

硼酸亲和整体柱在富集中药活性物质中的应用

胡青红¹, 王超然¹, 李 静^{1,2}, 王 彦¹, 谷 雪¹, 阎 超^{1*}

(1. 上海交通大学药学院, 上海 200240; 2. 上海通微分析技术有限公司, 上海 201203)

摘要: 以 4-乙烯基苯硼酸(VPBA) 为功能单体, 季戊四醇三丙烯酸酯(PETA) 为交联剂, 乙二醇和二甘醇为二元致孔剂, 通过热引发自由基聚合反应, 在毛细管内原位聚合制备得到一种 poly(VPBA-co-PETA) 毛细管整体柱。所制备的整体柱具有典型的硼酸亲和特性, 可以特异性地捕获含有顺二羟基的化合物。在前期实验的基础上, 将其用于两种中草药——蒲公英和刺果卫矛中含顺二羟基的小分子活性物质的富集。这两种中药提取物直接用高效液相色谱进行检测时, 其活性成分绿原酸等因含量太低而使检测困难或无法检测; 经过硼酸亲和整体柱富集后收集洗脱液进行检测, 色谱峰响应则显著提高。该结果表明所制备的 poly(VPBA-co-PETA) 整体柱可以作为富集中药提取物中含顺二羟基活性物质的有效手段。

关键词: 硼酸亲和; 整体柱; 顺二羟基化合物; 活性物质; 中药; 富集

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2013)07-0714-04

Enrichment of *cis*-diols active components in traditional Chinese medicines by boronate affinity monolithic column

HU Qinghong¹, WANG Chaoran¹, LI Jing^{1,2}, WANG Yan¹, GU Xue¹, YAN Chao^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;
2. Unimicro (Shanghai) Technologies Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract: A novel poly(4-vinylphenylboronic acid (VPBA)-co-pentaerythritol triacrylate (PETA)) monolithic column was prepared by thermal-initiated copolymerization of VPBA and PETA in a binary porogen system comprising diethylene glycol and ethylene glycol. The fabricated monolithic column demonstrated good boronate affinity property, which can specifically capture *cis*-diols containing compounds. We developed such a monolithic column and applied it to enrich active components in *Herba Taraxaci* and *Euonymus acanthocarpus*. The extracts of the two traditional Chinese medicines were separated and enriched on μ HPLC by the prepared monolith, and the fractions were collected and examined by HPLC. The results showed that the responses of the corresponding peaks were greatly improved, indicating that the poly(VPBA-co-PETA) monolithic column can be efficiently used to enrich active components in traditional Chinese medicines containing *cis*-diols group.

Key words: boronate affinity; monolithic column; *cis*-diols compounds; active components; traditional Chinese medicine (TCM); enrichment

毛细管整体柱(monolithic column)是通过在毛细管内原位聚合或固化的方法制备得到的具有多孔结构的整体棒状固定相,因其具有特殊的多孔结构和简便的制备过程而受到关注^[1]。其中,聚合物毛细管整体柱作为一种新型的色谱固定相,由于其比无机硅胶整体柱在生物相容性、pH 稳定性和修饰选

择性等方面更具有优势,自 20 世纪 90 年代被引入后,发展十分迅速^[2,3]。Svec^[4,5]和 Arrua 等^[6]综述了近年来聚合物毛细管整体柱的最新进展。

硼酸亲和整体柱是一类具有特异亲和性能的聚合物整体柱。它利用硼酸基团能够可逆结合含顺二羟基结构的化合物,生成稳定的五元环原理来进行

* 通讯联系人. Tel: (021) 34205673, E-mail: chaoyan@unimicrotech.com.

基金项目: 国家自然科学基金项目(21175092, 21105064); 国家重大科学仪器设备开发专项(2011YQ150072, 2011YQ15007204, 2011YQ15007207, 2011YQ15007210); 上海市自然科学基金项目(12ZR1413600)。

收稿日期: 2012-12-25

特异性分离。其中以苯硼酸为功能基团的硼酸亲和材料用得最多。其反应机理如图 1 所示。在碱性条件 ($\text{pH} > 8$) 下, 硼酸基团经过羟化从原来的三键共面结构变成四面体硼酸阴离子, 然后与顺二羟基化合物形成酯环; 而在酸性条件下, 此前产生的环状酯水解, 使反应向反方向进行^[7, 8]。整体柱渗透性好、传质快等优势结合硼酸亲和色谱的专一性, 非常适合于复杂样品的分析。目前, 硼酸亲和整体柱主要用于生物样品的分离分析, 如碳水化合物^[9, 10]、糖蛋白^[11-13]等的分离分析, 而将其应用于中药及其提取物的分析还鲜有报道。

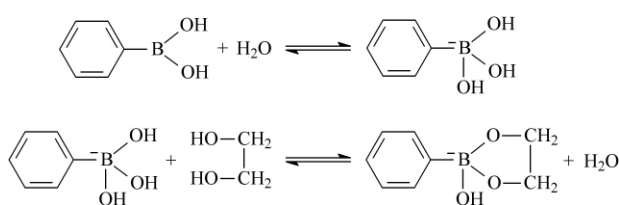


图 1 硼酸亲和作用原理

Fig. 1 Schematic illustration of the boronic acid method

中药提取物作为一类新兴的天然药物产品, 正被广泛应用于医疗保健等行业^[14]。但中药提取物成分复杂, 且在很多中药材中, 一些小分子活性物质的含量很低, 往往要经过多步提取、浓缩才能进行测定。因而对这类小分子物质的检测, 富集手段显得尤为重要。硼酸亲和整体柱因其专一的亲和性, 能够特异性地结合含有顺二羟基结构的化合物, 因此可以用于此类化合物的提取富集。本研究利用以 4-乙烯基苯硼酸 (VPBA) 为功能单体, 季戊四醇三丙烯酸酯 (PETA) 为交联剂所制备的 poly(VPBA-co-PETA) 硼酸亲和毛细管整体柱^[15]选择性地富集两种常见中草药——蒲公英和刺果卫矛中的活性物质, 如绿原酸等, 发现经 poly(VPBA-co-PETA) 整体柱富集后, 原样品中被分析物的浓度显著提高, 达到了预期的效果。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

TriSep™-2100 加压毛细管电色谱系统 (美国 Unimicro Technologies 公司), 包括溶剂输送系统、柱上紫外/可见光检测器、微流控系统、高压电源和数据采集系统; 岛津高效液相色谱仪 (日本岛津公司), 包括 LC-20AB 泵、SPD-20A 检测器、DGU-20A3 脱气仪和 LC solution 工作站。石英毛细管 (100 μm i. d., 365 μm o. d., 河北永年锐沓色谱器件有限公司); 0.22 μm 水相、有机相滤膜 (上海半岛实业有

限公司净化器材厂)。

甲醇和乙腈 (色谱纯, 美国 TEDIA 公司); γ -甲基丙烯酰氧丙基三甲氧基硅烷 (γ -MAPS, 纯度 97%)、VPBA (纯度 98%)、PETA (纯度 98%) 均购于英国 Alfa Aesa 公司; 偶氮二异丁腈 (AIBN)、乙二醇和二甘醇购于中国医药集团上海化学试剂有限公司; 三氟乙酸 (TFA) 等其他试剂均为分析纯。

蒲公英 (*Herba Taraxaci*)、刺果卫矛 (*Euonymus acanthocarpus*) 购于河北省安国市伊康药业有限公司, 经上海交通大学药学院王梦月副教授鉴定为菊科植物蒲公英的干燥全草和卫矛科植物刺果卫矛的干燥根。

1.2 毛细管整体柱的制备^[15]

毛细管首先经过碱洗、酸洗、甲醇冲洗等预处理步骤后进行硅烷化反应以修饰其内壁; 然后称取单体 VPBA、PETA、致孔剂乙二醇、二甘醇以及引发剂 AIBN 适量, 混合均匀后抽入毛细管内, 置于 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 12 h, 得到 poly(VPBA-co-PETA) 硼酸亲和整体柱。

1.3 对照品储备液的制备

精密称定咖啡酸、绿原酸对照品各 1 mg, 用少量甲醇溶解, 配制成 0.5 g/L 的对照品储备液, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 备用。

精密称定 3,4-二羟基苯乙醇和 2,3-二羟基苯甲酸苄酯精提物对照样品各约 10 mg, 用少量甲醇溶解, 配制成 1 g/L 储备液, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 备用。

所有样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存, 实验前用流动相稀释配制至所需浓度。

1.4 中药样品的处理

蒲公英: 经粉碎后称取适量蒲公英粉末, 加 10 倍质量的甲醇超声提取、过滤; 滤渣中再加 8 倍量的甲醇超声提取、过滤; 合并两次滤液, 旋转蒸发至干, 加水定容至一定体积, 得其醇提液。取适量醇提液用水 (醇提液与水的体积比为 1:4) 分散后依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取、回收, 冷冻干燥后用甲醇定容成 1 g/L 储备液。取正丁醇提取液, 稀释后进样。

刺果卫矛: 取刺果卫矛粉末 1 g, 加甲醇 20 mL, 回流 30 min, 抽滤, 滤液蒸干, 残渣中加水 10 mL, 加热使其溶解, 抽滤, 滤液用醋酸乙酯振摇提取 2 次 (10 mL/次), 合并醋酸乙酯液, 蒸干, 加甲醇使溶解, 作为刺果卫矛样品储备液。储备液稀释后进样。

1.5 色谱条件

1.5.1 毛细管液相色谱分析条件

毛细管 poly(VPBA-co-PETA) 硼酸亲和整体柱

柱长 45 cm (有效长度 25 cm)。流动相: A 相为乙腈-10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 8.5) (20:80, v/v), B 相为乙腈-1% 乙酸 (pH 2.8) (20:80, v/v); 洗脱程序: 先用碱性的 A 相平衡系统, 待不保留物质出峰 (约 10 min) 后, 切换至酸性的 B 相洗脱 25 min; 流速 50 μ L/min。检测波长为 214 nm。样品环体积约为 0.8 μ L; 分流比约为 38:1, 实际进样量约为 20 nL。

1.5.2 高效液相色谱分析条件

色谱柱: TSK gel ODS-100V (250 mm \times 4.6 mm)。流动相: A 相为乙腈-水 (10:90, v/v; 含 0.1% TFA), B 相为乙腈-水 (90:10, v/v; 含 0.1% TFA); 线性梯度洗脱程序: 0 ~ 35 min, 100% A ~ 100% B。流速 1 mL/min; 检测波长为 214 nm。

2 结果与讨论

2.1 毛细管整体柱对蒲公英中活性物质的富集

蒲公英提取物中富含酚酸类化合物, 具有广谱抗菌、抗氧化、消炎利胆、促进新陈代谢等作用^[16]。绿原酸和咖啡酸是其中主要的有效成分^[17] (其结构见图 2), 两者均是含有顺二羟基结构的化合物。

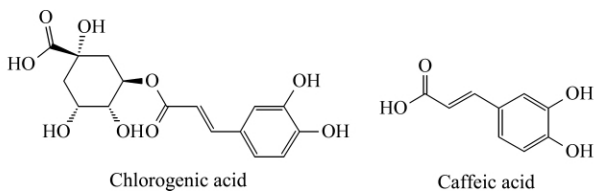


图 2 绿原酸和咖啡酸的分子结构
Fig. 2 Molecular structures of chlorogenic acid and caffeic acid

2.1.1 绿原酸和咖啡酸标准品的分离

按 1.5.2 节的色谱条件对绿原酸和咖啡酸标准品进行分离, 得到的图谱见图 3a。从图 3a 中可以看出, 绿原酸和咖啡酸在高效液相色谱中分离效果良好, 并依其极性的大小顺序先后出峰, 出峰时间分别为 17.0 min 左右和 19.5 min 左右。以此作为绿原酸和咖啡酸保留时间的参考标准。

2.1.2 蒲公英提取物中绿原酸和咖啡酸的分离

取制备好的蒲公英提取物样品进样, 按 1.5.2 节分析条件分离, 得到的色谱图如图 3b 所示。从图 3b 中可见, 在 17.0 min 和 19.5 min 的位置只出现了极小的色谱峰, 说明蒲公英正丁醇提取液中绿原酸和咖啡酸的含量很少, 直接检测困难。

2.1.3 蒲公英提取物中绿原酸和咖啡酸富集后的分离

由于绿原酸和咖啡酸的分子结构中含有顺二羟

基, 所以能够被 poly(VPBA-co-PETA) 硼酸亲和整体柱特异捕获。实验中, 先用碱性流动相平衡系统, 取制备好的蒲公英提取物样品进样富集分离, 此时绿原酸和咖啡酸被保留在整体柱上, 其余物质被直接洗脱; 将流动相切换成酸性流动相后, 保留在整体柱上的绿原酸和咖啡酸被洗脱, 收集洗脱液, 按 1.5.2 节条件进行 HPLC 检测, 得到的色谱图如图 3c 所示。由此可以看到, 经整体柱富集后, 蒲公英提取物中绿原酸和咖啡酸的色谱峰显著增大, 表明 poly(VPBA-co-PETA) 整体柱能很好地富集提取样品中的绿原酸和咖啡酸。

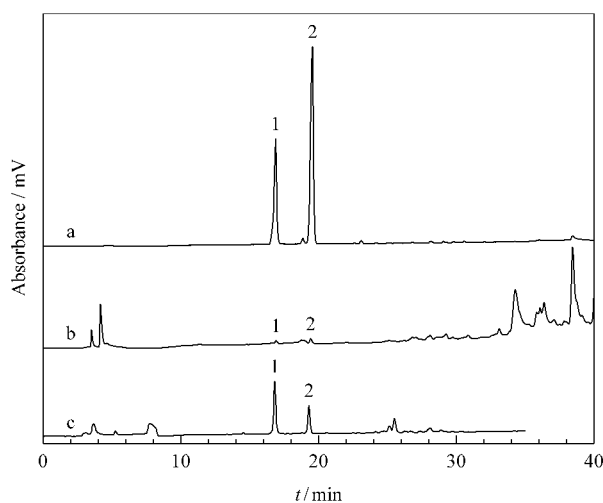


图 3 (a) 绿原酸和咖啡酸标准品、(b) 蒲公英提取物样品直接进样和 (c) 经亲和整体柱富集后进样的高效液相色谱图
Fig. 3 HPLC chromatograms of (a) a mixture of chlorogenic acid and caffeic acid standards, (b) an extract sample of *Herba Taraxaci* and (c) an extract sample of *Herba Taraxaci* after enrichment by the monolithic column
Peaks: 1. chlorogenic acid; 2. caffeic acid.

2.2 毛细管整体柱对刺果卫矛中活性物质的富集

为了进一步考察 poly(VPBA-co-PETA) 整体柱对中药中小分子活性物质的富集作用, 我们选择了另一种中草药刺果卫矛。刺果卫矛提取物中含有 3,4-二羟基苯乙醇和 2,3-二羟基苯甲酸苄酯等小分子活性物质, 这两种化合物的结构式如图 4 所示, 可见它们均含有顺二羟基结构, 推测可以被 poly(VPBA-co-PETA) 亲和整体柱特异性捕获。

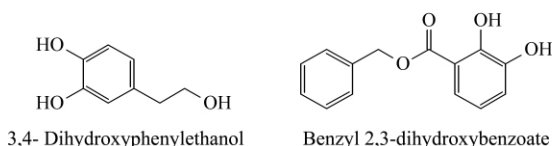


图 4 3,4-二羟基苯乙醇和 2,3-二羟基苯甲酸苄酯的分子结构图
Fig. 4 Molecular structures of 3,4-dihydroxyphenylethanol and benzyl 2,3-dihydroxybenzoate

在 1.5.2 节条件下对 3,4-二羟基苯乙醇和 2,3-二羟基苯甲酸苄酯精提物的对照品进行 HPLC 分离,结果分别如图 5a 和图 5b 所示。它们在反相液相色谱柱上的保留时间分别约为 17 min 和 31 min。出峰顺序与其极性大小顺序一致。

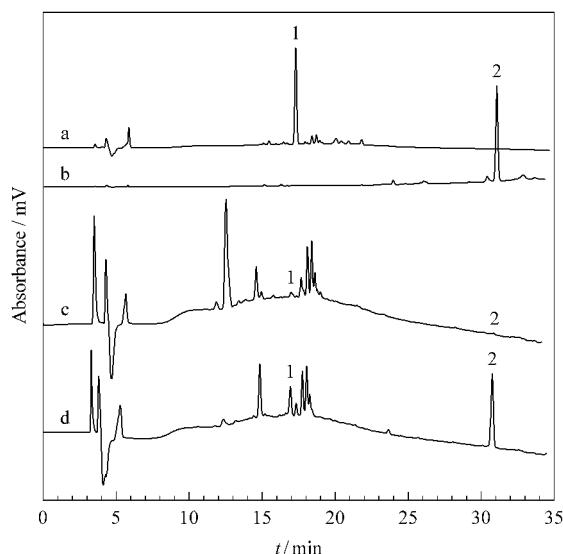


图 5 (a) 3,4-二羟基苯乙醇精提物对照样品、(b) 2,3-二羟基苯甲酸苄酯精提物对照样品、(c) 刺果卫矛提取物样品直接进样和 (d) 经亲和和整体柱富集后进样的高效液相色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of (a) 3,4-dihydroxyphenylethanol reference, (b) benzyl 2,3-dihydroxybenzoate reference, (c) an extract sample of *Euonymus acanthocarpus* and (d) an extract sample of *Euonymus acanthocarpus* after enrichment by the monolithic column

Peaks: 1. 3,4-dihydroxyphenylethanol; 2. benzyl 2,3-dihydroxybenzoate.

在同样的分析条件下对刺果卫矛提取物直接进样分析。从图 5c 中可见,刺果卫矛提取物中大约有 10 余种活性物质,在 17 min 处 3,4-二羟基苯乙醇的出峰位置只有一个很小的色谱峰,在 31 min 处 2,3-二羟基苯甲酸苄酯的出峰位置几乎看不到色谱峰,说明刺果卫矛提取物中 3,4-二羟基苯乙醇和 2,3-二羟基苯甲酸苄酯的含量很低,直接用 HPLC 分析检测不到。将上述样品经过 poly(VPBA-co-PETA) 硼酸亲和和整体柱后,收集酸性条件下的洗脱液,然后进行 HPLC 分析,得到的色谱图见图 5d。与图 5c 对比可看出,经硼酸亲和和整体柱富集后,在 17 min 和 31 min 均有明显的色谱峰出现,说明

3,4-二羟基苯乙醇和 2,3-二羟基苯甲酸苄酯被很好地富集在硼酸亲和柱上,使得其浓度显著提高,从而得到检测。

3 结论

本研究在自制的 poly(VPBA-co-PETA) 硼酸亲和和整体柱上可以特异性地捕获含有顺二羟基的化合物。在前期实验的基础上,我们将其用于蒲公英中的绿原酸和咖啡酸、刺果卫矛中的 3,4-二羟基苯乙醇和 2,3-二羟基苯甲酸苄酯等含顺二羟基结构的小分子活性物质的富集,使其色谱峰响应显著提高,达到了检测要求,为中药中低含量活性物质的分离检测提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Chen X, Tolley H D, Lee M L. *J Sep Sci*, 2011, 34: 2088
- [2] Cao Q, Xu Y, Liu F, et al. *Anal Chem*, 2010, 82: 7416
- [3] Connolly D, Curri van S, Paull B. *Proteomics*, 2012, 12: 2904
- [4] Svec F. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 902
- [5] Svec F. *J Chromatogr A*, 2012, 1228: 250
- [6] Arrua R D, Talebi M, Causon T J, et al. *Anal Chim Acta*, 2012, 738: 1
- [7] Liu X C. *Chinese Journal of Chromatography* (刘小川. 色谱), 2006, 24(1): 73
- [8] Hage D S. *Clin Chem*, 1999, 45: 593
- [9] Shoji E, Freund M S. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(42): 12486
- [10] Westmark P R, Gardiner S J, Smith B D. *J Am Chem Soc*, 1996, 118: 11093
- [11] Zhang Q B, Tang N, Brock J W C, et al. *J Proteome Res*, 2007, 6(6): 2323
- [12] Ren L B, Liu Y C, Dong M M, et al. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 8421
- [13] Lin Z A, Pang J L, Lin Y, et al. *Analyst*, 2011, 136: 3281
- [14] Xu W G, Xu P. *Research & Information of Traditional Chinese Medicine* (徐为公, 徐鹏. 中药研究与信息), 2005, 7(10): 34
- [15] Wang C R, Wang Y, Gao Y, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (王超然, 王彦, 高也, 等. 分析化学), 2012, 40(8): 1207
- [16] Lü J H, Qiu S C, Zhang L T, et al. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research* (吕俊华, 邱世翠, 张连同, 等. 时珍国医国药), 2002, 13(4): 215
- [17] Huang C J, Lin X D, Li J, et al. *Modern Chinese Medicine* (黄昌杰, 林晓丹, 李娟, 等. 中国现代中药), 2006, 8(5): 32