

文章编号: 1673—9620 (2007) 04—0021—04

# 盐酸氢氯噻嗪分子印迹聚合物的实验研究<sup>\*</sup>

董 艳<sup>1</sup>, 邱岳进<sup>2</sup>, 孙贤祥<sup>3</sup>

(1 常州市华生制药有限公司 质量管理部, 江苏 常州 213022; 2 常州出入境检验检疫局; 3 江苏工业学院)

**摘要:** 以盐酸氢氯噻嗪为模板分子, 以甲基丙烯酸甲酯 (MAA) 为功能单体, 以三—羟甲基丙烷—三—丙烯酸酯为交联剂, 偶氮二异丁腈为引发剂, 并通过实验条件的优选, 合成了对氢氯噻嗪具有特异作用的分子印迹聚合物。通过测定印迹聚合物的结合量, 评价了其对氢氯噻嗪的亲合力。Scatchard 分析表明, 在印迹聚合物中存在对氢氯噻嗪形成不同亲合力的两类结合位点, 这两类不同结合位点的离解常数分别为  $K_{d1} = 57.0 \mu\text{mol/L}$  和  $K_{d2} = 3.96 \text{ mmol/L}$ ; 其最大表现结合量分别为  $Q_{\max 1} = 5.59 \mu\text{mol/g}$  和  $Q_{\max 2} = 216.4 \mu\text{mol/g}$ 。

**关键词:** 盐酸氢氯噻嗪; 分子印迹聚合物; 印迹条件

中图分类号: Q 632; R 971 文献标识码: A

## Experimental Investigation on the Molecularly Imprinted Polymer Receptor for Hydrochlorothiazide

DONG Yan<sup>1</sup>, QIU Yue-jin<sup>2</sup>, SUN Xian-xiang<sup>3</sup>

(1. Department of Quality & Management, Hua Sheng Drug & Pharmaceutical limited Company, Changzhou 213022, China; 2. Changzhou Bureau of Commodity Inspection & Quarantine on Entering and Exiting; 3. Jiangsu Polytechnic University)

**Abstract:** A synthetic polymer selective to Hydrochlorothiazide was prepared by a non-covalently imprinted technique, using Hydrochlorothiazide as a template, methyl methacrylate as a functional monomer and tri—[hydroxymethyl]—propan—tri—acrylic acid as a cross—linker, and methanol as a porogenic solvent. After extraction of template, affinity of the polymer imprinted with Hydrochlorothiazide was examined in re-binding experiment. From the Scatchard analysis, binding site heterogeneity is obvious and two types of binding sites can be identified. The equilibrium dissociation constant  $K_{d1}$ , the apparent maximum amount  $Q_{\max 1}$  and the binding constant  $K_{a1}$  of the higher affinity binding sites can be calculated to be  $57.0 \mu\text{mol/L}$ ,  $5.59 \mu\text{mol/g}$ , and  $1.75 \times 10^4 (\text{mol/L})^{-1}$ ; while  $K_{d2}$ ,  $Q_{\max 2}$ , and  $K_{a2}$  of the lower affinity binding sites were calculated to be  $3.96 \text{ mmol/L}$ ,  $216.4 \mu\text{mol/g}$  and  $2.53 \times 10^2 (\text{mol/L})^{-1}$ , respectively.

**Key words:** Hydrochlorothiazide; molecularly imprinted polymer; imprinting condition

分子印迹聚合物 (molecularly imprinted polymer, MIP) 对模板分子的分子空间几何结构、大小具有可人工预设计性、特异的分子识别能力以及

优良的化学稳定性好等特点, 可以从复杂体系中分离、分析待测物质, 或进行选择性的识别。利用单体与模板分子之间形成非共价作用复合物制备

\* 收稿日期: 2007—04—05

作者简介: 董艳 (1973—), 女, 江苏徐州人, 助理工程师; 通讯联系人: 孙贤祥。

MIP, 由于制备方法不复杂, 因而在分析化学 (例如固相萃取、色谱分离、化学与生物传感器等)<sup>[1]</sup>、分子催化、生物医学<sup>[2]</sup>、化工分离<sup>[3]</sup>等领域得到了许多应用。例如, 药物分析中常需要从复杂的生物体液中分离、富集被测组分。研究对药物模板分子具有“记忆”功能的 MIP, 无疑是解决这类问题的新途径。

盐酸氢氯噻嗪是一种直接作用于肾脏而促进利尿功能的中效利尿药, 临床上主要用于治疗各种水肿、高血压及尿崩症的药物。本文以盐酸氢氯噻嗪模板分子, 分别以甲基丙烯酸甲酯 (MAA)、三羟甲基丙烷三丙烯酸酯、偶氮二异丁腈分别为单体、交联剂和引发剂, 制备盐酸氢氯噻嗪分子印迹聚合物, 并实验考查了盐酸氢氯噻嗪分子印迹聚合物对模板分子的亲和特性。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

甲基丙烯酸甲酯 (MAA, 分析纯), 三羟甲基丙烷三丙烯酸酯 (THPTA)、偶氮二异丁腈 (AIBN, 分析纯), 甲醇 (分析纯), 乙腈 (分析纯), 丙酮 (分析纯), 盐酸氢氯噻嗪 (HCTZ, 原料药)。

UV-757CRT 紫外分光光度计, 超级恒温槽。

### 1.2 分子印迹聚合物的合成

称取 0.297 g 盐酸氢氯噻嗪溶于 10 mL 有机溶剂, 加入一定量 MAA 于振荡器上振荡 2 h, 加入一定量 THPTA 和 20 mg AIBN, 待充分溶解后, 通氮除氧 10 min 后将瓶口密封, 置于 60 °C 恒温 (水) 浴中约 24 h, 制得坚硬的分子印迹聚合物。将聚合物研磨过筛, 取一定量的 360~400 目 MIP 装入交换柱内, 用甲醇浸泡 2 次 (每次约 2 h 时), 再用甲醇洗 7~8 次, 直至所收集的洗脱液中在  $\lambda = 271 \text{ nm}$  处无吸收为止, 晾干, 进行真空干燥后备用。

在同样的条件下制备出空白模板分子印迹聚合物。

### 1.3 分子印迹聚合物的结合量测定

#### 1.3.1 柱吸附法

将一定量的粒状盐酸氢氯噻嗪模板聚合物装入玻璃质交换柱中, 加入 25.00 mL  $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

的盐酸氢氯噻嗪甲醇溶液, 收集柱下液体, 稀释至一定体积、摇匀, 用 1 cm 比色皿于 271.0 nm 处测量其吸光度, 用标准工作曲线法测出其溶液中盐酸氢氯噻嗪浓度。根据过柱前后盐酸氢氯噻嗪浓度差, 计算出 MIP 对盐酸氢氯噻嗪的结合量, 平行测定 3 次取其平均值。

分配系数  $K = C_p / C_s$ , 被用来表征聚合物的结合 (键) 合程度,  $C_p$  是盐酸氢氯噻嗪在聚合物内的浓度,  $C_s$  是盐酸氢氯噻嗪在溶液里的浓度。

#### 1.3.2 平衡吸附法

称取一定量的盐酸氢氯噻嗪, 以甲醇为溶剂配制成  $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  溶液, 分别放入 50 mL 锥形瓶中, 分别放入 20 mg MIP, 将瓶密封, 震荡 24 h 后, 静置, 取上层清液和用 1 cm 比色皿, 在  $\lambda = 271.0 \text{ nm}$  处测量其吸光度, 用标准工作曲线法 (标准工作曲线法的线性工作区间为  $1.0 \times 10^{-5} \sim 9.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ) 测出其溶液中盐酸氢氯噻嗪浓度, 平行测定 2 次得出其平衡结合量。

## 2 结果与讨论

以盐酸氢氯噻嗪 (HCTZ) 为模板分子, 以 MAA 为单体, 以 THPTA 为交联剂制备分子印迹聚合物 (HCTZ-MIP) 的制备过程见图 1。

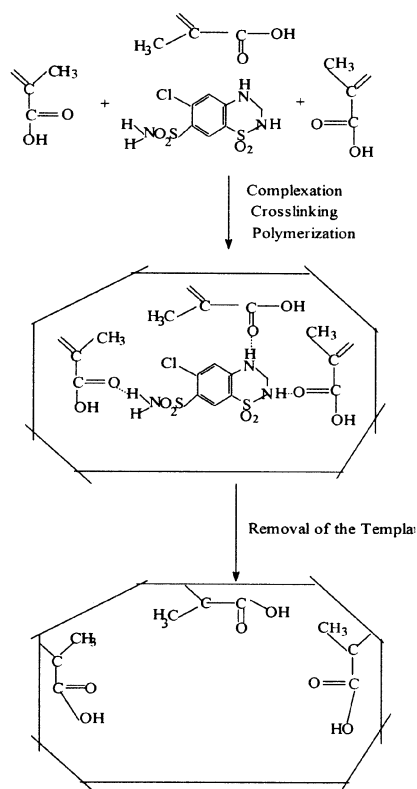


图 1 分子印迹形成示意图

Fig 1 Scheme of hypothetical imprint formation

## 2.1 HCTZ-MIP 合成条件的选择

许多研究表明, 分子印迹聚合物的种种性能取决于 MIP 聚合条件。本文分别对致孔剂种类、聚合反应物物质的量比等进行了实验调查。所用致孔剂为甲醇、乙腈、丙酮。试验的反应物物质的量比是: 模板分子、单体、交联剂比分别为 1:4:4, 1:4:8, 1:8:8 和 1:4:20。对各 HCTZ-MIP 和空白模板分子印迹聚合物 (NIP) 对模板分子的结合量进行了测定, 结果表明, 与对应的 HCTZ-MIP 的相比, 各 NIP 的结合量均很小。图 2 示出了 3 种致孔剂和 4 种比例各条件下所合成的 HCTZ-MIP 对底物的结合量的结果。

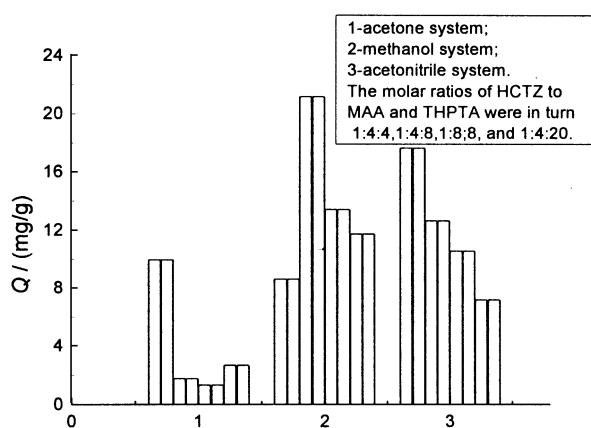


图 2 不同溶剂体系合成的 MIP 结合量

Fig 2 The influence of both the kind of porogenic solvents and the molar ratio of the mixture on the binding ability of MIP

由图 2 所见, 在相同反应温度和同一致孔剂情况下, 聚合反应物的不同比例是影响 HCTZ-MIP 对底物结合量的重要因素。所试验的甲醇、丙酮、乙腈 3 种致孔剂的介电常数分别是: 31.5, 19.1, 36.7。当以丙酮和乙腈为致孔剂, 3 者比例为 1:4:4 时所合成的 MIP 对 HCTZ 的结合量较大。当用极性较乙腈稍低的甲醇为致孔剂时, 所合成的 HCTZ-MIP 的再结合量明显高于丙酮、乙腈二种致孔剂时制备的 MIP, 而且以比例 1:4:8 聚合得到的 MIP 对 HCTZ 结合量最大。

从这 4 种不同比例的 MIP 中还可以看出交联剂含量会影响 MIP 对底物的再结合量。以含交联剂摩尔分数 66.7% 的结合性能最好, 而不是交联剂摩尔分数越大 (如 88.3%, 即 1:4:20) 的 MIP 的结合量最好。对于单体与交联剂相同摩尔分数的两种 MIP (1:4:4 和 1:8:8) 的结合量, 以单体摩尔百分数较大的结合量较高。这说明在这些条件下合成的聚合物结构的刚性和印迹孔穴

MIP, 对 HCTZ 的亲合性是较为有利的。

实验还发现, 用不同致孔剂下制备的各 MIP 的机械强度和可磨性上也存在差异。以甲醇为致孔剂所合成的 HCTZ-MIP 机械强度高, 不易被研磨, MIP 呈透明晶块状; 以乙腈为溶剂所制备的 HCTZ-MIP 呈淡黄色晶块, 质脆, 易于研磨; 而以丙酮为溶剂制备的 MIP 为淡黄色固体, 质软, 不易于被研磨。这说明用溶剂极性居中的甲醇为致孔剂时所合成的 HCTZ-MIP 机械性能好, 印迹过程中形成的空穴的空间取向以及抗溶胀性等较其他两者好, 使得其 HCTZ-MIP 具有较好的再键合能力。

除特别指明外, 以下研究所用的 MIP 均以甲醇为致孔剂和以模板分子、单体、交联剂的物质的量比是 1:4:8 合成的 MIP。

## 2.2 HCTZ-MIP 的再键合分析

在甲醇溶液中 HCTZ-MIP 对  $5.00 \times 10^{-5}$  mol/L HCTZ-MIP 的再键合随时间的关系用平衡法进行了实验调查, 结果见图 3。由图 3 可见, MIP 对模板分子的再键合需要 24 h 以上, 故平衡法测定再 (结) 键合量时选用了 24 h。在甲醇溶剂中的 MIP 对 HCTZ 的分配系数  $K$  随盐酸氢氯噻嗪浓度增加而变化。在底物浓度为  $3.00 \times 10^{-5}$  mol/L 时测定了 MIP 对底物的分配系数为 49.0 mL/g, 当 HCTZ 的质量浓度在 3.0 ~ 21.0 mg/L 范围内增加时,  $K$  逐渐下降 (图 4)。然而, 空白印迹聚合物的分配系数基本不变。MIP 的  $K$  是 NIP 的 4~6 倍, 两者对 HCTZ 的亲合性上的差异反映了在分子印迹所形成的孔穴上的显著差异。

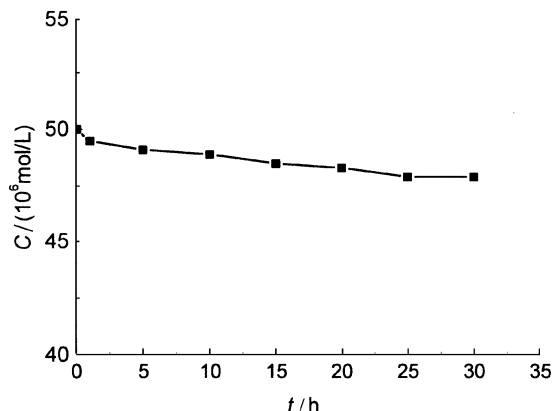


图 3 平衡时间对聚合物的影响

Fig 3 The effect of binding time on the re-binding ability of MIP

对 HCTZ-MIP 对底物的再键合特性, 进行

了 Scatchard 分析。Scatchard 方程为:  $Q/c$  (HCTZ) =  $(Q_{\max} - Q)/K_d$ , 式中  $Q$  为 MIP 对模板分子的结合量,  $Q_{\max}$  为表观最大结合量,  $c$  (HCTZ) 为盐酸氢氯噻嗪浓度,  $K_d$  为 MIP 结合位点的平衡离解常数。在 Scatchard 图 (图未给出) 的左右两部分,  $Q/c$  (HCTZ) 对  $Q$  分别呈现良好的线性关系 (两回归直线方程分别是  $y_1 = -17.5x + 98.09$ , 回归系数  $r_1 = 0.9186$ ;  $y_2 = -0.2526x + 54.76$ ,  $r_2 = 0.8001$ )。这说明 HCTZ 和功能单体的混合物聚合之后对氢氯噻嗪的结合位点不是等价的, 即在所研究的氢氯噻嗪浓度范围内 HCTZ-MIP 主要存在两类不同的结合位点。由回归直线的斜率和截距可计算出高亲和力的结合位点的离解常数  $K_{d1}$ , 最大表观结合量  $Q_{\max1}$ , 分别为  $57.0 \mu\text{mol/L}$  和  $5.59 \mu\text{mol/g}$ , MIP 低亲和力的结合位点的离解常数  $K_{d2}$  和最大表观结合量  $Q_{\max2}$  分别为  $3.96 \text{ mmol/L}$  和  $216.4 \mu\text{mol/g}$ 。由  $K_d$  值可求出其键合常数  $K_a^{[4]}$ :  $K_{a1} = 1.75 \times 10^4 (\text{mol/L})^{-1}$ ,  $K_{a2} = 2.53 \times 10^2 (\text{mol/L})^{-1}$ 。

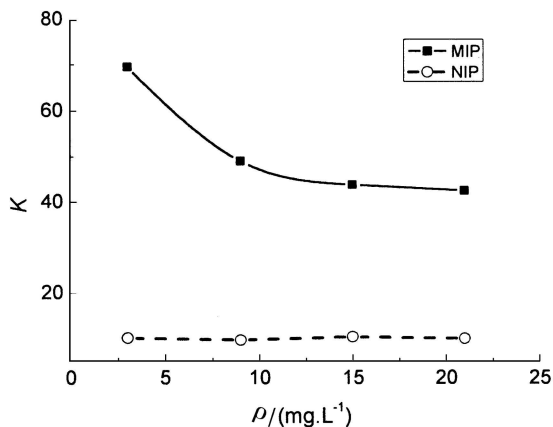


图 4 盐酸氢氯噻嗪浓度对聚合物再键合的影响

Fig 4 The influence of hydrochlorothiazide concentration on the re-binding abilities of polymers

## 2.3 HCTZ-MAA 复合物的作用

有机化合物的羧基与氨基或亚氨基可以形成氢键, 在聚合反应前氢氯噻嗪模板分子可以与甲基丙烯酸甲酯单体之间能通过氨基和亚氨基能与羟基之间以氢键相互作用, 而结合成复合物 (图 1)。已有实验证明了脂肪胺与羧酸之间可产生离子作用<sup>[5]</sup>。在甲醇溶剂中, 盐酸氢氯噻嗪与甲基丙烯酸的混合物的紫外吸收光谱见图 5。由图 5 可见, 随着功能单体的加入, 盐酸氢氯噻嗪在  $\lambda = 269.5 \text{ nm}$  处的吸收峰向长波方向移动了  $0.5 \sim 1.0 \text{ nm}$ , 这可能与 HCTZ 分子中苯环上取代基  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$  与

MAA 的羧基之间的部分离子化作用有关。

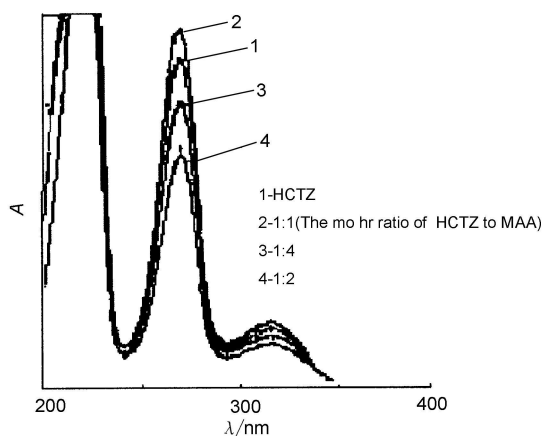


图 5 甲醇溶剂中 HCTZ-MAA 复合物的紫外吸收光谱

Fig 5 Difference absorption spectra of hydrochlorothiazide and hydrochlorothiazide-methyl methacrylate complex compounds in methanol at 25 °C

## 3 结论

通过对甲醇、乙腈、丙酮 3 种致孔剂, 以及模板分子、单体、交联剂配比等实验优选的基础上, 所合成的以甲醇为致孔剂和反应物中模板分子、单体、交联剂比为  $1:4:8$  的氢氯噻嗪分子印迹聚合物呈现出较好的再键合特性。Scatchard 分析表明, 在研究的 HCTZ 浓度范围内 HCTZ-MIP 存在两类结合位点, 计算得到的高亲和力的结合位点的离解常数  $K_{d1}$ 、最大表观结合量  $Q_{\max1}$  和键合常数为  $K_{a1}$  分别为  $57.0 \mu\text{mol/L}$ 、 $5.59 \mu\text{mol/g}$  和  $1.75 \times 10^4 (\text{mol/L})^{-1}$ ; 低亲和力的结合位点的  $K_{d2}$ 、 $Q_{\max2}$  和  $K_{a2}$  分别为  $3.96 \text{ mmol/L}$ 、 $216.4 \mu\text{mol/g}$  和  $2.53 \times 10^2 (\text{mol/L})^{-1}$ 。

## 参考文献:

- [1] Andersson L I. Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field [J]. J Chromatogr B, 2000, 745: 3-13.
- [2] Haupt K, Mosbach K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic Sensors [J]. Chem Rev, 2000, 100: 2495-2504.
- [3] Mosque N, Marce R M, Borrull F. Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction [J]. Trends in Anal Chem, 2001, 20: 477-485.
- [4] Turkewitsch P, Wandelt B, Darling G D, et al. Fluorescent functional recognition sites through molecular imprinting. A polymer-based fluorescent chemosensor for aqueous cAMP [J]. Anal Chem, 1998, 70: 2028-2030.
- [5] 郭洪声, 何锡文, 周杰, 等. 药物氟脲酸分子模板聚合物的分子识别特性 [J]. 分析化学, 2001, 29: 128-132.