

重组 α -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁

陈俊^{1,2}, 李利君², 倪辉², 肖安风^{2*} (1. 华侨大学化工学院, 福建 厦门 361021; 2. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 目的 利用重组 α -L-鼠李糖苷酶, 以柚皮苷为底物, 通过生物转化法制备普鲁宁。方法 以 HPLC 检测生物转化反应产物, 通过 DNS 法对酶促反应过程进行动态分析, 分析酶促反应动力学, 优化普鲁宁制备工艺。结果 重组 α -L-鼠李糖苷酶水解柚皮苷反应完全后, 可得到反应产物普鲁宁和鼠李糖; 生物转化法制备普鲁宁的最适反应温度为 60 °C、pH 值为 4.0、加酶量为 12 U·mL⁻¹、底物浓度为 2.0 g·L⁻¹, 在此最优工艺条件下, 94% 的柚皮苷转化为普鲁宁; 高浓度的 Mn²⁺、Fe²⁺ 能够促进柚皮苷转化生成普鲁宁; 重组酶对底物亲和力强, 酶促反应的米氏常数 K_m 为 1.02 μ mol·mL⁻¹, V_{max} 为 0.19 μ mol·mL⁻¹·min⁻¹。结论 利用重组 α -L-鼠李糖苷酶生物转化法制备普鲁宁, 转化率高、重现性好、产物易于分离, 可为普鲁宁功能研究、开发利用及改性等提供重要依据。

关键词: 重组 α -L-鼠李糖苷酶; 柚皮苷; 普鲁宁; 生物转化

中图分类号: R914 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2016)08-1025-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.08.015

Transformation of Prunin by Recombinant α -L-rhamnosidase

CHEN Jun^{1,2}, LI Lijun², NI Hui², XIAO Anfeng^{2*} (1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China; 2. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the transformation of prunin by recombinant α -L-rhamnosidase. **METHODS** The final product was identified by HPLC method. The dynamic conversion process was analyzed by DNS method, then the preparation process was optimized. **RESULTS** The transformation final products were prunin and rhamnose. The optimal conditions for transformation of prunin were 60 °C, pH 4.0, enzyme dosage 12 U·mL⁻¹, substrate concentration 2.0 g·L⁻¹. Under the optimal condition, 94% naringin could convert to prunin. High concentration of Mn²⁺ and Fe²⁺ could significantly accelerate transformation of prunin. The dynamic parameters of K_m and V_{max} were 1.02 μ mol·mL⁻¹ and 0.19 μ mol·mL⁻¹·min⁻¹ respectively. **CONCLUSION** The preparation of prunin by recombinant α -L-rhamnosidase has high conversion rate, good reproducibility, and the products were easy to separate.

KEY WORDS: recombinant α -L-rhamnosidase; naringin; pruning; transformation

柚皮苷(4',5,7'-三羟基二氢黄酮-7-鼠李糖葡萄糖苷)是一类二氢黄酮类化合物,是中药骨碎补、枳实、化橘红等的主要有效成分^[1]。在体内,大部分柚皮苷被肠道微生物代谢为柚皮素,进而发挥抗氧化、抗炎、降血脂等多种生物活性^[2-3]。体外研究发现,柚皮苷在柚苷酶作用下发生两步酶促反应:首先被 α -L-鼠李糖苷酶水解为普鲁宁和鼠李糖,普鲁宁在 β -D-葡萄糖苷酶的作用下水解为柚皮素和葡萄糖^[4]。近年来研究表明,普鲁宁具有降低胆固醇、抗氧化及抗病毒等功效^[5-7]。因而,分离纯化普鲁宁并对其生物活性进行研究,进而将其开发成功能食品或药品具有较好的前景。但柚苷酶是一种复合酶,反应的终产物为柚皮素,中间产物普鲁宁难以获得^[8]。因此,国内外学者将

目标转向 α -L-鼠李糖苷酶的研究,通过定向酶促反应合成普鲁宁^[9]。早期研究目标主要围绕天然来源 α -L-鼠李糖苷酶的分离纯化及酶学性质,近年来利用基因工程技术构建重组 α -L-鼠李糖苷酶成为热点^[10]。

在前期研究中,集美大学发酵工程研究室利用毕赤酵母表达系统构建了重组 α -L-鼠李糖苷酶,并建立了较稳定的发酵生产工艺。本研究利用重组酶,以柚皮苷为底物,通过生物转化法制备普鲁宁。通过酶促反应产物分析、生物转化条件优化,分析酶促反应动力学,确定重组 α -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁的最佳条件;并以此为基础,进行放大试验,为规模化酶法制备普鲁宁及相关应用研究提供理论依据。

基金项目:福建省教育厅科技项目(JA11160);福建省科技重点项目(2014Y0081)

作者简介:陈俊,男,博士生,副教授 Tel: (0592)6181487
Tel: (0592)6181487 E-mail: xxaaffeng@jmu.edu.cn

E-mail: chenjun@jmu.edu.cn *通信作者:肖安风,男,博士,教授

1 材料

1.1 菌种

含有重组质粒 pPIC9K-rha 的毕赤酵母 GS115 菌株由集美大学发酵工程研究室构建并保存。

1.2 仪器与试剂

Waters 1525 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Unic7200 紫外可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]。

柚皮苷(西安小草植物科技有限责任公司, 纯度 $\geq 98\%$); 鼠李糖(西安小草植物科技有限责任公司, 纯度 $\geq 98\%$); 普鲁宁(法国 Extrasynthese, Genay Cedex, 纯度 $\geq 98\%$); 甲醇、乙腈均为色谱纯。

2 方法

2.1 重组 α -L-鼠李糖苷酶的制备

将含有重组质粒 pPIC9K-rha 的毕赤酵母 GS115 进行活化; 活化后的菌液转接至液体培养基中继续培养, 检测 $OD_{600} \geq 3.0$ 后收集菌体, 重悬后置于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养, 进行重组 α -L-鼠李糖苷酶的诱导表达; 诱导的菌液每隔 24 h 取样 1 次, HPLC 进行酶活检测^[11-12], 符合要求后用于相关实验。

2.2 重组 α -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁

2.2.1 重组 α -L-鼠李糖苷酶转化柚皮苷制备普鲁宁 在 20 mL 反应体系中, 以柚皮苷为底物, 利用重组 α -L-鼠李糖苷酶, 控制反应条件, 制备普鲁宁, 制备过程见图 1。

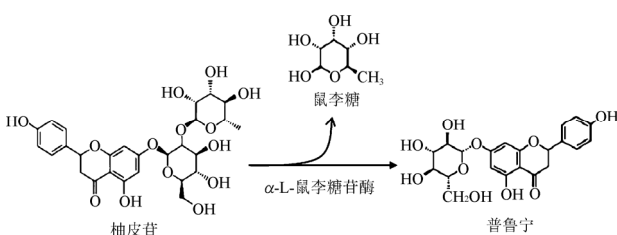


图 1 α -L-鼠李糖苷酶酶促转化制备普鲁宁

Fig. 1 The transformation of prunin by α -L-rhamnosidase

2.2.2 酶促转化反应产物分析 以 HPLC 对底物柚皮苷在重组 α -L-鼠李糖苷酶催化作用下生成的产物进行检测分析。

色谱条件: Symmetry C₁₈ 反相柱, 流动相: 水-甲醇-乙腈, 梯度洗脱^[13], 柱温: $35\text{ }^\circ\text{C}$, 紫外检测波长: 280 nm , 进样体积: $20\text{ }\mu\text{L}$, 流速: $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 走样时间: 23 min 。

2.2.3 酶促转化反应产物的分离 将预处理好的大孔吸附树脂湿法上柱, 然后将反应液以

$1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率通过树脂, 上样后用 3 倍去离子水进行洗脱, 检测到水洗液中不再有还原糖后, 改用 70%乙醇进行洗脱, 流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 收集器收集后浓缩干燥, 即得普鲁宁样品。

2.3 DNS 法分析普鲁宁生成反应进程

酶促转化反应的产物分析结果表明, 在一定条件下, 柚皮苷转化生成相同当量的普鲁宁和鼠李糖, 故采用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法测定酶解产物还原糖的生成量, 来评价普鲁宁生成反应进程^[14]。取 0.2 mL 鼠李糖标准溶液($0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)于试管中, 加入 0.6 mL DNS 溶液, 摇匀, $100\text{ }^\circ\text{C}$ 显色反应 15 min , 反应结束后迅速以流水降温, 定容至 5 mL , 测定 Abs_{520} , 制备标准曲线; 取 0.2 mL 酶促反应液, 同上进行测定, 依据标准曲线来计算反应液中还原糖即鼠李糖的生成量, 计算普鲁宁转化率, 分析重组 α -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁的反应进程, 计算公式如下:

$$\text{普鲁宁转化率}(\%) = \frac{\text{鼠李糖生成量} \times \text{柚皮苷相对分子质量}}{\text{鼠李糖相对分子质量} \times \text{柚皮苷总质量}} \times 100\%$$

其中鼠李糖相对分子质量为 182.11, 柚皮苷相对分子质量为 580.53。

2.4 重组 α -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁的条件优化

在 20 mL 反应体系中, 分别考察不同底物浓度、加酶量、温度、pH 值以及金属离子对普鲁宁生成作用的影响。反应及检测条件: $50\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温振荡水浴锅反应 5 h , 间隔一定时间取样, 沸水灭活 10 min , 流水冷却, 测定反应体系中还原糖含量, 计算普鲁宁转化率, 优化生物转化法制备普鲁宁的工艺。

2.5 重组 α -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁的动力学分析

以不同浓度柚皮苷为底物, 在酶用量为 $12\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 值为 4.0, 温度为 $60\text{ }^\circ\text{C}$, 振荡速率为 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下测定反应初速率, 以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/[I]$ 为纵坐标制作 Lineweaver-Burk 双倒数拟合曲线, 求出 K_m 值和 V_{\max} 值, 分析重组 α -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁的动力学特征。

3 结果

3.1 HPLC 检测生物转化反应产物

随着酶促反应的进行, 产物普鲁宁逐渐增多, 至反应结束, 底物基本全部转化成普鲁宁, 说明重组 α -L-鼠李糖苷酶可以定向水解柚皮苷生成普鲁宁。色谱图见图 2。

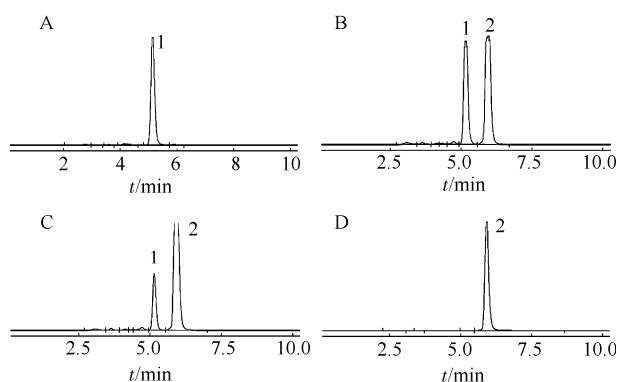


图2 酶促转化反应各阶段产物的高效液相色谱图
A-反应 0 h; B-反应 2 h; C-反应 4 h; D-反应 5 h; 1-柚皮苷; 2-普鲁宁。

Fig. 2 HPLC chromatography of the reaction product in different stages of enzymatic hydrolysis
A-reaction 0 h; B-reaction 2 h; C-reaction 4 h; D-reaction 5 h; 1-naringin; 2-prunin.

3.2 DNS 法检测生物转化产物普鲁宁

利用 DNS 法检测结果绘制标准, 回归方程为 $y=0.9509x-0.0679$, 线性相关系数 $R^2=0.9996$ 。在 $0\sim 2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, A_{520} 与标准溶液浓度成正比, 可用于生物转化产物普鲁宁的检测。

3.3 酶量对普鲁宁转化效率的影响

酶量的增加对生物转化反应初速率影响不大, 但是 1 h 后反应速率逐渐加快, 这与大多数水解酶用量的影响作用一致。根据产物转化率变化趋势以及经济成本, 确定利用 α -L-鼠李糖苷酶生物转化法制备普鲁宁的最适加酶量为 $12\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结果见图 3。

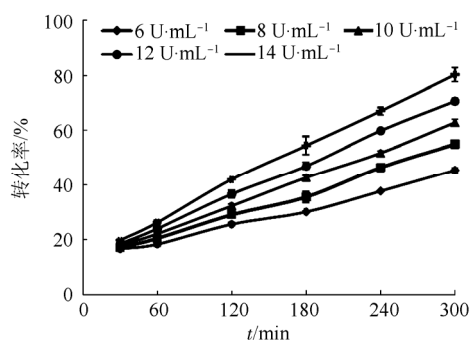


图3 酶量对普鲁宁转化效率的影响

Fig. 3 Effects of enzyme dosage on transformation of prunin

3.4 底物浓度对普鲁宁转化效率的影响

底物浓度较低时, 底物易被酶所饱和, 酶反应较快达到平衡; 底物浓度增大, 酶与底物接触的机会也随之增大, 酶反应速率相应加快, 但反应达到平衡的时间也会变长。当底物浓度达到

$2.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 240 min 后反应速率减慢, 转化率升高幅度不大, 产物对反应表现出一定的抑制作用, α -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁的底物浓度以 $2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为宜。结果见图 4。

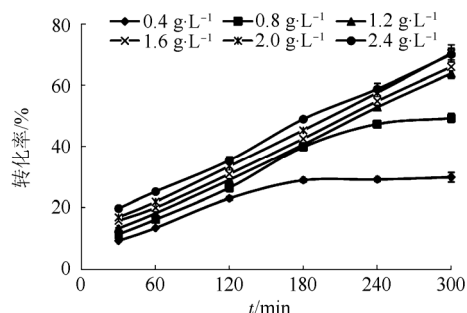


图4 底物浓度对普鲁宁转化效率的影响

Fig. 4 Effects of substrate concentration on transformation of prunin

3.5 pH 对普鲁宁生成作用的影响

在 pH 2.5 体系中, 反应后期转化率没有变化, 酶活可能丧失; 当 pH 为 3.5 和 4.0 时, 反应速率和转化率基本相同, 但 pH 4.0 反应更快达到平衡; 当 pH 继续增大时, 反应后期的酶活也受到抑制, 因此确定 α -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁的最适反应 pH 为 4.0。结果见图 5。这与真菌来源 α -L-鼠李糖苷酶的最适 pH 相似(4.0~7.0), 但与细菌来源酶的最适 pH(6.0~8.0)有差异^[15-17]。在不同 pH 环境中, 底物分子的解离状态不同, 影响酶与底物的结合; 过高或过低的 pH 条件甚至会导致酶蛋白变性而失活。

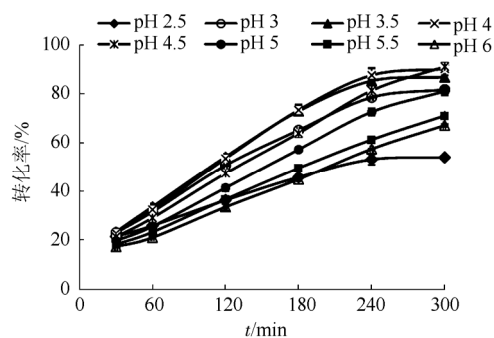


图5 pH 值对普鲁宁转化效率的影响

Fig. 5 Effect of pH value on transformation of prunin

3.6 温度对普鲁宁生成作用的影响

当反应温度由 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 逐步增至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 分子运动速率逐渐加快, 转化率快速增加, 反应达到平衡的时间缩短, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下反应 240 min 时柚皮苷转化基本完全; 而当升温至 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 柚皮苷转化率较低, 且没有变化, 说明酶可能受热变性, 丧失活力; 故确定 α -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁的适

宜温度为 60 °C。结果见图 6。这与其他微生物来源的 α -L-鼠李糖苷酶的最适反应温度(45~60 °C)相似, 只有极少的嗜热细菌产生的 α -L-鼠李糖苷酶的最适温度可达 70 °C^[18-20]。

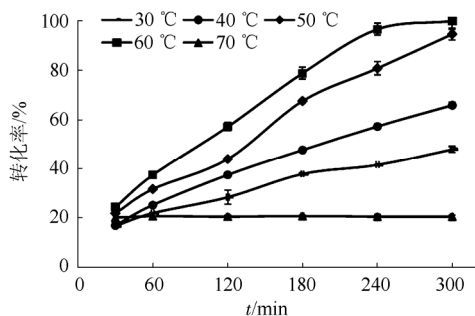


图 6 温度对普鲁宁转化效率的影响

Fig. 6 Effects of temperature on transformation of prunin

3.7 金属离子对普鲁宁转化效率的影响

在生物转化反应体系中, 金属离子类型会影响转化效率。在 5 mmol·L⁻¹ 浓度下, Mn²⁺、Fe²⁺ 对酶促转化反应有明显的促进作用, Mg²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Cu²⁺、Ca²⁺ 对生物转化反应有一定的促进作用, K⁺ 对转化反应影响不大, 而 Fe³⁺ 对转化反应有抑制作用。结果见图 7。

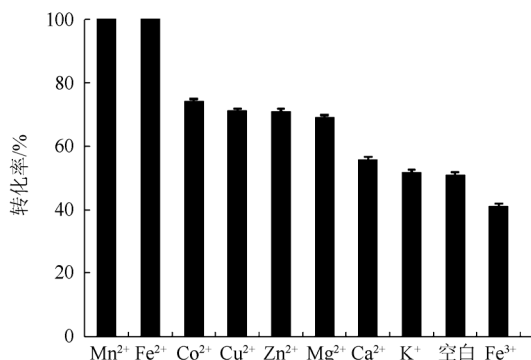


图 7 金属离子对普鲁宁转化效率的影响

Fig. 7 Effects of metal ions on transformation of prunin

3.8 Mn²⁺浓度对普鲁宁生成作用的影响

在重组 α -L-鼠李糖苷酶生物转化过程中, 随着 Mn²⁺浓度的增大, 酶促转化率大幅增大。当加入 10 mmol·L⁻¹ 的 Mn²⁺时, 30 min 时柚皮苷已全部转化成普鲁宁, 高浓度的 Mn²⁺对酶促转化反应有很好的促进作用, Mn²⁺有可能作为生物转化反应体系的促进剂。结果见图 8。

3.9 Fe²⁺浓度对普鲁宁生成作用的影响

低浓度 Fe²⁺对普鲁宁转化效率的影响不明显, 但随着浓度的增加, 柚皮苷转化生成普鲁宁的效率增大, Fe²⁺浓度为 10 mmol·L⁻¹时, 30 min 可使

转化率>90%。结果见图 9。由于 Fe³⁺对转化反应有抑制作用, 在后续研究中要将关注反应体系中 Fe²⁺/Fe³⁺的变化规律。

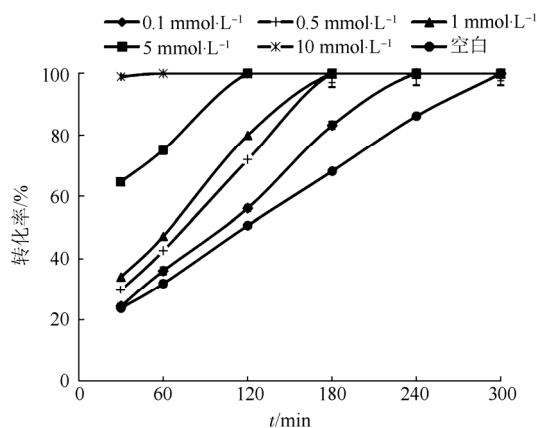


图 8 Mn²⁺浓度对普鲁宁转化效率的影响

Fig. 8 Effects of Mn²⁺ concentration on transformation of prunin

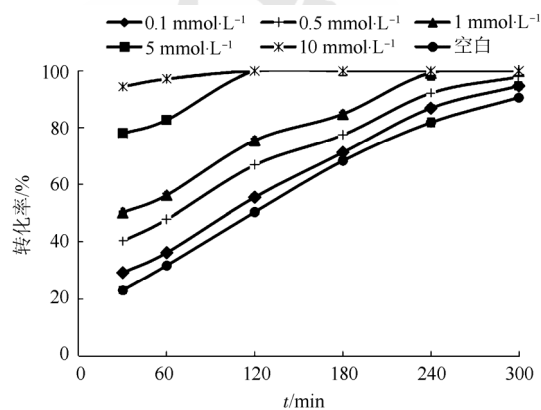


图 9 Fe²⁺浓度对普鲁宁转化效率的影响

Fig. 9 Effects of Fe²⁺ concentration on transformation of prunin

3.10 优化工艺的验证及放大试验

采用优化后的工艺条件进行 20 mL 验证试验和 1 L 放大试验, 结果表明, 采用最优工艺进行酶促转化效率大于未优化前, 在 1 L 反应体系中, 反应趋势基本不变, 说明利用该工艺制备普鲁宁具有良好的重现性。结果见图 10。

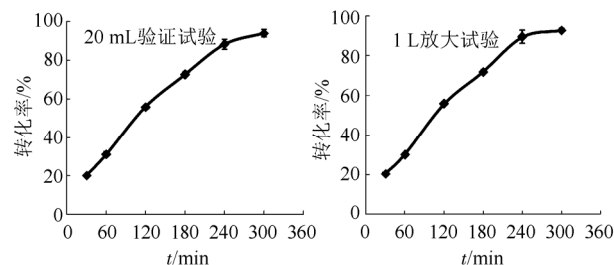


图 10 最优工艺验证试验及 1 L 放大试验

Fig. 10 The optimal process validation test and 1 L reaction system

3.11 酶促反应动力学

以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/[V]$ 为纵坐标制作 Lineweaver-Burk 双倒数曲线, 得到拟合方程为 $y=5.313 5x+9.041 1$, $R^2=0.954 2$ 。计算酶促反应的米氏常数 $K_m=588 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}(1.02 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1})$, $V_{\text{max}}=0.011 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}(0.19 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$ 。与 Birgisson 等^[21]报道的重组 α -L-鼠李糖苷酶 K_m 相比较, 本实验室构建制备的重组 α -L-鼠李糖苷酶对底物有较强的亲和力, 在柚皮苷底物浓度较低时具有较大的反应速率, 从而有利于产物普鲁宁的生成。

4 讨论

以柚皮苷为底物, 控制 α -L-鼠李糖苷酶的酶促转化条件, 可获得产物普鲁宁。早期使用的 α -L-鼠李糖苷酶, 主要通过细菌(包括芽孢杆菌、拟杆菌、乳杆菌、链霉菌等)和真菌(包括黑曲霉、白曲霉、棘孢曲霉、青霉菌等)来获取^[22-23], 但这些酶的纯度不高, 普鲁宁产率低, 制备成本较高, 价格较贵, 难以直接用于普鲁宁的规模化、产业化制备。本实验已构建了含有重组质粒 pPIC9K-rha 的毕赤酵母 GS115 菌株, 并建立了发酵中试工艺, 获得的重组 α -L-鼠李糖苷酶可以将柚皮苷末端 α -L-鼠李糖基进行特异性水解, 终产物只有 L-鼠李糖及普鲁宁, 产物易于分离纯化。

经过工艺优化, 生物转化法制备普鲁宁的最适条件如下: 反应温度 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 、酶量 $12 \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $\text{pH} 4.0$ 、底物浓度 $2.0 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 柚皮苷转化生成普鲁宁效率达 94% 。高浓度的 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 对柚皮苷转化生成普鲁宁有很好的促进作用。通过最优工艺条件验证及 1L 放大试验证明了该优化工艺具有良好的重现性。重组 α -L-鼠李糖苷酶制备普鲁宁酶促反应的 K_m 为 $1.02 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, V_{max} 为 $0.19 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, 对底物亲和力强, 有利于产物普鲁宁的生成。利用重组 α -L-鼠李糖苷酶以生物转化法制备普鲁宁, 条件温和、转化率高、产物易于分离、重现性好, 可为普鲁宁改性及开发利用提供重要依据。

REFERENCES

- [1] LIN G R. Study on enrichment and function of naringin from Shaddock Peel [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(10): 1197-1202.
- [2] ZHU H P, XIONG Y Q. Overview and progress on the study of the pharmacokinetics of naringin [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学), 2013, 18(11): 1297-1303.
- [3] SU J Y, LI X M. Effects of naringin on cerebral vasospasm and apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(1): 42-45.
- [4] GERSTORFEROVA D, FLIEDROVA B, HALADA P, et al. Recombinant α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of rutin [J]. Process Biochem, 2012, 47(5): 828-835.
- [5] CHANG H Y, LEE Y B, BAE H A, et al. Purification and characterisation of *Aspergillus sojae* naringinase: The production of prunin exhibiting markedly enhanced solubility with *in vitro* inhibition of HMG-CoA reductase [J]. Food Chem, 2011(124): 234-241.
- [6] SALAS M P, CELIZ G, GERONAZZO H, et al. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species [J]. Food Chem, 2011, 124(4): 1411-1415.
- [7] CÉLIZ G, ALFARO F F, CAPPELLINI C, et al. Prunin- and hesperetin glucoside-alkyl ($\text{C}_4\text{-C}_{18}$) esters interaction with Jurkat cells plasma membrane: consequences on membrane physical properties and antioxidant capacity [J]. Food Chem Toxicol, 2013(55): 411-423.
- [8] ZANG L H, FANG B S. Research progress and application of microbial origin naringinase [J]. Chem Ind Eng Prog(化工进展), 2013, 32(5): 1108-1115.
- [9] HU Q F, LI L J, CHEN Y H, et al. Purification of α -L-rhamnosidase from the solid-state fermentation product of *aspergillus niger* and its application in enzymatic production of prunin [J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2015, 31(1): 107-114.
- [10] SPOHNER S C, ZAHN D, SCHAUM V, et al. Recombinant α -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of α -l-rhamnose from steviol glycosides [J]. J Mol Catal B: Enzymatic, 2015, 122: 248-254.
- [11] CHEN Y L. Structure and characterization of the naringinase from *Aspergillus aculeatus* JMU db058 for the Hydrolysis of Naringin [D]. Xiamen: Ji Mei University, 2012.
- [12] NI H, CAI H N, XIAO A F, et al. Improved purification of α -L-rhamnosidase from *Aspergillus niger* naringinase [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2011(27): 2539-2544.
- [13] PARI L, AMUDHA K. Antioxidant effect of naringin on nickel-induced toxicity in rats: an *in vivo* and *in vitro* study [J]. Int J Pharm Sci Res, 2011, 2(1): 151-158.
- [14] NUNES M A, VILA-REAL H, FERNANDES P C, et al. Immobilization of naringinase in PVA-alginate matrix using an innovative technique [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2010, 160(7): 2129-2147.
- [15] YADAV S, YADAVA R S S, YADAV K D S. An α -L-rhamnosidase from MTCC-2879 and its role in debittering of orange juice [J]. Int J Food Sci Technol, 2013, 48(5): 927-933.
- [16] YADAV S, YADAVA S, YADAV K D S. Purification and characterization of α -L-rhamnosidase from MTCC-2011 [J]. Process Biochem, 2013, 48(9): 1348-1354.
- [17] ROJAS N L, VOGET C E, HOURS R A, et al. Purification and characterization of a novel alkaline-L-rhamnosidase produced by *Acrostalagus luteo albus* [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2011, 38(9): 1515-1522.
- [18] TAKUYA K, YUICHIRO M, NAHOKO N, et al. Characterization of α -L-rhamnosidase from and its gene [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 80(6): 1007-1013.
- [19] BIRGISSON H, HREGGVIDSSON G O, FRIDJ NSSON O H, et al. Two new thermostable α -L-rhamnosidases from a

- novel [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2004, 34(6): 561-571.
- [20] ORRILLO A G, LEDESMA P, DELGADO O D, et al. Cold-active α -L-rhamnosidases from psychrotolerant bacteria isolated from a sub-Antarctic ecosystem [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 40(2): 236-241.
- [21] BIRGISSON H, HREGGVIDSSON G O, FRIDJÓNSSON O H, et al. Two new thermostable α -L-rhamnosidases from a novel thermophilic bacterium [J]. *Enzyme Microb Technol*,

2004, 34(6): 561-571.

- [22] YADAV V, YADAV PRAMOD P K, YADAV S, et al. α -L-Rhamnosidase: A review [J]. *Process Biochem*, 2010, 45(8): 1226-1235.
- [23] WANG Y J. Purification and Characterization of α -L-rhamnosidase in *Enterococcus durans* [D]. Jinan: Shandong Institute of Light Industry, 2011.

收稿日期: 2016-01-12

利多卡因表面分子印迹聚合物的制备及其吸附特性研究

贾宝秀, 谢云兰, 李莉, 王仁亮(泰山医学院药学院, 山东 泰安 271016)

摘要: 目的 采用分子印迹技术制备利多卡因二氧化硅表面分子印迹聚合物, 探究其吸附特性, 用于选择性吸附、富集利多卡因。方法 利用分子印迹技术, 以利多卡因为模板分子, 通过溶胶-凝胶法制备利多卡因二氧化硅表面分子印迹聚合物, 并通过静态吸附平衡试验、动态吸附试验、扫描电镜、红外光谱研究聚合物的吸附特性、结构及形貌特征。结果 与化学组成相同的非印迹聚合物相比, 印迹聚合物具有良好的吸附性。结论 将该印迹聚合物用于选择性吸附、富集利多卡因是可行的。

关键词: 纳米二氧化硅; 分子印迹; 利多卡因

中图分类号: R944.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)08-1030-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.08.016

Preparation of Lidocaine Nano Silica Surface Molecular Imprinted Polymers and Its Binding Characteristics

JIA Baoxiu, XIE Yunlan, LI Li, WANG Renliang(*College of Pharmaceutical, Taishan Medical University, Tai'an 271016, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare lidocaine nano silica surface molecular imprinted polymers using molecular imprinting technique, and explore its adsorption properties for selective adsorption and enrichment of lidocaine. **METHODS** A nano silica surface molecular imprinted polymer was prepared by sol-gel method, in which lidocaine was template molecule. Equilibrium binding experiment was used to investigate the adsorption dynamics, the binding ability to template molecule and the substrate selectivity. The Scatchard analysis was used to study that the MIPs' binding characteristic to template molecule. **RESULTS** Compared with the same chemical composition of non imprinted polymer, the polymer had good adsorption. **CONCLUSION** Systematic study on recognition properties of nano silica surface molecular imprinted polymer is carried out. It is found that the imprinted polymer shows good binding characteristics to lidocaine.

KEY WORDS: nano silica; molecular imprinted; lidocaine

利多卡因(结构式如图 1), 是目前防治急性心肌梗死及各种心脏病并发快速室性心律失常药物, 是急性心肌梗死的室性早搏, 室性心动过速及室性震颤的首选药^[1]。利多卡因血药浓度达到一定高度, 可产生中枢神经系统及心血管系统的毒性反应, 一般认为利多卡因一次用量不能 $>7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 总用量不能 $>400 \text{ mg}$; 利多卡因血药浓度 $6 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 可频发严重不良反应。

因此, 有必要对患者体内的利多卡因浓度进行监测。复杂样品中痕量物质的分析因其基体的多样性和复杂性、待测组分含量低, 而使样品前处理成为整个分析过程中的关键环节。

由分子印迹技术(MIT)所制备的分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)具有高选择性及特异识别功能, 近年来广泛应用于在食品^[2-3]、药物分析^[4-7]、环境分析^[8-9]等领域。

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2013HL061); 泰安市科技发展计划(2015NS2124)

作者简介: 贾宝秀, 女, 硕士, 副教授 Tel: 18653866737 E-mail: jiabaixiu@163.com