

罗红霉素分子印迹聚合物的合成及其特性研究

贾宝秀¹, 孙晓业², 李玉琴^{1*}, 肖玉良¹, 郝吉福¹, 夏成才¹(1.泰山医学院药学院, 山东 泰安 271016; 2.天津中医药大学, 天津 300193)

摘要: 目的 探讨采用分子印迹技术合成罗红霉素分子印迹聚合物的方法, 并对其特性进行研究。方法 以罗红霉素为模板分子, α -甲基丙烯酸为功能单体, 以乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 采用分子印迹技术合成分子印迹聚合物。通过特异性吸附实验研究分子印迹聚合物的特性。结果 通过静态平衡吸附法研究了模板聚合物的结合动力学以及该聚合物的结合能力和选择特性, 通过 Scatchard 分析法研究了印迹聚合物对模板分子的结合特性, 经计算聚合物的最大表观结合量(Q_{\max})和平衡离解常数(K_d)分别为 $90.3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $1.35 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结论 合成的分子印迹聚合物有形状、大小以及识别位点都与模板分子相匹配的空穴, 即具有印迹作用。

关键词: 分子印迹聚合物; 罗红霉素; 吸附; 功能单体

中图分类号: R927.2 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2010)05-0441-04

Synthesis and Evaluation of Molecularly Imprinting Polymer Using Roxithromycin as Template

JIA Baoxiu¹, SUN Xiaoye², LI Yuqin^{1*}, XIAO Yuliang¹, HAO Jifu¹, XIA Chengcai¹(1.College of Pharmaceutical, Taishan Medical University, Tai'an 271016, China; 2.Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

ABCSTRACT: OBJECTIVE To synthesize molecularly imprinting polymer(MIP) for roxithromycin by using molecular imprinting technique(MIT), and study the characterisation of it. **METHODS** A MIP with special molecule recognition properties of roxithromycin was prepared by thermal polymerization in which roxithromycin as template molecule, α -methacrylic acid as functional monomer and ethylene glycol dimethacrylate as the crosslinker. **RESULTS** Equilibrium binding experiment was used

基金项目: 山东省教育厅(J09LF30)

作者简介: 贾宝秀, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0538)6229753 E-mail: jiabaoxiu@163.com *通信作者: 李玉琴, 女, 博士, 副教授
Tel: (0538)6229753 E-mail: lqq29@163.com

中国现代应用药学 2010 年 5 月第 27 卷第 5 期

Chin JMAP, 2010 May, Vol.27 No.5

• 441 •

to investigate the adsorption dynamics, the binding ability to template molecule and the substrate selectivity. The Scatchard analysis was used to study that the MIP's binding characteristic to template molecule. By the analysis of Scatchard plot, the apparent maximum number (Q_{\max}) and the equilibrium dissociation constant (K_d) were found to be $90.3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ and $1.35 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. **CONCLUSION** The MIP for roxithromycin we synthesized produces a cavity with molecular recognition sites that can bind selectively to the template, that is to say that it has imprinting effectiveness.

KEY WORDS: molecularly imprinting polymer; roxithromycin; adsorption; functional monomer

罗红霉素是大环内酯类抗生素,属于第二代半合成的红霉素。罗红霉素由法国 Rouse 公司开发,商品名 Rulid,1988 年上市,属 14 元环大环内酯类,是红霉素经 C9 位结构改造得到的衍生物。罗红霉素保留了红霉素治疗呼吸系统感染、皮肤与软组织感染、泌尿系统感染、胃肠道感染的作用,特别是用于治疗没有细胞壁的支原体和专性细胞内寄生的衣原体以及 L 型细菌具有特殊的作用,在治疗衣原体引起的泌尿生殖系统感染方面,取得了较高的疗效。迄今已在包括我国在内的世界 90 多个国家和地区得到广泛应用^[1-2]。

目前罗红霉素的含量测定方法主要有微生物检定法、分光光度法^[3]和 HPLC^[4]。国内对罗红霉素含量测定主要是紫外法,但是大环内酯类抗生素的紫外吸收较弱,罗红霉素只在紫外的末端 210 nm 处有吸收,而在 210 nm 下进行测定时,由于大多数溶剂有吸收,溶剂干扰大,因而导致仪器不稳定、分析重复性差、灵敏度较低^[5]。分子印迹技术(molecular imprinting technique, MIT)以目标分子为模板分子,与特定结构的功能单体作用后,加入交联剂进行聚合反应,反应完成后将模板分子洗脱出来,形成的一种具有固定空穴大小和形状及有确定排列功能团的交联高聚物,即分子印迹聚合物(molecular imprinting polymers, MIP)^[6-8]。近年来 MIT 在药物分析领域应用广泛,用于化合物的含量测定,专一性强,准确性高,用于色谱方法或流动注射化发光分析仪等,均得到较好的效果^[9-11]。因此本试验选用罗红霉素作为模板分子合成 MIP 并对特性其进行研究,以期建立一种在线、快速、简单、灵敏度高、选择性好的测定罗红霉素的新方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Avater370 型傅立叶变换红外分光光度计(美国热电设备公司); UV-2450PC 型紫外可见分光光度计(日本岛津设备公司); S-520 型扫描电子显微镜(日本日立公司); S-54 型紫外可见分光光度计(上海棱光技术有限公司)。

罗红霉素原料药、阿奇霉素(浙江国邦药业,批号:070802,070604,纯度:99.8%); α -甲基丙烯酸(MAA,分析纯,天津市永大化学试剂开发中心); 乙二醇二甲基丙烯酸酯(本实验室自行合成); 乙二醇(分析纯,上海化学试剂总厂第三分厂); 对苯二酚(分析纯,天津市大茂化学试剂厂); 对甲苯磺酸(分析纯,天津市巴斯夫化工有限公司); 偶氮二异丁腈(AIBN,化学纯,天津市博迪化工有限公司)。

1.2 罗红霉素 MIP 的制备方法

称取 0.005 mol 模板分子和 0.004 mol 的功能单体 MAA 溶于 3.0 mL 甲苯中,超声,静置 3 h,使模板分子与功能单体充分作用,加入 0.008 mol 交联剂和 0.028 g 引发剂 AIBN,超声,充氮气后立即密封。将其置于 60 °C 恒温水浴锅中 60 h,得到白色固体聚合物。将固体聚合物取出,真空干燥,研磨,过 200 目分样筛,得到粒径 76 μm 左右的 MIP 颗粒。然后加入甲醇溶液洗脱,超声,静置,上清液离心后于紫外分光光度计检测,反复洗涤直至无模板分子检出为止。真空干燥至恒重,得到 MIP。

空白聚合物(NIP)的制备步骤,除不加模板分子外,与上所述相同。

1.3 MIP 和 NIP 的吸附性能实验

分别称取 50.0 mg 罗红霉素 MIP 颗粒和 NIP 颗粒各 8 份于 10 mL 比色管中,标号,分别加入不同浓度的模板分子溶液,超声,离心,取上清液在 210 nm 处用紫外分光光度法测定吸光度,平行测定 3 次取平均值。用空白聚合物做对照。通过下式计算模板分子的游离浓度、印迹聚合物对模板分子的单位吸附量,评价印迹聚合物的结合能力^[12-13]。

$$A=4.48 \times 10^{-4}C+0.3346; Q=(C_0-C_1) \times V/m$$

其中: A 为吸光度; Q 为单位质量 MIP 或 NIP 对罗红霉素的吸附量, $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; C_0 为吸附前溶液的浓度, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; C_1 为吸附后溶液的浓度, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; V 为溶液的体积, mL; m 为 MIP 或 NIP 的质量, g。

2 结果与讨论

2.1 聚合条件的优化

2.1.1 交联剂用量对分子印迹性能的影响 考察了不同交联剂与分子模板摩尔比对分子印迹性能的影响。随着交联剂用量的增加,分子印迹的结合量先逐渐变大,在交联剂与模板分子比例为16:1时达到最大,而后又逐渐变小。因此,选择交联剂与模板分子摩尔比为16:1,所制得的聚合物交联度刚性适中,对罗红霉素的结合特性最佳。

2.1.2 功能单体用量对分子印迹性能的影响 考察了不同功能单体与模板分子比例对 MIP 吸附性能的影响。当功能单体用量较少时,只有少量的罗红霉素能与功能单体形成非共价键形式的稳定配合物,且部分罗红霉素仍处于游离状态,这样分子印迹中形成的与罗红霉素结构相匹配的立体孔穴的密度较低,识别位点就少,致使结合容量低;随着功能单体用量的增加,罗红霉素与功能单体之间的自组装进行得更加充分,形成稳定配合物的量增多,与罗红霉素结构相匹配的立体孔穴就多,吸附量变大,当功能单体与罗红霉素的比例为8:1时, Q 值达到最大;但功能单体与罗红霉素的比继续增加,聚合物的吸附性能反而下降。可能在高比例时,过量的功能单体使非选择性结合位点增加,另外功能单体的浓度过大可能导致自身的缔合,致使选择性结合位点数反而减少, Q 值又逐渐变小。所以,选择功能单体与模板分子的物质的量的比例为8:1。

2.2 印迹聚合物的吸附动力学

为测定 MIP 对罗红霉素的结合速率,采用静态平衡结合法测定了在 25 °C 下不同时间内的 MIP 对罗红霉素溶液的结合量。在前 2 h 内吸附量迅速增加,此后吸附速率缓慢增加,10 h 后基本达到吸附平衡。这是由于 MIP 中由交联剂和功能单体构成的立体孔穴分布深浅不一,在开始阶段,主要是颗粒外表面模板分子的吸附,对模板分子呈现出较快的结合速度,而当外表面结合达到饱和后,主要发生模板分子通过孔道向内扩散后吸附,其吸附速度受到传质阻力的影响,致使结合速度下降,表现为吸附曲线的斜率变小,在 10 h 以后,吸附基本达到平衡。

2.3 平衡吸附实验

使用静态平衡吸附法,在罗红霉素浓度为 0.40~0.95 mg·mL⁻¹ 内,测定了 MIP 和 NIP 对于罗红霉素的吸附结合量,得到不同初始浓度溶液的吸附等温线,结果见图 1。

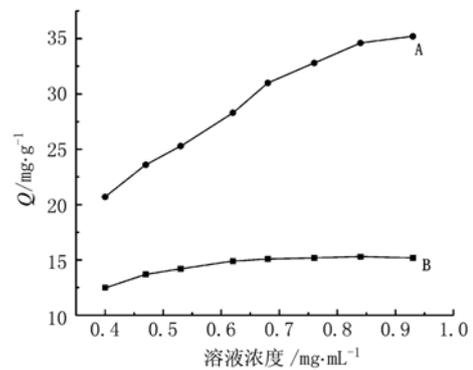


图 1 MIP(A)和 NIP(B)对罗红霉素的等温吸附曲线

Fig 1 The adsorption equilibrium isotherm of MIP and NIP for roxithromycin

MIP 的吸附量随着浓度的增加而逐渐增大,而 NIP 吸附量增加缓慢,并且在相同初始浓度下 MIP 的吸附量明显大于 NIP 的吸附量,这说明印迹过程中,模板分子在 MIP 中选择性键合产生的印迹孔穴及孔穴上的活性结合位点决定了 MIP 对模板分子的高度亲合力和特异识别性远大于非选择性键合作用。

在分子印迹的研究中,常常使用 Scatchard 模型评价分子印迹聚合物的结合特性, Scatchard 方程^[14]的表达式为:

$$Q/C = (Q_{\max} - Q)/K_d$$

式中, K_d 是结合位点的平衡离解常数, Q_{\max} 是结合位点的最大结合量, C 是底物在上清液中的平衡浓度。

据上式,以 Q/C 对 Q 作图结果见图 2。 Q/C 对 Q 明显呈线性关系,说明在所研究的浓度范围内,印迹聚合物对印迹分子存在一种等价的结合位点。从直线 $Q/C = 67.74 - 0.77Q$ ($r = 0.9919$; $SD = 0.58$) 的斜率和截距可以分别计算出 $K_d = 1.35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $Q_{\max} = 90.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

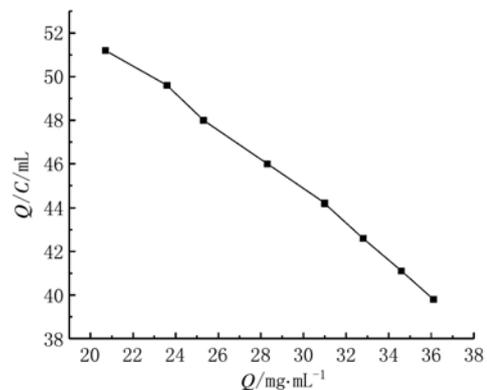


图 2 评价聚合物结合性质的 Scatchard 图

Fig 2 Scatchard plot to estimate the binding nature of MIP

2.4 印迹聚合物结合底物的选择性研究

选用模板分子罗红霉素和与其结构类似的阿奇霉素为底物,由平衡结合方法测定了印迹聚合物和非印迹聚合物对底物的结合量,并通过静态吸附分配系数 K_D 和分离因子 α 来表征^[15]。

静态吸附分配系数 K_D 的定义为 $K_D=C_p/C_s$,

式中, C_p 表示底物在聚合物上的浓度, $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; C_s 表示底物在溶液中的浓度, $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

分离因子 α 定义为 $\alpha=K_{Di}/K_{Dj}$

式中, i 和 j 分别表示模板分子和底物,规定 $i=j$ 时, $\alpha=1$ 。实验结果见表 1。

表 1 罗红霉素及阿奇霉素在 MIP 及 NIP 上的吸附量 Q 、静态吸附分配系数 K_D 和分离因子 α

Tab 1 Adsorption amount Q , distribution coefficient K_D and separation factor α of roxithromycin and azithromycin on MIP and NIP

样品底物	MIP			NIP		
	$Q/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	K_D	α	$Q/\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	K_D	α
罗红霉素	35.2	53.2	1	18.5	23.5	1
阿奇霉素	21.2	32.6	1.6	16.4	21.6	1.1

由表 1 可见,印迹聚合物对底物的吸附量和静态吸附分配系数均大于非印迹聚合物,表明印迹聚合物对模板分子产生了明显的印迹效应。在印迹聚合物中既存在与罗红霉素结合的功能基团,又有与罗红霉素的立体结构能互补的特定形状孔穴,这两种作用决定了印迹聚合物对模板分子的选择结合特性。

而在非印迹聚合物中功能基团的分布是任意的,没有与模板分子互补的分子识别位点,因此,尽管非印迹聚合物有着与印迹聚合物相同的化学组成,它对模板分子不显示特异选择性,仅靠弱的非选择性吸附作用结合底物,选择性降低。

3 结论

本试验以罗红霉素为模板分子,合成了 MIP 和相应的 NIP,并考察了 MIP 对模板分子的特异性吸附作用,研究结果证实了 MIP 对模板分子能够形成结构和大小特定的空穴,即具有“印迹”作用,对模板分子能产生良好的选择性和吸附作用。可望将其用作固相萃取剂,识别并分离富集(动物源性)食品中的罗红霉素,以期建立一种在线、快速、简单、灵敏度高、选择性好的测定罗红霉素的新方法。

REFERENCES

- [1] ZHANG Y Y. Pharmacological and clinical of roxithromycin [J]. Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2001, 21(2): 103-104.
- [2] REN T. The developments and applications of macrolide antibiotics [J]. Shanghai Med Pharm J (上海医药), 2000, 21(12): 5-7.
- [3] LI J, ZHAO H M, CHANG F F, et al. Determination of roxithromycin by spectrophotometry based on charge-transfer reaction with salicyl fluoride [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2009, 26 (8): 664-667.
- [4] HOU S Q, HUANG Z Q, WEI Z P. Analysis and preparations of domestic roxithromycin [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2000, 31(4): 184-186.
- [5] YU H J, CAI Y Q, GU R R. Analysis of erythromycin, clarithromycin and roxithromycin by high performance liquid chromatography with fluorometric detection [J]. Chin J Anal Lab (分析实验室), 2006, 25(6): 63-66.
- [6] WU P J, YANG J, SU Q D, et al. Rapid removal of template from molecularly imprinted polymers by accelerated solvent extraction [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2007, 5(4): 484-488.
- [7] CRAMEN C, LEIF S, ESTHER T, et al. Molecularly imprinted capillary electrochromatography for selective determination of thiabendazole in citrus samples[J]. J Chromatogr A, 2008, 1179(2): 216-223.
- [8] DAMIEN J, RAPHAEL D, FLORENT B, et al. Molecularly imprinted polymer of methyluridine for solid-phase extraction of pyrimidine nucleoside cancer markers in urine [J]. Bioorg Med Chem, 2008, 16(19): 8932-8939.
- [9] FERNANDO S, YASUNORI I, EMMANUEL P, et al. Toward an alternative for specific recognition of sulfated sugars. Preparation of highly specific molecular imprinted polymers [J]. Tetrahedron, 2007, 63(8): 1857-1862.
- [10] FANG Y J, YAN S L, NING B A, et al. Flow injection chemiluminescence sensor using molecularly imprinted polymers as recognition element for determination of maleic hydrazide [J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(8): 2323-2327.
- [11] LIU Y Q, XU L, YAN Y, et al. Development of molecularly imprinted polymer sensor [J]. J Instrum Anal (分析测试学报), 2007, 26 (3): 450-454.
- [12] XIANG H Y, ZHOU C S, ZHONG S A, et al. Synthesis of resveratrol imprinted polymer and its application in separation of active ingredient in *polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. extracts [J]. Chin J Appl Chem (应用化学), 2005, 22(7): 739-743.
- [13] WANG Y J, ZHANG J, ZHU X X, et al. Specific binding of cholic acid by cross-linked polymers prepared by the hybrid imprinting method [J]. Polymer, 2007, 48(19): 5565-5571.
- [14] YANMAMURA H I, KUHAR M J. Neurotransmitter Receptor Binding [M]. New York: Raven Press, 1985: 485-489.
- [15] WULFF G, VESPER R, GROBE-EINSLER R, et al. Enzyme-analogue built polymers, 4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates [J]. Macromol Chem Phys, 1977, 178(10): 2799-2816.

收稿日期: 2009-10-09