

## 石杉碱甲印迹聚合物的制备、表征及其吸附性能

李志平<sup>a,b</sup> 李 辉<sup>b,c\*</sup> 刘 芬<sup>b</sup> 逯翠梅<sup>b</sup>

(<sup>a</sup>吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室 张家界 427000; <sup>b</sup>吉首大学化学化工学院 吉首 416000;

<sup>c</sup>吉首大学生物资源与环境科学学院 吉首 416000)

**摘 要** 以硅胶为牺牲载体,石杉碱甲为模板分子,甲基丙烯酸为功能单体,二乙烯基苯为交联剂,偶氮二异丁腈为引发剂,首次制备了石杉碱甲分子印迹聚合物,并用红外光谱、扫描电子显微镜和热重分析研究了印迹聚合物的结构特征,用静态吸附法和 Scatchard 分析法研究了印迹聚合物的识别效能和表面位点分布特征。结果表明,石杉碱甲印迹聚合物对模板分子具有较好的选择吸附性能,选择系数为 1.399。Scatchard 分析表明,印迹聚合物基体中主要存有两类吸附位点,对高亲和位点:平衡离解常数  $K_{d1} = 0.776 \text{ g/L}$ ,最大表观结合量  $Q_{\max 1} = 0.213 \text{ mg/g}$ ;对低亲和位点:平衡离解常数  $K_{d2} = 0.169 \text{ g/L}$ ,最大表观结合量  $Q_{\max 2} = 0.832 \text{ mg/g}$ 。当该聚合物用于微固相萃取蛇足石杉粗提液中的石杉碱甲时,石杉碱甲回收率为 93.5%,显示了较好的富集效果。

**关键词** 分子印迹聚合物,表面聚合,石杉碱甲,硅胶,吸附

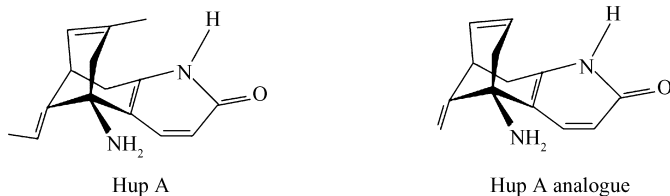
中图分类号:0631; TQ317

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2013)08-0915-07

DOI:10.3724/SP.J.1095.2013.20473

石杉碱甲(huperzine A, Hup A)<sup>[1]</sup>是传统中药蛇足石杉中的一种重要生物碱,也是一种高效、低毒和可逆的乙酰胆碱酯酶(Ach E)抑制剂<sup>[2]</sup>,其结构如 Scheme 1 所示。由于其高效低毒,现已应用于临床早老性痴呆症、重症肌无力等疾病的治疗。Hup A 的天然来源十分有限,且工业化合成相当困难,目前仍从植物蛇足石杉中提取。如赵新燕<sup>[3]</sup>研究了以氯仿-甲醇-氨水混合溶液为流动相,用制备液相色谱法分离千层塔中石杉碱甲,得到了纯度高于 90% 的产物。李俊等<sup>[4]</sup>研究了 5 种离子交换树脂对石杉碱甲的吸附量和解吸率,在优化条件下,可得到石杉碱甲含量约为 5% 的产物。李玉山<sup>[5]</sup>以氯仿-甲醇混合物为洗脱剂,用中性氧化铝柱色谱分离纯化石杉碱甲,石杉碱甲回收率达 97.6%,含量达 99.2%。陈建华等<sup>[6]</sup>利用高速逆流色谱技术,以正己烷/正丁醇/水两相溶剂体系,从千层塔提取物中分离制备了纯度高于 98% 的石杉碱甲单体。沈生荣<sup>[7]</sup>及刘建廷等<sup>[8]</sup>研究了用酸浸提、萃取、反萃取、活性炭脱色及氯仿重结晶等化学分离技术从千层塔中制备石杉碱甲。由于植物中石杉碱甲含量低,要得到高纯石杉碱甲,分离和富集仍是关键工序,而其中分离介质的选择至关重要。常规吸附剂或萃取剂,会受到吸附或萃取选择性的限制,而常规化学分离纯化工艺较为繁琐,且会带来一定的环境污染。



Scheme 1 Molecular structures of huperzine A and its analogue

分子印迹聚合物(MIPs)是模拟抗原抗体相互作用,以目标分子为模板合成的具有专一识别功能的高分子材料<sup>[9-11]</sup>。由于其独特的识别效果及稳定性能,已广泛应用于色谱分离、固相萃取、生物传感、模

2012-10-19 收稿, 2013-02-17 修回

国家自然科学基金面上项目(21077042)、林产化工工程湖南省重点实验室开放基金资助项目(JDZ201106)及湖南省教育厅重点项目(11A094)

通讯联系人:李辉,教授; Tel/Fax:0743-8563911; E-mail:lihuijsdx@163.com; 研究方向:生命科学中的分离分析新方法

拟酶催化及药物控制释放等领域<sup>[12]</sup>。为了提高分子印迹聚合物的可适用性,近年来开发了诸多新的制备方法<sup>[13]</sup>,其中 Yilmaz 等<sup>[14]</sup>报道的以硅胶为牺牲材料的表面印迹技术,可将印迹位点形成于材料表面,改善了印迹材料的传质动力学。该法工艺简单,原料利用率高,所得印迹聚合物具有优异的传质和选择吸附特性<sup>[15-18]</sup>。

本文以石杉碱甲为模板, $\alpha$ -甲基丙烯酸(MAA)为功能单体,二乙烯基苯(DVB)为交联剂,偶氮二异丁腈(AIBN)为引发剂,采用牺牲硅胶骨架法制备了石杉碱甲印迹聚合物,并用静态吸附法探讨了该分子印迹聚合物的吸附性能对模板及其结构类似物的选择性以及对石杉碱甲的微固相萃取性能,为用该分子印迹聚合物分离富集石杉碱甲提供理论和技术基础。类似工作目前还未见报道。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

石杉碱甲,纯度 98%;失二碳石杉碱甲类似物,纯度 95% 标准物质(结构见 Scheme 1);二乙烯基苯(DVB),纯度 99%; $\alpha$ -甲基丙烯酸(MAA),纯度 98%,以上均自 Sigma 公司。偶氮二异丁腈(AIBN,上海四赫维化工有限公司)。丙酮、甲醇和氢氟酸(HF)均购自中国医药集团上海化学试剂公司,无水乙醇、乙腈、乙酸均购自天津恒兴化学试剂制造有限公司,以上试剂均为分析纯。薄层层析硅胶(0.025 mm,青岛海洋化工厂)。

LC-20A 型高效液相色谱(日本岛津公司);IR Affinit-1 型岛津傅里叶变换红外光谱仪(日本岛津公司),KBr 压片法;FW-4A 型粉末压片机(天津市拓普仪器公司);KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);TD25-WS 型多管架自动平衡离心机(湘仪离心机公司);BZF-50 型真空干燥箱(上海博迅实业有限公司);DF-101B 型集热式恒温磁力搅拌器(浙江乐清市乐成电器厂);FA2104N 型电子分析天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);WCT-2C 型差热分析仪(北京光学仪器厂),升温速率:10 °C/min,在空气中测试;S-3400N 型扫描电子显微镜(河南贝尔伟业仪器有限公司),取少量聚合物样品于 1.5 mL 离心管中,加入少量甲醇,超声 5 min,取 1 滴置于盖玻片上,待甲醇挥发后即得观察用样品。空色谱柱管(200 mm, $\phi$  4.6 mm,北京金欧亚公司)。

### 1.2 石杉碱甲样品溶液的制备

称取 2.0 g 蛇足石杉细粉置于 200 mL 的圆底烧瓶中,加入 50 mL 石油醚提取 30 min,过滤。滤渣再用同样量的石油醚重复提取 2 次,过滤。滤渣用 25 mL 95% 的甲醇提取 3 次,每次 30 min,过滤,合并滤液,减压浓缩至近干,加入 20 mL 2% 的酒石酸溶解浓缩物,用氨水调节 pH 值至 8.0,再用氯仿萃取,当水层 Dragendorff's 反应呈阴性时,分出氯仿层,减压蒸馏除去氯仿至近干,用无水乙醇溶解并定容至 25 mL,备用。

### 1.3 预聚体系及引发剂溶液的制备

称取 0.5 mmol 石杉碱甲、2.0 mmol 甲基丙烯酸和 5.0 mmol 二乙烯基苯,溶于 3 mL 乙腈溶液中,混匀,通 N<sub>2</sub> 气 15 min,制得预聚合混合物溶液。称取 0.02488 g AIBN,溶于 1 mL 乙腈溶液中,通 N<sub>2</sub> 气除 O<sub>2</sub> 15 min,制得引发剂溶液。

### 1.4 Hup A 分子印迹聚合物的制备

在上述预聚合混合物溶液中加入 0.98 g 硅胶,充分混合至无粘连,再加入引发剂溶液,混匀。于 60 °C 水浴中静置聚合 24 h 后,将混合物倒入聚四氟乙烯烧杯中,加入 30 mL 40% HF 溶液,搅拌反应 12 h,待硅胶完全溶解后,离心分离聚合物,用去离子水洗至中性。过滤,用乙醇/氯仿(体积比 1:1)混合溶剂索氏提取 12 h,除去聚合物中的模板分子,真空干燥,备用。

非印迹聚合物的制备方式同上,只是在制备过程中不加入模板分子。

### 1.5 MIPs 的静态吸附

1.5.1 吸附等温线 在 25 mL 质量浓度分别为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45 和 0.50 g/L 的石杉碱甲乙腈溶液中各加入 20.0 mg MIPs,置于锥形瓶中进行静态吸附 5 h,用 0.45  $\mu$ m 的

微孔滤膜过滤。用紫外可见分光光度法测定滤液中石杉碱甲的浓度,并按下式计算平衡吸附量  $q_e$  (mg/g):

$$q_e = (\rho_0 - \rho_e) \frac{V}{m}$$

式中,  $\rho_0$  为初始浓度 (g/L),  $\rho_e$  为平衡浓度 (g/L),  $V$  为溶液体积 (mL),  $m$  为聚合物质量 (g)。

1.5.2 吸附选择性 在两份 25 mL 质量浓度均为 0.4 g/L 的石杉碱甲乙腈溶液中,分别加入 20.0 mg 分子印迹聚合物和非印迹聚合物,静态吸附 5 h 后,过滤,测定滤液中底物浓度。分布系数  $K_d$  (L/g) 为:

$$K_d = q_e / \rho_e$$

印迹聚合物对模板的选择系数 ( $k$ ) 和相对选择系数 ( $k'$ ) 分别为:

$$k = \frac{K_{d(\text{template})}}{K_{d(\text{analogue})}}$$

$$k' = \frac{k_{\text{MIP}}}{k_{\text{NIP}}}$$

式中,  $K_{d(\text{template})}$  和  $K_{d(\text{analogue})}$  分别为模板及类似物的分布系数,  $k_{\text{MIP}}$  和  $k_{\text{NIP}}$  分别为 MIPs 和 NIPs 的选择系数。

## 1.6 紫外可见分光光度法测定石杉碱甲的质量浓度

称取 5.2 mg 石杉碱甲标准物质,加入少量乙腈溶解,转入 25 mL 容量瓶中,并用乙腈定容至刻度。分别取 1、2、3、4、4.5 和 5 mL 溶液置于 10 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,分别制得 0.021、0.042、0.062、0.083、0.094 和 0.104 g/L 的标准溶液。以乙腈为参比,紫外可见分光光度法测定 308 nm 处的吸光度。以石杉碱甲浓度为横坐标,吸光度为纵坐标作图,得石杉碱甲的标准曲线为  $A = 26.59c + 0.0170$ ,  $R^2 = 0.9998$ 。

静态吸附后溶液中石杉碱甲的质量浓度测定:吸取 2.5 mL 滤液于 25 mL 容量瓶中,用乙腈定容到刻度,用紫外可见分光光度计于 308 nm 处测定溶液中石杉碱甲的浓度。

## 1.7 固相微萃取

1.7.1 装载 分别称取 20 mg 分子印迹聚合物和非印迹聚合物填入 2 支微固相萃取器中。取两份石杉碱甲粗提物的乙醇溶液,每份 10 mL,分别流经装有 MIPs 和 NIPs 聚合物的微固相萃取器,收集流出液。用高效液相色谱测定石杉碱甲样品溶液及被分子印迹聚合物和非印迹聚合物吸附后流出液中石杉碱甲的含量。

1.7.2 洗脱 吸附了石杉碱甲的聚合物先用 2 mL 乙腈冲洗,然后再用 10 mL  $V(\text{甲醇}):V(\text{醋酸}) = 9:1$  的混合液洗脱,收集冲洗液和洗脱液,用高效液相色谱测定其中石杉碱甲的含量。

## 1.8 高效液相色谱分析

高效液相色谱分析以 C18 柱 ( $\phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) 为分离柱,  $0.02 \text{ mol/L}$   $V(\text{磷酸二氢钾}):V(\text{乙腈}) = 92:8$  的混合物为流动相,流速  $1.0 \text{ mL/min}$ 。进样体积  $10 \mu\text{L}$ ,检测波长 308 nm。采用标准曲线法定量。

# 2 结果与讨论

## 2.1 分子印迹聚合物的表征

2.1.1 红外光谱 图 1 所示为硅胶 (a)、石杉碱甲 (b) 及其分子印迹聚合物 (MIPs) (c) 的红外光谱。谱线 a 中,  $1058 \text{ cm}^{-1}$  处是硅胶中 Si—O 键的特征吸收峰,  $3605 \text{ cm}^{-1}$  处为羟基—OH 伸缩振动吸收峰;谱线 b 中,  $3508$  和  $3006 \text{ cm}^{-1}$  处分别为 N—H 和 C—H 伸缩振动吸收峰,  $1785$  和  $1509 \text{ cm}^{-1}$  处分别为 C=O 基和 C=C 双键的对称伸缩振动吸收峰,  $1460 \text{ cm}^{-1}$  对应于吡啶酮环的伸缩振动吸收峰,  $1259 \text{ cm}^{-1}$  处为 C—N 单键伸缩振动吸收峰,  $671 \text{ cm}^{-1}$  处对应于石杉碱甲分子结构中杂环的变形振动吸收峰;当生成分子印迹聚合物后 (谱线 c),  $3612 \text{ cm}^{-1}$  处为羟基—OH 吸收峰, N—H 和 C—H 振动吸收峰分别移至  $3510$  和  $3016 \text{ cm}^{-1}$ , C=O 基和 C=C 双键的对称伸缩振动吸收峰分别移至  $1790$  和  $1500 \text{ cm}^{-1}$ , 而吡啶酮环和

C—N 单键的伸缩振动峰分别在 1463 和 1255  $\text{cm}^{-1}$ , 同时, Si—O 键吸收峰消失, 表明硅胶已完全脱除。

**2.1.2 SEM 观察** 石杉碱甲印迹聚合物(MIPs)和非印迹聚合物(NIPs)的扫描电子显微镜照片如图2所示。可见印迹聚合物生成了大量孔穴, 印迹位点分布于这些孔穴中, 对 MIPs 的选择吸附具有重要作用。从非印迹聚合物表面也可看到大量微孔穴, 但空穴的深度和形状与印迹空穴有较大差异。

## 2.2 热重分析

图3给出了石杉碱甲印迹聚合物(MIPs)和吸附了模板的分子印迹聚合物(MIPs-Hup A)的热失重曲线, 插图为其 DTG 曲线。从图3可看出, 当温度低于 100  $^{\circ}\text{C}$  时, 二者均有一些低沸点化合物脱出; 温度在 200 ~ 300  $^{\circ}\text{C}$  间, 吸附了模板的 MIP(b)有明

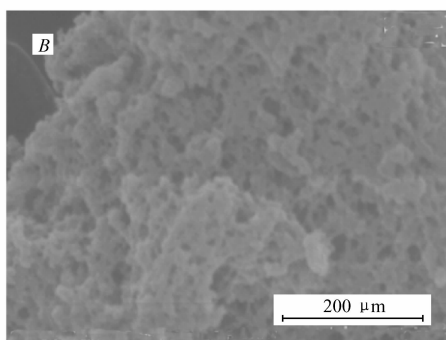
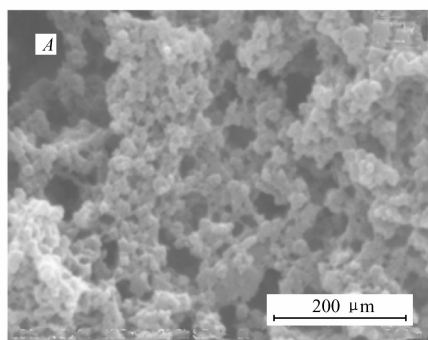


图2 石杉碱甲印迹聚合物(MIPs)(A)及非印迹聚合物(NIPs)(B)的扫描电子显微镜照片

Fig.2 SEM images of the MIPs(A) and NIPs(B)

显失重峰, 而未吸附模板的聚合物(a)则没有明显失重。因此, 该峰可能是模板分子的脱附所致。在 400 ~ 600  $^{\circ}\text{C}$  温度区间出现的失重, 是由有机物的分解及某些高沸点物质的热脱附所引起, 当温度达到 600  $^{\circ}\text{C}$  时基本达到了分解平衡。800  $^{\circ}\text{C}$  以内, Hup-MIPs 失重率为 87.02%, MIPs 失重率为 43.36%。

从 DTG 曲线可见, MIPs-Hup A 在 220  $^{\circ}\text{C}$  有明显失重峰, 是由模板分子脱附引起。而在 600  $^{\circ}\text{C}$ , MIPs-Hup A 与 MIPs 均有较大失重峰, 是聚合物热分解所致。

## 2.3 聚合物的吸附性能

**2.3.1 等温吸附及 Scatchard 分析** 由静态吸附法得到了 MIPs 和 NIPs 对模板分子的吸附等温线, 如图4A所示。可见在测试的底物浓度范围内, MIPs 的吸附量随浓度增加而增加。当底物浓度相同时, MIPs 的平衡吸附量远高于 NIPs, 表明 MIPs 对石杉碱甲分子具有比 NIPs 更大的吸附能力, 这是由于 MIPs 基体中存在大量与模板分子大小、形状和功能基方面相匹配的结合位点。

为了考察 MIPs 的表面位点分布特征, 用 Scatchard 等温吸附模型分析了 MIPs 的吸附等温线:

$$Q/Q_e = (Q_{\max} - Q)/K_d$$

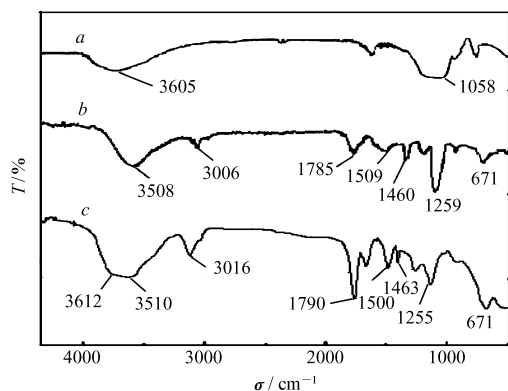


图1 硅胶(a)、石杉碱甲(b)及其印迹聚合物(c)的红外光谱

Fig.1 FT-IR spectra of silica(a), huperzine A(b) and MIPs(c)

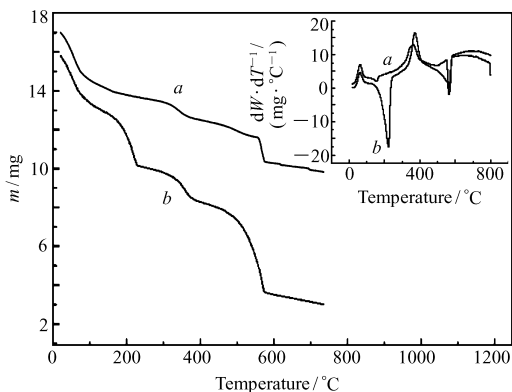


图3 MIPs(a)和 MIPs-Hup A(b)的热重曲线及微商热重曲线

Fig.3 TG and DTA curves of MIPs(a) and MIPs-Hup A(b) polymers

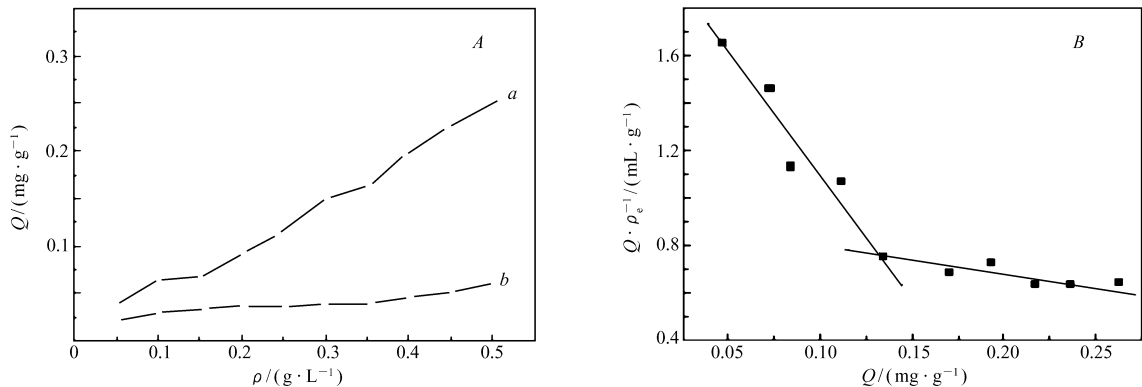


图 4 MIPs(a)和NIPs(b)对石杉碱甲的吸附等温线(A)与MIPs吸附等温线的Scatchard分析(B)

Fig. 4 Adsorption isotherms(A) of MIPs(a) and NIPs(b), Scatchard analysis for adsorption isotherm of MIPs(B)

式中, $K_d$ 为结合位点的平衡离解常数, $Q_{max}$ 为最大表观结合量(mg/g), $\rho_e$ 为平衡浓度(g/L)。

以 $Q/\rho_e$ 对 $Q$ 作图得到图4B,可以看到, $Q/\rho_e$ 对 $Q$ 呈现2条不同斜率的直线,表明MIPs基体中主要存在2种不同类型的结合位点。由直线的斜率和截距可以求得2类亲和位点的离解平衡常数 $K_d$ 和最大表观结合量 $Q_{max}$ 。高亲和位点的 $K_{d1}=0.776\text{ g/L}$ , $Q_{max1}=0.213\text{ mg/g}$ ;低亲和位点的 $K_{d2}=0.169\text{ g/L}$ , $Q_{max2}=0.832\text{ mg/g}$ 。

2.3.2 吸附选择性 在25 mL 0.4 g/L 石杉碱甲(Hup A)和失二碳石杉碱甲类似物(Hup A analogue)的乙腈溶液中分别加入20 mg MIPs,静态吸附5 h后,过滤,测定滤液中的Hup A和Hup A analogue的浓度,并计算分布系数 $K_d$ 、选择系数 $k$ 及相对选择系数 $k'$ 。表1给出了测定结果。从表1可以看出,MIPs对模板的选择系数为1.399,相对选择因子为1.206,表明了分子印迹聚合物有较好的选择识别性能和印迹效果。

表 1 分子印迹聚合物和非印迹聚合物对模板的选择识别

Table 1 Selective recognition of the imprinted and non-imprinted polymers toward the template

Compounds	MIPs		NIPs		$k'$
	$K_d$	$k$	$K_d$	$k$	
Hup A	0.786	—	0.094	—	—
Hup A analogue	0.562	1.399	0.081	1.160	1.206

为了进一步考察分子印迹聚合物对模板及其结构类似物的分辨能力,将MIPs和NIPs分别填充到空色谱柱中(用匀浆法填柱),它们对混合物的分离效果如图5所示。可见MIPs柱能很好分离模板及其类似物,而NIPs柱则不能。

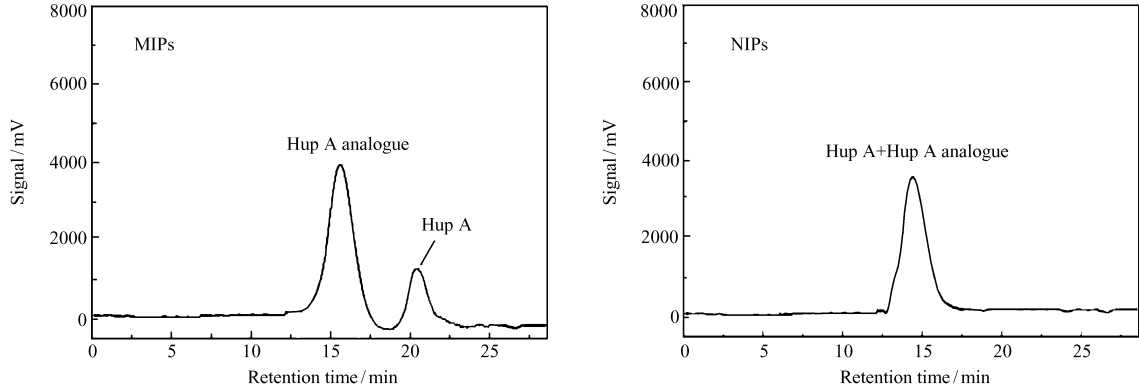


图 5 石杉碱甲及其结构类似物的混合物在MIPs柱和NIPs柱上的液相色谱图

Fig. 5 LC chromatograms of mixture of Hup A and its analogue on the MIPs and NIPs columns

Substrate concentration:0.2 g/L, mobile phase:acetonitrile

2.4 样品应用

图 6 为 Hup A 溶液(*a*)、MIPs 和 NIPs 吸附后滤液(分别为 *b* 和 *c*)及 MIPs 和 NIPs 洗脱液(分别为 *d* 和 *e*)的高效液相色谱图。保留时间为 11.8 min 的峰是 Hup A。通过比较可以看到,Hup A 样品溶液经 MIPs 吸附后,其峰高大幅降低,表明 MIPs 对 Hup A 具有高效吸附性能,NIPs 对样品溶液中的 Hup A 也有较大的吸附能力,但比印迹聚合物要弱。此外,MIPs 洗脱液中石杉碱甲的峰高(*d*)要高于 NIPs 洗脱液(*e*)。分子印迹微固相萃取的装载和洗脱结果示于表 2 中。从表 2 可见,在乙腈冲洗阶段,吸附在 NIPs 的石杉碱甲有部分释放,而 MIPs 则没有。吸附在 MIPs 的石杉碱甲主要在洗脱阶段脱附,目标化合物回收率达 93.5%。

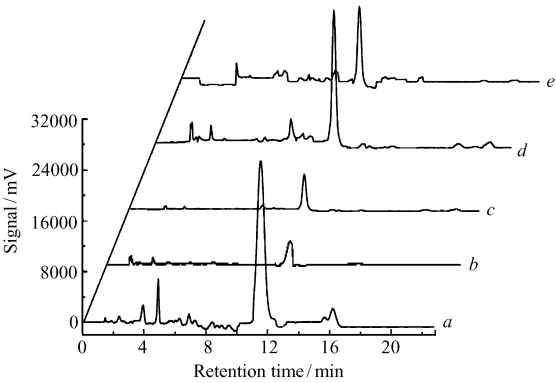


图 6 石杉碱甲样品溶液(*a*)、分子印迹聚合物(*b*)和非印迹聚合物(*c*)吸附后滤液及分子印迹聚合物(*d*)和非印迹聚合物(*e*)洗脱液的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC chromatograms of sample solution of Hup A extracted from *Huperzia serrata* (*a*), the filtrated liquid through the MIPs(*b*) and NIPs columns(*c*), and the elution for the MIPs(*d*) and NIPs columns(*e*)

表 2 装载和洗脱

Table 2 Loading and elution for MIPs solid phase micro-extraction

Procedure	MIPs	NIPs
10 <sup>3</sup> Loading/mg	12.4	3.4
10 <sup>3</sup> Washing/mg	—	0.8
10 <sup>3</sup> Elution/mg	11.6	2.4
Total recovery/%	93.5	94.1

—:Not found.

3 结 论

以硅胶为牺牲载体,石杉碱甲为模板分子,采用表面印迹技术制备了石杉碱甲印迹聚合物。通过平衡吸附实验以及 Scatchard 吸附等温模型分析,MIPs 表面主要存在 2 类不同性质的键合位点,高亲和位点的  $K_{d1}=0.776\text{ g/L}$ , $Q_{\text{max}1}=0.213\text{ mg/g}$ ;低亲和位点的  $K_{d2}=0.169\text{ g/L}$ , $Q_{\text{max}2}=0.832\text{ mg/g}$ 。石杉碱甲印迹聚合物对模板分子具有选择识别作用,选择因子和相对选择因子分别为 1.399 和 1.206。对样品溶液中石杉碱甲的微固相富集有较好的应用效果,目标化合物回收率达 93.5%,有望开发出石杉碱甲高效分离富集的新型吸附材料。

参 考 文 献

[1] Ye J W,Cai J X,Tang X C,*et al.* Improving Effects of Huperzine A on Spa Tial Working Memory in Aged Monkeys and Young Adult Monkeys with Experimental Cognitive Impairment[J]. *J Pharmacol Exp Ther*,1999,**288**(2):814-819.

[2] HONG Sijia,WANG Yitao,LI Mingyuan,*et al.* Advance in Pharmacology and Clinical Investigation on Hup A[J]. *Pharm Clin Chinese Mater Med*,2007,**23**(1):83-86(in Chinese).

洪思佳,王一涛,李铭源,等. 石杉碱甲药理与临床研究进展[J]. *中药药理与临床*,2007,**23**(1):83-86.

[3] ZHAO Xinyan. Separation of Hup A from *Huperziasserrata*(Thumb.) Trev by Preparative Liquid Phase Chromatography Method[J]. *Mech Electr Inf*,2011,**14**:1-3(in Chinese).

赵新燕. 制备型液相色谱法分离千层塔中石杉碱甲[J]. *机电信息*,2011,**14**:1-3.

[4] LI Jun,YAO Maojun,ZHU Shilong,*et al.* Study on Separation and Purification of Huperzine A by Cation Exchange Resin [J]. *Appl Chem Ind*,2012,**3**:424-426(in Chinese).

李俊,姚茂君,朱士龙,等. 阳离子交换树脂分离纯化石杉碱甲的工艺研究[J]. *应用化工*,2012,**3**:424-426.

[5] LI Yushan. Study on the Separation and Purification Technics of Huperzine A[J]. *Chinese Hosp Pharm J*,2012,**32**(9): 688-691(in Chinese).

李玉山. 石杉碱甲的分离纯化工艺[J]. *中国医院药学杂志*,2012,**32**(9):688-691.

[6] CHEN Jianhua,HUANG Shaolie,LI Zhong. Prepare Huperzine A by High-speed Countercurrent Chromatography[J]. *Chinese JMAP*,2006,**23**(4):295-297(in Chinese).

陈建华,黄少烈,李忠. 高速逆流色谱技术制备石杉碱甲单体[J]. *中国现代应用药学杂志*,2006,**23**(4):295-297.

[7] SHEN Shengrong,YU Haining,JIN Chaofang,*et al.* Isolation and Purification of Huperzine A[J]. *J Zhejiang Univ( Agric*

Life Sci), 2002, **28**(6):591-595 (in Chinese).

沈生荣,于海宁,金超芳,等. 石杉碱甲提取工艺研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2002, **28**(6):591-595.

[8] LIU Jianting, LI Yan, YAN Wei. Study on the Extraction of Huperzine A[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2006, **18**:298-301 (in Chinese).

刘建廷,黎艳,严伟. 石杉碱甲提取工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, **18**:298-301.

[9] Wulff G. Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers[J]. *Chem Rev*, 2002, **102**:1-25.

[10] Sellergren B. Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and Their Application in Analytical Chemistry[M]. Amsterdam: Elsevier, 2001.

[11] Ng S M, Narayanaswamy R. Molecularly Imprinted Cyclodextrin Polymer as Potential Optical Receptor for the Detection of Organic Compound[J]. *Sens Actuat B-Chem*, 2009, **139**:156-165.

[12] He J X, Fang G Z, Deng Q L, *et al.* Preparation, Characterization and Application of Organic-inorganic Hybrid Ractopamine Multi-template Molecularly Imprinted Capillary Monolithic Column[J]. *Anal Chim Acta*, 2011, **692**:57-62.

[13] Mayes A G, Whitcombe M J. Synthetic Strategies for the Generation of Molecularly Imprinted Polymers[J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2005, **57**:1742-1778.

[14] Yilmaz E, Ramstrom O, Moller P, *et al.* A Facile Method for Preparing Molecularly Imprinted Polymer Spheres Using Spherical Silica Templates[J]. *J Mater Chem*, 2002, **12**:1577-1581.

[15] Lin Z K, Cheng W J, Li Y Y, *et al.* A Novel Superparamagnetic Surface Molecularly Imprinted Nanoparticle Adopting Dummy Template: An Efficient Solid-phase Extraction Adsorbent for Bisphenol A[J]. *Anal Chim Acta*, 2012, **720**:71-76.

[16] Li Y, Zhou W H, Yang H H, *et al.* Grafting of Molecularly Imprinted Polymers from the Surface of Silica Gel Particles *via* Reversible Addition-fragmentation Chain Transfer Polymerization; A Selective Sorbent for Theophylline[J]. *Talanta*, 2009, **79**:141-145.

[17] Zhu R, Zhao W H, Zhai M J. Molecularly Imprinted Layer-coated Silica Nanoparticles for Selective Solid-phase Extraction of Bisphenol A from Chemical Cleansing and Cosmetics Samples[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, **658**:209-216.

[18] Peng Y, Xie Y, Luo J, *et al.* Molecularly Imprinted Polymer Layer-coated Silica Nanoparticles Toward Dispersive Solid-phase Extraction of Trace Sulfonylurea Herbicides from Soil and Crop Samples[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, **674**:190-200.

## Preparation, Characterization and Adsorption Behavior of Huperzine A Imprinted Polymers

LI Zhiping<sup>a,b</sup>, LI Hui<sup>b,c\*</sup>, LIU Fen<sup>b</sup>, LU Cuimei<sup>b</sup>

(<sup>a</sup>Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China;

<sup>b</sup>College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou 416000, China;

<sup>c</sup>College of Bio-resource and Environmental Science, Jishou University, Jishou 416000, China)

**Abstract** Preparation of huperzine A molecularly imprinted polymers (MIPs) using silica as sacrificial material was carried out for the first time by using huperzine A as template molecule, methyl acrylic acid as functional monomer, divinyl benzene as cross-linker and 2'-2-azobis-isobutyronitrile as initiator, respectively. The MIPs were characterized by infrared spectroscopy (IR), scanning electron microscopy (SEM) and thermogravimetric analysis. Static method was employed to measure adsorption isotherm and Scatchard analysis was used to investigate on site distribution on the surface of MIPs. Results indicated that such MIPs exhibited a good selective adsorption performance with a selectivity coefficient of 1.399 toward the template. Two types of adsorption sites were mainly found in the matrix of the imprinted polymers with dissociation constants and apparent maximum binding capacity of 0.169 g/L and 0.832 mg/g for the low affinity sites, and 0.776 g/L and 0.213 mg/g for the high affinity ones. Additionally, a good enrichment capability toward huperzine A was also observed when this MIPs was used for solid phase micro-extraction of target compound from crude extract solution of Serrate Clubmoss. A recovery of 93.5% for the product could be achieved.

**Keywords** molecularly imprinted polymers, surface polymerization, huperzine A, silica, adsorption