



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160151

利用分子印迹固相萃取法进行竹红菌素精制的研究

史文玉^{1,2}, 张同存¹

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 天津职业大学生物与环境工程学院, 天津 300410)

摘要: 选用沉淀聚合法合成竹红菌甲素分子印迹聚合物(molecular imprinted polymer, MIP)和竹红菌乙素 MIP, 研究了基于分子印迹聚合物的竹红菌素发酵液的静态吸附和解吸. 利用干法填充竹红菌甲素 MIP、竹红菌乙素 MIP 和制备型固相萃取柱, 对竹红菌素提取浓缩液进行了竹红菌甲素和乙素的分离与精制. 结果表明: 混合吸附的最佳填充柱组合为竹红菌甲素 MIP 10.5 g、竹红菌乙素 MIP 为 4.5 g, 洗脱次序为先洗脱竹红菌甲素, 更换淋洗剂后, 再洗脱竹红菌乙素.

关键词: 分子印迹; 固相萃取; 竹红菌素; 纯化分离

中图分类号: TS202.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2017)01-0031-05

Purification of Hypocrellin Through Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction

SHI Wenyu^{1,2}, ZHANG Tongcun¹

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. College of Biological and Environmental Engineering, Tianjin Vocational Institute, Tianjin 300410, China)

Abstract: Molecularly imprinted polymers (MIPs) of hypocrellin A and B were synthesized through precipitation polymerization. The absorption and desorption in static state of extracted and concentrated solution of hypocrellin with molecularly imprinted polymers (MIPs) has been studied. Separation and purification of hypocrellin A (HA) and hypocrellin B (HB) were conducted for the extracted and concentrated solution of hypocrellin through dry packing molecularly imprinted polymers (MIPs) of hypocrellin A and B, and preparative solid phase extraction column. The results showed that the optimum packing column combination for mixed adsorption was 10.5 g hypocrellin A MIP and 4.5 g hypocrellin B MIP, and the elution sequence is hypocrellin A first and then hypocrellin B after the eluent is changed.

Key words: molecularly imprinted polymer (MIP); solid phase extraction; hypocrellin; separation and purification

竹红菌素 (Hypocrellins) 属于花醌类光敏型色素^[1], 是竹黄子座中最重要也是最有价值的活性成分^[2]. 竹红菌素在皮肤病尤其是光敏治疗方面有显著的疗效, 可作为抗菌消炎剂, 并具有较强的光敏抗肿瘤和抗病毒活性^[3-5], 有着良好的市场应用前景^[6-7]. 竹红菌素包括竹红菌甲素、竹红菌乙素、竹红菌丙素和竹红菌丁素, 其中竹红菌甲素和竹红菌乙素的含量最高^[7]. 竹红菌素大多以硅胶吸附柱层析法纯化^[8], 或采用索氏提取法与酸碱沉淀法相结合^[9]的方式进行分离. 其分离纯化过程中的提取剂大多使用乙醇^[10]、丙酮^[9]. 这些方法的提取过程相对繁琐、耗费

大量试剂和时间. 另外, 由于竹红菌素在乙醇中溶解度较低, 提取量相对较少, 不能满足当前的需要. 因此, 如何快速、经济、高效地分离和纯化竹红菌素成为目前迫切需要解决的问题.

分子印迹固相萃取是整个分子印迹技术中应用最广的一种方法. 分子印迹聚合物具有很强的特异性、稳定性和亲和性, 这源于它对目标分子超强的识别能力, 可以在复杂的样品溶液中有目的地进行选择吸附, 特别是在待提取成分含量较少时, 更能体现出其优势. 目前分子印迹聚合物在食品安全的检测、环境污染的监测^[11]、化学药物成分的分析^[12]、农兽药

收稿日期: 2016-04-28; 修回日期: 2016-06-01

作者简介: 史文玉 (1981—), 女, 天津人, 讲师, 博士研究生; 通信作者: 张同存, 教授, tony@tust.edu.cn

残留的检验^[13]、天然药物活性物质的提取^[14]等方面应用广泛。本文采用分子印迹固相萃取方法对竹红菌素进行纯化分离,旨在有效地解决目前竹红菌素提取率低、产量不足的生产现状,为竹红菌素的精制研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

竹红菌甲素、竹红菌乙素,中国科学院感光化学研究所;无水乙醇、丙酮、醋酸、甲醇,天津市风船化学试剂科技有限公司。

固相萃取色谱柱,天津安莱科技有限公司;WATERS2695-2487型高效液相色谱仪,大连依利特分析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 印迹聚合物对竹红菌素的静态吸附性能测定

取锥形瓶若干,分别移取 15 mL 浓度为 6 mmol/L 的竹红菌素水溶液,并加入 0.1 g 的竹红菌甲素 MIP、乙素 MIP、非分子印迹聚合物(non molecular imprinted polymer, NIP)及 C18 填料,恒温振荡后在固定时间取样,然后用高速离心机进行离心分离,取上清液,测定竹红菌素浓度,按照式(1)计算竹红菌素 MIP 和 NIP 以及 C18 对竹红菌素的吸附容量,绘制吸附容量对时间的关系曲线。

$$Q = \frac{\rho_{\text{前}} - \rho_{\text{后}}}{m} \cdot V \quad (1)$$

式中: Q 为竹红菌素 MIP 和 NIP、C18 填料对竹红菌素的吸附容量, mg/g; $\rho_{\text{前}}$ 、 $\rho_{\text{后}}$ 分别为吸附前、后溶液中竹红菌素的质量浓度, mg/mL; V 为吸附液体积, mL; m 为 MIP 和 NIP 的质量, g。

1.2.2 印迹聚合物对竹红菌素动态吸附性能的测定

在 23 °C 的条件下,分别将 1.00 g 的竹红菌素 MIP 和 1.00 g 的竹红菌素 NIP 装入透明玻璃管内,玻璃管内径均为 5 mm。填充柱的床体积为 10 mL。将浓度为 6 mmol/L 的竹红菌素溶液以 2 BV/h 的流速逆流通过填充柱,以间隔为 0.5 BV 的速度收集流出的液体,测定竹红菌素在流出液体中的浓度,绘制动态吸附曲线图,并利用流出液的浓度与床体积数,计算竹红菌素 MIP 和 NIP 对竹红菌素的泄漏吸附容量与饱和吸附容量。

1.2.3 分子印迹聚合物的再生

称取干燥的 MIP 20 mg,加入 4 mmol/L 的加替沙

星-丙酮溶液 5 mL。静态吸附 5 h 后,用高速离心机进行离心分离,取上清液,测定其竹红菌素的浓度,计算竹红菌素 MIP 吸附容量。再用 10% 的醋酸-甲醇溶液进行洗脱,直至无模板分子检测出。之后再依次用甲醇、丙酮溶液洗至 MIP 为中性并干燥,重复上述步骤。

1.2.4 竹红菌甲素和乙素的动态吸附与解吸实验

将 50 mL 竹红菌素提取浓缩液上载到竹红菌素甲素的 MIP 固相萃取柱子中,浓缩液以 2 BV/h 的流速通过柱子,待红色完全吸附于萃取柱后,根据表 1 的洗脱方案淋洗柱子。收集洗脱液,直到柱子的红色完全退去,然后将洗脱液真空浓缩、干燥,固体残留物溶于丙酮中,通过 HPLC 分析,测定流出液中竹红菌甲素的质量浓度,按照式(2)计算精制率。同法进行竹红菌素乙素的动态吸附与解吸实验。

$$\text{精制率} = \frac{\rho_B \cdot V_B}{\rho_Y \cdot V_Y} \times 100\% \quad (2)$$

式中: ρ_B 为丙酮溶液中竹红菌素质量浓度, mg/mL; V_B 为丙酮溶液的体积, mL; ρ_Y 为样品溶液竹红菌素质量浓度, mg/mL; V_Y 为样品溶液体积, mL。

表 1 不同的淋洗剂及其配比

Tab. 1 Different eluent and proportion

编号	淋洗剂	体积/L	淋洗剂	体积/L
1	乙醇	1	水	1
2	乙醇	3	水	3
3	乙醇	1	水	0
4	丙酮	1	水	1
5	丙酮	3	水	3
6	丙酮	1	水	0
7	乙醇	3	丙酮	1
8	乙醇	2	丙酮	1
9	乙醇	1	丙酮	1
10	乙醇	1	丙酮	2
11	乙醇	1	丙酮	3

1.2.5 竹红菌素填充柱的制备

准确称量竹红菌甲素 MIP 和 NIP 15 g,委托天津安莱科技有限公司利用干法分别填充竹红菌甲素 MIP 制备型固相萃取柱和 NIP 制备型固相萃取色谱柱。同法填充竹红菌乙素 MIP 制备型固相萃取柱和 NIP 制备型固相萃取柱。按表 2 准确称量竹红菌甲素 MIP 和竹红菌乙素 MIP,充分混合后填充制备型固相萃取柱,并编号为 H1—H12。

1.2.6 竹红菌甲素和乙素的混合吸附与解吸实验

同 1.2.4 节的方法,利用固相萃取柱 H1—H12 对竹红菌素提取浓缩液进行竹红菌甲素和乙素的精制实验,实验中采用竹红菌甲素和竹红菌乙素分步收集

的方法. 由于在分步收集中, 竹红菌甲素的洗脱液中含有微量的竹红菌乙素, 同样在竹红菌乙素的洗脱液中含有微量的竹红菌甲素, 因此为了全面评价固相萃取柱对竹红菌甲素和竹红菌乙素的综合制备能力, 设计了柱性能综合评价指标 Z , 先洗脱竹红菌甲素, 后洗脱竹红菌乙素, 按照式(3)计算综合评价指标.

$$Z = \left(\frac{m_1}{m_5} \times 100 - \frac{m_2}{m_6} \times 100 \right) + \left(\frac{m_3}{m_6} \times 100 - \frac{m_4}{m_5} \times 100 \right) \quad (3)$$

式中: Z 为综合评价指标; m_1 为竹红菌甲素洗脱后洗脱液中竹红菌甲素的总量, mg; m_2 为竹红菌甲素洗脱后洗脱液中竹红菌乙素的总量, mg; m_3 为竹红菌乙素洗脱后洗脱液中竹红菌乙素的总量, mg; m_4 为竹红菌乙素洗脱后洗脱液中竹红菌甲素的总量, mg; m_5 为样品中竹红菌甲素的总含量, mg; m_6 为竹红菌乙素的总含量, mg.

表 2 不同竹红菌素填充柱的组成

Tab. 2 Different compositions of hypocrellin packed column

编号	竹红菌甲素 MIP/g	竹红菌乙素 MIP/g	编号	竹红菌甲素 NIP/g	竹红菌乙素 NIP/g
H1	4.5	10.5	H7	4.5	10.5
H2	6.0	9.0	H8	6.0	9.0
H3	7.5	7.5	H9	7.5	7.5
H4	9.0	6.0	H10	9.0	6.0
H5	10.5	4.5	H11	10.5	4.5
H6	12.0	3.0	H12	12.0	3.0

2 结果与分析

2.1 印迹聚合物对竹红菌素的静态吸附性能

在温度 28 °C、pH 6.5 的条件下, 以 C18 为参照, 分别绘制出竹红菌甲素和乙素印迹聚合物 (MIP、NIP) 对竹红菌甲素和乙素的静态吸附曲线, 如图 1 和图 2 所示. 竹红菌甲素 MIP 对竹红菌甲素的吸附具有较大的吸附容量和较强的专一性, 竹红菌乙素 MIP 对竹红菌乙素的吸附具有较大的吸附容量和较强的专一性.

2.2 印迹聚合物对竹红菌素的动态吸附性能

分别绘制出竹红菌甲素和乙素印迹材料 (MIP、NIP) 对竹红菌甲素和乙素的动态吸附动力学曲线, 如图 3 和图 4 所示. 结果表明, 竹红菌甲素 MIP 对竹红菌甲素的吸附能力强于 NIP 和 C18 的吸附能力, 竹红菌乙素 MIP 对竹红菌乙素的吸附能力强于 NIP

和 C18 的吸附能力.

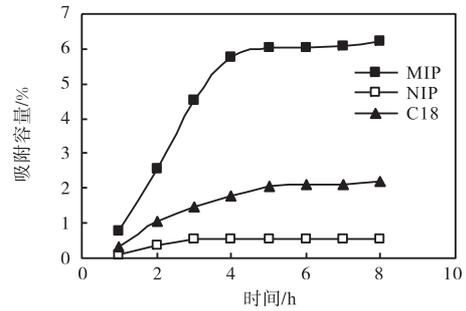


图 1 竹红菌甲素印迹聚合物对竹红菌甲素的静态吸附曲线

Fig. 1 Static adsorption curve of hypocrellin A with hypocrellin A imprinted polymer

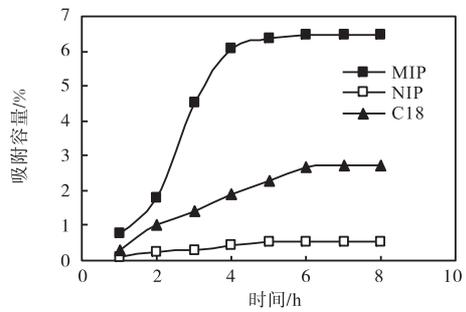


图 2 竹红菌乙素印迹聚合物对竹红菌乙素的静态吸附曲线

Fig. 2 Static adsorption curve of hypocrellin B with hypocrellin B imprinted polymer

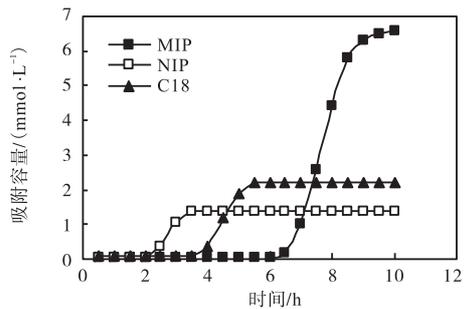


图 3 竹红菌甲素印迹聚合物对竹红菌甲素的动态吸附曲线

Fig. 3 Dynamic adsorption curve of hypocrellin A with hypocrellin A imprinted polymer

2.3 分子印迹聚合物的再生

按照 1.2.3 节的方法对分子印迹聚合物进行再生实验, 再生后的吸附容量与再生前的吸附容量比较见表 3. 分子印迹聚合物再生 10 次后, 竹红菌甲素和乙素的 MIP 吸附效果下降不大, 均具有较好的再生性能.

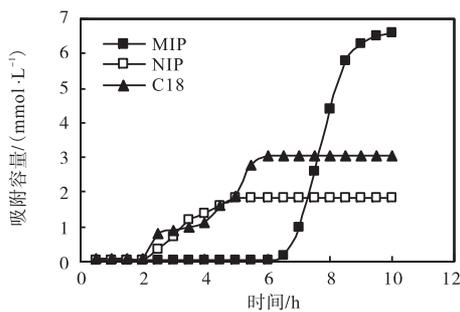


图4 竹红菌乙素印迹聚合物对竹红菌乙素的动态吸附曲线

Fig. 4 Dynamic adsorption curve of hypocrellin B with hypocrellin B imprinted polymer

表3 竹红菌甲素和乙素 MIP 的再生实验

Tab. 3 Regeneration of MIP of hypocrellin A and B

再生次数	$Q_{后}/Q_{前}$	
	竹红菌甲素 MIP	竹红菌乙素 MIP
1	0.985	0.982
5	0.937	0.931
10	0.914	0.907

2.4 竹红菌素的动态吸附性能

利用方法 1.2.2 绘制出竹红菌甲素和乙素的动态吸附曲线,结果如图 5 所示.竹红菌甲素 MIP 的吸附容量稍大于竹红菌乙素 MIP,在 65 min 左右,竹红菌甲素和乙素的动态吸附容量达到饱和.

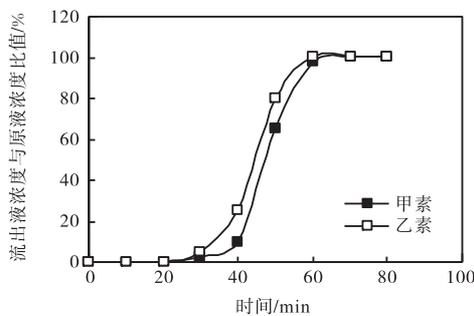


图5 竹红菌甲素和竹红菌乙素的动态吸附曲线

Fig. 5 Dynamic adsorption curve of hypocrellin A and B

2.5 淋洗剂的选择

选用分子印迹聚合物 MIP,利用方法 1.2.4 进行竹红菌素的解吸实验.不同淋洗剂对竹红菌甲素和乙素的解吸作用如图 6 所示,从图中可以看出,对于竹红菌甲素来说,最合适的淋洗剂为 9 号(乙醇/丙酮,1:1);对于竹红菌乙素来说,最合适的淋洗剂为 7 号(乙醇/丙酮,3:1).

2.6 竹红菌素的动态洗脱

根据方法 1.2.4,绘制出竹红菌甲素和乙素的洗脱曲线,如图 7 所示.从图 7 可以看出,竹红菌甲素

的洗脱时间收窄,淋洗剂具有良好的洗脱效果和单一性.竹红菌乙素的洗脱时间虽然较竹红菌甲素稍长,但也在合适范围之内,淋洗剂同样具有良好的洗脱效果和单一性.

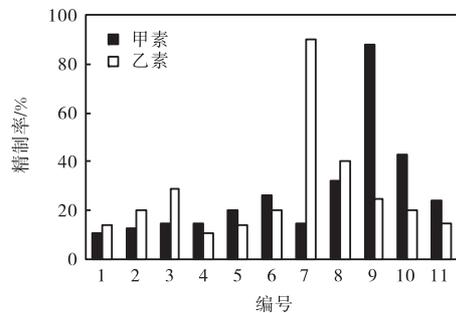


图6 不同淋洗剂对竹红菌甲素和乙素的解吸作用
Fig. 6 Desorption effect of different eluent on hypocrellin A and B

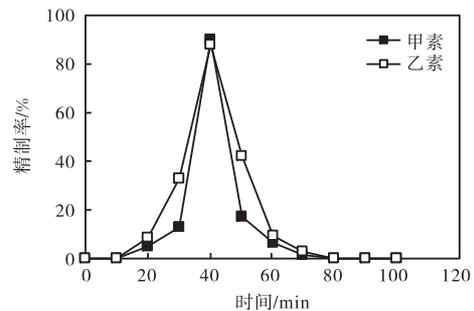


图7 竹红菌甲素和乙素的洗脱曲线
Fig. 7 Elution curve of hypocrellin A and B

2.7 竹红菌甲素和乙素的混合动态吸附与解吸

利用方法 1.2.5 和 1.2.6 进行竹红菌甲素、乙素的混合吸附与解吸实验.首先考虑填充柱组合对竹红菌甲素、乙素的混合吸附效果的影响,其结果如图 8 所示.

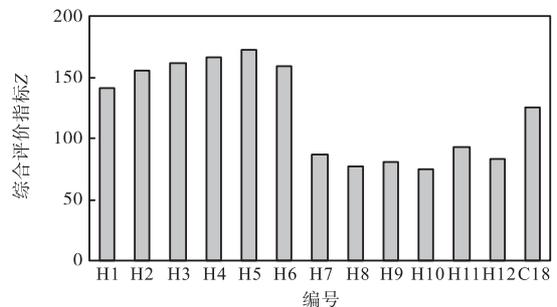


图8 不同竹红菌素填充柱组成的确定
Fig. 8 Determination of composition of different hypocrellin packed column

从图 8 中可以看出,最佳的填充柱组合为 H5,即竹红菌甲素 MIP 为 10.5 g,竹红菌乙素 MIP 为

4.5 g. 洗脱次序为先洗脱竹红菌甲素, 更换淋洗剂后, 再洗脱竹红菌乙素. 由此, 绘制出竹红菌甲素和乙素的混合动态洗脱曲线, 如图 9 所示. 从图中可以看出, 竹红菌素通过填充柱的洗脱后达到了良好的分离效果.

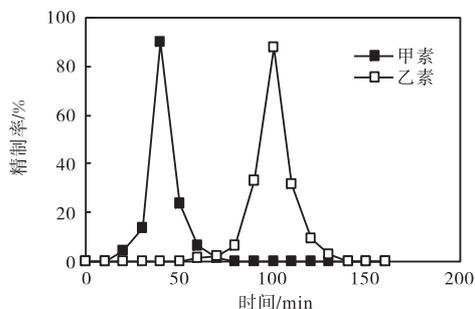


图 9 竹红菌甲素和乙素的混合动态洗脱曲线

Fig. 9 Hybrid dynamic elution curve of hypocrellin A and B

3 结 论

通过静态和动态吸附实验, 筛选出具有较高吸附特性的竹红菌素分子印迹. 找到合适的淋洗剂配比, 竹红菌甲素最合适的淋洗剂为乙醇和丙酮体积比 1 : 1; 竹红菌乙素最合适的淋洗剂为乙醇和丙酮体积比 3 : 1. 淋洗剂均具有良好的洗脱效果和单一性. 确定混合吸附的最佳填充柱组合为竹红菌甲素 MIP 10.5 g、竹红菌乙素 MIP 4.5 g; 洗脱次序为先洗脱竹红菌甲素, 更换淋洗剂后, 再洗脱竹红菌乙素; 绘制出了竹红菌甲素和乙素的混合动态洗脱曲线, 证实竹红菌素通过填充柱的洗脱后达到了良好的分离效果.

参考文献:

- [1] 贾小明, 徐晓红, 庄百川, 等. 药用竹黄菌的生物学研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(3): 147-150.
- [2] Kazmi M, Malik A, Hameed S, et al. An anthraquinone derivative from *Cassia Italica*[J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(3): 761-763.
- [3] Hudson J B, Zhou J, Chen J, et al. Hypocrellin, from *Hypocrella bambuase*, is phototoxic to human immunodeficiency virus[J]. *Photochem Photobiol*, 1994, 60(3): 253-255.
- [4] Cheng L, Wang J, Fu S. Effect of hypocrellin A sensitization on the lateral mobility of cell membrane proteins[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1988, 2(3): 395-398.
- [5] Xu S, Chen S, Zhang M, et al. Cyclohexylamino-demethoxy-hypocrellin B and photodynamic therapy decreases human cancer in vitro[J]. *Anticancer Drug Design*, 2001, 32(16): 271-277.
- [6] 王家璧, 包建南. 皮肤淀粉样变苔藓 37 例临床分析及竹红菌光化疗治疗观察[J]. *中国医学科学院学报*, 1985, 7(5): 349-351.
- [7] Diwu Z, Lown J. Hypocrellins and their use in photosensitization[J]. *Photochemistry & Photobiology*, 1990, 52(3): 609-616.
- [8] 沈云修, 荣先国, 高宗华. 竹黄的化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2002, 27(9): 674-676.
- [9] 彭京胜, 李晓丽, 孙振令, 等. 竹黄中竹红菌甲素的分离与纯化[J]. *山东理工大学学报: 自然科学版*, 2004, 18(2): 91-94.
- [10] 林海萍, 陈虹, 叶勇, 等. 竹黄竹红菌甲素含量测定方法[J]. *浙江农林大学学报*, 2002, 19(2): 157-160.
- [11] Moein M, Javanbakht M, Akbar B. Molecularly imprinted polymer cartridges coupled on-line with high performance liquid chromatography for simple and rapid analysis of dextromethorphan in human plasma samples[J]. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences*, 2011, 879(11/12): 777-782.
- [12] 黄怡, 张青杰, 刘敏. 分子印迹固相萃取: 高效液相色谱法测定饲料中莱克多巴胺[J]. *色谱*, 2012, 30(1): 56-61.
- [13] 杨卫海, 严守雷, 卫晨, 等. 沉淀聚合制备三聚氰胺分子印迹聚合物微球[J]. *高分子学报*, 2010, 30(10): 1163-1169.
- [14] 裴红, 胡静, 高文惠. 1-氨基乙内酰胺分子印迹聚合物的制备和吸附性能研究[J]. *化学研究与应用*, 2010, 22(2): 161-164.

责任编辑: 郎婧