

没食子酸-生物碱配伍存在状态的分析

吴 鑫^{1,2}, 左雯雯², 金立阳², 李存玉^{2*}, 彭国平²

(1. 江苏护理职业学院, 江苏 淮安 223001; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 分析没食子酸-生物碱配伍的存在状态。**方法** 将没食子酸与生物碱(苦参碱、苦参素、槐定碱、汉防己甲素、金雀花碱、秋水仙碱)按1:1、1:3、1:6比例配伍,根据超滤、纳滤分离情况,并借助紫外分光光度法、核磁共振技术判断上述酸碱混合物在复合溶液中的存在状态。**结果** 没食子酸与碱性较强的生物碱(槐定碱、金雀花碱、苦参碱)配伍时,其透过率明显下降,谱带1的 $\lambda_{\max}$ 发生不同程度的蓝移,而谱带2的 $\lambda_{\max}$ 出现红移,2条谱带 $\lambda_{\max}$ 所对应的吸光度有所下降,氢化学位移向低场位移明显;与碱性较弱的生物碱(苦参素、汉防己甲素、秋水仙碱)配伍时,该成分透过率及光化学变化不明显。**结论** 没食子酸与生物碱解离常数(pKa)差值越大,膜截留特征越明显。复合溶液中没食子酸与生物碱配伍后,前者透过率在纳滤中的下降程度明显大于超滤中。
关键词: 没食子酸;生物碱;存在状态;紫外分光光度法;核磁共振技术
中图分类号: TQ028.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)06-1416-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.004

Existing state analysis of gallic acid-alkaloids compatibility

WU Xin^{1,2}, ZUO Wen-wen², JIN Li-yang², LI Cun-yu^{2*}, PENG Guo-ping²

(1. Jiangsu Vocational College of Nursing, Huai'an 223001, China; 2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

KEY WORDS: gallic acid; alkaloids; existing state; ultraviolet spectrophotometry method; nuclear magnetic resonance technology

中药生产过程中有效成分的提取、精制是影响产品质量的关键环节,而成分之间的相互作用将直接影响生产过程中的质量传递^[1-2],特别是富含酸碱类成分的中药复方^[3]。目前研究认为,中药酸碱复合物反应成盐引起的分子量变大、溶解度降低等现象会在浓缩、醇沉等制药环节造成成分的损失^[4-6]。但酸碱化合物存在酸碱性强弱的区别,其成分存在复合成盐反应的同时,也会生成一种介于游离态与复盐态之间的存在状态,即官能团之间以较弱分子间作用力结合的缔合态^[7],但迄今为止有关研究相对薄弱。

紫外分光光度法是一种根据吸收光谱来研究物质结构及其相互作用的有效手段^[8],每种物质均具有不同的空间结构,吸收光能量情况也存在差

异,具有独特的光吸收谱线,因此可借助该方法判断酸碱复合物配伍前后官能团变化情况,同时通过核磁共振氢谱综合判断酸碱类成分在溶液中的存在状态。由于存在状态的改变会影响分子大小与荷电特征,故本实验采用以分子筛分、道南效应为主要分离原理的超滤和纳滤分离技术,对中药代表性酚酸成分没食子酸与碱性呈梯度变化的生物碱进行配伍,分析膜分离行为,研究该类成分在溶液中的存在状态,以期为中药复方的精制分离提供数据支撑。

1 材料

1.1 仪器

NF-1812-S2型膜分离实验装置(海安宏麦机械有限公司);聚醚砜超滤膜[截留分子量10 kDa,星达(泰州)膜科技有限公司];聚酰胺

收稿日期: 2019-12-09
基金项目: 国家自然科学基金(81503258, 81603307); 江苏省高校自然科学基金(17KJB360010); 江苏省自然科学基金青年基金(BK20151005)
作者简介: 吴 鑫(1993—),女,硕士,助教,从事中药化学与分析研究。Tel: 18851823865, E-mail: wuxin4741@163.com
* 通信作者: 李存玉(1985—),男,博士,副教授,从事中药制药工艺研究。Tel: (025) 86798186, E-mail: licunyuok@163.com

纳滤膜（截留分子量 600~800 Da，南京拓鈺医药科技有限公司）；FA-1004 型电子天平（万分之一）、FA-2204 型电子天平（十万分之一）（上海安亭电子仪器厂）；KH-250B 型超声波清洗器（昆山禾创超声仪器有限公司）；Avance 400 型核磁共振仪（德国 Bruker 公司）；T6 新世纪紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司）。

1.2 试剂与药物 没食子酸（批号 FY180106，纯度≥98%）、苦参碱（批号 FY180120，纯度≥98%）、苦参素（批号 FY180130，纯度≥98%）、槐定碱（批号 FY170911，纯度≥98%）、汉防己甲素（批号 FY171203，纯度≥98%）、金雀花碱（批号 FY170325，纯度≥98%）、秋水仙碱（批号 FY171206，纯度≥98%）原料药均购于郑州丰耀农业科技有限公司；没食子酸对照品（批号 110831-201204）购于中国食品药品检定研究院。氘代二甲基亚砜（DMSO-*d*₆，纯度 99.9%）购于美国 CIL 公司；甲醇、乙腈为色谱纯；其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 对照品溶液制备 精密称取没食子酸对照品适量，置于 10 mL 量瓶中，流动相溶解并定容至刻度，即得（质量浓度为 0.125 mg/mL）。

2.2 膜分离原液制备

2.2.1 单一供试品溶液 称取没食子酸原料药适量，纯化水制成质量浓度为 0.15 mg/mL 的药液，超声处理 15 min，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.2.2 混合供试品溶液 以 1：1、1：3、1：6 比例称取没食子酸、生物碱适量，纯化水制成没食子酸质量浓度为 0.15 mg/mL 的混合溶液，超声处理 15 min，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.3 分光光度法待测溶液 按“2.2”项下方法制备，没食子酸与生物碱比例为 1：3。

2.4 核磁样品

2.4.1 单一供试品溶液 称取没食子酸、苦参碱、苦参素、金雀花碱、槐定碱原料药适量，加入 0.6 mL 氘代水，振荡溶解，8 000 r/min 离心 5 min，转移到 5 mm 外径核磁管中，即得。

2.4.2 混合供试品溶液 称取没食子酸适量，与生物碱以 1：3 比例混合，加入 0.6 mL 氘代水溶解，8 000 r/min 离心 5 min，转移到 5 mm 外径核磁管中，即得。

2.5 色谱条件 参考文献 [9]。采用 Heder ODS-2 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相

甲醇-0.1% 三氟乙酸（20：80）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 270 nm；进样量 10 μL。

2.6 膜分离实验 选取已用纯化水清洗至中性条件下的超滤膜，组装超滤系统。采用 1 kD 超滤膜进行超滤（操作温度 25 ℃，操作压力 13.79 kPa），将超滤系统的进液端、超滤端、截流端放入装有“2.2.1”项下供试品溶液的容器内进行循环，待吸附-解吸附达到平衡时将容器内溶液搅拌均匀，作为平衡液，将超滤端取出进行滤液收集，待超滤完全后混匀，取出超滤液，计算透过率（*T*），公式为 $T = (C_{\text{超滤}}/C_{\text{平衡}}) \times 100\%$ ，其中 $C_{\text{超滤}}$ 是超滤液中溶质质量浓度，单位 mg/mL； $C_{\text{平衡}}$ 是平衡液中溶质质量浓度，单位 mg/mL。纳滤操作步骤同超滤。

2.7 紫外可见分光光度实验 将待测空白水溶液及样品置于同一石英比色皿中，室温下进行全波长扫描（190~600 nm），每 1 nm 采集一次数据，扫描速度 10 nm/s。

2.8 高场核磁实验 NMR 数据的 ¹H 图谱由 Bruker Avance 400 核磁共振波谱仪在恒温（25 ℃）下采集得到，采用 zg30 脉冲序列，具体参数为谱宽（SWH）8 223；采样点数（TD）65 K；采样时间（AQ）3.98 s；弛豫延迟时间（D1）1 s；采样次数（NS）16 次；增益次数（RG）124。

3 结果

3.1 复合物膜分离情况 没食子酸为酸性化合物，当与不同碱性的生物碱配伍时可起到调节溶液酸碱性的作用，使其呈分子态或离子态。当溶液 pH=p*K*_a-2 时，该成分主要以游离态形式存在；当溶液 pH=p*K*_a+2 时，该成分主要以离子态形式存在。

选取 p*K*_a 值不一样的 5 种生物碱（槐定碱、金雀花碱、苦参碱、苦参素、秋水仙碱）与没食子酸进行配伍，其中槐定碱分子量、p*K*_a 分别为 248 Da、8.97^[10]，金雀花碱分别为 234 Da、8.1，苦参碱分别为 248 Da、7.7，苦参素分别为 264 Da、5.8^[11]，秋水仙碱分别为 399 Da、1.84，没食子酸与不同生物碱配伍的透过率见表 1。由此可知，两者以 1：1 比例配伍时超滤透过率无明显变化，而在纳滤条件下略微下降；随着配伍比例升高（1：3、1：6），透过率均呈显著下降趋势，并且在生物碱碱性增强时更为明显，表明没食子酸透过率与酸碱 p*K*_a 差值呈现一定的相关性。

表 1 没食子酸-生物碱配伍透过率测定结果

Tab. 1 Results of transmittance determination of gallic acid-alkaloids compatibility

配伍	超滤透过率/%			纳滤透过率/%		
	1 : 1	1 : 3	1 : 6	1 : 1	1 : 3	1 : 6
没食子酸	—	81. 83	—	—	81. 67	—
没食子酸-槐定碱	78. 07	43. 89	40. 35	67. 93	33. 36	31. 02
没食子酸-金雀花碱	78. 35	44. 95	42. 03	68. 13	34. 08	31. 38
没食子酸-苦参碱	79. 72	46. 87	45. 26	70. 69	35. 64	32. 03
没食子酸-苦参素	80. 02	65. 00	63. 67	76. 03	62. 37	58. 38
没食子酸-秋水仙碱	84. 12	83. 07	80. 28	80. 38	80. 02	78. 89

在超滤、纳滤条件下，单一没食子酸提取液中的透过率相似，均在 81% 左右；复合溶液中没食子酸与碱性较强的生物碱（槐定碱、金雀花碱、苦参碱）配伍后，纳滤透过率下降程度大于超滤，约在 10% 左右，而与碱性较弱的生物碱（苦参素、秋水仙碱）配伍后，2 种膜分离差异不明显。

没食子酸透过率的变化是因为该成分与生物碱形成酸碱混合物，并且由于碱性强弱其存在状态也不尽相同。以没食子酸、金雀花碱为例，两者在 1 : 3 配伍比例下的超滤透过率较未配伍下降 36. 88%，而纳滤透过率下降 47. 59%。超滤分离是基于孔径筛分原理^[12]，没食子酸与生物碱配伍后有一部分形成特殊混合物，分子量升高，透过率下降，并以复合态或缔合态的形式存在。根据纳滤膜分离的电荷效应^[13]，推断没食子酸与金雀花碱以 1 : 3 比例配伍时，所形成的混合物中缔合态与复

合态共存，并且有 10% 以小分子离子态形式存在；苦参素、秋水仙碱碱性较弱，故与没食子酸配伍时大多形成分子间作用力较弱的缔合态。

3. 2 紫外吸收光谱考察 图 1（金雀花碱本身紫外吸收谱图复杂，故未纳入研究）、表 2 显示，没食子酸具有明显的苯环吸收带特征，谱带 1 为 B 吸收带（ $\lambda_{\max} = 269 \text{ nm}$ ），谱带 2 为 K 吸收带（ $\lambda_{\max} = 219 \text{ nm}$ ）。没食子酸与碱性较强的苦参碱、槐定碱配伍时，谱带 1 的 $\lambda_{\max}$ 发生不同程度的蓝移，而谱带 2 的 $\lambda_{\max}$ 出现红移，2 条谱带 $\lambda_{\max}$ 所对应的吸光度有所下降；与苦参素配伍时，谱带 1、2 的 $\lambda_{\max}$ 与对应吸光度的变化不明显；与秋水仙碱配伍时，因为它是酰胺碱而不与酸反应，故基本没有变化。由此可知，酸碱类成分配伍时由于存在状态不同，导致混合物的光化学行为不一样。

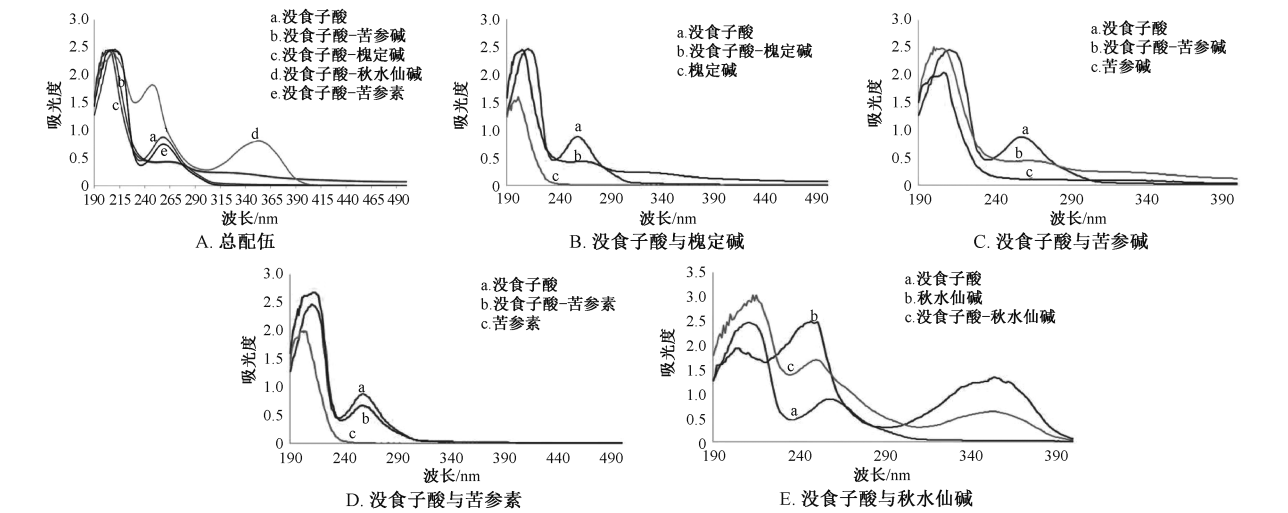


图 1 没食子酸-生物碱配伍的紫外吸收谱图

Fig. 1 UV absorption spectra for gallic acid-alkaloids compatibility

酸碱类成分配伍时，生物碱上氨基首先与没食子酸苯环上羧基部分结合，由于碱性基团的存在使得羰基吸电子能力增强，苯环的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁能量

增高，故谱带 1 的 $\lambda_{\max}$ 出现蓝移。碱性较强的苦参碱与槐定碱进一步与苯环上羟基结合而形成羧基阴离子，使得 p- π 共轭增强，故谱带 2 的 $\lambda_{\max}$ 出现

表 2 没食子酸-生物碱配伍最大吸收波长 (λ_{max})、吸光度测定结果

Tab. 2 Results of maximum absorption wavelength (λ_{max}) and absorbance determination of gallic acid-alkaloids compatibility

配伍	谱带 1		谱带 2	
	λ _{max} /nm	吸光度	λ _{max} /nm	吸光度
没食子酸	210	2. 468	258	0. 880
没食子酸-槐定碱	205	2. 447	264	0. 430
没食子酸-苦参碱	206	2. 458	263	0. 440
没食子酸-苦参素	208	2. 460	258	0. 753
没食子酸-秋水仙碱	209	2. 465	—	—

注:—表示与谱带 1 重合,无法检测。

红移。

另外,秋水仙碱的碱性极弱,故在水溶液中不与没食子酸发生作用;其他生物碱除了形成缔合物外,还能进一步与没食子酸发生反应而形成酸碱复盐。

3.3 没食子酸复合物高场核磁结构解析 通过膜分离技术和紫外全扫描可知,不同碱性的生物碱与没食子酸配伍后,由于复合物存在状态不同导致其透过率、λ_{max}存在差异。

¹H-NMR 被广泛用于化合物结构解析,故本实验采用该技术进一步分析复合物不同官能团结合的区别。将没食子酸与生物碱配伍后的复合物溶于 D₂O 中,发现其氢谱化学位移(400 MHz, D₂O = 90 : 10) δ 为 6. 91 (2H, s, 2, 6-H), 8. 82 (1H, s, 4-OH), 9. 17 (2H, s, 3, 5-OH), 12. 22 (1H, s, 1-OH)。没食子酸与金雀花碱、槐定碱、苦参碱、苦参素配伍后,1-OH、3, 5-OH、4-OH 的氢化学位移消失,而与秋水仙碱配伍后其变化不明显,这是由于碱性较强的金雀花碱、槐定碱、苦参碱与羧基、酚羟基均能结合,使氢核外电子云密度降低,氢化学位移向低场移动;苦参素因其中 1 个

N 形成 N-O 原子,故只有 1 个 N 结合;秋水仙碱是酰胺碱,碱性极弱,与没食子酸不成盐,故化学位移无明显变化。

复合盐中主要存在离子作用力,而缔合物则主要通过氢键作用相互连接而成,由于离子键作用力一般强于氢键,故在碳谱中的化学位移也存在明显区别,将没食子酸分别与生物碱及 NaOH 配伍,用 D₂O 溶解后进行核磁碳谱检测,结果见表 3。由此可知,加入金雀花碱、槐定碱、苦参碱、苦参素后没食子酸 δ_{C=O}、δ_{1-C} 值向低场位移,与秋水仙碱配伍后变化不明显;没食子酸与 NaOH 配伍成盐后,化学位移变化明显,其中 C=O、1-C 变化较大,并且两者位移差值大于与生物碱配伍后,间接表明没食子酸与生物碱并未以较强的离子作用力结合,推测两者可能主要以氢键形式结合形成缔合物,有一部分形成复盐。生物碱上氨基与没食子酸上羧基、酚羟基形成氢键后,吸电子效应使得相应官能团碳核外围电子云密度降低,故 δ 值向低场位移,但由于生物碱碱性不同,故氨基与酚羟基结合情况也有所差异。

表 3 没食子酸-生物碱配伍的¹³C-NMR 化学位移

Tab. 3 ¹³C-NMR chemical shifts of gallic acid-alkaloids compatibility

碳原子编号	δ 值(×10 ⁻⁶)						
	没食子酸	没食子酸+ 金雀花碱	没食子酸+ 槐定碱	没食子酸+ 苦参碱	没食子酸+ 苦参素	没食子酸+ 秋水仙碱	没食子酸+ NaOH
C=O	167. 39	168. 72	167. 98	167. 87	167. 83	167. 41	169. 77
4-C	145. 36	145. 60	145. 42	145. 36	145. 38	145. 37	145. 60
3, 5-C	137. 94	137. 03	137. 82	137. 92	137. 80	137. 95	137. 37
1-C	120. 41	124. 28	121. 27	120. 56	121. 10	120. 42	124. 01
3, 5-C	108. 68	108. 55	108. 72	108. 69	108. 70	108. 70	108. 86

4 讨论

本实验以没食子酸为研究对象，采用膜分离技术比较配伍前后存在状态不同时透过率的变化情况，并结合紫外分光光度法和核磁技术探究酸碱复合物官能团的结构特征。选择碱性呈梯度变化的生物碱与没食子酸反应，发现后者与 pKa 差值不同的生物碱所生成的混合物在透过率下降程度、紫外最大吸收波长、氢化学位移方面存在差异，这主要是由于混合物存在状态不同所致，没食子酸与碱性较强的生物碱配伍形成的混合物中，缔合物与复合盐共存，而与碱性较弱的生物碱配伍后一般只生成缔合物。

中药复方配伍后不同成分之间发生相互作用，对中药制剂过程中有效成分的提取、分离、精制均会产生影响，尤其是酸碱类成分配伍，更易产生反应。由于很多影响药品质量的关键工艺与溶液中分子存在状态有关，故明确酸碱类成分反应的内在机理、反应物不同状态的组成比例，以及复合物的结构变化，对中药复方汤剂临床合煎、另煎及相关制剂生产工艺的制定具有重要意义。

参考文献：

[1] 徐秀杰. 中药提取工艺对药品质量的影响分析[J]. 生物技术世界, 2016(4) : 228.

[2] 丁彦春. 影响中药煎煮质量因素探究[J]. 亚太传统医药,

2016, 12(10) : 144-145.

[3] 刘方敏, 林 辉, 吴德跃, 等. 丹参饮水提液酚酸类成分溶出特性及降解动力学研究[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(3) : 489-493.

[4] 裴妙荣, 段秀俊, 裴香萍, 等. 中医方剂中酸碱对药的配伍化学研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(15) : 1989-1993.

[5] Kamigauchi M, Kawanishi K, Sugiura M, *et al.* γ -Cyclodextrin as inhibitor of the precipitation reaction between berberine and glycyrrhizin in decoctions of natural medicines: Interaction studies of cyclodextrins with glycyrrhizin and glycyrrhetic acid by ¹H-NMR spectroscopy and molecular-dynamics calculation [J]. *Helv Chim Acta*, 2008, 91(9) : 1614-1624.

[6] 章津铭, 傅超美, 何宇新, 等. 附子-甘草配伍前后汤液中沉积物的化学组分对比研究[J]. 中草药, 2013, 44(2) : 165-169.

[7] 彭国平. 中药制药化学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 85; 213.

[8] 王安庆. 紫外可见分光光度法的中药学研究进展[J]. 医学信息, 2012, 25(5) : 112-113.

[9] 刘 莉, 李婷婷, 孔卫东, 等. HPLC 法测定肠炎宁胶囊中没食子酸的含量[J]. 内江科技, 2017, 38(3) : 23; 29.

[10] 王国清, 杨 波, 刘迎春, 等. 分光光度指示剂法测定槐定碱的电离常数[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(6) : 424-426.

[11] 杜 松, 邓英杰, 梁 伟. 氧化苦参碱的理化常数[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(2) : 80-83; 112.

[12] 李存玉. 超微孔过滤原理的研究与应用[D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.

[13] 韩永萍, 林 强, 李亚秋. 纳滤膜传质过程的研究[J]. 化学世界, 2011, 52(12) : 760-764; 733; 730; 742.