

利多卡因分子印迹聚合物的制备及其在固相萃取中的应用

刘翠¹ 吐尔洪·买买提*¹ 努尔买买提·库达巴尔地¹

Elena V. Piletska² 曾何华¹

¹(新疆大学化学化工学院,石油天然气教育部重点实验室,乌鲁木齐 830046)

²(Crandfield Health, Crandfield University Bedfordshire MK43 OAL, UK)

摘要 以利多卡因(LD)分子印迹聚合物为研究体系,利用分子模拟计算功能单体与模板分子之间的相互作用能,并通过作用实验加以验证,确定衣康酸为最佳单体。以乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂,*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)为溶剂,采用本体聚合法合成分子印迹聚合物(MIP);采用高效液相色谱检测。实验发现,聚合物具有较高的印迹指数和选择性;在乙腈加载、5%甲醇-乙腈淋洗、5% HCl-甲醇洗脱条件下,聚合物具有最佳印迹效果。通过渗漏实验考察聚合物键合容量。实验发现,在乙腈溶液中每 100 mg MIP 与空白聚合物(NIP)可分别键合 1.62 和 0.92 mg LD 分子;采用光度法测定牛血清中利多卡因的含量,其平均回收率达到 84.6%。

关键词 分子印迹聚合物;固相萃取;利多卡因;分光光度法

1 引言

盐酸利多卡因(LD)属酰胺类中效局部麻醉药,主要用于神经及硬膜外阻滞麻醉。LD 血药浓度过高时,可产生中枢神经系统及心血管系统的毒性反应。由于生物样品中许多内源性物质的存在,使得样品净化成为必要步骤。因此,发展快速、高效、高选择性、环境友好的样品前处理技术非常重要^[1]。

目前,生物样品中的盐酸利多卡因前处理手段较多,如溶剂萃取和固相萃取法,结合毛细管电泳、气相色谱质谱法或高效液相色谱法^[2-5]。溶剂萃取法需要大量的有机溶剂,耗时且存在严重的基体干扰,其它方法的仪器昂贵。固相萃取法(SPE)出现于 20 世纪 70 年代,至今已成为许多领域样品预处理的常用方法。传统的 SPE 吸附剂选择性不佳,在富集分析物过程中存在大量基体和干扰物质。分子印迹聚合物(MIP)是为印迹分子量身定做的高分子聚合物,具有预定性、实用性和识别性等特点^[6-8]。由于模板选择的多样性,使得 MIP 能广泛应用于物质的分离与分析过程,它对于目标物质的高度选择性也是普通 SPE 所不能比拟的^[9,10]。

本研究采用本体聚合法合成 MIP,并将其作为固相萃取材料,对分子印迹固相萃取(MI-SPE)过程进行优化选择,采用分光光度法测定生物样品中盐酸利多卡因含量。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

UV-2450 紫外可见分光光度计,LC-10A 高效液相色谱仪(日本岛津公司);5S1020 固相萃取仪(北京振翔工贸有限公司);利多卡因(LD)、衣康酸(IA,纯度>98.0%,Sigma-Aldrich 公司);盐酸胺碘酮(AD)、*N,N*-二甲基苯胺(CO,纯度>98.0%,杭州大阳化工有限公司);*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF,色谱纯,天津光复精细化工研究所);乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA,分析纯,百灵威化学技术有限公司);偶氮二乙丁腈(AIBN,化学纯,上海试剂厂);*N*-(2,6-二甲基苯基)-*N,N*-二乙基乙二胺(C1,自制)其它试剂均为分析纯。

2.2 MIP 的制备

将 LD 0.2343 g(1 mmol), IA 0.5204 g(4 mmol), AIBN 0.0785 g, EDMA 3.1715 g(16 mmol), DMF

3.9262 g 置于 50 mL 圆底烧瓶中,充分溶解混匀,超声脱气 5 min,通氮气 15 min,于 80 °C 恒温油浴锅中加热 24 h。聚合物磨碎收集粒径在 38 ~ 75 μm ,用索氏提取器以含冰乙酸-甲醇(1:9, V/V)溶液洗至无 LD 检出,继续用甲醇洗去乙酸,真空干燥至恒重。非印迹聚合物(NIP)除不加 LD 外,其余与印迹聚合物合成条件相同。

2.3 HPLC 检测

将洗涤过的聚合物干法装填于不锈钢色谱柱(50 mm \times 4.6 mm)中,以乙腈为流动相,流速 0.4 mL/min,色谱柱温 25 °C,波长 262 nm 检测。以丙酮测量死时间。1.0 g/L 模板分子的乙腈溶液,每次进样 10 μL 。

2.4 MI-SPE 印迹效果实验

分别取 MIP 和 NIP 各 100 mg 均匀填充至空的固相萃取柱中,在聚合物上放置塞板。依次用相应溶剂(表 1)平衡小柱,经装载、淋洗、洗脱后,测定各步洗脱液中待测物含量。

2.5 血清样品的处理

取 0.3 mL 牛血清于 4.0 mL 离心管中,定量加入 LD 标准溶液,涡旋混匀 1 min,加入乙腈 2.4 mL 混匀后,以 4000 r/min 离心 30 min 除去蛋白质。取上清液 1.5 mL,按照 2.4 节的条件进行萃取。洗脱液于 45 °C 用 N_2 吹干,测定方法参照文献[11],于 588.0 nm 处测定 LD 含量。

3 结果与讨论

3.1 模板与功能单体间相互作用能的理论计算

模拟计算在英国 Cranfield University 完成。在 Silicon Graphics Octane running IRIX 6.5 操作系统上,采用 SYBYL 6.9TM 软件的 LEAPFROGTM 算法^[12]。软件单体库中包含了 20 种常用功能单体,通过计算每种单体与 LD 结合能,推测它们之间的作用方式,筛选最有可能形成稳定复合物的单体,计算得到各单体与模板的结合能力大小: 衣康酸(IA) > 丙烯酰胺 > 甲基丙烯酸 > 咪唑丙烯酸 > 4-乙烯基吡啶 > 二乙烯基苯。从结果可知,IA 置于首位,与 LD 结合能为 -135.9 kJ/mol,表明 LD 与 IA 在预聚合时能够形成相对稳定的复合物。

3.2 模板分子与单体作用实验

固定 LD 浓度为 1.0 mmol/L,逐次加入 0.1 ~ 8.8 mmol/L 功能单体 IA,在 200 ~ 320 nm 测定紫外光谱(见图 1)。由图 1 可见,随着功能单体浓度的增加,吸收峰强度逐渐减弱,最大吸收波长向长波长移动(游离 LD 移动 10.8 nm),表明模板和单体 IA 之间产生了相互作用并形成了复合物。碱性模板分子一般选用酸性功能单体^[13]。由于 LD 为弱碱($\text{p}K_{\text{a}} = 7.9$),分子结构中含有 $-\text{C}=\text{O}$ 和 $-\text{NH}$ 可与酸性较强的 IA ($\text{p}K_{\text{a}1} = 3.85, \text{p}K_{\text{a}2} = 5.44$)^[14] 中的 $-\text{COOH}$ 生成氢键和离子键,使光谱发生变化。LD 常以盐酸盐形式存在,而酸式 LD 中 H^+ 可与分子中的羰基形成氢键,会与 LD 和 IA 之间的氢键竞争,光谱移动仅为 8.0 nm,使得模板-功能单体复合物不够稳定。本研究采用游离的 LD 作为模板分子,可增强其与酸性较强的 IA 的静电相互作用,形成更稳定

表 1 固相萃取实验中载液、淋洗液及洗脱液

Table 1 Percolated, washing and eluted solvents used during molecularly imprinted polymer (MIP) and nonimprinted polymer (NIP) experiments

载液 Loading 1.0 g/L	淋洗液 Washing 1 mL \times 1	次洗脱液 Elution 1.5 mL \times 2
ACN	CAN-MeOH (95:5, V/V)	
CH_2Cl_2	CH_2Cl_2 -ACN (90:10, V/V)	MeOH-0.2 mol/L HCl (95:5, V/V)
H_2O -ACN (50:50, V/V)	H_2O -ACN (50:50, V/V)	
PBS-ACN (50:50, V/V)	PBS-ACN (50:50, V/V)	

ACN: 乙腈 (Acetonitrile); PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution, pH 7.0)。

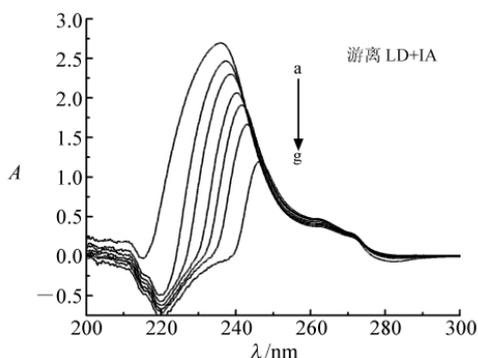


图 1 IA 对 LD 紫外吸光光谱的影响

Fig. 1 UV absorption spectra of lidocaine (LD) in presence of itaconic acid (IA) with different concentrations in acetonitrile

1.0 mmol/L LD; C_{IA} (mmol/L): a. 0.10; b. 0.49; c. 1.04; d. 2.06; e. 3.12; f. 4.44; g. 8.80. $\Delta\lambda = 10.8$ nm.

的复合物。

3.3 色谱评价

印迹指数 $K = k'_{\text{MIP}}/k'_{\text{NIP}}$ ($k' = (t_R - t_0)/t_0$, 其中 t_R 为组分保留时间 t_0 为死时间)。将 MIP 与 NIP 分别作为液相色谱固定相, 研究 N -(2,6-二甲基苯基)- N,N -二乙基乙二胺 (C1)、 N,N -二乙基乙二胺 (C0) 和盐酸胺碘酮 (AD) 等结构类似物 (结构见图 2) 在色谱柱中保留行为, 结果列于表 2。从表 2 可知, MIP 对模板及其类似物表现出一定识别能力, 但是对 LD 表现出显著的选择性 ($K = 3.0$)^[15]。

表 2 利多卡因 MIP 选择性

Table 2 Retention and selectivity factors on lidocaine-imprinted polymer

印迹指数 Retention factor (K)				选择性系数 Selective factor (α)		
LD	AD	C0	C1	$k_{\text{LD}}/k_{\text{AD}}$	$k_{\text{LD}}/k_{\text{C0}}$	$k_{\text{LD}}/k_{\text{C1}}$
3.0	1.2	1.1	0.19	2.5	2.7	15.8

LD: 利多卡因 (Lidocaine); C1: N -(2,6-二甲基苯基)- N,N -二乙基乙二胺 (N -[2-(Diethylamino) ethyl]-2',6'-xylylidine); C0: N,N -二甲基苯胺 (N,N -Dimethylaniline); AD: 胺碘酮 (Amiodarone)。

3.4 MI-SPE 条件优化

考察不同溶剂中 MIP 与 NIP 对 LD 吸附情况 (图 3)。结果表明, LD-乙腈溶液上样时, MIP 完全吸附模板分子; 而 NIP 中无有序排列且与模板分子结构相对应的立体孔穴, 出现大量渗漏, 洗脱回收率仅为 44%。MIP 经洗脱后留下的空穴无论从功能基和立体结构形状上都能与模板分子相匹配, 显示出良好的识别。通过优化装载、淋洗和洗脱过程, 较好地分离了特异性和非特异性结合的 LD。当用乙腈上样, 乙腈-甲醇 (95:5, V/V) 淋洗, 甲醇-0.2 mol/L HCl (95:5, V/V) 溶液洗脱两次时, 效果最好。

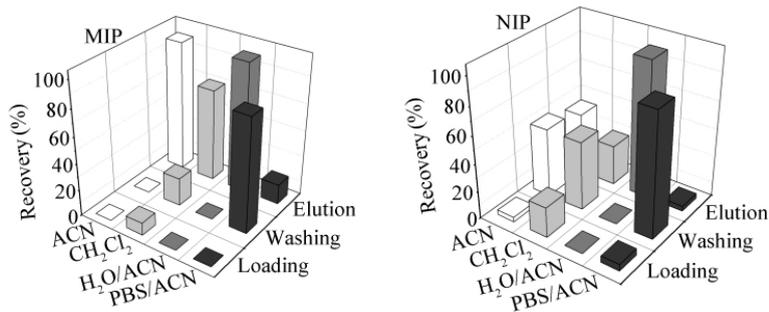


图 3 不同溶剂中利多卡因在 MIP 和 NIP 上回收率

Fig. 3 Extraction profiles obtained with MIP and NIP after the percolation of LD in different media

通过 Breakthrough 渗漏实验^[16]考察 MIP 与 NIP 的键合容量 (图 4A)。结果表明, 当 LD 乙腈溶液为 0.2 g/L 时, 每次上样 3 mL, 计算得到每 100 mg MIP 和 NIP 键合容量分别为 1.62 和 0.96 mg。随着 LD 浓度的增加, 键合容量增大 (图 4B)。在合成过程中模板分子的质量占总质量的 2.9%, 理论上聚合物的最大键合容量是合成时所使用的模板的 5%^[17]。聚合物之所以具有高容量是因为聚合物与模板分子之间不仅存在特异性吸附, 而且存在非特异性吸附。

3.5 类似物选择性

按照 3.3 节实验确定的最佳条件, 考察与 LD 结构类似化合物 AD, C0, C1 在固相萃取柱中的保留情况 (表 3)。结果表明, 由于 3 种结构类似物与模板分子在形状和官能团上存在相似性而呈现一定的交互吸附, 但回收率都低于 LD, 由此可说明 MIP 中形成的形状相匹配的立体空穴提高了 MIP 的萃取选择性。对于与模板分子尺寸相差很大的 C0 和 AD 而言, 选择性和保留情况呈现相似且比较差的结果。

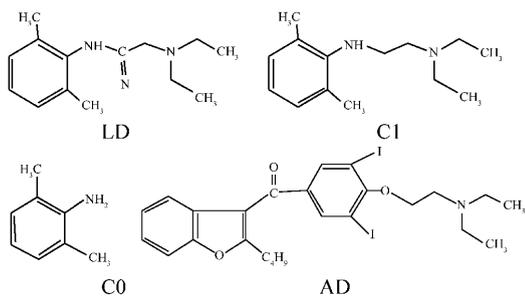


图 2 相似物结构分子式

Fig. 2 Structures of analogues

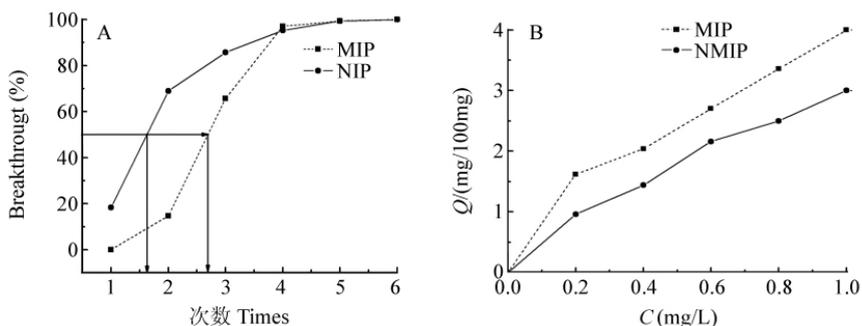


图 4 0.2 g/L LD 乙腈溶液在 MIP 与 NIP 上渗漏曲线及浓度对键合量的影响

Fig. 4 A. Breakthrough curve for 0.2 g/L of LD by MIP and NIP; B. Influence of LD concentration on the binding capacity of MIP and NIP

在氢键结合过程中,羰基是强的氢键接受体,由于在结构上 C1 较 LD 缺少一个羰基官能团,没有完全实现位点识别,回收率低。

表 3 乙腈为溶剂时 3 个类似物在 MIP 和 NIP 柱子上的分离

Table 3 Retention of three analogues in acetonitrile on MIP and NIP column

	回收率 Recovery (%)							
	MIP				NIP			
	LD	C1	C0	AD	LD	C1	C0	AD
上样 Loading	0	58.9	68.9	35.9	3.5	65.7	71.9	50.5
淋洗 Washing	0	31.9	26.6	58.8	49.7	30.2	24.7	47.8
洗脱 Elution	98.0	4.4	0	3.5	44.0	2.5	0	2.5

3.6 生物样品中 LD 的测定

在最佳实验条件下,用 MIP 萃取柱对牛血清中的 LD 进行富集,结果见表 4。由于 LD 摩尔吸光系数很小,且与溴甲酚紫形成离子缔合物在 588.0 nm 处有强吸收^[11],采用光度法对生物样品的 LD 能够准确测定,克服了色谱分析生物样品过程繁杂、成本高、用时长等缺点。

表 4 MI-SPE 净化牛血清中 LD 的分析结果

Table 4 Detection result of molecularly imprinted solid phase extraction (MI-SPE)-purified extracts of LD-spiked calf serum

加标量 Added (μg)	回收量 Mean found (μg)	回收率 Recovery (% , n = 6)	RSD (% , n = 6)
16.0	13.6	84.8	6.34
18.0	15.4	85.3	4.36
20.0	16.9	84.5	5.22

References

- HUANG Jian-Xiang (黄健祥), HU Yu-Fei (胡玉斐), PAN Jia-Liang (潘加亮), XU Zhi-Gang (许志刚), LI Gong-Ke (李攻科). *Science in China B (中国科学 B)*, **2009**, 39(8): 733 ~ 746
- ZHOU Mi-Mei (周密妹), LI Xing-Tian (李性天), GENG Li-Jian (耿立坚), WU Guo-Min (吴国民), ZENG Fan-Dian (曾繁典). *Chinese J. Pharm. Anal. (药物分析)*, **2007**, 27(9): 1374 ~ 1377
- Anderson M S, Lu B, Abdel-Rehim M, Blomberg S, Blomberg L G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2004**, 18(22): 2612 ~ 2618
- Abdel-Rehim M, Bielenstein M, Askemark Y, Tyrefors N, Arvidsson T. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 741: 175 ~ 188
- LING Xiao-Peng (凌晓鹏), WANG Kui-Yan (王奎彦). *Forensic Science and Technology(刑事技术)*, **2001**, 4: 50
- Wang H F, He Y, Ji T R, Yan X P. *Anal. Chem.*, **2009**, 81(4): 1615 ~ 1621
- Ye L, Mosbach K. *Chemistry of Materials*, **2008**, 20(3): 859 ~ 868
- Zhao Y J, Zhao X W, Hu J, Li J, Xu W Y, Gu Z Z. *Angewandte Chemie International Edition*, **2009**, 48: 7350 ~ 7352
- WANG Pei-Long (王培龙), FAN Li (范理), SONG Rong (宋荣), GAO Sheng (高升), SU Xiao-Ou (苏晓欧), YANG Shu-Ming (杨曙明). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2007**, 35(9): 1319 ~ 1322
- Zheng S L, Song S Q, Lan H, Qu G R, Li R X, Wu A B, Zhang D B. *Analytical Letters*, **2009**, 42(3): 600 ~ 614
- QIN Zong-Hui (秦宗会), SHEN Guang-Ming (沈光明), TAN Rong (谭蓉), PU Li-Jun (蒲利军). *China Pharmacy (中国药房)*, **2007**, 18(34): 2692 ~ 2694

- 12 Chianella I , Lotierzo M , Piletsky S A , Tothill I E , Chen B N , Karim K , Turner A P F. *Anal. Chem.* , **2002** , 74(6) : 1288 ~ 1293
- 13 Hugon-Chapuis F , Mullot J U , Tuffal G , Hennion M C , Pichon V. *J. Chromatogr. A* , **2008** , 1196 ~ 1197: 73 ~ 80
- 14 Pascale M , Girolamo A D , Visconti A , Magan N , Chianella I , Piletska E V , Piletsky S A. *Anal. Chim. Acta* , **2008** , 609: 131 ~ 138
- 15 SUN Bao-Wei(孙宝维) , YANG Min-Li(杨敏莉) , LI Yuan-Zong(李元宗) , CHANG Wen-Bao(常文保) . *Acta Chimica Sinica*(化学学报) , **2003** , 61(6) : 878 ~ 884
- 16 ZENG He-Hua(曾何华) , Turghun Muhammad(吐尔洪·买买提) , LIU Cui(刘翠) , WANG Ji-De (王吉德) . *Chinese J. Pharm. Anal.* (药物分析) , **2010** , 30(4) : 686 ~ 690
- 17 Chianella I , Karim K , Piletska E V , Preston C , Piletsky S A. *Anal. Chim. Acta* , **2006** , 559: 73 ~ 78

Synthesis of Lidocaine Molecularly Imprinted Polymers and Application on Solid Phase Extraction

LIU Cui¹ , Turghun Muhammad*¹ , Nurmement Hudaberdi¹ , Elena V. Piletska² , ZENG He-Hua¹

¹(College of Chemistry & Chemical Engineering , Xinjiang University , Key laboratory of Oil and Gas Fine Chemicals , Educational Ministry of China , Urumqi 830046)

²(Crandfield Health , Crandfield University Bedfordshire MK43 OAL , UK)

Abstract Itaconic acid was selected as the best template for lidocaine molecularly imprinted polymer (MIP) through computational investigation and template-monomer interaction experiment. The MIP was prepared using ethylene glycol dimethacrylate as crosslinker and dimethylformamide as porogen. High retention factor and selectivity were achieved by HPLC evaluation of MIPs as column sorbent. After optimization of SPE profile , it was found that the best imprinting effect was obtained with loading in acetonitrile , washing with methanol-acetonitrile (5:95 , V/V) , eluting with hydrochloric acid-methanol (5:95 , V/V) . MIP and nonimprinted polymer (NIP) showed surprisingly high binding capacity in acetonitrile in breakthrough curve , and their capacities are 1.62 and 0.92 mg of drug to 100 mg of adsorbent respectively. Concentration of lidocaine in spiked serum was determined by visible spectrophotometric measurement of the SPE eluent , with the average recovery of 84. 6% .

Keywords Molecularly imprinted polymer; Solid phase extraction; Lidocaine; Visible spectrophotometry

(Received 15 February 2010; accepted 31 May 2010)

《有机农药及中间体质谱手册》

该书是一部有机农药及中间体与代谢物的质谱工具书。全书共收集整理了 1412 种有机农药及中间体与代谢物 , 包括有机氯杀虫剂、有机磷杀虫剂、氨基甲酸酯类杀虫剂、沙蚕毒素类杀虫剂、卫生及建筑害虫防治剂、拟除虫菊酯类杀虫剂、其他杀虫剂、杀螨剂、增效剂、杀鼠剂、杀菌剂、除草剂、植物生长调节剂及农药中间体十四部分 , 几乎每个品种均列出了中文通用名称、英文通用名称、中文化学名称、英文化学名称、中文别名、英文别名、分子式、分子量、CAS 登录号、分子结构式和电子轰击质谱图(EIMS) 。为便于检索 , 书后附有中文名称索引、英文名称索引、分子式索引和 CAS 登录号索引。

该书信息量大、实用性强、索引完备 , 可供农业、环境保护、检验检疫、医疗卫生、司法鉴定等行业和有关高等院校、科研单位参考。

该书由李宏森、黄克建主编 , 化学工业出版社于出版 , 定价 135.00 元。