

中药现代化技术

木犀草素-Zn(II)配位分子印迹聚合物的制备及应用

乐 薇, 吉瑞冬, 吴士筠

(武汉工商学院 环境与生物工程学院, 湖北 武汉 430065)

摘要: 以箬叶黄酮碳苷母核木犀草素为虚拟模板分子, 结合 Zn(II)的配位作用, 丙烯酰胺为功能单体, *N, N'*-亚甲基双丙烯酰胺 (MBA) 为交联剂, 乙醇为溶剂制备了木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物, 并将此聚合物与固相萃取相结合, 分离了醇水体系中的箬叶黄酮碳苷。结果表明: 当 n (模板分子) : n (功能单体) : n (交联剂) = 1 : 5 : 30 时, 配位印迹聚合物具有最好的吸附性能, 对醇相中木犀草素的吸附容量可达 103.40 mg/g, 是未配位印迹聚合物吸附容量 (60.61 mg/g) 的 1.71 倍, 空白印迹聚合物 (7.33 mg/g) 的 14.11 倍。采用木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物分离醇水相中箬叶黄酮碳苷, 经一次分离后, 荜草苷、异荜草苷、牡荆苷和异牡荆苷的回收率分别为 91.95%、80.87%、60.43%和 63.63%; 质量分数分别是粗提物的 55.36、48.89、36.64 和 38.35 倍, 4 种黄酮碳苷总质量百分数由提取前的 0.70%提高到 32.68%。

关键词: 木犀草素; 配位分子印迹聚合物; 箬叶; 黄酮碳苷; 中药现代化技术

中图分类号: TQ041.8 R284.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214(2018)07-1156-07

Preparation and Application of Luteolin-Zn(II) Complex Molecularly Imprinted Polymers

YUE Wei, JI Rui-dong, WU Shi-jun

(College of Environmental and Biological Engineering, Wuhan Technology and Business University, Wuhan 430065, Hubei, China)

Abstract: A series of luteolin-Zn(II) complex molecularly imprinted polymers (MIPs) were synthesized in ethanol, using luteolin (the mother nucleus of C-glycosylflavones from *Indicalamus* leaf) as dummy template, acrylamide (AM) as monomer and *N, N'*-methylene diacrylamide (MBA) as cross-linker. And then C-glycosylflavones from *Indicalamus* leaf in alcohol-water system were separated by solid phase extraction using MIPs. The results showed that when $n(\text{luteolin-Zn}) : n(\text{AM}) : n(\text{MBA})$ was 1 : 5 : 30, the obtained complex molecularly imprinted polymer possessed the highest adsorption properties, and the adsorption capacity for luteolin from ethanol phase reached 103.40 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, which was 1.71 times that of uncoordinated molecularly imprinted polymer (60.61 mg/g), 14.11 times that of blank polymer (7.33 mg/g). After a separation, the recovery rates of orientin, isorientin, vitexin and isovitexin were 91.95%, 80.87%, 60.43% and 63.63%, compared with crude extract, the corresponding mass percents were increased by 55.36, 48.89, 36.64 and 38.35 times, respectively. In addition, the total mass percent of four C-glycosylflavones was increased to 32.68% from 0.70% before extraction.

Key words: luteolin; complex molecularly imprinted polymer; *Indicalamus* leaf; C-glycosylflavones; modernization technology of traditional Chinese medicines

Foundation items: Science Research Project of Hubei Provincial Department of Education (B2017321); Academic Team Funding Project of Wuhan Technology and Business University (SXTD2015003)

箬叶是禾本科、箬竹属植物叶子的总称, 主要分布于中国长江以南流域, 又称为粽叶, 目前主要用

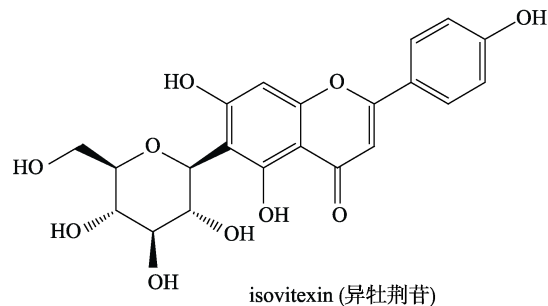
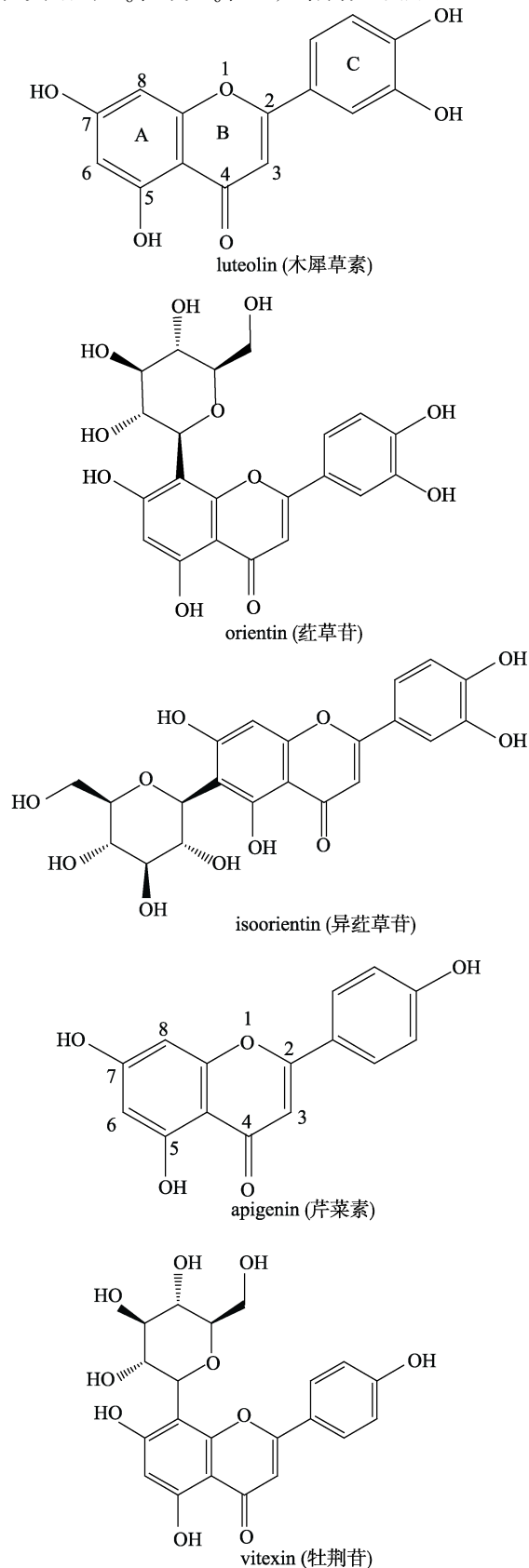
作食品包装物。箬叶来源丰富, 具有抗菌、防腐、抗癌等多种功效^[1-3], 在开发功能性食品及药物方面

收稿日期: 2017-08-02; 定用日期: 2017-11-13; DOI: 10.13550/j.jxhg.20170629

基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划项目 (B2017321), 武汉工商学院校学术团队资助项目 (SXTD2015003)

作者简介: 乐 薇 (1979—), 女, 副教授, E-mail: yuewei11@126.com

有着广阔前景。黄酮碳苷是箬叶中的一种重要功能成分,其代表物是荭草苷、异荭草苷、牡荆苷和异牡荆苷^[4]。这两对异构体分别以木犀草素和木犀草素的结构相似物芹菜素为母体,葡萄糖单元分别连接在黄酮的C₈位或C₆位^[5],结构如下所示:



研究表明,黄酮碳苷具有抗氧化、抗凋亡、抗脂质形成、抗辐射、镇痛、抗血栓等作用^[6-9]。黄酮碳苷虽为箬叶的重要有效成分,但由于含量低,导致其分离纯化难度高。分子印迹技术是新发展起来的一种模拟抗体-抗原相互作用的技术,由于生成的印迹聚合物(MIP)对目标分子具有高度的分子识别性,可将低含量的有效成分直接从粗提取物中筛选处理^[10],已有研究者将此技术应用于黄酮、生物碱、多元酚、蛋白质等物质的分离及含量测定^[11-17]。目前分离黄酮的MIP大多在弱极性溶剂中靠非共价键制备得到^[18-19],而在强极性溶液中,由于溶液本身氢键的干扰,使MIP对模板分子的选择识别性降低,应用受到限制^[20]。考虑到天然的分子识别系统大多是在强极性溶剂中进行,因此适合于强极性水环境下(如水或醇水体系)的分子识别是一个亟待研究且有重要价值的课题^[21]。由于金属配位作用在极性溶液中可稳定存在,基于金属离子与功能单体、目标分子配位作用的配位印迹聚合物可解决上述问题。在制备配位印迹聚合物时,需根据功能单体及目标分子的配位能力来选择中心金属,已有少量报道在极性溶剂中成功制备了配位印迹聚合物,一般选用的金属离子是Cu²⁺、Co²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺等过渡金属离子,如郑永军^[22]在乙酸乙酯/四氢呋喃中制备了杨梅黄酮-Zn(II)配位印迹聚合物,丁桂峰^[23]和成洪达^[24]等在甲醇/四氢呋喃中分别制备了木犀草素-Cu(II)配位和芦丁-Cu(II)配位印迹聚合物。但鲜见在安全性和极性更高的乙醇中制备黄酮配位印迹聚合物的报道。

本文以木犀草素为虚拟模板分子,以乙醇为溶剂,制备木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物,并应用于醇水体系中箬叶黄酮碳苷的分离,这对发展箬叶资源、提高箬叶产品的高附加值、实现低含量的生物活性物质筛选分离一体化等具有一定的现实意义。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

箬叶从湖北恩施武陵山区采摘。

木犀草素、荭草苷、异荭草苷、牡荆苷、异牡荆苷, 标准品, 上海金穗生物科技有限公司; 甲醇、乙腈, 色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司; 丙烯酰胺, 天津市科密欧化学试剂有限公司; *N, N'*-亚甲基双丙烯酰胺, 天津市凯通化学试剂有限公司; 偶氮二异丁腈, 上海山浦化工有限公司; 乙酸锌, 天津市天力化学试剂有限公司; 无水乙醇, 天津市百世化工有限公司; 所有分离用有机溶剂均为国产分析纯。

FTIR-7600 傅里叶红外光谱仪 天津港东科技发展有限公司; GI-3000 高效液相色谱系统(配有可变波长紫外检测器和 GI3000 色谱工作站), 通用(深圳)仪器有限公司; SPE-24 固相萃取装置, 上海那艾精密仪器有限公司; RE52CS 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 木犀草素及荭草苷含量测定方法

1.2.1.1 紫外吸收光谱法测定木犀草素的含量

(1) 木犀草素的紫外扫描: 准确称取木犀草素标准品 10 mg, 溶于甲醇中并定容至 10 mL, 充分混合后, 以甲醇为空白对照, 测定木犀草素在 190~400 nm 波长范围内紫外吸收光谱。

(2) 木犀草素标准曲线的制作: 以甲醇为溶剂, 配制质量浓度为 2、4、6、8、10 mg/L 的木犀草素甲醇标准品溶液, 各取 0.1 mL, 用甲醇溶液定容至 10 mL, 摇匀后于最大吸收波长 350 nm 处, 以甲醇溶液为空白测其吸光度, 以木犀草素标准品溶液的质量浓度 ρ 对吸光度 A 绘制标准曲线, 得到标准曲线方程为 $A=0.0999\rho-0.0428$, $R^2=0.9992$ 。

(3) 木犀草素质量浓度的测定: 取适量待测样品溶液, 用甲醇溶液定容至 10 mL, 按 (1) 中方法测吸光度 A , 按式 (1) 计算样品溶液的木犀草素质量浓度。

$$\rho = \frac{(A+b)}{k} \times n \quad (1)$$

式中: ρ 为待测溶液质量浓度, g/L; k 为木犀草素的标准曲线斜率; b 为木犀草素的标准曲线截距; n 为溶液稀释倍数

1.2.1.2 HPLC 法测定黄酮碳苷的含量

(1) 色谱条件: 色谱柱: Diamonsil-C18 的色谱柱(250 mm×4.6 mm×5 μ m); 温度: 30 $^{\circ}$ C; 流动相: V (乙腈): V (质量分数 0.5% 甲酸水溶液) = 14: 86; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μ L; 检测波长: 360 nm^[25]。

(2) 黄酮碳苷的标准曲线绘制: 分别精确称取一定质量的 4 种黄酮碳苷(荭草苷、异荭草苷、牡荆苷和异牡荆苷)标准品, 用甲醇溶解并定容, 配制 2 g/L 的母液。将母液分别稀释成质量浓度为

0.2、0.4、0.6、0.8、1 g/L 的标准液, 于色谱条件下进样, 以标准液的质量浓度 (x) 对峰面积 (y) 绘制标准曲线, 各黄酮碳苷的标准曲线见表 1。

1.2.2 木犀草素-Zn(II) 配位印迹聚合物的制备

1.2.2.1 木犀草素-Zn(II) 配位印迹聚合物制备工艺的优化

以印迹聚合物对模板分子木犀草素的吸附量为指标, 通过改变溶剂的种类、交联剂 *N, N'*-亚甲基双丙烯酰胺 (MBA) 的用量, 功能单体丙烯酰胺的用量, 优化木犀草素-Zn(II) 配位印迹聚合物的制备条件, 各聚合物的制备条件如表 2 所示。典型的金属配位印迹聚合物的制备过程如下:

表 1 4 种黄酮碳苷的标准曲线
Table 1 Standard curve of four C-glycosyflavones

黄酮碳苷	回归方程	R^2
荭草苷	$y=33664x-2268.4$	0.9998
异荭草苷	$y=31974x-2723.4$	0.9979
牡荆苷	$y=29727x+3007.9$	0.9990
异牡荆苷	$y=30285x-185.26$	0.9996

表 2 木犀草素-Zn(II) 配位印迹聚合物制备工艺的条件
Table 2 Preparation Conditions of luteolin-Zn(II) complex Molecularly Imprinted Polymers

聚合物	木犀草素 /mmol	AM /mmol	MBA /mmol	偶氮二异丁腈 /mg	溶剂种类
MIP ₁	0.25	1.00	7.50	50	甲醇
MIP ₂	0.25	1.00	7.50	50	乙醇 (体积分数 50%)
MIP ₃	0.25	1.00	7.50	50	无水乙醇
MIP ₄	0.25	1.00	7.50	50	水
MIP ₅	0.25	1.00	2.50	50	无水乙醇
MIP ₆	0.25	1.00	5.00	50	无水乙醇
MIP ₇	0.25	1.00	7.50	50	无水乙醇
MIP ₈	0.25	1.00	10.00	50	无水乙醇
MIP ₉	0.25	1.00	12.50	50	无水乙醇
MIP ₁₀	0.25	0.50	7.50	50	无水乙醇
MIP ₁₁	0.25	0.75	7.50	50	无水乙醇
MIP ₁₂	0.25	1.00	7.50	50	无水乙醇
MIP ₁₃	0.25	1.25	7.50	50	无水乙醇
MIP ₁₄	0.25	1.50	7.50	50	无水乙醇

称取 71.56 mg (0.25 mmol) 木犀草素、45.88 mg (0.25 mmol) 乙酸锌和 71.08 mg (1.0 mmol) 丙烯酰胺, 加入 30.00 mL 乙醇, 然后超声 2 h, 使木犀草素、锌离子和丙烯酰胺三者充分作用; 再加入 50 mg 的引发剂偶氮二异丁腈和 1.156 g (7.5 mmol) MBA, 经过超声脱气 20 min 后小心转入试管中并通氮气除氧 10 min 后密封, 于 75 $^{\circ}$ C 下反应 24 h 得到配位印迹聚合物, 研磨后将聚合物用滤纸包好后置于索氏提取器中, 于 80 $^{\circ}$ C 下用甲醇/冰醋酸 (体积

比 9 : 1) 的混合液反复抽提以洗去模板分子, 直至检测不出木犀草素为止, 再用浓度为 0.1 mmol/L 的乙二胺四乙酸二钠溶液除去聚合物中的锌离子, 用蒸馏水洗至中性后于 60 °C 下干燥后备用。

空白印迹聚合物的合成不加木犀草素和乙酸锌, 分子印迹聚合物的合成不加乙酸锌, 其他方法与此类似。

1.2.2.2 木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物吸附量测定

精确称取 0.1 g 待测金属配位印迹聚合物置于 25 mL 具塞锥形瓶中, 加入 10 mL 3 g/L 的木犀草素甲醇溶液, 于 37 °C 下恒温振荡吸附 12 h, 离心后取上清液, 以甲醇为参比溶液, 在 350 nm 波长处测定其上清液的吸光度 A , 按 1.2.1.1 中方法带入公式 (1) 计算吸附后木犀草素的平衡浓度, 并进一步计算木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物、木犀草素分子印迹聚合物以及空白分子印迹聚合物对木犀草素的平衡吸附量。吸附量的计算式如式 (2) 所示。

$$Q = \frac{(\rho_0 - \rho) \times V}{m_{\text{MIP}}} \quad (2)$$

式中, Q 为印迹聚合物对木犀草素的吸附量, mg/g; ρ_0 为吸附前木犀草素的初始质量浓度, g/L; ρ 为吸附后木犀草素的平衡质量浓度, g/L; V 为溶液的体积, mL; m_{MIP} 为印迹聚合物的质量, g。

1.2.3 木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物的光谱表征

1.2.3.1 木犀草素-Zn(II)-丙烯酸酰胺混合溶液的紫外吸收光谱分析

将一定体积的木犀草素甲醇溶液、乙酸锌甲醇溶液和丙烯酸酰胺甲醇溶液混合, 使其中木犀草素、乙酸锌、丙烯酸酰胺的终浓度分别为 3.5、3.5 和 7.0 $\mu\text{mol/L}$, 以不含木犀草素的相应溶液为参比溶液, 于 190~400 nm 处进行紫外光谱扫描。同时与相同浓度下的木犀草素-丙烯酸酰胺甲醇溶液的紫外光谱进行比较。

1.2.3.2 印迹聚合物的红外光谱分析

将干燥好的木犀草素分子印迹聚合物、木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物用 KBr 压片法制备试样, 进行红外光谱分析。

1.2.4 木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物固相分离 箬叶黄酮碳苷

1.2.4.1 箬叶黄酮碳苷粗提液的制备

箬叶于 60 °C 下烘干, 粉碎后, 置于石油醚溶液中浸泡 24 h 去色素。然后以体积分数为 85% 的乙醇水溶液为提取剂, 按照每 1 g 箬叶 20 mL 提取剂的比例, 超声提取 30 min, 得到箬叶黄酮碳苷粗提液, 其中一部分粗提液用于后续印迹聚合物的固相萃取分离, 另一部分经减压浓缩冷冻干燥后测定黄酮碳苷的含量。

1.2.4.2 木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物固相萃取 分离箬叶黄酮碳苷

准确称取一定量处理好的木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物, 置于固相萃取柱中。依次用甲醇润洗固相萃取柱。将箬叶黄酮碳苷粗提液过柱, 用体积分数 30% 的乙腈为淋洗液, 体积分数 55% 乙醇溶液为洗脱液^[23]。收集洗脱液, 浓缩干燥后通过 HPLC 法分析荭草苷、异荭草苷、牡荆苷和异牡荆苷的含量, 并按式 (3) 计算各黄酮碳苷的回收率, 按式 (4) 计算各黄酮碳苷的质量分数。

$$\eta / \% = \frac{m_{\text{碳苷}}}{m_{\text{碳苷}0}} \times 100 \quad (3)$$

$$w / \% = \frac{m_{\text{碳苷}}}{m} \times 100 \quad (4)$$

式中: η 为黄酮碳苷的回收率, %; $m_{\text{碳苷}}$ 为洗脱物中各黄酮碳苷的质量, mg; $m_{\text{碳苷}0}$ 为提取物中黄酮碳苷的质量, mg; m 为粗提物或洗脱物的质量, g。

2 结果与讨论

2.1 木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物制备工艺条件的优化

2.1.1 溶剂种类的影响

溶剂能使参与聚合反应的反应物形成均匀的混合物, 同时起着致孔剂的作用。选择溶剂时, 要充分溶解模板分子, 且不影响聚合过程。由于金属离子与功能单体、目标分子具有配位作用, 作用力大于氢键, 可在强极性条件下制备聚合物, 因此选择醇水体系进行实验, 考察 MIP₁~MIP₄ 对木犀草素的吸附量, 结果见图 1。

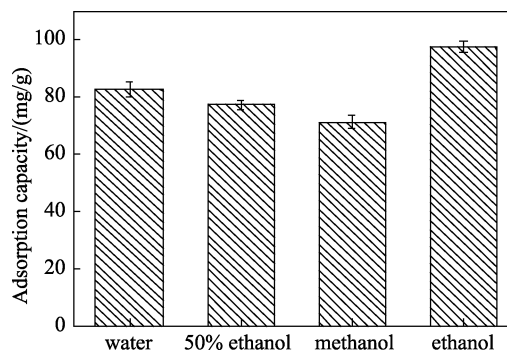


图 1 溶剂种类对聚合物吸附量的影响

Fig. 1 Effect of solution type on the MIP's adsorption capacity

如图 1 所示, 根据溶剂极性大小顺序 (水>50%乙醇>甲醇>无水乙醇), 可知随着溶剂极性的下降, 吸附量呈现先下降后上升的趋势, 说明溶剂的极性对吸附量存在影响。且无水乙醇效果最好, 因此, 后续实验选择无水乙醇为溶剂。

2.1.2 交联剂用量的影响

改变交联剂 MBA 用量, 考察 MIP₅~MIP₉ 对木

犀草素的吸附量结果见图 2。

如图 2 所示, 当 MBA 用量增加时, 吸附量逐渐上升, 添加量达到 7.5 mmol 时, 吸附量达到最高, 再增加交联剂用量时, 吸附量逐渐下降。这可能是因为交联剂用量较少时, 聚合度小, 结构松散, 随着交联剂增多, 表面积增大, 吸附速度随之加快, 从而使吸附量逐渐增加; 当交联剂用量过大时, 会使聚合度过高, 模板分子不易洗脱, 吸附位点被占据, 从而使吸附量下降。因此, 后续实验中交联剂 MBA 用量选择 7.5 mmol, 即模板分子与交联剂的物质的量比为 1 : 30。

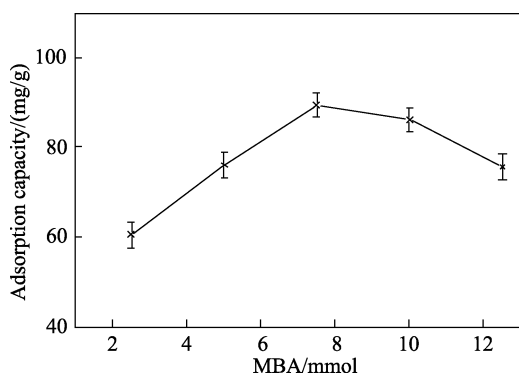


图 2 交联剂用量对聚合物吸附量的影响

Fig. 2 Effect of dosage of cross-linker on the MIP's adsorption capacity

2.1.3 功能单体用量对配位印迹聚合物吸附性能的影响

改变功能单体丙烯酸胺 (AM) 的用量, 考察 MIP₁₀~MIP₁₄ 对木犀草素的吸附量结果见图 3。

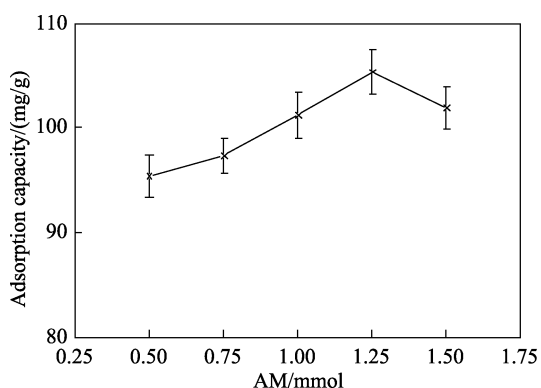


图 3 功能单体用量对聚合物吸附量的影响

Fig. 3 Effect of dosage of functional monomer on the MIP's adsorption capacity

如图 3 所示, 随着 AM 用量的逐渐增加, 配位印迹聚合物的吸附量先增大后下降, 当 AM 的用量达到 1.25 mmol 时, 聚合物的吸附量达到最大值。这可能是由于 AM 的量很少时, 与木犀草素-Zn(II) 形成的作用力不强, 而当 AM 的量逐渐增加, 形成的聚合物稳定性增强; 但当添加 AM 的量很大时,

会发生自身分子聚合, 大大减少 MIPs 中具有选择特异性的结合位点, 从而影响 MIPs 吸附效果。因此, 最佳配位印迹聚合物的制备条件为: 以乙醇为溶剂, 模板分子木犀草素 0.25 mmol, 乙酸锌 0.25 mmol, 功能单体 AM 1.25 mmol, 交联剂 MBA 7.5 mmol, 即 $n(\text{模板分子}) : n(\text{功能单体}) : n(\text{交联剂}) = 1 : 5 : 30$ 。

2.1.4 印迹聚合物吸附性能比较

考察了在最佳制备条件下制备的木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物、木犀草素分子印迹聚合物以及空白印迹聚合物对木犀草素的吸附量, 结果见图 4。

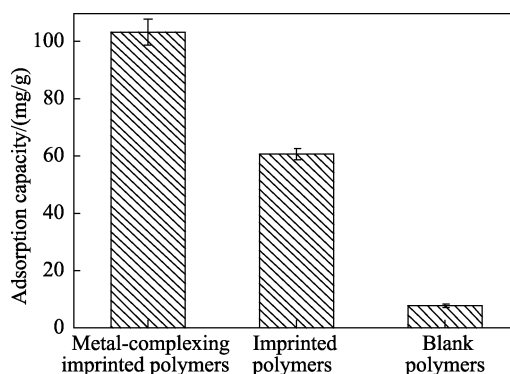


图 4 印迹聚合物吸附性能比较

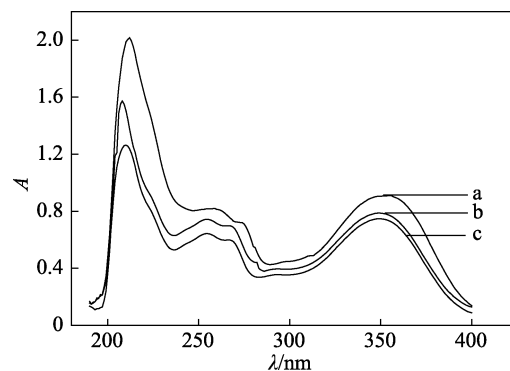
Fig. 4 Comparison of adsorption performance of imprinted polymers

如图 4 所示, 3 种分子印迹聚合物中, 配位印迹聚合物的吸附效果最好, 为 103.40 mg/g, 其吸附量是分子印迹聚合物 (60.61 mg/g) 的 1.71 倍, 是空白印迹聚合物 (7.33 mg/g) 的 14.11 倍, 说明配位作用能显著提高聚合物的吸附量。

2.2 木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物的光谱表征

2.2.1 紫外吸收光谱分析

木犀草素溶液、木犀草素-丙烯酸胺溶液、木犀草素-乙酸锌-丙烯酸胺溶液的紫外光谱见图 5。



a—木犀草素-Zn(II)-丙烯酸胺; b—木犀草素-丙烯酸胺; c—木犀草素

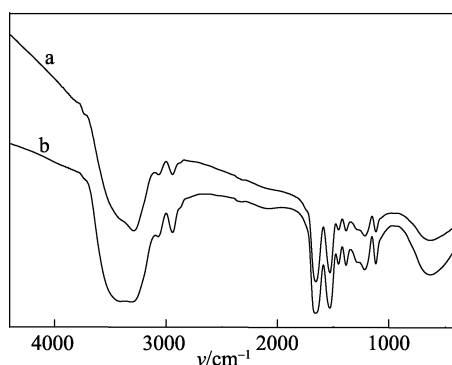
图 5 各体系的紫外吸收光谱分析

Fig. 5 UV spectra of different systems

如图 5 所示, 当向木犀草素甲醇溶液中单独加入功能单体 AM 时, 210 和 350 nm 附近的吸收峰位置不变, 但是吸光度增大明显; 当同时向木犀草素甲醇溶液中加入功能单体 AM 与乙酸锌后, 210 nm 处的吸收峰发生明显的红移, 且吸光度增大。通常情况下, 当有强相互作用力存在时, 会在一定程度上影响吸收峰的增色效应以及发生红移现象。说明木犀草素能与丙烯酸胺结合, 锌离子可以促进木犀草素与丙烯酸胺的相互作用, 即木犀草素、丙烯酸胺能够在锌离子的金属配位作用下形成了稳定的三元配合物。

2.2.2 红外光谱分析

木犀草素分子印迹聚合物和木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物的红外光谱见图 6。



a—木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物; b—木犀草素分子印迹聚合物

图 6 印迹聚合物的红外光谱图

Fig. 6 IR spectra of MIPs

如图 6 所示, 分子印迹聚合物在 1654 cm^{-1} 处为羰基的伸缩振动吸收峰, 配合印迹聚合物相对应的吸收峰向低波数移至 1647 cm^{-1} 处且强度减小, 推测配体木犀草素 C 环上的羰基氧参与了配位。木犀草素苯环 π 键共轭体系的吸收峰在 1529 cm^{-1} 处, 配位印迹聚合物中该吸收峰移至 1527 cm^{-1} 处, 推测是形成配合物后出现一个新的环状结构, 使得共轭效应增强。分子印迹聚合物在 1276 cm^{-1} 出现了木犀草素酚羟基的 C—O 键伸缩振动与 O—H 键面内变形振动耦合所致的吸收峰, 而配位印迹聚合物则在 1265 cm^{-1} 处出现吸收峰, 这表明酚羟基参与了配位成键。木犀草素结构中醚 C—O—C 的伸缩振动吸收峰在 1215 cm^{-1} 处, 在配位印迹聚合物中该峰没有发生位移, 说明环醚键并未发生开环, 醚氧原子未参与配位。

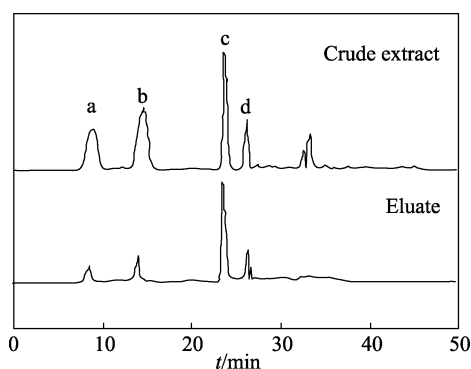
2.3 配位印迹聚合物固相萃取分离箬叶黄酮碳苷

利用配位印迹聚合物作为固相萃取剂, 分离箬叶黄酮碳苷。固相萃取前粗提物和萃取后的洗脱物的色谱图见图 7。

如图 7 所示, 比较洗脱物和粗提物 HPLC 色谱图中色谱峰的个数, 可知洗脱物色谱峰的个数减少,

说明洗脱物中化合物的种类减少, 印迹聚合物对箬叶黄酮碳苷有分离效果。

进一步对箬叶黄酮碳苷的含量进行分析, 结果见表 3。可知经一次固相萃取后, 荭草苷、异荭草苷、牡荆苷和异牡荆苷的回收率分别为 91.95%、80.87%、60.43%和 63.63%, 含量相比粗提物分别提高 55.36、48.89、36.64 和 38.35 倍, 4 种黄酮碳苷总含量由提取前的 0.70% 提高到 32.68%。说明配位印迹聚合物可有效回收荭草苷和异荭草苷, 并对牡荆苷和异牡荆苷等黄酮碳苷也有一定的分离作用。



a—牡荆苷; b—异牡荆苷; c—荭草苷; d—异荭草苷

图 7 箬叶黄酮碳苷固相萃取前后的 HPLC 图

Fig. 7 HPLC chromatogram of C-glycosylflavones from *Indicalamus* leaf before and after solid phase extraction

表 3 配位印迹聚合物固相萃取分离箬叶黄酮碳苷的结果
Table 3 Results of solid phase extraction of C-glycosylflavones by MIPs

	质量分数/%		回收率/%	纯化倍数
	粗提物	洗脱物		
荭草苷	0.278	15.39	91.95	55.36
异荭草苷	0.135	6.60	80.87	48.89
牡荆苷	0.146	5.35	60.43	36.64
异牡荆苷	0.139	5.33	63.63	38.35

3 结论

针对分离提取箬叶黄酮碳苷难度大及黄酮印迹聚合物主要局限在弱极性溶液中制备等问题, 制备了木犀草素-Zn(II)配位印迹聚合物, 并应用到极性溶剂中箬叶黄酮碳苷的分离, 取得了良好的效果: 以乙醇为溶剂, 在 n (模板分子木犀草素) : n (乙酸锌) : n (功能单体丙烯酸胺) : n (交联剂亚甲基双丙烯酸胺) = 1 : 1 : 5 : 30 时, 配位印迹聚合物对甲醇溶液中木犀草素吸附量达到最高, 是未配位印迹聚合物的 1.71 倍, 空白印迹聚合物的 14.11 倍; 该配位印迹聚合物能有效提取分离箬叶黄酮碳苷中的荭草苷和异荭草苷, 纯度可提高 50 倍左右, 对部分结构相似的牡荆苷和异牡荆苷也有一定的提取分

离效果。

后续研究可考虑：(1) 采用芹菜素与木犀草素为双模板分子制备配位印迹聚合物，以实现牡荆苷和异牡荆苷回收率的提升；(2) 对固相萃取的洗脱条件进行筛选，以实现各箬叶黄酮碳苷的分离。

参考文献：

- [1] Yu Jin (喻瑾). Chemical components of *Indocalamus Nakai* leaves [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry (中国林业科学研究院), 2014.
- [2] Su Chunhua (苏春花). Characteristics of *Indocalamus* forest structure and active ingredients in bamboo leaves [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University (南京林业大学), 2011.
- [3] Jin Yi (靳伟), Wang Enjun (王恩军), Song Jie (宋洁), *et al.* Impact of *indocalamus tessellatus* polysaccharides on cervical cancer and immunity [J]. Chinese Journal of Family Planning (中国计划生育学杂志), 2012, 20(3): 164-167.
- [4] Zhang Y, Bao B L, Lu B Y, *et al.* Determination of flavone C-glucosides in antioxidant of bamboo leaves(AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1065(2): 177-185.
- [5] Jiao Jingjing (焦晶晶). Studies on characteristic flavonoids in bamboo leaves [D]. Hangzhou: Zhejiang University(浙江大学), 2008.
- [6] Gu Chengbo (顾成波), Cai Man (蔡曼), Yuan Xiaohan (袁肖寒), *et al.* Research progress on plant resources distribution of vitexin and its pharmacological effects [J]. China Journal of Chinese Materia Medica (中国中药杂志), 2015, 40(3): 382-389.
- [7] Gong Jinyan (龚金炎), Wu Xiaoqin (吴晓琴), Zhang Ying (张英). Advanced research of flavonoid C-glycosides and their pharmacological effects [J]. Natural Product Research and Development (天然产物研究与开发), 2010, 22(3): 525-530.
- [8] ShaoYing (邵莹), Wu Qinan (吴启南), Yue Wei (乐巍), *et al.* Research progress on C-glycosylflavones for protection of myocardial ischemia [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 2015, 46(1): 128-139.
- [9] Wu Xinan (吴新安), Zhao Yimin (赵毅民). Advances in studies on natural flavonol glycosides and their activities [J]. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army (解放军药学报), 2005, 21(2): 135-138.
- [10] Garcia R, Maria J C, Freitas A M C. Application of molecularly imprinted polymers for the analysis of pesticide residues in food—a highly selective and innovative approach[J]. American Journal of Analytical Chemistry, 2011, 2(2): 16-25.
- [11] Pakade V, Cukrowska E, Lindahl S, *et al.* Molecular imprinted polymer for solid-phase extraction of flavonol aglycones from *Moringa oleifera* extracts[J]. Journal of Separation Science, 2013, 36(3): 548-55.
- [12] Verma N, Trehan N. Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for quercetin[J]. Journal of Biomimetics Biomaterials & Tissue Engineering, 2013, 17: 71-78. DOI: 10.4028/www.scientific.net/JBBTE.17.71.
- [13] Nasser I I, Algieri C, Garofalo A, *et al.* Hybrid imprinted membranes for selective recognition of quercetin[J]. Separation & Purification Technology, 2016, 163: 331-340.
- [14] Şeyda K E, Tütem E, Başkan K S, *et al.* Preparation, characterization and usage of molecularly imprinted polymer for the isolation of quercetin from hydrolyzed nettle extract[J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences, 2016, S1017/S1018: 89-100.
- [15] Ran D, Wang Y Z, Jia X P, *et al.* Bovine serum albumin recognition via thermosensitive molecular imprinted macroporous hydrogels prepared at two different temperatures[J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 723(8): 45-53.
- [16] Baydemir G, Andaç M, Perçin I, *et al.* Molecularly imprinted composite cryogels for hemoglobin depletion from human blood.[J]. Journal of Molecular Recognition, 2014, 27(9): 528-536.
- [17] Liu Boyang (刘伯洋), Li Lijun (李利军), Cheng Hao (程昊), *et al.* Separation of L-epicatechin in Liubao tea by molecularly imprinted solid phase extraction [J]. Food Science (食品科学), 2017, 38(2): 164-169.
- [18] Zhang Yanyan (张妍妍). Preparation of excellent adsorbing and surface molecular imprinted material toward flavonoids and research on their adsorption property [D]. Taiyuan: North University of China (中北大学), 2014.
- [19] Zhu Junfang (朱俊访), Li Bo (李博). Progress in the application of molecularly imprinted polymers in the separation of flavonoids [J]. Chinese Traditional Patent Medicine (中成药), 2015, 37(8): 1799-1802.
- [20] Fan P M, Wang B. Regulatory effects of Zn(II) on the recognition properties of metal coordination imprinted polymers[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2010, 116(1): 258-266.
- [21] Huang Jianxiang (黄健祥), Hu Yuling (胡玉玲), Hu YuFei (胡玉斐), *et al.* Application development of complex imprinted polymer in analytical chemistry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2012, 40(4): 643-650.
- [22] Zheng Yongjun (郑永军). Extraction, separation and pharmacological activity assay of garlic's functional components via molecular imprinting technique [D]. Qingdao, Chinese Marine University(中国海洋大学), 2012.
- [23] Ding Guifeng (丁桂峰), Study on preparation and application of luteolin-Cu(II) complexes molecularly imprinted polymer [D]. Xiangtang: Xiangtang University (湘潭大学), 2012.
- [24] Cheng Hongda (成洪达), Xing Zhanfen (邢占芬), Zhang Pingping (张平平). Preparation of rutin-Cu²⁺ complex imprinted polymer and its adsorption character [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药), 2015, 46(24): 3666-3669.
- [25] Zhang Chunjuan (张春娟), Meng Zhifeng (孟志芬), Guo Xuefeng (郭雪峰), *et al.* Simultaneous determination of four flavone C-glycosides in *phyllostachys edulis* leaves by high-performance liquid chromatography with ultraviolet spectrometry [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2014, 34(9): 2568-2572.