

文章编号: 1004-1656(2008)07-0812-04

# 分子印迹聚合物固相萃取红椒粉中的苏丹红 I

徐 莉<sup>\*</sup>, 刘英菊<sup>1</sup>, 刘有芹<sup>1</sup>, 刘 岚<sup>2</sup>

(1. 华南农业大学化学系, 广东 广州 510642

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

**摘要:** 本文以苏丹红 I 为模板分子, 以甲基丙烯酸 (MAA)、4-乙烯基吡啶 (4-VPy) 为功能单体, 制备了两种模板聚合物 (MAA-M IP 和 4-VPy-M IP)。对 4-VPy-M IP 进行了 Scatchard 方程分析。分别以这两种模板聚合物为固相萃取材料来填充固相萃取柱, 从掺有苏丹红 I 的红椒粉中萃取苏丹红 I。本文优化了固相萃取条件。高效液相色谱检测表明, 在合适的萃取条件下, 采用填充 4-VPy-M IP 的固相萃取柱可以有效地从红椒粉中分离富集苏丹红 I。

**关键词:** 分子印迹聚合物; 固相萃取; 苏丹红 I; 高效液相色谱

**中图分类号:** O657.7 **文献标识码:** A

苏丹红 I 属于偶氮类化工染色剂, 化学分子式为  $C_{16}H_{12}ON_2$ , 苏丹红 I 及其化学衍生物 II、III、IV 均具有致癌性, 因此在食品中禁止使用<sup>[1]</sup>。2004 年, 欧盟开始要求禁止进口掺有苏丹红的辣椒产品。目前国内已熟知苏丹红的检测方法为大连质检所推荐的国标方法 (GB/T 19681-2005)<sup>[2]</sup>。国标法采用正己烷作为萃取溶剂, 用氧化铝小柱净化样品, 采用高效液相色谱-紫外法检测食品中的苏丹红 I, 该法能较好地去除样品中的杂质。本文尝试采用分子印迹聚合物代替氧化铝作为固相萃取材料来净化样品。

分子印迹聚合物 (Molecularly imprinted polymer, MIP) 作为一种新兴的人工合成亲和材料, 对印迹分子具有“预定”的识别能力和选择性, 在色谱分离、化学传感器、模拟酶催化、固相萃取等许多领域表现出良好的应用前景<sup>[3-7]</sup>。本文采用本体聚合方法, 分别以甲基丙烯酸 (MAA)、4-乙烯基吡啶 (4-VPy) 为功能单体, 制备了两种模板聚合物 (MAA-M IP 和 4-VPy-M IP)。对 4-VPy-M IP 进行了 Scatchard 方程分析。分别以这两种模板聚合物为固相萃取材料填充固相萃取柱, 从掺有苏丹红 I 的红椒粉中萃取苏丹红 I。高效液相色谱检测表明, 选取合适的萃取溶剂, 采用填充 4-VPy-M IP 的固相萃取柱能有效地从红椒粉中分离富集

苏丹红 I。对本文所用的分子印迹的固相萃取—HPLC 检测方法与国标方法进行了对比。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

4-乙烯基吡啶 (4-VPy, Sigma 公司产品); 甲基丙烯酸 (MAA, 上海化学试剂公司); 乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EDMA, 江苏安利化工厂)。以上试剂需减压蒸馏除去阻聚剂。苏丹红 I (Sigma 公司产品); C-86 型恒温水浴锅 (广州越秀医疗器械厂); 其它试剂为分析纯。

环境扫描电子显微镜 XL230ESEM (荷兰飞利浦电子光学有限公司); AVATAR 360 FT-R 型红外光谱仪 (KBr 压片) (美国 Nicolet 公司); Agilent 1100 Series 型高效液相色谱仪。

### 1.2 实验过程

1.2.1 印迹苏丹红 I 的聚合物制备 称取 2 mmol 苏丹红 I 为模板分子, 分别以 8 mmol 甲基丙烯酸或 8 mmol 4-乙烯基吡啶为功能单体, 置于 25 mL 锥形瓶中, 加入 6 mL 氯仿, 超声混匀, 加入适量交联剂 EDMA, 偶氮二异丁腈, 超声混合后转入 50 mL 安培瓶中, 真空脱气 5 min 后封管, 置于 60°C 恒温水浴锅中反应 24 h, 得块状混合物。研碎, 过 250

收稿日期: 2007-09-25 修回日期: 2008-03-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20202015) 资助; 华南农业大学校长基金项目 (2005K04162) 资助

联系人简介: 徐莉 (1972-), 女, 博士, 讲师, 主要从事有机分析及精细有机合成研究。Email: lindafeng\_xu@163.com

目筛, 用 9:1(V/V) 甲醇/乙酸抽提 72h, 然后用丙酮反复沉降, 除去细小粉末。最后于 60℃ 真空干燥 24h, 分别得模板聚合物 MAA-M IP 和 4-VPy-M IP。

非模板聚合物 (MAA-N IP 和 4-VPy-N IP) 的制备除不加模板分子, 其余步骤同上。

1.2.2 结合量  $Q$  的测定 分别称取 20.0mg 模板聚合物, 置于 10mL 磨口锥形瓶中, 用移液管分别移取 2.0mL 不同浓度的底物氯仿溶液, 放入恒温水浴振荡器中室温下振荡 12h 后, 经 0.45 $\mu$ m 聚四氟乙烯有机滤膜过滤后, 用 2.0mL 移液管移取 0.5mL 滤液稀释至 5mL~10mL, 摇匀, 用紫外分光光度计在一定波长下测定平衡吸附液中底物的游离浓度, 根据结合前后溶液中底物变化可计算苏丹红 I 模板聚合物对苏丹红 I 的结合量  $Q$ 。

1.2.3 色谱条件 色谱柱: 4.5 × 150mm - C18 (Agilent); 流动相参照文献<sup>[2]</sup>, 流动相 A/流动相 B = 25:75 其中: (A) 0.1% 甲酸的水溶液: 乙腈 = 85:15 (B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液: 丙酮 = 80:20 检测波长: 478nm; 流速: 1mL/min; 进样体积: 20 $\mu$ L。

1.2.4 样品处理 取自制层析柱管 1cm (内径) × 6cm (高), 底部有砂芯隔板, 干法装入 MAA-M IP 和 4-VPy-M IP。轻敲实后加一薄层脱脂棉, 用 10mL 氯仿预淋洗, 洗净柱中的杂质后, 备用。称取 2.6g 市售红椒粉粉末, 表面喷洒一定浓度的苏丹红 I 待样品上色后, 放置过夜, 烘干。加入 15mL 氯仿, 超声混合均匀, 过滤, 用少许氯仿洗涤残渣, 合并氯仿溶液, 用旋转蒸发液浓缩至 5mL 以下, 慢慢加入层析柱中。10min 后用 1mL 二氯甲烷淋洗 2 次, 20min 后用 10mL 甲醇洗脱, 即得洗脱液。浓缩后用丙酮转移并定容至 5mL, 经 0.45 $\mu$ m 聚四氟乙烯有机滤膜过滤后待测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 聚合物的制备与表征

所得聚合物均经电镜扫描 (图 1) 和红外光谱表征。通过扫描电镜可观察到模板聚合物表面和非模板聚合物表面存在明显差异, 非模板聚合物比模板聚合物表面要平滑, 模板聚合物表面有许多微孔, 而这些微孔对识别模板化合物有重要作用。红外光谱表明, 所有聚合物有明显的羟基、羰基、酯基的特征吸收峰。不同的是, 以 4-VPy 为功能单体制得的 M IP2 在 1634  $\text{cm}^{-1}$  和 1602  $\text{cm}^{-1}$  有明

显的吡啶环伸缩振动吸收峰。

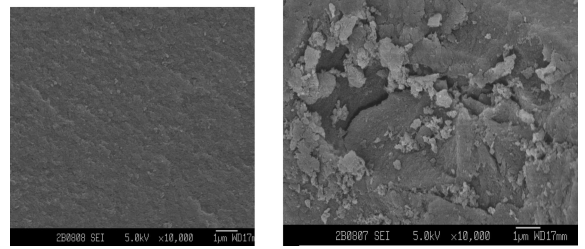


图 1 4-VPy-N IP (左) 和 4-VPy-M IP (右) 的扫描电镜图  
Fig. 1 The surface morphology of 4-VPy-N IP (left) And 4-VPy-M IP (right)

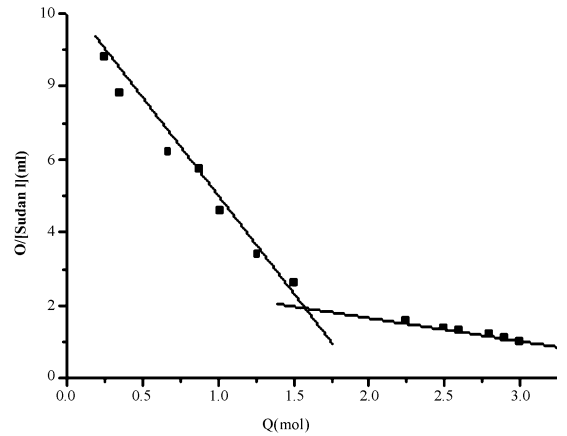


图 2 评价 4-VPy-M IP 结合性质的 Scatchard 图

Fig. 2 Scatchard plots to estimate the binding nature of 4-VPy-M IP

本文对聚合物的制备进行了优化。固定交联剂的用量, 模板分子与两种功能单体的比例为 1:4 时, M IP 对模板分子的吸附效果较好。另外, 聚合物 4-VPy-M IP 对模板分子的吸附作用明显强于 MAA-M IP, 因对苏丹红 I 有最大的表观吸附量值。本文对 4-VPy-M IP 进行了 Scatchard 分析。分子印迹中常用 Scatchard 方程评价分子模板聚合物的结合特性<sup>[8]</sup>。Scatchard 方程为:  $Q/[Sudan I] = (Q_{max} - Q)/K_D$ 。  $K_D$  代表结合位点的离解常数,  $Q_{max}$  代表最大表观结合量,  $[Sudan I]$  表示 Sudan I 在吸附液中的平衡浓度。以  $Q/[Sudan I]$  为纵坐标,  $Q$  为横坐标作图。图 2 中有两条直线呈线性。根据斜率和截距计算,  $K_{D1}$  和  $K_{D2}$  分别为 20.48  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 128.52  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。  $Q_{max1}$  和  $Q_{max2}$  分别为 99.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  和 215.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。最大表观吸附量分别是理论值的 36.85% 和 80.01%。可能由于模板分子与功能单体在聚合前后根据不同的配比进行排列, 而形成两处不同性质的特异性空穴, 由此可知聚合物应存在两类不同的特异性结合部位。

## 2.2 标准曲线和检出限

配制苏丹红 I 标准液浓度为 0.16, 0.32, 0.64, 1.28, 2.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 进样  $2\mu\text{L}$ , HPLC 分析测定, 以峰面积  $A$  对浓度  $C$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 进行回归分析。结果表明, 线性关系良好。

回归方程:  $A = 2.60833 + 80.9543C$ ; 相关系数: 0.9981; 检出限 ( $S/N = 2$ ):  $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## 2.3 固相萃取条件的选择

采用不同单体制备的两种印迹聚合物来装填固相萃取柱, 分别用 MAA-MIP 与 4VPy-MIP 表示; 同时填充相应空白柱以作比较, 即 MAA-NIP 和 4VPy-NIP。

由于苏丹红 I 具有非离子性脂溶物的特点, 导致样品提取、纯化、富集非常困难。而 MIP 一般对模板分子具有特异性的吸附作用, 分子烙印的固相萃取材料可以使萃取条件的选择得以大大简化。

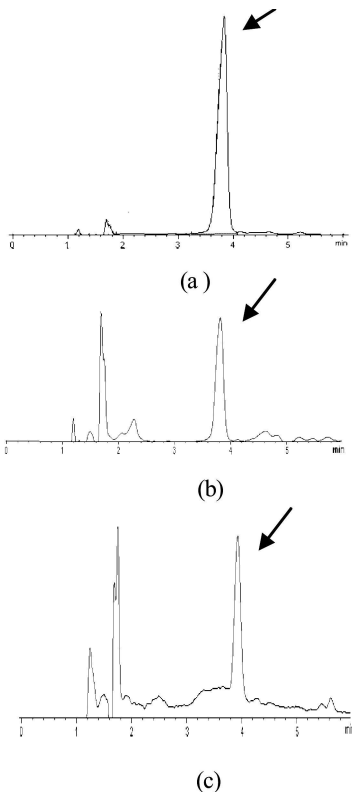


图 3 固相萃取样品的 HPLC 色谱分析

Fig. 3 HPLC chromatograms of the samples

(a) 4VPy-MIP, (b) 4VPy-NIP,

(c) MAA-MIP, 箭头表示苏丹红 I

## 参考文献:

[1] Stiborova V, Martinek V, Rydova H, et al Sudan I is a potential carcinogen for humans: evidence for its metabolic

由于制备 MIP 过程中采用甲醇洗脱模板分子苏丹红 I, 因此直接采用甲醇作为固相萃取柱的洗脱剂, 重点考察各种不同淋洗剂 (二氯乙烷、乙腈、氯仿、丙酮) 的效果。对不同的淋洗部分和洗脱部分经 HPLC 分析, 二氯甲烷的淋洗效果相对较好。在最大可能去除辣椒里面的部分杂质和干扰物等同时, 苏丹红 I 能相对较好的保留在 MIP 柱中。

图 3 分别是以 4VPy-MIP、4VPy-NIP、MAA-MIP 为固相萃取材料处理样品后洗脱液的色谱分离图。经计算, 4VPy-MIP 与 MAA-MIP 对红椒粉中苏丹红 I 的回收率分别为 86.3% 和 62.1%。空白柱 4VPy-NIP 与 MAA-NIP 对苏丹红 I 的回收率为 45.3% 和 25.7%。4-VPy-MIP 对苏丹红 I 回收率还有待提高的原因是一部分苏丹红 I 在淋洗过程中损失外, 还有少部分吸附在固相萃取柱中。

Scatchard 分析结合 HPLC 谱图更进一步说明, 采用 4-VPy 为功能单体所制得的 MIP 对模板分子的烙印效果较好。Nittsson 等用色谱法证明脂肪胺与羧酸之间可产生较强的离子作用, 有机化合物的羧基之间可形成氢键。由于模板苏丹红 I 的萘环上连有一个羟基, 既可以与弱碱性功能单体 4-VPy 发生较强的酸碱离子作用, 也可以与酸性功能单体 MAA 分子中的羧基发生一定程度的氢键作用。前者模板分子与功能单体之间的酸碱离子作用显然强于氢键作用。

将使用过的固相萃取填料 4-VPy-MIP 用 9:1 (V/V) 甲醇/乙酸洗涤后再用甲醇洗涤后真空干燥, 效果没有明显改变。

## 2.4 与国标方法的比较

本方法与国标相比, 使用不同批次的 MIP 处理样品后的回收率与重现性相对较差。但本方法有其独特的优点: 首先, 标准方法的前期工作很复杂, 因为每制备一个批次的氧化铝, 都要对其活度进行测试和调整; 本法前期准备工作相对较少, 装柱简单。其次, MIP 的机械性能稳定, 装填好后经过处理还可以重复使用。另外, 国标方法每个样品过氧化铝小柱需用各类溶剂接近 100 mL, 所需溶剂较多, 而分子印迹的 MIP 柱所需溶剂量少得多。

activation and detoxication by human recombinant cytochrome P4501A1 and liver microsomes [J]. *Cancer*

- Res, 2002, 62: 5678-5680.
- [2] 国家质量监督检验检疫总局 (GB/T 19681—2005). 食品中苏丹红染料的检测方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [3] 刘有芹, 颜芸, 徐莉, 等. 分子印迹聚合物填充色谱柱的研究与进展 [J]. 化学研究与应用, 2007, 19(4): 351-357.
- [4] Ryan S, Melissa E C, David A S. Shape selectivity versus functional group preorganization in molecularly imprinted polymers [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 591(1): 7-16.
- [5] Claudio B, Laura A, Cristina G. Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 591(1): 29-39.
- [6] Ou J J, Dong J, Tian T J, et al. Enantiomer separation of tetrahydropalmatine and Tergeser base by molecularly imprinted monolith in capillary electrophoresis [J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, 70(1): 71-76.
- [7] Li H, Liu Y J, Zhang Z H, et al. Separation and purification of chlorogenic acid by molecularly imprinted polymer monolithic stationary phase [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1098(1-2): 66-74.
- [8] Zhou J, He X W. Study of the nature of recognition in molecularly imprinted polymer selective for 2-anilino pyridine [J]. *Anal. Chim. Acta*, 1999, 381: 85-91.

## Molecularly imprinted solid phase extraction for detection of sudan I in red peppers

XU Li<sup>1\*</sup>, LIU Ying-ju<sup>1</sup>, LIU You-Qin<sup>1</sup>, LIU Lan<sup>2</sup>

(1. Department of Chemistry, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

(2. Department of Chemistry, Zhong Shan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract** In this paper two kinds of molecularly imprinted polymers (MIPs) were prepared with different functional monomers as methacrylic acid (MAA) and 4-vinylpyridine (4-VPy). The polymeric material was characterized by scanning electron microscope and Scatchard analysis. The polymeric particles were packed into 6m glass columns to be invested to absorb selectively Sudan I from red peppers. Under the extraction conditions the high performance liquid chromatography (HPLC) indicated the MIPs packed with 4-VPy-MIP possessed excellent selectivity toward the template comparing the MAA-MIP.

**Key words** molecularly imprinted polymer; solid phase extraction; sudan I; high performance liquid chromatography

(责任编辑 李方)