

- 7 范成德,等. 医院药学杂志, 1982, 2(2): 2
 8 刘产明,等. 中成药, 1998, 20(2): 17
 9 狄留庆,等. 中成药, 1998, 20(5): 9
 10 雷佩琳,等. 中成药研究, 1984, 6(3): 14
 11 陈大为,等. 中成药, 1993, 15(5, 6): 2
 12 敖秉臣,等. 中国医院药学杂志, 1984, 4(3): 1
 13 林凯葵,等. 中成药, 1998, 20(6): 2
 14 张学农,等. 中成药, 1998, 20(8): 5
 15 罗云,等. 中成药, 1997, 19(11): 10
 16 陈星灿,等. 中草药, 1990, 21(11): 14
 17 刘华钢,等. 中成药, 1995, 17(5): 3
 18 刘华钢,等. 中成药, 1996, 18(1): 3
 19 刘华钢,等. 时珍国药研究, 1998, 9(2): 137
 20 刘华钢,等. 中成药, 1993, 15(12): 11
 21 周件贵,等. 中国中药杂志, 1992, 17(11): 666
 22 周件贵,等. 中草药, 1991, 22(12): 541
 23 郑晓英,等. 中成药, 1994, 16(7): 3
 24 李素民,等. 中成药, 1998, 20(11): 7
 25 王昕,等. 中国医药工业杂志, 1998, 29(1): 27
 26 冯莉,等. 中国医院药学杂志, 1993, 13(6): 264
 27 王义海,等. 中成药, 1995, 17(9): 9
 28 安彩贤,等. 中成药, 1990, 12(6): 5
 29 刘雅敏,等. 中成药, 1993, 15(7): 2
 30 聂诗明,等. 中国中药杂志, 1996, 21(11): 667
 31 刘燕平,等. 中国医药工业杂志, 1996, 27(8): 349
 32 何群,等. 中药材, 1998, 21(6): 314

(1999-07-22收稿)

黄酮苷类化合物分离鉴定的研究进展[△]

河南师范大学化学与环境科学学院(新乡 453002) 渠桂荣* 郭海明

摘要 对近 5 年间有关黄酮苷的提取分离、结构鉴定的新进展作了综述,对质谱、紫外光谱、核磁共振等波谱方法用于结构研究的最新应用作了介绍。

关键词 黄酮苷 分离纯化 结构研究

黄酮苷是自然界中很重要的一大类天然有机化合物。有关它的提取、分离纯化、结构研究国内外已有一些零星报道。笔者重点对近 5 年间黄酮苷类的提取分离新技术、结构研究方法的新进展作一系统总结。

1 提取分离

1.1 提取: 黄酮苷类化合物多存在于植物的花、叶、果等组织中,一般可用丙酮、乙酸乙酯、乙醇、水或某些极性较大的混合溶剂进行提取,其中用得最多的是甲醇-水(1:1)或甲醇。一些多糖苷类则可以用沸水提取^[1]。提取方法常用的有:煎煮法^[2]、冷浸法^[3-5]、回流^[6,7]、渗漉^[8]等经典方法。刘峥等人对银杏叶总黄酮水浸提法作了研究,采取正交设计实验,确定了最佳水浸提条件^[3]。煎煮法常用的溶剂为水,煎煮次数为 2~3 次^[2];冷浸常用溶剂为 95%乙醇-甲醇和水。郭孝武等人运用超声技术提取黄酮苷是目前比较新的提取方法,此方法大大缩短了提取时间,提高了有效成分的提出率及药材的利用率^[9]。

1.2 分离纯化: 黄酮苷类的分离方法主要有各种柱层析法、HPLC法、离心薄层层析法、制备性薄层层析法和纸层析法等。

1.2.1 柱层析法: 1)聚酰胺柱层析法: 聚酰胺对各种黄酮苷类有较好的分离效果,其层析容量较大,适合于制备性分离,洗脱剂常用水-甲醇,也有用水-乙醇^[4,5]和甲醇-氯仿^[6]; 2)硅胶柱层析法: 此法的应用范围最广,不仅可以分离黄酮苷,也可以分离各种黄酮苷元^[1]。例如: Kikuchi 等人用此法从正丁醇提取物中分离得到 8 个黄酮及黄酮苷^[10]; Lin 等人亦用此法分离出具有抗血小板活性的黄酮碳苷^[11]; 3)葡聚糖凝胶柱层析: 它主要靠分子筛作用分离黄酮苷类,在洗脱时,一般按分子量的大小顺序洗出柱体。李教社等人用此法从蜜蒙花中分离得到 3 个黄酮苷类化合物^[8];李文魁等人亦用此法从朝鲜淫羊藿地上部分分离得到 2 种黄酮苷类化合物^[12]。

1.2.2 HPLC法: 应用 HPLC法分离黄酮苷类化合物的报道较多^[13,2]。邬安珍等人对 18 种黄酮及黄酮苷类化合物在 C₈、C₁₈和 CN 3 种固定相上的梯度洗脱、RP-HPLC法分离做了研究,结果表明, C₁₈柱基本可以对植物黄酮苷元和配基实现分离,但它对极性大的苷部分洗脱出慢峰,总洗脱时间增长和分离效果不太理想,而 C₈填料极性介于 C₁₈和 CN 二者之间,因而对黄酮苷类的分离比较理想,峰形和分

* Address: Qu Guihong, Department of Chemistry, Henan Normal University, Xinxiang

渠桂荣 女, 49 岁, 1976 年毕业于河南师范大学化学系, 现任河南师范大学化学与环境科学学院副院长, 教授, 硕士生导师, 多年来从事天然药物化学及近代波谱分析研究, 在国内外核心期刊发表学术论文近 30 篇, 获河南省优秀论文奖 6 篇, 获河南省科技进步三等奖两项。目前正在主持国家自然科学基金、国家新药基金项目与河南省重点攻关项目的研究。

[△]国家自然科学基金资助项目 No: 29972010

离度也最好^[14]。

1.2.3 离心薄层层析法:离心薄层层析法有分离速度快,处理样品量大等优点,可以代替制备性薄层层析,有时甚至能代替柱层析。

1.2.4 制备性薄层层析:李教社等人用制备性 TLC从蜜蒙花中分离得到 3个黄酮苷类化合物^[8];陈玉武等人用制备性聚酰胺薄层层析从蜜柑草的干燥全草中分离得到 4个黄酮苷类化合物^[2]。

1.2.5 纸层析法:郭新华等人应用表面活性剂胶束水溶液纸色谱分离测定了 5种黄酮及黄酮苷类化合物的 R_f值,此法操作简便,无环境污染,便于分离、检识含量较少的黄酮及黄酮苷类化合物^[15];Verlag用制备性纸色谱从大井口边草 *Pteris cretica* 中分离得到 3种黄酮苷类化合物^[16]。

1.2.6 超临界流体色谱分离:是近几年才发展起来的一种新技术。刘志敏等人利用超临界流体色谱法对 6种黄酮及黄酮苷类化合物做了研究,发现流动相组成是影响色谱条件的主要因素,其次色谱柱条件也是影响色谱分离的重要因素,硅胶基质的键合苯基柱比较适合于此类化合物的分离^[17]。

需要说明的是,有时需要两种或几种方法交替使用。

2 结构研究

对于黄酮苷的结构研究主要集中在苷元部分,苷元的基本结构可以分为 10多种主要类型。黄酮类苷元由 15个碳原子组成,共有 A B C 3个环,在各种类型结构中, A B 环上常见的取代基有羟基、甲氧基、异戊烯基等;组成苷的糖常见的有 D-葡萄糖、D-半乳糖、L-鼠李糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖醛酸、D-木糖等,或由这些单糖组成的双糖、三糖或多糖等。根据苷键原子不同,又分为氧苷和碳苷。

2.1 化学方法:黄酮类化合物的化学法测定结构现在已基本让位于各种类型光谱的综合解析,化学方法仅在确定化合物的类型上起到指导性作用。

2.2 波谱法:随着各种波谱技术的不断完善和发展,为解决含糖数较多的黄酮苷中苷键的构型、糖与糖之间的连结顺序、连结位置等一系列结构确定中的棘手问题提供了简洁有力的工具。

2.2.1 质谱:在测定黄酮类化合物苷元结构,特别是样品量很少时,电子电离质谱(EI-MS)测定法是一种有效的方法,仅需 1~50 μ g 样品。大多数黄酮类化合物苷元的分子离子峰很强,常为基峰。牛霖等人根据 EI-MS结合其它波谱推断了黄酮苷元异甘草素的结构^[18]。黄酮苷类化合物在 EI-MS上既不

显示分子离子峰,又不显示糖基的碎片,故不易用 EI-MS测定,而黄酮苷的场解吸附质谱(FD-MS)中,除分子离子峰 M⁺及 (M+1)⁺基峰外,还出现糖基的某些碎片,对该类化合物的鉴定提供了重要信息。在 FD-MS中,因为 (M+²³Na)⁺离子的强度随着溶剂极性及其发射丝电流强度的改变而变化,故可以辨认分子离子峰 (M)⁺及伪分子离子峰 (M+1)⁺。董英杰等人从大果山楂叶中用 FD-MS结合其它波谱鉴定了两种黄酮苷类成分^[4]。

快速原子轰击质谱(FAB-MS)为 80年代发展起来的另一种固体样品测试技术,苷类样品可形成离子复合物并由其进一步裂解,其碎片类型与 FD-MS基本相同;同时配备了阴离子捕获器,还可给出相应的阴离子质谱,与阳离子质谱互相补充,大大增加了它的信息来源及可信程度。

FD-MS在高质量区提供的信息比较详尽,但却不能提供有关苷元部分的结构碎片信息,而 FAB-MS除了给出分子量、糖碎片信息外,还在低质量区给出了苷元的结构碎片,从而弥补了 FD-MS的不足,目前在实际应用上已经远远超过了 FD-MS^[19]。

Yong Ju等人用 FAB-MS结合其它波谱鉴定了被共生菌感染的绿草中的两种黄酮苷的结构^[20]。李文魁等人亦用此法鉴定了朝鲜淫羊藿中的两种黄酮苷及黄酮醇苷的结构^[12,21]。

2.2.2 紫外光谱:大多数黄酮类化合物在甲醇(或乙醇)中的紫外吸收光谱由 300~400 nm 之间的吸收带 I 和 240~280 nm 之间吸收带 II 组成,在不同的试剂中(甲醇钠、乙醇钠、三氯化铝、三氯化铝盐酸、硼酸、醋酸钠等黄酮鉴定试剂),带 I 和带 II 将随黄酮苷结构不同而发生特定的变化。渠桂荣等人利用黄酮鉴定试剂结合其它波谱鉴定了裂叶芭蕉菜中的 10种黄酮与黄酮苷结构^[22,23]。

2.2.3 核磁共振氢谱(¹H NMR):黄酮类化合物¹H NMR谱常做成 3-甲基硅醚衍生物溶于 CCl₄中进行测定, A 环质子常出现在 δ 5.7~6.9, B 环质子常出现在 δ 6.5~7.9,因相对位置不同而表现出不同的裂分情况, C 环质子较为复杂,其所示特征是区别各类黄酮化合物的主要根据。黄酮类 H-3 常以一个尖锐单峰出现在约 δ 6.3 处,异黄酮类 H-2 为一个尖锐单峰,出现在 δ 7.6~7.8,因为受到 1 位氧原子和 4 位羰基影响比一般芳香质子位于低磁场,二氢黄酮类 H-2 因与两个磁场不等价的 H-3 相偶合,故被裂分成双双重峰,中心位于 δ 5.2,两个 H-3 各因相互偕偶又与 H-2 邻偶分别裂分成双双重峰,中

心位于 δ 2.8 处,但往往相互重叠不易区分。二氢黄酮醇类 H-2 及 H-3 构成了反式二直立键系统,故分别作为一个二重峰出现。H-2 位于 δ 4.9, H-3 则位于 δ 4.3,两者很容易区分,当 3-OH 成苷后则 H-2 及 H-3 信号均向低磁场方向位移,前者出现在 δ 5.6 ~ 5.0,后者出现在 δ 4.6 ~ 4.3 处。总之, ^1H NMR 在鉴定黄酮母体类型上显示了很强的优越性。

2.2.4 核磁共振碳谱 (^{13}C NMR): 根据 ^{13}C NMR 数据可以确定黄酮苷元各芳碳原子的取代图式,但不能据以确定骨架的类型,而根据 C 环的 3 个 ^{13}C 信号随母核结构不同的特征吸收有别,可以推测黄酮类化合物的骨架类型。双黄酮类化合物若分子中两部分氧化水平不一致时,则会在不同的磁场处出现两个 C=O 吸收。崔承彬等人对文冠木中 5 种黄酮类成分的 NMR 作了研究,对其 ^1H 及 ^{13}C NMR 信号作了明确归属^[24]。

黄酮苷的 ^{13}C NMR 谱分析同其它苷类成分相似,根据出现在 δ 99.0 ~ 109 范围内端基碳信号来确定糖的数目。结合文献报道确定糖的种类及环的大小。根据其苷化位移确定苷键位置。测定 T_1 值或进行部分水解再结合,核磁共振及质谱来推定糖的连接顺序。依据 $J_{\text{C}_1-\text{H}_1}$ 值来确定端基构型(一般端基碳若为 β 异构体,其 $J_{\text{C}_1-\text{H}_1}$ 值约为 160 Hz 若为 α 异构体, $J_{\text{C}_1-\text{H}_1}$ 值约为 170 Hz)。Kitanaka 等人用 ^{13}C NMR 数据结合其它波谱从珠节决明 *Cassia torosa* 的叶子中鉴定了 4 种黄酮及黄酮苷^[25]。

2.2.5 二维核磁共振谱: 随着分离技术的日益完善,近来人们的兴趣集中在对植物中微量、含糖数目较多的黄酮苷类结构的研究上。由于信号过多,甚至在许多位置(如端基碳区)发生重叠,难以对所有碳信号进行明确的归属,因而单靠碳谱确定糖的数目、种类,以及利用苷化位移确定苷键位置及糖的连接顺序等变得非常困难。近几年二维核磁共振谱的发展突飞猛进,在黄酮苷及各类化合物的结构鉴定中发挥了独特的作用。如用双量子滤过相敏感相关谱(DQPS-COPY)以及中继相干传递谱(RCT),结合 T_1 值测定、2D-NOE 等核磁技术,以 FAB-MS 为佐证,简便而明确解决了样品量少而含糖数目较多的黄酮苷中糖的连接顺序及连结位置等问题。游松等人对银杏叶中金松双黄酮的 ^1H NMR NOESY ^{13}C NMR DEPT 及 $^1\text{H}-^1\text{H}$ Hcosy- ^{13}C Hcosy 和 long-range ^{13}C Hcosy 谱

作了综合分析,确定了其结构和信号归属^[26];易以军等人利用 ^{13}C NMR 与 $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ 化学位移远程相关谱(COLOC 谱)及 NOESY 谱确定了 7,6'-二羟基-3-甲氧基异黄酮和落新妇苷的结构^[27];曹正中等人利用 ^1H 检测的与 ^{13}C 核多键相关实验(HMBC 谱)进一步揭示了 3'-methoxy-5'-hydroxy-isoflavone-7-O- β -D-glucoside 的化学结构^[28]。

2.3 单晶 X 射线衍射: 目前单晶 X 射线衍射可以得到数千个独立衍射和可观察数据点,从而可获取化合物分子中各种原子的坐标,得到化合物中各原子空间的相对位置,最终为确定分子结构提供直观可靠的立体图形。刘延泽等人在研究天葵苷的结构时,利用单晶 X 射线衍射确定了天葵苷中糖的连接位置及构型^[29]。

3 小结

近 5 年来黄酮苷类化合物的分离提纯技术及结构鉴定方法均得以快速发展,由于富含黄酮苷类化合物的植物种类繁多,生理活性广泛,所以今后人们将对它的研究越来越感兴趣。

参考文献

- 姚新生,等.天然药物化学.第 2 版.北京:人民卫生出版社,1997:201
- 陈玉武,等.中草药,1997,28(1):5
- 刘 峥,等.化学世界,1997,37(7):355
- 董英杰,等.沈阳药科大学学报,1996,13(1):31
- 李鸿英,等.植物学报,1981,23(6):511
- 李文魁,等.药学学报,1996,31(1):29
- 李伊庆,等.药学学报,1996,31(10):761
- 李教社,等.药学学报,1996,31(11):849
- 郭孝武.中草药,1992,27:234
- Kikuchi M, et al. J Nat Prod, 1996, 59: 314
- Lin C N, et al. J Nat Prod, 1997, 60: 851
- 李文魁,等.高等学校化学学报,1995,16(12):1892
- Ranman K, et al. Phytochemistry, 1997, 45(5): 1093
- 邬安珍,等.分析测试学报,1993,12(1):59
- 郭新华,等.兰州医学院学报,1996,22(3):3
- Verlag B. Experientia, 1994, 50(20): 1115
- 刘志敏,等.分析化学研究报告,1997,25(3):272
- 牛 霖,等.化学世界,1996,(10):539
- 彭军鹏,等.中草药,1992,23(8):437
- Ju Yong, et al. J Agric Food Chem, 1998, 46(9): 3785
- 李文魁,等.高等学校化学学报,1995,16(10):1575
- 渠桂荣,等.中草药,1995,26(5):233
- 渠桂荣,等.中国中药杂志,1996,20(5):292
- 崔承彬,等.沈阳药学院学报,1991,8(1):36
- Kitanaka S, et al. Chem Pharm Bull, 1992, 40(1): 249
- 游 松,等.沈阳药学院学报,1991,8(2):124
- 易以军,等.药学学报,1998,33(11):873
- 曹正中,等.药学学报,1999,34(5):392
- 刘延泽,等.中草药,1999,30(1):5

(1999-08-09收稿)