

甾烷类化合物分子印迹聚合物 功能单体的筛选及 MIPs 制备

马 荣^{1,2}, 原陇苗^{1,2}, 刘艳红¹, 王之语^{1,2}, 吴应琴^{1,3}

1. 中国科学院西北生态环境资源研究院/甘肃省油气资源研究重点实验室, 兰州 730000;

2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 海洋油气勘探国家工程中心, 北京 100028

摘要: 为了制备对甾烷类化合物具有特异性选择能力的分子印迹聚合物(MIPs), 利用紫外光谱法对预聚合体系进行筛选, 确定功能单体的种类、配比及其作用方式。将 3 种模板分子(胆固醇、 β -谷固醇、去氧胆酸)分别与 4 种功能单体, 即丙烯酸(AA)、甲基丙烯酸(MAA)、甲基丙烯酸甲酯(MMA)、丙烯酰胺(AM)的相互作用强度进行对比。研究发现, 功能单体 AA 均可与 3 种模板分子发生较强的相互作用并形成稳定的预聚合体系, 从而优选出 AA 为 MIPs 的功能单体。另外, 通过不同比例 AA 紫外光谱吸光度变化和差示紫外光谱分析, 显示 3 种模板分子与功能单体 AA 的最佳浓度比均为 1:4, 且形成的稳定配合物构型分别为胆固醇-1AA、 β -谷固醇-1AA 及去氧胆酸-3AA。同时, 以 EDGMA 为交联剂、AIBN 为引发剂, 采用沉淀聚合成功合成了 MIPs, 傅立叶变换红外光谱(FTIR)分析结果显示 MIPs 制备良好。因此, 此方法可用于对甾烷类化合物具有特异性选择能力的 MIPs 功能单体的筛选及其制备, 并为深层—超深层烃源岩油源对比研究提供技术支持。

关键词: 甾烷类化合物; 分子印迹聚合物; 紫外光谱; 模板分子; 功能单体

中图分类号: TE135

文献标识码: A

Screening of functional monomers and preparation of molecularly imprinted polymers (MIPs) in molecularly imprinted polymers of steranes

MA Rong^{1,2}, YUAN Longmiao^{1,2}, LIU Yanhong¹, WANG Zhiyu^{1,2}, WU Yingqin^{1,3}

1. Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. National Engineering Research Center for Offshore Oil and Gas Exploration, Beijing 100028, China

Abstract: To prepare molecularly imprinted polymers (MIPs) with specific selectivity for steranes, the prepolymerization system was screened by UV spectroscopy to determine the type, proportion and mode of action of functional monomers. In this study, the interaction intensities between three template molecules (cholesterol, β -sitosterol, deoxycholic acid) and four functional monomers (acrylic acid (AA), methacrylic acid (MAA), methyl methacrylate (MMA), and acrylamide (AM)) are compared respectively. The results show that the functional monomer AA can interact strongly with the three template molecules and form a stable prepolymerization system, so AA is selected as the functional monomer of MIPs. In addition, the UV spectral absorbance change and differential UV spectral analysis of different proportions of AA show that the optimal concentration ratios of the three template molecules to functional monomer AA are all 1:4, and the stable complex configurations formed are cholesterol-1AA, β -sitosterol-1AA and deoxycholic acid-3AA, respectively. The MIPs are successfully synthesized by precipitation polymerization using EDGMA as dispersant and AIBN as initiator, and the results of FTIR show that MIPs are well prepared. Therefore, this method can be used for the screening and preparation of MIPs functional monomers with specific selectivity for steranes, and provide technical support for the study of oil-source correlation between deep and ultra-deep source rocks.

Key words: steranes; molecularly imprinted polymer; UV spectrum; template molecule; functional monomer

收稿日期: 2022-11-17; 修订日期: 2023-03-30。

作者简介: 马荣(1996—), 女, 硕士生, 主要研究方向为油气地球化学。E-mail: marong202@mails.ucas.ac.cn。

通信作者: 吴应琴(1971—), 女, 教授级高级工程师, 博士生导师, 从事油气地球化学、环境地球化学研究。E-mail: yingqinwu@lzb.ac.cn。

基金项目: 国家自然科学基金(42072180, 41772147, 41272147)和中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目联合资助。

甾族化合物广泛存在于各种动植物体中,其分子结构相对稳定,受环境影响较小,基本保存了原始生物碳骨架,被广泛应用于沉积环境识别、成熟度评价、热解程度确认和油源对比等研究^[1-3],是油气形成和成藏的重要评价指标。然而深层—超深层古老地层的原油多来自于多套烃源岩,具有基质成分复杂、待测生标物质含量极低等特点^[4],不经前处理而直接测定会对分析结果造成影响。因此,需要探索一种高效、快速、识别性强、干扰小的分析测试方法,分离富集痕量甾烷类化合物,为油气勘探提供可靠信息。

分子印迹技术的核心是分子印迹聚合物(MIPs),它是一种合成的高分子材料,对特定目标分析物及相关结构的化合物具有高亲和力和选择性^[5],常用于痕量有机物的分析,并在色谱^[6]、制药^[7]、有机环境^[8]、化学分析^[9]等领域广泛应用,其待测物检出限可达 $10^{-10} \sim 10^{-12}$ g 级。因此,为了实现甾烷的分离富集,可将分子印迹技术引入痕量及超痕量生标化合物研究领域。然而,分子印迹技术的原理在于将预聚合混合物(模板分子与功能单体)形成的结构有效转化为聚合物基质^[10],使得MIPs的空穴含有与功能单体相互作用的特异性识别位点,因此,研究功能单体的种类及其与模板分子的配比,对提高分子印迹聚合物的识别性能至关重要,并会直接影响MIPs的后续应用。

对于结构简单的模板分子,可以直接根据其酸碱性来选择合适的功能单体^[11]。但大多数模板分子结构比较复杂,可能含有不同性质的基团(如:酸性、中性、碱性等基团),对功能单体产生位阻,因此,不能直接采用经验式方法选择合适的功能单体,必须通过实验方法确定。传统的筛选方法是模板分子分别与不同功能单体依次形成不同的MIPs,并对其微球进行表征和性能的研究^[12],但该方法费时费力,效率低。随着技术的发展,研究人

员开发了一些更成熟有效的筛选方法,比如紫外—可见光谱法^[13-15]、荧光光谱法^[16]、核磁共振法^[17]、红外光谱^[18]以及计算机模拟设计法^[19]等。通过对比发现,荧光光谱法需要模板分子具有荧光性,核磁共振中的氘代试剂成本较高,红外光谱很难实现对模板与单体比例的分析,计算机模拟设计法没有扣除溶剂的影响。而紫外光谱法所需仪器设备操作简单,灵敏度高,是研究生物分子和各种有机分子之间相互作用的重要手段。不仅可以对物质进行结构分析,还可以进行定性、定量分析,测试物质的理化性质^[20],因此,可通过研究其光谱性质的改变,考察模板分子与功能单体之间的相互作用。

由于甾烷类化合物没有相应的印迹位点,所以本研究以甾烷的类似结构胆固醇、 β -谷固醇、去氧胆酸为虚拟模板,选择AA、MAA、MMA、AM为功能单体(图1),通过紫外光谱分析的方法,判断模板分子与功能单体之间相互作用强度以及复合物的稳定性,优选功能单体的种类及配比。以沉淀聚合的方法分别制备虚拟胆固醇、 β -谷固醇、去氧胆酸模板分子印迹聚合物,利用傅立叶变换红外光谱(FTIR)对其聚合物进行结构表征。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

实验所需要的试剂与仪器,如表1和表2所示。

1.2 紫外光谱测定(UV)

1.2.1 模板分子与功能单体预组装体系的UV测定

分别配制不同浓度的模板分子(胆固醇—乙腈:0.5 mmol/L; β -谷固醇—甲醇:1 mmol/L;去氧胆酸—甲醇:3 mmol/L)和相应浓度的功能单体(AA、MAA、MMA、AM),并将其1:4混合,定容至10 mL,超声25 min后,静置12 h,以乙腈和甲醇溶液为参比溶液,在波长190~550 nm进行紫外光谱扫描。

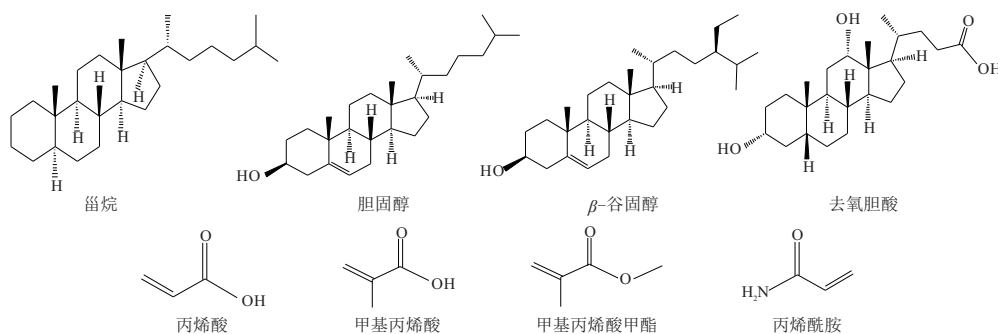


图1 模板与功能单体的化学结构

Fig.1 Chemical structure of template molecules and functional monomers

表1 制备分子印迹聚合物(MIPs)相关实验的主要试剂

Table 1 Main reagents used in related experiments for preparing MIPs

试剂名称	试剂级别	生产厂家
胆固醇	AR	天津市大茂化学试剂厂
β -谷固醇	AR	合肥巴斯夫生物科技有限公司
去氧胆酸	AR	麦克林生物科技有限公司
AA	AR	天津市大茂化学试剂厂
MAA	AR	天津市大茂化学试剂厂
MMA	AR	天津市大茂化学试剂厂
AM	AR	上海广诺化学科技有限公司
EDGMA	AR	北京百灵威科技有限公司
AIBN	AR	天津市大茂化学试剂厂
甲醇	HPLC	北京迈瑞达科技有限公司
乙腈	HPLC	北京迈瑞达科技有限公司

1.2.2 不同比例的功能单体与模板分子的 UV 扫描

分别配制 1 mmol/L 的胆固醇—乙腈溶液、1 mmol/L 的 β -谷固醇—甲醇溶液、32 mmol/L 的去氧胆酸—甲醇溶液,加入不同浓度的 AA,浓度比为 1:0、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8,定容至 10 mL,超声 25 min 后,静置 12 h,以相应的 AA 溶液作为参比,在波长 190~550 nm 进行紫外光谱扫描。对于差示紫外分析扫描,分别配置 0.5 mmol/L 的胆固醇溶液、1 mmol/L 的 β -谷固醇溶液、10 mmol/L 的去氧胆酸溶液,除分别以相应的模板分子溶液作为参比外,其余方法与功能单体比例的优化相同。

1.3 分子印迹聚合物的制备

制备 MIPs 及 NIP 的原料及含量如表 3 所示。首先将 0.5 mmol 的胆固醇、 β -谷固醇、去氧胆酸依次和 2 mmol 丙烯酸分别加入含 60 mL 乙腈的三角烧瓶中,超声 25 min 后,静置 2 h,然后加入 10 mmol EDGMA 和 160.5 mg AIBN,混合后继续超声 25 min,氮吹 15 min 后脱氧密封,在 60 °C 水浴下热聚合 24 h,将得到的热聚合物冷却、离心、干燥。用甲醇—乙酸混合溶液($V:V=9:1$)索氏提取 28 h,再用甲醇洗脱 13 h,在室温下干燥 24 h。最后得到胆固醇、 β -谷固醇、去氧胆酸印迹分子聚合物(MIPs)。除不加模板分子外,对照聚合物(NIP)的合成方法与 MIPs 相同。

1.4 聚合物的表征

利用傅立叶变换红外光谱(FTIR)采用溴化钾压片法测量固体胆固醇、 β -谷固醇、去氧胆酸及合成的 MIPs、NIP;采用 ATR 法测量液体 AA、EDGMA,均在 4 000~500 cm^{-1} 波长范围内进行光谱扫描。用场发射扫描电镜对合成的 MIPs 进行形貌表征。将待测样品均匀涂敷在导电胶上,采用离子溅射仪对 MIPs 喷碳,然后进行扫描电镜测试。

1.5 聚合物吸附性能的研究

分别称取 10 mg 的 MIPs、NIPs,放入带塞的 10 mL 玻璃离心管中,加入 5 mg/L 的 5 α -胆甾烷—甲醇溶液,封口混合均匀,恒温振荡 24 h 后,上清液过膜,通过 GC-MS 分析结果计算 MIPs 和 NIP 的

表2 制备 MIPs 相关实验的主要仪器设备

Table 2 Main instruments and equipments used in related experiments for preparing MIPs

实验仪器	型号	生产厂家
紫外可见光度计	UV-2600	谱质分析检测技术(上海)有限公司
傅立叶红外光谱仪	Bruker Alpha	泰科施普(北京)技术有限公司
电子恒温不锈钢水浴锅	HHS-2S	上海虞龙仪器设备有限公司
场发射扫描电子显微镜	Merlin Compact	德国蔡司
气相色谱/质谱联用仪	6890N(GC)/5737N(MS)	美国安捷伦科技有限公司
回旋式振荡器	HY-5	江苏盛兰仪器制造有限公司

表3 制备 MIP 和 NIP 的组分材料及含量

Table 3 Components and contents for preparing MIP and NIP

聚合物	模板分子类型	模板分子/mmol	功能单体/mmol	交联剂(EDGMA)/mmol	引发剂(AIBN)/mg	致孔剂(乙腈)/mL	温度/°C	吸附量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	印迹因子	分配常数/($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
MIP1	胆固醇	0.5	2	10	160.5	60	60	0.670	2.778	0.183
MIP2	β -谷固醇	0.5	2	10	160.5	60	60	0.779	3.231	0.226
MIP3	去氧胆酸	0.5	2	10	160.5	60	60	0.877	3.638	0.270
MIP4	去氧胆酸	0.5	2	10	160.5	60	50	0.418		
MIP5	去氧胆酸	0.5	2	10	160.5	60	70	0.695		
NIP			2	10	160.5	60	60	0.241		0.053

吸附量(Q)、分配系数(K_D)及印迹因子(IF)。

$$Q = \frac{(C_0 - C_f) \times V}{M} \quad (1)$$

$$K_D = \frac{Q}{C_f} \quad (2)$$

式中: C_0 为目标分析物初始浓度; C_f 为平衡吸附上清液中目标物浓度; V 为添加的溶液体积; M 为聚合物质量。

$$IF = \frac{Q_{MIPs}}{Q_{NIPs}} \quad (3)$$

式中: Q_{MIPs} 为 MIPs 对 5α -胆甾烷的吸附量; Q_{NIPs} 为 MIPs 对 5α -胆甾烷的吸附量。

2 结果与讨论

2.1 功能单体的筛选

在分子印迹聚合物的制备过程中,预聚合阶段能否通过氢键及其他化学键形成稳定的复合物,是获得高特异性聚合物的关键。因此,研究模板分子与不同功能单体之间的相互作用,是 MIPs 识别性能研究的关键环节之一^[21]。如果混合溶液中两种物质之间不存在相互作用,则理论上其溶液的紫外光谱吸光度等于相应波长范围内分别测得的两种物质单独溶液的紫外吸光度之和^[22]。若存在差异则两种化合物在一定条件下有可能会发

生化学反应,因此对于模板与功能单体相互作用强度和结合力的研究,可以利用两种混合溶液最大实际测量值和理论吸光度的差值大小作判断,差值越大,模板与单体的相互作用越强,形成的预聚合物越稳定^[23]。

通过紫外光谱法对 3 种模板分子与 4 种功能单体相对结合能力大小进行比较(表 4,图 2—图 4)。胆固醇与 AA、MAA、MMA、AM 混合体系的理论值均大于实际值(图 2),说明胆固醇与各单体产生了相互作用,即胆固醇的-OH 与各单体的-COOH、-COOR、-NH₂ 或-C=O 通过氢键作用形成新的复合物。当胆固醇与各单体的浓度比为 1:4 时,其混合体系差值分别为: $\Delta A_{AA}=1.063\ 08$ 、 $\Delta A_{MAA}=0.847\ 14$ 、 $\Delta A_{MMA}=0.861\ 46$ 、 $\Delta A_{AM}=0.718\ 72$ (表 4)。表明胆固醇与 AA 的差值最大,两者之间的相互作用最强。因此,对制备胆固醇虚拟分子印迹聚合物而言,以 AA 为单体合成 MIPs 具有

表 4 模板分子与功能单体的最大理论吸光度与实际吸光度差值

Table 4 Difference between the maximum theoretical absorbance and the actual absorbance of template molecules and functional monomers

模板分子	功能单体			
	AA	MAA	MMA	AM
胆固醇	1.063 08	0.847 14	0.861 46	0.718 72
β -谷固醇	0.908 60	0.668 06	0.621 24	0.368 06
去氧胆酸	0.298 62	0.133 27	0.095 51	0.060 29

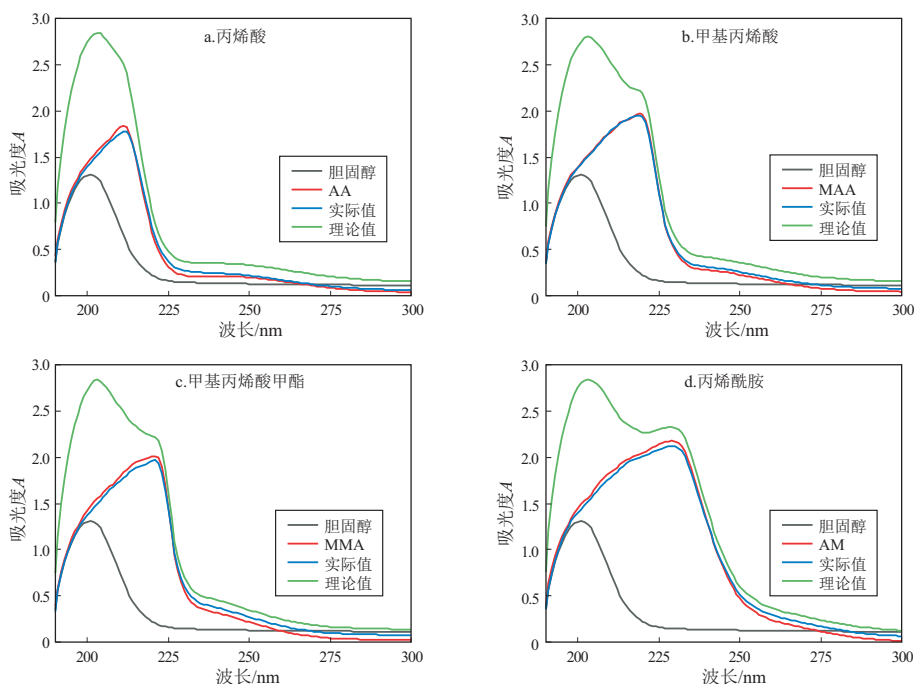


图 2 胆固醇、不同功能单体及其混合溶液的紫外吸收光谱

Fig.2 UV absorption spectra of cholesterol, different functional monomers and their mixed solutions

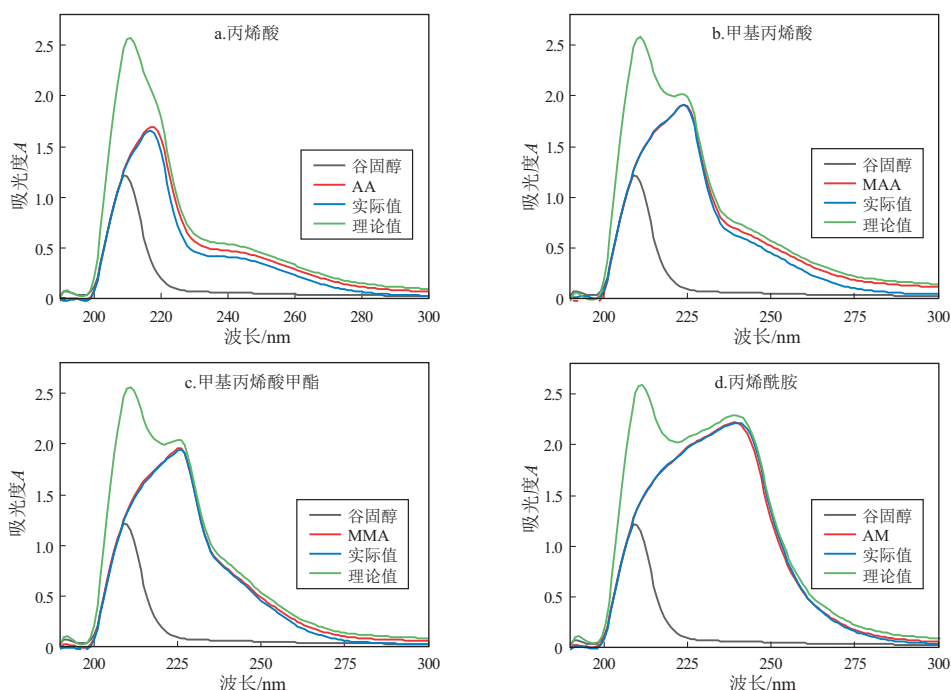


图 3 β -谷固醇、不同功能单体及其混合溶液的紫外吸收光谱

Fig.3 UV absorption spectra of β -sitosterol, different functional monomers and their mixed solutions

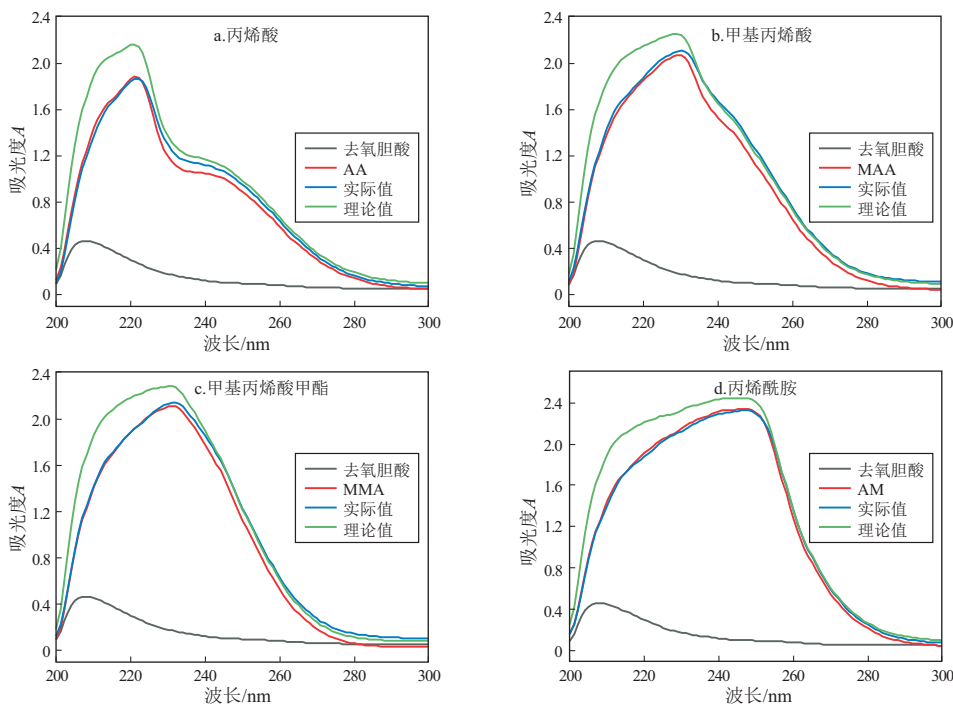


图 4 去氧胆酸、不同功能单体及其混合溶液的紫外吸收光谱

Fig.4 UV absorption spectra of deoxycholic acid, different functional monomers and their mixed solutions

更好的稳定性。

同样,由图 3 和表 4 所示, β -谷固醇与单体 AA 的浓度比为 1:4 时,其混合体系的实际测量值与理论吸光值差值最大($\Delta A_{AA}=0.90860$),AA 与 β -谷固醇之间的结合力最强,形成的 MIPs 最稳定,可能是由于 β -谷固醇的-OH 与 AA、MAA 的羧基

氧、MMA 的酯基氧、AM 的氨基氮或碳基氧形成氢键作用,改变了电子能量。

一般而言,去氧胆酸属于酸性,应该与碱性 AM 结合力最大,但紫外显示与单体 AA 的预聚合体系差值最大,稳定性最好($\Delta A_{AA}=0.29862$) (图 4,表 4),可能是羟基附近的六元环以及羧基

使得位阻增大,从而使得 AM 上的氧原子很难与去氧胆酸中羟基氢原子形成氢键,或 AM 中氨基氮与去氧胆酸-OH 键形成的氢键构型为 O-H...N,比去氧胆酸的羟基和羧基与 AA 形成的 O-H...O 作用力弱。综上所述,对制备虚拟胆固醇、 β -谷固醇、去氧胆酸分子印迹聚合物而言,均选择 AA 作为功能单体最为合适。

2.2 功能单体比例的优化

MIPs 的识别性能不仅与功能单体种类有关,

也受模板与功能单体配比的影响,功能单体过少时会使 MIPs 的特异性印迹位点较少,功能单体过多时会导致非特异性识别位点增多,或因为单体本身相互竞争而造成氢键减少,最终降低了 MIPs 的识别性能^[24]。

由图 5—图 7 可知,随着丙烯酸(AA)单体浓度地增加,预聚合溶液的最大吸光度呈现不同幅度的减少。当胆固醇、 β -谷固醇、去氧胆酸与 AA 混合溶液的浓度比为 1:1 时,其吸光值急速锐减,最

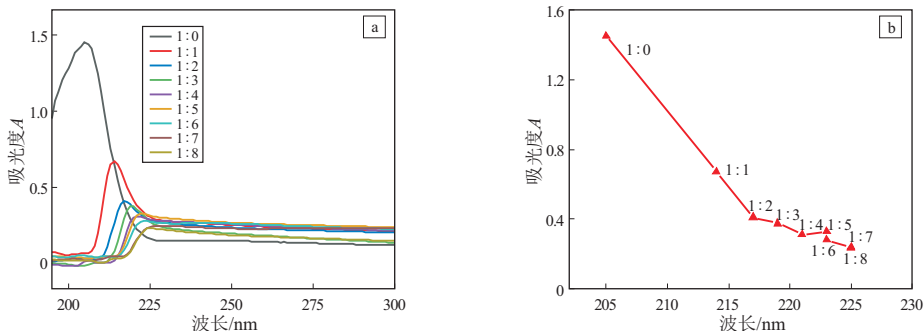


图 5 胆固醇与不同比例丙烯酸混合溶液的紫外吸收光谱

a.浓度为 1:0~1:8 的紫外光谱图;b.浓度为 1:0~1:8 混合溶液的最大吸收波长与相对应吸光值的变化曲线

Fig.5 UV absorption spectra of mixed solutions of cholesterol and acrylic acid in different proportions

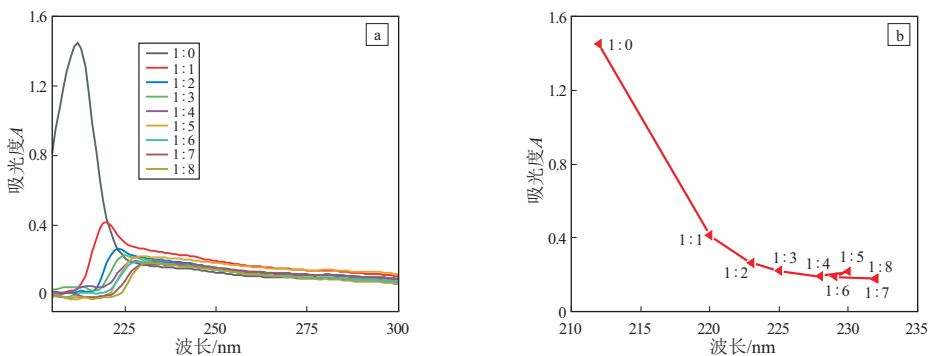


图 6 β -谷固醇与不同比例丙烯酸混合溶液的紫外吸收光谱

a.浓度为 1:0~1:8 的紫外光谱检测;b.浓度比 1:0~1:8 混合溶液的最大吸收波长与相对应吸光值的变化曲线

Fig.6 UV absorption spectra of mixed solutions of β -sitosterol and acrylic acid in different proportions

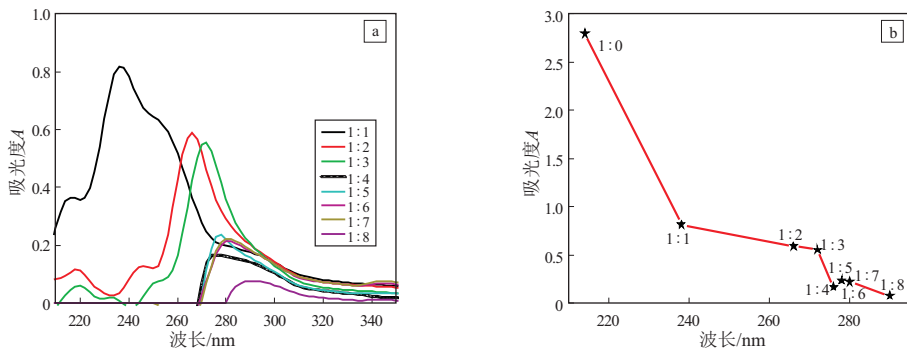


图 7 去氧胆酸与不同比例丙烯酸混合溶液的紫外光谱图

a.浓度为 1:1~1:8 的紫外光谱检测;b.浓度比 1:0~1:8 混合溶液的最大吸收波长与相对应吸光值的变化曲线

Fig.7 UV absorption spectra of mixed solutions of deoxycholic acid and acrylic acid in different proportions

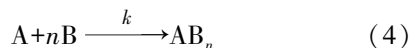
大吸收波长产生了红移,变化程度最大,说明模板与单体 AA 产生了化学效应,推测两者之间可能产生了氢键作用。随着 AA 浓度的不断增加,预聚合混合溶液吸光值继续降低,说明两者的相互作用还要进一步加强。当浓度比为 1:4 之后,其吸光值减小速度及红移程度变小且逐渐趋于平缓;当浓度比为 1:5 时,混合溶液的吸光值出现回升,推测是因为 AA 本身结构中存在着极性官能团,这种官能团之间将会产生氢键作用,即 AA 本身的取缔现象,导致对胆固醇、 β -谷固醇、去氧胆酸的影响减小(图 5b,6b,7b)。同时,如果再继续增加 AA 的含量,也会产生过多的非特异性位点以及材料的浪费。综上所述,三种模板均与 AA 浓度比为 1:4 时,可以形成稳定且相互作用较强的预聚合物,得到识别性能好的聚合物。

2.3 组装体系印迹位点的推断

差示紫外光谱分析方法用于研究分子印迹技术预组装体系主客体之间的化学配位数(n)和模板分子与功能单体结合的结合常数(K)^[25]。该方法主要通过绘制 ΔA 与 $\Delta A/b_m^n$ 的曲线,通过线性关系确定 n 和 K ,来解释分子印迹的组装机制,从而指导 MIPs 的合成路线,其中, ΔA 为测定混合物质

与标椎模板物质的差示吸光度, b_m 为不同梯度的单体浓度。胆固醇、 β -谷固醇、去氧胆酸与不同比例丙烯酸(AA)的差示紫外分析如图 8—图 10 所示。

对胆固醇、 β -谷固醇、去氧胆酸与 AA 的预组装反应体系而言。根据预聚物形成的理论分析^[26],设模板分子 A 与功能单体 B 之间结合反应如下:



式中:如果 [A] 比 [B] 小得多, [AB_n] 可根据公式(4)计算得出:

$$[AB_n] = \frac{[A][B]^n K}{1+[B]^n K} \quad (5)$$

式中:[A]、[B]、[AB_n] 分别为模板分子 A、功能单体 B 和主客体配合物 AB_n 的平衡浓度。根据 Lambert-Beer 定律,如模板分子 A 的总浓度为 a ,功能单体的总浓度为 b_m ,整理公式(4)和(5)得:

$$\frac{\Delta A}{b_m^n} = -K\Delta A + K\Delta\epsilon al \quad (6)$$

式中: $\Delta\epsilon$ 为模板和模板—单体配合物的摩尔吸光吸收的差值; l 为比色皿的厚度。

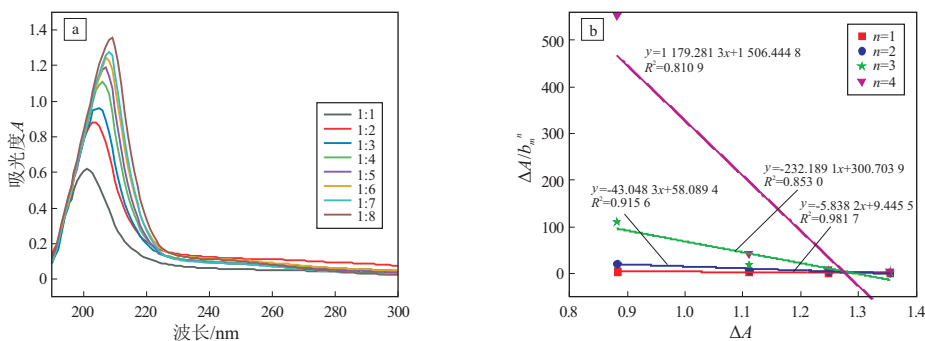


图 8 胆固醇预组装差示紫外光谱图
a.浓度比为 1:1~1:8 的差示紫外光谱;b.浓度比为 1:2,1:4,1:6,1:8 时 ΔA 与 $\Delta A/b_m^n$ 的线性关系
Fig.8 Differential UV spectra of cholesterol preassembly

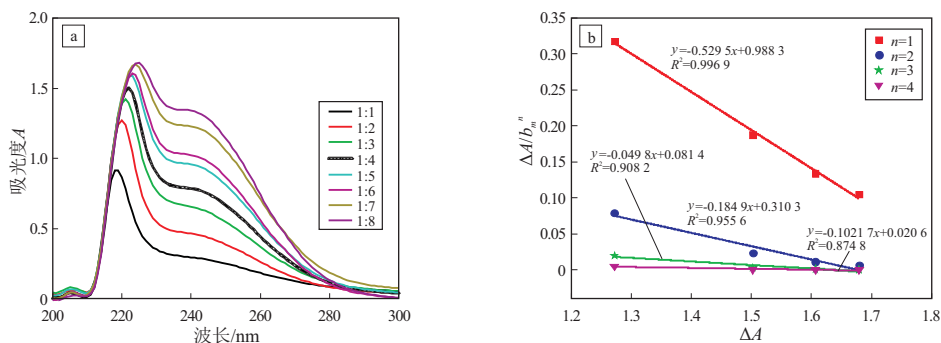


图 9 β -谷固醇预组装差示紫外光谱图
a.浓度比为 1:1~1:8 的差示紫外光谱图;b.浓度比为 1:2,1:4,1:6,1:8 时 ΔA 与 $\Delta A/b_m^n$ 的线性关系图
Fig.9 Differential UV spectra of β -sitosterol preassembly

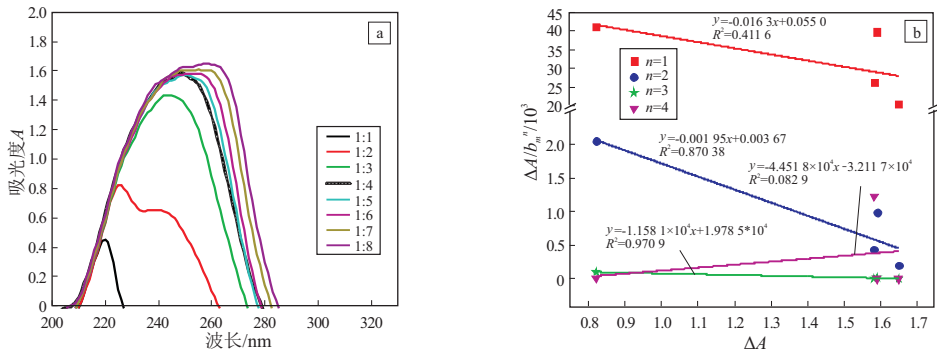


图 10 去氧胆酸预组装差示紫外光谱图

a. 浓度比为 1 : 1 ~ 1 : 8 的差示紫外光谱图; b. 浓度比为 1 : 2、1 : 4、1 : 6、1 : 8 时 ΔA 与 $\Delta A/b_m^n$ 的线性关系图

Fig.10 Differential UV spectra of deoxycholic acid preassembly

如果 $\Delta A/b_m^n$ 与 ΔA 有良好的线性关系, 则 n 的值就是一个模板能结合的单体数量。本实验采用尝试代入法取 $n=1, 2, 3, 4$, 以 $\Delta A/b_m^n$ 对 ΔA 拟合作图。当模板为胆固醇时, 发现胆固醇与 AA 浓度比在 1 : 2, 1 : 4, 1 : 6, 1 : 8 时, $\Delta A/b_m^n - \Delta A$ 的线性趋于良好 (图 8a)。当 $n=1$ 时, 相较而言其线性趋势较好 (图 8b), 回归方程为 $\Delta A/b_m^n = 9.4455 - 5.8382\Delta A$ ($R^2=0.9817$), 平衡常数为 $K=5.8382 \times 10^3$ L/mol, 说明 1 个胆固醇分子与 1 个 AA 分子形成胆固醇-1AA 型复合物。可能是因为胆固醇的六元环上有 1 个 -OH 可与 AA 中的 -COOH 产生氢键, 所以在 MIPs 体系中形成了具有与胆固醇特异识别的 1 个位点。推测胆固醇-AA 的自组装作用如图 11a

所示。

模板分子为 β -谷固醇时, 以 $\Delta A/b_m^n$ 对 ΔA 拟合作图, 同样发现 β -谷固醇与 AA 浓度比在 1 : 2, 1 : 4, 1 : 6, 1 : 8 时 $\Delta A/b_m^n - \Delta A$ 的线性趋于良好。当 $n=1$ 时, 曲线线性较好 (图 9b), 回归方程为 $\Delta A/b_m^n = 0.9883 - 0.5295\Delta A$ ($R^2=0.9969$), 平衡常数为 $K=0.5295 \times 10^3$ L/mol, 说明 1 个 β -谷固醇与 1 个 AA 分子形成 β -谷固醇-1AA 型复合物。可能由于 β -谷固醇六元环上的 1 个 -OH 可与 AA 中的 -COOH 产生氢键, 在 MIPs 体系中形成了具有与 β -谷固醇特异识别的 1 个位点。推测 β -谷固醇-AA 自组装作用如图 11b 所示。

当模板为去氧胆酸时, 以 $\Delta A/b_m^n$ 对 ΔA 拟合作

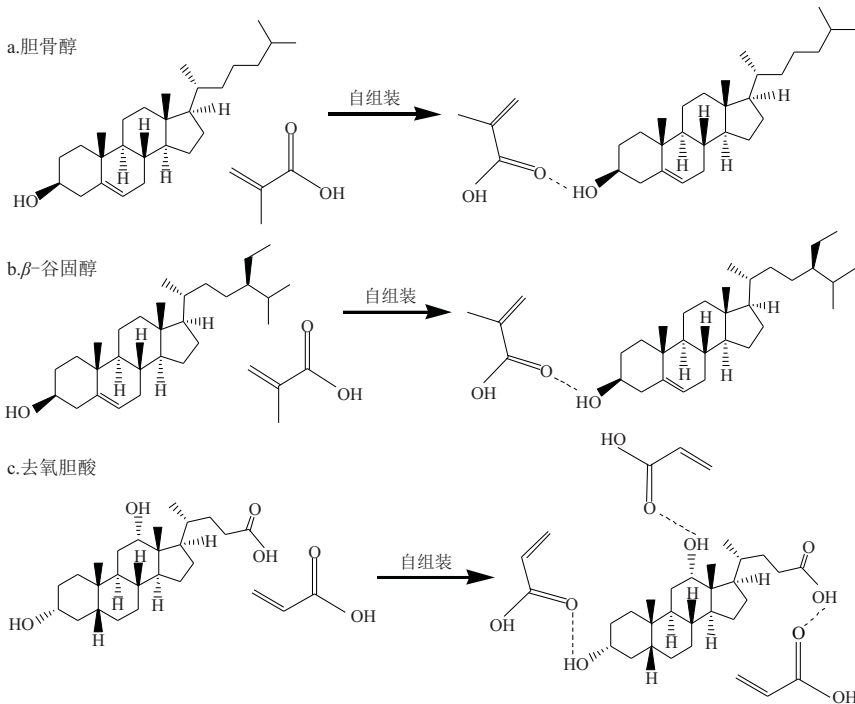


图 11 模板分子与丙烯酸(AA)的结合示意

Fig.11 Schematic diagram of binding of template molecules to acrylic acid (AA)

图,结果发现去氧胆酸与 AA 浓度比为 1 : 2、1 : 4、1 : 6、1 : 8 时, $\Delta A/b_m^n - \Delta A$ 曲线线性逐渐良好。与 $n=1,2,4$ 相比,当 $n=3$ 的线性相关性最好,线性回归方程为 $\Delta A/b_m^n = 1.978 5 \times 10^{-4} - 1.158 1 \times 10^{-4} \Delta A$ ($R^2=0.970 9$) (图 10),平衡常数为 $K=0.115 8 \times 10^6 \text{ L}^3/\text{mol}^3$,说明 1 个去氧胆酸分子能够与 3 个 AA 形成去氧胆酸-3AA 型稳定复合物。即去氧胆酸上有 3 个 O 与 AA 的 -COOH 产生氢键作用,形成了具有与去氧胆酸识别的 9 个位点。推测去氧胆酸自组装作用如图 11c 所示。

综上所述,不同模板分子与 AA 能够通过不同的印迹位点形成配合物。在虚拟胆固醇、 β -谷固醇分子印迹聚合物中形成了胆固醇-1AA 型、 β -谷固醇-1AA 型配合物,具有 1 个识别位点;在去氧

胆酸虚拟分子印迹聚合物中形成了去氧胆酸-3AA 型配合物,具有 9 个识别位点。

2.4 聚合机理推断

由图 12 所示,在 MIPs 和 NIP 红外光谱图中,存在 AA 和 EDGMA 的 $1 730 \text{ cm}^{-1}$ 处 C=O 特征峰、EDGMA 的 $1 157 \text{ cm}^{-1}$ 处 C-O-C 振动峰、和 AA 的 $1 257 \text{ cm}^{-1}$ 处羧基 C-O 吸收峰,因此 AA 和 EDGMA 发生了聚合且功能基团的振动峰并无明显变化。 $2 660 \text{ cm}^{-1}$ 处 AA 的 COOH 伸缩振动,在 MIPs 和 NIP 的吸附带中并未找到,由此也证明 AA 参与了聚合反应。在 MIPs 和 NIP 的红外光谱中,AA 的 $1 635 \text{ cm}^{-1}$ 处 C=C 振动峰较弱, $3 000 \text{ cm}^{-1}$ 处 C-H 吸收峰并不存在,也证明了 AA 和 EDGMA 发生了良好交联,且未交联部分极少(图 13)。同时,

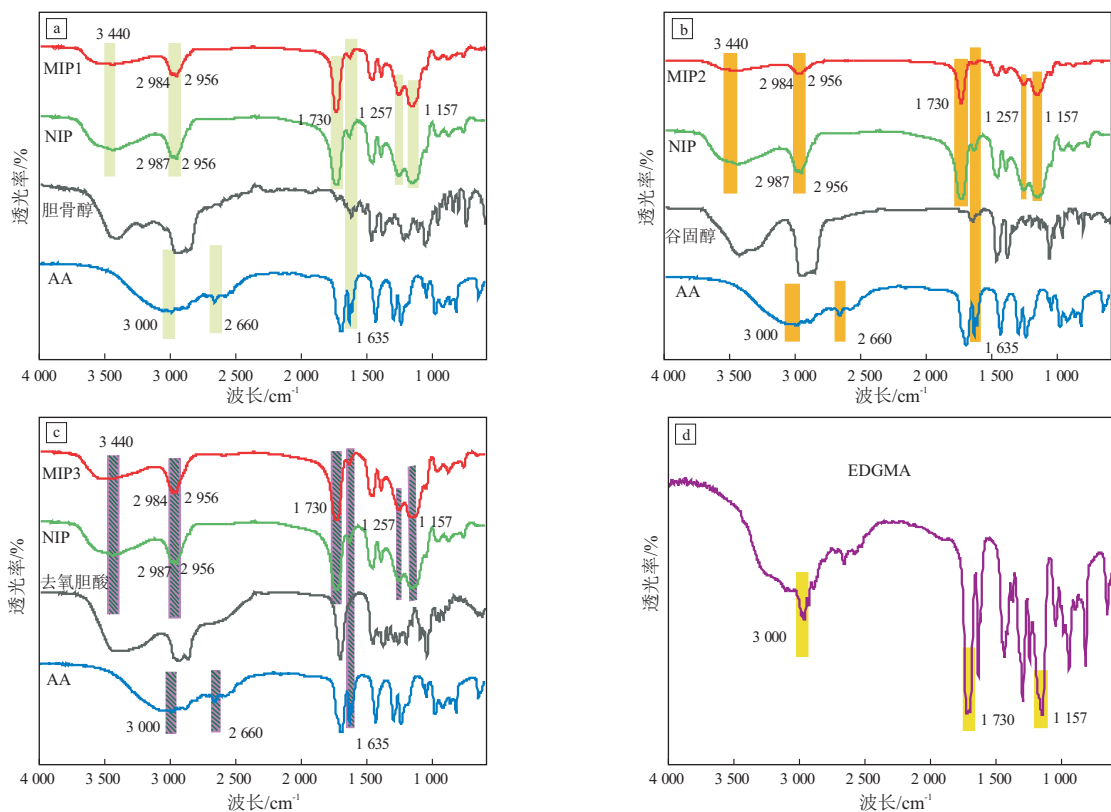


图 12 MIPs、NIP、去氧胆酸和 AA 红外吸收光谱

Fig.12 Infrared absorption spectra of MIPs, NIP, deoxycholic acid and AA

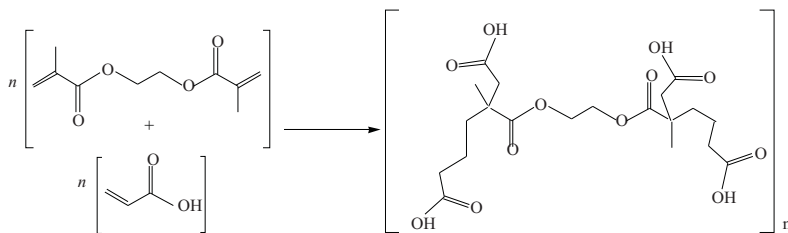


图 13 AA 与 EDGMA 的聚合反应方程式

Fig.13 Equation of polymerization reaction of AA and EDGMA

洗脱后 MIPs 和 NIP 红外光谱特征基本一样(图 12), $3\,440\text{ cm}^{-1}$ 处存在 $-\text{OH}$ 伸缩振动峰, $2\,984\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\,956\text{ cm}^{-1}$ 左右处出现甲基和亚甲基基团 $\text{C}-\text{H}$ 的对称和非对称伸缩振动, $1\,730\text{ cm}^{-1}$ 处的 $\text{C}=\text{O}$ 振动峰, 说明 MIPs 中的模板分子已经被洗脱下来。

因此, AA 和 EDGMA 发生了良好的聚合, 且在洗脱后还存在 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 、 $\text{C}-\text{O}$ 、 $\text{C}=\text{O}$ 的特征峰, 说明 AA 和 EDGMA 聚合后形成了稳定的印迹骨架, 使得洗脱后的 MIPs 中留有具有识别性能的空穴, 可以重复利用。通过紫外光谱和 FTIR 光谱分析, 以去氧胆酸虚拟分子印迹聚合物为例, 推测出其聚合过程(图 14)。后续可将制备良好的 3 种虚拟分子印迹聚合物进行表征和性能的研究, 并应用于原油中甾烷类化合物的分离富集。

2.5 聚合物的吸附性能

为了探究制备的 MIPs 的吸附性能, 通过平衡结合实验, 比较各 MIP1、MIP2、MIP3、NIP 的吸附量(Q)、印迹因子(IF)、分配系数(K_D) (表 3), 发现 MIPs 的 Q 值、 IF 值及 K_D 值均大于 NIP。因此, MIPs 对 5α -胆甾烷的吸附能力均大于 NIP, 说明 MIPs 对 5α -胆甾烷具有较高的亲和性和选择性。以上结果是由于 5α -胆甾烷与虚拟模板分子的结构相似, 和分子印迹聚合物之间存在特定的空穴结构, 使得 MIPs 是可以选择性的吸附, 而非分子印迹聚合物是随机分布的, 不能表现出特异的选择性。

2.6 温度对聚合物的影响

温度对聚合物反应的影响主要表现为它能改变引发剂分解产生自由基的速率, 影响聚合物颗粒的外貌形态^[13]。本实验采用的引发剂为偶氮二异丁腈, 当超过 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 就会急剧分解, 产生的热量不能及时散出, 从而影响聚合物的反应进程。

为了优化温度对聚合反应的影响, 选择去氧胆酸为模板分子, 分别于 50 、 60 、 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 下水浴恒温聚合 24 h 。结果发现反应温度为 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 时, 24 h 产生的聚合物沉淀较少, 影响了反应速率; 当反应温度为 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 时, 12 h 开始产生大量聚合物沉淀, 在 24 h 沉淀趋于稳定; $70\text{ }^\circ\text{C}$ 下, 聚合物在 6 h 开始出现大量沉淀。另外, 对 MIP3、MIP4、MIP5 进行电镜扫描测试, 通过 Image J 计算 190 个微球粒径, 随着温度的升高, 聚合物颗粒的平均粒径从 $1.638\text{ }\mu\text{m}$ 增长到 $1.956\text{ }\mu\text{m}$ (图 15), 认为是由于温度升高, 反应介质中的溶解度增大, 使得聚合物临界成核链增大, 或因为聚合速率加快, 聚合物的核浓度增加。结合吸附实验发现(表 3, 图 15), 当聚合温度为 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 时, 形成的 MIP4 吸附性能最低, 可能是因为引发不完全, 可溶低聚合物大量形成, 粒径分布不均匀, 稳定性较差; 当聚合温度为 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 时, 吸附量最大, 因为平均聚合度和交联度增加, 粒径分散性较好; 当聚合温度为 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 时, 出现爆聚现象, 短时间内出现大量 MIP5, 影响了识别位点的形成。综上所述, 选用 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 为最佳聚合温度。

3 结论

(1) 通过紫外光谱法研究了 3 种模板(胆固醇、 β -谷固醇、去氧胆酸)与不同功能单体(AA、MAA、MMA、AM)之间作用力大小, 结果表明 3 种模板均可与丙烯酸(AA)形成比较明显的氢键作用, 得到较稳定的预组装体系, 且 3 种模板与 AA 的最佳浓度比均为 $1:4$ 。

(2) 差示紫外光谱结果表明 1 个胆固醇分子和 1 个 β -谷固醇均可与 1 个 AA 形成稳定配合物, 而 1 个去氧胆酸分子可与 3 个 AA 形成稳定配合物, 它们之间的反应结合常数分别为 $K(\text{胆固醇}-\text{AA})=$

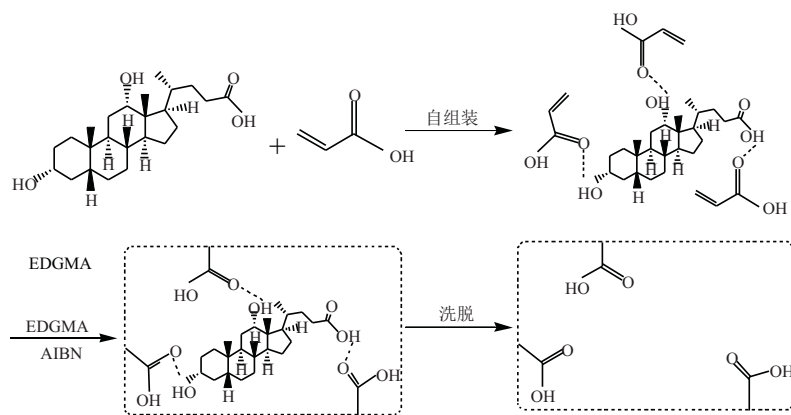


图 14 去氧胆酸虚拟分子印迹聚合物的合成示意

Fig.14 Synthesis of virtual molecularly imprinted polymers of deoxycholic acid

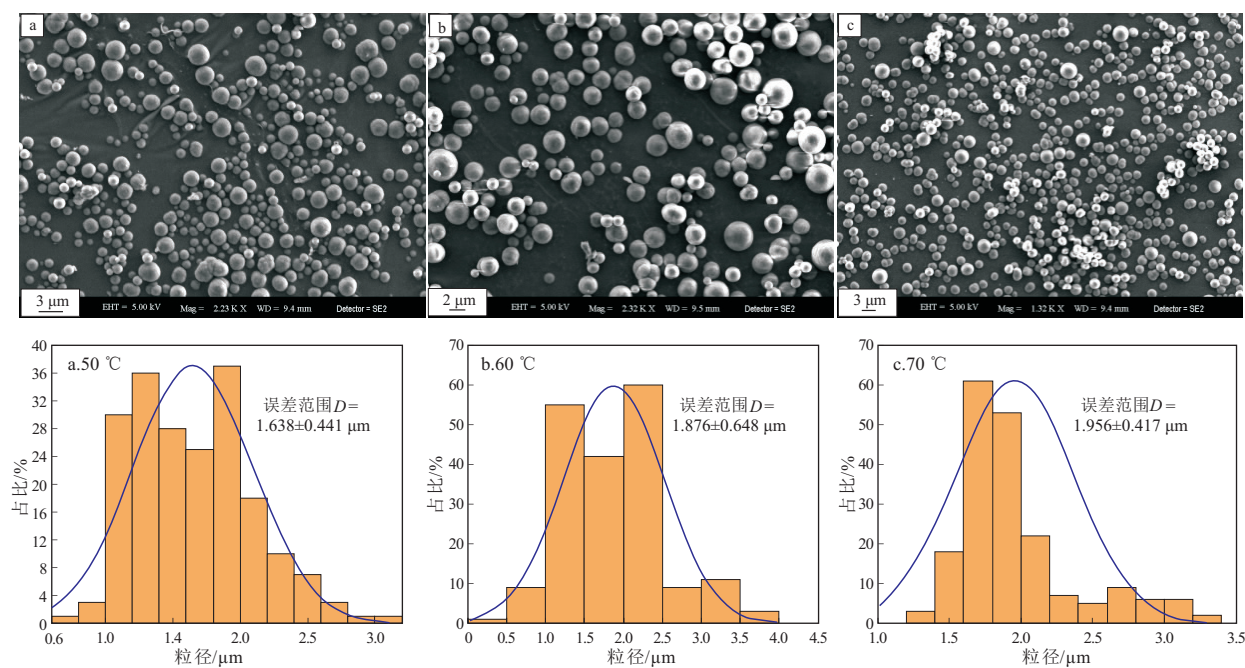


图 15 不同温度聚合物微球的扫描电镜图

Fig.15 SEM images of polymer microspheres at different temperatures

$5.838 \times 10^3 \text{ L/mol}$ ($n=1$), $K(\beta\text{-谷固醇-AA}) = 0.529 \times 10^3 \text{ L/mol}$ ($n=1$), $K(\text{去氧胆酸-AA}) = 0.115 \times 10^6 \text{ L}^3/\text{mol}^3$ ($n=3$)。

(3) 采用傅立叶变换红外光谱仪对聚合物进行表征分析, 结果表明, MIPs 中的模板被完全洗脱, 且 AA、EDGMA 成功地发生了聚合反应。通过吸附实验结果表明, MIPs 对甾烷类化合物 $5\alpha\text{-胆甾烷}$ 具有一定的选择性。结合扫描电镜发现 60°C 时, 聚合物的球粒分布均匀, 吸附性能最好, 为聚合的最佳温度。

致谢: 感谢中国科学院西北生态资源环境研究院油气资源研究中心甘肃省重点实验室对本次实验仪器的提供。

参考文献:

- [1] SHIRNESHAN G, BAKHTIARI A R, MEMARIANI M. Distribution and origins of *n*-alkanes, hopanes, and steranes in rivers and marine sediments from southwest Caspian coast, Iran; implications for identifying petroleum hydrocarbon inputs [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(17): 17484-17495.
- [2] LIU Shiju, GAO Gang, JIN Jun, et al. Source rock with high abundance of C_{28} regular sterane in typical brackish-saline lacustrine sediments; biogenic source, depositional environment and hydrocarbon generation potential in Junggar Basin, China [J]. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 2022, 208: 109670.
- [3] 万涛, 张洪安, 张宝君, 等. C_{29} 重排谷甾烷在油源对比研究中的应用: 以银额盆地查干凹陷为例 [J]. *断块油气田*, 2021, 28(2): 173-178.

WAN Tao, ZHANG Hongan, ZHANG Baojun, et al. The application of C_{29} rearranged sitostane in oil source correlation research; taking Chagan Depression of Yingen-Ejinaqi Basin for example [J]. *Fault-Block Oil and Gas Field*, 2021, 28(2): 173-178.

- [4] KASHIRTSEV V A, DOLZHENKO K V, FOMIN A N, et al. Hydrocarbon composition of bitumen from deeply buried terrestrial organic matter (*zone of apocatagenesis*) [J]. *Russian Geology and Geophysics*, 2017, 58(6): 702-710.
- [5] MEN Jiyong, DONG Chengya, SHI Hongxing, et al. Surface molecular imprinted membranes as a "gate" for selective transdermal release of chiral drug amlodipine [J]. *Journal of Membrane Science*, 2022, 664: 121059.
- [6] LI Aimin, HUANG Xiaolan, YAN Ling, et al. Pseudo-template molecularly imprinted polymeric fiber solid-phase microextraction coupled to gas chromatography for ultrasensitive determination of 2,4,6-trihalophenol disinfection by-products [J]. *Journal of Chromatography A*, 2022, 1678: 463322.
- [7] RAMANAVICIUS S, SAMUKAITE-BUBNIENE U, RATAUTAITE V, et al. Electrochemical molecularly imprinted polymer based sensors for pharmaceutical and biomedical applications (review) [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, 215: 114739.
- [8] WANG Xingguo, LIU Zhixiang, LU Jian, et al. Highly selective membrane for efficient separation of environmental determinands; enhanced molecular imprinting in polydopamine-embedded porous sleeve [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 449: 137825.
- [9] WANG Xuemei, HUANG Pengfei, MA Xiaomin, et al. Enhanced in-out-tube solid-phase microextraction by molecularly imprinted polymers-coated capillary followed by HPLC for Endocrine Disrupting Chemicals analysis [J]. *Talanta*, 2019, 194: 7-13.
- [10] YUAN Ya, WANG Yuzhi, HUANG Meidong, et al. Develop-

- ment and characterization of molecularly imprinted polymers for the selective enrichment of podophyllotoxin from traditional Chinese medicines[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 695(1/2): 63-72.
- [11] KARIM K, BRETON F, ROUILLON R, et al. How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers? [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57(12): 1795-1808.
- [12] 银珍红, 陈小明. 2,4-二氯苯氧乙酸分子印迹整体柱的制备、表征及色谱性能研究[J]. *分析测试学报*, 2009, 28(8): 949-953.
- YING Zhenhong, CHEN Xiaoming. Synthesis and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid molecularly imprinted monolithic column and its chromatographic property[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2009, 28(8): 949-953.
- [13] MA Xingbin, LIN Hongling, ZHANG Jiyu, et al. Preparation and characterization of dummy molecularly imprinted polymers for separation and determination of farrerol from *Rhododendron-ganniphum* using HPLC [J]. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 2018, 11(4): 513-522.
- [14] 李璐, 周刘梅, 解新安, 等. 溴氰菊酯农药残留检测的分子印迹预聚体系筛选及吸附性能[J]. *农业工程学报*, 2019, 35(1): 269-277.
- LI Lu, ZHOU Liumei, XIE Xinan, et al. Screening of molecularly imprinted pre-assembly system for detection of deltamethrin pesticide residues and its specific adsorption properties [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2019, 35(1): 269-277.
- [15] WANG Liping, SHE Xuhui, CHEN Zhi, et al. Preparation and characterization of a chiral molecularly imprinted polymer with a novel functional monomer for controlled release of S-sulpiride[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2021, 601: 120526.
- [16] 高博, 杨宏伟, 宋文琦, 等. 分子模拟辅助设计 L-苯丙氨酸分子印迹聚合物及其性能研究[J]. *化学通报*, 2019, 82(3): 251-257.
- GAO Bo, YANG Hongwei, SONG Wenqi, et al. Molecular simulation-aided design of L-phenylalanine-imprinted polymers and its properties[J]. *Chemistry*, 2019, 82(3): 251-257.
- [17] SÁNCHEZ-GONZÁLEZ J, PEÑA-GALLEGO Á, SANMARTÍN J, et al. NMR spectroscopy for assessing cocaine-functional monomer interactions when preparing molecularly imprinted polymers[J]. *Microchemical Journal*, 2019, 147: 813-817.
- [18] 杨俊, 朱晓兰, 苏庆德, 等. 可天宁印迹聚合物分子识别特性的光谱与 XPS 研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27(6): 1152-1155.
- YANG Jun, ZHU Xiaolan, SU Qingde, et al. Spectroscopy and XPS studies on molecular recognition of a molecularly imprinted cotinine-specific polymer[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, 27(6): 1152-1155.
- [19] WADIE M, ABDEL-MOETY EM, REZK M R, et al. Electro-polymerized poly-methyl dopa as a novel synthetic mussel-inspired molecularly imprinted polymeric sensor for darifenacin: computational and experimental study [J]. *Applied Materials Today*, 2022, 29: 101595.
- [20] GARCIA L L C, FIGUEIREDO-FILHO L C S, OLIVEIRA G G, et al. Square-wave voltammetric determination of paraquat using a glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotubes within a dihexadecyl hydrogen phosphate (DHP) film[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, 181: 306-311.
- [21] 林秋明, 何建峰, 刘岚, 等. 不同功能单体合成的分子印迹聚合物识别性能的研究[J]. *化学研究与应用*, 2007, 19(10): 1084-1088.
- LIN Qiuming, HE Jianfeng, LIU Lan, et al. Study on the effect of recognized characteristics of quercetin imprinted polymers with different functional monomers [J]. *Chemical Research and Application*, 2007, 19(10): 1084-1088.
- [22] 朱淮武. 有机分子结构波谱解析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- ZHU Huaiwu. *Organic molecular structure spectra analysis*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [23] 张晓. 番红花红 T 分子印迹聚合物的制备及其性能研究[D]. 兰州: 兰州交通大学, 2021.
- ZHANG Xiao. *Preparation and properties of safranin T molecular imprinted polymer*[D]. Lanzhou: Lanzhou Jiaotong University, 2021.
- [24] 刘婷婷, 卢春霞. 齐墩果酸分子印迹体系优化[J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(2): 139-145.
- LIU Tingting, LU Chunxia. Optimization of molecularly imprinted system for oleanolic acid [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2021, 49(2): 139-145.
- [25] 张孝刚, 朱秋劲, 胡萍. 三聚氰胺分子印迹预组装体系紫外光谱研究[J]. *食品科学*, 2011, 32(21): 128-132.
- ZHANG Xiaogang, ZHU Qiujiu, HU Ping. Ultraviolet spectroscopic investigations into melamine molecular imprinting pre-assembly system[J]. *Food Science*, 2011, 32(21): 128-132.
- [26] CHEN Changbao, CHEN Yanjun, ZHOU Jie, et al. A 9-vinyladenine-based molecularly imprinted polymeric membrane for the efficient recognition of plant hormone ¹H-indole-3-acetic acid[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 569(1/2): 58-65.