

吴茱萸生物总碱的 TLC-SERS 研究

张进治¹, 汪 瑗², 陈 惠², 邵会波²

1. 北方工业大学理学院, 北京 100041

2. 首都师范大学化学系, 北京 100037

摘 要 报道了将薄层色谱(TLC)与傅里叶变换表面增强拉曼散射(FT-SERS)联用, 获得了中草药吴茱萸中六种生物碱分子光谱研究的新方法。薄层色谱将微克级吴茱萸生物总碱中吴茱萸碱(Evodiamine)、吴茱萸次碱(Rutaecarpine)、羟基吴茱萸碱(Hydroxyevodiamine)、吴茱萸酰胺(Evodiamide)、二氢吴茱萸次碱(Dihydrrutaecarpine)和1,4-甲酰基二氢吴茱萸次碱(1,4-formyldihydrrutaecarpine)六种生物碱完全分离, 应用薄层原位的傅里叶变换表面增强拉曼散射(TLC-FT-SERS)技术, 获得吴茱萸生物碱分子的特征振动谱带, 进而阐述了样品分子在银胶表面的吸附模式。五种吴茱萸生物碱分子以 π 电子与银晶体微粒相互作用, 呈平面吸附; 吴茱萸次碱以N原子的 n 电子与银晶体微粒作用。在薄层色谱原位, 可明显观察到六种生物碱FT-SERS的光谱主要特征峰位。各生物碱分子拉曼散射获最大增强的是波数为 $1\,600\text{ cm}^{-1}$ 表征苯环环伸缩振动的谱带; 羟基吴茱萸碱谱图中可观察到波数为 $1\,342\text{ cm}^{-1}$ 羟基变形振动谱带, 明显区别于其他生物碱。采用此方法, 不用标准品即获得六种生物碱的指纹光谱。研究结果表明了TLC-FT-SERS对中草药化学成分进行高灵敏度示踪指纹检测的可靠性和优越性。

关键词 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱; 薄层色谱; 表面增强拉曼光谱

中图分类号: O697.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2007)05-0944-04

引 言

中草药是中国传统医药学的主要组成部分, 对世界医学作出了重要贡献。我国中草药资源品种众多, 达12 000多种。中草药本身是复杂的混合体系, 统一标准保证质量的鉴定分析比西药较为复杂, 难以得到国际医学界的普遍承认。因此, 解决中草药的质量鉴定和有效成分的定量定性分析是中药研究的重要课题, 对中药的出口和发扬我国传统医学有着重要的实际意义。

薄层色谱(TLC)是一种实用有效的分离与分析手段。在中草药有效成分分析等方面已得到广泛应用。但这种方法无法获得被分离的各化学组分的分子结构信息, 即不具备指纹检测功能, 因而使其在中草药深层次的研究中受到限制。金、银等金属的纳米粒子具有较强的表面增强活性, 利用其特性的傅里叶变换表面增强拉曼散射(FT-SERS)可高灵敏度检测单一组分化合物的分子结构信息, TLC-FT-SERS联用技术能使天然药物提取物有效分离并进行高灵敏度特征光谱检测, 这项研究在国内外仅有初步报道^[1-4]。

吴茱萸[*Evodiarutaecarpa* (Juss1) Benth]^[5]为芸香科植物吴茱萸的干燥未成熟果实, 具有散寒止痛, 降逆止呕, 助阳止泻等功效, 其主要成分为挥发油和生物碱两类, 而吴茱萸碱(EV)、吴茱萸次碱(RU)、羟基吴茱萸碱(HED)和吴茱萸酰胺(ED)又为其主要生物碱^[6]。本文应用TLC-FT-SERS技术, 对中草药吴茱萸中六种生物碱进行分离和高灵敏度特征拉曼光谱检测。在GF₂₅₄色谱板的各生物碱斑点原位, 滴洒灰银胶, 直接获得FT-SERS光谱。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国Nicollet FT-Raman 950光谱仪; Nd:YVO₄(激发光波长1 064 nm); 硅胶GF₂₅₄薄层色谱板(青岛海洋化工厂); 三用紫外分析仪(上海); 吴茱萸生物总碱(自制); AgNO₃(AR); 柠檬酸三钠(AR); 吴茱萸次碱、羟基吴茱萸碱标准品(中国药品生物制品检定所)。

1.2 薄层层析

碳酸钠水溶液碱法超声提取吴茱萸生物总碱, 氯仿萃取

收稿日期: 2006-05-06, 修订日期: 2006-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(29973026)资助

作者简介: 张进治, 1963年生, 北方工业大学理学院副教授

e-mail: zhangjzh@ncut.edu.cn

定容 5 mL。点于硅胶 GF₂₅₄ 薄层色谱板, 点样量为 2 μ L。以石油醚-氯仿-丙酮-甲醇-氨水(6 2 1.4 0.2 0.2)为展开剂将吴茱萸总碱对照物羟基吴茱萸碱、吴茱萸次碱展开, 六种生物碱完全分离(见图 1)。对照羟基吴茱萸碱、吴茱萸次碱标准品用 254 nm 紫外灯定位, 各生物碱比移值分别为 $Rf_1 = 0.36$, $Rf_2 = 0.42$, $Rf_3 = 0.51$, $Rf_4 = 0.58$, $Rf_5 = 0.70$, $Rf_6 = 0.76$ 。

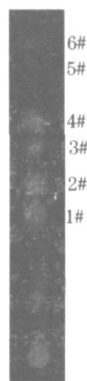


Fig 1 The TLC of *evodia rutaecarpa*

1.3 银胶制备与表面增强拉曼光谱检测

以硝酸银和柠檬酸三钠水溶液经氧化还原反应制备灰银胶, 并将其滴洒于 TLC 各组分化合物斑点原位, 待水分挥发后, 测其 FT-SERS 光谱。

2 结果与讨论

吴茱萸生物碱属于吲哚衍生物生物碱, 分子结构式如图 2~图 7 所示^[6]。

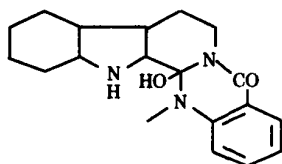


Fig 2 Hydroxyevodiamine

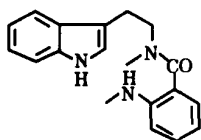


Fig 3 Evodiamide

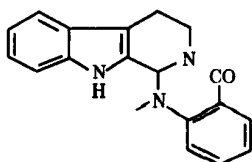


Fig 4 Evodiamine

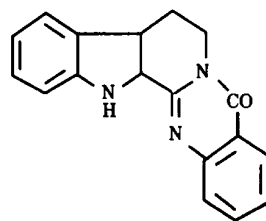


Fig 5 Rutaecarpine

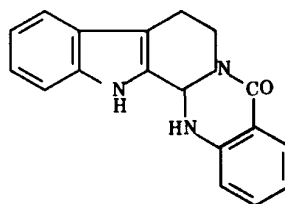


Fig 6 Dihydrorutaecarpine

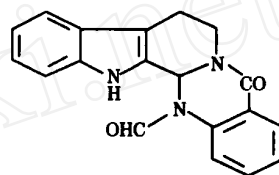


Fig 7 1,4-formyldihydrorutaecarpine

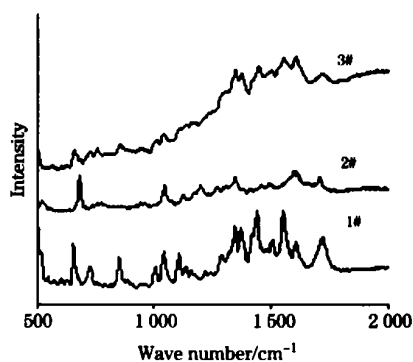


Fig 8 The TLC-SERS

1# : HED; 2# : ED; 3# : EV

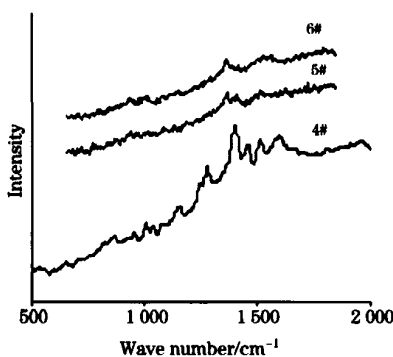


Fig 9 The TLC-SER

4# : RU; 5# : DRU; 6# : FDRU

依据极性、化合物在硅胶 GF₂₅₄ 板上斑点大小、明暗程度,对照标准品可确定 $R_{f1} = 0.36$ 的组分为羟基吴茱萸碱(HED), $R_{f2} = 0.42$ 的组分为吴茱萸酰胺(ED), $R_{f3} = 0.51$ 的组分为吴茱萸碱(EV), $R_{f4} = 0.58$ 的组分为吴茱萸次碱(RU), $R_{f5} = 0.70$ 的组分为二氢吴茱萸次碱(DRU), $R_{f6} = 0.76$ 的组分为 1,4-二甲酰基二氢吴茱萸次碱(FDRU)^[7]。

吴茱萸生物碱分子的拉曼光谱见图 8, 图 9(1~6[#])。主要光谱数据及归属见表 1。实验中可观察到: 六种吴茱萸生物碱的拉曼光谱都有明显的苯环伸缩振动增强峰, 并且六种吴茱萸生物碱的特征峰也清晰可见, 具体分析如下:

羟基吴茱萸碱谱图中(见图 8, 1[#] HED), TLC 原位 SERS 增强最明显的是波数为 1 562, 1 510 和 1 342 cm⁻¹ 的谱带。它们分别表征苯环伸缩振动及羟基变形振动, 这一实验现象表明, 分子主要是以苯环上的电子与银晶体微粒相互作用, 等离子体共振, 使苯环中的环伸缩振动显著增强。羟基变形振动峰在红外光谱分析中意义不大, 在一般拉曼光谱中也呈现中等吸收强度, 而在图 8, 1[#] 中羟基变形振动峰有不可忽视的强度, 是羟基吴茱萸碱区别于吴茱萸中其他生物碱的重要特征。

在吴茱萸酰胺的 SERS 谱图中(见图 8, 2[#] ED), 可明显观察到酰胺的特征, 1 698 cm⁻¹ 酰胺羰基 C=O 伸缩振动峰、1 606 和 1 589 cm⁻¹ 处苯环骨架伸缩振动及 N—H 变形振动峰, 1 478 cm⁻¹ CH₃ 变形振动峰。1 192 和 1 041 cm⁻¹ 不成环 C—C 伸缩振动和 679 cm⁻¹ 处苯环 C—H 面外变形振动峰, 吴茱萸酰胺分子结构中环数目减少, 与吴茱萸总碱中

其他生物碱有很大区别。

吴茱萸碱(见图 8, 3[#] EV)在 TLC 斑点原位 SERS 增强最明显的是与苯环伸缩振动相关的 1 610 cm⁻¹ 特征峰, 其次是波数为 1 482 cm⁻¹ 较弱和 1 372 cm⁻¹ 较强的 CH₃ 变形振动峰, 这是 EV 与其他吴茱萸生物碱结构的明显区别。

比较图 8 中 HED, ED, EV 3 种吴茱萸生物碱的 TLC-FT-SERS, 都能观察到分子中 C=O 的伸缩振动谱带, 强度中等, 这与我们以往的实验结果有所不同。通常分子往往通过 C=O 的 n 电子与硅胶吸附剂表面的 Si—OH 形成氢键, 因而在其 TLC-FT-SERS 谱图中观察不到 C=O 的伸缩振动谱带^[8]。本实验中应在表面增强中起重要作用的 C=O 的 n 电子虽未使其伸缩振动获最大增强, 但仍有不可忽视的强度, 可以推测, 可能因吴茱萸各碱中存在较多 n 电子, 不仅靠 C=O 的 n 电子使分子与硅胶吸附剂表面的 Si—OH 形成氢键, 仍然可观察到 C=O 的伸缩振动。

与以上实验现象不同, 在吴茱萸次碱(见图 9, 4[#] RU) TLC 原位 FT-SERS 谱中, 增强效果最明显的是环上 C—N 伸缩振动峰 1 403 cm⁻¹ 和苯环振动相关的 1 600 cm⁻¹ 特征峰。引起环上 C—N 伸缩振动峰获得最大增强的原因, 可能与其空间结构有关。与其他生物碱比较, 吴茱萸次碱分子中 3 个 N 原子与其他化合物有不同的空间关系, 分子可能通过 N 原子中孤电子对与银晶体微粒吸附, 当分子中 n 电子与 π 电子共存时, n 电子与银微粒间的相互作用比苯环上的 π 电子与银微粒间的作用强, 可能产生更明显的 SERS 效应^[9-11]。

Table 1 Raman spectral peaks (cm⁻¹) and their assignment

Hydroxyevodiamine	Evodiamide	Evodiamine	Rutaecarpine	Dihydrorutaecarpine	14-formyldihydrorutaecarpine
503 s	519 m	503 w			
656 s	679 vs	659 w			
727 w	763 w	755 w			
850 m		850 w	879 w		863 w
1 000 w	951 w	997 w			943 w
1 040 m	1 038 s	1 035 w	1 010 w		
1 099 m					
1 127 w	1 115 w				
1 157 m	1 192 s		1 160 w		
1 285 w	1 258 w				
	1 300 w				
1 342 s	1 338 s				
1 369 m		1 372 s	1 403 vs	1 401 m	1 401 m
1 433 s	1 452 m	1 441 s	1 460 s	1 450 w	
1 510 s	1 487 m	1 482 s	1 510 s		
1 562 vs		1 548 s			
1 595 m	1 589 s	1 597 vs		1 580 m	
	1 610 s		1 600 s		1 606 m
1 712 m	1 696 s	1 708 m			

注: vs: 很强 s: 强 m: 中等 w: 弱

与上述 4 种在 TLC 板上面积、亮度优势大, 即含量较高的吴茱萸生物碱 TLC-FT-SERS 比较, 二氢吴茱萸次碱(见图 9, 5[#] DRU)和 1,4-甲酰基二氢吴茱萸次碱(见图 9, 6[#]

FDRU) SERS 信息少, 谱图中有价值的 SERS 峰仅在 1 401, 1 580 和 1 606 cm⁻¹ 处有中等强度增强, 分别为环上 C—N 伸缩振动峰和苯环振动相关峰。1 450 cm⁻¹ 处弱增强是

N—H变形振动峰,可以区别二氢吴茱萸次碱和 1,4-甲酰基二氢吴茱萸次碱。这两种生物碱 TLC-FT-SERS 效果不很明显,分析其中原因,一可能是与它们的分子结构有关,二可能是这两种组分含量偏低。可以考虑改变表面增强基底,如使用光致还原溴化银溶胶制备纳米银颗粒等,此工作留待进一步研究。

实验结果表明:6 种吴茱萸生物碱中与分子中吡啶结构单元特别是苯环相关的振动峰都有明显的增强,因各生物碱分子结构不同,在它们的 TLC-FT-SERS 谱存在明显差异,可以明显地观察到各自的特征峰。未滴洒银胶的 TLC 原位 FT-Raman 光谱,只有强荧光背底上的噪声及 $1\,000\text{ cm}^{-1}$ 附近的拉曼峰,即只有在银溶胶的表面增强作用下,才能获得有价值的分子在 TLC 原位的 FT-SERS 谱。用透射电镜观察,使吴茱萸生物碱产生表面增强效果的溶胶的晶体微粒尺寸在 $50\sim 100\text{ nm}$ 之间,呈不规则型(见图 10)。

应用 TLC 薄层色谱与傅里叶变换表面增强拉曼散射技术联用,可以不用标准品,从中草药中直接提取生物碱进行有效分离并直接进行高灵敏度指纹检测,获得提取物中各化合物的精细结构信息,这为中草药有效成分的微量分离与深层次研究提供了一种新的方便而可靠的分析方法。

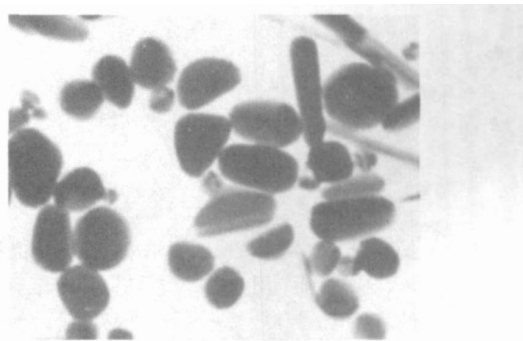


Fig 10 The SEM image of silver-gel (fifteen thousand times)

参 考 文 献

- [1] WANG Yuan, WANG Song-ying, ZHAO Yi-xue(汪 瑗, 王松颖, 赵宜学). Chemical J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 2001, 22(1): 46.
- [2] ZHANG Jin-zhi, WANG Yuan(张进治, 汪 瑗). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(1): 67.
- [3] Everall N J, Chaltmers J D. Appl. Spectroscopy, 1992, 46: 597.
- [4] Otto A, Bruckbauer A. Journal of Molecular Structure, 2003, 661-662: 501.
- [5] Rau A. Journal of Raman Spectroscopy, 1993, 24: 251.
- [6] Pal T, Narayanan V Anantha, Stokes D L, et al. Analytic Chimica Acta, 1998, 368: 21.
- [7] WANG Yuan, WANG Ying-feng, REN Gui-fen(汪 瑗, 王英锋, 任桂芬). Chinese Journal of Pharmaceutical Anal. (药物分析杂志), 2004, 24(1): 30.
- [8] MIAO Run-cai, FU Ke-de, XUN Yi-xian, et al(苗润才, 付克德, 郇宜贤, 等). Acta Physical Sinica(物理学报), 1992, 41(8): 1381.
- [9] ZHU Zi-ying, GU Ren-ao, LU Tian-hong(朱自莹, 顾仁敖, 陆天虹). Apply of Raman Spectroscopy in Chemistry(拉曼光谱在化学中的应用). Shenyang: Press of Northeast University(沈阳: 东北大学出版社), 1998. 71.
- [10] HUANG Yun-xia, FANG Jing-huai, SUN Zhen-rong, et al(黄云霞, 方靖淮, 孙真荣, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(12): 2009.
- [11] LUO Zhi-xun, FANG Yan(骆智训, 方 炎). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(2): 358.

TLC-SERS Study on Evodiamine in Evodia Rutaecarpa

ZHANG Jin-zhi¹, WANG Yuan², CHEN Hui², SHAO Hui-bo²

1. North University of Technology, Beijing 100041, China

2. Department of Chemistry, Capital Normal University, Beijing 100037, China

Abstract A new method for analyzing the ingredients of evodiamine(EV), rutaecarpine(RU), hydroxyevodiamine(HYD), evodiamide(ED), dihydrorutaecarpine(DRU) and 14-formyldihydrorutaecarpine(FDRU) in evodia rutaecarpa using high performance thin layer chromatography (TLC) and surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) technique is reported. The character of this method is that standard samples are not needed. The results show that the characteristic spectral bands of EV, RU, HYD, and ED can be obtained from the TLC spot with microgramme of sample. The spectral band at $1\,562\text{ cm}^{-1}$ was obtained with great enhancement. Molecule absorbed in surface silver sol by π electrons in ring. The spectral bands of EV, RU, HYD and ED are obviously different due to their differences in structure. The TLC and SERS techniques standard samples are a convenient and speedy method to analyze chemical ingredients with high sensitivity for the study of the Chinese traditional medicine.

Keywords Evodiamine; Rutaecarpine; TLC; SERS

(Received May 6, 2006; accepted Sep. 8, 2006)