

• 综述 •

分子印迹技术在中药活性成分分离纯化中的应用

林 喆¹, 罗 艳², 原 忠^{2*}

(1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117; 2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘 要:通过参考近年来分子印迹技术分离纯化中药活性成分的文献, 对其在黄酮、多元酚、生物碱、甾体、香豆素分离纯化中的应用进行了综述。由于分子印迹技术具有选择性强、操作简单、溶剂消耗量小等特点, 在中药现代研究中展现了良好的应用前景。此外, 对其尚存在的问题进行了简单论述。

关键词:分子印迹技术; 中药; 分离纯化

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)03-0457-04

Application of molecular imprinting technique to separating and purifying active components in Chinese materia medica

LIN Zhe¹, LUO Yan², YUAN Zhong²

(1. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Key words: molecular imprinting technique (MIT); Chinese material medica (CMM); separation and purification

近年来, 分子印迹技术(molecular imprinting technique, MIT)发展非常迅速, 并由于分子印迹聚合物(molecular imprinted polymers, MIPs)具有高效、稳定、制备简单等优点, 而得到了越来越广泛的应用, 如手性分离、固相萃取、临床药物分析、膜分离技术、模拟酶催化、仿生传感器等 MIPs 的领域中都展现了良好的应用前景^[1]。本文简单介绍该技术的基本原理、制备及特性, 重点论述了其在中药活性成分分离纯化中的应用。

1 分子印迹技术概述

1.1 基本原理: 模板(即印迹分子)与功能单体通过共价或非共价作用在溶剂中形成复合物后, 通过引发剂引发, 将带有特殊官能团的功能单体与交联剂进行光或热聚合, 得到高度交联的聚合物。然后, 通过物理或化学(如洗脱、水解等)方法除去模板, 聚合物主体上就形成了与模板空间相匹配的具有多重作用位点的孔穴。依赖于该聚合物和模板分子大小形状、功能基排列的匹配程度, 这种孔穴对模板及与模板结构相似的分子具有特异性结合能力。

1.2 MIPs 的制备: 主要有共价键法和非共价键法。二者的区别主要在于功能单体与模板的结合形式不同; 也正为这种不同, 对功能单体、模板等的要求也不同, 从而各有优缺点, 见表1。此外, 尚有将两者加以综合的“空间牺牲法”, 即聚合时功能单体与模板的作用力是共价的, 而在识别过程中是非共价的^[2]。

其过程主要有3步: 模板与功能单体组装形成复合物; 聚合形成具有特定识别位点的聚合物; 反复洗脱或水解, 去除绝大部分模板, 见图1。上述过程中, 功能单体的选择必须与模板成键或有一定作用力, 如: 甲基丙烯酸可以同胺发生离子化, 同酰胺或羧基产生氢键, 适合于碱性模板; 而乙烯吡啶则适合于酸性模板。此外, 还有很多因素影响 MIPs 性质^[3], 如: 模板、功能单体及交联剂的比例, 溶剂的性质和用量等。

1.3 MIPs 特性: MIPs 具有很好的物理和化学稳定性, 耐高温、高压, 可抵抗强机械作用力; 能抵抗酸碱、高离子强度和有机溶剂的作用。有些 MIPs 反复使用 100 次以上印迹能力也未发生显著衰减; 保存 8 个月以后其性能基本不变^[4]。

2 在中药活性成分分离纯化中的应用

中药活性成分结构复杂、类型多样, 再加上含量低和不稳定性, 导致了中药活性成分分离纯化困难。而目前分离纯化主要依赖于硅胶柱色谱、大孔吸附树脂柱色谱、聚酰胺柱色谱、凝胶柱色谱、高效逆流色谱、制备型高效液相色谱等色谱技术。为了得到纯度高的活性成分, 需经多种溶剂萃取和反复柱色谱, 不仅溶剂消耗量大、环境污染严重, 而且效率和收率也低。

分子印迹技术是以与目标分子具有高度识别的 MIPs 为固定相进行的色谱分离技术。与上述色谱分离技术相比, 具有许多独特的优点: 分子识别性强; 固定相制备简便快速; 操作

收稿日期: 2006-08-19

作者简介: 林 喆(1966—), 男, 副教授, 主要从事中药资源学和中药有效成分筛选研究。 E-mail: linzhe333@yahoo.com.cn

* 通讯作者 原 忠 E-mail: yuanzhong19@yahoo.com.cn

表 1 共价键法和非共价键法的比较

Table 1 Comparison between covalent approach and non-covalent approach

制备方法	结合形式	溶剂	模板	功能单体	识别速度	模板的去除	选择性
共价键法	硼酸酯、西佛碱、缩醛(酮)、酯、螯合作用等	极性溶剂如水、醇即可	限制较大,必须考虑共价键能适当,聚合后模板易去除	选择有限	识别过程中结合与解离速度慢,难以达到热力学平衡,不适合快速识别	共价键作用力强,去除比较困难	结合位点的形状、功能基排列与模板精确互补,选择性好,可极大地减少峰展宽和拖尾
非共价键法	氢键、静电引力、疏水作用、离子键、金属配位键等	强烈地依赖于溶液的极性,常在非极性溶剂如氯仿、甲苯中进行	几乎没有限制:药物分子、糖类、氨基酸、核苷酸乃至金属离子均可	作用力形式多样,可使用多种功能单体	平衡较快到达,识别速度快	用适宜的溶剂洗脱即可有效去除	结合位点的不均匀性,常导致非特异性结合,易峰展宽和拖尾;此外,使用多种作用结合制得的 MIPs 具有较高选择性和分离能力

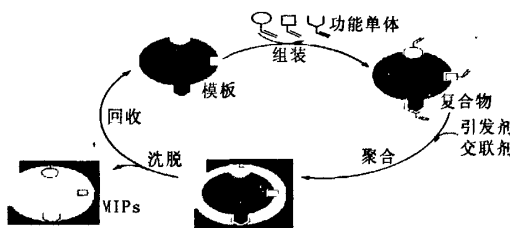


图 1 MIPs 的制备方法(共价键法)

Fig. 1 Preparation method of MIPs (covalent approach)

简单,溶剂消耗量小;模板和 MIPs 都可以回收再利用等。目前,有关分子印迹技术在药学领域的文献半数以上涉及手性药物的分离和分析,而其在中药活性成分的分离纯化中的应用虽然还不是很多,但都收到了较好的效果。

2.1 黄酮:目前所报道的分子印迹技术分离纯化黄酮类化合物多以槲皮素为模板,丙烯酸胺为功能单体。谢建春等^[5,6]首先将槲皮素 MIPs 直接用于银杏叶提取物水解液的分离,得到了槲皮素和与其结构相似的山奈酚,其中槲皮素的回收率为 89%。从而证明了利用 MIPs 直接从中药获得具有相同药效化合物的可能性。周力等^[7]以槲皮素为模板,在四氢呋喃中采用非共价键法制备了 MIPs,并从沙棘粗提物中分离得到了治疗心血管疾病的主要活性成分槲皮素和异鼠李素,进一步证明了谢建春的研究结论。Zhu 等^[8]则以槲皮素为模板制备的 MIPs 作为固相萃取材料,筛选到了藏药缘毛锦鸡儿中两个活性比槲皮素强的表皮生长因子受体抑制剂:(E)-piceatannol 和 butein,两者回收率分别为 80%和 76%。此外,谢建春等^[9]还以 2,2-二羟甲基丁醇三甲基丙烯酸酯(TRIM)为交联剂制备了槲皮素 MIPs,将其用于分子印迹固相萃取(MIP-SPE),从服用银杏叶提取物水解液的大鼠血浆中分离并测定了槲皮素和异鼠李素,表明该 MIP-SPE 能有效洁净水溶性生物样品,并直接进行定量测定。

2.2 多元酚:茶多酚中的儿茶素类成分结构相似,尤其是表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)和其对映体没食子儿茶素没食子酸酯(GCG),常规方法难以分离,而 EGCG 具有显著的抗氧化、抗癌功能。雷启福等^[10]以 EGCG 为模板, α -甲基丙烯酸为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂制备了 MIPs,从茶多酚中分离富集 EGCG 获得了满意效果。白藜芦

醇具有明显的抗菌、抗炎、抗血栓、抗高血脂等作用,对心血管病有明显效果。向海艳等^[11]以白藜芦醇为模板,丙烯酸胺为功能单体,偶氮二异丁腈为引发剂制备了 MIPs,并对虎杖提取液进行了分离,仅经过两步洗脱(甲醇淋洗后,5%醋酸甲醇溶液洗脱),就得到了白藜芦醇及少量白藜芦醇苷,且两者达到了良好的分离效果。

2.3 生物碱:分子印迹技术在生物碱中的应用较多,首先涉及到手性异构体的分离与测定。Dong 等^[12]以(-)-ephedrine 为模板,甲基丙烯酸为功能单体,合成了(-)-ephedrine 分子印迹聚合物,该聚合物对(-)-ephedrine 有良好的选择性和亲和力。将其用于分子印迹固相萃取(MIP-SPE),直接从麻黄中提取出了(-)-ephedrine,经高效液相分析,纯度较高,回收率和精密度良好,表明 MIP-SPE 能直接用于麻黄中(-)-ephedrine 的定量测定。Hwang 等^[13]分别以(+)或(-)-*n*-去甲麻黄碱为模板,甲基丙烯酸为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂制成 MIPs,对 *n*-去甲麻黄碱的对映体进行了色谱分离,分离度明显高于用手性试剂衍生化的反相色谱柱,但由于吸附位点的不均匀性和可能的非特异性吸附,峰形却变宽了。Beach 等^[14]还以(-)-伪麻黄碱和(-)-降麻黄碱为模板,制得 MIPs 作为薄层色谱的手性固定相,不仅实现了对相应模板分子的识别,而且还能分离一些结构类似的手性化合物,如麻黄碱和副肾碱^[14]。

此外,Zhang 等^[15]以原位聚合合法制备了土的宁的分子印迹整体柱,在对中毒老鼠血清和尿液中土的宁富集的同时进行定量测定,最低检测限为 4.9 ng,回收率、精密度良好,可以将其用于法医毒物分析。Nakamura 等^[16]以 2-(三氯甲基)丙烯酸为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂,采用多步溶胀热聚合合法制备了阿托品 MIPs,并将其成功应用于阿托品类生物碱(阿托品、东莨菪碱)药物的 HPLC 测定。陈移蛟等^[17]以咖啡因为模板,采用水溶液悬浮聚合合法制备了微米级分子印迹聚合物微球(MIPMs),当以茶叶碱为竞争分子时,该 MIPMs 对咖啡因有强的吸附和特异性选择识别能力,能对茶叶中的咖啡因进行分离富集。Xie 等^[18]用哈尔满(harman)为模板制备了 MIPs,并作为液相色谱-质谱联用系统的固定相,分离和在线鉴别了骆驼蓬种子甲醇提取物中两个和哈尔满结构类似的抗癌组分:哈尔明碱(harmine)和哈尔马林(harmaline)。

2.4 甾体:甾体类化合物结构相似,采用常规方法很难对某

一组分进行分离纯化和定量测定。而甾体分子大多含有羟基取代基,可以利用其和功能单体形成氢键或酯键,制备出相应 MIPs,使之得到高效分离。目前,应用分子印迹技术选择性分离、分析甾体分子已成为关注的热点^[19,20],但多数涉及人体内的一些活性物质,如胆固醇、皮质醇等^[2,21,22],用于植物中甾体成分的分离纯化较少。

油菜素甾酮被认为是一种可以刺激植物生长的活性物质,但常规提取过程非常繁琐。Kugimiya 等^[23]利用 *p*-乙炔基苯硼酸和油菜素甾酮中的两组顺式羟基发生酯化作用,制备了共价 MIPs。由于该法所得的 MIPs 对模板具有严谨、精确

的吸附,能够防止同样具有顺式羟基的雌激素三醇等成分的干扰^[23]。

2.5 香豆素:Hu 等^[24]用 MIP-SPE 从秦皮中提取到了秦皮乙素,并通过选择洗涤和洗脱溶剂,设计了一个分离秦皮乙素和其结构类似物秦皮甲素、香豆素、7-甲氧基香豆素及瑞香素的方案。

3 结语与展望

分子印迹技术在中药活性成分中的应用已较为广泛,涉及到黄酮、多元酚、生物碱、甾体、香豆素等多种结构类型化合物。其具体应用归纳见表 2。

表 2 MIT 在中药活性成分分离纯化中的应用

Table 2 Application of MIT to separating and purifying active components in CMM

应用	优点	文献
分离手性异构体及结构类似物	常规手段难以分离而 MIT 分离效果好	10、13、23、24
直接纯化活性成分并进行测定	前处理简单,方法可靠	12、16
洁净生物样品用于体内药物分析	样品处理简单	9、15
富集微量有效成分	富集痕量组分提高精密度和准确性,解决微量成分越来越少的难题	17
大批量一步分离纯化目标成分	回收率高,操作简单,免除反复柱色谱的低效率和低收率	6、8、11
以具有特定药效的化合物为模板选择性分离具有相同药效的活性组分	发现先导化合物的有效手段,为传统的中药分离提供补充	8、18

但是作为一种新型的分离手段,分子印迹技术本身还存在许多有待解决的问题,如分子印迹和识别过程的机制和定量描述,功能单体、交联剂的选择局限性等^[1],此外,其在中药活性成分分离纯化的应用中也有一定的局限性:1)有些模板往往十分昂贵或难于得到,且通常每合成 1 g 干聚合物就需要 50~100 $\mu\text{mol/L}$ 的模板,模板需要量较大^[4];回收率也有待进一步提高。2)在特殊的分离领域还需大力研究,由于结合位点的非均匀性和实际可利用官能团的数量有限,MIPs 作 HPLC 固定相时常常色谱峰过宽和拖尾,从而使柱效降低,影响了分离效果;为获得较大批量的产物,达到较大规模的制备水平,需要进一步增加聚合物中的实际有效结合位点以增加分离柱容量。3)目前制备相对分子质量较高成分的 MIPs 还有一定困难,所以现在使用的模板均为小分子的苷元,因此,需要进一步开发中药活性成分的模板。MIPs 的聚合方法多样,包括溶液聚合(本体聚合)法、悬浮聚合、原位聚合、种子聚合、表面印迹法等^[25],而在上述文献中,多用溶液聚合法,但需研磨过筛,费时费力,材料损失也较多。

尽管分子印迹技术具有上述种种局限性,还有待进一步深入研究,但由于其具备很高的选择性以及优良的理化特性,其必然会随着技术本身的不断发展和应用的逐渐增多,而在中药活性成分分离纯化领域发挥越来越大的作用。

References:

[1] Lai J P, He X W, Guo H S, et al. A review on molecular imprinting technique [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2001, 29(7): 836-844.
 [2] Whitcombe M J, Rodriguez M E, Villar P, et al. A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: Synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol [J]. *J Am Chem Soc*, 1995, 117(27): 7105-7111.
 [3] Cormack P A, Elorza A Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization [J]. *J Chromatogr B Analyt*

Technol Biomed Life Sci, 2004, 804(1): 173-182.
 [4] Ying T L, Gao M J, Zhang X L. Highly selective technique-molecular imprinting [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2001, 29(1): 99-102.
 [5] Xie J C, Luo H P, Zhu L L, et al. Extracting active compounds from herbs using molecular imprinting technology [J]. *Acta Phys-Chim Sin* (物理化学学报), 2001, 17(7): 582-585.
 [6] Xie J C, Zhu L L, Luo H P, et al. Direct extraction of specific pharmacophoric flavonoids from ginkgo leaves using a molecular imprinter polymer for quercetin [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 934(1): 1-11.
 [7] Zhou L, Xie J C, Ge Y F, et al. The application of molecular imprinting technology for *Hippophae rhamnoides* Linn. function integrants extraction [J]. *Acta Phys-Chim Sin* (物理化学学报), 2002, 18(9): 808-811.
 [8] Zhu L, Xu X. Selective separation of active inhibitors of epidermal growth factor receptor from *Caragana jubata* by molecularly imprinted solid-phase extraction [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 991(2): 151-158.
 [9] Xie J C, Chen L R, Li C X, et al. Selective extraction of functional components derived from herb in plasma by using a molecularly imprinted polymer based on 2, 2-bis (hydroxymethyl) butanol trimethacrylate [J]. *J Chromatogr B*, 2003, 788(1-2): 233-242.
 [10] Lei Q F, Zhong S A, Zhou C S, et al. Molecular recognition characteristics and Solid-Phase Extraction in *Epigallocatechin Gallate* imprinted polymer [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2005, 33(6): 857-860.
 [11] Xiang H Y, Zhou C S, Zhong S A, et al. Synthesis of resveratrol imprinted polymer and its application in separation of active ingredient in *Polygonum Sieb. Zucc.* extracts [J]. *Appl Acous* (应用化学), 2005, 22(7): 739-743.
 [12] Dong X, Sun H, Lu X, et al. Separation of ephedrine stereoisomers by molecularly imprinted polymers-influence of synthetic conditions and mobile phase compositions on the chromatographic performance [J]. *Analyst*, 2002, 127(11): 1427-1432.
 [13] Hwang C C, Lee W C. Chromatographic resolution of the enantiomers of phenylpropanolamine by using molecularly imprinted polymer as the stationary phase [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, 765(1): 45-53.
 [14] Beach I V, Shea K J. Designed catalysts. A synthetic net work polymer that catalyzes the dehydrofluorination of 4-fluoro-4-(*p*-nitrophenyl) butan-2-one [J]. *J Am Chem Soc*, 1994, 116: 379-380.
 [15] Zhang J, He L C, Fu Q. Concentration and determination of

- strychnine alkaloid in biological fluids [J]. *J Forensic Med* (法医学杂志), 2005, 21, (1): 36-38.
- [16] Nakamura M, Ono M, Nakajima T, et al. Uniformly sized molecularly imprinted polymer for atropine and its application to the determination of atropine and scopolamine in pharmaceutical preparations containing Scopolia extract [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 37(2): 231-237.
- [17] Chen Y J, Zhou X G, Li G L. Preparation of molecularly imprinted microspheres against caffeine by aqueous micro-suspension polymerization and its recognition characteristics [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(5): 692-695.
- [18] Xie J C, Zhu L L, Xu X J. Affinitive separation and on-line identification of antitumor components from *Peganum nigellastrum* by coupling a chromatographic column of target analogue imprinted polymer with mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2002, 74(10): 2352-2360.
- [19] Zhang J, Wang Y J. The application of molecular imprinting technique in steroid recognition and analysis [J]. *Chem Reag* (化学试剂), 2005, 27(6): 331-335.
- [20] Szumski M, Buszewski B. Molecularly imprinted polymers; a new tool for separation of steroid isomers [J]. *J Sep Sci*, 2004, 27(10-11): 837-842.
- [21] Baggiani C, Giraudi G, Trotta F, et al. Chromatographic characterization of a molecular imprinted polymer binding cortisol [J]. *Talanta*, 2000, 51(1): 71-75.
- [22] Hwang C C, Lee W C. Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 962(1-2): 69-78.
- [23] Kugimiya A, Matsui J, Abe H, et al. Synthesis of castasterone selective polymers prepared by molecular imprinting [J]. *Anal Chim Acta*, 1998, 365(1): 75-83.
- [24] Hu S G, Li L, He X W. Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of Chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1062(1): 31-37.
- [25] Dong X C. Application of molecular imprinted polymers to complex sample separation [J]. *J Instru Anal* (分析测试学报), 2004, 23(6): 119-123.

中药在心肌细胞离子通道方面的研究进展

李涵怡, 成建华*

(同济大学基础医学院 药理学教研室, 上海 200092)

摘要: 中医药学是我国的传统和特色医学, 现今已有多种中药被用于临床心血管疾病的预防和治疗, 而且也获得了很好的效果。现代研究认为, 这些有心脏保护作用的中药其作用的靶点主要在心肌细胞膜的离子通道上, 与第Ⅲ类抗心律失常药相比, 其具有作用温和、易于组方调控的优点, 且临床一直未发现有肺纤维化、甲状腺功能紊乱等副作用, 因此具有进一步研究开发价值。

关键词: 中药; 心肌细胞; 离子通道; 全细胞钳制技术; 抗心律失常

中图分类号: R286.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)03-0460-04

Advances in studies on Chinese materia medica effect on ion channels of myocardial cell

LI Han-yi, CHENG Jian-hua

(Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Key words: Chinese materia medica (CMM); myocardial cell; ion channel; technology of whole-cell patch clamp; antiarrhythmia

心肌细胞膜上存在多种离子通道, 如钙通道、钠通道和钾通道, 各通道在维持心肌的正常功能上起着至关重要的作用; 同时这些通道的异常改变也是引起各种心脏疾病的重要因素。当某种离子通道功能异常或数目上调或下调时将破坏心肌细胞离子通道间的平衡, 使各主要通道间比例改变而诱发心脏疾病。因此对心肌起主要作用的离子通道是大多数心脏药物特别是抗心律失常药作用的靶点。临床常用的第Ⅲ类抗心律失常药具有良好的抗颤动作用, 但也具有一定程度的致心律失常作用。如第Ⅲ类抗心律失常药中纯钾通道阻滞剂 d-sotalol 使心肌梗死后心功能低下患者病死率增加^[1]。Kate 等^[2]将西药的这种抗心律失常的治疗状况做了形象的比喻:

有人用枪准确的打断了蛇窟中一条醒着的毒蛇的头, 却惊醒了毒蛇群使问题更为棘手。中医药学是我国的传统和特色医学, 在长期的临床实践里, 人们发现许多中药具有抗心律失常及潜在的预防猝死作用; 与西药相比, 中药又具有价格低廉、天然、无或低不良反应及便于长期服用的优势。因而中药在心血管疾病治疗方面的作用越来越受到重视。本文综述近几年来一些中药单体成分对心肌细胞几种通道的研究进展。

1 对钙电流的影响

对心肌细胞来说, 离子钙将电活动与收缩联系起来, 即介导细胞的兴奋-收缩耦联^[3], 还参与维持心脏的正常收缩功能, 任何因素引起心肌收缩功能的变化, 均会涉及心肌细

收稿日期: 2006-06-21

作者简介: 李涵怡 (1979—), 女, 河南省南阳市人, 同济大学基础医学院二年级硕士研究生, 心血管药理学专业。 Tel: 13564491304 (021) 65982871 E-mail: lhyihanyi@yahoo.com.cn

* 通讯作者 成建华 E-mail: jcheng@mail.tongji.edu.cn