

前沿分析法研究对-羟基苯甲酸印迹整体柱的热力学行为

郑超¹, 刘照胜², 高如瑜³, 张玉奎⁴

- (1. 南开大学化学学院, 天津 300071; 2. 天津医科大学药学院, 天津 300203;
3. 南开大学元素有机化学研究所, 元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071;
4. 中国科学院大连化学物理研究所, 国家色谱研究分析中心, 大连 116023)

摘要 采用矩形前沿分析法对原位聚合的对-羟基苯甲酸印迹整体柱的热力学吸附等温线进行了测定. 印迹整体柱的吸附等温线是分别以乙腈、甲醇、四氢呋喃和含有体积分数分别为 1%, 3%, 5% 和 7% 乙酸的乙腈为流动相以及在以甲醇为流动相时柱温分别为 20, 40 和 50 °C 的条件下测定的. 吸附等温线表明, 印迹整体柱对模板分子的吸附能力比其结构类似物(邻-羟基苯甲酸)的吸附能力强. 用双 Langmuir 方程对不同条件下得到的实验数据进行拟合, 得到模板分子和邻-羟基苯甲酸在印迹整体柱各种吸附位点上的饱和吸附量和键合常数, 结果表明, 流动相中乙酸含量、有机溶剂的性质和柱温对模板分子容量因子的影响比对邻-羟基苯甲酸的大, 造成印迹聚合物的选择性随条件的变化而发生了明显的改变.

关键词 前沿分析法; 对-羟基苯甲酸; 印迹整体柱; 吸附等温线

中图分类号 O657.7⁺2

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)08-1443-06

分子印迹技术是近些年来发展起来的一种合成对某一特定分子(印迹分子)具有选择性的聚合物的方法. 由于分子印迹聚合物具有稳定的物理、化学性质, 容易制备以及选择性高等优点, 已被广泛应用于色谱固定相的制备^[1,2]、生物传感器^[3]和固相萃取^[4]等各个方面. 虽然分子印迹聚合物具有较高的选择性, 但应用于色谱固定相时始终存在模板分子色谱峰柱效较低, 色谱峰拖尾严重等问题. 这些都是由特异性识别位点上物质的超载和缓慢的传质速度造成的^[5,6]. 系统地研究分子印迹聚合物的热力学行为, 了解各种色谱条件对分子印迹聚合物中各种识别位点的影响, 对于选择合适的分离识别条件, 改善模板分子的柱效有着重要的指导作用.

研究分子印迹聚合物的热力学行为主要是通过测定不同条件下模板分子在聚合物上的平衡吸附量, 获得印迹聚合物的吸附等温线, 利用热力学模型对实验数据进行拟合, 从而达到了解各种键合位点的分布以及测定热力学参数的目的. 其中较普遍的方法是摇瓶法^[7], 该方法操作简单、无需特殊设备. 但是, 当待测样品溶液的浓度很低时, 浓度变化难以准确测定, 并且吸附达到平衡时所需要的时间很难预知^[8,9]. 近些年, 常用的另一种方法是前沿分析法^[5,10], 该方法由于具有不需要校准检测器, 检测数据不受传质动力学及纵向扩散的影响等优势, 而成为测定吸附等温线的一种精确快速的动态方法. 目前, 前沿分析法主要有阶梯式和矩形前沿分析法两种方法. 近几年来, 两种前沿分析法都已被应用于分子印迹聚合物吸附等温线的测定^[11-15].

虽然分子印迹技术在近些年来发展迅速, 但对分子印迹聚合物固定相的热力学研究大多局限于颗粒填充柱^[15-18], 而利用前沿分析法对印迹整体柱热力学行为的研究却很少见报道^[11]. 本文采用原位聚合法制备了对-羟基苯甲酸分子印迹整体柱, 以矩形前沿分析法测定了不同条件下的热力学吸附等温线, 考察了流动相中乙酸含量、有机溶剂的性质对印迹整体柱吸附能力和选择性的影响.

收稿日期: 2007-02-15.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20575045).

联系人简介: 高如瑜(1939年出生), 女, 教授, 主要从事高效液相色谱及毛细管电色谱的研究.

E-mail: zhengchao1978@yahoo.com.cn

1 理论部分

1.1 色谱方程

对分子印迹聚合物固定相色谱分离过程的研究可采取经典的传质模式^[5], 此模式中忽略了色谱柱中的轴向扩散, 假设谱带的展宽主要是由传质阻力引起的. 对于单组分体系, 色谱过程可以用下式表示^[5]:

$$\partial c/\partial t + F\partial q/\partial t + \mu\partial c/\partial z = 0 \quad (1)$$

式中 c 和 q 分别表示分析物在流动相和固定相中的浓度; F 表示相率; μ 表示流动相的流速; t 和 z 分别表示时间和分析物在色谱柱中的位置. 在实验的开始 $t=0$, 在色谱柱入口处 $z=0$.

1.2 平衡吸附模型

除了线性吸附等温模型外, 最简单的吸附等温模型是 Langmuir 方程^[12-14].

$$q = q_s bc/(1 + bc) \quad (2)$$

式中, q 和 c 分别为达到平衡时分析物在固定相和流动相中的浓度; q_s 为单层饱和吸附量, b 为键合常数. 但有的研究报道指出, 在印迹整体柱表面至少存在两类性质不同的吸附位点, 其中第二类吸附位点是印迹整体柱对模板分子的特异性吸附位点^[11]. 因此, 利用如下双 Langmuir 方程对实验数据进行拟合^[12-14]:

$$q = q_{s1} b_1 c/(1 + b_1 c) + q_{s2} b_2 c/(1 + b_2 c) \quad (3)$$

式中 q_{s1} , q_{s2} 和 b_1 , b_2 分别代表第一类和第二类吸附位点的饱和吸附量和键合常数.

1.3 初始和边界条件

实验中所用的色谱柱的初始和边界条件要符合前沿分析模式. 由于忽略轴向扩散对谱带展宽的影响, 所以无扩散的边界条件可以表示为^[5,12-14]

$$c(z, 0) = c_n \quad (4)$$

$$c(0, t) = c_{n+1} (t > 0) \quad (5)$$

$$\partial c(L, t)/\partial z = 0 \quad (6)$$

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

对-羟基苯甲酸(4-HBA)和邻-羟基苯甲酸(2-HBA)(分析纯, 天津天泰化学试剂厂); 偶氮二异丁腈(AIBN, 化学纯, 上海市赫维化工有限公司, 用前经重结晶纯化); 乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA, New Jersey, USA); 甲基丙烯酸(MAA, 天津市化学试剂一厂); 甲苯(分析纯, 天津市化学试剂厂); 异辛烷(分析纯, 天津市光复精细化工研究所); 甲醇(色谱纯, 北京益利精细化学品有限公司); 乙酸(分析纯, 天津市化学试剂厂); 乙腈(色谱纯, 天津市化学试剂厂); 超纯水为乐百氏纯净水.

Perkin-Elmer 高效液相色谱仪; Perkin-Elmer 高压恒流泵; LC-75 分光光度检测器; ANASTAR 色谱工作站; 501A 型超级恒温器.

2.2 分子印迹整体柱的制备

称取 0.0878 g 模板分子和 0.09 g 引发剂 AIBN, 溶于由功能单体 MAA(0.205 mL)、交联剂 EDMA(1.81 mL)、致孔剂甲苯(3.11 mL)和异辛烷(0.78 mL)组成的混合溶液中, 通氮气 10 min 除去氧气, 然后注入到不锈钢色谱柱(100 mm × 4.6 mm i. d.)中, 将两端封住, 用 53 °C 水浴恒温反应 12 h. 将柱取出并连于 HPLC 的高压泵上, 用体积比为 9:1 的甲醇和乙酸混合液冲洗至获得稳定的基线. 最后用流动相将系统平衡至基线水平. 不加模板分子的空白柱采用同样的方法制备.

2.3 吸附等温线的测定

2.3.1 流动相及样品溶液 分别以甲醇、乙腈和四氢呋喃为流动相. 前沿分析所用的样品溶液是将不同量的分析物溶解于流动相而得, 所得样品溶液的质量浓度范围为 0.001 ~ 0.030 g/L.

2.3.2 死体积及固定相体积的测定 死时间通过丙酮的保留时间测得, 通过计算得到的死体积 $V_0 =$

1. 601 mL. 固定相的体积(即色谱柱的柱容积与柱内流动相体积的差值) $V_a = 0.719$ mL.

2.3.3 吸附量的计算 在前沿分析法中平衡吸附量 q 可用下式计算^[12-14]:

$$q = c(V_{e_{qu}} - V_0)/V_a \quad (7)$$

式中, $V_{e_{qu}}$ 为吸附达平衡时的保留体积(可用半高法由突破曲线上测得^[18]).

3 结果与讨论

3.1 突破曲线的测定

前沿分析法中的突破曲线是在 HPLC 中测定的. 首先, 将纯流动相平衡系统, 然后将分析物浓度最低的样品溶液作为流动相流过色谱柱, 直至流出曲线达到一个稳定的平台, 即为完成一个突破曲线. 将样品洗脱干净后, 用下一个浓度稍高的样品溶液作为流动相重复上述实验, 直至得到一系列样品的突破曲线. 改变条件, 按照上述步骤进行实验. 图 1 为在 20 °C 下含有不同浓度的对-羟基苯甲酸的乙腈溶液作为流动相时在印迹整体柱上获得的一系列突破曲线.

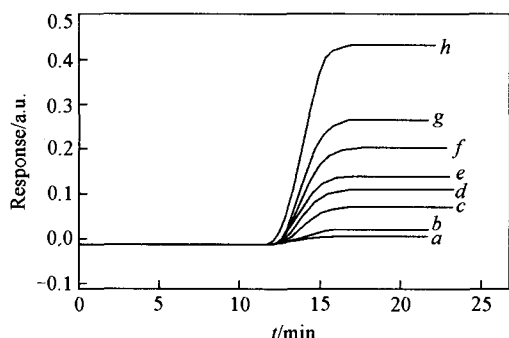


Fig.1 Frontal chromatogram of 4-HBA on the imprinted polymers monolith with acetonitrile mobile phase at 20 °C

Flow rate 1.0 mL/min. Analyte mass concentration/($g \cdot L^{-1}$): a. 0.001; b. 0.002; c. 0.005; d. 0.008; e. 0.010; f. 0.015; g. 0.020; h. 0.030.

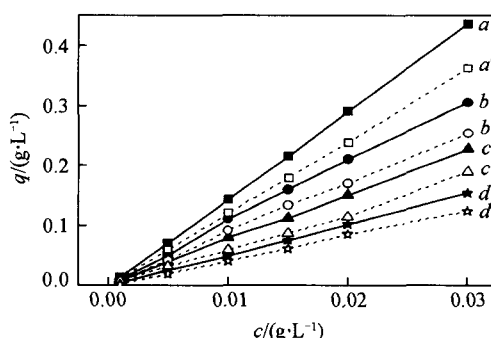


Fig.2 Experimental absorption isotherms of 4-HBA (solid symbols) and 2-HBA (open symbols) on imprinted polymers monolith at 20 °C from methanol containing different contents of acetic acid φ (Acetic acid): a, a'. 1%; b, b'. 3%; c, c'. 5%; d, d'. 7%.

3.2 流动相中乙酸含量对印迹聚合物上吸附能力和选择性的影响等温线的影响

由于乙酸中的羧基可以与功能单体甲基丙烯酸发生氢键作用, 当流动相中加入乙酸时, 印迹整体柱的保留能力有所降低. 图 2 为 20 °C 下甲醇中乙酸体积分数分别为 1%, 3%, 5% 和 7% 时对-羟基苯甲酸和邻-羟基苯甲酸在印迹整体柱上的吸附等温线. 从图 2 可以看出, 两种样品分子在印迹整体柱上的平衡吸附量随着流动相中乙酸含量的增加而降低. 这种现象说明乙酸分子竞争占据印迹聚合物表面的吸附位点而导致印迹整体柱的吸附能力下降. 用双 Langmuir 方程对不同乙酸浓度下得到的实验数据进行拟合, 所得热力学参数列于表 1.

Table 1 Isotherm parameters of samples in acetic acid with different concentrations in mobile phase at 20 °C

Sample	Acetic acid content (%)	Isotherm parameter			
		$q_1/(g \cdot L^{-1})$	$b_1/(L \cdot g^{-1})$	$q_2/(g \cdot L^{-1})$	$b_2/(L \cdot g^{-1})$
4-HBA	1	33.42	0.45590	2.584	0.013080
4-HBA	3	35.29	0.23020	2.011	0.012480
4-HBA	5	32.64	0.11870	1.876	0.011050
4-HBA	7	33.29	0.05420	1.781	0.009836
2-HBA	1	36.23	0.17470	2.039	0.004684
2-HBA	3	35.27	0.15130	2.014	0.007543
2-HBA	5	34.91	0.05952	1.987	0.006585
2-HBA	7	34.05	0.03574	2.016	0.004210

利用表 1 中的等温参数分别计算对-羟基苯甲酸和邻-羟基苯甲酸的容量因子 k 和选择性因子 α

$$(\alpha = k_{4\text{-HBA}}/k_{2\text{-HBA}})^{[12-14]}:$$

$$k_{4\text{-HBA}} = q_1 b_1 + q_2 b_2 \quad (8)$$

$$k_{2\text{-HBA}} = q_1' b_{1'} + q_2' b_{2'} \quad (9)$$

式中, q_1, q_2 和 q_1', q_2' 分别代表对-羟基苯甲酸和邻-羟基苯甲酸在不同吸附位点上的饱和吸附量; b_1, b_2 和 $b_{1'}, b_{2'}$ 分别代表对-羟基苯甲酸和邻-羟基苯甲酸在不同吸附位点上的键合常数.

由图 3(A) 可以看出, 随着流动相中乙酸含量的增加, 对-羟基苯甲酸和邻-羟基苯甲酸的容量因子 k 有所下降. 如图 3(B) 所示, 印迹整体柱的选择性因子 α 随乙酸含量的增加而下降. 实验表明, 由于乙酸体积分数的变化对模板分子和邻-羟基苯甲酸在吸附位点上的饱和吸附量和键合常数造成的影响不同, 导致印迹整体柱的吸附能力和选择性发生变化.

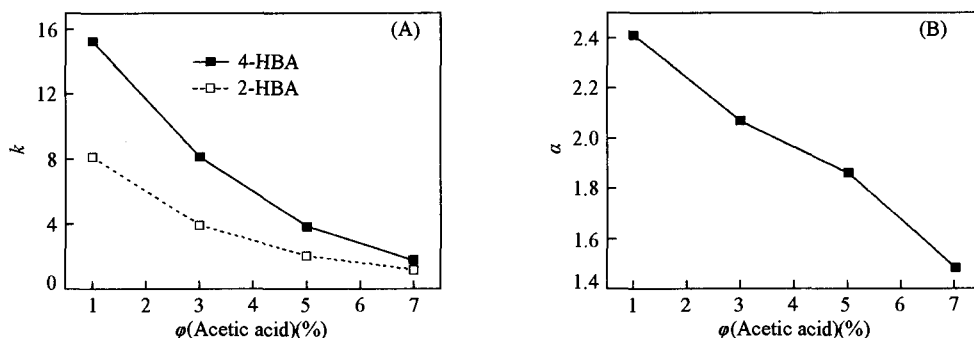


Fig. 3 Effects of acetic acid content on calculated total retention factors (A) of 4-HBA, 2-HBA and calculated selective factor (B)

3.3 流动相中有机溶剂的性质对模板分子在印迹聚合物上吸附等温线的影响

图 4 为以不同有机溶剂为流动相对对-羟基苯甲酸和邻-羟基苯甲酸在印迹整体柱上的实验吸附等温线. 由于流动相的洗脱能力随着有机溶剂与聚合物之间形成氢键能力的增强而增强^[12-14]. 因此当以乙腈为流动相时, 由于乙腈与印迹聚合物之间形成氢键的能力较弱, 聚合物对样品的吸附量最大; 而甲醇与印迹聚合物之间形成氢键的能力最强, 故此时聚合物对样品分子的吸附能力最弱. 利用双 Langmuir 方程对不同条件下的实验吸附等温线进行拟合, 所得等温参数如表 2 所示.

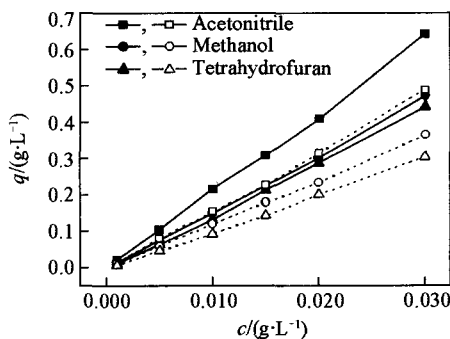


Fig. 4 Adsorption equilibrium isotherms of 4-HBA (solid symbols) and 2-HBA (open symbols) in different mobile phases

Table 2 Isotherm parameters of 4-HBA and 2-HBA in different mobile phases at 20 °C

Sample	Mobile phase	Isotherm parameter			
		$q_1/(g \cdot L^{-1})$	$b_1/(L \cdot g^{-1})$	$q_2/(g \cdot L^{-1})$	$b_2/(L \cdot g^{-1})$
4-HBA	Methanol	35.39	0.4592	2.732	0.01558
4-HBA	Acetonitrile	38.22	0.5821	3.624	0.01681
4-HBA	Tetrahydrofuran	36.37	0.5184	3.214	0.01575
2-HBA	Methanol	37.02	0.2042	2.152	0.004982
2-HBA	Acetonitrile	37.03	0.2321	2.416	0.007452
2-HBA	Tetrahydrofuran	37.06	0.2177	2.161	0.006573

利用表 2 的热力学参数计算出不同有机溶剂作为流动相对对-羟基苯甲酸和邻-羟基苯甲酸的容量因子 k , 结果如表 3 所示. 通过计算可知, 当分别以甲醇、乙腈和四氢呋喃作为流动相时印迹整体柱的选择性因子 α 分别为 2.59, 2.23 和 2.15. 由此可以看出, 当以乙腈作为流动相时, 印迹整体柱对对-羟基苯甲酸和邻-羟基苯甲酸的吸附能力较强并且表现出较好的选择性, 而以甲醇作为流动相时, 印迹整体柱对对-羟基苯甲酸和邻-羟基苯甲酸的吸附能力最弱选择性也最差.

Table 3 Effect of different mobile phases on retention factor *k*

Sample	Mobile phase	<i>k</i>	Sample	Mobile phase	<i>k</i>
4-HBA	Methanol	16.29	2-HBA	Methanol	7.570
4-HBA	Acetonitrile	22.31	2-HBA	Acetonitrile	8.613
4-HBA	Tetrahydrofuran	18.90	2-HBA	Tetrahydrofuran	8.453

3.4 温度对印迹聚合物吸附能力和选择性的影响

图5为柱温分别为20, 40和50℃时以甲醇为流动相对-羟基苯甲酸和邻-羟基苯甲酸在分子印迹聚合物上的实验吸附等温线. 实验结果表明, 温度对样品的热力学行为有明显的影 响, 吸附量随温度的升高而降低. 当流动相中样品分子的质量浓度为0.030 g/L, 柱温由20℃上升至50℃时, 印迹整体柱对对-羟基苯甲酸的吸附量下降了38.2%, 对邻-羟基苯甲酸的吸附量下降了28.3%. 用双Langmuir方程对不同乙酸浓度下所得到的实验数据进行拟合, 所得热力学参数如表4所示.

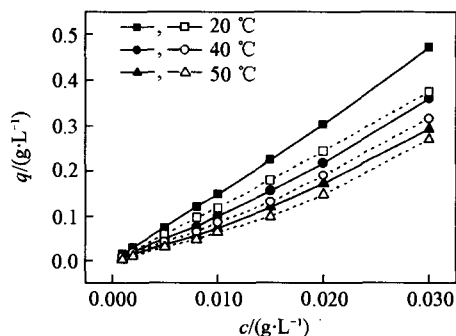


Fig. 5 Adsorption equilibrium isotherms of 4-HBA (solid symbols) and 2-HBA (open symbols) at different temperatures

Table 4 Isotherm parameters of 4-HBA and 2-HBA at different temperatures with methanol as mobile phase

Sample	<i>t</i> /°C	Isotherm parameter			
		$q_1/(g \cdot L^{-1})$	$b_1/(L \cdot g^{-1})$	$q_2/(g \cdot L^{-1})$	$b_2/(L \cdot g^{-1})$
4-HBA	20	35.39	0.45920	2.732	0.015580
4-HBA	40	35.07	0.22850	2.219	0.011430
4-HBA	50	33.71	0.13630	1.740	0.011650
2-HBA	20	37.02	0.20420	2.152	0.004982
2-HBA	40	36.23	0.13730	2.014	0.006934
2-HBA	50	34.26	0.08877	1.965	0.006642

利用表4中的等温参数分别计算了对-羟基苯甲酸和邻-羟基苯甲酸的容量因子*k*和选择性因子 α . 由图6(A)可以看出, 随着温度的增加对-羟基苯甲酸和邻-羟基苯甲酸的容量因子都有所下降. 当温度升至50℃时, 对-羟基苯甲酸的容量因子 k_{4-HBA} 下降了71.7%; 邻-羟基苯甲酸的容量因子 k_{2-HBA} 下降了60.0%. 由于对-羟基苯甲酸和邻-羟基苯甲酸的容量因子随柱温变化的程度不同导致了印迹整体柱选择性的变化. 如图6(B)所示, 印迹整体柱的选择性因子 α 随乙酸含量的增加而下降. 由此可以看出, 由于对-羟基苯甲酸的容量因子*k*随温度的变化大于邻-羟基苯甲酸的容量因子*k*随温度发生的变化, 从而造成印迹整体柱选择性随柱温的升高而下降.

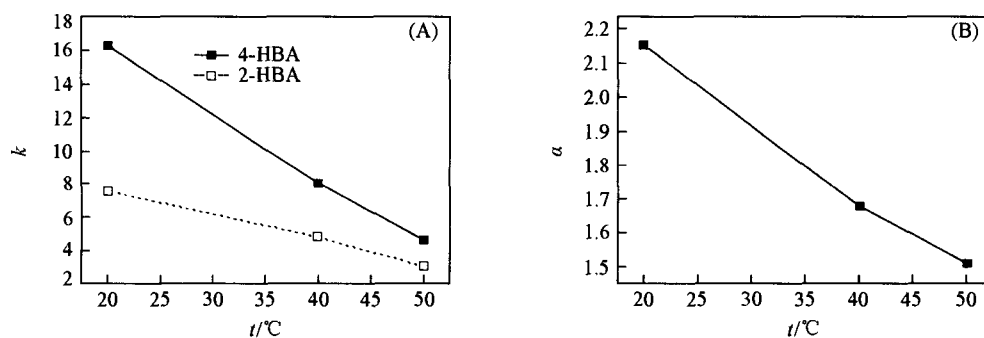


Fig. 6 Effects of temperature on the calculated total retention factors(A) of 4-HBA, 2-HBA and calculated selective factor(B)

参 考 文 献

[1] Yin J. F., Yang G. L., Chen Y.. J. Chromatogr. A[J], 2005, 1090(10): 68—75

- [2] Liu Z. S. , Xu Y. L. , Gao R. Y. , *et al.* . J. Chromatogr. A[J], 2005, **1087**(9) : 20—28
- [3] Klaus M. . Anal. Chim. Acta[J], 2001, **435**(3) : 3—8
- [4] Andersson L. I. , Hardenbor E. , Sandberg-Stall M. , *et al.* . Anal. Chim. Acta[J], 2004, **526**(11) : 147—154
- [5] Sajinz P. , Kele M. , Zhong G. M. , *et al.* . J. Chromatogr. A[J], 1998, **810**(6) : 1—17
- [6] Guiochon G. , Golshan-Shirazi S. , Katti A. . Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography [M] , New York: Academic Press, 1994; 235—240
- [7] Yamamura H. L. , Enna S. J. , Kuhar M. J. . Neurotransmitter Receptor Binding [M] , New York: Raven press, 1985; 416—423
- [8] Matsui J. , Miyoshi Y. , Doblhoff-Dier O. . Anal. Chem. [J] , 1995, **67**(23) : 4404—4408
- [9] Sellergren B. . Trends Anal. Chem. [J] , 1997, **16**(6) : 310—320
- [10] Guan-Sajonz H. , Sajinz P, Zhong G. M. , *et al.* . Biotechnol. Progr. [J] , 1996, **12**(3) : 380—386
- [11] Li H. , Nie L. H. , Yao S. Z. . Chromatographia [J] , 2004, **60**(10) : 425—431
- [12] Kim H. , Guiochon G. . Anal. Chem. [J] , 2005, **77**(6) : 1708—1717
- [13] Kim H. , Guiochon G. . Anal. Chem. [J] , 2005, **77**(6) : 1718—1726
- [14] Kim H. , Guiochon G. . Anal. Chem. [J] , 2005, **77**(6) : 2496—2504
- [15] Guiochon G. , Golshan-Shirazi S. , Katti A. . Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography [M] , New York: Academic Press, 1994; 52—60
- [16] GUO Hong-Sheng(郭洪声), HE Xi-Wen(何锡文), JING Ying(景莹), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J] , 2001, **22**(5) : 739—743
- [17] LEI Jian-Dou(雷建都), TAN Tian-Wei(谭天伟). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J] , 2002, **23**(11) : 2073—2075
- [18] Sajinz P. , Zhong G. M. , Guiochon G. . J. Chromatogr. A [J] , 1996, **731**(4) : 1—25

Thermodynamic Studies on 4-Hydroxybenzoic Acid-imprinted Polymer Monolith by Frontal Analysis

ZHENG Chao¹, LIU Zhao-Sheng², GAO Ru-Yu^{3*}, ZHANG Yu-Kui⁴

(1. College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2. College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China;

3. State Key Laboratory of Element-Organic Chemistry, Institute of Element-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China;

4. National Chromatographic R. & A. Center, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract The adsorption isotherms of 4-hydroxybenzoic acid imprinted monolith which was prepared by *in situ* therm-initiated polymerization were determined with the frontal analysis successfully. Adsorption isotherms of the monolith were measured at 20, 40 and 50 °C by using acetonitrile, tetrahydrofuran, methanol and acetonitrile containing 1%, 3%, 5% and 7% (volum fraction) acetic acid as the mobile phase, respectively. The results show that the adsorption capacity of the monolith for the template was found to be much stronger than 2-hydroxybenzoic acid. The experimental data was fitted by Bi-Langmuir isotherm, and the saturation capacity and association constant of imprinted monolith was achieved. The content of acetic acid in the mobile phase, the nature of the organic mobile phase and the temperature showed some influence on the adsorbent ability and selectivity of the imprinted polymer. This phenomenon can be explained that the saturation capacity and association constant of 4-hydroxybenzoic acid on the binding sites was influenced by the chromatographic conditions much more significantly than 2-hydroxybenzoic acid.

Keywords Frontal analysis method; 4-Hydroxybenzoic acid; Imprinted polymer monolith; Adsorption isotherm