

分子印记技术在葛根素分离中的应用及 溶剂对聚合物识别能力的影响



CHEN Li-na

陈立娜, 都述虎, 马坤芳, 蔡 政

(南京医科大学药学院, 江苏 南京 210029)

摘 要: 通过合成分子印记聚合物以实现葛根素的高效分离。通过静态吸附实验对聚合物的吸附性能进行了评价。使用量子化学的方法对模板分子与功能单体的结合构象进行了计算机模拟, 采用 UV、IR、¹H NMR 一系列光谱学分析了分子印记聚合物形成的机理, 通过固相萃取考察了聚合物对葛根素的选择性能。该分子印记聚合物对葛根素具有高度选择性, 一次性处理葛根素的回收率达到 78.0%, 纯度可达到 86.5%。为从葛根中高效分离富集异黄酮活性成分葛根素提供了一种新方法。

关键词: 葛根素; 分子印记; 固相层析; 计算机模拟

中图分类号: TQ91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2008)03-0018-05

Application of Molecular Imprinting Technology for Separation of Puerarin and Effect of Solvent on Recognition of Molecularly Imprinted Polymer

CHEN Li-na, DU Shu-hu, MA Kun-fang, CAI Zheng

(School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: A rational design approach was taken to the planning and synthesis of a molecularly imprinted polymer (MIP) capable of extracting puerarin from pueraria extract. The polymer was evaluated by static adsorption experiment. A molecular modeling approach was used to elucidate template-monomer interaction. Data from spectral analysis were used to prove the prediction made by molecular modeling. The MIPs have high selectivity to puerarin, the recovery rate of puerarin at 78.0%, and purity at 86.5% were attained. The successful preparation of molecular-imprinted polymers for solid-phase extraction for puerarin provides an innovative opportunity for the separation of traditional Chinese medicine.

Key words: puerarin; molecular imprinting; SPE; molecular modeling

葛根来源于豆科植物野葛 (*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi) 或甘葛藤 (*Pueraria thomsonii* Benth.) 的干燥根, 为一传统常用中药。葛根总黄酮中的主要功能成分葛根素具有明显缩小心肌梗塞范围、抗血栓形成、降血糖以及提高视力等功能。近年来, 葛根素注射液在临床上被广泛应用, 然而, 葛根提取液中存在大量结构和葛根素相似的同系物 (主要是大豆苷、大豆苷元、大豆苷元-4', 7-二葡萄糖苷), 运用普通分离纯化法很难达到满意分离, 因此迫切需要一种能够高效分离葛根素的方法。分子印记技术是近年来发展起来的一门新技术, 目前已广泛应用于环境、食品及药物等领域^[1-3]。分子印记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^[4-6]。以分子印记聚合物作为固相萃取的吸附剂, 即分子印记固相萃取法有着广泛的应用前景^[7-8]。本研究以葛根素为模板分子制备了具有特定空间结构的分子印记聚合物, 用 MIP-SPE-HPLC 离线联用模式对葛根素实现了高效分离, 并对其吸附机理进行了深入研究。

收稿日期: 2007-06-26

基金项目: 国家自然科学基金(30672532); 江苏省高校自然科学研究计划项目(06KJD360128); 南京医科大学科技发展基金重点项目(06NMUZ013)

作者简介: 陈立娜(1976-), 女, 辽宁大连人, 讲师, 博士, 研究方向为中药活性成分的提取分离和质量标准研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

仪器:高效液相色谱仪、LC-10Avp 泵、SPD-10Avp 紫外检测器、CTO-10Asvp 柱温箱,日本岛津公司。Gaussian 98: Gaussian Inc. Carnegic Office Park, Bldg. 6 pittsburgh, PA 15106, USA。材料:葛根素购于中国药品生物制品检定所;乙二醇二甲基丙烯酸酯、丙烯酰胺(AA)、偶氮二异丁腈均购于 Sigma 公司;葛根购于江苏省药材公司,经鉴定为野葛(*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi)的干燥根。四氢呋喃、乙腈、丙酮均为分析纯,临用前蒸馏。

1.2 分子印记聚合物(MIPs)的制备

称取3份0.416 g (1 mmol)葛根素分别溶于15 mL 四氢呋喃、丙酮、乙腈中,加入丙烯酰胺0.284 g (4 mmol),超声波作用10 min,室温放置4 h。再加入3.8 mL 乙二醇二甲基丙烯酸酯(20 mmol)、0.085 g 偶氮二异丁腈,超声10 min,通氮气10 min,然后密封在60 ℃的恒温水浴锅中,聚合24 h得到棒状聚合物,粉碎,过孔径为45 μm的筛子,真空干燥。将所得粉末用甲醇-冰醋酸(9:1,体积比)索氏回流提取48 h,以除去模板分子,用HPLC检测新鲜溶剂在254 nm处无任何吸收,真空干燥,得到葛根素印记聚合物MIP-1、MIP-2、MIP-3。空白聚合物除不加模板分子外,制备方法同上,得到非印记聚合物。

1.3 分子模拟

本实验采用 Gaussian 98 计算量子化学软件进行计算机模拟^[9]。计算分为两步:第一步,用 Gaussview 2.1 构建葛根素和功能单体,使用 Gaussian 98, OPT 方法,将葛根素和丙烯酰胺在真空中进行构型优化并计算其能量,然后将优化后的构型移入溶剂中,进行构型优化并计算其能量,以其真空和溶液中构型能量差来作为溶剂化能,根据溶剂化能的大小推断溶剂与葛根素和丙烯酰胺作用的强弱。

1.4 HPLC 测定

聚合物性能评价、固相萃取分离中葛根素样品的检测均采用 HPLC 法。

1.4.1 葛根药材提取液的制备 称取40 g 葛根粉末置于500 mL 茄形瓶中,加入8倍量体积分数为95%的乙醇,加热回流提取2次,每次3 h,过滤,合并滤液,回收乙醇,加适量甲醇溶解,定容于100 mL 备用。

1.4.2 色谱条件 C₁₈柱(250 mm × 4.0 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水(25:75, 体积比), 流速0.8 mL/min, 温度为30 ℃, 进样量10 μL, 检测波长254 nm。

1.5 聚合物性能评价

1.5.1 吸附动力学的测定 分别称取20 mg的MIP-1、MIP-2、MIP-3及其对照样,加入10 mL 葛根素乙腈溶液,25 ℃恒温水浴振荡,在0、5、10、15、20和25 h, HPLC 测定葛根素的质量浓度,考察聚合物对葛根素分子的吸附随时间的变化。吸附量(Q)由吸附前后的质量浓度差计算,计算公式如下:

$$Q = (c_0 - c_t) V / m$$

式中: c_0 —葛根素初始质量浓度, μg/mL; c_t —不同时间下葛根素质量浓度, μg/mL; V —溶液体积, mL; m —聚合物质量, μg。

1.5.2 静态吸附实验和 Scatchard 分析 精密称取10份(20 mg)的MIP-1,分别置于10个10 mL的离心管,加入不同质量浓度的葛根素-乙腈溶液,在25 ℃恒温水浴振荡30 h后,离心,取上清液测定其质量浓度。

1.6 分子印记聚合物的表征

1.6.1 红外光谱测定 葛根素与丙烯酰胺(1:4, 质量比)混合,静置4 h,在四氢呋喃溶液中分别作葛根素、丙烯酰胺和混合物的红外光谱。

1.6.2 紫外光谱扫描 配置10份相同浓度的葛根素-四氢呋喃溶液,加入不同浓度(葛根素与功能单体的质量比为1:10~1:50)的功能单体,放置4 h,扫描200~400 nm之间的紫外光谱。

1.6.3 ¹H NMR 取葛根素-丙烯酰胺的混合溶液,静置4 h,在二甲基亚砷溶液中分别作葛根素、丙烯酰胺和混合物的¹H NMR谱。

1.7 葛根素在 MIP-SPE 柱上的分离

称取 0.5 g MIP-1, 装入直径 1 cm、高度 50 cm 的玻璃柱中, 取 0.2 mL 葛根素提取液, 溶于 10 mL 甲苯, 以一定流速慢慢通过提取柱进行加样后, 先用 20 mL 甲苯-甲醇(5:1, 体积比)淋洗柱子, 然后再用 20 mL 甲醇-冰醋酸淋洗柱子, 收集洗脱液, 蒸干, 用 1 mL 甲醇溶解, HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 量子化学计算

由于葛根素和丙烯酰胺之间能否形成配合物及其稳定性如何和它们所处的溶剂环境有很大关系, 所以, 此处计算了葛根素和丙烯酰胺在不同溶剂中的溶剂化能, 进而得到葛根素和丙烯酰胺之间相互作用强弱的信息。葛根素和丙烯酰胺与溶剂相互作用强弱为: 乙腈 > 丙酮 > 四氢呋喃, 由于葛根素和丙烯酰胺的分子间相互作用与它们和溶剂分子的相互作用是相互竞争的关系, 故与溶剂相互作用强会导致葛根素和丙烯酰胺的分子间相互作用被削弱。由此可预期, 在上述溶剂体系中合成的聚合物对葛根素的分子识别能力的强弱为: 四氢呋喃 > 丙酮 > 乙腈。

除此之外, 计算机模拟还可以推测模板与单体结合时的物质的量之比。表 1 列出了模板与不同个数丙烯酰胺形成复合物的能量。

从表 1 可以看出, 随着丙烯酰胺的加入, 复合物的能量也增加, 但是当第四个丙烯酰胺分子加入时, 复合物能量却没有明显的增加。这表明, 分子印记过程中 1 个葛根素分子是和 3 个丙烯酰胺分子结合的, 第四个丙烯酰胺分子并没有参与体系氢键。实验中葛根素和丙烯酰胺按 1:4 加入反应体系, 是为了使丙烯酰胺过量, 加速反应进程。

计算机模拟结果显示葛根素在四氢呋喃中更容易和丙烯酰胺形成氢键, 而且 1 个葛根素分子是和 3 个丙烯酰胺分子结合的, 图 1 显示了它们的结合构象。从图中可以看出, 复合物中存在两种类型的氢键, 即葛根素的羰基氧和丙烯酰胺的氨基氢结合; 葛根素的羟基氢和丙烯酰胺的羰基氧结合。

2.2 印记聚合物的吸附动力学

不同聚合物的吸附量(Q)随时间变化的曲线如图 2 所示。由图中可知, 本研究所合成的 MIPs 在吸附 15 h 后基本达到平衡。在后续实验中将吸附时间定为 30 h, 以确保吸附完全平衡。而且, MIP-1 比 MIP-2 和 MIP-3 的吸附量大, 这说明在四氢呋喃体系中合成的 MIPs 的分子识别能力要优于在丙酮体系和乙腈体系中合成的分子印记聚合物。这一结果和计算机模拟的结果一致。

2.3 印记聚合物的吸附等温线及 Scatchard 分析

由于 MIP-1 的印记效果最佳, 以下测定了 MIP-1 和对照-1 的吸附等温线, 结果如图 3 所示。

在分子印记研究中通常采用 Scatchard 方程来研究印记聚合物的吸附行为 $Q/c = (Q_{\max} - Q)/K_d$, 式中 Q_{\max} 为最大表观吸附量, mmol/g; K_d 为聚合物平衡离解常数。对 MIP-1 的吸附等温线进行 Scatchard 分析, Q/c 对 Q 作图, 如果能得到一条线性, 说明体系存在一种类型的结合位点。结果 Q/c 对 Q 作图, 得到 2 条线, $Y = -0.0121X + 0.1639$, $R^2 = 0.9804$; $Y = -0.0674X + 0.2151$, $R^2 = 1$, 说明复合物中存在两种类型的氢键, 和计算机模拟结果一致。 Q_{m1} 、 K_{d1} 和 R_1^2 分别为 13.54 mmol/g、 8.26×10^{-2} mol/L 和 0.980; Q_{m2} 、 K_{d2} 和 R_2^2 为 3.19 mmol/g、 1.48×10^{-2} mol/L 和 1.00。

表 1 不同量丙烯酰胺与模板形成复合物的能量
Table 1 Acrylamide doses on calculated binding energies of the complex

| $n(\text{丙烯酰胺}) : n(\text{葛根素})$ $n(\text{acrylamide}) : n(\text{puerarin})$ | $\Delta E / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ |
|---|--|
| 1:1 | -24.58 |
| 2:1 | -40.44 |
| 3:1 | -64.60 |
| 4:1 | -69.02 |

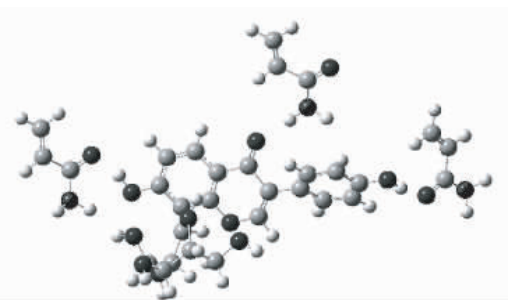


图 1 高斯模拟葛根素与 3 个丙烯酰胺的结合构象
Fig. 1 Gaussian simulated structure of the complex of puerarin and three acrylamide molecules

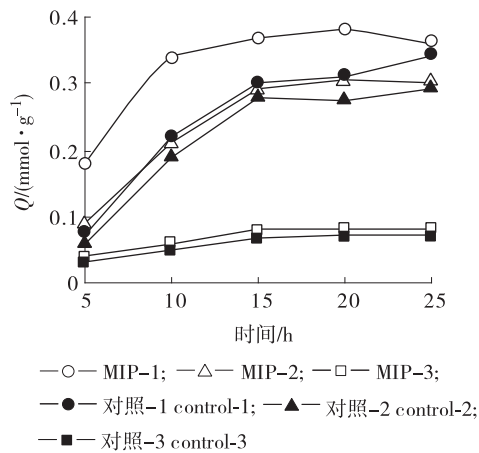


图2 分子印记聚合物的吸附动力学曲线

Fig. 2 Adsorption kinetic behavior of different MIPs

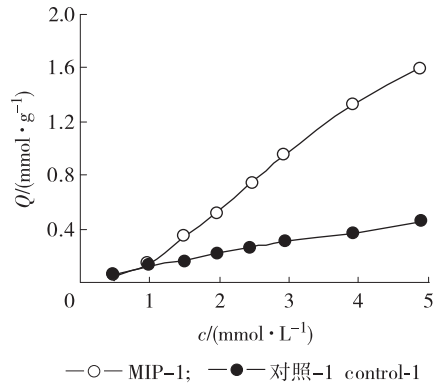


图3 MIP-1和对照-1的吸附等温线

Fig. 3 Adsorption isotherms of MIP-1 and control-1

2.4 丙烯酰胺和葛根素结合机理分析

通过吸附性能试验,发现葛根素在四氢呋喃溶液中形成的聚合物吸附性能最强,本研究采用紫外、红外、¹H NMR 光谱对 MIP-1 形成的机理进行分析。

2.4.1 紫外光谱分析 利用紫外吸收差光谱研究了葛根素与丙烯酰胺在四氢呋喃中的相互作用,根据功能单体与模板分子作用前后的吸光度差(用 ΔA 表示)绘制紫外吸收差光谱。如图 4 所示随着功能单体量的增加,吸光度也增加,并且由于氢键的形成,吸收光谱中最大吸收波长向长波方向移动。

理论上讲,复合物的形成过程可以用右式表示: $T + nM \xrightarrow{K} TM_n$ 。T 为模板分子, M 为功能单体, K 为结合常数, n 为个数 ($n = 1, 2, 3 \dots$)。[T], [M], [TM_n] 为其浓度。假设 [M] 远远大于 [T], 根据朗伯-比尔定律, 上式可进一步转化为: $\Delta A / [M]^n = -K\Delta A + K\Delta\epsilon [T] l \Delta\epsilon$ 为葛根素与丙烯酰胺在四氢呋喃中作用前后吸光系数差, l 为溶液体积。 $\Delta A / [M]^n$

对 ΔA 作图, 可以推导出 n 值, 从而得知在四氢呋喃溶液中模板分子与功能单体的作用模式, 也就是说在一个模板分子的周围有几个功能单体与其作用, 从而揭示分子印记作用的机理。当 $n = 3$ 时, $\Delta A / [M]^3$ 对 ΔA 作图是一条直线, 这就说明在研究浓度范围内 1 个葛根素分子和 3 个丙烯酰胺结合, 这和计算机模拟的结果一致。

2.4.2 红外光谱分析 从 3 者红外谱图中可以看出葛根素和丙烯酰胺混合后, 丙烯酰胺的羰基峰从 1689 cm^{-1} 移到了 1682 cm^{-1} , 这一变化可能是丙烯酰胺的羰基和葛根素分子中的 H 形成氢键作用而产生的。葛根素的羰基峰从 1630 cm^{-1} 移到了 1612 cm^{-1} , 丙烯酰胺的酰胺峰 II 从 1458 cm^{-1} 移到了 1442 cm^{-1} , 这可能是丙烯酰胺的氨基 H 和葛根素的羰基形成了氢键。有关氢原子参与氢键的形成情况可通过 ¹H NMR 分析。

2.4.3 ¹H NMR 分析 分子间氢键的形成将导致电子云密度平均化, 使得羟基和氨基中的质子移向低场, 因此, 可以通过 ¹H NMR 判断分子间氢键的形成。葛根素分子和丙烯酰胺分子存在两类氢键: 1) 葛根素分子中的 7 位、4' 位羟基 H 原子可以和丙烯酰胺分子中的羰基 O 原子形成氢键, 从而使 7 位、4' 位羟基 H 原子向低场方向移动 (由 $\delta 9.514$ 移至 $\delta 9.527$; $\delta 10.508$ 移至 $\delta 10.612$); 2) 丙烯酰胺分子中的氨基 H 原子和葛根素分子中的羰基 O 原子形成了氢键, 使得丙烯酰胺分子上的氨基 H 原的信号也向低

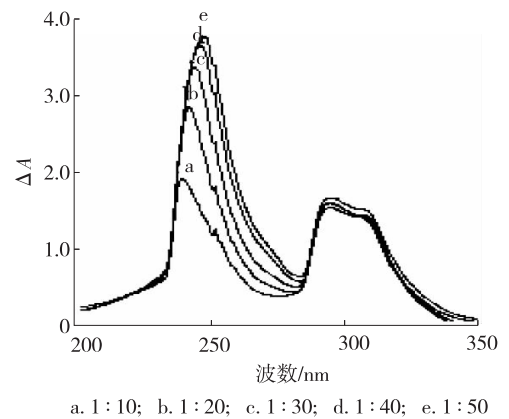


图4 不同比例的葛根素与丙烯酰胺在四氢呋喃中的紫外吸收差光谱
Fig. 4 UV difference absorbance spectra of puerarin with different ratios of AA in THF

场方向移动(δ 7.500 移至 δ 7.516; δ 7.063 移至 δ 7.075)。 ^1H NMR 数据验证了计算机通过 Gaussian 软件模拟出的葛根素和丙烯酰胺的结合构象。

2.5 葛根素在固相萃取柱上的分离

本研究用 MIP-SPE-HPLC 联用模式对葛根素实现了高效分离,葛根药材提取液上样后,先用甲苯-甲醇(5:1,体积比)将 MIP 上的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。然后用一定量的酸性溶剂破坏氢键,将 MIP 特异性吸附的组分洗脱下来。图 5 显示了各溶剂系统洗脱组分的 HPLC 分析图。

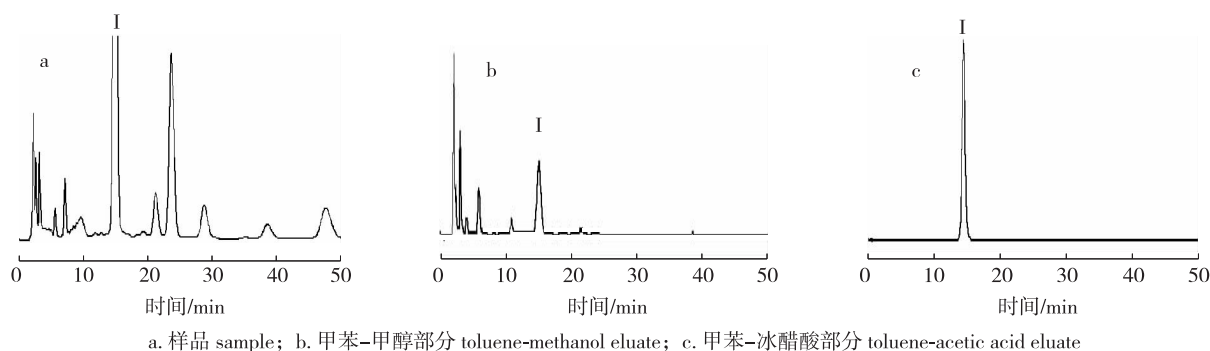


图 5 MIP-SPE 柱各溶剂系统洗脱组分的 HPLC 分析图

Fig. 5 HPLC spectra of elutes by different eluants from the sample on an SPE cartridge packed with MIP-1

从图 5 可以看出,甲苯-甲醇洗脱了绝大部分的非选择性组分,而目标物葛根素则主要被甲醇-冰醋酸系统洗脱。经过计算,一次性处理葛根素的回收率达到 78.0%,纯度可达到 86.5%。

3 结论

以葛根素为印记分子,以四氢呋喃、丙酮、乙腈为溶剂体系,综合应用 Scatchard 分析、计算机模拟等方法研究了溶剂对于印记聚合物分子识别能力的影响。实验结果显示,对于本研究合成的 MIPs,其分子识别性能随溶剂的变化可以简单地表示为:四氢呋喃 > 丙酮 > 乙腈。并且通过各项光谱学试验研究了葛根素分子印记聚合物的形成机理,发现 1 个葛根素分子和 3 个丙烯酰胺分子以两种类型的氢键结合,形成稳定的复合物。合成的分子印记聚合物填于固相萃取柱中对葛根素得到了良好的分离,一次性处理葛根素的回收率达到 78.0%,纯度可达到 86.5%,为分离富集葛根素提供了一种新的方法。

参考文献:

- [1] WUFF G, SARHAN A. The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemate[J]. *Biosens Bioelectron*, 2004, 20(6):1098-1105.
- [2] FAIRHURST R E, CHASSAING C, VENN R F, et al. A direct comparison of the performance of ground beaded and silica-grafted MIPs in HPLC and turbulent flow chromatography applications[J]. *Biosens Bioelectron*, 2004, 20(6):1098-1105.
- [3] FERRER I, LANZA F, ANTAL T. Selective trace enrichment of chlorotriazine pesticides from natural waters and sediment samples using terbutylazine molecularly imprinted polymer[J]. *Anal Chem*, 2000, 72(19):3934-3941.
- [4] SCHWEUTZ L, ANDERSSON L I, NILSSON S. Capillary electrochromatography with predetermined selectivity obtained through molecular imprinting[J]. *Anal Chem*, 1997, 69(6):1179-1183.
- [5] TAKENCHI T. Combinatorial molecular imprinting: An approach to synthetic polymer receptors[J]. *Anal Chem*, 1999, 71:285-290.
- [6] SUBRAHMANYAM S, PILETSKY S A, PILETSKA E V. 'Bite-and-Switch' approach using computationally designed molecularly imprinted polymers for sensing of creatinine[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2001, 16:631-639.
- [7] 程绍玲, 杨迎花. 利用分子印记技术分离葛根异黄酮[J]. *中成药*, 2006, 28(10):1484-1488.
- [8] 向海艳, 周春山, 钟世安, 等. 白藜芦醇分子印记聚合物合成及其对中药虎杖提取液活性成分的分离[J]. *应用化学*, 2005, 22(7):739-743.
- [9] 董文国, 闫明, 吴国是, 等. 溶剂对分子印记聚合物分子识别能力的影响: 实验研究与计算量子化学分析[J]. *化工学报*, 2005, 56(7):1247-1252.