[通 讯]

利用分子烙印技术分离中草药活性组分*

谢建春 骆宏鹏 朱丽荔 周 力 李崇熙 徐筱杰

(北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

摘要 用非共价法,在极性溶剂中,以丙烯酰胺作功能单体,以强极性化合物槲皮素为模板,制备了分子烙印聚合物(MIP).液相色谱实验表明,MIP对槲皮素具有特异的亲合性.将此MIP直接分离银杏叶提取物水解液,得到主要含模板槲皮素及与槲皮素结构相似化合物山奈酚两种黄酮的组分.研究证实了MIP技术用于直接分离、提取中草药中具有特定药效化合物的可行性.

关键词: 分子烙印, 槲皮素, 山奈酚, 银杏叶, 丙烯酰胺

分子烙印技术是对特定目标分子(即模板分子)制备具有高度亲和性聚合物材料(MIP)的技术. MIP存在与模板分子空间结构互补,官能团相互作用(氢键,离子或范德华力等)的聚合物孔穴. MIP与模板分子的作用类似于酶和底物的结合,对模板分子具有较强的亲和性及识别能力. 目前,MIP作为固相萃取材料(SPE),在分析化学领域已被用于临床药物分析^[1, 2]及环境分析前的样品富集^[3, 4]. 但作为固相提取材料从中草药中直接分离获得具有某种特定药效的化合物成分还未曾被研究过. 我们认为若用具有目标药效的活性分子作模板,将制备的分子烙印聚合物作为亲和材料,从中草药中直接分离提取具有该类药效活性组分应具有可行性. 黄酮类化合物在草药中存在较广,尤其在银杏叶中含量较高,具有降血压降血脂药理作用. 本研究中,以较易得到的黄酮类化合物槲皮素作模板制备分子烙印聚合物,从方法上探讨了MIP用于直接从中草药中分离提取具有特定药效化合物的可行性. 这一方面的研究工作尚未见报导.

1 实 验

1.1 分子烙印聚合物制备

模板分子槲皮素 0.8 mmol,丙烯酰胺 4 mmol,引发剂偶氮二异丁腈 22.0 mg,四氢呋喃 9 mL,二

甲基丙烯酸乙二醇酯 40 mmol,超声混合后,充氮气除氧 15 min,抽真空液氮冷却封管,60℃水浴聚合 24 h. 得到的棒状聚合物磨碎过筛(30 μm),颗粒小于 30 μm 部分用丙酮反复沉降,除去细末,再真空干燥. 空白聚合物(BP)的制备方法同上,只是未加模板分子.

1.2 液相色谱

装好的MIP液相色谱柱先后用9:1(V:V,下同)甲醇-醋酸,甲醇,9:1 甲醇-三乙胺,9:1 甲醇-醋酸,甲醇,洗至基线以保证除去模板分子. 空白聚合物按同样方法操作. 以丙酮测死时间. 每个样品独立进样,进样体积 20 μL,浓度 0.1 mmol·L⁻¹,流速 1 mL·min⁻¹. 容量因子 $K' = (t_R - t_0) / t_0$,其中 t_R 为样品的保留时间, t_0 为死时间. 烙印效率 $f_i = K'(\text{MIP}) / K'(\text{BP})$. 分离因子 $\alpha = \text{模板分子容量因子} / \text{结构类似物容量因子}$.

1.3 提取柱制备

将已除去模板分子的干聚合物 150 mg 加到 3 mL 甲醇中制成浆液,装入 6.0 mL 聚丙烯柱中,再用甲醇冲洗.

1.4 MIP 聚丙烯柱上银杏叶提取物水解液分离实验

1.4.1 银杏叶提取物水解液制备

提取物制备按文献[5, 6]. 水解液液相色谱检

表 1 不同流动相中 MIP 和 BP 的容量因子值 (K')

Table 1 Capacity factor (K') of quercetin on MIP and BP in different mobile phases

Mobile phase		CH ₃ CN	CH ₃ CN-H ₂ O(1% - 4%)	CH ₃ CN-H ₂ O(7%)	CH ₃ OH	CH ₃ OH-HAc(10%)
K'	BP	10	< 4	3	2.0	1.5
	MIP	> 39	> 15	3	7.14	1.5

测前用 BOND ELUT-C18 处理除去脂溶性物质。

1.4.2 液相色谱检测^[5, 6]

分离提取过程中用 HP Zorbax-C₈ 柱检查 MIP 聚丙烯柱上水解液中各组分保留情况。梯度洗脱条件:甲醇 38% /磷酸 (0.37%)62% $\xrightarrow{30\text{min}}$ 甲醇 55% /磷酸 (0.37%)45%。检测波长 365 nm 或 254 nm,进样量 20 μL ,流速 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.4.3 MIP 聚丙烯柱上提取实验

先将一定量水解液上样,再用适量甲醇洗柱,最后用甲醇 - 醋酸(10%)洗脱。

2 结果及讨论

2.1 液相色谱

2.1.1 流动相实验

用非质子溶剂乙腈作流动相 MIP 与 BP 容量因子具有明显差别(表 1),说明 MIP 对槲皮素的保留不是表面吸附,而是由于 MIP 上形成了与模板分子槲皮素空间结构、官能团排列相互作用的孔穴,即分子烙印效应。当流动相乙腈中水的含量逐渐增加时,由于水与模板分子竞争聚合物上的酰胺官能团,使槲皮素酚羟基与酰胺官能团氢键作用减弱, K' 减小。当水的含量达到 7% 时,MIP 酰胺官能团与槲皮素酚羟基氢键作用完全被消弱,不再具有烙印效应。使用甲醇流动相时,虽然质子性溶剂甲醇能破坏氢键作用, K' 值减小,但仍具有明显的烙印效应,当用甲醇 - 醋酸(10%)强溶剂洗脱时,MIP 与 BP

的 K' 值相同,进一步证明了槲皮素在 MIP 上的保留是通过氢键作用形成的分子烙印机制。

2.1.2 选择性实验

用甲醇作流动相比较了在植物中与槲皮素共存且结构相似的几种化合物对 MIP 的选择性。从容量因子 K' 值及烙印效率 f_i 值来看,模板分子槲皮素 K' 值或 f_i 值最大。克里拉京,芦丁两个分子空间结构比槲皮素大,较难进入模板槲皮素 MIP 孔穴中,只能形成表面的吸附作用,从而 K' 值或 f_i 值较小。没食子酸分子虽能进入孔穴,但由于分子较小不能与 MIP 孔穴中官能团形成匹配的氢键作用,从而 K' 及 f_i 值也较小。另外,柚皮素、白杨素两个黄酮化合物空间结构与槲皮素基本相同,且可进入孔穴。这样一来,虽然分子中酚羟基较少,但 K' 值或 f_i 值并不是最小。桑色素与槲皮素分子结构极为相似,但由于在我们的实验条件下,桑色素形成了分子内氢键,虽可以进入 MIP 孔穴中, K' 及 f_i 值仍小于模板槲皮素。从分离因子 α 来看,结构类似化合物在 MIP 的 α 值均大于其在 BP 上的 α 值,说明 MIP 比 BP 具有相对强的分离能力。选择性实验证明,MIP 对槲皮素具有识别能力,槲皮素在 MIP 上的保留是分子烙印机制。

2.2 MIP 分离银杏叶提取物水解液

银杏叶提取物的水解液上柱前在 254 nm 及 365 nm 检测出其具有多种成分(见图 1,图 2)。槲皮素峰(a)与标准品对照辨认,山奈酚峰(b)按文献^[6, 7]推测辨认。由于聚合物表面的非特异吸附作

表 2 选择性实验色谱参数

Table 2 Chromatographic parameters for quercetin and its analogues on MIP and BP

		Quercetin	Chrysin	Naringenin	Morin	Rutin	Corilagin	Ellagic acid	Gallic acid
K'	MIP	7.14	2.24	2.02	2.10	0.49	1.34	2.34	0.29
	BP	2.00	2.77	1.18	1.05	0.63	1.18	2.10	0.63
α	MIP	1	3.19	3.53	3.40	14.6	5.33	3.05	24.6
	BP	1	0.72	1.69	1.90	3.17	1.69	0.95	3.17
f_i		3.57	0.81	1.71	2.00	0.78	1.14	1.11	0.46

图 1 银杏叶提取物水解液的色谱图 ($\lambda = 365 \text{ nm}$)

Fig. 1 Chromatogram of the hydrolyzate of ginkgo leaves ($\lambda = 365 \text{ nm}$)

图 2 银杏叶提取物水解液的色谱图 ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

Fig. 2 Chromatogram of the hydrolyzate of ginkgo leaves ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

图 3 上样时流出液色谱图 ($\lambda = 365 \text{ nm}$)

Fig. 3 Chromatogram of the effluent liquid while loading ($\lambda = 365 \text{ nm}$)

用,上样时黄酮以外其它组分也全部保留(图 3). 但用适量甲醇洗柱后,有些非特异吸附极性比黄酮大的组分被洗出(图 4),而黄酮组分却具有相对较强的保留. 最后用甲醇-醋酸(10%)强溶剂洗脱,洗脱液谱图简化(图 5),提取物水解液中非黄酮组分含量相对降低,得到的主要是槲皮素及山奈酚黄酮组分. 山奈酚与槲皮素具有相近的保留,是由于山

图 4 甲醇洗柱液色谱图 ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

Fig. 4 Chromatogram of the washing-out solution using CH_3OH ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

图 5 甲醇-醋酸(10%)洗脱液色谱图 ($\lambda = 365 \text{ nm}$)

Fig. 5 Chromatogram of the eluent using $\text{CH}_3\text{OH-HAc}(10\%)$ ($\lambda = 365 \text{ nm}$)

奈酚与槲皮素具有相同空间结构及相似的官能团组成及排列,可以很好地与以槲皮素为模板制备的 MIP 相结合. 这也证明了利用 MIP 特异的亲和性从中草药获得具有相同药效化合物的可行性.

References

- 1 Paul M, Ian D W, David E M, Graeme R J, Kenneth J. *Anal. Comm.*, **1997**, *34*: 45
- 2 Lars I A. *Analyst.*, **2000**, *125*: 1515
- 3 Imma F, Francesca L, Antal T, Viola H, Börje S, George H, Damià B. *Anal. Chem.*, **2000**, *72*: 3934
- 4 Jun M, Kuniyuki F, Satoshi U, Toshifumi T. *J. Chromatogr. A*, **2000**, *889*: 25
- 5 Hasler A, Sticher O, Meier B. *J. Chromatogr.*, **1992**, *605*: 41
- 6 Yuan KW, Meng XH, Xu WH. *Chinese Tradit. Herb. Drugs*, **1997**, *28*: 211 [苑可武, 孟宪惠, 徐文豪. 中草药 (*Zhong Caoyao*), **1997**, *28*: 211]
- 7 Hasler A, Sticher O, Meier B. *J. Chromatogr.*, **1990**, *508*: 236

Extracting Active Compounds from Herbs Using Molecular Imprinting Technology

Xie Jian-Chun Luo Hong-Peng Zhu Li-Li Zhou Li Li Chong-Xi Xu Xiao-Jie

(*College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871*)

Abstract A molecularly imprinted polymer (MIP) was prepared using quercetin as the template and acrylamide as the hydrogen-bonding functional monomer in a polar solvent. The polymer exhibited high affinity for quercetin and good selectivity among the tested compounds. And when it was used as an extraction cartridge for the hydrolyzate of ginkgo leaves, it can purify the flavonoid component in the hydrolyzate, catching mainly quercetin and kaempferol. Thus it demonstrated the feasibility of using MIP in extracting specific pharmacophoric compounds directly from herbs.

Keywords: Molecularly imprinted polymer, Quercetin, Kaempferol, Ginkgo, Acrylamide