

高效液相色谱在黄酮类化合物分析中的应用

沈阳药学院天然药物化学教研室 (110015) 郑玉果 姚新生*

摘要 着重介绍1987年以来高效液相色谱 (HPLC) 在黄酮类化合物的分离、定量、定性分析中的应用及色谱条件优化的最新发展。

黄酮类是植物中广泛存在的化合物, 在药用植物中往往有着特殊的价值。黄酮类作为重要的天然产物成为现代HPLC最早分析的样品之一^[1]。HPLC在黄酮类中的应用获得了飞速发展^[2], 其中反相高效液相色谱(RP-HPLC)扮演着中心角色, 今从色谱条件的优化、定性、定量分析以及分离4个方面对HPLC在黄酮类化合物中的应用作一综述。

1 色谱条件优化

按分析的化合物类型, 主要是极性大小来选择所用柱子, 再对流动相组成进行优化, 直至选出最佳条件以获得最佳峰形和选择性。

1.1 层析柱: 黄酮类分析中以C₁₈柱用得最为普遍, 过去主要用于分析极性较大的甙或甙元, 现亦用于低极性的甙元。李浩等^[3]用氰基柱反相系统未经预处理测定石韦中的绿原酸及吡啶类成分芒果甙和异芒果甙, 获得了基线分离的效果。亦有应用径向压缩分离系统 (radial compression separation system, RCSS) 的^[4]。

Kahie等^[5]报道在以甲醇为调节剂的体系中, C₁₈柱、C₈柱、苯基柱 (Ph), 氰基柱 (CN) 对黄酮类的保留能力一般有如下顺序: C₁₈ ≈ C₈ > Ph > CN。郭安珍等^[6]对比了C₈、C₁₈、CN 3种柱子分离18种黄酮甙和甙元的混合物的情况, 认为RP-C₈柱系统对分离含广泛黄酮类组分的混合物比RP-C₁₈柱系统更为理想。

柱内填充粒径在研究中使用的频率据Osswald报道^[7]有如下顺序: 10μm > 5μm > 3μm, 但从近几年在黄酮类分析中的应用看, 以5μm用得最多, 其次为10μm。

表1列出了黄酮类分离中所用的色谱柱类型。

表1 分析黄酮类化合物的HPLC系统

固定相		流动相 (一般由3部分组成)			检测器及技术
反相系统	C ₁₈ 柱	组成A:	组成B:	组成C:	固定波长UV
	C ₈ 柱	甲醇	蒸馏水	乙酸	可变波长UV
	氰基柱	乙腈		甲酸	荧光检测
	氨基柱	乙醇		磷酸	电流检测
	苯基柱	二氧杂环己烷		高氯酸	停流扫描
	C ₈ 柱	THF		柠檬酸	光电二极管
	聚苯乙烯-二乙烯苯柱	2-丙醇		磷酸盐	阵列检测
	RCSS系统	特-丁醇			化学位移柱后
		离子对试剂: 四烷基溴化胺			衍生系统
正相系统	硅胶柱	正己烷	乙醇	乙酸	
	氨基柱	异辛烷	异丙醇		
		环己烷	二氯甲烷		
		苯	丙酮		
		氯仿	乙腈		
			二乙基醚		

*Address: Yao Xinsheng, Department of Natural Medicines, Shenyang College of Pharmacy, Shenyang

1.2 流动相: 自HPLC应用于黄酮类的分析以来, 甲醇-水及乙腈-水体系一直是优先选择的体系, 应用也最为广泛。色谱条件的优化主要在流动相的选择上。由于多数黄酮类化合物结构的类似性, 使得相似的溶剂体系对其分离分析具有较广的适应性。

Pietta等对丙醇-环醚(THF或二氧杂环己烷)-水体系在药用植物提取物中黄酮类分析中的应用作了一系列研究^[8~13], 证明此种体系在许多情况下比传统的甲醇(乙腈)-水体系优越。这种体系最大的特点是: a) 不需要加酸; b) 在等浓度洗脱的条件下可以得到满意的分离分析效果。这对于保护分析设备和保证分析结果的重复性是很重要的。

Bernardi等^[14]首次用特丁醇-水体系成功地分析了Drays octopetals中的黄酮甙。离子对色谱技术在黄酮类分析中亦有应用。

在化合物的HPLC分析中, 为了提高分离度常常需要使用梯度洗脱。一个好的洗脱程序往往要经过大量的试验耗费许多精力才能摸索出。而用计算机辅助优化色谱洗脱程序, 可以在减少试验次数的情况下, 使复杂植物提取物得到快速分离。其理论基础是: a) 保留值对流动相的依赖性; b) 塔板数对实验条件的依赖性; c) 保留值作为洗脱条件的函数, 其数值的可预言性。

Dzido等^[15]利用Drylab G软件辅助优化, 分析了Althaea属植物中的一部分黄酮类, 计算机辅助优化的模拟结果与实际分析结果获得了很好的一致性。

正相系统中多用乙烷或异辛烷等体系, 以极性较大的乙醇、丙醇、乙腈等有机溶剂调节。

由于黄酮类化合物常带有酚羟基, 在水中会部分解离, 而未解离的羟基与固定相作用较强, 从而导致拖尾, 所以黄酮类的反相HPLC中需要加入酸调节pH以抑制解离, 克服拖尾现象, 这与离子抑制色谱技术的原理是一致的^[16]。用来酸化流动相的酸可以是乙酸、甲酸、磷酸、或高氯酸等, 酸尤其是氢卤酸对分析仪器具有腐蚀性, 且酸浓度增加会导致容量因子 k 增加并因此延长保留时间, 所以有的色谱工作者^[6]不赞成酸化。不经酸化亦有成功的例子^[17]。表1列出了流动相组成中的有机调节剂。

2 分离

应用HPLC已分离了多种黄酮类化合物, 表2列出了一些典型黄酮化合物分离的例子。

低极性甙元的研究以多甲氧基黄酮类化合物常见。近年运用反相系统进行分离研究, 例如, 对以RP-18 Lichrosorb为固定相、水-THF-乙腈-甲醇为流动相的反相体系分离柑桔属中的多甲氧基黄酮类进行了优化设计^[30]。Pietta等^[13]则用C₁₈ Micosorb柱, 以2-丙醇-THF-水(22:4:74)为流动相的反相体系, 鉴定了桔皮中的多甲氧基黄酮类。此类丙醇-环醚-水体系近几年在黄酮类等浓度洗脱分离中应用很成功。

极性较大的甙元一般用C₁₈或C₈柱的反相系统分离。分离中最困难的是含有较多组分的复杂黄酮类化合物的分离。Vogt等^[31]用低压柱技术和Sephadex LH-20柱进行预分离纯化, 以0.5%磷酸水-甲醇-乙腈-THF(68:6:6:20)流动相分析了Cistus laurifolius中提取的黄酮甙元和黄酮醇甙的复杂混合物。Tomas-Barberan等^[32]在反相HPLC上分析了从蜂蜜中得到的20种黄酮甙元, 使用Spherisorb ODS-2和Lichocart RP-18柱, 试用了甲醇-水和乙腈-水的多种洗脱体系, 进行优化检测, 但没有一种溶剂体系能够分离所有这些黄酮。

许多色谱工作者用二极管阵列紫外检测技术检测峰的纯度^[9, 22, 28]。这种技术可以一

次打出包括波长、吸收值、保留时间在内的三维图谱,由某一色谱峰对应的紫外吸收光谱可以判断出此峰是单一的物质还是由多个有相同保留时间的物质组成的混合物。有关检测器及技术见表1。

表2 典型黄酮类化合物分离色谱条件示例

化合物	柱子	流动相	文献
黄酮类甙元	Hypersil ODS	甲醇-0.5%正磷酸水(梯度洗脱)	[18]
黄酮类碳甙	Lichrosorb RP-18	甲醇-水-甲酸	[19]
黄酮类	Spherisorb ODSII	THF-乙腈-甲醇-水-乙酸 (880:69:85:8966:500)	[20]
差向异构氧甙	Lichrosorb NH ₂	乙腈-水	[21]
双黄酮类	Novapak C ₁₈	THF-丙醇-水(21:20:69)	[22]
高异黄酮类	YWG-C ₁₈	甲醇-水-乙腈(32:19:13)	[23]
吡喃类	Zorbax-CN	甲醇-水(20:80)	[3]
双氢黄酮类	Nucleosil C ₈	乙腈-2-丙醇-水(30:8:62)	[24]
花色素类	Altex C ₁₈	0.05mol/L磷酸铵水-乙腈(梯度洗脱)	[25]
黄酮醇类	Hypersil RP-8	0.1%磷酸水-甲醇-乙腈-THF	[26]
双氢黄酮醇类	C ₈	甲醇-水-甲酸(35:65:0.2)	[27]
异黄酮类	Zorbax ODS	甲醇-水(梯度洗脱)	[28]
黄酮-4-ol类	μBondapak C ₁₈	甲醇-水(1:1) 水-乙酸-甲醇(33:65:2)	[29] [29]

3 定量

利用HPLC对某些黄酮类进行定量分析对于一些中药的质量控制具有较大意义。黄酮类化合物在植物中多以甙的形式存在,但因甙的标准品难以得到,致使分析工作遇到困难。现在黄酮类标准品商品的出现以及半制备性柱子^[14]在制备纯品上的应用,已大大促进了定量分析的发展。

以HPLC定量,最低检测限可达ng级或pg级。例如,Ito等^[33]用TSK gel ODS-120A柱,27%乙腈水溶液系统测定了Epimedic herba中的黄酮醇甙,检出下限为1.3~5.0ng,2.5~125.0μg/ml的校正曲线为直线。Dimov等^[34]用C₈柱/THF磷酸盐缓冲液系统测定了芦丁(rutin)的纯度,检出限为0.5μg/ml,0.05%的杂质即可检出。孙文基等^[35]用以YWG-C₁₈为固定相的不锈钢柱,以0.01mol/L磷酸二氢钾水-甲醇-乙酸(55:45:1.5)为固定相,测定了侧柏叶中槲皮甙的含量,为侧柏叶的质量评定建立了分析方法。

在植物中黄酮类的定量检测中,优化出最有效的提取方法是很重要的。常见的是甲醇回流提取,亦有氯仿振荡浸提^[13]、丙酮回流提取^[9]等,还有用流动相提取的^[15]。在提取中应用超声波振荡技术是一种快速、高效而且不破坏组分的好方法^[35]。

由于分析柱价格比较昂贵,常需在分析柱前加一保护柱(guard column)或应用固相提取技术^[8,9,13,24]进行纯化,以除去杂质,延长柱子寿命。

4 定性

HPLC应用于黄酮类分析主要是分离和定量,关于定性的应用相对很少,用HPLC测定化合物的保留值来定性需要有待测物的标准品,进行混合色谱分析(co-chromatography)。现在两谱联用技术的发展为化合物定性提供了方便,与HPLC联用的以紫外光谱为

常见,在比较保留值的同时,并对照样品与标准品的紫外光谱以进一步确定。为了提高鉴定的可靠性,可以使用多种流动相测试。例如,Pietta等^[20]运用二极管阵列检测的HPLC法鉴定Ginkgo biloba L., Anthomis nobilis和Equiserum arvense L.中的黄酮类,综合运用对比保留值、紫外光谱和水解分析鉴定了17种黄酮甙。

自70年代以来,应用HPLC已成功地分离分析了大量的黄酮类化合物,由于新技术的不断采用,大大提高了分离效果和定量分析的发展。计算机辅助下新的优化设计方法的研究,新的柱子和流动相的研究,特别是近年应用较多的丙醇-环醚-水体系,使一些用传统的甲醇(乙腈)-水体系难以分离的黄酮类化合物得到了很好的分离。这一切都促进了HPLC在黄酮类分析中的应用。HPLC已成为一种优势明显的黄酮类分离分析方法。

参 考 文 献

- 1 Ward R S, et al. J Chromatogr Sci, 1974, 12: 470
- 2 Daigle D J, et al. J Liquid Chromatogr, 1988, 11(2): 309
- 3 李洁,等.药学报,1992,27(2):153
- 4 Jaworski A W, et al. J Agric Food Chem, 1987, 35: 257
- 5 Kahle Y D, et al. Chromatographia, 1990, 30(7/8): 447
- 6 邬安珍,等.分析测试学报,1993,12(1):59
- 7 Osswald W F, et al. J Chromatogr, 1985, 333: 225
- 8 Pietta P G, et al. Chromatographia, 1989, 27(9/10): 509
- 9 Pietta P G, et al. J Chromatogr, 1991, 553: 223
- 10 Pietta P G, et al. Chromatographia, 1989, 28: 311
- 11 Pietta P G, et al. J Chromatogr, 1990, 513: 397
- 12 Pietta P G, et al. J Chromatogr, 1991, 537: 449
- 13 Pietta P G, et al. J Chromatogr, 1991, 447(1-2): 439
- 14 Bernardi M D, et al. J Chromatogr, 1984, 284: 269
- 15 Dzido T H, et al. J Chromatogr, 1991, 550(1-2): 71
- 16 马养民,等.分析化学,1993,21(3):368
- 17 Farmakalidis E, et al. J Chromatogr, 1984, 295: 510
- 18 Haster A, et al. J Chromatogr, 1990, 508(1): 236
- 19 Li Q M, et al. J Chromatogr, 1991, 562: 435
- 20 Dallenbach-Toelke K, et al. Plant Med, 1987, 53(2): 186
- 21 Woo W S, et al. Phytochemistry, 1980, 19: 2791
- 22 Pietta P, et al. J Chromatogr, 1988, 437(2): 453
- 23 Zhu Y, et al. J Chromatogr, 1988, 437(1): 265
- 24 Marzo A, et al. J Chromatogr, 1990, 535: 255
- 25 Lunte S M, et al. J Chromatogr, 1987, 384: 371
- 26 Vogt T, et al. Phytochemistry, 1988, 27: 3712
- 27 Trousdale E, et al. Phytochemistry, 1983, 22: 61
- 28 Eldridge A C, et al. J Agric Food Chem, 1983, 31: 394
- 29 Udupa S R, et al. J Chromatogr, 1981, 208: 132
- 30 Bianchini J P, et al. Chromatographia, 1987, 23: 15
- 31 Vogt T, et al. J Chromatogr, 1991, 537: 453
- 32 Tomas-Barberan F A, et al. J Chromatogr, 1993, 634: 41
- 33 Ito Y, et al. J Chromatogr, 1988, 456(2): 392
- 34 Dimov N, et al. Chromatographia, 1993, 35(9-12): 506
- 35 孙文基,等.药学报,1987,22(5):385

(1994-03-02收稿)