

氨基表面修饰磁性纳米粒子 (MNP-NH₂) 对黄酮类和有机酸类成分选择吸附研究

曹雪晓¹, 栗焕焕¹, 邱喜龙¹, 任晓亮^{1*}, 王 萌², 裴高升¹

1. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617

2. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 301617

摘要: 目的 制备氨基表面修饰磁性纳米粒子 (amino-modified Fe₃O₄ nanoparticles, MNP-NH₂) 并将其作为吸附剂, 研究其对黄酮类及有机酸类成分的吸附性能。方法 制备 MNP-NH₂ 磁性纳米粒子, 扫描/透射电镜、傅里叶红外光谱仪及振动样品磁强计对其结构进行表征; 通过研究对 12 种单体成分吸附性能探讨 MNP-NH₂ 的吸附规律; 将其应用到金银花药材中, 研究超声时间、温度、离子强度及 pH 值对吸附能力的影响, 采用 L₉(3⁴) 正交试验考察 MNP-NH₂ 对金银花 5 种成分的洗脱条件, 并研究其循环利用性能。结果 制备的 MNP-NH₂ 结构稳定、分布均匀, 有良好的磁性; 其吸附量与黄酮类、有机酸类化合物邻位酚羟基存在和个数有关; 离子浓度和温度对吸附过程几乎无影响, pH 值对不同类化合物的吸附过程影响较大, 最佳吸附条件为 30 °C 下超声 40 min, 洗脱条件为 5 mL 20% 冰乙酸溶液 (甲醇-水 60 : 40) 的洗脱液, 超声 40 min。结论 MNP-NH₂ 可用于对金银花中有效成分提取, 对其中黄酮类成分保持较高的吸附率, 同时 MNP-NH₂ 的循环使用与再生性良好, 为复杂中药及天然药物有效成分提取应用提供新的研究思路。

关键词: Fe₃O₄; MNP-NH₂; 金银花; 磁性纳米粒子; 黄酮; 有机酸; 吸附性能; 循环利用

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2018)20 - 4816 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.20.017

Preferential adsorption of flavonoids and organic acids by amino-modified Fe₃O₄ nanoparticles (MNP-NH₂)

CAO Xue-xiao¹, LI Huan-huan¹, QIU Xi-long¹, REN Xiao-liang¹, WANG Meng², PEI Gao-sheng¹

1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To synthesize amino-modified Fe₃O₄ nanoparticles (MNP-NH₂) and study the adsorption of flavonoids and organic acids by MNP-NH₂. **Methods** MNP-NH₂ were synthesized and characterized by transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, and vibrating sample magnetometer analysis; The adsorption rule of MNP-NH₂ was discussed by studying the adsorption properties of 12 monomers. The adsorption properties of MNP-NH₂ were assessed under conditions of different ultrasonic time, temperature, ionic strength, and pH. The final elution conditions were determined by L₉(3⁴) orthogonal test and the recycling performance was also considered. **Results** MNP-NH₂ synthesized in this study have stable structure, uniform distribution, and good magnetic properties. Adsorption of 12 monomers by MNP-NH₂ showed that the mechanism of adsorption was related to the number of ortho-phenolic hydroxyl groups. Ions concentration and temperature had little effect on adsorption for different compounds except pH. The optimized adsorption conditions were extraction for 40 min at 30 °C and the final elution conditions were determined to be 5 mL of 20% glacialacetic acid (methanol-water 60 : 40) and ultrasonication for 40 min. **Conclusion** MNP-NH₂ can be utilized to extract the effective components of *Lonicerae Japonicae Flos* and maintain a high adsorption rate of flavonoids. Moreover, MNP-NH₂ had great recycling and reproducibility, providing new ideas for the utilization of extracting chemical compounds from complex traditional Chinese medicine and natural medicines.

收稿日期: 2018-05-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774149); 天津市应用基础与前沿技术研究计划 (15JCQNJC14100)

作者简介: 曹雪晓 (1993—), 博士研究生, 中药学专业。E-mail: xuechen.3@163.com

*通信作者 任晓亮 (1980—), 副教授, 主要从事中药分析研究工作。Tel: (022)59596221 E-mail: renxiaoliang@tjutc.edu.cn

Key words: Fe_3O_4 ; MNP-NH₂; *Lonicerae Japonicae Flos*; magnetic nanoparticles; flavonoids; organic acids; adsorption property; recycling

随着纳米科学的迅速发展,各种各样的磁性纳米材料被成功地合成出来,并开始应用于磁性存储介质、生物传感器、药物转运载体和污水处理等领域^[1-7]。 Fe_3O_4 纳米粒子由于结构相对简单、成本低、毒性低、比表面积较高以及吸附性能良好得到广泛应用^[8-11]。为了改善 Fe_3O_4 磁性纳米粒子材料的选择吸附性能,提高捕获中草药及食品靶点的能力,诸多功能基团如巯基(-SH)、氨基(-NH₂)、羧基(-COOH)、磺酸基(-SO₃H)、羟基(-OH)等被用于提取材料的改性^[12-14]。在样品预处理中,相比较传统固相萃取(SPE),磁性固相萃取(MSPE)中将磁性(Fe_3O_4)纳米粒子作为吸附剂,已经吸引了相当多的关注^[15]。张卓琦等^[16]制备了磁性介孔纳米粒子并负载了抗癌药紫杉醇,提高了其对宫颈癌HeLa细胞的抑制率。Wu等^[17]制备了氧化石墨烯复合磁性纳米材料从茶、葡萄酒和尿液样本中提取黄酮类成分。虽然,磁性纳米粒子的独特特征已经引起的生物医学科学领域的广泛关注,但将其应用于食品和中药中化合物提取研究仍较少。

本研究构建了MNP-NH₂磁性纳米材料,探索其对黄酮类及有机酸类化合物的吸附规律,并将MNP-NH₂作为提取剂,首次应用到金银花药材中提取黄酮类及有机酸类成分,开发了其从植物来源的中药、食品中提取单体化合物的潜力。为MNP-NH₂应用于中草药、天然药物及食物中黄酮类及有机酸类成分的提取提供依据。

1 材料

1.1 原料及试剂

对照品木犀草素(批号20160709)、木犀草苷(批号20160709)、花旗松素(批号20161211)、二氢杨梅素(批号20160705)、芦丁(批号20160709)、柚皮素(批号20160607)、绿原酸(批号20161210)、咖啡酸(批号20160610)、水杨酸(批号20161210)、莽草酸(批号20160721)、原儿茶酸(批号20160911)、没食子酸(批号20160908)购自南京泽朗医药公司(经HPLC测定,质量分数 $\geq 98\%$)。金银花药材产于山东,经天津中医药大学李天祥教授鉴定为忍冬科植物忍冬*Lonicera japonica* Thunb.的干燥花蕾或带初开的花。

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1,6-己二胺、无水乙酸钠(NaAc)

购于阿拉丁试剂公司;乙二醇、无水乙醇购于天津科密欧试剂有限公司;磷酸购于天津市福晨化学试剂厂;磷酸钠,氢氧化钠购于天津市化学试剂批发公司;色谱甲酸、乙腈购自美国Sigma公司;所用水为屈臣氏蒸馏水。

1.2 仪器

Sartorius BT125D 十万分之一天平,赛多利斯科学仪器有限公司;JA31002 电子天平,上海精天电子仪器有限公司;TG16-WS 台式高速离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;KH3200B 超声波清洗器,昆山禾创超声仪器有限公司;DHG-9030A 电热鼓风干燥箱,北京博达科技公司;DZF-6020MBE 真空干燥箱,杭州科晓化工仪器公司;DF-101S 型集热式磁力搅拌器,巩义市予华仪器公司;DELTA 320 pH 计,瑞士Mettler Toledo公司;Waters2695 高效液相色谱仪,美国Waters公司;PPMS-9 振动样品磁强计,美国量子设计公司。JEOL JSM 6700F 型扫描电子显微镜(SEM),日本Jeol公司;Hitachi H-800 型透射电子显微镜(TEM),日本Hitachi公司;Bruker 550 型傅里叶变换红外光谱(FT-IR)仪,德国Bruker公司。

2 方法与结果

2.1 MNP-NH₂ 磁性纳米粒子制备

采用经典的溶剂热合成法制备MNP-NH₂^[18],称取 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.5 g)和1,6-己二胺(4.0 g)置于圆底烧瓶中,加入50 mL 乙二醇,充分搅拌、超声,使块状的固体溶解,加入NaAc(4.5 g)继续剧烈搅拌30 min,使之形成均一的黏稠液体,溶液颜色由浅黄色逐渐变为深棕色;将混合溶液转移到50 mL 的反应釜中,密封后放入烘箱,在200 °C下反应10 h;冷却至室温后用钕铁硼磁铁分离出黑色固体MNP-NH₂,依次分别用去离子水和无水乙醇各超声洗涤3次,60 °C条件下真空干燥8 h,制得MNP-NH₂。

2.2 MNP-NH₂ 的表征测试

2.2.1 电镜分析 采用SEM测定MNP-NH₂纳米粒子的形貌特征,真空度大于 1.33×10^{-6} Pa,加速电压3.0 kV,放大倍数80 000。通过TEM分析MNP-NH₂的特征,观察样品的精细结构。加速电压200.0 kV,放大倍数200 000,真空度大于 10^{-6} Torr

(1 Torr 约为 133.3 Pa), 拍摄 MNP-NH₂ 的粒子形貌。

由溶剂热合成法制得的 MNP-NH₂ 主要为球状结构, 磁性纳米粒子表面被氨基修饰可以保护 Fe₃O₄ 被氧化, 最后制得形貌规则、结构稳定、分布均匀的 MNP-NH₂ 复合材料。由图 1、2 测试图谱可知, MNP-NH₂ 纳米粒子粒径大小约 20 nm, 分布较为均匀, 基本为单层, 似球形, 局部有颗粒聚集和叠加。

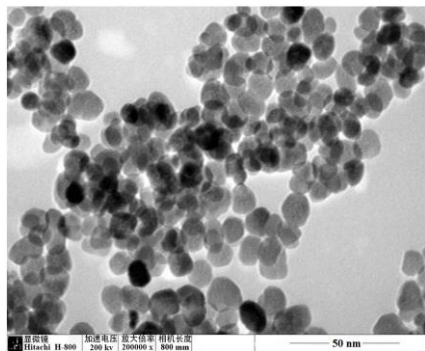


图 1 MNP-NH₂ 的 TEM 图

Fig. 1 TEM image of MNP-NH₂

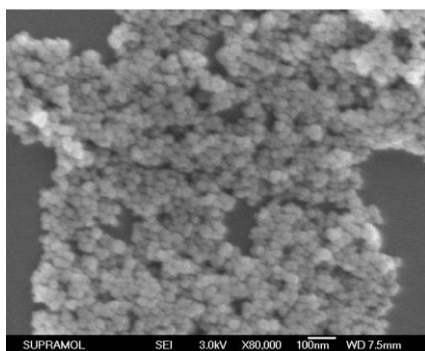


图 2 MNP-NH₂ 的 SEM 图

Fig. 2 SEM image of MNP-NH₂

2.2.2 FT-IR 分析 采用 KBr 压片, 波数范围 400~4 000 cm⁻¹, 分辨率 4 cm⁻¹, 扫描次数 32 次。测定 MNP-NH₂ 纳米粒子结构中化学官能团的结构特征。MNP-NH₂ 的红外光谱图见图 3, 在 586 cm⁻¹ 处为 Fe-O-Fe 键的特征吸收峰; 1 650 cm⁻¹ 处的吸收峰是由 O-H 的弯曲振动产生的, 说明 Fe₃O₄ 和 MNP-NH₂ 表面存在一些 -OH 基团。3 379、1 261 cm⁻¹ 的特征吸收对应氨基的 N-H 强伸缩振动吸收和 C-N 伸缩振动吸收, 说明反应后磁性粒子表面生成了氨基功能基团^[17]。

2.2.3 磁性测试分析 (VSM) 振动样品磁强计适用于各种磁性材料的测量。本实验采用美国量子设计公司的超导量子干涉器件测定 MNP-NH₂ 纳米粒

子的磁滞回线。从图 4 中可以明显看出, 在无外加磁场情况下, 制备的 MNP-NH₂ 能均匀的分散在溶液中, 当有外加磁场时 (即磁铁靠近时), MNP-NH₂ 能迅速向磁场方向聚集, 均一的分散液迅速出现分层现象; Fe₃O₄ 及 MNP-NH₂ 的饱和磁化强度 (M) 分别为 92.26、76.35 emu/g, MNP-NH₂ 的 M 降低, 是由于 MNP-NH₂ 表层被修饰了一定量的 -NH₂, 影响了 M , 从而降低了 MNP-NH₂ 的磁矩。当外加磁场强度 (H) 降为零时, 磁性样品的矫顽力和剩磁都几乎为零, 且几乎观察不到磁滞现象, 因此这种磁性纳米粒子非常适合用做载体。

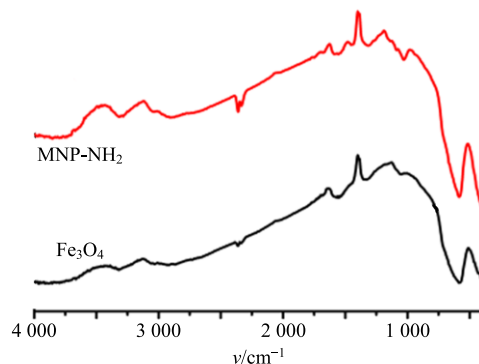


图 3 MNP-NH₂ 和 Fe₃O₄ 的红外图谱

Fig. 3 FT-IR spectra of MNP-NH₂ and Fe₃O₄

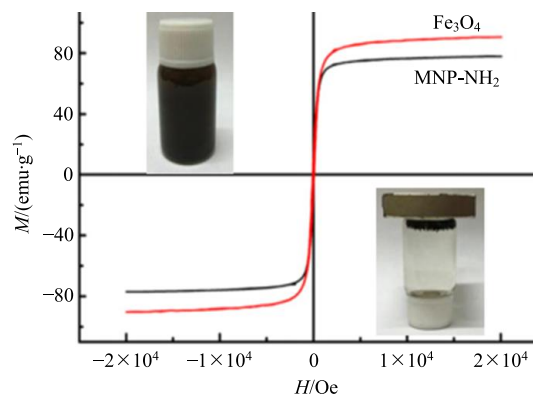


图 4 Fe₃O₄ 和 MNP-NH₂ 的磁力曲线

Fig. 4 Magnetic hysteresis loops of Fe₃O₄ and MNP-NH₂

2.3 MNP-NH₂ 对中药单体成分吸附性考察

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相及等度洗脱比例的确定依据《中国药典》2015 年版相关化合物检测条件并适当调整^[19], 结果见表 1; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL; 温度 30 °C。

2.3.2 对照品溶液的配制 取木犀草素、木犀草苷、花旗松素、二氢杨梅素、芦丁、柚皮素、绿原酸、咖啡酸、水杨酸、莽草酸、原儿茶酸、没食子酸对照品适量, 精密称定, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加甲

表 1 12 种化合物色谱条件及线性关系

Table 1 Chromatographic conditions and linear equations of 12 monomers

化合物	乙腈-0.2%磷酸水溶液	检测波长/nm	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
木犀草素	35:65	350	$Y=5\times 10^7 X+53\ 263$	0.999 7	5.45~109.00
木犀草苷	22:78	350	$Y=3\times 10^7 X-59\ 247$	0.999 9	5.38~107.60
花旗松素	30:70	290	$Y=3\times 10^7 X-21\ 479$	0.999 7	2.01~80.20
柚皮素	42:58	290	$Y=3.7\times 10^7 X+57\ 316$	0.999 5	5.25~103.10
芦丁	22:78	350	$Y=2\times 10^7 X+25\ 263$	0.999 6	5.02~100.12
二氢杨梅素	25:75	290	$Y=4\times 10^7 X-76\ 628$	0.999 6	9.12~91.20
绿原酸	15:85	324	$Y=3\times 10^7 X-21\ 479$	0.999 7	2.01~80.23
咖啡酸	15:85	324	$Y=3.1\times 10^7 X+16\ 953$	0.999 8	5.38~103.01
水杨酸	15:85	225	$Y=2\times 10^7 X+25\ 263$	0.999 6	5.24~100.21
莽草酸	2:98	210	$Y=2.5\times 10^7 X-35\ 247$	0.999 7	2.04~89.86
原儿茶酸	10:90	259	$Y=3\times 10^7 X-53\ 528$	0.999 6	4.07~92.13
没食子酸	5:95	218	$Y=3.4\times 10^7 X+40\ 352$	0.999 6	5.05~104.56

醇定容, 4 ℃ 保存即得对照品储备液。

2.3.3 样品溶液吸附 分别取 12 种中药单体成分样品溶液各 5 mL, 每份加入 1 mg 磁性纳米粒子, 混合均匀后在室温下超声 40 min, 借助外加磁铁实现磁性纳米粒子与样品液的分离(固液分相), 吸取上清液, 以微孔有机滤膜滤过, 分别测定吸附前样品液、吸附后上清液中指标成分的质量浓度。

2.3.4 线性关系考察 精密称取各对照品储备液适量, 按倍数用甲醇逐级稀释, 配制成一系列对照品溶液, 按“2.3.1”项色谱条件进样, 以峰面积为纵坐标(Y), 各对照品质量浓度为横坐标(X), 得回归方程见表 1, r 均在 0.999 以上, 在线性范围内线性关系良好。

2.3.5 吸附过程 以 MNP-NH₂ 作为吸附载体, 将 12 种中药单体成分储备液分成实验组和空白组, 在实验组中加入一定量的磁性纳米粒子, 未加入磁性纳米粒子的原料液(或者标准溶液)作为空白组, 超声处理。实验组在外加磁场作用下实现磁性纳米粒子与原料液的分离(固液分相), 取上清液过膜, 空白组直接过膜, 进样分析, 得到吸附前后的液相色谱图, 按公式计算出饱和吸附量(Q)。磁性纳米粒子 Q 的计算公式为 $Q=[(C_0-C_1)V_1]/M$, 其中 C_0 是起始质量浓度(mg/mL), C_1 是吸附平衡后的质量浓度(mg/mL), V_1 是加入各单体成分溶液的体积(mL), M 是 MNP-NH₂ 磁性纳米粒子的质量(g)。

2.3.6 MNP-NH₂ 对中药单体成分吸附效果 研究主要考察了氨基铁纳米粒子对不同中药单体成分的吸附情况。称取相同质量的氨基铁纳米粒子与相同浓度的 12 种中药单体成分在相同条件下进行分离

提取, 氨基铁纳米粒子对 12 种中药单体成分吸附结果见图 5。MNP-NH₂ 对中药单体的吸附考察中, 吸附率由大到小依次为木犀草素>芦丁>木犀草苷>二氢杨梅素>没食子酸>绿原酸>咖啡酸>花旗松素>原儿茶酸>莽草酸>水杨酸>柚皮素。研究发现, MNP-NH₂ 的吸附率与黄酮类和有机酸类化合物的邻位酚羟基的存在和羟基个数有关, 邻位酚羟基越多被吸附的量越大。

2.4 MNP-NH₂ 对金银花中 5 种活性成分选择性吸附研究

将制备的 MNP-NH₂ 纳米材料作为吸附剂, 研究 MNP-NH₂ 对金银花中黄酮类成分木犀草苷、木犀草素、芦丁及有机酸类成分绿原酸、咖啡酸的吸附性能。

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%磷

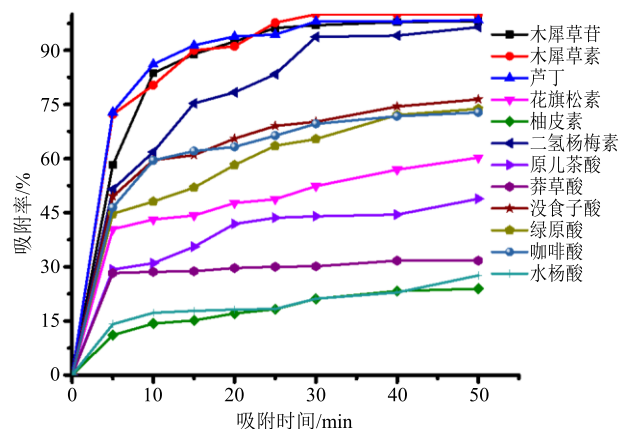


图 5 不同吸附时间下的吸附率

Fig. 5 Adsorption rate of 12 monomers under different adsorption time

酸水溶液,梯度洗脱:0~15 min, 10%~20%乙腈; 15~30 min, 20%~55%乙腈; 30~40 min, 55%~10%乙腈; 40~45 min, 10%乙腈; 检测波长 350 nm; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μ L; 温度 30 $^{\circ}$ C。HPLC 色谱图见图 6。

2.4.2 混合对照品溶液的制备 取对照品绿原酸、咖啡酸、芦丁、木犀草苷、木犀草素适量加甲醇定

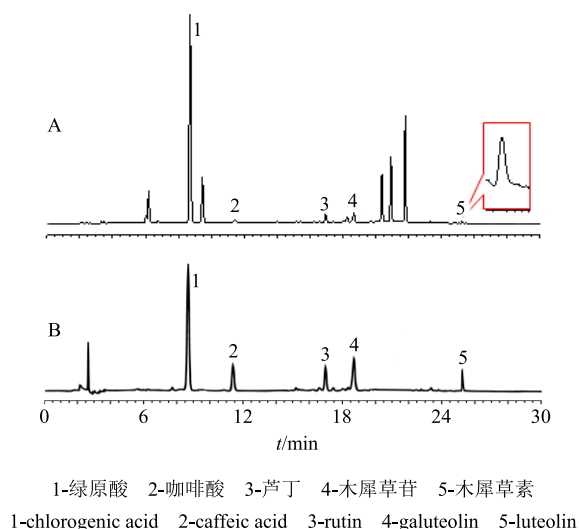


图 6 金银花样品液 (A) 及混合对照品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 6 HPLC of *Lonicerae Japonicae Flos* sample solution (A) and reference substance (B)

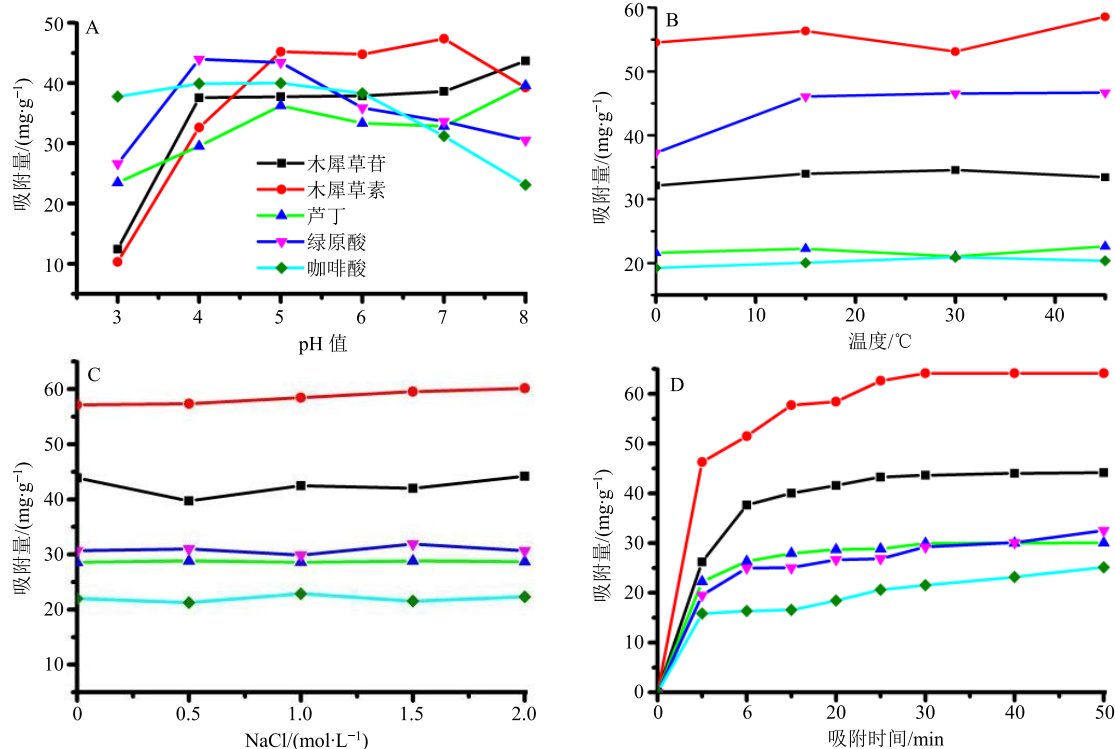


图 7 pH 值、温度、离子强度及超声时间对 MNP-NH₂ 吸附能力的影响

Fig. 7 Effect of ultrasonic time, temperature, ions, and pH value on MNP-NH₂ adsorption capacity

溶于 10 mL 量瓶中, 即得。

2.4.3 金银花样品溶液的制备 取 10 g 金银花, 加 30 倍水, 浸泡 30 min, 水浴提取 1 h, 提取 2 次, 合并滤液并混匀, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 即得。

2.4.4 金银花样品溶液吸附 取 5 mL 金银花样品溶液, 加入 100 mg 氨基铁, 与 5 mL 未加氨基铁母液, 30 $^{\circ}$ C 超声 40 min, 磁铁分离后, 离心 13 000 r/min, 10 min, 进液相; 剩余铁加 5 mL 洗脱液, 超声 40 min, 进行洗脱, 固液分离, 取洗液过膜, 按照“2.4.1”项下金银花色谱条件进样, 得到吸附前、后的 HPLC 图, 计算出 Q 值。

2.4.5 方法学考察 精密度、重复性、稳定性试验中金银花中的 5 种成分绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、木犀草素、芦丁的保留时间 RSD < 2%、峰面积 RSD < 3%, 均符合要求, 表明精密度、重复性良好, 样品在 24 h 内稳定。

2.4.6 吸附条件考察 取相同质量浓度的 5 种化合物溶液各 5 mL, 加入适量的 MNP-NH₂, 恒温超声。分别用 pH 值为 3、4、5、6、7、8 磷酸盐溶液稀释 5 种化合物储备液, 于 25 $^{\circ}$ C 下的恒温超声 40 min, 考察 pH 值对 MNP-NH₂ 吸附性能的影响, 结果见图 7-A。分别在 0、15、30、45 $^{\circ}$ C 下, 考察超

声温度对 MNP-NH₂ 吸附性能的影响, 结果见图 7-B。分别用 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L 的 NaCl 溶液稀释 5 种化合物储备液, 于 25 ℃ 下恒温超声 40 min, 考察离子浓度对 MNP-NH₂ 吸附性能的影响, 结果见图 7-C。分别在 0、5、10、15、20、25、30、40、50 min 下, 考察超声时间对 MNP-NH₂ 吸附性能的影响, 结果见图 7-D。

结果显示, 吸附时间在 40 min 时, 基本都达到最大吸附平衡; 离子浓度和温度对吸附过程几乎不影响。pH 值在 MNP-NH₂ 对不同类化合物的吸附过程中影响较大, 当 pH 值为 3 时, MNP-NH₂ 对木犀草素与木犀草苷吸附最小, 在 pH 值为 5 时, 5 种成分相对吸附量较高, 在不同 pH 值下, 5 种化合物吸附存在一定差异。最终选择 30 ℃ 下超声 40 min 作为最佳吸附条件。

2.4.7 洗脱条件考察 影响 MNP-NH₂ 洗脱效果的主要因素有冰乙酸体积分数 (A, 10%、20%、30%)、甲醇体积分数 (B, 40%、60%、80%)、洗脱时间 (C, 15、30、45 min) 和洗脱体积 (D, 3、5、7 mL) 4 个试验因素。采用 L₉(3⁴) 进行 4 因素 3 水平的正交试验, 收集洗脱液按“2.4.1”项下方法检测溶液中中药单体成分的质量浓度, 计算洗脱率, 并对结果进行方差分析。结果见表 2~4。

由方差分析 (表 4) 可知, 对绿原酸的吸附率因素中无显著性差异; 对咖啡酸的吸附率因素中 A 和 D 有显著性差异; 对芦丁的吸附率因素中 B 和 D 有显著性差异; 对木犀草苷的吸附率因素中 A、B 和 D 有显著性差异; 对木犀草素的吸附率因素中 A、B 和 D 有显著性差异。

结合直观分析 (表 3) 和方差分析, 最终确定

表 2 L₉(3⁴) 正交试验设计及结果Table 2 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A/%	B/%	C/min	D/mL	洗脱率/%				
					绿原酸	咖啡酸	芦丁	木犀草苷	木犀草素
1	10	40	15	3	17.57	15.72	26.28	56.01	66.63
2	10	60	30	5	23.16	19.57	38.18	74.61	87.22
3	10	80	45	7	18.32	17.71	32.77	70.24	82.87
4	20	40	30	7	18.69	17.93	30.10	68.01	74.13
5	20	60	45	3	16.94	18.07	32.84	68.80	77.43
6	20	80	15	5	29.33	20.50	36.27	74.07	86.37
7	30	40	45	5	20.57	16.71	33.06	69.83	56.83
8	30	60	15	7	30.83	17.55	35.08	80.90	64.64
9	30	80	30	3	21.54	15.17	29.25	70.21	58.72

表 3 洗脱率正交试验直观分析

Table 3 Intuitive analysis of orthogonal test

水平	绿原酸				咖啡酸				芦丁			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
K ₁	59.05	56.83	77.73	56.05	53.00	50.36	53.77	48.96	97.23	89.44	97.63	88.37
K ₂	64.96	70.93	63.39	73.06	56.50	55.19	52.67	56.78	99.21	106.10	97.53	107.51
K ₃	72.94	69.19	55.83	67.84	49.43	53.38	52.49	53.19	97.39	98.29	98.67	97.95
R	13.89	14.10	21.90	17.01	7.07	4.83	1.28	7.82	1.98	16.66	1.14	19.14

水平	木犀草苷				木犀草素			
	A	B	C	D	A	B	C	D
K ₁	200.86	193.85	210.98	195.02	236.72	197.59	217.64	202.78
K ₂	210.88	224.31	212.83	218.51	237.93	229.29	220.07	230.42
K ₃	220.94	214.52	208.87	219.15	180.19	227.96	217.13	221.64
R	20.08	30.46	3.96	24.13	57.74	31.70	2.94	27.64

表4 洗脱率方差分析

Table 4 Analysis of variance of elution rate

方差来源	自由度	绿原酸			咖啡酸			芦丁		
		偏差平方和	F值	显著性	偏差平方和	F值	显著性	偏差平方和	F值	显著性
A	2	32.393 4	1.000 0		8.331 1	26.027 4	$P<0.05$	0.806 5	3.035 5	
B	2	39.400 8	1.216 3	无	3.969 5	12.401 2		46.319 4	174.336 8	$P<0.01$
C	2	82.488 8	2.546 5	无	0.320 1	1.000 0		0.265 7	1.000 0	
D	2	50.621 4	1.562 7	无	10.214 8	31.912 5	$P<0.05$	61.056 6	229.805 0	$P<0.01$

方差来源	自由度	木犀草苷			木犀草素		
		偏差平方和	F值	显著性	偏差平方和	F值	显著性
A	2	67.201 2	25.675 2	$P<0.05$	725.668 1	441.028 4	$P<0.01$
B	2	161.211 6	61.593 3	$P<0.05$	214.332 9	130.261 9	$P<0.01$
C	2	2.617 4	1.000 0		1.645 4	1.000 0	
D	2	126.049 6	48.159 2	$P<0.05$	132.973 1	80.815 0	$P<0.05$

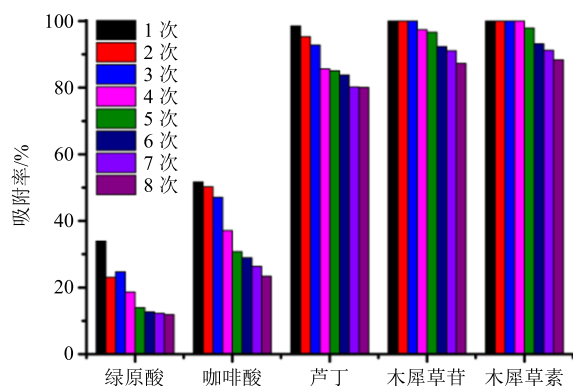
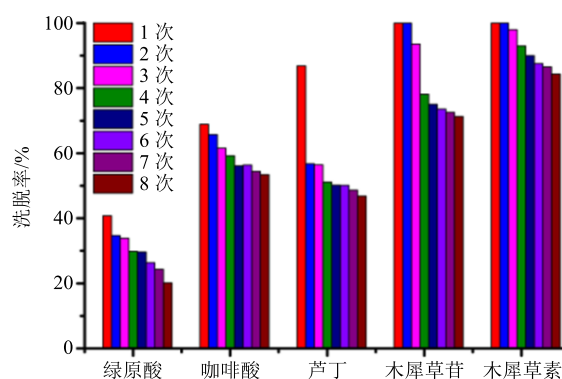
 $F_{0.05}(2, 2)=19.00$ $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

最佳洗脱条件为加 5 mL 20%冰乙酸液（甲醇-水 60:40）洗脱液，超声 40 min。

2.4.8 MNP-NH₂ 循环利用性能 为考察 MNP-NH₂ 的循环利用性能，将其重新用于金银花样品液的吸附，重复进行 8 次。测得 8 次循环中 MNP-NH₂ 对金银花样品液的脱附率见图 8、9。MNP-NH₂ 在吸附洗脱 8 次后，对金银花中有效成分木犀草素、木犀草苷、芦丁和咖啡酸保持较高的吸附率，达到 50% 以上；在循环洗脱过程中对芦丁、木犀草苷和木犀草素保持较高的洗脱率，达到 80% 以上。综上所述，MNP-NH₂ 具有良好的循环再利用特点，这也为将来的实际应用提供坚实的基础。

3 结论与讨论

本实验采用水热法制备得到 MNP-NH₂ 磁性纳米粒子，氨基成功修饰在磁性纳米粒子表面，MNP-NH₂ 复合粒子形貌规则、结构稳定、分布均匀且具

图8 MNP-NH₂ 循环利用吸附率Fig. 8 MNP-NH₂ recycling adsorption rate图9 MNP-NH₂ 循环利用洗脱率Fig. 9 MNP-NH₂ recycling elution rate

有良好的磁性及循环再利用特点，可用于下一步吸附。MNP-NH₂ 对金银花提取液中黄酮类成分相对有机酸类成分吸附率要高，而且洗脱的过程中两类化合物的差异较显著，对金银花中有效成分提取分离中具有潜在应用。

制备的 MNP-NH₂ 表面被修饰上丰富的氨基，与传统分离纯化方法，如大孔树脂等相比，本方法最显著的优点就是选择性强，操作简便能够直接从金银花提取液中分离出单体化合物，整个分离过程省时省力、操作简单易控，通过外加磁场即可实现吸附载体与原料液的分离，是一种很好的分离纯化方法。有望应用于中药材等复杂成分体系中黄酮类及有机酸类化合物的提取分离系统中。

参考文献

- [1] Wang Y, Gu H C. Core-shell-type magnetic mesoporous silica nanocomposites for bioimaging and therapeutic

- agent delivery [J]. *Adv Mater*, 2015, 27(3): 576-585.
- [2] Lei J Y, Wang L Z, Zhang J L. Superbright multifluorescent core shell mesoporous nanospheres as trackable transport carrier for drug [J]. *ACS Nano*, 2011, 5(5): 3447-3455.
- [3] Sadia S, Arifa T, Tayyaba A, *et al.* Green synthesis of iron nanoparticles and their environmental applications and implications [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2016, 6(11): 209-234.
- [4] He S Y, Zhong L H, Duan J J, *et al.* Bioremediation of waste water by iron oxide-biochar nanocomposites loaded with photosynthetic bacteria [J]. *Front Microbiol*, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00823.
- [5] Shete P B, Patil R M, Tiwale B M, *et al.* Water dispersible oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles for biomedical applications [J]. *J Magn Magn Mater*, 2015, 377: 406-410.
- [6] Fuhrer R, Herrmann I K, Athanassiou E K, *et al.* Immobilized β -cyclodextrin on surface modified carbon coated cobalt nanomagnets: Reversible organic contaminant adsorption and enrichment from water [J]. *Langmuir*, 2011, 27(5): 1924-1929.
- [7] 徐秋生, 李文松. 超顺磁性吸附剂1步高效提取和纯化丹参中丹参酮 [J]. *中草药*, 2015, 46(24): 3670-3674.
- [8] Anbarasu M, Anandan M, Chinnasamy E, *et al.* Synthesis and characterization of polyethylene glycol (PEG) coated Fe₃O₄ nanoparticles by chemical co-precipitation method for biomedical applications [J]. *Spectrochim Acta A*, 2015, 135(6): 536-539.
- [9] Sun N F, Liu Z A, Huang W B, *et al.* The research of nanoparticles as gene vector for tumor gene therapy [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014, 89(3): 352-357.
- [10] Huang C, Tang Z M, Zhou Y B, *et al.* Magnetic micelles as a potential platform for dual targeted drug delivery in cancer therapy [J]. *Int J Pharm*, 2012, 429(12): 113-122.
- [11] Tan L S, Sun M Y, Hu Y J, *et al.* Heavy metal removal from aqueous solution by functional magnetic Fe₃O₄ nanoparticles [J]. *Chem Prog*, 2013, 25(12): 2147-2158.
- [12] Xiao D, Zhang C, Yuan D, *et al.* Magnetic solid-phase extraction based on Fe₃O₄ nanoparticle retrieval of chitosan for the determination of flavonoids in biological samples coupled with high performance liquid chromatography [J]. *RSC Adv*, 2014, 4(110): 64843-64854.
- [13] Yue J, Jiang X H, Yu A B. Molecular dynamics study on Au/Fe₃O₄ nanocomposites and their surface function toward amino acids [J]. *J Phys Chem B*, 2011, 115(40): 11693-11699.
- [14] Torres-Lugo M, Peppas N A. Preparation and characterization of P (MAA-g-EG) nanospheres for protein delivery applications [J]. *J Nanopart Res*, 2002, 4(1/2): 73-81.
- [15] He H, Yuan D, Gao Z, *et al.* Mixed hemimicelles solid-phase extraction based on ionic liquid-coated Fe₃O₄/SiO₂ nanoparticles for the determination of flavonoids in bio-matrix samples coupled with high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1324(1): 78-85.
- [16] 张卓琦, 耿浩然, 宣瑞飞, 等. 磁性介孔纳米粒子的制备及对抗癌药紫杉醇的传输 [J]. *高等学校化学学报*, 2014, 35(7): 1509-1514.
- [17] Wu J, Xiao D, Zhao H, *et al.* A nanocomposite consisting of graphene oxide and Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for the extraction of flavonoids from tea, wine and urine samples [J]. *Microchim Acta*, 2015, 182(13/14): 2299-2306.
- [18] Tian M M, Chen D X, Sun Y L, *et al.* Pillararene-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles as magnetic solid-phase extraction adsorbent for pesticide residue analysis in beverage samples [J]. *RSC Adv*, 2013, 3(44): 22111-22119.
- [19] 中国药典 [S]. 一部. 2015.