

金属有机骨架-分子印迹复合微球的溶胶-凝胶法制备、表征及其对杜仲中桃叶珊瑚苷的提取分离

李中正¹, 向波^{2#}, 邓文³, 杨城城³, 王建霞¹, 王思源¹, 石欣¹, 田果¹, 李辉^{3*}

1. 吉首大学医学院, 湖南 吉首 416000

2. 吉首大学第一附属医院 检验科, 湖南 吉首 416000

3. 吉首大学化学化工学院, 湖南 吉首 416000

摘要: 目的 以金属有机骨架 (metal-organic frameworks, MOFs) 为载体, 制备桃叶珊瑚苷印迹复合材料, 并用于杜仲 *Eucommia Cortex* 中桃叶珊瑚苷的提取和分离。方法 采用溶胶-凝胶法制备了桃叶珊瑚苷印迹聚合物 (EM@MIPs), 并通过傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectrometer, FT-IR) 和扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 表征了该聚合物 (EM@MIP3) 表面化学官能团和形貌特征, 通过色谱法考察了印迹材料对杜仲桃叶珊瑚苷的分离效果。结果 印迹材料 (EM@MIP3) 具有较高的印迹因子 (6.830) 和较高选择性, 相对于喇叭糖苷、车前草苷和京尼平苷, 其对桃叶珊瑚苷的选择性因子 (α) 值分别为 4.931、4.896 和 3.418。采用色谱法测定 EM@MIP3 柱对桃叶珊瑚苷的吸附能力, 其吸附量为 51.34 mg/g。使用 EM@MIP3 柱对杜仲提取物中桃叶珊瑚苷进行在线分离纯化时, 桃叶珊瑚苷产品纯度大于 85%, 回收率高于 95%。此外, EM@MIP3 聚合物可重复使用。结论 印迹材料 (EM@MIP3) 有望发展成为一种高效的吸附介质, 用于中药中桃叶珊瑚苷的分离和纯化。

关键词: 杜仲; 溶胶-凝胶法; 分子印迹聚合物; 金属有机骨架材料; 桃叶珊瑚苷; 提取分离; 喇叭糖苷; 车前草苷; 京尼平苷

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)22-7402-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.22.016

Preparation of metal-organic frameworks-based molecularly imprinted polymer microsphere by a sol-gel technique and its application in extraction and separation of aucubin from *Eucommia ulmoides*

LI Zhong-zheng¹, XIANG Bo², DENG Wen³, YANG Cheng-cheng³, WANG Jian-xia¹, WANG Si-yuan¹, SHI Xin¹, TIAN Guo¹, LI Hui³

1. School of Medicine, Jishou University, Jishou 416000, China

2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Jishou University, Jishou 416000, China

3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou 416000, China

Abstract: Objective To prepare an aucubin imprinted polymer (EM@MIPs) composite with metal-organic frameworks (MOFs) as the carrier and apply its to the extraction and separation of aucubin from Duzhong (*Eucommia ulmoides*). **Methods** A sol-gel method was utilized to prepared EM@MIPs and the superficial chemical functional groups and morphology of polymers were characterized by Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR) and scanning electron microscope (SEM). The molecular recognition behavior for this imprinted material was evaluated through chromatographic method. **Results** The imprint materials (EM@MIP3) obtained under the optimized conditions possessed a high imprinting factor (6.830) and a high selectivity toward the template, with selectivity factor (α) values of 4.931, 4.896 and 3.418 relative to bugle glucoside, plantain glucoside and geniposide, respectively. The binding capacity for aucubin on the EM@MIP3 column was determined by frontal chromatography technique, with

收稿日期: 2023-08-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21865011)

作者简介: 李中正, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药药效物质基础与作用机制研究。E-mail: 397182163@163.com

*通信作者: 李辉, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事分子印迹药物载体的研究。E-mail: lihuijsdx@163.com

#共同第一作者: 向波, 硕士, 主任技师, 主要从事药物检验新剂型与新技术的研究。E-mail: xiangbobo1999@163.com

a value of 51.34 mg/g. The EM@MIP3 column can be utilized to on-line separation of aucubin from the extract of *E. ulmoides*, obtaining more than 90% purity of aucubin products, with a recovery higher than 95%. In addition, the reusability for the EM@MIP3 polymer was satisfactory. **Conclusion** This imprint materials (EM@MIP3) are expected to be developed into an efficient adsorption media for the separation and purification of aucubin from Chinese medicines.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv.; sol-gel technique; molecularly imprinted polymer; metal organic frameworks; aucubin; extraction and separation; bugle glucoside; plantain glucoside; geniposide

桃叶珊瑚苷是一种广泛存在于杜仲、车前草、人参、延胡索等植物中的天然产物,具有降压、抗氧化、抗衰老、抗炎、抗纤维化、抗癌等多种生物活性^[1-4]。从杜仲药材中提取高附加值的桃叶珊瑚苷已成为杜仲产业发展的重要一环。然而,由于植物中成分复杂,且存在大量结构相似的化合物,使得桃叶珊瑚苷的分离费时费力^[5]。桃叶珊瑚苷的传统分离往往涉及沉淀、结晶、两相萃取、大孔树脂吸附等繁琐的程序。而高选择吸附剂的研究和应用对于该化合物的分离纯化具有重要意义。

分子印迹聚合物 (molecularly imprinted polymer, MIPs) 基于其对目标化合物的高选择性结合能力,为从复杂系统中实现高效分离提供了可能。MIPs 已广泛应用于色谱分离^[6-8]、生物传感器^[9-10]、催化^[11-12]和其他领域^[13-14]。表面印迹法可将吸附位点布置在载体表面,从而在很大程度上改善分子识别过程中的传质动力学。但选择高比表面、易于修饰和具有较多活性基团的载体至关重要。

金属有机骨架 (metal-organic frameworks, MOFs) 是金属离子与有机配体组装而成的多孔晶体材料^[15]。MIL-101 (Cr) 作为 MOFs 家族的一员,通过金属铬离子 (III) 与对苯二甲酸^[16-18]配位而成。与传统多孔材料 (如活性炭、沸石、分子筛等) 相比, MIL-101 (Cr) 具有比表面积大、孔隙率高、孔可设计、易于合成等特点^[19-20], 广泛用于吸附分离、催化、载药及药物控释等领域^[21-22]。但 MOFs 材料对目标化合物选择性不够高,限制了其应用。将 MOFs 的高吸附容量与 MIPs 的高选择性相结合,有利于制备选择性和吸附性能优良的新型吸附材料,这为以 MOFs 为基体制备新型分子印迹聚合物提供了新思路。通过该方法获得的新型印迹聚合物在吸附选择性、结合容量和传质动力学方面将大幅提高。一些研究人员将 MIPs 固定在 MOFs 上,开发出了新型分子印迹电化学传感器,在色谱分析中表现出更高的选择性和灵敏度^[23-25]。

MOFs 基 MIPs 的制备主要是将 MIPs 负载到 MOFs 基质上或直接向黏合剂进行结合,但这种

固化方法很不稳定,并会引起严重的非特异性结合而导致测量差异^[26-27]。溶胶-凝胶法是一种通过水解来制备高交联无定形二氧化硅材料的新技术^[28]。二氧化硅基材是绿色、生物相容性高和环境友好型材料。近年来,溶胶-凝胶法被用来制备 MIPs^[29-30]。溶胶-凝胶反应可在水或醇介质中进行,其前驱体毒性明显低于有机试剂,且溶胶-凝胶法制备的 MIPs 具有更高的选择性和更快的传质速率^[31]。凝胶二氧化硅的刚性及高度交联结构有利于创建形状选择性的印迹位点,增强印迹材料的物理刚性、化学惰性、热稳定性和亲水性^[32]。

本研究以氨基修饰的 MIL-101 (Cr) 材料为载体,采用溶胶-凝胶法制备了 MOFs 基桃叶珊瑚苷印迹聚合物 (EM@MIPs)。优化了制备条件,并将分子印迹聚合物 EM@MIP3 用作液相色谱固定相,评价其分子识别能力。此外,还研究了 EM@MIP3 在线提取和分离杜仲粗提物中桃叶珊瑚苷的应用性,并考察了 EM@MIP3 的重复使用性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

S-3400 型扫描电子显微镜 (SEM)、LC-2010 AHT 型高效液相色谱仪、UV-2550 型紫外/可见分光光度计,日本岛津仪器公司; WGH-30A 型傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectrometer, FT-IR) 光谱仪,天津仪器有限公司; Branson 型超声波清洗器,上海必能信超声波有限公司。

1.2 试剂

桃叶珊瑚苷 (批号 20160202)、京尼平苷 (批号 20130514)、喇叭糖苷 (批号 20130615) 和车前草苷 (批号 20130525) 购自中国河南万嘉股份有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$ 。MIL-101 (Cr), 平均粒径 300 nm, 来自中国江苏先锋纳米材料股份有限公司。甲苯、二甲基亚砜 (DMSO)、甲醇、异丙醇、乙腈、乙酸和乙醇,均为分析纯,来自中国天津永大化学试剂厂。3-氨丙基三乙氧基硅烷 (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES, 质量分数 99%) 和四乙氧基硅烷 (tetraethyl orthosilicate, TEOS, 质

量分数 99%) 来自中国上海阿拉丁生化技术股份有限公司。浓 HCl 和浓 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 购自中国上海申博化工厂。去离子水使用前经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过。不锈钢空柱 ($5 \text{ cm} \times 2 \text{ mm}$) 来自日本岛津公司。

1.3 材料

1.3.1 药材 杜仲购自中药材市场 (产地湖南慈利), 经湘西土家族苗族自治州民族中医院药剂科王洪副主任中药师鉴定, 为杜仲科杜仲属落叶乔木杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliver 的干燥树皮。

1.3.2 杜仲提取物样品溶液的制备 将 10.0 g 干燥杜仲原料粉末加入 200 mL 石油醚中, 在 54.9°C 下加热回流 12 h 。滤过后, 将固体用 200 mL 乙醇在 49.9°C 下再萃取 30 min 。将收集的乙醇滤液减压蒸发以除去大部分溶剂。将杜仲提取物溶解在含有 1% H_2O 的 20 mL 乙腈中待用^[33]。

2 方法与结果

2.1 EM@MIPs 的制备

2.1.1 MIL-101 (Cr) 的氨基改性 为提高载体活性, 制备前, 先用乙二胺为改性剂^[34]对金属有机骨架 MIL-101 (Cr) 进行化学修饰。将 MIL-101 (Cr) 粉末 4.0 g 和乙二胺 0.3 g 加入 100 mL 甲苯中, 加热回流 12 h , 滤过得到的固体用 50 mL 无水乙醇洗涤 3 次, 真空干燥 24 h , 得到灰色固体, 即 MIL-101

(Cr)- NH_2 (EM)。

2.1.2 EM@MIPs 的制备 采用溶胶-凝胶法进行, 制备流程如图 1 所示, EM@MIPs 的合成始于溶胶-凝胶功能前体 APTES 的酸性水解。在 20 mL 异丙醇-乙醇混合溶剂 ($5:1$) 中加入一定体积的 APTES (如表 1 所示) 和 0.5 mL 0.1 mol/L HCl, 待 APTES 水解。搅拌均匀后, 室温下放置 6 h 。然后, 在剧烈搅拌下加入 0.1 mmol 桃叶珊瑚苷、 400 mg EM 和 0.2 mL DMSO, 均匀分散后, 静置 4 h , 得溶液 A。另将一定体积的功能前体 TEOS (如表 1 所示) 和 0.5 mL 0.1 mol/L HCl 加入到 10 mL 异丙醇-乙醇混合溶剂 ($5:1$) 中, 搅拌 20 min , 得溶液 B。将溶液 A 与溶液 B 混合, 混合溶液通入 Ar 气流中鼓泡 20 min , 加入 1.0 mL 1.0 mol/L $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 溶液在室温下放置 12 h 。然后将反应混合物倒入 20 mL 甲醇中, 反复超声处理直至滤液中检测不到桃叶珊瑚苷。收集固体并在 49.9°C 下干燥过夜, 生成桃叶珊瑚苷印迹聚合物 EM@MIPs。作为对照, 按照相同的程序 (但不添加模板桃叶珊瑚苷) 制备非印迹聚合物 EM@NIPs。

2.1.3 EM@MIPs 制备条件优化 溶剂类型、功能单体和交联剂用量等影响聚合物性能。用异丙醇-乙醇 ($5:1$) 混合物为溶剂时, 因极性较弱有利于模

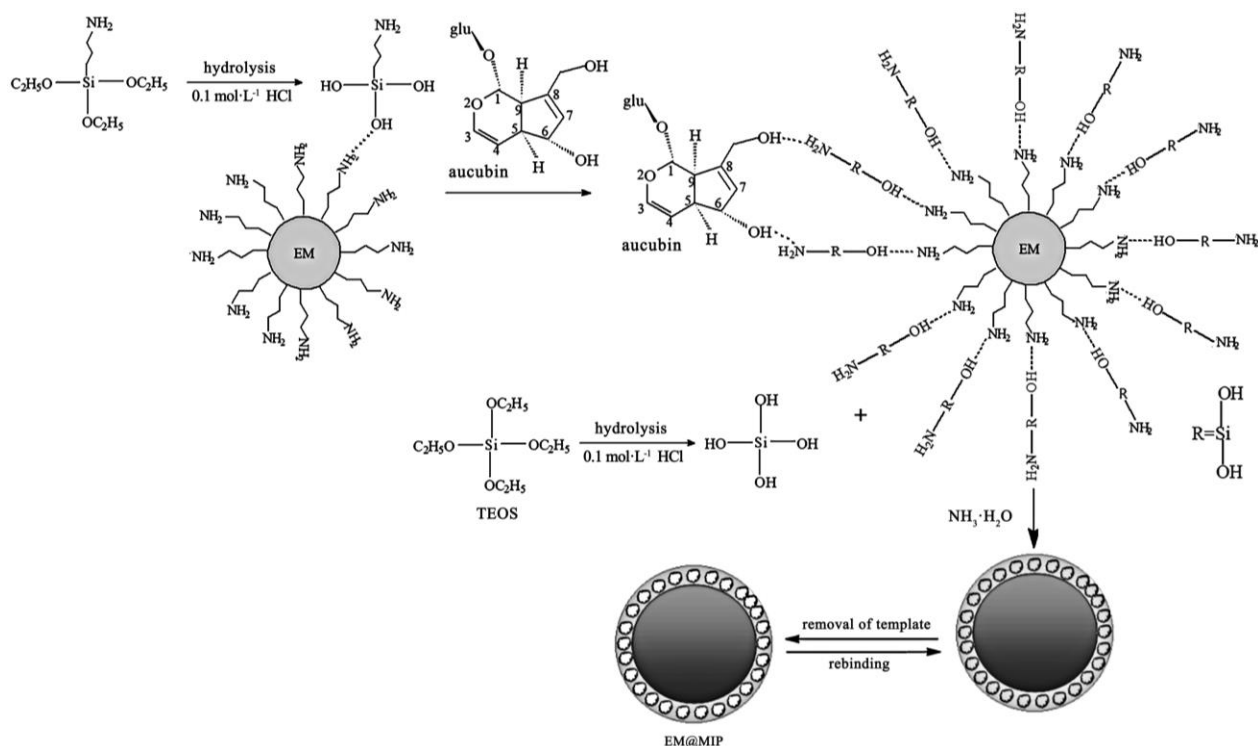


图 1 桃叶珊瑚苷印迹聚合物 (EM@MIPs) 的制备示意图

Fig. 1 Preparation scheme for aucubin imprinted polymers (EM@MIPs)

表 1 分子印迹聚合物的制备条件及 MIPs 的印迹因子 (IF)

Table 1 Preparation conditions of molecularly imprinted polymers and imprinting factors (IF) of MIPs

聚合物	模板	APTES/ TEOS/		IF
		mmol	mmol	
EM@MIP1	桃叶珊瑚苷	0.4	0.5	5.116±0.188
EM@NIP1	不添加桃叶珊瑚苷	0.4	0.5	—
EM@MIP2	桃叶珊瑚苷	0.6	1.0	5.725±0.206
EM@NIP2	不添加桃叶珊瑚苷	0.6	1.0	—
EM@MIP3	桃叶珊瑚苷	0.8	1.5	6.614±0.322
EM@NIP3	不添加桃叶珊瑚苷	0.8	1.5	—
EM@MIP4	桃叶珊瑚苷	1.0	2.0	6.438±0.295
EM@NIP4	不添加桃叶珊瑚苷	1.0	2.0	—

板和功能单体间的相互作用,而乙醇可促进单体溶解。优化了模板、功能单体和交联单体的物质的量比。表 1 分别给出了摩尔比为 1:4:5、1:6:10、1:8:15 和 1:10:20 时,制备的 EM@MIPs 的 IF 值(色谱条件:EM@MIPs 色谱柱;流动相为乙腈;体积流量 0.2 mL/min;柱温 24.9℃;检测波长 235 nm;进样量 10 μL。底物质量浓度 0.2 mg/mL)。从表 1 可知,IF 值随功能前驱体和交联前驱体的体积增加而增加,当 APTES 和 TEOS 与模板的物质的量比高于 8:1 和 15:1 时,IF 值增加缓慢。因此,选用模板-APTES-TEOS 的物质的量比为 1:8:15 来制备印迹材料,这样获得的印迹聚合物 EM@MIP3 的 IF 值最高(6.830)。

2.2 EM@MIP3 和 EM@NIP3 的表征

2.2.1 FT-IR 分析 EM@MIP3 和 EM@NIP3 的 FT-IR 光谱图如图 2 所示。EM@MIP3 有几个主要的红外吸收峰,即 3526 cm⁻¹ 处 O-H 键伸缩振动、3475 cm⁻¹ 处 N-H 键伸缩振动、3028 cm⁻¹ 处-CH₂ 基团中 C-H 键伸缩振动、1650 cm⁻¹ 处 C=O 键伸缩振动,1410 cm⁻¹ 桃叶珊瑚苷分子双环框架振动,1253 cm⁻¹ 处 C-O 键伸缩振动,1145 cm⁻¹ 处 C-O-C 伸缩振动,1082 cm⁻¹ 处 Si-O 键伸缩振动,以及桃叶珊瑚苷分子中 615 cm⁻¹ 处糖苷环框架振动。

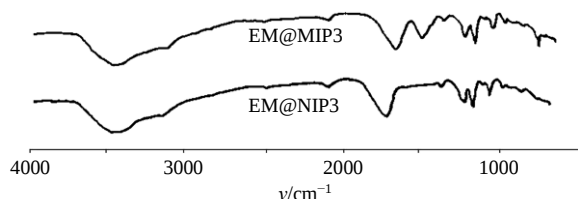


图 2 EM@MIP3 和 EM@NIP3 的 FT-IR 光谱

Fig. 2 FT-IR spectra for EM@MIP3 and EM@NIP3

与 EM@MIP3 的 FT-IR 光谱相比,EM@NIP3 在 1410 cm⁻¹ 和 615 cm⁻¹ (桃叶珊瑚苷分子的 2 个特定吸收峰) 处没有显示出红外吸收。EM@NIP3 的吸收峰为 3522 cm⁻¹ 处 O-H 键伸缩振动,3481 cm⁻¹ 处 N-H 键伸缩振动,3030 cm⁻¹ 处-CH₂ 基团中 C-H 键伸缩振动,1655 cm⁻¹ 处 C=O 键伸缩振动,1253 cm⁻¹ 处 C-O 键伸缩振动、1147 cm⁻¹ 处 C-O-C 伸缩振动、1086 cm⁻¹ 处 Si-O 键伸缩振动。这些红外吸收峰表明印迹过程成功。

2.2.2 SEM 观察 EM@MIP3 和 EM@NIP3 的 SEM 照片如图 3 所示,2 种聚合物微球颗粒大小较均匀,平均粒径 0.5~1.0 μm。此外,还观察到一些微细颗粒或颗粒微团,这可能来源于制备过程中的一些副反应,例如交联前体或功能单体之间的低聚作用等。这种均匀印迹微球更适合作为色谱介质。因此,使用 EM@MIP3 和 EM@NIP3 颗粒作为色谱固定相来评价其分子识别性能。

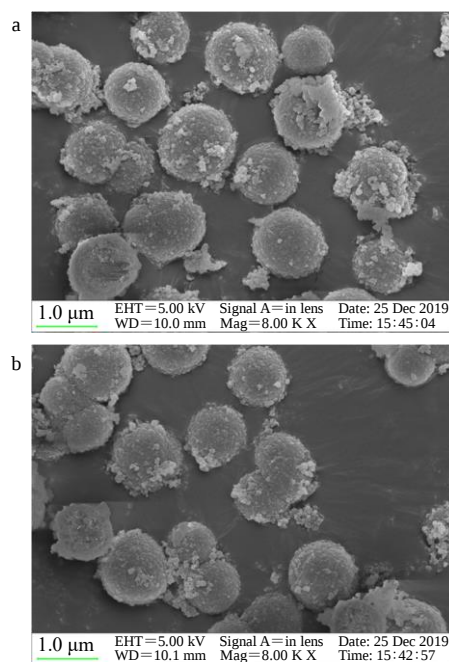


图 3 EM@MIP3 (a) 和 EM@NIP3 (b) 的 SEM 照片

Fig. 3 SEM photographs for EM@MIP3 (a) and EM@NIP3 (b)

2.3 EM@MIP3 色谱行为测试

用分子印迹聚合物作为固定相,在 LC-2010 AHT 高效液相色谱系统中测试 EM@MIP3 的色谱行为。首先将中空不锈钢柱(5 cm×2 mm)用甲醇和去离子水反复清洗,除去柱内壁的灰尘和污垢,然后风干。称取 0.15 g EM@MIP3 粉末,分散到异丙醇中,以甲醇为介质,用匀浆法将聚合物填充到

柱中。最后将柱连接到液相色谱系统中,用甲醇和乙腈为流动相依次洗脱,直至观察到稳定的基线。用乙腈-甲醇(20:1)为混合溶剂,分别配制桃叶珊瑚苷、喇叭糖苷、车前草苷、京尼平苷标准溶液 0.2 mg/mL,所有标准溶液均保持在 24.9 ℃。用含水乙腈(含 10%、5%、2%、1%水)作为流动相,流动相体积流量为 0.2 mL/min,检测波长为 235 nm,等度模式下,测定了 EM@MIP3 柱的色谱行为。柱温在 24.9~44.9 ℃变化,进样体积为 10 μL。用丙酮测试色谱柱的死时间。容量因子(k)、选择性因子(α)和 IF 分别由公式(1)、(2)和(3)计算。

$$k = (t_r - t_0) / t_0 \quad (1)$$

$$\alpha = k_{\text{桃叶珊瑚苷}} / k_{\text{com}} \quad (2)$$

$$\text{IF} = k_{\text{MIP3}} / k_{\text{NIP3}} \quad (3)$$

t_r 是化合物的保留时间, t_0 是色谱柱的死时间, $k_{\text{桃叶珊瑚苷}}$ 和 k_{com} 是模板和结构相关化合物的容量因子, k_{MIP3} 和 k_{NIP3} 分别是 EM@MIP3 和 EM@NIP3 色谱柱的容量因子

采用前沿液相色谱法测试了 EM@MIP3 柱对目标物的吸附能力,用目标物质量浓度为 0.01 mg/mL-1% 水的乙腈溶液为流动相,当流动相以 0.2 mL/min 的速率泵入柱中后,当流出曲线达到一稳定的平台后,完成突破。由突破曲线可计算印迹聚合物的吸附量^[35]。

将分子印迹聚合物作为色谱固定相,通过色谱法可获得其对不同化合物的保留值^[6-37]及分离效能。但色谱柱填装的均匀性和通透性均会影响测定结果。本研究采用浆料法填充色谱柱,装柱前将聚合物分散在异丙醇中,再用高压泵进行装填。

色谱柱通透性通过柱后压(又称背压,其高低反映了色谱柱的通透性)来评价。图 4 分别以甲醇、水、乙腈和 2.0 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 8.0) 缓冲溶液为流动相,不同体积流量(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL/min)时的柱后压。从图 4 中可以看出,当使用 2.0 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 8.0) 缓冲溶液或纯水作为流动相时,柱后压较高;而当使用乙腈时柱后压相对较低。另外,柱后压对流动相流速高度依赖,流速越快柱后压越高。因此,选择乙腈作为基础流动相,选择体积流量为 0.2 mL/min 进行后续实验。

使用不同体积分数的乙腈溶液(含 10%、5%、2%、1%水)作为流动相,测试了桃叶珊瑚苷及其结构类似物(喇叭糖苷、车前草苷和京尼平苷,分子结构如图 5 所示)在 EM@MIP3 和 EM@NIP3 柱

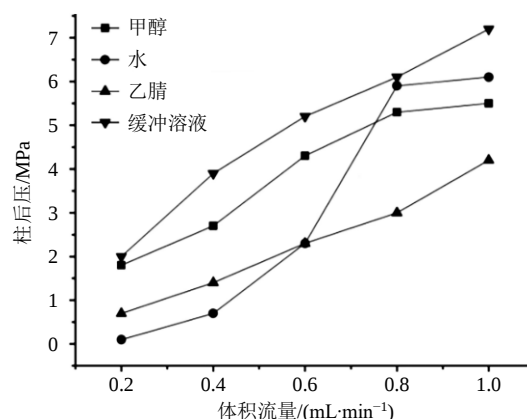


图 4 不同流动相和体积流量下分子印迹 (EM@MIP3) 色谱柱的背压

Fig. 4 Backpressure of molecularly imprinted (EM@MIP3) chromatographic column under different mobile phase composition and flow rates

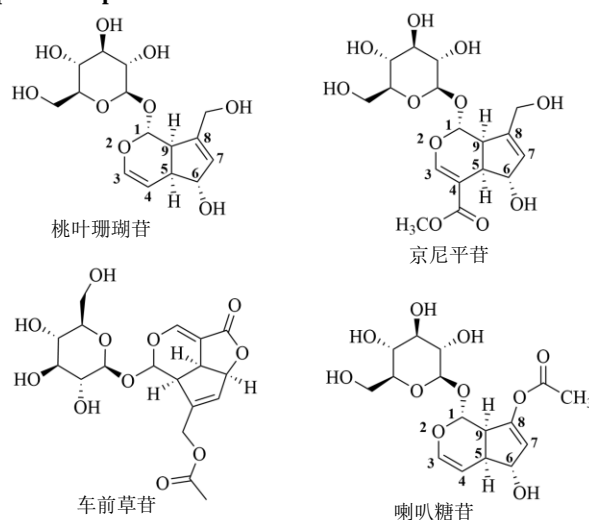


图 5 桃叶珊瑚苷 (AU)、京尼平苷 (GP)、喇叭糖苷 (BG) 和车前草苷 (PG) 的分子结构

Fig. 5 Molecular structures of aucubin, geniposide, bugle glucoside and plantain glucoside

上的保留能力。表 2 显示了 EM@MIP3 色谱柱在不同流动相下的 k 值。从表中数据可知,以乙腈为流动相时,EM@MIP3 色谱柱对桃叶珊瑚苷的保留能力最强, k 值最高,为 10.64;当乙腈流动相中水含量增加时,桃叶珊瑚苷的 k 值减少。当流动相中的水含量高于 10% 时,选择性丧失。这表明印迹位点和模板分子之间的作用力主要为氢键。但分析物的分子结构,如分子形状、官能团位置和数量,也会影响其保留,这可从相同流动相下几种化合物不同的保留因子推断得出。喇叭糖苷是一种模板类似物,可视为桃叶珊瑚苷分子 C_8 位羟甲基被乙酸甲酯取代的产物,尽管含有 1 个糖基和 1 个环戊烯基吡喃

表 2 使用不同体积分数乙腈作为流动相时, EM@MIP3 和 EM@NIP3 柱对桃叶珊瑚苷及其结构类似物的保留行为
Table 2 Retention behavior for EM@MIP3 and EM@NIP3 column toward aucubin and its structurally related compounds with acetonitrile containing various amount of water as mobile phase

水含量/ %	化合物	EM@MIP3 柱		EM@NIP3 柱	
		<i>k</i>	α	<i>k</i>	α
0	桃叶珊瑚苷	10.64±0.834	—	1.558±0.032	—
	喇叭糖苷	5.460±0.525	1.948±0.153	2.752±0.019	0.566±0.026
	车前草苷	5.371±0.712	1.981±0.159	2.449±0.030	0.636±0.033
	京尼平苷	5.700±0.607	1.866±0.146	2.319±0.028	0.672±0.028
1	桃叶珊瑚苷	7.470±0.811	—	1.571±0.035	—
	喇叭糖苷	2.672±0.117	2.799±0.304	1.931±0.029	0.814±0.037
	车前草苷	2.660±0.203	2.812±0.325	1.447±0.006	1.086±0.044
	京尼平苷	2.900±0.107	2.576±0.288	1.382±0.011	1.137±0.045
2	桃叶珊瑚苷	5.959±0.527	—	2.288±0.018	—
	喇叭糖苷	2.690±0.265	2.216±0.202	2.411±0.036	0.949±0.025
	车前草苷	2.780±0.223	2.144±0.195	2.202±0.025	1.039±0.019
	京尼平苷	2.710±0.118	2.200±0.138	2.336±0.019	0.980±0.017
5	桃叶珊瑚苷	3.743±0.238	—	2.381±0.045	—
	喇叭糖苷	2.740±0.227	1.366±0.096	2.379±0.015	0.993±0.027
	车前草苷	2.705±0.076	1.384±0.088	2.089±0.030	1.140±0.020
	京尼平苷	2.883±0.153	1.299±0.836	2.423±0.026	0.983±0.017
10	桃叶珊瑚苷	1.898±0.047	—	1.244±0.033	—
	喇叭糖苷	1.458±0.101	1.301±0.057	1.290±0.022	0.964±0.031
	车前草苷	1.470±0.205	1.291±0.062	1.204±0.017	1.033±0.016
	京尼平苷	1.421±0.088	1.336±0.053	1.377±0.007	0.903±0.025

双环结构,但在印迹柱上的保留因子降低。同样,京尼平苷在印迹柱上的弱保留也可能是由于京尼平苷分子结构中官能团位置和类型的差异造成的。车前草苷分子除含有 1 个糖基外,与模板分子的分子结构存在较大差异,因此,其在 EM@MIP3 柱上的保留最弱。

表 2 还显示了分子印迹柱对桃叶珊瑚苷的 α 与 *k* 变化规律。随着流动相中水含量的增加,EM@MIP3 色谱柱的选择性先增大后减小。当使用含 1% 水的乙腈作为流动相时,印迹聚合物对模板选择性最高,其 α 相对于喇叭糖苷、车前草苷和京尼平苷,分别为 2.799、2.812 和 2.576。与印迹聚合物柱相比,非印迹柱 EM@NIP3 对几种化合物的保留能力较弱,几乎没有选择性。

印迹柱对桃叶珊瑚苷的高选择性源于 EM@MIP3 柱基质中与模板分子在大小、形状和官能团等方面匹配的结合位点。这些结果也可从图 6 所示的色谱洗脱曲线得到证实(色谱条件:EM@MIP3

色谱柱,含 1% 水的乙腈为流动相,柱温 24.9 °C;底物质量浓度 0.2 mg/mL;进样量 10 μ L)。因此,用含 1% 水的乙腈作为流动相时,EM@MIP3 柱对桃叶珊瑚苷具有较高的选择性保留能力。

用含 1% 水的乙腈作为流动相时,测试了 EM@MIP3 柱在不同温度(24.9、34.9、44.9 °C)下的保留行为。表 3 显示了该印迹柱对几种化合物的 *k* 值(色谱条件:EM@MIP3 色谱柱;以含 1% 水的乙腈为流动相,体积流量为 0.2 mL/min,底物质量浓度 0.2 mg/mL;进样量 10 μ L)。可以发现,柱温 24.9 °C 时,印迹柱具有最高的 *k* 值,其对模板的 *k* 为 7.470。柱温升高,*k* 值下降。不同柱温下 EM@MIP 柱的 α 值如表 3 所示。结果表明,印迹柱的 α 值随温度先升高后降低,当柱温 34.9 °C 时选择性最高,EM@MIP 柱对桃叶珊瑚苷的 α 值相对于喇叭糖苷、车前草苷和京尼平苷分别为 4.931、4.896、3.418。优化的色谱条件:柱温 34.9 °C、流动相为含 1% 水的乙腈、体积流量 0.2 mL/min。

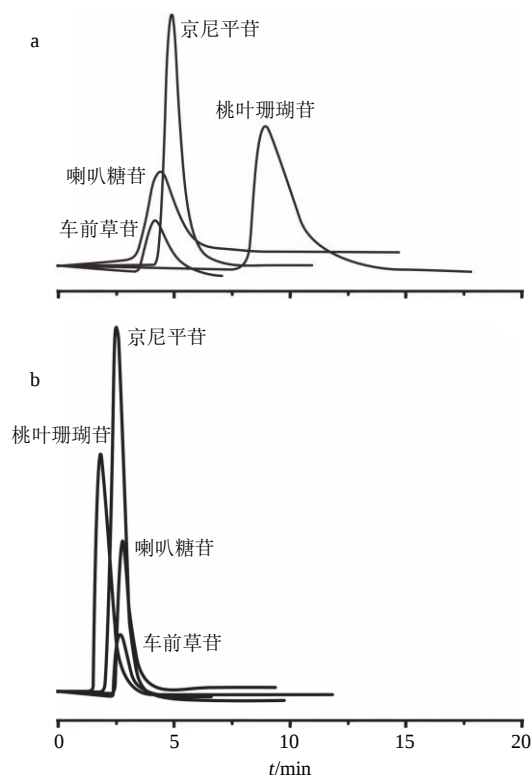


图 6 桃叶珊瑚苷 (模板) 及其结构类似物京尼平苷、喇叭糖苷和车前草苷在 EM@MIP3 (a) 和 EM@NIP3 (b) 柱上的洗脱曲线

Fig. 6 Elution curves for aucubin (template) and its analogues geniposide, bugle glucoside and plantain glucoside on EM@MIP3 (a) and EM@NIP3 (b) columns

表 3 不同柱温下 EM@MIP3 柱对印迹模板桃叶珊瑚苷及其结构类似物的 k 和 α 值

Table 3 Capacity factor (k) and selectivity factor (α) for EM@MIP3 column to imprinted template aucubin at different column temperatures

柱温/ °C	桃叶珊瑚苷		喇叭糖苷		车前草苷		京尼平苷	
	k	α	k	α	k	α	k	α
24.9	7.613 ± 0.275	—	2.706 ± 0.366	2.813	2.694 ± 0.174	2.826	2.821 ± 0.282	2.699
34.9	5.925 ± 0.187	—	1.202 ± 0.043	4.931	1.210 ± 0.065	4.896	1.733 ± 0.118	1.733
44.9	3.253 ± 0.182	—	0.890 ± 0.033	3.655	0.903 ± 0.052	3.602	1.175 ± 0.107	2.768

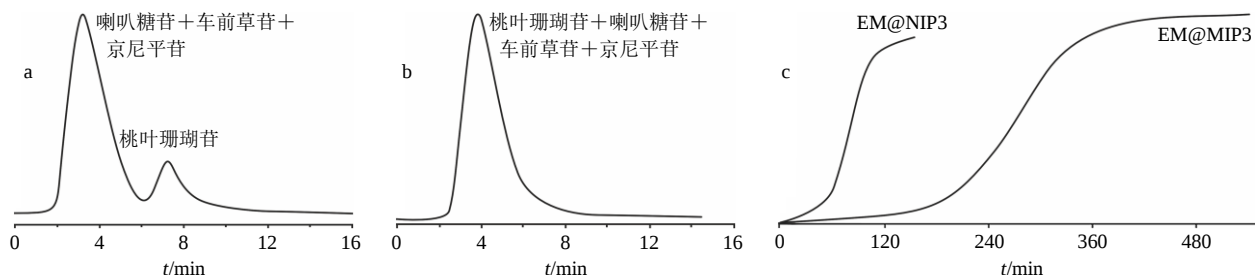


图 7 桃叶珊瑚苷、京尼平苷、喇叭糖苷和车前草苷的模型混合物在 EM@MIP3 (a) 和 EM@NIP3 (b) 柱的洗脱曲线和 0.01 mg·mL⁻¹ 桃叶珊瑚苷在 2 根柱上的穿透曲线 (c)

Fig. 7 Elution curves of model mixture containing aucubin, geniposide, bugle glucoside and plantain glucoside on EM@MIP3 (a) and EM@NIP3 (b) columns and experimental breakthrough curves (c) of 0.01 mg·mL⁻¹ aucubin on two columns

2.4 EM@MIP3 柱分离桃叶珊瑚苷

基于 EM@MIP3 柱对模板分子的选择识别能力,测试了印迹柱对模拟混合物中桃叶珊瑚苷、喇叭糖苷、车前草苷和京尼平苷的分离能力。当底物质量浓度为 0.1 mg/mL,柱温为 34.9 °C 时,图 7-a 和 b 分别显示了模型混合物在 EM@MIP3 和 EM@NIP3 聚合物固定相上的流出曲线。显然,分子印迹柱 EM@NIP3 可以将桃叶珊瑚苷从模拟混合物中完全分离出来。但对于 EM@NIP3 色谱柱,在色谱图上仅观察到单峰,模拟混合物没有分离。

本实验还测试了分子印迹材料的固相萃取应用性能。但萃取前,需知道其吸附容量。为此,利用前沿色谱技术进行测量。所谓前沿色谱,就是以含有待测物质的溶液为流动相,当流动相留给固定相时,待测物在固定相上进行吸附脱附,当吸附剂达到吸附饱和时,待测物质便随流动相流出,在色谱图上呈现出待测物的流出曲线,即穿透曲线;当目标物在色谱柱上不再被保留时,流出曲线呈现一高的平台。一般而言,穿透时间越长,吸附量越高,根据流出曲线形状、平台半高处的保留值及相应色谱理论便可计算吸附量。图 7-c 给出了桃叶珊瑚苷在分子印迹柱 EM@NIP3 及非印迹柱 EM@MIP3 上的穿透曲线,可以发现,在加载初期,由于聚合物基质中存在大量结合位点,桃叶珊瑚苷分子几乎完

全保留在结合位点上,流出液中未检测到桃叶珊瑚苷。随着桃叶珊瑚苷的不断流入,空白吸附位点变少,流出曲线上升。当所有结合位点被占据后,桃叶珊瑚苷将不再被保留,流出曲线构建了 1 个高的平台。通过半高法,求得桃叶珊瑚苷在 EM@NIP3 柱和 EM@MIP3 柱上的吸附容量分别为 23.72、51.34 mg/g。

使用在线色谱系统进行目标化合物的分离应用。进样前,用含有 1%水的乙腈溶液作为流动相平衡色谱柱。桃叶珊瑚苷的分离以一种在线方式进行,以 EM@MIP3 为分离柱,洗脱剂为含 1%水的乙腈溶液,体积流量 0.2 mL/min,柱温设定为 34.9 °C。向 EM@MIP3 色谱柱中分别注入 20、40、60、80、100 μ L 的杜仲提取物样品溶液,收集保留时间为 6.5~9.0 min 的流出液,旋转蒸发脱除溶剂,即得桃叶珊瑚苷产品。

各产品的纯度及目标物回收率如表 4 所示,可以发现,当样品溶液进样体积小于 60 μ L 时,得到的桃叶珊瑚苷产品质量分数 85%以上,回收率高于 95%。图 8-b 和 c 给出了杜仲提取物样品溶液的 HPLC 图及装载体积为 60 μ L 时,分离所得桃叶珊瑚苷产品的 HPLC 图[色谱条件: C₁₈ 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-水-乙酸混合溶液(20:80:1.5); 体积流量 1.0 mL/min; 进样体积 10 μ L; 检测波长 235 nm)]。

表 4 EM@MIP3 色谱柱在线分离杜仲桃叶珊瑚苷
Table 4 On-line application of EM@MIP3 column for separation of aucubin in *E. ulmoides*

进样体积/ μ L	产品纯度/%	回收率/%
20	92.32 $\pm$ 3.17	96.73 $\pm$ 5.82
40	91.61 $\pm$ 3.06	95.58 $\pm$ 4.64
60	85.41 $\pm$ 1.58	95.16 $\pm$ 2.87
80	80.30 $\pm$ 1.62	92.84 $\pm$ 2.26
100	72.65 $\pm$ 1.37	90.62 $\pm$ 2.05
粗提物	58.38 $\pm$ 1.63	—

利用分子印迹材料从含有 0.2 mg/mL 桃叶珊瑚苷的乙腈溶液中分离目标化合物,探讨了 EM@MIP3 的重复使用性能。结果表明印迹材料重复使用 10 次后,桃叶珊瑚苷回收率几乎恒定,聚合物重复使用性高。

3 讨论

采用溶胶-凝胶法成功制备了 MOF 基桃叶珊瑚

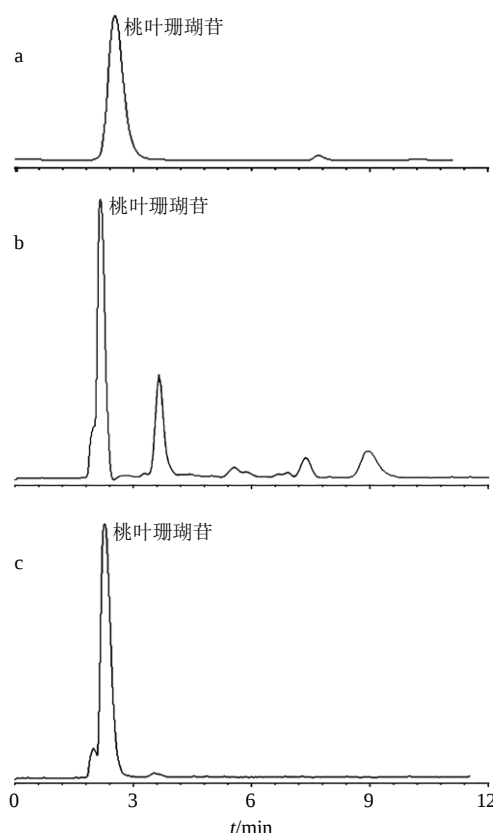


图 8 桃叶珊瑚苷标准品 (a)、杜仲粗提物 (b) 及经 EM@MIP3 柱分离后的桃叶珊瑚苷产品 (c) 的 HPLC 图

Fig. 8 HPLC for standard aucubin (a), crude extract of *E. ulmoides* (b) and aucubin products obtained by using EM@MIP3 column extraction (c)

苷印迹复合微球,优化制备条件为桃叶珊瑚苷与 APTES 和 TEOS 的物质的量比为 1:8:15。优化条件下制备的分子印迹聚合物 EM@MIP3 具有最高的 IF 值(6.830)。当以 EM@MIP3 为液相色谱固定相,以含 1%水的乙腈混合溶液为流动相(体积流量 0.2 mL/min,柱温 34.9 °C)时,印迹柱对桃叶珊瑚苷具有最高的选择保留能力,其对桃叶珊瑚苷的 α 相对于喇叭糖苷、车前草苷和京尼平苷分别为 4.931、4.896 和 3.418。EM@MIP3 柱对桃叶珊瑚苷的吸附容量达 51.34 mg/g。基于分子印迹聚合物的高选择性及高吸附能力,以之为吸附剂在线萃取杜仲粗提物中的桃叶珊瑚苷时,当样品溶液装载体积小于 60 μ L 时,一次萃取可获得纯度 85%以上的桃叶珊瑚苷产品,回收率高于 95%。这种分子印迹固相萃取为杜仲桃叶珊瑚苷的分离纯化提供了一种新的简单方法,有望推广到其他中药活性成分的提取及分离纯化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zeng X C, Guo F, Ouyang D S. A review of the pharmacology and toxicology of aucubin [J]. *Fitoterapia*, 2020, 140: 104443.
- [2] Huang T L, Yang S H, Chen Y R, *et al.* The therapeutic effect of aucubin-supplemented hyaluronic acid on interleukin-1 β -stimulated human articular chondrocytes [J]. *Phytomedicine*, 2019, 53: 1-8.
- [3] Liao Y H, Chen F, Xu L J, *et al.* Study on extraction and antibacterial activity of aucubin from *Eucommia ulmoides* seed-draff waste biomass [J]. *Heliyon*, 2022, 8(10): e10765.
- [4] Potočnjak I, Marinić J, Batičić L, *et al.* Aucubin protects against cisplatin-induced acute kidney injury in mice via attenuation of oxidative stress, apoptosis and inflammation [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 142: 111472.
- [5] Yu L, Cao L, Chang Y H, *et al.* Enhanced extraction performance of iridoids, phenolic acids from *Eucommia ulmoides* leaves by tailor-made ternary deep eutectic solvent [J]. *Microchem J*, 2021, 161: 105788.
- [6] Xu Y W, Tan Y L, Majeed Z, *et al.* Hybrid molecularly imprinted polymers for targeted separation and enrichment of 10-hydroxycamptothecin in *Camptotheca acuminata* Decne [J]. *Nat Prod Res*, 2023, doi: 10.1080/14786419.2023.2228981.
- [7] Karaman Ersoy Ş, Tütem E, Sözgen Başkan K, *et al.* Preparation, characterization and usage of molecularly imprinted polymer for the isolation of quercetin from hydrolyzed nettle extract [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1017/1018: 89-100.
- [8] 倪付勇, 刘露, 宋亚玲, 等. 分子印迹技术定向分离桂枝茯苓胶囊中活性成分去氢土莫酸 [J]. *中草药*, 2015, 46(6): 853-856.
- [9] Karimi-Maleh H, Yola M L, Atar N, *et al.* A novel detection method for organophosphorus insecticide fenamiphos: Molecularly imprinted electrochemical sensor based on core-shell Co₃O₄@MOF-74 nanocomposite [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2021, 592: 174-185.
- [10] Aftim N, Istamboulié G, Piletska E, *et al.* Biosensor-assisted selection of optimal parameters for designing molecularly imprinted polymers selective to phosmet insecticide [J]. *Talanta*, 2017, 174: 414-419.
- [11] Cai J T, Chen T, Xu Y H, *et al.* A versatile signal-enhanced ECL sensing platform based on molecular imprinting technique via PET-RAFT cross-linking polymerization using bifunctional ruthenium complex as both catalyst and sensing probes [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019, 124/125: 15-24.
- [12] Cho S J, Noh H B, Won M S, *et al.* A selective glucose sensor based on direct oxidation on a bimetal catalyst with a molecular imprinted polymer [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 99: 471-478.
- [13] Mokhtari P, Ghaedi M. Water compatible molecularly imprinted polymer for controlled release of riboflavin as drug delivery system [J]. *Eur Polym J*, 2019, 118: 614-618.
- [14] Loghmani M H, Shojaie A F, Hosseini S A. Glutathione-responsive hydrogel and molecularly imprinted polymer nanospheres: New aspect on cisplatin delivery [J]. *J Ind Eng Chem*, 2021, 96: 98-108.
- [15] 蔡梦如, 姚宇, 尹东阁, 等. 金属有机骨架材料在中药研究的应用进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(16): 5028-5038.
- [16] Yang K, Sun Q, Xue F, *et al.* Adsorption of volatile organic compounds by metal-organic frameworks MIL-101: Influence of molecular size and shape [J]. *J Hazard Mater*, 2011, 195: 124-131.
- [17] Rajati H, Navarchian A H, Tangestaninejad S. Preparation and characterization of mixed matrix membranes based on Matrimid/PVDF blend and MIL-101(Cr) as filler for CO₂/CH₄ separation [J]. *Chem Eng Sci*, 2018, 185: 92-104.
- [18] Gargiulo N, Peluso A, Aprea P, *et al.* Chromium-based MIL-101 metal organic framework as a fully regenerable D4 adsorbent for biogas purification [J]. *Renew Energy*, 2019, 138: 230-235.
- [19] Kirchon A, Feng L, Drake H F, *et al.* From fundamentals to applications: A toolbox for robust and multifunctional MOF materials [J]. *Chem Soc Rev*, 2018, 47(23): 8611-8638.
- [20] Li J, Wang X X, Zhao G X, *et al.* Metal-organic framework-based materials: Superior adsorbents for the capture of toxic and radioactive metal ions [J]. *Chem Soc Rev*, 2018, 47(7): 2322-2356.
- [21] Li J R, Sculley J, Zhou H C. Metal-organic frameworks for separations [J]. *Chem Rev*, 2012, 112(2): 869-932.
- [22] Xie L J, Liu S Q, Han Z B, *et al.* Preparation and characterization of metal-organic framework MIL-101 (Cr)-coated solid-phase microextraction fiber [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 853: 303-310.
- [23] Hageneder S, Bauch M, Dostalek J. Plasmonically amplified bioassay-total internal reflection fluorescence vs. epifluorescence geometry [J]. *Talanta*, 2016, 156/157: 225-231.
- [24] Eskandari H, Amirzehni M, Asadollahzadeh H, *et al.* MIP-capped terbium MOF-76 for the selective fluorometric detection of cefixime after its

- preconcentration with magnetic graphene oxide [J]. *Sens Actuat B*, 2018, 275: 145-154.
- [25] Rawool C R, Srivastava A K. A dual template imprinted polymer modified electrochemical sensor based on Cu metal organic framework/mesoporous carbon for highly sensitive and selective recognition of rifampicin and isoniazid [J]. *Sens Actuat B*, 2019, 288: 493-506.
- [26] Arabi M, Ostovan A, Bagheri A R, *et al.* Strategies of molecular imprinting-based solid-phase extraction prior to chromatographic analysis [J]. *Trac Trends Anal Chem*, 2020, 128: 115923.
- [27] Chen G N, Guo P Q, Wang Y, *et al.* Preparation of molecularly imprinted polymers and application in a biomimetic biotin-avidin-ELISA for the detection of bovine serum albumin [J]. *Talanta*, 2019, 198: 55-62.
- [28] Lofgreen J E, Ozin G A. Controlling morphology and porosity to improve performance of molecularly imprinted sol-gel silica [J]. *Chem Soc Rev*, 2014, 43(3): 911-933.
- [29] Chen G N, Shu H, Wang L, *et al.* Facile one-step targeted immobilization of an enzyme based on silane emulsion self-assembled molecularly imprinted polymers for visual sensors [J]. *Analyst*, 2019, 145(1): 268-276.
- [30] Zhao T, Wang Q Q, Li J, *et al.* Study on an electrochromatography method based on organic-inorganic hybrid molecularly imprinted monolith for determination of trace trichlorfon in vegetables [J]. *J Sci Food Agric*, 2014, 94(10): 1974-1980.
- [31] Bie Z J, Chen Y, Ye J, *et al.* Boronate-affinity glycan-oriented surface imprinting: A new strategy to mimic lectins for the recognition of an intact glycoprotein and its characteristic fragments [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54(35): 10211-10215.
- [32] Shang L, Liu C J, Watanabe M, *et al.* LSPR sensor array based on molecularly imprinted sol-gels for pattern recognition of volatile organic acids [J]. *Sens Actuat B*, 2017, 249: 14-21.
- [33] 陈玉甫, 张学俊, 王明力, 等. 不同方法提取杜仲中桃叶珊瑚苷等 4 种高活性成分的比较研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(1): 10-15.
- [34] Tian H X, Hui L, Mao L, *et al.* Preparation of a pinosresinol diglucoside imprinted polymer using metal organic frame as the matrix for extracting target compound from *Eucommia ulmoides* [J]. *Sep Sci Technol*, 2021, 56(18): 3136-3150.
- [35] Ostrihoňová M, Cabadaj P, Polakovič M. Design of frontal chromatography separation of 1-phenylethanol and acetophenone using a hydrophobic resin [J]. *Sep Purif Technol*, 2023, 314: 123578.
- [36] Wang D D, Luo X X, Wang M, *et al.* Selective separation and purification of polydatin by molecularly imprinted polymers from the extract of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*, rats' plasma and urine [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, 1156: 122307.
- [37] Miura C, Li H, Matsunaga H, *et al.* Molecularly imprinted polymer for chlorogenic acid by modified precipitation polymerization and its application to extraction of chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* leaves [J]. *J Pharmaceu Biomed Anal*, 2015, 114: 139-144.

[责任编辑 郑礼胜]