

## سنتز نانو پلیمر قالب مولکولی سطحی جاذب کلسترول بر پایه ذرات آهن مغناطیسی - سیلیس و بررسی ویژگی‌های عملکردی

احسان مقدس‌کیا<sup>۱</sup>، محمد علیزاده<sup>۲\*</sup>، محمدرضا وردست<sup>۳</sup>، محمود رضازاد<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۴/۱۱/۲۴ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۲/۰۲

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** امروزه استفاده از پلیمرهای قالب مولکولی که به‌صورت آنتی‌بادی‌های مصنوعی عمل و ترکیب هدف را از محیط بیولوژیک جداسازی می‌کنند، روشی نوین به شمار می‌رود. کلسترول یکی از عوامل مؤثر بیماری‌های قلبی عروقی است و شناسایی نوع کلسترول و مقدار دقیق آن حائز اهمیت است. در این پژوهش، با استفاده از نانو ذرات آهن مغناطیسی با پوشش سیلیس، پلیمر قالب مولکولی تولید و خواص کارکردی آن در جداسازی و اندازه‌گیری کلسترول مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش کار:** نانوذرات آهن مغناطیسی - سیلیس با روش هم‌ته‌نشینی تولید و سپس پلیمر قالب مولکولی کلسترول به روش سل-ژل هسته-پوسته‌سنتز شد. پلیمر حاصل نهایتاً با مخلوط حلال شسته شده تا جایگاه اختصاصی جاذب کلسترول ایجاد شد. سپس پلیمر با محلول کلسترول انکوبه و توانایی جداسازی آن توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شد. ساختار و ظاهر نمونه‌ها با طیف‌سنجی فروسرخ FT-IR و میکروسکوپ الکترونی روبشی سنجیده شد. **یافته‌ها:** نسبت وزنی/حجمی بهینه پلیمر به محلول کلسترول باعث جداسازی ۹۴ درصد کلسترول از محلول استاندارد اولیه ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گردید. نتایج طیف‌سنجی FT-IR نشان‌دهنده پوشش مناسب سیلیسی برای هسته آهن مغناطیسی بود. در اثر پلیمریزاسیون سل-ژل باند جایگاهی فعال سیلیسی جاذب مولکول قالب، تشدید شد. شکل پلیمر به‌صورت حفرات کروی متخلخل و در ابعاد زیر ۵۰ نانومتر مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** استفاده از نانوذرات آهن مغناطیسی-سیلیس در این روش باعث افزایش عملکرد جداسازی کلسترول به دلیل سهولت جداسازی و ماهیت قالب‌زنی سطحی پلیمرها می‌شود. بررسی مورفولوژی پلیمر جاذب نشان‌دهنده کارایی بالای سطوح نانویی در جذب ترکیب است. **کلیدواژه‌ها:** کلسترول، پلیمر قالب مولکولی سطحی، نانوذرات آهن مغناطیسی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره سوم، ص ۲۳۹-۲۳۱، خرداد ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، پردیس نازلو، دانشگاه ارومیه، ارومیه، تلفن: ۰۹۱۴۳۴۷۴۳۴۱

Email: malizadeh@outlook.com

### مقدمه

قلبی-عروقی به شمار می‌رود (۲). بنابراین اندازه‌گیری و شناسایی این ترکیب در انواع مطالعات بالینی پزشکی، امنیت غذایی، شناسایی تقلبات و آلودگی‌های زیست‌محیطی ضروری به نظر می‌رسد. امروزه عمدتاً از روش‌های آنزیمی، بیوشیمیایی و یا کروماتوگرافی در شناسایی این ترکیب استفاده می‌شود که به علت پیچیدگی پیکره نمونه، قابلیت عملی محدود و گزینش‌پذیری مطلوبی ندارند (۲،۳). پلیمرهای قالب مولکولی<sup>۱</sup> سامانه‌های هوشمندی می‌باشند که با پلیمریزاسیون مونومرها در اطراف یک مولکول هدف شکل گرفته،

کلسترول یک ترکیب استروئیدی است که نه تنها جز مهم غشای سلولی بوده بلکه پیش‌ساز ترکیبات مهم بیولوژیک نظیر نمک‌های صفراوی، ویتامین D<sub>3</sub>، هورمون‌های جنسی و هورمون‌های غدد فوق کلیوی در بدن است (۱). از سوی دیگر تجمع این ترکیب استرولی در اندام‌ها (هیپرکلسترولمیا) و خصوصاً عروق موجب تشکیل پلاک شده که از جمله عوامل اصلی بیماری تصلب شرایین هست؛ لذا عمدتاً میزان کلسترول در پلاسما به‌عنوان یک نشانگر مهم بیماری‌های

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه

<sup>۲</sup> دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

<sup>۳</sup> استادیار گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

<sup>۴</sup> دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه

<sup>۱</sup> Molecularly Imprinted Polymers

هستند. بنابراین از سایر روش‌های بهبود یافته نظیر پلیمریزاسیون رسوبی، سوسپانسیونی، قالب‌زنی سطحی (سل-ژل) استفاده می‌شود. عمدتاً از فن‌های سوسپانسیونی و قالب‌زنی سطحی برای تولید نانوذرات قالب پلیمری (Nano-MIP) استفاده می‌شود (۷-۵).

یکی از روش‌های نوین سنتز پلیمرهای قالب مولکولی استفاده از روش سل-ژل بر پایه پیش‌سازهای غیرآلی دارای گروه‌های سیلانی (Si-O) است. هیبریداسیون پلیمرهای قالب مولکولی با نانوذرات آهن مغناطیسی با پوشش سیلیسی ( $Fe_3O_4@SiO_2$ ) از جمله این روش‌های نوین بوده که با القا خاصیت فرامغناطیسی به پلیمر سبب جداسازی توأمان پلیمر و مولکول هدف می‌گردد (۷). همچنین از سویی سبب افزایش ظرفیت جذب پلیمر به دلیل سطوح نانویی شده، گزینشگری اختصاصی بهبود یافته و نهایتاً راندمان جداسازی را در انواع حلال‌های آبی و آلی را در محدوده دمایی گسترده بهبود می‌بخشد. علت استفاده از پوشینه سیلیسی برای نانوذرات آهن مغناطیسی، دیسپرسیون بهتر در محیط‌های آبی و ممانعت از خروج ذرات آهن مغناطیسی از پیکره و جلوگیری از تجمع ذرات فرامغناطیسی است (۸).

در این پژوهش برای اولین بار نانو پلیمرهای قالب مولکولی هیبرید شده با نانوذرات آهن مغناطیسی ( $Fe_3O_4@SiO_2-TEOS$ ) برای جداسازی مولکول کلسترول تولید شده و ویژگی‌های عملکردی و ساختاری آن جهت استفاده آتی در سامانه‌های بیولوژیک مورد بررسی قرار می‌گیرد.

## مواد و روش کار

### مواد:

کلسترول، تترا اورتو سیلیکات (TEOS) ۹۸ درصد، آمونیاک ۲۵ درصد، آهن کلرید ۶ آبه، آهن سولفات ۷ آبه، هگزان از مرک (آلمان) و اتانول مطلق از شارلوا (اسپانیا) تهیه شد. برای تهیه محلول فاز متحرک HPLC، از ۲-پروپانول و استونیتریل با خلوص ۹۹ درصد  $LiChrosolv^{\circledR}$  از مرک (آلمان) تهیه شدند. تمامی توزین‌ها با حساسیت ۰/۰۰۰۱ گرم توسط ترازو (ACCULAB, Sartorius, USA) صورت پذیرفت. برای تهیه محلول‌های آبی از آب دیونیزه (DirectQV UV-3, Millipore, France) با سختی  $18 \mu S$  استفاده شد.

### سنتز نانوذره $Fe_3O_4$ :

۵ میلی‌لیتر از محلول ۱ مولار آهن کلرید ۶ آبه و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول نیم مولار آهن سولفات ۷ آبه باهم مخلوط شدند. در طول ۳۰ دقیقه مخلوط فوق به آرامی به داخل ۲۰ میلی‌لیتر محلول ۳/۵ مولار آمونیوم هیدروکسید در دمای  $60^{\circ}C$  در حمام اولتراسونیک (Parsonic 2600S, Iran) اضافه شد. سپس نانوذرات

سپس مولکول قالب توسط شستشو با حلال از درون ساختار خارج شده و نهایتاً یک ساختار سه‌بعدی اختصاصی برای مولکول هدف شکل می‌گیرد که با توجه به عمل اختصاصی و پایداری فیزیکی و شیمیایی بالا این پلیمرهای سنتزی در انواع فرآیندهای جداسازی، شناسایی، استخراج و طراحی حسگرها به کار می‌روند (۴). محدوده پایین شناسایی، هزینه کم و قابلیت استفاده مجدد از دیگر مزایای این سیستم‌های پلیمری هوشمند در شناسایی و جداسازی ترکیبات شیمیایی خاص در انواع محیط‌های حقیقی و محلول‌های زیستی است (۵).

در روش‌های اولیه سنتز پلیمرهای قالب مولکولی، مخلوط پلیمریزاسیون عمدتاً شامل مولکول قالب به همراه مونومرهای عاملی، عامل اتصال‌دهنده، آغازگر رادیکال آزاد و حلال پروژن می‌باشد. بستر واکنش یک حلال خنثی پروتون دهنده است. مولکول قالب در تمامی فرآیندهای قالب‌زنی مولکولی نقشی اساسی در جهت‌دهی آرایش گروه‌های عاملی که به مونومرها متصل می‌شوند، دارد. اکثر پلیمرهای قالب مولکولی با استفاده از برهمکنش‌های کوالان و غیر کوالان بین مولکول الگو و مونومر عاملی صورت می‌گیرد (۴). روش کوالانی مزایایی نظیر کمینه بودن پیوندهای غیراختصاصی بین آنالیت و پیکره پلیمری و توزیع یکنواخت سایت‌های پیوندی دارد؛ امروزه انواع غیر کوالانی با توجه به ویژگی‌های متنوع این نوع سیستم (نیازمند هیچ مرحله سنتزی برای پیوند کوالانسی الگو به مونومر نیست؛ جداسازی مولکول الگو بدون نیاز به مراحل شیمیایی اضافی انجام می‌شود، نوع و شمار مولکول‌های قالب مناسب بیشتر از آن‌هایی است که به روش کوالانی تهیه می‌شود و سازگاری بیشتر با روش‌های خودکار دارد) بیشتر مورد توجه است. پلیمریزاسیون حرارتی منجر به ساخت پلیمری نامحلول با درجه بالایی از شبکه شدن حاوی مولکول الگو می‌شود. رهایش مولکول الگو از پلیمر غالباً توسط حلالی مثل متانول صورت می‌گیرد. به‌طور ایدئال، آنچه در ماتریس پلیمری باقی می‌ماند حفره‌های سه‌بعدی مکمل مولکول الگو، از نظر شکل و اندازه و جهت‌گیری گروه‌های عاملی است. پلیمرها بایستی نسبتاً صلب بوده تا ساختار حفره پس از جدا کردن الگو حفظ گردد؛ از طرف دیگر بایستی دارای انعطاف بالا بوده تا ایجاد تعادل بین رهایش و اتصال مولکول الگو در حفره صورت گیرد. رایج‌ترین روش سنتز پلیمرهای قالب مولکولی، پلیمریزاسیون توده‌ای است. در این روش یک پلیمر یکپارچه تولید شده و سپس به ذرات ریزتری آسیاب می‌شود و نهایتاً مولکول قالب از آن جدا می‌گردد. اندازه ناهمگون اجزای درشت (۵۰-۲۰ میکرونی) پلیمر، تخریب عمده جایگاه‌های فعال و در نتیجه کاهش ظرفیت بارگذاری، دشواری روند آسیاب و الک کردن و نهایتاً اتلاف قابل توجه از پلیمر (۵۰ درصد) از جمله معایب اصلی این روش

نیترژن کاملاً حل شد. سپس ۴۰ μl اسید کلریدریک غلیظ در داخل ۱۷۰۰ میکرو لیتر آب دیونیزه رقیق شده و به مخلوط افزوده شد (اسید رقیق سبب باز شدن زنجیره سیلانی شده و امکان قرارگیری مولکول قالب را فراهم می‌سازد). در ادامه ۱۷۰ میلی‌گرم  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$  به مخلوط اضافه شده و به مدت ۶ دقیقه در حمام سونیکاتور قرار گرفته و در ادامه به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق با سرعت ۶۰۰ دور بر دقیقه به خوبی هم زده شد. بعد از اتمام زمان فوق، ۱۷۰ میلی‌گرم کلاسترول (مولکول قالب) در مخلوط حلال اتانول مطلق: کلروفرم (۱:۳) حل شده و به مخلوط  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$  افزوده شد. نهایتاً با افزودن ۳۰۰ میکرو لیتر آمونیاک بلورهای سفید پلیمر شروع به تشکیل کردند. بعد از ۳۰ دقیقه استراحت مخلوط هموزن، کاملاً جامد شده و به یخچال منتقل گردید. بعد از ۱۸ ساعت نگهداری در یخچال، پلیمر هموزن به دست آمد. مراحل تولید پلیمر قالب مولکولی سطحی کلاسترول توسط نانوذرات آهن مغناطیسی-سیلیس به صورت شماتیک در شکل ۱ آورده شده است.

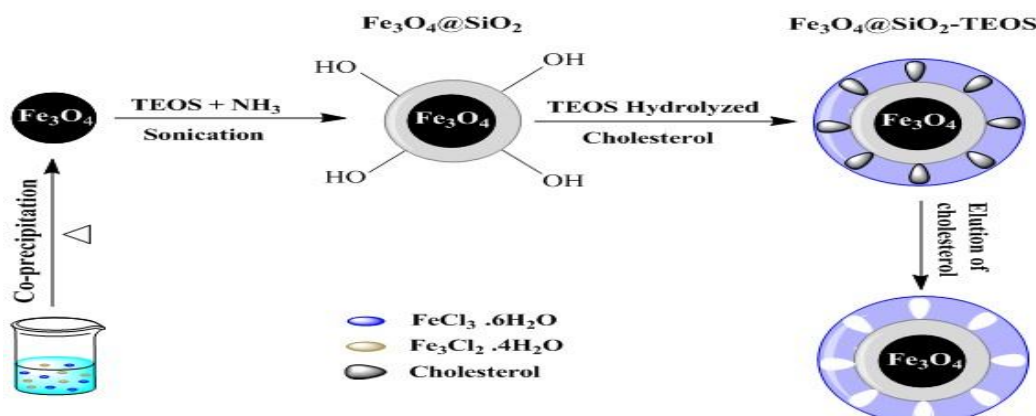
آهن مغناطیسی تشکیل شده به وسیله یک آهنربا از محلول جمع شده و به صورت متوالی با محلول آب-اسید رقیق شسته شده و نهایتاً در دمای  $55^\circ\text{C}$  در آون (Memmert EFB 400, Germany) خشک شدند (۹).

### پوشینه‌دار کردن سیلیسی نانوذرات آهن مغناطیسی ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$ ):

۳۰۰ میلی‌گرم از  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  در داخل ۲۰۰ میلی‌لیتر مخلوط اتانول مطلق: آب دیونیزه (۲:۸) تحت سونیکاسیون حل شد. سپس ۰/۷ میلی‌لیتر TEOS و ۵ میلی‌لیتر آمونیاک به محلول فوق تحت همزنی با دور بالا (Heidolph MR-Hei, Germany) اضافه گردید و واکنش تا ۱۲ ساعت در دمای  $40^\circ\text{C}$  ادامه یافت. محصول نهایی توسط میدان مغناطیسی آهنربا جدا شده و با آب دیونیزه ۵ مرتبه شسته و نهایتاً در آون دمای  $55^\circ\text{C}$  خشک شدند (۱۰).

### سنتز نانو پلیمر قالب مولکولی جاذب کلاسترول بر پایه $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$ :

ابتدا ۱۰ ml تتراورتو سیلیکات در داخل اتانول مطلق تحت گاز



شکل (۱): شکل شماتیک مراحل سنتز پلیمر قالب مولکولی سطحی کلاسترول بر پایه  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$

آزمون کیفی لیبرمن-بوخارد<sup>۱</sup> مورد آزمایش قرار گرفت. پلیمرهای مرطوب بر روی پلیت شیشه‌ای قرار داده شده و در آون دمای  $55^\circ\text{C}$  به مدت ۱۲ ساعت خشک شدند. سپس پلیمرها در داخل هاون چینی خرد شده و پس از مش‌بندی، نمونه با مش ۲۰۰ برای انجام آزمایش‌های متعدد مورد استفاده قرار گرفت (۱۱).

### آزمون‌های جذب کلاسترول توسط پلیمر:

محلول استاندارد اولیه ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کلاسترول در هگزان به صورت روزانه تهیه شد. ۲۰ میلی‌گرم پلیمر با ۵ میلی‌لیتر از محلول استاندارد اولیه در لوله فالکون به مدت یک ساعت بر روی

### آماده‌سازی پلیمر (شویش، خشک کردن و غربال):

برای خروج کلاسترول از ساختار پلیمر، شستشو با مخلوط حلال اتانول: آب دیونیزه: کلروفرم (۱:۲:۷) پنج مرتبه صورت پذیرفت. بعد از شستشو و خروج ترکیب قالب است که ساختار مکمل و جاذب کلاسترول بر روی لایه سیلیسی نانوذرات آهن مغناطیسی - سیلیس ایجاد می‌گردد. در هر شستشو برای جداسازی مایع رویی سانتریفوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه (MiniSpin®, Eppendorf Germany) استفاده شد. نهایتاً بعد از آخرین مرحله برای کفایت شستشو، بقایای کلاسترول در پلیمر با

<sup>۱</sup>Liebermann-Burchard test

$4001-4000\text{ cm}^{-1}$  و با قدرت تفکیک  $0.5\text{ cm}^{-1}$  در دستگاه FT-IR (Spectrum Two, Perkin Elmer, USA) مورد آنالیز قرار گرفتند.

### ویژگی‌های مورفولوژیک پلیمر Scanning Electron Microscopy (SEM):

مورفولوژی نمونه‌های خشک و الک شده پلیمر توسط تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM-MIRA3 (Tescan, Czech Republic) با بزرگنمایی حداکثر  $10000\times$  برابر و اعمال میدان مغناطیسی  $15\text{KV}$  توسط دتکتور In Beam سنجیده شد. نمونه‌ها قبل از اندازه‌گیری با لایه نازکی از طلا، پوشش‌دهی شدند.

### یافته‌ها

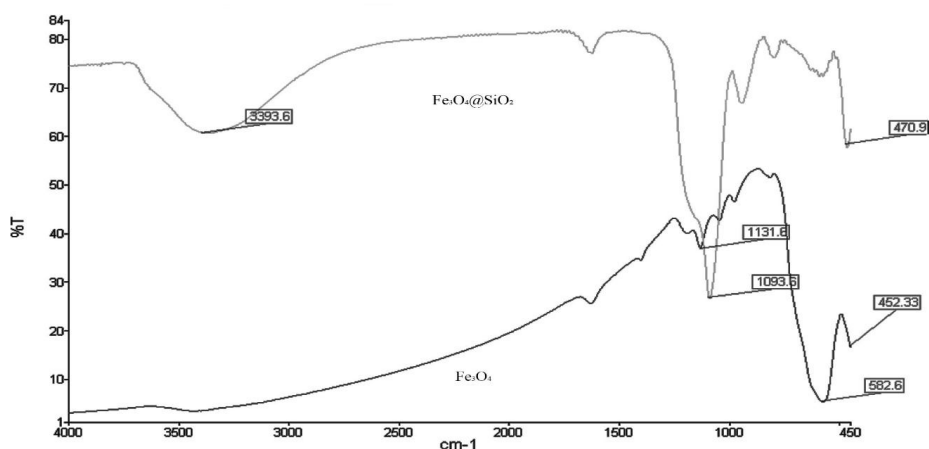
#### ویژگی‌های طیف فروسرخ پلیمر:

موقعیت و شدت باندها در طیف‌های FT-IR پلیمرهای قالب مولکولی اطلاعات سودمندی در مورد گروه‌های عاملی پلیمر و نحوه پوشش مونومرها می‌دهد. بررسی تطبیقی طیف‌های فروسرخ  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  و  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$  در شکل ۲ نشان داده شده است. وجود باند پیوندی در  $573\text{ cm}^{-1}$  نشانگر وجود پیوندهای ارتعاشی و خمشی F-O و در  $457\text{ cm}^{-1}$  نشانگر پیوندهای کششی F-O در طیف  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  می‌باشند. در طیف  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$  باند پهن در  $1092\text{ cm}^{-1}$  مبین پیوندهای قوی کششی غیرمقارن Si-O-Si، باند در  $947\text{ cm}^{-1}$  وجود پیوندهای کششی مقارن Si-O و در  $578\text{ cm}^{-1}$  حاکی از پیوندهای Si-O-Fe است (۱۲، ۱۳).

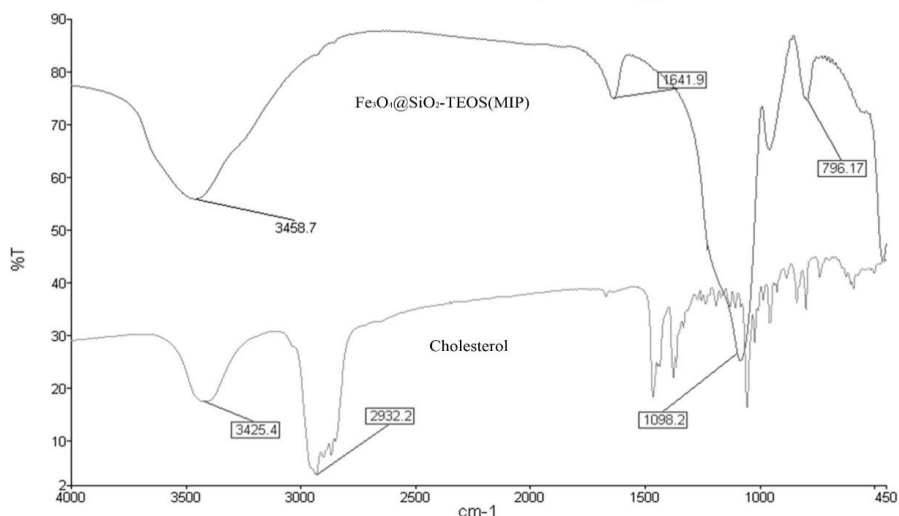
شیکر (Behdad, Iran) با سرعت  $250$  دور بر دقیقه انکوبه شد. بعد از یک ساعت نمونه‌ها به وسیله سانتریفوژ با سرعت  $10000$  دور بر دقیقه به مدت  $10$  دقیقه جداسازی شد. مایع رویی از فیلتر سر سرنگی PTFE با قطر  $0.22$  میکرون عبور داده شد و سپس آماده تزریق به دستگاه HPLC شد. برای اندازه‌گیری کلسترول از دستگاه HPLC (Cecil adept CE 4200, England) موجود در آزمایشگاه سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه استفاده گردید. کلسترول در طول موج  $202$  نانومتر و در فاز متحرک استونیتریل، پروپانول  $30:70$  و با سرعت  $1\text{ ml/min}$  در بازه زمانی  $15$  دقیقه با ستون C18 توسط دستگاه HPLC مجهز به دتکتور UV اندازه‌گیری شد. زمان ماندگاری کلسترول در شرایط فوق برابر با  $13$  دقیقه بود. مطالعات بهینه‌سازی جهت جذب کلسترول در زمان‌های  $120-0$  دقیقه، مقدار پلیمر  $50-10$  میلی‌گرم پلیمر و حجم  $20-2$  میلی‌لیتر از محلول  $100$  میلی‌گرم بر لیتر صورت گرفت. نتایج نشان داد که بیشینه جذب در  $60$  دقیقه،  $5$  میلی‌لیتر حجم محلول استاندارد اولیه و  $20$  میلی‌گرم پلیمر حاصل می‌شود؛ لذا آزمون‌های جذب در شرایط بهینه فوق صورت پذیرفت.

#### طیف‌سنجی فروسرخ (FT-IR):

برای طیف‌سنجی IR، قرص‌های نازک با ضخامت کم‌تر از یک میلی‌متر از اختلاط و آسیاب انواع نمونه‌های پلیمر و یا نانوذرات پوشش‌دار شده با پتاسیم برمید خشک به نسبت  $20:1$  و اعمال فشار حدود  $60\text{ KPa}$  به مدت  $10$  دقیقه در دستگاه تهیه قرص، به دست آمده و طیف عبور انواع نمونه‌ها در محدوده عدد موجی  $\text{cm}^{-1}$



شکل (۲): طیف‌های FT-IR  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  و  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$

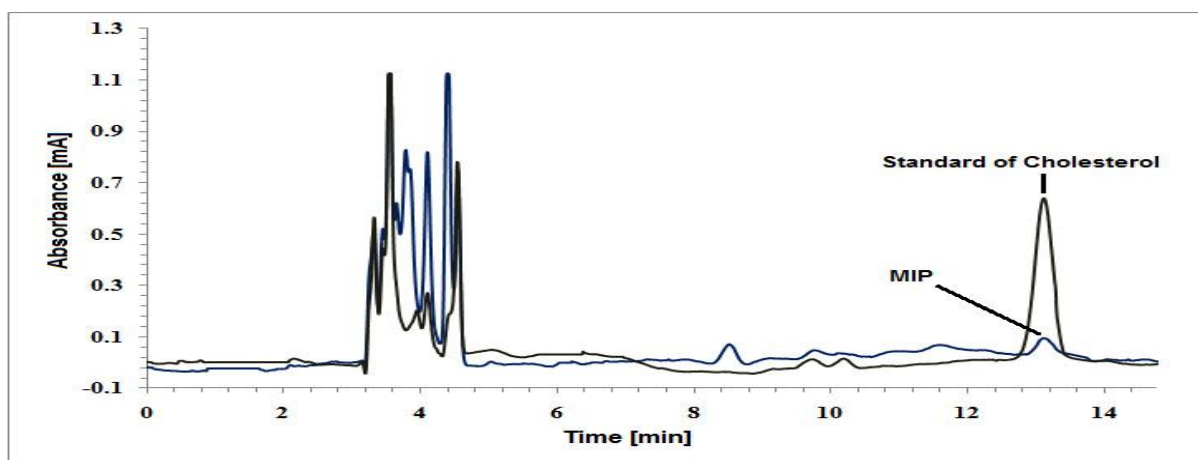


شکل (۳): طیف FT-IR نمونه پلیمر  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-TEOS}$  و کلسترول

#### آزمون‌های جذب کلسترول پلیمر:

با توجه به کروماتوگرام شکل ۴، میزان سطح زیر پیک محلول استاندارد اولیه برابر با  $10500$  میلی‌آمپر ثانیه بوده و این میزان برای نمونه پلیمر MIP انکوبه شده نیز برابر با  $650$  میلی‌آمپر ثانیه بوده که مبین میزان تقریباً  $94\%$  جذب کلسترول از محلول استاندارد اولیه می‌باشد که قابل توجه است. این میزان بیشینه جذب می‌تواند به کارایی بالای پوشش سیلیسی نانوذرات آهن مغناطیسی و مونومر سیلیسی سطحی مربوط باشد. جلوگیری از تجمع ذرات آهن مغناطیسی توسط پوشش سیلیسی، پراکنش بهتر نانوذرات آهن و جلوگیری از رهاش هسته آهن مغناطیسی در انواع محیط‌های اسیدی و یافتن شرایط بهینه جذب پلیمر قالب مولکولی جمله عوامل این کارایی جداسازی بیشینه است. مزیت اصلی استفاده از نانوذرات آهن مغناطیسی کارایی بالا و سهولت جداسازی آن است.

همچنین طیف‌های نمونه پلیمر و کلسترول در شکل ۳ نشان داده شده است. باندهای  $3402\text{cm}^{-1}$  و  $2936\text{cm}^{-1}$  در طیف کلسترول به ترتیب مربوط به گروه هیدروکسیل حلقه استرولی و استخلاف زنجیره هیدروکربنی این ترکیب می‌باشد. وجود باند مهم در  $3470$  و  $1634\text{cm}^{-1}$  نشان‌دهنده پیوندهای O-H موجود در پوشش سیلیسی پلیمر بوده و شدت باند  $1092\text{cm}^{-1}$  Si-O-Si در نمونه پلیمر نیز مؤید تشدید پیوندهای جاذب سیلیسی در اثر افزودن  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  می‌باشد. افزایش مقدار TEOS به کاربرده شده در سنتز پلیمر موجب گسترده شدن باندهای Si-O-Si و پیوندهای O-H موجود در رویه سیلیسی می‌گردد. همچنین بسته به نوع سنتز نانوذرات و احتمال تجمع (Aggregation) آن‌ها، شدت باندهای گروه‌های عاملی ممکن است متفاوت باشد (۱۴).

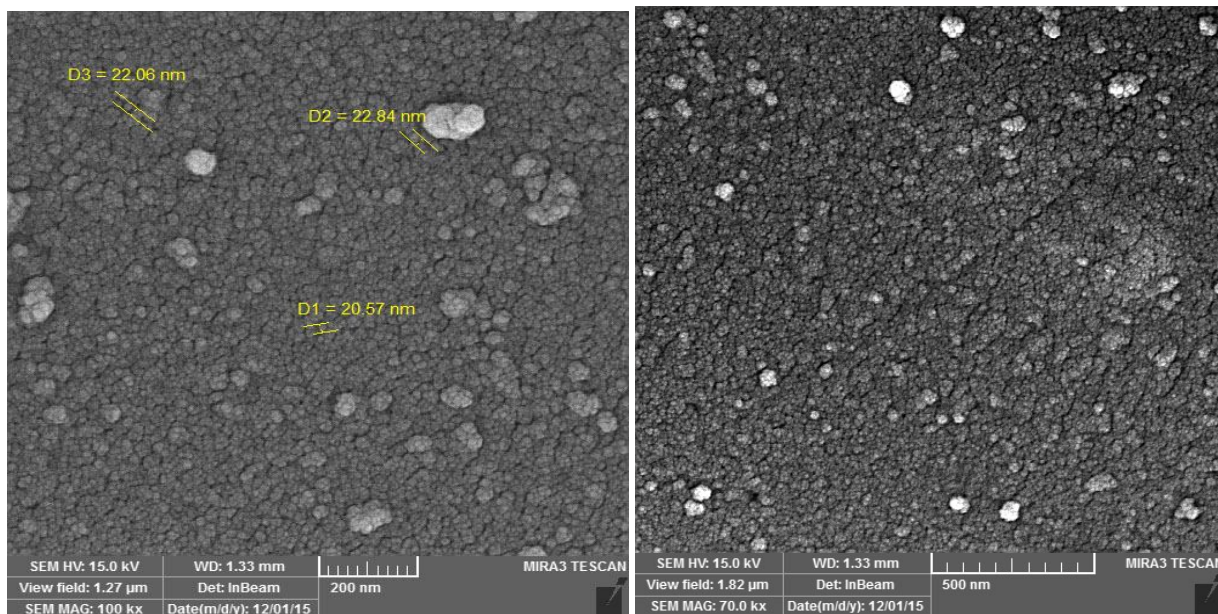


شکل (۴): کروماتوگرام HPLC محلول کلسترول و پلیمر جاذب

**بررسی مورفولوژی سطحی پلیمر:**

تصاویر میکروسکوپ الکترونی (شکل ۵) با بزرگنمایی‌های متفاوت پلیمرهای قالب مولکولی مؤید ۳ نکته اصلی است: درجه تجمع بالای پلیمرها، سطوح کروی زبر و متخلخل و مساحت سطح

به حجم بالای حفرات که احتمالاً این ویژگی‌ها باعث افزایش میزان جذب حداکثری کلسترول می‌شود. مطابق عکس SEM سایز ذرات و حفرات پلیمری بین ۲۰-۳۰ نانومتر بوده و توزیع یکنواختی از ذرات  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$  در داخل بافت پلیمر مشاهده می‌شود.



شکل (۵): تصاویر SEM نمونه‌های پلیمر با بزرگنمایی‌های متفاوت

**بحث و نتیجه‌گیری**

پژوهش زنجین<sup>۱</sup> که از نانوذرات آهن به‌عنوان هسته و از مونومرهای دی متیل آکریلامید با روش تعویض لیگاند به‌عنوان پوسته پلیمر قالب مولکولی استفاده نمود، اولین کاربرد جداسازی ترکیب فوق به‌وسيله کاربرد  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$  می‌باشد. وی در جداسازی کلسترول از سرم خون، شیر و زرده تخم‌مرغ و به ترتیب به میزان جداسازی ۹۱/۶ درصد، ۹۳/۶ درصد، ۹۲/۴ درصد دست‌یافت که در تأیید داده این پژوهش و مؤید کارایی  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  در پلیمرهای قالب مولکولی سطحی می‌باشد (۱۴). مطالعات (2014) Clausen در مورد بهینه‌سازی نشان داد که کاربرد تترائورتو سیلیکات در پلیمرهای قالب مولکولی متاکریلیکی در نسبت ۵:۱ بیشینه جذب را حاصل کرده است. وی با بررسی‌های جداگانه ایزوترم‌های جذب لانگمیر، فروندلیخ علت این امر را به پوشش مناسب سیلیسی حفرات انتخابی حاصل از متا آکرلیک دانست (۱۵). مطالعات Gupta(2011) نیز نشان داد که استفاده از ترکیباتی چون APTES (۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان) و MPS (۳-پروپیل متیل تری متوکسی سیلان) به علت داشتن گروه‌های آلی

اتصال‌دهنده (آمینی) باعث برهمکنش بهتر هسته  $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$  و پوسته متاکریلیکی-سیلیسی می‌شود (۱۶). مطالعات Oliveira (2015) در کاربرد استفاده از پلیمرهای قالب مولکولی سیلیسی در ستون‌های SPE (استخراج فاز جامد) جهت جداسازی کلسترول از شیر بر روی پارامترهای استخراج با فاز جامد توسط مدل‌سازی با شبکه عصبی مصنوعی صورت گرفت که در بهترین حالت میزان جذب در یک ساعت ابتدایی و به میزان ۶۰ درصد بوده است که نتایج پژوهش حاضر به علت کاربرد نانوذرات پوشینه‌دار شده سیلیسی از لحاظ جداسازی مولکول قالب به‌مراتب بهتر است (۱۱). هسو<sup>۲</sup> و همکاران، تولید پلیمرهای قالب مولکولی سیلیسی جاذب کلسترول و هورمون‌های جنسی نظیر تستوسترون، پروژسترون و پرگنولون را به روش سل-زل برای اولین بار انجام دادند. نتایج وی نشان‌دهنده جذب بهتر پلیمرهای سنتز شده در محیط‌های اسیدی رقیق به علت قطر کم‌تر مولکولی حفرات جاذب بود. برای مثال وی طول و ارتفاع ترکیب کلسترول را به ترتیب ۱/۹۱ و ۰/۷ نانومتر برآورد کرده و از این‌رو کاربرد پلیمرهایی که حجم حفرات بسیار ریز دارند را در افزایش جذب مؤثر کلسترول مهم

<sup>۱</sup> Zengin

<sup>۲</sup> Hsu

مقاومت فیزیکی آن در محیط‌های جداسازی می‌تواند مورد توجه باشد. همچنین سنتز پلیمرهایی که تطابق‌پذیری خوبی با سیستم‌های آبی داشته و قادر به جداسازی کلسترول بدون کم‌ترین پیش تیمار از محیط نمونه‌های بیولوژیک باشند را می‌توان جزو محدودیت این‌های روش مطالعه ارزیابی نمود.

مطالعه ساختار پلیمرهای تولیدی بیانگر زبری سطوح در پلیمرهای قالب مولکولی است که متعاقباً باعث افزایش نسبت سطح به حجم شده و مقاومت نفوذی به حلال کاهش یافته و انتقال جرم بین حفرات در فرآیند جذب و واجذب بهبود قابل ملاحظه‌ای می‌یابد که ابعاد کم‌تر از ۵۰ نانومتری پلیمرهای تولیدی باعث این مزیت می‌شود.

از این‌رو استفاده از نانو پلیمرهای قالب مولکولی سنتز شده سطحی جاذب کلسترول بر پایه ذرات آهن مغناطیسی-سیلیسی باعث جذب بیشتر کلسترول از محیط شده که در مقایسه با سایر مطالعات فوق این امر محتملاً می‌تواند به ویژگی‌های سنتز سطحی سطوح نانویی پلیمر و استفاده از پوشینه سیلیسی ذرات آهن مغناطیسی باشد.

ارزیابی کرد (۱۷). همچنین مشخص شد بهترین نسبت‌های جداسازی در محیط‌های غیرقطبی به دست می‌آید زیرا در محیط‌های قطبی مثل متانول و آب اتصالات مونومرها و ترکیب کلسترول بسیار ضعیف است و از سوی دیگر در بین ترکیبات استروئیدی ترکیبی که آب‌گریزی کم‌تری و ساختار نسبتاً خطی داشته باشد (برای مثال کلسترول به نسبت تستوسترون و کوله کلسیفرول)، در محیط‌های غیرقطبی جداسازی بالاتری را نشان می‌دهد. نهایتاً می‌توان گفت روش سل-ژل بر پایه سیلیکا در جداسازی انواع پلیمرهای قالب مولکولی با افزایش مقدار TEOS میزان جایگاه‌های غیراختصاصی را کم می‌کند (۱۷،۱۸).

بررسی آزمون‌های جذب نشان‌دهنده قابلیت جذب کلسترول از محیط می‌باشد که علت این امر نسبت سطح به حجم بالای پلیمر به علت پوشش سیلیسی نانوذرات آهن مغناطیسی و تمایل جذبی سطحی بالای مونومرهای سیلانی می‌باشد؛ از این‌رو استفاده از این پلیمر می‌تواند در ساخت و تولید زیست حسگرهای کلسترول بر پایه انواع اندازه‌گیری‌های شیمیایی (کروماتوگرافی، الکتروشیمیایی) جهت استفاده در محیط‌های زیستی و غذایی استفاده شود (۱۹،۲۰). بهینه‌سازی تولید این پلیمر با کاربرد سایر مونومرها باهدف افزایش

## References:

1. Li X, Tong Y, Jia L, Guan H. Fabrication of molecularly cholesterol-imprinted polymer particles based on chitin and their adsorption ability. *Monatsh Chem* 2015;146(3): 423-30.
2. Li J, Zhang Z, Xu S, Chen L, Zhou N, Xiong H, Peng H. Label-free colorimetric detection of trace cholesterol based on molecularly imprinted photonic hydrogels. *J Mater Chem* 2011;21(48): 19267-74.
3. Puoci F, Curcio M, Cirillo G, Iemma F, Spizzirri UG, Picci N. Molecularly imprinted solid-phase extraction for cholesterol determination in cheese products. *Food Chem* 2008;106(2): 836-42.
4. Lee S-W, Kunitake T. *Handbook of molecular imprinting: advanced sensor applications*. CRC Press; 2012.
5. Cheong WJ, Yang SH, Ali F. Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews. *J Sep Sci* 2013;36(3): 609-28.
6. Martín-Esteban A. Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. *TrAC Trends Anal Chem* 2013;45: 169-81.
7. Wackerlig J, Lieberzeit PA. Molecularly imprinted polymer nanoparticles in chemical sensing—Synthesis, characterisation and application. *Sens Actuators B* 2015: 144-57.
8. Li XS, Zhu GT, Luo YB, Yuan BF, Feng YQ. Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation. *TrAC Trends Anal Chem* 2013;45: 233-47.
9. Zeng H, Wang Y, Nie C, Kong J, Liu X. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers for separating rutin from Chinese medicinal plants. *Analyst* 2012;137(10): 2503-12.
10. Zou T, Zhou Z, Dai J, Gao L, Wei X, Li C, Guan W, Yan Y. Preparation of silica-based surface-imprinted core-shell nanoadsorbents for the selective recognition of sulfamethazine via reverse atom transfer radical precipitation polymerization. *J Polym Res* 2014;21(8): 1-2.

11. Oliveira GR, Santos AV, Lima AS, Soares CM, Leite MS. Neural modelling in adsorption column of cholesterol-removal efficiency from milk. *LWT Food Sci Technol* 2015;64(2): 632-8.
12. Ahangaran F, Hassanzadeh A, Nouri S. Surface modification of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ SiO<sub>2</sub> microsphere by silane coupling agent. *Int. Nano Lett* 2013;3(1): 1-5.
13. Uzuriaga-Sánchez RJ, Khan S, Wong A, Picasso G, Pividori MI, Sotomayor MD. Magnetically separable polymer (Mag-MIP) for selective analysis of biotin in food samples. *Food Chem* 2016;190: 460-7.
14. Zengin A, Yildirim E, Tamer U, Caykara T. Molecularly imprinted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for rapid enrichment and separation of cholesterol. *Analyst* 2013;138(23): 7238-45.
15. Clausen DN, Visentainer JV, Tarley CR. Development of molecularly imprinted poly (methacrylic acid)/silica for clean-up and selective extraction of cholesterol in milk prior to analysis by HPLC-UV. *Analyst* 2014;139(19): 5021-7.
16. Gupta R, Kumar A. Synthesis and characterization of sol-gel-derived molecular imprinted polymeric materials for cholesterol recognition. *J Sol-Gel Sci Technol* 2011;58(1): 182-94.
17. Hsu CW, Yang MC. Enhancement of the imprinting effect in cholesterol-imprinted microporous silica. *J Non-Cryst Solids* 2008;354(34): 4037-42.
18. Kugimiya A, Kuwada Y, Takeuchi T. Preparation of sterol-imprinted polymers with the use of 2-(methacryloyloxy) ethyl phosphate. *J Chromatogr A* 2001;938(1): 131-5.
19. Zhang Z, Tan W, Hu Y, Li G. Simultaneous determination of trace sterols in complicated biological samples by gas chromatography-mass spectrometry coupled with extraction using  $\beta$ -sitosterol magnetic molecularly imprinted polymer beads. *J Chromatogr A* 2011;1218(28): 4275-83.
20. Saxena U, Das AB. Nanomaterials towards fabrication of cholesterol biosensors: Key roles and design approaches. *Biosens Bioelectron* 2016;75: 196-205.



## SYNTHESIS OF CHOLESTEROL GRAFTED MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER BY MEANS OF THE SILANATION OF MAGNETIC PARTICLES AND EVALUATION OF FUNCTIONAL CHARACTERISTICS

Ehsan Moghaddas Kia<sup>1</sup>, Mohammad Alizadeh<sup>1\*</sup>, Mohammad Reza Vardast<sup>2</sup>, Mahmoud Rezazad<sup>3</sup>

Received: 13 Feb, 2016; Accepted: 22 Apr, 2016

### Abstract

**Background & Aims:** Nowadays usage of molecularly imprinted polymers which act as artificial antibodies and separate target molecules from biological environments is a novel approach. Cholesterol is one of the major risk factors of cardiovascular diseases and its precise determination is crucial. In this research, a molecularly imprinted polymer by means of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles coated with silica layer was fabricated and its functional characteristics were investigated.

**Materials & Methods:** Co-precipitation method was used for manufacturing of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles coated by silica. Then cholesterol imprinted polymer were synthesized by grafting core-shell procedure. Finally obtained polymer was eluted by mixture of solvents to create specific adsorbent active sites for cholesterol. The polymer was incubated with cholesterol stock solution and binding activity was determined through high performance liquid chromatography. Structure and morphology of samples were evaluated by FT-IR spectroscopy and scanning electron microscopy.

**Results:** Optimized ratio of polymer weight to cholesterol stock solution volume showed 94% separation from 100 mg/L stock solution. FT-IR spectrometry results revealed a fine coating of silica for magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> cores. Silica band which was adsorbent of template molecule was intensified by sol-gel polymerization method. Polymer morphology was porous, spherical shaped and particle dimensions were observed less than 50 nanometers.

**Conclusion:** Application of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles coated with silica in this method enables high separation of cholesterol which could be due to ease of extraction and grafted polymer nature. Morphology of adsorbent polymers indicated performance of nano surfaces in separation of this compound.

**Keywords:** Cholesterol, Grafted molecularly imprinted polymer, Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles

**Address:** Food Science and Technology Department, Urmia University, Urmia, Iran

**Tel:** +989143474341

**Email:** malizadeh@outlook.com

SOURCE: URMIA MED J 2016; 27(3): 239 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> PhD Candidate, Food Science and Technology Department, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Food Science and Technology Department, Urmia University, Urmia, Iran  
(Corresponding Author)

<sup>3</sup> Assistant Professor, Medicinal Chemistry Department, Pharmacy Faculty, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor, Food Science and Technology Department, Urmia University, Urmia, Iran