

在茄尼醇粗品(I)硅胶柱色谱分离过程中,考察了洗脱溶剂的种类和配比,最终确定了上述混合溶剂为茄尼醇富集洗脱液,可经一次洗脱得到质量分数约为 80%的茄尼醇粗品(II),二次柱色谱分离结果可以获得质量分数 95%的样品,其中硅胶柱的洗脱连续性及收集流份的体积对茄尼醇柱色谱分离都有重要的影响。

重结晶被视为取得高纯度茄尼醇的关键,本实验反复选用正己烷、乙醚、丙酮等为重结晶溶剂,结果发现采用混合溶剂重结晶能获得质量分数 98.26%的茄尼醇精品,其中结晶溶剂的种类、配比、用量,以及结晶温度和时间等对茄尼醇结晶的形成和纯度有重要的影响。

在茄尼醇的测定过程中,粗品试样须经微孔滤膜滤过,以防堵塞;在分离过程中,考察了不同流动相配比、不同体积流量、不同柱温等因素对分离的影响,结果选用正己烷-异丙醇(90:10)为流动相,体积流量为 1 mL/min,主峰和杂质峰能清晰地分开,此时目标化合物茄尼醇的保留时间在 9 min 左右,

分离效果满意。

本实验最终分离纯化得到的茄尼醇样品的质量分数远较 Sigma 公司提供的化学对照品要高。因此,本实验研究工作中除最初定性分析使用 Sigma 公司的茄尼醇外,有关定量分析研究均使用自制质量分数 98%以上的茄尼醇制备对照品溶液。

References:

[1] Zheng K L. One kind of method separating purification and measuring solanesol's content from the matter distilled of tobacco leaf [J]. *J Guizhou Norm Univ: Nat Sci* (贵州师范大学学报:自然科学版), 2003, 21 (1): 7-9.
 [2] Wang Y J, Li S F. Utilization of solanesol and nicotine and their extraction methods from tobacco leaves [J]. *Tianjin Chem Ind* (天津化学工业), 2003, 17 (3): 37-40.
 [3] Tawara T. Extraction of solanesol [P]. JP: 52139711, 1997-11-21.
 [4] Tawara T. Purification of solanesol [P]. JP: 63190840, 1998-08-08.
 [5] Zhang D Y, Zhang H Y. Process for extracting solanesol from mouldy or broken tobacco [P]. CN: 1087076, 1994-05-25.
 [6] Ma S X, Xu K L. Process for purifying solanesol [P]. CN: 1345711, 2002-04-24.
 [7] Zhang M S, Huang J X. Determination of solanesol in the extracts of tobacco leaves by high performance liquid chromatography [J]. *Chromatography*, 2001, 19 (5): 470-471.

悬浮聚合法制备咖啡因分子印迹聚合物微球及其性能研究

陈移蛟,周兴国,李桂玲*

(华中科技大学同济医学院,湖北 武汉 430070)

摘要:目的 建立一种分析测定中草药的方法,并对生物碱有效成分进行分离。方法 以咖啡因为模板分子,采用水溶液悬浮聚合法制备了用于色谱分离(作 HPLC 的固定相)的微米级分子印迹聚合物微球(MIPMs)。结果 当以茶叶碱为竞争分子时,MIPMs 对咖啡因有强的吸附和特异性选择识别能力。结论 该 MIPMs 能对茶叶中的咖啡因进行分离富集。

关键词:咖啡因;悬浮聚合;色谱固定相;分子印迹聚合物微球

中图分类号:R283.6; R286.02 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)05-0692-04

Preparation of molecularly imprinted microspheres against caffeine by aqueous micro-suspension polymerization and its recognition characteristics

CHEN Yi-jiao, ZHOU Xing-guo, LI Gui-ling

(Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430070, China)

Key words: caffeine; aqueous micro-suspension polymerization; HPLC stationary phase; molecularly imprinted polymeric microspheres (MIPMs)

分子印迹技术是结合高分子化学、生物化学、有机化学等学科发展起来的一门边缘学科。分子印迹聚合物可在分子水平上对物质进行选择识别。类

似于酶和底物、抗体和抗原的关系,且具有生物活性物质无法比拟的稳定性和寿命长等优点。由于其独特的性能,故在化合物的分离中得到了广泛的应用。

收稿日期:2004-11-08

作者简介:陈移蛟(1974—),女,湖北监利人,华中科技大学硕士研究生,主要从事药物合成及分析。E-mail: cyjailong@163.com

* 通讯作者 Tel: (027) 83650692 E-mail: gueilingli@163.net

目前分子印迹聚合物主要用于色谱^[1~3]、固定相萃取^[4,5]、膜分离及高效毛细管电泳等分离技术中。

本研究利用水相体系作为介质,聚乙烯醇(PVA)作为分散剂,让功能单体与模板分子之间形成离子键相互作用,合成微米级的印迹聚合物微球作为色谱固定相,从而达到对模板分子的识别分离作用。该方法有制备工艺简单、周期较短等优点。本实验对微米级分子印迹聚合物微球(MIPMs)合成影响因素进行了讨论,对其识别性能进行了分析。

1 仪器与试剂

美国 ALLTECH 装柱机, Aglient 1100 HPLC 操作系统, Aglient 1100 化学工作站, PHS 型酸度计, 56MC 型可见紫外分光光度计, 日本 JSM-5610LV 扫描电镜。

咖啡因和茶碱由中国药品生物制品检定所提供, 茶叶(湖南省兰岭茶叶有限公司), α -甲基丙烯酸(MAA, AR 级)、烯丙氨(ALM, AR 级)、4-乙烯基吡啶(4-VPY, CP 级, Sigma 公司)、乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA, AR 级)、羧甲基纤维素(HEC, AR 级)、PVA(400 \pm 50, AR 级)、偶氮二异丁腈(AIBN, AR 级), MAA 和 EDMA 使用前经减压蒸馏除去阻聚剂。所有反应溶剂均为分析纯, 色谱所用溶液均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 MIPMs 的制备: 将一定量的分散剂按表 1 于 90~95 $^{\circ}\text{C}$ 下溶于 150 mL 水中, 置于 250 mL 三口瓶中, 冷却后, 依次加入咖啡因(0.424 4 g, 2 mmol, 溶于 12 mL 氯仿中)、功能单体(8 mmol)、EDMA(40 mmol, 7.92 g)、ABIN(100 mg)。然后于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下超声脱气 30 min, 在氮气保护下 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 24 h, 转速为 350 r/min, 所得微球依次用水、甲醇、甲醇-醋酸缓冲溶液洗涤, 直到紫外可见分光光度计检测不出模板分子为止。所得微球真空干燥备用。空白印迹聚合物除去模板分子不加外其余合成操作步骤同上。

2.2 分散剂的选择: 由于水会削弱功能单体与模板分子之间的非共价键作用, 从而影响复合物的形成, 因为合成中用 MIPMs 作识别分子时, 大多是在弱极性或非极性的有机溶液中进行。但是天然的分子识别系统如抗原与抗体等的识别大多是在有水的介质中进行的。同时考虑到生物碱大多溶于极性溶剂, 从而如何在水介质中合成分子印迹聚合物是非常重要的。对于咖啡因模板分子, 采用 α -甲基丙烯酸作功能单体, PVA 为分散剂, 在水溶液中合成了

表 1 分散剂和功能单体配方 (n=3)

Table 1 Recipe of dispersant and function monomer (n=3)

MIPMs	分散剂	用量/g	功能单体
P0	PVA	4	MAA
P1	PVA	2	MAA
P2	PVA	4	MAA
P3	PVA	6	MAA
P4	PVA	8	MAA
P5	PVA	4	4-VPY
P6	PVA	4	ALM
P7	PVA	4	ACM
P8	HEC	4	MAA
P9	HEC	6	MAA

MIPMs。结果表明不同的分散剂及其不同用量对微球的合成都有非常大的影响, 见表 2。当使用 HEC 时, 合成效率低, 转化率为 MIPMs 占功能单体、模板分子和交联剂全部反应所得理论产物的质量分数只有 43%, 粒径分布不均匀, 凝聚现象严重, 并伴有大量畸形粒子产生。而使用 PVA 作分散剂时则得到了均匀粒径、形貌好和高转化率的微球, 用量为 4 g(在水中的质量浓度为 26.7 g/mL)时, 合成效率高达 85%, 粒径大都在 50 μm 以下。由扫描电镜图(图 1)可见微球粒径分布均匀, 一般在 10~50 μm 。单个微球的表面形貌, 其多孔性的表面有利于色谱分离和保留。而空白聚合物表面光滑, 对模板分子无特异性识别性能。

表 2 不同分散剂所得产物的转化率和形态

Table 2 Percent conversion and morphology of MIPMs prepared with different dispersants

MIPMs	分散剂	功能单体	用量/g	转化 率/%	凝聚物	平均 粒径	分布 宽度
P0	PVA	MAA	4	85	少量	小	小
P1	PVA	MAA	2	64	少量	大	大
P2	PVA	MAA	4	85	少量	小	小
P3	PVA	MAA	6	52	许多(凝聚物)	小	大
P4	PVA	MAA	8	48	许多(凝聚物)	小	大
P5	HEC	MAA	4	43	许多	大	大
P6	HEC	MAA	6	29	许多	大	大

2.3 功能单体的选择: 实验中使用了多种功能单体, 如烯丙胺、丙烯酸酰胺、4-乙烯基吡啶和 α -甲基丙烯酸。由于 PVA 和水与前 3 种功能单体(特别是烯丙胺)之间形成氢键的能力太强, 大大降低了分散剂的分散作用, 导致油水分离的现象, 聚合时形成块状聚合物。因此实验最终采用以 α -甲基丙烯酸为功能单体, 获得了适用于色谱固定相的 MIPMs。结果表明: 使用的功能单体不同时, MIPMs 对模板分子的容量因子(k')、分离因子(α)、印迹因子(β)也不一样(表 3)。当合成中采用酸性 α -甲基丙烯酸作为功能

表 3 不同功能单体制备的 MIPMs 的吸附和选择性能
Table 3 Sorption and selecting property on MIPMs prepared using different functional monomers

MIPMs	功能单体	k'	k'_0	α	β
P ₇	4-乙烯基吡啶	2.6	2.2	1.2	0.18
P ₈	丙烯酰胺	/	/	/	/
P ₉	烯丙氨	2.9	2.1	1.3	0.38
P ₂	α -甲基丙烯酸	4.2	2.6	1.6	0.62

单体,水作为介质,以碱性咖啡因为模板分子,以 PVA 作为分散剂合成分子印迹聚合物微球时,由于模板分子与功能单体之间不仅可以形成静电作用,还可以形成一定的氢键作用,因此制得的分子印迹聚合物微球的容量 k' 高达 4.2, α 为 1.6, β 为 0.62。一般认为,在色谱分离中,其色谱性能参数中的 k' 、

α 和 β 需满足以下条件: α 值应大于 1.5, 才能使模板分子和非模板分子达到基线分离; β 应大于 0.5 才能认为印迹柱和非印迹柱有显著性差异。而以 4-乙烯基吡啶、烯丙氨和丙烯酰胺为功能单体时, MIPMs 的 k' 较小, 选择性都在 1.5 以下, β 也都小于 0.5。可能因为咖啡因化学结构的氮上无氢原子, 与氨基不能形成强的氢键作用, 而 4-乙烯基吡啶的氮上也没有氢, 只有一对孤对电子, 既不能与咖啡因上的氮形成氢键, 也不能与之形成静电作用。所以在制备过程中, 咖啡因很难与客体存在着有较强的相互作用力, 致使制备的聚合物对模板分子也没有很好的选择识别功能。因此在以后的实验中都以 α -甲基丙烯酸为功能单体。

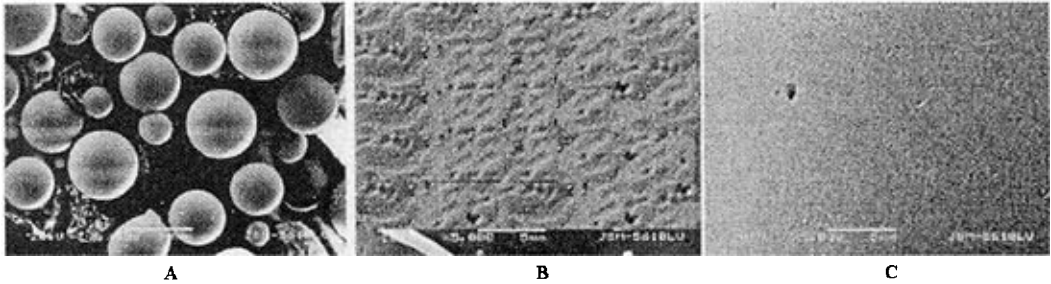


图 1 微球(A)及其表面(B)、空白聚合物表面(C)的扫描电镜图

Fig. 1 Scanning electronic micrographs for MIPMs (A), and its surface (B), surface of negative sample (C)

2.4 色谱检测方法的建立:将 2 g MIPMs 悬浮在甲醇-异丙醇(1:1)悬浮液中,在 600 kg/cm² 压力下装入不锈钢管(150 mm×4.6 mm)中。色谱条件:流动相为醋酸盐缓冲溶液-甲醇(1:9),体积流量为 1.0 mL/min,进样体积为 20 μ L,检测波长为 276 nm,柱温为室温。吸附因子按照公式 $k' = (t - t_0) / t_0$ 计算,式中 t 和 t_0 分别为保留时间和死时间。 t_0 由注入的丙酮峰测定。 α 按照公式 $\alpha = k / k_0$ 计算, β 按公式 $\beta = (k' - k'_0) / k'_0$ 计算。微球的扫描电镜图由扫描获得。

2.5 流动相缓冲溶液 pH 值对 k' 的影响:将 P₂ 作为 HPLC 的固定相,然后改变缓冲溶液 pH 值,研究了模板分子在不同 pH 值(2.0、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5)下的吸附效果(图 2)。

结果表明随着缓冲溶液 pH 值的改变, k' 也随着改变。当 pH 值小于 4 或大于 5.5 时,吸附效率开始下降。可能模板分子与功能单体主要以咖啡因的氮上的孤对电子与 α -甲基丙烯酸的羧基形成了较强的离子键(静电)相互作用。这进一步证实了利用水溶液悬浮聚合法制备 MIPMs 是可行的。当含有模板分子、单体、交联剂、引发剂和分散剂的有机相

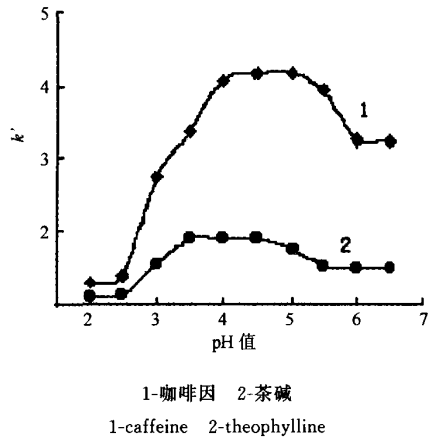


图 2 咖啡因和茶碱在 MIPMs 上分离能力的对比

Fig. 2 Comparison of separating capacity for caffeine and theophylline on MIPMs

加入到含有聚乙烯醇的水相后,模板分子与功能单体以强于氢键的离子键相互作用,使水很难破坏这种聚合。随着 pH 值的改变,固定相和流动相竞争结合模板分子的量也随着改变,在高的 pH 值流动相中,流动相对带有酸性基团的 MIPMs 柱的亲合作用起主导作用,在低的 pH 值流动相中,对碱性模板分子的保留作用起主导作用,当 pH 值小到一定量

时, MIPMs 柱就失去了对模板分子的选择性吸附和识别的性能。

2.6 选择性能的研究: 利用结构类似物茶碱进行对照来分析讨论 MIPMs 柱的选择性能。在 pH 4.5 的缓冲溶液流动相中分离结构类似物的图谱。在相同的条件下在空白柱上两物质达不到很好的分离, 表明该聚合物对模板分子有非常强的选择吸附性能。

2.7 茶叶中咖啡因的分离: 室温下取 5 g 茶叶浸泡在 200 mL 水 (25 °C) 中, 2 h 后取 2 mL 溶液放入 25 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 0.45 μm 滤膜滤过, 注入 2 mL 样品瓶中, 用 MIPMs 柱进行 HPLC 色谱分离, 见图 3。可见在 pH 值为 4.5 时, 咖啡因达到了很好的分离富集。

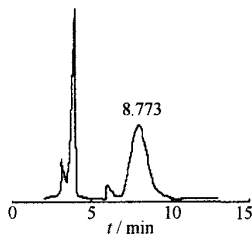


图 3 茶叶中咖啡因的分离谱图
Fig. 3 Separation chromatography of caffeine in tea

3 结论

在水介质中以聚乙烯醇为分散剂、用咖啡因因为

模板分子合成 MIPMs, 咖啡因与功能单体主要以离子键力相互作用, 它对咖啡因有很强的特异选择识别功能。这种操作过程简单, 便于推广分子印迹技术的应用。对于在天然物中质量分数低、药效高的成分的鉴定分析和分离纯化提供了方法借鉴。但是此 MIPMs 的特异选择性能有待提高。

References:

- [1] Theodridis G, Manesiotis P. Selective solid-phase extraction sorbent for caffeine made by molecular imprinting [J]. *Chromatography A*, 2002, 948: 163-169.
- [2] Kugimiya A, kuwada Y, Takeuchi T. Preparation of sterol-imprinted polymers with the use of 2-(methacryloyloxy) ethyl phosphate [J]. *Chromatography A*, 2001, 938: 131-135.
- [3] Haginaka J, Takekura H, Hosoya K. Molecularly imprinted uniform-sized polymer-based stationary phase for naproxen: comparison of molecular recognition ability of the molecularly imprinted polymers prepared by thermal and redox polymerization techniques [J]. *Chromatography A*, 1998, 816: 113-121.
- [4] Walshe M, Hauarth J. The preparation of a molecular imprinted polymer to 7-hydroxycoumarin and its use as a solid-phase extraction material [J]. *Pharm Biomed Anal*, 1997, 16: 319-325.
- [5] Cheng G X, Zhang L Y, Fu C. Molecule selecting property of cimetidine imprinted polymeric microspheres via suspension [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2002, 20 (2): 102-107.

岗松油的气相色谱指纹图谱研究

刘布鸣, 赖茂祥, 梁凯妮, 林霄, 严克俭
(广西中医药研究所, 广西南宁 530022)

摘要:目的 建立岗松油化学成分指纹图谱的研究方法, 以鉴别岗松油的质量。方法 采用气相色谱法测定, 对不同产地和采收期的岗松油的指纹图谱进行研究。结果 建立了岗松油指纹图谱, 确定 12 个色谱峰为共有峰。结论 不同产地和采收期岗松油的指纹图谱稳定性好, 相似性高, 具有特征性和唯一性, 利用岗松油指纹图谱可以对岗松油的质量进行控制。

关键词: 岗松油; 气相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)05-0695-05

Study on GC chromatographic fingerprint of *Baechea frutescens* essential oil

LIU Bu-ming, LAI Mao-xiang, LIANG Kai-ni, LIN Xiao, YAN Ke-jian

(Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning 530022, China)

Key words: *Baechea frutescens* L. essential oil (BFEO); GC; chromatographic fingerprint

岗松油为桃金娘科岗松属植物岗松 *Baechea frutescens* L. 带有花果的枝叶经水蒸气蒸馏得到的挥发油, 为淡黄色至淡棕黄色的澄清液体, 气芳香, 具有特殊的香味。岗松主要分布于广西、广东、江西、

福建等地, 具有化痰止痛、清热解毒、利尿通淋、杀虫止痒之功效, 用于跌打瘀肿、肝硬化、热泻、热淋、小便不利、阴痒、脚气、皮肤瘙痒、疥癣、水火烫伤、虫蛇咬伤。岗松油作为广西地方习用中药材收载于《广西