后, 液相色谱检测, 样品平行测定 3 次。过柱后流出液中均未检测出阿特拉津; 洗脱液中阿特拉津的含量分别为  $0.90 \times 10^{-9}$  mol,  $0.83 \times 10^{-9}$  mol 和  $0.88 \times 10^{-9}$  mol, RSD 为 4.14%。本方法应用于实际水样检测的前处理, 结果令人满意。

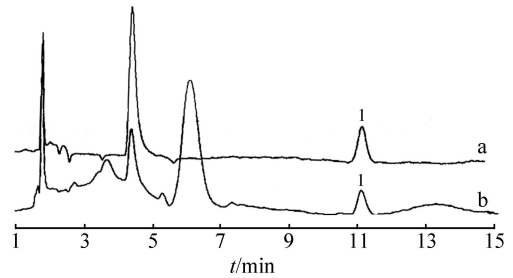


图 3 MIPs柱 (a)、C<sub>18</sub>柱 (b) 富集及净化后样品色谱图

Fig 3 Chromatograph of sample concentrated and purified using MIPs-SPE (a) and C<sub>18</sub>-SPE (b)

1. 阿特拉津 (Atrazine).

## References

- Martín-Esteban A. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **2001**, 370(7): 795~802
- D'Agostino G, Alberti G, Biesuz R, Pesavento M. *Biosensors and Bioelectronics*, **2006**, 22(1): 145~152
- Pesavento M, D'Agostino G, Biesuz R, Alberti G. *Electroanalysis*, **2009**, 21(3~5): 604~611
- Koohpaei A R, Shahtaheri S J, Ganjali M R, Rahini Forushani A, Golbabaei F. *Journal of Hazardous Materials*, **2009**, 170(2~3): 1247~1255
- Djavan D, Ebrahimi B. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 616(2): 152~159
- Tamayo F G, Martín-Esteban A. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1098(1~2): 116~122
- LI Qing-Bo (李清波), HUANG Guo-Hong (黄国宏), WANG Yan-Hong (王颜红), WANG Peng (王朋), ZHANG Xu-Dong (张旭东), LUO Yong-Ming (骆永明). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2003**, 31(3): 383
- GU Ji-Dong (顾继东), WANG Ying-Ying (王莹莹). *Ecologic Science* (生态科学), **2003**, 22(1): 1~5
- Amalric L, Mouvet C, Pichon V, Bristeau S. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1206(2): 95~104
- HU Yu-Ling (胡玉玲), ZHU Fei (朱飞), LI Ji-Wei (李家威), LI Gong-Ke (李攻科). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(3): 466~470
- Kliger S, Turner A P F, Mosbach K, Haupt K. *Anal. Chem.*, **1999**, 71(17): 3698~3702
- HU Hong-Yang (胡鸿雁), ZHANG Hong-Yu (张红雨), ZHANG Jie (张杰). *Environmental Science and Technology* (环境科学与技术), **2006**, 29(12): 31~32
- Koohpaei A R, Shahtaheri S J, Ganjali M R, Forushani A R, Golbabaei F. *Talanta*, **2008**, 75(4): 978~986
- Zhou J He X W. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 381(1): 85~91

# Preparation and Application of Atrazine Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction Pillar

WANG Yan-Hong<sup>1</sup>, HUO Jia-Ping<sup>1,2</sup>, ZHANG Hong<sup>1</sup>, WANG Shi-Cheng<sup>1</sup>,

SI Shi-Hu<sup>2</sup>, LIN Gui-Feng<sup>1</sup>, LI Guo-Chen<sup>1</sup>, QI Wei<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (Institute of Applied Ecology Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110015)

<sup>2</sup> (Institute of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha 410083)

**Abstract** The molecularly imprinted polymers (MIPs) was synthesized by polymerization for 17 h using atrazine as template,  $\alpha$ -methacrylic acid (MAA) as monomer, ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as cross-linker and 2,2-azobisisobutyronitrile (AIBN) as initiator. This polymer could specially recognize atrazine. The polymer was grinded, sieved, washed and packed into cartridges. The adsorbability of the solid phase extraction (SPE) pillar being stuffed with the polymers was 600 times compared with that of the polymer sphere, and the extraction time of this SPE pillar was only 1/60 compared with that of polymer sphere, the recovery was 90% testing by HPLC. The SPE pillar could enrich atrazine at the concentration less than  $2 \times 10^{-8}$  mol/L in the water sample with the recovery of 89.3%. In comparison with  $C_{18}$  pillar, the MIPs-SPE pillar used only 1/3 time and 1/4 reagent, and got higher recovery, as well purified the sample water more drastically, decreased the disturbance of peculiar peaks, improved the sensitivity and could protect the instrument against damage. And the water for agricultures could be tested using this method.

**Keywords** Molecularly imprinted polymer; Atrazine; Template; Solid phase extraction; High performance liquid chromatography

(Received 29 September 2009; accepted 14 December 2009)

## 中国化学会第 27 届学术年会 (第一轮通知)

中国化学会第 27 届学术年会定于 2010 年 6 月 20~23 日在福建省厦门市举行。大会主题: 创新型社会与化学的责任。会期 4 天, 6 月 19 日报到。会议由中国化学会主办, 厦门大学承办, 中国科学院福建物质结构研究所协办。

本次学术年会设立学术分会 18 个、专题论坛 3 个及专场展览展示。报告形式包括大会特邀报告、分会邀请报告、口头报告和墙报。欢迎广大化学工作者积极参加, 踊跃投稿。

第 9 分会: 分析化学 征文范围: (1) 色谱分离与分析; (2) 传感器与芯片技术和应用; (3) 分子光谱和原子光谱分析; (4) 纳米技术在分析化学中的应用; (5) 食品安全和环境化学; (6) 化学计量学应用; (7) 电分析化学; (8) 波谱新技术与应用。

分会联系及论文收集人: 江云宝 电话: 0592-2185662 电子信箱: ybjiang@xmu.edu.cn  
地址: 厦门大学化学学院 邮政编码: 361005