

溶菌酶分子印迹材料的制备及吸附性能研究

李培绪

(潍坊科技学院 综合教育学院, 山东 寿光 262700)

摘要: 采用 γ -氨丙基三甲氧基硅烷(AMPS)对硅胶进行改性,然后将聚甲基丙烯酸聚合接枝到 AMPS-SiO₂ 表面上,再以乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂进行交联聚合,溶菌酶(LYZ)为模板分子,得到表面具有溶菌酶分子印迹聚合物的硅胶材料(LYZ-MIP-PMAA/SiO₂)。采用红外、扫描电镜和粒径测定等方法对 LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ 进行了表征。通过静态和动态吸附试验研究 LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ 对溶菌酶的吸附性能,并以牛血清蛋白等为竞争底物,研究其选择吸附性能。结果显示,LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ 对溶菌酶的吸附能力明显大于空白分子印迹硅胶(NIP-PMAA/SiO₂),其对溶菌酶和牛血清蛋白的分离因子为 1.20,说明其对溶菌酶具有较好的选择吸附性能。

关键词: 硅胶;溶菌酶;表面分子印迹;吸附性能

Study on Preparation of Lysozyme Molecularly Imprinted Materials and Its Adsorption Properties

LI Pei-xu

(School of Comprehensive Education, Weifang University of Science and Technology, Shouguang 262700, Shandong, China)

Abstract: Silica was modified with AMPS, and then polymethacrylic acid was grafted onto AMPS-SiO₂ surface, forming polymethacrylic acid grafted silica gel (PMAA/SiO₂). With lysozyme as template molecule and ethylene glycol dimethacrylate as crosslinker, LYZ-imprinted polymeric layer was prepared and silica surface was coated with it (LYZ-MIP-PMAA/SiO₂). The material was characterized by scanning electron microscope (SEM) and particle size analysis. Infrared spectroscopy, scanning electron microscopy and particle size determination were used to characterize LYZ-MIP-PMAA/SiO₂. The adsorption properties of LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ on lysozyme were studied by static binding test and dynamic binding test, and its selective adsorption properties was investigated by selective binding test with bovine serum albumin as competing substrate. Results showed that the adsorption capacity of LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ on lysozyme was better than that of NIP-PMAA/SiO₂. The separation factor of LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ on lysozyme and bovine serum albumin was 1.20, showing that LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ displayed high recognition ability to the template molecule-LIN.

Key words: silicone; lysozyme; surface imprinted; adsorption property

溶菌酶(Lysozyme),化学名称为 N-乙酰胞壁质聚糖水解酶,是一种碱性酶,广泛存在于哺乳动物的体液、禽类的蛋白以及某些植物中。溶菌酶能够使很多细菌的细胞膜中糖蛋白类多糖发生水解,从而使细胞膜溶解而溶解细菌,起到杀死细菌的作用,因此溶菌酶具有抗菌、消炎、抗病毒等作用。由于溶菌酶具有较好的抑菌作用,且无毒、安全,因此在食品行业受到重视,例如可用于食品的储存^[1-2]。溶菌酶在实际样品中的含量很低,直接分析测量比较困难,一般都需要对

作者简介:李培绪(1976—),男(汉),讲师,硕士研究生,从事功能高分子材料研究。

样品进行预处理,而传统的分离富集方法没有特异选择性,富集倍数不高^[3-5]。

分子印迹聚合物(MIP)是一种对模板分子具有特异识别选择性的高分子材料,已经在色谱分离、固相萃取、手性分离、传感器以及膜分离等领域得到应用^[6-9]。将 MIP 应用于溶菌酶的分离富集,有助于克服目前传统材料对 LYZ 没有选择性、富集倍数不高的缺陷。

2000 年以来有关 LYZ-MIP 的研究报道不多^[10-12]。本文以硅胶为载体,溶菌酶作为分子模板,甲基丙烯酸(MAA)作为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)作为交联剂,通过接枝聚合,制备了硅胶表面

分子印迹聚合物,考察了其对于溶菌酶的选择性吸附性能,为其作为分离富集材料应用于溶菌酶的检测提供试验参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

溶菌酶($\geq 95\%$, ≥ 20 kU/mg):上海伊卡生物技术有限公司;牛血清白蛋白($\geq 98\%$):北京博尔西科技术有限公司;硅胶(200目~300目):青岛世纪海洋干燥剂有限公司; γ -氨丙基三甲氧基硅烷(AMPS):南京创世化工助剂有限公司;甲基丙烯酸(MAA):上海和发实业有限公司;乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA):天津科密欧化学试剂开发中心;过硫酸铵、醋酸、甲醇等均为分析纯试剂。

1.2 仪器

IR Prestige-21 傅里叶红外光谱仪:日本岛津公司;Mastersizer2000 激光粒度分析仪:英国马尔文公司;Quanta200E 环境扫描电子显微镜:荷兰 FEI 公司;T6-1650E 紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 方法

1.3.1 硅胶的活化

将硅胶加入体积分数为 50% 的硝酸溶液中,室温下充分搅拌后静置 24 h,过滤,用蒸馏水洗涤至中性,真空干燥得活化硅胶 SiO_2 。

1.3.2 硅胶的表面改性

将 0.3 g SiO_2 -NPs 和 5 mL γ -氨丙基三甲氧基硅烷(APTES)加入 50 mL 无水甲苯中,在氮气保护下加热回流反应 24 h,无水甲苯洗涤,真空干燥得氨基修饰的 SiO_2 。

1.3.3 甲基丙烯酸在硅胶表面的接枝聚合

将 1.5 g AMPS- SiO_2 和 5 mL 单体甲基丙烯酸(MAA)加入 100 mL 水中,通氮气 30 min。然后加入 0.055 g 过硫酸铵,在 40 $^\circ\text{C}$ 、 N_2 保护下反应 10 h。聚合结束后,抽滤,用索式提取器以乙醇抽提得到的聚甲基丙烯酸(PMAA)接枝硅胶(PMAA/ SiO_2)24 h,真空干燥。

1.3.4 溶菌酶表面分子印迹硅胶材料(LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2)的制备

称取 1.0 g PMAA/ SiO_2 加入 100 mL、1.0 g/L 的LYZ-甲醇溶液中,常温震荡 4 h,然后过滤,真空干燥。将 1.0 g 饱和吸附溶菌酶的接枝硅胶,加入 50 mL LYZ-乙醇/水混合溶液(1:1,体积比 ROX 浓度为 1.0 g/L)中,将 pH 调节为 9,然后于 45 $^\circ\text{C}$ 下加入 0.2 mL EDMA 搅

拌反应 8 h。抽滤,用甲醇/冰醋酸溶液(9:1,体积比)、蒸馏水反复洗涤固体微粒,直至中性为止,以除去溶菌酶,真空干燥。

在不加模板分子的情况下,采用与 LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 相同的步骤制备空白表面分子印迹(NIP)硅胶(NIP-PMAA/ SiO_2)。

1.3.5 表征

采用溴化钾压片法,用日本岛津公司的 IR Prestige-21 傅里叶红外光谱仪对 AMPS- SiO_2 和 PMAA/ SiO_2 进行红外色谱分析。将硅胶、AMPS- SiO_2 和 LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 进行表面喷金后,用荷兰 FEI 公司的 Quanta200E 环境扫描电子显微镜观察形貌。用英国马尔文公司的 Mastersizer2000 激光粒度分析仪进行粒径和分布测定。

1.3.6 建立标准曲线

溶菌酶在 290 nm 波长处有最大紫外吸收,利用这一特性可以使用紫外分光光度法对溶菌酶进行测定。准确称取 125 mg 溶菌酶,然后溶解于浓度为 0.85% 的氯化钠溶液中,配制为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶菌酶标准溶液。准确量取溶菌酶标准溶液 1、2、3、4、5 mL,分别加入 10 mL 容量瓶中,然后用浓度为 0.85% 的氯化钠溶液稀释至刻度。在 290 nm 波长下,分别测定上述溶液的紫外吸光度,以浓度对吸光度制作标准曲线并进行线性回归。

1.3.7 LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 的静态吸附性能研究

准确量取 LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 各 16 份,分别放置在 5 mL 的离心管中,编号 1 号~16 号,在 1 号中加入 3 mL 甲醇作为对照组,另外 2 号~16 号,分别加入 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、6.0、8.0 g/L 的溶菌酶溶液各 3 mL。将 1 号~16 号样品放入振荡器中震荡 24 h,离心后取上清液测定溶菌酶的浓度。

1.3.8 LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 的动态吸附性能研究

准确称取 10 mg LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 各 9 份,分别加入 5 mL 小试管中,然后在每一个小试管内加入相同浓度的溶菌酶溶液 3 mL,在振荡器中充分混合均匀。分别于 10、30、60、90、120、150、180、240、300 min 收取上清液,测定溶菌酶的浓度。

1.3.9 选择性吸附试验

为了表征 LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 的选择吸附性能,选择与溶菌酶结构类似的牛血清白蛋白作为竞争底物进行选择性吸附试验。分别量取 1 mmol/L 的溶菌酶和牛血清白蛋白各 3 mL,分别加入 10 mg LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 和 NIP-PMAA/ SiO_2 ,振荡器震荡 24 h,收取上清液,测定溶菌酶和牛血清白蛋白的浓度。通

过静态分配系数 K_D 以及分离因子 α 来表示其选择性吸附性能。静态分配系数 K_D 和分离因子 α 的表示式分别为:

$$K_D = \frac{C_p}{C_s}, \alpha = \frac{K_D'}{K_D''}$$

式中: C_p 是溶质被吸附的浓度, $\mu\text{mol/g}$; C_s 是溶质在溶液中的浓度, $\mu\text{mol/mL}$; K_D' 是模板分子的静态分配系数; K_D'' 是竞争底物的静态分配系数。一般情况下, 分离因子 α 越大, 表示对模板分子的选择性越高。

2 结果与分析

2.1 红外光谱分析

SiO_2 、AMPS- SiO_2 和 PMAA/ SiO_2 的红外光谱图见图 1。

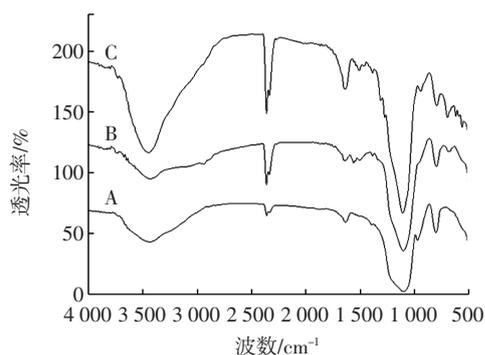


图 1 SiO_2 (A)、AMPS- SiO_2 (B)和 PMAA/ SiO_2 (C)的红外光谱图

Fig.1 FTIR spectra of SiO_2 (A), AMPS- SiO_2 (B) and PMAA/ SiO_2 (C)

在图 1 的 SiO_2 红外光谱图中, 1100 cm^{-1} 是 Si-O-Si 和 Si-O-H 的伸缩振动峰, 966 cm^{-1} 和 803 cm^{-1} 是 Si-O-H 的伸缩振动峰, 3445 cm^{-1} 和 1637 cm^{-1} 是 -OH 的伸缩振动峰。在 AMPS- SiO_2 的红外光谱图中, 3445 cm^{-1} 的 -OH 伸缩振动峰明显变小, 966 cm^{-1} 的 Si-O-H 的伸缩振动峰基本消失, 新出现了 3750 cm^{-1} 、 1583 cm^{-1} 和 1482 cm^{-1} 的 -NH 伸缩振动峰, 以及 2940 cm^{-1} 的 -CH 伸缩振动峰, 说明硅胶表面大部分羟基已经反应, AMPS 已经接枝到 SiO_2 表面。在 PMAA/ SiO_2 的红外光谱图中, 新出现了 700 cm^{-1} 的游离 -COOH 的特征吸收峰, 且 3445 cm^{-1} 的 -OH 特征峰明显增强, 说明 MAA 已成功接枝到改性 SiO_2 上。

2.2 扫描电镜和粒径分析

硅胶、AMPS- SiO_2 和 LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 的扫描电镜照片见图 2。

由图 2 可知, 活化硅胶颗粒表面比较光滑、干净, 而接枝 AMPS 和 MIP 后, 硅胶表面明显有附作物, 表面变得粗糙, 这是因为 AMPS 和 MIP 聚合物接枝在硅

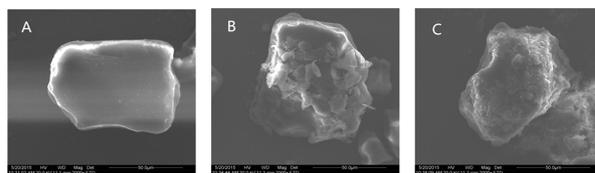


图 2 硅胶(A)、AMPS- SiO_2 (B)和 LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 (C)的 SEM 照片

Fig.2 SEM images of SiO_2 (A), AMPS- SiO_2 (B) and LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 (C)

胶表面造成的。经用粒度测定仪测定, 未经修饰的硅胶颗粒平均粒径 (d_{50}) 为 $56.4\text{ }\mu\text{m}$, ROX-MIP-PMAA/ SiO_2 的平均粒径 (d_{50}) 为 $62.8\text{ }\mu\text{m}$ 。在表面接枝和聚合之后, 硅胶颗粒表面形成了聚合物的薄膜层, 而且表面聚合物层也会造成颗粒黏连, 从而使得粒径增大。

2.3 标准曲线

溶菌酶标准曲线见图 3。

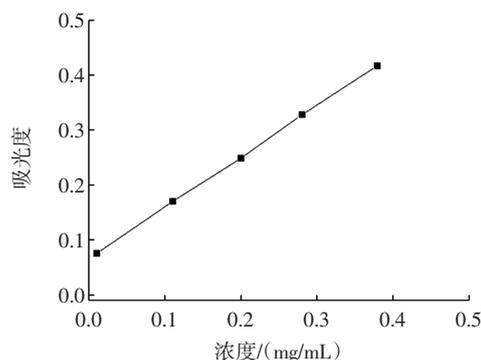


图 3 溶菌酶标准曲线

Fig.3 The standard curve of lysozyme

按照 1.2.6 的方法, 以吸光度 (A) 对浓度 (C) 进行线性回归, 得回归方程为 $y = 0.0210x - 0.03598$ ($y = A, x = C$), $R^2 = 0.9996$ ($n=5$)。

2.4 LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 的静态吸附性能

LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 和 NIP-PMAA/ SiO_2 的吸附等温线见图 4。

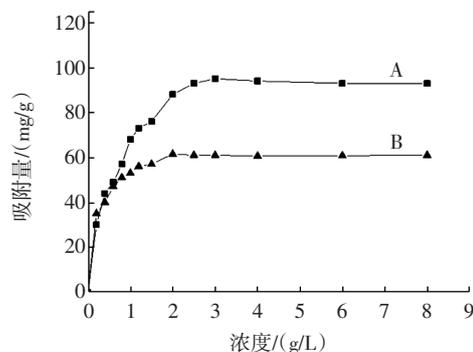


图 4 LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 (A)和 NIP-PMAA/ SiO_2 (B)的吸附等温线

Fig.4 The adsorption isotherm curve of LYZ-MIP-PMAA/ SiO_2 (A) and NIP-PMAA/ SiO_2 (B)

从图 4 中的吸附等温曲线可以看出,随着溶菌酶溶液浓度的增加,LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ 和 NIP-PMAA/SiO₂ 对溶菌酶的吸附量呈现快速增大趋势,随后逐渐达到平衡。由图 4 可知,LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ 和 NIP-PMAA/SiO₂ 对溶菌酶的吸附平衡浓度分别为 2.6 g/L 和 2.0 g/L,饱和吸附量分别为 93 mg/g 和 61 mg/g,LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ 的饱和吸附量明显大于 NIP-PMAA/SiO₂。在 LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ 和 NIP-PMAA/SiO₂ 的制备中都加入功能单体甲基丙烯酸以及交联剂乙二醇二甲基丙烯酸酯等物质,均含有羟基、羧基等功能基团,对模板分子具有一定的物理作用,可形成非印迹的结合位点,因此 NIP-PMAA/SiO₂ 对溶菌酶也具有一定的非印迹物理吸附作用,但是这种吸附作用是非特异性的。对于 LYZ-MIP-PMAA/SiO₂,除了存在非特异性的物理吸附,还存在因模板分子洗脱后留下的印迹空穴产生的特异性吸附,因此其对溶菌酶的吸附量明显增大,明显大于 NIP-PMAA/SiO₂。

2.5 LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ 的动态吸附性能

LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ 的动态吸附曲线见图 5。

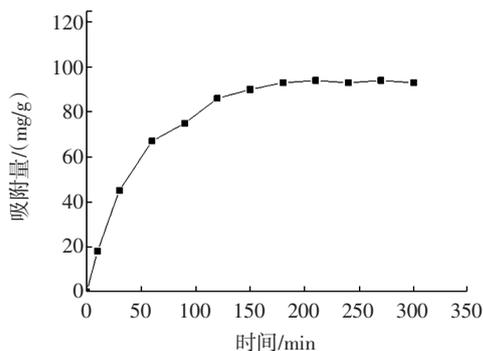


图 5 LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ 的动态吸附曲线

Fig.5 The absorption kinetic curve of LYZ-MIP-PMAA/SiO₂

从图 5 知,在前 60 min,LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ 的吸附量增加较快,60 min 后吸附量增加速度减缓,直至达到吸附平衡。一般认为,在印迹聚合物对模板分子的吸附过程中,存在非特异性物理吸附和特异性吸附。在吸附初期,印迹聚合物对模板分子的吸附以非特异性物理吸附为主,吸附速度较快。当非特异性吸附部位逐渐被占据后,则以特异性吸附为主,此时溶菌酶分子需要克服一定的空间位阻效应向深孔的特异性吸附部位扩散传质,所以传质速度较慢,吸附速度较小,因此吸附量增加减慢,最后缓慢平衡。LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ 对溶菌酶分子的吸附在 180 min 左右达到饱和。

2.6 选择性吸附性能

MIP 和 NIP 对溶菌酶和牛血清白蛋白的选择性

吸附数据见表 1。

表 1 MIP 和 NIP 对溶菌酶和牛血清白蛋白的选择吸附性能
Table 1 The selective adsorption properties of MIP and NIP on roxithromycin and erythromycin

项目	K_D (溶菌酶)	K_D (牛血清白蛋白)	α
MIP	24.46	20.34	1.20
NIP	14.13	14.00	1.01

由表 1 可知,ROX-MIP-PMAA/SiO₂ 对溶菌酶的分配系数明显大于牛血清白蛋白,其分离因子为 1.20,这说明其对溶菌酶具有较好的选择吸附性能。ROX-MIP-PMAA/SiO₂ 对竞争底物的分配系数也大于 NIP-PMAA/SiO₂。而 NIP-PMAA/SiO₂ 对溶菌酶和牛血清白蛋白的分配系数基本相同,分离因子仅为 1.01,基本没有选择吸附性能。ROX-MIP-PMAA/SiO₂ 对模板分子不仅存在非特异性物理吸附,还存在印迹空穴产生的特异性吸附,因此其对模板分子具有选择性,具有一定的分子识别性能。而 NIP-PMAA/SiO₂ 对两种底物仅具有物理吸附作用,没有选择性。

3 结论

1) 采用 γ -氨丙基三甲氧基硅烷 (AMPS) 对硅胶进行改性,然后将甲基丙烯酸接枝到 AMPS-SiO₂ 表面上,得到聚甲基丙烯酸接枝硅胶 (PMAA/SiO₂),再以乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EDMA) 为交联剂,在模板分子溶菌酶存在下在 PMAA/SiO₂ 表面进行交联聚合,得到溶菌酶表面分子印迹硅胶材料 (ROX-MIP-PMAA/SiO₂)。采用红外、电镜扫描和粒径测定等方法初步表征了 ROX-MIP-PMAA/SiO₂ 的结构。

2) 静态和动态吸附试验研究表明,LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ 对溶菌酶的吸附性能明显大于 NIP-PMAA/SiO₂。

3) 选择性吸附试验结果表明,LYZ-MIP-PMAA/SiO₂ 对溶菌酶和牛血清白蛋白的分离因子为 1.20,说明其对溶菌酶具有较好的选择吸附性能,而 NIP-PMAA/SiO₂ 对溶菌酶和牛血清白蛋白基本没有选择性。

参考文献:

- [1] 吴素萍. 溶菌酶在食品工业中的应用[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(5): 190-192
- [2] 徐敬宜, 徐永平, 刘姝, 等. 溶菌酶及其在食品工业中的应用[J]. 食品与机械, 2006, 22(1): 90-92
- [3] Rojas E E G, Coimbra J S D, Minim L A, et al. Hydrophobic interaction adsorption of hen egg white proteins albumin, conalbumin, and lysozyme[J]. J Chromatogr B, 2006, 840(2): 85-93
- [4] Zhou Q X, Ding Y J, Xiao J P. Sensitive determination of thiamethoxam, imidacloprid and acetamiprid in environmental water samples

龙眼壳粗黄酮提取物体内抗肿瘤研究

宋佳玉,张清伟,刘金宝,郭秋兰

(河南漯河医学高等专科学校,河南漯河462002)

摘要: 研究龙眼壳粗黄酮提取物体内抗肿瘤作用。体外试验以 MTT 法检测龙眼壳粗黄酮提取物对食管癌细胞 EC109、肝癌细胞 HepG2 的增殖抑制作用。体内试验建立 S180 荷瘤小鼠模型,观察龙眼壳粗黄酮提取物(100、200、300 mg/kg)组和龙眼壳粗黄酮提取物+CTX(20 mg/kg)组的抑瘤率,计算提取物+CTX 组小鼠的脾脏指数、胸腺指数、巨噬细胞吞噬指数、吞噬率,并采用 ELISA 法检测提取物组小鼠血清 TNF- α 的水平。体外试验显示龙眼壳粗黄酮提取物可显著抑制 EC109、HepG2 细胞的生长,并呈现一定的浓度依赖性。体内试验显示龙眼壳粗黄酮提取物(低)、(中)、(高)组均可抑制 S180 肉瘤生长,抑瘤率分别为 28.24%、44.91%、60.65%;提取物(低)+CTX 组、提取物(中)+CTX 组、提取物(高)+CTX 组抑瘤率分别为 53.7%、65.74%、70.37%,均高于 CTX 组 47.69%,且与 CTX 组比较,提取物+CTX 组可不同程度地升高荷瘤小鼠的脾脏指数、胸腺指数、巨噬细胞的吞噬率、吞噬指数;和模型组比较,提取物(低)、(中)、(高)组不增加小鼠血清 TNF- α 水平。龙眼壳粗黄酮提取物可抑制肿瘤细胞生长,具有抗肿瘤作用,且对 CTX 化疗药物具有增效减毒作用。

关键词: 龙眼壳粗黄酮提取物;食管癌细胞 EC109;肝癌细胞 HepG2;S180 荷瘤小鼠;增效减毒

The Antitumor Effects of Coarse Flavones Extract from Longan Shell in Vitro and Vivo

SONG Jia-yu, ZHANG Qing-wei, LIU Jin-bao, GUO Qiu-lan

(Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan, China)

Abstract: To investigate the antitumor effects of coarse flavones extract from longan shell in vitro and vivo. In vitro, MTT method was used to detect the inhibitory effect of coarse flavones extract from longan shell on EC109 and HepG2. In vivo, S180-bearing mice were given coarse flavones extract from longan shell and the tumor inhibitory rates of mice were detected in coarse flavones extract (100, 200, 300 mg/kg) groups and coarse flavones extract combined with CTX (20 mg/kg) groups. The thymus index, spleen index, macrophage phagocytic rate and phagocytic index were calculated in coarse flavones extract combined with CTX groups. ELISA method was used to detect the levels of serum TNF- α in coarse flavones extract groups. In vitro, the results showed that the coarse flavones extract of longan shell significantly inhibited the growth of EC109 and

作者简介:宋佳玉(1981—),女(汉),讲师,硕士,研究方向:肿瘤药理。

- with solid-phase extraction packed with multiwalled carbon nanotubes prior to high-performance liquid chromatography[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 385(8): 1520-1525
- [5] 杜卓,张娜,王建华.多壁碳纳米管固相萃取-在线提取血清中的溶菌酶[J]. 2008, 29(5): 902-905
- [6] Chapuis F, Mullot J U, Pichon V G, et al. Molecularly imprinted polymers for the clean-up of a basic drug from environmental and biological samples[J]. Chromatogr A, 2006, 1135(2): 127-134
- [7] Arimn M, Miller E I, Cormack P. Molecularly imprinted solid-phase extraction of iazepam and its metabolites from samples[J]. Anal Chem, 2007, 79(1): 256-262
- [8] Wulff G. Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers [J]. Chem Rev, 2002, 102(1): 1-28
- [9] Haupt K, Mosbach K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensor[J]. Chem Rev, 2000, 100(7): 2495-2504
- [10] 刘秋叶,盖青青,何锡文,等.复合分子印迹聚合物体系选择性富集蛋白质样品中的溶菌酶[J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(3): 505-509
- [11] 韩艳婷,马晋琴,岳宣峰,等.溶菌酶分子印迹聚合物的制备及其色谱评价[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2012, 40(4): 46-50
- [12] 孙寅静,刘瑜,谢操,等.溶菌酶分子印迹微球的制备与评价[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(10): 747-751

收稿日期:2015-08-25