

## 分子印迹技术定向分离桂枝茯苓胶囊中活性成分去氢土莫酸

倪付勇<sup>1,2,3</sup>, 刘露<sup>1,2,3</sup>, 宋亚玲<sup>1,2,3</sup>, 顾睿<sup>1,2,3</sup>, 赵祎武<sup>1,2,3</sup>, 黄文哲<sup>1,2,3</sup>, 王振中<sup>1,2,3</sup>, 徐筱杰<sup>4</sup>, 萧伟<sup>1,2,3\*</sup>

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001
2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001
3. 中药提取精制新技术重点研究室, 江苏 连云港 222001
4. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871

**摘要:** **目的** 建立利用分子印迹技术从桂枝茯苓胶囊提取物中定向分离制备去氢土莫酸的方法。**方法** 以去氢土莫酸为分子模板, 采用溶胶-凝胶法制备了去氢土莫酸分子印迹聚合物, 并对其吸附性能进行研究。以此聚合物为填料, 从桂枝茯苓胶囊提取物中一步分离制备得到去氢土莫酸, 根据理化性质和波谱数据鉴定其结构。**结果** 经 Scatchard 分析, 去氢土莫酸分子印迹聚合物最大表观结合位点数 ( $Q_{\max}$ ) 为 9.10 mg/g。经 HPLC 检测去氢土莫酸质量分数为 90.76%。**结论** 该方法可用于从桂枝茯苓胶囊提取物中靶向分离制备去氢土莫酸, 有利于减少提取过程中有机溶剂的使用, 操作简单, 为其高效分离纯化提供新的方法。

**关键词:** 桂枝茯苓胶囊; 分子印迹技术; 分子印迹聚合物; 溶胶-凝胶法; 去氢土莫酸

中图分类号: R283.6; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)06-0853-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.06.012

## Directional separation of active ingredients of dehydrotumulosic acid from Guizhi Fuling Capsule by molecular imprinting technique

NI Fu-yong<sup>1,2,3</sup>, LIU Lu<sup>1,2,3</sup>, SONG Ya-ling<sup>1,2,3</sup>, GU Rui<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Yi-wu<sup>1,2,3</sup>, HUANG Wen-zhe<sup>1,2,3</sup>, WANG Zhen-zhong<sup>1,2,3</sup>, XU Xiao-jie<sup>4</sup>, XIAO Wei<sup>1,2,3</sup>

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China
3. The Key Laboratory for the New Technique Research of TCM Extraction and Purification, Lianyungang 222001, China
4. College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

**Abstract: Objective** To establish a method for directional separation of dehydrotumulosic acid from the extracts of Guizhi Fuling Capsule with molecular imprinting technique (MIT). **Methods** Molecular imprinting polymer (MIP) was prepared by sol-gel process with dehydrotumulosic acid as molecular template to study the absorption property. The dehydrotumulosic acid was achieved from Guizhi Fuling Capsule by one-step separation with polymer as filler. The structure of dehydrotumulosic acid was identified on the basis of the spectral data and physicochemical property. **Results** The maximum binding capacity ( $Q_{\max}$ ) of MIP was 9.10 mg/g measured by Scatchard equation and the purity of dehydrotumulosic acid was 90.76% by HPLC. **Conclusion** The established MIT for the directional separation of dehydrotumulosic acid from Guizhi Fuling Capsule is simple and benefit to reducing the solvent use during the separation process, which could offer a novel method for the separation and purification of dehydrotumulosic acid.

**Key words:** Guizhi Fuling Capsule; molecular imprinting technique; molecular imprinting polymer; sol-gel process; dehydrotumulosic acid

桂枝茯苓胶囊是由桂枝、牡丹皮、桃仁、白芍和茯苓 5 味药组成, 具有活血化瘀、缓消癥块之功效, 是我国传统的纯中药制剂<sup>[1]</sup>。该处方来源于东

汉张仲景的《金匱要略》, 临床上主要用于治疗妇科痛经、子宫肌瘤、子宫内膜异位、乳腺增生及卵巢囊肿等症<sup>[2-5]</sup>, 是目前治疗妇科血瘀疾病的首选药。

收稿日期: 2015-02-04

基金项目: 科技部重大新药创制: 现代中药创新集群与数字制药技术平台 (2013ZX09402203)

作者简介: 倪付勇, 男, 硕士, 研究员, 从事天然产物化学研究。Tel: (0518)81152323 E-mail: nifuyong163@163.com

\*通信作者 萧伟, 男, 博士, 研究员级高级工程师, 研究方向为中药新药研究与开发。Tel: (0518)81152337 E-mail: kanionlunwen@163.com

为进一步阐明其治疗疾病的物质基础,本课题组对桂枝茯苓胶囊化学成分进行了系统的分离纯化和结构鉴定<sup>[6-10]</sup>,先后得到 61 个化合物,但是由于中药复方本身化学组成比较复杂,化合物的分离纯化过程繁琐,因此分离得到的化合物大部分量较少,去氢土莫酸就是其中之一。去氢土莫酸属于四环三萜类化合物,是桂枝茯苓胶囊的重要活性成分,具有多种药理活性,包括抗肿瘤、抗炎、调节免疫功能及止吐等作用<sup>[11-14]</sup>,对该化合物的研究具有重要的现实意义。因此,有必要对其进行深入研究,鉴于桂枝茯苓胶囊在化学组成上是一个复杂体系,而传统的分离纯化过程繁琐,效率低,故需要一种快速、简便、高效的方法对其进行分离纯化。

分子印迹技术(molecular imprinting technique, MIT)又称分子烙印,是高分子科学、材料科学、生物化学、化学工程等学科有机结合在一起,为获得在空间结构和结合位点上与模板分子完全匹配的聚合物即分子印迹聚合物(molecular imprinting polymer, MIP)的一种新型实验制备技术<sup>[15]</sup>。目前,分子印迹技术在中药活性成分分离纯化中已逐渐开始尝试应用<sup>[15-18]</sup>,因其高效、稳定、操作简便等优点,将会在中药及复方的研究中得到越来越广泛的应用<sup>[15,19-22]</sup>。

本研究以目标成分去氢土莫酸为分子模板,利用溶胶-凝胶法<sup>[23]</sup>合成 MIP,以该聚合物为填料,实现了桂枝茯苓胶囊中去氢土莫酸的分离纯化,为去氢土莫酸的规模制备提供了一条新的途径。

## 1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司,配自动进样器、四元泵、MWD 检测器;BP211D 型电子分析天平,德国 Sartorius 公司;Milli-Q Academic 纯水机,美国 Millipore 公司;KQ-250DB 型超声波清洗仪,昆山市超声仪器有限公司;HJ-5 型多功能搅拌器、HH-2 型数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;500 目筛,上海丰行筛网制造有限公司。

去氢土莫酸对照品,批号 140806,自制,质量分数 98.23%;桂枝茯苓胶囊,批号为 130201,江苏康缘药业股份有限公司提供;二氧化硅微珠(silica beads, 62~105 μm, Sigma Aldrich)、3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTS, 98%)、四乙氧基硅烷(TEOS, 98%),购自美国阿法埃莎化学有限公司;丙酮、甲醇、乙醇、浓盐酸、冰醋酸和四氢呋喃均

为分析纯,购自南京化学试剂公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 MIP 的制备<sup>[23]</sup>

200 g 活化二氧化硅微珠(62~105 μm),加入 2 mol/L 的盐酸溶液 2.5 L,60 °C 水浴 6 h,纯化水洗至中性,无水甲醇洗涤 3 次,70 °C 干燥 24 h,备用。模板分子去氢土莫酸(1.5 mmol)、500 mL 四氢呋喃、功能单体 APTS(20 mL)置于圆底烧瓶中,室温磁力搅拌 2 h,加入 75 g 活化后的二氧化硅微珠,继续搅拌 2 h;再加入 TEOS(45 mL),搅拌 1 h;最后加入 7 mL 1.0 mol/L 的冰醋酸水溶液,室温搅拌 18 h,减压滤过,甲醇洗涤 3 次,置于 100 °C 烘箱中 3 h。取出过筛(30 μm),除去粒径过小的颗粒,聚合物用甲醇-冰醋酸(9:1)洗涤,除去模板分子及未聚合的功能单体和交联剂,直至洗涤液紫外检测无以上物质的紫外吸收,最后用甲醇洗去残留冰醋酸,60 °C 干燥,得去氢土莫酸 MIP。

空白聚合物(non-imprinted polymer, NIP)的制备仅不加模板分子去氢土莫酸,制备过程同 MIP 的制备。

### 2.2 静态吸附实验

将“2.1”项下的去氢土莫酸 MIP 和 NIP 依次精密称取 30.0 mg,各 6 份,分别置于 10 mL 量瓶中,分别依次加入不同质量浓度(20~70 mg/L)的去氢土莫酸甲醇溶液 3 mL,室温振摇 20 h,离心,取上清液,用 HPLC 在 230 nm 波长下测定溶液中模板分子去氢土莫酸质量浓度的变化。根据吸附前后溶液中模板分子去氢土莫酸的质量浓度变化计算 MIP 的吸附量,并进行 Scatchard 分析。结果见图 1、2。等温吸附曲线是 MIP 或 NIP 的吸附量对去氢土莫酸甲醇溶液的平衡质量浓度图。MIP 或 NIP 对模板分子的吸附量( $Q$ )的计算公式<sup>[21]</sup>为  $Q=(C_0-C_s)V/m$ , $Q$  为静态平衡吸附量(mg/g), $C_0$  为底物的起始质量浓度(mg/L), $C_s$  为吸附平衡时底物的质量浓度(mg/L), $V$  为底物溶液的体积(L), $m$  为 MIP 的使用量(g)。

由图 1 可知,随着去氢土莫酸质量浓度的升高,两者吸附量增加,但 MIP 吸附能力高于其相应的 NIP,说明 MIP 对目标分子具有选择性的吸附性能,具有较强的吸附能力。

为了更直观精确地评价 MIP 的吸附能力,将 MIP 与目标分子的结合量采用 Scatchard 方程进行分析,其公式如下: $Q/C=(Q_{\max}-Q)/K_d$ , $Q_{\max}$  为聚

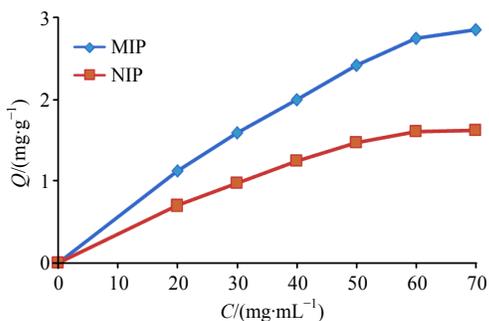


图1 去氢土莫酸 MIP 和 NIP 的等温吸附曲线

Fig. 1 Isothermal adsorption curves of MIP and NIP of dehydrotumulosic acid

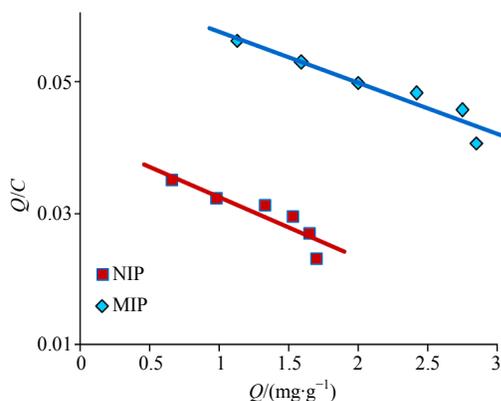


图2 去氢土莫酸 MIP 和 NIP 的 Scatchard 图

Fig. 2 Scatchard plots of MIP and NIP of dehydrotumulosic acid

合物对目标分子吸附的最大表观结合位点数 (mg/g),  $C$  为目标分子的平衡质量浓度 (mg/L),  $K_d$  为聚合物-目标分子复合物的解离常数 (mg/L)。根据实验数据计算出 MIP 和 NIP 的 Scatchard 方程分别为 MIP  $Q/C = -0.007 Q + 0.065$ , NIP  $Q/C = -0.009 Q + 0.041$ 。

由图2可知, MIP 的 Scatchard 曲线呈现较好的线性, 而 NIP 的 Scatchard 曲线线性相对较差, 说明在 MIP 内形成了一个特异性结合点。根据 Scatchard 曲线的斜率 ( $-1/K_d$ ) 和截距 ( $Q_{max}/K_d$ ), 可以计算出 MIP 的  $R^2 = 0.918$ ,  $K_d = 0.14$  mg/L,  $Q_{max} = 9.10$  mg/g; NIP 的  $R^2 = 0.821$ ,  $K_d = 0.11$  mg/L,  $Q_{max} = 4.51$  mg/g。因此可以看出去氢土莫酸 MIP 对目标分子吸附性能高于 NIP。

### 2.3 去氢土莫酸的制备

**2.3.1 色谱柱的制备** 称取“2.1”项下去氢土莫酸 MIP 70 g, 装入玻璃柱中 (350 mm × 35 mm), 装填均匀后用甲醇浸润该提取柱, 备用。

**2.3.2 桂枝茯苓胶囊提取物的制备** 取桂枝茯苓胶

囊内容物 50 g, 用 10 倍量 50% 甲醇回流提取 2 h, 滤渣加 8 倍量甲醇提取 1 h, 合并 2 次滤液, 减压浓缩, 真空干燥得固体 18.6 g (去氢土莫酸质量分数为 0.3%), 备用。

**2.3.3 去氢土莫酸的制备** 取“2.3.2”项下的桂枝茯苓胶囊甲醇提取物 18.5 g, 溶于 200 mL 甲醇溶液中, 离心, 取上清液, 加载至“2.3.1”项下色谱柱, 多次上样, 每次取 10 mL 样品上样, 体积流量 10 mL/min, 先用 600 mL 甲醇除杂, 再用甲醇-冰醋酸 (9:1) 洗脱, 收集洗脱液, 浓缩, 干燥并计算收率 (收率 = 制备得到的目标成分量/粗品中目标成分量), 得淡黄色粉末 49.2 mg, 收率为 88.2%。

### 2.4 质量分数测定

**2.4.1 色谱条件**<sup>[24]</sup> 色谱柱为 Acuity C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱程序: 0~5 min, 5% 乙腈; 5~20 min, 5%~17% 乙腈; 20~30 min, 17%~19% 乙腈; 30~40 min, 19%~26% 乙腈; 40~60 min, 26%~88% 乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 进样体积 10 μL; 检测波长 230 nm。

**2.4.2 对照品溶液制备** 精密称取去氢土莫酸对照品 4.8 mg, 置于 20 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为 240 μg/mL 的对照品溶液。

**2.4.3 供试品溶液制备** 精密称取“2.3.3”项下淡黄色粉末 4.8 mg, 置于 20 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制成质量浓度为 240 μg/mL 的供试品溶液。

**2.4.4 样品测定** 分别取去氢土莫酸对照品和供试品溶液各 10 μL, 按“2.4.1”项下色谱法测定, 用面积归一化法计算去氢土莫酸的质量分数为 90.76%, 色谱图见图 3。

### 2.5 去氢土莫酸的结构鉴定

淡黄色粉末。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 5.51 (1H, s, H-7), 5.39 (1H, d,  $J = 5.0$  Hz, H-11), 4.78 (1H, s, H-31), 1.45 (3H, s, H-30), 1.19 (3H, s, H-28), 1.06 (3H, s, H-19), 1.04 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-26), 0.98 (3H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-27), 1.05 (3H, s, H-29); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 36.0 (C-1), 28.5 (C-2), 78.5 (C-3), 38.4 (C-4), 48.3 (C-5), 23.1 (C-6), 121.2 (C-7), 141.6 (C-8), 146.9 (C-9), 36.9 (C-10), 116.8 (C-11), 35.9 (C-12), 44.4 (C-13), 48.8 (C-14), 44.1 (C-15), 76.0 (C-16), 57.5 (C-17), 17.1

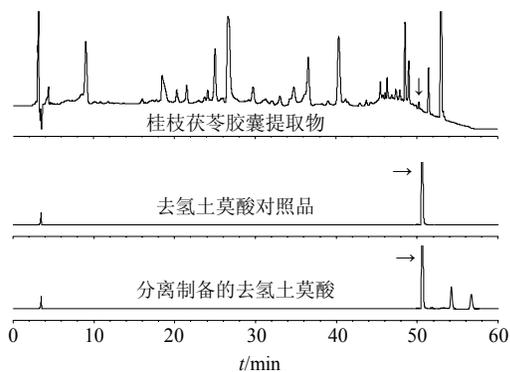


图 3 去氢土莫酸制备的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of preparation of dehydrotumulosic acid

(C-18), 22.8 (C-19), 48.5 (C-20), 177.9 (C-21), 31.8 (C-22), 33.7 (C-23), 156.9 (C-24), 34.3 (C-25), 22.6 (C-26), 21.5 (C-27), 28.2 (C-28), 15.8 (C-29), 26.4 (C-30), 107.4 (C-31)。以上数据与文献报道基本一致<sup>[8]</sup>, 故鉴定该化合物为去氢土莫酸。

### 3 讨论

MIT 在中药粗提物活性成分分离方面具有分离效率高, 溶剂使用量小, 保护环境等优势, 现已被广泛用于黄酮、多元酚、生物碱、甾体等多种结构化合物的分离纯化<sup>[16-17,19]</sup>。由于 MIT 具有很高的选择性和高度的识别功能<sup>[17]</sup>, 可有效解决中药成分复杂、提取分离过程繁琐这一难题。

本研究针对复方制剂桂枝茯苓胶囊的复杂化学体系, 运用溶胶-凝胶法制备 MIP, 以 MIP 为填料从桂枝茯苓胶囊中分离纯化得到 49.2 mg 质量分数为 90.76% 的去氢土莫酸, 可为高纯度去氢土莫酸的制备及桂枝茯苓胶囊药理药效的深入研究提供样品。同时, 利用 MIT 实现了复方或单味制剂中低含量成分的分离纯化, 为快速分离制备毫克级乃至克级单体化合物提供了一种新的思路和方法。

### 参考文献

[1] 孙 兰, 李家春, 周 军, 等. 桂枝茯苓胶囊对肾上腺素诱导大鼠实验性肠系膜微循环障碍的改善研究 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(1): 8-12.  
 [2] 王如意, 朱洪辉. 桂枝茯苓胶囊的临床应用研究新进展 [J]. 西北药学杂志, 2012, 25(1): 80-81.  
 [3] 胡春萍, 胡婷婷, 蔡雪婷, 等. 桂枝茯苓胶囊对子宫内位异位症大鼠脾脏 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞数和 NK 细胞杀伤活性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 145-148.  
 [4] 宋俊生, 高 岑, 熊 俊, 等. 桂枝茯苓胶囊与西医疗疗子宫肌瘤疗效比较的系统评价 [J]. 中国循证医学杂志, 2010, 10(12): 1439-1445.

[5] 蒋志滨, 于蓓蓓, 华浩明, 等. 桂枝茯苓胶囊联合米非司酮治疗子宫肌瘤疗效的 Meta 分析 [J]. 中成药, 2013, 35(1): 36-40.  
 [6] 王振中, 李 成, 李家春, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2011, 42(5): 856-858.  
 [7] 朱克近, 王振中, 李 成, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (II) [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1087-1089.  
 [8] 杨鹏飞, 王振中, 王洪庆, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (III) [J]. 中草药, 2012, 43(3): 463-466.  
 [9] 王洪庆, 刘 超, 方莲花, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (IV) [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1386-1390.  
 [10] 杨鹏飞. 桂枝茯苓胶囊及其单味药茯苓化学成分和生物活性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.  
 [11] 仲兆金, 刘 浚. 茯苓有效成分三萜的研究进展 [J]. 中成药, 2001, 23(1): 60-64.  
 [12] 仲兆金, 许先栋, 周京华, 等. 茯苓三萜成分的结构及其衍生物的生物活性 [J]. 中国药物化学杂志, 1998, 8(4): 239-244.  
 [13] 周 立, 张 玮, 藺慧颜, 等. 茯苓素诱导肿瘤坏死因子的作用 [J]. 中国抗生素杂志, 1994, 19(5): 376-380.  
 [14] 仲兆金, 刘 浚. 茯苓有效成分三萜的研究进展 [J]. 中成药, 2001, 23(1): 58-62.  
 [15] 吴正红. 分子印迹技术在药学中的应用 [J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(5): 477-480.  
 [16] 谢建春, 骆宏鹏, 朱丽荔, 等. 利用分子烙印技术分离中草药活性组分 [J]. 物理化学学报, 2001, 17(7): 582-585.  
 [17] 周 立, 谢建春, 戈育芳, 等. 分子烙印技术在沙棘功效成分提取中的应用 [J]. 物理化学学报, 2002, 18(9): 808-811.  
 [18] Chen T F, Gu J Y, Wang H, *et al.* Semi-preparative scale separation of emodin from plant extract by using molecularly imprinted polymer as stationary phase [J]. *Chromatographia*, 2014, 77(13/14): 893-899.  
 [19] 林 喆, 罗 艳, 原 忠. 分子印迹技术在中药活性成分分离纯化中的应用 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 457-459.  
 [20] 陈 晖, 戴红霞. 分子印迹技术在中药研究中的应用 [J]. 亚太传统医药, 2009, 5(3): 138-140.  
 [21] 马喜文, 杜 平, 张 利. 分子印迹技术在天然药物有效成分提取分离中的应用 [J]. 广东化工, 2011, 38(214): 71-72.  
 [22] 衣丽娜, 尹小英, 江一帆, 等. 分子印迹技术高效分离中药活性成分的应用 [J]. 国际药学研究杂志, 2012, 39(4): 307-310.  
 [23] Gong T Y, Cao X J. Preparation of molecularly imprinted polymers for artemisinin based on the surfaces of silica gel [J]. *J Biotechnol*, 2011, 153(1/2): 8-14.  
 [24] 李家春, 孙 兰, 李红娟, 等. 桂枝茯苓胶囊 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1333-1335.