

DOI: 10.3969/j.issn.2095-3704.2013.01.024

分子印迹技术在食品安全检测领域中的研究进展

高杨菲, 化占勇, 沈利明

(江苏省吴江市农业委员会, 江苏 吴江 215200)

摘要: 分子印迹技术近年来有了迅速地发展, 出现了新的分子印迹聚合物制备技术, 通过介绍分子印迹新技术的产生、发展、基本原理、制备方法及在食品安全领域中的研究进展, 对该技术应用前景进行了展望。

关键词: 分子印迹; 模板分子; 食品安全

中图分类号: TS207.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-3704 (2013) 01-0100-05

Research Progress of Molecular Imprinting Technique in Food Safety Detection

GAO Yang-fei, HUA Zhan-yong, SHENG Li-ming

(Agriculture Commission of Wujiang City, Wujiang 215200, China)

Abstract: Molecular imprinting technology has rapidly developed in recent years, and there have some new techniques of preparation for molecular imprinted polymer. This paper summarized the emergence and progress of these new techniques, and focused on its basic principle, preparation method, and research progress in the field of food safety detection. The application prospect of the technique were also discussed.

Key words: molecular imprinting; template molecules; food safety

随着全球经济一体化和食品贸易国际化发展, 食品安全问题已成为全世界关注的热点。近年来, 我国的食品安全问题频发, 对环境和人类造成危害, 这对食品安全检测水平和技术提出了挑战。目前应用于食品安全检测的技术手段或方法主要有: 色谱法、酶法、免疫法、传感器法和生物检测方法等, 这些方法都需要对样品进行前处理, 去除干扰杂质; 但在样品量大, 成分复杂的情况下上述方法不适宜现场快速检测, 而且存在检测成本高, 检测重现性不好等问题。研发更为快速、准确、灵敏的检测方法已经变得迫切需要。在此背景下, 许多学者积极开发新的检测技术或待检样品分离技术, 分子印迹

技术(molecularly imprinting technology, MIT)应运而生。该技术是一种新型高效分离及分子识别技术, 由于其具有优越的识别性和选择性, 在食品安全检测中发挥着重要的作用。

1 分子印迹技术

分子印记技术源于1940年Pauling^[1]在免疫学研究中提出的抗体形成学说, 即用抗原作为模板来铸造对应抗体空间结合位点的结合理论。到1973年, Wulf等^[2]成功发展了用于色谱手性拆分印记聚合物。分子印迹的基本原理是^[3]: 在目标底物的存在下, 充当分子模板的印记分子与功能性单体混合,

收稿日期: 2013-01-08

作者简介: 高杨菲, 女, 硕士, 主要从事食品安全研究, E-mail: gaoyangfei07@163.com。

在一定的溶液中利用交联剂与功能性单体聚合, 从而在模板分子周围占据着高度交联的聚合结构; 随后印记分子移去, 暴露出一个相对于模板分子空间构型相互匹配的具有多重作用点的空穴, 此空穴与印记分子在形状、大小等方面具有良好的互补性, 因而这种聚合物具有特异性识别印记分子的功能。

近几年发展起来的分子印记技术^[4]所得到的模拟生物聚合物(MIPs)与生物识别元件(如酶、抗体、核酸等)相比具有很多优点: (1)MIPs的稳定性好, 能反复使用50次以上; 在室温干燥环境中可保存数年, 水中保存4周以上不会影响其性质; 用酸性、碱性、金属离子和其它多种溶液处理时不会降低其识别特性; 能耐受一定的机械强度、高温及高压。(2)MIPs具有很高的选择性, 它对印记分子而言是“量身定做”的, 而且理论上任何一个分子均可制

备相应的MIPs^[5]。(3)生物识别元件来自于生物源, 在生产过程中往往要使用动物, 而分子印记技术完全是化学合成过程。(4)生物分子识别系统不易建立批量生产工艺, 所以价格昂贵, 而MIPs则费用低, 对于某些小分子化合物如药物来说, 制备其MIPs相当简单省时, 容易建立大规模生产^[6]。

1.1 分子印记技术的原理和方法

分子印记技术的原理: (1)功能单体与目标分子的功能基团在适当的条件下可逆结合, 形成复合物; (2)加入交联剂, 使其与功能单体聚合, 形成的聚合物将目标分子包埋在内部; (3)用一定的物理和化学方法, 将模板分子(即目标分子)从聚合物中洗脱, 以获得具有识别功能并与之相匹配的三维空穴。这样, 可以再次选择性地与模板分子结合, 从而具有专一识别模板分子的功能^[7]。过程如图1所示^[8]。

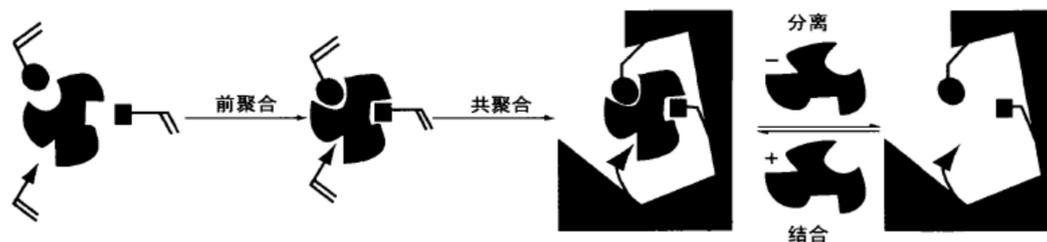


图1 分子印记聚合物的制备流程

迄今为止, 分子印记技术主要有两种: (1)共价键法(预组装) 共价键法是由 Wulff 等人创立发展起来的。该方法中印记分子(目标分子)和功能单体以共价键的形式结合生成印记分子的衍生物, 该聚合物进一步在化学条件下打开共价键使印记分子脱离。功能单体一般采用小分子化合物。共价键结合作用包括硼酸酯、西佛碱、缩醛(酮)、酯、螯合键作用等。共价键法主要应用于制备各种具有特异识别功能的聚合物, 如糖类及其衍生物、甘油酸及其衍生物、氨基酸及其衍生物、扁桃酸、芳香酮、二醛、三醛、铁转移蛋白、联辅酶及甾醇类物质^[9]。

(2)非共价键法(自组织法) 非共价键法是由 Mosbach等^[10]发展起来的。即把适当比例的印记分子与功能单体和交联剂混合, 通过非共价键结合在一起生成非共价键印记分子聚合物。这些非共价键包括氢键、静电引力、金属螯合作用、电荷转移、疏水作用以及范德华力等。此法主要应用于下列物质的分离中: 染料、二胺、维生素、氨基酸衍生物、多肽、肾上腺素功能药物抑制剂、茶碱、二氮杂苯、

核苷酸碱基、甾醇类抗感染药莱普生和苄胺等。

共价键法和非共价键法的主要区别在于单体与模板分子的结合机理不同^[11](图2)。

1.2 分子模拟在分子印记技术中的应用

随着计算机技术和量子化学理论的发展, 分子模拟的方法已被用于解释分子印记聚合物的分子识别的机理、选择功能单体、确定模板分子与功能单体的比例和优化分子印记的体系等。

1.2.1 解释聚合物识别机理 Wulff^[12]利用 MolCAD 1.0 分别计算以 α -D-甘露吡喃糖苯苷为模板, 4-乙烯基苯硼酸为功能单体的共价型分子印记聚合物和以 L-苯丙氨酸酰胺替苯胺为模板, α -甲基苯丙烯酸为功能单体的非共价型分子印记聚合物的模板-功能单体复合物的静电势能面, 并且认为静电势能面可以很好地并且直观地描述分子印记聚合物中对模板分子具有特异性识别作用的孔穴, 且孔穴的大小与模板分子的大小在同一个数量级。

1.2.2 证实和预测功能单体与模板分子之间相互作用力 Takeuehi等^[13]用 Monte Carlo 构象搜索的方

法,找到了在以生物素甲酯为模板的预组装溶液中可能存在的模板-功能单体复合物的构象,从构象图中可以清楚地看到模板-功能单体之间氢键相互作用的情况。李萍^[14]等用Hypechem软件模拟了以右旋邻氯扁桃酸为模板,以丙烯酰胺为功能单体的分子

印迹预聚合物。2005年Dumitru等^[15]用state-of-the-art工具筛选功能单体制备茶碱及其衍生物的分子印迹聚合物。后来,Dumitru等^[16]用模拟的方法发现静电力在分子印迹聚合物聚合过程中扮演重要的角色。

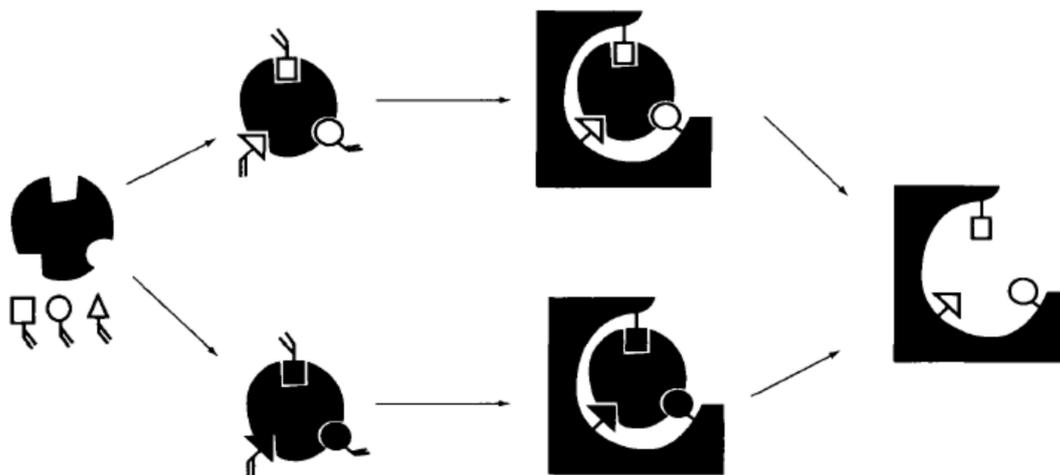


图2 分子印迹聚合物共价结合和非共价结合的两途径

1.2.3 分子模拟用于功能单体的选择和功能单体与模板分子比例的确定 Piletsky等用分子模拟研究分子印迹的重点就是功能单体的选择和功能单体-模板比例的确定。其核心思想是功能单体与模板之间具有较强的相互作用,而且功能单体-模板处于合适的计量比时,合成的MIPs具有最高的识别性能。模板分子与功能单体的相互作用可用以下公式计算: $\Delta E = E_{(\text{模板-功能单体复合物})} - E_{(\text{模板})} - \sum E_{(\text{功能单体})}$

在上述指导下,Sergeyeva等^[17]先利用Hypeche于1999年研究了阿特拉津和甲基丙烯酸复合物,发现模板和功能单体之间可以形成2个离子键、2至3个氢键,说明模板和功能单体之间具有较强的相互作用,所以选择MAA作为功能单体是合适的。随后Piletsky等^[18]使用SYBYL软件在SGI工作站上建立了模板(麻黄素)和20个通常使用的功能单体的构象,这些功能单体就组成了虚拟的功能单体库,然后通过MAX1MIN2关键字利用分子力场的方法优化模板和功能单体的构象,并且用Gasteiger-Huckel方法计算电荷,再用Leapfrog算法依次将功能单体与模板分子在各种可能的部位对接。

1.2.4 分子模拟的研究对印迹体系的优化 武利庆^[19]用分子模拟系统全面地研究了几种MIPs体系,建

立MIPs选择性预测的理论模型。在此基础上,他将所建立的分子模拟方法应用到功能单体种类的筛选、功能单体比例的优化以及致孔剂的筛选上。

2 在食品安全检测领域的应用

Chapuis等^[20]报道了以特丁津和莠灭净为模板分子,采用低温紫外引发制备印迹聚合物,用该聚合物装填3 mL固相萃取柱,能从复杂基质葡萄酒和土壤中选择性萃取加标莠去津及其代谢物,在 10^{-8} 级检测中,能达到基线平稳、定量准确。分离效果与免疫亲和层析柱(immunosorbents IS)相当。De Prada等^[21]研究了一种在线MISPE过程用来选择性富集和伏安法测定牛奶中衡量的磺胺甲基嘧啶,通过实验得到的浓缩因子为45。这种方法的检测限低于国际食品法典委员会标准规定(牛奶中磺胺甲基嘧啶的最大残留量25 mg/L),因此可以定量的检测牛奶中的磺胺甲基嘧啶残留。Puoci等^[22]建立一个简单的MISPE,方法从食品中预富集痕量的苏丹红N,结果表明当使用HPLC不能检测到苏丹红N时,MISPE是一个有效地检测痕量苏丹红的方法。周文辉等^[23]采用以三聚氰胺为模板分子合成了对三聚氰胺具有较好选择性的分子印迹聚合物。以该分子印迹聚合物为固相萃取材料填充固相萃取小

柱,可以从奶粉、纯牛奶等奶制品中选择性地分离、富集三聚氰胺,并有效地去除奶制品中的复杂基质,取得了良好的效果。对奶粉和液态奶提取液的加标回收率分别为 91%~103%、93%~98%,相对标准偏差($n=3$)分别为 719%和 111%。该分子印迹聚合物还有望用于其它奶制品的分析。Maier 等^[24]用 MISPE 方法来检测红酒中的致癌物质毒汁菌素赭曲霉素,他们发现非印迹聚合物与 MIPs 对模板分子具有相类似的选择性,并且将 NIPs 代替 MIPs 作为 SPE 的吸附剂来避免模板分子的流出。Zhou 等^[25]发明了一种在线 MISPE2PE 方法,使用荧光检测器来快速检测小麦中的赭曲霉素 A,每一个分析过程低于 5 min。而且, MISPE2PE 与 LC/MS 联用可以对赭曲霉素 A 进行快速的定性和定量分析。

3 展 望

分子印迹技术经过近十多年的发展,其优良的性能以及对目标物的特异性吸附其在手性物质分离、仿生传感、固相萃取、抗体模拟和催化等领域得到了广泛应用。分子印迹技术凭借其具有的特异结合性和较强的耐受能力,回收率高等优点,在食品安全检测领域已经得到广泛的应用。但仍然存在一些问题,如:聚合物的形态和传质机理还不够明晰;功能单体、交联剂和聚合方法的选择使用都有较大的局限性;吸附动力学过程缓慢;吸附过程机理不明确、不能广泛应用于水相体系;对大分子物质的印迹仍然是一个难题等在某种程度上阻碍了分子印迹技术的应用。

随着各种新型材料的不断涌现,结合新型材料的分子印迹技术已成为分子印迹研究的热点。结合新型材料的特性,发挥不同材料的优点以解决分子印迹技术存在的问题是今后分子印迹发展的趋势之一。分子印迹方法的不断改进、新的功能单体不断出现、各种新型材料不断引入都将不断推动分子印迹技术在更高层次上继续发展。总之,随着生物技术、电子技术、合成手段和现代分析检测手段的迅猛发展,分子印迹技术将日益完善,其必将在食品安全检测中发挥更大的作用。

参考文献:

[1] Pauling L. A theory of the structure and process of formation

of antibodies[J]. *J Am Chem Soc*, 1940, 62: 2643-2657.

[2] Wulff G, Sarhan A. Use of polyemers with enzyme-analogous structures for the resolution of raecemate[J]. *Angew Chem*, 1972, 11: 341-344.

[3] Owens P K, Karlsson. Molecular imprinting for bio and pharmaceutical analysis[J]. *Trends in Analytical Chem*, 1998, 18: 3, 146-154.

[4] Haupt K. Molecularly imprinted polymers: The next generation[J]. *Anal Chem*, 2003, 75: 376-383.

[5] Dickert F L, Lieberzeit P A, Hayden O, et al. Chemical sensors from molecules, complex mixtures to cells' supramolecular imprinting strategies[J]. *Sensors*, 2003, 3: 381-392.

[6] Ying T L, Gao M J, Zhang X L. Highly selective echnique-molecular imprinting[J]. *Chin J Anal Chem*, 2001, 29(1): 99-102.

[7] 赖家平, 何锡文, 郭洪声, 等. 分子印记技术的回顾、现状与展望[J]. *分析化学*, 2001, 7(29): 836-844.

[8] David A. Investigation into the scope and limitations of molecular imprinting with DNA molecules[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001(435): 65-74.

[9] Wulff G. Molecular imprinting of small particles, and production of small particles from solid state reactants[J]. *Trends in Biotechnology*, 1993, 11: 85-87.

[10] Andetssom Li. Citation exchange chromatography: Correlation between solute retention and a theoretical ion-exchange model using imprinted polymers[J]. *Journal of Chromatography A*, 1993, 654: 17-28.

[11] Karsten Haupt. Molecularly imprinted sorbent assays and the use of non-related probes [J]. *Reactive and Functional Polymers*, 1999, 41: 125-131.

[12] Wulff G. Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates a way towards artificial antibodies[J]. *Angew Chem*, 1995, 34: 1812-1832.

[13] Takeuchi T, Dobashi A, Kimura K. Molecular imprinting of biotin derivatives and its application to competitive binding assay using nonisotopic labeled ligands[J]. *Anal Chem*, 2000, 72: 2418-2422.

[14] 李萍, 戎非, 朱馨乐, 等. Studies on the preparation of L-2-chloromandelic acid imprinted polymer and its selective binding characteristics[J]. *高分子学报*, 2003

- (5): 724-727.
- [15] Dumitru P, Jolanta L. Computationally designed monomers and polymers for molecular imprinting of the ophylline and its derivatives (I)[J]. *Polymer*, 2005, 46: 7528-7542.
- [16] Dumitru P, Jolanta L. Computationally designed monomers and polymers for molecular imprinting of the ophylline and its derivatives(II)[J]. *Polymer*, 2005, 46: 7543-7556.
- [17] Sergeyeva T A, Piletsky S A, Brovko A A, et al. Selective recognition of atrazine by molecularly imprinted polymer membranes development of conductometric sensor for herbicides detection[J]. *Anal Chim Acta*, 1999, 392(2-3): 105-111.
- [18] Piletsky S A, Karim K, Piletska E V, et al. Recognition of ephedrine enantiomers by molecularly imprinted polymers[J]. *The Analyst*, 2001, 126: 1826-1830.
- [19] 武力庆. Theoretical prediction and regulation of molecularly imprinted polymer's affinity and selectivity[M]. Beijing: Peking University: 28-29.
- [20] Chapuis F, Pichon V, Lanza F, et al. Retention mechanism of analytes in the solid-phase extraction process using molecularly imprinted polymers-Application to the extraction of triazines from complex matrices[J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2004, 804(1): 93-101.
- [21] Prada A, Reviejo A J, Pingaron J M. A method for the quantification of low concentration sulfamethazine residues in milk based on molecularly imprinted clean-up and surface preconcentration at a Nafion-modified glassy carbon electrode[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 40(2): 281-286.
- [22] Puoci F. Molecularly imprinted solid phase extraction for detection of sudan I in food matrices[J]. *Food Chemistry*, 2005, 93(2): 349-353.
- [23] 周文辉, 林黎明, 郭秀春, 等. 三聚氰胺分子印迹聚合物的制备及奶制品中三聚氰胺的分离[J]. *分析测试学报*, 2009, 28(6): 687-691.
- [24] Maier N M. Molecularly imprinted polymer assisted sample clean up of ochratoxin A from red wine: Merits and limitations[J]. *Journal of Chromatography B*, 2004, 804(1): 103-111.
- [25] Zhou S, Lai E, Miller J. Analysis of wheat extracts for ochratoxin A by molecularly imprinted solid phase extraction and pulsed elution[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378: 1903-1906.