

Preparation of Surface Molecularly Imprinted Polymers for Erythromycin and Its Adsorption Properties

Didi Cheng, Caihong Liu*

College of Pharmaceutical, Taishan Medical University, Tai'an Shandong
Email: liuch7688@163.com

Received: Apr. 15th, 2017; accepted: May 7th, 2017; published: May 10th, 2017

Abstract

This study aims to prepare erythromycin imprinted polymers(EM-MIPs) by surface polymerization method at the surface of modified silica particles by using erythromycin(EM) as the template molecule. The synthesized EM-MIPs were characterized by scanning electron microscope (SEM) and particle size analysis. The results indicated that the MIPs layer has been successfully grafted on the surface of silica particles. The adsorption and recognition properties the obtained polymers were evaluated by static binding test, dynamic binding test and selective binding test. The results showed that EM-MIPs displayed higher recognition ability and adsorption capacity to the template molecule- EM.

Keywords

Surface Molecularly Imprinted Polymer, Erythromycin (EM), Molecular Recognition, Adsorption Properties

红霉素表面分子印迹聚合物的制备及其吸附性能研究

程迪迪, 刘彩虹*

泰山医学院, 药学院, 山东 泰安
Email: liuch7688@163.com

收稿日期: 2017年4月15日; 录用日期: 2017年5月7日; 发布日期: 2017年5月10日

*通讯作者。

摘要

采用表面分子印迹技术, 以红霉素(EM)为模板分子, 制备红霉素分子印迹聚合物(EM-MIPs)。利用扫描电镜和粒径分析对聚合物进行表征, 通过静态吸附平衡实验、动态吸附实验及选择性实验考察聚合物的吸附性能, 结果显示聚合物成功接枝在硅胶表面, EM-MIPs对红霉素具有良好的吸附性能和特异选择识别能力。

关键词

表面分子印迹聚合物, 红霉素, 分子识别, 吸附性能

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

红霉素(erythromycin, EM)是一种大环内酯类广谱抗生素, 在畜牧业中被广泛用于疾病的防治。禽畜养殖过程中不规范使用红霉素会造成动物源食品中的药物残留, 并通过食物链进入人体, 危害人类的健康。欧盟、美国及我国对 EM 最大残留量均有明确规定。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。目前, 检测 EM 及其残留的方法主要有 HPLC 及 LC-MS/MS [1] [2]等方法。这些方法均需要进行样品的前处理, 传统的前处理技术有液-液萃取、固相萃取等, 然而常用的萃取介质存在对目标物的特异性吸附不强, 对动物源性食品中痕量残留物质富集倍数不高等问题。

分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)是一类被精心裁制的, 对特定的模板分子有选择性结合的功能材料。由于 MIPs 具有特异识别性和较强的分离和富集能力, 因此可以作为优良的固相萃取介质[3] [4] [5] [6]。传统方法制备的 MIPs 存在印迹位点包埋过深、模板分子难以洗脱、产率低、传质速度较慢等缺点[7] [8]。近年来发展的表面印迹技术可将分子印迹位点置于具有良好可接近性的固体颗粒表面, 克服了传统分子印迹技术中的模板“包埋”现象, 所制备的表面分子印迹聚合物具有特异的选择性、更易接近的结合位点、快速的传质速率和较高的结合动力等优点[9]。

本研究采用表面印迹聚技术, 以红霉素为模板分子, 甲基丙烯酸为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 在改性硅胶表面制备红霉素分子印迹聚合物。利用扫描电镜和粒径测定对聚合物形貌和物理特性进行表征; 结合 HPLC 法, 采用静态吸附平衡实验、动态吸附实验及选择性吸附实验对红霉素分子印迹聚合物的吸附性能进行考察, 以期建立红霉素药物和食品中痕量红霉素药物残留的分离、富集方法提供实验依据。

2. 仪器与试剂

红霉素(EM)、罗红霉素(ROX)均由北京万佳首化生物科技有限公司提供; 硅胶(100-200 目)、甲基丙烯酸(MAA)、乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)、偶氮二异丁腈(AIBN)均购于国药集团化学试剂有限公司; 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)。MAA 使用前经旋转蒸发以除去阻聚剂; EDMA 使用前用 5%的氢氧化钠洗涤以除去阻聚剂。

2300 II 高效液相色谱仪(大连伊利特分析仪器有限公司); SHA-C 型水浴恒温振荡器(江苏省金坛市医疗仪器厂); 雷磁 PHS-3C 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司), LXJ-IIIB 低速大容量多管离心机(飞鸽牌); S-520 型扫描电子显微镜(日本日立公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

3. 方法

3.1. 红霉素表面印迹聚合物的制备

3.1.1. 硅胶的活化及改性

取 6 g 硅胶置于 50 mL 3 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液中, 常温静置 24 h, 然后用蒸馏水冲洗至中性, 抽滤, 60°C 下干燥 24 h, 得到活化硅胶。

取活化硅胶 5 g 和 50 mL 甲苯置于 100 mL 圆底烧瓶中, 缓慢加入硅烷偶联剂 APTES 2 mL 和三乙胺 1 mL, 90°C 下磁力搅拌回流 24 h。将反应后的硅胶用甲醇多次洗涤, 50°C 下真空干燥 24 h, 得到改性硅胶。

3.1.2. EM 表面分子印迹聚合物的合成

称取 0.1 g EM 置于 100 mL 甲醇中, 超声溶解, 加入 5 mL 单体 MAA 和 1.5 g 改性硅胶, 25°C 恒温振荡 6 h 进行预组装。再加入交联剂 EDMA 0.2 mL 和引发剂 AIBN 20 mg, 超声 30 min 后, 通 N₂ 30 min, 密封后 60°C 反应 24 h。反应结束后, 减压抽滤, 用甲醇/冰醋酸溶液(体积比为 9:1)洗涤 3 次, 以除去模板分子红霉素, 用丙酮冲洗, 最后用蒸馏水洗至中性, 真空干燥即得 EM 表面分子印迹聚合物。

非印迹聚合物(non-imprinted polymers, NIPs)的制备, 除不加入模板分子 EM 外, 其它步骤同上。

3.2. HPLC 条件

本实验中含量测定均采用 HPLC, 色谱柱: Hypersil BDS C 18 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 柱温: 25°C; 流速: 1.0 mL·min⁻¹。

红霉素色谱条件为: 流动相, 乙腈-磷酸盐缓冲液(pH = 8.2) (6:4, V/V); 检测波长, 215 nm。

罗红霉素色谱条件为: 流动相, 0.067 mol·L⁻¹ 磷酸二氢铵溶液(用三乙胺调节 pH = 6.5)-乙腈(65:35, V/V); 检测波长, 210 nm。

3.3. 聚合物吸附性能的考察

3.3.1. 聚合物的静态吸附实验

精密称定 EM-MIPs 20.0 mg, 放入 10 mL 锥形瓶中, 加入不同浓度的 EM 甲醇溶液各 4 mL, 充分混合后于 25°C 恒温空气振荡器内振荡 24 h。高速离心沉淀, 吸取上清液, 用 HPLC 测定平衡质量浓度, NIPs 按同样操作进行。平衡吸附量(Q)按公式(1)计算[10]。

$$Q(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}) = (\rho_0 - \rho_t) \times V \times 10^{-3} / m \quad (1)$$

式中: ρ_0 为吸附前 EM 的质量浓度(mg·mL⁻¹); ρ_t 为吸附后 t 时间溶液中 EM 的平衡质量浓度(mg·mL⁻¹); V 为 EM 溶液体积(mL); m 为 MIPs 或 NIPs 的质量(g)。

3.3.2. 聚合物的动态吸附试验

分别精密称定 20.0 mg EM-MIPs 和 NIPs 各 8 份, 于 10 mL 锥形瓶中, 加入 10 mL 一定浓度的红霉素溶液, 25°C 恒温空气振荡器内振荡, 分别于 0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5 h 取样, 离心, 测定上清液中游离红霉素的含量。

3.3.3. 聚合物的吸附选择性实验

分别精密称定 20.0 mg EM-MIPs 和 NIPs, 于 10 mL 锥形瓶中, 分别加入 $0.4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的红霉素溶液和罗红霉素溶液各 10 mL, 25°C 恒温空气振荡器内振荡 24 h, 离心, 取上清液, 测定游离含量。

4. 结果

4.1. 硅胶表面红霉素分子印迹聚合物的制备

先对硅胶颗粒进行酸活化处理, 使其表面含有羟基基团。偶联剂 APTES 与活化硅胶发生反应, 化学键合于硅胶微粒表面, 将氨基基团接枝在硅胶表面。加入的 EM 和 MAA 通过羧基与硅胶表面的氨基相互作用, 从而在硅胶表面发生聚合反应, 使聚合物层包覆在硅胶表面, 洗脱模板后, 形成 EM 表面分子印迹聚合物。

4.2. 聚合物的形貌表征

4.2.1. 扫描电镜

借助扫描电镜分别对活化硅胶和 EM-MIPs 的表面形貌特征进行了观察, 结果如图 1 所示。与活化硅胶相比, EM-MIPs 的表面更粗糙, 表明聚合物层在硅胶表面接枝成功。

4.2.2. 粒径分布测定

硅胶微粒和 EM-MIPs 微粒的粒径分布如图 2 所示。硅胶微粒的平均粒径为 $60.5 \mu\text{m}$, 表面包覆聚合物层的 EM-MIPs 微粒的平均粒径为 $80.4 \mu\text{m}$, 表明硅胶微粒表面形成了聚合物层, 粒径增大。

4.3. 聚合物吸附性能的考察

4.3.1. 静态吸附实验

聚合物的静态吸附实验结果如图 3 所示。随着溶液 EM 浓度从 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 升高到 $4.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 聚合物的吸附量均增加, 当溶液浓度增加至 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 聚合物对 EM 的吸附处于平衡状态, MIPs 和 NIPs 聚合物的饱和和吸附量分别为 $101.3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $70.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在整个吸附过程中, 随着 EM 初始浓度的升高, MIPs 的吸附量明显大于 NIPs 的吸附量, 可以看出 MIPs 对 EM 有明显的富集吸附的作用, 有特异的吸附能力。在制备过程中, EM 与 MAA 间存在氢键、静电作用力等非共价作用力, 使硅胶表面形成了能与 EM 分子相匹配且具有特异识别位点的三维孔穴结构, 因此 MIPs 除有同 NIPs 一样的非特异性吸附外, 还存在对模板分子的特异性吸附位点。

4.3.2. 动态吸附实验

聚合物的动态吸附实验结果如图 4 所示。随时间增加, 聚合物对模板分子 EM 的吸附量均呈增加趋势, 在 3 h 后吸附达到平衡, 且在任何时间段, MIPs 对 EM 的吸附量均明显高于 NIPs。

4.3.3. 吸附选择性实验

为考察 MIPs 对模板分子红霉素的选择性识别能力, 选择罗红霉素为类似物进行吸附选择性实验。用红霉素及罗红霉素为底物, 由平衡结合方法测定 MIPs 和 NIPs 对底物的结合量, 并计算静态吸附分配系数 K_D 和分离因子 α 。

MIPs 对分子的选择识别性能通常用静态分配系数 K_D 和分离因子 α 来表征[11]。

静态分配系数 K_D 的定义为:

$$K_D = C_p / C_s$$

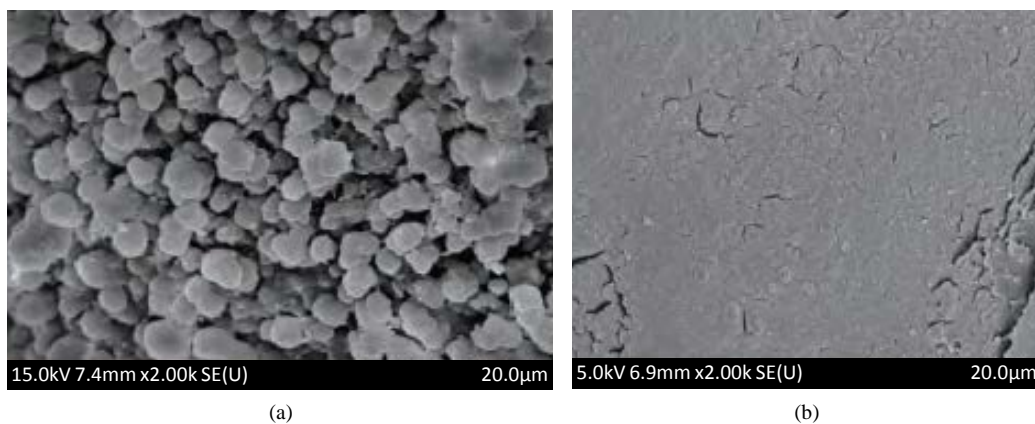


Figure 1. SEM images of (a) EM-MIPs and (b) activated silica gels

图 1. (a) EM-MIPs 和 (b) 活化硅胶的扫描电镜图

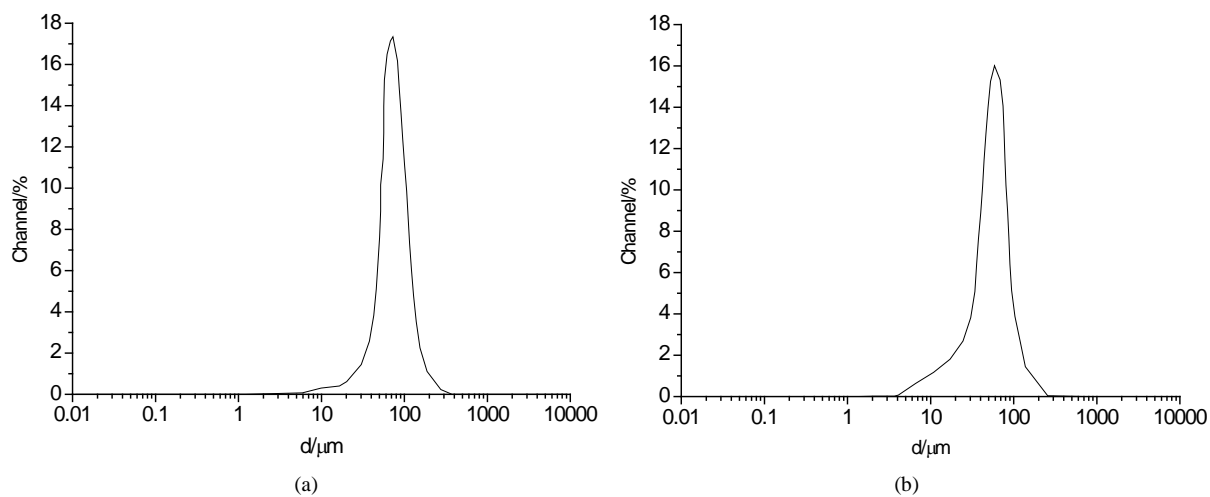


Figure 2. Size distribution of (a) silica gels and (b) EM-MIPs

图 2. (a) 硅胶微粒和 (b) EM-MIPs 粒径分布

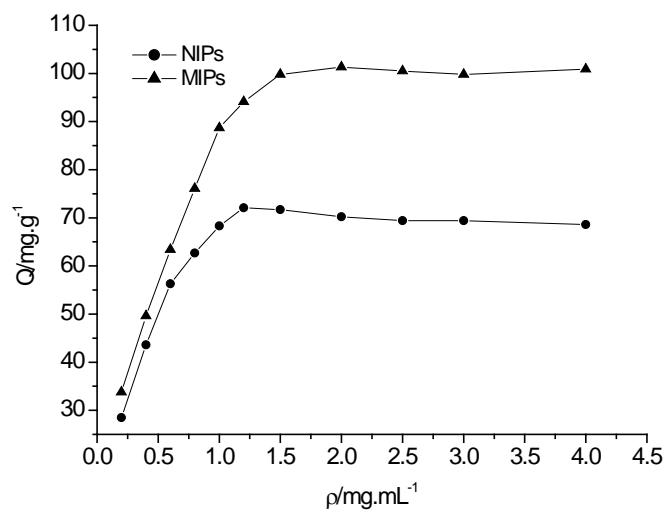


Figure 3. Adsorption isotherms of MIPs and NIPs

图 3. 聚合物的吸附等温线

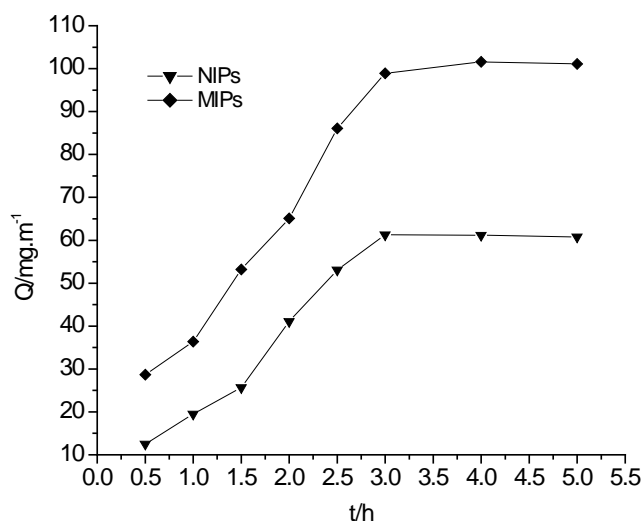


Figure 4. Adsorption dynamic curves of MIPs and NIPs
图 4. 聚合物的动态吸附曲线

Table 1. The recognizing ability of MIPs and NIPs
表 1. MIPs 和 NIPs 分子识别性能

聚合物	底物	K_D	α
MIPs	EM	0.145	2.10
	ROX	0.069	
NIPs	EM	0.067	1.03
	ROX	0.065	

式中, C_p 表示底物在聚合物中的浓度, C_s 表示底物在溶液中的浓度。 K_D 越大说明 MIPs 对底物的吸附能力越强。

分离因子 α 的定义为:

$$\alpha = K_{Di}/K_{Dj}$$

式中, K_{Di} 和 K_{Dj} 分别表示模板分子和竞争分子的静态分配系数。 α 越大表明 MIPs 对模板分子的选择专一性越好。若 $\alpha < 1$, 则表明 MIPs 对底物没有选择性; 若 $\alpha > 1$ 则表明, MIPs 对底物有一定的选择性。

由表 1 可见, MIPs 中红霉素的 K_D 明显大于罗红霉素的 K_D , 表明 MIPs 对红霉素的吸附能力更强。MIPs 中红霉素的 K_D 明显大于 NIPs 中红霉素的 K_D , 表明 MIPs 对红霉素分子产生了明显的印迹效应。 α 的数值表明 MIP 对模板分子红霉素有一定的选择性, 对罗红霉素没有选择性。

5. 结论

本实验以红霉素为模板分子采用表面分子印迹技术制备了红霉素分子印迹聚合物, 扫描电镜和粒径分析结果显示聚合物层已成功接枝在硅胶表面; 静态吸附平衡实验、动态吸附实验和吸附选择性实验结果表明 EM-MIPs 对 EM 具有良好的吸附性能和特异选择识别能力, 用于选择性分离、富集红霉素是可行的。

基金项目

国家级大学生创新创业训练计划(201510439080), 泰安市科技发展计划(2016NS1077)。

参考文献 (References)

- [1] 张晓燕, 郑定钊, 袁芳, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中的红霉素及其代谢物[J]. 分析测试学报, 2013, 32(9): 1131-1134.
- [2] 严丽娟, 张峰, 方恩华, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定动物饲料中的大环内酯类和林可胺类抗生素[J]. 色谱, 2010, 28(11): 1038-1042.
- [3] 龙泽荣, 徐微微, 鹿毅, 等. 分子印迹固相萃取-超高效液相色谱法测定河水中的碱性橙 II[J]. 理化检验-化学分册, 2014, 50(8): 937-743.
- [4] Zeng, H., Wang, Y.Z., Liu, X.J., *et al.* (2012) Preparation of Molecular Imprinted Polymers Using Bi- Functional Monomer and Bi- Crosslinker for Solid- Phase Extraction of Rutin. *Talanta*, **93**, 172-181. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.02.008>
- [5] 汤凯洁, 罗秋水, 余瑞龙, 等. 分子印迹固相萃取/高效液相色谱法测定猪肝中盐酸克伦特罗的方法研究[J]. 分析测试学报, 2016, 35(1): 115-118.
- [6] Saman, A.D., Alireza, H.N., Ebadullah, N., *et al.* (2014) Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for the Solid-Phase Extraction of Paracetamol from Plasma Samples, Followed Its Determination by HPLC. *Microchimica Acta*, **181**, 1823-1832. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1230-9>
- [7] 郑鹏磊, 罗智敏, 畅瑞苗, 等. 青霉噻唑酸表面分子印迹聚合物的制备及其吸附性能的考察[J]. 色谱, 2015, 33(9): 957-965.
- [8] 尹晓斐, 汤水粉, 刘玮, 等. 表面分子印迹技术研究进展[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2011, (5): 639-648.
- [9] Haupt, K., Linares, A.V., Bompart, M., *et al.* (2012) Molecularly Imprinted Polymers. *Topics in Current Chemistry*, **325**, 1-28. https://doi.org/10.1007/128_2011_307
- [10] Schwarz, L.J., Danylec, B. and Yang, Y.Z. (2011) Enrichment of (E)-Resveratrol from Peanut by Product with Molecularly Imprinted Polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 3539-3543. <https://doi.org/10.1021/jf104230f>
- [11] Yanmamura, H.I. and Kuhar, M.J. (1985) Neurotransmitter Receptor Binding. Raven Press, New York, 485-489.

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: aac@hanspub.org