

葡萄糖检测用分子印迹光子晶体的研究

薛飞 段廷蕊 薛敏 刘烽 王一飞 韦泽全
王森 张盼 袁梓高 孟子晖*

(北京理工大学化工与环境学院,北京 100081)

摘要 基于快速、持续、无创检测技术在血糖监测领域的重要性,以聚甲基丙烯酸甲酯微球阵列为光子晶体制孔模板,以葡萄糖为印迹模板,*N*-异丙基丙烯酰胺和甲基丙烯酸羟乙酯为混合单体,4-乙烯基苯硼酸为识别基,*N,N*-亚甲基双丙烯酰胺为交联剂,在制孔模板间隙进行共价型分子印迹聚合。除去制孔模板后,制得具有规整孔结构的新颖光学凝胶材料——分子印迹光子晶体。实验表明:此材料对葡萄糖响应速度快,选择性高,印迹聚合物对葡萄糖吸附量在 3 min 即达到 3.2 mg/g。在同等条件下,印迹聚合物对葡萄糖的吸附量是其它类似物吸附量的 2 倍以上。印迹聚合物的识别行为以衍射光波长变化形式表现。随着葡萄糖浓度由 0 mol/L 增加到 0.02 mol/L,葡萄糖分子印迹光子晶体的衍射波长发生 150 nm 的红移,表现出良好的传感特性。此材料为葡萄糖检测提供了新思路,有望用于人体泪液或尿液中葡萄糖浓度的检测,实现非侵入式的检测手段。

关键词 光子晶体; 分子印迹; 葡萄糖检测; 自组装

1 引言

糖尿病患病已成为威胁人类健康的疾病之一。实时快速监测糖尿病人的血糖对控制病情非常重要^[1]。病人对目前普遍采用的有创测试多有恐惧和不适,而且费用高。无创葡萄糖检测可以很好地克服该缺点。因此,制备快速、持续、无创的传感检测技术是葡萄糖传感器的发展方向之一^[2]。

光子晶体是一种新兴的光学材料,正越来越多地应用于分析化学领域,有可能成为新的研究热点^[3]。功能化的光子晶体在吸收目标化合物后,晶体结构会发生变化,从而会引起衍射波长发生改变,这便是光子晶体传感器的检测原理^[4]。其应用涉及对生化物质、毒剂、金属离子及环境污染物等的检测。将高度有序的带电胶体晶体阵列包埋在水凝胶聚合物中,形成聚合胶体晶体阵列,可制备对葡萄糖^[5]、pH 值^[6]、离子强度^[7]、金属离子^[8]及生物分子^[9]等的传感器。Nakayama 等^[10]采用 *N*-异丙基丙烯酰胺为单体,3-丙烯酰胺基苯硼酸为葡萄糖识别基,制备出一种简便式葡萄糖光子晶体传感器;张拥军等^[11]将硼酸根修饰的聚 *N*-异丙基丙烯酰胺微球包埋在凝胶中,构建了一种光强响应型葡萄糖传感器。但是上述的方法都存在着选择性差的缺点。Li 等将分子印迹技术引入到光子晶体的骨架结构中,所制备的光子晶体凝胶能对蛋白质^[12]、茶碱和麻黄碱^[13]、莨菪去津^[14]和胆酸^[15]等目标分子进行快速特异性的识别,这种分子印迹光子晶体方法为光子晶体材料选择性的提高开拓了全新的思路,扩大了分子印迹光子晶体传感器的应用范围。

分子印迹聚合物(Molecularly imprinted polymers, MIP)具有与模板分子在空间结构和官能团上互补的孔穴,从而实现对目标化合物的选择性识别。本研究将光子晶体与分子印迹相结合,以聚甲基丙烯酸甲酯微球自组装光子晶体模板,在光子晶体模板间隙进行葡萄糖分子印迹聚合,洗脱小球模板和葡萄糖分子,制备出葡萄糖分子印迹光子晶体凝胶(Molecularly imprinted photonic crystal, MIPC)。MIPC 对葡萄糖识别后发生溶胀,衍射峰发生明显红移。结果表明,葡萄糖 MIPC 是一种响应速度快、选择性高的光子晶体凝胶材料。常规的血糖仪和血糖检测方法都需要采血,给被检测人带来疼痛感,而且一次性耗材的使用使得家用血糖监控成本偏高,不利于推广。葡萄糖 MIPC 凝胶的高选择性和快速响应有望用于人体泪液或尿液中葡萄糖浓度的检测,实现非侵入式的检测手段,以期为糖尿病的家庭防治提供新技术。

2010-11-10 收稿; 2011-03-09 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20775007)、863 计划(No. 2007AA10Z433)和环境毒理国家重点实验室开放基金(No. KF2009-08)资助

* E-mail: m_zihui@yahoo.com

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

S-4800 扫描电镜(日本日立公司); LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司); ELSD-UM3000 蒸发光散射检测器(通微分析技术有限公司); SiO₂ 正相色谱柱(150 mm × 4.6 mm 5 μm, Agela 公司); Avaspec-2048TEC 微型光纤光谱仪(Avantes 公司), 配 AvaLight-DH-S-BAL 光源, FC-UV600-2-SR 光纤; RW20 数字搅拌器和 C-MAG HS7 控温仪(IKA 公司); KSW-5-12A 型马弗炉(天津市中环实验电炉有限公司); HWS-ISO 生化培养箱和 HWS-ISO 恒温恒湿箱(宁波海曙赛福实验仪器厂)。

甲基丙烯酸甲酯(MMA)、偶氮二异庚腈(ABVN)、*N*-异丙基丙烯酰胺(NIPA)、4-乙烯基苯硼酸(4-VPBA)均购自百灵威公司; 过硫酸钾(KPS)、十二烷基苯磺酸钠(SDBS)、H₂SO₄ 和 H₂O₂(北京韦斯化学试剂公司); *N,N*-亚甲基二丙烯酰胺(BIS)、二甲亚砜(DMSO)、丙酮、氨水、HCl、偶氮二异庚腈(ABDV, 上海试思赫维化工有限公司); 甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA, 阿拉丁试剂); 葡萄糖、*D*-核糖、*L*-鼠李糖均购自中北格林试剂公司。以上试剂均为分析纯。乙腈(色谱纯, Fisher 公司), 超纯水由 AWL-0502-U 超纯水系统(艾科浦公司)制备。

2.2 实验方法

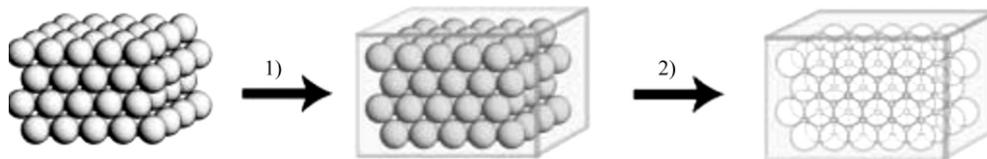
2.2.1 葡萄糖分子印迹聚合物(MIP)的制备及吸附性能检测 称取葡萄糖 0.0307 g (0.17 mmol), 识别基 4-VPBA 0.0252 g (0.17 mmol), 功能单体 HEMA 1.5 mL (12.4 mmol), NIPA 0.1698 g (1.5 mmol), 交联剂 BIS 0.0490 g (0.32 mmol), 引发剂 ABVN 0.0064 g (0.03 mmol) 溶于 1.5 mL 纯水和 0.4 mL DMSO 的混合溶剂中, 超声至全部溶解, 并充氮除氧, 得到分子印迹预聚溶液。在 60 °C 下热聚 12 h。将合成的聚合物于 60 °C 的真空干燥箱中干燥, 研磨为均匀的细小颗粒备用。

色谱条件: SiO₂ 正相色谱柱(150 mm × 4.6 mm 5 μm), 蒸发光散射检测器, 进样量 20 μL, 室温, 流动相为乙腈-水(2:1, V/V), 流速 1.0 mL/min。

2.2.2 单分散聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)胶体微球的制备与自组装 将 30 mL MMA 和 255 mL 去离子水置于 1000 mL 四口烧瓶中, 以 300 r/min 不断搅拌, 氮气保护下加热至 80 °C, 快速加入 0.04 g/mL KPS 溶液, 继续恒温搅拌 45 min。反应结束后, 引发剂、未反应的单体等通过离心的方法除去, 再用去离子水重新超声分散、离心, 再分散进行胶体微球的纯化过程, 重复 3 次后将所制得的 PMMA 胶体微球分散在去离子水中进行保存。

通过垂直沉降法^[16]将 PMMA 微球自组装在玻璃基片上。以盖玻片为基片, 用去离子水清洗干净, 吹干, 浸泡到浓 H₂SO₄-H₂O₂(7:3, V/V) 溶液中 12 h, 进行亲水化处理。用去离子水清洗多次后吹干。将处理过的基片垂直贴于玻璃槽内, 加入 0.3% (m/m) PMMA 微球悬浮液, 在 30 °C 湿度 50% 的条件下于恒温恒湿培养箱中控制溶液匀速挥发, 小球通过表面张力慢慢自组装于基片上。

2.2.3 葡萄糖分子印迹光子晶体的制备 MIPC 膜的制备过程如图解 1 所示。在 PMMA 胶体晶体模板边缘慢慢滴加 MIP 预聚溶液, 通过溶液的虹吸扩散作用使溶液布满整个膜片。将膜片于 60 °C 下热聚合 12 h。聚合后, 膜片先用丙酮浸洗 7 h, 除去 PMMA 小球模板, 再按 1% 氨水、纯水、HCl-纯水(pH 4)的顺序清洗 3 次, 除去印迹模板葡萄糖分子, 得到分子印迹光子晶体膜片(MIPC)。膜片最后浸泡于去纯水中平衡, 准备测量其光学性能。制备空白聚合物(Non-imprinted polymers, NIP)时, 除不加模板分子外, 其它方法同上。



图解 1 葡萄糖 MIPC 制备过程

Scheme 1 Preparation of molecularly imprinted photonic crystal (MIPC) for glucose

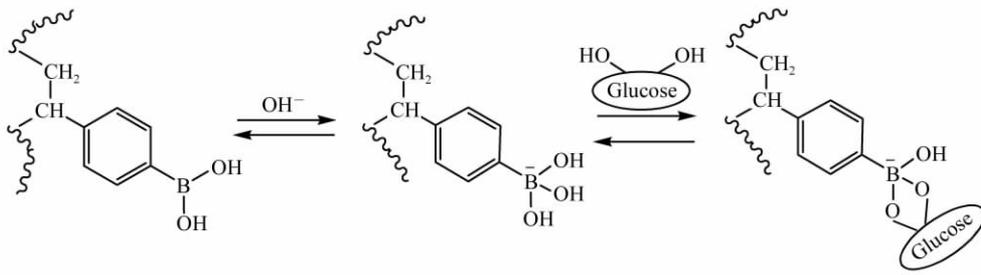
2.2.4 葡萄糖印迹光子晶体的传感特性 用微型光纤光谱仪测试薄膜的布拉格衍射光谱。10 mL 含 0.15 mol/L NaCl 缓冲溶液 (pH 9.6) 在 37 °C 恒温水浴中恒温, 分别放入 MIPC 膜和非印迹膜 (NIPC) 检测其衍射波长。记录后逐次加入葡萄糖, 使溶液中葡萄糖浓度分别为 0.001, 0.005, 0.010, 0.015 和 0.020 mol/L, 记录每次加入葡萄糖后 MIPC 膜衍射峰红移后的位置。

3 结果与讨论

3.1 葡萄糖分子印迹聚合物的制备

硼酸是一种常用的葡萄糖识别基, 苯硼酸衍生物作为一种共价型单体被广泛用于葡萄糖分子印迹聚合物的制备^[17]。Nakayama 等^[10]的研究表明, 在溶液中苯硼酸处于解离平衡中, 解离状态的苯硼酸能与葡萄糖分子结合形成酯, 与葡萄糖分子的结合, 促使苯硼酸平衡向解离方向移动。

本研究以 4-乙烯基苯硼酸 (4-VPBA) 为葡萄糖的识别基, 如图解 2 所示, 用于聚合的乙烯基和体系中的交联剂相连接, 葡萄糖上邻位二醇与四乙烯基苯硼酸之间形成酯键, 这一联节点的生成和分解都是较快和较易进行的。联节点具有稳定的刚性五元环结构, 有效实现了分子印迹。在聚合后, 酯键可以通过水解断裂, 而硼酸基就能适当地排布于聚合体内, 以键合客体分子。



图解 2 4-VPBA 识别基与葡萄糖的作用机理

Scheme 2 Equilibria associated with complex formation between 4-vinylphenylboronic acid and glucose

印迹模板分子、识别基、功能单体和交联剂的物质的量之比为 1: 1: 81.8: 1.5。此比例所得到的印迹聚合物柔韧性较好, 为透明状聚合物, 易于制备膜状 MIPC。

3.2 MIP 的印迹效果评价

通过印迹过程, 聚合物骨架上不仅有 4-VPBA 识别基, 还有与葡萄糖立体结构相匹配的空间结构。因此, MIP 对葡萄糖的特异性识别能力比 NIP 更强。MIP 在弱碱性条件下呈现一定的表观印迹效果, 与 4-VPBA 识别机理相同 (图解 2)。实验表明, 在 pH = 9.6 情况下, MIP 印迹效果明显, 且响应时间也很快, 在 3 min 内即达到饱和, 符合传感器快速响应的要求 (图 1)。但是在生理条件 (37 °C, pH = 7.4) 下, pH 值偏低, 泪液和尿液中的 pH 值变化范围较大, 限制了 MIPC 的应用。

3.3 MIP 选择性的评价

选择与葡萄糖结构相似的 D-核糖和 L-鼠李糖进行色谱吸附实验, 以判定 MIP 和 NIP 对葡萄糖的选择性。

表 1 中所列的吸附数据的吸附时间均为 6 min。MIP 对葡萄糖的吸附量分别是 D-核糖和 L-鼠李糖吸附量的

表 1 MIP 与 NIP 聚合物分别对葡萄糖及其结构类似物的吸附性能
Table 1 Adsorption properties of glucose and its analogues on MIP and NIP

化合物 Compound	模板吸附性能 Adsorption capacity of template (mg/g)	
	MIP	NIP
葡萄糖 Glucose	2.90	2.06
D-核糖 D-ribose	1.20	1.23
L-鼠李糖 L-rhamnose	0.99	1.18

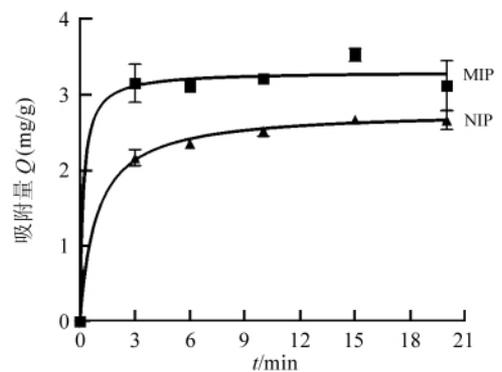


图 1 葡萄糖的吸附动力学曲线

Fig. 1 Adsorption kinetics curve of MIP for glucose at pH = 9.6

2.4 倍和 2.9 倍。NIP 对葡萄糖的吸附量低于 MIP。说明在 MIP 中,模板分子的印迹效应发挥了作用,对葡萄糖表现出较高选择性。

3.4 葡萄糖分子印迹光子晶体的制备

本研究中所制备的单分散 PMMA 微球单分散性好,平均粒径为 280 nm,通过垂直沉降法得到具有一定规整排列的光子晶体模板。洗脱掉 PMMA 微球和葡萄糖分子的去除,就形成具有高度有序大孔阵列结构的 MIPC 膜,能够与葡萄糖分子进行特异性可逆共价结合。图 2 为 PMMA 光子晶体模板以及葡萄糖印迹薄膜的扫描电镜图。制备好的小球模板需要加上聚合物溶液进行聚合,而溶液的加入很有可能破坏整齐排列的小球阵列。所以,需要对模板先进行固化处理。一般固化可通过高温烧结的方法。将自组装好的模板在 200℃ 高温下处理 30s 进行固化,使小球与小球间产生互相连接的“颈”,整个阵列具有良好的稳定性。相同条件下,固化后制备的光子晶体比未进行固化制备的光子晶体光学性能好。

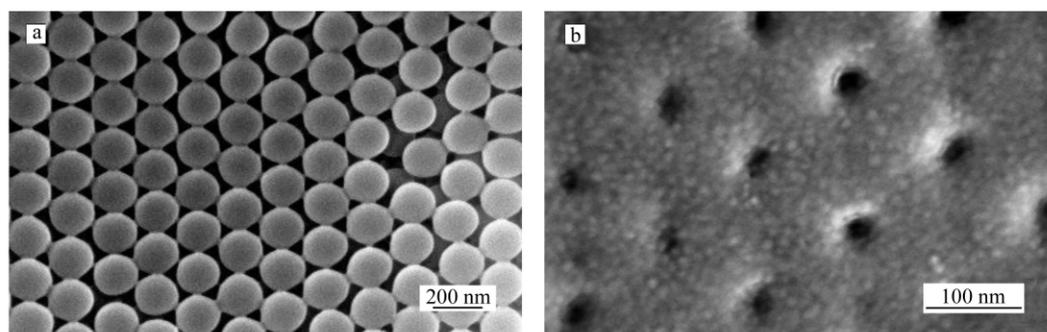


图 2 光子晶体模板 (a) 及葡萄糖印迹薄膜 (b) 的扫描电镜图片

Fig. 2 Scanning electron micrographs of photonic template (a) and MIPC (b)

3.5 葡萄糖印迹光子晶体的传感特性

传统的分子印迹聚合物只能提供大量的亲和位点,这些亲和位点可以作为传感装置的识别系统对目标分子进行特异性识别;然而,作为一个传感单元,还需要某些信号转换装置将分子识别的化学过程转换为可读的信号。为了达到快速、简便检测的目的,在体系中引入了具有灵敏度高,信号易读的光子晶体结构。三维有序的光子晶体结构可以与可见光相互作用产生布拉格衍射,也称布拉格反射,同时分子识别的化学过程会影响到光子晶体凝胶的晶格参数,对衍射峰的位置进行调解,因此分子识别的过程可以直接转化为可读的光信号。

分子印迹光子晶体凝胶的衍射峰的位置由布拉格衍射方程 (1) 决定:

$$m\lambda = 2nd\sin\theta \quad (1)$$

其中 m 是衍射级数 λ 是发生衍射的光的波长 n 是三维阵列的平均折光指数 d 是晶面间距 θ 是入射光与晶面法线的夹角。当 θ 一定时 λ 正比于 d ,即晶格间距的任何变化都会引起布拉格衍射峰的移动。通过衍射方程可以推断,如果分子识别过程能够引起凝胶的溶胀或收缩,光学信号就可以被观察到。

测试了葡萄糖分子印迹光子晶体凝胶薄膜的传感特性。将薄膜放置在一系列浓度的葡萄糖溶液中,待达到平衡后记录布拉格衍射峰的位置。为了进一步阐明印迹膜的选择特性,将印迹膜和非印迹膜分别浸入葡萄糖的不同浓度的溶液中,得到图 3 的光谱图。

MIPC 凝胶由于具有分子印迹产生的纳米孔穴,特异性吸附葡萄糖分子后引起光子晶体结构的变化,进而导致了衍射峰发生红移。随着葡萄糖浓度的增加,MIPC 膜和 NIPC 膜的衍射波长均发生红移。葡萄糖浓度为 0.02 mol/L 时,MIPC 膜的衍射波长红移约 150 nm,NIPC 膜的位移量仅约为 MIPC 的 1/3。图 3 中纵坐标为反射率,即样品的反射强度与仪器自带的白色参考背景的反射强度的百分比,可以看出反射的强度并没有明显的变化规律。

本方法制备的分子印迹光子晶体膜灵敏度强,在不同葡萄糖浓度下位移明显,符合传感器的要求,可对葡萄糖进行快速、方便、准确的检测。

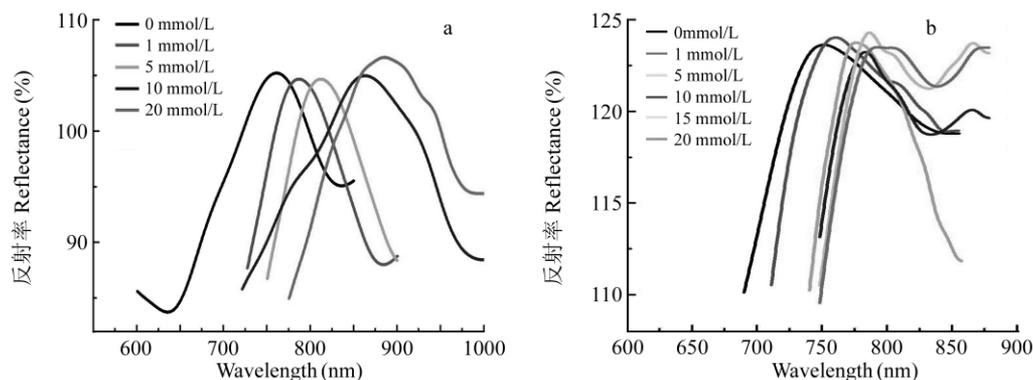


图3 MIPC (a) ,NIPC (b) 在不同的葡萄糖浓度下衍射位移比较

Fig.3 Optical response of MIPC (a) and NIPC (b) films in various concentrations of glucose

References

- Girardin C M , Huot C , Gonthier M , Delvin E. *Clin. Biochem.* , **2009** , 42(3) : 136 ~ 142
- YANG Qing-De , LIU Hong-Min , LIU Chun-Xiu , HE Yin-Zeng , TIAN Qing , CAI Xin-Xia(杨庆德 , 刘红敏 , 刘春秀 , 贺银增 , 田青 , 蔡新霞) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2009** , 37(11) : 1566 ~ 1571
- CHEN Yi , LI Jin-Cheng(陈义 , 李晋成) . *Chinese Journal of Chromatography*(色谱) , **2009** , 27(5) : 573 ~ 583
- Holtz J H , Asher S A. *Nature* , **1997** , 389(23) : 829 ~ 832
- Alexeev V L , Sharma A C , Goponenko A V , Das S , Lednev I K , Wilcox C S , Finegold D N , Asher S A. *Anal. Chem.* , **2003** , 75(10) : 2316 ~ 2323
- Lee K , Asher S A. *J. Am. Chem. Soc.* , **2000** , 122(39) : 9534 ~ 9537
- Reese C E , Asher S A. *Anal. Chem.* , **2003** , 75(15) : 3915 ~ 3918
- Asher S A , Sharma A C , Goponenko A V , Ward M M. *Anal. Chem.* , **2003** , 75(7) : 1676 ~ 1683
- Sharma A C , Jana T , Kesavamoorthy R , Shi L J , Virji M A , Finegold D N , Asher S A. *J. Am. Chem. Soc.* , **2004** , 126(9) : 2971 ~ 2977
- Nakayama D , Takeoka Y , Watanabe M , Kataoka K. *Angew. Chem. Int. Ed.* , **2003** , 42(35) : 4197 ~ 4200
- Liu Y , Zhang Y J , Guan Y. *Chem. Commun. (Camb)* , **2009** , (14) : 1867 ~ 1869
- Hu X B , Li G T , Huang J , Zhang D , Qiu Y. *Advanced Materials* , **2007** , 19(24) : 4327 ~ 4332
- Hu X B , Li G T , Li M H , Huang J , Li Y , G Y B , Zhang Y H. *Advanced Functional Materials* , **2008** , 18(4) : 575 ~ 583
- Wu Z , Tao C A , Lin C X , Shen D Z , Li G T. *Chem. Eur. J.* , **2008** , 14(36) : 11358 ~ 11368
- Wu Z , Hu X B , Tao C A , Li Y , Liu J , Yang C D , Shen D Z , Li G T. *Journal of Materials Chemistry* , **2008** , 18(45) : 5452 ~ 5458
- Norris D J , Vlasov Y A. *Advanced Materials* , **2001** , 13(6) : 371 ~ 376
- Alexeev V L , Das S , Finegold D N , Asher S A. *Clin. Chem.* , **2004** , 50(12) : 2353 ~ 2360

Molecularly Imprinted Photonic Crystal for Detection of Glucose

XUE Fei , DUAN Ting-Rui , XUE Min , LIU Feng , WANG Yi-Fei , WEI Ze-Quan ,
WANG Miao , ZHANG Pan , YUAN Zi-Gao , MENG Zi-Hui*

(School of Chemical Engineering and the Environment , Beijing Institute of Technology , Beijing 100081)

Abstract A three-dimensionally ordered , macroporous , inverse-opal glucose molecularly imprinted polymer crystal (MIPC) film was synthesized by the inverted colloidal-crystal template technique. Preparation of our MIPC was carried out by thermo-polymerization of monomers (2-hydroxyethyl methacrylate and N-isopropylacrylamide) , covalent recognizer (4-ethylenyl phenylboronic acid) , and cross-linker (N,N'-Methylenebisacryl-

