

谷胱甘肽磁性分子印迹聚合物的制备及吸附性能研究

王茹娟 马应霞 路翠萍 李涛 杜雪岩*

(兰州理工大学 省部共建有色金属先进加工与再利用国家重点实验室 材料科学与工程学院 甘肃 兰州 730050)

摘要 采用表面分子印迹技术,以谷胱甘肽(GSH)为模板分子, *N*-乙烯基吡咯烷酮(NVP)和丙烯酰胺(AM)为功能单体, *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)为交联剂, γ -(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷(KH570)改性的 Fe_3O_4 纳米颗粒为磁性载体,制备了对 GSH 有特异识别性的磁性分子印迹聚合物(GSH-MMIPs)。利用 X 射线衍射仪(XRD)、透射电子显微镜(TEM)、红外光谱(FT-IR)和振动样品磁强计(VSM)对聚合物进行了表征,结果表明磁性载体表面成功地包覆了分子印迹聚合物薄层。静态吸附平衡实验和 Scatchard 分析结果表明, GSH-MMIPs 中存在两类不同的结合位点,平衡解离常数分别为 8.786×10^{-4} mol/L 和 5.424×10^{-3} mol/L,最大吸附量分别为 49.195 mg/g 和 155.003 mg/g。与化学组成相同的磁性非印迹聚合物(GSH-MNIPs)相比, GSH-MMIPs 对谷胱甘肽有较高的选择吸附性能。

关键词 磁性纳米颗粒; 分子印迹聚合物; 谷胱甘肽; 吸附

Preparation and Adsorption Property of Glutathione Magnetic Molecularly Imprinted Polymers

Wang, Rujuan Ma, Yingxia Lu, Cuiping Li, Tao Du, Xueyan*

(State Key Laboratory of Advanced Processing and Recycling of Non-ferrous Metals, School of Materials Science & Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050)

Abstract The aim of this work was to produce a kind of magnetic molecularly imprinted polymers (MMIPs) with core-shell structure and good magnetic separation performance. Compared with the preparation of traditional MIPs, a novel process was adopted to prepare MMIPs with good simplicity, flexibility and selectivity, in which Fe_3O_4 NPs were firstly prepared by a reverse microemulsion method, and subsequently directly added to the mixed solution to undergo the polymerization reaction without washing and drying. This method avoids available the agglomeration and oxidation of Fe_3O_4 NPs. The MMIPs for glutathione (GSH) specific recognition (GSH-MMIPs), with core-shell structure, were prepared via one-step method polymerization, in which GSH as template molecule, *N*-vinylpyrrolidone (NVP) and acrylamide (AM) as functional monomers, *N,N'*-methylene bisacrylamide as crosslinker, H_2O_2 -Vc as initiator and Fe_3O_4 nanoparticles (NPs) modified with γ -methacryloxypropyltrimethoxysilane (KH-570) as magnetic carrier. The as-prepared polymers were characterized by using of X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and vibrating sample magnetometer (VSM). The results demonstrated that an imprinted polymer layer was successfully coated onto the surface of modified Fe_3O_4 NPs, resulting in a narrow diameter distribution and good magnetic responsibility. The specific adsorption equilibrium and selectivity were evaluated by batch rebinding studies. The Scatchard analysis showed that there were two kinds of binding sites in the GSH-MMIPs, the dissociation constants were 8.786×10^{-4} mol/L and 5.424×10^{-3} mol/L, and the corresponding maximum adsorption capacities of GSH onto GSH-MMIPs were 49.195 mg/g and 155.003 mg/g, respectively. The selectivity of the GSH-MMIPs was also evaluated to determine the rebinding capability of GSH and its analogues, compared with that of the magnetic non imprinted polymers (MNIPs) with similar chemical components. The GSH-MMIPs with high imprinting factor of 3.99 indicated that it was of good selectivity. This protocol was further employed for the extraction and separation of GSH from an aqueous solution.

Keywords magnetic nanoparticles; molecularly imprinted polymer; glutathione; adsorption

1 引言

分子印迹技术(molecular imprinting technique, MIT)是指以某一特定目标分子为模板,制备对该目标分子具有特异选择性的聚合物的过程。通过该技术获得的高分

子材料称之为分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer, MIP)。相对于其他分子识别材料, MIP 具有构效预定性、特异识别性和广泛实用性等三大优点,主要应用于分离、传感和生物模拟等领域^[1-5]。然而,在分离领域的实际操作中,分子印迹技术往往需要抽滤或离

* E-mail: duxy@lut.cn

Received March 19, 2014; published April 10, 2014.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 51061009).

项目受国家自然科学基金(No. 51061009)资助。

心, 不易连续化, 难以实现大规模快速生产.

磁性技术应用广泛, 磁性纳米颗粒由于其特殊的物理和化学性质, 被用于细胞分离^[6]、靶向给药^[7]和固定化酶^[8]等领域, 在化学、生物和医学等领域发挥了越来越重要的作用. 但由于镍、钴等存在毒性, 在生物、医药等领域的应用受到严格限制, 因此目前以低毒、稳定、价廉易得的四氧化三铁(Fe_3O_4)作为磁性材料的研究受到了人们的极大关注^[9~11]. 如果赋予 MIP 磁响应性, 使 MIP 不但能识别特定分子, 而且在外加磁场作用下实现定向移动, 无疑可使 MIP 的应用领域得到进一步拓展^[12~14].

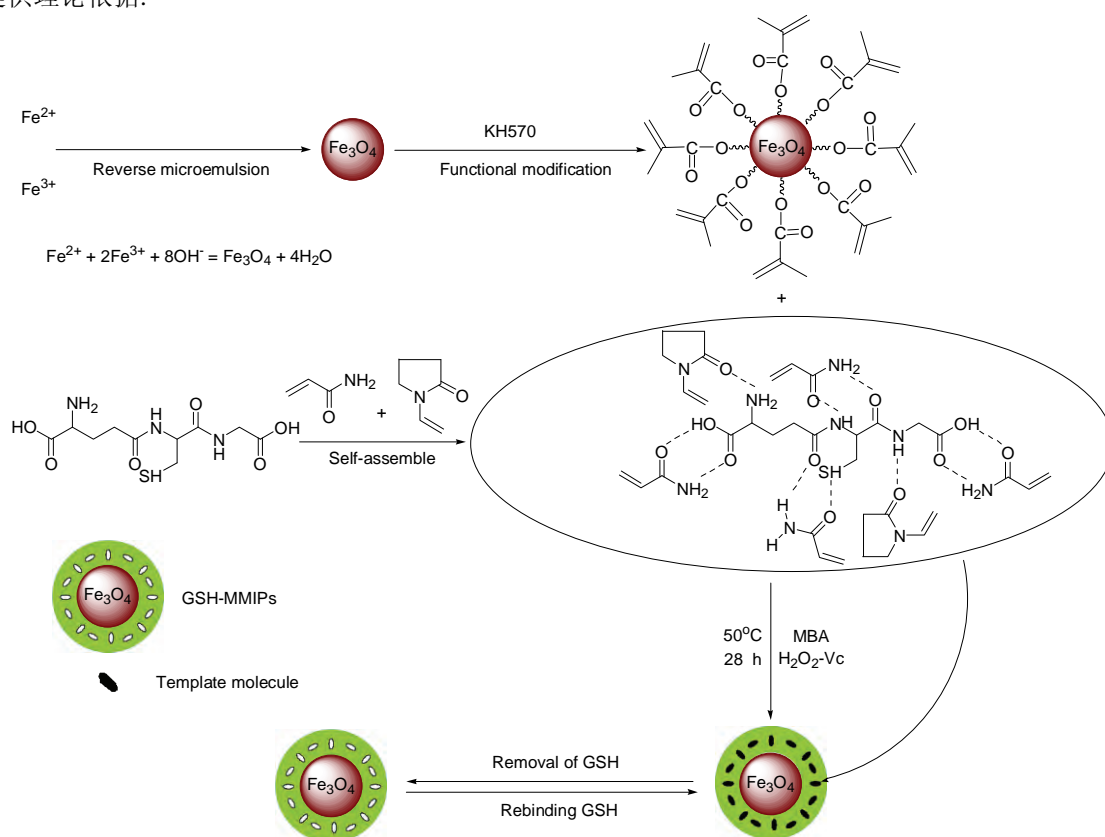
谷胱甘肽(GSH)是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸通过肽键缩合而成的三肽化合物, 广泛存在于动植物和微生物等细胞中, 是生物体内的主要抗氧化剂, 参与多种代谢过程, 能够保护细胞免受氧化和有毒物质的伤害, 因而在生物学、医疗、保健及抗衰老方面引起了人们的普遍关注. 目前 GSH 的分离纯化方法^[15]各有其优点, 但同时也存在提取率低、污染大及载体分离难等问题, 从而限制了其应用. 为此, 本文以反相微乳液法制备了 Fe_3O_4 纳米颗粒, 再用硅烷偶联剂 KH570 对其表面进行改性, 然后以此为磁性组分, GSH 为模板分子, 利用一步合成法制备了谷胱甘肽磁性分子印迹聚合物, 并对其吸附特性和识别机理进行了研究, 有望为类似分子识别的设计提供理论依据.

2 结果与讨论

2.1 谷胱甘肽磁性分子印迹聚合物 GSH-MMIPs 的构筑

谷胱甘肽磁性分子印迹聚合物 GSH-MMIPs 的构筑如图式 1 所示.

首先, 用反相微乳液法制备具有高结晶度且粒径分布较窄的 Fe_3O_4 纳米颗粒. 其次, 用 KH570 对 Fe_3O_4 纳米颗粒进行表面改性, 这不仅可以避免 Fe_3O_4 纳米颗粒在水溶液中的团聚, 还可使其表面具有双键等可聚合的基团. 然后, 将模板分子 GSH 与功能单体 AM 和 NVP 进行自组装, 由于 AM 的酰胺基和 NVP 的羰基与模板分子 GSH 中的羧基、氨基及巯基之间能产生氢键作用, AM 的氨基与 GSH 的羧基和巯基产生静电作用力, 而且 AM 和 NVP 功能基的空间结构存在很大的差异性, 当两者组成的复合功能单体与模板分子自组装时, 两者相互协同作用, 可以形成对 GSH 更加完整和紧密包覆的、更加稳定的主客体配合物. 最后将 GSH 与 AM 和 NVP 的主客体配合物加入到 KH570 改性后的 Fe_3O_4 溶液中, 接着加入交联剂和引发剂, 引发聚合. 反应结束后, 将会在载体表面形成一层聚合物薄膜, 去除模板分子后, 就可以得到具有大量识别位点的 GSH-MMIPs.



图式 1 谷胱甘肽磁性分子印迹聚合物 GSH-MMIPs 的合成示意图

Scheme 1 Schematic representation of the possible process of the GSH-MMIPs

2.2 谷胱甘肽磁性分子印迹聚合物 GSH-MMIPs 的特征

2.2.1 XRD 分析

图 1 是 Fe_3O_4 纳米颗粒(a)和 GSH-MMIPs (b)的 XRD 衍射图. 从图 1(a)可以清楚地看到 Fe_3O_4 的六个特征峰 ($2\theta=30.38^\circ, 35.58^\circ, 43.14^\circ, 53.48^\circ, 57.08^\circ, 62.66^\circ$), 根据 JCPDS 标准谱图可知其对应的晶面指数分别为 (220), (311), (400), (422), (511)和(440), 说明制备的 Fe_3O_4 纳米颗粒具有反尖晶石的结构. 根据谢乐公式 $D = K\lambda/(\beta\cos\theta)$ (D 为晶体直径, K 为谢乐常数, λ 为 X 射线波长, β 为衍射峰的半高峰宽, θ 为布拉格衍射角), 计算得到颗粒的平均粒径为 6.7 nm 左右. 从图 1(b)可以看到,

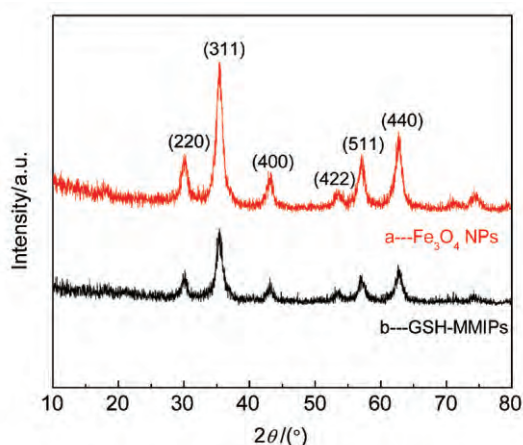


图 1 Fe_3O_4 纳米颗粒(a)和 GSH-MMIPs (b)的 XRD 衍射图
Figure 1 XRD patterns of Fe_3O_4 NPs (a) and GSH-MMIPs (b)

Fe_3O_4 纳米颗粒经表面分子印迹后, 各特征峰依然存在, 只是峰强度有所减弱, 这说明颗粒仍是反尖晶石结构, 可见包覆并不会改变磁性颗粒的晶型, 只会影响其 X-射线衍射峰的强度.

2.2.2 形貌与粒径分析

图 2 为 Fe_3O_4 纳米颗粒(a)和 GSH-MMIPs (b)的 TEM 照片、GSH-MMIPs 的 HRTEM 照片(c)以及分别采用 TEM (d)和动态激光光散射法 (DLS) (e)测定的 GSH-MMIPs 粒径分布图. 从图 2(a)可见, Fe_3O_4 纳米颗粒尺寸在 7 nm 左右, 这与 XRD 计算得到的粒径大小一致, 但有较为严重的团聚现象. 图 2(b)中纳米粒子的尺寸有所增大, 约为 10 nm, 说明在 Fe_3O_4 纳米颗粒的表面包覆了一层薄的印迹层, 而且其分散性明显改善. 图 2(c)的 HRTEM 照片, 说明通过反相微乳液一步合成法制备的磁性分子印迹聚合物具有核(Fe_3O_4 纳米颗粒) - 壳(表面印迹层)结构, 且表面印迹层的厚度约为 1.5 nm. 图 2 (d)是根据 TEM 得到的粒径分布图, 颗粒的粒径主要集中在 8.5~10.5 nm, (e)是通过 DLS 测得的 GSH-MMIPs 在水溶液中的粒径分布曲线, 可以看出, 所制备的 GSH-MMIPs 颗粒在溶液中呈单分散状态.

2.2.3 FT-IR 分析

图 3 为 Fe_3O_4 纳米颗粒(a)、KH570 改性的 Fe_3O_4 纳米颗粒(b)和 GSH-MMIPs (c)的红外光谱图. 图 3(a)中 587 cm^{-1} 的强峰为 Fe—O 的拉伸振动特征峰, 图 3(b)和图 3(c)中也出现了这个峰. 图 3(b)中 1100 cm^{-1} 出现的峰是 Si—O 的伸缩振动特征峰; 1713 cm^{-1} 是 C=O 的伸缩

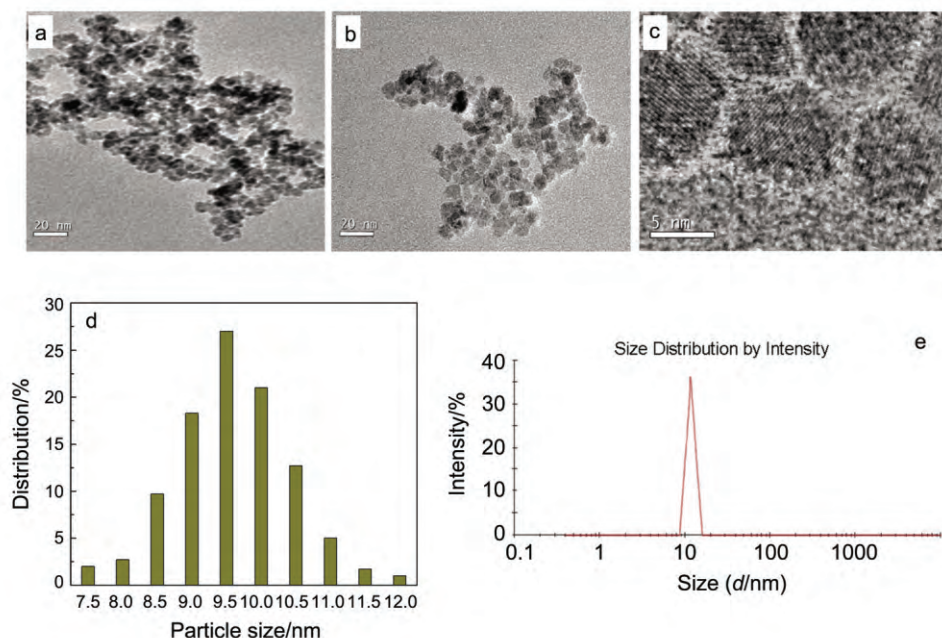


图 2 Fe_3O_4 纳米颗粒(a)和 GSH-MMIPs (b)的 TEM 照片、GSH-MMIPs 的 HRTEM 照片(c)以及采用 TEM (d)和 DLS (e)测定的 GSH-MMIPs 粒径分布图
Figure 2 TEM images of Fe_3O_4 NPs (a) and GSH-MMIPs (b); HRTEM image of GSH-MMIPs (c) and particle size distribution results of GSH-MMIPs by TEM (d) and DLS (e)

振动特征峰, 2848 cm^{-1} 为 C—H 的伸缩振动吸收峰, 说明通过硅烷化反应在 Fe_3O_4 纳米颗粒表面引入了乙烯基. 所有这些变化都充分表明, KH-570 与纳米 Fe_3O_4 表面的羟基发生了化学反应, 即达到了 KH-570 包覆改性纳米 Fe_3O_4 的目的. 图 3(c) 中 1442 cm^{-1} 出现了 C—H 的弯曲振动特征峰, 1557 cm^{-1} 是 N—H 的变形振动特征峰, 3388 cm^{-1} 处为 N—H 的伸缩振动特征峰, 这些谱峰来自于功能单体 AM 和交联剂 MBA, 可见在 Fe_3O_4 纳米颗粒表面发生了单体与交联剂的接枝交联聚合和模板分子 GSH 的印迹, 形成了 GSH 印迹聚合物层.

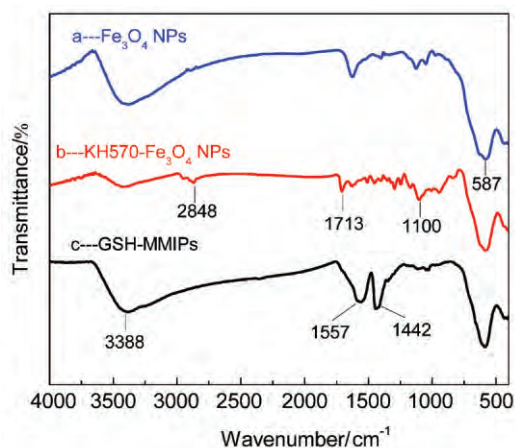


图 3 Fe_3O_4 纳米颗粒(a)、KH570- Fe_3O_4 纳米颗粒(b)和 GSH-MMIPs (c) 的红外光谱图

Figure 3 FT-IR spectra of Fe_3O_4 NPs (a), KH570- Fe_3O_4 NPs (b) and GSH-MMIPs (c)

2.2.4 VSM 分析

图 4 分别为 Fe_3O_4 纳米颗粒(a)、KH570 改性的 Fe_3O_4 纳米颗粒(b)和 GSH-MMIPs (c) 的磁滞回线以及 GSH-MMIPs 在外界磁场作用下的磁分离现象图(d). 从磁滞回线 a、b 和 c 可以看出, 三种样品均没有磁滞现象, 剩磁和矫顽力都为零, 这表明样品具有超顺磁性. 室温下, 三种样品的比饱和磁化强度分别为 61.8 emu/g 、 56.9 emu/g 和 50.1 emu/g . 与纯 Fe_3O_4 纳米颗粒的比饱和磁化强度相比, KH570- Fe_3O_4 纳米颗粒和 GSH-MMIPs 的比饱和磁化强度则有所下降, 原因是其表面包覆有非磁性层, 对其磁响应性有一定的影响. 从图 4(d) 可以看出, 在没有外加磁场存在时, GSH-MMIPs 均匀地分散在水溶液中, 呈黑色悬浮液(右); 当有外部磁场存在时, 黑色颗粒被快速吸引到有外加磁场的瓶壁一侧, 溶液变得透明(左). 这说明 GSH-MMIPs 具有良好的磁响应性, 作为磁性分离载体是可行的.

2.3 谷胱甘肽磁性分子印迹聚合物 GSH-MMIPs 的吸附性能研究

2.3.1 等温吸附线

用静态平衡吸附法得到 GSH 在 $0.1\sim 5.0\text{ g/L}$ 的范围内的吸附等温线, 如图 5 所示. 当 GSH 的起始浓度低于

4.0 g/L 时, 吸附量增加很快; 当 GSH 的起始浓度高于 4.0 g/L 时, 吸附容量趋于平衡, 这表明 GSH-MMIPs 上活性结合位点达到吸附饱和. 而 GSH-MNIPs 与 GSH-MMIPs 对 GSH 吸附变化趋势相同, 吸附量也随模板分子浓度的增加而增加, 随后也达到饱和. 但其与 GSH-MMIPs 相比, 吸附容量却小很多.

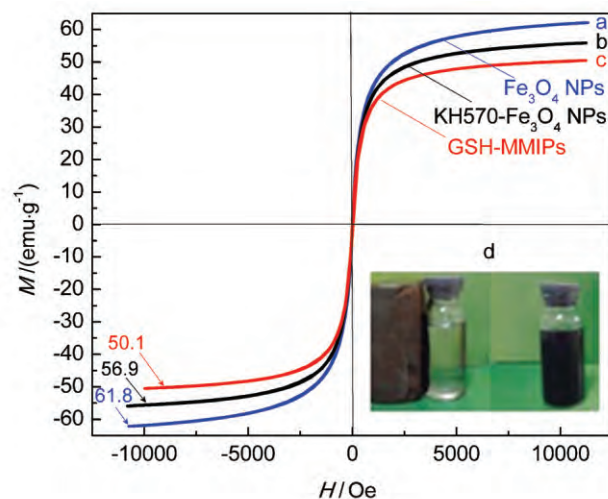


图 4 Fe_3O_4 纳米颗粒(a)、KH570- Fe_3O_4 纳米颗粒(b)和 GSH-MMIPs (c) 的磁滞回线以及 GSH-MMIPs 在外界磁场作用下的磁分离现象数码照片(d)

Figure 4 Magnetization curves obtained by VSM at room temperature of Fe_3O_4 NPs (a), KH570- Fe_3O_4 NPs (b) and GSH-MMIPs (c); and a photograph of GSH-MMIPs dispersed in the water in the presence (left) and absence (right) of an external magnetic field (d)

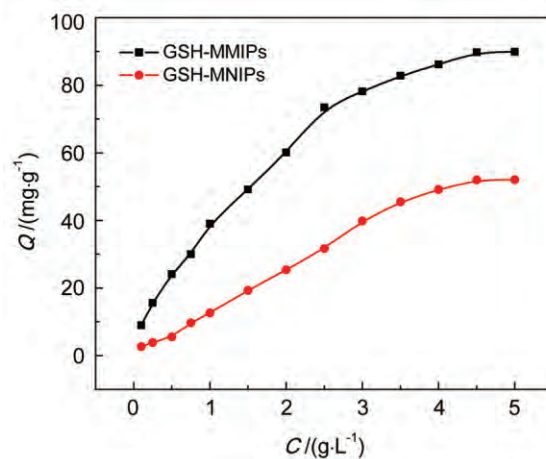


图 5 GSH-MMIPs 和 GSH-MNIPs 的结合等温吸附线

Figure 5 Adsorption isotherm of GSH-MMIPs and GSH-MNIPs. C_0 of GSH was $0.1\sim 5.0\text{ g/L}$, $V=5\text{ mL}$, $m=10\text{ mg}$, $t=12\text{ h}$, $\text{pH}=4.67$, $T=25\text{ }^\circ\text{C}$

为了进一步研究印迹聚合物的吸附特性, 通过 Scatchard 模型对所获得的 GSH-MMIPs 的等温吸附数据进行分析. Scatchard 模型方程^[16]为:

$$Q/C = (Q_{\max} - Q)/K_d \quad (1)$$

式(1)中: $Q(\text{mg/g})$ 为不同浓度下的平衡吸附量, $C(\text{g/L})$ 为 GSH 的平衡浓度, $Q_{\text{max}}(\text{mg/g})$ 是结合位点的最大结合量, $K_d(\text{mol/L})$ 是结合位点的平衡解离常数。

以 Q/C 对 Q 作图得到图 6, 明显呈非线性关系, 可看作由两条直线组成, 表明磁性印迹聚合物对印迹分子的结合位点并不是完全等价的, 存在两种不同的结合位点。对图中的两段线性部分进行拟合, 可以分别得到拟合线性方程: 高亲和力位点方程和低亲和力位点方程。由直线的斜率和截距可以求得, 此印迹聚合物高亲和力结合位点的平衡解离常数和最大吸附量分别为 $K_{d1} = 8.786 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, $Q_{\text{max}1} = 49.195 \text{ mg/g}$; 低亲和力结合位点的平衡解离常数和最大吸附量分别为 $K_{d2} = 5.424 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, $Q_{\text{max}2} = 155.003 \text{ mg/g}$ 。但是, 对存在不同结合位点的印迹聚合物, 采用 Scatchard 分析测定对应的结合参数存在一定的近似性, 因为当底物浓度较低时, 测定高亲和力位点的结合常数经常会忽略低亲和力位点的贡献; 同样地, 当底物浓度较高时, 测定低亲和力位点的结合常数时高亲和力位点仍有贡献^[17]。

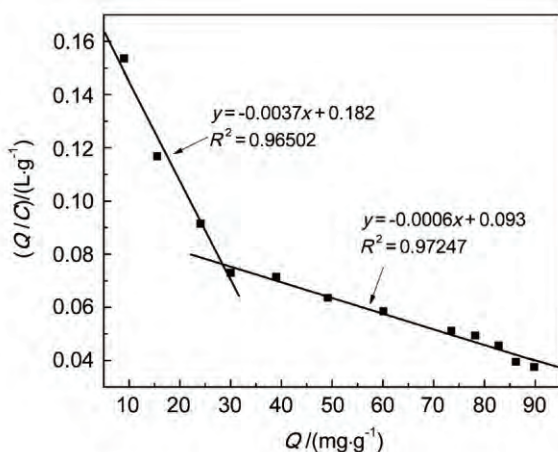


图 6 GSH-MMIPs 对 GSH 的 Scatchard 分析曲线

Figure 6 Scatchard plot analysis of the binding of GSH onto GSH-MMIPs

2.3.2 吸附选择性

GSH-MMIPs 和 GSH-MNIPs 对 GSH 及其类似物(氧化型谷胱甘肽、谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸)的饱和吸附量如图 7 所示。结果表明, GSH-MMIPs 对模板 GSH 有较高的吸附量, 但对氧化型谷胱甘肽、谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸的吸附量则相对较低, 与 GSH-MNIPs 对 GSH 的吸附量近似。这主要是由于在 GSH-MMIPs 中不存在 GSH 类似物的特定结合位点, 而使得 GSH 结构类似物不能和 GSH 一样, 可与特定的空间结合位点形成较强的作用力。GSH-MNIPs 对于 5 种底物的吸附量几乎相等, 没有选择性, 这也表明 GSH-MMIPs 对于 GSH 具有独特的选择性。

通常以印迹因子 α 来表示分子印迹聚合物的特异选择性, 其值越大, 特异性越强, 印迹效果越好, 定义如

下:

$$\alpha = Q_{\text{GSH-MMIPs}} / Q_{\text{GSH-MNIPs}} \quad (2)$$

式(2)中的 $Q_{\text{GSH-MMIPs}}$ 和 $Q_{\text{GSH-MNIPs}}$ 分别为谷胱甘肽磁性印迹和非印迹聚合物对 GSH 的吸附量。

经计算, GSH、氧化型谷胱甘肽、谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸的印迹因子分别为: 3.99, 1.45, 1.15, 1.08 和 1.14。从这些数据可知, 制备的磁性印迹聚合物有一定的选择性, 能够实现对水溶液中 GSH 的选择性吸附。

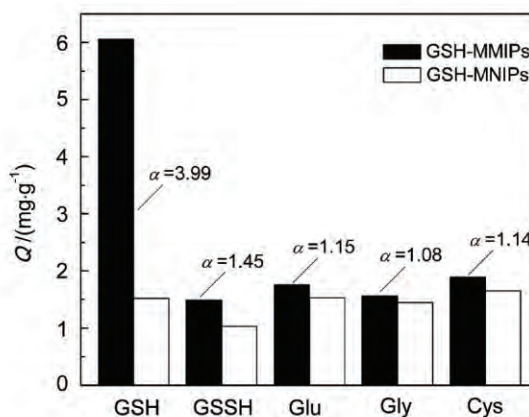


图 7 GSH-MMIPs 和 GSH-MNIPs 对 GSH 及其类似物的饱和吸附量
Figure 7 The specificity adsorption of GSH-MMIPs and GSH-MNIPs for GSH and analogues

C_0 of GSH and analogues was 0.1 g/L, $V=5 \text{ mL}$, $m=10 \text{ mg}$, $t=12 \text{ h}$, $\text{pH}=4.67$, $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$

3 结论

通过表面分子印迹技术, 以 GSH 为模板分子、AM 和 NVP 为功能单体、MBA 为交联剂、KH570 改性的 Fe_3O_4 纳米颗粒为载体, 利用一步合成法制备了对 GSH 有特异选择性吸附的 GSH-MMIPs, 避免了 Fe_3O_4 和 KH570- Fe_3O_4 合成后的洗涤和干燥, 从而防止了 Fe_3O_4 纳米颗粒的团聚和氧化。所制备的磁性分子印迹聚合物具有良好的磁响应性, 能够满足磁性分离的需要; 对模板分子 GSH 有特异的吸附能力, 其印迹因子高达 3.99。该方法将为多肽、蛋白质等生物大分子的有效分离提供一种新的途径。

4 实验部分

4.1 谷胱甘肽磁性分子印迹聚合物的制备

首先将 16.000 g 乳化剂 OP-10、22 mL 正丁醇和 50 mL 环己烷混合均匀后, 加入到装有机械搅拌、球形冷凝管、 N_2 导管的三口烧瓶中; 然后将 0.473 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 0.278 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于 25 mL 二次蒸馏水中, 加入到上述三口烧瓶中; 滴加 3 mL 浓氨水, $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 1 h。反应结束后, 在该体系中加入 0.96 mL KH570, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 5 h。同时, 将 5 mL 200 mmol/L 的 GSH 水溶液、0.197 g AM 和 0.137 g NVP 加入到 25 mL 烧杯中室温下静置 5

h, 加入到 KH570 改性后的体系中, 搅拌 10 min 后, 再加入 16 mmol MBA、0.15 mmol H₂O₂ 和 0.30 mmol Vc, 50 °C 反应 28 h. 整个反应过程始终在 N₂ 保护的气氛中进行. 产物利用外加磁场分离的方法, 先用甲醇/乙酸 (9 : 1, V/V) 洗脱液清洗 3 次后, 再放入盛有甲醇/乙酸 (9 : 1, V/V) 洗脱液的索氏提取器中洗脱模板分子, 直到洗脱液的吸光度 < 0.005. 将产物放入真空干燥箱中, 40 °C 真空干燥 24 h, 得到的样品记为 GSH-MMIPs.

用同样的方法, 不加模板分子制备磁性非印迹聚合物, 得到的样品记为 GSH-MNIPs.

4.2 吸附性能测试

准确称取 10 mg 的磁性印迹聚合物于 25 mL 的锥形瓶中, 分别加入 5 mL 不同浓度的 GSH 水溶液, 封紧瓶口, 室温下, 将其置于恒温振荡器中振荡 12 h, 磁铁吸沉, 取上清液用高效液相色谱法(HPLC)测定平衡液中 GSH 的浓度. 根据式(3)计算聚合物的吸附量:

$$Q = (C_0 - C) V / W \quad (3)$$

式中: Q 为 GSH-MMIPs 的单位吸附量(mg/g); C_0 为 GSH 的初始浓度(g/L); C 为 GSH 吸附残液的浓度(g/L); V 为 GSH 溶液的体积(mL); W 为 GSH-MMIPs 的质量(g).

4.3 吸附选择性能研究

选取 GSH 的结构类似物氧化型谷胱甘肽(GSSH)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)和半胱氨酸(Cys)为竞争底物, 分别称取 10 mg GSH-MMIPs 和 GSH-MNIPs 置于 25 mL 的锥形瓶中, 依次加入 5 mL GSH 与其结构类似物的混合溶液, 恒温振荡吸附 12 h, 磁铁吸沉, 取上清液用

HPLC 测定吸附平衡后溶液中每种底物的浓度.

References

- [1] Tamayo, F. G.; Turiel, E.; Martin-Esteban, A. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1152*, 32.
- [2] Wulff, G. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1.
- [3] Wang, H.-J.; Zhou, W.-H.; Yin, X.-F.; Zhuang, Z.-X.; Yang, H.-H.; Wang, X.-R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15954.
- [4] Gupta, R.; Kumar, A. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 533.
- [5] Guerreiro, A. R.; Korkhov, V.; Mijangos, I.; Piletska, E. V.; Rodins, J.; Turner, A. P. F.; Piletsky, S. A. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1189.
- [6] Lorz, C.; Segrelles, C.; Garín, M.; Paramio, J. M. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *585*, 1.
- [7] Zhang, L.; Qiao, S.-Z.; Jin, Y.-G.; Chen, Z.-G.; Gu, H.-C.; Lu, G.-Q. *Adv. Mater.* **2008**, *20*(4), 805.
- [8] Bílková, Z.; Slovákova, M.; Lyčka, A.; Horák, D.; Lenfeld, J.; Turková, J.; Churáček, J. *J. Chromatogr. B* **2002**, *770*(1/2), 25.
- [9] Pan, C. L.; Hu, B.; Li, W.; Sun, Y.; Ye, H.; Zeng, X. X. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *61*(3/4), 208.
- [10] Zhang, L.; Wang, W. Z.; Shang, M.; Sun, S. M.; Xu, J. H. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *172*(2/3), 1193.
- [11] Tian, H.; Li, J.-J.; Shen, Q.; Wang, H.-L.; Hao, Z.-P.; Zou, L.-D.; Hu, Q. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *171*(1/3), 459.
- [12] Kong, X.; Gao, R.-X.; He, X.-W.; Chen, L.-X.; Zhang, Y.-K. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1245*, 8.
- [13] Li, H.; Xu, W.-Z.; Wang, N.-W.; Ma, X.-H.; Niu, D.-D.; Jiang, B.; Liu, L.-K.; Huang, W.-H.; Yang, W.-M.; Zhou, Z.-P. *Microchim. Acta* **2012**, *179*, 123.
- [14] Dai, J.-D.; Pan, J.-M.; Xu, L.-C.; Li, X.-X.; Zhou, Z.-P.; Zhang, R.-X.; Yan, Y.-S. *J. Hazard. Mater.* **2012**, *205-206*, 179.
- [15] Xin, Y.; Tong, Y.-J.; Yang, H.-L.; Zhang, L.; Zhang, Y.-R.; Chen, Y.; Wang, W. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*(6), 803. (辛瑜, 全艳军, 杨海麟, 张玲, 张玉然, 陈亦, 王武, 化学学报, **2012**, *70*(6), 803.)
- [16] Liu, Q.-Y.; Li, W.-Y.; He, X.-W.; Chen, L.-X.; Zhang, Y.-K. *Acta Chim. Sinica* **2008**, *66*(1), 56. (刘秋叶, 李文友, 何锡文, 陈朗星, 张玉奎, 化学学报, **2008**, *66*(1), 56.)
- [17] Li, Q.; Du, Y.-L.; Yang, K.-K.; Li, F. *Chem. J. Chin. Univ.* **2007**, *28*(6), 1059. (李琼, 杜艳丽, 杨科珂, 李方, 高等学校化学学报, **2007**, *28*(6), 1059.)

(Cheng, B.; Lu, Z.)