

多步溶胀悬浮聚合法制备红霉素分子印迹聚合物微球及其性能评价^Δ

王小记*, 唐 辉, 李迎春#, 刘 媛(石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002)

中图分类号 R917;R978.1⁵ 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)13-1197-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.13.16

摘要 目的:制备红霉素(EM)分子印迹聚合物(MIPs)微球,并评价其性能特征。方法:以甲基丙烯酸(MAA)为功能单体,确定EM与MAA的最佳物质的量比,采用多步溶胀悬浮聚合法制备EM-MIPs微球,考察其形态、粒径,EM-MIPs微球吸附量与EM质量浓度的静态关系及EM-MIPs微球吸附量与时间的动态关系。以EM-MIPs微球平衡吸附量对EM平衡质量浓度和初始质量浓度(c_0)进行Scatchard和Langmuir模型分析。以罗红霉素为竞争分子进行选择吸附试验,比较EM-MIPs微球的特异性吸附能力。结果:EM与MAA的最佳物质的量比为3.5:1;所制得的微球外形规整,平均粒径为9.9 μm ,是单分散型微球。EM-MIPs微球吸附量与EM质量浓度成正比,最大吸附量为234 mg/g;吸附量与时间成正比,吸附饱和时间约120 min。Scatchard模型分析拟合方程 r 分别为0.995 4和0.922 9;Langmuir模型分析拟合方程 r 为0.987 1。以罗红霉素为竞争分子(最大吸附量27.90 mg/g)相比,EM-MIPs微球对模板分子红霉素具有更强的吸附能力。结论:所制得的微球具有较高的吸附量,达吸附平衡时间较快,对模板分子红霉素具有特异的吸附性;可作为固相萃取色谱柱的填料,对生物样品中残留的红霉素进行富集、纯化和检测。

关键词 红霉素;分子印迹技术;多步溶胀悬浮聚合;微球;吸附曲线

Preparation of Erythromycin Molecular Imprinted Polymer Microsphere by Multi-step Swelling and Suspension Polymerization and Evaluation of Its Performance

WANG Xiao-ji, TANG Hui, LI Ying-chun, LIU Yuan(School of Pharmacy, Shihezi University, Xinjiang Shihezi 832002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare erythromycin (EM) molecular imprinted polymers microsphere (MIPs), and to evaluate its performance characteristics. METHODS: Using methacrylic acid (MAA) as the functional monomer, the optimum molar ratio of EM and MAA were determined; multi-step swelling and suspension polymerization was used to prepare EM-MIPs microspheres; and the morphology, particle size, static and dynamic relationship of adsorption quantity of EM-MIPs microspheres with mass concentration of EM and adsorption time were observed. The EM-MIPs microspheres equilibrium adsorption capacity, equilibrium concentration and initial mass concentration (c_0) of EM were analyzed by Scatchard and Langmuir model. Taking roxithromycin as competitive molecular, specific adsorption capacity of EM-MIPs microspheres were compared in selective adsorption test. RESULTS: The optimum molar ratio of EM to MAA was 3.5:1, and the microspheres had the regular shape with average particle size of 9.9 μm , which was monodisperse microsphere. The adsorption quantity of EM-MIPs microsphere was directly proportional to mass concentration of EM, with maximum adsorption capacity of 234 mg/g; the adsorption amount was proportional to time, and adsorption time was about 120 min. The correlation coefficient r of fitted equations of Scatchard model were 0.995 4 and 0.922 9; that of Langmuir model was 0.987 1. Taking roxithromycin as competitive molecules (the maximum adsorption capacity of 27.90 mg/g), adsorption capacity of EM-MIPs microspheres is strong to the template molecule erythromycin. CONCLUSIONS: The adsorption capacity of the prepared microspheres is in high level, and the adsorption equilibrium time has been reached quickly. The prepared microspheres show specific adsorption to the template molecule of erythromycin, and can be used as solid phase extraction column packing to detect, enrich and purify erythromycin residues in biological samples.

KEY WORDS Erythromycin; Molecular imprinting technique; Multi-step swelling and suspension polymerization; Microsphere; Adsorption curve

分子印迹技术是指为获得在空间结构和结合位点上与模板分子(目标分子)完全匹配的聚合物的试验制备技术,所制备的聚合物称为分子印迹聚合物(Molecularly imprinted poly-

^Δ 基金项目:2012年度兵团博士资金项目资助(No. 2012BB020);2011年度石河子大学高层次人才资助项目(No. RC-ZX201115)

* 硕士研究生。研究方向:分子印迹聚合物的合成与应用。E-mail:659640803@qq.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:分子印迹聚合物的合成与传感器的开发与应用。E-mail:yingchun.li1982@gmail.com

mers, MIPs)。由于MIPs与目标分子具有“锁-钥”关系,具有高选择性和耐热、耐酸碱、耐机械力等优点,近年来得到快速发展,广泛应用于抗体或受体模拟、药物分离、给药系统、食品与环境检测、传感器等诸多领域,显示出良好的应用前景^[1-6]。

红霉素(EM)是一种大环内酯类广谱抗菌药物,在畜禽、水产品中主要用于细菌性疾病的防治。由于EM在动物体内代谢时间较长,因此,食品中EM残留检测是食品安全与质量控制的重要环节。EM分子印迹聚合物(EM-MIPs)微球可作为固相萃取色谱柱的填料,对生物样品中残留的EM进行富集、纯化和检测。

目前已报道的EM-MIPs,其主要聚合形式有:采用本体聚合合法制备的块状EM-MIPs^[7];采用沉淀^[8-9]、悬浮^[10]、溶胶-凝胶聚合^[11],制备的纳米级和微米级的球状EM-MIPs;以及EM分子印迹膜^[12]和用于修饰碳管的EM-MIPs^[13]。主要的应用领域有:传感器的修饰^[8],自来水^[7]、猪肉^[7]、牛奶^[10]、鸡肉^[13]等样本中EM的固相萃取。以上各种形式的聚合物中,球状聚合物具有广泛的实用性、较大的比表面积、较高的吸附容量及不需研磨便可直接使用等优点而备受关注。本研究采用多步溶胀悬浮聚合合法制备了EM-MIPs微球,得到了粒径较为均一的聚合物微球,并考察了其吸附行为和选择性。

1 材料

UV-2401 PC型紫外分光光度计、LC-15C型高效液相色谱仪[岛津(中国)有限公司];SHA-C型水浴恒温振荡器(江苏省金坛市医疗仪器厂);BP 211D天平(德国赛多利斯集团);85-2型数显磁力搅拌器和JJ-1型增力电动搅拌机(常州市伟嘉仪器制造有限公司);PHS-3C型雷磁pH计(上海精密科学仪器有限公司);TGL-16G型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);TP300超声波提取器[天鹏电子新技术(北京)有限公司];Microtrac S3500激光粒度分析仪(美国麦奇克有限公司);GSM-6490LV扫描电子显微镜(日本电子公司)。

EM(广东省韶关市集琦药业有限公司,批号:1105171,纯度:>88.0%);罗红霉素(ROX,上海源叶生物科技有限公司,批号:20120325,纯度:>94.0%);甲基丙烯酸(MAA,分析纯,使用前减压蒸馏)、乙二醇二甲甲基丙烯酸酯(EDMA,分析纯,使用前用5%的氢氧化钠洗1次,再用水洗至中性)、偶氮二异丁腈[AIBN, Sigma-Aldrich(中国)公司,分析纯,使用前用乙醇重结晶];聚乙烯醇(PVA,天津市光复科技发展有限公司,分析纯);乙腈为色谱纯,水为重蒸水,苯乙烯、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、十二烷基硫酸钠(SDS)等试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 EM与功能单体相互作用的紫外光谱分析

在EM-MIPs的制备中,功能单体的选择以及其与模板分子的比例非常重要。常见的功能单体有MAA、丙烯酰胺、乙炔基吡啶等。由于模板分子EM中有5个羟基和1个叔氨基,MAA能与EM的羟基通过氢键发生作用,同时能与叔氨基通过静电力发生作用。因此,本研究选择MAA作为功能单体。本试验中,采用紫外检测来解析模板分子和功能单体形成配合物的相互作用。固定EM的质量浓度不变,逐渐增大MAA质量浓度,配成EM(相对分子质量为733.93)与MAA(相对分子质量为86.09)物质的量之比为1:0、1:1、1:2、1:4、1:8、1:10、1:16的溶液,混合24 h,观察测得的紫外吸收光谱最大的吸收波长的移动以及吸光度值的变化,以此来确定EM与MAA的最佳物质的量之比。

2.2 聚合物微球的制备

2.2.1 聚苯乙烯种子的制备。称取9.06 g苯乙烯与0.10 g过硫酸钾加入到100 ml水中,搅拌(275 r/min)升温到70 ℃,通氮气恒温反应18 h结束,得聚苯乙烯种子乳液。

2.2.2 种子颗粒的三步溶胀和聚合反应。称取0.04 g SDS,量取0.96 ml DBP、10 ml水,超声制成微乳液,转移至锥形瓶中,加入1.5 ml聚苯乙烯种子乳液。搅拌(125 r/min)反应15 h,即完成第1步溶胀。称取0.3 g AIBN,量取5.0 ml氯仿、12.5 ml水、10 ml 4.8%的PVA溶液,超声制成微乳液,转移至第1步溶

胀液中,继续搅拌(125 r/min)反应2 h,即完成第2步溶胀。称取1.468 g EM、0.603 g MAA、4.96 g EDMA、0.02 g SDS,量取12.5 ml水、10 ml 4.8%的PVA溶液,超声制成微乳液,转移至第2步溶胀液中,继续搅拌(125 r/min)反应2 h,即完成第3步溶胀。第3步溶胀结束后,将锥形瓶中的反应液转移至三口烧瓶中,通入氮气,50 ℃油浴下搅拌(125 r/min)进行聚合反应24 h,即得聚合物微球。

2.2.3 模板分子的洗脱。将“2.2.2”项中所得聚合物微球在甲醇中重复洗涤3次,甲醇-水(50:50, V/V)中洗涤1次,四氢呋喃中重复2次,每次溶剂用量为200 ml。洗涤方法:聚合物置于烧杯中,倒入溶剂,超声20 min,静置6 h,然后小心倾去上清液,沉淀的聚合物继续进行下一步操作。全部洗涤结束后,过滤聚合物,丙酮冲洗,室温放置干燥,保存备用。

非印迹聚合物(Non-imprinting polymers, NIPs)除不加模板分子EM外,均按照上述方法制备。

2.3 EM-MIPs微球的表征

取适量MIPs和NIPs各2份,1份表面喷金后进行电镜扫描观察,对微球的形态以及表面形貌进行表征;另1份制成一定浓度的水相混悬液,进行粒径测定,以考察微球的粒径及其分布情况。

2.4 含量检测方法

含量检测均参考2010年版《中国药典》^[14]高效液相色谱(HPLC)法。EM的色谱条件为:流动相:磷酸盐缓冲液(取磷酸氢二钾8.7 g,加水1 000 ml,用20%的磷酸调节pH至8.2)-乙腈(40:60, V/V),流速:1.0 ml/min;柱温:35 ℃;检测波长:215 nm。ROX色谱条件为:流动相:0.067 mol/L磷酸二氢铵溶液(用三乙胺调节pH值至6.5)-乙腈(65:35, V/V),流速:1.0 ml/min;柱温:25 ℃;检测波长:210 nm。色谱柱均为WondaSil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)。以上的检测方法,分别以1.0 mg/ml的质量浓度平行测定6次考察其精密性,以0.8、1.0、1.2 mg/ml的质量浓度各平行测定3次考察其回收率。

2.5 EM-MIPs微球的吸附平衡等温线

称取10 mg干燥聚合物微球,置于5 ml离心管中,加入一定质量浓度EM的甲醇溶液3 ml,置于水浴恒温振荡器中混合24 h。取出,5 000 r/min离心5 min,用HPLC法测定上清液中EM的质量浓度。根据吸附前后溶液中EM质量浓度的变化计算EM-MIPs的吸附量: $Q=(c_0-c) \times V/m$,其中 c_0 、 c 分别为EM的初始质量浓度和吸附后的质量浓度, V 为溶液体积, m 为聚合物微球质量。平行测定3次上清液中EM的质量浓度,取平均值。以EM-MIPs微球平衡吸附量(y)对EM平衡质量浓度(x)和 c_0 采用Scatchard和Langmuir模型分析静态吸附情况,同时以EM-MIPs和NIPs的吸附量对时间进行动态吸附分析。

2.6 EM-MIPs微球的选择性吸附

称取10 mg已干燥的聚合物微球(EM-MIPs和NIPs)2份,分别加入含EM/ROX 1.0 mg/L的甲醇溶液3 ml,混合3 h,取出,5 000 r/min离心5 min。采用HPLC法平行测定3次上清液中EM的质量浓度,取其平均值。

3 结果和讨论

3.1 EM-MIPs微球的制备

不同物质的量之比的EM与MAA作用后EM-MIPs微球的紫外扫描光谱见图1,其最大吸光度见图2。

由图1可见,随着MAA比例的增加,最大吸收波长发生红移,同时吸光度值增大。这主要是由于模板分子和功能单

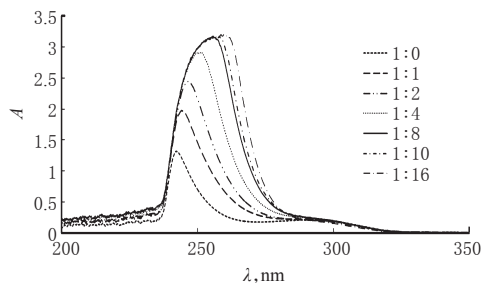


图1 不同物质的量之比的EM与MAA作用后EM-MIPs的紫外扫描图谱

Fig 1 UV scanning spectrum of EM-MIPs under different proportions between EM and MAA

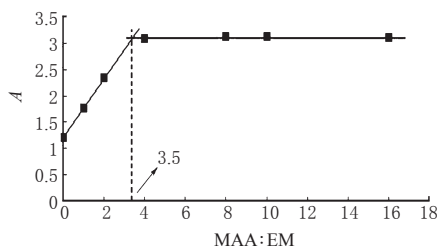


图2 不同物质的量之比的EM与MAA作用后EM-MIPs的最大吸光度

Fig 2 The maximum absorbance of EM-MIPs under different proportions between EM and MAA

体形成的复合物中,新的化学键数量增加所造成的。图2为分别取各比例下最大吸光度值对不同的比例作图,并对图中的点作2条切线,其交点即为模板分子和功能单体之间相互作用最充分的物质的量比值。从图2中可以看出,随着MAA:EM比值的增大,最大吸光度值A趋向平衡,这是由于随着MAA:EM比值的增大,新化学键的形成逐渐出现饱和;与此同时,MAA:EM的比值过大,会造成非印迹位点的形成。因此,为了提高印迹微球的印迹效果,通常选择二者之间键合饱和位点的物质的量之比。由图2所示,MAA:EM的最佳物质的量之比为3.5:1。

3.2 EM-MIPs微球的表征

EM-MIPs微球的粒径分布图见图3,EM-MIPs微球与NIPs的电镜扫描图见图4。

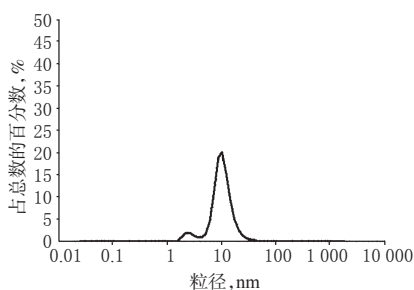


图3 EM-MIPs微球的粒径分布图

Fig 3 Particle size distribution of EM-MIPs microsphere

由图3可见,平均粒径为9.9 μm的微球占总数的94%,分布宽度为6.75,说明粒径分布较为集中。由图4可见,MIPs和NIPs微球表面都有孔穴存在,而MIPs表面孔穴痕迹较NIPs更多、更深。这是由于制备过程中,二者都加入了致孔剂,在微球表面留下了非特异性吸附孔穴;而MIPs还加入了模板分子EM,经过洗脱,表面留下了特异性吸附EM的孔穴。

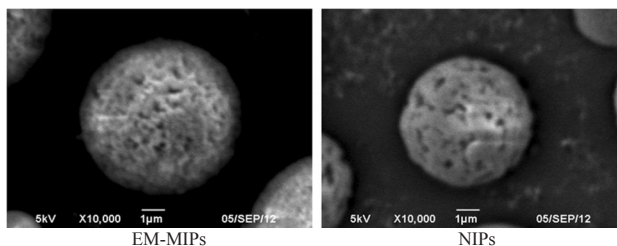


图4 EM-MIPs与NIPs的电镜扫描图(×10 000)

Fig 4 SEM image of EM-MIPs and NIPs(×10 000)

3.3 EM-MIPs微球吸附平衡等温线

3.3.1 静态吸附平衡试验。①含量测定。EM和ROX的回归方程分别为: $y=0.885 \times 10^6 x + 0.1003 \times 10^6$ ($r=0.9996, n=5$)和 $y=4055014x + 491783$ ($r=1.0, n=5$)。结果显示,EM检测质量浓度在0.1~20 mg/ml的范围内线性关系良好,精密度RSD=1.96% ($n=6$),平均回收率为98.64% (平均RSD=0.79%, $n=9$);ROX检测质量浓度在0.4~1.2 mg/ml的范围内线性关系良好,精密度RSD=0.37% ($n=6$),平均回收率为98.63% (平均RSD=1.08%, $n=9$)。EM-MIPs微球和NIPs的吸附量-EM质量浓度曲线见图5。

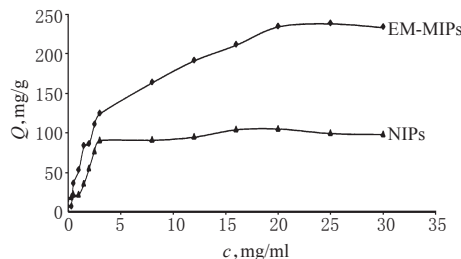


图5 EM-MIPs微球和NIPs的吸附量-EM质量浓度曲线

Fig 5 Curves of the adsorption amount-mass concentration of EM of EM-MIPs microsphere and NIPs

如图5所示,随着EM质量浓度的增加,EM-MIPs微球和NIPs的吸附量都在增加,但是,前者的吸附量明显大于后者,二者最大吸附量分别为234、105 mg/g。这是由于MIPs具有与模板分子的空间结构和官能团结合位点互补的立体空穴,这些空穴能与模板分子EM发生特异性结合,当这些空穴全部被占据之后,即吸附达到平衡;而NIPs只能依靠非特异性吸附。因此EM-MIPs微球对EM有更高的吸附容量,主要是印迹效应的结果。

② Scatchard 模型分析。在分子印迹研究中通常采用 Scatchard 方程来研究印迹聚合物的吸附行为,方程如下:

$$Q/c = (Q_{\max} - Q)/K_D \dots\dots\dots (1)$$

式中Q为每个质量浓度下的平衡吸附容量, Q_{\max} 为最大表观结合量,c为EM的平衡质量浓度(即测得质量浓度), K_D 为结合位点的平衡结合常数。

EM-MIPs微球的 Scatchard 模型分析中有两个明显的部分分别呈线性关系,线性回归方程分别为 $y=-0.4845x+107.63$ ($r=0.9954$)和 $y=-0.1627x+48.085$ ($r=0.9229$)。这证明在EM的质量浓度范围内,聚合物对EM存在结合力不均匀的两类结合位点。由其斜率和截距可求得高亲和力的结合位点的离解常数为2.06 mg/ml,最大表观结合量 $Q_{\max1}=222.15$ mg/g;低亲和力的结合位点的离解常数为6.15 mg/ml,最大表观结合量 $Q_{\max2}=295.7$ mg/g。当底物的质量浓度较高时,测定低亲和力的结合常数无法扣除高亲和力的结合位点的贡献而使所得

结果偏高;当底物的质量浓度较低时,测定高亲和力的结合常数,低亲和力的结合位点仍有贡献,只有底物的质量浓度极低时,低亲和力位点的贡献才可以忽略。

③Langmuir 模型分析。在分子印迹研究中也采用 Langmuir 方程来研究印迹聚合物的吸附行为,方程如下:

$$Q = Q_{\max} \cdot K_c \cdot c_0 / (1 + c_0 \cdot K_c) \dots \dots \dots (2)$$

式中: K_c 为 Langmuir 平衡常数。

由 Langmuir 模型拟合结果可见,EM-MIPs 微球的实际最大平衡吸附量为 234 mg/ml,最大表现结合量 $Q_{\max} = 265.3 \text{ mg/g}$,拟合方程为: $y = 265.3 \times 0.257c_0 / (1 + 0.257c_0)$ ($r = 0.9871$); NIPs 的实际最大平衡吸附量为 105 mg/ml,最大表现结合量为 $Q_{\max} = 111.7 \text{ mg/g}$,拟合方程为: $y = 111.7 \times 0.526c_0 / (1 + 0.526c_0)$ ($r = 0.9041$)。

3.3.2 动态吸附平衡试验。EM-MIPs 微球和 NIPs 的吸附量-时间曲线见图 6。

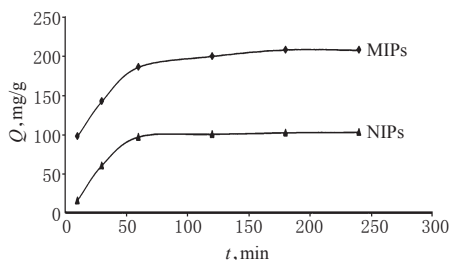


图 6 EM-MIPs 微球和 NIPs 的吸附量-时间曲线

Fig 6 Adsorption amount-time curves of EM-MIPs microsphere and NIPs

由图 6 可见,所制得的 MIPs 和 NIPs 对模板分子 EM 的吸附量 Q 随时间增加,吸附量也随之增加,在 120 min 后吸附饱和,达到平衡。而 MIPs 由于印迹效应,对 EM 的平衡吸附量要远大于 NIPs。

3.3.3 选择性吸附试验。EM-MIPs 微球和 NIPs 对 EM 的吸附量分别为 62.9 mg/g 和 34.2 mg/g;对 ROX 的吸附量分别为 27.90 mg/g 和 23.78 mg/g。EM-MIPs 微球对 EM 的吸附性能高于 ROX,这是因为 EM-MIPs 微球具有与模板分子的空间结构和官能团结合位点互补的立体空穴,这些空穴能与模板分子 EM 发生较强的亲合作用,对 ROX 的吸附只能依靠非特异性吸附发生作用。而 NIPs 对 EM 的吸附量大于结构相似物 ROX,这可能是因为非特异性吸附下,EM 本身可形成的氢键和静电力的基团较多,可与 NIPs 表面的功能基团形成更多的非共价键。

4 结论

本文采用多步溶胀悬浮聚合法制备了粒径较为均匀(平均粒径为 9.9 μm)的 EM 分子印迹微球。其吸附性能良好,最大饱和吸附量可达 234 mg/g,平衡吸附时间为 120 min。经过 Scatchard 模型分析,结果显示印迹微球具有两类亲和力不同的结合位点。经过 Langmuir 模型分析,得出印迹微球对模板分子 EM 的最大表现吸附量可达 265.3 mg/g,与试验数据十分接近。相对于竞争分子 ROX,印迹微球对模板分子 EM 表现出了高识别性。本法制备的 EM 分子印迹微球,有望作为固相

萃取色谱柱填料,对生物样品中 EM 残留进行富集、纯化和检测。

参考文献

[1] Li YC, Fu Q, He LC. Preparation and evaluation of uniform-size ephedrine-imprinted polymeric microspheres by multi-step swelling and suspension polymerization[J]. *Anal Sci*, 2006, 22(10): 1 355.

[2] Sadeghi HB, Ebrahimi SA, Tamaddon A, et al. Potentiometric sensing of lamotrigine based on molecularly imprinted polymers[J]. *Electroanalysis*, 2011, 23(11): 2 716.

[3] Chen CB, Yang LQ, Zhou J. Trace bensulfuron-methyl analysis in tap water, soil, and soybean samples by a combination of molecularly imprinted stir bar sorption extraction and HPLC-UV[J]. *J Appl Polym Sci*, 2011, 122(2): 1 198.

[4] Zhao D, Jia J, Yu X, et al. Preparation and characterization of a molecularly imprinted polymer by grafting on silica supports: a selective sorbent for patulin toxin[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401(7): 2 259.

[5] 张韻慧,晋兴华.分子印迹技术在给药系统中的应用研究进展[J]. *中国药房*, 2005, 16(17): 1 342.

[6] 何建峰,徐莉,朱全红.氯霉素前体分子印迹聚合物的制备及结合特性研究[J]. *中国药房*, 2007, 18(22): 1 713.

[7] Song S, Wu A, Shi X, et al. Development and application of molecularly imprinted polymers as solid-phase sorbents for erythromycin extraction[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 390(8): 2 141.

[8] 寇星,耿立媛,雷建都,等.EM 分子印迹聚合物纳米微球的制备及其吸附特性[J]. *过程工程学报*, 2011, 11(3): 481.

[9] Zhang ZH, Liu YJ, Long YM, et al. Effect of the size of molecularly imprinted polymers sensing materials on piezoelectric quartz crystal sensor performance[J]. *Anal Sci*, 2004, 20(2): 291.

[10] Geng L, Kou X, Lei JD, et al. Preparation, characterization and adsorption performance of molecularly imprinted microspheres for erythromycin using suspension polymerization[J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2012, 87(5): 635.

[11] 张朝晖,刘丽,聂丽华.溶胶-凝胶法制备 EM 印迹固相萃取材料及其选择性吸附[J]. *高分子学报*, 2010(6): 677.

[12] 管萍,胡小玲,郝明燕.EM 分子印迹膜的制备及性能研究[J]. *功能材料*, 2010, 41(S2): 379.

[13] Zhang ZH, Yang X, Zhang HB, et al. Novel molecularly imprinted polymers based on multi-walled carbon nanotubes with binary functional monomer for the solid-phase extraction of erythromycin from chicken muscle[J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(19): 1 617.

[14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S]. 2010 年版.北京:中国医药科技出版社, 2010: 301, 463.

(收稿日期:2012-07-09 修回日期:2012-11-14)