花椒麻味物质替代模板分子印迹聚合物的制备条件探究

李耀[1]，何叶子[1]，陈光静[1,2,3]，阚建全[1,2,3*]
（1.西南大学食品科学学院，重庆 400715；2.重庆市农产品加工与贮藏重点实验室，农业部农产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室（重庆），重庆 400715；3.中匈食品科学联合研究中心，重庆 400715）

摘 要：为制备对花椒麻味物质具有特异性吸附效果的分子印迹聚合物，优化其制备条件，采用紫外光谱法研究甲基丙烯酸（MAA）、丙烯酰胺（AM）、2-乙烯基吡啶（2-Vpy）与替代模板分子（LM）的作用强度、最佳浓度比；以乙二醇二甲基丙烯酸酯（EDMA）为交联剂，乙腈为溶剂，偶氮二异丁腈（AINB）为引发剂，采用本体聚合的方法在不同条件下制备多种分子印迹聚合物（MIPs）；从中选出对花椒麻味物质印迹效果最优的分子印迹聚合物，并用其分离纯化花椒萃取液中的花椒麻味物质，高效液相色谱检测结果表明，MIPs 对花椒麻味物质的吸附容量为(14.64±0.80) mg/g，洗脱液中花椒麻味物质占总峰面积的比例比在花椒萃取液中提高了约 21.95%，即该替代模板分子印迹聚合物对花椒麻味物质具有较好的特异性吸附效果。

关键词：花椒麻味物质；分子印迹聚合物；制备；替代模板

Preparation Conditions of Dummy Molecularly Imprinted Polymers for the numb-taste components of *Zanthoxylum*

LI Yao[1], HE Yezi[1], CHEN Guangjing[1,2,3], KAN Jianquan[1,2,3*]
(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-Products on Storage and Preservation (Chongqing), Ministry of Agriculture, Chongqing Key Laboratory of Produce Processing and Storage, Chongqing 400715, China; 3. Chinese-Hungarian Cooperative Research Centre for Food Science，Chongqing 400715, China)

Abstract: In this work, molecularly imprinted polymers (MIPs) for the numb-taste compounds were prepared by using the molecular structure analogs of acid amides (LM) as dummy template molecule. In order to optimize the preparation conditions of the dummy molecularly imprinted polymer for the numb-taste components of *Zanthoxylum*, UV spectra was applied to study the effect intensity and the optimal concentration ratio between the dummy template and the functional monomer. With ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as the cross-linker, acetonitrile as the pore-foaming agent, 2,2-azobisisobutyronitrile(AIBN) as the initiator, 16 kinds of MIPs were prepared by method of bulk polymerization. Then a best kind of MIPs was chosen out from the several kinds of MIPs to adsorb the numb-taste components from the extraction liquor of *Zanthoxylum* bungeanum, the result showed that the selected MIPs had the specific recognition and selectivity for the numb-taste components of *Zanthoxylum*, the relatively pure numb-taste components of *Zanthoxylum* can be obtained by the MIPs. The results

收稿日期：2017-12-12
基金项目：国家自然科学基金面上项目（31371834）；重庆市现代特色农业调味品产业技术体系创新团队项目（2017[7]号
第一作者简介：李耀（1991—），男，硕士研究生，研究方向为食品化学与营养。E-mail：18306052956@163.com
*通讯作者简介：阚建全（1965—），男，教授，博士，研究方向为食品化学与营养学。E-mail：ganjq1965@163.com

of the research showed that with the dummy template (LM), the MIPs could achieve a good imprinting effect for the numb-taste components. The research also provides an available method for the molecular imprinting technique of substances with similar structural characteristics.

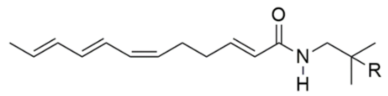
Key words: numb-taste components of *Zanthoxylum*; molecular imprinting polymers; preparation; dummy template

中图分类号： 文献标志码：A 文章编号：

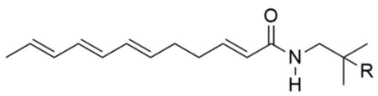
花椒（*Zanthoxylum*）含有多种生理活性成分，如挥发油类、生物碱类和酰胺类物质，目前从花椒中分离纯化得到的酰胺类物质主要是α-山椒素、β-山椒素、γ-山椒素及其羟基山椒素（见图1（a）、1（b）、1（c）），这类酰胺物质被称为花椒麻味物质（HJMS），山椒素是最能代表花椒引起麻刺感的成分，花椒麻味物质具有麻醉、抑菌、祛风除湿、杀虫和抗氧化等功效，具有很好的应用价值[1,2]。花椒麻味物质在空气中不稳定，目前还没有市售的标准品，传统分离纯化方法存在繁琐、成本高等缺点，而花椒麻味物质的结构、性质、含量等方面还有待深入研究，因此迫切需要研究出花椒麻味物质更加高效的分离纯化方法[3,4]。分子印迹技术为花椒麻味物质的分离纯化提供了新的思路。在分子印迹技术中，采用与印迹分子结构相似的化合物作为替代模板分子(dummy template molecular)，可以解决一些印迹分子难获得、溶解性差等问题[5,6]。用替代模板分子制备的分子印迹聚合物对目标印迹分子仍具有较好的印迹效果[7,8]。近些年替代模板分子印迹快速发展，但目前仍未见有关花椒麻味物质的替代模板分子印迹技术的报道。

花椒麻味物质标准品制备过程繁杂、成本高，其分子链上的多个不饱和碳碳双键容易发生共价键化学反应，使花椒麻味物质不易洗脱[9]；为解决上述问题，本实验采用山椒素的结构类似物（LM见图1（d））为分子印迹的替代模板分子（理论分子质量为271），采用本体聚合的方法制备多种花椒麻味物质分子印迹聚合物，从中选出对花椒麻味物质的印迹效果最优的分子印迹聚合物，并用其吸附花椒萃取液中的花椒麻味物质，为高纯度花椒麻味物质的分离纯化奠定基础，同时也为具有类似结构特点的物质的分子印迹技术提供了方法借鉴。

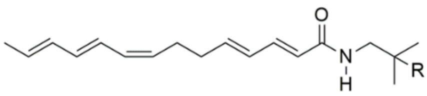
(a)



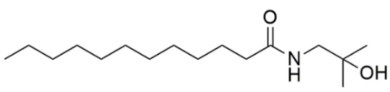
(b)



(c)



(d)



注：Fig.1(a)是α-山椒素（R=H）及羟基-α-山椒素（R=OH），Fig.1(b)是 β-山椒素（R=H）及羟基-β-山椒素（R=OH），Fig.1(c)是γ-山椒素（R=H）及羟基-γ-山椒素（R=OH），Fig.1(d)是替代模板（LM）的分子结构图

图1 花椒麻味物质主要成分及替代模板的分子结构图

Fig.1 Structures of acid amide components identified in pepper and the molecular structure analogs of sanshool acid amide components.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

花椒麻味物质（HJMS）标准品（95%以上），由实验室按照逆流干柱层析法、制备型 HPLC 法等工序制备[10]；替代模板分子（纯度 95%以上），由实验室按照参考文献 Menozzismarrito 提供的方法[11]制备；鲜花椒，重庆凯扬农业有限公司；乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)、2-乙烯基吡啶（2-Vpy）、甲基丙烯酸（MAA）、丙烯酰胺（AM），均为分析纯，阿拉丁公司；偶氮二异丁腈(AIBN)、氯仿、甲醇、冰乙酸、乙腈均为分析纯，成都科隆试剂公司；实验用水为蒸馏水。

1.2 仪器与设备

DSHZ-300 型水浴振荡仪，苏州市培英实验设备有限公司；DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱，上海一恒科学仪器有限公司；Eppendorf 5810 型离心机，艾本德公司；超声波清洗器，上海科导超声仪器有限公司；HH-6 型数显恒温水浴锅，金坛市富华仪器有限公司；HPLC 1260 型高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；CP214 型电子天平，奥豪斯仪器上海有限公司；UV-260 型紫外光谱仪，日本岛津公司；Equinox55 傅里叶变换红外光谱仪，德国 Bruker 公司；HITACHI S-3400N I 型扫描电镜，Hitachi Science Systems；R215 旋转蒸发器，BUCHI 公司。

1.3 方法

1.3.1 替代模板分子与功能单体混合溶液的紫外吸收光谱测定[12]

分别吸取替代模板分子(LM)乙腈溶液 100 μL、功能单体（2-Vpy、AM、MAA）的乙腈溶液 200 μL 及 LM 与功能单体混合物(浓度比为 1:2)于 10mL 比色管中，乙腈定容，超声 10 min 后，于 4℃避光静置 12 h，以乙腈作为参比溶液，在波长 190～400 nm 进行紫外光谱扫描。

1.3.2 不同比例的功能单体与替代模板分子的紫外光谱扫描

固定替代模板分子的乙腈溶液 1 mL 于 10 mL 比色管中，分别加入功能单体（2-Vpy、AM、MAA）的乙腈溶液，使 LM 与功能单体浓度比分别为 1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10，乙腈定容，超声 10 min 后在 4 ℃环境下避光保存 12 h，以相同浓度的功能单体为参比溶液，在 190 nm-400 nm 范围内进行紫外光谱扫描。

1.3.3 花椒麻味物质分子印迹聚合物的制备

分子印迹聚合物的不同聚合条件见表 1。以试验组编号 1 为例，聚合物的制备过程具体如下[14]：称取 67.75 mg (0.25 mmol)替代模板分子于 50 mL 圆底烧瓶中，加入 12 mL 乙腈溶解，然后加 1 mmol 功能单体 MAA，超声 30min，使其充分溶解，5℃避光放置过夜，使模板分子和功能单体充分作用；加入 4 mmol 交联剂 EDMA 和 10 mg 引发剂 AIBN，充分溶解后，向混合液中通氮气 20min，使瓶内保持惰性氛围，并在氮气保护下用封口膜密封烧瓶；于 50℃恒温水浴锅内热引发聚合 4 h 后再于 60℃恒温水浴锅内热引发聚合 20 h，得乳白色块状聚合物，将聚合物反复研磨，过 200 目标准检验筛；用丙酮自然沉降 3 次，弃去上层浊液，以除去聚合物中过细小的粒子；将沉淀物真空干燥后，以甲醇-乙酸(9:1，V/V)为洗脱液进行索氏提取，直至索氏提取器内溶液不含替代模板分子为止；再用甲醇反复洗涤聚合物以去除乙酸，将处理好的分子印迹聚合物放置于真空干燥箱内，40℃干燥至恒重，待用。花椒麻味物质替代模板分子印迹聚合物(MIPs)，记为：MIPs l～MIPs 16。

作为对照，实验制备了空白印迹聚合物(NIPs)，其制备方法与 MIPs 的步骤相同，只是在聚合过程中不加入替代模板分子[15]，记为：NIPs l～NIPs 16。

表 1 聚合物的制备条件

Table.1 Conditions of preparation for polymers

试验组编号	功能单体	在模板分子取 0.25 mmol 的基础上，n(模板分子):n(功能单体):n(交联剂)	溶剂乙腈 /（mL）	聚合温度 /（℃）
1	MAA	n(LM):n(MAA):n(EDMA)=1:4:16	12	A

2	AM	n(LM):n(AM):n(EDMA)=1:4:16	12	A
3	2-Vpy	n(LM):n(2-Vpy):n(EDMA)=1:4:16	12	A
4	2-Vpy	n(LM):n(2-Vpy):n(EDMA)=1:2:16	12	A
5	2-Vpy	n(LM):n(2-Vpy):n(EDMA)=1:3:16	12	A
6	2-Vpy	n(LM):n(2-Vpy):n(EDMA)=1:5:16	12	A
7	2-Vpy	n(LM):n(2-Vpy):n(EDMA)=1:6:16	12	A
8	2-Vpy	n(LM):n(2-Vpy):n(EDMA)=1:4:12	12	A
9	2-Vpy	n(LM):n(2-Vpy):n(EDMA)=1:4:20	12	A
10	2-Vpy	n(LM):n(2-Vpy):n(EDMA)=1:4:24	12	A
11	2-Vpy	n(LM):n(2-Vpy):n(EDMA)=1:4:28	12	A
12	2-Vpy	n(LM):n(2-Vpy):n(EDMA)=1:4:20	8	A
13	2-Vpy	n(LM):n(2-Vpy):n(EDMA)=1:4:20	16	A
14	2-Vpy	n(LM):n(2-Vpy):n(EDMA)=1:4:20	12	B
15	2-Vpy	n(LM):n(2-Vpy):n(EDMA)=1:4:20	12	C
16	2-Vpy	n(HJMS):n(2-Vpy):n(EDMA)=1:4:20	12	A

注：聚合温度条件 A：50℃水浴中反应 4 h 后，60℃继续反应 20h；B：55 ℃水浴中反应 24h；C：60℃水浴中反应 24 h。引发剂 AIBN 的用量均为 10 mg。

1.3.4　花椒麻味物质高效液相色谱检测条件及标准曲线[16]

HPLC 色谱检测条件：色谱柱-Agilent EclipseXDB-C18（5μm，4.6mm×250mm），流动相-甲醇：水（60:40，v/v），流速-1mL/min，保留时间 15min，进样量 10 μL，柱温 40℃，紫外检测波长 254 nm。配制 0.01~0.4 mg/mL 的花椒麻味物质标准溶液，高效液相色谱检测该系列标准溶液，以三次检测结果中目标峰的平均面积（y）对浓度（x，mg/mL）绘制标准曲线，花椒麻味物质标准曲线的线性回归方程：Y=17765X+125（R^2=0.999）。

1.3.5　分子印迹聚合物的静态吸附试验

称取 50 mg 替代模板分子印迹聚合物，置于 20mL 具塞锥形瓶中，加入 8mL 的一定质量浓度的 HJMS 氯仿溶液，于振荡器上 25℃下 150 r/min 振荡 12 h 后，倒入 10mL 离心管中 6000 r/min 离心 5min，移取适量上层清液，微孔滤膜过滤后，高效液相色谱检测 HJMS 浓度，差减法计算该聚合物对 HJMS 的吸附量 Q[17]，计算公式见式（1），

$$Q=(C_1-C_0)V/M \qquad (1)$$

其中：Q 为替代模板分子印迹聚合物的吸附量(mg/g)；C_1 为氯仿溶液中 HJMS 的原始浓度(μg/mL)，C_0 为吸附后上层清液中 HJMS 的浓度(μg/mL)；V 为所用氯仿溶液的体积(mL)；M 为印迹聚合物的重量(g)。

分子印迹研究中通常用 Q_{MIP} 表示吸附容量，特异因子 α 表示印迹效果。特异结合量定义为式(2)：

$$\Delta Q=Q_{MIP}-Q_{NIP} \qquad (2)$$

特异因子定义为式(3)：

$$\alpha=Q_{MIP}/Q_{NIP} \qquad (3)$$

式中：α 为特异因子；Q_{MIP} 为 MIPs 的吸附容量；Q_{NIP} 为 NIPs 的吸附容量。

1.3.6　花椒麻味物质分子印迹聚合物的红外表征[18]

称取 MIPs 和 NIPs 各 10 mg，1000 mg 溴化钾，研磨充分后于 100℃下恒重，经压片后，在 IR Equinox55 型傅里叶变换红外光谱仪上进行测定（扫描范围 400 cm^{-1}～4000 cm^{-1}）。

1.3.7　MIPs 对花椒中花椒麻味物质的分子印迹验证试验

取 1.0 g 粉碎后的花椒粉末置于 75 mL 氯仿中，于 35 ℃下 150 r/min 震荡提取 12 h，再将其转移到分液漏斗中，振摇 2 min，静置分层后，收集氯仿萃取液，定容于 100 mL 容量瓶中。称取 250 mg MIPs，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，加入 30 mL 的上述萃取液，于振荡器上 25 ℃下 150 r/min 振荡 5 h 后，

转入 10 mL 离心管中 6000 r/min 离心 5 min，收集固体沉淀物，以甲醇为洗脱液对固体沉淀物索氏抽提 24 h，将洗脱液浓缩至 100 mL，高效液相检测洗脱液中花椒麻味物质的含量[19]。

1.3.8　数据处理方法

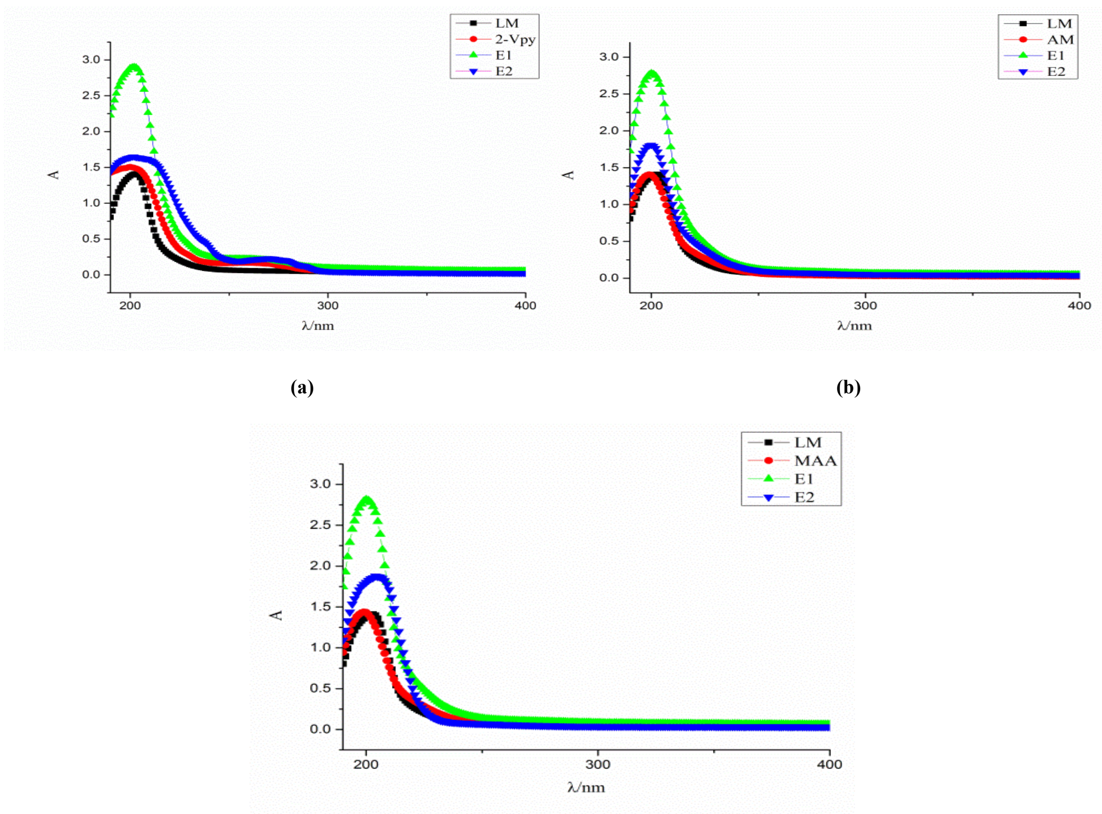
每组实验重复 3 次，用 origin8.0 和 excel 2003 处理实验数据并作图，结果以“平均值±标准方差”来表示。

2　结果与分析

2.1　单体与替代模板分子的紫外光谱分析

根据吸光值加和性，若溶液中各个组分彼此间不发生作用，则吸光度就等于该溶液中各个组分的吸光度之和，即混合物的理论吸光值，而该混合物的实际吸光值为该混合物溶液在该波长下实测的紫外吸光值，理论吸光值与实际测量值差值越大，表明二者相互作用也越大。

从图 2 可以看出，(a)、(b)、(c)的理论吸光值（E1）均大于实际测量值（E2），说明替代模板分子与功能单体间发生了相互作用，原因是替代模板分子上存在着酰基和羟基，与功能单体形成氢键[20]。LM-MAA 实测值与理论值差值为 0.937±0.095，LM-AM 实测值与理论值差值为 0.977±0.101，LM-2Vpy 实测值与理论值差值为 1.248±0.138，从差值上可以看出 LM 与 2-Vpy 相互作用最大，理论上说，用 2-Vpy 为功能单体合成的分子印迹聚合物具有更好的稳定性和特异性识别能力[21]。



(a)　(b)

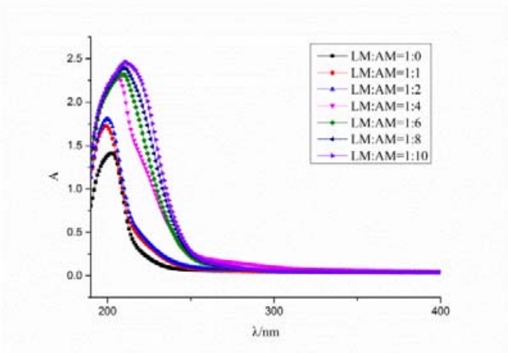
(c)

注：(a)、(b)、(c)分别表示以乙腈作为参比溶液，替代模板分子(LM)与 2-Vpy、AM、MAA 三种功能单体紫外吸收光谱，其中 E1 为混合物理论吸光值；E2 为混合物实际测定吸光值。

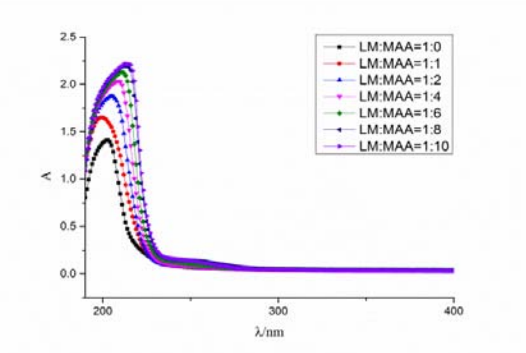
图 2　替代模板分子、功能单体及其混合物的紫外吸收光谱

Fig.2　Ultraviolet absorption spectra of LM, functional monomer and their mixture

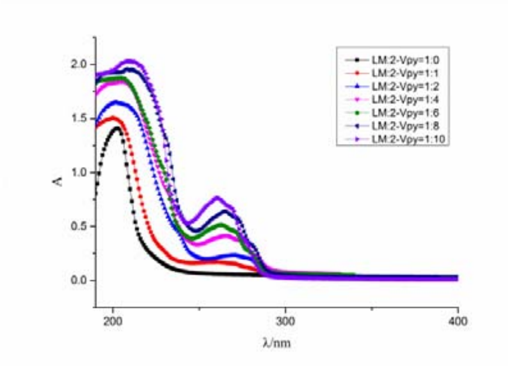
由图 3 中(a)、(b)、(c)可知，随着加入功能单体量的提高，替代模板分子和功能单体混合体系的最大吸收峰的吸光值呈上升趋势，这是因为替代模板分子 LM 上的（-NH-）、（C=O）和（-OH）基团与三种功能单体上含有的助色团和生色团相连，产生电子跃迁，使混合体系的最大吸收峰的吸光值增加，同时使最大吸收峰向长波长方向移动，这说明随着功能单体的加入，替代模板分子与相应的功能单体通过氢键生成了新的复合物，而该复合物的稳定性直接影响分子印迹聚合物的吸附效果[22]。吸光值变化趋于平缓时，说明混合物体系趋于稳定，此时进入平缓区的转折点所对应的混合物比例是最佳的配比[23]，从图 3(d)可看出，替代模板分子与 MAA、AM、2-Vpy 在对应浓度比超过 1:4 之后吸光值变化均较之前更加平缓，可推断 n(替代模板)∶n(功能单体)=1:4 时的浓度比可能是聚合的较佳比例。



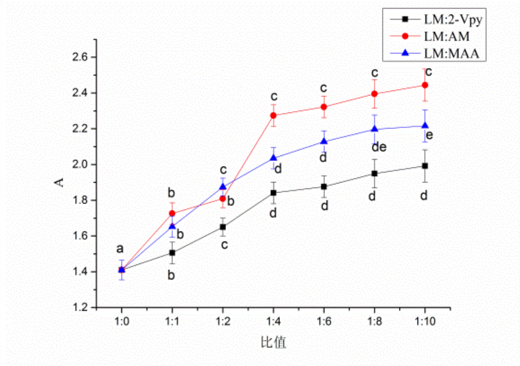
(a)



(b)



(c)



(d)

注：(a)、(b)、(c)分别表示不同比例 AM、MAA、2-Vpy 混合物测得的紫外光谱；(d)为图(a)、(b)、(c)中混合物最大吸收波长对应的吸光值，(d)中不同字母表示与其它数据点的值间存在显著差异($p<0.05$)，相同字母表示与其它数据点的值间不存在显著差异($p>0.05$)。

图 3　不同比例功能单体对预组装体系紫外光谱的影响

Fig.3　Effect of different ratio functional monomer on ultraviolet spectrum of the assembling system

差示紫外光谱扫描与不同比例的功能单体加入量的紫外光谱扫描试验方法类似，仅将参比溶液换成相同浓度的替代模板分子溶液。LM 与 2-Vpy 相互作用最大，故选择 LM-2-Vpy 组装体系进行差示紫外光谱分析，由于功能单体 2-Vpy 与替代模板分子以及其主客体复合物最大吸收波长在 206 nm 处，参照文献[24]，模板分子与功能单体反应公式可以推导整理为：

错误!未找到引用源。 $= K\Delta\varepsilon a_0 l - K\Delta A$

其中，n 表示替代模板分子 LM 和功能单体 2-Vpy 的结合比例(n =1，2，3…)，b_0为 2-Vpy 的浓度，a_0为 LM 的浓度，ΔA 为 LM 与 LM-2-Vpy 混合物的紫外吸收差值，K 为反应平衡常数。以 ΔA/**错误!未找到引用源。错误!未找到引用源。**对 ΔA 作图，可以推导出 n 值，从而得知在乙腈溶液中替代模板分子与功能单体的作用模式，进而揭示分子印迹作用机理。以 ΔA/**错误!未找到引用源。**对 ΔA 做图发现，浓度比为 1:1、1:2 时并没有出现很好的线性关系，这是由于推导反应公式的假设条件为 $b_0 \gg a_0$，即功能单体加入量远大于模板分子，这两种浓度并不满足上述假设条件。因此作线性关系图 4 时舍弃这 2 种比例。

从图 4 中可以看出当 n=3 时，ΔA/**错误!未找到引用源。**对 ΔA 做图可以拟合成一条直线(R^2=0.963)；当 n=4 时，ΔA/**错误!未找到引用源。**对 ΔA 做图也可以拟合成一条直线（R^2=0.974)，这说明在研究的浓度范围内主客体主要存在形式为 1 个替代模板分子与 3 个或者 4 个 2-Vpy 分子发生作用，即一个替代模板分子周围至少需要 3 个 2-Vpy 功能单体才能形成稳定的复合物[25]。

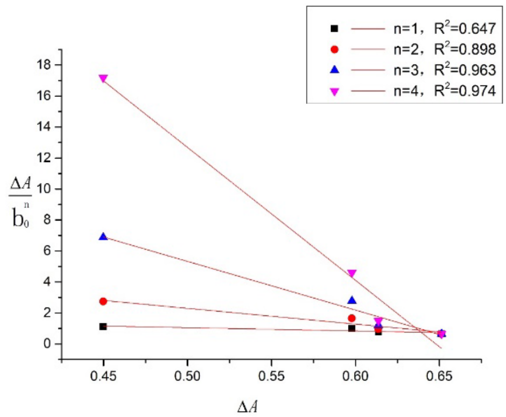


图 4　206 nm 处 ΔA/错误!未找到引用源。 对 ΔA 的关系图

Fig.4　Plots of ΔA/错误!未找到引用源。 versus ΔA at 206 nm

2.2　不同制备条件对分子印迹聚合物的分子印迹效果的影响

由表 2 可知：MIP 1、MIP 2、MIP 3 对 HJMS 的吸附容量的大小关系为 MIPs 3>MIPs 2>MIPs l，其特异性吸附效果也呈此趋势，即 $\alpha_3>\alpha_2>\alpha_1$。说明以 2-Vpy 为功能单体时，MIPs 3 对 HJMS 的印迹效果最好，这与功能单体和替代模板分子的紫外光谱分析的结果吻合。

MIPs 3~MIPs 7 对 HJMS 的吸附容量的大小为 MIPs 7>MIPs 6>MIPs 3>MIPs 5>MIPs 4，其特异性吸附效果为 $\alpha_3>\alpha_5>\alpha_6>\alpha_4>\alpha_7$，说明 n(替代模板): n(2-Vpy)=1:4 时 MIPs 的印迹效果最好，这与紫外光谱分析研究替代模板和功能单体相互作用的结果吻合。

MIPs 8~MIPs 11 和 MIP 3 对 HJMS 的吸附容量的大小关系为 MIPs 9>MIPs 3>MIPs 10>MIPs 11>MIPs 8，其特异性吸附效果为 $\alpha_9>\alpha_3>\alpha_8>\alpha_{10}>\alpha_{11}$，随着交联剂用量增大，吸附量先增大而后减少，非特异性吸附一直增大，这是因为交联剂过量时，易发生自聚，使所得聚合物内的非特异性吸附位点增多，从而造成非特异性吸附量增大[26]，因此实验选择功能单体和交联剂摩尔比为 n(2-Vpy):n(EDMA)=4:20。

MIPs 9、MIPs 12 和 MIPs 13 的实验结果显示，MIPs 9 对 HJMS 的吸附容量和特异性吸附效果最好，这是由于溶剂用量较小时，溶液中各组分浓度较大，这会使功能单体复合物被网络包裹的程度过

于致密，致孔剂不能充分进入聚合物网络形成大孔结构；溶剂的用量较大时，反应溶液浓度较低，自由基引发聚合反应速度减慢，延长了聚合反应的时间[17]。MIPs 9、MIPs 14 和 MIPs 15 的结果表明，其他条件相同时，温度 A 条件下制备的 MIPs 9 对 HJMS 的印迹效果最好。

MIPs 9、MIPs 16 对 HJMS 的吸附容量的大小关系为 MIPs 9>MIPs 16，其特异因子 α 也呈此趋势，即 MIPs 9 的印迹效果优于 MIPs 16，这是因为聚合反应制备 MIPs 的过程中，花椒麻味物质上的碳碳双键容易与交联剂发生共价键化学反应而形成大分子结构，使花椒麻味物质没有被洗脱完全，从而造成花椒麻味物质的再吸附时印迹孔穴的浪费和印迹位点利用率不高[9]。

综上所述，试验组编号 9 的分子印迹效果最好，在上述条件下制备分子印迹聚合物 MIPs 进行红外表征和吸附性能试验研究。

表 2　不同制备条件的分子印迹聚合物的分子印迹效果

Table 2　Imprinting effect of polymer by different conditions of preparation

试验组编号	Q_{MIP} / mg/g	Q_{NIP} / mg/g	ΔQ / mg/g	α
1	7.35±0.75^{a}	4.72±0.31^{a}	2.45±0.53^{a}	1.50±0.10^{a}
2	9.12±0.80^{b}	5.64±0.50^{ab}	3.48±0.78^{b}	1.62±0.16^{a}
3	12.60±0.97^{c}	5.91±0.51^{b}	6.69±0.71^{c}	2.13±0.14^{b}
4	5.76±0.48^{a}	3.84±0.74^{a}	1.92±0.67^{a}	1.53±0.23^{a}
5	8.47±0.99^{b}	4.95±0.50^{b}	3.52±0.52^{b}	1.71±0.05^{a}
6	14.05±0.80^{d}	8.39±0.36^{c}	5.66±0.43^{c}	1.67±0.03^{a}
7	14.64±0.94^{d}	9.75±0.52^{d}	4.88±0.51^{d}	1.50±0.04^{a}
8	11.66±1.45^{a}	5.57±0.42^{a}	6.08±1.17^{bc}	2.09±0.18^{b}
9	15.42±0.78^{b}	6.11±0.45^{a}	9.31±0.34^{d}	2.53±0.07^{c}
10	12.46±1.01^{a}	7.98±0.51^{b}	5.63±0.42^{b}	1.71±0.02^{a}
11	11.93±1.02^{a}	8.24±0.41^{b}	3.69±0.60^{a}	1.45±0.05^{a}
12	10.68±0.79^{a}	5.14±0.46^{a}	5.54±0.88^{a}	2.08±0.25^{a}
13	15.40±0.81^{b}	6.15±0.49^{b}	9.25±0.31^{b}	2.51±0.07^{b}
14	11.52±0.93^{a}	6.16±0.37^{a}	5.36±0.83^{a}	1.88±0.25^{a}
15	13.95±0.87^{b}	6.37±0.37^{a}	7.40±0.89^{b}	2.19±0.23^{b}
16	12.52±0.90^{b}	6.30±0.43^{a}	6.22±0.66^{b}	2.05±0.08^{b}

注：同列不同字母表示与其它数据值间存在显著差异($p<0.05$)，同列相同字母表示与其它数据值间不存在显著差异($p>0.05$)。

2.3　MIPs 对花椒麻味物质印迹前后的红外光谱分析

图 5 中 c 为 NIPs 的红外光谱图，b 为洗脱后 MIPs 的红外光谱图，a 为洗脱前 MIPs 的红外光谱图。曲线 a 和 b、c 的出峰位置很相近，但仍存在很多差异，曲线 a、b、c 在 2965 cm^{-1} 附近的双峰是功能单体 2-Vpy 中吡啶环上的 C-H 伸缩振动峰，a 在此处的峰型明显区别于 b 和 c，这是因为替代模板分子上的酰基与 2-Vpy 发生相互作用，形成氢键而缔合于 SMIP 上，曲线 a 在 1540 cm^{-1} 处和 1635 cm^{-1} 处比 b 和 c 的强度弱，这主要是替代模板分子上的仲酰胺 N-H 和 C=O 反式存在的吸收峰产生[27]，曲线 a 在 2853 cm^{-1} 处的峰是替代模板分子上的饱和 C-H 伸缩振动，曲线 a 与 b、c 的这些差异说明替代模板分子已经通过氢键结合在了 MIPs 上[28]；曲线 b 和 c 几乎没有差别，这说明替代模板分子已经完

全被洗脱下来[29,30]。

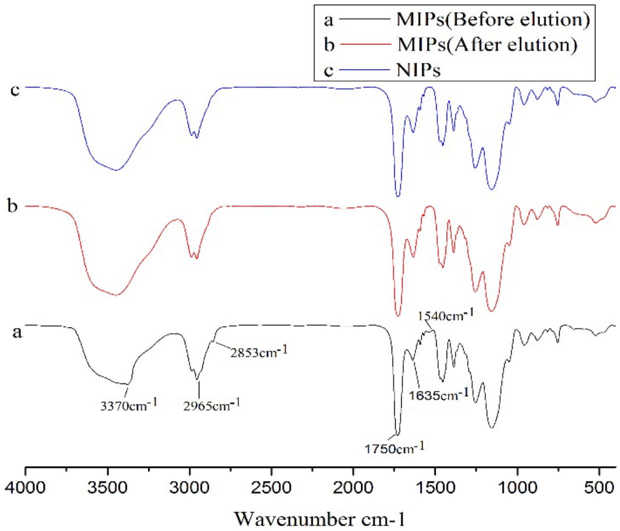
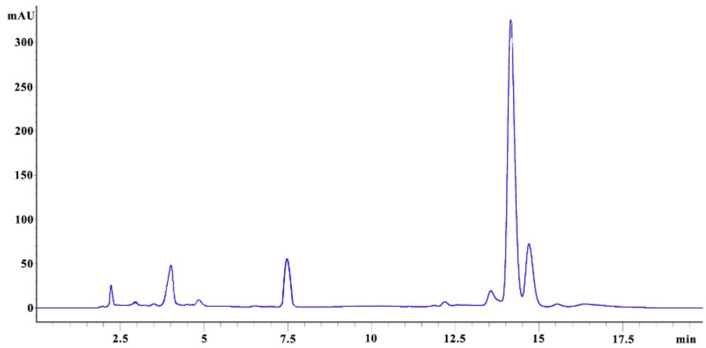


图 5 MIPs 和 NIPs 的红外光谱图

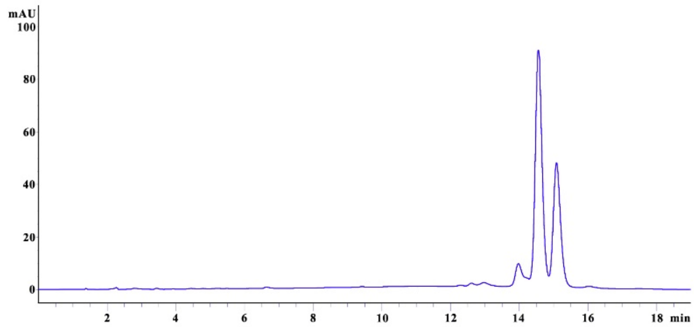
Fig.5 IR spectra of non-imprinted polymers and molecularly imprinted polymers

2.4 MIPs 对花椒中花椒麻味物质的分子印迹验证试验

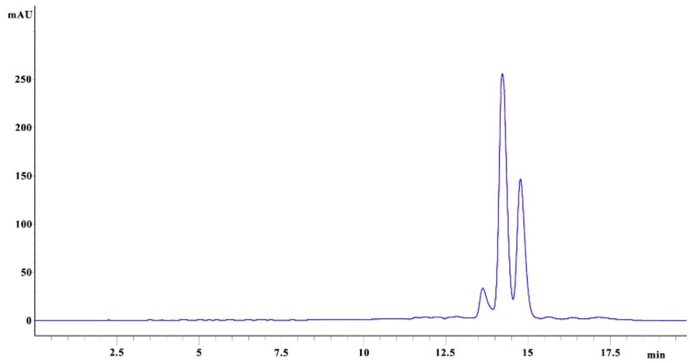
由图 6 可知，甲醇洗脱液与花椒麻味物质标准品的峰型及出峰时间一致，可确证分离纯化出的物质主要成分是花椒麻味物质；花椒萃取液中花椒麻味物质的峰面积占总峰面积的(72.65±1.27%)，MIPs 的甲醇洗脱液中花椒麻味物质占总峰面积的(94.60±1.52%)，花椒麻味物质占总峰面积的比例提高了约 21.95%；同时，高效液相检测到浓缩的甲醇洗脱液中花椒麻味物质的含量为(34.2±3.1) μg/mL，经计算 MIPs 对花椒的氯仿萃取液中花椒麻味物质的吸附容量为(14.64±0.80) mg/g。结果表明，MIPs 对花椒萃取液中的花椒麻味物质有较强的特异性吸附能力[31]。



(a) 花椒萃取液的 HPLC 图



(b) 甲醇洗脱液的 HPLC 图



(c) HJMS 标准品的 HPLC 图

图 6 花椒萃取液、甲醇洗脱液及花椒麻味物质标准品的高效液相色谱图

Fig.6 HPLC diagram of the sample solution of fresh prickly ash, the effluent through SMIP-SPEC and sanshool acid amide compounds standard.

3 结论

取 LM 替代模板 0.25 mmol，以 2-Vpy 为功能单体，替代模版、功能单体、交联剂用量的比为 1:4:20，乙腈 12 mL，AIBN 10 mg，在 50 ℃恒温水浴聚合 4 h 后再在 60 ℃恒温水浴聚合 20 h，该条件下合成的 MIPs 对 HJMS 具有较好的特异性吸附效果；在该条件下制备的分子印迹聚合物可以吸附花椒萃取液中的花椒麻味物质，吸附容量达到(14.64±0.80) mg/g。实验结果表明：(1) 分子印迹技术可以应用于花椒麻味物质标准品的分离纯化。(2) 采用替代模板分子，能够制备出对花椒麻味物质具有较强印迹效果的分子印迹聚合物。(3) 本研究为具有该分子结构特点物质的分子印迹聚合物的制备提供了方法借鉴，同时也对花椒麻味物质的研究和应用有借鉴价值。

参考文献：

[1] 张敬文，赵镭，史波林，等．花椒果皮中化学成分的研究[J]. 华西药学杂志，2016, 31(2): 109-112. DOI: 13375/j.cnki.wcjps.2016.02.001.

[2] X YANG. Aroma constituents and alkylamides of red and green huajiao (*Zanthoxylum* bungeanum and Zanthoxylum schinifolium)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(5): 1689-1696. DOI: 10.1021/jf0728101.

[3] TEZUKA Y, IRIKAWA S, KANEKO T, et al. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2001, 77(2/3): 209-217. DOI.org/10.1016/S0378-8741(01)00300-2.

[4] Shi WANG, Jianchun XIE, Wei YANG, et al. Preparative separation and purification of alkylamides from *Zanthoxylum bungeanum* maxim by high-speed counter-current chromatography[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2011, 34(20): 2640-2652. DOI.org/10.1080/10826076.2011.593219.

[5] 许志刚，刘智敏，杨保民，等. 替代模板分子印迹技术在样品前处理中的应用[J]. 化学进展,2012, 24(8): 1592-1598.

[6] 张红武，郭建文，李康，等. 以局部结构类似物为类模板的分子印迹整体柱在线检测三甲氧苄啶[J]. 分析化学，2012, 40(5): 699-704. DOI: 10.3724/SP.J.1096.2012.11085.

[7] Dan YU, Xiaolei HU , Shoutai WEI, et al. Dummy molecularly imprinted mesoporous silica prepared by hybrid Imprinting method for solid-phase extraction of bisphenol A[J]. Journal of Chromatography A, 2015, 1396: 17–24. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.04.006.

[8] 宋兴良，王爱香，刘晓泓，等. 虚拟模板分子印迹微球的制备及其对水中微囊藻毒素的吸附性能[J]. 环境化学，2016, 35(3):

451-459. DOI: 10.7524/j.issn.0254?6108.2016.03.2015021301.
[9] 权英，孙静，沈阳，等. 丙烯酰胺分子印迹聚合物的制备及性能研究[J]. 食品与发酵工业，2010(12): 177-180. DOI：10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2010.12.007.
[10] 罗凯，胡江，黄秀芳，等. 花椒麻味物质的提取分离及其组分分析[J]. 食品科学，2013, 34(24): 88-91. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201324018.
[11] C MENOZZISMARRITO, CE RIERA, C MUNARI, et al. Synthesis and Evaluation of New Alkylamides Derived from α-Hydroxysanshool, the Pungent Molecule in Szechuan Pepper[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry , 2009 , 57 (5) : 1982-1989. DOI: 10.1021/jf803067r.
[12] 高文惠，高林，刘博，等. 制备戊唑醇分子印迹聚合物前功能单体的选择[J]. 中国食品学报，2015, 15(6): 173-177. DOI：10.16429/j.1009-7848.2015.06.024.
[13] 黄雨杰，朱秋劲，赵晓联. 紫外光谱与密度泛函理论在亚精胺分子印迹预组装体系中的研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2014, 41(4): 48-54.
[14] Xiuli MA, Wenhua JI, Lingxiao CHEN, et al. Molecularly imprinted polymers with synthetic dummy templates for the preparation of capsaicin and dihydrocapsaicin from chili peppers[J]. Journal of Separation Science, 2015, 38(1): 100–107. DOI: https://doi.org/10.1002/jssc.201400911.
[15] J SUN, N PENG, WX AO, et al. Preparation and Binding Characteristics of Molecularly Imprinted Polymers for Capsaicin[J]. Advanced Materials Research, 2012, 430-432(4): 582-585. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.430-432.582.
[16] 杜文倩，史波林，欧克勤，等. 基于麻味物质构成特征的红花椒高效液相色谱指纹图谱建立研究[J]. 食品安全质量检测学报，2016, 7(3): 1138-1144.
[17] 王尊臣，于宁海，单伟光，等. 辣椒素分子印迹聚合物的制备及其在固相萃取中的应用[J].食品科学，2013, 34(12): 45-50. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201312010.
[18] MT LI, YY ZHU, L LI, et al. Molecularly imprinted polymers on a silica surface for the adsorption of tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke[J]. Journal of Separation Science, 2015, 38(14): 2551-2557.DOI: 10.1002/jssc.201500193.
[19] 王洪伟，罗凯，黄秀芳，等. 不同方法定量检测花椒油中花椒麻味物质的效果比较研究[J]. 食品工业科技，2014, 35(7): 272-275. DOI：10.13386/j.issn1002-0306.2014.07.005.
[20] 张丽影，赵小菁，齐小辉，等. 分子印迹聚合反应中致孔剂选择的紫外光谱分析[J]. 光谱实验室，2012, 29(1): 51-53. DOI: 10.3969/j.issn.1004-8138.2012.01.011.
[21] 王车礼，赵兴丽，方磊，等. 对羟基苯甲酸分子印迹聚合物合成功能单体选择与分子识别性能[J]. 化工学报，2011, 62(7): 1938-1943. DOI: 10.3969/j.issn.0438-1157.2011.07.023.
[22] 尹小英，衷友泉，江一帆，等. 分子印迹聚合反应中功能单体与模板分子间作用力的光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析，2010, 30(8): 2211-2214. DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)08-2211-04.
[23] 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.
[24] 杨卫海，严守雷，卫晨，王清章. 沉淀聚合法制备三聚氰胺分子印迹聚合物微球[J]. 高分子学报, 2010, 1(10): 1163-1169.
[25] 严守雷，高志贤，房彦军. 农药久效磷分子印迹聚合物合成及其亲合性评估[J]. 高分子学报, 2006, 1(01): 160-163.
[26] Shahana S KHURSHID, Christine E SCHMIDT, Nicholas A PEPPAS. Optimization of Molecularly Imprinted Polymers of Serotonin for Biomaterial Applications[J]. Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, 2011, 22(1-3): 343-362. DOI: 10.1163/092050610X486955.
[27] R Gutiérrezclimente, A Gómezcaballero, M Halhalli, et al., Iniferter-mediated grafting of molecularly imprinted polymers on porous silica beads for the enantiomeric resolution of drugs[J]. Journal of Molecular Recognition, 2016, 29(3): 106-114. DOI: 10.1002/jmr.2443.
[28] 王明华，曲荣君，纪春暖，等. 含酰胺结构的硅胶键载二乙烯三胺螯合微粒的合成及其吸附性能[J]. 离子交换与吸附，2008, 24(5): 408-417. DOI：10.16026/j.cnki.iea.2008.05.003.
[29] CM LEU, A Zhenwei WU, KH WEI. Synthesis and Properties of Covalently Bonded Layered Silicates/Polyimide (BTDA-ODA) Nanocomposites[J]. Chemistry of Materials, 2002, 14(7): 3016-3021. DOI: 10.1021/cm0200240.
[30] H YU, Z CHEN, Y FU, et al. Synthesis and optimization of molecularly imprinted polymers for quercetin[J]. Polymer International,

2012, 61(6):1002–1009. DOI: 10.1002/pi.4172.

[31] J YANG, Y LI, J WANG, et al. Molecularly imprinted polymer microspheres prepared by Pickering emulsion polymerization for selective solid-phase extraction of eight bisphenols from human urine samples[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 872: 35-45. DOI: 10.1016/j.aca.2015.02.058.