

单噻磺隆除草剂分子印迹聚合物的识别特性研究

王 宁^{1, 2}, 董襄朝^{1, 2}, 张学炜³, 吕宪禹³, 侯剑峰¹, 范志金²

(1. 南开大学 化学系, 天津 300071; 2. 南开大学 元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071;
3. 南开大学 生命科学学院, 天津 300071)

摘 要: 为了研究印迹聚合物作为固相提取剂在环境分析中的应用, 合成了以除草剂单噻磺隆为印迹分子的印迹聚合物, 通过平衡吸附和液相色谱的方法分析了印迹聚合物的识别特性, 并研究了不同色谱条件对单噻磺隆保留因子的影响。 研究结果表明, 印迹聚合物对印迹分子具有很好的亲和性和特定的选择性, 可作为固相提取剂, 在单噻磺隆的残留分析中, 对土壤提取样品进行有效的富集与净化。

关键词: 分子印迹; 单噻磺隆; 固相提取; 识别特性

中图分类号: O657.72; S482.44 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2004)04-0013-05

Synthesis and the Recognition Properties of the Monosulfuron Imprinted Polymer

WANG Ning^{1, 2}, DONG Xiang_chao^{1, 2}, ZHANG Xue_wei³, LÜ Xian_yu³,
HOU Jian_feng¹, FAN Zhi_jin²

(1. Department of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. State Key Laboratory of Elemento-organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: With monosulfuron as the template molecule, a molecularly imprinted polymer (MIP) was prepared and used as the solid-phase extraction material in the environmental analysis. Recognition properties of the monosulfuron imprinted polymer were studied by equilibrium adsorption and HPLC. The influence of various chromatographic conditions on the retention factors of monosulfuron was also evaluated. It was found that recognition properties of MIPs are greatly influenced by the mobile phase used. The results show that the imprinted polymer has good affinity and marked selectivity for monosulfuron, and it can selectively retain the template and separate the soil impurities from monosulfuron. This implies that it can be used as a solid-phase stationary material for sample enrichment and clean-up in the analysis of monosulfuron residues in soils.

Key words: Molecular imprinting; Monosulfuron; Solid-phase extraction; Recognition property

分子印迹(molecular imprinting)是通过印迹分子与功能单体相互作用, 形成复合物, 交联后产生具有选择性的聚合材料的一种新技术。分子印迹聚合物的选择性可与生物抗体相媲美, 是理想的分子识别工具^[1]。同时, 由于印迹聚合物对酸、碱、有机溶剂和温度有一定的耐受性, 易于合成和贮存, 在固相提取^[2, 3]、药物的手性分离^[4, 5]、传感器^[6, 7]等方面展现了广泛的应用前景。

在对目标化合物的结合过程中, 印迹分子由于其结构与印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)中的孔穴在形状、大小和功能基团的空间位置方面相适合而被识别。分子印迹聚合物可作为固相提取剂, 用于复杂体系样品的净化、富集。尤其当待测化合物的极性较强时, C₁₈固定相对其结合能力弱, 待测化合物和干扰组分(往往是环境中的腐殖酸)均不被保留, 因此样品净化困难, 而分子印迹聚合物在这一类化合物的环境样品的固相提取上有很大的应用潜力。

单噻磺隆是由农药国家工程研究中心(南开大学)研制开发的超高效磺酰脲除草剂产品, 目前报道的单噻磺隆的土壤残留分析方法需将土壤提取液作多次液液萃取及 C₁₈柱净化处理, 整个过程步骤比较繁琐, 工作量大^[8]。为了简化土壤中单噻磺隆残留分析样品的预处理过程, 研究分子印迹聚

收稿日期: 2003-08-16; 修回日期: 2004-04-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20107003); 南开大学元素有机化学国家重点实验室开放基金资助课题

作者简介: 王 宁(1980-), 女, 山东昌乐人, 硕士研究生; 董襄朝, 联系人。

合物在农药残留分析中的应用, 采用分子印迹技术, 合成了单噻磺隆的印迹聚合物, 并用平衡吸附及液相色谱方法研究了印迹聚合物的识别特性, 分析了其识别机理及环境条件对识别的影响。用印迹聚合物作色谱固定相进行了土壤提取液中杂质的初步分离, 确定了其在土壤残留分析中应用的可行性。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配有多波长紫外-可见检测器。Shimadzu UV_240 岛津紫外-可见分光光度计。

单噻磺隆($[N(2-(4\text{-甲基噻啶基})-2\text{-硝基苯磺酰脲, monosulfuron})$ 、氯磺隆(chlorosulfuron)、吡虫啉(imidacloprid)、NK# 94827 标准品由国家农药工程中心(南开大学)提供。 α -甲基丙烯酸(MAA, 分析纯, 北京东环联合化工厂); 乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA, 苏州安立化工厂); 偶氮二异丁腈(AIBN, 分析纯, 南开大学分校特种试剂实验厂); N,N -二甲基甲酰胺(DMF, 分析纯, 天津化学试剂研究所)。其它试剂均为分析纯或色谱纯。缓冲溶液: pH 2.6 和 pH 3.0 的缓冲溶液以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸- $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 配制; pH 3.6, pH 4.6 和 pH 5.2 的缓冲溶液以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HAc}$ - NaAc 配制; pH 6.0 的缓冲溶液以 $0.07 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $0.07 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ 配制^[9]。土壤采自山东, 为沙粘土壤(理化性质略)。

1.2 单噻磺隆分子印迹聚合物的合成

分子印迹聚合物(P)的合成采用非共价结合的紫外光引发溶液聚合法。将印迹化合物单噻磺隆 0.526 g (1.6 mmol), 功能单体(MAA, 7.8 mmol), 交联剂(EDMA, 39 mmol), 引发剂(AIBN, 0.6 mmol) 溶于 17 mL 的 DMF 中, 通氮气 10 min 后, 转入安培管中, 在抽真空的条件下用火焰封管, 室温下置于 366 nm 的紫外光下引发聚合 24 h 。将得到的棒状聚合物加水研磨, 并过孔径为 $37 \mu\text{m}$ 的筛, 得到粒径小于 $37 \mu\text{m}$ 的无定型颗粒。将聚合物颗粒用氨水($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)-甲醇(体积比 1:1)及乙醇反复提取, 除去印迹分子及未反应的化合物。用紫外-可见分光光度计在 237 nm 处测定提取液中单噻磺隆的吸光度, 直至提取液中单噻磺隆的吸光度 $A < 0.1$ (最后以乙腈为提取液进行测定)。用丙酮反复沉降除去过细聚合物颗粒, 室温下干燥保存。

非印迹聚合物(Pb)的合成除不加印迹分子外, 其它条件及步骤同上。

1.3 聚合物平衡吸附实验及 Scatchard 分析

配置一定浓度范围单噻磺隆-乙腈溶液(浓度分别为: 0.007 、 0.015 、 0.022 、 0.030 、 $0.037 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。用紫外可见分光光度计在 237 nm 处测定溶液中的单噻磺隆的吸光度, 绘制出浓度(c)-吸光度(A)标准曲线。

称取等量的印迹聚合物(每份约 30 mg) 15 份, 置于 10 mL 的磨口锥形瓶中, 分别加入不同浓度的单噻磺隆-乙腈溶液($0.03 \sim 0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 5.0 mL , 室温下于恒温水浴振荡器中振荡 8 h , 高速离心后取出上层清液, 用乙腈稀释一定倍数后, 在 237 nm 处测定平衡吸附液中单噻磺隆的吸光度, 根据标准曲线计算出上清液中单噻磺隆浓度。然后根据吸附前后溶液中单噻磺隆浓度的变化, 计算印迹聚合物对单噻磺隆的吸附量 B 。根据 Scatchard 方程: $B/c_{\text{monosulfuron}} = (B_{\text{max}} - B)/K_D$ 计算印迹聚合物的结合常数, 式中 B 为平衡时聚合物对分析物的吸附量($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$), B_{max} 为最大表现结合位点数($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$), $c_{\text{monosulfuron}}$ 为平衡时未被结合吸附的单噻磺隆浓度($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), K_D 为平衡离解常数。

非印迹聚合物对单噻磺隆的吸附量 B 的测定同上操作。

1.4 高效液相色谱实验

以丙酮-氯仿(体积比 3:5)为匀浆液, 丙酮为顶替液, 将印迹聚合物颗粒在 $3.0 \times 10^4 \text{ kPa}$ 压力下装柱($150 \times 4.6 \text{ i.d. mm}$ 不锈钢色谱柱), 室温下进行高效液相色谱(HPLC)实验, 检测波长为 237 nm 。保留因子 k' 按式 $k' = (t_r - t_0)/t_0$ 计算, 其中, t_r 为被分析物的保留时间, t_0 为死时间(以重铬酸钾测定)。选择性系数 α 按式 $\alpha = k'_M/k'_X$ 求算, 其中 k'_M 和 k'_X 分别为单噻磺隆及其它待测化合物的保留因子。

2 结果与讨论

2.1 印迹聚合条件的选择及其对聚合物亲和性的影响

功能单体能够与印迹分子在致孔剂中形成稳定复合物是形成具有亲和力的作用位点的决定因素。因此,选择合适的功能单体和致孔剂是合成印迹聚合物的关键。由于单嘧磺隆为带有嘧啶环的磺酰胺化合物,根据不同结构的基团形成氢键的能力推测,MAA上的羧基能够与单嘧磺隆分子中的酰胺基形成氢键,也可能与嘧啶环上的N以及苯环上的硝基形成氢键(图1),因此MAA被选作功能单体。

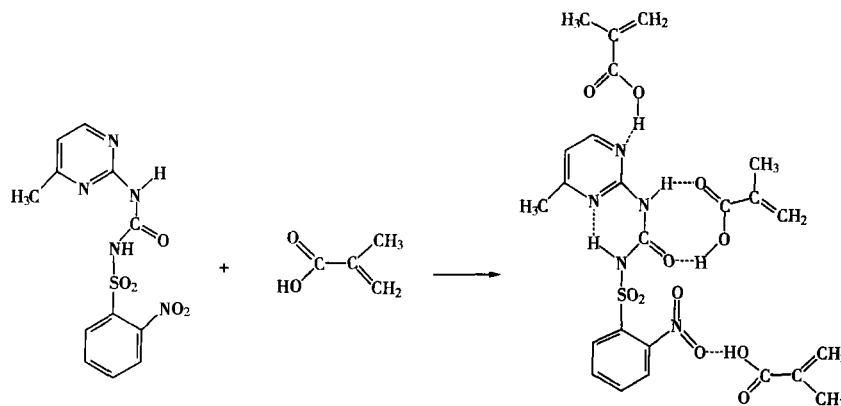


图1 单嘧磺隆分子中可能与MAA形成分子间氢键的作用位置

Fig. 1 Positions favorable to the hydrogen bonding interaction with MAA in the monosulfuron molecule

在聚合物的合成中,DMF被选作溶剂(致孔剂)。虽然DMF可能会影响印迹分子与功能单体之间的氢键作用,但由于单嘧磺隆在其它对氢键作用影响小的有机溶剂(三氯甲烷、乙腈、二氯甲烷等)中溶解度很低,若用这些溶剂作致孔剂合成聚合物,由于印迹分子浓度太低,会形成结合位点过少的聚合物而影响亲和力。而且如果按照功能单体与印迹分子的摩尔比为4:1进行合成,由于单体浓度低,合成的聚合物机械强度会很差。若采用过高的单体-印迹分子比例,则有可能导致非特异性吸附增强,选择性降低。基于溶解度的局限性,DMF被选作合成溶剂。平衡吸附结果显示,印迹聚合物对于单嘧磺隆的吸附能力强于非印迹聚合物(图2),说明采用DMF作致孔剂可以得到很好的印迹效果。另外,由于非印迹聚合物中随机排列的羧基和聚合物骨架均可能对印迹分子(单嘧磺隆)有一定的吸附作用(非特异性吸附),因此在低单嘧磺隆浓度下,当单嘧磺隆浓度小于 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,非印迹的非特异性结合远未达到最大结合量,印迹聚合物与非印迹聚合物没有明显的吸附量的差别。由于特异性结合更为稳定,随着浓度的升高,印迹聚合物与非印迹聚合物对于单嘧磺隆的吸附能力的差别更为明显(图2)。

2.2 印迹聚合物中结合位点的特性分析

为了测定印迹聚合物对单嘧磺隆的结合特性,利用平衡吸附曲线,对聚合物进行了Scatchard分析。以 $B/c_{\text{monosulfuron}}$ 对 B 作图,得到Scatchard曲线(图3)。曲线由两条不同斜率的直线组成,表明印迹聚合物中主要有两种特异性结合位点。

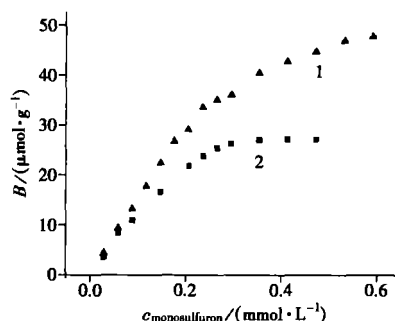


图2 印迹聚合物和非印迹聚合物的吸附等温线

Fig. 2 Binding isotherm of monosulfuron on polymers

1. molecularly imprinted polymer; 2. non-imprinted polymer

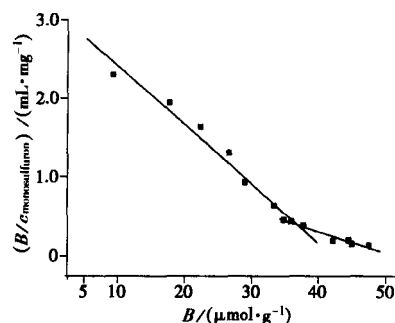


图3 单嘧磺隆分子印迹聚合物的Scatchard图

Fig. 3 Scatchard plot of imprinted polymer for monosulfuron

高亲和位点的离解常数 K_D 和最大表观结合位点数 $B_{\max}$ 分别为 13.4 、 $42.66 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ，低亲和位点的 K_D 和 $B_{\max}$ 分别为 39.3 、 $52.82 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。这种不同结合位点存在的现象可能是由聚合溶液中形成的不同的印迹分子-功能单体配位比和印迹聚合物具有非均一结合位点和可接近性所导致。在印迹聚合物的制备中，结合位点及孔穴可接近程度的非均一性是印迹固定相分离中柱效低的主要原因。

2.3 印迹聚合物的选择性

为了验证单噻磺隆印迹聚合物的选择性，以合成的印迹聚合物为色谱固定相，在相同的色谱条件下，测定了单噻磺隆、氯噻磺隆、吡虫啉及 NK# 94827 四种化合物(结构示于图 4)在印迹固相柱上的保留因子(表 1)。印迹柱对于单噻磺隆的保留最强，说明印迹聚合物具有较好的识别特性。分子结构同单噻磺隆相似的化合物(氯噻磺隆和 NK# 94827)在印迹柱上的保留次于单噻磺隆，而吡虫啉属于杂环类杀虫剂，结构与单噻磺隆相差较大，保留最弱。单噻磺隆和 NK# 94827 的分子结构中仅苯环上一个取代基不同，而两种化合物的保留时间相差很大，说明苯环中的侧链在识别中起到了重要作用。

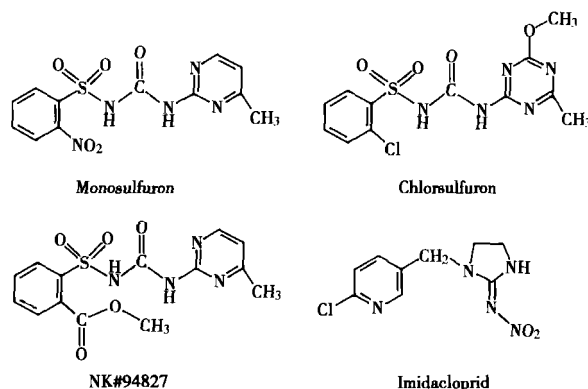


图 4 用作选择性评价的 4 种化合物的结构

Fig. 4 Molecular structures of four compounds used for the selectivity evaluation

表 1 4 种化合物在印迹聚合物上的保留因子和选择性因子*

Table 1 The retention and selectivity factors of the 4 pesticides on the MIP*

Retention factors(k')				Selectivity factors(α)**		
Monosulfuron	Chlorsulfuron	NK# 94827	Imidacloprid	k'_M / k'_C	k'_M / k'_N	k'_M / k'_I
8.4	6.7	5.1	4.0	1.3	1.7	2.1

* The mobile phase is a mixture of buffer($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HAc}-\text{NaAc}$, pH 3.6) and CH_3OH in a volume ratio of 4:6; flow rate: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;

** Selectivity factors(α) are the ratios of the retention factor of monosulfuron to those of the other pesticides, whereas k'_M , k'_C , k'_N , k'_I are the retention factors of monosulfuron, chlorsulfuron, NK# 94827 and imidacloprid, respectively.

2.4 色谱条件对印迹固定相保留特性的影响

为了评价淋洗剂对印迹固定相结合能力的影响，测定了单噻磺隆在不同流动相条件下的保留时间，并通过流动相的 pH 值及缓冲溶液比例的变化对单噻磺隆色谱行为的影响研究了印迹聚合物与单噻磺隆之间的作用机制。

2.4.1 流动相 pH 值对印迹分子保留特性的影响 根据不同 pH 值要求，分别以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HAc}-\text{NaAc}$ 、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸- $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $0.07 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $0.07 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ 配制不同 pH 值的缓冲溶液。分别将不同 pH 值的缓冲溶液(缓冲液的 pH 值分别为 2.6、3.0、3.6、4.6、5.2、6.0)与甲醇以体积比 4:6 混合作为流动相，测定单噻磺隆在印迹柱上的保留时间。随着流动相酸度的增加，单噻磺隆的保留因子 k' 升高(图 5)。单噻磺隆为弱酸性化合物，当流动相酸度增加时，主要以分子状态存在，与固定相之间的氢键作用力增强；同时由于分子疏水性增强，在极性流动相中的分配比降低，这可能是以上现象产生的原因。

2.4.2 流动相中缓冲液含量对印迹分子保留时间的影响 以缓冲溶液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HAc}-\text{NaAc}$, pH 值为 3.6)与甲醇的体积比分别为 2:8、3:7、4:6、5:5 的流动相测定单噻磺隆在印迹柱上的保留因子。当流动相中缓冲溶液含量增

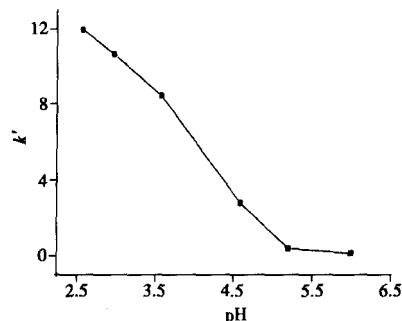


图 5 流动相 pH 值对单噻磺隆保留因子的影响

Fig. 5 The influence of the pH of the mobile phase on the retention factors of the monosulfuron

加时, 单嘧磺隆的保留因子随之增大。流动相条件对保留因子影响实验为在固相提取时淋洗剂的选择打下了基础。

2.5 印迹聚合物分离土壤样品中干扰成分的初步实验

为了测定印迹聚合物分离土壤中干扰成分的能力, 在风干过筛后的土壤中加入一定浓度的单嘧磺隆-乙腈溶液, 静置吸附后, 阴干, 加入氨水 ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) - 甲醇 (体积比 1:1) 溶液进行超声及水浴振荡提取。用旋转蒸发器将滤液浓缩至近干, 用空气泵吹干, 用乙腈溶解, 过滤后在相同的流动相条件下, 分别用印迹柱和 C_{18} 柱进行液相色谱分离。在印迹柱上, 土壤中的杂质与单嘧磺隆得到了很好的分离, 而在 C_{18} 柱上未能得到分离 (图 6), 说明印迹聚合物能够起到除去干扰杂质的作用。在分析环境中残留的痕量单嘧磺隆时, 印迹聚合物可作为固相提取的分离材料, 对样品进行富集和净化处理, 然后再作进一步的定量分析。目前, 固相提取的条件实验工作正在进行中。

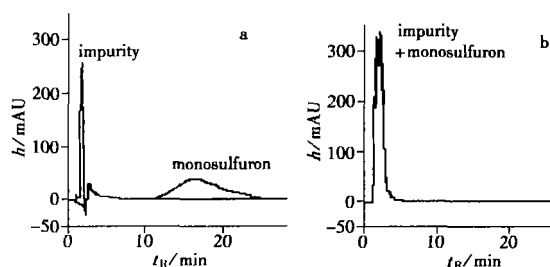


图 6 单嘧磺隆和土壤中杂质在不同柱子上的分离
Fig. 6 Separation of monosulfuron and impurity in soil on different columns

a. column with imprinted polymer as the stationary phase; b. ODS (ZORBAX) as the stationary phase; column: stainless steel, $150 \times 4.6 \text{ mm}$; mobile phase: ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ citric acid- $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 , pH 3.0) - $\text{CH}_3\text{OH} = 4:6$ (volume ratio); flow rate: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

3 结 论

采用分子印迹技术合成了除草剂单嘧磺隆的印迹聚合物, 并通过平衡吸附和液相色谱的方法研究了印迹聚合物的识别特性。实验结果说明, 使用可形成氢键的 DMF 作为致孔剂, 得到的印迹聚合物可以对单嘧磺隆进行有效识别, 并在对单嘧磺隆及其相似结构化合物的分离中显示了较好的选择性。在色谱分析中, 印迹聚合物能够对土壤中的杂质与单嘧磺隆进行有效的分离, 而 C_{18} 色谱固定相在同样的色谱条件下不能将杂质与单嘧磺隆分离, 说明印迹聚合物对于单嘧磺隆的保留方式不同于 C_{18} 色谱固定相。单嘧磺隆印迹聚合物结合特性的研究为其在环境样品固相提取中的应用建立了基础, 作为新型固相提取材料, 单嘧磺隆印迹聚合物可以被用于环境样品中磺酰脲类除草剂的残留分析中的样品前处理, 有望为单嘧磺隆土壤样品的富集净化提供一种新的, 简便有效的方法, 使分子印迹聚合物在环境样品的残留分析中发挥作用。

参考文献:

- [1] 怀其勇, 杨俊佼, 雷 荣, 等. 用于分子识别的分子印迹聚合物固定相[J]. 分析测试学报, 2001, 20(6): 84- 89.
- [2] STEVENSON D. Molecular imprinted polymers for solid-phase extraction[J]. Trends in Analytical Chemistry, 1999, 18(3): 154- 158.
- [3] THEODORIDIS G, MANESIOTIS P. Selective solid-phase extraction sorbent for caffeine made by molecular imprinting[J]. J Chromatogr. A, 2002, 948: 163- 169.
- [4] DONG X, SUN H, LÜX, *et al.* Separation of ephedrine stereoisomers by molecularly imprinted polymers- influence of synthetic conditions and mobile phase compositions on the chromatographic performance[J]. Analyst, 2002, 127: 1427- 1432.
- [5] 李 萍, 林保平, 胡 , 等. 苯丙氨酸衍生物的色谱手性拆分——采用分子印迹聚合物作为色谱固定相[J]. 分析测试学报, 2002, 21(3): 25- 27.
- [6] REO S, TOSHIFUMI, IZUMI K. Atrazine sensor based on molecularly imprinted polymer-modified gold electrode[J]. Anal Chem, 2003, 75: 4882- 4886.
- [7] MERKOCI A, ALEGRET S. New materials for electrochemical sensing IV. Molecular imprinted polymers[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2002, 21(11): 717- 725.
- [8] 胡继业, 钱传范, 范志金. 单嘧磺隆在土壤中的残留分析和消解动态研究[J]. 农药学报, 2000, 2(4): 60- 65.
- [9] FASMAN G D. Handbook of biochemistry and molecular biology[M]. Vol. 1, 3rd edition, Cleveland: CRC press, 1976. 358- 366.