

文章编号:1001-6880(2015)1-0169-05

沉淀聚合法制备 1-脱氧野尻霉素 分子印迹聚合物微球及其性能研究

罗孟君^{*}, 邓凤君¹, 郭巧红¹, 陈宗高², 陈 波³¹ 益阳医学专科学校, 益阳 413000; ² 益阳市第一中学, 益阳 413000; ³ 湖南师范大学化学化工学院, 长沙 410081

摘要:本研究制备了1-脱氧野尻霉素分子印迹聚合物微球,考察溶剂、反应时间对分子印迹聚合物产率以及性能的影响。以1-脱氧野尻霉素为模板分子,α-甲基丙烯酸(MAA)为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)为交联剂,采用沉淀聚合法合成分子印迹微球,采用静态吸附及扫描电镜(SEM)的方法对微球进行表征。结果表明,当反应时间为24 h、乙腈为溶剂时,所制得印迹聚合物微球的形貌和吸附性能较好,对1-脱氧野尻霉素与N-甲基-1-脱氧野尻霉素的选择性分离因子 α 为2.26,说明分子印迹聚合物微球对1-脱氧野尻霉素分子有特异性吸附和识别能力。

关键词:沉淀聚合法;分子印迹聚合物;1-脱氧野尻霉素

中图分类号:TQ050.4⁺³

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.034

Study on the Synthesis and Performance of 1-Deoxynojirimyc in Molecularly Imprinted Polymer Micro-Spheres via Precipitation Polymerization

LUO Meng-jun^{1*}, DENG Feng-jun¹, GUO Qiao-hong¹, CHEN Zong-gao², CHEN Bo³¹ Yiyang Medical College, Yiyang 413000, China; ² No. 1 Middle School of Yiyang, Yiyang 413000, China;³ Chemical Engineering of Hunan Normal University, Changsha 410081, China

Abstract: The 1-deoxynojirimyc molecular imprinted polymer (MIP) microsphere was synthesized in this study. The influences of reaction conditions, including the category of solvent and reaction time on the morphology and adsorption properties of MIP microspheres were studied. 1-deoxynojirimyc MIP microspheres were prepared by precipitation polymerization with 1-deoxynojirimyc as template and ethyleneglycol dimethacrylate (EGDMA) as cross-linker. The microspheres were characterized by static adsorption and scanning electron microscopy (SEM). The results showed the reaction time was 24 h, and acetonitrile was the solvent. The 1-deoxynojirimyc MIP microspheres were regular microspheres. The MIP microspheres showed high adsorption capacity and the partition N-methyl-1-deoxynojirimycin of the microspheres adsorbing 1-deoxynojirimyc was 2.26. It showed that 1-deoxynojirimyc MIP microspheres had specific adsorption and recognition capabilities to 1-deoxynojirimyc molecules.

Key words: precipitation polymerization; molecular imprinted polymer; 1-deoxynojirimyc; microsphere

分子印迹技术(molecular imprinting technology, MIT)是指为获得在空间结构和结合位点上与某一分子(模板分子)完全匹配的聚合物的实验制备技术,常常被形容为制造识别“分子钥匙”的人工“锁”技术。分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer, MIP)是一类通过分子印迹技术合成的对特定目标分子(模板分子)及其结构类似物具有特异性识别和选择性吸附的聚合物。由于其能够特异性识

别印迹分子,因此近年来被广泛应用于色谱分离^[1]、膜分离^[2]、固相萃取^[3]、药物控制释放^[4]、化学传感^[5]、环境检测^[6]等领域。

1-脱氧野尻霉素(1-Deoxynojirimycin, DNJ)又名1-去氧野尻霉素,是一种哌啶类多羟基生物碱,化学名称(2R,3R,4R,5S)-2-羟甲基哌啶-3,4,5-三醇,通常为白色粉末,分子式为C₆H₁₃NO₄,其结构式如图1。

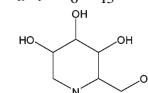


图1 1-脱氧野尻霉素结构式

Fig. 1 Chemical structure of DNJ

DNJ 是目前糖尿病治疗药物中唯一国际公认的零伤害生物制剂,具有对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用,是降血糖、治疗糖尿病的有效成分^[7,8],此外还具有抗病毒^[9,10]、抗肿瘤转移^[11]等药理作用。近年来,国内外学者对 DNJ 的来源、在生物体内的合成机制及化学合成方法进行了大量的研究探索,希望为找到一种稳定、高效、经济的获取 DNJ 的途径提供理论基础。

本研究以 DNJ 为模板分子,MAA 为功能单体,EGDMA 为交联剂,2,2'-偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂,乙腈为致孔剂,采用沉淀聚合法合成了对 DNJ 分子有特异性吸附、识别性能的 MIP 微球,用于 DNJ 的选择性吸附和富集。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1-脱氧野尻霉素标准品(批号:024K4076,美国 Sigma 公司);甲基丙烯酸(MAA,99%,美国 Sigma 公司);乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA,98%,科密欧);偶氮二异丁腈(AIBN,化学纯,阿拉丁试剂有限公司);乙腈(色谱纯,科密欧)

恒温水浴锅(HH-4,巩义市予华仪器有限责任公司);Agilent 1100 系列高效液相色谱仪,含 FLD 荧光检测器;扫描电子显微镜(SEM,Hitachi S-4300,日本日立公司);电子天平(AX-200,日本 Shimadzu Philippines 公司)

1.2 分子印迹聚合物微球的制备

1.2.1 溶剂的考察

准确称取 0.25 mmol 的 DNJ,分别溶于氯仿、乙腈、四氢呋喃、甲醇四种溶剂中,对其溶解能力进行观察。

1.2.2 反应时间的考察

在固定其他反应条件不变的前提下,采用不同的反应时间合成了 1-脱氧野尻 MIP 微球。通过对产率进行考察,从而确定最佳的反应时间。

1.2.3 DNJ 分子印迹聚合物微球的制备

称取 DNJ 溶于一定量乙腈中,加入功能单体 MAA,于室温下震荡 30 min,置于冰箱中过夜,使 DNJ 与 MAA 充分作用,然后加入交联剂 EGDMA 和引发剂 AIBN,充分混匀后,向混合液中通氮气 10 min 除氧后密封,将混合液置于恒温水浴箱,60 ℃热聚合聚合 24 h。聚合产物取出冷却至室温,离心获得聚合物沉淀,用 V(甲醇):V(乙酸)=9:1 溶液洗

掉模板分子和未聚合的功能单体和交联剂,直至洗脱液中检测不到模板分子,再用甲醇洗去过量的乙酸,于烘箱中 40 ℃ 真空干燥。所得聚合物为 MIP;同时按同样方法不加 DNJ 制备空白聚合物(NIP)。

1.3 吸附性能测定

1.3.1 标准曲线的绘制

准确称取 100.0 mg DNJ 标准品,用乙腈定容至 10 mL 容量瓶,得到 10 mg/mL 的 DNJ 标准溶液母液,然后根据母液配制 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 μ g/mL 的梯度标准溶液,按照文献^[14]所述柱前衍生-高效液相色谱法,用高效液相色谱-荧光检测器测定,测得 DNJ 峰面积 A,绘制 DNJ 溶液浓度与色谱峰面积值的工作曲线,并进行线性回归处理。

衍生化处理条件为:取 10 μ L DNJ 对照品溶液,依次加入 10 μ L 0.4 mol/L K_3BO_3 缓冲液(pH 8.5)、20 μ L 5 mmol/L FMOC-Cl 乙腈溶液,混匀后于 20 ℃ 下反应 20 min,加入 10 μ L 0.1 mol/L 甘氨酸水溶液以中止反应,反应液再加入到 950 μ L 0.1% 醋酸中,经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过后进行色谱分析。

色谱条件为:色谱柱为 Inertsil ODS-2 C₁₈(250 mm × 4.6 mm,5 μ m),流动相为乙腈:0.1% 醋酸水溶液(50:50,V/V),流速 1.0 mL/min,柱温 30 ℃,荧光检测器激发波长为 254 nm,吸收波长 322 nm,进样量 15 μ L。

1.3.2 聚合物吸附性能的测定

将 100.0 mg 1-脱氧野尻霉素 MIP 微球放入 40 mL 磨口锥形瓶中,分别加入不同浓度的 DNJ 乙腈溶液,室温振荡吸附 24 h,离心分离后,取上层清液,用柱前衍生-高效液相色谱法测定 DNJ 浓度,平行三次取平均值,根据吸附前后浓度变化计算聚合物的吸附量 Q(mg/g);绘制出吸附量 Q 与不同浓度关系的静态等温吸附曲线。同时考察 NIP 微球的吸附性能。

$$Q = (C_0 - C_e) \times V/m$$

其中:Co:吸附前溶液中 DNJ 的浓度(mg/mL);Ce:吸附后溶液中 DNJ 的浓度(mg/mL);m:称取的分子印迹聚合物的质量(mg);V:DNJ 溶液的体积(mL)。

1.3.3 吸附动力学测定

根据聚合物吸附性能测定结果,分别称取 100 mg MIP 和 NIP 微球至 50 mL 磨口锥形瓶中,分别加

入 25 mL 浓度为 0.5 mg/mL DNJ 乙腈溶液, 然后将其放入恒温振荡器中室温振荡。每隔 20 min 取 20 μL 溶液进行色谱分析, 测定溶液中 DNJ 浓度, 从而分析其吸附动力学性质。

1.4 MIP 微球的选择性考察

为了考察 MIP 微球的选择性识别性能, 选用 1-脱氧野尻霉素的结构类似物 N-甲基-1-脱氧野尻霉素作为竞争底物, 在浓度为 5.0 mmol/L 的乙腈溶液中进行平衡吸附实验, 测定达到平衡时溶液中的目标分子浓度, 并计算出分离系数 (KD) 及 1-脱氧野尻霉素与 N-甲基-1-脱氧野尻霉素的分离因子 (α), 其中, $KD = cp/cs$, cp (mmol/g) 表示聚合物结合底物的浓度, cs (mmol/L) 表示溶液中底物的平衡浓度, α

表 1 1-脱氧野尻霉素溶解性实验

Table 1 DNJ solubility experiment

溶剂 Solvent	用量 Dosage	现象 Phenomenon	致孔效果 Result
氯仿 Chlorform	20 mL	不溶 Not soluble	不好 Not good
乙腈 Acetonitrile	20 mL	溶解 Soluble	好 Good
四氢呋喃 Tetramethylene oxide	20 mL	不溶 Not soluble	一般 Common
甲醇 Methanol	20 mL	溶解 Soluble	不好 Not good

2.1.2 聚合时间的考察

在固定其他反应条件不变的前提下, 通过考察聚合产物产率随时间的变化关系, 对产率作图得到图 2, 由图可知, 聚合物产率随时间增长而增大, 当时间为 24 h 时, 得率为 85.4%, 此后时间增大, 产率随之增大的幅度已经很小, 因此, 本实验以 24 h 的聚合时间为最佳。

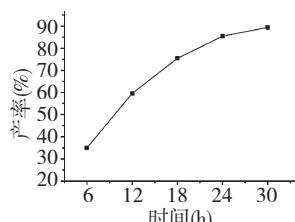


图 2 时间对聚合物产率的影响

Fig. 2 The influence of reaction time on polymerization rate

2.2 MIP 与 NIP 对 DNJ 吸附性能的考察

2.2.1 标准曲线

以色谱峰面积 A 对标准溶液浓度 C 进行线性回归, 得回归方程: $A = 317974C + 9983$, 相关系数 $R = 0.9982$, 结果表明在 1 ~ 10 μg/mL 之间, 线性关

为 2 种不同底物的分离系数之比。

1.5 聚合物微球扫描电镜分析

利用 Hitachi S-4300 SEM 对聚合物微球的表面结构和粒径进行分析。

2 结果与讨论

2.1 DNJ 分子印迹聚合物的制备

2.1.1 溶剂的选择

统一溶剂量为 20 mL, 溶解模板分子, 实验结果如表 1 所示, 只有乙腈和甲醇能够溶解模板分子, 结合印迹分子与功能单体之间的疏水作用, 应选择致孔效果较好的溶剂作为致孔剂, 综合考虑使用乙腈作为溶剂更合适。

表 1 1-脱氧野尻霉素溶解性实验

Table 1 DNJ solubility experiment

系良好。

2.2.2 吸附量的考察

分别考察了 MIP 与 NIP 对不同浓度 DNJ 溶液的吸附性能, 绘制出了相应的等温吸附曲线, 吸附详情见图 3。由图可知, 在 0.1 ~ 0.8 mg/mL 范围内, 吸附量与溶液浓度成正相关性, 当浓度达到一定程度, 吸附量不再升高, 达到饱和。而印迹聚合物的吸附量明显大于非印迹聚合物, 这是由于印迹聚合物中有预定的孔穴, 孔穴中有特定排列的功能基能够与模板分子产生作用, 而非印迹聚合物中则没有这种孔穴。

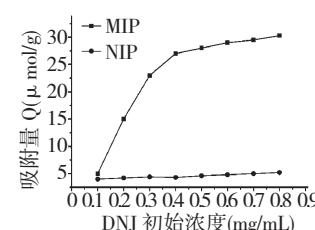


图 3 MIP 与 NIP 对 DNJ 分子的等温吸附曲线

Fig. 3 Adsorption isotherm of theophylline MIP and NMIP

2.2.3 MIP 与 NIP 微球的吸附动力学

对 MIP 与 NIP 微球进行吸附动力学测定, 结果如图 4。

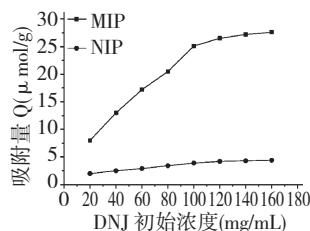


图 4 MIP 与 NIP 吸附动力学

Fig. 4 Kinetics of adsorption of MIP and NIP

由图 4 可知,随着时间增长,MIP 对 DNJ 的吸附量逐渐增大,当吸附时间达到 100 min,吸附接近饱和。NIP 对 DNJ 吸附量不大,随时间增长,也呈增大的趋势。

2.3 MIP 微球对底物的吸附选择性考察

本实验以与 1-脱氧野尻霉素结构类似的 N-甲基-1-脱氧野尻霉素作为竞争底物,在浓度为 5.0 mmol/L 的乙腈溶液中进行平衡吸附实验。实验结果如表 2 所示:

表 2 MIP 微球的选择性

Table 2 Selectivity of MIP microspheres

聚合物 Polymer	K_D (L/g)		
	1-脱氧野尻 霉素 DNJ	N-甲基- 1-脱氧野尻 霉素 N-DNJ	α
MIP	6.250	2.765	2.26
NIP	0.714	0.545	1.31

由表 2 可知,与 NIP 微球相比,MIP 微球对 DNJ 具有较好的选择性。

2.4 MIP 与 NIP 扫描电镜分析

用扫描电子显微镜(SEM)分别观测两种微球的形貌,扫描结果如图 5 所示:

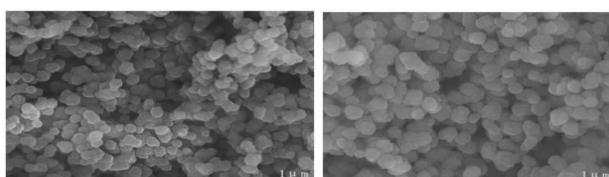


图 5 MIP(左)与 NIP(右)扫描电镜图

Fig. 5 The SEM photographs of MIP and NIP

由图 5 可以看出,实验中制备的 MIP 与 NIP 形态均一,除 NIP 粒径较 MIP 大外,彼此间无明显差异,这可能是由于模板分子 DNJ 的存在,使得聚合物生成过程中其分子内部结构形成固定形状的孔穴,从而空间排列发生了改变。

3 结论

本文采用沉淀聚合法制备了 1-脱氧野尻霉素分子印迹聚合物微球,并对其制备方法进行了初步优化。吸附性能考察实验说明,印记聚合物对 DNJ 分子能选择性吸附,MIP 吸附性能较 NIP 强。吸附选择性实验结果表明,相对于与 DNJ 结构相似的 N-甲基-1-脱氧野尻霉素,本实验所制备的 MIP 微球对 DNJ 有较强的选择结合特性。该方法简单易行,聚合物微球颗粒在 1 μm 左右,为开发天然产物中 1-脱氧野尻霉素的分离提纯新工艺提供了理论基础。

参考文献

- Yang Y(杨雨), Ouyang Z(欧阳臻), Chang Y(常钰), et al. Study on hypoglycemic effects of components in mulberry leaves. *Food Sci* (食品科学), 2007, 28:454-456.
- Gao WH(高文惠), Liu B(刘博), Pang J(庞军), et al. Determination of bitertanol and diniconazole in food by virtual-template molecularly imprinted solid phase extraction-HPLC. *Modern Food Sci Technol* (现代食品科技), 2013, 10:2504-2508.
- Yuan AH(原爱红), Ma J(马骏), Jiang XF(蒋晓峰), et al. Screening of glucosidase inhibitors from various fractions of mulberry leaves. *J Tongji Univ, Med Sci* (同济大学学报, 医学版), 2005, 26(4):8-11.
- Peng ZT(彭忠田), Shen C(申瑾), Tan DM(谭德明), et al. Anti-HBV activity of deoxynojirimycin derivatives *in vitro*. *China Pharm* (中国药房), 2007, 18:22-24.
- Dong JW(董建伟), Yang JT(杨军亭), Hou QE(侯清娥), et al. Determination of malachite green in environmental water samples by spectrophotometry with molecularly imprinted solid phase extraction. *J Food Safety Quality* (食品安全质量检测学报), 2013, 04:1200-1206.
- Dong SQ(董胜强), Li CX(李承溪), Zhu XF(朱秀芳), et al. Study on the preparation and property of coumarin molecularly imprinted composite membranes. *J Yunnan Univ* (云南大学学报, 自科版), 2014, 01:101-107.
- Allan G, Ouadid-Ahidouch H, Sanchez-Fernandez EM, et al. New castanospermine glycoside analogues inhibit breast cancer cell proliferation and induce apoptosis without affecting normal cells. *PLoS One*, 2013, 8:76411.
- Fuchs Y, Soppera O, Mayes AG, et al. Holographic molecularly imprinted polymers for label-free chemical sensing. *Adv Mater*, 2013, 25:566-570.

(下转第 152 页)