

SKUPINOVO-SELEKTÍVNY POLYMÉR S ODTLAČKOM MOLEKULY AKO SORBENT PRE EXTRAKCIU KUMARÍNOV Z LIEČIVÝCH RASTLÍN

ANDREA SPEVAK* a KATARÍNA HROBOŇOVÁ

Ústav analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
katarina.hrobonova@stuba.sk

Došlo 16.9.13, prijaté 25.11.13.

Kľúčové slová: polymér s odtlačkom molekuly, extrakcia tuhou fázou, kumaríny, liečivé rastliny

Úvod

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia je jednou z často používaných metód na analýzu mnohozložkových zmesí. Pred separáciou a stanovením analytov vo vzorkách so zložitou maticou je potrebné použiť vhodné postupy na úpravu a čistenie vzorky. Ich úlohou je prevedenie zložitej matrice na formu vhodnú pre analýzu separačnou technikou a odstránenie látok, ktoré by mohli interferovať s analyzovanými látkami alebo poškodiť kolónu. Najčastejšie sa používajú extrakčné techniky, medzi ktorými má prednostné miesto extrakcia tuhou fázou (SPE). Používané SPE sorbenty sú mnohokrát málo selektívne pre sledované analyty a to môže spôsobovať problémy pri následnej analýze zložitých vzoriek^{1–4}. Extrakcia tuhou fázou v spojení s využitím polymérov s odtlačkami molekúl (MIP) predstavuje jeden z perspektívnych smerov v oblasti vývoja sorpčných materiálov, ktorých cieľom je zvyšovanie selektivity predseparačnej úpravy. Technológia polymérov s odtlačkom molekuly je založená na príprave vysoko zosieťovaného polyméru okolo analytu v prítomnosti vhodného monoméru. Interakciami medzi molekulami analytu (templátu) a monoméru vznikajú v kvapalnej fáze komplexy pomocou kovalentných alebo nekovalentných väzieb, ktoré sa stabilizujú sieťovacou polymerizáciou. Odstránením analytu vznikajú v polyméri voľné špecifické miesta s afinitou k analytu⁵.

Kumaríny patria do skupiny látok často zastúpených v prírodných vzorkách vo voľnej forme alebo glykozidicky viazané v zlúčeninách. Zdrojom najznámejšieho z nich, kumarínu, je komonica lekárska alebo lípkavec marinkovitý. Vzhľadom na substitučné možnosti molekuly kumarínu

je známy veľký počet derivátov kumarínu, prírodných alebo syntetických, a takáto štruktúrna rôznorodosť je dôvodom mnohých biologických vlastností: antikoagulačné, antifungálne a niektoré z nich aj antitumorové. Niektoré deriváty majú schopnosť absorbovať ultrafialové žiarenie a môžu spôsobovať fotodermatitídu. Často prirodzene sa vyskytujúcim derivátom kumarínu je aj umbeliferón (7-hydroxykumarín)^{6,7}.

Práca sa zameriava na použitie polyméru s odtlačkom molekuly ako sorbentu pre extrakciu tuhú fázou derivátov kumarínu zo zložitých vzoriek, akými sú extrakty z liečivých rastlín. Prešetri sa vplyv štruktúry analytov na sorpčné vlastnosti polyméru.

Experimentálna časť

Použité chemikálie a vzorky

Referenčné látky dafnetín, dikumarol, herniarín, kumarín a umbeliferón boli získané zo Sigma-Aldrich v najvyššej dostupnej čistote. Na prípravu mobilných fáz sa použili acetonitril (pre HPLC, pre gradientovú elúciu, Merck), kyselina octová (p.a, Merck) a deionizovaná voda (Millipore). Na prípravu polyméru s odtlačkami molekuly sa použili kyselina metakrylová, etylénglykoldimetakrylát (EGDMA), azobisisobutyronitril (AIBN) (p.a, Merck); chloroform, metanol, acetón (pre HPLC, Merck).

Vzorky archangeliky lekárskej, komonice lekárskej a levandule úzkolistej (sušené, z oblasti Slovenska, rok získania 2012) sa získali z komerčnej siete lekární.

Príprava roztokov a vzoriek

Roztoky referenčných látok s koncentráciou 1,0 mg ml⁻¹ sa pripravili rozpustením analytov v metanole a následne sa riedili na nižšie koncentrácie podľa potreby.

K 1,0 g rozdrvenej sušenej vzorky rastlín sa pridalo 8 ml vody, následne sa zmes miešala pri teplote 23 °C po dobu 60 min na laboratórnej miešačke. Zmes sa prefiltrovala cez nylonový filter (veľkosť pórov 0,45 μm) a filtrát sa použil na MIP-SPE extrakciu.

Príprava polymérov

Zmes umbeliferónu (0,7 mmol), kyseliny metakrylovej (2,9 mmol), EGDMA (11,75 mmol) sa zmiešala s 7,5 ml chloroformu s prídavkom AIBN (0,18 mmol) a polymerizovala sa na vodnom kúpeli pri teplote 60 °C po dobu 24 hodín. Vzniknutý polymér sa rozdrvil a preosial cez sito (60 μm) a najmenšie častice sa odstránili flotáciou v acetóne. Výsledný produkt sa vysušil pri teplote 60 °C. Templát sa odstránil z polyméru Soxhletovou extrakciou

* Andrea Spevak získala zvláštni cenu poroty v súťaži O cenu firmy Merck 2013 za najlepšiu študentskou vedeckou prácu v obore analytickej chémie.

zmesou metanol/kyselina octová (9/1 v/v, 100 ml, 24 h). NIP sa pripravili rovnakým postupom ako MIP bez prida-
nia umbeliferónu do polymerizačnej zmesi.

Extrakcia tuhou fázou

Sorbent (0,10 g MIP resp. NIP) sa umiestnil do plas-
tovej trubice SPE kolónky. Kolónka sa premyla s 3 ml
metanolu, 5 ml vody a následne sa aplikoval roztok refe-
renčných látok alebo macerátu vzorky sušenej rastliny
(2 ml). Kolónka sa premyla vodou (2 ml) a sušila vákuom
(10 min). Analyty sa eluovali 2 ml zmesi metanol/kyselina
octová (9/1, v/v).

HPLC separácia

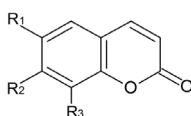
Použil sa kvapalinový chromatograf (Agilent Techno-
logies, seria 1200), ktorý obsahoval vysokotlakové čerpa-
do, dávkovací ventil Rheodyne s objemom slučky 20 μ l
a detektor s diódovým poľom. Na separáciu kumarínov sa
použila chromatografická kolóna LiChrospher 100 RP 18
(250 \times 4 mm I.D., 5 μ m) a mobilná fáza acetonitril/0,3%
kyselina octová (9/1, v/v) (A) a acetonitril (B)
s gradientovou elúciou (od 0 do 22,5 min lineárny gradient
zložky B z 0 na 36 %, potom do 24 min lineárny gradient
do 100 % B) pri prietoku 1,0 ml min⁻¹. Teplota kolóny
bola 23 °C. Chromatografické záznamy sa snímali pri
vlnovej dĺžke 323 nm (pre detekciu dafnetínu, dikumarolu,
herniarínu a umbeliferónu) a 280 nm (pre detekciu kuma-
rínu).

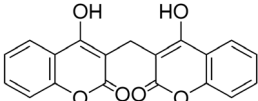
Výsledky a diskusia

Polymér s odtlačkom molekuly pre templát umbelife-
rón (obr. 1) bol pripravený použitím kyseliny metakrylo-
vej ako monoméru nekovalentným spôsobom, pri ktorom

sa pri tvorbe komplexu monomér-templát využívajú pre-
dovšetkým polárne nekovalentné interakcie, ako sú vodi-
kové väzby a elektrostatické interakcie. Ako polymerizač-
né rozpúšťadlo sa použil chloroform. Polárnejšie rozpúš-
ťadlá boli menej vhodné, pretože zabraňujú polymerizácii
a rušia väzby analyt-monomér⁸. Sorpčná kapacita pripra-
veného polyméru sa zisťovala frontálnou chromatografiou
a zodpovedala množstvu umbeliferónu, ktorý je polymér
schopný interakciami viazať. Sorpcia analytu polymérom,
podporovaná špecifickými interakciami, bola významne
ovplyvňovaná aj druhom rozpúšťadla analytu, ktoré prav-
depodobne ovplyvňovalo napučovanie polyméru a solvatač-
ný proces. Roztok umbeliferónu (koncentrácia 0,1 mg ml⁻¹)
bol pripravený v rozpúšťadlách metanol, acetonitril, a ich
zmesiach s vodou (1/1, v/v). Z výsledkov uvedených na
obr. 2 je zrejme, že najvyššie hodnoty sorpčnej kapacity sa
dosiahli pre umbeliferón rozpustený v zmesi metanol/voda
(1/1, v/v) a táto zmes sa použila pre následnú extrakciu
kumarínov z testovaných vzoriek liečivých rastlín.

Pri štúdiu vlastností pripraveného MIP sorbentu sa
prešetril vplyvu štruktúry analytu na sorpčnú kapacitu
polyméru. Použil sa umbeliferón a jemu štruktúrne podob-
né látky dafnetín, herniarín, kumarín a dikumarol (obr. 1).
Zvolené zlúčeniny sa odlišovali veľkosťou molekuly, kto-
rá súvisela s typom substituentov (hydroxylové a metoxy
skupiny) a ich polohou na aromatickej časti molekuly. Aj
tieto štruktúrne analógy sa špecificky viazali na MIP. Vy-
soká hodnota špecifickej sorpčnej kapacity, v porovnaní so
špecifickou sorpčnou kapacitou templátu-umbeliferónu, sa
zisťovala pre herniarín (tab. I). Tieto dve molekuly sú si
štruktúrne veľmi podobné (rozdielny substituent v polohe
C7). Hodnoty špecifickej sorpčnej kapacity ostatných štu-
dovaných molekúl boli o niekoľko desiatok nižšie, ale
naznačili, že aj iné zlúčeniny sa môžu viazať do kavit
pripraveného polyméru. Najnižšia hodnota špecifickej sorp-
čnej kapacity sa dosiahla pre molekulu kumarínu. Táto mo-
lekula v porovnaní s molekulou umbeliferónu nemá prí-



$R_1 = R_2 = R_3 = H$	2H-chromén-2-ón	kumarín
$R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$	7-hydroxykumarín; 7-hydroxychromén-2-ón	umbeliferón
$R_1 = R_3 = H, R_2 = CH_3O$	7-metoxykumarín; 7-metoxychromén-2-ón	herniarín
$R_1 = H, R_2 = R_3 = OH$	7,8-dihydroxykumarín; 7,8-dihydroxy-2H-chromén-2-ón	dafnetín
	3,3'-metylenobis(4-hydroxy-2H-chromén-2-ón)	dikumarol

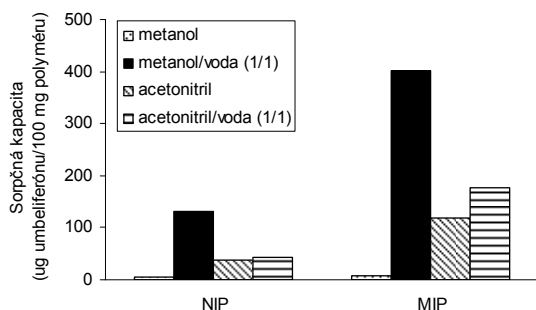
Obr. 1. Štruktúra kumarínu a jeho niektorých derivátov

Tabuľka I

Sorpčná kapacita MIP, NIP a špecifická sorpčná kapacita pre deriváty kumarínu

Derivát	Sorpčná kapacita ^a [µg/100 mg polyméru]				Špecifická sorpčná kapacita ^b [µg/100 mg polyméru]
	MIP	RSD [%]	NIP	RSD [%]	
Umbeliferón	401	8	132	6	269
Herniarín	345	4	225	5	120
Dafnetín	216	5	164	4	52
Kumarín	181	5	167	6	14
Dikumarol	>>	–	>>	–	–

^a $n = 3$; $c_{\text{analytov}} = 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$; ^b špecifická sorpčná kapacita vypočítaná ako rozdiel hodnôt sorpčnej kapacity MIP a NIP



Obr. 2. Vplyv rozpúšťadla analytu (umbeliferónu) na sorpčnú kapacitu MIP a NIP

tomné funkčné skupiny, čím je pravdepodobne znížená možnosť interakcií a tiež nie je svojou veľkosťou kompatibilná s veľkosťou odtlačenej dutiny. Molekula dikumarolu (obr. 1) je v porovnaní s inými študovanými derivátmi kumarínov výrazne odlišná svojou veľkosťou. Pri zisťovaní hodnoty špecifickej sorpčnej kapacity pre dikumarol sa pre túto látku nedosiahol prienik. To naznačuje, že dikumarol sa viazal na polyméry MIP aj NIP aj vplyvom nešpecifických interakcií. Z výsledkov štúdia vplyvu štruktúry derivátov kumarínu na špecifickú sorpčnú kapacitu polyméru s odtlačkom molekuly pre umbeliferón vyplýva, že pripravený polymérny sorbent je skupinovo selektívny aj pre ďalšie zlúčeniny kumarínov.

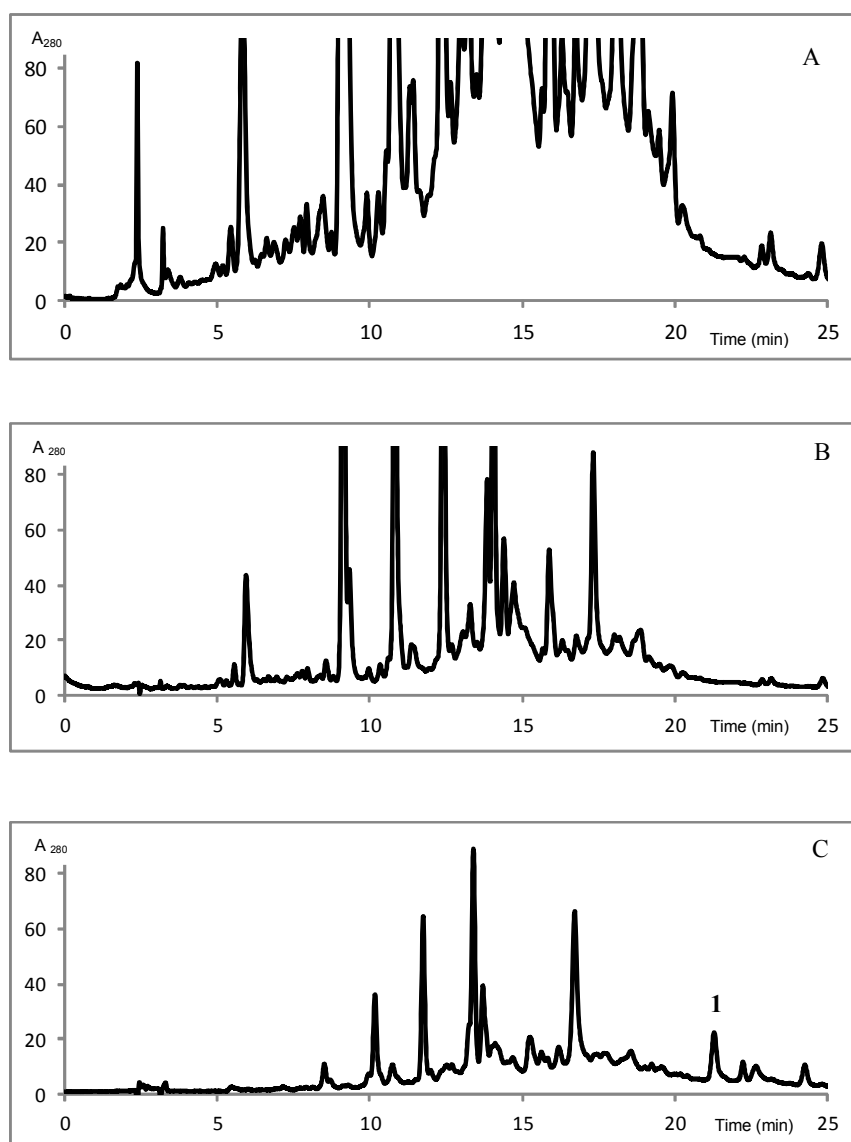
Polyméry s odtlačkom molekuly predstavujú selektívny typ sorbentu používaný pri extrakcii látok zo zložitých vzoriek. MIP sorbent sa použil na extrakciu kumarínov z extraktov liečivých rastlín. MIP-SPE extrakty sa analyzovali HPLC metódou so spektrofotometrickou detekciou.

Tabuľka II

Chromatografické charakteristiky (retenčný faktor k , symetria píku A_s , počet teoretických priehradok n , koeficient determinácie r^2) pre HPLC separáciu a metrologické parametre študovaných kumarínov

Parameter ^a		Dafnetín	Umbeliferón	Kumarín	Herniarín
k		3,41	4,83	7,39	8,63
A_s		1,01	0,95	0,95	0,94
n		31461	38113	65669	90681
opakovateľnosť k	v 1 deň	0,7	0,5	0,6	0,3
RSD, %	za 7 dní	1,1	0,7	0,8	0,4
opakovateľnosť A	v 1 deň	6,3	3,4	7,9	2,7
RSD, %	za 7 dní	6,6	6,7	9,0	8,9
r^2 (0,5–100 µg ml ⁻¹)		0,986	0,994	0,995	0,998
LOD, µg ml ⁻¹		0,20	0,10	0,10	0,10
LOQ, µg ml ⁻¹		0,50	0,30	0,30	0,25

^a $c = 1,0 \text{ µg ml}^{-1}$; $n = 3$; $t_M = 1,59 \text{ min}$; A – plocha píku; LOD – medza detekcie; LOQ – medza stanoviteľnosti



Obr. 3. Chromatografické záznamy MIP-SPE frakcií po aplikácii vodno-metanolového macerátu levandule (A), po premytí sorbentu vodou (B) a po elúcii analytov (C). Stacionárna fáza LiChrospher 100 RP 18, mobilná fáza acetonitril/0,3% kyselina octová s gradientovou elúciou, prietok $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, 280 nm , $23 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 – kumarín

Chromatografické charakteristiky sú uvedené v tab. II. Na kvantitatívne vyhodnotenie koncentrácie sledovaných kumarínov v testovaných vzorkách sa použila metóda kalibračnej čiary. Kalibračné závislosti mali lineárny priebeh v rozsahu koncentrácií od $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ do $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. Pre umbeliferón, herniarín, kumarín a dafnetín boli dosiahnuté medze detekcie v rozsahu od $0,1$ do $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ a medze stanoviteľnosti od $0,25$ do $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Výťažnosť extrakcie na polyméri bola zisťovaná porovnaním výsledkov stanovenia študovaných kumarínov získaných s použitím a bez použitia MIP-SPE a testovala sa v rozsahu koncen-

trácií $0,5\text{--}5,0 \mu\text{g ml}^{-1}$. Pre testované analyty bola viac ako 73 % (RSD < 10 %) (tab. III). Výsledky dokumentujú, že výťažnosť kumarínov v uvedenom koncentračnom rozsahu nezávisela od koncentrácie analytov. Vhodnosť extrakčného postupu pre off-line MIP-SPE (uvedený v experimentálnej časti) dokumentuje obr. 3. Z HPLC chromatogramov MIP-SPE frakcií po aplikácii vodno-metanolového (1/1, v/v) extraktu rastlinnej vzorky (A) a po premytí MIP sorbentu vodou (B) je zrejme, že eluenty obsahovali iba interferujúce zložky, kým kumaríny boli zadržované špecifickými interakciami v dutinách sorben-

Tabuľka III
Výtťažnosť kumarínov pre MIP-SPE

Analyt	Koncentrácia [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Výtťažnosť [%]	RSD ($n = 3$) [%]
Dafnetín	0,5	91,2	8,6
	1,0	89,8	6,8
	5,0	86,1	3,5
Umbeliferón	0,5	82,9	5,4
	1,0	87,7	4,2
	5,0	81,2	2,9
Kumarín	0,5	82,2	9,8
	1,0	83,3	5,9
	5,0	78,9	2,8
Herniarín	0,5	77,3	5,9
	1,0	81,5	5,8
	5,0	73,7	7,3

tu. Na elúciu kumarínov sa použila zmes metanol/kyselina octová (9/1, v/v), pri ktorej sa dosiahli najvyššie hodnoty výtťažnosti testovaných kumarínov. V testovanej vzorke levandule úzkolistej a komonice lekárskej bola zistená prítomnosť kumarínu ($0,76 \pm 0,04 \mu\text{g g}^{-1}$; $9,2 \pm 0,3 \mu\text{g g}^{-1}$) a vo vzorke archangeliky lekárskej prítomnosť umbeliferónu ($0,49 \pm 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$).

Záver

V práci sa testoval polymér s odtlačkom molekuly umbeliferónu ako sorbent pre extrakciu na tuhej fáze kumarínov z liečivých rastlín. Vhodný polymér bol pripravený nekovalentným spôsobom použitím kyseliny metakrylovej ako monoméru a chloroformu ako porogénu a preukázal dostatočnú sorpčnú kapacitu na stanovenie kumarínov v rastlinných vzorkách a dobrú skupinovú selektivitu pre študované kumaríny. Prešetril sa vplyv štruktúry látok na sorpčnú kapacitu polyméru. Off-line MIP-SPE extrakcia je vhodná metóda na prečistenie a sorpciu kumarínov zo zložitých vzoriek a je perspektíva využiť ju aj pre iné typy vzoriek.

Práca vznikla za podpory grantu č. 1/0499/14 Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied.

LITERATÚRA

1. Scotter M. J., Roberts D. P. T., Reesa G. O.: *Anal. Methods* 3, 414 (2011).
2. Zacaronia L. M., Cardoso M. G., Saczka A. A., Moraes A. R., A. J. Pereira, Resende Machado A. M., Nelson D. L.: *Anal. Lett.* 44, 2061 (2011).
3. Waksmondzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T. (ed.): *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, CRC Press, Boca Raton 2008.
4. Zgórk G., Głowniak K.: *Phytochem. Anal.* 10, 268 (1999).
5. Sádecká J., Polonský J.: *Chem. Listy* 99, 222 (2005).
6. Grainger Bisset N, Wichtl M. (ed.): *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. 2. vyd. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart 2001.
7. Hoult J. R. S., Paya M.: *Gen. Pharmacol.* 27, 713 (1996).
8. Esteban A. M.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 370, 795 (2001).

A. Spevak and K. Hroboňová (*Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava*): **Group-Selective Molecularly Imprinted Polymer as a Sorbent for Extraction of Coumarins from Medicinal Plants**

Coumarins occurring in plants are well known for their pharmacological activities as anticoagulants, fungicides and spasmolytics. The review deals with molecularly imprinted solid phase extraction coupled with HPLC applied to the determination of simple coumarins. The influence of analyte structure on sorption capacity was studied. The method is suitable for isolation and purification of coumarins.