

液晶分子印迹整体柱的制备及其分子识别热力学

魏 琴, 陈秀秀, 白丽红, 赵 亮, 黄艳萍*, 刘照胜*

(天津医科大学药学院, 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津 300070)

摘要:液晶分子印迹聚合物(MIPs)因刚性液晶单体的加入而在超低交联度水平下也能印迹和识别模板分子,有效解决了传统MIPs因高交联度造成的位点包埋、结合容量低、传质慢等问题。尽管液晶MIPs具有如此独特的优势,但却面临着由于交联度的大幅度降低而导致印迹效果下降的问题。为了研究液晶MIPs的结合特性,制备具有良好印迹效果的低交联液晶MIPs,该文通过二次接枝聚合,制备了一系列不同交联度的液晶分子印迹整体柱,用高效液相色谱法研究了聚合参数与印迹整体柱亲和性的关系。实验中选用三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯(TRIM)为交联剂,以甲苯和十二醇为致孔剂合成整体柱骨架,并在此基础上以(S)-萘普生为模板,加入液晶单体4-氰基苯基单环己基乙烯(CPCE)进行二次聚合接枝。实验中系统考察了流动相中乙腈比例及缓冲液pH值对色谱保留的影响,结果发现液晶单体的加入使得MIPs对萘普生保留控制机制由原来的氢键作用变为了疏水作用;通过动态吸附实验得到的突破曲线经前沿分析及对吸附等温线Langmuir、Freundlich和Scatchard分析拟合,发现交联度为15%时液晶MIPs印迹因子最大(3.78)、非均一性最强,且特异性吸附量高于非特异性吸附量。液晶MIPs的计量置换模型(SDM-R)分析表明,液晶印迹整体柱对模板分子的总亲和力($\ln A=0.645$)明显高于其类似物;而从空间匹配程度看,与液晶印迹整体柱空间匹配程度最高的是酮洛芬而非模板分子,但液晶印迹整体柱对酮洛芬的总亲和力($\ln A=0.242$)不及模板分子的一半,表明在本低交联液晶印迹系统中,空间效应不是决定印迹系统识别能力的主要因素。进一步的分离热力学研究发现,低交联液晶印迹柱的 $|\Delta\Delta H|<T|\Delta\Delta S|$,而交联度为70%的非液晶MIPs柱的 $|\Delta\Delta H|>T|\Delta\Delta S|$,表明液晶MIPs的分离过程是一个熵控制过程,而常规无液晶MIPs的分离过程是一个焓控制过程。上述结果表明,液晶单体的加入改变了MIPs的识别机制,适当的低交联度可显著提高液晶MIPs的识别性能,因此液晶MIPs这些特质有望使其成为新一代的MIPs。

关键词:分子印迹聚合物;液晶;接枝聚合;萘普生;分子识别

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2021)11-1171-11

Preparation of liquid crystal-based molecularly imprinted monolith and its molecular recognition thermodynamics

WEI Qin, CHEN Xiuxiu, BAI Lihong, ZHAO Liang, HUANG Yanping*, LIU Zhaosheng*

(Tianjin Key Laboratory of Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: Molecularly imprinted polymers (MIPs) incorporated with liquid crystalline monomers can imprint and recognize templates at a very low level of crosslinking, thus addressing challenges associated with conventional MIPs, such as the embedding of the imprinted sites, low binding capacity, and slow mass transfer due to the high degree of crosslinking. Compared with traditional MIPs, the prepared MIPs have a greater number of easily binding sites, which can effectively overcome the embedding and low utilization of imprinting sites. Simultaneously, with a decrease in the level of chemical crosslinking, the mass transfer of template molecules can be significantly improved. However, the imprinting effect of liquid crystalline MIPs is generally weaker than that of traditional MIPs due to the low degree of crosslinking. Therefore, to

收稿日期:2021-01-12

* 通讯联系人.E-mail:zhaoshengliu@sohu.com(刘照胜);E-mail:huangyp100@163.com(黄艳萍).

基金项目:国家自然科学基金(21775109).

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 21775109).

obtain liquid crystalline MIPs with a good imprinting effect, a series of low-crosslinked liquid crystalline molecularly imprinted monoliths were prepared by graft polymerization and evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC) to systematically determine the relation between the polymerization parameters and the affinity of the resulting liquid crystalline MIPs. In this experiment, trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM) was used to synthesize a monolithic column skeleton with toluene and dodecyl alcohol as porogens. (*S*)-Naproxen was used as a template and liquid crystalline monomer 4-(4-cyanophenyl)-cyclohexyl ethylene (CPCE) was added for grafting to synthesize the liquid crystalline MIP monolith. The influence of the acetonitrile content and pH in the mobile phase on the chromatographic retention of the template molecule was investigated. The results showed that the main force of MIP recognizing naproxen changed from hydrogen bonding to hydrophobic interaction by the addition of the liquid crystalline monomer. Frontal analysis and adsorption isotherm fitting, including Langmuir, Freundlich, and Scatchard fitting, showed that when the crosslinking degree was 15%, the liquid crystalline MIPs exhibited the highest imprinting factor and heterogeneity, and the specific adsorption was stronger than non-specific adsorption. By analyzing the stoichiometric displacement model, the total affinity of the MIP monoliths for the template molecules ($\ln A$) was determined to be 0.645, significantly higher than that of its analogues, indicating that the liquid crystalline imprinted monolith had a higher total affinity for the template molecule. The spatial matching degree ($n\beta$) of the template molecule to the cavity structures of MIPs was also very high, and only inferior to that of ketoprofen. Nevertheless, the $\ln A$ value of ketoprofen was only 0.242, which indicated that the spatial effect was not the key factor in determining the recognition ability of liquid crystalline imprinting systems. An analysis of the separation thermodynamics revealed that the separation of the liquid crystalline MIPs was an entropy-controlled process, while that of conventional liquid crystalline-free MIPs was an enthalpy-controlled process. Based on the above results, the addition of a liquid crystalline monomer may alter the recognition mechanism of MIPs, and an appropriately low crosslinking degree can significantly improve the recognition performance of liquid crystalline MIPs, paving the way for a new generation of MIPs.

Key words: molecularly imprinted polymers (MIPs); liquid crystalline; graft polymerization; naproxen; molecular recognition

分子印迹技术是以目标分子为模板,在功能单体及交联剂存在下制备对该分子具有特异性识别能力的聚合物的方法,该技术制得的产物即为分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)^[1]。MIPs可以与印迹分子特异性结合,其在外消旋体、小分子类似物及生物大分子等分离分析方面具有重要的应用^[2-4]。传统的MIPs通常需要

高交联度(大约80%~90%)保持聚合物的空间结构,以实现模板的识别^[5]。但是这种高交联度形成的聚合物其内部网格致密,导致分子进出印迹空穴受阻,传质变慢,作为高效液相色谱的固定相会带来严重的色谱峰展宽,导致定性定量困难。因此,需要发展新一代的MIPs,以避免为获得对模板分子良好印迹而产生的高交联度依赖。

引用本文:魏琴,陈秀秀,白丽红,赵亮,黄艳萍,刘照胜. 液晶分子印迹整体柱的制备及其分子识别热力学. 色谱, 2021, 39(11): 1171-1181.

WEI Qin, CHEN Xiuxiu, BAI Lihong, ZHAO Liang, HUANG Yanping, LIU Zhaosheng. Preparation of liquid crystal-based molecularly imprinted monolith and its molecular recognition thermodynamics. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(11): 1171-1181.

制备低交联度 MIPs 的一种新策略是应用液晶单体^[6]。液晶单体是一类末端具有可极化基团的刚性棒状分子,在 MIPs 制备时,液晶单体的加入可以替代部分化学交联剂,利用其刚性棒状结构的相互作用,起到固定柔性的聚合物链的作用,可使得制备的 MIPs 在很低交联度水平下也能够印迹和识别模板。因为用物理交联取代了部分化学交联,由此制备的 MIPs 与传统的高交联度 MIPs 相比具有更易结合的位点,有效减少了印迹位点包埋、位点利用率低的困扰,因此具有更高的结合容量。同时,伴随着化学交联水平的降低,模板分子的传质也大为提高。最近,已有基于液晶单体的 MIPs 在仿生催化剂^[7]、手性固定相^[8]、药物释放材料^[9]及电化学传感器^[10]等方面的研究,其都显示出不同以往的优势,因此有望成为新一代的 MIPs。

尽管液晶 MIPs 具有独特的优势,但与传统 MIPs 相比,其印迹效果由于交联度的大幅降低而下降也是不争的事实。因此研究液晶印迹柱的吸附特性以及特异性吸附与非特异性吸附随交联度的变化规律,对设计新型液晶 MIPs 并提高印迹效果有着至关重要的意义。但已有的工作只是将液晶 MIPs 应用于不同领域,尚未对其结合特性进行深入地讨论。本研究拟从色谱分离热力学角度出发,在合成液晶 MIPs 和色谱条件优化后,对其结合位点数及解离常数等进行系统考察,总结其结合特性及规律,为理性设计新一代液晶 MIPs 打下良好的基础。

药物和个人护理用品 (PPCPs) 作为一种新的环境污染物质广受研究者关注,这是因为未被除去的环境 PPCPs 会在环境中不断累积,从而对生态环境及人类健康产生极大危害,(*S*)-萘普生((*S*)-naproxen,

以下简称萘普生或 NAP,结构式见图 1)就是其中一种常见的 PPCPs 污染物。由于在环境水体中存在浓度低、极性极强且环境样品基质复杂等特点,常规的萃取技术难以实现对 PPCPs 有效的分离和富集,因此已成为急需破解的技术难题之一。

鉴于 MIPs 的选择性吸附已成为一种有前景的富集水中污染物的方法,在本文实验中我们用三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯 (TRIM) 为交联剂,以甲苯和十二醇为致孔剂,在不锈钢管柱中合成整体柱骨架,然后在其上二次聚合接枝,以萘普生为模板,加入液晶单体 4-氰基苯基单环己基乙烯 (CPCE) 合成液晶 MIPs 整体柱,并进行色谱保留及分离热力学的研究。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

高效液相色谱仪: CoM 6000 (CoMetro Technology, 美国); Waters 2487 系列 (Waters 公司, 美国)。

以下试剂纯度除特别说明外均为分析纯。萘普生和酮洛芬 (ketoprofen, KET) 购于浙江仙居化工有限公司,布洛芬 (ibuprofen, IBU)、芬布芬 (fenbufen, FENBI)、非诺洛芬 (fenoprofen, FENO) 及氟比洛芬 (flurbiprofen, FLU) 均购于湖北恒硕化工有限公司,CPCE 购于石家庄斯蒂亚诺精细化工有限公司,4-乙烯吡啶 (4-VP, 色谱纯)、三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯、二甲基丙烯酸乙二醇酯 (EDMA) 均购于美国 Sigma 公司,甲苯 (色谱纯) 购于廊坊市兴科化工有限公司,异辛烷、十二醇、偶氮二异丁腈 (AIBN) 均购于天津市科密欧化学试剂有限公司,

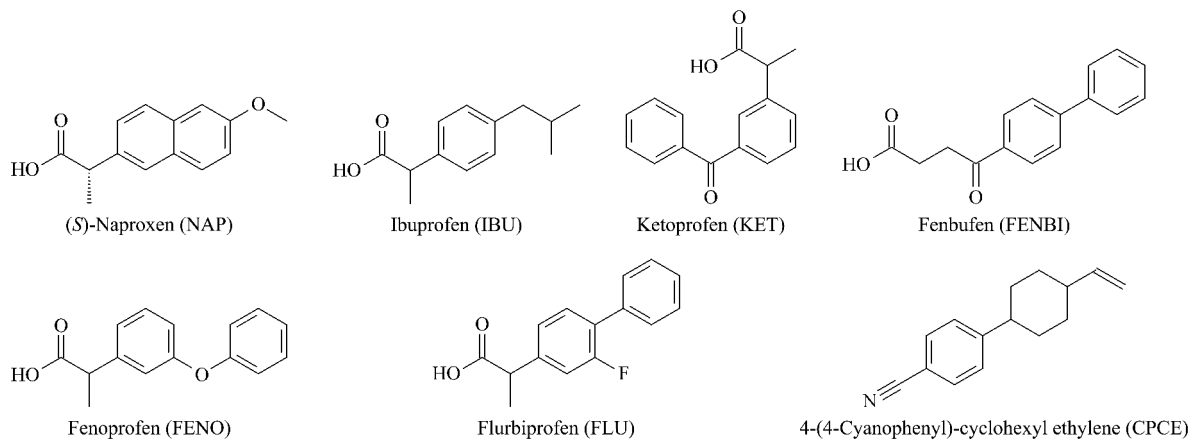


图 1 萘普生及其结构类似物和 CPCE 的结构式

Fig. 1 Structures of naproxen and its analogues and CPCE

乙腈(色谱纯)、乙酸(色谱纯)分别购于天津市彪士奇科技发展有限公司、天津市康科德科技有限公司,甲醇(色谱纯)、乙腈、丙酮、乙酸等试剂均购于天津市江天化工技术有限公司。萘普生结构类似物和液晶单体的结构式见图 1。

1.2 表面接枝印迹整体柱的制备方法

1.2.1 骨架材料的制备

按照表 1 称取 AIBN, 加入适量 TRIM, 再加入

致孔剂甲苯和异辛烷或者甲苯和十二醇溶液, 超声溶解 15 min 使之均匀、澄清, 通氮气 10 min 以除去氧气, 然后注入不锈钢柱(100 mm×4.6 mm), 将两端封住, 于 48 °C 恒温水浴中反应适当时间。将柱取出并连于 CoM 6000 HPLC 仪的高压泵上, 用乙腈冲洗除去整体柱中的致孔剂, 冲洗液总体积约为 150 mL。最后用乙腈将系统平衡至基线水平, 在流速为 0.5 mL/min 下测定柱压。

表 1 接枝印迹整体柱骨架材料制备的配方

Table 1 Formulation for preparing the skeleton material of the grafted imprinted monolith

Monolith	AIBN/ mg	TRIM/ μL	Toluene/ μL	Isooctane/ μL	Dodecanol/ μL	Time/ h	Theory plates/ (plates/m)	Back pressure/ kPa
C1	18	1000	1200	1800	0	16	3940	3447.5
C2	18	1000	1200	1800	0	14	9000	703.3
C3	18	1000	1200	1800	0	12	1980	0
C4	18	1000	1200	0	1800	14	1900	2482.2
C5	18	1000	750	0	2250	14	12000	324.1
C6	18	1000	600	0	2400	14	900	0
C7	18	1000	750	0	2250	15	4000	703.3
C8	18	1000	750	0	2250	13	1200	0

AIBN: azobisisobutyronitrile; TRIM: trimethylolpropane trimethacrylate.

1.2.2 接枝 MIPs 的制备

取模板 NAP 0.20 mmol、功能单体 4-VP 0.81 mmol 和引发剂 AIBN 10.8 mg, 再按照表 2 加入 CPCE、EDMA 及致孔剂甲苯和十二醇, 超声溶解 20 min, 得到均匀、澄清的预聚合液, 向其中通入氮气 10 min 以除去氧气。将骨架整体柱 C5 连接到 CoM 6000 高效液相色谱仪上, 用同样比例的甲苯和十二醇冲洗, 再将预聚合液以 0.2 mL/min 的速度注入整体柱中, 柱两端封住于 53 °C 恒温水浴中反应 4 h 后将柱取出, 先用乙腈冲洗以除去整体柱中残留的致孔剂, 然后再用甲醇-乙酸(9:1, v/v) 混合液冲洗至除去模板分子, 流速由 0.1 mL/min 逐渐增大至 1 mL/min, 冲洗液总体积约为 150 mL。空白印迹柱除不加模板外, 其余步骤同上。

表 2 接枝到整体柱骨架上的 MIPs 配方

Table 2 Formulation of MIPs grafted onto monolithic column skeleton

Monolith	Crosslinking degree/%	CPCE/ mmol	EDMA/ mmol	Toluene/ mL	Dodecanol/ mL
P1	26	2.15	1.05	1.556	0.389
P2	20	2.40	0.80	1.556	0.389
P3	15	2.59	0.60	1.556	0.389
P4	10	2.79	0.40	1.556	0.389
P5	7.5	2.90	0.30	1.556	0.389
P6	5.0	3.00	0.20	1.556	0.389
P7	70	0	1.90	1.556	0.389
P10	30	2.00	1.20	1.945	0

EDMA: ethylene glycol dimethacrylate.

1.3 色谱保留考察

将 P1 柱连接到 Waters 高效液相色谱仪上, 以乙腈-乙酸缓冲盐(50 mmol/L, pH 3.6) 为流动相, 依次改变乙腈含量为 50%~95% (v/v) 进行上样。或者以乙腈-乙酸缓冲盐(50 mmol/L, 99:1) 为流动相, 改变缓冲盐溶液 pH(3.0~5.0) 进行实验。其中, 流动相流速为 0.5 mL/min, 上样量为 20 μL, 检测波长 254 nm, 柱温为 28 °C。获得萘普生及其类似物在不同流动相条件下的保留因子。

1.4 动态吸附实验和前沿分析

将印迹整体柱连接到 Waters 高效液相色谱仪上, 用乙腈-乙酸缓冲盐(pH 3.6, 50 mmol/L) (99:1, v/v) 作流动相, 将不同浓度的萘普生溶液(0.1~0.4 mmol/L) 依次上样, 以 1.0 mL/min 的流速流过色谱柱, 当流出曲线达到一个稳定的平台, 即为完成一个突破曲线。实验中不同交联度的印迹整体柱(P1~P5, P7) 都可以获得一系列的浓度对应突破曲线。P6 由于无印迹效果无法进行该实验。萘普生的动态平衡吸附量(Q) 可由公式(1) 计算^[11]:

$$Q = A_0 \frac{V - V_0}{v} \quad (1)$$

其中 A_0 为萘普生的浓度, V 为吸附达到平衡时萘普生的保留体积(可用半高法在突破曲线上测得), V_0 为死体积(通过测定丙酮的保留时间算得), v 为柱

床体积。对动态吸附实验得到的突破曲线数据进行前沿分析^[12]:

$$\frac{1}{A_0(V-V_0)} = \frac{K_d}{B_t \cdot A_0} + \frac{1}{B_t} \quad (2)$$

其中 B_t 为结合位点总数, K_d 为解离常数。根据公式(2)绘制 $1/[A_0(V-V_0)]$ 对 $1/A_0$ 的关系图。

1.5 吸附等温线分析

从突破曲线实验可得不同浓度萘普生在 MIPs 上的动态平衡吸附量,用热力学模型对其进行拟合并分析。Langmuir 方程可以模拟模板分子在印迹固定相表面单分子层吸附达到平衡时 Q 与 C 的关系^[13]:

$$Q = \frac{Q_0 K_L C}{1 + K_L C} \quad (3)$$

式中 Q_0 为单层吸附的最大吸附量, K_L 为吸附系数, C 为达到平衡时分析物在流动相中的浓度。

鉴于印迹固定相为非均匀性吸附材料,我们用 Freundlich 方程以评估 MIPs 的非均一性^[13]:

$$\lg Q = \lg K_F + 1/n \lg C \quad (4)$$

式中 K_F 用来表征总结合位点数和平均亲和系数。 $1/n$ 为非均一性指数, $1/n$ 值越接近 0, 表明 MIPs 的非均一性越强, 印迹效应越大。

用 Scatchard 方程对吸附等温线进行拟合,可以评价分子印迹聚合物的结合位点类型。Scatchard 方程可写为^[14]:

$$\frac{Q}{C} = \frac{Q_{\max} - Q}{K_d} \quad (5)$$

其中 Q_{\max} 为 MIPs 最大表现吸附量。根据 Scatchard 方程,若 Q/C 对 Q 作图呈一良好的直线,则表明 MIPs 存在一类等价的结合位点。然而有时 Q/C 对 Q 明显呈非线性关系,这表明聚合物的结合位点并不是等价的,但在 Scatchard 图两端往往具有较好的直线关系,分别代表了高亲和位点和低亲和位点。由 Scatchard 图两端的直线的斜率和截距可求得两类结合位点的平衡解离常数 K_d 和最大表现吸附量 Q_{\max} 。

1.6 计量置换研究

将 P1 柱连接到 Waters HPLC 仪上,在流速为 0.5 mL/min、柱温为 28 °C 条件下,将不同量的乙酸作为强氢键竞争性溶剂加入到乙腈中,考察流动相中乙酸含量为 0.5%~3.0% (v/v) 时对萘普生及其类似物的保留因子的影响。依据计量置换模型 (SDM-R),将测得的色谱数据以方程(6)进行拟

合^[15]:

$$\ln k = \ln A - n\beta I \quad (6)$$

其中 k 是保留因子, I 是流动相中的乙酸百分比。 $\ln A$ 为溶质与固定相之间总体的亲和力,它包括了溶质与 MIPs 孔结构之间的空间效应,以及溶质、溶剂和功能单体之间的作用。 β 表示由强溶剂取代的弱溶剂的平衡常数。 n 表示溶质分子吸附在固定相上时,从固定相中释放出的强溶剂分子的数目。

1.7 分子识别热力学

为了考察温度对于分离的影响,我们研究了不同温度下模板及其类似物在二次聚合柱(交联度 70%、26%、15%、7.5%)上的保留。在流速为 0.5 mL/min 条件下将温度从 25 °C 逐步升到 45 °C,重复进样。根据 Van't Hoff 公式^[16],利用实验中得到的保留因子 k 和萘普生类似物与萘普生之间的分离因子 α 评估模板及其类似物在 MIPs 上保留的焓变、熵变和 Gibbs 自由能。即:

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \Phi \quad (7)$$

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta \Delta H}{RT} + \frac{\Delta \Delta S}{R} \quad (8)$$

其中, R 、 T 、 Φ 为分别为气体常数、绝对温度以及相比。

2 结果与讨论

2.1 表面接枝印迹整体柱的制备考察

由于液晶印迹聚合物具有天然的弹性,难以抵抗 HPLC 的高压,易变形,难于直接作为 HPLC 的固定相。应用接枝二次聚合制备的方法可以很好地解决这一问题,即先制备渗透性良好的聚合物整体柱,然后利用表面印迹的方法在整体柱骨架上进行分子印迹。Zhang 等^[8]曾用此思路制备出具有高印迹因子和良好选择性的 MIPs 并应用于 HPLC 分离。本研究我们采用类似的方法,选用 TRIM 为聚合单体,在不锈钢管柱中合成具有良好通透性和固定形态的聚合物整体柱骨架,然后合成接枝印迹整体柱。

2.1.1 骨架材料的制备

骨架材料被合成以后,其表面必须有剩余的双键存在,以保证二次聚合的进行。过去的文献表明,TRIM 聚合物中表面双键的剩余量与温度密切相关,即低温聚合会在 TRIM 聚合物的表面剩余更多的碳碳双键^[17]。在本实验中,我们选择 48 °C 作为反应温度,根据文献^[18],在 TRIM 骨架结构表面约

有 12% 游离的碳碳双键可作为 MIPs 印迹时的锚定位点。此外,在骨架材料的制备中,为保证聚合物骨架具有较好的通透性以及刚性,我们优化了一系列的聚合参数,包括致孔剂种类和组成、反应时间等。由于使用甲苯和异辛烷为致孔剂时,骨架刚性不够,导致二次接枝无法进行,故我们选择了甲苯和十二醇为致孔剂。根据表 1 可知 C5 柱柱效最高,且柱压较小,通透性较好,故最终我们选择其进行后续的实验。

2.1.2 接枝 MIPs 的制备

对于制备表面印迹的聚合物整体柱来说,尽管各种聚合条件对聚合物的通透性、刚性以及印迹效果都有影响,但本实验决定实验关键成败的却是致孔剂,因为最终制备的聚合物能够承受 HPLC 的高压是实验的必要条件,因此致孔剂的组成和种类是我们的主要考察因素。目前成功用于制备 MIPs 薄层的致孔剂体系有:甲苯^[10]、氯仿^[19]和一些混合溶剂,如环己醇-十二醇^[20]、甲苯-异辛烷^[21]和三元致孔体系(甲苯-异辛烷-DMSO)^[22]。实验表明,只使用甲苯做致孔剂不能使二次接枝很好地完成,这是因为只用甲苯会导致薄层中小孔结构过多而使柱压增大,导致二次聚合柱无法冲通(P10 柱)。而十二醇是致大孔溶剂^[23],有报道甲苯-十二醇为很好的致孔剂^[24],并且在我们的实验中能够很好地溶解模板 NAP 和液晶单体。因此,在我们的实验中选用甲苯-十二醇作为 MIPs 的致孔剂。

2.1.3 接枝印迹整体柱色谱行为及印迹因子

为了系统研究含有液晶单体的低交联度 MIPs 的结合特性,我们制备了一系列低交联度的 MIPs (P1~P6),另外还合成了交联度 70% 的二次无液晶印迹柱 P7 与之形成对比(见表 2),其中印迹因子可由公式 $IF = k_{MIP} / k_{NIP}$ 计算, k_{MIP} 和 k_{NIP} 分别为萘普生在 MIPs 和对应的 NIPs 上的保留因子。由表 3 可看到,随着交联度降低,制得的液晶 MIPs 模板保留减弱,柱效升高,其中印迹因子在交联度 15% 时最大,而当交联度为 5% 时,无印迹效果;相反,当交联度为 70% 时,即无液晶单体时,制得的 MIPs 柱效升高,但印迹因子明显低于柱效最低的 P1 柱。此外,制备的低交联液晶印迹整体柱(P1)能使萘普生与其结构类似物达到基线分离(见图 2)。

2.2 接枝印迹整体柱色谱行为考察

2.2.1 流动相乙腈比例的影响

从图 3a 可看出,当乙腈含量从 50% 增加到

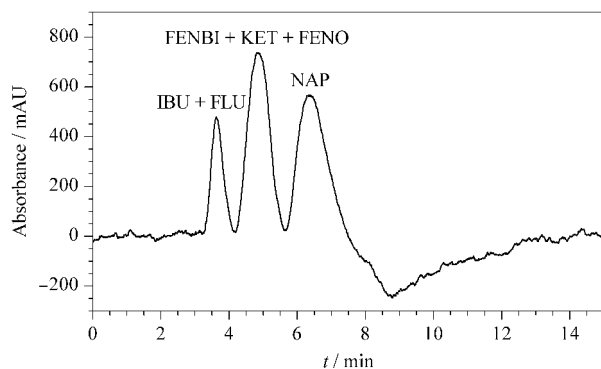


图 2 萘普生及其结构类似物在 P1 柱上的色谱分离图
Fig. 2 Chromatogram of naproxen and its analogues on column P1

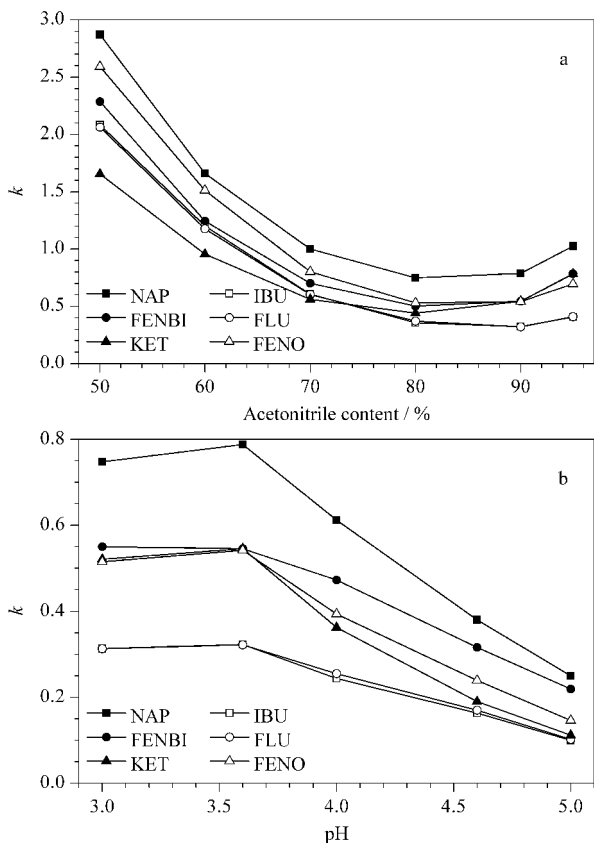


图 3 (a) 流动相中乙腈含量和 (b) 流动相 pH 值对萘普生及其类似物在 P1 柱中色谱保留的影响

Fig. 3 Effects of (a) acetonitrile content and (b) pH of mobile phase on the retention factors (k) of naproxen and its analogues in column P1

80% 时,萘普生及其结构类似物的保留因子均迅速减小,此时可能是疏水作用主导保留机制;而乙腈含量从 80% 增加到 95% 时,萘普生及其类似物的保留因子均稍有增加,此时可能是氢键或其他静电相互作用主导保留机制的结果,这一结果与先前的报道无液晶单体的 NAP-MIP 研究结果相反^[25]。因此,

表 3 萘普生在不同印迹整体柱上的色谱参数

Table 3 Chromatography parameters of naproxen on different MIP monoliths

Monolith (Crosslinking degree)	t_R / min	k	N / (plates/m)	IF
P1 (26%)	6.70	2.22	2410	2.66
P2 (20%)	6.61	2.18	2880	2.32
P3 (15%)	4.17	1.22	3870	3.78
P4 (10%)	3.71	0.52	3980	1.59
P5 (7.5%)	4.28	0.63	4250	1.44
P6 (5.0%)	4.11	0.50	4900	1.02
P7 (70%)	7.90	1.18	5400	1.66

t_R : retention time of naproxen; k : retention factor; N : theoretical plate; IF: imprinting factor.

这表明由于液晶单体的加入,使得控制印迹系统保留的机制由原来的氢键作用变为了疏水作用。另外,MIPs P1 柱对萘普生的保留因子始终大于其他类似物,表明 MIPs P1 柱具有较好的吸附特异性。

2.2.2 流动相 pH 值的影响

进一步研究了在液晶 MIP 上 NAP 及其类似物保留对 pH 的依赖性。从图 3b 可看出,在 pH 为 3.6 时,萘普生保留最大。尽管模板和类似物的保留都受到了流动相 pH 值的影响,但在 pH 3.6~5.0 时模板的保留因子变化趋势最为明显,因此 pH 对模板分子影响最大。MIP 对模板的保留主要受到 NAP 解离水平的影响,在 pH 3.0~3.6 时,模板主要成分子状态,易与功能单体形成较多的印迹复合物,此时 MIP 对模板的保留较强。在更低 pH 条件下,溶剂中有比较多的游离氢离子与模板结合,影响其与功能单体形成印迹复合物,所以当 pH 值从 3.6 减少到 3.0 时,保留因子稍有减小;而在 pH 3.6~5.0 时,流动相酸碱度已超过 NAP 的 pK_a ,模板萘普生中的 -COOH 成离子状态,不易形成氢键,印迹复合物的形成也受影响,所以 NAP 的保留因子也减少。

2.3 前沿分析

对突破曲线数据进行前沿分析,可求得 MIPs 的结合位点总数 B_t 和解离常数 K_d (见表 4)。在液晶 MIPs 中,虽然交联度 15% 时其印迹因子最大,但从前沿分析结果可以看到其结合位点总数并不是最大的。随着交联度从 15% 降低至 7.5%,MIPs 的结合位点数逐渐增大,但印迹因子减小,这可能是由于低交联度导致非特异性结合位点增加所致。相比于 P3 柱,交联度为 26% 的 P1 柱的结合位点总数较小,从而导致印迹因子较小;但是当交联度为 20% 和 70% 时,结合位点总数较大,而印迹因子却下降了。为了探究此处印迹因子下降的原因,进一步深入分析液晶 MIPs 识别的机理及规律,我们进行了以下的分析。

2.4 吸附等温线分析

2.4.1 Langmuir 拟合

采用 Langmuir 模型对吸附等温线拟合可得各柱单层最大吸附量 Q_0 和吸附系数 K_L (见表 4)。从表 4 可以看出,交联度为 15% 时, Q_0 最大,这与前沿分析的 B_t 值并不相符,但该结果与其具有最大的印迹效果是一致的,这表明 Langmuir 模型似乎更能科学地表征基于液晶单体的印迹系统的吸附性能。当交联度增大或者减小时, Q_0 均减小。此外,虽然交联度 15% 时的 Q_0 与交联度 70% 时的相差不大,但其在柱效低于 P7 整体柱的情况下,也能展现出更加优异的印迹效果。从表 4 可以看出 P3 的印迹因子显著高于 P7,这表明液晶单体在提高 MIPs 识别性能方面具有巨大潜力。

2.4.2 Freundlich 拟合

采用 Freundlich 模型对吸附等温线拟合得到的数据见表 4, K_F 越大表明吸附容量越高, $1/n$ 值越小表明非均一性能越强。从表 4 中可以看出, P3

表 4 不同印迹整体柱的前沿分析结果及 Langmuir、Freundlich 拟合参数

Table 4 Frontal analysis results for different MIP monoliths, with Langmuir and Freundlich fitting parameters

Monolith	Frontal analysis			Langmuir fitting			Freundlich fitting		
	$B_t/\mu\text{mol}$	$K_d/(\text{mmol/L})$	R	$Q_0/(\text{mmol/L})$	$K_L/(\text{L}/\text{mmol})$	R	$K_F/(\text{mmol/L})$	$1/n$	R
P1 (26%)	91.91	4.6	0.999	129.2	0.168	0.999	118.0	0.965	0.999
P2 (20%)	232.6	12.3	0.999	115.5	0.066	0.999	111.2	0.985	0.999
P3 (15%)	129.5	6.6	0.999	257.4	0.063	0.999	246.7	0.922	0.999
P4 (10%)	598.8	32.3	0.999	188.4	0.042	0.999	184.5	0.994	0.999
P5 (7.5%)	446.0	240.0	0.999	159.2	0.011	0.999	160.1	0.998	0.999
P7 (70%)	235.8	12.4	0.999	255.3	0.034	0.999	248.5	0.986	0.999

B_t : number of binding sites; K_d : dissociation constant; R : coefficient of determination; Q_0 : maximum adsorption capacity according to Langmuir monolayer adsorption; K_L : constant according to the Langmuir model; K_F : Freundlich constant related to adsorption capacity; $1/n$: adsorption intensity of the adsorbent.

柱 $1/n$ 最小, K_F 明显大于其他液晶印迹柱, 表明 P3 具有较强的非均一性能和较高的吸附容量。交联度增大或者减小, 其吸附容量(除 P7 外)和吸附能力都是减小, 这与印迹因子的变化规律也是一致的。与 Langmuir 模型拟合结果类似, 虽然 P3 的吸附容量稍低于 P7, 但其非均一性能要明显高于 70% 交联度的非液晶柱。另外, $1/n$ 值都小于 1 说明本实验制备的表面接枝印迹整体柱都是单层吸附^[13]。

2.4.3 Scatchard 分析

在本研究中, 根据 Scatchard 方程发现 Q/C 对 Q 明显呈非线性关系, 但曲线的两端分别有较好的直线关系, 表明制备的液晶印迹柱具有两类结合位点: 高亲和力位点和低亲和力位点。由 Scatchard 图两端的直线的斜率和截距可求得两类结合位点的平衡离解常数 (K_d) 和最大表观吸附量 (Q_{max}) (见表 5)。

由表 5 可看出, 只有交联度为 15% 时, 高亲和位点的 Q_{max} 高于低亲和位点的 Q_{max} , 表明 MIP 的特异性吸附强于非特异性吸附。此外其他的 MIP 无论交联度增加或减少, 高亲和位点的 Q_{max} 始终低于低亲和位点的 Q_{max} , 即 MIP 上特异性吸附量始终小于非特异性吸附量。例如, 当交联度增加为 26% 时, MIP 特异性结合位点减少, 高亲和位点的 Q_{max} 降低; 当交联度减少至 7.5% 时, 由于物理交联增大导致的非特异性结合位点增多, 低亲和位点的 Q_{max} 显著增加。对于交联度 70% 的非液晶印迹柱, 其低亲和位点的 Q_{max} 远高于高亲和位点的 Q_{max} , 即其非特异性吸附远强于特异性吸附, 这也解释了为什么前沿分析中 P7 的 B_i 大于 P3, 而印迹因子却显著小于 P3。但与前沿分析结果不同的是, 交联度为 20% 的 P2 柱用 Scatchard 拟合的结合位点数要低于 P3, 这与印迹因子的变化规律是一致的, 表明 Scatchard

分析也能准确直观地反映液晶印迹整体柱的识别特性。此外, 交联度 15% 时的 MIP 解离常数也比较小, 表明 P3 对于模板的结合力更强。

2.5 计量置换研究

在分子印迹聚合物的分子识别过程中, 起主导作用的是三维孔穴结构还是模板分子与功能单体之间的相互作用, 目前还存在分歧^[15]。计量置换模型是在液相色谱体系中全面考察溶质、溶剂及固定相分子之间的各种相互作用和不同种类溶剂分子在固定相表面上的竞争吸附的理论模型^[26], 因此被用来进一步分析液晶 MIP 的分子识别机制。

计量置换研究结果如表 6 所示, 相关系数的绝对值都超过 0.9, 这证实了 SDM 理论可以成功地应用于基于液晶单体的分子印迹系统。在液晶印迹柱 P1 上, 模板 NAP 的 $\ln A$ 值明显高于其类似物, 说明 P1 对印迹分子具有更高的亲和性, 即模板与功能单体的非共价相互作用。在印迹柱上, 当不同的溶质分子被吸附在固定相上时, 如果印迹分子的结构越匹配 MIPs 的空腔结构, 印迹分子覆盖的活性位点数量越高, 从固定相释放的相应数量溶剂分子也就越高, 即 $n\beta$ 越高^[15]。从表 6 可以知道, 印迹柱上的空穴结构与模板 NAP 匹配性很高 ($n\beta = 36.3$), 但稍次于其类似物酮洛芬 ($n\beta = 39.5$)。但 P1 对空间最匹配的酮洛芬的亲和力 ($\ln A = 0.242$) 不及模板分子 ($\ln A = 0.645$) 的 $1/2$, 这说明空间效应不是决定该液晶印迹系统的分子识别能力的主要因素。

2.6 分子识别热力学

根据 Van't Hoff 公式, 以 $\ln k$ 和 $\ln \alpha$ 分别对 $1/T$ 作图, 得到了直线关系图(见图 4)。在试验温度范围内, 模板和 3 个类似物的 $\ln k$ 和 $\ln \alpha$ 的 Van't Hoff 线性拟合良好, 并且保留因子随着温度

表 5 不同印迹整体柱的 Scatchard 拟合参数

Table 5 Scatchard fitting parameters for different MIP monoliths

MIP	High affinity sites			Low affinity sites		
	$Q_{max}/$ (mmol/ L)	$K_d/$ (mmol/ L)	R	$Q_{max}/$ (mmol/ L)	$K_d/$ (mmol/ L)	R
P1 (26%)	473	3.6	0.999	1117	8.8	0.992
P2 (20%)	782	6.7	0.992	1370	11.8	0.906
P3 (15%)	1366	4.6	0.999	1240	5.2	0.999
P4 (10%)	2543	10.8	0.975	2661	13.5	0.947
P5 (7.5%)	2329	14.5	0.971	9231	57.5	0.947
P7 (70%)	1762	6.8	0.986	9169	36.0	0.911

Q_{max} : maximum adsorption amount; K_d : dissociation constant.

表 6 液晶印迹整体柱 P1 的 SDM-R 结果

Table 6 SDM-R results for liquid crystal imprinted monolithic column (P1)

Analyte	$\ln A$	$n\beta$	r
NAP	0.645	36.3	-0.975
IBU	-0.389	28.3	-0.974
FLU	-0.365	28.9	-0.963
KET	0.242	39.5	-0.983
FENBI	0.304	30.6	-0.973
FENO	0.123	30.9	-0.966

$\ln A$: total affinity potential between the solute and stationary phase; n : number of strong solvent molecules released from the stationary phase; β : constant related to solvents; r : correlation coefficient.

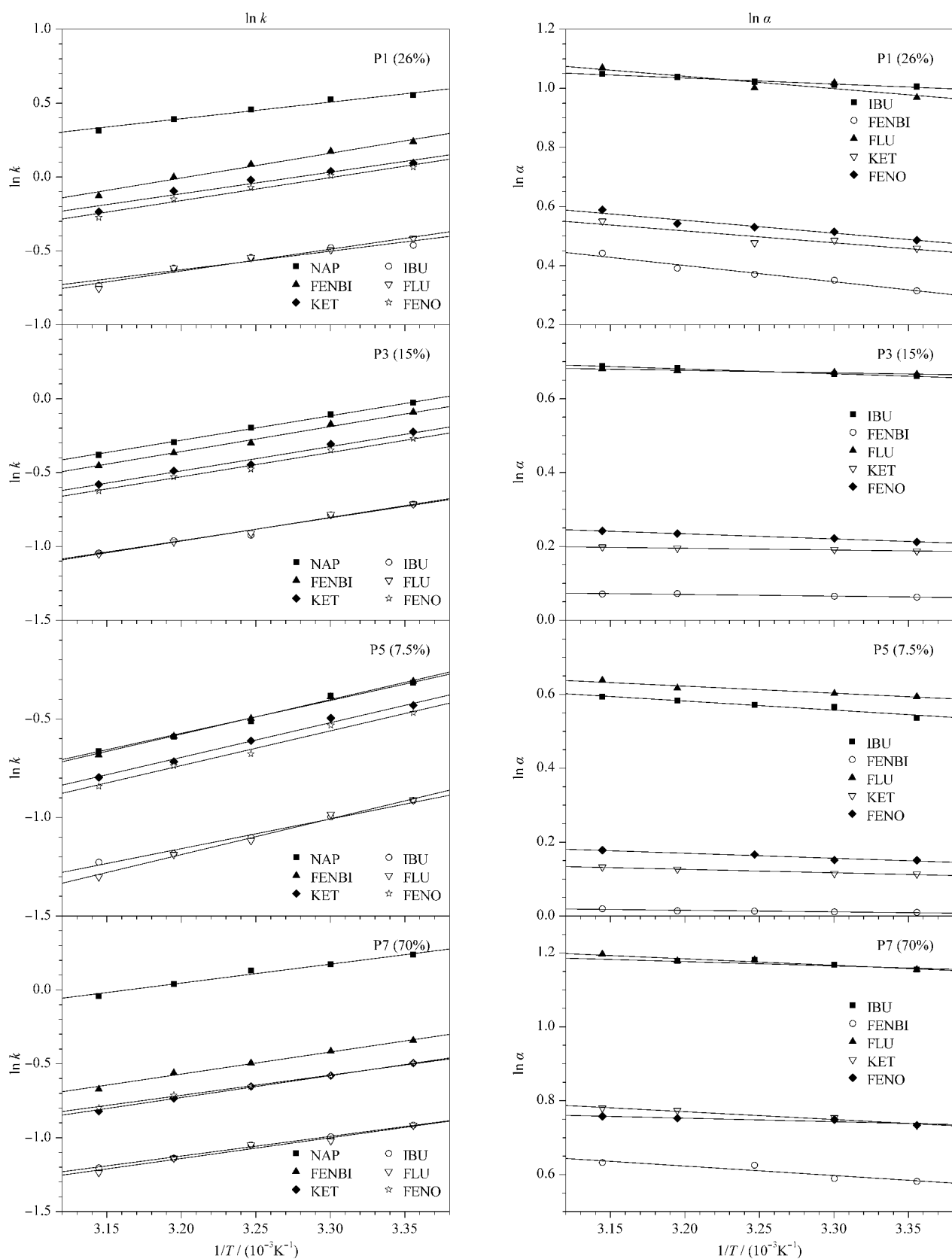


图 4 萘普生与其类似物在不同交联度整体柱上的保留因子以及分离因子 (α) 随温度变化的 Van't Hoff 图

Fig. 4 Van't Hoff plots of retention factors and separation factors (α) of naproxen and its analogues versus temperature on imprinted monoliths with different crosslinking degrees

升高而减少。表 7 总结了 NAP 及其类似物在不同交联度 MIPs 上的焓变、熵变和焓变差、熵变差。对于低交联液晶 MIPs 柱,即 26%、15%、7.5% 交联柱, $|\Delta\Delta H| < T|\Delta\Delta S|$, 这表明低交联液晶印迹系统的分

离过程是一个熵控制的过程。而对于高交联非液晶 MIPs 柱,即 70% 交联度柱, $|\Delta\Delta H| > T|\Delta\Delta S|$, 则表明该非液晶 MIPs 的分离过程是一个焓控制的过程。

表 7 不同交联度的印迹整体柱的热力学参数

Table 7 Thermodynamic parameters of imprinted monoliths with different crosslinking degrees

Monolith	Analyte	$\Delta H/(\text{kJ/mol})$	$\Delta S/(\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K}))$	r_1	$\Delta\Delta H/(\text{kJ/mol})$	$\Delta\Delta S/(\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K}))$	r_2
P1 (26%)	NAP	-9.60	-27.5	0.987			
	IBU	-10.7	-39.4	0.962	1.75	14.2	-0.988
	FENBI	-14.3	-45.7	0.990	4.67	18.3	-0.983
	FLU	-12.6	-45.6	0.979	3.55	20.0	-0.916
	KET	-12.5	-40.9	0.974	3.44	15.3	-0.931
	FENO	-13.3	-43.8	0.988	3.68	16.4	-0.971
P3 (15%)	NAP	-14.1	-47.5	0.999			
	IBU	-13.2	-50.2	0.989	1.11	9.23	-0.995
	FENBI	-14.5	-49.4	0.996	0.385	1.82	-0.953
	FLU	-13.7	-51.7	0.994	0.554	7.40	-0.981
	KET	-14.1	-49.1	0.991	0.421	2.97	-0.987
	FENO	-14.0	-49.3	0.994	1.17	5.70	-0.998
P5 (7.5%)	NAP	-14.2	-50.3	0.995			
	IBU	-13.5	-50.8	0.993	2.11	11.6	0.966
	FENBI	-15.0	-52.7	0.999	0.358	1.27	-0.929
	FLU	-15.5	-59.6	0.995	1.63	10.4	-0.967
	KET	-15.0	-53.8	0.996	0.801	3.61	-0.983
	FENO	-15.0	-54.1	0.993	1.16	5.14	-0.964
P7 (70%)	NAP	-10.9	-34.6	0.991			
	IBU	-11.4	-45.7	0.998	12.9	14.0	-0.919
	FENBI	-12.7	-45.5	0.995	12.2	12.1	-0.923
	FLU	-12.0	-47.8	0.987	15.1	14.7	-0.956
	KET	-12.7	-46.8	0.999	17.9	12.7	-0.983
	FENO	-11.7	-43.4	0.999	8.32	8.92	-0.918

ΔH : enthalpy changes; ΔS : entropy changes; $\Delta\Delta H$: difference in enthalpy changes; $\Delta\Delta S$: difference in entropy changes. r_1 and r_2 represent the correlation coefficients of $\ln k$ and $\ln \alpha$ to $1/T$, respectively (Equations (7) and (8)).

3 结论

本文制备了一系列低交联度液晶 MIPs, 通过与常规的高交联度 MIPs 比较分析发现, 液晶的加入具有显著提高吸附特异性和吸附容量的能力。热力学研究可以看到低交联度液晶印迹整体柱展现出了与高交联度非液晶印迹整体柱不同的保留机制。总之, 本文对低交联液晶印迹柱的保留机制和识别热力学的研究为新一代 MIP 固定相的特性提供了更为深入地认识, 未来我们将对该类色谱固定相传质机理进行深入研究, 为液晶 MIP 这种新型固定相的理性设计及合成提供有益的信息。

参考文献:

[1] Belbruno J J. Chem Rev, 2019, 119(1): 94
 [2] Li Z Q, Jia L. Chinese Journal of Chromatography, 2020, 38(9): 1046

李振群, 贾丽. 色谱, 2020, 38(9): 1046
 [3] Guo J L, Wang Q Q, Xu D S, et al. TrAC-Trends Anal Chem, 2020, 123: 115774
 [4] Sun X Y, Ma R T, Shi Y P. Chinese Journal of Chromatography, 2020, 38(1): 50
 孙晓宇, 马润恬, 师彦平. 色谱, 2020, 38(1): 50
 [5] Garcinuño R M, Chianella I, Guerreiro A, et al. Soft Matter, 2009, 5(2): 311
 [6] Mo C E, Chai M H, Zhang L P, et al. Int J Pharm, 2018, 557: 293
 [7] Weyland M, Ferrère S, Lattes A, et al. Liq Cryst, 2008, 35(2): 219
 [8] Zhang C, Zhang J, Huang Y P, et al. Anal Bioanal Chem, 2015, 407(10): 2923
 [9] Zhang L P, Tan X X, Huang Y P, et al. Eur J Pharm Biopharm, 2018, 127: 150
 [10] Zhang L P, Wei Z H, He S N, et al. Anal Bioanal Chem, 2020, 412(26): 7321
 [11] Zheng C, Liu Z S, Gao R Y, et al. Chemical Journal of Chinese Universities, 2007, 28(8): 1443
 郑超, 刘照胜, 高如瑜, 等. 高等学校化学学报, 2007, 28

- (8): 1443
- [12] Feng J, Li F, Ran R X, et al. *Eur Polym J*, 2019, 120: 109242
- [13] Li Q, Yue Q Y, Su Y, et al. *Chem Eng J*, 2010, 158(3): 489
- [14] Larpant N, Suwanwong Y, Boonpangrak S, et al. *Polymers*, 2019, 11(3): 570
- [15] Li X X, Bai L H, Wang H, et al. *J Chromatogr A*, 2012, 1251: 141
- [16] Wei Z H, Sun X, Mu L N, et al. *J Chromatogr A*, 2019, 1602: 48
- [17] Fan P R, Zhao X, Wei Z H, et al. *Eur Polym J*, 2020, 124: 109456
- [18] Reiholdsson P, Hargitai T, Isaksson R, et al. *Angew Makromol Chem*, 1991, 192: 113
- [19] Song W F, Zhao Q L, Zhou X J, et al. *Microchim Acta*, 2019, 186(1): 22
- [20] Qin S, Jin F, Gao L, et al. *Roy Soc Open Sci*, 2019, 6(6): 190119
- [21] Zhao Q L, Zhou J, Zhang L S, et al. *Talanta*, 2016, 152: 277
- [22] Wu X, Wei Z H, Huang Y P, et al. *Chromatographia*, 2010, 72(s1/2): 101
- [23] Chen C, Chen Z H, Zeng X Z, et al. *Colloid Polym Sci*, 2012, 290(4): 307
- [24] Zheng C, Huang Y P, Liu Z S. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(7): 2147
- [25] Li F, Chen X X, Huang Y P, et al. *J Chromatogr A*, 2015, 1425: 180
- [26] Kopaciewicz W, Rounds M A, Fesusnaogh F, et al. *J Chromatogr A*, 1983, 266: 3