

共晶分离技术在染料木素-葛根素-大豆苷元三元体系 分离纯化中的应用

李雪铭, 卢燕, 钱帅, 庞遵霆, 魏元锋*

(中国药科大学中药学院, 江苏南京 211198)

摘要: 共晶分离技术是一种利用配体选择性与目标化合物形成共晶后从混合体系中分离的技术。葛根素、染料木素及大豆苷元是葛根中的主要成分, 这3种结构相似的成分的分离精制多采用常规柱色谱、重结晶等技术, 具有分离周期长、溶剂消耗量大、制备效率低等问题。本团队利用前期新发现的共晶分离现象设计并实现了染料木素-葛根素-大豆苷元三元混合物的分步提取分离实验, 在混合体系中依次加入咖啡因和脯氨酸作为共晶配体, 通过混悬液法形成了染料木素-咖啡因共晶和葛根素-脯氨酸共晶, 并从溶液中分别分离析出, 最终得到染料木素纯度为93%的染料木素-咖啡因共晶和葛根素纯度为99%的葛根素-脯氨酸共晶, 且大豆苷元的纯度也提高了6.76倍。本研究提出了一种不同于传统分离方法、操作简单、成本低、适用范围广的分离方法, 实现了中药中结构相近化学组分的分离, 为共晶技术应用于中药的分离与精制奠定基础。

关键词: 葛根素; 染料木素; 大豆苷元; 共晶; 分离方法

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)02-0439-08

Application of cocrystal separation technology in the separation and purification of genistein-puerarin-daidzein ternary system

LI Xue-ming, LU Yan, QIAN Shuai, PANG Zun-ting, WEI Yuan-feng*

(School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract: Cocrystal separation technology is a technology that utilizes coformers to selectively form cocrystals with target compounds and separate them from mixed systems. Our study used puerarin (PUE), daidzein (DDZ), and genistein (GEN) as model drugs, which have similar structures and are the main isoflavones in *Pueraria lobata* root. The separation and purification processes in the modern traditional Chinese medicine (TCM) of these three components use conventional column chromatography, recrystallization, and other technologies, which have the issues of lengthy separation cycles, high solvent consumption, and inefficient preparation. Different with existing separation technology, our team used the early-found cocrystal separation method to design a step-by-step extraction and separation experiment of GEN-PUE-DDZ ternary mixture. Caffeine and *L*-proline were added to the mixed system in turn, GEN-caffeine cocrystal and PUE-proline cocrystal were prepared by suspension method. The cocrystals precipitated out of the solution. The purities of the GEN-caffeine cocrystal and the PUE-proline cocrystal could achieve 93% (the purity of GEN) and 99% (the purity of PUE). Besides, the purity of DDZ could also be increased by 6.76 times. This study proposed a simple operating, low cost and wide application range separation method different from the traditional separation method and realized the separation of structurally similar chemical components in TCM, laying a foundation for the application of cocrystal technology in the

收稿日期: 2022-07-22; 修回日期: 2022-09-24.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873012, 82074029, 82104401, 82274217); 中国药科大学“双一流”建设项目 (CPU2018GY11, CPU2018GY27); 江苏省青年基金项目 (SBK2020042291); 中国博士后面上项目 (2020M671665); 中央高校基金资助项目 (2632021ZD15).

*通讯作者 Tel: 15251756256, E-mail: weiyuanfengyuer@yeah.net

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0893

separation and refining of TCM.

Key words: puerarin; genistein; daidzein; cocrystal; separation method

药物共晶 (cocrystal, CC) 是指活性药物分子 (active pharmaceutical ingredient, API) 与形成物 (coformer, CF) 按固定的化学计量比通过氢键、 π - π 堆积或其他非共价键相结合形成的单一均相的晶体^[1,2], CF 须为药学可接受的小分子配体或是另一种有协同药理作用的小分子药物。共晶技术可在不改变药物化学结构及临床药理特性的情况下, 对 API 的关键药剂学性质进行改善, 包括溶解度、溶出速率、机械性能、稳定性、生物利用度等^[3]。

本课题组前期研究发现^[4], 共晶形成过程中, API 与 CF 间的结合力主要为方向性氢键, 基于分子识别原理, CF 能选择性与混合体系中某一化合物形成共晶; 从而可利用共晶与另一种化合物溶解度的差异实现分离。目前, 共晶分离技术主要应用于二元化合物体系, 如 Hsi 等^[5]通过共晶分离技术实现了布洛芬与酮洛芬的分离, 其在三元或多元化合物体系及中药多组分体系中分离、纯化的可行性需进一步研究。

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 在国内外广泛应用于心血管疾病、高血压、糖尿病等疾病的治疗^[6]。研究表明, 葛根中葛根素 (puerarin, PUE)、大豆苷元 (daidzein, DDZ)、染料木素 (genistein, GEN) 含量分别为 PUE 52.04%~89.02%、DDZ 1.54%~44.43%、GEN 3.01%~19.54%^[7], 提取得到的葛根总黄酮进一步水解精制后, 由 PUE、DDZ、GEN 几种异黄酮类化合物组成 (图 1)^[8-10]。组合大孔吸附树脂法从葛根提取液中分离得到的提取物中的 PUE, 经薄层色谱法和高效液相色谱法 (HPLC) 测定其纯度仅为 55%, 收率仅有 2%^[11]。Cheng 等^[12]设计以 PUE 为目标模板分子的分子印迹聚合物能有效地从葛根提取物中分离 PUE 并通过 HPLC 检测, 但由于识别结构十分相似, 分子印迹聚合物会同时提取出 DDZ 等化合物, 从而导致产物含有较多种类杂质。此外, 3 种成分水溶性均较差, 且 DDZ 和 GEN 仅在 A 环的 C5 位

上相差 1 个 -OH, 三者难以通过重结晶分离。

在现有分离方法不理想的情况下, 本研究应用共晶技术实现了 GEN-PUE-DDZ 三元体系的有效分离, 提高了各组分的纯度, 同时分离得到的共晶具有提高难溶性药物 PUE、GEN 水溶性和成药性的潜能。

材料与方法

药品及试剂 PUE (99.98%, 浙江震元制药有限公司); GEN (98%, 西安泽朗生物科技有限公司); DDZ (99%, 国药集团化学试剂有限公司); 咖啡因 (caffeine, CAF, 99.3%, 江西康丰生物科技有限公司); L-脯氨酸 (L-proline, PRO, 99%, 源叶生物公司); 实验用水 (Milli-Q 水纯化系统自制, 美国 Millipore 公司); 乙醇 (分析纯, 南京化学试剂股份有限公司); 乙腈 (色谱纯, 甲谱纯) (上海安谱科学仪器有限公司)。

仪器 BS124S、BT25S 电子天平 (德国 Sartorius 公司); 差示扫描量热分析 (differential scanning calorimetry, DSC) 仪 (200F3Phoenix Netzsch, 德国 Netzsch 公司); 高效液相色谱仪 (LC-2010A HT&LC-10ADVP Shimadzu)、傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 仪 (Affinity-1S Shimadzu) (日本 Shimadzu 公司); 粉末 X-射线衍射仪 (D8 Advance, 德国 Bruker 公司)。

配体的选择和制备方法研究 前期通过混悬液法筛选发现配体 CAF 能与 PUE 或 GEN 形成化学计量比 1:1 的共晶, PRO 仅与 PUE 形成化学计量比 1:1 的共晶^[13]。

PUE-CAF 共晶 称取 3.21 g PUE 和 1.44 g CAF (摩尔比 1:1) 于西林瓶中, 加入甲醇 10 mL, 密封, 室温搅拌 24 h。将所得混悬液过滤, 所得产物于 25 °C 真空干燥箱中干燥 24 h 后, 过 100 目筛网即得, 室温干燥保存。

GEN-CAF 共晶 称取 2.00 g GEN 和 1.44 g CAF

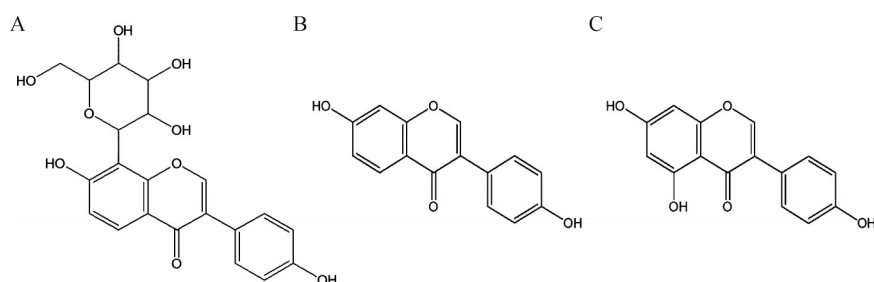


Figure 1 The chemical structures of puerarin (PUE, A), daidzein (DDZ, B), and genistein (GEN, C)

(摩尔比 1:1) 于西林瓶中, 加入甲醇 10 mL, 同上述方法操作即得。

PUE-PRO 共晶 称取 5.35 g PUE 和 1.15 g PRO (摩尔比 1:1) 于西林瓶中, 加入 20 mL 甲醇, 同上述方法操作即得。

物理混合物 分别称取摩尔比 1:1 的 PUE 和 CAF、GEN 和 CAF、PUE 和 PRO 适量, 过 100 目筛混合 3 次即得。

样品表征

粉末 X-射线衍射 (powder X-ray diffraction, PXRD) 分别取样品粉末约 200 mg, 采用 Cu-K α 靶进行测定, 扫描速度为 4°/min, 扫描范围 2θ 为 5°~40°, 步长为 0.02°, 波长为 1.540 6 Å, 管压为 40 kV, 管流为 40 mA。

DSC 分别取样品粉末约 3 mg 置于铝坩埚内, 升温速率为 10 °C·min⁻¹, 测定范围为 40~250 °C 或 40~320 °C。

FT-IR 分别取样品粉末 (约 2 mg) 与 KBr 充分研磨, 并在 1 T 的压力下压制成薄片。采用 IRAffinity-1S 型的红外光谱仪, 对 KBr 空白片及各样品片进行扫描, 仪器相关参数设置, 测定模式为透过率 (%), 扫描次数为 32 次, 分辨率为 4 cm⁻¹, 扫描范围 4 000~400 cm⁻¹。

含量测定方法的建立

对照溶液的配制 取 PUE (GEN、DDZ、CAF、PRO) 粉末适量, 用甲醇溶解制得质量浓度约为 1 mg·mL⁻¹ 的对照溶液。混合标准对照溶液: 用移液管精密移取 PUE、GEN、CAF 对照溶液适量, 用甲醇将其稀释制得各约含 250 μ g·mL⁻¹ 的混合标准对照溶液。

HPLC 分析方法 采用 Xtimate XB-C18 柱 (6 mm \times 150 mm, 5 μ m), 检测波长为 260 nm, 流动相 A 为纯水, 流动相 B 为甲醇, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 梯度程序为: 0~25 min, 46% B; 25~30 min, 60% B; 30~36 min, 80% B; 36~40 min, 40% B, 柱温 40 °C, 进样体积为 10 μ L, 检测波长为 260 nm。

线性与范围 用移液管分别精密移取对照溶液适量, 用甲醇将其稀释一定倍数, 即得系列质量浓度分别为 400、200、100、50、25、12、6 μ g·mL⁻¹ 的 PUE、GEN 和 DDZ 溶液, 取上述各系列溶液, 用 0.22 μ m 尼龙针式滤器过滤, 取续滤液 10 μ L 按 HPLC 分析方法进样检测, 记录色谱图。分别以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制散点图, 回归分析得到标准曲线。

分离流程 分离流程如图 2 所示。

不同组分化合物对共晶形成的影响

DDZ 对 GEN-CAF 共晶形成的影响 在含有 1 mmol GEN 和 1 mmol DDZ 的 2 mL 甲醇混悬液中加

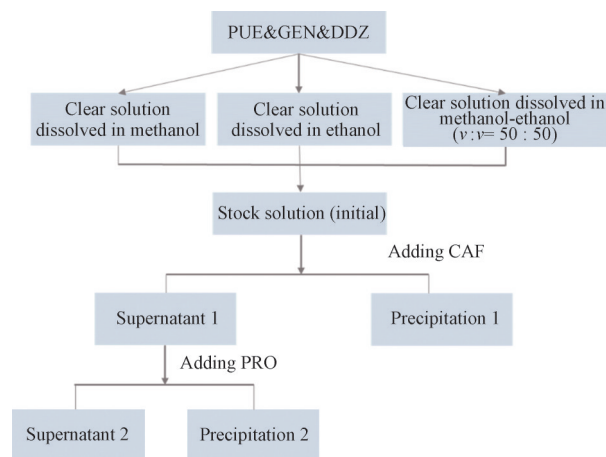


Figure 2 Schematic diagram of ternary system separation by cocrystal method. CAF: Caffeine; PRO: L-Proline

入 1 mmol CAF (DGC 样品), 置于 10 mL 西林瓶中, 室温搅拌 24 h。将混悬液过滤后得到的滤饼进行真空干燥 24 h, 并在 4 °C 的真空干燥器中保存。

PUE 对 GEN-CAF 共晶形成的影响 在含有 1 mmol GEN 和 1 mmol PUE 的 2 mL 甲醇混悬液中加入 1 mmol CAF (PGC 样品), 同上述操作制备产物。

GEN 对 PUE-PRO 共晶形成的影响 在含有 1 mmol GEN 和 1 mmol PUE 的 2 mL 甲醇混悬液中加入 1 mmol PRO (GPP 样品), 同上述操作制备产物。

DDZ 对 PUE-PRO 共晶形成的影响 在含有 1 mmol PUE 和 1 mmol DDZ 的 2 mL 甲醇混悬液中加入 1 mmol PRO (DPP 样品), 同上述操作制备产物。

分别取以上制备产物适量进行 PXRD 测定。

分离溶剂的选择 测定室温条件下 PUE 晶体、GEN 晶体及 PUE-PRO 共晶、GEN-CAF 共晶在不同溶剂 [甲醇、乙醇、甲醇-乙醇 (v:v = 50:50) 或乙腈] 中 API 的溶解度。分别称取过量的上述样品于密封管中, 加入 5 mL 溶剂, 置于恒温振荡器中 (温度 25 \pm 1 °C, 振摇速度 250 r·min⁻¹) 振摇 24 h, 并在此温度下静置平衡 1 h 取出样品。样品经 0.22 μ m 尼龙针式滤器过滤, 用甲醇稀释一定倍数后进行 HPLC 分析。每个样品平行测定 3 份。

复杂混合体系中共晶分离方法及分离效果的评价

三元混合母液的制备 取 3 个具塞碘量瓶, 分别加入 200 mL 甲醇、乙醇、甲醇-乙醇 (v:v = 50:50) 溶剂。称取过量 PUE、GEN 和 DDZ 粉末置于装有 3 种溶剂的碘量瓶中, 置于恒温振荡器中 (温度 25 \pm 1 °C, 振摇速度 250 r·min⁻¹) 强力振摇 24 h, 并在此温度下静置平衡 1 h 再取出样品, 样品经 0.22 μ m 尼龙针式滤器过滤, 得到甲醇、乙醇、甲醇-乙醇 (v:v = 50:50) 的三元饱和澄清母液, 分别为母液 A、B、C, 经上述 HPLC 法

分别测定母液中PUE、GEN及DDZ的含量。

GEN的分离 分别取100 mL的母液A、B和C,向各母液中加入与GEN等摩尔的配体CAF后,于25 °C条件下搅拌24 h。将反应得到的混悬液4 000 r·min⁻¹离心5 min,分离固液混合物,经HPLC分别测定上清液与沉淀中GEN、PUE、DDZ的含量。

PUE的分离 取上一步制备得到的上清液10 mL,加入与上清液中PUE等摩尔量的配体PRO后,同法操作进行分离。经HPLC分别分析第2次分离后的上清与沉淀中GEN、PUE、DDZ的含量。

分离效果的评价 通过计算上清液与沉淀中化合物的纯度*P*%,评价PUE-GEN的分离效果。再分别将上清液与沉淀进行真空干燥,得到干燥固体后称重,计算上清液中的单体及沉淀中的共晶回收率*R*%。每个样品平行操作3次。

纯度*P*%由公式(1)求得(以GEN为例):

$$P\% = \frac{C_{L,GEN}}{C_{L,PUE} + C_{L,GEN} + C_{L,DDZ}} \times 100\% \text{ 或}$$

$$P\% = \frac{C_{S,GEN}}{C_{S,PUE} + C_{S,GEN} + C_{S,DDZ}} \times 100\% \quad (1)$$

其中, $C_{L,PUE}$ 、 $C_{S,PUE}$ 分别表示分离后PUE在液相和固相中的浓度(mg·mL⁻¹); $C_{L,GEN}$ 、 $C_{S,GEN}$ 分别表示分离后GEN在液相和固相中的浓度(mg·mL⁻¹); $C_{L,DDZ}$ 、 $C_{S,DDZ}$ 分别表示分离后DDZ在液相和固相中的浓度(mg·mL⁻¹)。

回收率*R*%由公式(2)求得:

$$R\% = \frac{W_L \times P_L\%}{W_T} \times 100\% \text{ 或}$$

$$R\% = \frac{W_S \times P_S\%}{W_T} \times 100\% \quad (2)$$

其中, W_L 、 W_S 分别表示分离的上清液与沉淀干燥后的净重量(g); P_L 、 P_S 分别表示分离的上清液与沉淀中化合物的纯度(%); W_T 表示相应物料的起始投入量(g)。

统计学分析 实验数据用SPSS 22.0统计软件进行分析,各组间数据采用多因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

结果与讨论

1 样品表征

1.1 PXRD 由图3可知,PUE晶体在 $2\theta = 6.44^\circ$ 、 7.94° 、 11.58° 、 13.86° 、 15.88° 、 18.66° 、 21.04° 、 23.30° 处具有特征衍射峰。GEN晶体的特征衍射峰在 $2\theta = 7.50^\circ$ 、 12.20° 、 12.74° 、 14.30° 、 15.40° 、 18.04° 、 22.46° 、 24.74° 、 28.72° 。DDZ晶体在 $2\theta = 10.44^\circ$ 、 15.84° 、 17.04° 、 24.62° 、 25.29° 、 26.49° 等处具有特征的衍射峰。CAF晶

体的特征衍射峰在 $2\theta = 11.84^\circ$ 、 12.02° 、 26.46° 、 27.14° 。PRO晶体的特征衍射峰在 $2\theta = 15.25^\circ$ 、 18.08° 、 18.45° 、 19.59° 、 22.73° 、 24.78° 。PUE与CAF形成共晶后,PUE的特征峰大部分消失,在 $2\theta = 7.50^\circ$ 、 9.40° 、 23.52° 、 24.00° 等处出现了新的特征衍射峰。GEN与CAF形成共晶后,GEN的特征峰大部分消失, $2\theta = 9.46^\circ$ 、 20.18° 、 22.04° 、 26.34° 、 28.18° 等处出现了新的特征衍射峰,与文献^[14]报道一致。PUE与PRO形成共晶后,在 $2\theta = 5.43^\circ$ 、 7.56° 、 13.32° 、 19.16° 、 20.62° 处出现了新的特征衍射峰,表明产物均为新的固体形态,可能形成了PUE-CAF、GEN-CAF及PUE-PRO共晶。

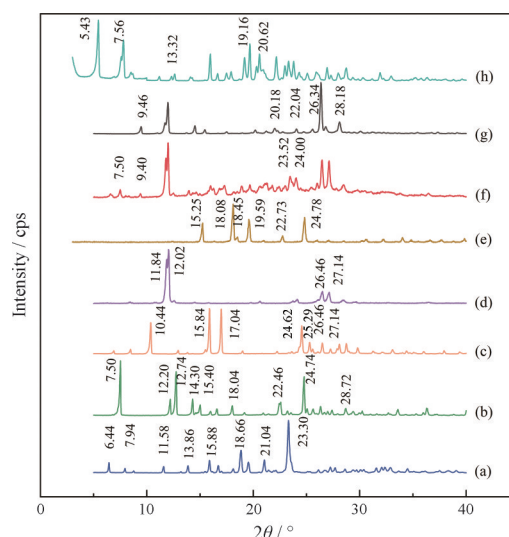


Figure 3 Powder X-ray diffraction (PXRD) patterns of PUE (a), GEN (b), DDZ (c), CAF (d), PRO (e), PUE-CAF cocrystal (f), GEN-CAF cocrystal (g), PUE-PRO cocrystal (h)

1.2 DSC 由图4可知,PUE晶体的DSC图谱上有2个吸热峰,其中82.9 °C处宽的吸热峰为脱水峰,208.7 °C处吸热峰为其熔融峰,与文献^[15,16]报道一致。GEN晶体在305.6 °C处有单一尖锐吸热熔融峰。CAF晶体在162.5 °C处的吸热峰为 $\alpha \rightarrow \beta$ 晶型转变峰,吸热熔融峰在237.0 °C^[17]。PRO晶体在233.7 °C有一尖锐吸热熔融峰。PUE-CAF共晶在194.0 °C出现单一尖锐吸热熔融峰。GEN-CAF共晶在250.3 °C出现单一尖锐吸热熔融峰,与文献^[14]报道一致。PUE-PRO共晶在179.5 °C处有单一尖锐的吸热熔融峰,表明形成了单一组分的共晶。

1.3 FT-IR 由图5可知,PUE晶体的 $\nu_{(O-H)}$ 伸缩振动位于3 346、3 232 cm⁻¹, $\nu_{(C=O)}$ 伸缩振动位于1 631 cm⁻¹,1 235 cm⁻¹为 $\nu_{(C-O)}$ 伸缩振动。染料木素晶体 $\nu_{(O-H)}$ 伸缩振动位于3 408 cm⁻¹, $\nu_{(C=O)}$ 伸缩振动位于1 651 cm⁻¹,苯环的骨架 $\nu_{(C=C)}$ 振动位于1 614和1 519 cm⁻¹。酚羟基

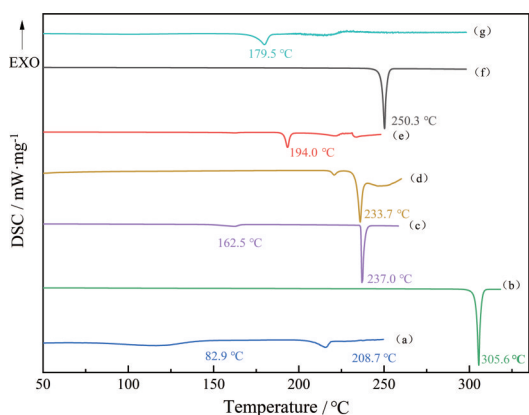


Figure 4 Differential scanning calorimetry (DSC) curves of PUE (a), GEN (b), CAF (c), PRO (d), PUE-CAF cocrystal (e), GEN-CAF cocrystal (f), PUE-PRO cocrystal (g)

的键弯曲振动峰为 $1\ 309\ \text{cm}^{-1}$, $\nu_{(\text{C-O})}$ 伸缩振动位于 $1\ 202\ \text{cm}^{-1}$, 与文献^[18,19]报道一致。CAF 晶体苯环的 $\nu_{(\text{C-H})}$ 伸缩振动位于 $3\ 112\ \text{cm}^{-1}$, $\nu_{(\text{C=O})}$ 伸缩振动位于 $1\ 701$ 和 $1\ 656\ \text{cm}^{-1}$ ^[20]。PUE+CAF 或 GEN+CAF 的物理混合物的红外图谱分别为二组分特征峰的简单叠加。PUE-CAF 共晶中 PUE O-H 伸缩振动峰红移后与 $3\ 232\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰重合, 形成了 $3\ 378\ \text{cm}^{-1}$ 处的宽峰。而 CAF 的 $\nu_{(\text{C=O})}$ 伸缩振动蓝移至 $1\ 659\ \text{cm}^{-1}$ 。推测 PUE 的羟基与咖啡因的羰基形成了分子间氢键。

PUE-CAF 共晶中 GEN 的 $\nu_{(\text{O-H})}$ 伸缩振动和 CAF 的 $\nu_{(\text{C-H})}$ 伸缩振动在 $3\ 196\ \text{cm}^{-1}$ 处合并成了一个大宽峰; GEN $\nu_{(\text{C=O})}$ 伸缩振动弱化消失; 苯环骨架 C=C 键的振动峰红移至 $1\ 602\ \text{cm}^{-1}$; 酚羟基的 O-H 键弯曲振动峰红移至 $1\ 328\ \text{cm}^{-1}$; $\nu_{(\text{C-O})}$ 伸缩振动峰红移至 $1\ 244\ \text{cm}^{-1}$ 。CAF 的 $\nu_{(\text{C=O})}$ 伸缩振动峰红移至 $1\ 641\ \text{cm}^{-1}$ 。推测 GEN 的 C7 位上的羟基与 CAF 的 C2 位上的羰基形成了分子间氢键, GEN 的 C5 位上的羟基和 C4 位上的羰基形成了分子内氢键, 且 GEN 与 CAF 分子间存在 π - π 堆积^[14]。

PRO 分子中羧酸基团的 $\nu_{(\text{O-H})}$ 吸收峰在 $3\ 064\ \text{cm}^{-1}$ 处, $\nu_{(\text{C=O})}$ 吸收峰在 $1\ 550\ \text{cm}^{-1}$ 处, COO⁻ 基团的对称振动吸收峰位于 $1\ 622\ \text{cm}^{-1}$ 。PRO 与 PUE 物理混合物的红外图谱为二者特征峰的简单叠加。PUE-PRO 共晶中 PUE 的酚羟基 $\nu_{(\text{O-H})}$ 吸收峰蓝移至 $3\ 360\ \text{cm}^{-1}$, PUE 的酚羟基上的 $\nu_{(\text{C=O})}$ 蓝移到 $1\ 250\ \text{cm}^{-1}$, 并且峰形发生明显的宽化, PUE 的酚羟基上 $\delta_{(\text{OH})}$ 的面外变形由 $611\ \text{cm}^{-1}$ 变弱。而 PRO 羧基的 $\nu_{(\text{O-H})}$ 吸收峰蓝移至 $3\ 081\ \text{cm}^{-1}$ 。推测 PUE 的酚羟基与 PRO 的羧基参与了 PUE-PRO 共晶中分子间氢键的形成。

2 含量测定方法

PUE、GEN、DDZ 的保留时间分别为 4.2、21.8、14.3 min, 分离度均大于 1.5, 各组分之间能达到有效分

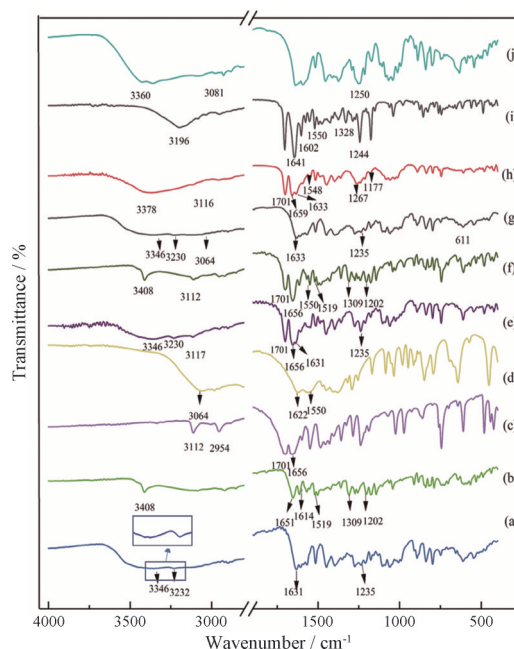


Figure 5 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) spectra for PUE (a), GEN (b), CAF (c), PRO (d), physical mixture of PUE and CAF (e), GEN and CAF (f), PUE and PRO (g), PUE-CAF cocrystal (h), GEN-CAF cocrystal (i), PUE-PRO cocrystal (j)

离, 表明该色谱条件专属性好, 分离效果良好。PUE 的线性范围为 $6\sim 401\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 相关系数 $r = 1.000\ 0$, GEN 的线性范围为 $6\sim 389\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 相关系数 $r = 1.000\ 0$, DDZ 的线性范围为 $6\sim 391\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 相关系数 $r = 1.000\ 0$ 。该方法分离度良好, 重复性好, 准确度高。

3 各成分间对共晶形成的影响

3.1 DDZ 或 PUE 对 GEN-CAF 共晶形成的影响

DDZ 对 GEN-CAF 共晶形成的影响如图 6A 所示。在 GEN 与 DDZ 甲醇溶液中, 加入等摩尔的 CAF (1:1:1), 经磁力搅拌, 所析出产物 (DGC 样品) 的 PXRD 特征峰基本与 GEN-CAF 共晶一致, 这表明 DDZ 不会影响 GEN-CAF 共晶的形成。此外, 还在 $2\theta = 10.44^\circ$ 、 15.84° 、 17.04° 、 24.62° 、 25.29° 处出现 DDZ 晶体的衍射峰, 表明在共晶析出的过程中, 伴随着部分 DDZ 晶体析出。

PUE 对 GEN-CAF 共晶的形成影响如图 6B 所示。在 GEN 与 PUE 甲醇溶液中, 加入等摩尔的 CAF (1:1:1), 经磁力搅拌, 所析出产物 (PGC 样品) 的 PXRD 特征峰与 GEN-CAF 共晶一致, 同时缺少 PUE-CAF 共晶在 $2\theta = 7.50^\circ$ 、 15.88° 、 23.30° 等处的特征峰, 表明在此三元体系中, CAF 竞争性选择与 GEN 形成共晶, PUE 不会影响 GEN-CAF 共晶的形成。

3.2 GEN 或 DDZ 对 PUE-PRO 共晶形成的影响

GEN 或 DDZ 对 PUE-PRO 共晶形成的影响如图 6C 所示。在 GEN 与 PUE 甲醇溶液中, 加入等摩尔的 PRO (1:1:1),

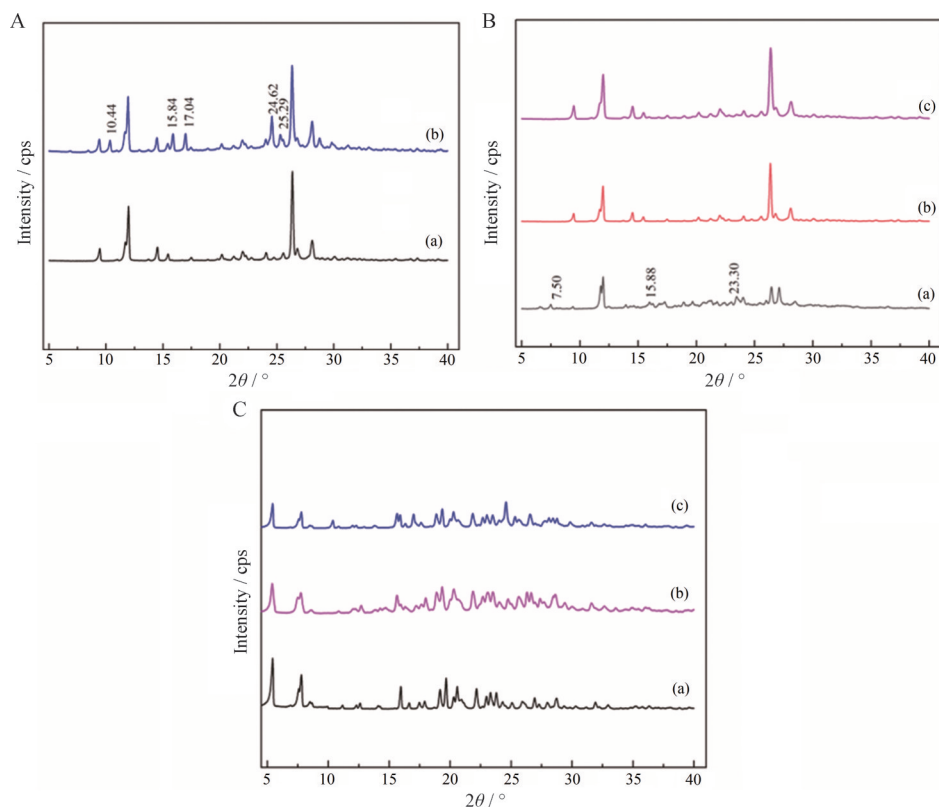


Figure 6 A: PXRD patterns of GEN-CAF cocrystal (a) and GEN-CAF cocrystal + DDZ (DGC, b). B: PXRD patterns of PUE-CAF cocrystal (a), GEN-CAF cocrystal (b) and GEN-CAF cocrystal + PUE (PGC, c). C: PXRD patterns of PUE-PRO cocrystal (a), PUE-PRO cocrystal + GEN (GPP, b) and PUE-PRO cocrystal + DDZ (DPP, c)

经磁力搅拌, 所析出产物 (GPP 样品) 的 PXRD 特征峰与 PUE-PRO 共晶一致。在 DDZ 与 PUE 甲醇溶液中, 加入等摩尔的 PRO (1:1:1), 经磁力搅拌, 所析出产物 (DPP 样品) 的 PXRD 特征峰与 PUE-PRO 共晶一致。这表明, GEN 或 DDZ 不会影响 PUE-PRO 共晶的形成。

综上, 在含有 GEN-PUE-DDZ 的三元体系中, CAF 与 PUE、GEN 均可形成共晶, 但优先与 GEN 形成共晶, PRO 仅与 PUE 形成共晶。这为选用 CAF 与 PRO 为配体, 经共晶技术实现 GEN-PUE-DDZ 三元体系的分离纯化奠定了基础。

4 分离溶剂的选择

选择合适的溶剂使 GEN-CAF 共晶与 GEN 单体在溶剂中的溶解度具有较大的差异, 是得到高回收率共晶的前提条件。如表 1 所示, 在甲醇、乙醇及乙腈中, GEN-CAF 共晶的溶解度相比 GEN 晶体分别下降了

87.32%、90.61% 及 55.45%, 相比之下, 乙腈不适于作为三元体系分离的溶剂。

对三元体系中 PUE 的分离是加入配体 PRO 进行搅拌反应, 使其形成 PUE-PRO 共晶以沉淀形式析出实现的。在甲醇、乙醇及甲醇-乙醇混合溶剂中, PUE-PRO 共晶与 PUE 晶体相比, 溶解度分别下降了 75.22%、90.02% 及 82.79%。

考虑到单体与共晶的溶解度差异大小会影响到实际分离时的分离效率, 后续将对分析甲醇、乙醇及甲醇-乙醇混合溶剂的分离效果。

5 复杂混合体系中分离效果的评价

5.1 GEN 的分离 以 CAF 为配体时, GEN-PUE-DDZ 三元体系中, CAF 优先与 GEN 形成共晶, DDZ 与 PUE 不会影响 GEN-CAF 共晶的形成 (图 6)。因此, 选用 CAF 作为配体从三元体系中分离 GEN (图 7), GEN-

Table 1 Solubility determination results of GEN crystal, GEN-CAF cocrystal (CC), PUE crystal, and PUE-PRO CC ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Solvent	Sample			
	GEN	GEN-CAF CC (GEN)	PUE	PUE-PRO CC (PUE)
Methanol	12.78 ± 1.43	1.62 ± 0.10	45.64 ± 3.59	11.31 ± 2.14
Ethanol	16.18 ± 0.52	1.52 ± 0.11	16.91 ± 1.44	1.35 ± 0.01
Acetonitrile	2.11 ± 0.02	0.94 ± 0.04	0.29 ± 0.02	No determination
Methanol-ethanol ($v : v = 50 : 50$)	No determination	No determination	30.27 ± 0.02	5.21 ± 0.12

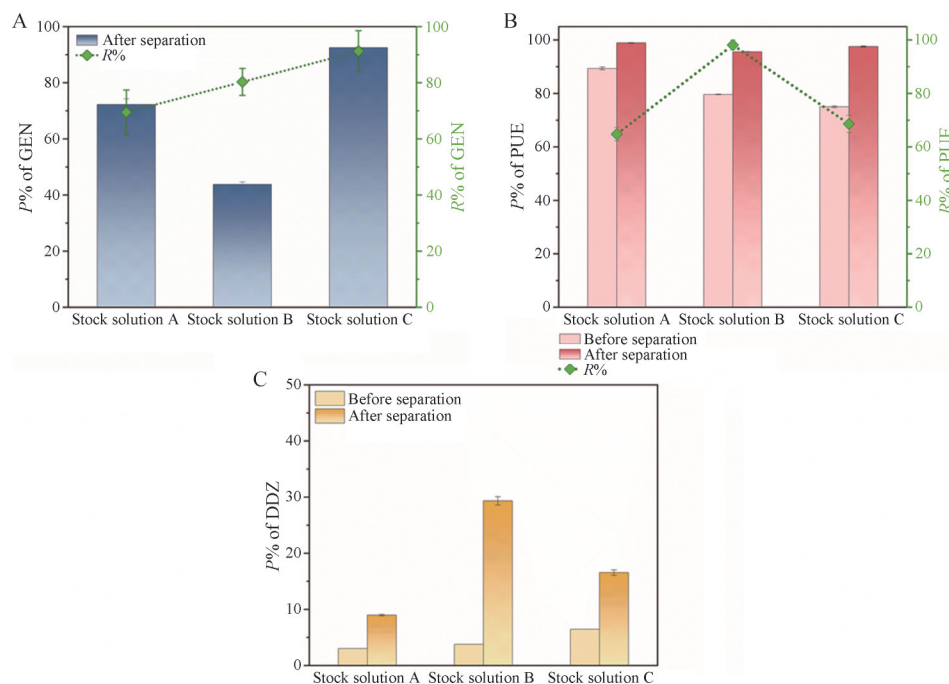


Figure 7 A: Purity ($P\%$) and recovery ($R\%$) of GEN in the precipitation after the first cocrystal separation from different stock solutions. B: $P\%$ and $R\%$ of PUE in the supernatant (before adding PRO) and the precipitate (after adding PRO). C: Changes of $P\%$ of DDZ in the supernatant before and after the cocrystal separation. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$

CAF共晶以沉淀的形式析出。由图7A可知,从母液A、B、C中析出的固体中GEN纯度分别为72%、44%和93%,回收率分别为70%、80%和91%。母液A、C中的GEN均得到很好的分离,母液B中GEN的纯度较低,这可能是由于不同母液中GEN-CAF共晶与另两种组分间溶解度差异不同导致的。在沉淀析出过程中,溶解度差异越大,沉淀中目标成分纯度越高,如在母液A、B中PUE溶解度分别是共晶的28.17、11.13倍(表1),在沉淀析出过程中,母液B的PUE更易随共晶析出,GEN纯度较低。

5.2 PUE的分离 如图7B所示,经5.1项下第一步共结晶分离后,3种母液上清液中PUE的纯度均在70%以上(母液A:89%,母液B:80%,母液C:75%)。通过加入PRO进行第二步共结晶分离后,PUE-PRO共晶以沉淀形式析出,沉淀中PUE纯度分别提高至99%(母液A)、96%(母液B)、96%(母液C),同时回收率分别为65%、98%、69%,即3种母液中的PUE均得到很好的沉淀分离,说明共结晶的方式可提取体系中的PUE,得到纯度均接近100%的PUE-PRO共晶。

同时,经二次共结晶分离后,DDZ在上清液中的纯度也有很大程度的提高,在母液A、B、C中分别提高了1.96、6.76和1.56倍(图7C)。此分离步骤对上清液中DDZ的富集效应较差是由于共晶反应生产的PUE-PRO共晶在甲醇中具有一定溶解度(表1),上清

液中残留的PUE的量仍较高,所以在母液A和C中DDZ纯度比母液B中的低。

结论

本研究验证了在复杂的中药体系中通过共晶分离技术可以实现PUE-GEN-DDZ的混合体系的有效分离纯化。通过共晶分离方法可得到纯度为93%的GEN-CAF共晶和纯度为99%的PUE-PRO共晶,具有较高的回收率。同时,该共晶分离方法具有操作步骤少、简单方便、易重复操作的优势,对于运用现代晶体工程学前沿技术推动中药的传承与创新具有积极意义,对于本研究提出的晶体学分离技术在更复杂的多元体系中的分离应用还有待于继续研究。

作者贡献: 李雪铭、卢燕负责实验操作、结果分析及撰写文章;钱帅、庞遵霆负责实验操作、结果分析;魏元锋负责修改文章。

利益冲突: 作者排名顺序无争议,稿件不涉及泄密和知识产权争议。

References

- [1] Lara-Ochoa F, Espinosa-Petrez G. Cocrystals definitions [J]. *Supramol Chem*, 2007, 19: 553-557.
- [2] Shan N, Zaworotko MJ. The role of cocrystals in pharmaceutical science [J]. *Drug Discov Today*, 2008, 13: 440-446.

- [3] Weng XY, Pang ZT, Qian S, et al. Druggability enhancement by modification of physicochemical properties of drugs *via* crystal engineering [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 2883-2891.
- [4] Xia YM, Wei YF, Chen H, et al. Competitive cocrystallization and its application in the separation of flavonoids [J]. IUCrJ, 2021, 8: 195-207.
- [5] Hsi KHY, Chadwick K, Fried A, et al. Separation of impurities from solution by selective co-crystal formation [J]. CrystEngComm, 2012, 14: 2386-2388.
- [6] Song W, Li YJ, Qi X, et al. Chemistry of the Chinese herbal medicine *Puerariae Radix* (Ge-Gen): a review [J]. J Chin Pharm Sci, 2014, 23: 347-360.
- [7] Huang ZQ, Wang TT, Ma YY, et al. Quality evaluation study of *Pueraria Radix* and *Pueraria thomsonii* by component contents and anti-oxidant activity [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 1667-1676.
- [8] Yuan XP, Liu YM, Liu JQ, et al. Comparison of puerarin, daidzin, daidzein, genistein content of *Pueraria lobata*, *P. thomsonii* and *P. peduncularis* [J]. China Pharm (中国药房), 2012, 23: 4462-4464.
- [9] Huang Y, Yang JH, Zhao Y, et al. Screening, optimization, and bioavailability research of natural deep eutectic solvent extracts from *Radix Pueraria* [J]. Molecules, 2021, 26: 729.
- [10] Bharti R, Chopra BS, Raut S, et al. *Pueraria tuberosa*: a review on traditional uses, pharmacology, and phytochemistry [J]. Front Pharmacol, 2021, 11: 582506.
- [11] Liu JP, Tang SL, Yuan H, et al. Enrichment and purification process of puerarin in *Pueraria Lobata* Ohwi by combined technique of two macroporous adsorption resins [J]. Tianjin Pharm (天津药学), 2013, 25: 8-10.
- [12] Cheng SL, Yang YH. Separation of isoflavones from *Radix Pueraria* by molecular imprinting technology [J]. China Tradit Patent Med (中成药), 2006, 28: 1484-1488.
- [13] Lu Y. Cocrystallization/coamorphization Technology in Separation of *Pueraria Flavonoids* (共晶/共无定形技术在葛根黄酮分离中的应用和机制研究) [D]. Nanjing: China Pharmaceutical University, 2021.
- [14] Sowa M, Slepokura K, Matczak-Jon E. Solid-state characterization and solubility of a genistein-caffeine cocrystal [J]. J Mol Struct, 2014, 1076: 80-88.
- [15] Li Y, Yang DJ, Chen SL, et al. Comparative physicochemical characterization of phospholipids complex of puerarin formulated by conventional and supercritical methods [J]. Pharm Res, 2008, 25: 563-577.
- [16] Li Y, Yang DJ, Zhou W, et al. Recrystallization of puerarin using the supercritical fluid antisolvent process [J]. J Cryst Growth, 2012, 340: 142-148.
- [17] Dong JX, Li Q, Tan ZC, et al. The standard molar enthalpy of formation, molar heat capacities, and thermal stability of anhydrous caffeine [J]. J Chem Thermodyn, 2007, 39: 108-114.
- [18] Chen AZ, Li Y, Chau FT, et al. Application of organic nonsolvent in the process of solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂ to prepare puerarin fine particles [J]. J Supercrit Fluids, 2009, 49: 394-402.
- [19] Tao HQ, Meng QF, Li MH, et al. HP- β -CD-PLGA nanoparticles improve the penetration and bioavailability of puerarin and enhance the therapeutic effects on brain ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2013, 386: 61-70.
- [20] Hong C, Xie Y, Yao YS, et al. A novel strategy for pharmaceutical cocrystal generation without knowledge of stoichiometric ratio: myricetin cocrystals and a ternary phase diagram [J]. Pharm Res, 2015, 32: 47-60.