

替代模板法制备甲硝唑分子印迹聚合物及其 在血清样品固相萃取中的应用

吐尔洪·买买提* 阿不都克热木·卡地尔 哈丽丹·买买提
尼鲁帕尔·阿不都克尤木

(石油天然气精细化工教育部和自治区重点实验室 新疆大学化学化工学院, 乌鲁木齐 830046)

摘要 以甲硝唑酯化物(MNZ-Es)为模板分子,甲基丙烯酸为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂,氯仿为致孔剂,合成了对甲硝唑(MNZ)具有特异吸附性能分子印迹聚合物(MIP)。由静态吸附实验结果得知,印迹指数为 2.02,说明 MIP 对 MNZ 具有良好的识别性能。MIP 吸附属于 Langmuir 吸附模型,其对 MNZ 的吸附属于单层分子吸附,其最大表现吸附量 Q_{max} 为 116 $\mu\text{mol/g}$,结合常数 K 为 0.65 L/mmol。在固相萃取实验中, MNZ 在分子印迹固相萃取(MISPE)和非印迹固相萃取(NISPE)上的回收率分别为 97.4% 和 44.3%,而结构类似物 MNZ-Es 和对硝基苯酚在印迹和非印迹柱子上的回收率均小于 11.6%,表明替代模板 MIP 对 MNZ 具有很高的选择性吸附。应用 MISPE 分离富集血清样品中的 MNZ 回收率为 94.5%,说明替代模板 MIP 可实现血清样品中 MNZ 的选择性分离富集,且没有模板渗漏。

关键词 甲硝唑; 替代模板; 分子印迹聚合物; 固相萃取

1 引言

甲硝唑(MNZ)是临床常用的硝基咪唑类抗微生物药物,可抑制阿米巴原虫氧化还原反应,使原虫氮链发生断裂,具有抗菌和消炎的作用^[1]。在环境和生物样品中,检测 MNZ 的方法有气相色谱法^[2]、高效液相色谱法^[3-6]、质谱法^[7]和分光光度法^[8]等。

溶剂萃取和固相萃取法(Solid phase extraction, SPE)是提取生物样品中 MNZ 的有效前处理手段^[9]。但传统的 SPE 吸附剂和被分析物之间的作用力是非特异性的,吸附率和回收率均不佳。与之相比,分子印迹聚合物(MIP)具有高选择性、亲和性及预定性,故 MIP 作为 SPE 材料得到了广泛应用。Mohamed 等^[10]制备了硝基咪唑类化合物的 MIP,但并未给出功能单体等重要因素。Jafari 等^[11]将 MNZ 作为模板分子制备 MIP,其回收率仅 89%,也未考察聚合物的印迹效果。但 MISPE 应用中有模板分子渗漏的缺陷,会干扰目标物测定。为解决模板渗漏, Matsui 等^[9]提出了替代模板法。该法是将目标化合物的结构类似物作为模板分子,制备对目标分子有选择性 MIP 的一种新方法。已对多种化合物使用替代模板法制备了 MIP,基本解决了模板渗漏问题^[12-16]。

本研究采用替代模板法制备 MNZ-MIP,将其作为 SPE 吸附剂,考察聚合物的吸附量和选择性,并应用于生物样品的分离与富集。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

ProStar 高效液相色谱分析仪(美国 VARIAN 公司); UV-2450 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); 5S1020 固相萃取仪(北京振翔工贸有限公司)。甲硝唑(MNZ, 杭州大阳化工有限公司); 甲基丙烯酸(MAA, 纯度 >99.5%, Acros-Organics 公司); 对硝基苯酚(4-NP, 杭州大阳化工有限公司); 乙二醇二甲基丙烯酸酯(用前除阻聚剂, EDMA, 分析纯, 百灵威化学技术有限公司); 偶氮二乙丁腈(用甲醇重结晶, AIBN, 化学纯, 上海试剂厂); 甲醇(MeOH, 色谱纯, TEDIA, New Jersey) 其它试剂均为分析纯。

2011-04-14 收稿; 2011-08-06 接受

本文系国家自然科学基金(Nos. 20765005, 21065011)和新疆大学石油天然气精细化工重点实验室开放课题基金(No. XJDX0908-2010-06)资助

* E-mail: turghunm@gmail.com

2.2 替代模板的合成

将3.0 mL (32 mmol) 乙酸酐滴入1.0 g (5.84 mmol) MNZ 中,水浴加热至70 °C 搅拌反应4 h,减压蒸干^[17]。剩余物经柱色谱分离,得0.9348 g 金黄色晶体(MNZ-Es),熔点为75 ~ 76 °C,产率为75%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7.96 (s, 1H), 4.58 (m, 2H), 4.41 (m, 2H), 2.51 (s, 3H), 2.03 (s, 3H)。

2.3 MIP 的制备

将0.1704 g (0.8 mmol) MNZ-Es、0.3444 g (4 mmol) MAA、40 mg AIBN、3.1715 g (16 mmol) EDMA, 5.5 mL 氯仿,置于聚合瓶中,充分溶解混匀,超声脱气5 min,通氮气10 min,密封。将聚合瓶放入50 °C 恒温油浴锅中加热24 h,得到白色块状聚合物。将块状聚合物用湿法研磨,过筛收集得到粒径38 ~ 75 μm 的微粒,以冰乙酸-甲醇(1:9, V/V) 溶液洗至无 MNZ-Es 检出;再用甲醇洗去乙酸,最后真空干燥至恒重。NMIP 的制备:除不加入 MNZ-Es 外,其余步骤与 MIP 的制备过程相同。

2.4 静态吸附实验

称取20 mg MIP(或 NIP),置于5 mL 容量瓶中,加入4 mL MNZ-二氯甲烷溶液(10 ~ 350 mg/L) 室温振荡12 h。溶液经微孔膜过滤,滤液用二氯甲烷适当稀释,测317 nm 处的吸光度,计算 MNZ 的回收率。

2.5 分子印迹固相萃取(MISPE)

称取100 mg 干燥的 MIP(或 NIP),置入1 mL SPE 小柱中,在聚合物上放置塞板。小柱分别用2 mL 甲醇和2 mL 二氯甲烷活化, MNZ-二氯甲烷溶液上样1 mL,依次用1 mL 二氯甲烷和1 mL 乙腈-二氯甲烷(5:95, V/V) 淋洗,1 mL 甲醇洗脱两次,以吸光度计算回收率。

2.6 样品的制备及萃取

取空白牛血清样品0.4 mL,置于具塞离心管中,准确加入0.1 mL 450 mg/L MNZ 水溶液,涡旋混匀1 min;加3 mL 氯仿-异丙醇(95:5, V/V) 混匀,2000 r/min 离心10 min,除去蛋白质;准确量取上层清液2.5 mL,在40 °C 水浴中用氮气吹干,用1.0 mL 二氯甲烷溶解,按照2.5节的方法进行固相萃取。萃取液用 HPLC 法测定,色谱柱为依利特 C₁₈ 分析柱(150 mm × 4.6 mm 5 μm),流动相为甲醇-水(15:85, V/V);流速1 mL/min;进样量20 μL;柱温为25 °C;检测波长315 nm。

3 结果与讨论

3.1 替代模板分子与功能单体的相互作用

MNZ 是一种水溶性药物,在常用的制备 MIP 的溶剂(氯仿、乙腈、甲苯)中溶解性差。因此,用自制的 MNZ 酯化物作为替代模板法制备对 MNZ 具有特异吸附性能的 MIP,在 Silicon Graphics Octane running IRIX 6.5 操作系统上,采用 SYBYL 6.9TM 软件的 LEAPFROGTM 算法进行了计算机模拟^[17,18]。模拟结果显示,MAA 分子中的-OH 替代模板分子, MNZ-Es 中的 -C=O 有强氢键作用(图1),并形成稳定的复合物。以 EDMA 为交联剂,氯仿为致孔剂, AIBN 为引发剂时,能在复合物周围形成固定的网状结构的 MIP,对 MNZ 有很强的特异吸附性能。

3.2 MIP 的结合能力和印迹指数

除去模板分子后,在 MIP 中形成与模板分子在空间和结合位点上相匹配的具有多重作用位点的空穴,这样的空穴对模板分子具有很高的选择性^[19]。通过吸附前后溶液中 MNZ 含量变化,计算 MIP(或 NIP)对 MNZ 的结合量(Q): $Q = (C_0 - C) V / m$ (C_0 和 C 分别是吸附前后溶液中 MNZ 的浓度(mg/L), V 是溶液的体积, m 是 MIP(或 NIP)的质量。由图2可见,随着浓度的提高, MIP 和 NIP 的吸附量随之增大;浓度为1.46 mmol/L 时,吸附达到饱和。此时 MIPs 和 NIP 对 MNZ 的吸附容量分别为34.0 和 16.8 μmol/g,印迹指数为2.02,表明 MIP 对 MNZ 具有良好的选择性吸附能力。

以 Langmuir 等温吸附模型^[20], $1/Q = 1/Q_{\max} KC + 1/Q_{\max}$ (Q_{\max} 为结合位点的最大表观吸附量, K 为结合位点的结合常数),拟合图2中的 MIP 吸附曲线。经 $1/Q$ 对 $1/C$ 线性回归,得方程 $y = 0.0133x + 0.0086$, $R^2 = 0.998$,与 Langmuir 等温吸附模型吻合很好。说明在所研究的浓度范围内, MNZ 在 MIP 上的吸附是单层分子吸附。通过曲线截距计算最大表观吸附量 Q_{\max} 为116 μmol/g,由截距和斜率之比计算结合常数 K 为0.65 L/mmol。

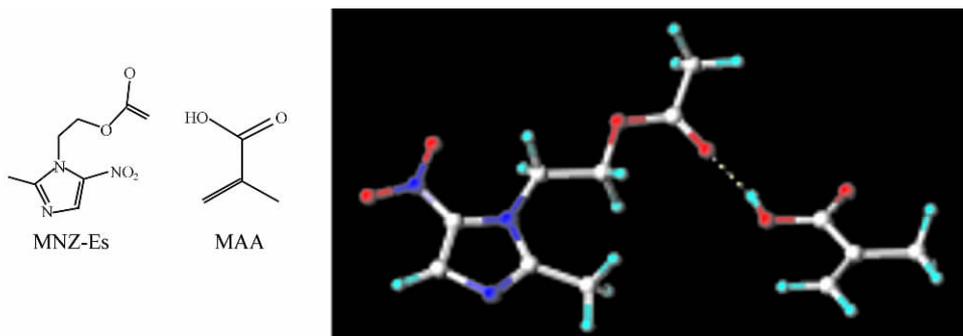


图 1 替代模板分子 MNZ-Es 与功能单体 MAA 的结构式及其计算机模拟

Fig.1 Chemical structures of dummy template metronidazole ester (MNZ-Es) , monomer methacrylic acid (MAA) and results of computer modelling

3.3 固相萃取 (SPE) 条件的优化

分别用水、甲醇、乙腈、氯仿和二氯甲烷作为溶剂,考察 MISPE 和 NISPE 对 MNZ 的保留能力。由图 3 可见,在水中回收率最低 (NIP 和 MIP 的分别为 12.1% 和 16.4%),而二氯甲烷中回收率最高 (NIP 和 MIP 的分别为 86.2% 和 98.3%),即回收率随溶剂极性降低而升高,故选二氯甲烷为上样溶剂。

目标分子在 MIP 表面上的结合形式并非是完全的特异性吸附,选用合适的淋洗剂,可减少非特异性吸附。由图 4 可见,用 1 mL 甲醇或乙腈时,不但能淋洗 MISPE 上非特异性吸附的 MNZ,同时特异性吸附的 MNZ 也被淋洗掉,回收率分别是 6.3% 和 14.5%。二氯甲烷作为淋洗剂时, MIP 的形态转变为有利于形成氢键的状态, MNZ 被选择性地保留在 MIP 上,而其它杂质物都被淋洗剂除去。为了获得高选择性,将少量的乙腈加入到二氯甲烷中,作为淋洗剂,除去样品中非特异性吸附的残留物。当乙腈含量为 5% 时, MNZ 在 NISPE 上的回收率较低 (77.5%),而在 MISPE 上很高 (97.9%)。因此,选定 1 mL

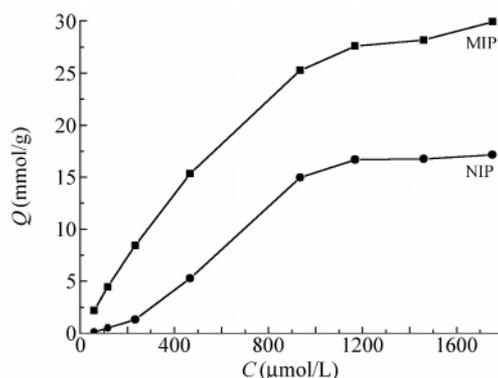


图 2 MIP 和 NIP 的吸附等温曲线

Fig.2 Adsorption isotherms of MIP and non-molecularly imprinted polymer (NIP)

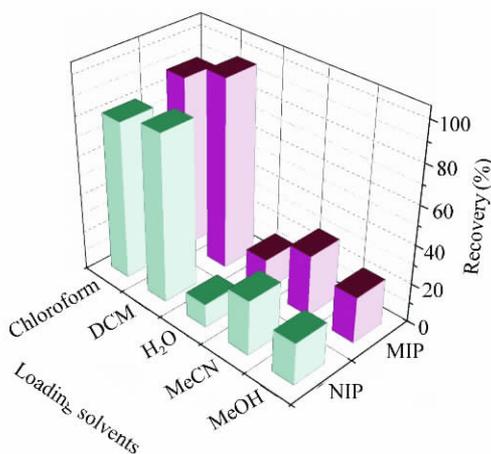


图 3 不同溶剂中 MNZ (50 mg/L) 在 MIP 和 NIP 上回收率

Fig.3 MIP and NIP recoveries (%) for 1 mL 50 mg/L of metronidazole in different loading solvents

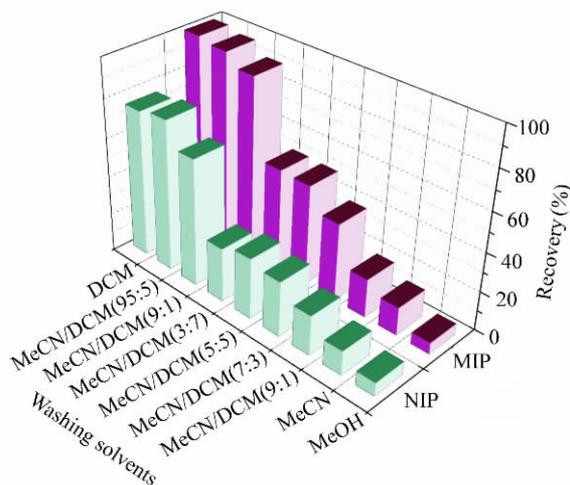


图 4 用不同淋洗溶剂时 MNZ 在 MISPE 和 NISPE 上回收率

Fig.4 Effect of washing solvents on recoveries of MNZ on molecularly imprinted-solid phase extraction (MISPE) and NISPE

二氯甲烷和 1 mL 5% (V/V) 乙腈-二氯甲烷作为后续实验的淋洗溶剂。极性强的溶剂能有效破坏 MIP 和目标分子之间的特异性结合。本实验使用甲醇为洗脱液时回收率最高。因此,选择 2 × 1.0 mL 甲醇为洗脱液。

3.4 MIP 的选择性实验

为评价替代模板 MIP 的选择性,以 MNZ-Es 和 4-NP 作为结构类似物,研究它们在 MISPE (或 NISPE) 上的保留能力。由图 5 可见,MNZ 在 MISPE 和 NISPE 上的回收率分别为 97.4% 和 44.3%,说明 MIP 对 MNZ 有很高的吸附选择性。然而,MNZ-Es 和 4-NP 在 MISPE 上的保留能力很差,回收率分别为 11.6% 和 4.3%,它们在 NISPE 上的回收率分别为 5.6% 和 5.2%。这些化合物在 MIP 上的吸附主要是非特异性吸附,所以都能被大量淋洗除去。

作为结构类似物的 MNZ-Es 具有与 MNZ 相同的分子结构和官能团,它的回收率略高于 4-NP。虽然 4-NP 分子中也有能形成氢键的官能团(硝基 羟基),但它的形状和大小与 MIP 中的空穴相差很大,很难与识别位点发生作用。MIP 在选择性吸附过程中,目标分子的独特形状和特有功能基团同时起关键作用。

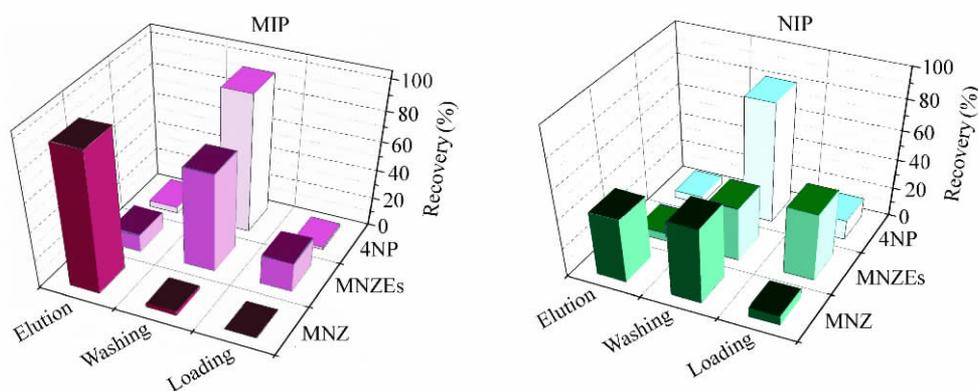


图 5 50 mg/L MNZ, MNZ-ester, 4-NP 二氯甲烷溶液在 MISPE 和 NISPE 上的萃取分离

Fig. 5 Extraction profiles obtained with MISPE and NISPE after percolation of dichloromethane spiked with MNZ, MNZ-ester, 4-NP at 50 mg/L ($n = 4$, RSD = 1.5% ~ 7%)

3.5 血清样品的测定

在上述条件下,用替代模板分子印迹固相萃取对血清样品的 MNZ 进行分离富集。血清样品是一个非常复杂的体系,其中的一些蛋白质会影响测试结果,本研究采用氯仿/异丙醇分离血清中的蛋白质。按照 MNZ 在人体中有效血药浓度(1.0 ~ 5.0 mg/L) 选取 3 个浓度配制血清样品,去除蛋白质后用 MISPE 处理,用 HPLC 平行测定 4 次,结果见表 1。MNZ 分析柱的保留时间为 4.98 min,方法的检出限为 0.2 mg/L。可见,替代模板 MISPE 对血清药品中的 MNZ 较高的萃取回收率(平均值为 94.5%),具有一定应用价值。

本研究以自制的甲硝唑酯化物(MNZ-Es)为模板分子,甲基丙烯酸为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂,氯仿为致孔剂,合成了高度选择性的替代模板 MISPE,实现了血清样品中的 MNZ 分离富集和检测,解决了模板渗漏。

致谢 Crandfield University 的 Elena V. Piletska 在计算机模拟方面给予的帮助

References

- JIN Gen-Di, LÜ Ya-Mei (金根娣, 吕雅梅). *J. Yangzhou Polytech. College* (扬州职业大学学报), 2010, 14(1): 43 ~ 45

表 1 MISPE 净化牛血清中 MNZ 后 HPLC 分析结果

Table 1 Results from HPLC analysis of MISPE-purified extracts of MNZ-spiked calf serum

加标量 Added (mg/L)	回收量 Amount found (mg/L)	回收率 Recovery (%, $n = 4$)	RSD (%, $n = 4$)
1.5	1.4	93.1	6.54
3.5	3.3	95.7	3.42
4.5	4.3	94.8	2.12

- 2 Ho C , Sin D W M , Wong K M , Tang H P O. *Anal. Chim. Acta* , **2005** , 530(1) : 23 ~ 31
- 3 Do Nascimento TG , Oliveira EdJ , Macêdo RO J. *Pharm. Biomed. Anal.* , **2005** , 37(4) : 777 ~ 783
- 4 Tashtoush B M , Jacobson E L , Jacobson M K. *Drug Dev. Ind. Pharm.* , **2008** , 34(8) : 840 ~ 844
- 5 Yeung P K F , Little R , Jiang Y Q , Buckley S J , Pollak P T , Kapoor H. *J. Pharm. Biomed. Anal.* , **1998** , 17(8) : 1393 ~ 1398
- 6 Stubbings G , Bigwood T. *Anal. Chim. Acta* , **2009** , 637(1-2) : 68 ~ 78
- 7 Sagan C , Salvador A , Dubreuil D , Poulet PP , Duffaut D , Brumpt I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* , **2005** , 38(2) : 298 ~ 306
- 8 HU Xiao-Gang , LI Gong-Ke(胡小刚 , 李攻科) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2006** , 34(7) : 1035 ~ 1041
- 9 Matsui J , Okada M , Tsuruoka M , Takeuchi T. *Anal. Commun.* , **1997** , 34(3) : 85 ~ 87
- 10 Mohamed R , Mottier P , Treguier L , Richoz-Payot J , Yilmaz E , Tabet J C , Guy P A. *J. Agr. Food Chem.* , **2008** , 56(10) : 3500 ~ 3508
- 11 Jafari M T , Rezaei B , Zaker B. *Anal. Chem.* , **2009** , 81(9) : 3585 ~ 3591
- 12 Feás X , Ye L , Regal P , Fente C A , Hosseini S V , Cepeda A. *J. Sep. Sci.* , **2009** , 32(10) : 1740 ~ 1747
- 13 Liu X , Liu J , Huang Y , Zhao R , Liu G , Chen Y. *J. Chromatogr. A* , **2009** , 1216(44) : 7533 ~ 7538
- 14 Nomachi M , Kubo T , Hosoya K , Kaya K. *Anal. Bioanal. Chem.* , **2006** , 384(6) : 1291 ~ 1296
- 15 Yin J , Meng Z , Du M , Liu C , Song M , Wang H. *J. Chromatogr. A* , **2010** , 1217(33) : 5420 ~ 5426
- 16 Sun H W , Wang F C , Ai L F. *J. Chromatogr. B* , **2007** , 857(2) : 296 ~ 300
- 17 ZHAO Xian-Rui , LI Chong-Xi(赵宪瑞 , 李崇熙) . *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis* (北京大学学报) , **2002** , 38(2) : 175 ~ 180
- 18 LIU Cui , Muhammad T , Hudaberdi N , Elena V Piletska , ZENG He-Hua(刘翠 , 吐尔洪·买买提 , 努尔买买提·库达尔巴里地 , Elena V , Piletska , 曾何华) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2010** , 38(11) : 1652 ~ 1656
- 19 Muhammad T , ABULIKEMU Abulizi , WANG Ji-De , CHEN Jian(吐尔洪·买买提 , 阿布力克木·阿布力孜 , 王吉德 , 陈坚) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) , **2007** , 35(7) : 1059 ~ 1062
- 20 García-Calzón J A , Díaz-García M E. *Sensors and Actuators B* , **2007** , 23(2) : 1180-1194

Dummy-template Molecularly Imprinted Polymer for Selective Solid Phase Extraction of Metronidazole in Bovine Serum

TURGHUN Muhammad* , ABDUKIREM Kadier , HALIDAN Mamat , NILUPAER Abudukeyoumu
(Key Laboratory of Oil and Gas Fine Chemicals , Ministry of Education and Xinjiang Uyghur Autonomous Region ,
College of Chemistry and Chemical Engineering , Xinjiang University , Urumqi 830046)

Abstract Metronidazole (MNZ) ester was chosen as a dummy template , methacrylic acid as monomer , ethylene glycol dimethacrylate as crosslinker and chloroform as porogen to synthesize dummy-template molecularly imprinted polymers (MIP) for MNZ. The result of batch rebinding tests showed that imprinting factor of the polymer was 2.02 , indicating high recognition ability of the MIP against MNZ. MIP adsorption isotherm was fit to Langmuir adsorption model , therefore it was monolayer adsorption , with maximum binding capacity Q_{\max} of 116 $\mu\text{mol/g}$ and binding constant K of 0.65 L/mmol. The recoveries of MNZ on MIP and nonimprinted cartridges were 97.4% and 44.3% respectively in solid phase extraction (SPE) experiment. However , the analogues of MNZ , MNZ ester and 4-nitrophenol , had recoveries less than 11.6% on both MIP and NIP in SPE , showing the high selectivity of the dummy template MIP against MNZ. The MIP was successfully used for the separation and concentration of MNZ spiked serum sample with mean recovery of 94.5% , which demonstrated that MIP was feasible of pre-treatment of MNZ serum sample without template bleeding.

Keywords Metronidazole; Dummy-template; Molecularly imprinted polymer; Solid phase extraction

(Received 14 April 2011; accepted 6 August 2011)