

靛茜兰分子印迹聚合物的合成及其性能表征

许鹏飞¹, 吴超钧², 宋立新², 张云霞², 王慧格², 何娟^{1*}

(1. 河南工业大学化学化工学院, 河南 郑州 450001;

2. 河南水利与环境职业学院环境工程系, 河南 郑州 450008)

摘要:采用悬浮聚合法, 以与赭曲霉毒素 A (OTA) 结构类似的靛茜兰为模板分子、 α -甲基丙烯酸为功能单体、乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂制备对 OTA 有特异性识别作用的靛茜兰分子印迹聚合物 (Molecularly Imprinted Polymers, MIPs)。通过单因素实验、正交实验得出 MIPs 的最佳合成条件。利用红外光谱仪、扫描电子显微镜、激光粒度仪等对聚合物进行表征; 吸附性能实验表明 MIPs 的最大吸附量为 4.015 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

关键词:靛茜兰; 悬浮聚合; 赭曲霉毒素 A; MIPs; 吸附性能

中图分类号: O657.3

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2021)S-0208-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2021.S.042

Synthesis and performance characterization of quinizarin blue molecularly imprinted polymers

XU Peng-fei¹, WU Chao-jun², SONG Li-xin², ZHANG Yun-xia², WANG Hui-ge², HE Juan^{1*}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;

2. Department of Environmental Engineering, Henan Vocational College of Water Conservancy and Environment, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: Quinizarin blue molecularly imprinted polymers (MIPs) that possess specific recognition to ochratoxin A (OTA) are prepared through suspension polymerization method with quinizarin blue as template molecule, α -methylacrylic acid as functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate as crosslinking agent, and azobisisobutyronitrile as initiator. The best synthesis conditions for the MIPs are obtained through single factor experiment and orthogonal experiment. The prepared MIPs are characterized by means of infrared spectrometer, scanning electron microscope, laser particle size analyzer and other instruments. It is indicated by adsorption performance experiment that the maximum adsorption capacity of the MIPs to OTA is 4.015 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Key words: quinizarin blue; suspension polymerization; ochratoxin A; molecularly imprinted polymers; adsorption performance

分子印迹技术是以目标物分子或目标分子的结构类似物为模板分子, 当模板分子与功能单体充分接触时, 两者在共价键或非共价键作用下形成预聚物; 之后通过引发剂的作用, 预聚物和交联剂发生聚合反应, 在模板分子周围形成高度交联的三维网状聚合物; 然后再使用洗脱剂将模板分子从聚合物中洗脱, 最终得到所需的分子印迹聚合物 (Molecularly Imprinted Polymers, MIPs)^[1-4]。MIPs 是一种分布在三维网络中具有识别位点和印记空腔的合成材

料^[5], 具有操作简便、化学和物理性质稳定、性价比高、特异性分子识别能力强等竞争特点^[6]。

赭曲霉毒素是如今已被发现报道的 300 多种真菌毒素中的一类, 常有赭曲霉毒素 A (OTA)、赭曲霉毒素 B (OTB)、赭曲霉毒素 C (OTC)、赭曲霉毒素 α (OTA α) 4 种, 其中以 OTA (1965 年发现^[7]) 的毒性最强。OTA 主要由曲霉属和青霉属菌产生^[8-10], 易溶于极性溶剂, 微溶于水, 其广泛存在于谷类、稻米、干果、咖啡、白酒、啤酒、葡萄汁、肉类制品等多种食

收稿日期: 2021-03-13; 修回日期: 2021-05-25

基金项目: 河南省自然科学基金 (202300410116); 河南省重点研发与推广专项 (20210211057); 河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) (202102310006); 河南工业大学河南省省属高校基本科研业务费专项 (2017RCJH10)

作者简介: 许鹏飞 (1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向为复杂体系的分离与分析, 2808474370@qq.com; 何娟 (1966-), 女, 博士, 教授, 研究方向为复杂体系的分离与分析, 通讯联系人, juanhe@haut.edu.cn。

品和饮料中^[11-15]。OTA 具有致癌性、致畸形、神经毒性等多种毒害性的同时还具有长达 35 d 的半衰期^[16],因此,OTA 已经引起了世界范围内的广泛关注,被国际癌症研究机构列为 2B 类致癌物质。根据我国食品安全标准,谷类、稻米中 OTA 的最高限量为 10 μg/kg。本文采用悬浮聚合的方法,以 OTA 的结构类似物醌茜兰为模板分子,制备对 OTA 有特异性识别作用的醌茜兰 MIPs,并对聚合物的吸附性能进行测定。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

仪器:电子扫描显微镜(INSPECT F50 型)、紫外-可见分光光度计(UV-2450 型),日本岛津仪器有限公司;激光粒度分布仪, Mastersizer 2000,英国马尔文仪器有限公司;电子天平,BS210S 型,德国赛多利斯集团;电热恒温水浴锅,上海树立仪器仪表有限公司;集热式恒温加热磁力搅拌器,DF-101S,巩义市予华仪器有限责任公司。

试剂:醌茜兰,α-甲基丙烯酸,乙二醇二甲基丙烯酸酯,偶氮二异丁腈,甲醇,冰乙酸,OTA 标准样品,三氯甲烷。

1.2 实验方法

1.2.1 模板分子的结构

本实验以醌茜兰为模板分子,醌茜兰结构式如图 1 所示。

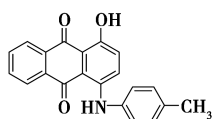


图 1 醌茜兰结构式

1.2.2 合成聚合物

MIPs 的合成:取 1 mmol(0.329 35 g)醌茜兰放置于 50 mL 锥形瓶中,加入 25 mL 三氯甲烷,超声振荡,溶解所有模板分子;再加入 5 mmol(421 μL)α-甲基丙烯酸,继续振荡 5 min;待模板分子与功能单体充分作用后,再加入 30 mmol(5.641 mL)乙二醇二甲基丙烯酸酯,振荡 5 min;然后再加入 2.5% 的引发剂偶氮二异丁腈,振荡 5~10 min;使用滴液漏斗将混合溶液以 2 滴/s 的速度滴加到 1% 聚乙烯醇悬浮液中,75℃ 油浴加热,冷凝回流,仔细观察反应情况并不断调整滴速和转速;反应一段时间后,有紫色固体小颗粒生成,继续反应 5 h,之后升温到

90℃,熟化 2 h;静置使颗粒沉淀,然后倒出上层液体。

非分子印迹聚合物 NIPs 的合成:不加模板分子醌茜兰,其他步骤与合成 MIPs 一致。

1.2.3 去除悬浮剂

反应结束后倒入烧杯中,洗液分层后倒出上层液体,加入热蒸馏水,反复洗涤至上层液体澄清。抽滤,烘干。

1.2.4 洗脱模板分子

将聚合物用滤纸包裹,以 V(甲醇):V(乙酸)=4:1 的比例配制洗脱液,在索氏提取器中对聚合物进行洗脱至无模板分子为止;再用甲醇洗至中性,然后烘干,得到淡紫色的 MIPs。

1.2.5 聚合物吸附量的测定

采用紫外-可见分光光度法进行测定。根据标准曲线法,以溶液吸光度和溶液浓度的线性关系绘制标准曲线,计算溶液的质量浓度,根据公式计算聚合物对目标物的吸附量。

$$Q = (C_0 - C_1) \times m/V \quad (1)$$

式中:Q 为吸附量,μg/mg;C₀ 为吸附前溶液中 OTA 浓度,μg/mL;C₁ 为吸附后溶液中 OTA 浓度,μg/mL;V 为溶液体积,mL;m 为聚合物质量,mg。

(1) 等温吸附测定

称取 10 mg 已合成的 MIPs 和 NIPs 各 9 份,编号,分别加入浓度为 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、15、20 μg/mL 的 OTA 标准溶液 4 mL,涡旋 1 min,吸附 2 h,按仪器工作条件测量吸附前后的吸光度。根据公式(1)计算 MIPs 和 NIPs 的吸附量 Q。

(2) 吸附速率测定

称取 10 mg MIPs 11 份,编号,分别加入浓度为 20 μg/mL 的 OTA 标准溶液 4 mL;吸附时间分别为 0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、8、10、12 min,计算不同吸附时间后 MIPs 的吸附量 Q。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

通过单因素实验考察反应温度、引发剂量、功能单体量、交联剂量对 MIPs 吸附性能的影响。结果发现,当反应温度为 70℃、引发剂量为单体与交联剂总质量的 2%、n(模板):n(单体)=1:6、n(模板):n(交联剂)=1:30 时吸附量最大。

2.2 正交实验

在单因素实验基础上设计正交实验,实验结果

如表 1 所示。

表 1 正交实验表

实验序号	温度/ ℃	n (模板): n (单体)	n (模板): n (交联剂)	引发剂/ %	吸附量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)
1	65	1:5	1:20	1.5	0.1485
2	65	1:6	1:30	2.0	0.1335
3	65	1:7	1:40	2.5	0.0795
4	70	1:5	1:30	2.5	0.2910
5	70	1:6	1:40	1.5	0.1545
6	70	1:7	1:20	2.0	0.0720
7	75	1:5	1:40	2.0	0.2130
8	75	1:6	1:20	2.5	0.2340
9	75	1:7	1:30	1.5	0.1635
K1	0.1205	0.2175	0.1515	0.1555	—
K2	0.1725	0.1740	0.1960	0.1395	—
K3	0.2035	0.1050	0.1490	0.2015	—
R	0.0830	0.1125	0.0470	0.0620	—

由表 1 可直观看出实验 4 是最佳合成条件,即温度为 70°C , n (模板): n (单体): n (交联剂) = 1:5:30, 引发剂为模板与交联剂总质量的 2.5%。

由 K1、K2、K3 可知最优的合成条件为温度 75°C , n (模板): n (单体): n (交联剂) = 1:5:30, 引发剂为模板与交联剂总质量的 2.5%。与直观表现不符,因此以 2 种条件各自重新合成聚合物,再比较两者吸附量的大小。结果如表 2 所示。

表 2 2 种合成条件下聚合物对 OTA 的吸附量

实验序号	温度/ ℃	n (模板): n (单体)	n (模板): n (交联剂)	引发剂/ %	吸附量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)
1	70	1:5	1:30	2.5	0.505
2	75	1:5	1:30	2.5	0.669

由表 2 可知,确定最佳合成条件为温度 75°C 、 n (模板): n (单体): n (交联剂) = 1:5:30、引发剂为模板与交联剂总质量的 2.5%,此时吸附量最大。

2.3 聚合物的表征

2.3.1 傅里叶变换红外光谱

图 2 为 MIPs、NIPs 的红外光谱图。 $3\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 附近为 C—H 的伸缩振动峰, $2\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 附近为 CO_2 的特征峰, $1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ 处为 C=O 的吸收峰, $1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 附近为未反应的 C=C 的伸缩振动吸收峰。通过 MIPs 的红外光谱图可知,大部分的单体

都已经进行了反应,同时 $3\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 附近有一宽的吸收峰,为—OH 的吸收峰。

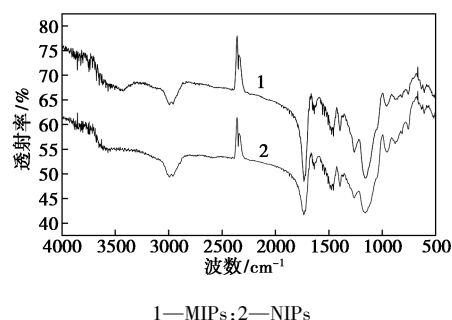


图 2 MIPs、NIPs 的红外光谱图

2.3.2 电镜扫描

根据电镜扫描图像来观察聚合物的表面形态和表面结构。图 3 为 MIPs 放大 400 倍(左)和 2 000 倍(右)的电镜扫描图。

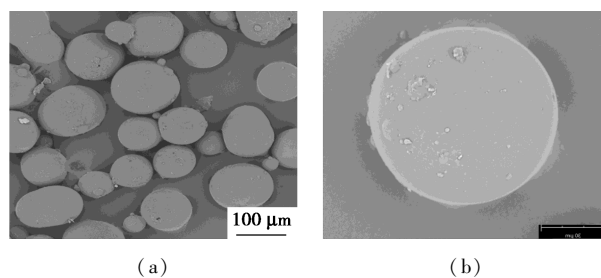


图 3 MIPs 的电镜扫描图

由图 3 左图可以看出,合成的 MIPs 颗粒小且均匀,呈圆球形;从右图可以看出 MIPs 表面结构疏松,有利于吸附。

2.3.3 粒度分析

最优条件下合成 MIPs 的粒度分析如图 4 所示。

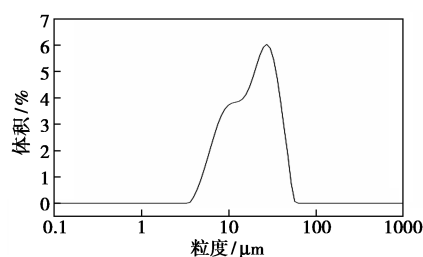


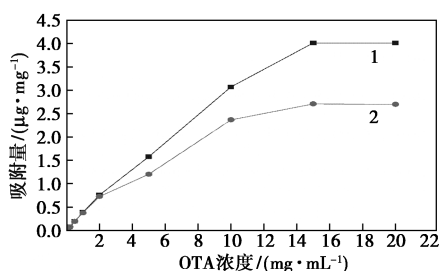
图 4 MIPs 粒度分析图

由图 4 可知,整体来看合成的产物颗粒大小较为均匀,平均粒径为 $15.229\ \mu\text{m}$ 。吸附性能较好,可用作吸附剂。

2.4 聚合物吸附性能测试

2.4.1 等温吸附测定

等温条件下测定 MIPs、NIPs 对不同浓度 OTA 标准溶液的吸附量,绘制等温吸附线,如图 5 所示。



1—MIPs 等温吸附线; 2—NIPs 等温吸附线

图5 MIPs、NIPs 的等温吸附线

由图5可知,当OTA浓度达到15 μg/mL时, MIPs上的特异性识别位点完全被占据,其对OTA的吸附量达到饱和,吸附-解吸达到动态平衡,该浓度下MIPs的吸附量为4.015 μg/mg。由于NIPs不具备特异性识别位点,故不能对OTA进行特异性吸附,因此其对OTA的捕获能力差,从而对OTA的吸附量要明显低于MIPs。NIPs的最大吸附量是2.708 μg/mg。

2.4.2 吸附速率测定

MIPs对OTA的吸附速率曲线如图6所示。

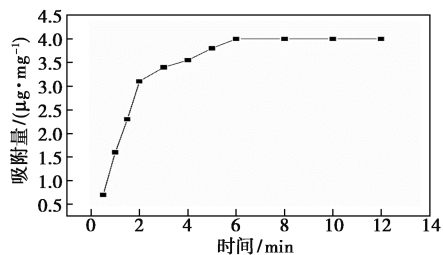


图6 MIPs 的吸附速率曲线

如图6所示,0~2 min时, MIPs上的特异性结合点未被占据,吸附量随着时间迅速增长;2~6 min时, MIPs上特异性识别位点数量逐渐减少,吸附量增长趋向平缓;6 min以后,聚合物达到最大吸附量,聚合物吸附-解吸达到平衡。

3 结论

通过悬浮聚合,与OTA结构类似的靛茜兰为模板分子,合成了靛茜兰MIPs。通过单因素实验和正交实验对印迹聚合物的合成条件进行优化,确定了聚合物的最佳合成条件为:温度为75℃, n (模板): n (单体): n (交联剂)=1:5:30,引发剂量为模板与交联剂总质量的2.5%。通过等温吸附实验、吸附速率实验对聚合物的吸附性能进行测定, MIPs在6 min时达到吸附平衡,最大吸附量为4.015 μg/mg,大于同等条件下NIPs的吸附量,证明MIPs

的吸附性能更加优秀。

参考文献

- [1] 罗爱芹,陈炜杰,张鑫,等.分子印迹磁性荧光复合微球的制备及其性能研究[J].北京理工大学学报,2020,40(10):1126-1132.
- [2] 徐武,付含,陈贵堂.分子印迹技术用于食品中真菌毒素样品前处理的研究进展[J].生物加工过程,2020,18(4):417-424.
- [3] 王露,王芹,宋鑫,等.新型磁性分子印迹聚合物快速萃取-高效液相色谱法测定牛血清白蛋白[J].理化检验(化学分册),2019,55(3):282-286.
- [4] 吴姗姗,魏雍玲,赵丽娟,等.新型磁性限进分子印迹复合材料的制备及富集性能[J].高等学校化学学报,2019,40(6):1150-1157.
- [5] Huang Z P, He J, Li H Y, et al. Synthesis and application of magnetic-surfaced pseudo molecularly imprinted polymers for zearalenone pretreatment in cereal samples[J]. Food Chemistry, 2020, 308: 125696.
- [6] Rui C F, He J, Li Y Y, et al. Selective extraction and enrichment of aflatoxins from food samples by mesoporous silica fdu-12 supported aflatoxins imprinted polymers based on surface molecularly imprinting technique[J]. Talanta, 2019, 201: 342-349.
- [7] Vanderem K J, Steyn P S, Foueie L, et al. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by aspergillus ochraceus with[J]. Nature, 1965, 205(976):1112-1113.
- [8] Malir F, Ostry V, Novoton E. Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data[J]. Toxin Reviews, 2013, 32(2):19-33.
- [9] Pfohl-Leszkowicz A, Manderville R A. An update on direct genotoxicity as a molecular mechanism of ochratoxin A carcinogenicity[J]. Chemical Research in Toxicology, 2012, 25(2):252-262.
- [10] Pfohl-Leszkowicz A, Manderville R A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2007, 51(9):1192-1192.
- [11] Mishra R K, Hayat A, Catanante G, et al. Sensitive quantitation of ochratoxin A in cocoa beans using differential pulse voltammetry based aptasensor[J]. Food Chemistry, 2016, 192:799-804.
- [12] Tsubouchi H, Yamamoto K, Hisada K, et al. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with aspergillus ochraceus[J]. Mycopathologia, 1987, 97(2):111-115.
- [13] Boudra H, Lebars P, Lebars J. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(3):1156-1158.
- [14] Ventura M, Vallejos C, Anaya I, et al. Analysis of ochratoxin A in coffee by solid-phase cleanup and narrow-bore liquid chromatography-fluorescence detector-mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(26):7564-7567.
- [15] Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, et al. Transfer of ochratoxin A into tea and coffee beverages[J]. Toxins, 2014, 6(12):3438-3453.
- [16] Syderr-Rohr I, Schlatter J, Dietrich D R. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans[J]. Archives of Toxicology, 2000, 74(9):499-510. ■