

s 磁性聚苯乙烯微球固定化辅酶维生素 B₆ 条件的研究

杜崇旭 曹 巍 范圣第*

(大连民族学院生物工程系 辽宁大连 116600)

摘 要 以自制的复合微球为载体, 研究并确定了以戊二醛为交联剂, 维生素 B₆——主要是盐酸吡哆醇的最佳固定化条件, 诸如: 戊二醛浓度、时间、温度等。

关键词 分散聚合 固定化 维生素 B₆

Study on Immobilization of Vitamin B₆ with Magnetic Polystyrene Microspheres

Du Chongxu, Cao Wei, Fan Shengdi*

(Department of Biochemical Engineering, Dalian Nationalities University, Dalian Development Zone 116600)

Abstract In this paper, vitamin B₆ especially pyridoxol was immobilized on the self-prepared composite microspheres with glutaraldehyde by cross-linking reaction. At the same time, the optimum immobilizational conditions were studied, such as glutaraldehyde density, reaction time and temperature etc.

Key words Dispersion polymerization, Immobilization, Vitamin B₆

辅酶物质具有如下特点: 辅酶和相应的酶蛋白有一定的亲和性; 辅酶和某些不具活性的酶结合后, 能使其产生活性; 辅酶物质本身的催化活性很弱, 但是它们与特定的高分子物质相结合后催化效力会大大提高。辅酶物质固定化后, 将会产生新的特性, 开拓新的应用, 例如: 做成酶的亲和吸附剂; 为酶提供可循环使用的必需的辅酶物质; 制备“人工催化剂”, 为研究酶的作用机制及酶在体内的作用规律提供实验模型。

维生素 B₆ 包括吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺、磷酸吡哆醛、磷酸吡哆胺。其中磷酸吡哆醛、能使一个氨基酸底物 α -碳原子上的三个键之一变的不稳定, 从而能催化转氨、脱羧、醇醛缩合、外消旋化及 b 或 g 位取代反应(如下图 1 所示)。

为了进一步提高维生素 B₆ 及其衍生物的生物学功能以及催化活性, 特别是提高其在非水相中对非天然产物进行转化的能力, 对辅酶维生素 B₆ 及其衍生物进行固定化研究有着重要的意义。

磁性功能高分子微球, 是指通过适当的方法使有机高分子与无机磁性物质结合起来, 形成的具有一定磁性及特殊结构的微球^[1]。它同时兼具高分子微球的众多特性和磁响应性, 不但能通过共聚及表面改性等方法赋予其表面功能基(如—OH、—COOH、—CHO、—NH₂、—SH), 使其作为生物活性物质的载体^[2], 还能在外加磁场的作用下, 方便快速地分离。笔者通过合成

杜崇旭 男, 39 岁, 博士, 现从事有机合成、酶的固定化的研究。E-mail: dcx@dlnu.edu.cn *联系人

国家自然科学基金资助项目(29672005)

2002-12-06 收稿, 2003-06-01 修回

系列磁性功能高分子微球作载体, 对辅酶维生素 B₆ 及其衍生物的固定化进行了研究。

本文通过对磁性聚苯乙烯高分子微球的合成, 并以此作为载体, 对辅酶维生素 B₆ 的固定化条件进行了探讨, 为今后对辅酶维生素 B₆ 及其衍生物的固定化, 以及固定化后的生物学功能的研究提供了依据。

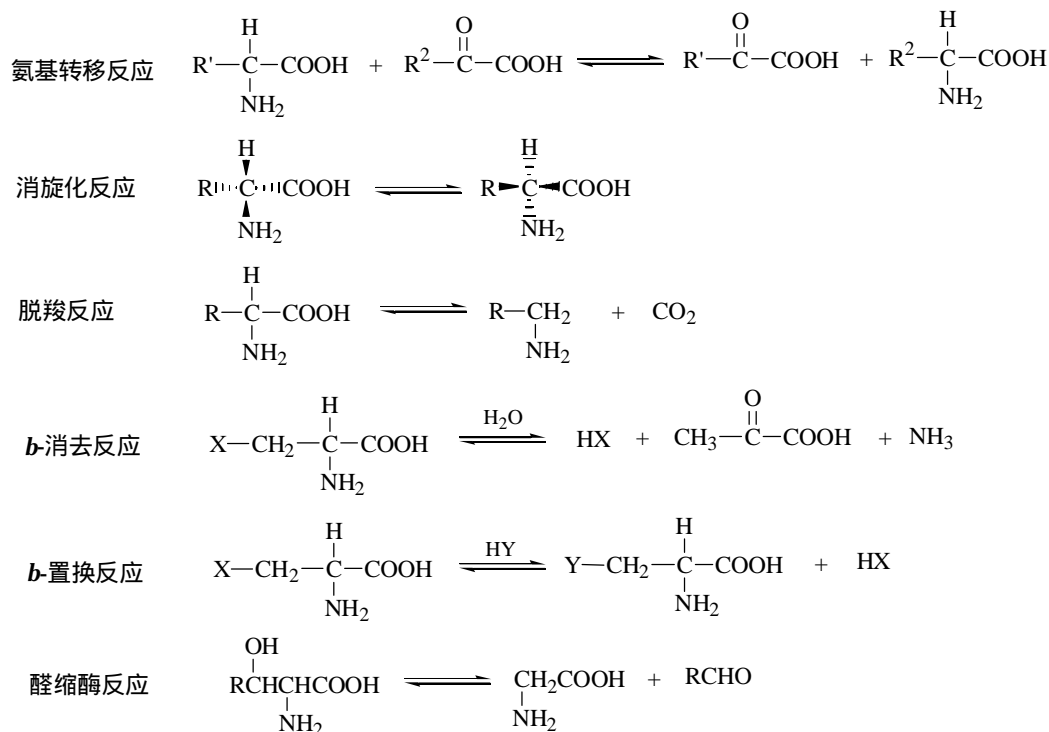


图 1 维生素 B₆ 参与的催化反应

Fig.1 Catalytic reaction participated by vitamin B₆

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 苯乙烯、丙烯酸, 均经减压蒸馏除去阻聚剂; 丙烯酰胺、氨水、聚乙二醇(PEG, $M = 6000$)、过二硫酸钾、三氯化铁、二氯化铁、氢氧化钠和乙醇等试剂均为分析纯, 未经进一步纯化; 30%的过氧化氢溶液, 盐酸吡哆醇(维生素 B₆), 25%戊二醛; 水为去离子水。

1.1.2 仪器 旋转蒸发仪、振荡器、红外光谱仪、离心机、常规显微镜, 磁力加热搅拌器, 真空干燥器, 7220 分光光度计, 振荡仪, pH 计, 减压过滤装置。

1.2 磁性聚苯乙烯微球固定化辅酶维生素 B₆ 的制备

1.2.1 亲水性磁流体的制备^[4] 依次将 0.27g 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 0.10g 的 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶解于装有 30mL 蒸馏水的三颈瓶中, 放入磁力搅拌子并装配好回流冷凝管, 然后加入 10g 聚乙二醇, 氩气保护状态下, 在油浴中升温至 58°C, 用氨水调节 pH 在 11~13, 反应 30min 后冷却至室温, 用去离子水反复冲洗离心分离沉淀物至中性, 再进行减压过滤。过滤残渣用去离子水冲洗至滤液无色, 真空干燥后保存备用。

1.2.2 磁性聚苯乙烯微球的制备 取一定量前述制备的磁流体, 用过二硫酸钾溶液浸泡 5h, 加

入 30mL 乙醇及 20mL 水作为反应介质, 然后加入苯乙烯、丙烯酸、丙烯酰胺反应单体, 各试剂加入量如表 1 所示, 反应在装有回流冷凝管, 磁力搅拌子的 250mL 三颈瓶中进行, 氩气保护状态下, 升温至 68°C, 以 150 r/min 的速度进行振荡, 反应 10h 后, 冷却至室温, 减压过滤, 不溶物用 60mL 去离子水分 3 次冲洗后, 再用 30mL 无水乙醇分 2 次冲洗, 不溶物在真空干燥器中干燥。

1.2.3 磁性聚苯乙烯微球的表征及讨论 从磁性微球的红外光谱图上可看出, 617.3cm⁻¹ 为无机物 Fe₃O₄ 的特征吸收峰, 3235.0cm⁻¹ 处的伯胺特征吸收峰和 1637.8cm⁻¹ 处的羰基吸收峰, 证明了酰胺键的存在。根据文献, 以上数据表明, 胺基磁性微球为无机物 Fe₃O₄ 和有机聚合物的复合体。

1.2.4 辅酶维生素 B₆ 固定化 维生素 B₆ 包括吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺三种化合物, 它们都能与 FeCl₃ 作用显棕黄色, 并在 450nm 有最大吸收^[3]。根据此性质来定量检测固定化辅酶维生素 B₆ 的结果。

在梨形瓶中, 同时加入磁性微球、戊二醛溶液及维生素 B₆ 进行振荡。然后将固定化后的产物进行过滤, 用去离子水冲洗, 再用铁标液进行显色, 在 450nm 下, 用 0.5cm 比色皿测定吸光度, 以进行固定化效果的比较。

2 结果与讨论

2.1 戊二醛浓度对维生素 B₆ 固定化的影响

分别在 7 个梨形瓶中加入 0.01g 磁性微球, 加入不同浓度的(2%~8%)5mL 戊二醛溶液, 然后各加入 0.005g 维生素 B₆。反应体系在 200 r/min 的速度下振荡, 12h 后进行过滤, 滤渣用 60mL 去离子水分三次进行洗涤, 将滤液收集并摇匀。取一定量的滤液, 向其中加入 1%FeCl₃ 溶液进行显色, 在 450nm 下用 0.5cm 的比色皿测定吸光度。

将所得结果绘制成曲线图, 如图 2 所示, 随着戊二醛浓度的增大, 吸光度逐渐减小; 当戊二醛浓度达到 5% 时, 吸光度达到最低值; 随后, 吸光度又逐渐增大。所以, 当戊二醛浓度为 5% 时, 维生素 B₆ 固定化的量为最大。

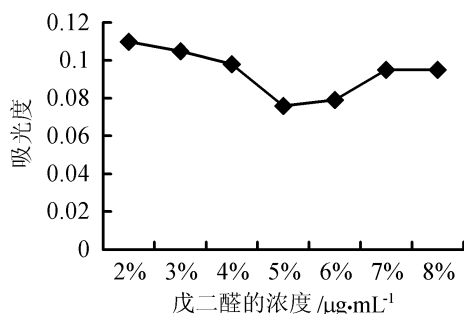


图 2 戊二醛对维生素 B₆ 固定化影响

Fig.2 Effect of glutaraldehyde's concentration on the immobilized vitaminB₆

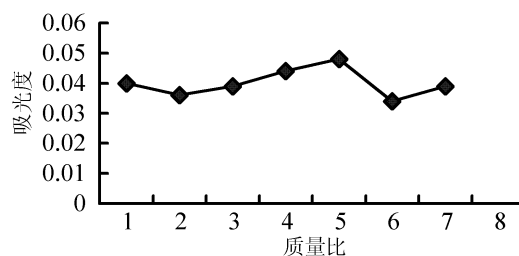


图 3 载体与维生素 B₆ 的质量比对维生素 B₆ 固定化影响

Fig.3 Relationship between the mass ratio (carrier: VB₆) and the immobilized vitaminB₆

2.2 载体与维生素 B₆ 的质量比对固定化的影响

取 7 份 0.01g 盐酸吡哆醇, 分别装在 7 个 25mL 的梨形瓶中, 再分别加入不同量的磁性聚

苯乙烯微球, 与维生素 B₆ 进行固定化反应。通过反应后取得滤液, 测定其吸光度, 确定载体与维生素 B₆ 的质量比对维生素 B₆ 固定化的影响。

如图 3 所示, 维生素 B₆ 固定化的量在载体与维生素 B₆ 质量比 1~7 范围内出现两个较高点, 即 2 和 6, 且它们的数值较接近。在质量比 3~5 范围内, 固定化维生素 B₆ 的量减少, 这有可能因为较多的载体在戊二醛的作用下发生了自身交联, 占用较多的氨基。但在质量比 6 时陡然上升, 这有可能因为交联较密的载体以网格式的形式包埋维生素 B₆, 但并未稳定地固定上。基于上述分析, 优先采用质量比为 2 的操作比例。

2.3 振荡时间对维生素 B₆ 固定化的影响

在 9 个 50mL 梨形瓶中, 分别加入 0.02g 磁性微球和 5mL 5% 的戊二醛, 然后加入 0.01g 维生素 B₆, 如图 4 所示的不同时间段内进行振荡反应, 检测随时间增长, 维生素 B₆ 被固定的量的变化。振荡速度为 200r/min。

结果如图 4 所示, 通过用分光光度法检测分析, 随着振荡反应时间的延长, 维生素 B₆ 不断被固定到载体上。当达到 12h 时, 维生素 B₆ 被固定的量最大, 最佳振荡反应时间确立为 12h。

2.4 振荡温度对维生素 B₆ 固定化的影响

在 9 个 50mL 梨形瓶中, 分别加入 0.02g 磁性微球和 5mL 5% 的戊二醛, 然后加入 0.01g 维生素 B₆, 在不同温度下振荡反应, 振荡速度为 200r/min, 时间为 12h。然后将产物减压过滤, 用 60mL 水洗涤, 收集滤液。各取 1mL, 加入 1%FeCl₃ 溶液, 摇晃使之充分显色, 测定其吸光度。

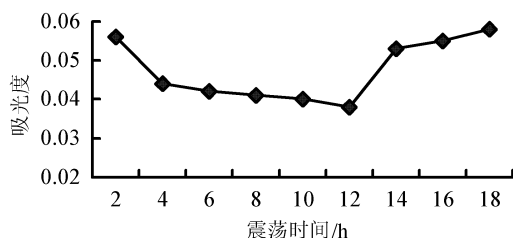


图 4 振荡时间对维生素 B₆ 固定化影响

Fig.4 Effect of reaction time on the immobilized vitaminB₆

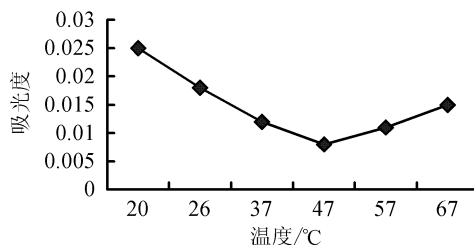


图 5 振荡温度对维生素 B₆ 固定化影响

Fig.5 Effect of reaction temperture on the immobilized vitaminB₆

如图 5 所示, 从 20°C 开始随温度升高, 吸光度减小; 47°C 后, 吸光度又开始增大, 在 47°C 时被固定的维生素 B₆ 量最多。

3 结论

根据文献的方法, 采用分散聚合法, 以乙醇/水(V(乙醇)/V(水)=3:2)作为分散介质, 按苯乙烯、丙烯酸、丙烯酰胺摩尔比为 1:0.8:0.5 的比例进行单体聚合。用聚乙二醇包裹 Fe₃O₄ 而成的磁性胶体粒子作为聚合种子, 在一定的振荡速度下, 68°C 反应 10h, 即得到带有胺基功能团的磁性聚苯乙烯微球, 它具有良好的悬浮稳定性及超顺磁性。

以磁性聚苯乙烯微球为载体, 探讨了辅酶维生素 B₆ 的固定化方法, 获得了最佳的固定化条件是: 用戊二醛作交联剂, 磁性聚苯乙烯微球载体与维生素 B₆ 的质量比为 2:1, 戊二醛为 5mL(5%), 振荡温度为 47°C, 振荡时间为 12h。这为今后对辅酶维生素 B₆ 及其衍生物的固定化, 以及固定化后的生物学功能的进一步研究提供了基础数据。

参考文献

- [1] 谢 钢, 张秋禹, 李铁虎. 高分子学报, 2001, (6): 38~45.
- [2] 邱广明, 孙宗华. 应用化学, 1996, 13(1): 6~9.
- [3] 金明宣, 张 程, 张 力 等. 内蒙古民族师院学报, 1998, 13(1): 79~81.
- [4] 景晓燕, 王 君, 李茹民 等. 应用科技, 2000, 27(1): 16~17.