

沉淀聚合法制备三聚氰胺分子印迹聚合物微球*

杨卫海 严守雷** 卫 晨 王清章

(华中农业大学食品科技学院 武汉 430070)

摘 要 以三聚氰胺为模板分子,以甲基丙烯酸为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂,在乙腈-乙二醇(20:1, V/V)混合溶剂中沉淀聚合制备了分子印迹聚合物微球. 利用¹H-NMR 和紫外光谱方法研究了模板与功能单体相互作用情况. 结果表明,三聚氰胺与甲基丙烯酸(MAA)分子通过协同氢键作用形成 1:2 型氢键配合物. 利用扫描电镜和红外光谱对聚合物微球的结构进行了表征. 结果表明,印迹聚合物近似圆球形,粒径约为 400~500 nm,且大于非印迹聚合物微球,表面存在大量的结合位点. 通过静态平衡吸附实验研究了聚合物微球对模板分子的结合能力,印迹聚合物微球在 4 h 后逐渐达到吸附平衡,Scatchard 分析表明,印迹聚合物微球主要存在两类不同的结合位点,最大表观结合量($Q_{\max}$)和平衡离解常数(K_d)分别为 $Q_{\max 1} = 22.97 \mu\text{mol/g}$, $K_{d1} = 0.14 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$; $Q_{\max 2} = 157.65 \mu\text{mol/g}$, $K_{d2} = 2.55 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 计算得出表观印迹效率和有效印迹效率分别为 68% 和 58%. 此方法合成的印迹聚合物微球对三聚氰胺有较好的结合性能,可应用于三聚氰胺的分离检测.

关键词 三聚氰胺, 分子印迹聚合物微球, 沉淀聚合

三聚氰胺简称三胺,是一种三嗪类含氮杂环有机化合物和重要的氮杂环有机化工原料,主要用于制造三聚氰胺树脂. 近年来发生在国内婴儿奶粉受三聚氰胺污染导致婴儿肾结石事件以及美国的数起饲料致死宠物的事件,使三聚氰胺的检测成为关注的热点. 目前国内外检测食品及饲料内三聚氰胺残留,通常采用液相色谱法^[1]、气相色谱-质谱法^[2]、液相色谱-质谱法^[3]、毛细管电泳-质谱法^[4]等方法. 这些方法成本较高,而且在检测前都需要进行复杂的预处理,如对样品进行液-液萃取,再采用多步柱净化和富集. 由于硅胶柱色谱法和合成硅酸镁柱色谱法缺乏特异性,对复杂的生物样品中痕量的三聚氰胺的净化、富集效果并不理想.

分子印迹技术(molecularly imprinted technology)是最近几十年来发展起来的一种包含多种学科的研究方法. 在合适的溶剂中模板分子与功能单体依靠分子间作用力形成主客体配合物,再加入交联剂和引发剂,引发聚合形成稳定的高分子聚合物;洗去模板分子后,聚合物中留有对模板分子有特异性结合能力的位点. 这类分子印迹材料对目标物具有高度的选择性,且性能稳定、

价格低廉,可以解决样品前处理复杂、成本较高等问题,迄今已被用于传感器^[5]、色谱分离^[6]、固相萃取^[7]和人工抗体^[8]等领域.

周文辉等^[2]以三聚氰胺为模板分子,乙醇-水(4:1, V/V)为溶剂和致孔剂,采用本体聚合法制备了聚氰胺分子印迹聚合物^[9]. 但本体聚合制得大块聚合物,再经过粉碎、研磨、筛分、反复沉降制得一定颗粒直径的粉末材料,过程繁琐,得率低. 本文选择乙腈-乙二醇(20:1, V/V)为溶剂和致孔剂,采用沉淀聚合方法合成了三聚氰胺分子印迹聚合物微球,并对它的吸附性能和结构进行了研究,为下一步应用样品前处理提供基础.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

三聚氰胺(天津市化学试剂公司分公司,分析纯);甲基丙烯酸(MAA, Sigma 公司,分析纯);2,2'-偶氮二异丁腈(AIBN, 上海试剂四厂,化学纯);乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA, Sigma-Aldrich 公司,分析纯);乙二醇、甲醇、冰醋酸、乙腈(分析纯)均购于国药集团化学试剂有限公司.

SHIMADZU UV-1700 紫外分光光度计(日本

* 2009-10-16 收稿,2009-11-23 修稿;教育部新教师基金(基金号 20070504081)和博士后基金(基金号 20080440951)资助项目;

** 通讯联系人, E-mail: yanshoulei1225@sohu.com

岛津);JSM-6390/LV 扫描电子显微镜(日本 NTC);NEXU-S 红外光谱仪(美国 NICDET);Averce AV-400 核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker);超声清洗仪(上海捷杰里技有限公司);电热恒温水浴锅(江苏金坛县国华仪器厂);贝克曼高速冷冻离心机(美国贝克曼公司);电热恒温干燥箱(上海市跃进医疗器械厂);CHA-S 型气浴恒温振荡器(天津市华北试验仪器有限公司)。

1.2 三聚氰胺与 MAA 相互作用的研究

用氘代二甲基亚砷作溶剂,配制三聚氰胺(80 mmol/L)与 MAA (160 mmol/L)的混合溶液,4℃ 储存 6 h. 然后,以四甲基硅烷为内标,在 25℃ 下测定三聚氰胺(80 mmol/L),MAA (160 mmol/L)和混合液的¹H-NMR。

取一系列比色管,加入固定量的三聚氰胺,渐增 MAA,用乙腈-乙二醇(20:1, V/V)稀释至刻度,置于振荡器振荡 30 min,冰箱中过夜,再以乙腈-乙二醇为参比扫描吸收光谱并在适当波长下测得吸光度。

1.3 三聚氰胺分子印迹聚合物微球的制备

印迹聚合物的制备过程是在 100 mL 的圆底烧瓶中加入 0.25 mmol (31.5 mg) 三聚氰胺、1 mmol (0.085 mL) MAA 和 2 mL 乙二醇,60℃ 加热溶解后加入 40 mL 乙腈,于室温下振荡 30 min,冰箱中过夜,再加入 5 mmol (0.95 mL) EGDMA 和 10 mg AIBN,通氮气 10 min 以除去体系中的氧气,密封,于 60℃ 水浴热聚合 12 h. 取出冷却至室温,超声 10 min,5000 r/min 离心,用冰醋酸-甲醇(6:4, V/V)溶液抽提 24 h 至检测不到三聚氰胺分子. 于烘箱中 40℃ 真空干燥,所得聚合物为 MIP;同时按同样方法不加三聚氰胺制得空白聚合物(N-MIP)。

1.4 聚合物微球的静态吸附实验

称取一组等量的印迹聚合物 2 mg,分别置于 1.5 mL 的小离心管中,加入 1.0 mmol/L 的三聚氰胺乙腈-乙二醇溶液 1 mL,置于恒温振荡器中保持 28℃ 振荡不同时间,6000 r/min 离心 5 min,取离心液 0.6 mL,乙腈-乙二醇稀释到定容至合适的浓度,紫外分光光度计 236 nm 测定吸光度. 计算不同吸附时间单位质量聚合物的结合量,从而进一步分析三聚氰胺分子印迹聚合物微球的吸附动力学。

称取一组等量的印迹聚合物和空白聚合物 2 mg,分别置于 1.5 mL 的小离心管中,加入 0.1 ~

1.5 mmol/L 的三聚氰胺乙腈-乙二醇溶液 1 mL,置于恒温振荡器中保持 28℃ 振荡 12 h,采用同样方法测算单位质量聚合物的结合量,从而得出印迹聚合物微球对三聚氰胺的吸附等温线。

1.5 聚合物微球的结构表征

利用 JSM-6390/LV 扫描电子显微镜对聚合物微球的表面结构和粒径进行分析;利用 NEXU-S 红外光谱仪,采用 KBr 压片法对去除模板分子的印迹聚合物微球和非印迹聚合物微球进行红外光谱分析。

2 结果与讨论

2.1 印迹聚合物微球的制备和结构表征

溶剂对所制备印迹聚合物微球的吸附特性高低具有重要作用. 分子印迹过程中常用的溶剂和致孔剂有氯仿、二氯甲烷、乙腈、丙酮、甲苯等. 而三聚氰胺属于弱碱性三嗪类杂环化合物,在常见有机溶剂中的溶解度均较小. 对氯仿、乙腈、丙酮、甲苯、甲醇、乙二醇以及不同比例混合溶剂进行多次试验,结果发现三聚氰胺在热的乙二醇与乙腈的混合溶剂中的溶解度较大,可以满足实验要求. 实验选择乙腈-乙二醇(20:1, V/V)为溶剂和致孔剂,40 mL 为最佳体积。

沉淀聚合物微球是在大量反应介质中形成的,沉淀聚合开始于均相混合液. 随着反应进行低聚物通过交联成核从介质中析出,又相互聚合而形成聚合物粒子,通过捕捉低聚物和功能单体最终形成高交联的聚合物微球. 由图 1 可以看出所制备的 MIP 及 N-MIP 形态均一,近似圆球形,微球直径分布为 400 ~ 500 nm. 但印迹聚合物微球的粒径大于非印迹聚合物微球的粒径,可能是由于印迹分子的存在占有一定的空间体积,洗脱之后便留下大量“孔穴”,在微球数量基本相同的情况下,表现为粒径变大。

对制备的印迹聚合物和非印迹聚合物进行红外分析,结果(图 2)表明,三聚氰胺印迹聚合物和非印迹聚合物的红外图谱很接近,但在一些特征基团峰上有明显差别. 3456 和 2988 cm⁻¹ 处是羧基中 O—H 的伸缩振动吸收峰,说明存在大量的功能基羧酸基团,但印迹聚合物的峰形比非印迹聚合物的更尖锐,更明显,表明它表面带有较多的游离 OH 基团. 原因可能是, O—H 的振动会受氢键的影响,吸收带变宽^[10]. 在非印迹聚合物中, OH 主要与 C=O 之间生成了氢键,而在印迹聚

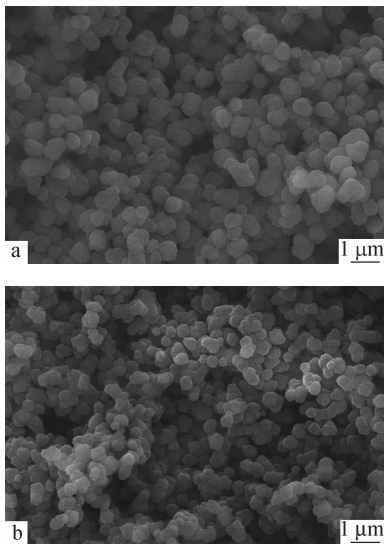


Fig. 1 SEM photographs of MIP (a) and N-MIP (b)

合物中,OH 除了与 C=O 之间生成氢键外,还与三聚氰胺分子形成了氢键. 这部分 OH 在三聚氰胺洗脱之后,从缔合态恢复到了游离态,使 O—H 振动峰变得尖锐. 1633 cm⁻¹附近的 C=C 双峰很小,说明交联剂和功能单体大部分进行了交联聚合,只有很小部分残留. 由此可见,功能单体与交联剂聚合后,将三聚氰胺分子与 MAA 形成的配合物固定下来,模板分子洗脱后,印迹聚合物中留下了可以同模板分子相互作用的化学基团,这为特异识别性创造了条件.

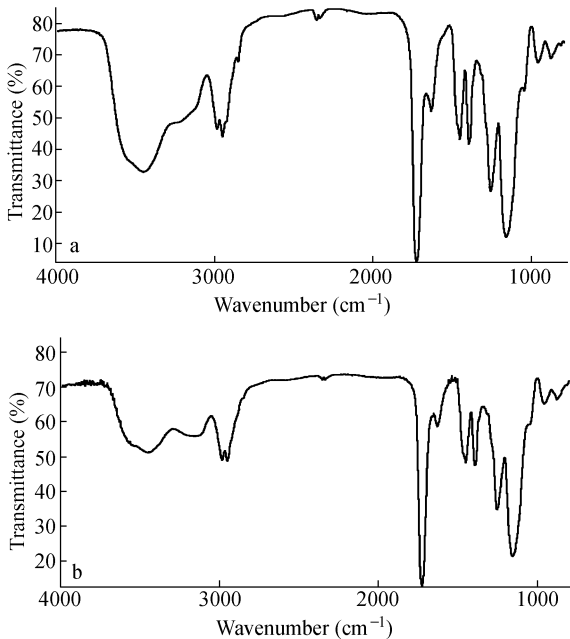


Fig. 2 IR spectra of the MIP (a) and N-MIP (b)

2.2 三聚氰胺分子与 MAA 结合机理分析

模板分子与功能单体的作用强弱直接影响着分子印迹聚合物的选择性和亲和性. 作用强,聚合后聚合物对模板分子的亲和性高. 因此,于聚合前在聚合溶剂中考察模板分子与功能单体的作用力,可以预测印迹聚合物的亲和能力. 图 3 是三聚氰胺(a)、MAA (b)以及三聚氰胺和 MAA 混合溶液(c)的¹H-NMR 结果. 三聚氰胺分子中杂环上的 N 原子和氨基上的 N 原子均可能与 MAA 的羧基之间产生了氢键作用. 如图 3 所示,三聚氰胺分子中氨基上的氢质子的位移由 $\delta = 6.04$ 在预组装后向低场移至 $\delta = 6.22$,同时 MAA 中羧基质子的位移由 $\delta = 12.42$ 在预组装后向高场移至 $\delta = 7.12$,这是质子参与氢键形成的共同特征^[10]. 由此说明,在印迹过程中,三聚氰胺中分子与 MAA 的羧基之间产生了氢键作用形成配合物,并导致了三聚氰胺和 MAA 分子中特定质子的位移.

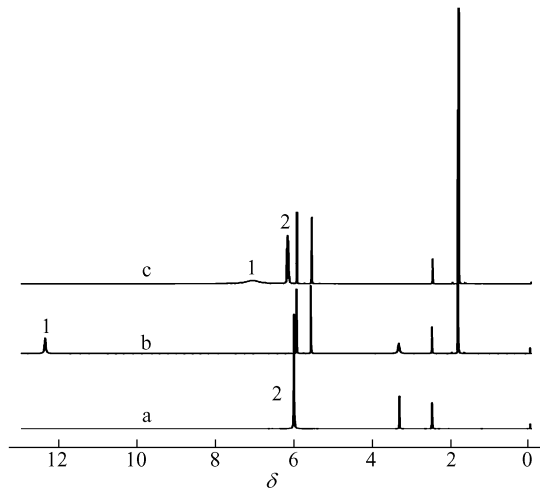


Fig. 3 ¹H-NMR spectra of melamine (a), MAA (b) and melamine-MAA (c) at 25°C

通过差示紫外光谱研究可以得知三聚氰胺和 MAA 的配位比以及反应的结合常数. 在乙腈-乙二醇中固定三聚氰胺的浓度为 0.1 mmol/L, MAA 的浓度为 0.4 mmol/L,研究了三聚氰胺分子与 MAA 在乙腈-乙二醇混合溶液中的相互作用,结果如图 4(a)所示. 可以看出,0.1 mmol/L 三聚氰胺和 0.4 mmol/L MAA 混合体系的理论吸光值与实际吸光值有很大的差别,说明在乙腈-乙二醇溶剂中三聚氰胺与 MAA 之间发生了明显的相互作用,形成了配合物.

固定三聚氰胺的浓度为 0.1 mmol/L, 渐增 MAA 的浓度, MAA 的浓度分别为 0.05 ~

1 mmol/L,在紫外分光光度计上测得混合溶液的吸收曲线(图4b),从而绘制出紫外吸光度差光谱(图4c).由图可以看出,随着功能单体 MAA 量的增加,吸光度也增加,吸收光谱中最大吸收波长发生红移.

在理论上^[11],模板分子与功能单体形成复合物,可以用下式来表示:



式中 k 是结合常数, $n=1,2,3\cdots,n$. 功能单体的浓度(b_0)远大于模板分子的浓度(a_0),因此复合物的浓度(c)可推导为:

$$c = \frac{a_0 b_0 k}{1 + b_0^n k} \tag{2}$$

由于功能单体与模板分子以及其主客体复合物最大吸收波长在 221 nm 处,所以功能单体与模板分子在乙腈溶液中作用前后吸光度差 ΔA 可表示为:

$$\Delta = A - A_0 = c\Delta\xi l \tag{3}$$

式中 $\Delta\xi = \xi_c - \xi_A - \xi_B$,可以得到:

$$\frac{\Delta A}{b_0^n} = -K\Delta A + K\Delta\xi c a_0 l \tag{4}$$

以 $\frac{\Delta A}{b_0^n}$ 对 ΔA 作图可以推导出 n 值,从而得知在乙腈-乙二醇溶液中模板分子与功能单体的作用模式,从而揭示分子印迹作用机理.

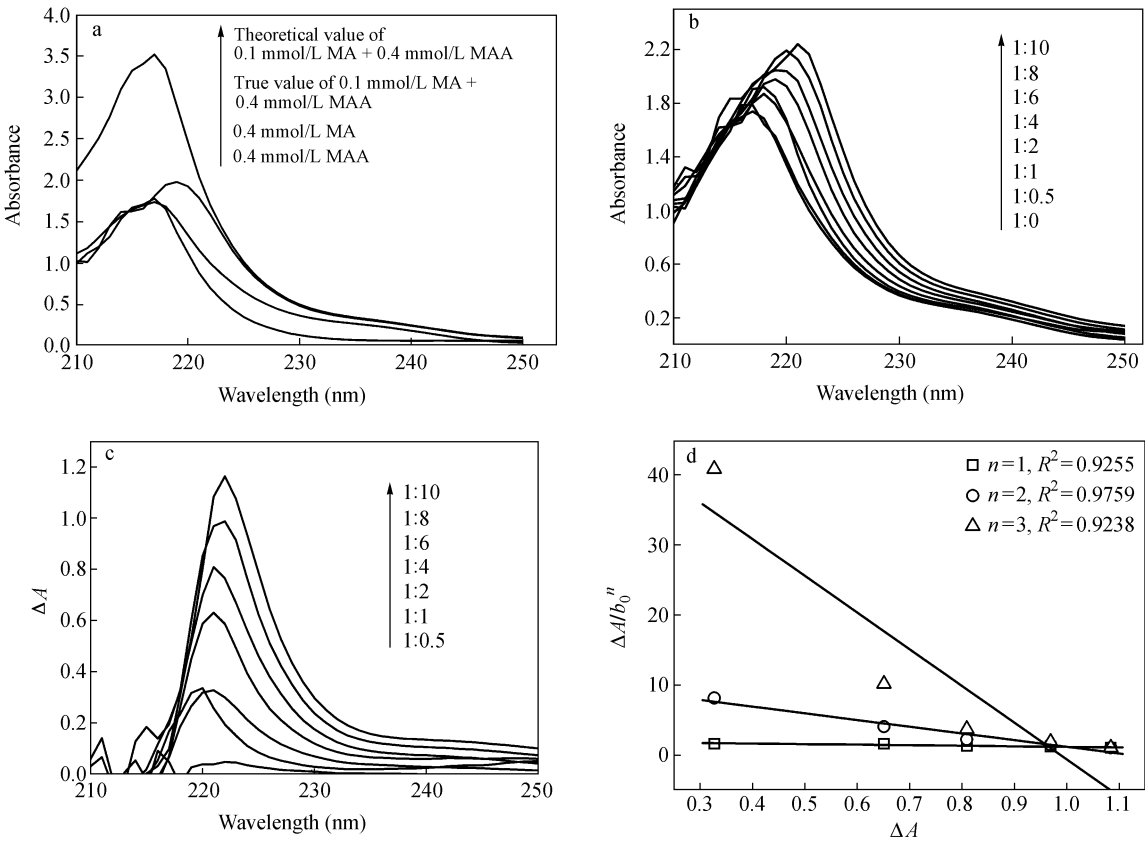


Fig. 4 The spectrogram of the interaction between melamine and MAA in acetonitrile-ethylene glycol (20:1 V/V)
(a) Difference adsorption spectra of MA, MAA and the mixture; Difference adsorption spectra (b) and the difference absorbance (c) of MA in presence of MAA, the ratio of MA to MAA is 1:0.5, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10; (d) Plots of $\Delta A/b_0^n$ versus ΔA at 221 nm

从图4(d)中可以看出当 $n=2$ 时, $\Delta A/b_0^n$ 对 ΔA 作图是一条直线 ($R^2=0.9759$). 这也就说明在研究的浓度范围内主客体主要存在形式为 1 个三聚氰胺与 2 个 MAA 发生作用. 但是, 单独通过氢键来识别是不稳定的, 因此空间效应也可能对识别有很大作用. 同时, 三聚氰胺分子是对称结

构, 含有三个的官能团 ($-\text{NH}_2$), 却只有两个与单体发生作用, 这也可能是空间位阻效应的影响. 可以推测三聚氰胺分子印迹聚合物的合成路线 (见图 5).

2.3 印迹聚合物微球的吸附动力学研究

分子印迹聚合物吸附动力学实验不仅可以考

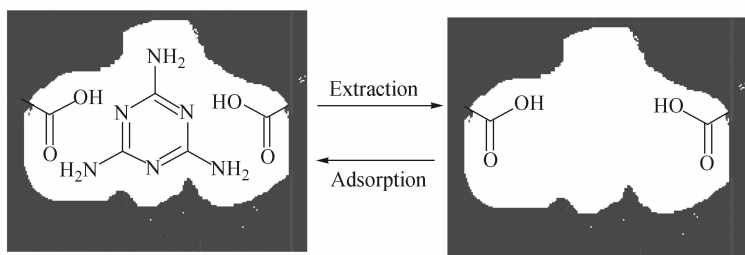


Fig. 5 Synthetic route of melamine molecular imprinted polymer microspheres

察制备的聚合物对模板分子吸附容量的大小,而且还可以考察该聚合物达到平衡吸附所需的时间.为测定 MIP 对三聚氰胺的结合速率,固定三聚氰胺浓度为 1 mmol/L,采用静态平衡结合法测定了不同时间内的 MIP 和 N-MIP 对三聚氰胺的吸附量.所得吸附量-时间曲线如图 6 所示.由图 6 可见,随着吸附时间的增加,三聚氰胺 MIP 对其吸附量逐渐增大,且 MIP 的吸附量高于 N-MIP.在开始阶段吸附量增长速率快,2 h 后吸附量占到总量的 85.8%,而后逐渐趋缓,在 4 h 后逐渐达到吸附平衡,吸附量占到总吸附量的 97.4%.这是由于 MIP 中由交联剂和功能单体构成的立体孔穴分布深浅不一.在开始阶段,主要是颗粒表面对模板分子的吸附,对模板分子呈现出较快的结合速度,而当外表面结合达到饱和后,主要发生模板分子通过孔道向内扩散后吸附,其吸附速度受到传质阻力的影响,致使结合速度下降,表现为吸附曲线的斜率变小.

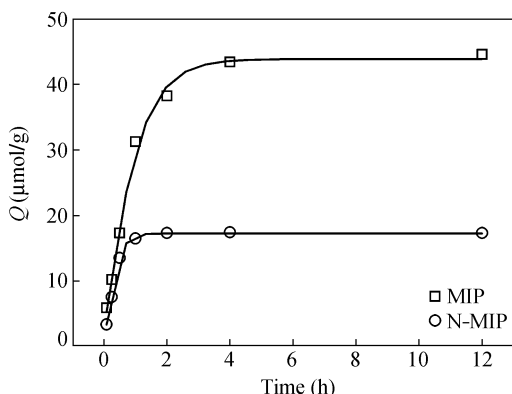


Fig. 6 Effect of adsorption time on amount of adsorption

2.4 平衡吸附实验及 Scatchard 分析

为研究 MIP 的亲合性质,在三聚氰胺浓度 0.1 ~ 1.5 mmol/L 的范围内测定了不同初始浓度溶液的吸附等温线(见图 7).由图 7 的曲线可知,随着三聚氰胺浓度的增加,单位质量分子印迹聚

合物的吸附量也增加,而 N-MIP 在三聚氰胺初始浓度大于 0.5 mmol/L 时的吸附量已趋于饱和,并且在相同初始浓度下单位质量 MIP 的吸附量远大于在单位质量 N-MIP 的吸附量,这说明印迹过程中,模板分子在 MIP 中选择性键合产生的印迹孔穴及孔穴上的活性结合位点,决定了 MIP 对模板分子的高度亲合力和特异识别性远大于非选择性键合作用.

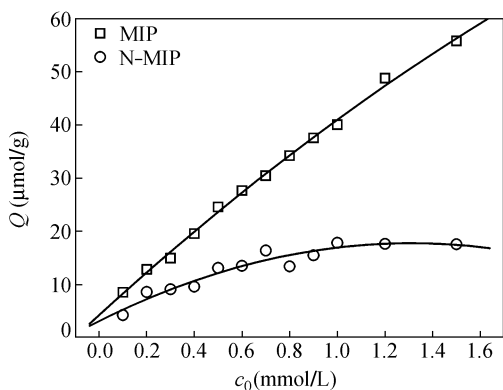


Fig. 7 Isotherm of melamine adsorption on MIP and N-MIP

在分子印迹的研究中,常用 Scatchard 模型评价分子印迹聚合物的结合特性,Scatchard 方程式为:

$$Q/c = (Q_{\max} - Q)/K_d \quad (5)$$

将图中的结合数据按式(5)作图可得 Scatchard 图(图 8).由图 8 可见, Q/c 对 Q 明显是非线性关系,表明 MIP 对三聚氰胺的结合位点是非均一的.但是在图的两端有两个明显的部分具有良好的线性关系,这表明在所研究的三聚氰胺浓度范围内,印迹聚合物主要存在两类不同的结合位点.推测原因可能是由于功能单体和印迹分子之间存在多种相互作用,可以形成多种不同组成的复合物,不同类型的复合物在聚合之后就形成了具有不同性质的作用位点.

以这两段线性关系为依据分别进行拟合,得

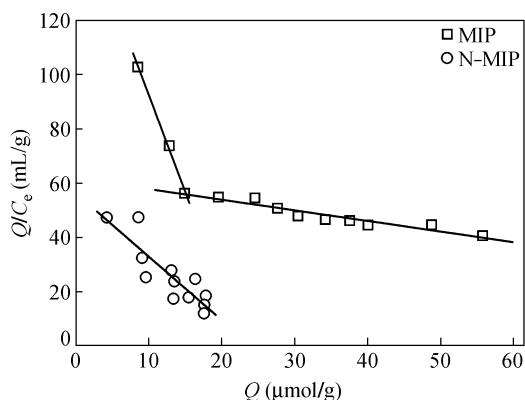


Fig. 8 Scatchard plot of melamine adsorption on MIP and N-MIP

到拟合线性方程 $Q/c = 164.057 - 7.143Q$ ($R_2 = 0.998$) 和 $Q/c = 61.747 - 0.392Q$ ($R_2 = 0.956$). 由线性方程的斜率和截距可求得高亲和性位点的离解常数为 $K_{d1} = 0.14 \times 10^{-3}$ mol/L, 最大表观结合量 $Q_{\max 1} = 22.97$ $\mu\text{mol/g}$; 低亲和性位点的离解常数为 $K_{d2} = 2.55 \times 10^{-3}$ mol/L, 最大表观结合量 $Q_{\max 2} = 157.65$ $\mu\text{mol/g}$.

根据得到的最大表观结合量, 我们再用印迹效率(E)对分子印迹聚合物的结合性能进一步评价. 印迹效率有以下两种:

表观印迹效率:

$$E_{ia} = Q_{\max} / B_{\max} \quad (6)$$

有效印迹效率:

$$E_i = (Q_{\max} - Q_{\text{blank}}) / B_{\max} \quad (7)$$

式中 $B_{\max}$ 为模板分子在 MIP 中的最大理论印迹量, 可以通过 MIP 中模板分子的量与功能单体及交联剂的总质量之比计算而得. $Q_{\max}$ 为 MIP 对模板分子的最大表观结合量. Q_{blank} 为 N-MIP 对模板分子的最大表观结合量.

将 Scatchard 模型得出的数据代入公式(6)和(7)中, 得到三聚氰胺分子印迹聚合物对模板的表观印迹效率和有效印迹效率分别为 68% 和 58%, 结果好于文献[12]中的大部分相关数据, 说明本方法合成的三聚氰胺分子印迹聚合物结合性能较好.

3 结论

采用沉淀聚合的方法, 在乙腈-乙二醇(20:1, V/V)混合溶剂中合成了三聚氰胺分子印迹聚合物微球, 该工艺制备的聚合物不需要研磨和过筛, 并具有比传统印迹聚合物更高的选择性和吸附性能. 该聚合物具有热稳定性强、机械稳定性高、可以长期使用的优点, 可望将其用作固相萃取剂, 识别并分离富集食品及饲料中的三聚氰胺, 以便于对三聚氰胺的检测, 为复杂样品中三聚氰胺的选择性富集及分析检测提供了一条新的途径.

致 谢 感谢华中农业大学电镜平台和华中科技大学分析测试中心对本研究的帮助.

REFERENCES

- Li Yan (李燕), Chai Yong (柴勇), Gong Jiuping (龚久平), Liu Jizhen (刘吉振), Yi Zhijian (易志坚), Hong Yunju (洪云菊), Gao Jing (高静). Food Science (食品科学), 2009, 30(14): 227 ~ 229
- Yokley R A, Mayer L C, Rezaaiyan R, Manuli M E, Cheung M W. J Agric Food Chem, 2000, 48(8): 3352 ~ 3358
- F iligenzi M S, Puschner B, Aston L S, Poppenga R H. J Agric Food Chem, 2008, 56(17): 7593 ~ 7599
- Yan N, Zhou L, Zhu Z F, Chen, X G. J Agric Food Chem, 2009, 57(3): 807 ~ 811
- Piacham T, Josell A, Arwin H, Prachayasittikul V, Ye L. Anal Chim Acta, 2005, 536(1-2): 191 ~ 196
- Kempe M. Anal Chem, 1996, 68(11): 1948 ~ 1953
- Chen W, Liu F, Zhang X M, Li K A, Tong S Y. Talanmta, 2001, 55(1): 29 ~ 34
- Vlatakis G, Andersson L I, Müller R, Mosbach K. Nature, 1993, 361(6413): 645 ~ 647
- Zhou Wenhui (周文辉), Lin Liming (林黎明), Guo Xiuchun (郭秀春), Yang Huanghao (杨黄浩), Wang Xiaoru (王小如). Journal of Instrumental Analysis (分析测试学报), 2009, 28(6): 687 ~ 691
- Shen Zhonglan (申中兰), Yang Jun (杨俊), Zhu Xiaolan (朱晓兰), Gao Yun (高芸), Su Qingde (苏庆德). Spectroscopy and Spectal Analysis (光谱学与光谱分析), 2009, 29(1): 78 ~ 81
- Yan Shoulei (严守雷), Gao Zhixian (高志贤), Fang Yanjun (房彦军). Acta Polymerica Sinica (高分子学报), 2006, (1): 160 ~ 163
- Wang Xuejun (王学军), Xu Zhenliang (许振良), Bing Naici (邴乃慈). Chemical World (化学世界), 2007, (4): 243 ~ 247

PREPARATION OF MELAMINE MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER MICROSPHERES BY PRECIPITATION POLYMERIZATION

YANG Weihai, YAN Shoulei, WEI Chen, WANG Qingzhang

(Huazhong Agricultural University, College of Food Science and Technology, Wuhan 430070)

Abstract Uniform molecularly imprinted polymer (MIP) microspheres were prepared by precipitation polymerization of methacrylic acid (MAA) and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) using melamine as template in acetonitrile-ethylene glycol mixed solvent (20:1, V/V). $^1\text{H-NMR}$ and UV spectrometry were employed to demonstrate the mechanism of the interaction between melamine and MAA, and the structure of the polymer microspheres was characterized by scanning electron microscopic (SEM) photographs and IR spectrometry. The results showed that the melamine-MAA complexes of 1:2 mole ratio were obtained by cooperative hydrogen bonding. The MIP particles with many binding abilities on their surface were microspheres and the diameters ranging from 400 nm to 500 nm were larger than those of the non-imprinted polymer microspheres. The adsorption efficiency was investigated by equilibrium adsorption experiments. The data obtained showed that the imprinted polymer microspheres reached equilibrium after 4 h and had higher adsorption efficiency compared to the non-imprinted polymer microspheres, which had the same chemical composition. Scatchard plot's analysis revealed that the apparent maximum binding capacity and the dissociation contents were $Q_{\text{max1}} = 22.97 \mu\text{mol/g}$, $K_{\text{d1}} = 0.14 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ for high affinity binding sites and $Q_{\text{max2}} = 157.65 \mu\text{mol/g}$, $K_{\text{d2}} = 2.55 \times 10^{-3} \text{mol/L}$ for low affinity binding sites, respectively. Thus, the apparent imprinting efficiency and the effective imprinting efficiency were calculated to be 68% and 58%, respectively. The melamine imprinted polymer microspheres synthesised in this method had better performance and could be used for separation, enrichment and analysis of melamine.

Keywords Melamine, Molecularly imprinted polymers microspheres, Precipitation polymerization