

桔霉素分子印迹预组装体系的量子化学模拟及吸附性能研究

周康熙^{1,2}, 吴俐², 吕旭聪², 倪莉^{1,2*}

(¹福州大学石油化工学院 福州 350108

²福州大学食品科学技术研究所 福建省食品生物技术创新工程技术研究中心 福州 350108)

摘要 为解决桔霉素分子印迹聚合物在构建和应用过程中模板分子泄露和功能单体筛选工作量大的问题,以 1-羟基-2-萘甲酸为假模板分子,基于液相色谱法构建桔霉素和 1-羟基-2-萘甲酸的同时检测方法,该方法对分子印迹洗脱液中的两种目标物具有良好的回收率($\geq 95\%$),也能对功能红曲霉提液中桔霉素进行分离。运用量子化学方法,通过分子构型优化、原子电荷分布计算和结合能计算优选了构建分子印迹聚合物的功能单体 2,6-二氨基吡啶。以响应面法对其制备工艺进行优化,优化后的聚合物对桔霉素的吸附载量为 $(195.10 \pm 13.21) \text{ ng/g}$,相比优化前提高了 0.79 倍。以甲基丙烯酸为功能单体构建的桔霉素分子印迹聚合物为对照,对比了优化后的聚合物和对照聚合物的吸附性能,前者对桔霉素的吸附载量为后者的 3 倍,证实计算机模拟技术在桔霉素分子印迹聚合物构建中的实用性,旨在为分子印迹聚合物的构建和桔霉素富集与检测提供参考。

关键词 桔霉素; 红曲; 分子印迹; 量子化学; 吸附性能

文章编号 1009-7848(2023)11-0361-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.11.034

真菌毒素桔霉素(Citrinin, CIT)是一种由青霉或曲霉产生的聚酮类次级代谢产物^[1],对生物体内多种脏器具有毒性^[2-4],因此桔霉素的检测对于该类发酵食品的安全性评估尤为重要^[5]。当前桔霉素的检测方法有高效液相色谱法(HPLC法)^[6]、荧光分光光度法^[7]、免疫分析法^[8]等,其中 HPLC 法是检测桔霉素最为常用的方法,也被多个标准所使用。由于桔霉素的限量较低,因此当前对于痕量浓度的样品仅靠 HPLC 的分析检测略显不足^[9]。桔霉素新国标 GB 5009.222-2016《食品安全国家标准食品中桔青霉素的测定》是在旧国标 GB/T 5009.222-2008《红曲类产品中桔青霉素的测定》的基础上进行改进,在样品前处理阶段增加了免疫亲和柱净化操作,能够起到除杂和富集的效果,其定量限由 1 mg/kg 改进至 80 $\mu\text{g/kg}$,提高了检测灵敏度,然而免疫亲和柱的成本较为高昂^[10],因此有必要开发一种低成本的替代方法。

分子印迹技术使用化学合成方法人为构建具有特殊识别位点的聚合物(分子印迹聚合物,

Molecular imprinted polymer, MIP),该聚合物能够模拟抗体对抗原的识别功能,在特异性吸附的基础上实现对目标物的分离纯化或分析检测^[11-12]。MIP 常用的构建方法是:以目标物为模板分子,将具有聚合作用功能单体与模板分子之间进行共价或非共价结合,再加入交联剂和引发剂对功能单体进行交联聚合,最后将模板分子洗脱,从而形成对目标物具有吸引力的多孔穴印迹聚合物^[13-14]。当前已有基于分子印迹技术开发用于桔霉素的提纯或检测的固相萃取柱(Solid phase extraction column)的报道^[15-16]。在构建桔霉素分子印迹聚合物时,洗脱溶剂无法完全清除聚合物深层的模板分子,在痕量分析时可能会发生模板泄露^[17]。为避免模板泄露带来的检测失准问题,需要使用与目标物结构相似的假模板^[18-19]。然而,当前缺乏桔霉素与假模板分子的同时检测方法,在预组装桔霉素分子印迹聚合物时挑选功能单体也较为盲目,不利于快速构建桔霉素分子印迹聚合物。

基于此,本文以 1-羟基-2-萘甲酸(1-Hydroxy-2-naphthoic acid, 1H2NA)为假模板分子,构建同时检测 CIT 和 1H2NA 的方法,基于量子化学计算方法筛选桔霉素分子印迹聚合物的功能单体,用响应面法优化该聚合物的最佳组装工艺,同时分析该聚合物对桔霉素的吸附性能,旨在为分子

收稿日期: 2022-11-28

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目
(2018YFC1604106)

第一作者: 周康熙,男,博士生

通信作者: 倪莉 E-mail: 385709570@qq.com

印迹聚合物的构建和桔霉素富集与检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

功能红曲(*Fermentum Rubrum*)FHQ2取自福建宁德;CIT(色谱纯级),上海源叶生物科技有限公司;1H2NA、2,6-二氨基吡啶(2,6-Diaminopyridine, 2,6-DAP)、甲基丙烯酸(Methacrylic acid, MAA)、乙二醇二甲基丙烯酸酯(Ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA)等试剂(分析纯级),阿拉丁试剂(上海)有限公司;磷酸、三乙胺、四氢呋喃等试剂(分析纯级),国药集团化学试剂有限公司;乙腈(色谱纯级),德国默克公司;桔霉素免疫亲和柱,美国VICAM公司。

1.2 仪器与设备

Ultimate 3000 UHPLC液相色谱仪,美国赛默飞世尔科技公司;RE-52AA型旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;ZWY-2102C型摇床,上海智城分析仪器制造有限公司;DLSB-5/10低温冷却循环泵,予华仪器有限责任公司;V-100型步琦真空泵,瑞士BUCHI有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 CIT和1H2NA的同时检测

1.3.1.1 标品的配置 以75%乙醇为溶剂,配制同时含有500 ng/mL的CIT和4 000 ng/mL的1H2NA的混标母液,将母液与75%乙醇分别按1:4、2:3、3:2、4:1的体积比稀释成不同质量浓度梯度的标品溶液。

1.3.1.2 样品的处理 对于分子印迹样品,取分子印迹聚合物清洗液或者吸附试验的样品于12 000 r/min离心5 min,取上清液用0.22 μm滤膜过滤后待测;对于红曲样品,取0.5 g样品加入75%乙醇20 mL,60℃提取120 min,4 500 r/min离心15 min,取上清液经0.22 μm滤膜后待测。

1.3.1.3 自建液相色谱的检测条件 色谱柱:Agilent Zorbax SB-C18(4.6 mm×250 mm,5 μm),激发波长331 nm,发射波长500 nm,样品进样量20 μL,流动相:A相为同时含有0.02%三乙胺、0.32%四氢呋喃和0.1%磷酸的水溶液,B相为100%的乙腈,流动相的洗脱梯度条件见表1。

表1 HPLC流动相的梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions of mobile phase of HPLC

时间/min	流速/ mL·min ⁻¹	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	1.0	70	30
2.0	1.0	70	30
5.0	1.0	30	70
7.5	1.5	15	85
8.0	1.5	10	90
8.5	1.5	5	95
9.0	1.5	0	100
11.0	1.2	0	100
12.5	1.2	0	100
13.5	1.0	30	70
15.0	1.0	70	30
17.0	1.0	70	30

1.3.2 基于量子化学计算筛选功能单体 以1H2NA为假模板分子,以MAA等20个常见的功能单体为对象,用量子化学相关软件优化假模板分子与备选功能单体的最低能量构象图及计算各原子电荷分布,推测其可能的主要质子给出点和电子给出点,初筛合适的功能单体,再将假模板分子与之进行分子对接并优化其结合物的最低能量构象,根据式(1)计算两者之间的结合能(ΔE),以此来筛选适合制备CIT分子印迹聚合物的功能单体。

$$\Delta E(\text{kJ/mol})=E_{AB}-n \times E_A-E_B \quad (1)$$

式中, E_{AB} ——结合物单点能,kJ/mol; n ——功能单体数量; E_A ——功能单体单点能,kJ/mol; E_B ——模板分子单点能,kJ/mol。

量子化学的计算过程如下:首先使用Gaussian 16软件在B3LYP/6-31g**em=gd3bj水平进行优化,并在相同水平做振动分析以确保没有虚频。所有构型的单点能均在B3LYP/def2tzvp em=gd3bj水平进行。结合构型搜索以及优化采用molclus软件^[20]产生最可能的50个吸附结构,并使用xtb软件^[21]进行初步优化并进行去除能量重叠,得到能量最低的6种构型。将6种构型在B3LYP/6-31g** em=gd3bj水平进一步优化,在相同水平做振动分析以确保没有虚频,并在B3LYP/

def2tzvp em=gd3bj 水平进行单点计算。该部分数据的计算委托中科科翼(北京)科技有限公司代为执行。

1.3.3 分子印迹聚合物的制备 以 1H2NA 为假模板分子、2,6-DAP 为功能单体、二甲亚砜为致孔剂、 β -环糊精为辅助致孔剂、EGDMA 为交联剂、偶氮二异丁腈为引发剂制备桔霉素分子印迹聚合物 MIP1。MIP1 的具体制备步骤与参考文献[22]所述一致。MIP1 的优化指标为 1H2NA、2,6-DAP 和 EGDMA 添加的物质的量,这三者的初始添加物质的量分别为 1,2,2 mmol,单因素优化在此基础上将每种物质添加的物质的量分别替换为 1,2,3,4,5,6 mmol,基于单因素优化结果使用 Design-Expert V8.0.6.1 软件进行三因素三水平响应面优化。在 MIP1 最优合成条件下,以不加 1H2NA 的聚合物为 NIP1;在 MIP1 最优合成条件下,将 2,6-DAP 替换为 MAA 即得 MIP2;在 MIP2 制备工艺的基础上不加 1H2NA 的聚合物即得 NIP2。

1.3.4 聚合物的动态吸附性考察 称取制备好的 MIP1、NIP1、MIP2 和 NIP2 各 0.25 g 分别均匀分散于 100 mL 锥形瓶内的 30 mL 200 ng/mL 桔霉素溶液中,将各个吸附体系在 30 °C、120 r/min 条件下振荡 180 min,从第 0 分钟开始每隔 30 min 取样 1 mL 并迅速进行高速离心(12 000 r/min 离心 5 min)和过膜(0.22 μ m 滤膜)处理,分析上清液中剩余桔霉素浓度,按式(2)计算不同分子印迹聚合物对桔霉素的吸附载量(Q)。

$$Q(\text{ng/g}) = \frac{(C_0 - C_t) \times V}{m} \quad (2)$$

式中, C_0 ——桔霉素的初始质量浓度,ng/mL; C_t —— t 时刻样品溶液中桔霉素质量浓度,ng/mL; V ——所取桔霉素溶液的体积,mL; m ——聚合物的质量,g。

1.3.5 聚合物的静态吸附性考察 以 100 mL 锥形瓶为容器,制备好的聚合物 MIP1、NIP1、MIP2 和 NIP2 每种各准备 7 份,每份 0.25 g,将每种聚合物分别均匀分散于 7 个不同质量浓度梯度(0,100,200,300,400,500,600 ng/mL)的 30 mL 桔霉素溶液中,再将各个吸附体系在 30 °C、120 r/min 条件下振荡 150 min,吸附结束后进行高速离心(12 000 r/min 离心 5 min)和过膜(0.22 μ m 滤膜)

处理,分析上清液中剩余桔霉素质量浓度,按式(2)计算不同分子印迹聚合物对桔霉素的吸附载量(Q)。

1.3.6 聚合物对红曲样品中桔霉素的吸附效果考察 称取 0.25 g 制备好的 MIP1、NIP1 和 MIP1 分别填充于 SPE 空柱中,封装后分别加入 75%乙醇润湿,直至不再流出液体,向柱子内加入 1 mL 样品溶液,收集过滤液直至液体不再流出,将液体 12 000 r/min 离心 5 min 后过膜用 HPLC 绘制图谱。

2 结果与分析

2.1 桔霉素和 1-羟基-2-萘甲酸同时检测方法的构建

在构建分子印迹聚合物时,洗脱溶剂无法将深埋于聚合物内部的模板分子完全洗脱,为避免模板泄露带来的检测失准问题,需要使用与目标物结构相似的假模板。1H2NA 与 CIT 分子结构较为相似,均具有荧光显色反应的聚酮环,两者的聚酮环上均具有邻位羟基和羧基,适宜作为 CIT 的假模板^[6]。对 CIT 和 1H2NA 同时检测方法的构建有助于同时监测 CIT 的吸附与假模板的洗脱。

由图 1 可知,新构建的 HPLC 检测方法能够将 CIT 和 1H2NA 相分离,两者峰形良好,不干扰、不拖尾、标曲线性好($R^2 > 0.999$),能够实现对这 2 种质的同时检测。以甲醇对分子印迹聚合物的清洗液为对象,添加一定质量浓度的 CIT 作为待测样品,经检测 2 种目标物的质量浓度后再做加标回收率试验,加标回收率均在 95%~100%之间(表 2),说明该方法能为后续 CIT 分子印迹聚合物的构建提供检测基础,尤其是检验聚合物对样品吸附过程中是否有模板泄露问题。此外,由于这两种物质结构过于相似,其经过 C18 柱的保留时间相差较短(0.48 min),验证了 1H2NA 可作为替代 CIT 作为分子印迹模板的可行性。

2.2 基于量子化学计算筛选功能单体

基于量子化学方法优化假模板分子 1H2NA 与 20 种功能单体的最低能量构象及计算各原子电荷分布,推测其主要质子给出点和电子给出点(表 3)。原子电荷大小与其电子交换能力有关,所带负电荷越大,电子越多,越能结合质子;所带正

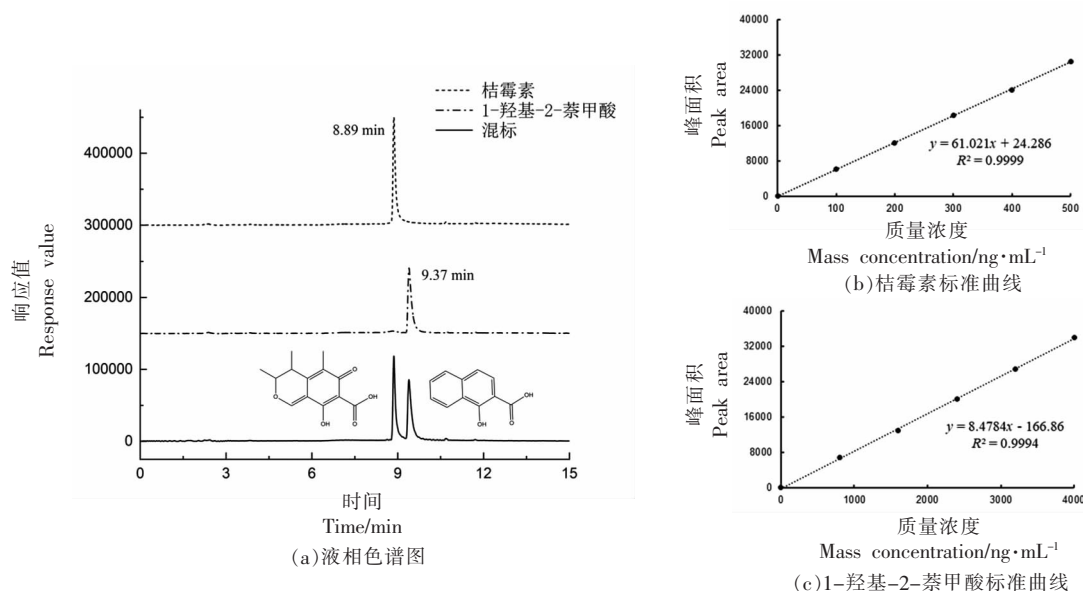


图1 CIT及1H2NA的液相色谱图(a)及其标准曲线(b,c)

Fig.1 Liquid chromatogram (a) and standard curve (b, c) of CIT and 1H2NA

表2 CIT和1H2NA同时检测方法的加标回收率

Table 2 The recovery rate of standard addition of the simultaneous detection method for CIT and 1H2NA

物质名称	原始质量浓度/ng·mL ⁻¹	加标质量浓度/ng·mL ⁻¹	总质量浓度测定/ng·mL ⁻¹	加标回收率/%
桔霉素	287.76	150	430.54	95.19
		300	583.54	98.59
		600	879.36	98.60
1H2NA	490.34	250	735.21	97.95
		500	984.23	98.78
		1000	1468.53	97.82

电荷越大,给质子能力越强。虽然所有物质均存在质子给出点和电子给出点,但两者的强度有所差异。相比于1H2NA,4-乙炔基咪唑、苯乙烯、对二乙炔基苯和对乙基苯乙烯主要质子给出点和电子给出点处的电荷较小,对目标物的结合能力较弱;MAA和2-(三氟甲基)丙烯酸给质子能力虽较强,但给电子能力较弱,2-(甲基丙烯氧基)-N,N,N,-三甲基乙烷-1-胺、烯丙胺、4-乙炔基吡啶、1-乙炔基咪唑、甲基丙烯酸甲酯、2-乙炔基吡啶、N-乙炔基吡咯烷酮、甲基丙烯酸二乙氨基乙酯则给质子能力不足,这两类物质与1H2NA的结合稳定性较低。初步筛选出较为合适的功能单体亚甲基丁二酸、4-乙炔基苯甲酸、丙烯酰胺、甲基丙烯酸甲酯、丙烯酸、2,6-DAP。

以此为基础,再次运用量子化学预测初筛后

的功能单体与1H2NA按物质的量比2:1结合后的最低能量构象模拟图(图2),并根据式(1)计算结合能(ΔE)。结合能越高,预组装的MIP就越稳定。从表4中可看出,1H2NA与2,6-DAP的结合最为稳定,因此选择2,6-DAP作为功能单体。

2.3 响应面优化CIT分子印迹聚合物的合成工艺

模板分子、功能单体和交联剂的添加比例需要均衡,当模板分子比例太低或交联剂比例太高时,可能会形成较多的非印迹空穴,当模板分子比例太高或交联剂比例太低时,可能会导致印迹聚合物结构松散,在研磨或超声处理时其印迹空穴的结构被破坏。以桔霉素吸附载量为指标,采用响应面法优化构建桔霉素分子印迹聚合物所需的模板分子、功能单体和交联剂的最优配比,参考单因

表 3 假模板分子与各功能单体的主要质子给出点和电子给出点

Table 3 The main proton-giving points and electron-giving points of pseudo-template molecules and functional monomers

编号	名称	序号	原子	原子电荷	编号	名称	序号	原子	原子电荷
CA	1-羟基-2-萘甲酸(假模板分子)	12	O	-0.604	FM11	甲基丙烯酸甲酯	5	O	-0.580
		13	O	-0.615			11	H	0.180
		21	H	0.441			12	H	0.180
		22	H	0.417			FM12	苯乙烯	1
FM1	甲基丙烯酸	5	O	-0.588	9	H			0.176
		12	H	0.432	10	H	0.176		
FM2	2-(三氟甲基)丙烯酸	5	O	-0.576	FM13	对二乙烯基苯	8	C	-0.402
		12	H	0.448			10	C	-0.405
FM3	亚甲基丁二酸	7	O	-0.597			16	H	0.175
		8	O	-0.621			17	H	0.175
		14	H	0.453	19	H	0.175		
		15	H	0.439	20	H	0.175		
FM4	4-乙烯基苯甲酸	9	O	-0.599	FM14	丙烯酸	4	O	-0.610
		16	H	0.453			9	H	0.435
FM5	2-(甲基丙烯氧基)-N,N,N-三甲基乙烷-1-胺	4	C	-0.458	FM15	甲基丙烯酸二乙氨基乙酯	5	O	-0.620
		5	O	-0.590			17	H	0.209
		16	H	0.207			18	H	0.209
		17	H	0.207			FM16	2,6-二氨基吡啶	7
FM6	烯丙胺	1	N	-1.012	8	N			-1.065
		4	C	-0.539	12	H			0.447
		10	H	0.218	13	H			0.440
FM7	4-乙烯基吡啶	11	H	0.218	14	H	0.441		
		6	N	-0.742	15	H	0.449		
		10	H	0.202	FM17	对乙基苯乙烯	1	C	-0.428
11	H	0.196	11	H			0.178		
FM8	1-乙烯基咪唑	2	N	-0.629			12	H	0.178
		10	H	0.239			FM18	2-乙烯基吡啶	6
FM9	4-乙烯基咪唑	11	H	0.220	13	H			0.197
		2	N	-0.555	FM19	N-乙烯基吡咯烷酮	6	O	-0.628
10	H	0.321	8	C			-0.514		
FM10	丙烯酰胺	4	O	-0.675			16	H	0.200
		5	N	-0.944	17	H	0.200		
		9	H	0.428	FM20	甲基丙烯酸羟乙酯	5	O	-0.607
		10	H	0.436			9	O	-0.712
						19	H	0.453	

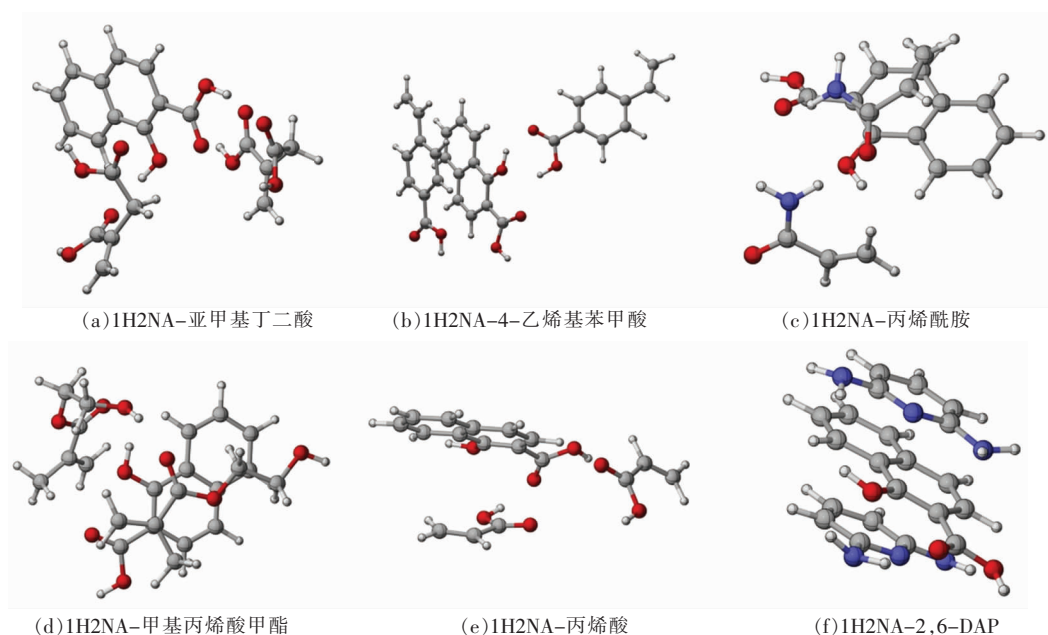


图2 假模板分子与备选功能单体的最低能量构象模拟图

Fig.2 Simulation diagram of the lowest energy conformation of pseudo-template molecule and alternative functional monomer

表4 假模板分子与备选功能单体的结合能理论计算结果

Table 4 Theoretical calculation results of binding energy between pseudo-template molecule and alternative functional monomer

目标物类型	$E/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta E/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
1-羟基-2-萘甲酸	-1 706 532.895	
亚甲基丁二酸	-1 300 372.857	
4-乙烯基苯甲酸	-1 308 704.031	
丙烯酰胺	-649 580.681	
甲基丙烯酸羟乙酯	-1 209 122.386	
丙烯酸	-701 774.159	
2,6-二氨基吡啶	-943 041.423	
1-羟基-2-萘甲酸——亚甲基丁二酸	-4 307 470.103	-191.494
1-羟基-2-萘甲酸——4-乙烯基苯甲酸	-4 324 092.493	-151.536
1-羟基-2-萘甲酸——丙烯酰胺	-3 005 865.159	-170.902
1-羟基-2-萘甲酸——甲基丙烯酸羟乙酯	-4 124 967.471	-189.804
1-羟基-2-萘甲酸——丙烯酸	-3 110 241.276	-160.063
1-羟基-2-萘甲酸——2,6-二氨基吡啶	-3 592 819.303	-203.562

素优化结果(图3)3种物质所选添加物质的量优化范围为1~4 mmol,响应面优化试验方案及结果见表5。

拟合方程:

$$Y = -295.01879 + 89.62513X_1 + 2.92325X_2 + 220.21301X_3 + 6.09235X_1X_2 - 5.61967X_1X_3 -$$

$$20.96920X_2X_3 - 17.31930X_1^2 + 10.25023X_2^2 - 28.89983X_3^2$$

其中, Y ——吸附载量,ng/g; X_1 ——假模板分子用量,mmol; X_2 ——功能单体用量,mmol; X_3 ——交联剂用量,mmol。

当 $X_1=2.95$ mmol, $X_2=4$ mmol, $X_3=2.07$ mmol

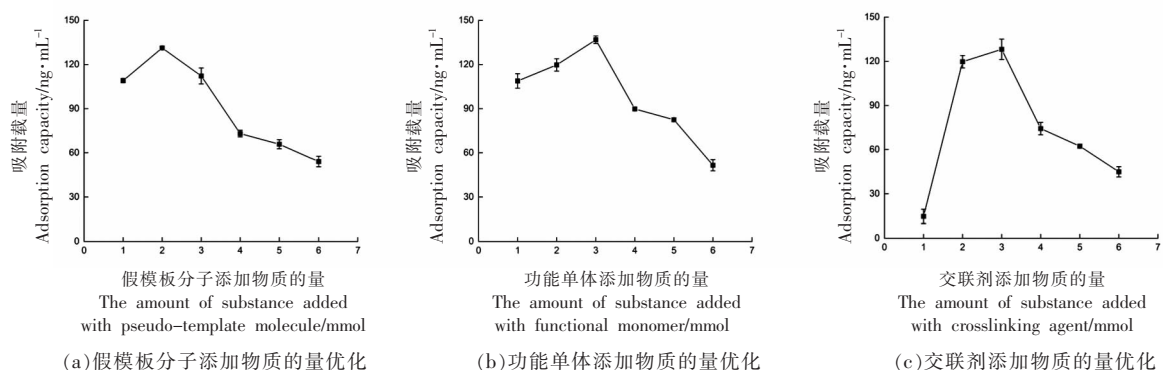


图 3 MIP1 组装体系的单因素优化

Fig.3 Single factor optimization of MIP1 assembly system

表 5 响应面优化桔霉素分子印迹聚合物制备工艺的试验方案

Table 5 Test scheme for optimizing the preparation process of citrinin molecularly imprinted polymer by response surface methodology

序号	假模板分子/ mmol	功能单体/ mmol	交联剂/ mmol	吸附载量/ ng·g ⁻¹	序号	假模板分子/ mmol	功能单体/ mmol	交联剂/ mmol	吸附载量/ ng·g ⁻¹
1	4.0	2.5	4.0	34.295	10	2.5	1.0	4.0	97.295
2	4.0	4.0	2.5	161.302	11	1.0	2.5	1.0	0.382
3	1.0	2.5	4.0	78.198	12	2.5	4.0	4.0	89.656
4	1.0	4.0	2.5	90.010	13	2.5	2.5	2.5	153.921
5	2.5	2.5	2.5	109.366	14	1.0	1.0	2.5	102.254
6	2.5	1.0	1.0	0.011	15	2.5	4.0	1.0	181.095
7	2.5	2.5	2.5	138.452	16	4.0	1.0	2.5	118.715
8	4.0	2.5	1.0	7.056	17	2.5	2.5	2.5	144.930
9	2.5	2.5	2.5	123.210					

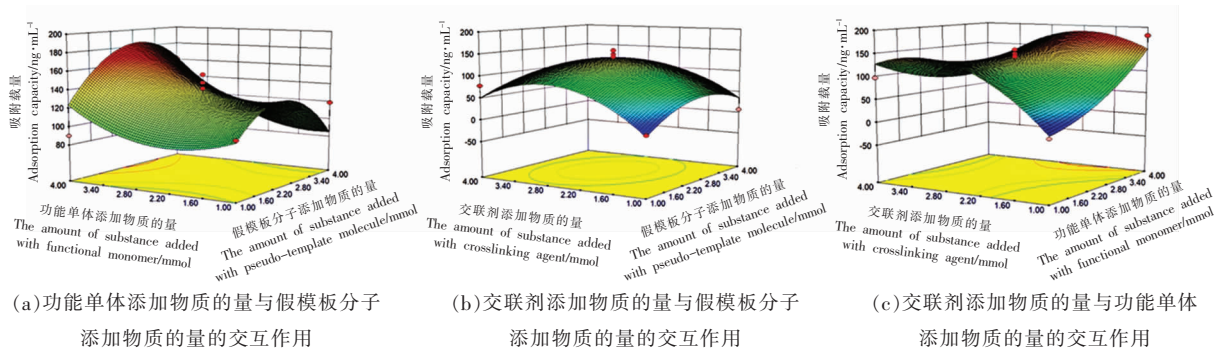


图 4 MIP1 组装体系的响应面优化

Fig.4 Response surface optimization of MIP1 assembly system

时,该分子印迹聚合物对桔霉素的吸附载量最大,其理论最大值为 190.31 ng/g。经过试验验证,该聚合物对桔霉素的实际吸附载量为 (195.10±13.21) ng/g,符合理论模型,相比于优化前【假模板分子用

量 1 mmol、功能单体用量 2 mmol、交联剂用量 2 mmol,吸附载量 (109.04±1.49)ng/g】提高了 0.79 倍。

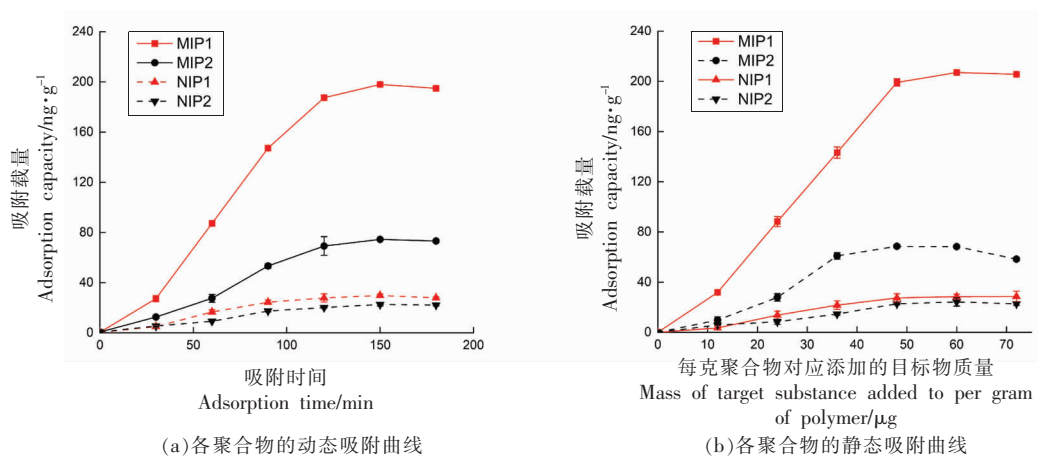


图5 各聚合物的动态吸附曲线(a)和静态吸附曲线(b)

Fig.5 Dynamic adsorption curve (a) and static adsorption curve (b) of each polymer

2.4 CIT分子印迹聚合物的吸附特性研究

以功能单体 MAA 为对照,对比量子化学筛选的最优功能单体 2,6-DAP 对桔霉素的吸附效果。从图 5 可看出,无论是动态吸附还是静态吸附,用 2,6-DAP 合成的 MIP1 对桔霉素的吸附载量都要大于以 MAA 合成的 MIP2,说明量子化学方法对功能单体筛选具有实用性。对于 MIP1,当吸附时间超过 120 min 时,其吸附载量已趋近饱和,在 150 min 时吸附载量最大,为 $(197.95\pm 1.40)\text{ng/g}$;由静态吸附曲线可知,当桔霉素含量低于 400 ng/mL 时,MIP1 能够快速吸附桔霉素,当其质量浓度大于 400 ng/mL 时,MIP1 对桔霉素的吸附已接近饱和,在桔霉素质量浓度为 500 ng/mL 时,其最大吸附载量为 $(207.05\pm 1.97)\text{ng/g}$,其结果接近于动态吸附最大吸附载量,也接近于响应面优化结果,说明 MIP1 的吸附性能较为稳定。

MIP1 对功能红曲 FHQ2 醇提液中桔霉素的吸附效果(图 6)显示,桔霉素峰形良好无干扰,说明桔霉素和 1H2NA 的同时检测方法也适用于桔霉素的分离检测。MIP1 对桔霉素的吸附能力均优于 MIP2 和 NIP1,其吸附后的溶液中桔霉素的峰面积较原液下降了 82.98%,大于 MIP2 的 26.89% 和 NIP1 的 7.72%;同时,MIP1 和 MIP2 这两种印迹聚合物对桔霉素都有一定的识别吸附能力,因此在红曲醇提液中 MIP1 和 MIP2 对桔霉素吸附量的比值(3.09 倍)与桔霉素标品溶液中 MIP1 和 MIP2 对桔霉素吸附量的比值(3.03 倍)基本一致。

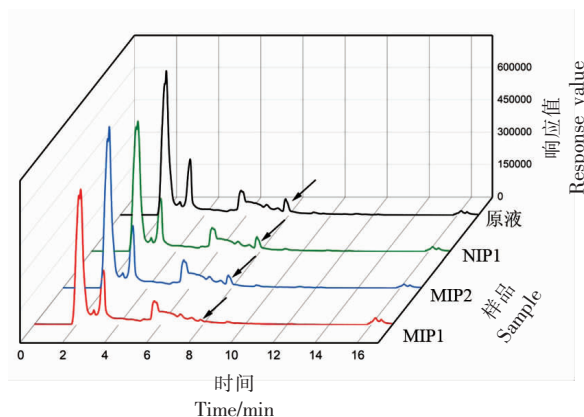


图6 各聚合物对功能红曲醇提液中桔霉素的吸附效果

Fig.6 Adsorption effect of polymers on CIT in alcohol extract of functional Hongqu

3 讨论

计算机分子模拟技术是量子化学理论的进一步升华,将其应用于分子印迹技术能够预测不同分子之间的结合位点及结合能力^[23],从而在筛选合成原料^[24]、确定不同合成原料之间比例^[25]、选择合适致孔剂^[26]等方面发挥作用,还能为印迹聚合物对目标物的识别机理提供理论解释^[27],有利于节约试验物资成本和时间成本。然而,使用不同程序进行计算有可能得出不同的结果,量子化学计算结果只能提供理论参考,最终优化结果还需要通过试验进行验证。

虽然本研究所合成的 MIP1 对 CIT 具有良好

的吸附特性,但从静态吸附特性曲线中可知,在吸附体系中,当 1 g MIP1 添加 60 μg CIT 时,MIP1 对 CIT 的吸附载量为 207.05 ng/g,目标物与印迹聚合物的识别空穴结合能力较低,这也是分子印迹聚合物可能存在的缺陷^[28-30]。为克服该缺陷,除了优选制备原料和制备工艺外,通常会将聚合物尽可能地研磨和过筛,以此在洗脱过程中脱除“包埋”过深的模板,尽量暴露出隐藏在聚合物内部的识别位点,减少目标物在被识别过程中的运动阻碍,以提高聚合物的吸附载量^[31-32]。然而,研磨操作也可能会破坏所构建的具有识别能力的空间结构,增加了非目标物的竞争吸附。表面分子印迹技术能够在基质材料表面建立一层分子印迹聚合物^[33],该聚合物比表面积较大^[34],能够避免聚合物研磨带来的问题,然而目前表面分子印迹技术尚处于发展阶段,这种聚合物本身对目标物的结合容量小,仅能对目标物进行分析检测,对其富集能力略显不足^[35]。就当前技术而言,开发检测和富集兼备的分子印迹技术仍有很大的发展空间。

4 结论

基于 HPLC 的 CIT 和 1H2NA 的同时检测方法能够满足对印迹聚合物构建过程中样品的分析检测,也适用于功能红曲中 CIT 的分离检测。响应面优化 MIP1 的制备工艺能使最优配方下的 MIP1 对 CIT 吸附载量提高 0.79 倍。基于量子化学方法优选出的功能单体 2,6-DAP 所构建的 MIP1 相比于常用功能单体 MAA 所构建的 MIP2 对 CIT 吸附能力更佳,其吸附载量是后者的 3 倍。

参 考 文 献

- [1] LI Y P, HU Y C, TU Z Q, et al. Research on the mechanism of action of a citrinin and anti-citrinin antibody based on mimotope X27[J]. *Toxins*, 2020, 12(10): E655.
- [2] AYDIN Y, YILMAZ B O, YILDIZBAYRAK N, et al. Evaluation of citrinin-induced toxic effects on mouse sertoli cells[J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2019, 44(6): 559-565.
- [3] HAN Q Q, YU L B, GUO Y Q, et al. Toxic effects of citrinin on the male reproductive system in mice [J]. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2012, 64(5): 465-469.
- [4] RAI D, MLADINI M, ELJEI D, et al. Effects of combined treatment with ochratoxin A and citrinin on oxidative damage in kidneys and liver of rats[J]. *Toxicol*, 2018, 146: 99-105.
- [5] 林瑾, 宋畅, 周康熙, 等. 福建红曲产业的发展现状与对策[J]. *中国酿造*, 2018, 37(11): 200-203.
LIN J, SONG C, ZHOU K X, et al. Development status and countermeasures of Fujian Hong Qu industry[J]. *China Brewing*, 2018, 37(11): 200-203.
- [6] LI X M, SHEN X H, XUE L, et al. A validated RP-HPLC method for the determination of citrinin in Xuezhikang capsule and other *Monascus*-fermented products[J]. *Journal of Chemistry*, 2019, 9(1): 260-266.
- [7] ZHOU Y X, CHEN J B, DONG L N, et al. A study of fluorescence properties of citrinin in β -cyclodextrin aqueous solution and different solvents[J]. *Journal of Luminescence*, 2012, 132(6): 1437-1445.
- [8] SINGH G, VELASQUEZ L, HUET A, et al. Development of a sensitive polyclonal antibody-based competitive indirect ELISA for determination of citrinin in grain-based foods [J]. *Food Additives & Contaminants. Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 2019, 36(10): 1567-1573.
- [9] GU S, WANG X Y, YANG L, et al. Development and validation of a bullfrog-immunoaffinity column clean-up for citrinin determination in red yeast rice [J]. *Process Biochemistry*, 2019, 78: 200-206.
- [10] 高玲, 王毅谦, 黄娟, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定红曲类保健品中的桔青霉素[J]. *环境化学*, 2017, 36(2): 453-455.
GAO L, WANG Y Q, HUANG J, et al. HPLC-MS/MS determination of citrinin in *Monascus* kinds of health products[J]. *Environmental Chemistry*, 2017, 36(2): 453-455.
- [11] OROWITZ T E, SOMBO P P A A, RAHAYU D, et al. Microsphere polymers in molecular imprinting: Current and future perspectives[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25(14): E3256.
- [12] AEMAIL T C C C, STEFANUCCI E, PILETSKA E, et al. Synthetic mechanism of molecular imprinting at the solid phase [J]. *Macromolecules*, 2020, 53(4): 1435-1442.

- [13] VILLA C C, SÁNCHEZ L T, VALENCIA G A, et al. Molecularly imprinted polymers for food applications: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 111: 642–669.
- [14] DONG C Y, SHI H X, HAN Y R, et al. Molecularly imprinted polymers by the surface imprinting technique[J]. European Polymer Journal, 2021, 145: 110231.
- [15] IVONA L, DALIBOR Š, LUCIE H, et al. A fully automated and fast method using direct sample injection combined with fused-core column on-line SPE-HPLC for determination of ochratoxin A and citrinin in lager beers[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(12): 3319–3329.
- [16] GUO B Y, WANG S X, REN B Z, et al. Citrinin selective molecularly imprinted polymers for SPE[J]. Journal of Separation Science, 2010, 33(8): 1156–1160.
- [17] APPELL M, MUELLER A. Mycotoxin analysis using imprinted materials technology: Recent developments [J]. Journal of AOAC International, 2016, 99(4): 861–864.
- [18] APPELL M, JACKSON M A, WANG L C, et al. Determination of citrinin using molecularly imprinted solid phase extraction purification, HPLC separation, and fluorescence detection [J]. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 2015, 38(20): 1815–1819.
- [19] URRACA J, EACUTE H, REZ J E, et al. Development of magnetic molecularly imprinted polymers for selective extraction: Determination of citrinin in rice samples by liquid chromatography with UV diode array detection[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(11): 3033–3042.
- [20] LU T. Molclus program version 1.9.4 [EB/OL]. (2020-04-21)[2022-04-28]. <http://www.keinsci.com/research/molclus.html>.
- [21] GRIMME S, BANNWARTH C, SHUSHKOV P. A robust and accurate tight-binding quantum chemical method for structures, vibrational frequencies, and noncovalent interactions of large molecular systems parametrized for all spd-block elements ($Z = 1-86$) [J]. Journal of Chemical Theory and Computation, 2017, 13(5): 1989–2009.
- [22] 倪莉, 周康熙, 吕旭聪. 一种桔霉素分子印迹聚合物的构建方法: 20211110637.1[P]. 2021-11-16[2022-04-28].
- NI L, ZHOU K X, LÜ X C. A construction method of citrinin molecularly imprinted polymer: 20211110637.1[P]. 2021-11-16[2022-04-28].
- [23] LIU Z M, XU Z G, WANG D, et al. A review on molecularly imprinted polymers preparation by computational simulation-aided methods [J]. Polymers, 2021, 13(16): 2657.
- [24] LI H H, ZHANG W C, WU Z Y, et al. Theoretical design, preparation, and evaluation of Ginkgolide B molecularly imprinted polymers[J]. Journal of Separation Science, 2020, 43(2): 514–523.
- [25] 谷雪贤. 基于四氯二苯并-对-二噁英的分子印迹材料的计算机模拟研究[J]. 化工新型材料, 2021, 49(7): 171–174.
- GU X X. Computer simulation of molecularly imprinted material based on tetrachlorodibenzo-p-dioxin [J]. New Chemical Materials, 2021, 49(7): 171–174.
- [26] 陈晓龙, 李耀, 阚建全. 花椒麻味物质分子印迹预组装体系的分子模拟与吸附性能[J]. 中国食品学报, 2019, 19(5): 76–84.
- CHEN X L, LI Y, KAN J Q. Molecular simulation and adsorption properties of the molecularly imprinted polymer of numb-taste components[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(5): 76–84.
- [27] DONG W G, YAN M, WU G S, et al. Effect of solvent on molecular recognition of molecularly imprinted polymer: Experimental investigation and computational quantum chemistry analysis [J]. Journal of Chemical Industry and Engineering (China), 2005, 56(7): 1247–1252.
- [28] 张成博, 李兆周, 侯玉泽, 等. 分子印迹技术在药物残留检测中的应用[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 323–328.
- ZHANG C B, LI Z Z, HOU Y Z, et al. Application of molecular imprinting technology in the detection of drug residues[J]. Food Science, 2014, 35(9): 323–328.
- [29] 许祯毅, 吴玉琼, 范俐, 等. 分子印迹技术在食品安全检测领域的应用进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(3): 207–212.
- XU Z Y, WU Y Q, FAN L, et al. Application progress of molecular imprinting technology in food safety detection[J]. Food Research and Development,

- 2021, 42(3): 207–212.
- [30] 李会萍, 王江涛. 分子印迹纳米材料研究进展[J]. 中国粉体技术, 2020, 26(1): 22–28.
LI H P, WANG J T. Research progress of molecularly imprinted nanomaterials[J]. China Powder Science and Technology, 2020, 26(1): 22–28.
- [31] 谭钰清, 孙梦瑶, 刘宇婷, 等. 应用介孔分子印迹聚合物萃取粮食中的乙酰甲胺磷[J]. 分析测试学报, 2019, 38(7): 811–816.
TAN Y Q, SUN M Y, LIU Y T, et al. Extraction of acephate in grains using mesoporous molecularly imprinted polymer[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2019, 38(7): 811–816.
- [32] 李杰. 分子印迹材料的制备及性能研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2018.
LI J. Preparation and properties of molecularly imprinted materials[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2018.
- [33] DU Q S, ZHANG Y, YU L L, et al. Surface molecularly imprinted polymers fabricated by differential UV–vis spectra and reverse prediction method for the enrichment and determination of sterigmatocystin[J]. Food Chemistry, 2022, 367: 130715.
- [34] PAN T, LIN Y L, WU Q Z, et al. Preparation of boronate–functionalized surface molecularly imprinted polymer microspheres with polydopamine coating for specific recognition and separation of glycoside template[J]. Journal of Separation Science, 2021, 44(12): 2465–2473.
- [35] 杜晓芳, 李兆周, 陈秀金, 等. 喹诺酮类药物印迹仿生抗体的研制及应用进展[J]. 化工进展, 2020, 39(4): 1447–1457.
DU X F, LI Z Z, CHEN X J, et al. Development and application progress of quinolone imprinted biomimetic antibody[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2020, 39(4): 1447–1457.

Studies on Quantum Chemical Simulation and Adsorption Properties of Citrinin Molecularly Imprinted Preassembly System

Zhou Kangxi^{1,2}, Wu Li², Lü Xucong², Ni Li^{1,2*}

^{(1)College of Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108}

^{2Institute of Food Science and Technology, Fuzhou University, Fujian Center of Excellence for Food Biotechnology, Fuzhou 350108)}

Abstract The purpose of this study was to provide new ideas for solving the problems of large leakage of template molecules and screening of functional monomers in the construction and application of molecularly imprinted polymers of citrinin. 1-hydroxy-2-naphthoic acid was used as a pseudo-template molecule, and a simultaneous determination of citrinin and 1-hydroxy-2-naphthoic acid was established based on liquid chromatography, which had a good recovery ($\geq 95\%$) for molecularly imprinted eluent and could also separate citrinin from the alcohol extract of functional Hongqu. The functional monomer 2,6-diaminopyridine for the construction of molecularly imprinted polymer was optimized by the quantum chemical method through molecular configuration optimization, atomic charge distribution, and binding energy calculation. The preparation process of the imprinted polymer was optimized by response surface methodology. The adsorption capacity of the optimized polymer to citrinin was as high as (195.10 ± 13.21) ng/g, which was 0.79 times higher than that before optimization. Finally, the adsorption properties of the optimized polymer and the control polymer were compared with the polymer constructed with methacrylic acid as a functional monomer. The adsorption capacity of the former to citrinin was three times that of the latter, which confirmed the practicability of computer simulation in the construction of citrinin molecularly imprinted polymer. This study aimed to provide references for the construction of molecularly imprinted polymers and the enrichment and detection of citrinin.

Keywords citrinin; Hongqu; molecular imprinting; quantum chemistry; adsorption properties