



中文核心期刊
中国科技核心期刊
《中国科技期刊数据库》来源期刊
《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊

《中国学术期刊(光盘版)》收录期刊
美国《化学文摘》(CA)收录期刊
全国石油和化工期刊100强
全国石油和化工精品期刊40强

ISSN 0258-3283
CN 11-2135/TQ

化学试剂

CHEMICAL REAGENTS

2023年2月 第45卷第2期



国药集团化学试剂有限公司
Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.

产品
信息

企业
文化

惊喜好礼

触发灵感 点亮科技

一键
活动报名

海量
行业资讯

专业
服务



“国药试剂”小程序

活动报道

广告

ISSN 0258-3283



9 770258 328232

中国石油和化学工业联合会 主管

中国分析测试协会 主办
国药集团化学试剂有限公司
北京国化精试咨询有限公司



化学试剂

中文核心期刊

主要栏目

综述与专论
生化与药用试剂
功能材料
分离提取技术
电化学和新能源
化学品与环境
分析与测试
标准物质与标准品
合成与工艺技术



中文核心期刊

中国科技核心期刊

《中国科技期刊数据库》来源期刊

《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊

《中国学术期刊(光盘版)》收录期刊

美国化学文摘(CA)收录期刊

全国石油和化工期刊100强

全国石油和化工精品期刊40强

地址: 北京市西城区太平街8号院6号楼107室
投稿网址: <https://hxsj.cbpt.cnki.net>

电话: (010) 58321793, (010) 58321153
E-mail: webmaster@chinareagent.com.cn

1979 年 4 月创刊·月刊

第 45 卷 第 2 期

总第 373 期

2023 年 2 月 15 日出版

主管单位 中国石油和化学工业联合会
主办单位 中国分析测试协会
国药集团化学试剂有限公司
北京国化精试咨询有限公司
出版单位 化学试剂编辑部
地址 北京市西城区太平街 8 号院
6 号楼 2 层 107 室
邮政编码 100050
联系电话 010-58321793 010-58321723
广告及发行 010-58321153
投稿网址 <https://hxsj.cbpt.cnki.net>
E-mail webmaster@chinareagent.com.cn
名誉主编 王 夔
主 编 何 晖
印刷 北京科信印刷有限公司
国内总发行 北京市报刊发行局
邮发代号 2-444
国内订阅处 全国各地邮电局
海外总发行 中国国际图书贸易集团
有限公司
国外代号 M591
连续出版物号 ISSN 0258-3283
CN 11-2135/TQ
广告发布登记 京西工商广登字
20170008 号
国内定价 40.00 元/本 480.00 元/年

化学试剂

HUAXUE SHIJI

目 次

· 综述与专论 ·

- 磁性水凝胶的制备及其应用研究进展
..... 董黎明,陈金雨,袁源,王士凡*(1)
香豆素类杂环化合物的抗微生物活性研究进展
..... 彭莘媚*,王江河,贺银菊,李云萍,陈汉生,慈成刚(11)
天然二氢黄酮醇类化合物及其衍生物的研究进展
..... 刘懿锋,林汝娟,周琢强*(22)

· 生化与药用试剂 ·

- 查尔酮类化合物抗肿瘤活性研究进展
..... 李林博,刘玉肖,樊平平,周淑晶,李进京*(33)
酪氨酸激酶 2 抑制剂的研究进展
..... 姚华良,曾宪霞,张洁,黄怀征,何林洪*(43)
基于丁酸功能化基团钌化合物的合成及其抗菌活性研究
..... 曾威*,丁云霞,姜雯雯,陈晓燕,荣小娟,马兆霞(54)
2-(2-氨基苯基)苯并咪唑铂(II)配合物的合成及其与 BSA
作用的光谱研究
..... 袁涛,覃姣兰*,罗翠萍,仇继家,钟雨佳,姚鹏飞(62)
CYP1B1 抑制剂研究进展 王志刚*,费荣杰(69)

· 功能材料 ·

- 复合型多金属氧酸盐的合成与应用
... 赵孟雅,田璐,肖禹圣,王震寰,刘淑莹,赵幻希*,修洋*(75)
废弃烟滤嘴制备醋酸纤维素微球及其对 Pb(II) 的吸附
性能 陈燕敏*,刘冰,赵文伯,卢鑫,邵冰琪(83)

· 分离提取技术 ·

- 响应面法优化酶法制备薏苡仁寡糖工艺研究
..... 郑舒怡,左佳昕,戴鑫,高淑娟,张怡,卢旭*(90)

红毛藻不同乙醇浓度提取物的生物活性及其成分分析 ...

常高萍,林巧燕,张敏,郭佳瑄,李志朋*,杜希萍,姜泽东(98)

酸性低共熔溶剂的理化特性及其与虾青素溶解度的相关性

研究 程婉婷,陈世钰,贤凤,胡坤,高静*(106)

响应面法优化毛大丁草总香豆素提取工艺及其抗氧化作用

研究 高奇,李齐激,杨柳,杨娟,孙超*(114)

· 化学品与环境 ·

3-甲醛肟基苯甲酸乙酯的合成及其对部分重金属离子的荧

光选择识别 董艳芹,刘欣宇,曾展鹏,彭佩,王勇*(121)

ZnCuNi-LDHs 的制备及其对 MO 吸附性能研究

..... 李阳,王泽华,田慧媛,李萍,崔节虎*(128)

MnO_x@Fe₃O₄ 复合材料制备及其对苯酚处理性能研究 ...

..... 高卫民*,程寒飞,朱巧红,冉景(134)

· 分析与测试 ·

超高效液相色谱串联质谱法测定葡萄酒中酚酸和酚醛类化

合物 马燕玲,王一名,初坤,陈晨,吴帅*(141)

一测多评法测定黑果小檗果实中 5 种花色苷含量

..... 陈玲,包海燕,阳莹,李敏,李慧敏,康莹莹,李建光*(148)

· 标准物质与标准品 ·

纳摩尔级一氧化氮标准气体的制备技术研究

..... 高冰,王帅斌,杨静,封跃鹏,倪才倩*(155)

· 合成与工艺技术 ·

高纯二水合连四硫酸钠的制备及其表征

..... 刘红梅*,谷芳芳,王保全,李炳华,杜荣光,陈勉彬(161)

* 通讯联系人

《化学试剂》介绍(前插页)·

2023 年《化学试剂》期刊征订单(后插页)·

《化学试剂》第五届编委会

顾 问 何鸣元 林国强 赵玉芬

傅若农 李建华

主 任 王 夔

副主任 柴之芳 王 刚

副主编 (按拼音为序)

方岩雄 姜雪峰 李培武 余远斌

许家喜 张庆合 赵丽娇 赵黎明

郑岳青 朱永法

编 委 (按拼音为序)

褚小立 董庆利 付海燕 顾小焱

何 晖 胡高飞 胡跃飞 黄跟平

黄年玉 黄 挺 纪红兵 蒋少华

金慧子 李春艳 李金花 刘 昉

马 强 牛 佳 庞 欢 彭 羽

邵学广 宋金链 孙继红 孙志鹏

汤 磊 王保金 王德发 王 旭

王昊阳 王晓晨 王玉成 王志刚

肖 雪 徐 丽 徐久振 应志耀

喻小琦 臧慕文 张 磊 张 庆

张国新 张立兵 朱志伟

(本期编辑:屈纓虹 孟翠苗)

中文核心期刊

中国科技核心期刊

《中国科技期刊数据库》来源期刊

《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊

《中国学术期刊(光盘版)》收录期刊

美国《化学文摘》(CA)收录期刊

全国石油和化工期刊 100 强

全国石油和化工精品期刊 40 强



《化学试剂》官方微信公众号

CONTENTS

Progress in the Preparation and Application of Magnetic Hydrogels	
..... DONG Li-ming, CHEN Jin-yu, YUAN Yuan, WANG Shi-fan* (1)	
Recent Progress on the Antimicrobial Activities of Coumarin-derived Heterocyclic Compounds	
..... PENG Xin-mei*, WANG Jiang-he, HE Yin-ju, LI Yun-ping, CHEN Han-sheng, CI Cheng-gang (11)	
Progress in Natural Products and Derivatives of Flavanonol	LIU Yi-feng, LIN Ru-juan, ZHOU Zhuo-qiang* (22)
Research Progress on Anti-tumor Activity of Chalcone Derivatives	
..... LI Lin-bo, LIU Yu-xiao, FAN Ping-ping, ZHOU Shu-jing, LI Jin-jing* (33)	
Research Progress of Tyrosine Kinase 2 Inhibitors	
..... YAO Hua-liang, ZENG Xian-xia, ZHANG Jie, HUANG Huai-zheng, HE Lin-hong* (43)	
Ruthenium Complex Based on Butyric Acid Functionalized Ligand; Synthesis and Antibacterial Activity Study	
..... ZENG Wei*, DING Yun-xia, JIANG Wen-wen, CHEN Xiao-yan, RONG Xiao-juan, MA Zhao-xia (54)	
Synthesis of 2-(2-Aminophenyl) Benzimidazole Platinum Complex and Spectral Study of its Interaction with BSA	
..... YUAN Tao, QIN Jiao-lan*, LUO Cui-ping, QIU Ji-jia, ZHONG Yu-jia, YAO Peng-fei (62)	
Research Progress of CYP1B1 Inhibitors	WANG Zhi-gang*, FEI Rong-jie (69)
Synthesis and Applications of Composite Polyoxometalates	
..... ZHAO Meng-ya, TIAN Lu, XIAO Yu-sheng, WANG Zhen-huan, LIU Shu-ying, ZHAO Huan-xi*, XIU Yang* (75)	
Preparation of Cellulose Acetate Microspheres from Waste Cigarette Filters and Its Adsorption Properties for Pb ²⁺	
..... CHEN Yan-min*, LIU Bing, ZHAO Wen-bo, LU Xin, SHAO Bing-qi (83)	
Optimization of Enzymatic Preparation of Coix Lacryma Oligosaccharides by Response Surface Methodology	
..... ZHENG Shu-yi, ZUO Jia-xin, DAI Xin, GAO Shu-juan, ZHANG Yi, LU Xu* (90)	
Bioactivity and Component Analysis of Different Ethanol Concentration Extracts from <i>Bangia Fusco-purpurea</i>	
..... CHANG Gao-ping, LIN Qiao-yan, ZHANG Min, GUO Jia-huan, LI Zhi-peng*, DU Xi-ping, JIANG Ze-dong (98)	
Physicochemical Properties of Acidic Deep Eutectic Solvents and the Correlation with Astaxanthin Solubility	
..... CHENG Wan-ting, CHEN Shi-yu, XIAN Feng, HU Kun, GAO Jing* (106)	
Optimization of Extraction Process of Total Coumarins from <i>Piloselloides Hirsuta</i> by Response Surface Methodology and its Antioxidant Effect	
..... GAO Qi, LI Qi-ji, YANG Liu, YANG Juan, SUN Chao* (114)	
Synthesis of 3-(hydroxyimino-methyl)-benzoic Acid Ester and its Fluorescence Recognition of Selected Heavy Metal Ions	
..... DONG Yan-qin, LIU Xin-yu, ZENG Zhan-peng, PENG Pei, WANG Yong* (121)	
Study on the Preparation of ZnCuNi-LDHs and their Adsorption Properties for MO	
..... LI Yang, WANG Ze-hua, TIAN Hui-yuan, LI Ping, CUI Jie-hu* (128)	
Preparation of Magnetic Nano-MnO _x @Fe ₃ O ₄ Composite and Its Treatment Performance of Phenol	
..... GAO Wei-min*, CHENG Han-fei, ZHU Qiao-hong, RAN Jing (134)	
Determination of Phenolic Acids and Phenol Aldehyde Compounds in Wine by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry	
..... MA Yan-ling, WANG Yi-ming, CHU Kun, CHEN Chen, WU Shuai* (141)	
Determination of Five Anthocyanins in <i>Berberis heteropoda</i> Schrenk Fruit by QAMS Method	
..... CHEN Ling, BAO Hai-yan, YANG Ying, LI Min, LI Hui-min, KANG Ying-ying, LI Jian-guang* (148)	
Preparation of Nanomolar Nitric Oxide Gas Standard	
..... GAO Bing, WANG Shuai-bin, YANG Jing, FENG Yue-peng, NI Cai-qian* (155)	
Preparation and Characterization of High-purity Sodium Tetrathionate Dihydrate	
..... LIU Hong-mei*, GU Fang-fang, WANG Bao-jin, LI Bing-hua, DU Rong-guang, CHEN Mian-bin (161)	

Sponsor: China Association for Instrumental Analysis
Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.
Beijing Guohua Jingshi Consulting Co., Ltd.
Editor and Publisher: Chemical Reagents Editorial Board
(F2, Building No.6, Yard 8, Taiping Street,
Xicheng District, Beijing, China 100050)
Overseas Distributor: China International Books Trading Corporation
P.O.Box 399, Beijing, China (Code No.M591)

Honorary Editor-in-Chief: WANG Kui
Editor-in-Chief: HE Hui
Phone: (010) 58321793
Website: <https://hxsj.cbpt.cnki.net>
Subscription: Local Post Offices
Costal Distribution Code: 2-444

综述与专论

磁性水凝胶的制备及其应用研究进展

董黎明, 陈金雨, 袁源, 王士凡*

(徐州工程学院 材料与化学工程学院, 江苏 徐州 221018)

摘要:近些年来,磁性水凝胶材料因其优异的磁性、稳定性和良好的生物相容性而备受关注。同时,对磁性水凝胶的材料改性工作也在不断推进,以提高磁性水凝胶材料的吸附、运载等特定能力。介绍了磁性水凝胶材料的制备,包括共混法、接枝法、原位沉淀法和溶胀法。重点介绍了其在重金属离子吸附、药物运输、癌症治疗等领域的应用。考虑到对未来发展的贡献,对磁性水凝胶在智能多功能材料方面的应用进行了展望。

关键词:磁性水凝胶;吸附;水处理;生物医学

中图分类号: O032.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2023)02-0001-10

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0522

Progress in the Preparation and Application of Magnetic Hydrogels DONG Li-ming, CHEN Jin-yu, YUAN Yuan, WANG Shi-fan* (School of Materials and Chemical Engineering, Xuzhou Institute of Engineering, Xuzhou 221018, China)

Abstract: In recent years, magnetic hydrogels have attracted much attention because of their excellent magnetism, stability and good biocompatibility. At the same time, the modification of magnetic hydrogels is also being carried out constantly to improve the adsorption, transport and other specific capabilities of magnetic hydrogels. In the paper, the preparation of magnetic hydrogel materials was introduced, and its application and effect in the fields of heavy metal ion adsorption, drug transportation and cancer treatment were highlighted. The main methods can be classified as blending method, grafting method, in situ precipitation, and swelling method. Overall, in view of the contributions in the future developments, this review summarized the progress of magnetic hydrogels in the field of smart multifunctional materials.

Key words: magnetic hydrogel; adsorption; water treatment; biomedical

磁性水凝胶是指对磁场具有响应特性的一类环境敏感性水凝胶,此类凝胶因可以利用外部磁场快速实现运动方式和运动方向的有效控制而备受关注。磁性水凝胶结合了铁磁体的磁性和水凝胶的弹性。例如,通过外部磁场、磁弹性耦合来远程驱动,如伸长、收缩、偏转和卷曲等。这些响应在磁性水凝胶中不到 1 s 的时间内可被诱导完成,除了与磁性填料浓度成正比外,还与伸长和偏转响应的磁场阈值相关,超过限定阈值,响应变为非线性并且以大偏转/伸长为特征,进一步增加磁场强度只会引起很小的额外应变。通过将磁性颗粒以不同的方法结合到不同水凝胶基质材料中,可以获得各种不同性质、不同功能的水凝胶产品。例如,可以有效去除水体中有害物质的吸附类磁性水凝胶^[1];可以靶向释放药物取得高效的治疗效果的运载释放类磁性水凝胶^[2]。另外,

一些具有良好生物相容性的磁性水凝胶材料,可广泛应用于组织工程等领域^[3]。

1 磁性水凝胶的制备

关于制备磁性水凝胶以获得所需的性能,主要包括共混法、接枝法、原位沉淀法和溶胀法等策略,如图 1 所示。

收稿日期:2022-07-11;网络首发日期:2022-10-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(51873232);徐州工程学院资助培育项目(XKY2018123)。

作者简介:董黎明(1978-),男,河北邯郸人,博士,副教授,主要研究方向为高分子功能材料。

通讯作者:王士凡, E-mail: shifanwang@xzit.edu.cn。

引用本文:董黎明,陈金雨,袁源,等.磁性水凝胶的制备及其应用研究进展[J].化学试剂,2023,45(2):1-10。

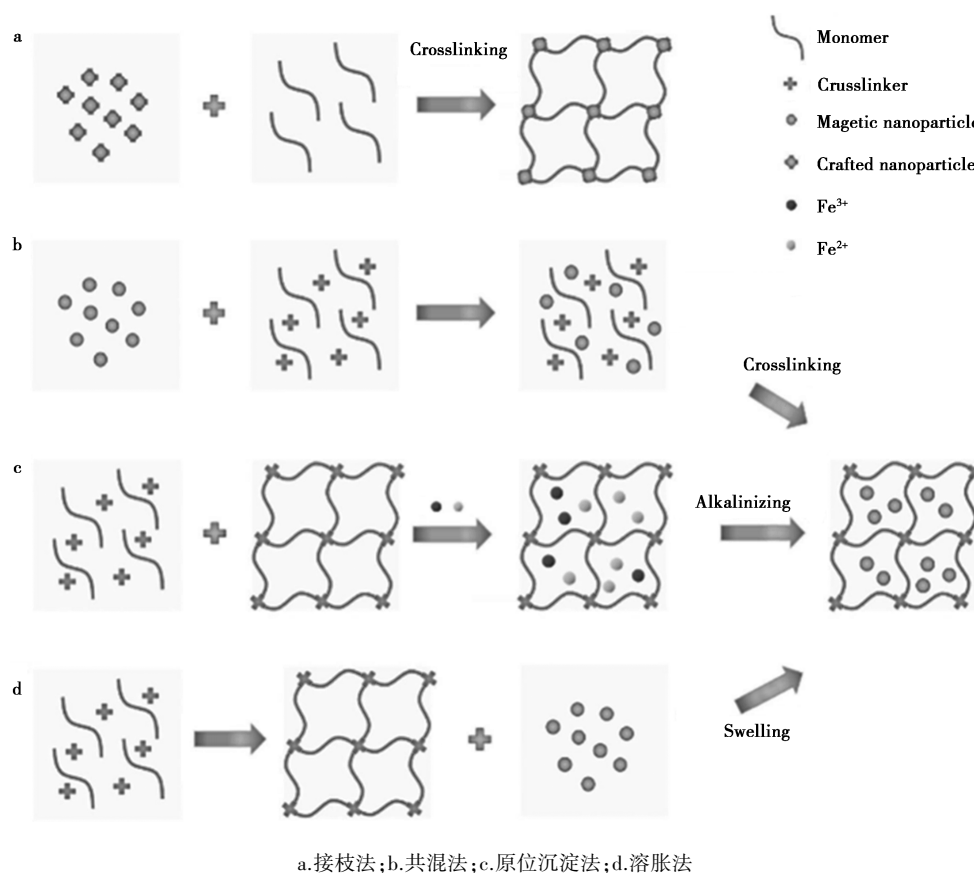


图 1 磁性凝胶制备方法示意图^[2]

Fig.1 Schematic representation of the methods for preparation of magnetic gels^[2]

共混法是最为简单的制备方法,首先合成磁性纳米粒子,然后与水凝胶前体混合,最后聚合成水凝胶。Mikhnevich 等^[4]通过混合方法开发了聚(丙烯酸胺)铁磁水凝胶。在磁性镍纳米粒子的存在下,N,N'-亚甲基-双(丙烯酸胺)作为交联剂丙烯酸胺单体发生自由基聚合。尽管简单,但纳米粒子团聚可能会干扰凝胶网络形成,此外纳米粒子的均匀分散也具有挑战性。磁性纳米粒子与凝胶的结合力较弱,在溶胀时可能会从凝胶中扩散出来。因此,可能需要适当手段来稳定纳米颗粒。

接枝法包括长出支链、嫁接支链和长出主链 3 种形式。与混合方法相比,磁性纳米粒子与凝胶形成共价偶联结构,从而抑制了纳米粒子从凝胶中扩散。Roeder 等^[5]通过接枝共聚开发了聚(丙烯酸胺)磁性水凝胶,其中嵌入了甲基丙烯酸酯表面功能化的赤铁矿纳米颗粒作为水凝胶基质的交联剂。接枝法虽然优点显著,但是其制备时间较长、复杂和高成本的制造过程限制了其在生物医学应用中的使用。

原位沉淀法是先制备出水凝胶网络,然后在凝胶网络内合成磁性纳米颗粒。一般先将制备好

的水凝胶放入磁性纳米粒子所需离子的浓缩水溶液中,直至达到溶胀平衡,然后将其浸入碱溶液中以产生磁性纳米粒子。Sang 等^[6]通过将水凝胶浸入铁离子和亚铁离子的浓缩水溶液中,开发了基于聚(2-丙烯酸胺基-2-甲基-1-丙磺酸)(PAMPS)和氧化铁纳米颗粒的磁性凝胶,随后用氨水溶液沉淀。然而,这种方法仅限于具有稳定网络结构的水凝胶,尤其不适用于碱性条件易于分解的水凝胶。

溶胀法是水凝胶与铁磁一起同时孵育的方法,这也是一种制备微凝胶的有效方法。Witt 等^[7]通过溶胀法制备了聚(N-异丙基丙烯酰胺-烯丙基胺)(P(NIPAM-co-AA))微凝胶,包含柠檬酸盐包覆的铁酸钴纳米颗粒。实验中分批进料使得磁性纳米颗粒多积累在外壳,加载过程受网络结构相互作用影响,因此纳米粒子不仅限于水凝胶网格尺寸,而且还需要适当稳定。

2 磁性水凝胶在水处理中的应用

吸附法作为处理工业废水常用的手段,具有高效、操作简单及吸附剂可再生等优点。然而,大多吸附材料价格昂贵,难于回收,且存在多次使用

后吸附效能下降的不足。磁性水凝胶材料对重金属废水、染料废水中的有害物质有极强的吸附作用,且具有性能稳定、重复使用率高、易回收等优点,使其具有良好的应用前景。磁性水凝胶吸附剂处理工业废水过程如图 2 所示^[8]。

磁性水凝胶吸附剂由载磁体和基体组成,常见的载磁体为零价铁纳米颗粒、赤铁矿($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)、磁赤铁矿($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)、磁铁矿(Fe_3O_4)和尖晶石铁氧体等;基体可以是碳、聚合物、淀粉或生物质等^[9,10]。吸附机理和动力学过程取决于吸附剂的表面形态和磁性,此外还受到吸附条件的影响,例如 pH 值、时间、吸附剂浓度、废水温度和污染物的初始剂量等。目前,载磁体的研究集中在 Fe_3O_4 颗粒,尤其当颗粒尺寸为纳米级时,对于

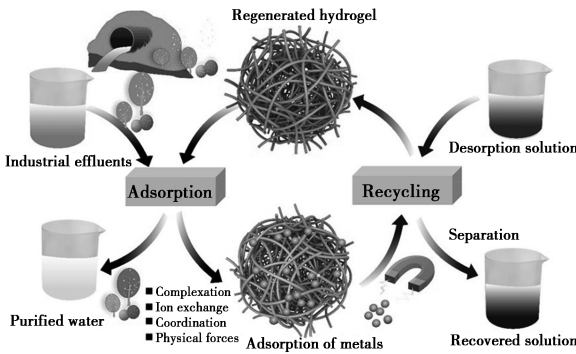


图 2 吸附和解吸附过程示意图^[8]

Fig.2 Schematic representation of adsorption and desorption process^[8]

去除金属离子非常有效^[11,12]。有关不同磁性吸附剂对重金属离子的吸附性能见表 1。

表 1 磁性吸附剂对废水中重金属离子的吸附^注

Tab.1 Adsorption of heavy metal from wastewater using magnetic adsorbents

Adsorbent	$Q_m/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$													Conditions		Ref.
	Cu^{2+}	Pb^{2+}	Cd^{2+}	Zn^{2+}	Co^{2+}	Fe^{2+}	Ni^{2+}	Cr^{6+}	Ag^{2+}	Hg^{2+}	Cr^{3+}	As^{3+}	As^{5+}	pH	$T/^\circ\text{C}$	
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{G}$	—	—	—	—	—	—	—	78.5	—	—	—	—	—	—	25	[13]
F-MC	—	—	—	—	—	—	—	1 423.0	—	—	—	—	—	1.0	25	[14]
Magnetite-Dowex 50WX4	416.0	380.0	398.0	—	—	—	384.0	400.0	—	—	—	—	—	5.5~7.0	25	[15]
$\text{FeNi}_3/\text{TiO}_2$	—	—	—	—	—	—	—	398.0	—	—	—	—	—	3.0	25	[16]
Magnetic reduced graphene oxide-cobalt oxide	—	—	—	—	—	—	—	384.0	—	—	—	—	—	3.0	25	[17]
FeS-coated iron	—	—	—	—	—	—	—	69.7	—	—	—	—	—	5.0	25	[18]
MNPLB	—	—	—	—	—	—	—	434.8	—	—	—	—	—	2.1	35	[19]
$\text{CaO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$	—	227.3	—	—	217.4	—	—	—	—	—	—	—	—	6.0	25	[20]
MCB	122.0	—	—	—	—	—	—	81.0	107.0	306.0	63.0	—	—	4.0	30	[21]
Functionalized magnetic microsphere NiFe_2O_4	20.2	—	16.6	15.6	—	—	—	—	—	—	16.8	—	—	5.0	25	[22]
MNP-PTMT	—	533.2	216.6	—	—	—	—	—	—	603.2	—	—	—	7.0	25	[23]
CCM	143.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6.0	25	[24]
MNP-PN-TN	—	—	—	—	—	—	—	35.0	—	—	—	—	—	7.0	45	[25]
MGO-IL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	160.7	104.1	2.0	45	[26]
Magnetic layered double oxide/carbon	192.7	359.7	386.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6.0	25	[27]
MGO	62.9	200.0	—	63.7	—	—	51.0	—	—	—	24.3	—	—	6.0~8.0	25	[28]
$\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{CS-P}$	—	212.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6.0	25	[29]
XMPC	100.0	67.0	307.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5.5	30	[30]
MCSB	124.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5.0	25	[31]

注:“—”表示无。

2.1 以高分子为基质的磁性水凝胶吸附材料

高分子材料通常处于固体或凝胶状态,具有一定的粘度、耐腐蚀性等,性能稳定。其中壳聚糖(CS)、羧甲基纤维素(CMC)、聚乙烯醇(PVA)等

常用于制备水凝胶材料。

Huang 等^[29]制备了一种磷酸化壳聚糖包覆的磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ 纳米颗粒的水凝胶珠($\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{CS-P}$)(见图 3),并对 Pb^{2+} 具有高选择性

吸附,吸附容量为 212.8 mg/g,制备方法如图 3 所示。在 7 个金属离子共存的溶液中进行竞争性实验, $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ \text{CS-P}$ 表现出优异的 Pb^{2+} 捕获选择性,其分布系数(0.75 L/g)是

其他金属离子的 10 倍以上。吸附后的傅里叶红外光谱和光电子能谱表明,高吸附性能和选择性捕获 Pb^{2+} 主要受吸附剂表面磷酸基团的配位控制。

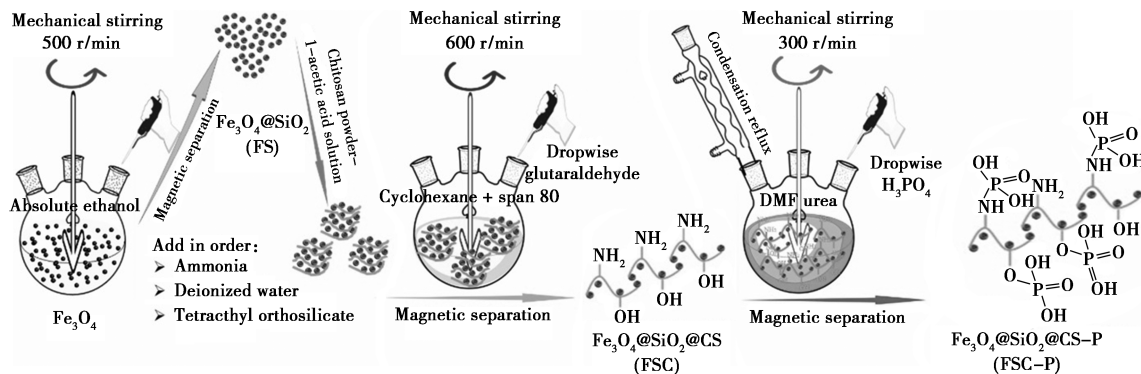


图 3 磁性磷酸化壳聚糖的合成路线^[29]

Fig.3 Synthesis route of the phosphorylated chitosan-coated magnetic silica nanoparticles^[29]

Wang 等^[30]采用聚乙烯醇、壳聚糖和磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2$ 纳米粒子合成硫醇基改性磁性水凝胶 XMPC,用于有效去除水溶液中的重金属离子。对 Cd^{2+} 的去除率为 307 mg/g,该水凝胶可以多次重复使用,并且通过磁性很容易从溶液中分离。

Tao 等^[31]以海藻酸钠水凝胶为骨架,结合壳聚糖和磁性 Fe_3O_4 ,制备了新型的磁性壳聚糖/海藻酸钠凝胶微珠(MCSB)。研究了其对 Cu^{2+} 的吸附性能,最大吸附量为 124.5 mg/g,此外 MCSB 具有良好的磁性能,饱和磁化强度为 12.5 emu/g。

以上研究说明,这些磁性材料可用于高效、选择性地从水溶液中捕获重金属离子,在各类工业污水废水处理领域具有广阔的发展前景。

Kamel 等^[32]以交联羧甲基纤维素接枝丙烯酸酰胺、多孔碳和柠檬酸改性磁铁矿为原料制备了磁性水凝胶。由于交联羧甲基纤维素基质、多孔碳和柠檬酸改性磁铁矿之间的协同作用,磁性水凝胶对水中的 Pb^{2+} 和亚甲基蓝染料具有高效的去除率, Pb^{2+} 和亚甲基蓝染料的吸附量分别达 294.1、222.2 mg/g。

Jv 等^[33]研制一种具有半互穿网络结构的磁性聚天冬氨酸-聚丙烯酸水凝胶(PAsp-PAA/ Fe_3O_4),对有机染料亚甲基蓝和中性红具有较好的吸附性能,用 Langmuir 模型计算其对亚甲基蓝和中性红的最大吸附量分别为 357.1、370.4 mg/g,此外该水凝胶具有良好的循环利用性,可以作为去除废水中染料污染物的优良吸附剂。

Pu 等^[34]采用原位共沉淀法和柠檬酸钠交联法制备高孔磁性壳聚糖水凝胶(PMCH),PMCH 含有羟基、氨基、羧基等基团,对金属阳离子具有较高的吸附效率,对 Pb^{2+} 的最大吸附容量为 84.0 mg/g。以膨润土/羧甲基壳聚糖/海藻酸钠为原料制备的磁性复合水凝胶珠(Mag-Ben/CCS/Alg),吸附 90 min 达到平衡, Cu^{2+} 去除率为 92.6%,吸附容量为 56.8 mg/g。循环 4 次后对 Cu^{2+} 的去除率仍保持在 80%以上^[35]。

Sanchez 等^[36]采用冻融法制备聚乙烯醇/膨润土、酸改性膨润土、磁性纳米粒子和介孔碳质复合水凝胶,对 Cd^{2+} 的最大吸附量为 42.6 mg/g,且磁性纳米粒子含量越高,吸附效率越高。另一种以 PVA 为基质的聚乙烯醇/硅酸盐 laponite RD 磁性纳米复合材料(PVA-mLap),具有良好的吸附性能。吸附位点的异质性随着吸附剂磁浓度的增加和 pH 值的升高而增强。此外,离子浓度增加 4 倍以上,对 Cd^{2+} 的吸附量仅降低了 15% 左右^[37]。

高分子材料易于加工成各种形状,如凝胶、微球、纤维等,将磁性纳米材料与之相结合可以显著增大吸附材料的比表面积,提高重金属离子的去除率。

2.2 碳基复合磁性水凝胶吸附材料

碳基材料包括石墨、活性炭、碳纳米管、石墨烯等,而对于传统吸附用碳材料来说,其吸附性能易受吸附物量的影响,且选择吸附性相对较差;将碳基材料与凝胶材料复合,可以在一定程度上提

高材料的特定性能^[38]。其中,石墨烯在磁性水凝胶的制备中极具研究意义。

Sahraei 等^[39]以黄芪胶、聚乙烯醇和氧化石墨烯(GO)为原料,采用凝胶法在硼酸、丙酮混合溶液中制备了新型磁性水凝胶吸附材料,具有良好的吸附性能,可有效去除水溶液中的染料离子,结晶紫、刚果红以及重金属离子 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} , 最大吸附量分别为 81.8、69.7、94.0、101.7 mg/g。吸附行为符合 Langmuir 吸附等温模型。另外,材料在重复使用 3 个循环后没有明显的活性损失。

Yao 等^[40]采用 N-乙烯基咪唑与丙烯酸原位共聚法将乙二胺修饰的氧化石墨烯复合到磁性水凝胶(MGO/PNA)中。MGO/PNA 水凝胶对甲基紫、亚甲基蓝、柠檬黄和紫红花的最大吸附容量分别为 609.8、625.0、613.5、609.8 mg/g。MGO/PNA 水凝胶在经过 5 次吸附-脱附循环后仍能保持良好的吸附效果。在水凝胶中加入 Fe_3O_4 不仅赋予了 MGO/PNA 水凝胶易回收的特性,而且在一定程度上提高了水凝胶的吸附能力。

另外,Halouane 等^[41]以化学共沉淀法合成结合磁性纳米颗粒的纤维素,并与氧化石墨烯一起填入聚乙二醇二甲基丙烯酸酯基水凝胶中,制备了磁性氧化石墨烯负载水凝胶,能够有效去除染料,如亚甲基蓝,吸附容量达 111.9 mg/g。

2.3 其他类复合磁性水凝胶吸附材料

除常用的基质材料外,还有一些基质材料可以获得性能稳定、高效的磁性水凝胶材料。例如,Li 等^[42]采用磁性阳离子水凝胶 MCH 吸附 NO_3^- ,其吸附量与 pH 值有较大关系,在 pH 5.2~8.8 时达到最佳吸附,最大吸附量达 95.9 mg/g。

Dong 等^[43]制备了分别载有 La^{3+} 、 $\text{La}(\text{OH})_3$ -W、 $\text{La}(\text{OH})_3$ -EW 的阳离子磁性水凝胶复合材料,并探究了镧的种类对磷酸盐吸附的影响。由于配体交换、静电相互作用和 Lewis 酸碱相互作用,在 pH 4.5~11 之间时对磷酸盐吸附能力保持较高水平且相对稳定,最大吸附容量均超过 69.2 mg/g。此外在较宽的 pH 范围内,以及存在竞争性阴离子(包括 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 HCO_3^- 和 SiO_4^{4-})的情况下,对磷酸盐均有较强的吸附。使用后的 MCH- $\text{La}(\text{OH})_3$ -EW 水凝胶可通过 NaOH-NaCl 解吸剂再生,且在 5 次吸附-脱附循环过程中对磷酸盐的吸附量仍保持在 72% 以上。

3 磁性水凝胶在生物医学中的应用

磁性水凝胶材料除吸附作用外,因具有优良的磁学性能及生物相容性,还可作为新一代的药物载体,实现磁响应、磁靶向及磁热疗等功能^[44,45]。

3.1 用于药物释放的磁性水凝胶材料

Liu 等^[46]研究了近铁磁共振频率的电磁辐射的潜在用途,发现粒子内的能量耗散导致凝胶加热,从而导致热响应凝胶中的体积变化。响应取决于粒子浓度及其化学性质,并可通过改变电磁信号的频率、暴露时间或外部磁场来调节。除此之外,也可以调控直流/交流磁场来实现药物释放。在聚乙烯醇磁性凝胶中,当施加直流磁场时,产生纳米颗粒以端到端的结构组装,从而减小了凝胶网络中的孔径并限制了药物的释放(图 4a、4b)。关闭磁场时会导致药物突然释放,并在一段时间后恢复正常的药物扩散。交流磁场诱导的药物释放机制与直流磁场不同,主要依赖交流磁场产生的热量加速药物释放(图 4c)。

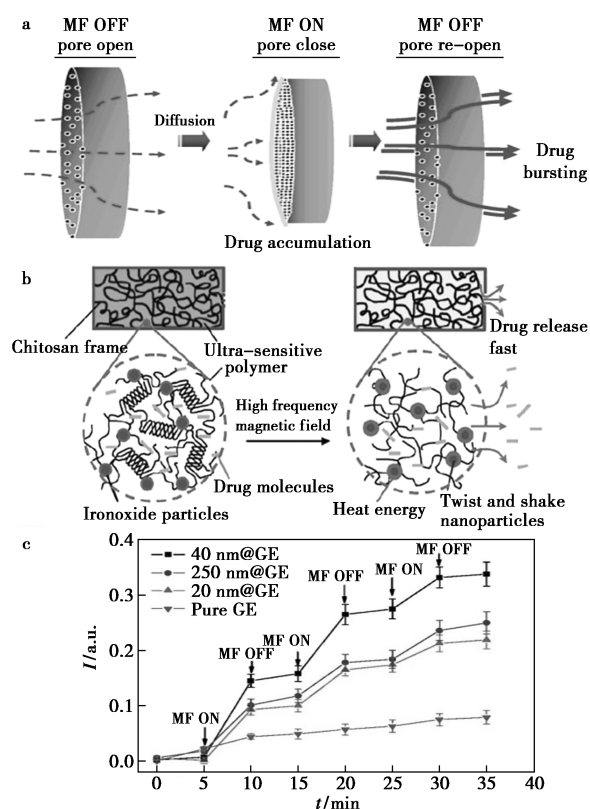


图 4 a.b.交流磁场和直流磁场的药物释放机制示意图;c.交流磁场下磁性凝胶的累积药物释放曲线^[2]

Fig.4 a.b.Schematic representation of the drug release mechanism through DC and AC magnetic field; c.Cumulative drug release profile of magnetic gels with AC magnetic field exposure cycles^[2]

Hu 等^[47]也发现处于交流磁场时,基于壳聚糖的磁性凝胶会表现出爆发性药物释放,而在没有磁场的情况下,磁性凝胶的释放速率低于纯水凝胶,这表明纳米颗粒可以作为药物扩散的物理“开关”。此外,由于负载药物的消耗,在每个直流循环后,突发药物释放量逐渐减少。在脱氢肽基磁性水凝胶释放姜黄素时,也观察到在没有热疗效应的情况下药物释放受阻,与常用的磁热疗类似,凝胶在波长超过 600 nm 的照射下显示出药物释放的增强^[48]。

Wang 等^[49]使用原位复合法制备了强磁性壳聚糖水凝胶,该方法制备的水凝胶材料在低频交变磁场下将运载的药物由被动释放切换为脉动释放。原位复合方法避免了磁性纳米粒子在水凝胶中的团聚,同时使其强度和弹性模量分别提高了

416%、265%。对这种水凝胶材料施加各 15 min 持续时间的开关交替低频交变磁场,药物迅速释放并呈现 Z 字形脉冲释放行为。强磁性壳聚糖水凝胶的累积释放度和局部释放度分别提高了 67.2%、31.9%。

如图 5 所示,使用菠萝皮羧甲基纤维素、再生纳米纤维素和聚乙烯醇为基质材料,采用原位法掺入 Fe_3O_4 制备 pH/磁敏水凝胶。再生纳米纤维素可提高水凝胶的成膜和包封效率。使用这种方法所制备的水凝胶运载柚苷,发现柚苷可以从水凝胶中逐渐释放出来,并遵循 Fickian 扩散模型。所制备的水凝胶具有良好的生物相容性和磁灵敏度,可作为药物运载的候选材料,并且此研究为纳米纤维素的生产提供了一种相对绿色的方法^[50]。

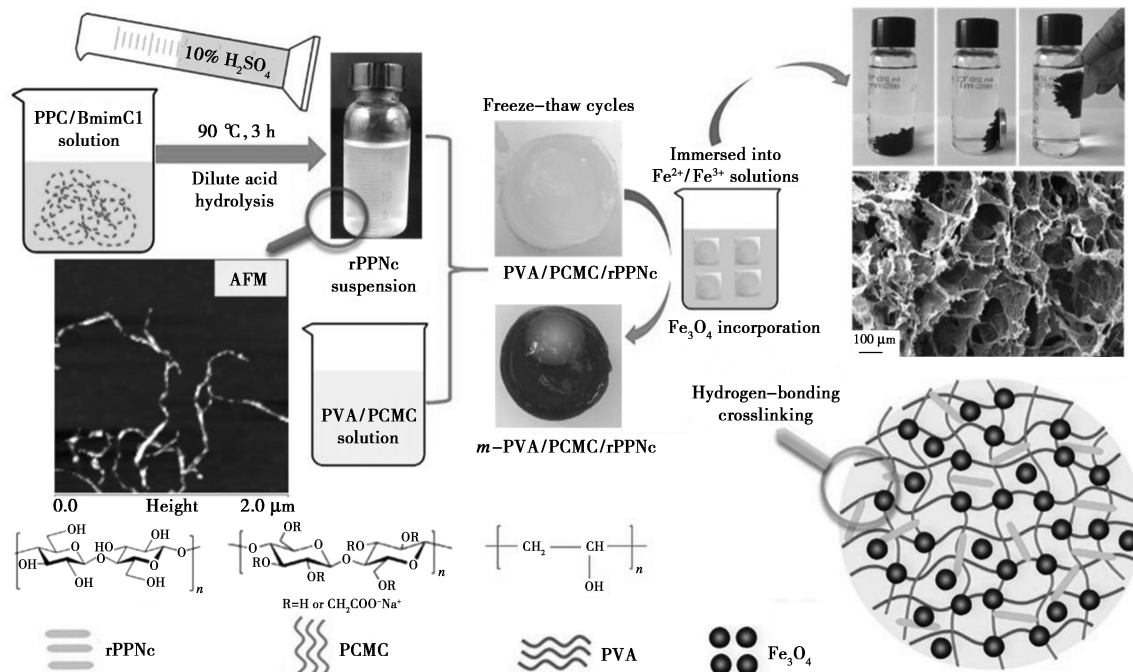


图 5 水凝胶的制备过程、形貌和磁响应示意图^[50]

Fig.5 Schematic illustration of the preparation process, morphology and magnetic response of hydrogel^[50]

Jeddi 等^[51]通过纳米晶纤维素的羧甲基化反应合成了纳米羧甲基纤维素。将该纳米材料磁化后,应用于双分子层海藻酸/壳聚糖水凝胶中,开发出环保、智能、磁敏感的水凝胶。磁性纳米羧甲基纤维素提高了双分子层海藻酸/壳聚糖水凝胶的载药能力和溶胀性能,同时也调节了水凝胶的释药行为。

磁性的引入改善了水凝胶在药物释放的应用,例如通过对直流和交流磁场的磁响应来实现疏水性药物均匀释放,通过不同的物理和化学相

互作用以增强负载药物的结合,以解决亲水性药物的爆发性释放。

3.2 用于磁热疗的磁性水凝胶材料

Wu 等^[52]用聚乙二醇和 α -环糊精配位制备了一种磁性纳米酶水凝胶 (MHZ),将这种纳米酶用于肿瘤磁热疗的催化反应生成活性氧簇,从而增强肿瘤氧化应激水平。由于剪切稀化以及磁热相变特性,MHZ 可以注入并扩散到肿瘤组织中, Fe_3O_4 产生的磁热首先为肿瘤提供 42 °C 的热疗。 Fe_3O_4 纳米酶在肿瘤的酸性环境中发挥类过氧

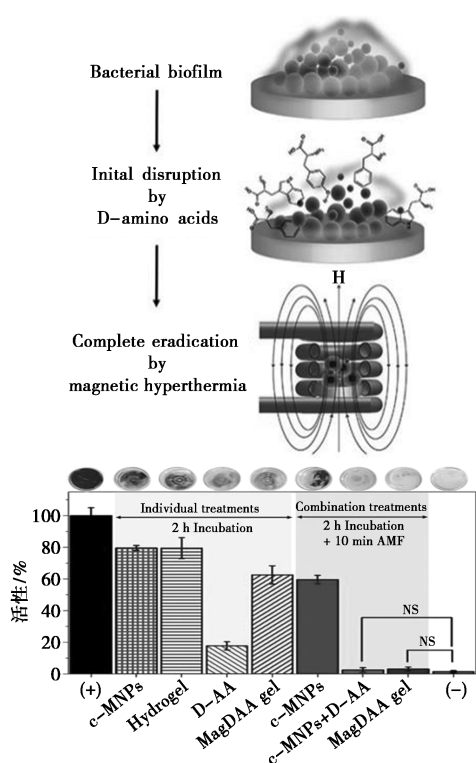


图 6 热响应聚乙二醇/壳聚糖纳米复合材料制备与其生物膜破坏活性^[53]

Fig.6 Preparation of thermally responsive polyethylene glycol/chitosan nanocomposites and their biofilm disrupting activity^[53]

化物质,通过 Fenton 反应生成羟基自由基。热疗促进 Fe_3O_4 纳米酶的酶活性产生更多羟基自由基,羟基自由基可进一步破坏热疗中肿瘤细胞高度表达的保护性蛋白,增强热疗的治疗效果。这

种单一磁性纳米颗粒具有热疗和催化治疗双重功能,协同治疗肿瘤,克服肿瘤细胞对诱导热应激的抵抗,而不会在 42 °C 热疗对正常组织造成严重的副作用。

另外,Abenojar 等^[53]研究开发了一种含 *d*-氨基酸和氧化铁纳米颗粒的热响应聚乙二醇/壳聚糖纳米复合材料(图 6),这种材料可在生理温度下从液态转化为凝胶状态。该材料具有磁响应特性,可用于 *d*-氨基酸的磁靶向释放和感染部位的磁场驱动热处理。

3.3 用于组织工程的磁性水凝胶材料

良好的生物相容性,使得磁性水凝胶在组织工程方面显示出巨大潜力。通过简单地将双膦酸盐(HA)改性的透明质酸(BP)聚合物溶液和 Fe_3O_4 纳米粒子分散体混合形成一种新型磁性水凝胶($\text{HA-BP} \cdot \text{Fe}_3\text{O}_4$),其中水凝胶网络由 BP 基团和颗粒表面的铁原子交联(图 7)。 Fe-BP 配位化学提供了一个动态网络,其特点是具有自愈性、剪切稀化性和可平滑注射的特性。此外, $\text{HA-BP} \cdot \text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性水凝胶在交变磁场下表现出发热特性,动物实验证实了其较好的生物相容性,展现了水凝胶在组织再生和抗癌治疗方面的应用潜力^[54]。

以聚乙烯醇、纳米羟基磷灰石和磁性纳米颗粒 Fe_2O_3 为原料,采用超声分散法和冻融交联成型法制备磁性纳米复合水凝胶具有良好的力学性能,保障组织工程的相应力学要求。 Fe_2O_3 的加入可促进骨髓间充质干细胞的生长,并且明显刺激了软骨细胞相关基因的表达^[55]。

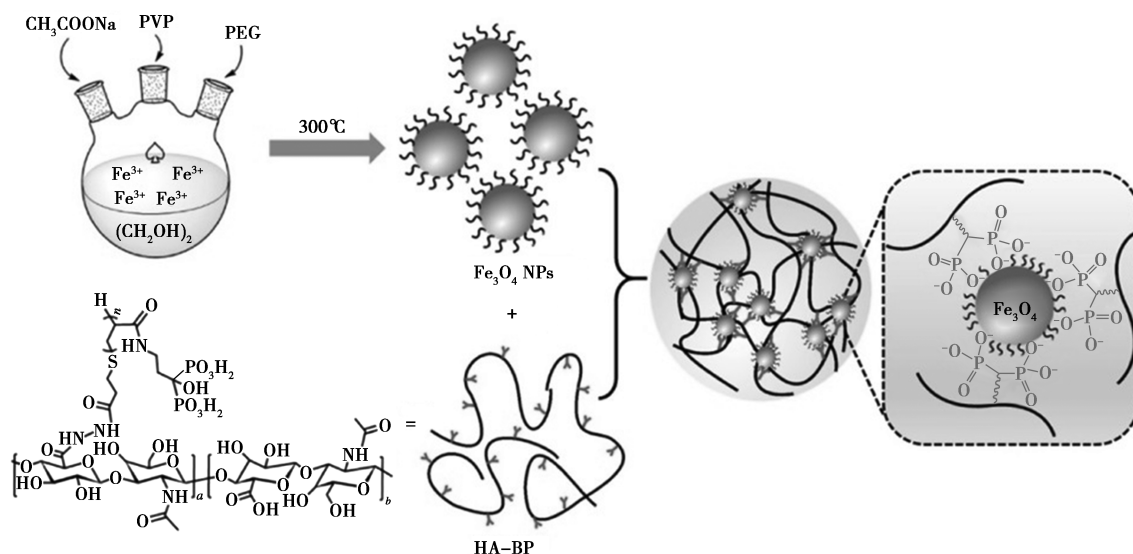


图 7 $\text{HA-BP} \cdot \text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性水凝胶合成示意图^[54]

Fig.7 Schematic for $\text{HA-BP} \cdot \text{Fe}_3\text{O}_4$ magnetic hydrogel formation^[54]

Shin 等^[56]利用静电纺丝技术,采用聚乙烯醇作为聚合物基质制备了具有不同尺寸铁蛋白团簇的生物相容性纳米纤维水凝胶。通过热量控制主体 PVA 水凝胶和蛋白之间的相互作用,以改变铁蛋白簇的大小和浓度,发现铁蛋白的聚集过程与 PVA/铁蛋白纳米纤维的超顺磁性和磁共振成像(MRI)对比度的变化有关。具有不同空间分布的铁蛋白纳米颗粒的 PVA/铁蛋白纳米纤维水凝胶可用作基于 MRI 无创检测细胞培养支架和人工肌肉。

4 磁性水凝胶在其他领域的应用

磁性聚合物颗粒也广泛应用于定位分离到诊断和成像等领域。Bong 等^[57]研究使用新型光刻技术生产带有图形码区、探针区和磁尾区的磁性水凝胶微粒子。这种方法制备的各向异性多功能磁性聚合物粒子为先前合成的磁性粒子增强版本,可用于对核酸的快速多路检测。新加入的磁区在弱均匀磁场存在下获得偶极矩,允许粒子沿所施加的磁场方向排列。这种磁性材料具备在生物分析过程中有效定位和分离条码微粒子而不破坏检测的能力。

此外,Fe₃O₄ 纳米颗粒被认为是 Fenton 工艺的良好催化剂,该工艺在水净化方面显示了巨大的潜力。以沉淀法制备的具有开孔结构的磁性大孔水凝胶微球作为 Fenton 反应催化剂,在水中分解甲基橙分解率可达 99.6%。因此,多孔水凝胶颗粒可作为催化 Fenton 反应分解水中有机污染物的高效催化剂^[58]。

5 结论

磁性水凝胶在水处理中具有良好应用前景,其优异的选择吸附性,极大的提升了材料的吸附性能,对富集不同物质的废水可以实行专门化处理。此外,磁性水凝胶吸附材料易回收,重复利用率高。这些优点可以降低废水处理成本,提高经济效益。磁性水凝胶吸附剂的实际应用仍处于探索阶段。因此,有必要在以下方面进行更多的研究:(1)增强水凝胶吸附剂的再生能力,例如,大多数水凝胶的吸附能力在 5 个吸附-解吸循环后会显著降低;(2)拓宽磁性水凝胶应用范围,例如放射性和稀土金属离子的分离;(3)制造具有快速吸附速率的新型智能水凝胶,开发在不同环境条件下具有特定离子识别特性的热响应和 pH 响

应智能水凝胶;(4)开发具有高机械强度的工程磁性水凝胶,并易于与水分离以用于废水处理;(5)采用原位技术在实际废水中制备水凝胶,金属离子的去除与实际废水中磁性水凝胶吸附剂的形成同时发生,从而不需要传统的吸附剂合成步骤。随着磁性水凝胶的深入研究,这将为磁性吸附剂在实际废水处理中的应用创造可能性。此外,磁性水凝胶的磁响应行为以及良好的生物相容性在药物的磁靶向释放、磁热疗等生物医学领域中已得到初步运用。本文提到的一种同时具备药物运输、磁热疗的凝胶材料,预示同种多效的磁性水凝胶材料可以进一步得到发展。磁性水凝胶材料在组织工程、细胞分离与培养、固定化酶等领域也有广泛应用。现今主要的问题之一是如何简化磁性水凝胶材料的制备工艺以期达到量产,降低生产成本,并将磁性水凝胶材料应用到更多领域。

参考文献:

- [1] QASEM N A A, MOHAMMED R H, LAVAL D U. Removal of heavy metal ions from wastewater: A comprehensive and critical review [J]. *Npj. Clean Water*, 2021, **4**(1): 36.
- [2] VELOSO S R S, ANDRADE R G D, CASTANHEIRA E M S. Review on the advancements of magnetic gels: Towards multifunctional magnetic liposome-hydrogel composites for biomedical applications [J]. *Adv. Colloid. Interface*, 2021, **288**: 102 351.
- [3] ZHANG J, HUANG Q, DU J. Recent advances in magnetic hydrogels [J]. *Polym. Int.*, 2016, **65**(12): 1 365-1 372.
- [4] MIKHNEVICH E A, CHEBOTKOVA P D, SAFRONOV A P, et al. Influence of uniform magnetic field on elastic modulus in polyacrylamide ferrogels with embedded nickel nanoparticles [J]. *J. Phys. Conf. Ser.*, 2019, **1 389**(1): 12 059.
- [5] ROEDER L, RECKENTHALER M, BELKOURA L, et al. Covalent ferrohydrogels based on elongated particulate cross-linkers [J]. *Macromolecules*, 2014, **47**(20): 7 200-7 207.
- [6] SANG J, WU R, GUO P, et al. Affinity-tuned peroxidase-like activity of hydrogel-supported Fe₃O₄ nanozyme through alteration of crosslinking concentration [J]. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2016, **133**: 43 065.
- [7] WITT M U, HINRICHS S, MÖLLER N, et al. Distribution of CoFe₂O₄ nanoparticles inside PNIPAM-based microgels of different cross-linker distributions [J]. *J. Phys. Chem. B*, 2019, **123**(10): 2 405-2 413.
- [8] ZHANG K, LUO X, YANG L, et al. Progress toward hy-

- drogels in removing heavy metals from water: Problems and solutions-a review [J]. *ACS ES&T Water*, 2021, **1**(5):1 098-1 116.
- [9] ZHOU W, DENG J, QIN Z, et al. Construction of MoS₂ nanoarrays and MoO₃ nanobelts: Two efficient adsorbents for removal of Pb(II), Au(III) and methylene Blue [J]. *J. Environ. Sci.*, 2022, **111**:38-50.
- [10] 周国萍, 康成, 王士凡, 等. 纳米复合高分子重金属离子吸附材料的研究进展 [J]. *水处理技术*, 2021, **47**(8):26-31.
- [11] 吴新华, 邓冰锋, 邵艳群, 等. 磁性水凝胶的制备与应用 [J]. *材料开发与应用*, 2018, **33**(1):100-104.
- [12] 张浩然, 王士凡, 朱文友, 等. 基于丙烯酸-丙烯酰胺-对苯乙烯磺酸钠的新型磁性水凝胶吸附重金属的研究 [J]. *分析试验室*, 2022, **41**(3):273-277.
- [13] GAO H, LV S, DOU J, et al. The efficient adsorption removal of Cr(VI) by using Fe₃O₄ nanoparticles hybridized with carbonaceous materials [J]. *RSC Adv.*, 2015, **5**(74):60 033-60 040.
- [14] CAO Y, HUANG J, PENG X, et al. Poly(vinylidene fluoride) derived fluorine-doped magnetic carbon nanoadsorbents for enhanced chromium removal [J]. *Carbon*, 2017, **115**:503-514.
- [15] LASHEEN M R, EL-SHERIF I Y, EL-WAKEEL S T, et al. Heavy metals removal from aqueous solution using magnetite Dowex 50WX4 resin nanocomposite [J]. *JMES*, 2017, **8**(2):503-511.
- [16] SHEKARI H, SAYADI M H, REZAEI M R, et al. Synthesis of nickel ferrite/titanium oxide magnetic nanocomposite and its use to remove hexavalent chromium from aqueous solutions [J]. *Surf. Inter.*, 2017, **8**:199-205.
- [17] AL NAFIEY A, ADDAD A, SIEBER B, et al. Reduced graphene oxide decorated with Co₃O₄ nanoparticles (rgo-Co₃O₄) nanocomposite: A reusable catalyst for highly efficient reduction of 4-nitrophenol, and Cr(VI) and dye removal from aqueous solutions [J]. *Chem. Eng. J.*, 2017, **322**:375-384.
- [18] GONG Y, GAI L, TANG J, et al. Reduction of Cr(VI) in simulated groundwater by FeS-coated iron magnetic nanoparticles [J]. *Sci. Total. Environ.*, 2017, **595**:743-751.
- [19] SRIVASTAVA S, AGRAWAL S B, MONDAL M K. Synthesis, characterization and application of Lagerstroemia speciosa embedded magnetic nanoparticle for Cr(VI) adsorption from aqueous solution [J]. *J. Environ. Sci.*, 2017, **55**:283-293.
- [20] SHAKERIAN K F, ESMAEILI H. Synthesis of cao/Fe₃O₄ magnetic composite for the removal of Pb(II) and Co(II) from synthetic wastewater [J]. *J. Serb. Chem. Soc.*, 2018, **83**(2):237-249.
- [21] FAN C, LI K, HE Y, et al. Evaluation of magnetic chitosan beads for adsorption of heavy metal ions [J]. *Sci. Total. Environ.*, 2018, **627**:1 396-1 403.
- [22] LIU X, LIU M, ZHANG L. Co-adsorption and sequential adsorption of the co-existence four heavy metal ions and three fluoroquinolones on the functionalized ferromagnetic 3D NiFe₂O₄ porous hollow microsphere [J]. *J. Colloid. Interf. Sci.*, 2018, **511**:135-144.
- [23] HUANG X, YANG J, WANG J, et al. Design and synthesis of core-shell Fe₃O₄@ PTMT composite magnetic microspheres for adsorption of heavy metals from high salinity wastewater [J]. *Chemosphere*, 2018, **206**:513-521.
- [24] YI X, HE J, GUO Y, et al. Encapsulating Fe₃O₄ into calcium alginate coated chitosan hydrochloride hydrogel beads for removal of Cu(II) and U(VI) from aqueous solutions [J]. *Ecotox. Environ. Safe*, 2018, **147**:699-707.
- [25] LIN Y J, CHEN J J, CAO W Z, et al. Novel materials for Cr(VI) adsorption by magnetic titanium nanotubes coated phosphorene [J]. *J. Mol. Liq.*, 2019, **287**:110 826.
- [26] ZHANG M, MA X, LI J, et al. Enhanced removal of As(III) and As(V) from aqueous solution using ionic liquid-modified magnetic graphene oxide [J]. *Chemosphere*, 2019, **234**:196-203.
- [27] HOU T, YAN L, LI J, et al. Adsorption performance and mechanistic study of heavy metals by facile synthesized magnetic layered double oxide/carbon composite from spent adsorbent [J]. *Chem. Eng. J.*, 2020, **384**:123 331.
- [28] FAROOQ M U, JALEES M I. Application of magnetic graphene oxide for water purification: Heavy metals removal and disinfection [J]. *J. Water Process Eng.*, 2020, **33**:101 044.
- [29] HUANG Y, HU C, AN Y, et al. Magnetic phosphorylated chitosan composite as a novel adsorbent for highly effective and selective capture of lead from aqueous solution [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2021, **405**:124 195.
- [30] WANG S, LIU Y, YANG A, et al. Xanthate-modified magnetic Fe₃O₄@ SiO₂-based polyvinyl alcohol/chitosan composite material for efficient removal of heavy metal ions from water [J]. *Polymers*, 2022, **14**(6):1 107.
- [31] TAO H C, LI S, ZHANG L J, et al. Magnetic chitosan/sodium alginate gel bead as a novel composite adsorbent for Cu(II) removal from aqueous solution [J]. *Environ. Geochem. Hlth.*, 2019, **41**:297-308.
- [32] KAMEL S, EL-GENDY AHMED A, HASSAN MOHAMED A, et al. Carboxymethyl cellulose-hydrogel embedded with modified magnetite nanoparticles and porous carbon: Effective environmental adsorbent [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2020, **242**:116 402.
- [33] JV X, ZHAO X, GE H, et al. Fabrication of a magnetic poly(aspartic acid)-poly(acrylic acid) hydrogel: Application for the adsorptive removal of organic dyes from aqueous solution [J]. *J. Chem. Eng. Data*, 2019, **64**(3):1 228-1 236.

- [34] PU S Y, MA H, ZINCHENKO A, et al. Novel highly porous magnetic hydrogel beads composed of chitosan and sodium citrate: An effective adsorbent for the removal of heavy metals from aqueous solutions [J]. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2017, **24**(19): 16 520-16 530.
- [35] ZHANG H, OMER A M, HU Z H, et al. Fabrication of magnetic bentonite/carboxymethyl chitosan/sodium alginate hydrogel beads for Cu(II) adsorption [J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, **135**: 490-500.
- [36] SANCHEZ L M, SHUTTLEWORTH P S, WAIMAN C, et al. Physically-crosslinked polyvinyl alcohol composite hydrogels containing clays, carbonaceous materials and magnetic nanoparticles as fillers [J]. *J. Environ. Chem. Eng.*, 2020, **8**(3): 103 795.
- [37] SARA M A A, MAHDAVINIA G R. Polyvinyl alcohol-based nanocomposite hydrogels containing magnetic lapomite RD to remove cadmium [J]. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2018, **25**(15): 14 977-14 988.
- [38] BERNAL V, GIRALDO L, MORENO-PIRAJÁN J C. Adsorption of pharmaceutical aromatic pollutants on heat-treated activated carbons: Effect of carbonaceous structure and the adsorbent-adsorbate interactions [J]. *ACS Omega*, 2020, **5**(25): 15 247-15 256.
- [39] SAHRAEI R, POUR Z S, GHAEMY M. Novel magnetic bio-sorbent hydrogel beads based on modified gum tragacanth/graphene oxide: Removal of heavy metals and dyes from water [J]. *J. Clean. Prod.*, 2017, **142**(4): 2 973-2 984.
- [40] YAO G H, BI W D, LIU H. pH-responsive magnetic graphene oxide/poly(NVI-co-AA) hydrogel as an easily recyclable adsorbent for cationic and anionic dyes [J]. *Colloid. Surface A*, 2020, **588**(C): 124 393.
- [41] HALOUANE F, OZ Y, MEZIANE D, et al. Magnetic reduced graphene oxide loaded hydrogels: Highly versatile and efficient adsorbents for dyes and selective Cr(VI) ions removal [J]. *J. Colloid. Interf. Sci.*, 2017, **507**: 360-369.
- [42] LI J Y, DONG S X, WANG Y L, et al. Nitrate removal from aqueous solutions by magnetic cationic hydrogel: Effect of electrostatic adsorption and mechanism [J]. *J. Environ. Sci.*, 2020, **91**(5): 177-188.
- [43] DONG S X, WANG Y L, ZHAO Y W, et al. La³⁺/La(OH)₃ loaded magnetic cationic hydrogel composites for phosphate removal: Effect of lanthanum species and mechanistic study [J]. *Water Res.*, 2017, **126**: 433-441.
- [44] 张浩然, 王士凡, 朱文友, 等. 抗菌水凝胶在生物医学领域的研究进展 [J]. *化学试剂*, 2021, **43**(5): 622-631.
- [45] LIAO J, HUANG H. Review on magnetic natural polymer constructed hydrogels as vehicles for drug delivery [J]. *Biomacromolecules*, 2020, **21**(7): 2 574-2 594.
- [46] LIU T Y, HU S H, LIU T Y, et al. Magnetic-sensitive behavior of intelligent ferrogels for controlled release of drug [J]. *Langmuir*, 2006, **22**(14): 5 974-5 978.
- [47] HU S H, LIU T Y, LIU D M, et al. Controlled pulsatile drug release from a ferrogel by a high-frequency magnetic field [J]. *Macromolecules*, 2007, **40**(19): 6 786-6 788.
- [48] VELOSO S R S, MARTINS J A, HILLIOU L, et al. Dehydropeptide-based plasmonic magnetogels: A supramolecular composite nanosystem for multimodal cancer therapy [J]. *J. Mater. Chem. B*, 2020, **8**(1): 45-64.
- [49] WANG Y, LI B, XU F, et al. Tough magnetic chitosan hydrogel nanocomposites for remotely stimulated drug release [J]. *Biomacromolecules*, 2018, **19**(8): 3 351-3 360.
- [50] DAI H J, ZHANG H, MA L, et al. Green pH/magnetic sensitive hydrogels based on pineapple peel cellulose and polyvinyl alcohol: Synthesis, characterization and naringin prolonged release [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2019, **209**: 51-61.
- [51] JEDDI M K, MAHKAM M. Magnetic nano carboxymethyl cellulose-alginate/chitosan hydrogel beads as biodegradable devices for controlled drug delivery [J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, **135**: 829-838.
- [52] WU H, LIU L, SONG L, et al. Enhanced tumor synergistic therapy by injectable magnetic hydrogel mediated generation of hyperthermia and highly toxic reactive oxygen species [J]. *ACS Nano*, 2019, **13**(12): 14 013-14 023.
- [53] ABENOJAR E C, WICKRAMASINGHE S, JU M, et al. Magnetic glycol chitin-based hydrogel nanocomposite for combined thermal and D-amino-acid-assisted biofilm disruption [J]. *ACS Infect. Dis.*, 2018, **4**(8): 1 246-1 256.
- [54] SHI L, ZENG Y, ZHAO Y, et al. Biocompatible injectable magnetic hydrogel formed by dynamic coordination network [J]. *ACS Appl. Mater. Inter.*, 2019, **11**(49): 46 233-46 240.
- [55] HUANG J, LIANG Y, JIA Z F, et al. Development of magnetic nanocomposite hydrogel with potential cartilage tissue engineering [J]. *ACS Omega*, 2018, **3**(6): 6 182-6 189.
- [56] SHIN M K, KIM S I, KIM S J, et al. Controlled magnetic nanofiber hydrogels by clustering ferritin [J]. *Langmuir*, 2008, **24**(21): 12 107-12 111.
- [57] BONG K W, CHAPIN S C, DOYLE P S. Magnetic bar-coded hydrogel microparticles for multiplexed detection [J]. *Langmuir*, 2010, **26**(11): 8 008-8 014.
- [58] ZHANG S, FAN X, ZHANG F, et al. Synthesis of emulsion-templated magnetic porous hydrogel beads and their application for catalyst of fenton reaction [J]. *Langmuir*, 2018, **34**(12): 3 669-3 677.

香豆素类杂环化合物的抗微生物活性研究进展

彭莘媚*, 王江河, 贺银菊, 李云萍, 陈汉生, 慈成刚

(黔南民族师范学院 化学化工学院, 贵州 都匀 558000)

摘要:香豆素母核反应活性高, 结构修饰性强, 易引入多种官能团实现结构多样化, 在医药、农药、香料、材料等多种领域具有较高的应用价值。杂环修饰的香豆素类化合物具有广泛的生物活性、多靶点的作用机制、更强的选择性及更低的毒性等特点, 在医药领域的研究一直是研究者们关注的热点。随着微生物耐药性的加剧, 寻找有效且不易引起菌株产生耐药性的抗感染药物迫在眉睫。综述了近 5 年来香豆素类杂环化合物在抗细菌、抗结核及抗真菌 3 个方面的生物活性研究概况, 以期为相关研究提供参考。

关键词:香豆素; 杂环化合物; 抗细菌; 抗结核; 抗真菌

中图分类号:R914.4 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2023)02-0011-11

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0632

Recent Progress on the Antimicrobial Activities of Coumarin-derived Heterocyclic Compounds PENG Xin-mei*, WANG Jiang-he, HE Yin-ju, LI Yun-ping, CHEN Han-sheng, CI Cheng-gang (School of Chemistry and Chemical Engineering, Qiannan Normal University for Nationalities, Duyun 558000, China)

Abstract: Coumarin core has high chemical reactivity. It is much easy to be introduced into a variety of functional groups to achieve its derivatives with different applications, which are widely used in medicine, pesticides, spices, materials and other fields. Coumarins modified by heterocycles possess diverse biological activities, multi-targets mechanism, stronger selectivity and lower toxicity. These advantages make them become the focus for researchers in medicine field. With the rapid increase of microbial resistance, it is urgent to search for effective anti-infective drugs with no or little resistance. The present review aimed to highlight the current progress on the antibacterial, antituberculous and antifungal activities of coumarin heterocyclic compounds in the past five years. It is hopeful to provide reference for future exploration.

Key words: coumarin; heterocyclic compound; antibacterial; antituberculous; antifungal

香豆素存在于植物、动物及微生物中, 具有较高的生物活性, 在制药工业和农业中占据着重要地位^[1]。尽管香豆素类抗菌剂如新生霉素、氯新生霉素等对革兰氏阴性菌活性较弱、水溶性较差或副作用较大, 临床上未见大量应用, 但香豆素骨架是苯环与内酯环稠合的平面芳香环, 具有广泛的结构修饰性, 包括对香豆素母核进行羟基化、烷氧基化、烷基化、磷酸化、硝化、卤化、芳甲酰化、磺酰化、亚磺酰化和芳基化等修饰及开环和闭环等模式的变化, 使其在合成药物化学领域仍然为一种独特的结构, 相关研究甚多^[2]。

在药物设计中, 两种或多种功能性结构杂合而成的分子可能具有更好的生物活性、更强的选择性、不同或多靶点的作用机制和/或更少的副作用等优势。因此, 在研发具有潜在治疗价值的新药方面, 杂合是一种令人鼓舞的策略。杂环化合物如咪唑、三唑、吡唑、噻唑等易通过氢键、 π - π 堆积和配位键等化学键与生物活性位点相结合, 从而改善药物分子的理化性质和药代动力学特性,

提高生物活性和生物利用度及靶点选择性, 在抗微生物领域得到广泛应用^[3]。当不同的杂环与香豆素杂合时, 在靶体系中得到两种环的协同作用, 产生具有突出生物活性的新型杂化分子^[4], 如香豆素杂合的噻唑、吡唑、咪唑、三唑等具有较好的生物活性。本文阐述香豆素类杂环化合物在

收稿日期: 2022-08-13; 网络首发日期: 2022-11-08

基金项目: 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2018]431); 黔南民族师范学院校级项目(qnsyre-201613, qnsy2018014, Qnsyk201603, QNSYCYJD2018005); 国家自然科学基金资助项目(22163007); 贵州省自然科学基金项目([2020]1Y050); 大学生创新创业训练计划资助项目(2018521328)。

作者简介: 彭莘媚(1987-), 女, 四川广安人, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然产物导向的新药研发, E-mail: pxm325@163.com。

引用本文: 彭莘媚, 王江河, 贺银菊, 等. 香豆素类杂环化合物的抗微生物活性研究进展[J]. 化学试剂, 2023, 45(2): 11-21。

抗细菌、抗结核和抗真菌方面的研究进展,期望为后续的相关研究提供参考。

1 香豆素杂环化合物的抗菌活性

致病性细菌严重影响人类健康,加之耐药性问题加剧,细菌感染仍是威胁人类健康的重要因素之一^[5]。自 2000 年以来,市场上出现了 5 种新型抗菌药物:利奈唑胺(2000)、达托霉素(2003)、瑞他帕林(2007)、非达霉素(2010)和贝达喹啉(2012)^[6],但这 5 种药物都只针对革兰氏阳性菌的感染,对革兰氏阴性菌感染的治疗非常有限,而 6 种主要耐药细菌中,有 4 种是革兰氏阴性菌。因此,寻找有效治疗细菌感染的新药仍是当务之急。

1.1 香豆素噻唑化合物的抗菌活性

噻唑是一种同时具有供电子(S)和吸电子(C=N)性的五元含氮含硫芳香杂环,在先导物的鉴定和优化中发挥了多种作用,包括作为药物载体和生物等排体以及作为连接基团等,对多种细菌都具有较好的抑制活性,成为抗菌新药研发的热点之一。

香豆素氨基噻唑(1a、1b)对大肠杆菌、产气肠杆菌、伤寒沙门菌及肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌具有显著的抑制作用(见表 1),最小抑菌浓度(MIC)分别均为 79、73 $\mu\text{mol/L}$ 。结构中溴的存在对抗菌活性的发挥具有重要作用,氨基氮单取代的抗菌效果强于双取代,香豆素核被供电子基团($-\text{OCH}_3$)取代后活性略有提高^[7]。基于香豆素环上取代基的疏水性增强,抗菌性能增强的事实,对化合物 1b 作进一步结构修饰得到强抗菌活性的双香豆素噻唑(2),尤其是含羟基的化合物 2b,其抗肺炎链球菌和抗金黄色葡萄球菌活性与链霉素和万古霉素相当且优于卡那霉素^[8]。

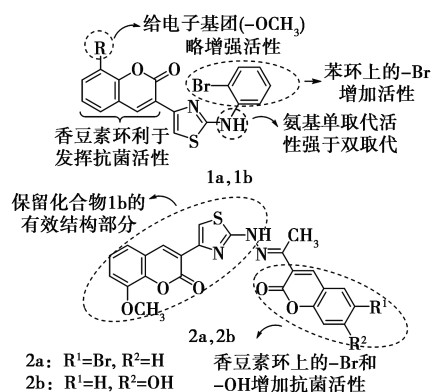


图 1 化合物 1 和 2 的化学结构式

Fig.1 Chemical structures of compounds 1 and 2

表 1 香豆素氨基噻唑(1a 和 1b)的抗菌活性

Tab.1 Antibacterial activity of coumarin-aminothiazoles (1a and 1b)

化合物 编号	R	MIC/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)				
		大肠 杆菌	产气肠 杆菌	伤寒 沙门菌	肺炎 链球菌	金黄色 葡萄球菌
1a	H	79	79	79	79	79
1b	OCH_3	73	73	73	73	73

香豆素噻唑酯(3)对金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌、大肠杆菌和沙门氏菌表现出较好的抑菌活性, MIC 为 0.05~8 $\mu\text{g/mL}$, 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和耐万古霉素金黄色葡萄球菌(VRSA)的抑制效果(MIC = 4 $\mu\text{g/mL}$)优于环丙沙星、新生霉素、氟哌酸和左氧氟沙星(MIC = 4~32 $\mu\text{g/mL}$)。该化合物可与 DNA 回旋酶结合, 体外酶半抑制浓度(IC_{50})为 0.13 $\mu\text{mol/L}$, 可作为有效的 DNA 回旋酶抑制剂进行深入研究^[9]。

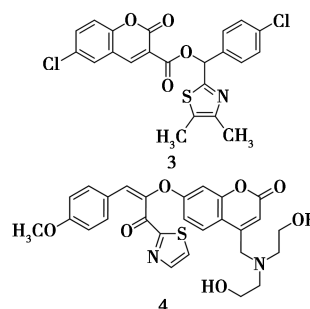


图 2 化合物 3 和 4 的化学结构式

Fig.2 Chemical structures of compounds 3 and 4

查尔酮具有突出的药用价值,如甘草查尔酮 A 对金黄色葡萄球菌和黄体微球菌表现出显著的抗菌能力。将查尔酮噻唑与香豆素杂合所得的香豆素噻唑(4, $\text{Clog}P=3.03$)对 MRSA 具有较强的选择性和显著的抑制活性(MIC = 0.004 mmol/L),比诺氟沙星(MIC = 0.025 mmol/L)强 6 倍,且未产生明显的细胞毒性和耐药性。化合物 4 可通过形成稳定的氢键与 DNA 回旋酶结合,可破坏 MRSA 细胞膜,也可插入 MRSA DNA 中抑制其复制和生长,值得作为潜在的抗 MRSA 药物而被深入开发^[10]。

噻唑烷酮由于氧、氮、硫的存在使其衍生物通常具有广泛的生物活性,噻唑烷酮修饰的香豆素(5)显示出中等至较好的抑制大肠杆菌、产气肠杆菌、伤寒沙门菌和肺炎链球菌生长活性, MIC 为 41~82 $\mu\text{g/mL}$ 。香豆素环上的溴取代使该化合物

的生物活性增加了 4~8 倍,进一步证明了香豆素噻唑中香豆素环上取代基的疏水性越强,抗菌性能越好的结论^[11]。

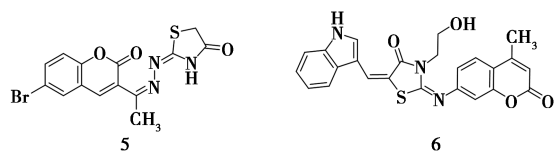


图 3 化合物 5 和 6 的化学结构式

Fig.3 Chemical structures of compounds 5 and 6

吡啶修饰的香豆素噻唑烷酮(6)具有良好的药代动力学特性和低细胞毒性,在浓度为 0.25~2 $\mu\text{g/mL}$ 时有较强的抑菌活性。该分子能破坏细菌细胞膜,导致细胞内物质泄漏和代谢抑制,有利于避免细菌产生耐药性;能介导过量活性氧积累,抑制谷胱甘肽活性,诱导脂质过氧化,从而阻碍细菌生长;能与 DNA 回旋酶 B 相结合,插入 DNA 碱基对,影响细菌 DNA 复制。此外,化合物 6 的 HOMO-LUMO 能隙较低,与靶点的作用更稳定,有利于更好地发挥抗菌活性^[12]。

噻唑烷二酮也是设计和开发新型生物活性药物的重要杂环片段,香豆素丙炔噻唑烷二酮(7)抗 MRSA 的 MIC 为 0.006 $\mu\text{mol/mL}$,明显优于诺氟沙星(MIC = 0.025 $\mu\text{mol/mL}$)。该化合物可与 DNA 回旋酶通过氢键结合,可与 MRSA DNA 形成稳定的超分子复合物阻碍 DNA 复制,且其杀菌速度快,对 LO2 肝细胞毒性低,对 MRSA 无明显耐药性^[13]。含甲氧基的香豆素噻唑烷二酮(8)对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的 MIC 为 0.25 $\mu\text{g/mL}$,对大肠杆菌和铜绿假单胞菌的 MIC 为 1 $\mu\text{g/mL}$,均强于环丙沙星(MIC = 2 $\mu\text{g/mL}$)。该化合物能与金黄色葡萄球菌二氢蝶酸合成酶的氨基酸残基 ASN103 形成氢键,可作为高效抗菌药物的先导化合物^[14]。

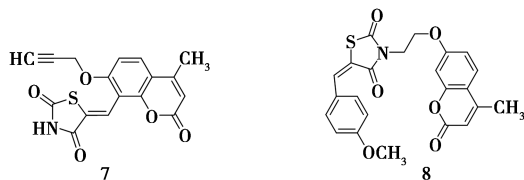


图 4 化合物 7 和 8 的化学结构式

Fig.4 Chemical structures of compounds 7 and 8

1.2 香豆素吡唑化合物的抗菌活性

吡唑环含有两个不饱和键和两个氮原子,—NH—结构既显碱性又显酸性,易形成氢键产生超分子,在医药领域发挥着重要作用,吡唑类化合

物在抗菌方面的研究时有报道。

香豆素 C-6 位含甲氧基的吡唑(9)对革兰氏阳性菌和阴性菌都有很强的抑制作用, MIC 为 1.56~6.25 $\mu\text{g/mL}$ 。该化合物能与金黄色葡萄球菌二氢蝶酸合成酶形成 6 个氢键^[15]。含缩氨基硫脲结构的香豆素吡唑(10, MIC = 12.5 $\mu\text{g/mL}$)具有强于环丙沙星的抗金黄色葡萄球菌活性(MIC = 25 $\mu\text{g/mL}$)、抗大肠杆菌活性(MIC = 25 $\mu\text{g/mL}$)及与其相当的抗铜绿假单胞菌活性(MIC = 12.5 $\mu\text{g/mL}$)^[16]。

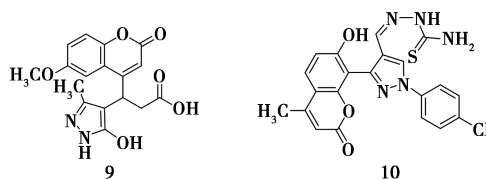


图 5 化合物 9 和 10 的化学结构式

Fig.5 Chemical structures of compounds 9 and 10

香豆素吡唑啉(11a、11b)是有效的 D-丙氨酸-D-丙氨酸连接酶(DdlB)抑制剂(见表 2), IC₅₀ 分别为 106、111 $\mu\text{mol/L}$ 。与 D-环丝氨酸相比,化合物 11a、11b 与 DdlB 具有更好的结合力,尤其是化合物 11b, G 值为 -9.086。二者对大肠杆菌 1411、大肠杆菌 SM1411 和金黄色葡萄球菌 NCIM-2901 的 MIC 分别为 14/16、14/18、32/40 $\mu\text{g/mL}$,与 D-环丝氨酸相当(MIC = 16~32 $\mu\text{g/mL}$)。结构中香豆素环对 DdlB 的抑制活性至关重要,吡唑啉环上的 NH 未被取代时抗菌活性

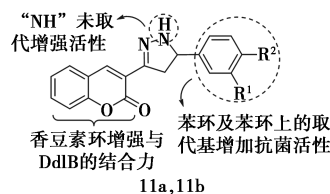


图 6 化合物 11 的化学结构式

Fig.6 Chemical structure of compound 11

表 2 香豆素吡唑啉(11a 和 11b)的抗菌活性

Tab.2 Antibacterial activity of coumarin-pyrazolines (11a and 11b)

化合物编号	R ¹	R ²	IC ₅₀ / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MIC / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)		
				大肠杆菌 1411	大肠杆菌 SM1411	金黄色葡萄球菌 NCIM-2901
11a	OCH ₃	OH	106	14	14	32
11b	H	CH ₃	111	16	18	40
D-环丝氨酸			276	16	16	32

更高,苯环上 4-位和 3-位的—OH、—CH₃ 和 —OCH₃ 可增强酶的抑制作用,这为进一步优化和修饰基于此结构的 DdIB 抑制剂提供了一个重要的起点^[17]。

1.3 香豆素咪唑化合物的抗细菌活性

咪唑,结构上与吡唑相似,是由 3 个碳原子和 2 个相间的氮原子组成的五元芳香杂环,具有极性和电离性,其衍生物在药物化学领域具有广阔的应用前景。在抗微生物方面,对大多数病原菌均有较强的抑制作用和良好的药代动力学特征。

烷氧基桥连的香豆素咪唑(12)是新型抗菌药物开发的重要靶点烯酰酰基载体蛋白还原酶 FabI 和 FabK 抑制剂(见表 3),其抗 FabI 的 IC₅₀ 为 111~158 μmol/L,抗 FabK 的 IC₅₀ 为 1.13~2.74 μmol/L。该类化合物不仅能有效抑制柱状黄杆菌、无乳链球菌和金黄色葡萄球菌的生长, MIC 为 2~16 μmol/L,与恩诺沙星相当(MIC 为 2~8 μmol/L),优于诺氟沙星(MIC 为 32~64 μmol/L),还具有杀柱状黄杆菌、无乳链球菌和金黄色葡萄球菌活性,最小杀菌浓度(MBC)在 8~128 μmol/L 之间。化合物 12 结构中 8 个碳原子的脂肪链最适宜,咪唑环对药效的提高必不可少,2-位甲基取代物 12b 的活性最高^[18]。该类抗菌香豆素咪唑可作为 FabI 和 FabK 抑制剂骨架,为开发更有效的 FabI 和 FabK 抗菌剂提供参考。咪

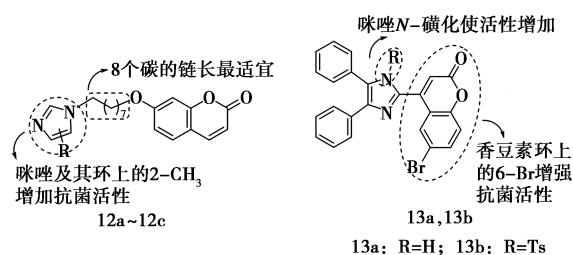


图 7 化合物 12 和 13 的化学结构式

Fig.7 Chemical structures of compounds 12 and 13

表 3 香豆素咪唑(12a~12c)的抗细菌活性

Tab.3 Antibacterial activity of coumarin-imidazoles (12a~12c)

化合物编号	R	IC ₅₀ / (μmol·L ⁻¹)		MIC 或 MBC / (μmol·L ⁻¹)		
		FabI	FabK	柱状黄杆菌	无乳链球菌	金黄色葡萄球菌
12a	H	158	2.74	4/8	8/16	16/128
12b	2-CH ₃	111	1.13	2/8	4/16	16/128
12c	4-CH ₃	116	1.75	4/8	4/16	8/64
恩诺沙星				2/2	8/16	2/4
诺氟沙星				32/128	64/128	32/64

唑直连的香豆素(13)被报道具有较强的抗菌活性,其中咪唑 N-磺化的化合物 13b 能显著抑制弯曲芽孢杆菌和假单胞菌属的生长, MIC 为 0.2 μg/mL,略高于咪唑氮未被修饰的化合物 13a (MIC=0.4 μg/mL)^[19]。

1.4 香豆素三唑化合物的抗细菌活性

1,2,3-三唑具有适度的偶极子性质、氢键能力以及在体内条件下的刚性和稳定性,使其衍生物生物活性增强。一些含 1,2,3-三唑的抗生素及合成抗菌药如头孢曲唑和他唑巴坦已用于临床,显示了 1,2,3-三唑类在抗菌方面的潜能,尤其是 C-4 位上具有取代基的 1,2,3-三唑,其平面性得到了消除,可促进化合物与受体结合,通过诱导配合改善药效,相关研究颇多。

尿嘧啶双 1,2,3-三唑香豆素(14a 和 14b)对金黄色葡萄球菌显示出较强的生长抑制活性(见表 4),抑菌圈直径分别为 26、28 mm, MIC 分别为 11.7、7.23 μg/mL。构效关系表明,当 R 为电负性原子时,抗菌活性增强,且电负性与抗菌能力成正比,其中 F 取代和 Cl 取代时抗菌活性相当。当三唑环和香豆素环之间的链长(n)为 2 时,抗菌效力最强。化合物 14b 能与二氢叶酸还原酶有效结合,可作为开发强效抗菌剂的重点研究分子^[20]。

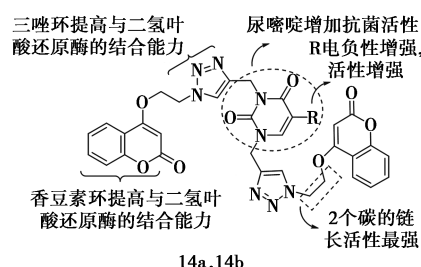


图 8 化合物 14 的化学结构式

Fig.8 Chemical structure of compound 14

表 4 双 1,2,3-三唑香豆素(14a 和 14b)的抗金黄色葡萄球菌活性

Tab.4 Anti-*S.aureus* activity of bis-1,2,3-triazole-coumarins (14a and 14b)

化合物编号	R	抗菌活性	
		抑菌圈直径/mm	MIC / (μg·mL ⁻¹)
14a	F	26	11.70
14b	Cl	28	7.23
左氧氟沙星		32	3.12

香豆素 1,2,3-三唑(15)是良好的 α-淀粉酶抑制剂, IC₅₀ 为 4.11 μmol/L。其对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌具有良好的抑制

作用, MIC 分别为 12.5、12.5、6.5 $\mu\text{g/mL}$ 。这一研究结果为开发新型抗菌药物分子提供了可结构优化的模型骨架^[21]。

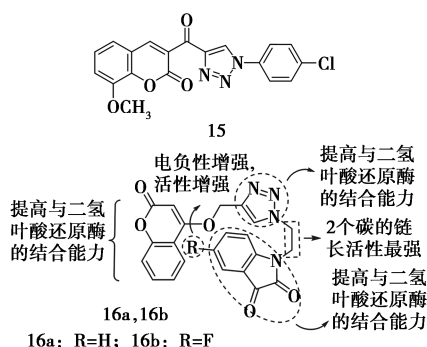


图 9 化合物 15 和 16 的化学结构式

Fig.9 Chemical structures of compounds 15 and 16

吡啶酮分布于多种天然产物中,具有广泛药理活性,1,2,3-三唑连接的吡啶酮香豆素 16a 和 16b 具有良好的抗菌性能,化合物 16b 对金黄色葡萄球菌和肠球菌的抑菌圈直径分别为 2.5、1.3 cm。它可与金黄色葡萄球菌二氢叶酸还原酶活性位点通过静电、范德华力、 π - π 叠加和氢键等发生相互作用。构效关系表明,吡啶酮环上 5-位取代基的电负性越大,抗菌活性越强。但连接 1,2,3-三唑和吡啶酮的碳链长度越长,活性越低,两个碳的长度最合适^[22]。

1.5 稠杂环香豆素化合物的抗细菌活性

稠杂环香豆素主要分为呋喃香豆素、吡喃香豆素及其衍生物。呋喃香豆素是一些高等植物的次生代谢产物,具有光敏性,在紫外线照射下可与细菌、真菌的 DNA 发生反应破坏其复制,从而抑制微生物生长。从伞形科植物 *Ferulago trachycarpa* 中提取的二氢呋喃香豆素(17)就具有一定的抗 MRSA 活性^[23],证明从植物中提取天然呋喃类香豆素来对抗 MRSA 感染是抗菌新药研发途径之一。基于天然呋喃香豆素的抗菌潜能,呋喃香豆素衍生物的合成和抗菌研究得到了激发。多组分一锅法合成的呋喃香豆素(18)既具有抑菌活性又具有杀菌活性,杀菌浓度为 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 。化合物 18a 主要对藤黄微球菌和克雷伯杆菌敏感,化合物 18b 主要对枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌、大肠杆菌、克雷伯杆菌和金黄色葡萄球菌敏感^[24]。

吡喃香豆素如花椒内酯、邪蒿内酯等已被证实有包括抗菌在内的多种生物活性。二氢吡喃香豆素季铵盐(19)具有显著的抑菌活性(见表 5)。化合物 19a 活性最强,对金黄色葡萄球菌、蜡样芽

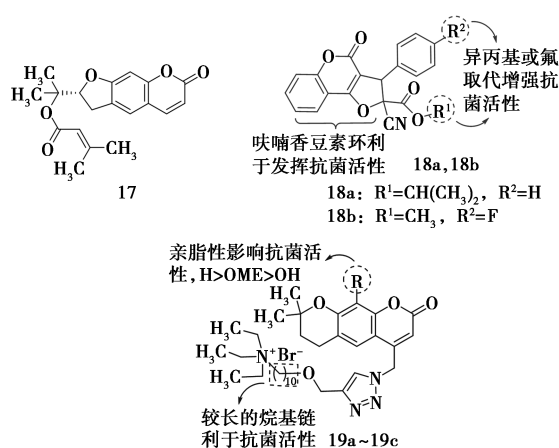


图 10 化合物 17~19 的化学结构式

Fig.10 Chemical structures of compounds 17~19

表 5 三唑基吡喃香豆素(19a~19c)的抗细菌活性

Tab.5 Antibacterial activity of triazolyl pyranochromenones (19a~19c)

化合物 编号	R	抗菌活性					
		抑菌圈直径/mm			MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
		金黄色 葡萄 球菌	蜡样 芽孢 杆菌	铜绿 假单 胞菌	金黄色 葡萄 球菌	蜡样 芽孢 杆菌	铜绿 假单 胞菌
19a	H	17	23	24	12	6	8
19b	OH	12	13	12	90	65	115
19c	OCH ₃	16	22	22	55	40	45

孢杆菌和铜绿假单胞菌的抑菌圈直径为 17~24 mm, MIC 为 6~12 $\mu\text{g/mL}$ 。羟基衍生物 19b 的毒性最低,但抗菌活性相对较弱,对上述 3 种细菌的 MIC 为 65~115 $\mu\text{g/mL}$ 。甲氧基衍生物 19c 显示中等抗金黄色葡萄球菌、抗蜡样芽孢杆菌和抗铜绿假单胞菌活性, MIC 为 40~55 $\mu\text{g/mL}$ 。由此可知,二氢吡喃香豆素 C-10 位取代基的亲脂性大有利于抗菌活性发挥^[25]。

1.6 香豆素杂环金属配合物的抗细菌活性

金属配合物在医学方面的应用早已被研究,在抗菌方面,其具有易通过细菌膜的脂质层,并阻断微生物酶中的金属结合位点等特性,尤其是含杂环配体(如含 N 或 O 的杂环体系)的银(I)配合物,具有相对较低的毒性和微动力学效应,近年来受到越来越多的关注。

氯香豆素-银(I)-N-杂环卡宾(NHC)(20a)对大肠杆菌的抑菌圈直径为 21 mm,比氨苄西林的抑菌活性(16 mm)有所提高^[26]。甲基香豆素-银(I)-NHC(20b)在 8 $\mu\text{g/mL}$ 时对铜绿假单胞菌的活性比氨苄西林高^[27]。将复合物 20 的咪唑环替换为苯并咪唑环所得的香豆素-银(I)-

NHCs (21a~21e, MIC = 8 $\mu\text{g/mL}$) 的抗铜绿假单胞菌活性优于氨苄西林 (MIC > 128 $\mu\text{g/mL}$) (见表 6), 对大肠杆菌也有较强的抑制活性 (MIC = 16 $\mu\text{g/mL}$)^[28]。配合物 21f 能有效抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌的生长, MIC 为 2~4 $\mu\text{g/mL}$, 其抗大肠杆菌活性 (MIC = 2 $\mu\text{g/mL}$) 是氨苄西林 (MIC = 4 $\mu\text{g/mL}$) 的 2 倍^[29]。

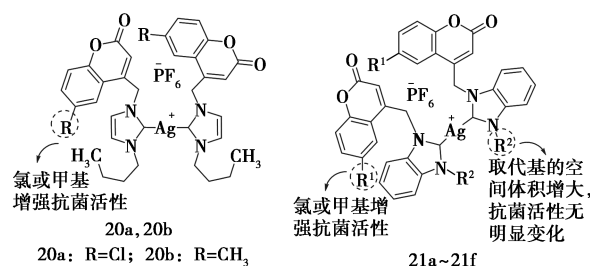


图 11 化合物 20 和 21 的化学结构式

Fig.11 Chemical structures of compounds 20 and 21

表 6 香豆素-银(I)-NHCs(21a~21f)的抗菌活性

Tab.6 Antibacterial activity of coumarin-Ag(I)-NHCs (21a~21f)

化合物 编号	R ¹	R ²	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
			金黄色 葡萄球菌	大肠杆菌	铜绿假 单胞菌
21a	Cl		32	16	8
21b	Cl		32	16	8
21c	Cl		32	16	8
21d	Cl		32	16	8
21e	Cl		32	16	8
21f	CH ₃		2	2	4
氨苄西林			≤0.5	4	>128

当以两性霉素 B 为标准时, 香豆素-1,2,3-三唑-Ag(22) 对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和粪链球菌的活性较高, 抑菌圈直径均为 13 mm, 优于其配体的抗菌活性^[30]。除银配合物外, 香豆素吡啶-Cu(23) 也被报道具有抑菌活性, 吡啶环上

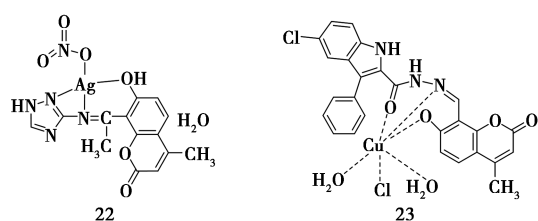


图 12 化合物 22 和 23 的化学结构式

Fig.12 Chemical structures of compounds 22 and 23

吸电性的氯取代比同系列甲基取代的化合物表现出更好的抑菌能力。当浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 配合物 23 的抗枯草芽孢杆菌、抗大肠杆菌和抗金黄色葡萄球菌活性与庆大霉素相当^[31]。该化合物可通过裂解超螺旋质粒 DNA pBR322 实现抑制病原微生物的生长。

1.7 其他香豆素杂环化合物的抗菌活性

对醚类化合物的研究已得到具有抗微生物活性的分子, 由醚键连接的香豆素喹啉 (24a、24b) 脂水分配系数适宜, 对金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌具有高度活性 (见表 7), MIC 低至 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 是环丙沙星 (MIC = 2 $\mu\text{g/mL}$) 的 10 倍。化合物 24a 具有完全的 DNA 裂解能力, 化合物 24b 具有部分的 DNA 裂解能力, 二者的极性表面值均为 48.42, 在可行候选药物的极性表面范围 (<140) 以内。此类化合物可进行深入抗菌活性研究^[32]。醚键连接的香豆素哌啶 (25a、25b) 也具有适宜的脂水分配系数, 当浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对肺炎克雷伯氏菌的活性高于新生霉素 (MIC = 25 $\mu\text{g/mL}$), 且无细胞毒性。香豆素 C-4 衍生物 25b 在 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下还能抑制金黄色葡萄球菌的生长, 比香豆素 C-7 衍生物 25a 抗菌性能更好, 前者结构中的哌啶

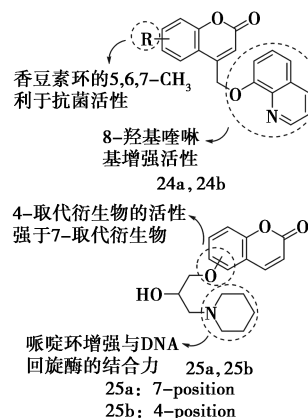


图 13 化合物 24 和 25 的化学结构式

Fig.13 Chemical structures of compounds 24 and 25

表 7 香豆素喹啉 (24a 和 24b) 的抗菌活性

Tab.7 Antibacterial activity of coumarin-quinolines (24a and 24b)

化合物 编号	R	logP	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
			金黄色 葡萄球菌	粪肠 球菌	大肠 杆菌	铜绿 假单胞菌
24a	6-CH ₃	3.81	0.2	0.2	0.2	0.2
24b	5,7-CH ₃	4.32	0.2	0.2	0.2	0.2
环丙沙星			2.0	2.0	2.0	2.0

氮与 DNA 回旋酶的 Asn46 残基可形成氢键^[33]。

硫醚键存在于许多天然活性产物和医药产品中,用硫原子取代氧原子可以大大提高某些化合物的生物活性。硫醚键连接的香豆素-三嗪并[5,6-b]呋啉(26)具有较强的抗菌活性,对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌的 MIC 为 0.125~0.5 $\mu\text{g/mL}$,明显优于环丙沙星的 2 $\mu\text{g/mL}$ ^[34]。硫醚键连接的香豆素尿嘧啶(27a、27b)对金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 5、2.5 $\mu\text{g/mL}$ (见表 8),均优于环丙沙星(MIC = 10 $\mu\text{g/mL}$),二者的 C-score(分别为 6.41、6.66)也均高于环丙沙星(均为 5.01)。化合物 27a、27b 可分别与二氢喋酸合成酶的活性位点形成 6、4 个氢键^[35]。

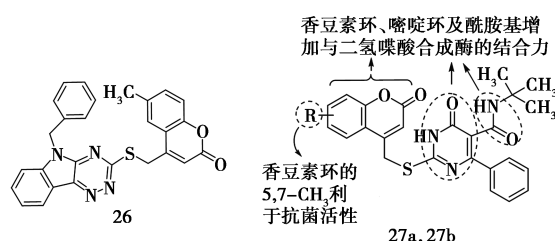


图 14 化合物 26 和 27 的化学结构式

Fig.14 Chemical structures of compounds 26 and 27

表 8 香豆素嘧啶(27a 和 27b)的
抗金黄色葡萄球菌活性

Tab.8 Anti-*S.aureus* activity of coumarin-pyrimidines
(27a and 27b)

化合物编号	R	C-score	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
27a	5,7-CH ₃	6.41	5.0
27b	5,6-Benzo	6.66	2.5
环丙沙星		5.01	10.0

香豆素吗啉 28a($\log P=2.78$)和 28b($\log P=2.01$)具有适宜亲脂性,化合物 28a 对金黄色葡萄球菌的抑制效果较好(见表 9),MIC 为 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 。化合物 28b 抗铜绿假单胞菌的 MIC 为 31.25 $\mu\text{g/mL}$,与环丙沙星相当(MIC = 25 $\mu\text{g/mL}$)。构效关系表明,供电子取代基(如—OCH₃)和弱吸电子取代基(如—Cl)有利于提高抑菌活性。化合物 28a、28b 的 HOMO-LUMO 能级差较低,分别为 3.510、3.508,且化合物 28a 可与 DNA 回旋酶的 ARG-136 残基形成氢键,这可能是其抗菌活性较好的原因^[36]。

香豆素-吡喃[2,3-d]嘧啶(29a 和 29b)分别能显著抑制肺炎链球菌和表皮葡萄球菌的生长(见表 10),抑菌圈直径为 13、10 mm。化合物 29a

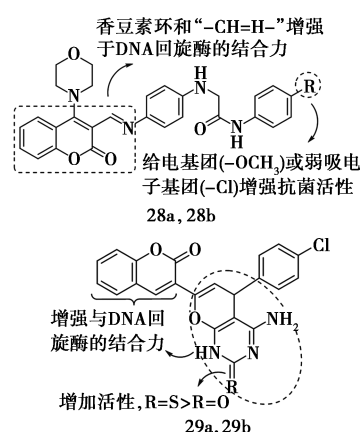


图 15 化合物 28 和 29 的化学结构式

Fig.15 Chemical structures of compounds 28 and 29

表 9 香豆素吗啉(28a 和 28b)的抗菌活性

Tab.9 Antibacterial activity of coumarin-morpholines
(28a and 28b)

化合物 编号	R	$\log P$	MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
			金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌
28a	Cl	2.78	62.5	100.00
28b	OCH ₃	2.01	100.0	31.25
环丙沙星			50.0	25.00

表 10 香豆素吡喃嘧啶(29a 和 29b)的抗菌活性

Tab.10 Antibacterial activity of coumarin
pyrano-pyrimidines (29a and 29b)

化合物 编号	R	IC ₅₀ / ($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	抗菌活性			
			抑菌圈直径/mm		MIC/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
			DNA 回旋酶 B	肺炎 链球菌	肺炎 链球菌	表皮葡 萄球菌
29a	O	5.12		13	7.8	
29b	S	4.91			10	0.4
阿莫西林				16	13	7.8
新生霉素		4.52				15.6

对肺炎链球菌的 MIC 为 7.8 $\mu\text{g/mL}$,与阿莫西林相当,化合物 29b 对表皮葡萄球菌的 MIC 为 0.4 $\mu\text{g/mL}$,远强于阿莫西林。与新生霉素相比($\text{IC}_{50}=4.52$ nmol/L),化合物 29a、29b 具有与之等效的 DNA 回旋酶 B 抑制活性, IC_{50} 分别为 5.12、4.91 nmol/L。分子对接显示,嘧啶环上 4-位的氨基可与 Asn46 残基形成氢键,可提高其对 DNA 回旋酶 B 的抑制活性^[37]。

2 香豆素杂环化合物的抗结核分枝杆菌活性

结核病是一种主要由结核分枝杆菌(MTB)感染而引起的严重传染病^[38],其一线治疗药物主要为异烟肼、利福平、乙胺丁醇和吡嗪酰胺,但需

要至少 6 个月的治疗来防止复发。随着耐药结核分枝杆菌尤其是多药耐药 (MDR) 和广泛耐药 (XDR) 结核分枝杆菌的产生,寻找和开发新型、快速、有效的抗结核药物迫切突出。

天然香豆素 (+)-Calanolide A 对结核分枝杆菌 H₃₇Rv 和 MDR 结核菌非常有效,含 1,2,3-三唑的化合物 1-A09 被视为具有新结构的抗结核活性先导分子,将香豆素与 1,2,3-三唑杂合可能是新型抗结核药物的理想起点。1,2,3-三唑桥连的糖基香豆素 (30) 既可抗菌,也可在无毒浓度下杀菌,对 H₃₇Rv 和 MDR 临床分离株 591 的 MIC 为 5.1、10.3 μmol/L, MBC 为 6.4、11.5 μmol/L,优于乙胺丁醇,尤其是抗 MDR 临床分离株 591 的活性,为异烟肼、利福平、乙胺丁醇和链霉素活性的 6~212 倍。该化合物的高活性与 1,2,3-三唑环和香豆素环之间的—OCH₂—桥增加了分子的柔韧性有关。杂合体 30 为结核分枝杆菌 InhA 蛋白直接抑制剂和 DNA 回旋酶 B 直接抑制剂,可通过干扰细菌细胞壁的结构达到抗菌活性^[39]。将其结构中的糖基替换为含两个碳链的靛红基团所得的靛红香豆素 (31) 对 MDR 菌株的 MIC 为 32 μg/mL,是利福平 (MIC=64 μg/mL) 的 2 倍,异烟肼 (MIC>128 μg/mL) 的 4 倍以上^[40]。

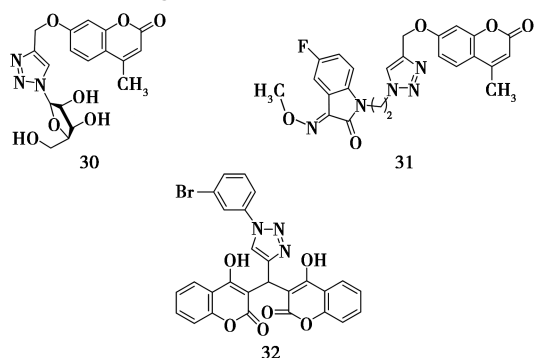


图 16 化合物 30~32 的化学结构式

Fig.16 Chemical structures of compounds 30~32

双香豆素 1,2,3-三唑 (32) 对休眠的结核分枝杆菌 H37Ra 抗菌活性良好, IC₅₀ 为 1.44 μg/mL,对活跃的 H37Ra 菌株抗菌活性也较好, IC₅₀ 为 1.93 μg/mL。其结构中溴原子的存在对抗结核活性不可或缺。该化合物与结核分枝杆菌 DprE1 酶有较高的对接分数,为-8.935,能通过空间和静电作用与其活性位点紧密结合^[41]。

噁二唑连接的香豆素苯并三唑 (33a 和 33b) 在无细胞毒性的浓度下表现出与吡嗪酰胺 (MIC=12.5 μmol/L) 相近的抗结核活性, MIC 为

15.5~18.3 μmol/L。构效关系表明,香豆素的 7-位引入羟基可增强抑菌活性,但 6-位引入卤素及 8-位引入甲基均会降低抗菌活性^[42]。

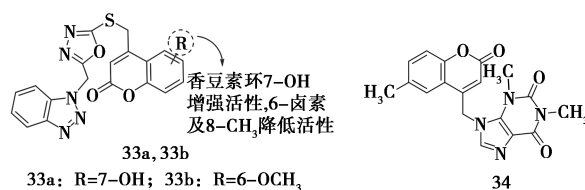


图 17 化合物 33 和 34 的化学结构式

Fig.17 Chemical structures of compounds 33 and 34

嘌呤是自然界中含量丰富的多活性含氮杂环,嘌呤修饰的香豆素 (34) 具有良好的抗结核分枝杆菌活性, MIC 为 0.12 μg/mL,香豆素环 C-6 位的甲基取代增强了抗菌活性。该化合物能通过香豆素环上的 1-位氧原子和羰基氧原子与结核分枝杆菌靶蛋白氨基酸残基 ILE21、SER94 和 ALA22 形成 4 个氢键^[43]。

3 香豆素杂环化合物的抗真菌活性

真菌感染急剧增加,对人类健康构成严重威胁,唑类药物在一线抗真菌治疗中应用最为广泛,咪唑类,其核心结构成为许多研究者的研究对象,并进行了多种药效团优化。在香豆素类似物中,含三唑取代基的香豆素 1,2,3-三唑 (35) 在 4 μg/mL 时对酵母菌有明显的抑制作用,对白色念珠菌的 MIC 低至 1 μg/mL,与咪唑 (MIC=1 μg/mL) 活性相当。该化合物能与羊毛甾醇 14α-去甲基化酶 (CYP51) 结合,结合亲和力为 -11.7 kcal/mol^[44]。

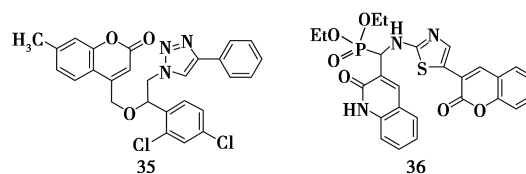


图 18 化合物 35 和 36 的化学结构式

Fig.18 Chemical structures of compounds 35 and 36

氨基噻唑磷酸酯桥连的香豆素噻啉 (36),在浓度为 0.5 μg/mL 时能有效抑制白色念珠菌与啤酒酵母菌的生长,其中对白色念珠菌的 MIC 为 0.25 μg/mL,明显优于氟康唑 (MIC=2 μg/mL)。其结构中的香豆素环和噻唑环能增加抗真菌活性,可为寻找新的有效抗真菌药物提供参考^[45]。

双香豆素 1,2,3-三唑 (37a、37b) 可与 CYP51 有效结合。氯代化合物 37a 和甲氧基化合物 37b

对白色念珠菌和克鲁斯氏念珠菌的 MIC 为 $1\ \mu\text{g/mL}$,与伊曲康唑 ($\text{MIC} = 1\ \mu\text{g/mL}$) 活性相似^[46]。双香豆素苯并咪唑 (38a、38b) 对实用假性酵母菌、白色念珠菌和克鲁斯假丝酵母菌有较强的生长抑制活性。这主要归因于氯取代基、香豆素母核和苯并咪唑环的存在。其中,化合物 38b 与甲羟戊酸-5-焦磷酸脱羧酶具有高亲和力 ($-10.8\ \text{kcal/mol}$),表现为香豆素的内酯氧是氨基酸残基 ASP302 和 ALA119 的氢键供体,而 ASP302 也能与一个香豆素核形成显著的静电相互作用,以及各种氨基酸残基与蛋白质配体复合物产生的范德华力作用^[47]。

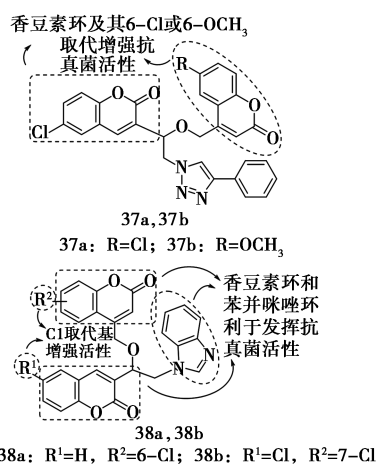


图 19 化合物 37 和 38 的化学结构式

Fig.19 Chemical structures of compounds 37 and 38

4 总结与展望

香豆素类抗微生物药物,除新生霉素、香豆霉素等少数几个抗生素外,几乎没有在抗菌方面的合成香豆素类药物上市。但香豆素母体通过结构修饰可实现多种功能化,如提高抗菌活性、拓宽抗菌谱、减少耐药性、降低毒副作用、改善水溶性等,因此,对香豆素的结构修饰,尤其是杂环化合物对其修饰的研究长期以来都受到极度重视。近年来,对具有抗菌活性的香豆素杂环化合物的结构修饰主要集中在以下几个方面:1) 杂环对香豆素核的结构修饰主要在 C-3、C-4 和 C-7 位;2) 对香豆素核进行结构修饰的杂环多为含 N 杂环,尤其是唑类,如噻唑、吡唑、咪唑及 1,2,3-三唑;3) 香豆素环上引入供电子基团(如—CH₃、—OCH₃)及弱吸电子基团(如—F、—Cl、—Br、—I)对抗菌活性有利。香豆素杂环化合物由于多杂环的协同作用,如香豆素环的 O 原子及引入杂环的 N、S、O 原子增强了化合物与靶点的结合力,因而大多显示

出优良的抗细菌、抗结核及抗真菌活性,具有潜在药学应用价值。

尽管香豆素杂环化合物的抗菌活性取得了积极进展,但也面临着一些问题,如:1) 溶解性仍待提高,一定程度上影响了其生物利用度;2) 杂环修饰后的香豆素衍生物的抗菌靶点多样,但具体作用机制尚不完全明确,且抗耐药性能力有待深入研究;3) 部分已报道活性分子具有手性,但其具体构型并未得到明确证明;4) 对抗菌活性分子的探索仍处于体外研究阶段,体内研究甚少,更未见处于临床研究阶段的香豆素杂环化合物报道。基于以上问题,结合目前香豆素杂环化合物的抗菌构效关系,可为今后设计更具成药性的香豆素杂环抗菌活性分子提供参考。随着香豆素杂环化合物抗菌活性研究的深入,聚焦香豆素杂环化合物的明确作用机制、抗耐药能力及构型、体内活性及代谢过程,甚至临床研究等是未来的重点研究方向,对于突破合成香豆素在抗菌方面的临床应用具有重要意义。

参考文献:

- [1] AMINARSHAD F, HEIDARI S, MOSTAJERAN N, et al. Design, solvent-free synthesis and antibacterial activity evaluation of new coumarin sulfonamides [J]. *J. Iran. Chem. Soc.*, 2022, **19**:547-562.
- [2] 彭莘媚, 潘旭玲, 闻轩, 等. 浅谈香豆素类化合物的抗菌活性[J]. *化学试剂*, 2019, **41**(4):371-377.
- [3] HU Y Y, HU S Y, PAN G X, et al. Potential antibacterial ethanol-bridged purineazole hybrids as dual-targeting inhibitors of MRSA [J]. *Bioorg. Chem.*, 2021, **114**:105 096.
- [4] SALEHIAN F, NADRI H, JALILI-BALEH L, et al. A review: Biologically active 3,4-heterocycle-fused coumarins [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2021, **212**:113 034.
- [5] SHARMA V, MISHRA P, SHARMA A, et al. Synthesis, electrochemical studies, molecular docking, and biological evaluation as an antimicrobial agent of 5-amino-6-cyano-3-hydroxybenzo[c] coumarin using Ni-Cu-Al-CO₃ hydro-talcite as a catalyst [J]. *ACS Omega*, 2022, **7**(18): 15 718-15 727.
- [6] KLAHN P, BRONSTRUP M. Bifunctional antimicrobial conjugates and hybrid antimicrobials [J]. *Nat. Prod. Rep.*, 2017, **34**:832-885.
- [7] OSMAN H, YUSUFZAI S K, KHAN M S, et al. New thiazolyl-coumarin hybrids: Design, synthesis, characterization, X-ray crystal structure, antibacterial and antiviral

- evaluation [J]. *J. Mol. Struct.*, 2018, **1** **166**: 147-154.
- [8] YUSUFZAI S K, OSMAN H, KHAN M S, et al. Design, characterization, *in vitro* antibacterial, antitubercular evaluation and structure-activity relationships of new hydrazinyl thiazolyl coumarin derivatives [J]. *Med. Chem. Res.*, 2017, **26**: 139-148.
- [9] LIU H, XIA D G, CHU Z W, et al. Novel coumarin-thiazolyl ester derivatives as potential DNA gyrase inhibitors: Design, synthesis, and antibacterial activity [J]. *Bioorg. Chem.*, 2020, **100**: 103-907.
- [10] HU Y Y, HU C F, PAN G X, et al. Novel chalcone-conjugated, multi-flexible end-group coumarin thiazole hybrids as potential antibacterial repressors against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2021, **222**: 113-628.
- [11] YUSUFZAI S K, OSMAN H, KHAN M S, et al. 4-Thiazolidinone coumarin derivatives as two-component NS2B/NS3 DENV flavivirus serine protease inhibitors: Synthesis, molecular docking, biological evaluation and structure-activity relationship studies [J]. *Chem. Cent. J.*, 2018, **12**: 69.
- [12] YANG X C, ZHANG P L, KUMAR K V, et al. Discovery of unique thiazolidinone-conjugated coumarins as novel broad spectrum antibacterial agents [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2022, **232**: 114-192.
- [13] HU C F, ZHANG P L, SUI Y F, et al. Ethylenic conjugated coumarin thiazolidinediones as new efficient antimicrobial modulators against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Bioorg. Chem.*, 2020, **94**: 103-434.
- [14] MANGASULI S N. Synthesis of novel coumarin-thiazolidine-2,4-dione derivatives: An approach to computational studies and biological evaluation [J]. *Res. Chem.*, 2021, **3**: 100-105.
- [15] CHOUGALA B M, SAMUNDEESWARI S, HOLIYACHI M, et al. Synthesis, characterization and molecular docking studies of substituted 4-coumarinylpyrano[2,3-*c*] pyrazole derivatives as potent antibacterial and anti-inflammatory agents [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **125**: 101-116.
- [16] RENUKA N, VIVEK H K, PAVITHRA G, et al. Synthesis of coumarin appended pyrazolyl-1,3,4-oxadiazoles and pyrazolyl-1,3,4-thiadiazoles: Evaluation of their *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities and molecular docking studies [J]. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2017, **43**(2): 197-210.
- [17] CHATE A V, REDLAWAR A A, BONDLE G M, et al. A new efficient domino approach for the synthesis of coumarin-pyrazolines as antimicrobial agents targeting bacterial D-alanine-D-alanine ligase [J]. *New J. Chem.*, 2019, **43**: 9002-9011.
- [18] HU Y, SHEN Y F, WU X H, et al. Synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives containing imidazole skeleton as potential antibacterial agents [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, **143**: 958-969.
- [19] HOLIYACHI M, SAMUNDEESWARI S, CHOUGALA B M, et al. Design and synthesis of coumarin-imidazole hybrid and phenylimidazoloacrylates as potent antimicrobial and anti-inflammatory agents [J]. *Monatsh. Chem.*, 2018, **149**: 595-609.
- [20] SANDUJA M, GUPTA J, SINGH H, et al. Uracil-coumarin based hybrid molecules as potent anti-cancer and anti-bacterial agents [J]. *J. Saudi Chem. Soc.*, 2020, **24**: 251-266.
- [21] CHANNABASAPPA V, KUMARA K, KARIYAPPA A. Design, synthesis of coumarin tethered 1,2,3-triazoles analogues, evaluation of their antimicrobial and α -amylase inhibition activities [J]. *J. Chem. Sci.*, 2021, **133**: 130.
- [22] BHAGAT K, BHAGAT J, GUPTA M K, et al. Design, synthesis, antimicrobial evaluation, and molecular modeling studies of novel indolinone-coumarin molecular hybrids [J]. *ACS Omega*, 2019, **4**: 8720-8730.
- [23] DIKPINAR T, SUZGEC-SELCUK S, ÇELİK B Ö, et al. Antimicrobial activity of rhizomes of *Ferulago trachycarpa* Boiss. and bioguided isolation of active coumarin constituents [J]. *Ind. Crops Prod.*, 2018, **123**: 762-767.
- [24] KALE A, BINGI C, SRIPADA S, et al. A simple, one pot synthesis of furo[3,2-*c*] chromenes and evaluation of antimicrobial activity [J]. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016, **26**(20): 4899-4902.
- [25] YADAV P, KUMAR B, GAUTAM H K, et al. Synthesis and antibacterial activity screening of quaternary ammonium derivatives of triazolyl pyranochromenones [J]. *J. Chem. Sci.*, 2017, **129**(2): 211-222.
- [26] GAUTAM A, RAMYA V C, UPENDRANATH K, et al. Coumarin-tethered (benz)imidazolium salts and their silver(I) N-heterocyclic carbene complexes: Synthesis, characterization, crystal structure and antibacterial studies [J]. *Appl. Organometal. Chem.*, 2017, **31**(11): e3770.
- [27] ACHAR G, SHAHINI C R, PATIL S A, et al. Synthesis, structural characterization, crystal structures and antibacterial potentials of coumarin-tethered N-heterocyclic carbene silver(I) complexes [J]. *J. Organomet. Chem.*, 2017, **833**: 28-42.
- [28] ACHAR G, UPENDRANATH K, RAMYA V C, et al.

- Synthesis, characterization, crystal structure and biological studies of silver(I) complexes derived from coumarin-tethered N-heterocyclic carbene ligands[J]. *Polyhedron*, 2017, **123**: 470-479.
- [29] ACHAR G, SHAHINI C R, PATIL S A, et al. Sterically modulated silver(I) complexes of coumarin substituted benzimidazol-2-ylidenes: Synthesis, crystal structures and evaluation of their antimicrobial and antitumor cancer potentials[J]. *J. Inorg. Biochem.*, 2018, **183**: 43-57.
- [30] ABDEL-KADER N S, MOUSTAFA H, EL-ANSARY A L, et al. A coumarin Schiff base and its Ag(I) and Cu(II) complexes: Synthesis, characterization, DFT calculations and biological applications[J]. *New J. Chem.*, 2021, **45**: 7 714-7 730.
- [31] MAHENDRA RAJ K, MRUTHYUNJAYASWAMY B H M. Synthesis, spectroscopic characterization, electrochemistry and biological activity evaluation of some metal(II) complexes with ONO donor ligands containing indole and coumarin moieties[J]. *J. Saudi Chem. Soc.*, 2017, **21**: S202-S218.
- [32] REVANKAR H M, KULKARNI M V. Hybrid ethers of 8-hydroxyquinoline and coumarin, 1-azacoumarin moieties: Synthesis, spectral studies and biological evaluation[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2018, **88**(1): 1-8.
- [33] PRIYANKA, SINGH V, EKTA, et al. Synthesis, antimicrobial, cytotoxic and *E. coli* DNA gyrase inhibitory activities of coumarinyl amino alcohols[J]. *Bioorg. Chem.*, 2017, **71**: 120-127.
- [34] MANGASULI S N. Microwave assisted synthesis and biological activity of a novel triazino indole-coumarin hybrid: Crystal structure, hirshfeld surface analysis and DFT calculations[J]. *Chem. Data Coll.*, 2020, **29**: 100 503.
- [35] CHAVAN R R, HOSAMANI K M, KULKARNI B D, et al. Molecular docking studies and facile synthesis of most potent biologically active N-tert-butyl-4-(4-substituted phenyl)-2-((substituted-2-oxo-2H-chromen-4-yl) methylthio)-6-oxo-1, 6-dihydropyrimidine-5-carboxamide hybrids: An approach for microwave-assisted syntheses and biological evaluation[J]. *Bioorg. Chem.*, 2018, **78**: 185-194.
- [36] CHAUHAN P M, THUMMAR S N, CHIKHALIA K H. Design, synthesis, bioactivity, and computational studies of some morpholine-clubbed coumarinyl acetamide and cinnamide derivatives[J]. *J. Iran. Chem. Soc.*, 2018, **15**: 1 261-1 277.
- [37] FAYED E A, NOSSEIR E S, ATEF A, et al. In vitro antimicrobial evaluation and in silico studies of coumarin derivatives tagged with pyrano-pyridine and pyrano-pyrimidine moieties as DNA gyrase inhibitors[J]. *Mol. Divers.*, 2022, **26**: 341-363.
- [38] SHAIKH F, SHASTRI S L, NAIK N S, et al. Synthesis, antitubercular and antimicrobial activity of 1, 2, 4-triazolidine-3-thione functionalized coumarin and phenyl derivatives and molecular docking studies[J]. *ChemistrySelect*, 2019, **4**(1): 105-115.
- [39] SRIVASTAVA S, BIMAL D, BOHRA K, et al. Synthesis and antimycobacterial activity of 1-(β -D-ribofuranosyl)-4-coumarinyloxymethyl-/coumarinyl-1, 2, 3-triazole[J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, **150**: 268-281.
- [40] GAO T, ZENG Z G, WANG G Q, et al. Synthesis of ethylene tethered isatin-coumarin hybrids and evaluation of their *in vitro* antimycobacterial activities[J]. *J. Heterocyclic Chem.*, 2018, **55**(6): 1 484-1 488.
- [41] DANNE A B, CHOUDHARI A S, SARKAR D, et al. Synthesis and biological evaluation of novel triazolebi-scoumarin conjugates as potential antitubercular and anti-oxidant agents[J]. *Res. Chem. Intermed.*, 2018, **44**: 6 283-6 310.
- [42] AMBEKAR S P, MOHAN C D, SHIRAHATTI A, et al. Synthesis of coumarin-benzotriazole hybrids and evaluation of their anti-tubercular activity[J]. *Lett. Org. Chem.*, 2018, **15**(1): 23-31.
- [43] MANGASULI S N, HOSAMANI K M, DEVARAJE-GOWDA H C, et al. Synthesis of coumarin-theophylline hybrids as a new class of anti-tubercular and antimicrobial agents[J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, **146**: 747-756.
- [44] SUTAR S M, SAVANUR H M, PATIL C, et al. Synthesis, molecular modelling studies and antimicrobial activity of coumarin and 1-azacoumarin linked 1, 2, 3-triazole[J]. *Chem. Data Coll.*, 2020, **28**: 100 480.
- [45] LITIM B, DJAHOUDI A, MELIANI S, et al. Synthesis and potential antimicrobial activity of novel α -aminophosphonates derivatives bearing substituted quinoline or quinolone and thiazole moieties[J]. *Med. Chem. Res.*, 2022, **31**: 60-74.
- [46] SAVANUR H M, NAIK K N, GANAPATHI S M, et al. Click chemistry inspired design, synthesis and molecular docking studies of coumarin, quinolinone linked 1, 2, 3-triazoles as promising anti-microbial agents[J]. *ChemistrySelect*, 2018, **3**(19): 5 296-5 303.
- [47] SAVANUR H M, PAWASHE G M, KIM K M, et al. Synthesis and molecular modeling studies of coumarin- and 1-aza-coumarin-linked miconazole analogues and their antifungal activity[J]. *ChemistrySelect*, 2018, **3**(33): 9 648-9 653.

天然二氢黄酮醇类化合物及其衍生物的研究进展

刘懿锋, 林汝娟, 周琢强*

(华南农业大学 材料与能源学院, 广东 广州 510642)

摘要:二氢黄酮醇即 3-羟基二氢黄酮, 在植物界中广泛存在, 是黄酮类化合物的重要组成部分, 具有抗氧化、抗病毒、抗肿瘤、抗菌等多种生物活性, 备受医药、食品等多个领域的关注。二氢黄酮醇类化合物的生物活性与其结构具有紧密的联系, 通过结构修饰还可改善或改变其活性。因此对二氢黄酮醇类化合物结构、生物活性及结构修饰等方面进行综述, 期望为其今后的进一步开发提供帮助。

关键词:二氢黄酮醇; 生物活性; 结构修饰; 研究进展; 衍生物

中图分类号:R914 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2023)02-0022-11

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0697

Progress in Natural Products and Derivatives of Flavanonol LIU Yi-feng, LIN Ru-juan, ZHOU Zhuo-qiang* (College of Materials and Energy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Flavanonol, namely 3-hydroxyflavanone, widely exists in the plant kingdom and is an important part of flavonoid. It has various biological activities such as antioxidant, antiviral, antitumor and antibacterial, and has attracted much attention in many fields such as medicine and food. The biological activity of flavanons is closely related to their structure, and their activity can be improved or changed by structural modification. Therefore, the structure, biological activity and structural modification of flavanons were reviewed in this paper, hoping to support their further development.

Key words: flavanons; biological activities; structural modification; research progress; derivatives

随着人们对天然化合物的关注日益增长, 具有低毒、多功效的天然二氢黄酮醇类化合物, 备受各领域的关注。二氢黄酮醇 (Flavanonol) 即 3-羟基二氢黄酮 (结构见图 1), 广泛存在于植物界中, 在双子叶植物, 特别是豆科中分布较为普遍, 在少数裸子植物和单子叶植物中也存在^[1]。研究表明, 二氢黄酮醇类化合物具有抗氧化^[2]、抗癌^[3-6]、调血脂^[7]、保肝^[8-10]、抗炎^[11-14]、抑菌^[15, 16]等作用, 且这些生物活性与它们的结构具有一定的联系。为对进一步开发利用二氢黄酮醇类化合物提供帮助, 本文对二氢黄酮醇类化合物结构、来源及生物活性和结构修饰作一综述。

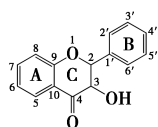


图 1 二氢黄酮醇的结构骨架

Fig.1 Structural framework of flavanonol

1 二氢黄酮醇类化合物的结构及来源

1.1 取代基仅为羟基的二氢黄酮醇类化合物

天然二氢黄酮醇类化合物中常见的简单结构有二氢山奈酚、二氢槲皮素、二氢桑色素和二氢杨

梅素等 (结构见图 2), 它们的取代基仅为羟基。

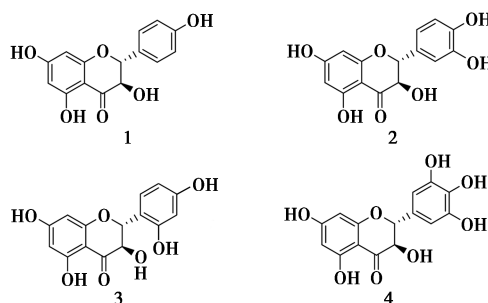


图 2 取代基仅为羟基的二氢黄酮醇类化合物

Fig.2 Chemical structural of flavanols whose substituents are only hydroxyl groups

二氢山奈酚 (Dihydrokaempferol, 1) 存在于三叉刺^[17]、鬼箭羽^[18]等中。二氢槲皮素 (Dihydroquercetin, 2) 又名花旗松素 (Taxifolin), 最早在花

收稿日期: 2022-09-16; 网络首发日期: 2022-11-09

作者简介: 刘懿锋 (1998-), 女, 广东佛山人, 硕士生, 主要研究方向为有机药物合成。

通讯作者: 周琢强, E-mail: zqzhou@scau.edu.cn。

引用本文: 刘懿锋, 林汝娟, 周琢强. 天然二氢黄酮醇类化合物及其衍生物的研究进展 [J]. 化学试剂, 2023, 45(2): 22-32。

旗松的树皮中提取所得^[19],在长白落叶松、水飞蓟、红蓼等中也存在。二氢桑色素(Dihydromorin, 3)被报道在桑科植物桑中有存在^[20]。二氢杨梅素(Dihydromyricetin, 4)是显齿蛇葡萄的主要活性物质,据报道含量可高达 30%~40%,是少见的在植物单体中含量高的天然产物^[21,22]。

1.2 二氢黄酮醇糖苷类化合物

天然二氢黄酮醇的羟基衍生物和甲氧基衍生物在植物中常作为配糖体,以糖苷形式存在。其糖苷衍生物一般为 O-糖苷类型,取代位置多为 C-3 位, C-7、C-5 位取代也有相关报道。二氢黄酮醇糖苷类化合物连接的糖基类型除葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖等单糖外还有双糖、三糖;有的糖基还有乙酰化或有其他取代基的现象。以下介绍部分天然二氢黄酮醇糖苷类化合物。

Astilbin(5)最早在落新妇中分离得到,在中药土茯苓、菝葜等中也有存在^[23]。Engeletin(6)在土茯苓中也可分离提取得到^[24]。Seo 等^[25]在龙牙草(*Agrimonia pilosa* Ledeb.)的气生部分提取分离得两个新二氢黄酮醇糖苷化合物(2*R*,3*S*)-dihydrokaempferol-3-O- β -D-glucoside(7)、(2*S*,3*R*)-dihydrokaempferol-3-O- β -D-glucoside(8)。Huang 等^[26]从野鸢尾(*Iris dichotoma* Pall.)的根茎中提取出 Irisdichotins B(9)、Irisdichotins C(10);Zheng 等^[27]从柘树(*Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bur.)的细枝中分离得(2*S*,3*S*)-2,3-trans-dihydromorin-7-O- β -D-glucoside(11)。Zhao 等^[28]从核桃(*Juglans regia* L.)果核内的木质隔膜分离得(2*S*,3*S*)-taxifolin-3-O- α -D-arabinofuranoside(12)、(2*S*,3*S*)-taxifolin-3-O- α -L-arabinofuranoside(13),这是首次在核桃属植物中同时发现具有 α -D 和 α -L 的花旗松素-3-O-阿拉伯呋喃糖苷。Wang 等^[29]从黄药大头茶(*Gordonia chrysandra*)的根部中提取出两种二氢黄酮醇糖苷化合物 Chrysandrosides A(14)、Chrysandrosides B(15)。Xin 等^[30]从黄杞叶(*Engelhardtia roxburghiana*)中分离得二氢黄酮醇糖苷化合物 Roxburghianaside A(16)、B(17)、C(18)。Wungsintaweekul 等^[31]从菝葜科菝葜属植物筐条菝葜(*Smilax corbularia* Kunth)分离提取出 5 种二氢黄酮醇糖苷类化合物(2*R*,3*R*)-2''-acetylasterilbin(19)、(2*R*,3*R*)-3''-acetylasterilbin(20)、(2*R*,3*R*)-4''-acetylasterilbin(21)、(2*R*,3*R*)-3''-acetylengelenitin(22)。化合物结构见表 1。

表 1 天然二氢黄酮醇糖苷类化合物

化合物	结构	来源	文献
5,6		<i>Smilax glabra</i> Roxb., <i>Smilax china</i> L.	[23,24]
7		<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.	[25]
8		<i>Agrimonia pilosa</i> Ledeb.	[25]
9,10		<i>Iris dichotoma</i> Pall.	[26]
11		<i>Cudrania tricuspidata</i> (Carr.) Bur.	[27]
12		<i>Juglans regia</i> L.	[28]
13		<i>Juglans regia</i> L.	[28]
14		<i>Gordonia chrysandra</i>	[29]
15		<i>Gordonia chrysandra</i>	[29]

续表

化合物	结构	来源	文献
16, 17		<i>Engelhardtia roxburghiana</i>	[30]
18		<i>Engelhardtia roxburghiana</i>	[30]
19~22		<i>Smilax corbularia</i> Kunth	[31]

1.3 异戊烯基二氢黄酮醇类化合物

异戊烯基黄酮类化合物是黄酮类化合物的重要一类,异戊烯基的存在通常能增加类黄酮的亲脂性,改善对生物膜的亲和性,有效提高生物活性。在异戊烯基黄酮类化合物中,异戊烯基的取代位点多在黄酮 A 环,常为 A-6 位和 A-8 位,异戊烯基具有多种异构体,在母核中,可在不同位置上连接不同结构类型的取代基。取代基的结构、数量及取代位点的不同使得异戊烯基二氢黄酮醇类化合物结构多样复杂。以下介绍部分天然异戊烯基二氢黄酮醇类化合物。

Lukaseder 等^[32]从泰国以及马来西亚采集的山小橘属植物叶子提取液中分离出 3 种二氢黄酮醇化合物,分别为 Chlorospermin (23)、Glysapinol (24)、Puyanol (25)。Muiva-Mutisya 等^[33]从肯尼亚东南部特有植物 *Tephrosia subtriflora* 的气生部分中提取出两种二氢黄酮醇化合物,包括首次报道的 Subtriflavanonol (26) 以及已知的 Flavanonols MS-II (27)。Chepkirui 等^[34]对豆科植物 *Mundulea sericea* 风干成粉末的叶子进行提取,发现了一种新的二氢黄酮醇类化合物 3-hydroxyerythrinenegalone (28) 以及已知的 Isomundulinol (29)。化合物结构见表 2。

表 2 异戊烯基二氢黄酮醇类化合物

化合物	结构	来源	文献
23		<i>Glycosmis species</i>	[32]
24		<i>Glycosmis species</i>	[32]
25		<i>Glycosmis species</i>	[32]
26, 27		<i>Tephrosia subtriflora</i>	[33]
28, 29		<i>Mundulea sericea</i>	[34]

1.4 其他结构

Liu 等^[35]在泡桐属的白花泡桐 (*Paulownia fortunei*) 的果实中提取分离得新化合物 Fortunones A (30)、Fortunones B (31)。Liaqat 等^[36]在丛卷毛荆芥 (*Nepeta floccosa Benth*) 中提取出一种新的二氢黄酮醇类化合物并命名为 Nepetavanol (32)。

Son 等^[37]从几内亚格木 (*Erythrophleum suaveolens*) 的茎中分离出未报道过的 Suaveolensone B (33)。化合物化学结构见图 3。

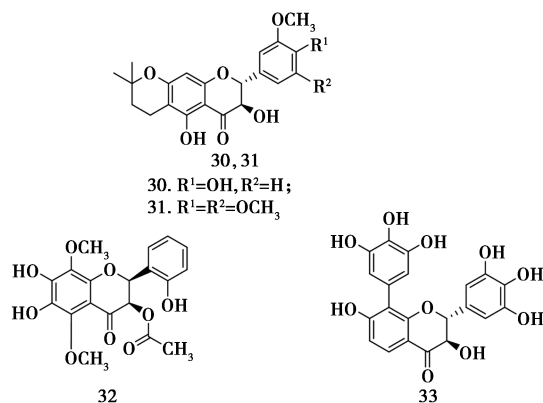


图 3 其他二氢黄酮醇类化合物的化学结构

Fig.3 Chemical structures of other flavanoneols

2 二氢黄酮醇类化合物的生物活性

大量报道表明二氢黄酮醇类化合物具有多样的生物活性,在抗癌、抗炎、抗疟原虫、抗氧化、抗病毒等方面具有突出的价值。

2.1 抗癌作用

全球癌症统计报告 2020 年版(Global Cancer Statistics 2020)中统计了全球 185 个国家、26 种癌症的发病率以及死亡率,报道显示 2020 年全球新诊断癌症 1 930 万,癌症的死亡人数预计可达 1 000

万人^[38],防癌治癌的方法备受关注,而在众多的预防癌症及治疗癌症的方案中,利用植物提取的天然化合物来防癌和抗癌是大众接受度较高的方案。

多项报道表明二氢黄酮醇类化合物具有广泛的抗癌、抗肿瘤活性且对正常细胞的毒性较低。目前关于化合物 2、4 的抗癌活性的研究报道较多,包括肺癌、乳腺癌、胃癌等多种癌种,作用机制主要为促进癌细胞的凋亡、抑制癌细胞的增殖、侵袭和转移等(具体见表 3)。

表 3 化合物 2、4 抗癌作用机理研究

Tab.3 Studies on anticancer mechanism of compound 2 and compound 4

化合物	病症模型	实验对象	作用机制	作用分子靶	参考文献
2	肺癌	A549	抑制癌细胞增殖并促进其凋亡	促进内质网应激和细胞内 ROS 的产生	[39]
	宫颈癌	Hela	诱导细胞凋亡	升高 P53 和 P21 mRNA 表达	[40]
	结直肠癌	HCT116	抑制细胞生长、促进细胞凋亡	抑制 β -catenin、Akt 表达	[41]
	皮肤癌	SSCC cell line	诱导细胞凋亡、引起细胞周期阻滞	MMP-2、MMP-9 $\downarrow$	[42]
4	胃癌	AGS	抑制癌细胞的增殖、迁移并诱导其凋亡	caspase-9、caspase-3 $\uparrow$; 抑制 Akt/stat3 信号途径的活化以及 HMGB1 的表达	[43,44]
	乳腺癌	MCF-7	抑制癌细胞增殖并促进凋亡	ADAM17、JAK2、STAT3 $\downarrow$	[45]
	喉癌	Hep-2	促进癌细胞凋亡	CXCR4 $\downarrow$	[46]
	卵巢癌	A2780	诱导癌细胞凋亡	激活 ERS 通路	[47]

化合物 16~18 处理人结肠癌细胞 HT-29 72 h 后显示有抗增殖作用,其中化合物 18 的抗增殖作用最高,在浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 下,处理 96 h 后细胞生长减少 50%;3 种化合物对人肝癌细胞 HepG2 也具有抑制作用,在浓度 ≥ 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,化合物 16 处理 96 h 后细胞生长能减少 50%,化合物 17 减少 46%,但化合物 18 的抑制活性相比较低,在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,仅减少 35%,化合物 16 抗增殖效果最好。可见三者选择性地抑制不同类型的癌细胞,化合物 18 对人结肠癌细胞 HT-29 具有最好的效果,而化合物 16 则对人肝癌细胞 HepG2 具有最好的效果,这种选择性作者认为可能是化合物对不同细胞具有不同的渗透能力或是在不同细胞系中有不同的细胞过程^[30]。化合物 26 对人喉鳞癌细胞 HEp2 具有细胞毒性,CC₅₀ 值为 16.9 $\mu\text{mol/L}$ ^[33]。

2.2 抗炎作用

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD),是一种在老年人群中十分常见的神经退行性疾病。炎症是造成 AD 的原因之一,现已有不少的二氢黄酮醇类化合物被证实具有一定的抗炎活性。化合物 4 可通过调控 NF- κ B 信号通路,降低 TNF- α 、iNOS、COX-2 等炎症因子的表达,还可通过抑制治疗 AD 的有效靶点 NLRP3 的表达和激活,从而

起到抗炎作用^[48]。化合物 2、4 在结构上区别仅为化合物 4 的 B 环上比化合物 2 多一个羟基,两者均具有良好的体外抗炎作用,但活性却具有差异,在 LPS 诱导 RAW264.7 巨噬细胞的体外炎症模型下,王佳奇等^[49]对两者的抗炎活性进行了对比,结果显示化合物 2 的抗炎活性比化合物 4 更高,可见 B 环上更多羟基数量在抗炎活性中不一定起积极作用。

在 LPS 诱导的 J774A.1 炎症模型下,化合物 5、6 具有良好的抗炎活性,化合物 16~18 也具有一定的抗炎活性,但效果远低于化合物 5、6,可见糖基上 C-3"位的基团取代可能对抗炎活性带来消极影响,同时化合物 17、18 的抗炎活性也具有区别,两者从结构上分析,区别仅为糖基上取代基的不同,可见糖基上不同取代基的取代对抗炎活性具有不同的影响^[30]。

2.3 抗疟原虫作用

部分天然二氢黄酮醇类化合物被报道具有良好的抗疟活性。化合物 27 对恶性疟原虫 D6 虫株、3D7 虫株、F32-TEM 虫株、KSM 009 虫株的 IC₅₀ 分别为 4.6、1.7、1.4、1.5 $\mu\text{mol/L}$,具有良好的抗疟活性。化合物 26、27 结构区别仅为化合物 26 的 B 环上有一个羟基,化合物 27 则无,但化合物 26 活性大不如化合物 27,对 D6 虫株 IC₅₀ 为

12.5 $\mu\text{mol/L}$, 对 3D7 虫株 IC_{50} 为 24.2 $\mu\text{mol/L}$, 对 F32-TEM 虫株 IC_{50} 为 18.7 $\mu\text{mol/L}$ ^[33], 可见 B 环上羟基的取代可能对抗疟活性带来消极影响。化合物 28 对恶性疟原虫 W2、3D7 虫株具有良好抑制活性, 对 W2 虫株的 IC_{50} 为 2.0 $\mu\text{mol/L}$, 对 3D7 虫株的 IC_{50} 为 6.6 $\mu\text{mol/L}$ ^[34]。

2.4 抗病毒作用

包括正在流行的新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 在内, 目前已知 7 种可感染人的冠状病毒。3CL^{Pro} 是位于冠状病毒非结构蛋白 nsp5 上的半胱氨酸蛋白酶, 与病毒转录复制相关, 是目前广谱抗病毒药物的重要靶点^[50]。Su 等^[51] 使用基于 FRET 的蛋白酶测定法分析化合物 4 对 SARS-CoV-2 3CL^{Pro} 的抑制活性时发现, 当浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 化合物 4 对其抑制率超 90%, IC_{50} 为 1.14 $\mu\text{mol/L}$; 在抑制 SARS-CoV-2 在细胞中复制效果测定中, EC_{50} 为 13.56 $\mu\text{mol/L}$, 是治疗 COVID-19 感染的潜在药物。

2.5 抗氧化作用

多酚化合物普遍具有良好的抗氧化活性, 大部分天然二氢黄酮醇类化合物具有多个酚羟基, 在抗氧化上具有极大的应用潜力。

卢怡雯等^[52] 采用微量光度滴定法研究化合物 2 清除 DPPH 自由基活性, 结果显示其具有良好的清除活性, 清除 DPPH 自由基的能力要强于芦丁。化合物 4 对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、DPPH 自由基也具有好的清除活性^[53]。化合物 6 是具有清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基能力的天然抗氧化剂, 具有保护 DNA 氧化损伤的活性, 保护的机制可能为其可直接消除 ROS (活性氧簇) 以及间接消除 ROS^[54]。在 DPPH 自由基清除活性测定下, 化合物 32 具有较好的自由基清除活性, IC_{50} 为 99.793 mmol/L ^[36]。Son 等^[37] 通过密度泛函理论 (DFT) 中 B3LYP/6-311++G(d,p) 方法, 研究化合物 33 的分子结构与抗氧化能力关系, 研究结论为化合物 33 通过断裂 O—H 键而起抗氧化作用, 其中 7-OH 是自由基攻击的良好活性位点。

2.6 其他作用

酪氨酸酶在动植物、微生物以及人体中广泛存在, 能直接影响黑色素的合成, 与果蔬的褐化以及人雀斑、褐斑等黑色素沉积有关^[55]。报道显示部分二氢黄酮醇类化合物具有酪氨酸酶抑制活性, 在食品、化妆品领域有应用前景。反式化合物 3 在以 L-酪氨酸为底物时, 酪氨酸酶抑制活性优

于曲酸, IC_{50} 为 21.54 $\mu\text{mol/L}$, 而化合物 11 即反式化合物 3 的糖苷衍生物活性则要低于其苷元, IC_{50} 为 93.17 $\mu\text{mol/L}$, 可见在 A 环 C-7 位上糖苷化会降低酪氨酸酶抑制活性。文章还报道, 在酪氨酸酶抑制活性对比中, 化合物 11 > 二氢山奈酚-7-O- β -D-葡萄糖苷 > 花旗松素-7-O- β -D-葡萄糖苷, 从结构上分析三者区别仅为 B 环上羟基的数量、取代位置不同, 根据活性对比可得知羟基的取代位置在酪氨酸酶抑制活性中起更重要的作用^[27]。

3 二氢黄酮醇类化合物的结构修饰

二氢黄酮醇类化合物功效多样但实际应用并不多, 原因之一为部分二氢黄酮醇化合物存在溶解性差、稳定性低等问题, 限制了其实际应用。针对该点原因利用结构修饰对分子结构进行适当的改造, 可改善存在的问题。目前结构修饰的方法主要有酶法、微生物法、化学法, 且大多围绕相对容易获取的化合物 2、4、5 进行, 即二氢槲皮素 (花旗松素)、二氢杨梅素、落新妇苷。下文主要介绍用化学法对它们进行结构修饰并进行简要的分析。

3.1 羟基结构改造

3.1.1 酰化酯化

多酚化合物常用酰化酯化的手段对羟基进行结构修饰, 从而提高脂溶性及稳定性。研究人员利用月桂酰氯^[56]、葵酰氯^[57]、亚麻酰氯^[58]、十二酰氯^[59]、乙酸酐^[60] 或乙酰氯^[61] 等对二氢杨梅素的羟基进行结构修饰, 有效地提高了脂溶性以及稳定性。研究人员对这些衍生物还进行了抗氧化测试, 在自由基清除能力测试下, 结果显示衍生物的抗氧化活性随着酯化程度的提高而下降^[61], 这可能是由于酚羟基是黄酮类化合物发挥抗氧化作用的原因之一, 过度的羟基修饰会导致抗氧化活性的下降。因此可考虑选择性地对羟基进行修饰。如 Nifant'ev 等^[62] 以 5,7,3',4'-四苄基二氢槲皮素为中间体, 选择性对其 3 号位进行结构修饰。而脂质体系下, 由于溶解性的增强, 酯化修饰后衍生物抗氧化活性获得提高, 如二氢杨梅素的酯化物在铁离子-抗坏血酸诱导的卵磷脂过氧化反应体系中, 抗氧化活性显著高于二氢杨梅素^[56]; 孟思等^[58] 利用亚麻酰氯对二氢杨梅素进行修饰后大大提高其对火麻油的抗氧化效果, 这也说明了二氢杨梅素衍生物在粮油领域具有应用潜力。

Su 等^[51] 以二氢杨梅素为原料, 利用硫酸二

甲酯制得 7-O-甲基-二氢杨梅素,该衍生物在 SARS-CoV-2 3CL^{pro}抑制活性测定中,显示具有良好效果($IC_{50}=0.26 \mu\text{mol/L}$);在抑制 SARS-CoV-2 在细胞中复制效果测定中,该衍生物的 EC_{50} 值为 $11.50 \mu\text{mol/L}$,抑制活性优于母体二氢杨梅素,且根据口服药代动力学分析得其口服生物利用度为 18.1%,是治疗新型冠状病毒感染的潜在药物。

通过在分子中引入其他官能团和结构片段,有利于扩大化合物的生物活性、生物利用度以及多种病理学的选择性。叶建涛等^[63]合成得二氢杨梅素与 5-氟尿嘧啶的拼合物(见图 4),并采用 MTT 法检测其对人白血病细胞 K562 及其耐药株 K562/ADR 的抑制效果。如图 4 所示,作者利用氯乙酸作为连接桥梁,将抗代谢药物 5-氟尿嘧啶衍生成 5-氟尿嘧啶-1-乙酸,在缩合剂 N,N'-二环己基碳酰亚胺(DCC)下与二氢杨梅素的羟基反应,得衍生物 A、B。制备得的衍生物 A、B 对 K562、K562/ADR 细胞增殖具有良好的抑制效果,抑制作用在 48 h 达到最大值,对 K562 细胞 IC_{50} 值分别为 (11.62 ± 2.20) 和 $(10.34 \pm 0.60) \mu\text{mol/L}$,对 K562/ADR 细胞 IC_{50} 值分别为 (7.19 ± 0.51) 、 $(11.26 \pm 1.29) \mu\text{mol/L}$ 。

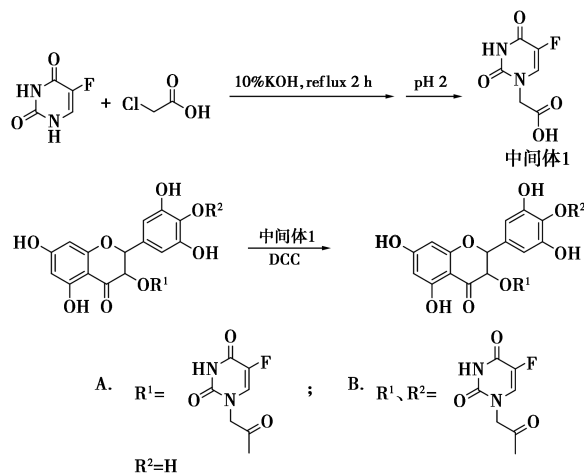


图 4 化合物 A、B 的合成路线

Fig.4 Synthetic route of compound A and B

Mamontova 等^[64]给二氢槲皮素引入琥珀酸基团,合成得化合物 DHQMS(C),并后续与 NH_3 、烷基胺、含氮基杂环化合物以及具有药理活性的植物生物碱形成缀合物(见图 5),并测定了这一系列衍生物的水溶性能和抗氧化性能。如图 5 所示,作者在 4-二甲氨基吡啶(DMAP)、三乙胺存在下,合成具有琥珀酸基团的衍生物 C,并在 EtOAc 为溶剂下,与各种胺类化合物形成缀合物。所合

成的一系列化合物都具有良好水溶性以及高抗氧化活性,其中溶解度最高的化合物,水溶性约为二氢槲皮素的 400 倍。在 DPPH 自由基测定抗氧化活性测试中,化合物的 IC_{50} 值范围为 $6.4 \sim 10.9 \mu\text{mol/L}$,说明了化学修饰后仍具有高抗氧化活性。

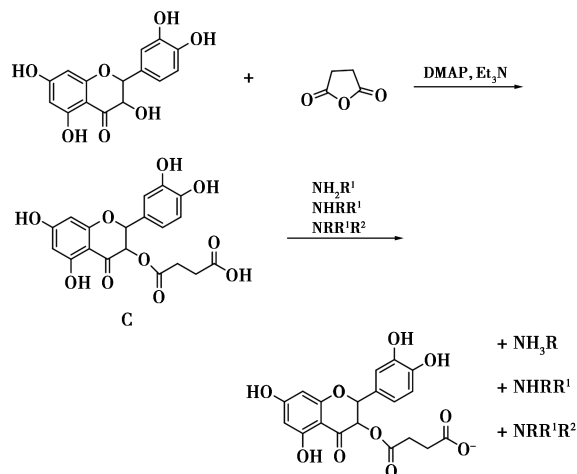


图 5 DHQMS 及其缀合物的合成路线

Fig.5 Synthetic route of DHQMS and conjugates of DHQMS

3.1.2 硒化衍生物

硒作为人体必需的微量元素之一,有多种生物学功能,是医药、农业等领域的关注对象之一。毛敏等^[65]利用亚硒酸钠作为硒源制备得硒化二氢杨梅素,经表征得 SeO_3^{2-} 基团取代位点为羟基的 H,作者还对制备的硒化衍生物进行了热稳定性及抗氧化活性测试,实验结果显示硒化衍生物的分解失重温度为 360°C ,而二氢杨梅素为 250°C ,热稳定性得到明显提高。抗氧化活性测试测定了对 $\cdot\text{OH}$ 自由基、DPPH 自由基的清除能力,在 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除能力测试中,硒化衍生物的清除能力更强,但硒化衍生物对 DPPH 自由基的清除能力低于母体,这可能是由于羟基氢被取代而导致的。

3.2 金属配合物

黄酮类化合物分子具有较高的超离域度、大 π 键共轭体系、强配位氧原子以及合适的空间构型,是良好的金属离子螯合配体,生命过程中一些金属离子承担多种生物功能,与金属离子螯合形成配合物后,生物活性可能得到提高或具有新的药理活性。

Trofimova 等^[66]利用 ZnCl_2 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 在水作为溶剂下合成了二氢

槲皮素-Zn 配合物以及用 CuSO_4 、 $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 在乙醇与水的混合溶剂下合成二氢槲皮素-Cu 配合物,两种配合物均具有抗流感病毒 H3N2 活性,且 Cu 配合物对抗病毒 H5N2 具有强活性,通过给药前后 H5N2 病毒的电镜显微镜图像观察到,这种活性可能来源于其可导致病毒包膜溶解。Wu 等^[67]用乙酸锌作为原料,合成得二氢杨梅素-Zn(II)配合物并测定其对 DPPH 自由基、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除活性,结果显示,其自由基清除活性效果优于 Vc 及原结构二氢杨梅素。Li 等^[68]以氯化钴为钴源,合成二氢杨梅素-Co(II)配合物,并采用试管二倍稀释法研究得该配合物对白色念珠菌具有良好的抑制活性,抑制活性强于原结构二氢杨梅素。

3.3 糖苷化

在黄酮类化合物的结构修饰中,糖苷化是改善稳定性、溶解性、生物利用度的理想方法之一。杨淞瑞等^[69]以落新妇苷为原料,乙酸酐作为酰化剂,控制条件制备得裸露 5-OH 的乙酰化中间体,利用三氯乙酰亚胺酯糖基供体与中间体在三氟甲磺酸三甲基硅酯催化下进行糖苷化,最后利用甲醇钠脱除保护基,为落新妇苷引入了 D-半乳糖、D-葡萄糖、D-甘露糖和 D-阿拉伯糖这 4 种天然水溶性单糖(见图 6),引入了水溶性糖基后,水溶性得到大大的提高。

3.4 C=O 结构改造

酰肼类 Schiff 碱化合物是一类具有较好生物活性的药物配体,郭芳等^[70]利用二氢杨梅素与异烟肼以乙醇为溶剂、冰乙酸调节 pH 合成了二氢杨梅素异烟肼席夫碱化合物(见图 7),并采用正交试验,考察不同反应条件对产率的影响,最后得出的最优条件是:温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 5.5、反应时间为 7 h。

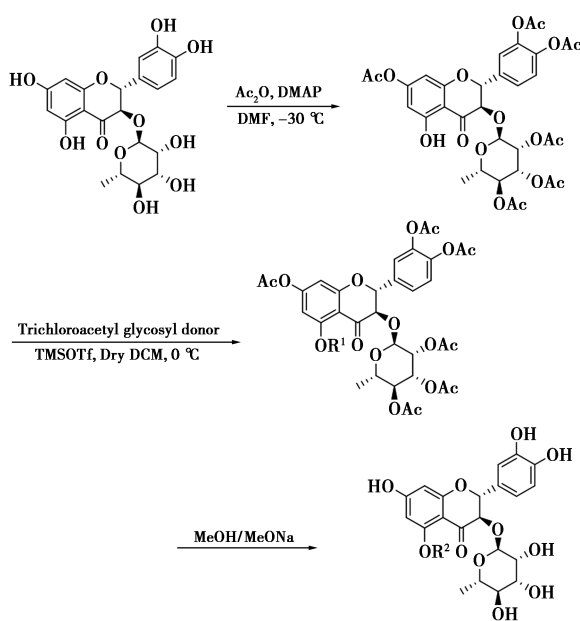


图 6 落新妇苷 C-5 位糖苷衍生物的合成路线

Fig.6 Synthetic route of C-5 glycosidic derivatives of Astilbin

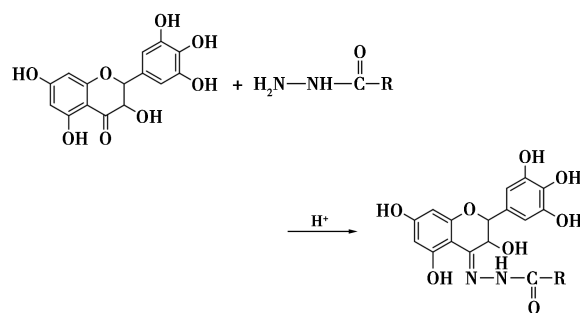


图 7 二氢杨梅素异烟肼席夫碱化合物的合成路线

Fig.7 Synthetic route of dihydromyricetin isoniazid hydrazine schiff base compounds

3.5 其他

有报道利用二氢槲皮素在甲醛与仲胺下发生曼尼希二烷基胺甲基化反应(Mannich dialkylaminomethylation),改善了其水溶性,Kukhareva 等^[71]

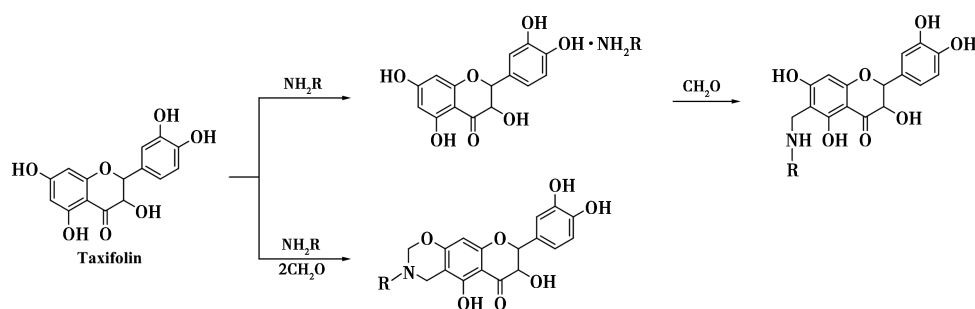


图 8 二氢槲皮素衍生物的合成路线

Fig.8 Synthetic route of dihydroquercetin derivatives

修改该合成方法,利用二氢槲皮素与伯胺进行反应得加合物,这些加合物在反应物等物质的量下短间接触后形成,并自发沉淀,后再用该加合物在异丙醇下与甲醛继续反应得 C-6 上连接胺的衍生物,且作者在两倍过量甲醛下使二氢槲皮素与伯胺反应时,发现形成了杂环片段(见图 8)。

Gogotov 等^[72]对二氢槲皮素进行亚硝化,在 B 环的 C-5'位上引入亚硝基,得亚硝化衍生物 D(见图 9),作者首先是将原料二氢槲皮素溶解于热水中,再加入亚硝酸钠,在 2~4 °C 下,用盐酸酸化,使得 NaNO_2 转化为 HNO_2 ,在无氧条件下反应,直至溶液颜色转至红棕色。经抗氧化活性测试得亚硝化衍生物的抗自由基活性超过原结构 10%~15%。

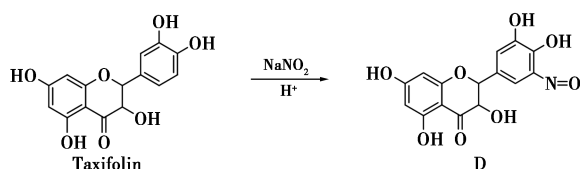


图 9 化合物 D 的合成路线

Fig.9 Synthetic route of compound D

Hurtova 等^[73]报道了一种利用 α,β 二溴氢肉桂酸温和、选择性地溴化黄酮类化合物的方法,并通过该方法对二氢槲皮素进行溴化,得单溴化衍生物 E、二溴化衍生物 F(见图 10),这些溴化衍生物是可用于进一步合成的有用中间体。该合成方法是在 DMF 为溶剂、反应物与碱的物质的量比为 1:0.5 进行的,其中单溴化使用 Cs_2CO_3 作碱,在

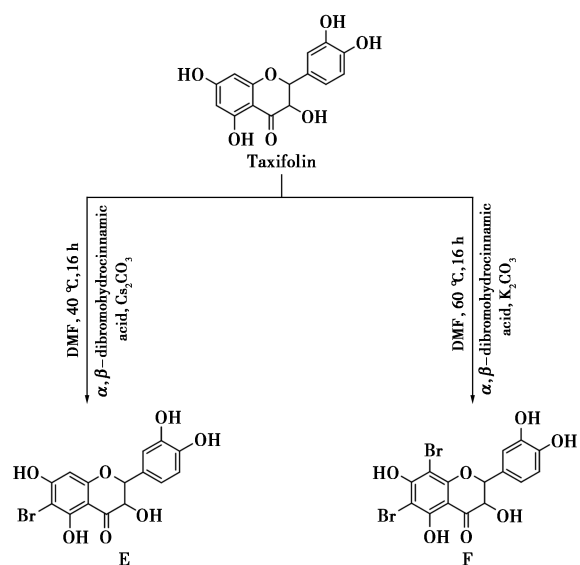
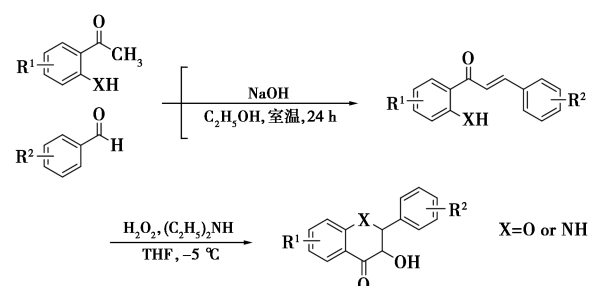


图 10 化合物 E、F 的合成路线

Fig.10 Synthetic route of compounds E and F

40 °C 下反应 16 h,而二溴化则是以 K_2CO_3 为碱,更高的温度(60 °C)下反应 16 h 得到。

胡春玲等^[74]从合成路线出发,以邻羟基苯乙酮衍生物和苯甲醛衍生物开始,得 A、B 环修饰的衍生物,又以邻氨基苯乙酮衍生物,苯甲醛衍生物开始,得 C 环结构改变的衍生物(见图 11),并利用 ELISA 法测定一系列衍生物作用于 LPS 诱导下 RAW264.7 细胞的 $\text{TNF-}\alpha$ 的分泌量来进行抗炎活性评价,测试结果显示,抗炎活性最显著的两个化合物分别为 A 环 C-6 位上 -OH 取代和 B 环 C-4'位上 F 的取代,对比其他衍生物的抗炎效果可得 A 环上的酚羟基是发挥活性的原因之一,且羟基数量增多可对抗炎活性带来积极影响;对于 B 环来说,B 环 C-4'位上取代基对活性具有较大影响,F 原子取代能增强抗炎活性;对于 C 环来说,C 环结构改变的衍生物抗炎活性比原结构要低,可得 C 环可能是发挥抗炎活性的原因之一,改变 C 环结构可能对抑制炎症因子带来消极影响。



$\text{R}^1 = \text{H}; 5\text{-OH-7OH}; 7\text{-OH}; 5\text{-OH}; 5\text{-OH-6-OH-7-OH}; 7\text{-Cl};$
 $5\text{-OCH}_3; 7\text{-OCH}_3$

$\text{R}^2 = \text{H}; 3'\text{-OH-4'-OH}; 3'\text{-OCH}_3; 4'\text{-OCH}_3; 3'\text{-OCH}_3\text{-4'-OCH}_3;$
 $4'\text{-OPh}; 4'\text{-F}; 4'\text{-Cl}; 4'\text{-i-Pr}$

图 11 A、B、C 环结构修饰的合成路线

Fig.11 Synthetic route of structural modification of ring A, B, C

4 结论与展望

从上述提及的二氢黄酮醇类化合物结构、生物活性及结构修饰可得,基团的数量、种类及取代位置不同都可造成生物活性的差异,即便是结构上较小的差异,其溶解性或生物活性都会有明显的差别。因此在未来天然二氢黄酮醇类化合物的研究中,需对二氢黄酮醇类化合物的结构特异性给予更多的关注,从而有利于它们在实际应用中的进一步开发。

目前使用化学法对二氢黄酮醇类化合物进行

结构修饰的报道并不多,其中对羟基进行结构改造占较大比重。结构修饰可在提高溶解能力及改善生物活性上提供帮助,但使用化学法进行结构修饰仍面临着反应位点多、区域选择性差、酸碱敏感等问题。随着人们对天然化合物的深入研究,相信不久后会有更简洁、高效、绿色的方法用于二氢黄酮醇类化合物的结构修饰,从而提高其生物利用度及改善其生物活性。

参考文献:

- [1] 张鞍灵,高锦明,王姝清. 黄酮类化合物的分布及开发利用[J]. 西北林学院学报, 2000, **1**: 69-74.
- [2] NGROUPAYO J, TABOPDA T K, ALI M S, et al. Antioxidant stilbenoid and flavanone from stem of *Erythrophleum suaveolens* (Guill. & Perr.) [J]. *Magn. Reson. Chem.*, 2015, **53**(8): 612-615.
- [3] HUANG H L, HU M, ZHAO R, et al. Dihydromyricetin suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by inducing G2/M arrest through the Chk1/Chk2/Cdc25C pathway [J]. *Oncol. Rep.*, 2013, **30**(5): 2 467-2 475.
- [4] BEBOVÁ M, BOŠTÍKOVÁ Z, MOSEROVÁ M, et al. Modulation of xenobiotic conjugation enzymes by dihydromyricetin in rats [J]. *Monatsh. Chem.*, 2017, **148**(11): 2 003-2 009.
- [5] ABDEL-SALAM N A, GHAZY N M, SALLAM S M, et al. Flavonoids of *Alcea rosea* L. and their immune stimulant, antioxidant and cytotoxic activities on hepatocellular carcinoma HepG-2 cell line [J]. *Nat. Prod. Res.*, 2018, **32**(6): 702-706.
- [6] AJMAL ALI M. Molecular docking and molecular dynamics simulation of anticancer active ligand cular 7,3',5'-pentahydroxy-flavanone-3-O- α -L-rhamnopyranoside' from *Bauhinia strychnifolia* Craib to the cyclin-dependent protein kinase [J]. *J. King Saud. Univ. Sci.*, 2020, **32**(1): 891-895.
- [7] YAO M J, TENG H, LV Q Y, et al. Anti-hyperglycemic effects of dihydromyricetin in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Food Sci. Hum. Wellness*, 2021, **10**(2): 155-162.
- [8] CELIK H, KOSAR M. Inhibitory effects of dietary flavonoids on purified hepatic NADH-cytochrome b5 reductase: Structure-activity relationships [J]. *Chem. Biol. Interact.*, 2012, **197**(2/3): 103-109.
- [9] CHEN S H, ZHAO X L, WAN J, et al. Dihydromyricetin improves glucose and lipid metabolism and exerts anti-inflammatory effects in nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial [J]. *Pharmacol. Res.*, 2015, **99**: 74-81.
- [10] XIE K, HE X, CHEN K Y, et al. Ameliorative effects and molecular mechanisms of vine tea on western diet-induced NAFLD [J]. *Food Funct.*, 2020, **11**(7): 5 976-5 991.
- [11] WENG L H, ZHANG H, LI X X, et al. Ampelopsin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response through the inhibition of the NF- κ B and JAK2/STAT3 signaling pathways in microglia [J]. *Int. Immunopharmacol.*, 2017, **44**: 1-8.
- [12] LI K K, SHEN S S, DENG X, et al. Dihydrofisetin exerts its anti-inflammatory effects associated with suppressing ERK/p38 MAPK and heme oxygenase-1 activation in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages and carrageenan-induced mice paw edema [J]. *Int. Immunopharmacol.*, 2018, **54**: 366-374.
- [13] LIN Y M, FAN J, RUAN L J, et al. Semi-preparative separation of dihydromyricetin enantiomers by supercritical fluid chromatography and determination of anti-inflammatory activities [J]. *J. Chromatogr. A*, 2019, **1 606**: 460 386.
- [14] LIANG X Q, HU C, LIU C Y, et al. Dihydrokaempferol (DHK) ameliorates severe acute pancreatitis (SAP) via Keap1/Nrf2 pathway [J]. *Life Sci.*, 2020, **261**: 118 340.
- [15] AN J, ZUO G Y, HAO X Y, et al. Antibacterial and synergy of a flavanone rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) [J]. *Phytomedicine*, 2011, **18**(11): 990-993.
- [16] LIANG H Y, HE K K, LI T, et al. Mechanism and antibacterial activity of vine tea extract and dihydromyricetin against *Staphylococcus aureus* [J]. *Sci. Rep.*, 2020, **10**(1): 21 416.
- [17] 周光雄,程燕,叶文才,等. 三叉刺中黄酮类化学成分研究[J]. 中草药, 2008, **4**: 510-512.
- [18] 陈云华,龚慕辛,卢旭然,等. 鬼箭羽的降糖有效部位的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, **16**(7): 42-43.
- [19] FUKUI Y, NAKADOME K, ARIYOSHI H. Isolation of a new taxifolin glucoside from the leaves of *Chamaecyparis obtuse* Endlicher [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1966, **86**(3): 184-189.
- [20] 袁婷,郑甜碧,谢鲁灵枫,等. HPLC 法同时测定桑白皮中 5 种成分[J]. 中成药, 2019, **41**(7): 1 606-1 611.
- [21] 王岩,周莉玲,李锐,等. RP-HPLC 法测定不同药用部

- 位不同采收期藤茶中蛇葡萄素的含量[J]. 中药材, 2002, **1**: 23-24.
- [22] 张友胜, 杨伟丽, 熊皓平. 显齿蛇葡萄基本成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2001, **5**: 46-48.
- [23] 魏玉娇, 郭晓强, 杨淞瑞, 等. 基于响应面法的土茯苓中落新妇苷提取工艺研究[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2019, **38**(3): 251-255.
- [24] 龙丽, 张亚莉, 杨琴, 等. HPLC 法测定莪荇药材中黄酮类成分的含量[J]. 中药材, 2019, **42**(12): 2 874-2 877.
- [25] SEO U M, NGUYEN D H, ZHAO B T, et al. Flavanonol glucosides from the aerial parts of *Agrimonia pilosa* Ledeb. and their acetylcholinesterase inhibitory effects[J]. *Carbohydr. Res.*, 2017, **445**: 75-79.
- [26] HUANG L, MA W H, LIU Y Z, et al. Irisdichotins A-C, three new flavonoid glycosides from the rhizomes of *Iris dichotoma* Pall [J]. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2011, **13**(8): 744-748.
- [27] ZHENG Z P, TAN H Y, CHEN J, et al. Characterization of tyrosinase inhibitors in the twigs of *Cudrania tricuspidata* and their structure-activity relationship study[J]. *Fitoterapia*, 2013, **84**: 242-247.
- [28] ZHAO H X, BAI H, JING Y C, et al. A pair of taxifolin-3-O-arabinofuranoside isomers from *Juglans regia* L. [J]. *Nat. Prod. Res.*, 2017, **31**(8): 945-950.
- [29] WANG K, YANG J Z, ZUO L, et al. Two new flavanonol glycosides from *Gordonia chrysandra* [J]. *Chinese Chem. Lett.*, 2008, **19**(1): 61-64.
- [30] XIN W B, HUANG H Q, YU L, et al. Three new flavanonol glycosides from leaves of *Engelhardtia roxburghiana*, and their anti-inflammation, antiproliferative and antioxidant properties [J]. *Food Chem.*, 2012, **132**(2): 788-798.
- [31] WUNGSINTAWEEKUL B, UMEHARA K, MIYASE T, et al. Estrogenic and anti-estrogenic compounds from the Thai medicinal plant, *Smilax corbularia* (Smilacaceae) [J]. *Phytochemistry*, 2011, **72**(6): 495-502.
- [32] LUKASEDER B, VAJRODAYA S, HEHENBERGER T, et al. Prenylated flavanones and flavanonols as chemical markers in *Glycosmis species* (Rutaceae) [J]. *Phytochemistry*, 2009, **70**(8): 1 030-1 037.
- [33] MUIVA-MUTISYA L M, ATILAW Y, HEYDENREICH M, et al. Antiplasmodial prenylated flavanonols from *Tephrosia subtriflora* [J]. *Nat. Prod. Res.*, 2018, **32**(12): 1 407-1 414.
- [34] CHEPKIRUI C, OCHIENG P J, SARKAR B, et al. Antiplasmodial and antileishmanial flavonoids from *Mundulea sericea* [J]. *Fitoterapia*, 2021, **149**: 104 796.
- [35] LIU H, JIA X H, WANG H C, et al. Flavanones from the fruit extract of *Paulownia fortunei* [J]. *Phytochem. Lett.*, 2021, **43**: 196-199.
- [36] LIAQAT A, SAMINA A, TANIA S R, et al. Antioxidant flavonoids from *Nepeta floccosa* Benth [J]. *Rec. Nat. Prod.*, 2015, **9**(4): 567-571.
- [37] SON N T, THUY P T, VAN TRANG N. Antioxidative capacities of stilbenoid Suaveolensone A and flavonoid Suaveolensone B: A detailed analysis of structural-electronic properties and mechanisms [J]. *J. Mol. Struct.*, 2021, **1 224**: 129 025.
- [38] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J. Clin.*, 2021, **71**(3): 209-249.
- [39] 符小玲, 赵兴丹, 张倩, 等. 花旗松素对人非小细胞肺癌细胞 A549 的作用及其机制的研究[J]. 肿瘤药学, 2018, **8**(4): 519-523, 527.
- [40] 翟延君, 程飞, 王添敏, 等. 花旗松素对人宫颈癌 Hela 细胞的体外抗肿瘤活性及其机理研究[J]. 中成药, 2011, **33**(12): 2 052-2 055.
- [41] RAZAK S, AFSAR T, ULLAH A, et al. Taxifolin, a natural flavonoid interacts with cell cycle regulators causes cell cycle arrest and causes tumor regression by activating Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *BMC Cancer*, 2018, **18**(1): 1 043.
- [42] ZHOU W, LIU Z M, WANG M, et al. Taxifolin inhibits the scar cell carcinoma growth by inducing apoptosis, cell cycle arrest and suppression of PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *J. Buon.*, 2019, **24**(2): 853-858.
- [43] 陆崇, 王承党. 二氢杨梅素通过 ERK 和 p38 途径抑制人胃癌 AGS 细胞的增殖并诱导其凋亡[J]. 福建医科大学学报, 2021, **55**(5): 390-394.
- [44] WANG S N, GE F, CAI T Y, et al. Dihydromyricetin inhibits proliferation and migration of gastric cancer cells through regulating Akt/STAT3 signaling pathways and HMGB1 expression [J]. *J. South Med. Univ.*, 2021, **41**(1): 87-92.
- [45] 李杨, 戴雪明, 王晔, 等. 二氢杨梅素通过抑制 ADAM 17 影响乳腺癌细胞 MCF-7 增殖和凋亡的研究[J]. 肿瘤药学, 2018, **8**(4): 528-530, 554.
- [46] 赵锐, 周米露, 刘海. 二氢杨梅素诱导喉癌 Hep-2 细胞凋亡的机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, **38**(14): 1 588-1 592.
- [47] 王凤杰, 王海静, 陈显兵, 等. 二氢杨梅素激活内质网应激促进卵巢癌 A2780 细胞凋亡[J]. 药学报, 2022, **61**(12): 2 158-2 164.

- 2020, **55**(9): 2 127-2 133.
- [48] JING N S, LI X N. Dihydromyricetin attenuates inflammation through TLR4/NF-kappaB pathway [J]. *Open Med. (Wars)*, 2019, **14**: 719-725.
- [49] 王佳奇, 陈凯, 王月亮, 等. 二氢槲皮素与二氢杨梅素抗炎活性对比研究[J]. 中国兽药杂志, 2016, **50**(7): 46-52.
- [50] 赵佩佩, 郑文慧, 步敏, 等. 冠状病毒抑制剂的研究进展[J]. 化学通报, 2020, **83**(8): 674-689.
- [51] SU H X, YAO S, ZHAO W F, et al. Identification of pyrogallol as a warhead in design of covalent inhibitors for the SARS-CoV-2 3CL protease[J]. *Nat. Commun.*, 2021, **12**(1): 3623.
- [52] 卢怡雯, 李晓芬, 高云涛, 等. 花旗松素清除 DPPH 自由基的微量光度滴定研究[J]. 食品科技, 2015, **40**(7): 286-289.
- [53] 张命龙, 彭密军, 杨秋玲, 等. 显齿蛇葡萄抗氧化活性与主要成分相关性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, **31**(3): 387-394.
- [54] 谢雨露, 黄毓珧, 李熙灿. 黄杞苷保护 DNA 氧化损伤的活性及其可能机制[J]. 中国现代应用药学, 2018, **35**(9): 1 333-1 336.
- [55] 何敏, 凡美艳, 杨维, 等. 曲酸类酪氨酸酶抑制剂研究进展[J]. 化学试剂, 2022, **44**(7): 1 001-1 011.
- [56] 李卫, 郑成, 宁正祥, 等. 酯化修饰对二氢杨梅素性能的影响[J]. 食品科学, 2011, **32**(1): 66-69.
- [57] 吴春, 李俊生, 车春波, 等. 脂溶性二氢杨梅素的制备及其抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2011, **32**(20): 69-71.
- [58] 孟思, 肇立春, 吴隆坤, 等. 火麻油保质期二氢杨梅素的酯化修饰与抗氧化性研究[J]. 中国粮油学报, 2021, **36**(6): 87-90.
- [59] 李卫, 郑成, 宁正祥, 等. 二氢杨梅素的酯化及其抗氧化规律探讨[J]. 食品科技, 2007, **5**: 198-201.
- [60] LI W, BHADBHADE M, HOOK J, et al. Dihydro-myricetin hexa-acetate [J]. *Acta Cryst.*, 2010, **66**(Pt 10): o2627.
- [61] 蔡祯艳, 刘赫男, 王虹, 等. 二氢杨梅素乙酰化衍生物的合成及其抗氧化活性研究[J]. 中国医药工业杂志, 2016, **47**(1): 18-21.
- [62] NIFANT'EV E E, KOROTEEV A M, POZDEEV A O, et al. Acylation of 5, 7, 3', 4'-tetrabenzylidihydroquercetin with heterocyclic carboxylic acid chlorides [J]. *Dokl. Chem.*, 2015, **459**(2): 209-211.
- [63] 叶建涛, 伟明, 何蓉蓉, 等. 蛇葡萄素与 5-氟尿嘧啶拼合物的合成及其抗肿瘤活性[J]. 时珍国医国药, 2012, **23**(5): 1 143-1 145.
- [64] MAMONTOVA N V, CHERNYAK E I, AMOSOV E V, et al. First ionic conjugates of dihydroquercetin monosuccinate with amines [J]. *Chem. Nat. Compd.*, 2017, **53**(6): 1 045-1 051.
- [65] 毛敏, 李香香, 杨晶莹, 等. 二氢杨梅素硒化修饰及其理化性质研究[J]. 中成药, 2022, **44**(3): 902-907.
- [66] TROFIMOVA N N, BABKIN V A, KISELEV O I. Complex compounds of zinc and copper(II) ions with dihydroquercetin and their antiviral activity [J]. *Russ. Chem. B.*, 2016, **64**(6): 1 430-1 436.
- [67] WU C, ZHENG X P, CHEN L L. Study on Antioxidant activity of dihydromyricetin-zinc(II) complex [J]. *Adv. Mater.*, 2011, **183/185**: 863-867.
- [68] LI H X, YANG W, ZHAI R R, et al. Synthesis and antibacterial activity of dihydromyricetin-Co(II) [J]. *Asian J. Chem.*, 2014, **26**(19): 6 309-6 912.
- [69] 杨淞瑞, 郭晓强, 何源超, 等. 新型免疫抑制剂落新妇苷 C-5 位糖苷衍生物的合成研究[J]. 化学研究与应用, 2019, **31**(10): 1 818-1 825.
- [70] 郭芳, 李海霞, 任强强, 等. 二氢杨梅素异烟肼酰胺席夫碱的合成工艺研究[J]. 食品工业, 2017, **38**(8): 44-46.
- [71] KUKHAREVA T S, KRASNOVA V A, NIFANT'EV E E. Alkylaminomethylation of dihydroquercetin [J]. *Russ. J. Gen. Chem.*, 2005, **75**(10): 1 553-1 555.
- [72] GOGOTOV A F, KANITSKAYA L V, HAI D T T, et al. Enhancement of antiradical properties of dihydroquercetin by nitrosation [J]. *Russ. J. Appl. Chem.*, 2015, **87**(12): 1 877-1 883.
- [73] HURTOVA M, BIEDERMANN D, KUZMA M, et al. Mild and selective method of bromination of flavonoids [J]. *J. Nat. Prod.*, 2020, **83**(11): 3 324-3 331.
- [74] 胡春玲, 周宗宝, 向远航, 等. 花旗松素衍生物的设计、合成及抗炎活性构效关系研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, **30**(10): 1 714-1 720.

生化与药用试剂

查尔酮类化合物抗肿瘤活性研究进展

李林博¹, 刘玉肖¹, 樊平平¹, 周淑晶^{1,2}, 李进京^{*1,2}

(1.佳木斯大学 药学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 2.黑龙江省药学研究所, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:天然产物查尔酮因其具有广泛的生物活性而被人们所关注。特别是在抗肿瘤方面,可作用于多种抗癌靶标从而发挥抗肿瘤作用,如 EGFR、VEGFR-2、Ntoch 信号通路、PI3K/AKT 信号通路、WNT/ β -cantenin 信号通路以及线粒体介导的细胞凋亡信号通路等。依据不同抗癌机制对近年来查尔酮及其衍生物在抗肿瘤活性方面的研究成果进行分类阐述,为新型含 α,β -不饱和酮结构的抗肿瘤药物的研发工作提供参考。

关键词:查尔酮;天然产物;抗癌靶标;抗肿瘤活性;研究进展

中图分类号:R979.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2023)02-0033-10

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0450

Research Progress on Anti-tumor Activity of Chalcone Derivatives LI Lin-bo¹, LIU Yu-xiao¹, FAN Ping-ping¹, ZHOU Shu-jing^{1,2}, LI Jin-jing^{*1,2} (1.College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China; 2.Heilongjiang Institute of Pharmacy, Jiamusi 154007, China)

Abstract:Chalcone as the natural product has attracted people's attention due to its diverse biological activities. Especially in terms of anti-tumor effect, it can bind to a variety of anti-cancer targets, such as EGFR, VEGFR-2, Ntoch signaling pathway, PI3K/AKT signaling pathway, WNT/ β -cantenin signaling pathway and mitochondrial-mediated apoptosis signaling pathway. Classified by anti-cancer mechanism, the account was mainly focused on the research of chalcone derivatives in anti-tumor field in the last years, in order to provide references in the development of novel anti-tumor drugs containing α,β -unsaturated ketone structure.

Key words:chalcone; natural product; anticancer target; antitumor activity; research progress

查尔酮(Chalcone,图1)是一类广泛存在于柑橘类水果、蔬菜、甘草以及红花等植物中的类黄酮类天然产物,其经典结构主要由一个含 3C 单元的 α,β -不饱和酮结构连接两个芳基构成^[1]。研究表明,该类化合物是植物主要的次生代谢产物,作为植物的防御机制来抵抗活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS),防止微生物、昆虫或草食动物等对自身造成损害^[2]。此外,查尔酮及其衍生物因其独特的结构而具有广泛的生物活性,如抗菌^[3]、抗糖尿病^[4]、抗结核^[5]、抗氧化^[6]、抗疟^[7]等。

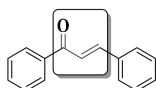


图1 查尔酮的经典结构

Fig.1 Classic structure of chalcone

癌即是指来源于上皮组织的恶性肿瘤,其产生是由突变或异常体细胞不受控制地生长导致^[8]。据世界卫生组织推测,到 2035 年,在全球

范围约 1 315 万人将因癌症而死亡^[9]。目前,基于抗肿瘤药物的化学疗法(简称化疗)是人们预防及治疗癌症的主要手段,其旨在靶向各种肿瘤机制,如细胞周期、生长因子以及和细胞死亡的控制信号等^[10],但临床上应用的抗肿瘤药物几乎都具有不同程度的副作用。因此,加速研究靶向、高效、低毒副作用的新型抗肿瘤药物迫在眉睫。

基于活性天然产物分子结构,设计并合成类天然产物库,从中筛选出高效率、高选择性、低毒副作用的先导化合物来进行抗肿瘤药物的临床前

收稿日期:2022-06-13;网络首发日期:2022-11-09

基金项目:黑龙江省属高校基本科研业务费项目(2018-KYYWF-0946);佳木斯大学博士启动项目(JMSUZB2018-02)。

作者简介:李林博(1997-),男,河南长葛人,硕士生,主要研究方向为新型小分子抗肿瘤药物的设计与合成。

通讯作者:李进京,E-mail:lijinjing@jmsu.edu.cn。

引用本文:李林博,刘玉肖,樊平平,等.查尔酮类化合物抗肿瘤活性研究进展[J].化学试剂,2023,45(2):33-42。

研究,是研发新药的主要途径之一。如前所述,查尔酮因其合成简单且具有多个反应中心以及较好的柔性^[11],能与多种活性基团相结合而受到广泛关注。特别是在抗肿瘤方面,诸多查尔酮类化合物均表现出卓越的生物活性。此外,流行病学研究表明,饮食中摄入较高量的植物类黄酮或许能降低癌症患病率^[12],这进一步使得查尔酮类化合物成为人们研究抗肿瘤药物的热点。本综述重点讨论近五年查尔酮及其衍生物在抗肿瘤活性方面的研究成果,以抗肿瘤作用机制进行分类阐述,并对查尔酮类衍生物在抗肿瘤方面的应用作了展望。

1 查尔酮及其衍生物的抗肿瘤活性

1.1 抑制微管蛋白聚合机制

由 α -和 β -微管蛋白异二聚体的聚合和解聚之间的平衡而建立的细胞微管系统广泛存在于各类细胞(包括肿瘤细胞)结构中^[13]。其结构长而空心,具有维持细胞形状、调节细胞运输及细胞分裂的作用^[14,15]。基于微管在细胞周期中的重要作用,通过抑制或干扰微管蛋白聚合和解聚的动力学,即可导致细胞有丝分裂停滞,引起细胞凋亡。这已被认为是开发抗肿瘤药物的理想策略之

一。在微管蛋白中有 4 个独特的结合位点,其中靶向长春花生物碱和秋水仙碱结合位点的属微管蛋白聚合抑制剂^[16]。2017 年,Shankaraiah 等^[17]基于秋水仙碱结合位点设计并合成出一系列含不同杂环的查尔酮衍生物并测试其体外抗微管蛋白聚合活性。研究发现,化合物 1(图 2)能明显抑制微管蛋白聚合从而破坏微管的形成,IC₅₀ 值为 9.66 $\mu\text{mol/L}$ 。初步的机制研究表明,化合物 1 能够以浓度依赖性促进细胞产生 ROS,阻滞细胞周期至 G2/M 期并诱导细胞凋亡。SAR 分析发现查尔酮与哌嗪杂环的柔性连接链的长度以 3C 单位更易与受体结合,从而发挥更好的抗微管蛋白聚合活性。

同年,Huang 等^[18]则合成出一系列含酰胺基的新型查尔酮衍生物。体外抗肿瘤活性评价发现,在该系列衍生物中化合物 2(图 2)对测试的癌细胞系(包括 MDR 人类癌症系)表现出较强的抗增殖活性(IC₅₀ = 3.75~8.2 $\mu\text{mol/L}$)。此外,在 15 $\mu\text{mol/L}$ 浓度条件下,化合物 2 能有效地抑制体外微管蛋白的聚合。初步的机制研究表明,化合物 2 也能够阻滞细胞周期至 G2/M 期并上调 ROS 水平、引起线粒体膜电位丧失以及细胞色素 C(cyto.C)释放、下调 Bcl-2、上调 Bax、激活起始凋亡蛋白酶 caspase-9 和效应凋亡蛋白酶 caspase-3 等诱导 NCI-H460 细胞凋亡。随后,该课题组又基于前药的设计策略,首次将查尔酮与铂基抗癌药物通过酯键连接在一起形成 Pt(IV)复合物,以期改进铂基抗癌药物的生物利用度低、副作用严重等缺陷^[19]。体外抗肿瘤活性评价发现,化合物 3、化合物 4(图 2)对癌细胞的抗增殖活性均比顺铂(*cis*-Diamine Dichloroplatinum, CDDP)强。SAR 表明 Pt(IV)复合物对癌细胞的抗增殖活性随着其碳链长度的增加而增强。机制研究表明,受试分子可阻滞细胞周期至 G2/M 期并诱导 ROS 产生、调节 Bcl-2 的表达,进而诱导细胞凋亡。

Wang 等^[20]于 2018 年设计并合成出了一系列靶向微管蛋白秋水仙碱结合位点的含胺基查尔酮衍生物,其中化合物 5(图 2)表现出最佳的抗微管蛋白聚合活性(IC₅₀ = 7.1 $\mu\text{mol/L}$, IC_{50(秋水仙碱)} = 9.0 $\mu\text{mol/L}$)。体外抗肿瘤活性评价表明,化合物 5 对测试的癌细胞系的抗增殖能力均优于阳性对照物秋水仙碱。2020 年,该课题组又设计出两类靶向微管蛋白秋水仙碱结合位点的查尔酮衍生物。第一类是含有二芳基醚基团的新

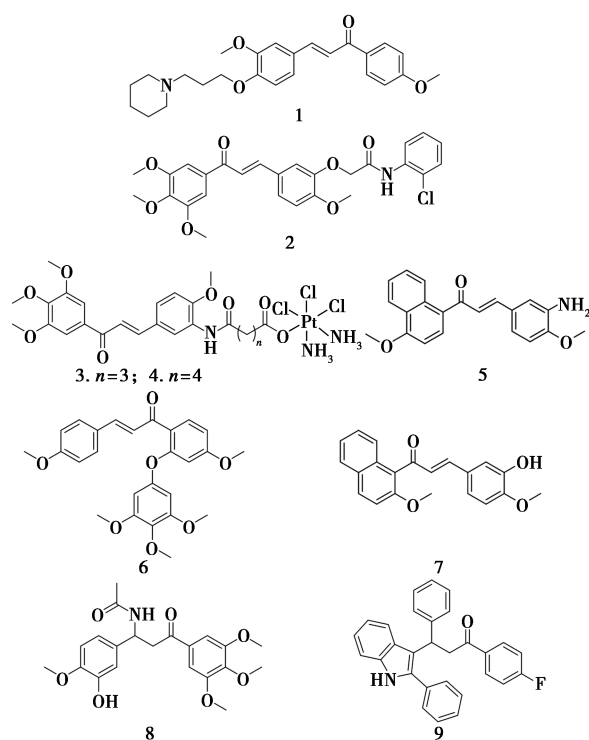


图 2 具有抑制微管蛋白聚合活性的查尔酮类化合物

Fig.2 Chalcone compounds with activity to inhibit tubulin polymerization

型查尔酮衍生物^[21],其中化合物 6(图 2)能够有效地抑制微管蛋白聚合($IC_{50} = 20.0 \mu\text{mol/L}$)。分子对接研究发现,化合物 6 在与微管蛋白的结合模式中呈“Y 形”构象,其 4-甲氧基苯基和 3',4',5'-三甲氧基苯基被残基 Ala-180、Cys-241、Leu-248、Ala-250、Leu-255、Ala-316、Val-318 和 Ala-354 围绕,并形成强疏水键。第二类则是与化合物 3 结构类似的含萘芳基类查尔酮衍生物,其中化合物 7(图 2)对 MCF-7 表现出比阳性对照物 CDDP($IC_{50} = 15.24 \mu\text{mol/L}$)更佳的抗增殖活性, IC_{50} 值为 $1.42 \mu\text{mol/L}$ 。此外,化合物 7 对正常细胞系 HEK293 表现出相对较低的细胞毒性。同样,化合物 7 表现出与化合物 3 相近地抑制微管蛋白聚合活性($IC_{50} = 8.4 \mu\text{mol/L}$, $IC_{50(\text{秋水仙碱})} = 10.6 \mu\text{mol/L}$)。分子对接发现,化合物 7 在与微管蛋白的结合模式中呈“L 形”构象,其中 2-甲氧基萘基位于疏水口袋处,被残基 Cys-241、Leu-248、Ala-250、Leu-252 以及 Leu-255 包围,形成了牢固的疏水结合作用^[22]。

Karimikia 等^[13]以及 Patel 等^[23]于 2019 年分别基于查尔酮的 α,β -不饱和酮的双键部分设计出两类具有抑制微管蛋白聚合作用的查尔酮衍生物。其中参考文献[13]发现具有 β -乙酰胺基酮结构的化合物 8(图 2)对体外微管蛋白聚合的抑制活性弱于具有刚性 α,β -不饱和键的化合物。结合 SAR 分析可得, α,β -不饱和键是化合物具有微管蛋白聚合抑制作用的关键。分子对接表明,化合物 8 的—OH 可与 LysB352 或 AlaB317 形成氢键,从而增强其与微管蛋白的相互作用。参考文献[23]所设计的一些系列含吡啶基的查尔酮衍生物中,体外抗肿瘤活性评价发现化合物 9(图 2)对 B16F10 和 MCF-7 有着良好抗增殖活性($IC_{50} = 11.14, 10.01 \mu\text{mol/L}$)。

1.2 抑制血管生长机制

肿瘤血管的生长过程是一个复杂且涉及到诸多血管生长刺激信号接受和转导的生化反应过程。其中,促血管生成因子主要有:表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)、血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)以及血小板衍生生长因子(Platelet-Derived Growth Factor, PDGF)等,它们主要通过介导信号转导通路促进肿瘤新生血管的生长^[24],是当前抑制血管生长的重要研究靶点。

1.2.1 靶向表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)

EGFR 属受体酪氨酸激酶(Protein Tyrosine Kinases, RTK)的 ErbB 家族。EGF 和 EGFR 结合后与 1 个 ATP 分子作用,促使 EGFR 胞内区特异的受体酪氨酸残基磷酸化,将外界各种信号转导至胞内,激活下游的 Ras-Raf-MAPK 级联系统和磷酸肌醇激酶系统,并与多种参与有丝分裂的信号转导分子产生高亲和,将有丝分裂信号从胞外传递到胞内,从而有效调节细胞对外界的刺激反应、细胞增殖、迁移和分化等。诸多实体肿瘤细胞中的 EGFR 均存在过度表达现象^[25]。

临床上可通过抑制 EGFR 胞内区受体酪氨酸磷酸化来阻止 EGFR 信号传递系统,阻断其下游通路,阻滞细胞周期至 G1 期、促进细胞凋亡并抑制新血管形成^[26]。Mohamed 等^[27]近期发现含有三唑并[4,3-a]喹啉结构的查尔酮衍生物能够有效地抑制 EGFR 活性,表现出抑制肿瘤血管生长作用。其中化合物 10(图 3)对 MCF-7、HCT-116 以及 HEPG-2 表现出最佳的细胞毒性($IC_{50} = 3.61, 1.65, 8.58 \mu\text{mol/L}$)。SAR 分析表明,芳基上的取代基对受试分子的细胞毒性起关键作用,以多甲氧基取代最佳。体外 EGFR 活性抑制实验表明,化合物 10 比阳性对照物 Staurosporine($IC_{50} = 0.054 \mu\text{mol/L}$)更佳,其 IC_{50} 值为 $0.039 \mu\text{mol/L}$ 。此外,化合物 10 还具有优异的体外抗微管蛋白聚

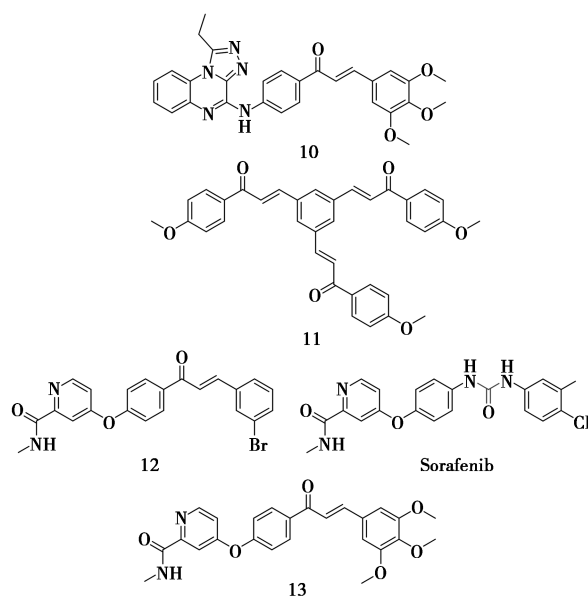


图 3 具有抗血管生成作用的查尔酮类化合物

Fig.3 Chalcone compounds with anti-angiogenesis effect

合作用(IC_{50} 值为 $8.84 \mu\text{mol/L}$, $IC_{50}(\text{秋水仙碱}) = 26.8 \mu\text{mol/L}$), 分子对接表明化合物 10 作用于秋水仙碱结合位点, 查尔酮部分占据了 β 亚基中 Leu-248、Ala-315、Ile-378、Leu-255 残基并形成的疏水口袋。而喹啉环则通过氢键键合到 Thr-179 残基并与 α 亚基相互作用。2018 年, Al-Anazi 等^[28] 基于计算建模方法经分子对接以及分子动力学模拟研究了一系列含三元查尔酮结构的化合物。其中化合物 11(图 3)能够很好地结合在 3POZ 的活性位点上, 与酪氨酸激酶结构域 ATP 结合位点中的 ATP 竞争, 阻止 ATP 与 EGF/EGFR 聚合物的结合。此外, 经 MM-GBSA 计算得化合物 11 与活性位点的结合能为 -56.6 kcal/mol , 进一步强调了其具有作为 EGFR 抑制剂的潜力。

1.2.2 靶向血管内皮生长因子受体 2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, VEGFR-2)

VEGFR-2 属 RTK 受体超家族, 对肿瘤转移和肿瘤血管生长具有重要调控作用, 主要在血管内皮细胞和造血干细胞中表达。VEGFR-2 介导 VEGF 调控的细胞信号转导通路, 刺激血管内皮细胞增殖, 导致血管生长^[29]。目前, 靶向 VEGFR-2 的抗肿瘤药物, 一般通过与 ATP 竞争而占据其催化域中的 ATP 结合口袋, 从而阻断下游信号转导通路。此外, VEGFR-2 抑制剂一般为多靶点抑制剂, 可同时阻断多个对肿瘤转移和肿瘤血管生长有重要作用的独立信号通路。Wang 等^[30] 基于 VEGFR-2 抑制剂 Sorafenib(图 3)的母核结构合成出一系列新型查尔酮衍生物并表现出良好的 VEGFR-2 抑制活性, 其中化合物 12(图 3)的活性最佳($IC_{50} = 0.72 \mu\text{mol/L}$)。此外, 化合物 13(图 3)对 B-Raf 激酶也有着优异的抑制活性($IC_{50} = 1.8 \mu\text{mol/L}$)。SAR 分析发现利用查尔酮的 α, β -不饱和酮部分替代 Sorafenib 的脒基能够改善细胞毒性, 且卤素(3-Br, 4-F)或甲氧基等取代基对该活性有益。

1.3 信号通路调控机制

1.3.1 PI3K/AKT 信号通路

磷脂酰肌醇 3 激酶 (Phosphoinositide 3-Kinase, PI3K) 是 RTK 家族 EGFR/VEGFR-2 下游重要的传导信号, 激活后使磷酸化磷脂酰肌醇-4, 5-二磷酸转变为磷脂酰肌醇-3, 4, 5-三磷酸 [PI(3, 4, 5)P₃], PI(3, 4, 5)P₃ 结合并激活丝苏氨酸蛋白激酶 AKT, 随后通过磷酸化调控多种转录因子(如 NF- κ B)从而抑制凋亡基因的表达。此外,

AKT 还能磷酸化糖原合成 GSK-3、mTOR 等, 上调周期蛋白 D, 引起细胞周期变短, 导致肿瘤发生^[31, 32]。2016 年, Shuai 等^[33] 研究了天然产物 Naringenin Chalcone(简称 NC, 图 4)对 PI3K/AKT 信号通路的影响及其对 U87MG 细胞系的体内外抗肿瘤作用。体外研究发现 NC 对 U87MG 显示出剂量依赖性和时间依赖性的抗增殖活性并诱导细胞凋亡, 透射电子显微镜亦观察到自噬泡的形成。Western 印迹分析表明 NC 能够激活 PI3K 和 AKT, 上调 PI3K 相关蛋白表达水平。在 U87MG 小鼠模型中, 通过比较肿瘤重量和肿瘤体积发现 NC 能明显地抑制肿瘤生长。

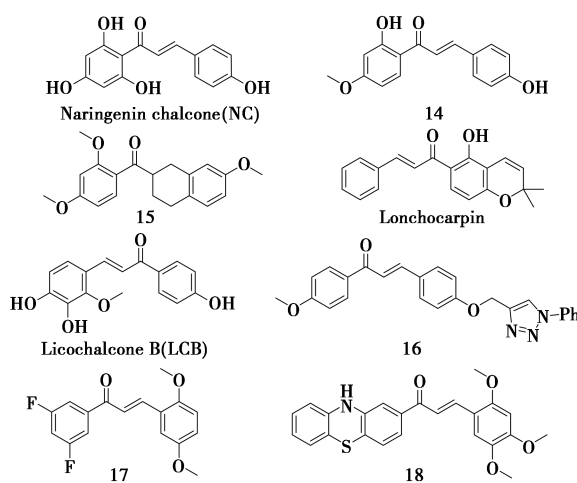


图 4 靶向各种信号通路的查尔酮类化合物

Fig.4 Chalcone compounds targeting various signaling pathways

1.3.2 Ntoch 信号通路

选择性靶向控制癌症干细胞 (Cancer Stem Cells, CSCs) 自我行为的信号通路是提高常规化疗和放射疗法效果的有效途径之一。近年来, Notch 信号已被证明在多种人类肿瘤 CSCs 的维持和自我更新中起着重要作用, 研究表明实体肿瘤以及血液癌症的转移与 Notch 信号转导异常有关^[34]。Notch 信号传导是一种短程细胞间通讯系统, 调节着许多生物学过程, 如胚胎和成年期干细胞的自我更新以及细胞分化、增殖等。该信号的激活将诱导诸多蛋白水解, 如 ADAM 金属蛋白酶裂解、 γ 分泌酶 (GS) 复合物裂解等, 后者导致膜上活性 NICD 释放并与 DNA 结合蛋白 CSL 促进 Notch 下游靶基因的转录^[35]。

2017 年, Mori 等^[36] 对天然产物分子库中诸多代表性化合物的结构研究发现, 具有查尔酮结构的化合物 14(图 4)对 T-ALL 癌细胞系 DND41

的短期治疗能够导致 Notch 信号传导活性呈剂量依赖性降低 ($IC_{50} = 1.92 \mu\text{mol/L}$)。Western 印迹分析表明化合物 14 能以较低剂量 ($1 \sim 5 \mu\text{mol/L}$) 降低 N1Val 和 N3ICD 蛋白表达水平,阻滞细胞周期至 G1 期并诱导凋亡。Quaglio 等^[37]基于参考文献[36]研究,于 2019 年对化合物 14 进行结构修饰以期获得具有更佳抑制 Notch 信号传导活性的衍生物。在癌细胞系 KOPTK1 中发现具有四氢化萘结构的化合物 15(图 4)能降低 Notch 目标基因 DELTEX1 的 N1Val 蛋白表达以及内源性 mRNA 水平。但在抗增殖方面,化合物 15 的活性不及化合物 14。SAR 分析表明, α,β -不饱和酮结构对受试分子细胞毒性的影响起到关键作用。

1.3.3 WNT/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路

WNT 属分泌型糖蛋白,富含半胱氨酸残基,可通过自分泌或旁分泌发挥作用,并与位于细胞膜上的受体相结合,激活细胞内信号通路,调节靶基因的表达;对细胞的增殖、分化、迁移、极化和凋亡起到重要作用^[38]。WNT 信号通路可分为 WNT/ β -catenin 信号通路和非经典 WNT 信号通路。本质上,WNT/ β -catenin 信号通路即是 Axin (多结构域支架蛋白)、 β -catenin 和 WNT 蛋白调控细胞内 β -catenin 的磷酸化及降解的过程。在肿瘤细胞中 β -catenin 能够在苏氨酸和丝氨酸残基处产生突变,从而避免 β -catenin 的磷酸化和降解并促进肿瘤细胞的生长和存活。2019 年,Predeas 等^[39]经 Western 免疫印迹实验发现天然产物 Lonchocarpin(图 4),表明其能在转录水平上起作用^[40]。对结直肠癌细胞系 SW480,其可通过损害胞核内转录因子 TCF 介导的转录从而抑制 WNT 信号通路下游 β -catenin 的稳定水平,表现出良好的抗肿瘤作用。此外,还发现 Lonchocarpin 能够选择性抑制 HCT116、SW480 和 DLD-1 等癌细胞系的细胞迁移和细胞增殖且对正常细胞系 IEC-6 无明显抑制活性。在由丙氧甲烷(AOM)/右旋糖酐硫酸钠(DSS)诱导的结肠癌小鼠模型中,Lonchocarpin 亦能够明显减少体内肿瘤的增殖。

1.3.4 线粒体介导的细胞凋亡通路

细胞凋亡指为维持内环境稳定,在多基因严格控制下,细胞自主有序的死亡现象。其受内源性线粒体途径或外源性死亡受体途径调控。线粒体凋亡途径起始于细胞内产生的促凋亡因子,这些因子作用于线粒体后使其外膜透化,cyto.C 向

胞质内释放并在胞质内与衔接蛋白 Apaf-1 形成多聚复合物,活化 caspase-9、caspase-3,活化的 caspase-3 裂解维持细胞结构的必需蛋白质,导致细胞凋亡^[41]。在线粒体凋亡途径中,其关键在于线粒体膜透化,cyto.C 转移到细胞质中。研究表明,Bcl-2 家族蛋白是影响线粒体膜透化的关键分子。其可分为起限制凋亡作用的 Bcl-xL、Bcl-2,促进凋亡作用的 Bax、Bak 以及辅助凋亡作用的 Bin、Bad、Puma 等^[42,43]。

刘瑛等^[44]在 MCF-7 中对分离自甘草中的 Licochalcone B(简称 LCB,图 4)进行体外抗增殖活性研究时发现,LCB 能以时间和浓度依赖性来有效地抑制 MCF-7 细胞增殖,并通过线粒体凋亡途径来诱导细胞凋亡。荧光显微镜明显观察到染色体边集、核浓缩、核碎裂等典型凋亡形态学特征。初步的机制研究表明 LCA 能够使 MCF-7 细胞下调 Bcl-xL、上调 Bax,并激活 caspase-9、caspase-3。

2017 年,Yadav 等^[45]设计并合成出一系列含 1,2,3-三氮唑结构的新型查尔酮并对其进行了细胞毒性测试。结果表明,化合物 16(图 4)对测试的 4 种癌细胞系均表现出良好的细胞毒性 ($IC_{50} = 4 \sim 11 \mu\text{mol/L}$),且化合物 16 对人正常细胞系 rR2 无明显毒性 ($IC_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$)。机制分析表明,化合物 16 可诱导 MIA-Pa-Ca-2 细胞线粒体膜电位丧失,激活 Procaspase-9,经线粒体凋亡途径诱导细胞凋亡。此外,化合物 16 还可以引起外源性死亡受体途径关键蛋白 Procaspase-8 的活化。同年,Yamali 等^[46]合成出一系列含氟查尔酮衍生物,体外抗肿瘤活性评价发现化合物 17(图 4)对 Ca9-22、HSC2 癌细胞系表现出较高的细胞毒性 ($CC_{50} = 3.4, 3.3 \mu\text{mol/L}$)。经计算其选择性表达值(PSE)高达 442,表明其对肿瘤细胞有着较高的选择性毒性。Western 免疫印迹实验表明,化合物 17 能激活由 caspase-3 介导的线粒体凋亡途径,诱导细胞凋亡。该课题组又设计出一系列含吩噻嗪结构的新型查尔酮衍生物^[47],体外抗肿瘤活性评价发现化合物 18(图 4)能够以低浓度抑制 4 种人口腔鳞状细胞癌细胞系的增殖活性 ($CC_{50} = 2.9 \sim 8.4 \mu\text{mol/L}$)。Western 免疫印迹分析发现化合物 18 能诱导 HSC-2 中 PARP 裂解产物的产生(caspase-3 的底物)并促进 caspase-3 的活化。值得一提的是,化合物 18 对肿瘤细胞的选择性毒性远超化合物 17(PSE>1285)。

1.4 细胞毒性

细胞毒性是化学物质作用于细胞基本结构或生理过程,如细胞骨架结构、细胞的新陈代谢过程、离子调控、细胞分裂等过程,导致细胞存活、增殖或功能的紊乱。查尔酮类化合物对肿瘤细胞具有广泛的细胞毒性^[48]。该部分主要阐述近年来没有具体的抗癌机制,但对肿瘤细胞具有抗恶性增殖活性的查尔酮及其衍生物。

从天然产物结构出发,基于生物活性亚结构拼接原理开发新型抗肿瘤药物是当前新药研发的重要途径。Smit 等^[49]经分子杂交策略,将二氢青蒿素通过酯键与查尔酮相连,设计并合成出一系列二氢青蒿素-查尔酮衍生物。抗肿瘤活性评价发现化合物 19(图 5)比母体查尔酮 20(图 5)的

抗肿瘤活性强。如对 TK-10 细胞系,前者 $IC_{50} = 5.99 \mu\text{mol/L}$,后者 $IC_{50} = 18.87 \mu\text{mol/L}$ 。此外,查尔酮芳环被 2,3-(OCH_3)₂ 取代的化合物 21(图 5)对 MCF-7 表现出最强的细胞毒性, $IC_{50} = 1.02 \mu\text{mol/L}$ 。

天然产物白藜芦醇(Resveratrol,图 5)是一种存在于葡萄皮中的天然植物抗毒素,具有广泛的生物活性,被认为是潜在的癌症化学预防剂。Gao 等^[50]于 2018 年首次将白藜芦醇引入查尔酮结构,设计并合成一系列新型查尔酮衍生物,随后利用 MTT 法评估了其对 A549、HeLa 和 SGC7901 的细胞毒性。结果表明,化合物 22(图 5)对 A549、HeLa 表现出较好的细胞毒性, IC_{50} 值分别为 0.26、7.35 $\mu\text{mol/L}$ 。此外,化合物 22 能够显著诱导肿瘤细胞 A549 的凋亡。基于 *Piper methysticum* 根中得到的天然查尔酮 Flavokawain B (FKB) 骨架,Addila 等^[51]在 2018 年设计并合成出一系列衍生物并评估了其对 MCF-7 和 MDA-MB-231 的细胞毒性。结果表明,含有 F 或 Cl 取代的化合物 23~25(图 5)表现出较好的细胞毒性,其 IC_{50} 值依次分别为 7.12 和 4.04 $\mu\text{g/mL}$ (化合物 23)、5.50 和 6.50 $\mu\text{g/mL}$ (化合物 24)、6.50 和 4.12 $\mu\text{g/mL}$ (化合物 25)。

天然产物 DMC(图 5)因其过强的亲脂性而使得其近乎不溶于水,在临床应用中受到极大限制。Wang 等^[52]受前药设计策略的启发,于 2017 年通过将极性、可电离的叔胺基经醚键与 DMC 的芳基相连接,合成出一系列水溶性较好的查尔酮衍生物。抗肿瘤活性评价发现化合物 26(图 5)对 MCF-7 的抗增殖活性相较于 DMC 而言,有了极大地提高, IC_{50} 值由 15.1 $\mu\text{mol/L}$ 降低至 1.3 $\mu\text{mol/L}$ 。此外,化合物 26 对紫杉醇诱导的耐药性癌细胞系 HeLa/Tax 也有着极强的抗增殖活性($IC_{50} = 2.3 \mu\text{mol/L}$)。水溶性差、生物利用度低等也是查尔酮类化合物作为临床抗肿瘤药物的主要局限。Zhu 等^[53]亦基于前药设计策略,对具有良好抗肿瘤活性的查尔酮衍生物 OC26(图 5)通过形成磷酸盐的形式来增加其水溶性,以期改善其在体内抗肿瘤实验中显现的生物利用度低的缺陷^[54]。结果表明,成盐的 BOC26P(图 5)相较于 OC26 而言,其体内抗肿瘤活性更强,且表现出更强的生物利用度。

含氮杂环因其独特的化学性质以及广泛的生物活性,而成为一类常见于抗肿瘤药物中的活性

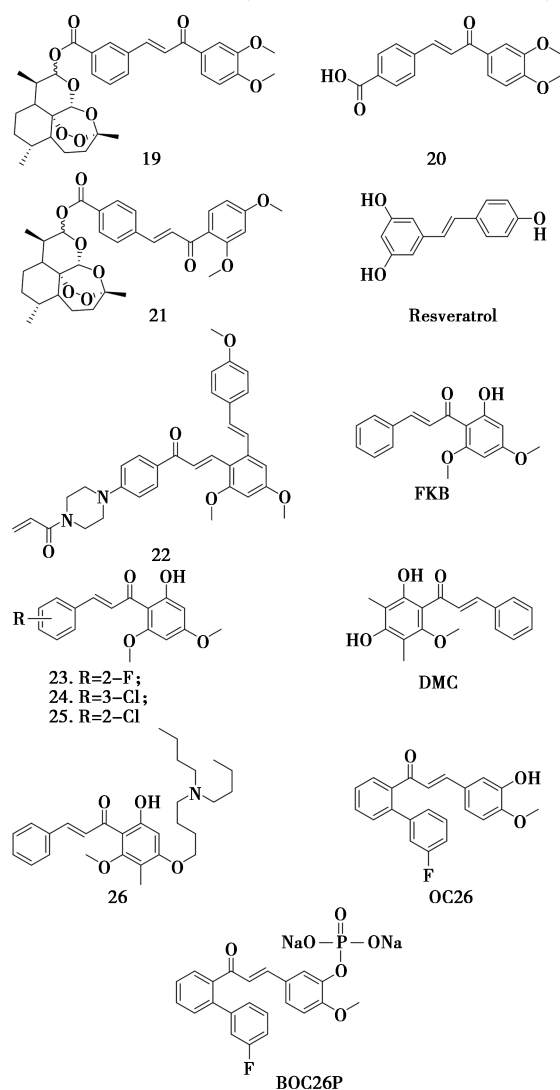


图 5 基于天然产物活性结构拼接策略合成的查尔酮类化合物

Fig.5 Chalcone compounds synthesized based on the splicing strategy of natural product active structures

亚结构。2016 年, Mao 等^[55] 基于分子杂交策略设计并合成出一系列含 4-哌嗪基查尔酮衍生物。抗肿瘤活性评价发现, 化合物 27 (图 6) 对 A549、HeLa 和 SGC7901 表现出最佳抗增殖活性 ($IC_{50} = 5.24, 0.19, 0.41 \mu\text{mol/L}$)。SAR 分析表明, 哌嗪 N-苯乙酮基上的卤素对化合物的细胞毒性有着重要影响。体内抗肿瘤活性实验发现化合物 27 能在 25 mg/kg/d 剂量条件下, 显著抑制体内肿瘤生长。2017 年, 该团队发现哌嗪 N-萘乙酮取代的化合物 28 (图 6) 对 A549、HeLa 和 SGC7901 癌细胞系表现出优于阳性对照物 CDDP 的细胞毒性^[56], 但化合物 28 对癌细胞的细胞毒性弱于化合物 27。为进一步研究卤素对化合物 SAR 的影响, 该课题组于 2018 在不同的取代位置向查尔酮中引入卤素^[57]。抗肿瘤活性评价发现, 4'-Br 取代的化合物 29 (图 6) 对 A549 表现出比化合物 27、28 更强的抗增殖活性 ($IC_{50} = 0.05 \mu\text{mol/L}$), 即 B 芳基上的卤素取代基对该类衍生物的细胞毒性起着更关键的影响。

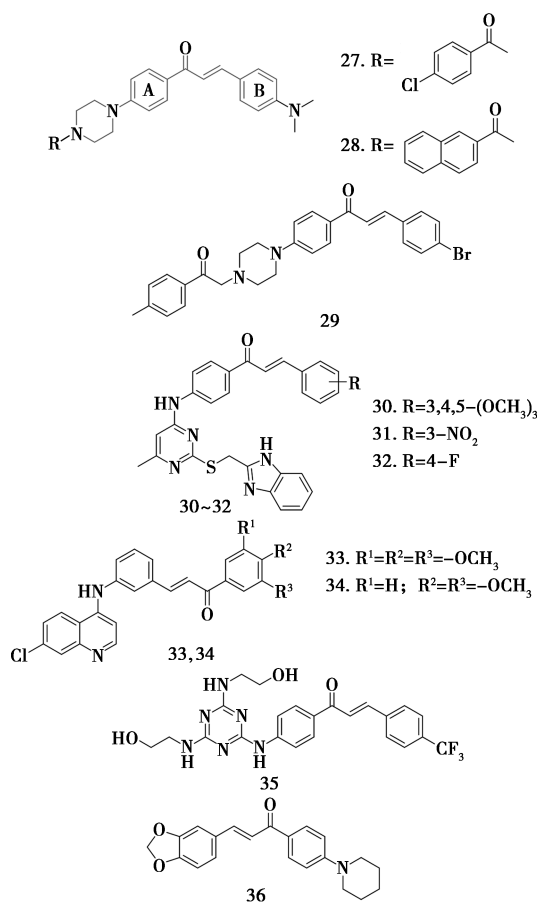


图 6 具有氮杂环基团的查尔酮类化合物

Fig.6 Chalcone compounds with nitrogen heterocycle group

Song 等^[58] 于 2017 年设计出一系列含嘧啶基的查尔酮衍生物并利用 CCK-8 比色法进行体外抗肿瘤活性评价, 发现化合物 30 (图 6) 对 MGC-803 和 MDA-MB-231 的抗增殖活性优于阳性对照物 5-氟尿嘧啶 (5-FU), IC_{50} 值分别为 0.99 和 $1.77 \mu\text{mol/L}$ 。此外, 化合物 31 (图 6) 对 HepG-2 的抗增殖活性优于 5-FU, 化合物 32 (图 6) 对 EC-109 的抗增殖活性优于 5-FU。同年, Ramirez-Prada 等^[59] 通过氨基将喹啉与查尔酮相连, 设计出一系列新型查尔酮衍生物。经美国国家癌症研究所 (NCI) 的活性测试发现化合物 33 (图 6) 对肺癌 RPMI-8226 表现出最佳的抗肿瘤活性 ($GI_{50} = 0.31 \mu\text{mol/L}$)。基于此, Charris 等^[60] 在 2019 年发现含喹啉化合物 34 (图 6) 对 HL60 和 Jurkat E6.1 表现出比阳性对照物 DOX 更强的细胞毒性 ($IC_{50} = 2.88, 3.44 \mu\text{mol/L}$), 且对人正常淋巴细胞表现出较低的细胞毒性。此外, 化合物 34 对于两种癌细胞系的选择性优于 DOX。

2018 年, Moreno 等^[61] 所设计的含有 1,3,5-三嗪基的新型查尔酮衍生物同样经 NCI 对 58 种不同的人类肿瘤细胞系的抗癌活性进行检测, 结果表明化合物 35 (图 6) 对肾癌 UO-31 表现出最强细胞毒性 ($GI_{50} = 1.54 \mu\text{mol/L}$)。2019 年, Sheng 等^[62] 基于经典 Claisen-Schmidt 缩合反应将哌啶、吗啡啉等杂环取代基与查尔酮结合在一起, 合成出一系列新型查尔酮衍生物。基于 MTT 法评估了其对于 MCF-7、A549、HL-60、HeLa 以及 Bewo 的细胞毒性, 其中化合物 36 (图 6) 对 MCF-7、A549 和 HL-60 这 3 种癌细胞系抗癌活性最佳, IC_{50} 值依次为 $8.70, 9.72, 7.15 \mu\text{mol/L}$ 。

2 结论及展望

近年来, 基于天然产物结构以及计算机模拟等手段来设计并合成出类天然产物库, 筛选出具有低毒、高效且靶向性强的先导化合物, 进行药物临床前研究, 是抗肿瘤药物的主流研发途径。具有 α, β -不饱和酮结构的查尔酮类化合物因其具有简单的合成方法、独特的理化性质以及低毒副作用等优点而被人们广泛地应用到抗肿瘤药物的研发中。基于查尔酮结构来设计合成的类似衍生物可作用于多个抗癌靶点, 如微管蛋白; 抑制 EGFR、VEGFR2 活性从而抑制血管生长; 影响 Ntoch 信号通路、PI3K/AKT 信号通路、WNT/ β -cantenin 信号通路以及线粒体介导的细胞凋亡信

号通路等。可以预见,随着研究的进一步深入,查尔酮类化合物更多的抗癌机制将被发现,也必将成为今后抗肿瘤药物分子设计的重要研究骨架之一。

参考文献:

- [1] OUYANG Y, LI J, CHEN X, et al. Chalcone derivatives: Role in anticancer therapy [J]. *Biomolecules*, 2021, **11**(6): 894.
- [2] REBELO I. Antioxidant effects of chalcones during the inflammatory response: An overall review [J]. *Curr. Med. Chem.*, 2021, **28**(37): 7 658-7 713.
- [3] MENG F L, ZHENG C J, LI Y J, et al. Synthesis and antibacterial activity of novel chalcone derivatives containing 2,4-thiazolidinedione-3-acetic acid moiety [J]. *Chinese J. Org. Chem.*, 2012, **32**(1): 183-188.
- [4] MAHAPATRA D K, ASATI V, BHARTI S K, et al. Chalcones and their therapeutic targets for the management of diabetes: Structural and pharmacological perspectives [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **92**(6): 839-865.
- [5] MASCARELLO A, CHIARADIA L D, VERNAL J, et al. Inhibition of mycobacterium tuberculosis tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: Kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth [J]. *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**(11): 3 783-3 789.
- [6] AOKI N, MUKO M, OHTA E, et al. C-geranylated chalcones from the stems of angelica keiskei with superoxide-scavenging activity [J]. *J. Nat. Prod.*, 2008, **71**(71): 1 308-1 310.
- [7] TOMAR V, BHATTACHARJEE G, KAMALUDDIN, et al. Synthesis of new chalcone derivatives containing acridinyl moiety with potential antimalarial activity [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**(2): 745-751.
- [8] US National Institutes of Health. National Cancer Institute. Dictionary of Cancer Terms. US National Institutes of Health National Cancer Institute, 2002.
- [9] World Health Organization. WHO technical specifications: Cryosurgical equipment for the treatment of precancerous cervical lesions and prevention of cervical cancer [EB/OL]. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/75853>, 2012.
- [10] ROZMER Z, PERJÉSI P. Naturally occurring chalcones and their biological activities [J]. *Phytochem. Rev.*, 2016, **15**: 87-120.
- [11] ZHUANG C L, ZHANG W, SHENG C Q, et al. Chalcone: A privileged structure in medicinal chemistry [J]. *Chem. Rev.*, 2017, **117**(12): 7 762-7 810.
- [12] HOENSCH H P, KIRCH W. Potential role of flavonoids in the prevention of intestinal neoplasia [J]. *Int. J. Gastrointest. Cancer*, 2005, **35**(3): 187-196.
- [13] KARIMIKIA E, BEHRAVAN J, ZARGHI A, et al. Colchicine-like β -acetamidoketones as inhibitors of microtubule polymerization: Design, synthesis and biological evaluation of in vitro anticancer activity [J]. *Iran. J. Basic Med. Sci.*, 2019, **22**(10): 1 138-1 146.
- [14] AMOS L A. What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics [J]. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2011, **22**(9): 916-926.
- [15] AMOS L A. Microtubule structure and its stabilisation [J]. *Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2**(15): 2 153-2 160.
- [16] LI L, JIANG S B, LI X X, et al. Recent advances in trimethoxyphenyl (TMP) based tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, **151**(10): 482-494.
- [17] SHANKARAIAH N, NEKKANTI S, BRAHMA U R, et al. Synthesis of different heterocycles-linked chalcone conjugates as cytotoxic agents and tubulin polymerization inhibitors [J]. *Bioorg. Med. Chem.*, 2017, **25**(17): 4 805-4 816.
- [18] HUANG X, HUANG R, LI L, et al. Synthesis and biological evaluation of novel chalcone derivatives as a new class of microtubule destabilizing agents [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **132**(26): 11-25.
- [19] HUANG X, HUANG R, WANG Z, et al. Pt(IV) complexes conjugating with chalcone analogue as inhibitors of microtubule polymerization exhibited selective inhibition in human cancer cells [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, **146**(25): 435-450.
- [20] WANG G, PENG Z, ZHANG J, et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of amino-chalcone derivatives as potential anticancer agents by targeting tubulin colchicine binding site [J]. *Bioorg. Chem.*, 2018, **78**: 332-340.
- [21] WANG G, LIU W, GONG Z, et al. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of new chalcone derivatives containing diaryl ether moiety as potential anticancer agents and tubulin polymerization inhibitors [J]. *Bioorg. Chem.*, 2020, **95**: 103 565.
- [22] WANG G, LIU W, GONG Z, et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular modelling of new naphthalene-chalcone derivatives as potential anticancer agents on MCF-7 breast cancer cells by targeting tubulin colchicine binding site [J]. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2020, **35**(1): 139-144.
- [23] PATEL T, GAIKWAD R, JAIN K, et al. First report on

- 3-(3-oxoaryl) indole derivatives as anticancer agents; Microwave assisted synthesis, in vitro screening and molecular docking studies [J]. *ChemistrySelect*, 2019, **4**(15): 4 478-4 482.
- [24] BAERISWYL V, CHRISTOFORI G. The angiogenic switch in carcinogenesis [J]. *Semin. Cancer Biol.*, 2009, **19**(5): 329-337.
- [25] DAY K C, HILES G L, KOZMINSKY M, et al. HER2 and EGFR overexpression support metastatic progression of prostate cancer to bone [J]. *Cancer Res.*, 2017, **77**(1): 74-85.
- [26] ZWICK E. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies [J]. *Endocr. Relat. Cancer*, 2001, **8**(3): 161-173.
- [27] MOHAMED A, ASHRAF B, KAMAL E, et al. Design, synthesis and cytotoxic evaluation of novel chalcone derivatives bearing triazolo [4, 3-a] -quinoxaline moieties as potent anticancer agents with dual egfr kinase and tubulin polymerization inhibitory effects [J]. *Molecules*, 2018, **23**(1): 48.
- [28] AL-ANAZI M, AL-NAJJAR B O, KHAIRUDDEAN M, et al. Structure-based drug design studies toward the discovery of novel chalcone derivatives as potential epidermal growth factor receptor (egfr) inhibitors [J]. *Molecules*, 2018, **23**(12): 3203.
- [29] 刘鹏, 周云飞, 张勇, 等. VEGFR-2 抑制剂研究进展 [J]. *药学报*, 2017, **52**(4): 531-540.
- [30] WANG M, XU S, WU C, et al. Design, synthesis and activity of novel sorafenib analogues bearing chalcone unit [J]. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016, **26**(22): 5 450-5 454.
- [31] 訾富明. 基于 PI3K/AKT/mTOR 及 AMPK/mTOR 双信号通路探讨二甲双胍抗骨髓瘤作用及其机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [32] CANTLEY L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. *Science*, 2002, **296**(5 573): 1 655-1 657.
- [33] SHUAI Z, JIANG Z F, PAN Q, et al. Anti-cancer effect of naringenin chalcone is mediated via the induction of autophagy, apoptosis and activation of PI3K/Akt signalling pathway [J]. *Bangladesh. J. Pharmacol.*, 2016, **11**(3): 684-690.
- [34] PALERMO R, CHECQUOLO S, BELLAVIA D, et al. The molecular basis of Notch signaling regulation: A complex simplicity [J]. *Curr. Mol. Med.*, 2014, **14**(1): 34-44.
- [35] PUROW B W, SUNDARESAN T K, BURDICK M J, et al. Notch-1 regulates transcription of the epidermal growth factor receptor through p53 [J]. *Carcinogenesis*, 2008, **29**(5): 918-925.
- [36] MORI M, TOTTON L, QUAGLIO D, et al. Identification of a novel chalcone derivative that inhibits Notch signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Sci. Rep.*, 2017, **7**: 2 213.
- [37] QUAGLIO D, ZHDANOVSKAYA N, TOBAJAS G, et al. Chalcones and chalcone-mimetic derivatives as notch inhibitors in a model of t-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2019, **10**(4): 639-643.
- [38] 王义成. WNT 信号通路抑制剂 Pyrvinium 及其类似物的合成 [D]. 南京: 东南大学, 2013.
- [39] PREDES D, OLIVEIRA L F S, FERREIRA L S S, et al. The chalcone lonchocarpin inhibits wnt/beta-catenin signaling and suppresses colorectal cancer proliferation [J]. *Cancers*, 2019, **11**(12): 1 968.
- [40] BAUDRENGHIEN J, JADOT J, HUIS R, et al. Etablissement de la formule de structure de la lonchocarpine [J]. *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège*, 1949, **18**: 52.
- [41] 郝兴. 塞来昔布通过 ERK/JNK/P38 通路诱导胆囊癌细胞凋亡及细胞周期阻滞 [D]. 太原: 山西医科大学, 2017.
- [42] LIU T, LIANG X, LI B, et al. Telomerase reverse transcriptase inhibition stimulates cyclooxygenase 2 expression in cancer cells and synergizes with celecoxib to exert anti-cancer effects [J]. *Br. J. Cancer.*, 2013, **108**: 2 272-2 280.
- [43] 刘国华, 陈燕明, 陈晓军, 等. 塞来昔布抑制肺癌增殖及血管生成的实验研究 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2012, **20**(11): 2 042-2 043.
- [44] 刘瑛, 王艳明, 阎新燕, 等. 甘草查尔酮 B 对人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞的增殖抑制作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, **22**(15): 106-111.
- [45] YADAV P, LAL K, KUMAR A, et al. Green synthesis and anticancer potential of chalcone linked-1, 2, 3-triazoles [J]. *Eur J. Med. Chem.*, 2017, **126**(27): 944-953.
- [46] YAMALI C, OZGUN D O, INCI G H, et al. Synthesis and structure elucidation of 1-(2, 5/3, 5-difluorophenyl)-3-(2, 3/2, 4/2, 5/3, 4-dimethoxyphenyl)-2-propen-1-ones as anticancer agents [J]. *Med. Chem. Res.*, 2017, **26**(4): 2 015-2 023.
- [47] INCI G H, CEM Y, GULSEN G, et al. Cytotoxicity, apoptosis, and QSAR studies of phenothiazine derived methoxylated chalcones as anticancer drug candidates [J]. *Med. Chem. Res.*, 2018, **27**: 2 366-2 378.
- [48] CORSINI E, FACCHETTI G, ESPOSITO S, et al. Anti-proliferative effects of chalcones on T cell acute lymphoblastic leukemia-derived cells: Role of PKC β [J]. *Arch*

- Pharm.*, 2020, **353**(7) : e2 000 062.
- [49] SMIT F J, VAN BILJON R A, BIRKHOLTZ L M, et al. Synthesis and invitro biological evaluation of dihydroar-temisinyl-chalcone esters [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **90**(27) : 33-44.
- [50] GAO H, ZHENG X, QI Y, et al. Synthesis and cytotoxic activity of novel resveratrol-chalcone amide derivatives [J]. *Chinese J. Org. Chem.*, 2018, **38**(3) : 648-655.
- [51] ADDILA A B, MUHAMMAD A, NORLAILY M A, et al. Design, synthesis and docking studies of flavokawain b type chalcones and their cytotoxic effects on mcf-7 and mda-mb-231 cell lines [J]. *Molecules*, 2018, **23**(3) : 616.
- [52] WANG C, WU P, SHEN X L, et al. Synthesis, cytotoxic activity and drug combination study of tertiary amine derivatives of 2', 4'-dihydroxyl-6'-methoxyl-3', 5'-dimethylchalcone [J]. *RSC Adv.*, 2017, **7**(76) : 48 031-48 038.
- [53] ZHU C G, ZUO Y L, WANG R M, et al. Synthesis and evaluation of anticancer activity of BOC26P, an ortho-aryl chalcone sodium phosphate as water-soluble prodrugs in vitro and in vivo [J]. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, **96**: 551-562.
- [54] ZHU C G, ZUO Y L, WANG R M, et al. Discovery of potent cytotoxic ortho-aryl chalcones as new scaffold targeting tubulin and mitosis with affinity-based fluorescence [J]. *J. Med. Chem.*, 2014, **57**(14) : 6 364-6 382.
- [55] MAO Z W, ZHENG X, QI Y, et al. Synthesis and biological evaluation of novel hybrid compounds between chalcone and piperazine as potential antitumor agents [J]. *RSC Adv.*, 2016, **6**(10) : 7 723-7 727.
- [56] LIN Y, HU C, ZHENG X, et al. Synthesis and anti-tumor activities of novel 4'-(n-substitued-1-piperazinyl) chalcone derivatives [J]. *Chinese J. Org. Chem.*, 2017, **37**(1) : 237-241.
- [57] GAO H, ZHENG X, ZHU P, et al. Synthesis and biological evaluation of novel substituted chalcone-piperazine derivatives [J]. *Chinese J. Org. Chem.*, 2018, **38**(3) : 684-691.
- [58] SONG P P, LI N, CUI F, et al. Synthesis and antitumor activity evaluation of 2, 4, 6-trisubstituted pyrimidine derivatives [J]. *Chinese J. Org. Chem.*, 2017, **37**(10) : 2 725-2 735.
- [59] RAMÍREZ-PRADA J, ROBLEDO S M, VELEZ I D, et al. Synthesis of novel quinoline-based 4, 5-dihydro-1H-pyrazoles as potential anticancer, antifungal, antibacterial and antiprotozoal agents [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **131**(5) : 237-254.
- [60] CHARRIS J E, MONASTERIOS M C, ACOSTA M E, et al. Antimalarial, antiproliferative, and apoptotic activity of quinoline-chalcone and quinoline-pyrazoline hybrids. A dual action [J]. *Med. Chem. Res.*, 2019, **28**: 2 050-2 066.
- [61] MORENO L M, QUIROGA J, ABONIA R, et al. Synthesis of new 1, 3, 5-triazine-based 2-pyrazolines as potential anticancer agents [J]. *Molecules*, 2018, **23**(8) : 1 956.
- [62] SHENG Q W, ZHAO W Q, ZENG M, et al. Synthesis and evaluation of chalcone derivatives as novel anticancer agents [J]. *Chinese J. Org. Chem.*, 2019, **39**(3) : 703-708.

酪氨酸激酶 2 抑制剂的研究进展

姚华良,曾宪霞,张洁,黄怀征,何林洪*

(广西医科大学 药学院,广西 南宁 530021)

摘要:酪氨酸激酶 2(TYK2)作为两面神激酶非受体酪氨酸激酶家族的一员,被 IL-12、IL-23 和 I-IFN 等多种细胞因子激活,启动信号转导及转录激活因子(STAT)将信号传递到细胞核内,启动炎症免疫反应,参与多种慢性炎症和自身免疫性疾病进展。目前,关于 TYK2 抑制剂的报道逐渐增多,主要靶向该蛋白的激酶结构域(JH1)和假激酶结构域(JH2),前者为 ATP 竞争性抑制剂,后者为变构调节剂。由于变构抑制剂的结合位点为非 ATP 竞争结构域,可较容易地获得激酶选择性以下调不良反应的发生,同时减少氨基酸突变所造成的耐药问题,因此,该类抑制剂正逐渐被科研工作者青睐。从 TYK2 结构特点出发,分别介绍靶向 JH1 和 JH2 的抑制剂,为以后的研究提供参考。

关键词:酪氨酸激酶 2;激酶结构域(JH1);ATP 竞争性抑制剂;假激酶结构域(JH2);变构调节剂

中图分类号:R914 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2023)02-0043-11

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0462

Research Progress of Tyrosine Kinase 2 Inhibitors YAO Hua-liang, ZENG Xian-xia, ZHANG Jie, HUANG Huai-zheng, HE Lin-hong* (College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: Tyrosine kinase 2 (TYK2), a member of Janus Kinases (JAKs) belongs to the family of non-receptor tyrosine kinases, can be activated by many cytokines including IL-12, IL-23 and I-IFN, then trigger the signal transduction and transcriptional activation factors (STATs) to transfer the signals into nucleus, initiate inflammatory immune responses and participate in the progressions of various chronic inflammatory and autoimmune diseases ultimately. At present, the research about TYK2 inhibitors that mainly target its kinase domain (JH1) and pseudokinase domain (JH2) are gradually increasing, the former ones are ATP-competitive inhibitors, while the latter ones are allosteric modulators. Given that the binding site of TYK2 allosteric inhibitors is not the ATP-competitive domain, which can easily obtain the kinase selectivity and reduce the appearance of adverse reactions, as well as cut down the risk of drug resistance caused by amino acid mutations, they are gradually getting attention by researchers. This paper summarized inhibitors targeting JH1 and JH2 respectively according to its structure, which may provide reference for the future research.

Key words: TYK2; kinase domain (JH1); ATP-competitive inhibitors; pseudokinase domain (JH2); allosteric modulators

细胞因子在炎症和自身免疫性疾病的发病机制中起着重要的作用,其可与细胞膜上 I/II 型细胞受体的胞外结构域结合,启动信号传导,促进受体二聚化或多聚化,进而将该信号传入细胞质内,激活两面神激酶(JAK)信号通路,再通过信号转导及转录激活因子(STAT)将信号传递到细胞核内,启动炎症免疫反应^[1-3]。JAK 家族包含 JAK1、JAK2、JAK3 和酪氨酸激酶 2(TYK2)4 个亚型^[4,5],由于各亚型在催化活性位点的高度同源性(JAK3 与 JAK1、JAK2、TYK2 的同源性依次为 84%、87%、80%),目前临床在用的 JAK 抑制剂主要为广谱的 JAK1、JAK2 和 JAK3 抑制剂^[6,7],广泛的细胞因子抑制,导致严重感染、肺栓塞、恶性肿瘤、心血管事件、贫血等严重副作用^[8,9],因此被 FDA 要求更新安全性警告。新一代 JAK 抑制剂的设计原则为提高选择性,避免泛 JAK 抑制所

带来的毒副作用,维持药物对特定疾病的疗效,同时降低不良反应风险,确保安全性^[10,11]。于是, JAK 家族的另一个成员——TYK2 备受全球众多企业和学者青睐。

TYK2 主要激活于细胞因子 IL-6、IL-10、IL-12、IL-23 和 I 型干扰素(I-IFN)(图 1)^[12,13]。其中,IL-12 和 IL-23 不仅是 TYK2 的活化所必需,而

收稿日期:2022-06-15;网络首发日期:2022-11-09

基金项目:广西自然科学基金青年基金项目(2021GXNSFBA075028);国家自然科学基金青年基金项目(81803350)。

作者简介:姚华良(1995-),男,广西北海人,硕士生,主要研究方向为靶向小分子抑制剂研究。

通讯作者:何林洪, E-mail:HLhongedu@163.com。

引用本文:姚华良,曾宪霞,张洁,等.酪氨酸激酶 2 抑制剂的研究进展[J].化学试剂,2023,45(2):43-53。

且能增强 TYK2 对 I-IFN 反应的敏感性;它们可诱导 TYK2 与 JAK2 的二聚化,激活 JAK-STAT 信号通路,促进 TH1 和 TH17 细胞的增殖、分化和成熟,过度激活的 TH1 和 TH17 细胞会产生过多的细胞因子(如 IFN- γ 、IL-2、IL-10、IL-17、IL-21、IL-22 和 TNF),加剧炎症发酵和循环,导致体内免疫失衡^[14-17]。I-IFN (IFN- α 和 IFN- β) 则通过诱导 TYK2 和 JAK1 形成二聚体发挥生物学效应,参与巨噬细胞的活化,调节树突细胞的成熟及活化、主要相容性复合体和共刺激分子的表达、B 细胞的分化和抗体的产生以及 T 细胞的存活等,共同调节机体炎症免疫平衡^[18-20]。因此, TYK2 参与多种炎症和免疫性疾病的进展,包括银屑病、系统性红斑狼疮、炎症性肠病、克罗恩病等^[21,22]。由于 TYK2 的激活主要依赖于 IL-12、IL-23 和 I-IFN,尤其是前两者,对其的抑制可减轻广谱细胞因子失活所造成的严重不良反应,于是 TYK2 抑制剂逐渐发展成为慢性炎症和免疫性疾病治疗的热点^[23]。基于近年来 TYK2 抑制剂的快速发展,本文将对该类抑制剂的研究进展进行综述。

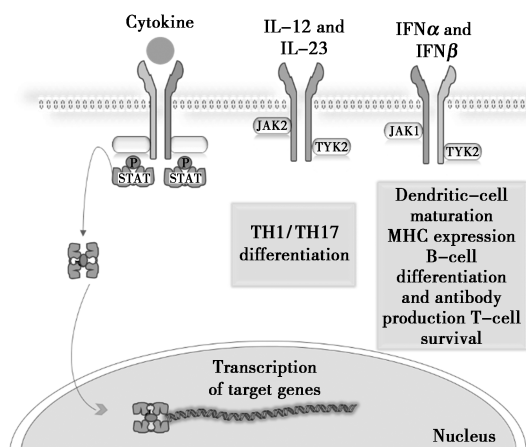


图 1 JAK/STAT 信号通路传导路径及与 TYK2 相关的细胞因子

Fig.1 Signaling pathway of JAK/STAT, and the cytokines associated with TYK2

1 TYK2 激酶的结构

TYK2 同 JAK 家族其他成员一样具有 7 个不同的同源区域,可分为 4 个结构域,包括激酶结构域(JH1)、假激酶结构域(JH2)、Src 同源结构域(JH3 和 JH4)和 FERM 结构域(JH5、JH6 和 JH7)(图 2a 所示)^[24],其中,前两者(JH1 和 JH2)的串联结构是 JAK 的结构特征^[25]。

JH1,作为活性蛋白酪氨酸激酶的催化结构

域,包含三磷酸腺苷(ATP)结合位点,负责接受和调节细胞因子的信号传递,因此靶向该结构域的药物称为 ATP 竞争性抑制剂,它们通过与 ATP 竞争结合位点,阻断 TYK2 磷酸化活化及下游信号转导,减少细胞因子的产生等(图 2c、2d)^[26];这包括已经上市的第一代泛 JAK 抑制剂和临床在研的部分第二代 TYK2 抑制剂。

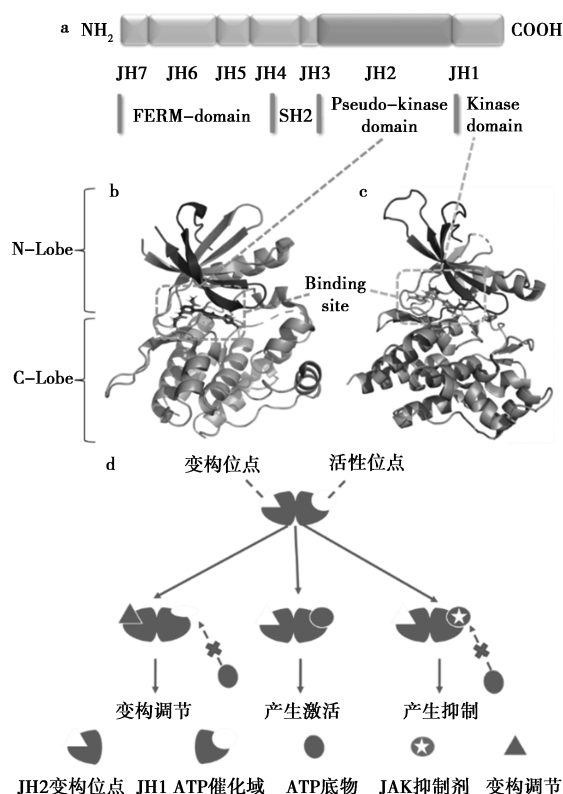


图 2 a.TYK2 激酶的示意图和结构;b.TYK2 JH2 的结构和催化位点(PDB:6X8F);c.TYK2 JH1 的结构和催化位点(PDB:6NZP);d.TYK2 JH1 抑制剂与 TYK2 JH2 变构调节剂的作用机制区别

Fig.2 a.Domain structure of TYK2;b.Catalytic site of TYK2 JH2 domain (PDB:6X8F);c.Catalytic site of TYK2 JH1 domain (PDB:6NZP);d.Difference of function mechanisms between TYK2 JH1 inhibitors and TYK2 JH2 allosteric modulators

JH2,曾被认为不具有催化功能^[27],但越来越多的数据表明,其拥有重要的调控功能^[28]。如 TYK2 V678F 同源突变会导致功能获得表型^[29];随机诱变 TYK2 JH2 中的突变可消除固有的催化活性并形成高亲和力的 I-IFN 受体^[30];而且在自身免疫性疾病 TYK2 I684S 突变中也观察到类似的表型^[31],于是靶向 JH2 位点的药物也逐渐被开发和报道。该类药物通过靶向 JH2 结构域将 JH1 稳定在构象状态,阻止假激酶和激酶结构域的相

互作用来抑制受体催化结构域的活性^[32,33](图 2b、2d),这种稳定作用导致下游 STAT 依赖性基因转录的阻断以达到治疗的效果,因此靶向 JH2 结构域的药物称为变构调节剂。基于 JH1 和 JH2 的功能作用,本文将分别靶向 TYK2 两个结构域的抑制剂和调节剂进行综述分类。

2 TYK2 抑制剂

2.1 靶向 JH1 结构域的 ATP 竞争性抑制剂

由于该类抑制剂为 ATP 竞争性抑制剂,对其二聚化受体 JAK1 或 JAK2 拥有一定的选择性,因此,长期用药安全性仍有待考察,本文将根据母核结构进行分类描述。

2.1.1 2-氨基嘧啶衍生物

Brepocitinib(2) 开发于辉瑞公司,衍生于嘧啶-2-胺系列化合物^[34](图 3a)。先导化合物 1 在 K_m ATP 浓度下为 TYK2&JAK1 双重抑制剂,但在 $[ATP] = 1 \text{ mmol/L}$ 的生理浓度下,该化合物对 TYK2 的抑制作用较弱($IC_{50} = 774 \text{ nmol/L}$),也无法有效失活 JAK1($IC_{50} = 3714 \text{ nmol/L}$)。如图 3b 分析,嘧啶核处于蛋白的铰链核心,同时作为供氢体和受氢体与 VAL-981 形成氢键相互作用。于是,化合物 1 的结构优化主要集中于嘧啶核周围的 4 个取代基: R^1 氢原子(换成 F 原子降低了分子亲脂性), R^2 桥连哌嗪部分(3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷体系效果最佳),溶剂暴露区的芳香族取代基 R^3 ,以及与激酶 P 环(P-Loop)相互作用的 R^4 官能团。构效关系(SAR)表明, R^3 位置使用吡唑基取代苯基可下调苯胺造成的毒性^[35], R^4 位置引入的 S-1,1-二氟环丙烷基可深入 TYK2 的 P-loop 区域,进而平衡 TYK2 和 JAK1 的抑制谱,得到化合物 2。其有效抑制 JAK1 和 TYK2,对 JAK2 和 JAK3 具有一定的选择性;在全血(hWB)检测中对 $INF\alpha$ ($IC_{50} = 30 \text{ nmol/L}$) 和促红细胞生成素(EPO, $IC_{50} = 577 \text{ nmol/L}$) 也显示明显的选择性差异。目前,化合物 2 在临床上就系统性红斑狼疮(NCT03845517)、特应性皮炎(NCT03903822)、银屑病关节炎(NCT03963401)、斑块状银屑病(NCT02969018)、克罗恩病(NCT03395184)、溃疡性结肠炎(NCT02958865)、斑秃(NCT02974868)、成人化脓性汗腺炎(NCT04092452)、活动性非节段性白癜风(NCT03715829)、瘢痕性脱发(NCT05076006)已经开展或完成了相关的临床二期试验。并且在斑

块状银屑病^[36-38]、斑秃^[39,40]和炎症性肠病^[41,42]中表现出安全有效的治疗效果。

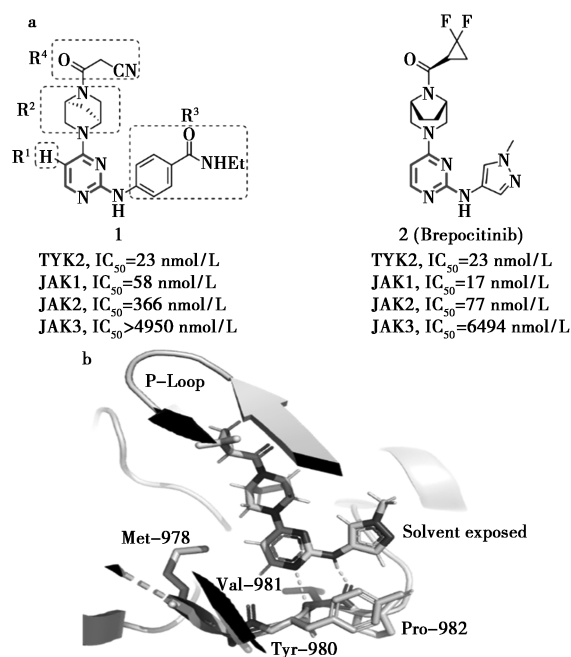


图 3 a.先导化合物 1 模块化分解及化合物 2 (Brepocitinib) 的结构;b.化合物 2 结合于 TYK2 JH1 晶体结构(PDB:6DBM)的 X-射线分析

Fig.3 a.Modular decomposition of lead compound 1, and the structure of compound 2 (Brepocitinib); b.X-ray structure of compound 2 into the TYK2 JH1 domain (PDB:6DBM)

Zhang 等^[43]、Yang 等^[44]也报道了以 2-氨基嘧啶为骨架的 TYK2 抑制剂(图 4a)。化合物 3 最早是作为 JAK2 ($IC_{50} = 0.7 \text{ nmol/L}$) 和 FLT3 ($IC_{50} = 4 \text{ nmol/L}$) 双靶点抑制剂被了解,后来发现其对 TYK2 同样表现出色的抑制活性($IC_{50} = 2 \text{ nmol/L}$)。由于母核 2-氨基嘧啶可以与 TYK2 JH1 铰链区 Val-981 形成较好的氢键相互作用,因此保持该母核不变,P-loop 区域腈基的引入有效提高激酶选择性,尽管溶剂暴露区域强吸电子三氟甲基取代基的引入可改善化合物的代谢稳定性(化合物 4, HLM $T_{1/2} = 9.8 \text{ min}$, HLM CL = 141.6 mL/min/g),但成药性有待改善。于是,在吡啶环中引入双键(化合物 5)以增强结构刚性、稳定分子构象,进而大大改善代谢稳定性(HLM $T_{1/2} = 121.6 \text{ min}$, HLM CL = 11.4 mL/min/g),但其生物利用度仍极为有限($F\% = 11.9\%$)。在 P-loop 的桥接点引入螺环支架替换吡咯官能团,得到化合物 6,保留了 TYK2 的抑制活性($IC_{50} = 6 \text{ nmol/L}$),尽管化合物 6 对 JAK 的选择性有所下降,但生物

利用度明显提高 ($F\% = 23.7\%$); 在急性溃疡性结肠炎小鼠模型中, 其表现出较托法替尼更优的抗炎功效。

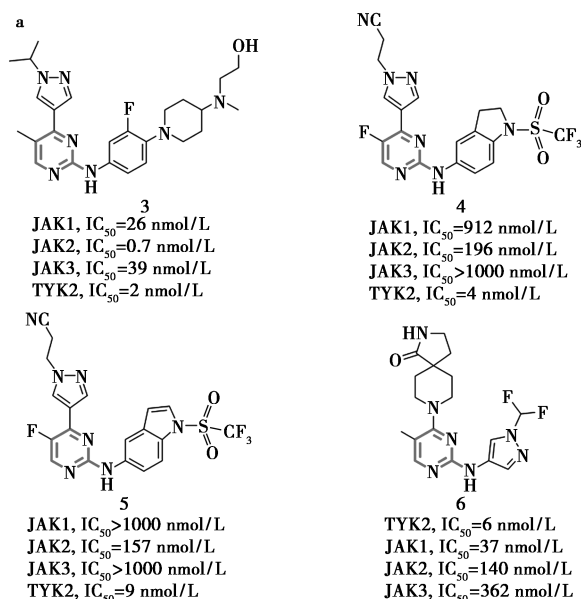


图 4 a. 2-氨基嘧啶系列化合物 3~6; b. 化合物 5 与 TYK2 蛋白 (PDB: 4GJ3) 的模拟对接分析

Fig. 4 a. Compounds 3~6 with the fragment of 2-aminopyrimidine; b. Predicted binding conformation of compound 5 with TYK2 (PDB: 4GJ3)

2.1.2 吡唑并吡嗪类衍生物

化合物 7 (PF-06826647, 图 5a)^[45], 开发于辉瑞公司。在 JAK 激酶的 JH1 ATP 位点存在一个共同的 Met-978 作为看门人; 而在背面口袋位置上, TYK2 拥有特定的 Ile-960, 其他 JAKs 在此位置为 Val-981 (图 5b)。早期开发的吡咯并嘧啶 JAK 系列抑制剂, 可分别与 Glu-979 和 Val-981 形成氢键相互作用, 但这种结合模式容易与 TYK2 的 Ile-960 发生冲突, 迫使环上侧链发生旋转, 降低对 TYK2 ATP 结合位点的亲和力, 因此独特的 Ile-960 残基差异为选择性 TYK2 抑制剂铰链区基团的研究提供了思路。对系列母核 [5,6]-稠合芳环体系的 SAR 分析中, 选定吡唑并吡嗪基作为激酶铰链核心 (图 5b), 源于该母核可特异地作为供

氢体与 Val-981 形成氢键相互作用, 而不与 Glu-979 相互作用, 避开了与 TYK2 Ile-960 的作用冲突。与 P 环相互作用的烷烃支链 SAR 表明, 环丁烷电子等排体碎片的引入可提高 TYK2 分别对 JAK1 和 JAK2 的选择性, 平衡理化性质 ($\text{sfLogP} = 1.7$), 确保一定的人源血浆药物游离浓度 ($F_u = 0.38$) 和较低的代谢清除率 ($\text{HLM} < 8 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)。溶剂基团暴露区通过引入五元杂环, 增加平面刚性, 防止铰链基团翻转与其他氨基酸残基结合, 导致泛选择性。最优化化合物 7 经 hWB 试验筛选, 确定为具有一定选择性的 TYK2 抑制剂 (TYK2 的 $IC_{50} = 15$ nmol/L, JAK2 的 $IC_{50} = 74$ nmol/L), 在血液-血浆浓度相等情况下有效抑制 IL-12 ($IC_{50} = 14$ nmol/L), 同时将 EPO ($IC_{50} = 148$ nmol/L) 抑制保持在合适范围内。目前, 该化合物已在健康受试者和斑块型银屑病患者 (NCT03210961) 受试者中完成了 I 期临床试验^[46]; 在中度重度斑块状银屑病 (NCT03895372)、成人化脓性汗腺炎 (NCT04092452) 开展或完成了 II 期研究; 在治疗斑块状银屑病中具有良好的疗效^[47,48]。

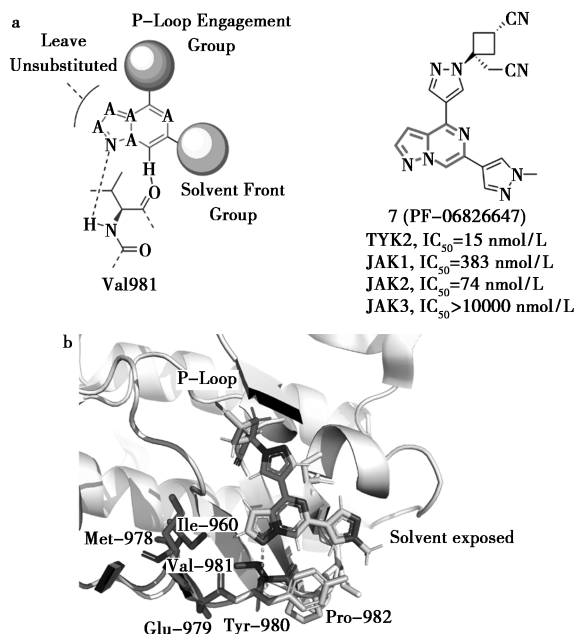


图 5 a. [5,6]-稠合芳环支架改造策略、化合物 7 (PF-06826647) 结构; b. 化合物 7 结合于 TYK2 JH1 晶体结构 (PDB: 6X8G) 的 X-射线分析

Fig. 5 a. Strategy of structural modification on [5,6]-fused aromatic ring scaffold, and the structure of compound 7 (PF-06826647); b. X-ray structure of compound 7 into the TYK2 JH1 domain (PDB: 6X8G)

2.1.3 氨基吡啶系列化合物

Liang 等^[49] 研究报道氨基吡啶系列化合物

8~11 (图 6a)。其中,先导化合物 8 经高通量筛选发现,对 TYK2 的 K_i 值为 230 nmol/L,活性较低;吡啶 2 位酰胺环丙基的引入(化合物 9)增加了与激酶铰链区 Val-981 的氢键相互作用进而提高 TYK2 的抑制活性($K_i=4.8$ nmol/L);但由于分子亲脂性高($\text{LogD}=3.4$)和首过效应突出等问题,难以开发。于是,对碎片 2,6-二氯苯基和环丙基酰胺部分进行系统的 SAR 研究,苯基 4 位腈基(化合物 10)的引入除了可以阻断苯基上的氧化代谢,还与 P-loop 的 Arg-1027 形成了氢键相互作用,增强对 TYK2 的抑制(图 6b);(1*R*,2*R*)-2-氟环丙基酰胺基的替换则进一步改善 TYK2 的效力($K_i=1.6$ nmol/L)和对 JAK1($K_i=96$ nmol/L)、JAK2($K_i=62$ nmol/L)的选择性倍数,阻断 IL-12 信号通路(IL-12 pSTAT4 的 $\text{EC}_{50}=224$ nmol/L);而且整个分子亲脂性下调($\text{LogD}=2.5$),在大鼠中显示适当的体内清除率($\text{HLM}=1.0$ mL/min/kg)^[50]。

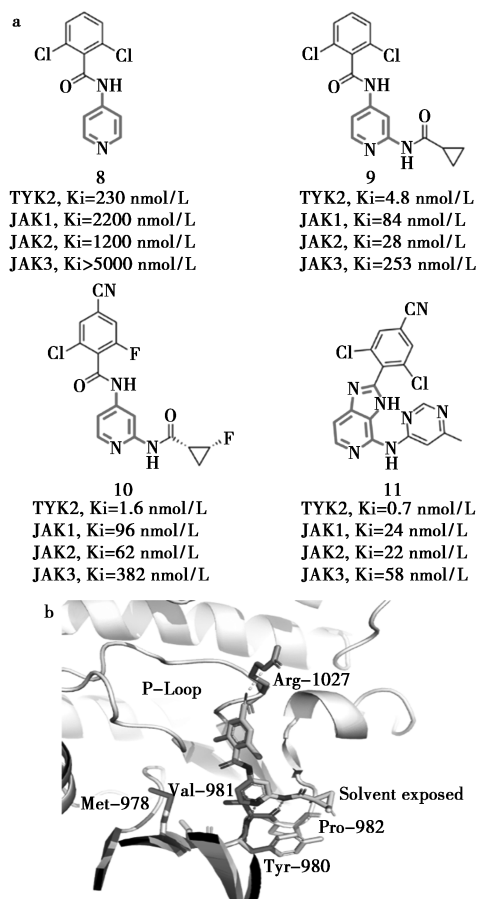


图 6 a.氨基吡啶系列化合物 8~11;b.化合物 10 结合于 TYK2 JH1 晶体结构(PDB:4GJ3)的 X-射线分析

Fig.6 a.Compounds 8~11 with the fragment of aminopyridine;b.X-ray structure of compound 10 into the TYK2 JH1 domain (PDB:4GJ3)

为了继续开发此类结构抑制剂,在吡啶环上添加杂环稠合和芳香取代基以限制分子的旋转(化合物 11),TYK2($K_i=0.7$ nmol/L)的抑制活性得到进一步改善;在小鼠银屑病模型中可剂量依赖降低 IL-17 的产生和耳朵厚度,表明化合物 11 作为银屑病患者的治疗极具潜力^[51]。

2.1.4 五元杂环系列

五元杂环以 1,2,4-三氮唑基或噁唑基为母核的 TYK2 抑制剂开发于 Sareum 公司(图 7)。先导化合物 12 最初是作为细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂被发现^[52],随后发现其也可有效抑制 JAK1($\text{IC}_{50}=21$ nmol/L)和 TYK2($\text{IC}_{50}=32$ nmol/L)。当使用羧基替换磺酰氨基官能团时(化合物 13),活性并没有显著改变。于是,Sareum 公司将结构优化集中于母核及支链部分,成功获得苗头化合物 14 和 15^[53-55],两者表现相同的激酶活性和选择性。其中,化合物 14 在细胞检测中呈剂量依赖阻断由不同细胞因子如 IL-12/IL-23、IL-22 和 IFN- α 所激活的 JAK1 和/或 TYK2 信号通路;而且可以减少银屑病小鼠的鳞屑和发红。

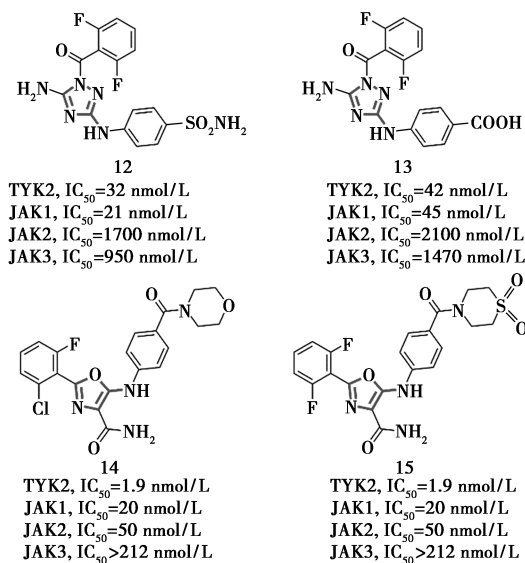


图 7 五元杂环系列化合物 12~15

Fig.7 Compounds 12~15 with the fragment of five-membered heterocycle

2.1.5 吡啶并五元杂环系列

吡咯并吡啶-5-酮类 TYK2 抑制剂由 Nimbus 公司开发报道^[56]。其中,最优化合物 16(图 8)在专利中被重点描述,其在 1 mmol/L ATP 浓度下可有效失活 TYK2($\text{IC}_{50}=56.9$ nmol/L);经 IL-12 刺激的人源外周血单核细胞(PBMC)的 p-STAT4 表达也受到有效抑制($\text{IC}_{50}<150$ nmol/L);狗的 PK

数据(口服 10 mg/kg: $C_{\max} = 2\ 105\ \text{ng/mL}$, $\text{AUC}_{(0-4)} = 18\ 747\ \text{ng}\cdot\text{hr/mL}$)显示该化合物拥有良好的药代动力学特性。吡啶并咪唑类 TYK2 抑制剂 17、18 由 Galapagos 公司开发报道^[57]。其中,化合物 18 (TYK2 的 $\text{IC}_{50} = 2.5\ \text{nmol/L}$)对皮内注射 IL-23 诱导的银屑病表皮增生小鼠模型治疗 5 d 后呈现好转的效果。化合物 19 则是 Abbvie 公司开发的吡啶并吡咯系列的一个代表化合物^[58],其在细胞水平即表现良好的 TYK2 抑制效力和对 JAK1 和 JAK2 的选择性(>317x 和 198x)。

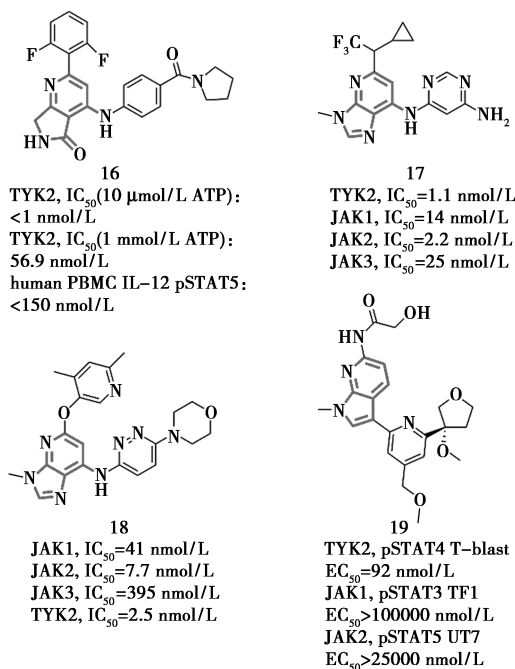


图 8 吡啶并五元杂环系列化合物 16~19

Fig.8 Compounds 16~19 contain the fragment of pyrido five-membered ring

2.1.6 大环系列

化合物 20(图 9)是武田制药在研究高功能化的吡咯烷酮时发现,其不仅能高效抑制 TYK2 ($\text{IC}_{50} = 1.2\ \text{nmol/L}$),而且家族亚型间选择性较

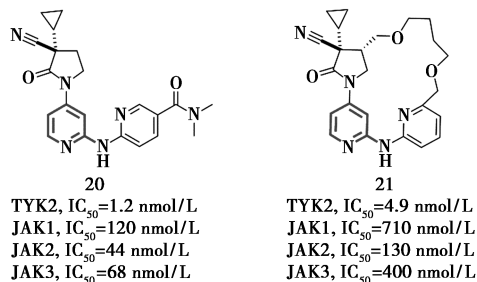


图 9 化合物 20 及其大环类似物 21 结构

Fig.9 Structure of compound 20 and macrocyclic compound 21

高^[59]。在不影响其稳定构象情况下,使用长链关联吡咯烷酮基和吡啶环基得到化合物 21,尽管 TYK2 抑制效力($\text{IC}_{50} = 4.9\ \text{nmol/L}$)略有下调,但对家族成员间选择性有所提高(145x/27x/82x),因此,大环结构不失为高选择性 TYK2 JH1 抑制剂的研究方向。

2.2 作用于 JH2 结构域的 TYK2 变构调节剂

TYK2 变构调节剂特异性结合于 JH2 活性口袋,不与 ATP 竞争结合位点,实现家族亚型间的高选择性,获得较宽的药物治疗窗口,保障用药安全性。较靶向 JH1 的 TYK2 ATP 竞争性抑制剂开发而言, TYK2 变构调节剂的报道尚少,主要有 N-甲基烟酰胺类、N-甲基吡嗪-3-甲酰胺类、咪唑并吡嗪类和吡咯并吡啶类,详细描述如下。

2.2.1 N-甲基烟酰胺和 N-甲基吡嗪-3-甲酰胺类衍生物

以 N-甲基吡嗪-3-甲酰胺和 N-甲基烟酰胺为骨架的 TYK2 变构抑制剂均由百时美施贵宝(BMS)公司研发(图 10a)^[60,61]。亲和闪烁分析法(SPA)观察化合物与蛋白的作用模式,发现化合物 22 通过与 TYK2 JH2 结构域相互作用而使蛋白变构失活($\text{IC}_{50} = 0.46\ \text{nmol/L}$),但其对 JAK 成员的 JH1 结构域并未显示明显的选择性(TYK2、JAK1、JAK2 JH1 的 IC_{50} 分别为 15、26、24 nmol/L)。在甲基烟酰胺上引入氘代甲基可提高化合物对 JH1 结构域的选择性;挑选碱性较低的吡嗪基替换吡啶基可以提高渗透性;环丙烷酰基取代 2-氟吡啶官能团可减轻因芳香度高所造成的潜在的心脏毒性,得到化合物 23。在化合物 23 的苯基碳 3 位引入 N-甲基-1,2,4-三唑基,直接占据水的位置(图 10b),得到化合物 24 (Deucravacitinib),特异性并选择性地结合于 TYK2 JH2 结构域,对 JAK 亚型的 JH1 结构域均未观察到明显活性($\text{IC}_{50} > 10\ \mu\text{mol/L}$),而且高效抑制 hWB 中 IL-23 ($\text{IC}_{50} = 5\ \text{nmol/L}$)和 IFN- α ($\text{IC}_{50} = 13\ \text{nmol/L}$)所激活的信号转导。此外,化合物 24 对多种物种肝微粒体代谢显示稳定($T_{1/2} > 120\ \text{min}$)、良好的被动渗透性(Caco-2 $\text{Papp} = 73\ \text{nm/s}$),以及较低的心脏毒性(hERG: 10 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制率为 26%)。目前,Deucravacitinib 在牛皮癣(NCT04036435/NCT04772079)测试中完成了 III 期临床试验,系统性红斑狼疮(NCT03920267)、银屑病关节炎(NCT04908202/NCT04908189)、结肠炎/克罗恩病(NCT03934216/

NCT04877990/NCT04613518) 均临床 II/III 期在研。

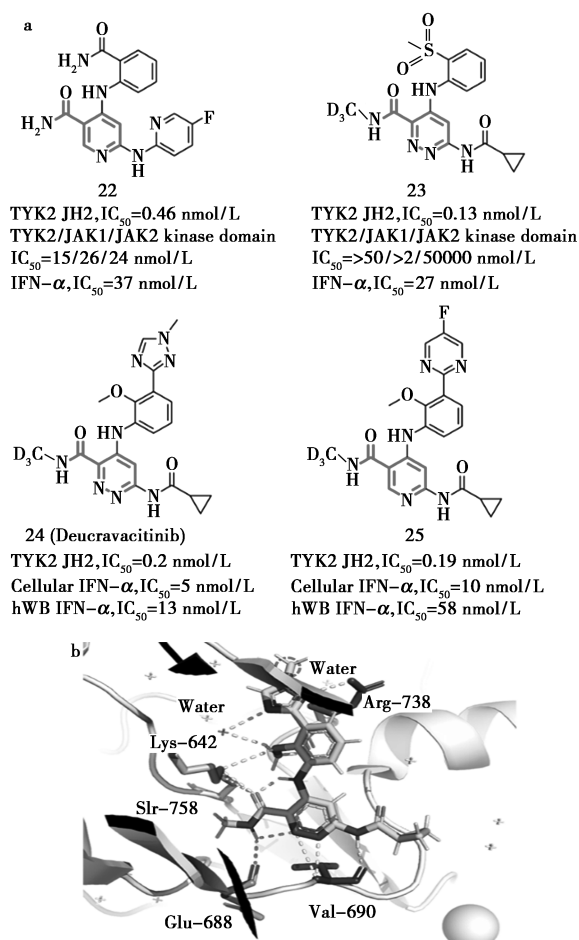


图 10 a. N-甲基吡嗪-3-甲酰胺 (23、24) 和 N-甲基烟酰胺 (22、25) 系列化合物; b. 化合物 24 结合于 TYK2 JH2 晶体结构 (PDB:6NZP) 的 X-射线结构

Fig.10 a. Derivatives of N-methyl nicotinamide (compounds 23 and 24) and N-methyl pyridazine-3-carboxamide (compounds 22 and 25); b. X-ray structure of compound 24 into the TYK2 JH2 domain (PDB:6NZP)

将化合物 24 的 N-甲基三氮唑官能团替换成 4-氟嘧啶基可得到临床候选化合物 25 (BMS-986202)^[62]。其中, 氟原子的引入显著提高通透性 (Caco-2 Papp = 96 nm/s), 生物电子等排体吡啶替换吡嗪也并不影响其与受体的氢键相互作用, 因此化合物 25 同样能高效抑制 TYK2 JH2 ($IC_{50}=0.19$ nmol/L), 对 IL-23 触发的棘皮病、抗 CD40 诱导的结肠炎和自发性狼疮小鼠模型中均显示显著的治疗效果。目前化合物 25 已经完成银屑病 I 期的临床试验 (NCT02763969)。

2.2.2 咪唑并吡嗪系列衍生物

咪唑并吡嗪类 TYK2 JH2 抑制剂^[63] 同样由

BMS 公司研发 (图 11a)。先导化合物 26 由多种激酶抑制剂经 IL-23 刺激细胞检测发现, 对 TYK2 JH2 的 K_i 值为 0.13 nmol/L, 无法失活其他 JAKs ($IC_{50}>50$ μ mol/L), 为高选择性的 TYK2 变构抑制剂; 但其代谢稳定性差, 在人、大鼠和小鼠肝微粒体中孵育 4 min 后, 剩余量仅分别为 11%、14% 和 1%。为了改善该化合物的代谢稳定性问题, 引入极性基团 (化合物 27), 下调脂溶性以获得适当的脂水分配系数, 进而提高代谢稳定性, 化合物 27 在人、大鼠和小鼠肝微粒体中均显示良好的稳定性, 回收率分别为 99%、76% 和 44%。考虑到化合物 27 中存在 5 个氢键供体, 导致其表现出了有限的渗透性 (Caco-2 值低至 34 nm/s), 在体内暴露有限, 为了平衡渗透性和代谢稳定性之间的关系, 在不影响其与核心铰链区 LYS-642 氢键相互作用的情况下, 减少氢键供体的同时在吡啶酮基上引入不同的芳基, 得到化合物 28、29, 它们和

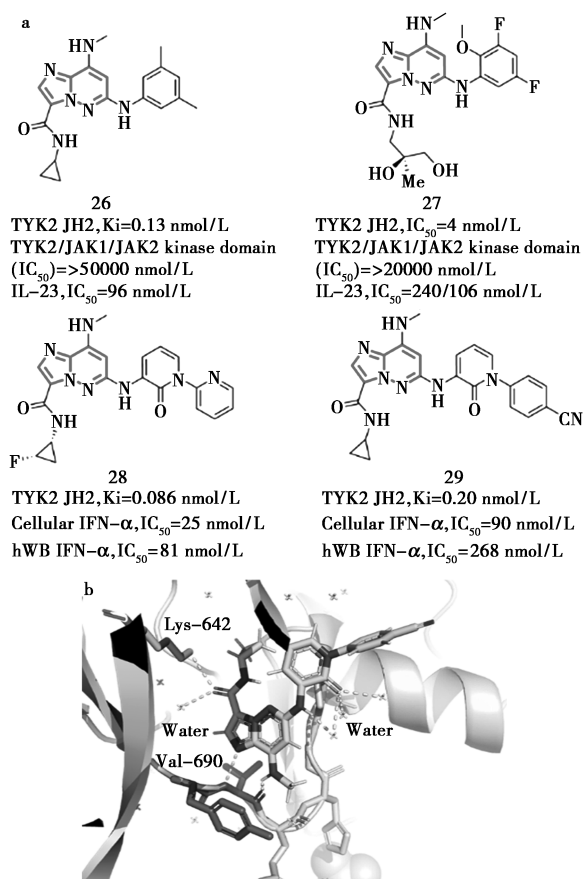


图 11 a. 咪唑并[1,2-b]吡嗪系列化合物 26~29; b. 化合物 29 结合于 TYK2 JH2 晶体结构 (PDB:6NSL) 的 X-射线结构

Fig.11 a. Derivatives 26~29 of imidazo[1,2-b]pyridazine; b. X-ray structure of compound 29 into the TYK2 JH2 domain (PDB:6NSL)

TYK2 JH2 结构域的作用方式相似(图 11b),与化合物 26 和 27 相比,吡啶酮的引入有利于改善化合物的代谢稳定性。其中,化合物 28 的小鼠口服生物利用度高达 114%,不仅能剂量依赖抑制大鼠中 IL-12/IL-18 诱导产生的 IFN- γ (在 1、10 mg/kg 剂量下,IFN- γ 抑制率分别为 45%、77%),而且口服 5 mg/kg 即可有效治疗大鼠佐剂性关节炎模型,对慢性炎症性免疫疾病治疗的潜力。

目前,Nimbus 公司也对咪唑并吡嗪类 TYK2 抑制剂展开了研究并申请了专利^[64,65]。他们以咪唑并吡嗪为母核,合成了大环类 TYK2 JH2 抑制剂,其中,化合物 30 和 31 在 hPBMC 中不仅显示较优的生物活性(IFN- α pSTAT5 的 IC₅₀ 分别为 1.2、5.1 nmol/L),而且具备极高的选择性(IL-2 pSTAT5>10 000 nmol/L);但该系列化合物的大鼠口服利用度极低(化合物 30,F:5%;化合物 31,F:6%),仍难以开发。

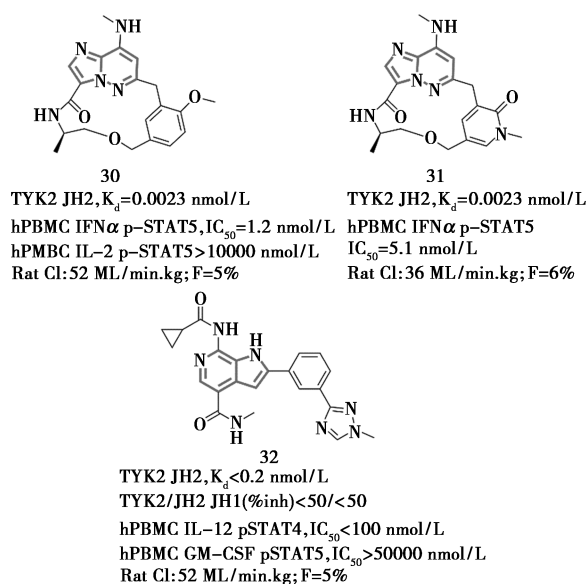


图 12 咪唑并[1,2-b]吡嗪化合物 30、31 和吡咯并吡啶衍生物 32

Fig.12 Derivatives 30 and 31 of imidazo[1,2-b]pyridazine and derivative 32 of pyrrolopyridine

2.2.3 吡咯并吡啶系列衍生物

吡咯并吡啶系列 TYK2 JH2 变构抑制剂同样由 Nimbus 公司开发。代表化合物 32 对 TYK2 JH2 的 K_d 值小于 0.2 nmol/L,而对 TYK2/JAK2 JH1 的选择性较高(TYK2/JAK2 JH1 (% inh): <50/<50 at 1 mmol/L[ATP])^[66]。目前,该类调节剂尚未给出临床前的其他数据。

3 结论与展望

TYK2 可被 IL-12、IL-23 和 I 型 IFN 等细胞因子的选择性激活,在银屑病、斑秃、炎症性肠病等慢性炎症和免疫性疾病中发挥重要作用。目前,关于 TYK2 抑制剂的开发主要分为两类,一类是靶向 JH1 结构域的 ATP 竞争性抑制剂,另一类是靶向 JH2 结构域的变构调节剂。尽管关于 TYK2 的 ATP 竞争性抑制剂研发已经较为成熟,但由于 JAK 亚型间的高度同源性,还是较难获得高选择性 TYK2 抑制剂,长期用药安全性有待考察。TYK2 变构位点的保守性不如 ATP 结构区域,受到进化的选择压力小,而且不需要与天然底物 ATP 竞争结合位点,因此该类变构调节剂容易获得家族成员间的高选择性,减轻或避免脱靶效应,保障较宽的药物治疗窗和安全性,如 Deucravacitinib 在包括银屑病和斑秃在内的多种疾病临床试验中未见关于泛 JAKs 抑制不良反应的报道。当然,不容忽视的是,大部分蛋白的变构口袋呈疏水性,调节剂要求较高的亲脂性,这将导致不良的脂水分配系数和生物利用度。随着变构药物从偶然发现到合理设计的发展,研究人员已逐渐掌握其有关规律,可以在有效结构上引入增溶基团改善化合物的药代动力学特性,或者以成盐的形式进行口服给药,相信其最终能为人类的健康事业做出贡献。

参考文献:

- [1] SCHWARTZ D M, KANNO Y, VILLARINO A, et al. JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases [J]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2017, **16**(12): 843-862.
- [2] HAMMARÉN H M, VIRTANEN A T, RAIIVOLA J, et al. The regulation of JAKs in cytokine signaling and its breakdown in disease [J]. *Cytokine*, 2019, **118**: 48-63.
- [3] MORRIS R, KERSHAW N J, BABON J J. The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway [J]. *Protein Sci.*, 2018, **27**(12): 1 984-2 009.
- [4] VILLARINO A V, KANNO Y, O'SHEA J J. Mechanisms and consequences of JAK-STAT signaling in the immune system [J]. *Nat. Immunol.*, 2017, **18**(4): 374-384.
- [5] LAURENCE A, PESU M, SILVENNOINEN O, et al. JAK kinases in health and disease: An update [J]. *Open Rheumatol J.*, 2012, **6**: 232-244.
- [6] SERRA LÓPEZ-MATENCIO J M, MORELL BALADRÓN A, CASTAÑEDA S. JAK-STAT inhibitors for the treatment

- of immunomediated diseases [J]. *Med. Clin. (Barc)*, 2019, **152**(9):353-360.
- [7] XIN P, XU X, DENG C, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases [J]. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, **80**:106 210.
- [8] WINTHROP K L, COHEN S B. Oral surveillance and JAK inhibitor safety: The theory of relativity [J]. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2022, **18**(5):301-304.
- [9] MCLORNAN D P, POPE J E, GOTLIB J, et al. Current and future status of JAK inhibitors [J]. *Lancet.*, 2021, **398**(1 0302):803-816.
- [10] GOLL G L, KVIEN T K. New-generation JAK inhibitors: How selective can they be [J]. *Lancet*, 2018, **391**(10 139):2 477-2 478.
- [11] ANGELINI J, TALOTTA R, RONCATO R, et al. JAK-Inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis: A focus on the present and an outlook on the future [J]. *Biomolecules*, 2020, **10**(7):1 002.
- [12] CLARK J D, FLANAGAN M E, TELLIEZ J B. Discovery and development of Janus kinase (JAK) inhibitors for inflammatory diseases [J]. *J. Med. Chem.*, 2014, **57**(12):5 023-5 038.
- [13] SOHN S J, BARRETT K, VAN ABBEMA A, et al. A restricted role for TYK2 catalytic activity in human cytokine responses revealed by novel TYK2-selective inhibitors [J]. *J. Immunol.*, 2013, **191**(5):2 205-2 216.
- [14] ISHIZAKI M, AKIMOTO T, MUROMOTO R, et al. Involvement of tyrosine kinase-2 in both the IL-12/Th1 and IL-23/Th17 axes in vivo [J]. *J. Immunol.*, 2011, **187**(1):181-189.
- [15] SWAIN S L, MCKINSTY K K, STRUTT T M. Expanding roles for CD4⁺ T cells in immunity to viruses [J]. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, **12**(2):136-148.
- [16] KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, et al. IL-17 and Th17 cells [J]. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, **27**:485-517.
- [17] BABON J J, LUCET I S, MURPHY J M, et al. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation [J]. *Biochem J.*, 2014, **462**(1):1-13.
- [18] SCHNEPF D, CROTTA S, THAMAMONGOOD T, et al. Selective Janus kinase inhibition preserves interferon- λ -mediated antiviral responses [J]. *Sci. Immunol.*, 2021, **6**(59):eabd5 318.
- [19] SIMMONS D P, WEARSCH P A, CANADAY D H, et al. Type I IFN drives a distinctive dendritic cell maturation phenotype that allows continued class II MHC synthesis and antigen processing [J]. *J. Immunol.*, 2012, **188**:3 116-3 126.
- [20] ELORANTA M L, RÖNNBLÖM L. Cause and consequences of the activated type I interferon system in SLE [J]. *J. Mol. Med. (Berl)*, 2016, **94**:1 103-1 110.
- [21] MINEGISHI Y, SAITO M, MORIO T, et al. Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity [J]. *Immunity*, 2006, **25**(5):745-755.
- [22] GHORESCHI K, AUGUSTIN M, BARALIAKOS X, et al. TYK2 inhibition and its potential in the treatment of chronic inflammatory immune diseases [J]. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 2021, **19**(10):1 409-1 420.
- [23] NOGUEIRA M, PUIG L, TORRES T. JAK Inhibitors for treatment of psoriasis: Focus on selective TYK2 inhibitors [J]. *Drugs*, 2020, **80**(4):341-352.
- [24] XU P, SHEN P, YU B, et al. Janus kinases (JAKs): The efficient therapeutic targets for autoimmune diseases and myeloproliferative disorders [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2020, **192**:112 155.
- [25] NASH O, OMOTUYI O, LEE J, et al. Artocarpus altilis CG-901 alters critical nodes in the JH1-kinase domain of Janus kinase 2 affecting upstream JAK/STAT3 signaling [J]. *J. Mol. Model.*, 2015, **21**(11):280.
- [26] TANAKA Y, LUO Y, O'SHEA J J, et al. Janus kinase-targeting therapies in rheumatology: A mechanisms-based approach [J]. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2022, **18**(3):133-145.
- [27] MIN X, UNGUREANU D, MAXWELL C, et al. Structural and functional characterization of the JH2 pseudokinase domain of JAK family Tyrosine Kinase 2 (TYK2) [J]. *J. Biol. Chem.*, 2015, **290**:27 261-27 270.
- [28] STAERK J, KALLIN A, DEMOULIN J, et al. JAK1 and Tyk2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: Cross-talk with IGF1 receptor [J]. *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**:41 893-41 899.
- [29] STAERK J, KALLIN A, DEMOULIN J B, et al. JAK1 and Tyk2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: Cross-talk with IGF1 receptor [J]. *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**(51):41 893-41 899.
- [30] YE H T C, DONDI E, UZE G, et al. A dual role for the kinase-like domain of the tyrosine kinase Tyk2 in interferon- α signaling [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, **97**(16):8 991-8 996.
- [31] LI Z, GAKOVIC M, RAGIMBEAU J, et al. Two rare disease-associated Tyk2 variants are catalytically impaired but signaling competent [J]. *J. Immunol.*, 2013, **190**(5):2 335-2 344.
- [32] LUPARDUS P J, ULTSCH M, WALLWEBER H, et al.

- Structure of the pseudokinase-kinase domains from protein kinase TYK2 reveals a mechanism for Janus kinase (JAK) autoinhibition [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2014, **111**; 8 025-8 030.
- [33] WANG Z, HUANG W, ZHOU K, et al. Targeting the non-catalytic functions: A new paradigm for Kinase drug discovery [J]. *J. Med. Chem.*, 2022, **65**(3): 1 735-1 748.
- [34] FENSOME A, AMBLER C M, ARNOLD E, et al. Dual inhibition of TYK2 and JAK1 for the treatment of autoimmune diseases: Discovery of ((S)-2,2-difluorocyclopropyl)((1R,5S)-3-(2-((1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)pyrimidin-4-yl)-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octan-8-yl)methanone (PF-06700841) [J]. *J. Med. Chem.*, 2018, **61**(19): 8 597-8 612.
- [35] KALGUTKAR A S. Should the incorporation of structural alerts be restricted in drug design? An analysis of structure-toxicity trends with aniline-based drugs [J]. *Curr. Med. Chem.*, 2015, **22**(4): 438-464.
- [36] FORMAN S B, PARISER D M, POULIN Y, et al. TYK2/JAK1 inhibitor PF-06700841 in patients with plaque psoriasis: Phase IIa, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *J. Invest. Dermatol.*, 2020, **140**(12): 2 359-2 370..
- [37] KRUEGER J G, MCINNES I B, BLAUVELT A. Tyrosine kinase 2 and Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling and inhibition in plaque psoriasis [J]. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2022, **86**(1): 148-157.
- [38] NOGUEIRA M, PUIG L, TORRES T. JAK inhibitors for treatment of psoriasis: Focus on selective TYK2 inhibitors [J]. *Drugs*, 2020, **80**(4): 341-352.
- [39] KING B, GUTTMAN-YASSKY E, PEEVA E, et al. Vincent MS. A phase 2a randomized, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of the oral Janus kinase inhibitors ritlecitinib and brepocitinib in alopecia areata: 24-Week results [J]. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2021, **85**(2): 379-387.
- [40] WINNETTE R, BANERJEE A, SIKIRICA V, et al. Characterizing the relationships between patient-reported outcomes and clinician assessments of alopecia areata in a phase 2a randomized trial of ritlecitinib and brepocitinib [J]. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2022, **36**(4): 602-609.
- [41] D'AMICO F, FIORINO G, FURFARO F, et al. Janus kinase inhibitors for the treatment of inflammatory bowel diseases: Developments from phase I and phase II clinical trials [J]. *Expert Opin. Investig. Drugs.*, 2018, **27**(7): 595-599.
- [42] D'AMICO F, FIORINO G, FURFARO F, et al. Janus kinase inhibitors for the treatment of inflammatory bowel diseases: Developments from phase I and phase II clinical trials [J]. *Expert Opin. Investig. Drugs.*, 2018, **27**(7): 595-599.
- [43] ZHANG C, QI W, LI Y, et al. Discovery of 3-(4-(2-((1H-indol-5-yl)amino)-5-fluoropyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1-yl)propanenitrile derivatives as selective TYK2 inhibitors for the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *J. Med. Chem.*, 2021, **64**(4): 1 966-1 988.
- [44] YANG T, CUI X, TANG M, et al. Identification of a novel 2,8-diazaspiro[4.5]decan-1-one derivative as a potent and selective dual TYK2/JAK1 inhibitor for the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *J. Med. Chem.*, 2022, **65**(4): 3 151-3 172.
- [45] GERSTENBERGER B S, AMBLER C, ARNOLD E P, et al. Discovery of tyrosine kinase 2 (TYK2) inhibitor (PF-06826647) for the treatment of autoimmune diseases [J]. *J. Med. Chem.*, 2020, **63**(22): 13 561-13 577.
- [46] SINGH R S P, PRADHAN V, ROBERTS E S, et al. Safety and pharmacokinetics of the oral TYK2 inhibitor PF-06826647: A phase I, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study [J]. *Clin. Transl. Sci.*, 2021, **14**(2): 671-682.
- [47] KRUEGER J G, MCINNES I B, BLAUVELT A. Tyrosine kinase 2 and Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling and inhibition in plaque psoriasis [J]. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2022, **86**(1): 148-157.
- [48] TEHLIRIAN C, SINGH R S P, PRADHAN V, et al. Oral tyrosine kinase 2 inhibitor PF-06826647 demonstrates efficacy and an acceptable safety profile in participants with moderate-to-severe plaque psoriasis in a phase 2b, randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2022, **87**(2): 333-342.
- [49] LIANG J, TSUI V, VAN ABBEMA A, et al. Lead identification of novel and selective TYK2 inhibitors [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2013 **67**: 175-187.
- [50] LIANG J, VAN ABBEMA A, BALAZS M, et al. Lead optimization of a 4-aminopyridine benzamide scaffold to identify potent, selective, and orally bioavailable TYK2 inhibitors [J]. *J. Med. Chem.*, 2013, **56**(11): 4 521-4 536.
- [51] LIANG J, VAN ABBEMA A, BALAZS M, et al. Identification of an imidazopyridine scaffold to generate potent and selective TYK2 inhibitors that demonstrate activity

- in an in vivo psoriasis model [J]. *Bioorg Med. Chem. Lett.*, 2017, **27**(18): 4 370-4 376.
- [52] LIN R, CONNOLLY P J, HUANG S, et al. 1-Acyl-1H-[1,2,4] triazole-3,5-diamine analogues as novel and potent anticancer cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and evaluation of biological activities [J]. *J. Med. Chem.*, 2005, **48**(13): 4 208-4 211.
- [53] MALERICH J P, LAM J S, HART B, et al. Diamino-1,2,4-triazole derivatives are selective inhibitors of TYK2 and JAK1 over JAK2 and JAK3 [J]. *Bioorg Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**(24): 7 454-7 457.
- [54] WORKS M G, YIN F, YIN C C, et al. Inhibition of TYK2 and JAK1 ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis by inhibiting IL-22 and the IL-23/IL-17 axis [J]. *J. Immunol.*, 2014, **193**(7): 3 278-3 287.
- [55] SAREUM LIMITED. TYK2 kinase inhibitors; WO2 020 074 461 [P]. 2020-04-16.
- [56] NIMBUS LAKSHMI, INC. Tyk2 inhibitors, uses, and methods for production thereof; WO2 018 165 240 [P]. 2018-09-13.
- [57] GALAPAGOS INC. Novel compounds and pharmaceutical compositions thereof for the treatment of inflammatory disorders; WO2 019 076 716 [P]. 2019-04-25.
- [58] ABBVIE INC. Inhibitors of tyrosine kinase 2 mediated signaling; WO2 019 178 079 [P]. 2019-12-12.
- [59] SASAKI Y, TOKUHARA H, OHBA Y, et al. Efficient synthesis of tert-butyl-3-cyano-3-cyclopropyl-2-oxopyrrolidine-4-carboxylates: Highly functionalized 2-pyrrolidinone enabling access to novel macrocyclic TYK2 inhibitors [J]. *Bioorg Med. Chem.*, 2020, **30**: 126 963.
- [60] WROBLESKI S T, MOSLIN R, LIN S, et al. Highly selective inhibition of Tyrosine Kinase 2 (TYK2) for the treatment of autoimmune diseases; Discovery of the allosteric inhibitor BMS-986165 [J]. *J. Med. Chem.*, 2019, **62**(20): 8 973-8 995.
- [61] MOSLIN R, ZHANG Y, WROBLESKI S T, et al. Identification of N-methyl nicotinamide and N-methyl pyridazine-3-carboxamide pseudokinase domain ligands as highly selective allosteric inhibitors of Tyrosine Kinase 2 (TYK2) [J]. *J. Med. Chem.*, 2019, **62**(20): 8 953-8 972.
- [62] LIU C, LIN J, LANGEVINE C, et al. Discovery of BMS-986202; A clinical Tyk2 inhibitor that binds to Tyk2 JH2 [J]. *J. Med. Chem.*, 2021, **64**(1): 677-694.
- [63] LIU C, LIN J, MOSLIN R, et al. Identification of imidazo[1,2-b]pyridazine derivatives as potent, selective, and orally active Tyk2 JH2 inhibitors [J]. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2019, **10**(3): 383-388.
- [64] NIMBUS LAKSHMI, INC. TYK2 inhibitors and uses thereof; WO2 019 023 468 [P]. 2019-01-31.
- [65] FRONTHERA U. S. PHARMACEUTICALS LLC. TYK2 inhibitors and uses thereof; WO2 020 185 755 [P]. 2020-09-17.
- [66] NIMBUS LAKSHMI, INC. TYK2 inhibitors and uses thereof; WO2 020 112 937 [P]. 2020-06-04.

基于丁酸功能化基团钌化合物的合成及其抗菌活性研究

曾威*, 丁云霞, 姜雯雯, 陈晓燕, 荣小娟, 马兆霞

(江西科技学院 医学院, 江西 南昌 330013)

摘要:以含丁酸取代的邻菲罗啉衍生物为主配体(PHIBA)合成了两个新型抗菌钌化合物 $[\text{Ru}(\text{dtb})_2\text{PHIBA}](\text{PF}_6)_2$ (Ru1)、 $[\text{Ru}(\text{dmb})_2\text{PHIBA}](\text{PF}_6)_2$ (Ru2),通过最低抑菌浓度、时间杀伤曲线、溶血毒素试验、棋盘联用实验等评价了钌化合物对金黄色葡萄球菌的抗菌活性。采用DAPI/PI染色试验、(DISC₃)₅膜去极化染色试验、DNA泄露试验、内膜渗透性实验及活性氧监测(DCFH-DA)试验验证了化合物Ru1的抑菌机制。最后通过大蜡螟幼虫感染模型研究了Ru1的体内抗菌活性。结果表明,两个钌配合物均具有显著的抗菌活性(MIC=1.56~6.25 μg/mL),钌化合物Ru1(1.56 μg/mL)能通过破坏细菌细胞膜并诱导产生ROS杀死细菌。此外,Ru1不仅能有效抑制细菌毒素的分泌,而且与部分抗生素具有协同抗菌活性(FICI≤0.5)。更为重要的是,Ru1能显著提高细菌感染后大蜡螟幼虫的存活率(40%)。研究结果表明,基于丁酸功能化配体的钌化合物具有显著的抗菌活性。

关键词:钌配合物;丁酸;抗菌机制;金黄色葡萄球菌

中图分类号:R916 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2023)02-0054-08

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0624

Ruthenium Complex Based on Butyric Acid Functionalized Ligand: Synthesis and Antibacterial Activity Study ZENG Wei*, DING Yun-xia, JIANG Wen-wen, CHEN Xiao-yan, RONG Xiao-juan, MA Zhao-xia (School of Medicine, Jiangxi University of Technology, Nanchang, 330013, China)

Abstract: Two ruthenium complexes based on butyric acid functionalized ligand: $[\text{Ru}(\text{dtb})_2\text{PHIBA}](\text{PF}_6)_2$ (Ru1), $[\text{Ru}(\text{dmb})_2\text{PHIBA}](\text{PF}_6)_2$ (Ru2), were synthesized and characterized. Their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* were investigated through time-kill kinetics assay, rabbit erythrocyte hemolysis assays and checkerboard assay. In addition, DAPI/PI staining assay, membrane depolarization assay, DNA leakage assay and ROS generation monitored assay were employed to explore the antibacterial mechanism. At last, the antibacterial activity of Ru1 *in vivo* was studied using *Galleria mellonella*. The results indicated that two ruthenium complexes exhibited strong antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (MIC = 1.56 ~ 6.25 μg/mL). The most active complex Ru1 (1.56 μg/mL) kill bacteria through destroying bacterial cell membranes and inducing the generation of ROS. In addition, Ru1 could inhibit the toxin secretion and showing synergistic effect (FICI ≤ 0.5) when used in combination with some antibiotics. More importantly, Ru1 also effective *in vivo*. In summary, ruthenium complex based on butyric acid functionalized ligand are promising antibacterial agents.

Key words: ruthenium complexes; butyric acid; antibacterial mechanism; *Staphylococcus aureus*

多重耐药性细菌的广泛传播对全球公共卫生安全造成了巨大威胁^[1,2]。全球每年因耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染导致的死亡人数超过了100万^[3]。而开发出具有全新作用机制的抗菌药物是应对多重耐药菌的手段之一。研究表明,具有细菌膜破坏作用的抗菌剂不仅抗菌活性高,而且细菌不容易产生耐药性^[4-6]。其中抗菌多肽作为一种典型的膜靶向分子受到了广泛关注^[7]。然而体内稳定性差、合成成本高等缺点严重制约了抗菌多肽的临床应用^[8]。设计合成具有抗菌多肽类似作用的有机小分子可以有效地解决这些缺陷,因此开发具有膜破坏作用的有机小分子代替抗菌肽被认为是一种有前途的抗菌策略^[9]。有机丁酸不仅广泛用于各种药物活性中间体的合成,而且丁酸类化合物本身也具有多样

的生物活性,如抗肿瘤、抗菌活性等^[10-12]。研究表明,短链脂肪族丁酸发挥抗菌作用与靶向细菌细胞膜密切相关^[13]。

相比于传统有机小分子化合物,金属配合物具有多靶点、不容易诱导细菌产生耐药性等特点。因此,金属化合物在抗菌方面的应用受到了广泛

收稿日期:2022-08-10;网络首发日期:2022-11-22

基金项目:江西省教育厅科技项目(GJJ202015);江西省卫健委科技计划项目(202211352)。

作者简介:曾威(1987-),男,江西九江人,硕士,讲师,主要研究方向为抗菌活性物质的设计与筛选,E-mail:675926906@qq.com。

引用本文:曾威,丁云霞,姜雯雯,等.基于丁酸功能化基团钌化合物的合成及其抗菌活性研究[J].化学试剂,2023,45(2):54-61。

关注,而钌化合物是研究最为广泛的金属类抗菌化合物之一。钌化合物不仅对各类病原菌呈现出显著的抑菌活性,而且对多重耐药性病原菌同样具有很好的抗菌活性^[14-17]。基于钌化合物在抗菌方面的优势,本文将有机小分子丁酸整合到金属钌化合物中,并成功合成了两个具有破坏细菌细胞膜完整性的钌基抗菌剂: $[\text{Ru}(\text{dtb})_2\text{PHBA}]$

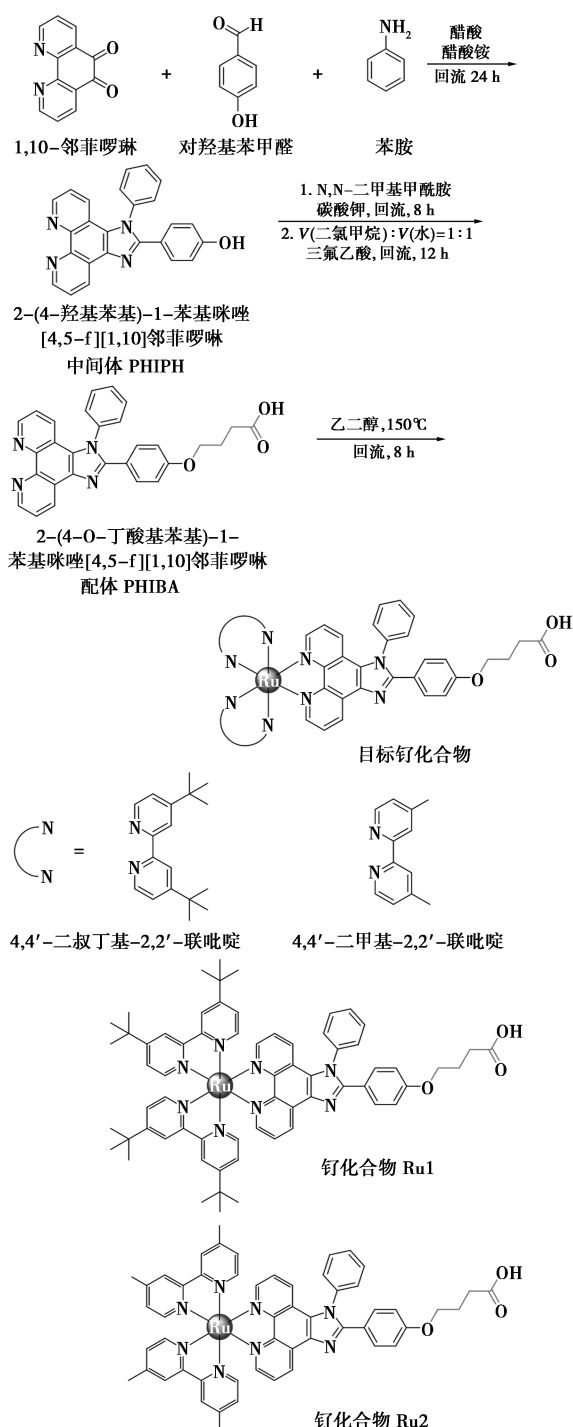


图 1 中间体及钌配合物的合成路线

Fig.1 Synthesis route of intermediates and Ruthenium complexes

$(\text{PF}_6)_2(\text{Ru1})$ 、 $[\text{Ru}(\text{dmb})_2\text{PHIBA}](\text{PF}_6)_2(\text{Ru2})$ 。通过最低抑菌浓度(MIC)和时间杀伤曲线的测定初步测定了两个化合物对金黄色葡萄球菌的抗菌活性。随后通过 DAPI 染色实验、核酸及酶泄露实验、细菌膜电位监测以及细菌内 ROS 的监测等实验验证了化合物的抗菌机制。此外,还通过溶血毒素分泌实验以及棋盘联用实验进一步验证了 Ru1 的抗菌活性。最后通过大蜡螟幼虫感染模型评价了 Ru1 的体内抗菌活性。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

AM-400 型超导核磁共振仪(美国 Bruker 公司); LCMS-IT-TOF 型高分辨率质谱仪(美国 Thermo 公司); DM2500 型 LED 荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

对羟基苯甲醛、溴丁酸甲酯、三氟乙酸(分析纯, 萨恩科学技术有限公司); 冰醋酸、醋酸铵、碳酸钾(化学纯, 西陇科学股份有限公司); 苯胺、N,N-二甲基甲酰胺(分析纯, 上海安耐吉化学有限公司); 所有试剂使用时无需进一步纯化。金黄色葡萄球菌(中国工业微生物菌种保藏中心)。

1.2 化合物的合成

1.2.1 中间体 PHIPH 的合成

中间体 PHIPH 的合成是根据文献[18]报道的路线。

1.2.2 配体 PHIBA 的合成

在 50 mL 的反应管中加入 0.776 g (2 mmol) 中间体 PHIPH、15 mL N,N-二甲基甲酰胺、0.276 g (2 mmol) 碳酸钾、0.398 g (2.2 mmol) 溴丁酸甲酯后搅拌回流 8 h。反应结束后冷却到室温, 加入 40 mL 水后析出大量棕黄色沉淀。过滤收集沉淀后真空干燥得到棕黄色粉末。将粗产物溶解在 10 mL 混合溶液(V(水):V(二氯甲烷)=1:1)后继续加入三氟乙酸, 在 90℃继续回流 12 h。反应结束后加入 30 mL 水后析出棕黄色沉淀。过滤收集沉淀后真空干燥得到 0.778 g 棕黄色粉末, 产率 82%。¹H NMR (DMSO, 400 MHz), δ : 9.27 (s, 1H); 9.10 (s, 1H); 8.96 (s, 1H); 8.09 (s, 1H); 7.74~7.58 (m, 6H); 7.44~7.32 (m, 3H); 6.83 (d, J =8.7 Hz, 2H); 3.90 (s, 2H); 2.28 (s, 2H); 1.83 (s, 2H)。¹³C NMR (DMSO, 100 MHz), δ : 173.73 (s); 159.51 (s); 152.61 (s); 146.44 (s); 137.64 (d, J =110.0 Hz); 134.73 (s); 130.49 (d, J =29.1 Hz); 128.99 (d, J =97.2 Hz); 124.74 (d,

$J=54.1\text{ Hz}$); $121.08(\text{s})$; $114.13(\text{s})$; $66.61(\text{s})$; $29.98(\text{s})$; $24.08(\text{s})$ 。HR-MS (ESI), $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3$, 实测值(计算值), m/z : $475.177\ 0(475.177\ 2)[\text{M}]^+$ 。

1.2.3 化合物 Ru1 的合成

50 mL 反应瓶中加入 $148.68\text{ mg}(0.21\text{ mmol})$ $\text{Ru}(\text{dtb})_2\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $99.58\text{ mg}(0.21\text{ mmol})$ PHIBA、10 mL 乙二醇,在 $150\text{ }^\circ\text{C}$ 氮气保护下搅拌回流 8 h。反应结束后加入 30 mL 饱和六氟磷酸钾溶液,得到红色固体沉淀。粗产物经中性氧化铝柱($V(\text{乙腈}):V(\text{二甲苯})=2:1$)分离纯化,洗脱液减压蒸馏后得 156.08 mg 红色粉末,产率 53%。 $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}, 400\text{ MHz})$, δ : $9.17(\text{s}, 1\text{H})$; $8.86(\text{d}, J=15.2\text{ Hz}, 4\text{H})$; $8.05(\text{s}, 1\text{H})$; $7.97(\text{d}, J=8.6\text{ Hz}, 2\text{H})$; $7.79(\text{s}, 2\text{H})$; $7.76(\text{s}, 3\text{H})$; $7.63(\text{d}, J=6.5\text{ Hz}, 4\text{H})$; $7.59(\text{s}, 1\text{H})$; $7.53(\text{s}, 2\text{H})$; $7.47(\text{s}, 1\text{H})$; $7.40(\text{d}, J=7.2\text{ Hz}, 2\text{H})$; $7.34(\text{s}, 2\text{H})$; $6.95(\text{s}, 2\text{H})$; $3.97(\text{s}, 2\text{H})$; $1.97(\text{s}, 2\text{H})$; $1.84(\text{s}, 2\text{H})$; $1.41(\text{d}, J=9.9\text{ Hz}, 18\text{H})$; $1.34(\text{s}, 18\text{H})$ 。 $^{13}\text{C NMR}(\text{DMSO}, 100\text{ MHz})$, δ : $162.25 \sim 162.05(\text{m})$; $160.59(\text{s})$; $156.88(\text{s})$; $155.34(\text{s})$; $154.33(\text{s})$; $151.09(\text{s})$; $150.67(\text{s})$; $149.95(\text{s})$; $145.89(\text{s})$; $136.99(\text{d}, J=66.9\text{ Hz})$; $131.32(\text{s})$; $130.93(\text{d}, J=41.8\text{ Hz})$; $129.25(\text{s})$; $128.16(\text{s})$; $127.97 \sim 127.84(\text{m})$; $126.69(\text{d}, J=117.1\text{ Hz})$; $125.38(\text{t}, J=45.7\text{ Hz})$; $122.31(\text{s})$; $122.10(\text{d}, J=36.4\text{ Hz})$; $121.26(\text{s})$; $114.92(\text{s})$; $68.51(\text{s})$; $35.98(\text{s})$; $34.45(\text{s})$; $30.54(\text{s})$; $26.35(\text{s})$ 。HR-MS(ESI), $\text{C}_{65}\text{H}_{70}\text{N}_8\text{O}_3\text{Ru}$, 实测值(计算值), m/z : $556.231\ 6(556.232\ 4)[\text{M}-2\text{PF}_6-2\text{H}]^+$ 。

1.2.4 化合物 Ru2 的合成

化合物 Ru2 的合成方法与化合物 Ru1 的合成方法相同,用 $\text{Ru}(\text{dmb})_2\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 取代 $\text{Ru}(\text{dtb})_2\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,得 259.64 mg 化合物,产率 46%。 $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}, 400\text{ MHz})$, δ : $9.21(\text{s}, 1\text{H})$; $8.74(\text{d}, J=8.4\text{ Hz}, 4\text{H})$; $8.17(\text{s}, 1\text{H})$; $8.00(\text{s}, 2\text{H})$; $7.81(\text{d}, J=7.5\text{ Hz}, 5\text{H})$; $7.59(\text{d}, J=8.5\text{ Hz}, 5\text{H})$; $7.41(\text{d}, J=5.5\text{ Hz}, 5\text{H})$; $7.21(\text{s}, 2\text{H})$; $6.99(\text{s}, 2\text{H})$; $4.06(\text{s}, 2\text{H})$; $2.57(\text{s}, 6\text{H})$; $2.51(\text{s}, 2\text{H})$; $2.50(\text{s}, 6\text{H})$; $2.01(\text{s}, 2\text{H})$ 。 $^{13}\text{C NMR}(\text{DMSO}, 100\text{ MHz})$, δ : $172.92(\text{s})$; $160.10(\text{s})$; $156.72(\text{s})$; $154.29(\text{s})$; $151.00(\text{s})$; $149.86(\text{s})$; $146.72 \sim 144.03(\text{m})$; $137.36(\text{s})$; $131.13(\text{s})$; $129.20(\text{s})$; $128.92(\text{s})$; $127.97(\text{s})$; $127.3 \sim 127.00(\text{m})$; $126.10(\text{s})$; $125.35(\text{s})$; $125.35(\text{s})$; $121.81(\text{s})$; $114.94(\text{s})$; $66.34(\text{s})$; $30.52(\text{s})$;

$24.58(\text{s})$; $21.00(\text{s})$ 。HR-MS (ESI), $\text{C}_{53}\text{H}_{46}\text{N}_8\text{O}_3\text{Ru}$, 实测值(计算值), m/z : $472.137\ 5(472.138\ 0)[\text{M}-2\text{PF}_6-2\text{H}]^+$ 。

1.3 抗菌活性测试

1.3.1 最低抑菌浓度与时间杀伤曲线

处于对数期的金黄色葡萄球菌用新鲜 TSB 培养基稀释 1 000 倍后得到细菌混悬液,然后将 $50\text{ }\mu\text{L}$ 含梯度浓度的钌化合物($0.2 \sim 200\text{ }\mu\text{g/mL}$)与 $200\text{ }\mu\text{L}$ 细菌悬液加入到 96 孔平板中,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 20 h 后观察最低抑菌浓度数值。

对于时间杀伤曲线的绘制,将不同浓度的钌化合物与细菌混悬液在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 共同孵育,在指定的时间点将细菌悬浮液稀释 100 倍并涂布在培养平板上, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下培养 20 h 后对菌落进行计数。

1.3.2 DAPI/PI 染色实验

细菌染色实验根据文献[19]实验方法开展。将处于对数期的金黄色葡萄球菌离心收集,PBS 清洗 3 次后用 PBS 缓冲液稀释至 $1 \times 10^7\text{ CFU/mL}$ 备用。将 Ru1 ($2 \times \text{MIC}$ 、 $4 \times \text{MIC}$) 加入到细菌混悬液中 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h。分别取 $20\text{ }\mu\text{L}$ ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$) 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 和 $20\text{ }\mu\text{L}$ ($20\text{ }\mu\text{g/mL}$) 碘化丙啶 (PI) 加入到细菌悬液中,常温孵育 30 min 后,用共聚焦荧光显微镜成像。

1.3.3 细胞质膜去极化实验

收集对数期生长的金黄色葡萄球菌,用 PBS 缓冲液稀释至 $1 \times 10^7\text{ CFU/mL}$ 。加入 Ru1 ($2 \times \text{MIC}$ 、 $4 \times \text{MIC}$) 后在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 2 h。然后离心收集细菌,PBS 洗涤 3 次后重悬于 PBS 缓冲液中,加入 $30\text{ }\mu\text{L}$ ($30\text{ }\mu\text{mol/L}$) DiSC₃(5) 荧光染料,黑暗条件下孵育 1 h 后,通过共聚焦荧光显微镜成像。

1.3.4 内膜渗透性实验

金黄色葡萄球菌在含 0.4% 乳糖的 M9 培养基中培养过夜,离心收集细菌后用 PBS 重悬细菌。取 2 mL 细菌悬液、 $400\text{ }\mu\text{L}$ 药物溶液以及 $100\text{ }\mu\text{L}$ 邻-硝基酚- β -D-半乳糖苷 (ONPG) 加入到 10 mL 摇菌管中,用紫外分光光度计测定混合液在 415 nm 处的吸光度值。

1.3.5 核酸泄露实验

收集对数期生长的细菌,PBS 洗涤 3 次后重悬于 PBS 缓冲液中。加入 Ru1 (MIC 、 $2 \times \text{MIC}$) 孵育不同时间后,取细菌混悬液经用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤细菌。过滤液用紫外分光光度计监测在 260 nm 处的吸光度值。

1.3.6 ROS 监测

不同浓度的 Ru1 ($2 \times \text{MIC}$ 、 $4 \times \text{MIC}$) 与细菌在

37 °C 下孵育 2 h,然后用 PBS 洗涤 3 次后重悬细菌。加入最终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)染料后在 37 °C 继续孵育 30 min。然后 3 600 r/min 离心 5 min 收集细菌,用 PBS 洗涤 3 次后使用共聚焦显微镜进行成像。

1.3.7 兔红细胞溶血实验

过夜培养的细菌用新鲜 TSB 培养基稀释 1 000 倍后,加入钌配合物后继续培养 16 h。离心收集上清液后,取 150 μL 细菌上清液和 25 μL 的兔血细胞加入到 1 mL 的 PBS 缓冲液中。37 °C 下孵育 30 min 后离心收集上清液,在 543 nm 处测定上清液的吸光度值。

1.3.8 棋盘联用实验

将 25 μL 含不同浓度的 Ru1、25 μL 不同浓度的抗生素和 200 μL 细菌悬浮液(制备方法见最低抑菌浓度的测试)加入到 96 孔平板中,随后在 37 °C 恒温培养箱中培养 20 h 测定化合物各自的 MIC 值。两种药物的联用效果可用分级抑制浓度指数(FICI)评价,当 $\text{FICI} \leq 0.5$ 时表示具有协同作用。

1.3.9 大蜡螟幼虫细菌感染模型

离心收集对数期生长的细菌,然后用 PBS 缓冲液将细菌稀释至 $OD_{600} = 0.3$,所有大蜡螟幼虫随机分为 5 组(每组 12 只)并用 75% 的酒精对注射部位消毒。大蜡螟幼虫右后腹足处注射 10 μL 细菌混悬液,1 h 后从大蜡螟幼虫左后腹足注射 10 μL (16、32、64 mg/kg) 不同浓度的 Ru1 和 64 mg/kg 万古霉素。监测 7 d 内大蜡螟幼虫的存活率。

2 结果与讨论

2.1 体外抗菌活性

本文以丁酸取代的邻菲罗啉衍生物为主配体合成了两个新型钌化合物,化合物的结构通过高分辨率质谱、核磁共振氢谱和碳谱进行了表征。通过最低抑菌浓度(MIC)的测定评价了两种化合物对金黄色葡萄球菌的抑菌活性,化合物 Ru1、Ru2 的 MIC 值分别为 1.56、6.25 $\mu\text{g/mL}$ 。值得注意的是,化合物 Ru1 的抗菌活性明显高于庆大霉素($\text{MIC} = 7.80 \mu\text{g/mL}$)。这一结果表明两个钌化合物具有显著的抗菌活性(见表 1)。为了进一步

表 1 钌化合物及常用抗生素对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度

Tab.1 Minimum inhibitory concentration of ruthenium complex and antibiotics against <i>Staphylococcus aureus</i>				
化合物	Ru1	Ru2	庆大霉素	PHIBA
MIC/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1.56	6.25	7.80	>200

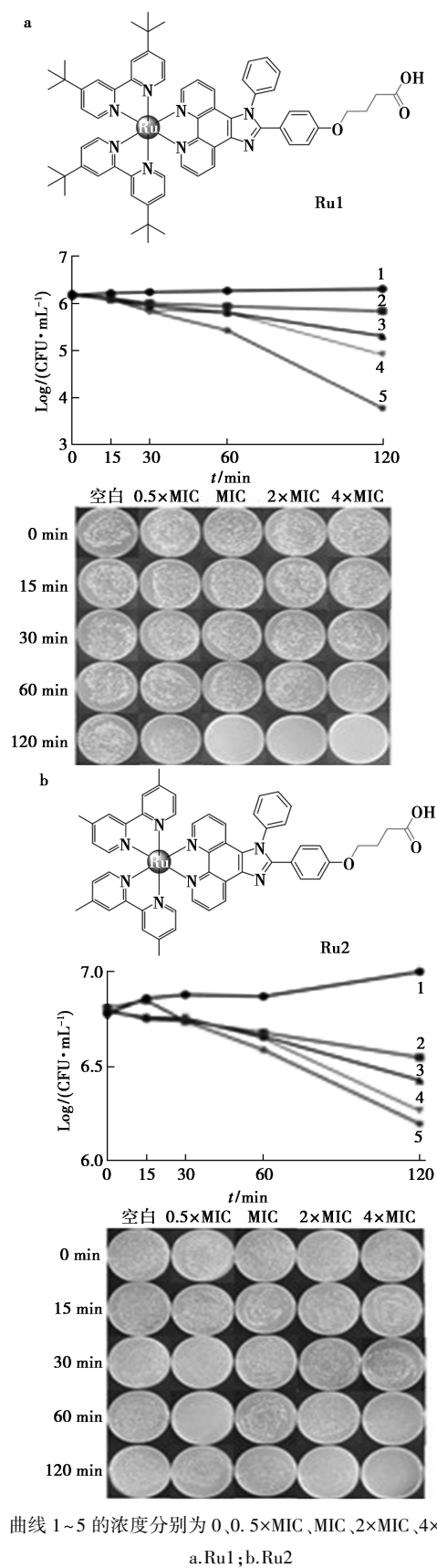


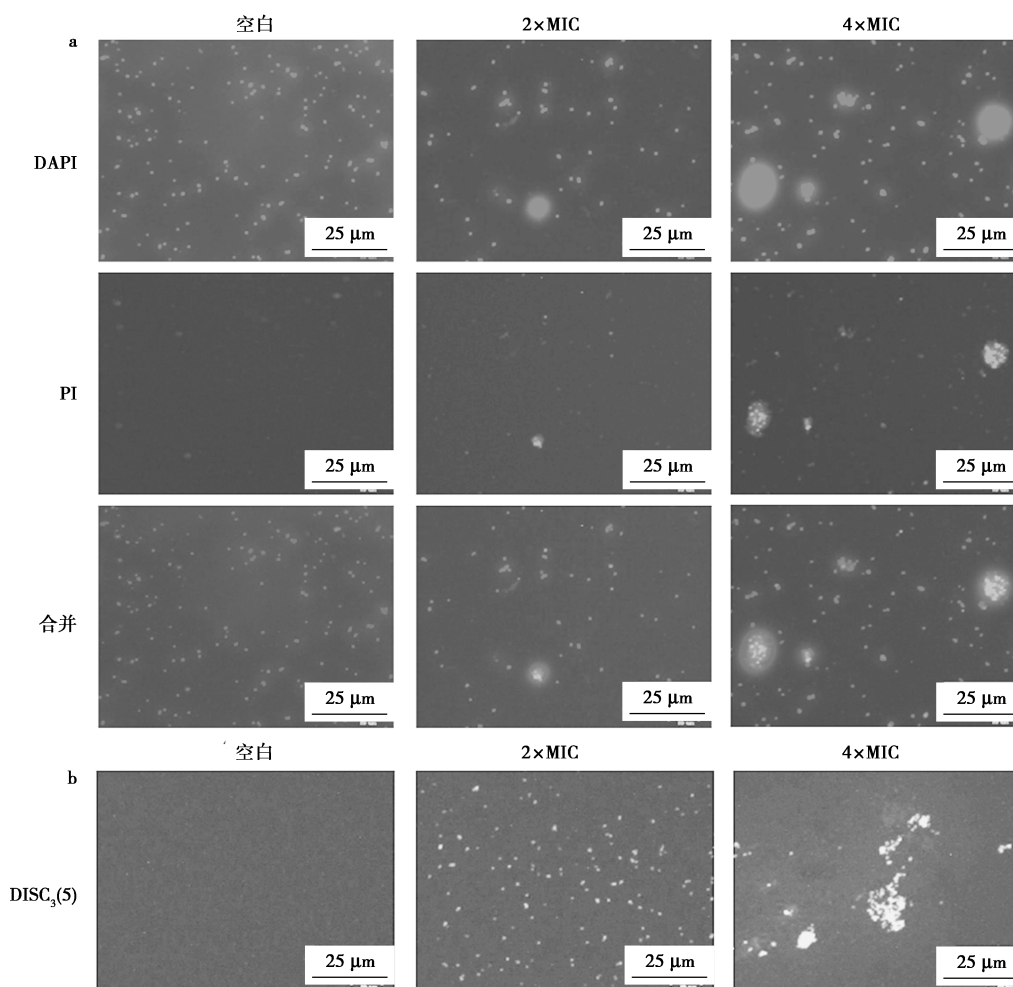
图 2 不同钌化合物对金黄色葡萄球菌的时间杀伤曲线
Fig.2 Time killing curve of two ruthenium complex against *Staphylococcus aureus*

研究钌化合物的杀菌作用,将不同浓度的钌化合物与金黄色葡萄球菌共同孵育,然后在不同时间点监测活细菌的数量。结果显示两种钌化合物($0.5\times\text{MIC}\sim 4\times\text{MIC}$)处理 2 h 后,存活的细菌数量明显减少。化合物 Ru1($4\times\text{MIC}$)能在 2 h 内杀死 39% 的金黄色葡萄球菌(图 2)。以上结果表明,目标钌化合物不仅可以有效抑制细菌的生长,而且还可以起到快速杀菌的作用。

2.2 钌化合物的抑菌机制

考虑到化合物 Ru1 具有较强的抑菌活性,以 Ru1 为研究对象进一步研究钌化合物的抑菌机制。首先,通过 DAPI 以及 PI 染色实验监测了细菌细胞膜的完整性。DAPI 作为常见的荧光染料,与 DNA 结合并显示出强烈的蓝色荧光,因此

DAPI 处理后细菌会产生蓝色荧光。然而 PI 染料只能穿过受损的细胞膜,其进入细胞内与 DNA 结合后产生红色荧光^[20]。结果显示,Ru1 处理后的细菌呈现出强烈的蓝色和红色荧光,而未处理组仅显示蓝色荧光,这表明 Ru1 能有效破坏细菌细胞膜的完整性(图 3a)。随后,通过 $\text{DISC}_3(5)$ 荧光探针进一步监测了 Ru1 处理后细菌细胞膜电位的变化情况。 $\text{DISC}_3(5)$ 是一种膜去极化探针,与细胞膜磷脂双分子层结合后荧光会淬灭,当细胞膜破损时会导致膜电位发生变化,因此 $\text{DISC}_3(5)$ 染料会从细胞膜磷脂双分子层中释放出来而发生绿色荧光。如图 3b 所示,Ru1 处理后的细菌呈现出显著的绿色荧光,这说明细菌细胞膜破坏后导致膜电位去极化。



以 PBS 处理的细菌为对照组

a. 经 DAPI 和 PI 染色; b. 经 $\text{DISC}_3(5)$ 染色

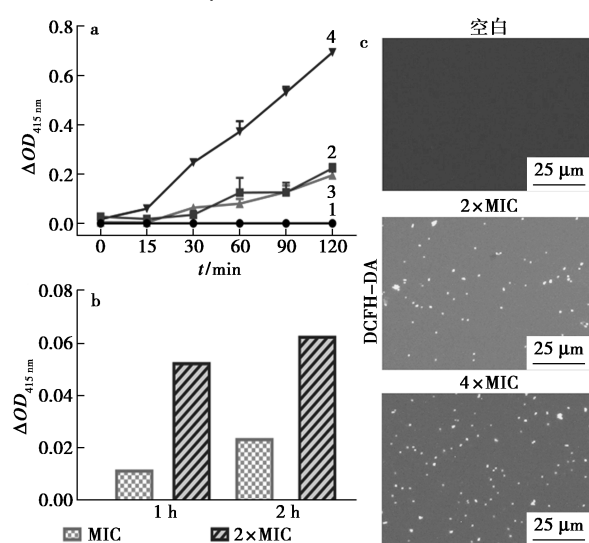
图 3 不同浓度 Ru1 处理后细菌经染色后的荧光成像图

Fig.3 Fluorescence imagings of bacteria stained after different concentrations of Ru1

细菌的细胞膜破损后,细菌内容物如核酸与蛋白质等会泄露到细胞外,因此监测了细菌内部

核酸以及 β -D-半乳糖苷酶的泄露量。核酸(DNA, RNA)在 280 nm 处有最大吸收,而邻-硝基

酚- β -D-半乳糖苷 (ONPG) 可以监测 β -D-半乳糖苷酶的泄露情况。 β -半乳糖苷酶能催化 ONPG 生成黄色的邻硝基酚,邻硝基酚在 415 nm 处有最大吸收。实验结果显示,在化合物 Ru1 作用下细菌培养液在 415 nm 处的吸收显著上升,提示邻硝基酚的大量生成。这说明 β -D-半乳糖苷酶已经从细菌体内泄露出来(图 4a)。此外,经化合物 Ru1 处理后,细菌培养上清液在 280 nm 处的吸收同样明显增加,这提示细菌内核酸的泄露(图 4b)。以上结果表明,Ru1 通过破坏细菌细胞膜的完整性导致细胞内核酸和 β -半乳糖苷酶的泄漏。



曲线 1 为空白对照组,曲线 2 为万古霉素处理组,
曲线 3、4 为 Ru1 处理组,浓度分别为 MIC、2×MIC

图 4 a.通过邻-硝基酚- β -D-半乳糖苷 (ONPG) 的转化生成邻硝基酚来监测细菌内 β -D-半乳糖苷酶的泄露情况;b.细菌培养上清液中核酸的含量;c.2,7-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 检测细胞内 ROS 生成

Fig.4 a.Release of β -galactosidase from *S.aureus* in the presence of Ru1;b.Amount of nucleic acid leakage in *S.aureus* in the presence of Ru1;c.Intracellular ROS generation was detected using 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)

研究表明通过诱导活性氧 (ROS) 的产生是许多药物杀菌的机制之一^[21]。为了进一步验证钌化合物是否同样能诱导产生 ROS,利用 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 作为荧光探针监测了细菌体内 ROS 的生成情况。细胞内活性氧可以使 DCFH-DA 氧化为具有绿色荧光的 2',7'-二氯荧光素 (DCF),因而绿色荧光的强度可以反应细胞内活性氧的水平。实验结果显示,经 Ru1 (2×MIC、4×MIC) 处理过的细菌呈现出强烈的

绿色荧光,这提示细菌体内 ROS 的大量生成(图 4c)。因此,化合物 Ru1 同样能通过诱导细菌体内 ROS 的生成来杀灭细菌。

2.3 Ru1 抑制细菌溶血毒素的分泌

溶血毒素作为一种重要的细菌外毒素,在细菌感染和致病性方面发挥着关键作用^[22]。为了评价 Ru1 是否能抑制细菌外毒素的分泌,通过兔红细胞溶血实验研究了金黄色葡萄球菌溶血毒素的分泌情况。实验结果显示,经 0.39 或 0.78 μ g/mL 的 Ru1 处理后,细菌上清液破裂兔红细胞的能力明显下降(图 5a)。与空白组相比,0.39 和 0.78 μ g/mL 的 Ru1 使细菌溶血毒素的分泌量分别减少了 58.0% 和 87.8% (图 5b)。这说明 Ru1 在能有效抑制金黄色葡萄球菌的溶血毒素的分泌。值得注意的是,化合物 Ru1 本身具有良好的生物相容性,即使在 1.5 μ g/mL 浓度下也未见血细胞裂解。

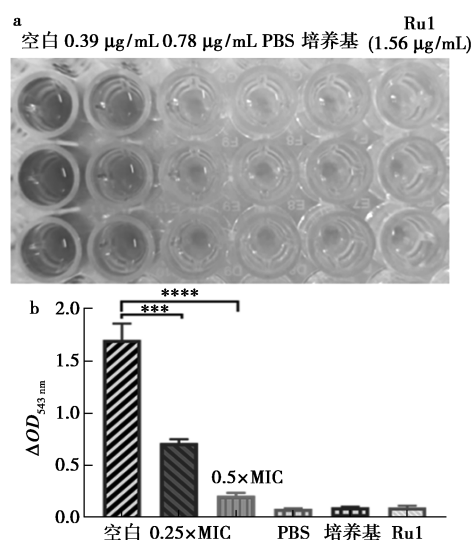


图 5 a.兔红细胞的裂解情况图;b.通过 543 nm 处的吸光度值定量测定红细胞的裂解程度

Fig.5 a.Hemolysis results of rabbit blood cells;
b.Degree of erythrocyte lysis was quantified by the absorbance value at 543 nm

2.4 棋盘联用实验

药物的联合使用被认为是应对耐药菌感染的有效手段之一^[22]。为了验证化合物 Ru1 与传统抗生素的联用效果,开展了棋盘联用实验。药物的协同作用通过抑菌浓度指数 (Fractional Inhibitory Concentration Index, FICI) 来进行判断。如果药物联用时的 FICI 值 > 4,说明具有拮抗作用;如果 FICI 值 $\leq$ 0.5 时,表明具有协同抗菌活性。实验结果显示, Ru1 与环丙沙星 (FICI 为 0.50)、多

粘菌素 B (FICI 为 0.37) 和头孢氨苄 (FICI 为 0.50) 等 3 种传统抗菌药物具有协同抗菌活性

(图 6)。这一结果表明,化合物 Ru1 与传统抗菌联用时能增强其抗菌活性。

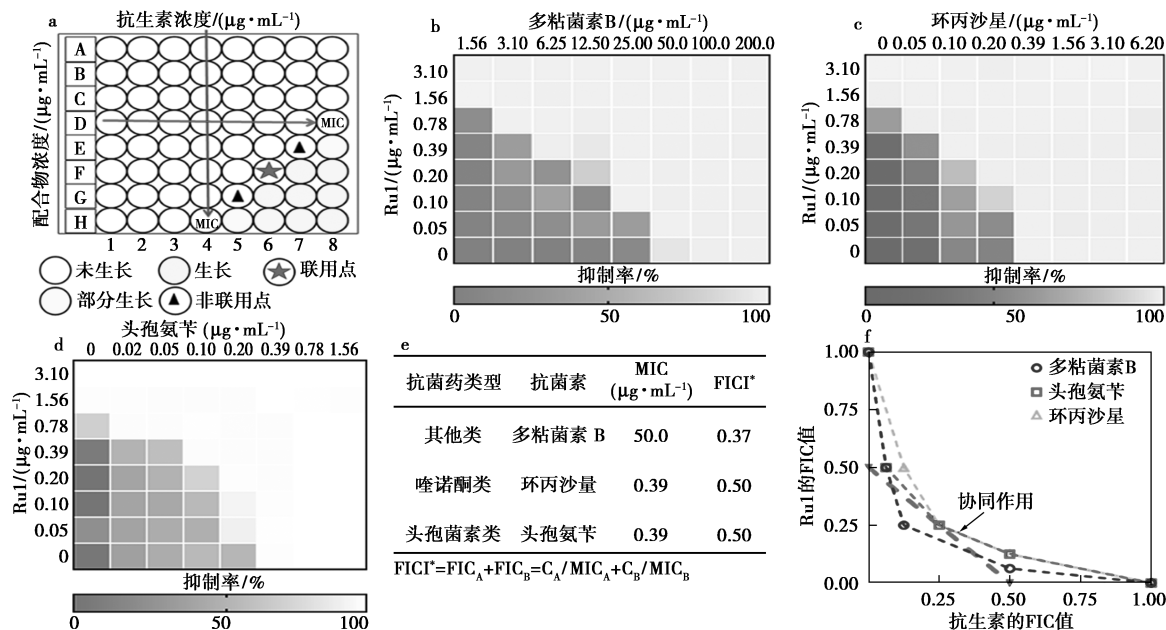
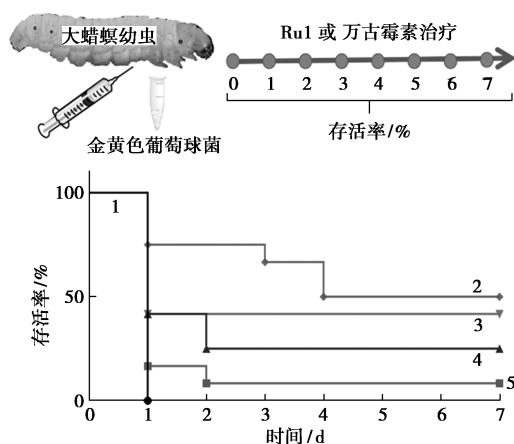


图 6 a.棋盘联用实验的原理;b~d.Ru1 与 3 种抗菌药物联合使用抗金黄色葡萄球菌的热图;
e.Ru1 与抗生素联用后抑制金黄色葡萄球菌的 FICI 值;f.Ru1 与 3 种抗菌药物联用效果等效图

Fig.6 a.Diagram illustration of synergy checkerboard assay;b~d.Heat plots of checkerboard assays of three antibiotics combination with Ru1 against *S. aureus* Newman;e.FICIs values after combination with Ru1 against *S. aureus*;f.Synergistic effects of Ru1 with three antibiotics analyzed by isobologram

2.5 Ru1 的体内抗菌活性

通过大蜡螟幼虫感染模型评价 Ru1 的体内抗菌活性。大蜡螟幼虫感染细菌 1 h 后,通过幼



曲线 1 为空白组;曲线 2~4 分别代表 Ru1 浓度为 16、32、64 mg/kg;曲线 5 为 64 mg/kg 万古霉素组

图 7 大蜡螟幼虫 (每组 12 只) 感染金黄色葡萄球菌后,采用 Ru1 (16、32、64 mg/kg) 或万古霉素 (64 mg/kg) 治疗后的存活率

Fig.7 Survival rates of *S. aureus*-infected *G. mellonella* larva treated with Ru1 (16, 32, 64 mg/kg) or Vancomycin (64 mg/kg)

虫腹右足注射 16、32、64 mg/kg 不同浓度的化合物 Ru1 治疗,观察 7 d 内大蜡螟幼虫的存活率。以 64 mg/kg 万古霉素治疗组作为阳性对照。结果如图 7 所示,PBS 治疗组的大蜡螟幼虫在第 1 d 全部死亡,而 Ru1 的治疗能显著提升幼虫的存活率。64 mg/kg 化合物 Ru1 治疗后的大蜡螟幼虫存活率几乎与 64 mg/kg 万古霉素处理组相当。这些结果表明,Ru1 在动物体内同样能有效抑制金黄色葡萄球菌。

3 结论

本文成功设计并合成了两个以丁酸取代邻菲罗啉衍生物为配体的新型多吡啶钆化合物,并对所合成的化合物进行了结构表征。体外抑菌实验表明,两个钆化合物 (Ru1、Ru2) 均表现出显著的抗菌活性,Ru1 能在 2 h 内快速杀死大部分金黄色葡萄球菌。抗菌机制研究表明,Ru1 通过破坏细菌细胞膜的完整性以及诱导产生 ROS 杀死金黄色葡萄球菌。此外,Ru1 不仅能在亚抑制浓度 (0.25×MIC、0.5×MIC) 下有效抑制金黄色葡萄球菌溶血毒素的分泌,而且与临床常见的 3 种抗生素 (环丙沙星、多粘菌素 B、头孢氨苄) 具有协同

抗菌活性。最后,通过大蜡螟幼虫感染模型进一步证实 Ru1 在动物体内同样对金黄色葡萄球菌有显著的抗菌活性,具有较好的抗感染疗效。综上所述,本研究的结果表明丁酸修饰的钌基配合物作为一种全新作用机制的抗菌化合物具有显著的抗菌活性,为后续新抗菌策略的研究提供了一定的思路。

参考文献:

- [1] BAI S L, WANG J X, YANG K L, et al. A polymeric approach toward resistance-resistant antimicrobial agent with dual-selective mechanisms of action [J]. *Sci. Adv.*, 2021, **7**(5): eabc9 917.
- [2] LIN S M, KOH J J, AUNG T T, et al. Semisynthetic flavone-derived antimicrobials with therapeutic potential against methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) [J]. *J. Med. Chem.*, 2017, **60**(14): 6 152-6 165.
- [3] CHOW H Y, PO K H L, GAO P, et al. Methylation of daptomycin leading to the discovery of Kynomycin, a cyclic lipopeptide active against resistant pathogens [J]. *J. Med. Chem.*, 2020, **63**(3): 3 161-3 171.
- [4] SILVER LYNN L. Multi-targeting by monotherapeutic antibacterials [J]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2007, **6**(1): 41-45.
- [5] COATUS A R, HALLS G, HU Y M. Novel classes of antibiotics or more of the same? [J]. *Br. J. Pharmacol.*, 2011, **163**(1): 184-194.
- [6] HURDLE G J L, O'NEILL A J, CHOPRA I, et al. Targeting bacterial membrane function: An underexploited mechanism for treating persistent infections [J]. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2011, **9**(1): 62-75.
- [7] BROGDEN K A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? [J]. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, **(3)**: 238-250.
- [8] IVANKIN A, LIVNE L, MOR A. Role of the conformational rigidity in the design of biomimetic antimicrobial compounds [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**(45): 8 462-8 465.
- [9] LIN S M, LI H X, TAO Y W, et al. Vitro and in vivo evaluation of membrane-active flavone amphiphiles: Semisynthetic Kaempferol-derived antimicrobials against drug-resistant gram-positive bacteria [J]. *J. Med. Chem.*, 2020, **63**(11): 5 797-5 815.
- [10] COLEMAN M F, LIU K A, PFEIL A J, et al. β -Hydroxy- β -methylbutyrate supplementation promotes antitumor immunity in an obesity responsive mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Cancers*, 2021, **13**(24): 6 359.
- [11] SCHULTHEIS J, PANDEY S, CAPITANI M, et al. The short chain fatty acid butyrate imprints an antimicrobial program in macrophages [J]. *Immunity*, 2019, **50**(2): 275-278.
- [12] HUANG D, LIU Q W, ZHANG M J, et al. A mitochondria-targeted phenylbutyric acid prodrug confers drastically improved anticancer activities [J]. *J. Med. Chem.*, 2022, **65**(14): 9955-9973.
- [13] MOLINA C P, HUSSEY G S, ERIKSSON J, et al. 4-Hydroxybutyrate promotes endogenous antimicrobial peptide expression in macrophages [J]. *Tissue Eng. Part A*, 2018, **(25)**: 693-706.
- [14] WANG L Q, HUANG B, DUAN X M, et al. The development of three ruthenium-based antimicrobial metallo-drugs: Design, synthesis and activity evaluation against staphylococcus aureus [J]. *J. Chem. Res.*, 2021, **45**(11): 1 059-1 067.
- [15] WANG L Q, LIU L H, WANG X R, et al. Ruthenium (II) complexes targeting membrane as biofilm disruptors and resistance breakers in staphylococcus aureus bacteria [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2022, **(238)**: 114 485.
- [16] 廖向文, 姜桂娟, 蒋光彬, 等. 含 4-氟苯乙烯基取代钌配合物的合成及其抗菌活性研究 [J]. *化学试剂*, 2021, **43**(12): 1 644-1 650.
- [17] 刘汉杰, 付彬, 付爱玲, 等. 多吡啶钌配合物 $[(\text{Phen})_2\text{Ru}(\text{dppz})](\text{PF}_6)_2$ 的抗菌活性及机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2016, **32**(9): 1 249-1 253.
- [18] KARLSSON E A, LEE B L, LIAO R Z, et al. Synthesis and electron-transfer processes in a new family of ligands for coupled Ru-Mn-2 complexes [J]. *Chempluschem*, 2014, **79**(7): 936-950.
- [19] ZHANG C Y, YU R J, WANG L Q, et al. Design, synthesis, and evaluation of aryl-thioether ruthenium polypyridine complexes: A multi-target antimicrobial agents against gram-positive bacteria [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2022, **(240)**: 114 562.
- [20] GUO Y, HOU E H, WEN T Y, et al. Development of membrane-active honokiol/magnolol amphiphiles as potent antibacterial agents against methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) [J]. *J. Med. Chem.*, 2021, **64**(17): 12 903-12 916.
- [21] DWYER D J, BELENKY P A, YANG J H, et al. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality [J]. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, **111**(20): 2 100-2 109.
- [22] ASSIS L M, NEDELJKOVIC M, DESSEN A. New strategies for targeting and treatment of multi-drug resistant staphylococcus aureus [J]. *Drug Resist. Update.*, 2017, **(31)**: 1-14.

2-(2-氨基苯基) 苯并咪唑铂(Ⅱ) 配合物的合成及其与 BSA 作用的光谱研究

袁涛, 覃姣兰*, 罗翠萍, 仇继家, 钟雨佳, 姚鹏飞

(百色学院 化学与环境工程学院 广西城市水环境重点实验室, 广西 百色 533000)

摘要:以 2-(2-氨基苯基) 苯并咪唑(L_2) 和 K_2PtCl_4 为原料反应合成铂配合物 $[Pt(L_2)_2Cl_2] \cdot H_2O$ (L_2 -Pt), 并获得其晶体结构。在生理条件下 (pH 7.40), 利用紫外吸收光谱、荧光光谱研究 L_2 和 L_2 -Pt 对牛血清白蛋白 (BSA) 相互作用的影响。结果表明, L_2 和 L_2 -Pt 通过静态猝灭方式引起 BSA 荧光发生猝灭, 在 298、304、310 K 这 3 个温度下, L_2 -Pt 对 BSA 的猝灭率及猝灭常数均大于 L_2 。焓变 (ΔH)、熵变 (ΔS) 和吉布斯自由能变化 (ΔG) 表明, L_2 与 BSA 间的作用力主要是疏水力 ($\Delta H > 0, \Delta S > 0$), 结合是自发进行的 ($\Delta G < 0$); 而 L_2 -Pt 与 BSA 间的作用力主要是氢键和范德华力 ($\Delta H < 0, \Delta S < 0$), 结合也是自发进行的 ($\Delta G < 0$)。紫外-可见吸收光谱和同步荧光光谱表明 L_2 -Pt 并未使 BSA 的微结构发生改变。

关键词:铂配合物; 牛血清白蛋白; 荧光光谱; 相互作用; 静态猝灭

中图分类号: O657 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2023)02-0062-07

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0633

Synthesis of 2-(2-Aminophenyl) Benzimidazole Platinum Complex and Spectral Study of its Interaction with BSA YUAN Tao, QIN Jiao-lan*, LUO Cui-ping, QIU Ji-jia, ZHONG Yu-jia, YAO Peng-fei (Guangxi Key Laboratory of Urban Water Environment, College of Chemical and Environmental Engineering, Baise University, Baise 533000, China)

Abstract: The platinum complex $[Pt(L_2)_2Cl_2] \cdot H_2O$ (L_2 -Pt) was synthesized from 2-(2-aminophenyl) benzimidazole (L_2) and K_2PtCl_4 as raw materials. The corresponding crystal structure was obtained. The effect of L_2 and L_2 -Pt to bovine serum albumin (BSA) was studied by UV absorption, fluorescence spectroscopy under physiological conditions (pH 7.4). The results revealed that L_2 and L_2 -Pt caused the fluorescence quenching of BSA through a static quenching procedure, and the quenching rate and quenching constants of L_2 -Pt on BSA are higher than those of L_2 at 298, 304 and 310 K, respectively. The calculating of enthalpy change (ΔH) and the entropy change (ΔS) and gibbs free energy (ΔG) implied that the main interaction force of L_2 with BSA was hydrophobic force ($\Delta H > 0, \Delta S > 0$), and the binding process was spontaneous ($\Delta G < 0$). While the main interaction force of L_2 -Pt with BSA was hydrogen bonds and van der Waals forces ($\Delta H < 0, \Delta S < 0$), and the binding process also was spontaneous ($\Delta G < 0$). The UV-Vis spectroscopy and synchronous fluorescence indicated that L_2 -Pt did not alter the microstructure of BSA.

Key words: platinum complex; bovine serum albumin; fluorescence spectrum; interaction; static quenching

苯并咪唑基团同时含有芳香环和咪唑环, 含有苯并咪唑基团的衍生物表现出具有抗肿瘤^[1,2]、抗炎^[3]、抗菌和抗氧化^[4]等生物活性, 因此该类基团被广泛用到药物设计中, 如临床用于治疗胃部疾病的药物雷贝拉唑钠 (Rabeprazole Sodium) 和奥美拉唑 (Omeprazole)^[5]。以苯并咪唑基团为骨架, 在不同位置引入功能基团获得效果显著、靶点多样的抗肿瘤化合物^[6], 如已经上市的烷化剂苯达莫司汀 (Bendamustine) 和进入Ⅲ期临床试验的蛋白酪氨酸激酶 (Protein Tyrosine Kinases, PTK) 抑制剂 TKI-258 (Dovitinib), 均是在 2,5-位引入双取代基。苯并咪唑基团具有较好的共轭结构, 咪唑环上的两个 N 原子有孤对电子,

活性较高, 是良好配体, 易与生物体中的各类酶或受体形成氢键, 或是与金属离子配位形成配合物, 充分发挥了“苯并咪唑基团+中心金属离子”双活

收稿日期: 2022-08-14; 网络首发日期: 2022-11-16

基金项目: 广西省部共建药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室开放课题项目 (CMEMR2019-B11); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201910609028, 教高司函 [2020]13 号, 202010609011)。

作者简介: 袁涛 (1983-), 男, 山东菏泽人, 硕士, 讲师, 主要研究方向为配合物的合成及活性研究。

通讯作者: 覃姣兰, E-mail: 635328858@qq.com。

引用本文: 袁涛, 覃姣兰, 罗翠萍, 等. 2-(2-氨基苯基) 苯并咪唑铂(Ⅱ) 配合物的合成及其与 BSA 作用的光谱研究 [J]. 化学试剂, 2023, 45(2): 62-68。

性功能。比如,苯并咪唑及其衍生物易与铜^[7,8]、银^[9]等过渡金属离子还有镉、铋、钐等^[10]稀土离子配位,均获得抗肿瘤活性比相应配体好的金属配合物。

在抗癌金属配合物中,铂类药物是研究热点,继顺铂、卡铂、奥沙利铂、奈达铂等的临床应用后,近年来人们设计合成出很多创新型的铂类抗癌药物^[11-13],并对其作用机制进行了深入研究,为癌症治疗提供了许多的方法策略,对癌症的治疗具有重要意义。铂与苯并咪唑类化合物的协同作用也表现出良好的生物活性,如 Tari 等^[14]合成了系列含苯并咪唑的 Pt(Ⅱ)配合物,如 2-氯-(2-(1*H*-3-烷基)苯并咪唑)铂(Ⅱ)配合物和 2-氯-(2-(3,4,5-三甲氧基)苯并咪唑)铂(Ⅱ)配合物显示出比卡铂和顺铂强的 DNA 相互作用。

小分子药物与蛋白质生物大分子间的相互作用一直备受关注,两者形成稳定的药物-蛋白质复合物,对药物在血液和运输、分配具有重要影响。白蛋白是一种重要的储存和转运蛋白,牛血清白蛋白(BSA)和人血清白蛋白(HSA)具有高度相似的折叠结构,且成本低,易于获得,经常被用作模型蛋白。本文合成了 2-(2-氨基苯基)苯并咪唑铂(Ⅱ)配合物(L₂-Pt),研究 L₂-Pt 与 BSA 的相互作用,为铂类药物的作用机制提供科学依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

APEX II 型单晶 X-射线衍射仪(日本 Rigaku 公司);F-7000 型荧光分光光度计(日本日立公司);UV-2700 型紫外-可见分光光度计、IRPresti-21 型傅里叶变换红外分析仪(日本岛津公司)。

2-(2-氨基苯基)苯并咪唑、K₂PtCl₄(上海阿拉丁生化科技有限公司);Tris-HCl 缓冲溶液(上海麦克林生化科技有限公司);牛血清白蛋白(美国 Sigma 公司);试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 [Pt(L₂)₂Cl₂]·H₂O 的合成

取 0.417 g(1 mmol) K₂PtCl₄ 用 10 mL H₂O 溶解,取 0.212 g(1 mmol) 2-(2-氨基苯基)苯并咪唑(L₂)用 10 mL 甲醇溶解。将 K₂PtCl₄ 溶液在搅拌下缓慢加入 L₂ 溶液中,于 65 ℃ 回流 6 h,冷却过夜,过滤,静置缓慢挥发 14 d,有黑色针状晶

体析出,产率约为 45%。挑选尺寸合适晶体进行 X-射线单晶衍射测定。

IR(KBr), ν , cm⁻¹: 3 536(N—H), 3 457, 1 598 (C=C/C=N), 1 561, 1 486, 1 450, 754(苯环 1,2-取代), 449(Pt-N)。

1.2.2 荧光光谱测定

L₂、L₂-Pt 分别用 DMSO 溶解配成 1.0×10^{-3} mol/L 的待测液,BSA 用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.40)配成 1.0×10^{-5} mol/L。在 7 根比色管中固定 BSA 的浓度为 5×10^{-6} mol/L,滴加 1.0×10^{-3} mol/L 的 L₂ 或 L₂-Pt,使其浓度变化范围为 $0 \sim 3.0 \times 10^{-5}$ mol/L,在 298、304、310 K 温度下反应 10 min,测其荧光光谱。激发波长为 280 nm,电压 480 V,狭缝宽度均为 5 nm。在同步荧光中,将激发和发射波长设置为 $\Delta\lambda = 15、60$ nm 进行测定。

1.2.3 UV-Vis 测定

在 2.5 mL(5×10^{-6} mol/L) BSA 溶液中,分别滴加浓度为 1.0×10^{-3} mol/L 的 L₂、L₂-Pt,使其浓度变化范围为 $0 \sim 1.2 \times 10^{-5}$ mol/L,反应 5 min 后,在 200~600 nm 下进行光谱扫描。

2 结果与讨论

2.1 晶体结构

L₂-Pt 晶体结构如图 1 所示,晶体学数据及结构修正参数如表 1 所示,部分键长、键角如表 2 所示。L₂-Pt 属于正交晶系,空间群为 *P*2₁2₁2₁,Pt(Ⅱ)与 L₂ 中的一个咪唑 N 原子以及苯环上的氨基 N 原子配位,同时保留两个铂盐 Cl 原子,形成四配位结构。此外,L₂-Pt 中还含有一个结晶水分子,水分子中的氧原子与咪唑另一个 N 上的氢形成氢键。

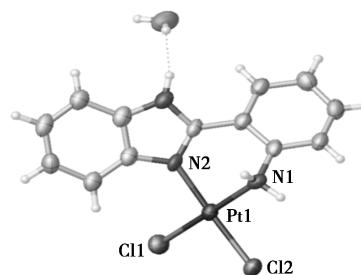


图 1 L₂-Pt 的晶体结构

Fig.1 Crystal structure of L₂-Pt

表 1 L_2 -Pt 晶体学数据及结构修正参数

Tab.1 Crystal data and structure refinement

parameters of L_2 -Pt			
Parameters	L_2 -Pt	Parameters	L_2 -Pt
Empirical formula	$C_{13}H_{13}Cl_2N_3OPt$	$D_c(g \cdot m^{-3})$	2.239
Formula weight(M)	493.24	$F(000)$	928.0
Crystal system	Orthorhombic	2θ range for data collection ($^\circ$)	9.98~136.14
Space group	$P2_12_12_1$	Reflections collected/unique	16 904
$a/\text{\AA}$	17.702 7(10)	Goodness-of-fit on F^2	1.063
$b/\text{\AA}$	10.240 8(6)	Final R indices	$R_1=0.053\ 9$, $\omega R_2=0.104\ 0$
$c/\text{\AA}$	8.072 7(5)	R indices (all data)	$R_1=0.058\ 3$, $\omega R_2=0.106\ 3$
$\alpha/^\circ$	90		
$\beta/^\circ$	90		
$\gamma/^\circ$	90		
$V/\text{\AA}^3$	1 463.50(15)		
Z	4		

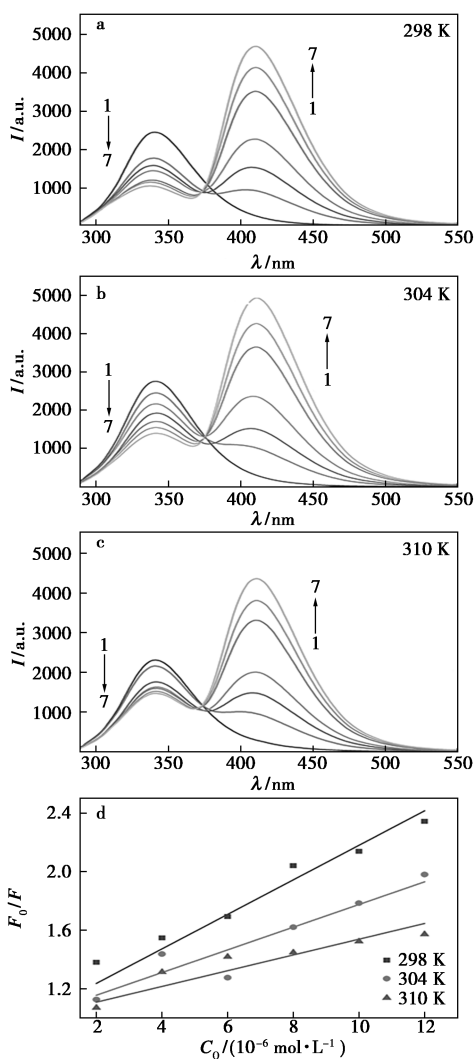
表 2 L_2 -Pt 的部分键长($\text{\AA}$)和键角($^\circ$)Tab.2 Selected atomic distances($\text{\AA}$) and bond angles($^\circ$) of L_2 -Pt

化学键	键长/ $\text{\AA}$	化学键	键长/ $\text{\AA}$
Pt1—Cl1	2.299(3)	Pt1—Cl2	2.308(3)
Pt1—N1	2.050(8)	Pt1—N2	2.007(8)
化学键	键角/ $^\circ$	化学键	键角/ $^\circ$
Cl1—Pt1—Cl2	90.44(10)	N1—Pt1—Cl1	176.5(2)
N1—Pt1—Cl2	90.5(2)	N2—Pt1—Cl1	93.9(3)
N2—Pt1—Cl2	175.0(3)	N2—Pt1—N1	85.3(3)
Cl1—Pt1—Cl2	90.44(10)	N1—Pt1—Cl1	176.5(2)

2.2 L_2 和 L_2 -Pt 对 BSA 荧光光谱的影响

BSA 中由于含有色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸残基而具有较强的内源荧光,而色氨酸是 BSA 的最主要荧光来源。当小分子与 BSA 结合时,会导致 BSA 内源荧光强度降低,产生猝灭现象。图 2、3 分别是 L_2 、 L_2 -Pt 对 BSA 荧光的影响。BSA 在 280 nm 光的激发下,在 342 nm 处有最大发射峰,随着 L_2 和 L_2 -Pt 浓度的递增,BSA 在 342 nm 的荧光强度呈现不同程度地猝灭,说明 L_2 和 L_2 -Pt 可以与 BSA 结合成复合物,导致荧光猝灭^[15]。

在 298、304、310 K 这 3 个温度下,当 $[L_2]:[BSA]=0:1\sim 6:1$ 时, L_2 使 BSA 荧光强度分别下降了 36.4%、49.4%、57.1%,且最大吸收峰发生移动(分别蓝移 4、1、0 nm);在 298、304、310 K 这 3 个温度下,当 $[L_2-Pt]:[BSA]=0:1\sim 6:1$ 时, L_2 -Pt 使 BSA 荧光强度分别下降了 60.1%、62.8%、76.9%,且最大吸收峰发生移动(分别蓝移 2、3、3 nm)。可见, L_2 和 L_2 -Pt 均能与 BSA 相互作用,



曲线 1~7 代表 L_2 浓度分别为 0、5、10、15、20、25、30 ($\times 10^{-6}$ mol/L)

图 2 不同温度下 L_2 与 BSA 作用的荧光光谱图(a~c)及 Stern-Volmer 曲线(d)

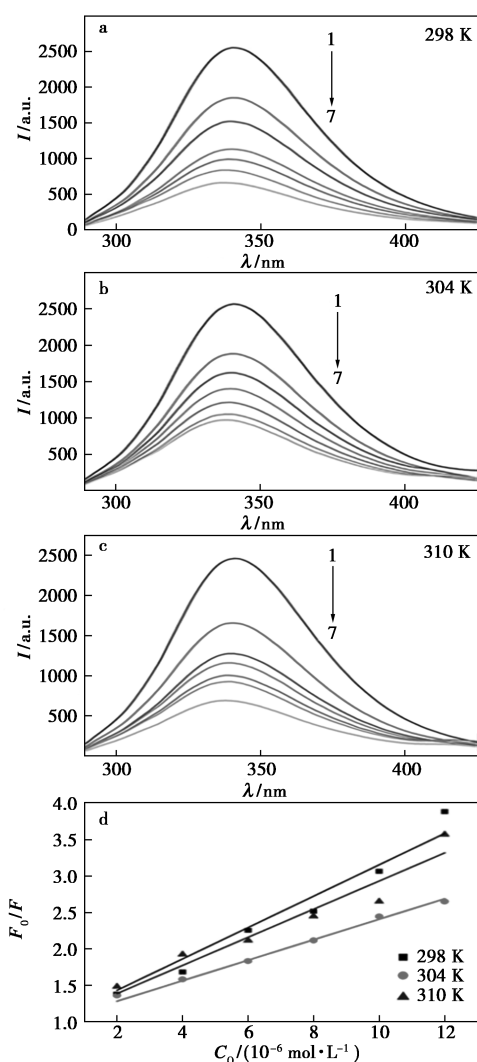
Fig.2 Fluorescence spectra (a~c) and Stern-Volmer plots (d) of the interaction between L_2 and BSA at different temperatures

L_2 -Pt 导致 BSA 猝灭较 L_2 更显著,推测 L_2 -Pt 与 BSA 作用更强。

此外, L_2 与 BSA 作用的荧光光谱中,随着 L_2 浓度的增加,在 411 nm 处的荧光强度逐渐增强,经验证,该处荧光是 L_2 本身产生的荧光发射峰,荧光强度随着 L_2 浓度的增加而呈现上升趋势。

2.3 荧光猝灭类型

根据猝灭机制的不同,荧光猝灭分为动态猝灭和静态猝灭,静态猝灭是指在基态时的荧光体分子与 BSA 形成复合体,导致荧光强度下降,而动态猝灭则是化合物与 BSA 的激发态分子发生



曲线 1~7 代表 L_2 -Pt 浓度分别为 0、5、10、15、20、25、30 ($\times 10^{-6}$ mol/L)

图 3 不同温度下 L_2 -Pt 与 BSA 作用的荧光光谱图(a~c)及 Stern-Volmer 曲线(d)

Fig.3 Fluorescence spectra (a~c) and Stern-Volmer plots (d) of the interaction between L_2 -Pt and BSA at different temperatures

碰撞,其不会导致吸收光谱发生变化。为研究小分子与 BSA 相互作用的荧光猝灭机理,假设两者的相互作用机理为动态猝灭,符合 Stern-Volmer 方程^[16,17],见式(1)。

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 C_Q = 1 + K_{SV} C_Q \quad (1)$$

式中: F_0 为无猝灭剂时的荧光强度; F 是存在猝灭剂时的荧光强度; K_q 表示荧光猝灭速率常数, $L/(\text{mol} \cdot \text{s})$; τ_0 表示蛋白质分子的荧光平均寿命($\approx 10^{-8}$ s)^[18]; K_{SV} 表示荧光猝灭常数, L/mol ; C_Q 表示加入猝灭剂的浓度, mol/L 。

以 F_0/F 对 C_Q 进行线性拟合,得到不同温度下的 Stern-Volmer 图,如图 2d、3 d 所示。依据拟合后的曲线方程得出猝灭常数 K_{SV} ,进而求出猝

灭速率常数 K_q ,计算结果见表 3。 L_2 与 L_2 -Pt 对 BSA 的猝灭速率常数 K_q 的数量级为 $10^{12} \sim 10^{13}$,均远大于猝灭剂对蛋白质(生物大分子)最大碰撞猝灭常数阈值($2.0 \times 10^{10} L/(\text{mol} \cdot \text{s})$)^[19,20],说明 L_2 、 L_2 -Pt 对 BSA 荧光的猝灭方式为静态猝灭。 L_2 对 BSA 的猝灭常数 K_{SV} 随着温度的升高而减小,表明 L_2 引发 BSA 猝灭机制属于典型静态猝灭^[21]。 L_2 -Pt 对 BSA 的猝灭常数变化没有 L_2 有规律,但总体上随着温度的升高减小,表明 L_2 -Pt 引发 BSA 猝灭机制属于非典型静态猝灭,而是伴随有动态猝灭^[22,23]。文献[24]、[25]报道,小分子引起 BSA 作用静态猝灭常数并不一定随温度的升高而减小,有时会增加或保持不变。

表 3 L_2 和 L_2 -Pt 在不同温度下对 BSA 的猝灭常数

Tab.3 Quenching constants at different temperatures for the binding of L_2 and L_2 -Pt to BSA separately

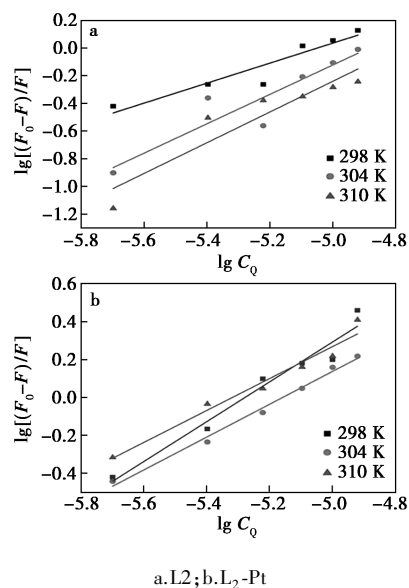
	温度/K	$K_{SV}/(L \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q/(L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	R^2
L_2	298	1.18×10^5	1.18×10^{13}	0.998 20
	304	7.74×10^4	7.74×10^{12}	0.996 24
	310	5.37×10^4	5.37×10^{12}	0.997 77
L_2 -Pt	298	2.15×10^5	2.15×10^{13}	0.995 63
	304	1.41×10^5	1.41×10^{13}	0.999 62
	310	1.93×10^5	1.93×10^{13}	0.994 86

2.4 结合常数及结合位点数的确定

对于静态猝灭,符合 Scatchard 方程^[26](式 2):

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_a + n \lg C_Q \quad (2)$$

式中: K_a 为小分子与 BSA 的结合常数; n 为结合位点数。



a. L_2 ; b. L_2 -Pt

图 4 不同温度下 L_2 、 L_2 -Pt 与 BSA 荧光猝灭的双对数曲线图

Fig.4 Double logarithmic plots of the interaction between L_2 and L_2 -Pt with BSA at different temperatures

以 $\lg[(F_0-F)/F]$ 对 $\lg C_0$ 作图, 计算结果如表 4 所示。由表 4 的 K_a 值可知, 在 298、304、310 K 时 L_2 -Pt 与 BSA 作用的结合常数均比 L_2 与 BSA 的结合常数大, 可见形成铂配合物后与 BSA 作用随着温度的升高结合作用力增强。根据 $\lg[(F_0-F)/F]$ 对 $\lg C_0$ 作图计算出 L_2 和 L_2 -Pt 与 BSA 的结合位点数约为 1。

表 4 不同温度下 L_2 、 L_2 -Pt 与 BSA 作用的结合常数(K_a)和结合位点数 n

Tab.4 Binding constant (K_a) and binding sites number (n) of the interaction between L_2 and L_2 -Pt with BSA at different temperatures

	温度/K	$K_a/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	n	R^2
L_2	298	4.44×10^3	0.72	0.945 3
	304	1.53×10^4	1.06	0.925 7
	310	2.02×10^4	1.11	0.934 8
L_2 -Pt	298	3.62×10^5	1.11	0.985 7
	304	3.01×10^4	0.87	0.991 4
	310	3.09×10^4	0.84	0.981 8

2.5 作用力类型

小分子与 BSA 之间的作用力可分为疏水力、静电力、氢键和范德华力。Ross 等^[27]实验描述了化合物与蛋白质相互作用的过程中有关热力学参数的关系。当 $\Delta H>0$ 、 $\Delta S>0$ 时, 体系间的作用力为疏水力; 当 $\Delta H<0$ 、 $\Delta S>0$ 时, 体系间的作用力为静电力; 当 $\Delta H<0$ 、 $\Delta S<0$ 时, 体系间的作用力为氢键和范德华力。

依据 Van't Hoff 方程(公式(3))和热力学公式(公式(4))以及上述 K_a 值可计算 L_2 和 L_2 -Pt 与 BSA 作用的热力学参数。

$$\ln K_a = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

式中: K_a 为在温度 T 时的结合常数; R 为气体常数, $8.314 \text{ J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$; ΔG 为吉布斯自由能变, kJ/mol ; ΔH 为反应前后的热力学焓变, kJ/mol ; ΔS 为反应前后的热力学熵变, $\text{J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$; T 为热力学温度, K 。

当温度变化很小时, ΔH 可视为常数, 以 $\ln K_a$ 对 $1/T$ 作图, 由截距和斜率算出 ΔS 和 ΔH , 计算结果如表 5 所示。 L_2 与 BSA 的热力学参数 $\Delta H>0$ 、 $\Delta S>0$ 、 $\Delta G<0$; L_2 -Pt 与 BSA 的热力学参数 $\Delta H<0$ 、 $\Delta S<0$ 、 $\Delta G<0$ 。由此可以判定, L_2 与 BSA 相互作用的分子间作用力主要表现为疏水作用力, 结合反应自发进行; L_2 -Pt 与 BSA 相互作用的分子间作用力主要表现为氢键和范德华力, 结合反应自发进行。

表 5 不同温度下 L_2 和 L_2 -Pt 与 BSA 作用的热力学参数

Tab.5 Thermodynamic parameters of the interaction between L_2 and L_2 -Pt with BSA at different temperatures

	温度/ K	$\Delta S/(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$	$\Delta H/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
L_2	298			-20.81
	304	397.79	97.36	-24.35
	310			-25.55
L_2 -Pt	298			-31.71
	304	-428.92	-158.54	-26.06
	310			-26.65

2.6 L_2 、 L_2 -Pt 与 BSA 作用的紫外-可见吸收光谱

紫外-可见吸收光谱是一种探索小分子与蛋白质间形成复合物的简单而有效的方法, BSA 在 278 nm 处有一特征吸收峰, 主要是由芳香族色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)发生 $\pi-\pi^*$ 跃迁所引起的, 与氨基酸残基微环境极性有关, 若吸收光谱位置出现红移, 说明小分子导致 BSA 芳香族氨基酸残基的结构或周围的微环境极性增加, 使得蛋白质亲水性增加^[28,29]。若是吸收光谱出现蓝移, 表明 BSA 色氨酸残基周围微环境的疏水性的增加^[30]。图 5 中随着 L_2 、 L_2 -Pt 浓度的增加, BSA 在 278 nm 处吸光度逐渐增大, 但峰位置并没有观察到明显变化, 说明从吸收光谱中未能观察到 L_2 、 L_2 -Pt 对 BSA 氨基酸残基的微环境极性有明显影响^[31]。

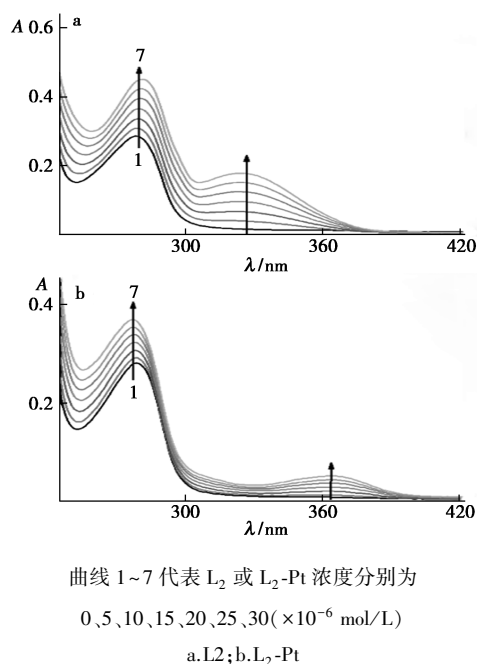
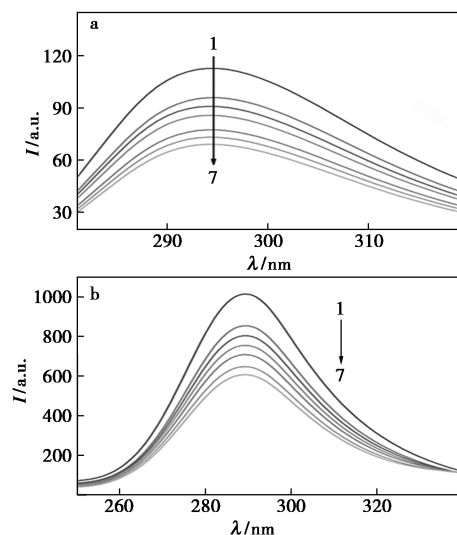


图 5 L_2 、 L_2 -Pt 与 BSA 作用的紫外-可见吸收光谱

Fig.5 UV-Vis absorption spectra of the interaction between L_2 , L_2 -Pt and BSA

2.7 同步荧光光谱

同步荧光光谱可考察小分子与 BSA 相互作用引起最大峰值位置对应的蛋白质荧光微环境变化。当发射波长与激发波长的波长差 $\Delta\lambda = 15$ 、60 nm 时,同步荧光分别呈现蛋白质中酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)残基特征荧光^[32]。由图 6 可知,随着 L_2 -Pt 浓度的增加,酪氨酸残基和色氨酸残基的荧光强度均发生猝灭,这可能是由于高浓度药物使蛋白质分子延伸,从而减少了氨基酸之间的能量转移,降低了荧光强度。但最大发射峰并没有发生明显变化,这表示 L_2 -Pt 并没有引起 BSA 微环境的明显改变^[31,33],与紫外光谱结果一致。



曲线 1~7 代表 L_2 -Pt 浓度分别为
0、5、10、15、20、25、30 ($\times 10^{-6}$ mol/L)
a. $\Delta\lambda = 15$ nm; b. $\Delta\lambda = 60$ nm

图 6 L_2 -Pt 与 BSA 作用的同步荧光光谱

Fig.6 Synchronous fluorescence spectra of the interaction between L_2 -Pt with BSA

3 结论

本文以 2-(2-氨基苯基)苯并咪唑(L_2)为配体合成了其铂配合物(L_2 -Pt),并获得配合物单晶结构,且从分子水平上研究 L_2 和 L_2 -Pt 与 BSA 的相互作用。实验表明, L_2 -Pt 与 L_2 均通过静态猝灭方式使 BSA 荧光发生猝灭, L_2 -Pt 对 BSA 的猝灭率和猝灭常数 K_{sv} 均大于 L_2 ,说明 L_2 -Pt 与 BSA 的结合作用比 L_2 强。 L_2 与 BSA 作用的 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ 、 $\Delta G < 0$,说明分子间的作用力主要是疏水力,反应自发进行; L_2 -Pt 与 BSA 作用的 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$ 、 $\Delta G < 0$,表明氢键和范德华力在结合过程

中起着重要作用,反应自发进行。该研究结果对苯并咪唑类铂配合物的合成及作用机制提供较好参考依据。

参考文献:

- [1] AKHTAR M J, KHAN A A, ALI Z, et al. Synthesis of stable benzimidazole derivatives bearing pyrazole as anticancer and EGFR receptor inhibitors [J]. *Bioorg. Chem.*, 2018, **78**: 158-169.
- [2] WANG S X, GUAN L H, ZANG J, et al. Structure-based design of novel benzimidazole derivatives as Pin1 inhibitors [J]. *Molecules*, 2019, **24**(7): 1 198.
- [3] KAUR G, SILAKARI O. Benzimidazole scaffold based hybrid molecules for various inflammatory targets: Synthesis and evaluation [J]. *Bioorg. Chem.*, 2018, **80**: 24-35.
- [4] ASHOK D, GUNDU S, AAMATE V K, et al. Conventional and microwave-assisted synthesis of new indole-tethered benzimidazole-based 1, 2, 3-triazoles and evaluation of their antimycobacterial, antioxidant and antimicrobial activities [J]. *Mol. Diversity*, 2018, **22**(4): 769-778.
- [5] 徐红慧, 黄树青, 陈莹. 雷贝拉唑钠肠溶片体外释放一致性评价 [J]. *安徽医药*, 2013, **17**(9): 1 481-1 484.
- [6] 牟杰, 陈宁海, 裴冬生. 苯并咪唑衍生物的抗肿瘤活性及构效关系研究 [J]. *中国医药工业杂志*, 2021, **52**(3): 283-298.
- [7] 李森. 苯并咪唑-喹啉基金属配合物的合成及其抗肿瘤活性研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2017.
- [8] 原邦鹏. 苯并咪唑/硫脲基金属配合物的合成及抗肿瘤活性研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2021.
- [9] 杨艳芳, 林娟娟, 李雪华, 等. 1,3-双苯并咪唑银配合物的合成、抗肿瘤活性及与 DNA 的相互作用研究 [J]. *化学研究与应用*, 2018, **30**(7): 1 106-1 113.
- [10] 张晓凡. 含苯并咪唑基稀土配合物的设计合成其与牛血清白蛋白作用的研究 [D]. 武汉: 湖北大学, 2021.
- [11] WANG X H, WANG X Y, JIN S X, et al. Stimuli responsive therapeutic metallodrugs [J]. *Chem. Rev.*, 2019, **119**(2): 1138-1192.
- [12] 金素星, 郭子建, 王晓勇. 靶向能量代谢的抗肿瘤金属配合物 [J]. *药理学进展*, 2020, **44**(4): 280-293.
- [13] QIN J L, QIN Q P, WEI Z Z, et al. Stabilization of c-myc G-Quadruplex DNA, inhibition of telomerase activity, disruption of mitochondrial functions and tumor cell apoptosis by platinum(II) complex with 9-amino-oxoisophorphine [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, **124**: 417-427.
- [14] TARI Ö, GUMUS F, ACIK L, et al. Synthesis, characterization and DNA binding studies of platinum(II) com-

- plexes with benzimidazole derivative ligands[J]. *Bioorg. Chem.*, 2017, **74**: 272-283.
- [15] 王会镇, 赵雨, 姚小军, 等. 1-(4-甲氧基苯基)-3-(2-噻吩基)-2-丙烯酮与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 化学试剂, 2021, **43**(11): 1 569-1 574.
- [16] SAMARI F, SHAMSIPUR M, HEMMATEENEJAD B, et al. Investigation of the interaction between amodiaquine and human serum albumin by fluorescence spectroscopy and molecular modeling[J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **54**: 255-263.
- [17] 刘昭清, 万众, 江政, 等. 罗非昔布与牛血清白蛋白之间相互作用的研究[J]. 分析科学学报, 2020, **36**(3): 421-426.
- [18] EFTINK M R, GHIRON C A. Oxygen fluorescence quenching studies with single tryptophan-containing proteins[J]. *J. Fluoresc.*, 1994, **4**(2): 187-193.
- [19] 龚爱琴, 金党琴, 朱霞石. 荧光法研究琥珀酸曲格列汀与牛血清白蛋白的相互作用及分析应用[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, **38**(1): 157-160.
- [20] 滕晓鹏, 任婷, 恽鸿博, 等. 光谱法研究比克白芷素与人血清白蛋白的相互作用机制[J]. 化学研究与应用, 2021, **33**(11): 2 179-2 185.
- [21] 张恩凤, 张新波, 黄富平, 等. 磺胺嘧啶锌(II)配合物与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 化学研究与应用, 2018, **30**(3): 319-326.
- [22] TIAN Z Y, SONG L N, ZHAO Y, et al. Spectroscopic study on the interaction between naphthalimide-polyamine conjugates and bovine serum albumin (BSA)[J]. *Molecules*, 2015, **20**(9): 16 491-16 523.
- [23] HU Y J, LIU Y, ZHANG L X, et al. Study of interaction between colchicines and bovine serum albumin by fluorescence quenching method[J]. *J. Mol. Struct.*, 2005, **750**: 174-178.
- [24] ZHANG J, CHEN L N, ZENG B R, et al. Study on the binding of chloroamphenicol with bovine serum albumin by fluorescence and UV-Vis spectroscopy[J]. *Spectrochim. Acta A*, 2010, **77**: 430-436.
- [25] XUE J J, CHEN Q Y. The interaction between ionic liquids modified magnetic nanoparticles and bovine serum albumin and the cytotoxicity to HepG-2 cells[J]. *Spectrochim. Acta A*, 2014, **120**: 161-166.
- [26] 石婧楠, 温毛桂, 于青, 等. 鹅掌楸碱与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 化学试剂, 2018, **40**(6): 513-517; 559.
- [27] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of macromolecular association reactions; Analysis of forces contributing to stabilization[J]. *Biophys. J.*, 1980, **32**(1): 79-81.
- [28] 韩永光, 寿先苗, 李晓飞. 光谱法研究胞磷胆碱钠与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 化学试剂, 2019, **41**(4): 402-405.
- [29] 袁彝, 何勇林. 邻苯二胺与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 化学研究与应用, 2019, **31**(5): 894-901.
- [30] PATHAK M, MISHRA R, AGARWALA P K, et al. Binding of ethyl pyruvate to bovine serum albumin: Calorimetric, spectroscopic and molecular docking studies[J]. *Thermochim. Acta*, 2016, **633**(4): 140-148.
- [31] 顾佳丽, 刘璐, 黄曦瑶, 等. 醋酸可的松及其代谢物与牛血清白蛋白相互作用机制的研究[J]. 化学试剂, 2021, **43**(6): 820-824.
- [32] SHAHRAKI S, SHIRI F, SAEIDIFAR M. Evaluation of in silico ADMET analysis and human serum albumin interactions of a new lanthanum(III) complex by spectroscopic and molecular modeling studies[J]. *Inorg. Chim. Acta*, 2017, **463**: 80-87.
- [33] FU L, SUN Y, DING L, et al. Mechanism evaluation of the interactions between flavonoids and bovine serum albumin based on multi-spectroscopy, molecular docking and Q-TOF HR-MS analyses[J]. *Food Chem.*, 2016, **203**(7): 150-157.

CYP1B1 抑制剂研究进展

王志刚*, 费荣杰

(南京化学试剂股份有限公司, 江苏 南京 210047)

摘要: CYP1B1 酶 (Cytochrome P450 1B1, CYP1B1) 是细胞色素 P450 酶 (Cytochrome P450 enzyme, CYPs) 的一个亚族, 能参与多种内、外源性化合物的氧化/还原反应, 在多种恶性肿瘤中高表达。CYP1B1 酶逐渐成为抗肿瘤药物设计研发的热门靶点, 许多学者以 CYP1B1 酶为靶标蛋白设计的抑制剂, 表现出较好的活性和巨大的应用潜力, 尤其是在克服肿瘤耐药性中具有重要意义。目前报道的 CYP1B1 抑制剂种类繁多, 活性最佳的化合物是 α -萘黄酮 (ANF)。主要介绍了较为常见的几类 CYP1B1 抑制剂, 简述了各类化合物的特点以及酶抑制效果, 并对 CYP1B1 抑制剂的发展前景进行了展望。

关键词: CYP1B1 酶; 抑制剂; 靶点; 抗肿瘤; α -萘黄酮

中图分类号: R9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2023)02-0069-06

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0035

Research Progress of CYP1B1 Inhibitors WANG Zhi-gang*, FEI Rong-jie (Nanjing Chemical Reagent Co., Ltd., Nanjing 210047, China)

Abstract: Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) enzyme is a subfamily of Cytochrome P450 enzymes (CYPs), which can participate in the oxidation/reduction reaction of a variety of endogenous and exogenous compounds, and is highly expressed in a variety of malignant tumors. CYP1B1 enzyme has gradually become a popular target for the design and development of anti-tumor drugs. Many scholars have designed inhibitors targeting CYP1B1 enzyme, which show good activity and great application potential, especially in overcoming tumor drug resistance. A variety of CYP1B1 inhibitors have been reported, and the most active compound is α -naphthalene flavone (ANF). The review introduced several common classes of CYP1B1 inhibitors, briefly described the characteristics and enzyme inhibition effects of each compound, and look forward to the development prospects of CYP1B1 inhibitors.

Key words: CYP1B1 enzyme; inhibitor; a target point; antitumor; α -naphthalene flavone

癌症是一种严重威胁人类生命健康的疾病, 其致病原因复杂, 主要有内源性致病和外源性致病两大类。近年来癌症发病率逐年上涨, 已经成为威胁人类健康的第一大疾病^[1]。随着我国的人口老龄化程度不断加深, 癌症发病率还将逐年上涨。

化学致癌是最重要的一类明确的致癌因素。如各种化石燃料等有机物燃烧产生的多环芳烃 (PAH)^[2], 相关研究表明 PAH 与胃癌、乳腺癌、肺癌等癌症的发生有关^[3,4]。目前较为成熟的癌症治疗手段包括手术疗法、放射疗法和化学疗法。手术疗法主要是针对早期实体肿瘤, 疗效显著; 放射疗法缺点是照射区域有限, 限制了其应用范围; 化学疗法是目前主流的保守治疗方式, 在多种肿瘤疾病的治疗中起着至关重要的作用。然而部分患者在经历数次给药后肿瘤细胞会产生不同程度的耐药性, 导致疗效变差, 严重威胁了患者的生存质量。因此, 为解决肿瘤细胞产生耐药

性而开发新型抗肿瘤药物是该领域研究的热点之一^[5]。

细胞色素 P450 (简称 CYP450) 是多种酶组成的亚铁血红素蛋白族, 一氧化碳与活性中心结合后在 450 nm 处会有特征吸收。P450 介导了药物 I 相代谢中大约四分之三的代谢过程, 它能氧化化学小分子药物中的重要基团 (如烷基、芳香基); 还原硝基、偶氮等化学基团。这些过程是药物在体内代谢转化的关键步骤, 对于药物的生物利用率、半衰期和清除率等都有着不可忽视的影响, 是在药物代谢关键环节发挥着重要作用的一类功能全面的氧化还原酶。P450 家族中的一些

收稿日期: 2023-01-16; 网络首发日期: 2023-01-31

作者简介: 王志刚 (1964-), 男, 江苏南通人, 学士, 高级工程师, 主要研究方向为化学试剂及助剂、药用辅料的研发生产, E-mail: wzg@nj-reagent.com。

引用本文: 王志刚, 费荣杰. CYP1B1 抑制剂研究进展 [J]. 化学试剂, 2023, 45 (2): 69-74。

酶日益成为药物研发的重要靶标,受到越来越多的学者重视。

1 CYP1 酶简介

CYP1A1 和 CYP1B1 是肝外酶,CYP1A2 是肝内酶,它们都是 P450 亚族 CYP1 酶的成员^[6-10]。研究表明,乳腺癌、肺癌、结肠癌细胞中 CYP1 蛋白高表达,其中 CYP1B1 的表达程度最高,该过程与正常细胞癌变、肿瘤生长密切相关^[11],这表明其具有作为潜在的抗肿瘤药物治疗靶点的潜力。

在 CYPs 超家族中,CYP1B1 的大小和氨基酸数目在已知 CYP1 中是最大的,但结构却最为简单。另外,文献[12]报道表明,CYP1B1 一方面在正常细胞中含量较低,另一方面,在很多肿瘤细胞中高表达并表现出特异性。该研究表明设计针对性抑制 CYP1B1 的抑制剂对正常细胞毒性可能较低,证明了针对该蛋白设计抑制剂的合理性。



图 1 CYP1B1 酶的结构(PDB ID:3PM0)

Fig.1 Structure of CYP1B1 enzyme(PDB ID:3PM0)

2 CYP1B1 酶与肿瘤

CYP1B1 在肿瘤发生中的作用主要体现在两方面:一方面,CYP1B1 参与了许多前致癌物、诱变剂的代谢,此类能力是由芳香烃受体(AhR)和 AhR 核酸转录蛋白(ARNT)操控的;另外,CYP1B1 通过将环境致癌物代谢为含羟基的亲电性中间代谢产物,这些代谢产物会通过共价键与 DNA 形成加合物,引起癌基因和抑癌基因的突变,从而使致癌或诱变过程启动^[13]。有研究报道,雌二醇经过 CYP1B1 的代谢作用,从而转化为 4-羟基雌二醇,进而诱导乳腺癌^[14]。在体内由 CYP 酶参与反应的 17- β -雌二醇的代谢产物会与 DNA 发生迈克尔加成反应,导致 DNA 的突变,诱导正常细胞癌变。

一项动物实验表明,CYP1B1 在哺乳动物的生长发育中不是必须的,敲除小鼠体内的 CYP1B1 酶相关基因不会影响个体的生长发育,但是却可以避免 7,12-二甲基苯并蒽诱导的癌症肿瘤的发生^[15],这为设计合成 CYP1B1 抑制剂提供了很好的生物学依据。

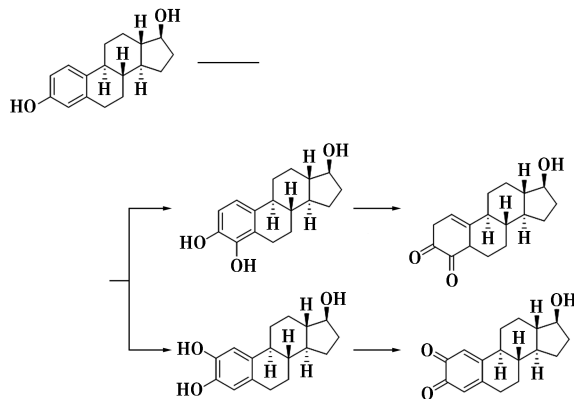


图 2 代谢过程表达示意图

Fig.2 Schematic diagram of metabolic process expression

同时,CYP1B1 酶还与一系列药物在体内失活有关,4-羟基它莫昔酚就是典型的例子,经过体内代谢后 CYP1B1 能使其产生不同构象的结构,而这种化合物的抑制活性也随之消失^[16]。紫杉醇是另外一个典型的例子,也有相关的体外实验证明,紫杉醇类药物子宫内肿瘤的耐药性与 CYP1B1 在细胞中的高表达密切相关^[17]。

3 CYP1B1 酶抑制剂的研究现状

目前以 CYP1B1 为靶向的抗肿瘤药物研究主要是以 CYP1B1 为靶向的抑制剂。报道过的抑制剂类型主要包括:二苯乙烯类、黄酮类、香豆素类、生物碱类以及含不饱和羟基的芳香化合物^[18-22]。其中,二苯乙烯类以及黄酮类化合物是当前的热点研究对象。

3.1 黄酮类抑制剂

黄酮类抑制剂是基于自然界中黄酮母核经过结构改造合成的一类新型抑制剂。这类化合物能起到抗肿瘤和预防肿瘤发生的作用^[23,24],作为与 E2 结构类似的化合物,黄酮类化合物对 CYP1B1 有一定的抑制能力。相关大鼠灌服生物实验证明,黄酮类小分子对与 DMBA 相关的肿瘤病灶抑制作用明显^[25,26]。

生物活性实验还表明,羟基在提高黄酮类小

分子化合物的活性方面具有独特的作用,在黄酮母核多个不同位置上引入羟基,能够有效提升小分子的生物活性和选择性,对 CYP1B1 的抑制能力有明显提高^[27]。这可能与羟基可以和 CYP1B1 周围的氨基酸形成强烈分子间作用力,如果有氢键形成,则会大大增加它们之间的结合力,在这种思路指导下研发的黄酮类 CYP1B1 抑制剂中有很强抑制能力,其中 5-羟基-7,8-吡喃黄酮就是代表性化合物之一^[28]。

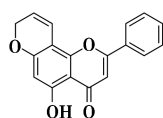


图 3 5-羟基-7,8-吡喃黄酮的结构

Fig.3 Structure of 5-hydroxy-7,8-pyrano flavone

人工合成的先导化合物 α -萘黄酮 (ANF) 对 CYP1B1 和 CYP1A1 的抑制选择性很强, ANF 对 CYP1B1 的抑制很强,其 IC_{50} 为 1.3 nmol/L,但是对 CYP1A1 的抑制活性大大下降,只有十二分之一。有相关实验组设计并合成了萘环上甲氧基取代的 α -萘黄酮^[29],其酶抑制活性结果显示,引入甲氧基可大大提高化合物的酶抑制能力与选择性。此研究组所合成的一些列化合物中,3'-氟-6,7,10-三甲氧基- α -萘黄酮抑制能力脱颖而出,其对 CYP1B1 的抑制活性 IC_{50} 为先导化合物 IC_{50} 的三十分之一。相关研究报道, ANF 可以有效克服 CYP1B1 相关的紫杉醇耐药性^[30]。

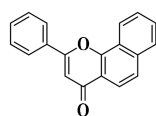


图 4 小分子抑制剂 ANF 结构

Fig.4 Structure of small molecule inhibitor ANF

为了改善 ANF 的水溶性,有研究团队合成了一种 α -萘黄酮醇的结构,并且在侧链上引入了水溶性的盐酸盐,改善了化合物的水溶性和抑制活性,且后续的生物实验表明化合物明显减弱了由 CYP1B1 酶引起的耐药性^[31]。结果表明, CYP1B1 在耐药性很强的 MCF-7 细胞中,该化合物的盐酸盐能够显著克服 CYP1B1 酶高表达导致的多西紫杉醇耐药,抑制剂在 10 μ mol/L 浓度下可使细胞对多西紫杉醇的吸收能力大大提升。

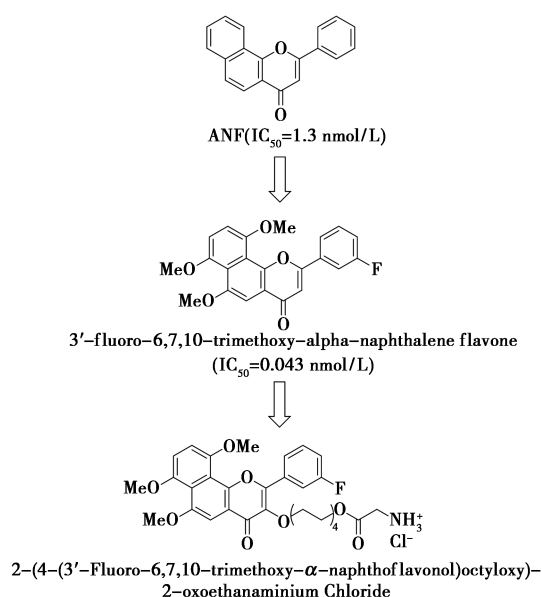


图 5 ANF 的活性及水溶性改进流程图

Fig.5 Flow chart of improved activity and water solubility of ANF

3.2 二苯乙烯类抑制剂

该类化合物是常见于中草药的活性成分之一,对肿瘤细胞有一定的抑制作用^[32,33],这类化合物发挥抗肿瘤作用的机制相当多样化,其中之一便是通过抑制 CYP1B1 达到抗肿瘤的效果。天然产物白藜芦醇对 CYP1 酶家族存在抑制作用,其中对 CYP1 B1 的抑制活性达到了 1.4 μ mol/L。在体内实验中,它表现出了一种阻碍多环芳烃与 CYP 蛋白的结合的能力,以此发挥了预防正常细胞的癌变作用^[34]。

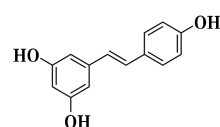


图 6 白藜芦醇的分子结构

Fig.6 Molecular structure of resveratrol

目前抗肿瘤药物的候选化合物中白藜芦醇及其类似物也是重要组成之一。根据相关研究表明,白藜芦醇可在 NADPH 的参与下发挥抑制 CYP1B1 酶的活性,其 IC_{50} 为 1.4 μ mol/L^[35,36]。有相关研究运用李药策略选取各自优势结构对 α -萘黄酮与二苯乙烯的有效结构进行组合^[37]。结果发现,由此研发的系列化合物对 CYP1B1 酶抑制活性大大提高,其中三甲氧基取代衍生物 TMFN 的 IC_{50} 值 0.31 nmol/L,抑制活性十分突出,证明了该策略的正确性。

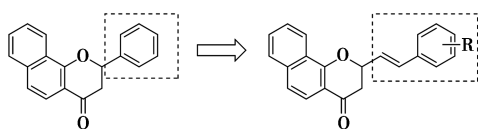


图 7 α-萘黄酮与二苯乙烯组合设计思路

Fig.7 Design idea of combining α-naphthalene flavone with stilbene

3.3 香豆素类抑制剂

香豆素是一种天然产物,其特征是拥有苯并α-吡喃酮结构,化学家发现对香豆素结构进行改造可以使其表现出不同的活性特点。其中最受人关注的是香豆素的抗肿瘤活性研究^[38,39]。根据相关报道,7-羟基-8-酰基香豆素能够有效抑制由 CYP1 酶导致的苯并芘代谢为苯并芘-7,8-二氢二醇,进而预防正常细胞癌变的作用^[40]。还有文献报道,香豆素对大鼠乳腺癌有显著的抑制作用,对苯并芘诱发的大鼠胃腕部肿瘤也具有预防作用^[41]。此外,文献报道了 7,8 位杂环取代的香豆素衍生物对 CYP1B1 的抑制作用^[42]。

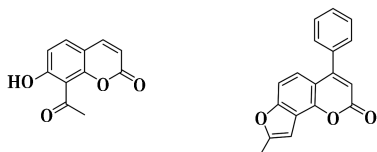


图 8 7-羟基-8-酰基取代和苯环取代的香豆素结构

Fig.8 Coumarin structures with 7-hydroxy-8-acyl and phenyl ring substitutions

3.4 生物碱衍生物

生物碱的主要特征是存在于生物体内且分子中含氧化态氮原子。有研究发现了黄连素选择性抑制 CYP1B1^[43]。该团队发现黄连素可以有效抑制 CYP1B1 导致的雌二醇结构转变^[44]。

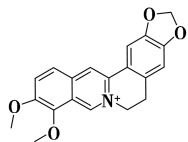


图 9 黄连素的结构

Fig.9 Structure of berberine

3.5 多环芳烃类化合物

这是一类芳香性不饱和碳氢化合物,其中乙烯基和炔基对该类化合物的抑制活性提高显著。有研究小组合成了一系列含不饱和烃基的芳香化合物,并且进行了酶抑制活性测试^[45]。这类抑制剂的作用原理是通过自由基与卟啉基团中的铁原子形成强烈的共价键而发挥对 CYP1 酶很强

的抑制活性^[44],如对 1-(1-丙炔基)芘及 2-(1-丙炔基)菲。

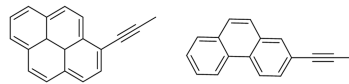


图 10 1-(1-丙炔基)芘及 2-(1-丙炔基)菲的结构

Fig.10 Structure of 1-(1-propargyl) pyrene and 2-(1-propargyl) phenanthrene

4 结论与展望

综上所述,由于 CYP1B1 具有在肿瘤细胞中高表达、与肿瘤细胞生长及耐药密切相关,对正常细胞毒性可能较低的特点,CYP1B1 酶被认为是一个可靠的抗肿瘤药物研究新靶点,引起很多学者的浓厚兴趣。目前文献报道的几类小分子抑制剂中有的已经具有很高的活性,但尚存在生物相容度差的问题,针对这一问题继续开发一类生物活性和生物相容度俱佳的小分子抑制剂将成为主要的研究方向。CYP1B1 新型抑制剂有望在肿瘤新药研发、克服肿瘤耐药性方面取得好的成果,具有重要的理论和实践意义。

参考文献:

- [1] FERLAY J, SHIN H, BRAY F, et al. GLOBOCAN 2008. Cancer Incidence and Mortality Worldwide [R]. GLOBOCAN, International Agency for Research on Cancer, 2010.
- [2] YUE H, YUN Y, GAO R, et al. Winter polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-bound particulate matter (PM) from peri-urban North China promotes lung cancer cell metastasis [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**(24): 14 484-14 493.
- [3] LIAO L M, HOGMANN J N, KAMANGAR F, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of gastric cancer in the Shanghai Women's Health Study [J]. *IJMEG*, 2014, **5**(3): 140-144.
- [4] WHITE A J, CHEN J, MCCULLOUGH L E, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-DNA adducts and breast cancer: Modification by gene promoter methylation in a population-based study [J]. *Cancer Cause. Control*, 2015, **26**(12): 1 791-1 802.
- [5] RIGANTI C, MINI E, NOBILI S. Editorial: Multidrug resistance in cancer: Pharmacological strategies from basic research to clinical issues [J]. *Front. Oncol.*, 2015, **5**: 1-3.
- [6] GUENGERICH F P, SHIMADA T. Oxidation of toxic and

- carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes [J]. *Chem. Res. Toxicol.*, 1991, **4**(4): 391-407.
- [7] WRIGHTON S A, STEVENS J C. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism [J]. *Crit. Rev. Toxicol.*, 1992, **22**(1): 1-21.
- [8] CUI J, LI S. Inhibitors and prodrugs targeting CYP1: A novel approach in cancer prevention and therapy [J]. *Curr. Med. Chem.*, 2014, **21**(5): 519-552.
- [9] SPYROU I, SIFAKIS S, PLOUMIDIS A, et al. Expression profile of CYP1A1 and CYP1B1 enzymes in endometrial tumors [J]. *Tumor Biol.*, 2014, **35**(10): 9549-9556.
- [10] MURRAY G I, TAYLOR M C, MCFADYEN M C. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1 [J]. *Cancer Res.*, 1997, **57**: 3026-3031.
- [11] NAKAJIMA M, IWANARI M, YOKOI T. Effects of histone deacetylation and DNA methylation on the constitutive and TCDD-inducible expressions of the human CYP1 family in MCF-7 and HeLa cells [J]. *Toxicolo. Lett.*, 2003, **144**: 247-256.
- [12] 刘春莲, 焦海燕. 细胞色素 P4501B1 基因多态性与乳腺癌易感性研究进展 [J]. *生命科学*, 2007, **1**: 37-42.
- [13] HAYES C L, SPINK D C, SPINK B C, et al. 17 Beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1 [J]. *P. Natl. A Sci.*, 1996, **93**(18): 9776-9781.
- [14] TSUCHIYA Y, NAKAJIMA M, YOKOI T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human [J]. *Cancer Lett.*, 2005, **227**(2): 115-124.
- [15] JU W, YANG S, ANSEDE J H, et al. CYP1A1 and CYP1B1-mediated biotransformation of the antitryptanosomal methamidoxime prodrug DB844 forms novel metabolites through intramolecular rearrangement [J]. *J. Pharm. Sci.*, 2014, **103**(1): 337-349.
- [16] 刘媛媛, 孙华威, 刘志野. 紫杉醇对子宫内膜癌细胞 CYP1B1 基因表达的影响 [J]. *黑龙江医药科学*, 2015, **38**(3): 84-85.
- [17] CHUN Y J, LIM C, OHK S O, et al. Trans-stilbenoids: Potent and selective inhibitors for human cytochrome P4501B1 [J]. *Med. Chem. Commun.*, 2011, **2**(5): 402-405.
- [18] DOOSTDAR H, BURKE M D, MAYER R T. Bioflavonoids: Selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1 [J]. *Toxicology*, 2000, **144**(1): 31-38.
- [19] KLEINER H E, VULIMIRI S V, REED M J, et al. Role of cytochrome P450 1a1 and 1b1 in the metabolic activation of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene and the effects of naturally occurring furanocoumarins on skin tumor initiation [J]. *Chem. Res. Toxicol.*, 2002, **15**(2): 226-235.
- [20] SHIMADA T, YAMAZAKI H, FOROOZESH M, et al. Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1 [J]. *Chem. Res. Toxicol.*, 1998, **11**(9): 1048-1056.
- [21] FOROOZESH M, PRIMROSE G, GUO Z, et al. Aryl acetylenes as mechanism-based inhibitors of cytochrome P450-dependent monooxygenase enzymes [J]. *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, **10**(1): 91-102.
- [22] HARBORNE J B, BAXTER H, MOSS P. *Phytochemical dictionary: A handbook of bioactive compounds from plants* [M]. Netherlands: Cancer Causes & Control, 1998.
- [23] SO F V, GUTHRIE N, CHAMBERS A F, et al. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices [J]. *Nutr. Cance*, 1996, **26**(2): 167-181.
- [24] ZHAI S, DAI R, WEI X, et al. Inhibition of methoxyresorufin demethylase activity by flavonoids in human liver microsomes [J]. *Life Sci.*, 1998, **63**(8): 119-123.
- [25] LE BON A M, SIESS M H, SUSCHETET M. Inhibition of microsome-mediated binding of benzo [a] pyrene to DNA by flavonoids either in vitro or after dietary administration to rats [J]. *Chem. Biol. Interact.*, 1992, **83**(1): 65-71.
- [26] VERMA A K, JOHNSON J A, GOULD M N, et al. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene- and N-nitrosomethylurea induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin [J]. *Cancer Res.*, 1988, **48**(20): 5754-5758.
- [27] SHIMADA T, TANAKA K, TAKENAKA S, et al. Structure-function relationships of inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, and 3A4 by 33 flavonoid derivatives [J]. *Chem. Res. Toxicol.*, 2010, **23**(12): 1921-1935.
- [28] LIU J, TAYLOR S F, DUPART P S, et al. Pyranoflavones: A group of small-molecule probes for exploring the active site cavities of cytochrome P450 enzymes 1A1, 1A2, and 1B1 [J]. *J. Med. Chem.*, 2013, **56**(10): 4082-4092.
- [29] CUI J, MENG Q, ZHANG X, et al. Design and synthesis of new α -Naphthoflavones as cytochrome P450 (CYP) 1B1 inhibitors to overcome docetaxel-resistance associated with CYP1B1 overexpression [J]. *J. Med. Chem.*,

- 2015, **58**(8): 3 534-3 547.
- [30] MCFADYEN M C E, MCLEOD H L, JACKSON F C, et al. Cytochrome P450 CYP1B1 protein expression: A novel mechanism of anticancer drug resistance [J]. *Biochem. Pharm.*, 2001, **62**(2): 207-212.
- [31] ZORDOKY B N M, EL-KADI A O S. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and β -naphthoflavone induce cellular hypertrophy in H9c2 cells by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism [J]. *Toxicol. Vitro*, 2010, **24**(3): 863-871.
- [32] RIMANDO A M, SUH N. Biological/chemopreventive activity of stilbenes and their effect on colon cancer [J]. *Planta Med.*, 2008, **74**(13): 1 635.
- [33] RIMANDO A M, CUENDET M, DESMARCHELIER C, et al. Cancer chemopreventive and antioxidant activities of pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol [J]. *J. Agri. Food Chem.*, 2002, **50**(12): 3 453-3 457.
- [34] CASPER R F, QUESNE M, ROGERSI M, et al. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: Implications for prevention of dioxin toxicity [J]. *Mol. Pharmacol.*, 1999, **56**(4): 784-790.
- [35] CHANG T K H, LEE W B K, KO H H. Trans-resveratrol modulates the catalytic activity and mRNA expression of the procarcinogen-activating human cytochrome P450 1B1 [J]. *Can. J. Physiol. Pharm.*, 2000, **78**(11): 874-881.
- [36] CHUN Y J, KIM M Y, GUENGERICH F P. Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor [J]. *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, 1999, **262**(1): 20-24.
- [37] HU D G L, CUI J H, ZHANG X, et al. Synthesis and synthesis of styrylnaphthalenes as potent inhibitors of CYP1B1 [J]. *Chinese J. Med. Chem.*, 2013, **23**(4): 262-270.
- [38] FEUER G, KELLEN J A, KOVACS K. Suppression of 7, 12-dimethylbenz (α) an-thracene-induced breast carcinoma by coumarin in the rat [J]. *Oncology*, 1976, **33**(1): 35-39.
- [39] WATTENBERG L W, LAM L K T, FLADMOE A V. Inhibition of chemical carcinogen-induced neoplasia by coumarins and α -angelicalactone [J]. *Cancer Res.*, 1979, **39**(5): 1 651-1 654.
- [40] STUPANS I, RYAN A J. In vitro inhibition of 3-methylcholanthrene-induced rat hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase by 8-acyl-7-hydroxycoumarins: Structure activity relationships and metabolite profiles [J]. *Biochem. Pharmacol.*, 1984, **33**(1): 131-139.
- [41] LIU J, PHAM P T, SKRIPNIKOVA EV, et al. A ligand-based drug design. Discovery of 4-trifluoromethyl-7, 8-pyrano coumarin as a selective inhibitor of human cytochrome P450 1A2 [J]. *J. Med. Chem.*, 2015, **58**(16): 6481-6493.
- [42] LO S N, CHANG Y P, TSAI K C, et al. Inhibition of CYP1 by berberine, palatine, and jatrorrhizine: Selectivity, kinetic characterization, and molecular modeling [J]. *Toxico. Appl. Pharm.*, 2013, **272**(3): 671-680.
- [43] CHANG Y P, HUANG C C, SHEN C C, et al. Differential inhibition of CYP1-catalyzed regioselective hydroxylation of estradiol by berberine and its oxidative metabolites [J]. *Drug Metab. Pharm.*, 2015, **30**(5): 374-383.
- [44] SHIMADA T, MURAYAMA N, OKADA K, et al. Different mechanisms for inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic inhibitors [J]. *Chem. Res. Toxicol.*, 2007, **20**(3): 489-496.
- [45] SHIMADA T, YAMAZAKI H, FOROOZESH M, et al. Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1 [J]. *Chem. Res. Toxicol.*, 1998, **11**(9): 1 048-1 056.

功能材料

复合型多金属氧酸盐的合成与应用

赵孟雅,田璐,肖禹圣,王震寰,刘淑莹,赵幻希*,修洋*

(长春中医药大学 吉林省人参科学研究院,吉林 长春 130117)

摘要:多金属氧酸盐(Polyoxometalates, POMs)是由高价态的过渡金属离子通过氧连接而成的一类多金属氧簇化合物,因其丰富的元素组成、可调控的多样结构及氧化还原活性,在催化、材料和医药等领域拥有广泛的应用。POMs 在极性溶剂中通常有良好的溶解度,这导致其不易从反应体系分离。制备复合型 POMs,一方面可以提高 POMs 的比表面积和稳定性,进而提高催化活性;另一方面可以降低 POMs 在极性溶剂中的溶解度,有利于回收及重复利用。主要综述了近年来复合型 POMs 的合成、性质及应用的研究现状。

关键词:多金属氧酸盐;复合型材料;有机大环化合物;无机材料;催化剂;合成与应用

中图分类号:TQ426.91 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2023)02-0075-08

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0535

Synthesis and Applications of Composite Polyoxometalates ZHAO Meng-ya, TIAN Lu, XIAO Yu-sheng, WANG Zhen-huan, LIU Shu-ying, ZHAO Huan-xi*, XIU Yang* (Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract: Polyoxometalates (POMs) are metal oxide clusters formed by oxygen bonding of transition metals in high oxidation states, which have been applied to a wide range of fields: catalysis, materials and medicine due to its rich constituent elements, tunable architectures and redox properties. The high solubility of POMs in polar solvents give rise to the difficulty in separation from the reaction system. By preparation of composite POMs, on the one hand, the surface areas and stability can be increased in comparison with its parent POMs to further improve the catalytic activity. On the other hand, it can reduce the solubility of POMs in polar solvents, which is convenient for recycling and reusing. The different synthetic methodologies, properties, and applications of composite POMs in recent years were reviewed.

Key words: polyoxometalates; composite materials; organic macrocyclic compounds; inorganic materials; catalysts; synthesis and applications

多金属氧酸盐(Polyoxometalates, POMs)是一类由不同种类的含氧酸根阴离子簇组成的化合物,其骨架结构中含有 Mo、W、V、Nb、Ta 等过渡金属元素^[1,2],是性能优异的酸碱^[3]和氧化还原^[4]双功能催化剂。这类催化剂具有良好的光电敏感性^[5]、热稳定性^[6]和可调变的结构^[7],已被广泛用于催化有机、无机^[8]、电化学^[9]和光化学反应^[10]。

POMs 作为一种环境友好型催化剂具有以上的诸多优势,但是 POMs 具有比表面积小(通常低于 10 m²/g),易溶于极性溶剂以及回收再利用困难等缺点,在一定程度上限制了其催化活性和应用范围^[11]。将 POMs 负载于适宜的载体中合成复合型 POMs 可以提高 POMs 的催化活性和选择性,有助于解决这些问题。近年来,具有大比表面

积、多孔结构及稳定化学性质的固体材料成为了负载高活性 POMs 的理想载体。常用的载体包括金属有机框架、大环化合物等有机材料和二氧化硅、金属氧化物等无机材料。

复合型 POMs 的合成方法主要有浸渍法、溶胶-凝胶法、扩散法及水热法等。主体材料的结构

收稿日期:2022-07-14;网络首发日期:2022-11-08

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20200201093JC, 20210204098YY);国家自然科学基金项目(21475012)。

作者简介:赵孟雅(1998-),女,吉林长春人,硕士生,主要研究方向为分子生药学新技术和新方法。

通讯作者:赵幻希, E-mail: phoenix8713@ sina.com; 修洋, E-mail: ys830805@ sina.com。

引用本文:赵孟雅,田璐,肖禹圣,等.复合型多金属氧酸盐的合成与应用[J].化学试剂,2023,45(2):75-82。

与稳定性决定了可选择的合成方法,也影响了复合型 POMs 的催化活性。本文总结了利用不同类型的主体材料合成复合型 POMs 的主要方法以及所合成材料的应用领域。

1 POM-有机大环化合物

大环化合物是 1967 年 C.J.Pedersen 首次对冠醚化合物进行报道后兴起的一类环状化合物,成环原子数一般大于或等于 12。大环化合物具有易于形成主客体包合物的空腔,可作为主体与 POMs 通过非共价相互作用如氢键和库仑力等形成 POM-大环化合物^[12],其较单一的主、客体材料具有更好的稳定性。常用的大环主体有环糊精(Cyclodextrins, CDs)、冠醚、杯芳烃和葫芦[n]脲(Cucurbit[n]urils, CB[n])等。

1.1 POM-CD

CDs 是由 6~12 个 D-吡喃葡萄糖单元组成的内壁疏水、外壁亲水的环状空腔^[13],适宜作为主体材料负载性质活泼的客体。由 6 个葡萄糖单元组成的 α -CD 空腔直径较小,通常利用含有 7 个及以上葡萄糖单元的 β -CD 和 γ -CD 合成 POM-CD。

2015 年, Wu 等^[14]利用 β -CD 和 γ -CD 与 Keggin 型多金属氧酸盐 $[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$ 配位,分别合成了 $[\text{La}(\text{H}_2\text{O})_9]\{[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]\subset[\beta\text{-CD}]_2\}$ 和 $[\text{La}(\text{H}_2\text{O})_9]\{[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]\subset[\gamma\text{-CD}]_2\}$,这是首次在 CDs 的空腔中直接引入 POMs,为 POM-CD 复合材料的合成奠定了基础。Yang 等^[15]考察了碱金属阳离子对 POM-CD 结构的影响。在含有不同碱金属离子(Na^+ 、 K^+ 、 Cs^+)的醋酸盐缓冲液中,利用 $\text{P}_2\text{Mo}_5\text{O}_{23}$ 与 CDs 共结晶制备了 7 种 POM-CD,发现了碱金属离子的大小直接影响 POM-CD 的孔隙度和形状。Fan 等^[16]将 $\text{H}_4\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}$ 和 γ -CD 通过蒸汽扩散法合成催化剂 $\text{SiW}_{12}/\gamma\text{-CD}$,并将其用于 H_2O_2 氧化环辛烯环的反应中,结果表明, $\text{SiW}_{12}/\gamma\text{-CD}$ 的催化效率约为 SiW_{12} 的 10 倍。此外, POM-CD 还具有良好的催化活性以及稳定性,已经被用于染料和抗生素的光降解^[17]、材料合成^[18]以及能源储存^[19]等领域。

1.2 POM-CB[n]

CB[n] 是一类由 2n 个亚甲基和 n 个胍单元形成的大环笼状化合物。Ni 等^[20]根据 CB[n] 外壁较强的正电性提出了“外壁作用”,其中 CB[n] 与无机阴离子的外壁作用包括:(1)CB[n] 端

口羰基的负电荷与带正电荷的基团或金属离子之间的偶极作用^[21];(2)CB[n] 外壁次甲基和亚甲基与无机阴离子之间的氢键作用^[22]。CB[n] 笼入口的尺寸小于 POMs 分子的尺寸,无法容纳 POMs,因此 POM-CB[n] 的合成正是通过 CB[n] 的外壁作用实现的。

CB[n] 具有良好的水溶性和热稳定性,因此通常采用水热法合成 POM-CB[n]。2009 年, Fang 等^[23]首次报道了 POM-CB[n] 的合成,在 CB[6] 的碱性溶液中,由 VOSO_4 和氢氧根原位生成多氧阴离子,合成了杂化配合物 $\text{K}_{12}[\text{CB}[6](\text{H}_2\text{O}\subset\text{V}_{18}\text{O}_{42})]\cdot 27\text{H}_2\text{O}$ 。Lin 等^[24]以 β -Keggin 型多钨酸盐簇 $[\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}]^{6-}$ 、 α -Keggin 和 β -Keggin 型多氧硅钨酸团簇 $[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]^{4-}$ 为反应物,与 $\text{Me}_{10}\text{Q}[5]$ 水热合成了 3 种 Q[n]-POM 杂化物。同样地, Han 等^[25]通过水热分散法将钒酸盐簇 $\{\text{V}_4\text{O}_{12}\}^{4-}$ 、 $\{\text{H}_2\text{V}_6\text{O}_{18}\}^{4-}$ 、 $\{\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}\}^{4-}$ 和 $\text{Me}_{10}\text{Q}[5]$ 合成了 3 种罕见的三明治型 POM-CB[n] 材料,其中 $\text{Li}_4(\text{H}_2\text{O})_6[(\text{H}_2\text{V}_6\text{O}_{18})\cdot(\text{Me}_{10}\text{CB}[5]@\text{H}_2\text{O})_2]\cdot\sim 14\text{H}_2\text{O}$ 在可见光下对甲基橙溶液的降解显示出光催化活性。Cao 等^[26]以 $\text{Me}_{10}\text{CB}[5]$ 为载体, $\{\text{W}_6\text{O}_{19}\}^{2-}$ 为活性组分合成了复合材料 $\{[\text{Na}_2(\text{W}_6\text{O}_{19})(\text{Me}_{10}\text{CB}[5])(\text{H}_2\text{O})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}\}_n$,并将其用作罗丹明 B 降解的可见光催化剂,其光催化性能与单一的 POMs 和 $\text{Me}_{10}\text{CB}[5]$ 相比明显增强。此外, POM-CB[n] 还具有可逆的光致变色特性^[27]和对丙酮的选择性吸附能力^[28]。作为多相酸催化剂,可提高没食子酸和正丙醇酯化为没食子酸丙酯的反应活性和稳定性^[29],还可作为有效的酶抑制剂调节 α -糜蛋白酶的活性^[30]。

1.3 POM-冠醚

杂环有机化合物冠醚包含多个醚基团,对碱金属和碱土金属离子具有超强的配位能力,因此 POM-冠醚的研究多与碱金属元素相关。1979 年, Nagano 等^[31]将 18-冠-6 与 $\text{K}_2\text{Mo}_6\text{O}_{19}$ 结合,合成了第一个 POM-冠醚化合物 $(\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_6)_2\cdot\text{K}_2\text{Mo}_6\text{O}_{19}\cdot\text{H}_2\text{O}$ 。

Zhang 等^[32]以 18-冠-6 和 $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ 为原料,在乙腈溶液中通过溶剂挥发法合成复合材料 $[(4\text{-bromoanilinium})([\text{18}]\text{crown-6})]_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]\cdot\text{CH}_3\text{CN}$,并证实了 POM-冠醚晶体结构的稳定性取决于 POMs 和冠醚之间的氢键相互作用。鲁晓明等^[33-35]利用不同孔径的冠醚与钼钨取代的

POMs 在常温常压下合成了一系列 POM-冠醚化合物,并证明大环化合物作为主体分子在选择 POMs 作为客体分子时显示出特有的分子识别性,POMs 阴离子也随化学环境的变化呈现出聚合度和结构上的差异。Xiong 等^[36] 分别利用 H 管扩散法和溶剂挥发法合成了 $[(3\text{-F-4-MeAnis}) ([18] \text{ crown-6})]_2 [SMo_{12}O_{40}] \cdot CH_3CN$ 和 $[(4\text{-IAnis}) ([18] \text{ crown-6})]_3 [PMo_{12}O_{40}] \cdot 4CH_3CN$ 两种晶体,并通过 XRD 分析了它们不同的结构特征。

朱春立等^[37] 以 $H_3PW_{12}O_{40}$ 、18-冠-6 和苯胺

为反应物在丙酮溶液中采用 H 管扩散法合成了 $(C_6H_5-NH_2^{0.5})_6(18\text{-冠-6})_3 [PW_{12}O_{40}]^{3-} (C_6C_3P)$ 晶体。变温-介电常数测试结果显示该化合物是一种新颖的介电异常型材料,在新型介电器件方面具有潜在的应用价值。Wang 等^[38] 以 $H_4 [SiMo_{12}O_{40}]$ 和 18-冠-6 为反应物,在乙腈溶液中通过一锅法合成了 $[K(H_{24}C_{12}O_6)]_3 [K(H_{24}C_{12}O_6) (CH_3CN)] [SiMo_{12}O_{40}]$,其作为电催化剂在 2 000 次循环运行后仍保持催化活性。

表 1 总结了常见的 POM-有机大环化合物的合成方法与主要产物。

表 1 POM-有机大环化合物的合成方法与产物

Tab.1 Synthetic methods and products of POM-organic macrocyclic compounds

有机大环化合物	POMs	合成方法	产物	参考文献
β -CD	$[PMo_{12}O_{40}]^{3-}$	气相扩散法	$[La(H_2O)_9] \{ [PMo_{12}O_{40}] \subset [\beta\text{-CD}]_2 \}$	[14]
γ -CD	$[PMo_{12}O_{40}]^3$	液液扩散法	$[La(H_2O)_9] \{ [PMo_{12}O_{40}] \subset [\gamma\text{-CD}]_2 \}$	[14]
α -CD/ β -CD/ γ -CD	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O / NaCH_3COO^- / KCH_3COO^- / CsCl$	浸渍法	$Na\text{-}PMo\text{-}\alpha\text{-CD} / K\text{-}PMo\text{-}\alpha\text{-CD} / Cs\text{-}PMo\text{-}\alpha\text{-CD} / Na\text{-}PMo\text{-}\beta\text{-CD} / Na\text{-}PMo\text{-}\gamma\text{-CD} / K\text{-}PMo\text{-}\gamma\text{-CD} / Cs\text{-}PMo\text{-}\gamma\text{-CD}$	[15]
γ -CD	$H_4SiW_{12}O_{40}$	蒸汽扩散法	$SiW_{12}/\gamma\text{-CD}$	[16]
CB[6]	$[H_2O \subset V_{18}^{IV}O_{42}]^{12-}$	一锅法	$K_{12}[CB[6](H_2O \subset V_{18}^{IV}O_{42}) \cdot 27H_2O]$	[23]
$Me_{10}Q[5]$	$[\beta\text{-}H_2W_{12}O_{40}]^{6-} / [\alpha\text{-}SiW_{12}O_{40}]^{4-} / [\beta\text{-}SiW_{12}O_{40}]^{4-}$	水热合成法	$[Na_6(H_2O)_{11}(Me_{10}Q[5])_2] \cdot [\beta\text{-}H_2W_{12}O_{40}] \cdot 5H_2O / [Na_4(H_2O)_7(Me_{10}Q[5])_2] \cdot [\alpha\text{-}SiW_{12}O_{40}] \cdot 20H_2O / [Na_4(H_2O)_7(Me_{10}Q[5])_2] \cdot [\beta\text{-}SiW_{12}O_{40}] \cdot 13H_2O$	[24]
$Me_{10}CB[5]$	$\{V_4O_{12}\}^{4-} / \{H_2V_6O_{18}\}^{4-} / \{H_2V_{10}O_{28}\}^{4-}$	水热合成法	$(NH_4)_4[(V_4O_{12}) \cdot (Me_{10}CB[5]@0.5H_2O)_2] \cdot \sim 15H_2O / Li_4(H_2O)_6[(H_2V_6O_{18}) \cdot (Me_{10}CB[5]@H_2O)_2] \cdot \sim 14H_2O / (NH_4)_4[(H_2V_{10}O_{28}) \cdot (Me_{10}CB[5]@H_2O)_2] \cdot \sim 16H_2O$	[25]
$Me_{10}CB[5]$	$\{W_6O_{19}\}^{2-}$	水热合成法	$\{[Na_2(W_6O_{19})(Me_{10}CB[5])(H_2O)] \cdot 2H_2O\}_n$	[26]
18-冠-6	$K_2Mo_6O_{19}$	溶剂挥发法	$(C_{12}H_{24}O_6)_2 \cdot K_2Mo_6O_{19} \cdot H_2O$	[31]
18-冠-6	$H_3PW_{12}O_{40}$	溶剂挥发法	$[(4\text{-bromoanilinium}) ([18] \text{ crown-6})]_3 [PMo_{12}O_{40}] \cdot CH_3CN$	[32]
B15C5	$[\alpha\text{-}PMo_{12}O_{40}]^{3-}$	水热合成法	$[NaL(CH_3CN)] [NaL] - [\alpha\text{-}PMo_{12}O_{40}] [NaL_2] (L = B15C5)$	[33]
DB18C6	Na_2WO_4	溶剂热法	$[Na(DB_{18}C_6)(CH_3CN)]_2 W_6O_{19} \cdot (CH_3CN)_2$	[34]
B15C5	$Mo_6O_{19}^{2-}$	水热合成法	$[Na(B3OC10)] [Mo_6O_{19}]$	[35]
18-冠-6	$SMo_{12}O_{40}^{2-} / PMo_{12}O_{40}^{3-}$	H 管扩散法/ 溶剂挥发法	$[(3\text{-F-4-甲基苯铵盐}) ([18] \text{ 冠-6})]_2 [SMo_{12}O_{40}] \cdot CH_3CN / [(4\text{-碘苯铵盐}) ([18] \text{ 冠-6})]_3 [PMo_{12}O_{40}] \cdot 4CH_3CN$	[36]
18-冠-6	$PW_{12}O_{40}^{3-}$	H 管扩散法	$(C_6H_5-NH_2^{0.5})_6(18\text{-冠-6})_3 [PW_{12}O_{40}]^{3-}$	[37]
18-冠-6	$H_4[SiMo_{12}O_{40}]$	一锅法	$[K([18]\text{-冠-6})]_3 [K([18]\text{-冠-6})(CH_3CN)] [SiMo_{12}O_{40}]$	[38]

2 POM-无机材料

用于制备 POM-无机材料的载体主要是酸性或中性且化学惰性的 SiO_2 ^[39]、 Al_2O_3 ^[40]、 TiO_2 ^[41] 和分子筛^[42] 等。 SiO_2 和分子筛等多孔材料具有比表面积大、相对密度低、孔隙率高、渗透性好等特性。以多孔材料为载体不仅可以提高 POMs 的比表面积、增加分散的活性位点,进而提高催化活性和选择性,同时还可使 POMs 的反应体系转变

为非均相反应,有利于 POMs 的回收及再利用。

2.1 POM-SiO₂

SiO_2 作为合成复合型 POMs 的常用载体,具有较大的比表面积和独特的孔道结构,同时具备热稳定性高和酸碱性适中等优点^[43],其表面的羟基可以吸附溶液中的离子,因此 POM-SiO₂ 具有较高的催化活性。POM-SiO₂ 复合催化剂在反应中通常以非均相的形式存在,在反应结束后易回

收,并可进行循环使用^[44,45]。

合成 POM-SiO₂ 复合材料通常采用浸渍法和溶胶-凝胶法。浸渍法操作较简便,POMs 通过静电作用吸附在 SiO₂ 的表面。但是在催化反应中 POMs 易从 SiO₂ 载体上分离,降低催化效率^[46]。Izumi 等^[47]于 1995 年首次提出了利用溶胶-凝胶法制备微孔硅负载的磷钨酸 H₃PW₁₂O₄₀-SiO₂,将多酸固定在通过硅酸乙酯水解产生的具有网络结构的 SiO₂ 载体中,解决了由浸渍法合成的 POM-SiO₂ 在极性溶剂中浸出的问题。

目前,溶胶-凝胶法已成为合成 POM-SiO₂ 的主要方法。Reyes-López 等^[48]在溶胶制备阶段将 H₃PW₁₂O₄₀ 和 H₄SiW₁₂O₄₀ 分别引入 SiO₂ 基质中,获得了对可见光具有高透明度的 H₃PW₁₂O₄₀/SiO₂ 和 H₄SiW₁₂O₄₀/SiO₂ 材料,TG/DSC 结果显示 POMs 的引入显著提高了 SiO₂ 的热稳定性。Ai 等^[46]采用溶胶-凝胶法制备了不同 H₄[Ti(H₂O)TiW₁₁O₃₉]·7H₂O 负载量(30%、45%和 60%)的复合材料 TiW₁₁Ti/SiO₂,其对染料 X-3B 降解的催化活性高于 TiW₁₁Ti 和浸渍法制备的复合材料 M-TiW₁₁Ti/SiO₂,并具有良好的循环利用度。可以看出,溶胶-凝胶法避免了浸渍法合成导致的 POMs 溶出问题,提高了 POM-SiO₂ 的稳定性,使其适用于多种催化反应。

2.2 POM-TiO₂

TiO₂ 是一种常用的半导体材料,因其化学性质稳定、无毒和成本低等优势而常被用于光催化剂的合成研究^[49]。与 POMs 复合可以促进 TiO₂ 中的电子转移,解决其禁带宽度大、电子与空穴快速复合导致的光催化效率低等问题,提高光催化活性^[50]。通常采用浸渍法和溶胶-凝胶法制备 POM-TiO₂。Wang 等^[51]通过溶胶-凝胶法分别将 K₃PW₁₂O₄₀·nH₂O 的菱形十二面体纳米晶(PW₁₂-R)和空心菱形十二面体纳米晶(PW₁₂-H)掺入 TiO₂ 中,合成了 PW₁₂-R@TiO₂ 和 PW₁₂-H@TiO₂,其染料敏化太阳能电池的效率分别为 7.28% 和 8.06%,比原始 TiO₂ 的效率 21% 和 34%。

利用表面修饰的 POMs 和金属或非金属元素掺杂的 TiO₂ 合成 POM-TiO₂ 可以进一步提高其光催化活性。Pazhooh 等^[52]采用浸渍法简便的将含 [(PW₉O₃₄)₂(HOSnIVO₃)₃]¹²⁻(P₂W₁₈Sn₃) 的三明治型多金属氧酸盐负载于 Ln(Nd、Sm、Dy、Tb) 掺杂的 TiO₂ 纳米粒子上,合成了易于分离和回收

的复合型 POM-TiO₂ 光催化剂 Ln-TiO₂/P₂W₁₈Sn₃,并证明了其在甲基橙和亚甲基蓝的降解反应中具有光催化活性,且 Ln-TiO₂/P₂W₁₈Sn₃ 复合材料的催化活性明显高于单一的 TiO₂ 或 POMs。Wang 等^[53]以溶胶-凝胶法制备了钇掺杂的 TiO₂ 载体,进一步通过浸渍法制备了不同 H₃PW₁₂O₄₀ 负载量(10%~40%)的光催化剂 H₃PW₁₂O₄₀-Y-TiO₂,并优化光催化降解甲基橙(50 mL, 10 mg/L)的反应条件。经过 8 次的循环后,该催化剂仍保持了较高的光催化活性。Cao 等^[54]将 Pt 取代的 [(CH₃)₄N]₃[PW₁₁O₃₉{cis-Pt(NH₃)₂}]₂·10H₂O(PW₁₁Pt₂) 浸渍在 TiO₂ 表面,合成了可用于光催化析氢反应的多相催化剂 TiO₂-SiNH₂-PW₁₁Pt₂。Nd、Sm、Tb、Dy、Ce 等取代的 POMs 均可与 TiO₂ 合成复合型 POM-TiO₂ 用于甲基苯硫醚制备甲基苯亚砷或甲基苯砷^[55]和染料的降解反应^[56]。POMs 与 TiO₂ 的结合降低了电荷复合速率,使其显示出优于原始 TiO₂ 和 POMs 的光、电、化学性能,二者的协同作用在一定程度上提高了复合材料的催化活性。

2.3 POM-分子筛

分子筛具有比表面积大、热稳定性好和孔道均匀规整等优点,非常适合作为主体与 POMs 合成主-客体复合材料。POMs 可以通过静电吸附、氢键、范德华力等作用附着于分子筛孔道表面或内部,合成的 POM-分子筛复合材料不仅具有更大的比表面积和较强的稳定性,同时与本体酸相比,POM-分子筛的催化活性通常较高,这归因于 POMs 在分子筛上的高度分散,提供了更多的表面质子位点。目前用于合成复合型 POMs 的分子筛主要有 MCM-41、MCM-48、SBA-15 和 ZSM-5 等^[57,58]。

浸渍法是较为常用的 POM-分子筛的合成方法。Bandyopadhyay 等^[57]通过浸渍法将 Preyssler 型 H₁₄(P₅W₃₀)O₁₁₀Na 成功引入 SBA-15、MCM-48 和 MCM-41 等介孔材料中,所合成的复合材料作为固体酸催化剂在乙醇脱水生成乙烯的反应中均具有良好催化活性,其中 SBA-15-P 和 MCM-41-P 催化的反应中乙烯产率较高,可达到约 76%。

然而,浸渍法容易导致 POMs 从载体中浸出,降低循环利用率。将分子筛进行功能化可避免 POMs 的浸出^[59]。Ding 等^[60]将 Wells-Dawson 型 H₆P₂W₁₈O₆₂ 浸渍到氨基硅氧烷(KH-540、KH-792 和 NQ-62)功能化的 MCM-41 上,分别合成了

KH540-MCM-41、KH-792-MCM-41 和 NQ-62-MCM-41,并用于甘油脱水制丙烯醛的反应中。催化结果表明,氨基硅氧烷改性的催化剂比未改性的 D-HPW/MCM-41 催化剂具有更高的丙烯醛选择性和稳定性。随着氨基数量的增加,氨基与 POMs 之间的化学相互作用增强,抑制了 POMs 的浸出,提高了催化剂的稳定性。Wang 等^[61]将钒取代的 Keggin 型多酸 $H_{3+x}PW_{12-x}V_xO_{40} \cdot yH_2O$ ($x = 0, 1, 2, 3, 4$) 浸渍于胺功能化的 Ce-MCM-41 上合成了

POM/APTES-CeM,并测试了它们在二苯并噻吩的氧化脱硫反应中的催化活性,其中 $PW_9V_3/APTES-CeM-50$ 具有最高的催化活性,脱硫率可达到 99.26%,循环反应 8 次后仍具有良好的催化活性。此外,POM-分子筛复合材料在甲烷脱氢芳构化^[58]、甲醇制烯烃^[62]和油酸与三甲基丙烷的酯化^[63]等反应中也表现出良好的催化活性。

POM-无机材料的合成方法与产物总结于表 2 中。

表 2 POM-无机材料的合成方法与产物

Tab.2 Synthetic methods and products of POM-inorganic materials

无机材料	POMs	合成方法	产物	参考文献
SiO ₂	$H_4[Ti(H_2O)TiW_{11}O_{39}] \cdot 7H_2O$	溶胶-凝胶法	TiW ₁₁ Ti/SiO ₂	[46]
SiO ₂	H ₃ PW ₁₂ O ₄₀	溶胶-凝胶法	H ₃ PW ₁₂ O ₄₀ -SiO ₂	[47]
SiO ₂	H ₃ PW ₁₂ O ₄₀ /H ₄ SiW ₁₂ O ₄₀	溶胶-凝胶法	H ₃ PW ₁₂ O ₄₀ /SiO ₂ /H ₄ SiW ₁₂ O ₄₀ /SiO ₂	[48]
TiO ₂	$K_3PW_{12}O_{40} \cdot nH_2O(PW_{12}-R)/$ $K_3PW_{12}O_{40} \cdot nH_2O(PW_{12}-H)$	溶胶-凝胶法	PW ₁₂ -R@TiO ₂ /PW ₁₂ -H@TiO ₂	[51]
TiO ₂	P ₂ W ₁₈ Sn ₃	浸渍法	Ln-TiO ₂ /P ₂ W ₁₈ Sn ₃	[52]
TiO ₂	H ₃ PW ₁₂ O ₄₀	溶胶-凝胶法	H ₃ PW ₁₂ O ₄₀ -Y-TiO ₂	[53]
TiO ₂	PW ₁₁ Pt ₂	浸渍法	TiO ₂ -SiNH ₂ -PW ₁₁ Pt ₂	[54]
SBA-15/MCM-41/MCM-48	H ₁₄ (P ₅ W ₃₀)O ₁₁₀ Na	浸渍法	SBA-15-P/MCM-41-P/MCM-48-P	[57]
KH540/KH-792/NQ-62	H ₆ P ₂ W ₁₈ O ₆₂	浸渍法	KH540-MCM-41/KH-792-MCM-41/NQ-62-MCM-4	[60]
Ce-MCM-41	$H_{3+x}PW_{12-x}V_xO_{40} \cdot yH_2O$	浸渍法	POM/APTES-CeM	[61]

3 结论

本文综述了复合型 POMs 的合成及其应用,讨论了不同载体与合成方法对复合型 POMs 的结构、性能或催化活性的影响。POMs 主要通过浸渍法、溶胶-凝胶法、水热法和自组装等方法固定于有机/无机载体上合成复合型 POMs。合成的复合型 POMs 降低了 POMs 在极性溶剂中的溶解度,提高了比表面积和稳定性,进而获得了更好的催化活性和重复利用度。不断改进的合成方法提高了复合型 POMs 的结构稳定性和多样性。在复合型 POMs 的合成中,主体材料不仅起到固定和负载的作用,还可以通过与 POMs 的协同效应发挥助催化的功能,进一步提高 POMs 的催化活性。越来越多的有机和无机主体材料被发现可作为复合型 POMs 的载体,这不仅拓展了复合型 POMs 的功能性,还使其在光化学、电化学、化学合成和材料科学中得到了更广泛应用,而催化仍然是复合型 POMs 最主要的应用方向。

尽管复合型 POMs 的合成与应用已受到越来越多的关注,但是该领域仍缺少系统性和深入性的研究。复合型 POMs 的结构已可以被准备无误

的表征,但是对多酸阴离子与主体材料的相互作用和结合方式的研究却鲜有报道,这导致复合型 POMs 的合成机理以及影响产物结构的因素仍不明确。此外,复合型 POMs 的构效关系,主体材料如何辅助提高 POMs 的催化活性,复合型 POMs 与单一 POMs 参与催化反应的机制差异,以及探索将 POMs 应用于更多种类催化反应的可行性都是有待解决的关键问题。因此,复合型 POMs 的合成与应用仍有着广阔的研究空间。

参考文献:

- [1] UEDA T. Electrochemistry of polyoxometalates: From fundamental aspects to applications [J]. *ChemElectrochem*, 2018, **5**(6): 823-838.
- [2] ZHAO M J, CHEN X S, CHI G X, et al. Research progress on the inhibition of enzymes by polyoxometalates [J]. *Inorg. Chem. Front.*, 2020, **7**(22): 4 320-4 332.
- [3] SAHER L, MAKHLOUFI-CHEBLI M, DERMECHE L, et al. Keggin and Dawson-type polyoxometalates as efficient catalysts for the synthesis of 3, 4-dihydropyrimidinones: Experimental and theoretical studies [J]. *Tetrahedron Lett.*, 2016, **57**(13): 1 492-1 496.

- [4] ISHIMOTO R, KAMATA K, SUZUKI K, et al. Synthesis and structural characterization of BINOL-modified chiral polyoxometalates [J]. *Dalton Trans.*, 2015, **44**(24): 10 947-10 451.
- [5] SADIJADI S, HERAVI M M, DARAIE M. Heteropolyacid supported on amine-functionalized halloysite nano clay as an efficient catalyst for the synthesis of pyrazolopyranopyrimidines via four-component domino reaction [J]. *Res. Chem. Intermed.*, 2017, **43**(4): 2 201-2 214.
- [6] WANG S Y, SUN W J, HU Q, et al. Synthesis and evaluation of pyridinium polyoxometalates as anti-HIV-1 agents [J]. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2017, **27**(11): 2 357-2 359.
- [7] GUAN W M, WANG G X, DING J B, et al. A supramolecular approach of modified polyoxometalate polymerization and visualization of a single polymer chain [J]. *Chem. Commun.*, 2019, **55**(72): 10 788-10 791.
- [8] LI Z L, WANG Y, ZHANG L C, et al. Three molybdophosphates based on Strandberg-type anions and Zn(II)-H₂O subunits: Syntheses, structures and catalytic properties [J]. *Dalton Trans.*, 2014, **43**(15): 5 840-5 846.
- [9] WANG D, LIU L L, JIANG J, et al. Polyoxometalate-based composite materials in electrochemistry: State of the art progress and future outlook [J]. *Nanoscale*, 2020, **12**(10): 5 705-5 718.
- [10] PATEL A, NARKHEDE N, SINGH S, et al. Keggin-type lacunary and transition metal substituted polyoxometalates as heterogeneous catalysts: A recent progress [J]. *Catal. Rev.: Sci. Eng.*, 2016, **58**(3): 337-370.
- [11] NASERI E, KHOSHNAVAZI R. Sandwich type polyoxometalates encapsulated into the mesoporous material: Synthesis, characterization and catalytic application in the selective oxidation of sulfides [J]. *RSC Adv.*, 2018, **8**(49): 28 249-28 260.
- [12] SHETTY D, RAYA J, HAN D S, et al. Lithiated polycalix 4 arenes for efficient adsorption of iodine from solution and vapor phases [J]. *Chem. Mater.*, 2017, **29**(21): 8 968-8 972.
- [13] TANG W Y, ZOU C J, DA C, et al. A review on the recent development of cyclodextrin-based materials used in oilfield applications [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2020, **240**: 11 6321.
- [14] WU Y L, SHI R F, WU Y L, et al. Complexation of polyoxometalates with cyclodextrins [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**(12): 4 111-4 118.
- [15] YANG P, ATSHANKITI B, KHASHAB N M. Intrinsically porous molecular building blocks for metal organic frameworks tailored by the bridging effect of counter cations [J]. *Crystengcomm*, 2020, **22**(17): 2 889-2 894.
- [16] FAN Y X, LU S F, CAO J A. A novel inorganic-organic hybrid complex between polyoxometalate and cyclodextrin: Synthesis, structure and catalytic activity [J]. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2019, **435**: 163-167.
- [17] WANG J, CHEN Y, CHENG N, et al. Multivalent supramolecular self-assembly between beta-cyclodextrin derivatives and polyoxometalate for photodegradation of dyes and antibiotics [J]. *ACS Appl. Bio Mater.*, 2019, **2**(12): 5 898-5 904.
- [18] JIANG Z G, MAO W T, HUANG D P, et al. A nonconventional host-guest cubic assembly based on gamma-cyclodextrin and a Keggin-type polyoxometalate [J]. *Nanoscale*, 2020, **12**(18): 10 166-10 171.
- [19] YANG P, ZHAO W L, SHKURENKO A, et al. Polyoxometalate-cyclodextrin metal-organic frameworks: From tunable structure to customized storage functionality [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, **141**(5): 1 847-1 851.
- [20] NI X L, XIAO X, CONG H, et al. Self-assemblies based on the "outer-surface interactions" of cucurbit [n] urils: New opportunities for supramolecular architectures and materials [J]. *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**(4): 1 386-1 395.
- [21] HWANG I, JEON W S, KIM H J, et al. Cucurbit [7] uril: A simple macrocyclic, pH-triggered hydrogelator exhibiting guest-induced stimuli-responsive behavior [J]. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**(1/2): 210-213.
- [22] BARDELANG D, UDACHIN K A, LEEK D M, et al. Highly symmetric columnar channels in metal-free cucurbit [n] uril hydrate crystals (n=6,8) [J]. *Crystengcomm*, 2007, **9**(11): 973-975.
- [23] FANG X, KOGERLER P, ISAACS L, et al. Cucurbit [n] uril-polyoxoanion hybrids [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**(2): 432-433.
- [24] LIN J X, LU J, YANG H X, et al. Construction of train-like supramolecular structures from decamethylcucurbit [5] uril and iso- or hetero-Keggin-type polyoxotungstates [J]. *Cryst. Growth Des.*, 2010, **10**(4): 1 966-1 970.
- [25] HAN L W, LIN J X, YIN Q, et al. Sandwich-type inorganic-organic hybrid solids of iso-polyvanadate clusters and decamethylcucurbit [5] uril [J]. *Cryst. Growth Des.*, 2016, **16**(3): 1 213-1 217.
- [26] CAO H L, CAI F Y, HUANG H B, et al. Polyoxometalate-cucurbituril molecular solid as photocatalyst for dye degradation under visible light [J]. *Inorg. Chem. Commun.*, 2017, **84**: 164-167.
- [27] LU J, LIN J X, ZHAO X L, et al. Photochromic hybrid materials of cucurbituril and polyoxometalates as photo-

- catalysts under visible light [J]. *Chem. Commun.*, 2012, **48**(5): 669-671.
- [28] CHEN H Y, HOU H T, LIANG Z Y, et al. Coordination of alkali and alkaline-earth metal ions to perhydroxycucurbit [5] uril and formation of supramolecular self-assemblies in the presence of $\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}(4-)$ anions [J]. *Inorg. Chim. Acta*, 2016, **453**: 122-127.
- [29] LI S, XIA W, ZHANG Y Q, et al. Self-assembled tetramethyl cucurbit [6] uril-polyoxometalate nanocubes as efficient and recyclable catalysts for the preparation of propyl gallate [J]. *New J. Chem.*, 2020, **44**(27): 11 895-11 900.
- [30] CHENG N, CHEN Y, ZHANG Y, et al. Cucurbit [7] uril-mediated 2D single-layer hybrid frameworks assembled by tetraphenylethene and polyoxometalate toward modulation of the alpha-chymotrypsin activity [J]. *ACS Appl. Mater. Inter.*, 2020, **12**(13): 15 615-15 621.
- [31] NAGANO O, SASAKI Y. Structure of the hydrated potassium hexamolybdate complex of hexaoxacyclooctadecane (18-crown-6) [J]. *Acta Crystallogr.*, 1979, **35**(10): 2 387-2 389.
- [32] ZHANG Y H, CAO S, LU S F, et al. Supramolecular structural inorganic-organic hybrid (4-bromoanilinium) (18 crown-6) (3) $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ center dot CH_3CN [J]. *Chin. J. Struct. Chem.*, 2018, **37**(8): 1 272-1 278.
- [33] 鲁晓明, 刘顺诚, 刘育, 等. N-对 R 苯基氮杂 15 冠 5 八钼多酸钠超分子配合物的合成与结构 [J]. *化学学报*, 1997, (10): 1 009-1 018.
- [34] 萨如拉, 鲁晓明, 顾新波, 等. $[\text{Na}(\text{DB}_{18}\text{C}_6)(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{W}_6\text{O}_{19}] \cdot (\text{CH}_3\text{CN})_2$ 的合成、晶体结构及谱学表征 [J]. *无机化学学报*, 2007, (6): 1 051-1 054.
- [35] 史旭东, 喻冲, 毕研刚, 等. 苯并 15 冠 5 与钼多酸的组装 [J]. *化学学报*, 2011, **69**(1): 59-64.
- [36] XIONG J, LUO T, ZHANG J, et al. Two supramolecular inorganic-organic hybrid crystals based on Keggin polyoxometalates and crown ethers [J]. *Crystals*, 2018, **8**(2): 17.
- [37] 朱春立, 刘洋, 王晨丽, 等. 一种磷钨杂多酸冠醚型超分子晶体材料的制备及性能研究 [J]. *化学试剂*, 2019, **41**(11): 1 184-1 188.
- [38] WANG P, ZHANG H X, WANG P S, et al. A crown ether supramolecular host-guest complex with Keggin polyoxometalate: Synthesis, crystal structure and electrocatalytic performance for hydrogen evolution reaction [J]. *Catal. Commun.*, 2022, **165**: 106 446.
- [39] MARTINEZ-EDO G, BALMORI A, PONTON I, et al. Functionalized ordered mesoporous silicas (MCM-41): Synthesis and applications in catalysis [J]. *Catalysts*, 2018, **8**(12): 617.
- [40] HUANG T T, CHANG J Y, HE S S, et al. Efficient hydrodesulfurization of 4, 6-dimethyldibenzothiophene via $\text{Ni}_4\text{Mo}_{12}/\text{Al}_2\text{O}_3$ catalysts prepared by a one-step hydrothermal polyoxometalate dispersion method [J]. *Energy Fuels*, 2019, **33**(1): 135-147.
- [41] DI A D, SCHMITT J, DA SILVA M A, et al. Self-assembly of amphiphilic polyoxometalates for the preparation of mesoporous polyoxometalate-titania catalysts [J]. *Nanoscale*, 2020, **12**(43): 22 245-22 257.
- [42] WANG C W, LIU Z, GAO R M, et al. Deep oxidative desulfurization of model fuels catalyzed by polyoxometalates anchored on amine-functionalized ceria doped MCM-41 with molecular oxygen [J]. *New J. Chem.*, 2020, **44**(16): 6 251-6 260.
- [43] 张丽炜. NH-2MIL-101 负载杂多酸复合材料的合成及其在氧化脱硫中的应用 [D]. 天津: 天津大学, 2016.
- [44] KUVAYSKAYA A, GARCIA S, MOHSENI R, et al. Superacidic mesoporous catalysts containing embedded heteropolyacids [J]. *Catal. Lett.*, 2019, **149**(7): 1 983-1 990.
- [45] GHARIB A, PESYAN N N, FARD L V, et al. Catalytic synthesis of dicoumarols using silica-supported preyssler nanoparticles (SPN), $\text{H}_{14}[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}]/\text{SiO}_2$ [J]. *Am. J. Heterocycl. Chem.*, 2015, **1**(2): 21-28.
- [46] AI L M, ZHANG D F, WANG Q, et al. Photocatalytic degradation of textile dye X-3B using $\text{TiW}_{11}\text{Ti}/\text{SiO}_2$ hybrid materials [J]. *Catal. Commun.*, 2019, **126**: 10-14.
- [47] IZUMI Y, ONO M, KITAGAWA M, et al. Silica-included heteropoly compounds as solid acid catalysts [J]. *Microporous Mater.*, 1995, **5**(4): 255-262.
- [48] REYES-LÓPEZ M, PIZARRO-LUNA A, MATA I, et al. Inclusion of $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ and $\text{H}_4\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}$ into a silica gel matrix via "sol-gel" methodology [J]. *J. Chil. Chem. Soc.*, 2017, **62**(1): 3 322-3 324.
- [49] EIDSVAG H, BENTOUBA S, VAJEESTON P, et al. TiO_2 as a photocatalyst for water splitting-an experimental and theoretical review [J]. *Molecules*, 2021, **26**(6): 1 687.
- [50] WU D, CHEN W L, WANG T, et al. Synthesis of copper (II)-imidazole complex modified sandwich-type polyoxometalates for enhancing the power conversion efficiency in dye-sensitized solar cells [J]. *Dyes Pigm.*, 2019, **168**: 151-159.
- [51] WANG X M, CHEN L, CHEN W L, et al. A strategy for utilizing hollow polyoxometalate nanocrystals to improve the efficiency of photovoltaic cells [J]. *Inorg. Chem. Commun.*, 2018, **96**: 73-80.

- [52] PAZHOOH P, KHOSHNAVAZI R, BAHRAMI L, et al. Synthesis and photocatalytic activity assessing of the TiO_2 nanocomposites modified by some lanthanide ions and tin-derivative sandwich-type polyoxometalates [J]. *J. Iran. Chem. Soc.*, 2018, **15**(8): 1 775-1 783.
- [53] WANG Y J, LU K C, FENG C G. Photocatalytic degradation of methyl orange by polyoxometalates supported on yttrium-doped TiO_2 [J]. *J. Rare Earths*, 2011, **29**(9): 866-871.
- [54] CAO Y D, YIN D, WANG M L, et al. Pt-Substituted polyoxometalate modification on the surface of low-cost TiO_2 with highly efficient H₂ evolution performance [J]. *Dalton Trans.*, 2020, **49**(7): 2 176-2 183.
- [55] GHOLAMYAN S, KHOSHNAVAZI R, ROSTAMI A, et al. Immobilized sandwich-type polyoxometalates $\text{Mn}_4(\text{XW}_9\text{O}_{34})(2)(n-)$ on Tb-doped TiO_2 nanoparticles as efficient and selective catalysts in the oxidation of sulfides and alcohols [J]. *Catal. Lett.*, 2017, **147**(1): 71-81.
- [56] KHOSHNAVAZI R, SOHRABI H, BAHRAMI L, et al. Photocatalytic activity inhancement of TiO_2 nanoparticles with lanthanide ions and sandwich-type polyoxometalates [J]. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2017, **83**(2): 332-341.
- [57] BANDYOPADHYAY M, JADAV D, TSUNOJI N, et al. Immobilizaion of preysler type heteropoly acids on siliceous mesoporous supports and their catalytic activities in the dehydration of ethanol [J]. *React. Kinet., Mech. Catal.*, 2019, **128**(1): 139-147.
- [58] JULIAN I, HUESO J L, LARA N, et al. Polyoxometalates as alternative Mo precursors for methane dehydroaromatization on Mo/ZSM-5 and Mo/MCM-22 catalysts [J]. *Catal. Sci. Technol.*, 2019, **9**(21): 5 927-5 942.
- [59] ZHENG M, DING Y, CAO X H, et al. Homogeneous and heterogeneous photocatalytic water oxidation by polyoxometalates containing the most earth-abundant transition metal, iron [J]. *Appl. Catal. B*, 2018, **237**: 1 091-1 100.
- [60] DING J F, MA T L, SHAO R, et al. Gas phase dehydration of glycerol to acrolein on an amino siloxane-functionalized MCM-41 supported Wells-Dawson type $\text{H}_6\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}$ catalyst [J]. *New J. Chem.*, 2018, **42**(17): 14 271-14 280.
- [61] WANG C W, LIU Z, GAO R M, et al. Deep oxidative desulfurization of model fuels catalyzed by polyoxometalates anchored on amine-functionalized ceria doped MCM-41 with molecular oxygen [J]. *New J. Chem.*, 2020, **44**(16): 6 251-6 260.
- [62] HASHEMI F, TAGHIZADEH M, RAMI M D. Polyoxometalate modified SAPO-34: A highly stable and selective catalyst for methanol conversion to light olefins [J]. *Microporous Mesoporous Mater.*, 2020, **295**: 109 970.
- [63] AVRAMIDOU K V, ZACCHERIA F, KARAKOULIA S A, et al. Esterification of free fatty acids using acidic metal oxides and supported polyoxometalate (POM) catalysts [J]. *Mol. Catal.*, 2017, **439**: 60-71.

废弃烟滤嘴制备醋酸纤维素微球及其对 Pb(Ⅱ) 的吸附性能

陈燕敏*, 刘冰, 赵文伯, 卢鑫, 邵冰琪
(郑州师范学院 化学化工学院, 河南 郑州 450044)

摘要:采用双重乳液溶剂挥发法与气体发泡技术相结合的方法将从废弃卷烟滤嘴中再生得到的醋酸纤维素进行改性, 制备出醋酸纤维素多孔微球。通过扫描电镜、氮吸附和压汞法考察了内水相发泡剂用量和搅拌速度对微球形貌、比表面积和孔结构的影响, 并进一步研究了其对重金属 Pb²⁺ 的吸附性能。结果表明: 随发泡剂用量增大, 微球粒径逐渐变大, 比表面积先增大后稍有下降, 由闭孔转化为贯通孔; 随搅拌速度加大, 微球粒径逐渐减小, 比表面积呈增大趋势, 高速搅拌下具有更多的贯通孔结构。静态吸附结果显示, 所制备醋酸纤维素多孔微球对 Pb²⁺ 吸附量可达 57.6 mg/g, 远远优于未采用发泡剂技术所得微球的吸附性能。吸附动力学以及吸附等温实验表明该醋酸纤维素微球对 Pb²⁺ 的吸附符合准二级动力学模型和 Freundlich 吸附等温模型。

关键词:废弃卷烟滤嘴; 回收再生; 醋酸纤维素微球; 吸附; Pb²⁺

中图分类号: TQ352.9 文献标识码: A 文章编号: 0258-3283(2023)02-0083-07

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0671

Preparation of Cellulose Acetate Microspheres from Waste Cigarette Filters and Its Adsorption Properties for Pb²⁺
CHEN Yan-min*, LIU Bing, ZHAO Wen-bo, LU Xin, SHAO Bing-qi (College of Chemistry and Chemical Engineering, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044, China)

Abstract: The cellulose acetate regenerated from waste cigarette filters was modified by the combination of dual emulsion solvent evaporation and gas foaming technology to prepare the cellulose acetate porous microspheres. The effects of the amount of foaming agent and stirring speed on the morphology, surface area and pore structure of the microsphere were investigated by scanning electron microscope (SEM), N₂ adsorption and mercury intrusion porosimetry (MIP). The results showed that the diameter of microsphere gradually increased, the surface area increased at first and then decreased slightly and closed pores transformed to through pores with the adding of foaming agent. With the increment of stirring speed, the diameter of microsphere gradually decreased, and the surface area increased, leading to more through-holes structure appeared under high-speed stirring. The results of static adsorption revealed that the Pb²⁺ adsorption capacity of the cellulose acetate microspheres was up to 57.6 mg/g, which was much better than that of the microspheres without blowing technology. Adsorption kinetics and adsorption isotherm experiments showed that the Pb²⁺ adsorption of cellulose acetate microsphere was compliant with quasi-second-order kinetic model and Freundlich adsorption isothermal model.

Key words: waste cigarette filters; recycling; cellulose acetate microsphere; adsorption; Pb²⁺

随着现代工业的快速发展, 重金属废水已成为造成环境污染最严重的工业废水之一^[1]。其中, Pb 是一种对人体健康造成严重危害的重金属元素, 研究表明人体摄入铅主要滞留在骨骼中, 过量会严重损害大脑, 而当体内铅含量超过 30% 时, 还会造成婴幼儿生长迟缓、智力低下等严重后果^[2]。目前常用的离子交换法、电解法、化学沉淀法等重金属废水处理技术普遍存在工艺复杂、成本高、对低浓度废水处理效果较差的问题^[3]。对比之下, 吸附法则具有适用范围广、反应速度快、可适应不同反应条件、环境友好等优点, 受到了研究者的广泛关注^[4-7]。近年来, 研究较多的吸附材料有活性炭^[8]、沸石^[9]、膨润土^[10]等, 这些吸

附剂对废水中重金属 Pb(Ⅱ) 有一定的去除效果, 但也存在不足, 价格较贵、再生困难, 亦或效果不佳需进行合理改性^[11]。

与非生物物质吸附剂相比, 纤维素^[12]、木质

收稿日期: 2022-09-02; 网络首发日期: 2022-11-08

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(21B150023); 郑州师范学院青年骨干教师培养项目(QNGG-20743)。

作者简介: 陈燕敏(1983-), 女, 河南安阳人, 博士, 副教授, 主要研究方向为水处理技术及材料研发, E-mail: yanminchen2011@163.com。

引用本文: 陈燕敏, 刘冰, 赵文伯, 等. 废弃烟滤嘴制备醋酸纤维素微球及其对 Pb(Ⅱ) 的吸附性能[J]. 化学试剂, 2023, 45(2): 83-89。

素^[13]等生物质基吸附剂含有大量吸附功能基团,对重金属离子有很强的吸附能力和较高吸附容量,而且具有理化性质稳定、无毒无害、可降解再生和廉价易得等特点,这些优势使其成为重金属离子吸附材料领域的一大研究热点^[14-17]。

废弃卷烟滤嘴中的材料是醋酸纤维丝,经过处理后得到再生醋酸纤维素,可用于废水中的重金属处理^[18-20]。但是,由于其可利用的吸附位点少,对重金属离子的去除率相对较低。多孔聚合物微球利用其多孔结构和较大的比表面积,可作为螯合剂载体,克服现有废水处理弊端,并通过调控制备条件、表面修饰等方法达到对重金属离子高选择性、高吸附饱和容量、易脱除富集等目的^[21-24]。

基于以上考虑,本文对从废弃卷烟滤嘴中回收得到的醋酸纤维素多孔微球的制备方式进行了详细探究,并将其作为吸附剂,应用在重金属 Pb^{2+} 的去除上。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

T25 型分散机(德国 IKA 公司);Spectrum BX 型傅里叶红外光谱仪(美国 Perkin Elmer 公司);BX53 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);Inspect F50 型扫描电镜(美国 FEI 公司);Tristar 3020 型自动吸附仪、Autopore IV 9500 型压汞仪(美国

Micromeritics 公司);GGX-610 型火焰原子吸收光谱仪(北京海光仪器有限公司)。

聚乙烯醇(PVA,醇解度 88%)、碳酸氢铵、二氯甲烷、乙酸乙酯、硝酸铅(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);废弃卷烟滤嘴在吸烟室收集而来,取出醋酸纤维素滤芯备用。

1.2 废弃滤嘴醋酸纤维素的再生

将废弃滤嘴的醋酸纤维素滤芯剪断、撕碎后,分别采用乙醇、水浸泡洗涤 3 次,以去除绝大部分吸附于其中的杂质(焦油、烟碱等烟气相关化学成分),干燥后得到再生醋酸纤维素。

1.3 多孔醋酸纤维素微球的制备

多孔微球采用双重乳液溶剂挥发法与气体发泡技术相结合的方法制备^[25]。典型制备过程见图 1:将 5.0 g 再生醋酸纤维素溶解于 100 mL 混合溶剂($m(\text{二氯甲烷}):m(\text{乙酸乙酯})=1:1$)中得到油相(O);将 20.0 mL 溶解有 0.02 wt% PVA 和一定含量(0%~10%)碳酸氢铵的水溶液作为内水相(W1)加入至上述油相中,使用分散机高速乳化 1 min 制得 W1/O 乳液;将上述 W1/O 乳液加入至 800 mL 0.2 wt% PVA 的外水相(W2)中,机械搅拌得到 W1/O/W2 乳液;继续常温搅拌 3 h(搅拌速度 200~400 r/min),挥发有机溶剂,液滴固化得到微球,经过滤、洗涤、干燥后制得醋酸纤维素多孔微球。

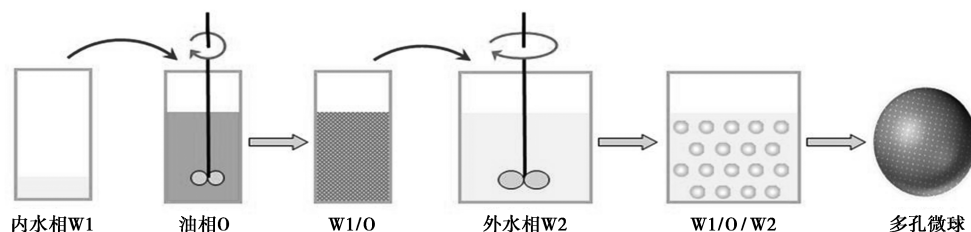


图 1 多孔醋酸纤维素微球的制备示意图

Fig.1 Preparation scheme of porous cellulose acetate microspheres

1.4 吸附性能测试

采用静态吸附法测定了醋酸纤维素多孔微球对 Pb^{2+} 的吸附性能。将 0.05 g 醋酸纤维素微球加入至 100 mL (50 mg/L) Pb^{2+} 水溶液(pH 5.0, $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$)中,150 r/min 振荡吸附 120 min,用滤膜过滤样品后采用火焰原子吸收光谱仪测定吸附后 Pb^{2+} 浓度,由式(1)计算吸附量。

$$q_e = [(c_0 - c_e)/m] \times V \quad (1)$$

式中: q_e 为吸附达到平衡的吸附量,mg/g; c_0 和 c_e 分别为 Pb^{2+} 溶液的初始和平衡质量浓度,mg/L; m 为微球质量,g; V 为 Pb^{2+} 溶液体积,L。

动力学吸附实验:量取 100 mL (50 mg/L) Pb^{2+} 水溶液(pH 5.0, $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$),称取 0.05 g 醋酸纤维素微球置于其中,150 r/min 条件下,振荡 5、10、30、60、90、120、180、240 min 后,分别测定 Pb^{2+} 质量浓度。

等温吸附实验:量取 100 mL 初始质量浓度分别为 10、20、30、50、70、100、200 mg/L 的 Pb^{2+} 溶液(pH 5.0, $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$),均加入 0.05 g 醋酸纤维素微球,150 r/min 条件下振荡吸附 120 min 后,分别测定 Pb^{2+} 质量浓度。

2 结果与讨论

2.1 再生醋酸纤维素制备多孔微球研究

以废弃卷烟滤嘴再生的醋酸纤维素为原料,采用双重乳液溶剂挥发法与气体发泡技术相结合制备了醋酸纤维素微球,FT-IR 谱图见图 2。在 $1\,758\text{ cm}^{-1}$ 处有明显的酯羰基 ($\text{C}=\text{O}$) 伸缩振动峰, $1\,375\text{ cm}^{-1}$ 处为 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 的伸缩振动峰, $1\,237$ 、 $1\,048\text{ cm}^{-1}$ 分别归属于 $\text{C}-\text{O}$ 键和酯基的伸缩振动。

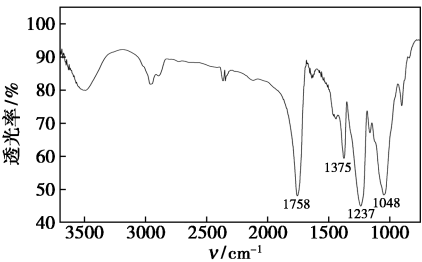


图 2 醋酸纤维素微球的红外谱图

Fig.2 FT-IR spectrum of cellulose acetate microspheres

考察了内水相发泡剂碳酸氢铵的添加量及搅拌速率对微球结构性质的影响。表 1 给出了微球制备条件及其物理结构特性表征结果。

表 1 微球样品制备条件及物理结构特性结果

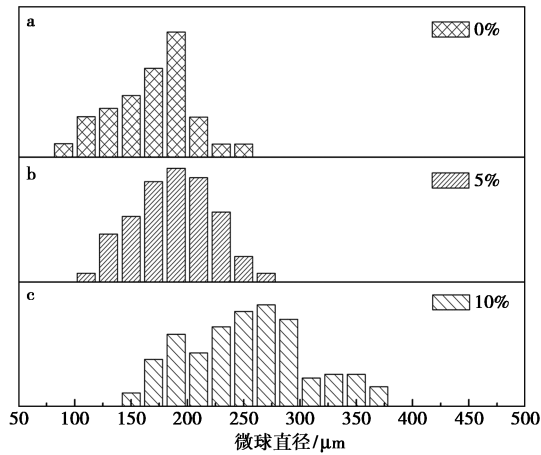
Tab.1 Preparation conditions and physical structure characteristics of microspheres

样品 序号	碳酸氢氨 质量分数/%	搅拌速率/ ($\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)	粒径/ μm	堆积密度/ ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	比表面积/ ($\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)
A1	0	300	168	0.130	2.3
A2	5	300	191	0.066	8.6
A3	10	300	258	0.048	6.5
A4	10	200	299	0.072	3.4
A5	10	400	245	0.027	8.9

2.1.1 内水相发泡剂用量的影响

图 3 为不同发泡剂用量所制备的醋酸纤维素微球尺寸分布图。与未添加发泡剂碳酸氢铵相比,随着内水相发泡剂碳酸氢氨浓度的增大,微球 A1~A3 尺寸从 $168\text{ }\mu\text{m}$ 增大到 $258\text{ }\mu\text{m}$,粒径分布也有所变宽,微球尺寸及堆积密度、比表面积等表征结果列于表 1 中。随着内水相碳酸氢铵浓度的增大,微球 A1~A3 松散堆积密度从 0.130 g/mL 降低至 0.048 g/mL ,比表面积则从 $2.3\text{ m}^2/\text{g}$ 增大至 $8.6\text{ m}^2/\text{g}$ 后又降低至 $6.5\text{ m}^2/\text{g}$ 。在所采用的双重乳液溶剂挥发法与气体发泡技术相结合制备微球过程中,水为致孔剂,碳酸氢铵为发泡剂。碳酸氢铵的发泡作用限制了乳液液滴在固化过程的大幅收缩,从而在存在发泡剂时,所制得的微球尺

寸相对更大,发泡剂碳酸氢铵的用量越大,相应的微球尺寸也越大。由于发泡剂碳酸氢铵的作用,微球内部可形成更多的孔,孔体积增大,因此微球的松散堆积密度也随着发泡剂碳酸氢铵的用量增大而降低。相比未使用发泡剂制备的微球 A1,使用发泡剂制备的微球 A2 和 A3,由于孔数量的增多,微球比表面积也变大;但是由于发泡作用主要产生大孔结构。因此,在更高的发泡剂浓度下(例如 10%),微球 A3 比表面积又稍有降低。



a.A1;b.A2;c.A3

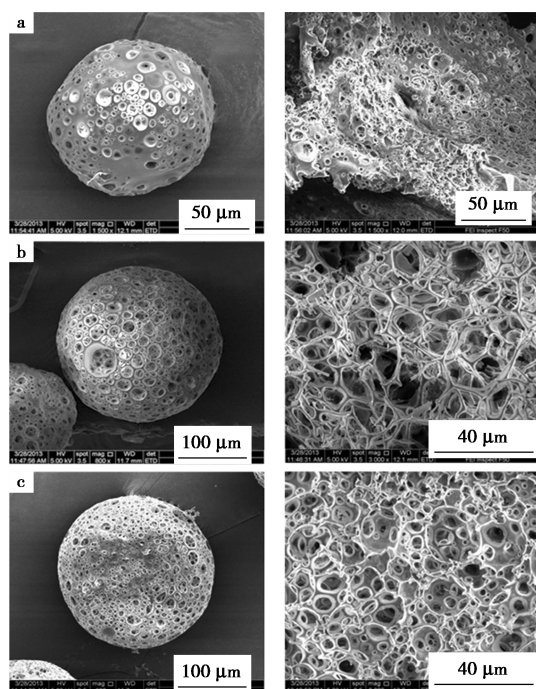
图 3 不同发泡剂用量所制备的醋酸纤维素微球尺寸分布图

Fig.3 Size distribution of cellulose acetate microspheres with different amount of foaming agent

图 4 为内水相采用不同发泡剂用量时所制备的微球 SEM 图。随着内水相发泡剂的添加,微球表面和内部孔结构明显增多,孔结构由闭孔向贯通孔变化。当内水相未添加碳酸氢铵时,内水相的水为致孔剂,在油相溶剂逐渐挥发过程中,随着油相的固化,内水相形成孔结构,因此所制得的微球具有一定数量的孔。但是,由于醋酸纤维素的疏水性,在溶剂挥发过程油水界面逐渐收缩,因此主要形成闭孔结构,内部孔之间贯通性差。当内水相添加碳酸氢铵后,由于碳酸氢铵分解产生二氧化碳而起到发泡作用,碳酸氢铵的发泡作用与内水相的水共同致孔,因此形成更多的孔结构,碳酸氢铵的发泡作用使得孔结构变为贯通孔。

2.1.2 搅拌速度的影响

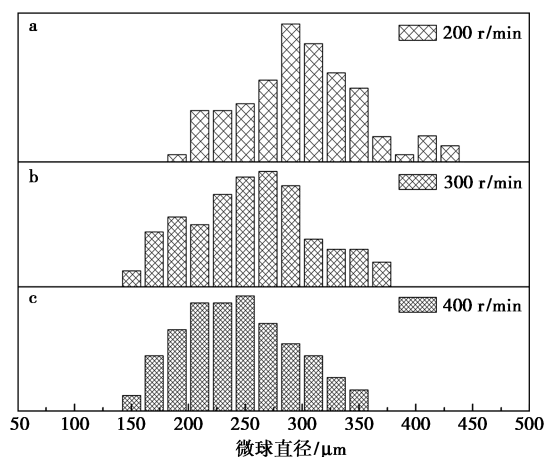
在双重乳液体系,搅拌速度是控制乳液液滴尺寸的一个重要参数。图 5 给出了相同发泡剂 NH_4HCO_3 含量(10%)、不同搅拌速度制备的微球的尺寸分布。随着搅拌速度从 200 r/min 增大到 400 r/min ,微球 A4、A3、A5 尺寸从 $299\text{ }\mu\text{m}$ 降低



a. 碳酸氢铵用量 0%, A1; b. 碳酸氢铵用量 5%, A2;
c. 碳酸氢铵用量 10%, A3

图 4 微球 A1、A2、A3 的 SEM 图

Fig.4 SEM of microspheres A1, A2, A3



a. A4; b. A3; c. A5

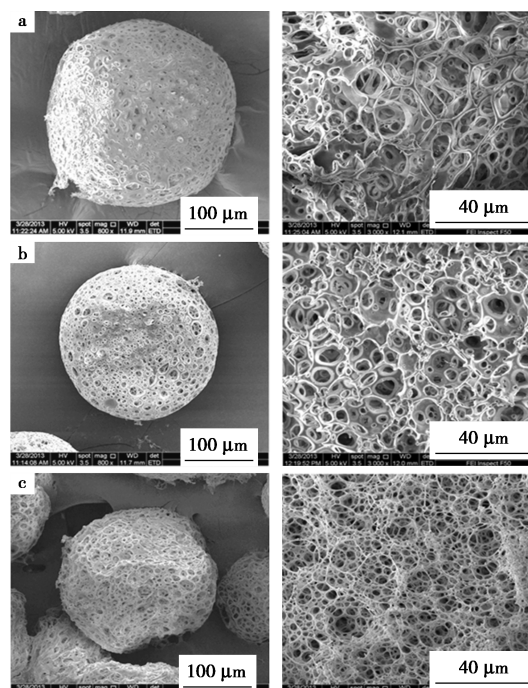
图 5 不同搅拌速率制备的醋酸纤维素微球尺寸分布图

Fig.5 Size distribution of cellulose acetate microspheres with different stirring speed

至 245 μm 。随着搅拌速度的增加,剪切力增强,液滴尺寸降低,因此固化形成的微球尺寸也相应降低。从表 1 可以看出,随着搅拌速度的增大,微球 A4、A3、A5 比表面积从 3.4 m^2/g 逐渐增大到 8.9 m^2/g ,堆积密度从 0.072 g/mL 降低至 0.027 g/mL 。

图 6 是不同搅拌速度制备的微球 SEM 图。

随着外水相搅拌转速的增加,微球表面和内部贯通孔数量增多。随着搅拌速度增加,剪切力增强,有机溶剂移出速度也加快,微球固化速度增大,微球孔结构易于固定,因此微球贯通孔数量增多。从剖面 SEM 图来看,不同搅拌速度制备的微球内部均为贯通的大孔结构,在高搅拌速度下制备的微球具有更多的贯通孔结构。这一研究结果与高搅拌速度制备的微球具有较小的堆积密度和较大的比表面积相一致。



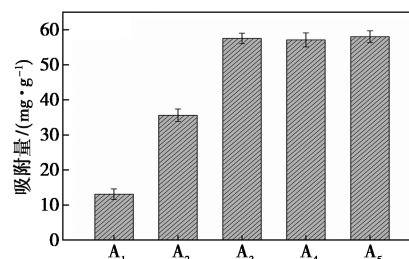
a. 200 r/min, A4; b. 300 r/min, A3; c. 400 r/min, A5

图 6 微球 A4、A3、A5 的 SEM 图

Fig.6 SEM of microspheres A4, A3, A5

2.2 醋酸纤维素多孔微球的吸附性能

采用静态吸附法评价了醋酸纤维素多孔微球对 Pb^{2+} 的吸附性能,结果见图 7。与未添加发泡剂碳酸氢铵的样品(微球 A1)相比,与发泡技术



A₁~A₃ 发泡剂用量分别为 0%、5%、10%,搅拌速率 300 r/min;
A₄ 和 A₅ 发泡剂用量为 10%,搅拌速率分别为 200、400 r/min

图 7 醋酸纤维素多孔微球对 Pb^{2+} 的吸附

Fig.7 Adsorption of cellulose acetate porous microspheres for Pb^{2+}

结合所制备的微球(微球 A2、A3)对 Pb^{2+} 的吸附性能明显提升,吸附量分别达到 35.6 和 57.6 mg/g,明显高于未采用发泡技术所制备的微球(13.1 mg/g)。结合发泡技术所制备的微球具有较多的孔,并且孔结构为大孔结构,有利于离子的扩散和吸附,因此所得微球具有较好的吸附性能。相同发泡剂用量(10%)、不同搅拌速率(200、300、400 r/min)下制备的微球(A4、A3、A5)对 Pb^{2+} 的吸附性能相当。取 A3 微球进行后续的动力学吸附和等温吸附实验。

2.2.1 醋酸纤维素多孔微球对 Pb^{2+} 的吸附动力学

为探究醋酸纤维素微球吸附铅离子的动力学吸附机理,测量吸附时间 5~240 min 的 A3 微球对 Pb^{2+} 的去除影响,结果如图 8 所示。从图中可以看出,不同时间下微球对 Pb^{2+} 的去除是先增加然后达到吸附平衡,其吸附达到平衡的时间为 120 min。其中 0~60 min 内,微球对 Pb^{2+} 的吸附量迅速增加;时间由 60 min 增至 120 min 时,吸附量增大缓慢。这主要是由于在前 60 min,吸附剂含有充足的活性位点,此时溶液中的 Pb^{2+} 与微球中 Pb^{2+} 浓度差较大,有利于溶液中 Pb^{2+} 扩散至微球中,与之形成配合物,所以在吸附初始阶段速率较快;随着吸附反应的进行,微球内吸附位点逐渐被 Pb^{2+} 占据,趋近饱和状态,吸附速率随之下降^[26]。

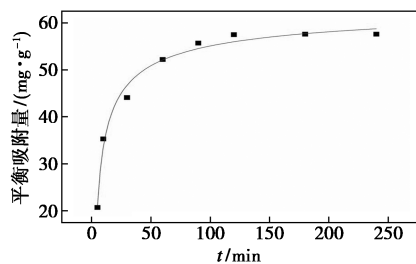


图 8 不同时间下醋酸纤维素多孔微球对 Pb^{2+} 吸附情况

Fig.8 Adsorption capacity of Pb^{2+} on cellulose acetate porous microspheres at different times

吸附动力学包含两种模型,准一级动力学模型和准二级动力学模型^[22]。准一级动力学模型假设吸附为液膜扩散过程,即物理吸附起主导作用,准二级动力学模型假设吸附过程为化学吸附为主导作用,两者的动力学模型方程见式(2)和式(3)。

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - k_1 t \quad (2)$$

$$t/q_t = 1/k_2 q_e^2 + t/q_e \quad (3)$$

式中: q_e 为平衡吸附量拟合值,mg/g; q_t 为 t 时刻吸附量,mg/g; k_1 为准一级吸附速率常数, min^{-1} ; k_2 为准二级吸附速率常数, $\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ 。

采用吸附时间 t 为横坐标, $\log(q_e - q_t)$ 、 t/q_t 为纵坐标进行线性拟合,结果如图 9 所示,从图中可知,醋酸纤维素多孔微球对 Pb^{2+} 的吸附过程更加满足准二级吸附动力学模型,线性相关系数达到 0.999 42,而准一级动力学线性相关系数只有 0.913 08,说明在吸附过程中主要是化学吸附起到主导作用,且准二级模型拟合得到 $q_e = 58.06$ mg/g,与实际平衡吸附量更为接近。

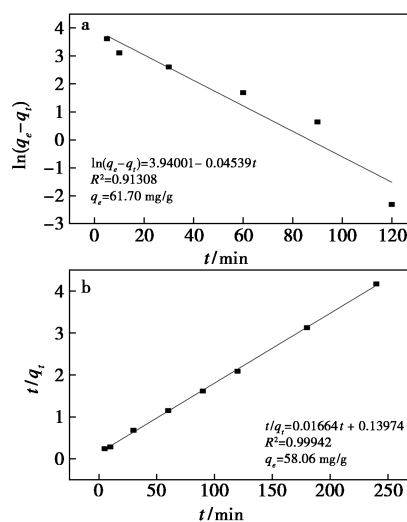


图 9 醋酸纤维素多孔微球对 Pb^{2+} 的准一级(a)、准二级(b)吸附动力学模型拟合

Fig.9 Quasi-first order (a) and quasi-second order (b) adsorption kinetic model fitting of Pb^{2+} on cellulose acetate porous microspheres

2.2.2 醋酸纤维素多孔微球对 Pb^{2+} 的吸附等温线

吸附等温线可反映出吸附剂和被吸附物质之间的作用方式,进一步解释吸附机理^[23]。对于吸附等温方程,有 Langmuir 等温吸附模型和 Freundlich 等温吸附模型,Langmuir 等温吸附模型的假设为单层表面吸附、所有的吸附位均相同、被吸附的粒子完全独立,Freundlich 等温吸附模型假定吸附剂表面性质差异大,吸附位点分布不均匀,常发生多分子层吸附,两者的模型方程分别为式(4)和式(5)。

$$c_e/q_e = 1/q_{\max} k_L + c_e/q_{\max} \quad (4)$$

$$\ln q_e = \ln k_f + \ln c_e/n \quad (5)$$

式中: c_e 为吸附达到平衡时 Pb^{2+} 的质量浓度,mg/L; q_e 和 $q_{\max}$ 分别为平衡时的吸附量和吸附反应过程中所能达到的最大吸

附量, mg/g ; k_L 为结合常数, L/mg ; k_F 为 Freundlich 模型下与吸附容量和吸附强度有关的常数; $1/n$ 为 Freundlich 常数。较大的 k_F 、 n 值是吸附剂具有较好吸附性能的表征。

醋酸纤维素微球对不同初始浓度 Pb^{2+} 的吸附情况见图 10, 从图中可以看出, 微球对 Pb^{2+} 的吸附量和去除率随着 Pb^{2+} 初始浓度的增加呈正相关关系, 并最终达到平衡。

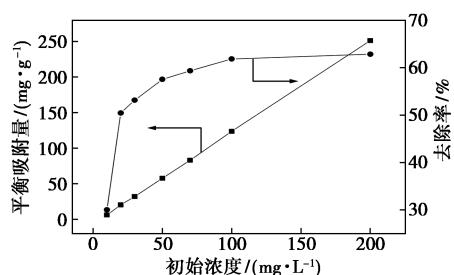


图 10 醋酸纤维素多孔微球与 Pb^{2+} 作用的等温吸附曲线

Fig.10 Isothermal adsorption curves of cellulose acetate porous microspheres with Pb^{2+}

为进一步解释该微球与 Pb^{2+} 的作用机理, 对不同初始浓度的 c_e 和吸附量 q_e 进行了 Langmuir 和 Freundlich 等温吸附模型模拟, 结果如图 11 所示。由图可知, Langmuir 模型基本不成线性关系, 而 Freundlich 模型的相关方程为 $\ln q_e = 1.489 2 \ln c_e - 0.652 08$, 线性相关系数为 0.950 05, 相关系数较高, 所以 Freundlich 等温吸附模型能更好地描述 Pb^{2+} 在醋酸纤维素微球上的吸附过程^[27]。

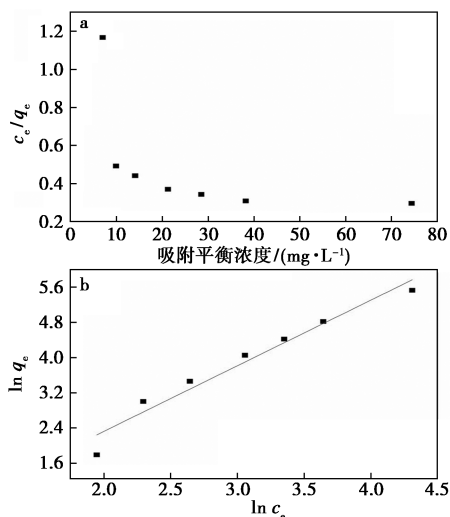


图 11 醋酸纤维素多孔微球对 Pb^{2+} 的 Langmuir (a) 和 Freundlich (b) 吸附等温线模型拟合图
Fig.11 Langmuir (a) and Freundlich (b) adsorption isothermal model fitting of Pb^{2+} on cellulose acetate porous microspheres

3 结论

以废弃卷烟滤嘴为原料, 对醋酸纤维素进行再生处理, 并采用双重乳液溶剂挥发法与气体发泡技术相结合的方法制备了醋酸纤维素多孔微球, 所制备的微球具有贯通的孔结构。结合碳酸氢铵发泡技术后, 微球尺寸增大, 贯通的大孔结构显著增多。静态吸附法评价表明所制备的醋酸纤维素多孔微球对 Pb^{2+} 表现出较好的吸附性能, 吸附量可达 57.6 mg/g 。动力学吸附实验和等温吸附实验反映出该微球对 Pb^{2+} 的吸附符合准二级动力学模型和 Freundlich 等温吸附模型。

参考文献:

- [1] 李红艳. 重金属废水污染治理方法探究[J]. 资源节约与环保, 2020, 16(9): 89-90.
- [2] 杨铁男. 某矿区儿童环境铅暴露健康风险评价及影响因素研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2020.
- [3] 周磊, 周坤. 表面废水的处理方法综述[J]. 云南化工, 2020, 47(6): 21-22.
- [4] 刘义, 张淑琴, 任大军, 等. 不同官能团改性壳聚糖吸附重金属的研究进展[J]. 化学试剂, 2022, 44(4): 495-503.
- [5] 附青山, 张磊, 张伟, 等. 金属-有机框架材料对废水中污染物的吸附研究进展[J]. 材料导报, 2021, 35(11): 11 100-11 110.
- [6] 刘海龙, 郭存彪, 何璐红. 废水中重金属离子吸附材料的研究进展[J]. 化工技术与开发, 2021, 50(3): 51-54.
- [7] 崔静磊, 桂晓光, 王茜. 纤维素改性材料对重金属吸附性能的研究进展[J]. 功能材料, 2021, 52(3): 3 050-3 059.
- [8] 包汉峰, 杨维薇, 张立秋, 等. 污泥基活性炭去除水中重金属离子效能与动力学研究[J]. 中国环境科学, 2013, 33(1): 69-74.
- [9] 左思敏, 荆肇乾, 陶梦妮, 等. 天然沸石和改性沸石在废水处理中的应用研究[J]. 应用化工, 2019, 48(5): 1 136-1 139.
- [10] 程冰冰, 莫伟, 苏秀娟, 等. 膨润土同时去除水中铅、锌、镉、砷及其作用机制研究[J]. 广西大学学报(自然科学版), 2022, 47(2): 526-537.
- [11] BOLISSETTY S, PEYDAYESH M, MEZZENGA R. Sustainable technologies for water purification from heavy metals: Review and analysis[J]. Chem. Soc. Rev., 2019, 48(2): 463-487.
- [12] 张婧, 鲍艳, 王莹. 醋酸纤维素的研究现状及展望[J].

- 当代化工,2021,**50**(8):1 931-1 938.
- [13] 鲁秀国,陈晶.化学改性木质素吸附水中重金属的研究进展[J].化工新型材料,2021,**49**(11):279-282.
- [14] GE Y Y, LI Z L. Application of lignin and its derivatives in adsorption of heavy metal ions in water: A review[J]. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2018, **6**(5): 7 181-7 192.
- [15] 李若男,周丽莎,陈舜胜,等.纤维素纳米纤维及其改性产物吸附重金属的研究进展[J].化工进展,2022, **41**(1):310-319.
- [16] 王光荣,高世霞,于晓锋,等.改性玉米芯对 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 的吸附性能研究[J].轻工学报,2019,**34**(2):56-62.
- [17] 周建军,张欢,何明.纤维素基吸附分离材料研究进展[J].高分子通报,2015,**34**(6):29-36.
- [18] 罗学刚.生物质基重金属吸附材料的制备与应用[M].北京:科学出版社,2012.
- [19] MELO D D, NETO V D S, BARROS F C D, et al. Chemical modifications of lignocellulosic materials and their application for removal of cations and anions from aqueous solutions [J]. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2016, **133**(15): 43 286.
- [20] LIU J F, ZHU G C, WAN P, et al. Current applications of electrocoagulation in water treatment: A review[J]. *Desalin. Water Treat.*, 2017, **74**:53-70.
- [21] 许少凡.多糖基重金属吸附剂的制备及应用[D].广州:华南农业大学,2019.
- [22] JUNG Y, CHOI U S, KO Y G. Nanofibrous spherical cage mimicking a ball of pearl necklaces for super capture of heavy metal ions [J]. *J. Mater. Chem. A*, 2021, **9**(32):17 281-17 291.
- [23] 周慧敏,鲁杰,程意,等.醋酸纤维素的改性及应用研究进展[J].林产化学与工业,2020,**40**(8):1-7.
- [24] 郑学成,颜玉如,罗维,等.CS/PVA 微球的制备及其对重金属离子吸附研究[J].安全与环境工程,2021, **28**(2):196-203.
- [25] 朱建华,舒家才,黄鑫怡.聚烯丙基氯化铵调控的中空多孔磷酸八钙超结构及其对 Pb(Ⅱ) 的吸附特性[J].环境科学学报,2021,**41**(6):2 147-2 155.
- [26] 蒲生彦,王可心,马慧,等.磁性壳聚糖凝胶微球对水中 Pb(Ⅱ) 的吸附性能[J].中国环境科学,2018, **38**(4):1 364-1 370.
- [27] 陈培珍,刘瑞来,赵璠云,等.丁二酸酐接枝纤维素纳米纤维膜及其重金属离子吸附[J].应用化学,2017, **34**(8):891-898.

分离提取技术

编者按: 本栏目由来自福建农林大学的青年编委卢旭副教授组稿,共收录4篇论文,主要涉及天然活性产物提取与分离技术应用及产物活性表征的内容。

传统的有机溶剂已广泛应用于食品资源中各种生物活性成分的提取、分离和纯化,但依然存在提取率低、处理步骤复杂、部分试剂存在毒性等问题。近年来一些新型绿色溶剂(如离子液体、超临界流体等)、新型提取模型(如响应面和神经网络等)与新型提取技术(闪式提取技术、超声微波联用提取技术、生物酶法提取技术等)被开发出来,并应用于提取、分离和纯化食品资源中的各种生物活性成分。提取分离方法的应用已引起医学、药学等领域专家的强烈兴趣,并为化合物结构与活性的基础研究发展作出了重要贡献。

响应面法优化酶法制备薏苡仁寡糖工艺研究

郑舒怡^{1,3,4},左佳昕^{1,3,4},戴鑫^{1,3,4},高淑娟^{1,3,4},张怡^{1,2,3,4},卢旭^{*1,2,3,4}

(1.福建农林大学 食品科学学院,福建 福州 350002;

2.福建省特种淀粉品质科学与加工技术重点实验室,福建 福州 350002;

3.中国-爱尔兰国际合作食品物质学与结构设计研究中心,福建 福州 350002;

4.农业农村部亚热带特色果蔬菌加工重点实验室(部省共建),福建 福州 350002)

摘要:以薏苡仁为原料,选取酶解温度、料液比、 α -淀粉酶添加量以及酶解时间4个因素进行单因素试验,利用响应面法建立数学模型,根据所得模型分析4个因素对寡糖得率的影响,最后对提取工艺进行优化。结果表明最佳工艺条件为:料液比1:16.41(g/mL)、酶添加量0.91 g、酶解时间111.49 min、酶解温度45.46℃,其中对薏苡仁寡糖得率影响最大的因素条件为酶解温度。在该条件下,薏苡仁寡糖得率为33.01%,与模型预测值33.19%接近,该工艺条件切实可行,可用于预测薏苡仁寡糖的提取。

关键词:薏苡仁;寡糖;酶解;响应面;提取过程

中图分类号:TS201.4 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2023)02-0090-08

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0696

Optimization of Enzymatic Preparation of Coix Lacryma Oligosaccharides by Response Surface Methodology ZHENG Shu-yi^{1,3,4}, ZUO Jia-xin^{1,3,4}, DAI Xin^{1,3,4}, GAO Shu-juan^{1,3,4}, ZHANG Yi^{1,2,3,4}, LU Xu^{*1,2,3,4} (1.College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002; 2.Fujian Provincial Key Laboratory of Quality Science and Processing Technology in Special Starch, Fuzhou 350002, China; 3.China-Ireland International Cooperation Centre for Food Material Science and Structure Design, Fuzhou 350002, China; 4.Key Laboratory of Subtropical Characteristic Fruits, Vegetables and Edible Fungi Processing (Co-construction by Ministry and Province), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Firstly, the four factors of enzymatic digestion temperature, material to liquid ratio, α -amylase addition and enzymatic digestion time were selected as the raw material of coix lacryma for the single-factor test. Then using the response surface method to establish a mathematical model. The resulting model was used to analyse the effect of four factors on the oligosaccharide yield, and finally, the extraction process was optimised. According to the experiment results, the optimum process conditions were that the ratio of material and liquid was 1:16.41(g/mL), enzyme addition was 0.91 g, enzymatic digestion time was 111.49 min, and enzy-

收稿日期:2022-09-16;网络首发日期:2022-11-09

基金项目:国家自然科学基金面上基金项目(32172151);福建省对外合作项目(2021H0007);“中爱国际合作食品物质学与结构设计研究中心”项目(KXGH17001);福建农林大学杰出青年科研人才计划项目(xjq201811);福建农林大学科技创新专项基金项目(CXZX2018069, CXZX2019095G, CXZX2020120A)。

作者简介:郑舒怡(2000-),女,福建泉州人,硕士生,主要研究方向为食品加工与营养。

通讯作者:卢旭, E-mail: lxvst@yeah.net。

引用本文:郑舒怡,左佳昕,戴鑫,等.响应面法优化酶法制备薏苡仁寡糖工艺研究[J].化学试剂,2023,45(2):90-97。

matic digestion temperature was 45.46 °C. The enzymatic digestion temperature was the most influential factor on the yield of *coix lacryma* oligosaccharides. Under these conditions, the yield of *coix lacryma* oligosaccharide was 33.01%, which was close to the model prediction of 33.19%. The process conditions were practicable and could be used to predict the extraction of *coix lacryma* oligosaccharide.

Key words: *Coix lacryma*; oligosaccharides; enzymatic digestion; response surface; extraction process

薏苡仁 (*Coix lacryma-jobi* [L] var. *frumentacea* Makino), 又称薏米、米仁等, 是禾本科植物薏苡干燥后的成熟种仁^[1]。我国人工栽培的薏苡仁历史沉淀深厚、覆盖范围广, 主要存在于辽宁、福建、江苏等地区。薏苡仁是传统药食两用植物, 富含营养活性物质, 其中淀粉含量为 59%~72%, 蛋白质含量为 12.2%~16.7%, 脂肪含量为 5.1%~9.4%, 除此外还有类黄酮、多糖等营养物质^[2-4]。自古以来薏苡仁就有益脾、健胃、祛湿等功效。现代功能学研究显示其具有抗肿瘤、减脂降压、调节免疫功能等药理活性, 临床上也将薏苡仁油作为主要原料用于抗癌治疗等药品^[5-7]。

寡糖又称低聚糖, 是由 3~10 个单糖分子通过 α -1,4 糖苷键连接而成的低度聚合糖, 当寡糖本身被吸收时, 会释放相当多的短链脂肪酸, 调节肠腔的酸性环境, 促进肠内矿物质吸收; 同时, 寡糖可以作为原料, 通过葡萄糖苷酶的作用产生麦芽糖, 可以转变成一系列非发酵性低聚糖, 其不易被吸收, 但可被双歧杆菌作用^[8], 有助其繁殖, 有效阻止胃肠中有害微生物进一步增长, 增强机体抵抗力; 寡糖不易被链球菌发酵, 且具有良好的防龋齿功能^[9]; 此外寡糖具有的易降解和成膜性还可用于食品包装^[10]。

寡糖的提取工艺包含酶解法、生物法、溶剂浸提法、超声波辅助法和蒸汽爆破技术等^[11,12]。酶解法与其他的提取工艺相比条件温和、提取率高、成本低, 且可以保持寡糖的功能性。此外微生物发酵法是一种利用酵母在生长过程中不能利用功能性寡糖, 而除去小分子非功能性糖类, 从而对薏苡仁寡糖起到去杂纯化效果^[13]。由于薏苡仁淀粉含量较高, 因此可选用淀粉酶进行提取, 酵母去除单糖和二糖, 运用酶结合微生物发酵的方法, 可以进一步提高提取寡糖的得率和抗消化性能^[14]。目前薏苡仁的提取研究主要集中在蛋白质、淀粉、多糖、油脂方面, 发酵酶解法提取薏苡仁寡糖却鲜有报道, 因此该实验可以为薏苡仁寡糖的综合利用提供依据。

响应面设计法 (Response Surface Method, RSM)

将多元二次回归方法当作工具, 估计函数, 分析对等高线和函数的响应面, 拟合响应面和各因子的函数关系, 可以短期、有效、准确地处理大量数据, 并在食品工艺设计中得到普遍应用^[15]。本研究以薏苡仁为原料, 采用响应面法进行酶解提取寡糖, 挑选最优提取工艺, 优化薏苡仁寡糖得率。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

T6 型紫外-可见分光光度计 (北京市普析通用仪器公司); RE5298A 型旋转蒸发器 (上海市亚荣生化仪器厂); FW177 型中草药粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司); 80 目试验标准筛 (0.2 mm, 上虞市银河测试仪器厂)。

苯酚、95%乙醇、浓硫酸、葡萄糖 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 酵母、 α -淀粉酶 (上海源叶生物科技有限公司, 来源于米曲霉, 比酶活力 $\geq 3\ 500\ \text{U/g}$); 薏苡仁 (福建省三明市杨晨食品有限公司); 实验室用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 酶解提取薏苡仁寡糖的工艺流程

参考文献^[16]的方法制备, 薏苡仁打碎→过 20 目筛→加 5 g 水搅拌→加 0.30 g α -淀粉酶进行酶解→100 °C 灭酶 (10 min)→添加一定量的酵母进行酵解→抽滤→55 °C 进行真空浓缩 (至 1/3 原体积)→加乙醇进行沉降→过滤→真空浓缩 (无醇味为止)→定容至 100 mL→稀释 200 倍 (用 1 mL 定容)→测总糖 (苯酚硫酸法)

工艺要点如下: 1) 酶解: 50 °C 下, 薏苡仁粉水溶液加 α -淀粉酶酶解 30 min, 酶解终点用碘试纸确定。2) 酵母: 在 38~40 °C 的条件下, 加入原料质量 1% 的酵母、2% 的糖、10 倍酵母量的水 (V/W), 经过活化 30~60 min 后进行使用 (即先将 0.05 g 酵母、0.02 g 葡萄糖、1 g 水混合后, 置于 40 °C 中进行复水活化 30 min 添加使用)。3) 醇沉降: 将 5 倍用量的 95% 乙醇加入提取液中, 搅拌, 于 4 °C 的条件下进行沉降过夜 (>8 h)。

1.2.2 薏苡仁寡糖含量的测定

6 支具塞试管 (进行编号)→分别加入 0.2、

0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 对照品溶液→加 2 mL 水→加 1 mL 6% 苯酚→摇至均匀→加 5 mL 浓硫酸→摇至均匀→静放 10 min→水浴 (40 ℃, 15 min)→冷却 (至室温)→测 OD 值 (490 nm)。结果得标准曲线公式为: $A = 12.818C + 0.004$, 用该吸光度计算样品中的寡糖含量和寡糖得率。

$$\text{寡糖得率}(\%) =$$

$$\frac{\text{葡萄糖浓度} \times \text{定容体积} \times \text{稀释倍数}}{\text{样品质量} \times 1000}$$

测试时取 2 mL 稀释样液、1 mL 6% 苯酚、5 mL 浓硫酸, 冷却, 于 490 nm 波长下测吸光度值。

1.3 单因素试验设计

称取 5 g 薏苡仁干粉, 固定 α -淀粉酶添加量 0.3 g、酶解时间 30 min、酶解温度 50 ℃, 分别采用 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60 (g/mL) 料液比, 按 1.2.1 和 1.2.2 中的方法提取样品溶液并测定其吸光度, 考察不同的料液比对寡糖得率的影响。

称取 5 g 薏苡仁干粉, 固定料液比 1:30 (g/mL)、酶解时间 30 min、酶解温度 50 ℃, 分别采用 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70、0.80、0.90、1.00 g 的酶添加量, 按 1.2.1 和 1.2.2 中的方法提取样品溶液并测定其吸光度, 考察不同的酶添加量对寡糖得率的影响。

称取 5 g 薏苡仁干粉, 固定料液比为 1:30 (g/mL)、 α -淀粉酶添加量为 0.3 g、酶解温度 50 ℃, 分别采用 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120 min 的酶解时间, 按 1.2.1 和 1.2.2 中的方法提取样品溶液并测定其吸光度, 考察不同的酶解时间对寡糖得率的影响。

称取 5 g 薏苡仁干粉, 固定料液比 1:30 (g/mL)、 α -淀粉酶添加量 0.3 g、酶解时间 30 min, 分别采用 25、35、45、55、65、75、85、95 ℃ 的酶解温度, 按 1.2.1 和 1.2.2 中的方法提取样品溶液并测定其吸光度, 考察不同的酶解温度对寡糖得率的影响。

1.4 Box-Behnken 响应面试验设计

试验设计见表 1。

表 1 响应面因素设计

Tab.1 Responsive design of surface factors

	A	B	C	D
	料液比/ (g·mL ⁻¹)	酶添加量/ g	酶解时间/ min	酶解温度/ ℃
-1	1:10	0.8	80	40
0	1:20	0.9	100	45
1	1:30	1.0	120	50

1.5 数据处理

各试验做 3 次平行, 结果取平均值; 分别利用 DPS 7.05、origin2018、Design Expert 8.0 软件, 对试验数据进行分析, 绘图和建立响应面模型。

2 结果与讨论

2.1 单因素对测定薏苡仁中寡糖得率的影响

2.1.1 不同料液比对薏苡仁寡糖得率的影响

从图 1 可以看出, 寡糖得率随料液比提升而上升, 可能是料液比提高, 传质推动力上升, 寡糖扩散过程增快^[17]; 当其超过 1:20 (g/mL) 后, 寡糖得率下降并逐渐趋于稳定, 这可能由于酶与底物接触机会减少、细胞壁降解减弱, 寡糖扩散减慢, 并且料液比过大也会浪费溶剂不利实际生产以及后续浓缩, 所以将料液比控制在 1:20 (g/mL) 最适宜。

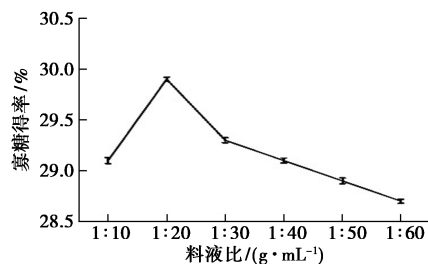


图 1 料液比对薏苡仁寡糖得率的影响

Fig.1 Impact of material to liquid ratios on the yield of oligosaccharides from *Coix lacryma*

2.1.2 不同酶添加量对薏苡仁寡糖得率的影响

由图 2 可知, 随着酶添加量的增加, 薏苡仁寡糖的得率稳步上升, 在酶添加量为 0.9 g 时达到峰值, 后寡糖得率呈现下降趋势, 水解程度的增加可能使寡糖含量达到饱和状态, 小分子低聚糖的水解属于多链式反应, 水解到一定程度后低聚糖的水解速度变慢甚至有些低聚糖不能水解^[18], 所以 α -淀粉酶添加量为 0.9 g 最适宜。

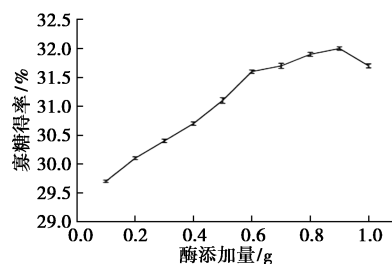


图 2 酶添加量对薏苡仁寡糖得率的影响

Fig.2 Impact of enzyme adding amounts on the yield of oligosaccharides from *Coix lacryma*

2.1.3 不同酶解时间对薏苡仁寡糖得率的影响

由图 3 可知,随酶解时间延长,薏苡仁寡糖得率逐步递增,但是当超过 100 min 后,寡糖得率逐渐趋于稳定,时间太短会提取不充分,甚至酶活性没被激活,时间增长薏苡仁颗粒已经充分溶胀,寡糖也得到充分溶出,但是时间的延长,部分溶液中的游离氨基酸可能与寡糖进行美拉德反应,使溶液变深^[19],寡糖得率也会因此受到不良的影响,故酶解时间为 100 min 最适宜。

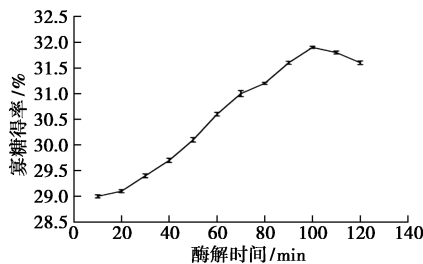


图 3 酶解时间对薏苡仁寡糖得率的影响

Fig.3 Impact of enzymatic digestion times on the yield of oligosaccharides from *Coix lacryma*

2.1.4 不同酶解温度对薏苡仁寡糖得率的影响

从图 4 可知,酶解温度递增的同时,薏苡仁寡糖的得率逐步升高,45 ℃ 为峰值,每种酶都有特定的最适温度范围,在此范围内酶活性与温度成正比,进一步促进体系的热运动,寡糖的得率增大,但是温度过高会破坏寡糖和酶结构,导致酶变性甚至失活,而且温度过高产品的品质也会有所下降^[12],故 45 ℃ 为最适宜酶解温度。

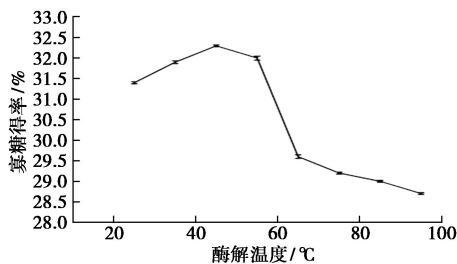


图 4 酶解温度对薏苡仁寡糖得率的影响

Fig.4 Impact of enzyme solution temperature on the yield of oligosaccharides from *Coix lacryma*

2.2 响应面法优化薏苡仁寡糖提取的工艺条件

2.2.1 Box-Behnken 响应面试验结果

单因素试验分析结果显示,4 个因素对薏苡仁寡糖得率均有显著的影响效果。在此基础上,通过响应面探索薏苡仁寡糖提取的最佳条件^[20],响应面试验设计及结果见表 2。

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Tab.2 Box-Behnken experimental design and results

试验号	A 料液比/ (g·mL ⁻¹)	B 酶添加量/ g	C 酶解时间/ min	D 酶解温度/ ℃	得率/%
1	-1	-1	0	0	31.435 9
2	1	-1	0	0	31.222 3
3	-1	1	0	0	32.072 4
4	1	1	0	0	31.859 3
5	0	0	-1	-1	29.897 3
6	0	0	1	-1	30.290 3
7	0	0	-1	1	30.499 1
8	0	0	1	1	31.298 3
9	-1	0	0	-1	30.472 3
10	1	0	0	-1	30.298 7
11	-1	0	0	1	31.198 3
12	1	0	0	1	30.953 2
13	0	-1	-1	0	31.560 3
14	0	1	-1	0	31.793 1
15	0	-1	1	0	31.601 2
16	0	1	1	0	32.193 2
17	-1	0	-1	0	32.342 1
18	1	0	-1	0	32.152 3
19	-1	0	1	0	32.755 2
20	1	0	1	0	32.555 1
21	0	-1	0	-1	28.351 2
22	0	1	0	-1	28.951 2
23	0	-1	0	1	29.153 1
24	0	1	0	1	29.701 2
25	0	0	0	0	33.227 6
26	0	0	0	0	32.906 9
27	0	0	0	0	33.294 8
28	0	0	0	0	32.993 8
29	0	0	0	0	32.955 2

2.2.2 模型方差分析

以薏苡仁中寡糖得率为响应值,进行多元回归分析拟合,得到回归方程: $Y = 33.08 - 0.10A + 0.27B + 0.20C + 0.38D + 1.25 \times 10^{-4} AB - 2.575 \times 10^{-3} AC - 0.018AD + 0.090BC - 0.013BD + 0.10CD - 0.15A^2 - 1.33B^2 - 0.20C^2 - 2.43D^2$,回归模型方差分析结果见表 3。

从表 3 可以看出 P 值、失拟差 P 值、拟合结果用系数(R^2)、修正的关联系数(R^2_{Adj})、预测修正的关联系数(R^2_{Pred})和变化系数(CV)。回归模型 P 值小于 0.000 1<0.01,表明回归模型极显著,且其失拟差 P 值为 0.099 7>0.05,表明该模型有较高的拟合度,可以用来分析薏苡仁寡糖提取的工

表 3 回归模型的方差分析^注
Tab.3 Regression model analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	标准误差	95%置信限		F 值	P 值	显著性
					低	高			
模型	48.86	14	3.49	0.14	32.78	33.37	37.4	<0.000 1	* *
A	0.13	1	0.13	0.088	-0.29	0.086	1.36	0.262 6	
B	0.88	1	0.88	0.088	0.081	0.46	9.41	0.008 4	* *
C	0.5	1	0.5	0.088	0.015	0.39	5.36	0.036 4	*
D	1.72	1	1.72	0.088	0.19	0.57	18.42	0.000 7	* *
AB	0.000 000 062 5	1	0.000 000 062 5	0.15	-0.33	0.33	0.000 000 669 7	0.999 4	
AC	0.000 026 52	1	0.000 026 52	0.15	-0.33	0.33	0.000 284 2	0.986 8	
AD	0.001 278	1	0.001 278	0.15	-0.35	0.31	0.014	0.908 5	
BC	0.032	1	0.032	0.15	-0.24	0.42	0.35	0.566 0	
BD	0.000 670 8	1	0.000 670 8	0.15	-0.34	0.31	0.007 188	0.933 6	
CD	0.041	1	0.041	0.15	-0.23	0.43	0.44	0.517 0	
A ²	0.14	1	0.14	0.12	-0.41	0.11	1.53	0.236 2	
B ²	11.41	1	11.41	0.12	-1.58	-1.07	122.26	<0.000 1	* *
C ²	0.25	1	0.25	0.12	-0.45	0.061	2.67	0.124 7	
D ²	38.3	1	38.3	0.12	-2.69	-2.17	410.42	<0.000 1	* *
残差	1.31	14	0.093						
失拟项	1.19	10	0.12				3.93	0.099 7	
纯误差	0.12	4	0.03						
总离差	50.17	28							
$R^2=0.974$ $R^2_{Adj}=0.947\ 9$ $CV=0.97$ $R^2_{Pred}=0.860\ 1$									

注: * * 表示为极显著, * 表示为显著。

艺参数。 R^2 较高并不表示该模型为可靠的回归模型, R^2 也会增加模型中的变量, 它与变量没有显著相关性。因此, 可以选用 R^2_{Adj} 用于评估模型的可靠性。若项数或样本容量不够大, R^2_{Adj} 将明显小于 R^2 。从表 3 可知, R^2_{Adj} 略小于 R^2 , R^2_{Pred} 和 R^2_{Adj} 之间存在的差异 ≤ 0.12 , 因此它们处于合理的波动范围内^[20]。 CV 表示标准误差与试验观察平均值的比值, 以评估模型的再现性。若 CV 大于 10, 则平均值的变化程度太高, 该模型的可靠性低^[21]; 若 CV 值较低, 则表明平均值偏差程度较低, 从而表明试验结果的可靠性高, 由表 3 中的 CV 值可知该模型准确可靠。

F 越大, 该因子作用效果越显著。通过表 3 可以看出, 各因子影响程度为 $D > B > C > A$ 。偏回归系数中 B、D 为极显著, C 为显著, 说明酶添加量、酶解温度对结果有极显著作用效果, 酶解时间有显著作用效果; 交互项均为不显著 ($P > 0.05$) 说明交互项无显著作用效果; 二次项中 B^2 、 D^2 的偏回归系数极显著, 表明酶添加量、酶解温度对薏苡仁寡糖得率影响不存在简单的线性关系。

2.2.3 响应面结果分析

响应面图是由响应值与各因子通过多元线性回归方程构成的曲面图, 其坡度可以体现这一因子的作用程度, 相互作用曲线越陡峭, 则说明该因子对薏苡仁寡糖得率的影响越大, 同时对于反应值的改变幅度越大^[11,22]。变量间的交互作用程度可以通过其形状看出, 其中椭圆形、马鞍形表示交互作用较强, 而圆形则相反, 极值存在的条件则在圆心处。

由图 5 可知, 在酶添加量 0.9 g、酶解温度 45 ℃ 时, 薏苡仁寡糖得率达峰值, 而后随酶添加量、酶解温度推移, 薏苡仁寡糖得率减少。由图 6 可知, 在酶解时间 104 min、酶解温度 45 ℃ 时, 寡糖的得率达峰值, 之后随酶解时间、酶解温度的增加, 薏苡仁寡糖得率下降。图 7 可知, 在酶添加量为 0.9 g、酶解时间在 104 min 时, 薏苡仁寡糖得率达峰值, 之后随酶添加量、酶解时间的推移, 薏苡仁寡糖得率减少。

从图 5~7 可以看出, 倘若另外 3 个因子不变, 寡糖产量将随着时间的推移逐渐增加, 表现为等高线之间的差距扩大, 但趋势拐点不明显, 相互

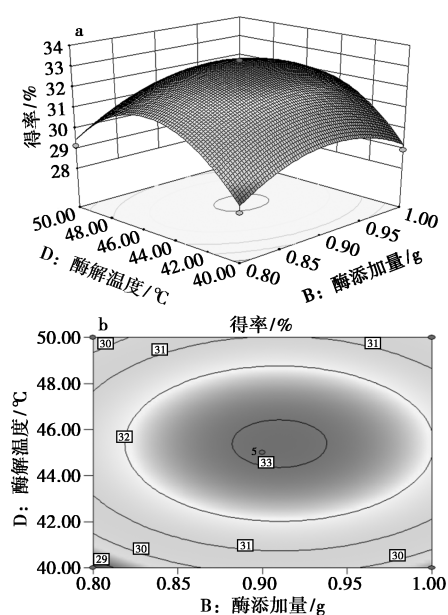


图 5 酶解温度、酶添加量对薏苡仁寡糖得率影响的响应面图(a)和等高线图(b)

Fig.5 Response surface graph (a) and contour graph (b) of enzyme solution temperature and the enzyme adding amounts on the yield of *Coix lacryma* oligosaccharides

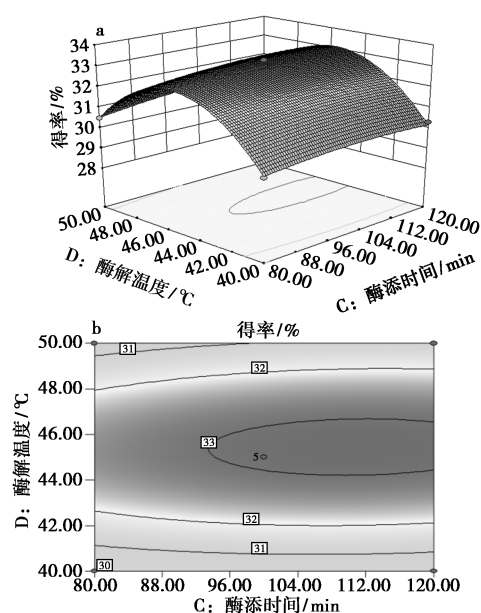


图 6 酶解温度、酶解时间对薏苡仁寡糖得率影响的响应面图(a)和等高线图(b)

Fig.6 Response surface plot (a) and contour plot (b) of the effect of enzyme solution temperature and enzymatic digestion time on the yield of *Coix lacryma* oligosaccharides

叠加的影响不显著,表明酶解时间对薏苡仁寡糖的得率影响无明显变化,酶添加量、酶解温度的趋势拐点较为明显,坡度较陡峭,颜色较深,对薏苡

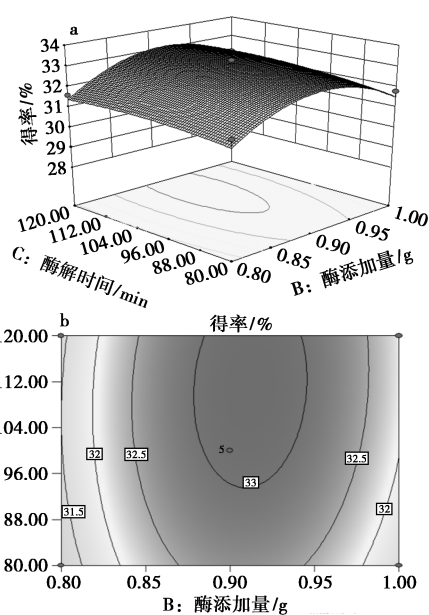


图 7 酶添加量、酶解时间对薏苡仁寡糖得率影响的响应面图(a)和等高线图(b)

Fig.7 Response surface plot (a) and contour plot (b) of the effect of enzyme adding amounts and enzymatic digestion time on the yield of *Coix lacryma* oligosaccharides

仁寡糖的得率有显著作用。从图 5~7 和表 3 能够看出,3 个因子之间的交互作用均不显著 ($P > 0.05$)。

2.2.4 验证试验

通过解回归方程可得最好的提取条件为料液比 1:16.41 (g/mL)、酶添加量 0.91 g、酶解时间 111.49 min、酶解温度 45.46 °C 时,此时薏苡仁寡糖的理论得率为 33.1862%。为了验证该回归模型的可靠性,调整实际试验参数为料液比 1:16 (g/mL)、酶添加量 0.9 g、酶解时间 111 min、酶解温度 45 °C 时,重复 3 次试验,得到得率平均值为 33.009 2%,与理论值基本一致,说明该模型准确可靠。

本研究所得的薏米仁寡糖与香菇寡糖 (1.07%)^[23] 和胡萝卜寡糖 (3.6%)^[24] 相比含量较高,可能是因为薏苡仁含有较多的寡糖,酶解法促进了薏苡仁寡糖的生成。采用不同提取方法,糖的提取率也会有所变化,孙海等^[25] 通过酶解发酵法提取毛木耳多糖得率为 3.59%,大于回流提取工艺 (1.4%),同时减少了乙醇的用量,可能是由于酵母发酵与糖分解产生乙醇和气体,增大渗透压,使组织蓬松细胞壁破裂,多糖溶出更充分^[26]。Li 等^[27] 用酶解结合发酵方法提取藻酸盐寡糖得率与 Hu 等^[28] 采用酸水解法相当,但酶解

法投入少、能耗低,并且酵母可以提高酶的分泌和活性,寡糖的纯度在发酵后也由 30.5% 提升至 92.3%。Chen 等^[29]用盐酸提取 agaro 寡糖得率为 19.28%,Seo 等^[30]使用琼脂酶水解得率为 44.8%,并且由于酶的专一性,避免酸解无法纯化 agaro 寡糖的缺点^[31],在许多寡糖提取试验中酶法提取已成为温和提取方法的首选。本研究用酶法结合酵母发酵的方法提取薏苡仁寡糖与薛亚茹等^[32]使用的超声波辅助提取法相比得率明显升高,可能是淀粉受到 α -淀粉酶的酶解或者酵母酵解促进寡糖形成(可能包括麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖等),从而进一步提高寡糖产量。因此发酵酶解法能够有效地提高薏米寡糖得率,对工业化应用具有指导价值。

3 结论

本文建立响应面二次多项式模型,优化酶解发酵提取薏苡仁寡糖工艺,并对各因素间的交互作用进行研究,得出各因子影响程度为:酶解温度>酶添加量>酶解时间>料液比;最佳提取条件为料液比 1:16.41(g/mL)、酶添加量 0.91 g、酶解时间 111.49 min、酶解温度 45.46 °C 时,薏苡仁寡糖的理论得率为 33.186 2%;实际测得寡糖得率为 33.009 2%,与理论值基本一致,说明模型准确可靠。酶解发酵法可以有效地破坏细胞壁,分离蛋白质、纤维等其他物质,促进淀粉酶解,使薏苡仁寡糖更好地溶出,并且酶解条件温和,可以有效地保持薏苡仁寡糖的活性,该提取工艺可以为进一步深入研究薏苡仁寡糖提供参考依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] LIU X, ZHANG X, RONG Y Z, et al. Rapid determination of fat, protein and amino acid content in coix seed using near-infrared spectroscopy technique [J]. *Food Anal. Method.*, 2015, **8**(2): 334-342.
- [3] WANG L, CHEN J, XIE H, et al. Phytochemical profiles and antioxidant activity of adlay varieties [J]. *J. Agr. Food Chem.*, 2013, **61**(21): 5 103-5 113.
- [4] 王辰, 刘虹, 陈雁, 等. 薏苡仁的营养成分和生物活性研究进展 [J]. *农产品加工*, 2019, **6**: 62-65.
- [5] LU X, LIU W, WU J, et al. A polysaccharide fraction of adlay seed (*Coix lachryma-jobi* L.) induces apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, 2013, **430**(2): 846-851.
- [6] TAKAHASHI M, KONNO C, HIKINO H. Isolation and hypoglycemic activity of coixans A, B and C, glycans of coix lachryma-jobi var. ma-yuen seeds [J]. *Planta Med.*, 1986, **52**(1): 64-65.
- [7] 高微微, 赵杨景, 何春年. 我国薏苡属植物种质资源研究概况 [J]. *中草药*, 2006, **2**: 293-295.
- [8] GOPAL P K, PRASAD J, GILL H S. Effects of the consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10TM) and galacto-oligosaccharides on the microflora of the gastrointestinal tract in human subjects [J]. *Nutr. Res.*, 2003, **23**(10): 1 313-1 328.
- [9] KAMASAKA H, INABA D, MINAMI K, et al. Production and application of phosphoryl oligosaccharides prepared from potato starch [J]. *Trends Glycosci. Glycotech.*, 2010, **15**(82): 75-89.
- [10] 石洁, 王雪嵘, 徐朝阳. 食品包装用壳聚糖薄膜的研究进展 [J]. *包装工程*, 2022, **43**(3): 42-50.
- [11] 张梓原, 徐伟, 王鑫, 等. 黄精多糖的提取工艺对比研究 [J]. *包装工程*, 2020, **41**(9): 51-58.
- [12] 赵华, 樊龙星, 张朝正. 响应面法优化组成型壳聚糖酶解条件 [J]. *中国酿造*, 2020, **39**(1): 165-169.
- [13] YOON S H, MUKERJEA R, ROBYT J F. Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation [J]. *Carbohydr. Res.*, 2003, **338**(10): 1 127-1 132.
- [14] 张瑞瑶, 曾洁, 李华, 等. 香蕉低聚糖提取分离研究进展 [J]. *食品科技*, 2017, **42**(6): 205-211.
- [15] REN W X, CHEN H B. Finite element model updating in structural dynamics by using the response surface method [J]. *Eng. Struct.*, 2010, **32**(8): 2 455-2 465.
- [16] 涂明锋, 叶文峰. 响应面法优化酵母发酵法提取车前子多糖工艺 [J]. *中国食品添加剂*, 2018, **9**: 122-128.
- [17] LIU B P, QUAN C X, HUANG X B, et al. Optimization of ethanol extraction of tea saponin using response surface methodology [J]. *China Oils Fats*, 2013, **38**(6): 84-86.
- [18] 李凡. 滨海白首乌酵素的制备及其功效性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- [19] 卢旭, 张帅, 林珊, 等. 莲子低聚糖提取工艺优化及其组分分析 [J]. *热带作物学报*, 2015, **36**(4): 813-820.
- [20] MARAN J P, SIVAKUMAR V, SRIDHAR R, et al. Development of model for barrier and optical properties of tapioca starch based edible films [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2013, **92**(2): 1 335-1 347.

- [21] DRAPER N R. Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments [J]. *J. Stat. Plan. Infer.*, 1997, **59**(1): 185-186.
- [22] MONTGOMERY D C. Design and analysis of experiments [M]. John Wiley & Sons, 2017.
- [23] 王玖玖, 施永生, 孙晓红, 等. 香菇寡糖提取及分离纯化研究 [J]. 价值工程, 2017, **36**(15): 170-174.
- [24] 信维平. 胡萝卜寡糖的提取与应用的研究 [J]. 粮油加工, 2009, (12): 3.
- [25] 孙海, 黄荣. 毛木耳多糖复合酶解-酵母发酵产业化提取工艺研究 [J]. 食用菌, 2019, **41**(4): 4.
- [26] ALAM N, AMIN R, KHAN A, et al. Nutritional analysis of cultivated mushrooms in bangladesh-pleurotus ostreatus, pleurotus sajor-caju, pleurotus florida and calocybe indica [J]. *Mycobiology*, 2008, **36**(4): 228-232.
- [27] LI S Y, WANG Z P, WANG L N, et al. Combined enzymatic hydrolysis and selective fermentation for green production of alginate oligosaccharides from *Laminaria japonica* [J]. *Bioresource Technol.*, 2019, **281**: 84-89.
- [28] HU T, LI C, ZHAO X, et al. Preparation and characterization of guluronic acid oligosaccharides degraded by a rapid microwave irradiation method [J]. *Carbohydr. Res.*, 2013, **373**: 53-58.
- [29] CHEN H M, LI Z, YAN X J. The preparation and bioactivity research of agaro-oligosaccharides [J]. *Food Biotechnol.*, 2005, **19**(3): 227-246.
- [30] SEO Y B, LU Y, CHI W J, et al. Heterologous expression of a newly screened β -agarase from *Alteromonas* sp. GNUM1 in *Escherichia coli* and its application for agarose degradation [J]. *Process Biochem.*, 2014, **49**(3): 430-436.
- [31] JIANG C, CHENG D, LIU Z, et al. Advances in agaro-oligosaccharides preparation and bioactivities for revealing the structure-function relationship [J]. *Food Res. Inter.*, 2021, **145**: 110 408.
- [32] 薛雅茹, 操然, 卢旭, 等. 响应面法优化超声波辅助提取薏苡仁低聚糖工艺的研究 [J]. 热带作物学报, 2017, **38**(3): 365-371.

红毛藻不同乙醇浓度提取物的生物活性及其成分分析

常高萍¹, 林巧燕¹, 张敏¹, 郭佳瑄¹, 李志朋^{*1,2,3,4}, 杜希萍^{1,2,3,4}, 姜泽东^{1,2,3,4}

(1.集美大学 海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021;

2.福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021;

3.厦门市食品与生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021;

4.厦门南方海洋研究中心海藻资源化利用与深加工重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要:为了探究红毛藻乙醇提取物活性成分及其功能活性,使用不同浓度乙醇溶液提取红毛藻,并测定不同浓度乙醇溶液提取物中的总多酚、总生物碱、总黄酮含量。通过研究胰脂肪酶、酪氨酸酶、乙酰胆碱酯酶抑制活性和 DPPH 自由基清除能力来评价不同浓度乙醇溶液提取红毛藻的活性差异。通过 LC-MS/MS 技术完成红毛藻乙醇提取物中的多酚鉴定。结果表明,红毛藻不同乙醇浓度提取物均具有 DPPH 清除能力以及酪氨酸酶、胰脂肪酶、乙酰胆碱酯酶抑制活性,乙醇浓度不同,其提取物生物活性不同,总多酚、总黄酮、总生物碱含量不同;其中 100% 乙醇浓度提取物总多酚、总黄酮和总生物碱含量最高,具有较强的 DPPH 清除能力和酪氨酸酶抑制活性。同时结果还表明,总多酚和总黄酮含量与酪氨酸酶抑制活性和 DPPH 清除能力均具有极显著相关性。LC-MS/MS 结果显示红毛藻 100% 乙醇提取物中含有 37 种多酚类化合物。

关键词:红毛藻;生物活性;成分分析;相关性分析;LC-MS/MS

中图分类号:TS201.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2023)02-0098-08

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0718

Bioactivity and Component Analysis of Different Ethanol Concentration Extracts from *Bangia fuscopurpurea* CHANG Gao-ping¹, LIN Qiao-yan¹, ZHANG Min¹, GUO Jia-huan¹, LI Zhi-peng^{*1,2,3,4}, DU Xi-ping^{1,2,3,4}, JIANG Ze-dong^{1,2,3,4} (1. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China; 3. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, China; 4. Key Laboratory of Systemic Utilization and In-depth Processing of Economic Seaweed of Southern Ocean Technology Center of Xiamen, Xiamen 361021, China)

Abstract: For exploring the active constituents and functions of ethanol extracts from *Bangia fuscopurpurea*, the contents of total polyphenols, alkaloids and flavonoids were determined. The inhibitory effects of pancreatic lipase, tyrosinase and acetylcholinesterase and DPPH free radical scavenging were evaluated. The identification of polyphenols in ethanolic extracts of *B. fuscopurpurea* was completed by LC-MS/MS. The results showed that different ethanol concentration extracts from *B. fuscopurpurea* had different DPPH scavenging ability, tyrosinase, pancreatic lipase and acetylcholinesterase inhibitory activity, and different contents of total polyphenols, flavonoids, alkaloids. 100% ethanol extract from *B. fuscopurpurea* had the highest contents of total polyphenols, flavonoids, alkaloids, and stronger DPPH scavenging ability and tyrosinase inhibitory activity. Correlation analysis showed that the contents of total polyphenols and flavonoids were significantly correlated with tyrosinase inhibitory activity and DPPH scavenging ability. LC-MS/MS results revealed 37 polyphenolic compounds in 100% ethanolic extract from *B. fuscopurpurea*.

Key words: *Bangia fuscopurpurea*; biological activities; component analysis; correlation analysis; LC-MS/MS

红毛藻(*Bangia fuscopurpurea*)又称红毛菜、红毛苔等,是一种重要的商业食用红藻,在中国广泛分布于东南海沿岸,其中福建省莆田市是主要产地之一^[1]。红毛藻不仅味道鲜美,含有丰富的营养成分,还具有降血压和防止心血管疾病等作

用^[2]。但目前国内外对红毛藻的研究多集中在红毛藻多糖、藻红蛋白及其生理学特性,如宋田源等^[3]通过提取分离红毛藻多糖得到多糖组分 1 对血管紧张素转换酶活性具有显著抑制作用,其半数抑制浓度 IC₅₀ 为 0.34 g/L,具有潜在的降血压

收稿日期:2022-09-22;网络首发日期:2022-11-08

基金项目:国家自然科学基金项目(22038012);福建省自然科学基金项目(2021J01833)。

作者简介:常高萍(1997-),女,河南开封人,硕士生,主要研究方向为生物化学与分子生物学。

通讯作者:李志朋, E-mail: lzp2019@jmu.edu.cn。

引用本文:常高萍,林巧燕,张敏,等.红毛藻不同乙醇浓度提取物的生物活性及其成分分析[J].化学试剂,2023,45(2):98-105。

功效;付晓苹^[4]纯化得到的红毛藻藻红蛋白具有抗氧化活性,其对羟基自由基的半数清除率为 1.2 mg/L,对过氧化氢的半数清除率为 4.8 mg/L。而关于红毛藻小分子活性成分与生物活性之间相关性的研究却很少报道。如 Huang 等^[5]研究发现红毛藻 70%乙醇提取物具有保湿和美白作用;李月等^[6]研究结果表明,采用 60%乙醇提取的红毛藻多酚提取物具有 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力。

本文使用不同浓度乙醇溶液提取红毛藻中的小分子活性物质,并对提取物中总多酚、总黄酮、总生物碱含量与 DPPH 清除能力、胰脂肪酶、乙酰胆碱酯酶、酪氨酸酶抑制活性进行相关性分析。进一步基于 LC-MS/MS 技术分析红毛藻乙醇提取物中总多酚类物质,以期为红毛藻活性物质的制备和功能食品开发提供理论依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Cary 50 Probe 型紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公司);Nexera X2 型超高效液相色谱仪(日本岛津公司);4500 QTRAP 型系统串联质谱仪(美国赛默飞世尔公司);350 型 pH 计(美国 Beckman 公司);Epoch2T 型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司);EL104 型电子分析天平(梅特勒-托利(上海)有限公司)。

福林酚(生物试剂)、2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH,98%)(上海源叶生物科技有限公司);L-酪氨酸、没食子酸(生物试剂,国药集团化学试剂有限公司);3-吗啉丙磺酸(99%,北京 Solarbio 科技有限公司);4-硝基苯基丁酸酯(*p*-NPB)(98%)、碘化硫代乙酰胆碱(98%)、5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)(98%)、溴甲酚绿(分析纯)、盐酸小檗碱(98%)、牛血清白蛋白(98%)、乙酰胆碱酯酶(来源于电鳗,1 000 U/mg)、酪氨酸酶(来源于蘑菇,1 000 U/mg)(美国 Sigma 公司);胰脂肪酶(来源于猪胰腺,15~35 U/mg,上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

红毛藻(*Bangia fuscopurpurea*)购于福建莆田市,除杂、干燥后粉碎过 60 目筛,得红毛藻藻粉,置于棕色干燥器备用。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备

称取 5 g 红毛藻藻粉,分别使用不同浓度(0%、20%、40%、60%、80%和 100%)乙醇溶液浸

提 3 d,重复提取 2 次,合并浸提液后常压过滤,于 42 ℃真空浓缩后冷冻干燥得红毛藻不同浓度乙醇提取物,在-20 ℃密封保存备用。

1.2.2 红毛藻提取物 DPPH 清除能力的测定

向 96 孔板中加入 50 μL(5 mg/mL)样品和 50 μL(2×10^{-4} mol/L) DPPH 溶液,30 ℃温育 30 min 后在 517 nm 处测吸光度值,根据式(1)计算样品的 DPPH 清除能力:

$$\text{清除率} = [1 - (A_x - A_1)/A_0] \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_x 为红毛藻提取物+DPPH 吸光度值; A_1 为红毛藻提取物+甲醇的吸光度值; A_0 为 50%甲醇水+DPPH 的吸光度值。

1.2.3 红毛藻提取物酶抑制活性的测定

1.2.3.1 酪氨酸酶抑制活性的测定^[7]

向 96 孔板中依次加入 40 μL(5 mg/mL)样品、80 μL PBS 缓冲液(100 mmol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠,pH 6.8)、40 μL(250 U/mL)酪氨酸酶溶液,置于 25 ℃温育 10 min 后加入 40 μL(0.85 mmol/L)L-酪氨酸溶液,再次于 25 ℃温育 10 min 后使用酶标仪在 492 nm 处测吸光度值,酪氨酸酶抑制活性按式(2)进行计算:

$$\text{酪氨酸酶抑制率} =$$

$$[1 - (A - B)/(C - D)] \times 100\% \quad (2)$$

式中: A 为红毛藻提取物+酪氨酸酶测得的吸光度值; B 为红毛藻提取物+PBS 测得的吸光度值; C 为酪氨酸酶+50%甲醇水测得的吸光度值; D 为 PBS+50%甲醇水测得的吸光度值。

1.2.3.2 乙酰胆碱酯酶抑制活性的测定^[8]

将 20 μL(5 mg/mL)红毛藻提取物,80 μL Buffer D 溶液(50 mmol/L Tris-HCl,0.1%牛血清白蛋白,pH 8.0)、20 μL(0.04 U/mL)乙酰胆碱酯酶溶液依次加入 96 孔板中混合均匀,置于 37 ℃温育 15 min 后加入 40 μL(0.5 mmol/L)5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)溶液和 40 μL(2.5 mmol/L)碘化硫代乙酰胆碱溶液,在 37 ℃反应 15 min,加入 50 μL 无水乙醇终止反应,于 405 nm 波长下检测溶液吸光度值。乙酰胆碱酯酶抑制活性按式(3)进行计算:

$$\text{乙酰胆碱酯酶抑制率} =$$

$$[1 - (A - B)/(C - D)] \times 100\% \quad (3)$$

式中: A 为红毛藻提取物+乙酰胆碱酯酶测得的吸光度值; B 为红毛藻提取物+Buffer D 测得的吸光度值; C 为乙酰胆碱酯酶+50%甲醇水测得的吸光度值; D 为 Buffer D+50%甲醇水测得的吸光度值。

1.2.3.3 胰脂肪酶抑制活性的测定

参考于洋君等^[9]方法并稍作修改:将 20 μL(5 mg/mL)样品、170 μL Buffer A 溶液(50 mmol/L Tris-HCl,50 mmol/L 无水氯化钙,pH 7.0)、6 μL

(10 U/mL)胰脂肪酶溶液依次加入 96 孔板中混合均匀,置于 37 ℃ 恒温振荡器中温育 15 min 后加入 4 μ L (5 mmol/L) *p*-NPB 溶液开始反应,再次置于 37 ℃ 下反应 15 min,于 405 nm 波长下检测溶液吸光度值。胰脂肪酶抑制率按公式(4)进行计算:

胰脂肪酶抑制率 =

$$[1 - (A - B) / (C - D)] \times 100\% \quad (4)$$

式中: *A* 为红毛藻提取物+胰脂肪酶测得的吸光度值; *B* 为红毛藻提取物+Buffer B 测得的吸光度值; *C* 为胰脂肪酶+50% 甲醇水测得的吸光度值; *D* 为 Buffer B+50% 甲醇水测得的吸光度值。Buffer B: 10 mmol/L 3-吗啉丙磺酸, 0.1 mmol/L 乙二胺四乙酸, pH 6.8。

1.2.4 红毛藻提取物化学成分的测定

1.2.4.1 总多酚含量的测定

样品中的总多酚含量采用 Folin-Ciocalteu 法^[10]进行测定,取 1 mL (1 mg/mL) 提取物溶液于 10 mL 容量瓶中,依次加入 1 mL 福林酚显色剂及 3 mL 7.5% Na_2CO_3 ,超纯水定容至 10 mL,混匀,避光反应 2 h,于 765 nm 波长处测定吸光度。以没食子酸溶液浓度 (0、10、20、30、40、50、100、150 和 200 mg/L) 为横坐标,以吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线 $y = 0.0069x + 0.0329$, $R^2 = 0.9986$ 。根据标准曲线计算总多酚的含量。

1.2.4.2 总黄酮含量的测定

样品中的总黄酮含量采用亚硝酸钠-硝酸铝法^[11]进行测定,取 1 mL (5 mg/mL) 提取物溶液于 10 mL 容量瓶中,加入 0.4 mL 5% 亚硝酸钠,在室温下孵育 6 min。第 1 次孵育完成后,加入 0.4 mL 的 10% 硝酸铝到容量瓶中,混合后等待 6 min 后,加入 4 mL 4% NaOH,混合均匀后加入 50% 甲醇水定容至 10 mL,于 510 nm 处测定吸光度。以槲皮素甲醇溶液浓度 (0、10、20、30、40、50、60、70 和 80 mg/L) 为横坐标,以吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线 $y = 0.0006x + 0.0455$, $R^2 = 0.9996$ 。根据标准曲线计算总黄酮的含量。

1.2.4.3 总生物碱含量的测定

称取 30 mg 样品,加入 10 mL 2% 盐酸溶液超声溶解,常压过滤,使用 2% NaOH 溶液调至 pH 9~10,再用二氯甲烷萃取 2 次,每次萃取 30 min。合并二氯甲烷层,然后回收二氯甲烷,干燥、称重,即得总生物碱。柠檬酸缓冲液复溶所得总生物碱后取 1 mL,加入 1 mL 0.05% 溴甲酚绿溶液,再加 5 mL 二氯甲烷,充分振荡混匀,静置 30 min 后,于 417 nm 波长处测定吸光度^[12]。以盐酸小檗碱溶液浓度 (0、10、20、30、40、50、60、70 和 80

mg/L) 为横坐标,以吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线 $y = 0.0091x + 0.0598$, $R^2 = 0.9988$ 。根据标准曲线计算总生物碱的含量。

1.2.5 红毛藻 100% 乙醇提取物中多酚类化合物的鉴定

取红毛藻 100% 乙醇提取物 50 mg,置 2 mL EP 管中。加入 600 μ L 70% 甲醇内标提取液,涡旋 3 min,离心 10 min (12 000 r/min, 4 ℃)。取上清液用微孔滤膜 (0.22 μ m) 过滤,保存于进样瓶中,用于 LC-MS/MS 检测。液相条件: 色谱柱: Agilent SB-C18 (1.8 μ m, 2.1 mm $\times$ 100 mm); 流动相: A 相为 *V*(甲酸):*V*(水) = 0.1%, B 相为 (加入 0.1% 的甲酸) 乙腈; 梯度洗脱, 0~9 min: 5%~95% B, 9~10 min: 95% B, 10~11 min: 95%~5% B, 11~14 min: 5% B; 流速 0.35 mL/min; 柱温 40 ℃; 进样量 4 μ L。

质谱参数如下: ESI 离子源, 涡轮喷雾; 源温度 550 ℃; 离子喷雾电压在正离子模式下为 5 500 V, 在负离子模式下为 -4 500 V; 离子源气体 I、气体 II 和帘气分别设置为 344 750、413 700 和 172 375 Pa, 碰撞诱导电离参数设置为高。

1.3 数据分析

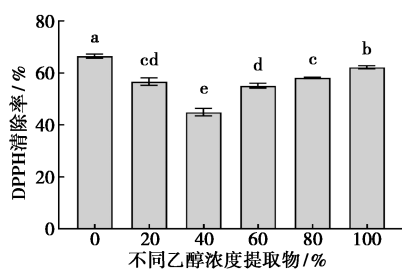
基于迈维 (武汉) 生物技术有限公司自建 MVDB 数据库, 根据二级谱信息进行物质定性, 利用三重四极质谱的多反应监测模式 MRM 完成多酚物质定量, 利用软件 Analyst 1.6.3 处理质谱数据。每个实验设定 3 组平行, 利用 Excel 2016 软件进行数据分析和作图, 实验结果采用 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 的形式表示, 使用 SPSS 17.0 分析软件对数据进行单因素方差分析, 采用 Duncan 检验来检验数据均值之间的显著差异。使用 GraphPad Prism 8.3.0 进行 Pearson 相关性检验并分析作图。

2 结果与讨论

2.1 红毛藻提取物 DPPH 清除能力分析

由于 DPPH 是一种相对稳定的自由基, 它可以接受电子或氢原子而成为稳定的化合物分子, 广泛用于自由基清除活性的研究^[13], 本研究通过 DPPH 清除活性测定红毛藻提取物的抗氧化能力。图 1 为红毛藻不同乙醇浓度提取物对供氢猝灭活性物质 DPPH 的清除能力。由图可知, 红毛藻不同乙醇浓度提取物的 DPPH 清除能力与乙醇浓度有关且具有一定的差异。其中水提取物对 DPPH 的清除率最高, 为 (66.49 $\pm$ 0.82)%; 其次为

100%乙醇提取物,清除率为 $(62.21 \pm 0.62)\%$;20%、60%、80%乙醇浓度提取物的 DPPH 清除率无显著性差异,分别为 $(56.68 \pm 1.41)\%$ 、 $(55.08 \pm 0.93)\%$ 和 $(58.11 \pm 0.31)\%$;40%乙醇浓度提取物的 DPPH 的清除率最低,为 $(44.92 \pm 1.41)\%$ 。Liu 等^[14]对褐藻泡叶藻中的抗氧化物质的提取工艺进行了优化,结果表明,DPPH 清除活性随乙醇浓度(40%~80%)的增加而增加,本研究也获得了类似的结果。



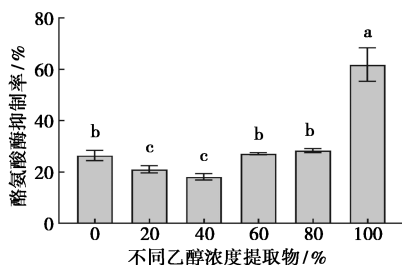
小写字母不同表示差异显著,即 $P < 0.05$

图 1 红毛藻不同乙醇浓度提取物的 DPPH 清除能力

Fig.1 DPPH scavenging ability of different ethanol concentration extracts from *Bangia fusco-purpurea*

2.2 红毛藻提取物酶抑制活性分析

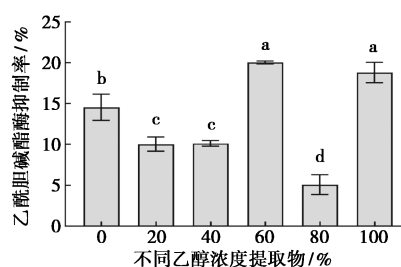
红毛藻不同乙醇浓度提取物对酪氨酸酶、乙酰胆碱酯酶和胰脂肪酶的抑制活性如图 2~4 所示。由图 2 可知,红毛藻不同乙醇浓度提取物对酪氨酸酶的抑制活性不同。100%乙醇提取物对酪氨酸酶的抑制率最高,为 $(61.84 \pm 6.55)\%$;40%乙醇提取物对酪氨酸酶的抑制率最低,为 $(18.12 \pm 1.23)\%$;水提取物、60%乙醇提取物和 80%乙醇提取物对酪氨酸酶的抑制率无显著性差异,其抑制率分别为 $(21.07 \pm 1.39)\%$ 、 $(27.11 \pm 0.40)\%$ 和 $(28.32 \pm 0.81)\%$ 。红毛藻提取物的酪氨酸酶活性差异可能是由其相关活性成分的含量及差异所致。Issa 等^[15]比较了杨梅不同溶剂提取物的酪



小写字母不同表示差异显著,即 $P < 0.05$

图 2 红毛藻不同乙醇浓度提取物的酪氨酸酶抑制活性

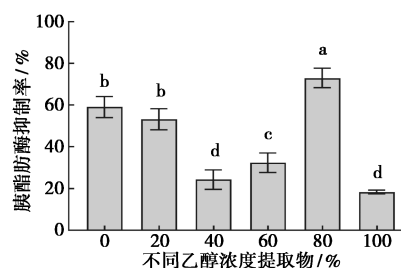
Fig.2 Tyrosinase inhibitory activity of different ethanol concentration extracts from *Bangia fusco-purpurea*



小写字母不同表示差异显著,即 $P < 0.05$

图 3 红毛藻不同乙醇浓度提取物的乙酰胆碱酯酶抑制活性

Fig.3 Acetylcholinesterase inhibitory activity of different ethanol concentration extracts from *Bangia fusco-purpurea*



小写字母不同表示差异显著,即 $P < 0.05$

图 4 红毛藻不同乙醇浓度提取物的胰脂肪酶抑制活性

Fig.4 Pancreatic lipase inhibitory activity of different ethanol concentration extracts from *Bangia fusco-purpurea*

氨酸酶抑制活性,其中乙醇提取物要高于水提取物的活性。与本研究结果相似,说明红毛藻中酪氨酸酶抑制剂大部分不易溶于水,较易溶于极性小的乙醇溶剂。

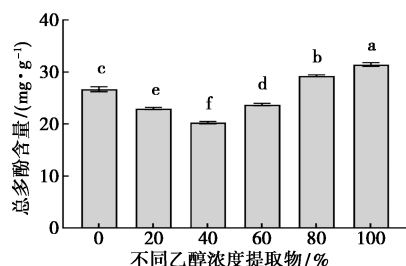
由图 3 可知,红毛藻不同乙醇浓度提取物对乙酰胆碱酯酶均有抑制作用,且不同浓度提取物之间具有一定的差异。60%乙醇提取物和 100%乙醇提取物对乙酰胆碱酯酶的抑制率分别为 $(20.02 \pm 0.47)\%$ 和 $(18.78 \pm 1.24)\%$,显著高于其他提取物;其次是水提取物,对乙酰胆碱酯酶抑制率为 $(14.54 \pm 1.60)\%$;20%、40%乙醇浓度提取物对乙酰胆碱酯酶的抑制作用无显著性差异,其抑制率分别为 $(10.03 \pm 0.87)\%$ 和 $(10.15 \pm 0.35)\%$;80%乙醇浓度的提取物对乙酰胆碱酯酶的抑制率最低,为 $(5.08 \pm 1.22)\%$ 。

由图 4 可知,红毛藻不同乙醇浓度提取物对胰脂肪酶均有抑制作用,说明红毛藻可作为胰脂肪酶抑制剂,阻止或中断胰脂肪酶将脂肪水解为甘油和游离脂肪酸,从而减少肠道吸收。乙醇浓度不同,其红毛藻提取物对胰脂肪酶的抑制作用不同。其中 80%乙醇浓度提取物对胰脂肪酶的

抑制率最高,为 $(72.97 \pm 4.68)\%$,显著高于其他提取物;100%乙醇浓度的提取物对胰脂肪酶的抑制率最低,为 $(18.40 \pm 0.86)\%$ 。

2.3 红毛藻提取物成分分析

图 5 显示红毛藻不同乙醇浓度提取物总多酚含量范围为 $(20.28 \sim 31.47) \text{ mg/g}$,不同乙醇浓度提取物之间有显著性差异,红毛藻提取物中的总多酚含量随着乙醇浓度的增大呈现先降低后增加的趋势,这一变化趋势与不同乙醇浓度提取物的 DPPH 清除力趋势基本相同。其中 100%乙醇提取物中总多酚物质含量最高,为 $(31.47 \pm 0.36) \text{ mg/g}$,40%乙醇提取物中总多酚含量最低,为 $(20.28 \pm 0.22) \text{ mg/g}$,结果表明提取溶剂的极性对多酚的提取具有显著影响。Wang 等^[16]研究发现,水在提取多酚类化合物方面不如极性有机溶剂,这可能是由于乙醇使大多数蛋白质沉淀,并将一些可逆结合的酚类化合物保留在溶液中,从而使总多酚的提取含量增加。

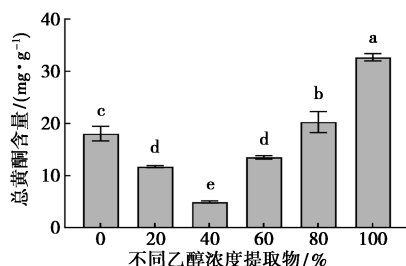


小写字母不同表示差异显著,即 $P < 0.05$

图 5 红毛藻不同乙醇浓度提取物的总多酚含量

Fig.5 Content of total polyphenol of different ethanol concentration extracts from *Bangia fusco-purpurea*

图 6 显示红毛藻不同乙醇浓度提取物总黄酮含量范围为 $(4.94 \sim 32.72) \text{ mg/g}$,红毛藻提取物中的总黄酮含量与总多酚含量变化趋势相似,随着乙醇浓度的增大呈现先降低后增加的趋势,其中 100%乙醇提取物中总黄酮物质含量最高,为



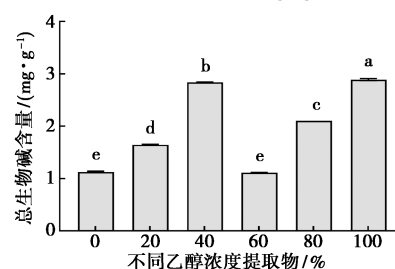
小写字母不同表示差异显著,即 $P < 0.05$

图 6 红毛藻不同乙醇浓度提取物的总黄酮含量

Fig.6 Content of total flavones of different ethanol concentration extracts from *Bangia fusco-purpurea*

$(32.72 \pm 0.69) \text{ mg/g}$,40%乙醇提取物中总黄酮含量最低,为 $(4.94 \pm 0.19) \text{ mg/g}$,表明红毛藻提取物中含有不同种类的黄酮化合物且富含弱极性黄酮类化合物。

图 7 显示红毛藻不同乙醇浓度提取物总生物碱含量范围为 $(1.11 \sim 2.89) \text{ mg/g}$,乙醇浓度不同,其总生物碱含量不同。其中 100%乙醇提取物总生物碱含量显著高于其他提取物,为 $(2.89 \pm 0.02) \text{ mg/g}$;其次是 40%乙醇提取物,总生物碱含量为 $(2.84 \pm 0.00) \text{ mg/g}$;水提取物和 60%乙醇提取物总生物碱含量最低且无显著性差异,分别为 (1.13 ± 0.02) 、 $(1.11 \pm 0.00) \text{ mg/g}$ 。



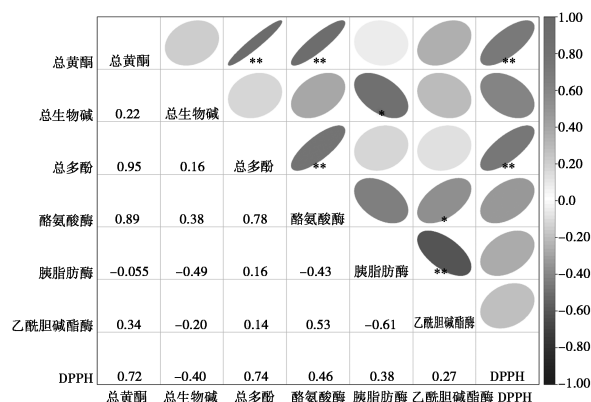
小写字母不同表示差异显著,即 $P < 0.05$

图 7 红毛藻不同乙醇浓度提取物的总生物碱含量

Fig.7 Content of total alkaloid of different ethanol concentration extracts from *Bangia fusco-purpurea*

2.4 相关性分析

图 8 为红毛藻不同乙醇浓度提取物的化学成分与生物活性的相关性分析。其中圆圈水平向左倾斜 45° 表示正相关性,水平向左倾斜 135° 表示负相关性,圆圈越扁相关系数的绝对值越大,相关性越强。图中数字表示 pearson 相关系数 R^2 ,介于 ± 1 之间,其绝对值越大表示相关性越强。由



* 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)

图 8 红毛藻化学成分与生物活性相关性

Fig.8 Correlation between chemical constituents and biological activities of *Bangia fusco-purpurea*

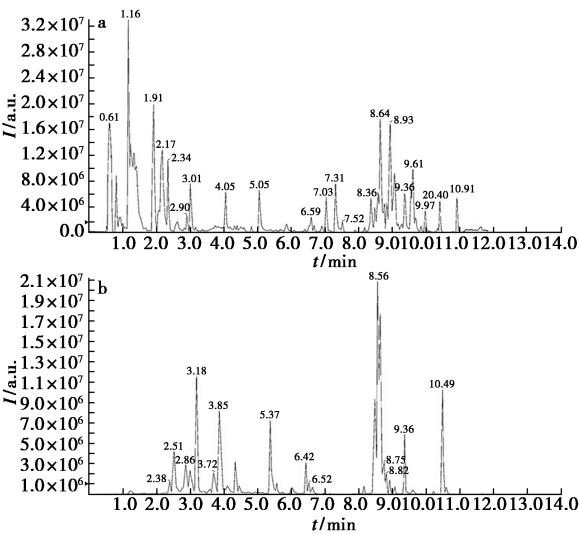
图 8 可知,总黄酮含量与酪氨酸酶抑制活性、DPPH 清除能力呈极显著正相关($P<0.01$),说明总黄酮含量越高,酪氨酸酶抑制率和 DPPH 清除率越高;总多酚含量与酪氨酸酶抑制率、DPPH 清除率呈极显著正相关($P<0.01$),说明总多酚含量越高,酪氨酸酶抑制率和 DPPH 清除率越高,红毛藻中的多酚可能是产生酪氨酸酶抑制活性和抗氧化作用的原因。

以往研究表明总多酚含量与抗氧化活性之间具有正相关性。Yuan 等^[17]通过微波辅助提取技术提取 4 种褐藻多酚,研究结果表明多酚含量与 DPPH 清除能力具有相关性;陈青青等^[18]相关性分析显示,总多酚对抗氧化活性贡献程度最高。本文中总黄酮含量与酪氨酸酶抑制活性和 DPPH 清除能力的相关系数分别为 0.89、0.72;总多酚含量与酪氨酸酶和 DPPH 清除能力的相关系数分别为 0.78、0.74。相对于其他乙醇浓度的提取物,红毛藻 100%乙醇提取物具有较高的酪氨酸酶活性和 DPPH 清除能力,可能是由于其含有较多的总黄酮和总多酚,因而接下来采用 LC-MS/MS 技术对红毛藻 100%乙醇提取物中的多酚类化合物进行定性和定量分析。

2.5 红毛藻 100%乙醇提取物中多酚类化合物的鉴定

图 9 表示采用 LC-MS/MS 技术对红毛藻

100%乙醇提取物中的多酚类化合物进行定性的总离子色谱图。根据二级谱信息进行化合物定性,并与标准数据库进行比较。根据比较的结果,将鉴定的化合物分为 3 个等级(1 级、2 级和 3 级),可信度顺序如下:1 级>2 级>3 级。化合物鉴定等级为 1 级的化合物详细信息见表 1,红毛藻 100%乙醇提取物中共检测出 37 种多酚类化合物,其中酚酸类 25 种、黄酮 9 种、木质素和香豆素 3 种。部分化合物的鉴定过程如下:



a.正离子模式;b.负离子模式

图 9 红毛藻总离子色谱图

Fig.9 Total ion chromatogram of *Bangia fusco-purpurea*

表 1 红毛藻 100%乙醇提取物的鉴定信息^注

Tab.1 Identification information of 100% ethanol extract from *Bangia fusco-purpurea*

编号	分子式	母离子/Da (实测值)	母离子/Da (理论值)	含量/ (mL·L ⁻¹)	特征离子/ Da	离子 模式	物质名称	物质 分类	等级	峰面积
1	C ₉ H ₁₀ O ₂	149.060 3	149.060 3	0	105.070 1	[M-H] ⁻	氢化肉桂酸	酚酸类	1	31 574 333.3
2	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403.136 2	403.139 4	7.9	373.091 5	[M+H] ⁺	川陈皮素	黄酮	1	16 653 333.3
3	C ₈ H ₆ O ₄	165.020 1	165.018 8	7.9	121.03	[M-H] ⁻	对苯二甲酸*	酚酸类	1	7 129 866.7
4	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.046 9	181.050 6	20.4	135.04	[M-H] ⁻	羟苯基乳酸	酚酸类	1	6 976 433.3
5	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.046 9	181.051 2	23.8	135.04	[M-H] ⁻	2,4-二羟苯基乙酸甲酯	酚酸类	1	6 647 033.3
6	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	433.146 8	433.149 9	7.2	403.11	[M+H] ⁺	3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮	黄酮	1	6 412 033.3
7	C ₇ H ₆ O ₂	121.029 4	121.029 0	3.3	92.00	[M-H] ⁻	对羟基苯甲醛*	酚酸类	1	5 249 733.3
8	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.126 2	373.128 8	7.0	343.09	[M+H] ⁺	桔皮素	黄酮	1	4 781 333.3
9	C ₈ H ₈ O ₃	151.039 2	151.040 3	7.3	107.05	[M-H] ⁻	4-羟基苯乙酸	酚酸类	1	4 510 500.0
10	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.054 7	165.055 7	6.1	106.00	[M-H] ⁻	3-(3-羟基苯基)丙酸*	酚酸类	1	4 031 600.0
11	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.054 7	165.055 2	3.0	106.00	[M-H] ⁻	3-羟基苯基乙酸甲酯	酚酸类	1	3 959 066.7
12	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.053 9	165.055 7	10.9	92.03	[M-H] ⁻	4-羟基苯甲酸乙酯	酚酸类	1	2 534 600.0
13	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	261.112 0	261.112 1	0.4	189.06	[M+H] ⁺	橙皮内酯	木质素和 香豆素	1	2 132 033.3
14	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	279.158 3	279.159 1	2.9	149.02	[M+H] ⁺	邻苯二甲酸二丁酯*	酚酸类	1	2 064 400.0
15	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	279.158 3	279.159 1	2.9	149.02	[M+H] ⁺	邻苯二甲酸二异丁酯*	酚酸类	1	1 938 466.7
16	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	279.158 2	279.159 1	3.2	149.03	[M+H] ⁺	邻苯二甲酸-1-丁酯-2-异丁酯*	酚酸类	1	1 891 333.3

续表

编号	分子式	母离子/Da (实测值)	母离子/Da (理论值)	含量/ (mL·L ⁻¹)	特征离子/ Da	离子 模式	物质名称	物质 分类	等级	峰面积
17	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.126 2	373.128 8	7.0	312.1	[M+H] ⁺	甜橙素	黄酮	1	1 848 500.0
18	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	261.110 5	261.112 1	6.1	189.06	[M+H] ⁺	酸橙素烯醇	木脂素和 香豆素	1	1 281 366.7
19	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	261.110 5	261.112 1	6.1	189.06	[M+H] ⁺	7-甲氧基-5-异戊烯基氧基香豆素	木脂素和 香豆素	1	1 248 266.7
20	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	579.168 3	579.171 5	5.5	271.06	[M-H] ⁻	柚皮素-7-O-新橙皮糖苷(柚皮苷)	黄酮	1	1 122 533.3
21	C ₇ H ₆ O ₃	137.023 7	137.024 9	8.8	93.04	[M-H] ⁻	水杨酸	酚酸类	1	935 103.3
22	C ₈ H ₆ O ₄	165.020 1	165.018 8	7.9	77.04	[M-H] ⁻	邻苯二甲酸*	酚酸类	1	727 773.3
23	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.054 8	165.055 7	5.5	119.05	[M-H] ⁻	2,6-二甲氧基苯甲醛	酚酸类	1	578 550.0
24	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.127 3	373.128 8	4.0	343.08	[M+H] ⁺	异甜橙黄酮	黄酮	1	526 856.7
25	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.054 7	165.055 2	3.0	119.05	[M-H] ⁻	3-(4-羟基苯基)丙酸*	酚酸类	1	366 893.3
26	C ₇ H ₆ O ₄	153.018 4	153.018 8	2.6	109.03	[M-H] ⁻	3,4-二羟基苯甲酸;原儿茶酸*	酚酸类	1	251 606.7
27	C ₁₄ H ₂₂ O	205.157 9	205.159 8	9.3	189.13	[M-H] ⁻	2,4-二叔丁基苯酚*	酚酸类	1	242 360.0
28	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	579.168 3	579.171 5	5.5	271.00	[M-H] ⁻	柚皮素-7-O-芸香糖苷(芸香柚皮苷)	黄酮	1	235 570.0
29	C ₁₄ H ₂₂ O	205.155 7	205.159 8	20.0	189.13	[M-H] ⁻	2,6-二叔丁基苯酚*	酚酸类	1	225 796.7
30	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609.178 1	609.182 0	6.4	301.09	[M-H] ⁻	橙皮素-7-O-芸香糖苷(橙皮苷)	黄酮	1	216 403.3
31	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609.178 1	609.182 0	6.4	301.00	[M-H] ⁻	橙皮素-7-O-新橙皮糖苷(新橙皮苷)	黄酮	1	185 790.0
32	C ₈ H ₁₀ O ₂	137.059 5	137.060 8	9.5	119.05	[M-H] ⁻	酪醇	酚酸类	1	159 213.3
33	C ₇ H ₆ O ₂	121.029 3	121.029 5	1.7	77.04	[M-H] ⁻	2-羟基苯甲醛(水杨醛)*	酚酸类	1	157 500.0
34	C ₆ H ₆ O ₂	109.028 4	109.029 0	5.5	81.00	[M-H] ⁻	邻苯二酚;儿茶酚	酚酸类	1	82 725.7
35	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	179.105 1	179.107 3	12.3	123.00	[M+H] ⁺	甲基丁香酚	酚酸类	1	59 677.7
36	C ₈ H ₈ O	121.065 5	121.065 4	0.8	77.00	[M+H] ⁺	苯乙醛	酚酸类	1	4 797.3
37	C ₉ H ₁₀ O ₂	149.060 3	149.061 6	8.7	108.02	[M-H] ⁻	4-烯丙基儿茶酚	酚酸类	1	2 925.5

注:等级 1 为样本物质二级质谱、保留时间与数据库物质匹配得分为 0.7 分以上; * 表示该物质存在同分异构体。

化合物 1: C₉H₁₀O₂, 在负离子模式下脱质子, 裂解为 m/z 149.059 5 [M-H]⁻, 然后该离子进一步裂解得到碎片离子 m/z 105.070 1 [M-H]⁻, 与数据库和参考文献[19]相比对, 确定化合物 1 为氢化肉桂酸。氢化肉桂酸的二级质谱图如图 10 所示。

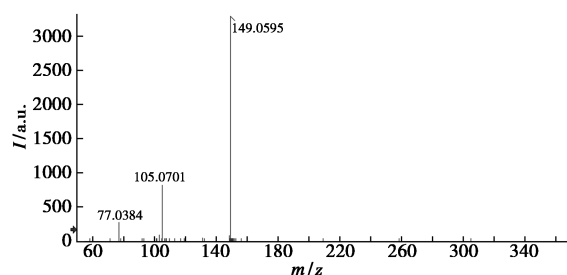


图 10 氢化肉桂酸的二级质谱图

Fig.10 MS² spectrum of hydrocinnamic acid

化合物 2: C₂₁H₂₂O₈, 在正离子模式下质子化, 产生一级母离子为 m/z 403.138 4 [M-H]⁺, 然后母离子进一步裂解得到二级碎片离子 m/z 373.091 5 [M-H]⁺, 与数据库和参考文献[20]相比对, 确定化合物 2 为川陈皮素。川陈皮素的二

级质谱图如图 11 所示。

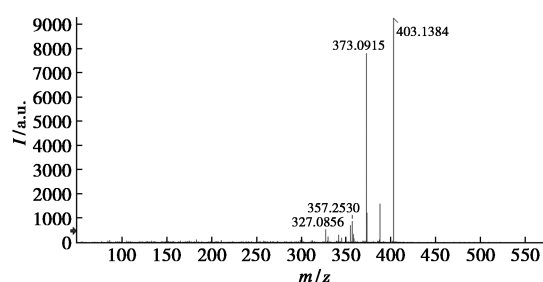


图 11 川陈皮素的二级质谱图

Fig.11 MS² spectrum of nobiletin

从红毛藻 100% 乙醇提取物中鉴定得到的多酚类化合物具有多种生物活性, 如氢化肉桂酸^[21]、川陈皮素^[22]具有较好的抗氧化活性, 桔皮素^[23]可用于治疗神经退行性疾病, 对羟基苯甲醛^[24]、4-羟基苯乙酸^[25]具有酪氨酸酶抑制活性。

3 结论

红毛藻不同乙醇浓度提取物均具有 DPPH 清除能力, 以及酪氨酸酶、胰脂肪酶、乙酰胆碱酯酶抑制活性, 乙醇浓度不同, 其提取物生物活性不

同,总多酚、总黄酮、总生物碱含量不同。相关性分析表明,总多酚和总黄酮含量与酪氨酸酶抑制活性和 DPPH 清除能力均具有极显著相关性。LC-MS/MS 检测结果显示红毛藻 100% 乙醇提取物中含有 37 种多酚类化合物,为红毛藻活性物质的研究及红毛藻在功能性食品、医药等领域的应用提供了理论支持。

参考文献:

- [1] 纪乃茹,李月,姜泽东,等.红毛藻研究进展[J].食品工业,2020,41(2):238-241.
- [2] 郑江,王文星,黄水英.红毛藻中天然蛋白质色素的提取研究[J].食品科技,2002,(12):49-51.
- [3] 宋田源,陈艳红,倪辉,等.红毛藻多糖对血管紧张素转换酶活性的抑制作用[J].集美大学学报:自然科学版,2017,22(5):24-30.
- [4] 付晓苹.红毛藻及坛紫菜藻红蛋白的分离纯化与相关性质的研究[D].厦门:集美大学,2007.
- [5] HUANG S Y, WANG H M D, KE J H, et al. Two cosmetic properties of an ethanol extract of a cultured and edible red macroalga, *Bangia fuscopurpurea*: Moisturizing and whitening effects[J]. *Nat. Prod. Commun.*, 2020, 15(8): 1-8.
- [6] 李月,纪乃茹,李健,等.红毛藻多酚提取工艺优化及抗氧化活性[J].食品工业科技,2021,42(7):156-161.
- [7] LI L J, CAI Y C, SUN X, et al. Tyrosinase inhibition by p-coumaric acid ethyl ester identified from camellia pollen[J]. *Food Sci. Nutr.*, 2021, 9(1): 389-400.
- [8] 张涛,陈艳红,常高萍,等.基于乙酰胆碱酯酶和氧化应激研究海胆酮对阿尔兹海默症的作用机制[J].食品科学,2022,43(11):105-112.
- [9] 于洋君,伍菱,何君竹,等.对羟基肉桂酸乙酯对胰脂肪酶的抑制作用及机理[J].食品工业科技,2021,42(9):94-99.
- [10] 孙旭,姜泽东,杜希萍,等.乳酸菌发酵对茶花粉营养成分及生物活性的影响[J].食品工业科技,2018,39(3):44-47,51.
- [11] LIU W, YIN D, LI N, et al. Influence of environmental factors on the active substance production and antioxidant activity in *Potentilla fruticosa* L. and its quality assessment[J]. *Sci. Rep.*, 2016, 6: 28 591.
- [12] 卢芯,王桂玲,王琢,等.龙葵有效部位总生物碱的提取、含量测定及抗肿瘤作用的初步研究[J].泰山医学院学报,2020,41(10):735-737.
- [13] GONG J, HUANG J, XIAO G, et al. Antioxidant capacities of fractions of bamboo shaving extract and their antioxidant components[J]. *Molecules*, 2016, 21(8): 996.
- [14] LIU X, LUO G, WANG L, et al. Optimization of antioxidant extraction from edible brown algae *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology[J]. *Food Bioprod. Process.*, 2019, 114: 205-215.
- [15] ISSA R A, AFIFI F U, AMRO B I. Studying the anti-tyrosinase effect of *Arbutus andrachne* L. Extracts[J]. *Int. J. Cosmetic. Sci.*, 2008, 30(4): 271-276.
- [16] WANG T, JÓNSDÓTTIR R, ÓLAFSDÓTTIR G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds[J]. *Food Chem.*, 2009, 116(1): 240-248.
- [17] YUAN Y, ZHANG J, FAN J J, et al. Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four economic brown macroalgae species and evaluation of their antioxidant activities and inhibitory effects on α -amylase, α -glucosidase, pancreatic lipase and tyrosinase[J]. *Food Res. Int.*, 2018, 113: 288-297.
- [18] 陈青青,李柯,唐晓清,等.华东覆盆子果、茎与叶的酚类成分及抗氧化活性分析[J].食品科学,2020,41(24):209-215.
- [19] HORAI H, ARITA M, KANAYA S, et al. Massbank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences[J]. *J. Mass Spectrom.*, 2010, 45(7): 703-714.
- [20] KUMAR A, DEVARAJ V C, GIRI K C, et al. Development and validation of a highly sensitive LC-MS/MS-ESI method for the determination of nobiletin in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study[J]. *Biomed. Chromatogr.*, 2012, 26(12): 1 464-1 471.
- [21] TSAI P J, SHE C H. Significance of phenol-protein interactions in modifying the antioxidant capacity of peas[J]. *J. Agr. Food Chem.*, 2006, 54(22): 8 491-8 494.
- [22] GHASEMI-TARIE R, KIASALARI Z, FAKOUR M, et al. Nobiletin prevents amyloid β 1-40-induced cognitive impairment via inhibition of neuroinflammation and oxidative/nitrosative stress[J]. *Metab. Brain Dis.*, 2022, 37(5): 1 337-1 349.
- [23] BRAIDY N, BEHZAD S, HABTEMARIAM S, et al. Neuroprotective effects of citrus fruit-derived flavonoids, nobiletin and tangeretin in Alzheimer's and Parkinson's disease[J]. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 2017, 16(4): 387-397.
- [24] YI W, CAO R, PENG W, et al. Synthesis and biological evaluation of novel 4-hydroxybenzaldehyde derivatives as tyrosinase inhibitors[J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, 45(2): 639-646.
- [25] WEN K C, CHANG C S, CHIEN Y C, et al. Tyrosol and its analogues inhibit α -melanocyte-stimulating hormone induced melanogenesis[J]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, 14(12): 23 420-23 440.

酸性低共熔溶剂的理化特性及其与虾青素溶解度的相关性研究

程婉婷^a, 陈世钰^b, 贤凤^a, 胡坤^b, 高静^{*b}

(广东药科大学 a.公共卫生学院, 广东 广州 510000; b.食品科学学院, 广东 中山 528400)

摘要:制备 7 种酸性低共熔溶剂 (DES), 在不同温度下系统测定低共熔溶剂的理化特性, 评估了虾青素的溶解度, 并与有机溶剂和离子液体进行比较, 深入探讨虾青素溶解度与低共熔溶剂理化性质之间的关联性。结果表明, 7 种酸性低共熔溶剂具有低黏度和良好的热稳定性; 虾青素在 7 种低共熔溶剂中的溶解效果均优于乙醇与离子液体三丁基辛基氯化磷, 溶解能力最强的是 DL-薄荷醇:乙酸 (MAA), 可达 $(405.94 \pm 12.90) \text{ mg}/100 \text{ g}$; 低共熔溶剂的密度、黏度和偶极性/极化率 3 个性质与虾青素溶解能力密切相关, 相关系数分别为 0.99、-0.85 和 0.83, 这为选择和设计提取天然类胡萝卜素的溶剂及其应用提供了理论指导。

关键词:低共熔溶剂; 理化性质; 虾青素; 溶解度

中图分类号:TQ413 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2023)02-0106-08

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0704

Physicochemical Properties of Acidic Deep Eutectic Solvents and the Correlation with Astaxanthin Solubility CHENG

Wan-ting^a, CHEN Shi-yu^b, XIAN Feng^a, HU Kun^b, GAO Jing^{*b} (Guangdong Pharmaceutical University, a.School of Public Health, Guangzhou 510000, China; b.School of Food Science, Zhongshan 528400, China)

Abstract: 7 Acidic deep eutectic solvents (DES) were prepared, and the effects of temperature on the physicochemical properties were explored. In addition, solubility of astaxanthin in different DES was measured and compared with organic solvent and ionic liquid (IL). Moreover, the correlation coefficients of the physicochemical properties and astaxanthin solubility were analyzed. The results showed that the acidic DES presented low viscosity and favourable thermal stability. The solubility of astaxanthin in all the DES was higher than that in ethanol and IL (tributyl(octyl)phosphonium chloride). Besides, DL-menthol:acetic acid (MAA) showed the highest astaxanthin solubility of $(405.94 \pm 12.90) \text{ mg}/100 \text{ g}$. Furthermore, the correlation analysis showed that the astaxanthin solubility was significantly correlated with density, viscosity and dipolarity of DES, whose related coefficients are 0.99, -0.85 and 0.83 respectively. The study provides theoretical guidance for the pre-selection and design of suitable solvents for the extraction of carotenoids and their applications.

Key words: deep eutectic solvent; physicochemical properties; astaxanthin; solubility

类胡萝卜素是一类重要的抗氧化剂, 其中虾青素的抗氧化能力最高^[1]。天然虾青素主要来源于红法夫酵母和雨生红球藻, 普遍采用有机溶剂法提取^[2,3]。但丙酮等有机溶剂对环境 and 操作安全都存在一定风险。开发适合虾青素的溶剂以提高提取过程的安全性和效率仍然是一项重要的挑战。

低共熔溶剂 (DES) 是通过加热特定比例的氢键供体 (HBD) 和氢键受体 (HBA) 而获得的新型试剂^[4]。低共熔溶剂具有成本低、易于设计和环境友好等优点, 在提取、催化、有机合成和制药等领域展现出巨大的应用潜力^[5-8]。迄今为止, 以氯化胆碱和有机酸构成的低共熔溶剂已成功从天然资源中提取虾青素^[9,10]。Mussagy 等^[11]采用 n (氯化胆碱): n (丁酸) = 1:5 从红法夫酵母中提

取虾青素, 回收率达 81.8%。但是, 低共熔溶剂的黏度普遍显著高于有机溶剂, 不利于萃取过程的质量传递, 是低共熔溶剂用于萃取领域亟需解决的问题之一^[12]。与亲水性低共熔溶剂和其他基于磷的疏水性低共熔溶剂相比, 萜烯类低共熔

收稿日期: 2022-09-18; 网络首发日期: 2022-11-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21706040, 22078070); 广东省自然科学基金项目 (2019A15010640, 2019A15011843)。

作者简介: 程婉婷 (1998-), 女, 广西玉林人, 硕士生, 主要研究方向为天然产物提取; 陈世钰 (2002-), 女, 广西北海人, 本科生, 主要研究方向为天然产物提取。

通讯作者: 高静, E-mail: gaojing1231@163.com。

引用本文: 程婉婷, 陈世钰, 贤凤, 等. 酸性低共熔溶剂的理化特性及其与虾青素溶解度的相关性研究 [J]. 化学试剂, 2023, 45(2): 106-113。

溶剂黏度较低,还具有抗炎和抗菌特性^[13]。

据文献报道,类胡萝卜素的提取效率和抗氧化能力在酸性条件下显著提高^[14]。因此,本研究以薄荷醇和脂肪酸为氢键受体、以有机酸为氢键供体,构建酸性低共熔溶剂。系统测定了不同温度下 7 种酸性低共熔溶剂的物理化学性质(密度、黏度、电导率、表面张力、极性和热稳定性),并且考察了虾青素在不同低共熔溶剂中的溶解度,同时与有机试剂和离子液体相比较。最后,深入研究了酸性低共熔溶剂的理化特性与虾青素溶解度之间的关联特性。本研究旨在为类胡萝卜素提供一种更为高效和绿色的新型溶剂体系。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

MCR102 型模块化智能型高级旋转流变仪(安东帕);UV-1800 型紫外-可见分光光度计、AW120 型分析天平(日本岛津公司);SDT650 型热重-差热同步测定系统(美国 TA 仪器有限公司);DDSJ-308A 型电导率仪(上海仪电科学仪器股份有限公司);HH-6 型数显电子恒温水浴锅(常州国华电器有限公司)。

DL-薄荷醇(纯度>98%)、丙酸(纯度>99%)、戊酸(纯度>98%)、辛酸(纯度>99%)、虾青素分析标准品(纯度>98%)(上海阿拉丁生化科技有限公司);十二烷酸(纯度>99%)、十四烷酸(纯度>99%)、癸酸(纯度>98%)、壬酸(纯度>98%)(上海麦克林生化科技有限公司);冰醋酸(分析纯,广东光华科技有限公司)。低共熔溶剂化学结构如图 1 所示。

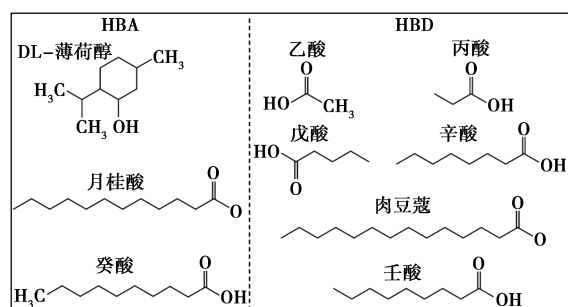


图 1 低共熔溶剂的化学结构

Fig.1 Chemical structures of deep eutectic solvent

1.2 实验方法

1.2.1 低共熔溶剂的制备

如表 1 所示,采用加热搅拌法^[15]于 60~80 °C 恒温搅拌,直至溶液变为均一透明,冷却至

室温后备用。

表 1 DES 的组成和简称以及氢键受体与氢键供体物质的量比

Tab.1 Composition and abbreviation of DES and molar ratio of hydrogen bond acceptor and hydrogen bond donor

编号	氢键受体	氢键供体	物质的量比	简称	参考文献
DES-1	月桂酸	癸酸	1:2	LADA	[16]
DES-2	月桂酸	壬酸	1:3	LANA	[16]
DES-3	癸酸	肉豆蔻酸	5:1	DAMA	[17]
DES-4	DL-薄荷醇	乙酸	1:2	MAA	[18]
DES-5	DL-薄荷醇	丙酸	1:2	MPA	[18]
DES-6	DL-薄荷醇	戊酸	1:2	MVA	[18]
DES-7	DL-薄荷醇	辛酸	1:2	MOA	[18]

1.2.2 低共熔溶剂理化性质的测定

水分测定采用 GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》方法;电热恒温鼓风干燥箱设定为 101.3 kPa、378.15 K;密度测定:采用重量体积法;电导率:使用电导率仪测定;表面张力:表面张力计测定;黏度测定:使用旋转流变仪在 303.15~343.15 K 程序升温,50 s⁻¹恒定剪切速率测定;极性测定^[19]:紫外-可见分光光度计 303.15 K,对铵基苯铵以及 N,N-二乙基-4-硝基苯铵、甲醇、低共熔溶剂的 Kamlet-Taft 极性参数(β , π),计算参考 Guan 等^[19]方法。

1.2.3 虾青素溶解度测定

向装有低共熔溶剂的 2 mL 离心管中加入虾青素,经超声混匀 5 min,然后控制温度为 303.15、313.15、323.15、333.15、343.15 K,放到恒温振荡仪连续振荡 24 h,使用离心机在 8 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液用 0.45 μ m 有机滤膜过滤,无水乙醇稀释,在最大吸收波长处测定吸光度,根据标准曲线,计算虾青素溶解度。

1.3 数据分析

试验均测定 3 次,采用软件 SPSS 26 进行方差分析, $P<0.05$ 时具有统计学差异。

2 结果与讨论

2.1 DES 的基本性质

2.1.1 密度

低共熔溶剂的密度取决于分子的组织 and 堆积,并且受液体中空穴和空位的影响^[20]。测定 7 种低共熔溶剂在 303.15~343.15 K 温度范围内的密度,结果如图 2a 所示。7 种低共熔溶剂的密度均小于水,密度范围为 0.867 3~0.938 1 g/cm³。根据“空穴”理论,热能在局部密度上产

生涨落,所以低共熔溶剂液体中离子运动和自由体积的增加导致低共熔溶剂密度随温度的升高而降低。本文研究结果与朱俊芳等^[21]研究规律相似,即温度越高,低共熔溶剂的密度越小。

另一方面,低共熔溶剂的密度与氢键供体的种类密切相关^[22]。在相同温度下,7 种低共熔溶剂的密度大小整体符合以下规律:MAA>MPA>MVA>MOA>LADA≈DAMA≈LANA。在 303.15 K 下,密度最大的是 MAA,为 $(0.938\ 1 \pm 0.000\ 2)\text{ g/cm}^3$;密度最小的是 LANA,为 $(0.888\ 0 \pm 0.000\ 6)\text{ g/cm}^3$ 。由此可见,HBD 为长链的羧酸构成的低共熔溶剂的密度普遍较低。而且,含薄荷醇的低共熔溶剂密度较大,一方面可能是有机酸和薄荷醇之间形成氢键,构成致密的网络结构^[23],另一方面是,烷基链之间形成范德华相互作用会产生更好的堆积,从而形成更稠密的分子微观结构。

2.1.2 摩尔体积

温度也是影响分子摩尔体积(V_m)的重要因素。如图 2b 所示,当温度升高时,低共熔溶剂分子热运动加速,分子间缔合减弱,分子距离增大,摩尔体积增大。除此之外,低共熔溶剂自身的结构也是摩尔体积变化的主要原因。根据式(1)可知,当低共熔溶剂的相对分子质量大、密度小的时候,该低共熔溶剂的摩尔体积大。因此,由十二烷酸和十四烷酸组成的低共熔溶剂比薄荷醇类低共熔溶剂的摩尔体积大。在 303.15 K 下,摩尔体积最大的是 DAMA,为 $(611.72 \pm 0.72)\text{ cm}^3/\text{mol}$,摩尔体积最小的是 MAA,为 $(147.30 \pm 0.04)\text{ cm}^3/\text{mol}$ 。

$$V_m(\text{cm}^3/\text{mol}) = M/\rho \quad (1)$$

式中: M 为混合相对分子质量。

2.1.3 等压热膨胀系数

如图 2c 所示,当温度升高时,离子的热运动和自由体积的增加使等压膨胀系数变大。由式(2)可知,升温使摩尔体积增大,密度减小,从而导致等压膨胀系数增大。同样,由于其自身结构的不同,其规律和摩尔体积又略有不同。在 303.15 K 下,MVA 和 MOA 这两者的等压膨胀系数较大,分别为 (7.70 ± 0.07) 、 $(7.95 \pm 0.02)\text{ k}^{-1}$,说明两者分子内部的热运动对温度变化更加敏感。这一现象与氢键供体的链长相关,氢键供体链长越长,等压膨胀系数越大,MVA 和 MOA 相对于温度的变化膨胀体积更大。303.15 K 时,等压膨胀系数最小的是 MPA,为 $(5.31 \pm 0.03)\text{ k}^{-1}$,其

压缩性相对其他几种来说更强。

$$\alpha_p = -[A_1/(A_0 + A_1 T)] \quad (2)$$

式中: A_0 和 A_1 为密度线性回归方程中得到的系数。

2.1.4 黏度

在绿色萃取技术中,具有低黏度的溶剂具有更强的优势。近年来,离子液体成为广泛关注的萃取溶剂^[24]。但是,由于其黏度很高,往往通过加水或有机溶剂等助溶剂来降低黏度,限制了其在萃取领域的功能^[25]。低共熔溶剂因成本低、易降解等特性,被普遍认为是替代离子液体的理想溶剂,但是其黏度仍然普遍很高。常见的离子液体,如溴化-1-丁基-3-甲基咪唑和 1-丁基-3-甲基咪唑四氟硼酸盐在室温下表现为固体状态,三丁

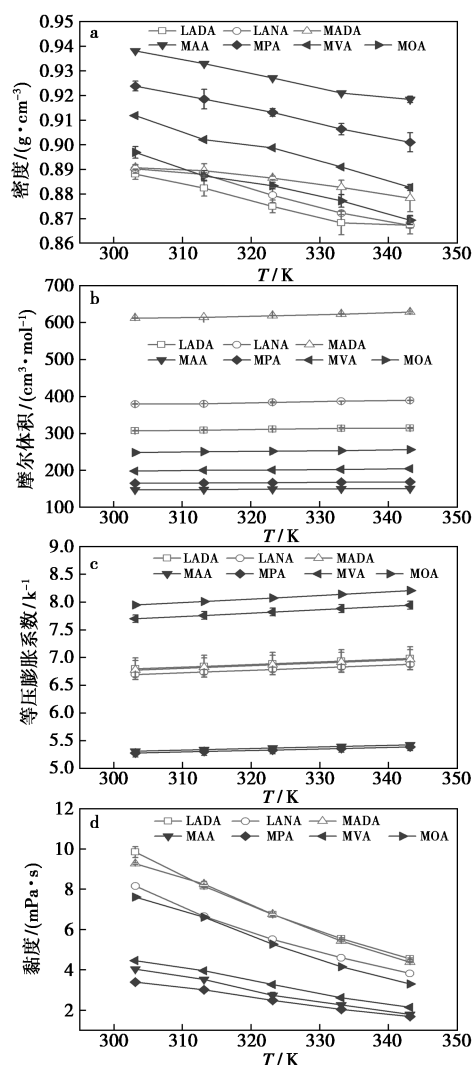


图 2 不同温度下 DES 的密度(a)、摩尔体积(b)、等压膨胀系数(c)和黏度(d)

Fig.2 Density (a), molar volume (b), coefficient of equipartition expansion (c) and viscosity (d) of DES at different temperatures

基辛基氯化膦($[P_{4448}]Cl$)在 298.15 K 下黏度为 $1\,260\text{ mPa}\cdot\text{s}$ ^[26],常见的低共熔溶剂如氯化胆碱:葡萄糖、氯化胆碱:果糖在 298.15 K 下的黏度分别为 $(654.05\pm 39.65)\times 10^3$ 、 $(54.06\pm 0.48)\times 10^3\text{ mPa}\cdot\text{s}$ ^[26],都不利于工业上的生产操作。Van 等^[27]建议将黏度为 $100\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 作为过程工程研究中的最大黏度值。因此,探索低黏度的低共熔溶剂并应用于萃取领域具有十分重要的研究价值。从图 2d 中可以看出,本研究的 7 种低共熔溶剂黏度均低于 $10\text{ mPa}\cdot\text{s}$,与离子液体和常见低共熔溶剂相比,显示出理想的流动性,具有作为良好萃取溶剂的潜力。

此外,通过调节温度获得适宜黏度的溶剂是常见的方法之一。升高温度使分子热运动剧烈,破坏了低共熔溶剂 HBA 和 HBD 之间的氢键网络,分子间的相互作用力减弱,导致低共熔溶剂黏度随温度升高而降低。例如,当温度从 303.15 K 升高到 343.15 K,MAA 的黏度从 $(4.04\pm 0.02)\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 迅速降低到 $(1.74\pm 0.13)\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 。

另一方面,可以基于“空穴”理论使用小尺寸的 HBD 和 HBA 设计低黏度低共熔溶剂。聂文洁等^[28]测定氯化胆碱类低共熔溶剂时发现 HBD 的碳链长度为乙二醇<1,3-丙二醇<1,4-丁二醇,随着 HBD 链长的增加,黏度升高。Shi 等^[29]也提出,具有相同 HBA 的低共熔溶剂的一般趋势是黏度随着 HBD 链长的减少而降低。对于本研究的 7 种低共熔溶剂,增加脂肪酸的烷基链长度对黏度的影响可以忽略不计,应更多的考察氢键受体的类型。这一现象与 Wu 等^[30]研究结果类似,HBA 为苦参碱,HBD 为癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸时,在 303.15 K 时的黏度值为 247、236、238 $\text{mPa}\cdot\text{s}$,可推断出烷基链长对黏度没有影响。从图 2d 中可观察到,在 343.15 K 下,不同低共熔溶剂的黏度值变得接近,随着温度的变化,两种有机酸类组成的低共熔溶剂的黏度范围要表现得更宽,其黏度值对温度的敏感性更强。

2.1.5 表面张力

表面张力可用来揭示分子结构对低共熔溶剂中氢键受体和氢键供体之间相互作用强度的影响,是萃取溶剂的一个重要特性,影响提取效率和提取液雾化过程。表面张力和黏度均与“空穴”理论有关^[28]。通常,黏度和表面张力呈正相关关系。溶剂的黏度越低,则表面张力值越低,形成液

滴的能力越大,越容易渗入狭窄空间^[31]。

7 种低共熔溶剂的黏度接近,介于 $2\sim 10\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 之间,而 7 种低共熔溶剂在 303.15 K 下的表面张力也没有显著性差异,平均为 28.48 mN/m (表 2)。常见的有机溶剂如乙二醇的表面张力为 48 mN/m (298.15 K)^[32],常见的低共熔溶剂如氯化胆碱:乳酸的表面张力为 47.4 mN/m (293.15 K)^[33]。与此相比,本研究的 7 种低共熔溶剂具有较低的表面张力,形成液滴的能力较强,传质速率较高,有作为活性物质提取液和良好递送系统的潜力。

2.1.6 极性

Kamlet-Taft 参数用于表示溶剂中的氢键相互作用、分散相互作用和静电相互作用,包括 α (给予质子的溶剂容量)、 β (接受质子的溶剂能力)和 π^* (偶极性/极化率)^[34]。疏水性低共熔溶剂的极性主要取决于 HBA 的性质。表 2 总结了 303.15 K 下 7 种低共熔溶剂的极性参数。

从研究数据来看,未发现极性参数与 HBD 的碳链长有直接的关系,极性大小的影响更多是 HBA 的种类,由于 DL-薄荷醇中存在芳香环,所以 π^* 值会相对较高,但会降低其作为氢键受体(β 值)的能力^[35],也就是说 β 值和 π^* 值通常会呈现出相反的趋势^[36]。Florindo 等^[37]测定了 n (DL-薄荷醇): n (乙酸)=1:1、 n (DL-薄荷醇):(辛酸)=1:1 的 β 值分别为 0.60 和 0.50, π^* 值分别为 0.53 和 0.37。与本研究结果相比,其 β 值增大而 π^* 值减小,可推断增加低共熔溶剂中薄荷醇比例会使提供氢键的能力增强,偶极性/极化率会相对降低。

2.1.7 热稳定性

在萃取过程中常常需要输入外界热量促进提取效率,此时溶剂的热稳定性就尤为重要。测定了 7 种低共熔溶剂的热重曲线,将初始降解温度(T_i)、最大降解速率峰的温度(T_{peak})、降解终止温度(T_f)3 个参数列于表 2 中。

总体来说,7 种低共熔溶剂都具有较好的热稳定性,降解起始温度均大于 300 K。而且脂肪酸类的低共熔溶剂比 DL-薄荷醇基的低共熔溶剂稳定性更强,遵循如下规律:MAA<MPA<MVA<MOA。HBD 的碳链越长,热稳定性越好。由于乙酸和丙酸其本身具有易挥发的特性,在高温下更加速了他们的降解。MOA 的降解起始温度最高,

达到 426.35 K, 表现出了很好的热稳定性。

表 2 DES 的热稳定性参数

Tab.2 Thermal stability parameters of DES

DES 种类	$F/(\text{mN} \cdot \text{m}^{-1})$	β	π^*	T_i/K	T_{peak}/K	T_f/K
MAA	27.55±0.04	0.46±0.48	0.60±0.04	319.78	464.01	469.09
MPA	27.39±0.02	0.40±0.44	0.58±0.00	325.84	408.96	457.49
MVA	27.41±0.06	0.43±0.41	0.54±0.01	363.50	541.09	550.69
MOA	28.14±0.03	0.41±0.58	0.53±0.01	426.35	525.18	583.45
LADA	29.56±0.04	0.54±0.44	0.32±0.06	394.33	539.89	549.93
LANA	29.56±0.04	0.49±0.48	0.35±0.03	405.77	535.36	556.72
DAMA	29.74±0.02	0.52±0.51	0.36±0.01	371.63	534.91	561.00

注: T_i 为初始降解温度; T_{peak} 为最大降解速率峰的温度; T_f 为降解终止温度; 303.15 K 下的表面张力(F)、氢键碱度(β)和偶极化率(π^*)。

2.2 虾青素在低共熔溶剂中的溶解度

溶剂对虾青素的溶解度大小直接反映出其从天然资源中提取虾青素的能力。提高溶解度是提高萃取率的有效手段^[38], 一般情况下, 溶解度随温度的升高而升高。例如, β -胡萝卜素的溶解度随着温度的升高呈指数级增长^[39]。

实验测定了在 303.15 ~ 343.15 K 温度范围内虾青素在不同低共熔溶剂中的溶解度, 结果如图 3 所示。343.15 K 时, 虾青素在 MAA 中溶解度最高为 $(405.94 \pm 12.90) \text{ mg}/100 \text{ g}$, 而 303.15 K 时, 虾青素溶解度仅为 $(67.92 \pm 2.85) \text{ mg}/100 \text{ g}$, 可证明升高温度使溶解度得到极大的增加。

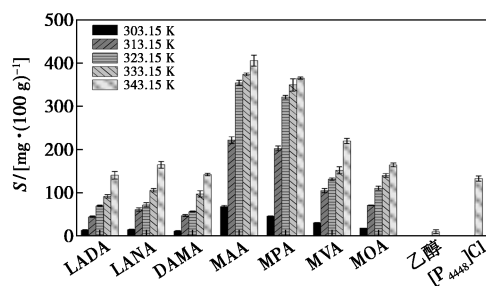


图 3 不同温度下虾青素在 DES、乙醇和 $[\text{P}_{4448}]\text{Cl}$ 中的溶解度

Fig.3 Solubility of astaxanthin in DES, ethanol and $[\text{P}_{4448}]\text{Cl}$ at different temperatures

此外, 低共熔溶剂的结构决定了其溶解能力

的强弱。前期研究发现, 由低共熔溶剂(薄荷醇: 乙酸)制备的微乳液体系溶解虾青素、虾青素酯和叶黄素能力最强^[18]。虾青素在 7 种低共熔溶剂中的溶解度有较大差异, HBD 碳链短的更有利于虾青素的溶解, 其中 MAA 的溶解能力最强 $((405.94 \pm 12.90) \text{ mg}/100 \text{ g}, 343.15 \text{ K})$ 。DL-薄荷醇类和脂肪酸类低共熔溶剂间的结构主要差异是 DL-薄荷醇中存在芳香环, 这意味着它可以建立 π 堆叠相互作用^[31]。Mohd 等^[40] 提出分离生物活性化合物使用的低共熔溶剂大多数都含有有机酸, 而不是糖和多元醇, 这是由于溶质和低共熔溶剂分子之间强氢键相互作用。换句话说, 酸性更强的溶液表现出更好的溶解效果, 这也解释了虾青素在 MAA 中溶解度高的原因。

为了体现低共熔溶剂作为新型提取溶剂的优越性, 进一步比较了提取虾青素常用的有机溶剂以及提取率较高的离子液体, 结果如图 3 所示。343.15 K 时, 虾青素在乙醇中的溶解度为 $(8.375 \pm 0.217) \text{ mg}/100 \text{ g}$, 远小于本研究中虾青素在低共熔溶剂中溶解度。近年来, 越来越多研究者开始关注用离子液体来提取天然类胡萝卜素, 四丁基磷三氟乙酸盐 $([\text{P}_{4444}]\text{CF}_3\text{COO})$ 、三丁基辛基氯化磷 $([\text{P}_{4448}]\text{Cl})$ 已被证明可成功提取出虾青素^[41,42]。343.15 K 下, 含水量为 20% 的 $[\text{P}_{4448}]\text{Cl}$ 溶解度为 $(121.316 \pm 8.947) \text{ mg}/100 \text{ g}$, 虽然与有机溶剂相比已经有较好的增溶效果, 但仍然低于 MAA 及其他 6 种酸性低共熔溶剂的溶解能力。不仅如此, 季磷类离子液体的制备成本也远大于酸性低共熔溶剂。

由此可见, 基于 DL-薄荷醇和脂肪酸类的疏水性低共熔溶剂可显著改善虾青素的溶解能力, 且比离子液体合成过程更经济简便, 是有机溶剂的良好替代品, 更有望代替离子液体成为低成本、更绿色的天然提取溶剂。

2.3 低共熔溶剂理化性质与虾青素的溶解度相关性分析

Cablé 等^[43] 研究中发现, n (辛酸): n (薄荷醇) = 2:1 低共熔溶剂对酚类化合物表现出最高的提取效率, 且密度更高。同样, Fan 等^[44] 筛选出的 n (薄荷醇): n (1-丁醇) = 1:1 从雨生红球藻中提取紫杉烷的回收率超过 95.31%, 相比之下该低共熔溶剂也表现出较高的密度和较低的黏度。为了研究低共熔溶剂各物理性质与虾青素溶解度之间的相关性, 绘制了低共熔溶剂性质数据与虾

青素溶解度数据关联系数热图,结果如图 4 所示。

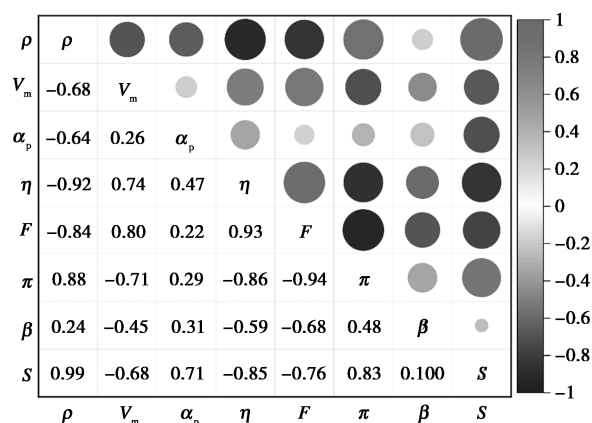


图 4 DES 物理性质之间的相关性热图

Fig.4 Heatmaps of correlations between DES physical properties

关联系数(R)越接近“1”,相关性越强,关联系数为正数表现为正相关。就溶解度来说,其与密度、摩尔体积、等压膨胀系数、黏度、表面张力和 π^* 值都显著相关($R>0.6$)^[45],并且密度、黏度、表面张力这三者间的关联性较强($R>0.8$)。其中,密度与黏度、表面张力呈负相关,黏度与表面张力呈正相关,这与溶剂自身结构、分子之间缔合的紧密程度和分子间相互作用有关。

由图 4 可知,溶解度与密度相关系数最大($R=0.99$),表示低共熔溶剂的密度越大,其对虾青素的溶解能力更强。该结论与图 3 数据高度吻合,MAA 的密度最大,其对虾青素的增溶效果也最好。因此,密度可作为预测低共熔溶剂对虾青素溶解度的重要指标之一。其次,低共熔溶剂的溶解度与黏度关联系数较高($R=-0.85$),即黏度更低的溶剂更有利于溶解虾青素。毫无疑问,低黏度的溶剂具有较大的优势且有利于提高传质速率,由图 2d 黏度数据可得,MAA 和 MPA 拥有较低的黏度,虾青素在其中表现出了更高的溶解度。 π^* 值与溶解度的关联系数也相对较高($R=0.83$), π^* 值通常用来表示分子极性的大小,极性大的低共熔溶剂与虾青素分子结合能力越强,越容易形成氢键,起到更好的溶解效果。

3 结论

本文以薄荷醇和脂肪酸为氢键受体、不同链长的有机酸作为氢键供体构建了 7 种酸性低共熔溶剂,考察了低共熔溶剂的物理性质在不同温度下的变化规律和虾青素在不同溶剂中的溶解度。

HBD 的烷基链之间形成相互作用产生堆积,从而形成更稠密的分子微观结构,较长碳链的 HBD 表现出更小的密度和更大的黏度。此外,它们表现出理想的流动性,形成液滴能力强,传质速率较高,溶解虾青素能力均强于乙醇和离子液体[P₄₄₄₈]Cl。虾青素在低共熔溶剂中溶解度与密度和偶极性/极化率呈正相关性,与黏度呈负相关性。综合评价,MAA 在 7 种低共熔溶剂中密度最大、黏度最小、 π^* 值最大,虾青素的溶解度最高,可达(405.94±12.90) mg/100 g。本研究为探索低共熔溶剂作为提取类胡萝卜素的新型溶剂提供了理论依据。

参考文献:

- [1] REN Y, DENG J, HUANG J, et al. Using green alga *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin and lipid co-production; Advances and outlook [J]. *Bioresour Technol.*, 2021, **340**: 125-736.
- [2] ANEESH P A, AJEESHKUMAR K K, LEKSHMI R G K, et al. Bioactivities of astaxanthin from natural sources, augmenting its biomedical potential; A review [J]. *Trends. Food. Sci. Tech.*, 2022, **125**: 81-90.
- [3] DONG S, HUANG Y, ZHANG R, et al. Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *Sci. World J.*, 2014, **2** 014: 694-305.
- [4] HANSEN B B, SPITTLE S, CHEN B, et al. Deep eutectic solvents; A review of fundamentals and applications [J]. *Chem. Rev.*, 2021, **121**(3): 1 232-1 285.
- [5] ABO-HAMAD A, HAYYAN M, ALSAADI M A, et al. Potential applications of deep eutectic solvents in nanotechnology [J]. *Chem. Eng. J.*, 2015, **273**: 551-567.
- [6] XU P, ZHENG G W, ZONG M H, et al. Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis [J]. *Bioresour Bioprocess*, 2017, **4**(1): 34.
- [7] SEKHARAN T R, KATARI O, RUHINA RAHMAN S N, et al. Neoteric solvents for the pharmaceutical industry: An update [J]. *Drug Discov. Today.*, 2021, **26**(7): 1 702-1 711.
- [8] CAO D, LIU Q, JING W, et al. Insight into the deep eutectic solvent extraction mechanism of flavonoids from natural plant [J]. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2020, **8**(51): 19 169-19 177.
- [9] CHANDRA ROY V, HO T C, LEE H J, et al. Extraction of astaxanthin using ultrasound-assisted natural deep eutectic solvents from shrimp wastes and its application in bio-

- active films[J]. *J. Clean. Prod.*, 2021, **284**: 125 417.
- [10] LEE Y R, ROW K H. Comparison of ionic liquids and deep eutectic solvents as additives for the ultrasonic extraction of astaxanthin from marine plants [J]. *J. Ind. Eng. Chem.*, 2016, **39**: 87-92.
- [11] MUSSAGY C U, SANTOS-EBINUMA V C, HERCULANO R D, et al. Ionic liquids or eutectic solvents? Identifying the best solvents for the extraction of astaxanthin and β -carotene from *Phaffia rhodozyma* yeast and preparation of biodegradable films [J]. *Green Chem.*, 2022, **24**(1): 118-123.
- [12] VAN OSCH D J G P, DIETZ C H J T, WARRAG S E E, et al. The curious case of hydrophobic deep eutectic solvents: A story on the discovery, design, and applications [J]. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2020, **8**: 10 591-10 612.
- [13] SILVA J M, PEREIRA C V, MANO F, et al. Therapeutic role of deep eutectic solvents based on menthol and saturated fatty acids on wound healing [J]. *ACS Appl. Bio. Mater.*, 2019, **2**(10): 4 346-4 355.
- [14] ZHOU Y, YIN D, WANG D, et al. Experiment investigation of microemulsion enhanced oil recovery in low permeability reservoir [J]. *J. Mater. Res. Technol.*, 2020, **9**(4): 8 306-8 313.
- [15] ABBOTT A P, CAPPER G, DAVIES D L, et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures [J]. *Chem. Commun. (Camb)*, 2003, **1**: 70-71.
- [16] FLORINDO C, ROMERO L, RINTOUL I, et al. From phase change materials to green solvents: Hydrophobic low viscous fatty acid-based deep eutectic solvents [J]. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2018, **6**(3): 3 888-3 895.
- [17] HAIDER M B, DWIVEDI M, JHA D, et al. Azeotropic separation of isopropanol-water using natural hydrophobic deep eutectic solvents [J]. *J. Environ. Chem. Eng.*, 2021, **9**(1): 104 786.
- [18] LI Y, HU K, HUANG C, et al. Improvement of solubility, stability and antioxidant activity of carotenoids using deep eutectic solvent-based microemulsions [J]. *Colloids. Surf. B. Biointerf.*, 2022, **217**: 112 591.
- [19] GUAN W, CHANG N, YANG L, et al. Determination and prediction for the polarity of ionic liquids [J]. *J. Chem. Eng. Data.*, 2017, **62**(9): 2 610-2 616.
- [20] OMAR K A, SADEGHI R. Physicochemical properties of deep eutectic solvents: A review [J]. *J. Mol. Liq.*, 2022, **360**: 119 524.
- [21] 朱俊芳, 王咸英, 冯树波. 憎水性薄荷醇-乳酸低共熔溶剂的合成及其理化性质表征 [J]. 化学研究与应
用, 2018, **30**(2): 219-225.
- [22] EL ACHKAR T, GREIGE-GERGES H, FOURMENTIN S. Basics and properties of deep eutectic solvents: A review [J]. *Environ. Chem. Lett.*, 2021, **19**(4): 3 397-3 408.
- [23] SAS O G, IVANIŠ G R, KIJEVČANIN M L, et al. High pressure densities and derived thermodynamic properties of deep eutectic solvents with menthol and saturated fatty acids [J]. *J. Chem. Thermodyn.*, 2021, **162**: 106 578.
- [24] KAUR G, KUMAR H, SINGLA M. Diverse applications of ionic liquids: A comprehensive review [J]. *J. Mol. Liq.*, 2022, **351**: 118 556.
- [25] CHÁVEZ-CASTELLANOS Á E, AGUILAR-MARTINEZ M, REYNA-GONZÁLEZ J M. Effect of water and ions on the rheological behavior of a low viscosity ammonium-based ionic liquid [J]. *Fluid Phase Equilibr.*, 2022, **556**: 113 391.
- [26] 张莉莉, 李艳, 高静. 热可逆离子液体-低共熔溶剂双水相体系的相行为及理化特性研究 [J]. 化工学报, 2021, **72**(5): 2 493-2 505.
- [27] VAN OSCH D J G P, DIETZ C H J T, VAN SPRONSEN J, et al. A search for natural hydrophobic deep eutectic solvents based on natural components [J]. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2019, **7**(3): 2 933-2 942.
- [28] 聂文洁, 王剑飞, 赵贯甲. 氯化胆碱类低共熔溶剂结构与性质的分子动力学研究 [J]. 四川大学学报 (自然科学版), 2022, **59**(3): 104-112.
- [29] SHI Y, XIONG D, ZHAO Y, et al. Highly efficient extraction/separation of Cr(VI) by a new family of hydrophobic deep eutectic solvents [J]. *Chemosphere.*, 2020, **241**: 125 082.
- [30] WU J, YIN T. Insight into the physicochemical properties and bioactivities of therapeutic deep eutectic solvents based on matrine and fatty acids [J]. *J. Mol. Liq.*, 2022, **360**: 119 560.
- [31] BERGUA F, CASTRO M, MUÑOZ-EMBID J, et al. L-menthol-based eutectic solvents: Characterization and application in the removal of drugs from water [J]. *J. Mol. Liq.*, 2022, **352**: 118 754.
- [32] TIAN X X, KALBASI R, JAHANSHAH R, et al. Competition between intermolecular forces of adhesion and cohesion in the presence of graphene nanoparticles: Investigation of graphene nanosheets/ethylene glycol surface tension [J]. *J. Mol. Liq.*, 2020, **311**: 113 329.
- [33] CHEN Y, CHEN W, FU L, et al. Surface tension of 50 deep eutectic solvents: Effect of hydrogen-bonding donors, hydrogen-bonding acceptors, other solvents, and temperature [J]. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2019, **58**(28):

- 12 741-12 750.
- [34] CAO J, SU E. Hydrophobic deep eutectic solvents: The new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry[J]. *J. Clean. Prod.*, 2021, **314**: 127 965.
- [35] MARTINS M A R, CRESPO E A, PONTES P V A, et al. Tunable hydrophobic eutectic solvents based on terpenes and monocarboxylic acids[J]. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2018, **6**(7): 8 836-8 846.
- [36] FAROOQ M Q, ABBASI N M, ANDERSON J L. Deep eutectic solvents in separations: Methods of preparation, polarity, and applications in extractions and capillary electrochromatography [J]. *J. Chromatogr. A.*, 2020, **1 633**: 461 613.
- [37] FLORINDO C, MCINTOSH A J S, WELTON T, et al. A closer look into deep eutectic solvents: Exploring intermolecular interactions using solvatochromic probes[J]. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **20**(1): 206-213.
- [38] SHEKAARI H, MOKHTARPOUR M, FARAJI S, et al. Enhancement of curcumin solubility by some choline chloride-based deep eutectic solvents at different temperatures[J]. *Fluid Phase Equilibr.*, 2021, **532**: 112 917.
- [39] MOHAMMADI H S, ASL A H, KHAJENOORI M. Experimental measurement and correlation of solubility of β -carotene in pure and ethanol-modified subcritical water [J]. *Chin. J. Chem. Eng.*, 2020, **28**(10): 2 620-2 625.
- [40] MOHD F F, MOHD M N, HARUN-KAMARUDDIN A. Hydrophilic natural deep eutectic solvent: A review on physicochemical properties and extractability of bioactive compounds[J]. *J. Mol. Liq.*, 2021: 339.
- [41] GAO J, FANG C, LIN Y, et al. Enhanced extraction of astaxanthin using aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and potassiumphosphate[J]. *Food Chem.*, 2020, **309**: 125 672.
- [42] GAO J, YOU J, KANG J, et al. Recovery of astaxanthin from shrimp (*Penaeus vannamei*) waste by ultrasonic-assisted extraction using ionic liquid-in-water microemulsions[J]. *Food Chem.*, 2020, **325**: 126 850.
- [43] CABLÉ P A, LE BRECH Y, MUTELET F. Liquid-liquid extraction of phenolic compounds from aqueous solution using hydrophobic deep eutectic solvents [J]. *J. Mol. Liq.*, 2022, **366**: 120 266.
- [44] FAN X H, WANG L T, CHANG Y H, et al. Application of green and recyclable menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents aqueous for the extraction of main taxanes from taxus chinensis needles[J]. *J. Mol. Liq.*, 2021, **326**: 114 970.
- [45] 吴映梅, 徐龙泉, 杨倩. 凯里红酸汤中番茄红素异构体含量及与有机酸的相关性分析[J]. *中国调味品*, 2022, **47**(6): 23-26; 43.

响应面法优化毛大丁草总香豆素提取工艺及其抗氧化作用研究

高奇^{1,2}, 李齐激^{1,2}, 杨柳², 杨娟^{1,2}, 孙超^{*1,2}

(1. 贵州医科大学 药学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014)

摘要:以毛大丁草为研究对象, 选择提取温度、提取溶剂、料液比和提取时间进行单因素试验, 在单因素试验基础上, 采用 Box-Behnken 响应面法优化其总香豆素提取工艺, 并测定不同产地毛大丁草总香豆素提取率及评价其体外抗氧化活性。结果表明, 其最佳提取工艺为提取温度 85 ℃, 乙醇体积分数 60%, 料液比 1:40 (g/mL), 提取时间 60 min。不同产地中清除率最高的为广西百色市样品, IC_{50} 为 0.36 $\mu\text{g/mL}$; 最低的是贵州黔南州样品, IC_{50} 为 121.43 $\mu\text{g/mL}$ 。不同产地兰香草总黄酮具有一定的总抗氧化能力, 能够有效地清除 DPPH 自由基, 效果弱于同浓度条件下 V_c 。经验证该工艺合理、简便, 总香豆素提取率可达 1.66%。

关键词:毛大丁草; 总香豆素; 提取工艺; 响应面法; 抗氧化活性

中图分类号:R932 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2023)02-0114-07

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0700

Optimization of Extraction Process of Total Coumarins from *Piloselloides Hirsuta* by Response Surface Methodology and its Antioxidant Effect GAO Qi^{1,2}, LI Qi-ji^{1,2}, YANG Liu², YANG Juan^{1,2}, SUN Chao^{*1,2} (1. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025; 2. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China)

Abstract: Single factor experiments were carried out by choosing extraction solvent, solid-liquid ratio, extraction time and extraction temperature from *Piloselloides hirsuta*. Based on the results of single factor experiments, the Box-Behnken response surface methodology was used to optimize the extraction process of total coumarins, and the contents of total coumarins in *Piloselloides hirsuta* from different areas was determined and their antioxidant activities in vitro were compared and evaluated. The optimal reflux extraction process were as follows: extraction temperature 85 ℃, ethanol concentration 60%, solid-liquid ratio 1:40 (g/mL) and extraction time 60 min. The content of total coumarins of *Piloselloides hirsuta* from ten different areas are varied. Among them, the highest content of total flavonoids is from Baise, Guangxi, with IC_{50} of 0.36 $\mu\text{g/mL}$; the lowest content is from Qiannan Prefecture, Guizhou, with IC_{50} of 121.43 $\mu\text{g/mL}$. The total coumarins of *Piloselloides hirsuta* from different areas have a certain total antioxidant capacity, and they can scavenge DPPH radical effectively, which are all weaker than the same concentration of vitamin C. It has been proved that the process is reasonable and simple, and the extraction rate of total coumarins can reach 1.66%.

Key words: *sargassum pilosum*; total coumarins; extraction process; response surface methodology; antioxidant activity

毛大丁草为菊科兔耳一支箭属多年生草本植物兔耳风 *Piloselloides hirsuta* (Forsskal) C. Jeffrey ex Cufodontis 的全草, 别名白头翁、白薇等, 长于林缘、草丛中或旷野荒地上。在中国主要产于贵州、西藏、云南等省区, 在日本、尼泊尔等地也有分布^[1]。毛大丁草主要以全草入药, 具有宣肺止咳、发汗等作用^[2]。其化学成分主要为香豆素类、黄酮类、糖苷类、苯乙酮类等。其中又以香豆素类化合物为主, 包括简单香豆素、呋喃香豆素、吡喃香豆素等^[3,4]。现代药理学研究发现, 香豆素类化合物具有较为广泛的生物活性^[5-10]。毛大丁草的镇咳、平喘、抗炎、抗氧化等功效与其主要成分的香豆素类化合物紧密关联, 如 8-甲氧补骨脂素化合物是具有强的超氧化物负离子自由基的有效抑制

剂, 可通过增加血液中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽硫转移酶等酶的活性, 降低过氧化氢酶活性, 发挥抗氧化作用^[11]。童天娇等^[12]对秦皮的研究中发

收稿日期: 2022-09-17; 网络首发日期: 2022-11-09

基金项目: 贵州省科技创新能力建设专项项目(黔科合服企[2020]4013); 贵州省发展和改革委员会项目(黔财建[2019]303); 贵州省教育厅高等学校特色重点实验室项目(黔教合 KY 字[2020]018)。

作者简介: 高奇(1997-), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士生, 研究方向为天然药物化学及活性物质研究。

通讯作者: 孙超, E-mail: chao_sun2000@hotmail.com。

引用本文: 高奇, 李齐激, 杨柳, 等. 响应面法优化毛大丁草总香豆素提取工艺及其抗氧化作用研究[J]. 化学试剂, 2023, 45(2): 114-120。

现,同等浓度条件下香豆素提取液的抗氧化能力均强于 V_c 。从陆俊霞等^[13]的实验中得知,实验所用香豆素类化合物都具有良好的抗氧化活性。研究发现,具有抗氧化活性的天然产物被广泛应用于预防和治疗氧化应激所导致的各种疾病^[14,15]。

香豆素类成分是毛大丁草中的特征性功效成分,对其提取工艺研究可使其总香豆素含量最大化。因此本文通过对提取因素进行响应面实验,以总香豆素的提取率为检测指标,优选毛大丁草总香豆素的最佳提取工艺。同时考察毛大丁草中总香豆素对 DPPH 自由基和 ABTS⁺ 自由基的清除作用,以期为进一步探讨其药理活性和开发利用提供实验基础。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

UV-1800 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);EPOCH 型多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);DK-98-II 型水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);SB25-12DTD 型超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司);FA2004N 型电子天平(上海菁海仪器有限公司)。

羟基香豆素(贵州迪大科技有限责任公司);维生素 C、DPPH(梯希爱化成工业有限公司);ABTS 试剂盒、FRAP 试剂盒(南京建成生物工程研究所);其余试剂均为分析纯。

10 个产地毛大丁草由贵州中医药大学孙庆文教授鉴定为 *Piloselloides hirsute* (Forsskal) C. Jeffrey ex Cufodontis 的干燥全草,烘干备用。药材信息见表 1。

表 1 毛大丁草采收信息

Tab.1 Haryesting information of *Piloselloides hirsute*

编号	采集地区	药用部位
1	贵州黔南	全草
2	贵州毕节	全草
3	贵州贵阳	全草
4	广西玉林	全草
5	广西百色	全草
6	云南大理	全草
7	云南昆明	全草
8	安徽亳州	全草
9	河北保定	全草
10	福建三明	全草

1.2 实验方法

1.2.1 毛大丁草的提取

将毛大丁草洗净,真空干燥,粉碎,过 2 号筛,

以石油醚进行超声脱色处理,回收溶剂后烘干备用。精密称取 1.00 g 毛大丁草,按照一定的料液比加入一定浓度的乙醇,在一定的温度下回流提取一定时间后,过滤、稀释,作为待测溶液。

1.2.2 香豆素标准曲线的制备

精密称定 10.00 mg 7-羟基香豆素对照品,用 95%的乙醇溶解并定容至 25 mL,配制成 0.40 mg/mL 香豆素标准溶液,再将其稀释得到一定浓度梯度的标准品溶液,在 325 nm 波长处测定其吸光度值。以标准品的浓度 X 为横坐标、吸光度值 Y 为纵坐标,绘制标准曲线后得到回归方程 $Y = 96.92X + 0.0109 (R^2 = 0.9993)$ 。

1.2.3 单因素试验

1.2.3.1 提取方法对总香豆素提取率的影响

精密称定 1.00 g 毛大丁草粉末,在固定乙醇浓度、料液比 1:40(g/mL)、提取时间 60 min 的条件下,分别考察冷浸提取法、超声提取法、回流提取法对毛大丁草香豆素提取率的影响。每个实验平行 3 次,取平均值。

$$\text{毛大丁草总香豆素提取率} = [(C \times V \times n) / m] \times 100\%$$

式中: C 为在回归方程中求出的毛大丁草总香豆素的质量浓度,mg/mL; V 为提取溶剂体积,mL; n 为稀释倍数; m 为毛大丁草质量,g。

在乙醇体积分数 90%、料液比 1:20(g/mL)、提取温度 85 ℃、提取时间 60 min、提取 1 次的条件下,考察超声提取法、回流提取法、冷浸提取法对毛大丁草香豆素提取率的影响。

1.2.3.2 料液比对总香豆素提取率的影响

精密称取 5 份 1.00 g 毛大丁草粉末,固定乙醇体积分数为 95%、提取时间为 60 min、提取温度为 80 ℃,按料液比 1:10、1:20、1:30、1:40、1:50(g/mL)进行回流提取。每个实验平行 3 次,取平均值。

1.2.3.3 乙醇体积分数对总香豆素提取率的影响

精密称取 5 份 1.00 g 毛大丁草粉末,固定料液比 1:40(g/mL)、提取温度为 80 ℃、提取时间为 60 min,按乙醇体积分数为 50%、60%、70%、80%、90%进行回流提取。每个实验平行 3 次,取平均值。

1.2.3.4 提取时间对总香豆素提取率的影响

精密称取 5 份 1.00 g 毛大丁草粉末,固定料液比 1:40(g/mL)、乙醇体积分数为 60%、提取温度为 80 ℃,按提取时间为 30、60、90、120、150 min

进行回流提取。每个实验平行 3 次,取平均值。

1.2.3.5 提取温度对总香豆素提取率的影响

精密称取 1.00 g 毛大丁草粉末,固定料液比 1:40 (g/mL)、乙醇体积分数为 60%、提取时间为 60 min,按提取温度为 70、75、80、85、90 °C 进行回流提取。每个实验平行 3 次,取平均值。

1.3 响应面实验

以单因素考察为基础,将料液比、乙醇体积分数、提取时间、提取温度 4 个因素作为自变量,香豆素提取率为响应值,设计响应面优化实验。数据处理运用 Design-Expert 8.0.6 软件对响应面结果进行分析处理试验。实验自变量因素变化水平设计见表 2。

表 2 响应面实验设计的因素与水平

Tab.2 Factors and levels of response surface experimental design

水平	A 乙醇浓度/ %	B 料液比/ (g·mL ⁻¹)	C 提取时间/ min	D 提取温度/ °C
-1	50	1:30	30	80
0	60	1:40	60	85
1	70	1:50	90	90

1.4 不同产地毛大丁草香豆素含量的比较

按照响应面实验的最佳提取工艺对 10 个产地的毛大丁草进行回流提取,计算不同产地的毛大丁草香豆素的提取率,进行含量的差异比较。

1.5 抗氧化实验

精密称取 1.00 g 不同产地的毛大丁草粉末,按响应面下的最佳提取工艺进行总香豆素的提取,将所得提取液分别配制成浓度为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mg/mL 的样品溶液,分析其抗氧化能力。

1.5.1 毛大丁草香豆素清除 DPPH 自由基能力的测定

毛大丁草香豆素清除 DPPH 自由基的测定参照文献[16]的方法。精确称取 1.30 mg 的 DPPH 于棕色容量瓶中,用无水乙醇进行溶解定容制成浓度为 0.10 mmol/mL 的 DPPH 溶液。将 100 μL 香豆素乙醇溶液与 100 μL DPPH 溶液加入 96 孔板中,振摇均匀后室温避光 30 min,使用酶标仪在 517 nm 处测定其吸光度值,记为 A_x ;同时,将 100 μL DPPH 与 100 μL 乙醇溶液加入 96 孔板中,测定其吸光度值,记为 A_j ;将 100 μL 香豆素乙醇溶液与 100 μL 乙醇溶液加入到 96 孔板中,测定其吸光度值,记为 A_0 。按清除率 = $[1 -$

$(A_x - A_0)/A_j] \times 100\%$,计算不同浓度的香豆素溶液对 DPPH 自由基清除率的影响。在以香豆素乙醇溶液的浓度为横坐标,清除率为纵坐标绘制浓度-清除率曲线。阳性对照组将香豆素提取液替换为 V_c 进行测定。

1.5.2 毛大丁草香豆素清除 ABTS⁺ 自由基的测定

ABTS 在适当的氧化剂作用下氧化生成绿色的 ABTS⁺,在抗氧化物存在时,ABTS⁺的产生会被抑制,在 405 nm 处测定其吸光度值,则可计算出样品的总抗氧化能力。实验操作按说明书进行。

1.5.3 毛大丁草香豆素总抗氧化能力的测定

在酸性条件下抗氧化物质可以还原 Fe^{3+} -TPTZ 产生蓝色的 Fe^{2+} -TPTZ,在 593 nm 处测吸光度可以计算出样品的总抗氧化能力,实验操作按说明书进行。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验的确定

2.1.1 提取方法的确定

在乙醇体积分数 90%、料液比为 1:20 (g/mL)、提取温度 85 °C、提取时间 60 min、提取 1 次的条件下,考察超声提取法、回流提取法、冷浸提取法对毛大丁草总香豆素提取率的影响。由图 1 可知,回流提取时总香豆素的提取率最高,故选择回流提取法进行后续实验。

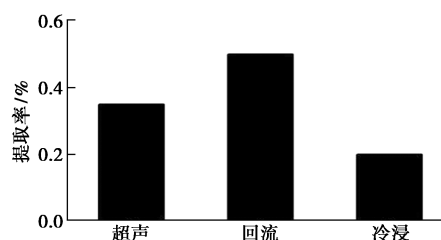


图 1 提取方法对总香豆素提取率的影响

Fig.1 Effect of extraction methods on extraction rate of coumarins

2.1.2 料液比的确定

由图 2a 可知,当料液比 < 1:40 (g/mL) 时,总香豆素的提取率随着料液比的增加而增加,当料液比为 1:40 (g/mL) 时,香豆素的提取率达到最大值,继续增加料液比,香豆素的提取率有所下降。当提取溶剂过大时,会造成水溶性蛋白和多糖的析出,使香豆素溶出受到阻碍,而且过高的料液比会造成成本增加,所以将 1:40 (g/mL) 作为最佳料液比。

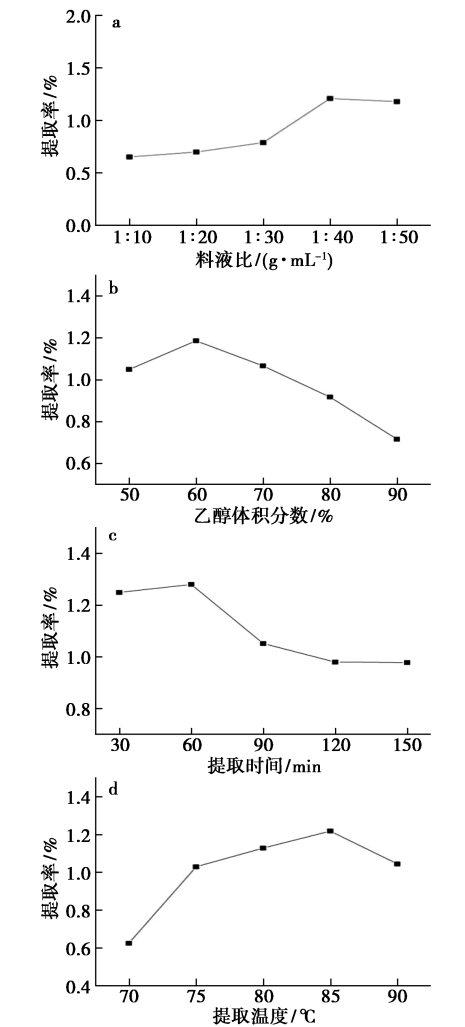


图 2 单因素对总香豆素提取率的影响

Fig.2 Effect of single factor on extraction rate of total coumarins

2.1.3 乙醇体积分数的确定

由图 2b 可知,当乙醇体积分数为 60%时,总香豆素提取率达到最高值,继续增加乙醇浓度,总香豆素提取率呈现出直线下降的趋势,这是因为香豆素类成分在乙醇中的溶出率比在水中的高,所以在乙醇浓度由 50%上升到 60%时,总香豆素提取率出现一个升高的趋势;但是当乙醇体积分数过高时,毛大丁草中其他脂溶性成分会溶出,对香豆素的提取产生不利的影响,所以将 60%乙醇作为最佳体积分数。

2.1.4 提取时间的确定

由图 2c 可知,30~60 min 范围内,总香豆素提取率随时间延长而不断增加。这是由于随时间延长可使药材粉末与提取溶剂接触更加完全和充分,使香豆素的溶出率更高。但当 60 min 后继续

延长提取时间,总香豆素的提取率出现一定的下降;在 90~150 min 时间内,总香豆素的提取率趋于稳定,因为长时间的加热导致物质的结构遭到破坏,增大杂质的析出,故将 60 min 定为最佳提取时间。

2.1.5 提取温度的确定

由图 2d 可知,在 70~85 °C 的温度范围内,总香豆素的提取率呈现出上升的趋势。当温度升到 85 °C,提取率达到最大值。原因是植物细胞在较高温度时容易破裂,且分子运动随着温度的升高而逐渐剧烈,可以促进香豆素的溶出。当温度继续升高时,香豆素的提取率不增反减。故最佳提取温度应为 85 °C。

2.2 响应面实验设计

2.2.1 响应面实验设计结果

以单因素考察为基础,响应面实验及设计结果见表 3,方差分析见表 4。运用 Design-Expert8.0.6 进行回归分析,得到毛大丁草总香豆素提取率(Y)对乙醇体积分数 A、料液比 B、提取温度 C、提取时间 D 的回归方程为: $Y = 1.36 - 0.046A + 0.024B + 0.065C - 5.000 \times 10^{-3}D + 0.092AB - 0.018AC + 0.023AD + 0.023BC + 0.023BD - 0.14CD - 0.099A^2 - 0.026B^2 - 0.092C^2 - 0.065D^2$ 。

表 3 Box-Behnken 实验设计与结果

Tab.3 Box-Behnken experimental design and results

编号	A 乙醇浓度/ %	B 料液比/ (g·mL ⁻¹)	C 提取时间/ min	D 提取温度/ °C	提取率 %
1	-1	-1	0	0	1.38
2	1	-1	0	0	1.13
3	-1	1	0	0	1.17
4	1	1	0	0	1.29
5	0	0	-1	-1	0.99
6	0	0	-1	-1	1.35
7	0	0	-1	1	1.34
8	0	0	1	1	1.16
9	-1	0	0	-1	1.28
10	1	0	0	-1	1.18
11	-1	0	0	1	1.17
12	1	0	0	1	1.16
13	0	-1	-1	0	1.18
14	0	1	-1	0	1.17
15	0	-1	1	0	1.27
16	0	1	1	0	1.35
17	-1	0	-1	0	1.15
18	1	0	-1	0	1.03
19	-1	0	1	0	1.35
20	1	0	1	0	1.16

续表

编号	A 乙醇浓度/ %	B 料液比/ (g·mL ⁻¹)	C 提取时间/ min	D 提取温度/ ℃	提取率 %
21	0	-1	0	-1	1.25
22	0	1	0	-1	1.34
23	0	-1	0	1	1.16
24	0	1	0	1	1.34
25	0	0	0	0	1.37
26	0	0	0	0	1.38
27	0	0	0	0	1.30
28	0	0	0	0	1.38
29	0	0	0	0	1.39

表 4 响应曲面方差分析及显著性检验

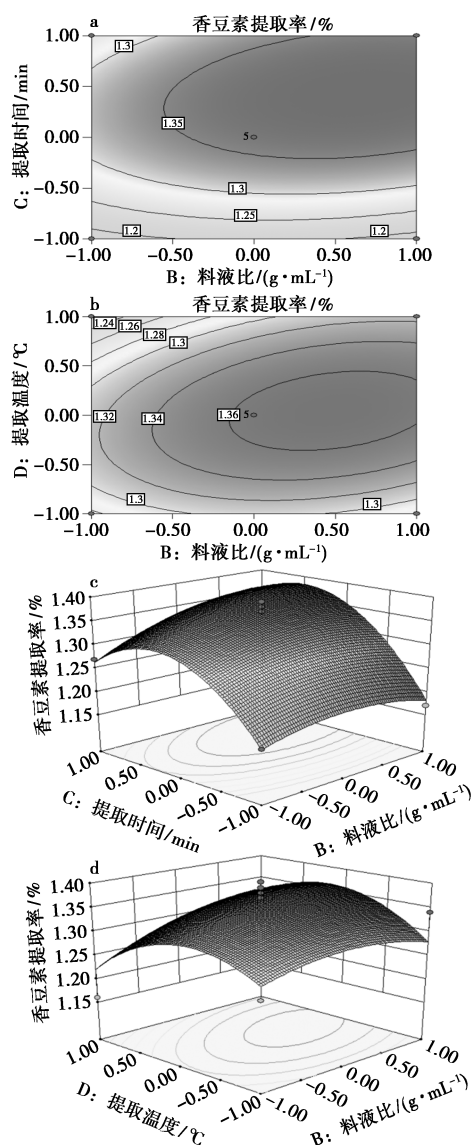
Tab.4 Response surface variance analysis and significance test

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.31	14	0.022	7.69	0.000 2	**
A	0.025	1	0.025	8.86	0.010 0	*
B	7.008×10^{-3}	1	7.008×10^{-3}	2.46	0.138 8	
C	0.051	1	0.051	17.83	0.000 9	**
D	3.000×10^{-4}	1	3.000×10^{-4}	0.11	0.750 1	
AB	0.034	1	0.034	12.04	0.003 8	*
AC	1.225×10^{-3}	1	1.225×10^{-3}	0.43	0.522 2	
AD	2.025×10^{-3}	1	2.025×10^{-3}	0.71	0.412 9	
BC	2.025×10^{-3}	1	2.025×10^{-3}	0.71	0.412 9	
BD	2.025×10^{-3}	1	2.025×10^{-3}	0.71	0.412 9	
CD	0.073	1	0.073	25.64	0.000 2	**
A ²	0.063	1	0.063	22.21	0.000 3	**
B ²	4.441×10^{-3}	1	4.441×10^{-3}	1.56	0.231 9	
C ²	0.055	1	0.055	19.48	0.000 6	**
D ²	0.027	1	0.027	9.61	0.007 8	*
残差	0.040	14	2.844×10^{-3}			
失拟项	0.034	10	3.449×10^{-3}	2.59	0.185 8	
纯误差	5.320×10^{-3}	4	1.330×10^{-3}			
总差	0.34	28				

2.2.2 响应面分析

由表 4 可知该模型极显著 ($P < 0.01$), 失拟项不显著 ($P = 0.185 8, P > 0.05$), $R^2 = 0.884 9$, 说明该模型拟合度好, 可用于毛大丁草总香豆素回流提取的预测与分析。回归方程的各项分析表明, 一次项 A、C 的影响极显著 ($P < 0.01$), B、D 的影响不显著; 二次项 A²、C² 的影响极显著, D² 的影响显著, B² 的影响不显著; 交互项 CD 影响极显著, AB 影响显著 ($P < 0.05$), AC、AD、BC、BD 的影响不显著; 由 F 值可知 4 个因素对 Y 的影响大小依次为 C (提取时间) > A (乙醇体积分数) > B (料液比) > D (提取温度)。交互作用对毛大丁草总香豆素提取率影响见图 3。由图可知, 总香豆素

提取率随提取时间、料液比先上升后下降, 等高线均为椭圆形, 说明料液比和提取时间的交互作用对总香豆素的提取率影响较大。



a. 料液比-提取时间响应面图; b. 料液比-提取温度响应面图;
c. 料液比-提取时间等高线图; d. 料液比-提取温度等高线图

图 3 响应面和等高线分析图

Fig.3 Analysis chart of response surface and contour

2.2.3 最佳提取工艺的验证

运用 Design-Expert 8.0.6 软件分析得到的毛大丁草总香豆素的最佳提取工艺条件为: 乙醇体积分数 59.95%、料液比 1:40.02 (g/mL)、提取时间 60.06 min、提取温度 85 °C, 在此条件下毛大丁草香豆素的提取率为 1.36%。为检验该工艺的可靠性, 对其进行了验证试验, 结合实际操作的可性, 将条件修正为: 乙醇体积分数 60%、料液比 1:40 (g/mL)、提取时间 60 min、提取温度 85 °C,

平行 3 次试验后得到的香豆素提取率为 $(1.36 \pm 0.03)\%$, 说明利用响应面优化的毛大丁草提取工艺具有较高的可靠性和可行性^[17-20]。

2.3 不同产地毛大丁草总香豆素提取率的比较

10 个产地的毛大丁草总香豆素提取率的结果见图 4, 由图可知, 不同产地毛大丁草总香豆素提取率有所差异, 其中提取率最高的是广西百色市样品, 总香豆素提取率为 1.66%, 最低的是贵州贵阳市样品, 总香豆素提取率为 1.04%。

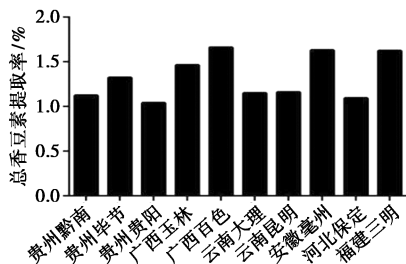


图 4 不同产地毛大丁草总香豆素提取率

Fig.4 Determination results of the total coumarins content of *Piloselloides hirsuta* from different places

2.4 抗氧化实验

2.4.1 毛大丁草总香豆素清除 DPPH 自由基能力的测定

由图 5 可知, 10 个产地的毛大丁草香豆素对 DPPH 具有一定的清除能力, 且清除率随着香豆素浓度增加而增加, 与样品浓度存在量效关系。不同产地的样品存在一定的差异性。10 个产地样品和阳性药 V_c 对 DPPH 的半数抑制浓度分别 121.43、24.84、64.36、9.44、0.36、4.43、30.12、2.68、25.76、1.48、 $3.57 \times 10^{-4} \mu\text{g/mL}$ 。其中清除率最高的是广西百色市样品, 清除率最低的是贵州黔南州样品。

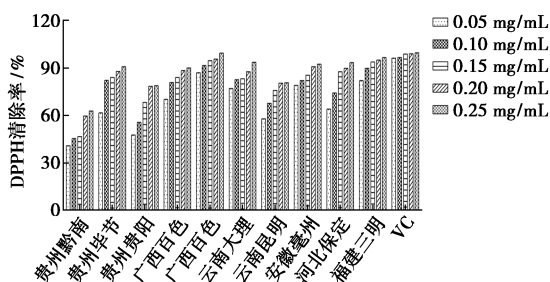


图 5 不同产地毛大丁草总香豆素对 DPPH 自由基清除能力

Fig.5 Scavenging activity on DPPH radical of the total coumarins of *Piloselloides hirsuta* from different places

2.4.2 毛大丁草总香豆素清除 ABTS⁺ 自由基的测定

按照试剂盒说明书要求配制所用工作液。将

标准品 Trolox 溶液用蒸馏水稀释成 0.10、0.20、0.40、0.80、1.00 mmol/L, 室温反应 6 min, 在 405 nm 波长处测定其吸光度值。以标准品 OD 值为横坐标, 各 OD 值浓度为纵坐标制成标准曲线, 回归曲线为 $Y = -0.98767X + 1.1394$ ($R^2 = 0.9915$)。将测定孔测得 OD 值带入标准曲线中, 计算得出 10 个产地样品总抗氧化能力。图 6 所示, 不同产地的毛大丁草总抗氧化能力有明显的差异, 其中抗氧化能力最强的是广西百色市样品, 抗氧化能力最弱的是贵州黔南州样品。

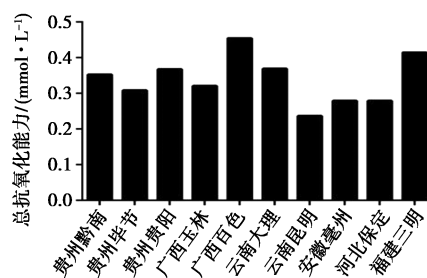


图 6 不同产地总香豆素对 ABTS⁺ 自由基清除作用

Fig.6 Scavenging activity on ABTS⁺ radical of the total coumarins of *Piloselloides hirsuta* from different places

2.4.3 毛大丁草总香豆素总抗氧化能力的测定

按照试剂盒说明书上的试剂组成和配制, 自行配制工作液。精密称定 27.80 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 用 1 mL 蒸馏水溶解, 取适量 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液再稀释成 0.15、0.30、0.60、0.90、1.20 和 1.50 mmol/L。37 °C 孵育 3~5 min, 在 593 nm 波长处测定其吸光度值。各孔减去空白孔 OD 值后, 以标准品 OD 值为横坐标, 相对应浓度为纵坐标绘制标准曲线, 得到回归曲线为 $Y = 0.118X + 0.1157$ ($R^2 = 0.9969$)。经过计算, 10 个产地的总抗氧化能力如图 7 所示。结果表明, 广西百色市的样品总抗氧化能力最强, 云南昆明市的样品总抗氧化能力最弱。

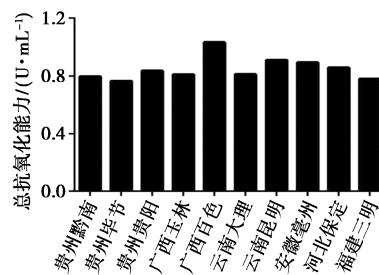


图 7 不同产地总香豆素总抗氧化能力

Fig.7 Total antioxidant capacity of the total coumarins of *Piloselloides hirsuta* from different areas

2.5 总香豆素提取率与抗氧化活性分析

10 个不同产地的毛大丁草进行了提取率及抗氧化活性的差异性研究表明,毛大丁草总提取率最高的是广西百色市样品,提取率最低的是贵州贵阳市样品。通过 3 种抗氧化实验研究发现,毛大丁草总香豆素具有良好的抗氧化能力,且抗氧化能力的强弱与香豆素含量成正比。即总香豆素提取率最高样品的抗氧化能力最强,反之最弱。

3 结论

本实验以乙醇为溶剂,乙醇回流法对不同产地毛大丁草的香豆素提取进行研究。在单因素试验的基础上,应用 Box-Behnken 法优选其提取工艺,该法简单可靠,首次对毛大丁草总香豆素的提取工艺进行优化。确定最佳提取条件为乙醇体积分数 60%、料液比 1:40 (g/mL)、提取时间 60 min、提取温度 85 ℃。

通过文献调研发现,毛大丁草在中国西南地区少数民族中应用比较广泛,本实验研究的毛大丁草香豆素的抗氧化活性与少数民族的应用联系起来,阐明其民族药用价值,促进民族药药材的标准化和规范化。本文构建了毛大丁草香豆素的提取工艺,并筛选了不同产地的抗氧化活性,这为毛大丁草作为天然抗氧化剂的开发提供了可靠的实验依据。同时,对毛大丁草的深入研究可以进一步对其有效部位、有效成分进行阐明,为新药的开发与研究奠定理论基础,使毛大丁草的使用更加广泛,提高这一植物资源的合理应用度,为少数民族创造经济价值。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,1993:94.
- [2] 张贝西,王建军,雷启义,等.民族药用植物毛大丁草的化学成分及药理作用研究进展[J].南京中医药大学学报,2019,35(3):351-355.
- [3] LI T, MA X, DANIIL F, et al. Structure elucidation of prenyl and geranyl substituted coumarins in gerbera piloselloides by NMR spectroscopy, electronic circular dichroism calculations, and single crystal X-ray crystallography[J]. *Molecules*, 2020, 25(7):1-25.
- [4] 郑玲,赵挺,孙立新.香豆素类化合物的药理活性和药代动力学研究进展[J].时珍国医国药,2013,24(3):714-717.
- [5] LAILA R, SUMBAL A, SAJJAD A, et al. An update on synthesis of coumarin sulfonamides as enzyme inhibitors and anticancer agents[J]. *Molecules*, 2022, 27(5):1-31.
- [6] PAN B L, LIU T, WANG X J, et al. Research progress of coumarins and their derivatives in the treatment of diabetes[J]. *J. Enzyme. Inhib. M.*, 2022, 37(1):616-628.
- [7] ANTONIJEVIC M R, AVDOVIC E H, SIMIJONOVIC D M, et al. Radical scavenging activity and pharmacokinetic properties of coumarin-hydroxybenzohydrazide hybrids[J]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23(1):1-16.
- [8] KAUSHIK C P, CHAHAL M. Synthesis, antimalarial and antioxidant activity of coumarin appended 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles[J]. *Mon. Chem.*, 2021, 152(8):1-14.
- [9] ASGHAR H, ASGHAR H, ASGHAR T. A review on anti-urease potential of coumarins[J]. *Curr. Drug. Targets.*, 2021, 22(17):1926-1943.
- [10] 代英宏,赵艳敏,张美媛,等.香豆素类化合物生理药理活性的研究[J].山东化工,2021,50(4):30-31.
- [11] 王凯,刘翔,徐浩然,等.天然呋喃香豆素类成分药理活性、药动学及毒性研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2021,35(4):312-320.
- [12] 童天娇,刘伟,胥鑫萌,等.秦皮中香豆素提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J].保鲜与加工,2021,21(12):46-50.
- [13] 陆俊霞,李珂珂,王平,等.儿茶酚香豆素清除自由基能力测定及作用机制探索[J].中国现代中药,2016,18(5):573-578.
- [14] 左玉.抗氧化剂在食品中的应用[J].粮食与油脂,2022,35(4):9-11.
- [15] 史娟,葛红光,郭少波,等.响应曲面法优化白花前胡总香豆素提取及抑菌和抗氧化活性[J].中国粮油学报,2022,37(1):157-163.
- [16] 陈如一,史悦悦,张晓熙,等.艾柱挥发油和燃烧产物成分 GC-MS 分析及抗氧化活性比较[J].中成药,2021,43(12):3507-3512.
- [17] NWOSU C, AYODELE O, IBRHIM H. Optimization of hydrogen production via catalytic autothermal reforming of crude glycerol using response surface methodology and artificial neural network[J]. *Int. J. Energy. Res.*, 2021, 45(13):18999-19013.
- [18] DEHGA N M, K, NIKUKAR H. Modeling and optimizing a polycaprolactone/gelatin/polydimethylsiloxane nanofiber scaffold for tissue engineering: Using response surface methodology[J]. *J. Text. I.*, 2020, 112(3):482-493.
- [19] TWAROG N R, MARTINEZ N E, GARTRELL J, et al. Using response surface models to analyze drug combinations[J]. *Drug. Discov. Today.*, 2021, 26(8):2014-2024.
- [20] 谭荣,李本鹏,蒋向辉,等.长毛风毛菊中总香豆素的提取工艺及抗氧化活性研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2019,21(5):906-911.

化学与环境

3-甲醛肟基苯甲酸乙酯的合成及其对部分重金属离子的
荧光选择识别

董艳芹, 刘欣宇, 曾展鹏, 彭佩, 王勇*

(荆楚理工学院 化工与药学院 药物合成与优化湖北省重点实验室, 湖北 荆门 448000)

摘要: 基于肟类化合物对重金属离子具有很好的配位能力, 是一类制备荧光探针的优良配体。将 3-溴苯甲酸与二氯亚砷在乙醇中直接反应制得中间体 3-溴苯甲酸乙酯(L2)。接着将中间体 L2 与氰化亚铜直接反应得到中间体 3-氰基苯甲酸乙酯(L3), 最后将中间体 L3 与盐酸羟胺在碳酸钠存在下制得标题化合物 L4。对化合物 L2~L4 进行核磁共振氢谱、碳谱和红外光谱等结构表征。利用电子吸收光谱和荧光光谱研究了常见重金属离子(Cu(II)、Fe(III)、Pb(II)、Co(II)、Cr(III)、Ni(II)、Fe(II)、Mn(II)、Zn(II) 和 Cd(II)) 对目标化合物 L4 的选择性, 研究表明目标化合物对 Cu(II)、Fe(III) 和 Pb(II) 离子表现优良的选择作用。随着金属离子 Cu(II)、Fe(III) 和 Pb(II) 的加入, 目标化合物 L4 的荧光强度均逐渐减弱至基本完全猝灭, 而对其他重金属离子没有选择识别作用或选择识别作用较弱。

关键词: 肟; 重金属离子; 荧光光谱; 电子吸收光谱; 设计合成

中图分类号: O621.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2023)02-0121-07

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0576

Synthesis of 3-(hydroxyimino-methyl)-benzoic Acid Ester and its Fluorescence Recognition of Selected Heavy Metal Ions DONG Yan-qin, LIU Xin-yu, ZENG Zhan-peng, PENG Pei, WANG Yong* (Key Laboratory of Drug Synthesis and Optimization, College of Chemical Engineering and Pharmacy, Jingchu University of Technology, Jingmen 448000, China)

Abstract: Oxime-based compounds have good coordination ability to heavy metal ions, and which are excellent ligands for the preparation of fluorescent probes. 3-Bromobenzoic acid ethyl ester (L2) was obtained by reaction of 3-bromobenzoic acid (L1) with thionyl chloride in ethanol. 4-Cyano-2-methyl-benzoic acid methyl ester (L3) was synthesized by reaction of L2 with cuprous cyanide. And finally reaction of ethyl 3-cyanobenzoate with hydroxylamine hydrochloride in the presence of sodium carbonate affords ethyl formaloximinobenzoate (L4). The structures of L2~L4 were characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR and IR. The electron absorption spectroscopy and fluorescence spectroscopy were used to investigate the interaction of selected heavy metal ions (Cu(II), Fe(III), Pb(II), Co(II), Cr(III), Ni(II), Fe(II), Mn(II), Zn(II) and Cd(II)) with L4. The study showed that L4 possessed excellent selectivity for Cu(II), Fe(III) and Pb(II) ions. With the addition of metal ions Cu(II), Fe(III) and Pb(II), the fluorescence intensity of L4 gradually weakened, and even almost to be quenched completely, while it had no selective recognition effect or weak selective recognition effect on other heavy metal ions.

Key words: oximes; heavy metal ions; fluorescence spectroscopy; electron absorption spectroscopy; design and synthesis

近年来, 环境污染问题日益严重, 由重金属离子造成的环境污染问题更是突出。重金属一般很难降解、容易富集等, 在空气、土壤、水体等载体中留存、转移, 不仅严重破坏了生态环境, 而且还通过食物链的富集作用进入人体危害身体健康, 导致各种疾病发生^[1-3]。因此, 快速、准确检测重金属离子十分必要, 特别是在环境治理和生物领域中的分析和检测已成为生命科学、环境科学以及医学等学科的重要课题^[4-6]。

目前重金属离子检测方法如分光光度法、电

化学分析法、原子吸收光谱法等大多对仪器设备

收稿日期: 2022-07-28; 网络首发日期: 2022-11-15

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究重点项目(D20214302); 荆楚理工学院项目(ZD202101); 大学生创新创业训练计划项目(S202211336030)。

作者简介: 董艳芹(2002-), 女, 湖北荆门人, 本科生, 主要研究方向为化学工程与工艺。

通讯作者: 王勇, E-mail: wangyong1987@jcut.edu.cn。

引用本文: 董艳芹, 刘欣宇, 曾展鹏, 等. 3-甲醛肟基苯甲酸乙酯的合成及其对部分重金属离子的荧光选择识别[J]. 化学试剂, 2023, 45(2): 121-127。

要求高、分析成本高、很难做到实时检测。现场快速、准确地检测重金属污染物,对于减少和消除各种危险隐患、预防事故的发生有非常重要的作用。荧光光谱法检测重金属离子,操作简单、携带方便、价格便宜,对于现场即行检测有极其重要的作用^[7-9]。脒类化合物含有特征基团 >C=N-O , 结构中氮原子具有孤对电子,氧原子具有很大的电负性,都与金属离子有很好的配位作用^[10,11]。脒类对金属离子有很好的配位作用,容易合成,性质相对稳定,是充当金属离子荧光探针的优良配体^[12,13]。

本文以 3-甲醛脒基苯甲酸乙酯(L4)为研究目标,以 3-溴苯甲酸(L1)通过酰化、酯化、取代、亲核加成、消除等反应制得目标脒类化合物,提供了一种反应条件更加温和、操作更加简便的脒类化合物合成方法。合成的脒类化合物 L4 含有共轭 π 键体系,使得脒类化合物具有较好的配位能力和荧光性能。最后,利用电子吸收光谱和荧光光谱研究了常见重金属离子(Cu(II) 、 Fe(III) 、 Pb(II) 、 Co(II) 、 Cr(III) 、 Ni(II) 、 Fe(II) 、 Mn(II) 、 Zn(II) 和 Cd(II))对化合物 L4 的光谱响应情况。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

JACSO-V770 型紫外-可见分光光度计(日本 JACSO 公司);F-4600 型日立荧光分光光度计(日本日立公司);Nicolet iS50 型傅里叶红外光谱仪(美国 Thermo 公司);Bruker 400 MHz 型核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司)。

3-溴苯甲酸(上海韶远科技有限公司);无水氯化镍、乙酸铜一水合物、氯化铅(萨思化学技术有限公司);硝酸镉、乙酸钴四水合物、盐酸羟胺(上海思域化工科技有限公司);氰化亚铜、四水乙酸锰、硫酸亚铁铵六水合物(上海泰坦科技股份有限公司);无水碳酸钠、氯化锌、硝酸铬、硝酸铁(III)九水合物(上海麦克林生化科技有限公司);所用试剂均为分析纯。

1.2 分析方法

1.2.1 荧光光谱法

在室温下,用荧光分光光度计研究了化合物 L4 对金属离子响应的荧光光谱,具体操作如下:用乙腈和二氯甲烷($V(\text{乙腈}):V(\text{二氯甲烷})=23:$

2)配制了化合物 L4 ($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$)储备液。同时选取了 10 种常见金属盐试剂:无水氯化镍、乙酸铜一水合物、氯化铅、硝酸镉、乙酸钴四水合物、四水乙酸锰、硫酸亚铁铵六水合物、氯化锌、硝酸铬、硝酸铁(III)九水合物,并用乙腈溶液配制相应的金属离子(10^{-2} mol/L)储备液。

荧光光谱的测定方法:将 3.0 mL ($1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$)化合物 L4 的原液配制的溶液转移到 1 cm 石英池中,并在荧光光谱仪记录光谱。向池中加入 30 μL ($1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) Cu(II) 储备液,并记录其光谱。上述过程在其他浓度的 Cu(II) 离子作用下重复进行。然后依次重复其他金属离子。

1.2.2 电子吸收光谱法

在室温下,用紫外-可见分光光度计研究了化合物 L4 及其对重金属离子响应的电子吸收光谱。L4 对不同金属离子的电子吸收光谱响应操作与荧光光谱基本类似。

1.3 化合物的合成

1.3.1 3-溴苯甲酸乙酯(L2)的制备

室温下,将 2 mL (27.54 mmol)二氯亚砷加入到 60 mL 含 5.0 g (24.87 mmol) L1 的无水乙醇中,接着回流反应 6 h。之后将其冷却至室温,加入 50 mL 饱和 Na_2CO_3 水溶液, $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ 溶剂萃取 (20 mL $\times$ 3),收集合并有机相,有机相依次使用水 (10 mL $\times$ 2) 和饱和 NaCl 溶液 (10 mL $\times$ 2) 洗涤,干燥,过滤,除去溶剂,得到 4.99 g 黄色油状液体,产率 87.6%。¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 8.17~8.18 (t, 1H, $J=1.72 \text{ Hz}$, Ar—H); 7.96~7.98 (dt, 1H, $J=1.2, 7.8 \text{ Hz}$, Ar—H); 7.65~7.68 (dq, 1H, $J=1.08, 8 \text{ Hz}$, Ar—H); 7.27~7.33 (q, 1H, $J=7.92 \text{ Hz}$, Ar—H); 4.35~4.41 (q, 2H, — OCH_2CH_3); 1.38~1.41 (t, 3H, — OCH_2CH_3)。 ¹³C NMR (CDCl_3 , 100 MHz), δ : 165.24 (—COO—), 135.74 (Ar—C), 132.54 (Ar—C), 132.42 (Ar—C), 129.90 (Ar—C), 128.13 (Ar—C), 122.41 (Ar—C), 61.40 (— OCH_2CH_3), 14.29 (— OCH_2CH_3)。 IR (KBr), ν , cm^{-1} : 3 095, 3 068 (Ar—H 伸缩振动), 2 981, 2 935, 2 902, 2 871 (CH_2 —H 伸缩振动), 1 727 (C=O), 1 616, 1 568, 1 506, 1 470, 1 423 (芳香环 Ar—C=C—骨架伸缩振动), 1 284, 1 256, 1 172 (—C—O—C—), 883, 857, 808, 746, 713 (Ar—C—H 面外弯曲振动), 614 (C—Br)。

1.3.2 3-氰基苯甲酸乙酯(L3)的制备

将 19.50 g (217.73 mmol) 氰化亚铜加入到 80 mL 含 4.99 g (21.78 mmol) L2 的 DMF 溶液中, 回流反应 48 h。之后将溶液冷却至室温, 加入 100 mL 饱和 Na_2CO_3 水溶液, 立即析出黄色固体, 过滤, 除去黄色固体物质。滤液用 $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ 溶剂萃取 (30 mL $\times$ 3), 收集有机相。得到的有机层依次用水 (15 mL $\times$ 2) 和饱和 NaCl 水溶液 (15 mL $\times$ 2) 洗涤, 干燥, 过滤, 冷却结晶, 得到 1.86 g 白色固体中间体, 产率 48.7%。 ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 8.33 ~ 8.34 (td, 1H, J = 0.44, 1.6 Hz, Ar—H); 8.26 ~ 8.29 (dt, 1H, J = 1.60, 7.96 Hz, Ar—H); 7.83 ~ 7.85 (dt, 1H, J = 1.48, 7.76 Hz, Ar—H); 7.57 ~ 7.61 (td, 1H, J = 0.44, 7.88 Hz, Ar—H); 4.40 ~ 4.45 (q, 2H, — OCH_2CH_3); 1.40 ~ 1.44 (t, 3H, — OCH_2CH_3)。 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz), δ : 164.62 (—COO—), 135.88 (Ar—C), 133.65 (Ar—C), 133.27 (Ar—C), 131.77 (Ar—C), 129.40 (Ar—C), 117.97 (Ar—C—CN), 112.91 (Ar—C—CN), 61.82 (— OCH_2CH_3), 14.26 (— OCH_2CH_3)。 IR (KBr), ν , cm^{-1} : 3 101, 3 059, 3 038 (Ar—H 伸缩振动), 2 976, 2 926, 2 903, 2 865 (CH_2 —H 伸缩振动), 2 228 (氰基伸缩振动), 1 720 ($\text{C}=\text{O}$), 1 609, 1 576, 1 558, 1 507, 1 476, 1 435 (芳香环 Ar—C=C—骨架伸缩振动), 1 290, 1 192, 1 172 (—C—O—C—), 934, 915, 864, 822, 751 (Ar—C—H 面外弯曲振动)。

1.3.3 3-甲醛肟基苯甲酸乙酯(L4)的制备

将含有 0.81 g (11.66 mmol) 盐酸羟胺和 2.36 g (22.27 mmol) 无水碳酸钠的 20 mL 水溶液加入到 20 mL 含 1.86 g (10.62 mmol) L3 的乙醇溶液中, 将该混合物在 70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 6 h。冷却至室温, 旋蒸除去乙醇, 过滤, 得到粗产物绿色固体, 重结晶, 获得 0.95 g 较纯的绿色粉末, 产率 46.3%。 ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 8.44 (s, 1H, Ar—H); 8.21 ~ 8.23 (d, 1H, J = 7.72 Hz, Ar—H); 8.07 ~ 8.09 (d, 1H, J = 7.72 Hz, Ar—H); 7.54 ~ 7.58 (t, 1H, J = 7.76 Hz, Ar—H); 5.78 ~ 6.22 (d, 2H, H—C=N + N—O—H); 4.39 ~ 4.44 (q, 2H, — OCH_2CH_3); 1.40 ~ 1.44 (t, 3H, — OCH_2CH_3)。 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz), δ : 168.20 (—COO—), 165.81 (H—C=N), 133.57

(Ar—C), 132.95 (Ar—C), 132.02 (Ar—C), 130.95 (Ar—C), 128.95 (Ar—C), 128.05 (Ar—C), 61.46 (— OCH_2CH_3), 14.33 (— OCH_2CH_3)。 IR (KBr), ν , cm^{-1} : 3 408 (O—H 伸缩振动), 3 309, 3 164, 3 058 (Ar—H 伸缩振动), 2 993, 2 940, 2 905, 2 970 (CH_2 —H 伸缩振动), 1 704 ($\text{C}=\text{O}$), 1 681 ($\text{C}=\text{N}$), 1 627, 1 581, 1 471, 1 432 (芳香环 Ar—C=C—骨架伸缩振动), 1 279, 1 154 (—C—O—C—), 812, 775, 722, 641 (Ar—C—H 面外弯曲振动)。 UV-Vis (CH_3CN), λ_{max} , nm (ϵ , $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 201 (90 010)。

2 结果与讨论

2.1 合成与表征

目标化合物以 3-溴苯甲酸为原料, 在二氯亚砷的乙醇溶液中酰氯化、酯化得到中间体 L2; 之后将化合物 L2 与氰化亚铜回流反应, 目的是利用氰化亚铜上氰根取代 2-溴苯甲酸乙酯上的溴, 得到中间体 L3; 最后在碳酸钠溶液碱性条件下, 将化合物 L3 与盐酸羟胺反应, 主要是利用氰基与盐酸羟胺在碱性条件下一步制得相应的目标化合物 L4^[14, 15], 合成路线见图 1。

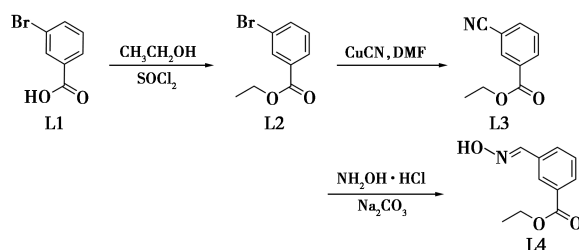


图 1 3-甲醛肟基苯甲酸乙酯的合成路线

Fig.1 Synthetic route of 3-formaloximinoethyl benzoate

化合物从 L2 到 L3 的变化, 可以直接通过红外光谱在 2 228 cm^{-1} 处有强的吸收峰出现识别, 这是氰基的红外特征伸缩振动, 基本可以证明已经由化合物 L2 转变成了化合物 L3。化合物 L3 到 L4, 可以通过在 2 228 cm^{-1} 处氰基红外吸收峰基本消失识别, 证明化合物 L3 已经全部转变成了化合物 L4。对化合物 L2 ~ L4 进行了 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 IR 等结构表征。

2.2 核磁共振

化合物 L2 ~ L4 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 光谱是在 400 MHz 波谱仪上测试的, 以 CDCl_3 作为溶剂, 样品装在 5 mm 的标准样品管。化学位移以 δ

表示,以 TMS(TMS=四甲基硅烷)作为内标。

2.2.1 化合物 L2 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR

化合物 L2 的 ^1H NMR: δ 8.17~8.18 是一组三重峰, $J=1.72$ Hz,对应苯环上 4 号碳上氢的化学位移; δ 7.96~7.98 是两组三重峰,是 dt 耦合, $J=1.2$ Hz 是苯环上的 2,6 位置碳上氢的耦合, $J=7.8$ Hz 是苯环上的 1,2 位置碳上氢的耦合,对应苯环上 2 号碳上氢的化学位移; δ 7.65~7.68 是两组四重峰,是 dq 耦合, $J=1.08$ Hz 是苯环上的 2,6 位置碳上氢的耦合, $J=8$ Hz 是苯环上的 1,6 位置碳上氢的耦合,对应苯环上 6 号碳上氢的化学位移; δ 7.27~7.33 是四重峰, $J=7.92$ Hz,对应苯环 1 号碳上氢的化学位移; δ 4.35~4.41 是四重峰,对应乙氧基上—CH₂ 上 2 个氢的化学位移,和直接与其相连—CH₃ 发生耦合; δ 1.38~1.41 是三重峰,对应乙氧基上—CH₃ 上 3 个氢的化学位移,和直接与其相连—CH₂ 发生耦合。

化合物 L2 的 ^{13}C NMR: δ 165.24 是酯—COO 上碳的化学位移; δ 135.74 对应苯环 6 号碳的化学位移; δ 132.54 对应苯环 3 号碳的化学位移; δ 132.42 对应苯环 4 号碳的化学位移; δ 129.90 对应苯环 1 号碳的化学位移; δ 128.13 对应苯环 2 号碳的化学位移; δ 122.41 对应苯环 5 号碳的化学位移; δ 61.40 对应乙氧基上—CH₂ 上碳的化学位移; δ 14.29 对应乙氧基上—CH₃ 上碳的化学位移; δ 76.74~77.38 对应溶剂 CDCl₃ 上碳的化学位移。

2.2.2 化合物 L3 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR

化合物 L3 的 ^1H NMR: δ 8.33~8.34 是三组两重峰,是 td 耦合, $J=0.44$ 、1.6 Hz,对应苯环上 4 号碳上氢的化学位移; δ 8.26~8.29 是两组三重峰,是 dt 耦合, $J=1.60$ Hz 是苯环上 2,6 号碳上氢的耦合, $J=7.96$ Hz 是苯环上的 1,2 位置碳上氢的耦合,对应苯环上 2 号碳上氢的化学位移; δ 7.83~7.85 是两组三重峰,是 dt 耦合, $J=1.48$ Hz 是苯环上 2,6 号碳上氢的耦合, $J=7.76$ Hz 是苯环上的 1,6 位置碳上氢的耦合,对应苯环上 6 号碳上氢的化学位移; δ 7.57~7.61 是三组两重峰,是 td 耦合, $J=0.44$ 、7.88 Hz,对应苯环 1 号碳上氢的化学位移; δ 4.40~4.45 是四重峰,对应乙氧基上—CH₂ 上 2 个氢的化学位移,和直接与其相连—CH₃ 发生耦合; δ 1.40~1.44 是三重峰,对应乙氧基上—CH₃ 上 3 个氢的化学位移,和直接

与其相连—CH₂ 发生耦合; δ 7.27 对应溶剂 CDCl₃ 上氢的化学位移。

化合物 L3 的 ^{13}C NMR: δ 164.62 是酯—COO 上碳的化学位移; δ 135.88 对应苯环上 6 号碳的化学位移; δ 133.65 对应苯环上 2 号碳的化学位移; δ 133.27 对应苯环上 4 号碳的化学位移; δ 131.77 对应苯环上 3 号碳的化学位移; δ 129.40 对应苯环上 1 号碳的化学位移; δ 117.97 对应羰基上碳的化学位移; δ 112.91 对应苯环上 5 号碳的化学位移; δ 61.82 对应乙氧基上—CH₂ 上碳的化学位移; δ 14.26 对应乙氧基上—CH₃ 上碳的化学位移; δ 76.72~77.36 对应溶剂 CDCl₃ 上碳的化学位移。

2.2.3 化合物 L4 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR

化合物 L4 的 ^1H NMR: δ 8.44 是单重峰,对应苯环 4 号碳上氢的化学位移; δ 8.21~8.23 是一组双重峰, $J=7.72$ Hz,对应苯环上 2 号碳上氢的化学位移; δ 8.07~8.09 是一组双重峰, $J=7.72$ Hz,对应苯环上 6 号碳上氢的化学位移; δ 7.54~7.58 是一组三重峰, $J=7.76$ Hz,对应苯环上 1 号碳上氢的化学位移; δ 5.78~6.22 分别对应 H—C=N 和 N—O—H 氢的化学位移; δ 4.39~4.44 是四重峰,对应乙氧基上—CH₂ 上两个氢的化学位移,和直接与其相连—CH₃ 发生耦合; δ 1.40~1.44 是三重峰,对应乙氧基上—CH₃ 上 3 个氢的化学位移,和直接与其相连—CH₂ 发生耦合; δ 7.26 对应溶剂 CDCl₃ 上氢的化学位移。

化合物 L4 的 ^{13}C NMR: δ 168.20 是酯—COO 上碳的化学位移; δ 165.81 对应 H—C=N—OH 上碳的化学位移; δ 133.57 对应苯环上 5 号碳的化学位移; δ 132.95 对应苯环上 6 号碳的化学位移; δ 132.02 对应苯环上 2 号碳的化学位移; δ 130.95 对应苯环上 3 号碳的化学位移; δ 128.95 对应苯环上 4 号碳的化学位移; δ 128.05 对应苯环上 1 号碳的化学位移; δ 61.46 对应乙氧基上—CH₂ 上碳的化学位移; δ 14.33 对应乙氧基上—CH₃ 上碳的化学位移; δ 76.71~77.35 对应溶剂 CDCl₃ 上碳的化学位移。

2.3 电子吸收光谱

在室温下,研究了 10 种常见金属离子(Cu(Ⅱ)、Fe(Ⅲ)、Pb(Ⅱ)、Mn(Ⅱ)、Fe(Ⅱ)、Cd(Ⅱ)、Co(Ⅱ)、Ni(Ⅱ)、Zn(Ⅱ)和 Cr(Ⅲ))和化合物 L4 在乙腈溶液中于 190~1100 nm 波长下

的电子吸收光谱。 $\text{Zn}(\text{II})$ 、 $\text{Mn}(\text{II})$ 和 $\text{Cd}(\text{II})$ 离子分别在 196、199 和 207 nm 有最大吸收峰; $\text{Fe}(\text{III})$ 和 $\text{Cr}(\text{III})$ 离子在 209 nm 有最大吸收峰; $\text{Fe}(\text{II})$ 、 $\text{Cu}(\text{II})$ 和 $\text{Co}(\text{II})$ 离子分别在 212、215 和 221 nm 有最大吸收峰; $\text{Pb}(\text{II})$ 离子在 205 和 275 nm 两处有最大吸收峰; $\text{Ni}(\text{II})$ 离子在 199 和 234 nm 有最大吸收峰。

化合物 L4 在 201 nm 有最大吸收峰,可以归结为 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁。化合物 L4 对不同金属离子电子吸收光谱响应研究表明,随着 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子(图 2)的加入,化合物 L4 在 201 nm 处吸收峰强度显著增加且有一定程度红移。例如对于 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子,在未加入 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子之前,化合物 L4 在 201 nm 出现最大吸收峰,随着 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子的加入,化合物 L4 的最大吸收峰强度逐渐增大,并且逐渐发生红移,当 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子的浓度增加到化合物 L4 的 10 倍时,化合物 L4 的最大吸收峰强度最大,并且最大吸收峰红移到 207 nm。其他金属如 $\text{Fe}(\text{III})$ (图 2)、 $\text{Cr}(\text{III})$ (图 3)、 $\text{Co}(\text{II})$ 和 $\text{Cd}(\text{II})$ 离子也有类似现象。

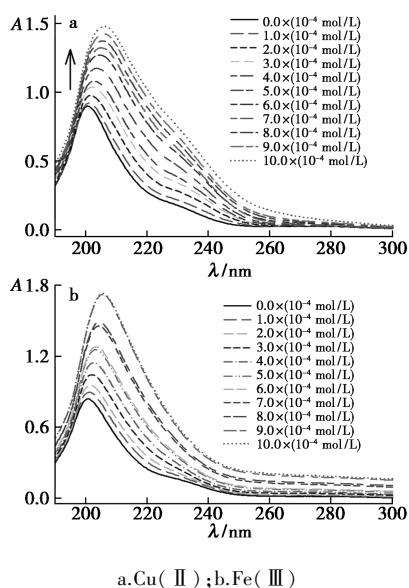


图 2 不同比例离子加入后 L4 的电子吸收光谱变化

Fig.2 Variation in the electron absorption spectrum of L4 with the addition of different ions

随着 $\text{Pb}(\text{II})$ 离子的加入,化合物 L4 在 201 nm 最大吸收峰强度逐渐增大,并且逐渐发生红移(图 3),当 $\text{Pb}(\text{II})$ 离子的浓度增加到化合物 L4 的 10 倍时,化合物 L4 的最大吸收峰强度最大,并且最大吸收峰红移到 203 nm。此外在 270 nm 出现新的电子吸收峰,270 nm 的吸收峰随

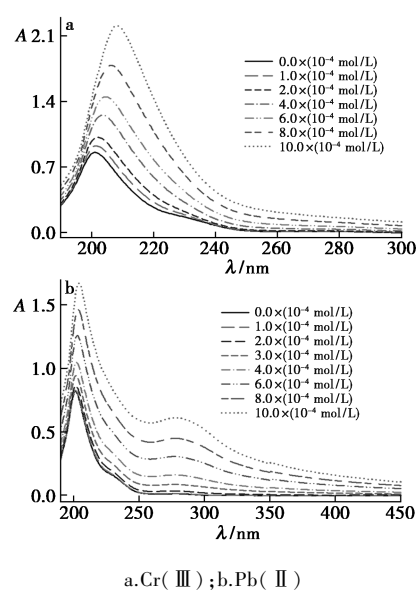


图 3 不同比例离子加入后 L4 的电子吸收光谱变化
Fig.3 Variation in the electron absorption spectrum of L4 with the addition of different ions

着 $\text{Pb}(\text{II})$ 离子量的增大而增强。对于 $\text{Ni}(\text{II})$ 离子也有类似的现象,只是在 279 nm 出现新的电子吸收峰。金属离子 $\text{Fe}(\text{II})$ 、 $\text{Mn}(\text{II})$ 和 $\text{Zn}(\text{II})$ 的加入,基本不影响化合物 L4 的电子吸收光谱。

2.4 荧光光谱

为了研究 L4 对重金属离子的选择识别,测试了 L4 的荧光光谱及其对重金属离子的响应,荧光光谱测试方法详见 1.2.1。化合物 L4 的发射光谱和激发光谱如图 4 所示,固定发射波长 312 nm,在 200~300 nm 扫描激发波长,在 228 和 278 nm 出现最大激发波长,其中 278 nm 处激发峰强度远高于 228 nm,因此选择 278 nm 作为激发波长。同样固定激发波长 278 nm,在 290~600 nm 范围内扫描发射波长,在 312 nm 出现最大发射波长。

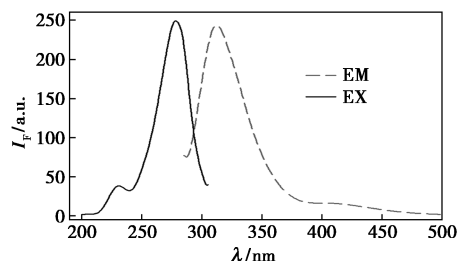


图 4 目标化合物 L4 的激发光谱(EX)和发射光谱(EM)

Fig.4 Fluorescence excitation spectrum (EX) and emission spectrum (EM) of compound L4

由化合物 L4 对不同金属离子荧光响应光谱

可知,随着 $\text{Cu}(\text{II})$ 、 $\text{Fe}(\text{III})$ 和 $\text{Pb}(\text{II})$ 、 $\text{Fe}(\text{II})$ 离子的加入(图 5、6),化合物 L4 的荧光强度逐渐减弱直至最后荧光基本完全猝灭。例如随着 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子的加入,化合物 L4 的荧光强度逐渐减弱,当 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子物质的量为化合物 L4 的 40 倍时,化合物 L4 的荧光基本完全猝灭。随着 $\text{Fe}(\text{II})$ 离子的加入(图 6),化合物 L4 的荧光强

度开始时逐渐降低,但是随着金属离子的加入化合物 L4 的荧光强度不再发生改变。对于 $\text{Co}(\text{II})$ 、 $\text{Cd}(\text{II})$ 和 $\text{Mn}(\text{II})$ 离子的加入,有类似的现象。随着 $\text{Cr}(\text{III})$ 、 $\text{Ni}(\text{II})$ 和 $\text{Zn}(\text{II})$ 离子的加入,化合物 L4 的荧光强度不改变或改变甚微。其中,化合物 L4 对于 $\text{Cu}(\text{II})$ 离子的最低检测限为 $2.2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ($E = -2 \times 10^8 c + 4\ 483$, E 为荧光发射强度, c 为金属离子浓度),荧光猝灭率为 97.25%。 $\text{Fe}(\text{III})$ 离子的最低检测限为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ($E = -7 \times 10^7 c + 7\ 343.8$),荧光猝灭率为 97.30%。 $\text{Pb}(\text{II})$ 离子的最低检测限为 $7.4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ($E = -1 \times 10^8 c + 7\ 406.9$),荧光猝灭率为 97.52%。

3 结论

本文以 3-溴苯甲酸为起始原料经酰氯化、乙醇酯化制得中间体 3-溴苯甲酸乙酯(L2),将化合物 L2 与氰化亚铜反应制得中间体 3-氰基苯甲酸乙酸(L3),最后将中间体 L3 与盐酸羟胺在碳酸钠溶液中反应制得 3-甲醛肟基苯甲酸乙酯(L4)。对合成的两个中间体和最终产品进行了结构表征。利用电子吸收光谱和荧光光谱研究了目标化合物 L4 对 10 种常见金属离子的选择识别,表明目标化合物 L4 对 $\text{Cu}(\text{II})$ 、 $\text{Fe}(\text{III})$ 和 $\text{Pb}(\text{II})$ 离子具有很好的选择识别作用。

参考文献:

- [1] 郭健,姚云,赵小旭,等.粮食中重金属铅离子、镉离子的污染现状及对人体的危害[J].粮食科技与经济,2018,43(3):33-35.
- [2] ZHONG W, HOOLEY R. Combining excellent selectivity with broad target scope: Biosensing with arrayed deep cavitand hosts[J]. *Acc. Chem. Res.*, 2022, 55(7): 1 035-1 046.
- [3] WANG Y, QIAN G FG, XIAO Z Y, et al. Synthesis and characterisation of anthracene-based fluorophore and its interactions with selected metal ions[J]. *Inorg. Chim. Acta*, 2010, 363(10): 2 325-2 332.
- [4] YU M, HU J M, WANG Y. Synthesis and characterization of terpyridine ligand and its interactions with selected metal ions[J]. *Chin. J. Struct. Chem.*, 2020, 39(4): 783-792.
- [5] LIANG F, XU L, JIN D, et al. A novel near-infrared fluorescence probe for detecting and imaging Hg^{2+} in living

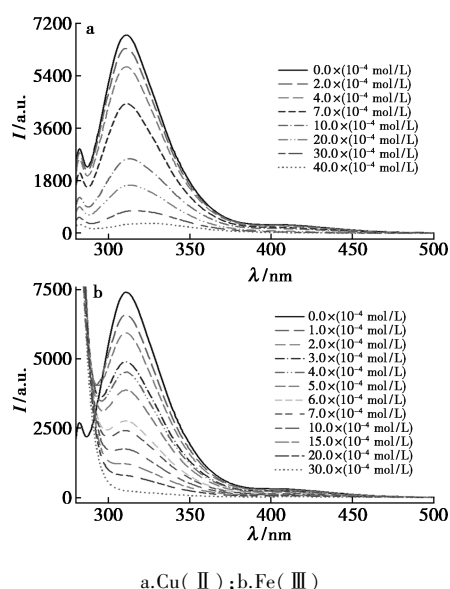


图 5 不同浓度的金属离子对化合物 L4 发射光谱的影响

Fig.5 Effect of metal ions with different concentrations on the emission spectra of compound L4

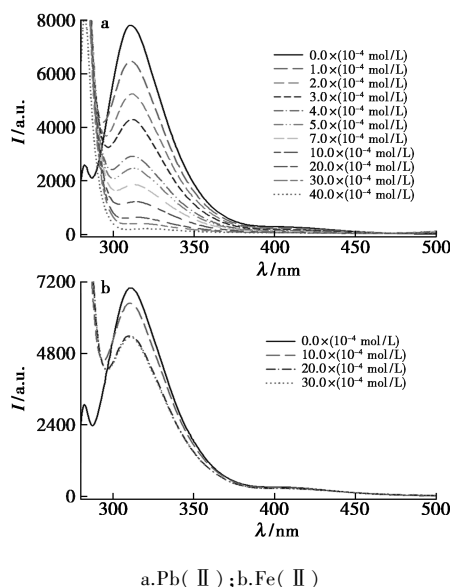


图 6 不同浓度的金属离子对化合物 L4 发射光谱的影响

Fig.6 Effect of metal ions with different concentrations on the emission spectra of compound L4

- cells[J]. *Luminescence*, 2022, **37**(1):161-169.
- [6] HU J, WANG Y. Synthesis and characterization of the *cis*-dicyanoiron(II) building block and its interactions with selected metal ions [J]. *Chin. J. Struct. Chem.*, 2020, **39**(9):1 714-1 722.
- [7] 徐黎黎, 杨莉霞, 董海峰. 基于原子吸收光谱的环境重金属离子检测技术进展[J]. *分析仪器*, 2018, (3):11-20.
- [8] 王勇, 施红. 配合物 $\text{Fe}(\text{L})_2(\text{PF}_6)_2$ 的合成及其对部分过渡金属离子荧光选择研究[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2021, **40**(6):551-556.
- [9] SHAH A, SULTAN S, ZAHID A, et al. Highly sensitive and selective electrochemical sensor for the trace level detection of mercury and cadmium[J]. *Electrochim. Acta.*, 2017, **258**:1 397-1 403.
- [10] GUNGOR O, KOSE M. Selective detections of nitroaromatic explosives by monomeric and polymeric Bi(III) complexes[J]. *Sensor Actuat.*, 2018, **264**:363-371.
- [11] 于孟, 万芳, 王勇. 对金属离子具有荧光选择识别作用的 4-甲醛肟基苯甲酸乙酯的合成[J]. *化学试剂*, 2020, **42**(5):572-577.
- [12] WU C, WU K, LIU J, et al. Structure-guided discovery of a luminescent theranostic toolkit for living cancer cells and the imaging behavior effect [J]. *Chem. Sci.* 2020, **11**(42):11 404-11 412.
- [13] SINGH S, KANSAL S K. Dual fluorometric detection of Fe^{3+} and Hg^{2+} ions in an aqueous medium using carbon quantum dots as a “turn-off” fluorescence sensor[J]. *J. Flu.*, 2022, **32**(3):1 143-1 154.
- [14] 刘明, 杨文豪, 张冕, 等. 2-甲基-4-氰基苯甲酸甲酯一步法制备 2-甲基-4-甲醛肟基苯甲酸甲酯[J]. *化学试剂*, 2018, **40**(11):1 112-1 114;1 118.
- [15] 黄道友, 江国栋, 王勇, 等. 2-甲基-4-甲醛肟基苯甲酸甲酯的合成[J]. *化学试剂*, 2017, **39**(7):776-778.

ZnCuNi-LDHs 的制备及其对 MO 吸附性能研究

李阳¹, 王泽华¹, 田慧媛¹, 李萍¹, 崔节虎^{*1,2}

(1. 郑州航空工业管理学院 材料学院, 河南 郑州 450000;

2. 郑州市环境功能材料重点实验室, 河南 郑州 450000)

摘要:以硝酸锌、硝酸铜和硝酸镍为原料, 三乙醇胺为碱源, 采用水热合成法制备出 3 种 ZnCuNi-LDHs 复合纳米材料, 并用于染料废水甲基橙中阴离子的吸附研究。结果表明, ZnCuNi-LDHs 吸附甲基橙符合准二级动力学模型, 吸附反应为化学吸附, 自发放热反应。考察各种条件下的吸附能力, 在 25 ℃、初始 pH 的条件下, 向 20 mL (20 mg/L) 甲基橙溶液中投加 25 mg 3 种 ZnCuNi-LDHs, 对甲基橙的去除率可分别达 98.5%、94.7%、92.4%; 对 MO 最大吸附量分别为 1 163、1 230、1 712 mg/g; 经过 3 次循环利用后, Zn-Cu-Ni-LDHs 对甲基橙的吸附率仍分别可达 71.5%、61.2%、50.6%。

关键词: Zn-Cu-Ni-LDHs; 甲基橙; 吸附; 水处理技术; 循环利用

中图分类号: X703 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2023)02-0128-06

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0618

Study on the Preparation of ZnCuNi-LDHs and their Adsorption Properties for MO Li Yang¹, WANG Ze-hua¹, TIAN Hui-yuan¹, LI Ping¹, CUI Jie-hu^{*1,2} (1. The College of Materials Science and Engineering, Zhengzhou University of Aeronautical, Zhengzhou 450000, China; 2. Key Laboratory of Environment Functional Materials, Zhengzhou University of Aeronautical, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: Using zinc nitrate, copper nitrate and nickel nitrate as raw materials, and triethanolamine as the base source, three Zn-Cu-Ni-LDHs composite nanomaterials were prepared by hydrothermal synthesis method for the adsorption of negative ions of methyl oranges existed in dye wastewater. The results showed that ZnCuNi-LDHs adsorb methyl orange in line with the quasi-secondary kinetic model, and the adsorption reaction was chemical adsorption and self-release thermal reaction. The adsorption capacity under various conditions was investigated, and the removal rate of methyl orange was 98.5%, 94.7% and 92.4%, respectively, by adding 20 mL (20 mg/L) methyl orange solution under the condition of 25 ℃ and initial pH. The maximum adsorption of MO was 1 163, 1 230, and 1 712 mg/g, respectively. After three cycles, the adsorption rate of ZnCuNi-LDHs on methyl oranges can still reach 71.5%, 61.2% and 50.6%, respectively.

Key words: Zn-Cu-Ni-LDHs; methyl orange; adsorption; water treatment technology; recycling

近年来,环境问题愈加严重,环境污染治理成为影响全球发展的重大问题之一^[1]。染料废水作为环境治理问题中难治理的废水之一^[2],具有成分复杂、色度深、难降解、毒性强、污染物含量相对较高^[3]等特点,实现染料废水的达标排放已刻不容缓。现阶段,处理印染废水的方法主要有吸附法、生物法^[4]、氧化法和膜法^[5]。生物法使用微生物将有机物转化为无机物来处理废水,操作方便,但微生物处理废水周期长,检测指标相对较少,处理过程中不容易发现问题;氧化法是利用强氧化剂与污染物进行反应处理废水,但氧化剂成本高且对环境有一定的影响;膜法以高分子薄膜对废水进行处理,易于管理,但投资较高,处理效率较低;其中吸附法由于工艺简单、高效、原料易得,还容易回收资源,再生利用,应用较为广泛,因此高效、经济、易再生的新型吸附材料开发成为研

究的重点^[6]。

类水滑石层状氢氧化物作为一种新型的环保多功能吸附材料,具有独特的层间结构、阴离子交换性以及记忆效应,已经被应用于水处理领域;与其他的吸附材料相比,类水滑石的制备方法简便且成本较低,制备方法主要有水热合成法、焙烧复原法^[7]、共沉淀法^[8]、离子交换法^[9]、电化学合成法^[10]、固相等。根据文献研究表明^[11,12],

收稿日期:2022-08-09;网络首发日期:2022-11-10

基金项目:国家自然科学基金项目(21771165);河南省科技攻关项目(192102310237)。

作者简介:李阳(1999-),女,河南安阳人,硕士生,主要研究方向为 LDH 的制备及性能研究。

通讯作者:崔节虎, E-mail: cuijiehu@163.com。

引用本文:李阳,王泽华,田慧媛,等. ZnCuNi-LDHs 的制备及其对 MO 吸附性能研究[J]. 化学试剂, 2023, 45(2): 128-133。

多元的类水滑石层状氢氧化物制备和吸附性能研究甚少。

基于以上因素,本文以硝酸锌、硝酸铜和硝酸镍为原料,三乙醇胺为碱源,采用水热合成法制备出 3 种 ZnCuNi-LDHs 复合纳米材料,通过 SEM、XRD、FT-IR 和比表面积测试等手段对其形貌、结构形态及官能团等进行表征,并以甲基橙(MO)为目标污染物,考察吸附时间、温度、吸附剂用量、MO 染料浓度及 pH 对其吸附性能的影响,为染料废水的处理提供了一个新思路。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

JSM-7001F 型扫描电子显微镜(日本电子株式会社);U-4100 型紫外-可见吸收光谱仪(日本高新技术公司);BrukerD8ANCE 型 X-射线衍射分析仪(德国布鲁克公司);IS5 型傅里叶变换红外光谱仪(费尔伯精密仪器有限公司);AUTOSO-IP-C 型比表面积分析仪(贝士德仪器科技有限公司)。

六水合硝酸锌、六水合硝酸铜、六水合硝酸镍、三乙醇胺(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);MO(分析纯,洛阳化学试剂厂);实验用水均为去离子水。

1.2 材料制备

采用水热法制备 Zn-Cu-Ni-LDHs 纳米材料。按照 $n(\text{硝酸锌}):n(\text{硝酸铜}):n(\text{硝酸镍})=1:1:1$ 称取相应质量放入烧杯中,磁力搅拌器上搅拌均匀后逐滴加入 1 mL 三乙醇胺,继续搅拌 5 min 后倒入反应釜中;将反应釜转移至鼓风干燥箱中,设置温度 110 °C,时间 3 h。待反应完成冷却后用抽滤机抽滤、水洗、乙醇洗净后,再次放入 60 °C 的真空干燥箱中进行烘干,研磨得到浅蓝色粉末即为 ZnCuNi-LDHs-1。按上述方法改变三乙醇胺的添加量为 2、3 mL,即可制得 ZnCuNi-LDHs-2、ZnCuNi-LDHs-3。

1.3 吸附实验

将一定量的 ZnCuNi-LDHs 加入到石英管中,加入 20 mL 一定浓度的 MO 溶液,搅拌一定时间,取 5 mL 上层清液离心两次,于 464 nm 处用紫外分光光度计测定其吸光度,从而计算出溶液中 MO 的浓度。Zn-Cu-Ni-LDHs 对 MO 的去除率和吸附量的计算式如下:

$$R = [(C_0 - C_1)/C_0] \times 100\% \quad (1)$$

$$q = [(C_0 - C_1)V]/m \quad (2)$$

式中: C_0 为溶液初始质量浓度,mg/L; C_1 为溶液平衡质量浓度,mg/L; V 为吸附溶液体积,L; m 为吸附剂的投加量,g。

采用准一级、准二级吸附动力学模型对吸附 MO 的动力学过程进行拟合。

准一级动力学方程:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (3)$$

准二级动力学方程:

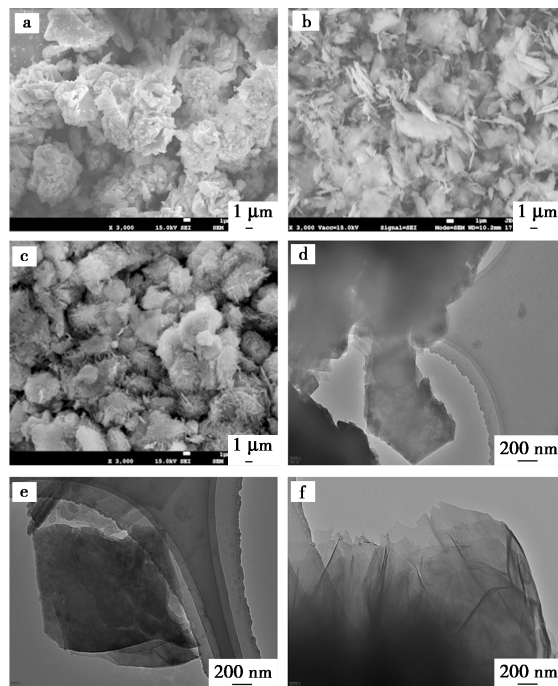
$$t/q_t = 1/k_2 q_e^2 + t/q_e \quad (4)$$

式中: q_e 为平衡吸附容量,mg/g; q_t 为 t 时刻的吸附容量,mg/g; k_1 为准一级动力学方程常数; k_2 为准二级动力学方程常数。

2 结果与讨论

2.1 扫描电子显微镜(SEM)和透射电子显微镜(TEM)表征

图 1a~1c 是三乙醇胺添加量分别为 1、2、3 mL 时纳米材料的 SEM 图。当三乙醇胺添加量为 1 mL 时,ZnCuNi-LDHs-1 的形貌为片状的不规则四边形。当三乙醇胺的添加量为 2 mL 时,ZnCuNi-LDHs-2 的形态发生转变,呈现薄片状结构。当三乙醇胺的添加量为 3 mL 时,ZnCuNi-LDHs-3 呈现了花状结构。图 1d~1f 是三乙醇胺添加量分别为 1、2、3 mL 时纳米材料的 TEM 图。



a~c.SEM 图;d~f.TEM 图

图 1 不同三乙醇胺添加量的纳米材料表征图

Fig.1 Characterize images of nanomaterials with different amounts TEOA

从图中可以清晰观察到片状结构,随着三乙醇胺添加量的增加,纳米片的厚度变薄。以上分析说明,三乙醇胺在 ZnCuNi-LDHs 的形成中起着结构调控作用,可以通过三乙醇胺的量来调控水滑石的尺寸和形貌^[13]。

2.2 X-射线衍射(XRD)表征

图 2 为 ZnCuNi-LDHs-1、ZnCuNi-LDHs-2 和 ZnCuNi-LDHs-3 吸附前后 X-射线衍射(XRD)谱图。该材料显示出典型的水滑石结构特征峰,ZnCuNi-LDHs-1 的 2θ 为 12.95° 、 26.02° 、 35.72° 、 42.40° 处分别对应(003)、(006)、(009)、(012)晶面的衍射峰。ZnCuNi-LDHs-2 在 2θ 为 12.83° 、 25.78° 、 35.53° 、 42.43° 处分别对应(003)、(006)、(009)、(012)晶面的衍射峰。ZnCuNi-LDH-3 的 2θ 为 9.46° 、 12.95° 、 19.70° 、 33.35° 、 36.42° 、 47.62° 处分别对应(003)、(006)、(009)、(012)、(015)、(110)晶面的衍射峰。ZnCuNi-LDHs-1 到 ZnCuNi-LDHs-3 衍射峰强度降低,峰宽变宽,说明类水滑石的结晶度变差。吸附 MO 后的 ZnCuNi-LDHs 仍然保留了水滑石结构衍射峰,没有出现其他衍射峰,表明 MO 吸附过程不会破坏 ZnCuNi-LDHs 的水滑石结构^[14]。

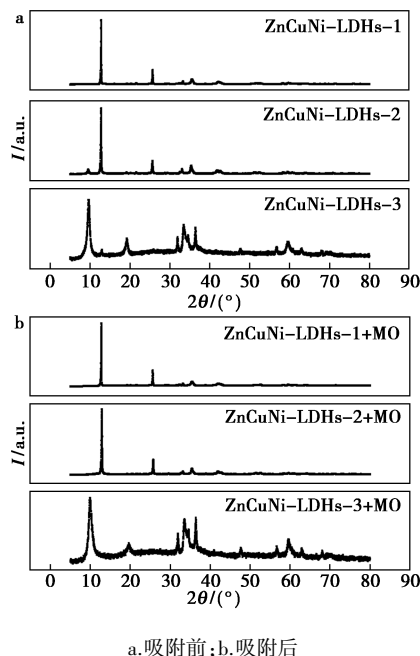
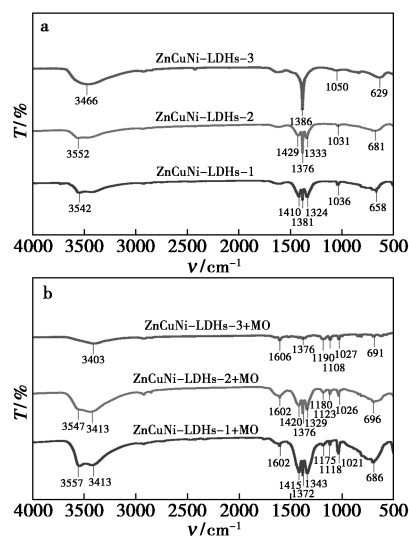


图 2 不同三乙醇胺添加量的 ZnCuNi-LDHs 的 XRD 图
Fig.2 XRD patterns of ZnCuNi-LDHs with different amounts of TEOA

2.3 红外光谱(FT-IR)表征

图 3 为 ZnCuNi-LDHs-1、ZnCuNi-LDHs-2 和 ZnCuNi-LDHs-3 吸附前和吸附后的红外光谱图。

3 466~3 552 cm^{-1} 处的吸收峰为氢氧化物层中的 OH^- 的拉伸振动^[15];3 413~3 542 cm^{-1} 处的吸收峰可能与硝酸盐基团的氢键振动和水分子 OH^- 的拉伸振动有关^[16];1 602~1 621 cm^{-1} 处的吸收峰可能是 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动;1 324~1 429 cm^{-1} 处的吸收峰可能是硝酸盐基团的不对称振动;629~696 cm^{-1} 处的吸收峰可能是 $\text{M}-\text{O}-\text{M}$ 的拉伸振动^[17]。以上的结果表明,3 个类水滑石均含有典型的水滑石特征振动峰,硝酸盐基团成功插层到吸附剂的层间。吸附后的红外光谱存在 $\text{C}=\text{C}$ 双键,证明 MO 被吸附。



a. 吸附前; b. 吸附后

图 3 不同三乙醇胺添加量的 ZnCuNi-LDHs 的 FT-IR 图
Fig.3 FT-IR patterns of ZnCuNi-LDHs with different amounts of TEOA

2.4 比表面积测试(BET)

图 4 为 ZnCuNi-LDHs 的 N_2 吸附-脱附等温线和孔径大小分布图。3 种 ZnCuNi-LDHs 的 N_2 吸附-脱附等温线属于典型的 H3 型滞回曲线。由图可知,3 种 ZnCuNi-LDHs 材料的表面积分别为 2.390 2、10.778 8 和 29.167 2 m^2/g ,孔径分别为 20.4837 5、17.405 68 和 20.769 57 nm,孔体积分别为 0.012 24、0.046 903 和 0.151 447 cm^3/g ,其中 ZnCuNi-LDHs-3 的比表面积最大,孔隙率较高,具有潜在的优异吸附性能^[18]。

2.5 吸附性能

2.5.1 溶液 pH 和投加量对吸附性能的影响

称量 $(0.025 \pm 0.000 5) \text{ g}$ 3 种 ZnCuNi-LDHs 加入到 20 mL (20 mg/L) MO 溶液中,用 NaOH/HCl 调节 MO 的溶液至 pH 4~9,常温下于磁力搅拌器上搅拌 1 h,吸附完成后分别测定 MO 浓度

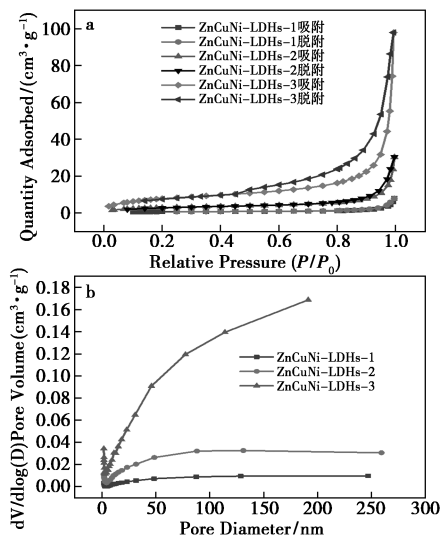


图 4 ZnCuNi-LDHs 的 N_2 吸脱附曲线(a)和孔径分布图(b)

Fig.4 N_2 adsorption-desorption isotherms(a) and pore size distribution (b) of ZnCuNi-LDHs

表 1 ZnCuNi-LDHs 的比表面积和孔隙结构

Tab.1 Specific surface area and pore structure of ZnCuNi-LDHs

吸附剂	BET Surface area/ ($m^2 \cdot g^{-1}$)	Pore volume/ ($cm^3 \cdot g^{-1}$)	Pore size/ nm
ZnCuNi-LDHs-1	2.390 2	0.012 240	20.483 75
ZnCuNi-LDHs-2	10.778 8	0.046 903	17.405 68
ZnCuNi-LDHs-3	29.167 2	0.151 447	20.769 57

并计算平衡吸附量。图 5 为不同 pH 下 ZnCuNi-LDHs 对 MO 的吸附效果。由图可知, pH 对 ZnCuNi-LDHs-1 有一定的影响, 在 pH 4~6 范围内, ZnCuNi-LDHs-1 都有较高的去除率。当 MO 溶液的 pH>6 时, 去除率开始下降, 可能是溶液中的 OH^- 浓度不断增加, 与 MO 的阴离子产生竞争吸附^[19], 从而抑制了水滑石对阴离子的吸附。pH 对 ZnCuNi-LDHs-2 和 ZnCuNi-LDHs-3 几乎没有影响。通过以上分析, 吸附实验所用的 MO 溶液均采用原始 pH 值。

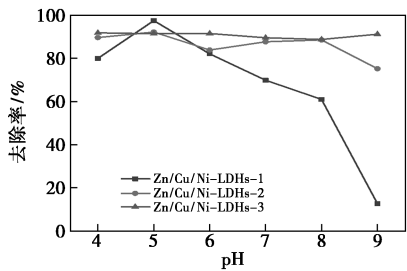


图 5 pH 对吸附效果影响

Fig.5 Effect of pH on adsorption

固定 pH、MO 的浓度、体积和搅拌速率等条

件, 改变 ZnCuNi-LDHs 投加量, 搅拌 1 h, 吸附完成后分别测定 MO 剩余浓度, 并计算平衡吸附量。图 6 为不同吸附剂用量下 ZnCuNi-LDHs 对 MO 的吸附效果。当投加量为 10 mg, 对 MO 的去除率较低, 原因可能吸附剂表面的吸附位点能够被完全占据, 吸附剂用量从 10 mg 增加到 20 mg, 吸附剂表面能够提供足够多的活性位点, 吸附剂对 MO 的吸附率增大, 从而提高了去除率。之后去除率逐渐趋于平衡, 可能是随着吸附剂用量的逐渐增加, MO 被快速吸附, 大量的吸附剂表面还有很多空余的吸附点位并没有吸附占据, 吸附已达到饱和状态。吸附后剩余的 MO 浓度不断变小, 溶液的传质动力也会相应的降低, 吸附量会逐渐降低。综合考虑, 实验使用 ZnCuNi-LDHs 的投加量均为 25 mg。

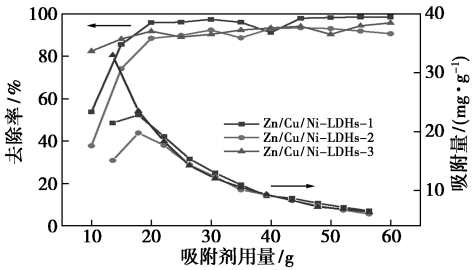


图 6 吸附剂量对吸附效果影响

Fig.6 Effect of adsorption dose on adsorption

2.5.2 MO 初始浓度和吸附时间对吸附性能的影响

图 7 为 ZnCuNi-LDHs 对甲基橙的吸附效果图。3 种材料对甲基橙的吸附量随着初始甲基橙浓度的增加而增加, 在初始浓度 0~3 000 mg/L 范围内, ZnCuNi-LDHs 吸附量分别从 0 增加到 1 163、1 230、1 712 mg/g, 这是因为随着甲基橙初始浓度的增加而增加, 溶液的传质驱动力也会相应增加^[20], 从而有更多的阴离子被吸附剂吸附。ZnCuNi-LDHs-1 对阴离子表现出较强的吸附能力, ZnCuNi-LDHs-2 和 ZnCuNi-LDHs-3 的吸附量相对要高于 ZnCuNi-LDHs-1, 这说明三乙醇胺的

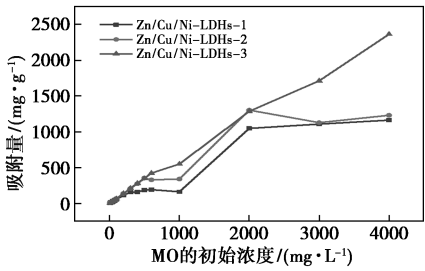


图 7 溶液浓度对吸附效果影响

Fig.7 Effect of solution concentration on adsorption

添加量增加, OH^- 的数量也增加, 活性吸附位数量也相应地增加。随着 MO 浓度进一步增加到 4 000 mg/L, ZnCuNi-LDHs-1、ZnCuNi-LDHs-2 吸附量趋于平衡, 这是因为吸附剂的吸附位点占据完全。然而 ZnCuNi-LDHs-3 还在上升, 说明还有一定的吸附位点, 这与 BET 结果完全一致^[21]。

图 8 为 ZnCuNi-LDHs 的吸附时间对甲基橙吸附性能影响。在 0~10 min 内, 吸附量呈现快速增加, 40 min 后吸附达到平衡状态。ZnCuNi-LDHs 的平衡吸附量分别为 15.82、15.25 和 14.95 mg/g。在吸附的初始阶段, 溶液中甲基橙的浓度较高, 水滑石表面和溶液中阴离子的浓度相差较大, 产生的传质驱动力高, 从而吸附速率较快。随着不断吸附的过程不断进行, 吸附剂的吸附位点逐渐被甲基橙的阴离子占据, 导致传质驱动力降低, 吸附过程就会达到平衡状态。

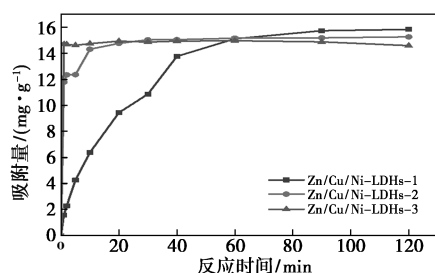


图 8 反应时间对吸附效果影响

Fig.8 Effect of reaction time on adsorption

2.5.3 吸附动力学和热力学

表 2 为准一级动力学模型和准二级动力学模型的拟合结果。通过比较准一级动力学模型和准二级动力学模型的拟合决定系数 (R^2), 准二级动力学模型更适合描述水滑石吸附 MO 的过程。拟合得到的平衡时 MO 的吸附量更接近真实值, 说明 ZnCuNi-LDHs 吸附 MO 的过程可以用准二级动力学模型来描述, 该过程是以化学吸附为主^[22]。

表 2 ZnCuNi-LDHs 对 MO 的吸附动力学拟合参数

Tab.2 Fitting parameters of MO adsorption kinetics of ZnCuNi-LDHs

吸附剂	准一级动力学模型			准二级动力学模型		
	$Q_e / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$K_1 / (\text{min}^{-1})$	R^2	$Q_e / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$K_1 / (\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	R^2
ZnCuNi-LDHs-1	15.08	0.045	0.966	18.08	0.004	0.994
ZnCuNi-LDHs-2	3.13	0.078	0.926	15.33	0.095	0.999
ZnCuNi-LDHs-3	3.24	0.062	0.681	14.69	-0.267	0.999

其他条件不变, 调整温度为 20、25、30、35 和 40 $^{\circ}\text{C}$, 搅拌 1 h, 吸附完成后分别测定其剩余浓度。表 3 为根据吸附温度条件得到的 ZnCuNi-

LDHs 对 MO 的吸附热力学参数, 计算了吸附过程的吉布斯自由能变化 (ΔG , kJ/mol)、焓变 (ΔH , kJ/mol)、熵变 (ΔS , J/(mol·K)), 结果如表 3 所示。 $\Delta G < 0$, 所以该吸附过程是一个自发的反应过程。 $\Delta H < 0$, 表明该吸附过程为放热过程。ZnCuNi-LDHs-2、ZnCuNi-LDHs-3 的 $\Delta S > 0$, 表明吸附过程体系混乱自由度增大。

表 3 ZnCuNi-LDHs 对 MO 的吸附热力学参数

Tab.3 Adsorption thermodynamic parameters of MO adsorption of ZnCuNi-LDHs

吸附剂	反应温度/ K	$\Delta G / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S / (\text{J} \cdot (\text{mol} \cdot \text{K})^{-1})$
ZnCuNi-LDHs-1	293			
	298	-2.77	-43.02	-132.90
ZnCuNi-LDHs-2	303	-2.62	-1.88	2.42
ZnCuNi-LDHs-3	308	-2.592	-1.56	312.523.10
	313			

2.5.4 Zeta 电位分析和循环再生

为了探究不同 pH 下的电性以及是否存在静电作用, 对 ZnCuNi-LDHs 3 种材料做了 Zeta 电位分析。由图 9 可知, Zeta 电位在 pH 3~9 的范围内均为负值, 且数值在 -6~-20 之间呈现递减趋势, 这表明 ZnCuNi-LDHs 这 3 种材料带有负电荷, 吸附过程主要以层间离子交换为主, 这与 pH 条件对吸附性能影响的结果相对应。

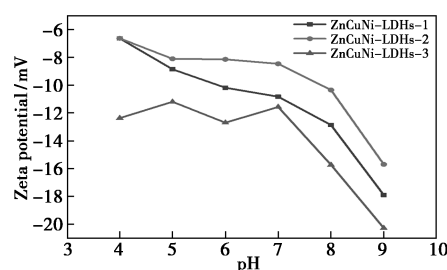


图 9 Zeta 电位图

Fig.9 Zeta potentiogram

为考察 ZnCuNi-LDHs 的循环再生性能, 对 ZnCuNi-LDHs 进行了 3 次循环再生实验。由图 10

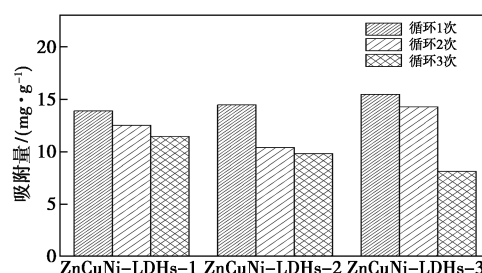


图 10 ZnCuNi-LDHs 的回收和重复实验

Fig.10 Recovery and replicate experiments of ZnCuNi-LDHs

可知,ZnCuNi-LDHs 在经过 3 次循环试验之后,ZnCuNi-LDHs 对 MO 的吸附率仍分别可达 71.5%、61.2%、50.6%。故该水滑石具有良好的循环利用率,对实际应用有一定价值。

3 结论

本文使用三乙醇胺作为碱源,水热法成功合成 3 种不同层状四边形结构的 ZnCuNi-LDHs,通过 XRD 图证实了存在类水滑石的典型特征峰。ZnCuNi-LDHs 对 MO 的吸附动力学模型符合准二级动力学吸附模型,对于 20 mg/L 的 MO 溶液,理论吸附容量分别为 18.08、15.33、14.69 mg/g,根据时间对吸附性能的影响实验数据表明:在吸附时间 120 min 时,吸附量可达到 15.83、15.25、14.58 mg/g,与理论吸附容量相差不大。ZnCuNi-LDHs 最大吸附量分别为 1 163、1 230、1 712 mg/g。且对 MO 的循环吸附方面具有一定的重复利用性。

参考文献:

- [1] ZHU H Y, JIANG R, XIAO L, et al. Photocatalytic decolorization and degradation of Congo Red on innovative crosslinked chitosan/nano-CdS composite catalyst under visible light irradiation [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2009, **169**(1): 933-940.
- [2] ASAHI K, HISANORI S, SHOJI H. Aryl radical cyclization with alkyne followed by tandem carboxylation in methyl 4-tert-butylbenzoate-mediated electrochemical reduction of 2-(2-propynyloxy) bromobenzenes in the presence of carbon dioxide [J]. *Tetrahedron*, 2016, **31**(72): 4 626-4 636.
- [3] SHEN J, IKAI T, SHEN X, et al. Synthesis and immobilization of amylose derivatives bearing a 4-tert-butylbenzoate group at the 2 position and 3,5-dichlorophenylcarbamate/3-(triethoxysilyl) propylcarbamate groups at 3-and 6 positions as chiral packing material for HPLC [J]. *Chem. Lett.*, 2010, **39**(5): 442-444.
- [4] 王兴骥, 陈建辉, 呼冬雪, 等. 外加碳源对共代谢降解 β -内酰胺类抗生素的影响 [J]. *中国给水排水*, 2017, **33**(15): 75-77.
- [5] 肖作义, 肖宇, 肖明慧, 等. 磁性水滑石/生物炭复合材料的制备及其对水溶液中磷的吸附性能 [J]. *环境污染与防治*, 2020, **42**(9): 1 090-1 095; 1 101.
- [6] HUGO B, ARIANA M A P, SILVIA C R S, et al. Performance and prospects of different adsorbents for phosphorus uptake and recovery from water [J]. *Chem. Eng. J.*, 2020, **381**: 122 566.
- [7] VARGA G, KUKOVECZ, K, NYA Z, et al. Mn(II)-amino acid complexes intercalated in CaAl-layered double hydroxide-well characterized, highly efficient, recyclable oxidation catalysts [J]. *J. Catal.*, 2016, **335**: 125-134.
- [8] MEHRZAD A, MAJID P. Effects of washing and drying on crystal structure and pore size distribution (PSD) of $Zn_4O_{13}C_{24}H_{12}$ framework (IRMOF-1) [J]. *Acta Metall. Sin-Eng.*, 2013, **26**(5): 597-601.
- [9] GUO J H, YAN C Z, LUO Z X, et al. Synthesis of a novel ternary HA/Fe-Mn oxides-loaded biochar composite and its application in cadmium(II) and arsenic(V) adsorption [J]. *J. Environ. Sci.*, 2019, **85**(C): 168-176.
- [10] 欧阳跃军, 胡婷, 王佳音, 等. 镁合金表面层状双氢氧化物的电化学沉积和表征 [J]. *中国腐蚀与防护学报*, 2019, **39**(5): 453-457.
- [11] 张爽, 丁欣欣, 闫良国. 改性水滑石类材料的制备及其吸附性能研究进展 [J]. *中国粉体技术*, 2021, **27**(1): 1-10.
- [12] 张明. LZH 及其复合材料对染料废水吸附/光催化研究 [D]. 郑州: 郑州航空工业管理学院, 2019.
- [13] 程福龙, 聂凡贵, 赵嫦欣, 等. 生物炭 Mg/Al-LDHs 复合材料对磷的吸附特性及机理 [J]. *农业工程学报*, 2021, **37**(2): 226-234.
- [14] 刘杰, 朱宗强, 朱义年, 等. 白果壳遗态 Fe/C 复合材料对水中磷的吸附特征 [J]. *环境科学研究*, 2019, **32**(7): 1 239-1 249.
- [15] CUI J, WEI C, ZHANG M, et al. 2D to 3D controllable synthesis of three Zn-Co-LDHs for rapid adsorption of MO by TEA-assisted hydrothermal method [J]. *Appl. Surf. Sci.*, 2020, **534**(8): 147 564.
- [16] ZAGHLOUL A, BENHITI R, ABALI M, et al. Kinetic, isotherm, and thermodynamic studies of the removal of methyl orange by synthetic clays prepared using urea or coprecipitation [J]. *Euro-Mediterr. J. Envi.*, 2021, **6**: 18.
- [17] 韩晓刚, 刘转年, 陆亭伊, 等. 改性聚氯化铝残渣吸附剂制备及其除磷性能 [J]. *无机盐工业*, 2019, **51**(4): 59-62.
- [18] 龚新怀, 辛梅华, 李明春, 等. 磁性响应茶渣制备及其对水溶液中亚甲基蓝的吸附 [J]. *化工进展*, 2019, **38**(2): 1 113-1 121.
- [19] YANG G D, TANG L, LEI X X, et al. Cd(II) removal from aqueous solution by adsorption on α -ketoglutaric acid-modified magnetic chitosan [J]. *Appl. Surf. Sci.*, 2014, **292**(15): 710-716.
- [20] IFTHIKAR J, JIA W, WANG Q, et al. Highly efficient lead distribution by magnetic sewage sludge biochar: Sorption mechanisms and bench applications [J]. *Biore-source Technol.*, 2017, **238**: 399-406.
- [21] 梁越敢, 方涛, 李伟, 等. 磁性龙虾壳吸附去除水中磷的特性 [J]. *中国环境科学*, 2019, **39**(5): 1 928-1 933.
- [22] 刘晨, 张美一, 潘纲. 超薄水滑石纳米片除磷效果与机理 [J]. *环境工程学报*, 2018, **12**(9): 2 446-2 456.

MnO_x@Fe₃O₄ 复合材料制备及其对苯酚处理性能研究

高卫民*,程寒飞,朱巧红,冉景
(中冶生态环保集团有限公司,北京 100020)

摘要:首先采用两步法设计制备磁性纳米复合材料 MnO_x@Fe₃O₄,然后测量其粒度的分布状态,再通过扫描电镜(SEM)、X-射线衍射(XRD)和红外光谱(IR)3种方法表征其结构形态;初步研究了纳米复合物分子 MnO_x@Fe₃O₄ 结构与组成,深入分析了该磁性纳米复合材料的添加量和改变苯酚的初始浓度对该复合材料活化 PMS 分解苯酚性能的影响,并研究了纳米复合材料 MnO_x@Fe₃O₄ 循环使用的效果。结果表明,纳米复合材料 MnO_x@Fe₃O₄ 是 α-MnO₂ 表面负载四氧化铁(Fe₃O₄)的复合材料,平均粒径为 247.3 nm,磁分离性好;纳米复合材料 MnO_x@Fe₃O₄ 有较好的活化 PMS 分解苯酚的效果,在处理初始浓度为 10 mg/L 的酚类废水,添加 80 mg/L 该复合材料,用时 180 min 效果明显,去除率达到 100%;随着苯酚的浓度逐渐提高,同一添加量的 MnO_x@Fe₃O₄ 活化 PMS 分解去除效果会下降;MnO_x@Fe₃O₄ 活化 PMS 循环使用效果较好,对 10 mg/L 的苯酚废水,反复使用 6 次,还有 90% 以上的去除率。

关键词:磁性;MnO_x@Fe₃O₄ 复合材料;含酚废水;高级氧化

中图分类号:X506 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2023)02-0134-07

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0374

Preparation of Magnetic Nano-MnO_x@Fe₃O₄ Composite and Its Treatment Performance of Phenol GAO Wei-min*, CHENG Han-fei, ZHU Qiao-hong, RAN Jing (MCC Ecological Environmental Protection Group Co., Ltd., Beijing 100020, China)

Abstract: Nano-MnO_x@Fe₃O₄ composite was designed and prepared by two-step method, and the particle size distribution was measured. The structural morphology was analyzed by scanning electron microscope (SEM), X-ray diffraction (XRD) and infrared spectrum (IR) three methods. The structural composition of nano-MnO_x@Fe₃O₄ composite was preliminarily discussed. The effects of the addition amount of nano-MnO_x@Fe₃O₄ composites and different initial concentrations of phenol on the performance of nano-MnO_x@Fe₃O₄-activated PMS to decompose phenol were investigated, and the effect of recycling nano-MnO_x@Fe₃O₄ composites was also studied. The results showed that the nano-MnO_x@Fe₃O₄ composite material was a composite material with iron tetroxide (Fe₃O₄) loaded on the surface of α-MnO₂, the average particle size was 247.3 nm, and the magnetic separation was excellent; the nano-MnO_x@Fe₃O₄ composite material had a good effect of activating PMS to decompose phenol. The addition amount of 80 mg/L can reach 100% removal rate of phenol waste with a concentration of 10 mg/L in 180 min. When the initial concentration of phenol increased, the decomposition effect of the same amount of nano-MnO_x@Fe₃O₄ activated PMS will decrease. The recycling effect of nano-MnO_x@Fe₃O₄ activated PMS was better, which can be reused 6 times to deal with the phenol waste with an initial concentration of 10 mg/L. Over 90% removal rate was still obtained.

Key words: magnetism; MnO_x@Fe₃O₄ composite; phenol-containing wastewater; advanced oxidation

众所周知,酚类在有机化学工业原料中占有很重要的地位,同时它也被广泛用作溶剂与消毒剂,是一种高毒有机物,含苯酚的废水对环境和人体危害极大,如不加以处理,直接排放,后果不堪设想。因而,人们格外关注含酚废水的处理,大致将其处理方法分为高级氧化法、吸附法和生物法等^[1-3]。

研究发现锰氧化物(MnO_x)是一种性能优异的苯酚高级氧化催化剂,不同 MnO_x 中的锰(Mn)呈+2 到+4 价的不同价态。MnO_x 的多价态表现

出不同能力的氧化还原性和催化活性。此外, MnO_x 的晶型对催化能力的影响也较大,如 MnO₂

收稿日期:2022-05-16;网络首发日期:2022-11-09

基金项目:中冶集团非钢领域重大研发项目(2022 年度)。

作者简介:高卫民(1981-),男,江苏南京人,博士,高级工程师,主要研究方向为环境治理与生态修复材料及关键技术, E-mail:gaowmchem@126.com。

引用本文:高卫民,程寒飞,朱巧红,等. MnO_x@Fe₃O₄ 复合材料制备及其对苯酚处理性能研究[J]. 化学试剂, 2023, 45(2):134-140。

有 $\alpha\text{-MnO}_2$ (2×2 的隧道结构)、 $\beta\text{-MnO}_2$ (1×1 的隧道结构)、 $\gamma\text{-MnO}_2$ (1×2 隧道结构) 等晶型。其中, $\alpha\text{-MnO}_2$ 研究发现活化过一硫酸氢钾 (PMS) 去除污染物的速率比 $\beta\text{-MnO}_2$ 和 $\gamma\text{-MnO}_2$ 要更快^[4,5]。

MnO_x 的制备方式主要有水热法、溶剂热法、溶胶-凝胶法等^[6,7]。在 MnO_x 制备时, 影响 MnO_x 的组成、结构形态和理化性质的因素有很多, 例如氧化剂/还原剂的比例、反应时间、温度、溶剂极性等等。

MnO_2 已经广泛地用于苯酚、双酚 A、布洛芬和有机染料^[8-10] 中去除污染物。但是在实践中发现, 由于 MnO_2 颗粒较小, 很难沉降分离, 如需分离操作比较繁琐, 而且并不高效, 采用调节 pH 值、投放絮凝剂等来提高其沉降分离性^[11,12]。通过反复实验, 寻找到一种高效环保的处理材料即磁性材料, 该材料可以提高分离性, 且并不需要投放任何试剂, 节约成本。

因此, 本文将采用两步法制备磁性纳米复合材料 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$, 第一步制备纳米 MnO_x , 第二步在 MnO_x 表面原位制备并负载磁性材料, 从而得到 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合物。分析其尺寸情况, 并利用 X-射线衍射技术 (XRD)、扫描电子显微镜 (SEM) 和红外光谱 (FT-IR) 等技术对其结构和形状加以表征, 进而来探讨该材料的组成。研究了 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料投加量和苯酚初始浓度对纳米复合材料 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 活化 PMS 分解苯酚的影响, 并研究了 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 反复使用效果, 以期对 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 活化 PMS 分解含酚废水的实际应用提供数据支持。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

ESJ-1000/2000 型机械搅拌器 (上海易勒机电设备有限公司); LY-808 型曝气机 (青岛力鹰环保科技有限公司); PM300 型电子天平 (上海人和科学仪器有限公司); TU-1800 型紫外分光光度计 (美国哈希公司); S-1F 型 pH 检测计 (上海仪电科学仪器有限公司); Nicolet460 型红外光谱仪 (美国热电公司); X'pert PRO 型 X-射线衍射仪 (荷兰 Nalytical 公司); Lynx5000 型离心机 (美国赛默飞公司); ZEN3500 型激光粒度仪 (美国麦奇克公司); SU3600 型电子显微镜 (日本日立公司)。

七水硫酸亚铁、苯酚、高锰酸钾、一水硫酸锰、氢氧化钠 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 浓硫酸 (质量分数 > 98%)、乙醇 (分析纯) (南京化学试剂股份有限公司); 聚乙烯醇 (分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 过一硫酸氢钾 (质量分数 > 98%, 武汉普洛夫生物科技有限公司)。

1.2 原材料准备

1.2.1 MnO_x 的制备

利用水热法制备纳米锰氧化物^[13]。首先, 在 1 000 mL 三口烧瓶中放入去离子水, 且在烧瓶中要配备 pH 检测计, 以及升温设备和曝气设备。第二步, 将 0.1 g 聚乙烯醇 (PVA 分子量 2 000) 溶液投入去离子水中, 然后通过升温设备, 迅速升温到约 50 °C, 同时开启搅拌器搅拌至溶解; 同步滴加 100 mL (20 mmol/L) 高锰酸钾溶液、100 mL (30 mmol/L 一水硫酸锰与 65 mmol/L 硫酸) 混合溶液; 加入后, 搅拌混合均匀; 在 100 °C 水热真空反应釜中, 水热反应约 3 h; 然后冷却至常温条件, 离心机离心固液分离, 并采用水洗直至中性, 水洗 3 次, 再用乙醇洗 3 次; 放入 60 °C 的真空干燥箱中 24 h, 然后通过研磨后过筛, 制得纳米锰氧化物。

1.2.2 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料制备

本实验运用同步氧化水热沉淀负载的方法制备 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料^[14,15]。首先, 在 1 000 mL 三口烧瓶中放入去离子水, 且在烧瓶中配备 pH 检测计, 以及升温设备和曝气设备。第二步, 将 0.1 g 聚乙烯醇 (PVA 分子量 2 000) 和 0.6 g 纳米锰氧化物加入去离子水中, 将曝气装置的曝气量调为 1 L/min, 加热到 80 °C, 开启搅拌器搅拌溶解; 并同时添加 100 mL (100 mmol/L) FeSO_4 水溶液和 100 mL (100 mmol/L) NaOH 溶液, 使溶液达 pH 8.9~9.1; 添加完毕, 搅拌均匀, 始终维持 80 °C 下保温曝气反应 3 h, 需要注意的是, 过程中始终要维持在 pH 8.9~9.1; 采用磁分离, 并采用水洗直至中性, 水洗 3 次, 再用乙醇洗涤 3 次; 然后置于 60 °C 的真空干燥箱中 24 h, 然后通过研磨后过筛, 制得复合材料 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ ($n(\text{MnO}_x) : n(\text{Fe}_3\text{O}_4) = 2:1$)。

1.3 材料表征

磁性测试: 将 0.05 g 以上两步法生产的复合材料置于装满 10 mL 去离子水的小瓶中, 经充分

振荡,使之平衡,然后再利用铈磁吸铁,在一段时间过后观察其分离特点;粒径分析:利用 ZEN3500 式激光粒径仪,对所得试样的粒径分布进行分析;SEM 分析:采用 SU3600 型电子显微镜对所得试样的表面形态以及结构进行观察;XRD 衍射测试:利用 X'pert PRO 型衍射仪对所得的试样的晶体结构进行了解析;IR 分析:采用 Nicolet460 型红外光谱仪对所得样品的组成进行光谱分析。

1.4 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 处理苯酚实验

1.4.1 苯酚测试中标准曲线^[16]

储存的酚类溶液:将 0.05 g 苯酚溶于 200 mL 蒸馏水中,完全溶解后,转移至 1 000 mL 容量瓶中,加水至刻度,浓度为 50 mg/L,作为储备液。

在 50 mL 比色管中取一定量浓度为 50 mg/L 的苯酚储备溶液,并用蒸馏水稀释定容,然后均匀摇晃,将储备苯酚溶液稀释至浓度为 4、8、12、16、20 mg/L 苯酚溶液。通过紫外-可见分光光度计,以磷酸缓冲溶液为参比,在 200~400 nm 的波长范围内对苯酚溶液扫描。确定吸收波长为 270 nm。

配制浓度分别为 4、8、12、16 和 20 mg/L 的苯酚溶液。在 5.0 mL 离心管中加 2 000 μL 磷酸缓冲溶液 (pH 4)、200 μL 不同浓度的苯酚溶液。30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 1 min,取出溶液加入到石英比色皿中测定不同浓度的苯酚溶液在其特征吸收波长 270 nm 处吸光度,以吸光度-浓度作图得出苯酚的标准曲线,拟合线性方程。

1.4.2 苯酚浓度分析与检测

苯酚降解的最佳条件测定:用紫外-可见分光光度计 (UV) 测定在其在特征吸收波长 270 nm 处吸光度值,对照苯酚的吸光度-浓度标准曲线和拟合线性方程,计算苯酚浓度,并按照下面公式计算苯酚的降解率:

$$\eta = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\%$$

式中: η 为苯酚的降解率,%; C_0 为苯酚的初始浓度,mg/L; C_1 为降解后苯酚的浓度,mg/L。

1.4.3 不同加药量处理含酚废水试验

将浓度为 50 mg/L 苯酚储备液稀释到 10 mg/L。取苯酚浓度为 10 mg/L 的模拟废水,然后分别装入 6 个烧杯中,调节转速为 150 r/min,开始搅拌,然后分别添加 0、10、20、30、40、50、60 mg $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料,添加浓度分别为 0、20、40、60、80、100、120 mg/L,再加入 1 g/L PMS,搅

拌处理时长为 180 min,停止搅拌机搅拌,取出水样,进行磁分离,最后测试澄清液苯酚浓度。

1.4.4 不同 pH 下处理含酚废水试验

将浓度为 50 mg/L 的苯酚储备液稀释到 10 mg/L。取 500 mL 苯酚浓度为 10 mg/L 的模拟废水,分别装入 6 个烧杯中,搅拌下用 10% 质量浓度的盐酸溶液和 10% 质量浓度的氢氧化钠溶液调节至 pH 1、3、5、7、9、11,调节转速为 150 r/min,然后分别添加 40 mg $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料,添加量为 80 mg/L,再加入 1 g/L PMS,搅拌处理时长为 180 min,停止搅拌机搅拌,取出水样,进行磁分离,最后测试澄清液苯酚浓度。

1.4.5 不同含酚废水初始浓度处理试验

将苯酚储备液分别稀释至 5、10、15 和 20 mg/L,分别取 500 mL 装入 6 个烧杯中,转速控制在 150 r/min 下,添加 80 mg/L 的 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料,再加入 1 g/L PMS 搅拌处理,分别处理 20、40、60、80、100、120、160 和 180 min,取出水样,进行磁分离,测试澄清液苯酚浓度。

1.4.6 循环处理含酚废水试验

将苯酚储备液稀释至 10 mg/L,取 500 mL 装入烧杯中,转速控制在 150 r/min 下,加入 80 mg/L 的 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料,再加入 1 g/L 的 PMS,搅拌处理时长为 180 min,停止搅拌机搅拌,取出水样,进行磁分离,测试澄清液苯酚浓度。回收 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料继续加入到 500 mL (10 mg/L) 的苯酚废水中,转速为 150 r/min,加入 1 g/L 的 PMS,搅拌处理时长为 180 min,进行磁分离,测试澄清液苯酚浓度。如此反复使用 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料 6 次,测试处理后苯酚浓度。

2 结果与讨论

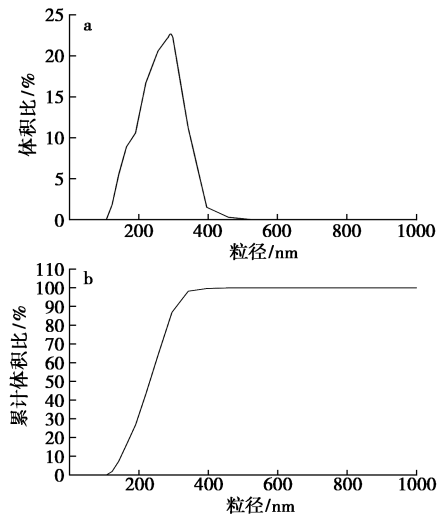
2.1 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料形态表征

2.1.1 磁性分析

使用磁铁对材料吸引的方式,来检验得到材料的磁性,该复合材料在水中扩散均匀,若加入一个外加磁场时,静置 30 s 后,则出现分离现象,该复合材料被吸附到了器皿壁的一侧,由此可见该复合材料的磁响应现象明显,通过两步法制备的复合材料具有良好的磁性,当外加一个磁场时很快能形成固液分离的状态,便于材料的回收循环利用。

2.1.2 粒度分析

$\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料的粒径分布见图 1 和表 1, 两步法制备的 $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料的颗粒粒径小于 460 nm, 其中最小粒径在 100 ~ 120 nm, 平均粒径为 247.3 nm, 粒径分布最多的是 220~295 nm, 占比超过 60%。



a. $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料粒径;
b. $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料累计粒径分布

图 1 $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料粒径分布

Fig.1 Particle size distribution of $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ composite

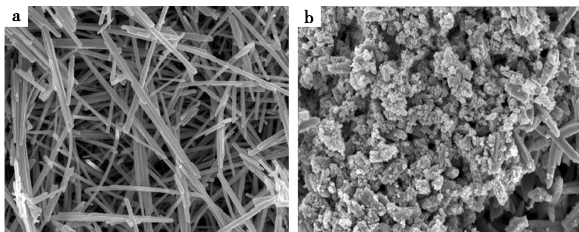
表 1 $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料粒径分布数据

Tab.1 Particle size distribution data of $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ composite

粒径/nm	<122	<142	<164	<190	<220
粒径分布/%	1.8	7.3	16.2	26.8	43.5
粒径/nm	<255	<295	<342	<396	<460
粒径分布/%	64.1	87	98.2	99.7	100

2.1.3 SEM 分析

图 2 是纳米 MnO_x 颗粒和纳米 $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$



a. 纳米锰氧化物; b. $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料

图 2 纳米 MnO_x 和 $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料的 SEM 图

Fig.2 SEM of nano MnO_x and $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ composite

复合材料的 SEM 图, 对比发现, 通过水热法合成的纳米 MnO_x 呈一维纳米棒状结构, 边缘光滑, 形貌完整, 纯度较高, 是 $\alpha\text{-MnO}_2$ 晶型, 而两步法制备的 $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料中, Fe_3O_4 原位合成并均匀的负载在 $\alpha\text{-MnO}_2$ 上。

2.1.4 XRD 分析

由复合材料的 XRD 图谱可知, 对比 α -二氧化锰 (JCPDS65-3107) 和四氧化三铁 (JCPDS44-0141) 的标准图谱, Fe_3O_4 的特征峰 (2θ 为 30.2° 、 35.5° 、 43.1° 、 57.1° 、 62.7°), $\alpha\text{-MnO}_2$ 的特征峰 (2θ 为 12.6° 、 18.1° 、 28.7° 、 37.6° 、 42° 、 49.9° 、 56.3° 、 69.6°)。由图 3 可知, $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料是 $\alpha\text{-MnO}_2$ 和 Fe_3O_4 的组合, 因为 $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料的峰位置与 Fe_3O_4 及 $\alpha\text{-MnO}_2$ 标准谱吻合, 说明此结论与 SEM 结论吻合。

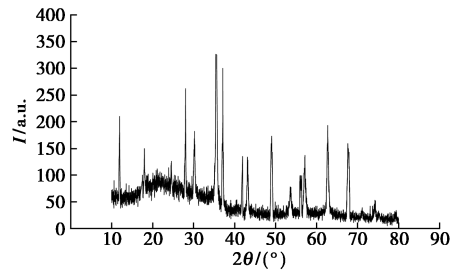


图 3 $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料的 XRD

Fig.3 XRD of $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ composite

2.1.5 FT-IR 分析

图 4 为 $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 红外谱图, 其中出现两次特征峰, 分别在 1650 、 3450 cm^{-1} 处。分析其出现的原因, 为水分子羟基发生形变、水分子伸缩振动。由此可以说明, 该复合材料表面吸附了水分子。 $\text{Mn}-\text{O}$ 振动的特征峰在 730 、 470 cm^{-1} 处, 由于 $\text{Fe}-\text{O}$ 的振动, 可能出现 590 cm^{-1} 的特征峰。由图 4 分析可知, $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 是由 Fe_3O_4 和 MnO_2 复合而成的, 此结果与 SEM 和 XRD 结论吻合。

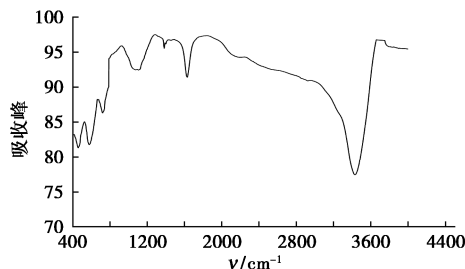


图 4 $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料红外谱图

Fig.4 IR of $\text{MnO}_x@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ composite

2.2 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 处理苯酚性能研究

2.2.1 苯酚测试标准曲线

通过 1.4.1 配制的不同浓度的苯酚溶液,采用紫外分光光度计在 270 nm 下分别测定吸光度值,并以磷酸缓冲溶液为参比,将数据进行了整理,加以分析,绘制浓度与吸光度关系图,如图 5 所示。标准曲线方程为 $A = 0.015\,29C - 0.000\,476\,2$ ($R^2 = 0.997\,9$),该方法的浓度范围为 4~20 mg/L。

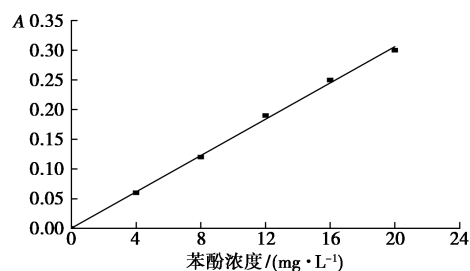


图 5 吸光度与苯酚浓度的关系

Fig.5 Relationship between absorbance and concentration of phenol

2.2.2 添加量对 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料处理苯酚性能的影响

设置初始苯酚浓度为 10 mg/L,考察了 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料用量在 20~120 mg/L 范围内变化时,材料加入量对复合材料处理苯酚性能的影响,结果见图 6。结果表明,PMS 具有强氧化性,单独使用对苯酚有一定的分解处理效果,处理 180 min 的去除率为 36%。在 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料催化作用下,PMS 氧化能力有较大提升,且随着 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料用量的增加, $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料活化 PMS 对苯酚的去除效果先增加后缓慢下降,当复合材料用量为 20 mg/L 时,180 min 的去除率显著提升至 64%,随着 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料用量的增加,处理效果先快速提高,后缓慢提高,最后缓慢下降,推测原因可能是随着催化材料浓度的提高,开始时活化 PMS 产生活性物质的数量增多,撞击苯酚分子的概率提高,分解效率随之提高,但是随着催化材料浓度过高,活化 PMS 产生活性物质的数量过多,就会引起活性物质间相互撞击产生的活性物质淬灭,从而降低了苯酚处理效率。所以当 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料添加量为 60 mg/L 时,测试苯酚浓度为 0.5 mg/L,其去除率达到 95%;当材料用量提高到 80 mg/L 时,180 min 后苯酚去除率达到 100%,随后材料用量进一步提高,苯酚去除率有缓慢下降趋势,即当复合材料用量提高到 120 mg/L 时,

测试苯酚浓度为 0.4 mg/L,其去除率下降至 96%。

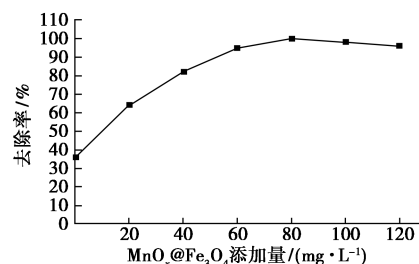


图 6 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料添加量对苯酚处理性能的影响

Fig.6 Effect of adding amount of $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ composition phenol removal

2.2.3 初始 pH 对 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料催化 PMS 处理苯酚性能的影响

设置初始苯酚浓度为 10 mg/L,考查了初始废液在 pH 1~11 范围内对 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料催化 PMS 处理苯酚性能的影响,结果见图 7。结果表明,酸性和中性环境有利于 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料催化 PMS 活性,碱性环境不利于 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料催化 PMS 活性。在 pH 酸性至中性环境下, $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料催化 PMS 分解处理苯酚的效果均较好,处理 180 min 的苯酚去除率均能达到 100%。当 pH 为碱性环境下, $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料催化 PMS 分解处理苯酚的效果显著下降,且随着 pH 升高,催化能力进一步降低。当废液 pH 11 时,处理 180 min 的苯酚去除率仅为 23%。

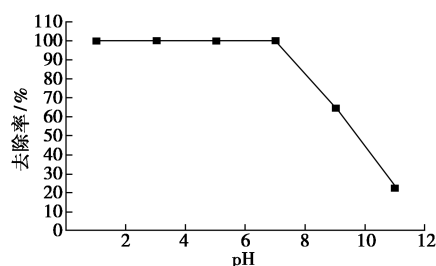


图 7 pH 对 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料催化 PMS 苯酚处理性能的影响

Fig.7 Effect of pH on the performance of $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ composite activated PMS

2.2.4 苯酚初始浓度对 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 处理苯酚性能的影响

复合材料活化 PMS 对不同浓度下酚类废水的处理效果,见图 8。结果表明, $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料活化 PMS 对初始浓度低于 10 mg/L 苯酚

处理效果较好,前 60 min 处理速度最快,效率最高。初始苯酚浓度 5、10 mg/L 时,60 min 后的测试浓度为 0.35、1.15 mg/L,去除率分别为 93% 和 88.5%,之后去除效果开始变缓,当处理 120 min 后苯酚去除率分别能达到 100% 和 99%,180 min 时均能实现 100% 去除。随着初始苯酚浓度的进一步提高, $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料活化 PMS 对苯酚处理效果下降,当苯酚的初始浓度分别为 15、20 mg/L 时,经过 180 min 的处理,测试其浓度分别为 1.5、3 mg/L,去除率分别为 90% 和 85%。根据 2.2.2 的研究结果,对于高浓度的苯酚废水可以通过增加 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料的用量来提高对苯酚的处理效果。

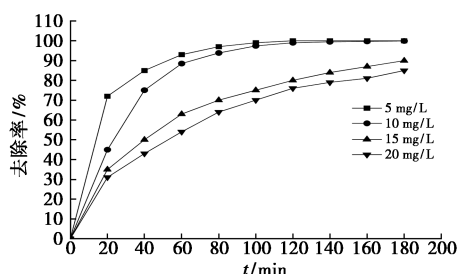


图 8 初始苯酚浓度对 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料活化 PMS 性能的影响

Fig.8 Effect of initial phenol concentration on the performance of $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ composite activated PMS

2.2.5 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料循环使用

图 9 是 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料循环使用活化 PMS 分解苯酚的效果。结果显示,处理苯酚初始浓度为 10 mg/L 的废水, $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料前 3 次循环使用活化 PMS 分解苯酚效果较好,苯酚去除率都保持 100%,表现出优异的处理效果,使用 3 次后去除率开始缓慢下降,到循环使用第 6 次处理后,浓度为 0.9 mg/L,去除率仍能保持 90% 以上。由此可见该复合材料可以重复使用。

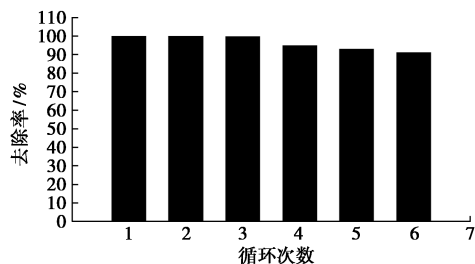


图 9 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料循环使用的去除率

Fig.9 Removal rate of magnetic nano- $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ composite for recycling

3 结论

本文采用两步法制备磁性纳米复合材料 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$,随后测试其粒径的分布情况,并用 3 种方式表征其结构形貌,同时研究材料添加量、不同初始苯酚浓度和循环使用次数对 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料活化 PMS 去除废水中苯酚性能的影响。

3.1 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料是由锰氧化物 ($\alpha\text{-MnO}_2$) 和磁性四氧化三铁 (Fe_3O_4) 复合而成, ($n(\alpha\text{-MnO}_2) : n(\text{Fe}_3\text{O}_4) = 2 : 1$),且 Fe_3O_4 均匀地负载在 $\alpha\text{-MnO}_2$ 的表面, $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料的粒径主要分布在 220~295 nm,占比超过 60%,平均粒径 247.3 nm,磁分离性好。

3.2 磁性纳米复合材料 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 具有较好的活化 PMS 分解苯酚效果,随着 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料添加量的提高,该复合材料对苯酚的处理效果先上升,后缓慢下降,当添加量为 80 mg/L 时,实现去除率 100%。

3.3 酸性和中性环境有利于 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料活化 PMS 分解苯酚,相反碱性环境下 $\text{MnO}_x @ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 复合材料的催化活性降低;随着初始苯酚浓度的提高,同一添加量的复合材料活化 PMS 分解效果会下降,可以通过增加材料用量提高苯酚去除率;复合材料具有良好的重复使用性,循环使用第 6 次时苯酚的去除率仍能保持 90% 以上。

参考文献:

- [1] MA H, ZHANG X, MA Q, et al. Electrochemical catalytic treatment of phenol wastewater [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2009, **165**(1): 475-480.
- [2] 张文军, 王旭, 李强. 含酚废水处理技术的研究进展 [J]. *工业用水与废水*, 2011, **42**(1): 5-7.
- [3] 赵永祥, 张闯, 贾志奇. MnO_x/GAC 复合材料制备及其在苯酚废水处理中的应用 [J]. *工业催化*, 2019, **27**(7): 45-49.
- [4] 宋旭春, 杨娥, 郑一凡, 等. $\alpha\text{-MnO}_2$ 和 $\beta\text{-MnO}_2$ 纳米棒的制备和催化性能研究 [J]. *无机化学学报*, 2007, **23**(5): 919-922.
- [5] 薛兆辉, 刘兆临, 马方伟, 等. 水热法合成 $\alpha\text{-MnO}_2$ 纳米棒及其电化学性能 [J]. *无机化学学报*, 2012, **28**(4): 691-697.
- [6] 秦玲, 关宇霆, 晋刚, 等. 负载二氧化锰的磁性蔗渣炭

- 对铅离子的吸附[J].有色金属(冶炼部分),2022,**2**:99-105.
- [7] 向小倩,夏强,廖小刚,等.多孔 $\alpha\text{-Mn}_2\text{O}_3$ 的制备及其催化过一硫酸盐降解亚甲基蓝溶液的性能[J].材料工程,2022,**50**(2):164-172.
- [8] 金圣圣,张丽梅,贺纪正,等.锰氧化物与环境中有机的作用及其在环境修复中的应用[J].环境科学学报,2008,**28**(12):2 394-2 403.
- [9] 王一凡,李小蝶,侯美茹,等.锰基氧化物活化过硫酸盐降解水中有机污染物的研究进展[J].环境科学研究,2021,**34**(8):1 899-1 908.
- [10] 乔宇,吴明伟,石玉青,等.锰氧化物改性分子筛的制备及其在含酚废水处理中的应用[J].上海师范大学学报(自然科学版),2021,**50**(6):706-713.
- [11] 于文广,张同来,乔小晶,等.不同形貌 Fe_3O_4 纳米粒子的氧化沉淀法制备与表征[J].无机化学学报,2006,**22**(7):1 263-1 268.
- [12] 丁明洁,肖雅丽.纳米四氧化三铁及其复合材料的性能研究进展[J].广东化工,2017,**44**(16):129-131.
- [13] 宋佳星,方向,郭涛,等.水热法制备 $\alpha\text{-MnO}_2$ 纳米棒及特性分析计算[J].解放军理工大学学报:自然科学版,2017:1-4.
- [14] 高卫民,程寒飞,詹茂华,等.磁性纳米 Fe-S 复合材料制备及其对 Cr(VI) 的处理性能研究[J].化学试剂,2020,**42**(3):238-243.
- [15] 高卫民,程寒飞,詹茂华,等.一锅法和两步法合成磁性羟基磷灰石重金属吸附材料研究[J].化学试剂,2019,**41**(8):784-788.
- [16] 朱薇.分光光度法快速测定水中苯酚[J].环境科学与管理,2010,**35**(9):145-147;151.

分析与测试

超高效液相色谱串联质谱法测定葡萄酒中酚酸和酚醛类化合物

马燕玲^{1,2}, 王一名¹, 初坤¹, 陈晨¹, 吴帅^{*1}

(1.烟台市食品药品检验检测中心, 山东 烟台 264000; 2.青岛市农业科学研究院, 山东 青岛 266100)

摘要:建立了超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法检测葡萄酒中18种酚酸和酚醛类物质的方法。将葡萄酒经0.22 μm PTFE滤膜过滤后进样, 选用ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 以0.1% (V/V) 甲酸乙腈溶液-0.1% (V/V) 甲酸水溶液为流动相, 采用梯度洗脱方式, 对酚类物质进行分离。选择电喷雾离子源(ESI), 采用多反应监测(MRM)的模式, 优化质谱参数。实验结果表明, 18种酚酸和酚醛类物质在各自的质量浓度范围内均呈良好的线性关系, 检出限在0.2~4 μg/L之间, 定量限在0.8~10 μg/L之间, 平均回收率为75.0%~98.8%, 精密密度为1.68%~6.19%。利用上述方法对葡萄酒样品进行分析, 结果表明, 所有葡萄酒中均含有没食子酸、咖啡酰石羧酸、对羟基苯甲酸、丁香酸、香草酸等酚类物质, 未检出原儿茶酸、鞣花酸、水杨酸和肉桂酸等, 部分酒样中检出芥子酸。该方法能够满足葡萄酒酚酸和酚醛类物质检测的定量和定性要求。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱法; 葡萄酒; 酚酸类; 酚醛类; 过滤

中图分类号: O652.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2023)02-0141-07

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0757

Determination of Phenolic Acids and Phenol Aldehyde Compounds in Wine by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry MA Yan-ling^{1,2}, WANG Yi-ming¹, CHU Kun¹, CHEN Chen¹, WU Shuai^{*1} (1. Yantai Testing Center for Food and Drug, Yantai 264000, China; 2. Qingdao Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266100, China)

Abstract: A method for the separation of 18 kinds of phenolic acid and phenol aldehyde compounds in wine was developed by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Wines filtered after 0.22 μm membrane were analyzed using ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm). The composition were isolated by the mobile phase of 0.1% (V/V) formic acid acetonitrile and 0.1% (V/V) formic acid water using gradient elution. The qualitative and quantitative analyses were operated under multiple reaction monitoring (MRM) mode using electrospray ion source (ESI) mode. The test results showed that the compounds to be tested presented a good linear relationship in respective mass concentration ranges. The limits of detection (LODs) were between 0.2~4 μg/L and the limits of quantification (LOQs) were 0.8~10 μg/L. The average recovery was in the range of 75.0%~98.8% with the precision from 1.68% to 6.19%. The above methods were used to analyze the wine samples. The results showed that gallic acid, caftaric acid, p-hydroxybenzoic acid, syringic acid, vanillic acid and other phenolic substances were found in all wines. Ellagic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, salicylic acid and cinnamic acid were not detected in wine. Sinapic acid was detected in a few wine samples. This method was proved to be accurate for the analysis of phenolic acid and phenol aldehyde compounds in wine.

Key words: UPLC-MS/MS; wine; phenolic acid; phenol aldehyde; filter

葡萄酒香气浓郁、口感丰富, 酿造历史悠久。近年来, 因其具有较高的营养保健功能, 受到越来越多消费者的青睐。葡萄酒中含有种类丰富的有机酸、氨基酸、单宁、酚类和香气物质等^[1], 其中酚类化合物作为植物体内的次生代谢物^[2], 对葡萄酒的质量至关重要。酚类化合物是一类具有大而复杂结构的化合物, 从本质上讲酚是苯环(又称芳香环)上直接连有一个或多个羟基的化合物, 多酚物质是含有酚官能团的物质。酚类物质

收稿日期: 2022-10-10; 网络首发日期: 2022-11-10

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目(2020MK061)。

作者简介: 马燕玲(1987-), 女, 山东烟台人, 硕士, 工程师, 主要从事农产品质量风险评估的研究。

通讯作者: 吴帅, E-mail: wushuai97@163.com。

引用本文: 马燕玲, 王一名, 初坤, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定葡萄酒中酚酸和酚醛类化合物[J]. 化学试剂, 2023, 45(2): 141-147。

是葡萄中重要的次生代谢产物,与葡萄的抗病性、保鲜特性和果实品质等有密切的关系。葡萄酒中的酚类物质主要可分为类黄酮和非类黄酮,非类黄酮类物质不具有类黄酮 C6-C3-C6 结构,主要包括酚酸类化合物(羟基苯甲酸类、羟基肉桂酸类)^[3]。酚酸类物质除了具备多酚共有的强抗氧化能力外,在葡萄酒发酵和陈酿过程中还参与多种氧化还原反应和褐变反应^[4],如咖啡酸、香豆酸等能与酒石酸和花色素结合成酒石酸酯,影响葡萄酒的氧化过程和颜色稳定性^[5];一些酚酸类的前体物质,如丁香醛和香草醛等,既可以赋予葡萄酒特殊的香气^[6],也表现出一定的辅色能力^[7],影响葡萄酒的颜色和风味。酚类物质对于葡萄酒的颜色具有重要的作用^[8]。葡萄酒中多酚种类较多、含量不一,在不同品种^[9]、类型^[10]、产地^[11]、成熟度及陈酿条件^[12-16]下,所占比例不同,因此分析葡萄酒中酚类物质的含量具有重要意义。

目前针对酚类物质的检测已有一些报道,主要分析方法有高效液相色谱法(HPLC)^[17-19]、毛细管电泳分析法(CE)^[20]、高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS/MS)^[21,22]等。Goncalves 等^[23]采用 HPLC 在 HSS T3 分析柱上分离葡萄酒中 16 种生物活性酚类成分。Budić-Letoa 等^[24]采用 HPLC-MS/MS 在酚类物质的基础上,对克罗地亚甜葡萄酒和干葡萄酒进行鉴别。从文献资料来看,HPLC 检测的缺陷在于其仪器运行时间长,且葡萄酒成分复杂,待测化合物与干扰物的有效分离仍是难点,用二极管阵列检测器定性时,存在假阳性的可能。CE 受葡萄酒样品基质的影响非常大,灵敏度低。与前两种方法相比,HPLC-MS/MS 具有分析速度快、选择性好、灵敏度高的优点^[25],受到越来越多研究人员的关注。目前研究葡萄酒酚酸和酚醛类化合物时多采用 HPLC,而利用 HPLC-MS/MS 研究相关内容的文章还未见报道。

本研究建立了超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法同时测定葡萄酒中酚酸和酚醛类化合物的方法,并应用于实际样品的检测。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

TQ-S 型超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱联用仪(美国 Waters 公司);CR18RT 型台式冷冻离心机(上海精科天美公司);Multi Reax 型多

管涡旋振荡器(德国 Heidolph 公司);N-EVAP 112 型氮吹仪(美国 Organomation 公司);AR224CN 型电子天平(美国奥豪斯公司);Milli-Q 型超纯水机(美国 Millipore 公司)。

没食子酸、咖啡酰酒石酸、咖啡酸、肉桂酸(成都普菲德生物技术有限公司);丁香酸、对羟基苯甲酸、对香豆酸和芥子酸(美国 Sigma-Aldrich 公司);香草酸、阿魏酸、原儿茶酸、鞣花酸、水杨酸、绿原酸、香草醛、龙胆酸、3,5-二羟基苯甲酸(成都普瑞法科技开发有限公司);丁香醛(德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司);甲酸、甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Merck 公司);乙酸乙酯、乙醚(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);实验用水为自制超纯水。葡萄酒购买于超市。

1.2 实验条件

1.2.1 色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm),柱温 35℃;流动相 A 为 0.1%(V/V)甲酸-水溶液,B 为 0.1%(V/V)甲酸-乙腈溶液,流速 0.3 mL/min;进样量 2 μL。梯度洗脱程序:0~3 min,5%~20% B;3~4.3 min,20% B;4.3~9 min,20%~45% B;9~11 min,45%~100% B;11~13 min,100% B;13~13.5 min,100%~5% B;13.5~15 min,5% B。

1.2.2 质谱条件

电喷雾离子源正离子(ESI⁺)模式下的毛细管电压为 3.5 kV,电喷雾离子源负离子(ESI⁻)模式下的毛细管电压为 2.9 kV;脱溶剂气温度为 500℃,脱溶剂气流速为 1 000 L/h,锥孔气流速为 150 L/h,碰撞气流速为 0.15 mL/min。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

单标准溶液(1 000 mg/L):称取 10 mg 标准品,用甲醇超声溶解并定容至 10 mL 棕色容量瓶中,置于-20℃保存备用。

混合标准储备液(50 mg/L):分别取 250 μL 单标准溶液,用甲醇定容至 5 mL 容量瓶中,置于-20℃保存备用。

1.3.2 模拟酒样的配制

取 120 mL 食用酒精和 5 g 食品级酒石酸,移到 1 L 容量瓶中,用去离子水定容,即得到模拟酒样。

1.3.3 预处理方法

溶剂提取法^[26,27]:取 10 mL 模拟酒样,加入

10 mL 乙酸乙酯或无水乙醚,涡旋振荡后,离心,取上清液,重复萃取 3 次,合并有机相,氮气吹至近干,用 1 mL 甲醇溶解残渣,过滤膜,上机分析。

直接进样法:葡萄酒样品经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,在仪器工作条件下进行分析。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的选择

选择电喷雾离子源(ESI),采用多反应监测(MRM)模式对待测物的质谱条件进行优化。在正离子和负离子模式下,以流动注射方式将待测物标准溶液注入质谱仪进行全扫描^[28,29]。结果

显示,没食子酸、咖啡酰酒石酸、丁香酸、鞣花酸、绿原酸和芥子酸等 6 种化合物在负离子模式下响应值较高且峰形更好(基峰均为 $[M-H]^-$),而其他化合物如对羟基苯甲酸、对香豆酸、水杨酸等在正离子模式下的响应值更高(基峰均为 $[M+H]^+$),所以分别选择正、负离子模式进行检测。选定各自的母离子,在 MS/MS 模式下对其进行轰击寻找子离子,选取干扰较小、信噪比最高的离子对进行监测,确定定量和定性离子对^[30]。通过对毛细管电压、锥孔电压、离子源温度、脱溶剂气温度、接口温度、去溶剂气和锥孔反吹气流速等参数进一步优化,从而确定质谱运行参数。具体分析参数见表 1。

表 1 酚酸和酚醛类化合物的质谱参数^注

Tab.1 Mass spectrometry parameters of phenolic acid and phenol aldehyde compounds

化合物	英文名称	质荷比 m/z		碰撞能量/V	锥孔电压/V
		母离子	子离子		
没食子酸	gallic acid	169	79 [*] /97	-22/-18	-26
咖啡酰酒石酸	caftaric acid	311	149 [*] /179/135	-15/-12/-30	-30
对羟基苯甲酸	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	139	77 [*] /65	16/25	30
丁香酸	syringic acid	197	182 [*] /123/167	-15/-22/-15	-10
香草酸	vanillic acid	169	93 [*] /110/95	14/15/20	20
对香豆酸	<i>p</i> -coumaric acid	165	119 [*] /91	17/22	25
阿魏酸	ferulic acid	195	145 [*] /117	16/21	26
咖啡酸	caffeic acid	181	163.4 [*] /117	10/20	30
原儿茶酸	3,4-dihydroxybenzoic acid	155	65 [*] /93	18/20	30
鞣花酸	ellagic acid	301	145 [*] /185/173	-35/-30/-30	-30
水杨酸	salicylic acid	139	121 [*] /65/93	12/15/18	30
绿原酸	chlorogenic acid	353	191 [*] /179/135	-15/-20/-32	-30
芥子酸	Sinapic Acid	223	208 [*] /164	-14/-14	-30
肉桂酸	cinnamic acid	149	131 [*] /103	12/18	20
香草醛	vanillin	153	93 [*] /125/65	15/10/20	25
丁香醛	syringaldehyde	183	123 [*] /155/95	12/10/18	25
龙胆酸	2,5-dihydroxybenzoic acid	155	137 [*] /81/109	18/22/18	30
3,5-二羟基苯甲酸	3,5-dihydroxybenzoic acid	155	93 [*] /137	20/18	30

注:“*”为定量离子。

2.2 色谱柱的选择

根据待测成分的特点,选择 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm)和 BEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm)为试验用色谱柱。考察待测物在两支色谱柱上的分离效果,结果显示,待测物在色谱柱上的分离效果相差不大。对比相同待测物在 HSS T3 色谱柱和 C18 色谱柱上响应值的比值,计算结果见表 2。由表可知,待测物在 HSS T3 色谱柱上的响应值均

高于 C18 色谱柱。与 BEH C18 色谱柱相比,咖啡酰酒石酸和水杨酸在 HSS T3 色谱柱上的响应值高 100% 以上;对羟基苯甲酸、原儿茶酸、对香豆酸、鞣花酸、绿原酸、龙胆酸、3,5-二羟基苯甲酸在 HSS T3 色谱柱上的响应值高约 51%~100%;丁香醛的响应值增加幅度最低,高约 17%,其余 8 种组分的响应值高约 30%~50%。考虑到待测物在 HSS T3 色谱柱上的响应信号更好,本实验选择 HSS T3 色谱柱作为待测物分析用色谱柱。

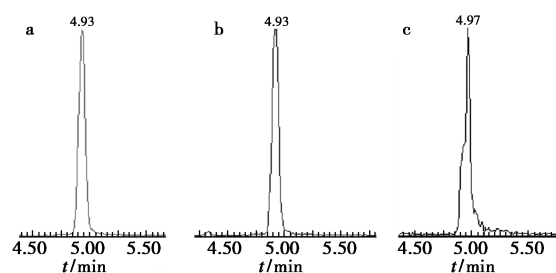
表 2 酚酸和酚醛类化合物在 HSS T3 和 C18 色谱柱上响应信号的对比

Tab.2 Comparison of response signals of phenolic acid and phenol aldehyde compounds on HSS T3 and C18 columns

化合物	T3/C18 响应 比值/%	化合物	T3/C18 响应 比值/%
没食子酸	31	鞣花酸	60
咖啡酰酒石酸	159	水杨酸	106
对羟基苯甲酸	78	绿原酸	52
丁香酸	47	芥子酸	28
香草酸	43	肉桂酸	49
对香豆酸	60	香草醛	37
阿魏酸	49	丁香醛	17
咖啡酸	49	龙胆酸	58
原儿茶酸	78	3,5-二羟基苯甲酸	73

2.3 流动相的选择

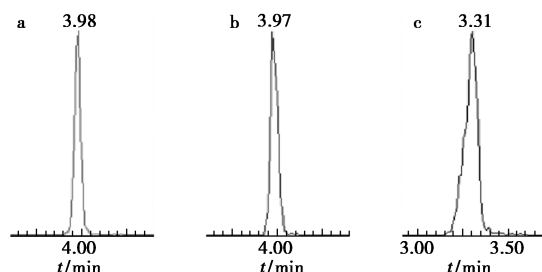
以 HSS T3 色谱柱作为分析用色谱柱,分别选用 0.1% (V/V) 甲酸乙腈溶液-0.1% (V/V) 甲酸水溶液 (I)、乙腈-0.1% (V/V) 甲酸水溶液 (II) 和 乙腈-水 (III) 作为流动相,比较 3 种流动相对待测物的分离效果。结果显示,多数目标峰在加酸后的流动相中出峰效果更佳,以香草醛和丁香酸为例,其在流动相 I、II 中峰形更对称,如图 1、2



a. 0.1% (V/V) 甲酸乙腈溶液-0.1% (V/V) 甲酸水溶液;
b. 乙腈-0.1% (V/V) 甲酸水溶液; c. 乙腈-水

图 1 香草醛在不同流动相中的色谱峰

Fig.1 Chromatographic peaks of vanillin in different mobile phases



a. 0.1% (V/V) 甲酸乙腈溶液-0.1% (V/V) 甲酸水溶液;
b. 乙腈-0.1% (V/V) 甲酸水溶液; c. 乙腈-水

图 2 丁香酸在不同流动相中的色谱峰

Fig.2 Chromatographic peaks of syringic acid in different mobile phases

所示;从峰面积来看,除丁香酸外,其他 17 种待测物在流动相 I 和 II 中的响应值均显著高于流动相 III。

待测物在流动相 I 和 II 中的分离效果表现相似,但响应值存在差异。8 种化合物在两种流动相中的响应值相差 10% 以上,其中没食子酸、咖啡酰酒石酸、原儿茶酸、龙胆酸和 3,5-二羟基苯甲酸在流动相 I 中的响应值比流动相 II 高约 20%~50%,香草酸、水杨酸和芥子酸在流动相 II 中的响应值比流动相 I 高约 10%~20%。

综合待测物在 3 种流动相中的响应值和分离效果来看,选择 0.1% (V/V) 甲酸乙腈溶液-0.1% (V/V) 甲酸水溶液为流动相。

2.4 滤膜材质的影响

由于葡萄酒中目标分析物的特性具有较大差别,不同材质滤膜对分析物的吸附能力也存在较大差异。在过滤时,滤膜会不同程度地改变分析物浓度,从而影响检测方法的准确性。本研究选择不同类型的针头式微滤膜过滤器:聚四氟乙烯 (PTFE)、聚偏氟乙烯 (PVDF) 和尼龙 (Nylon),直径均为 13 mm、孔径均为 0.22 μm ,研究滤膜对检测方法的影响。

将浓度为 1 000 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液,分别通过不同类型的滤膜,过滤体积均为 1 mL。同一份滤膜做 3 个平行样。根据过滤前后的浓度计算过膜率,结果见表 3。由数据可知,每种滤膜对酚类物质的吸附程度存在差异。膜材质为 Nylon 时,咖啡酰酒石酸、鞣花酸和龙胆酸的过膜率均低于 50%,香豆酸、咖啡酸、芥子酸、3,5-二羟基苯甲酸的过膜率在 60%~70% 之间;膜材质为 PVDF 时,鞣花酸的过膜率为 17.4%,3,5-二羟基苯甲酸的过膜率为 51.7%;香草酸的过膜率为 63.3%,其余待测物过膜率在 70% 以上;膜材质为 PTFE 时,所有待测物的过膜率均在 70% 以上。因此,为了实现目标物更为准确的定性和定量分析,本实验选择 PTFE 作为试验用滤膜。

表 3 滤膜对酚酸和酚醛类化合物过膜率的影响

Tab.3 Effect of membrane on the transmembrane rate of phenolic acid and phenol aldehyde compounds

化合物	过膜率/%		
	PTFE	PVDF	Nylon
没食子酸	90.9	90.6	88.9
咖啡酰酒石酸	96.5	98.9	41.9
对羟基苯甲酸	97.9	87.6	89.9
丁香酸	93.8	85.5	82.2

化合物	过膜率/%		
	PTFE	PVDF	Nylon
香草酸	97.6	63.3	83.7
对香豆酸	96.4	90.1	64.9
阿魏酸	98.8	92.4	72.2
咖啡酸	98.2	93.6	63.4
原儿茶酸	86.6	71.6	74.1
鞣花酸	84.9	17.4	3.5
水杨酸	85.4	98.2	35.6
绿原酸	74.3	96.9	81.9
芥子酸	89.3	74.1	61.9
肉桂酸	94.0	86.3	75.9
香草醛	78.3	79.3	99.8
丁香醛	94.9	93.2	98.8
龙胆酸	95.1	87.7	24.8
3,5-二羟基苯甲酸	98.9	51.7	66.5

2.5 预处理方法对回收率的影响

葡萄酒酚类物质检测方法的预处理方式有乙酸乙酯提取法、乙醚提取法和直接过膜法。在模拟酒样中添加固定浓度的标准品,比较不同预处理方式下各待测物的回收率,结果见表 4。

表 4 预处理方式对酚酸和酚醛类化合物回收率的影响

化合物	回收率/%		
	乙酸乙酯法	乙醚法	直接过膜法
没食子酸	69.9	52.1	91.4
咖啡酰酒石酸	52.3	40.2	96.7
对羟基苯甲酸	92.8	69.5	92.8
丁香酸	85.0	60.3	91.6
香草酸	93.5	72.5	95.3
对香豆酸	89.1	81.4	97.0
阿魏酸	82.7	76.8	96.7
咖啡酸	82.9	76.6	97.4
原儿茶酸	60.4	62.6	91.1
鞣花酸	70.2	60.7	80.4
水杨酸	72.3	84.4	83.1
绿原酸	67.2	12.8	75.6
芥子酸	58.8	58.9	84.3
肉桂酸	80.8	92.8	94.3
香草醛	81.6	82.4	80.3
丁香醛	89.2	79.7	91.6
龙胆酸	94.6	77.6	94.9
3,5-二羟基苯甲酸	73.3	71.9	92.8

由表可知,采用乙酸乙酯提取时,没食子酸、咖啡酰酒石酸、原儿茶酸、鞣花酸、水杨酸、绿原酸、芥子酸和 3,5-二羟基苯甲酸的回收率在 50%~74%之间;采用乙醚提取时,咖啡酰酒石酸和绿原酸的回收率低于 50%,没食子酸、对羟基

苯甲酸、3,5-二羟基苯甲酸、丁香酸、原儿茶酸、鞣花酸和芥子酸的回收率在 50%~72%之间;采用直接过膜法时,绿原酸的回收率最低,为 75.6%,其他成分的回收率均在 80%以上。考虑到方法的准确度和简便性,本方法选择样品直接过滤膜后,上机检测。

2.6 标准工作曲线的建立

将混合标准储备液用甲醇稀释出 6 个浓度水平的标准工作溶液,按照仪器工作条件进行测定,每个浓度做 3 个平行,以峰面积 Y 为纵坐标、质量浓度 X 为横坐标,计算得到标准曲线。分析可知,待测物标准品在各自的质量浓度范围内均呈良好的线性关系。分别以 3、10 倍信噪比 (S/N) 计算检出限和定量限,结果见表 5。

表 5 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

化合物	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	线性方程	相关系数	检出限/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	定量限/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
没食子酸	100~2 000	$Y=239\ 194X+32\ 165$	0.991 1	1.0	3.0
咖啡酰酒石酸	100~2 000	$Y=120\ 125X+90\ 483$	0.990 4	4.0	10.0
对羟基苯甲酸	100~2 000	$Y=25\ 395X+9\ 747$	0.998 9	1.0	5.0
丁香酸	100~2 000	$Y=85\ 420X-2\ 607$	0.997 1	0.4	1.5
香草酸	100~2 000	$Y=101\ 081X+70\ 624$	0.990 8	0.4	1.5
对香豆酸	100~2 000	$Y=103\ 446X+89\ 630$	0.995 8	0.8	3.0
阿魏酸	100~2 000	$Y=148\ 795X+68\ 659$	0.993 8	0.5	2.0
咖啡酸	100~5 000	$Y=164\ 755X+69\ 087$	0.990 4	0.8	2.5
原儿茶酸	1~100	$Y=4\ 017X-737$	0.999 1	1.0	4.0
鞣花酸	2~100	$Y=1\ 017X-54$	0.998 3	2.0	6.0
水杨酸	1~100	$Y=8\ 808X+1\ 356$	0.999 8	1.0	5.0
绿原酸	1~100	$Y=5\ 951X+121$	0.999 8	0.2	1.0
芥子酸	1~100	$Y=2\ 804X-426$	0.998 3	1.0	3.0
肉桂酸	1~100	$Y=14\ 224X+7\ 862$	0.992 4	0.4	1.2
香草醛	1~1 000	$Y=61\ 480X+1\ 498$	0.998 9	0.2	1.0
丁香醛	1~1 000	$Y=67\ 463X+567$	0.999 6	0.2	0.8
龙胆酸	1~100	$Y=78\ 717X+1\ 832$	0.995 3	0.4	1.5
3,5-二羟基苯甲酸	2~100	$Y=16\ 315X+631$	0.993 7	2.0	5.0

2.7 回收率和精密度

分别在模拟酒样中添加 10、100、1 000 $\mu\text{g/L}$ 这 3 个质量浓度,按照直接进样法处理后,在优化的实验条件下,上机检测。平行测定 7 次,计算加标回收率,待测物的精密度以其相对标准偏差 ($\text{RSD},\%$) 表示,结果见表 6。结果显示,平均回收率为 75.0%~98.8%,各待测物的相对标准偏

差为 1.68%~6.19%。结果表明,该方法的准确度良好,符合待测物定量检测的要求。

表 6 回收率和精密度

Tab.6 Recovery and precision

化合物	回收率/%	精密度/%
没食子酸	90.5~92.8	2.12~3.18
咖啡酰酒石酸	95.9~97.2	3.08~5.20
对羟基苯甲酸	90.9~95.1	2.57~4.46
丁香酸	88.6~93.2	3.64~5.09
香草酸	90.8~95.3	2.08~4.37
对香豆酸	95.7~98.0	1.68~3.07
阿魏酸	96.1~98.8	2.68~4.98
咖啡酸	93.2~98.1	2.50~4.08
原儿茶酸	87.6~93.4	3.21~4.95
鞣花酸	75.6~84.3	3.56~5.94
水杨酸	80.7~86.8	2.01~4.85
绿原酸	75.0~79.1	2.25~3.65
芥子酸	82.7~86.3	4.69~6.19
肉桂酸	92.6~96.4	1.65~3.19
香草醛	77.3~83.6	2.62~3.95
丁香醛	86.0~91.8	2.70~5.13
龙胆酸	90.2~95.4	3.99~5.07
3,5-二羟基苯甲酸	91.6~93.8	4.51~5.64

2.8 实际酒样的检测结果

收集 15 份市售的葡萄酒样品,其中赤霞珠干红葡萄酒 7 份,美乐干红葡萄酒 3 份,蛇龙珠干红葡萄酒 2 份,霞多丽干白葡萄酒 2 份,雷司令干白葡萄酒 1 份。以新建立的方法对样品进行分析,其中,没食子酸和咖啡酰酒石酸的含量过高,将样品稀释合适的倍数,使其含量在表 5 标准曲线的线性范围内,按照方法进样分析,然后进行计算。结果见表 7 和表 8。结果表明,所有葡萄酒样品中均含有没食子酸、咖啡酰酒石酸、对羟基苯甲酸、丁香酸、香草酸、对香豆酸、阿魏酸、咖啡酸、绿原酸、香草醛、丁香醛。原儿茶酸、鞣花酸、水杨

表 7 赤霞珠干红葡萄酒中酚酸和酚醛类化合物的测定结果^注

Tab.7 Determination results of phenolic acid and phenol aldehyde compounds in Cabernet Sauvignon dry red wine

化合物	赤霞珠质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)						
	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	7 号
没食子酸	15 277	28 729	23 890	23 807	36 062	36 495	29 266
咖啡酰酒石酸	13 150	5 441	4 700	4 052	3 363	3 604	6 668
对羟基苯甲酸	1 513	438	655	619	929	548	846
丁香酸	2 339	1 173	2 072	1 147	971	1 098	944
香草酸	5 992	1 414	2 787	2 047	888	1 165	1 396
对香豆酸	4 008	3 719	3 914	5 149	4 943	4 648	4 167

续表

化合物	赤霞珠质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)						
	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	7 号
阿魏酸	506	420	410	440	647	604	492
咖啡酸	2 546	1 129	1 440	2 182	1 134	1 647	1 970
原儿茶酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
鞣花酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
水杨酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
绿原酸	0.8	3.7	2.5	0.2	0.9	0.4	0.6
芥子酸	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
肉桂酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
香草醛	105	49	95	86	55	42	100
丁香醛	138	41	50	49	103	95	183
龙胆酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3,5-二羟基苯甲酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注:ND 表示含量低于检出限。

表 8 其他品种葡萄酒中酚酸和酚醛类化合物的测定结果^注

Tab.8 Determination results of phenolic acid and phenol aldehyde compounds in other varieties of wine

化合物	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)							
	美乐		蛇龙珠		霞多丽		雷司令	
	1 号	2 号	3 号	1 号	2 号	1 号	2 号	1 号
没食子酸	15 733	42 606	31 048	13 219	14 745	2 177	1 370	953
咖啡酰酒石酸	11 696	12 133	7 633	13 931	13 425	12 908	3 170	4 754
对羟基苯甲酸	681	712	675	1 544	1 485	287	16	ND
丁香酸	343	204	223	3 174	2 352	116	74	68
香草酸	2 732	1 777	2 213	6 262	4 691	161	588	84
对香豆酸	2 624	3 741	4 222	2 759	2 514	1 803	3 027	2 501
阿魏酸	340	413	525	368	448	523	690	574
咖啡酸	1 039	1 165	1 328	2 594	2 554	4 338	1 859	2 850
原儿茶酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
鞣花酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
水杨酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
绿原酸	0.8	6.1	8.8	5.2	21.4	1.2	1.2	0.6
芥子酸	ND	ND	ND	14	6	ND	ND	ND
肉桂酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
香草醛	122	169	271	504	261	4	ND	12
丁香醛	42	41	148	1 037	498	4	7	ND
龙胆酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3,5-二羟基苯甲酸	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注:ND 表示含量低于检出限。

酸、肉桂酸、龙胆酸和 3,5-二羟基苯甲酸在葡萄酒中未检出。赤霞珠干红葡萄酒 1 号样品中芥子酸含量为 1 $\mu\text{g}/\text{L}$,蛇龙珠干红葡萄酒 1 号、2 号样品中芥子酸含量分别为 14、6 $\mu\text{g}/\text{L}$,其余酒样未检出芥子酸。

3 结论

本文建立了葡萄酒中酚酸和酚醛类物质的超高效液相色谱-串联质谱分析方法。试验结果表明,新方法具有快速、灵敏度高等优点,适用于葡萄酒中酚类成分的检测。该方法的建立为研究葡萄酒检测技术提供技术支撑,同时也为葡萄酒品质的监控提供了一种新的手段。

参考文献:

- [1] 赵任军.葡萄酒的功能与营销[J].中外葡萄与葡萄酒, 2006, **24**(5): 51-53.
- [2] 朱美蓉,房玉林.葡萄多酚研究进展及其开发利用[J].中国酿造, 2015, **34**(12): 1-4.
- [3] 张欣珂,赵旭,成池芳,等.葡萄酒中的酚类物质 I: 种类、结构及其检测方法研究进展[J].食品科学, 2019, **40**(15): 255-268.
- [4] 孙建平.葡萄与葡萄酒中酚类物质 LC-UV-MS/MS 谱库构建及应用[D].北京:中国农业大学, 2006.
- [5] MARTIN J D, LUIS B M, LOPEZ M C, et al. Effect of caffeic acid on the color of red wine [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**: 2 062-2 067.
- [6] SANCHEZ-GOMEZ R, DEL A S M, NEVARES I. Volatile composition of oak wood from different customised oxygenation wine barrels: Effect on red wine [J]. *Food Chem.*, 2020, **329**: 127 181.
- [7] ZHANG B, HE F, ZHOU P P, et al. The color expression of copigmentation between malvidin-3-O-glucoside and three phenolic aldehydes in model solutions: The effects of pH and molar ratio [J]. *Food Chem.*, 2016, **199**: 220-228.
- [8] 张宁,赵旭,兰义宾,等.中国东亚种红葡萄酒的颜色特征及酚类组成研究[J].中国酿造, 2022, **41**(5): 34-41.
- [9] 史宁,卢浩成,刘瑶,等.添加‘丹菲特’单品种葡萄酒对‘赤霞珠’葡萄酒酚类物质和颜色的影响[J].中国酿造, 2022, **41**(9): 68-73.
- [10] 孙树霖,刘政海,张丽.三种红色酿酒葡萄品种果实酚类物质比较[J].中国酿造, 2020, **39**(4): 137-141.
- [11] ROCCHETTIA G, GATTIB M, BAVARESCO L, et al. Untargeted metabolomics to investigate the phenolic composition of Chardonnay wines from different origins [J]. *J. Food Compos. Anal.*, 2018, **71**: 87-93.
- [12] 马锦锦.葡萄和葡萄酒中酚类物质及原花青素[D].西安:陕西师范大学, 2014.
- [13] 韩国民,陈锋,侯敏,等.葡萄酒中 14 种单体酚的高效液相色谱测定[J].食品科学, 2011, **32**(2): 180-183.
- [14] ZHANG B, CAI J, DUAN C Q, et al. A review of polyphenolics in oak woods [J]. *Int. J. of Mol. Sci.*, 2015, **16**: 6 978-7 014.
- [15] 张晓燕,孙成举,孙丙升,等.葡萄酒中多酚物质的种类、影响因素及其作用[J].中外葡萄与葡萄酒, 2017, **216**(6): 51-56.
- [16] 赵昊,宋晶晶,于佳俊,等.不同产区葡萄酒多酚物质抗氧化活性差异及相关性分析[J].食品与发酵工业, 2021, **47**(6): 84-91.
- [17] 唐柯,马磊,徐岩,等.超高效液相色谱法快速测定葡萄酒中酚酸[J].中国酿造, 2015, **34**(12): 157-161.
- [18] 赵建勇,任水英. UPLC 法同时检测新疆葡萄酒中的 7 种单体酚[J].中国酿造, 2015, **34**(2): 139-141.
- [19] 陈建业,温鹏飞,战吉成,等.葡萄酒中 11 种酚酸的反相高效液相色谱测定方法研究[J].中国食品学报, 2006, **6**(6): 133-138.
- [20] 曹玉华,张欣,方禹之,等.毛细管电泳电化学检测法测定红葡萄酒中的多元酚[J].高等学校化学学报, 2001, **22**(12): 2 011-2 013.
- [21] TORRE G L L, SAITTA M, VILASI F, et al. Direct determination of phenolic compounds in Sicilian wines by liquid chromatography with PDA and MS detection [J]. *Food Chem.*, 2006, **94**: 640-650.
- [22] ALECU A, ALBU C, LITESCU S C, et al. Phenolic and anthocyanin profile of valea calugareasca red wines by HPLC-PDA-MS and MALDI-TOF analysis [J]. *Food Anal. Method*, 2016, **9**: 300-310.
- [23] GONCALVES J, MENDES B, SILVA C, et al. Development of a novel microextraction by packed sorbent-based approach followed by ultrahigh pressure liquid chromatography as a powerful technique for quantification phenolic constituents of biological interest in wines [J]. *J. Chromatogr. A*, 2012, **16**: 13-23.
- [24] BUDIĆ-LETOA I, ZDUNIĆA G, GAJDOŠ-KLJUSURIĆB J, et al. Differentiation between Croatian dessert wine Prošek and dry wines based on phenolic composition [J]. *J. Food Compos. Anal.*, 2017, **62**: 211-216.
- [25] 张勋,邢燕燕,赵韞慧,等.基于液相色谱-串联质谱法检测多种食品中的 16 种合成着色剂[J].化学试剂, 2017, **39**(4): 385-390.
- [26] 赵权,王军,杨成君.不同品种山葡萄果皮和酒中非花色苷酚的成分分析[J].东北林业大学学报, 2012, **40**(3): 72-77, 102.
- [27] 孙建平,侯小歌,梁峰,等.高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱法测定红葡萄酒中酚类物质[J].分析化学, 2006, **11**: 1 565-1 569.
- [28] 许晓辉,王小乔,石晓峰,等. QuEChERS-分散固相萃取-液质联用法测定婴幼儿奶粉中 9 种禁用安眠药[J].化学试剂, 2021, **43**(9): 1 257-1 261.
- [29] 许晓辉,王瑞,党子龙,等.超高效液相色谱串联质谱法测定中药类保健品中 6 种有毒生物碱[J].化学试剂, 2022, **44**(4): 594-598.
- [30] 白利文,王瑞花,于忠山,等.超高效液相色谱-串联质谱法筛查血液中 29 种常见毒品[J].化学试剂, 2020, **42**(3): 280-284.

一测多评法测定黑果小檗果实中 5 种花色苷含量

陈玲¹, 包海燕¹, 阳莹¹, 李敏¹, 李慧敏¹, 康莹莹¹, 李建光^{*1,2}

(1.新疆医科大学 药学院,新疆 乌鲁木齐 830011;2.新疆科技学院 医学院,新疆 库尔勒 841000)

摘要:建立高效液相色谱—一测多评法(HPLC-QAMS)测定黑果小檗果实中 5 种花色苷的含量。采用 Welch Topsil™ C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为甲醇-2.5%甲酸水溶液,梯度洗脱;检测波长为 520 nm;流速为 0.8 mL/min;柱温为 35 ℃;进样量为 10 μL。以矢车菊素-3-O-葡萄糖苷为内参物,建立飞燕草素-3-O-葡萄糖苷、矮牵牛素-3-O-葡萄糖苷、芍药素-3-O-葡萄糖苷以及锦葵素-3-O-葡萄糖苷的相对校正因子,并计算各成分含量,同时与外标法测定结果进行对比。5 种花色苷分别在各自浓度范围内与峰面积的线性关系良好($0.9994 \leq R^2 \leq 0.9996$);平均加样回收率为 99.44%~101.72%,RSD 为 1.32%~2.59%;6 批不同产地的黑果小檗采用 QAMS 法与外标法所测含量无显著性差异($P>0.05$)。该方法可用于黑果小檗果实中 5 种花色苷的含量测定。

关键词:黑果小檗;花色苷;一测多评法;相对校正因子;含量测定

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:0258-3283(2023)02-0148-07

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0666

Determination of Five Anthocyanins in *Berberis heteropoda* Schrenk Fruit by QAMS Method CHEN Ling¹, BAO Hai-yan¹, YANG Ying¹, LI Min¹, LI Hui-min¹, KANG Ying-ying¹, LI Jian-guang^{*1,2} (1.College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2.School of Medicine, Xinjiang University of Science and Technology, Korla 841000, China)

Abstract: To establish a high performance liquid chromatography-quantitative analysis of multi-component by single marker (HPLC-QAMS) method for determination of five anthocyanins in *Berberis heteropoda* Schrenk fruit. Welch Topsil™ C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used as the column with methanol-2.5% formic acid water as the mobile phase by gradient elution. The detection wavelength was set at 520 nm, the flow rate was 0.8 mL/min, the column temperature was 35 ℃ and the injection volume was 10 μL. The relative correction factors of delphinidin-3-O-glucoside, petunidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside and malvidin-3-O-glucoside were established with cyanidin-3-O-glucoside as internal reference. The contents of each component were calculated and compared with the results of external standard method. Five anthocyanins showed good linear relationships within their own ranges ($0.9994 \leq R^2 \leq 0.9996$); whose average recoveries are 99.44%~101.72% with the RSD of 1.32%~2.59%. There was no significant difference between QAMS method and external standard method in the results of 6 batches of *Berberis heteropoda* Schrenk fruits from different producing areas ($P>0.05$). The established method can be used for the determination of five anthocyanins in *Berberis heteropoda* Schrenk fruits.

Key words: berberis heteropoda schrenk; anthocyanin; QAMS; relative correction factor; content determination

黑果小檗(*Berberis heteropoda* Schrenk)为小檗科小檗属灌木植物,始载于《新疆中草药手册》,在新疆阿勒泰及天山等地区均有分布^[1],因果实成熟后呈紫黑色而得名。该果实具健胃和中、生津止渴、清热解毒等功效,哈萨克族人民会将果实长期泡茶饮用,具有降血压的作用^[2]。近年研究发现黑果小檗果实中主要有 5 种花色苷^[3],分别为飞燕草素-3-O-葡萄糖苷(Delphinidin-3-O-glucoside, De-3G)、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷(Cyanidin-3-O-glucoside, Cy-3G)、矮牵牛素-3-O-葡萄糖苷(Petunidin-3-O-glucoside, Pet-3G)、芍药素-3-O-葡萄糖苷(Peonidin-3-O-glucoside, Peo-3G)、锦葵素-3-O-葡萄糖苷(Malvidin-3-O-glucoside, Mal-

3G)。药理学研究发现,花色苷在抗炎、抗氧化、抗癌、保护心血管以及调节血脂等方面都有显著的疗效^[4-7],并对 2 型糖尿病、阿尔兹海默病以及肝纤维化等疾病的防治表现出巨大的潜力^[8-10]。

收稿日期:2022-08-31;网络首发日期:2022-11-10

基金项目:杰出青年科学基金项目(2022D01E17);新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室项目(XJDX1713)。

作者简介:陈玲(1996-),女,浙江台州人,硕士生,主要研究方向为天然药物资源的研究与开发。

通讯作者:李建光,E-mail:xjykd_xljg@163.com。

引用本文:陈玲,包海燕,阳莹,等.一测多评法测定黑果小檗果实中 5 种花色苷含量[J].化学试剂,2023,45(2):148-154。

目前常用 pH 示差法和高效液相外标法对花色苷进行含量测定,然而 pH 示差法仅用于总花色苷的含量测定且准确度较低,采用外标法可同时测定多个花色苷的含量,但存在操作繁琐复杂以及对照品价格昂贵等缺点^[11],因而亟需一种高效快捷、低成本的含量测定方法。一测多评法(Quantitative Analysis of Multi-components by Single Marker, QAMS)利用中药各成分存在内在函数关系,建立成分间的相对校正因子,以其中一个性质稳定、廉价易得的成分为内参物,实现多成分的同时定量^[12]。该方法不仅降低了检测的成本,解决对照品不足及不稳定的问题,而且缩短了检测的时间,提高了方法的实用性。本研究选择价格便宜、易得的 Cy-3G 为内参物,建立 QAMS 法同时测定黑果小檗果实中 5 种花色苷含量,以期实现以单指标对黑果小檗果实进行多指标成分含量测定的目的。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

LC-20AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);Agilent1220 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);AB135-S 型分析天平(瑞士梅特勒公司);KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Phs-3E 型 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

De-3G(纯度 100.00%)、Cy-3G(纯度 99.8%)、Pet-3G(纯度 98.5%)、Peo-3G(纯度 98.6%)、Mal-3G(纯度 98.5%)(成都麦德生科技有限公司);甲醇(色谱纯,美国 Sigma 公司);甲酸(色谱纯,天津市大茂化学试剂厂);实验用水为超纯水。

6 批黑果小檗果实分别采自新疆不同地区,经新疆医科大学药学院生药学教研室胡君萍教授鉴定为小檗科小檗属黑果小檗(*Berberis heteropoda* Schrenk)的果实,样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Tab.1 Information of samples

编号	产地	采收日期
S1	新疆伊犁	2021 年 9 月
S2	新疆伊犁	2019 年 9 月
S3	新疆博乐	2020 年 9 月
S4	新疆阿勒泰	2020 年 9 月
S5	新疆南山	2020 年 9 月
S6	新疆塔城	2021 年 9 月

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Welch Topsil™ C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-2.5% 甲酸水(B), 梯度洗脱(0~20 min, 15%~20% A; 20~40 min, 20%~25% A; 40~47 min, 25%~30% A; 47~55 min, 30%~35% A; 55~65 min, 35%~15% A; 65~70 min, 15% A); 检测波长: 520 nm; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL。

1.2.2 混合对照品储备液的制备

分别取 De-3G、Cy-3G、Pet-3G、Peo-3G、Mal-3G 对照品适量,精密称定,置于 10 mL 棕色容量瓶中,用 80% 甲醇(含体积分数 0.5% 的 HCl)稀释至刻度,摇匀,制成浓度分别为 0.432、0.430、0.276、0.380、0.888 mg/mL 的混合对照品储备液。

1.2.3 混合对照品溶液的制备

精密量取 1 mL 混合对照品储备液,用 80% 甲醇(含体积分数 0.5% 的 HCl)定容至 25 mL,摇匀,制成浓度分别为 17.28、17.20、11.04、15.20、35.52 μg/mL 的混合对照品溶液。

1.2.4 供试品溶液的制备

取约 1.0 g 黑果小檗粉末,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 30 mL 80% 甲醇(含体积分数 0.5% 的 HCl),摇匀,称定质量,室温超声 30 min,放冷后再称定质量,用 80% 甲醇(含体积分数 0.5% 的 HCl)补足质量,摇匀,过滤,为样品储备液。取 1 mL 样品储备液定容至 5 mL,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2 结果与讨论

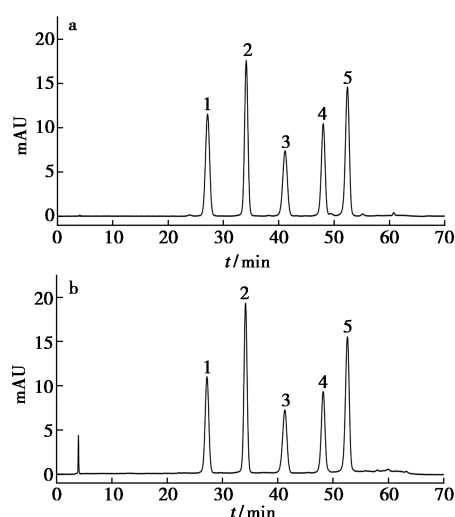
2.1 方法学考察

2.1.1 系统适用性试验

精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,按 1.2.1 色谱条件进样测定,发现各目标峰峰形良好,与相邻峰的分度度>1.5,理论塔板数大于 3 000,色谱图见图 1。

2.1.2 线性关系考察

精密吸取 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 1.2.2 混合对照品储备液,分别置于 10 mL 棕色容量瓶中,用 80% 甲醇(含体积分数 0.5% 的 HCl)稀释至刻度,摇匀,按 1.2.1 色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品质量浓度为横坐标($X, \mu\text{g/mL}$)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,



a.混合对照品色谱图;b.供试品色谱图

1.De-3G;2.Cy-3G;3.Pet-3G;4.Peo-3G;5.Mal-3G

图 1 对照品及供试品 HPLC 图

Fig.1 HPLC spectrum of reference substance and sample substance

结果表明 5 种花色苷在各自范围内线性关系良好。另取 1.2.3 混合对照品溶液,用 80% 甲醇(含体积分数 0.5% 的 HCl)进行倍比稀释,分别以 3 倍信噪比和 10 倍信噪比考察检测限和定量限,结果见表 2。

表 2 线性方程、线性范围与定量限、检测限结果

Tab.2 Results of linear equation, linear range, quantification limit and detection limit

成分	线性方程	R^2	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检测限/ ng	定量限/ ng
De-3G	$Y=32\,744X+19\,762$	0.999 5	4.32~43.20	1.25	4.37
Cy-3G	$Y=41\,530X+17\,317$	0.999 4	4.30~43.00	1.19	2.37
Pet-3G	$Y=36\,526X+9\,836.4$	0.999 6	2.76~27.60	2.19	4.38
Peo-3G	$Y=30\,900X+13\,531$	0.999 6	3.80~38.00	1.37	3.43
Mal-3G	$Y=19\,159X+18\,228$	0.999 6	8.88~88.80	2.08	5.80

2.1.3 精密度试验

精密吸取 10 μL 1.2.3 混合对照品溶液,按 1.2.1 色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积并计算其 RSD。结果 De-3G、Cy-3G、Pet-3G、Peo-3G、Mal-3G 峰面积的 RSD 分别为 1.07%、0.81%、0.67%、1.82%、1.22% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.1.4 稳定性试验

精密吸取 10 μL 同一份供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 时按 1.2.1 色谱条件进样测定,记录峰面积并计算其 RSD。结果 De-3G、Cy-

3G、Pet-3G、Peo-3G、Mal-3G 峰面积的 RSD 分别为 1.04%、1.30%、1.22%、1.31%、1.68% ($n=7$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.5 重复性试验

取约 1.0 g 黑果小檗粉末(S1),精密称定,按 1.2.4 方法制备 6 份供试品溶液,按 1.2.1 色谱条件进样测定,记录峰面积,计算 5 种成分的含量及其 RSD。结果 De-3G、Cy-3G、Pet-3G、Peo-3G、Mal-3G 平均含量分别为 2.39、2.89、1.67、2.15、6.00 mg/g, RSD 分别为 0.56%、0.81%、0.92%、1.19%、1.30% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.1.6 回收率试验

取约 0.5 g 已知含量黑果小檗粉末(S1),精密称定,按 1.2.4 方法制备 9 份供试品溶液,按 50%、100%、150% 的比例精密加入 5 种花色苷对照品溶液,按 1.2.1 色谱条件进样测定,记录峰面积,计算 5 种花色苷平均加样回收率及 RSD,结果 RSD 均小于 5%,表明该方法准确度良好,结果见表 3。

表 3 样品回收率试验结果

Tab.3 Results of sample recovery rates ($n=9$)

成分	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	加样回 收率/%	平均加样 回收率/%	RSD/ %
De-3G	0.674 8	0.375 6	1.055 3	101.29	99.68	2.59
	0.639 6	0.375 6	1.009 1	98.39		
	0.689 6	0.375 6	1.056 5	97.69		
	0.681 1	0.751 2	1.404 5	96.30		
	0.673 0	0.751 2	1.423 1	99.86		
	0.685 9	0.751 2	1.410 0	96.39		
	0.694 3	1.126 8	1.853 7	102.89		
	0.673 4	1.126 8	1.828 0	102.47		
	0.698 1	1.126 8	1.845 8	101.85		
Cy-3G	0.694 8	0.375 1	1.070 6	100.20	100.66	2.21
	0.663 0	0.375 1	1.046 1	102.14		
	0.690 0	0.375 1	1.079 8	103.94		
	0.686 6	0.750 2	1.423 1	98.17		
	0.691 3	0.750 2	1.426 1	97.94		
	0.688 9	0.750 2	1.423 3	97.88		
	0.702 6	1.125 3	1.842 4	101.29		
	0.691 7	1.125 3	1.841 7	102.20		
	0.689 3	1.125 3	1.839 3	102.20		
Pet-3G	0.436 2	0.238 5	0.677 1	101.03	100.71	1.63
	0.429 3	0.238 5	0.666 4	99.42		
	0.442 3	0.238 5	0.684 0	101.36		
	0.422 8	0.476 5	0.889 3	97.90		
	0.432 0	0.476 5	0.902 5	98.74		
	0.414 6	0.476 5	0.899 7	101.81		
	0.444 0	0.715 5	1.170 8	101.58		
	0.432 5	0.715 5	1.169 3	102.97		
	0.431 5	0.715 5	1.158 1	101.55		

续表						
成分	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	加样回 收率/%	平均加样 回收率/%	RSD/ %
Peo-3G	0.490 5	0.262 5	0.755 9	101.10	101.72	1.19
	0.466 7	0.262 5	0.735 0	102.20		
	0.485 1	0.262 5	0.757 3	103.69		
	0.485 7	0.525 0	1.017 9	101.36		
	0.494 0	0.525 0	1.023 7	100.90		
	0.495 9	0.525 0	1.020 5	99.92		
	0.498 3	0.787 5	1.301 7	102.02		
	0.507 6	0.787 5	1.302 4	100.93		
	0.504 0	0.787 5	1.317 7	103.33		
	1.520 5	0.812 4	2.341 4	101.05		
Mal-3G	1.496 1	0.812 4	2.292 0	97.97	99.44	1.32
	1.523 1	0.812 4	2.337 4	100.24		
	1.514 1	1.624 8	3.100 4	97.63		
	1.490 4	1.624 8	3.094 3	98.71		
	1.529 9	1.624 8	3.133 8	98.71		
	1.575 4	2.437 2	4.045 6	101.35		
	1.573 2	2.437 2	4.011 3	100.04		
	1.570 0	2.437 2	3.989 1	99.26		

2.2 相对校正因子(RCF)的确定

分别精密吸取 2、4、6、8、10、15、20 μL 混合对照品溶液,按 1.2.1 色谱条件进样测定,记录峰面积,采用多点校正法,根据公式 $f_{i/s} = f_i/f_s = A_s \times C_i / (A_i \times C_s)$ (其中 $f_{i/s}$ 为待测成分与内参物的相对校正因子, A_s 为内参物峰面积, C_s 为内参物浓度, A_i 为待测组分峰面积, C_i 为待测组分浓度),以 Cy-3G 为内参物,计算 De-3G、Pet-3G、Peo-3G、Mal-3G 的相对校正因子,结果见表 4。

表 4 各成分相对校正因子

Tab.4 Relative correction factors of various constituent				
进样体积/ μL	RCF(内参物为 Cy-3G)			
	De-3G	Pet-3G	Peo-3G	Mal-3G
2	1.203	1.136	1.316	2.147
4	1.237	1.135	1.330	2.158
6	1.248	1.136	1.338	2.162
8	1.253	1.137	1.338	2.173
10	1.256	1.136	1.339	2.178
15	1.260	1.137	1.342	2.165
20	1.263	1.137	1.342	2.166
均值	1.246	1.136	1.335	2.164
RSD/%	1.66	0.04	0.69	0.47

2.3 RCF 耐用性考察

2.3.1 不同仪器、色谱柱的影响

分别考察岛津 LC-20AD、Agilent 1220 这两种色谱仪和 Welch Topsil™ C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 以及依利特 BDS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 这 3 种色谱柱对 RCF 的影响,并计算 RSD,结果 RSD 均小于 2%,表明建立的 RCF 在不同色谱仪和色谱

柱重现性良好,结果见表 5。

表 5 不同仪器和色谱柱的相对校正因子

Tab.5 Relative correction factors at different instruments and columns

色谱仪	色谱柱	RCF(内参物为 Cy-3G)			
		De-3G	Pet-3G	Peo-3G	Mal-3G
岛津 LC-20AD	Welch Topsil™ C ₁₈	1.237	1.133	1.340	2.161
	Agilent C ₁₈	1.238	1.134	1.340	2.162
	依利特 BDS C ₁₈	1.236	1.133	1.339	2.162
Agilent 1220	WelchTopsil™ C ₁₈	1.266	1.137	1.344	2.167
	Agilent C ₁₈	1.266	1.108	1.344	2.167
	依利特 BDS C ₁₈	1.241	1.137	1.344	2.167
均值		1.247	1.130	1.342	2.165
RSD/%		1.19	0.99	0.16	0.14

2.3.2 不同流速、柱温、波长、流动相 pH 值的影响

采用岛津 LC-20AD 型色谱仪、Welch Topsil™ C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 分别考察不同流速 (0.7、0.8、0.9、1.0、1.1 mL/min)、柱温 (25、30、35、40、45 ℃)、波长 (518、519、520、521、522 nm)、流动相 (2、2.5、3、3.5、4% 甲酸溶液) pH 值对 RCF 的影响,并计算 RSD,结果 RSD 均小于 1%,表明建立的 RCF 在不同实验条件下的耐用性良好,结果见表 6~9。

表 6 不同流速对相对校正因子的影响

Tab.6 Effects of different flow rates on the relative correction factors

流速/ (mL·min ⁻¹)	RCF(内参物为 Cy-3G)			
	De-3G	Pet-3G	Peo-3G	Mal-3G
0.7	1.236	1.131	1.328	2.150
0.8	1.251	1.136	1.338	2.162
0.9	1.254	1.142	1.344	2.171
1.0	1.246	1.136	1.337	2.161
1.1	1.243	1.135	1.336	2.158
均值	1.246	1.136	1.337	2.160
RSD/%	0.55	0.33	0.43	0.35

表 7 不同柱温对相对校正因子的影响

Tab.7 Effects of different column temperatures on the relative correction factors

柱温/ ℃	RCF(内参物为 Cy-3G)			
	De-3G	Pet-3G	Peo-3G	Mal-3G
25	1.250	1.138	1.339	2.162
30	1.253	1.136	1.339	2.162
35	1.253	1.137	1.338	2.162
40	1.255	1.139	1.339	2.166
45	1.250	1.134	1.336	2.159
均值	1.252	1.137	1.338	2.162
RSD/%	0.17	0.15	0.11	0.12

表 8 不同波长对相对校正因子的影响

Tab.8 Effects of different detection wavelength on the relative correction factors

波长/ nm	RCF(内参物为 Cy-3G)			
	De-3G	Pet-3G	Peo-3G	Mal-3G
518	1.256	1.140	1.346	2.167
519	1.252	1.136	1.337	2.161
520	1.250	1.137	1.340	2.163
521	1.250	1.136	1.338	2.158
522	1.255	1.138	1.344	2.165
均值	1.253	1.137	1.341	2.163
RSD/%	0.22	0.17	0.29	0.15

表 9 不同流动相 pH 值对相对校正因子的影响

Tab.9 Effects of different mobile phase pH on the relative correction factors

流动相 pH 值	RCF(内参物为 Cy-3G)			
	De-3G	Pet-3G	Peo-3G	Mal-3G
2%甲酸(pH 2.07)	1.247	1.135	1.339	2.163
2.5%甲酸(pH 2.01)	1.250	1.133	1.336	2.158
3%甲酸(pH 1.95)	1.251	1.134	1.339	2.193
3.5%甲酸(pH 1.91)	1.248	1.136	1.340	2.164
4%甲酸(pH 1.88)	1.257	1.138	1.341	2.165
均值	1.251	1.135	1.339	2.169
RSD/%	0.31	0.19	0.15	0.65

2.4 待测成分色谱峰定位

相对保留时间法^[13-15]是目前最常用的色谱峰定性方法,本研究在岛津 LC-20AD、Agilent 1220 两种色谱仪上分别用 3 种不同色谱柱考察了各待测色谱峰相对保留时间的重现性。由表 10 可知,保留时间靠前的色谱峰,其实测和预测

保留时间的相对误差(Relative Error, RE)绝对值相对较小,定位较准确,可采用相对保留时间法定位;但保留时间靠后的 Peo-3G、Mal-3G 色谱峰的误差偏大,部分保留时间甚至相差 2 min 以上,难以准确定位。王龙星等^[16]提出在同样分析条件下,不同的色谱仪和色谱柱,各成分的保留时间存在简单的线性关系。本研究采用原理近似的“两点校正法”定位色谱峰,为保证计算结果的准确性,在前后色谱峰各选 1 点,以内参物 Cy-3G 和最后一个色谱峰 Mal-3G 为对象进行两点校正,岛津 Welch Topsil™ C₁₈测定的两者保留时间为横坐标(X),其他色谱仪和色谱柱测定的保留时间为纵坐标(Y)建立校正方程,再将岛津 Welch Topsil™ C₁₈分离各成分的保留时间代入方程,进行相应色谱峰定位。由表 11 可知,采用两点校正法除 De-3G 的差异较大以外,其余成分保留时间的实测和预测 RE 绝对值均小于 2%,可准确定位色谱峰。对于 De-3G,由于其出峰靠前,可单独采用相对保留时间法定位。

2.5 外标法与 QAMS 法结果比较

精密称定 6 批黑果小檗,按 1.2.4 方法制备 6 份供试品溶液,每批平行 3 份,按 1.2.1 色谱条件进样测定,记录峰面积,分别以外标法和 QAMS 法计算各成分含量,结果见表 12,采用 SPSS 25.0 软件,对外标法和 QAMS 法测得的结果进行统计学分析,结果显示 $P>0.05$,表明两种方法测定值之间无显著差异。

表 10 相对保留时间预测保留时间定位色谱峰

Tab.10 Retention time to locate chromatographic peaks predicted retention time

色谱仪	色谱柱	保留时间	De-3G	Cy-3G	Pet-3G	Peo-3G	Mal-3G
岛津 LC-20AD	Welch Topsil™ C ₁₈	标准保留时间(t_R)	27.063	33.965	41.077	47.955	52.449
		标准相对保留时间(R_{tR}, X)	0.797	1.000	1.209	1.412	1.544
		实测 t_R	24.407	31.105	37.886	45.935	50.414
	Agilent C ₁₈	预测 t_R ($Y=31.105X$)	24.784	31.105	37.618	43.917	48.033
		实测 t_R 与预测 t_R 的 RE%	1.545	0	-0.707	-4.393	-4.724
		实测 t_R	28.586	36.190	43.381	50.601	54.352
	依利特 BDS C ₁₈	预测 t_R ($Y=36.190X$)	28.836	36.190	43.768	51.096	55.885
		实测 t_R 与预测 t_R 的 RE%	0.874	0	0.892	0.979	2.820
		实测 t_R	26.323	33.070	40.013	47.773	51.800
	Welch Topsil™ C ₁₈	预测 t_R ($Y=33.070X$)	26.350	33.07	39.995	46.691	51.067
		实测 t_R 与预测 t_R 的 RE%	0.102	0	-0.046	-2.264	-1.415
		实测 t_R	24.013	30.333	36.897	44.550	48.907
Agilent 1220	Agilent C ₁₈	预测 t_R ($Y=30.333X$)	24.169	30.333	36.684	42.827	46.840
		实测 t_R 与预测 t_R 的 RE%	0.650	0	-0.576	-3.868	-4.225
		实测 t_R	26.997	34.213	41.127	48.103	51.777
	依利特 BDS C ₁₈	预测 t_R ($Y=34.213X$)	27.261	34.213	41.377	48.305	52.832
		实测 t_R 与预测 t_R 的 RE%	0.976	0	0.608	0.420	2.038
		实测 t_R					

表 11 两点校正法预测出峰时间定位色谱峰

Tab.11 Peak time to locate chromatographic peaks predicted by two points correction method

色谱仪	色谱柱	保留时间	De-3G	Cy-3G	Pet-3G	Peo-3G	Mal-3G
岛津 LC-20AD	Welch Topsil™ C ₁₈	标准保留时间(<i>t_R</i>)	27.063	33.965	41.077	47.955	52.449
		实测 <i>t_R</i>	24.407	31.105	37.886	45.935	50.414
		预测 <i>t_R</i> (<i>Y</i> =1.045 <i>X</i> -4.376)	23.894	31.104	38.533	45.718	50.412
	Agilent C ₁₈	实测 <i>t_R</i> 与预测 <i>t_R</i> 的 RE%	2.102	-0.004	1.708	-0.473	-0.004
		实测 <i>t_R</i>	28.586	36.190	43.381	50.601	54.352
		预测 <i>t_R</i> (<i>Y</i> =0.983 <i>X</i> +2.817)	29.409	36.191	43.179	49.937	54.353
	依利特 BDS C ₁₈	实测 <i>t_R</i> 与预测 <i>t_R</i> 的 RE%	2.878	0.002	-0.466	-1.312	0.002
		实测 <i>t_R</i>	26.323	33.070	40.013	47.773	51.800
		预测 <i>t_R</i> (<i>Y</i> =1.013 <i>X</i> -1.347)	26.076	33.070	40.276	47.246	51.800
	Agilent 1220	实测 <i>t_R</i> 与预测 <i>t_R</i> 的 RE%	-0.939	-0.001	0.658	-1.104	-0.001
		实测 <i>t_R</i>	24.013	30.333	36.897	44.550	48.907
		预测 <i>t_R</i> (<i>Y</i> =1.005 <i>X</i> -3.797)	23.398	30.334	37.481	44.393	48.909
	Agilent C ₁₈	实测 <i>t_R</i> 与预测 <i>t_R</i> 的 RE%	2.560	-0.003	-1.582	0.353	-0.003
		实测 <i>t_R</i>	26.997	34.213	41.127	48.103	51.777
		预测 <i>t_R</i> (<i>Y</i> =0.950 <i>X</i> +1.939)	27.654	34.212	40.970	47.505	51.776
	依利特 BDS C ₁₈	实测 <i>t_R</i> 与预测 <i>t_R</i> 的 RE%	2.433	-0.003	-0.382	-1.242	-0.003
		实测 <i>t_R</i>	26.997	34.213	41.127	48.103	51.777
		预测 <i>t_R</i> (<i>Y</i> =0.950 <i>X</i> +1.939)	27.654	34.212	40.970	47.505	51.776

表 12 5 种成分含量测定结果

Tab.12 Results of content determination of five constituents

(mg/g, *n*=3)

编号	Cy-3G	De-3G		Pet-3G		Peo-3G		Mal-3G	
	外标法	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS
S1	2.723	2.656	2.637	1.828	1.826	2.026	2.031	6.243	6.233
S2	1.047	1.782	1.736	1.070	1.047	0.674	0.693	2.029	2.046
S3	1.982	1.822	1.821	1.374	1.370	1.642	1.645	2.799	2.847
S4	2.343	1.816	1.824	1.297	1.302	1.379	1.398	4.226	4.248
S5	2.020	2.010	2.001	1.329	1.328	1.588	1.593	4.512	4.507
S6	2.368	2.282	2.270	1.464	1.465	1.587	1.599	5.049	5.050

2.6 讨论

2.6.1 内参物的选择

Cy-3G 作为主要活性成分之一,具有价格便宜、在样品中含量高、性质稳定等特点,适宜在长期大量分析实验中使用,因此本研究以 Cy-3G 为内参物,建立一测多评的分析方法,弥补了对照品不足或价格昂贵等缺点,也体现了 QAMS 法低成本的优势。

2.6.2 供试品制备方法

本研究的前处理方法基于课题组前期研究,以 80% 甲醇(含体积分数 0.5% 的 HCl)为提取溶剂,室温超声 30 min,料液比 1:30(g/mL),提取 1 次作为前处理方法^[17,18]。该方法能够兼顾上述 5 种成分,峰形良好,杂质干扰峰较少。

2.6.3 色谱条件的选择

以黑果小檗果实中 5 种花色苷的分离效果为主要考察指标,兼顾分析检测用时、色谱图基线平稳等因素,结果发现甲醇-2.5% 甲酸水溶液梯度

洗脱分离效果较好,其中 Peo-3G 和 Mal-3G 达不到有效分离,进而对 25、30、35、40、45 ℃ 柱温进行了考察,根据其对分离效果的影响及对色谱柱寿命的影响,选择柱温为 35 ℃,能够实现各成分有效分离。最终确定以 1.2.1 中梯度洗脱程序对黑果小檗果实 5 种花色苷含量同时进行检测。结果在此条件下,各成分分离效果较好,色谱图基线平稳,杂质对目标成分的测定干扰较小。

2.6.4 RCF 耐用性考察

本研究考察了不同色谱仪、色谱柱、流速、柱温、波长以及流动相 pH 对 RCF 的影响,结果表明实验条件的改变对 RCF 的影响较小,体现 QAMS 法在黑果小檗含量测定中有良好的技术应用性和方法重现性。

2.6.5 色谱峰定位

QAMS 法能够实现多指标同步定量的关键是对各成分色谱峰的准确定位。相对保留时间法虽然是 QAMS 法中最常用的色谱峰定性方法,但

由于色谱柱和色谱仪的差异,其预测结果与实际结果存在较大差异,只适合保留时间靠前的色谱峰,在实际应用中准确性不强。根据相关文献在色谱峰定位方法选择上研究,发现两点校正法优于相对保留时间定位法^[19-21]。本研究采用两点校正法,通过绘制校正曲线,推算理论出峰时间,从而实现对色谱峰准确快速的定位。结果发现,除第 1 个色谱峰外,其余色谱峰均可准确定位。因此,本研究以相对保留时间法定位 De-3G,以两点校正法定位其他色谱峰,所有色谱峰预测和实测保留时间的 RE 绝对值均小于 2%,使所有色谱峰均可实现准确定位。

3 结论

本研究采用 HPLC-QAMS 法同时测定黑果小檗果实中 5 种花色苷含量,通过方法学考察、相对校正因子耐用性试验、色谱峰定位以及统计学分析外标法和 QAMS 法所测得含量无差异,证明 HPLC-QAMS 法在含量测定中的可行性和适用性,有效的解决了部分对照品不稳定以及不易获得等诸多不利的因素,增加了检测的便利性,为黑果小檗果实中花色苷含量测定方法提供了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 新疆部队后勤部卫生部.新疆中草药手册[M].乌鲁木齐:新疆人民出版社,1970.
- [2] 谭为,张兰兰,庞市宾,等.黑果小檗果实的色素提取与纯化工艺[J].中国民族民间医药,2019,28(7):42-46.
- [3] SUN L L,GAO W,ZHANG M M,et al.Composition and antioxidant activity of the anthocyanins of the fruit of berberis heteropoda schrenk[J].Molecules,2014,19(11):19 078-19 096.
- [4] 林好,陈圻宇,黄庆谱,等.紫薯提取物中花色苷的含量测定及抗氧化活性研究[J].中国食品添加剂,2021,32(4):16-22.
- [5] PANCHAL S K,JOHN O D,MATHAI M L,et al.Anthocyanins in chronic diseases:The power of purple[J].Nutrients,2022,14(10):2 161.
- [6] JAYARATHNE S,STULL A J,PARK O,et al.Protective effects of anthocyanins in obesity-associated inflammation and changes in gut microbiome[J].Mol.Nutr.Food.Res.,2019,63(20):e1 900 149.
- [7] 李婧,杨芳,栾广祥,等.黑果枸杞的花青素类成分及其药理作用的研究进展[J].华西药学杂志,2022,37(3):331-336.
- [8] KALT W,CASSIDY A,HOWARD L R,et al.Recent research on the health benefits of blueberries and their anthocyanins[J].Adv.Nutr.,2020,11(2):224-236.
- [9] 迪娜·吐尔洪,康莹莹,阳莹,等.黑果小檗总花色苷对 β -淀粉样蛋白致阿尔茨海默病大鼠的改善作用[J].新疆医科大学学报,2020,43(3):280-286.
- [10] 杨静.黑果腺肋花楸花色苷对肝纤维化的防治作用机制研究[D].沈阳:辽宁大学,2020.
- [11] 刘芳芳,向成钢,张宏,等.高效液相色谱法与 pH 示差法测定紫萼豌豆花青素含量的比较[J].食品科技,2022,47(1):298-303.
- [12] 王智民,钱忠直,张启伟,等.一测多评法建立的技术指南[J].中国中药杂志,2011,36(6):657-658.
- [13] 刘颖新,冯传平,刘利利,等.一测多评法同时测定不同产地墨旱莲中 9 种成分及其质量评价研究[J].中国现代应用药学,2022,39(18):2 339-2 346.
- [14] 姬翔宇,张子雯,陈姿伊,等.一测多评法同时测定雷公藤药材及制剂雷公藤多苷片中 7 个质控成分[J].中草药,2022,53(17):5 338-5 347.
- [15] 孙云波,陈育鹏,张创峰,等.一测多评法同时测定连花清瘟胶囊中 7 个成分[J].药物分析杂志,2022,42(7):1 128-1 136.
- [16] 王龙星,肖红斌,梁鑫森.一种提高色谱指纹谱保留时间重现性的新方法[J].分析化学,2003,31(10):1 232-1 236.
- [17] SUN J,LI Q,LI J G,et al.Nutritional composition and antioxidant properties of the fruit of berberis heteropoda schrenk[J].PLoS One,2022,17(10):e0 262 622.
- [18] 李雪俐.新疆特色含花色苷类植物抗氧化活性的研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2018.
- [19] 张红伟,赵一擎,王晓燕,等.双标线性校正法辅助色谱峰定位对牛黄上清制剂的多指标成分定性分析[J].中国药学杂志,2022,57(5):385-391.
- [20] 何兵,田吉,杨世艳.一测多评法同时测定不同采收期白苞蒿中 8 种成分[J].中成药,2022,44(3):842-848.
- [21] 耿若愚,居博伟,杨建华,等.一测多评法测定新疆假龙胆中 3 种环烯醚萜[J].中成药,2022,44(3):829-835.

标准物质与标准品

纳摩尔级一氧化氮标准气体的制备技术研究

高冰^{1,2}, 王帅斌^{1,2}, 杨静^{1,2}, 封跃鹏^{1,2}, 倪才倩^{*1,2}

(1. 生态环境部环境发展中心环境标准样品研究所, 北京 100029;

2. 国家环境保护污染物计量和标准样品研究重点实验室, 北京 100029)

摘要:采用称量法经四级稀释制备纳摩尔级(50 nmol/mol)氮气中一氧化氮标准气体,采用化学发光法分析氮气中一氧化氮标准气体,考察了制备重复性、气瓶内壁吸附解吸作用、瓶内均匀性和时间稳定性,开展了比对分析研究。结果表明,抛光气瓶可满足纳摩尔级一氧化氮标准气体的制备需求,一氧化氮在抛光气瓶内壁的吸附解吸作用可以忽略不计。浓度水平为 50 nmol/mol 的氮气中一氧化氮标准气体具有良好的制备重复性、瓶内均匀性和时间稳定性,且与具有国家标准样品编号的稀释为同一浓度水平的一氧化氮标准气体具有较好的量值一致性。该标准气体可为环境空气氮氧化物监测提供可靠的技术支持。

关键词:纳摩尔级;一氧化氮;标准气体;均匀性;稳定性;比对分析

中图分类号:X830.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2023)02-0155-06

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0662

Preparation of Nanomolar Nitric Oxide Gas Standard GAO Bing^{1,2}, WANG Shuai-bin^{1,2}, YANG Jing^{1,2}, FENG Yue-peng^{1,2}, NI Cai-qian^{*1,2} (1. Institute for Environmental Reference Materials Ministry of Environmental Protection, Beijing 100029, China; 2. State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Pollutant Metrology and Reference Materials, Beijing 100029, China)

Abstract: The nanomolar nitric oxide gas standard material with concentration of 50 nmol/mol in nitrogen was prepared using a four-step weighing method. The gas standard material was analyzed by using chemiluminescence method, and the preparation repeatability, adsorption and desorption effect of the inner wall, in-bottle uniformity and time stability of nitric oxide gas standard material were investigated. In addition, comparison analysis was also conducted. The related results demonstrated that the polished cylinders can meet the preparation needs of standard nanomolar nitric oxide gas. The adsorption and desorption effect of nitric oxide on the inner walls of polished cylinders can be ignored. The nitric oxide gas standard material (50 nmol/mol) in nitrogen had good preparation repeatability, in-bottle uniformity and time stability. Moreover, it had good value consistency with the standard nitric oxide gas along with the national standard sample number diluted to the same concentration level. The gas standard can supply the standards support for the nitrogen oxides determination in ambient air.

Key words: nanomolar; nitric oxide; gas standard; homogeneity; stability; comparison analysis

“十三五”期间,我国大气污染防治成效显著,“大气十条”和蓝天保卫战目标全面实现。但是,全国仍有 38% 的地级及以上城市 $PM_{2.5}$ 浓度超标,夏季臭氧污染问题凸显,已成为影响全国夏季环境空气质量的重要因素^[1]。氮氧化物作为《环境空气质量标准》(GB 3095—2012)中规定的必测污染物之一^[2],也是臭氧生成的重要前体物^[3]。为此,《中华人民共和国国民经济和社会发展第十四个五年规划和 2035 年远景目标纲要》明确提出要加强细颗粒物和臭氧污染协同控制,大力减排挥发性有机物和氮氧化物。

目前,我国城市环境空气质量监测中氮氧化物的日平均浓度水平一般为几十 nmol/mol,背景质量监测中氮氧化物的日平均浓度相对更

收稿日期:2022-08-30;网络首发日期:2022-09-23

基金项目:中日友好环境保护中心科技基金发展项目“纳摩尔级一氧化氮标准气体的制备技术研究”(202012)。

作者简介:高冰(1989-),女,山东聊城人,博士,工程师,主要研究方向为标准气体的研制和分析。

通讯作者:倪才倩, E-mail: ni.caiqian@ierm.com.cn。

引用本文:高冰,王帅斌,杨静,等.纳摩尔级一氧化氮标准气体的制备技术研究[J].化学试剂,2023,45(2):155-160。

低^[4,5]。随着生态环境部一系列臭氧污染防控措施和氮氧化物超低排放措施政策的发布实施,环境空气中氮氧化物呈现更低浓度的态势将会愈发明显。超低排放条件下如何准确监测氮氧化物的问题亟待解决。虽然现有常规浓度的一氧化氮标准气体经动态校准仪稀释后最低浓度可达几十 nmol/mol,但增加了仪器稀释环节,仪器稀释过程所增加的不确定度无疑会影响氮氧化物浓度的准确度。纳摩尔级一氧化氮标准气体将无需经稀释过程即可应用于环境空气氮氧化物监测质量控制工作,能更好地满足大气背景监测仪器的校准需求^[6]。

经调研国内外相关标准气体现状发现,美国国家标准与技术研究院(NIST)研制的低浓度一氧化氮标准气体为 500 nmol/mol,相对不确定度为 1.6%。英国国家物理实验室(NPL)研制出 100 nmol/mol 浓度水平的一氧化氮标准气体来满足空气质量监测仪的校准需求,相对不确定度为 4.4%。中国计量科学研究院已研制完成浓度为 100 nmol/mol 的一氧化氮气体一级标准物质(GBW08200),相对不确定度为 10%。总体而言,目前国内外研发的纳摩尔级一氧化氮标准气体种类极少。因此,本文根据称量法制备标准气体的原理^[7],首次研制浓度水平为 50 nmol/mol 的一氧化氮标准气体,开展制备重复性、气瓶筛选、瓶内均匀性、时间稳定性及比对分析研究,以减少监测仪器校准与质量控制时标准气体的稀释层级,充分保证监测数据准确可靠。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

XP26003L 型质量比较器(瑞士 Mettler-Toledo 公司);原料气体填充设备、氮气填充设备、高压气瓶加热-抽真空设备(日本 Stec 公司);铝合金普通气瓶、铝合金抛光气瓶(抚顺洁能科技有限公司);42i-TLE 型氮氧化物分析仪、146i 型动态稀释仪(美国 Thermo 公司);9NP100 HP 型高性能气体纯化器(先普半导体技术(上海)有限公司)。

一氧化氮(日本酸素株式会社);高纯氮(北京氮普北分气体工业有限公司)。

1.2 样品制备流程

制备纳摩尔级一氧化氮标准气体所用的高纯

氮气经高性能气体纯化器进行了提纯,纯化后气体纯度可达到 99.999 999 9%,氧气和水含量小于 1 nmol/mol,尽可能减少微量水和氧气对纳摩尔级一氧化氮标准气体定值和稳定性的影响。

本研究制备纳摩尔级一氧化氮标准气体时,选用纯度高的稀释气,稀释气经高性能气体纯化器进行提纯,纯化器内置 0.003 μm 的颗粒过滤器,气体流量为 100 L/min,最大气体压力为 18 MPa。稀释气经气体纯化器时进气口与出气口压力不超过 1 MPa,水分和氧气含量小于 1 nmol/mol,尽可能降低了稀释气中微量水分和氧气对样品的影响。制备方法选用称量法^[7],以一氧化氮高纯气体为原料气,高纯氮气为稀释气,通过四级稀释,最终制备得到浓度水平为 50 nmol/mol 的氮气中一氧化氮标准气体,逐级制备流程如图 1 所示。

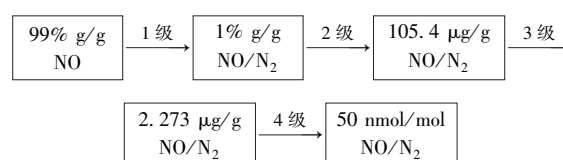


图 1 一氧化氮标准气体(50 nmol/mol)逐级制备流程图

Fig.1 Gradual preparation flow chart of nitric oxide gas standard (50 nmol/mol)

1.3 样品分析方法

采用化学发光法^[8]对氮气中一氧化氮标准气体进行分析,分析方法的重复性以样品 6 次重复分析结果的相对标准偏差来表示,分析方法重复性如表 1 所示。

表 1 分析方法重复性

Tab.1 Reproducibility of analytical method

制备值/ (nmol· mol ⁻¹)	分析结果/(nmol·mol ⁻¹)						均值/ (nmol· mol ⁻¹)	RSD/ %
	1	2	3	4	5	6		
48.15	48.2	48.1	48.0	48.2	48.1	48.0	48.1	0.19

由表 1 可知,浓度水平为 48.15 nmol/mol 一氧化氮标准气体 6 次重复分析的相对标准偏差为 0.19%,分析方法重复性良好,满足测量需求。

1.4 样品均匀性评价方法

为保证标准气体使用时在不同压力下的量值准确可靠,本研究重点考察样品量值随瓶内气体压力的变化量,并对标准气体的瓶内均匀性进行评价^[9]。

瓶内均匀性检验试验方法^[10]为:将充有 10 MPa 以上的氮气中一氧化氮(50 nmol/mol)气体样品,分别在 10、8、6、4、2、1 MPa 压力下通过减压阀放气,在每个压力值时重复测量 3 次。基于样品在每个压力值下的 3 次测定结果,采用单因素方差分析方法计算不同压力值测量结果的均方($MS_{\text{间}}$)和同一压力值重复测量结果的均方($MS_{\text{内}}$),并由此计算样品因均匀性变化引入的不确定度(u_{bb})。

1.5 样品稳定性评价方法

本研究重点考察样品量值随时间推移的变化量,并对标准气体的稳定性进行评价,以确保标准气体在实际工作中能够得以有效应用^[11]。

稳定性评价方法^[10]为:分别在一定的时间间隔,以新制备的氮气中一氧化氮(50 nmol/mol)作为基准气体,采用单点校准对 42i-TLE 型氮氧化物分析仪进行校准,对进行稳定性考察的氮气中一氧化氮(50 nmol/mol)标准气体进行分析。假设标准气体的量值与储存时间之间符合线性关系^[12]:

$$Y = b_0 + b_1 X \tag{1}$$

式中: Y 表示每次稳定性监测的检验结果, X 表示稳定性监测的时间(月), b_1 表示线性斜率, b_0 表示线性截距。

通过比较斜率的绝对值 $|b_1|$ 和 $t_{0.95,n-2} \times s(b_1)$ 的大小,考察斜率 b_1 的显著性,来判断样品的量值是否随时间的推移而发生变化。其中, $s(b_1)$ 为斜率 b_1 的不确定度。若 $|b_1| < t_{0.95,n-2} \times s(b_1)$,则表示标准气体的量值随时间的推移无显著变化,样品具有良好的稳定性;若 $|b_1| > t_{0.95,n-2} \times s(b_1)$,则表示标准气体的量值随时间的推移发生了明显的变化,样品稳定性较差。

2 结果与讨论

2.1 气瓶适用性

本研究采用称量法制备氮气中一氧化氮(50 nmol/mol)标准气体,气瓶内壁的光洁度、内壁处理技术的适用性等将会对标准气体的量值准确性产生直接影响^[13,14]。因此,制备样品时需考虑组分与气瓶内壁是否会发生反应,是否会被吸附的问题。以往研制几十至几百 $\mu\text{mol/mol}$ 氮气中一氧化氮标准气体时均使用铝合金普通气瓶,制备的样品均具有良好的均匀性和稳定性,并已获得国家标准样品编号。因此,本研究使用铝合

金普通气瓶制备了 6 瓶浓度水平为 50 nmol/mol 的氮气中一氧化氮标准气体,优先考察了铝合金普通气瓶充装 50 nmol/mol 一氧化氮标准气体的适用性。所用气瓶在使用前均进行了多次高温清洗、抽真空与预饱和处理。制备的 6 瓶样品放置 20 d 后的测试结果如表 2 所示。

表 2 采用普通气瓶制备的样品放置 20 d 后的测试结果

Tab.2 Test results after 20 d of prepared samples by ordinary cylinders

标准样品	配制值/ (nmol·mol ⁻¹)	测定值/ (nmol·mol ⁻¹)	偏差/ %
1	46.63	44.5	-4.57
2	51.19	46.8	-8.58
3	52.89	48.4	-8.49
4	54.64	52.4	-4.10
5	53.42	50.3	-5.84
6	56.17	52.3	-6.89

由表 2 可知,采用铝合金普通气瓶制备的 6 瓶一氧化氮(50 nmol/mol)样品放置 20 d 后,量值均发生了不同程度的明显下降(-4%~-9%),表明铝合金普通气瓶对 50 nmol/mol 一氧化氮气体样品的吸附作用较强,不适用于制备纳摩尔级(50 nmol/mol)一氧化氮标准气体。针对此问题,经文献调研气瓶内壁处理技术的特点,发现对容器表面进行抛光处理,降低内表面粗糙度,可减少内表面对气体的吸附^[15,16]。因此,本研究又选用铝合金抛光气瓶充装一氧化氮(50 nmol/mol)气体样品,考察其适用性。对采用抛光气瓶制备的 6 瓶样品同样放置 20 d 后进行检测,测试结果如表 3 所示。

表 3 采用抛光气瓶制备的样品放置 20 d 后的测试结果

Tab.3 Test results after 20 d of prepared samples by polished cylinders

标准样品	配制值/ (nmol·mol ⁻¹)	测定值/ (nmol·mol ⁻¹)	偏差/ %
1	52.09	51.8	-0.56
2	50.81	50.5	-0.61
3	51.60	51.5	-0.19
4	50.63	50.6	-0.06
5	48.15	48.1	-0.10
6	54.65	54.4	-0.46

由表 3 可见,采用铝合金抛光气瓶制备的 6 瓶一氧化氮(50 nmol/mol)样品放置 20 d 后,量

值偏差均在 1% 以内,没有发生明显的变化,表明铝合金抛光气瓶可用于充装纳摩尔级 (50 nmol/mol) 一氧化氮标准气体。为进一步考察抛光气瓶的适用性,对抛光气瓶开展了气瓶内壁吸附作用评价。采用将充有 10 MPa 的氮气中一氧化氮标准气体(母瓶)转入经过抛光处理的气瓶(子瓶)中,至母瓶与子瓶压力相等,放置 48 h 后分别测定母瓶的响应值 (C_0 , nmol/mol) 及其对应子瓶的响应值 (C_1 , nmol/mol), 并进行比较,试验结果如表 4 所示。

表 4 纳摩尔级一氧化氮标准气体的气瓶内壁吸附作用结果

Tab.4 Result of cylinder inner wall adsorption of nanomolar nitric oxide gas standard

母瓶		子瓶		$(C_1 - C_0)/C_0 \times 100\%$
瓶号	测量值 (C_0)/ (nmol· mol ⁻¹)	瓶号	测量值 (C_1)/ (nmol· mol ⁻¹)	
211605017	50.6	90410143	50.5	-0.20%
203016042	49.1	90410146	49.0	-0.20%
202615024	46.3	90314145	46.1	-0.43%
203016072	45.5	90314014	45.5	0.00%

由表 4 可见,子瓶与母瓶间的量值偏差小于 0.5%,两者之间不存在显著性差异,表明一氧化氮在抛光气瓶内壁的吸附作用可以忽略不计,抛光气瓶适用于制备浓度水平为 50 nmol/mol 的一氧化氮标准气体。这主要是因为气瓶内壁经抛光处理后,表面变得光滑,粗糙度大大降低,从而减少了表面对气体的吸附^[15]。

2.2 样品的制备重现性

使用铝合金抛光气瓶制备 6 瓶浓度水平为 50 nmol/mol、压力为 10 MPa 的氮气中一氧化氮标准气体,记录其配制浓度 ($C_{\text{配}}$, nmol/mol); 放置 48 h 后测定其在 42i-TLE 型氮氧化物分析仪上的测定值 ($C_{\text{测}}$, nmol/mol)。样品制备重现性以单位

表 5 样品制备重现性结果

Tab.5 Results of sample preparation reproducibility

标准样品	配制值($C_{\text{配}}$)/ (nmol·mol ⁻¹)	测定值($C_{\text{测}}$)/ (nmol·mol ⁻¹)	$R = C_{\text{测}}/C_{\text{配}}$	RSD/ %
1	51.03	50.8	0.995	0.40
2	52.68	52.3	0.993	
3	50.39	50.3	0.998	
4	50.86	50.3	0.989	
5	48.14	47.7	0.991	
6	50.96	50.9	0.999	

浓度仪器测定值 (R) 的相对标准偏差来表示,结果如表 5 所示。

由表 5 可知,本研究制备的 6 瓶浓度水平为 50 nmol/mol 一氧化氮标准气体 R 的相对标准偏差为 0.40%,这表明本研究采用的制备方法重现性良好,能满足纳摩尔级一氧化氮标准气体的制备需求。

2.3 瓶内均匀性评价

本研究制备了 4 瓶浓度水平为 50 nmol/mol、压力为 10 MPa 的氮气中一氧化氮标准气体,用于考察样品的瓶内均匀性。图 2 为制备的一氧化氮标准气体在 10、8、6、4、2、1 MPa 压力下的量值变化图,表 6 为一氧化氮标准气体由不均匀引入的不确定度。

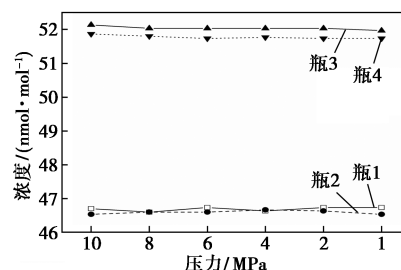


图 2 纳摩尔级一氧化氮标准气体在不同压力值下的量值变化

Fig.2 Figure of concentration of nanomolar nitric oxide gas standard under different pressure

表 6 纳摩尔级一氧化氮标准气体的均匀性结果

Tab.6 Result of homogeneity test of nanomolar nitric oxide gas standard

标准样品	$MS_{\text{间}}$	$MS_{\text{内}}$	$u_{\text{bb}}/\%$
1	1.02×10^{-2}	2.22×10^{-3}	0.11
2	8.56×10^{-3}	3.89×10^{-3}	0.08
3	8.56×10^{-3}	3.33×10^{-3}	0.08
4	8.56×10^{-3}	2.78×10^{-3}	0.08

由图 2 和表 6 可知,本研究配制的 4 瓶样品在不同压力点下的量值均没有发生明显变化,且 4 瓶样品由瓶内不均匀性引起的不确定度均在 0.10% 左右波动,小于分析方法的重复性 (0.19%)。以上结果表明,本研究制备的纳摩尔级一氧化氮标准气体具有良好的瓶内均匀性,且最低使用压力可达 1 MPa。

2.4 时间稳定性评价

本研究制备了 4 瓶浓度水平为 50 nmol/mol、压力为 10 MPa 的氮气中一氧化氮标准气体,考察了 4 瓶样品在 3 个月内的量值变化情况。4 瓶

纳摩尔级一氧化氮标准气体在 3 个月内的量值变化趋势如图 3 所示,时间稳定性评价结果如表 7 所示。

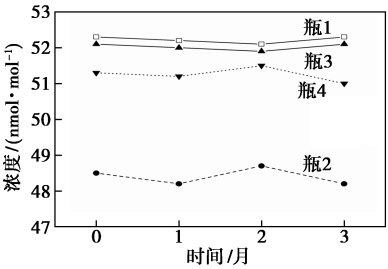


图 3 纳摩尔级一氧化氮标准气体在 3 个月内的量值变化情况

Fig.3 Concentration trend graph of nanomolar nitric oxide gas standard in 3 months

表 7 纳摩尔级一氧化氮标准气体的时间稳定性评价结果

Tab.7 Results of time stability of nanomolar nitric oxide gas standard

序号	1	2	3	4
$ b_1 $	1.00×10^{-2}	4.00×10^{-2}	1.00×10^{-2}	6.00×10^{-2}
$s(b_1)$	5.20×10^{-2}	1.31×10^{-1}	5.20×10^{-2}	1.06×10^{-1}
$t_{(0.95,2)} \times s(b_1)$	2.24×10^{-1}	5.64×10^{-1}	2.24×10^{-1}	4.55×10^{-1}
判定结果	无显著差异	无显著差异	无显著差异	无显著差异

由图 3 和表 7 可知,本研究制备的 4 瓶样品在 3 个月内量值有升高也有降低的趋势,但变化幅度较小($-0.49\% \sim 0.66\%$)。此外,4 瓶样品的 $|b_1|$ 均小于 $t_{0.95,n-2} \times s(b_1)$,表明在 95% 置信水平内标准气体的量值随时间的推移没有发生明显变化。以上结果表明,本研究制备的浓度水平为 50 nmol/mol 的一氧化氮标准气体在 3 个月的试验期内具有良好的稳定性。后续将继续开展稳定性研究工作。

2.5 比对分析

由于目前国内外尚无同等浓度水平的标准气体,为验证本研究制备的氮气中一氧化氮(50 nmol/mol)标准气体量值准确性,采用具有国家标准样品编号的氮气中一氧化氮标准气体(标准样品编号: GSB 07-1406—2019,标准值为 28.90 $\mu\text{mol/mol}$,相对扩展不确定度为 3%),经动态稀释仪稀释。动态稀释仪(146i 型)配有除氧装置,经稀释后浓度为 50 nmol/mol,对 42i-TLE 型痕量一氧化氮分析仪进行校准,并对研究制备的两瓶氮气中一氧化氮(50 nmol/mol)标准气体进行分析测试,结果如表 8 所示。

表 8 氮气中一氧化氮(50 nmol/mol)标准气体的比对结果

Tab.8 Comparison results of nitric oxide gas standard (50 nmol/mol)

序号	标准值/(nmol·mol ⁻¹)	分析值/(nmol·mol ⁻¹)	偏差/%
1	52.68	51.7	1.9
2	55.74	54.2	2.8

由表 8 可知,本研究制备的两瓶氮气中一氧化氮(50 nmol/mol)标准气体的分析值与标准值的偏差均在 3% 以内,表明本研究研制的氮气中一氧化氮(50 nmol/mol)标准气体与具有国家标准样品编号的稀释为同一浓度水平的一氧化氮标准气体具有较好的量值一致性。

3 结论

采用称量法经四级稀释制备了浓度水平为 50 nmol/mol 的氮气中一氧化氮标准气体。实验结果表明,该制备方法具有良好的重现性。经气瓶筛选发现铝合金普通气瓶不适用于制备纳摩尔级氮气中一氧化氮标准气体,抛光气瓶内壁对一氧化氮的吸附解吸作用可忽略不计,可选用铝合金抛光气瓶。本研究制备的氮气中一氧化氮标准气体(50 nmol/mol)在 1 MPa 以上具有良好的均匀性,在 3 个月的试验期内具有良好的稳定性,且与具有国家标准样品编号的稀释为同一浓度水平的一氧化氮标准气体具有较好的量值一致性。本标准气体可应用于大气背景监测站、空气质量监测站、科研机构等检测分析过程中的质量控制与保证、仪器校准及其他相关领域。

参考文献:

[1]何立峰,胡祖才.中华人民共和国国民经济和社会发展规划第十四个五年规划和 2035 年远景目标纲要[M].北京:人民出版社,2021.

[2]中华人民共和国环境保护部,国家质量监督检验检疫总局.环境空气质量标准:GB 3095—2012[S].北京:中国环境科学出版社,2012.

[3]白静.大气 PM_{2.5}与臭氧的作用机制与协同控制策略研究[J].能源与节能,2021,10:119-120.

[4]王瑞斌.国家环境空气背景监测网络设计与监测技术应用[M].北京:中国环境出版社,2013.

[5]苏彬彬,刘心东,陶俊.华东森林及高山背景区域 SO₂、NO_x、CO 本底特征[J].中国环境监测,2013,29(6):15-21.

- [6]王帅斌,钱萌,李宁,等.氮气中SO₂、NO、CO混合气体标准样品的制备技术研究[J].化学试剂,2016,38(3):255-258.
- [7]中华人民共和国国家市场监督管理总局.气体分析 校准用混合气体的制备 第1部分:称量法制备一级混合气体:GB/T 5274.1—2018[S].北京:中国标准出版社,2018.
- [8]中华人民共和国生态环境部.环境空气 氮氧化物的自动测定 化学发光法:HJ 1043—2019[S].北京:中国环境出版社,2019.
- [9]田文,李宁,樊强.标准气体均匀性和稳定性实验方法的研究[J].中国标准化,2008,8:15-17.
- [10]中华人民共和国生态环境部.环境标准样品研复制技术规范:HJ 173—2017[S].北京:中国环境出版社,2017.
- [11]冯兴兵,胥关涛,刘雅珍,等.气体标准物质研制中标气样品的均匀性和稳定性判定方法研讨[J].低温与特气,2015,33(6):33-37.
- [12]李宁,王倩,王帅斌,等.温室气体监测用4种氟氯烃混合标准气体的研制[J].化学试剂,2016,38(9):887-889;920.
- [13]杨静,杜健,王倩,等.环境监测用正丁烷标准气体的研制[J].化学试剂,2019,41(7):688-692.
- [14]LEUENBERGER M C, SCHIBIG M F, NYFELER P. Gas adsorption and desorption effects on cylinders and their importance for long-term gas records[J]. *Atmos. Meas. Tech.*, 2015, 8(12): 5 289-5 299.
- [15]金花子,吴杰,熊天英.材料表面特性与气体包装容器内壁处理技术[C].苏州:2009 全国特种气体第十三次年会,2009.
- [16]赵鑫蕊,毕哲,贡鸣,等.铝合金气瓶表面处理方法概述[J].化学试剂,2020,42(5):514-521.

合成与工艺技术

高纯二水合连四硫酸钠的制备及其表征

刘红梅^{*1,2}, 谷芳芳^{1,2}, 王保金^{1,2}, 李炳华^{1,2}, 杜荣光^{1,2}, 陈勉彬^{1,2}

(1.广州化学试剂厂, 广东 广州 510288; 2.广东广试试剂科技有限公司, 广东 肇庆 526238)

摘要:在低温条件下, 硫代硫酸钠与固体碘反应, 经重结晶制得高纯二水合连四硫酸钠, 并用 XRD 和 IR 对其结构进行了表征。结果表明, 最佳制备条件为: 氧化剂碘要比计量比稍过量一点, 反应温度在 10 ℃ 以下, 至少需要重结晶 1 次; XRD 图表明, 该工艺制备的产品 XRD 图与标准图谱基本一致; IR 图谱表明, 连四硫酸钠中所含杂质硫代硫酸盐对红外图谱有较大的影响, 硫代硫酸盐含量越低, 在 1 238~1 090 cm⁻¹ 区间内的吸收峰越少, 曲线越平滑。

关键词:连四硫酸钠; 高纯度; 制备; 表征

中图分类号:TQ125.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2023)02-0161-05

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0472

Preparation and Characterization of High-purity Sodium Tetrathionate Dihydrate LIU Hong-mei^{*1,2}, GU Fang-fang^{1,2}, WANG Bao-jin^{1,2}, LI Bing-hua^{1,2}, DU Rong-guang^{1,2}, CHEN Mian-bin^{1,2} (1. Guangzhou Chemical Reagent Factory, Guangzhou 510288, China; 2. Guangdong Guangshi Reagent Technology Co., Ltd, Zhaoqing 526238, China)

Abstract: The high purity of sodium tetrathionate dihydrate was prepared by the reaction between iodine and sodium thiosulphate at low temperature. It was recrystallized from a cool aqueous solution by the addition of ethanol. Its structure was characterized by XRD and IR. Based on the experiment results, the best preparation method is that the addition of oxidant iodine was slightly excessive than the stoichiometric ratio, the reaction temperature was below 10 ℃, and the recrystallization was required at least once. The XRD pattern showed that the XRD diagram of the products prepared by this process was basically consistent with the standard diagram of sodium tetrathionate dehydrate. The IR spectra showed that the impurity thiosulphate in the product had a great impact on the infrared spectra. The content of thiosulfate becomes lower along with the less absorption peak in the wave range of 1 238~1 090 cm⁻¹, as well as the smoother the curve.

Key words: sodium tetrathionate dihydrate; high purity; preparation; characterization

连四硫酸钠 (Na₂S₄O₆·2H₂O) 的摩尔质量为 306.27 g/mol, 白色或近白色结晶粉末或晶体, 密度为 2.1 g/cm³, 易溶于水, 不溶于乙醇。1964 年, Foss 等^[1] 利用 X-射线衍射得到连四硫酸盐的分子结构, 确定连四硫酸盐晶体为斜方晶系结构, 空间群为 C2。1986 年, Christidis 等^[2] 利用三维 X-射线强度数据对连四硫酸钠的结构做了进一步研究, 从上述对连四硫酸盐分子结构的研究可以看出, 连四硫酸盐硫链中的 3 个 S—S 键可以看作

是沿着立方体的 3 个边排布的, 两个二面角都是接近于 90°。因此, 连四硫酸盐结构是一个无支链的链状结构, 且硫链是一个非平面的立体结构, 如图 1 所示^[1-3]。

连四硫酸盐 S₄O₆²⁻ 是 S₂O₃²⁻ 氧化的最直接和最主要的产物, 大量存在于定影剂废弃液、贵金属矿的 S₂O₃²⁻ 浸滤溶液和不锈钢应力腐蚀液中, 它的存在直接导致体系中物质组成的复杂化。另外研究表明, S₄O₆²⁻ 可作为氧化剂, 应用于蛋白质中

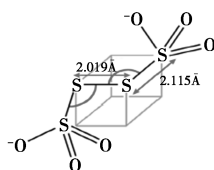


图 1 连四硫酸根离子结构示意图

Fig.1 Structure diagram of the tetrathionate anion

收稿日期: 2022-06-20; 网络首发日期: 2022-11-09

作者简介: 刘红梅 (1977-), 女, 广西桂林人, 硕士, 工程师, 主要从事化学试剂相关产品的研发, E-mail: 65007533@qq.com。

通讯作者: 刘红梅, 谷芳芳, 王保金, 等. 高纯二水合连四硫酸钠的制备及其表征[J]. 化学试剂, 2023, 45(2): 161-165。

硫醇类化合物的封端,从而起到保护作用^[4]。连四硫酸钠对蛋清溶菌酶淀粉变性有抑制作用^[5];还可以保护肽酶的活性^[6],同时还是氰化物和甲硫醇中毒的一种有效解毒剂^[7,8]等。因此,连四硫酸钠作为重组蛋白的变性剂,广泛应用于生物医药的工艺过程中。

连四硫酸钠的合成路线有报道,文献[3]、[9]提到用 SCL_2 与亚硫酸反应制得连四硫酸盐,文献[10]提到用碘、过氧化氢、重铬酸钠或三氧化二砷为氧化剂,氧化硫代硫酸钠制得连四硫酸钠等,但其中合成连四硫酸盐最为简便的方法是利用硫代硫酸钠和碘反应,实际上该文献也是利用碘和硫代硫酸钠反应制备连四硫酸钠,只不过是活性炭负载碘进行反应,操作过程复杂,工业化不好量产。文献[1]、[11]也是利用碘和硫代硫酸钠反应制备连四硫酸钠,但反应条件各不相同。本文采用固体碘与硫代硫酸钠溶液在低温条件下反应,用在较低温度下无水乙醇析晶的方法制备连四硫酸钠,并采用 XRD 和 IR 对其结构进行了表征,证实该工艺条件下制备的产品是连四硫酸钠。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

78-1 型磁力加热搅拌机(江苏金怡仪器科技有限公司);BCD-163S 型冰箱(无锡松下冷机有限公司);SHZ-D III 型循环水真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);5110 ICP-OES 型电感耦合等离子体-原子发射光谱仪(美国安捷伦公司);Spectrum-one 型红外光谱仪(美国 PE 公司);Ultima IV 型 X-射线衍射仪(日本理学公司)。

硫代硫酸钠、碘、无水乙醇(分析纯,广州化学试剂厂);连四硫酸钠(工业级,湖北云镁科技有限公司)。

1.2 实验方法

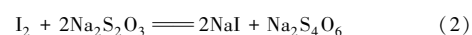
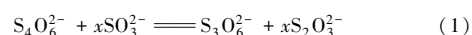
1.2.1 连四硫酸钠的制备

称取适量的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 晶体加入到一定量的水中,制成饱和溶液,并采用冰水浴冷却,当温度降到适宜的温度时,缓慢少量加入固体碘到上述 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 饱和溶液中,并不断搅拌。由于反应是放热的,反应溶液的温度控制到 $10\text{ }^\circ\text{C}$ 以下,体系的 pH 值会降低,反应终点为微微的黄色,反应完成后,快速用冰乙醇冲晶,离心,再用低温纯

水对连四硫酸钠进行重结晶,用低温乙醇冲晶,快速离心,低温冷冻干燥,检测合格得成品。制得的 $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 采用 X-射线衍射和红外光谱方法确认。

1.2.2 连四硫酸钠的成分分析检测

水份用卡尔费休法检测,金属离子用 ICP 检测,硫代硫酸盐用碘量法测定,连四硫酸钠的含量采用方程式(1)^[3,9]和(2)进行化学分析检测。



称取适量样品,用低温纯水溶解,将溶解后的试样进行中和后加入亚硫酸钠溶液,亚硫酸根离子与连四硫酸根离子发生反应,过量的亚硫酸根离子用甲醛掩蔽,而产生的硫代硫酸根离子由碘量法定量^[12]。

1.2.3 连四硫酸钠金属离子用 ICP-OES 测定

采用电感耦合等离子体-原子发射光谱仪,发生器功率为 $1\ 200\text{ W}$,冷却气为 12.0 L/min ,辅助气 1.00 L/min ,载气 0.7 L/min ,观察高度为 8 mm ,积分时间为 5 s 。

1.2.4 连四硫酸钠的红外表征

采用红外光谱仪,将连四硫酸钠固体粉末与 KBr 压片后进行常规测试,测试范围 $4\ 000 \sim 400\text{ cm}^{-1}$,扫描次数为 32 次。

1.2.5 连四硫酸钠的 XRD 表征

采用 X-射线衍射仪进行测试,测试条件为:Cu 靶 Ka 线,管压 40 kV ,管电流为 40 mA ,步长为 $4^\circ/\text{min}$,扫描范围为 $3.0^\circ \sim 90^\circ$ 。

2 结果与讨论

2.1 合成连四硫酸钠过程中氧化剂的选择

连四硫酸钠的制备方法主要由过氧化氢、重铬酸钠或三氧化二砷、碘等作为氧化剂,氧化硫代硫酸钠制得连四硫酸钠。用双氧水作氧化剂有以下几个缺点:1)反应较激烈,由于双氧水氧化性强,还会容易过度氧化,造成大量副反应产生,使反应产物不纯,文献[13]有详细叙述,文献[9]也是用双氧水和硫代硫酸钠制备连三硫酸钠,还有副产物硫酸钠产生;2)反应终点不明显,不容易判断,不利于工业化生产;3)过氧化氢不稳定,容易分解,会产生气体,也不利于连四硫酸钠制备的放大生产。用重铬酸钠或三氧化二砷作为氧化剂,对环境不友好,且易导致重金属残留。用碘作

氧化剂,该反应定量、反应产物稳定,反应速度快,反应终点明显。虽然单质碘容易升华,但反应条件温度低,而且反应物是固体,少量连续加入,且加入后有水相液封,还有硫代硫酸钠与之快速反应,生成的副产物碘化钠易分离除去,而且还可以根据文献[14~16]回收利用碘,再制备连四硫酸钠。

2.2 合成温度对连四硫酸钠纯度的影响

连四硫酸钠中硫的氧化数有两个硫为+5价,另两个为0价,平均价态为+2.5,处于两种极端价态-2价的硫离子(S^{2-})和+6价的硫酸盐(SO_4^{2-})之间。由此可见,连四硫酸钠中硫在中间价态,既具有氧化性又有还原性,而且需要低温保存,否则很不稳定,会有单质硫析出。因此,在制备过程中要控制好反应温度,合成最佳温度应在10℃以下,加料速度要适宜,不然局部反应生成热来不及扩散,使反应不稳定,出现副反应,从而有单质硫的出现,该副反应还会有链式反应的趋势,会加速副反应发生,最终影响连四硫酸钠的纯度和收率。试验过程中发现,连四硫酸钠出现副反应后,只靠重结晶的方法,难以满足含量指标要求。试验过程中有一个样,合成出来含量可以达到标准要求,但因为存放温度高于8℃,外观有点发绿,说明有单质硫出现,之后重结晶处理,含量只有92.86%。

2.3 反应物用量对连四硫酸钠纯度以及成本的影响

连四硫酸钠是用碘和硫代硫酸钠两个物料合成,由于连四硫酸钠质量指标要求,有硫代硫酸盐的要求,因此不能让硫代硫酸钠过量,因为硫代硫酸钠的存在,会加快连四硫酸钠的不稳定性,还会影响连四硫酸钠的外观,使外观颜色容易偏绿。实验过程中一般会让碘稍微过量一点,由于碘易溶于酒精,可通过析晶和重结晶去除,还有碘微溶于水,溶于水会显色,所以可以用碘的显色反应判断反应终点。但由于碘的成本较贵,所以只需让溶液有微微的黄色即可,这样既不浪费碘,又使硫代硫酸钠反应充分。

2.4 重结晶对连四硫酸钠纯度及品质的影响

由于连四硫酸钠性质非常不稳定,如果有一定量杂质硫代硫酸钠的存在,会加速连四硫酸钠的不稳定性;另一个原因是,如果不重结晶,会因为杂质的存在,影响连四硫酸钠的纯度,不重结晶

和重结晶产品的纯度数据见表1。

表1 重结晶对连四硫酸钠纯度的影响^注

Tab.1 Effect of the purity of $Na_2S_4O_6 \cdot 2H_2O$ by recrystallized

序号	项目名称	指标	S1	S2	S3
1	含量/%	≥98.0	94.73	99.43	99.49
2	水分/%	10.5~20.0	没检测	12.81	12.49
3	水溶解试验 (H_2O :50 g/L)	稍浑浊 无色	有点 浑浊	合格	合格
4	硫代硫酸盐 ($S_2O_3^{2-}$)/%	≤0.050	0.580	0.110	0.024
5	镉(Cd)/%	≤0.005	$<1 \times 10^{-5}$	$<1 \times 10^{-5}$	$<1 \times 10^{-5}$
6	钴(Co)/%	≤0.005	$<2 \times 10^{-5}$	$<2 \times 10^{-5}$	$<2 \times 10^{-5}$
7	铜(Cu)/%	≤0.005	$<3 \times 10^{-4}$	$<3 \times 10^{-4}$	$<3 \times 10^{-4}$
8	铁(Fe)/%	≤0.005	$<3 \times 10^{-4}$	$<3 \times 10^{-4}$	$<3 \times 10^{-4}$
9	钾(K)/%	≤0.010	$<3 \times 10^{-4}$	$<3 \times 10^{-4}$	$<3 \times 10^{-4}$
10	镍(Ni)/%	≤0.005	$<1 \times 10^{-4}$	$<1 \times 10^{-4}$	$<1 \times 10^{-4}$
11	铅(Pb)/%	≤0.005	5×10^{-4}	5×10^{-4}	5×10^{-4}
12	锌(Zn)/%	≤0.005	0.001	0.001	0.001
13	钙(Ca)/%	≤0.050	2×10^{-4}	2×10^{-4}	2×10^{-4}
14	储存温度/℃	2~8			

注:S1为没有重结晶;S2为重结晶;S3为S1样处理硫代硫酸盐后重结晶。

从表1可以看出,在原材料一致时,制备的连四硫酸钠产品中金属阳离子项目基本都满足指标要求,最主要的区别在于主体含量和硫代硫酸盐杂质含量。S1样品是制备连四硫酸钠的粗产品,没有经过重结晶,检测含量为94.73%,硫代硫酸盐为0.58%,比指标大10倍以上;S2为S1重结晶后样品,含量为99.34%,硫代硫酸盐为0.11%,比S1少很多,只比标准大2倍;S3为S1样品多补加一点碘与硫代硫酸盐反应后,再重结晶,样品S3的硫代硫酸盐比标准少一半,其他项目都符合指标要求。从这些数据可以看出,连四硫酸钠不经过重结晶,含量低,最主要的是硫代硫酸盐超标较大,而重结晶后,连四硫酸钠中硫代硫酸盐的杂质含量明显降低,主体含量明显提高,水溶解试验重结晶的样品比没有重结晶的样品要好,而且重结晶后的样品稳定性要比没有重结晶的样品好。

2.5 连四硫酸钠红外谱图的分析

采用压片制样法,取少许连四硫酸钠与KBr一起碾细,压成小圆片,测定 $Na_2S_4O_6 \cdot 2H_2O$ 的红外光谱,结果如图2、3所示。

由图2可知,在3 200~3 700 cm^{-1} 处有宽广

本工艺制备的产品为连四硫酸钠。红外图谱表明,连四硫酸钠的纯度越高,在 $1\,238\sim 1\,090\text{ cm}^{-1}$ 区间的吸收峰越少,曲线越平滑。

参考文献:

- [1] FOSS O, HORDVIK A. The crystal structure of sodium tetrathionate dihydrate [J]. *Acta Chem. Scand.*, 1964, **18**(3): 662-670.
- [2] CHRISTIDIS P C, RENTZEPERIS P J, BOLOS C A. Crystal structure and chirality of sodium tetrathionate dihydrate, $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [J]. *Z. Krist.*, 1986, **177**(1/4): 107-116.
- [3] 闫向东. 连四硫酸盐硫代硫酸化与连五硫酸盐亚硫酸化反应动力学[D]. 徐州: 中国矿业大学, 2017.
- [4] 陆永超. 反应过程中硫氧化合物的检测和动力学分析[D]. 徐州: 中国矿业大学, 2010.
- [5] SARKAR N, MANJEET, KUMAR, et al. Effect of sodium tetrathionate on amyloid fibril: Insight into the role of disulfide bond in amyloid progression[J]. *Biochimie*, 2011, **93**(5): 962-968.
- [6] LLERENA-SUSTER C R, PRIOLO N S, MORCELLE S R. Sodium tetrathionate effect on papain purification from different Carica papaya latex crude extracts[J]. *Prep. Biochem. Biotech.*, 2011, **41**(2): 107-121.
- [7] BOSS G R, CHAN A, BRENNER M, et al. Tetrathionate for cyanide and methylmercaptan poisoning: US20 210 330 702A1[P]. 2021-10-28.
- [8] CHAN A, LEE J, BHADRA S, et al. Development of sodium tetrathionate as a cyanide and methanethiol antidote [J]. *Clin. Toxicol.*, 2021, **60**(1): 1-10.
- [9] 李国防, 张富强. 连多硫酸盐的合成、检测与应用[J]. 商丘师范学院学报, 2016, **32**(3): 33-39.
- [10] 文良柱, 赵丹, 黄晓梅. 一种负载单质碘催化合成连四硫酸钠的方法: CN201 510 984 797.8[P]. 2015-12-25.
- [11] EAGER R L, MAHADEVAPPA D S. Radiolysis of sodium tetrathionate dihydrate [J]. *Nature*, 1965, **208**: 781-782.
- [12] 薛可轶, 高庆宇, 石美, 等. 无机硫氧化合物的分析化学[J]. 化学研究与应用, 2004, **16**(6): 723-727.
- [13] 薛可轶, 高庆宇, 刘兵, 等. H_2O_2 - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 反应对 pH 和反应物起始浓度比的依赖性[J]. 物理化学学报, 2004, **20**(7): 772-775.
- [14] 李剑惠, 高捷, 王蕾. 实验室废碘液中碘的回收及升华装置改进[J]. 实验室研究与探索, 2009, **28**(12): 235-236.
- [15] 魏剑英, 许炎妹, 韩周祥, 等. 含碘废液中碘的回收[J]. 无机盐工业, 2007, **39**(9): 47-49.
- [16] 廖戎. 实验室废碘液中碘的回收研究[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2005, **31**(4): 520-524.
- [17] 吉琛. 连多硫酸盐亚硫酸化及硫代硫酸化的反应动力学分析[D]. 徐州: 中国矿业大学, 2014.
- [18] 中本一雄. 无机和配位化合物的红外和拉曼光谱[M]. 黄德如, 汪仁庆, 译. 北京: 化学工业出版社, 1986.
- [19] 翁诗甫. 傅里叶变换红外光谱分析(第二版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.

2023 年《化学试剂》期刊征订单

《化学试剂》于 1979 年创刊,是主要报道化学试剂及相关领域的科技期刊,国内外公开发刊。

《化学试剂》是中文核心期刊、中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊),是《中国科技期刊数据库》《中国学术期刊综合评价数据库》《中国学术期刊(光盘版)》收录期刊、中国石油和化工行业优秀期刊;是美国化学文摘(CA)主要摘录的千种期刊之一。

《化学试剂》快速报道和介绍化学试剂、精细化学品、专用化学品及相关领域的研究动态、理论知识、科研成果、技术经验、新产品的合成、分离、提纯以及各种测试技术等,及时反映国内外相关领域的发展水平。热情欢迎各界人士订阅本刊。

刊 号:CN 11—2135/TQ,ISSN 0258—3283 邮发代号:2-444

国内订阅处:全国各地邮局

国外总发行:中国国际图书贸易总公司 国外代号:M591

定 价:40 元/期 480 元/年

欢迎读者直接与编辑部联系订阅,并将订刊回执回传至编辑部,如需样刊也请与编辑部联系。

编辑部地址:北京市西城区太平街 8 号院 6 号楼 107 室 邮编:100050

电话:(010)58321153,(010)58321793 网址:https://hxsj.cbpt.cnki.net E-mail:webmaster@chinareagent.com.cn

订 刊 回 执

单 位		收 刊 人	
邮寄地址		邮 编	
联 系 人		电 话	
订刊时间	202 ____ 年 ____ 期~202 ____ 年 ____ 期	订阅份数	
电子邮件		寄款金额	

银行汇款方式如下,见款后寄发票

银行汇款:

户 名:北京国化精试咨询有限公司

帐 号:11171401040002050

开户行:中国农业银行股份有限公司北京朱雀门支行

广告

广 告 目 次

国药集团化学试剂有限公司	封面(彩色)	广州国际分析测试及实验室设备展	QC6(彩色)
国药集团化学试剂有限公司	封二(彩色)	天津市康科德科技有限公司	QC7(彩色)
天津市永大化学试剂有限公司	QC1(彩色)	南京化学试剂股份有限公司	QC8(彩色)
上海阿拉丁生化科技股份有限公司	QC2(彩色)	天津市科密欧化学试剂有限公司	QC9(彩色)
天津阿尔塔科技有限公司	QC3(彩色)	广东光华科技股份有限公司	QC10(彩色)
江苏强盛功能化学股份有限公司	QC4(彩色)	北化试剂	封三(彩色)
上海馨晟试化工科技有限公司	QC5(彩色)	西陇科学股份有限公司	封底(彩色)

QC:前部彩色广告插页

QD:前部单色广告插页

HC:后部彩色广告插页

HD:后部单色广告插页