

# 分子印迹材料基质超高效液相色谱柱开发及应用

周娜, 李金花, 李博伟, 吴学丽

(中国科学院 烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003)

**摘要:** 分子印迹聚合物材料 (MIPs) 是将模板分子、功能单体、交联剂、引发剂和致孔剂通过一定的反应聚合在一起, 形成的具有特异选择性的聚合物材料。近年来, MIPs 因其构效预设性、特异选择性、高稳定性、低制备成本、可重复使用等优势引起了研究者的关注, 被广泛应用于样品前处理技术、色谱分离技术领域。本文设计开发以分子印迹聚合物材料为固定相的超高效液相色谱柱, 用于复杂海岸带环境样品中氯酚类化合物和三嗪类除草剂的选择性识别和分离, 有效避免基质干扰问题, 提高色谱柱的分离效率。

**关键词:** 分子印迹聚合物材料;液相色谱柱;氯酚类化合物;海岸带环境样品

## Development and application of ultra-performance liquid chromatography columns based on molecularly imprinted polymers

Zhou Na, Li Jinhua, Li Bowei, Wu Xueli

(Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

**Abstract:** Molecularly imprinted polymers (MIPs) are the nanomaterials with specific selectivity formed by polymerization of template molecules, functional monomers, cross-linking chemicals, initiators and pore-forming reagents. In recent years, MIPs has attracted the attention of researchers due to its advantages of structure presupposition, specific selectivity, high stability, low preparation cost, and reusability, which has been widely used in sample pretreatment technology and chromatographic separation technology. In this project, ultra-high performance liquid chromatography columns with molecularly imprinted polymers as the stationary phase was designed and developed for the selective determination and separation of chlorophenols and triazine herbicides in coastal environmental samples, which effectively avoided interferences and improved the separation efficiency of the columns.

**Keywords:** Molecularly imprinted polymers, liquid chromatography column, chlorophenols, coastal environmental samples

# 1 引言

三嗪类除草剂是当今应用广泛的除草剂，而莠去津又是这一家族中应用最广泛的除草剂<sup>[1]</sup>。作为环境内分泌干扰物中的一员，莠去津具有环境类雌激素效应，尤其在生物放大之后具有很高的致癌性和致突变性。因此监测环境中莠去津的含量显得尤为重要<sup>[2]</sup>。由于莠去津在环境中分布广泛、基体样品复杂、浓度较低，莠去津的分析检测过程较为复杂，需要高选择性的高效浓缩富集和高灵敏度的分析检测方法<sup>[3]</sup>。

酚类化合物，尤其是苯酚及氯酚类化合物，被广泛用作除草剂、杀菌剂、抗氧化剂、染料、皮革及其纺织品防腐剂等<sup>[4]</sup>。这些酚类化合物可以通过直接排放或间接产生等途径进入环境中，目前，在地下水、污水、地表水及土壤中均能不同程度的检测到酚类化合物的存在<sup>[5]</sup>。酚类化合物一旦进入环境水体中，将会严重影响生态平衡，造成鱼类死亡、农作物大量减产等危害，最终通过食物链富集进入人体内，引起头晕、恶心、贫血及其各种神经系统中毒症状<sup>[6]</sup>。由于酚类化合物在环境中的含量较低，亟需发展可靠、有效、高灵敏度、高选择性的分析方法用于复杂基质中痕量酚类化合物的检测。

分子印迹聚合物（Molecularly Imprinted Polymers, MIPs），作为一种新型的萃取填料，以其优越的性能引起大家的广泛关注<sup>[7]</sup>。它是将模板分子、功能单体、交联剂、引发剂和致孔剂通过一定的反应聚合在一起，形成的具有特异选择性的聚合物材料<sup>[8]</sup>。近年来，MIPs 因其构效预设性、特异选择性、高稳定性、低制备成本、可重复使用等优势引起了研究者的关注，被广泛应用于样品前处理技术、色谱分离及化学/生物传感技术<sup>[9]</sup>。MIPs 具有构效预设性、特异识别性、稳定性好、制备成本低等特点，在色谱分离、固相萃取、仿生传感、模拟酶催化等领域得到广泛应用。在色谱分离方面的研究中，制备合成球形形貌、粒径均匀可控、选择性好的 MIPs 材料是目前的研究热点<sup>[10]</sup>。目前，将分子印迹聚合物材料作为固定相填充成超高效液相色谱柱尚处于起步阶段，具有较大的应用前景。分子印迹材料基质高效液相色谱柱的研制，既可以结合 MIPs 材料的特异选择性、稳定性好等特点，也可以有效利用 UPLC 分析速度快、灵敏度高等优势，有利于解决复杂样品基质中目标物的分离分析困难等问题。

本项目以三嗪类农药、氯酚类化合物为检测对象，设计开发以分子印迹聚合物材料为固定相的超高效液相色谱柱，用于复杂海岸带环境样品中目标物的选择性识别和分离，有效避免基质干扰问题，解决传统硅胶基质色谱柱酸碱耐受力差等问题，提高色谱柱的分离效率，

增加传质速率，降低色谱柱背压，减少制备成本，延长色谱柱的使用寿命，保障仪器设备的平稳运行和满足实验室特殊特定样品的分析测试需求。

## 2 系统总体设计

本项目设计研发分子印迹材料基质的超高效液相色谱柱，用于发展复杂海岸带环境样品中三嗪类农药、氯酚类化合物的选择性识别和高灵敏度分析方法。针对三嗪类农药、氯酚类化合物为目标物，制备合成球形形貌、粒径均匀可控、选择性好、比表面积较大的分子印迹聚合物材料。采用适当的色谱柱填装技术将上述 MIPs 材料填装成超高效液相色谱柱，并连接 UPLC 对目标物进行高选择性、快速高效、高灵敏度的分离分析。根据本项目的研究内容和研究目标，拟采取的技术路线如图 1 所示，主要包括三部分内容：分子印迹聚合物材料的制备、色谱柱填装、色谱柱应用。

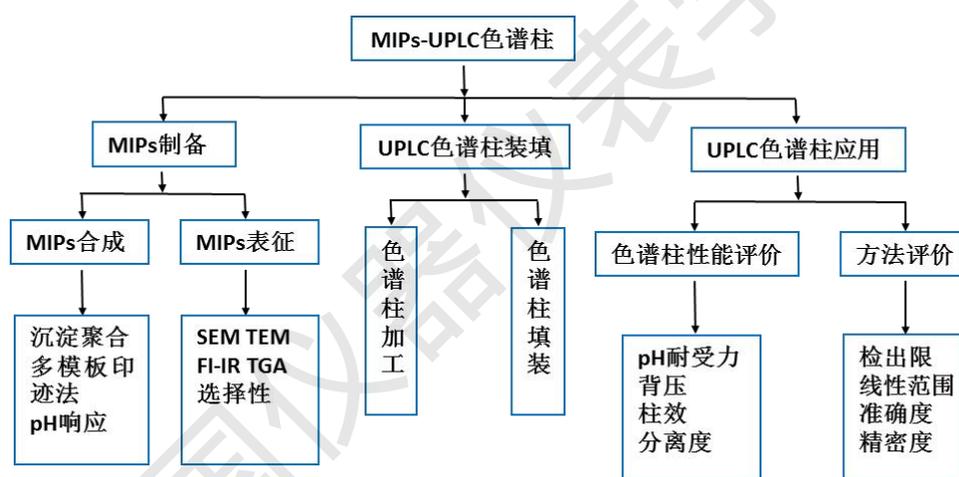


图 1 研究技术路线图

## 3 分子印迹聚合物材料的设计和制备

### 3.1 氯酚类印迹聚合物材料的制备

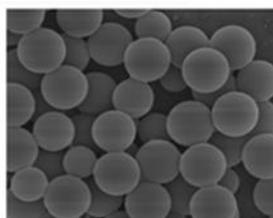


图 2 氯酚印迹聚合物材料电镜图

采用一步沉淀聚合法制备氯酚类分子印迹聚合物材料，模板分子与功能单体之间通过非

共价作用力结合，合成路线如下：50 mL 三口烧瓶中加入 20 mL 致孔剂，0.1 mmol 模板分子和 0.4 mmol 功能单体，超声溶解后，将上述溶液置于冰箱中预聚合 12 h。再加入交联剂和引发剂超声溶解后，在冰浴环境下通氮气 15 min，水浴温度为 60 °C 聚合反应 24 h。聚合反应结束后，清洗去除未反应的溶剂，再用乙腈/乙酸（体积比为 9:1，V/V）清洗去除聚合物表面及内部的模板分子，最后用乙腈清洗去除残留的乙酸。将清洗后所得分子印迹聚合物材料在真空干燥箱中干燥至恒重后使用。

### 3.2 三嗪类莠去津印迹聚合物材料的制备

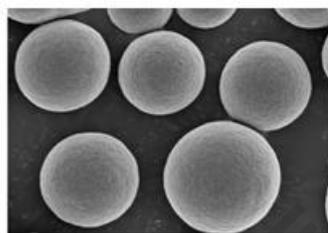


图 3 莠去津印迹聚合物电镜图

我们采用活性沉淀表面印迹法，以功能单体，交联剂，乙腈为溶剂制备莠去津表面印迹聚合物。聚合过程简述如下：功能单体和模板分子莠去津溶解于 50 mL 乙腈中，放置于冰箱中预组装 12 h 形成功能单体与模板分子的配合物。30 mg 经乙烯基修饰的纳米二氧化硅粒子，交联剂，引发剂，和可逆加成断裂链转移剂加入到上述溶液中，溶液超声除气通氮除氧后将反应瓶密封。采用两步升温法制备表面印迹聚合物。首先 50 °C 下反应 8 h，随后将体系升温，60 °C 下继续反应 24 h。将所得印迹聚合物过滤收集后，用甲醇/乙酸（体积比 9:1，V/V）的混合液为溶剂洗脱去除模板分子和未反应的单体，将得到的聚合物于 40 °C 下真空干燥至恒重。此外，以传统沉淀聚合法制备二氧化硅表面印迹聚合物，与活性沉淀表面印迹法制备聚合物对比，其制备方法与活性沉淀表面印迹相似，只是聚合体系中不加可逆加成断裂链转移剂。

## 4 分子印迹固定相超高效液相色谱柱的制备

### 4.1 氯酚印迹聚合物材料为固定相超高效液相色谱柱的制备

将一定量的氯酚印迹聚合物材料固定相分散到 50 mL 的异丙醇-乙腈（1:1，V/V）溶液中，超声分散 3 min。用 50 mL 针筒注入匀浆罐内，匀浆罐接至装柱机上，甲醇做顶替液，用 60 MPa 压力下装入不锈钢空柱中，顶替液成线形流出，维持高压 20 min，减压至 30 MPa 运行 10 min，然后撤去压力。待压力表指针读数降为零，静止三分钟。取下装填好的色谱柱，

用小刀削平填料，两端密封，贴好标记及流动相方向待用。



图 4 氯酚印迹聚合物材料为固定相超高效液相色谱柱的制备过程

所制备色谱柱的性能评价、数据采集和处理主要在 ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪上完成。用不同极性物质尿嘧啶、苯酚、甲苯的混合物作为测试物来评价聚色谱柱的各项性能，流动相为乙腈/水=60/40 溶液，在流速为 1 mL/min 范围内考察，检测波长为 254 nm。所制备 4.6×25cm 色谱柱塔板数大于 20000，选择性因子 3.2，不对称因子在 0.8-1.2 之间。由于现在无市售酚类物质检测色谱柱，故与常规 C18 色谱柱进行对比，所制备色谱柱选择性因子优于常规色谱柱。

#### 4.2 三嗪类莠去津印迹聚合物材料为固定相超高效液相色谱柱的制备

取一定量的莠去津印迹聚合物材料固定相分散于异丙醇中，超声 3 min 后倒入匀浆罐，用甲醇作为流动相在 60 MPa 的压力下将填料装入不锈钢柱管中作为液相色谱柱，维持高压 30 min 后，将柱子拆下，用甲醇和水的混合液（9:1，V/V）以 1 mL/min 的流速将柱子冲洗 6 h。待压力表指针读数降为零时，取下装填好的色谱柱，用小刀削平填料，两端密封，贴好标记及流动相方向待用。



图 5 三嗪类莠去津印迹聚合物材料为固定相超高效液相色谱柱的制备过程

所制备色谱柱的性能评价、数据采集和处理主要在 ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪上完成。用不同极性物质尿嘧啶、苯酚、甲苯的混合物作为测试物来评价聚色谱柱的各项性能，流动相为乙腈/水=60/40 溶液，在流速为 1 mL/min 范围内考察，检测波长为

254 nm。所制备 4.6×25cm 色谱柱塔板数大于 20000，选择性因子 2.1，不对称因子在 0.8-1.2 之间。由于现在无市售酚类物质检测色谱柱，故与常规 C18 色谱柱进行对比，所制备色谱柱选择性因子优于常规色谱柱。

## 5 新型色谱柱性能柱效与稳定性考察

### 5.1 精密度以及重复性试验

取同一供试品溶液，连续进样 6 次，考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积的一致性，结果表明各共有峰相对保留时间的相对标准偏差  $RSD < 1.40\%$ ，相对峰面积的  $RSD < 2.42\%$ ，结果表明方法精密度良好。取同一批样品 6 份，精密称定，制成供试品溶液，分别进样，考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积的一致性，各共有峰相对保留时间的  $RSD < 0.74\%$ ，相对峰面积的  $RSD < 2.93\%$ ，结果表明方法重现性良好。

### 5.2 稳定性试验

以甲醇-水 (65:35, v/v) 为流动相，流速设为 0.4 mL/min，柱温为 25 °C，检测波长设为 254 nm，测得理论塔板数为 4558 块/米。采用甲醇交替冲洗一个月，保留时间、理论塔板数变化很小，说明该固定相在流动相中是稳定的。所制备色谱柱重复使用 30 次，各共有峰相对保留时间的相对标准偏差  $RSD$  数值小 1.72%，结果表明方法稳定性良好。

### 5.3 pH 适用范围试验

一般硅胶基质填料的固定相其 pH 适用范围为 2~8。项目组为提高硅胶基质的填料键合相在酸性条件下的稳定性，一般在碳链的硅烷基侧链上采用大体积的有机基团进行保护，使得此类色谱填料能够稳定地用于 pH 极端的流动相体系中，而不会导致硅烷键的流失。我们推出能够耐受高 pH 稳定性的填料，这种填料兼顾了表面多孔型填料和硅胶表面有机杂化的优势，具有高柱效、宽 pH 耐受范围 (2-11) 的优势。

## 6 分子印迹聚合物材料为固定相的超高效液相色谱柱的应用

为验证新型填料色谱柱的色谱分离性能以及实际应用价值，将制备的两种印迹聚合物材料为固定相超高效液相色谱柱分别用于湖水、海水和自来水等 12 种实际样品中 7 种酚类化合物和 5 种三嗪类除草剂的选择性富集和检测。

### 6.1 对酚类化合物的分离

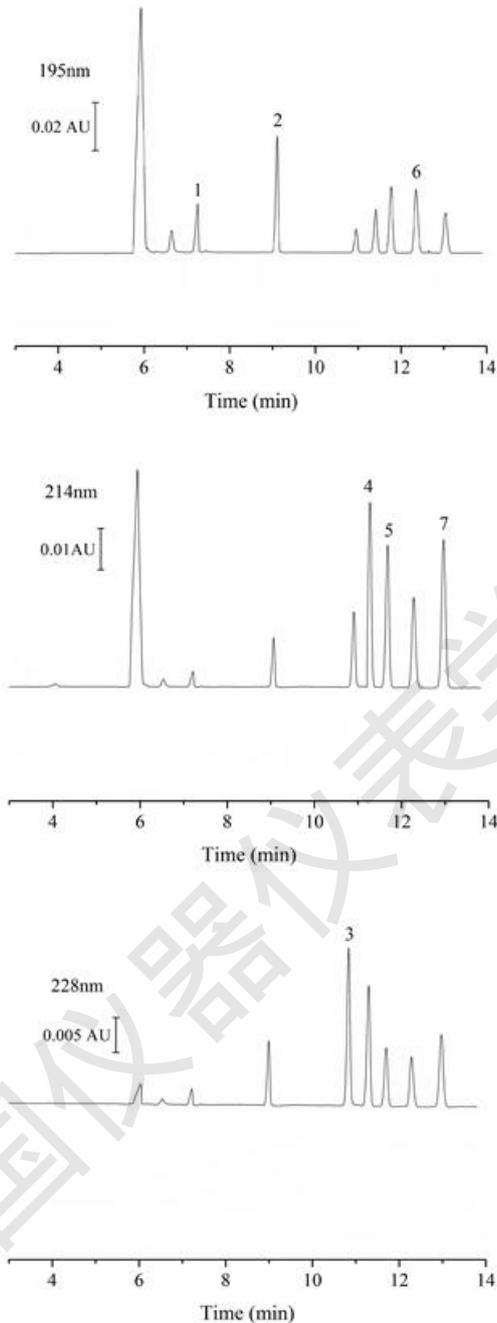


图 6 7 种酚类化合物在 195 nm、214 nm、228 nm 通道下的谱图

根据分子印迹聚合物材料的结构，填料的表面存在许多极性基团（如羟基和羧基等）。用 7 种酚类化合物考察了分子印迹聚合物材料填料在正相色谱条件对酚类化合物的分离性能。考察了流动相中乙醇含量对酚类化合物分离效果的影响，随着流动相中乙醇含量的增加，酚类化合物的保留因子逐渐减小。图 6 为最佳分离条件下的色谱分离图，可以看出这 7 种酚类化合物可以在分子印迹聚合物材料为填料的色谱柱上得到很好地分离，并且出峰顺序是与其极性相关的。比如，邻硝基苯酚中的硝基和羟基能够形成分子内氢键，大大削弱了邻硝基苯酚的极性，所以它保留时间相对较小。

## 6.2 对三嗪类化合物的分离

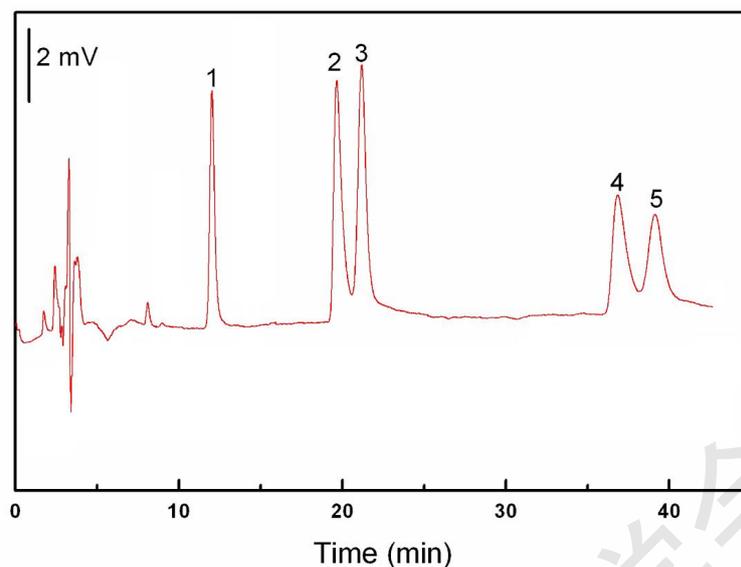


图 7 五种三嗪类除草剂加标样品色谱图(1)西玛津；(2)西草净；(3)莠去津；(4)莠灭净；(5)扑灭津.

项目组考察了分子印迹聚合物材料填料色谱柱对三嗪类化合物的分离效果(各个化合物在色谱柱上的保留因子)。随着化合物本身 $\pi$ -电子体系的增大,其保留时间逐渐增长,色谱峰逐渐变宽。这是因为填料的印迹聚合物本身就是一个大的 $\pi$ -电子体系,随着待测化合物的 $\pi$ -电子体系的增加,他们之间的 $\pi$ - $\pi$ 键相互作用增加,导致三嗪类化合物的保留时间和色谱峰变宽。在色谱柱上的正相色谱分离性能,如图7所示。在只用正己烷做流动相条件下,五种三嗪类除草剂可以在分子印迹聚合物材料填料色谱柱上得到很好地分离,并且出峰顺序和它们的 $\pi$ -电子体系大小一致。

## 6.3 实际样品中代表性酚类化合物和三嗪类除草剂检测

为进一步评估复杂基质中项目组研发色谱柱的分析性能,对实际样品进行加标回收实验,加标浓度选择  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。12种实际样品加标后经色谱柱分析检测后,加标回收率和检测限结果如表1所示。以上结果表明,分子印迹聚合物材料为固定相的超高效液相色谱柱可以用于实际样品中酚类化合物和三嗪类化合物的同时选择性萃取、富集和分离检测。

**表 1 多种实际样品中 7 种酚类化合物和 5 种三嗪类除草剂回收率以及检出限**

实际样品	莠去津回收率 (%)	苯酚回收率 (%)	莠去津检出限	苯酚检出限
苹果	89-95	70.7-106.7	2.4 $\mu\text{g/L}$	4.5 $\mu\text{g/L}$
海水	39-103	90.3-102.3	3.8 $\mu\text{g/L}$	1.08 $\mu\text{g/L}$
莴苣	95-103.2	77.7-97.7	0.2 $\mu\text{g/L}$	0.11 $\mu\text{g/L}$
自来水	81-106.1	81.2-96.3	90 $\mu\text{g/L}$	0.75 $\mu\text{g/L}$
大豆	79-98	79.8-99.6	6.3 $\mu\text{g/L}$	0.44 $\mu\text{g/L}$
土壤	95.1-101	85.5-105.6	25 $\mu\text{g/}$	0.44 $\mu\text{g/L}$
沉积物	94.6-101	90.9-105.5	0.14 $\mu\text{g/}$	0.19 $\mu\text{g/L}$
湖水	71.6-126.7	84.8-100.6	2.1-8.17 $\mu\text{g/L}$	0.32 $\mu\text{g/L}$
玉米	81.5-100.9	73.5-98.6	2.8 $\mu\text{g/L}$	0.18 $\mu\text{g/L}$
河水	73.5-102	77.8-104.3	2.8-9.6 $\mu\text{g/L}$	0.25 $\mu\text{g/L}$
生菜	85-102.1	82.1-103.1	1.3-1.65 $\mu\text{g/L}$	0.35 $\mu\text{g/L}$
瓶装水	97.4-105.2	91.5-103.7	3.3 $\mu\text{g/L}$	0.31 $\mu\text{g/L}$

## 7 结语

本项目以三嗪类农药、氯酚类化合物为检测对象,设计开发以分子印迹聚合物材料为固定相的超高效液相色谱柱,用于复杂海岸带环境样品中目标物的选择性识别和分离,有效避免基质干扰问题,解决传统硅胶基质色谱柱酸碱耐受力差等问题,提高色谱柱的分离效率,增加传质速率,降低色谱柱背压,减少制备成本,延长色谱柱的使用寿命,保障仪器设备的平稳运行和满足实验室特殊特定样品的分析测试需求。

### 参考文献:

- [1] Y. Li, C. Dong, J. Chu, J. Qi, X. Li, Surface molecular imprinting onto fluorescein-coated magnetic nanoparticles via reversible addition fragmentation chain transfer polymerization: A facile three-in-one system for recognition and separation of endocrine disrupting chemicals [J]. *Nanoscale*, 2011, 3, 280-287.

- [2] X. Liu, T. Zhou, Z. Du, Z. Wei, J. Zhang, Recognition ability of temperature responsive molecularly imprinted polymer hydrogels [J]. *Soft Mater.*, 2011, 7, 1986–1993.
- [3] C. Wang, A. Javadi, M. Ghaffari, S. Gong, A pH-sensitive molecularly imprinted nanospheres /hydrogel composite as a coating for implantable biosensors [J]. *Biomaterials*, 2010, 31, 4944–4951.
- [4] G. Bayramoğlu, M. Arica, Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads [J], *J. Hazard. Mater.*, 2008, 156: 148–155.
- [5] J. Padilla-Sanchez, P. Plaza-Bolanos, R. Romero-Gonzalez, N. Barco-Bonilla, J. Martinez-Vidal, A. Garrido-Frenich, Simultaneous analysis of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in wastewater effluents, using solid phase extraction and further determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J], *Talanta*, 2011, 85: 2397–2404.
- [6] O. Gimeno, M. Carbajo, F. Beltrán, F. Rivas, Phenol and substituted phenols AOPs remediation [J], *J. Hazard. Mater.*, 2005, 119: 99–108.
- [7] M. Polyakov, Adsorption properties of silica gel and its structure [J]. *Zhur. Fiz. Khim.*, 1931, 2, 799–805.
- [8] C. Alexander, H. Andersson, L. Andersson, R. Ansell, N. Kirsch, I. Nicholls, J. O'Mahony, M. Whitcombe, Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003 [J]. *J. Mol. Recognit.*, 2006, 19, 106–180.
- [9] R. Liang, D. Song, R. Zhang, W. Qin, Potentiometric sensing of neutral species based on a uniform-sized molecularly imprinted polymer as a receptor [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, 2556–2559.
- [10] D. Lakshmi, A. Bossi, M. J. Whitcombe, I. Chianella, S. Fowler, S. Subrahmanyam, E. Piletska, S. Piletsky, Electrochemical sensor for catechol and dopamine based on a catalytic molecularly imprinted polymer-conducting polymer hybrid recognition element [J]. *Anal. Chem.*, 2009, 81, 3576–3584.