

溶胶-凝胶法制备红霉素印迹固相萃取材料及其选择性吸附^{*}

张朝晖^{1, 2**} 刘 丽¹ 聂丽华²

(¹吉首大学化学化工学院 吉首 416000) (²湖南大学化学生物传感与计量国家重点实验室 长沙 410082)

摘 要 以红霉素为模板分子,采用溶胶-凝胶印迹技术,合成对红霉素具有特异选择识别性能的印迹聚合物.采用红外光谱、扫描电子显微镜、热重分析以及比表面积测定技术对印迹聚合物的结构和表面性能进行详细探讨,结果表明所得印迹聚合物比表面积为 266.2 m²/g,粒径为 600 nm 左右的颗粒材料.选择 3 种抗生素类药物进行选择吸附研究,结果表明,该聚合物对红霉素的分离因子最高达到 2.20.优化固相萃取条件,结果表明用甲醇:乙酸(75:25, V/V)作为洗脱剂时对红霉素的洗脱效果最好.结合液相色谱技术,该印迹材料成功的分离和富集红霉素肠溶片中的红霉素,回收率达到 104.5%.

关键词 溶胶-凝胶, 固相萃取, 红霉素, 分子印迹

分子印迹技术(molecularly imprinted technique, MIT)是近年来发展起来的一门新技术^[1].因其聚合物具有预定性、识别性,以及高度稳定特性,MIT 逐渐发展成一个研究热点,在分析科学、分离科学、传感技术等领域有了快速发展^[2-4].

分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer, MIP)具有独特的选择性和亲和力,作为固相萃取吸附剂,克服了常规固相萃取材料的缺点^[5, 6].具有立体构型和相互作用位点双重识别能力的高选择性分子印迹萃取材料不仅可以实现目标成分富集^[7, 8],而且在药品质量控制以及药品药理研究中,能够排除药品辅料或人体体液复杂成分的影响,实现准确、快速和高效含量测定^[9, 10].目前在临床工作中,滥用抗生素的状况特别严重.抗生素如同一把双刃剑,用之科学合理,可以为人类造福,不恰当则危害人类的健康.因此药物中的抗生素超标则会严重危害人类的健康.采用传统的样品分离和溶剂萃取等前处理方法^[11-13],手续繁杂.采用分子印迹固相萃取技术,有望以简便和高效的方式克服样品体系复杂、目标组分含量低等不利因素,为样品的富集和分离带来极大的方便.

采用传统方法制备的印迹聚合物由于其刚性和惰性较差的缺点,不利于模板分子的重新吸附.作为一种新的印迹材料,溶胶-凝胶材料近年来被

广泛地研究,它兼顾了溶胶-凝胶和分子印迹二者的优点,克服了以上缺点,在溶胶-凝胶过程,把模板分子引入到无机网络结构中,形成一种刚性复合材料^[14].一旦模板分子从主体中除去,对模板分子显示出良好的亲和性.本文以抗生素类药物红霉素为模板分子,采用溶胶-凝胶印迹技术,合成对红霉素具有特异选择性识别能力的分子印迹聚合物,并作为固相萃取填充材料,成功的分离出肠溶片药物中的红霉素.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

原硅酸乙酯(TEOS)和 3-氨丙基三甲氧基硅烷(APTMS)购自 Sigma 公司;盐酸(HCl),甲醇(分析纯),乙醇(分析纯),和乙腈(色谱纯)等试剂购自长沙化学试剂公司;红霉素(erythromycin, Ery),硫酸链霉素(streptomycin sulphate, Stre)和氯洁霉素(clindamycin, Clin)等标样购自中国药检所;红霉素肠溶片产自江苏平光制药有限公司;二次蒸馏水.

LC-10AD 型高效液相色谱(日本岛津公司); WGH-30A 双光束红外分光光度(天津市港东科技发展有限公司);差热分析仪(PCR-1A 北京光学仪器厂);扫描电镜(日本日立公司).

1.2 印迹聚合物(MIP)的制备

在 150 mL 干燥锥形瓶中加入 0.224 g TEOS,

^{*} 2009-06-22 收稿,2009-09-22 修稿;湖南省自然科学基金(基金号 08JJ4004)、湖南省教育厅优秀青年基金(基金号 07B061)、湖南大学化学传感与计量国家重点实验室开放基金(基金号 2008007)及吉首大学校级课题(项目号 08JDY020)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: zhaohuizhang77@hotmail.com

24 mL 乙二醇乙醚, 搅拌混合均匀. 然后加入 1600 μL APTMS, 800 μL HCl, 磁力搅拌 5 min, 然后逐滴加入 4 mL 二次蒸馏水, 水解反应 2 h, 得溶胶, 备用.

称取 0.628 g (2 mmol) 红霉素溶于 20 mL 二次蒸馏水中, 加入 16 mL 上述制备的溶液, 搅拌 5 min, 混合均匀, 密封, 然后于 80 $^{\circ}\text{C}$ 下陈化 12 h.

将上述制备好的材料放在 100 mL 带塞锥形瓶中, 加入体积比为 9:1 的甲醇和乙酸混合液 50 mL, 磁力搅拌 2 h. 过滤, 滤饼用甲醇和乙酸混合液洗涤, 直到滤液中检测不到红霉素为止. 再用甲醇洗去多余的乙酸, 干燥后即得到红霉素分子印迹聚合物.

非印迹聚合物(non imprinted polymer, NIP)的合成方法与 MIP 完全一致, 只是在合成时不加入模板分子.

1.3 结构和性能表征

热稳定性性能表征, 利用微机差热分析仪对 MIP, NIP 的热稳定性进行表征, 温度范围 0 ~ 800 $^{\circ}\text{C}$ (升温速度 10 K/min). 形貌表征, 取少量样品分散于乙腈中, 超声处理, 室温下涂在平整的载玻片上, 干燥后涂布到导电胶上, 喷金后采用扫描电镜(S3400)观察 MIP 的形貌. 化学结构表征, 样品测量前采用红外灯充分干燥, 磨碎成粉末, 用

KBr 压片, 红外光谱测定, 观测波数为 400 ~ 4000 cm^{-1} . 采用 N_2 吸附方法对其表面性能进行分析.

1.4 静态吸附性能研究

取 20 mg MIP, 置于吸附管中, 加入 10 mL 不同浓度(1.0 ~ 4.0 mmol/L)红霉素的乙醇溶液. 置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温超声波振荡器中, 振荡 30 min 后, 以 9000 r/min 速度离心分离, 取上清液用高效液相色谱测定平衡时红霉素的浓度, 根据吸附前后浓度变化, 计算聚合物对不同浓度红霉素溶液的吸附量 Q . 色谱检测条件是色谱柱为 C_{18} 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm), 检测波长 $\lambda = 210$ nm, 流动相为甲醇: 水 ($V/V = 65:35$), 流速为 1.0 mL/min.

1.5 选择性吸附实验

为了研究印迹聚合物的选择性, 选择与红霉素结构类似的抗生素类药物硫酸链霉素和氯洁霉素(结构式如图 1 所示)作为竞争底物, 用平衡吸附试验研究 MIP 和 NIP 的选择识别性能. 分别配制浓度为 0.1 mmol/L 的红霉素和硫酸链霉素以及红霉素和氯洁霉素的 2 种混合溶液, 取 10 mL 混合溶液于离心管中, 然后加入 20 mg MIP 或 NIP, 超声 30 min, 离心分离. 用高效液相色谱法检测上清液中底物的浓度. 根据吸附前后溶液中底物的变化可计算聚合物对 3 种底物的结合量, 比较该印迹聚合物的选择吸附性能.

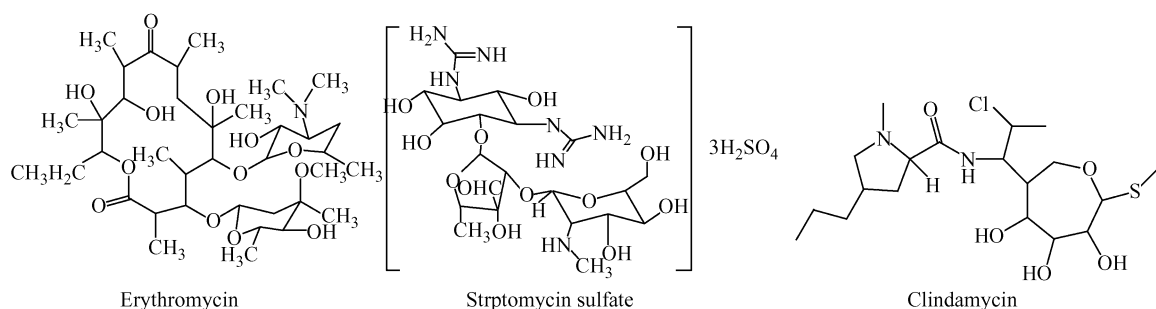


Fig. 1 Chemical structures of erythromycin, streptomycin sulfate and clindamycin

1.6 固相萃取应用

1.6.1 印迹固相萃取柱的制备 取 1.0 g MIP 填充于自制固相萃取柱(10 mm i. d. $\times$ 70 mm)中, 两端用玻璃棉封堵. 用甲醇: 水(80:20, V/V)进行预处理 30 min, 控制流速 0.5 mL/min. 萃取过程中溶液采用高效液相色谱仪分析. 作为对照, 取 1.0 g NIP 按照上述过程制备空白萃取柱.

1.6.2 固相萃取实验 取 2.0 mmol/L 红霉素的乙醇溶液, 上样 10 mL, 控制流速 0.5 mL/min, 分别用水和氯仿淋洗除去非特异性吸附的干扰物

质后, 使用甲醇: 乙酸(70:30, V/V)为洗脱剂洗脱, 回收被保留的模板分子, 用高效液相色谱分析. 通过检测样品和洗脱液中红霉素的量计算回收率.

1.6.3 优化固相萃取条件 选择与红霉素结构类似的硫酸链霉素和氯洁霉素为底物, 配制浓度为 1.0 mmol/L 的红霉素、硫酸链霉素、氯洁霉素的乙醇溶液, 按照上述方法上样, 用不同体积比的甲醇-乙酸混合溶液作为洗脱剂, 采用高效液相色谱对流出液和洗脱液进行检测分析, 优化洗脱

条件. 作为对照,取空白萃取柱进行相同的操作.

1.6.4 固相萃取分离红霉素肠溶片中的红霉素

样品制备,取两片红霉素肠溶片去除外层包衣,研碎. 称取 6 mg 肠溶片粉末加入 5 mg 红霉素标样配成肠溶片的乙醇溶液,备用.

取 10 mL 红霉素肠溶片溶液,上样. 用 20% 的甲醇淋洗后,用 15 mL 体积比为 75:25 的甲醇:乙酸溶液洗脱,对流出液和洗脱液进行液相色谱分析.

2 结果与讨论

2.1 MIP 的制备

本文以红霉素作为模板分子,因其结构中含有大量的—OH 和—C=O,所以选择 APTMS 作为功能单体,使模板分子通过—N—H,—O—H

两种氢键与功能单体牢固的结合,合成路线如图 2 所示. 为了使溶胶-凝胶聚合体系更好的交联聚合,本文引入交联度 $C(\%)$ 和凝胶浓度 $T(\%)$,其定义为 $C(\%) = [M_{\text{TEOS}} / (M_{\text{TEOS}} + M_{\text{APTMS}})] \times 100\%$; $T(\%) = [(M_{\text{TEOS}} + M_{\text{APTMS}}) / V] \times 100\%$. 式中, M_{TEOS} 为交联剂 TEOS 的质量(g); M_{APTMS} 为功能单体 APTMS 的质量(g); V 为聚合溶液的总体积(mL). 交联度 C 反映凝胶结构中聚合物的密度,从而决定聚合物中形成孔的直径,孔径随交联度的增加而减小. 研究表明凝胶浓度 T 一般在 3% ~ 30% 范围内变化,凝胶浓度过高时形成的胶体质地坚硬而且比较脆,过小凝胶比较稀软,另外 T 对孔径大小也有影响^[8]. 红霉素为小分子物质,综合考虑,本文确定选择交联度为 12.9%,凝胶浓度为 5%.

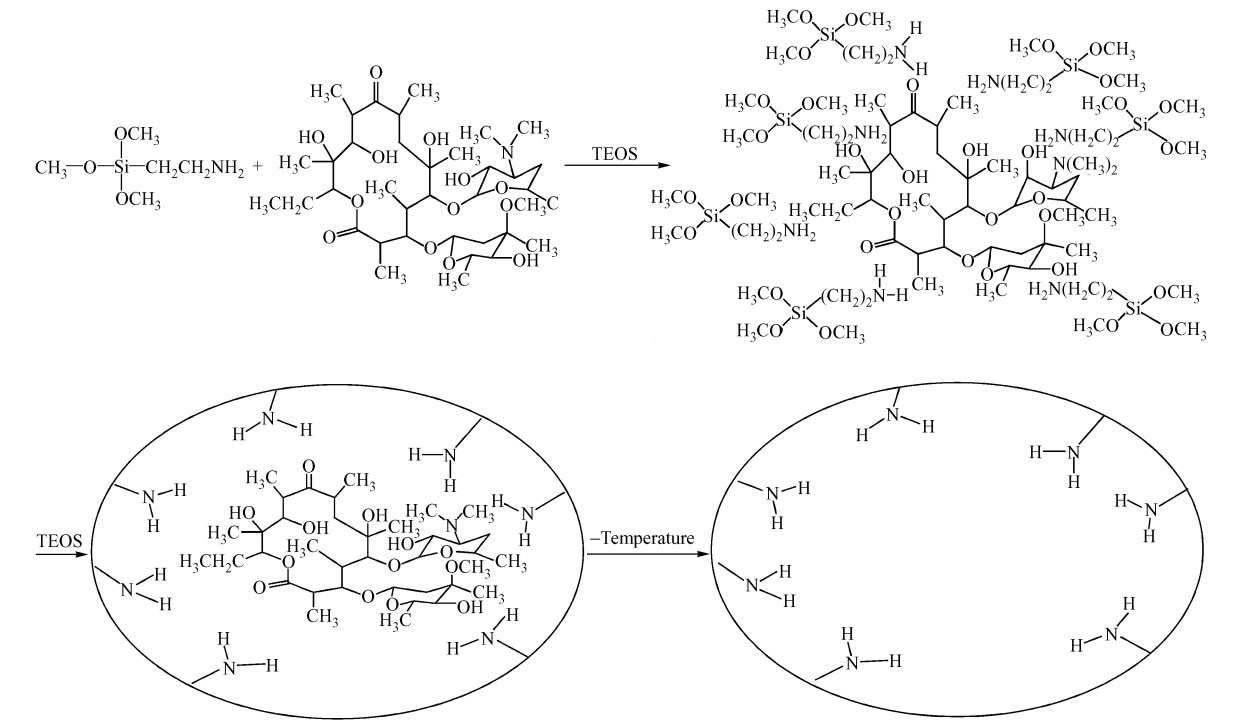


Fig. 2 Procedure for preparing MIP

采用扫描电镜对 MIP 进行形貌分析,结果如图 3 所示. MIP 为表面光滑,粒径均匀,尺寸约为 600 nm 的微球. 进一步采用 N₂ 吸附方法,对合成的印迹吸附材料进行了表面性能分析,测得制备的印迹材料的比表面积为 266.2 m²/g.

2.2 红外及热重分析

采用红外光谱技术对模板洗脱前后的 MIP 和 NIP 进行结构分析. 如图 4 所示,MIP 和 NIP 在约 3700 cm⁻¹ 附近均有一 N—H 吸收峰,这是因为

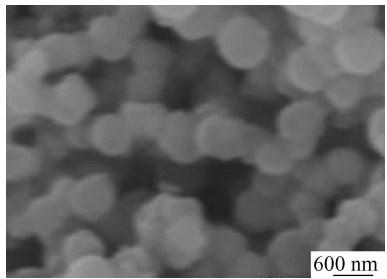


Fig. 3 SEM image of MIP

合成过程中使用功能单体 APTMS 的原因. 在图 4 谱线 (a) 中, 约 3300 cm^{-1} 为 —OH 峰, 约 3100 cm^{-1} 为饱和 —C—H 键的伸缩振动, 约 1750 cm^{-1} 为 —C=O 峰, 这是由于洗脱前的 MIP 中含有的模板分子红霉素引起的. 与图 4 谱线 (a) 对比, 图 4 谱线 (b) 中的 —C=O 峰基本消失, 饱和 —C—H 键的伸缩振动也相对减小, 表明 MIP 中模板分子洗脱干净. 图 4 谱线 (b) 和谱线 (c) 中仍有一 —OH 吸收峰, 但强度明显减弱, 这是未完全干燥的水和醇类溶剂中的一 —OH 引起的.

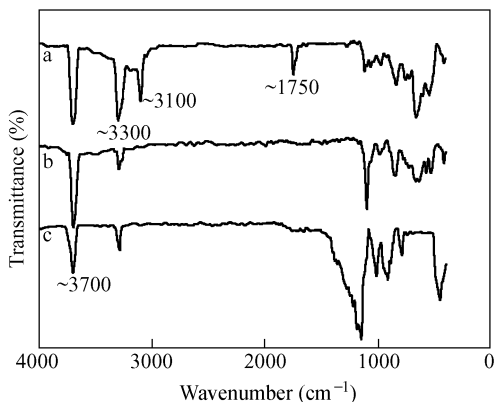


Fig. 4 IR spectra of MIP before eluting the template (a), after eluting the template (b) and NIP (c)

MIP 和 NIP 的热重分析结果如图 5 所示. 在 $25\sim100^{\circ}\text{C}$ 范围内有一定的质量损失, 这主要是未干燥完全的溶剂以及未反应完全的功能单体进行燃烧分解造成的. 随着温度的升高, 聚合物开始燃烧分解, 质量分数随温度的增加逐渐下降, 最终 NIP 失重率为 60% , MIP 失重率为 55% , 这是由于 MIP 在制备过程中模板分子与功能单体以氢键形成稳定的结构, 而 NIP 中功能单体排列无序, 导致结构不够稳定.

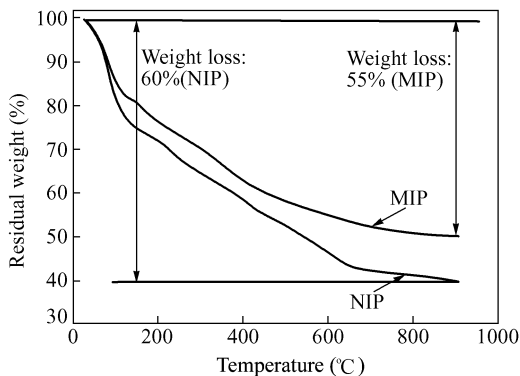


Fig. 5 Thermogravimetric curves for the MIP and NIP

2.3 印迹聚合物对红霉素的静态吸附以及选择性研究

采用静态吸附法测定 MIP 及 NIP 对红霉素的结合等温线, 实验结果如图 6 所示. 结果表明 MIP 对红霉素具有较强的吸附能力, 而 NIP 对红霉素的吸附很小, 这表明在该实验条件下, 印迹聚合物对模板具有特异吸附性, 这种吸附一般主要来源与识别位点和模板分子间的空间互补作用.

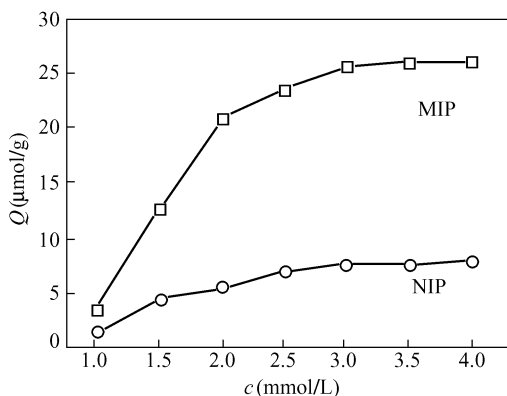


Fig. 6 Adsorption isotherms of MIP and NIP

为了进一步研究 MIP 的选择吸附性能, 本文选用模板分子红霉素和与其结构类似的抗生素类药物硫酸链霉素和氯洁霉素为底物, 由平衡结合方法测定 MIP 和 NIP 对底物的结合量, 并通过静态吸附分配系数 K_D 和分离因子 α 来表征^[15].

静态吸附分配系数 K_D 的定义为

$$K_D = c_p / c_s$$

式中, c_p 表示底物在聚合物上的浓度 ($\mu\text{mol/g}$), c_s 表示底物在溶液中的浓度 ($\mu\text{mol/mL}$).

分离因子 α 定义为

$$\alpha = K_{D1} / K_{D2}$$

式中, K_{D1} 表示模板分子的分配系数, K_{D2} 表示底物的分配系数. 实验结果列于表 1.

由表 1 可以发现, 模板分子红霉素的分配系数远远大于竞争底物的分配系数, MIP 对竞争底物的分配系数也均大于 NIP. 这是因为, 模板分子与功能单体所形成的氢键作用, 以及印迹聚合物合成过程中形成的互补孔穴对识别模板分子均有选择性吸附作用. 而其他两种抗生素分子与印迹孔穴不能形成互补, 故物理吸附占主导作用. 同样, 在 NIP 中功能单体的分布是任意的, 在合成过程中没有与模板分子形成互补的印迹孔穴, 因此不能对模板分子显示出特异选择性.

Table 1 Distribution coefficient K_D and separation factor α of ery, stre and clin on MIP and NIP

Mixture solution	Substrate	MIP				NIP			
		c_p ($\mu\text{mol/g}$)	c_s ($\mu\text{mol/mL}$)	K_D (mL/g)	α	c_p ($\mu\text{mol/g}$)	c_s ($\mu\text{mol/mL}$)	K_D (mL/g)	α
Ery + Stre	Ery	25.58	0.21	122.22	2.20	7.48	0.11	68.89	1.43
	Stre	14.36	0.26	55.56		5.77	0.12	48.11	
Ery + Clin	Ery	24.39	0.22	110.87	1.96	6.59	0.10	65.90	1.21
	Clin	12.74	0.23	56.44		4.94	0.09	54.84	

2.4 固相萃取研究

2.4.1 优化固相萃取条件 为了优化萃取柱的洗脱条件,选择与红霉素结构类似的硫酸链霉素和氯洁霉素作为竞争底物. 取 10 mL 1.0 mmol/L 的混合溶液上样,吸附达到平衡后,用水和氯仿淋洗,除去非特异性吸附,然后分别用 10 mL 体积比为 80:20,75:25,70:30 的甲醇:乙酸溶液洗脱. 对洗脱液进行液相色谱检测分析,3 种抗生素的回收率如图 7 所示. 当用体积比为 75:25 的甲醇和乙酸的混合溶液作为洗脱剂时,红霉素的洗脱效果最好,回收率最大,可达 96.5%.

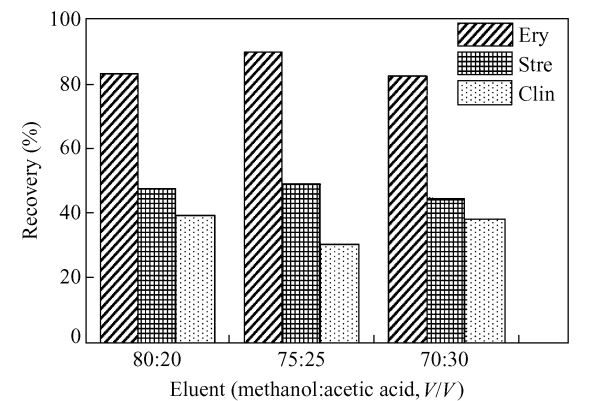


Fig. 7 The recoveries of erythromycin, streptomycin sulphate and clindamycin in the eluents eluted using different eluents

为了进一步研究洗脱剂对模板分子的洗脱分布,采用 20 mL 体积比为 75:25 的甲醇:乙酸溶液为洗脱剂,计算累计回收率,结果如图 8 所示. 前 5 mL 洗脱剂的回收率接近 90%,到第 15 mL 达到 103.1%.

2.4.2 固相萃取分离红霉素肠溶片中的红霉素的研究 为了研究印迹聚合物对肠溶片中红霉素的分离效果,对红霉素肠溶片的乙醇溶液进行固相萃取. 取 15 mL 红霉素肠溶片溶液,上样,步骤同上. 先用 20% 的甲醇淋洗,再用 10 mL 体积比为 75:25 的甲醇:乙酸溶液洗脱. 红霉素肠溶片溶液在上样前经高效液相色谱检测,在 210 nm 处检测出多种成分,如图 9(a) 所示. 采用高效液相色谱对 MIP 和 NIP 萃取柱的流出液和洗脱液进

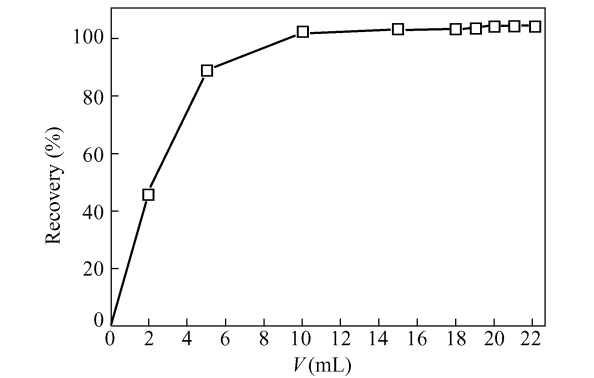


Fig. 8 The recoveries of molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) erythromycin changing with the volume of eluent

行检测,如图 9(b)~9(e) 所示. 从色谱图 9(b) 可以看出,样品溶液通过固相萃取柱后,流出液中的红霉素峰面积明显减少,说明样品中大部分红霉素被 MIP 吸附而保留在萃取柱中. 经过洗脱剂洗脱,使萃取柱中红霉素解吸出来,回收率达到 104.5%. 说明 MIP 萃取柱中能够富集和分离肠溶片中的红霉素. 如图 9(d) 所示,样品通过 NIP 萃取柱后,红霉素随着溶剂一起流出,只有少量的物理吸附. 可以看出,NIP 萃取柱并不能富集和分离肠溶片中的红霉素.

3 结论

本文采用溶胶-凝胶技术合成红霉素分子印迹聚合物,分别采用红外光谱、热重分析、扫描电镜及比表面积测定对聚合物进行详细表征. 结果表明,所得聚合物的比表面积为 $266.2 \text{ m}^2/\text{g}$,并且颗粒均匀,表面光滑,粒径为 600 nm 左右. 选择吸附实验研究表明该聚合物对红霉素的分离因子最高达到 2.20. 作为固相萃取吸附剂,优化洗脱条件实验表明选择体积比为 75:25 的甲醇:乙酸溶液为洗脱剂,用量为 15 mL 时,对该印迹萃取柱洗脱效果最好. 该分子印迹萃取柱成功用于红霉素肠溶片中的红霉素分子分离与富集,回收率达到 104.5%.

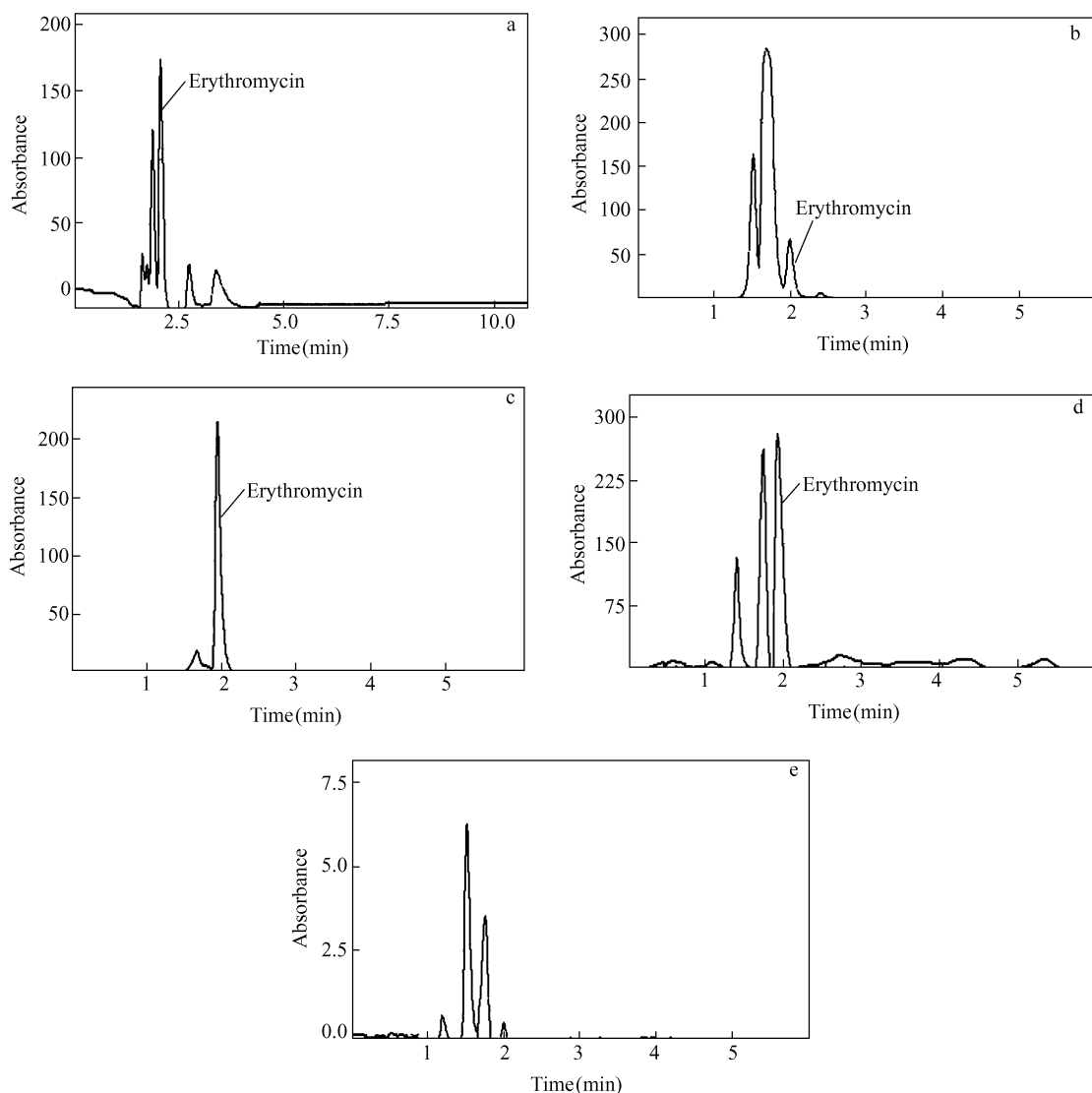


Fig. 9 Chromatograms of erythromycin enteric-coated tablets solution (a), washings on MIP-coloum (b) and NIP-coloum (d), elutions on MIP-coloum (c) and NIP-coloum (e)

REFERENCES

- 1 Sun Z, Schussler W, Sengl M. *Anal Chim Acta*, 2008, 620: 73 ~ 81
- 2 Anderson R A, Ariffin M M, Cormack P A G. *Forensic Sci Int*, 2008, 174: 40 ~ 46
- 3 Fang G Z, Tan J, Yan X P. *Anal Chem*, 2005, 77: 1734 ~ 1739
- 4 Claude B, Morin P, Lafosse M. *Talanta*, 2008, 75: 344 ~ 350
- 5 Jorn C C Y, Edward P C L. *Food Chem*, 2007, 105: 301 ~ 310
- 6 Lin H G, Gan T, Wu K B. *Food Chem*, 2009, 113: 701 ~ 704
- 7 Yang C C, Liang C H. *Mater Chem Phys*, 2009, 114: 670 ~ 675
- 8 Zhang Mo(张茉), He Xiwen(何锡文), Qin Lei(秦磊). *Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 2008, 29(3): 498 ~ 504
- 9 Zhang Shengzu(张圣祖), Fu Xinjian(付新建), Wang Hong(王宏), Yang Yajiang(杨亚江). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2009, (3): 244 ~ 248
- 10 Zhang Nuowei(张挪威), Ding Mingxing(丁明星), Liu Guoyan(刘国艳), Song Weiwei(宋巍巍), Chai Chunyan(柴春彦). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2008, 10: 1380 ~ 1384
- 11 Poole C F. *Trends Anal Chem*, 2003, 22: 362 ~ 373

12 Hu Shuguo(胡树国),Li Li(李礼),He Xiwen(何锡文). Progress in Chemistry(化学进展),2005,17(3):531 ~ 542

13 Geng Lina(耿利娜),Kang Ning(康宁),Ning Zhouyun(宁周云),Wu Liqing(武利庆),Li Yan(李琰),Sun Liquan(孙立权),Luo Aiqin(罗爱芹). Acta Physico-Chimica Sinica(物理化学学报),2008,24(1):25 ~ 31

14 Lu Y K,Yan X P. Anal Chem,2004,76:453 ~ 457

15 Yang Lvwen(杨律文),Liu Hanmao(刘含茂),Qu Hemi(屈贺霖). Chinese Journal of Applied Chemistry(应用化学),2008,25:137 ~ 141

PREPARATION OF ERYTHROMYCIN-IMPRINTED SOLID-PHASE
EXTRACTION MATERIAL BY SOL-GEL METHOD AND
THE SELECTIVE ADSORPTION

ZHANG Zhaozhui^{1,2}, LIU Li¹, NIE Lihua²

(¹ College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University 416000)

(² State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, Hunan University, Changsha 410082)

Abstract A highly selective molecularly imprinted polymer (MIP) was prepared by a simple molecular imprinting technique with a sol-gel process. Erythromycin was used as template, 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) as functional monomer and tetraethylorthosilicate (TEOS) as reticulating agent. Infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, thermogravimetric and surface area analyses were used to characterize the composite structure and morphology in detail. The results showed that the specific surface area of MIP was 266.2 m²/g. These imprinted polymer particles had perfect spherical shape with average size of 600 nm and exhibited especially selective recognition for erythromycin. Equilibrium binding experiment showed that the separation factor was 2.20 when erythromycin was separated by using MIP. The elution condition was optimized, and the optimal condition was methane: acetic acid (75:25, V/V) as eluent, and the optimal elution volume was 15 mL. The recovery of erythromycin was 103.1% by using 15 mL mixture of methane: acetic acid (75:25, V/V) as eluent. Packed in solid phase extraction column, the polymer was used to extract erythromycin from erythromycin enteric-coated tablets. The results indicated that the polymer can separation and enrich erythromycin from erythromycin enteric-coated tablets successfully with the recovery of 104.5%.

Keywords Sol-gel, Solid phase extraction, Erythromycin, Molecularly imprinted