

花椒麻味物质替代模板分子印迹聚合物的制备

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、丙烯酰胺、2-乙烯基吡啶与替代模板分子的作用强度、最佳物质的量比; 以乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 乙腈为溶剂, 偶氮二异丁腈为引发剂, 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; 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, 最优分子印迹聚合物对花椒麻味物质的吸附量为(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 of Dummy Molecularly Imprinted Polymers for Numb-Taste Components of *Zanthoxylum bungeanum*

LI Yao¹, HE Yezi¹, 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) with specific binding affinity for the numb-taste compounds of *Zanthoxylum bungeanum* were prepared by using structural analogs of alkyl amides (LM) as dummy template molecule. In order to optimize the preparation conditions, UV spectroscopy was applied to study the effect of intensity of interaction and molar ratio between dummy template and functional monomers. With ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as the cross-linker, acetonitrile as the pore-foaming agent, 2,2-azobisisobutyronitrile (AIBN) as the initiator, 16 MIPs were prepared by bulk polymerization and the best MIP was selected and used to separate numb-taste compounds from the extract of *Z. bungeanum*. The results showed that the selected MIP had specific recognition and selectivity for the numb-taste components and exhibited an adsorption capacity of (14.64 ± 0.80) mg/g as determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The peak area percentage of numb-taste component increased by approximately 21.95% after adsorption by the MIP.

Keywords: numb-taste components of *Zanthoxylum bungeanum*; molecular imprinting polymers; preparation; dummy template

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201816039

中图分类号: S188

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2018)16-0273-07

引文格式:

李耀, 何叶子, 陈光静, 等. 花椒麻味物质替代模板分子印迹聚合物的制备[J]. 食品科学, 2018, 39(16): 273-279.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201816039. <http://www.spkx.net.cn>

LI Yao, HE Yezi, CHEN Guangjing, et al. Preparation of dummy molecularly imprinted polymers for numb-taste components of *Zanthoxylum bungeanum*[J]. Food Science, 2018, 39(16): 273-279. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201816039. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2017-12-12

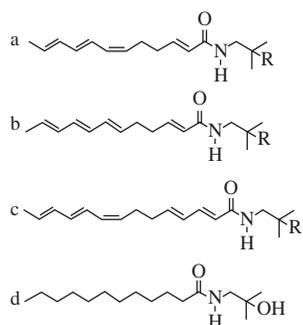
基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31371834); 重庆市现代特色农业调味品产业技术体系创新团队项目(2017[7]号)

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学。E-mail: 18306052956@163.com

*通信作者简介: 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

花椒 (*Zanthoxylum bungeanum*) 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 (图1), 这类酰胺物质被称为花椒麻味物质 (numb-taste components of *Z. bungeanum*, NTCZB), 山椒素是最能代表花椒引起麻刺感的成分。NTCZB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]。但NTCZB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NTCZB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NTCZB更加高效的分离纯化方法^[3-4]。分子印迹技术为NTCZB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, 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 (molecular imprinting polymers, MIPs) 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技术快速发展, 但目前鲜见有关采用替代模板分子制备NTCZB的MIPs相关报道。

NTCZB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NTCZB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 (molecular structural analogs of alkyl amides, LM, 见图1d) 为NTCZB分子印迹的替代模板分子 (理论相对分子质量为271), 采用本体聚合的方法制备多种NTCZB的MIPs, 从中选出对NTCZB的印迹效果最优的MIPs, 并用其吸附花椒萃取液中的NTCZB, 为高纯度NTCZB的分离纯化奠定基础, 同时也为具有类似结构特点物质的分子印迹技术提供方法借鉴。



a. α -山椒素 (R=H) 及羟基- α -山椒素 (R=OH); b. β -山椒素 (R=H) 及羟基- β -山椒素 (R=OH); c. γ -山椒素 (R=H) 及羟基- γ -山椒素 (R=OH); d. LM。

图1 NTCZB主要成分及LM的分子结构图

Fig. 1 Molecular structures of numb-taste components of *Z. bungeanum* and structural analogs of alkyl amides

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

NTCZB标准品 (纯度 $>95\%$), 由实验室按照逆流干柱层析法、制备型高效液相色谱法等工序制备^[10]; LM (纯度 $>95\%$) 由实验室按照Menozzismarrito等^[11]提供的方法制备; 鲜花椒 重庆凯扬农业有限公司; 乙二醇二甲基丙烯酸酯 (ethylene glycol dimethacrylate, EDMA)、2-乙烯基吡啶 (2-vinylpyridine, 2-Vpy)、甲基丙烯酸 (methacrylic acid, MAA)、丙烯酰胺 (acrylamide, AM) (均为分析纯) 阿拉丁公司; 偶氮二异丁腈 (2,2-azobisisobutyronitrile, 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; 5810型离心机 德国艾本德公司; 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; 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; S-3400N I型扫描电子显微镜 日本Hitachi公司; R215旋转蒸发器 瑞士Büchi公司。

1.3 方法

1.3.1 LM与功能单体混合溶液的紫外吸收光谱测定^[12-13]

分别吸取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 (物质的量比为1:2) 于10 mL比色管中, 乙腈定容, 超声10 min后, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 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 不同物质的量比的功能单体与LM的紫外光谱扫描

固定LM-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与功能单体物质的量比分别为1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10, 乙腈定容, 超声10 min后在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下避光保存12 h, 以相同浓度功能单体为参比溶液, 在190~400 nm波长范围内进行紫外光谱扫描。

1.3.3 NTCZB的MIPs制备

MIPs的不同聚合条件见表1。以实验组编号1为例, 聚合物的制备过程具体如下^[14]: 称取67.75 mg (0.25 mmol) LM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30 min, 使其充分溶解, 5 $^{\circ}\text{C}$ 避光放置过夜, 使LM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20 min,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LM为止;再用甲醇反复洗涤聚合物以去除乙酸,将处理好的MIPs放置于真空干燥箱内,40 ℃干燥至恒质量,待用。各条件下制备NTCZB的MIPs记为MIPs 1~MIPs 16(表1)。作为对照,实验制备了空白印迹聚合物(non-imprinting polymers, NIPs),其制备方法与MIPs的步骤相同,只是在聚合过程中不加入LM^[15],对应样品记为NIPs 1~NIPs 16。

表1 聚合物的制备条件

Table 1 Conditions for preparation of polymers

样品	功能单体	模板分子-功能单体-交联剂物质的量比	溶剂乙醇体积/mL	聚合温度条件
MIPs 1	MAA	n (LM) : n (MAA) : n (EDMA) =1:4:16	12	A
MIPs 2	AM	n (LM) : n (AM) : n (EDMA) =1:4:16	12	A
MIPs 3	2-Vpy	n (LM) : n (2-Vpy) : n (EDMA) =1:4:16	12	A
MIPs 4	2-Vpy	n (LM) : n (2-Vpy) : n (EDMA) =1:2:16	12	A
MIPs 5	2-Vpy	n (LM) : n (2-Vpy) : n (EDMA) =1:3:16	12	A
MIPs 6	2-Vpy	n (LM) : n (2-Vpy) : n (EDMA) =1:5:16	12	A
MIPs 7	2-Vpy	n (LM) : n (2-Vpy) : n (EDMA) =1:6:16	12	A
MIPs 8	2-Vpy	n (LM) : n (2-Vpy) : n (EDMA) =1:4:12	12	A
MIPs 9	2-Vpy	n (LM) : n (2-Vpy) : n (EDMA) =1:4:20	12	A
MIPs 10	2-Vpy	n (LM) : n (2-Vpy) : n (EDMA) =1:4:24	12	A
MIPs 11	2-Vpy	n (LM) : n (2-Vpy) : n (EDMA) =1:4:28	12	A
MIPs 12	2-Vpy	n (LM) : n (2-Vpy) : n (EDMA) =1:4:20	8	A
MIPs 13	2-Vpy	n (LM) : n (2-Vpy) : n (EDMA) =1:4:20	16	A
MIPs 14	2-Vpy	n (LM) : n (2-Vpy) : n (EDMA) =1:4:20	12	B
MIPs 15	2-Vpy	n (LM) : n (2-Vpy) : n (EDMA) =1:4:20	12	C
MIPs 16	2-Vpy	n (NTCZB) : 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20 h;B.55 ℃水浴中反应24 h;C.60 ℃水浴中反应24 h。引发剂AIBN的用量均为10 mg。

1.3.4 NTCZB高效液相色谱检测条件及标准曲线^[16]的绘制

高效液相色谱检测条件:色谱柱-Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:甲醇-水(60:40, V/V),流速1 mL/min,保留时间15 min,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NTCZB标准溶液,高效液相色谱检测该系列标准溶液,以3次检测结果中目标峰的平均峰面积(y)对质量浓度(x)绘制标准曲线,NTCZB标准曲线的线性回归方程:y=17 765x+125(R²=0.999)。

1.3.5 MIPs的静态吸附实验

称取50 mg MIPs,置于20 mL具塞锥形瓶中,加入8 mL的一定质量浓度的NTCZB-氯仿溶液,于振荡器上

25 ℃、150 r/min振荡12 h后,倒入10 mL离心管中6 000 r/min离心5 min,移取适量上层清液,微孔滤膜过滤后,高效液相色谱检测NTCZB浓度,差减法计算该聚合物对NTCZB的吸附量^[17],计算见式(1):

$$Q = \frac{(C_1 - C_0) \times V}{m} \quad (1)$$

式中:Q为MIPs的吸附量/(mg/g);C₁为氯仿溶液中NTCZB的原始质量浓度/(μg/mL),C₀为吸附后上层清液中NTCZB的质量浓度/(μg/mL);V为所用氯仿溶液的体积/mL;m为印迹聚合物的质量/g。

分子印迹研究中通常用特异因子α表示印迹效果。特异结合量和特异因子分别定义为式(2)、(3):

$$\Delta Q = Q_{MIPs} - Q_{NIPs} \quad (2)$$

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

式中:ΔQ为特异结合量/(mg/g);Q_{MIPs}为MIPs的吸附量/(mg/g);Q_{NIPs}为NIPs的吸附量/(mg/g);α为特异因子。

1.3.6 MIPs的红外表征^[18]

称取MIPs和NIPs各10 mg,1 000 mg溴化钾,研磨充分后于100 ℃烘干至恒质量,经压片后,在傅里叶变换红外光谱仪上进行测定(扫描范围400~4 000 cm⁻¹)。

1.3.7 MIPs对花椒中NTCZB的分子印迹验证实验

取1.0 g粉碎后的花椒粉末置于75 mL氯仿中,于35 ℃、150 r/min振荡提取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 ℃、150 r/min振荡5 h后,转入10 mL离心管中6 000 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,高效液相色谱检测洗脱液中NTCZB的含量^[19]。

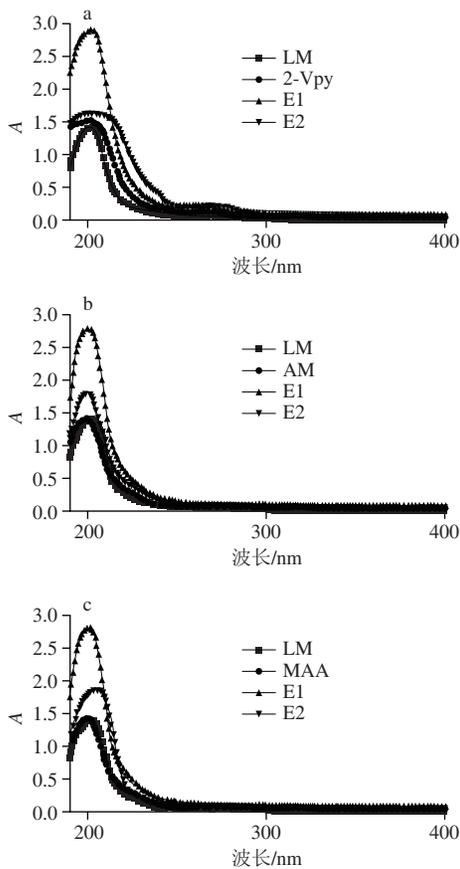
1.4 数据处理

每组实验重复3次,用Origin 8.0和Excel 2003处理实验数据并作图,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 单体与LM的紫外光谱分析

根据吸光度加和性,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度,而该混合物的实际吸光度为该混合物溶液在该波长下实测的紫外吸光度,理论吸光度与实际测量值差值越大,表明二者相互作用也越大。



a~c.分别表示以乙醇作为参比溶液, LM-2-Vpy、LM-AM、LM-MAA混合物的紫外吸收光谱。E1.混合物理论吸光度; E2.混合物实际测定吸光度。

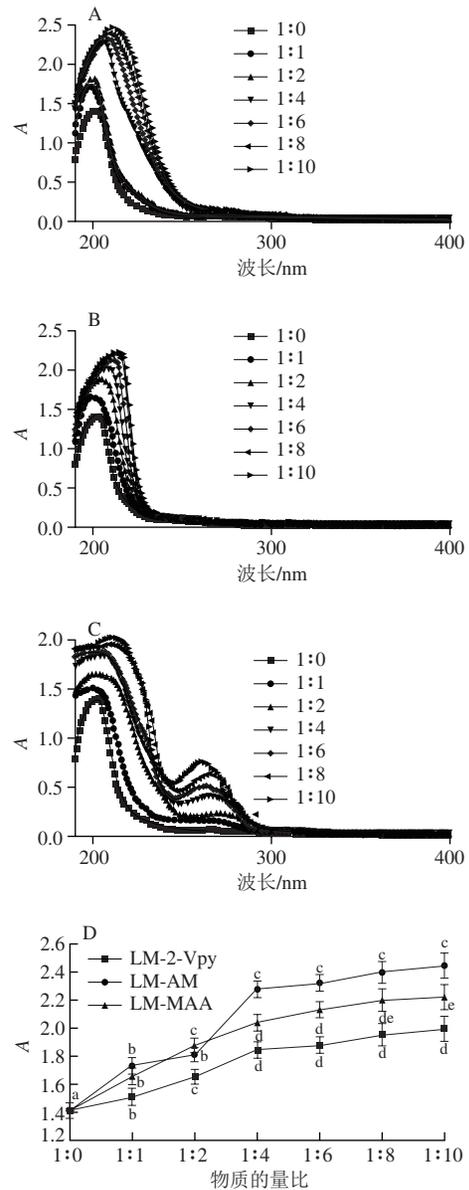
图2 LM、功能单体及其混合物的紫外吸收光谱

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

从图2可以看出,所有样品的理论吸光度(E1)均大于实际测量值(E2),说明LM与功能单体间发生了相互作用,原因是LM上存在酰基和羟基,与功能单体形成氢键^[20]。LM-MAA在波长200 nm处的实测值与理论值差值为 0.937 ± 0.095 , LM-AM波长200 nm处的实测值与理论值差值为 0.977 ± 0.101 , LM-2-Vpy波长200 nm处的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MIPs具有更好的稳定性和特异性识别能力^[21]。

由图3A、B、C可知,随着加入功能单体的增加,LM和功能单体混合体系的最大吸收峰的吸光度呈上升趋势,这是因为LM上的一NH、C=O和-OH基团与3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度增加,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,LM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MIPs的吸附效果^[22]。吸光度变化趋于平缓时,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3D可看出,LM与MAA、AM、2-Vpy在对应物质的量比在1:4之后吸光度变化均较之前更加平缓,可推断LM与功能单体物质的量比为1:4可能是聚合的较佳比例。



注: A~C.表示LM分别与AM、MAA、2-Vpy不同物质的量比混合物测得的紫外光谱; D.图A、B、C中混合物最大吸收波长对应的吸光度,不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

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 ratios between functional monomers on UV spectrum of preassembled system

差示紫外光谱扫描与不同物质的量比的功能单体加入量的紫外光谱扫描实验方法类似,仅将参比溶液换成相同浓度的LM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LM以及其主客体复合物最大吸收波长在

206 nm波长处, 参照文献[24], LM与功能单体反应公式可以推导整理为式(4):

$$\frac{\Delta A}{b_0^n} = K\Delta\epsilon a_0 I - K\Delta A \quad (4)$$

式中: n 为LM和功能单体2-Vpy的结合比例($n=1, 2, 3, \dots$); b_0 为2-Vpy的浓度; a_0 为LM的浓度; ΔA 为LM与LM-2-Vpy混合物的紫外吸光度差值; K 为反应平衡常数; $\Delta\epsilon$ 为复合物与功能单体的摩尔吸光系数差值; I 为比色皿厚度。

以 $\Delta A/b_0^n$ 对 ΔA 作图, 可以推导出 n 值, 从而得知在乙醇溶液中LM与功能单体的作用模式, 进而揭示分子印迹作用机理。以 $\Delta A/b_0^n$ 对 ΔA 作图发现, 物质的量比为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 远大于 a_0 , 即功能单体加入量远大于LM, 这2种浓度并不满足上述假设条件。因此作线性关系图时舍弃这2种比例。

从图4可以看出, 当 n 为3时, $\Delta A/b_0^n$ 对 ΔA 作图可以拟合成一条直线($R^2=0.963$); 当 n 为4时, $\Delta A/b_0^n$ 对 ΔA 作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LM与3个或者4个2-Vpy分子发生作用, 即1个LM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]。

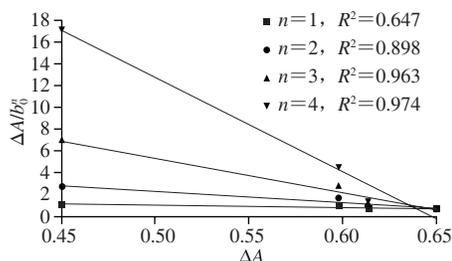


图4 206 nm波长处 $\Delta A/b_0^n$ 对 ΔA 的关系图

Fig. 4 Plots of $\Delta A/b_0^n$ versus ΔA at 206 nm

2.2 不同制备条件对MIPs的分子印迹效果的影响

由表2可知, MIPs 1、MIPs 2、MIPs 3对NTCZB的吸附量的大小关系为MIPs 3>MIPs 2>MIPs 1, 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NTCZB的印迹效果最好, 这与功能单体和LM的紫外光谱分析的结果吻合。

MIPs 3~MIPs 7对NTCZB的吸附量的大小为MIPs 7>MIPs 6>MIPs 3>MIPs 5>MIPs 4, 其特异性吸附效果为 $\alpha_3 > \alpha_5 > \alpha_6 > \alpha_4 > \alpha_7$, 说明替代模板与2-Vpy物质的量比为1:4时MIPs的印迹效果最好, 这与紫外光谱分析研究LM和功能单体相互作用的结果吻合。

MIPs 8~MIPs 11和MIPs 3对NTCZB的吸附量的大小关系为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物质的量比为2-Vpy与EDMA 4:20。

MIPs 9、MIPs 12和MIPs 13的实验结果显示, MIPs 9对NTCZB的吸附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NTCZB的印迹效果最好。

MIPs 9、MIPs 16对NTCZB的吸附量的大小关系为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, NTCZB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NTCZB没有被洗脱完全, 从而造成NTCZB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, MIPs 9样品的分子印迹效果最好, 在上述条件下对制备MIPs 9进行红外表征和吸附性能实验研究。

表2 不同制备条件的MIPs的分子印迹效果

Table 2 Imprinting effect of MIPs prepared under different conditions

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

注: 同列不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

2.3 MIPs 9对NTCZB印迹前后的红外光谱分析

由图5可知, 3条曲线的出峰位置很相近, 但仍存在很多差异, 洗脱前MIPs 9、洗脱后MIPs 9、NIPs 9在2 965 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, 洗脱前MIPs 9在此处的峰形明显区别

于洗脱后MIPs 9和NIPs 9, 这是因为LM上的酰基与2-Vpy发生相互作用, 形成氢键而缔合于MIPs上, 洗脱前MIPs 9在 $1\ 540\ \text{cm}^{-1}$ 处和 $1\ 635\ \text{cm}^{-1}$ 处比洗脱后MIPs 9和NIPs 9的强度弱, 这主要是LM上的仲酰胺N—H和C=O反式存在的吸收峰产生^[27], 洗脱前MIPs 9在 $2\ 853\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰是LM上的饱和C—H伸缩振动, 洗脱前MIPs 9与洗脱后MIPs 9、NIPs 9的这些差异说明LM已经通过氢键结合在了MIPs上^[28]; 洗脱后MIPs 9和NIPs 9几乎没有差别, 这说明LM已经完全被洗脱下来^[29-30]。

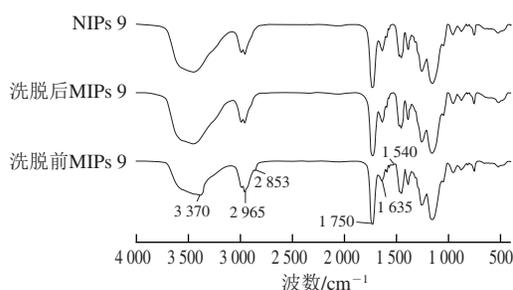
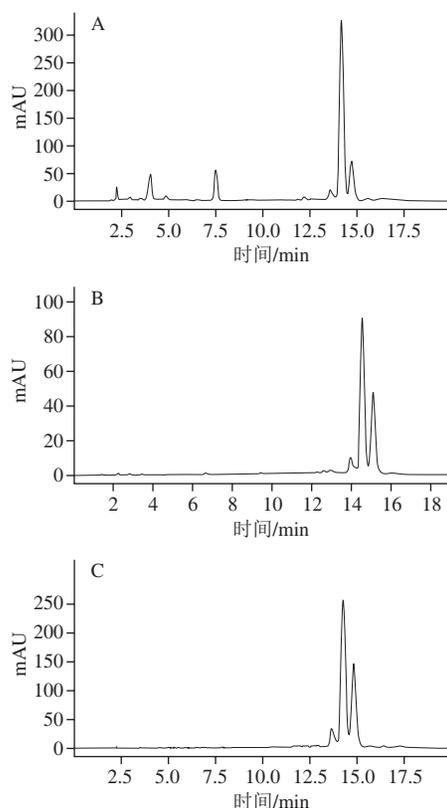


图5 MIPs 9和NIPs 9的红外光谱图

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

2.4 MIPs 9对花椒中NTCZB的分子印迹验证实验结果



A. 花椒萃取液; B. 甲醇洗脱液; C. NTCZB标准品。

图6 花椒萃取液、甲醇洗脱液及NTCZB标准品的高效液相色谱图
Fig. 6 HPLC profiles of the extract of prickly ash, the methanol eluate and NTCZB standard

由图6可知, 甲醇洗脱液与NTCZB标准品的峰形及出峰时间一致, 可确证分离纯化出的物质主要成分是NTCZB; 花椒萃取液中NTCZB的峰面积占总峰面积的 $(72.65 \pm 1.27)\%$, MIPs 9的甲醇洗脱液中NTCZB占总峰面积的 $(94.60 \pm 1.52)\%$, NTCZB占总峰面积的比例提高了约21.95%; 同时, 高效液相色谱检测到浓缩的甲醇洗脱液中NTCZB质量浓度为 $(34.2 \pm 3.1)\ \mu\text{g/mL}$, 经计算MIPs 9对花椒的氯仿萃取液中NTCZB的吸附量为 $(14.64 \pm 0.80)\ \text{mg/g}$ 。结果表明, MIPs 9对花椒萃取液中的NTCZB有较强的特异性吸附能力^[31]。

3 结论

取LM 0.25 mmol, 以2-Vpy为功能单体, LM、功能单体、交联剂物质的量比为1:4:20, 乙腈12 mL, AIBN 10 mg, 在50 °C恒温水浴聚合4 h后再在60 °C恒温水浴聚合20 h, 该条件下合成的MIPs对NTCZB具有较好的特异性吸附效果; 在该条件下制备的MIPs可以吸附花椒萃取液中的NTCZB, 吸附量达到 $(14.64 \pm 0.80)\ \text{mg/g}$ 。实验结果表明: 分子印迹技术可以应用于NTCZB标准品的分离纯化。采用LM能够制备出对NTCZB具有较强印迹效果的MIPs。本研究为具有该分子结构特点物质的MIPs的制备提供了方法借鉴, 同时也对NTCZB的研究和应用具有借鉴价值。

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]. 华西药科学杂志, 2016, 31(2): 109-112. DOI:13375/j.cnki.wcjps.2016.02.001.
- [2] YANG X. 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:10.1016/S0378-8741(01)00300-2.
- [4] WANG S, XIE J C, YANG W, 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: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] YU D, HU X L, WEI S T, 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.025476108.2016.03.2015021301.
- [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] MENOZZISMARRITO C, RIERA C E, MUNARI C, 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] MA X L, JI W H, CHEN L X, 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:10.1002/jssc.201400911.
- [15] SUN J, PENG N, AO W X, et al. Preparation and binding characteristics of molecularly imprinted polymers for capsaicin[J]. Advanced Materials Research, 2012, 430/431/432(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] LI M T, ZHU Y Y, LI L, 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, 等. 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(10): 1163-1169. DOI:10.3724/SP.J.1105.2010.09347.
- [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): 160-163.
- [26] KHURSHID S S, SCHMIDT C E, PEPPAS N A. Optimization of molecularly imprinted polymers of serotonin for biomaterial applications[J]. Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, 2011, 22(1/2/3): 343-362. DOI:10.1163/092050610X486955.
- [27] GUTIÉRREZ-CLIMENTE R, GÓMEZ-CABALLERO A, HALHALLI M, 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] LEU C M, WU Z W, WEI K H. 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] YU H, CHEN Z, FU Y, 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] YANG J, LI Y, WANG J, 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.