

基于磁性分子印迹胶体磁珠分离和 GC-MS 检测血清中脂联素

胡富陶, 余红卫

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用分子印迹技术, 以 3,4-二氯苯乙酸(DCP)作为模板分子合成了 MWCNTs@DMMIPs 材料, 克服了脂联素(ADPN)质量浓度低, 不易形成氢键等缺点, 增强了材料的吸附能力. 实验对血类中常见的 ADPN 用 GC-MS 方法进行检测, 检测限为 $0.32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 回收率为 83.2%~101.2%. 材料适用于血类中常见的 ADPN 检测.

关键词: 分子印迹; 胶体磁珠; 血清脂联素; 特异性富集

中图分类号: O657

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2015) 02-0103-05

血清中脂联素(ADPN)对人体健康会产生较大的影响, 是检测心血管疾病的重要指标^[1-3]. 而对其快速检测方法最关键的是改进和寻求一种合适的样品前处理技术. 目前常见的样品前处理技术有液液萃取(LLE)、固相萃取(SPE)以及固相微萃取(SPME)^[4-5]. 但是 LLE 方法存在时间长、人力费、需要用到大量的有机试剂对环境造成污染的缺陷; 而 SPME 方法则成本较高. 与其他 2 种方法相比, SPE 方法用到的有机溶剂少、成本较低, 因此应用比较广泛. 分散固相萃取方法(DSPE)是在 SPE 方法上发展起来的一种新方法, 实验时将吸附剂直接分散于吸附溶液中, 增加吸附剂与被吸附物的接触面积, 提高吸附效率. 采用 DSPE 方法还可以减少分离时间, 避免试管堵塞^[6].

在采用 DSPE 方法中, 材料选择很重要. 目前有很多用于吸附 ADPN 的材料, 如环糊精、石墨烯以及分子印迹等^[7-9]. 环糊精和石墨烯对含苯环的物质具有较好的吸附作用, 可以吸附任何含有苯环的物质, 但是对 ADPN 的特异性吸附不强. 而分子印迹技术由于其高选择性、稳定性和易操作性被广泛地应用于痕量目标分子的分离富集. 分子印迹聚合物具有能对目标分子特异性识别的结合位点, 能够有效地防止基质干扰. 而磁性分子印迹聚合物由于其易分离, 避免了离心及萃取等过程, 减

少了实验误差, 目前已经应用到磁生物分离、酶固定和药物传输等领域^[10-15].

笔者将磁性分子印迹技术相结合, 合成了磁性分子印迹材料(MMIPs), 将其应用于 ADPN 的吸附. 但是由于 ADPN 在血清中溶解度低, 并且不易与功能单体形成氢键. 为避免上述情况发生, 笔者采用了 ELISA 中 ADPN 的反应竞争底物 3,4-二氯苯乙酸(DCP)作为模板分子, 合成了伪模板磁性分子印迹材料(DMMIPs), 并且为了提高材料的吸附容量, 实验将 MWCNTs 嵌入到磁性分子印迹聚合物中, 使其形成 MWCNTs 与 DMMIPs 的复合材料 (MWCNTs@DMMIPs). 最后将实验合成的 MWCNTs@DMMIPs 复合材料用于吸附 ADPN. 实验结果发现, 与传统的吸附材料相比, MWCNTs@DMMIPs 兼具有较大的吸附容量和较高的选择性, 并且在吸附后可以通过外加磁场的作用对其进行快速分离.

1 实验材料与过程

1.1 仪器与试剂

脂联素试剂盒购自美国 Accustandard 公司; 3,4-二氯苯乙酸以及聚二烯丙基二甲基氯化铵购自国药集团化学试剂公司; 羧基化多壁碳纳米管(MWCNTs) (直径<8 nm, 纯度>98%)购自南京先丰

纳米有限公司; 硫酸(95%~97%)、正己烷和二氯甲烷购自 Aladdin 公司; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 CH_3COONa 、氢氧化钠、乙二醇和 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 购自北京化工有限公司。其他化学试剂均为分析纯, 用去离子水配制。

仪器: GC-MS QP2010E, H7650 扫描电子显微镜和 SU-70 透射电子显微镜购自日本岛津公司; X 射线衍射仪(Bruker, D8 Focus); 6700 FT-IR (Nicolet, USA); 热重分析仪(TG/DTA 7300); 固相萃取装置 HSE-12D (南京科捷分析仪器有限公司); 真空泵 HPD-25; 水浴氮吹仪 CM-12 (北京成萌伟业科技有限公司)。

1.2 DMMIPs 的合成

1.2.1 MWCNTs-COO⁻/PDPA@Fe₃O₄@SiO₂ 的合成

用强酸对羧基化多壁碳纳米管纯化, 然后将纯化后的 MWCNTs 分散在氯化钠水溶液中, 加入 6 mL PDPA, 剧烈搅拌 30 min。然后将产物离心分离, 并用去离子水清洗数次以除去未反应的 PDPA。

用水热法合成磁性 Fe₃O₄ 纳米粒子。然后用溶胶-凝胶方法, 向 Fe₃O₄ 乙醇溶液中加入 TEOS 合成核壳型的 Fe₃O₄@SiO₂。再将合成的 Fe₃O₄@SiO₂ 加入上述 PDPA 修饰的 MWCNTs 溶液中, 剧烈搅拌 1 h。最后用磁铁分离所得产物, 用去离子水清洗后真空干燥 12 h。

1.2.2 MWCNTs@DMMIPs 的合成

用 KH570 在上述产物 MWCNTs-COO⁻/PDPA@Fe₃O₄@SiO₂ 的硅表面修饰双键。将 1 g MWCNTs-COO⁻/PDPA@Fe₃O₄@SiO₂ 溶于 300 mL 甲苯中, 然后在氮气保护下加入 5 mL 的 KH570, 在 120 °C 下搅拌 24 h。接着取 0.5 g KH570 修饰后的 MWCNTs-COO⁻/PDPA@Fe₃O₄@SiO₂, 1 000 μL 的 MAA 和 0.025 g DCP 加入到 300 mL 甲苯中, 氮气保护下加入 0.05 g AIBN 和 5 mL EGDMA。将上述混合溶液在 50 °C 下搅拌 6 h, 60 °C 下搅拌 24 h, 80 °C 下搅拌 8 h。用磁铁将最终产物分离后用去离子水和甲苯轮流清洗数次, 真空干燥。MWCNTs@DMNIPs 的合成除了不加模板分子 DCP 外其他与 MWCNTs@DMMIPs 相同。

1.3 吸附实验

(1)向锥形瓶中加入 50 mg MWCNTs@DMMIPs 或 MWCNTs@DMNIPs, 加入 200 mL 含 ADPN 溶液, 搅拌 90 min。

(2)用磁铁将 MWCNTs@DMMIPs 和 MWCNTs@DMNIPs 从溶液中分离。

(3)将吸附剂转移到有机膜中, 真空干燥 1 h。

(4)用 $V(\text{正己烷}):V(\text{二氯甲烷})=1:1$ 洗脱吸附剂, 将洗脱液用 15 mL 离心管收集。吸附剂可回收并重复使用。

(5)洗脱溶液用氮吹仪吹干, 然后用 1 mL 色谱纯的正己烷和 0.5 mL 的浓硫酸定容。取 1 μL 进样用于 GC-MS 检测。

1.4 血清样品处理

实验前, 将血清样品在 -4 °C 下冷冻保存 24 h。实验时称取 1 g 血清样品, 用 $V(\text{正己烷}):V(\text{二氯甲烷})=1:1$ 索氏提取预处理 8 h; 然后分别加入 100 μL 1 mg 的 6 种 ADPN 标准溶液, 索氏提取 12 h; 接着将所得产物加入圆底烧瓶中, 旋转蒸发仪蒸干。剩余实验步骤与 1.3 节相同。

2 结果与讨论

2.1 吸附材料的表征

图 1 为各种材料在 20°到 80°的 XRD 图。由图 1 可以知道, 合成 Fe₃O₄ 具有 6 个典型的特征峰, 晶

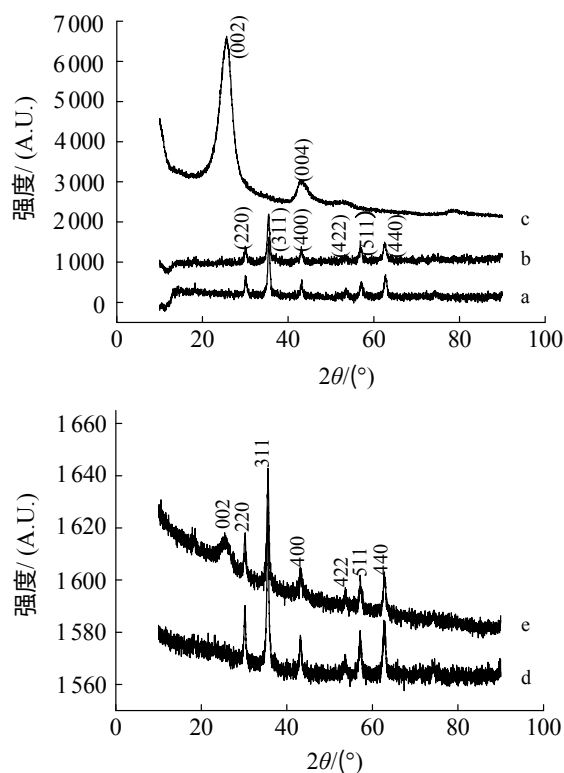


图 1 各种材料在 20°~80°的 XRD 图

型结构明显. 在 Fe_3O_4 表面修饰二氧化硅后, 其晶型结构无明显改变. 而比较 DMMIPs 和 $\text{MWCNTs}@$ DMMIPs 的 XRD 图可看到, $\text{MWCNTs}@$ DMMIPs 在 25° 时明显多了 1 个 MWCNTs 的特征峰, 证明 $\text{MWCNTs}@$ DMMIPs 已经成功合成.

图 2 是 Fe_3O_4 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 、 MWCNTs 、DMMIPs 和 $\text{MWCNTs}@$ DMMIPs 的红外表征图. Fe_3O_4 在 600 cm^{-1} 下有典型的特征峰. 图 2 中 DMMIPs 和 $\text{MWCNTs}@$ DMMIPs 在 600 cm^{-1} 下同样有特征峰, 证明聚合物中有 Fe_3O_4 的存在. Si-O-Si 的特征峰在 1065 cm^{-1} , 图 2 表明 SiO_2 已经成功地修饰了 Fe_3O_4 表面. 来自于 MAA 和 EDGMA 的 C-H、C=O、C-O 的特征峰分别在 2970 、 1725 和 1460 cm^{-1} . 将 $\text{MWCNTs}@$ DMMIPs 峰与 DMMIPs 在 1160 cm^{-1} 比较可知, $\text{MWCNTs}@$ DMMIPs 的峰较宽, 这是因为 MWCNTs 的存在使峰出现了拖尾现象, 也证明了 $\text{MWCNTs}@$ DMMIPs 中有 MWCNTs 的存在.

图 3 是 DMMIPs 和 $\text{MWCNTs}@$ DMMIPs 的热

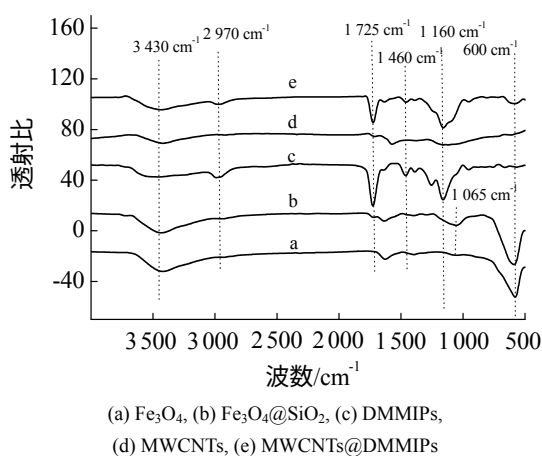


图 2 各种材料的红外图

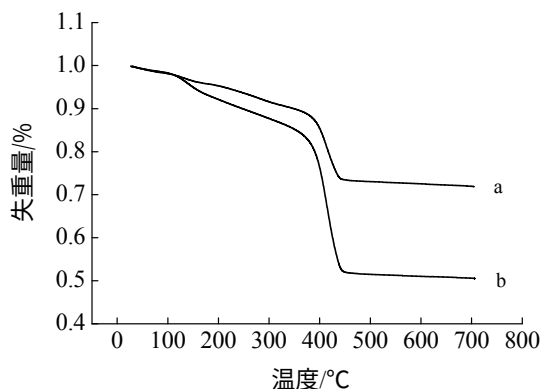


图 3 DMMIPs 和 $\text{MWCNTs}@$ DMMIPs 的热重曲线

重曲线. 从图 3 可知, 物质质量变化温度分为 3 个阶段: $0\sim 350$ 、 $350\sim 450$ 、大于 450°C , 最后 DMMIPs 中剩余的物质是 Fe_3O_4 , $\text{MWCNTs}@$ DMMIPs 中剩余的物质是 Fe_3O_4 和 MWCNTs .

2.2 条件优化

2.2.1 洗脱剂种类的优化

洗脱剂的选择对实验结果有重要影响, 因此我们对洗脱剂种类进行了探讨. 实验研究了正己烷、二氯甲烷、丙酮和 $V(\text{正己烷}):V(\text{二氯甲烷})=1:1$ 为洗脱剂对实验结果的影响, 选取 $V(\text{正己烷}):V(\text{二氯甲烷})=1:1$ 为最佳洗脱溶剂.

2.2.2 洗脱剂用量的优化

实验研究了 $V(\text{正己烷}):V(\text{二氯甲烷})=1:1$ 的用量为 $2\sim 16\text{ mL}$ 时对实验结果的影响(图 4). 从图 4 可知, 选取 14 mL 为最佳洗脱剂用量, 其回收率超过 85% .

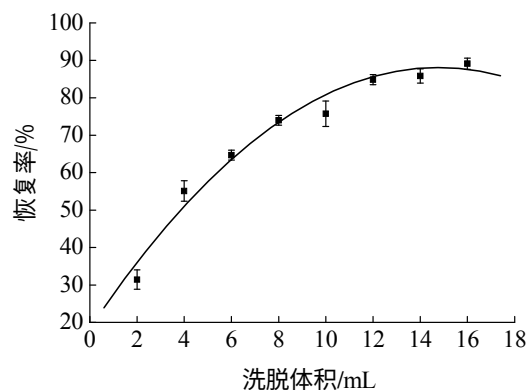


图 4 洗脱剂用量优化实验

2.2.3 等温吸附模型研究

实验探究了吸附温度为 $298\sim 338\text{ K}$ 时复合材料对吸附效果的影响, 并对数据进行了分析. 采用 $\ln(Q_e/C_e)$ 对 $1/T$ 作图得到方程为:

$$\ln(Q_e/C_e) = 0.63 + 2758/T, R = 0.9715,$$

通过方程

$$\Delta G = -RT \ln K_0,$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T,$$

计算得到吉布斯自由能 ΔG 、焓变 ΔH 以及熵变 ΔS 值分别为 -9.23 、 $-2.12\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 和 $21.23\text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$. 表明 $\text{MWCNTs}@$ MMIPs 对 ADPN 的吸附是自发的熵增大的放热过程, 其吸附模型符合 Freundlich 等温吸附.

2.2.4 材料的选择性及可重复利用性

为了探究本复合材料的选择吸附能力, 以有

机苯物质(如二甲苯、氯苯)和具有和 ADPN 类似结构的萘胺为干扰物质进行实验. 实验中 6 种 PCB 的质量浓度都是 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 结果表明上述材料为 6 种 PCB 质量浓度 80 倍时对检测结果仍然无明显影响, 水中常见的无机离子如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 NO_3^- 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 和 PO_4^{3-} 等对检测完全没有影响.

另外实验还对材料的重复实验次数进行了探究, 结果表明 MWCNTs@DMMIPs 至少可重复使用 8 次, 回收率均达 60%以上.

2.2.5 方法的线性范围、检出限和精密度

本实验对一系列质量浓度为 0.5、1、5、10、20、40、60、80、100、300、500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 ADPN 线性范围进行了研究, 其线性范围的 LODs、LOQ 分别为 $0.32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $1.02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. 其中 LOD 以 3 倍的信号/噪音定义, LOQ 以 10 倍的信号/噪音定义. 另外, 实验还对 MWCNTs@DMMIPs 复合材料的日间精密度和日内精密度的研究, 质量浓度为 10、50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ADPN 的日间 RSDs 分别为 3.24%和 2.34%, 日内精密度的分别为 2.45%和 1.64%. 说明该方法具有前处理快速、选择性高、检测限低的优点.

2.2.6 真实样品的测定

实验对来自不同病人血清中的 ADPN 进行了检测, 结果见表 1.

表 1 人血清样本中 3 种 ADPN 的检测结果

样本 序列	实际样本/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	加标/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/ %	RSD/ %	标准方法/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	8.5	10	83.2	2.80	8.1
2	9.6	10	94.1	3.21	9.1
3	7.3	10	101.2	2.32	7.5

表 1 中统计了用 MWCNTs@DMMIPs-SPE 前处理方法结合 GC-MS 检测到的样品中 ADPN 的回收率和质量浓度, 并将结果与国家标准方法检测的结果进行比较. 由表 1 数据可以知道, 样品的回收率为 83.2%~101.2%, 在病人体内均检测出了 ADPN, 检测结果与国家标准方法检测结果接近, 表明东海鱼类中已被 PCB28 轻度污染, 需采取措施防止污染扩大. 同时也表明 MWCNTs@DMMIPs 具有良好的吸附选择性, 可以有效地防止基质的干扰.

3 结语

本实验采用一种用伪模板分子合成的检测鱼类中 ADPN 的 MWCNTs@DMMIPs 复合胶体磁珠材料, 其对 ADPN 具有特异性识别能力. 在实验过程中我们采用分子印迹技术, 以 ADPN 的类似物 DCP 作为模板分子, 合成了 MWCNTs@DMMIPs 材料, 克服了 ADPN 质量浓度低, 不易形成氢键等缺点. 同时由于 MWCNTs 可以和 ADPN 有 π - π 堆积作用, 增强了材料的吸附能力. 实验对鱼类中 ADPN 用 GC-MS 方法进行了检测, 其检测限为 $0.32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 回收率为 83.2%~101.2%, 说明材料适用于鱼类中 ADPN 的检测.

参考文献:

- [1] 葛庆峰, 闫杰. 急性心肌梗死患者血清脂联素水平的动态变化[J]. 临床荟萃, 2005, 20(11):601-603.
- [2] 郭继龙, 袁清, 马仰国. 血清脂联素水平与脑梗死的关系研究[J]. 检验医学, 2009, 24(2):140-142.
- [3] 严俊, 徐东杰, 李其龙, 等. 胶体金法和免疫比浊法大便隐血检测在人群结直肠癌筛查中的应用[J]. 中国肿瘤, 2014(2):92-96.
- [4] 张洪瑞, 向代军, 白洁, 等. 胶乳增强免疫比浊法测定血浆和尿液中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的方法学评价[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(11):1027-1032.
- [5] Skaare J U, Bernhoft A, Derocher A, et al. Organochlorines in top predators at Svalbard-occurrence, levels and effects[J]. Toxicology Letters, 2000, 112/113:103-109.
- [6] Toft G, Edwards T M, Baatrup E, et al. Disturbed sexual characteristics in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from a lake contaminated with endocrine disruptors[J]. Environmental Health Perspectives, 2003, 111:695-701.
- [7] Magi E, Liscio C, Pistarino E, et al. Interdisciplinary study for the evaluation of biochemical alterations on mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to a tributyltin-polluted area[J]. Analytical Bioanalytical Chemistry, 2008, 391:671-678.
- [8] Olsovská J, Kresinová Z, Flieger M, et al. Separation of PCBs by liquid chromatography on reversed phase sub-2-micron particle columns[J]. Talanta, 2010, 80: 1849-1855.
- [9] Storelli M M, Giacomini-Stuffler R, Storelli A, et al. Polychlorinated biphenyls in seafood: Contamination

- levels and human dietary exposure[J]. Food Chemistry, 2003, 82:491-496.
- [10] Andersson P L, Berg A H, Bjerselius R, et al. Bio-accumulation of selected PCBs in zebrafish, three-spined stickleback and Arctic char after three different routes of exposure[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2001, 40:519-530.
- [11] Smith A G, Gangolli S D. Organochlorine chemicals in seafood: Occurrence and health concern[J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40:767-779.
- [12] 王连生. 有机污染化学(下)[M]. 北京: 科学出版社, 1991:233-244.
- [13] 陶庆会. 多氯联苯沉积物质量评价研究进展[J]. 环境污染治理技术和设备, 2004(1):28-31.
- [14] Sable-Demessie E, Enriquez J, Gupta G. Attenuation of methyl tert-butyl ether in water using sunlight and a photocatalyst[J]. Water Environment Research, 2002, 74(2): 122-130.
- [15] Jasna D, Siu C C, Sylvia H Y C. Analysis of pesticides and PCB congeners in serum by GC/MS with SPE sample cleanup[J]. Toxicology Letters, 2002, 134:253-258.

Enrichment of Serum Adiponectin and Separation Based on Magneticmolecularly Imprinted Colloidal Beads

HU Fu-tao, YU Hong-wei

(Marine School, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In this paper, we use the molecular imprinting technique to enrich the serum adiponectin for detection purposes. MWCNTs@DMMIPs material is synthesized using DCP as template molecule, which can overcome the shortcomings of lower ADPN concentration, and difficulty to form hydrogen bonds and others. Using the proposed method, the adsorption capacity of the material can be enhanced. Six kinds of common ADPN blood type in the course of the experiment are detected by GC-MS method. It is found that the detection is $0.32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the recovery rate between 83.2%-101.2%. Detection material is found to be suitable for enriching the common ADPN in blood.

Key words: molecular imprinting; magnetic immune-beads; serum adiponectin; specific enrichment

(责任编辑 史小丽)