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7月 第45卷第7期

ISSN 0258-3283
07>
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
国药集团化学试剂有限公司 主办
北京国化精试咨询有限公司

化学试剂 CHEMICAL REAGENTS Vol.45 No.7 July 2023

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　　电话：（010）58321793，（010）58321153
投稿网址：https://hxsj.cbpt.cnki.net　　E-mail：webmaster@chinareagent.com.cn

1979 年 4 月创刊 · 月刊
第 45 卷 第 7 期
总第 378 期
2023 年 7 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

· 特约专题 ·

响应面法优化 N-乙酰氨基葡萄糖发酵液精制纯化工艺 …… 刘硕,刘鲁杰,王永红,赵黎明*(1)

新型分离纯化技术在药用蔗糖制备工艺中的应用 …… 王刚,刘鲁杰,秦建国,赵黎明*(10)

有机溶剂纳滤膜在化学品纯化方面的应用进展 …… 罗立汉,童奕皓,贾蕊,韩蕊,许振良,杨虎,徐孙杰*(17)

· 综述与专论 ·

靶向细胞器的次氯酸/次氯酸盐的小分子荧光探针研究进展 …… 李林柯,徐俊红,麻秋娟*,朱楠楠,刘淑珍(25)

四氧化三铁纳米粒子在酶催化领域的应用研究进展 …… 石婧怡,李兆周*,王耀*,陈秀金,牛华伟,李芳,高红丽(34)

· 生化与药用试剂 ·

噻洛芬酸衍生物的合成、分子对接及其抗菌活性研究…… 卫鑫宝,李玉芳,陆思颖,王立升*(43)

功能型 SiO_2 气凝胶在生物医药领域的研究进展 …… 吕春艳,王文倩,崔闻宇,张文君*,厚晓庆,韩锐(51)

钌化合物抗微生物应用研究进展 … 聂鹏*,董睿,许波*(57)

· 功能材料 ·

壳聚糖改性生物炭复合材料的制备及其对 Pb^{2+} 的吸附性能 …… 罗小生,李新丽,杨明,何建明(66)

荧光分子探针检测甲醛的研究进展 …… 孙萌,马杰*(72)

植物还原制备纳米金过程中黄酮类物质的作用、外界影响因素及其应用…… 刘海*,王飞,王毅敏,宋桃,柯义虎(78)

· 分离提取技术 ·

桉叶油的提取工艺优化及对金黄色葡萄球菌的作用 …… 刘瑞秀,覃英克,齐维金,龙利,王鲁*(87)

苦藠化学成分及抗炎活性研究 ……
杨丽婷,李博术,张寒翠,李琼娣,贾敬皓,邱莉,谢集照*(94)

·电化学和新能源·

铁稳定的铂单原子催化选择性加氢反应 ……
…… 尤志鑫,纪钰霞,蒋妍,郎睿*,吴传德*(100)
无定型碳/g-C_3N_4 制备及其光催化降解四环素性能 ……
陈建军*,周诗园,黄雨晨,尤红歌,郑添祥,柴柳青,赵文伯(107)
聚茜素红-羧基化多壁碳纳米管修饰电极测定花生壳中木犀草素的含量研究 ……
…… 司晓晶,杨澜,刘之进,张灵露,韩梅*(113)

·化学品与环境·

改性生物炭对水体中氮和磷共去除:改性方法和吸附机制
…… 王硕,汪雅茹,尹通,刘慧,范子涵,范世锁*(119)
低共熔溶剂在食品质量安全检测中的研究进展 ……
…… 王超,杨雪,于照,李硕,孙鹏*(128)

·分析与测试·

QuEChERS 联合 LC-MS/MS 测定土壤及蚯蚓中吡虫啉及异丙甲草胺 13 种代谢产物……
…… 符芙蓉,赵丽霞,李晓晶,叶会科,孙扬*,李永涛(136)

·合成与工艺技术·

水飞蓟宾 C-3 位衍生物的设计、合成及抗肿瘤活性研究…
…… 刘家越,李学城,赵凤菊,霍荣迪,孟艳秋*(144)
[5+1]串联反应构建螺[环己酮-吡唑啉酮]骨架的研究…
…… 陈治明(152)

*通讯联系人

《化学试剂》介绍(前插页)·
《化学试剂》期刊栏目介绍(后插页)·
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　佘远斌　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:刘文燕　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

Vol.45, No.7 **HUAXUE SHIJI** July 15, 2023

(CHEMICAL REAGENTS)

CONTENTS

Optimization of Impurity Removal Process of N-acetylglucosamine Fermentation Broth by Response Surface Method ····· *LIU Shuo, LIU Lu-jie, WANG Yong-hong, ZHAO Li-ming** (1)

Application of Novel Separation and Purification Technology for the Preparation of Medicinal Sucrose ····· *WANG Gang, LIU Lu-jie, QIN Jian-guo, ZHAO Li-ming** (10)

Application Progress of Organic Solvent Nanofiltration Membranes in the Purification of Chemicals ····· *LUO Li-han, TONG Yi-hao, JIA Rui, HAN Rui, XU Zhen-liang, YANG Hu, XU Sun-jie** (17)

Recent Advances of Organelle-Targeted Fluorescent Probes for Hypochlorous Acid/Hypochlorite ····· *LI Lin-ke, XU Jun-hong, MA Qiu-juan*, ZHU Nan-nan, LIU Shu-zhen* (25)

Research Progress on the Application of Fe_3O_4 Nanoparticles in the Field of Enzyme Catalysis ····· *SHI Jing-yi, LI Zhao-zhou*, WANG Yao*, CHEN Xiu-jin, NIU Hua-wei, LI Fang, GAO Hong-li* (34)

Synthesis, Docking, and Antibacterial Activity of Tiaprofenic Acid Derivatives ····· *WEI Xin-bao, LI Yu-fang, LU Si-ying, WANG Li-sheng** (43)

Application of Functionalized SiO_2 Aerogels in the Field of Biomedicine ····· *LV Chun-yan, WANG Wen-qian, CUI Wen-yu, ZHANG Wen-jun*, HOU Xiao-qing, HAN Rui* (51)

Research Progress on Antimicrobial Application of Ruthenium Complexes ····· *NIE Peng*, DONG Rui, XU Bo** (57)

Preparation of Chitosan Modified Biochar Composites and Their Adsorption Properties for Pb^{2+} ····· *LUO Xiao-sheng, LI Xin-li, YANG Ming, HE Jian-ming* (66)

Research Progress in the Detection of Formaldehyde by Fluorescent Molecular Probe ····· *SUN Meng, MA Jie** (72)

Role of Flavonoids and External Influencing Factors in the Process of Preparing Nano-gold by Plant Reduction and Its Application ····· *LIU Hai*, WANG Fei, WANG Yi-min, SONG Tao, KE Yi-hu* (78)

Optimization of the Extraction Process of Eucalyptus Oil and its Effect on *Staphylococcus Aureus* ····· *LIU Rui-xiu, QIN Ying-ke, QI Wei-jin, LONG Li, WANG Lu** (87)

Chemical Constituents of *Physalis Angulata* L. and Their Anti-inflammatory Activities ····· *YANG Li-ting, LI Bo-shu, ZHANG Han-cui, LI Qiong-di, JIA Jing-hao, QIU Li, XIE Ji-zhao** (94)

Iron-Stabilized Pt Single-Atom Catalysis for the Selective Hydrogenation ····· *YOU Zhi-xin, JI Yu-xia, JIANG Yan, LANG Rui*, WU Chuan-de** (100)

Preparation of Amorphous Carbon/g-C_3N_4 and Its Photocatalytic Degradation of Tetracycline ····· *CHEN Jian-jun*, ZHOU Shi-yuan, HUANG Yu-chen, YOU Hong-ge, ZHENG Tian-xiang, CHAI Liu-Qing, ZHAO Wen-bo* (107)

Determination of Luteolin in Peanut Shell by Poly Alizarin Red-Carboxylated Multi-walled Carbon Nanotube Modified Electrode ····· *SI Xiao-jing, YANG Lan, LIU Zhi-jin, ZHANG Ling-lu, HAN Mei** (113)

Co-removal of Nitrogen and Phosphate from Water by Modified Biochar: Modification Methods and Adsorption Mechanisms ····· *WANG Shuo, WANG Ya-ru, YIN Tong, LIU Hui, FAN Zi-han, FAN Shi-suo** (119)

Research Progress of Deep Eutectic Solvents in Food Safety Testing ····· *WANG Chao, YANG Xue, YU Zhao, LI Shuo, SUN Peng** (128)

Determination of 13 Metabolites of Imidacloprid and Metolachlor in Soil and Earthworm by QuEChERS Combined with LC-MS/MS ····· *FU Fu-rong, ZHAO Li-xia, LI Xiao-jing, YE Hui-ke, SUN Yang*, LI Yong-tao* (136)

Design, Synthesis and Antitumor Activity of C-3 Derivatives of Silybin ····· *LIU Jia-yue, LI Xue-cheng, ZHAO Feng-ju, HUO Rong-di, MENG Yan-qiu** (144)

Study on the Construction of Spiro [Cyclohexanone Pyrazolone] Skeleton by [5+1] Tandem Reaction ····· *CHEN Zhi-ming* (152)

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

特约专题

编者按:本期“药用辅料分离纯化”专题由华东理工大学赵黎明教授组稿,共收录 3 篇论文,主要涉及药用蔗糖、氨糖的分离纯化技术及新型分离膜的开发应用。

药用蔗糖等药用辅料以及高纯化学品等均对产品纯度要求极高,严重依赖具有经济性和工业化价值的分离纯化技术及介质。然而,无论是来源于天然产物的药用蔗糖还是通过生物发酵制备的功能糖等,现有分离纯化技术尚不能解决存在的痕量杂质(比如内毒素、金属盐等)对于产品质量和标准的影响难题。围绕这些问题和迫切需求,近期一些新的分离纯化技术及介质不断开发出来,并尝试用于高纯天然产物、生物医药以及高纯化学品的制造,比如新型高效色谱分离介质,适用于有机溶剂体系的纳滤膜,基于晶体工程的新型结晶技术等。这些分离新技术、新理论、新介质、新材料的研究与应用,为高纯生物制品和化学制剂的国产化提供了可能。

响应面法优化 N-乙酰氨基葡萄糖发酵液精制纯化工艺

刘硕[a,b],刘鲁杰[a,b],王永红[a],赵黎明[*a,b]

(华东理工大学 a.生物工程学院,b.发酵工业分离提取技术研发中心,上海　200237)

摘要:为从发酵液中精制 N-乙酰氨基葡萄糖(NAG),以预处理的 NAG 发酵液为研究对象,开发 NAG 发酵液精制纯化工艺,筛选适用于 NAG 发酵液精制纯化的树脂,考察树脂用量、上样浓度、温度、料液流速对发酵液脱盐率、脱色率与 NAG 回收率的影响,在单因素实验的基础上,采用响应面分析法对 NAG 发酵液的精制纯化工艺进行优化。从 6 种树脂中,筛选出的 DS-1 树脂对发酵液脱盐效果最优、HS-3 树脂对发酵液脱色效果最优,优化后的最佳条件为阴阳离子交换树脂体积比为 0.35∶1、上样浓度为 65 mg/mL、温度为 41 ℃,此时发酵液脱盐率为 96.9%,脱色率为 79.5%,NAG 回收率为 84.5%,NAG 结晶纯度可达 99.8%。该精制纯化工艺可以有效地去除降低 NAG 品质的无机盐和色素,提高 NAG 纯度与结晶率并减少母液量。

关键词:响应面分析法;发酵液;NAG;离子交换树脂;纯化

中图分类号:TQ028　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0258-3283(2023)07-0001-09

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0176

Optimization of Impurity Removal Process of N-acetylglucosamine Fermentation Broth by Response Surface Method

LIU Shuo[a,b],*LIU Lu-jie*[a,b],*WANG Yong-hong*[a],*ZHAO Li-ming*[*a,b](a.School of Bioengineering,b.Fermentation Industry Separation and Extraction Technology Research and Development Center,East China University of Science and Technology,Shanghai 200237,China)

Abstract:In order to refine N-acetylglucosamine (NAG) from fermentation broth,the pretreated NAG fermentation broth was utilized to develop the purification process of NAG fermentation broth.The suitable resins for purification of NAG fermentation liquor were screened,and the effects of resin dosage,sample concentration,temperature and solid-liquid flow rate on the desalting rate,decolorization rate and NAG recovery rate of the fermentation liquor were investigated.On the basis of single factor experiments,response surface analysis was used to optimize the purification process of NAG fermentation liquid.Among the six resins,DS-1 resin was selected to have the best desalting effect on the fermentation solution,and HS-3 resin had the best decolorizing effect on the fermentation solution.The best conditions were the volume ratio of anion/cation exchange resin 0.35∶1,sample concentration 65 mg/mL,temperature 41 ℃.Thus,the desalting rate and decolorization rate of fermentation broth were 96.9% and 79.5%,re-

收稿日期:2023-03-13;**网络首发日期**:2023-04-18

作者简介:刘硕(1997-),男,黑龙江绥化人,硕士生,主要研究方向为氨基寡糖的分离纯化。

通讯作者:赵黎明,E-mail:zhaoliming@ ecust.edu.cn。

引用本文:刘硕,刘鲁杰,王永红,等.响应面法优化 N-乙酰氨基葡萄糖发酵液精制纯化工艺[J].化学试剂,2023,**45**(**7**):1-9。

spectively, the recovery rate of NAG was 84.5%, and the crystal purity of NAG could reach 99.8%. The purification process can effectively remove the inorganic salts and pigments which reduce the quality of NAG, improve the purity and crystallization rate of NAG and reduce the amount of mother liquor.

Key words: response surface analysis; fermentation broth; NAG; ion exchange resin; purification

N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)是生物体内的一种重要含氮单糖,是生物细胞内许多重要多糖的基本组成单位,具有消炎、抗肿瘤和抗氧化等生物活性,被广泛应用于食品、医药、材料、农业等多个领域[1,2]。目前,工业上主要利用微生物发酵法生产 NAG,NAG 发酵液成分复杂,含有菌体、蛋白质、无机盐、色素等杂质[3]。通过沉降、膜分离等分离手段进行固液分离,可以除去菌体、蛋白质等大颗粒杂质[4]。然而对于分子量与 NAG 接近的无机盐和色素等杂质,现有的分离纯化工艺尚不能有效地分离纯化[5]。

许多研究工作对无机盐和色素等杂质的去除进行了尝试。然而,非特异性的分离介质无法有效地将各类杂质从复杂的发酵液体系中分离出来[6],尤其是那些与目标分子分子量接近的无机盐与色素等杂质。Cornelissen 等[7]发现不同类型离子交换树脂对饮用水中天然有机物的去除率相差达到 60%,证明了分离介质对分离体系的重要性。Susanto 等[8]以 S6368 树脂与 OC1074 树脂为分离介质,从易发生褐变反应的工业糖浆中制备得到脱色率高达 97.4%的液体糖。李明[9]以 QY-Z001 树脂为分离介质,将牛初乳中唾液酸乳糖的纯度提高至 99.3%。因此,选择特异性的分离介质并确定分离工艺,对 NAG 发酵液中难以除去的杂质实现有效地分离纯化是目前亟需解决的问题。

本研究采用超滤膜对 NAG 发酵液进行预处理。首先对预处理发酵液中 NAG、蛋白质含量进行检测,以确保树脂对预处理发酵液的精制纯化不受蛋白质的影响,并从 6 种具有不同活性基团与骨架结构的树脂中筛选适用于 NAG 发酵液精制纯化的树脂。在单因素实验的基础上,采用响应面分析法优化分离条件,从而有效地去除与 NAG 分子量接近的无机盐与色素等小分子杂质,以期为 NAG 的精制与氨糖衍生产品的开发提供技术支撑。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

BSD-YX32001 型摇床(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司);玻璃层析柱 400 mm×25 mm(上海联塔仪器有限公司);UV-759CRT 型紫外-可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司);LC-20AT 型液相色谱仪、ELSD-LT Ⅱ 型检测器(日本 Shimadzu 有限公司);NH_2P-50 4E 型氨基柱 250 mm×4.6 mm(日本 Shodex 有限公司);EL3-ELK 型电导率仪(上海仪电科学仪器股份有限公司);BT100-2J 型蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司);RE-5203 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂有限公司);XSP-002 型光学显微镜(苏州神鹰光学有限公司);S3400N 型扫描电子显微镜(日本 HITACHI 有限公司)。

强酸性阳离子交换树脂 HS-1、强酸性阳离子交换树脂 HS-2、弱酸性阳离子交换树脂 DS-1、强碱性阴离子交换树脂 HS-3、弱碱性阴离子交换树脂 DS-2、强碱性阴离子交换树脂 DS-3(发酵工业分离提取技术研发中心);乙腈(C_2H_3N,色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);盐酸(HCl)、氯化钠(NaCl)、氢氧化钠(NaOH)(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵液的预处理

NAG 发酵液由山东润德生物科技有限公司提供,通过超滤膜除去发酵液中的蛋白质,收集超滤膜透过液作为预处理发酵液,将超滤膜透过液中 NAG 浓度稀释至 20 mg/mL 作为树脂精制纯化的初始原料。

1.2.2 树脂的预处理

将干树脂置于饱和 NaCl 溶液中溶胀 24 h 并用去离子水洗净,阳离子交换树脂先用 3% NaOH 溶液清洗 3 h,树脂用去离子水洗净后,再用 5% HCl 溶液清洗 6 h,最后用去离子水洗至树脂流出液为中性。阴离子交换树脂先用 5% HCl 清洗 3 h,树脂用去离子水洗净后,再用 3% NaOH 溶液清洗 6 h,最后用去离子水洗至树脂流出液为中性。

1.2.3 树脂的再生

用去离子水以 10 BV/h 的流速分别反洗阴、阳离子交换树脂 30 min。阴离子交换树脂采用 2.5 mol/L NaOH 溶液以 20 BV/h 流速再生 2 h,

将树脂完全转化为 OH^- 型。阳离子交换树脂采用 2.5 mol/L HCl 溶液以 20 BV/h 流速再生 2 h,将树脂完全转化为 H^+ 型。

1.2.4　脱盐率、脱色率、NAG 回收率的测定方法

脱盐率、脱色率、NAG 回收率参照张中义等[10]的方法进行测定。脱盐率的计算公式为:

$$脱盐率(\%) = [(脱盐前电导率值 - 脱盐后电导率值)/脱盐前电导率值] \times 100 \quad (1)$$

全波长扫描确定发酵液中的有色杂质在可见光的最大吸收波长为 420 nm,因此确定脱色率的计算公式为:

$$脱色率(\%) = [(脱色前\ OD_{420} - 脱色后\ OD_{420})/脱色前\ OD_{420}] \times 100 \quad (2)$$

NAG 回收率的计算公式如下:

$$R(\%) = [(C_1V_1 + C_2V_2)/(C_0V_0)] \times 100 \quad (3)$$

式中:R 为 NAG 回收率,%;C_0 为 NAG 初始浓度,mg/mL;V_0 为上样体积,mL;C_1 为流出液中 NAG 浓度,mg/mL;V_1 为收集到的流出液体积,mL;C_2 为淋洗液中 NAG 浓度,mg/mL;V_2 为收集到的淋洗液体积,mL。

1.2.5　分析方法

NAG 的检测参照 HPLC-ELSD 法(GB/T 20365—2006),并根据实际情况进行调整。流动相 V(水):V(乙腈)= 2:8,柱温 35 ℃,流速 1.00 mL/min,漂移管温度 60 ℃,喷雾器温度 75 ℃。进样体积 10 μL,运行时间 15 min。以 NAG 为标准品绘制标准曲线为 $y = 38.772\ 5x - 64.593\ 0$,$R^2 = 0.999\ 4$。

蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法[11],以牛血清白蛋白为标准品,标准曲线为 $y = 3.815\ 0x + 0.017\ 6$,$R^2 = 0.999\ 5$。

结晶率与母液体积占比的测定参照郭元亨等[12]的方法。将精制纯化后的料液浓缩至 330~350 mg/mL,25 ℃结晶 12 h,真空抽滤后收集母液,NAG 晶体用乙醇淋洗 3 次后置于烘箱中 80 ℃烘干 6 h 后称重。

结晶率计算公式如下:

$$A(\%) = [S/(C_0V_0)] \times 100 \quad (4)$$

式中:A 为 NAG 结晶率,%;S 为烘干后的 NAG 晶体质量,g;C_0 为料液浓缩液中 NAG 浓度,mg/mL;V_0 为料液浓缩液体积,mL。

母液体积占比计算公式如下:

$$F(\%) = (V_F/V_0) \times 100 \quad (5)$$

式中:F 为母液体积占比,%;V_F 为真空抽滤收集的母液体积,mL。

结晶纯度采用峰面积归一化法[13]进行测定。

结晶的表面形态采用光学显微镜放大 40 倍后进行测定。

结晶的晶型参照 Verma 等[14]的方法,采用扫描电子显微镜放大 500 倍后进行测定。

1.2.6　树脂筛选实验

分别准确量取 20 mL 预处理后的 HS-1、HS-2、HS-3、DS-1、DS-2、DS-3 树脂并倒入预先编号的锥形瓶中,分别向锥形瓶中加入 40 mL 预处理后的 NAG 发酵液(预热至 35 ℃,NAG 浓度稀释至 20 mg/mL),立即置于恒温摇床中,180 r/min,35 ℃条件下进行树脂筛选实验,每隔 40 min 取样并测定电导率与 OD_{420},计算不同型号树脂对发酵液的脱盐率与脱色率。以树脂对发酵液的脱盐率、脱色率为指标[10],筛选出适用于 NAG 发酵液精制纯化的树脂。

1.2.7　单因素实验

将 DS-1 树脂与 HS-3 树脂串联使用,控制总树脂用量 25 mL、上样浓度 20 mg/mL、上样体积 50 mL、温度 35 ℃、料液流速 8 BV/h,依次考察阴离子交换树脂与阳离子交换树脂体积比 1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1对发酵液脱盐率、脱色率、NAG 回收率的影响。

控制阴阳离子交换树脂体积比为 1:3、总树脂用量 25 mL、上样体积 50 mL、温度 35 ℃、料液流速 8 BV/h,依次考察上样浓度 20、40、60、80、100、120 mg/mL 对发酵液脱盐率、脱色率、NAG 回收率的影响。

控制上样浓度为 60 mg/mL、总树脂用量 25 mL、上样体积 50 mL、阴阳离子交换树脂体积比 1:3、料液流速 8 BV/h,依次考察温度 35、40、45、50、55、60 ℃对发酵液脱盐率、脱色率、NAG 回收率的影响。

控制上样浓度为 60 mg/mL、总树脂用量 25 mL、上样体积 50 mL、阴阳离子交换树脂体积比 1:3、温度 40 ℃,依次考察料液流速 4、6、8、10、12、14、16 BV/h 对发酵液脱盐率、脱色率、NAG 回收率的影响。

1.2.8　响应面分析实验

在单因素实验基础上,控制上样浓度为 60 mg/mL、总树脂用量 25 mL、上样体积 50 mL,选取阴阳离子交换树脂体积比、上样浓度、温度为实验因素,分别以发酵液脱盐率、脱色率、NAG 回收率为响应值,进行三因素三水平的响

应面分析实验。

2 结果与讨论

2.1 预处理发酵液成分分析

采用超滤膜对 NAG 发酵液进行预处理,收集超滤膜透过液并以 NAG、蛋白质含量、电导率、OD_{420}为检测指标进行测定,结果如表 1 所示,分析可知超滤膜能够将发酵液中的蛋白质完全除去,但预处理发酵液中仍含有大量的无机盐与有色杂质。

表 1 预处理发酵液的各项指标测定[注]

Tab.1 Determination of various indexes of the pretreated fermentation liquid

检测指标	预处理发酵液
NAG/(mg·mL^{-1})	117.6±6.7
蛋白质含量/(mg·mL^{-1})	—
电导率/(μs·cm^{-1})	6143±119
OD_{420}	1.36±0.06

注:"—"代表相应检测指标的含量未检出。

2.2 树脂筛选结果

如图 1 与图 2 所示,对比不同型号树脂对发酵液脱盐率与脱色率的影响,发现弱酸性阳离子交换树脂 DS-1 对发酵液的脱盐效果最佳,强碱性阴离子交换树脂 HS-3 对发酵液的脱色效果最佳,因此,选择 DS-1 树脂与 HS-3 树脂对发酵液进行精制纯化。

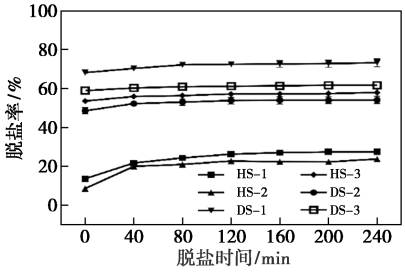


图 1 不同树脂脱盐效果对比

Fig.1 Comparison of desalting effect of different resins

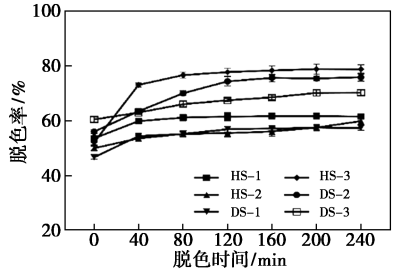


图 2 不同树脂脱色效果对比

Fig.2 Contrast of decolorization effect of different resins

2.3 单因素实验结果

2.3.1 阴阳离子交换树脂体积比对发酵液精制纯化效果影响

阴阳离子交换树脂体积比对发酵液精制纯化效果的影响如图 3 所示,阴阳离子交换树脂体积比对发酵液脱盐率的影响较小,脱色率随阴阳离子交换树脂体积比的增加呈现出先上升后下降的趋势,这说明两种树脂对色素的去除效果差异明显,适当提高阴离子交换树脂的体积占比有利于 NAG 发酵液中色素杂质的去除。NAG 回收率随着阴阳离子交换树脂体积比的增加,小幅度上升后便快速下降,这主要是因为凝胶型树脂吸水溶胀后,会在大分子链节间形成细微的孔隙[15,16],导致一部分 NAG 会因为非静电相互作用而被吸附[17]。当阴阳离子交换树脂体积比为 1∶3时,NAG 回收率最高,达到 70.4%。综合考虑发酵液纯化效果与 NAG 的回收,确定精制纯化工艺的阴阳离子交换树脂体积比为 1∶3。

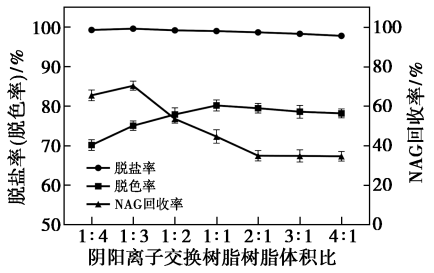


图 3 阴阳离子交换树脂体积比对发酵液精制纯化效果影响

Fig.3 Effect of volume ratio of anion/cation exchange resin on purification of the pretreated fermentation broth

2.3.2 上样浓度对发酵液精制纯化效果影响

上样浓度对发酵液精制纯化效果的影响如图 4 所示。上样浓度对发酵液脱色率产生的影响较小。随着上样浓度的提高,脱盐率快速下降,当上样浓度超过 60 mg/mL 后,脱盐率下降速度加

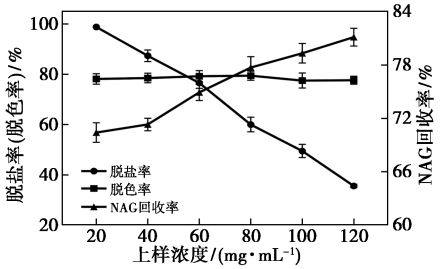


图 4 上样浓度对发酵液精制纯化效果影响

Fig.4 Effect of loading concentration on purification effect of fermentation liquid

快,而 NAG 回收率上升趋势变缓,这说明当上样浓度为 60 mg/mL 时,脱盐率与 NAG 回收率达到平衡,此时发酵液的脱盐率为 76.5%、脱色率为 79.2%、NAG 回收率为 74.9%。上样浓度过高会导致纯化效果不佳[18,19],上样浓度过低则会导致产品损失[20,21]。因此,综合考虑发酵液纯化效果与 NAG 的回收,确定精制纯化工艺的上样浓度为 60 mg/mL。

2.3.3　温度对发酵液精制纯化效果影响

温度对发酵液精制纯化效果的影响如图 5 所示。随着温度的升高,发酵液脱盐率快速上升并达到平衡,40 ℃时的脱盐率最高,上样浓度为 60 mg/mL 时,脱盐率为 93.2%。脱色率则在温度升高时略有下降,说明温度的升高加剧了无机盐、色素与树脂活性基团间的竞争性交换作用[22]。温度升高,NAG 回收率下降,这说明凝胶型树脂与大孔型树脂对 NAG 的吸附是吸热过程[23,24]。同时温度也会影响树脂的机械强度与交换能力[25],温度过高会导致更多的 NAG 损失与能量消耗。因此,综合考虑发酵液纯化效果与 NAG 的回收,确定精制纯化工艺的运行温度为 40 ℃,此时发酵液的脱盐率为 93.2%、脱色率为 76.1%、NAG 回收率为 79.9%。

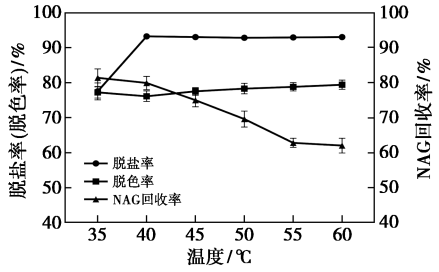


图 5　温度对发酵液精制纯化效果影响

Fig.5　Effect of temperature on purification of fermentation liquid

2.3.4　料液流速对发酵液精制纯化效果影响

料液流速对发酵液精制纯化效果的影响如图 6 所示。脱盐率与脱色率均会随着料液流速的增加而下降,料液流速高于 6 BV/h 时,脱盐率与脱色率下降趋势加快。由此可见,随着料液流速的增加,带电杂质在树脂内部进行基团交换的时间变短,部分带电杂质未与树脂的活性基团进行交换便随着料液从树脂柱中流出[26],导致脱盐率降低。同时,料液流速过快也减少了因非静电相互作用而被树脂吸附的色素量[27],料液流速过慢则会导致更多的 NAG 被树脂吸附,增加产品损失。因此,综合考虑发酵液纯化效果与 NAG 的回收,确定精制纯化工艺的料液流速为 6 BV/h,此时发酵液的脱盐率为 97.2%、脱色率为 78.4%、NAG 回收率为 79.5%。

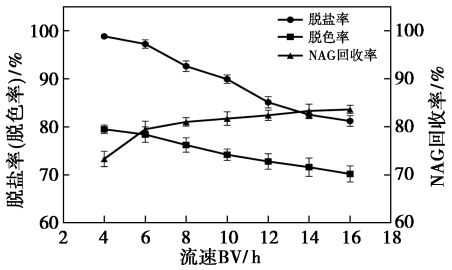


图 6　料液流速对发酵液精制纯化效果影响

Fig.6　Effect of feed liquid velocity on purification of fermentation liquid

2.4　响应面优化精制纯化工艺

根据单因素实验结果,选择阴阳离子交换树脂体积比、上样浓度、温度为实验因素,进行三因素三水平的响应面分析实验,响应面因素水平见表 2。

表 2　响应面因素水平

Tab.2　Response surface factor level

因素	编码	水平编码值		
		−1	0	1
阴阳离子交换树脂体积比	A	0.30	0.35	0.40
上样浓度/(mg·mL^{-1})	B	45	60	75
温度/℃	C	37	40	43

在单因素实验的基础上,采用 Design Expert 12.0 按照表 2 的编码水平设计三因素三水平响应面实验 17 组,实验设计及结果如表 3 所示。

表 3　响应面实验设计及结果

Tab.3　Experimental design and results of response surface

编号	A	B	C	脱盐率/%	脱色率/%	NAG 回收率/%
1	0.30	45	40	92.6	64.3	74.9
2	0.40	45	40	92.8	74.3	73.2
3	0.30	75	40	91.5	64.7	87.4
4	0.40	75	40	91.8	75.1	83.5
5	0.30	60	37	91.2	67.7	81.6
6	0.40	60	37	91.0	79.8	78.8
7	0.30	60	43	91.8	70.8	83.7
8	0.40	60	43	92.1	78.2	80.4
9	0.35	45	37	93.8	73.9	75.9
10	0.35	75	37	94.4	71.6	84.8
11	0.35	45	43	95.7	73.4	73.8
12	0.35	75	43	93.9	75.6	86.9
13	0.35	60	40	97.9	78.8	83.2

续表

编号	A	B	C	脱盐率/%	脱色率/%	NAG 回收率/%
14	0.35	60	40	98.1	79.8	82.8
15	0.35	60	40	97.3	80.3	81.9
16	0.35	60	40	97.5	78.9	83.7
17	0.35	60	40	98.2	79.7	84.1

采用 Design Expert 12.0 对表 3 中的数据进行多元回归拟合和显著性检验,结果如表 4、表 5、表 6 所示。

表 4 脱盐率回归模型方差分析

Tab.4 Variance analysis of regression model of desalting rate

来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型	114.19	9	12.69	121.24	<0.000 1
A	0.045 0	1	0.045 0	0.430 0	0.532 9
B	1.36	1	1.36	13.01	0.008 7
C	1.20	1	1.20	11.48	0.011 6
AB	0.002 5	1	0.002 5	0.023 9	0.881 5
AC	0.062 5	1	0.062 5	0.597 3	0.464 9
BC	1.44	1	1.44	13.76	0.007 6
A^2	76.95	1	76.95	735.36	<0.000 1
B^2	7.67	1	7.67	73.33	<0.000 1
C^2	16.84	1	16.84	160.95	<0.000 1
残差	0.732 5	7	0.104 6		
失拟项	0.132 5	3	0.044 2	0.294 4	0.828 5
纯误差	0.600 0	4	0.150 0		
总离差	114.92	16			

表 5 脱色率回归模型方差分析

Tab.5 Variance analysis of decolorization rate regression model

来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型	437.56	9	48.62	139.91	<0.000 1
A	199.00	1	199.00	572.67	<0.000 1
B	0.151 3	1	0.151 3	0.435 3	0.530 5
C	3.13	1	3.13	8.99	0.020 0
AB	0.040 0	1	0.040 0	0.115 1	0.744 4
AC	5.52	1	5.52	15.89	0.005 3
BC	5.06	1	5.06	14.57	0.006 6
A^2	93.01	1	93.01	267.66	<0.000 1
B^2	113.85	1	113.85	327.63	<0.000 1
C^2	1.92	1	1.92	5.52	0.051 1
残差	2.43	7	0.347 5		
失拟项	0.812 5	3	0.270 8	0.668 7	0.614 1
纯误差	1.62	4	0.405 0		
总离差	439.99	16			

表 6 NAG 回收率回归模型方差分析

Tab.6 Variance analysis of NAG recovery regression model

来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型	305.52	9	33.95	50.40	<0.000 1
A	17.11	1	17.11	25.41	0.001 5
B	250.88	1	250.88	372.50	<0.000 1
C	1.71	1	1.71	2.54	0.155 0
AB	1.21	1	1.21	1.80	0.222 0
AC	0.062 5	1	0.062 5	0.092 8	0.769 5
BC	4.41	1	4.41	6.55	0.037 6
A^2	7.20	1	7.20	10.69	0.013 7
B^2	18.26	1	18.26	27.11	0.001 2
C^2	2.11	1	2.11	3.13	0.120 2
残差	4.71	7	0.673 5		
失拟项	1.82	3	0.607 5	0.840 2	0.538 5
纯误差	2.89	4	0.723 0		
总离差	310.24	16			

分别以脱盐率、脱色率、NAG 回收率为 *Y* 值,得到回归方程(6)、(7)、(8)。

$$Y = 97.80 + 0.08A - 0.41B + 0.39C + 0.03AB + 0.13AC - 0.60BC - 4.28A^2 - 1.35B^2 - 2.00C^2 \quad (6)$$

$R^2 = 0.993\ 6$, $R^2_{Adj} = 0.985\ 4$。

$$Y = 79.50 + 4.99A + 0.14B + 0.63C + 0.10AB - 1.17AC + 1.13BC - 4.70A^2 - 5.20B^2 - 0.68C^2 \quad (7)$$

$R^2 = 0.994\ 5$, $R^2_{Adj} = 0.987\ 4$。

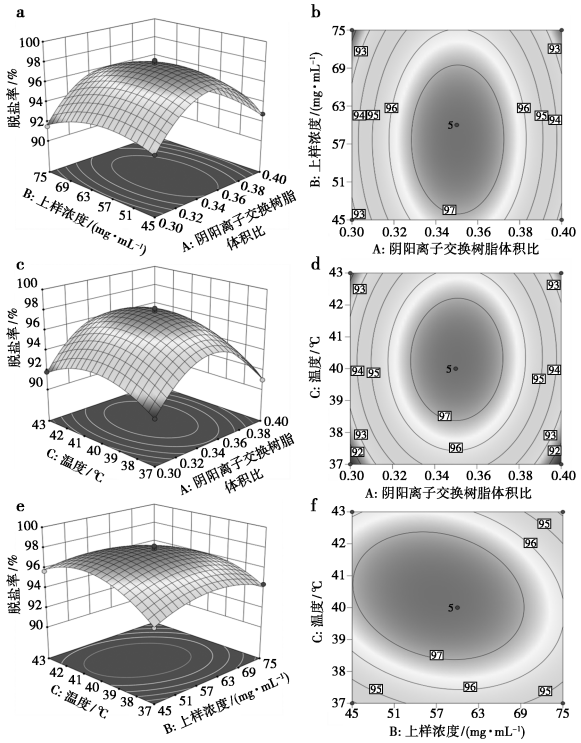
$$Y = 83.14 - 1.46A + 5.60B + 0.46C - 0.55AB - 0.13AC + 1.05BC - 1.31A^2 - 2.08B^2 - 0.71C^2 \quad (8)$$

$R^2 = 0.984\ 8$, $R^2_{Adj} = 0.965\ 3$。

3 个方程的相关系数 R^2 分别为 0.993 6、0.994 5、0.984 8,说明模型与实验拟合良好。3 个模型的 R^2_{Adj} 别分为 0.985 4、0.987 4、0.965 3,表明 96%以上实验数据的变异性可用上述回归模型解析[28]。对回归方程进行失拟性检验,方程(6)、(7)、(8)的 *P* 值分别为 0.828 5、0.614 1、0.538 5,均大于 0.05,说明模型的失拟项不显著。对回归方程(6)、(7)、(8)分别进行显著性检验,方程(6)、(7)、(8)的 *P* 值均小于 0.01,说明模型极显著。

通过对方程一次项系数绝对值进行比较,可判断各因素对相应响应值的影响程度[29]。因此,发酵液脱盐率模型中上样浓度、温度、阴阳离子交换树脂体积比对脱盐率的影响程度依次降低。同理发酵液脱色率模型中阴阳离子交换树脂体积比、温度、上样浓度对脱色率的影响程度依次降低。NAG 回收率模型中上样浓度、阴阳离子交换

树脂体积比、温度对 NAG 回收率的影响程度依次降低。



a、b 分别为上样浓度、阴阳离子交换树脂体积比的响应面图和等高线图;c、d 分别为温度、阴阳离子交换树脂体积比的响应面图和等高线图;e、f 分别为温度、上样浓度的响应面图和等高线图

图 7　发酵液脱盐率的响应面图与等高线图

Fig.7　Response surface diagram and contour diagram of desalting rate of fermentation solution

将温度、上样浓度、阴阳离子交换树脂体积比分别固定,发酵液脱盐率随其余 2 个参数变化的响应面图与等高线图如图 7 所示,响应面图中,曲线越弯曲说明对应因素对响应值影响越大[30],等高线呈椭圆形表明因素间交互作用显著,等高线呈圆形则表明因素间交互作用不显著。从响应面图与等高线图中可以看出,随着温度的提高,发酵液脱盐率逐渐增加,并很快达到极值。结合方差分析表中交互项的 P 值小于 0.01 可知,发酵液脱盐率模型中温度、上样浓度之间的交互作用极显著。同理发酵液脱色率模型中阴阳离子交换树脂体积比与温度之间的交互作用极显著,温度与上样浓度之间的交互作用极显著。NAG 回收率模型中上样浓度与温度之间的交互作用显著。

利用软件寻找最优解,以脱盐率、脱色率与 NAG 回收率最高值为 100%,寻求最大值,得出最优精制纯化条件为阴阳离子交换树脂体积比 0.35∶1、上样浓度 64.58 mg/mL、温度 40.57 ℃。此时模型预测值分别为脱盐率 97.49%,脱色率 79.60%,NAG 回收率为 84.63%。结合实际条件调整阴阳离子交换树脂体积比为 0.35∶1、上样浓度 65 mg/mL、温度 41 ℃对实验进行验证得发酵液脱盐率为 96.9%,脱色率为 79.5%,NAG 回收率为 84.5%,实验值与预测值基本一致,模型准确可靠。发酵液脱盐率、脱色率与 NAG 回收率的回归方程可应用于实践。

2.5　树脂再生性能测定

不同使用次数下的树脂精制纯化性能测定如图 8 所示,树脂在使用 7 次后仍具有较好的纯化性能,对发酵液的脱盐率为 93.3%、脱色率为 76.4%、NAG 回收率为 79.7%,表明树脂经过多次再生后对发酵液仍有良好的精制纯化效果。

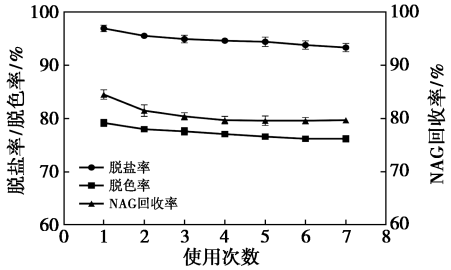


图 8　不同使用次数下树脂精制纯化性能测定

Fig.8　Determination of resin purification properties under different use times

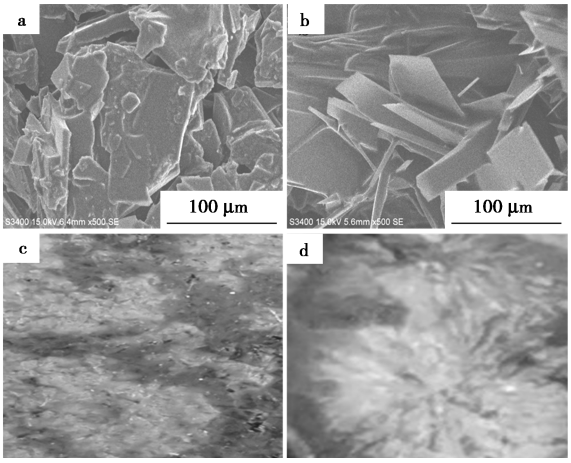
2.6　树脂精制纯化前后 NAG 品质对比

发酵液经树脂精制纯化前后的各项指标变化如表 7 所示,NAG 的结晶纯度提高到 99.8%,结晶率提高到 81.1%,结晶母液体积占比减少 8.5%。从图 9 可以看出,发酵液纯化前后,NAG 色泽与晶型变化明显。纯化后,NAG 晶体呈无色且晶体结构规则。说明精制纯化工艺可有效去除发酵液中的无机盐与色素杂质并提高 NAG 品质。

表 7　发酵液精制纯化前后的各项指标变化

Tab.7　Changes of various indexes of fermentation liquid before and after purification

检测指标	纯化前	纯化后
电导率/(μs·cm^{-1})	2241±79	69±3
OD_{420}	0.78±0.06	0.16±0.02
结晶纯度/%	91.5±2.8	99.8±0.1
结晶率/%	65.0±4.5	81.1±3.9
母液体积占比/%	29.3±2.5	20.8±0.8



a、b 分别为精制纯化前、后的 NAG 晶体电镜图；
c、d 分别为精制纯化前、后的 NAG 晶体形态

图 9 发酵液精制纯化前后 NAG 结晶品质对比

Fig.9 Comparison of NAG crystal quality before and after fermentation broth purification

3 结论

针对复杂的 NAG 发酵液体系，本文开发了适用于 NAG 精制纯化的新工艺。筛选了由 DS-1 树脂与 HS-3 树脂组成的适用于 NAG 发酵液精制纯化的树脂组合，在单因素实验的基础上，通过对阴阳离子交换树脂体积比、上样浓度、温度进行响应面分析实验，得到 NAG 发酵液精制纯化的最佳条件为阴阳离子交换树脂体积比 0.35∶1、上样浓度 65 mg/mL、温度 41 ℃，此时发酵液脱盐率为 96.9%，脱色率 79.5%，NAG 回收率 84.5%，NAG 结晶纯度可达 99.8%。通过对比纯化前后发酵液的各项指标变化与 NAG 晶体品质可以看出，精制纯化新工艺可有效去除无机盐与色素杂质，提高 NAG 纯度与结晶率并减少母液量。

参考文献：

[1] CHEN Q M, ZHAO L M. The application of chitooligosaccharides on biomaterials, oligosaccharides of chitin and chitosan bio-manufacture and applications [M]. New York: Springer Nature, 2019: 3-18.

[2] SIMON R R, MARKS V, LEEDS A R, et al. A comprehensive review of oral glucosamine use and effects on glucose metabolism in normal and diabetic individuals[J]. *Diabetes-Metab. Res.*, 2011, **27**(**1**): 14-27.

[3] EISAYED H E, MOHAMED R E. Synthesis and biological relevance of N-acetylglucosamine-containing oligosaccharides[J]. *Pure Appl. Chem.*, 2007, **79**(**12**): 2 229-2 242.

[4] SAXENA A, TRIPATHI B P, KUMAR M, et al. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview[J]. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2009, **145**(**1/2**): 1-22.

[5] SHEN J, KAUR I, BAKTASH M M, et al. A combined process of activated carbon adsorption, ion exchange resin treatment and membrane concentration for recovery of dissolved organics in pre-hydrolysis liquor of the kraft-based dissolving pulp production process[J]. *Bioresource Technol.*, 2013, **127**(**12**): 59-65.

[6] HARIPRASAD P, DIVAKARA S T, NIRANJANA S R. Isolation and characterization of chitinolytic rhizobacteria for the management of Fusarium wilt in tomato[J]. *Crop Prot.*, 2011, **30**(**12**): 1 606-1 612.

[7] CORNELISSEN E R, MOREAU N, SIEGERS W G, et al. Selection of anionic exchange resins for removal of natural organic matter (NOM) fractions[J]. *Water Res.*, 2008, **42**(**1/2**): 413-423.

[8] SUSANTO H, ROIHATIN A, WIDIASA I N. Production of colorless liquid sugar by ultrafiltration coupled with ion exchange[J]. *Food Bioprod. Process.*, 2016, **98**(**12**): 11-20.

[9] 李明. 牛初乳中功能寡糖的分离纯化技术研究[D]. 上海：华东理工大学, 2017.

[10] 张中义, 邵文科, 柴颖. 混合床离子交换树脂大豆肽脱盐工艺研究[J]. 食品科技, 2016, **41**(**6**): 280-286.

[11] 王文平, 郭祀远, 李琳, 等. 考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J]. 食品研究与开发, 2008, (**1**): 115-117.

[12] 郭元亨, 吕哲, 丁子元, 等. 乙醇体系中 D-阿洛酮糖的结晶工艺优化[J]. 食品工业科技, 2019, **40**(**24**): 185-189.

[13] 彭炳先, 黄振中, 陈受惠. 色谱峰面积归一化法测定中药小过路黄挥发油化学成分[J]. 时珍国医国药, 2007, (**10**): 2 465-2 466.

[14] VERMA P, IYER S R, SHAH N, et al. Insights into the crystallization phenomenon in the production of non-centrifugal sugar[J]. *J. Food Eng.*, 2021, **55**(**6**): 240-249.

[15] OHTA K, OHASHI M, JIN J Y, et al. Separation of aliphatic carboxylic acids and benzenecarboxylic acids by ion-exclusion chromatography with various cation-exchange resin columns and sulfuric acid as eluent[J]. *J. Chromatogr. A*, 2003, **997**(**1/2**): 117-125.

[16] CAO X J, HYUN S Y, YOONMO K. Recovery of l-(+)-lactic acid by anion exchange resin Amberlite IRA-400 [J]. *Biochem. Eng. J.*, 2002, **11**(**2**): 189-96.

[17] TAN L, SHUANG C D, WANG Y S, et al. Effect of pore

structure on the removal of clofibric acid by magnetic anion exchange resin[J]. *Chemosphere*, 2018, **191**(1): 817-824.

[18]HEINONEN J, TAMPER J, LAATIKAINEN M, et al. Chromatographic recovery of monosaccharides and lignin from lignocellulosic hydrolysates[J]. *Chem. Eng. Technol.*, 2018, **41**(12): 2 402-2 410.

[19]LODI G, PELLEGRINI L A, ALIVERTI A, et al. Recovery of monosaccharides from lignocellulosic hydrolysates by ion exclusion chromatography[J]. *J. Chromatogr. A*, 2017, **1 496**(3): 25-36.

[20]石云,孔祥珍,华欲飞.离子交换树脂纯化大豆糖蜜上清液[J].大豆科学,2016,**35**(1):130-135.

[21]ZABKOVA M, BORGES D A, RODRIGUES A E. Recovery of vanillin from Kraft lignin oxidation by ion-exchange with neutralization[J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2007, **55**(1): 56-68.

[22]NAM H, LIM G, MUN S. Separation of acetic acid, formic acid, succinic acid, and lactic acid using adsorbent resin[J]. *J. Chem. Eng. Data*, 2012, **57**(8): 2 102-2 108.

[23]DECARVALHO W, CANILHA L, MUSSATTO S I, et al. Detoxification of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate with ion-exchange resins for xylitol production by calcium alginate-entrapped cells[J]. *J. Chem. Technol. Biot.*, 2004, **79**(8): 863-868.

[24]CHEN K F, SHILAI H, HANG L, et al. Ion exchange separation for recovery of monosaccharides, organic acids and phenolic compounds from hydrolysates of lignocellulosic biomass[J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2017, **172**(8): 100-106.

[25]OHTA K, TOWATA A, OHASHI M. Ion-exclusion chromatographic behavior of aliphatic carboxylic acids and benzenecarboxylic acids on a sulfonated styrene—Divinylbenzene co-polymer resin column with sulfuric acid containing various alcohols as eluent[J]. *J. Chromatogr. A*, 2003, **997**(1/2): 95-106.

[26]JAKOBSSON N, DEGERMAN M, STENBORG E, et al. Model based robustness analysis of an ion-exchange chromatography step[J]. *J. Chromatogr. A*, 2007, **1 138**(1/2): 109-119.

[27]WU X Y, LIU Y, LIU Y F, et al. Evaluation on the adsorption capability of chemically modified macroporous adsorption resin with ionic liquid[J]. *Colloid. Surface. A*, 2015, **469**(1): 141-149.

[28]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.

[29]高奇,李齐激,杨柳.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.

[30]马冰清,张忠,吴迪,等.香菇菌糠高温高压-复合酶降解工艺优化及提取物的生物活性[J].食用菌学报,2021,**28**(4):27-38.

新型分离纯化技术在药用蔗糖制备工艺中的应用

王刚[1,2],刘鲁杰[1],秦建国[2],赵黎明*[1]
(1.华东理工大学 生物工程学院,生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237;
2.国药集团化学试剂有限公司,上海 200002)

摘要:药用蔗糖是一种重要的药用辅料,是关系到国计民生的重要物资。目前国内药用蔗糖的制备工艺发展相对滞后,品种单一,高端品种严重不足。药用蔗糖制备的关键在于分离纯化工艺,随着我国对药用蔗糖的需求逐步提高,开发新型的分离纯化技术并应用到药用蔗糖制备已迫在眉睫。综述了目前国内外药用蔗糖的分离纯化工艺及相关分离纯化技术,阐述了新型分离纯化技术在药用蔗糖制备过程中的研究进展,并对未来药用蔗糖纯化工艺的开发提出建议。

关键词:药用蔗糖;药用辅料;高纯;分离纯化技术;生产工艺
中图分类号:TQ028 **文献标识码**:A **文章编号**:0258-3283(2023)07-0010-07
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0160

Application of Novel Separation and Purification Technology for the Preparation of Medicinal Sucrose *WANG Gang*[1,2], *LIU Lu-jie*[1], *QIN Jian-guo*[2], *ZHAO Li-ming*[*1] (1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd., Shanghai 200002, China)

Abstract: Medicinal sucrose is one of the important pharmaceutical excipients in pharmaceutical industry of our country. It is an important material related to national economy and people's livelihood. The key step in the preparation of medicinal sucrose lies in the separation and purification process. With the increasing demand of medicinal sucrose in our country, the preparation of domestic medicinal sucrose faces some challenges, such as the slow development of preparation technology, single variety, and the insufficient output of high-quality products. It is urgent to develop novel separation and purification techniques and to apply them to the preparation of medicinal sucrose. Herein, the preparation process, separation and purification methods of medicinal sucrose domestic and abroad are reviewed, and the future development of medicinal sucrose purification technology is also discussed.

Key words: medicinal sucrose; pharmaceutical excipients; high purity; separation and purification techniques; production process

蔗糖的使用和发展可以追溯到几千年前,唐宋期间形成的手工业制糖技术使得糖的品种和质量都达到相当高的水平,此后随着制糖技术的传播,蔗糖的加工制备方法不断发展和演变。尤其是分离纯化技术的广泛应用,使得蔗糖的工业化生产得到快速发展,进而提升了蔗糖的生产效率、产品品质以及产品种类。蔗糖,由一分子葡萄糖的半缩醛羟基和一分子果糖的半缩醛羟基脱水缩合而成。蔗糖味甜,是食品中有营养的甜味剂,且由于其具有渗透作用,可抑菌,常用来保藏食品。药用蔗糖,是制药工业中重要的药用辅料之一,作为矫味剂、赋形剂、键合剂、保湿剂和稳定剂,被广泛应用于药品特别是中成药的口服制剂中[1],在单克隆抗体配方中,蔗糖作为张力调节剂,在注射或滴注药物时通过平衡渗透压可以减小患者的疼痛感[2]。

相较于食品级蔗糖,药用级蔗糖更加注重其安全性,重点关注重金属、钙盐、硫酸盐、还原糖、内毒素等的含量等指标。这些杂质会影响药品的质量,给用药安全带来隐患[3]。蔗糖来源于天然植物,蔗糖中的重金属可能来源于土壤中,钙盐和硫酸盐来源于蔗糖精炼过程,这些盐的存在对后续的蒸发煮糖结晶和成品蔗糖的质量都有不良影响[4]。同时,跟蔗糖性质接近的葡萄糖、果糖、麦芽糖等还原糖掺杂在蔗糖中,在制备或存储过程中,还原糖易导致蔗糖产品颜色加深[5]。植物来源的蔗糖在制备过程中,革兰氏阴性菌细胞坏死或者破坏之后释放出内毒素。内毒素是革兰氏阴

收稿日期:2023-03-07;**网络首发日期**:2023-04-13
作者简介:王刚(1977-),男,浙江镇海人,博士,高级工程师,主要研究方向为生物医药用高端试剂的研发与产业化及企业战略管理、公司治理等。
通讯作者:赵黎明,E-mail:zhaoliming@ ecust.edu.cn。
引用本文:王刚,刘鲁杰,秦建国,等.新型分离纯化技术在药用蔗糖制备工艺中的应用[J].化学试剂,2023,**45**(**7**):10-16。

性菌细胞壁的一种成分,由 O-抗原、核心寡糖和脂质 A 组成,具有耐热性和稳定性[6]。人体对细菌内毒素极为敏感,可产生各种生理反应,注射 2 ng/kg 剂量的内毒素即可导致发热,较高剂量可引发血液循环问题、内毒素休克甚至死亡[7]。因此,使用低内毒素的药用蔗糖代替食品级蔗糖用于医药生产势在必行,开发纯度高、杂质少的药用蔗糖,可以保证药品质量和用药安全。

现阶段,我国医药制剂每年使用药用蔗糖约 50~60 万 t,且随着我国医药行业的发展,药用蔗糖的使用范围和用量将继续逐年增加[1]。国内药用蔗糖行业起步较晚,规范化程度不断提高,行业格局分散,先进分离纯化技术应用不足,导致品种单一,市场竞争激烈,工艺复杂、技术要求高的高端品种依赖进口,比如疫苗用蔗糖。近些年我国生物医药发展迅速,然而该行业却面临着药用辅料被“卡脖子”的挑战。对此,国家《“十四五”医药发展规划》支持国内药用辅料行业高质量发展,满足制剂国际化要求。目前国内进行药用蔗糖的制备工艺和分离纯化技术研究较少,因此开发新型的分离纯化技术应用于药用蔗糖的制备工艺中已迫在眉睫。本文将对目前国内外的药用蔗糖的分离纯化工艺及相关分离纯化技术进行详细阐述,结合不同分离纯化技术的特点,探讨其在药用蔗糖制备过程中的应用,并对未来药用蔗糖制备工艺的发展提出展望。

1　药用蔗糖和普通蔗糖质量指标对比

近年来,我国在医疗用药及药事管理方面对制剂的质量标准渐趋严格,《“十四五”国家药品安全及促进高质量发展规划》和《“十四五”医药工业发展规划》等政策的出台,强调药用辅料标准要紧跟国际标准,促进药品有效满足仿制药一致性评价、制剂国际化等要求。药用蔗糖作为医药工业中重要的药用辅料之一,其质量标准严格按照《中国药典》执行。《中国药典》分别从产品性状、比旋度、硫酸盐含量、还原糖含量、钙盐含量、重金属含量和炽灼残渣的角度对药用蔗糖的质量标准进行了严格的要求,并且记载了详细的检测分析方法。将药用级蔗糖质量标准《中国药典》2020 版[8]与食品级蔗糖质量标准 GB 317—2018 相对比(表 1),发现药用级蔗糖对蔗糖分和还原糖的要求比精制白砂糖的要求稍低,更加注重的是诸如硫酸盐、钙盐、重金属、炽灼残渣等安全性指标。医药级蔗糖产品与分析级(AR)蔗糖相比,其它指标基本没什么变化,但是增加了对细菌内毒素的检测(表 2)。药品作为用于治病救人的特殊商品,产品的安全性应是首要的。因此,使用药用蔗糖是我国制药工业依法生产药品的重要环节。

表 1　药用蔗糖(《中国药典》2020 版)与白砂糖(GB 317—2018)质量指标对比表

Tab.1　Contrast of quality indexes of medicinal sucrose in Chinese Pharmacopoeia (2020 Edition) and white granulated sugar (GB 317—2018)

项目	精制白砂糖	优级白砂糖	一级白砂糖	药用蔗糖
蔗糖分/(g·100 g^{-1})≥	99.8	99.7	99.6	99.6(按比旋度折算)
还原糖分/(g·100 g^{-1})≤	0.03	0.04	0.10	0.10
电导灰分/(g·100 g^{-1})≤	0.02	0.04	0.10	—
干燥失重/(g·100 g^{-1})≤	0.05	0.06	0.07	—
色值(IU)≤	25	60	150	—
混浊度(MAU)≤	30	80	160	—
不溶于水杂质/(mg·kg^{-1})≤	10	20	40	—
二氧化硫/(g·kg^{-1})≤	0.1	0.1	0.1	—
硫酸盐/%<	—	—	—	0.05
炽灼残渣/%<	—	—	—	0.10
钙盐/%<	—	—	—	0.05
重金属/(mg·L^{-1})<	—	—	—	5

表 2　医药级蔗糖和分析级蔗糖质量指标对比表

Tab.2　Contrast of quality indexes of medicinal sucrose and analytical sucrose

检验项目	医药级	分析级
含量/%	98.5	98.5
比旋光	+66.3~+67.0	+66.2~+67.0
干燥失重	≤0.03	≤0.03
澄清度试验	≤4	≤4
水不溶物	≤0.002	≤0.002
灼烧残渣(以硫酸盐计)	≤0.01	≤0.01
氯化物(Cl),%	≤0.000 5	≤0.000 5
酸度(以 H 计)/(mmol·g^{-1})	≤0.000 8	≤0.000 8
硫酸盐(SO_4)/%	≤0.002	≤0.002
铁(Fe)/%	≤0.000 05	≤0.000 05
重金属(以 Pb 计)/%	≤0.000 05	≤0.000 1
还原糖	合格	合格
细菌内毒素/(EU·mg^{-1})	≤0.5	—

2　国内外药用蔗糖分离纯化工艺研究进展

药用蔗糖的分离纯化工艺根据所采用的分离

纯化技术可分为:沉淀法、结晶法、膜分离法、色谱分离法和离子交换法。

2.1 沉淀法纯化蔗糖生产工艺

沉淀法纯化蔗糖生产工艺根据添加澄清剂的不同,分为碳酸法和亚硫酸法。

2.1.1 碳酸法

碳酸法通过在糖汁中加入大量的生石灰和 CO_2,生成碳酸钙作为澄清剂和助滤剂,澄清效率高,产品质量好。如图 1 所示,首先原糖与热浓缩糖浆混合以软化外层晶体,晶体通过离心从糖浆中分离出来,然后该晶体溶解在热水中形成糖液。溶化的糖液通过碳酸法和磷浮法进行纯化,该纯化过程将悬浮的杂质困在更大的颗粒中,更容易从糖液中沉淀分离出来。向溶化的糖中加入二氧化碳和石灰,石灰与二氧化碳生成大量碳酸钙沉淀粒子,它起着吸附杂质和助滤作用。接着将其过滤,过滤设备大都采用压力式叶滤机,过滤介质为合成纤维布。该过程经过两次 CO_2 饱充和过滤、青汁硫漂、浓缩等工序,使蔗汁快速处理,最终达到高效清净的目的[9,10]。

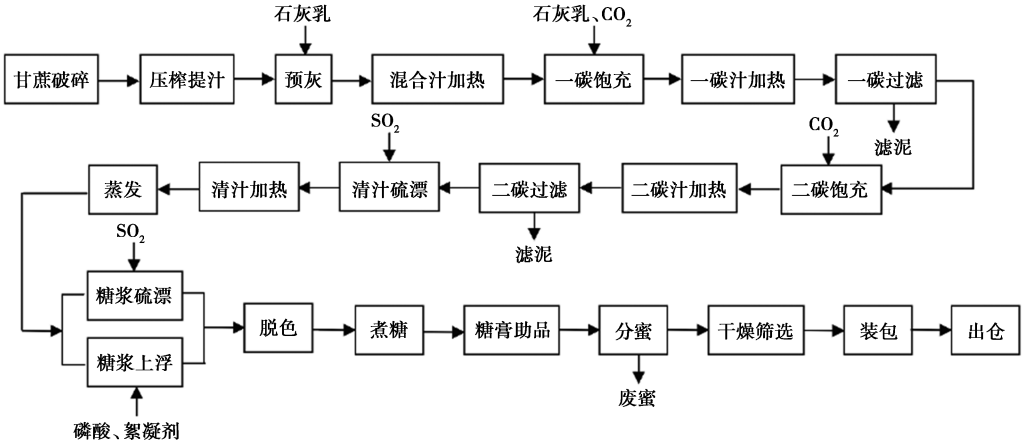


图 1 碳酸法制糖生产工艺流程

Fig.1 Process flow diagram of the preparation of sucrose by carbonate precipitation method

滤出的清糖浆加入磷酸或可溶性磷酸盐和石灰乳,磷酸用量(以五氧化二磷计算)为溶糖量的 0.01%~0.02%,调节糖浆的 pH 为 7.0~7.3,并充入压缩空气及加入絮凝剂,再把糖浆送入上浮清净器。磷酸钙粒子吸附了糖浆的杂质和气泡上浮至液面,形成浮渣从上部排出,清糖浆则从清净器底部排出。用水将浮渣稀释后再经一次上浮清净或过滤以收回浮渣内的糖分。收集清糖浆,通过脱色柱脱色,随后经过高温煮沸浓缩得到清液,最后进行结晶,离心分离,二次蒸煮结晶和离心得到高纯的蔗糖产品[11]。

2.1.2 亚硫酸法

亚硫酸法是用生石灰和 SO_2 为澄清剂的蔗汁澄清方法。虽然该方法较碳酸法生产的蔗糖在色泽和浊度上有些差距,但工艺流程短,如图 2 所示。提高蔗糖质量的关键是要改进蔗汁清净系统。其工艺包括压榨提汁、预加灰、硫熏中和、中和汁沉降、蒸发浓缩、糖浆硫熏、煮糖结晶、分蜜、

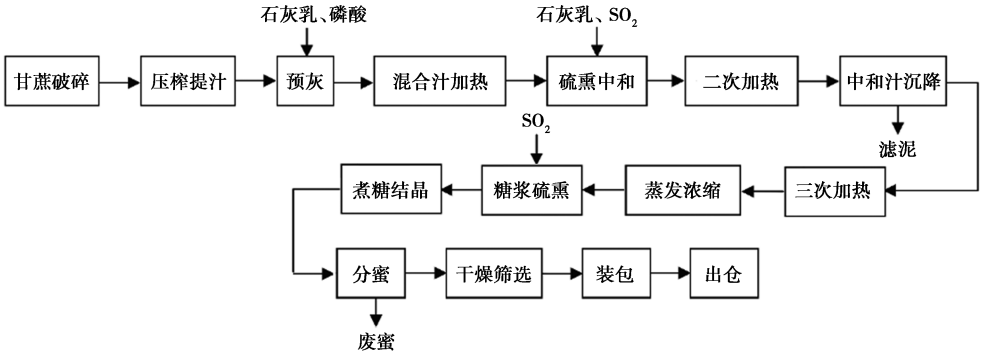


图 2 亚硫酸法制糖生产工艺流程

Fig.2 Process flow diagram of the preparation of sucrose with sulfitation process

干燥冷却、分筛、包装。通过采用中和值自动控制系统并改进燃硫炉设备,以保证有足够的硫熏强度以及稳定的中和反应状态。同时石灰乳有消毒作用,可抑制细菌繁殖,因此采用预加石灰能有效地提高净化效果,采用快速沉降器使蔗汁达到快速处理的目的[12]。为了提高蔗糖品质,仿效碳酸法,将过滤得到的清糖浆,通过磷浮法过程进行纯化,得到高纯的蔗糖产品。

2.2　结晶法纯化蔗糖生产工艺

结晶法是重要的固体产品分离和纯化技术之一,通过重结晶,特别是在不同溶剂中反复结晶,能使产品纯度提高[13]。以食品级蔗糖为原料,采用活性炭脱色、乙醇-水重结晶法制备药用蔗糖[3],工艺流程简图如图 3 所示。相比于沉淀法,该方法操作流程相对简单,具有较强的可操作性[14,15]。对于糖液,活性炭具有优异的脱色效果,能够有效吸附影响蔗糖色值的类黑精、美拉德色素等成分[16,17]。结晶法可以去除蔗糖中的有机非糖组分,同时可以脱盐。连续结晶技术具有结晶率高、运行效率高、节能、操作简便等优点,可以提高药用蔗糖制备过程中的结晶效率、实现连续化生产[18]。

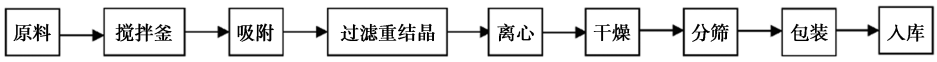


图 3　结晶法制糖生产工艺流程

Fig.3　Process flow diagram of the preparation of sucrose by crystallization method

2.3　膜分离法纯化蔗糖生产工艺

膜分离技术具有低能耗、无相变、操作方便、应用广泛等优点[19]。与其它分离方法相比,膜过滤技术适用于分离热敏性物质,是现代分离技术中一种高效分离手段。常用的膜分离过程有微滤、超滤、纳滤、反渗透,在蔗糖纯化工艺中可应用于糖浆的澄清、脱色、除还原糖、脱盐、浓缩等方面。另外通过膜过滤可以去除试剂中的内毒素和病毒、微生物,保证试剂可用于食品和医药中。目前,膜分离法在蔗糖制备过程中应用的研究工作已经取得了一定的进展。膜分离法结合化学处理、活性炭吸附或树脂吸附等方法,可以用来为蔗糖糖浆脱色[20-22],脱色率达到 99.5%。Luo 等[23]利用超滤膜结合纳滤膜组成的纯化工艺澄清蔗糖糖浆、脱色,并除去葡萄糖、果糖和盐等小分子物质。为了进一步去除小分子还原糖、提高糖浆中蔗糖分,Luo 等[24]开发了纳滤膜渗滤-浓缩的级联生产工艺,通过优化工艺参数使蔗糖的截留率提高到了 95%,还原糖截留率降到了 5%,糖浆中蔗糖含量由 76.1%提高到 87.9%。Sjölin 等[25]利用不同膜组合的方式纯化糖浆,陶瓷膜可以除去糖浆中的悬浮粒子或聚集体等大粒径物质以澄清糖浆,纳滤膜可以去除小分子化合物如葡萄糖、盐及灰分。Qiang 等[26]开发了由陶瓷膜、非极性树脂、纳滤膜组成的集成工艺从糖蜜中回收蔗糖,提高了蔗糖回收率,去除了糖浆中的色素。除去糖浆中的焦糖色素,可以减轻纳滤膜污染,提高纳滤分离过程中的膜通量[27]。膜分离技术在药用蔗糖分离纯化工艺中的应用,为药用蔗糖生产提供一种清洁、可持续的纯化方式,节省能源利用,减少废水排放。

2.4　色谱分离法纯化蔗糖生产工艺

色谱法是一种依据不同组分在固定相和流动相中的作用差异从而将混合物分离成单个组分的分离方法。离子交换树脂与吸附树脂等色谱介质可以通过与待分离组分的离子交换与吸附,达到分离、提纯、浓缩和富集等功能,且分离效率高,使用周期长,不会产生二次污染。近年来,色谱分离技术在我国制糖行业逐步得到广泛应用,用来分离蔗糖组分与非蔗糖组分。模拟移动床是一种连续色谱系统,具有连续进样、分离度高、处理量大、色谱介质和流动相利用率高等特性。Schoenrock 等[28]将模拟移动床技术应用到原糖糖浆的分离纯化过程。在该工艺中,原液为纯度较低的蔗糖溶液,洗脱液为水,提取液为高纯蔗糖溶液,残余液为非蔗糖组分的水溶液。通过这种连续分离的方法不断得到高纯度的蔗糖溶液,该蔗糖溶液经过进一步浓缩结晶就可以得到高纯蔗糖产品。随着模拟移动床技术的进步,利用模拟移动床技术从原糖糖浆中分离得到的蔗糖纯度可以达到 92%,收率 93%[29,30]。色谱法是非常重要且常用的一种分离方法。新型色谱分离介质的开发以及新型色谱分离技术(如模拟移动床等)的应用,将进一步提升药用蔗糖质量,提高生产效率。

2.5　离子交换法纯化蔗糖生产工艺

离子交换法是利用离子交换介质和极性组分之间的化学亲和力的差异进行选择性分离的方法。离子交换法在制糖过程中主要用于糖浆的脱

色、脱盐和除去重金属离子等。糖液中的大多数有色物质为弱酸性有机物,在中性范围内带负电荷,可采用阴离子交换树脂去除带负电荷以及不带电的有色物质[5,31]。糖液中的盐类主要有 K^+、Na^+、Li^+、Ca^{2+}和 Mg^{2+}等,在实际生产中常用阳离子交换树脂和阴离子交换树脂联用,同时脱除盐类和色素,提高糖浆纯度[1]。中粮辽宁糖业在蔗糖生产工艺中过滤脱色环节利用离子交换技术,使蔗糖产品质量得到很大提升。新型离子交换介质的开发,为药用蔗糖制备过程中利用离子交换技术脱色、脱盐和除去重金属离子提供了新的选项。王立升等[32]基于离子交换树脂原理开发的 ZB-1 强酸性阳离子交换纤维柱,可以有效去除蔗糖中重金属杂质,并使蔗糖比旋光度符合药典质量标准。罗永恒[33]将改性豆浆与白砂糖共热煮沸,利用豆浆蛋白在高温下发生热变性后与糖液里的非糖物质结合,不吸附蔗糖,从而达到降低糖液浊度、去除灰分的作用,然后利用壳聚糖/海藻酸钠水滑石吸附柱进行吸附得到粗滤液,壳聚糖/海藻酸钠水滑石吸附柱对糖类物质吸附性小,但能吸附带电荷有色物质、盐类、重金属离子等杂质,最后将粗滤液经过超滤膜过滤,浓缩、结晶,即可得到药用蔗糖。该发明制备的药用蔗糖纯度高,不添加化学原料参与工艺制备,原料利用率高,具有很好的经济效益。

在药用蔗糖制备过程中,不同的分离纯化方法具有不同的优缺点,如表 3 所示。沉淀法技术成熟、纯度高,但纯化工艺效率低,严重限制了药用蔗糖的产量,且实际生产过程中色值和灰分指标不稳定。结晶法虽然操作流程简单,但产品质量不稳定,除杂不彻底,同时糖分转化损失较大。近年来,膜和色谱等新型分离纯化技术的广泛应用,为药用蔗糖制备新工艺的开发提供了更多的选项。膜分离法操作简单,可连续性生产,在杂质分子与目标分子分子量相差较大时分离效果显著,但膜分离技术在药用蔗糖制备过程中的应用存在膜孔不均一、膜易污染等问题,出现蔗糖分子与分子量接近的杂质分子分离效果不好、膜通量下降较快等现象,因此,需要对膜材料的选择、膜分离的传质过程等方面进行深入研究。色谱分离法与离子交换法在我国制糖行业得到了逐步的应用,用于糖浆的脱色、脱盐、脱钙和还原糖及其它非蔗糖组分的分离。其核心分离介质根据是否含有活性功能基团以及含有活性功能基团的种类,分别适用于不同物质的分离、提纯、浓缩和富集等。分离介质(如离子交换树脂和吸附树脂等)具有吸附特异性好、吸附效率高、性质稳定的特点,结构上易于设计,使用范围广,再生简便,使用周期长,这些优势使得色谱分离与离子交换技术应用越来越广泛。但色谱分离法纯化工艺一次性投入成本较高,离子交换法的分离介质需要周期性再生。因此如何将新型的分离纯化方法应用于药用蔗糖的分离纯化工艺中,实现药用蔗糖低成本、高效地制备是我们亟待解决的课题。

表 3 药用蔗糖不同分离纯化方法对比

Tab.3 Comparison of different separation and purification methods for medicinal sucrose

分离纯化方法	应用	优点	缺点
沉淀法(包括碳酸法和亚硫酸法)	糖浆澄清,去除非糖组分	工艺成熟,纯度高,澄清剂可抑菌	流程长,效率低,对仪器设备要求高,产品色值和灰分指标不稳定
结晶法	去除非糖组分	操作流程简单,杂质去除率高	除杂不彻底,产品质量不稳定
膜分离法	脱盐,脱色,去除葡萄糖和果糖等小分子物质	低能耗,操作方便,收率高	对于分子量接近的杂质分子分离效果不好,膜通量下降较快
色谱分离法	分离蔗糖组分和非蔗糖组分	纯度高,收率高	对料液品质要求高,一次性投入成本高
离子交换法	脱盐,脱色	脱盐、脱色效果显著,收率高	分离介质需要周期性再生,废水量大

3 药用蔗糖制备过程中分离纯化技术的应用

目前,以甘蔗或甜菜为原料,通过沉淀法(亚硫酸法和碳酸法)对粗糖汁进行澄清、纯化等工序,可以得到纯度 96%以上的蔗糖晶体。药用蔗糖是在原糖或普通蔗糖的基础上进一步精制所得的高纯蔗糖产品。相比于普通蔗糖,药用蔗糖的分离纯化工艺更加关注重金属、钙盐、硫酸盐、还原糖和内毒素的含量等指标。

沉淀法和结晶法普遍应用于目前的蔗糖分离纯化工艺。沉淀法纯化工艺成熟,添加的澄清剂可有效抑菌,有利于保持制备过程中蔗糖的稳定。采用沉淀法结合磷浮法的分离纯化工艺可以制备高纯的药用蔗糖,纯度高达 99.7%[11]。该工艺流程长,效率低,仪器设备要求高,易出现产品质量波动(色值和灰分指标),在实际生产中需要严格

控制工艺指标。离子交换法脱盐脱色效果显著,在沉淀法(碳酸法)纯化过程中(图 1),饱充后的糖浆会存在一定含量的钙盐,通过引入离子交换系统可实现对糖浆的脱钙处理,同时可以对糖浆进行脱色[4]。膜过滤技术是近年来重要的提纯蔗糖的方法之一。膜分离法是基于筛分原理对不同分子量大小的物质进行分离或浓缩的方法。将膜分离法与沉淀法联用澄清糖浆,可实现浊度降低 99.60%,同时缩短了沉淀法的纯化工艺流程,提升了糖浆的色泽,降低了灰分,取得了良好的澄清效果[34]。利用重结晶法对原糖或普通蔗糖进行精制,可以很大程度提高蔗糖纯度。如图 3 所示,活性炭吸附和重结晶组成的分离纯化工艺制备药用蔗糖,操作流程简单,可以极大降低杂质含量,尤其是细菌内毒素含量。但糖分损失较大,收率在 80%左右[3],而且根据我们的研究发现该分离纯化工艺对于去除还原糖效果不好。连续色谱技术可以高效分离蔗糖组分和非蔗糖组分,刘颖慰等[35]利用连续色谱技术替代传统回收糖重结晶环节,配合传统的结晶工艺,可以完全回收糖蜜中的蔗糖,获得的蔗糖溶液纯度高达 99.5%,避免了糖分损失。而且利用连续色谱技术还可以去除蔗糖溶液中的还原糖。连续色谱技术的应用,提高了分离效率、减少了结晶后糖蜜的排放。

基于不同分离纯化技术的特点,以膜和色谱等为代表的新型分离纯化技术与传统分离纯化工艺可以实现有效地互补,且在药用蔗糖的分离纯化工艺中已经进行了尝试,但尚未应用到大规模的药用蔗糖的制备中。因此如何集成不同的分离纯化技术以开发低成本、高效的药用蔗糖纯化工艺是我们下一步的重要研究方向。

4　总结与展望

药用辅料是药物制剂的重要成分,影响药品质量、安全性和有效性。作为一种重要的药用辅料,药用蔗糖在中成药制剂、生物药制剂等品类都得到了广泛的应用。然而,我国药用蔗糖生产面临分离纯化水平不高、质量相对粗糙、高端品种产能不足的问题,不能满足先进医药制剂的需求,有被“卡脖子”的风险。尽管现有药用蔗糖的生产工艺已经取得了进步,但使用的沉淀法纯化工艺对仪器设备要求较高,流程较长,严重限制了药用蔗糖的产量,结晶法虽然相对操作简单,但质量不够稳定,收率较低。现有膜和色谱等新型分离纯化技术在蔗糖分离纯化中的应用,看起来更具有“实验性”而缺少“实践性”。针对这些问题,在药用蔗糖生产过程中,加强膜和色谱等新型分离纯化技术的实际应用研究,如离子交换系统脱色脱盐,膜分离除去小分子还原糖等;开发集成技术工艺,如将膜分离、色谱分离和连续结晶工艺相结合,利用膜分离将糖浆澄清,提高后续色谱分离的处理量,将色谱分离得到的高纯糖浆通过连续结晶工艺高效获得药用蔗糖产品;提升设备自动化、智能化水平,提高产品质量、保障产品生产过程稳定性。药用蔗糖分离纯化工艺水平的提升,可以拓展药用蔗糖产品种类,避免单一产品激烈竞争,有助于实现我国药用蔗糖产业结构的优化升级和行业的健康持续发展。

参考文献:

[1]王健,陈花山,王宝,等.我国精炼糖厂发展现状、问题及对策[J].中国糖料,2020,**42**:73-80.

[2]吝建华,韩君,徐寒梅.PD-1/PD-L1 免疫检查点抗体药物制剂稳定性开发[J].中国生物工程杂志,2020,**40**(**10**):35-42.

[3]王立升,郭鑫,刘力恒,等.医药级蔗糖制备工艺研究[J].食品科技,2008,**33**(**7**):148-150.

[4]赵亚红,刘琳,杨丽,等.精炼糖厂糖浆脱色与脱钙系统的树脂耦合再生应用研究[J].甘蔗糖业,2022,**51**(**1**):23-28.

[5]龙为,张新林,朱思明,等.糖用树脂对美拉德色素的吸附性能分析[J].食品与发酵工业,2015,**41**(**12**):172-175.

[6]CALABRESE V,CIGHETTI R,PERI F.Molecular simplification of lipid a structure:tLR4-modulating cationic and anionic amphiphiles[J].*Mol. Immunol.*,2015,**63**:153-161.

[7]ZHANG G,WANG T,ZHOU J,et al. Intrinsic mechanisms underlying the highly efficient removal of bacterial endotoxin and related risks in tailwater by dielectric barrier discharge plasma[J].*Water Res.*,2022,**226**:119 214.

[8]国家药典委员会.中国药典(2020 版四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2020.

[9]肖凌,岑跃,傅其军,等.碳酸法糖厂药用辅料蔗糖生产实践探索[J].甘蔗糖业,2015,**3**:66-72.

[10]肖凌,周宣茂,梁拱云,等.一种碳酸法工艺生产药用辅料蔗糖的方法:CN201 410 797 420.7[P].2015-05-13.

[11]郑晓云.精炼糖最佳清净工艺研究[D].北京:中国农业大学,2005.

[12]黄健,韦奇象.新型高效亚硫酸法制糖工艺:CN110 229 934A[P].2019-09-13.

[13]胡祥正,王玲.鹅去氧胆酸重结晶纯化及溶剂对其结晶形态影响研究[J].化学试剂,2020,**42**(**11**):1 361-1 365.

[14]刘孟亚.一种药用蔗糖的生产工艺:CN105 153 245A[P].2015-12-16.

[15]刘群,谭宗华,幸慧,等.一种药用蔗糖的制备方法:CN108 085 424A[P].2018-05-29.

[16]廖炳权.活性炭在制糖清净工艺中的试验研究[D].南宁:广西大学,2015.

[17]盘艳梅,吴海铃,韦巧艳,等.磁性壳聚糖改性对高岭土吸附蔗糖溶液中咖啡酸性能的影响[J].食品与机械,2021,**37**(**8**):7.

[18]周锡文,梁裕,孙小鹏.连续结晶技术在甘蔗糖厂的应用[J].甘蔗糖业,2014,**5**:50-53.

[19]赵黎明.膜分离技术在食品发酵工业中的应用[M].北京:中国纺织出版社,2011.

[20]BERNAL M,RUIZ M O,GEANTA R M,et al.Colour removal from beet molasses by ultrafiltration with activated charcoal[J].*Chem.Eng.J.*,2016,**283**:313-322.

[21]SUSANTO H,ROIHATIN A,WIDIASA I N.Production of colorless liquid sugar by ultrafiltration coupled with ion exchange[J].*Food Bioprod.Process.*,2016,**98**:11-20.

[22]ZHU Z,MHEMDI H,ZHANG W,et al.Rotating disk-assisted cross-flow ultrafiltration of sugar beet juice[J].*Food Bioprocess Tech.*,2016,**9**(**3**):493-500.

[23]LUO J,HANG X,ZHAI W,et al.Refining sugarcane juice by an integrated membrane process:Filtration behavior of polymeric membrane at high temperature[J].*J.Membrane Sci.*,2016,**509**:105-115.

[24]LUO J,GUO S,WU Y,et al.Separation of sucrose and reducing sugar in cane molasses by nanofiltration[J].*Food Bioprocess Tech.*,2018,**11**:913-925.

[25]SJÖLIN M,THUVANDER J,WALLBERG O,et al.Purification of sucrose in sugar beet molasses by utilizing ceramic nanofiltration and ultrafiltration membranes[J].*Membranes*,2020,**10**(**5**):2-17.

[26]QIANG X,LUO J,GUO S,et al.A novel process for molasses utilization by membrane filtration and resin adsorption[J].*J.Clean.Prod.*,2019,**207**:432-443.

[27]GUO S,LUO J,WU Y,et al.Decoloration of sugarcane molasses by tight ultrafiltration:Filtration behavior and fouling control[J].*Sep.Purif.Technol.*,2018,**204**:66-74.

[28]SCHOENROCK K W R,KEARNEY M M,REARICK E.Method and apparatus for the sorption and separation of dissolved constituents:US4 412 866[P].1981-03-26.

[29]GIACOBELLO S,STORTI G,TOLA G.Design of a simulated moving bed unit for sucrose-betaine separations[J].*J.Chromatogr.A*,2000,**872**(**1**):23-35.

[30]SUZUK K,KAWAJIRI Y,MATSUURA N,et al.Sucrose recovery from affination syrup by chromatographic separation[J].*Int.Sugar J.*,2002,**104**(**1 241**):221-227.

[31]邓子成,韦贤爱,李淑贞.离子交换树脂在制糖生产中的应用与研究综述[J].广西糖业,2011,**2**:35-38.

[32]王立升,张阳,李婉媚,等.离子交换纤维制备医药级蔗糖工艺研究[J].安徽农业科学,2011,**39**(**12**):7 113-7 115.

[33]罗永恒.一种医药级蔗糖的制备方法:CN109 438 529A[P].2019-03-08.

[34]LI W,LING G Q,HUANG P,et al.Performance of ceramic microfiltration membranes for treating carbonated and filtered remelt syrup in sugar refinery[J].*J.Food Eng.*,2016,**170**:41-49.

[35]刘颖慰,田博,温惠宇,等.一种甘蔗制糖精炼工艺:CN113 881 815[P].2022-02-19.

有机溶剂纳滤膜在化学品纯化方面的应用进展

罗立汉[b],童奕皓[b],贾蕊[b],韩蕊[b],许振良[b],杨虎[b],徐孙杰[*a,b]
(华东理工大学 a.材料科学与工程学院,b.化工学院,上海　200237)

摘要:有机溶剂纳滤(OSN)过程具有能耗低、无相变、高分离效率、可控性强等优势,广泛应用于化工、医药、食品等行业中。将 OSN 膜应用于各类化学试剂的物质分离、纯化和回收是当前的研究热点。以有机材料膜为主,从整体非对称膜和薄层复合膜两个方向展开,基于传质模型和工程应用对近期研究进展进行了讨论。未来的研究应注重膜材料与结构的耐溶胀和其在不同溶剂中的分离性能不一致性等关键问题,为 OSN 膜的发展与工业应用提供新的思路。

关键词:有机溶剂纳滤;分离;纯化;回收;分离性能不一致性
中图分类号:TQ028　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0258-3283(2023)07-0017-08
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0121

Application Progress of Organic Solvent Nanofiltration Membranes in the Purification of Chemicals

LUO Li-han[b], *TONG Yi-hao*[b], *JIA Rui*[b], *HAN Rui*[b], *XU Zhen-liang*[b], *YANG Hu*[b], *XU Sun-jie*[*a,b] (a. School of Materials Science and Engineering, b.School of Chemical Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Organic solvent nanofiltration (OSN) has advantages such as low energy consumption, no phase change, high separation efficiency, and strong controllability, which is widely used in industries such as chemical, pharmaceutical, and food. The introduction of membrane separation into processes such as separation, purification, and recycling is currently a research hotspot. This article discusses recent research progress in the two directions of overall asymmetric membranes and thin-layer composite membranes based on organic material membranes, combined with mass transfer models and engineering applications. Future research should focus on key issues such as the resistance to swelling of membrane materials and structures and the separation performance inconformity of membrane, providing new ideas for the development and industrial applications of OSN membranes.

Key words: organic solvent nanofiltration; separation; purification; recycling; separation performance inconformity

目前,数百万 t 的有机溶剂用于化工、制药、食品等行业,其中 50%以上的工艺流程涉及分离,例如油水分离、抗生素纯化、牛奶磷脂纯化等[1-3]。在过去的十几年中,制造业越来越关注产生的能耗和污染排放。通过溶剂回收和再循环可以提高工艺的整体效率、降低原料、仓储和污染物排放等成本。传统分离回收过程是通过蒸馏、蒸发和干燥将溶质与溶剂分离。但这些工艺不仅消耗大量能源,而且在高温下还可能降低产品活性。有机溶剂纳滤(OSN)膜可以成为这些分离需求的新方案。膜分离最直接的优势是低能耗,绝大部分膜仅靠压力驱动即可得到优异的分离结果。此外,OSN 膜的模块化可以很好的与工厂中的工艺系统进行关联使用,不用重新设计生产线。

有机溶剂纳滤的概念最早由 Sourirajan 于 1964 年提出,当时使用醋酸纤维素膜分离液态烃混合物,但由于需求量低,直到后十年才引起人们的关注,如图 1 所示[4]。在 1980 年,Exxon、Shell

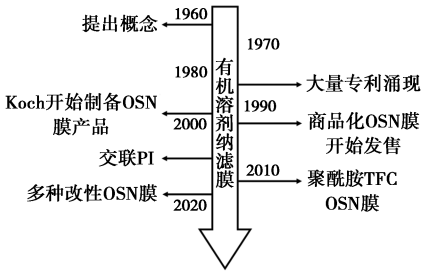


图 1　1960 年后 OSN 膜的发展

Fig.1　Development of OSN membranes after the 1960s

和 Union Carbide 公司以专利的形式大量发表用

收稿日期:2023-02-24;**网络首发日期**:2023-05-06
基金项目:国家重点研发计划项目(2021YFB3801101);国家自然科学基金青年科学基金项目(22208101)。
作者简介:罗立汉(1999-),男,湖南株洲人,硕士生,主要研究方向为有机溶剂纳滤。
通讯作者:徐孙杰,E-mail:chemmembrxsj@ ecust.edu.cn。
引用本文:罗立汉,童奕皓,贾蕊,等.有机溶剂纳滤膜在化学品纯化方面的应用进展[J].化学试剂,2023,**45**(7):17-24。

于过滤有机溶剂的商业膜。

1993 年,Koch 开始发售商业膜 MPF-5 和 MPF-60。1994 年,Exxon-Mobil 公司建造一所大型商业 OSN 工厂并投入使用,用于制备聚酰亚胺(PI)膜[5]。到 2000 年代末,Grace Davison、Koch、Solsep 和 GMT 等公司已经开始供应商业 OSN 膜。同时,2007 年,Toh 等[6]通过 PI 膜与脂肪族二胺的化学交联构建了 OSN 膜,并证明该膜在不同的有机溶剂中稳定,具有良好的分离性能。对公开文献中报道工作的回顾如图 2 所示,OSN 膜在过去十年中受到了越来越多的关注,成为了膜领域的研究热点。

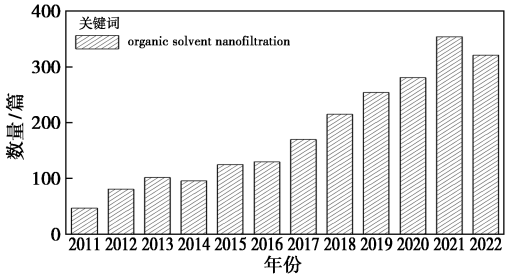


图 2 近十年有机溶剂纳滤膜的文章发表数量

Fig.2 Number of publications on OSN membrane over the past decade

1 膜结构和改性

OSN 技术对膜材料的要求主要有可加工性、化学稳定性、热稳定性、力学性能以及材料成本。聚合物膜材料具有价格低廉和易于加工的特点,已成为主流膜材料,包括聚丙烯腈(PAN)、PI、聚苯并咪唑(PBI)、聚醚醚酮(PEEK)等。这些具有芳香基团或酰胺键的聚合物具有一定的耐溶剂性,并通过相转化法制备整体非对称(ISA)膜,或者使用界面聚合法制备薄层复合(TFC)膜。

1.1 整体非对称膜

ISA 膜制作的原理是相转化。相转化是指将均质的铸膜液通过溶剂的挥发、向溶液中加入非溶剂或者加热等,使液相转化为固相的过程。在相转化制备 ISA 膜过程中,当铸膜液接触非溶剂时,溶剂与非溶剂发生交换,热力学稳定的铸膜液逐渐趋向不稳定状态,然后发生分层形成贫聚合物相和富聚合物相,最后形成膜。在制备过程中,将有机共价框架(COF)、金属-有机框架(MOF)、氧化石墨烯(GO)、碳纳米管(CNT)等不同的纳米颗粒加入铸膜液内,可以提高 OSN 膜的热稳定性、机械强度和耐溶剂性[7,8]。近年来发表的 ISA 膜如表 1 所示。

表 1 近几年发表的 ISA OSN 膜

Tab.1 ISA OSN membranes published in recent years

膜	改性方法	溶质	溶剂	膜分离性能			参考文献
				膜渗透率/($L\cdot m^{-2}\cdot h^{-1}\cdot bar^{-1}$)	截留率/%	运行压力/bar	
PBI	$K_2S_2O_8$ 交联	RB	N,N-二甲基甲酰胺	0.15	~99.0	20	[9]
PTSC	GPTMS 交联	直接红	二甲基亚砜	2.20	100.0	5	[10]
Cu-TCPP/P84	非溶剂诱导相分离	亮蓝 R	乙腈	1.80	>95.0	7	[11]
PEI/PSS-CNT_{10}	交联	RB	乙醇 甲醇 异丙醇 丙酮	2.52 4.21 1.21 4.75	>98.0	5	[12]
PEI/SWCNT_8-GA	交联	RB	丙酮 异丙醇 N,N-二甲基甲酰胺 甲醇 乙醇	4.36 1.16 1.74 3.92 2.17	>99.0	5	[13]
NH_2-SiO_2 MMM	交联	反应红 直接黄 碱性绿 RB 结晶紫	乙醇	1.26	99.9 98.9 91.5 85.5 81.6	15	[14]
UiO-66-NH_2 MMM	交联	亮蓝 R	异丙醇	0.40	~90.0	10	[15]
ZIF-8-PVDF	非溶剂诱导相分离	RB	乙醇 异丙醇	37.00 14.70	99.2 99.5	3	[16]
PPSU/ZIF-8@ RMs	相转化	RB	甲醇	4.17	96.1	10	[17]

Yao 等[11]用一系列四(4-羧基苯基)卟啉 MOFs (Zn,Cu,Co,Ni)(M-TCPP)制备 OSN 膜,过程如图 3 所示。与不含 MOF 的膜相比,含有 MOF 的膜都显示出较高的乙醇通量,对亮蓝 R(BBR)的截留率略低。在制备含 MOF 的膜中,Zn-TCPP/P84 MMM(负载 1% Zn)表现出最大的乙醇通量[1.8 L/(m^2·h·bar)],这可归因于其由皱纹纳米片作为构建组装的花状结构,而 Cu-TCPP/P84 MMM(负载 1.5% Cu)最大乙醇通量为 1 L/(m^2·h·bar),BBR 截留率大于 95%。此外,当 Cu-TCCP MOF 经过超声处理后,分散成复数 Cu-TCPP 纳米片,将 1.5 wt%的纳米片掺入膜中,渗透性能增加 1.5~2 倍,而 BBR 截留率从 95.7%略微下降到 94.7%。总的来说,M-TCCP/P84 对其他溶剂表现出高通量和良好的稳定性,可以用于维生素 B12/乙醇的分离提纯。

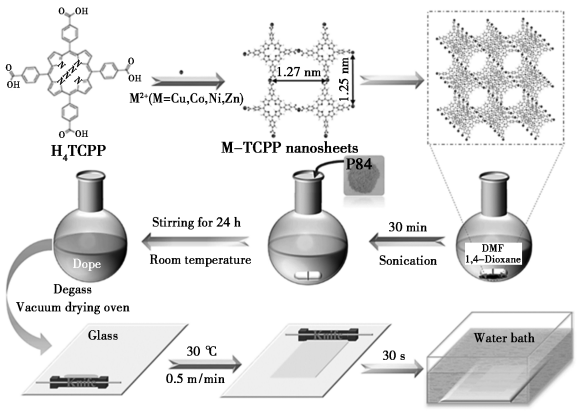


图 3　MMMs 的制造过程示意图,包括 M-TCPP 纳米片的制备、铸膜液的制备和通过刮刀进行制膜[11]

Fig.3　Schematic illustration of the fabrication process of MMMs, including the preparation of M-TCPP nanosheets, the preparation of the dope solution, and membrane casting via a knife casting method[11]

Atefeh 等[16]采用相转化法制备了含有 8% ZIF-25 的 ZIF-8/PVDF OSN 膜,膜在异丙醇(IPA)中对染料 Rose bengal(RB)的截留率达 99.5%,在乙醇(EtOH)中的截留率也达到 99.2%,与不包含 ZIF-8 的 PVDF 膜截留率相比高出约 15%的膜分离性能。

1.2　薄层复合膜

TFC 膜的分离层通过界面聚合制备,利用两种高反应活性单体或者预聚物在两个不相溶的溶剂界面处发生聚合反应,从而形成一层超薄分离层。常见的 TFC 膜主要由无纺布、多孔基膜以及分离层 3 部分组成,如图 4 所示。其中无纺布为膜提供机械强度,多孔基膜为界面聚合提供的支撑,分离层则是界面聚合反应后得到的具有选择性的分离层。

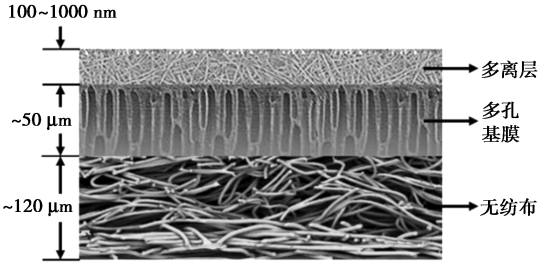


图 4　TFC 膜结构示意图

Fig.4　Schematic diagram of TFC membrane structure

通常,该类膜的分离层组成为各类聚酰胺,常采用多元胺为水相(哌嗪、乙二胺、间苯二胺等),多元酰氯为油相,两者进行反应(均苯三甲酰氯、间苯二甲酰氯)。对于 TFC 膜的制备,可以通过多种方式来控制膜的结构和性质,如调节基膜的结构和性质、反应单体的特性、反应溶液的浓度、反应时间、温度等。

近年来发表的 TFC 膜如表 2 所示。Jia 等[18]通过引入 3 种不同形状(球形、空心管和花状)的 ZIF-8 纳米颗粒对 PES 基膜进行改性,通过在改性基底上合成聚酰胺层来获得 TFC 膜。结果表明,改性 PES 基膜在 IP 反应后增加了 TFC 膜的表面粗糙度,进而增加膜的分离性能。同时,由于 ZIF-8 具有额外孔道,有利于的溶剂通过,与传统 TFC 膜相比,改性 TFC 膜表现出优异的渗透性能和染料分离性能。添加 1.0 wt% ZIF-8 时,3 种膜的纯水通量分别提高了 120%、158%、80%。

Thijs 等[19]利用联萘二酰氯与甲基和丙基以及几种胺单体来研究分子结构对膜性能的影响。随着胺单体浓度的增加,水渗透性能下降而乙腈渗透性能增加。除了优化使用的胺单体,还研究了联萘基团的影响。由甲基连接联萘组成的膜比由丙基连接联萘组成的膜表现出更高的截留率,这表明烷基接头长度的增加会导致更开放的网络结构。此外,所有基于联萘的膜都表现出比传统 TFC 膜更高的渗透性能和截留率。

2　OSN 传质机理和模型

在膜科学研究领域,和膜性能预测相关的膜分离机理研究一直是主流方向,相应的也提出了很多纳滤膜分离机理的模型。现在主流的OSN

表 2 近几年发表的 TFC OSN 膜

Tab.2 TFC OSN membranes published in recent years

膜	改性方法	溶质	溶剂	膜分离性能			参考文献
				膜渗透率/($L\cdot m^{-2}\cdot h^{-1}\cdot bar^{-1}$)	截留率/%	运行压力/bar	
P1d	1,2,4TA. 2HCl/MPD1L-BN-AC 交联	RB	去离子水	2. 2	~92. 0	15	[19]
Noria+TPC	Noria-TPC	高亮 R	甲醇	18. 0	~92. 0	6	[20]
GO-TFN HF OSN	界面聚合	罗丹明 b	乙醇	20. 0	100. 0	1	[21]
PCN-250	溶剂热合成	亚甲基蓝	甲醇 乙醇 N-甲基吡咯烷酮	337. 9 69. 2 17. 2	93. 7	1~5	[22]
PpPD/HPAN NF	原位生长	刚果红	乙醇	242. 0	90. 0	4	[23]
$((PA\ TTSBI)/PI)_{xa}$ OSN	界面聚合	罗丹明 b	乙醇	59. 3	99. 0	5	[24]
TA-MoS_2 TFN	界面聚合	罗丹明 b	N,N-二甲基甲酰胺	219. 1	99. 1	10	[25]
GQD_NH_2@PA	界面聚合	曙红 Y RB	甲醇 N,N-二甲基甲酰胺	11. 1 5. 9	100. 0	10	[26]

传质模型为不可逆热力学模型、孔流模型和溶解-扩散模型。

2.1 不可逆热力学模型

1958 年,Kedem 和 Katchalsky 从不可逆热力学原理出发,分析非电解质通过膜,引入 3 个唯象系数 L_p、P_i、σ_i,把溶质流量 J_i 和总体积流量 J_v 与跨膜的流体压力差 Δp 及渗透压差 $\Delta\pi$ 进行关联,如式 1、2 所示[27]。

$$J_v = L_p(\Delta p - \sigma_i\Delta\pi) \tag{1}$$

$$J_i = P_i\Delta c_i + (1-\sigma_i)J_v\bar{c}_i \tag{2}$$

1966 年,Spiegler 和 Kedem 拓展了沿膜厚度方向的微分形式,如式 3 所示[28]。

$$J_i = -P_i\Delta x(\mathrm{d}c_i/\mathrm{d}x) + (1-\sigma_i)J_v\bar{c}_i \tag{3}$$

其中总体积流量 J_v、进料测和透过测的压力差 Δp 和溶质浓度差 Δc_i 已知,溶剂渗透系数 L_p、溶质渗透系数 P_i、反射系数 σ_i 可通过纯溶剂渗透实验 J_v-Δp 和溶质截留实验 R_i-J_v 求得,其中 R_i 的求解如式 4~6 所示[27]。

$$R_i = [(1-F)\sigma_i]/(1-F\sigma_i) \tag{4}$$

$$F = \exp[-J_v(1-\sigma_i)/\bar{P}_i] \tag{5}$$

$$P_i = \bar{P}_i/l \tag{6}$$

式中,l 为沿径向坐标的膜厚,nm。

由于该模型不考虑膜本身的结构参数,如孔径、厚度等对渗透过程的影响,因此模型的适用范围受限。不可逆热力学模型的计算简单且易于实现,但其忽略了膜本身的结构特性,预测的结果可能与实际情况存在一定的偏差。因此,该模型在实际应用时需要根据实际情况进行修正和补充。

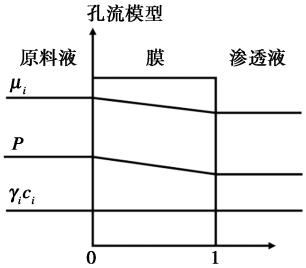
之后基于此模型,研究者们建立了孔流模型和溶解-扩散模型研究有机溶剂和溶质分子跨膜传质与膜结构参数之间的关系。

2.2 孔流模型

孔流模型认为膜内部的溶质分子和溶剂分子的浓度是相同均匀的,跨膜的化学势梯度仅仅和压力的梯度相关,如图 5 所示。针对孔流模型的传质过程,已经有多个经验方程可用于计算溶质通量。这些经验方程考虑了孔道内带电荷的溶质渗透过程以及溶质分子半径与孔径之间的比率,模拟了溶质分子在膜内传递和扩散的阻力[29]。在 OSN 分离中,孔流模型因其计算简单、可预测性强等优点而受到广泛关注。孔流模型如式 7 所示。

$$J_i = k[(p_0 - p_l)/l] \tag{7}$$

式中,k 为渗透系数;l 为膜厚,nm。



μ_i 为化学势;P 为压力;$\gamma_i c_i$ 为溶质浓度

图 5 压力驱动下孔流模型的膜渗透示意图

Fig.5 Schematic for pressure-driven permeation through a membrane according to pore-flow transport models

当纯溶剂通过膜时,由于不存在浓度梯度,得到式 8 的 Hagen-Poiseuille 方程[29]。

$$J_v = (\varepsilon r_p^2/8l\tau)(\Delta p/\eta) = K_{HP}(\Delta p/\eta) \tag{8}$$

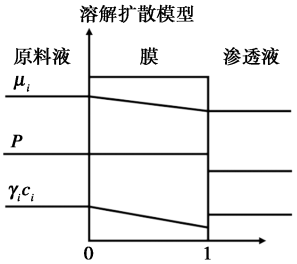
式中,r_p 为孔半径,nm;ε 为孔扭曲率;τ 为孔扭曲度。

为了评估 OSN 膜的结构,研究人员对一系列

有机溶剂纳滤膜在糖类和醇类体系中进行了透过实验,并使用非平衡热力学模型与浓差极化进行回归分析计算膜的特征参数值,如溶质透过系数和膜的反射系数,从而估算膜的结构参数[30]。通过对结果数值进行验证讨论表明孔流模型对于有机溶剂纳滤膜的结构评价是适用的。

2.3　溶解-扩散模型

与孔流模型相同,溶解扩散模型将膜的性质考虑在内,溶质分子和溶剂分子渗透过膜的推动力来源于膜内的化学势梯度的变化,如图 6 所示[31]。该化学势主要是由两部分组成,一部分是电化学势由电动力导致;另一部分是化学势由压力、温度、浓度梯度而导致。



μ_i 为化学势;P 为压力;$\gamma_i c_i$ 为溶质浓度

图 6　压力驱动下溶解-扩散模型的膜渗透示意图

Fig.6　Schematic for pressure-driven permeation through a membrane according to solution-diffusion models

根据费克定律,溶质/溶剂通量如式 9 所示。

$$J_i = -D_i(\mathrm{d}c_i/\mathrm{d}x) = -(RTL_i/c_i)(\mathrm{d}c_i/\mathrm{d}x) \quad (9)$$

式中 D_i 为扩散系数。

考虑到跨膜压力差的存在,溶质/溶剂通量如式 10 所示。

$$J_i = (D_iK_i/l)[c_{i,0} - c_{i,l}e^{-\nu i(p_0-p_l)/RT}] = P_i[c_{i,0} - c_{i,l}e^{-\nu i(p_0-p_l)/RT}] \quad (10)$$

式中 K_i 为吸附系数。

与孔流模型相比,溶解扩散模型对化学势的表达方式有所不同,是通过压力和浓度的变化来统一表达化学势,适用于有着浓度和压力的多种推动力过程[31]。此外,溶解扩散模型的重要假设是溶质分子和溶剂分子在膜内的传递过程是互相独立的,适用于描述均质膜的传质过程。溶解扩散模型中引入了膜内的扩散和对流,以及溶解的过程,通过对这些因素的计算,能够预测膜的传质通量和溶质分离效果,描述均质膜的传质过程。

3　OSN 应用

3.1　化工领域

在化工领域,OSN 膜在溶剂回收、溶质纯化等工艺中被广泛应用。Abhinaba 等[32]通过自制的纳米聚二环戊二烯膜从反式脂肪酸中分离出纯度 99% 的顺式脂肪酸。Xin 等[33]使用商业 OSN 膜 PM280 和 PMS600 回收润滑油生产时使用的脱蜡溶剂(甲苯和甲乙酮的混合物),与多级闪蒸和蒸馏工艺相比,使用 OSN 膜的溶剂回收率不仅在 97%以上,还节省大量的能耗。Tim 等[34]使用 PMS600 用于分离桦木分馏出的木质素油,分离甲醇和乙酸乙酯混合溶剂时,分离系数达到 7.4,且透过液组分中的酚类纯度为 88%,示意图如图 7 所示。

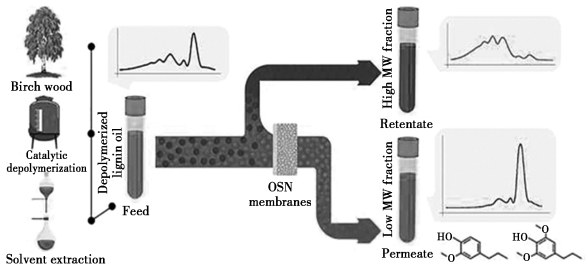


图 7　木质素油分离示意图[34]

Fig.7　Lignin oil separation schematic[34]

Wang 等[35]通过用 α, α′-二溴对二甲苯(DBX)进行共价改性,并用 4-磺酸杯芳烃(SCA8)进行浸渍,开发了用于 OSN 的聚苯并咪唑(PBI)中空纤维膜,用于浓缩 10 wt%的油/丙酮混合物。在 10 bar 下浓缩 30 d,其丙酮通量约为 0.35 L/(m²·h·bar),稳定后油的截留率>99.5%。

Matthew 等[36]利用铜催化的叠氮烯环化(CuAAC)反应,将无定形无序多孔有机笼(ASPOC)与 PI 交联制作 TFC 膜,先聚合物用炔烃部分进行化学官能化,再将 ASPOC 添加到聚合物溶液中,并将薄膜复合物旋涂到 PI 上与 CuAAC 反应交联。结果表明,与未添加 ASPOC 的 PI 膜相比,膜渗透性能上升 79%,对苯乙烯二聚体分离系数上升 159%,并将膜应用在甲苯和三异丙苯的混合物中分离纯化甲苯,分离系数达到了 9.8。虽然在界面聚合反应中加入新材料能提升膜的性能,但是材料制备的复杂程度和成本会限制其工业化应用。

3.2　医药领域

在医药领域中,OSN 膜主要应用在药物活性成分(API)的纯化和溶剂回收两方面。传统 API 纯化例如吸附、萃取等,工艺复杂、能耗高且耗时长,在长时间的纯化过程中 API 容易失活导致良品率降低。在 API 生产过程中,OSN 可以应用于

不同反应步骤之间的合成或下游加工,包括分离(萃取、蒸馏)和颗粒形成单元操作(结晶、过滤、干燥)。

Sun 等[37]将改性后的 ZIF-67 通过原位生长至基膜上,将膜通量提高 67 倍,并对四环素和维生素 B12 的截留率达到 99.6%。Keng 等[38]使用自制的 TFC 中空纤维膜对左氧氟沙星进行单级浓缩处理,浓度为 5 000 mg/L 时,连续运作 9 h 后截留率依然保持在 99.2%,当浓度增加至 20 000 mg/L 时截留率下降至 95%。

Rifan 等[39]使用自制的聚合物 P(4,5-T6GBL)合成 ISA OSN 膜,在甲醇中运行一周后能保持稳定的通量(8.6±0.1)。用于截留橄榄苦甙和罗红霉素时,截留率能达到 87%和 100%。

Shi 等[40]将四(4-甲酰基苯基)甲烷(TFPM)上的醛基与水合肼(HZ)反应制备的 3D COF TFPM-HZ 固定在 PAN 基膜上得到 TFPM-HZ/PAN 膜。该膜对姜黄素、四环素、利福平和维生素 B12 的排斥率分别为~91%、~100%、~95%和~96%。研究者测试了不同的医学活性成分在其膜上的应用,但是都是在相同的溶剂中测试,由于各厂家的工艺不同,同样的成分可能会溶解于不同的溶剂中,因此需要测试在不同溶剂中分离是否有同样的效果。

3.3 食品领域

在食品领域,OSN 膜可用于食品天然成分提纯、粮油食品加工等方面,由于条件温和,对天然活性组分的损失更小[41]。Joana 等[42]提出了一种使用 OSN 膜从杜氏盐藻中回收多样性化合物的综合工艺并拟定了生产方案,通过 matlab 模拟,得到的结果里类胡萝卜素(85%)、甘油(86%)、极性脂质(94%)和蛋白质(95%)的回收率均达到较高值。

Teresa 等[43]提出了一种从乙醇中提取洋蓟苦素的方法。先通过超声辅助提取,再使用 DuraMem200 膜进行纳滤而获得。在超声后,洋蓟苦素的质量损失低于 10%,经过 5 级 OSN 浓缩所获得的提取物洋蓟苦素的质量损失仅为 13.9%,为洋蓟苦素的提纯提出了新的生产方案。高伟等从分离辣椒红素后剩余物中提取糖酯。通过将剩余物溶于有机溶剂后利用 OSN 膜对糖酯进行分离的操作。可实现辣椒红色素提取剩余物中糖酯与杂质成分的有效分离,只需一步操作即可实现糖酯的有效纯化,步骤简单,能耗低,易于实现工业化连续生产[44]。

3.4 回收利用

副产在工业生产中是必定会出现的成分,例如生产中的附属产物、废液、废渣等。随着国家对环保要求的提高,企业随意处理副产的情况慢慢被禁止。因此对副产的回收利用是工业生产过程中的一项重要工作,它不仅可以降低成本,还可以减少对环境的污染。

Carmen 等[45]测试了 9 种商用 OSN 膜,研究了它们在 V(乙醇):V(水)= 50:50 中的稳定性及其处理湿橄榄渣溶剂提取物模型溶液的性能。与其他测试膜相比,DuraMem500、NFX 和 NF270 膜显示出较好的通量(10~100 L/hm)。所选膜对目标酚类化合物表现出低截留率(羟基酪醇低于 10%),对非目标化合物(如糖和有机酸)有着高截留率(50%~100%)。

Varvara 等[46]利用膜组成的过滤系统去除所有脂肪、脂类和固体,同时酚类化合物在浓缩液中被提纯。浓缩物流中的总酚含量为 225 mg/L,通过超滤-纳滤-反渗透三级浓缩过滤,最终流出物中的总含量低于 10 mg/L。最终流出物的化学需氧量(~280 mg/L)远低于进料流(>32 000 mg/L)。现有的商品膜在食品和回收中都有着良好的表现,但有时需要多级处理才能得到需求的浓度含量,因此在设计膜处理系统时也需注重整体的成本大小。

4 总结与展望

目前,OSN 膜作为一种新兴的膜分离技术已经得到了广泛的关注和应用,但是在实际应用中仍然存在一些问题需要解决。首先,由于膜的耐溶胀性较差,随着处理时间的增加,膜会发生溶胀现象,这会导致分离性能下降。更长时间的处理可能会导致分离性能的完全消失,这对于实际应用来说是不可接受的。其次,OSN 膜的分离性能不一致现象也是一个亟需突破的问题。由于膜对不同溶剂中的同一种溶质表现出不同的分离性能,导致分离性能和结果难以预测,限制了其进一步在化学试剂纯化中的应用。为了解决这些问题,在开发新型的 OSN 膜时应对其材质、结构、性能等因素进行更全面的分析,再通过优化膜的结构和制备工艺,降低膜的制备成本和提高膜的稳定性,最终把分离性能不一致的影响降低,从而推

动 OSN 膜在化学试剂纯化应用中的深入发展和广泛应用。

参考文献:

[1] CHEN X W, SUAN Y E Y, JIA Y I W, et al. Lanthanum-doped kaolinite for hierarchical bi-modal porous inorganic membrane[J]. *J. Eur. Ceram. Soc.*, 2017, **37**(**10**): 3 443-3 451.

[2] CHENG X Q, ZHANG C, WANG Z X, et al. Tailoring nanofiltration membrane performance for highly-efficient antibiotics removal by mussel-inspired modification[J]. *J. Membr. Sci.*, 2016, **499**: 326-334.

[3] HUANG Z G, ZHENG H T, CHARLES S B, et al. Production of milk phospholipid-enriched dairy ingredients[J]. *Foods*, 2020, **3**(**9**): 263.

[4] SOURIRAJAN S. Separation of hydrocarbon liquids by flow under pressure through porous membranes[J]. *Nature*, 1946, **203**: 1 348-1 349.

[5] PRISKE M, LAZAR M, SCHNITZER C, et al. Recent applications of organic solvent nanofiltration[J]. *Chem. Ing. Tech.*, 2016, **88**(**1/2**): 39-49.

[6] TOH Y, LIM F W, LIVINGSTON A G. Polymeric membranes for nanofiltration in polar aprotic solvents[J]. *J. Membr. Sci.*, 2007, **301**(**1/2**): 3-10.

[7] MAHDAVI H, KARAMI M. Cross-linked mixed matrix membranes made up of amine-functionalized silica and chloromethylated polysulfone for organic solvent nanofiltration applications[J]. *J. Environ. Chem. Eng.*, 2022, **10**(**2**): 107 145.

[8] THOMAS A M, GROOTH J D, WOOD J A. Synthetic guidelines for highly selective mixed matrix membranes[J]. *J. Membr. Sci.*, 2022, **649**: 120 311.

[9] CHEN D J, YAN C, LI X, et al. A highly stable PBI solvent resistant nanofiltration membrane prepared via versatile and simple crosslinking process[J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2019, **224**: 15-22.

[10] JAMALIAH A, ABDUL-HAMID E, KLAUS-VIKTOR P. Silane-crosslinked asymmetric polythiosemicarbazide membranes for organic solvent nanofiltration[J]. *Macromol. Mater. Eng.*, 2019, **304**(**1**): 1 800 551.

[11] YAO A Y, HUA D, ZHAO F G, et al. Integration of P84 and porphyrin-based 2D MOFs (M-TCPP, M = Zn, Cu, Co, Ni) for mixed matrix membranes towards enhanced performance in organic solvent nanofiltration[J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2022, **282**: 120 022.

[12] CHEN W, MYOUNG J P, DONG H S, et al. Inkjet printed polyelectrolyte multilayer membrane using a polyketone support for organic solvent nanofiltration[J]. *J. Membr. Sci.*, 2022, **642**: 119 943.

[13] CHEN W, MYOUNG J P, RALPH R G, et al. Novel organic solvent nanofiltration membrane based on inkjet printing-assisted layer-by-layer assembly[J]. *J. Membr. Sci.*, 2022, **655**: 120 582.

[14] HOSSEIN M, MILAD K. Cross-linked mixed matrix membranes made up of amine-functionalized silica and chloromethylated polysulfone for organic solvent nanofiltration applications[J]. *J. Environ. Chem. Eng.*, 2022, **10**: 107 145.

[15] GAO Z F, FENG Y N, MA D C, et al. Vapor-phase crosslinked mixed matrix membranes with UiO-66-NH_2 for organic solvent nanofiltration[J]. *J. Membr. Sci.*, 2019, **574**: 124-135.

[16] ATEFEH K, ALIREZA K, MAHDIE S, et al. Development of mixed matrix ZIF-8/polyvinylidene fluoride membrane with improved performance in solvent resistant nanofiltration[J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2020, **237**: 116 358.

[17] DAI J, LI S S, HE J, et al. Fabrication and characterization of a defect-free mixed matrix membrane by facile mixing PPSU with ZIF-8 core-shell microspheres for solvent-resistant nanofiltration[J]. *J. Membr. Sci.*, 2019, **589**: 117 261.

[18] JIA W, XUAN Z, QU H Q, et al. Rationally regulating the PES substrate by introducing ZIF-8 with tunable shapes for optimal thin-film composite membrane[J]. *Appl. Surf. Sci.*, 2023, **615**: 156 181.

[19] THIJS M, GOETHEM C V, VANKELECOM I, et al. Binaphthalene-based polymer membranes with enhanced performance for solvent-resistant nanofiltration[J]. *J. Membr. Sci.*, 2020, **606**: 118 066.

[20] ZHAI Z, JIANG C, ZHAO N, et al. Polyarylate membrane constructed from porous organic cage for high-performance organic solvent nanofiltration[J]. *J. Membr. Sci.*, 2020, **595**: 117 505.

[21] SU J H, LV X H, LI S X, et al. High separation performance thin film composite and thin film nanocomposite hollow fiber membranes via interfacial polymerization for organic solvent nanofiltration[J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2022, **278**: 119 567.

[22] YU X, FAN W D, VANESSA W, et al. Polycrystalline Iron(Ⅲ) metal-organic framework membranes for organic solvent nanofiltration with high permeance[J]. *J. Membr. Sci.*, 2022, **644**: 120 130.

[23] MA G Q, ZHAO S, WANG Y, et al. Conjugated polyani-

line derivative membranes enable ultrafast nanofiltration and organic-solvent nanofiltration [J]. *J. Membr. Sci.*, 2022, **645**: 120 241.

[24] LI S X, ZHANG R R, YAO Q S, et al. High flux thin film composite (TFC) membrane with non-planar rigid twisted structures for organic solvent nanofiltration (OSN) [J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2022, **286**: 120 496.

[25] LI S X, DU S J, LIU S X, et al. Ultra-smooth and ultrathin polyamide thin film nanocomposite membranes incorporated with functionalized MoS_2 nanosheets for high performance organic solvent nanofiltration [J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2022, **291**: 120 937.

[26] SHEN Q, LIN Y Q, ZHANG P F, et al. Development of ultrathin polyamide nanofilm with enhanced inner-pore interconnectivity via graphene quantum dots-assembly intercalation for high-performance organic solvent nanofiltration [J]. *J. Membr. Sci.*, 2021, **635**: 119 498.

[27] 水雪荣, 李佳骐, 冯炜林, 等. 有机溶剂纳滤膜的研究现状与展望 [J]. 膜科学与技术, 2021, **6**(**41**): 192-201.

[28] MARCHETTI P, SOLOMON M F J, SZEKELY G, et al. Molecular separation with organic solvent nanofiltration: A critical review [J]. *Chem. Rev.*, 2014, **21**(**114**): 10 735-10 806.

[29] 王晓琳. 纳滤膜分离机理及其应用研究进展 [J]. 化学通报, 2001, **2**: 86-90.

[20] SPIEGLER K S, KEDEM O. Thermodynamics of hyperfiltration (reverse osmosis): Criteria for efficient membranes [J]. *Desalination*, 1966, **4**(**1**): 311-326.

[31] LONSDALE H K, MERTEN U, TAGAMI M. Phenol transport in cellulose acetate membranes [J]. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1967, **9**(**11**): 1 807-1 820.

[32] ABHINABA G, NED B B. Separation of cis-Fatty acids from saturated and trans-Fatty acids by nanoporous polydicyclopentadiene membranes [J]. *Appl. Mater. Interfaces*, 2013, **5**: 924-933.

[33] XIN Y S, YIN F X. A combined experimental and molecular simulation study of lube oil dewaxing solvent recovery using membrane [J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2021, **261**: 118 278.

[34] TIM C, ABHISHEK D, ROBIN D B, et al. Extraction of monophenols and fractionation of depolymerized lignin oil with nanofiltration membranes [J]. *Chem. Eng. J.*, 2023, **452**: 139 418.

[35] WANG K Y, CHUNG T S. 3D-macrocycles impregnated polybenzimidazole hollow fiber membranes with excellent organic solvent resistance for industrial solvent recovery [J]. *J. Membr. Sci.*, 2021, **638**: 119 678.

[36] MATTHEW P R, NICHOLAS C B, FINN M G, et al. Organic solvent reverse osmosis using CuAAC-crosslinked molecularly-mixed composite membranes [J]. *J. Membr. Sci.*, 2021, **638**: 119 700.

[37] SUN H, LI X T, WANG N X, et al. Defect engineering on zeolitic imidazolate framework membrane via thermal annealing for organic solvent nanofiltration [J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2023, **310**: 123 220.

[38] KENG S G, CHEN Y F, JENG Y C, et al. Thin film composite hollow fibre membrane for pharmaceutical concentration and solvent recovery [J]. *J. Membr. Sci.*, 2021, **621**: 119 008.

[39] RIFAN H, ROBIN M C, EUGENE Y X C, et al. Sustainable nanofiltration membranes based on biosourced fully recyclable polyesters and green solvents [J]. *J. Mater. Sci. Lett.*, 2022, **2**: 100 016.

[40] SHI X S, ZHANG Z P, YIN C C, et al. Design of Three-dimensional covalent organic framework membranes for fast and robust organic solvent nanofiltration [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2022, **61**: e202 207 559.

[41] MOHAMMAD A W, TEOW Y H, ANG W L, et al. Nanofiltration membranes review: Recent advances and future prospects [J]. *Desalination*, 2015, **356**: 226-254.

[42] JOANA M, CLÁUDIA R, CELINA P, et al. Biorefinery of dunaliella salina: Sustainable recovery of carotenoids, polar lipids and glycerol [J]. *Bioresour. Technol.*, 2020, **297**: 122 509.

[43] TERESA B, DANIELA R, ANA C G, et al. Fractionation of cynara cardunculus ethanolic extracts using dianano-filtration [J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2021, **256**: 117 856.

[44] 高伟, 路姣姣, 齐立军, 等. 一种分离辣椒红素提取剩余物中糖酯的方法: CN113 444 130A [P]. 2021-09-28.

[45] CARMEN M S A, TIM C, BART V B, et al. Feasibility of several commercial membranes to recover valuable phenolic compounds from extracts of wet olive pomace through organic-solvent nanofiltration [J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2023, **305**: 122 396.

[46] VARVARA S, ALEXIS G P, IAKOVOS C I, et al. Treatment of two-phase olive mill wastewater and recovery of phenolic compounds using membrane technology [J]. *Membranes*, 2019, **9**(**2**): 27.

综述与专论

靶向细胞器的次氯酸/次氯酸盐的小分子荧光探针研究进展

李林柯[1],徐俊红[2],麻秋娟*[1],朱楠楠[1],刘淑珍[1]
(1.河南中医药大学 药学院,河南 郑州　450046;2.华北水利水电大学 电气工程学院,河南 郑州　450011)

摘要:次氯酸(HClO)/次氯酸盐(ClO^-)是生物体内重要的活性氧(ROS)之一,其浓度水平与生物体生理和病理进程密切相关。荧光成像分析法由于具有灵敏度高、时空分辨率高和原位实时等优点,已被广泛用于细胞内 HClO/ClO^-的检测。为了在亚细胞水平探究 HClO/ClO^-在相关生理病理过程中的作用机制,科研工作者开发了许多细胞器靶向 HClO/ClO^-的荧光探针。对近五年细胞器靶向 HClO/ClO^-的用于生物成像的小分子荧光探针进行综述,阐述这些荧光探针的设计原理、检测机制和生物学应用,为细胞器靶向 HClO/ClO^-荧光探针的开发和应用提供参考。

关键词:次氯酸/次氯酸盐;细胞器;荧光探针;研究进展;生物成像
中图分类号:O657.3　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0258-3283(2023)07-0025-09
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0045

Recent Advances of Organelle-Targeted Fluorescent Probes for Hypochlorous Acid/Hypochlorite

LI Lin-ke[1], *XU Jun-hong*[2], *MA Qiu-juan**[1], *ZHU Nan-nan*[1], *LIU Shu-zhen*[1](1.School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2.Department of Electrical Engineering, North China University of Water Resources and Electric Power, Zhengzhou 450011, China)

Abstract: Hypochloric acid (HClO)/hypochlorite (ClO^-) is one of the important reactive oxygen species (ROS) in organisms, and its concentration level is closely related to the physiological and pathological processes of organisms. Fluorescence imaging analysis has been widely used for the detection of intracellular HClO/ClO^- due to its advantages of high sensitivity, high spatio-temporal resolution, and real-time in situ. In order to explore the mechanism of HClO/ClO^- in related physiological and pathological processes at the subcellular level, researchers have developed many organelle-targeted HClO/ClO^- fluorescent probes. This article mainly reviewed the latest progress of organelle-targeted fluorescent probes for HClO/ClO^- in the past five years. The design principle, detection mechanism, and biological applications of these fluorescent probes were described in detail, providing references for the development and application of organelle-targeted fluorescent probes for the detection of HClO/ClO^-.

Key words: hypochlorous acid/hypochlorite; organelles; fluorescent probe; recent advances; bioimaging

作为生物体内最重要的活性氧簇(ROS)之一,次氯酸(HClO)/次氯酸盐(ClO^-)是随过氧化物酶(MPO)催化过氧化氢(H_2O_2)和氯离子(Cl^-)所产生的氧化产物,是公认的一种杀菌剂,在先天宿主防御和炎症相关病理状况的调节中起着至关重要的作用[1]。人体体液中 HClO/ClO^-的平均水平约为 200 μmol/L[2]。当 HClO/ClO^-浓度异常时,会使氧化还原稳态失衡,产生致病性氧化应激损伤,引起包括癌症在内的许多疾病[3],比如:阿尔兹海默症、心血管疾病等。因此,实现对生物体中 HClO/ClO^-的实时监测和准确检测具有重要意义。

真核细胞含有亚细胞室,称为细胞器,如线粒体、溶酶体、内质网(ER)、高尔基体等。这些复杂但有序的细胞器在确保细胞生长、增殖、信号转导和凋亡的进程中发挥着重要作用。细胞器的氧化应激反应(OS)在细胞中扮演着重要角色,OS 是由 ROS 和内源性抗氧化剂之间的失衡引起的[4]。HClO/ClO^-作为一种十分重要的 ROS,也是氧化应激可靠的信号生物分子。因此,准确检测细胞器中 HClO/ClO^-在疾病治疗学病理和生理机制探索中起着至关重要的作用。

收稿日期:2023-01-31;**网络首发日期**:2023-04-14
基金项目:国家自然科学基金项目(21807027)。
作者简介:李林柯(1997-),女,河南周口人,硕士生,主要研究方向为化学生物传感。
通讯作者:麻秋娟,E-mail:maqiujuan104@126.com。
引用本文:李林柯,徐俊红,麻秋娟,等.靶向细胞器的次氯酸/次氯酸盐的小分子荧光探针研究进展[J].化学试剂,2023,**45**(**7**):25-33。

近些年,荧光成像探针由于具有灵敏度高、时空分辨率高、原位无损检测以及实时快速检测等优点,在研究亚细胞结构与其中物质的定位及浓度水平的动态变化等方面的应用越来越广泛[5,6]。为了进一步研究 HClO/ClO⁻在细胞中的作用机制,学者们设计并合成了一些细胞器靶向 HClO/ClO⁻的荧光探针。本文主要综述了近五年来细胞器靶向 HClO/ClO⁻的用于生物成像的小分子荧光探针的设计合成与生物成像应用进展。

1 设计靶向细胞器荧光探针的一般方法

细胞器靶向的荧光探针主要包含 3 个部分:细胞器定位基团、荧光基团和识别基团,如图 1 所示。每一种细胞器都有特定的靶向基团。正常情况下,线粒体膜通常具有-180 mV 的电位,由于电泳效应,膜渗透性阳离子化合物将在线粒体中富集,常用的线粒体定位基团常含有正电荷,如三苯基膦阳离子、吡啶阳离子、罗丹明、吲哚等[7]。溶酶体具有酸性的囊泡状结构(pH 4.5~5.5)[8],其中弱碱性化合物可以在溶酶体中积聚,常用溶酶体定位基团为亲脂性的弱碱性基团,如吗啉基团和叔胺基团[9,10]。内质网(ER)是细胞内精细的膜系统,是细胞内最大的细胞器,腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)敏感的 K^+通道主要位于 ER 膜,常用内质网定位基团为对甲苯磺酰胺基团、磺酰脲基团和五氟苯基[11],可以与 ATP 敏感性 K^+通道中的磺酰脲受体结合。

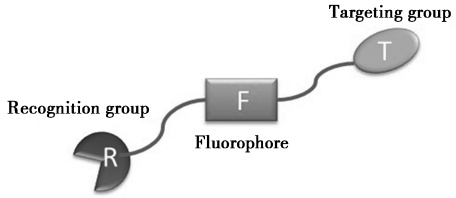


图 1 细胞器靶向型荧光探针的设计示意图

Fig.1 Illustration of designing an organelle-targeted fluorescent probe

2 线粒体靶向 HClO/ClO⁻的荧光探针

以 C═C 为识别基团,Zhang 等[12]以吡啶阳离子为线粒体靶向基团,开发了一种新的基于荧光共振能量转移(FRET)的比率型荧光探针 1,用于检测 HClO/ClO⁻。如图 2 所示,在 420 nm 激发下,探针 1 由于发生了 FRET,在 486 nm 有微弱荧光,609 nm 有较强荧光。当 HClO/ClO⁻存在时,C═C 双键被氧化,探针 1 在 609 nm 处的荧光强度降低,在 486 nm 处的荧光强度增强。并且,探针 1 已成功应用于 RAW264.7 细胞中 HClO/ClO⁻的比率型荧光成像分析。

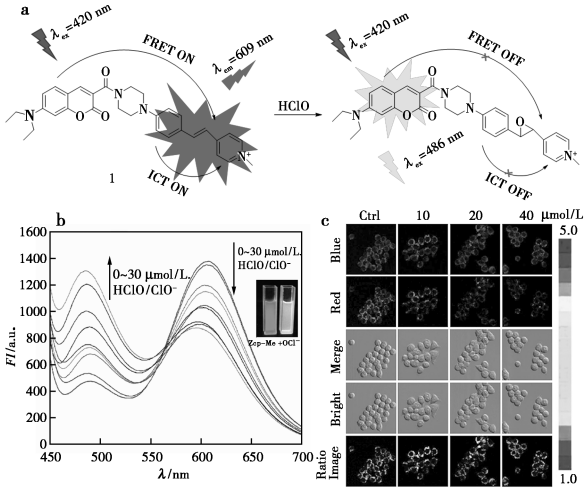


图 2 a.线粒体靶向荧光探针 1 对 HClO/ClO⁻的传感机制;b.探针 1 在不同浓度 HClO/ClO⁻存在时的荧光光谱图;c.探针 1 在 RAW264.7 细胞内检测 HClO/ClO⁻的荧光成像图

Fig.2 a.Sensing mechanism of mitochondria-targeted fluorescence probe 1 to HClO/ClO⁻;b.Fluorescence emission spectra of probe 1 after adding different concentrations of HClO/ClO⁻;c.Confocal imaging of RAW264.7 cells hatched with probe 1 in presence of different concentrations of HClO/ClO⁻

基于硫原子被氧化的机制,Xie 等[13]以三苯基膦为线粒体定位基团,基于二酮吡咯并吡咯和吩噻嗪平台报道了一种新的线粒体靶向的 HClO/ClO⁻荧光探针 2。加入 ClO⁻后,由于吩噻嗪中硫原子被氧化,探针 2 在 615 nm 处荧光强度呈现轻微增加趋势,而位于 420 nm 处的荧光发射强度急剧增加从而实现 HClO/ClO⁻的识别。基于硒原子被转化为硒氧化物的机理,Lv 等[14]设计合成了以三苯基膦为定位基团,1,8-萘酰亚胺为荧光基团,硒代吗啉为识别基团的线粒体靶向 HClO/ClO⁻荧光探针 3,该探针具有选择性好、灵敏度高和响应迅速(<2 s)等特点。基于苯胺被氧化成亚硝基化合物的机制,Zhu 等[15]开发了一种水溶性和线粒体靶向的近红外荧光探针 4,用于检测 HClO/ClO⁻。

基于螺内酰胺开环的机制,Mao 等[16]以三苯基膦(TPP)阳离子为线粒体靶向基团,设计合成了一种线粒体靶向荧光探针 5,用于线粒体内 HClO/ClO⁻的检测。探针 5 具有高灵敏度、高选

择性以及深层组织穿透(230 μmol/L)能力,成功地用于检测细菌感染细胞和炎症小鼠模型中的内源性 HClO/ClO^-。Zhu 等[17]报道了一种由罗丹明、咪唑鎓盐和香豆素基团组成的线粒体靶向荧光探针 6,它对 HClO/ClO^-具有高选择性和灵敏度。探针 6 具有固有的蓝色荧光信号,可以靶向线粒体,揭示线粒体动力学的变化。

以 C═N 为响应基团,Zhao 等[18]构建了一种水溶性的线粒体靶向近红外荧光探针 7,用于检测 HClO/ClO^-。基于香豆素内酯开环机制,Wang 等[19]设计合成了一种靶向线粒体增强型 HClO/ClO^-荧光探针 8。当探针 8 单独存在时,分子内的香豆素内酯呈闭环状态,显示微弱荧光。在加入 HClO/ClO^-后,通过氧化水解将香豆素内酯环打开,荧光增强。以苯硼酸基团为识别基团,Zhang 等[20]设计合成了一种线粒体靶向 HClO/ClO^-荧光探针 9,利用“信号放大器”牛血清白蛋白(BSA)来促进荧光响应,有效地将探针从原来与 HClO 反应后的“关闭”模式转换为比率荧光检测模式,可以将检测限降低至 1.5 nmol/L。基于氧硫杂环脱保护的机制,Li 等[21]制备了一种对 HClO/ClO^-具有高灵敏度、特异性和快速响应的比率型荧光探针 10,探针 10 与 HClO/ClO^-的反应导致了从探针中的“D′-π-D-π-D′”到产物中的“A-π-D-π-A”(D/D′:电子供体,A:电子受体)的推拉跃迁,提高了分子内电荷转移(ICT)效率。基于 HClO/ClO^-促进三唑吡啶形成的机制,Teng 等[22]设计了一种新型线粒体特异性和“环保”型荧光探针 11,使用 TPP 作为靶向基团,用于现场和实时监测 HClO/ClO^-,并且成功应用于 HepG2 细胞和斑马鱼中线粒体的内源性 HClO/ClO^-成像。基于(2-氨基乙基)硫脲基团为识别位点,吡啶阳离子为线粒体靶向基团,Xu 等[23]设计合成了一种用于靶向线粒体 HClO/ClO^-的荧光探针 12。

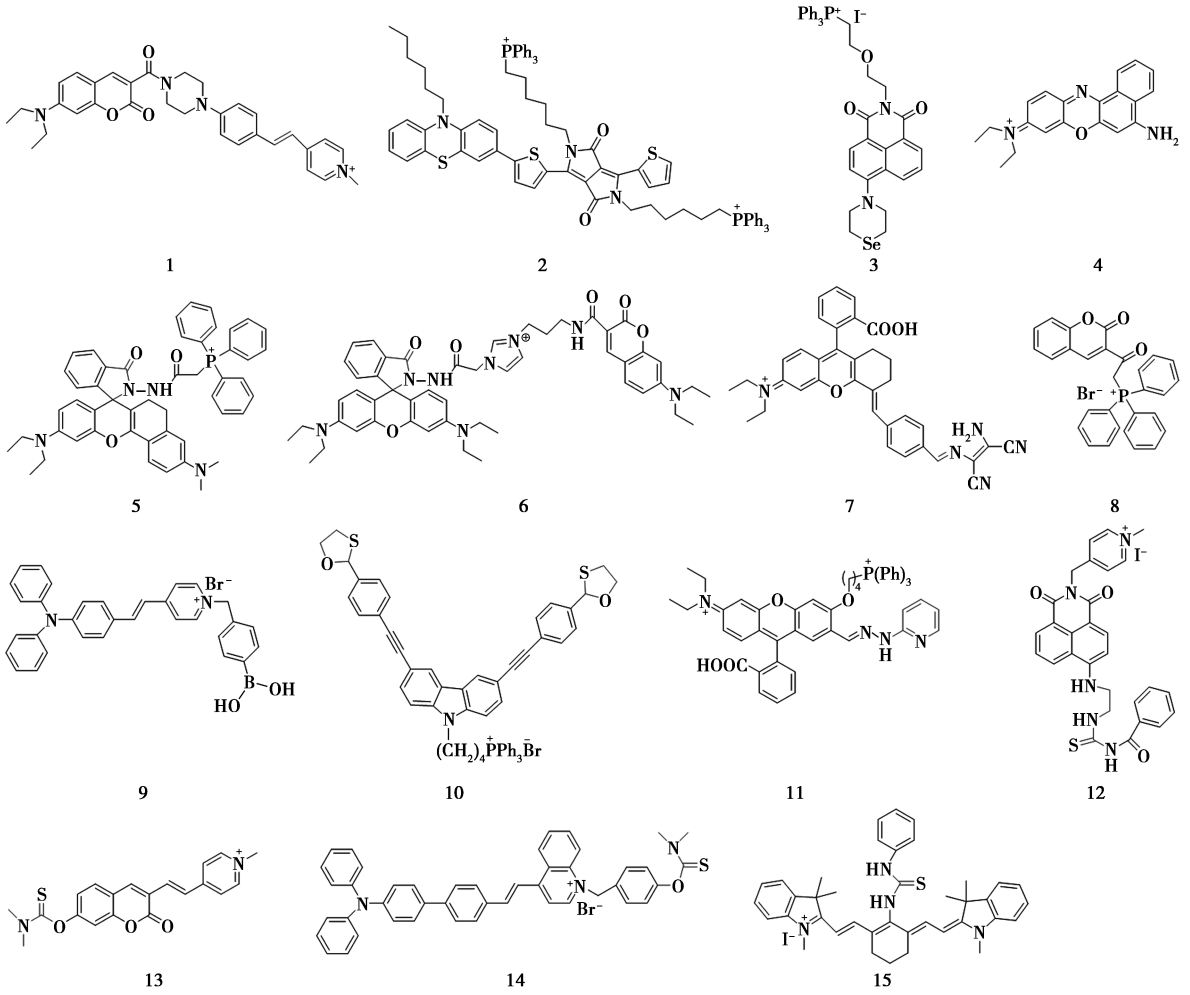


图 3　线粒体靶向的 HClO/ClO^-荧光探针 1~15 的结构式

Fig.3　Structural formula of mitochondria-targeted fluorescent probes 1~15 for HClO/ClO^-

以二甲氨基硫代甲酸酯为识别位点，Huo 等[24]以吡啶阳离子为线粒体识别基团设计合成了一种线粒体靶向荧光探针 13 来检测 HClO/ClO⁻，在 HClO/ClO⁻的存在下，探针 13 荧光增强。Mao 等[25]制备了一种基于三苯胺衍生物的新型反应型荧光探针 14，用于检测 HClO/ClO⁻。基于异硫氰酸苯基的硫原子作为 HClO/ClO⁻的特异识别的机制，Huang 等[26]基于 ICT 过程的机理，选择花菁染料作为荧光基团，构建了一种新的 HClO/ClO⁻比率型荧光探针 15。探针 15 对 HClO/ClO⁻的比率荧光响应信号快（<7 s）、具有高选择性、高灵敏度以及大的斯托克位移（278 nm）等优点，且肉眼很容易观察到反应前后的颜色变化。线粒体靶向的 HClO/ClO⁻荧光探针 1～15 的结构式如图 3 所示。

3 溶酶体靶向 HClO/ClO⁻的荧光探针

基于螺内酰胺环化的机制，Shen 等[27]通过跨键能量转移（TBET）策略合成了靶向溶酶体的 HClO/ClO⁻的比率型荧光探针 16，自由探针以非荧光螺环形式存在，TBET 过程没有发生。探针仅显示咪唑并[1,5-a]吡啶基团的荧光。如图 4 所示，当加入 HClO/ClO⁻后，咪唑并[1,5-a]吡啶的发射和罗丹明部分的发射都出现了，表明噁二

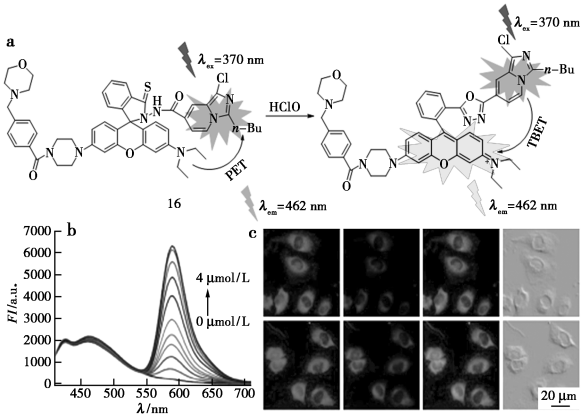


图 4 a.溶酶体靶向荧光探针 16 对 HClO/ClO⁻的传感机制；b.探针 16 在不同浓度 HClO/ClO⁻存在时的荧光光谱图；c.探针 16 在 RAW264.7 细胞内检测 HClO/ClO⁻的荧光成像图

Fig.4 a.Sensing mechanism of lysosome-targeted fluorescence probe 16 to HClO/ClO⁻; b.Fluorescence emission spectra of probe 16 after adding different concentrations of HClO/ClO⁻; c.Confocal imaging of RAW264.7 cells hatched with probe 16 in presence of different concentrations of HClO/ClO⁻

唑的形成和 TBET 过程的发生。同理，Mao 等[28]首次报道了一种用于溶酶体 HClO/ClO⁻成像的近红外荧光探针 17。探针 17 是罗丹明衍生物为荧光团，吗啉单元作为溶酶体靶向基团，HClO/ClO⁻介导的环化反应作为响应机理。

基于螺内酰胺开环的机制，Ren 等[29]结合光笼技术和传统的分析物响应型荧光探针的优势，设计合成了首个以光笼溶酶体为靶标的 HClO/ClO⁻荧光探针 18，能够对溶酶体中的 HClO/ClO⁻进行远程光控识别。在黑暗中，探针 18 由于含有光敏基团，不能检测 HClO/ClO⁻；当暴露于光中时，笼式探针 18 变为非笼式，并转换为传统的活性分析物响应的 HClO/ClO⁻荧光探针，可用于 HClO/ClO⁻检测。利用二甲氨基硫代甲酸酯作为识别位点，Shi 等[30]设计合成了一种新型双激活荧光探针 19，在酸性条件下对 HClO/ClO⁻具有高特异性和快速响应，可成功应用于细菌感染巨噬细胞中产生的溶酶体 HClO/ClO⁻成像。基于硫原子被氧化的机制，Zhou 等[31]构建了一种新的基于萘酰亚胺溶酶体靶向的比率荧光探针 20，其中硫代茴香醚作为 HClO/ClO⁻识别基团，吗啉作为溶酶体靶向基团。基于 C═C 双键响应基团，Chen 等[32]以吗啉作为溶酶体定位基团，选择吩噻嗪作为荧光团构建了基于 ICT 机理的近红外比率型荧光探针 21，用于溶酶体中 HClO/ClO⁻的检测。

以（2-氨基乙基）硫脲基团为识别位点，吗啉用作溶酶体靶向基团，Ma 等[33]设计合成一种基于萘酰亚胺衍生物的新型靶向溶酶体的比率型荧光探针 22，用于监测 HClO/ClO⁻的浓度水平。当探针单独存在时，分子内发生了 ICT 效应，显示出绿色荧光。随着 HClO/ClO⁻的加入，ICT 过程被抑制，导致荧光发射从 533 nm 蓝移到 476 nm。基于 C═N 的响应机制，Huang 等[34]设计合成了一种基于 BODIPY 衍生物的溶酶体靶向荧光探针 23，用于选择性检测 HClO/ClO⁻。由于 C═N 异构化，游离探针显示极弱的荧光。在 HClO/ClO⁻存在下，探针在 530 nm 处的荧光强度显著增强。基于腙螺环开环的响应机制，Wang 等[35]基于 2-甲酰基罗丹明开发合成了一种新型六元罗丹明荧光探针 24，用于检测水和 HUVEC 细胞中的 HClO/ClO⁻。当探针 24 单独存在时，几乎没有荧光。随着 HClO/ClO⁻的加入，氧化探针 24 中的腙部分，诱导六元罗丹明腙螺环的开环反应，在 556 nm 处的荧光强度明显增加，HUVEC 细胞的共定

位染色进一步证实了探针 24 可以特异性地定位在活细胞的溶酶体中。Wu 等[36]以对氨基酚基团为识别基团,吗啉基团作为溶酶体定位基团,构建了一种新的基于萘酰亚胺的双光子荧光探针 25 用于 HClO/ClO⁻检测。游离的探针 25 具有低荧光量子产率,这是因为从氨基酚基团到萘酰亚胺部分的扭曲 ICT 效应。加入 HClO/ClO⁻后,探针 25 的荧光增强。Wang 等[37]以吡啶为溶酶体靶向基团,以对氨基苯基醚为识别基团,萘酰亚胺为荧光团,设计合成了一种靶向溶酶体的 HClO/ClO⁻的荧光探针 26。游离的探针显示微弱荧光,在 HClO/ClO⁻存在下,探针 26 荧光增强。

溶酶体靶向的 HClO/ClO⁻荧光探针 16~26 的结构式如图 5 所示。

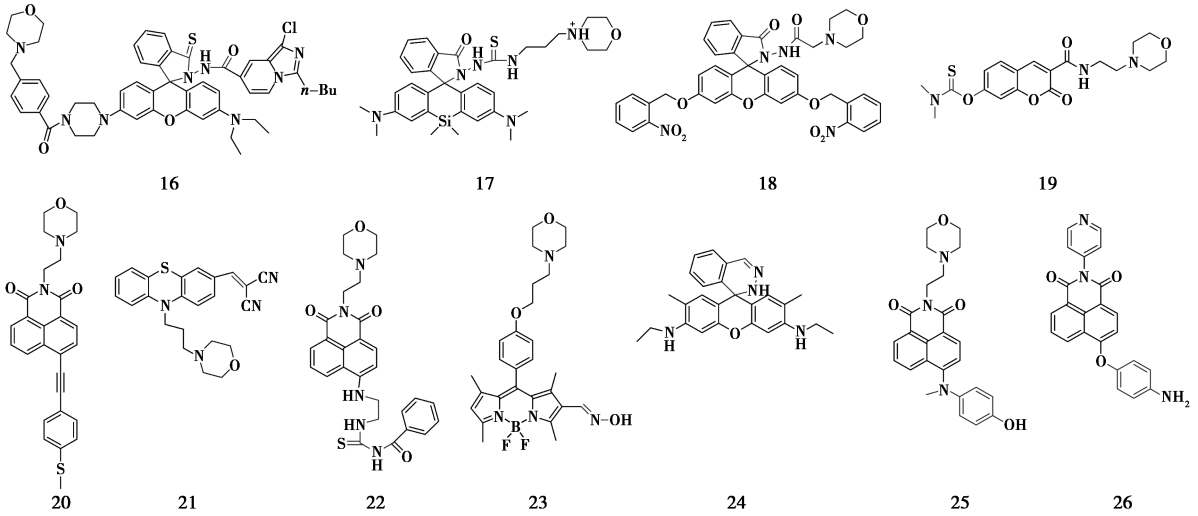


图 5　溶酶体靶向的 HClO/ClO⁻荧光探针 16~26 的结构式

Fig.5　Structural formula of lysosome-targeted fluorescent probes 16~26 for HClO/ClO⁻

4　内质网靶向和高尔基体靶向 HClO/ClO⁻的荧光探针

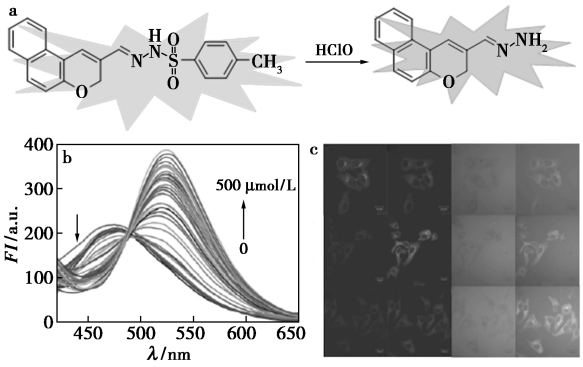


图 6　a.内质网靶向荧光探针 27 对 HClO/ClO⁻的传感机制;b.探针 27 在不同浓度 HClO/ClO⁻存在时的荧光光谱图;c.探针 27 在 Hela 细胞内检测内源性和外源性 HClO/ClO⁻的荧光成像图

Fig.6　a.Sensing mechanism of reticulum-targeted fluorescence probe 27 to HClO/ClO⁻;b.Fluorescence emission spectra of probe 27 after adding different concentrations of HClO/ClO⁻;c.Confocal imaging of Hela cells hatched with probe 27 in presence of exogenous and endogenous HClO/ClO⁻

基于磺酰胺的响应机制,Chang 等[38]以对甲苯磺酰胺为内质网定位基团,报道了一种基于甲苯磺酰腙的 HClO/ClO⁻探针 27。腙与 HClO/ClO⁻反应后经常分解为醛,但是探针 27 与 HClO/ClO⁻反应后发生了磺酰胺键的断裂转化为新的腙类化合物。探针 27 在 475 nm 处显示蓝色荧光发射,在加入 HClO/ClO⁻后 475 nm 处的荧光逐渐降低,同时 525 nm 处的荧光逐渐增强,从而实现对 HClO/ClO⁻的比率型检测。

以 B—H 键为识别位点,Pak 等[39]设计合成了靶向内质网的 HClO/ClO⁻比率型荧光探针 28,并用于 HClO/ClO⁻的特异性检测。游离的探针 28 在 361 nm 显示强荧光,加入 HClO/ClO⁻后,探针在 361 nm 处的荧光降低,在 450 nm 处的荧光增强,和商用内质网染料的共定位系数为 0.92。基于甲硫基被氧化的机制,Song 等[40]提出了一种新型的靶向 ER 的荧光探针 29,用于活细胞中 HClO/ClO⁻的双光子检测。探针 29 选择萘酰亚胺为荧光基团,以对甲苯磺酰胺为内质网定位基团,游离的探针显示出强绿色荧光,加入 HClO/ClO⁻后,甲硫基被氧化为亚砜基,ICT 被抑制,在

502 nm 处的荧光强度降低。以 C═N 双键为识别基团,Hou 等[41]以对甲苯磺酰胺为内质网定位基团,设计合成了一种基于香豆素类的 ER 靶向的比率型荧光探针 30,并应用于 HClO/ClO⁻的传感。探针 30 与 HClO/ClO⁻反应后生成了香豆素酸。Lu 等[42]以二甲氨基硫代甲酸酯作为识别位点,对甲苯磺酰胺作为 ER 特异性基团,萘酰亚胺作为荧光团,设计合成了一种 ER 靶向的荧光探针 31,用于检测 HClO/ClO⁻。

基于 C═C 双键响应基团,Zhang 等[43]设计合成了一种基于苯并咪唑-半花菁的内质网靶向的 HClO/ClO⁻比率型探针 32。以对氨基苯基醚为识别位点,Yang 等[44]构建了新型的开启式双光子可靶向 ER 的荧光探针 33,当 1,8-萘酰亚胺的 4-位被对氨基苯基醚基团取代时,由于增强的光诱导电子转移(PET)效应和抑制的 ICT 过程,其荧光被显著猝灭,加入 HClO/ClO⁻后,荧光显著增强。基于对氨基酚基团为识别位点,Zhang 等[45]设计合成了一个基于萘酰亚胺类的 ER 靶向的 HClO/ClO⁻荧光探针 34。荧光探针 34 与 HClO/ClO⁻反应后,对氨基苯酚基被氧化为胺基,荧光增强。基于硒原子被氧化为硒氧化物的机理,Tang 等[46]以对甲苯磺酰胺作为内质网靶向基团,萘酰亚胺为荧光基团,设计合成了内质网靶向的 HClO/ClO⁻荧光探针 35,与 HClO/ClO⁻反应后探针荧光增强从而检测 HClO/ClO⁻。基于二酰肼被氧化为二亚胺的机制,2022 年 Jiang 等[47]设计合成了一种用于 HClO/ClO⁻检测的 ER 靶向荧光探针 36,当加入 HClO/ClO⁻之后,二酰肼可以被选择性氧化为二亚胺,荧光从黄绿色变为橙色。

以二甲氨基硫代甲酸酯为识别位点,2023 年 Liu 等[48]以苯磺酰胺作为定位基团,设计合成了一种基于萘酰亚胺衍生物的高尔基体定位的荧光探针 37,并用于 HClO/ClO⁻的荧光成像检测。当探针 37 单独存在时,ICT 过程被抑制,显示微弱荧光。随着 HClO/ClO⁻的加入,探针恢复 ICT 过程,在 550 nm 处观察到显著的荧光开启响应。

内质网靶向的 HClO/ClO⁻荧光探针 27~36 的结构式和高尔基体靶向的 HClO/ClO⁻荧光探针 37 的结构式如图 7 所示。

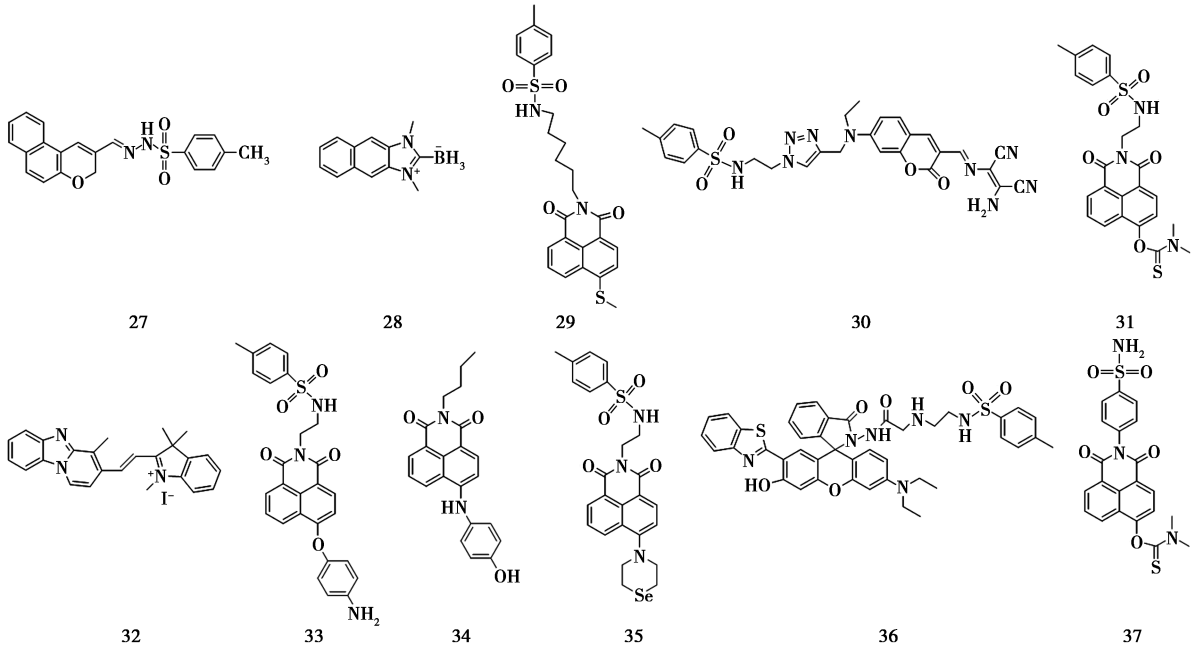


图 7 内质网靶向的 HClO/ClO⁻荧光探针 27~36 的结构式和高尔基体靶向的 HClO/ClO⁻荧光探针 37 的结构式

Fig.7 Structural formula of reticulum-targeted fluorescent probes 27~36 and Golgi-targeted fluorescent probe 37 for HClO/ClO⁻

5 结论与展望

综上所述,本文总结了近五年靶向细胞器的 HClO/ClO⁻小分子荧光探针,并讨论了它们的设计策略、传感机制以及在生物成像中的应用,并且罗列了探针的相关参数。虽然大多数报道的荧光探针显示出良好的特异性和高灵敏度,并在特定细胞器的 HClO/ClO⁻荧光成像中得到了应用,但对其在相关疾病研究中的应用还有很长的路要

表 1　HClO/ClO^-荧光探针的相关参数

Tab.1　Relevant parameters of the HClO/ClO^- fluorescent probes

探针	细胞器	识别位点	激发波长/发射波长/nm	线性范围/($mol\cdot L^{-1}$)	检出限/($mol\cdot L^{-1}$)	响应时间/s	输出类型
1	线粒体	C═C 键	420/486,609	$0\sim2.0\times10^{-5}$	8.9×10^{-8}	900	比率型
2	线粒体	硫原子	365/420,615	$0\sim4.0\times10^{-5}$	1.9×10^{-7}	600	比率型
3	线粒体	硒代吗啉	405/540	$0\sim6.5\times10^{-6}$	4.8×10^{-9}	<2	增强型
4	线粒体	苯胺键	600/672	$0\sim2.0\times10^{-10}$	1.08×10^{-11}	<5	淬灭型
5	线粒体	螺内酰胺	605/650	$6.0\times10^{-8}\sim1.0\times10^{-5}$	2.5×10^{-8}	60	增强型
6	线粒体	酰肼	543/580	$0\sim1.0\times10^{-6}$	3.8×10^{-9}	50	增强型
7	线粒体	C═N 键	550/667	$0\sim2.0\times10^{-5}$	9.02×10^{-8}	180	增强型
8	线粒体	酯键	418/480	$0\sim8.5\times10^{-6}$	9.86×10^{-8}	<20	增强型
9	线粒体	苯硼酸	462/468,600	$0\sim2.5\times10^{-4}$	1.5×10^{-9}	—	比率型
10	线粒体	氧硫烷环	358/465,525	$0\sim1.0\times10^{-5}$	3.5×10^{-8}	—	比率型
11	线粒体	C═N 键	505/580	$0\sim8.0\times10^{-6}$	2.2×10^{-9}	4	增强型
12	线粒体	(2-氨基乙基)硫脲	370/488	$5.0\times10^{-7}\sim2.5\times10^{-6}$	2.3×10^{-7}	60	增强型
13	线粒体	二甲氨基硫代甲酸酯	465/641	$0\sim1.2\times10^{-4}$	2.8×10^{-9}	<5	增强型
14	线粒体	二甲氨基硫代甲酸酯	450/560	$0\sim1.0\times10^{-5}$	2.07×10^{-8}	—	增强型
15	线粒体	硫原子	373/471,651	$0\sim1.0\times10^{-5}$	3.5×10^{-7}	<7	比率型
16	溶酶体	螺内酰胺	370/462,589	$0\sim3.0\times10^{-6}$	1.02×10^{-8}	<40	比率型
17	溶酶体	螺内酰胺	620/680	$5.0\times10^{-8}\sim1.0\times10^{-5}$	2.0×10^{-8}	240	增强型
18	溶酶体	螺内酰胺	480/525	$0\sim2.5\times10^{-5}$	6.2×10^{-8}	100	增强型
19	溶酶体	二甲氨基硫代甲酸酯	345/451	$0\sim9.0\times10^{-5}$	2.43×10^{-8}	—	增强型
20	溶酶体	硫原子	405/452,638	$0\sim1.0\times10^{-5}$	3.6×10^{-8}	<3	比率型
21	溶酶体	C═C 键	410/500,684	$3.0\times10^{-6}\sim2.4\times10^{-5}$	2.0×10^{-8}	30	比率型
22	溶酶体	(2-氨基乙基)硫脲	380/476,533	$1.0\times10^{-6}\sim1.0\times10^{-4}$	8.0×10^{-7}	90	增强型
23	溶酶体	C═N 键	504/530	$5.0\times10^{-5}\sim1.2\times10^{-4}$	1.65×10^{-8}	60	增强型
24	溶酶体	六元罗丹明腙螺环	533/556	$0\sim1.0\times10^{-5}$	1.2×10^{-8}	18	增强型
25	溶酶体	对氨基酚	432/540	$2.0\times10^{-6}\sim1.0\times10^{-5}$	1.3×10^{-8}	600	增强型
26	溶酶体	对氨基苯基醚	468/560	$0\sim1.0\times10^{-6}$	1.6×10^{-8}	—	增强型
27	内质网	磺酰胺键	400/475,525	$3.0\times10^{-6}\sim1.0\times10^{-5}$	1.01×10^{-8}	360	比率型
28	内质网	B—H 键	326/361,450	—	3.6×10^{-6}	60	比率型
29	内质网	甲硫基	405/502	$0\sim1.0\times10^{-4}$	7.6×10^{-7}	360	淬灭型
30	内质网	C═N 键	425/480,554	$0\sim1.2\times10^{-4}$	5.9×10^{-7}	30	比率型
31	内质网	二甲氨基硫代甲酸酯	460/555	$0\sim3.0\times10^{-5}$	1.3×10^{-7}	120	增强型
32	内质网	C═C 键	475/512,653	$0\sim1.05\times10^{-4}$	5.6×10^{-8}	780	比率型
33	内质网	对氨基苯基醚	450/550	$0\sim3.0\times10^{-5}$	6.2×10^{-9}	60	增强型
34	内质网	对氨基酚	460/540	$1.0\times10^{-6}\sim9.0\times10^{-6}$	3.4×10^{-6}	1 800	增强型
35	内质网	硒原子	417/540	$4.0\times10^{-7}\sim2.4\times10^{-5}$	2.88×10^{-8}	8	增强型
36	内质网	二酰肼	360/515,585	$0\sim1.4\times10^{-4}$	4.0×10^{-8}	<80	比率型
37	高尔基体	二甲氨基硫代甲酸酯	450/550	$5.0\times10^{-7}\sim1.0\times10^{-5}$	5.7×10^{-8}	2	增强型

走。另外,大多数的靶向细胞器的 HClO/ClO^-荧光探针的发射波长分布在紫外和可见光区域,易受到荧光背景的干扰,不利于其在体内的生物成像应用,而具有 NIR 发射或 NIR-Ⅱ发射的 HClO/ClO^-探针可以较好解决这些问题。我们相信,随着化学家和生物学家在不同领域的共同努力,这些问题将在不久的将来得到解决。我们希望这些靶向细胞器的 HClO/ClO^-的荧光探针及其改进的下一代荧光探针将为进一步研究细胞器中 HClO/ClO^-浓度水平与生物体生理和病理进程的关联提供强大的分子工具。

参考文献:

[1]LI L K,HOU Y M,LIU X C,et al.An ICT-FRET-based fluorescent probe for the ratiometric sensing of hypochlorous acid based on a coumarin-naphthalimide derivative [J].*New J.Chem.*,2022,**46**(**14**):6 596-6 602.

[2]SUN J G,XU J H,MA Q J,et al.A highly selective fluo-

rescent probe for hypochlorous acid in living cells based on a naphthalene derivative[J]. *Int. J. Anal. Chem.*, 2022, **2 022**: 7 649 230.

[3] HAYES J D, DINKOVA-KOSTOVA A T, TEW K D. Oxidative stress in cancer[J]. *Cancer Cell*, 2022, **38**(**2**): 167-197.

[4] CHANG K C, LIU P F, CHANG C H, et al. The interplay of autophagy and oxidative stress in the pathogenesis and therapy of retinal degenerative diseases[J]. *Cell Biosci.*, 2022, **12**(**1**): 1-20.

[5] LIN J Y, YANG K, NEW E J. Strategies for organelle targeting of fluorescent probes[J]. *Org. Biomol. Chem.*, 2021, **19**: 9 339-9 357.

[6] 张人杰, 史纪福, 王雪, 等. 汞离子荧光探针的研究进展[J]. 化学试剂, 2022, **44**(**9**): 1 325-1 333.

[7] MODICA-NAPOLITANO J S, APRILLE J R. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells[J]. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2001, **49**(**1/2**): 63-70.

[8] ZHU J L, XU Z, YANG Y, et al. Small-molecule fluorescent probes for specific detection and imaging of chemical species inside lysosomes[J]. *Chem. Commun.*, 2019, **55**(**47**): 6 629-6 671.

[9] VILLAMIL GIRALDO A M, APPELQVIST H, EDERTH T, et al. Lysosomotropic agents: Impact on lysosomal membrane permeabilization and cell death[J]. *Biochem. Soc. Trans.*, 2014, **42**(**5**): 1 460-1 464.

[10] LIU Q, LIU C, JIAO X, et al. Lysosome-targeted near-infrared fluorescent dye and its application in designing of probe for sensitive detection of cysteine in living cells[J]. *Dyes Pigments*, 2021, **190**(**11**): 109 293.

[11] SINGH D, RAJPUT D, KANVAH S. Fluorescent probes for targeting endoplasmic reticulum: Design strategies and their applications[J]. *Chem. Commun.*, 2022, **58**: 2 413-2 429.

[12] ZHANG L J, ZHAO X, YANG D, et al. A new water-soluble and mitochondria-targeted fluorescence probe for ratiometric detection of hypochlorous acid in living cells[J]. *Sens. Actuat. B Chem.*, 2018, **276**: 8-12.

[13] XIE X, WANG J, YAN Y, et al. A new mitochondria-targeted ratiometric fluorescent probe based on diketopyrrolopyrrole for imaging endogenous HOCl in living cells[J]. *Analyst*, 2018, **143**(**23**): 5 736-5 743.

[14] LV X, YUAN X, WANG Y, et al. A naphthalimide based fast and selective fluorescent probe for hypochlorous acid/hypochlorite and its application for bioimaging[J]. *New J. Chem.*, 2018, **42**(**18**): 15 105-15 110.

[15] ZHU B, WU L, ZHANG M, et al. A highly specific and ultrasensitive near-infrared fluorescent probe for imaging basal hypochlorite in the mitochondria of living cells[J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2018, **107**: 218-223.

[16] MAO G J, GAO G Q, LIANG Z Z, et al. Mitochondria-targetable two-photon fluorescent probe with a far-red to near-infrared emission for sensing hypochlorite in biosystems[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2019, **1 081**: 184-192.

[17] ZHU N, GUO X, CHANG Y, et al. A mitochondria-tracing fluorescent probe for real-time detection of mitochondrial dynamics and hypochlorous acid in live cells[J]. *Dyes Pigments*, 2022, **201**: 110 227.

[18] ZHAO X, JIANG Y, CHEN Y, et al. A new "off-on" NIR fluorescence probe for determination and bio-imaging of mitochondrial hypochlorite in living cells and zebrafish[J]. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2019, **219**: 509-516.

[19] WANG Q M, JIN L, SHEN Z Y, et al. Mitochondria-targeting turn-on fluorescent probe for HClO detection and imaging in living cells[J]. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2020, **228**: 117 825.

[20] ZHANG P, ZHANG Q, LI S, et al. Enhanced fluorescence sensing of hypochlorous acid using serum albumin as a signal amplifier[J]. *J. Mater. Chem. B*, 2019, **7**(**8**): 1 238-1 245.

[21] LI L, WANG X, SUN C, et al. Design of a two-photon fluorescent probe for ratiometric imaging of endogenous hypochlorite in mitochondria[J]. *Dyes Pigments*, 2020, **181**: 108 548.

[22] TENG H, TIAN J, SUN D, et al. A mitochondria-specific fluorescent probe based on triazolopyridine formation for visualizing endogenous hypochlorous acid in living cells and zebrafish[J]. *Sens. Actuat. B Chem.*, 2020, **319**: 128 288.

[23] XU J, WANG C, MA Q, et al. Novel mitochondria-targeting and naphthalimide-based fluorescent probe for detecting HClO in living cells[J]. *ACS Omega*, 2021, **6**(**22**): 14 399-14 409.

[24] HUO Y, JI Y, CHEN D, et al. Fast responding of mitochondrial HClO using a coumarin-based fluorescent probe in living cells and zebrafish[J]. *Dyes Pigments*, 2022, **209**: 110 940.

[25] MAO S, DING G, WANG Q, et al. A novel mitochondria-targeted fluorescent sensor for the HOCl/ClO^- detection and imaging application in living cells[J]. *Tetrahedron*, 2022, **123**: 132 983.

[26] HUANG L, SU W, ZHAO Y, et al. Synthesis, molecular docking calculation, fluorescence and bioimaging of mitochondria-targeted ratiometric fluorescent probes for

sensing hypochlorite in vivo[J]. *J. Mater. Chem. B*, 2021, **9**(**11**): 2 666-2 673.

[27] SHEN S L, HUANG X Q, LIN X H, et al. A ratiometric fluorescent probe for lysosomal hypochlorous acid based on through-bond energy transfer strategy[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2019, **1 052**: 124-130.

[28] MAO G J, LIANG Z Z, BI J, et al. A near-infrared fluorescent probe based on photostable Si-rhodamine for imaging hypochlorous acid during lysosome-involved inflammatory response[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2019, **1 048**: 143-153.

[29] REN M, LI Z, NIE J, et al. A photocaged fluorescent probe for imaging hypochlorous acid in lysosomes[J]. *Chem. Comm.*, 2018, **54**(**66**): 9 238-9 241.

[30] SHI L, YANG S, HONG H J, et al. A novel target and pH dual-activatable fluorescent probe for precisely detecting hypochlorite in lysosomes[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2020, **1 094**: 122-129.

[31] ZHOU G, HOU S, ZHAO N, et al. A novel colorimetric and ratiometric fluorescent probe for monitoring lysosomal HOCl in real time[J]. *Dyes Pigments*, 2022, **204**: 110 394.

[32] CHEN X, JIANG D, JIANG C, et al. A novel near-infrared ratiometric fluorescent probe targeting lysosomes for imaging HOCl in vitro and in vivo[J]. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2022, **286**: 121 966.

[33] MA Q, WANG C, BAI Y, et al. A lysosome-targetable and ratiometric fluorescent probe for hypochlorous acid in living cells based on a 1, 8-naphthalimide derivative[J]. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2019, **223**: 117 334.

[34] HUANG C, QIAN Y. A fast-responsed lysosomal-targeted fluorescent probe based on BODIPY with low limit detection for hypochlorous acid and its application of intracellular hypochlorous acid bioimaging[J]. *Opt. Mater.*, 2019, **92**: 53-59.

[35] WANG Z, ZHANG Q, LIU J, et al. A twist six-membered rhodamine-based fluorescent probe for hypochlorite detection in water and lysosomes of living cells[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2019, **1 082**: 116-125.

[36] WU G S, THIRUMALAIVASAN N, LIN T C, et al. Ultrasensitive and specific two-photon fluorescence detection of hypochlorous acid by a lysosome-targeting fluorescent probe for cell imaging[J]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2020, **190**: 113 545.

[37] WANG K, LIU Y, LIU C, et al. A simple pyridine-based highly specific fluorescent probe for tracing hypochlorous acid in lysosomes of living cells[J]. *New J. Chem.*, 2021, **45**(**32**): 14 548-14 553.

[38] CHANG X C, HAN X F, LIU B J, et al. A tosylhydrazone-based probe for the ratiometric fluorescent detection of hypochlorite in endoplasmic reticulum of living cells[J]. *J. Mol. Struct.*, 2022, **1 255**: 132 382.

[39] PAK Y L, PARK S J, SONG G, et al. Endoplasmic reticulum-targeted ratiometric N-heterocyclic carbene borane probe for two-photon microscopic imaging of hypochlorous acid[J]. *Anal. Chem.*, 2018, **90**(**21**): 12 937-12 943.

[40] SONG W, DONG B, LU Y, et al. Development of an endoplasmic reticulum-targeting fluorescent probe for the two-photon imaging of hypochlorous acid (HClO) in living cells[J]. *Anal. Methods*, 2019, **11**(**35**): 4 450-4 455.

[41] HOU J T, KIM H S, DUAN C, et al. A ratiometric fluorescent probe for detecting hypochlorite in the endoplasmic reticulum[J]. *Chem. Comm.*, 2019, **55**(**17**): 2 533-2 536.

[42] LU Y, DONG B, SONG W, et al. An endoplasmic reticulum-targeting fluorescent probe for the imaging of hypochlorous acid in living cells and zebrafishes[J]. *J. Photochem. Photobiol. A*, 2019, **384**: 111 980.

[43] ZHANG L J, NING J Y, MIAO J Y, et al. A new ratiometric fluorescent probe for detecting endogenous HClO in living cells[J]. *New J. Chem.*, 2018, **42**(**4**): 2 989-2 993.

[44] YANG T, SUN J, YAO W, et al. A two-photon fluorescent probe for turn-on monitoring HOCl level in endoplasmic reticulum[J]. *Dyes Pigments*, 2020, **180**: 108 435.

[45] ZHANG M, MA Y H, LI P, et al. Detection of atherosclerosis-related hypochlorous acid produced in foam cells with a localized endoplasmic reticulum probe[J]. *Chem. Comm.*, 2020, **56**(**17**): 2 610-2 613.

[46] TANG Y J, HE S, GUO X F, et al. A redox reversible endoplasmic reticulum-targeted fluorescent probe for revealing the redox status of living cells[J]. *Analyst*, 2021, **146**(**24**): 7 740-7 747.

[47] JIANG C, XU X, YAO C. A ratiometric fluorescence probe for imaging endoplasmic reticulum (ER) hypochlorous acid in living cells undergoing excited state intramolecular proton transfer[J]. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2022, **273**: 121 075.

[48] LIU S Z, XU J H, MA Q J, et al. A naphthalimide-based and Golgi-targetable fluorescence probe for quantifying hypochlorous acid[J]. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2023, **286**: 121 986.

四氧化三铁纳米粒子在酶催化领域的应用研究进展

石婧怡,李兆周*,王耀*,陈秀金,牛华伟,李芳,高红丽
(河南科技大学 食品与生物工程学院,河南省食品绿色加工与质量安全控制国际联合实验室,河南 洛阳 471000)

摘要:Fe_3O_4 纳米粒子(Fe_3O_4 nanoparticles,Fe_3O_4 NPs)具有高比表面积、超顺磁性、易改性和低毒等优点,在固定化酶和仿生催化等领域日益受到重视。综述了 Fe_3O_4 NPs 在固定化酶和模拟酶领域的应用,论述了 Fe_3O_4 纳米酶、Fe_3O_4 固定化酶以及 Fe_3O_4 印迹模拟酶的制备方法和优缺点,探讨了 Fe_3O_4 印迹模拟酶在农用化学品和抗菌药物催化降解、光诱导有机物催化降解、电化学传感信号放大及肿瘤治疗等方面的研究进展,总结了 Fe_3O_4 NPs 在酶催化领域所面临的挑战和未来的发展方向。Fe_3O_4 NPs 的应用越来越广泛,相关的影响因素和作用机理日趋复杂,所涉及的基础理论和技术措施仍需进一步深入研究。

关键词:Fe_3O_4;纳米酶;固定化酶;模拟酶;催化
中图分类号:O631 **文献标识码**:A **文章编号**:0258-3283(2023)07-0034-09
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0197

Research Progress on the Application of Fe_3O_4 Nanoparticles in the Field of Enzyme Catalysis *SHI Jing-yi*, *LI Zhao-zhou**, *WANG Yao**, *CHEN Xiu-jin*, *NIU Hua-wei*, *LI Fang*, *GAO Hong-li* (Henan International Joint Laboratory of Food Green Processing and Quality Safety Control, College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China)

Abstract: With the advantages of high specific surface area, superparamagnetism, easy modification and low toxicity, Fe_3O_4 nanoparticles (Fe_3O_4 NPs) are paying increasing attention in the fields of enzyme immobilization and biomimetic catalysis. The applications of Fe_3O_4 NPs in the fields of enzyme immobilization and mimic enzymes were reviewed. The preparation methods of Fe_3O_4 nanozyme, Fe_3O_4 immobilized enzyme and Fe_3O_4 imprinted mimic enzyme were elucidated. Their advantages and disadvantages were compared and analyzed. Furthermore, the research progress of Fe_3O_4 imprinted mimic enzyme was discussed in the fields of catalytic degradations of agricultural chemicals and antibacterial drugs, photoinduced catalytic degradation of organic substances, electrochemical sensing signal amplification and tumor treatment, etc. Additionally, the facing challenges and future directions were summarized. The application of Fe_3O_4 NPs is becoming more and more widespread and the related influencing factors and mechanisms of action are becoming increasingly complicated. Therefore, the basic theories and technical measures involved in the research still need to be further investigated.

Key words: Fe_3O_4; nanozyme; enzyme immobilization; mimic enzyme; catalysis

磁性纳米材料具有良好的生物相容性、优异的磁性能、低毒性和高比表面积,一直被认为是非常有前途的载体材料,被广泛用于提取、分离和传感识别等领域[1]。其中最常见的是 Fe_3O_4NPs,它粒径小、制备简单、无毒、表面易改性、有超顺磁性,对其特点和应用效果的研究不断深入,具体涉及催化、环境、生物医学和电化学等多个领域[2,3],近年来在固定化酶和模拟酶领域的优势也逐渐显现。

酶是一种由活细胞产生的具有高效催化作用的生物大分子,为解决天然酶稳定性差、在极端条件下易失活等问题,固定化酶技术应运而生。该项技术于 1916 年被 Nelson 和 Griffin 首次发

收稿日期:2023-03-20;**网络首发日期**:2023-04-25
基金项目:河南省优秀青年科学基金项目(202300410121);洛阳市公益性行业科研专项(2202021A);国家自然科学基金项目(31701694,U1504330 和 31702218);河南省青年人才托举工程项目(2020HYTP029);河南省研究生教育改革与质量提升工程项目(HNYJS2020JD06)。
作者简介:石婧怡(1997-),女,河南洛阳人,硕士生,主要研究方向为分子印迹模拟酶。
通讯作者:李兆周,E-mail:ilizhaozhou@126.com;王耀,E-mail:tiger861215@163.com。
引用本文:石婧怡,李兆周,王耀,等.四氧化三铁纳米粒子在酶催化领域的应用研究进展[J].化学试剂,2023,**45**(7):34-42。

现[4],并于 20 世纪 60 年代逐渐发展起来[5]。采用该技术,通过物理或化学手段让酶在固定区域内发挥作用,实现了酶的非均相催化和回收利用。在固定化酶的制备中,Fe_3O_4NPs 已成为特色鲜明的理想载体。

用化学合成方法制备具有类似酶活性的人工模拟酶,是克服天然酶缺点的另一途径。金属纳米颗粒、杂环化合物和分子印迹技术等已成功用于人工模拟酶的构建[6-8]。印迹模拟酶与目标识别物在尺寸、形状和结构上能形成互补,具备特异性识别性能。Fe_3O_4 NPs 与印迹酶结合,可以制备出分解效率高、耐受性强和特异性高的磁性印迹模拟酶。2007 年,Gao 等[9]发现 Fe_3O_4 NPs 具有类似天然过氧化物酶的活性,引起国内外多领域科学家的广泛关注,50 多种不同材料和结构的纳米酶被相继报道,自此开启了无机材料的“纳米酶时代”[10]。随着研究深入,Fe_3O_4 NPs 在模拟酶领域也日益凸显出独特作用和广泛影响。

1　Fe_3O_4 NPs 在固定化酶领域的应用

作为固定酶的新型载体,Fe_3O_4 NPs 具有独特的磁性能,比表面积大,与生物酶结合,既可以更好地从反应体系中分离和回收酶,不需要额外的离心过滤设备;又可以保护生物酶不受外界条件的干扰,提高催化活性,有效避免纳米粒子团聚现象的发生。Fe_3O_4 NPs 载体和酶的结合方式,分为共价结合法、静电吸附法和共价-非共价结合法 3 种。

1.1　共价结合法

通过对 Fe_3O_4 NPs 表面进行改性或包覆其他材料,增加其表面特定基团和结合位点的数量,再与酶蛋白中的氨基、羧基和羟基等基团形成共价连接。采用该方法,酶可以固定在 Fe_3O_4 NPs 载体上,作用力强,不易脱落。Cheng 等[11]对 Fe_3O_4 NPs 表面进行氨基化修饰,以戊二醛为交联剂,与含有氨基的 α-葡萄糖苷酶直接进行共价连接(图 1),用于筛选虎仗提取物中的酶抑制剂。结果表明,固定化酶的热稳定性和 pH 耐受范围较游离酶有所提高,重复利用率大幅提升,7 次重复利用后的催化活性仍可以达到初始值的 66%。

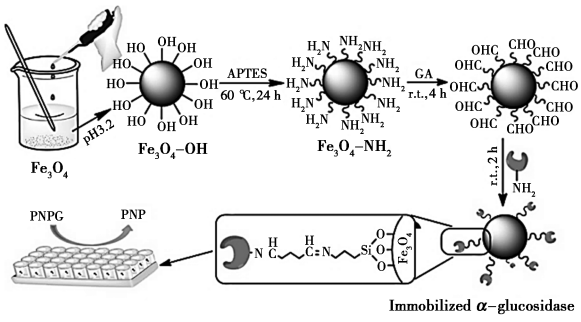


图 1　固定化 α-葡萄糖苷酶的制备及活性测定示意图[11]

Fig.1　Schematic illustration of preparation and activity determination of immobilized α-glucosidase[11]

直接共价键合固定化酶的制备方法简单,但裸露的 Fe_3O_4 NPs 容易氧化、团聚、对酸敏感,进而导致磁性下降、不易与酶结合。在 Fe_3O_4 NPs 外包覆惰性材料是提高其稳定性的理想途径,Dong 等[12]将聚多巴胺包覆在 Fe_3O_4 NPs 外,以双醛淀粉为交联剂,与高地芽孢杆菌酯酶偶联起来,形成共价结合的包覆层,在一定程度上提高了固定化酶的重复利用率,12 次循环后仍能保持 80% 以上的活力。Aghamolaei 等[13]利用修饰了氨基的金纳米粒子与脂肪酶共价结合(图 2),固定化酶的稳定性和重复利用率显著提高,30 d 内仍未损失酶活性,循环使用 6 次后活性仍能达到初始值的 95%。

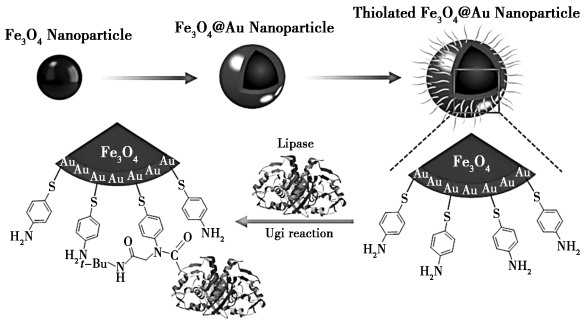


图 2　基于磁性纳米颗粒修饰的功能化脂肪酶[13]

Fig.2　Functionalization lipase based on the chemical modification with magnetic nanoparticles[13]

固定化酶研究过程中,包覆材料对酶性能的影响较大,其中最常用的包覆材料为 SiO_2。Ainiwaer 等[14]分别用交联法、包埋法和共价结合法制备了固定化 Melac13220 漆酶,其中共价结合法采用氨基修饰的 SiO_2 包覆 Fe_3O_4,并与酶进行共价结合。结果显示,共价结合法的固定化效率和回收率最高,经 10 次循环使用后仍保持约 80% 的活性。

1.2　静电吸附法

在静电吸附法制备固定化酶的过程中,酶与载体之间靠正负电荷间的静电引力,不形成共价键,不影响酶的活性位点,载体可重复使用。

Mahto 等[15]以聚苯胺(Polyaniline,PANI)为配体,与磁性介孔二氧化硅(Mesoporous silica,MS)相结合,制备了 PANI-MS@Fe_3O_4 纳米复合材料,利用该材料中的亚胺基和脂肪酶羧基之间的静电吸引,研制固定化脂肪酶。所得固定化酶的活性和耐受性较游离脂肪酶显著提高,重复利用 7 次后,活性仍能保持 70%。Li 等[16]则用羧化壳聚糖包裹 Fe_3O_4 NPs,利用静电吸附来固定化蜗牛酶,用于人参皂苷的转化。在最佳固定化条件下,对酶的最大包被量为 67.67 mg/g。所用的 Fe_3O_4 NPs 有效提升了催化剂的分离和回收效率,固定化蜗牛酶经 7 个循环后仍能保持约 60%的初始催化活性。但静电吸附法对酶的固定能力不强,稳定性差。

1.3 共价-非共价结合法

共价结合法制备的固定化酶结构稳定性强,但容易影响酶活性中心的结构。静电吸附法虽能保持酶结构的完整,但与载体结合的不牢固,易因酶的浸出而导致活性损失,稳定性差。Liu 等[17]首次采用吸附法和共价交联法相结合的方式制备了固定化酪氨酸酶,用于筛选酶抑制剂,他们将酪氨酸酶吸附在氨基化 Fe_3O_4NPs 表面,该方法稳定了酶的构象,然后通过戊二醛共价交联形成稳定的支架结构(图 3),避免了共价和非共价法的缺点,经 5 次循环后活性仍能保持 61%。

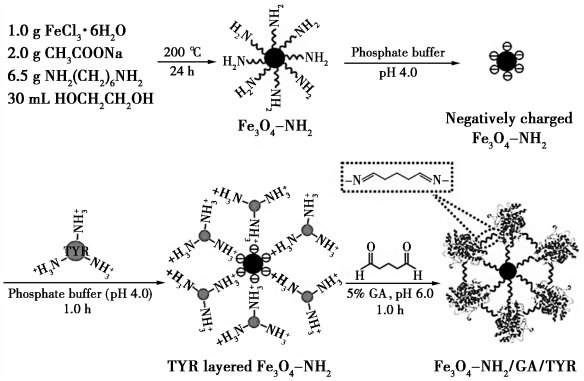


图 3 Fe_3O_4-NH_2/GA/TYR 颗粒制备示意图[17]

Fig.3 Schematic illustration of preparation of Fe_3O_4-NH_2/GA/TYR nanoparticles[17]

有研究人员将吸附法和包埋法结合在一起,提高载体与酶的结合力,进一步增强固定化酶的稳定性。Xia 等[18]用离子液体修饰 Fe_3O_4 NPs,使纳米粒子表面带正电荷,采用静电吸附法将胰脂肪酶固定在其上,最后用海藻酸钙包埋(图 4)。实验测得该固定化酶重复使用 3 次后活性仍能达到 78%。室温保存 5 d 后,活性仍可达到初始活性的 89%。

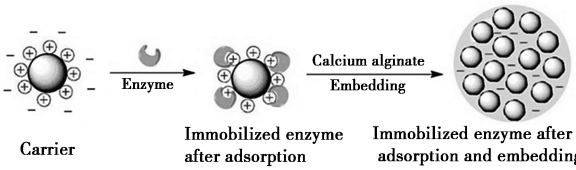


图 4 海藻酸钙包埋法制备固定化酶[18]

Fig.4 Immobilization of the enzyme by using calcium alginate embedding method[18]

2 Fe_3O_4 NPs 在模拟酶领域的应用

早期的模拟酶是由环糊精、杯芳烃、卟啉和葫芦脲等传统杂环化合物通过仿生化学的方法合成[19-21],随着纳米技术和分子印迹技术在模拟酶领域的不断发展,纳米酶和印迹酶成为备受关注的热点。

2.1 Fe_3O_4 NPs 纳米酶

Fe_3O_4 NPs 本身可以直接作为纳米酶用于催化领域,它具有类似过氧化物酶的特性,原理可以总结为芬顿、类芬顿反应或电子转移的过程,在过氧化氢和 3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine,TMB)显色液的存在下,可以催化过氧化氢还原,氧化 TMB 显色,消耗过氧化氢,达到检测或降解有害物质的作用[22]。与天然过氧化物酶相比,Fe_3O_4 NPs 纳米酶具有化学稳定性好、储存方便、制备简单、成本低、易于实现磁性分离等优点。

Fe_3O_4NPs 纳米酶的制备方法主要有共沉淀法、热分解法、溶胶-凝胶法、溶剂热法、微乳液法和微波法等,这几种方法制得的磁性纳米颗粒由于形状、大小及晶型稳定性等不同,在结构和性能方面存在一定的差异,适用于不同的应用领域[23],具体特点见表 1。其中共沉淀法工艺简单,最为常用,但合成的纳米酶粒径较大且不均一。溶剂热法制备的纳米酶粒径小、纯度高,但反应条件复杂。溶胶-凝胶法较易控制粒径的大小,但生产成本高。随着科技的不断进步,不同方法也不断地交叉、渗透和融合。微波辅助加热与溶剂热法的联用可以使 Fe_3O_4 NPs 受热均匀,粒径更小,合成的纳米酶拥有更高的活性,Li 等[24]采用微波辅助溶剂热法,制备了组氨酸修饰的 Fe_3O_4 NPs,作为信号放大器建立电化学免疫传感器,Fe_3O_4 NPs 纳米酶以 TMB 为底物的催化效率

是天然酶的 108 倍。

表 1　Fe_3O_4NPs 常用的制备方法

Tab.1　Frequently used methods for the preparation of Fe_3O_4NPs

制备方法	Fe_3O_4 NPs 特点	反应条件特点	参考文献
热分解法	粒径分布均匀(40~60 nm)、大小可控、分散性好、结晶度高	200~500 ℃高温、氩气等惰性气体参与	[25,26]
共沉淀法	结晶度较差、大小分布不均、分散性难以控制	加热温度低(低于 80 ℃)、操作简单、反应速度快、成本低、产率高	[27,28]
溶剂热法	粒径小(10~50 nm)、形貌好、纯度高、分布均匀	高温高压、设备要求高、难以规模化生产、成本较高(200 ℃、高压反应釜)	[29,30]
溶胶-凝胶法	颗粒结构和尺寸易控制	在进行干燥时容易开裂(150 ℃烘箱)、生产成本高	[31]
微乳液法	形貌和分散性较好	会消耗大量有机试剂、污染严重、成本高、难实现大批量生产	[32]
微波法	粒径小、分布均一、分散性好、表面活性基团丰富	成本低、操作简便(微波炉)	[33]

不同的制备方法和修饰方法合成的 Fe_3O_4NPs 纳米酶的催化效率也有所不同,如表 2 所示。

表 2　Fe_3O_4 NPs 纳米酶的制备方法、催化活性及应用

Tab.2　Preparation methods, catalytic activities and applications of Fe_3O_4 NPs nanoenzymes

纳米酶	制备方法	底物	K_m/(mmol·L^{-1})	V_{max}/(10^{-7} mol·L^{-1}·s^{-1})	应用	参考文献
Fe_3O_4@MoS_2	溶剂热法	TMB H_2O_2	0.250 1.390	1.110 1.630	抗菌剂	[34]
Fe_3O_4@PDA@Pd/Pt	溶剂热法	TMB	0.036	7.948	免疫层析探针	[35]
Co@Fe_3O_4	溶剂热法	TMB H_2O_2	1.170 0.190	3.790 7.150	肿瘤治疗	[36]
Fe_3O_4	溶剂热法	TMB H_2O_2	1.060 56.890	1.680 5.960	肿瘤治疗	[36]
His-Fe_3O_4	微波辅助溶剂热法	TMB H_2O_2	6.220 10.580	1.570 1.459	电化学信号放大	[24]
Fe_3O_4	水热法	TMB H_2O_2	0.220 5.700	0.280 0.570	抗菌剂	[37]
Fe_3O_4-Fe^0/Fe_3C	水热法	TMB H_2O_2	0.880 1.460	5.467 0.568	检测牛奶中的 H_2O_2、降解有机染料	[38]

续表

纳米酶	制备方法	底物	K_m/(mmol·L^{-1})	V_{max}/(10^{-7} mol·L^{-1}·s^{-1})	应用	参考文献
T-MIPneg	共沉淀法	TMB	0.150	0.567	氧化还原反应的高特异性催化	[39]
Fe_3O_4	共沉淀法	TMB	0.295	0.072		
Fe_3O_4-DA-GO	共沉淀法	TMB H_2O_2	0.242 0.089	0.390 0.555	光催化降解农药	[40]
Fe_3O_4	共沉淀法	TMB H_2O_2	0.373 0.355	0.143 0.160	光催化降解农药	[40]

由表 2 可以看出,共沉淀法合成的 Fe_3O_4NPs 对 TMB 的米氏常数(K_m 值)较低,亲和力较好,原因是共沉淀法合成的 Fe_3O_4NPs 粒径较小,所以催化效率较高。

2.2　Fe_3O_4 NPs 印迹酶

分子印迹技术广泛应用于催化领域[41],也是人工模拟酶构建的重要途径。印迹过程中,首先模板与单体以某种相互作用结合在一起,然后交联固定,聚合成分子印迹聚合物(Molecular imprinting polymer,MIP),最后再除去聚合物中的模板分子,此时聚合物中就留下了相应的活性结构和识别位点。由于 MIP 与模板分子结构互补,使其特异性大大增强。如今,MIP 在固相萃取、分离分析、电化学传感器、药物控释和医学诊断分析等领域均有比较成功的应用[42-45],而在酶学领域最重要的应用就是将 MIP 和催化化学结合起来,发展具有高选择性和高催化活性的分子印迹模拟酶。印迹酶相较于固定化酶,具有稳定性更好、抗酸碱能力更强、使用寿命更长等优点。但也存在结合位点分布不均匀以及催化活性位点的可及性较差等缺点[46]。为解决这些问题,将 Fe_3O_4 NPs 和 MIP 结合起来的磁性分子印迹聚合物(Magnetic molecularly imprinted polymer,MMIP)模拟酶被证明是一种更有效的途径,相较于磁性纳米酶来说,MMIP 模拟酶具有选择性强、催化活性高、易于回收和重复利用率高等特点。

2.2.1　制备方法

为了制备粒径均一、大小可控且具有优良磁性能的 MMIP 模拟酶,常用方法有沉淀聚合法、溶胶-凝胶法和表面印迹法。

2.2.1.1　沉淀聚合法

沉淀聚合作为一种非均相的聚合方式,无需稳定剂和表面活性剂,操作简单,制备出的聚合物紧密、粒径小、形态均匀、表面洁净。Arabzadeh 等[47]通过沉淀聚合法,合成了 Fe_3O_4@TiO_2@

MIP 多组分光催化剂,在紫外光下,180 min 内该催化剂对染料柠檬黄的降解率达到 98.7%,而非磁性催化剂 TiO_2-MIP 和裸 TiO_2 的降解率都较低(分别为 68.7%、42.1%)。经 5 次循环应用后,磁性 TiO_2-MIP 的活性仍可保持 93%。实验证明,Fe_3O_4 和 MIP 均可提高 TiO_2 的催化活性,3 种组分的协同作用保证了催化剂的稳定性和重复利用性。为避免聚合物团聚,沉淀聚合一般在稀溶液中进行,但产率低、毒性高。于是,Lin 等[48]开发了一种高压辅助沉淀聚合策略,通过改变单体和交联剂的浓度来精准控制 MIP 层的厚度,大幅减少了有毒溶剂的使用。制备的 MMIP 具有较好的选择识别性和再结合能力,在加热和紫外线的触发下有一定的控释能力,该法为其他 MMIP 材料的合成也提供了新的思路。

2.2.1.2 溶胶-凝胶法

溶胶-凝胶法相对于其他合成方法成本较低,合成过程不需要很高的温度,简便易行,所得的聚合物颗粒的热稳定性较好、孔隙率高。Zhang 等[49]采用溶胶-凝胶法制备了核壳结构的分子印迹羟基磷灰石(Molecularly imprinted hydroxyapatite,MIH)复合光催化剂,用于降解废水污染物西玛津。与非印迹的 Fe_3O_4/SiO_2/羟基磷灰石(Hydroxyapatite,HAP)相比,Fe_3O_4/SiO_2/MIH 的催化活性和选择性显著提高,同一条件下,Fe_3O_4/SiO_2/MIH 的光降解速率约为 Fe_3O_4/SiO_2/HAP 的 2.26 倍。虽然溶胶-凝胶法制备出的聚合物具有较大的比表面积,但结合容量较小,不适合小分子的印迹,聚合过程需时较长。

2.2.1.3 表面印迹法

表面印迹法是在 Fe_3O_4 载体表面进行的聚合反应,解决了其他传统方法合成的聚合物粒径大小不均匀的缺点。同时,表面印迹形成的识别位点位于载体表面,底物更容易接近催化活性位点,避免了印迹位点包埋过深、模板分子不易洗脱的问题[50]。该方法常以 Fe_3O_4 NPs 为核心,在其表面进行印迹,合成核壳型 MMIP,用于选择性识别和分离纯化。磁性粒子不仅能够提高分离效率,还提高了酶的回收率和重复利用率。Mokhtari 等[51]利用表面印迹法,在 Fe_3O_4@SiO_2 表面包覆 MIP 层,研制选择性光催化剂 MMIP@TiO_2,在紫外灯照射下降解柳氮磺胺吡啶(图 5)。结果表明,MMIP@TiO_2 在 10 min 内降解率达到 92%,而非印迹催化剂降解率只有 77%,经 4 次重复利用后,活性仍能保持 63%。MMIP 对 TiO_2 的包覆和修饰显著提高了其催化活性和选择性。

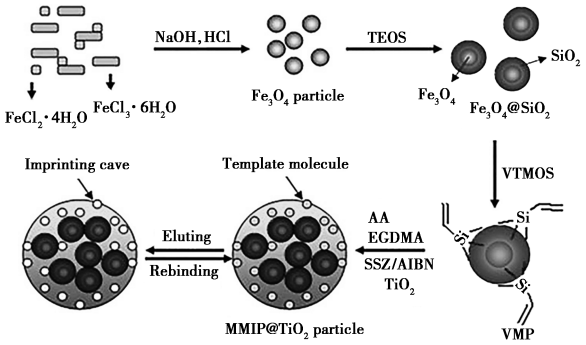


图 5 MMIP@TiO_2 的制备方案[51]

Fig.5 Scheme of preparation of MMIP@TiO_2[51]

对于生物大分子的印迹也常采用上述方法。Guo 等[52]将 SiO_2 包覆在 Fe_3O_4NPs 外,采用表面印迹法印迹了卵清蛋白,制备了新型表面印迹核壳纳米棒(Fe_3O_4@SiO_2/MIP),用于糖蛋白的分离和提取。

值得注意的是,印迹过程是用水溶性分子多巴胺在碱性环境中自聚完成的,这样更利于保持蛋白质的构象和活性。Fe_3O_4@SiO_2/MIP 的结合能力和传质速率优于其他磁性颗粒,该方法不仅创新了生物大分子的印迹识别和催化方法,也为 MMIP 在生物分离中的应用开辟了新的途径。

2.2.2 MMIP 在催化领域中的应用

2.2.2.1 抗菌药物催化降解

MMIP 在催化抗菌药物降解的过程中表现出独特的选择性,为其他物质的高效降解提供了参考。Li 等[53]利用分子印迹技术,以 Fe_3O_4NPs 为核心制备了可快速分离的磁性印迹定向催化剂(Fe_3O_4-DA-MIP)。该方法采用聚多巴胺对 Fe_3O_4 进行修饰,大幅提高了 MMIP 的亲水性,在污水中

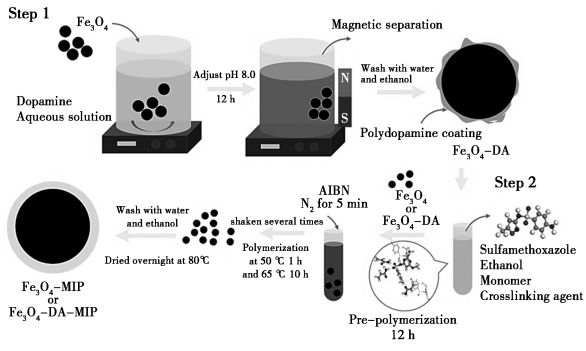


图 6 定向催化合成工艺示意图[53]

Fig.6 Schematic diagram of targeted catalytic synthesis process[53]

磺胺类药物的降解中展示了显著优势(图 6)。

实验结果表明,Fe_3O_4-DA-MIP 可通过吸附和催化双重作用快速去除污水中的磺胺甲噁唑(Sulfamethoxazole,SMX),反应 30 min 后,可将 60%以上的 SMX 降解。该研究为靶向催化剂科学设计和废水中污染物的高效降解提供了新的思路。

2.2.2.2　农用化学品催化降解

农用化学品种类多,降解路径复杂,环境危害大。在农药降解方面,Carboni 等[54]在 Fe_3O_4 NPs 表面包覆 SiO_2 壳,经精氨酸修饰后,再利用分子印迹技术包覆一层有机凝胶外壳,最终得到可以水解有机磷农药的 Fe_3O_4@ SiO_2-MIP,原理如图 7 所示。其中,Fe_3O_4 NPs 可实现磁性快速分离和富集,SiO_2 可用于锚定胍类催化基团,聚丙烯酰胺凝胶壳层可以特异性识别有机磷农药,提高催化活性,加速水解效率。实验证明,该 MMIP 可以高效降解对氧磷,反应速度较空白对照快 50%。

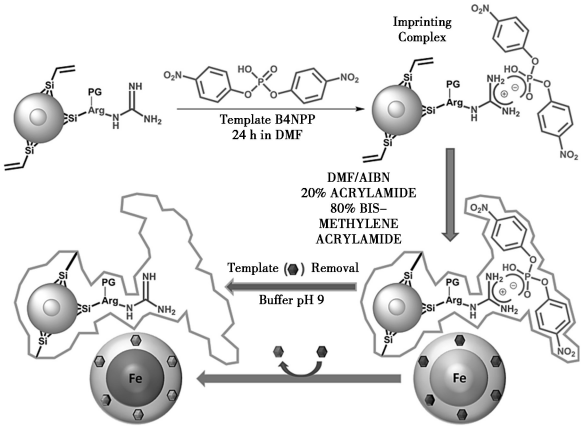


图 7　印迹聚合物的聚合和模板去除过程示意图[54]

Fig.7　Schematic describing the formation of the imprinting polymer and the template removal[54]

对于硝基酚类的农药中间体,Yang 等[55]利用分子印迹技术,以对硝基苯酚(*p*-Nitrophenol,*p*-NP)为模板分子,在氨基化修饰的 Fe_3O_4/SiO_2 核壳粒子表面制备 MIP,在苯酚和 *p*-NP 共同存在下,Fe_3O_4/SiO_2-MIP 的印迹层对目标分子具有选择性识别能力,表现出对 *p*-NP 的优先和高效催化作用,经过 5 次重复使用后,Fe_3O_4/SiO_2-MIP 的回收利用率和降解效率分别为(95.5±2.66)%和(75.3±2.23)%,其易回收性和稳定性为降解硝基酚类剧毒污染物提供了新的途径。

2.2.2.3　光诱导有机物催化降解

降解污染物除了化学氧化的方法,还有生物降解和光催化,显而易见,光催化法更易进行,是无毒、无害、无污染的绿色降解技术。分子印迹技术可有效提高光催化降解的效率和特异性。

二氧化钛(TiO_2)经常作为有机物氧化分解的光催化剂,它具有无毒、不溶于水却亲水、稳定性高且成本低等优点。但 TiO_2 带隙较大,只有在紫外光照射下才能激发其催化活性。MIP 与其相结合,不仅可以极大地提高催化的选择性,也可以使带隙宽度变低,有利于催化活性的提高。Wei 等[56]以 4-硝基苯酚为模板,制备了分子印迹 TiO_2/WO_3 包覆的磁性 Fe_3O_4@ SiO_2 纳米复合材料,用于光催化降解目标污染物。结果表明,印迹模拟酶在可见光下能高效降解 4-硝基苯酚,经 5 次重复使用后降解率几乎不变且易于回收、选择性高。为进一步提高光催化活性,Wang 等[57]采用表面印迹法,将分子印迹 PANI 固定在 Fe_3O_4/ZnO 复合材料上(图 8),所得的 MMIP 光催化剂在可见光照射下可选择性降解废水中的阿莫西林,在同样的底物浓度下,Fe_3O_4/ZnO@ MI-PANI 的催化降解效率是 Fe_3O_4/ZnO 的 2 倍。实验证明,所制备的 MIP 提高了光催化剂的降解效率和选择性,其中的 Fe_3O_4NPs 不仅有助于催化剂的分离和回收,还可以提高光催化能力。Fe_3O_4/ZnO@ MI-PANI 光催化剂的研究和应用为制备具有选择性降解有机污染物能力的分子印迹模拟酶提供了新的思路。

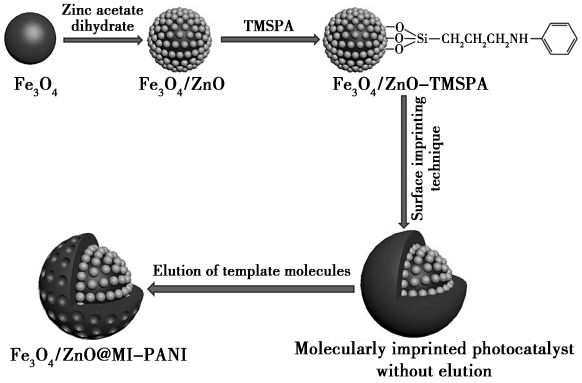


图 8　Fe_3O_4/ZnO@ MI-PANI 的合成工艺示意图[57]

Fig.8　Schematic illustration of the synthetic process for the Fe_3O_4/ZnO@ MI-PANI[57]

2.2.2.4　电化学传感信号放大

MMIP 在电催化中的应用主要通过构建信号放大体系,实现高灵敏度检测,用于各种化合物的检测。Fe_3O_4NPs 可以单独或与其他材料复合作为修饰材料固定在电极表面,以增强导电性和灵

敏度,提高信号放大的效果。Wang 等[58]首次以硫堇(Thionine,Thi)为模板,在 Fe_3O_4 NPs 表面聚合多巴胺,制备出一种能够选择性催化 Thi 还原的 MMIP 模拟酶,构建了基于 Fe_3O_4NPs MMIP 玻碳电极的电化学传感器,用于检测乙酰胆碱酯酶。该方法具有线性范围宽、灵敏度高、检出限低、选择性高等优势。Fe_3O_4NPs MMIP 已成为一种颇具应用前景的传感器增敏材料,在信号放大和增敏领域中展示了独特优势。

2.2.2.5 肿瘤治疗

近年来,纳米复合体的应用已成为肿瘤临床治疗的新趋势,既可用于探索细胞凋亡的途径和癌症的治疗,又能防止治疗中的副作用。Chen 等[59]研制了一种新型复合纳米材料用于癌症的治疗。该技术以磁性 Fe_3O_4/Fe 纳米棒为核心,外面包裹二氧化硅/聚多巴胺(SiO_2/PDA)壳层,再以过氧化氢酶(Catalase,CAT)为模板制备 MIP(图 9)。在肿瘤细胞中,MIP 可以选择性结合并抑制 CAT 的活性,同时,Fe_3O_4/Fe 纳米棒可以释放铁离子,催化过氧化氢氧化,诱导细胞凋亡。此外 Fe_3O_4/Fe@ F-SiO_2/PDA 纳米粒子具有良好的磁靶向能力,可以用于核磁共振成像,该技术为肿瘤的靶向治疗开辟了新的路径。

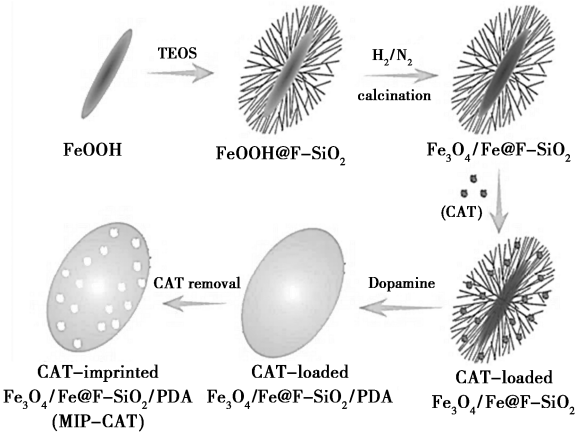


图 9 多功能纳米平台 MIP-CAT 的合成[59]

Fig.9 Synthesis of the multifunctional theranostic nanoplatform MIP-CAT[59]

在肿瘤治疗过程中,抗癌药物的定向传送已成为影响疗效的关键问题。Kubo 等[60]报道了一种基于 MMIP 的新型药物传递系统,在 Fe_3O_4NPs 外包覆一层甲氨蝶呤的 MIP 层,可有效降低抗肿瘤药物甲氨蝶呤的副作用,使药物的有效治疗作用最大化。

3 结论与展望

Fe_3O_4 NPs 作为一种易于制备、稳定性强的磁性材料,因其具有类似过氧化物酶的生物活性,在纳米酶领域已广泛应用。近年来,Fe_3O_4 NPs 在固定化酶领域的应用日益广泛,其独特的超顺磁性和生物相容性可以保护生物酶分子不受破坏,也便于从反应体系中分离和回收。由 Fe_3O_4NPs 与分子印迹模拟酶结合的新型聚合物(Fe_3O_4NPs MMIP),融合了分子印迹技术的高选择性和磁性材料易分离的特性,在农用化学品和抗菌药物的催化降解、光诱导有机物催化降解、电化学传感信号放大以及肿瘤治疗等方面均具有重要应用,相关的研究方法和技术路径也为新型模拟酶的研发指引了新方向。

同时,Fe_3O_4 NPs MMIP 的应用也暴露出一些问题,比如:Fe_3O_4 NPs MMIP 的印迹方法还存在不足,催化效率有待进一步提高,催化机理还需要深入研究,应用还不够广泛,这些方面均值得进一步深入分析和研究。未来,Fe_3O_4NPs 将与更多新型技术和材料进一步融合,其功能和活性将更加高效、稳定,在固定化酶和模拟酶中的应用将更为普遍。

参考文献:

[1] YANG Y, YAN W, GUO C, et al. Magnetic molecularly imprinted electrochemical sensors: A review [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2020, **1 106**: 1-21.

[2] XU Z, LI L, LI K, et al. Peroxidase-mimetic activity of a nanozyme with uniformly dispersed Fe_3O_4 NPs supported by mesoporous graphitized carbon for determination of glucose[J]. *Microchim. Acta*, 2021, **188**(**12**): 421.

[3] LI Y, CHANG Y, YUAN R, et al. Highly efficient target recycling-based netlike Y-DNA for regulation of electrocatalysis toward methylene blue for sensitive DNA detection [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, **10**(**30**): 25 213-25 218.

[4] NELSON J M, GRIFFIN E G. Adsorption of invertase[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1916, **38**(**5**): 1 109-1 115.

[5] 卓仁禧,罗毅,陶国良.固定化酶技术及其进展[J].离子交换与吸附,1994,(**5**):447-452.

[6] DONG H, DU W, DONG J, et al. Depletable peroxidase-like activity of Fe_3O_4 nanozymes accompanied with separate migration of electrons and iron ions[J]. *Nat. Commun.*, 2022, **13**(**1**): 5 365.

[7] POONIA K, RAIZADA P, SINGH A, et al. Magnetic molecularly imprinted polymer photocatalysts: Synthesis, applications and future perspective[J]. *J. Ind. Eng. Chem.*,

2022,**113**:1-14.

[8]MATHEW D,THOMAS B,DEVAKY K S.Design,synthesis and characterization of enzyme-analogue-built polymer catalysts as artificial hydrolases[J].*Artif.Cells Nanomed. Biotechnol.*,2019,**47**(**1**):1 149-1 172.

[9]GAO L,ZHUANG J,NIE L,et al.Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles[J].*Nat.Nanotechnol.*,2007,**2**(**9**):577-583.

[10]尉枫,韩晓军.纳米酶及其在生物医学检测领域的研究进展[J].分析化学,2021,**49**(**4**):581-592.

[11]CHENG G,XING J,PI Z,et al.α-Glucosidase immobilization on functionalized Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for screening of enzyme inhibitors[J].*Chin.Chem.Lett.*,2019,**30**(**3**):656-659.

[12]DONG F,LIN L,SU Y,et al.Esterase-immobilized sea-urchin-like Fe_3O_4 nanoparticles for chloramphenicol palmitate synthesis[J].*Catal.Lett.*,2022,doi:10.1007/s10562-022-04136-7.

[13]AGHAMOLAEI M,LANDARANI-ISFAHANI A,BAHADORI M,et al.Preparation and characterization of stable core/shell Fe_3O_4@Au decorated with an amine group for immobilization of lipase by covalent attachment[J].*RSC Adv.*,2022,**12**(**10**):5 971-5 977.

[14]AINIWAER A,LI A,ZHAO X,et al.Site-specific covalent immobilization of methylobacterium extorquens nonblue laccse Melac13220 on Fe_3O_4 nanoparticles by aldehyde tag[J].*Catalysts*,2022,**12**(**11**):1 379.

[15]MAHTO T K,CHOWDHURI A R,SAHOO B,et al.Polyaniline-functionalized magnetic mesoporous nanocomposite:A smart material for the immobilization of lipase[J].*Polym.Compos.*,2016,**37**(**4**):1 152-1 160.

[16]LI W,ZHANG X,XUE Z,et al.Ginsenoside CK production by commercial snailase immobilized onto carboxylated chitosan-coated magnetic nanoparticles[J].*Biochem.Eng.J.*,2021,**174**:108 119.

[17]LIU D M,CHEN J,SHI Y P.Tyrosinase immobilization on aminated magnetic nanoparticles by physical adsorption combined with covalent crosslinking with improved catalytic activity,reusability and storage stability[J].*Anal.Chim.Acta*,2018,**1 006**:90-98.

[18]XIA J J,ZOU B,ZHU G B,et al.Quick separation and enzymatic performance improvement of lipase by ionic liquid-modified Fe_3O_4 carrier immobilization[J].*Bioprocess Biosyst.Eng.*,2018,**41**(**5**):739-748.

[19]沈静茹,雷灼霖,孙小梅,等.β-环糊精构筑模拟酶催化法测定葡萄糖[J].分析化学,2001,(**7**):828-831.

[20]MOLENVELD P,ENGBERSEN J F J,KOOIJMAN H,et al.Efficient catalytic phosphate diester cleavage by the synergetic action of two Cu(Ⅱ) centers in a dinuclear *Cis*-diaqua Cu(Ⅱ) calix[4]arene enzyme model[J].*J.Am.Chem.Soc.*,1998,**120**(**27**):6 726-6 737.

[21]PALMA A,ARTELSMAIR M,WU G,et al.Cucur-bit[7]uril as a supramolecular artificial enzyme for Diels-Alder reactions[J].*Angew.Chem.Int.Ed.*,2017,**56**(**49**):15 688-15 692.

[22]LIU Q,ZHANG A,WANG R,et al.A review on metal- and metal oxide-based nanozymes:Properties,mechanisms,and applications[J].*Nano-Micro.Lett.*,2021,**13**(**1**):154.

[23]LI S,LI M H,ZHAI S R,et al.Designed synthesis and catalytic applications of magnetic solid acids[J].*Prog.Chem.*,2013,**25**(**2/3**):233-247.

[24]LI W,FAN G C,GAO F,et al.High-activity Fe_3O_4 nanozyme as signal amplifier:A simple,low-cost but efficient strategy for ultrasensitive photoelectrochemical immunoassay[J].*Biosens.Bioelectron*,2019,**127**:64-71.

[25]ASGARI M,SOLEYMANI M,MIRI T,et al.A robust method for fabrication of monodisperse magnetic mesoporous silica nanoparticles with core-shell structure as anticancer drug carriers[J].*J.Mol.Liq.*,2019,**292**:111 367.

[26]XU L,JIAO R,TAO X,et al.One-step thermal decomposition of $C_4H_4FeO_6$ to Fe_3O_4@carbon nano-composite for high-performance lithium-ion batteries[J].*Mater.Chem.Phys.*,2020,**239**:122 024.

[27]谢欣卓,钟金魁,李静,等.四氧化三铁负载纳米零价铁类 Fenton 法降解水中磺胺甲噁唑[J].中国环境科学,2022,doi:10.19674/j.cnki.issn1000-6923.20220314.014.

[28]ZHAO Q,WU Q,MA P,et al.Selective and sensitive fluorescence detection method for pig IgG based on competitive immunosensing strategy and magnetic bioseparation[J].*Talanta*,2019,**195**:103-108.

[29]张凯,韦秀丽,王冰,等.Fe_3O_4 改性水热炭活化过硫酸钠降解罗丹明 B[J].化工进展,2020,**39**(**7**):2 867-2 875.

[30]WANG M,FU Q,ZHANG K,et al.A magnetic and carbon dot based molecularly imprinted composite for fluorometric detection of 2,4,6-trinitrophenol[J].*Microchim.Acta*,2019,**186**(**2**):86.

[31]CUI H,LIU Y,REN W.Structure switch between α-Fe_2O_3,γ-Fe_2O_3 and Fe_3O_4 during the large scale and low temperature sol-gel synthesis of nearly monodispersed iron oxide nanoparticles[J].*Adv.Powder Technol.*,2013,**24**(**1**):93-97.

[32]DAI Y,YANG D,YU D,et al.Engineering of monodisperse core-shell up-conversion dendritic mesoporous silica nanocomposites with a tunable pore size[J].*Nanoscale*,2020,**12**(**8**):5 075-5 083.

[33]袁梦,郑雅允,谭小琪,等.微波法制备四氧化三铁/粉末活性炭粒子电极及其在三维电化学氧化中处理氨氮废水的研究[J].化工新型材料,2022,**50**(**2**):211-215;221.

[34]WEI F,CUI X,WANG Z,et al.Recoverable peroxidase-

like Fe_3O_4@MoS_2-Ag nanozyme with enhanced antibacterial ability[J]. *Chem. Eng. J.*, 2021, **408**: 127 240.

[35] LAI X, ZHANG G, ZENG L, et al. Synthesis of PDA-mediated magnetic bimetallic nanozyme and its application in immunochromatographic assay[J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2021, **13**(**1**): 1 413-1 423.

[36] WANG Y, LI H, GUO L, et al. A cobalt-doped iron oxide nanozyme as a highly active peroxidase for renal tumor catalytic therapy[J]. *RSC Adv.*, 2019, **9**(**33**): 18 815-18 822.

[37] GUO J, WEI W, ZHAO Y, et al. Iron oxide nanoparticles with photothermal performance and enhanced nanozyme activity for bacteria-infected wound therapy[J]. *Regener. Biomater.*, 2022, **9**: 1-12.

[38] BAYE A F, NGUYEN T H, KIM H. Fe^0/Fe_3C-assisted Fe_3O_4 redox sites as robust peroxidase mimics for colorimetric detection of H_2O_2[J]. *Sensor. Actuat. B Chem.*, 2023, **377**: 133 097.

[39] ZHANG Z, ZHANG X, LIU B, et al. Molecular imprinting on inorganic nanozymes for hundred-fold enzyme specificity[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**(**15**): 5 412-5 419.

[40] BORUAH P K, DARABDHARA G, DAS M R. Polydopamine functionalized graphene sheets decorated with magnetic metal oxide nanoparticles as efficient nanozyme for the detection and degradation of harmful triazine pesticides[J]. *Chemosphere*, 2021, **268**: 129 328.

[41] 胡莹露. 分子印迹光催化剂的制备及荧光传感器的构建[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2021.

[42] 龙芳. 磁性印迹固相萃取-印迹电化学传感器联用技术快速检测肉制品中的红霉素[J]. 食品工业科技, 2022, **43**(**1**): 269-278.

[43] CHEN Z, WANG Z, REN J, et al. Enzyme mimicry for combating bacteria and biofilms[J]. *Acc. Chem. Res.*, 2018, **51**(**3**): 789-799.

[44] PILETSKY S S, PILETSKA E, POBLOCKA M, et al. Snapshot imprinting: Rapid identification of cancer cell surface proteins and epitopes using molecularly imprinted polymers[J]. *Nano Today*, 2021, **41**: 101 304.

[45] CHEN L, WANG X, LU W, et al. Molecular imprinting: Perspectives and applications[J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**(**8**): 2 137-2 211.

[46] YÁÑEZ-SEDEÑO P, CAMPUZANO S, PINGARRÓN J M. Electrochemical sensors based on magnetic molecularly imprinted polymers: A review[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2017, **960**: 1-17.

[47] ARABZADEH N, MOHAMMADI A, DARWISH M, et al. Construction of a TiO_2-Fe_3O_4-decorated molecularly imprinted polymer nanocomposite for tartrazine degradation: Response surface methodology modeling and optimization[J]. *J. Chin. Chem. Soc.*, 2019, **66**(**5**): 474-483.

[48] LIN F, CHEN J, LEE M, et al. Multi-responsive ibuprofen-imprinted core-shell nanocarriers for specific drug recognition and controlled release[J]. *ACS Appl. Nano Mater.*, 2020, **3**(**2**): 1 147-1 152.

[49] ZHANG C, SI S, YANG Z. Facile synthesis of Fe_3O_4/SiO_2/molecularly imprinted hydroxyapatite nanocomposite and its enhanced photocatalytic degradation of target contaminant[J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2015, **143**: 88-93.

[50] 金久煜, 李兆周, 陈秀金, 等. 分子印迹酶的研究现状及进展[J]. 化学试剂, 2022, **44**(**11**): 1 558-1 567.

[51] MOKHTARI S, FAGHIHIAN H, MIRMOHAMMADI M. A core/shell TiO_2 magnetized molecularly imprinted photocatalyst (MMIP@TiO_2): Synthesis and its photodegradation activity towards sulfasalazine[J]. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2022, **30**(**5**): 13 624-13 638.

[52] GUO Z, SUN Y, ZHANG L, et al. Surface imprinted core-shell nanorod for selective extraction of glycoprotein[J]. *J. Colloid Interface Sci.*, 2022, **615**: 597-605.

[53] LI X, LIANG K, YANG B, et al. Preparation and application of a targeted magnetically separated catalyst for sulfonamides degradation based on molecular dynamics selection and mechanism analysis[J]. *Chem. Eng. J.*, 2022, **432**: 134 365.

[54] CARBONI D, LASIO B, MALFATTI L, et al. Magnetic core-shell nanoparticles coated with a molecularly imprinted organogel for organophosphate hydrolysis[J]. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2016, **79**(**2**): 395-404.

[55] YANG J, LI S, GONG Y, et al. Preferential catalytic ozonation of *p*-nitrophenol by molecularly imprinted Fe_3O_4/SiO_2 core-shell magnetic composites[J]. *Water Sci. Technol.*, 2014, **69**(**1**): 170-176.

[56] WEI S, LIU H, HE C, et al. Molecularly imprinted TiO_2/WO_3-coated magnetic nanocomposite for photocatalytic degradation of 4-nitrophenol under visible light[J]. *Aust. J. Chem.*, 2016, **69**(**6**): 638-644.

[57] WANG J, FENG J, WEI C. Molecularly imprinted polyaniline immobilized on Fe_3O_4/ZnO composite for selective degradation of amoxycillin under visible light irradiation[J]. *Appl. Surf. Sci.*, 2023, **609**: 155 324.

[58] WANG L, MIAO L, YANG H, et al. A novel nanoenzyme based on Fe_3O_4 nanoparticles @ thionine-imprinted polydopamine for electrochemical biosensing[J]. *Sens. Actuat. B Chem.*, 2017, **253**: 108-114.

[59] CHEN J, LEI S, ZENG K, et al. Catalase-imprinted Fe_3O_4/Fe@ fibrous SiO_2/polydopamine nanoparticles: An integrated nanoplatform of magnetic targeting, magnetic resonance imaging, and dual-mode cancer therapy[J]. *Nano Res.*, 2017, **10**(**7**): 2 351-2 363.

[60] KUBO T, TACHIBANA K, NAITO T, et al. Magnetic field stimuli-sensitive drug release using a magnetic thermal seed coated with thermal-responsive molecularly imprinted polymer[J]. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2019, **5**(**2**): 759-767.

生化与药用试剂

噻洛芬酸衍生物的合成、分子对接及其抗菌活性研究

卫鑫宝[a]，李玉芳[a]，陆思颖[b]，王立升*[b]
（广西大学 a.化学化工学院，b.医学院，广西 南宁　530004）

摘要：优化了噻洛芬酸的合成路线并对其进行结构修饰，通过 ^{1}HNMR、^{13}CNMR、HR-MS 确定了所得物质的结构，并采用二倍稀释法测试了其对大肠杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、痤疮丙酸杆菌和白色念珠菌的抗菌活性。结果表明，大部分化合物均具有一定的抗菌活性，其中化合物 2-(5-([1,1′-联苯]-4-羰基)-2-噻吩基)丙酸对白色念珠菌具有良好的抗菌活性，其最低抑菌浓度(MIC)为 3.14 mg/mL，强于阳性对照药氟康唑。最后，对化合物噻洛芬酸、2-(5-(2-萘基)-2-噻吩基)丙酸、2-(5-([1,1′-联苯]-4-羰基)-2-噻吩基)丙酸、2-(5-(1-萘基)-2-噻吩基)丙酸与白色念珠菌相关蛋白 4WMZ 进行分子对接，从计算的角度进一步解释了化合物 2-(5-([1,1′-联苯]-4-羰基)-2-噻吩基)丙酸活性较好的原因推测是该化合物羰基、羧基与蛋白之间有较强的氢键作用。

关键词：噻洛芬酸；衍生物；合成；抗菌；分子对接
中图分类号：O626.4　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0258-3283(2023)07-0043-08
DOI：10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0092

Synthesis, Docking, and Antibacterial Activity of Tiaprofenic Acid Derivatives *WEI Xin-bao*[a], *LI Yu-fang*[a], *LU Si-ying*[b], *WANG Li-sheng**[b] (a.School of Chemistry and Chemical Engineering, b.School of Medicine, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: The synthetic route of tiaprofenic acid was optimized and its structure was modified. The structures of its derivatives were confirmed by ^{1}HNMR, ^{13}CNMR, and HR-MS analyses. Their antibacterial activity against several pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Propionibacterium acnes, and Candida albicans was tested via the double-dilution method. The results showed that most of the compounds exhibited antibacterial activity. Particularly, compound 2-(5-([1,1′-biphenyl]-4-carbonyl) thiophen-2-yl) propanoic acid showed good antibacterial activity against Candida albicans with minimum inhibitory concentration (MIC) of 3.14 mg/mL, stronger than the positive control drug fluconazole. Additionally, compounds tiaprofenic acid, 2-(5-(2-naphthoyl) thiophen-2-yl) propanoic acid, 2-(5-([1,1′-biphenyl]-4-carbonyl) thiophen-2-yl) propanoic acid, and 2-(5-(1-naphthoyl) thiophen-2-yl) propanoic acid were docked with the Candida albicans-related protein 4WMZ. On the basis of the calculation, it was further explained that the activity of compound 2-(5-([1,1′-biphenyl]-4-carbonyl) thiophen-2-yl) propanoic acid might be attributed to the strong hydrogen bonds between the carbonyl group or carboxyl group of the compound and the protein.

Key words: tiaprofenic acid; derivative; synthesis; antibacterial; molecular docking

非甾体抗炎药是世界上应用最广泛的处方药物之一[1]。尽管其会导致很多不良反应，包括肾毒性[2]、肝毒性[3]、胃溃疡[4]和其他的毒性反应[5]。但是，对于非甾体抗炎药的研究一直是科研工作者的热门话题，对其的关注已经不再局限于解热、镇痛、消炎的作用。研究表明一些非甾体抗炎药具有抗肿瘤[6]、抗菌[7]，甚至对于 2019 年爆发的新型冠状病毒也有一定的辅助治疗作用[8]。

抗生素自被发现开始一直在抗菌方面表现出优良的活性，但是随着耐药菌的出现和抗生素的滥用，抗生素发挥的作用变的非常有限。所以，迫切的需要寻找一些潜在抗菌药物来替代或辅助抗生素发挥作用。

2021 年，廖向文等[9]发现钌金属配位的 4-氟

收稿日期：2023-02-15；**网络首发日期**：2023-04-14
作者简介：卫鑫宝(1997-)，男，山西临汾人，硕士生，主要研究方向为药物化学。
通讯作者：王立升，E-mail：w_lsheng@163.com。
引用本文：卫鑫宝，李玉芳，陆思颖，等.噻洛芬酸衍生物的合成、分子对接及其抗菌活性研究[J].化学试剂，2023，**45**(7)：43-50。

苯乙烯对金黄色葡萄球菌表现出良好的抑菌活性。2015 年,Soheili 等[10]发现吡罗昔康和美洛昔康可以通过抑制 LasR 蛋白和 PqsE 蛋白抑制铜绿假单胞菌。2018 年,Cai 等[11]发现塞来昔布、阿司匹林或萘普生等非甾体抗炎药可以协同增强卡那霉素或氨苄青霉素诱导的金黄色葡萄球菌和抗药性金黄色葡萄球菌死亡。2016 年,Rosato 等[12]发现阿尼芬净通过与阿司匹林、双氯芬酸、布洛芬的联用可以起到对假丝酵母菌抑菌活性的明显增效作用。

噻洛芬酸是一种丙酸类非甾体抗炎药,临床上用于风湿性关节炎、骨关节炎、类风湿脊柱炎,用于术后炎症及疼痛、扭伤、其他软组织损伤。并且,羧酸类衍生物被认为是替代抗生素开发的一种抗菌类潜在候选药物[13]。尽管具有游离羧基的化合物显示出很高的抗菌活性,但这方面的研究一直进展缓慢。所以希望对噻洛芬酸进行结构修饰,在不改变丙酸母体的情况下,设计并得到具有抗菌活性的潜在药物分子。本实验合成得到了 16 种噻洛芬酸衍生物,并且采用二倍稀释法在 96 聚苯乙烯孔板上检测了噻洛芬酸和其 16 种衍生物对两种革兰氏阳性菌,两种革兰氏阴性菌以及一种真菌的抗菌活性。其合成路线如图 1 所示。

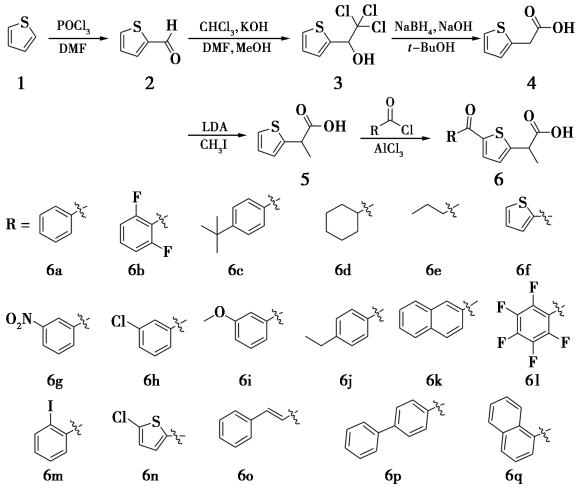


图 1 噻洛芬酸及其衍生物的合成路线

Fig.1 Synthetic route of tiaprofenic and its derivatives

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

AVANCE Ⅲ HD600-型核磁共振仪、Impact Ⅱ型超高效液相-质谱联用仪(德国 Bruker 公司);Infinite E Plex 型酶标仪(帝肯奥地利有限公司)。噻吩(上海安耐吉化学有限公司);三氯氧磷、N,N-二甲基甲酰胺、三氯甲烷、氢氧化钾(上海毕得医药科技股份有限公司);96 孔培养板、二甲基亚砜 DMSO(细胞培养级)(上海泰坦科技股份有限公司);实验过程中使用的铜绿假单胞菌# 5336 由广西医科大学提供并传代培养,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌由广西中医药大学提供并传代培养,白色假丝酵母和痤疮丙酸杆菌从广东省微生物菌种保藏中心处购买并传代培养。所有试剂均为分析纯或化学纯。

1.2 2-噻吩甲醛(2)的合成[14]

将 8.414 g(0.1 mol)噻吩滴加到 8.771 g(0.12 mol)含有 15.333 g(0.1 mol)三氯氧磷的 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液中。在 85 ℃,1,2-二氯乙烷作溶剂下反应 8 h,冰水猝灭,二氯甲烷萃取,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,即得 10.43 g 黄色液体,产率 82%。

1.3 2,2,2-三氯-1-(-2-噻吩基)乙烷-1-醇(3)的合成[15]

将 8.972 g(0.08 mol)化合物 2 和 14.3 mL(0.18 mol)三氯甲烷加入到 50 mL 氮气保护的 DMF 中,在-10 ℃条件下缓慢滴加 11 mL 含有 4.488 g(0.08 mol)氢氧化钾的甲醇溶液。在-10 ℃下反应 2 h。用 100 mL(1 mol/L)盐酸猝灭反应,用二氯甲烷萃取反应液,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,硅胶柱层析[V(石油醚):V(乙酸乙酯)= 2∶1],得到 13.89 g 无色液体,产率 75%。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:8.14(dd,1H,J = 4.0,0.9 Hz);7.79(dd,1H,J = 5.0,0.9 Hz);7.18(dd,1H,J = 4.8,4.2 Hz)。

1.4 2-噻吩乙酸(4)的合成[15]

将 11.495 g(0.05 mol)化合物 3 溶解到 50 mL 叔丁醇中,分别加入 6.6 g(0.165 mol)氢氧化钠和 2.874 g(0.075 mol)硼氢化钠,在 40 ℃下反应 12 h。将反应液减压浓缩至干,加入 160 mL(1 mol/L)盐酸酸化的反应液,用二氯甲烷萃取,无水硫酸钠干燥有机层,过滤,浓缩,柱层析[V(石油醚):V(乙酸乙酯)= 1∶1],得到 5.41 g 黄色晶体,产率 76%。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:7.24(dd,1H,J = 4.7,1.6 Hz);6.99~6.96(m,2H);3.89(s,2H)。

1.5 2-(2-噻吩基)丙酸(5)的合成[16]

在氮气保护下将 50 mL 含有 2 mol/L 的二异丙基氨基锂(LDA)的四氢呋喃溶液加入到两口

瓶中,在-15 ℃下缓慢加入 5.687 g(40 mmol)化合物 4,搅拌 1 h。然后缓慢加入 12.491 g(88 mmol)碘甲烷,滴加完毕后将混合物在 20 ℃下反应 4 h。加入 10%盐酸溶液,直至 pH 值为 1。水层用乙酸乙酯萃取,合并有机层,无水硫酸钠干燥,浓缩,柱层析[V(石油醚):V(乙酸乙酯)= 1∶1]得到 5.3 g 微黄色液体,产率 85%。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:7.22(dd,1H,J = 5.1,1.3 Hz);7.00~6.98(m,1H);6.97~6.96(m,1H);4.07~4.01(m,1H);1.61(d,3H,J=7.2 Hz)。

1.6　目标产物的合成[17]

以噻洛芬酸(6a)为例,将 1.406 g(10 mmol)苯甲酰氯和 1.6 g(12 mmol)氯化铝分别加入到 50 mL 二氯甲烷中,在 0 ℃下搅拌 30 min。加入 1.562 g(10 mmol)化合物 5,继续搅拌 5 h。用冰盐酸猝灭反应,然后用二氯甲烷萃取,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,柱层析[V(石油醚):V(乙酸乙酯)= 1∶2]得到 2.16 g 白色固体,产率 83%。化合物 6b~6q 均是按照上述方法制备得到。以*标注的化合物为未见文献报道的新化合物。

噻洛芬酸 6a:白色固体,产率 86%,m.p. 96.3 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:9.14(s,1H);7.82(dd,2H,J = 8.3,1.4 Hz);7.61~7.54(m,1H);7.50(d,1H,J=3.9 Hz);7.47(dd,2H,J=8.4,7.0 Hz);7.05(dd,1H,J=3.9,0.7 Hz);4.07(q,1H,J = 7.2 Hz);1.64(d,3H,J = 7.2 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:188.32,178.10,151.97,142.37,137.87,135.12,132.37,129.17(2C),128.48(2C),126.51,41.41,19.02。HR-MS(ESI),$C_{14}H_{12}O_3S$,实测值(计算值),m/z:261.053 6(261.050 7)[M+H]$^+$。

2-(5-(2,6-二氟苯甲酰基-2-噻吩基))丙酸(6b)*:微黄色油状物,产率 73%。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:7.43(tt,1H,J = 8.5,6.3 Hz);7.37(dd,1H,J=3.8,1.1 Hz);7.04(d,1H,J=3.9 Hz);7.02~6.97(m,2H);4.07(q,1H,J=7.2 Hz);1.64(d,3H,J = 7.2 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:180.43,178.19,160.58,158.90,153.68,142.97,135.72,132.16,127.01,116.90,112.15,111.98,41.60,19.08。^{19}FNMR($CDCl_3$,565 MHz),δ:-111.88。HR-MS(ESI),$C_{14}H_{10}F_2O_3S$,实测值(计算值),m/z:297.032 8(297.031 9)[M+H]$^+$。

2-(5-(4-(叔丁基)苯甲酰基-2-噻吩基))丙酸(6c)*:白色固体,产率 88%,m.p.109.4 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:7.80(d,2H,J=8.5 Hz);7.54(d,1H,J=3.8 Hz);7.50(d,2H,J=8.4 Hz);7.06(dd,1H,J=3.8,0.8 Hz);4.08(q,1H,J=7.1 Hz);1.66(d,3H,J = 7.2 Hz);1.36(s,9H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:187.94,178.40,156.16,151.38,142.79,135.24,134.75,129.31(2C),126.44,125.53(2C),41.45,35.21,31.27(3C),19.10。HR-MS(ESI),$C_{18}H_{20}O_3S$,实测值(计算值),m/z:317.115 4(317.113 3)[M+H]$^+$。

2-(5-(环己烷羰基-2-噻吩基))丙酸(6d)*:无色液体,产率 84%。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:7.58(d,1H,J=3.9 Hz);7.01(dd,1H,J=3.8,0.8 Hz);4.02(q,1H,J=7.2 Hz);3.05(tt,1H,J=11.7,3.4 Hz);1.90~1.85(m,2H);1.83(dt,2H,J=13.1,3.4 Hz);1.75~1.68(m,1H);1.61(d,3H,J=7.2 Hz);1.57~1.47(m,2H);1.35(dddd,2H,J = 16.3,12.9,9.6,3.3 Hz);1.29~1.23(m,1H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:196.90,178.43,150.81,142.76,131.57,126.55,47.29,41.43,29.70,29.68,25.89,25.87(2C),19.04。HR-MS(ESI),$C_{14}H_{18}O_3S$,实测值(计算值),m/z:267.099 6(267.097 7)[M+H]$^+$。

2-((5-丙酰基)-2-噻吩基)丙酸(6e)*:白色固体,产率 80%,m.p.99.3 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:7.57(d,1H,J=3.8 Hz);7.01(d,1H,J=3.9 Hz);4.03(q,1H,J=7.1 Hz);2.89(q,2H,J=7.4 Hz);1.61(d,3H,J=7.2 Hz);1.21(t,3H,J=7.4 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:194.07,178.37,150.77,143.02,131.72,126.53,41.38,32.38,19.04,8.71。HR-MS(ESI),$C_{10}H_{12}O_3S$,实测值(计算值),m/z:213.053 6(213.050 7)[M+H]$^+$。

2-(5-(噻吩-2-羰基)-2-噻吩基)丙酸(6f)*:微黄色油状物,产率 81%。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:7.88(dd,1H,J=3.8,1.2 Hz);7.76(t,1H,J=3.5 Hz);7.69(dd,1H,J=5.0,1.2 Hz);7.18(dd,1H,J=5.0,3.8 Hz);7.09(dd,1H,J=13.6,3.9 Hz);4.08(q,1H,J=7.2 Hz);1.66(d,3H,J=7.2 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:178.72,178.40,151.10,142.66,141.80,133.62,133.34,133.28,128.08,126.49,41.40,19.07。

HR-MS(ESI),$C_{12}H_{10}O_3S_2$,实测值(计算值),*m/z*:267.009 4(267.007 1)[M+H]$^+$。

2-(5-(3-硝基苯甲酰基)-2-噻吩基)丙酸(6g)*:白色固体,产率 71%,m.p. 105.7 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:8.65(t,1H,*J*=1.9 Hz);8.43(ddd,1H,*J*=8.2,2.3,1.1 Hz);8.16(dt,1H,*J*=7.7,1.4 Hz);7.71(t,1H,*J*=7.9 Hz);7.51(d,1H,*J*=3.9 Hz);7.10(d,1H,*J*=3.9 Hz);4.10(q,1H,*J*=7.3 Hz);1.67(d,3H,*J*=7.1 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:185.57,178.02,153.43,148.18,141.36,139.32,135.48,134.79,129.97,126.98,126.75,124.03,41.60,19.18。HR-MS(ESI),$C_{14}H_{11}NO_5S$,实测值(计算值),*m/z*:306.038 2(306.035 8)[M+H]$^+$。

2-(5-(3-氯苯甲酰基)-2-噻吩基)丙酸(6h)*:白色固体,产率 75%,m.p. 96.8 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:7.80(t,1H,*J*=1.9 Hz);7.70(dt,1H,*J*=7.7,1.3 Hz);7.55(ddd,1H,*J*=8.0,2.2,1.1 Hz);7.49(d,1H,*J*=3.9 Hz);7.43(t,1H,*J*=7.8 Hz);7.07(dd,1H,*J*=3.9,0.8 Hz);4.09(q,1H,*J*=7.2 Hz);1.66(d,3H,*J*=7.2 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:186.91,178.48,152.68,142.23,139.78,135.47,134.99,132.58,130.14,129.42,127.52,126.92,41.72,19.34。HR-MS(ESI),$C_{14}H_{11}ClO_3S$,实测值(计算值),*m/z*:295.013 4(295.011 7)[M+H]$^+$。

2-(5-(3-甲氧基苯甲酰基)-2-噻吩基)丙酸(6i)*:白色固体,产率 82%,m.p. 60.2 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:8.59(s,1H);7.43(ddd,1H,*J*=8.3,7.5,1.8 Hz);7.36(dd,1H,*J*=7.5,1.8 Hz);7.32(d,1H,*J*=3.9 Hz);7.01~6.96(m,3H);4.06~4.00(m,1H);3.77(s,3H);1.61(d,3H,*J*=7.2 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:188.00,177.59,156.74,152.14,143.24,135.12,131.75,128.95,128.03,126.25,119.97,111.41,55.45,41.20,18.71。HR-MS(ESI),$C_{15}H_{14}O_4S$,实测值(计算值),*m/z*:291.062 9(291.061 3)[M+H]$^+$。

2-(5-(4-乙基苯甲酰基)-2-噻吩基)丙酸(6j)*:白色固体,产率 84%,m.p. 77.6 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:7.79(d,2H,*J*=8.1 Hz);7.52(d,1H,*J*=3.9 Hz);7.31(d,2H,*J*=7.9 Hz);7.05(d,1H,*J*=3.9 Hz);4.08(q,1H,*J*=7.2 Hz);2.73(q,2H,*J*=7.6 Hz);1.66(d,3H,*J*=7.2 Hz);1.28(t,3H,*J*=7.6 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:187.98,178.39,151.41,149.38,142.76,135.51,134.71,129.58(2C),128.06(2C),126.42,41.45,29.05,19.09,15.36。HR-MS(ESI),$C_{16}H_{16}O_3S$,实测值(计算值),*m/z*:289.083 2(289.082 0)[M+H]$^+$。

2-(5-(2-萘基)-2-噻吩基)丙酸(6k)*:白色固体,产率 86%,m.p. 140.8 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:8.37(d,1H,*J*=1.6 Hz);7.97~7.93(m,2H);7.92~7.89(m,2H);7.63~7.53(m,3H);7.09(d,1H,*J*=3.8 Hz);4.11(q,1H,*J*=7.2 Hz);1.68(d,3H,*J*=7.2 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:188.18,178.00,151.76,142.79,135.31,135.27,135.06,132.45,130.60,129.44,128.60,128.35,127.98,127.02,126.56,125.40,41.45,19.14。HR-MS(ESI),$C_{18}H_{14}O_3S$,实测值(计算值),*m/z*:311.068 5(311.066 4)[M+H]$^+$。

2-(5-(五氟苯甲酰基)-2-噻吩基)丙酸(6l)*:白色固体,产率 68%,m.p. 91.0 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:7.39(d,1H,*J*=3.9 Hz);7.08(d,1H,*J*=4.0 Hz);4.09(q,1H,*J*=7.2 Hz);1.66(d,3H,*J*=7.2 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:178.30,176.44,155.15,144.65,143.53,142.97,141.90,138.60,136.91,136.16,127.36,113.88,41.72,19.12。^{19}FNMR($CDCl_3$,565 MHz),δ:−139.80~−139.93(m);−140.08(dd,*J*=22.6,8.3 Hz);−150.11(t,*J*=20.5 Hz);−150.32;−159.58(qt,*J*=16.5,7.9 Hz)。HR-MS(ESI),$C_{14}H_7F_5O_3S$,实测值(计算值),*m/z*:351.005 1(351.003 6)[M+H]$^+$。

2-(5-(2-碘代苯甲酰基)-2-噻吩基)丙酸(6m)*:白色固体,产率 71%,m.p. 123.6 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:7.92(dd,1H,*J*=8.0,1.1 Hz);7.43(td,1H,*J*=7.5,1.1 Hz);7.37(dd,1H,*J*=7.6,1.7 Hz);7.26(d,1H,*J*=3.6 Hz);7.17(td,1H,*J*=7.7,1.7 Hz);7.02(d,1H,*J*=3.9 Hz);4.18~4.01(m,1H);1.65(d,3H,*J*=6.9 Hz)。^{13}CNMR(DMSO-d_6,151 MHz),δ:188.78,173.59,155.21,143.71,140.53,139.30,136.46,131.60,128.05,128.03,127.25,92.75,41.04,19.20。HR-MS(ESI),$C_{14}H_{11}IO_3S$,实测值(计算值),*m/z*:386.947 7(386.947 4)[M+H]$^+$。

2-(5-(5-氯噻吩-2-羰基)-2-噻吩基)丙酸

(6n)*:无色油状物,产率 73%。^{1}HNMR(DMSO-d_6,600 MHz),δ:7.96~7.89(m,2H);7.31(d,1H,J=4.1 Hz);7.16(d,1H,J=3.9 Hz);4.11(q,1H,J=7.1 Hz);1.49(d,3H,J=7.1 Hz)。^{13}CNMR(DMSO-d_6,151 MHz),δ:176.74,173.68,153.54,141.09,139.59,137.45,134.04,133.78,129.00,127.06,40.87,19.22。HR-MS(ESI),$C_{12}H_9ClO_3S_2$,实测值(计算值),m/z:300.970 4(300.968 2)[M+H]$^+$。

2-(5-肉桂酰基-2-噻吩基)丙酸(6o)*:白色固体,产率 81%,m.p.141.4 ℃。^{1}HNMR(DMSO-d_6,600 MHz),δ:12.82(s,1H);8.19(d,1H,J=3.9 Hz);7.90~7.86(m,2H);7.84(d,1H,J=15.6 Hz);7.71(d,1H,J=15.6 Hz);7.45(dd,3H,J=5.1,2.0 Hz);7.18(dd,1H,J=3.9,0.8 Hz);4.14~4.04(m,1H);1.49(d,3H,J=7.1 Hz)。^{13}CNMR(DMSO-d_6,151 MHz),δ:181.40,173.77,153.65,143.95,142.95,134.55,133.53,130.65,128.94(2C),128.91(2C),126.94,121.65,41.02,19.17。HR-MS(ESI),$C_{16}H_{14}O_3S$,实测值(计算值),m/z:287.068 8(287.066 4)[M+H]$^+$。

2-(5-([1,1′-联苯]-4-羰基)-2-噻吩基)丙酸(6p)*:白色固体,产率 82%,m.p.117.8 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:7.93(d,2H,J=8.2 Hz);7.74~7.69(m,2H);7.67~7.62(m,2H);7.56(d,1H,J=3.7 Hz);7.52~7.45(m,2H);7.44~7.37(m,1H);7.08(d,1H,J=3.8 Hz);4.10(d,1H,J=8.2 Hz);1.67(d,3H,J=7.0 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:187.59,177.90,151.50,145.16,142.61,139.96,136.58,134.70,130.05,129.82,129.05,128.99,128.19,127.33,127.30,127.15,127.14,126.42,41.29,19.02。HR-MS(ESI),$C_{20}H_{16}O_3S$,实测值(计算值),m/z:337.092 3(337.092 0)[M+H]$^+$。

2-(5-(1-萘基)-2-噻吩基)丙酸(6q)*:无色油状物,产率 83%。^{1}HNMR(DMSO-d_6,600 MHz),δ:8.09(dd,1H,J=8.3,1.2 Hz);8.03~7.97(m,2H);7.72(dd,1H,J=7.1,1.3 Hz);7.61~7.48(m,3H);7.31(d,1H,J=3.9 Hz);7.08(dd,1H,J=3.9,0.8 Hz);4.15~4.10(m,1H);1.51(d,3H,J=7.2 Hz)。^{13}CNMR(DMSO-d_6,151 MHz),δ:226.38,211.45,192.40,180.54,173.71,173.17,171.05,168.79,167.55,166.21,165.03,164.70,164.58,164.30,162.60,162.43,78.83,56.90。HR-MS(ESI),$C_{18}H_{14}O_3S$,实测值(计算值),m/z:311.076 1(311.076 4)[M+H]$^+$。

1.7　合成小结

噻洛芬酸的合成关键步骤是 2-(2-噻吩基)丙酸的合成,传统的合成方法是直接在噻吩上引入丙酸基。2006 年,孙敏等[18]通过将噻吩丙酰化得到 2-丙酰噻吩,后经 1,2-迁移,水解得到 2-(2-噻吩基)丙酸。虽然反应通过巧妙的 1,2-迁移构建了丙酸结构,总产率 30%,但是反应使用了碘单质,价格较高且毒性较大。2007 年,于龙江[19]用三价锰催化下噻吩与 2-甲基丙二酸二乙酯进行偶联反应,引入丙二酸结构。强碱作用下水解,脱羧得到丙酸结构。虽然该反应产率较高,但是该方法使用了污染较大的重金属锰,限制了反应的应用。

本文从噻吩开始经过 5 步反应合成了噻洛芬酸,反应条件简单,总产率 33%,产率中等。与传统合成路线不同,新路线的关键步骤是 2-噻吩乙酸的合成,根据 Cafiero 等[15]的工作,通过芳香醛转化为同系羧酸的方法得到 2-噻吩乙酸,然后 α 位引入甲基,最后经傅-克酰基化反应得到目标产物。反应过程中没有使用重金属和毒性较大的化学品,并且反应条件温和,重现性高,符合绿色化学的理念。为噻洛芬酸的合成工艺提供了一条新的路线。

最后,2-(2-噻吩基)丙酸通过与不同的酰氯经过傅-克酰基化反应,得到 16 种噻洛芬酸的衍生物,其中有 13 种是未报到的化合物。在合成中发现对于含有供电子基团的酰氯,傅-克反应的产率较高,而含有吸电子基团的酰氯,反应产率较低。可能是由于反应经过酰基正离子中间体,而含有供电子基团更有利于中间体的稳定性。

2　目标化合物的抑菌活性测试

2.1　阳性对照药的选择

氟康唑(批号:93MNRN8R)-白色假丝酵母;硫酸卡那霉素(批号:9VEX2REK)-大肠杆菌;青霉素 G 钠(批号:97YRRM7D)-金黄色葡萄球菌;头孢他啶(批号:9DDADRLX)-铜绿假单胞菌#5336;盐酸多西环素(批号:EH0RRQ4R)-痤疮丙酸杆菌;以上标准品均购于上海安耐吉化学有限公司。

2.2 实验方法

首先根据标准方法分别配制各受试细菌的培养基(肉汤)以及各受试细菌,然后称取待测化合物溶于二甲基亚砜并用肉汤将其稀释。采用二倍稀释法测试待测化合物的抑菌活性,先在 96 孔板中每孔加入 100 μL 事先配制的肉汤,用移液枪取 100 μL 稀释的待测化合物置于第一个孔板中,并用移液枪轻轻吹打 20 次然后从第一个孔板中取 100 μL 充分混匀的待测液加至第二孔板里,如此重复 8 次,从第 8 个孔板中取 100 μL 舍去,按照 16~0.125 mg/mL 共 8 个浓度梯度范围进行初筛,对应受试细菌的阳性对照药和噻洛芬酸操作同上,同时每个浓度设置 3 个平行孔,以肉汤为空白对照。除空白对照外其余每孔中加入 5 μL 的菌液,然后把 96 孔板放置培养箱中待培养到对数期,用酶标仪测其 OD_{600} 值,平行孔中的 OD_{600} 值之差在标准误差范围内,说明所得数值可信,依据所得数据再策划适宜的浓度梯度筛出各待测化合物的最小抑菌浓度。

2.3 实验结果

表 1 的结果显示,大部分化合物对大肠杆菌的抑菌效果一般,其中化合物 6b 的抑菌效果最佳,其最低抑菌浓度(MIC)为 1.73 mg/mL,但比相应的阳性对照药硫酸卡那霉素的抑菌效果差。

表 1 噻洛芬酸及其衍生物的抑菌活性实验[注]

Tab.1 Antibacterial activity of tiaprofenic acid and its derivatives

化合物	MIC/(mg·mL^{-1})				
	革兰氏阴性菌		革兰氏阳性菌		真菌
	大肠杆菌	铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌	痤疮丙酸杆菌	白色假丝酵母
6a	2.97	2.06	6.62	0.45	6.12
6b	1.73	1.63	0.84	0.38	8.39
6c	5.67	3.94	2.99	0.51	25.9 2
6d	6.96	7.97	13.92	0.27	13.16
6e	2.16	1.59	1.56	0.73	20.1
6f	6.21	3.54	13.40	0.57	30.25
6g	3.12	0.71	0.62	0.20	8.01
6h	3.07	6.01	7.41	0.45	8.71
6i	4.75	3.89	3.25	2.00	8.14
6j	25.47	6.95	3.83	2.14	10.53
6k	3.60	2.28	5.43	0.33	3.25
6l	7.80	3.26	5.83	2.85	8.40
6m	8.24	5.20	7.23	0.26	32.03
6n	7.87	5.07	6.43	4.55	9.61
6o	53.44	0.73	1.58	0.80	14.47
6p	7.05	1.57	2.54	0.55	3.14
6q	12.44	7.19	7.90	3.21	6.23
对照药 1~5	1-0.05	2-0.45	3-0.06	4-0.02	5-6.40

注:1 表示硫酸卡那霉素,2 表示头孢他啶,3 表示青霉素 G 钠,4 表示盐酸多西环素,5 表示氟康唑。

大部分化合物对铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、痤疮丙酸杆菌的抑菌效果中等,其中化合物 6g 的抑菌效果最好,其最低抑菌浓度分别(MIC)为 0.71、0.62、0.20 mg/mL,但比相应的阳性对照药头孢他啶、青霉素 G 钠、盐酸多西环素的抑菌效果差。

大部分目标化合物对白色假丝酵母菌的抑菌效果一般,但是化合物 6p 有较好的抗菌活性,其最低抑菌浓度为(MIC)3.14 mg/mL,比相应的阳性对照药氟康唑的抗菌效果好。

2.4 构效关系

对于大肠杆菌,含有吸电子基团的化合物一般有较为优良的活性(6b、6g、6h),而供电子的基团一般活性较差(6j、6o)。对于铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌,含有强吸电子基团(6g)或者共轭结构的化合物会有较好的活性(6o、6p),而弱吸电子基团或者供电子基团则会表现出较差的活性(6d、6h、6j、6m)。对于痤疮丙酸杆菌含有强吸电子的基团表现出较好的活性(6h)。对于白色假丝酵母菌含有大的共轭 π 键的化合物有比较优良的活性(6k、6p、6q)。

总体来看含有吸电子基团的化合物抗菌活性更强,但是,不同细菌对化合物吸电子的能力要求不同。例如,大肠杆菌对于含有弱吸电子的化合物也可以表现出较好的抑菌活性,而铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌则需要更强的吸电子基团才会表现出较优的抗菌活性。白色假丝酵母菌则与化合物的共轭 π 键有关,大的共轭 π 键可能对反应更有利。

3 分子对接

筛选了白色假丝酵母菌的相关蛋白(PBD ID:4WMZ)分别与噻洛芬酸和较优的衍生物进行

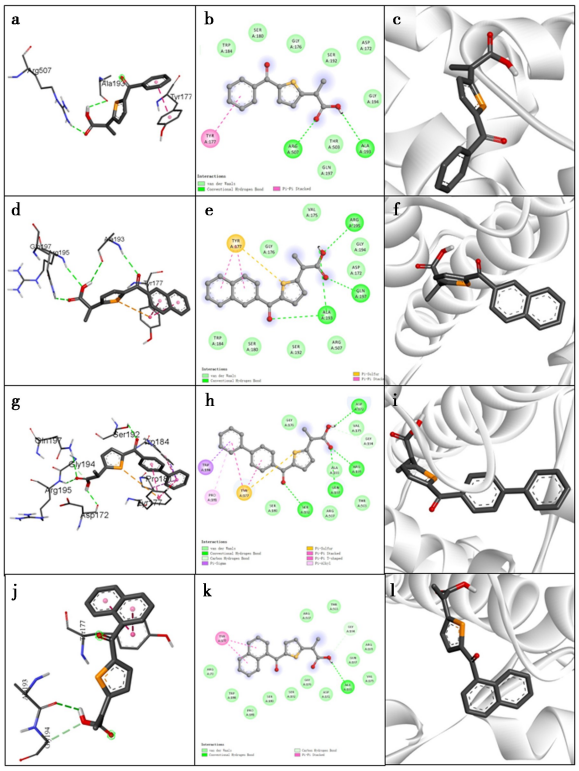
分子对接。通过 Discovery Studio 19 软件模拟化合物与白色假丝酵母菌相关蛋白的作用机制,更深入地研究活性较好的化合物可能含有的良性基团。根据表 2 和图 2 的数据可以看出,化合物 6q

表 2　化合物 6a、6k、6p、6q 与 4WMZ 相互作用[注]

Tab.2　Interaction between compounds 6a,6k,6p, 6q and 4WMZ

分子	氢键	π-π 共轭	范德华力	其它作用力
6a	ARG-507 ALA-193	TYR-177	TRP-184 SER-180 ……	——
6k	ARG-195 GLN-197 ALA-193	TYR-177	VAL-175 GLY-176 ……	TYR-177
6p	ASP-172 ARG-195 GLN-197 SER-192	TYR-177	GLY-176 VAL-175 ……	PRO-181 TRP-184 TYR-177
6q	ALA-193	TYR-177	ARG-507 THR-503 ……	——

注:——表示没有相互作用力;……表示还有其他未注明范德华力。



a、d、g、f 为 2D 图;b、e、h、k 为 3D 图;c、f、i、l 为对接模型图

图 2　化合物 6a、6k、6p、6q 与 4WMZ 相互作用 2D 图,相互作用 3D 图和对接模型图

Fig.2　2D diagram,3D diagram and docking model diagram of interaction between compounds 6a,6k,6p,6q and 4WMZ

与蛋白 4WMZ 之间只有 1 个氢键和 1 个 π-π 共轭作用;噻洛芬酸与蛋白 4WMZ 之间有 2 个氢键和 1 个 π-π 共轭作用,作用力都较小。化合物 6k 与蛋白 4WMZ 之间有 2 个氢键作用和 1 个 π-π 共轭作用,作用力中等。而化合物 6q 与蛋白 4WMZ 之间有 4 个氢键作用和 1 个 π-π 共轭作用,作用力最强。计算模拟结果和实验结果对比来看,氢键使得化合物与蛋白的作用力增强,化合物抑菌活性也增强。

通过化合物与蛋白 4WMZ 的作用 2D 图分析,可以看出,化合物 6p 和 6k 活性较好的原因推测是蛋白片段通过 π 键将联苯(萘环)片段和噻吩片段结合起来(作用力 TYR-177),使得化合物羰基和羧基的氧原子更加的“裸露”,从而更容易与蛋白质的其它片段通过氢键结合。作用力的增强使得化合物更好地与蛋白结合,从而发挥抑菌作用。

4　结果与讨论

通过对噻洛芬酸及其衍生物的抗菌活性研究,实验结果表明,噻洛芬酸具有一定的抗菌活性,改造后的化合物相对于噻洛芬酸母体抗菌活性大多数都有所提高。化合物 6p 对白色假丝酵母的最低抑菌浓度(MIC)为 3.14 mg/mL,强于阳性对照药氟康唑。并且,通过分子对接表明,其活性较强的原因是化合物 6p 与蛋白质之间 π 键的作用导致其与蛋白之间氢键变多,分子间作用力变强,抑菌活性也增强。这为抑制白色假丝酵母菌的进一步研究与开发提供了一个新的方向。

参考文献:

[1]MIURA T. Reactivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with peroxidase:A classification of nonsteroidal anti-inflammatory drugs[J]. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2012, **64**(**10**):1 461-1 471.

[2]KNIGHTS K M,TSOUTSIKOS P,MINERS J O,et al.Novel mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced renal toxicity[J].*Expert Opin. Drug Met.*, 2005, **1**(**3**):399-408.

[3]YAXLEY J,LITFIN T.Non-steroidal anti-inflammatories and the development of analgesic nephropathy:A systematic review[J].*Renal Failure*,2016,**38**(**9**):1 328-1 334.

[4]GRAHAM D Y. Prevention of gastroduodenal injury induced by chronic nonsteroidal antiinflammatory drug

therapy[J]. *Gastroenterology*, 1989, **96**: 675.

[5] KONG J S W, TEUBER S S, GERSHWIN M E, et al. Aspririn and nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity[J]. *Clin. Rev. Allerg. Immu.*, 2007, **32**(**1**): 97-109.

[6] MARKO M, ZORC B, LANA P, et al. Fenoprofen and ketoprofen amides as potential antitumor agents[J]. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2007, **69**(**3**): 222-226.

[7] PAES L R C, DA S B. Antimicrobial activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs on biofilm: Current evidence and potential for drug repurposing[J]. *Front. Microbiol.*, 2021, **12**: 707 629.

[8] KRAGHOLM K, TORP-PEDERSEN C, FOSBOL E, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug use in COVID-19 [J]. *Lancet Rheumatol.*, 2021, **3**(**7**): e465-e466.

[9] 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.

[10] SOHEILI V, BAZZAZ B S, ABDOLLAHPOUR N, et al. Investigation of pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signaling system for identifying multiple inhibitors using molecular docking and structural analysis methodology [J]. *Microb. Pathog.*, 2015, **89**: 73-78.

[11] CAI J, HOU Y, LI J, et al. Prostaglandin E2 attenuates synergistic bactericidal effects between COX inhibitors and antibiotics on Staphylococcus aureus[J]. *Prostag. Leukotr. Ess.*, 2018, **133**: 16-22.

[12] ROSATO A, CATALANO A, CAROCCI A, et al. In vitro interactions between anidulafungin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms of Candida spp[J]. *Bioorg. Med. Chem.*, 2016, **24**(**5**): 1 002-1 005.

[13] KEFFER J L, PLAZA A, BEWLEY C A, et al. Motualevic acids A-F, antimicrobial acids from the sponge Siliquariaspongia sp[J]. *Org. Lett.*, 2009, **11**(**5**): 1 087-1 090.

[14] WU X, WANG W, LI B, et al. Synthesis and electrochromic, acidochromic properties of Schiff bases containing triphenylamine and thiophene units[J]. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol.*, 2015, **140**: 398-406.

[15] CAFIERO L R, SNOWDEN T S. General and practical conversion of aldehydes to homologated carboxylic acids [J]. *Org. Lett.*, 2008, **10**(**17**): 3 853-3 856.

[16] HU J T, LAN T L, RAO Y, et al. Unactivated C(sp^3)-H hydroxylation through palladium catalysis with H_2O as the oxygen source[J]. *Chem. Commun.*, 2013, **51**(**80**): 14 929-14 932.

[17] 郑庚修, 嵇耀武, 黄志新, 等. 噻洛芬酸的合成[J]. 中国医药工业杂志, 1991, **22**(**3**): 97-98.

[18] 孙敏, 蔡进, 周文, 等. 噻洛芬酸的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2006, **37**(**12**): 796-797.

[19] 于龙江. 三价锰作用下托美汀和噻洛芬酸的合成研究[D]. 天津: 天津理工大学, 2007.

功能型 SiO_2 气凝胶在生物医药领域的研究进展

吕春艳[a,b,c]，王文倩[a,c]，崔闻宇[a,b,c]，张文君*[a,b,c]，厚晓庆[a,c]，韩锐[a,c]
（哈尔滨商业大学 a.药学院，b.抗肿瘤天然药物教育部工程研究中心，
c.黑龙江省预防与治疗老年性疾病药物研究重点实验室，黑龙江 哈尔滨　150076）

摘要：SiO_2 气凝胶具有高孔隙率、高比表面积、良好的生物相容性和生物降解性等性质，其成为生物医药领域研究的热点之一。总结了 SiO_2 气凝胶的功能型分类、特性及其影响因素，分析了 SiO_2 气凝胶的潜在毒性，综述了 SiO_2 气凝胶在药物输送系统、组织工程和生物传感器等生物医药领域的应用及研究现状，最后对 SiO_2 气凝胶在生物医药领域的发展前景进行展望，以期为 SiO_2 气凝胶材料在生物医药领域的进一步研究和应用提供参考。

关键词：SiO_2 气凝胶；功能型分类；生物相容性；药物输送；生物医药领域
中图分类号：TQ4　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0258-3283(2023)07-0051-06
DOI：10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0078

Application of Functionalized SiO_2 Aerogels in the Field of Biomedicine

LV Chun-yan[a,b,c]，*WANG Wen-qian*[a,c]，*CUI Wen-yu*[a,b,c]，*ZHANG Wen-jun**[a,b,c]，*HOU Xiao-qing*[a,c]，*HAN Rui*[a,c]（a.College of Pharmacy，b.Engineering Research Center，Ministry of Education，c.Key Laboratory of Drug Research for the Prevention and Treatment of Senile Diseases，School of Harbin University of Commerce Medicine，Harbin 150076，China）

Abstract：Due to its unique properties，such as high porosity，high specific surface area，biocompatibility，and biodegradability，SiO_2 aerogels have become one of the research hotspots in the field of biomedicine.In this paper，the functional classification，characteristics and influencing factors of SiO_2 aerogels were summarized，and the potential toxicity of SiO_2 aerogels was analyzed，the application and research status of SiO_2 aerogels in the fields of biomedicine，such as drug delivery system，tissue engineering and biosensor，were reviewed，it is expected to provide references for further research and application of SiO_2 aerogels in the field of biomedicine.

Key words：SiO_2 aerogel；functional classification；biocompatibility；drug delivery；the field of biomedicine

气凝胶是一种结构可控的轻质纳米多孔材料，种类繁多，在过去的几十年里得到了越来越多的关注，并在生物医药领域中得到了广泛的研究。SiO_2 气凝胶由 Kistler 于 20 世纪 30 年代发现，在众多气凝胶中最受关注，对其研究最多[1]。SiO_2 气凝胶表面存在易于修饰的基团，通过物理改性或化学反应接枝，赋予其新的官能团，实现不同功能化，例如催化型、机械型、载药型、热稳定型和其他类型，从而应用到医药、催化、隔热等多个领域[2]。由于 SiO_2 气凝胶具有高孔隙率、高表面积、生物降解性和生物相容性等特点，因而在生物医药领域的研究备受关注，包括药物传递、组织支架、植入材料、生物成像和生物传感等[3]。随着人们对 SiO_2 气凝胶的深入研究，使其在生物医药领域的应用有了可观的进展。通过中国知网、Wiley InterScience 等数据库，查阅了近十几年来关于 SiO_2 气凝胶在生物医药领域中的最新研究成果，从 SiO_2 气凝胶特性、分类、影响因素、毒性及其在生物医药领域中的应用几个方面进行了归纳总结，为 SiO_2 气凝胶在生物医药领域中的进一步研究及应用提供参考。

因此，据近年文献对 SiO_2 气凝胶的功能化分类及其在生物医药领域应用进展进行系统研究，有助于新型功能化 SiO_2 气凝胶的开发以及在生物医药领域应用的进一步拓展。

1　SiO_2 气凝胶的特性

SiO_2 气凝胶具有高孔隙率、高表面积、生物

收稿日期：2023-02-11；**网络首发日期**：2023-04-25
基金项目：黑龙江省教育厅青年后备人才专项计划项目（2019CX41）；哈尔滨商业大学博士科研启动基金项目（13DL023）。
作者简介：吕春燕（1984-），女，黑龙江哈尔滨人，博士，副教授，主要从事纳米材料及新型药物传输系统研究。
通讯作者：张文君，E-mail：wenjun0501@126.com。
引用本文：吕春艳，王文倩，崔闻宇，等.功能型 SiO_2 气凝胶在生物医药领域的研究进展[J].化学试剂，2023，**45**(7)：51-56。

相容性、亲疏水性等特性,这些独特性能为其在基础研究和应用领域的广泛使用提供了可能性。表 1 中总结了 SiO_2 气凝胶特性、应用领域及其应用原理。

表 1 SiO_2 气凝胶的特性

Tab.1 Characteristics of SiO_2 aerogels

特性	应用	原理
孔隙结构[4]	载药,释药	SiO_2 气凝胶的孔径决定了药物被吸附到孔隙中的分子大小和释药速率;随着气凝胶孔径的增加,药物负载量和释药速率升高。
低密度[5]	载药	SiO_2 气凝胶密度低,从而具有较高的孔隙率,有利于大量药物负载。
高表面积[6]	载药	SiO_2 气凝胶具有高表面积,为药物的大量附着提供充足的空间。
生物相容性[7]	载药,组织工程	SiO_2 气凝胶具有生物相容性,一方面可延长药物在体内的存留时间;另一方面有效降低细胞毒性,提高细胞的存活、附着和生长,可作为潜在的骨组织工程骨支架材料。
亲水性[8]	释药	亲水性气凝胶可以克服液体中基质快速侵蚀的限制,以此来阻碍药物的突发性释放,并实现受控释放。
疏水性[9]	释药	通过具有疏水基团的 SiO_2 气凝胶表面衍生化和表面修饰来影响包埋药物释放,实现药物的控制释放。
可调节性[10]	靶向	通过表面修饰 SiO_2 气凝胶,在气凝胶表面键合其他功能基团,使载体材料被赋予靶向性[11-13],被特定细胞的特有受体选择性识别,用于药物靶向释放。

2 功能型 SiO_2 气凝胶分类

SiO_2 气凝胶经过调控,可以优化其孔隙率、密度及亲水性等特性,从而增强其催化、抑菌、载药等性能[14]。按照调控性能不同,可将其分为响应型、抑菌型、载药型、热稳定型、吸附型等几类。

2.1 响应型 SiO_2 气凝胶

可控释放和靶向释放限制了纳米载体的传递疗效和临床应用。基于 SiO_2 气凝胶的纳米平台为提高药物疗效提供了一些可行的策略。光热释放和 pH 控制释放是功能型 SiO_2 气凝胶纳米载体的优良特性,在癌症和细菌治疗、组织工程和生物成像等生物医药领域都有良好的应用。石墨烯-SiO_2 气凝胶作为纳米载体进行载药,通过谷胱甘肽(GSH)[15]触发药物释放,已被证明成功地实现响应性释放,为设计刺激反应药物释放系统提供了机会。

2.2 抑菌型 SiO_2 气凝胶

近年来,尽管抗生素已被广泛应用于致病性感染的临床治疗,但耐药性是由抗生素的滥用引起的,这种耐药性正成为对人类生存的潜在威胁。因此具有超低密度、高孔隙率和孔径可调、生物相容性等优点的 SiO_2 气凝胶通过负载抗菌剂,掺入金属/金属氧化物以及通过表面功能化和涂覆各种官能团来提供抗菌活性得到重视。在医学领域,Tian 等[16]利用溶剂蒸发法在硅烷季铵接枝中空介孔二氧化硅给药系统中加载甲硝唑,研究了该载药系统的体外抗菌作用,发现对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌作用随着甲硝唑负荷浓度的增加而增加。

2.3 载药型 SiO_2 气凝胶

为改善 SiO_2 气凝胶的生物相容性,使其更好地应用于药物传送,以壳聚糖和原硅酸四乙酯为反应前驱体,通过溶胶-凝胶法和冷冻干燥技术制备壳聚糖-SiO_2 复合气凝胶,增大 SiO_2 气凝胶的孔体积和表面积,使制得的壳聚糖-SiO_2 复合气凝胶载药量增大,药物溶解度提高,并且有较好的药物缓释效果,发挥药物的最大生物利用度[17],进一步扩展 SiO_2 气凝胶在医药学领域的应用。

2.4 热稳定型 SiO_2 气凝胶

为提高 SiO_2 气凝胶在医药领域应用的稳定性,用亚临界干燥技术制得 Ag/SiO_2 复合气凝胶,通过增大孔径和孔体积来提高热稳定性能。Ameen 等[18]发现,Ag/SiO_2 复合气凝胶热稳定性增强,这一发现可以使所制备的材料在医药应用方面具有广泛的前景,如医疗植入物、伤口敷料。利用原位复合法制备环氧树脂-SiO_2 复合气凝胶,可以改善气凝胶骨架坍塌和颗粒破碎的现象[19],因此制得的环氧树脂-SiO_2 复合气凝胶热稳定性增强。此外,环氧树脂的加入量不同,使制得的环氧树脂-SiO_2 复合气凝胶孔径不同,可以实现包载不同大小药物的目的。

2.5 吸附型 SiO_2 气凝胶

由于纳米气凝胶材料吸附性能好,可吸附多种活性分子,因此在医学上有许多应用,如药物传递、成像、疾病诊断和筛选、DNA 测序、基因治疗和组织培养以及癌症等。治疗 SiO_2 气凝胶因其尺寸可控、生物相容性、生物安全性、化学稳定性和催化性能等应用前景而受到广泛关注。为拓展 SiO_2 气凝胶在医药领域的应用,Chen 等[20]提出了一种改进药物吸附的气凝胶,将氧化石墨烯掺入壳聚糖基体中制得交联壳聚糖/SiO_2 负载石墨烯(CS/石墨烯-SiO_2)复合气凝胶,增强了对胆红素的吸附能力,表现出高吸附容量和快速吸附速率。

2.6　其他类型

为改善 SiO_2 气凝胶机械性能弱、容易脆裂坍塌的缺点,通过添加玻璃纤维使制得的复合材料机械性能增强[21],以 Al_2SiO_5 纤维作为增强材料,通过超声波处理改性后的 SiO_2 气凝胶,制得 Al_2SiO_5/SiO_2 气凝胶,力学性能明显优于纯气凝胶材料[22],可应用于防止药物突释和作为骨架支撑材料。

3　SiO_2 气凝胶性能影响因素

SiO_2 气凝胶性能具有多种影响因素,如温度、pH 值、催化剂、老化、干燥、加水量等。表 2 中总结了各影响因素对 SiO_2 气凝胶性能的影响机制并加以引证。

表 2　SiO_2 气凝胶性能影响因素

Tab.2　Factors affecting the properties of SiO_2 aerogels

影响因素	影响机制	引证
温度	温度升高促进缩聚产物互相碰撞,缩短凝胶时间。	通过实验[23]证明温度与凝胶中氢键的形成和离解有关,当溶液温度升高时,使凝胶网络疏松,凝胶溶胀;温度下降时,凝胶收缩,溶胀度的改变会影响其载药和释药能力。
pH 值	SiO_2 气凝胶在不同 pH 值下渗透性能不同,达到靶向、缓控释药的作用。	Kono 等[24]用部分交联的聚丙烯酸-聚乙烯亚胺共聚物构成胶囊,发现改变缓冲液 pH 值可对药物分子的渗出进行控制。
催化剂	催化剂可以影响缩聚反应的速率。	Haranath 等[25]比较了不同催化剂对 SiO_2 气凝胶微观结构的影响。实验表明,对于碱性催化剂,孔径分布向较大的孔径方向移动,对于酸性催化剂,孔径分布向较小的孔径方向移动。
老化	老化过程中,伴随化学反应改变 SiO_2 气凝胶的孔径和比表面积。	在老化过程中网络曲率会降低,平均孔径和比表面积受老化时间的影响[26],从而影响 SiO_2 气凝胶的药物附着能力。
干燥	干燥除去凝胶中残留溶剂,减小溶剂对凝胶引起的表面毛细管张力,进而降低 SiO_2 气凝胶收缩程度,使其骨架结构完好。	干燥凝胶[27]使凝胶孔内的溶剂蒸发;也可使用表面改性剂促进所谓的回弹效果,改善毛细管张力,防止 SiO_2 气凝胶开裂,使其骨架结构完好[28],提高 SiO_2 气凝胶在医药领域方面如组织支架的稳定性。
加水量	加水量会影响缩聚物的交联度和聚合度,随着加水量增多,缩聚物的交联度和聚合度都增大,从而使凝胶时间缩短。	Zhang 等[29]研究湿度环境对硅纳米多孔材料导热系数的影响,证明过量的水加快了水解反应速度。当材料含水量增加时,导热系数也随温度增加变快。

4　SiO_2 气凝胶的毒性

用于药物传递的气凝胶研究中,尽管所有测试都显示出良好的细胞相容性和生物相容性,但也有被检测到毒性事件,如聚合物气凝胶、无机气凝胶[30]。因此,需要更多长期展示、重复给药和吸收、分布、代谢和排泄(ADME)的数据,以确保其在生物医学应用中的安全使用。

4.1　SiO_2 气凝胶的细胞毒性

SiO_2 气凝胶表面存在的游离硅烷醇、硅氧烷基团和 SiO_2 衍生的自由基是其相关毒性的主要原因[31],通过吸入、摄入、皮肤渗透和血液循环等途径对人体产生相关的生物学影响,如细胞溶血、神经毒性、肺癌、纤维化、肾损伤等。Tiryaki 等[32]研究了由高浓度(≥10 mg/mL)口服途径诱导的 Caco-2(上皮结肠)细胞的细胞毒性,发现 SiO_2 气凝胶引起了细胞毒性,但在右旋糖酐化学功能化后被消除。因此,生物可降解聚合物对二氧化硅的功能化可以降低表面游离硅醇基团引起的细胞毒性。

4.2　SiO_2 复合气凝胶的潜在毒性

SiO_2 复合气凝胶通常被认为是安全的,但它们可能有相关的潜在毒性。气凝胶的结构会引起肾脏、肺和肝毒性积累,例如,一种用于伤口敷料的壳聚糖-SiO_2 气凝胶在上皮结肠细胞系(HT29)中也显示出潜在毒性[33]。研究证明[34],可通过化学和离子交联方式降低 SiO_2 复合气凝胶的正电荷,从而降低 SiO_2 复合气凝胶的潜在毒性,同时保持抗菌活性。

5　SiO_2 气凝胶在医药生物领域的应用

SiO_2 气凝胶具有极高的孔隙率,同时还具有一定的生物相容性和生物降解性,可用于药物输送、组织工程、可植入医疗器械、成像、骨移植、生物传感等生物医学领域[35]。

5.1　用于药物传输

SiO_2 气凝胶作为一种具有大孔隙率、高比表面积及表面易修饰的载体材料,通过静电作用、物理吸附、共价键合等方式负载疏水性药物或抗肿瘤药物,构建药物递送系统,用于改善药物的溶解度,或作为控制药物、靶向的载体[36]提高药物治疗效率。采用不同的方法将药物分子加载到 SiO_2 气凝胶中,可以达到提高药物载药量、改善药物溶出效果和控制药物释放的目的。

5.1.1 提高药物载药量和溶解度

SiO_2 气凝胶因大表面积和高孔体积等优点，可作为一种理想的载体材料。Smirnova 等[37]通过 SiO_2 气凝胶对硝酸咪康唑的装载，载药量高达 60.3%，证明了 SiO_2 气凝胶作为载体系统可以实现较高的载药量。

SiO_2 气凝胶的硅醇基可与药物分子形成氢键，使其从晶态转变为非晶态，从而改善药物的溶解度和提高药物的溶出速率。Smirnova 等[38]研究了 SiO_2 气凝胶作为口服给药系统的可行性，发现吸附在 SiO_2 气凝胶上的药物与相应的结晶药物相比，前者溶解速度更快。

5.1.2 控制药物释放速率

SiO_2 气凝胶可以通过调整表面的官能团来控制释放药物的速率[39]，气凝胶的纳米多孔结构可保证孔中非晶药物的稳定。在与胃肠道液体接触时，液体可能会渗透到孔内，形成巨大的毛细管力，进而破坏气凝胶网络，因此，可从气凝胶-药物配方中控制释放药物。通过实验[40]比较气凝胶中药物与纯结晶药物的溶出情况，结果显示加载气凝胶中尼美舒利的溶解比结晶尼美舒利的溶解快得多。大约 80%的尼美舒利在 6 min 内从气凝胶中溶解，而溶解 80%的晶体药物大约需要 90 min。因此，使用气凝胶作为载体，促进了药物的快速释放。Alnaief 等[41]研究了一种新的 SiO_2 气凝胶微球涂层工艺，采取了将模型药物布洛芬加载到气凝胶微球上的方法，证明 SiO_2 气凝胶可以控制药物释放速率。

5.1.3 靶向药物递送

靶向药物传递系统定位在体内的目标区域，将药物递送到该区域，而不会影响身体中的任何其他区域。为了提高药物的疗效，利用能被肿瘤细胞选择性识别的功能化纳米载体对药物进行包覆[42]。在众多纳米载体中，易于表面修饰的 SiO_2 气凝胶得到了广泛的关注。Tsai 等[43]通过聚乙二醇间隔物将抗 her2/neu 单抗(单克隆抗体)偶联到含有绿色荧光染料的 SiO_2 气凝胶上，检测了它们对 her2/neu 过表达乳腺癌细胞的靶向特性，结果表明此偶联系统具有较高的靶向效率，证明 SiO_2 气凝胶在靶向药物传递中具有潜力。

5.2 用于生物组织支架

一般来说，气凝胶通常是组织工程的首选，SiO_2 气凝胶具有高孔隙率、较好的机械强度和生物相容性，可用于细胞附着，并具有向细胞供应营养和氧气以及消除细胞代谢副产物的互连性，也可以设计成支架所需的几乎任何形状和形态，是组织工程支架的理想候选材料。Ge 等[44]研究了 SiO_2 气凝胶/聚己内酯(PCL)复合材料作为骨组织工程的潜在骨支架材料，是可生物降解的，其成分类似于组织细胞外基质(ECM)中的成分，并显示良好的细胞相容性。SiO_2 气凝胶也被用作加工生物组织的中间体，通过添加附加功能材料用于组织工程[45]。

5.3 用于医疗植入材料

生物医学植入物，特别是以气凝胶为代表的生物材料，在医药学领域具有广阔的前景。Yin 等[46]研究了几种用于植入的机械改进 SiO_2 气凝胶，由于极低密度和高机械强度可用作人造心脏瓣膜。Weiss 等[47]发现 N3200 聚脲增强 SiO_2 气凝胶具有良好的生物相容性和结构血浆生物稳定性，其性能已通过表面等离子体处理进行了优化，使其对免疫反应更具惰性，证明 SiO_2 气凝胶可应用于植入式心血管设备。

5.4 用于生物医学成像

SiO_2 气凝胶具有声吸收特性，近年来，气凝胶基植入物被考虑用于周围神经系统的无创和快速成像。通过超声成像技术利用气凝胶与软生物组织之间的声阻差异跟踪植入物的降解[48]；SiO_2 气凝胶通过使用 X 射线成像模式帮助在大鼠模型中对气凝胶植入物进行体内跟踪[49]，得到了较好的成像效果；此外，SiO_2 气凝胶也被用于肺幻影[50]的多模态成像，多孔和质轻的二异氰酸酯交联 SiO_2 气凝胶可以模拟肺和纤维组织的海绵状和柔性结构，以评估各种成像方式的性能，SiO_2 气凝胶幻影 MRI 成像评估显示弛豫时间值在正常范围内。然而，在这方面，需要详细研究气凝胶的物理性质，如孔隙大小和交联聚合物的类型，以满足该材料的肺幻影应用。

5.5 用于生物传感

SiO_2 气凝胶本身的高孔隙率、良好的生物相容性、表面易修饰等特点使其具有成为生物传感器的潜质。Ayers 等[51]利用光致发光 SiO_2 气凝胶作为活性元素用于气态分子氧的光学传感。Power 等[52]报道了基于 SiO_2 气凝胶的生物传感器，用于检测和收集气溶胶病毒颗粒。这种基于 SiO_2 气凝胶的生物传感器具有可重复性、敏感度高、稳定性好及反应迅速等优势，是一种良好的新型生物传感介质。

6　发展前景与展望

近年来,SiO_2 气凝胶在生物医药领域的关注度越来越高,并取得了良好的研究成果。但是,为了更深入探究 SiO_2 气凝胶基材料与生物医药应用间的作用机制,在后续的研究工作中,还应加强以下几方面的研究工作:(1)加强 SiO_2 气凝胶的生物相容性和毒性的体内外研究,努力开发出生物相容性优异、毒性低甚至无毒的 SiO_2 气凝胶基材料,更好地应用于生物医药领域。(2)加强 SiO_2 气凝胶与功能性分子共组装的作用机制研究,以期精准调控 SiO_2 气凝胶基材料的结构与功能,为其在生物医药领域的广泛应用奠定基础。(3)进一步深入探究 SiO_2 气凝胶本身的特性与药物相互作用对其载药、释药能力的影响机制,为新药开发、制剂研究提供理论依据。综上所述,通过不断深入的研究,SiO_2 气凝胶一定会极大地发挥 SiO_2 气凝胶材料在生物医药领域应用的优越性。

参考文献:

[1] BERNIK D L. Silicon based materials for drug delivery devices and implants[J]. *Recent Pat. Nanotech.*, 2007, **1**(**3**):186-192.

[2] JIANG P, JI Z, WANG X, et al. Surface functionalization—A new functional dimension added to 3D printing[J]. *J. Mater. Chem. C*, 2020, **8**(**36**):12 380-12 411.

[3] ABDUL-KHALIL H P S, YAHYA E B, TAJARUDIN H A, et al. Insights into the role of biopolymer-based xerogels in biomedical applications[J]. *Gels*, 2022, **8**(**6**): 334.

[4] GARCIA-GONZALEZ C A, SOSNIK A, KALMAR J, et al. Aerogels in drug delivery: From design to application[J]. *J. Control. Release*, 2021, **332**:40-63.

[5] DORCHEH A S, ABBASI M H. Silica aerogel synthesis, properties and characterization[J]. *J. Mater. Process. Technol.*, 2008, **199**(**1/3**):10-26.

[6] QIN L, HE Y, ZHAO X, et al. Preparation, characterization, and in vitro sustained release profile of resveratrol-loaded silica aerogel[J]. *Molecules*, 2020, **25**(**12**):2 752.

[7] GEORGE A, SHAH P A, SHRIVASTAV P S. Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review[J]. *Int. J. Pharmaceut.*, 2019, **561**: 244-264.

[8] GUENTHER U, SMIRNOVA I, NEUBERT R H H. Hydrophilic silica aerogels as dermal drug delivery systems-Dithranol as a model drug[J]. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008, **69**(**3**):935-942.

[9] SMIRNOVA I, SUTTIRUENGWONG S, ARLT W. Feasibility study of hydrophilic and hydrophobic silica aerogels as drug delivery systems[J]. *J. Non-Cryst. Solids*, 2004, **350**:54-60.

[10] HE Q, SHI J, CHEN F, et al. An anticancer drug delivery system based on surfactant-templated mesoporous silica nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2010, **31**(**12**): 3 335-3 346.

[11] VERONOVSKI A Z, KNE Z, NOVAK Z. Comparison of ionic and non-ionic drug release from multi-membrane spherical aerogels[J]. *Int. J. Pharmaceut.*, 2013, **454**(**1**):58-66.

[12] VERES P, LOPEZ-PERIAGO A M, LAZAR I, et al. Hybrid aerogel preparations as drug delivery matrices for low water-solubility drugs[J]. *Int. J. Pharmaceut.*, 2015, **496**(**2**):360-370.

[13] ANTONYUK S, HEINRICH S, SMIRNOVA I. Discrete element study of aerogel particle dynamics in a spouted bed apparatus[J]. *Chem. Eng. Technol.*, 2012, **35**(**8**): 1 427-1 434.

[14] ALNAIEF M, SMIRNOVA I. Effect of surface functionalization of silica aerogel on their adsorptive and release properties[J]. *J. Non-Cryst. Solids*, 2010, **356**(**33/34**): 1 644-1 649.

[15] ZENG X, YUAN Y, WANG T, et al. Targeted imaging and induction of apoptosis of drug-resistant hepatoma-cells by miR-122-loaded grap hene-InPnano compounds[J]. *J. Nanobio Technol.*, 2017, **15**:9.

[16] TIAN B, LIU Y. Antibacterial applications and safety issues of silica-based materials: A review[J]. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, 2021, **18**(**2**):289-301.

[17] GARCIA-GONZALEZ C A, ALNAIEF M, SMIRNOVA I. Polysaccharide-based aerogels-promising biodegradable carriers for drug delivery systems[J]. *Carbohyd. Polym.*, 2011, **86**(**4**):1 425-1 438.

[18] AMEEN K B, RAJASEKHARAN T, RAJASEKHARAN M V. Grain size dependence of physico-optical properties of nanometallic silver in silica aerogel matrix[J]. *J. Non-Cryst. solids*, 2006, **352**(**8**):737-746.

[19] 刘昊.二氧化硅气凝胶/聚合物复合材料的制备与性能研究[D].北京:北京化工大学,2019.

[20] CHEN J, MA Y, WANG L, et al. Preparation of chitosan/SiO_2-loaded graphene composite beads for efficient removal of bilirubin[J]. *Carbon*, 2019, **143**:352-361.

[21] 王少伟,邵亚国.二氧化硅气凝胶/玻纤棉复合材料导热性的研究[J].玻璃纤维,2019,**1**:9-14.

[22] 蒋颂敏,段小华,王晓欢,等.硅酸铝纤维增强 SiO_2 气凝胶复合材料的力学与隔热性能研究[J].玻璃钢/复合材料,2018,**5**:79-83.

[23] ANDERSON M L, STROUD R M, MORRIS C A, et al. Tailoring advanced nanoscale materials through synthesis of composite aerogel architectures[J]. *Adv. Eng. Mater.*, 2000, **2**(**8**):481-488.

[24] KONO K, TABATA F, TAKAGISHI T. pH-responsive

permeability of poly (acrylic acid)—Poly (ethylenimine) complex capsule membrane [J]. *J. Membrane Sci.*, 1993, **76**(**2/3**): 233-243.

[25] HARANATH D, RAO A V, WAGH P B. Influence of DCCAs on optical transmittance and porosity properties of TMOS silica aerogels[J]. *J. Porous Mat.*, 1999, **6**: 55-62.

[26] 李伟. 溶胶-凝胶法制备二氧化硅气凝胶纳米材料的研究[D]. 湘潭: 湘潭大学, 2002.

[27] MALEKI H, DURAES L, PORTUGAL A. Development of mechanically strong ambient pressure dried silica aerogels with optimized properties [J]. *J. Phys. Chem. C*, 2015, **119**(**14**): 7 689-7 703.

[28] BISSON A, RIGACCI A, LECOMTE D, et al. Drying of silica gels to obtain aerogels: Phenomenology and basic techniques[J]. *Dry. Technol.*, 2003, **21**(**4**): 593-628.

[29] ZHANG H, GU W, LI M J, et al. Influence of environmental factors on the adsorption capacity and thermal conductivity of silica nano-porous materials [J]. *JNN*, 2015, **15**(**4**): 3 048-3 054.

[30] 张丽丽. 二氧化硅/聚噻吩复合吸附剂处理 Pb^{2+} 和 Cd^{2+}[J]. 化学试剂, 2022, **44**(**3**): 385-392.

[31] BANG A, SADEKAR A G, BUBACK C, et al. Evaluation of dysprosia aerogels as drug delivery systems: A comparative study with random and ordered mesoporous silicas [J]. *ACS Appl. Mater. Inter.*, 2014, **6**(**7**): 4 891-4 902.

[32] TIRYAKI E, ELALMIS Y B, IKIZLER B K, et al. Novel organic/inorganic hybrid nanoparticles as enzyme-triggered drug delivery systems: Dextran and dextran aldehyde coated silica aerogels[J]. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2020, **56**: 101 517.

[33] DI P P, STRANO G, ZUCCARELLO L, et al. Gold and silver nanoparticles for applications in theranostics[J]. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2016, **16**(**27**): 3 069-3 102.

[34] SABRI F, BOUGHTER JR J D, GERTH D, et al. Histological evaluation of the biocompatibility of polyurea crosslinked silica aerogel implants in a rat model: A pilot study[J]. *PloS One*, 2012, **7**(**12**): e50 686.

[35] STERGAR J, MAVER U. Review of aerogel-based materials in biomedical applications[J]. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2016, **77**(**3**): 738-752.

[36] HARI S K, GAUBA A, SHRIVASTAVA N, et al. Polymeric micelles and cancer therapy: An ingenious multimodal tumor-targeted drug delivery system[J]. *Drug Deliv. Transl. Re.*, 2023, **13**(**1**): 135-163.

[37] SMIRNOVA I, SUTTIRUENGWONG S, ARLT W. Feasibility study of hydrophilic and hydrophobic silica aerogels as drug delivery systems [J]. *J. Non-Cryst. Solids*, 2004, **350**: 54-60.

[38] SMIRNOVA I, SUTTIRUENGWONG S, SEILER M, et al. Dissolution rate enhancement by adsorption of poorly soluble drugs on hydrophilic silica aerogels[J]. *Pharm. Dev. Technol.*, 2005, **9**(**4**): 443-452.

[39] 张文君, 吴梦婷, 吕春艳, 等. 介孔二氧化硅在药物递送系统及其体内外研究进展[J]. 生物技术通报, 2019, **35**(**12**): 10.

[40] CAPUTO G. Fixed bed adsorption of drugs on silica aerogel from supercritical carbon dioxide solutions[J]. *Int. J. Che. Eng.*, 2013, **2 013**: 7.

[41] ALNAIEF M, ANTOYUK S, HENTZSCHEL C M, et al. A novel process for coating of silica aerogel microspheres for controlled drug release applications[J]. *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2012, **160**: 167-173.

[42] COLILLA M, BAEZA A, VALLET-REGI M. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and controlled release applications [J]. *The Sol-Gel Handbook*, 2015, **42**(**8**): 1 309-1 344.

[43] TSAI C, CHEN C, HUNG Y, et al. Monoclonal antibody-functionalized mesoporous silica nanoparticles (MSN) for selective targeting breast cancer cells [J]. *Mater. Chem.*, 2009, **19**: 5 737-5 743.

[44] GE J, LI M, ZHANG Q, et al. Silica aerogel improves the biocompatibility in a poly-caprolactone composite used as a tissue engineering scaffold[J]. *Int. J. Polym. Sci.*, 2013, **2 013**: 7.

[45] GARCIA-GONZALEZ C A, LÓPEZ-IGLESIAS C, CONCHEIRO A, et al. Biomedical applications of polysaccharide and protein based aerogels[J]. *Biobased Aerogels*, 2018, **16**: 295-323.

[46] YIN W, VENKITACHALAM S M, JARRETT E, et al. Biocompatibility of surfactant-templated polyurea-nanoencapsulated macroporous silica aerogels with plasma platelets and endothelial cells[J]. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2010, **92**(**4**): 1 431-1 439.

[47] WEISS P, DAVIS H. Pressure block in nerves provided with arterial sleeves [J]. *J. Neurophysiol.*, 1943, **6**(**4**): 269-286.

[48] SUETENS P. Fundamentals of medical imaging [M]. Cambridge: Cambridge university press, 2017: 268.

[49] SABRI F, SEBELIK M E, MEACHAM R, et al. In vivo ultrasonic detection of polyurea crosslinked silica aerogel implants[J]. *PloS One*, 2013, **8**(**6**): e66 348.

[50] IN E, NAGUIB H. Fabrication and characterization of silica aerogel as synthetic tissues for medical imaging phantoms[C]. *AIP Conference Proceedings*. AIP Publishing LLC, 2015, **1 664**(**1**): 130 002.

[51] AYERS M R, HUNT A J. Synthesis and properties of chitosan-silica hybrid aerogels [J]. *J. Non-Cryst. Solids*, 2001, **285**(**1/3**): 123-127.

[52] POWER M, HOSTICKA B, BLACK E, et al. Aerogels as biosensors: Viral particle detection by bacteria immobilized on large pore aerogel [J]. *J. Non-Cryst. Solids*, 2001, **285**(**1/3**): 303-308.

钌化合物抗微生物应用研究进展

聂鹏*,董睿,许波*
(贵州省食品药品检验所,贵州 贵阳　550004)

摘要:了解新报道的钌化合物抗微生物应用,探究其构效关系。分析近年来已报道的钌化合物抗微生物应用文献,总结其可能发展规律。据文献总结,钌化合物可作用于细胞外膜或者细胞内的核酸,以达到抑菌或抗菌的效果。钌化合物的脂溶性、其骨架支撑配体的电子性质和化合物整体的电荷属性都是影响其抗微生物活性的重要因素,仿生配体的配位与解离能显著提高钌化合物的生物活性和相容性,研究热点也聚焦于纳米钌粒子的绿色合成和生物活性成分应激释放。抗微生物类钌化合物的研究朝着绿色、环保、低毒、高效的方向发展,为后续的深入研究提供了一定参考。

关键词:钌化合物;抗微生物;构型;机制;作用效果
中图分类号:O627.8　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0258-3283(2023)07-0057-09
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0140

Research Progress on Antimicrobial Application of Ruthenium Complexes *NIE Peng**,*DONG Rui*,*XU Bo**(Guizhou Institute for Food and Drug Control,Guiyang 550004,China)

Abstract:Learning about newly reported antimicrobial applications of ruthenium compounds and exploring their intrinsic structure-activity relationship is one of the research goals.The reported literatures on antimicrobial application of ruthenium compounds in recent years were analyzed,and the possible development rule were summarized.According to the literature summary,ruthenium compounds can act on the outer membrane or intracellular nucleic acids to achieve bacteriostatic or antibacterial effects.The lipophilicity of ruthenium compounds,the electronic properties of their backbone support ligands,and the overall charge properties are all important factors affecting their antimicrobial activity.In addition,the coordination and dissociation of biomimetic ligands can significantly improve the biological activity and compatibility of ruthenium compounds,and recent research hotspots focus on the green synthesis of nanoruthenium particles and the stress release of bioactive ingredients.The research of antibacterial ruthenium compounds is developing towards the direction of green and environmentally friendliness,low toxicity and high efficiency,providing references for further research.

Key words:Ru complexes;antimicrobial;configuration;mechanism;effect

在数亿年生命进化史中,微生物一直扮演着重要的角色。自人类诞生至一百年前,微生物病菌是人类健康的最大威胁[1]。随着青霉素以及后续系列抗生素的发现,现代人类才逐渐掌握对抗微生物病菌的有效方法。但随着微生物病菌的迭代变异,其耐药性不断增强,而有机分子类抗生素的发明迟滞于病菌变异,给人类健康带来了重大挑战[2]。

随着顺铂的面世,金属有机类药物逐渐进入到人们的视野,相比有机分子药物而言,其作用彻底、抗菌谱广、微生物耐药性相对较弱等,引起了化学及药学工作者的浓厚兴趣[3]。钌金属有机化合物具有相对较好的生物相容性以及水氧稳定性、丰富的成键性能和空间属性、合适的电负性和电子密度、优异的抗微生物效果,是广大科研工作者重点关注的热点之一[4]。在药学领域,Ru(Ⅱ)配合物目前被用作抗白血病和抗病毒药物,但也有较多文献报道该类化合物在抗微生物领域的新型用途[5]。

按照钌化合物的结构来分,可以分为八面体型、半夹心型以及纳米粒子型。钌原子结合不同官能团的配体,可与不同类型病菌发生不同作用,从而具有较强的专属性,但截至目前,不同于药物专属作用机制,部分钌化合物具有广谱抗菌性,其内在构效关联尚未清晰[6]。因此,本文介绍了部

收稿日期:2023-03-02;**网络首发日期**:2023-04-14
基金项目:黔科合基础-ZK[2021]一般 041。
作者简介:聂鹏(1986-),男,湖南隆回人,博士,副主任药师,主要研究方向为药品质量控制研究。
通讯作者:聂鹏,E-mail:niepeng2001@163.com;许波,E-mail:439207529@qq.com。
引用本文:聂鹏,董睿,许波.钌化合物抗微生物应用研究进展[J].化学试剂,2023,**45**(**7**):57-65。

分钌化合物在抗微生物领域的应用情况,结合其分子的物理化学性质,推理其可能的内在关系,为后续的深入研究提供一定的参考。

1 钌化合物分类

根据现有文献报道,抗菌钌化合物的分子结构可大致分为八面体类配合物、半夹心类配合物以及纳米粒子类配合物。在八面体配合物中,钌占据中心位置,以联吡啶、菲啰啉为代表的双齿氮配体与钌螯合成键,整个分子以离子形式参与作用[7]。在半夹心型配合物中,通常由环戊二烯基、芳烃等 6 电子配体占据钌上三个配位点与钌成键,整个分子呈半夹心形状,钌原子上剩余的三个配位点可结合不同配位数和电荷数的配体[8]。而在纳米粒子中,钌以单体包裹在纳米级亲脂性载体中或连接在纳米粒子上,实现对特定细胞的识别,并根据不同条件产生应激并发挥功效[9]。其中,八面体型钌化合物研究较早,水溶性和脂溶性均较好,其研究较为深入且广泛。而半夹心型钌化合物通常用于金属有机和有机合成方法学研究,在药学领域与仿生分子或基团结合,发挥出不一样的功效。纳米粒子作为新型化合物形态,能较好进行分子识别以及定点释放,其优点显而易见,也是目前药学研究的热点之一。

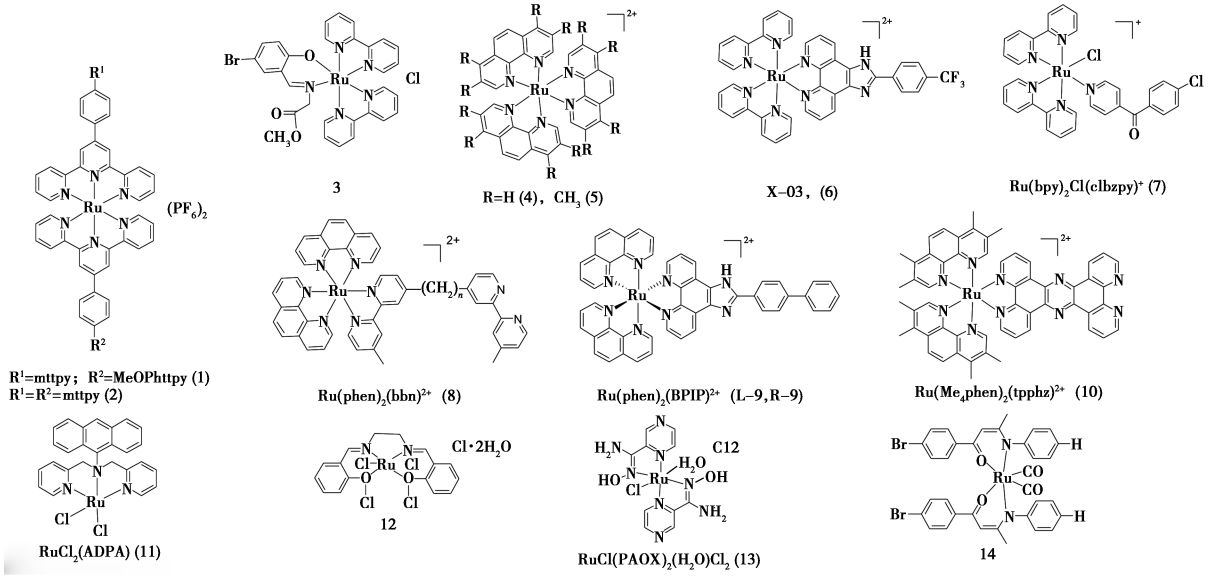


图 1 八面体型钌化合物示例

Fig.1 Examples of octahedral ruthenium compounds

2 八面体钌化合物

八面体钌化合物以钌原子为中心,2~3 个多齿氮杂环配体作为骨架,其他杂原子配体调节中心金属的电子密度和成键功能,共同组建抗微生物分子模型。参与配位的多齿氮杂环配体基于自身的成键轨道特征,能够分散钌原子中心的电子,显著降低钌化合物的极性,进而影响到钌化合物与转运蛋白之间的作用,增加透过微生物外膜的几率[8]。另外提供修饰功能的单齿或双齿配体,通常具有较为丰富的调控原子种类和电子性质,能够有效地控制配体与钌原子之间的配位键能强弱,在适当的溶液环境中发生配体取代反应,与 DNA、RNA 或蛋白相互作用,进而产生抑菌或杀菌的功效。而外围离子通常影响到钌化合物的吸收和转移,但在人体的水系环境中,该类离子通常易与不同形式的水分子结合,产生的作用程度相对较小,主要起维持化合物结构稳定以及电荷属性的作用[10]。该类型化合物的制备方法相对简单,通常经 2~3 步的配体取代反应合成,对于合成条件要求也相对较低,科研工作者更多地关注于配体修饰和特定官能团对化合物抗微生物性能的影响。

2.1 多吡啶配体

多吡啶类配体与钌结合,在药学研究领域有着重要的应用,其研究历史较长,研究也较为透彻。早在 2008 年,Balasubramanian 等[11]报道了系列基于多吡啶钌化合物在抗微生物领域的应用。在该系列化合物中,无论取代基的电子性质

如何,均会导致金属配体电荷转移(MLCT)在可见光谱区强度增加并红移。在抗菌方面,化合物 1 对人体病原体的最低抑制浓度确定为 10~15 μg/mL,比四环素的最低抑制浓度略低。化合物 2 和化合物 1 对褐豆病菌、菜豆病菌和尖孢菌均表现出明显的抗真菌活性,最低抑制浓度分别为 10~15、9~17 μg/mL,而多菌灵对上述 3 种植物病原体的最低抑制浓度为 15、25 μg/mL。这些结果与其他钌配合物如[Ru(bpy)$_2$(2-phenyl-azo-imidazole)]$^{2+}$的最低抑制浓度相当[12]。该报道体现了钌化合物在抗微生物领域的应用潜力。

水杨醛二胺具有抗真菌、抗菌、抗疟、抗病毒和退热等特性,由水杨醛和氨基酸衍生的水杨醛二胺金属螯合物已被证明是生物系统转胺反应机制中的一类重要化合物。Yörür-göreci 等[13]报道了系列结合水杨醛二胺的钌配合物 3 的抗微生物性能。在抑菌方面,3 种不同浓度(1、2.5、5 mg/mL)配合物的抑菌活性均较自由配体有明显提高(分别为 10%、13%和 33.4%)。围绕细胞的脂膜只允许脂溶性物质通过,因此亲脂性是控制抗菌活性的重要因素。根据 Tweedy 的螯合理论来解释,金属配合物的极性相比游离离子大大降低[14],导致配合物的亲脂性增加,进而提高了药物渗透进入脂膜的比例而占据酶中的金属结合位点,因此阻断了蛋白质的合成,从而抑制了微生物的进一步生长。结合具有生物活性功能的特定基团配体,可促进钌化合物在生物体内的作用,有效降低药物分子模型筛选的工作量。

2.2　菲啰啉配体

虽然大多数有机碎片具有线性(1D)或平面(2D)形状,但更复杂的 3D 碎片更适合生物分子的立体识别和与细胞内靶点的最佳相互作用[15]。此外,增加药物分子的三维化学拓扑结构可有效拓宽适用范围[16,17]。与单一的有机分子相比,金属配合物具有活性氧生成、氧化还原激活、配体交换和参与重要细胞过程的底物耗竭等众多优点[18],对关键耐药病原体的活性更高(0.87%对 9.9%)。与[Ru(phen)$_3$]$^{2+}$(4)相比,[Ru(Me$_4$phen)$_3$]$^{2+}$(5)增强了其对革兰氏阳性菌的亲脂性和活性,但是注射至小鼠体内会产生严重的神经毒性[19]。含有 bpy、phen、dmp(4,4′-二甲基-2,2′-联吡啶)或 hdpa(2,2′-联吡啶胺)等双齿配体的钌(Ⅱ)配合物,对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌具有不同程度的活性[20,21]。其中,化合物 6 对几种革兰氏阳性菌、肺炎链球菌、单核增生李斯特菌和金黄色葡萄球菌均具有活性,但对革兰氏阴性菌无毒性。蛋白质组学数据显示,化合物 6 引起了几种参与氧化应激反应和脂肪酸生物合成的蛋白质表达下调,提示其原因可能为氧化应激易感性和膜损伤的增加。此外,化合物 6 在高于 MIC 8 倍的浓度下对 A549 肺泡和 HBE 支气管上皮细胞株仍表现出较低的毒性,表明对细菌具有选择性毒性[22]。配合物 7 在水溶液中能发生蓝光光解(453 nm),得到的顺式产物[Ru(bpy)$_2$(H$_2$O)Cl]$^+$在体外对 DNA 表现出较高的结合亲和力,提高了对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的杀菌活性[23]。有证据表明,在 453 和 505 nm 的水溶液中,蛋氨酸的释放和随后与水分子的光解交换,导致顺式[Ru(bpy)$_2$(H$_2$O)$_2$]$^{2+}$共价结合到双链 DNA,促进光裂解并诱导细胞凋亡[24]。该报道说明不同的取代基团能够影响金属有机类药物的实际作用效果。

含有菲啰啉配体的单核 Ru(Ⅱ)配合物也被研究为潜在的抗菌剂,但其作用机制有所不同。虽然 mono-bb$_{10}$分子内的烷烃链更大,其亲脂性更强,但对金黄色葡萄球菌的活性不如 mono-bb$_7$(8)[25,26]。化合物 8 对革兰氏阴性菌株的活性较低,但该药物在葡萄球菌菌株内的吸收远高于大肠杆菌和绿脓杆菌。化合物 8 能引起金黄色葡萄球菌细胞膜去极化,增加细胞膜通透性,说明膜损伤可能是其作用方式的一部分。在金黄色葡萄球菌中,存在类似复合物[Ru(phen)$_2$(BPIP)]$^{2+}$导致膜损伤的形态变化。根据此类报道,可推理药物分子需保持合适的尺寸才能与转运蛋白结合,进而具备进入细胞体内的可能性。不同构型的配合物,其结构也能影响作用效果。L-[Ru(phen)(bb$_{12}$)]$^{2+}$(L-9)对大肠杆菌的活性是其几何异构体 R-[Ru(phen)(bb$_{12}$)]$^{2+}$(R-9)的 2~4 倍,而对金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的活性无差异。值得注意的是,类似的复合物 L-[Ru(Me$_4$phen)(bb$_7$)]$^{2+}$对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌具有类似的 L-[Ru(Me$_4$phen)(bb$_{12}$)]$^{2+}$的活性,并具有显著的 DNA 结合亲和力[27,28]。

有文献表明,[Ru(phen)$_2$(dppz)]$^{2+}$对分枝杆菌(MIC=2 μg/mL)表现出良好的杀菌活性,其作用机制被认为与 ROS 的产生和 DNA 插入有关[29]。不同取代基团的类似化合物生物活性有

所区别,钌化合物[Ru(2,9-Me_2phen)$_2$(dppz)]$^{2+}$对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌具有抗菌活性,但对线虫无毒。四吡啶吩嗪(tpphz)的配合物相对于它们的 dppz 类似物更亲脂,其性质通常更活跃。带有 tpphz 配体的钌配合物 10,在药敏菌株中表现出与氨苄西林相当的效果,在耐药菌株中仍保持活性,并且在革兰氏阳性和革兰氏阴性菌株中都显示出靶向 DNA 染色体。模型毒性筛选结果表明,该化合物在 MIC 值 3~25 倍以上的浓度下,对西瓜街螟幼虫无毒[30]。与双核衍生物不同,配合物 10 不会造成膜损伤。

2.3 其他配体

Yuan 等[31]基于可活动的多齿吡啶配体,合成了系列八面体型过渡金属配合物,并考察了多氮配体和相应不同金属配合物对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和白色念珠菌的体外抗菌活性。X 射线结构分析表明,3 种化合物均具有单核 0D 结构,并通过氢键进一步连接成三维超分子结构。实验结果表明,该系列化合物比配体具有更好的抗菌活性,但革兰氏阴性菌(大肠杆菌)对该配体和其配合物不敏感。各配合物对革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)的活性高于对真菌(白色念珠菌)的活性,其活性顺序为 Pt(Ⅱ)>Ru(Ⅱ)>Cu(Ⅱ)。这项研究表明新化合物 11 可能是治疗金黄色葡萄球菌和白色念珠菌感染的候选药物之一。

表 1 钌化合物作用机制汇总

Tab.1 Summary of action mechanism of ruthenium compounds

化合物	抗细菌种类	作用机制	实验浓度	参考文献
化合物 1、2	褐豆病菌、菜豆病菌和尖孢菌	—	10~15 和 9~17 μg/mL	[11]
化合物 3	黑曲霉	阻断了蛋白质的合成	1、2.5、5 mg/mL	[13]
化合物 5	革兰氏阳性菌	—	—	[19]
化合物 6	肺炎链球菌	复合物干扰了铁的获取系统	25 μg/mL	[22]
化合物 8	金黄色葡萄球菌	亲脂性效应,同时增加线粒体中的积累	10 mmol/L	[26]
化合物 9	金黄色葡萄球菌、四方微球菌	破坏细胞膜和膜完整性,完整的 DNA 和 RNA 减少或消失	15 μmol/L	[27]
化合物 10	革兰氏阳性和革兰氏阴性菌株	靶向 DNA	约 10 μmol/L	[30]
化合物 12	革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌	增加细胞膜通透性	0.649 μmol/L	[32]
化合物 13	白色假单胞菌	阻断线粒体中 Ca^{2+}的摄取,从而阻断细胞呼吸过程	5 μg/mL	[33]
化合物 14	白色念珠菌	作为一氧化碳释放分子	抑制浓度约为 100 μmol/L	[34]
配合物 17~20	金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌	—	IZD ≧ 20 mm	[35]
化合物 21	革兰氏阳性细菌	穿透细菌外膜	100 μg/L	[36]
化合物 22~24	新型隐球菌	通过共价和非共价结合与溶菌酶反应	4.83 nmol/L	[37]
化合物 25	革兰氏阳性菌、金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	亲脂性更强,更易进入微生物体内	MIC/MBC 值最大,为 1/8 和 0.5/8 μg/mL	[38]
纳米粒子 27	铜绿假单胞菌	抑制生物被膜形成	50 μg/mL	[39]

作为抑菌剂,钌化合物产生的表面膜对细菌的攻击也具有强抵抗力。EIS 研究显示,随着暴露时间的增加,钌化合物 12 的阻抗值达到 8 d,SEM 图像也显示 Ru(Ⅲ)离子在钛合金表面均匀分布并吸附,并且对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有良好的抑菌效果,而且对白念珠菌的生长也有明显的抑制作用。此外,螯合作用可有效降低金属离子的极性,加速和增强金属离子通过细胞膜脂质层的渗透,从而达到抑菌效果[32]。在细胞实验中,从 0.649 μmol/L 开始,观察到对两种正常细胞(L929 小鼠成纤维细胞和人类胚胎肾 HEK 293 细胞)的影响很小。HEK293 细胞在 0.649 μmol/L 浓度下,在 24、48 h 时分别显示 98%和 97%的活性。并且 L929 细胞 24 h 细胞增殖率为 97%,48 h 细胞增殖率为 96%。其较低的细胞毒性反应表明,在一定的浓度条件下,该药物具有一定的生物相容性和进一步临床应用的可能性。

之前的研究表明,配体的结构对化合物的稳定性和抑制微生物增殖的能力有重要影响[40]。吡嗪环是一种多环衍生物,具有重要的生物和工业用途。有报道研究吡嗪环第二位置不同取代基对配合物化学性质的影响[33],该双齿配体中的氮原子与金属配位可稳定过渡金属的高氧化态。采用 MIC 和 MBC 试验,配合物 13 在 5 mg/L 浓度下对白色念珠菌具有较强的抗真菌活性,其用量与氟康唑相近,而 $RuCl_3\cdot 3H_2O$ 或游离吡嗪配体均

未有抗菌活性。该化合物不会对健康造成不良影响,可以用作潜在的抗菌剂,其机制可能为[X(NH_3)$_4$Ru(Ⅲ)ORu(Ⅳ)(NH_3)$_4$X]$^{3+}$阻断线粒体中 Ca^{2+}的摄取,从而阻断细胞呼吸过程。希夫碱 Ru^{3+}配合物极性较低,促进钌化合物通过磷脂细胞膜,Ru^{3+}离子被还原为 Ru^{2+}离子,并在 HEM 中竞争 Fe^{2+}的位置,从而发挥抗菌作用。

Madzivire 等[34]合成了系列不同取代基酮亚胺钌配合物,并考察了对白色念珠菌和新型隐球菌变种 grubii 的抗真菌活性。配合物 14 对白色念珠菌的生长抑制值为正,对新型念珠菌的生长抑制值为负,其生长抑制率为 44.1%,选择比大于 18.5。配合物 14-diF 对革兰氏阳性金黄色葡萄球菌具有部分活性,生长抑制率为 58%,但对其他 4 种菌株无活性。与 Dyson 的钌(Ⅱ)芳烃类配合物性能相比,配合物 14 对新型弧菌的抑制能力高出几个数量级,推测这类配合物可能作为一氧化碳释放分子(CORMs)参与作用。

3　半夹心型钌化合物

半夹心型是一种较为经典的构型,通常为平面共轭配体占据钌原子的 3 个同侧轨道与钌成键,形成茂状结构,因此也成为半三明治化合物。配体通常为芳烃或环戊二烯基,具有较为丰富的官能团调节位点以及较强的脂溶性,剩下的 3 个成键轨道能够与不同功能和组成的单齿或多齿配体键合,发挥金属中心电子密度和分子极性调节的作用,可有效促进与微生物体内相应基团之间的相互作用。

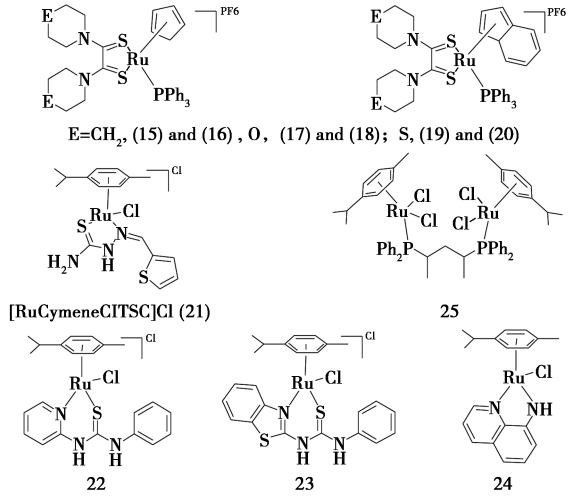


图 2　半夹心型钌化合物示例

Fig.2　Examples of semi-sandwich ruthenium compounds

3.1　环戊二烯基配体

环戊二烯基为负一价 6 电子配体,能够与过渡金属紧密结合,生成不同类型的过渡金属化合物,再与不同抗微生物活性的游离配体反应,生成包含环戊二烯基的结构稳定的抗菌活性金属有机化合物,因此辅助配体的修饰成为众人的关注焦点。二硫代烯配体存在于整个生命王国的生物分子中,通常作为反应酶组成配体参与催化对宿主生物至关重要的化学反应[41]。以往的文献报道了大量包含二硫代烯基团的钼酶和钨酶,因此包含二硫代烯的活性金属有机化合物的研究也是当前热点之一[42]。金属二噻吩配合物既具有芳香族性质,又具有不饱和性质。前者使金属二硫烯环发生取代反应[43],后者使 Lewis 碱(如膦配体)与不饱和金属中心发生加成反应[44]。Dkhar 等[35]选择了含二硫代烯的仲胺取代基,如哌啶、吗啉和硫代喹啉开展合成及活性检测工作。相比缺乏活性的游离配体而言,金属二噻吩配合物对所测试的细菌和真菌菌株具有较强的抑菌活性,特别是含有二硫代烯和吗啉取代基的配合物 17、18 对革兰氏阳性菌和真菌株具有较高活性。另外,含有哌啶衍生物的二噻吩钌配合物 15、16 的抗菌活性仅对金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯菌有效。配合物 17~20 对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌有效,其抗菌活性可能来源于配合物中吗啡啉和硫吗啡啉的结构相似性。

3.2　芳烃配体

芳烃配体也为 6 电子零价配体,其分子未能有效接收钌原子中心的反馈电子,相比而言脂溶性较强,但该配体与钌原子结合稳定性相对较差,另一方面也可有效促进芳烃配体与钌原子的解离,使得钌原子能作用于微生物体内发挥功效。Yildirim 等[36]研究了配合物 21 对 9 株细菌和 1 株真菌的体外抗菌活性,100 μg/L 浓度下,复合物 21 对革兰氏阴性菌和真菌均有一定的抑菌活性。革兰氏阳性细菌的标准 ATCC 菌株比革兰氏阴性菌株对该化合物的抗菌活性更敏感,这可能是因为革兰氏阳性细菌缺乏革兰氏阴性细菌的外膜,可抑制药物分子有效穿透[45]。

通常来讲,双齿配体配合物的生物活性优于单齿配合物[46]。已报道的配合物 X 射线结晶学数据表明,His15 侧链是强有力的相互作用点[47]。经检测,钌化合物 22~24 对革兰氏阴性菌无活性,但对金黄色葡萄球菌的活性依次为:化合物

23(6.77 nmol/L)>化合物 24(19.3 nmol/L)>化合物 22(29.9 nmol/L)。配合物 22 对白色念珠菌 ATCC 90028 和新型隐球菌变种 grubii H99 的抑制率分别为 80%和 70%,配合物 23 和 24 对白色念珠菌的 MIC 值分别为 6.77 和 9.65 nmol/L,表现出良好的抗真菌活性。但是,化合物 22 和 $[RuCl(\mu\text{-}Cl)(Cymene)]_2$ 对新型隐球菌无活性,而化合物 24(4.83 nmol/L)比化合物 23(13.5 nmol/L)具有更强的抗新型隐球菌活性。正态 ESI-MS 结果表明,Ru(Cymene)配合物通过共价和非共价结合方式与溶菌酶反应。在咪唑钌配合物形成过程中,杂环配位中心脱离,配位模式由 N,S-双齿型转变为 S-单齿型。抗菌数据表明,该系列配合物仅对金黄色葡萄球菌有效,并且苯并噻唑配合物比吡啶类似物更有效[37]。药物的抑菌活性可能受到细菌细胞壁结构的影响,而细胞壁结构对细菌的生存至关重要。相比之下,将吡啶环与苯并噻唑部分交换,可显著提高对金黄色葡萄球菌的毒性,化合物 22~24 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性优于磺胺嘧啶银可支持这一推理[48],合成的(Cymene)Ru(Ⅱ)配合物显示出有趣的抗菌活性,因此值得进一步研究。

Ru(Ⅱ)-芳烃半夹心型配合物的抗菌研究主要集中在含膦配体的 Ru-芳烃结构上[49],但其配体通常为单齿膦配体,含有双齿膦配体的复合物对细菌和真菌的生长抑制作用报道较少。Klaimanee 等[38]通过 $[RuCl(Cymene)(\mu\text{-}Cl)]_2$ 二聚体与双二苯基膦基丙烷(dppp)配位合成了 3 种基于有机磷配体的新型(Cymene)钌(Ⅱ)配合物。所有配合物对革兰氏阳性菌、金黄色葡萄球菌 ATCC25923(SA)和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)均表现出显著的抑制活性,但其 MIC/MBC 值远低于之前报道的 Ru(Cymene)(dppm)Cl_2 的值[50]。配合物 25 的 MIC/MBC 值为 1/8 和 0.5/8 μg/mL,略高于抗菌药物万古霉素的 MIC/MBC 值(0.25/0.5 和 0.5/0.5 μg/mL)。配合物 25 对白色念珠菌(CA90028、CA3153 和 CN90112、CN90113)的 MIC/MFC 值分别为 16/32、16/32 和 16/64、16/16μg/mL。配合物 25 亲脂性更强,但其抗菌性较弱,其可能原因为这些配合物及其自由配体较难渗透到所研究的微生物细胞中。

4 纳米粒子类

纳米材料具有热电磁感应、尺寸可调控以及电子性能优越等优点,在材料科学领域和分析化学领域均有着重要的用途。通过烷烃链或芳香烃链与纳米粒子连接,进而将钌原子负载到纳米粒子上,可在光、热、磁等作用下缓释或集中于特定部位释放,进而产生抗微生物或抑制微生物增殖的确切效果,实现治疗效果的同时有效减少药物的摄入,提高药物的有效性和使用安全性。

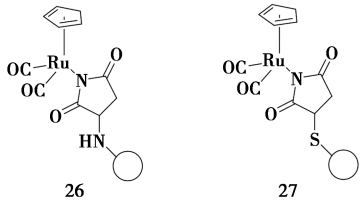


图 3 纳米粒子型钌化合物示例

Fig.3 Examples of nanoparticle type ruthenium compounds

据报道,以氧化铁磁性纳米颗粒(MNPs)为基础的药物系统对微生物感染进行了测试,包括那些由耐抗生素病原体引起的感染[51,52]。抗菌药物涂层的 MNPs 被认为是对抗多药耐药病原体的有力工具,并能提高抗菌治疗效果[53]。修饰后的磁性纳米颗粒还增加了抑制生物被膜形成的能力,并对多种真菌病原体的生长表现出抑制作用[54]。在表面连接氨基或巯基,可进一步与过渡金属配合物配位,生成的新型纳米粒子可具有抑菌活性[39]。50 μg/mL 浓度下,MNP@SH(Ru)(27)抑制率为 40%,而 MNP@NH_2(Fe)抑制率为 50%。相比铁化合物而言,MNP@NH_2(Ru)对细菌代谢的影响达到 60%(50 μg/mL),说明修饰颗粒对铜绿假单胞菌 Xen5 的治疗潜力较大[55]。将该复合物固定在 MNP 上可显著降低铜绿假单胞菌 Xen5 生物膜的质量。在预防和根除过程中观察到该药物对生物被膜的不同作用,所有浓度下,钌粒子可与真菌细胞作用,显著降低嵌入细胞的生物膜基质数量,并抑制细胞增殖。用—SH 衍生物处理成熟生物膜后,分别加入 5、50 μg/mL 不同浓度的 MNP@SH(Ru),其生物膜质量分别减少了 70%和 80%。MNPs 和基于 MNPs 的纳米系统相互作用可能涉及膜插入,并可能促进双层膜结构的重组而导致膜功能障碍。此外,其可能机制涉及活性氧(ROS)的产生、CO 或游离金属离子的释放以及与 DNA、ATP 和蛋白质等胞内成分的相互作用[56,57]。光降解研究表明,紫外诱导的分解对游离金属羰基配合物(Fe 和 Ru)比固定在磁性纳米颗粒上的配合物更快。生物学研究表明,

磁性纳米载体上的金属羰基配合物具有良好的抗菌和抗真菌活性。因此,这类物质在成为抗微生物的生物膜处理剂方面具有很大的潜力。

纳米颗粒(NPs)的绿色合成因其对环境友好的协议而备受关注。在此背景下,植物提取物因其良好的产量和显著的生物活性而成为合成 NPs 的最佳替代品。因此,许多植物提取物被用于合成金属和金属氧化物 NPs[58,59]。抗真菌活性的 NPs-Pg 图谱和 HSA 检测结果显示,(NPs-Pg@AFA)和(NPs-Pg@ HSA)分别表现出较低粒径下较好的抗真菌和羟基自由基清除活性,长春花钌粒子和小冠薰钌粒子也显示出显著的抗真菌活性[60]。在这些样品中,最小值位于长春花钌粒子和小冠薰钌粒子之间,表明夹竹桃科和唇形科植物提取液通过纳米合成处理后获得了更好的抗氧化性能,这为后续的活性药物筛选提供了新的选择。

5　总结与展望

自文明开始,人类一直与微生物做斗争,通过各种方法和技术防治微生物感染。20 世纪初青霉素的发现,打开了抗生素研究的大门,显著提高人类平均寿命。而顺铂的面世,使得金属有机化合物作为药物进入到人们的视野中。钌化合物由于其自身的水氧稳定性、配体多样性以及生物耐受性等众多优点,得到全球广大科研工作者的青睐。

研究起初,化学工作者关注钌化合物单体的性质,通过调节骨架支撑配体的电子性质、分子极性以及空间位阻等,同时控制辅助配体的电荷属性以及选取等效 DNA 或蛋白质分子基团的相似官能团,便于钌化合物在微生物体内富集并作用,实现抑制微生物增殖或促进细胞凋亡的目标。在此类研究中,通过多吡啶螯合配体或芳烃等多电子配体与钌原子配位,并结合众多具有不同官能团的辅助配体,使其具备通过微生物细胞膜的能力,并作用于微生物的不同细胞器,显示出低的耐药性以及高的杀微生物效果。基于类似的作用机制,钌化合物负载于纳米团簇或颗粒上,从而具备缓释或应激反应等功效,极大提高了药物的有效性和治疗的专属性。钌化合物的脂溶性良好是其发挥功效的首要条件,类似生物基础分子的配体官能团种类是其作用位点的重要因素,同时钌化合物配位取代反应的难易程度也在很大程度上影响了药物的最终作用。因此,优化钌化合物上骨架支撑配体的溶解性质,修饰具有一定生物属性的辅助配体,控制配体的特定官能团种类和解离能力,是目前化学工作者在此类研究中需重点关注的问题。

本文介绍了近些年公开报道的钌化合物抗微生物部分应用,按照不同支撑骨架进行分类,限于现有的研究条件,其分子结构与分子性质之间的构效关系尚未完全清晰,但也阐明了部分基本原理和作用机制。在现阶段,钌化合物抗微生物的研究仍需广大化学或药学工作者持续探索和总结。相信在不久的将来,低毒且效果好的抗微生物钌药物能够造福人类。

参考文献:

[1] BRIAN I. Duerden health protection: Microbiology and the public health response to the bioterrorism threat[J]. *Anaerobe*, 2006, **12**: 59-62.

[2] LING J, O′DONOGHUE P, SÖLL D. Genetic code flexibility in microorganisms: Novel mechanisms and impact on physiology[J]. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, **13**: 1.

[3] MIGUEL A, SIERRA M A, LUIS C L, et al. Bio-organometallic derivatives of antibacterial drugs[J]. *Chem. Eur. J.*, 2019, **25**(**30**): 7 232-7 242.

[4] 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.

[5] LIU J, JI L N, MEI W J, et al. The development of ruthenium complexes as anticancer drugs activation and anticancer mechanism[J]. *Prog. Chem.*, 2004, **16**(**6**): 969-974.

[6] YANG Y L, LIAO G J, FU C. Recent advances on octahedral polypyridyl Ruthenium(Ⅱ) complexes as antimicrobial agents[J]. *Polymers*, 2018, **10**(**6**): 650-661.

[7] RUDI A, KASHMAN Y, GUT D, et al. Ruthenium complexes of eilatin: Face selectivity in octahedral geometry; synthesis of $[Ru(bpy)_2(eilatin)]^{2+}$ and $[Ru(phen)_2(eilatin)]^{2+}$[J]. *Chem. Commun.*, 1997, **1**: 17-18.

[8] JIA W G, WANG Z B, ZHI X T, et al. Syntheses, characterization and catalytic activities of half-sandwich ruthenium complexes with naphthalene-based Schiff base ligands [J]. *J. Coord. Chem.*, 2017, **70**(**5**): 848-858.

[9] BLUNDEN B M, STENZEL M H. Incorporating ruthenium into advanced drug delivery carriers—An innovative generation of chemotherapeutics[J]. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2015, **90**(**7**): 1 177-1 195.

[10] CARVALHO J M D, BATISTA A H D, NOGUEIRA N A P, et al. A biphosphinic ruthenium complex with potent anti-bacterial and anti-cancer activity[J]. *New J. Chem.*, 2017, **41**(**21**): 13 085-13 095.

[11] ANTHONYSAMY A, BALASUBRAMANIAN S, SHANMUGAIAH V, et al. Synthesis, characterization and electrochemistry of 4′-functionalized 2,2′:6′,2″-terpyridine ruthenium(Ⅲ) complexes and their biological activity [J]. *Dalton Trans.*, 2008, **16**: 2 136-2 143.

[12] MAZUMDER U K, GUPTA M, KARKI S S, et al. Synthesis and pharmacological activities of some mononuclear Ru(Ⅱ) complexes[J]. *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**: 5 766.

[13] YÖRÜR-GÖRECI C, ALTAŞ-PUNTAR N, TORAMAN A, et al. Synthesis, spectral and thermal characterization, biological activity of a new amino acide ester containing substituted salicylaldimine Schiff base ligand and its Ru(Ⅱ) bipyridyl complex[J]. *Main Group Chem.*, 2021, **20**: 193-202.

[14] TWEEDY B G. Plant extracts with metal ions as potential antimicrobial agents[J]. *Phytopatology*, 1964, **55**: 910-918.

[15] MORRISON C N, PROSSER K E, STOKES R W, et al. Expanding medicinal chemistry into 3D space: Metallofragments as 3D scaffolds for fragment-based drug discovery[J]. *Chem. Sci.*, 2020, **11**: 1 216-1 225.

[16] HUNG A W, RAMEK A, WANG Y, et al. Route to three-dimensional fragments using diversity-oriented synthesis [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011, **108**: 6 799-6 804.

[17] GALLOWAY W R J D, ISIDRO-LLOBET A, SPRING D R. Diversity-oriented synthesis as a tool for the discovery of novel biologically active small molecules[J]. *Nat. Commun.*, 2010, **1**: 80.

[18] FREI A, ZUEGG J, ELLIOTT A G, et al. Metal complexes as a promising source for new antibiotics[J]. *Chem. Sci.*, 2020, **11**: 2 627-2 639.

[19] SHULMAN A, DWYER F P. Metal chelates in biological systems. In chelating agents and metal chelates[M]. Cambridge: Academic Press, 1964.

[20] SRISHAILAM A, GABRA N M, KUMAR Y P, et al. Synthesis, characterization DNA binding and antitumor activity of ruthenium(Ⅱ) polypyridyl complexes[J]. *J. Photochem. Photobiol. Biol.*, 2014, **141**: 47-58.

[21] RAVI K V, NAGABABU P, SRINIVAS G, et al. Investigation of DNA/BSA binding of three Ru(Ⅱ) complexes by various spectroscopic methods, molecular docking and their antimicrobial activity[J]. *J. Coord. Chem.*, 2017, **70**: 3 790-3 809.

[22] YANG X Y, ZHANG L, LIU J, et al. Proteomic analysis on the antibacterial activity of a Ru(Ⅱ) complex against streptococcus pneumoniae[J]. *J. Proteomics*, 2015, **115**: 107-116.

[23] DE S A P, GONDIM A C S, SOUSA E H S, et al. An unusual bidentate methionine ruthenium(Ⅱ) complex: Photo-uncaging and antimicrobial activity[J]. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2020, **25**: 419-428.

[24] GARNER R N, GALLUCCI J C, DUNBAR K R, et al. $[Ru(bpy)_2(5\text{-cyanouracil})_2]^{2+}$ as a potential light-activated dual-action therapeutic agent[J]. *Inorg. Chem.*, 2011, **50**: 9 213-9 215.

[25] LI F, FETERL M, MULYANA Y, et al. In vitro susceptibility and cellular uptake for a new class of antimicrobial agents: Dinuclear ruthenium(Ⅱ) complexes[J]. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012, **67**: 2 686-2 695.

[26] MULYANA Y, WEBER D K, BUCK D P, et al. Oligonuclear polypyridylruthenium(Ⅱ) complexes incorporating flexible polar and non-polar bridges: Synthesis, DNA-binding and cytotoxicity[J]. *Dalton Trans.*, 2011, **40**: 1 510-1 523.

[27] SUN D, ZHANG W, LV M, et al. Antibacterial activity of ruthenium(Ⅱ) polypyridyl complex manipulated by membrane permeability and cell morphology[J]. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, **25**: 2 068-2 073.

[28] SUN B, SOUTHAM H M, BUTLER J A, et al. Synthesis, isomerisation and biological properties of mononuclear ruthenium complexes containing the bis[4(4′-methyl-2,2′- bipyridyl)]-1, 7-heptane ligand[J]. *Dalton Trans.*, 2018, **47**: 2 422-2 434.

[29] LIAO G, YE Z, LIU Y, et al. Octahedral ruthenium(Ⅱ) polypyridyl complexes as antimicrobial agents against mycobacterium[J]. *PeerJ*, 2017, **5**: 3 252-3 260.

[30] SMITTEN K L, THICK E J, SOUTHAM H M, et al. Mononuclear ruthenium(Ⅱ) theranostic complexes that function as broad-spectrum antimicrobials in therapeutically resistant pathogens through interaction with DNA [J]. *Chem. Sci.*, 2020, **11**: 8 828-8 838.

[31] YUAN Z, SHEN X, HUANG J. Syntheses, crystal structures and antimicrobial activities of Cu(Ⅱ), Ru(Ⅱ), and Pt(Ⅱ) compounds with an anthracene-containing tripodal ligand[J]. *RSC Adv.*, 2015, **5**: 10 521-10 528.

[32] EL-GAMEL N E A, FEKRY A M. Antimicrobial ruthenium complex coating on the surface of titanium alloy. High efficiency anticorrosion protection of ruthenium complex[J]. *Bioelectrochemistry*, 2015, **104**: 35-43.

[33] OGRYZEK M, CHYLEWSKA A, KROLICKA A, et al. Coordination chemistry of pyrazine derivatives analogues of PZA: Design, synthesis, characterization and biological activity[J]. *RSC Adv.*, 2016, **6**: 52 009-52 025.

[34] MADZIVIRE C R, CARAMÉS-MÉNDEZ P, PASK C M, et al. Anticancer, antifungal and antibacterial potential of bis(β-ketoiminato) ruthenium(Ⅱ) carbonyl complexes [J]. *Inorganica Chimica Acta*, 2019, **498**: 119 025.

[35] DKHAR L, SAWKMIE M, KAOT A L, et al. Cp and indenyl ruthenium complexes containing dithione derivatives: Synthesis, antibacterial and antifungal study[J]. *J. Organomet. Chem.*, 2020, **923**: 121 418.

[36] YILDIRIM H, GULER E, YAVUZ M, et al. Ruthenium(Ⅱ) complexes of thiosemicarbazone: Synthesis, bio-

sensor applications and evaluation as antimicrobial agents[J].*Mat.Sci.Eng.C*,2014,**44**:1-8.

[37]MANSOUR A M,RADACKI K.Protein binding affinity of biologically active thiourea based half-sandwich Ru(Ⅱ) cymene complexes[J].*Polyhedron*,2020,**175**:114 175.

[38]KLAIMANEE E,NHUKEAW T,SAITHONG S.Half-sandwich ruthenium(Ⅱ) *p*-cymene complexes based on organophosphorus ligands:Structure determination,computational investigation,in vitro antiproliferative effect in breast cancer cells and antimicrobial activity[J].*Polyhedron*,2021,**204**:115 244.

[39]WILCZEWSKA A Z,KOSIŃSKA A,MISZTALEWSKA-TURKOWICZA I.Magnetic nanoparticles bearing metallocarbonyl moiety as antibacterial and antifungal agents[J].*Appl.Surf.Sci.*,2019,**487**:601-609.

[40]CHYLEWSKA A,SIKORSKI A,OGRYZEK M,et al.Attractive S-π and π-π interactions in the pyrazine-2-thiocarboxamide structure:Experimental and computational studies in the context of crystal engineering and microbiological properties[J].*J.Mol.Struct.*,2016,**11**(**5**):96-104.

[41]JOHNSON M K,REES D C,ADAMS M W W.Tungstoenzymes[J].*Chem.Rev.*,1996,**96**:2 817-2 840.

[42]ROMAO M J,ARCHER M,MOURA I,et al.Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxidoreductase from D.Gigas[J].*Science*,1995,**270**(**5 239**):1 170-1 176.

[43]KAJITANI M,HAGINO G,TAMADA M,et al.Electrophilic and radical substitution of 1,2,5-cobaltadithiolenes[J].*J.Am.Chem.Soc.*,1996,**118**:489-490.

[44]HATANO H,KAJITANI M,AKIYAMA T,et al.Photoreaction of the adduct between (η-Cyclopentadienyl)(1,2-dicyano-1,2-ethylenedithiolato)cobalt(Ⅲ) and tributylphosphine.Oxygenation of coordinated phosphine by singlet oxygen[J].*Chem.Lett.*,1990,**19**(**7**):1 089-1 092.

[45]WALSH S E,MAILLARD J Y,RUSSEL A D,et al.Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and negative bacteria[J].*J.Appl.Microbiol.*,2003,**94**:240-247.

[46]COLINA-VEGAS L,LUNA-DULCEY L,PLUTÍN A M,et al.Half sandwich Ru(ⅱ)-acylthiourea complexes:DNA/HSA-binding,anti-migration and cell death in a human breast tumor cell line[J].*Dalton Trans.*,2017,**46**:12 865.

[47]SULLIVAN M P,NIEUWOUDT M K,BOWMAKER G A,et al.Unexpected arene ligand exchange results in the oxidation of an organoruthenium anticancer agent:The first X-ray structure of a protein-Ru(carbene) adduct[J].*Chem.Commun.*,2018,**54**:6 120.

[48]JIMENEZ J,CHAKRABORTY I,ROJAS-ANDRADE M,et al.Silver complexes of ligands derived from adamantylamines:Water-soluble silver-donating compounds with antibacterial properties[J].*J.Inorg.Biochem.*,2017,**168**:13.

[49]SADLER P,CHELLAN P,AVERY V,et al.Organometallic conjugates of the drug sulfadoxine for combatting antimicrobial resistance[J].*Chem.Eur.J.*,2018,**24**:10 078-10 090.

[50]CHUKLIN P,CHALERMPANAPHAN V,NHUKEAW T,et al.Half-sandwich ruthenium-arene complexes with thiophen containing thiosemicarbazones:Synthesis and structural characterization[J].*J.Organomet.Chem.*,2017,**846**:242-250.

[51]GEILICH B M,GELFAT I,SRIDHAR S,et al.Superparamagnetic iron oxide-encapsulating polymersome nanocarriers for biofilm eradication[J].*Biomaterials*,2017,**119**:78-85.

[52]MARKIEWICZ K H,MISZTALEWSKA-TURKOWICZ I,NIEMIROWICZ K,et al.Carbamohydrazonothioate-based polymer-magnetic nanohybrids:Fabrication,characterization and bactericidal properties[J].*Arab.Chem.*,2019,**12**(**8**):5 187-5 199.

[53]PELGRIFT R Y,FRIEDMAN A J.Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance[J].*Adv.Drug Deliv.Rev.*,2013,**65**:1 803-1 815.

[54]NIEMIROWICZ K,DURNAŚ B,TOKAJUK G,et al.Formulation and candidacidal activity of magnetic nanoparticles coated with cathelicidin LL-37 and ceragenin CSA-13[J].*Sci.Rep.*,2017,**7**(**1**):4 610.

[55]NIEMIROWICZ K,SUREL U,WILCZEWSKA A Z,et al.Bactericidal activity and biocompatibility of ceragenin-coated magnetic nanoparticles[J].*J.Nanobiotechnol.*,2015,**13**:32.

[56]WANG L,HU C,SHAO L.The antimicrobial activity of nanoparticles:Present situation and prospects for the future[J].*Int.J.Nanomedicine*,2017,**12**:1 227-1 249.

[57]SLAVIN Y N,ASNIS J,HÄFELI U O,et al.Metal nanoparticles:Understanding the mechanisms behind antibacterial activity[J].*J.Nanobiotechnol.*,2017,**15**:65.

[58]AHMED S,AHMED M,SWAMI B L,et al.A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications:A green expertise[J].*J.Adv.Res.*,2016,**7**:17-28.

[59]RAJ R A,SALHI A,DEVANESAN S.Microwave-assisted synthesis of nickel oxide nanoparticles using coriandrum sativum leaf extract and their structural-magnetic catalytic properties[J].*Materials*,2017,**10**:460-472.

[60]GUPTA1 P K,RANGANATH K V S,DUBEY N K.Green synthesis,characterization and biological activity of synthesized ruthenium nanoparticles using fishtail fern,sago palm,rosy periwinkle and holy basil[J].*Curr.Sci.*,2019,**117**(**8**):1 308-1 317.

功能材料

壳聚糖改性生物炭复合材料的制备及其对 Pb^{2+} 的吸附性能

罗小生[1],李新丽*[2],杨明[1],何建明[1]
(1.中国安能集团第一工程局有限公司,广西 南宁 530000;2.河北工业职业技术大学,河北 石家庄 050000)

摘要:以城市洗衣污水中的有机污泥为原料,通过热解法制备生物炭,再以水热法与胺化后的壳聚糖形成了生物炭/改性壳聚糖吸附剂(BC/NS)。FT-IR、SEM、pHzpc 以及 XPS 对 BC/NS 的形貌和结构进行表征。静态和动态吸附实验表明 BC/NS 吸附剂对溶液中的 Pb^{2+} 具有良好的吸附性能,如平衡时间短(15 min)、吸附速率快(25 mg/(g·min))、低浓度时除去率高(99%)、静态饱和吸附容量大(391 mg/g)等。动态吸附实验表明,BC/NS 吸附剂的最大吸附能力约为 380 mg/g,与静态吸附基本接近,远远超过了壳聚糖吸附材料。结果显示,BC/NS 吸附剂对 Pb^{2+} 的吸附能力受到多种吸附机制控制,如静电吸引作用、沉淀和金属离子配合作用。此外,在 pH 4 时用 40 mg/L 的铅溶液时,BC/NS 吸附剂在 5 次吸附-脱附实验后,仍保有 75%以上的吸附性能,说明 BC/NS 吸附剂具有良好的循环稳定性。

关键词:污泥;生物炭;壳聚糖;铅离子;吸附剂
中图分类号:TQ3118 **文献标识码**:A **文章编号**:0258-3283(2023)07-0066-06
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2022.0902

Preparation of Chitosan Modified Biochar Composites and Their Adsorption Properties for Pb^{2+}

LUO Xiao-sheng[1],*LI Xin-li*[*2],*YANG Ming*[1],*HE Jian-ming*[1](1.China Aneng Group First Engineering Bureau Co.,Ltd.,Nanning 530000,China;2.Hebei Vocational University of Industry and Technology,Shijiazhuang 050000,China)

Abstract:Biochar/modified chitosan adsorbent (BC/NS) was prepared from organic sludge in municipal laundry sewage by the pyrolytic method,and then combined with the aminated chitosan by the hydrothermal method.The morphology and structure of BC/NS were characterized by FT-IR,SEM,pHzpc and XPS analyses.The static and dynamic adsorption experiments verify revealed that BC/NS adsorbent had good adsorption performance for Pb^{2+} in solution,including short equilibrium time (15 min),fast adsorption rate (25 mg/(g·min)),high removal rate (99%) at low concentration and the static saturation adsorption capacity (391 mg/g).Dynamic adsorption experiments showed that the maximum adsorption capacity of BC/NS adsorbent was about 380 mg/g,very close to that of the static adsorption and far superior to that of chitosan adsorbent material.The results illustrated that the adsorption capacity of BC/NS adsorbent for Pb^{2+} was controlled by a variety of adsorption mechanisms,such as the electrostatic attraction,metal ion complexation,and cation-π effect.In addition,when 40 mg/L lead solution was used at pH 4,the adsorption performance of BC/NS adsorbent was more than 75% after 5 adsorption-desorption experiments,indicating that BC/NS adsorbent had good cyclic stability.

Key words:sludge;biocarbon;chitosan;lead-ion;adsorbent

工业废水问题一直是困扰绿色发展的一大难题,废水中重金属离子会对环境造成严重的破坏。环境中重金属离子会在植物上富集,通过食物链传递最终会转移到人体,对人体产生严重损害[1-3]。废水中的污染物种类繁多,世界各地的研究人员一直在开发能够减少这些污染物的新处理方法和材料。在这些方法中有的已被广泛应用于去除重金属离子,包括生物处理,过滤,氧化和吸附[4-7]。

吸附是一种物理化学方法,它被描述为一种简单且经济可行的废水处理方法[3]。在此过程中,吸附材料的孔隙结构和化学表面组织起着重要的作用,并选择性的从溶液中去除特定的离子[8]。活性炭是吸附过程中用于去除有机和无

收稿日期:2022-12-20;**网络首发日期**:2023-04-17
基金项目:河北省高等学校科学研究计划项目(QN2021047)。
作者简介:罗小生(1983-),男,河南郑州人,硕士,工程师,主要从事市政水环境工程施工、水环境技术研究等工作。
通讯作者:李新丽,E-mail:lixl18631113353@ sina.com。
引用本文:罗小生,李新丽,杨明,等.壳聚糖改性生物炭复合材料的制备及其对 Pb^{2+} 的吸附性能[J].化学试剂,2023,**45**(7):66-71。

机污染物使用最广泛的吸附材料之一。由于它们优异的吸附性能和高表面积,可用于净化、解毒、除臭和过滤过程。这些应用在各个领域都极受关注,特别是在饮用水、工业废水和大气的处理方面[9]。商业活性炭的高成本制约了它的使用,促使人们寻求丰富且廉价的产品,来代替商业活性炭[4]。

洗衣店属于纺织行业,洗衣店使用软化和脱色产品去除衣物上的染料,这些染料会随排放进入废水中;其次洗衣店使用浮石或者膨胀粘土用以增加与衣物之间的摩擦,衣物上被摩擦下的物质会随着洗涤水进入废水中。以上的有机物一部分沉积在污水中的污泥中,这让污泥能够成为吸附材料存在了可能。污泥还会存在来自于微生物的有机物质,纤维素和聚电解质以及来自膨胀粘土和浮石的无机废物[10-13]。采用缓慢热解法将污泥提炼成生物炭,将生物炭应用到处理废水中重金属离子污染,已然成为一种的重要的处理重金属离子的方法。

本文采用衣物洗涤污水污泥制备生物炭,再与壳聚糖结合形成生物炭/改性壳聚糖吸附剂,将吸附剂应用于除去水溶液中的 Pb^{2+},不仅将污泥中的废弃物再利用,而且又能治理环境问题。

1　实验部分

1.1　主要仪器与试剂

Sirion 200 型扫描电子显微镜(SEM,美国 FEI 公司);K-Alpha 型 X 射线光电子能谱(XPS,美国 Thermo Scientific 公司);EN2500 型傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR)、TAS990 型原子吸收分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

壳聚糖、冰醋酸、乙醛、戊二醛、无水乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);铅标准溶液(分析纯,国家有色金属及电子材料分析测试中心)。

1.2　实验方法

1.2.1　BC/NS 的制备

污水污泥是从南宁市工业洗衣店的废水处理系统中收集的,样品最初在 60 ℃的烘箱中干燥 48 h,然后研磨并适当储存以供进一步研究。

上述的样品研磨并通过筛子获得粒径小于 3 mm 的颗粒。粉末原料被收集并放置在不锈钢反应器中,然后在二氧化碳限制条件下在马弗炉中缓慢热解。热解温度从 25 ℃升高到 600 ℃,升温速率为 10 ℃/min,保温温度为 600 ℃,保温时间为 2 h,氮气气氛下的流速为 50 mL/min,从污泥得到的生物炭被命名为 SC。热解后,SC 在管式炉中氮气的条件下进一步热处理,所需温度为 800 ℃,持续 2 h。冷却至室温后,此时改性生物炭称为 BC。

先将 7 g 壳聚糖加入 500 mL 去离子水中形成悬浮液,然后加入 4.65 g 冰醋酸溶解壳聚糖。加入 5.8 g 50%乙醛溶液,搅拌一段时间,得到澄清粘稠的溶液,透析冷冻干燥,得到 N-羧甲基壳聚糖,下文称为 NS。取 5 g BC 与上述 NS 共同加入到 500 mL 三颈烧瓶中,加入 100 mL 蒸馏水,在 60 ℃下回流 0.5 h。待溶液形成均匀的悬浮液,向三颈烧瓶中加入 5 mL 的戊二醛,在 60 ℃下回流 3 h。回流结束后,将混合物冷却至室温。采用离心机分离固液两相,再用蒸馏水和无水乙醇冲洗固体直至洗涤液无色。然后运用烘箱将固体烘干,获得污泥生物炭/改性壳聚糖(BC/NS)。BC/NS 吸附剂的制备流程如图 1 所示。

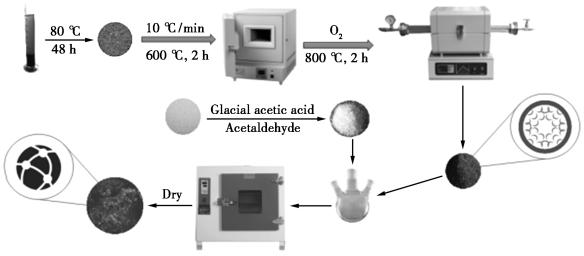


图 1　BC/NS 制备实验流程

Fig.1　Experimental process of BC/NS synthesis

1.2.2　表征/测试方法

为了确定 BC/NS 吸附剂在零电荷点的 pH 值,将 10 mg BC/NS 吸附剂在 10 mL(0.1 mol/L) KCl 溶液中搅拌 24 h。溶液的初始 pH 值(pH 2.0~5.0)用 0.1 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L HCl 溶液调节。搅拌后,用 pH 计测量溶液的最终 pH 值。测量混合后溶液的 pH 值,绘制 $\Delta pH(pH_{最后}-pH_{初始})$ 对 $pH_{初始}$ 的图形。pHzpc 表示的是 ΔpH 0 的点。

所有的静态吸附研究都是在室温下进行,100 mL 的铅溶液中投入 10 mg 的 BC/NS 吸附剂,连续搅拌 60 min。BC/NS 吸附剂在不同的接触时间(0~60 min)、初始铅浓度(10~300 mg/L)、初始 pH 值(2.0~5.0)的批量吸附实验中研究了铅的吸附行为。为了评估 BC/NS 吸附剂的可回收性,使用盐酸作为洗脱剂(pH 1)回收被吸附的

铅,并在 pH 4 时用 40 mg/L 的铅溶液进行循环实验。此外,实验数据与两种吸附等温线模型(Langmuir 和 Freundlich 模型)和两种吸附动力学模型(拟一级和拟二级)进行了拟合,进一步分析了 BC/NS 吸附剂对铅的吸附行为。铅的动态吸附实验是通过自制的连续吸附装置进行的。通过高速离心分离 BC/NS 吸附剂,用火焰法原子吸收仪估算剩余的铅浓度。BC/NS 吸附剂对铅的吸附能力和去除率由公式(1)和(2)计算得出。

$$q_m = [(C_0 - C_e)V]/m \quad (1)$$

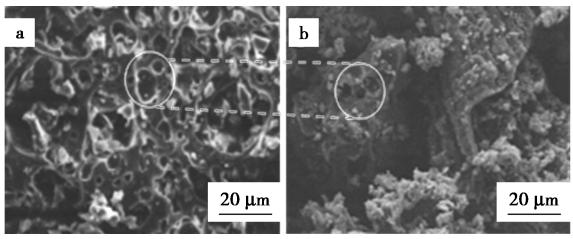
$$W = [(C_0 - C_m)/C_0] \times 100\% \quad (2)$$

式中,C_0 和 C_m 分别为 Pb 的初始和最终浓度,mg/L;V 为溶液体积,L;m 为 BC/NS 吸附剂的质量,g。

2 结果与讨论

2.1 结果表征

扫描电子显微镜技术被用来研究材料的形态。图 2a 显示了 BC 的 SEM 图像,其中可以看到具有表面空腔的紧凑结构。在 BC/NS 吸附剂的 SEM 图中空腔的结构减少(图 2b),出现了堆砌的层状结构,是由于改性的壳聚糖所致。生物炭的加入改变了壳聚糖的表面结构,增加了吸附剂的比表面积,这有利于吸附过程。



a.BC;b.BC/NS

图 2 样品的扫描电子显微镜(SEM)图

Fig.2 Scanning electron microscopy (SEM) images of the sample

图 3 显示了 BC、NS 和 BC/CS 的 FT-IR 光谱。从图 3 中可以看出,BC 具有很少的带信号,并且在结构上与石墨相似。对于 NS,在 3 300 cm^{-1}附近观察到的宽带归因于 N—H 拉伸振动与 O—H 拉伸振动的重叠[14]。2 900、2 850 cm^{-1}处的两个弱带对应于 C—H 拉伸[15]。1 650 和 1 595 cm^{-1}处的特征带对应于 C═O 拉伸振动和 N—H 变形[16]。此外,1 160 和 1 030 cm^{-1}处的对应于于 C—O—C 的对称拉伸振动峰和 C—O 拉伸振动峰[17]。BC/NS 的特征带呈现与 NS 相似的曲线,没有新的带或任何移位。FT-IR 结果表明,BC 经历了一定程度的石墨化,并且在 BC/NS 吸附剂中,NS 和 BC 之间主要为物理相互作用。

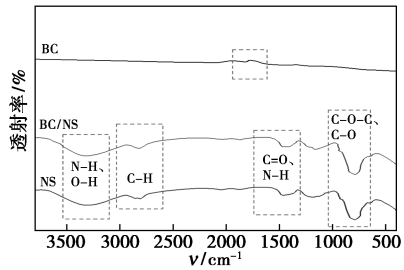


图 3 BC、NS 和 BC/NS 的 FT-IR 光谱

Fig.3 FT-IR spectra of BC, NS and BC/NS

2.2 pH 的影响

如图 4a 所示,研究了不同 pH 值(2.0~5.0)对铅离子吸附容量的影响(溶液中铅离子的浓度为 40 mg/L)。铅离子在 BC/NS 的吸附容量随着 pH 值(pH 2.0~4.0)增大不断提高,在 pH 值从 4.0 到 5.0 保持恒定。图 4b 显示了 BC/NS 在 pH>pHzpc 时带负电荷,这有利于铅离子的静电吸附。然而,BC/NS 由于 H^+的强烈竞争,在低 pH(2.0~3.0)下都表现出较低的铅离子吸附能力。随着 pH 值的增加,H^+的竞争越来越弱。此外,低 pH 值下吸附剂表面活性位点的质子化会导致结合铅的活性位点减少,从而导致铅离子的低吸附能力。当 pH 增大时,BC/NS 上活性位点的去质子化显著增强,致使铅离子的容易捕获。

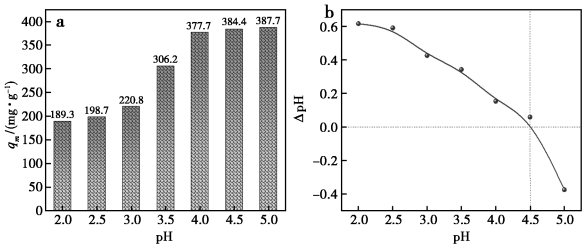


图 4 a.pH 对 Pb 在 BC/NS 上吸附的影响;b.氯化钾溶液中 BC/NS 的 pHzpc 值的测定

Fig.4 a.Effect of pH in the adsorption of Pb onto BC/NS;b.Determination of pHzpc values of BC/NS in KCl solution

2.3 接触时间和初始浓度的影响

图 5a 表示的是接触时间对 Pb 吸附容量和溶液残留率的影响。BC/NS 在最初的 5 min 内,吸附容量迅速上升,这是由于 BC/NS 在与 Pb 接触初期,其上具有大量的吸附位点,Pb 能快速占据。随后,吸附速率变缓,直至在 15 min 时达到吸附平衡,这是由于吸附位点减少,已经占据吸附位点的 Pb 会与溶液中的 Pb 发生排斥,进而影响吸附速率。

图 5b 表示的是不同初始浓度的 Pb 对 BC/NS 吸附剂吸附 Pb 的影响。随着 Pb 浓度的增加,吸附容量迅速提高,但吸附效率显著降低。在较低的初始 Pb 浓度下,吸附剂上的活性位点可以快速从溶液中捕获 Pb,直到 Pb 离子被完全吸附。当 Pb 浓度超过一定值时,吸附剂的吸附容量达到恒定值,表明吸附剂上的活性位点已饱和。由于在初始浓度为 10 mg/L 时,溶液的残留率最低,随着浓度的增加,残留率上升,这是归因于随着 Pb 浓度的不断升高而产生离子之间的排斥。此外,即使在高 Pb 浓度(50 mg/L)下,溶液中 Pb 的残留率仍低于 8%,这表明 BC/NS 吸附剂对 Pb 具有良好的吸附性能。

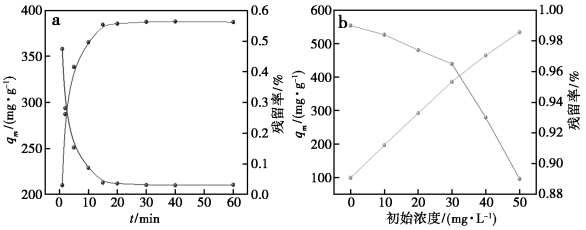


图 5　不同接触时间(a)、不同 Pb 的初始浓度(b)条件下 BC/NS 吸附剂对 Pb 的吸附容量及 Pb 的残留率

Fig.5　Adsorption capacity and residual rate of Pb by BC/NS adsorbent under different contact time (a) and initial concentration of Pb (b) conditions

2.4　等温线和动力学研究

Langmuir 等温线模型[18]:

$$C_e/Q_e = 1/K_L Q_m + C_e/Q_m \quad (3)$$

Freundlich 等温线模型[19]:

$$\ln q_e = \ln K_F + 1/n \ln C_e \quad (4)$$

式中,C_e 为溶液的钍平衡浓度,mg/L;Q_e 为平衡时吸附剂的吸附容量,mg/g;K_L 为朗缪尔常数,L/mg;Q_m 为 Langmuir 模型的理论最大吸附容量,mg/g;K_F 为 Freundlich 常数,mg/g;n 为 Freundlich 常数,(L/mg)^n,表示吸附的异质性和强度。

在 298 K 下研究了 BC/NS 的吸附等温线,并应用 Langmuir 和 Freundlich 模型来验证吸附数据。如图 6a、6b 和表 1 所示,Langmuir 模型的相关系数(R^2)高于 Freundlich 模型,表明 Langmuir 模型适合于拟合 BC/NS 对 Pb 的去除行为。此外,q_m 的实验值与 Langmuir 模型的拟合值接近。这些结果表明,BC/NS 对 Pb 的去除过程是由均匀的单层吸附控制的[20]。

表 1　Pb 在 BC/NS 上吸附的等温线参数

Tab.1　Isotherm parameters of Pb adsorption on BC/NS

模型	参数		
Langmuir	K_L	q_m	R^2
	0.152	578	0.996
Freundlich	n	K_F	R^2
	2.504	115.612	0.947

拟一级动力学模型[21]:

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - k_1 t \quad (5)$$

拟二级动力学模型[22]:

$$t/Q_t = t/k_2 Q_e^2 + 1/Q_e \quad (6)$$

式中,Q_e 为平衡吸附容量,mg/g;Q_t 为接触时间 t 时的吸附时间,mg/g;t 是接触时间,min;k_1,k_2 分别为拟一级和拟二级动力学模型的速率常数,min^{-1} 和 g/(mg·min)。

图 6c、6d 和表 2 显示了 BC/NS 对 Pb 的吸附动力学曲线,包括拟一级和拟二级动力学模型。拟二级模型的相关系数高于拟一级模型,说明 BC/NS 的吸附行为更符合拟二级动力学原理,揭示了 BC/NS 是通过化学吸附来吸附 Pb。随着接触时间的增加,Pb 在 BC/NS 上的吸附率明显减慢,这表明吸附时间在 Pb 从液体到吸附剂的转移也起着重要作用。总之,快速的吸附率在去除废水中 Pb 的应用中非常重要,吸附率的提高将有助于 BC/NS 对实际含 Pb 废水的处理[23]。

表 2　Pb 在 BC/NS 上吸附的动力学参数

Tab.2　Kinetics parameters of Pb adsorption on BC/NS

模型	参数		
拟一级	Q_e	k_1	R^2
	61.731	0.072	0.722
拟二级	Q_e	k_2	R^2
	395	0.000 36	0.999

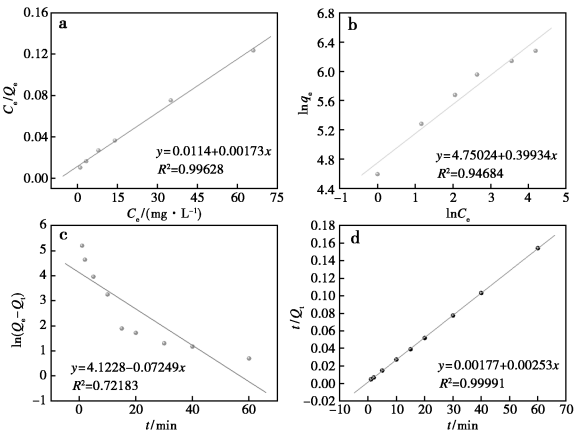


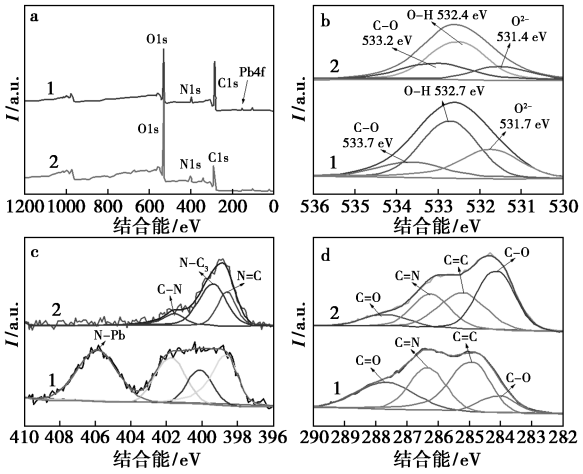
图 6　a.线性 Langmuir 吸附模型;b.线性 Freundlich 吸附模型;c.拟一级动力学;d.拟二级动力学

Fig.6　a.Linear Langmuir adsorption model; b.Linear Freundlich adsorption model; c.Proposed primary kinetics; d.Proposed secondary kinetics

2.5　吸附机理

为了深入了解 BC/NS 和 Pb 之间的相互作用

机制,进一步研究了 BC/NS 和 BC/NS-Pb 的 XPS 光谱。如图 7a 所示,在 BC/NS-Pb 的 XPS 光谱中观察到两个新的峰值,分别在 139.85、142.95 eV 左右,这两个峰值被分配给 $Pb4f_{7/2}$ 和 $Pb4f_{5/2}$,进一步表明 Pb 被吸附在 BC/NS 的表面[24]。如图 7b 所示,O1s 的高分辨率 XPS 可以细分为 3 个峰,分别是 531.4 eV 的 O^{2-} 氧化物,532.4 eV 的 O—H 和 533.2 eV 的 C—O。吸附后,O^{2-} 氧化物、O—H 和 C—O 的峰转移到更高的结合能,证实了含氧官能团是配位 Pb 的重要活性位点。从图 7c 来看,在 398.6、399.2、401.8 eV 处的峰值分别归因于 BC/NS 的 C═N、N—C_3、C—N。吸附后在 406.2 eV 处出现了一个新的峰值,这可能与结合 Pb 后形成的氮有关。如图 7d 所示,BC/NS 在 284.3、285.0、286.4、287.9 eV 处的峰可以分别归属于 C—O、C═C、C═N、C═O。Pb 吸附后,C—O 的含量明显下降,进一步说明含氧/含氮官能团参与吸附过程[25]。综上所述,活性官能团与 Pb 的复合的相互作用在吸附中对 Pb 离子的捕获过程起着主导作用。



1.BC/NS-Pb;2.BC/NS

a.XPS 全谱;b.O 1s 谱图;c.N 1s 谱图;d.C 1s 谱图

图 7 BC/NS 和 BC/NS-Pb 的 XPS 谱图

Fig.7 XPS spectra of BC/NS and BC/NS-Pb

从研究 pH 对吸附影响的结果得知,BC/NS 的质子化会影响对 Pb 的吸附,说明 BC/NS 与 Pb 之间存在静电吸引。随着 pH 的升高,溶液中的 OH^- 会与 Pb 离子结合形成氢氧化铅难溶物,这种方式也会致使 Pb 的浓度下降[26]。综上,BC/NS 与 Pb 之间的吸附作用如图 8 设想所示,整个吸附过程存在金属配合、静电吸附和沉淀等多种吸附机制控制。

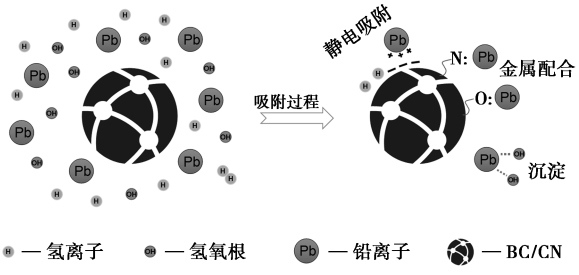


图 8 BC/NS 的吸附机理设想

Fig.8 Assumption of adsorption mechanism of BC/NS

2.6 动态吸附实验

为了进一步验证 BC/NS 的适用性,通过连续吸附装置研究了 BC/NS 对 Pb 的动态吸附行为。在 pH 4 时,研究了 10 mg 的 BC/NS 在不同初始浓度(10、20、40 mg/L)下对 Pb 的动态吸附效率。在 10 mg/L Pb 下,经过一个循环的液体循环后,溶液中大于 96%的 Pb 被去除,5 个循环后溶液中的残余 Pb 只有约 0.5 mg/L,这已经达到了国家污水中铅的排放标准(1 mg/L)。BC/NS 在低 Pb 浓度下几乎可以完全从水中分离出 Pb,进一步证明了 BC/NS 是一种有潜力的分离 Pb 的材料,可以大规模应用。在 40 mg/L Pb 的情况下,经过 5 个循环的液体循环,BC/NS 对 Pb 的去除效率仍然超过 99%。结果表明,BC/NS 具有良好的动态吸附能力,可以作为一种有前途的吸附剂用于去除废水中的 Pb。

2.7 循环稳定性

评估了 BC/NS 的循环稳定性,如图 9 所示。由于解吸/再生过程对应于 BC/NS 上的 Pb 被酸性溶液中的 H^+ 所取代,所以使用 HCl 溶液作为洗脱溶剂,Pb 可以很容易地从 BC/NS 上解吸出来。在吸附/解吸过程中,BC/NS 吸附效率下降,造成这种现象的原因可能是 BC/NS 表面的活性位点在吸附-解吸过程中被破坏,但是 BC/NS 在经过 5 次循环后仍具有 75%的吸附效率,可以证明 BC/NS 具有良好的稳定性,可以多次循环使用。

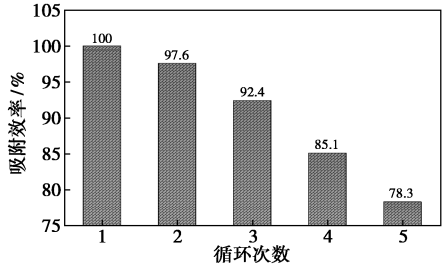


图 9 BC/NS 吸附剂反复使用的吸附效率

Fig.9 Adsorption efficiency of repeated use of BC/NS adsorbent

3　结论

以城市洗衣污水中的污泥为原材料,采用热解法制备了生物炭,并通过水热法将生物炭与壳聚糖结合获得 BC/NS 吸附剂。SEM 和 FT-IR 分析结果表明,生物炭与壳聚糖的结合,致使材料的化学性质和物理结构发生了变化。BC/NS 具有吸附时间短(15 min)、吸附速率快(25 mg/(g·min))、低浓度时除去率高(99%)、静态饱和吸附容量大(391 mg/g)等特点,成功应用于水溶液中 Pb^{2+} 的去除。吸附研究表明,pH 值对 BC/NS 吸附 Pb^{2+} 有较大的影响,拟二级动力学模型符合吸附实验数据结果,Langmuir 等温线模型符合吸附平衡数据。吸附机理表明,BC/NS 与 Pb 之间是以表面配合为主,同时伴有静电吸附、沉淀的吸附过程。在 5 次吸附-解吸循环后具有良好的吸附能力,证实了 BC/NS 的实际应用的适用性。

参考文献:

[1]MUTHIRULAN P,NAGANATHAN G,KANNAN N,et al. Beneficial role of commercial MSN tivated carbon for the decoloration of Safranine dye on TiO_2 and ZnO/UV system for the application of effluents treatment from wastewater[J]. *Indian J. Environ. Prot.*, 2012, **32**: 546-553.

[2]燕翔,王都留,张少飞,等.改性核桃壳吸附剂对 Pb^{2+} 的吸附性能[J].青岛农业大学学报(自然科学版),2022,**39**(**4**):298-303.

[3]MÉTIVIER-PIGNON H, FAUR-BRASQUET C, CLOIREC P. Adsorption of dyes onto Activated carbon cloths:Approach of adsorption mechanisms and coupling of MSNC with ultrafiltration to treat coloured wastewaters [J].*Sep.Purif.Technol.*,2003,**31**:3-11.

[4]CARVALHO W A,JIMENEZ R S,BOSCO S M D.Heavy metal removal from wastewater by natural zeolite scolecite-influence of temperature and pH on the adsorption mono elementary systems[J].*Quim.Nova*,2004,**27**:734-738.

[5]黄文强,李晨曦.吸附分离材料[M].北京:化学工业出版社,2005.

[6]GUPTA V K,JAIN R,VARSHNEY S.Removal of reactofix golden yellow 3 RFN from aqueous solution using wheat husk-An agricultural waste[J]. *J. Hazard. Mat.*, 2007,**142**(**1/2**):443-448.

[7]MAMIGONYAN R A,GUTIN Y V.Creation of a new generation of micro- and ultra-filtration units for separation of aggressive waste water[J]. *Chem. Petrol. Eng.*, 2003, **39**(**7/8**):442-445.

[8]FRITZMANN C, LÖWENBERG J, WINTGENS T, et al. State of the art reverse osmosis desalination[J].*Desalination*,2015,**216**(**1/3**):1-76.

[9]王芬,郭晓改,郭婉林,等.掺杂改性纳米铁氧体材料去除水体污染物的研究进展[J].化工新型材料,2022,**50**(**9**):75-79.

[10]KATINKA M K,GERARD C,GABRIELA C,et al.Sewage sludge biochars as effective PFAS-sorbents[J].*J. Hazard.Mater.*,2023,**445**:130 449.

[11]付秋平,张海润,罗云,等.海藻酸钠/聚乙烯亚胺复合材料对 Pb(Ⅱ)的吸附性能研究[J].化学试剂,2022,**44**(**10**):1 457-1 462.

[12]赵坤,陈进,孙建科,等.无机吸附材料在水处理中的研究进展[J].化工新型材料,2022,**50**(**9**):70-74.

[13]PRAHAS D,KARTIKA Y,INDRASWATI N,et al.Activated carbon from jackfruit peel waste by H_3PO_4 chemical activation:Pore structure and surface chemistry characterization[J].*Chem.Eng.J.*,2008,**140**:32-42.

[14]张丽芳,武欢,张乐.Fe_3O_4 改性壳聚糖对水中 Cr(Ⅵ)的吸附研究[J].沈阳理工大学学报,2022,**41**(**6**):26-33.

[15]梁倩瑜,翁博雅,黄美茹,等.季铵化改性壳聚糖的制备及其凝血性能研究[J/OL].应用化工,**52**(**2**):389-392.

[16]田薪成,刘珊,冯婷,等.SDS 改性壳聚糖对 Cu(Ⅱ)的吸附研究[J].应用化工,2019,**48**(**1**):10-13.

[17]付爽,殷子懿,陈宇,等.玉米苞叶改性壳聚糖对 Cu^{2+} 的吸附研究[J].云南化工,2022,**49**(**7**):15-18.

[18]姚培,李树白,张启蒙,等.PDMDAAC 功能化二氧化钛复合材料对金属离子吸附研究[J].化学试剂,2022,**44**(**12**):1 804-1 809.

[19]刘攀,文永林,汤琪.生物吸附材料处理含六价铬废水的研究进展[J].电镀与涂饰,2016,**35**(**4**):215-221.

[20]左国强,苏小莉,刘改云,等.纳米零价铁吸附法去除废水中的 Pb^{2+}[J].化学试剂,2022,**44**(**6**):828-834.

[21]韦琴,周帆.板栗壳活性炭对中性红和活性蓝 19 的吸附行为[J].化学试剂,2022,**44**(**6**):841-845.

[22]张妍杰,王欢,蔡玉福,等.改性柚子皮生物炭吸附亚甲基蓝性能研究[J].化学试剂,2022,**44**(**6**):822-827.

[23]闫改萌,石丹丹,张渺,等.改性稻壳对水中亚甲基蓝的吸附性能研究[J].化学工程师,2021,**35**(**9**):35-38.

[24]MA Y, YOU D Y, FANG Y, et al. Confined growth of MOF in chitosan matrix for removal of trace Pb(Ⅱ) from reclaimed water[J].*Sep.Purif.Technol.*,2022,**294**: 121 223.

[25]ZHAO F, YANG W, HAN Y, et al. A straightforward strategy to synthesize supramolecular amorphous zirconium metal-organic gel for efficient Pb(Ⅱ) removal[J]. *Chem.Eng.J.*,2021,**407**:126 744.

[26]陈龙,李凯,涂智,等.微波制备碱木质素生物炭对 Zn^{2+} 的吸附性能及机理[J/OL].环境工程:1-12[2023-03-09].

荧光分子探针检测甲醛的研究进展

孙萌,马杰*
(上海理工大学 材料与化学学院,上海 200000)

摘要:甲醛,作为重要的醛基小分子原料,被广泛应用于化工、生物医药、建材等领域。过量甲醛严重时可导致基因突变或癌变。系统地综述了近年来基于 2-aza-Cope 重排、肼醛缩合、胺醛缩合的反应型荧光探针分子的代表性成果。根据聚集态物质的荧光特点将其分为 ACQ 型、AIE 型和 MOF 材料 3 类,从探针分子的设计、机制和应用的方面进行系统介绍,归纳这 3 种类型甲醛荧光探针的优势以及不足。对甲醛荧光探针的未来发展进行了展望,以期为设计性能更优良的荧光探针提供有益参考。

关键词:甲醛;小分子荧光探针;2-aza-Cope 重排;亚胺;AIE 效应
中图分类号:O625.6 **文献标识码**:A **文章编号**:0258-3283(2023)07-0072-06
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0167

Research Progress in the Detection of Formaldehyde by Fluorescent Molecular Probe *SUN Meng*, *MA Jie** (School of Materials and Chemistry, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200000, China)

Abstract: As an important aldehyde-based small molecule raw material, formaldehyde is widely used in chemical industry, biomedicine, building materials and other fields. Excessive formaldehyde can lead to gene mutation or cancer in severe cases. The representative results of reactive fluorescent probe molecules based on 2-aza-Cope rearrangement, hydrazine and aldehyde condensation, and amine and aldehyde condensation were reviewed in recent years. According to the fluorescence characteristics of aggregates, they are divided into ACQ, AIE and MOF materials. The advantages and disadvantages of three types of formaldehyde fluorescence probes were summarized from the aspects of the design, mechanism and application of probe molecules. The future development of formaldehyde fluorescent probes was prospected in order to provide useful reference for the design of better fluorescence probes.

Key words: formaldehyde; small molecule fluorescent probe; 2-aza-Cope rearrangement; imine; AIE effect

甲醛是一种无色、有刺激性气味的生物活性物质,具有良好的水溶性。其天然存在于空气及动植物体中,人体的新陈代谢甚至是烹饪过程中都会产生微量的甲醛。甲醛也是重要的化工原料,被广泛地应用于化工、医药、建材等领域[1]。尽管甲醛与人类的生活息息相关,但过量的甲醛会对人体和环境造成不可逆转的伤害,它已被世界卫生组织(WHO)确定为致癌致畸型物质[2-4]。我国禁止在食品添加剂和化妆品中使用或添加甲醛[5]。

为了监控甲醛污染,科学家开发出多种分析检测方法:主要包括气相色谱法、高效液相色谱法、分光光度法、电化学传感法、质谱法等[6]。虽然上述方法能够有效地检测气相或液相中甲醛的含量,但是它们存在着操作复杂、设备昂贵、在线检测实施难度大等不足。荧光检测法因灵敏度和选择性都高,操作简便,光源获取方便,可以实现快速的定性和定量检测,获得研究者的青睐。近年来,基于甲醛独特的反应特性,检测甲醛的荧光探针研究也取得较大进展。本文根据聚集态荧光探针分子的发光特征,分为聚集诱导猝灭(ACQ)型荧光探针、聚集诱导发光(AIE)型荧光探针、MOF 材料 3 类简述探针研发中的典型代表,侧重于归纳各探针的性质和实用性,以期为从事相关研究和应用的工作人员提供有益的参考。

荧光探针是一种分子测量装置,在光谱化学和光学波导与测量技术的基础上,利用被检测物质与探针分子相互作用的特性,将其化学信息转变成可检测的荧光信号。小分子荧光探针一般由

收稿日期:2023-03-09;**网络首发日期**:2023-04-14
作者简介:孙萌(1999-),女,安徽亳州人,硕士生,主要研究方向为有机荧光探针。
通讯作者:马杰,E-mail:majie@usst.edu.cn。
引用本文:孙萌,马杰.荧光分子探针检测甲醛的研究进展[J].化学试剂,2023,**45**(**7**):72-77。

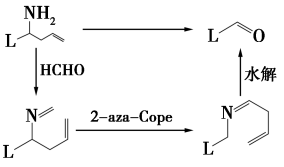
3 部分组成[7-10]:(1)荧光团:生成荧光信号,不同的荧光基团决定不同强弱的识别信号,常见的荧光基团有罗丹明、香豆素等;(2)识别基团:与被检测物结合,决定探针分子是否具有特异性的物质;(3)连接体:将识别基团与荧光团连接在一起,起连接和电荷、能量传递作用。当被检测分子或离子加入到检测体系时,荧光分子中的识别基团将与其发生强相互作用,导致荧光分子的荧光性能发生改变。这种改变与被检测物质的浓度相关,可以通过荧光光谱仪进行检测和分析。

1　ACQ 型荧光探针

常见的 ACQ 型探针是由香豆素、荧光素及芳香胺类等作为荧光基团构成的,具有在低浓度有强荧光,但在高浓度或固态时荧光猝灭的特点,我们将这种现象称为聚集诱导荧光猝灭效应(ACQ)[10],这种现象主要归因于分子间聚集引发的分子内电子从激发态跃迁回基态时,分子间存在强的相互作用,能级发生交叠,导致非辐射跃迁的几率急剧增加,辐射跃迁能量显著下降所致。研究者加入甲醛特异性识别基团可以构建反应型 ACQ 荧光探针。

1.1　基于 2-aza-Cope 重排反应的荧光探针

基于 2-aza-Cope 重排反应机理的探针类型在遇到甲醛时,胺基首先发生重排异构化反应,再发生烷基胺水解反应,最终转化为醛基。利用荧光变化的信号达到对甲醛特异性检测的目的。



L 为荧光基团

图 1　2-aza-Cope 重排的反应机理

Fig.1　Reaction mechanism of 2-aza-Cope rearrangement

Hao 等[11] 以 2-(2′羟基苯基)苯并噻唑(HBT)作为荧光团,烷基胺作为识别基团,构建了 Probe1(图 2)。Probe 1 与甲醛发生 2-aza-Cope 重排反应,导致分子结构发生变化,烷基胺水解转化回 Fluorophore 2,由于醛基的存在,Fluorophore 2 对 HOMO 和 LUMO 的电子分布具有更大的共轭作用,发生激发态分子内质子转移(ESIPT)作用,荧光发射峰发生红移,肉眼可见溶液由无色变为淡黄色,荧光由蓝色变为黄色。这点在荧光光谱中也可以得到印证。

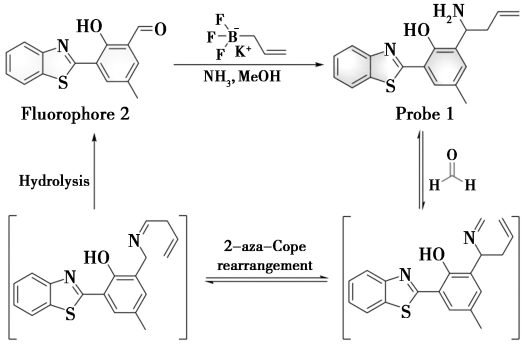


图 2　探针 Probe 1 的作用机理图[11]

Fig.2　Mechanism diagram of probe 1[11]

依据 2-aza-Cope 重排反应,其他课题组通过改变荧光基团构建了类似的荧光探针并展开研究。

Quan 等[12] 以 HBT 作为荧光基团,以均烯丙胺作为识别基团构建了一对荧光探针 FAFP 和 Form-AFP(图 3),当甲醛存在时,富电子的均烯丙胺转化为缺电子的醛基,发生分子内电荷转移(ICT)对甲醛进行比例传感。探针 Form-AFP 在甲醛存在时会发生 2-aza-Cope 重排和 β 自消除,通过重建分子内氢键来恢复 ESIPT 荧光。探针 FAFP 和 Form-AFP 具有显著的响应时间差异,猜想是由于分子水溶性的差异而导致,Form-AFP 与甲醛反应后转化为疏水性的酚羟基,推动了反应的正向进行,而 FAFP 与甲醛反应后产生亲水性的醛基,从而探针 Form-AFP 对甲醛的响应更快,选取 Form-AFP 做进一步的测试。Form-AFP 可用于检测活细胞中内源和外源的甲醛,值得一提的是此探针也可以检测由氧化应激上调的甲醛水平。

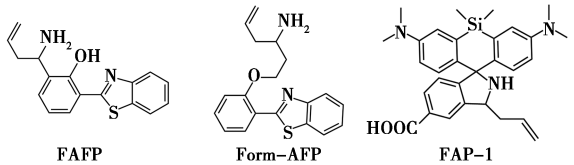


图 3　几种基于 2-aza-Cope 重排反应的荧光探针

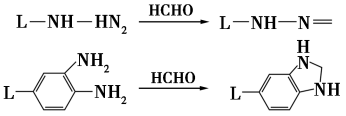
Fig.3　Several Probes based on 2-aza-Cope rearrangement

Chang 等[13] 设计一种基于氨基甲基硅罗丹明荧光团的新型甲醛荧光探针 FAP-1(图 3),以氨基甲基硅罗丹明为荧光团,均烯丙基氨基为反应基团。由于荧光团具有螺旋性,纯探针的荧光很微弱,遇到甲醛发生反应后发生 2-aza-Cope 重排反应,生成螺旋打开形式的 3-丁烯-1-胺的结构,发出显著红色荧光。这是第一代反应型荧光

探针,能够在生理水平上检测甲醛,并且通过抑制人乳腺癌细胞中甲醛的生成得到内源性甲醛浓度的变化。

1.2 肼醛缩合和胺醛缩合

基于肼和胺与醛基发生席夫碱缩合反应生成仲胺,研究者们设计了新型荧光探针。



L 为不定位荧光基团

图 4 肼醛缩合和胺醛缩合的反应机理

Fig.4 Reaction mechanism of hydrazine aldehyde condensaton and amine aldehyde condensation

Ding 等[14] 利用荧光共振能量转移机制(FRET)和光致诱导电子转移机制(PET)设计出一种双光子比值荧光探针 CmNp-CHO(图 5)。该探针以 π-推-拉结构的 TP 萘荧光团为供电子体,甲醛开启萘酰亚胺荧光团为受电子体,与甲醛反应后,CmNP-CHO 会发生略微的红移,紫外灯下荧光由蓝色变成黄色,定性地证明了探针与甲醛发生了反应。该探针为首次被开发出用于食品、活细胞、组织、斑马鱼等中甲醛检测的 TP 型比例荧光探针。在生物医学方面具有广阔前景。

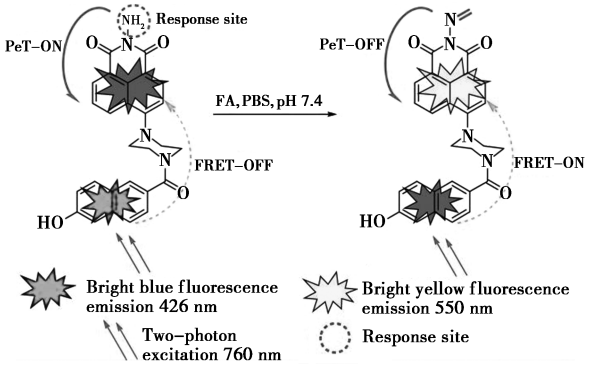


图 5 探针 CmNP-CHO 的作用机理图[14]

Fig.5 Mechanism diagram of CmNP-CHO[14]

Jana 等[15] 研发一种单苯荧光探针 DAB(图 6),利用谷胱甘肽作为放大器,与甲醛作用后生成 3,4-双(亚甲基氨基)苯甲酸(MABA),由其发出荧光。传统的 2-aza-Cope 重排中的 β 消除会产生副产物致癌物,而联胺荧光团会避免这种现象,活细胞成像实验证明探针 DAB 在细胞内内源性甲醛成像的适用性,为搭建小型经济有效的分子甲醛传感探针提供了坚实的平台。

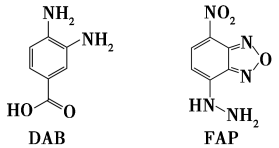


图 6 基于胺醛缩合反应的两种 ACQ 型探针

Fig.6 Two ACQ-type probes based on amine aldehyde condensation reaction

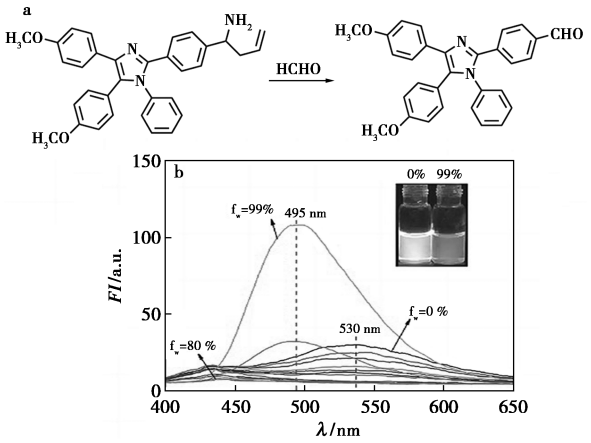
Ge 等[16] 基于醛胺缩合反应设计出一种荧光增强型探针 FAP,用于检测气态甲醛(图 6)。探针 FAP 以 7-硝基苯并-2-氧-1,3-氮基(NBD)染料支架作为荧光团,肼作为反应触发器。在甲醛存在的情况下,甲醛先与探针结构中的胺反应,随后发生 2-aza-Cope 重排和水解反应,抑制 PET 效应,产生显著荧光,相较于直接发生重排反应,这样达到反应平衡的时间更短。

2 AIE 型荧光探针

在实际应用中 ACQ 效应有许多弊端,例如实验中使用去离子水作为检测体系,但是由于有机荧光分子结构中有疏水性的芳烃,在水中溶解度较低,容易形成聚集态,发生 ACQ 效应导致荧光猝灭,不利于水相中的物质检测,另外,检测体系中有机溶剂的大量使用,也不利于环保。在开发性能更优良的探针过程中,研究人员[17,18] 发现四苯乙烯、六苯基噻咯等具有特殊荧光现象,并把这种现象成为聚集诱导发光现象(AIE),与 ACQ 效应相反,此类分子在低浓度非聚集态没有荧光或发光微弱,但分子聚集或固态时其荧光反常增强。利用 AIE 荧光团接识别基团发现也能进行检测,尽管目前关于 AIE 荧光分子的荧光产生机制还没有弄清楚,但研究者已经做了大量探索,相较于传统荧光分子,基于 AIE 效应的荧光探针可以呈固相,便于携带检测,受环境因素的影响小,可用于水相中检测,提高了荧光探针的灵敏度和实用性。AIE 效应的发现为荧光探针的研发开辟了新的方向,并呈良好的发展势头。

研究者基于上述反应模式,利用具有 AIE 性能的荧光基团就可以构建系列 AIE 型分子荧光探针。Gao 等[19] 基于 2-aza-Cope 重排反应设计了一种 AIE 效应探针 MPIPA(图 7),通过在四苯基取代咪唑框架上引入供电子(甲氧基)和吸电子(醛基)来调整 4-(1,4,5-三苯基-1-氢-咪唑-2)苯甲醛(TIB),合成可调节发射颜色的新型荧光探针分子,探针 MPIPA 可以有选择地和甲醛反应,发生 2-aza-Cope 重排反应生成亚胺离子,随后水

解生成 MPIB,其在水中发生自聚集,限制分子内旋转,产生显著荧光。在荧光光谱图中可以看出随着 DMSO-H_2O 体系中含水量的增多,探针的荧光强度增强,具有典型的 AIE 特征,探针 MPIPA 可用于临床中癌症体系甲醛的成像。



a.结构及作用机理图;b.不同含水率下荧光光谱曲线图以及紫外灯下照片

图 7　探针 MPIPA 的作用机理及荧光图[19]

Fig.7　Mechanism of action and fluorescence of MPIPA[19]

唐琳等[20]设计了一种含有胺基的 AIE 类型的荧光分子探针 PAN(图 8),探针 PAN 是二芳基取代的丙烯腈类化合物,三苯胺部分具有螺旋桨状扭曲结构,进一步增加了探针的聚集诱导效应,亲水的腈基和胺基具有一定的水溶性,在乙腈/水的体系中,探针 PAN 与甲醛反应后发生胺醛缩合反应,生成溶解性更小的亚胺物质。目前对基于胺醛缩合反应的 AIE 甲醛荧光探针分子的研究刚刚起步,唐琳团队在此方向上推进了研究。

Chen 等[21]基于聚集诱导发光效应原理,由四苯乙烯功能化制备得到探针 FAP(图 8),该探针含有两个胺基,利用醛胺缩合反应的特异性检测甲醛。胺基不仅是反应基团,也能增加探针的水溶性,与甲醛反应后生成亚甲胺,其溶解度变小,产物聚集后限制分子内旋转诱导,使其荧光显著增强。探针 FAP 被用于生物成像和传感方面。

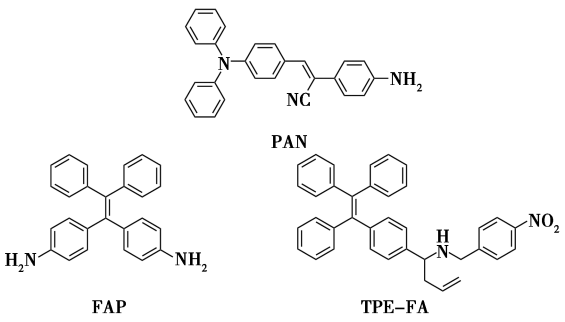


图 8　甲醛检测的几种 AIE 型探针

Fig.8　Several AIE-type probes for testing CH_2O

Zhao 等[22]基于聚集诱导发光效应设计了以四苯乙烯为荧光团的探针 TPE-FA(图 8),用于快速检测气体中的甲醛。探针与甲醛进行 2-aza-Cope 重排反应,由于光致诱导电子转移(PET),与甲醛反应后,弱发射型 TPE-FA 转化为高发射型化合物,在 480 nm 波长处荧光逐步增强,在 180 min 内增加了约 4 倍,实现荧光“开启”。将探针 TPE-FA 直接加载在高性能薄层色谱硅胶板上,制备便携式固体甲醛测试传感器,在紫外灯下可以用肉眼观察到与甲醛反应前后测试板的荧光变化,此探针是一种实用气态甲醛检测传感器,具有广泛的应用前景。

3　MOF 结构荧光探针

近年来,MOF 材料由于其扩展的晶体框架、大的比表面积、热稳定性、结构均匀的纳米级腔以及内外表面可以进一步修饰的潜力而被人们广泛关注。研究者发现在 MOF 材料上引入荧光团并利用 2-aza-Cope 重排、醛胺缩合和肼胺缩合反应也可以构筑甲醛的荧光检测探针,开辟了快速检测甲醛的荧光探针新领域。

Bej 等[23]使用溶剂热法合成了具有 PET 效应的 MOF 材料:CMERI-1(图 9),CMERI-1 为针状结构,具有很好的热稳定性。荧光传感实验中,在 350 nm 激发时,该 MOF 材料在 430 nm 处出现离散峰,这种弱发射可能是由 MOF 骨架内的配体电荷转移引起的。在甲醛存在的情况下,随着甲醛浓度的增加,荧光强度有轻微的峰值移动,而其他醛类的存在对此没有丝毫影响,这是因为它的框架更容易形成亚胺,其他醛体积较大,扩散性低,离域电子结构稳定,亲电性较低,不能通过多孔通道扩散,几乎不与胺官能团反应。因此该探针对甲醛更加敏感,具有显著的选择性和抗干扰性。检测限达到 0.62 μm,低于世界卫生组织对建议的饮用水和食物中甲醛浓度。制备探针水凝胶基膜,进一步探究该 MOF 材料对甲醛蒸汽的检测限,计算得知,CMERI-1/PVA 对甲醛的检出限为 0.26 μm,相较于与甲醛反应前,荧光强度增加约 2.2 倍,目前对气相甲醛的检测探索还不是很广泛,该探针材料具有巨大发掘空间。

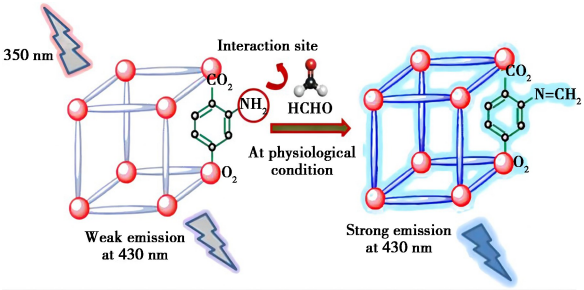


图 9 CMERI-1 探针的检测机制[23]

Fig.9 Detection mechanism of CMERI-1[23]

Che 等[24]用 $Eu(NO_3)_3 6H_2O$ 和均苯四甲酸设计了一种 Eu 基 MOF 材料，遇到甲醛后，甲醛中的氢原子易被 MOF 材料中的富电子氧原子吸引，形成 C—H—O 键，其中氢键使 MOF 处于反溶液状态，通过限制振动和旋转的能量损失，达到最强荧光。在此基础上，团队开发出可智能检测溶液中甲醛浓度范围的多功能逻辑装置和可视化检测甲醛的便携式荧光膜，此材料是第一个可同时用于液相和气相中甲醛检测的 MOF 材料，对于预防甲醛危害具有重要意义。

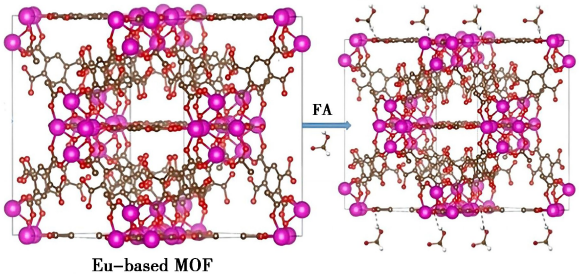


图 10 Eu 基 MOF 材料的检测原理[24]

Fig.10 Detection principle of Eu-based MOF[24]

表 1 从适用 pH、检出限和响应时间 3 方面对各探针的实用性进行归纳对比，探针有各自的优点和缺点。对于 ACQ 类型的探针来说，适用的 pH 范围更为宽泛，适合在生物体环境或生活生产场景中，检出限也更低，缺点是相较于 AIE 类型的探针，响应时间会更长，因此也拉长了检测的周期。AIE 类型的探针适用的条件基本上在酸性环境中，不利于生物体内甲醛的检测，但也有性质相对优良的探针，例如探针 AIE-FA，适用 pH 覆盖了酸、中性、弱碱性，更重要的是此探针可以达到即时检测的效果。除此之外，MOF 材料具有超低的检出限和较快的响应时间，多孔的纳米材料具有更加稳定的性质，是值得进一步研究的新材料领域。

表 1 各探针的归纳对比

Tab.1 Induction and comparison of each probe

探针类型	反应机理	探针	pH	检出限/$\times10^{-6}$ ($mol\cdot L^{-1}$)	响应时间/min
ACQ	2-aza-Cope 重排	Probe 1	7.4	0.58	90
		FAFP 和 Form-AFP	6.0~9.0	0.066	70
		FAP-1	7.4	5	120
	缩合反应	CmNp-CHO	2.0~12.0	0.008 3	—
		DAB	7.2	0.079	15
		FAP	2.48~4.55	12.5	40
AIE	2-aza-Cope 重排	MPIPA	2.0~7.4	0.123	120
		AIE-FA	4.0~9.0	0.04	1.5
		TPE-FA	<5	0.036	60
	亚甲基胺	PAN	—	—	—
MOF	CMERI-1 和 CMERI-2	—	0.62 和 1.39	1 和 5	
	Eu 基 MOF	7.0	液相 1.06 气相 0.393	8	

4 总结与展望

综上所述，本文概括了近年来利用 2-aza-Cope 重排反应、醛胺缩合反应构建的 ACQ 型、AIE 型和 MOF 材料型检测甲醛荧光探针，虽然这些荧光探针分子具有选择性好、特异性高、检出限低、响应时间短、灵敏度高、可应用于生物体内等优点，但有关荧光探针的研究仍存在一些不足：(1)对于醛胺缩合的发光机制不够清楚，尤其是 AIE 类型探针的发光机制，仍有待深入研究；(2)虽然在实验室环境中探针表现优良，但实际应用中的可靠性仍需大量实验数据积累来验证；(3)利用醛基的氧化还原性设计的新型荧光探针机制有待研发。因此，开发环保、安全、实用的荧光探针依然是未来努力的方向，尤其是 AIE 型的探针，以其适用于高水、全水体系，固相体系，操作便利等优点，将在工业生产、环境监测和探究甲醛生物学等方面都有广阔的研发与应用空间。

参考文献：

[1]黄舒美.有机小分子甲醛荧光探针的设计、合成与细胞成像[D].广州：广东工业大学，2022.

[2]卢辉旭，唐永和，周红梅，等.一种荧光增强型甲醛荧光探针的合成及其性能研究[J].有机化学，2022，**42**(**4**)：1 163-1 169.

[3]曹碧霞，刘荣，高玉清，等.基于 1，8-萘酰亚胺的甲醛荧光探针研究进展[J].化学试剂，2022，**44**(**2**)：203-211.

[4]龚雪云，吴江，张磊.生物样品中甲醛检测方法研究进

展[J].化学世界,2021,**62**(**11**):653-659.
[5]王学川,王岩松,韩庆鑫,等.有机小分子荧光探针对甲醛的识别及其应用[J].化学进展,2021,**33**(**9**):1 496-1 510.
[6]赵予,张涛.用于生物体内甲醛可视化检测的小分子荧光探针的研究进展[J].激光生物学报,2022,**31**(**3**):193-201.
[7]袁岗强.新型甲醛荧光探针的设计、合成与应用[D].长沙:中南林业科技大学,2021.
[8]张雪.特异性甲醛荧光探针的设计、合成及性能研究[D].济南:济南大学,2021.
[9]袁雯雯.检测甲醛的三种新型荧光探针之设计、合成与性能研究[D].南京:南京师范大学,2021.
[10]陈思鸿,许佳敏,李月媚,等.基于有机小分子的聚集诱导猝灭(ACQ)-聚集诱导发射(AIE)转换研究进展[J].有机化学,2022,**42**(**6**):1 651-1 666.
[11]HAO Y,ZHANG Y,ZHANG A,et al.A benzothiazole-based ratiometric fluorescent probe for detection of formaldehyde and its applications for bioimaging[J].*Spectrochim.Acta A Mol.Biomol.Spectrosc.*,2020,**229**:1-6.
[12]QUAN T,LIANG Z,PANG H,et al.A ratiometric ESIPT probe based on 2-aza-Cope rearrangement for rapid and selective detection of formaldehyde in living cells[J].*Analyst*,2022,**147**:252-261.
[13]BREWER T F,CHANG C J.An aza-cope reactivity-based fluorescent probe for imaging formaldehyde in living cells[J].*J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**: 10 886-10 889.
[14]DING H,YUAN G,PENG L,et al.TP-FRET-based fluorescent sensor for ratiometric detection of formaldehyde in real food samples,living cells,tissues and zebrafish[J].*J.Agr.Food Chem.*,2020,**68**:3 670-3 677.
[15]JANA A,JOSEPH M M,MUNAN S,et al.A single benzene fluorescent probe for efficient formaldehyde sensing in living cells using glutathione as an amplifier[J].*J. Photoch.Photobio.B*,2021,**214**:1-8.
[16]GE H,LIU G,YIN R,et al.An aldimine condensation reaction based fluorescence enhancement probe for detection of gaseous formaldehyde[J].*Microchem. J.*, 2020,**156**:1-6.
[17]LUO J,XIE Z,LAM J W,et al.Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole[J].*Chem.Commun.*,2001,(**18**):1 740-1 741.
[18]DANG D,QIU Z,HAN T,et al.1+1>>2:Dramatically enhancing the emission efficiency of TPE-based AIEgens but keeping their emission color through tailored alkyl linkages[J].*Adv.Funct.Mater.*,2018,**28**(**16**):1 707 210.
[19]GAO T,CAO X,BI A,et al.An Aza-cope mediated fluorescent probe based on aggregation-induced emission for highly selective and sensitive detection of formaldehyde in living cells and tissues[J].*Sensor. Actuat. B-chem.*, 2018,**B273**(**PT.927/184**):1 139-1 145.
[20]唐琳,郝梦菲,李敢,等.基于聚集诱导发光的甲醛荧光探针[J].海南师范大学学报(自然科学版),2021,**34**(**1**):8-11.
[21]CHEN W,HAN J Y,WANG X N,et al.Aggregation-induced emission-based fluorescence probe for fast and sensitive imaging of formaldehyde in living cells[J].*ACS Omega*,2018,**3**(**10**):14 417-14 422.
[22]ZHAO X,JI C,MA L,et al.An aggregation-induced emission-based "turn-on" fluorescent probe for facile detection of gaseous formaldehyde[J].*ACS Sensors*, 2018,**3**(**10**):2 112-2 117.
[23]BEJ S,MANDAL S,MONDAL A,et al.Solvothermal synthesis of high-performance d10-MOFs with hydrogel membranes@"turn-on" monitoring of formaldehyde in solution and vapor phase[J].*ACS Appl. Mater. Inter.*, 2021,**13**(**21**):25 153-25 163.
[24]CHE H,LI Y,TIAN X,et al.A versatile logic detector and fluorescent film based on Eu-based MOF for swift detection of formaldehyde in solutions and gas phase[J].*J.Hazard.Mater.*,2020,**410**(**129**):1-10.

植物还原制备纳米金过程中黄酮类物质的作用、外界影响因素及其应用

刘海*,王飞,王毅敏,宋桃,柯义虎
(北方民族大学 a.化学与化学工程学院,b.国家民委化工技术基础重点实验室,
c.宁夏太阳能化学转化技术重点实验室,宁夏 银川 750021)

摘要:植物还原法制备纳米金(Gold nanoparticles,GNPs)绿色经济、易操作、原材料可再生,避免了有毒化学试剂的使用以及物理法高成本的投入,为 GNPs 的制备提供了新的途径。然而,植物种类繁多且生物成分复杂,以植物提取液为整体制备 GNPs 不同的活性组分会互相干扰,使 GNPs 合成机制变得复杂。此外,提取液与金前体浓度、酸碱度、温度等外界因素也直接影响着 GNPs 的合成。系统的综述了黄酮类物质在合成 GNPs 过程中的还原与保护机理,外界因素在转化率、形貌粒径、分散性等方面的影响规律以及 GNPs 在抗癌,药物传递,抗菌,催化等领域的应用,最后展望了植物法制备 GNPs 的局限性。对调控制备 GNPs 活性组分的作用机制以及制备条件的优化具有指导意义。

关键词:植物还原法;纳米金;黄酮类物质;外界因素;应用
中图分类号:Q501 **文献标识码**:A **文章编号**:0258-3283(2023)07-0078-09
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0118

Role of Flavonoids and External Influencing Factors in the Process of Preparing Nano-gold by Plant Reduction and Its Application

*LIU Hai**,*WANG Fei*,*WANG Yi-min*,*SONG Tao*,*KE Yi-hu* (a.School of Chemistry and Chemical Engineering,b.Key Laboratory for Chemical Engineering and Technology,State Ethnic Affairs Commission,c.Ningxia Key Laboratory of Solar Chemical Conversion Technology,North Minzu University,Yinchuan 750021,China)

Abstract:The preparation of gold nanoparticles(GNPs) by plant reduction method is green,economical,easy to operate,and the raw materials are renewable.It avoids the use of toxic chemical reagents and the high cost of physical methods,and provides a new way for the preparation of GNPs.However,there are many kinds of plants and complex biological components.When the plant extract is used as a whole to prepare GNPs,different active components will interfere with each other,leading to the synthetic mechanism of GNPs complicated.In addition,the concentration of extract and the gold precursor,pH value,temperature and other external factors also directly affect the synthesis of GNPs.The reduction and protection mechanism of flavonoids in the process of synthesizing GNPs,the influence law of external factors in conversion rate,morphology,particle size and dispersion,and the application of GNPs in anticancer,drug delivery,antibacterial and catalysis were systematically reviewed.Finally,the limitations of preparing GNPs by plant method were prospected.It would provide significant guidance for regulating the action mechanism of active components for preparing GNPs and optimizing the preparation conditions.

Key words:plant reduction method;gold nanoparticle;flavonoid;external factor;application

纳米金(Gold nanoparticles,GNPs)由于特殊的光、电、热、磁等特性以及特有的等离子共振效应,成为生命科学[1,2]、传感器[3,4]、催化[5-7]等领域的热门材料。而生物法制备 GNPs 过程中无需添加任何化学试剂,选材灵活多样,原材料可再生,为 GNPs 的制备提供了新的思路[8]。同时天然产物具有更好的生物相容性,与物理法与化学法相比,生物法合成的 GNPs 在医学领域的应用更为广泛[9]。生物法分为微生物法和植物还原法,由于后者制备的 GNPs 更稳定,且可在较低温度下合成,操作简便,人们将研究的重点放在了植物还原法制备 GNPs 上。

如表 1 所示,植物体系不同所含的活性物质也存在差异,因此具备完全不同的还原和稳定能力。同时,单一组分与多组分的活性物质导致了

收稿日期:2023-02-23;**网络首发日期**:2023-04-18
基金项目:宁夏自然科学基金项目(2021AAC03200);宁夏高等学校科学研究项目(NXG2020055)。
作者简介:刘海(1976-),男,北京人,博士,副教授,主要研究方向为纳米材料,生物化工和工业催化等交叉领域,E-mail:2007059@nun.edu.cn。
引用本文:刘海,王飞,王毅敏,等.植物还原制备纳米金过程中黄酮类物质的作用、外界影响因素及其应用[J].化学试剂,2023,**45**(**7**):78-86。

不同的成核生长机理,形成粒径形貌多样化的 GNPs。

表 1　不同植物制备 GNPs 的实例

Tab.1　Examples of GNPs preparation by different plants

植物	形貌	粒径/nm	有效组分	引文
西葫芦叶	棱柱状、球形	<10	醛	[10]
锦葵叶	球形	10	—	[11]
凤梨叶	近球形	7.39~32.09	黄酮类物质、单宁	[12]
白柳	—	50~80	胺、酰胺、芳香基团	[13]
姜黄根茎	球形	20	酚	[14]
薄荷叶	球形	36.4	多酚	[15]
龙葵、蓖麻、桑树	球形、六边形、三角形	2.5~10.5	—	[16]
海藻	球形	10	糖	[17]
根皮蕨	准球形、三角形、五边形	5~18(准球形)	—	[18]
玫瑰	球形、三角形、二十面体	10(t=40 ℃)	黄酮类物质、多酚、皂苷	[19]
火龙果	球形、椭圆形、三角形	10~20	—	[20]

此外,外界环境因素对 GNPs 的合成也会产生不定性影响。而 GNPs 的形貌与粒径等因素很大程度上决定了它的光电和理化性质,所以对其进行调控尤为重要[21]。在植物众多复杂成分中,黄酮类物质作为一种特殊的多酚通常由 2 个含若干酚羟基的苯环,以中央三碳原子连接而成,这一结构预示了其较强的抗氧化性能。普遍认为,抗氧化剂具有优异的还原能力,可提供电子将 Au^{3+} 转化为 Au^0,并利用自身与无机、有机和生物物质间的相互作用来调控 GNPs 的尺寸与形貌[22-24]。特殊的物化性质使黄酮类物质在一个纳米系统中具备多种功能。

1　黄酮类物质作用分析

金属纳米粒子的植物合成通常需要 3 个阶段即成核、生长和稳定[25]。作为表面活性剂的先决条件则至少拥有一个原子或显示孤电子对的官能团,才能与 GNPs 结合发挥作用[26]。金属离子成核致使溶液中金属前驱体快速耗尽,这些活性组分进一步引导颗粒的生长,合成更加稳定的纳米颗粒。黄酮类物质在此过程主要作为还原剂与稳定剂存在,如表 2 所示。

1.1　作还原剂

表面活性剂与金属离子的相互作用类似于金属配合物中配体和缺电子金属离子的行为[23]。Zhou 等[27]印证了 $[AuCl_4]^-$ 通过离子键或静电力与生物分子相互作用的机制,蛋白质作为保护剂包覆在 GNPs 表面,黄酮类物质等作为天然抗氧化剂负责了 Au^{3+} 的还原。此项研究首次将植物有效组分的抗氧化能力与其还原性能联系起来。

将白柳等作为研究对象用于合成 GNPs 时,研究者发现提取液中的水溶性黄酮类物质中通过羰基或者 π 电子与 GNPs 相互作用吸附在其表面,与 Au^{3+} 接触之后发生电子转移,促使了反应的发生,证实了酮基向羧酸转化还原 Au^{3+} 的主要机制[28-30]。除酮基转化之外,Alam 等[31]的研究证实了九里香中的多羟基黄酮类物质在还原过程中,羟基自身被氧化为 α,β-不饱和羰基,引发 Au^{3+} 还原生成了 Au^0,如图 1 所示。

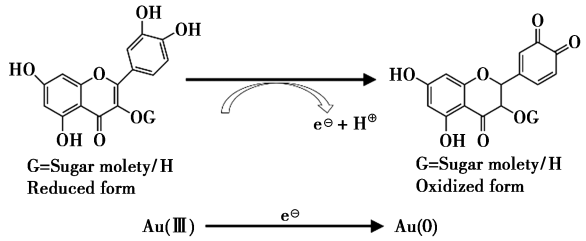


图 1　Au(Ⅲ)合成 GNPs 的机理探讨[31]

Fig.1　Mechanism of Au(Ⅲ) synthesis of GNPs[31]

在用辣木花瓣等提取液制备 GNPs 的研究中,研究者们[32,33]证实了作为表面活性物质的黄酮类和酚类化合物含有的羟基氧化为羰基,Au^{3+} 得以还原合成 GNPs。此外,Wang 等[34]进一步证实了黄酮类物质对 Au^{3+} 的还原活性与自身化学结构特别是酚羟基的数量和位置密切相关。如图 2 所示,槲皮素 A、C 两个环上共有 4 个酚羟基,特别是 C 环上的 2 个邻位酚基团有助于增强黄酮类物质的抗氧化能力。大豆苷的 2 个酚羟基只有一个在 C 环上,降低了其还原活性。而葛根素只有 A 环的糖基化和 C 环上的一个羟基,因此这类黄酮类物质的还原活性最弱。

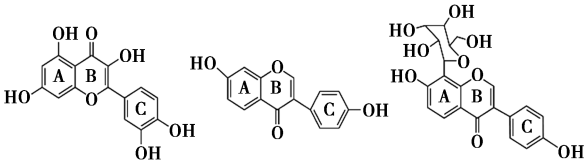


图 2　槲皮素,大豆苷,葛根素[34]

Fig.2　Quercetin, daidzein, puerarin[34]

Patra 等[35]从芒果叶中分离得到一种可有效将 Au^{3+} 还原为 Au^0 的含葡萄糖残基的黄酮类物

质(芒果苷),反应过程中,芳香环发生 $n\rightarrow\pi^*$ 跃迁以及整个分子的分子内电子发生转移或者跃迁。芒果苷当中的酚单元和缺失的葡萄糖单元负责还原 Au^{3+} 生成 GNPs。反应机理如图 3 所示。

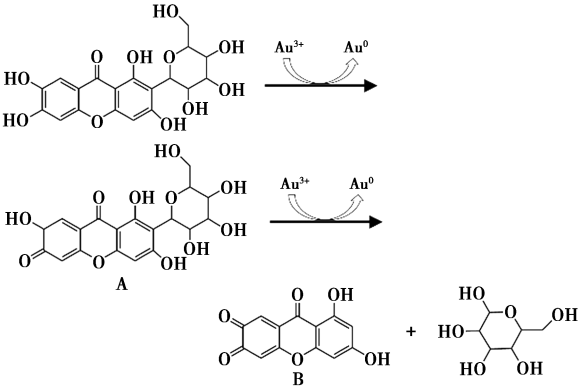


图 3 芒果苷形成 GNPs 的机理[35]

Fig.3 Mechanism of mangiferin forming GNPs[35]

Olajire 等[12]在凤梨叶提取物合成 GNPs 的过程中,将黄酮类物质和单宁被确定为还原 Au^{3+} 的主要活性物质。随着反应发生,羰基(>C=O)首先与芳香环部分发生共轭,位于芳香环 1,4-位置之间的羰基(>C=O)与 1,4-位置的羟基(—OH)相互作用,随后 π(p)电子转移到部分填充的 Au^{3+} d-轨道形成了 GNPs。

如上所述黄酮类物质可通过多种机理实现对 Au^{3+} 的还原。廉婷[36]在研究中证实了黄酮类物质拥有比蛋白质、糖类等生物组分更理想的还原能力。为今后研究者运用植物还原法制备 GNPs 以及还原剂的选择上提供了指导和理论支持。

1.2 作保护剂

研究表明,结晶位点在未被保护剂覆盖状态下,随反应进行 GNPs 晶体会持续生长。生物组分对 GNPs 的保护机制可分为两种:第一种是非离子大体积表面活性剂在 GNPs 表面形成空间涂层使粒子之间产生空间排斥;另一种是基于粒子间的静电斥力,生物分子包覆下的 GNPs 之间由于静电作用相互排斥,有效防止了聚集[26]。GNPs 的分散性及稳定性取决于 GNPs 之间相互接近时存在的斥力和引力是否平衡。如果所有的粒子之间都相互排斥,则 GNPs 的单分散性较强并保持稳定。当粒子之间只有很小的斥力或没有斥力,就会导致粒子的聚集[37]。

研究者先后对生物组分当中的黄酮类物质进行了分离,在 Singh 等[38]用黄檀叶提取物合成 GNPs 的研究中黄酮、异黄酮、黄酮醇、新黄酮醇等物质作为封端配体,使 GNPs 趋于分散,氧原子的存在促进了 GNPs 对表面杂环成分的吸收。

当归中的黄酮类等活性组分在 GNPs 周围形成保护性覆盖层通过静电作用产生斥力防止 GNPs 团聚保证其稳定性[39]。此外,廉婷[36]发现芳樟植物质中黄酮类物质含有的—COOH 基团能够有效保护纳米颗粒,防止其发生团聚。Mukherjee 等[40]将可用作中草药的黄连叶和扶桑在水溶液中合成了不同形貌的 GNPs。黄酮类等物质的羰基或酮基以及多羟基黄酮类物质的羟基覆盖于形成的金胶体表面,形成稳定的保护层,防止了 GNPs 的聚集[41]。黄酮类物质通过自身基团与 GNPs 的相互作用包覆于 GNPs 表面,利用产生的静电斥力和空间位阻抑制了颗粒之间团聚确保了 GNPs 的稳定存在。

1.3 作为还原剂和稳定剂

在 Lee 等[42]用富含黄酮类物质和氧杂蒽酮的山竹果皮制备 GNPs 的研究中,黄酮类物质可同时作为还原剂和稳定剂存在,$HAuCl_4$ 在山竹水溶液基质中充分分散后,与山竹有效组分的官能团反应生成[Au/山竹基质]。反应过程如下:

$$HAuCl_4(aq) + G.mangostana \quad \text{Stirring at Room Temp} \quad [Au/G.mangostana]$$

同时,山竹基质作为封端剂可将 GNPs 从聚集物分离出来,黄酮类物质和氧杂蒽酮当中的羰基覆盖并稳定了 GNPs,氧原子促使化合物被

表 2 GNPs 制备过程中黄酮类物质的作用

Tab.2 Role of flavonoids in the preparation of GNPs

作用机理	植物体	方式	途径	引文
还原性	白柳、丁香、刺棘草、九里香、辣木花瓣、大马士革玫瑰	官能团氧化	酮基向羧酸转化 羟基氧化为 α,β-不饱和羰基 羟基氧化为羰基	[28-33]
	芒果、凤梨	电子转移	$n\rightarrow\pi^*$ 跃迁,分子内电子发生转移或者跃迁 π(p)电子转移到部分填充的 Au^{3+} d-轨道	[12,35]
保护性	黄檀叶	空间位阻	黄酮、异黄酮、黄酮醇、新黄酮醇等分子作为封端配体,避免 GNPs 发生团聚	[38]
	当归、芳樟、黄连叶、扶桑、玫瑰、山竹	静电斥力	黄酮类物质含有的羧基覆盖 GNPs 黄酮类物质的羰基或酮基覆盖 GNPs 多羟基黄酮类物质的羟基覆盖 GNPs	[19,36,39-42]

GNPs 吸收。此外,玫瑰中黄酮类物质含有的羟基负责了 Au^{3+}的还原,而羰基覆盖于粒子表面保证了粒子的稳定性与分散性[19]。可见,在一些体系当中黄酮类物质具备双重性能,还原制备 GNPs 并使其稳定存在。

2　外界因素在制备纳米金过程中的影响

2.1　提物液浓度

如上所述,黄酮类物质可通过特定作用有效制备并稳定 GNPs。实际制备过程中,GNPs 的形貌粒径以及产率等与植物质的浓度等因素也密切相关,如表 3 所示。Wang 等[34]利用电化学技术研究了黄酮类物质对 Au^{3+}的还原作用,证实了随着黄酮类物质浓度的增加,活性物质与金电极之间的电通讯逐渐受阻,氧化还原波逐渐减小。过高的浓度将导致活性物质与金离子的相互作用受影响,不利于 Au^{3+}的还原。

以金格林叶提取物还原 Au^{3+}时,Kumari 等[43]发现提取液的浓度增加后 GNPs 的产率随之增加。Zhou 等[27]通过分光光度法进一步证实了黄酮类物质含量与转化率之间成正相关关系。此外,Satpathy 等[21]用富含黄酮类物质的刺棘草提取液合成 GNPs 时发现过量的活性组分及质子又会影响 AuNPs 的成核,使 $HAuCl_4$ 保持分子形式,从而阻止 Au^{3+}还原为 Au^0。

在植物提取物浓度对 GNPs 的尺寸研究方面,Thangamani 等[10]与 Zayed 等[44]发现低浓度下由于成核速率较慢容易生成粒径较大的 GNPs,适当提高叶提取物的浓度可形成单分散、颗粒尺寸更小的 GNPs。Usman 等[45]又成功利用浓度差异调控了 GNPs 的形貌,将干燥樟树叶植物质的质量从 0.1 g 增加到 1 g 之后,GNPs 从片状三角形转变为粒径较小的球形。而当浓度过高时,Dash 等[46]发现马樱丹提取液制备的 GNPs 容易嵌入有机基质当中形成花絮状物质。Gangula 等[30]进一步证实了高浓度的植物提取液易导致表面封端分子和预成核表面二次还原过程之间的额外相互作用,因此会生成粒径较大的颗粒。

Usman 等[45]探究了提取液浓度对分散性的影响规律,动态光散射分析表明随着提取物质量分数从 2% 增加到 5%,多分散性指数(PDI)从 0.459 降到了 0.207,浓度的增加使 GNPs 的保护层变厚,提高了 GNPs 的单分散性。植物提取液浓度的增大有利于 GNPs 的转化以及分散程度。提取物浓度较低时,用于还原和稳定 GNPs 的活性分子不足,GNPs 颗粒趋向于各向异性生长形成尺寸较大的片状 GNPs 以获得更高的稳定性。反之,过高的提取液浓度则会导致活性分子与预成核表面的额外相互作用,形成大尺寸的颗粒。合适浓度的活性组分与纳米粒子之间的强相互作用能够趋向于形成各向同性尺寸较小的球状 GNPs。

2.2　金前体浓度

在植物还原法制备 GNPs 的研究中,金前体浓度同样起着关键作用。Zayed 等[44]通过向凤凰叶提取物中逐滴加入 $HAuCl_4$ 溶液探究 GNPs 的形成机理,$HAuCl_4$ 浓度达到成核的临界浓度后开始自发成核,原子核沉积逐渐生长,产生了大小均匀的球形 GNPs。Patra 等[35]用天然黄酮类物质芒果苷探究了 $HAuCl_4$ 的最佳浓度,发现当 $HAuCl_4$ 的浓度与芒果苷质量分数保持在比值为 0.7 mmol/L、0.1%时,GNPs 的产率达到最佳值。以白柳为研究对象,Ul-Islam 等[28]将 1 mmol/L 的 $HAuCl_4$ 确定为合成 GNPs 的最佳浓度,并在此浓度下以 V(白柳提取液):V($HAuCl_4$ 溶液) = 1:15 制备出了粒径为 50~80 nm 纳米金颗粒。Satpathy 等[21]采用富含黄酮类物质的刺棘草合成 GNPs 时发现当 $HAuCl_4$ 浓度超过 1 mmol/L 时,过量的 Au^{3+}耗尽植物提取液中的还原剂,剩余组分不足以还原和稳定 GNPs 致使其变得不稳定发生团聚,形成粒径较大的 GNPs。

在金前体浓度对反应速率的探究上,Alam 等[31]发现 Au^{3+}浓度在 0.5 mmol/L 以内时,随着浓度的增加,GNPs 的合成速率也随之增加,超过 0.5 mmol/L 时,其合成速率不再变化。金前驱体成核需要一定的浓度范围,而这一范围会随不同的生物源以及合成方法发生改变。金前驱体浓度影响着 GNPs 的转化率、尺寸、形貌、以及合成速率。

2.3　酸碱度

反应体系酸碱度的改变伴随着电荷的变化,进而影响植物质活性组分对 GNPs 的保护能力。在用藤茶干粉提取液制备 GNPs 的研究中,郭秋兰等[47]证实了初始酸碱度与转化率之间的负相关关系以及对 GNPs 尺寸的作用规律。在碱性介质中,生成的 GNPs 与 OH^-相互作用,生物分子不易于在 GNPs 表面产生吸附,纳米粒子呈聚集态增加了GNPs的尺寸。此外,研究人员[21,27,39]发

表 3 GNPs 制备过程中外界因素的影响规律

Tab.3 Influence law of external factors in the preparation of GNPs

外界因素	植物体	影响内容	影响趋势	引文
提物液浓度	金格林叶、刺棘草	转化率	浓度与转化率成正相关关系,浓度过高不利于 Au^{3+} 转化	[21,43]
	西葫芦叶、凤凰叶	粒径	提高浓度后有利于减小 GNPs 粒径	[10,44]
	樟树叶、橄榄叶、沙棘	形貌	提高浓度有利于片状三角形 GNPs 向球形转变,浓度过高时容易形成花絮状物质	[30,45]
	西葫芦叶、凤凰叶、樟树叶	分散性	浓度提高可增强单分散性	[10,44,45]
金前体浓度	凤凰叶	成核	金前驱体成核需要临界浓度,高于此浓度开始自发成核	[44]
	白柳、刺棘草	粒径	金前体有最佳浓度,浓度过高时 GNPs 容易团聚形成粒径较大的 GNPs	[21,28]
	芒果、九里香	合成速率、转化率	在一定的范围内,提高浓度,GNPs 的生成速率与产率随之增加	[31,35]
酸碱度	藤茶	转化率	初始酸碱度与转化率之间成负相关关系	[47]
	刺棘草、当归、燕麦	粒径	多数情况下,碱性介质中 GNPs 呈聚集态粒径较大,酸性介质中易合成小尺寸 GNPs	[21,39]
	玫瑰、白柳	稳定性	酸性介质中 GNPs 更稳定	[19,28]
温度	刺棘草、九里香、人参、玫瑰	产率、粒径、分散性	较高温度下,有利于制备粒径较小,产率与分散性较高的 GNPs,温度太高时 GNPs 发生团聚粒径变大	[19,21,31]

现黄酮类与酚类等活性物质在酸性环境下,其含有的羟基等官能团容易质子化而携带更多的正电荷,静电吸引促使活性物质与带相反电荷的 $[AuCl_4]^-$ 相互作用有利于 Au^{3+} 的转化形成小尺寸的球状 GNPs。而弱酸及碱性环境下由于金离子的二次还原,易形成尺寸较大的 GNPs。

Kyziol 等[19] 与 UL-Islam 等[28] 利用玫瑰、白柳等植物研究了 GNPs 稳定性对酸碱度的依赖作用,发现在酸性环境中,金胶体可稳定存在超过一年,而反应介质为碱性时,24 h 后便出现了沉淀,失去了原有的稳定性。初始酸碱度通过调控环境中的电性,改变活性物质和金前体之间的静电相互作用对粒径形貌、稳定性以及反应速率起到调节作用。而不同来源的植物提取液合成 GNPs 时受酸碱性影响的规律稍有不同,较难形成一致结论。

2.4 温度

反应温度的改变会影响 GNPs 的成核过程,进而使 GNPs 的形貌与粒径趋于多样化。研究者探寻了合成 GNPs 的最佳温度,在用富含黄酮类物质的九里香等植物制备 GNPs 的研究中,研究者发现,较低温度下 Au^{3+} 未被完全还原,生成的 GNPs 较少,而在 80 ℃时制备出了量相对较多、粒径较小且分散均匀的 GNPs。当温度持续上升时植物次生代谢产物发生降解,GNPs 团聚后粒径变大[21,31]。此外,研究者利用植物还原法在常温下也成功合成了形貌粒径不同的 GNPs[19]。温度的改变对转化率,粒径形貌等都有不小的影响。适当的高温环境,有利于成核提高纳米粒子的合成速率,同时二次成核过程得到抑制形成形貌单一的小尺寸纳米粒子[26]。但研究表明多数植物质在较为温和的环境下就可以合成 GNPs,节能且操作简便,成功用于各种领域,使 GNPs 在常温下的合成更具有意义。

除上述几个因素外,反应时间、搅拌速率、微波场等因素也影响着 GNPs 的合成。

3 应用

植物还原法合成 GNPs 简易,环保,使其应用迈上一个新的台阶。以天然黄酮类物质为主要活性物质制备的 GNPs 更是广泛应用于抗癌药物生产、给药系统、抗菌、催化等领域。

3.1 作为抗癌药物

GNPs 可以有效地攻击所有类型的细菌和病毒,而对正常细胞不显示毒性。在癌细胞的早期检测和治疗中成效显著,如表 4 所示。

当 GNPs 用于癌症治疗时,对粒径与形貌的要求比较宽泛,粒径不同;球形、三角形、多面体等形貌的 GNPs 对癌细胞都体现了良好的抑制作用。

3.2 作为给药系统用于药物传递

GNPs 具有良好的表面化学性质、化学稳定性和较大的比表面积,在体内环境下 GNPs 还具有柔韧的表面特征以及最小的细胞毒性等独特特性,成为炎症和癌细胞治疗重要的药物传递载

表 4　植物还原法合成的 GNPs 在各领域的应用

Tab.4　Application of GNPs synthesized by plant reduction method in various fields

植物	最小粒径/nm	形貌	应用领域	引文
刺棘草	68.44±0.3	球形、棒状、三角形	乳腺癌、卵巢癌等	[21]
火龙果	10~20	球形、椭圆形、三角形	乳腺癌	[20]
玫瑰	8.33±3.33	球形、三角形、二十面体	人肺腺癌	[19]
籼稻种子	50	球形、准球形	胃癌	[48]
薄荷叶	36.4	球形	乳腺癌	[15]
辣木花	<5	三角形、六边形、近球形	人肺上皮腺癌	[32]
黄连叶	5~25	球形、六边形、三角形	携带阿霉素抑制癌细胞	[13]
姜黄根茎	20	球形	铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌等	[14]
西葫芦叶	<10	棱柱状、球形	变形链球菌、大肠杆菌等	[10]
台湾藜	24±17	24±17	大肠杆菌、金黄色葡萄球菌	[48]
锦葵叶、马樱丹	10	球形	4-硝基酚(4-NP)还原	[11,30,46]
金格林叶	10±2	球形	降解 4-NP、刚果红(CR)、亚甲基蓝(MB)	[43]
五味子	10~20	球形	合成铬基[2,3-d]嘧啶-2-基)酚衍生物	[5]

体[39],不同的相互作用(如特异性结合、静电相互作用)可以使分子以非共价的方式附着在 GNPs 上。经修饰的 GNPs 携带并释放药物分子实现对癌细胞的靶向用药(图 4)[9]。

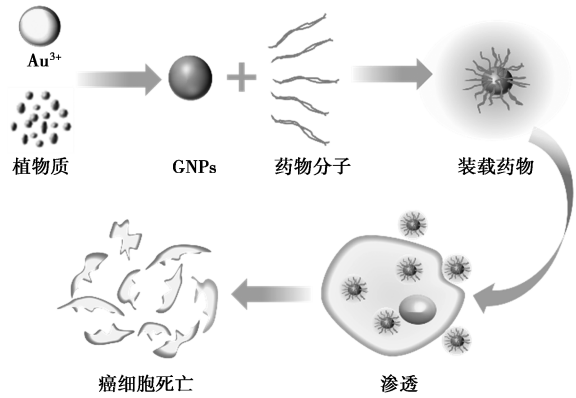


图 4　GNPs 携带药物分子杀死癌细胞的示意图[9]

Fig.4　Schematic of GNPs carrying drug molecules to kill cancer cells[9]

Mukherjee 等[40]发现将黄连叶合成的 GNPs 作为给药系统携带阿霉素用于抑制乳腺癌细胞(MCF-7 和 MDA-MB-231)增殖时显示出比原始阿霉素更加显著的效果。药物的胺基与 GNPs 之间的静电吸引有利于更多的药物分子吸附在 GNPs 表面,携带众多药物分子的 GNPs 作为一个单独的基团对抗微生物,强化了作用效果[13]。在给药系统中,理想尺寸的纳米颗粒具有更强的渗透性和保留效应,易于在肿瘤细胞中积累,滞留更长的时间以对癌细胞起作用。此外,纳米颗粒的形状也影响药物的传递,球形纳米颗粒因较高的比表面积,可携带更多的活性物质具有更好的治疗效果[9]。这为药物传递中 GNPs 的合成指明了方向,选用适宜的植物体与外界条件合成尺寸较小的球形 GNPs 以确保其较优的比表面积去携带药物分子使治疗效果更佳。

3.3　作为抗菌剂

纳米粒子的粒径、形貌、覆盖层、比表面积等理化因素影响纳米粒子与生物界面的初始相互作用[49]。GNPs 渗透细胞壁进入到细胞内,其带有的正电荷与细菌表面微生物的负电荷因静电引发相互作用,起到抑菌效果。粒径较小的 GNPs 与较大 GNPs 相比用于与菌体相互作用的表面积增加,具有更大的抗菌潜力[14]。Thangamani 等[10]发现 0.3 mL 西葫芦叶提取物与 2.7 mL(1×10^{-3} mol/L)金前驱体制备的 GNPs 对葡萄球菌、变形链球菌、大肠杆菌等细菌都表现出了较强的抑菌活性。Chen 等[48]发现台湾藜合成的 GNPs 在 40 ℃下可在大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞壁中积累引起细胞凋亡,有效抑制了细菌增长。与作为药物传递分子相似,植物还原法合成 GNPs 用于抗菌时也要求其具有较高的比表面积,因此需选择合适的植物体以在趋于合成小尺寸 GNPs 的外界环境下进行合成,优化 GNPs 的比表面积,提升其抗菌活性。

3.4　催化剂

官能团化芳香胺是超分子结构的重要中间体,在学术研究以及工业上都有很高的需求量,研究者[11,30,46]分别在有无 $NaBH_4$ 存在下将锦葵叶与马樱丹等提取液合成的 GNPs 用作 4-NP 还原为 4-AP 的催化剂,促使苯环上的—NO_2 向—NH_2 转化,增大催化剂用量可进一步提升还原速率,证实了 GNPs 对 4-NP 良好的催化降解活性。工业废水中的有机污染物和芳香族硝基化合物是污染

地表水和陆地环境的重要因素,针对这类问题 Kumari 等[43]使用 $NaBH_4$ 作为 BH_4^- 电子供体,通过金格林叶提取物制备的 GNPs 将电子传递到 CR 等受体分子上。实现了对 4-NP、CR 和 MB 的有效催化,降解了工业废水污染物。Balwe 等[5]将五味子合成的 GNPs 负载于聚苯乙烯上用作合成铬基[2,3-d]嘧啶-2-基)酚衍生物的催化剂。多次循环后依然保持良好的催化活性。GNPs 作为纳米催化剂在各类催化反应中表现出显著的活性、优异的选择性、稳定性以及可重复使用性。但在一些反应中,由于 GNPs 流失以及团聚等造成的催化剂失活问题难以避免,选择以及优化载体依然是不小的挑战。

4 总结与展望

植物还原制备 GNPs 经济环保,成本低廉,产物生物相容性与抗菌活性较高,在生物医学等多个领域得到了广泛关注与应用。综述展示了植物生物组分中黄酮类物质作为一种特殊的多酚,通过多种还原与保护机制实现对 GNPs 的有效制备,外界因素也从粒径、形貌、转化率、分散性等多方面影响 GNPs 的合成。这些机理与调控规律为不同植物体制备贵金属纳米颗粒提供了参考。

然而,大多数植物资源生物组成中糖类物质含量居多,还原与保护能力优异的黄酮类与酚类物质相对较少,可通过色谱技术对植物质进行有效分离,有望用纯化后的有效成分/功能基团协同优化后的反应条件合成 GNPs,避免植物活性组分带来的干扰,制备理想形貌与尺寸的 GNPs。此外,大多数关于植物法制备 GNPs 的研究主要集中在植物体叶子与果实部分,而其余部分的利用受到限制。因此,开发可以充分利用植物的工艺,以及对废弃植物质资源如水果残渣和农业废料的开发利用十分必要。

在某些特定领域对 GNPs 粒径与热稳定性等要求苛刻,例如将植物法制备的 GNPs 用于催化领域时,催化剂在高温热处理过程中,保护性分子损失会导致活性分子 GNPs 烧结迁移,引起催化剂失活。这对于产物 GNPs 的利用仍然是一种挑战。尽管如此,植物还原制备 GNPs 对环境和生物体毒性小,这种绿色合成方法被认为是近年来最具发展前景的工艺之一。

参考文献:

[1] ELEMIKE E E, ONWUDIWE D C, NUNDKUMAR N, et al. CuO and Au-CuO nanoparticles mediated by stigmaphyllon ovatum leaf extract and their anticancer potential[J]. *Inorg. Chem. Commun*, 2019, **104**: 93-97.

[2] MARIYCHUK R, SMOLKOVA R, BARTOSOVA V, et al. The regularities of the mentha piperita L. Extract mediated synthesis of gold nanoparticles with a response in the infrared range[J]. *Appl. Nanosci*, 2021, **12**(**4**): 1 071-1 083.

[3] 孙晨阳,康天放,鲁理平,等.基于石墨烯金粒子的肾上腺素分子印迹电化学传感器研究[J].化学试剂, 2022, **44**(**8**): 872-879.

[4] YANG X H, WANG W W, WANG C L, et al. Synthesis of Au decorated V_2O_5 microflowers with enhanced sensing properties towards amines[J]. *Powder Technol.*, 2018, **339**: 408-418.

[5] BALWE S G, ROKADE A A, PARK S S, et al. Green synthesis and characterization of supported gold nanoparticles (Au@PS) from schisandra chinensis fruit extract: An efficient and reusable catalyst for the synthesis of chromeno 2,3-d pyrimidin-2-yl) phenol derivatives under solvent-free conditions[J]. *Catal. Commun.*, 2019, **128**: 105 703.

[6] CHOI D H, HONG J E, JUNG Y, et al. Synthesis of gold nanoparticles supported at graphene derivatives using green reductants and evaluation of their catalytic activity in 4-nitrophenol reduction[J]. *Gold Bull.*, 2019, **52**(**3/4**): 165-174.

[7] 薛新新,邹光龙.纤维素/丝素蛋白复合水凝胶作为金纳米粒子的选择性载体:合成和催化应用研究[J].化学试剂, 2022, **44**(**9**): 1 738-1 746.

[8] KHAN M, AHMAD F, KOIVISTO J T, et al. Green synthesis of controlled size gold and silver nanoparticles using antioxidant as capping and reducing agent[J]. *Colloid Interface Sci. Commun.*, 2020, **39**: 100 322.

[9] LEE K X, SHAMELI K, YEW Y P, et al. Recent developments in the facile bio-synthesis of gold nanoparticles (GNPs) and their biomedical applications[J]. *Int. J. Nanomed.*, 2020, **15**: 275-300.

[10] THANGAMANI N, BHUVANESHWARI N. Green synthesis of gold nanoparticles using simarouba glauca leaf extract and their biological activity of micro-organism[J]. *Chem. Phys. Lett.*, 2019, **732**: 136 587.

[11] SK I, KHAN M A, HAQUE A, et al. Synthesis of gold and silver nanoparticles using malva verticillata leaves extract: Study of gold nanoparticles catalysed reduction of nitro-Schiff bases and antibacterial activities of silver nanoparticles[J]. *Curr. Res. Green Sustainable Chem.*, 2020, **3**: 100 006.

[12] OLAJIRE A A, MOHAMMED A A. Bio-directed synthesis of gold nanoparticles using ananas comosus aqueous leaf extract and their photocatalytic activity for LDPE degradation[J]. *Adv. Powder Technol*, 2021, **32**(2): 600-610.

[13] ISLAM N U, JALIL K, SHAHID M, et al. Green synthesis and biological activities of gold nanoparticles functionalized with Salix alba[J]. *Arabian J. Chem.*, 2015, **12**(8): 2 914-2 925.

[14] MUNIYAPPAN N, PANDEESWARAN M, AMALRAJ A. Green synthesis of gold nanoparticles using curcuma pseudomontana isolated curcumin: Its characterization, antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities[J]. *Environ. Chem. Ecotoxicol.*, 2021, **3**: 117-124.

[15] LI S, AL-MISNED F A, EL-SEREHY H A, et al. Green synthesis of gold nanoparticles using aqueous extract of mentha longifolia leaf and investigation of its anti-human breast carcinoma properties in the in vitro condition[J]. *Arabian J. Chem.*, 2021, **14**(2): 102 931.

[16] ASNAG G M, ORABY A H, ABDELGHANY A M. Green synthesis of gold nanoparticles and its effect on the optical, thermal and electrical properties of carboxymethyl cellulose[J]. *Compos Part B-Eng*, 2019, **172**: 436-446.

[17] GONZALEZ-BALLESTEROS N, RODRIGUEZ-ARGUELLES M C, PRADO-LOPEZ S, et al. Macroalgae to nanoparticles: Study of Ulva lactuca L. Role in biosynthesis of gold and silver nanoparticles and of their cytotoxicity on colon cancer cell lines[J]. *Mat. Sci. Eng. C-Mater.*, 2019, **97**: 498-509.

[18] SINGH A T, SHAIKH I N, RALE M V. Synthesis of gold and silver nanoparticles using phlogacanthus thyrsiformis extracts-its phytochemical screening and anti-oxidant studies[J]. *Mater. Today: Proc.*, 2020, **43**: 2 805-2 809.

[19] KYZIOL A, LUKASIEWICZ S, SEBASTIAN V, V, et al. Towards plant-mediated chemistry-Au nanoparticles obtained using aqueous extract of Rosa damascena and their biological activity in vitro[J]. *J. Inorg. Biochem.*, 2021, **214**: 111 300.

[20] DIVAKARAN D, LAKKAKULA J R, THAKUR M, et al. Dragon fruit extract capped gold nanoparticles: Synthesis and their differential cytotoxicity effect on breast cancer cells[J]. *Mater. Lett.*, 2019, **236**: 498-502.

[21] SATPATHY S, PATRA A, AHIRWAR B, et al. Process optimization for green synthesis of gold nanoparticles mediated by extract of Hygrophila spinosa T. Anders and their biological applications[J]. *Phys. E (Amsterdam, Neth.)*, 2020, **121**: 113 830.

[22] LIU H, ZHANG X Y, XU Z P, et al. Role of polyphenols in plant-mediated synthesis of gold nanoparticles: Identification of active components and their functional mechanism[J]. *Nanotechnology*, 2020, **31**(41): 415 601.

[23] RAVISANKAR S, QUEIROZ V A V, AWIKA J M. Rye flavonoids-structural profile of the flavones in diverse varieties and effect of fermentation and heat on their structure and antioxidant properties[J]. *Food. Chem.*, 2020, **324**: 126 871.

[24] ZHAN G W, HUANG J L, LIN L Q, et al. Synthesis of gold nanoparticles by cacumen platycladi leaf extract and its simulated solution: Toward the plant-mediated biosynthetic mechanism[J]. *J. Nanopart. Res.*, 2011, **13**(10): 4 957-4 968.

[25] ABBASI T, ANURADHA J, GANAIE S U, et al. Biomimetic synthesis of nanoparticles using aqueous extracts of plants (botanical species)[J]. *J. Nano Res.*, 2015, **31**: 138-202.

[26] DUMUR F, GUERLIN A, DUMAS E, et al. Controlled spontaneous generation of gold nanoparticles assisted by dual reducing and capping agents[J]. *Gold Bull.*, 2011, **44**(2): 119-137.

[27] ZHOU Y, LIN W, HUANG J, et al. Biosynthesis of gold nanoparticles by foliar broths: Roles of biocompounds and other attributes of the extracts[J]. *Nanoscale Res. Lett.*, 2010, **5**(8): 1 351-1 359.

[28] UL-ISLAM N, JALIL K, SHAHID M, et al. Green synthesis and biological activities of gold nanoparticles functionalized with Salix alba[J]. *Arabian J. Chem.*, 2019, **12**(8): 2 914-2 925.

[29] DESHPANDE R, BEDRE M D, BASAVARAJA S, et al. Rapid biosynthesis of irregular shaped gold nanoparticles from macerated aqueous extracellular dried clove buds (syzygium aromaticum) solution[J]. *Colloids Surf., B*, 2010, **79**(1): 235-240.

[30] GANGULA A, PODILA R, RAMAKRISHNA M, et al. Catalytic reduction of 4-nitrophenol using biogenic gold and silver nanoparticles derived from breynia rhamnoides[J]. *Langmuir*, 2011, **27**(24): 15 268-15 274.

[31] ALAM M N, DAS S, BATUTA S, et al. Murraya koenegii spreng. leaf extract: An efficient green multifunctional agent for the controlled synthesis of Au nanoparticles[J]. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2014, **2**(4): 652-664.

[32] ANAND K, GENGAN R M, PHULUKDAREE A, et al. Agroforestry waste moringa oleifera petals mediated green synthesis of gold nanoparticles and their anticancer and catalytic activity[J]. *J. Ind. Eng. Chem.*, 2015, **21**: 1 105-1 111.

[33]GHOREISHI S M, BEHPOUR M, KHAYATKASHANI M. Green synthesis of silver and gold nanoparticles using Rosa damascena and its primary application in electrochemistry [J]. *Phys. E (Amsterdam, Neth.)*, 2011, **44**(**1**):97-104.

[34]WANG J, ZHOU N, ZHU Z, et al. Detection of flavonoids and assay for their antioxidant activity based on enlargement of gold nanoparticles [J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **388**(**5/6**):1 199-1 205.

[35]PATRA N, DEHURY N, PAL A, et al. Preparation and mechanistic aspect of natural xanthone functionalized gold nanoparticle[J]. *Mat. Sci. Eng. C-Mater.*, 2018, **90**: 439-445.

[36]廉婷.芳樟提取液中的活性成分对丙烯环氧化 Au/TS-1 催化剂催化性能的作用分析[D].厦门:厦门大学,2017.

[37]NUNE S K, CHANDA N, SHUKLA R, et al. Green nanotechnology from tea: Phytochemicals in tea as building blocks for production of biocompatible gold nanoparticles [J]. *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**(**19**):2 912-2 920.

[38]SINGH C, BABOOTA R K, NAIK P K. Biocompatible synthesis of silver and gold nanoparticles using leaf extract of Dalbergia sissoo [J]. *Adv. Mater. Lett.*, 2012, **3**(**4**):279-285.

[39]MARKUS J, WANG D, KIM Y J, et al. Biosynthesis, characterization, and bioactivities evaluation of silver and gold nanoparticles mediated by the roots of Chinese herbal angelica pubescens maxim [J]. *Nanoscale Res. Lett.*, 2017, **12**:46.

[40]MUKHERJEE S, SUSHMA V, PATRA S, et al. Green chemistry approach for the synthesis and stabilization of biocompatible gold nanoparticles and their potential applications in cancer therapy[J]. *Nanotechnology*, 2012, **23**(**45**):455 103.

[41]YASMIN A, RAMESH K, RAJESHKUMAR S. Optimization and stabilization of gold nanoparticles by using herbal plant extract with microwave heating[J]. *Nano Convergence*, 2014, **1**(**1**):12.

[42]LEE K X, SHAMELI K, MIYAKE M, et al. Green synthesis of gold nanoparticles using aqueous extract of garcinia mangostana fruit peels[J]. *J. Nanomater.*, 2016, **2 016**:8 489 094.

[43]KUMARI K A, REDDY G B, MITTAPALLI V. Microwave assisted synthesis of gold nanoparticles with Phyla nodiflora (L.) greene leaves extract and its studies of catalytic reduction of organic pollutants [J]. *Mater. Today: Proc.*, 2020, **27**:1 449-1 454.

[44]ZAYED M F, EISA W H. Phoenix dactylifera L. Leaf extract phytosynthesized gold nanoparticles; controlled synthesis and catalytic activity [J]. *Spectrochim. Acta, Part A*, 2014, **121**:238-244.

[45]USMAN A I, AZIZ A A, ABU NOQTA O. Green sonochemical synthesis of gold nanoparticles using palm oil leaves extracts [J]. *Mater. Today: Proc.*, 2019, **7**: 803-807.

[46]DASH S S, BAG B G, HOTA P. Lantana camara Linn leaf extract mediated green synthesis of gold nanoparticles and study of its catalytic activity[J]. *Appl. Nanosci.*, 2015, **5**(**3**):343-350.

[47]郭秋兰,郭清泉,罗汝洪,等.藤茶干粉提取液还原制备金纳米粒子[J].应用化学,2014,**31**(**7**):841-846.

[48]CHEN M N, CHAN C F, HUANG S L, et al. Green biosynthesis of gold nanoparticles using chenopodium formosanum shell extract and analysis of the particles′ antibacterial properties[J]. *J. Sci. Food Agric.*, 2019, **99**(**7**): 3 693-3 702.

[49]SINGH P, PANDIT S, GARNAE S, et al. Green synthesis of gold and silver nanoparticles from Cannabis sativa (industrial hemp) and their capacity for biofilm inhibition[J]. *Int. J. Nanomed.*, 2018, **13**:3 571-3 591.

分离提取技术

桉叶油的提取工艺优化及对金黄色葡萄球菌的作用

刘瑞秀[1],覃英克[2],齐维金[1],龙利[1],王鲁*[1]
(1.贵州大学 a.药学院,b.西南特色药用生物资源开发利用教育部工程研究中心,贵州 贵阳　550025;
2.贵州省荔波县农业农村局,贵州 荔波　558400)

摘要:为了评价桉叶油的抑菌作用及最佳提取工艺。通过检测最低抑菌浓度(MIC)考察桉叶油抗菌谱,采用酶标仪测定其对金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)的抑菌曲线,通过检测疏水性、肽聚糖、碱性磷酸酶和β-半乳糖苷酶的含量变化,评价桉叶油对 *S.aureus* 细胞壁膜的影响,通过扫描电镜验证(SEM);热回流提取且采用响应面法以油重为评判标准优化桉叶油的工艺条件。结果表明,桉叶油通过改变细胞表面的疏水性,破坏 *S.aureus* 细胞壁膜结构的完整性,导致胞内容物外流,引起细胞集聚而抑制 *S.aureus* 的生长;优化的桉叶油提取工艺稳定可行。这将为具有良好抗 *S.aureus* 活性的桉叶油研发提供理论数据。

关键词:桉叶油;金黄色葡萄球菌;细胞壁;细胞膜;提取工艺
中图分类号:R915　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0258-3283(2023)07-0087-07
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0193

Optimization of the Extraction Process of Eucalyptus Oil and its Effect on *Staphylococcus Aureus*

LIU Rui-xiu[1],*QIN Ying-ke*[2],*QI Wei-jin*[1],*LONG Li*[1],*WANG Lu*[*1](1.a.College of Pharmacy;b.Engineering Research Center of the Ministry of Education for the Development and Utilization of Southwestern Special Medicinal Biological Resources,Guizhou University,Guiyang 550025,China;2.Bureau of Agriculture and Rural Affairs,Libo County,Guizhou Province,Libo 558400,China)

Abstract:In order to evaluate the antibacterial effect of eucalyptus oil and the optimal extraction process,the antibacterial spectrum of eucalyptus oil was investigated by detecting the minimum inhibitory concentration (MIC),and its inhibition curve against *Staphylococcus aureus*(*S.aureus*) was determined by enzyme standardization,and the effect of eucalyptus oil on the cell wall membrane of *S.aureus* was evaluated by detecting the changes in the content of hydrophobicity,peptidoglycan,alkaline phosphatase and β-galactosidase,verified by scanning electron microscopy (SEM).The process conditions of eucalyptus oil were optimized by hot reflux extraction and oil weight as the criterion.The results showed that eucalyptus oil could alter the hydrophobicity of the cell surface and disrupt the membrane structure of *S.aureus* cell wall.The optimized eucalyptus oil extraction process is stable and feasible.This will provide theoretical data for the development of eucalyptus oil with good anti-*S.aureus* activity.

Key words:eucalyptus oil;*staphylococcus aureus*;cell wall;cell membrane;extraction process

金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)是一种侵入性病原体,在自然界中大量存在,可引起伤口感染、心内膜炎、脑膜炎等[1-3]。此外,*S.aureus* 对抗生素有很强的遗传抗性,增强了其引起威胁生命感染的能力,因此我们考虑从天然产物中开发针对细菌细胞壁膜的抗菌药物,从而避免细菌对抗生素的抗性。

现代研究表明,植物挥发油具有良好的抗菌活性[4]。桉树为桃金娘科(*Myrtaceae*)桉树属(*Eucalyptus*)乔木,在我国种植面积广泛[5]。从桉叶中提取得到的桉叶油(Eucalyptus oil,EO)因具有良好的杀虫和抑菌等作用而引人们广泛关注。文献报道蓝桉叶精油具有抑菌作用,且对铜绿假单胞菌、荧光假单胞菌、*S.aureus* 的 MIC 为 2.25~9 mg/mL[6,7],但由于过大 MIC 值,研发其药用价值是没有科学意义的。实验室前期研究发现,蓝

收稿日期:2023-03-19;**网络首发日期**:2023-04-21
基金项目:国家自然科学基金项目(32273051)。
作者简介:刘瑞秀(1997-),女,贵州遵义人,硕士生,主要研究方向为天然药物成分及活性。
通讯作者:王鲁,E-mail:wanglu7007@163.com。
引用本文:刘瑞秀,覃英克,齐维金,等.桉叶油的提取工艺优化及对金黄色葡萄球菌的作用[J].化学试剂,2023,**45**(7):87-93。

桉醇对 *S. aureus* 有很好的抗菌活性,在 EO 中也富含蓝桉醇[8],为了深入评价 EO 的抑菌作用,我们进行了本文研究,另外,目前植物精油的提取多采用热回流法、超临界 CO_2 萃取法、有机溶剂萃取法、微波辅助提取法等,这些方法各有其优缺点,为了更加适用于生产实际,本研究采用热回流法优化 EO 的提取工艺,将为 EO 资源的合理开发及利用提供一定的理论参考。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

ZQLY-180N 型振荡培养箱(上海知楚仪器有限公司);XPX-9082MBE 型电热恒温培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);SW-CJ-ID 型单人净化工作台(苏州净化设备有限公司)。

桉叶采自贵州省榕江县,并由贵州大学林学院熊中华副教授鉴定为桉树叶;EO(自制);金黄色葡萄球菌(ATCC 13565)、大肠杆菌(ATCC 25922)、无乳链球菌(ATCC 13813)、铜绿假单胞杆菌(ATCC 27853)、白色念珠菌(ATCC 10231)、耐甲氧西林金葡菌(ATCC 6538)、沙门氏菌(ATCC 36395)、变异链球菌(ATCC 25175)、化脓链球菌(ATCC 19615)、牙龈卟啉单胞菌(ATCC 33277)、变形杆菌(CMCC 49027)、鼠伤寒沙门氏菌(CMCC 50115)、藤黄微球菌(CMCC 28001)、枯草芽孢杆菌(ATCC 6633)(中国药品生物制品检定所);吐温-80(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 响应面优化 EO 提取工艺

称取 100 g 桉叶置于三颈烧瓶中热回流提取 EO,以 m(料):V(液)= 1∶4、1∶6、1∶8、1∶10、1∶12;加入蒸馏水浸泡时间分别为 0、0.5、1、1.5、2 h;提取时间分别为 3.5、4、4.5、5、5.5 h;加热温度分别设为 95、100、105、110、115 ℃,通过单因素试验确定响应面各因素适宜的取值范围,提取结束后收集 EO 用无水硫酸钠干燥后称重。根据单因素实验的结果,选取料液比(A)、浸泡时间(B)、油提取时间(C)、提取温度(D)作为自变量,采用四因素三水平设计 Box-Behnken Design 实验,实验因素与水平见表 1。根据实际情况可操作性,按照工艺最优条件进行 3 次重复实验验证。

表 1 响应面设计因素与水平表

Tab.1 Table of response surface design factors and levels

水平	A 料液比/(g·mL^{-1})	B 浸泡时间/h	C 油提取时间/h	D 提取温度/℃
−1	1∶4	0.5	3.5	105
0	1∶6	1.0	4.0	110
1	1∶8	1.5	4.5	115

1.2.2 EO 抗菌谱 MIC 值的测定

参照 CLSI 2021 标准操作,EO 用吐温-80 溶解后采用二倍稀释法[9]加入培养基中,将稀释后的菌液接种于 96 孔板中,分别于 37、28 ℃培养箱内恒温培养 24 h,裸眼观察以孔内溶液澄清无沉淀的最小质量浓度为 MIC。

1.2.3 EO 作用下 *S. aureus* 生长曲线的测定

制备药物 0.25、0.5、1、2、4 MIC 组,溶剂组,空白组。*S. aureus* 终浓度为 1×10^5 CFU/mL,恒温震荡培养,分别于 0、1、3、6、9、12、24、48 h 取样用酶标仪读取其 OD_{600} nm 时的吸光值,绘制生长曲线[10]。

1.2.4 EO 作用下 *S. aureus* 细胞表面疏水性(CSH)的测定

生理盐水洗涤后用 0.1 mol/L 硝酸钠溶液(pH 6.2)调整菌体浓度为 2×10^8 CFU/mL。设置对照组,药物 1、2 MIC 组,恒温震荡培养,30 min 后分别取 5 mL 菌液在 600 nm 波长下测量吸光值,记为 OD_1;再分别取 4.8 mL 菌液与 0.8 mL 十六烷,涡旋混匀,室温条件下静止 15 min,20 min 后吸取水相测量吸光值,记为 OD_2。细菌疏水分配值 $CSH\% = (OD_1 - OD_2)/OD_1 \times 100\%$[11]。

1.2.5 EO 作用下 *S. aureus* 碱性磷酸酶(AKP)活力的检测

用 PBS(磷酸盐缓冲液)调整菌浓度为 2×10^8 CFU/mL。设置对照组,药物 1、2、3 MIC 组,恒温震荡培养,每隔 2 h 取上清液按照 AKP 检测试剂盒说明书的方法测定 AKP 活力[12]。

1.2.6 EO 作用下 *S. aureus* 的肽聚糖(PG)检测

参考侯峰[13]的方法,并适当调整。用磷酸盐缓冲液稀释菌体浓度为 3×10^8 CFU/mL,设置对照组,药物 0.5、1、2 MIC 组,恒温震荡培养,每隔 0.5 h 取适量菌液,用双光束紫外分光光度计在 260 nm 下测吸光值。

1.2.7 EO 作用下 *S. aureus* β-半乳糖苷酶的测定

参考韩晴[14]的方法,并适当调整。用 PBS 洗

涤并调整菌体浓度为 1×10^8 CFU/mL。将 V(细菌悬浮液):V(2-硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷)=3:1充分混匀,设置药物 1/2、1、2、3 MIC 组,对照组,混合后置 37 ℃水浴中,每隔 1 h 分别取反应混合物离心后收集上清液,用酶标仪测定 420 nm 处的吸光值,药物组记为 OD_1,对照组记为 OD_2。用 OD 差值(OD_1~OD_2)的变化说明 *S.aureus* 细胞内膜渗透性的变化[15],OD 差值越大,表明细菌细胞膜渗透性越强。

1.2.8　扫描电子显微镜(SEM)观察桉叶油作用后 *S.aureus* 的细胞形态

用 PBS 洗涤并调整 *S.aureus* 浓度为 1×10^8 CFU/mL。设置药物 2 MIC 组,以生理盐水做空白对照组,混匀后恒温振荡培养 12 h,采用文献[16]的方法,通过 SEM 观察细菌的形态变化。

1.3　数据处理

每组实验都平行测定 3 次,取平均值,运用 Microsoft Excel 2010 进行单因素和抑菌实验结果分析;利用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面法试验设计及数据处理,以 $P<0.05$ 表示差异显著,$P<0.01$ 表示差异极显著,具有统计学意义。

2　结果与讨论

2.1　单因素试验分析结果

当 m(料):V(液)=1:6时 EO 油重达到最大值(图 1a);当浸泡时间在 1 h 时 EO 油重达到最大值(图 1b);当提取时间在 4 h 时 EO 油重达到最大值(图 1c);随着温度的升高,在 110 ℃时 EO 油重达到最大值(图 1d)。

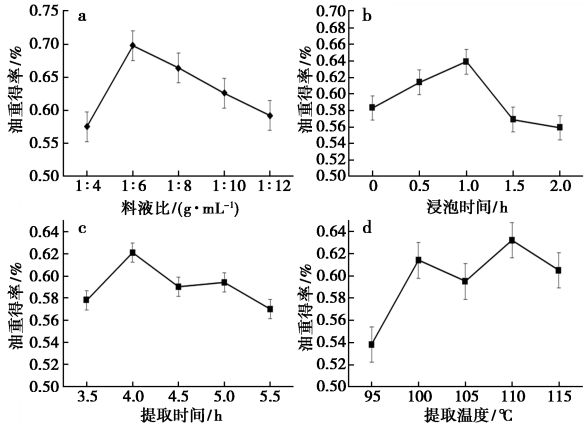


图 1　料液比(a)、浸泡时间(b)、提取时间(c)、提取温度(d)对油重的影响

Fig.1　Effects of feed-to-liquid ratio (a), soaking time (b), extraction time (c), and extraction temperature (d) on oil weight

2.2　响应面试验结果及方差分析

响应面优化实验结果及方差分析结果见表 2、3,由表 2、3 可以得到响应值,Y(油重得率)对自变量 A(料液比)、B(浸泡时间)、C(油提取时间)及 D(提取温度)的方程结果为:$Y=0.628\ 0+0.007\ 5A-0.003\ 3B+0.003\ 3C+0.007\ 5D+0.007\ 5AB-0.002\ 5AC-0.012\ 5AD+0.000\ 0BC+0.007\ 5BD-0.002\ 5CD-0.032\ 3A^2-0.021\ 1B^2-0.026\ 1C^2-0.067\ 3D^2$,CV=1.51%,说明桉叶油得率回归方程模型非常可靠,该回归方程可用来分析和预测桉叶油提取工艺。由表 3 可知,自变量 A、D 对 Y 的影响极显著,自变量 B、C 对 Y 的影响不显著。

表 2　Box-Behnken 试验设计及试验结果

Tab.2　Box-Behnken design experiment and results

序号	A/(g·mL⁻¹)	B/h	C/h	D/℃	Y/%
2	−1	0	−1	0	0.56
3	0	0	−1	−1	0.52
4	−1	−1	0	0	0.58
5	1	0	0	−1	0.55
6	0	−1	1	0	0.59
7	−1	0	0	1	0.54
8	−1	0	1	0	0.57
9	0	0	0	0	0.63
10	0	−1	−1	0	0.58
11	1	0	1	0	0.57
12	0	1	0	1	0.54
13	0	0	1	1	0.56
14	0	0	0	0	0.63
15	1	1	0	0	0.59
16	0	0	1	−1	0.53
17	−1	0	0	−1	0.49
18	1	−1	0	0	0.58
19	−1	1	0	0	0.56
20	1	0	0	1	0.54
21	1	0	−1	0	0.57
22	0	0	0	0	0.63
23	0	0	−1	1	0.55
24	0	1	1	0	0.57
25	0	1	0	−1	0.53
26	0	0	0	0	0.62
27	0	−1	0	−1	0.55
28	0	1	−1	0	0.56
29	0	0	0	0	0.63

表 3 响应面拟合回归方程的方差分析结果[注]

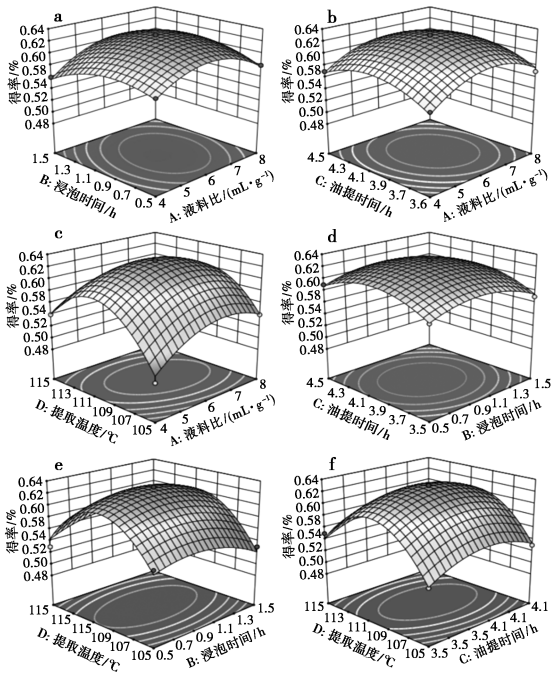
Tab.3 Variance analysis results of response surface fitting regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值
模型	0.035 6	14	0.002 5	34.80	<0.000 1
A	0.000 7	1	0.000 7	9.25	0.008 8
B	0.000 1	1	0.000 1	1.83	0.197 9
C	0.000 1	1	0.000 1	1.83	0.197 9
D	0.000 7	1	0.000 7	9.25	0.008 8
AB	0.000 2	1	0.000 2	3.08	0.100 9
AC	0.000 0	1	0.000 0	0.342 6	0.567 7
AD	0.000 6	1	0.000 6	8.56	0.011 0
BC	6.39E−18	1	6.39E−18	9.508E−14	1.000 0
BD	0.000 2	1	0.000 2	3.08	0.100 9
CD	0.000 0	1	0.000 0	0.342 6	0.567 7
A^2	0.006 8	1	0.006 8	92.92	<0.000 1
B^2	0.002 9	1	0.002 9	39.51	<0.000 1
C^2	0.004 4	1	0.004 4	60.47	<0.000 1
D^2	0.029 4	1	0.029 4	402.98	<0.000 1
残差	0.001 0	14	0.000 1		
失拟项	0.000 9	10	0.000 1	4.71	0.074 4
纯误差	0.000 1	4	0.000 0		

注：*P*>0.05 表示差异不显著；*P*<0.05 表示差异显著；*P*<0.01 表示差异极显著。

各因素之间的交互作用形成的响应面图见图 2。响应面图能较为直观地显示各因素之间的交互作用，图中图形越陡峭表明其交互作用越显著，反之则交互作用越小[17,18]。因此可以发现自变量 A(液料比)、B(浸泡时间)、C(油提取时间)及 D(提取温度)之间交互作用中只有 AD 间交互作用显著。

最优提取条件验证实验表明，最佳工艺得到油重得率为 0.63%，与预测值基本相符，相对标准偏差 RSD=0.08%，小于 3%，说明提取工艺稳定可靠，适用于优化桉叶油的提取工艺。



a.液料比与浸泡时间；b.液料比与油提时间；
c.液料比与提取温度；d.浸泡时间与油提时间；
e.浸泡时间与提取温度；f.油提时间与提取温度

图 2 两因素之间的交互作用对提取油重影响的响应面图

Fig.2 Response surface plot of the effect of interaction between two factors on the weight of extracted oil

2.3 EO 抗菌谱测定的结果

如表 4 显示，EO 对 *S. aureus* 的抑菌效果最好，MIC 值为 54.69 μg/mL。对其他菌次之，且抑菌效果呈浓度依赖性。这与之前文献报道的结果完全不同[6,7]，MIC 值几乎相差 100 倍，这值得进一步深入研究，为植物精油作为抑菌剂添加数据，也说明研发 EO 的抑菌潜力更具有科学意义。

表 4 EO 对受试菌株 MIC 值[注]

Tab.4 MIC values of EO on the tested strains (*n*=3)

菌种	EO 浓度/(μg·mL⁻¹)									
	7 000	3 500	1 750	875	437.5	218.75	109.38	54.69	27.35	13.67
金黄色葡萄球菌	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
铜绿假单胞菌	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+
耐甲氧西林金葡菌	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+
白色念珠菌	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+
尖孢镰刀菌	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+
枯草芽孢杆菌	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+
变异链球菌	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+
牙龈卟啉单胞菌	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
大肠杆菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
无乳链球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

续表

菌种	EO 浓度/(μg·mL^{-1})									
	7 000	3 500	1 750	875	437.5	218.75	109.38	54.69	27.35	13.67
化脓链球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
沙门氏菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
藤黄微球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
鼠伤寒沙门氏菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
变形杆菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注:+表示有可见菌生长;-表示无可见菌生长。

2.4　EO 作用下 *S.aureus* 的生长曲线

EO 作用 *S.aureus* 后菌株生长曲线如图 3 所示,空白组和吐温-80 组的细菌在 9 h 时进入对数生长期,具有完整的生长周期。与溶剂组相比,≥1/4 MIC 的 EO 在 12 h 内能抑制 *S.aureus* 的生长,≥1/2 MIC 的 EO 在 24 h 内能完全抑制 *S.aureus*的生长,延缓其进入对数生长期,24 h 后有一定程度的繁殖;≥1 MIC 的 EO 在 48 h 内 *S.aureus*无明显增殖现象。结果表明,EO 能够影响 *S.aureus* 的生长,影响程度呈浓度依赖性。

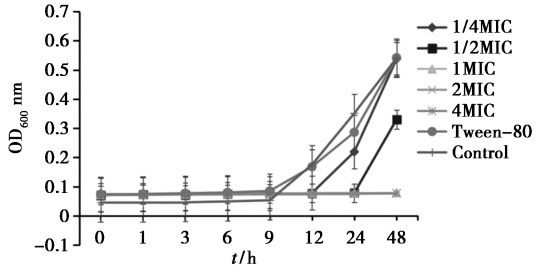
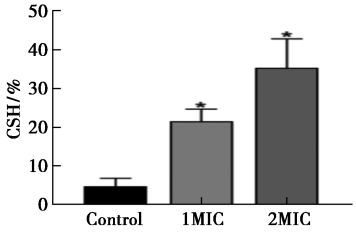


图 3　不同浓度 EO 作用下 *S.aureus* 的生长曲线

Fig.3　Growth curve of *S.aureus* under the effect of different concentrations of EO

2.5　EO 作用下 *S.aureus* 细胞表面 CSH 的结果

研究表明,细胞表面 CSH 与细菌对生物或非生物表面的粘附、细菌之间的集聚有关[19],目前检测十六烷对 *S.aureus* 细胞吸附率的变化,能直观体现出 *S.aureus* 细胞表面 CSH 的改变。结果如图 4 所示,与空白组相比,经 1 MIC 的 EO 处理后,*S.aureus* 细胞表面 CSH 显著增加($P<0.05$),



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

图 4　EO 对 *S.aureus* CSH 的影响

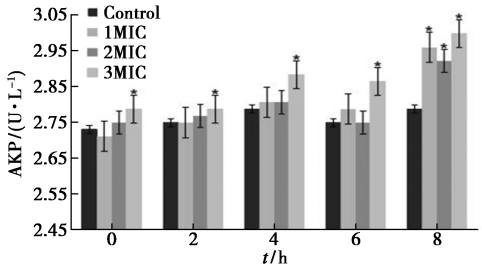
Fig.4　Effect of EO on *S.aureus* CSH

改变了菌体细胞表面 CSH,且影响程度呈浓度依赖性。这可能是 EO 抑制 *S.aureus* 生长的作用机制之一,需要进一步深入研究与探讨其根本原理。

2.6　EO 作用下 *S.aureus* 细胞壁通透性的结果

现代研究结果表明,许多植物精油能够破坏细菌细胞壁膜的结构,通过促进细胞内成分泄露或使细胞发生破碎,从而杀伤细菌[20-24]。

文献报道,细菌细胞壁的通透性和完整性具有维持细胞内的渗透压和保护细菌细胞的作用,并决定细胞的形状[25],AKP 存在于细胞壁膜之间,当细胞壁被破坏时,AKP 将泄露出来,因此 AKP 活性是判断细胞壁通透性的指标[26],结果如图 5 所示,与对照组相比,实验组的 AKP 泄漏量明显增多,其中在 8 h 时 1、2 MIC 组 AKP 的活性显著增加,而 3 MIC 组中 AKP 的活性在 0 h 时就显著增加($P<0.05$),且随着 EO 浓度的增大及作用时间的延长,AKP 的泄漏量越多。表明 EO 可能使细菌细胞壁通透性增加,从而杀伤 *S.aureus*。



* 表示 $P<0.05$ 差异显著;* * 表示 $P<0.01$ 差异极显著

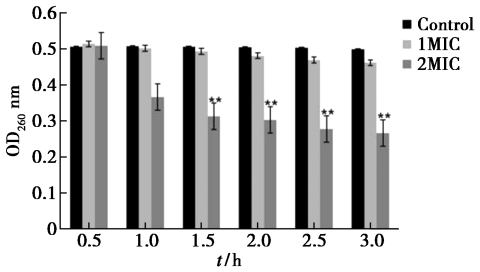
图 5　EO 对 *S.aureus* 胞外 AKP 活力的影响

Fig.5　Effect of EO on the extracellular AKP activity of *S.aureus*

2.7　EO 作用下 *S.aureus* 细胞壁 PG 合成的结果

细胞壁中含有丰富的 PG,且 PG 在波长 260 nm 下有最大吸收[27],因此可通过在此波长下测定 PG 的吸光度来判断药物作用后 *S.aureus* 细胞壁的完整情况。结果如图 6 所示,与空白组相比,3 h 内实验组的吸光度都呈下降的趋势,且药物浓度越大,下降趋势也越大。其中 1 MIC 组

的吸光度微弱下降,2 MIC 组的吸光度在 1.5 h 时极显著下降($P<0.01$),且随着作用时间的增加影响程度继续加大,表明 EO 可能抑制 *S.aureus* PG 的合成,破坏其细胞壁的结构,从而杀伤 *S.aureus*,这也是 EO 抑制 *S.aureus* 生长的作用机制之一。细菌细胞壁不存在于哺乳动物,PG 合成过程中的关键酶或中间产物是研究新型抗菌药物值得关注的潜在靶点,EO 如何干扰 PG 的合成、EO 能否影响 PG 合成过程中的关键酶或中间产物、EO 中哪些成分发挥这些作用,这些都是值得深入研究的课题。



* 表示 $P<0.05$ 差异显著;* * 表示 $P<0.01$ 差异极显著

图 6 EO 对 *S.aureus* 胞外 PG 含量的影响

Fig.6 Effect of EO on the extracellular PG content of *S.aureus*

2.8 EO 作用下 *S.aureus* 细胞膜通透性的结果

同样,细胞膜的渗透性和完整性对细菌的生长也至关重要[28]。细胞膜是细菌的第二道屏障,当细胞膜遭到破坏时,会造成胞内小分子物质和 DNA、RNA 等大分子物质的泄漏,β-半乳糖苷酶是一种细菌内源性酶,在正常情况下其活性变化很小,而当细胞膜遭到破坏时其可能逸出细胞,通常通过测定细胞外 β-半乳糖苷酶含量,研究药物对细胞膜通透性的影响[29]。结果如图 7 所示,不同浓度 EO 处理后 *S.aureus* 上清液中 β-半乳糖苷酶的吸光值随时间的变化曲线。在试验期的 3 h 内各组的吸光值随着时间的延长都明显增加,并且随着 EO 浓度的增加,各组吸光值明显变大。但是 4 h 之后各组吸光值略有下降,可能是随着 EO 作用时间的延长,β-半乳糖苷酶受到破坏后活性降低甚至失活,从而吸光度下降。表明 EO 可能是改变了 *S.aureus* 细胞膜的通透性,从而发挥抑菌作用。

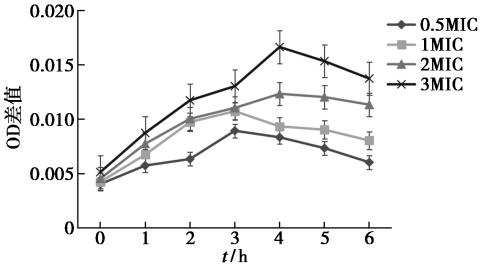
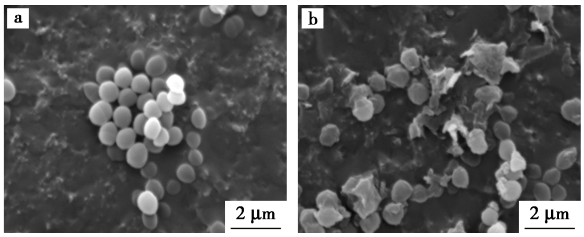


图 7 EO 对 *S.aureus* 胞内 β-半乳糖苷酶泄漏的影响

Fig.7 Effect of EO on intracellular β-galactosidase leakage in *S.aureus*

2.9 EO 对 *S.aureus* 形态的影响

SEM 是一种常用而有效的生物学观察工具,可用于观察 EO 处理后 *S.aureus* 细胞形态的变化,结果见图 8。对照组的 *S.aureus* 显示出完整的细胞结构,菌体呈典型的球状,胞质饱满,且具有完整、光滑的表面(图 8a)。经 2 MIC EO 处理后(图 8b),*S.aureus* 表现出严重的细胞形态损伤,包括表面凹陷皱缩、细胞破裂和胞内物质泄露等。



a.对照组;b.2 MIC EO

图 8 EO 处理后的 *S.aureus* 的 SEM

Fig.8 SEM of *S.aureus* after EO treatment

这一结果与 Kang 等[30]的报道一致,他们发现薄荷精油不可逆地破坏了 *S.aureus* 的细胞膜,并伴随有胞内物质的泄露。Zhang 等[31]认为肉桂精油对 *S.aureus* 的抗菌作用是通过直接改变细胞壁膜的结构实现的。上述研究表明,EO 能够破坏 *S.aureus* 的细胞形态,且造成的损伤具有不可逆性。

3 结论

抗菌谱试验结果表明,EO 对 *S.aureus* 的抑菌效果最好,且抑制作用随浓度的增加而逐渐增强。EO 作用于 *S.aureus* 后,可显著改变菌体细胞表面疏水性;破坏细胞壁膜的完整性和通透性、从而影响细菌的正常生命过程,导致细菌死亡。而为了使 EO 的提取更加适用于生产实际,本实验基于单因素实验并利用响应面软件优化提取桉叶中桉叶油的条件,得到较多的桉油量,这也将为桉叶的充分利用提供理论参考,且研发 EO 的抑菌潜力也具有科学意义。

参考文献:

[1] BONIFACIUS A,GOLDMANN O,FLOESS S,et al.Staph-

ylococcus aureus alpha-toxin limits type 1 while fostering type 3 immune responses[J]. *Front. Immunol.*, 2020, **11**: 1 579-1 591.

[2]SINSINWAR S, VADIVEL V. Catechin isolated from cashew nut shell exhibits antibacterial activity against clinical isolates of MRSA through ROS-mediated oxidative stress [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2020, **104**(**19**): 8 279-8 297.

[3]OLIVEIRA D, BORGES A, SIMOES M. Staphylococcus aureus toxins and their molecular activity in infectious diseases[J]. *Toxins.*, 2018, **10**: 252.

[4]李旭领,郭月婷,王一佳,等.药用植物挥发油的抗菌作用及机制研究进展[J].动物医学进展,2022,**43**(**5**):97-101.

[5]祁述雄.中国桉树.第 2 版[M].北京:中国林业出版社,2002.

[6]闫佳,牛延菲,史正军,等.滇产 5 种植物精油的抑菌性能及其成分分析[J].林业工程学,2021,**6**(**1**):98-104.

[7]叶舟.大叶桉叶精油化学成分及其抑菌活性[J].福建林学院学报,2007,**27**(**1**):48-51.

[8]王颖,宋爱华,刘艳梅,等.蓝桉叶挥发油化学成分分析研究[J].精细化工中间体,2008,**38**(**2**):70-72.

[9]ZHONG L, ZHOU L, ZHOU Y, et al. Antimicrobial flavonoids from the twigs of populus nigra x populus deltoides[J]. *Nat. Prod. Res.*, 2012, **26**(**4**):307-313.

[10]KENT R J, BAKHTIAR M, SHANSON D C. The in-vitro bactericidal activities of combinations of antimicrobial agents against clinical isolates of mycobacterium avium-intracellulare[J]. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 1992, **30**: 643-650.

[11]林娟,曾金晶,刘树滔,等.青枯菌细胞表面的疏水性[J].微生物学通报,2011,**38**(**1**):45-50.

[12]MA C, HE N, ZHAO Y, et al. Antimicrobial mechanism of hydroquinone [J]. *Appl. Biochem. Biotech.*, 2019, **189**(**4**):1 291-1 303.

[13]侯峰.光滑爪蟾(Xenopus laevis)皮肤抗菌肽的筛选及其相关研究[D].上海:中国人民解放军军事医学科学院,2010.

[14]韩晴.ε-聚赖氨酸对金黄色葡萄球菌的抑制机理及在牛乳上的应用效果[D].济南:齐鲁工业大学,2015.

[15]郝刚.Buforin Ⅱ抗菌肽的分子设计及对 DNA 作用抑菌机理研究[D].无锡:江南大学,2009.

[16]吕飞.天然植物精油的抑菌活性及其作用机理研究[D].北京:北京化工大学,2011.

[17]朱淼,廖文,向红,等.白车轴草多酚提取工艺优化[J].化学试剂,2019,**41**(**9**):977-981.

[18]张腊梅,黄红琴,李敏,等.超声酶法辅助提取水芹菜多糖工艺优化及生物学活性研究[J].化学试剂,2022,**44**(**8**):1 170-1 177.

[19]PRINGLE J H, FLETCHER M. Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces[J]. *Appl. Environ. Microb.*, 1983, **45**(**3**):811-817.

[20]CRANDAL L, PHILIP G, CALO J, et al. Essential oils as antimicrobials in food systems-A review[J]. *Food Control*, 2015, **54**: 111-119.

[21]WANG X, SHEN Y, THAKUR K, et al. Antibacterial activity and mechanism of ginger essential oil against escherichia coli and staphylococcus aureus[J]. *Molecules*, 2020, **25**(**17**):3 955-3 971.

[22]YANG H, GAO Y, LONG L, et al. Antibacterial effect of blumea balsamifera (L.) DC. Essential oil against staphylococcus aureus [J]. *Arch. Microbiol.*, 2021, **203**(**7**): 3 981-3 988.

[23]CHEN Z, HE B, ZHOU J, et al. Chemical compositions and antibacterial activities of essential oils extracted from alpinia guilinensis against selected foodborne pathogens[J]. *Ind. Crop. Prod.*, 2016, **83**: 607-613.

[24]JIAN G X, TING L, QING P H, et al. Chemical composition, antibacterial properties and mechanism of action of essential oil from clove buds against staphylococcus aureus[J]. *Molecules*, 2016, **21**(**9**):1 194-1 206.

[25]MULLER A, KLOCKNER A, SCHNEIDER T. Targeting a cell wall biosynthesis hot spot [J]. *Nat. Prod. Rep.*, 2017, **34**(**7**):909-932.

[26]TANG H, CHEN W, DOU Z M, et al. Antimicrobial effect of black pepper petroleum ether extract for the morphology of listeria monocytogenes and salmonella typhimurium [J]. *J. Food Sci. Technol.*, 2017, **54**(**7**): 2 067-2 076.

[27]EGAN A, ERRINGTON J, VOLLMER W. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling [J]. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2020, **18**(**8**):446-460.

[28]ZHENG X Y, GUO J L, RAO H S, et al. Antibacterial and antibiofilm activity of coenzyme Q0 against vibrio parahaemolyticus[J]. *Food Control*, 2020, **109**: 106 955-106 997.

[29]ZHANG Y, WU Y T, ZHENG W, et al. The antibacterial activity and antibacterial mechanism of a polysaccharide from cordyceps cicadae [J]. *J. Funct. Foods*, 2017, **38**: 273-279.

[30]KANG J M, JIN W Y, WANG J F, et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of peppermint essential oil against staphylococcus aureus[J]. *LWT*, 2019, **101**: 639-645.

[31]ZHANG Y B, LIU X Y, WANG Y F, et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against escherichia coli and staphylococcus aureus [J]. *Food Control*, 2016, **59**: 282-289.

苦蘵化学成分及抗炎活性研究

杨丽婷,李博术,张寒翠,李琼娣,贾敬皓,邱莉,谢集照*
(广西医科大学 药学院,广西 南宁 530021)

摘要:研究苦蘵的化学成分及抗炎活性。采用硅胶、Sephadex LH-20 和 ODS 等柱色谱分离技术对苦蘵乙酸乙酯部位进行分离纯化,通过波谱学技术鉴定化合物结构,并采用 LPS 诱导的 RAW264.7 释放 NO 的细胞模型,评价化合物的体外抗炎活性。从苦蘵中分得 13 个化合物:5,4′-二羟基-3,3′,7-三甲氧基-黄酮(1)、3β-hydroxy-5α,8α-epidioxyergosta-6,22-diene(2)、(22*R*)-5β,6β:14α,17:14β,26-triepoxy-2α-ethoxy-13,20,22-trihydroxy-1,15-dioxo-16α,24-cyclo-13,14-secoergosta-18,27-dioic acid 18→20,27→22-dilactone(3)、alkesterol B(4)、withaminilide F(5)、酸浆苦素 B(6)、酸浆苦素 D(7)、酸浆苦素 U(8)、withaphysalin R(9)、rel-(18*R*,22*R*)-5β,6β:18β,20-diepoxy-3β,18α-dimethoxy-4β-hydroxy-1-oxowith-24-enolide(10)、withaphysalin P(11)、β-谷甾醇(12)、棕榈酸(13)。化合物 1 和 2 首次从酸浆属中分离得到,化合物 3~5、10、11 首次从该植物中得到。体外抗炎结果表明,化合物 5、6、10、11 抗炎效果显著。

关键词:苦蘵;化学成分;酸浆苦素类;醉茄内酯类;抗炎活性
中图分类号:R284 **文献标识码**:A **文章编号**:0258-3283(2023)07-0094-06
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0077

Chemical Constituents of *Physalis Angulata* L. and Their Anti-inflammatory Activities *YANG Li-ting, LI Bo-shu, ZHANG Han-cui, LI Qiong-di, JIA Jing-hao, QIU Li, XIE Ji-zhao** (School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: The chemical constituents from *Physalis angulata* L. and their anti-inflammatory activities were studied. The chemical constituents were isolated and purified by silica gel, Sephadex LH-20 and ODS chromatography. The structures of isolated compounds were elucidated by spectroscopic analyses. Meanwhile the anti-inflammatory activities of the chemical components against NO production from LPS stimulated RAW264.7 cells were evaluated *in vitro*. The structures were identified as: 5,4′-dihydroxy-3,3′,7-trimethoxy-flavone (1), 3β-hydroxy-5α,8α-epidioxyergosta-6,22-diene (2), (22*R*)-5β,6β:14α,17:14β,26-triepoxy-2α-ethoxy-13,20,22-trihydroxy-1,15-dioxo-16α,24-cyclo-13,14-secoergosta-18,27-dioic acid 18→20,27→22-dilactone (3), alkesterol B (4), withaminilide F (5), physalin B (6), physalin D (7), physalin U (8), withaphysalin R (9), rel-(18*R*,22*R*)-5β,6β:18β,20-diepoxy-3β,18α-dime-thoxy-4β-hydroxy-1-oxowith-24-enolide (10), withaphysalin P (11), β-sitosterol (12), and palmitic acid (13). Compounds 1 and 2 were isolated form this genus for the first time, while compounds 3~5, 10, and 11 were obtained from this plant for the first time. Compounds 5, 6, 10, and 11 show significant anti-inflammatory activities.

Key words: *Physalis angulata* L.; chemical constituents; physalins; withanolides; anti-inflammatory activities

苦蘵 *Physalis angulata* L.是茄科(Solanaceae)酸浆属(Physalis)的一年生草本植物,古代又称蘵、蘵草、小苦耽等[1]。该属植物全世界约有 120 种,我国主要有 5 个种和 2 个变种[2],大多分布于热带和温带地区,主要集中于我国东部至西南部。苦蘵,味苦,性寒,归脾、肝经,以果、根或全草入药,具有清热解毒、镇痛、利尿之功效[1]。植物化学研究结果表明,酸浆属植物蕴含丰富的化学成分和活性物质,主要包括甾体类、黄酮类、苯丙素类、多糖类、维生素及微量元素类等[3,4]。其中甾体类化合物中的酸浆苦素类和醉茄内酯类化合物具有抗肿瘤、抗炎、抗菌和免疫调节等作用[5-8]。目前对苦蘵乙酸乙酯部位系统化学成分研究的报道相对较少,其抗炎、免疫调节等作用特点、作用机制尚不完全明确,因此继续研究苦蘵的化学成分,探究其抗炎活性具有重要意义。为了更加深入了解苦蘵的物质基础,本研究以苦蘵乙酸乙酯部位为研究区域,依托药学、化学相关平台,采用现代色谱分离方法和现代波谱学技术,对苦蘵乙酸乙酯部位的化学成分进行系统分离和结构鉴

收稿日期:2023-02-11;**网络首发日期**:2023-04-17
作者简介:杨丽婷(1999-),女,广西玉林人,硕士生,主要研究方向为天然药物化学。
通讯作者:谢集照,E-mail:xiejizhao@gxmu.edu.cn。
引用本文:杨丽婷,李博术,张寒翠,等.苦蘵化学成分及抗炎活性研究[J].化学试剂,2023,**45**(7):94-99。

定,并阐明单体化合物的体外抗炎活性。

1　实验部分

1.1　主要仪器与试剂

Bruker Avance Ⅲ-600M 型核磁共振波谱仪(美国 Bruker 公司);AB204-N 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);DW86 L621 型超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司);FD-1D-50 型真空冷冻干燥器(北京博医康实验仪器有限公司);LCMS-IT-TOF 型液相色谱质谱联用仪(日本岛津公司);X-5 型精密显微熔点仪(北京和众视野科技有限公司)。柱层析硅胶、薄层层析硅胶(青岛鼎康科技有限公司);氘代试剂(上海泰坦科技有限公司);Sephadex LH-20 型填料(上海源叶科技有限公司)。

RAW264.7 细胞株由广西医科大学药学院实验中心提供。胎牛血清(美国 Corning 公司);DMEM 高糖培养液(美国 Gibico 公司);二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司);脂多糖(美国 Sigma-Aldrich 公司);Griess 试剂 A:w(N-萘乙二胺盐酸盐)= 0.1%溶于水中;Griess 试剂 B:w(对氨基苯磺酰胺)= 1%溶于 φ(H_3PO_4)= 5%中,使用前等体积混合试剂 A 和 B。

苦蘵枝叶采自于贺州市八步区莲塘镇,经广西中医药研究院黄云峰研究员鉴定为茄科酸浆属苦蘵 *Physalis angulata* L.的枝叶,药材标本(编号:KZ201809)存放于广西医科大学天然药物化学实验室。

1.2　实验方法

1.2.1　提取与萃取

22 kg 苦蘵干燥地上部分用 10 倍量 85%乙醇进行加热回流提取 3 次,每次 3 h,减压浓缩得到 6.4 kg 浸膏,浸膏依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,分别得到 700 g 石油醚部位、1 630 g 乙酸乙酯部位、2 000 g 正丁醇部位和 1 650 g 水部位。

1.2.2　乙酸乙酯部位分离纯化

取 1 630 g 乙酸乙酯部位硅胶拌样后,经过硅胶柱色谱梯度(V(环已烷):V(乙酸乙酯)= 100:0~0:100;V(乙酸乙酯):V(甲醇)= 100:0~0:100)洗脱,得到 5 个组分(Fr1-5)。50 g Fr1 经过硅胶柱色谱(V(石油醚):V(乙酸乙酯)= 100:0~0:100)分离后得到 4 个组分 Fr1a~1d。

5.0 g Fr1d 经过 Sephadex LH-20 柱色谱、甲醇重结晶后得到 125.8 mg 化合物 8。

180.9 g Fr2 经过硅胶柱色谱(V(环已烷):V(乙酸乙酯)= 50:1~0:100)洗脱分离后得到 6 个组分 Fr2a~2f。

40.3 g Fr2b 经硅胶柱层析色谱(V(石油醚):V(乙酸乙酯)= 25:1~0:100)洗脱后,得到 5 个组分 Fr2b-1~2b-5,Fr2b-2 和 Fr2b-3 经硅胶柱层析色谱(V(环已烷):V(乙酸乙酯)= 20:1~0:100)和 Sephadex LH-20 柱色谱(V(二氯甲烷):V(甲醇)= 1:1)分离纯化后得到 8.0 mg 化合物 1 和 10.1 mg 化合物 2。

18.0 g Fr2c 组分经 Sephadex LH-20 柱色谱(V(二氯甲烷):V(甲醇)= 1:1)洗脱后得到 13 个

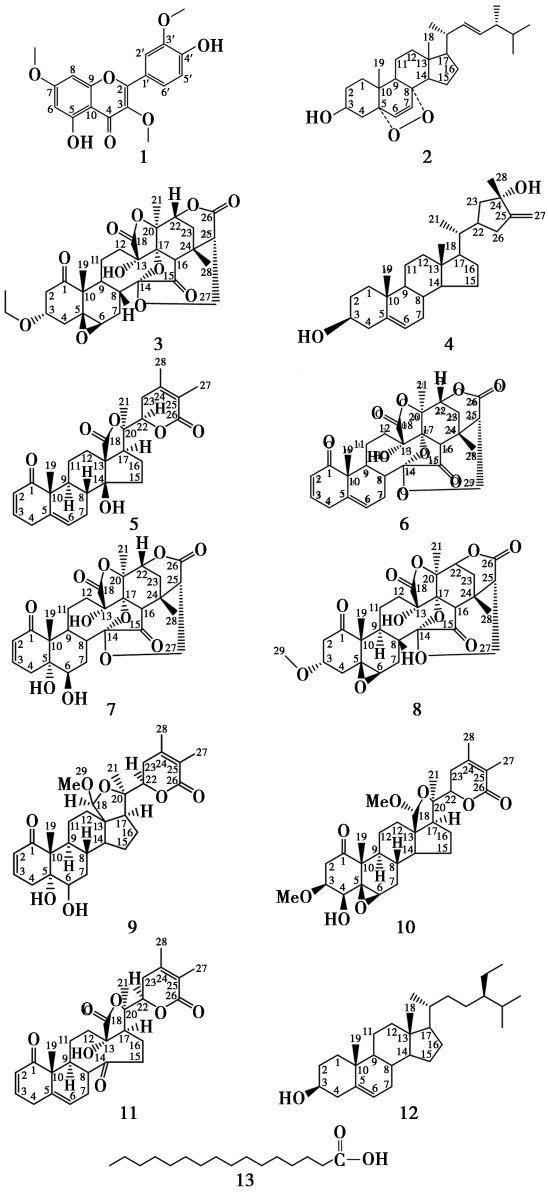


图 1　化合物 1~13 的结构式

Fig.1　Chemical structures of compounds 1~13

组分 Fr2c-1 ~ 2c-13, Fr2c-3 采用 ODS 柱色谱(V(甲醇):V(水)= 3:7~9:1)分离纯化后得到 25.7 mg 化合物 7。Fr2c-13 经过硅胶柱色谱(V(环己烷):V(乙酸乙酯)= 100:0~0:100)洗脱后得到 4 个组分 Fr2c-13a~2c-13d,Fr2c-13a,重结晶后得到 15.6 mg 化合物 10。Fr2c-13d 经 Sephadex LH-20 柱色谱(V(二氯甲烷):V(甲醇)= 1:1)洗脱并纯化后得到 20.1 mg 化合物 11。

30.5 g Fr2d 经硅胶柱色谱洗脱后得到 5 个组分 Fr2d-1~2d-5,Fr2d-3 经硅胶柱色谱(V(二氯甲烷):V(甲醇)= 100:0~0:100)和 ODS 柱色谱(V(甲醇):V(水)= 2:8~9:1)洗脱得到 20.5 mg 化合物 4 和 20.0 mg 化合物 6。

25.8 g Fr2e 经硅胶柱色谱(V(二氯甲烷):V(甲醇)= 100:0~0:100)洗脱得到 2 个组分 Fr2e-1 和 Fr2e-2,Fr2e-1,纯化后得到 60.5 mg 化合物 12 和 50.0 mg 化合物 13,Fr2e-2 组分经 ODS 柱色谱(V(甲醇):V(水)= 2:8~9:1)和 Sephadex LH-20(甲醇)分离纯化后得到 20.2 mg 化合物 3 和 50.3 mg 化合物 5。

13.2 g Fr2f 经硅胶柱色谱(V(二氯甲烷):V(甲醇)= 100:0~0:100)洗脱后得到 5 个组分 Fr2f-1~2f-5,其中 Fr2f-4 经 Sephadex LH-20 柱色谱(V(二氯甲烷):V(甲醇)= 1:1)洗脱得到 52.5 mg 化合物 9。

1.2.3 体外抗炎活性测试

选取生长良好在对数生长期的 RAW264.7 巨噬细胞,以 1×10^6 个 mL^{-1} 密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,放置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。实验设置空白组、模型组、阳性对照组和样品组,每组设置 3 个复孔,阳性对照为地塞米松。空白组和模型组加入不含药培养基,样品组分别加入含高、中、低浓度样品培养基,孵育细胞 1 h 后除空白组外其他各组均加入 LPS 使其终浓度为 1 μg/mL,继续孵育细胞 24 h,吸取 100 μL 上清液至酶标板中,加入等体积的 Griess 试剂,室温反应 15 min 后测定 540 nm 处的吸光值。用浓度分别为 0、1、2、5、10、20、40、60 μmol/L 的 $NaNO_2$ 绘制标准曲线,根据 $NaNO_2$ 标准曲线计算细胞培养上清液中 NO_2^- 的浓度以及对 NO 释放的抑制率。同一批细胞采用 CCK-8 法对细胞活力进行测定。抑制率计算公式为:NO 释放抑制率(%) = 100% × ($[NO_2^-]_{LPS}$ − $[NO_2^-]_{LPS+样品}$)/($[NO_2^-]_{LPS}$−$[NO_2^-]_{空白}$)。

2 结果与讨论

2.1 化合物结构鉴定

5,4′-二羟基-3,3′,7-三甲氧基-黄酮(1):黄色无定形粉末,m.p. 164 ~ 167 ℃。^{1}HNMR(DMSO-d_6,600 MHz),δ:12.71(s,1H);10.00(s,1H);7.71(d,1H,J = 2.4 Hz);7.66(dd,1H,J = 8.4,1.8 Hz);7.00(d,1H,J = 8.4 Hz);6.83(d,1H,J = 2.4 Hz);6.41(d,1H,J = 1.8 Hz);3.91(s,6H);3.86(s,3H)。^{13}CNMR(DMSO-d_6,151 MHz),δ:179.0,166.1,161.8,157.2,156.7,150.9,148.4,138.9,123.3,121.6,116.6,112.9,106.1,98.8,93.4,60.7,57.1,56.7。ESI-MS,$C_{18}H_{16}O_7$,m/z:345.0[M+H]$^+$。以上数据与文献[9]报道基本一致,故鉴定该化合物为 5,4′-二羟基-3,3′,7-三甲氧基-黄酮。

3β-hydroxy-5α, 8α-epidioxyergosta-6, 22-diene(2):白色无定形粉末,m.p.169~173 ℃。^{1}HNMR(pyrdine-d_5, 600 MHz),δ:6.52(d,1H,J = 8.4 Hz);6.32(d,1H,J = 8.4 Hz);5.25(dd,1H,J = 15.0,7.8 Hz);5.19(dd,1H,J = 16.8,8.4 Hz);4.39(m,1H);1.02(d,3H,J = 6.0 Hz);0.95(d,3H,J = 7.2 Hz);0.90(s,3H);0.86(d,3H,J = 4.8 Hz);0.85(d,3H,J = 6.6 Hz);0.78(s,3H)。^{13}CNMR(pyrdine-d_5,151 MHz),δ:136.1,135.8,132.2,130.8,82.2,79.2,65.7,56.2,52.0(2C),44.6,43.0,39.9,39.5,38.2,37.4,35.4,33.3,31.2,29.0,23.6,21.1,21.0,20.1,19.8,18.3,17.7,12.9。ESI-MS,$C_{28}H_{44}O_3$,m/z:429.4[M+H]$^+$。以上数据与文献[10]报道基本一致,故鉴定该化合物为 3β-hydroxy-5α, 8α-epidioxyergosta-6,22-diene。

(22R)-5β, 6β:14α, 17:14β, 26-triepoxy-2α-ethoxy-13,20,22-trihydroxy-1,15-dioxo-16α,24-cyclo-13,14-secoergosta-18,27-dioic acid 18→20,27→22-dilactone(3):白色针状晶体,m.p. 268 ~ 270 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:4.51(dd,1H,J = 13.8,4.8 Hz);4.13(s,1H);3.93(m,1H);3.74(d,1H,J = 13.8 Hz);3.39(m,2H);3.22(d,1H,J = 1.8 Hz);2.42(d,1H,J = 4.2 Hz);2.14(s,1H);2.09(m,1H);1.96(s,3H);1.23(s,3H);1.21(s,3H);1.11(t,3H,J = 7.2 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:213.8,207.7,172.4,166.8,107.2,81.2,80.2,79.5,76.8,71.2,63.6,63.3,63.1,60.8,56.4,53.8,

51.0, 43.2, 37.5, 37.0, 33.9, 33.1, 31.2, 26.6, 25.8, 25.0, 23.4, 21.6, 15.4, 15.1。ESI-MS, $C_{30}H_{36}O_{11}$, m/z:590.3[M+H_2O]$^+$,以上数据与文献[11]报道基本一致,故鉴定该化合物为(22*R*)-5β,6β:14α,17:14β,26-triepoxy-2α-ethoxy-13,20,22-trihydroxy-1,15-dioxo-16α,24-cyclo-13,14-seco-ergosta-18,27-dioic acid 18→20,27→22-dilactone。

alkesterol B(4):白色针状晶体,m. p.181~182 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:5.33(d,1H,*J*=4.8 Hz);5.07(s,1H);4.76(s,1H);1.42(m,1H);1.33(s,3H);1.25(m,1H);0.99(s,3H);0.94(d,3H,*J*=6.6 Hz);0.66(s,3H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:157.0,141.0,122.0,106.9,73.8,72.0,57.0,56.1,50.2,42.5(2C),40.0,37.5,36.7,36.1,35.7,32.1,31.9(2C),29.5(2C),28.4,27.7,24.5,21.3,19.6,19.0,12.0。ESI-MS,$C_{28}H_{42}O_2$,m/z:433.1[M+Na]$^+$。以上数据与文献[12]报道基本一致,故鉴定该化合物为 alkesterol B。

withaminilide F(5):白色针状晶体,m. p.186~187 ℃,^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:6.79(ddd,1H,*J*=10.2,5.0,2.5 Hz);5.87(dd,1H,*J*=9.9,2.7 Hz);5.60(d,1H,*J*=5.4 Hz);4.55(dd,1H,*J*=13.6,3.6 Hz);2.49(t,1H,*J*=9.0 Hz);1.96(m,1H);1.92(s,3H);1.87(m,1H);1.86(s,3H);1.48(s,3H);1.26(s,3H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:204.4,177.7,165.1,148.4,146.0,135.2,127.9,124.7,122.3,83.7,83.4,78.4,60.7,57.4,51.6,40.0,38.2,35.7,34.9,33.4,31.8,28.8,27.1,25.1,23.2,20.7,18.9,12.7。ESI-MS,$C_{28}H_{34}O_6$,m/z:484.3[M+H_2O]$^+$。以上数据与文献[13]报道基本一致,故鉴定该化合物为 Withaminilide F。

酸浆苦素 B(6):淡黄色针状晶体,m. p.253~254 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:6.68(ddd,1H,*J*=10.2,4.8,1.8 Hz);5.90(dd,1H,*J*=10.2,2.4 Hz);5.56(d,1H,*J*=6.0 Hz);4.53(t,1H,*J*=3.0 Hz);4.51(dd,1H,*J*=13.2,4.8 Hz);4.18(s,1H);3.76(d,1H,*J*=13.2 Hz);1.95(s,3H);1.25(s,3H);1.19(s,3H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:208.4,206.0,172.5,167.0,146.4,134.1,127.5,124.7,107.7,81.2,80.4,79.8,77.1,60.9,56.6,52.9,51.1,40.1,33.3,33.2,32.9,31.3,26.7,26.0,25.0,24.4,21.7,18.0。ESI-MS,$C_{28}H_{30}O_9$,m/z:533.2[M+Na]$^+$。以上数据与文献[14]报道基本一致,故鉴定该化合物为酸浆苦素 B。

酸浆苦素 D(7):白色羽毛状晶体,m. p.256~257 ℃。^{1}HNMR(DMSO-d_6,600 MHz),δ:6.62(ddd,1H,*J*=9.6,4.8,1.8 Hz);5.80(s,1H);5.71(dd,1H,*J*=10.2,1.8 Hz);4.91(d,1H,*J*=4.2 Hz);4.57(s,1H);4.24(s,1H);4.23(dd,1H,*J*=13.2,4.2 Hz);3.58(d,1H,*J*=13.2 Hz);3.49(m,1H);3.10(brd,1H,*J*=19.2 Hz);2.88(d,1H,*J*=4.2 Hz);2.20(td,1H,*J*=11.4,4.2 Hz);1.98(dd,1H,*J*=19.2,4.8 Hz);1.80(s,3H);1.16(s,3H);1.10(s,3H)。^{13}CNMR(DMSO-d_6,151 MHz),δ:210.0,204.3,171.9,167.4,142.9,127.3,106.9,80.7,80.5,78.7,76.5,76.4,72.6,60.5,54.0,53.5,49.4,38.3,35.2,31.3,30.5,29.9,26.7,25.9,24.8,24.5,21.7,13.3。ESI-MS,$C_{28}H_{32}O_{11}$,m/z:567.3[M+Na]$^+$。以上数据与文献[15]报道基本一致,故鉴定该化合物为酸浆苦素 D。

酸浆苦素 U(8):白色针状晶体,m. p.281~283 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,600 MHz),δ:4.50(dd,1H,*J*=13.0,4.6 Hz);4.12(s,1H);3.73(d,1H,*J*=13.0 Hz);3.29(s,3H);3.25(d,1H,*J*=2.4 Hz);2.54(m,1H);2.45(d,1H,*J*=4.6 Hz);1.98(s,3H);1.90(dd,1H,*J*=15.0,11.0 Hz);1.25(s,6H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,151 MHz),δ:213.5,207.8,172.5,166.9,107.2,81.3,80.2,79.5,76.8,73.6,63.6,63.2,60.9,56.4,56.3,54.0,51.0,42.5,36.9,36.8,33.9,33.2,31.3,26.7,25.8,25.1,23.5,21.8,15.3。ESI-MS,$C_{29}H_{34}O_{11}$,m/z:576.3[M+H_2O]$^+$。以上数据与文献[16]报道基本一致,故鉴定该化合物为酸浆苦素 U。

withaphysalin R(9):白色无定形粉末,m. p.246~248 ℃。^{1}HNMR(DMSO-d_6,600 MHz),δ:6.60(ddd,1H,*J*=10.2,4.8,1.8 Hz);5.66(dd,1H,*J*=10.2,2.4 Hz);4.79(d,1H,*J*=4.2 Hz);4.49(s,1H);4.40(dd,1H,*J*=13.2,3.0 Hz);4.25(s,1H);3.40(brs,1H);3.29(s,3H);3.11(d,1H,*J*=19.8 Hz);2.00(d,1H,*J*=10.2 Hz);1.95(dd,1H,*J*=19.8,4.8 Hz);1.91(s,3H);1.76(s,3H);1.28(s,3H);1.11(s,3H)。^{13}CNMR(DMSO-d_6,151 MHz),δ:204.1,165.4,149.7,142.4,127.6,120.3,108.2,84.6,80.2,

76.3, 72.9, 57.7, 55.7 (2C), 55.3, 50.9, 40.1, 35.2, 34.8, 33.2, 31.2, 30.5, 25.8, 25.0, 24.9, 20.6, 20.1, 15.2, 12.3。ESI-MS, $C_{29}H_{40}O_7$, m/z: 523.3[M+Na]$^+$。以上数据与文献[17]报道基本一致,故鉴定该化合物为 withaphysalin R。

rel-(18*R*, 22*R*)-5β, 6β : 18β, 20-diepoxy-3β, 18α-dimethoxy-4β-hydroxy-1-oxowith-24-enolide (10):白色方块状晶体, m. p. 280 ~ 282 ℃。^{1}HNMR(pyrdine-d_5, 600 MHz), δ: 7.94 (s, 1H); 4.63 (s, 1H); 4.49 (dd, 1H, J = 13.2, 3.0 Hz); 3.96 (dd, 1H, J = 8.4, 3.6 Hz); 3.94 (d, 1H, J = 3.6 Hz); 3.43 (brs, 1H); 3.38 (s, 3H); 3.31 (s, 3H); 3.19 (dd, 1H, J = 15.6, 8.4 Hz); 3.03 (dd, 1H, J = 15.6, 3.6 Hz); 2.30 (dd, 1H, J = 15.0, 3.0 Hz); 1.91 (s, 3H); 1.77 (s, 3H); 1.69 (s, 3H); 1.45 (s, 3H); 1.43 (m, 1H)。^{13}CNMR(pyrdine-d_5, 151 MHz), δ: 209.9, 166.3, 149.2, 122.2, 108.6, 85.5, 81.2, 79.1, 74.8, 65.3, 58.3, 58.2, 57.1, 56.7, 56.6, 55.8, 51.3, 43.0, 41.4, 35.1, 32.2, 31.6, 31.3, 26.8, 26.0, 23.8, 21.4, 20.3, 15.6, 12.9。ESI-MS, $C_{30}H_{42}O_8$, m/z: 553.3[M+Na]$^+$。以上数据与文献[18]报道基本一致,故鉴定该化合物为 rel-(18*R*,22*R*)-5β,6β:18β,20-diepoxy-3β, 18α-dimethoxy-4β-hydroxy-1-oxowith-24-enolide。

withaphysalin P(11):白色方块状晶体, m. p. 221~223 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$, 600 MHz), δ: 6.79 (ddd, 1H, J = 10.2, 4.8, 2.4 Hz); 5.90 (dd, 1H, J = 10.2, 2.4 Hz); 5.54 (dd, 1H, J = 5.2, 1.8 Hz); 4.21 (dd, 1H, J = 13.2, 3.6 Hz); 3.23 (t, 1H, J = 11.4 Hz); 1.89 (s, 3H); 1.80 (s, 3H); 1.43 (s, 3H); 1.23 (s, 3H)。^{13}CNMR($CDCl_3$, 151 MHz), δ: 216.8, 204.6, 179.5, 163.9, 148.0, 146.0, 136.0, 127.8, 122.4, 122.0, 83.5, 76.9, 76.0, 60.2, 51.3, 51.1, 36.3, 33.3, 32.9, 30.7, 28.0, 27.6, 26.9, 23.1, 21.7, 20.7, 18.2, 12.5。ESI-MS, $C_{28}H_{34}O_7$, m/z: 505.2[M+Na]$^+$。以上数据与文献[17]报道基本一致,故鉴定该化合物为 withaphysalin P。

β-谷甾醇(12):白色无定形粉末, m. p. 137 ~ 139 ℃。^{1}HNMR(pyrdine-d_5, 600 MHz), δ: 5.45 (m, 1H); 3.89 (m, 1H); 1.09 (s, 3H); 1.00 (d, 3H, J = 6.6 Hz); 0.90 (t, 3H, J = 7.2 Hz); 0.85 (d, 3H, J = 6.0 Hz); 0.84 (d, 3H, J = 4.8 Hz); 0.70 (s, 3H)。^{13}CNMR(pyrdine-d_5, 151 MHz), δ: 139.2, 121.6, 71.7, 56.7, 56.5 (2C), 50.9, 44.0, 42.9, 42.4, 39.5, 37.3 (2C), 36.5, 34.4, 32.6 (2C), 31.0, 28.9 (2C), 26.1, 24.9 (2C), 21.7, 19.3 (2C), 18.8, 12.4 (2C)。ESI-MS, $C_{29}H_{50}O$, m/z: 415.6[M+H]$^+$。以上数据与文献[19]报道基本一致,故鉴定该化合物为β-谷甾醇。

棕榈酸(13):白色无定形粉末, m. p. 63 ~ 64 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$, 600 MHz), δ: 2.32 (t, 2H, J = 7.8 Hz); 1.61 (m, 2H); 1.23 ~ 1.25 (m, 24H); 0.89 (t, 3H, J = 6.9 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$, 151 MHz), δ: 179.7, 34.2, 32.1, 29.9 (C-5), 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 24.9, 22.9, 14.3。ESI-MS, $C_{16}H_{32}O_2$, m/z: 255.2[M−H]$^-$。以上数据与文献[20]报道基本一致,故鉴定该化合物为棕榈酸。

2.2 抗炎活性筛选结果

利用 CCK-8 法测定化合物对 RAW264.7 细胞在不同浓度下的细胞毒性作用。根据细胞毒性测试结果对本实验化合物的给药浓度进行设计。结果显示,化合物 1 在浓度为 60 μmol/L;化合物 2~5、7~9、11 在浓度为 10 μmol/L;化合物 6、10 在浓度在 1 μmol/L 内对细胞增殖没有影响,细胞存活率达到 90%。以上述浓度为最大浓度进行实验。抗炎结果显示化合物 1、5、6、10、11 的 IC_{50} 分别为(42.01±1.29)、(7.89±2.51)、(0.28±0.03)、(0.45±0.09)、(1.11±0.21)μmol/L。

表 1 化合物 1~11 对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 生成的抑制作用(IC_{50})[注]

Tab.1 Inhibitory effect (IC_{50}) of compounds 1~11 on NO production induced by LPS in RAW264.7 macrophages (n=3)

Compound	IC_{50}/(μmol·L^{-1})	Compound	IC_{50}/(μmol·L^{-1})
1	42.01±1.29	7	>10
2	>10	8	>10
3	>10	9	>10
4	>10	10	0.45±0.09
5	7.89±2.51	11	1.11±0.21
6	0.28±0.03	地塞米松*	14.40±2.70

注:* 阳性对照。

3 结论

本研究对苦蘵地上部分的乙酸乙酯部位进行分离,得到 13 个化合物,包括 3 个甾醇类化合物(2,4,12),4 个酸浆苦素类化合物(3,6,7,8),4 个醉茄内酯类化合物(5,9,10,11),1 个黄酮类化

合物(1)和 1 个长链脂肪酸类化合物(13)。其中,化合物 1 和 2 首次从酸浆属中分离得到,化合物 3、4、5、10、11 首次从该植物中得到。抗炎结果显示化合物 5、6、10、11 表现出很强的抑制 RAW264.7 细胞中 NO 的活性。尤其是化合物 6 和化合物 10 的活性最强,其 IC_{50} 为(0.28±0.03)和(0.45±0.09)μmol/L,表明了酸浆苦素类和醉茄内酯类化合物有潜在的抗炎活性。该研究进一步完善了苦蘵的化学结构多样性,为苦蘵的化学成分以及抗炎作用机制的研究奠定了基础,同时为酸浆属植物的开发和利用提供了科学依据。

参考文献:

[1]南京中医药大学.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,2006:1 762-1 763.

[2]邱峰.几种酸浆属药用植物的化学成分和生物活性研究[C].上海:中国化学会第十一届全国天然有机化学学术会议论文集(第一册),2016:61.

[3]SHENSTONE E,LIPPMAN Z,VAN E J.A review of nutritional properties and health benefits of Physalis species [J].*Plant Foods Hum.Nutr.*,2020,**75**(**3**):316-325.

[4]方雷,展晓日,俞春娜,等.苦蘵化学成分及药理作用研究进展[J].杭州师范大学学报(自然科学版),2016,**15**(**6**):613-616.

[5]YU T J,CHENG Y B,LIN L C,et al.*Physalis peruviana*-derived physapruin A (PHA) inhibits breast cancer cell proliferation and induces oxidative-stress-mediated apoptosis and DNA damage[J].*Antioxidants* (*Basel*),2021,**10**(**3**):393-406.

[6]YI Y Y.Effect of ethanol extract and fractions of physalis calyx seu fructus on inflammation and mycoplasma gallisepticum.[J].*Pak.Vet.J.*,2020,**40**(**3**):283-288.

[7]JOSEPH M K.Antimicrobial,cytotoxicity,acute oral toxicity and qualitative phytochemical screening of the aqueous and methanolic extracts of *Physalis peruviana* L.(Solanaceae)[J].*J.Appl.Microbiol.*,2021,**10**(**2**):117-125.

[8]VIECELI P S,JUIZ P J L,LAURIA P S S,et al.*Physalis angulata* reduces the progression of chronic experimental periodontitis by immune-modulatory mechanisms[J].*J.Ethnopharmacol.*,2021,**273**:113 986.

[9]梁荣感,毛庭枝,梁成钦,等.小叶黄杨化学成分的研究[J].广西植物,2009,**29**(**5**):703-706.

[10]TAKAISHI Y,MINORU U,TAKASHI O,et al.Glycosides of ergosterol derivatives from *Hericum erinacens* [J].*Phytochemistry*,1991,**30**(**12**):4 117-4 120.

[11]LI Y,PAN Y,HUANG X,et al.Withanolides from *Physalis alkekengi* var.*francheti*[J].*Helv.Chim.Acta*,2008,**91**(**12**):2 284-2 291.

[12]XU Q M,LIU Y L,FENG Y L,et al.C28 sterols with a cyclopentane ring at C-22 and 26 from cape gooseberry (berries of *Physalis pubeacens* L.)[J].*J.Asian.Nat.Prod.Res.*,2010,**12**(**9**):752-759.

[13]HU B,LI H,TANG C,et al.Withaphysalins from medicinal and edible *Physalis minima* and their anti-inflammatory activities[J].*J.Agric.Food Chem.*,2022,**70**(**18**):5 595-5 609.

[14]HO A,HOANG T,NGUYEN T T,et al.Effects of compounds from *Physalis angulata* on fatty acid synthesis and glucose metabolism in HepG2 cells via the AMP-activated protein kinase pathway[J].*Nat.Prod.Sc.*,2020,**26**(**3**):200-206.

[15]张楠,储小琴,蒋建勤.锦灯笼醋酸乙酯部位化学成分的研究[J].中草药,2015,**46**(**8**):1 120-1 124.

[16]KUO P C,KUO T H,DAMU A G,et al.Physanolide A,a novel skeleton steroid,and other cytotoxic principles from *Physalis angulata*[J].*Org Lett.*,2006,**8**(**14**):2 953-2 956.

[17]LEI M,GAN X W,HE Q P,et al.Cytotoxic withaphysalins from *Physalis minima*[J].*Helv.Chim.Acta*,2007,**90**(**7**):1 406-1 419.

[18]BATISTA P H,DE L K S,PINTO F,et al.Withanolides from leaves of cultivated *Acnistus arborescens*[J].*Phytochemistry*,2016,**7**(**130**):321-327.

[19]孙珍,李泠鸽,院珍珍,等.小蓟中甾体类化合物的分离及结构鉴定[J].食品科学,2012,**33**(**19**):124-127.

[20]邹娟,毛效贤,何康,等.全缘凤尾蕨化学成分的研究[J].广西植物,2021,**41**(**7**):1 046-1 053.

电化学和新能源

铁稳定的铂单原子催化选择性加氢反应

尤志鑫[1],纪钰霞[1],蒋妍[1],郎睿*[1],吴传德*[1,2]
(1.广东工业大学 轻工化工学院,广东 广州 510006;2.浙江大学 化学学院,浙江 杭州 310027)

摘要:多相催化剂常以过渡金属为活性中心,当催化活性位点呈原子级分散时,金属利用率达到最高,故具有优异的催化性能。然而,铂族金属和惰性氧化物的结合较弱,所以在 Al_2O_3 和 SiO_2 之类的载体上,铂很难被分散成单原子的形式。使用简单的溶胶-凝胶法,在惰性氧化物中掺杂铁元素可显著增强铂与载体之间的共价相互作用,从而制得单原子铂催化剂。在苯乙炔选择性加氢生成苯乙烯的反应中,0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 单原子催化剂具有良好的选择性,其反应速率是 0.2 wt% Pt/Al_2O_3-SiO_2 纳米颗粒催化剂的 1.4 倍。该单原子催化剂还在循环测试中表现出高稳定性,证明了载体的掺杂改性是一种将活性金属分散在惰性氧化物上,得到高活性和高稳定性的单原子催化剂的有效策略。

关键词:铂;单原子催化剂;苯乙炔;选择性加氢;复合氧化物载体
中图分类号:O643 **文献标识码**:A **文章编号**:0258-3283(2023)07-0100-07
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0128

Iron-Stabilized Pt Single-Atom Catalysis for the Selective Hydrogenation *YOU Zhi-xin*[1], *JI Yu-xia*[1], *JIANG Yan*[1], *LANG Rui**[1], *WU Chuan-de**[1,2](1.School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2.Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: The heterogeneous catalysts with isolated active metal centers at the atomic dispersion show the highest metal utilization, leading to superior catalytic activities. However, achieving the atomic dispersion of Pt-group metals on irreducible oxides, such as Al_2O_3 and SiO_2, is quite difficult. Consequently, the Al_2O_3-SiO_2 support is modified by the Fe component to strengthen the interaction with Pt species. The single-atom Pt catalyst was fabricated using a simple sol-gel method, showing high selectivity for the hydrogenation of phenylacetylene to styrene. Besides, the reaction rate of 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 single-atom catalyst is 1.4 times higher than that of 0.2 wt% Pt/Al_2O_3-SiO_2 nanoparticle analogue. Moreover, the high stability of thus synthesized single-atom catalyst is proved by the recycling tests, demonstrating an efficient method to anchor single metal atoms on the modified inert oxide supports.

Key words: platinum; single-atom catalyst; phenylacetylene; selective hydrogenation; composite oxide support

苯乙烯是一种广泛应用于橡胶、药物和颜料等化工领域的重要中间体[1],我国年产量接近 1 000 万 t,主要来源于抽提石油裂解产物[2]。苯乙炔是苯乙烯原料中的主要杂质[3],在后续的苯乙烯聚合阶段会毒害催化剂[4,5],严重影响产品性能[6]。苯乙烯与苯乙炔的理化性质相近,靠物理方式分离除杂比较困难。目前,主要通过催化的手段,将苯乙炔杂质选择性加氢转化为苯乙烯[7]。这一过程中,还要尽量避免将苯乙烯过度加氢成乙苯[8],所以设计具有高活性与高选择性的催化剂至关重要。

铂族金属催化剂广泛应用于化工生产、能源转化、环境保护等各个领域[9]。在炔烃催化加氢过程中,常用的活性金属有铂[10,11]、钯[5,12]、钌[13]、金[14]和铜[15]等,其中铂基催化剂的活性较高。然而,铂基纳米颗粒催化剂对烯烃产物的选择性通常较差,故需要进一步改善铂基催化剂的性能[16]。单原子催化剂的出现正好解决了这一难题,与传统的纳米催化剂相比,单原子催化剂的活性中心呈原子级分散[17],能最大限度地提高活

收稿日期:2023-02-27;**网络首发日期**:2023-04-17
基金项目:广州市基础研究项目(202102020202)。
作者简介:尤志鑫(1998-),男,广东茂名人,硕士生,主要研究方向为高分散金属催化剂。
通讯作者:郎睿,E-mail:langrui@gdut.edu.cn;吴传德,E-mail:cdwu@zju.edu.cn。
引用本文:尤志鑫,纪钰霞,蒋妍,等.铁稳定的铂单原子催化选择性加氢反应[J].化学试剂,2023,**45**(7):100-106。

性金属的利用效率[18]。此外,与纳米催化剂相比,在单原子催化剂中,活性位点的组成与结构更为均一,故单原子催化剂在加氢反应中具有更优越的选择性[19]。但是,单原子活性位点的表面不饱和程度比纳米颗粒更高,所以在制备或反应的过程中,原本被完全分散的金属原子可能会自发团聚以降低表面能,从而导致催化性能改变。因此,载体对于单原子催化剂的稳定性至关重要,工业上常用的多相催化剂载体多为不可还原氧化物载体,如沸石、氧化铝和氧化硅等[20-23],但是这些载体很难使铂达到原子级的均匀分散。因此,用具有可还原性的金属如铈[10]、铁[24]、钴[25]等对惰性氧化物进行改性,能明显增强金属与载体之间的相互作用,帮助铂族金属分散成单原子的状态,从而提高加氢反应的活性和选择性[26]。

通过溶胶-凝胶法合成氧化物负载的单原子催化剂具有独特优势。例如,由 P123、异丙醇铝与氯铂酸形成的凝胶,经过焙烧可分解为氧化铝载体。在此过程中,铂被牢牢地锚定在载体表面的缺陷中,没有团聚成纳米颗粒,合成的单原子铂催化剂具有良好的热稳定性[18]。本文用溶胶-凝胶法在硅铝复合氧化物中掺杂了少量的铁元素,把高分散的铂活性中心锚定在载体上,合成出铂负载量为 0.2 wt%的单原子催化剂 0.2 wt% Pt-Fe_{50}/Al_2O_3-SiO_2。在苯乙炔加氢反应中,改变 Fe 的掺杂量会影响催化剂的性能,当 Pt∶Fe 物质的量比为1∶50 时,催化活性与选择性达到最高。此外,该单原子催化剂表现出了良好的底物适用性和循环稳定性。这种简便的改性策略有助于实现在惰性载体上合成单原子催化剂。

1　实验部分

1.1　主要仪器与试剂

TD-3500 型 X 射线衍射仪(丹东通达科技有限公司);ASAP2460 型全自动比表面与孔隙度分析仪(美国麦克默瑞提克(上海)仪器有限公司);JEM-2100F 型高分辨透射电子显微镜、JEM-ARM200F 型球差校正透射电子显微镜(AC-STEM)(日本株式会社);Scientific K-Alpha 型 X 射线光电子能谱仪(XPS,美国赛默飞世尔科技公司);Agilent 7700s 型电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS,美国安捷伦科技公司);9790 Ⅱ型气相色谱仪(GC,浙江福立分析仪器有限公司)。

硝酸铝九水合物、硅酸四乙酯、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、苯乙炔、1-氯-4-乙炔基苯、4-甲氧基苯乙炔(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);硝酸铁(Ⅲ)九水合物、氯铂酸六水合物、1,3,5-均苯三甲酸、2-甲基-3-丁炔-2-醇(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司);无水乙醇(99.7%,安徽泽升科技有限公司);(4-溴苯基)炔、1-炔基-4-甲基苯、1-辛炔(分析纯,上海毕得医药科技股份有限公司)。

1.2　催化剂的制备

将 860 μL(3.9 mmol)硅酸四乙酯、1.2 g(3.2 mmol)硝酸铝九水合物、1.4 g(6.4 mmol)均苯三甲酸、0.08 g(0.2 mmol)硝酸铁九水合物、含 0.8 mg Pt 的氯铂酸水溶液、4 mL 去离子水加入至 20 mL 无水乙醇中,搅拌至完全溶解转移至水热反应釜中,在 120 ℃恒温反应 12 h 得到红棕色凝胶,干燥后在马弗炉中以 5 ℃/min 的升温速率加热至 500 ℃,焙烧 4 h 得到 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2。通过调节硝酸铝与硅酸四乙酯的用量得到氧化铝或氧化硅负载的催化剂;保持载体与 Pt 的含量不变,改变硝酸铁的用量得到不同铁含量的催化剂;增加氯铂酸的用量,得到 Pt 载量为 1.0 wt%的催化剂(1.0 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2)。

2　结果与讨论

2.1　表征分析

2.1.1　Pt 的分散态分析

使用 XRD 来分析负载在 Al_2O_3-SiO_2 载体上的 Pt 基催化剂的物相组成和结构。结果如图 1 所示,1.0 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 在 $2\theta = 39.8°$处出现了微弱的衍射峰,对应着的 Pt(111)晶面(PDF04-0802),从 0.2 wt% Pt/Al_2O_3-SiO_2 及 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 的衍射谱图中未观察到明显的 Pt 或 PtO_x 的相关衍射峰,其衍射谱图与 Al_2O_3-SiO_2 的谱图相比没有明显的差异。

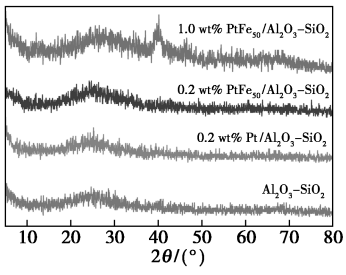
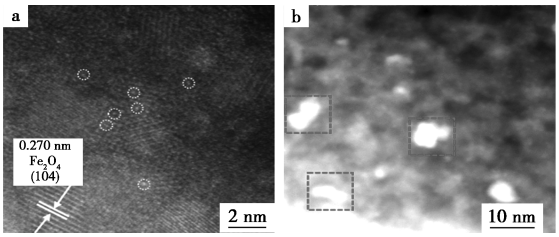


图 1　催化剂的 XRD 谱图

Fig.1　XRD pattern of catalysts

鉴于低载量的催化剂在 XRD 上不出峰,为了进一步研究 Pt 在 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 及 0.2 wt% Pt/Al_2O_3-SiO_2 上的分散状态,分别使用球差校正透射电镜、高角度环形暗场扫描透射电子显微镜(HAADF-STEM)及能量色散 X 射线谱(EDS)对这些催化剂的微观形貌进行了分析(图 2、图 3)。从 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 的 AC-STEM 图像(图 2a)中可以看出,Pt 以单原子形式(白圈标注)分散在载体上,且没有观察到 Pt 团簇或纳米颗粒的存在,图中的晶格条纹间距为 0.270 nm,对应 Fe_2O_3(104)晶面;通过 HAADF-STEM(图 3a)与 EDS 面扫结果分析(图 3b~3d)可知,Pt 和 Fe 元素都是以高分散状态存在于 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 上。上述面扫结果与 AC-STEM 及 XRD 结果相吻合,证实了 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 中的 Pt 以单原子分散。而与此相反的是,通过 HAADF-STEM 图像(图 2b)可以清晰地观察到 0.2 wt% Pt/Al_2O_3-SiO_2 中 Pt 以约 5 nm 的纳米颗粒(框内标注)形式存在,这表明了



a.0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 的 AC-STEM 图像;
b.0.2 wt% Pt/Al_2O_3-SiO_2 的 HAADF-STEM 图像

图 2 催化剂的 AC-STEM 和 HAADF-STEM 图

Fig.2 AC-STEM and HAADF-STEM of catalysts

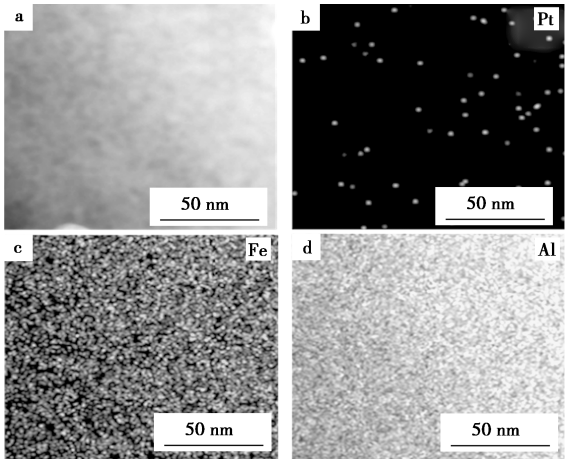


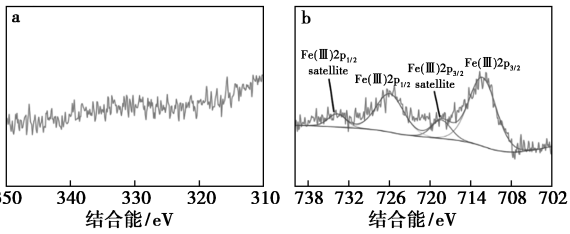
图 3 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 催化剂的 HAADF-STEM(a)和 EDS 面扫结果(b~d)

Fig.3 HAADF-STEM(a) and EDS mapping image(b~d) of 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2

Fe 元素的掺杂有助于 Pt 金属的分散。由于 Al_2O_3-SiO_2 载体为非晶相载体,对低载量的 Pt 晶相颗粒 X 射线衍射峰具有一定的掩盖作用,电镜分析对 XRD 表征结果给予了支持。

2.1.2 价态分析

XPS 显示 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 催化剂在 310~350 eV 范围内没有明显的 Pt 4d 信号(图 4a)。该催化剂的铂负载量仅为 0.2 wt%,换算成原子百分比为 0.02 at%,实际上低于 XPS 的检测限(0.1 at%)。根据之前工作中的 XPS 结果,在空气中焙烧之后得到的含量为 1 wt% 的 Pt/Fe_2O_3 单原子催化剂(0.2 at%),Pt 为+2 和+4 价共存的状态[24]。本文中 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 催化剂也是在空气气氛中经 500 ℃焙烧制得,由此判断该催化剂中 Pt 也是以正价态存在。图 4b 给出了该催化剂 Fe 2p 的 XPS 精细谱,结合能从小到大分别代表了 Fe $2p_{3/2}$(712.6 eV)、Fe $2p_{3/2}$的卫星峰、Fe $2p_{1/2}$(726.2 eV)及 Fe $2p_{1/2}$的卫星峰,即在该催化剂中存在 Fe^{3+}。结合 **2.1.1** 中 AC-STEM 的结果表明 Fe 元素以 Fe_2O_3 的形式掺杂于载体上。而这些 Fe 元素的掺杂,使得 Pt 能以单原子的形式分散于 Al_2O_3-SiO_2 上,这也与之前工作中的结论一致[10,24]。



a.Pt 4d;b.Fe 2p

图 4 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 催化剂的 XPS 谱图

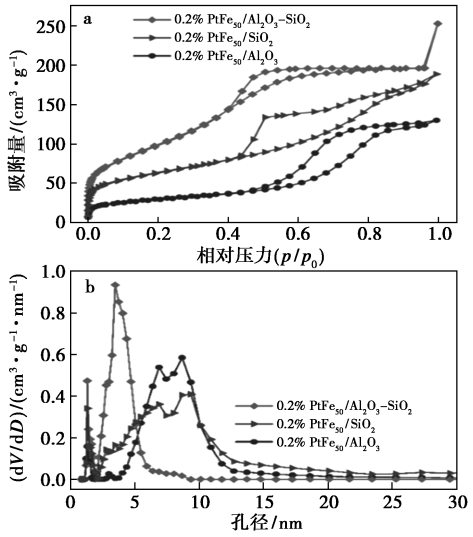
Fig.4 XPS spectra of 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2

2.1.3 比表面积分析

为了更充分的佐证 Pt 在不同载体上存在形式的差异,对掺杂 Fe 的 3 种不同载体的催化剂进行了氮气等温吸脱附测试。结果如图 5 所示,负载在 Al_2O_3-SiO_2 复合氧化物上的催化剂的比表面积(371 m^2/g)要比负载在单一组分载体(Al_2O_3:105 m^2/g,SiO_2:220 m^2/g)上的催化剂要大,甚至略大于二者之和,这表明 Al_2O_3-SiO_2 载体并不是单纯两种载体的简单堆砌,而是在结构上发生了变化,由此带来了比表面积的增大。

由 N_2 等温吸脱附曲线(图 5a)可以看出,3 种材料均符合Ⅳ型吸附等温线,这表明 3 种材料

均具有丰富的微孔及介孔结构。由图 5b 的 BJH 孔径分布图可知,3 种材料的微孔尺寸均为 1.3 nm,不同的是 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 的介孔尺寸为 2.6 nm,要比 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$ 与 0.2 wt% $PtFe_{50}/SiO_2$ 的介孔尺寸(位于 6~9 nm 处)都小。



a.N_2 等温吸脱附曲线;b.BJH 孔径分布

图 5　不同催化剂的 N_2 等温吸脱附曲线与孔径分布

Fig.5　N_2 isothermal adsorption-desorption curves and pore size distribution of different catalysts

2.2　炔烃的选择性加氢催化性能

2.2.1　反应活性

以苯乙炔选择性加氢生成苯乙烯(styrene, ST)为模型反应考察各催化剂的性能。具体反应条件如下:1 mmol 苯乙炔、1 MPa H_2、2 mL DMF 作为溶剂,催化剂用量分别为 50 mg 负载量为 0.2 wt%的 Pt 催化剂或 10 mg 的 1.0 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2,反应温度为 30 ℃,转速为 700 r/min,反应时间根据转化率确定。

首先考察了铂负载量为 0.2 wt%时,不同载体对加氢活性与选择性的影响,结果如表 1 所示。0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 在 98.7%的转化率时,反应速率达到了 585 $mol_{ST}/(mol_{Pt}\cdot h)$,且选择性高达 91.2%,其反应速率亦或者是选择性都比 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$ 及 0.2 wt% $PtFe_{50}/SiO_2$ 高,显现出了 Al_2O_3-SiO_2 混合氧化物载体的优越性。0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 转化率与选择性随反应时间的变化曲线如图 6 所示,苯乙炔的转化率随着反应时间延长稳步提升,与此同时,苯乙烯的选择性并未出现明显的下降,可归因于 Pt 单原子具有组成均一的活性位点[27]。在苯乙炔加氢的铂系催化剂中,0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 的反应速率处于中等水平,但是该催化剂对苯乙烯的选择性较高(表 2)。

表 1　负载于不同载体上的催化性能

Tab.1　Catalytic performance of supported on different supports

催化剂	选择性/%	反应速率/($mol_{ST}\cdot mol_{Pt}^{-1}\cdot h^{-1}$)
0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-Si O_2	91.2	585
0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$	88.4	397
0.2 wt% $PtFe_{50}/SiO_2$	79.2	446

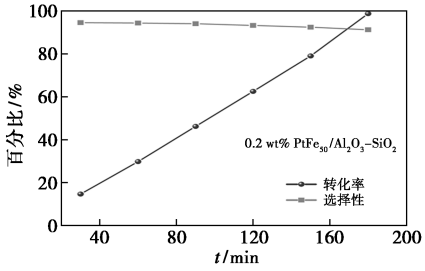


图 6　苯乙炔加氢转化率与选择性随反应时间的变化曲线

Fig.6　Variation curve of phenylacetylene hydrogenation conversion and selectivity with reaction duration

表 2　苯乙炔选择性加氢的铂系催化剂性能比较[注]

Tab.2　Comparison of performance over various Pt catalysts for the phenylacetylene hydrogenation reaction

催化剂	选择性/%	反应速率/($mol_{ST}\cdot mol_{Pt}^{-1}\cdot h^{-1}$)
0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2	91.2	585[1)]
Pt@ X-zeolite[8]	83.0	295.6[2)]
Pt@ HPSNs[28]	81.0	1 057[2)]
Pt@ $mTiO_2$[29]	80.3	98[2)]
Pt/TiO_2-400[30]	81.7	763
$Pt/PSiO_2$[31]	87.5	396

注:1)本工作;2)按表面铂含量计算。

随后探究了 0.2 wt% $PtFe_x/Al_2O_3$-SiO_2 催化剂中 Fe 的掺杂量对催化性能的影响,当 Pt 与 Fe 原子比分别为 1∶25、1∶50、1∶75 及不掺杂铁时,结果见表 3 所示。测试结果表明,当 Pt 与 Fe 原子比为 1∶50 时,催化剂具有最佳的催化性能,并且 Fe 的加入能显著提高苯乙烯的选择性。以上实验结果表明,Fe 的掺杂对 Pt 具有调控作用,但 Fe 过少时,活性的提升并不明显,而过多的 Fe 又可能会掩盖 Pt 的活性位点,造成反应速率减缓。所以在对惰性载体掺杂改性时,需要精确调控掺杂金属的含量,在本催化体系中,最佳的 Pt∶Fe 物质的量比例为1∶50。

表 3 不同 Fe 掺杂量的催化性能[注]

Tab.3 Catalytic performance of different Fe doping amounts

催化剂	选择性/%	反应速率/($mol_{ST}\cdot mol_{Pt}^{-1}\cdot h^{-1}$)
0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2	91.2	585
0.2 wt% Pt/Al_2O_3-SiO_2	84.5	407
0.2 wt% $PtFe_{25}/Al_2O_3$-SiO_2	90.0	449
0.2 wt% $PtFe_{75}/Al_2O_3$-SiO_2	92.1	404

注:反应条件:1 mmol 苯乙炔、1 MPa H_2、2 mL DMF、50 mg 催化剂、30 ℃。

最后,对不同 Pt 含量的 $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 的催化性能进行了研究,结果见表 4。以 Pt 单原子形态存在的 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 催化剂展现出了比 1.0 wt%催化剂更佳的催化性能。当 Pt 含量从 0.2 wt%提高至 1.0 wt%时,苯乙烯的选择性降低至 87.2%,与表 3 中的 0.2 wt% Pt/Al_2O_3-SiO_2 及表 1 中的 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$ 接近。随着 Pt 含量从 0.2 wt%提高到 1.0 wt%,活性位点由单原子转化成了纳米颗粒,导致了选择性的下降;进一步证明了均一的 Pt 单原子活性位点是高选择性的决定因素。

表 4 不同 Pt 负载量的催化性能[注]

Tab.4 Catalytic performance of different Pt loadings

催化剂	选择性/%	反应速率/($mol_{ST}\cdot mol_{Pt}^{-1}\cdot h^{-1}$)
0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2	91.2	585
1.0 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2	87.2	423

注:反应条件:1 mmol 苯乙炔、1 MPa H_2、2 mL DMF、0.1 mg Pt、30 ℃。

2.2.2 催化剂的稳定性

0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 的稳定性测试结果如图 7 所示,在经历了 5 次循环后,该催化剂对苯乙炔的转化率没有显著下降,而选择性则稳定在 91%左右。通过 ICP-MS 测定了循环后回收的催化剂,其中 Pt 含量仍为 0.2 wt%。这些结果说明了催化剂具有良好的稳定性,在反应过程中 Pt 被牢牢的锚定在载体上,没有观察到明显的团聚或流失。

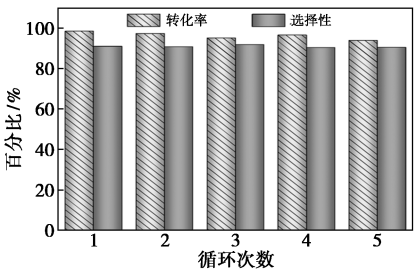


图 7 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 循环测试

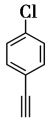
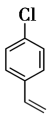
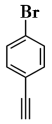
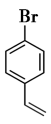
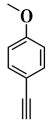
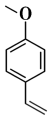
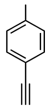
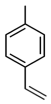
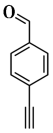
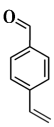
Fig.7 Recycling test of 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2

2.2.3 底物拓展

为了考察 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 单原子催化剂对于底物的普适性,研究了包括对位取代的苯乙炔衍生物、一种直链炔烃及一种带羟基的脂肪炔的加氢性能。从表 5 中的结果可以看出,该催化剂对于主产物的选择性都在 84%以上,而当苯环上存在吸电子基团即卤素原子或醛基时,反应速率与选择性相较苯乙炔有所下降,其中(4-溴苯基)炔在 30 ℃时没有转化,需将温度提高到 50 ℃。与之相反,当苯环上存在供电子基团,如甲基或甲氧基时,反应速率增大,且选择性与苯乙炔相当;而当催化直链炔烃加氢时,选择性略有下降,这也与先前的文献报道相符[32,33]。总之,卤素、醛基、甲氧基和醇羟基等官能团在该反应体系中都能被很好的保留,为这一类苯乙烯衍生物在有机合成中的进一步转化提供了潜在的反应位点。

表 5 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 对于不同炔烃底物的选择性加氢性能[注]

Tab.5 Selective hydrogenation of 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 for different alkyne substrates

反应物	产物	选择性/%	反应速率/($mol_{产物}\cdot mol_{Pt}^{-1}\cdot h^{-1}$)
		90.2	549
		84.4	1 072[1)]
		91.5	688
		92.0	852
		86.3	390
		84.1	541
		87.7	588

注:反应条件:1 mmol 苯乙炔、1 MPa H_2、2 mL DMF、50 mg 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2、30 ℃;1)50 ℃。

3　结论

本文以一种简便的溶胶-凝胶法制备了 0.2 wt% $PtFe_{50}/Al_2O_3$-SiO_2 单原子催化剂,发现在苯乙炔选择性加氢反应中,单原子催化剂的性能远高于纳米催化剂,在 30 ℃的温和条件下速率高达 585 $mol_{ST}/(mol_{Pt}\cdot h)$,苯乙烯的选择性为 91.2%,且具有极佳的底物适用性和循环稳定性,证明了惰性载体的掺杂改性是实现单原子催化剂可控合成的有效策略。

参考文献:

[1]LI Z,HU M,LIU B,et al.Pd-Zn alloy nanoparticles encapsulated into mesoporous silica with confinement effect for highly selective semi-hydrogenation of phenylacetylene [J].*ChemCatChem*,2020,**13**(**3**):868-873.

[2]ZHAO L,QIN X,ZHANG X,et al.A magnetically separable Pd single-atom catalyst for efficient selective hydrogenation of phenylacetylene [J]. *Adv. Mater.*, 2022, **34**(**20**):2 110 455-2 110 462.

[3]DENG D,YANG Y,GONG Y,et al.Palladium nanoparticles supported on mpg-C_3N_4 as active catalyst for semi-hydrogenation of phenylacetylene under mild conditions [J].*Green Chem.*,2013,**15**(**9**):2 525-2 531.

[4]LI X,SONG L,GAO D,et al.Tandem catalysis of ammonia borane dehydrogenation and phenylacetylene hydrogenation catalyzed by CeO_2 nanotube/Pd@ MIL-53(Al) [J].*Chem.Eur.J.*,2020,**26**(**19**):4 419-4 424.

[5]MARKOV P V,MASHKOVSKY I S,BRAGINA G O,et al. Particle size effect in liquid-phase hydrogenation of phenylacetylene over Pd catalysts:Experimental data and theoretical analysis [J]. *Chem. Eng. J.*, 2019, **358**: 520-530.

[6]AKHMEDOV V,ALIYEV A,BAHMANOV M,et al. Kinetics of phenylacetylene selective hydrogenation to styrene over metal-free polymeric carbon nitrides[J].*Appl. Catal.*,*A*,2018,**565**:13-19.

[7]WANG Z,WANG H,SHI Y,et al.CuPd alloy decorated $SnNb_2O_6$ nanosheets as a multifunctional photocatalyst for semihydrogenation of phenylacetylene under visible light [J].*Chem.Eng.J.*,2022,**429**:132 018-132 025.

[8]ZHANG Z,LIU G,DING L,et al.Promotion effect of the X-Zeolite host on encapsulated platinum clusters for selective hydrogenation of phenylacetylene to styrene[J]. *Inorg.Chem.*,2021,**60**(**24**):19 120-19 127.

[9]WANG J,WANG M,LI X,et al.Bidentate ligand modification strategy on supported Ni nanoparticles for photocatalytic selective hydrogenation of alkynes[J].*Appl.Catal.*,*B*,2022,**313**:121 449-121 459.

[10]ZHOU Y,XI W,XIE Z,et al.High-loading Pt single-atom catalyst on CeO_2-modified diatomite support [J]. *Chem.Asian J.*,2021,**16**(**18**):2 622-2 625.

[11]于志勇,余小龙,华达银,等.Pt/WO_{3-x}纳米催化剂的制备及其性能研究[J].化学试剂,2018,**40**(**5**):422-424;448.

[12]张瀚,王磊,胡广林,等.Pd/CNTs 金属纳米催化剂的制备及其催化对氯硝基苯加氢性能[J].化学试剂,2017,**39**(**11**):1 142-1 145.

[13]LI Z,HU M,LIU J,et al.Mesoporous silica stabilized MOF nanoreactor for highly selective semi-hydrogenation of phenylacetylene via synergistic effect of Pd and Ru single site[J].*Nano Res.*,2022,**15**(**3**):1 983-1 992.

[14]SHAO L,HUANG X,TESCHNER D,et al.Gold supported on graphene oxide:An active and selective catalyst for phenylacetylene hydrogenations at low temperatures [J].*ACS Catal.*,2014,**4**(**7**):2 369-2 373.

[15]PISCHETOLA C,FRANCIS S M,GRILLO F,et al.Phenylacetylene hydrogenation coupled with benzyl alcohol dehydrogenation over Cu/CeO_2:A consideration of Cu oxidation state[J].*J.Catal.*,2021,**394**:316-331.

[16]XIA L,LI D,LONG J,et al.N-doped graphene confined Pt nanoparticles for efficient semi-hydrogenation of phenylacetylene[J].*Carbon*,2019,**145**:47-52.

[17]杨守宁,万佳,邓宝娟,等.单原子催化剂的制备与表征[J].化学试剂,2019,**41**(**12**):1 254-1 259.

[18]ZHANG Z,ZHU Y,ASAKURA H,et al.Thermally stable single atom $Pt/m\text{-}Al_2O_3$ for selective hydrogenation and CO oxidation[J].*Nat. Commun.*, 2017, **8**(**1**): 16 100-16 109.

[19]李晓怡,朝飞,麦悦贤,等.Cu-N/C 单原子催化剂用于芳基硼酸羟基化反应[J].化学试剂,2022,**44**(**2**):233-238.

[20]YU W, XIN Z, NIU S, et al. Nanosized palladium on phosphorus-incorporated porous carbon frameworks for enhanced selective phenylacetylene hydrogenation[J]. *Catal.Sci.Technol.*,2017,**7**(**21**):4 934-4 939.

[21]GAO X P,ZHOU Y A,JING F L,et al.Layered double hydroxides derived $ZnO\text{-}Al_2O_3$ supported Pd-Ag catalysts for selective hydrogenation of acetylene[J].*Chin.J.Chem.*,2017,**35**(**6**):1 009-1 015.

[22]LAN X,WANG T,LI X,et al.Pt@ SnO_x/SiO_2 catalysts with enhanced selectivity to allyl alcohol for acrolein hydrogenation[J].*Catal.Sci.Technol.*,2016,**6**(**21**):7 703-7 707.

[23] LOMATE S, SULTANA A, FUJITANI T. Effect of SiO_2 support properties on the performance of Cu-SiO_2 catalysts for the hydrogenation of levulinic acid to gamma valerolactone using formic acid as a hydrogen source [J]. *Catal. Sci. Technol.*, 2017, **7**(**14**): 3 073-3 083.

[24] LANG R, XI W, LIU J C, et al. Non defect-stabilized thermally stable single-atom catalyst [J]. *Nat. Commun.*, 2019, **10**(**1**): 234-243.

[25] QI L, DAS S, ZHANG Y, et al. Ethene hydroformylation catalyzed by Rhodium dispersed with zinc or Cobalt in silanol nests of dealuminated Zeolite beta [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2023, **145**(**5**): 2 911-2 929.

[26] ZHOU H, YANG X, LI L, et al. PdZn intermetallic nanostructure with Pd-Zn-Pd ensembles for highly active and chemoselective semi-hydrogenation of acetylene [J]. *ACS Catal.*, 2016, **6**(**2**): 1 054-1 061.

[27] WANG Y, ARANDIYAN H, SCOTT J, et al. Single atom and nanoclustered Pt catalysts for selective CO_2 reduction [J]. *ACS Appl. Energy Mater.*, 2018, **1**(**12**): 6 781-6 789.

[28] XU C, LI K, YU H, et al. Pt nanoparticles confined in hollow silica nanoreactors as highly efficient catalysts for semihydrogenations of alkynes at atmospheric H_2 pressure [J]. *J. Colloid Interface Sci.*, 2023, **630**: 334-342.

[29] HU M, JIN L, DANG Y, et al. Supported Pt nanoparticles on mesoporous titania for selective hydrogenation of phenylacetylene [J]. *Front. Chem.*, 2020, **8**: 581 512-581 520.

[30] ZHANG X, LI Z, PEI W, et al. Crystal-phase-mediated restructuring of Pt on TiO_2 with tunable reactivity: Redispersion versus reshaping [J]. *ACS Catal.*, 2022, **12**(**6**): 3 634-3 643.

[31] JAYAKUMAR S, MODAK A, GUO M, et al. Ultrasmall platinum stabilized on triphenylphosphine-modified silica for chemoselective hydrogenation [J]. *Chem. Eur. J.*, 2017, **23**(**32**): 7 791-7 797.

[32] DRELINKIEWICZ A, SOBCZAK J W, SOBCZAK E, et al. Physicochemical and catalytic properties of Pt-poly (4-vinylpyridine) composites [J]. *Mater. Chem. Phys.*, 2009, **114**(**2**): 763-773.

[33] YANG X, XING C, ZHANG B, et al. Direct bonding of CpCo-fragments on Pt nanoparticles and their electronic effect for alkyne semihydrogenation [J]. *ACS Catal.*, 2022, **12**(**17**): 10 849-10 856.

无定型碳/g-C_3N_4 制备及其光催化降解四环素性能

陈建军*,周诗园,黄雨晨,尤红歌,郑添祥,柴柳青,赵文伯
(郑州师范学院 化学化工学院,河南 郑州　450044)

摘要:以葡萄糖和尿素为原料,通过高温煅烧的方法制备出无定形碳/g-C_3N_4(C/g-C_3N_4)复合材料,并对无定型碳的含量进行调控。采用 XRD、FT-IR、XPS、TEM、UV-Vis 和光电流测试对样品的结构、形貌和光电性能进行分析。结果表明,与相同条件下制备的 g-C_3N_4 相比,C/g-C_3N_4 复合材料具有更强的光吸收性能和光生电子-空穴分离效率。通过可见光下降解四环素对复合材料的催化性能和稳定性进行评价。结果发现:0.05% C/g-C_3N_4 表现出最佳的光催化效率,其对四环素的降解速率为 0.059 46 min^{-1},为 g-C_3N_4(0.011 84 min^{-1})的 5 倍。经过 5 个循环实验后,复合材料的降解率没有出现明显的下降。

关键词:g-C_3N_4;无定型碳;可见光催化;四环素;复合材料
中图分类号:O614.1　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0258-3283(2023)07-0107-06
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0098

Preparation of Amorphous Carbon/g-C_3N_4 and Its Photocatalytic Degradation of Tetracycline *CHEN Jian-jun**, *ZHOU Shi-yuan*, *HUANG Yu-chen*, *YOU Hong-ge*, *ZHENG Tian-xiang*, *CHAI Liu-Qing*, *ZHAO Wen-bo* (School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044, China)

Abstract: The amorphous carbon/g-C_3N_4 composite was prepared by calcination of glucose and urea at high temperature, and the content of amorphous carbon was regulated. The structure, morphology and photoelectric properties of the samples were analyzed by XRD, FT-IR, XPS, TEM, UV-Vis and photocurrent. The results showed that, compared with g-C_3N_4, amorphous C/g-C_3N_4 composite had stronger light absorption performance and electron-hole separation efficiency. The catalytic performance and stability of the composite were evaluated by the degradation of tetracycline under visible light. The results showed that 0.05% C/g-C_3N_4 had the best photocatalytic efficiency. The degradation rate of 0.05% C/g-C_3N_4 was 0.059 46 min^{-1}, which was five time as that of g-C_3N_4 (0.011 84 min^{-1}). After 5 cycles, the degradation rate of composites did not change significantly.

Key words: g-C_3N_4; amorphous carbon; visible light catalysis; tetracycline; composite material

自青霉素问世后,抗生素的应用进入了“黄金时期”,最常用的一类抗生素——四环素,人体肠胃很难将其完全吸收,一部分会以化合物的形式被人体排出到自然环境当中。由于四环素的稳定性高,其在自然界中难以被分解,对生态环境造成了不可估量的危害[1-3],因此迫切需要找到一种方法来解决这个问题。半导体光催化技术,能够利用太阳能将污染物转化为无害物质,是解决这个问题的有效途径。近半个世纪以来,对半导体光催化剂研究已经取得了一些重要的成果[4-6]。但是,其光催化效率还不能满足现实的要求。因此,开发新型高效的光催化剂成为了当前研究的热点。

近年来,非金属半导体光催化剂,尤其是具有二维层状结构的 g-C_3N_4,因具有能吸收可见光、成本低、稳定性好等优点,受到研究者极大的关注[7-9]。然而,g-C_3N_4 中相邻的共轭平面是通过弱范德华力相互作用堆积而成,不利于光生载流子的分离。为了进一步提高其光催化性能,研究人员将 g-C_3N_4 与各种碳质材料,如有序介孔碳[10]、碳纳米管[11]、富勒烯[12]、石墨烯[13]和碳量子点[14,15]进行复合,并对其性能进行研究。结果表明:将 g-C_3N_4 与碳质材料进行结合不仅能改善其光吸收性能,还有利于促进光生载流子的分离,

收稿日期:2023-02-16;**网络首发日期**:2023-04-20
基金项目:河南省高等学校重点科研项目(22B430032);河南省科技攻关项目(212102310513);郑州师范学院大学生创新性实验计划项目(DCZ2022014)。
作者简介:陈建军(1982-),男,河南长葛人,博士,讲师,主要研究方向为光催化功能材料的制备,E-mail:jianjunch82612@163.com。
引用本文:陈建军,周诗园,黄雨晨,等.无定型碳/g-C_3N_4 制备及其光催化降解四环素性能[J].化学试剂,2023,**45**(7):107-112。

进而改善了其光催化活性。但是合成这些碳质材料所需原料昂贵、步骤复杂。研究发现无定型炭材料具有成本低廉、易与制备等特点,然而将无定型碳和 g-C_3N_4 相结合,并用于降解四环素的研究还未报道。

基于此,以尿素和葡萄糖为原料,采用一步高温煅烧的方法制备 C/g-C_3N_4 复合材料。通过调节葡萄糖的比例,改变复合物中无定型碳含量。对复合材料的可见光催化降解四环素性能进行研究,并初步探讨其催化反应机理。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

SSWH 型电子分析天平(常州市奥豪斯仪器有限公司);ECF1-6-14 型高温电炉(上海广益高温技术实业有限公司);TG16-WS 型高速台式离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);PLS 型氙灯光源(北京泊菲莱科技有限公司);Uitima Ⅳ型 X-射线衍射仪(日本理学株式会社);Cary-5000 型紫外-可见分光光度仪、FTIR-2000 型傅里叶变换红外光谱仪(安捷伦科技中国有限公司);Thermo ESCALAB 250XI 型 X 射线光电子能谱仪(美国赛默飞世尔科技公司);Tecnai G2 20 透射电子显微镜(美国 FEI 公司);、CHI-600E 型电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)。

尿素($CO(NH_2)_2$)、葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)、四环素($C_{22}H_{24}N_2O_8$)(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 光催化剂的制备

准确称取 10.0 g 尿素和一定质量的葡萄糖放入研钵中,研磨至粉末状,使其充分混合。接着将其转移到坩埚当中,盖严盖子后放置于高温电炉。以 5 ℃/min 升温至 500 ℃,在 500 ℃下保温 2 h,得到 C/g-C_3N_4 复合材料。葡萄糖和尿素的质量比分别为 0%、0.02%、0.05%、0.10%、0.20%[16],所得样品依次标记为 g-C_3N_4、0.02% C/g-C_3N_4、0.05% C/g-C_3N_4、0.10% C/g-C_3N_4 和 0.20% C/g-C_3N_4。

1.2.2 可见光催化降解四环素性能

将四环素作为目标降解物,首先取 10 mL(20 mg/L)四环素溶液于离心管当中,作为第一个样品。接着将 100 mL(20 mg/L)的四环素溶液转移至反应器当中,加入 20 mg 催化剂,暗反应 30 min,使得样品和四环素完成吸附解离平衡,然后取样 10 mL 于离心管中。暗反应完成后,打开冷凝水,打开氙灯,用 420 nm 的滤光片获取可见光。每隔 5 min 取一次样(10 mL)于离心管中,共取样 4 次,所有样品置于避光处保存。将得到的 6 个样品按照取样的先后顺序进行编号,离心 10 min 后取其上清液,在 360 nm 处测其吸光度,根据朗伯比尔定律 $A=\varepsilon bc$ 计算其降解率,其中摩尔吸收系数 ε 为 1.38×10^4 L/(mol·cm)。

1.2.3 电化学性能测试

以 Na_2SO_4 为电解质溶液,将氙灯作为光源,用电化学工作站对样品进行光电流、阻抗和模特-肖特基测试,在进行光电流曲线测试时以 200 s 为一次检测,在此区间内 10 s 暗反应、10 s 光反应交替进行测试。

2 结果与讨论

2.1 XRD 结果分析

采用 X-射线衍射仪对无定型碳、g-C_3N_4 和复合物的物相结构进行分析,结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出,无定形碳有一个宽的衍射峰,这是无定形碳的典型特征[17]。g-C_3N_4 和 C/g-C_3N_4 在 27.06°处有明显的衍射峰,为共轭芳香体系层与层间周期性叠加形成的。13.19°处形成的衍射峰为三-S-三嗪环结构,上述的两个峰分别对应于石墨相氮化碳的(100)和(002)晶面。另外从图中可以看出,与 g-C_3N_4 相比,复合物的衍射峰位置并没有发生变化,表明无定型碳没有掺杂到 g-C_3N_4 内部,而是以复合的形式和 g-C_3N_4 进行了结合。

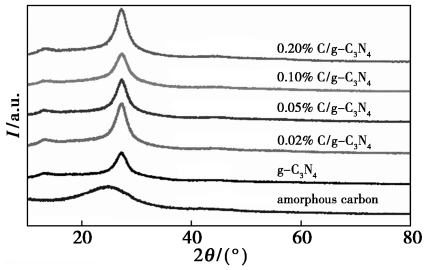


图 1 样品的 XRD 图

Fig.1 XRD patterns of samples

2.2 FT-IR 结果分析

采用 FT-IR 对样品官能团结构进行进一步分析,结果如图 2 所示,所有样品在 816 cm^{-1}处有一个强吸收峰,是由三-S-三嗪环结构的弯曲振动所产生。在 1 630、1 437、1 329 和 1 252 cm^{-1}处出现

的一系列吸收峰为 C═N 结构的骨架振动。此外在 3 181 cm^{-1}处出现一个强度较大的宽峰,为 N—H 键或 O—H 键的伸缩振动,其出现的原因是未缩合的氨基吸附表面 H_2O 而分子形成的。另外从图中可以看出,复合物与 g-C_3N_4 的特征吸收峰位置未有明显的差异,表明无定形碳的引入没有改变 g-C_3N_4 的骨架结构。

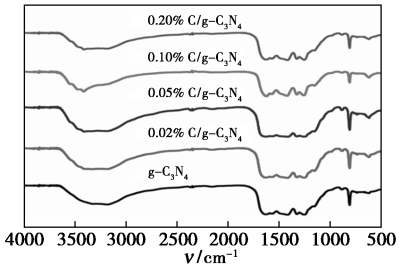
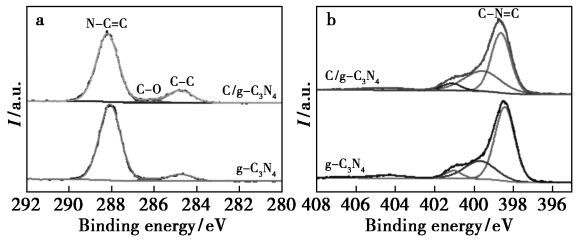


图 2　样品的 FT-IR 图

Fig.2　FT-IR spectra of samples

2.3　XPS 结果分析

为研究 g-C_3N_4 与复合材料的化学组成及键合特性,对其进行了 XPS 分析,结果如图 3 所示。图 3a 为 C 1s 的高分辨谱图,从图中可以看出样品在 288 与 285 eV 处有两个峰,分别对应芳香结构中 N—C═N 杂化的碳和石墨 C—C 键,在 286 eV 处有一个很小的峰,为煅烧过程中残留的 C—O 键。图 3b 为 N 1s 的高分辨谱图,在 398、399 和 401 eV 处有 3 个峰,这 3 个峰对应于 N 3 种形态:sp^2 杂化芳香 N(C—N═C)、叔 N 与 C 原子结合成键(N—$(C)_3$)以及氨基与 C 原子结合成键(NH_2—C)。从表 1 中可以看出,与 g-C_3N_4 中的 C/N 原子百分比(0.75)相比,0.05% C/g-C_3N_4 中 C/N 比(0.84)有了提高,进一步证明了无定型碳和 g-C_3N_4 实现了复合,与 XRD 和 FT-IR 分析结果相一致。



a.C 1S 图;b.N 1S 图

图 3　g-C_3N_4 和 0.05% C/g-C_3N_4 的 XPS 图谱

Fig.3　XPS spectra of g-C_3N_4 和 0.05% C/g-C_3N_4

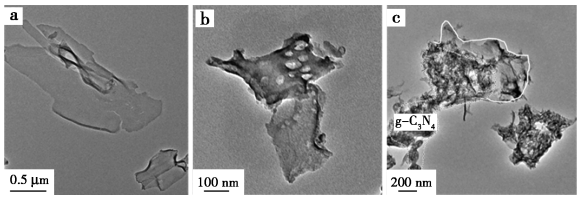
表 1　g-C_3N_4 和 0.05% C/g-C_3N_4 中的 C/N 原子比

Tab.1　C/N atomic ratio of g-C_3N_4 and 0.05% C/g-C_3N_4

Samples	C/%	N/%	C/N
g-C_3N_4	42.77	57.23	0.75
0.05% C/g-C_3N_4	45.58	54.42	0.84

2.4　微观结构分析

通过透射电镜分别对无定形碳、g-C_3N_4 和 C/g-C_3N_4 复合材料的形貌进行分析,结果如图 4 所示。其中无定型碳为片状结构,如图 4a 所示。图 4b 为 g-C_3N_4 的透射电镜图,从图中可看到 g-C_3N_4 具有多孔片状结构,这些孔是在加热过程中尿素分解产生的气体诱导形成的。图 4c 为 0.05% C/g-C_3N_4 的透射电镜图,与 g-C_3N_4 片状结构相比,0.05% C/g-C_3N_4 呈现出重叠层,表明通过高温煅烧的方法成功的实现了无定形碳与 g-C_3N_4 的复合。



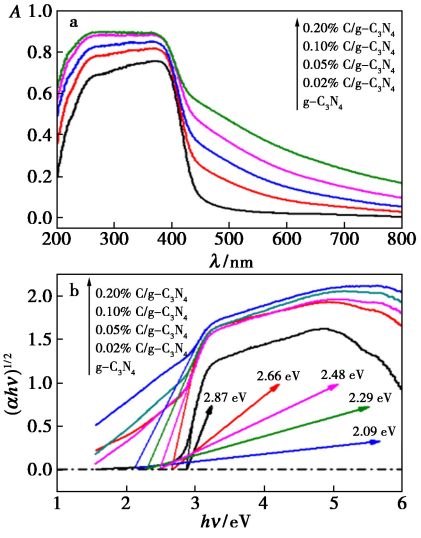
a.无定形碳;b.g-C_3N_4;c.0.05% C/g-C_3N_4

图 4　样品的透射电镜图

Fig.4　TEM images of samples

2.5　光吸收性能分析

材料的光吸收性能是影响光催化性能的一个重要因素,为研究样品的光吸收性能,对 g-C_3N_4 与复合物的 UV-Vis 漫反射光谱进行分析,结果如图 5 所示。从图 5a 中可以看出,所有样品在可见光区都有吸收。与 g-C_3N_4 相比,复合物 C/g-C_3N_4



a.UV-Vis 漫反射光谱;b.带隙图

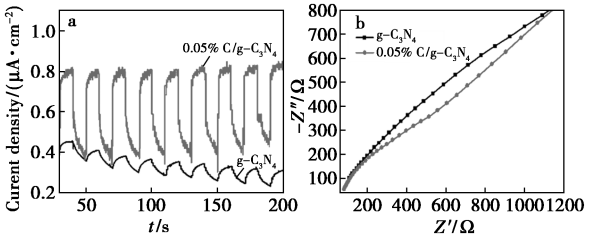
图 5　样品的光吸收性能

Fig.5　Light absorption properties of samples

的光吸收强度都有不同程度的增强。图 5b 为样品的带隙图,与 g-C_3N_4 带隙相比(2.87 eV),复合物的 C/g-C_3N_4 带隙宽度变窄,光吸收范围变宽。综上可知,无定形碳的引入使得复合材料的光吸收性能得到了显著提高,可以捕捉更多的可见光从而产生更多的光生载流子,有望呈现出更好的光催化性能。

2.6 光电化学分析

利用光电流测试对 g-C_3N_4 和 0.05% C/g-C_3N_4 的光生电子与空穴分离效果进行评价,光电流密度越高,光生电子与空穴分离效果越好。从图 6a 可以看出,与 g-C_3N_4 相比,0.05% C/g-C_3N_4 光电流强度得到明显增强,更有利于光生载流子的分离。图 6b 为材料的阻抗图,从图中可看出 C/g-C_3N_4 的弧度半径比 g-C_3N_4 要小,圆弧半径越小表明其电子越容易扩散,电子和空穴不易复合,与光电流测试结果相一致。



a.*I-t* 曲线图;b.阻抗图

图 6 样品的光电化学分析

Fig.6 Photochemical analysis of samples

2.7 光催化降解四环素性能分析

通过在可见光下降解四环素对样品的光催化性能进行分析,结果如图 7 所示。在没有任何光催化剂的情况下,四环素的光解作用可以忽略不计。与 g-C_3N_4 相比(22.12%),可见光照射 20 min 后,复合材料对四环素的降解率都得到了明显提高,其中 0.05% C/g-C_3N_4 呈现最优的降解率,达到了 70.95%。当污染物的浓度较低时候,光催化降解满足一级动力学模型[18]:

$$\ln(c_0/c) = kt \quad (1)$$

式中,c_0 是开灯开始时四环素的浓度,mol/L;k 是表观速率常数,min^{-1};c 为经过时间 t 照射后四环素的浓度,mol/L。

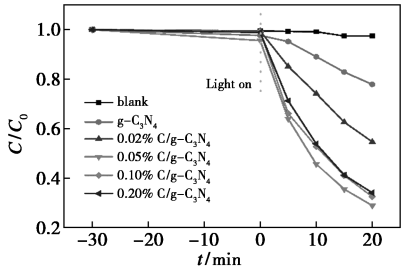


图 7 催化剂在可见光下对四环素的光降解曲线

Fig.7 Degradation curve of tetracycline by catalysts under visible light

按照此模型进行线性拟合如图 8 所示,由拟合曲线可知空白、g-C_3N_4、0.02% C/g-C_3N_4、0.05% C/g-C_3N_4、0.1% C/g-C_3N_4、0.2% C/g-C_3N_4 的表观速率常数分别为:0.001 18、0.011 84、0.030 06、0.059 46、0.054 08、0.053 40 min^{-1}。其中 0.05%的 C/g-C_3N_4 样品的表观速率常数最大,为 g-C_3N_4 的 5 倍。基于以上分析可知,在复合无定形碳之后,g-C_3N_4 的光催化降解率和降解速率都得到了很大的提升,这主要是由于无定形碳的引入不仅增强了其光吸收能力,还促进原本均匀分布在三-S-三嗪环中的电子和空穴进行空间分离,使得光生载流子复合率降低,进而能为光催化反应提供更多的活性中心。

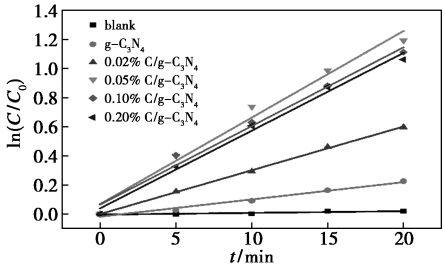


图 8 动力学线性拟合图

Fig.8 Corresponding kinetics linear fittings

催化剂的稳定性是评估其性能的重要指标,因此通过循环降解四环素实验对 0.05% C/g-C_3N_4 稳定性进行评估,结果如图 9 所示,0.05% C/g-C_3N_4 循环使用 5 次后,其对四环素 TE 的降解率没有明显的下降,表面催化剂具有良好的稳定性。

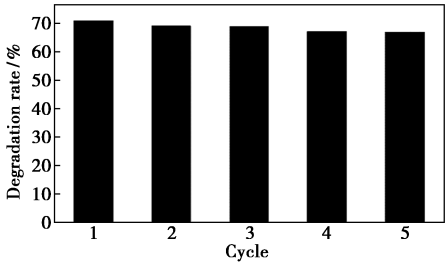


图 9 0.05% C/g-C_3N_4 可见光降解四环素的循环实验

Fig.9 Recycling testing of 0.05% C/g-C_3N_4 for degrading TE under visible light

2.8 光催化机理分析

图 10 为 g-C_3N_4 的莫特-肖特基曲线,由图可

知 g-C_3N_4 的导带电位为-0.59 eV,根据图 5 所得的禁带宽度可求得 g-C_3N_4 价带电位为 2.28 eV。由此可知,g-C_3N_4 具有较强的氧化性,可以用于高效的降解污染物。

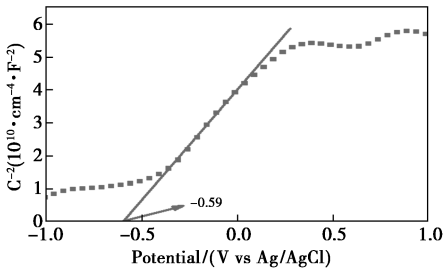


图 10　g-C_3N_4 的莫特-肖特基曲线图

Fig.10　Mott-Schottky plots of g-C_3N_4

为了研究光催化机理,采用对苯醌(BQ,2 mmol/L)、叔丁醇(t-BuOH,15 mL)、乙二胺四乙酸(EDTA,2 mmol/L)分别作为超氧自由基($\cdot O_2^-$)、羟基自由基($\cdot$OH)和空穴(h^+)的猝灭剂,以确定复合物光催化降解四环素过程中的活性物种,结果如图 11 所示。添加猝灭剂后,0.05% C/g-C_3N_4 对四环素的降解效果均有下降,其中 EDTA 的捕获效果最好,对苯醌次之,叔丁醇最弱。表明空穴和$\cdot O_2^-$是光催化降解反应中最重要的活性物种,$\cdot$OH 对该光催化过程影响很小。根据以上结果,给出了 C/g-C_3N_4 光催化机理图,如图 12 所示,g-C_3N_4 价带上电子吸收可见光后跃迁到导带上,价带上形成了空穴,空穴具有很强的氧化性,可以把四环素氧化。g-C_3N_4 导带上电子则转移到活性炭表面,与氧气结合生成强氧化性的活性基团,也能高效的降解四环素。另外从图 7、8 中可以看出,C/g-C_3N_4 的降解率和反应速率随着无定型碳含量的增加呈现出先增加后降低的趋势,这是由于过多的无定型碳会成为电子和空穴复合的场所,导致活性基团的减少。

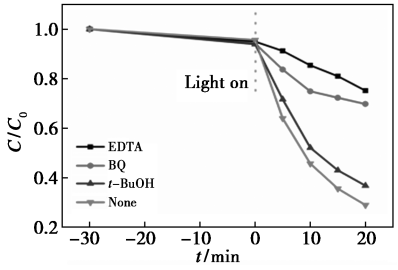


图 11　不同猝灭剂对 0.05% C/g-C_3N_4 降解四环素的影响

Fig.11　Effect of different scavengers on tetracycline degradation by 0.05% C/g-C_3N_4

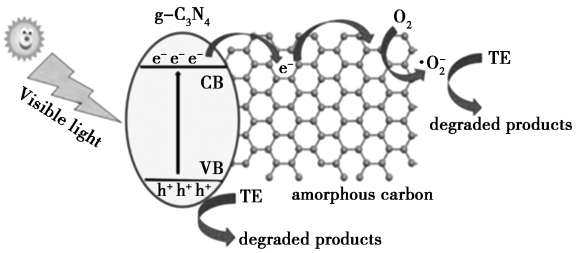


图 12　光催化机理图

Fig.12　Diagram of photocatalytic mechanism

3　结论

以葡萄糖和尿素为原料,通过高温聚合的方法制备出无定形碳/g-C_3N_4 复合材料。其中无定型碳是以复合的形式和 g-C_3N_4 进行结合,无定形碳的引入不仅拓宽了对可见光的吸收范围,还促进了光生载流子的有效分离。可见光催化降解四环素结果表明:0.05% C/g-C_3N_4 呈现出最好的光催化效果,其可见光催化降解四环素反应速率为 0.059 46 min^{-1},是 g-C_3N_4 的 5 倍。该工作为新型复合材料的开发和应用提供了一种的新思路。

参考文献:

[1]程士,安芮,穆熙,等.水中四环素污染现状及其处理方法研究进展[J].山东化工,2016,**45**(**16**):44-47.

[2]陈建发,林诚,刘福权,等.臭氧预处理+絮凝沉淀+BAF 组合工艺在二级生化处理出水深度处理的应用[J].化工进展,2014,**6**:1 601-1 606.

[3]徐向月,马文瑾,安博宇,等.四环素类抗生素在环境中的风险评估研究进展[J].中国畜牧兽医,2020,**47**(**3**):948-957.

[4]KUDO A,MISEKI Y.Heterogeneous photocatalyst materials for water splitting[J].*Chem. Soc. Rev.*,2009,**38**(**1**):253-278.

[5]ZENG S,KAR P,THAKUR U K,et al.A review on photocatalytic CO_2 reduction using perovskite oxide nanomaterials[J].*Int. J. Nanotechnol.*,2018,**29**(**5**):052 001.

[6]SIN J C,LAM S M,MOHAMED A R,et al.Degrading endocrine disrupting chemicals from wastewater by photocatalysis: A review [J]. *Int. J. Photoenergy*, 2011, **2 012**(**1/2**):88-90.

[7]楚增勇,原博,颜廷楠.g-C_3N_4 光催化性能的研究进展[J].无机材料学报,2014,**8**:785-794.

[8]ZHU D D,ZHOU Q X.Nitrogen doped g-C_3N_4 with the extremely narrow band gap for excellent photocatalytic activities under visible light[J].*Appl. Catal. B*,2021,**281**:

1-11.

[9]艾兵,何海南,邓璇,等.Mn-P 共掺杂氮化碳的制备及其光催化性能研究[J].化学试剂,2022,**44**(**3**):408-414.

[10]SHI L, LIANG L, SUN J, et al. Remarkably enhanced photocatalytic activity of ordered mesoporous carbon/g-C_3N_4 composite photocatalysts under visible light[J]. *Dalton. Trans.*,2014,**43**:7 236-7 244.

[11]CHEN Y, LI J, HONG Z, et al. Origin of the enhanced visible light photocatalytic activity of CNT modified g-C_3N_4 for H_2 production[J]. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014,**16**:8 106-8 113.

[12]BAI X, WANG L, WANG Y, et al. Enhanced oxidation ability of g-C_3N_4 photocatalyst via C_{60} modification[J]. *Appl. Catal. B Environ.*,2014,**152/153**:262-270.

[13]LOW J, YU J, HO W. Graphene-based photocatalysts for CO_2 reduction to solar fuel[J]. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2015,**6**:4 244-4 251.

[14]LIU J, LIU Y, LIU N, et al., Metal-free efficient photocatalyst for stable visible water splitting via a two-electron pathway[J]. *Science*,2015,**347**:970-974.

[15]LI K, SU F, ZHANG W. Modification of g-C_3N_4 nanosheets by carbon quantum dots for highly efficient photocatalytic generation of hydrogen[J]. *Appl. Surf. Sci.*, 2016, **375**:10-117.

[16]XU Q L, CHENG B, YU J G. Making co-condensed amorphous carbon/g-C_3N_4 composites with improved visible-light photocatalytic H_2-production performance using Pt as cocatalyst[J]. *Carbon*,2017,**118**:241-249.

[17]OKAMURA M, TAKAGAKI A, HAYASHI S, et al. Acid-catalyzed reactions on flexible polycyclic aromatic carbon in amorphous carbon[J]. *Chem. Mater.*, 2006, **18**(**13**):3 039-3 045.

[18]YE S, WANG R, WU M Z, et al. A review on g-C_3N_4 for photocatalytic water splitting and CO_2 reduction[J]. *Appl. Surf. Sci.*,2015,**358**:15-27.

聚茜素红-羧基化多壁碳纳米管修饰电极测定花生壳中木犀草素的含量研究

司晓晶,杨澜,刘之进,张灵露,韩梅*
(上海商学院 食品系,上海　200235)

摘要:基于羧基化多壁碳纳米管(C-MWCNT),利用聚茜素红(PAR)的电催化特性在玻碳电极(GCE)上电聚合制备了PAR/C-MWCNT/GCE 电化学修饰电极,并对花生壳中木犀草素(Lut)的含量测定进行了方法建立和实际应用。采用SEM、XRD 对电极表面修饰剂的形貌和组成进行表征。通过循环伏安法和差分脉冲伏安法探究了 Lut 在电极上的电化学行为。结果表明,pH 8.5 的磷酸盐缓冲溶液中,Lut 在该修饰电极上的响应电流是裸电极的 3 倍,具有良好的分析性能,检测 Lut 的线性范围为 1~100 μmol/L,线性方程为 $y=0.372\ 28x-0.016\ 75$($R^2=0.993\ 3$)。该电极具有制备简单、选择性好和线性范围宽的特点,测得花生壳中 Lut 的含量为 8.514 μmol/L,加标回收率为 91%~98%,相对标准偏差为 2.62%。

关键词:木犀草素;茜素红;羧基化多壁碳纳米管;修饰电极;花生壳
中图分类号:O65　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0258-3283(2023)07-0113-06
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0074

Determination of Luteolin in Peanut Shell by Poly Alizarin Red-Carboxylated Multi-walled Carbon Nanotube Modified Electrode *SI Xiao-jing*, *YANG Lan*, *LIU Zhi-jin*, *ZHANG Ling-lu*, *HAN Mei** (The Department of Food, Shanghai Business School, Shanghai 200235, China)

Abstract: By taking advantage of the electrocatalytic property of poly alizarin red (PAR), a poly alizarin red (PAR)/carboxylated multi-walled carbon nanotube (C-MWCNT) modified glassy carbon electrode (GCE) was fabricated for the determination of luteolin (Lut) in peanut shell. The morphology and composition of the surface of modified electrode were characterized by SEM and XRD analyses. The electrochemical behavior of Lut on the modified electrode was explored by cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry. The results showed that the current of Lut on the modified electrode was three times as that of the bare electrode in the phosphate buffer solution with pH 8.5. Under optimized conditions, a good linear relationship ($y = 0.372\ 28x - 0.016\ 75$, $R^2 = 0.993\ 3$) was established with a concentration of Lut covering from 1 to 100 μmol/L. The PAR/C-MWCNT/GCE is easy to prepare, and the as-proposed method exhibits good selectivity and broad linear range for the detection of Lut. The PAR/C-MWCNT/GCE based assay was applied for the determination of Lut with the result was 8.514 μmol/L in peanut shells. The recoveries ranged from 91% to 98% with the relative standard deviation less than 2.62%.

Key words: luteolin; alizarin Red; carboxylated multi-walled carbon nanotube; modified electrode; peanut shel

木犀草素(Luteolin, Lut)以 2-苯基色原酮为基本母核,是一类重要的黄酮物质,在自然界分布普遍,全叶青兰、辣椒、野菊花、金银花、紫苏、刺槐等纯天然药物中,以及芹菜、甜椒、红辣子、花生等蔬菜水果中均有 Lut,多以多糖甙形式存在,具有一定的药用价值,主要表现在抗菌、耐炎、抗过敏性、抗氧化物、防止癌症等方面[1-3]。而且,Lut 对金黄色葡萄球菌、肠道埃希菌等产生了较好的抗菌效应,对急性痛风性关节炎的炎症反应有明显减轻作用[4]。因此,近年来对 Lut 制剂的开发研究逐渐增多,不仅可以提高 Lut 的生物利用度,还可促进中药现代化制剂研究的发展。此外,Lut 在功能保健食品的开发中很有前景,目前市面上已有针对老年人群的 Lut 胶囊,具有平衡酸值的作用。

Lut 最常用的测定方法有分光光度法[5]、色谱法[6,7]和毛细管电泳法[8],但这些方法存在灵

收稿日期:2023-02-09;**网络首发日期**:2023-04-17
基金项目:国家自然科学基金资助项目(32102007);上海商学院一流本科建设项目(SBS-2023-XJJK-18)。
作者简介:司晓晶(1982-),女,江苏徐州人,博士,副教授,主要研究方向为食品安全检测。
通讯作者:韩梅,E-mail:hanmei.918521@163.com。
引用本文:司晓晶,杨澜,刘之进,等.聚茜素红-羧基化多壁碳纳米管修饰电极测定花生壳中木犀草素的含量研究[J].化学试剂,2023,**45**(7):113-118。

敏度不高、操作复杂、仪器昂贵等缺点。相比之下,电化学传感技术具有仪器简单、选择性好、检测速度快、仪器易于实现微型化等优点,而且 Lut 中的多羟基结构使其具有更优越的电活性[9]。为了提高电化学传感器的灵敏度,功能化复合纳米材料修饰电极成为一种有效的策略。多壁碳纳米管由于具有独特的几何结构、良好的机械强度和高效的导电能力,以及较强的催化性能,得到了广泛的应用[10]。在碳纳米管表面上加入含有羧基、羟基、氨基的活性基团可进一步提高其电子转移速率,还能将其他材料复合到碳纳米管上,而且羧化多壁碳纳米管(Carboxylated multiwalled carbon nanotubes, C-MWCNTs)可以提高其水溶性,使其在电化学传感领域具有更好的应用[11,12]。

茜素红(Alizarin Red, $C_{14}H_7NaO_7S \cdot H_2O$, AR),属一种蒽醌类衍生物,其结构中含有共轭芳香环,其中在 π-π 键作用力下,具有电化学活性。碳纳米管侧壁具备一定的物理吸附能力,而且 AR 分子式中的醌官能团经过可逆反应形成了稳定的聚合物 PAR,从而更容易吸附在电极表面[13,14]。茜素红膜修饰后的电极在电化学实验中的应用也有进展,并且电信号较为稳定、灵敏。

我国是世界上最大的花生生产国,花生壳作为一种农业废弃物,利用率较低,应用范围不大,或被来做肥料或燃烧,甚至直接被丢弃,因此造成了资源的浪费和环境污染[15]。但研究表明,花生壳中含有包括 Lut 在内的丰富的黄酮类物质[16]。为了提高花生壳的价值和利用度以及充分发挥其药理作用,本文采用电化学方法基于 AR 和 C-MWCNT 研究了 Lut 在 PAR/C-MWCNT 修饰玻碳电极上的电化学行为,并建立了检测 Lut 含量的新方法并应用于花生壳中 Lut 的含量测定。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

CHI 660d 型电化学工作站(上海辰华仪器公司);S-25 型 pH 酸度计(上海雷磁仪器厂);KQ218 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器公司);Tecnai G2 F2 型高分辨扫描电子显微镜(美国 FEI 公司);饱和甘汞电极、Φ=3 mm 玻碳电极(天津高仕睿联公司);C-MWCNT(长 50 μm,羧基含量 2.56 wt%,江苏先丰纳米有限公司)。

木犀草素(98%)、茜素红(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);无水 CH_3OH、无水 C_2H_5OH、H_2SO_4、K_2HPO_4、KH_2PO_4、KCl 等(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);花生购自上海奉贤区某炒货商店。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

0.01 mol/L AR 溶液的制备:准确称量 0.034 23 g 茜素红固体,转移到含有 10 mL PBS 为 7.0 的溶液中,搅拌均匀,制得浓度为 0.01 mol/L 的 AR 溶液。4 ℃冰箱冷藏,备用。

Lut 溶液的制备:准确称量 10.00 mg Lut 标准品,适量甲醇溶解,转移至 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇定容至刻度,超声混匀,得浓度为 1 mg/mL 的 Lut 标准溶液。

1.2.2 样品溶液配制

花生剥壳后用粉碎机粉碎,分析天平准确称取 5.00 g 花生壳干粉于 100 mL 烧杯中,加入 50 mL 无水乙醇,超声 2 h 后,5 000 r/min 离心 10 min,过滤,定容至 50 mL,得 0.1 g/mL 的 Lut 供试品溶液,4 ℃冰箱冷藏,备用。

1.2.3 PAR/C-MWCNT/GCE 复合修饰电极的制备

首先,将玻碳电极(GCE)在麂皮上磨擦 15 min 左右直到电极表面光滑后用超纯水清洗干净,于 HNO_3(1+1)溶液、无水乙醇和超纯水中依次超声 5 min,置于 0.05 mol/L H_2SO_4 溶液里,-1~1 V 活化。然后,取 1 mg C-MWCNT 放入含有 1 mL 的纯化水中进行 30 min 超声,使得 C-MWCNT 可以均匀地分散在超纯水中。准确移取 8 μL C-MWCNT 分散液滴涂到抛光的 GCE 上,红外灯下干燥 40 min,制备成 C-MWCNT 修饰电极。将上述电极置于配制好的 10 mL(0.01 mol/L)AR 溶液中,在-1.2~1.8 V 电位范围内,经过数圈的电聚合,制得 PAR/C-MWCNT/GCE 复合修饰电极。为了做进一步的对比,将 C-MWCNT/GCE 和 PAR/GCE 按照相同的操作步骤进行制备。

1.2.4 测定

取 10 mL 磷酸盐缓冲溶液(Phosphate buffered solution, PBS)溶液于烧杯中,加入搅拌子,用微量进样器注入待测物质,使用三电极系统在电化学工作站上进行测试。差分脉冲伏安法(DPV)检测参数为:电位范围-0.2~1.2 V,脉冲宽度 0.2 s,采样间隔 0.016 7 s,电位增量 0.014 V,振幅 0.05 V,脉冲周期 0.5 s,静置时间 12 s。

2　结果与讨论

2.1　PAR/C-MWCNT 复合纳米材料的表征

对 PAR/C-MWCNT/GCE 修饰电极和 C-MWCNT/GCE 修饰电极通过 SEM 和 EDS 进行表征,以确定得到的复合纳米材料形态和元素组成。图 1a 是 PAR/C-MWCNT 纳米复合材料的 SEM 图。可以清楚看到,在碳纳米管上,出现了一簇簇的附着物,说明聚合 AR 后,PAR 膜将 C-MWCNT 均匀包裹了起来,而且管状结构清晰,这样的管状结构会增强修饰电极与 Lut 之间的相互作用,从而进一步增强修饰电极对 Lut 的检测灵敏度和稳定性,提高其电化学反应活性。在 PAR/C-MWCNT 纳米复合材料的 EDS 图中(图 1b),该纳米复合材料含有 AR 中的 C、H、Na、O、S 元素,且与 AR 聚合后,C 含量达到 85.1%。以上均证明成功制备了 PAR/C-MWCNT 纳米复合材料。

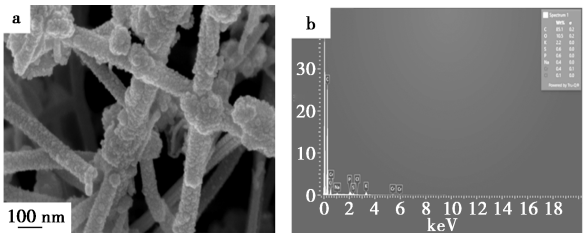


图 1　(a)PAR/C-MWCNT 纳米复合材料的 SEM 图和(b)EDS 图

Fig.1　(a)SEM and (b)EDS of the PAR/C-MWCNT nanocomposite

2.2　电极比较

图 2a 为 30 μmol/L Lut 分别在裸 GCE、C-MWCNT/GCE、PAR/GCE 和 PAR/C-MWCNT/GCE 上的氧化电流值,分别为:3.90、7.12、8.27、12.54 μA,相对于裸 GCE,Lut 在 PAR/GCE 和 C-MWCNT/GCE 上的电化学信号要高出一倍左右,PAR/C-MWCNT/GCE 电化学催化能力增加了 3 倍多,相对于 AR/GCE 和 C-MWCNT/GCE,PAR/C-MWCNT/GCE 复合修饰电极也显著提升。这证实了复合修饰电极 PAR/C-MWCNT/GCE 对 Lut 的电化学活性更高。

为了考察电极在溶液中的电子传递效率和电极修饰材料的导电性能,采用电化学阻抗谱(EIS)研究了电极表面性质的变化。图 2b 为在 5.0 mmol/L $Fe(CN)_6]^{3-}$/$[Fe(CN)_6]^{4-}$ 和 0.1 mol/L KCl 工作电解质溶液中裸电极 GCE、C-MWCNT/GCE、PAR/GCE 和 AR/C-MWCNT/GCE 的阻抗图。如图所示,裸 GCE 电极的电荷转移阻抗(R_{ct})为 418.4 Ω,裸 GCE 电极上滴涂 C-MWCNT 后,R_{ct} 值显著降低,仅有 20.2 Ω,这说明 C-MWCNT 具有强大的电子传输能力和有利于电子转移的大比表面积;当再聚合 AR 后 R_{ct} 值为 198.4 Ω,比裸电极的 R_{ct} 减少了 220 Ω,若单独聚合 AR,发现其 R_{ct} 值高达 2 395.7 Ω,研究其原因,应该是 PAR 膜阻碍了电子的导电性。虽然聚合 AR 后,R_{ct} 增大显著,但由于分子间的醌基和羟基的存在,PAR 可以作为质子受体促进电化学催化反应进行,增强了修饰电极与待测液之间的电子传递,还是能够提高 Lut 的电流响应[17]。以上结果均说明了 PAR/C-MWCNT/GCE 电化学传感器已成功制备。

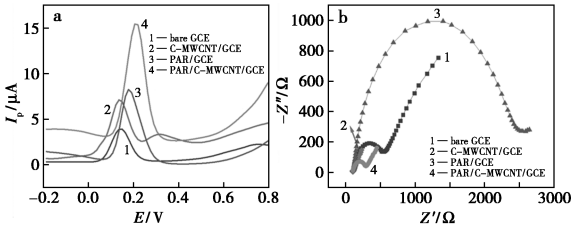


图 2　a.30 μmol/L Lut 在不同电极上电流值的 DPV 图;b.不同电极的电化学 EIS 图

Fig.2　a.DPVs of different electrodes with 30 μmol/L Lut;b.EIS of different electrodes

2.3　PAR/C-MWCNT/GCE 电极上的条件优化

2.3.1　pH 的优化

图 3a 为不同 pH 值的 PBS 缓冲溶液下,PAR/C-MWCNT/GCE 对 20 μmol/L Lut 的氧化电流值。当 PBS 缓冲液的 pH 为 7.5~8.5 时,Lut 的氧化还原电流逐渐变大。当 PBS 缓冲液的 pH 为 8.5 时氧化还原电流的值达到最大,而 PBS 缓冲液 pH 超过 8.5 时,Lut 的氧化还原电流响应值逐渐减小。因此,选定 pH 8.5 为最佳的体系酸碱条件,同时也说明质子和电子参与 Lut 的反应过程。

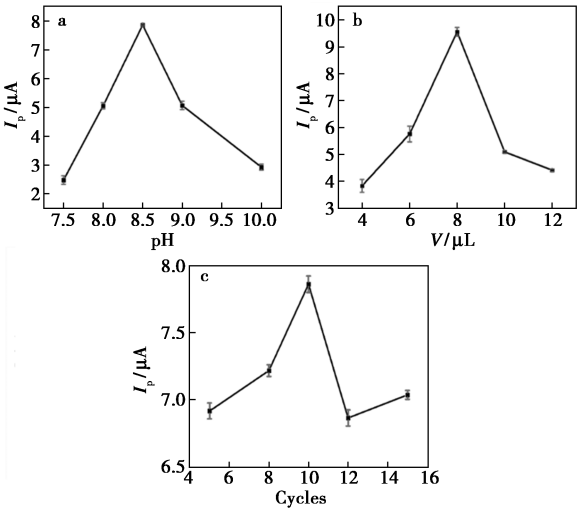
2.3.2　C-MWCNT 滴涂量的优化

图 3b 表现了 Lut 的峰电位与 C-MWCNT 滴涂量的关系。从图中可以看出,随着 C-MWCNT 滴涂量的值从 4 到 8 μL,Lut 在 C-MWCNT 滴涂量在 8 μL 时复合修饰电极的电流达到最大值,然而,当 C-MWCNT 滴涂量继续增大,峰电流却逐渐减小,因此最佳的选择是 C-MWCNT 滴涂量为 8 μL。

2.3.3　PAR 聚合圈数的优化

如图 3c 所示,聚合圈数从 5 到 10 时,PAR 对 C-MWCNT/GCE 电流值逐渐升高,在聚合圈数达

到 10 时,AR 对修饰电极的影响最为明显,电流值达到最大。当超过 10 圈时,PAR 的电化学活性反而下降,这是由于 AR 膜的过厚会阻碍它的导电性。因此聚合圈数过多过少都不利于电子的传递,PAR 聚合膜厚度最佳才能更有利于电子之间的传递,使得 PAR/C-MWCNT/GCE 对 Lut 的催化活性明显提高。因此最优化的 PAR 聚合圈数为 10 圈。



a.反应体系 pH;b.C-MWCNT 滴涂量;c.AR 聚合圈数

图 3 不同条件对 20 μmol/L Lut 的氧化电流响应影响

Fig.3 Effect of different conditions on the oxidation current response of 20 μmol/L Lut

2.4 选择性,重现性和稳定性

为了研究 PAR/C-MWCNT/GCE 的稳定性,在最佳实验条件下,将 PAR/C-MWCNT/GCE 电极置于 20 μmol/L Lut 溶液中平行 5 次实验,结果见表 1,RSD 为 6.26%。将 PAR/C-MWCNT/GCE 在 4 ℃的冰箱中保藏 7 d,在相同操作条件下平行测定 5 次,得其平均值为 7.41 μA,是初始电流响应的 93.56%,RSD 为 5.09%。结果说明 PAR/C-MWCNT/GCE 的稳定性和重现性良好。

表 1 PAR/C-MWCNT/GCE 的稳定性结果

Tab.1 Stability results for PAR/C-MWCNT/GCE

	7 d 前/μA	平均值/μA	RSD/%	7 d 后/μA	平均值/μA	RSD/%	变化/%
1	8.526			7.574			
2	8.046			6.864			
3	7.036	7.92	6.26	7.075	7.41	5.09	93.56
4	7.844			7.676			
5	8.171			7.861			

如图 4 所示,其中最左列为 30 μmol/L Lut 在 pH 8.5 的 PBS 溶液中的响应电流值,其余各列为加入各干扰离子后的相应电流值。结果显示出,100 倍的 NaCl、$MgCl_2$、KNO_3、K_2SO_4、50 倍的葡萄糖、缬氨酸、精氨酸、蔗糖对 Lut 的检测干扰在 5%~6%以内,干扰性不显著。组氨酸对 Lut 的检测干扰在 10%以内。结果表明,利用 PAR/C-MWCNT/GCE 修饰电极对 Lut 的检测具有较好的选择性。

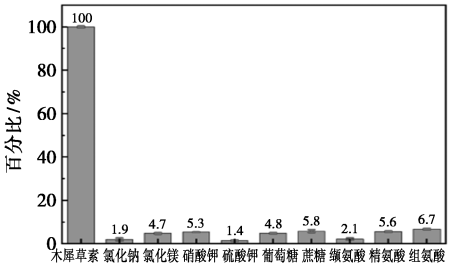


图 4 干扰离子对 PAR/C-MWCNT/GCE 测定 Lut 的影响

Fig.4 Effect of interfering ions on the determination of Lut by PAR/C-MWCNT/GCE

2.5 Lut 的标准曲线

分别精密量取 1、5、10、20、30、50、75、100 μL (0.01 mol/L)的 Lut 至烧杯中,用 pH 为 8.5 的 PBS 缓冲溶液定容至 10 mL,得其浓度分别为 1、2、5、10、20、30、50、75、100 μmol/L。分别在优化的条件下测定其氧化电流值(图 5)。随着 Lut 浓度的逐渐升高,峰电流也逐渐增加。在 1~100 μmol/L 线性关系良好,回归方程 $y=0.372\ 28x-0.016\ 75$,$R^2=0.993\ 3$。

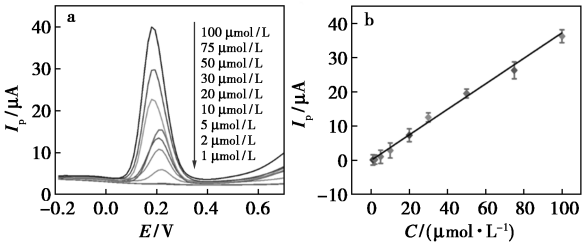


图 5 a.不同浓度的 Lut 在 PAR/C-MWCNT/GCE 上的 DPV 图;b.Lut 测定的线性标准曲线

Fig.5 a.DPV of PAR/C-MWCNT/GCE at different concentrations of Lut;b.Calibration curve for the determination of Lut

2.6 花生壳中 Lut 的测定

准确吸取 1 mL 处理好的花生壳样液,加入含有 10 mL PBS(pH 8.5)缓冲液中,用制备好的 PAR/C-MWCNT/GCE 修饰电极 DPV 下进行测定,平行实验 5 次,取平均值,同时用加标的方法

测定其回收率。

如表 2 所示,通过回归方程计算得出样品检测量为 8.514 μmol/L。平行测定 5 次的峰电流值相对标准偏差(RSD)为 1.52%,说明该修饰电极具有比较好的重现性。根据加标回收率公式:

$$\text{加标回收率} = \frac{(\text{加标试样测定值} - \text{试样测定值})}{\text{加标量}} \times 100\%$$

计算出加标回收率在 91%到 98%之间,平均加标回收率为 95%。与已有文献中不同修饰电极对 Lut 的测定方法比较(表 3),线性范围较宽,适用样品范围较广,且本方法材料合成过程非常简单,成本较低。

表 2　花生壳中 Lut 的含量测定结果

Tab.2　Results of Lut determination in peanut shells

	电流值/μA	检测量/(μmol·L^{-1})	RSD/%	加标量/(μmol·L^{-1})	加标电流值/μA	加标测得量/(μmol·L^{-1})	回收率/%	RSD/%
1	3.128	8.45		10	6.731	18.12	96.73	
2	3.142	8.48		10	6.739	18.15	96.66	
3	3.212	8.67	1.52	10	6.868	18.49	98.18	2.62
4	3.191	8.62		10	6.772	18.23	96.14	
5	3.093	8.35		10	6.505	17.51	91.57	
平均	3.153 2	8.514	—	10	6.723	18.1	95.85	—

表 3　不同修饰电极对 Lut 的测定比较

Tab.3　Comparison of Lut measurement by different modified electrodes

修饰电极	工作曲线	检测限	分析样品	文献
GCE	8.0×10^{-8} ~ 8.0×10^{-6} mol/L	7.14×10^{-8} mol/L	无	[9]
ErGO-MWCNTs/GCE	2.5×10^{-7} ~ 1.3×10^{-5} mol/L	7.0×10^{-8} mol/L	无	[18]
Cu/GP/GCE	7.0×10^{-8} ~ 3.0×10^{-6} mol/L	3.0×10^{-8} mol/L	菊花	[19]
PBG/CQDs/GCE	1.0~15.0 μmol/L	0.004 μmol/L	独一味胶囊	[20]
Au/SDS/GCE	1.0×10^{-9} ~ 1.3×10^{-6} mol/L	5.0×10^{-10} mol/L	菊花、花生壳	[21]
MoS_2/GN-CNTs/GCE	0.01~5 μmol/L	6.0 nmol/L	口服液、花生壳	[22]
PAR/C-MWCNTs/GCE	1~100 μmol/L	0.33 μmol/L	花生壳	本文

3　结论

本文提出一种新型修饰电极的制备,即聚 AR 和 C-MWCNT 复合材料修饰 GCE,并成功测出花生壳中 Lut 的含量。聚 AR 和 C-MWCNT 复合材料对 Lut 的电催化活性主要归因于有机聚合物和碳材料的综合性能。由于具有制作简单、良好的稳定性以及较大的加工精度,相信不久的将来 PAR/C-MWCNT/GCE 会被用于 Lut 以及其他天然植物中活性成分的测定,对于以后临床检测 Lut 有着较大的潜力。

参考文献:

[1]王琪,李坤伟,周长征.木犀草素的药理作用及制剂研究进展[J].北京联合大学学报,2022,**36**(**1**):59-63.

[2]王伟,何平,江小明.木犀草素及其黄酮苷的抗炎、抗氧化作用[J].食品科学,2020,**41**(**17**):208-215.

[3]陈芳,程美华,冯秀丽,等.木犀草素的抗病毒效应及机制[J].国际流行病学传染病学杂志,2019,**46**(**6**):537-540.

[4]曹瑶.花生壳中木犀草素对金黄色葡萄球菌的抗菌活性及其机理研究[D].南京:南京财经大学,2022.

[5]王智儀,郭佳佳,曹智威,等.花生壳中提取木犀草素及其含量测定[J].生物化工,2021,**7**(**3**):61-63;67.

[6]于艳华,王月洁,岳显文,等.RP-HPLC 测定虎眼万年青中木犀草素含量及抗氧化能力研究[J].长春师范大学学报,2021,**40**(**4**):70-75.

[7]SHI F G,PAN H,LU Y F,et al.An HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of luteolin and its major metabolites in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J. Sep. Sci*, 2018, **41**(**20**): 3 830-3 939.

[8]XU X Q,YU L S,CHEN G N.Determination of flavonoids in portulaca oleracea L.By capillary electrophoresis with electrochemical detection [J]. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006,**41**(**2**):493-499.

[9]屈凌波,赵俊宏,杨冉,等.木犀草素的电化学性质及在其测定中的应用[J].理化检验(化学分册),2010,**46**(**3**):313-316.

[10]张玲,矫淞霖,张慧,等.聚合离子液体-多壁碳纳米管化学修饰电极同时测定多巴胺、抗坏血酸与尿酸[J].分析测试学报,2019,**38**(**4**):435-441.

[11]VAIRAVAPANDIAN D,VICHCHULADA P,LAY M D. Preparation and modification of carbon nanotubes: Review of recent advances and applications in catalysis and sensing[J].*Anal.Chim.Acta*,2008,**626**(**2**):119-129.

[12]SHALAUDDIN M, AKHTER S, BASIRUN W J, et al. Hybrid nanocellulose/f-MWCNTs nanocomposite for the electrochemical sensing of diclofenac sodium in pharmaceutical drugs and biological fluids[J].*Electrochim.Acta*,2019,**304**(**5**):323-333.

[13]REDDAIAH K, MADHUSUDANA REDDY T, VENKATA RAMANA D K, et al. Poly-Alizarin red S/multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode for the boost up of electrocatalytic activity towards the investigation of dopamine and simultaneous resolution in the presence of 5-HT: A voltammetric study[J]. *Mater. Sci. Eng. C*, 2016, **62**(**5**): 506-517.

[14]FILIK H, AVAN A A, MÜMIN Y. Simultaneous electrochemical determination of caffeine and vanillin by using poly(Alizarin Red S) modified glassy carbon electrode [J]. *Food. Anal. Methods*, 2017, **10**(**1**): 31-40.

[15]吕东灿,王志敏,姜广策,等.改性花生壳吸附亚甲基蓝动力学与机理研究[J].化学试剂,2022,**44**(**2**):259-265.

[16]路立峰,李赫宇,李增绪,等.花生壳木犀草素的研究进展[J].食品研究与开发,2015,**36**(**9**):149-152.

[17]MOHAMMED M A, ATTIA A K, ELWY H M. Electrochemical sensor based on multiwalled carbon nanotube, alizarine red S and chitosan for simultaneous determination of oxomemazine hydrochloride, paracetamol and guaifenesin[J]. *Electroanalysis*, 2017, **29**(**2**): 506-513.

[18]吴巧灵,秦方园,王啸,等.基于还原氧化石墨烯-碳纳米管复合物的电化学传感器对木犀草素的检测[J].化学研究与应用,2021,**33**(**9**):1 712-1 718.

[19]杨铁金,杜江,孙洪力,等.铜纳米簇/石墨烯修饰玻碳电极电流-时间法测定木犀草素[J].理化检验(化学分册),2013,**49**(**11**):1 355-1 359.

[20]高叶,李晓彤,张晓蕾,等.聚溴甲酚绿/碳量子点修饰电极测定木犀草素[J].扬州大学学报(自然科学版),2020,**23**(**1**):10-15;43.

[21]白小慧,杜芳艳,邢艳,等.木犀草素在纳米金/十二烷基硫酸钠修饰玻碳电极上的电化学行为及测定[J].化工科技,2020,**28**(**6**):1-5.

[22]许冰洁,席佳佳,冯莹莹,等.基于二硫化钼/多孔石墨烯复合材料的木犀草素电化学传感器[J].分析化学,2018,**46**(**12**):1 931-1 936.

化学品与环境

改性生物炭对水体中氮和磷共去除:改性方法和吸附机制

王硕,汪雅茹,尹通,刘慧,范子涵,范世锁*
(安徽农业大学 资源与环境学院,安徽 合肥　230036)

摘要:水体中氮和磷的共去除和资源化利用一直是研究的热点,生物炭应用为其提供了新的选择。综述了改性生物炭对氮和磷的共去除,重点聚焦在改性方法和吸附机制。生物炭改性方法主要为矿物质的负载,具体可分为镁改性、铁改性、双金属改性、其它矿物质改性等。改性目的是增加生物炭的比表面积和孔隙结构;强化静电作用;加强离子交换能力;增强配合能力;促进沉淀作用,特别是促进鸟粪石结晶反应,回收资源。改性生物炭对氮和磷共去除的机制涉及:更高比表面积和发达孔隙结构提供更多的吸附点位;表面电性和氮磷之间的静电作用;矿物质组分与氮磷之间的离子交换作用;多种官能团能与氮磷产生配合作用;矿物组分能与氨氮和磷酸盐发生沉淀作用,特别是鸟粪石化学沉淀。未来的研究方向是:创新生物炭的改性方法;借助先进的手段揭示共去除的微观机制;回收氮磷制备缓释肥;改性生物炭在实际水体中的应用。

关键词:生物炭;氮和磷;共去除;改性方法;吸附机制
中图分类号:X703　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0258-3283(2023)07-0119-09
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0136

Co-removal of Nitrogen and Phosphate from Water by Modified Biochar:Modification Methods and Adsorption Mechanisms

WANG Shuo, *WANG Ya-ru*, *YIN Tong*, *LIU Hui*, *FAN Zi-han*, *FAN Shi-suo** (School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Co-removal and resource utilization of nitrogen and phosphate in water had become a research hotspot, and biochar applications provided a new options. In this study, the co-removal of nitrogen and phosphate by modified biochar was summarized, focusing on the modification methods and adsorption mechanisms. The modification methods of biochar were mainly focused on the loading of minerals, including magnesium modification, iron modification, bimetallic modification, and other mineral modification methods. The purposes of modification were increasing the specific surface area and pore structure of biochar; enhancing electrostatic action; strengthening ion exchange capacity; enhancing complexation ability; promoting precipitation, especially promoting struvite crystallization reaction to recycle resources. The co-removal mechanism of nitrogen and phosphorus from modified biochar involves: its higher specific surface area and developed pore structure which provides more adsorption sites; its surface electricity causing electrostatic interaction; its mineral components leading to ion exchange; many functional groups bringing complexation; its mineral components producing precipitates, especially struvite chemical precipitation. The future research directions are: innovating the modification methods of biochar; uncovering the microscopic mechanisms of co-removal using advanced techniques; recycling of nitrogen and phosphate to prepare slow release fertilizer; application of modified biochar in actual water.

Key words: biochar; nitrogen and phosphate; co-removal; modification method; adsorption mechanism

随着农业、畜牧业、工业等快速发展,过量的氮、磷会导致水体富营养化,使得大量藻类滋生,严重威胁水生态系统的健康。水体中的氮和磷去除至关重要,一种较好的方式就利用基质材料将

收稿日期:2023-03-01;**网络首发日期**:2023-04-14
基金项目:国家自然科学基金项目(51809001);安徽省高校自然科学重点项目(2022AH050879);大学生创新项目(X202210364097)。
作者简介:王硕(2000-),男,安徽淮南人,硕士生,主要从事生物炭制备及应用作用的研究。
通讯作者:范世锁,E-mail:fanshisuo@ahau.edu.cn。
引用本文:王硕,汪雅茹,尹通,等.改性生物炭对水体中氮和磷共去除:改性方法和吸附机制[J].化学试剂,2023,**45**(**7**):119-127。

氮磷吸附之后变成缓释肥,特别是针对农田排水中的氮磷[1-5]。常见的吸附基质填料有多孔混凝土、污泥-粉煤灰陶粒、改性凹凸棒石、沸石、砺石等,吸附氮磷后的基质填料还有作为缓释肥的潜力[6-10]。但是造价偏高、吸附效果有限、投入量大等因素限制了常规基质填料的广泛应用。因此,迫切需要寻求水体净化效果显著、环境友好且成本较低的新型吸附填料基质。研究表明,利用生物炭负载蒙脱石复合材料可以有效提高废水中氮磷的吸附效果,并对水生态环境的影响较小,有着较好的应用前景[3,4,11,12]。

近年来,生物炭基质作为填料越来越多的应用在人工湿地、农田排水沟渠、生活污水、畜禽养殖尾水等水体的污染控制,提升对氮和磷的吸附效果。生物质原材料来源广泛、数目庞大,包括秸秆、木屑、污泥、粪便等,其中应用较多的是玉米秸秆[7,13,14]与木屑[1,3,15-17]。但是,原状生物炭对氮和磷等污染物的吸附拦截效果有限[13,18],因为其有限的孔隙结构、官能团和吸附位点。为提升对污染物的去除效果,可对生物炭进行定向改性修饰以优化其表面特性、完善孔隙结构、丰富官能团、引入矿物元素,并赋予更多的吸附位点,进而实现对污染物的高效去除[19-21]。常见的改性方法包括物理改性和化学改性,其中化学改性应用的更多,包括酸碱活化、引入官能团、氧化剂处理、金属浸渍、矿物质负载改性。其中铁和镁改性生物炭因改性方式简单、对氮磷吸附效果好而被广泛研究。

目前关于生物炭单独吸附氮和磷的研究和综述已有报道,而关于改性生物炭同时吸附氮和磷的研究综述却鲜有报道。因此,本文综述了改性生物炭对氮和磷的共去除,重点聚焦在改性方法和吸附机制,并对未来的研究方向和趋势进行了展望,以期为改性生物炭的制备及水体中氮磷的资源化利用提供参考。

1 生物炭对氮磷共去除的改性方法

因比表面积较小、孔隙结构不发达和吸附位点不足等局限性,原状生物炭对氮和磷的吸附容量有限,可对生物炭进行针对性改性从而提升对氮和磷的吸附效果[11,22-24]。在改性生物炭对氮磷共去除的研究中,被广泛采用的生物质原材料为农业废弃物,包括秸秆、稻壳、花生壳、木屑等。目前,生物炭改性方法主要为矿物质的负载,具体可分为镁改性、铁改性、双金属改性、其他矿物质改性,见图 1。“生物炭-矿物质负载”复合材料可用于对水体中氮和磷的共去除,因为矿物质改性可以赋予生物炭更多的吸附位点以实现对氮和磷的共去除,如增加比表面积、完善孔隙结构、改变电性、丰富的官能团类型、引入矿物质离子,进而强化静电吸附、离子交换、表面配合、化学沉淀等作用机制。

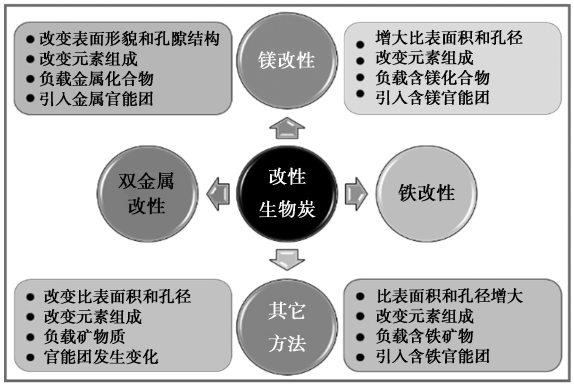


图 1 生物炭改性方法

Fig.1 Biochar modification methods

1.1 镁改性

镁改性是提升生物炭同时吸附氮和磷的最常用方法,主要改性剂是 $MgCl_2·6H_2O$。镁改性可以增大生物炭的比表面积、制造多孔结构、优化表面电性、负载含镁矿物质,强化离子交换能力,促进沉淀反应发生。镁改性主要是通过吸附氮和磷形成鸟粪石,从而作为一种缓释肥[12,14-16,25-33]。

有研究制备多孔 MgO-生物炭纳米复合材料用于吸附水体中氮和磷,发现对氮和磷的最大吸附量可达 94 和 835 mg/g。生物炭的碳基体上负载纳米 MgO 薄片,形成更多的多孔和微孔,增大了比表面积,从而更有利于吸附氮和磷[27]。

有研究采用壳聚糖改性镁负载生物炭(CS-MgCBC)吸附水体中氮和磷,发现对氮和磷的最大吸附量可达 35.59 和 221.89 mg/g。壳聚糖含有大量的活性基团(—NH_2/—OH),它们可以与各种金属离子配位形成金属螯合物。CS-MgCBC 存在大量不规则的小孔,发达的孔隙结构能提高对氮和磷的吸附效果;壳聚糖改性可以提高生物炭的比表面积,提供了更多的吸附位点和丰富的官能团(—OH、—CH_3、—C═O 等),CS-MgCBC 对 PO_4^{3-}-P 和 NH_4^+-N 去除的主要机制是静电吸附、沉淀和配体交换[15]。

还有研究采用 $MgCl_2$ 改性生物炭吸附水体中

氮和磷,发现对氮和磷的最大吸附量可达 38.18 和 74.37 mg/g,鸟粪石沉淀结晶是 Mg 改性生物炭去除 NH_4^+-N 和 PO_4^{3-} 的主要原因[29]。

1.2　铁改性

铁改性也是提升生物炭对氮和磷吸附效果的重要手段。铁改性可以使得生物炭具有大比表面积、优化孔隙结构、增加吸附位点,强化离子交换、沉淀、静电作用。采用最多的改性剂是 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$。也有的铁改性方法联合其他试剂进行共改性,如铁+氮共改性和铁+蒙脱石共改性等[17,34-40]。

有研究采用 Fe-N ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 和双氰胺)共改性制备生物炭,发现铁氮改性能引入更多的铁颗粒;制造更多的比表面积和孔隙结构;生成 γ-Fe_2O_3、Fe_3O_4 和 Fe_3C;导致 C 含量降低,N 和 O 含量增加;引起 Fe 和 N 官能团发生变化。铁氮生物炭对 NH_4^+-N 和 PO_4^{3-} 的吸附量为 238.94 和 165.02 mg/g[17]。

也有研究采用铁($FeCl_3$)改性制备改性生物炭,发现铁改性使得生物炭的表面更加粗糙,增加了生物炭的 pH_{PZC},还引入了 Fe—OH。铁氮生物炭对 NH_4^+-N 和 PO_4^{3-} 的吸附量为 11.53 和 26.14 mg/g[34]。

采用纳米零价铁结合蒙脱石制备改性生物炭,可以发现改性引入了蒙脱石和零价铁,使得生物炭表面更加粗糙和更多颗粒负载,制造更大的比表面积和孔隙结构,并引入更多的官能团。铁氮生物炭对 NH_4^+-N 和 PO_4^{3-} 的吸附量为 24.21 和 172.41 mg/g[36]。

1.3　双金属改性

双金属同时改性也可以提升生物炭对氮和磷的吸附效果,采用的最多是 Mg/Al 和 Mg/Fe 改性。双金属改性可以增加生物炭的比表面积,引入矿物质组分,可强化静电作用和离子交换,也促进沉淀反应的发生[41-47]。

有研究采用 Mg/Al 改性生物炭,发现改性可以负载金属,并提高比表面积和孔隙。改性生物炭对 NO_3^- 和 PO_4^{3-} 的吸附能力为 0.93 和 6.10 mg/g[41]。

采用同样 Mg/Al 改性方法的生物炭,研究发现改性可以将 MgO 和 $Mg(OH)_2$ 负载在生物炭上,生物炭表面是粗糙和多孔,引入了 Mg—O 官能团等。改性生物炭对 NH_4^+、NO_3^-、和 PO_4^{3-} 的吸附能力为 0.70、~25 和~40 mg/g[42]。

也有研究 Mg/Fe 共改性污泥生物炭,发现改性使得生物炭表面不规则且多孔,比表面积和孔隙增大且有晶体形成。改性生物炭对 NH_4^+ 和 PO_4^{3-} 的吸附量分别为 103.12 和 205.07 mg/g[45]。

1.4　其他矿物质改性方法

其他矿物质改性方法包括 La、Ca、Zn、Al、蒙脱石、赤泥和污泥等,其他矿物质改性生物炭可有效的提高对氮磷的吸附效果。这些改性方法也可以赋予多孔结构和较高的比表面积、改变生物炭表面的电性、提高离子交换和促进形成沉淀[48-55]。

有研究采用 $LaCl_3$ 改性生物炭,发现 La 改性生物炭中的碱性官能团是改善 NO_3^- 吸附效果的主要原因,而对 PO_4^{3-} 的去除与碱性官能团的增加相关;生物炭表面存在的 MgO 也可以结合 PO_4^{3-},其中 MgO 与 La_2O_3 的零电荷点近似相等;酸性官能团则在对 NH_4^+ 的吸附中发挥了积极作用。改性生物炭对 NH_4^+ 的最高吸附量为 4.13 mg/g(La-300);对 NO_3^- 的最高吸附量为 8.70 mg/g(La-600)。实验中 500 ℃下产出的 La 改性生物炭与未改性生物炭对 PO_4^{3-} 的吸附量分别为 19.75 与 10.02 mg/g[48]。

也有研究发现 Al 改性降低了生物炭的 C 含量,增加了 Al 含量,使得芳香性变差和亲水性变好,同时引入了 AlOOH 矿物质和 Al—O 键,且比表面积增加和制造发达孔隙结构。Al 改性生物炭对 NO_3^- 和 PO_4^{3-} 的吸附量为 89.58 和 57.49 mg/g[49]。

还有研究发现蒙脱石改性使得生物炭表面更加粗糙,引入更多无定形颗粒,官能团、pH 和比表面积也发生了变化,同时增加芳香性,降低亲水性。蒙脱石改性生物炭对 NH_4^+ 和 PO_4^{3-} 的最大吸附容量为 105.28 和 12.52 mg/g[50]。

Wang 等[51]研究发现羧甲基纤维素结合纳米零价锌改性可以使得生物炭(nZVZ-CMC-PMBC)表面更加粗糙和比表面积更大,孔径更发达,同时零价锌进入球形颗粒和出现纳米金属薄片结构。nZVZ-CMC-PMBC 对 NH_4^+-N 和 TP 的吸附量为 39.875 和 144.01 mg/g。

张秋亚等[55]研究发现磁性污泥基生物碳复合材料通过表面吸附、离子交换和鸟粪石沉淀以提高对氮磷的吸附,其中以鸟粪石沉淀为主。复合材料对氨氮最佳吸附效果为 103.12 mg/g,对磷酸盐最佳吸附效果为 205.07 mg/g。

2 改性生物炭对氮和磷共去除的机制

改性生物炭对氮和磷的吸附能力明显高于原始生物炭,这是因为改性生物炭具有较高的比表面积、发达的孔隙结构、较高的反应活性和表面官能团,可以通过物理吸附、静电作用、离子交换、官能团配合和沉淀作用等途径高效去除水体中的氮磷。通常,生物炭对氮磷的吸附是多种机制同时发挥作用,见图 2。生物炭改性的效果和目的:增加比表面积和孔隙结构;强化静电作用;加强离子交换能力;强化配合能力;沉淀作用,特别是促进鸟粪石结晶反应,回收资源。

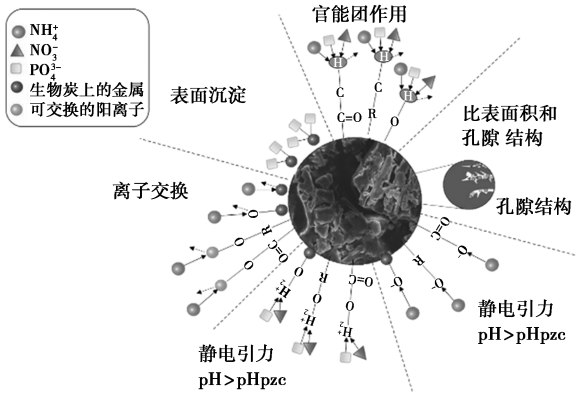


图 2 生物炭吸附氮和磷的机制[11]

Fig.2 Adsorption mechanism of nitrogen and phosphorus by biochar[11]

2.1 物理吸附(比表面积和孔径)

生物炭的比表面积和孔径在吸附氮磷过程中发挥重要作用,比表面积大和孔隙结构发达有利于更多负载吸附位点,也有助于氮磷的动力学扩散,从而提高对氮磷的吸附效果。

Li 等[17]发现铁和双氰胺共改性胡桃壳生物炭的比表面积、微孔比表面积、孔体积和微孔体积分别为 967.108 4、512.365 7 m^2/g 和 0.742 5、0.462 4 cm^3/g,分别是原状炭的 3.39、5.05、6.42 和 8.81 倍,发现孔隙扩散是改性生物炭去除氮磷的重要机制。Xi 等[26]研究发现改性后生物炭的比表面积和孔体积为 55.0 m^2/g 和 0.14 cm^3/g。与原状生物炭相比,共热解改性增加了生物炭的比表面积和总体积,且镁颗粒进入生物炭的孔隙中有利于对氮磷的吸附。Wang 等[51]使用熊猫粪便作为原材料,利用羧甲基纤维素稳定的纳米零价锌改性制备生物炭,发现比表面积、微孔比表面积、孔体积和微孔体积分别为 72.964 7、33.567 4 m^2/g 和 0.049 4、0.015 3 cm^3/g,远远高于原状生物炭。改性生物炭更大的比表面积和孔体积能提供更多的吸附位点,从而有利于氮磷的去除。

2.2 静电作用

生物炭的表面电性在吸附氮磷过程中发挥关键作用,带负电的生物炭更容易通过静电作用吸附带正电的 NH_4^+,而带正电的生物炭更容易吸附 PO_4^{3-}。因此,改性对生物炭表面电性的影响至关重要。pH_{PZC}是反映生物炭静电作用的重要指标。改性可以改变生物炭的 pH_{PZC},进而影响静电作用。静电作用也是生物炭吸附氮磷的重要机制。静电引力主要受溶液 pH 值的控制,当溶液的 pH 值<pH_{PZC}时,生物炭的表面会变薄带正电荷,反之则带负电荷。

例如,有研究发现制备的铁氮生物炭(Fe/N@BC)的零电荷点(pH_{PZC})约为 7.8。当溶液 pH 值为 3 时,NH_4^+-N 的吸附量仅为 35.37 mg/kg,原因是 H^+和 NH_4^+-N 之间的竞争。然而,当溶液 pH>7 时,NH_4^+-N 的吸附量显著降低。NH_4^+-N 极有可能以 $NH_3\cdot H_2O$ 的形式在碱性环境中存在,不利于吸附。当 pH 值较低时,H_3PO_4 是液相中主要磷形态,不利于与正离子相互作用位点,导致吸附能力低,发现吸附 PO_4^{3-}-P 的最佳溶液 pH 为 7~9。当 pH>9 时,PO_4^{3-}-P 和 Fe/N@BC 之间的静电斥力越来越强,导致了 PO_4^{3-}-P 吸附能力下降。此外,羟基离子与 PO_4^{3-}-P 对吸附位点竞争也是不可忽视的[37]。

也有研究发现铁改性的生物炭(Fe-BC690)pH_{PZC}(pH_{PZC} 9.6)高于原状沼液(pH 8.3),导致 Fe-BC690 的表面正电荷,很容易被吸引带负电的磷酸根[34]。

还有研究发现,未改性的原始生物炭(SSB)的 pH_{PZC} 值为 4.88,经过硝酸改性后,生物炭(MSSB1)的 pH_{PZC} 急剧下降为 2.75,这主要是由于 MSSB1 表面产生了大量的酸性官能团。通过碳酸钠溶液的进一步改性处理致使生物炭(MSSB2)的 pH_{PZC} 值变为 6.99[44]。在酸性条件下,一方面,溶液中存在了大量的 H^+,与 NH_4^+ 一同竞争生物炭表面的吸附位点;另一方面是 MSSB2 表面官能团随着 pH 的降低逐渐被质子化(pH<pH_{PZC}),不利于 MSSB2 表面与 NH_4^+ 的静电吸引;因此当 pH 3 时,MSSB2 对氨氮的吸附量最低。当 7<pH<9 时,MSSB2 表面呈负电性,且随着 pH 的升高,表面有越来越多的负电荷,与 NH_4^+ 的静电吸引作用越来越强,因此吸附量也越来越高。

然而,当初始的 pH 10 时,溶液中的氨氮大多数是以 $NH_3 \cdot H_2O$ 的形式存在,此时,静电吸引作用和离子交换作用均对 $NH_3 \cdot H_2O$ 不再有效。当溶液的 pH 低于吸附剂的 pH_{PZC},吸附剂表面质子化,随着 pH 的降低,吸附剂表面带有更多的正电荷,这有利于水溶液中的磷酸根的吸附。当 pH > pHpzc 时,吸附剂材料上的更多的负电荷表面位点与磷酸根离子之间的静电斥力增加导致了较低的磷酸盐吸附量。另一方面,在高 pH 条件下,OH^- 与磷酸盐负离子之间可能存在竞争导致对磷酸盐吸附量的减少[44]。静电作用的过程见以下公式:

$$M^{n+} + PO_4^{3-}/HPO_4^{2-}/H_2PO_4^- \longrightarrow M^{n+} \cdot PO_4^{3-}/HPO_4^{2-}/H_2PO_4^- \quad (1)$$

$$M^{n-} + NH_4^+ \longrightarrow M^{n-} \cdot NH_4^+ \quad (2)$$

2.3　离子交换

改性后的生物炭负载多种矿物质离子,能与氨氮和磷酸盐离子之间发生离子交换从而释放更多的矿物质离子到溶液中,从而有效的吸附氨氮和磷酸根离子。此外,生物炭通常还含有丰富的官能团(如羟基和羰基),可能与 NH_4^+-N 和 PO_4^{3-}-P 发生离子交换。研究发现离子交换是生物炭吸附铵的重要机制,且生物炭上官能团在去除铵中发挥重要作用[52]。

氮磷和矿物质离子之间发生离子交换作用。例如,改性生物炭(MBC-400)中的蒙脱石可通过阳离子交换反应实现对 NH_4^+ 的高效吸附[50]。研究发现改性生物炭上的 Na^+ 和 K^+ 可通过离子交换实现对 NH_4^+ 的吸附[26]。此外,改性生物炭上的 Mg^{2+} 可通过离子交换实现对 NH_4^+ 的高效吸附[16,28]。改性生物炭(CA-MB)的阳离子交换量(CEC)为 91.06 ~ 155.41 cmol/kg,是原状炭的 3.84~8.25 倍,这是因为 CA-MB 表面含有更多的 Ca^{2+} 和 CA-MB 的 CEC 含量显著增加。CEC 较高意味着 CA-MB 具有良好的阳离子交换能力。CA-MB 对 NH_4^+ 的吸附量随着 pH 增加逐渐增加。当溶液的 pH 值较低时,CA-MB 表面的阳离子可与 NH_4^+ 发生交换从而去除 NH_4^+,过程如下:

$$CA\text{-}MB \cdot M^{n+} + NH_4^+ \longrightarrow CA\text{-}MB \cdot NH_4^+ + M^{n+} \quad (3)$$

2.4　官能团配合

生物炭上含有多种类型的官能团(如羟基、羧基等),特定改性之后官能团的类型更加丰富,这些官能团能与氨氮、磷酸盐发生配合作用。比如,改性后的 nZVZ-CMC-PMBC 材料为表面均匀覆盖 nZVZ 薄片,即可利用高活性的 nZVZ 进行配合反应去除 NH_4^+ 和 TP[51]。改性生物炭(Fe-BC690)可通过表面配合去除磷酸盐[34]。此外,nZVI-SBC 的表面质子化是有利的,在酸性条件下与磷酸盐配合[32]。Fe-BC 对 NO_3^- 和 PO_4^{3-} 的吸附主要是通过配合作用[39]。改性生物炭上的酚羟基通过配合作用去除 NH_4^+-N 和 TP[12]。Ca 通过官能团配合去除磷酸根的反应如下:

$$Ca\text{-}OH + H_2PO_4^- \longrightarrow Ca\text{-}H_2PO_4^- + OH^- \quad (4)$$

2.5　沉淀机制

沉淀机制也是改性生物炭去除氮磷的主要机制之一,特别是对磷去除。通常,镁改性生物炭同时去除氮磷的机制就是通过鸟粪石化学沉淀反应,产生的鸟粪石有作为缓释肥料的潜力。镁改性生物炭可通过释放 Mg^{2+},与 NH_4^+、PO_4^{3-} 发生沉淀反应生产鸟粪石[12,15,25,43],生成 $Mg(NH_4)PO_4$ 沉淀物质附着在生物炭的表面和孔隙内部,鸟粪石具体反应式如下:

$$Mg^{2+} + NH_4^+ + PO_4^{3-} + 6H_2O \longrightarrow MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O\downarrow \quad (5)$$

$$Mg^{2+} + NH_4^+ + HPO_4^{2-} + 6H_2O \longrightarrow MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O\downarrow + H^+ \quad (6)$$

$$Mg^{2+} + NH_4^+ + H_2PO_4^- + 6H_2O \longrightarrow MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O\downarrow + 2H^+ \quad (7)$$

除了鸟粪石沉淀之外,Mg 离子也能直接与 PO_4^{3-} 发生化学反应生成沉淀。铁改性生物炭中的镁氧化物和铁氧化物在水中解离为离子态,与磷酸根结合重新生成了磷酸盐沉淀物($Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ 和 $Fe_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$),从而使磷得到去除[16,28,30,46]。

$$3Mg^{2+} + 2PO_4^{3-} + 8H_2O \longrightarrow Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O\downarrow \quad (8)$$

$$3Fe^{2+} + 2PO_4^{3-} + 8H_2O \longrightarrow Fe_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O\downarrow \quad (9)$$

研究发现表明沉淀也是铁氮生物炭去除 PO_4^{3-}-P 的重要机制,如 Fe^{3+} 与 PO_4^{3-}-P 之间发生沉淀作用[17,34]。沉淀作用也是零价铁改性生物炭去除 PO_4^{3-}-P 的重要机制,生成的沉淀包括 $FePO_4$、$Fe_3(PO_4)_2$ 和 $Fe_3(PO_4)_4(OH)_2$ 等[37]。改性生物炭上的钙离子可与磷酸根形成沉淀,从而促进了磷酸根的去除[52],具体的反应式如下:

$$3Fe^{2+} + 2PO_4^{3-} + 8H_2O \longrightarrow Fe_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O\downarrow \quad (10)$$

$$5Ca^{2+} + 3PO_4^{3-} + OH^- \longrightarrow Ca_5(PO_4)_3OH\downarrow \quad (11)$$

$$5Ca^{2+} + 3HPO_4^{2-} + 4OH^- \longrightarrow Ca_5(PO_4)_3OH\downarrow + 3H_2O \quad (12)$$

$$5Ca^{2+} + 3H_2PO_4^{2-} + 7OH^- \longrightarrow Ca_5(PO_4)_3OH\downarrow + 6H_2O \quad (13)$$

3 讨论

3.1 创新生物炭制备的方法

创新改性方法研制性能更好的生物炭[56]，实现对水体中氮和磷效果更优更稳定的去除。例如，Jing 等[16]合成了生物炭负载的 $Mg(OH)_2$/膨润土复合材料，其对磷酸盐和氨氮的吸附能力分别为 125.36 和 58.20 mg/g，磷酸盐固定主要受鸟粪石沉淀的控制。Li 等[17]采用 $FeCl_3·6H_2O$ 和双氰胺共改性制备铁氮生物炭，发现对磷酸盐和氨氮的吸附能力分别为 165.02 和 238.94 mg/g，共吸附机制包括孔隙填充、静电相互、离子交换、表面配合、表面沉淀、氢键和 π-π 相互作用。Wang 等[51]制备了羧甲基纤维素稳定纳米零价锌负载生物炭复合材料，发现对磷酸盐和氨氮的吸附能力分别为 154.30 和 40.31 mg/g，主要机制涉及 Zn^{2+} 的沉淀、静电作用和表面配合。

3.2 揭示氮磷共去除的微观机制

目前，改性生物炭对氮磷同步去除的微观机制还有待进一步深入揭示，如微观动力学过程、作用力结合方式、氮磷相互作用等。Du 等[57]采用密度泛函理论(DFT)计算研究掺 La 生物炭对磷的吸附机理，发现磷酸盐吸附的主要机制是吸附位点数量的增加与 La 掺杂诱导的静电吸附引起的配体交换之间的协同作用。Yin 等[58]采用 DFT 计算 Mg/Ca 改性生物炭对 $H_2PO_4^-$ 的吸附，发现吸附过程包含了边缘吸附和金属吸附，Ca 修饰的生物炭比 Mg 修饰的生物炭更适合吸附，而就吸附效果而言，金属吸附效果优于边缘吸附效果。Palansooriya 等[59]使用 XAFS 等手段研究负载 Fe^{3+} 的壳聚糖生物炭复合材料对磷的吸附，NEXAFS 光谱证实了磷酸盐与改性生物炭上的铁矿物(Fe-P)的关联，与生物炭相比，Fe-P 是 FBC-N 和 FBC-C 中的主要物质，约占总磷酸盐的 58%，而 Ca-P 是次要物种(~28%)。

3.3 制备生物炭基缓释肥

改性生物炭同步吸附氮磷之后的吸附剂可以作为缓释肥，特别是镁改性生物炭吸附后可以制备成缓释肥。Sun 等[60]制备了蛋壳改性生物炭在较宽的 pH 范围(5~13)内表现出优异的磷吸附性能，并实现了 557.0 mg P/g 的最大吸附量，其土埋试验表明，富含磷的改性生物炭具有良好的磷缓释性能(可维持长达 25 d)，作为缓释肥料具有广阔的应用潜力。Lee 等[61]研究了多种改性生物炭去除环境污染物的应用，其中 $AlCl_3$ 和 CaO_2 改性生物炭可以吸附磷酸盐并作为磷肥回用于土壤，可修复缺磷土壤。Wang 等[62]制备了环保型煤矸石-生物炭复合材料，并通过发芽试验评价载磷(P 负载)复合物作为缓释肥料的应用，表明复合材料不仅可用于废水中除磷，还可作为缓释肥料。Sim 等[63]研究发现生物炭吸附氮磷后可以作为良好的缓释肥，能够减少养分流失并增大农作物的养分利用效率。生物炭还被用作土壤中的碳汇材料，以防止二氧化碳的排放，这使其比其他缓释/控释肥料更具优势。Marcińczyk 等[64]，发现原状生物炭利用其多孔结构和官能团可以成功地富集更多的营养物质，可以成为高效的生物炭基缓释肥料。使用基于生物炭的缓释肥还可以使作物生产力提高近 30%，养分利用效率甚至提高 40%。

3.4 改性生物炭的实际应用

目前大部分改性生物炭吸附氮和磷的实验都是在实验室中完成，缺乏在实际水体中长周期的应用案例和工程，如畜禽生化尾水、农田排水、湖泊河流水体等。将来可以更多的改性生物炭应用于实际水体中氮和磷的共去除，实现氮磷的资源化利用。

4 结论

“生物炭-矿物质负载”复合材料可用于对水体中氮和磷的共去除，因为矿物质改性可以赋予生物炭更多的吸附位点以实现对氮磷的共去除，如增加比表面积、完善孔隙结构、改变电性、丰富的官能团类型、引入矿物质离子，进而强化静电吸附、离子交换、表面配合、化学沉淀等作用机制。常见的矿物质改性方法包括镁改性、铁改性、双金属改性、其它矿物方法改性方法等。未来的研究方向是：创新生物炭的改性方法；借助先进的手段揭示共去除的微观机制；回收氮磷制备缓释肥；改性生物炭在实际水体中的应用。

参考文献：

[1] DUAN Q, JIANG S, CHEN F, et al. Fabrication, evaluation methodologies and models of slow-release fertilizers: A review[J]. *Ind. Crops. Prod.*, 2023, **192**: 116 075.

[2] ZHANG T, LIU S, LI H, et al. One-pot preparation of amphoteric cellulose polymers for simultaneous recovery of ammonium and dihydrogen phosphate from wastewater and reutilizing as slow-release fertilizer[J]. *Eur. Polym.*

J.,2022,**171**:111 223.

[3]BEGNA S G,BELEGE A T,ADMASSU W Y,et al.Mg/Zr modified nanobiochar from spent coffee grounds for phosphate recovery and its application as a phosphorous release fertilizer[J].*Environ.Manage.*,2023,**19**:100 766.

[4]唐司尘,杨肖松,张万通,等.鸟粪石及生物炭包膜缓释肥在石灰性土壤中的氮磷释放特性[J].中国科学院大学学报,2021,**38**(**1**):83-93.

[5]WANG S F,MA M X,ZHANG Q R,et al.Efficient phosphate sequestration in waters by the unique hierarchical 3D artemia egg shell supported nano-Mg(OH)(2) composite and sequenced potential application in slow release fertilizer[J]. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2015, **3**(**10**): 2 496-2 503.

[6]HUANG W,CHEN J,HE F,et al.Effective phosphate adsorption by Zr/Al-pillared montmorillonite:Insight into equilibrium,kinetics and thermodynamics[J].*Appl. Clay Sci.*,2015,**104**:252-260.

[7]LU Z,ZHANG K,LIU F,et al.Simultaneous recovery of ammonium and phosphate from aqueous solutions using Mg/Fe modified NaY zeolite:Integration between adsorption and struvite precipitation[J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2022,**299**:121 713.

[8]KUHN D C,CABRAL L L,PEREIRA I C,et al.Development of aerated concrete waste/white cement composite for phosphate adsorption from aqueous solutions:Characterization and modeling studies[J]. *Chem. Eng. Process*, 2023,**184**:109 284.

[9]朱宏伟,于涛,郭志鹏,等.新型给水污泥-粉煤灰陶粒性能与除磷效果[J].环境工程学报,2018,**12**(**10**): 2 741-2 750.

[10]DENG C X,XUE J H,WU Y B.Using magnetite/zirconium-comodified attapulgite as a novel phosphorus (P) sorbent for the efficient removal of P and the adsorption mechanism allowing this effect[J]. *Appl. Water Sci.*, 2023,**13**(**1**):14.

[11]ZHANG M,SONG G,GELARDI D L,et al.Evaluating biochar and its modifications for the removal of ammonium,nitrate,and phosphate in water[J]. *Water Res.*, 2020,**186**:116 303.

[12]JIANG Y H,LI A Y,DENG H,et al.Characteristics of nitrogen and phosphorus adsorption by Mg-loaded biochar from different feedstocks[J]. *Bioresour. Technol.*, 2019,**276**:183-189.

[13]孟依柯,王媛,汪传跃.木屑生物炭在雨水径流中的氮磷淋出和吸附特性[J].环境科学,2021,**42**(**9**): 4 332-4 340.

[14]蒋艳红,李安玉,邓华,等.载镁香蕉秆基生物炭对养猪废水中磷的吸附性能[J].水处理技术,2020, **46**(**6**):33-8;44.

[15]LI L,CHEN Q F,ZHAO C S,et al.A novel chitosan modified magnesium impregnated corn straw biochar for ammonium and phosphate removal from simulated livestock wastewater[J]. *Environ. Technol. Inno.*, 2022, **26**: 16.

[16]JING H P,LI Y,WANG X J,et al.Simultaneous recovery of phosphate, ammonium and humic acid from wastewater using a biochar supported Mg(OH)(2)/bentonite composite[J]. *Environ. Sci-Wat. Res.*, 2019, **5**(**5**):931-943.

[17]LI X,SHI J.Simultaneous adsorption of tetracycline,ammonium and phosphate from wastewater by iron and nitrogen modified biochar:Kinetics, isotherm, thermodynamic and mechanism[J]. *Chemosphere*, 2022, **293**: 133 574.

[18]王章鸿,郭海艳,沈飞,等.热解条件对生物炭性质和氮、磷吸附性能的影响[J].环境科学学报,2015, **35**(**9**):2 805-2 812.

[19]何红艳,邹思佳.介孔生物炭的合成、改性及其对染料的吸附性能研究[J].化学试剂,2020,**42**(**10**): 1 148-1 153.

[20]杨鑫宇,张全悦,武中豪,等.二乙烯三胺改性磁性生物炭对 Cr(Ⅵ)吸附性能研究[J].化学试剂,2023, **45**(**1**):122-128.

[21]毛艳丽,李朝阳,刘超朋,等.磁性分子印迹麦秆炭吸附环丙沙星性能研究[J].化学试剂,2021,**43**(**12**): 1 631-1 637.

[22]LV B W,ZHANG W L,XU D Z,et al.Influence of different metals on production of sewage sludge-based biochar and its application for ammonium and phosphate adsorption removal from wastewater[J].*J.Environ.Chem. Eng.*,2022,**148**(**9**):12.

[23]BILIANI S E,VAKROS J,MANARIOTIS I D.Screening of raw and modified biochars from food processing wastes for the removal of phosphates, nitrates, and ammonia from water[J]. *Sustainability*, 2022, **14**(**24**): 20.

[24]YU Y L,YANG B,PETROPOULOS E,et al.The potential of biochar as N carrier to recover N from wastewater for reuse in planting soil:Adsorption capacity and bioavailability analysis[J].*Separations*,2022,**9**(**11**):15.

[25]XU K,LIN F,DOU X,et al.Recovery of ammonium and phosphate from urine as value-added fertilizer using wood waste biochar loaded with magnesium oxides[J].*J.*

Clean. Prod., 2018, **187**: 205-214.

[26] XI H, ZHANG X, HUA ZHANG A, et al. Concurrent removal of phosphate and ammonium from wastewater for utilization using Mg-doped biochar/bentonite composite beads[J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2022, **285**: 120 399.

[27] ZHANG M, GAO B, YAO Y, et al. Synthesis of porous MgO-biochar nanocomposites for removal of phosphate and nitrate from aqueous solutions[J]. *Chem. Eng. J.*, 2012, **210**: 26-32.

[28] GONG Y P, NI Z Y, XIONG Z Z, et al. Phosphate and ammonium adsorption of the modified biochar based on phragmites australis after phytoremediation[J]. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2017, **24**(**9**): 8 326-8 335.

[29] HE Q S, LI X F, REN Y P. Analysis of the simultaneous adsorption mechanism of ammonium and phosphate on magnesium-modified biochar and the slow release effect of fertiliser[J]. *Biochar*, 2022, **4**(**1**): 16.

[30] YIN Q Q, LIU M T, REN H P. Removal of ammonium and phosphate from water by Mg-modified biochar: Influence of Mg pretreatment and pyrolysis temperature[J]. *Bioresources*, 2019, **14**(**3**): 6 203-6 218.

[31] 何珊珊.镁改性生物炭的制备及其对废水中氮磷的去除效应[D].咸阳:西北农林科技大学,2021.

[32] THANT-ZIN M M, KIM D J. Simultaneous recovery of phosphorus and nitrogen from sewage sludge ash and food wastewater as struvite by Mg-biochar[J]. *J. Hazard. Mater.*, 2021, **403**: 123 704.

[33] 李安玉,李双莉,余碧戈,等.镁浸渍生物炭吸附氨氮和磷:制备优化和吸附机理[J].化工学报,2020, **71**(**4**): 1 683-1 695.

[34] LI B, JING F, HU Z, et al. Simultaneous recovery of nitrogen and phosphorus from biogas slurry by Fe-modified biochar[J]. *J. Saudi Chem. Soc.*, 2021, **25**(**4**): 101 213.

[35] LI J H, LV G H, BAI W B, et al. Modification and use of biochar from wheat straw (Triticum aestivum L.) for nitrate and phosphate removal from water[J]. *Desalin Water Treat*, 2016, **57**(**10**): 4 681-4 693.

[36] XU D Z, FAN X L, CHEN Q, et al. Removal of nitrogen and phosphorus from water by sludge-based biochar modified by montmorillonite coupled with nano zerovalent iron[J]. *Water Sci. Technol.* 2022, **85**(**7**): 15.

[37] LIU X H, WEI J, HOU L A, et al. Feasibility of nanoscale zerovalent iron-loaded sediment-based biochar (nZVI-SBC) for simultaneous removal of nitrate and phosphate: High selectivity toward dinitrogen and synergistic mechanism[J]. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2021, **28**(**28**): 37 448-37 458.

[38] 李书奇.改性硬质生物炭复合材料的制备及其对水体氮磷的吸附作用[D].石家庄:河北师范大学, 2022.

[39] 何琨,姜应和,周龙,等.铁改性生物炭吸附初雨中氮磷的试验研究[J].环境科学与技术,2022, **45**(**7**): 78-86.

[40] MIN L, ZHONGSHENG Z, ZHE L, et al. Removal of nitrogen and phosphorus pollutants from water by $FeCl_3$-impregnated biochar[J]. *Ecol. Eng.*, 2020, **149**: 105 792.

[41] LI S, MA X, MA Z, et al. Mg/Al-layered double hydroxide modified biochar for simultaneous removal phosphate and nitrate from aqueous solution[J]. *Environ. Technol. Inno.*, 2021, **23**: 101 771.

[42] YIN Q, WANG R, ZHAO Z. Application of Mg-Al-modified biochar for simultaneous removal of ammonium, nitrate, and phosphate from eutrophic water[J]. *J. Clean. Prod.*, 2018, **176**: 230-240.

[43] 陈靖.Fe/Mg 改性生物炭去除水中氮磷的研究[D].重庆:重庆大学,2015.

[44] 尚璐.改性生物炭吸附水中氮磷性能及其资源化研究[D].广州:华南理工大学,2019.

[45] 彭广飞.改性污泥生物炭强化水中氮磷吸附性能的研究及其应用[D].常州:常州大学,2020.

[46] 梁嘉琪,吕媛,陆茵,等.铁磁性氧化镁生物炭对玉米加工废水中氮磷的回收效果[J].环境工程,2020, **38**(**9**): 89-94.

[47] 董旭彤.镁/铁盐涂层改性生物炭的制备及其对水体氮磷的吸附作用[D].石家庄:河北师范大学,2021.

[48] WANG Z H, GUO H Y, SHEN F, et al. Biochar produced from oak sawdust by Lanthanum (La)-involved pyrolysis for adsorption of ammonium (NH_4^+), nitrate (NO_3^-), and phosphate (PO_4^{3-})[J]. *Chemosphere*, 2015, **119**: 646-653.

[49] YIN Q, REN H, WANG R, et al. Evaluation of nitrate and phosphate adsorption on Al-modified biochar: Influence of Al content[J]. *Sci. Total Environ.*, 2018, (**631/632**): 895-903.

[50] CHEN L, CHEN X L, ZHOU C H, et al. Environmental-friendly montmorillonite-biochar composites: Facile production and tunable adsorption-release of ammonium and phosphate[J]. *J. Clean. Prod.*, 2017, **156**: 648-659.

[51] WANG M, HU S, WANG Q, et al. Enhanced nitrogen and phosphorus adsorption performance and stabilization by novel panda manure biochar modified by CMC stabilized nZVZ composite in aqueous solution: Mechanisms and application potential[J]. *J. Clean. Prod.*, 2021, **291**: 125 221.

[52]FENG Q, CHEN M, WU P, et al. Simultaneous reclaiming phosphate and ammonium from aqueous solutions by calcium alginate-biochar composite: Sorption performance and governing mechanisms [J]. *Chem. Eng. J.*, 2022, **429**: 132 166.

[53]ZHAO Z, WANG B, FENG Q, et al. Recovery of nitrogen and phosphorus in wastewater by red mud-modified biochar and its potential application[J]. *Sci. Total Environ.*, 2023, **860**: 160 289.

[54]朱倩,张乃明,夏运生,等.5 种活性生物炭对水体低浓度氮、磷吸附效果研究[J].生态环境学报,2021, **30**(**12**):2 387-2 394.

[55]张秋亚,康旭栋,彭明国,等.磁性污泥基生物炭的制备及其对水溶液中氮磷的同步回收[J].环境工程学报,2022, **16**(**11**):3 558-3 568.

[56]SHAKOOR M B, YE Z L, CHEN S. Engineered biochars for recovering phosphate and ammonium from wastewater: A review[J]. *Sci. Total Environ.*, 2021, **779**: 146 240.

[57]DU M, ZHANG Y, WANG Z, et al. La-doped activated carbon as high-efficiency phosphorus adsorbent: DFT exploration of the adsorption mechanism [J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2022, **298**: 121 585.

[58]YIN Q, LIU M, LI Y, et al. Computational study of phosphate adsorption on Mg/Ca modified biochar structure in aqueous solution[J]. *Chemosphere*, 2021, **269**: 129 374.

[59]PALANSOORIYA K N, KIM S, IGALAVITHANA A D, et al. Fe(Ⅲ) loaded chitosan-biochar composite fibers for the removal of phosphate from water[J]. *J. Hazard. Mater.*, 2021, **415**: 125 464.

[60]SUN C Y, CAO H, HUANG C, et al. Eggshell based biochar for highly efficient adsorption and recovery of phosphorus from aqueous solution: Kinetics, mechanism and potential as phosphorus fertilizer[J]. *Bioresour. Technol.*, 2022, **362**: 9.

[61]LEE J E, PARK Y K. Applications of modified biochar-based materials for the removal of environment pollutants: A mini review[J]. *Sustainability*, 2020, **12**(**15**): 15.

[62]WANG B, MA Y, LEE X, et al. Environmental-friendly coal gangue-biochar composites reclaiming phosphate from water as a slow-release fertilizer[J]. *Sci. Total Environ.*, 2021, **758**: 143 664.

[63]SIM D H H, TAN I A W, LIM L L P, et al. Encapsulated biochar-based sustained release fertilizer for precision agriculture: A review [J]. *J. Clean. Prod.*, 2021, **303**: 127 018.

[64]MARCIŃCZYK M, OLESZCZUK P. Biochar and engineered biochar as slow- and controlled-release fertilizers [J]. *J. Clean. Prod.*, 2022, **339**: 130 685.

低共熔溶剂在食品质量安全检测中的研究进展

王超[a],杨雪[a,b,c],于照[a],李硕[a,b,c],孙鹏*[a,b,c]
(黑龙江八一农垦大学 a.食品学院,b.农业农村部农产品及加工品质量监督检验测试中心(大庆),
c.国家杂粮工程技术中心,黑龙江 大庆 163319)

摘要:低共熔溶剂(DESs)作为一种可设计的绿色溶剂,具有取代传统萃取剂的潜力。概述了近几年 DESs 作为萃取剂在食品的样品前处理中的研究进展,综述了其在各类食品样品中农药残留、兽药残留、重金属、食品添加剂和合成色素分析检测中的应用,同时与其他常规方法进行比较,并且对 DESs 作为萃取剂在食品质量安全检测领域应用中存在的问题及今后的发展方向进行了讨论和展望。

关键词:低共熔溶剂;样品前处理;食品质量安全;检测方法;发展
中图分类号:TS251.7 **文献标识码**:A **文章编号**:0258-3283(2023)07-0128-08
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0038

Research Progress of Deep Eutectic Solvents in Food Safety Testing *WANG Chao*[a], *YANG Xue*[a,b,c], *YU Zhao*[a], *LI Shuo*[a,b,c], *SUN Peng*[*a,b,c] (a.College of Food Science, b.Agricultural Products and Procesed Products Supervision and Testing Center, Ministry of Agriculture, c. National Coarse Cereals Engineering Research Center, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: Deep eutectic solvents (DESs) have the potential to replace conventional extracts as a designable green solvent. The article outlined the progress of research on DESs as an extract from sample pretreatment for food products during recent years. An overview of its application for the analysis and detection of pesticide residues, veterinary drug residues, heavy metals, food additives, and synthetic pigments in various food samples. Also compared with other conventional methods. The problems with applications of DESs as the extract in the field of food quality and safety testing and its future application development were also discussed and prospected.

Key words: deep eutectic solvent; sample pretreatment; food quality and safety; testing methods; development

随着近几年新冠疫情的持续影响,食品安全问题得到了国际各界的广泛关注,更是成为普通民众眼中的焦点[1-3]。根据世界卫生组织的定义,食品安全问题是“食物中有毒、有害物质对人体健康影响的公共卫生问题”。有害成分主要来源于农业种植、畜牧养殖、食品卫生及加工储存等。通过食物的摄入,它们直接影响人类甚至动物的身体素质,因此,建立完善的食品安全检验检测方法,是保障食品安全科学管控的重要手段[4]。

样品前处理是食品检测体系中的关键步骤,可以确保后续对于复杂基质检测的灵敏度,以便精确的提取目标物。传统样品前处理技术如固相萃取[5]、索氏提取[6]、固-液萃取[7]和液-液萃取[8]等,通常周期长、重复性差,最主要的缺陷为有机溶剂的大量消耗。针对绿色分析化学中减少或消除有害成分的理念[9],已经诞生出较成熟的微型前处理技术,例如固相微萃取(SPME)[10]和液-液微萃取(LPME)[11]技术。目前,这两类技术应用最为广泛的提取剂大多为正己烷、乙腈、甲醇等溶剂,但这些溶剂由于挥发性大、毒性高,会造成严重的环境污染,并威胁人类健康[12]。在绿色分析化学中所提倡的绿色溶剂在当今科研生产领域中的发展尤为迅速,许多相关的提取技术已经出现,并成功替代了传统的提取程序,用来增强检测程序的安全性。研究者们在过去几十年中提出了几种绿色溶剂:离子液体(ILs)[13]、超临界流体[14]和低共熔溶剂(DESs)[15]。由于其存在大量的可能性,这些新型的溶剂引起了科学界的浓厚兴趣,因此,它们能够开拓新颖的设计思路产生巨大的影响力。虽然 ILs 环保,但是粘度大、回收不易,

收稿日期:2023-01-28;**网络首发日期**:2023-04-14
基金项目:低共熔溶剂掺杂碳材料的制备及其对有害物质的吸附研究项目(ZRCPY202124)。
作者简介:王超(1998-),男,黑龙江鸡西人,硕士生,主要研究方向为食品样品前处理。
通讯作者:孙鹏,E-mail:byndsunpeng@163.com。
引用本文:王超,杨雪,于照,等.低共熔溶剂在食品质量安全检测中的研究进展[J].化学试剂,2023,**45**(**7**):128-135。

而超临界流体设备造价高,且对水溶性成分萃取效果差。综合考虑到成本、制备方法等客观因素,低共熔溶剂以其特有的环保、廉价、获取简单、粘度低等特点可作为科研人员的最佳选择。

低共熔溶剂是替代 SPME 和 LPME 技术等常用传统溶剂的一种很有前景的新型溶剂[16],自 Abbot 首次发现以来就备受关注,利用其可设计性广泛运用于环境、医药和食品领域中的痕量检测。本文主要介绍了低共熔溶剂的合成、性质及分类,综述了近年来在食品质量安全中农药兽药残留、重金属累积、合成色素及添加剂等有害成分样品前处理的应用并展望了未来的开发方向。

1　低共熔溶剂的合成、性质和分类

1.1　低共熔溶剂的合成

DESs 是一类由氢键供体(HBD)和氢键受体(HBA)按照一定的物质的量比例,通过分子间氢键的结合而形成的一种绿色溶剂,其制备是两种或三种化合物在 50~100 ℃下混合组分来形成液态的低共熔混合物。2003 年,Abbott 等[17]通过在 80 ℃下加热搅拌,以氯化胆碱和尿素为材料合成出了类似离子液体的新溶液,因其熔点比单个组分熔点低,因此被命名为低共熔溶剂。该方法可称为搅拌加热法,方法操作简单、得率高,因此被广泛用于 DESs 的制备[18,19]。之后又出现两种小众制备法,其一是冷冻干燥法,将各固态单组分经由水溶液混合,通过冷冻干燥制备出 DESs[20];另一个为研磨法,是将两组分混合后研磨至形成均匀态[21]。

1.2　低共熔溶剂的性质

1.2.1　熔点

DESs 的熔点是各原料成分熔化制造 DESs 时的温度,它限制了该 DESs 产生共熔现象的最低温度。例如,最初发现的以氯化胆碱和尿素合成的 DESs,其熔点为 12 ℃,远低于单独成分的熔点(302 和 133 ℃)[22]。DESs 的熔点取决于 HBD 中羟基的数目和 HBA 与 HBD 种类的影响[23]。不同胆碱盐和尿素组成的 DESs 的熔点的大小顺序为 $ChF>ChNO_3>ChCl>ChBF_4$,表明 DESs 的熔点确实受氢键强度的影响。因此,选择合适的 HBA 和 HBD 种类配比,可以得到该组分 DESs 的最适熔点。

1.2.2　挥发性

DESs 的组成成分大多数为固态或液态物质,然而,通过两种组分混合而产生的 DESs,挥发性极低。因此,比起挥发性有机溶剂,使用 DESs 时可大大降低爆炸的风险,保证实验操作安全。

1.2.3　密度

大多数季铵盐与氢键供体合成的 DESs 密度在 1.0~1.35 g/cm^3 之间。通常,温度与 DESs 的密度具有相关性,DESs 的密度随着温度的升高而降低。绝大多数 DESs 的密度均大于水和有机溶剂,已知密度最大的 DESs 是由 n(氯化锌):n(尿素)= 1:3.5 混合制成,密度高达 1.63 g/cm^3[24]。

1.2.4　粘度

DESs 的粘度多使用粘度计测定,大多数 DESs 在室温下的粘度较大,通常大于 100 mPa·s[25]。DESs 是通过氢键相互作用合成的,形成的氢键越多或者氢键的作用力越强,则粘度越大,流动性也越差,这意味着低粘度的液体很容易流动,而高粘度的液体则展现出流动较慢类似糖浆的流动特征,随着温度的升高而急剧下降[26]。一般来说粘度受到组分配比、温度和含水量等因素的影响,因此,作萃取剂时使用低粘度 DESs 以降低干扰很有必要。

1.2.5　极性

DESs 对 Fe_3O_4、Cu_2O、MnO_2、SO_2、CO_2 等无机物质和难溶的有机物具有良好的溶解性。低共熔溶剂的溶解性大小取决于其单组分表现出的极性。Abbott 等[27]报道,[氯化胆碱/甘油]的极性相似于咪唑类离子液体,并测定了不同物质的量比的 DESs[氯化胆碱/甘油]的极性,研究表明随着氯化胆碱与甘油物质的量比的增加,DESs 的极性值随之增加。另外,低共熔溶剂中含有的烷基链越长,其极性越弱。

1.2.6　毒性

DESs 不仅挥发性低,而且其组成成分大部分为绿色的化合物,合成过程中不需要任何有机溶剂的加入。低共熔溶剂的毒性通常低于离子液体,只有一小部分低共熔溶剂达到一定的毒性水平才会抑制生物细胞的生长[28]。Hayyan 等[29]初次研究了氯化胆碱基和季膦盐基 DESs 的毒性和细胞毒性,最终发现 DESs 的毒性和细胞毒性归因于所用成分的结构差异。

2　低共熔溶剂的分类

DESs 具有盐和中性分子(氢键供体),是由两种或两种以上化合物混合形成的一种复合物。

混合物的熔点或纯化合物的熔点降低,归因于氢键产生的阴离子电荷的迁移。氢键和范德华力相互作用阻止了初始化合物的结晶,混合物即呈现溶液状态,这现象被称为低共熔。DESs 按配合剂性质通常分为 4 种类型[30]。

表 1 4 种常规的 DESs 类型

Tab.1 Four types of conventional DESs

类型	组合	举例
Ⅰ型	金属氯化物、季铵盐	$ZnCl_2$+ChCl(氯化胆碱)
Ⅱ型	水合金属氯化物、季铵盐	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$+ChCl
Ⅲ型	季铵盐、氢键供体	ChCl+Urea(尿素)
Ⅳ型	水合金属氯化物、氢键供体	$ZnCl_2$+Urea

从 DESs 首次诞生到现在,DESs 的研发一直未间断过,DESs 的类型已经不限制于以上 4 类两种组分合成的常规 DESs。2005 年,Imperato 等[31]报道了多元醇(糖醇)/尿素/铵盐组合而成的三元 DESs。2011 年,Choi 等[32]提出自然界中存在类似 DESs 的物质的可能性,并称之为天然低共熔溶剂(Natural deep eutectic solvent, NADES)。自此以后,研究者将胆碱类衍生物、有机酸、糖和氨基酸等小分子作为组分合成了一系列的 NADESs[33-35]。从经济和环境角度考虑,NADESs 的生物相容性和可持续性均优于 DESs,在食品安全的检测分析领域中展现出巨大的潜力。

3 DESs 在食品安全样品预处理中的应用

3.1 DESs 在农药残留预处理中的应用

农药残留问题是食品安全中最主要的问题之一。近五十年,随着农业的发展,人工合成的有机农药数量庞大、种类繁多,广泛应用于农业生产[36]。因为部分农药存在着耐受性,所以每年有许多新型化合物用作杀虫剂、除草剂和抗菌剂。农药的过度投放,其次是农药残留在土壤、水体以及食物链的传递,直接或间接影响人类的健康[37,38]。因此,开发同时检测农产品和食品中农药残留检测方法十分必要。

Nemati 等[39]提出了一种新的蒸发辅助液-液微萃取法来提取果汁中拟除虫菊酯农药,后续使用气相色谱-质谱法分析。该团队以氯化胆碱和丁酸为原料合成 DESs 作为萃取剂,氯仿作为密度改性剂,与分析物混合,将液相中氯仿蒸发出去导致萃取剂液滴释放。随着氯仿的去除,分析物因两相间的密度差而从水相向上移动,富集分析物。在最终条件下,萃取回收率和富集因子分别在 83%~92%和 623~690 之间,RSD<6.9%,检出限和定量限范围在 9~21 ng/mL 和 31~69 ng/mL 之间。与以往报道的方法相比,该方法具有更好的精密度和准确度。

Sereshti 等[40]采用了一种热诱导自由基聚合物(AIBN)作引发剂,制备聚 2-甲基丙烯酸和十四醇组合的新型 DESs 并结合静电纺丝工艺。首次使 DESs 与聚酰胺 6 混合,并结合静电纺丝工艺,将其静电纺丝成复合纤维支架,作为吸附剂对谷物面粉中农药残留进行富集,用气相色谱-质谱法分析。优化条件下,获得定量限范围为 0.016~1.805 μg/L,日内和日间精度分别在 1.1%~5.8%和 2.4%~8.5%之间。该方法对玉米、水稻、小麦和糕点面粉样品中各类农药残留的回收率在 71%~118%之间,RSD<7.5%。与其他发表著作的方法相比,这是一种新颖、环保、高效的谷物样品农药残留检测技术。

Phosiri 等[41]合成了一种基于氯化胆碱和蔗糖合成的 NADES 改性的磁层氢氧化物复合材料,并应用于有机氯农药的萃取分析。在优化的磁性固相萃取方法下,富集系数为 158,检出限较低,添加水和土壤样品的回收率分别为 80.9%~104.7%(RSD<7.9%)和 88.8%~104.1%(RSD<7.3%)。与其他检测技术相比,该方法对环境中微量有机氯农药残留的测定敏感且可靠。

由于 DESs 具有低毒性、环境友好性、生物降解性特点,可作为有机物分析程序中的替代溶剂。此外,DESs 在应用过程中还可以减轻对环境的二次污染。因此,对于环境和样品中的农药残留检测,DESs 相比其他萃取剂具有独特优势。

3.2 DESs 在兽药残留预处理中的应用

兽药用于控制不同的动物疾病,促进动物源性食品的生产并增强产品质量[42]。但在生产食品的动物中使用兽药可能会导致动物源性食品中残留兽药,肉类和食用组织中兽药含量超过允许的最大残留限量,可能会影响食品贸易和人类健康[43]。因此,设计出快速分析食品中多类兽药残留的方法具有重要意义。

目前 DESs 制备已经不局限于二元共熔,逐渐趋向多元化[44]。Sereshti 等[45]开发了一种基于新型疏水 DESs 的绿色液-液微萃取技术,以百里香酚、乙二醇和苯甲醇合成的三元 DESs,提取婴儿配方中的四环素,并结合高效液相色谱法分

析。得到定量限为 3 ~ 9.32 μg/L,回收率在 68.9% ~ 102.0%之间,RSD 在 9%以内。本方法可替代涡旋辅助乳化液-液微萃取法,是一种安全、简便、环境友好的技术。

Zhao 等[46]建立了一种涡旋辅助液-液微萃取液微萃取和磁性固相萃取相结合的方法,测定牛奶中 3 种性激素残留。作者以氯化胆碱和尿素等 DESs 作为萃取剂,磁性多壁碳纳米管作为吸附剂,将 DESs 吸附至表面,结合涡旋辅助和盐析改善萃取效果。最佳实验条件下,方法检出限和定量限分别低至 1.0 ~ 1.3 ng/mL 和 2.5 ~ 4.5 ng/mL,不同牛奶样品中回收率均在 80.1% ~ 116.4%范围内。与以前的检测方法相比较,检测系统回收率好、更能节省时间。

Shishov 等[47]提出了一种三组分 DESs(季铵盐、羧酸和中链脂肪酸)对固体样品进行预处理的方法,用于鸡肉中磺胺类兽药的分离。首先以四丁基溴化铵、丙二酸和己酸合成最优 DESs 溶解样品中分析物,在此溶剂相基础上加入水相,实现对磺胺药物的液-液微萃取,最后结合高效色谱法分析。丙二酸发挥降低 DESs 粘度的作用,为分析物在溶剂相中电离提供帮助,提高了萃取效率。在最佳条件下,磺胺甲噁唑和磺胺甲嘧啶检出限分别为 3、7 μg/L。与普通检测相比,溶剂消耗更小,并允许排除吸附时间。

兽药残留不同于农药残留,含量更低,毒性当量更大,代谢物更多,检测基质更加复杂。上述内容可以证明 DESs 作萃取剂对常见的几种兽药残留(如磺胺类、抗生素类、激素类等)都有可靠的萃取能力,由此可见,DESs 的应用对动物源性食品的安全监管更有意义。

3.3　DESs 在重金属预处理中应用

食物中的金属元素污染已经对食品安全和公众健康造成了严重威胁[48]。人体非必需微量元素,也就是重金属(如 Hg、Cu、Fe、Pb、Ag、Cd、Cr、As 及其混合物),主要来源于农业投入和食品加工过程。重金属摄入后难以清除,在体内会改变生物分子构象或高级结构,当累积到一定水平甚至会诱导神经类疾病[49,50]。因此高效准确的报告食品相关基质中的重金属残留水平是尤为重要的。

Karimi 等[51]以氯化胆碱基 DESs 用于富集不同种食用油中铅离子与镉离子,最后用于火焰原子吸收法鉴定。最佳条件下,该方法的检出限分别为 8、0.2 ng/mL,回收率均在 95.3% ~ 104.9%内,两种离子的 RSD 分别在 2.0% ~ 5.0%和 5.0% ~ 8.3%范围之间。通过比较其他传统方法,基于 DESs 的液-液微萃取法富集因子高,检出限低,提取时间短。

Elahi 等[52]采用超声波辅助方式,以四丁基氯化铵和癸酸为原料合成疏水性 DESs,并用于鱼类和牛奶等食品中镍和锌的萃取,最后使用 ICP-MS 测定。憎水性 DESs 可适用于各种复杂食品基质,相较于亲水性 DESs 对金属离子效果更显著。在最优条件下,该方法检出限分别为 0.029、1.5 μg/L,回收率分别在 102.6% ~ 103.3%和 101.4% ~ 103.9%内,RSD 在 1.6% ~ 1.8%和 2.4% ~ 2.7%内。与其他常规方案比较,这种新开发的方法操作简单、选择性高且绿色度更高。

最近衍生出许多亲水 DESs 与纳米级材料联用的技术应用于目标分析物的萃取吸附[53]。Alomar 等[54]以四丁基溴化铵和甘油合成 DESs 作为碳纳米管的功能化剂,作为水样中汞离子的吸附剂。该功能化 CNT 表现出对汞离子的吸附潜力,最大吸附量为 177.76 mg/g。此类功能化 CNT 的表面积明显增加,证明这种组合材料是对重金属离子的充分吸附剂。在方法基础上尝试不同 DESs 功能化基团,结合原子吸收法或 ICP 法可用作食品中多种重金属的痕量分析。

利用 DESs 作为萃取剂萃取重金属,可从不同食品环境萃取所需的金属离子,本身价格便宜、制备简单、操作方便,还能防止再次污染。DESs 溶剂可同时作为配合剂与萃取剂,降低资源损耗,为食品质量监管提供帮助。

3.4　DESs 在食品添加剂预处理中的应用

食品添加剂是食品生产和加工的重要组成部分,其功能特性不仅对改善感官质量至关重要,而且对防止变质从而延长货架期也十分重要。如果添加剂用量超标或不符合标准,将违背消费者的意愿,对人体肠道菌群产生影响以至于损害健康[55]。因此建立对精准测定食品中添加剂含量的分析方法具有实际意义。

Mogaddam 等[56]将 n(四丁基氯化铵):n(对苯二酚)= 1:2制成新型疏水 DESs,从油样中提取 3 种酚类抗氧化剂,并结合气相色谱法分析。食用油中一般会加入少量的抗氧化剂阻止或延缓油脂变质,提高稳定性。作者使用了一种“可切换萃取”的方法,在碱性环境下通过酸碱反应调节

pH 来改变萃取剂形式对抗氧化成分进行富集,可以增强萃取效果。碱性条件由氢氧化钠构成,主要作用是使分析物去质子化,然后提取至水相,不同 pH 状态时萃取剂会由疏水转换为亲水,并且过程可逆,萃取剂与分析物充分接触,因此萃取效率得到提高。该方法具有良好的重复性和可靠的灵敏度,检出限在 0.13~0.42 ng/mL 之间,回收率在 74%~89%内,富集因子为 370~445,容易应用于不同食品的抗氧化剂测定。

Shi 等[57]首次提出了一种利用 2-乙基己基-4-羟基苯甲酸酯(EE)与荧光增白剂 52(FWA52)原位在线合成疏水 DESs,于面条、鱼丸、蘑菇和纸杯等食品接触类材料中分析和提取 FWA52。在最优实验条件下,线性范围为 0.20~25 μg/L(R^2=0.999 5),检出限和定量限分别为 0.045 和 0.20 μg/L,实际样品回收率为 82%~113%,RSD 为 4.7%~9.9%。EE 和 FWA52 结构间可以形成强氢键,正因如此 FWA52 的溶解度逐渐降低,最后从水相中分离。该方法能从食品和食品接触材料中高效提取和分析 FWA52,与其他方法相比操作简单、省时、不使用有毒溶剂。

防腐剂在食品工业中是最常见的添加剂,以延长食品保质期和维护消费者健康,但是由于产品制造中不正规使用或超剂量添加,会严重威胁公众健康[58]。Alimoradi 等[59]首次研究了一种表面活性剂辅助的 DESs 基液-液微萃取技术,以氯化胆碱、乙酸和丁醇合成三元 DESs,用于从果汁中分离纳他霉素,并结合高效色谱-紫外检测法分析。作者将分析物、表面活性剂和水混溶提取剂形成均匀态,采用盐析作用打破均匀溶液,增强萃取效率。在最佳的萃取工艺条件下,检出限为 0.78 ng/mL,回收率为 76%,RSD 在 4.9%~7.1%范围内。与其他方法相比,其精密度较高,且能够进行绿色、简便和高效的监测。

传统萃取方法通常消耗大量有机溶剂,而以 DESs 为基础的萃取方法普遍成本低、操作简单且更加环保。可以用于食品中食品添加剂的精准检测和严格管控。

3.5 DESs 在合成色素预处理方法中的应用

色泽是食品感官评价的一项重要指标。天然色素在加工储存过程中不易保存,而人工合成色素更加稳定[60]。生产商因天然色素价格昂贵而选择廉价的合成色素,更有少部分使用食品违禁染料(如孔雀石绿、苏丹红、酸性橙等)。合成色素的违规使用会造成巨大的食品安全隐患[61,62]。因此,检测食品中合成色素的使用量以及是否添加违规染料十分重要。

针对各类食品中合成色素的检测分析手段较多,但部分标准方法步骤复杂,在批量化检测时成本高和效率低的劣势非常明显,而基于 DESs 的色素检测技术能够弥补不足[63,64]。Ozak 等[65]利用百里香酚和香豆素合成新型 DESs,结合超声辅助萃取,对香料样品中的苏丹红(Ⅰ~Ⅳ)进行简单、环保的分析。最优参数下,R^2 值高于 0.998 9,定量限小于 1.17 μg/L,添加样品回收率在 85.55%~92.99%之间,RSD 在 3.17%以下。与以往报道方法相比,提取时间相当短,该法可成功应用于不同食品中性质相似的人造色素。

Zhang 等[66]在 PPG400/Na_2SO_4 双水相体系的基础上添加氯化胆碱和尿素合成的 DESs,用于饮料中的苋菜红、甲基绿等色素含量。双水相具备生物相容性和可持续性,却无法在一定阶段控制分析物的分布。DESs 的加入影响两相组分,导致各相极性的区别,从而控制色素的位置。同时,研究通过改变 Na_2SO_4 质量产生底相和顶相的相反转现象,上层苋菜红有下降趋势,从 94.45%减少到 4.09%。与其他使用不同试剂的方法比较,加入 DESs 可以实现对两相中色素的完全控制分配,提高了色素的选择性分离能力。

Xu 等[67]以亲水性(四丁基溴化铵和聚丙二醇 400)和疏水性(氯化胆碱和甘油)DESs 构建新型双水相系统,针对不溶于水的色素进行分离。实际样品的回收率为 92.3%~106.1%,混合样品中各类色素的回收率在 88.64%以上。色素的分布关键在于色素的疏水性和成相组分,这极大扩展了双水相系统的设计性能。该方法在色素萃取领域具有出色的裁剪能力,可作为不同疏水性色素的可调控分离系统。

综合上述文献可以看出,DESs 可用于从不同食品样品中萃取分离不同种类的目标化合物,因此,DESs 作为萃取溶剂具有独特的优势,与传统萃取体系相比,DESs 在农药残留、兽药残留、食品添加剂、金属离子、合成色素等物质萃取检测中展现出良好的应用前景。

4 结论与展望

DESs 在化合物分离领域中已经显示出巨大的应用潜力,这不仅是因为它的“绿色性”,还因

为它独特的物理化学性质。作为固相萃取和液-液微萃取中流动相和固定相制备溶剂时,DESs 的可电离性和强大的氢键使其具有与传统有机溶剂不同的效果。用 DESs 代替传统溶剂展现的主要优点,如操作更简单,成本更低和环境安全等。此外,基于食品中农药残留、兽药残留、金属离子、添加剂及染料的食品安全质量新分析方法的选择性和敏感性往往优于传统的提取技术。然而,对于 DESs 的内在理论和微观结构方面的研究仍不足,其相对于传统有机溶剂的优势尚未充分显现。同时,DESs 因其可设计性具有更大的开拓空间。毫无疑问,在未来利用 DESs 维护食品安全的应用程度将持续增长,以后的研究和发展主要集中在下列 3 个方向:(1)合成新型的 DESs、三元 DESs 或 NADESs,并用于食品样品分析中新型检测技术的开发;(2)DESs 与各种纳米材料结合,提高从复杂食品基质中萃取目标物的萃取效果;(3)探索各种技术与 DESs 的联合使用,改善 DESs 对食品中目标化合物的选择性和萃取性能。

参考文献:

[1]FAOUR-KLINGBEIL D, OSAILI T M, AL-NABULSI A A, et al. How has public perception of food safety and health risks changed a year after the pandemic and vaccines roll out? [J]. *Food Control*, 2022, **139**: 109 073.

[2]MIN S, XIANG C, ZHANG X H. Impacts of the COVID-19 pandemic on consumers′ food safety knowledge and behavior in China [J]. *J. Integr. Agr.*, 2020, **19**(**12**): 2 926-2 936.

[3]DJEKIC I, NIKOLIC A, UZUNOVIC M, et al. Covid-19 pandemic effects on food safety-multi-country survey study[J]. *Food Control*, 2021, **122**: 107 800.

[4]WONG S K, SIN D W M, KAARLS R, et al. International symposium on "food and health: From measurement science to quality and safety" [J]. *Accredit. Qual. Assur.*, 2012, **17**: 557-560.

[5]ZHANG C, XING H F, YANG L G, et al. Development trend and prospect of solid phase extraction technology [J]. *Chin. J. Chem. Eng.*, 2022, **42**: 245-255.

[6]CASTRO M D L D, PRIEGO-CAOOTE F. Soxhlet extraction: Past and present panacea [J]. *J. Chromatogr. A*, 2010, **1 217**(**16**): 2 383-2389.

[7]HIDAYAH N N, ABIDIN S Z. The evolution of mineral processing in extraction of rare earth elements using solid-liquid extraction over liquid-liquid extraction: A review [J]. *Miner. Eng.*, 2017, **112**: 103-113.

[8]SPRAKEL L M J, SCHUUR B. Solvent developments for liquid-liquid extraction of carboxylic acids in perspective [J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2019, **211**: 935-957.

[9]KAYA S I, CETINKAYA A, OZKAN S A. Green analytical chemistry approaches on environmental analysis [J]. *Trends Environ. Anal.*, 2022, **33**: e00 157.

[10]GHORBANI M, AGHAMOHAMMADHASSAN M, CHAMSAZ M, et al. Dispersive solid phase microextraction[J]. *TrAC Trend. Anal. Chem.*, 2019, **118**: 793-809.

[11]SAJID M. Dispersive liquid-liquid microextraction: Evolution in design, application areas, and green aspects [J]. *TrAC Trend. Anal. Chem.*, 2022, **152**: 116 636.

[12]XU H Q, JIA Y, SUN Z D, et al. Environmental pollution, a hidden culprit for health issues[J]. *Eco. Environ. Health*, 2022, **1**(**1**): 31-45.

[13]GOUTHAM R, ROHIT P, VIGNESHWAR S S, et al. Ionic liquids in wastewater treatment: A review on pollutant removal and degradation, recovery of ionic liquids, economics and future perspectives [J]. *J. Mol. Liq.*, 2022, **349**: 118 150.

[14]DIAS A L B, AGUIAR A C, ROSTAGNO M A. Extraction of natural products using supercritical fluids and pressurized liquids assisted by ultrasound: Current status and trends[J]. *Ultrason. Sonochem.*, 2021, **74**: 105 584.

[15]SANTOS L B, ASSIS R S, BARRETO J A, et al. Deep eutectic solvents in liquid-phase microextraction: Contribution to green chemistry [J]. *TrAC Trend. Anal. Chem.*, 2022, **146**: 116 478.

[16]SAINI A, KUMAR A, PANESAR P S, et al. Potential of deep eutectic solvents in the extraction of value-added compounds from agro-industrial by-products [J]. *Appl. Food Res.*, 2022, **2**(**2**): 100 211.

[17]ABBOTT A P, CAPPER G, DAVIES D L, et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures[J]. *Chem. Commun.*, 2003, **1**: 70-71.

[18]CHEN Y, XU F X, PANG M M, et al. Microwave-assisted hydrodistillation extraction based on microwave-assisted preparation of deep eutectic solvents coupled with GC-MS for analysis of essential oils from clove buds[J]. *Sustain. Chem. Pharm.*, 2022, **27**: 100 695.

[19]QIAO L Z, SUN R T, TAO Y, et al. New low viscous hydrophobic deep eutectic solvents for the ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of endocrine-disrupting phenols in water, milk and beverage [J]. *J. Chromatogr. A*, 2022, **1 662**: 462 728.

[20]GUTIERREZ M C, FERRER M L, MATEO C R, et al. Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: A suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures [J]. *Langmuir*, 2009, **25**(**10**): 5 509-5 515.

[21]FLORINDO C, OLIVEIRA F S, REBELO L P N, et al. Insights into the synthesis and properties of deep eutec-

tic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids[J].*ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2014, **2**(**10**): 2 416-2 425.

[22] TANG B K, ZHANG H, ROW K H. Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples [J]. *J. Sep. Sci.*, 2015, **38**(**6**): 1 053-1 064.

[23] ABBOTT A P, CAPPER G, DAVIES D L, et al. Solubility of metal oxides in deep eutectic solvents based on choline chloride [J]. *J. Chem. Eng. Data*, 2006, **15**(**4**): 1 280-1 282.

[24] MOTA-MORALES J D, GUTIERREZ M C, SANCHEZ I C, et al. Frontal polymerizations carried out in deep-eutectic mixtures providing both the monomers and the polymerization medium [J]. *Chem. Commun.*, 2011, **47**(**18**): 5 328-5 330.

[25] TANG B K, ROW K H. Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences[J]. *Monatsh. Chem.*, 2013, **144**: 1 427-1 454.

[26] 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.

[27] ABBOTT A P, HARRIS R C, RYDER K S, et al. Glycerol eutectics as sustainable solvent systems [J]. *Green Chem.*, 2011, **13**(**1**): 82-90.

[28] TORREGROSA-CRESPO J, MARSET X, GUILLENA G, et al. New guidelines for testing "Deep eutectic solvents" toxicity and their effects on the environment and living beings[J]. *Sci. Total. Environ.*, 2020, **704**: 135 382.

[29] HAYYAN M, HASHIM M A, AL-SAADI M A, et al. Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents [J]. *Chemosphere*, 2013, **93**(**2**): 455-459.

[30] TOME L I N, BAIAO V, SILVA W D, et al. Deep eutectic solvents for the production and application of new materials[J]. *Appl. Mater. Today*, 2018, **10**: 30-50.

[31] IMPERATO G, EIBLER E, NIEDERMAIER J, et al. Low-melting sugar-urea-salt mixtures as solvents for Diels-Alder reactions [J]. *Chem. Commun.*, 2005, **9**: 1 170-1 172.

[32] CHOI Y H, SPRONSEN J V, DAI Y, et al. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? [J]. *Plant Physiol.*, 2011, **156**(**4**): 1 701-1 705.

[33] RADOSEVIC K, ĆURKO N, SRCEK V G, et al. Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity[J]. *LWT*, 2016, **73**: 45-51.

[34] DAI Y, ROZEM E, VERPOORTE R, et al. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from Catharanthus roseus with high extractability and stability replacing conventional organic solvents[J]. *J. Chromatogr. A*, 2016, **1 434**: 50-56.

[35] NIA N N, HADJMOHAMMAD M R. Amino acids-based hydrophobic natural deep eutectic solvents as a green acceptor phase in two-phase hollow fiber-liquid microextraction for the determination of caffeic acid in coffee, green tea, and tomato samples[J]. *Microchem. J.*, 2021, **164**: 106 021.

[36] SABZEVARI S, HOFMAN J. A worldwide review of currently used pesticides′ monitoring in agricultural soils [J]. *Sci. Total. Environ.*, 2022, **812**: 152 344.

[37] EL-NAHHAL I, EL-NAHHAL Y. Pesticide residues in drinking water, their potential risk to human health and removal options [J]. *J. Environ. Manage.*, 2021, **299**: 113 611.

[38] DHANANJAYAN V, RAVICHANDRAN B. Occupational health risk of farmers exposed to pesticides in agricultural activities[J]. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health*, 2018, **4**: 31-37.

[39] NEMATI M, FARAJZADEH M A, MOGADDAM M R A, et al. Development of a gas-controlled deep eutectic solvent-based evaporation-assisted dispersive liquid-liquid microextraction approach for the extraction of pyrethroid pesticides from fruit juices [J]. *Microchem. J.*, 2022, **175**: 107 196.

[40] SERESHTI H, MOHAMMADI Z, SOLTANI S, et al. Development of a gas-controlled deep eutectic solvent-based evaporation-assisted dispersive liquid-liquid microextraction approach for the extraction of pyrethroid pesticides from fruit juices [J]. *J. Mol. Liq.*, 2022, **364**: 120 077.

[41] PHOSIRI P, SANTALADCHAIYAKIT Y, BURAKHAM R. Natural deep eutectic solvent-decorated magnetic layered double hydroxide as a sorbent for the enrichment of organochlorine pesticides in environmental samples[J]. *J. Chromatogr. A*, 2022, **1 673**: 46 311.

[42] ROCHA D C, ROCHA C S, TAVARES D S, et al. Veterinary antibiotics and plant physiology: An overview[J]. *Sci. Total. Environ.*, 2021, **767**: 144 902.

[43] TURNIPSEED S B, ANDERSEN W C. Comprehensive analytical chemistry [M]. The Netherlands: Elsevier Besloten Vennootschap, 2008: 307-338.

[44] RASHID S N, HAYYAN A, HAYYAN M, et al. Ternary glycerol-based deep eutectic solvents: Physicochemical properties and enzymatic activity [J]. *Chem. Eng. Resd. Des.*, 2021, **169**: 77-85.

[45] SERESHTI H, ZAREI H M, SOLTANI S, et al. Green vortex-assisted emulsification microextraction using a ternary deep eutectic solvent for extraction of tetracy-

clines in infant formulas[J]. *Food Chem.*, 2022, **396**: 133 743.

[46] ZHAO Z X, LIU C, LIAN J X, et al. Development of extraction separation technology based on deep eutectic solvent and magnetic nanoparticles for determination of three sex hormones in milk[J]. *J. Chromatogr. B*, 2021, **1 166**: 122 558.

[47] SHISHOV A, GORBUNOV A, BARANOVSKII E, et al. Microextraction of sulfonamides from chicken meat samples in three-component deep eutectic solvent[J]. *Microchem. J.*, 2020, **158**: 105 274.

[48] VELLINGIRI B, SURIYANARAYANAN A, SELVARAJ P, et al. Role of heavy metals (copper (Cu), arsenic (As), cadmium (Cd), iron (Fe) and lithium (Li)) induced neurotoxicity [J]. *Chemosphere*, 2022, **301**: 134 625.

[49] ALEKSANDRO A P, MIRKOV I, TUCOVIC D, et al. Immunomodulation by heavy metals as a contributing factor to inflammatory diseases and autoimmune reactions: Cadmium as an example[J]. *Immunol. Lett.*, 2021, **240**: 106-122.

[50] ZHAO X G, LI Z L, WANG D L, et al. Pollution characteristics, influencing factors and health risks of personal heavy metals exposure: Results from human environmental exposure study in China[J]. *Build Environ.*, 2022, **220**: 109 217.

[51] KARIMI M, DADFARNIA S, SHABANI A M H, et al. Deep eutectic liquid organic salt as a new solvent for liquid-phase microextraction and its application in ligandless extraction and preconcentraion of lead and cadmium in edible oils[J]. *Talanta*, 2015, **144**: 648-654.

[52] ELAHI F, ARAIN M B, KHAN W A, et al. Ultrasound-assisted deep eutectic solvent-based liquid-liquid microextraction for simultaneous determination of Ni(Ⅱ) and Zn(Ⅱ) in food samples[J]. *Food Chem.*, 2022, **393**: 133 384.

[53] RAHMATI N, RAHIMNEJAD M, POURAL M, et al. Effective removal of nickel ions from aqueous solution using multi-wall carbon nanotube functionalized by glycerol-based deep eutectic solvent [J]. *Colloid. Interfac. Sci.*, 2021, **40**: 100 347.

[54] ALOMAR M K, ALSAADI M A, JASSAM T M, et al. Novel deep eutectic solvent-functionalized carbon nanotubes adsorbent for mercury removal from water[J]. *J. Colloid. Interf. Sci.*, 2017, **497**: 413-421.

[55] CAO Y, LIU H L, QIN N B, et al. Impact of food additives on the composition and function of gut microbiota: A review[J]. *Trends Food Sci. Tech.*, 2020, **99**: 295-310.

[56] MOGADDAM M R A, FARAJZADEH M A, TUZEN M, et al. Organic solvent-free elevated temperature liquid-liquid extraction combined with a new switchable deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction of three phenolic antioxidants from oil samples [J]. *Microchem. J.*, 2021, **168**: 106 433.

[57] SHI Y Y, LI X, SHANG Y, et al. Effective extraction of fluorescent brightener 52 from foods by in situformation of hydrophobic deep eutectic solvent[J]. *Food Chem.*, 2020, **311**: 125 870.

[58] DEY S, NAGABABU B H. Applications of food color and bio-preservatives in the food and its effect on the human health[J]. *Food Chem. Adv.*, 2022, **1**: 100 019.

[59] ALIMORADI V, MOGADDAM M R A, FARAJZADEH M A, et al. Surfactant-assisted salting-out homogenous liquid-liquid extraction based on deep eutectic solvents using central composite design; application in the extraction of natamycin from fruit juices before its determination by HPLC-UV [J]. *Microchem. J.*, 2022, **179**: 107 504.

[60] CORRADINI M G. Encyclopedia of food chemistry[M]. The Netherlands: Elsevier Besloten Vennootschap, 2019: 291-296.

[61] DURAZZO A, CAROCHO M, HELENO S, et al. Food dyes and health: Literature quantitative research analysis [J]. *Meas. Food*, 2022, **7**: 100 050.

[62] LEMOINE A, TOUNIA P. Allergie aux colorants alimentaires: Une pathologie à évoquer avec parcimonie food-dye allergy: A pathology to be evoked sparingly[J]. *Rev. Fr. Allergol.*, 2018, **58**(**7**): 506-512.

[63] LAWAL I A, KLINK M, NDUNGU P. Deep eutectic solvent as an efficient modifier of low-cost adsorbent for the removal of pharmaceuticals and dye[J]. *Environ. Res.*, 2019, **179**(**B**): 108 873.

[64] ZHU S Q, ZHOU J, JIA H F, et al. Liquid-liquid microextraction of synthetic pigments in beverages using a hydrophobic deep eutectic solvent[J]. *Food Chem.*, 2018, **243**: 351-356.

[65] OZAK S S, YILMAZ Y. Ultrasound-assisted hydrophobic deep eutectic solvent based solid-liquid microextraction of Sudan dyes in spice samples[J]. *Spectrochim. Acta A.*, 2020, **236**: 118 353.

[66] ZHANG H M, XU K J, WANG Y Z. Constructing a phase-controllable aqueous biphasic system by using deep eutectic solvent as adjuvant[J]. *Sep. Purif. Technol.*, 2021, **256**: 117 812.

[67] XU K J, XU P L, WANG Y Z. Aqueous biphasic systems formed by hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents for the partitioning of dyes[J]. *Talanta*, 2020, **213**: 120 839.

分析与测试

QuEChERS 联合 LC-MS/MS 测定土壤及蚯蚓中吡虫啉及异丙甲草胺 13 种代谢产物

符芙蓉[1],赵丽霞[1],李晓晶[1],叶会科[1],孙扬*[1],李永涛[2]
(1.农业农村部环境保护科研监测所,天津 300191;2.华南农业大学 资源环境学院,广东 广州 510642)

摘要:建立土壤及蚯蚓基质中吡虫啉及异丙甲草胺两种农药的 13 种代谢产物分析测试方法。通过筛选提取溶剂的种类、净化方式,优化高效液相色谱及质谱条件建立了 QuEChERS 联合 LC-MS/MS 的处理及测定方法。该方法使用含 1%甲酸的乙腈溶液提取土壤及蚯蚓中两种常见农药的 13 种代谢物,以稀释 2 倍的方式削弱土壤浸提液中的基质效应、以稀释 3.2 倍及添加 PSA、GCB、C18 的方式净化蚯蚓浸提液。在土壤介质中,方法的平均回收率为 68.0%~114.8%,相对标准偏差为 1.3%~10.7%,检出限范围为 0.008 6~0.40 μg/kg,定量限为 0.029~2.00 μg/kg。蚯蚓介质中,方法的平均回收率为 67.1%~93.8%,相对标准偏差为 2.0%~7.8%,检出限为 0.11~5.00 μg/kg,定量限为 0.36~25.0 μg/kg。本研究方法相对简便高效、检出限低、稳定性高,适于科学实验和田间实际土壤及蚯蚓样品中吡虫啉及异丙甲草胺代谢产物的定性、定量分析。

关键词:土壤;蚯蚓;吡虫啉;异丙甲草胺;代谢物;QuEChERS;LC-MS/MS
中图分类号:R917 **文献标识码**:A **文章编号**:0258-3283(2023)07-0136-08
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0162

Determination of 13 Metabolites of Imidacloprid and Metolachlor in Soil and Earthworm by QuEChERS Combined with LC-MS/MS

FU Fu-rong[1],*ZHAO Li-xia*[1],*LI Xiao-jing*[1],*YE Hui-ke*[1],*SUN Yang*[*1],*LI Yong-tao*[2](1.Agro-Environmental Protection Institute,Ministry of Agriculture and Rural Affairs,Tianjin 300191,China;2.College of Natural Resources and Environment,South China Agricultural University,Guangzhou 510642,China)

Abstract:To determine 13 metabolites of imidacloprid and metolachlor in soil and earthworm,a method was established by adjusting the conditions of liquid phase chromatography and mass spectrometry,optimizing the types of extraction solvents and purification methods.The method used acetonitrile containing 1% formic acid to extract 13 metabolites from soil and earthworm,weakened the matrix effect of soil extract by diluting 2 times,and purified earthworm extract by diluting 3.2 times and adding PSA,GCB and C18.In soil matrix,the average recovery of the method was 68.0%~114.8% with RSD as 1.3%~10.7%,the limit of detection at 0.008 6~0.40 μg/kg,and the limit of quantitation at 0.029~2.00 μg/kg.In earthworm matrix,the average recovery of the method was 67.1%~93.8% with RSD as 2.0%~7.8%,the limit of detection as 0.11~5.00 μg/kg,and the limit of quantitation at 0.36~25.0 μg/kg.The method is simple,efficient,sensitive and stable and is suitable for the qualitative and quantitative analysis of metabolites of imidacloprid and metolachlor in soil and earthworm samples from scientific experiments and actual field.

Key words:soil;earthworm;imidacloprid;metolachlor;metabolites;QuEChERS;LC-MS/MS

吡虫啉和异丙甲草胺分别是广谱类杀虫剂和除草剂,广泛应用于农业生产中。苹果地[1]、番茄田及黄瓜田等土壤中均能检出吡虫啉,检出率为 49%~100%,检出平均浓度为 23.6~233 g/kg[1,2]。异丙甲草胺在土壤、地表水及地下水中均能被检出[3,4]。农药施用后残留在土壤中的农药使土壤生物/微生物活动受到严重干扰,土壤生态平衡遭到破坏[5-8]。异丙甲草胺影响土壤微生物组成及根际土壤酶的活性[7]。吡虫啉能够引起土壤动物蚯蚓的回避行为,干扰蚯蚓生殖行为[6]。蚯蚓是土壤中生物量最大的无脊椎动物,

收稿日期:2023-03-08;**网络首发日期**:2023-04-14
基金项目:青海省科技计划项目(2019-NK-A11);国家自然科学基金面上项目(42177034)。
作者简介:符芙蓉(1998-),女,海南临高人,硕士生,主要从事土壤有机污染物生物修复研究。
通讯作者:孙扬,E-mail:sunyang01@caas.cn。
引用本文:符芙蓉,赵丽霞,李晓晶,等.QuEChERS 联合 LC-MS/MS 测定土壤及蚯蚓中吡虫啉及异丙甲草胺 13 种代谢产物[J].化学试剂,2023,**45**(**7**):136-143。

是土壤的生态工程师,能够指示土壤、改善土壤质量[9]。由于蚯蚓及农药共存于土壤环境中,蚯蚓的摄食、消化及排泄行为影响农药的迁移降解。残留的农药经过代谢转化后多以母体及代谢物的形式共存于土壤中,且代谢物可能较母体有更强的生物毒性[10,11]。为了准确全面评估农药在土壤中的迁移降解行为,准确可靠的土壤/蚯蚓中农药母体及代谢物分析测试方法尤为重要。当前开发的农田系统农药残留测试方法主要针对农药母体,而对毒性未知的代谢产物的分析检测技术明显滞后。这成为农药生态行为风险评估的短板,因此农药代谢产物的准确评估工作亟待开展。当前吡虫啉及异丙甲草胺代谢产物的分析测试方法已存在针对单一农药母体代谢物的方法[12-16]。这些方法涉及的基质多为水样[11]、土壤[11,15]及食品[14,16],代谢物种类为 2~5 种,如 Schuhmann 等[11]测定了土壤及浸出液中异丙甲草胺及其两种代谢物的浓度;Arias 等[17]通过比较稀释直接进样及固相萃取两种方式建立了液质联用测定径流水中异丙甲草胺及其代谢物异丙甲草胺草酸盐(Metolachlor-OA)的方法;刘倩宇等[14]利用液质联用仪建立了生菜中吡虫啉及其 5 种代谢产物的方法;梁秀美等[16]建立了蜂蜜及蜂花粉中吡虫啉及其 3 种代谢产物的液质测定方法;当前吡虫啉及异丙甲草胺代谢产物分析测试方法的局限在于测试方法多针对单一农药母体的代谢物、代谢物种类不够全面、针对蚯蚓基质的研究较少,基于此,本研究拟建立土壤及土壤动物蚯蚓中两种农药多种代谢物的残留测定方法。本文拟通过优化 QuEChERS 前处理方法和检测仪器条件建立简便、高效、检测灵敏度高的分析测定方法以测定土壤及蚯蚓中吡虫啉及异丙甲草胺代谢产物,以期有利于准确评估两种常见农药在土壤生态系统迁移降解行为。

1　实验部分

1.1　主要仪器与试剂

Qtrap® 4500 型液相色谱-质谱联用仪(美国 SCIEX 公司);ML104 型电子天平(梅特勒托利多中国有限公司);MTV-100 型多管旋涡混合仪(杭州奥盛仪器有限公司);H2050R-1 型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);N-EVAP™112 型氮吹仪(美国 Organomation 公司)。

标准品 4,5 二羟基—吡虫啉(1 000 μg/mL)、标准品吡虫啉胍、吡虫啉尿素、6-氯烟酸、吡虫啉-5-羟基、吡虫啉-羟基、吡虫啉-烯烃、异丙甲草胺脱氯、异丙甲草胺-2-乙氧基、异丙甲草胺-2-羟基、异丙甲草胺乙磺酸钠盐、异丙甲草胺草酸盐、异丙甲草胺硫醚氨酸盐(100 μg/mL,天津阿尔塔科技有限公司);甲醇、甲酸(色谱纯,美国赛默飞世尔科技有限公司);PSA、GCB(天津博纳艾杰尔科技有限公司);C18(上海安谱实验科技股份有限公司);无水硫酸镁、氯化钠(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司);乙腈(分析纯,天津康科德科技有限公司);Milli-Q 水:屈臣氏水。13 种农药代谢物简称、英文对照如表 1 所示。

土壤采自天津市某设施菜地(未见吡虫啉及异丙甲草胺检出),土壤性质:pH 6.95,有机质含量 27.7 g/kg。蚯蚓选用实验室常用模式物种赤子爱胜蚓,购自天津市贾立平蚯蚓厂。

1.2　实验方法

1.2.1　液相色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C18(2.1×100 mm+2.1×5 mm,1.7 μm);流动相:0.01%甲酸水溶液(A),甲醇(B);进样梯度:0~2 min,10%~35% B;2~3.5 min,35%~95% B;3.5~5.5 min,95% B;5.5~5.6 min,95%~10% B;5.6~8 min 10% B;进样量:2 μL;流速:0.3 μL/min;柱温:40 ℃。

1.2.2　质谱条件

离子源:电喷雾离子源;扫描方式:多反应监测模式(MRM),正负离子扫描;离子源电压:5 500 V(+)/4 500 V(-);离子源温度:500 ℃;气帘气:206.8 kPa;碰撞气:Medium(中级);喷雾气:344.7 kPa;辅助加热气:344.7 kPa。

1.2.3　标准溶液配制

采用甲醇稀释代谢物标准品,配制成浓度为 5 μg/mL 混标储备液,保存于-20 ℃备用。分析测试前采用 V(甲醇):V(水)= 1∶1稀释混标储备液,配制 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100 ng/mL 共 10 个浓度的标准曲线,现用现配。

1.2.4　样品前处理

土壤样品经冻干过筛后,准确称量 5.00 g 于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 超纯水、10 mL 含 1%甲酸的乙腈溶液后于 2 500 r/min 涡旋 5 min,加入 1 g NaCl、4 g $MgSO_4$ 后以 2 500 r/min 涡旋 5 min、8 000 r/min 离心 5 min。取 0.5 mL 上清液,加入 0.5 mL 超纯水,涡旋混匀过 0.22 μm 滤膜置于进样小瓶后待测。

蚯蚓经冻干剪碎后混匀制成待分析样品。准确称取 0.080 g 于 10 mL 离心管中,加入 1 mL 超纯水、2 mL 1%甲酸的乙腈溶液后以 2 500 r/min 涡旋 5 min 后,加入 0.2 g NaCl、0.8 g $MgSO_4$ 后以 2 500 r/min 涡旋 5 min、10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为蚯蚓浸提液。将蚯蚓浸提液分为两份进行净化:①取 0.25 mL 蚯蚓浸提液氮吹后加入 0.8 mL 甲醇水,涡旋复溶后过 0.22 μm 滤膜待测;②取 1 mL 上清液置于装有 150 mg 无水 $MgSO_4$、50 mg PSA、50 mg GCB 及 50 mg C18 的离心管中,以 2 500 r/min 涡旋 5 min、10 000 r/min 离心 10 min 后取 0.25 mL 上清液,加入 0.25 mL 超纯水,涡旋 5 min 混匀后过 0.22 μm 滤膜待测。

1.2.5 添加回收实验

将 13 种代谢物的甲醇溶液按照添加浓度分别加至土壤/蚯蚓中作为加标样品,待甲醇挥发后同 **1.2.4** 步骤处理,每个添加浓度设置 4 个重复。

1.2.6 实际样品测定

采用五点取样法于天津市武清区某设施菜地土壤中随机取样,将样品混匀后通过四分法选取 4 份样品进行测定,样品前处理方法同 **1.2.4** 所述。

由于田间采样过程中未采集到蚯蚓,故选择室内暴露的方式测定蚯蚓于吡虫啉及异丙甲草胺污染土壤培养后产生的代谢产物。具体实验步骤如下:将清肠 24 h 后蚯蚓(置于 0.2 mg/kg 吡虫啉及 2 mg/kg 异丙甲草胺混合污染土壤中培养 30 d,土壤含水率调节至最大持水量的 60%,为保证蚯蚓活性,每隔 72 h 向烧杯中补充水分。培养结束后将蚯蚓取出清肠洗净,参照 **1.2.4** 处理测定。

1.3 数据处理

数据采用 Microsoft Excel 2010 进行处理分析,使用 Origin 2021 进行图形绘制。

2 结果与讨论

2.1 测定方法优化

2.1.1 质谱条件优化

采用 V(甲醇):V(水)= 1:1分别稀释 13 种代谢物的标准溶液至 100 ng/mL,通过针泵将其逐一注入质谱系统以优化相关参数。分别于 Q1 MS 和 Product Ion(MS2)扫描模式确定代谢物的母离子和子离子,随后利用 MRM 模式优化各离子对的去簇电压(DP)、碰撞电压(CE)、出口电压(CXP)等参数。13 种代谢物详细质谱参数如表 1 所示,其中 8 种物质采用正离子模式,5 种物质采用负离子模式。

表 1 13 种代谢物的英文对照、简称及质谱参数

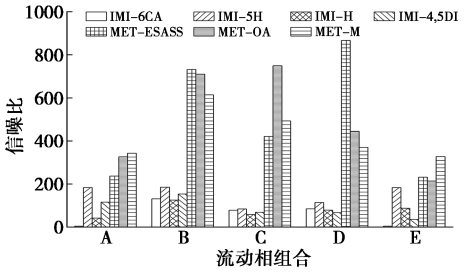
Tab.1 English names, abbreviations and MS/MS parameters of 13 metabolites

农药代谢物名称	英文对照	简称	离子化模式	母离子 Q1	子离子 Q3	碰撞能量(CE)/V	去簇电压(DP)/V	出口电压(CXP)/V
吡虫啉胍	Imidacloprid desnitro hydrochloride	IMI-DH	ESI(+)	210.9	125.9/89.9	33/45	90/90	11/6
吡虫啉尿素	Imidacloprid urea	IMI-U	ESI(+)	212.0	128.0/126.0	24/32	80/80	14/14
6-氯烟酸	6-Chloronicotinic acid	IMI-6CA	ESI(+)	157.9	121.8/78.1	27/32	80/80	9/5
吡虫啉-5-羟基	Imidacloprid-5-hydroxy	IMI-5H	ESI(+)	271.7	191.0/225.0	24/26	70/70	14/6
吡虫啉-羟基	Imidacloprid-hydroxy	IMI-H	ESI(+)	272.1	224.9/84.0	21/20	65/65	7/6
吡虫啉-烯烃	Imidacloprid-olefin	IMI-O	ESI(−)	252.0	205.0/81.0	−19/−14	−60/−60	−10/−10
4,5-二羟基—吡虫啉	4,5-Dihydroxy imidacloprid	IMI-4,5DI	ESI(−)	286.0	228.0/166.0	−17/−25	−70/−70	−12/−12
异丙甲草胺脱氯	Metolachlor deschloro	MET-D	ESI(+)	250.0	218.0/176.0	23/34	100/100	14/14
异丙甲草胺-2-乙氧基	Metolachlor-2-ethoxy	MET-2E	ESI(+)	294.2	262.0/148.0	23/31	120/120	14/14
异丙甲草胺-2-羟基	Metolachlor-2-hydroxy	MET-2H	ESI(+)	266.0	234.0/176.0	18/31	90/90	14/14
异丙甲草胺乙磺酸钠盐	Metolachlor ethane sulfonic acid sodium salt	MET-ESASS	ESI(−)	328.1	79.9/121.0	−66/−30	−100/−100	−10/−10
异丙甲草胺草酸盐	Metolachlor oxanilic acid	MET-OA	ESI(−)	278.0	206.0/174.0	−14/−22	−40/−40	−10/−10
异丙甲草胺硫醚氨酸盐	Metolachlor mercapturate	MET-M	ESI(−)	409.9	280.0/151.0	−22/−40	−80/−80	−10/−10

2.1.2 流动相种类选择

液相色谱中流动相的种类直接影响目标物的响应、出峰时间、分离度等色谱行为[18]。本文通过比较 10 μg/L 混合标准溶液在不同流动相洗脱下 13 种目标物的信噪比,考察 5 种流动相组合(A:水-甲醇;B:0.01%甲酸水溶液-甲醇;C:0.1%甲酸水溶液-甲醇;D:0.01%甲酸水溶液-0.01%甲酸甲醇溶液;E:含 0.01%甲酸和 2 mmol/L 甲酸

铵的超纯水-甲醇)对目标物响应的影响。由于 IMI-6CA、IMI-5H、IMI-H、IMI-4,5DI;MET-ESASS、MET-OA、MET-M 在质谱中响应较低,且流动相种类对其影响较大,为提高其检出限,重点考察流动相种类对这几种物质响应的影响。结果如图 1 所示,IMI-6CA 仅在含甲酸的流动相组合中才能出峰,而添加甲酸铵则降低了 IMI-4,5DI 的响应。对不同添加量的甲酸而言,低响应的 4 种吡虫啉代谢物 IMI-6CA、IMI-5H、IMI-H 及 IMI-4,5DI 在组合 B(0.01%甲酸水溶液-甲醇)中响应最强,因此选择 0.01%甲酸水溶液-甲醇为流动相。



A:水-甲醇;B:0.01%甲酸水溶液-甲醇;C:0.1%甲酸水溶液-甲醇;D:0.01%甲酸水溶液-0.01%甲酸甲醇;E:含 0.01%甲酸和 2 mmol/L 甲酸铵的超纯水-甲醇

图 1　部分目标物在不同流动相组合洗脱下的信噪比

Fig.1　S/N values of some objects eluted by different combination of mobile phases

2.1.3　液相洗脱程序优化

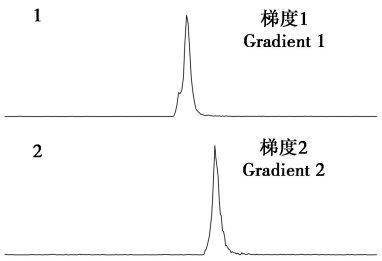
液相色谱中流动相的进样梯度影响物质的峰型及响应[19]。梯度洗脱较等度洗脱更有利于多目标物的分离,且不会造成后出峰目标物峰型变宽。因此,本文采用梯度方式对目标物进行洗脱,考察了两个梯度程序(表 2)对目标物的洗脱效果,结果表明,梯度 1 洗脱时,MET-OA 峰型前沿,影响定量,而将洗脱程序改为梯度 2 后,MET-OA 峰型尖锐对称,因此选择梯度 2 为最终洗脱程序。

表 2　梯度洗脱程序[注]

Tab.2　Gradient elution program

梯度 1			梯度 2		
时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	90	10	0.00	90	10
1.00	90	10	2.00	65	35
4.50	5	95	3.50	5	95
6.50	5	95	5.50	5	95
6.60	90	10	5.60	90	10
8.00	90	10	8.00	90	10

注:流动相 A:0.01%甲酸水溶液;流动相 B:甲醇。



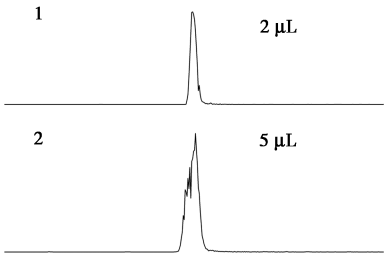
a:梯度 1;b:梯度 2

图 2　不同洗脱程序下 MET-OA 的峰形

Fig.2　Peak shapes of MET-OA in different elution

2.1.4　进样量优化

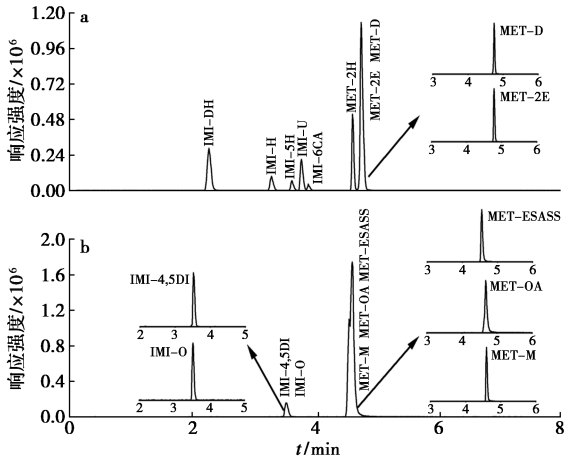
虽然样品进样量越大,目标物响应越高,检出限越低,但进样量过大可能会造成某些目标物产生溶剂效应、色谱柱过载峰型异常等现象[20]。本文考察了 2 μL 及 5 μL 进样量下目标物的出峰情况。由图 3 可以看出,进样量 2 μL 时,IMI-DH 峰型对称尖锐且峰宽较窄;而进样量 5 μL 时目标峰由于溶剂效应出现异常,峰形杂乱且峰宽变大,严



1:进样量 2 μL;2:进样量 5 μL

图 3　不同进样量下 IMI-DH 的峰形

Fig.3　Peak shapes of IMI-DH due to different injection volumes



a.正离子模式;b.负离子模式

图 4　13 种农药代谢物的总离子流图

Fig.4　Total ion chromatograms of 13 pesticide metabolites

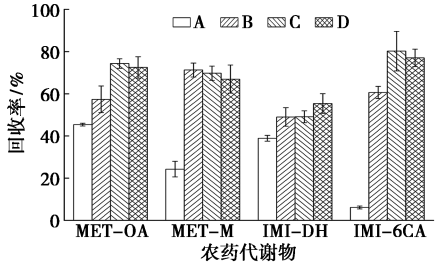
重影响定量的准确度。进样量 2 μL 时所有目标物峰形正常,如图 4 所示。因此选定 2 μL 为最终进样量。

2.2 前处理方法优化

2.2.1 土壤前处理方法优化

2.2.1.1 提取剂选择

根据目标物的极性、不同溶剂中的溶解度等理化性质选择合适的提取溶剂,对于保障分析结果的准确度和精确度至关重要。由于 MET-OA、MET-M、IMI-DH、IMI-6CA 及 MET-ESASS 分别为带羧基及磺酸基的酸性有机物,酸性环境可能有助于提高这 5 种物质的回收率[19],因此本文比较了乙腈(A)、含 0.1% 甲酸的乙腈溶液(B)含 0.5%甲酸的乙腈溶液(C)及含 1%甲酸的乙腈溶液(D)4 种酸度环境的提取效率。具体提取方法如下:准确称取 5.00 g 土壤,加入 5 mL 超纯水、10 mL 提取溶剂后于 2 500 r/min 涡旋 5 min,接着加入 1 g NaCl、4 g $MgSO_4$ 后于 2 500 r/min 涡旋 5 min,以 8 000 r/min 离心 5 min,然后取 0.5 mL 提取液上清液用氮气吹干,最后以 0.5 mL 体积分数 50%的甲醇水溶液涡旋复溶后过 0.22 μm 滤膜待测。结果表明,在 13 种代谢物中,MET-OA、MET-M、IMI-DH、IMI-6CA 4 种代谢物受甲酸浓度影响较大。如图 5 所示,甲酸的加入使 4 种代谢物的回收率提高了 10.1%~74.14%。由于 4 种代谢物中 IMI-DH 回收率最低,选择提取溶剂酸度时应优先考虑。4 种提取剂中含 1%甲酸的乙腈溶液对 IMI-DH 提取效果最好,故选择含 1%甲酸的乙腈溶液为提取溶剂。



A:乙腈;B:含 0.1%甲酸的乙腈溶液;
C:含 0.5%甲酸的乙腈溶液;D:含 1%甲酸的乙腈溶液

图 5 4 种溶剂提取效果比较

Fig.5 Extraction efficiencies of four solutions

2.2.1.2 提取液净化

土壤体系基质复杂,其中含有的大量杂质会严重干扰目标化合物测定。为了减小基质效应,提高测试的准确度和精确度,QuEChERS 方法常采用 PSA、GCB、C18 等吸附剂去除提取液中的杂质[21]。此外,稀释提取液也可以有效降低基质效应[17],但采用提取液稀释手段会降低样品中目标物检测灵敏度。因此,本文选择的稀释倍数为 2 倍,并比对稀释液 2 倍处理、添加 PSA、GCB、C18 以及 PSA+GCB+C18 5 种处理对提取液的净化效果。具体过程如下:1)稀释两倍:取 **2.2.1.1** 中提取液上清液 0.5 mL,加入 0.5 mL 超纯水混匀,过 0.22 μm 滤膜待测;2)添加吸附剂:取 **2.2.1.1** 中提取液上清液 1 mL 加至含净化剂的离心管(①150 mg 无水 $MgSO_4$+15 mg PSA,②150 mg 无水 $MgSO_4$+15 mg GCB,③150 mg 无水 $MgSO_4$+15 mg C18,④150 mg 无水 $MgSO_4$+15 mg PSA+15 mg GCB+15 mg C18),以 2 500 r/min 涡旋 5 min,再以 8 000 r/min 离心 5 min 后取 0.5 mL 上清液氮吹至干,以 0.5 mL V(甲醇):V(水)= 1∶1涡旋复溶后过 0.22 μm 滤膜待测。以目标物回收率范围在 70%~120%为基准对 5 种净化方式进行评定,结果如图 6 所示,稀释两倍后,回收率满足要求的代谢物比例占 92.3%,而 PSA、GCB、C18 及 PSA+GCB+C18 处理中,满足要求的代谢物仅占 53.8%、46.1%、53.8%。此外,由图 6 可以看出,IMI-O 的回收率过高,3 种吸附剂中,仅有 PSA 能够将其调整至合理范围,然而由于 PSA 对有机酸具有吸附作用[22],PSA 的加入导致磺酸类物质 MET-ESASS 的回收率仅有 4%左右,因此本文最终选择稀释两倍的净化方式。与 Sun 等[12]及秦信先等[15]对土壤中异丙甲草胺及吡虫啉代谢产物的前处理方法相比,本方法涉及的代谢产物种类更多,含 2 种母体的 13 种代谢产物。此外,上述两种方式通过添加吸附剂的方式净化提取液,而本文采用直接稀释提取液的方式减少土壤基质的影响,在满足检测需求的前提下,本方法处理步骤更为简便、高效。

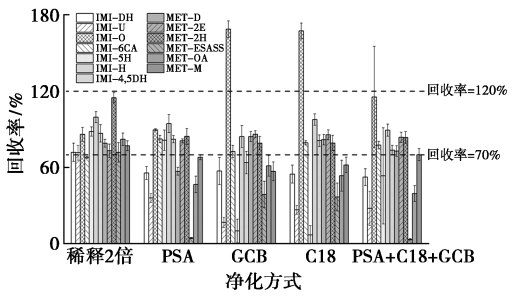
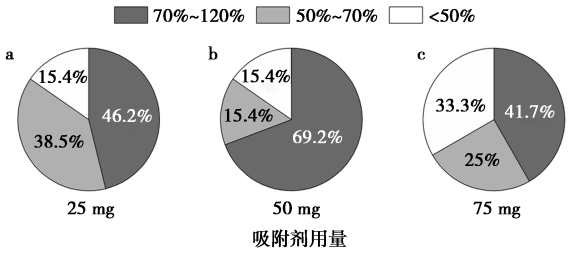


图 6 土壤中 5 种净化方式效果比较

Fig.6 Efficiencies of five purification methods in soil

2.2.2　蚯蚓前处理方法优化

参照土壤前处理方法,提取剂选择含 1%甲酸的乙腈溶液。由于蚯蚓含大量脂肪且其浸提液颜色为深棕色,为了最大程度保护色谱柱及仪器流路系统,本文采用 PSA(吸附糖类及有机酸)、GCB(吸附色素)、C18(吸附脂类)3 种吸附剂混合除杂的方式净化蚯蚓浸提液[23]。但吸附剂用量的选择会对提取净化效果产生显著的影响:吸附剂用量太少会导致基质去除不完全,相反用量过多可能会对目标物产生明显吸附。综合参考已有文献[24,25],本文考察了低、中、高(25、50、75 mg)3 种用量的 PSA、GCB 和 C18 的净化效果。取 1 mL 蚯蚓浸提液加至装有净化材料的离心管(①150 mg 无水 $MgSO_4$+25 mg PSA+25 mg GCB+25 mg C18,②150 mg 无水 $MgSO_4$+50 mg PSA+50 mg GCB+50 mg C18,③150 mg 无水 $MgSO_4$+75 mg PSA+75 mg GCB+75 mg C18)混匀离心后取 0.25 mL 上清液加入 0.25 mL 超纯水,混匀过膜待测。结果如图 7a、7b 所示,当添加量为 25、50 mg 时,11 种(占 84.6%)目标物回收率大于 50%,而添加量为 75 mg 时(图 7c)仅有 8 种(66.7%)目标物回收率大于 50%。此外,当添加量为 25 mg 时,46.2%的目标物回收率满足 70%~120%的要求,而添加量为 50 mg 时,69.2%的目标物满足要求。因此最终选择 50 mg 为净化剂的最终用量。



a:吸附剂用量为 25 mg;b:吸附剂用量为 50 mg;c:吸附剂用量为 75 mg

图 7　吸附剂用量对蚯蚓中农药代谢物回收率的影响

Fig.7　Effect of adsorbent dosages on recoveries of pesticide metabolites in earthworm

上述方法中,MET-ESASS 及 MET-OA 回收率低于 30%,这可能是由于吸附剂对这两种物质的强烈吸附。因此为提高两种物质的回收率,对蚯蚓浸提液另作稀释而不添加吸附剂的方式净化。由于蚯蚓浸提液含较多色素(深棕色),为减少对色谱柱及仪器损害,筛选能使浸提液呈无色的稀释倍数。当稀释增至 3.2 倍时,蚯蚓浸提液呈无色,此时 MET-ESASS 回收率为 74.0%,MET-OA 回收率为 67.1%。为保证两种物质的检出限,不再增加稀释倍数,选定 3.2 倍为最终稀释倍数。

由图 8 可知,上述确定的两种净化过程中,添加吸附剂后 MET-ESASS 及 MET-OA 回收率低于 30%,而稀释 3.2 倍时,IMI-U 回收率仅为 24.8%,且回收率满足 70%~120%的农药数量少于添加吸附剂处理。综上,为了同时测定蚯蚓中 13 种目标物,本文选择使用两种净化方式。分别比对 13 种物质在两种净化方式中的回收率后,最终确定稀释 3.2 倍方法用于测定 MET-ESASS、MET-OA、IMI-DH 及 IMI-6CA,添加吸附剂方法用于测定剩余 9 种物质。

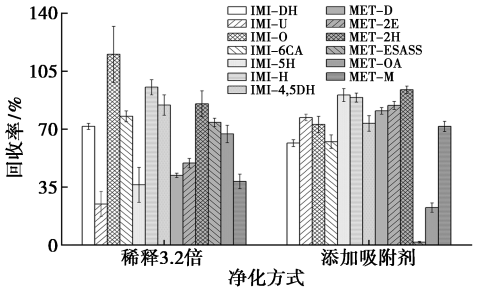


图 8　两种净化方式下蚯蚓中农药代谢物回收率

Fig.8　Recoveries of pesticide metabolites in earthworms using two purification methods

本方法采用一次提取、两种净化方式提取测定蚯蚓中异丙甲草胺及吡虫啉代谢物。虽然对提取液进行两次净化稍显繁琐,但该方法填补了 QuEChERS 联合 LC-MS/MS 同时测定异丙甲草胺及吡虫啉代谢物方法空白,且该方法中所有目标物回收率均大于 65%,其中 92.3%的物质回收率满足 70%~120%。方法检出限为 1.7~33.3 μg/kg,足以满足测定需要。

2.2.3　方法的线性方程、决定系数及检出限

配制浓度为 0.1~100 μg/L 的一系列标准溶液,以目标物标准溶液浓度为横坐标、相应峰面积为纵坐标绘制标准曲线得到相关线性方程(表 3),标准曲线的决定系数在 0.998 4~0.999 8 之间。以信噪比为 3 时对应的浓度为检出限,确定了 13 种代谢物在土壤中的检出限为 0.008 6~0.40 μg/kg,蚯蚓中为 0.11~5.00 μg/kg;以信噪比为 10 时对应的浓度为定量限,确定了 13 种代谢物在土壤中的定量限为 0.029~2.00 μg/kg,蚯蚓中为 0.36~25.0 μg/kg。对比秦信先等[15]建立的液质联用测定土壤中吡虫啉及其 5 种代谢产物的方法:吡虫啉代谢产物的检出限为 1.7~33.3

μg/kg,定量限为 5~100 μg/kg,浓度远高于本方法检出限及定量限。这表明本方法大幅提升了吡虫啉代谢产物检测的灵敏度。Zhang 等[26]通过 QuEChERS 方法及液质联用仪建立了鱼体内肌肉、肝脏、鳃 3 种组织器官中莠去津、乙草胺、异丙甲草胺 3 种农药及其代谢物的测定方法,其中包含 MET-OA 和 MET-ESASS 两种异丙甲草胺代谢产物,其检出限为 0.19~0.39 μg/kg,本方法中这两种物质在土壤中检出限(0.056~0.078 μg/kg)均优于上述方法。

表 3 方法的线性方程、决定系数、检出限、定量限及回收率

Tab.3 Regression equation, determination coefficient, detection limit, quantitation limit and recovery of method (n=4)

代谢物	线性方程	决定系数	检出限/(μg·kg^{-1})		定量限/(μg·kg^{-1})		平均回收率(RSD)/%	
			土壤	蚯蚓	土壤	蚯蚓	土壤	蚯蚓
IMI-DH	$y=2.3\times10^5x+7.7\times10^3$	0.998 4	0.016	0.20	0.053	0.66	72.0(9.9)	71.7(3.4)
IMI-U	$y=1.2\times10^5x+1.2\times10^4$	0.999 3	0.027	0.33	0.089	1.12	71.6(8.1)	77.0(2.6)
IMI-6CA	$y=2.0\times10^4x+1.8\times10^3$	0.999 1	0.12	1.50	0.40	5.00	86.1(6.3)	77.7(6.5)
IMI-5H	$y=2.3\times10^4x+4.8\times10^2$	0.999 0	0.11	1.40	0.37	4.67	68.0(1.3)	90.6(4.3)
IMI-H	$y=4.8\times10^4x+1.5\times10^3$	0.999 5	0.043	0.55	0.14	1.82	88.3(5.4)	89.1(3.0)
IMI-O	$y=4.2\times10^2x-2.2\times10^2$	0.998 9	0.40	5.00	2.00	25.00	99.6(4.1)	72.9(6.8)
IMI-4,5DI	$y=3.7\times10^3x+3.6\times10^2$	0.999 0	0.40	5.00	2.00	25.00	86.9(7.9)	73.5(6.3)
MET-D	$y=6.4\times10^5x+1.3\times10^4$	0.999 7	0.008 6	0.11	0.029	0.36	81.5(4.7)	81.1(2.5)
MET-2E	$y=2.1\times10^5x+1.1\times10^4$	0.998 8	0.015	0.19	0.050	0.62	73.1(7.2)	84.3(2.9)
MET-2H	$y=2.1\times10^5x+1.7\times10^4$	0.999 8	0.027	0.33	0.089	1.12	114.8(3.5)	93.8(2.3)
MET-ESASS	$y=3.6\times10^4x+5.9\times10^2$	0.998 8	0.056	1.12	0.19	3.74	71.9(10.7)	74.0(4.8)
MET-OA	$y=6.7\times10^4x+1.6\times10^2$	0.999 8	0.078	1.56	0.26	5.19	82.2(5.9)	67.1(7.8)
MET-M	$y=3.3\times10^4x+2.3\times10^3$	0.999 4	0.070	0.88	0.24	2.94	77.1(5.1)	71.6(5.5)

2.2.4 方法的回收率及精密度

以 10、50、100 μg/kg 为添加浓度考察方法在土壤中的回收率,结果表明,土壤中 13 种代谢物的平均回收率范围为 68.0%~114.8%,相对标准偏差为 1.3%~10.7%。其中,所有代谢物回收率在 60%以上,92.3%的代谢物回收率为 70%~120%之间。回收率足以满足测定需求。

在 250、500、1 000 μg/kg 的添加水平下,蚯蚓中 13 种农药的回收率在 67.1%~93.8%之间,相对标准偏差为 2.0%~7.8%。其中 92.3%的代谢物回收率在 70%~120%之间。具体回收率见表 3。

2.2.5 实际样品测定

采用本分析测试方法测定了天津市武清区某设施菜地土壤中残留的异丙甲草胺及吡虫啉代谢物。如表 4 所示,13 种代谢物中,共检出 6 种代谢物,检出率为 46.1%,其中含 4 种异丙甲草胺代谢物,分别为 MET-D、MET-2H、MET-ESASS、MET-OA,浓度为 1.9~8.6 μg/kg;2 种吡虫啉代谢物,分别为 IMI-DH、IMI-U,浓度为 0.4~3.2 μg/kg。

将赤子爱胜蚓置于吡虫啉及异丙甲草胺混合污染土壤中培养 30 d 后测定蚯蚓体内异丙甲草胺及吡虫啉代谢物,共 7 种代谢物检出,检出率为 53.8%,其中含 4 种异丙甲草胺代谢物,分别为 MET-D、MET-2H、MET-ESASS、MET-OA,浓度为 30.7~870.1 μg/kg;3 种吡虫啉代谢物,分别为 IMI-U、IMI-5H、IMI-O,浓度为 36.8~93.3 μg/kg。实际样品的测定说明本文所建立的 QuEChERS 联合 LC-MS/MS 同时测定土壤及蚯蚓中吡虫啉及异丙甲草胺共 13 种代谢产物的残留方法是高效可靠的。

表 4 实际样品中 13 种代谢物残留情况[注]

Tab.4 Residue of 13 metabolites in practical sample (n=4)

代谢物	土壤		蚯蚓	
	平均浓度/(μg·kg^{-1})	RSD/%	平均浓度/(μg·kg^{-1})	RSD/%
IMI-DH	3.2	3.2	—	—
IMI-U	0.4	5.5	93.3	14.0
IMI-6CA	—	—	—	—
IMI-5H	—	—	36.8	6.1
IMI-H	—	—	—	—
IMI-O	—	—	45.0	15.9
IMI-4,5DI	—	—	—	—
MET-D	1.9	8.7	30.7	11.4
MET-2E	—	—	—	—
MET-2H	5.7	3.8	63.8	7.4
MET-ESASS	8.6	8.7	870.1	14.4
MET-OA	6.1	0.3	717.6	2.6
MET-M	—	—	—	—

注:—表示未检出。

3　结论

本文以土壤及蚯蚓为研究基质,通过优化液相及质谱仪器条件、前处理提取净化过程建立了同时测定吡虫啉及异丙甲草胺 13 种代谢产物的定性定量分析测定方法,该方法快速简便、检出限低、灵敏度高。

参考文献:

[1]师荣光,郑向群,李晓华,等.苹果园常用农药施用期土壤残留研究[J].土壤通报,2020,**51**(**5**):1 224-1 231.

[2]姜林杰,耿岳,王璐,等.设施番茄和黄瓜田土壤中农药残留及其对蚯蚓的急性风险[J].农业环境科学学报,2019,**38**(**10**):2 278-2 286.

[3]WANG C,WU R,LI Y,et al.Effects of pesticide residues on bacterial community diversity and structure in typical greenhouse soils with increasing cultivation years in Northern China[J]. *Sci. Total Environ.*, 2020, **710**: 136 321.

[4]ROSE C E,COUPE R H,CAPEL P D,et al.Holistic assessment of occurrence and fate of metolachlor within environmental compartments of agricultural watersheds[J]. *Sci.Total Environ.*,2018,**612**:708-719.

[5]邓勋飞,詹宇,王祥云,等.蔬菜地农药施用的土壤生态风险评估[J].农业环境科学学报,2014,**33**(**10**):1 920-1 927.

[6]GE J,XIAO Y,CHAI Y,et al.Sub-lethal effects of six neonicotinoids on avoidance behavior and reproduction of earthworms (*Eisenia fetida*)[J]. *Ecotox. Environ. Safe.*, 2018,**162**:423-429.

[7]谢颖,陈媞,龙友华,等.异丙甲草胺对烤烟根际土壤微生物和酶活性的影响[J].山地农业生物学报,2017,**36**(**2**):13-18.

[8]SHARMA S,SINGH B.Persistence behaviour of imidacloprid and its metabolites in soil under sugarcane[J].*Environ.Monit.Assess.*,2014,**186**(**4**):2 281-2 288.

[9]BLOUIN M,HODSON M E,DELGADO E A,et al.A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services[J].*Eur.J.Soil.Sci.*,2013,**64**(**2**):161-182.

[10]SUCHAIL S,GUEZ D,BELZUNCES L P.Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*[J].*Environ. Toxicol.Chem.*,2001,**20**(**11**):2 482-2 486.

[11]SCHUHMANN A,KLAMMLER G,WEISS S,et al.Degradation and leaching of bentazone,terbuthylazine and S-metolachlor and some of their metabolites:A long-term lysimeter experiment[J]. *Plant Soil Environ.*, 2019, **65**(**5**):273-281.

[12]SUN Y,ZHAO L,LI X,et al.Stimulation of earthworms (*Eisenia fetida*) on soil microbial communities to promote metolachlor degradation[J].*Environ.Pollut.*,2019,**248**:219-228.

[13]张建平,吕警.超高效液相色谱-串联质谱法测定水样中吡虫啉及其代谢物残留[J].农业灾害研究,2020,**10**(**9**):138-139.

[14]刘倩宇,李远播,董丰收,等.吡虫啉在生菜中的吸收迁移及转化行为[J].植物保护,2022,**48**(**2**):63-68.

[15]秦信先,黄敏,张侃侃.毒死蜱和吡虫啉在小麦和土壤中的消解动态[J].山地农业生物学报,2020,**39**(**4**):44-49.

[16]梁秀美,王祥云,薛晓锋,等.液相色谱-串联质谱法测定蜂产品中吡虫啉及其 3 种代谢物[J].分析化学,2017,**45**(**4**):553-559.

[17]ARIAS J L D O,SCHNEIDER A,BATISTA-ANDRADE J A,et al.Evaluation of dilute-and-shoot and solid-phase extraction methods for the determination of S-metolachlor and metolachlor-OA in runoff water samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Anal. Methods-UK*,2017,**9**(**39**):5 777-5 783.

[18]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.

[19]蔡霖,席普宇,谢晴,等.QuEChERS 方法联合 HPLC-MS/MS 和 GC-MS 测定土壤中 110 种农药残留[J].农业环境科学学报,2017,**36**(**8**):1 680-1 688.

[20]安琪,孙红,武林芝,等.高效液相色谱中溶剂效应的探讨及消除方法[J].广州化工,2022,**50**(**8**):95-98.

[21]曲斌.QuEChERS 在动物源性食品兽药残留检测中的研究进展[J].食品科学,2013,**34**(**5**):327-331.

[22]武晓丽,丁自勉,柯润辉.基于改进 QuEChERS 法联合超高效液相色谱-质谱法的人参中禁用农药残留分析[J].中国现代中药,2022,**24**(**12**):2 376-2 382.

[23]杨志敏,朱仁愿,薛华丽,等.改良 QuEChERS-气相色谱质谱联用法测定金银花中农药残留[J].分析试验室,2023,**42**(**1**):49-56.

[24]孙悦萍,周芹,徐利剑,等.QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定水稻中氯虫苯甲酰胺和噻虫胺的残留[J].中国农学通报,2022,**38**(**36**):126-131.

[25]季宝成,韩雨,杨澜瑞,等.改良 QuEChERs-超高效液相色谱-串联质谱法测定羊肉中 28 种药物残留[J].质谱学报,2023,**38**(**36**):442-451.

[26]ZHANG C,WANG Z,LIU S,et al.Analytical method for sequential determination of persistent herbicides and their metabolites in fish tissues by UPLC-MS/MS[J]. *Chemosphere*,2022,**288**:132 591.

合成与工艺技术

水飞蓟宾 C-3 位衍生物的设计、合成及抗肿瘤活性研究

刘家越,李学城,赵凤菊,霍荣迪,孟艳秋*
(沈阳化工大学 制药工程学院,辽宁 沈阳 110142)

摘要:设计并合成一系列新型水飞蓟宾衍生物,研究其抗肿瘤活性。以水飞蓟宾为起始原料,经过酰化、选择性氨解、烷基化、氧化脱氢等手段,合成目标化合物。通过 MTT 法测定了化合物对乳腺癌 MCF-7 和胃癌 SGC7901 两株细胞的体外抗肿瘤活性。利用分子对接技术,将目标化合物与 MEK 受体模拟偶联,分析其与 MEK 的作用方式。设计并合成 12 个新型水飞蓟宾衍生物,通过 ^{1}HNMR、^{13}CNMR 及 MS 对化合物进行结构表征。细胞试验表明 7-O-苄基-3-O-氯乙酰-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(I_2)和 7-O-苄基-3-O-苯磺酰-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(I_{12})明显高于母体水飞蓟宾,与阳性对照药物拉帕替尼表现相当。分子对接结果显示化合物可以与 MEK 的氨基酸残基通过氢键等作用稳定结合。合成的水飞蓟宾衍生物对乳腺癌 MCF-7 和胃癌 SGC7901 细胞有明显的抑制作用,C-3 位羟基的选择性酰化是增强抗肿瘤活性的关键。

关键词:水飞蓟宾;结构修饰;MEK;分子对接;抗肿瘤
中图分类号:R914 **文献标识码**:A **文章编号**:0258-3283(2023)07-0144-08
DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0151

Design,Synthesis and Antitumor Activity of C-3 Derivatives of Silybin *LIU Jia-yue, LI Xue-cheng, ZHAO Feng-ju, HUO Rong-di, MENG Yan-qiu** (Department of Pharmaceutical Engineering, Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142, China)

Abstract: A series of novel silybin derivatives were designed and synthesized and their antitumor activities were evaluated. The target compounds were synthesized from silybin by acylation, selective ammonolysis, alkylation, and oxidative dehydrogenation. The antitumor activities of the compounds against breast cancer MCF-7 and gastric cancer SGC7901 cells in vitro were determined by the MTT assay. Using molecular docking technology, the target compounds were simulated to couple with MEK receptor, and their interaction mode with MEK was analyzed. Twelve new silybin derivatives were designed, synthesized, and characterized by ^{1}HNMR, ^{13}CNMR and MS analysis. Cell tests showed that the antitumor activities of compounds 7-O-benzyl-3-O-chloroacetyl-5,20,23-tri-O-acetyl-2,3-dehydrosilybin (I_2) and 7-O-benzyl-3-O-benzenesulfonyl-5,20,23-tri-O-acetyl-2,3-dehydrosilybin (I_{12}) were significantly higher than those of silybin, and were equivalent to those of positive control drug rapatinib. The results of molecular docking showed that the compounds can stably bind with amino acid residues of MEK through hydrogen bonding and other effects. The synthesized silybin derivatives have obvious inhibitory effects on breast cancer MCF-7 and gastric cancer SGC7901 cells, and the selective acylation of C-3 hydroxyl group plays a key role to enhance the anti-tumor activity.

Key words: silybin; structural modification; MEK; molecular docking; antitumor activity

水飞蓟宾是从天然产物水飞蓟种子中提取出的多酚类黄酮木质素类化合物,由大约等比例的两种非对映异构体(A 和 B,图 1)组成,具有多种药理活性,可以快速修复受损的肝细胞,防止肝功能障碍,常作为保肝药物应用于临床[1-3]。同时其还具有抗氧化[4]、降低血脂[5]、抗炎[6]、抗血小板

收稿日期:2023-03-06;**网络首发日期**:2023-04-17
基金项目:国家自然科学基金项目(21372156);辽宁省重点研发计划项目(2019JH2/10300034);辽宁省教育厅重点项目(LJKZ0427);辽宁省教育厅面上项目(LJKZ0427);沈阳市重大科技成果转化项目(20-203-5-45);沈阳化工大学重点攻关和服务地方项目(LDB2019001)。
作者简介:刘家越(1998-),男,河南信阳人,硕士生,主要研究方向为天然产物有效成分的结构改造及抗肿瘤活性研究。
通讯作者:孟艳秋,E-mail:myq6581@163.com。
引用本文:刘家越,李学城,赵凤菊,等.水飞蓟宾 C-3 位衍生物的设计、合成及抗肿瘤活性研究[J].化学试剂,2023,**45**(7):144-151。

聚集[7]、减轻肾毒性、预防糖尿病[8]以及保护心肌[9]等生理作用。近些年水飞蓟宾及其衍生物在抑制肿瘤细胞生长、保护神经细胞和调节免疫系统等方面的作用也越来越受到重视[10-13]。

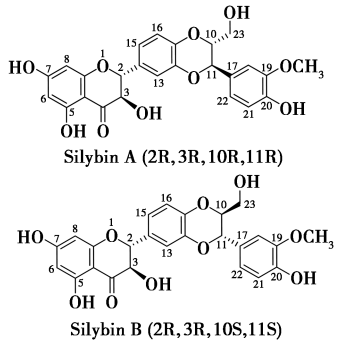


图 1　水飞蓟宾 A 和 B

Fig.1　Silybin A and B

丝裂原激活细胞外信号调节激酶(MEK)在基因表达、细胞增殖、细胞存活和细胞凋亡等细胞过程中发挥着重要作用,其作用的途径被称为 RAS-RAF-MEK-ERK 通路(MAPK 通路),世界上约有三分之一的癌症与 MAPK 通路有关[14]。RAS 或 RAF 基因的突变通常会过度激活下游的 MEK 和 ERK 靶点,促进恶性肿瘤细胞持续增殖,推动细胞不受抑制的生长[15,16]。针对这一途径的药物开发一直是人们非常感兴趣的研究热点,体外和临床研究显示了 MEK 抑制剂(MEKi)的前景,MEKi 已成为某些癌症的首选治疗方案[17]。水飞蓟宾可以通过下调癌细胞中的 MEK、ERK1/2 和 Akt 活性诱导细胞死亡[18,19],MEK 表达水平可能在水飞蓟宾诱导的细胞死亡中起关键作用。

本研究以水飞蓟宾为起始原料,经过酰化、选择性氨解、烷基化、氧化脱氢等手段,合成 12 个目标化合物,并对其进行细胞活性评价。利用分子对接技术,模拟化合物与 MEK 靶点蛋白(PDB 编号:7f2x)的作用方式,评估其与靶蛋白受体的结合能力,验证设计的合理性。

1　实验部分

1.1　主要仪器与试剂

ARX-600 型核磁共振分析仪(瑞士 BRUKER 公司);BUCHI B-540 型熔点测定仪、R-200 型旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司);Thermos Finnigan LCQ 型液-质联用仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

水飞蓟宾(辽宁盘锦格林恩生物资源开发有限公司);3-氨基-1-丙醇、苄溴、氯乙酰氯(上海麦克林生化科技有限公司);乙酸酐(国药集团化学试剂有限公司),所用试剂均为分析纯。

1.2　实验方法

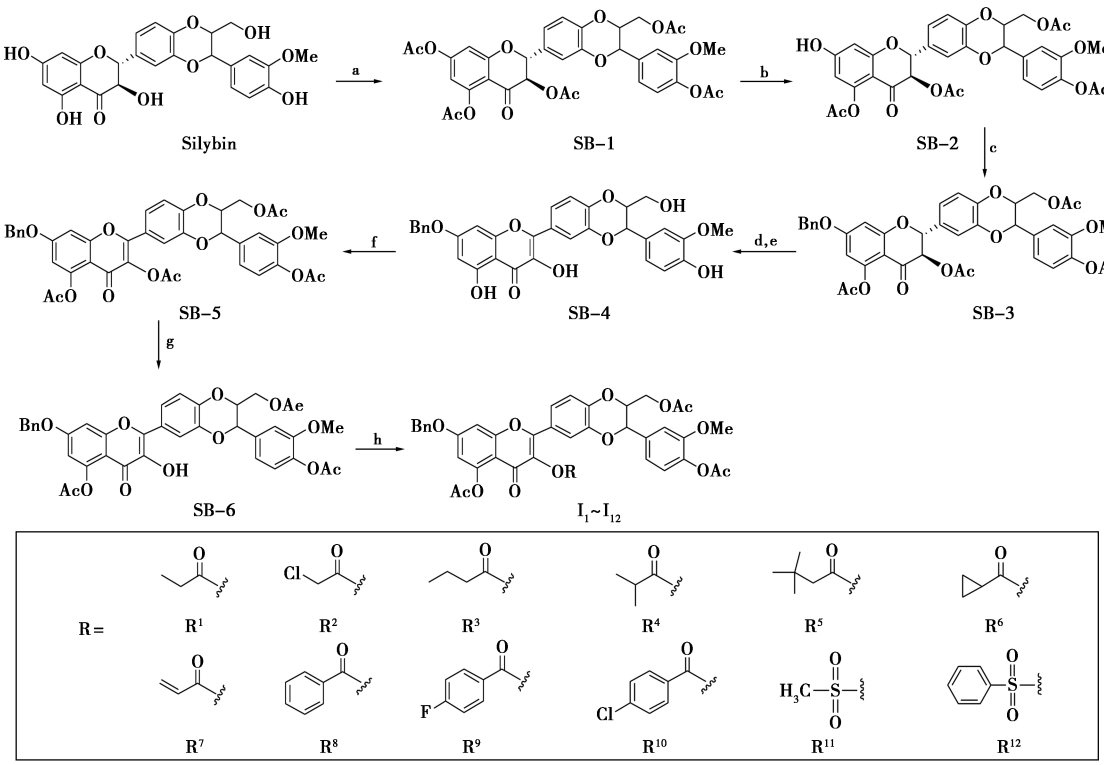
本研究以水飞蓟宾为起始原料,先与乙酸酐在催化剂 4-二甲氨基吡啶(DMAP)的作用下反应生成中间体 SB-1,此反应产率接近 100%。冰浴下,将 SB-1 溶于吡啶中,滴加 3-氨基-1-丙醇,控制反应时间,加入等量的冰醋酸淬灭反应,此举可选择性的将反应物 C-7 位暴露出羟基,得到 SB-2。80 ℃油浴下,DMF 作为溶剂,$KHCO_3$ 与 KI 作为催化剂,将 SB-2 与溴化苄反应生成中间体 SB-3。SB-3 在碱性条件下,另外 4 个羟基被解离出来,同时在此条件下 C-2,C-3 位置脱氢形成双键,得到中间体 SB-4,经乙酰化后得到 SB-5。与 3-氨基-1-丙醇反应后暴露出 C-3 位的羟基,得到 SB-6,最后将 C-3 位上的羟基改造,得到 12 个化合物。合成路线如图 2 所示。

在研究中,我们发现 3,5,7,20,23-五-O-乙酰基水飞蓟宾(SB-1)的酯基团具有酰化能力,胺可以与这些基团反应生成酰胺并将其酯转化为羟基。该过程不是碱性条件下酯的水解,因为这个反应可以在无水条件下进行;伯胺和仲胺都能完成这一反应,叔胺则不能。水飞蓟宾 C-7 位置羟基的酸性最强,该位置酯基的酰化能力也最强。通过控制胺的用量和反应时间,SB-1 的 C-7 位置的酯基能够完全转化为羟基,而其他酯基不受影响。当水飞蓟宾 C-2、C-3 位置被氧化形成双键后,处在 C-3 位上的羟基酸性接近 C-7 位,此时 C-3 位酯基转化为羟基的条件与 C-7 位羟基的转化相同。这一发现以前未报道过,对于水飞蓟宾、黄酮和多羟基化合物的区域选择性修饰具有重要意义。

1.2.1　中间体的制备

3,5,7,20,23-五-O-乙酰水飞蓟宾(SB-1):0.964 g(2 mmol)水飞蓟宾溶于 10 mL 吡啶中。在室温下搅拌混合物,然后加入 2 mL(35 mmol)乙酸酐,由 5 mg 4-二甲氨基吡啶(DMAP)作为催化剂,反应混合物在室温下搅拌 5 min,然后向混合物中倒入 100 mL 冰水。沉淀物被过滤出来,用水、石油醚反复冲洗 3 次,然后干燥,得到中间体 SB-1。所得纯产物为 1.365 g 白色粉末,产率 99%,m. p.115.3~116.1 ℃。

3,5,20,23-四-O-乙酰水飞蓟宾(SB-2):在 1.384 g(2 mmol)中间体 SB-1 的 10 mL 吡啶溶液



a.acetic anhydride, DMAP, pyridine, r.t.; b.3-Amino-1-propanol, pyridine, 0 ℃; c.benzyl bromide, DMF, $KHCO_3$, KI, 80 ℃ reflux, 2 h; d、e.CH_3OH, NaOH, H_2O; O_2, 60 ℃ reflux, 2 h; f.acetic anhydride, DMAP, pyridine, r.t; g.3-Amino-1-propanol, pyridine, 0 ℃; h.acid chloride, triethylamine, THF, r.t.

图 2 化合物合成路线图

Fig.2 Synthetic roadmap of compounds

中加入 459 μL(6 mmol)3-氨基-1-丙醇,反应混合物在 0 ℃搅拌 30 s。加入等量的 459 μL(6 mmol)冰乙酸立即猝灭反应。将反应溶液倒入 200 mL 冰水中。沉淀物被过滤出来,用水及石油醚冲洗,然后干燥,得到中间体 SB-2。1.297 g 白色固体,产率 99.03%,m. p.134.6~135.0 ℃。

7-O-苄基-3, 5, 20, 23-四-O-乙酰水飞蓟宾(SB-3):将 650 mg(1 mmol)中间体 SB-2 溶于 8 mL N, N-二甲基甲酰胺(DMF)中,然后添加 595 mL(3 mmol)溴化苄,加入 300 mg(3 mmol) $KHCO_3$ 与 5 mg KI 作为此反应的缚酸剂和催化剂,将反应混合物在 80 ℃下回流 2 h。通过减压过滤去除多余的酸结合剂($KHCO_3$),在减压下蒸发溶剂(DMF)。残渣在甲醇中重结晶,得到中间体 SB-3,725 mg 淡粉色固体,产率 97.97%,m. p. 115.2~115.8 ℃。

7-O-苄基-2,3-脱氢水飞蓟宾(SB-4):740 mg(1 mmol)中间体 SB-3 溶于 10 mL 甲醇中,缓慢滴加 240 mg(6 mmol)NaOH 水溶液,盖住瓶塞反应 30 min 后,打开瓶塞(利用空气中的 O_2 氧化),继续反应 2 h 后,向反应液中倒入 100 mL 冰水,沉淀物逐渐析出,减压抽滤,用水、石油醚反复冲洗滤饼 3 次,干燥得中间体 SB-4,549 mg 黄色固体,产率 96.25%,m. p.115.7~116.4 ℃。

7-O-苄基-3,5,20,23-四-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(SB-5):570 mg(1 mmol)中间体 SB-4 溶于 6 mL 吡啶中。在室温下搅拌混合物,然后加入 1 mL(17 mmol)乙酸酐,由 5 mg DMAP 作为催化剂,反应混合物在室温下搅拌 5 min,然后向混合物中倒入 100 mL 冰水。沉淀物经减压抽滤,水、石油醚反复冲洗 3 次,然后干燥,得到中间体 SB-5。671 mg 淡黄色粉末,产率 90.92%,m. p. 114.7~115.2 ℃。ESI-MS,*m/z*:741.19$[M+H]^+$。

7-O-苄基-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(SB-6):738 mg(1 mmol)中间体 SB-5 溶于 6 mL 吡啶中,加入 230 μL(3 mmol)3-氨基-1-丙醇,反应混合物在 0 ℃反应 30 s。加入等量的 230 μL(3 mmol)冰乙酸立即猝灭反应。将反应溶液倒入 100 mL 冰水中。沉淀物被过滤出来,用水及石油醚冲洗 3 次,然后干燥,得到中间体 SB-

6。666 mg 淡黄色固体粉末,产率 95.65%,m.p. 134.2~134.9 ℃。

1.2.2　目标化合物 I_1~I_{12}的制备

将制得的 696 mg(1 mmol)中间体 SB-6 溶于 5 mL 四氢呋喃中,加入相应的 1.1 mmol 酸酐或酰氯,用 5 mg 4-二甲氨基吡啶(DMAP)或 300 μL(3 mmol)三乙胺作为催化剂,室温搅拌反应 20 min,TLC 检测反应终点。反应结束后,过滤除去三乙胺盐酸盐,收集滤液,减压旋干溶剂,加入甲醇进行重结晶,减压抽滤、冷水洗涤、干燥,得到目标化合物 I_1~I_{12}。

7-O-苄基-3-O-丙酰-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(I_1):0.697 1 g 淡黄色粉末状固体,产率 92.70%,m.p.123.3~124.5 ℃。^{1}HNMR(DMSO-d_6,500 MHz),δ:7.48~6.78(m,13H);5.28(s,2H);5.19(d,1H,J=7.9 Hz);4.75(t,1H,J=7.9 Hz);4.19(d,1H,J=12.6 Hz);4.02(d,1H,J=12.7 Hz);3.80(s,3H);2.39(m,2H);2.31(s,3H);2.27(s,3H);2.02(s,3H);1.16(t,3H)。^{13}CNMR(DMSO-d_6,125 MHz),δ:170.36(2C),169.52(2C),168.73,168.04,162.78,158.06,154.16,151.78,150.75,145.54,143.50,140.74,135.27,134.10,133.32,128.84(2C),128.57,127.54(2C),123.40,123.24,122.31,119.89,117.50,117.33,111.21,111.13,109.18,99.73,77.25,76.39,75.93,70.80,62.51,56.04,21.14,20.75,20.66(2C),9.55。ESI-MS,m/z:741.19[M+H]$^+$。

7-O-苄基-3-O-氯乙酰-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(I_2):0.682 7 g 淡黄色粉末状固体,产率 88.37%,m.p. 157.5~158.0 ℃。^{1}HNMR(DMSO-d_6,500 MHz),δ:7.48~6.78(m,13H);5.28(s,2H);5.19(d,1H,J=7.9 Hz);4.75(t,1H,J=7.9 Hz);4.32(s,2H);4.19(d,1H,J=12.6 Hz);4.02(d,1H,J=12.7 Hz);3.80(s,3H);2.31(s,3H);2.27(s,3H);2.02(s,3H);1.16(t,3H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,125 MHz),δ:170.36(2C);169.60(2C);164.04,162.78,158.06,154.16,151.88,150.93,147.54,143.50,140.74,135.27,133.32,131.25,128.84(2C),127.87,127.54(2C),123.24,122.31,120.79,119.50,117.33,112.21,111.13,109.18,99.73,97.23,79.28,77.39,70.80,62.51,55.84,40.14,20.70,20.52(2C)。ESI-MS,m/z:772.45[M+H]$^+$。

7-O-苄基-3-O-正丁酰-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(I_3):0.669 6 g 淡黄色粉末状固体,产率 87.42%,m.p. 127.5~129.8 ℃。^{1}HNMR(DMSO-d_6,500 MHz),δ:7.48~6.78(m,13H);5.28(s,2H);5.19(d,1H,J=7.9 Hz);4.75(t,1H,J=7.9 Hz);4.32(s,2H);4.19(d,1H,J=12.6 Hz);4.02(d,1H,J=12.7 Hz);3.80(s,3H);2.31(s,3H);2.30(t,2H);2.27(s,3H);2.02(s,3H);1.58(m,2H);1.01(t,3H)。^{13}CNMR(DMSO-d_6,125 MHz),δ:171.22,170.34(2C),169.42(2C),164.04,162.78,158.06,154.16,151.58,150.93,147.54,143.50,139.76,135.27,133.02,131.15,128.87(2C),127.67,127.22(2C),123.24,122.31,120.79,119.50,117.33,112.21,111.13,109.18,99.73,97.23,79.28,78.39,70.80,62.51,55.84,36.12,20.70,20.60(2C),18.53,13.45。ESI-MS,m/z:791.25[M+H]$^+$。

7-O-苄基-3-O-异丁酰-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(I_4):0.685 9 g 淡黄色粉末状固体,产率 89.55%,m.p. 99.6~100.4 ℃。^{1}HNMR(DMSO-d_6,500 MHz),δ:7.48~6.78(m,13H);5.28(s,2H);5.19(d,1H,J=7.9 Hz);4.75(t,1H,J=7.9 Hz);4.32(s,2H);4.19(d,1H,J=12.6 Hz);4.02(d,1H,J=12.7 Hz);3.80(s,3H);2.53(m,1H);2.31(s,3H);2.27(s,3H);2.02(s,3H);1.07(t,6H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,125 MHz),δ:173.33,170.20(2C),169.12(2C),164.04,162.78,158.06,154.16,151.58,150.93,147.54,143.50,139.76,135.27,133.02,131.15,129.01(2C),127.67,127.02(2C),123.24,122.31,120.79,119.50,117.33,112.16,111.13,109.18,99.73,97.23,79.28,78.39,70.80,62.51,55.84,36.22,21.70,20.30(2C),19.25(2C)。ESI-MS,m/z:791.25[M+H]$^+$。

7-O-苄基-3-O-三甲基乙酰-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(I_5):0.691 5 g 淡黄色粉末状固体,产率 88.65%,m.p. 136.1~136.6 ℃。^{1}HNMR(DMSO-d_6,500 MHz),δ:7.48~6.78(m,13H);5.28(s,2H);5.19(d,1H,J=7.9 Hz);4.75(t,1H,J=7.9 Hz);4.19(d,1H,J=12.6 Hz);4.02(d,1H,J=12.7 Hz);3.83(s,3H);2.50

(s,3H);2.31(s,3H);2.02(s,3H);1.22(s,9H)。^{13}CNMR(CDCl$_3$,125 MHz),δ:176.24,170.34(2C),169.09(2C),164.04,162.65,157.44,154.16,151.58,150.93,147.54,143.50,139.76,135.27,133.02,131.15,128.95(2C),127.67,127.11(2C),123.24,122.31,120.79,119.50,117.23,112.16,111.13,109.68,99.73,98.01,79.48,78.66,70.45,62.34,55.89,38.82,27.57(3C),20.79,20.30(2C)。ESI-MS,*m/z*:785.26[M+H]$^+$。

7-O-苄基-3-O-环丙基甲酰-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(I_6):0.739 9 g 淡黄色粉末状固体,产率 96.85%,m.p.119.4~120.1 ℃。^{1}HNMR(DMSO-d_6,500 MHz),δ:7.48~6.78(m,13H);5.28(s,2H);5.19(d,1H,*J*=7.9 Hz);4.75(t,1H,*J*=7.9 Hz);4.19(d,1H,*J*=12.6 Hz);4.02(d,1H,*J*=12.7 Hz);3.83(s,3H);2.31(s,3H);2.27(s,3H);1.61(m,1H);1.11(q,4H)。^{13}CNMR(DMSO-d_6,125 MHz),δ:183.06,171.01(2C),169.42(2C),168.73,168.04,162.78,158.06,154.16,151.78,150.75,145.54,143.50,140.74,135.27,134.10,133.32,128.84(2C),128.57,127.54(2C),123.40,123.24,122.31,119.89,117.50,117.33,111.21,111.13,109.18,99.73,77.25,76.39,75.93,70.80,62.51,56.04,21.14,20.75,20.36(2C),12.78,8.45(2C)。ESI-MS,*m/z*:763.21[M+H]$^+$。

7-O-苄基-3-O-丙烯酰-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(I_7):0.674 0 g 淡黄色粉末状固体,产率 89.87%,m.p.129.8~130.5 ℃。^{1}HNMR(DMSO-d_6,500 MHz),δ:7.48~6.78(m,13H);6.53(t,1H,*J*=5.2 Hz);6.25(d,1H,*J*=5.2 Hz);5.97(d,1H,*J*=5.2 Hz);5.28(s,2H);5.19(d,1H,*J*=7.9 Hz);4.75(t,1H,*J*=7.9 Hz);4.19(d,1H,*J*=12.6 Hz);4.02(d,1H,*J*=12.7 Hz);3.80(s,3H);2.39(m,2H);2.31(s,3H);2.27(s,3H);2.02(s,3H)。^{13}CNMR(CDCl$_3$,125 MHz),δ:170.24(2C),169.21(2C),163.94,162.78,158.06,154.16,151.58,150.93,147.54,143.50,139.76,135.27,134.10,133.02,131.15,128.87(2C),127.67,127.22(2C),123.24,122.31,120.79,119.50,117.33,112.21,111.13,109.18,99.73,97.23,79.28,78.39,70.80,62.51,55.84,20.68,20.33(2C)。ESI-MS,*m/z*:749.08[M+H]$^+$。

7-O-苄基-3-O-苯甲酰-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(I_8):0.640 2 g 淡黄色粉末状固体,产率 80.00%,m.p.159.8~160.8 ℃。^{1}HNMR(DMSO-d_6,500 MHz),δ:8.15(d,2H,*J*=7.2 Hz),7.81(t,1H);7.62(d,2H,*J*=7.2 Hz);7.48~6.78(m,13H);6.53(t,1H,*J*=5.2 Hz);6.25(d,1H,*J*=5.2 Hz);5.97(d,1H,*J*=5.2 Hz);5.28(s,2H);5.19(d,1H,*J*=7.9 Hz);4.75(t,1H,*J*=7.9 Hz);4.19(d,1H,*J*=12.6 Hz);4.02(d,1H,*J*=12.7 Hz);3.80(s,3H);2.31(s,3H);2.27(s,3H);2.02(s,3H)。^{13}CNMR(CDCl$_3$,125 MHz),δ:170.32(2C),169.40(2C),164.04,162.78,158.06,154.16,151.58,150.93,147.54,143.50,139.76,135.27,133.02,131.15,130.32(2C),129.01(2C),128.81(2C),127.67,127.02(2C),123.24,122.31,120.79,119.50,117.33,112.16,111.13,109.18,99.73,97.23,79.28,78.39,70.80,62.51,55.90,21.72,20.30(2C)。ESI-MS,*m/z*:791.25[M+H]$^+$。

7-O-苄基-3-O-对氟苯甲酰-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(I_9):0.636 3 g 淡黄色粉末状固体,产率 77.78%,m.p.164.4~165.1 ℃。^{1}HNMR(CDCl$_3$,500 MHz),δ:8.15(d,2H,*J*=7.2 Hz);7.50(d,2H,*J*=7.2 Hz);7.48~6.78(m,13H);6.53(t,1H,*J*=5.2 Hz);6.25(d,1H,*J*=5.2 Hz);5.97(d,1H,*J*=5.2 Hz);5.28(s,2H);5.19(d,1H,*J*=7.9 Hz);4.75(t,1H,*J*=7.9 Hz);4.19(d,1H,*J*=12.6 Hz);4.02(d,1H,*J*=12.7 Hz);3.80(s,3H);2.39(s,3H);2.28(s,3H);2.04(s,3H)。^{13}CNMR(CDCl$_3$,125 MHz),δ:171.12(2C),169.42(2C),168.13,163.84,162.78,158.06,154.16,151.78,150.75,145.54,143.50,140.74,135.27,134.10,133.32,131.92(2C),131.52,128.84(2C),128.57,127.54(2C),123.40,123.24,122.31,119.89,117.50,117.33,115.4(2C),111.21,111.13,109.23,99.77,77.25,76.39,75.93,70.69,63.31,55.80,21.14,20.30(2C)。ESI-MS,*m/z*:811.19[M+H]$^+$。

7-O-苄基-3-O-对氯苯甲酰-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(I_{10}):0.729 0 g 淡黄色粉末状固体,产率 87.25%,m.p.154.9~155.2 ℃。^{1}HNMR(DMSO-d_6,500 MHz),δ:8.05(d,2H,*J*=

7.2 Hz), 7.70 (d, 2H, J = 7.2 Hz); 7.48 ~ 6.78 (m, 13H); 6.53 (t, 1H, J = 5.2 Hz); 6.25 (d, 1H, J = 5.2 Hz); 5.97 (d, 1H, J = 5.2 Hz); 5.38 (s, 2H); 5.17 (d, 1H, J = 7.9 Hz); 4.75 (t, 1H, J = 7.9 Hz); 4.19 (d, 1H, J = 12.6 Hz); 4.02 (d, 1H, J = 12.7 Hz); 3.80 (s, 3H); 2.31 (s, 3H); 2.27 (s, 3H); 2.04 (s, 3H)。^{13}CNMR ($CDCl_3$, 125 MHz), δ: 170.56 (2C), 169.40 (2C), 164.04, 162.78, 158.06, 154.16, 151.88, 150.93, 147.54, 143.50, 140.74, 135.27, 133.32, 131.72 (2C), 131.25, 128.89 (2C), 127.87, 127.54 (2C), 123.24, 122.31, 120.79, 119.50, 117.33, 112.21, 111.13, 109.18, 99.73, 97.23, 79.28, 77.39, 70.80, 62.51, 55.84, 20.70, 20.52 (2C)。ESI-MS, m/z: 853.39 $[M+H]^+$。

7-O-苄基-3-O-甲基磺酰-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(I_{11}):0.676 4 g 红褐色粉末状固体,产率 87.39%, m.p. 116.3 ~ 116.9 ℃。^{1}HNMR (DMSO-d_6, 500 MHz), δ: 7.48 ~ 6.78 (m, 13H); 5.28 (s, 2H); 5.19 (d, 1H, J = 7.9 Hz); 4.75 (t, 1H, J = 7.9 Hz); 4.19 (d, 1H, J = 12.6 Hz); 4.02 (d, 1H, J = 12.7 Hz); 3.83 (s, 3H); 3.43 (s, 3H); 2.31 (s, 3H); 2.27 (s, 3H); 2.02 (s, 3H)。^{13}CNMR (DMSO-d_6, 125 MHz), δ: 170.24 (2C), 169.02 (2C), 164.04, 162.78, 158.06, 154.16, 151.58, 150.93, 147.54, 143.50, 139.76, 135.27, 133.02, 131.15, 129.15 (2C), 128.87 (2C), 127.67, 127.22 (2C), 123.24, 122.31, 120.79, 119.50, 117.33, 112.21, 111.13, 109.18, 99.73, 97.23, 79.28, 78.39, 70.80, 62.51, 55.84, 20.71, 20.30 (2C)。ESI-MS, m/z: 777.23 $[M+H]^+$。

7-O-苄基-3-O-苯磺酰-5,20,23-三-O-乙酰-2,3-脱氢水飞蓟宾(I_{12}):0.638 9 g 红褐色粉末状固体,产率 76.42%, m.p. 129.7 ~ 131.8 ℃。^{1}HNMR (DMSO-d_6, 500 MHz), δ: 7.89 (d, 2H, J = 7.2 Hz); 7.83 (s, 1H); 7.69 (d, 2H, J = 7.2 Hz); 7.48 ~ 6.78 (m, 13H); 5.28 (s, 2H); 5.19 (d, 1H, J = 7.9 Hz); 4.75 (t, 1H, J = 7.9 Hz); 4.19 (d, 1H, J = 12.6 Hz); 4.02 (d, 1H, J = 12.7 Hz); 3.83 (s, 3H); 2.31 (s, 3H); 2.27 (s, 3H); 2.02 (s, 3H)。^{13}CNMR ($CDCl_3$, 125 MHz), δ: 170.20, 169.42 (2C), 168.13, 163.84, 162.78, 158.06, 154.16, 151.78, 150.75, 145.54, 143.50, 140.74, 135.27, 134.10, 133.32, 132.51, 131.92 (2C), 131.52, 130.00 (2C), 128.84 (2C), 128.57, 128.12 (2C), 127.54 (2C), 123.40, 123.24, 122.31, 119.89, 117.50, 117.33, 115.4 (2C), 111.21, 111.13, 109.23, 99.77, 77.25, 76.39, 75.93, 70.69, 63.31, 55.80, 21.14, 20.45 (2C)。ESI-MS, m/z: 865.28 $[M+Na]^+$。

1.2.3　生物活性试验测试

使用 MTT 法在癌细胞(MCF-7 和 SGC7901)中测定衍生物 I_1 ~ I_{12} 的细胞毒性。实验在 96 孔培养皿中进行(每孔约 6000 个细胞),拉帕替尼(lapatinib)为阳性对照,阴性对照包含细胞、培养基、MTT 和 DMSO。MCF-7 细胞和 SGC7901 细胞在补充有 10% FBS 和 1%青霉素-链霉素的培养基中培养,所有细胞均在装有体积分数为 5% CO_2 气体的 37 ℃恒温箱中培养 24 h,然后,将细胞与不同浓度的化合物(0.1、1、10、20、50 μmol/L)共培养 48 h,随后加入 MTT 溶液(每孔 100 μL)并在 37 ℃下孵育 4 h,最后在每孔中加入 150 μL DMSO,使用 Robonik P2000 EIA 读数器测量每个孔的吸光度测定 490 nm 下的光密度(Optical density, OD)值,抑制率(IR) = (对照组平均 OD 值−给药组平均 OD 值)/(对照组平均 OD 值-空白组平均 OD 值)×100%。使用 Graph Pad Prism

表 1　化合物对人乳腺癌细胞 MCF-7 和胃癌细胞 SGC7901 的抗肿瘤活性[注]

Tab.1　Antitumor activity of compounds on human breast cancer cell MCF-7 and gastric cancer cell SGC7901

Compound	Inhibition rate/% *		IC_{50}/(μmol·L^{-1})	
	MCF-7	SGC7901	MCF-7	SGC7901
I_1	46.8	37.8	12.55	16.62
I_2	61.2	42.5	7.39	17.56
I_3	41.1	38.2	15.16	14.98
I_4	35.6	21.4	16.02	30.22
I_5	27.7	24.8	21.55	28.70
I_6	33.6	27.7	18.14	26.95
I_7	50.3	43.1	12.78	14.56
I_8	42.6	27.5	14.88	26.89
I_9	46.5	36.7	13.31	15.46
I_{10}	22.3	19.9	23.23	39.45
I_{11}	40.5	31.4	12.97	19.57
I_{12}	58.8	50.8	7.36	11.57
Silybin	14.3	18.7	>50	>50
Lapatinib	56.3	45.7	7.55	15.49

注: * Compound concentration is 10 μmol/L and cell inhibition rate after 48 h treatment。

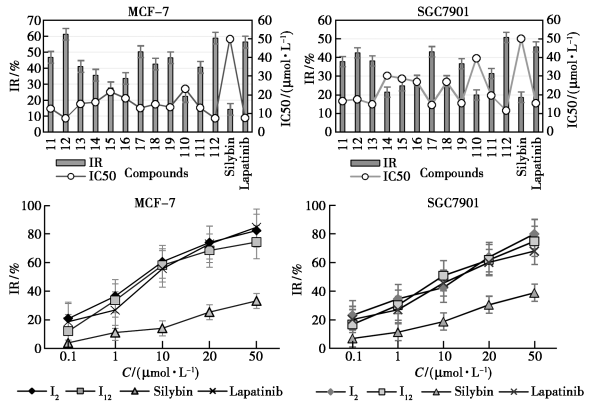


图 3 目标化合物对 MCF-7 和 SGC7901 的抑制率及 IC_{50}值

Fig.3 Inhibition rate and IC_{50} of target compounds on MCF-7 and SGC7901

软件确定诱导最大 50%的细胞增殖抑制(IC_{50})的浓度。重复实验 3 次,结果取平均值。细胞实验结果见表 1、图 3。

1.2.4 分子对接

本文利用计算机辅助药物设计对水飞蓟宾及其衍生物与 MEK 蛋白进行对接,模拟分析化合物与受体蛋白之间的相互作用。通过 Schrodinger 2021 软件预测和评估目标化合物与 MEK 靶点蛋白(PDB 编号:7f2x)的结合能力,将蛋白质结构导入软件中,选择 Protein Preparation 用于除水、加氢、填补缺失的侧链等。选择 Receptor Gride Generation 模块,确定结合位点并模拟候选分子配体与 EGFR 的结合方式。最终,使用 Virtual Screening Workflow 模块,以 XP(extra precision)进行精确筛选,并通过函数打分的方式将结果直接表示出来,分数的绝对值越大,结合能力就越强。结果如表 2 所示。

表 2 水飞蓟宾衍生物与 MEK 蛋白对接得分表

Tab.2 Docking scores of silybin derivatives and MEK target protein

Compound	Score	Compound	Score
I_1	-9.104	I_8	-8.953
I_2	-11.019	I_9	-8.174
I_3	-9.918	I_{10}	-8.332
I_4	-8.568	I_{11}	-9.292
I_5	-8.774	I_{12}	-11.175
I_6	-8.647	Silybin	-7.982
I_7	-9.074	Lapatinib	-10.223

2 结果与讨论

目标化合物 I_1~I_{12}对两种肿瘤细胞的抑制活性均强于水飞蓟宾,整体来说,目标化合物对 MCF-7 的抑制率强于 SGC7901,其中 I_2 和 I_{12}表现出较强的抑制活性,与拉帕替尼表现相当,IC_{50}值分别是 I_2:7.39(MCF-7)、17.56 μmol/L(SGC7901)和 I_{12}:7.36(MCF-7)、11.57 μmol/L(SGC7901)。

由表 2 可知,化合物的对接情况良好,其中 I_2 与 I_{12}的对接分数较高,显著高于母体水飞蓟宾。将对接完毕的化合物 I_2 与 I_{12}及靶蛋白导出为 PDB 格式文件,用 Discovery studio 2019 Client 软件进一步解析受体与目标化合物之间的作用力,得到化合物与靶蛋白的对接立体平面图像。结果如图 4、5 所示。

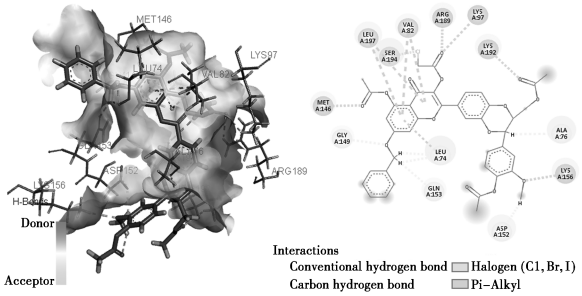


图 4 I_2 与 MEK 蛋白的分子对接图

Fig.4 Molecular docking diagram of I_2 and MEK protein

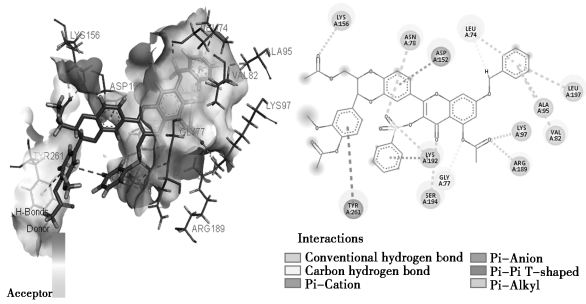


图 5 I_{12}与 MEK 蛋白的分子对接图

Fig.5 Molecular docking diagram of I_{12} and MEK protein

如图 4、5 所示,衍生物 I_2 的羰基和甲氧基与目标蛋白氨基酸残基 MET146、LYS97、LYS156、LYS192、ARG189 形成氢键,与目标蛋白稳定结合,同时引入的氯原子也与氨基酸残基 SER194 通过卤素作用紧密连接,增强了结合力。衍生物 I_{12}则与目标蛋白氨基酸残基 ASN78、LYS97、LYS156、LYS192、ARG189、SER194 形成氢键,从而与目标蛋白稳定结合。

3 结论

通过对水飞蓟宾 C-3 位的选择性酰化,合成了一系列新型衍生物,细胞活性实验表明合成的

目标物 I_1~I_{12}对人乳腺癌细胞和胃癌细胞有明显的抑制作用,高于起始原料水飞蓟宾,接近于阳性对照药拉帕替尼,也显示出对 C-3 位羟基选择性修饰有利于增强其抗肿瘤活性。这对水飞蓟宾进一步的结构修饰和优化具有一定的指导意义,为新型抗肿瘤药物的研发提供了可能的方向。分子对接结果显示目标衍生物与 MEK 蛋白能够稳定结合,且结合力强于水飞蓟宾,衍生物 I_2 和 I_{12}可能通过抑制 MEK,阻断下游通路起到抗肿瘤作用,但具体作用机制仍有待研究。

参考文献:

[1]KREN V,ALENTOVA K.Silybin and its congeners:From traditional medicine to molecular effects[J].*Nat. Prod. Rep.*,2022,**39**(**6**):1 264-1 281.

[2]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.

[3]黎迎,杨丹丹,李展,等.共载盐酸阿霉素和水飞蓟宾口服肝靶向脂质体机制评价[J].中国新药杂志,2019,**28**(**7**):837-843.

[4]黄秋萍,黄秋婵,郑燕菲,等.薜荔果总黄酮提取工艺及抗氧化性研究[J].化学试剂,2021,**43**(**9**):1 262-1 267.

[5]闫鹏举,苏瑾,王璐璐.水飞蓟宾的肝保护机制及促吸收技术研究[J].中国医药生物技术,2020,**15**(**6**):630-634.

[6]BIEDERMANN D, VAVRIKOVA E, CVAK L, et al. Chemistry of silybin[J].*Nat. Prod. Rep.*, 2014, **31**(**9**): 1 138-1 157.

[7]张志鹏,孟艳秋,王趱.水飞蓟宾及其衍生物生物活性及作用机制的研究进展[J].中草药,2021,**52**(**12**):3 717-3 724.

[8]ZHANG Z P, MENG Y Q, WANG Z, et al. Discovery of potent glucokinase and PPARγ dual-target agonists through an innovative scheme for regioselective modification of silybin.[J].*ACS omega*, 2022, **7**(**4**): 3 812-3 822.

[9]曹旭丹,任春梅,和田田,等.水飞蓟宾对心肌缺血再灌注性心律失常的影响及机制探索[J].医学研究杂志,2019,**48**(**10**):117-120;143.

[10]PIGNATELLI P, CARNEVALE R, MENICHELLI D. Silybin and metabolic disorders[J].*Intern. Emerg. Med.*, 2019,**14**(**1**):1-13.

[11]OLTEAN M. Silybin against liver ischemia-reperfusion injury:Something old,something new[J].*J. Invest. Surg.*, 2018,**31**(**6**):521-522.

[12]EUNAE K,HOON J,EONGI S,et al. Neferine increases sensitivities to multiple anticancer drugs via downregulation of Bcl-2 expression in renal cancer cells[J].*Genes Genom.*,2022,**44**(**2**):165-173.

[13]REINA M,MARTINEZ A. Silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans as free radical scavengers[J].*J. Phys. Chem. B*,2015,**119**(**35**):11 597-11 606.

[14]MCCUBREY J A,STEELMAN L S,ABRAMS S L,et al. Emerging MEK inhibitors[J]. *Expert Opin. Emerg. Drugs*,2010,**15**(**2**):203-223.

[15]GRIMALDI A M,SIMEONE E,FESTINO L,et al. MEK inhibitors in the treatment of metastatic melanoma and solid tumors[J].*Am. J. Clin. Dermatol.*, 2017, **18**(**6**): 745-754.

[16]CHAMBARD J C,LEFLOCH R,POUYSSEGUR J,et al. ERK implication in cell cycle regulation[J].*Biochim. Biophys. Acta*,2007,**1 773**(**8**):1 299-1 310.

[17]DUMAZ N, LEBBE C. New perspectives on targeting RAF,MEK and ERK in melanoma[J].*Curr. Opin. Oncol.*,2021,**33**(**2**):120-126.

[18]KIM T H,WOO J S,KIM Y K,et al. Silibinin induces cell death through reactive oxygen species-dependent downregulation of notch-1/ERK/Akt signaling in human breast cancer cells[J].*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2014, **349**(**2**):268-278.

[19]WANG J Y,CHANG C C,CHIANG C C,et al. Silibinin suppresses the maintenance of colorectal cancer stem-like cells by inhibiting PP2A/AKT/mTOR pathways[J].*J. Cell Biochem.*,2012,**113**(**5**):1 733-1 743.

[5+1]串联反应构建螺[环己酮-吡唑啉酮]骨架的研究

陈治明

(贵州师范大学 化学与材料科学学院 贵州省功能材料化学重点实验室,贵州 贵阳 550001)

摘要:吡唑啉酮螺环骨架的构建在新药研发领域扮演着极其重要的角色,正成为有机合成领域的研究热点之一。合成了3种具有Lewis酸和手性酰胺结构的轴手性催化剂(1a~1c),并将其应用于双苄叉丙酮与吡唑啉酮的[5+1]环加成串联反应,在室温25 ℃下,得到的目标化合物螺[环己酮-吡唑啉酮]的产率高(92%),对映体选择性好(89% *e.e.*)。该方法具有催化剂易制备、反应条件温和、对环境友好等特点,为具有生物药理活性的螺环己酮-吡唑啉酮骨架的合成提供了重要途径。

关键词:吡唑啉酮;轴手性催化剂;串联反应;[5+1]环加成;螺环己酮-吡唑啉酮

中图分类号:O626 **文献标识码**:A **文章编号**:0258-3283(2023)07-0152-07

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0182

Study on the Construction of Spiro [Cyclohexanone Pyrazolone] Skeleton by [5+1] Tandem Reaction *CHEN Zhi-ming*

(Guizhou Provincial Key Laboratory of Functional Materials Chemistry, School of Chemistry and Materials Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: The construction of pyrazolone spiro skeleton plays an extremely important role in the field of new drug research and development, and has become a research hotspot in the field of organic synthesis. Three axial chiral catalysts (1a~1c) with acidic and chiral amide structure were synthesized and applied to the [5+1] cycloaddition reaction of bisbenzylidene acetone and pyrazolone. At room temperature 25 ℃, the target compound was obtained in high yield (92%) and good enantioselectivity (89% *e.e.*). This method had the characteristics of easy preparation of catalyst, mild reaction conditions and environmental friendliness, which provided an important way for the synthesis of spirocyclohexanone-pyrazolone skeleton with biological pharmacological activity.

Key words: pyrazolone; axial chiral catalyst; tandem reaction; [5+1] annulation; spirocyclohexanone-pyrazolone

螺环吡唑啉酮衍生物是广泛存在于天然产物和药剂中的重要分子骨架[1]。吡唑啉酮具有许多反应中心,可以进一步修饰和转化以获得新的生物药理活性价值的化合物,同时也是药物化学中的重要骨架之一[2,3]。目前市场上的多种药物都以吡唑螺环为主,如安乃近[4]、磺胺吡拉酮[5]、依达拉奉[6]等。在系列螺环吡唑啉酮化合物中,螺环己酮-吡唑啉酮化合物是一类含有一个六元手性碳环,具有很好的抗肿瘤、抗抑郁、抗氧化、抗菌、抗惊厥、镇痛、抗炎等生物活性(图1)[7-13]。

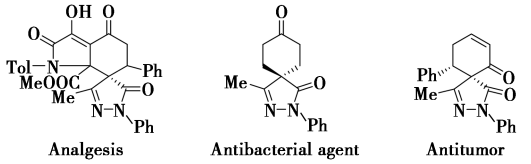


图1 具有生物活性的吡唑啉酮衍生物

Fig.1 Biologically active pyrazolone derivatives

目前,螺环吡唑啉酮衍生物的合成已经广泛应用于许多天然化合物和药物制剂中,一直是有机化学中最受欢迎和最有吸引力的研究领域之一[14-16]。2010年,Zea等[17]首次报道通过Micheal/Micheal/aldol反应合成手性螺环吡唑啉酮化合物。2012年,Wu等[18]采用不对称双Michael加成串联反应合成高对映选择性螺环己酮-吡唑啉酮,该反应提供良好的吡唑酮衍生物。2014年,Sun等[19]以1,3-二羰基化合物与不饱和吡唑啉酮和不饱和醛的一锅法有机催化对映选择性反应,研究了手性多官能化螺环吡唑啉酮衍生物的原子经济合成方法。2016年,Wang等[20]提出了一种以烯醛和不饱和吡唑啉酮为底物,用N杂环二碳烯催化[3+2]环加成合成五元螺环吡唑啉酮的新合成策略。2018年,Leng等[21]报道了一种仲胺催化的高对映选择性α烷基吡唑啉酮与

收稿日期:2023-03-15;**网络首发日期**:2023-04-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21362006)。

作者简介:陈治明(1971-),男,贵州贵阳人,硕士,教授,主要从事有机合成研究,E-mail:czm000219@163.com。

引用本文:陈治明.[5+1]串联反应构建螺[环己酮-吡唑啉酮]骨架的研究[J].化学试剂,2023,**45**(7):152-158。

α,β-不饱和醛的[3+3]环化反应,该反应可制备多种结构和立体化学复杂的对映体螺环吡唑啉酮。2018 年,Lu 等[22]提出了一种[4+1]环加成不对称合成具有 3 个连续手性中心和 2 个季碳的螺环戊酮-吡唑啉酮化合物。

本文设计了 3 种既含 Lewis 酸且具手性胺的轴手性催化剂,该类催化剂存在多活性中心,具有多氢键结构,轴手性诱导有利于提高产物的对映选择性,氢键及多活性中心有利于反应产率的提升[23]。将合成的催化剂用于催化双苄叉丙酮与吡唑啉酮的不对称[5+1]串联环加成反应,过程中无需添加剂获得了具有两个手性中心的螺[环己酮-吡唑啉酮]核心结构,目标化合物的产率高(91%),对映体选择性好(89% *e.e.*)。该方法为具有生物药理活性的螺[环己酮-吡唑酮]骨架的合成提供了重要的途径。

1　实验部分

1.1　主要仪器与试剂

RU-21A 型旋转蒸发仪(上海贝茵生物有限公司);TripleTOF 6600 LC-MS/MS 型质谱、LC2000 型天美高效液相色谱仪、Avance DPX 型核磁共振仪、TENSOR27 型傅里叶变换红外光谱仪(德国 BRUKER 公司);X-6 型数字显微熔点测定仪(北京泰克科技有限公司)。

2-羟基-3-萘甲酸(北京百灵威科技有限公司);L-亮氨酸甲脂盐酸盐、四甲基乙二胺(TMEDA)、N,N-二己基碳二亚胺(DCC)、1-羟基苯并三唑(HOBT)、(R)-(-)-1-环己基乙胺、(R)-1-(1-萘基)乙胺、石油醚(PE)、乙酸乙酯(EA)、(R)-1-(4-甲苯基)乙胺(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);三氯甲烷、二氯甲烷(成都科隆化学品有限公司)纯化后使用,其余所有试剂均为市售分析纯级。

1.2　催化剂 1a~1c 的合成

向 50 mL 三口烧瓶中依次称取 0.299 2 g(0.8 mmol)自制 s 型联二萘酚酸(1)[24]、0.329 6 g(1.6 mmol)DCC、0.216 3 g(1.6 mmol)HOBT,然后在 0 ℃氮气氛围下加入 15 mL 纯化的 THF 搅拌溶解,再用 3 mL THF 稀释溶解 0.6 mL(0.4 mmol)(R)-1-(4-甲苯基)乙胺于恒压滴液漏斗,最后 0 ℃氮气氛围下缓慢滴加 1 h 后升至室温搅拌,TLC 检测反应完,向反应溶液中加入乙酸乙酯萃取、过滤,滤液减压浓缩。柱层析(洗脱剂:V(PE):V(EA)=4:1)提纯得化合物 1a。同样的方法合成 1b、1c。

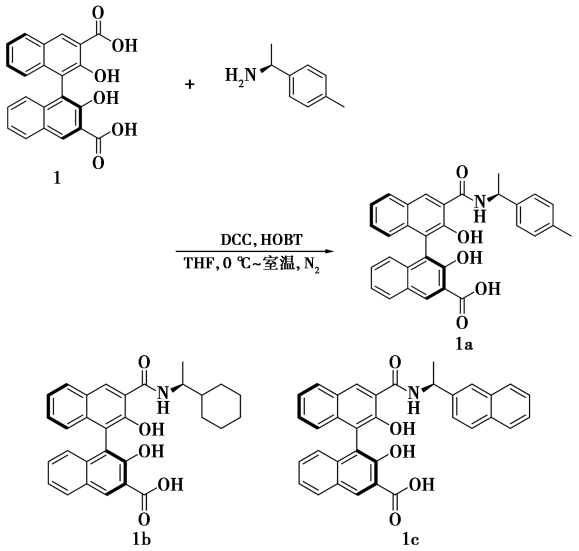


图 2　催化剂 1a~1c 的合成

Fig.2　Synthesis of catalysts 1a~1c

(S)-2,2′-二羟基-3′-(((R)-1-(对甲苯基)乙基)氨基甲酰基)-[1,1′-联萘]-3-羧酸(1a):淡黄色固体,产率 78%,m. p. 128.6 ~ 129.5 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$, 400 MHz),δ: 12.00(s, 1H);11.59(s,1H);8.16(s,1H);8.09(s,1H);7.86~7.78(m,1H);7.70~7.63(m,1H);7.39~7.24(m,5H);7.19(dd,4H,J=11.6,7.7 Hz);7.11(dd,2H,J=8.8,5.9 Hz);7.07~6.95(m,1H);5.40~5.25(m,1H);2.36(s,3H);1.26(s,3H)。^{13}CNMR($CDCl_3$, 101 MHz),δ: 169.1, 168.7, 154.3,139.9,139.3,137.5,129.6,129.1,128.8,127.9,127.6,127.0,126.3,124.7,123.9,117.5,117.3,116.8,49.4,33.9,31.6,29.2,21.1. HR-MS,$C_{31}H_{25}NO_5$,实测值(计算值),m/z:492.177 5(492.176 7)$[M+H]^+$。

(S)-2,2′-二羟基-3′-(((R)-1-环己基乙基)氨基甲酰基)-[1,1′-联萘]-3-羧酸(1b):黄色固体,产率 80%,m. p. 138.6 ~ 139.7 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,400 MHz),δ: 12.00(s,2H);11.85(s,1H);8.11(d,2H,J=16.1 Hz);7.89~7.78(m,1H);7.75(dd,1H,J=7.3,2.0 Hz),7.35~7.26(m,2H);7.24~7.16(m,1H);7.14~7.06(m,2H);6.69~6.56(m,2H);4.18~4.07(m,1H);1.61~1.44(m,1H);1.29~1.21(m,10H);0.92~

0.69(m,3H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,101 MHz),δ:169.3,168.9,154.4,154.3,136.2,136.1,129.0,128.6,127.2,126.9,124.6,123.8,117.6,117.4,50.1,43.1,29.4,29.2,26.4,26.2,17.9,17.8。HR-MS,$C_{30}H_{29}NO_5$,实测值(计算值),m/z:484.207 6(484.207 1)$[M+H]^+$。

(S)-2,2′-二羟基-3′-((R)-1-(2-萘乙基)氨基甲酰基)-[1,1′-联萘]-3-羧酸(1c):淡黄色固体,产率 82%,m.p.121.6~122.6 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,400 MHz),δ:11.85(d,1H,J=78.1 Hz);8.22~8.03(m,7H);7.93~7.80(m,3H);7.77~7.61(m,2H);7.60~7.43(m,4H);7.35~7.01(m,4H);6.15(t,1H,J=7.1 Hz);1.81(dd,3H,J=16.8,6.7 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$,101 MHz),δ:168.6,154.3,137.8,137.3,136.2,134.1,133.5,131.2,131.1,128.9,127.9,127.8,127.1,126.1,125.4,124.6,123.9,123.2,123.0,117.5,45.5,45.3,29.7,20.6,20.4。HR-MS,$C_{34}H_{25}NO_5$,实测值(计算值),m/z:528.176 6(528.175 8)$[M+H]^+$。

1.3 手性螺[环己酮-吡唑啉酮]化合物的合成

将 0.031 8 g(0.2 mmol)的 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(2a)和 0.058 5 g(0.25 mmol)的双苄叉丙酮(3a)依次加入到 25 mL 的圆底烧瓶中,加入 5 ml 的二氯甲烷溶解底物后加入 10 mol%的催化剂 1a,25 ℃条件下搅拌 24 h,TLC 检测。减压蒸馏除去 CH_2Cl_2、柱层析(洗脱剂 V(PE):V(EA)=7:3)纯化,得到棕黄色固体 4a,合成路线如图 3 所示。以类似的方法合成化合物 4b~4l。

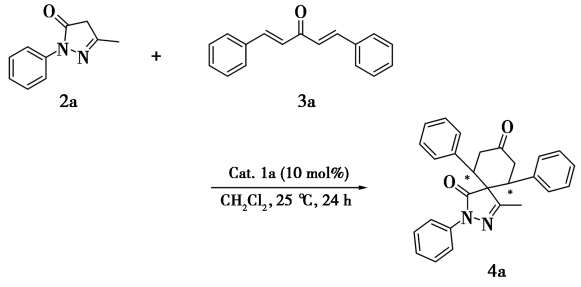


图 3 化合物 4a 的合成

Fig.3 Synthesis of compound 4a

4-甲基-2,6,10-三苯基-2,3-二氮杂螺[4.5]癸-3-烯-1,8-二酮(4a):棕黄色固体,产率 91%,89% *e.e.*,m.p.172~178 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,400 MHz),δ:7.39~7.15(m,15H);3.78(dd,1H,J=12.8,4.0 Hz);3.46~3.58(m,1H);3.32(dd,1H,J=12.0,8.2 Hz);2.83(d,1H,J=8.0 Hz);2.49(t,1H,J=8.0 Hz);1.52(d,3H,J=4.0 Hz);1.23(s,1H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,101 MHz),δ:208.2,175.6,161.6,160.2,137.4,136.7,135.5,130.0,129.8,129.7,129.6,129.2,126.6,126.5,124.5,118.5,60.8,60.6,43.1,41.6,41.4,40.2,39.5,16.7。HR-MS,$C_{27}H_{24}N_2O_2$,实测值(计算值),m/z:408.187 6(408.187 1)$[M+H]^+$。

4-甲基-6,10-二(4-氯苯基)-2-苯基-2,3-二氮杂螺[4.5]癸-3-烯-1,8-二酮(4b):黄色固体,产率 88%,84% *e.e.*,m.p.223~225 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,400 MHz),δ:7.54~7.15(m,9H);3.87~3.68(m,2H);3.60~3.29(m,2H);2.85(dd,1H,J=4.0,8.0 Hz);2.60(dd,2H,J=16.0,24.0 Hz);1.76(d,4H,J=20.0 Hz);1.27(s,2H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,101 MHz),δ:207.3,175.4,158.8,136.9,135.8,135.2,134.3,131.7,131.1,130.3,128.6,128.2,128.1,127.9,124.9,121.3,121.2,119.9,118.5,60.6,46.8,42.3,41.0,39.9,39.3,16.2,15.2。HR-MS,$C_{27}H_{22}Cl_2N_2O_2$,实测值(计算值),m/z:476.106 2(476.105 8)$[M+H]^+$。

4-甲基-6,10-二(4-氟苯基)-2-苯基-2,3-二氮杂螺[4.5]癸-3-烯-1,8-二酮(4c):黄色固体,产率 90%,88% *e.e.*,m.p.82~84 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,400 MHz),δ:6.76~6.64(m,12H);3.98~3.87(m,2H);3.59(d,1H,J=12.0 Hz);3.38(dd,1H,J=4.0,4.0 Hz);2.89(dd,1H,J=12.0,12.0 Hz);2.59(d,1H);1.69(d,3H,J=12.0 Hz);1.31(s,1H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,101 MHz),δ:207.5,173.5,162.4,160.1,159.1,135.8,133.1,131.2,131.1,128.5,128.3,128.0,127.7,124.7,118.5,115.0,114.7,63.0,42.0,40.6,40.1,40.0,16.2。HR-MS,$C_{27}H_{22}F_2N_2O_2$,实测值(计算值),m/z:445.168 7(445.168 2)$[M+H]^+$。

4-甲基-6,10-二(4-溴苯基)-2-苯基-2,3-二氮杂螺[4.5]癸-3-烯-1,8-二酮(4d):白色固体,产率 92%,89% *e.e.*,m.p.226~228 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,400 MHz),δ:7.32~6.91(m,11H);3.79~3.68(m,2H);3.19(dd,1H,J=12.8,4.0 Hz);2.88(dd,2H,J=12.0,12.0 Hz);2.53(d,1H,J=12.0 Hz);1.59(d,4H,J=20.0 Hz);1.08(s,1H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,101 MHz),δ:207.2,

174.3,158.8,136.2,135.7,134.3,131.2,130.8,128.4,128.2,127.8,124.8,121.3,121.1,118.6,60.4,42.3,40.9,39.9,39.3,16.8。HR-MS,$C_{27}H_{22}Br_2N_2O_2$,实测值(计算值),*m/z*:564.005 6(564.004 8)[M+H]$^+$。

4-甲基-6,10-二(4-甲氧基苯基)-2-苯基-2,3-二氮杂螺[4.5]癸-3-烯-1,8-二酮(4e):白色固体,产率 72%,85% *e.e.*,m.p.72 ~ 75 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,400 MHz),δ:7.53(t,2H,*J* = 12.0 Hz);7.32(dd,2H,*J* = 12.0,8.0 Hz);6.86 ~ 7.27(m,5H);6.78(dd,4H,*J* = 8.0,8.0 Hz);3.49 ~ 3.67(m,8H);3.19(dd,1H,*J* = 4.0,8.0 Hz);2.74(dd,1H,*J* = 8.0,8.0 Hz);2.42(d,1H,*J* = 16.0 Hz);1.59(d,3H,*J* = 12.0 Hz);1.17(s,1H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,101 MHz),δ:208.5,174.0,160.0,158.2,158.1,136.1,130.5,127.6,125.6,124.4,118.6,113.1,112.8,61.1,54.3,42.5,40.6,40.5,39.9,16.6。HR-MS,$C_{29}H_{28}N_2O_4$,实测值(计算值),*m/z*:469.284 0(469.209 1)[M+H]$^+$。

4-甲基-6,10-二(3-氟苯基)-2-苯基-2,3-二氮杂螺[4.5]癸-3-烯-1,8-二酮(4f):红棕色固体,产率 92%,85% *e.e.*,m.p.154 ~ 162 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,400 MHz),δ:7.38 ~ 6.79(m,12H);3.88 ~ 3.59(m,2H);3.49(d,1H,*J* = 12.0 Hz);3.30(dd,4H,*J* = 4.0,12.0 Hz);2.89(dd,1H,*J* = 12.0,12.0 Hz),2.59(t,1H,*J* = 16.0 Hz),1.19(s,1H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,101 MHz),δ:208.0,173.3,162.8,158.9,141.2,141.0,137.8,135.9,131.8,127.8,124.9,122.9,122.2,118.9,114.2,114.0,113.7,113.6,60.8,60.4,42.9,41.4,39.9,16.8。HR-MS,$C_{27}H_{22}F_2N_2O_2$,实测值(计算值),*m/z*:445.187 6(445.164 3)[M+H]$^+$。

4-甲基-6,10-二(3-溴苯基)-2-苯基-2,3-二氮杂螺[4.5]癸-3-烯-1,8-二酮(4g):白色固体,产率 85%,81% *e.e.*,m.p.156 ~ 157 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,400 MHz),δ:7.38 ~ 7.13(m,11H);3.89 ~ 3.47(m,2H);3.40(d,1H,*J* = 12.0 Hz);3.30(dd,1H,*J* = 4.0,12.0 Hz);2.87(dd,1H,*J* = 12.0,4.0 Hz);2.59(d,1H,*J* = 16.0 Hz);1.56(d,4H,*J* = 12.0 Hz);1.18(s,1H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,101 MHz),δ:206.9,175.3,160.0,139.8,137.1,135.8,135.5,132.5,132.3,130.9,130.5,130.4,130.2,127.9,125.4,125.1,125.0,122.2,121.8,120.1,62.6,42.5,41.8,40.5,40.2,16.8。HR-MS,$C_{27}H_{22}Br_2N_2O_2$,实测值(计算值),*m/z*:564.220 4(564.005 1)[M+H]$^+$。

4-甲基-6,10-二(3-甲氧基苯基)-2-苯基-2,3-二氮杂螺[4.5]癸-3-烯-1,8-二酮(4h):黄色油状,产率 75%,86% *e.e.*。^{1}HNMR($CDCl_3$,400 MHz),δ:7.53 ~ 6.91(m,13H);4.11 ~ 3.79(m,2H);3.65(t,4H,*J* = 12.0 Hz);2.67 ~ 2.06(m,6H);1.59(s,3H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,100 MHz),δ:208.9,175.1,159.9,137.8,137.4,136.4,136.3,128.9,127.7,127.6,127.2,127.1,126.0,123.7,121.4,121.0,120.0,61.0,60.8,47.6,47.3,43.3,41.8,40.6,39.9,20.7,20.5,16.8。HR-MS,$C_{29}H_{28}N_2O_4$,实测值(计算值),*m/z*:468.205 2(468.204 9)[M+H]$^+$。

4-甲基-6,10-二(2-呋喃基)-2-苯基-2,3-二氮杂螺[4.5]癸-3-烯-1,8-二酮(4i):棕红色油状,产率 68%,66% *e.e.*。^{1}HNMR($CDCl_3$,400 MHz),δ:7.73 ~ 7.24(m,5H);6.18(dd,3H,*J* = 12.0,8.0 Hz);4.23(d,1H,*J* = 8.0 Hz);3.92 ~ 3.70(m,2H);2.69 ~ 2.40(m,4H);1.48(t,5H,*J* = 20.0 Hz)。^{13}CNMR($CDCl_3$,101 MHz),δ:206.9,172.3,160.8,153.0,152.1,143.5,143.0,134.2,128.3,128.2,118.5,110.9,107.4,105.8,57.9,40.8,40.3,38.3,36.3,30.0,15.4。HR-MS,$C_{23}H_{20}N_2O_4$,实测值(计算值),*m/z*:388.142 8(388.142 3)[M+H]$^+$。

4-甲基-6,10-二苯基-2-(对甲苯基)-2,3-二氮杂螺[4.5]癸-3-烯-1,8-二酮(4j):黄色固体,产率 83%,87% *e.e.*,m.p.172 ~ 178 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,400 MHz),δ:7.42 ~ 7.04(m,14H);3.91 ~ 3.75(m,2H);3.64(d,1H,*J* = 12.0 Hz);3.54(d,1H,*J* = 4.0 Hz);2.92(dd,1H,*J* = 8.0,8.0 Hz);2.53(s,3H);2.51(t,1H,*J* = 12.0 Hz);2.19(s,3H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,101 MHz),δ:209.4,174.6,160.3,160.1,138.5,136.7,135.3,134.5,129.0,128.9,128.8,128.7,128.1,128.0,127.8,119.8,61.9,44.4,42.4,42.2,41.3,40.6,21.1,15.7。HR-MS,$C_{28}H_{26}N_2O_2$,实测值(计算值),*m/z*:423.207 8(423.207 3)[M+H]$^+$。

4-甲基-6,10-二苯基-2-(4-氯苯基)-2,3-二氮杂螺[4.5]癸-3-烯-1,8-二酮(4k):黄色固体,产率

92%, 86% *e.e.*, m.p. 132~138 ℃。^{1}HNMR ($CDCl_3$,400 MHz),δ:7.52(d,10H,J=8.0 Hz);3.83~3.67(m,2H);3.61(d,1H,J=12.0 Hz);3.27(d,1H,J=4.0 Hz);2.82(dd,1H,J=12.0,8.0 Hz);2.32(s,3H);1.70(d,3H,J=8.0 Hz);1.58(s,3H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,101 MHz),δ:208.6,174.5,163.6,161.9,160.3,135.9,133.9,133.8,131.9,130.8,129.4,129.3,129.1,129.0,128.8,120.3,116.2,115.8,115.7,115.4,62.2,43.2,41.7,40.4,15.4。HR-MS,$C_{28}H_{24}Cl_2N_2O_2$,实测值(计算值),m/z:490.121 8(490.121 5)$[M+H]^+$。

4-甲基-6,10-二(4-氯苯基)-2-(对甲苯)-2,3-二氮杂螺[4.5]癸-3-烯-1,8-二酮(4l):黄色固体,产率 89%,87% *e.e.*,m.p.122~124 ℃。^{1}HNMR($CDCl_3$,400 MHz),δ:7.31~6.88(m,12H);3.93~3.76(m,2H);3.60(d,1H,J=12.0 Hz);3.27(d,1H,J=4.0 Hz);2.97(dd,2H,J=4.0,12.0 Hz);2.32(s,3H);1.57(s,3H)。^{13}CNMR($CDCl_3$,101 MHz),δ:208.4,174.3,159.6,136.6,135.7,134.9,134.4,134.1,129.4,129.2,128.9,128.8,119.8,86.4,61.2,43.1,41.5,40.8,40.2,20.8,15.7。HR-MS,$C_{28}H_{24}F_2N_2O_2$,实测值(计算值),m/z:458.182 2(458.180 6)$[M+H]^+$。

2 结果与讨论

2.1 催化剂及用量的筛选

以化合物 2a、化合物 3a 反应为模板,考察了 3 种结构不同催化剂的催化能力和最佳用量,其结果见表 1。

表 1 催化剂及用量的筛选[注]

Tab.1 Screening of catalyst and dosage

序号	催化剂/mol%	产率[1)]/%	*e.e.*[2)]/%
1	1a/20	82	85
2	1b/20	71	77
3	1c/20	79	80
4	1a/15	88	79
5	1a/10	92	89
6	1a/5	86	87

注:反应条件:0.2 mmol 化合物 2a、0.25 mmol 化合物 3a、10 mol%催化剂 1a、2 mL 溶剂 CH_2Cl_2、25 ℃中反应 24 h;1):分离产量;2):手性高效液相色谱法测定。

序号 1~3 表明,当催化剂量为 20 mol%时,催化剂 1a 的催化效果最好,产物 4a 的产率及 *e.e.* 值分别达到 82%和 85%。序号 1、4~6 表明,当催化剂 1a 的量为 10 mol%时,产物 4a 产率及 *e.e.* 值高达 92%和 89%。综上所述,当催化剂为 10 mol%的化合物 1a 时,催化效果达到最佳。

2.2 溶剂和温度的优化

以化合物 2a、化合物 3a 为底物,10 mol%的催化剂 1a,探讨该反应的最佳反应溶剂、温度,其结果见表 2。序号 1~6 表明,当反应温度为 45 ℃时,反应在三氯甲烷、四氢呋喃、二氯甲烷中的反应效果较好,其中二氯甲烷作溶剂时,产物 4a 产率及 *e.e.* 值分别达到 81%和 76%。序号 6~10 表明,在最佳溶剂二氯甲烷中反应,温度 25 ℃时,产物 4a 的产率及 *e.e.* 值分别高达 92%和 89%。因此筛选出最佳反应温度为 25 ℃。

表 2 溶剂和温度的优化[注]

Tab.2 Optimization of solvents and temperatures

序号	溶剂	温度/℃	产率[1)]/%	*e.e.*[2)]/%
1	$CHCl_3$	45	79	74
2	THF	45	76	89
3	EtOAc	45	35	74
4	Et_2O	45	35	68
5	DMF	45	12	65
6	CH_2Cl_2	45	81	76
7	CH_2Cl_2	35	88	82
8	CH_2Cl_2	25	92	89
9	CH_2Cl_2	15	77	78
10	CH_2Cl_2	0	75	66

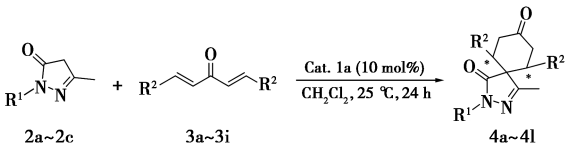
注:条件同表 1。

2.3 反应底物的扩展

在 10 mol%催化剂 1a、二氯甲烷为溶剂、25 ℃下反应 24 h 的最佳反应条件下,对二亚苄叉丙酮和的反应底物进行扩展,如表 3 所示。从表中可知,底物普适性良好,能以 68%~92%的产率、66%~89%的 *e.e.* 值获得目标产物。序号 2~8 中,当二亚苄叉丙酮的苯环上对位连有吸电子基团时,苯环上的吸电子基团增加碳正离子活性,获得了较高的产率。序号 9 中,当双苄叉丙酮的取代基为 2-呋喃时,引入杂原子影响双烯酮的活性导致产物产率降低。序号 10~12 中,对化合物 2a 进行底物拓展。结果表明,R_1 为推电子和拉电子基团时,产物的产率和对映选择性影响不大。

表 3　反应底物的扩展[注]

Tab.3　Expansion of reaction substrates



2a~2c　　3a~3i　　4a~4l

序号	R_1	R_2	产物	产率[1)]/%	e.e.[2)]/%
1	C_6H_5(2a)	C_6H_5(3a)	4a	91	89
2	C_6H_5(2a)	4-Cl C_6H_5(3b)	4b	88	84
3	C_6H_5(2a)	4-F C_6H_5(3c)	4c	90	88
4	C_6H_5(2a)	4-Br C_6H_5(3d)	4d	92	89
5	C_6H_5(2a)	4-MeO C_6H_5(3e)	4e	72	85
6	C_6H_5(2a)	3-F C_6H_5(3f)	4f	92	85
7	C_6H_5(2a)	3-Br C_6H_5(3g)	4g	85	81
8	C_6H_5(2a)	3-MeO C_6H_5(3h)	4h	75	86
9	C_6H_5(2a)	2-furyl(3i)	4i	68	66
10	4-CH_3 C_6H_5(2b)	C_6H_5(3a)	4j	83	87
11	4-Cl C_6H_5(2c)	C_6H_5(3a)	4k	88	86
12	4-CH_3 C_6H_5(2b)	4-Cl C_6H_5(3b)	4l	89	87

注:反应条件同表 1。

3　催化机理的探讨

以催化剂 1a 催化底物化合物 2a、化合物 3a 的可能机理如图 4 所示,催化剂 1a 结构中的酰胺与化合物 3a 的碳氧双键形成氢键活化底物,催化剂 1a 结构中的羧酸与吡唑啉酮烯醇式中的羟基形成氢键,更有利于进攻烯酮中的碳碳双键形成中间体,最后中间体进一步快速进攻另一端碳碳双键生成螺[环己酮-吡唑啉酮]化合物 4a。

4　结论

本文设计合成出一种具有 Lewis 酸及手性胺的 C_2 轴手性多活性中心的催化剂,不对称催化吡唑啉酮和双苄叉丙酮的[5+1]环加成高效构建高立体选择性螺环吡唑啉酮类化合物,该过程中无添加剂得到了具有 3 个相邻立体中心的螺[环己酮-吡唑啉酮]核心骨架,目标化合物的产率高(92%),对映体选择性好(89% *e.e.*)。为具有生理活性的重要天然产物骨架吡唑啉酮衍生物的合成提供了一种新的方法。

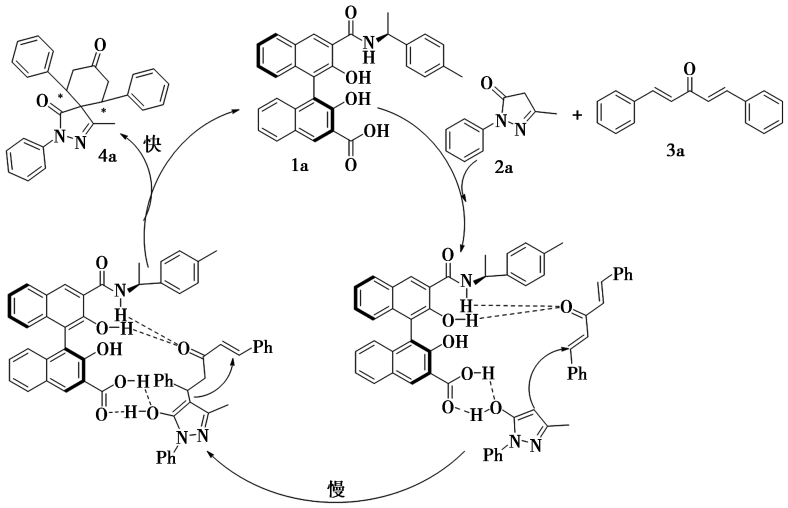


图 4　可能的催化过渡态

Fig.4　Possible catalytic transition

参考文献:

[1]FANG F,HU S,LI C,et al.Catalytic system-controlled divergent reaction strategies for the construction of diversified spiropyrazolone skeletons from pyrazolidinones and diazopyrazolones [J]. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 2021, **60**(**39**):21 327-21 333.

[2]LI X,CHEN F Y,KANG J W,et al.Stereoselective assembly of multifunctional spirocyclohexene pyrazolones that induce autophagy-dependent apoptosis in colorectal cancer cells [J]. *J. Org. Chem.*, 2019, **84**(**14**):9 138-9 150.

[3]SHARM R,CHAWLA P A,CHAWLA V,et al.A therapeutic journey of 5-pyrazolones as a versatile scaffold:A review[J].*Mini Rev. Med. Chem.*,2021,**21**(**13**):1 770-1 795.

[4]SAHOO J,SAHOO C R,SARANGI P K N,et al.Molecules with versatile biological activities bearing antipyrinyl nucleus as pharmacophore[J].*Eur. J. Med. Chem.*,

2020,**18**(**6**):1 119-1 121.

[5]BARREIRO C O,MORALES N G,ROJAS S P,et al.Synthesis and evaluation of biological activities of bis(spiropyrazolone)cyclopropanes:A potential application against leishmaniasis[J].*Molecules*,2021,**26**(**16**):4 960.

[6]CHAUHAN P,MAHAJAN S,LOH C C J,et al.Streocontrolled construction of six vicinal stereogenic centers on spiropyrazolones via organocascade Michael/Michael/1,2-addition reactions[J].*Org.lett.*,2014,**16**(**11**):2 954-2 957.

[7]LIU L,ZHONG Y,ZHANG P,et al.Core scaffold-inspired stereoselective synthesis of spiropyrazolones via an organocatalytic Michael/cyclization sequence[J].*J. Org. Chem.*,2012,**77**(**22**):10 228-10 234.

[8]LIANG J,CHEN Q,LIU L,et al.An organocatalytic asymmetric double Michael cascade reaction of unsaturated ketones and unsaturated pyrazolones:Highly efficient synthesis of spiropyrazolone derivatives[J].*Org. Biomol. Chem.*,2013,**11**(**9**):1 441-1 445.

[9]WU Q,MA C,DU X H,et al.Diversity-oriented synthesis of spiropyrazolone-based tetrahydropyrroles via three-component 1,3-dipolar cycloadditions[J].*Synthesis*,2016,**48**(**4**):595-605.

[10]ZHANG Y,WANG C,HUANG W,et al.Application of organocatalysis in bioorganometallic chemistry:Asymmetric synthesis of multifunctionalized spirocyclic pyrazolone-ferrocene hybrids as novel ralA inhibitors[J].*Org.Chem.Front.*,2018,**5**(**14**):2 229-2 233.

[11]TIAN Q,XU S,ZHANG C,et al.Palladium catalyzed direct carbonylative thiomethylation of aryldiazonium salts and amines with 4-(methylthio)-2-butanone as (methylthio) transfer agent[J].*J. Org. Chem.*,2021,**86**(**13**):8 797-8 804.

[12]ZHANG Y,WU S,WANG S,et al.Divergent cascade construction of skeletally diverse "privileged" pyrazole-derived molecular architectures[J].*Eur. J. Org. Chem.*,2015,**2 015**(**9**):2 030-2 037.

[13]任传清,张强.新型多取代 5-吡唑啉酮的合成与表征[J].化学试剂,2020,**42**(**11**):1 366-1 369.

[14]LU H,ZHANG H X,TAN C Y,et al.One-pot asymmetric synthesis of spiropyrazolone-linked cyclopropanes and benzofurans through a general michael addition/chlorination/nucleophilic substitution sequence[J].*J. Org.Chem.*,2019,**84**(**16**):10 292-10 305.

[15]CHAUHAN P,MAHAJAN S,ENDERS D.Asymmetric synthesis of pyrazoles and pyrazolones employing the reactivity of pyrazolin-5-one derivatives[J].*Chem. Commun.*,2015,**51**(**65**):12 890-12 907.

[16]LIU S,BAO X,WANG B.Pyrazolone:A powerful synthon for asymmetric diverse derivatizations[J].*Chem. Commun.*,2018,**54**(**82**):11 515-11 529.

[17]ZEA A,VALERO G,ALBA A N R,et al.Bifunctional thiourea-catalyzed asymmetric addition of anthrones to maleimides[J].*Adv.Synth.Catal.*,2010,**352**(**7**):1 102-1 106.

[18]WU B,CHEN J,LI M Q,et al.Highly enantioselective synthesis of spiro[cyclohexanone-oxindoles] and spiro[cyclohexanone-pyrazolones] by asymmetric cascade [5+1] double michael reactions[J].*Eur. J. Org. Chem*,2012,**42**(**7**):1 318-1 327.

[19]SUN P,MENG C Y,ZHOU F,et al.Organocatalytic asymmetric one-pot sequential reaction:Synthesis of highly substituted spirocyclohexanepyrazolones with six contiguous stereogenic carbons[J].*Tetrahedron*,2014,**70**(**49**):9 330-9 336.

[20]WANG L,LI S,CHAUHAN P,et al.Asymmetric,three-component,one-pot synthesis of spiropyrazolones and 2,5-chromenediones from aldol condensation/NHC-catalyzed annulation reactions[J].*Chem. Eur. J.*,2016,**22**(**15**):5 123-5 127.

[21]LENG H J,LI Q Z,ZENG R,et al.Front cover picture:Asymmetric construction of spiropyrazolone skeletons via amine-catalyzed [3+3] annulation[J].*Adv. Synth. Catal.*,2018,**360**(**2**):193-193.

[22]LU H,TAN C Y,ZHANG H X,et al.Participation of β-ketothioamides in N-heterocyclic carbene-catalyzed [3+3] spiroannulation:Asymmetric synthesis of functionalized spiro-piperidinone derivatives[J].*J. Org. Chem.*,2018,**83**(**24**):15 245-15 255.

[23]AURSNES M,TUNGEN J E,HANSEN T V.Enantioselective organocatalyzed bromolactonizations:Applications in natural product synthesis[J].*J. Org. Chem.*,2016,**81**(**18**):8 287-8 295.

[24]杨兰西,秦婷,安雪婕,等.轴手性酰基硫脲催化合成吡唑啉酮衍生物[J].化学试剂,2022,**44**(**4**):623-631.

《化学试剂》期刊栏目介绍

《化学试剂》创刊于 1979 年，是有关化学试剂及相关领域的专业性刊物。主要报道国内外化学试剂、精细化学品、专用化学品及相关领域的创新成果、先进技术和发展水平等。

本刊设立了特约专题、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、电子化学品等栏目。

1　特约专题

主要针对当前研究热点和某一领域突出创新成果进行组稿，要求稿件质量好，研究价值大。

2　综述与专论

主要报道化学试剂、精细化学品、专用化学品、绿色化学品等应用领域的研究成果整理、分析与前景预测。

3　生化与药用试剂

主要报道生物材料、抗癌药物、诊断试剂、生化试剂等新方向的研究进展和成果展示。

4　功能材料

主要报道光催化材料、荧光探针、晶体配合物、吸附材料、纳米材料等方向的研究进展。

5　分离提取技术

主要报道与天然产物、精细化学品、化学试剂等成分分析相关的分离提取技术。

6　电化学和新能源

主要报道电极材料、电化学传感、生物质能等领域的创新成果。

7　化学品与环境

主要报道与环境相关的化学品应用研究，包括空气、土壤、水、食品等方面的化学物质检测。

8　分析与测试

主要报道分析方法、仪器检测、成分分析等方面的新技术、新工艺、新设备。

9　标准物质与标准品

主要报道标准物质与标准品的制备过程及发展现状、标准物质的纯度分析及评价。

10　合成与工艺技术

主要报道与化学试剂、精细化学品、专用化学品生产和研制有关的新成果和创新成果。

11　电子化学品

主要报道电子工业中常用的专用化学品，包括高纯试剂、特种气体、电镀化学品、PCB 化学品等。

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,国内外公开发行。

《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**:M59l
定　　价:40 元/期　　480 元/年

欢迎读者直接与编辑部联系订阅,并请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)	上海馨晟试化工科技有限公司	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)
赛默飞世尔科技(中国)有限公司	QC1(彩色)	南京化学试剂股份有限公司	QC8(彩色)
全球分析科学与生化技术博览	QC2(彩色)	天津市科密欧化学试剂有限公司	QC9(彩色)
天津市永大化学试剂有限公司	QC3(彩色)	广东光华科技股份有限公司	QC10(彩色)
上海阿拉丁生化科技股份有限公司	QC4(彩色)	北化试剂	封三(彩色)
江苏强盛功能化学股份有限公司	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