

黄连生物碱类成分的分离与鉴定

孟莹莹

陕西国际商贸学院, 陕西咸阳, 712046;

摘要: 黄连是一味常用的中药, 黄连生物碱是具有很好药效的一类有效成分。本文从黄连生物碱的化学结构特征、分离提取、鉴定等方面进行了综述, 在此基础上重点介绍了小檗碱、黄连碱和巴马汀等主要成分的分离纯化方法, 并运用现代色谱与光谱技术完成了对其成分的鉴定, 旨在为黄连资源的开发利用和黄连的质量控制提供理论参考。研究表明, 对黄连生物碱进行分离时需要考虑提取效率、成本以及是否绿色环保的问题, 并且使用多种技术联合的方式可以大大增加鉴别的准确性。

关键词: 黄连; 生物碱; 分离提取; 结构鉴定; 药理活性

DOI: 10.69979/3029-2808.26.02.087

引言

黄连为毛茛科植物, 根茎干燥后入药, 是中华民族传统中药材之一, 《神农本草经》上有记录, 可清热燥湿、泻火解毒, 现已知黄连主要有效成分是异喹啉类生物碱, 如小檗碱、黄连碱、巴马汀、药根碱等, 这类化合物具有抗菌、抗炎、降血糖、抗肿瘤等作用, 但由于它们的化学结构非常相似, 使得黄连生物碱分离纯化过程较为困难。随着分析技术的发展, 黄连生物碱的分离提取方法逐渐得到改进和完善, 检测鉴定方法也由最初的低灵敏度、低分辨率逐步向高灵敏度、高分辨率的方向发展。本文在总结近年来有关黄连生物碱的研究进展的基础上, 详细阐述黄连生物碱的化学结构特征、分离提取方法和鉴定技术, 以期对黄连资源的开发利用以及黄连的质量控制提供一定的理论参考。

1 黄连生物碱的化学结构与理化性质

从黄连中分离鉴定出的生物碱多达 20 余种, 均为原小檗碱型季铵碱, 母核为 5, 6-二氢-二苯并[de, g]喹啉, 其结构通式如式 I 所示: 所有这些生物碱都含有一个季铵氮原子和一个含氧取代基(甲氧基、羟基等), 由于空间构型不同以及取代基的位置不同导致各种生物碱具有不同的药理作用。下面是黄连的主要生物碱的化学结构和理化性质。

1.1 小檗碱

小檗碱为黄连的主要成分, 含量最高, 占黄连质量的 5%-10%, 化学名称: 5, 6-二氢-9, 10-二甲氧基-苯并[g]-1, 3-苯并二氧戊环[5, 6-a]喹啉季铵盐; 分子式: $C_{20}H_{18}NO_4Cl$; 盐酸盐外观为黄色针状结晶, 熔点 145℃, 极易溶于热水、乙醇, 难溶于氯仿、苯等有机溶剂, 水溶液在酸性条件下较稳定, 在碱性条件下易生成沉淀, 紫外吸收峰为 228nm、263nm、345nm, 可以利用此波长进

行定量分析。

1.2 黄连碱

黄连碱是黄连的主要标志成分, 含量约为 1~2%, 化学名称为 5, 6-二氢-9, 10-二甲氧基-苯并[g]-1, 3-苯并二氧戊环[5, 6-a]喹啉-7-醇季铵盐, 分子式 $C_{19}H_{16}NO_4Cl$ 。黄连碱游离碱为黄色结晶; 盐酸盐溶解度较小, 紫外吸收与小檗碱相近, 而熔点(203℃)却明显高于小檗碱。黄连碱的抗菌活性与小檗碱相当, 但是对某些耐药菌株具有更强的抑制作用。

1.3 巴马汀

巴马汀在黄连中含量约为 2~3%, 化学名称为 5, 6-二氢-9, 10-二甲氧基-苯并[g]-1, 3-苯并二氧戊环[5, 6-a]喹啉-2-甲氧基季铵盐, 分子式为 $C_{21}H_{20}NO_4Cl$, 分子量为 387.875。巴马汀结构与小檗碱相近, 仅 C2 位多一个甲氧基取代基, 故其物理性质与小檗碱相似, 但熔点较高(208℃), 且水溶性较小檗碱略低, 巴马汀的抗菌活性与小檗碱相当, 但是, 在抗肿瘤及降血糖方面却具有显著优势。

1.4 其他生物碱

黄连除了主要含有小檗碱外, 还含有药根碱、表小檗碱、非洲防己碱等生物碱, 含量虽低但是有效成分, 如药根碱具有抗炎、神经保护等作用, 表小檗碱的降血糖作用强于小檗碱等, 因此对这些成分的分离鉴定有利于更好地研究评价黄连的药效。

2 生物碱的分离提取方法

黄连生物碱的分离提取过程中要同时兼顾提取效率、成本和环境友好度。常用的黄连生物碱分离提取方法主要有溶剂提取法、色谱分离法以及膜分离法等。下面将分别对各种方法做简单介绍。(1) 溶剂提取法: 此

方法是将黄连用极性或非极性的溶剂(如乙醇、甲醇)浸泡、提取后蒸馏回收溶剂,即得到粗制的黄连生物碱。此法操作简单方便,但是易造成有效成分损失,并且有机溶剂易燃、有毒、污染大、成本高。(2)色谱分离法:该方法是利用混合物中各组分的溶解度或吸附系数不同,在流动相与固定相之间进行反复分配,以达到分离目的。常用的色谱方法有柱层析、薄层色谱、高效液相色谱等。其优点是分离谱宽较宽、分辨率高,适合于痕量化合物的分离与检测;但是所需仪器昂贵、操作繁琐、不适合大量样品处理。(3)膜分离法:这是依据不同组分透过膜的速度差异而实现分离的技术。包括电渗析、反渗透、纳滤、超滤和微滤等类型。其优点是无相变、能耗低、无二次污染、可实现常温分离,但是对原料预处理要求高、设备投资大、膜易堵塞。

2.1 传统溶剂提取法

2.1.1 酸水提取法

酸水提取法虽是利用生物碱盐易于溶于水的性质,通过稀硫酸溶液将黄连粉先浸泡、渗漉提取,提取液用石灰乳调节 pH 值至 5~6,过滤,加盐酸调 pH 值至 2~3,然后再用盐析的方法得到小檗碱盐酸盐沉淀。此法操作简单,成本较低,但容易引入杂质,同时也会造成部分有效成分的损失。

硫酸浓度对提取有较大的影响,浓度过高会使硫酸氢小檗碱的生成较多,反而使溶解度减小;浓度过低又不能使有效成分完全溶出。因此,通过试验得知,以 0.3% 的硫酸溶液为适宜的提取浓度。多次调节 pH 值,操作较为繁琐,也容易带入杂质。废水中的硫酸根残留会带来污染,需进行后续处理。

2.1.2 乙醇回流提取法

乙醇回流提取法使用 60%~70% 乙醇作为溶剂,利用加热回流提取后再浓缩,并进行酸化-碱化-盐析的流程来分离生物碱,该方法提取率较高,但要注意控制各项参数。乙醇浓度太低不能有效地提取,乙醇浓度太高会增加成本并且会引入脂溶性杂质,所以有研究表明,66% 的乙醇是最佳提取溶剂。温度和时间太大容易导致生物碱降解,较好的条件为温度 81℃、料液比 1:23、时间 120min。盐析条件:加入 NaCl 可降低小檗碱盐酸盐的溶解度,加入量以提取液的 5~10% 为宜。

2.2 现代分离技术

2.2.1 大孔吸附树脂柱层析

大孔吸附树脂柱层析是利用树脂对生物碱的吸附选择性进行分离的方法,D101 型树脂具有良好的大比表面积及合适的孔径,适用于从黄连中分离生物碱。先将

样品上柱,待样品全部上柱后,用蒸馏水充分洗涤除去杂质,然后再用不同浓度的洗脱剂进行梯度洗脱,收集各部位的流出液,并通过薄层色谱或高效液相色谱进行检测,最后根据色谱图判断收集组分的纯度。

(1) 样品预处理:将黄连提取液进行浓缩,并调节 pH 值至 2~3,使生物碱以盐的形式存在,有利于提高吸附效率。

(2) 上柱与洗脱:用去离子水平衡树脂柱后再上样,然后先后使用去离子水及 40%~65% 乙醇溶液进行洗脱。小檗碱和巴马汀能被 40% 乙醇溶液部分地从树脂上洗脱下来,而黄连碱则被 65% 乙醇溶液从树脂上完全地洗脱下来。

(3) 纯化和结晶:将洗脱液进行浓缩后再进行重结晶,纯度可达到 95% 以上。

该方法虽操作简单,但树脂再生时需要使用有机溶剂进行清洗,费用较高。

2.2.2 高效液相色谱(HPLC)

HPLC 使用 C18 色谱柱作为固定相,乙腈-20mmol/L 乙酸铵溶液作为流动相,采用梯度洗脱方式(0—35min 乙腈的比例由 10% 升高到 32%),可以将小檗碱、黄连碱、巴马汀等有效成分同时分离鉴定,该方法虽然分离度较高,但是仍然存在一些不足。由于设备成本高,导致其难以大规模生产。流动相使用乙腈等是有毒试剂,对环境有害。样品预处理要求较高,需要除掉蛋白质、多糖等杂质。

2.2.3 反萃分散液膜技术

反萃分散液膜技术是利用液膜的选择透过性,通过液膜将生物碱由有机相转入水相的一种方法。具体来说,是将供料相(含生物碱的有机溶液)和接受相(水溶液)以液膜(含有载体)为媒介接触,在生物碱与载体的作用下透过液膜进入接受相的过程。该方法的优点有:操作简便,无需高温高压。能耗低,适合连续化生产。选择性高,能够实现复杂体系中目标成分的分离。然而,由于液膜的稳定性还有待提高,目前还不能实现大规模运用。

3 生物碱的鉴定方法

黄连生物碱鉴定主要依据化学显色反应、光谱分析和色谱技术来进行结构确证与含量测定,下面简单介绍几种常用的鉴定方法。(1)采用试剂显色反应的方法来鉴别和区分不同的黄连生物碱成分,如用三氯化铁来区别小檗碱;(2)运用光谱技术(紫外光谱、红外光谱、质谱、核磁共振等)对黄连生物碱的结构进行表征,确定其结构类型,甚至到确定分子量、相对分子量及结构式的程度;(3)借助色谱技术(薄层色谱、高效液相色谱)

谱、气相色谱、毛细管电泳等)实现对黄连生物碱中主要成分的分离纯化以及定性定量分析。

3.1 化学显色反应

3.1.1 硝酸小檗碱反应

取黄连粉末或薄切片,加入95%乙醇1~2滴和30%硝酸1滴,镜检可见黄色针状或针簇状结晶析出(硝酸小檗碱)。本反应特异性较高,但仅可用于小檗碱的定性鉴定。

3.1.2 丙酮加成反应

样品溶于热水后用氢氧化钠溶液中和,然后将此溶液用水浴加热到50℃左右,再滴加丙酮,振荡后静置出现黄色结晶,此反应可用于原小檗碱型季铵碱的检识,但应注意控制反应条件,以免产生假阳性反应。

3.1.3 漂白粉显色反应

小檗碱在酸性水溶液中与漂白粉作用,或通入氯气,溶液可变樱红色(深一些)。此反应操作简单,灵敏度较低,适宜于日常快速筛查。

3.2 光谱与色谱技术

3.2.1 薄层色谱(TLC)

采用硅胶G作为吸附剂,环己烷-乙酸乙酯-异丙醇-甲醇-水-三乙胺(3:3.5:1:1.5:0.5:1)作为展开剂,紫外灯(365nm)下观察,供试品色谱与对照药材色谱在同一位置出现4个以上荧光斑点;该方法操作简单,但重现性易受环境湿度的影响。

3.2.2 高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)

应用高效液相色谱-质谱联用技术配合电喷雾离子化源,在正离子模式下进行扫描,可以同时鉴定出黄连中的7种生物碱成分,其中小檗碱的准分子离子峰为336[M]⁺,巴马汀为352[M]⁺。该方法灵敏度高,但是仪器价格昂贵。

3.2.3 核磁共振(NMR)

通过氢谱和碳谱解析可以确定生物碱的立体构型以及取代基的位置等信息,例如小檗碱的氢谱中, δ 9.70(s, 1H, H-8)和 δ 7.70(d, J=8.5Hz, 1H, H-11)为特征信号峰。核磁共振是结构鉴定的金标准,但是要求样品纯度较高(通常要大于95%)。

4 讨论与展望

针对黄连生物碱分离提取工艺存在的问题,目前主要有改进传统酸水提取法和采用现代色谱技术两种方式。其中,传统酸水提取法虽然操作简单,但是容易造成环境污染;色谱技术虽然分离效果较好,但是设备费用高。对于方法改进方面,可以从优化工艺条件、采用新型吸附剂和结合物理方法等方面入手。

(1)开发绿色提取技术,如利用超临界流体萃取、微波辅助提取等低能耗、无污染的方法代替传统的有机溶剂提取方法,以降低工业三废排放。

(2)结构修饰与衍生成药研究,对生物碱进行化学修饰以改善生物碱的生物利用度和药理活性,例如将小檗碱转变为小檗碱葡萄糖苷衍生物能明显提高其水溶性。

(3)非传统部位利用:黄连的须根、叶等非药用部位含有生物碱,关于其有效成分含量、活性等未见完整报道,开发非传统部位可有效缓解依赖主根茎的问题,实现可持续利用。

(4)多技术联用鉴定:将高效液相色谱-质谱联用、核磁共振、圆二色谱等技术结合运用,可以全方位地对生物碱的结构和立体构型进行鉴定,这将有助于对新药的研发。

5 结论

黄连生物碱分离提取和鉴定是开发利用黄连资源的一个关键环节,利用传统溶剂提取方法虽然适合于工业化生产,但是需要对工艺进行改进以减少对环境的污染;利用现代色谱技术虽然可以获得较高的纯度,但是价格较为昂贵;将化学显色反应、光谱分析以及色谱技术联用可有效提高鉴别的准确性。今后的工作应侧重于绿色提取技术、结构修饰、非传统部位等方面的研究,促进黄连产业的可持续发展。

参考文献

- [1]刘娜,管淑玉,徐鹏. HPLC法测定黄连中3种原小檗碱型生物碱的研究[J]. 河南科学, 2020, 第007期.
- [2]赵陆华,蔡星瀛,董善士. HPLC法测定黄连、黄柏及其中成药中小檗碱型生物碱的含量[J]. 中国药科大学学报, 1989, 第2期.
- [3]袁久荣,魏英勤,袁浩. RP-HPLC法同时测定黄连中四种原小檗碱型生物碱的含量[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2006, 第006期.
- [4]张国华,王延琮,张永友. 高效毛细管电泳测定黄连及成药中小檗碱型生物碱的含量[J]. 色谱, 1995, 第004期.
- [5]张琳,陈思含,任小艳. 不同部位镇坪黄连小檗碱、总生物碱提取与含量测定[J]. 山东化工, 2021, 第004期.

作者简介:孟莹莹(2001.10——),籍贯:陕西省榆林市,汉族,女,学历:本科,研究方向:利用现代波谱技术进行快速、精准的成分鉴定。