

文章编号:1674-2869(2012)05-0016-04

林可霉素 A 分子印迹聚合物微球的制备及性能

蒋兴娜,李卫朋,张佑红*,朱雄伟,谌 颖,苏腾甲

(武汉工程大学化工与制药学院,绿色化工过程省部共建教育部重点实验室,湖北 武汉 430074)

摘 要:为提高林可霉素粗品中 A 组分的纯度,研究了制备林可霉素 A 分子印迹聚合物微球的方法及其性能.以聚苯乙烯微球为种球,林可霉素 A 为模板分子,通过单步溶胀法合成分子印迹聚合物微球;通过静态平衡结合法研究该聚合物的结合特性和分子识别性能.结果表明:分子印迹聚合物对模板分子具有选择性和识别能力,对林可霉素 A 和林可霉素 B 的分离因子 α 为 1.27,而非印迹聚合物微球的分离因子 α 仅为 1.02;林可霉素 A 分子印迹聚合物微球可用于制备林可霉素,并提高其粗品的纯度.

关键词:单步溶胀聚合;林可霉素;分子印迹聚合物微球;分子识别

中图分类号:TQ317

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2012.05.005

0 引 言

林可霉素^[1]是由 Mason 等在 1962 年从链霉菌林可变种培养液中获得的一类高效广谱的抗生素.国内林可霉素厂家发酵产物以林可霉素 A 为主,同时也含有林可霉素 B、C、D 等类似物.研究表明,林可霉素 A、B 组分的分子结构中仅相差一个 CH_2 ,物理化学性质相似,但林可霉素 B 抗菌活力小,毒性大.因此,为提高林可霉素的药效,减少药物的毒副作用,需要对其进行分离提纯以获得高纯度的林可霉素.

我国各厂家所采用的林可霉素提炼工艺主要是溶剂萃取法,但此法存在工艺复杂、工序繁多、收率低、物耗及能耗高等缺点,故寻找出一种高效提高林可霉素 A 的纯度的方法是至今亟待解决的问题.分子印迹聚合物^[2-7]是一种新型的分离材料,对目标分子具有高亲和性和选择性,适用于结构类似的化合物分离,特别是与色谱分析和分离^[4-8],固相萃取^[9]等技术的结合已成为研究的热点.

本研究运用分子印迹技术,首次以林可霉素 A 为模板分子,采用单步溶胀法^[10-12]制备球形的分子印迹聚合物,并对其吸附性能进行研究,为进一步研制出有效分离林可霉素各组分的方法提供实验基础.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 苯乙烯;甲醇;冰醋酸;氯仿;偶氮二异丁腈;过二硫酸钾;邻苯二甲酸二丁酯; α -甲基丙烯酸;氯化钠;十二烷基硫酸钠;聚乙烯醇;乙二醇二甲基丙烯酸酯;盐酸林可霉素.

1.1.2 仪器 JY92-2D 超声波细胞粉碎仪;JSM-5510LV 扫描电子显微镜;马尔文激光粒度分析仪; Nicolet 6700 傅立叶红外光谱仪;UV-1600 紫外分光光度计;氮气吹干仪;SXT-06 索氏提取器;1260 安捷伦高效液相色谱;DZF-6050 真空干燥箱;旋转蒸发仪;TG18M 高速离心机;恒温振荡器.

1.2 方法

1.2.1 紫外光谱分析 称取适量的林可霉素加入容量瓶中,用氯仿稀释定容,配制浓度为 4 mmol/L 的溶液,固定该浓度,按 1:0、1:2、1:4、1:6 的比例加入功能单体 MAA,25 °C 下振荡 24 h 后,以相应浓度的 MAA 氯仿溶液作为参比,测定林可霉素紫外吸收光谱的变化.

1.2.2 分子印迹聚合物微球的制备 **a. 聚苯乙烯微球制备** 将 70 mL 超纯水、0.087 g 氯化钠、10 g 苯乙烯单体加入锥形瓶中,室温下水浴超声分散 40 min,然后将溶液转入到四口瓶,通入氮气 20 min 后加入 30 mL 2.5 mmol/L 脱氧过硫酸钾

收稿日期:2012-02-29

基金项目:武汉工程大学研究生创新项目(CX201114)

作者简介:蒋兴娜(1985-),女,广西北海人,硕士研究生.研究方向:生化分离工程.

指导老师:张佑红,男,教授,博士,博士研究生导师.研究方向:生物技术.*通信联系人

水溶液,在氮气保护下,70 ℃恒温反应 20 h. 反应结束后,冷却至室温,将获得的乳液用超纯水反复离心洗涤干燥后重新分散到水中,配成 0.2 g/mL 的分散液.

b. 林可霉素 A 分子印迹聚合物微球的制备. 称取 0.406 g 林可霉素溶解于 5 mL 氯仿中,加入 0.34 g 的甲基丙烯酸(MAA)、3.96 g 乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)、1.96 g 邻苯二甲酸二丁酯和 0.2 g 偶氮二异丁腈,溶解混合均匀后加入 50 mL 0.1% (质量比)十二烷基硫酸钠和 1.0% 聚乙烯醇混合液,超声分散均匀,加入 2.0 mL 聚苯乙烯微球分散液,25 ℃下以 150 r/min 速度搅拌溶胀 20 h. 通入氮气保护,70 ℃反应 20 h. 非印迹聚合物微球的制备方法与上述相同,只是在制备过程中没有加入模板分子林可霉素 A.

c. 洗脱处理. 将获得的颗粒置于索氏提取器中,以甲醇:冰醋酸(9:1)为溶剂萃取 24 h 除去模板分子,再用甲醇继续萃取 5 h 除去冰醋酸,最后用水洗去残留的甲醇,20 ℃真空干燥至恒重.

1.2.3 红外光谱分析 采用傅立叶红外光谱仪对 MIPMs、MAA、EDMA 进行光谱分析.

1.2.4 分子印迹聚合物微球的形貌及粒径分析

采用扫描电镜观测 MIPMs 的形貌,并用粒度分析仪对微球的粒径进行分析.

1.2.5 林可霉素的含量检测 吸附液中林可霉素的含量分析,采用高效液相色谱法. 色谱条件:流动相为 0.05 mmol/L 的四硼酸钠水溶液(用浓盐酸将 pH 值调至 6);甲醇(体积比 6:4);色谱柱为 Phenomenex C18 柱(4.6 mm × 100 mm, 5 μm);柱温 25 ℃;流速 1 mL/min;进样量 5 μL;检测波长 UV 为 214 nm.

1.2.6 分子印迹聚合物微球的结合性能研究

为研究 MIPMs 对模板分子的结合特性,取 50 mg MIPMs 和 NIPMs 分别置于 25 mL 锥形瓶中,加入不同浓度的林可霉素氯仿溶液,25 ℃下恒温振荡 24 h,然后将其混合物用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,精密移取 2 mL 滤液用氮气吹干,甲醇稀释定容,通过高效液相色谱法测定吸附前和吸附平衡后溶液中的林可霉素 A 的浓度.

利用式(1.1)计算单位质量 MIPMs 和 NIPMs 对底物的吸附量 Q :

$$Q = \frac{(C_0 - C) \times V}{m} \quad (1.1)$$

式中, Q 为分子印迹聚合物微球对底物的吸附量(μmol/g); C_0 为吸附前底物的初始浓度(mmol/L); C 为吸附后溶液中底物的浓度

(mmol/L); V 为吸附液的体积(mL); m 为吸附剂的质量(g).

为分析 MIPMs 对模板分子的识别特异性,称取 50 mg MIPMs 和 NIPMs 分别置于 25 mL 锥形瓶中,加入 10 mL 1 mol/L 的林可霉素粗品氯仿溶液,按相同的方法测定其含量.

利用式(1.2)计算结合分配系数 K_D :

$$K_D = \frac{C_p}{C_s} \quad (1.2)$$

式中, C_p 为分子印迹聚合物微球结合底物的浓度(μmol/g); C_s 为溶液中底物的平衡浓度(mmol/L).

利用式(1.3)计算分离因子 α :

$$\alpha = \frac{K_A}{K_B} \quad (1.3)$$

式中, α 表示 A、B 两种物质的分离因子; K_A 表示 A 物质在分子印迹聚合物微球吸附后的分配系数(mL/g); K_B 表示 B 物质在分子印迹聚合物微球吸附后的分配系数(mL/g).

2 结果与讨论

2.1 紫外光谱研究模板分子与功能单体的作用力

紫外光谱分析模板分子林可霉素和功能单体 MAA 在氯仿中结合的情况.

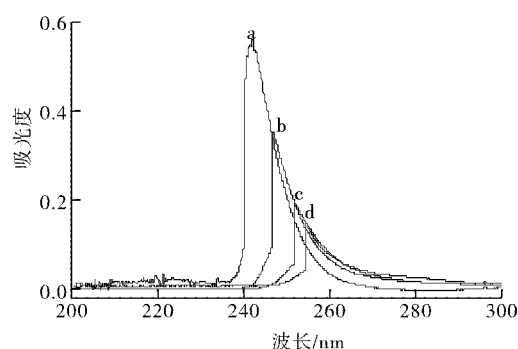


图1 林可霉素在不同浓度的 MAA 中的紫外吸收光谱

Fig.1 UV adsorption of lincomycin in the presence of different concentration of MAA m (lincomycin)/ m

注:a) 1:0; b) 1:2; c) 1:4; d) 1:6.

图1中的a、b、c及d曲线分别为4 mmol/L的林可霉素在氯仿中按1:0、1:2、1:4及1:6的比例加入MAA后的紫外光谱的变化.由图可知,随着MAA浓度的增加,林可霉素的紫外吸收峰出现红移,且波峰强度不断降低,这可能是由于林可霉素羰基中的氧原子与MAA中羟基的氧原子产生了较强的相互作用,推测为O...H—O的氢键作用.

2.2 红外光谱分析分子印迹聚合物微球的结构

红外光谱分析功能单体和交联剂的共聚情况、以及模板分子与功能单体之间发生作用的功能基团。

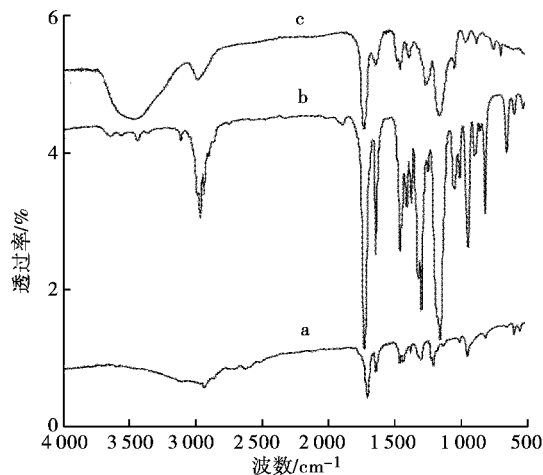


图 2 MAA (a)、EDMA (b) 及 MIPMs (c) 的红外光谱图

Fig. 2 IR of spectrum of MAA (a), EDMA (b) and MIPMs (c)

图 2 中的 a、b 及 c 曲线分别是功能单体 MAA、交联剂 EDMA 及林可霉素 A 分子印迹聚合物微球的红外光谱图。由图可知,在 1636 cm^{-1} 为 MAA 的 $\text{C}=\text{C}$ 的伸缩振动峰, 1637 cm^{-1} 为 EDMA 的 $\text{C}=\text{C}$ 的伸缩振动峰,经交联聚合后, 1637 cm^{-1} 附近 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动峰很小,说明大部分功能单体 MAA 和交联剂 EDMA 进行了交联聚合,只有少部分残留; 3400 cm^{-1} 左右处出现较宽的峰为 MAA 的 $\text{O}-\text{H}$ 的伸缩振动峰,说明 MIPMs 存在可以同模板分子作用的羟基基团。

2.3 分子印迹聚合物微球的表观形貌及粒径

扫描电镜观察林可霉素 A 分子印迹聚合物微球的表观形态。

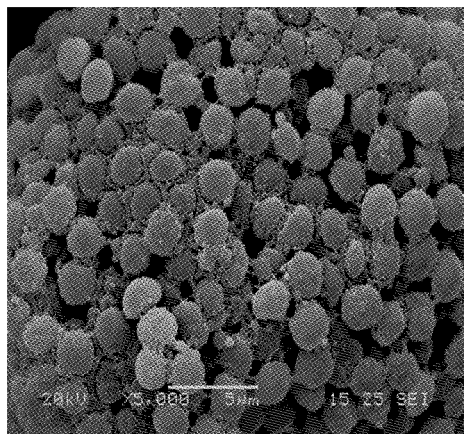


图 3 MIPMs 的扫描电镜照片

Fig. 3 SEM of MIPMs

由图 3 可知, MIPMs 虽然表面有些粗糙,但是

粒度均匀,单分散性良好。同时经激光粒度分析检测,其平均粒径为 $2.58\text{ }\mu\text{m}$,基本符合色谱柱对微球粒径的要求。

2.4 分子印迹聚合物微球的结合性能研究

2.4.1 MIPMs 的结合特性 研究 MIPMs 的结合特性,在林可霉素 A 浓度 $0\sim 3.5\text{ mmol/L}$ 的范围内,测定 MIPMs 和 NIPMs 的结合等温线。

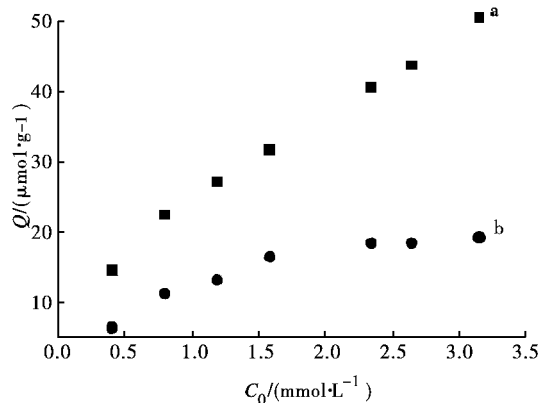


图 4 MIPMs 和 NIPMs 的结合等温线

Fig. 4 Binding isotherm of MIPMs and NIPMs

图 4 中的 a 和 b 分别为 MIPMs 和 NIPMs 对林可霉素 A 的结合等温线。比较图 4 中的 a、b 曲线可知, MIPMs 对林可霉素 A 的结合量高于 NIPMs 的,说明林可霉素 A 在 MIPMs 中留下的印迹孔穴及孔穴上的活性结合位点决定了 MIPMs 对林可霉素 A 的亲合力。

2.4.2 MIPMs 的特异识别性能 选用林可霉素 A 的结构类似物林可霉素 B 作为竞争底物考察 MIPMs 的识别性能(表 1)。

表 1 MIPMs 与 NIPMs 对林可霉素 A 和林可霉素 B 的吸附性能

Table 1 capabilities of MIPMs and NIPMs to lincomycin A and ladsorptionincomycin B

Sorbent	KD/(mL · g ⁻¹)		α
	林可霉素 A	林可霉素 B	
MIPMs	31.08	24.47	1.27
NIPMs	13.84	13.57	1.02

由表 1 可知, MIPMs 和 NIPMs 分别对林可霉素 A 和林可霉素 B 两底物的吸附性能存在一定的差异。MIPMs 对林可霉素 A 有一定的选择吸附能力,其分离因子 α 为 1.27。NIPMs 对两底物的吸附能力基本相当,其分离因子 α 仅为 1.02。这种差异表明,通过单步溶胀聚合法制得的 MIPMs 对模板分子具有识别性能。

4 结 论

以大粒径的单分散聚苯乙烯微球为种球、林

可霉素A为模板分子,采用单步溶胀聚合法制备林可霉素A的分子印迹聚合物微球.通过对其结构的表征和识别性能的测定,表明该材料对林可霉素A具有一定的亲和性和选择性,对林可霉素A和林可霉素B的分离因子 α 为1.27,而非印迹聚合物微球的分离因子 α 仅为1.02.该分子印迹聚合物微球有望用于林可霉素粗品的分离、纯化.

参考文献:

- [1] 顾觉奋. 微生物化学药品与分析[M]. 北京:军事医学科学出版社, 1996:1-2.
- [2] 小宫山真, 竹内俊文, 务川高志. 分子印迹学——从基础到应用[M]. 北京:科学出版社, 2006:6-11.
- [3] 姜忠义, 吴洪. 分子印迹技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2003:1-6.
- [4] Chapuis F, Mullet J U, Pichon V G, et al. Molecularly imprinted polymers for the clean-up of a basic drug from environmental and biological samples [J]. Chromatography A, 2006, 1135(2):127-134.
- [5] Ariffin M, Miller E I, Cormack P, et al. Molecularly imprinted solid-phase extraction of diazepam and its metabolites from samples [J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(1):256-262.
- [6] Maya Z, Manu K, Marc O, et al. Molecular imprinting of maltose binding protein: Tuning protein recognition at the molecular level [J]. Macromolecules, 2011, 44(10):3966-3972.
- [7] Wulff G. Design of biomimetic catalysts by molecular imprinting in synthetic polymers: The role of transition state stabilization [J]. Accounts of Chemical Research, 2012, 45(2):239-247.
- [8] 颜流水, 王宗花, 罗国安, 等. 分子印迹毛细管整体柱液相色谱法测定咖啡因[J]. 分析化学学报, 2004(2):148-152.
- [9] Zhai Y, Yang D, Chang X, et al. Molecularly imprinted polymer(II) from biological and natural water samples by SPE using ion-imprinted polymer[J]. Separation Science, 2008, 31(6/7):1195-1200.
- [10] 赖家平, 曹现峰, 何锡文, 等. 水溶液中制备分子印迹聚合物微球及其分子识别特性研究[J]. 化学学报, 2002, 60(2):322-327.
- [11] Zhang Li yong, Cheng Guo xiang, Fu Cong. Molecular selectivity of tyrosine imprinted polymers prepared by seed swelling and suspension polymerization [J]. Polymer International, 2002, 51(8):687.
- [12] Hien N T, Richard J. N-isopropylacrylamide as a functional monomer for noncovalent molecular imprinting [J]. Journal of Molecular Recognition, 2012, 25(1):1-10.

Preparation and properties of lincomycin A molecular imprinted polymer microspheres

JIANG Xing-na, LI Wei-peng, ZHANG You-hong, ZHU Xiong-wei, CHEN Jie, SU Teng-jia

(School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology; Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Wuhan 430074, China)

Abstract: To improve the purity of lincomycin A in the crude product, preparation and properties of lincomycin A molecular imprinted polymer microspheres (MIPMs) were studied. Using polystyrene particles as seeds, lincomycin as template molecules, MIPMs were prepared by a single-step swelling and polymerization method. The binding characteristics and molecular recognition of MIPMs were investigated through binding experiments. The results show the MIPMs have the selectivity for lincomycin A, the separation factor between lincomycin A and lincomycin B is 1.27, while the factor is only 1.02 by the non imprinted polymer microspheres (NIPMs). The lincomycin A MIPMs can be used to prepare lincomycin and improve the purity of the crude lincomycin.

Key words: single-step swelling and polymerization method; lincomycin; molecular imprinted polymer microspheres; molecular recognition

本文编辑:张 瑞