

·研究简报·

农药久效磷分子印迹聚合物合成及其亲合性评估*

严守雷 高志贤** 房彦军

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所 天津 300050)

关键词 分子印迹, 久效磷, 沉淀聚合

有机磷农药药效高、易于被水、酶和微生物所降解, 残留毒性小, 但由于不合理利用等因素, 粮食、蔬菜、水果和环境中的有机磷农药残留严重超标, 其危害引起了各国政府、学术界、民众的高度重视。目前有色谱法、酶法和免疫法等, 这些方法的应用都受到客观因素的限制^[1]。因此研制类似于酶和抗体的高选择性、低造价、稳定性好的吸附材料用于食品和环境中有有机磷农药残留的富集、分离纯化和分析尤为重要。

分子印迹技术是最近几十年来发展起来的一种功能高分子研究方法。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, 自由基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和结构类似物有特异性结合能力的位点^[2]。迄今分子印迹技术已被用于传感器^[3]等领域。分子印迹聚合物通常是通过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^[4]。本研究以久效磷(见图1)为模板分子, 利用沉淀聚合方法热引发聚合一步制得印迹聚合物微球, 对其吸附特性和机理进行了研究。

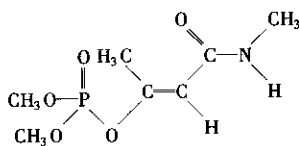


Fig. 1 The chemical structure of monocrotophos

1 试剂与仪器

久效磷, O, O-二甲基-O-(1-甲基-3-甲胺基-3-氧)丙基磷酸酯 (Monocrotophos, MCP, 美国

ChemService 公司, 色谱纯 98%); 实验中应用的其他农药购于农业部环保所(天津), 甲基丙烯酸(MAA, Sigma 公司, 分析纯); 二甲基丙烯酸乙二醇(EGDMA, Sigma-Aldrich 公司, 分析纯); 偶氮二异丁腈(AIBN, 上海试剂四厂, 化学纯); 甲醇、冰醋酸、氯仿(分析纯)购于天津市第一化学试剂厂。

CHA-S 型气浴恒温振荡器(天津市华北试验仪器有限公司); Beckman DU-530 紫外分光光度计; Teflon 红外光谱仪。

2 久效磷分子印迹聚合物微球的制备

在 100 mL 的圆底烧瓶中加入 0.5 mmol (111.6 mg) MCP、2 mmol (0.17 mL) MAA 和 50 mL 氯仿, 于室温下震荡 30 min, 冰箱中过夜, 再加入 10 mmol (1.9 mL) EGDMA 和 20 mg AIBN, 通氮气 10 ~ 15 min 除去溶解的氧气, 密封, 于 60℃ 水浴热聚合 24 h, 冷却至室温, 5000 r/min 离心, 用 10% 醋酸甲醇洗涤聚合物微球至检测不到久效磷分子, 烘箱中 40℃ 真空干燥, 所得聚合物为 MIP; 同时按同样方法不加久效磷制得空白聚合物(Non-MIP)。

3 聚合物微球扫描电镜分析

利用 Phillips ESEM-XL30 对聚合物微球的表面结构和粒径进行分析。

4 气相色谱条件

采用 Agilent 6890 气相色谱仪, 配有 FPD 检测器和 HP7673 自动进样器, j&w DB-17 毛细管柱, 柱初温 150℃, 保持 2 min, 8℃/min, 升温至 250℃, 在 250℃ 保温 1.5 min, 共 16 min。FPD 检测器温度 250℃, 进样量 1 μL。

5 紫外光谱分析

取系列 5 mL 比色管, 加入固定量的 MCP, 渐增 MAA, 用氯仿稀释至刻度, 置于振荡器上振荡

* 2005-04-11 收稿, 2005-08-19 修稿; 国家自然科学基金(基金号 30371218)和国家 863 青年基金(基金号 2004 AA649110)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: gaozhx@163.com

30 min, 冰箱中过夜, 用 1 cm 石英比色皿氯仿为参比扫描并在适当波长下测得吸光度。

6 红外光谱分析

在氯仿溶液中分别作 MCP (50 mmol/L)、MAA (200 mmol/L) 和 MCP (50 mmol/L) 与 MAA (200 mmol/L) 混合物的红外光谱。

7 印迹聚合物微球吸附特性研究

称取一组等量印迹聚合物微球和空白聚合物微球 20 mg, 分别置于 2 mL Eppendorf 管中, 加入 0 ~ 1.2 mmol/L MCP 氯仿溶液 1.5 mL, 于恒温振荡器上 25℃ 振荡 24 h, 5000 r/min 离心 5 min, 取离心液 0.5 mL, 氮气吹干, 丙酮稀释定容, 气相色谱测定含量, 从而计算吸附平衡时溶液中 MCP 的浓度, 根据结合前后溶液中 MCP 的浓度变化计算单位质量聚合物微球的结合量。

为了分析印迹聚合物微球的对模板分子的识别特异性, 称取一组等量印迹聚合物微球和空白聚合物微球 20 mg, 分别置于 2 mL Eppendorf 管中, 加入 0.6 mmol/L MCP 及其结构类似的有机磷农药氯仿溶液 1.5 mL, 按相同的方法测定其吸附量。

8 分子印迹纳米聚合物微球的制备

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。蒲家志等^[5]研究发现在氯仿中合成的印迹聚合物的硬度和吸附性明显优于在乙腈和甲醇中。溶剂在聚合过程中起到重要的作用, 首先是作为溶剂, 使它们进入一个均相体系; 其次是作为致孔剂, 保证在聚合物中形成一定大小的孔隙, 易于待测物进入识别位点; 最后, 在保证前两条条件下, 降低溶剂的极性和质子化, 在此溶剂体系中模板分子和功能单体易于形成主客体复合物。为保证制得颗粒均一的印迹聚合物微球, 应选择低粘度的溶剂。本试验在氯仿中利用沉淀聚合方法制得 MCP 的印迹聚合物微球, 得率为 93%。试验中发现, 在固定聚合物原料量时, 只有当氯仿的用量达到很大比例是才可以制得微球, 当低于此量时聚合物为凝胶状, 这与在乙腈中的实验结果相一致。由图 2 可以看出印迹聚合物粒径大于非印迹聚合物的粒径, 且形状更似圆球形, 可能是由于印迹分子与功能单体形成复合物, 促进了聚合物的形成。

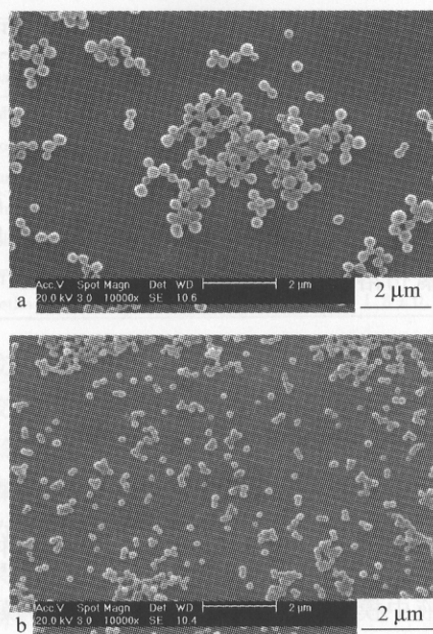


Fig. 2 SEM photograph of MIP (a) and Non-MIP (b)

9 MCP 与 MAA 结合机理分析

利用紫外分光光度法研究了 MCP 与 MAA 在氯仿中相互作用, 在氯仿中固定 MCP 的浓度为 0.2 mmol/L, 渐增 MAA 的浓度, 分别为 0 ~ 10 mmol/L, 在紫外分光光度计上测得混合溶液吸收曲线, 从而绘制出紫外吸收差光谱, 如图 3 所示, 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向长波长移动。

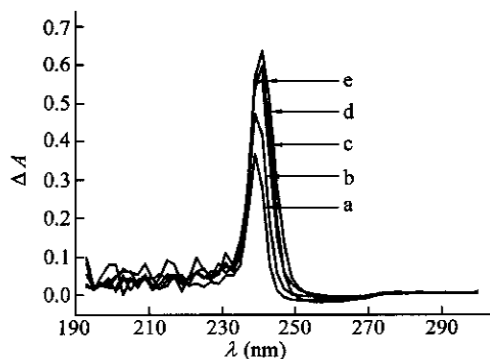
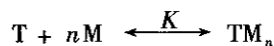


Fig. 3 Difference absorbance spectra of MCP in the presence of MAA in chloroform at room temperature

The molar ratio of MCP to MAA is: a) 1:18; b) 1:25; c) 1:36; d) 1:42; e) 1:50

在理论上, 模板分子(T)与功能单体(M)形成复合物, 可以用下式来表示:



式中 K 是结合常数, n 复合物中功能单体组成, $n = 1, 2, 3, \dots, q$. 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:

$$c = \frac{a_0 b_0^n K}{1 + b_0^n K} \quad (1)$$

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都在 245 nm 处,所以功能单体与模板分子在氯仿溶液中作用前后吸光度差 ΔA 可表示为:

$$\Delta A = A - A_0 = c \Delta \epsilon l \quad (2)$$

式中 $\Delta \epsilon = \epsilon_c - \epsilon_A - n\epsilon_B$,可以得到:

$$\frac{\Delta A}{b_0^n} = -K\Delta A + K\Delta \epsilon_c a_0 l \quad (3)$$

以 $\frac{\Delta A}{b_0^n}$ 对 ΔA 作图,可以推导出 n 值,从而得知在氯仿溶液中模板分子与功能单体的作用模式,也就是说在一个模板分子的周围有几个功能单体与其作用,从而揭示分子印迹作用机理.从图 4 中可以看出当 $n = 3$ 时, $\Delta A/b_0^3$ 对 ΔA 作图是一条直线,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 MCP 为 3 个 MAA 所包围.

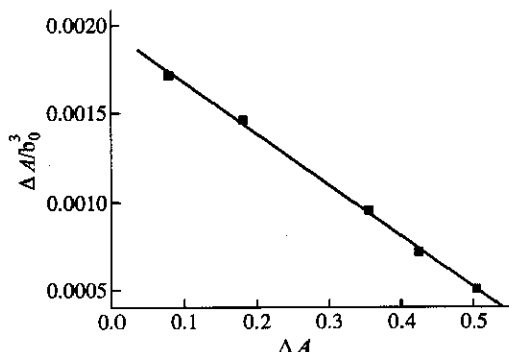


Fig. 4 Plot of $\Delta A/b_0^3$ versus ΔA at 245nm

红外光谱分析表明, MCP 加入功能单体 MAA 后,在 $\nu(\text{NH})3456 \text{ cm}^{-1}$ 单峰附近 3283 cm^{-1} 出现一个单峰,此峰可能为 MCP 的仲酰胺基中的 H 和 MAA 形成缔合作用而产生的,并且可能是反式缔合;同时有两吸收峰存在说明在此体系中仲酰胺基可能有两种存在形式:反式和顺式缔合式.酰胺峰 I ($\nu(\text{C}=\text{O}) 1680 \sim 1630 \text{ cm}^{-1}$) 和酰胺峰 II ($\delta(\text{NH}) + \nu(\text{CN}) 1550 \sim 1510 \text{ cm}^{-1}$) 也发生了变化,说明这 $-\text{C}=\text{O}$ 和 $-\text{NH}$ 可能与 MAA 形成缔合作用.另外 $\nu(\text{P}-\text{O}-\text{C}) 1058.6 \text{ cm}^{-1}$ 峰在加入 MAA 后也发生了变化,这说明在此与 MAA 发生了氢键作用.而对于 $\text{P}=\text{O}$ 是否与 MAA 之间是否形成氢键很难判断,因为 $\nu(\text{P}-\text{O}) 1215.5 \text{ cm}^{-1}$ 峰在加入

MAA 前后没有明显的变化,可能是由于 MCP 与 MCP 分子间自身发生缔合的,而加入 MAA 后,原来的缔合作用破坏,形成新的缔合,峰位置变化不明显;而在功能单体红外谱图中也在 1215.6 cm^{-1} 处存在峰,可能是 $\text{C}-\text{H}$ 振动的偶合.综合以上可以说明可能在 MCP 的 $\text{P}=\text{O}$, $\text{P}-\text{O}-\text{C}$, $-\text{C}=\text{O}-\text{NH}-$ 部位与 MAA 形成缔合作用.

10 MIP 的结合性质

为研究 MIP 的结合特性,室温下 MCP 浓度 $0 \sim 1.2 \text{ mmol/L}$ 的范围内测定了结合等温线(见图 5),随着 MCP 浓度的增加,单位质量分子印迹聚合物的吸附量也增加,可以明显地看出单位质量 MIP 的吸附量远大于单位质量 Non-MIP 的吸附量.结果表明在印迹聚合物中存在特异的结合位点.

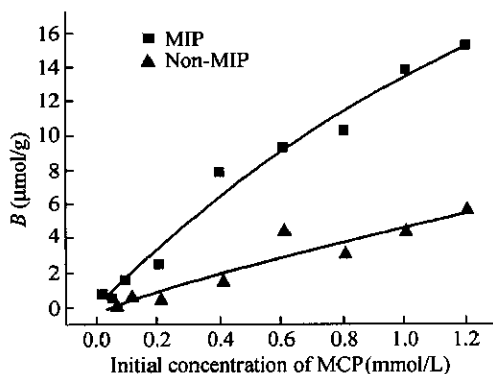


Fig. 5 Isotherm of MCP adsorption on MIP and Non-MIP

利用 Langmuir 模型对图中的数据点拟合:

$$B = \frac{B_{\max} \times C}{K_D + C} \quad (4)$$

式中 B 为单位质量聚合物对 MCP 吸附量, $B_{\max}$ 为最大吸附量, K_D 为平衡离解常数, C 为平衡时溶液中 MCP 的浓度.结果见表 1,可以看出印迹聚合物对 MCP 有更高的亲和力.在分子印迹中常用 Scatchard 模型评价分子印迹聚合物的结合特性, Scatchard 方程式为:

$$B/C = (B_{\max} - B)/K_D \quad (5)$$

Table 1 Affinity parameters of MCP on the MIP and Non-MIP

Polymer	$B_{\max} (\mu\text{mol/g})$	$K_D (\text{mol/L})$
MIP	45.7	2.4×10^{-3}
Non-MIP	27.7	4.4×10^{-3}

将图中的结合数据按式(5)作图可得 Scatchard 图.

在 Scatchard 图(图 6)中 Bound/Free 对 Bound

明显是非线性的,表明存在不同的结合位点.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 MCP 浓度范围内,印迹聚合物主要存在两类不同的结合位点,对其分别线性拟合,根据斜率和截距可以求得高亲和性位点的离解常数为 $K_{D1} = 0.062 \text{ mmol/L}$,最大表观结合量 $B_{\max1} = 3.26 \text{ }\mu\text{mol/g}$,低亲和性位点的离解常数为 $K_{D2} = 3.03 \text{ mmol/L}$,最大表观结合量 $B_{\max2} = 65.70 \text{ }\mu\text{mol/g}$.

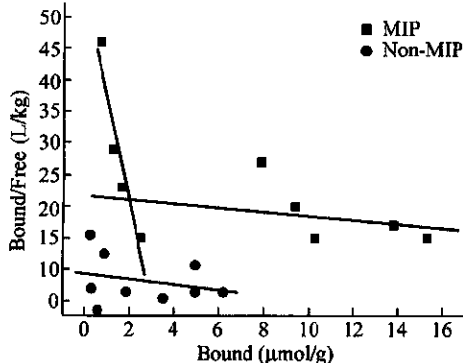


Fig. 6 Scatchard plot of MCP adsorption on MIP and Non-MIP

由表 2 可以看出,印迹聚合物微球对印迹分

Analytes	MIPs ($\mu\text{mol/g}$)	Non-MIP($\mu\text{mol/g}$)
MCP	10.2 ± 0.5	4.3 ± 0.3
Phosdrin	4.3 ± 1.1	2.0 ± 0.8
Methamidophos	10.0 ± 0.4	5.6 ± 0.6
Dichlorvos	7.5 ± 1.2	2.4 ± 1.0
Phosphamidon	4.8 ± 0.7	2.4 ± 0.8
Dimethoate	6.0 ± 0.6	2.8 ± 0.5
Omethoate	9.1 ± 1.0	1.8 ± 0.2

子有较高的识别特性,同时对甲胺磷和氧化乐果也有较高的吸附特性,这可能是由于甲胺磷也有氨基,氧化乐果与久效磷结构类似的缘故;而其他有机磷农药的吸附量很低,同时可以印迹聚合物微球的吸附量大于空白聚合物微球的吸附量.试验结果表明所制得的印迹聚合物微球对模板分子有较高的选择吸附性.

综上所述,以氯仿为溶剂,利用分子印迹技术沉淀聚合方法合成了久效磷有机磷农药的印迹聚合物微球,该材料对久效磷有很高的亲合性和选择性,对其识别机理利用光谱法进行了研究.有望用于有机磷农药的分离、富集和分析.

REFERENCES

- Sherma J. J AOAC International, 1997, 80 (2):283 ~ 287
- Ye L, Mosbach K. Reactive & Functional Polymers, 2001, 48:149 ~ 159
- Malitesta C, Lostito I, Zambonin P G. Analytical Chemistry, 1999, 71(7):1366 ~ 1373
- Pérez-Moral N, Mayes A G. Analytica Chimica Acta, 2004, 504:15 ~ 22
- Pu Jiazhi(蒲家志), Tang Youwen(汤又文), Hu Xiaogang(胡小刚). Journal Instrumental Analysis(分析实验室), 2004, 23(3):86 ~ 89

PREPARATION AND AFFINITY ASSESSMENT OF MONOCROTOPHOS MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS

YAN Shoulei, GAO Zhixian, FANG Yanjun

(Institute of Hygienic and Environmental Medicinal Science, Academy of Military Medicinal Science, Tianjin 300050)

Abstract Uniformly imprinted polymer microspheres were prepared by precipitation polymerization in chloroform. MCP (monocrotophos), MAA (methacrylic acid), EGDMA (ethylene glycol dimethacrylate) and AIBN (azobisisobutyronitrile) were used as template, functional monomer, cross-linker and initiator, respectively. UV and IR spectra were used to demonstrate the mechanism of the interaction between MCP and MAA . It was found that one MCP was entrapped by three MAA molecules in chloroform. Langmuir model was used to fit the adsorption data, the results showed that the MCP imprinted polymer microspheres showed specific binding sites to the MCP. The data obtained in equilibrium adsorption experiments were processed by Scatchard analysis, the dissociation contents (K_{D1}) and the apparent maximum binding capacity ($B_{\max1}$) were $K_{D1} = 0.062 \text{ mmol/L}$, $B_{\max1} = 3.26 \text{ }\mu\text{mol/g}$ for high affinity binding sites and $K_{D2} = 3.03 \text{ mmol/L}$, $B_{\max2} = 65.70 \text{ }\mu\text{mol/g}$ for low affinity binding sites, respectively. The MCP imprinted polymers have showed higher affinity to MCP than to the other organophosphorus pesticide used. So the imprinted polymers microspheres can be used for trace pesticide residue separation, enrichment and analysis.

Key words Molecular imprinting, Monocrotophos, Precipitation polymerization