

# 应用分子印迹-固相萃取法提取 中药活性成分非瑟酮

李 礼<sup>1</sup>, 胡树国<sup>1</sup>, 何锡文<sup>1</sup>, 李文友<sup>1</sup>, 陈朗星<sup>1</sup>, 张玉奎<sup>1,2</sup>

(1. 南开大学化学学院, 天津 300071; 2. 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116011)

**摘要** 分别以中药黄栌的主要成分非瑟酮为印迹分子、丙烯酰胺为功能单体及乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 通过封管聚合合法合成了分子印迹聚合物; 将其装于自制的固相萃取柱中, 研究了以不同体积比的乙醇-水溶液为溶剂时非瑟酮在柱上的保留行为; 通过优化清洗及洗脱条件, 使非瑟酮与它的结构相似物槲皮素在柱上得到了很好的分离。

**关键词** 非瑟酮; 槲皮素; 分子印迹聚合物(MIPs); 固相萃取; 中药

**中图分类号** O657.3

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2006)04-0608-04

分子印迹技术是近年来发展起来的一门新技术, 它的应用领域很广, 可应用于环境、食品及药物等领域<sup>[1~8]</sup>. 分子印迹聚合物因对目标物有较高的选择性而可进行手性分离, 又因具有一定的机械强度和耐酸、碱及热的稳定性而将其视为性能优良的吸附剂. 固相萃取出现在于 20 世纪 70 年代中期, 因其将分离与富集融为一体, 具有操作简易、负载量大及回收率高等优点, 而受到普遍关注<sup>[9~12]</sup>. 其不足之处在于, 常用的吸附剂缺乏分离专一性, 仅用固相萃取, 对复杂样品难以达到预期目的, 而分子印迹聚合物刚好弥补了该缺陷, 它不仅能分离具有相似结构的混合物, 而且还可纯制目标物. 以分子印迹聚合物作为固相萃取的吸附剂, 即分子印迹-固相萃取法有着广泛的应用前景<sup>[13~17]</sup>.

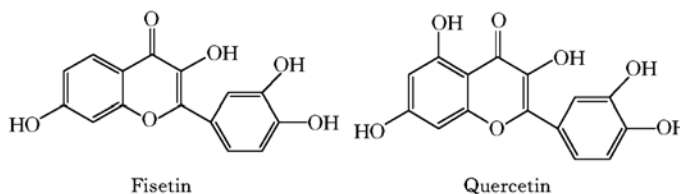
黄栌(漆树科植物, *Cotinus coggygia scop*)是治疗急性黄疸型肝炎的中药, 非瑟酮(Fisetin, 又名漆黄素)是其主要的有效成分<sup>[18]</sup>, 它具有多种生理活性<sup>[19]</sup>, 目前对它的研究还比较少<sup>[20]</sup>.

本文将非瑟酮分子印迹聚合物作为固相萃取吸附剂, 经实验得到了比较理想的上样、清洗及洗脱液体系. 根据实验条件优化的结果, 建立了分子印迹-固相萃取的分离富集方法, 用该方法可以成功地分离非瑟酮及其相似物槲皮素(Quercetin).

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

非瑟酮(化学对照品, 中国药品生物制品检定所), 槲皮素(纯度 $\geq 99\%$ , 上海同田生化技术有限公司), 两者的结构式见 Scheme 1. 乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA, 江苏安利化工有限公司, 分析纯), 丙烯酰胺(天津化学试剂研究所, 分析纯), 偶氮二异丁腈(AIBN, 南开大学分校特种试剂实验厂, 化学纯), 氢氧化钠(天津试剂公司, 分析纯), 无水乙醇、丙酮和 *N,N'*-二甲基甲酰胺(DMF)均为分析纯, 实验用水为双蒸去离子水.



Scheme 1 Chemical structure of analogues

收稿日期: 2005-06-02.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20375017, 20375019 和 20445001)和天津市自然科学基金(批准号: 033603511)资助.

联系人简介: 何锡文(1939 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 从事分子印迹和分子识别研究. E-mail: xiwenhe@nankai.edu.cn;

张玉奎(1942 年出生), 男, 研究员, 博士生导师, 中国科学院院士, 从事色谱基础理论及新技术开发应用研究.

E-mail: Ykzhang@online.in.cn

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国);多波长紫外检测器;反相 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm i. d., 天津色谱科学技术公司);色谱条件: V(甲醇): V(0.3% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>的水溶液) = 45:55, 流速保持 1 mL/min; Shimadzu UV-240 紫外分光光度计(日本);检测波长 364 nm.

## 1.2 分子印迹聚合物(MIPs)和非分子印迹聚合物(NMIPs)的制备

MIPs 的制备: 将 0.286 2 g(1 mmol)非瑟酮(作为模板分子), 0.355 4 g(5 mmol)丙烯酰胺(作为功能单体)、4.0 g(约 20 mmol)EDMA(作为交联剂)和 12 mg AIBN(作为引发剂)加入到 25 mL 装有 8 mL 丙酮的锥形瓶中. 将溶液超声 5 min 后通入 N<sub>2</sub>气 3 min, 再将溶液转移到安培瓶中. 利用真空泵对安培瓶进行减压后密封, 再将安培瓶放入 60 °C 水浴中反应 24 h. 聚合完成后, 将安培瓶中的块状聚合物取出进行研磨和筛分, 收集粒径为 40 ~ 65 μm 的 MIPs 颗粒. 将 MIPs 用体积比为 8:2 的无水乙醇和冰乙酸的混合溶液进行清洗, 直至检测不到模板分子为止, 最后再用无水乙醇将残留在聚合物上的冰乙酸洗脱干净.

NMIPs 的制备: 除了不加入模板分子外, 其余步骤与印迹聚合物的合成过程相同.

## 1.3 固相萃取柱

自行设计固相萃取柱(150 mm × 10 mm, SPE): 在 SPE 柱中装入 400 mg MIPs(或 NMIPs), 在聚合物上方加一小团玻璃棉. 固相萃取过程中每次上样、清洗及洗脱溶液的体积均为 5 mL. 萃取柱的流速由 N<sub>2</sub>气控制, 萃取过程中的溶液由高效液相色谱仪分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 结合实验

固相萃取的优点之一是萃取柱的负载量大, 但使用不同溶剂时萃取柱的负载量也会随之变化. 因目标物易溶于乙醇, 故选择不同体积比的乙醇-水溶液作为上样溶液, 考察印迹和非印迹萃取柱对非瑟酮的吸附情况, 结果如图 1 所示. 由图 1 可知, 当乙醇的体积分数小于 40% 时, 印迹和非印迹萃取柱均可完全吸附非瑟酮; 随着上样溶液中乙醇体积分数的逐渐增加, 印迹和非印迹萃取柱的负载量均开始下降, 但其在印迹聚合物上的吸附量要比在非印迹聚合物上的吸附量大. 考虑到吸附量, 选择含体积分数为 40% 的乙醇-水溶液 5 mL 作为上样溶液, 该实验条件可确保目标物能被全部定量吸附.

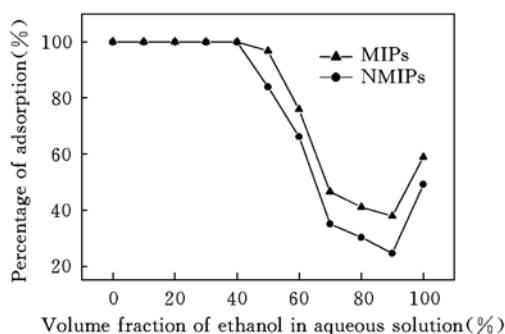


Fig. 1 Adsorption of fisetin on MIPs and NMIPs columns

The concentration of 5 mL loading solution including different volume fraction of ethanol was 0.1 μmol/mL.

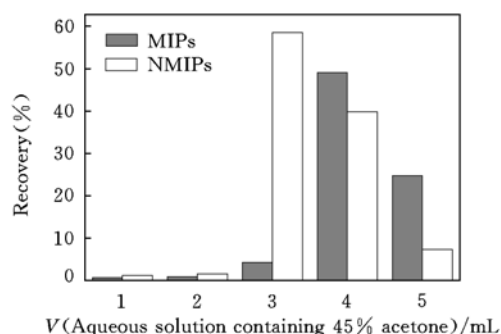


Fig. 2 Recoveries of fisetin on MIPs and NMIPs columns using 5 mL aqueous solution containing 45% acetone as washing solution for non-specific loaded fisetin(5 mL of 0.1 μmol/mL)

### 2.2 优化清洗和洗脱条件

当采用含非瑟酮的乙醇-水溶液为上样溶液时, 印迹和非印迹聚合物都存在着很强的非选择性吸附. 为消除非选择性吸附, 选择合适的清洗液尤为重要. 首先考察了含不同体积分数的乙醇水溶液作为非瑟酮的清洗液, 结果发现, 该体系对非瑟酮的清洗效果很差, 印迹和非印迹柱的差别很小. 为此又考察了含不同体积分数的丙酮水溶液作为非瑟酮的清洗液. 丙酮体积分数在 40% 以下时印迹柱和非印迹柱均未检测到非瑟酮, 这说明当丙酮的体积分数低时, 不足以破坏非瑟酮与聚合物间的疏水微环境; 当水溶液中丙酮的体积分数达到 45% 时即可看出清洗效果, 结果如图 2 所示. 前 2 mL 清洗时

MIPs 和 NMIPs 的柱差别不大;第 3 mL 清洗时,非瑟酮在 MIPs 和 NMIPs 柱上的回收率分别为 4.3% 和 58.6%,这是由于 NMIPs 没有特定的三维空穴和相应的识别位点,因而在 NMIPs 柱上非瑟酮更容易被洗下来.综上所述,选择 3 mL 含体积分数为 45% 的丙酮水溶液作为下面分离和萃取实验的清洗液,这样可将非选择性组分优先冲洗下来,以保证目标物与同系物能够得到很好的分离.

由于非瑟酮易溶于乙醇,所以在选择洗脱液时首先考察了 10 mL 乙醇对非瑟酮的洗脱效果,实验结果表明,仅用乙醇不能将上样的非瑟酮全部洗脱下来.考虑到 *N,N'*-二甲基甲酰胺(DMF)的强极性,选择它作为乙醇的添加剂,并对 DMF 和乙醇的比例进行了优化.当 DMF 体积分数为 10% 时,非瑟酮在印迹柱上的回收率在 90% 以上,随着洗脱液中 DMF 含量的增加,非瑟酮的回收率也逐渐提高.最终选择 10 mL 含体积分数为 30% 的 DMF 乙醇溶液作为洗脱液,它可将目标物定量地洗脱下来,定量回收率的实验结果列于表 1.

**Table 1 Recoveries of fisetin via loading solution containing MIPs with different concentrations ( $n=3$ )**

Amount added/ $\mu\text{mol}$	Mean amount found/ $\mu\text{mol}$	Recovery (%)
0.250	0.257 $\pm$ 0.004	102.8 $\pm$ 1.0
0.500	0.506 $\pm$ 0.002	101.2 $\pm$ 0.5
0.750	0.760 $\pm$ 0.010	101.3 $\pm$ 1.4

### 2.3 回收率测定

为验证体积分数 30% 的 DMF 乙醇溶液作为洗脱液的可靠性,同时证明 MIPs 柱可反复多次使用,选取不同上样量的非瑟酮对其回收率进行了比较.从表 1 可以看出, MIPs 柱对非瑟酮的回收率是令人满意的.

### 2.4 分离结构相似物

为说明 MIPs 与 SPE 结合使用的优越性,选择与非瑟酮分子结构极其相似的化合物——槲皮素(其结构式见图 1)作为比较物,用来考察印迹及非印迹聚合物的选择性,并设计了分离和萃取非瑟酮的方案.在测定混合试样之前,先将模板(非瑟酮)和类似物(槲皮素)分别在 MIPs 柱及 NMIPs 柱上进行吸附及洗脱实验,结果列于表 2.

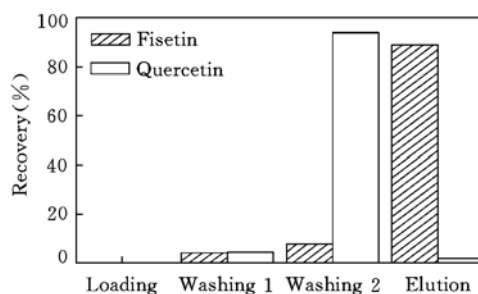
**Table 2 Recoveries (%) of fisetin and quercetin via loading solution containing MIPs or NMIPs**

Operation	MIPs		NMIPs	
	Fisetin	Quercetin	Fisetin	Quercetin
Loading	0.0	0.0	0.0	0.0
Washing 1	3.8	5.1	60.9	63.7
Washing 2	8.6	92.9	38.6	36.4
Elution	87.9	2.1	0.7	0.3

从表 2 中实验数据可见, MIPs 柱洗去类似物后,可对模板分子进行富集,两种组分可以得到分离;而 NMIPs 柱对模板分子及其类似物几乎没有选择性,两种组分无法得到分离.对比可知,印迹聚合物对模板分子及其类似物具有高度的选择性,反之,非印迹聚合物柱对模板分子及其类似物则不具有这种选择性.

分离结构相似物不仅要凭借 MIPs 的高选择性,同时也要选择合适的清洗条件,因为它可直接影响到分离效果.首先以含体积分数为 40% 的乙醇水溶液作为溶剂,配制非瑟酮与槲皮素(各 0.1  $\mu\text{mol/mL}$ )的混和溶液,取 5 mL 上样;再用含体积分数为 45% 的丙酮水溶液 3 mL 以及含 0.01  $\mu\text{mol/mL}$  NaOH 的水溶液 10 mL 作为清洗液,不但可除去与非瑟酮结构相似的化合物槲皮素,还可除去溶于水的其它干扰物,最终达到富集和分离非瑟酮的目的;最后将 10 mL 含体积分数为 30% 的 DMF 乙醇溶液作为洗脱液用于 HPLC 检测,结果如图 3 所示.

含有两种化合物的混和试样上柱后均被完全吸附,清洗液可将 98% 的对照物槲皮素清洗下来,洗脱时目标



**Fig. 3 Separation of fisetin and quercetin on MIPs column**

物非瑟酮的回收率达到 90%。分离之前样品非瑟酮与槲皮素的摩尔比为 1:1, 经过分子印迹-固相萃取分离富集非瑟酮, 它们的摩尔比近似于 90:2, 即非瑟酮(相对对照物槲皮素)的富集因子提高了 45 倍。由该实验结果可以看出, 选好适宜的上样、清洗及洗脱条件并利用 MIPs 的高选择性就可以分离一些结构上很相似的化合物, 即使达不到完全分离, 也可对目标物起到富集和纯化的作用, 因此 MIPs 作为固相萃取的吸附剂对纯制中药的目标物的确是一个很好的方法。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Chapuis F. , Pichon V. , Lanza F. *et al.* . J. Chromatogr. A[J] , 2003 , **999** : 23—33
- [ 2 ] Möller K. , Crescenzi C. , Nilsson U. . Anal. Bioanal. Chem. [J] , 2004 , **378** : 197—204
- [ 3 ] Hu S. G. , Wang S. W. , He X. W. . Analyst[J] , 2003 , **128** : 1485—1489
- [ 4 ] Edward P. C. L. , Sherry Y. F. . Microchem. J. [J] , 2003 , **75** : 159—168
- [ 5 ] Molinelli A. , Weiss R. , Mizaikoff B. . J. Agric. Food Chem. [J] , 2002 , **50** : 1804—1808
- [ 6 ] Hu S. G. , Li L. , He X. W. . J. Chromatogr. A[J] , 2005 , **1062** : 31—37
- [ 7 ] HU Shu-Guo(胡树国) , WANG Shan-Wei(王善韦) , HE Xi-Wen(何锡文) . Acta Chimica Sinica(化学学报)[J] , 2004 , **62** : 864—868
- [ 8 ] Hu S. G. , Li L. , He X. W. . Anal. Chim. Acta[J] , 2005 , **537** : 215—222
- [ 9 ] Ensing K. , Berggren C. , Majors R. E. . LC · GC Europe[J] , 2002 , **15**(1) : 2—8
- [ 10 ] ZHANG Hai-Xia(张海霞) , ZHU Peng-Ling(朱彭龄) . Chin. J. Anal. Chem. (分析化学)[J] , 2000 , **28** : 1172—1180
- [ 11 ] Poole C. F. . Trends Anal. Chem. [J] , 2003 , **22** : 362—373
- [ 12 ] HU Shu-Guo(胡树国) , LI Li(李 礼) , HE Xi-Wen(何锡文) . Progress in Chemistry(化学进展)[J] , 2005 , **17**(3) : 531—543
- [ 13 ] Zhu L. L. , Xu X. J. . J. Chromatogr. A[J] , 2003 , **991** : 151—158
- [ 14 ] Xie J. C. , Zhu L. L. , Luo H. P. *et al.* . J. Chromatogr. A[J] , 2001 , **934** : 1—11
- [ 15 ] Xie J. C. , Chen L. R. , Li C. X. *et al.* . J. Chromatogr. B[J] , 2003 , **788** : 233—242
- [ 16 ] ZHOU Li(周 力) , XIE Jian-Chun(谢建春) , GE Yu-Fang(戈育芳) *et al.* . Acta Phys. Chim. Sin. (物理化学学报)[J] , 2002 , **18**(6) : 808—811
- [ 17 ] XIE Jian-Chun(谢建春) , LUO Hong-Peng(骆宏鹏) , ZHU Li-Li(朱丽荔) *et al.* . Acta Phys. Chim. Sin. (物理化学学报)[J] , 2001 , **17**(7) : 582—585
- [ 18 ] SHEN Qing-Liang(申庆亮) , LI Jian-Hua(李建华) . China J. Chin. Materia Medica(中国中药杂志)[J] , 1990 , **15**(7) : 424—425
- [ 19 ] LI Jian-Hua(李建华) , LI Jie(李 洁) , WANG Xiao-He(王效合) *et al.* . Medical J. Chin. People's Armed Police Forces(武警医学)[J] , 1997 , **8**(3) : 151—152
- [ 20 ] FENG Xing(冯 星) , XU Dong-Hui(许东晖) , MEI Xue-Ting(梅雪婷) *et al.* . Chinese Pharmacological Bulletin(中国药理学通报)[J] , 2003 , **19**(12) : 1397—1401

## Solid-phase Extraction of Active Component of Chinese Traditional Medicine Fisetin by Using Molecularly Imprinted Polymers

LI Li<sup>1</sup> , HU Shu-Guo<sup>1</sup> , HE Xi-Wen<sup>1\*</sup> , LI Wen-You<sup>1</sup> , CHEN Lang-Xing<sup>1</sup> , ZHANG Yu-Kui<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

**Abstract** Fisetin is the main function integrant in *Cotinus coggygia scop* of Chinese traditional medicine. Using fisetin as imprinted molecule, acrylamide as the functional monomer, and EDMA as the crosslinking agent, a polymer was prepared by molecular imprinting technique. The polymer was loaded into the self-made solid-phase extraction(SPE) cartridge. A SPE procedure was suggested for extracting and concentrating fisetin by using different volume fractions of ethanol in aqueous solution as the loading conditions. In order to optimize the washing and eluting solution, the adsorption of fisetin in different solutions was studied. It was found that the fisetin and analogue quercetin were separated primely.

**Keywords** Fisetin; Quercetin; Molecularly imprinted polymers(MIPs); Solid-phase extraction; Chinese traditional medicine

(Ed. : A, G)