

左旋延胡索乙素印迹聚合物的制备及固相萃取应用

朱俊访, 李 博*

广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520

摘要:目的 利用分子印迹技术制备左旋延胡索乙素(*L*-THP)分子印迹聚合物(MIPs),并进行固相萃取应用研究。方法 以*L*-THP为模板分子,甲基丙烯酸(MAA)为功能单体,乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)为交联剂,制备左旋延胡索乙素分子印迹聚合物(*L*-THP-MIPs),并进行固相萃取实验优化萃取条件,考察*L*-THP-MIPs吸附的选择性和专一性。结果 *L*-THP-MIPs能特异性地吸附*L*-THP,而对*L*-THP的结构类似物延胡索甲素未表现出明显的吸附行为。结论 *L*-THP-MIPs对*L*-THP具有良好的选择性和专一性。

关键词:分子印迹技术;分子印迹聚合物;左旋延胡索乙素;固相萃取;甲基丙烯酸;乙二醇二甲基丙烯酸酯;延胡索甲素
中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)01-0072-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.01.011

Preparation of molecular imprinted polymers for solid-phase extraction of *L*-tetrahydropalmatine

ZHU Jun-fang, LI Bo

Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China

Abstract: Objective To prepare the molecularly imprinted polymer (MIPs) of *L*-tetrahydropalmatine (*L*-THP) by the molecular imprinting technique and study on solid-phase extraction. **Methods** Using *L*-THP as template, methyl acrylic acid (MAA) as functional monomer, and ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as a cross-linking agent to prepare the *L*-THP-MIPs. A test was conducted to investigate the selectivity and the specificity of solid-phase extraction. **Results** The experiment showed that the MIPs had the specific adsorption to *L*-THP, but did not have the specific adsorption to corydaline the structural analogue with *L*-THP. **Conclusion** The *L*-THP-MIPs have a good selectivity and the specificity of *L*-THP.

Key words: molecular imprinting technique; molecularly imprinted polymer; *L*-tetrahydropalmatine; solid-phase extraction; methyl acrylic acid; ethylene glycol dimethacrylate; corydaline

延胡索为罂粟科紫堇属植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎,具有活血、利气、止痛之功效,临床主要用于各种疼痛、心血管疾病及痛经等。延胡索具有镇痛作用,其镇痛效价约为阿片的 1/100。延胡索总碱及延胡索甲素、乙素、丑素、癸素均有镇痛作用,以延胡索乙素、丑素为最强,延胡索甲素次之。大量的动物实验证明较大剂量左旋延胡索乙素(*L*-THP)具有明显的催眠作用,可抑制条件反射,减少自发及被动反射,但不能消除翻正反射,显示无麻醉作用。延胡索具有良好的临床应用价值,其中的 *L*-THP 等叔胺类生物碱

是其作用的主要物质基础^[1]。分子印迹技术具有分子识别性强、固定相制备简便快捷、操作简单、性质稳定、溶剂消耗量小以及模版分子和分子印迹聚合物(MIPs)可回收利用等优点^[2]。以中药活性物质为模板制备的 MIPs,正是具有其他分离材料所不具备的强特异性和高选择性,因此在中药活性成分的分离、分析中具有很好的应用前景^[3]。本实验采用分子印迹技术分离 *L*-THP,以期获得一种用于富集 *L*-THP 的可行有效的方法。

1 仪器与材料

LC-2010A 岛津高效液相色谱仪、AUY120 电子

收稿日期: 2015-07-29

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(A2015470); 广东食品药品职业学院自然科学研究项目(2014YZ010)

作者简介: 朱俊访(1981—),男,硕士,研究方向为天然产物有效成分分离与分析。Tel: 13560169686 E-mail: junfang-zhu@163.com

*通信作者 李 博,女,硕士。E-mail: libo8207@163.com

天平,日本岛津仪器公司;UV2600 紫外分光光度计,尤尼科仪器有限公司;HH-4 恒温水浴锅,常州澳华仪器有限公司;L-THP 对照品(质量分数98%,批号14020702),L-THP 原料药(质量分数98%,批号20141226),西安沃森生物科技有限公司;延胡索甲素(批号20150316,质量分数98%)南京森贝伽生物科技有限公司;延胡索提取物(广州市康之恒中药饮片有限公司);甲基丙烯酸(MAA)、偶氮二异丁氰(AIBN),科密欧化学试剂有限公司;乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA),乔科化学有限公司。乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯。

2 方法

2.1 左旋延胡索乙素分子印迹聚合物(L-THP-MIPs)和空白分子印迹聚合物(NIPs)的制备^[4]

准确称取 L-THP 360.4 mg (1 mmol),置于 Schlenk 管中,加入一定量氯仿超声振荡 5 min,使其溶解,加入一定量的 MAA,静置过夜,再加入一定量的 EDMA 和 50 mg AIBN,超声振荡 10 min,通氮气脱氧 15 min,抽真空,密封后放入 60 °C 水浴锅中保温 24 h,得到聚合物。将聚合物研磨,过 200 目筛后放入索氏提取器中,用甲醇-冰醋酸(9:1)提取,直至提取液在 280 nm 下无模板分子吸收,再用甲醇洗去残留的冰醋酸,晾干后真空干燥 24 h 后备用。

NIPs 的合成除了不加模板分子 L-THP 外,其余步骤同 MIPs 的制备。

为了筛选 L-THP-MIPs 制备的最佳工艺,将 EDMA 的用量分别设为 2、4、6、8、10 mmol,MAA 用量为 2 mmol,制备得到 1~5 号 L-THP-MIPs。确定 MAA 与 EDMA 的比例后,加大投药量,制备得到 6~9 号 L-THP-MIPs,根据所得 MIPs 性状和平衡吸附量(Q)判断最佳工艺。

$$Q = (C_0 - C_e) / 1000 W$$

Q 为平衡吸附量($\mu\text{mol/g}$), C_0 为溶液中 L-THP 的起始浓度($\mu\text{mol/L}$), C_e 为平衡时溶液中 L-THP 的浓度($\mu\text{mol/L}$), W 为印迹聚合物的质量(g)

2.2 静态吸附性能实验

精密称取 40 mg 的 L-THP-MIPs 10 份,放入 25 mL 具塞锥形瓶中,分别加入用甲醇配制的浓度分别为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10 mmol/L 的 L-THP 对照品溶液,室温振荡 24 h,取溶液进行离心、滤过,滤液于 280 nm 处测定吸光度。

NIPs 的静态吸附实验的处理和操作同上^[5-6]。

2.3 固相萃取实验^[7-10]

取 2 支空柱(100 mm×10 mm)分别加入 0.5 g 干燥的 L-THP-MIPs 和 NIPs,用 10 mL 甲醇冲洗平衡。分别吸取浓度为 0.10 mmol/L 的 L-THP 对照品溶液 2 mL 加至平衡后的 L-THP-MIPs 柱和 NIPs 柱。为了优化淋洗条件,分别选用甲醇、氯仿、丙酮、丙酮-水和丙酮-氯仿进行淋洗,收集洗脱液,再用甲醇-冰醋酸(9:1)洗脱,收集洗脱液。洗脱液分别浓缩至干,再用甲醇溶解,进行 HPLC 分析。

为了考察 L-THP-MIPs 的吸附选择性,另取 2 支空柱,分别装入 L-THP-MIPs 和 NIPs,分别上样 L-THP 的结构类似物延胡索甲素,用优化的条件进行冲洗,同样进行 HPLC 分析,实验重复 3 次。

2.4 HPLC 测定 L-THP 条件与线性关系考察

Agilent C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-1%磷酸水溶液(用三乙胺调 pH 6.0, 80:20),进样量为 20 μL ,体积流量为 1.0 mL/min,检测波长为 280 nm。

线性关系考察:精密称取 18.2 mg L-THP 对照品,用甲醇定容至 100 mL,得浓度为 0.5 mmol/L 的对照品溶液,用甲醇稀释至浓度为 0.01~0.10 mmol/L 的 L-THP 系列对照品溶液,进行 HPLC 分析,得峰面积(A)与浓度(C)的线性关系为 $A = 143\,531 C - 5\,103.9$, $r^2 = 0.999\,7$ 。

2.5 应用 L-THP-MIPs 固相萃取柱提取 L-THP 验证实验

称取延胡索提取物粉末(50 目)20 g,置于 500 mL 圆底烧瓶,加入甲醇 300 mL,加热回流 60 min,抽滤浓缩,甲醇定容至 100 mL,得样品溶液。取样品溶液 2 mL 稀释至 250 mL,得供试品溶液。取供试品溶液适量,按“2.4”项方法测定供试品溶液中 L-THP 的量。

称取 0.5 g L-THP-MIPs 装柱,用 10 mL 甲醇冲洗平衡,精密吸取 2 mL 供试品溶液,经过 10 mL 丙酮淋洗、10 mL 甲醇-冰醋酸(9:1)洗脱后,进行 HPLC 分析,每个实验重复 3 次。

3 结果与讨论

3.1 L-THP-MIPs 制备

工艺筛选结果见表 1。改变制备工艺中交联剂 EDMA 的量分别得到 1~5 号 MIPs,根据所得 MIPs 性状和 Q 判断,4 号工艺较佳,因此可确定功能单体 MAA 和交联剂 EDMA 的比例为 1:4。固定工

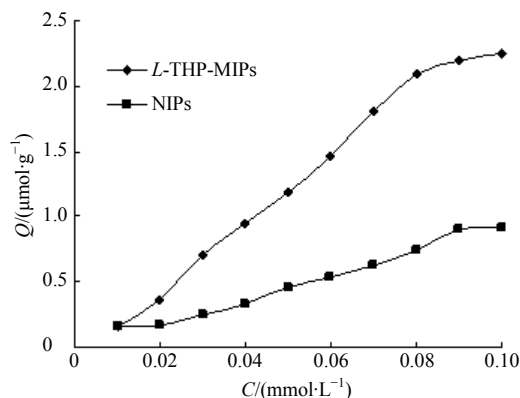
表 1 *L*-THP-MIPs 的制备条件Table 1 Preparation conditions of *L*-THP-MIPs

序号	<i>L</i> -THP/mmol	氯仿/mL	MAA/mmol	EDMA/mmol	性状	$Q/(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1})$
1	1	5	2	2	黄色液体	无
2	1	5	2	4	黄色半液体半固体	无
3	1	5	2	6	黄色固体少量黄色液体	无
4	1	5	2	8	黄色固体	1.27
5	1	5	2	10	浅黄色固体	0.85
6	1	10	3	12	黄色固体少量黄色液体	1.78
7	1	10	4	16	黄色固体	1.53
8	1	10	5	20	黄色固体	1.91
9	1	10	6	24	浅黄色固体	1.80

艺中 MAA 和 EDMA 所用量的比例为 1:4, 加大投料量, 得 6~9 号 MIPs, 由 MIPs 性状和 Q 值可判断较佳工艺为 8 号, 即印迹分子 *L*-THP 的量为 1 mmol, 溶剂氯仿的量为 10 mL, 功能单体 MAA 的量为 5 mmol, 交联剂 EDMA 的量为 20 mmol。

3.2 *L*-THP-MIPs 和 NIPs 的平衡吸附性能

通过静态吸附实验研究 *L*-THP 在 *L*-THP-MIPs 和 NIPs 上的吸附行为, 等温吸附曲线见图 1。由图 1 可见在所研究的浓度范围内, *L*-THP-MIPs 对 *L*-THP 具有一定的吸附能力, 吸附量随着溶液浓度的升高逐渐增大, 最大吸附量可达 $2.25 \mu\text{mol/g}$ 。而 NIPs 对 *L*-THP 的吸附相对较小, 说明 *L*-THP-MIPs 存在印迹效果。

图 1 *L*-THP-MIPs 和 NIPs 的等温吸附曲线Fig. 1 Isothermal adsorption curve of *L*-THP-MIPs and NIPs

3.3 固相萃取条件的优化

已上样的 *L*-THP-MIPs 柱和 NIP 柱分别使用甲醇、氯仿、丙酮、丙酮-水 (4:1) 和丙酮-氯仿 (4:1) 等不同极性溶剂洗脱, 流出液进行 HPLC 分析, 每个实验重复 3 次, 计算平均回收率, 见表 2。

表 2 不同溶剂洗脱后 *L*-THP 的平均回收率 ($n=3$)Table 2 Average recovery rates of *L*-THP eluted by different solvents ($n=3$)

溶剂	平均回收率/%	
	<i>L</i> -THP-MIPs	NIPs
甲醇	57.4	92.7
氯仿	71.6	83.4
丙酮	28.8	95.4
丙酮-水 (4:1)	70.3	95.2
丙酮-氯仿 (4:1)	41.8	95.0

根据印迹原理, *L*-THP-MIPs 应对 *L*-THP 有特异性吸附能力, 而 NIPs 是非特异性吸附, 因此可通过回收率实验比较 *L*-THP-MIPs 与 NIPs 之间的差异, 筛选合适的洗脱剂。甲醇、氯仿和丙酮-水 (4:1) 对 *L*-THP-MIPs 柱的清洗效果不好, *L*-THP-MIPs 柱和 NIPs 柱之间差异不大, 说明这 3 种溶剂对 *L*-THP 的洗脱能力较强。丙酮和丙酮-氯仿 (4:1) 洗脱的 *L*-THP-MIPs 柱和 NIPs 柱的回收率差值可达 66.6% 和 53.2%, 表明这 2 种溶剂可用于 *L*-THP-MIPs 柱的清洗, 最终确定丙酮为洗脱剂。

3.4 选择性评价

L-THP (0.10 mmol/L) 与其结构类似物延胡索甲素 (0.10 mmol/L, 结构见图 2) 分别进行 *L*-THP-MIPs 柱和 NIPs 柱的固相萃取, 上样 2 mL, 经过 10 mL 丙酮洗脱、10 mL 甲醇-冰醋酸 (9:1) 洗脱后, 进行 HPLC 分析, 每个实验重复 3 次, 计算平均回收率, 见表 3。

由表 3 可知, *L*-THP 用 *L*-THP-MIPs 吸附后用丙酮洗脱时只有一部分被洗脱下来, 大部分被洗脱剂甲醇-冰醋酸洗脱下来, 这是由于 *L*-THP 能被 *L*-

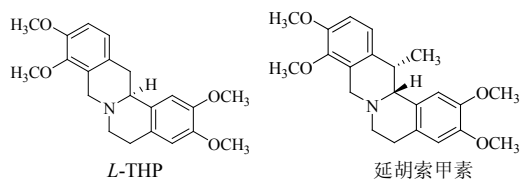


图 2 *L*-THP 与延胡索甲素的结构

Fig. 2 Structures of *L*-THP and corydaline

表 3 *L*-THP 和延胡索甲素分别在 *L*-THP-MIPs 柱和 NIPs 柱上的洗脱平均回收率 ($n = 3$)

Table 3 Average recovery rates of *L*-THP and corydaline in *L*-THP-MIPs column and NIPs column ($n = 3$)

洗脱方式	平均回收率/%	
	<i>L</i> -THP	延胡索甲素
<i>L</i> -THP-MIPs 柱丙酮洗脱	29.2	92.8
<i>L</i> -THP-MIPs 柱甲醇-冰醋酸 (9:1) 洗脱	70.1	7.1
NIPs 柱丙酮洗脱	95.1	93.7
NIPs 柱甲醇-冰醋酸 (9:1) 洗脱	4.8	6.2

THP-MIPs 选择性吸附, 甲醇-冰醋酸比丙酮洗脱能力强, 可以破坏 *L*-THP 与 *L*-THP-MIPs 非共价键作用。*L*-THP 与 NIPs 只有非特异性吸附, 因此在 NIPs 柱上绝大部分 *L*-THP 在丙酮洗脱时被洗脱下来。延胡索甲素在 *L*-THP-MIPs 柱和 NIPs 柱的吸附行为与 *L*-THP 在 NIPs 柱的吸附行为一致, 由此可知其吸附行为也是非特异性吸附, 说明 *L*-THP-MIPs 对 *L*-THP 的结构类似物延胡索甲素没有吸附选择性, 即 *L*-THP-MIPs 对模板分子 *L*-THP 具有高度的选择性和专一性。*L*-THP 经过 *L*-THP-MIPs 固相萃取洗脱剂清洗后, 平均回收率为 70.1%, RSD 为 2.8%, 最大吸附量可达 49.9 $\mu\text{g/g}$ 。

3.5 *L*-THP 富集实验

将延胡索提取物供试品溶液过 *L*-THP-MIPs 柱, 比较上样前和洗脱后样液中 *L*-THP 的量, 得平均回收率为 68.7%, RSD 为 3.6%。结果显示以 *L*-THP 为模板分子的 *L*-THP-MIPs 可有效地从延胡索提取物中分离出 *L*-THP。

4 讨论

MIPs 的制备工艺与溶剂、功能单体和交联剂的用量密切相关, 本实验通过筛选确定 *L*-THP-MIPs 的较佳制备工艺为 *L*-THP 的量为 1 mmol, 溶剂氯

仿的量为 10 mL, 功能单体 MAA 的量为 5 mmol, 交联剂 EDMA 的量为 20 mmol。对所得 *L*-THP-MIPs 进行平衡吸附实验, 结果表明 *L*-THP-MIPs 对模板分子 *L*-THP 有一定的印迹能力。通过固相萃取研究, 由 *L*-THP-MIPs 制作的萃取柱能较好地分离 *L*-THP 和结构类似物延胡索甲素, 并且对延胡索提取液中 *L*-THP 表现出了良好的富集能力。本实验采用分子印迹技术制备了 *L*-THP-MIPs, 表现出良好的吸附特性与选择性, 为 *L*-THP 的富集与纯化提供了新的方法与思路。

参考文献

- [1] 姜永慧. 延胡索药理研究及临床应用进展 [J]. 科技创业家, 2013(5): 217.
- [2] 谭天伟. 分子印迹技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.
- [3] 陈方方, 师彦平. 分子印迹固相萃取技术在天然产物有效成分分离分析中的应用进展 [J]. 色谱, 2013, 31(7): 626-633.
- [4] Ou J J, Kong L, Pan C S, *et al.* Determination of *DL*-tetrahydropalmatine in *Corydalis yanhusuo* by *L*-tetrahydropalmatine imprinted monolithic column coupling with reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1117: 163-169.
- [5] 王胜利, 申利红, 王建森, 等. 大黄酚分子印迹聚合物的合成及固相萃取应用 [J]. 中药材, 2010, 33(12): 1946-1949.
- [6] López M M C, Cela-Pérez M C, Dopico-García S, *et al.* Preparation, evaluation and characterization of quercetin-molecularly imprinted polymer for preconcentration and clean-up of catechins [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 721: 68-78.
- [7] 黄丹丹, 李 莉, 殷勇冠, 等. 分子印迹聚合物选择性富集长春碱的研究 [J]. 中国科学: 化学, 2010, 40(6): 794-800.
- [8] Hong Y S, Chen L G. Extraction of quercetin from *Herba Lysimachiae* by molecularly imprinted-matrix solid phase dispersion [J]. *J Chromatogr B*, 2013, 941: 38-44.
- [9] Zeng H, Wang Y Z, Liu X J, *et al.* Preparation of molecular imprinted polymers using bi-functional monomer and bi-crosslinker for solid-phase extraction of rutin [J]. *Talanta*, 2012, 93: 172-181.
- [10] 王文娜, 吴亦集, 胡 静, 等. *N*-甲酰基哌啶分子印迹聚合物的合成及特异吸附性能研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(3): 555-558.