

色谱方法在植物黄酮含量测定中的应用

陈丛瑾 黄克瀛^a 韦龙宾^b

(广西大学化学化工学院 南宁市大学路 100 号 530004)

^a(中南林业科技大学材料科学与工程学院 湖南省株洲市石峰区樟树下 412006)

^b(广西林业干部学校 南宁市 530001)

摘 要 综述了黄酮类化合物含量的色谱测定方法, 包括薄层扫描法、高效液相色谱、超临界流体色谱等, 旨在为黄酮类化合物的研究、开发、应用提供参考。

关键词 黄酮含量, 薄层扫描法, 高效液相色谱法, 超临界流体色谱法。

中图分类号: O 657. 7 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2007)05-0820-05

1 前言

黄酮类化合物(Flavonoids)是在植物中分布非常广泛的一类天然产物, 其在植物体内大部分与糖结合成苷类, 有一部分是以游离态(苷元)形式存在的。绝大多数的植物体内都含有黄酮类化合物, 其对植物的生长、发育、开花、结果及防菌防病等方面起着重要的作用。同时, 黄酮类化合物生理活性多种多样, 如槲皮素(Quercetin)、芦丁(Rutin)、葛根素(Puerarin)等具有扩冠作用, 水飞蓟宾(Silybin)具有保肝作用等, 因此引起了人们的广泛研究。而近十年来, 黄酮类化合物的研究以倾向于其药用价值的开发, 涉及到提取、分离、纯化的研究, 黄酮含量测定在中药材的品质鉴定、制剂工艺的评价及中药制剂的质量控制等方面有非常重要的意义。目前黄酮类成分的含量测定方法主要有: 光谱分析法、色谱分析法、电化学分析法等, 下面就色谱分析法做一综述, 旨在为黄酮类化合物的研究、开发及应用提供一定的参考。

2 薄层扫描法

薄层扫描法(TLC-Scanning method)亦称薄层光密度法(TLC-Densitometry), 是薄层色谱技术与光密度计和微型电子计算机结合起来的一种新型仪器分析方法。薄层扫描法是将样品先经薄层分离后, 然后用一束长宽可以调节的一定波长、一定强度的光照射到薄层斑点上进行整个斑点的扫描, 用仪器测量通过斑点或被斑点反射的光束强度的变化达到定量的目的。应用薄层扫描仪可同时对各种复杂的样品进行分离和测定, 简便快速、灵敏准确、专属性好。因此, 在医药学领域得到广泛应用, 尤其在中草药复杂成分的分析中, 几乎是首选方法, 现已被国内外药典普遍采用^[1,2]。我国中草药的资源 and 品种非常丰富, 近年来利用薄层扫描法定量测定中草药各种组分的研究很多^[3], 薄层扫描法定量测定植物提取液中的黄酮成分的研究也很多。银杏叶提取物的主要有效成分是黄酮类和萜内酯, 李俊等^[4]用薄层扫描法对银杏叶 5 种黄酮成分的含量进行了同时测定。他们用 70% 乙醇

联系人, 手机: (0)13873311062; E-mail: gxdxcccj@163.com

作者简介: 陈丛瑾(1970—), 女, 湖北省咸宁市人, 讲师, 主要从事林产化工的教学、科研工作。

收稿日期: 2007-06-05; 接受日期: 2007-06-13

提取干银杏叶后加热浓缩提取液, 浓缩液过聚酰胺柱, 收集 60% 乙醇洗脱液部分并浓缩, 干燥得到结晶, 用甲醇溶解后点样在高效硅胶薄层板上, 以展开剂 I 石油醚 (bp. 60—90)-乙醚-甲酸-乙酸乙酯 (60 30 6 4) 的上层分离槲皮素、山奈素和异鼠李素, 以展开剂 II 氯仿-甲醇-水 (6 4 2) 的下层-乙酸 (15 1) 分离槲皮苷、异鼠李苷。薄层板在层析缸内用展开剂饱和 5min 后, 取出薄层板, 挥干溶剂, 在 $K = 370\text{nm}$ 处用直线扫描测定槲皮素、山奈素和异鼠李素的含量。然后用展开剂对同一薄层板进行展开, 相同扫描条件下测定了槲皮苷、异鼠李苷的含量。李吉来等^[5]将银杏黄酮醇甙类水解而获得的甙元, 用薄层扫描进行定量测定。测定波长 370nm, 参比波长 650nm, 回收率为 96.0%—99.6%, RSD 为 1.03%—2.08%。王凌云等^[6]采用双波长薄层扫描仪测定了长瓣金莲花的牡荆甙和荜草甙的含量。该方法灵敏度高, 准确可靠, 回收率为 96.99%。王朝周等^[7]、景仁志等^[8]和李伟等^[9]分别用薄层扫描法测定了槐米、苦荞叶和新疆雪莲中芦丁含量。王跃生等^[10]用薄层扫描法测定了青皮、枳壳和枳实中黄酮苷的含量。田振坤等^[11]用双波长薄层扫描法测定了黄芪茎叶中黄酮苷的含量。胡梅等^[12]用高效薄层扫描法测定了 166 种杜鹃中 6 种黄酮类成分的含量。总之, 薄层扫描仪可以扫描测定样品中微量或痕量黄酮组分的含量, 方法样品用量少, 灵敏度高, 分析速度快, 结果准确, RSD 可达到 1%—2% 甚至更小的误差^[13]。

3 高效液相色谱

随着对黄酮类化合物的深入研究和不断开发利用, 其分析方法近年来也得到了迅速的发展。利用先进的分离分析技术和仪器, 建立快速、准确、适用的分析方法定性、定量分析天然药用植物中的黄酮类化合物就成了非常有意义的工作。由于黄酮类化合物的特点: 不易挥发, 对热不稳定, 有紫外吸收和荧光, 分子离子峰稳定, 游离苷元一般难溶或不溶于水, 易溶于甲醇、乙醇、乙酸乙酯、乙醚等有机溶剂及稀碱液中, 黄酮苷一般易溶于水、甲醇、乙醇等强极性溶剂, 难溶或不溶于苯、氯仿等有机溶剂。由于黄酮苷极性大, 难气化, 不稳定, 因此高效液相色谱就成了重要的方法而被广泛用于黄酮类化合物的分离和含量测定。

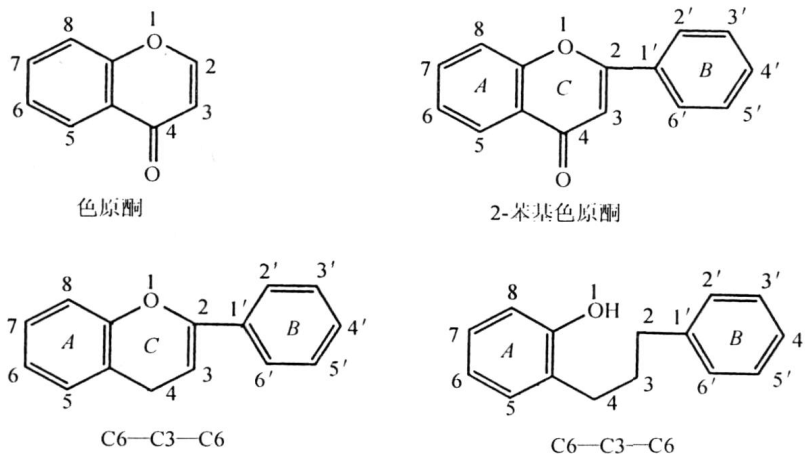


图 1 黄酮类化合物的基本碳架

黄酮类化合物的结构特点在于三碳链形成吡喃酮结构 (图 1 所示), 其紫外吸收光谱有带 I (300—400nm) 和带 II (220—280nm) 两个主要吸收峰。Merken 等^[14]用高效液相色谱法检测了食品 (包括龙井茶) 中的芹菜素和藤黄菌素, 采用以 $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ 为流动相在 XDB- C_{18} 柱上进行梯度洗脱。Justesen 等^[15]用高效液相色谱-质谱 (HPLC-MS) 对 15 种新鲜药材中的黄酮类化合物进行了分离分析, 采用以 A: $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}-\text{HCOOH}$ (30 70 1) 和 B: CH_3OH 为流动相在 RP- C_{18} 柱上

进行梯度洗脱,发现欧芹中芹菜素含量最大,达到 510—630mg/100g。Chen 等^[16]研究了漆树黄酮在小鼠体内的代谢,用高效液相色谱法分离了漆树黄酮及其代谢产物,并用质谱和核磁共振谱确定了代谢物的结构。Nuutila^[17]在 80 ℃ 下用含 1.2mol/L HCl 的 50% 甲醇水溶液对黄酮苷进行了水解,分离分析了洋葱和菠菜中的芹菜素和藤黄菌素。吴惠勤等^[18]用高效液相色谱法测定了银杏叶中的槲皮素、山奈酚和异鼠李素,并讨论了采摘时间对黄酮类化合物的影响。陈辉强等^[19]测定了苦丁茶中芦丁的含量。Markham 等^[20,21]对新西兰产的地钱中黄酮类化合物进行了高效液相色谱分离分析,在 Merck Lichrospher 100RP-C₁₈ 柱上,以 A (1.5% H₃PO₄) 和 B (HOAc-CH₃CN-H₃PO₄-H₂O=20:24:1.5:54:5) 混合溶液为流动相进行梯度洗脱:开始以 80% A 为流动相,在 30min 内 A 在混合溶液中的含量降为 33%,在 33min 内 A 在混合溶液中的含量降为 10%,在 39.3min 内 A 在混合溶液中的含量降为 0%,测定波长为 352nm。在此色谱条件下,分离分析了 9 种黄酮类化合物。

张玉潜等^[22]用反相高效液相色谱法对依普黄酮及其代谢产物进行了药代动力学研究,最低检测量分别为 0.04ng 和 0.05ng。邹耀洪^[23]在 80 ℃ 水浴中用 95% 的乙醇提取杨梅叶,用反相高效液相色谱定量地测定了杨梅素和 4 种黄酮醇苷。张廷之等^[24]用反相高效液相色谱法,RP-C₈ 柱为固定相,甲醇-水-冰乙酸(40:60:2)为流动相,以芦丁为参照物外标法定量,辅以二极管阵列检测技术,测定了毛竹叶中总黄酮的含量。易醒等^[25]用反相高效液相色谱法,对我国特有保健食品资源青钱柳中的异槲皮甙、槲皮素和山奈酚的含量进行了测定。色谱条件为 Altima C₁₈ 柱(5μm, 150mm × 4.6mm),流动相 A 为 H₂O-HOAc=98:2(V/V),流动相 B 为 CH₃CN。洗脱程序为:8%B-30min-50%B-5min-50%B-5min-8%B。检测波长为 360nm,流速为 0.6mL/min。方法的平均回收率和 RSD 为 98.6% 和 1.57%。测得:青钱柳甲醇提取物中黄酮含量为异槲皮甙 0.543%,槲皮素 0.0615%,山奈酚 0.0387%;水提取物中异槲皮甙 0.464%,槲皮素 0.0603%,山奈酚 0.0337%。肖建波等^[26]采用反相高效液相色谱,在 RP-C₁₈ 柱上以乙酸-甲醇-乙腈-磷酸-水为多元流动相,等度洗脱,在 30min 内对地钱的黄酮提取物进行分离与测定,检测波长 350nm,流速 0.60mL/min,采用校准曲线法对实际样品中的芹菜素、槲皮素和木犀草素进行定量分析。结果表明:平均加标回收率 96.79%—101.13%,相对标准偏差 0.66%—1.52%。

微柱高效液相色谱是在高效液相色谱法的基础上,随着新材料的出现和微加工技术的不断进步于 20 世纪末期新开发出来的一种色谱微分离技术。高效液相色谱法出现于 20 世纪 70 年代初,80 年代趋于成熟。由于其具有分离分析效能高、速度快、检测灵敏度高等特点而被广泛应用在化学化工、商品检验、食品卫生、环境检测、药品分析等诸多领域。但该方法也存在一些不足,如流动相消耗量大,所用溶剂大多有毒且价格昂贵等。特别是对于一些较复杂样品的分析,用单相分离分析方法往往很难完成,虽然可以采取高效液相色谱与质谱等检测器联用的技术来解决,但由于流速匹配的问题使其推广、应用受到一定限制。微柱高效液相色谱以其较低的最佳流量、易与其他仪器线联用、分析样品少、消耗溶剂少、环境污染小等优点而引起人们的极大兴趣。高翠芬等^[27]研究了用微柱高效液相色谱法测定贯叶连翘中芸香苷。样品中的芸香苷用 80% 甲醇加热回流提取,以 Waters Xterra TMRP₁₈ (1.0 × 30mm, 2.5μm) 色谱微柱为固定相,1% 的醋酸和甲醇(40:60,V/V)为流动相,流速为 0.2mL/min;检测波长为 356nm,进样体积 2.0μL。该色谱条件下,样品芸香苷在 1.0min 内可达到基线分离,用紫外二极管矩阵检测器检测,检测波长为 356nm。分别配制浓度为 100、20、4.0、0.8μg/mL 的标准溶液,进样后根据不同浓度的峰面积计算出回归方程: $A = 2.12 \times 10^5 C + 158$, $r = 0.9999$ 。根据信噪比 $S/N = 3$,测得最低检测浓度为 22μg/mL。李维莉等^[28]研究了用微柱高效液相色谱法测定苦荞中芦丁和槲皮素的方法。苦荞中的芦丁和槲皮素用 90% 甲醇加热回流提取,以 Waters Xterra TMRP₁₈ (1.0mm × 50mm, 2.5μm) 色谱柱为固定相,1% 的乙酸和甲醇

为流动相,在该色谱条件下,苦荞中芦丁和槲皮素在20min内可达到基线分离,用紫外二极管矩阵检测器检测,方法用于4种苦荞试样中芦丁和槲皮素的测定,分析结果的RSD在0.51%—1.20%之间,回收率在98%—102%间。杨亚玲等^[29]研究了用微柱高效液相色谱法测定葛根中的4种黄酮类成分。样品中的黄酮用甲醇超声振荡提取,然后用WatersXtera TMRP₁₈(50×1.0mm,3.5μm)微柱吸附,以A,甲醇和B,1%乙酸溶液为流动相,按0min(A30%+B70%),2.5min(A50%+B50%),4.0min(A80%+B20%),5min(A30%+B70%)的线性梯度条件洗脱分离,平衡5min后进入下一个样,流速为0.15mL/min,进样体积2μL,用紫外二极管阵列检测器检测,检测波长为250nm。在上述色谱条件下,4,7-二葡萄糖基大豆甙元、葛根素、大豆甙元和大豆甙的保留时间分别为:1.412、2.024、2.725和3.853min。

4 超临界流体色谱法

超临界流体色谱(Supercritical Fluid Chromatography,简称SFC)法是近年来出现的一种新方法,在分析领域得到应用。刘志敏等^[30]采用超临界流体色谱法分离测定了银杏叶提取物水解后的三个苷元——槲皮素、山奈酚、异鼠李素的含量。以苯基柱(尺寸为200×4.6mm,内填粒径为5μm的苯基固定相)为固定相,二氧化碳-乙醇-磷酸(90:9.98:0.02V/V)为流动相,流动相流速为1.00mL/min;三个黄酮苷元获得良好的分离,利用各苷元的转换因子计算了黄酮化合物的总黄酮的含量。方法定量结果准确,重现性好。王学军等^[31]建立了超临界流体色谱法同时测定银杏叶提取物中槲皮素和芦丁的含量。采用C₁₈色谱柱,流动相为超临界CO₂-0.05%三氟乙酸的乙醇溶液(10:1),检测波长360nm。槲皮素和芦丁的平均回收率分别为99.2%和101.3%,RSD分别为2.3%和2.8%。

5 结语

色谱分析法是黄酮的定量分析方法之一。薄层扫描法是将点在薄层板上的样品用溶剂展开,使黄酮与非黄酮成分甚至黄酮单体分开后,用一束长宽可以调节的一定波长、一定强度的光照射到薄层斑点上进行整个斑点的扫描,用仪器测量通过斑点或被斑点反射的光束强度的变化达到定量的目的。高效液相色谱法需用流动相将注入色谱柱中的黄酮单体分开后用光学或其他检测方法测定黄酮单体的含量,适用范围更广。而超临界流体色谱法是近年来出现的一种新方法,该法用超临界流体或添加了改性剂的超临界流体做流动相使黄酮单体分离后测定,目前该法测定黄酮含量的报道不多。相信随着科学技术的进步,色谱分析法会出现更加方便、快捷的分析黄酮化合物的新技术及新方法。

参考文献

- [1] 何丽一. 平面色谱法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001. 166—180
- [2] 王绪明, 赵庆华, 梁爱君等. 薄层扫描法近年在医药学中的应用进展[J]. 解放军药学学报, 1999, 15(2): 24—27.
- [3] 马毅红. 薄层扫描法在中草药分析中的应用[J]. 宁夏医学院学报, 2002, 24(4): 301—303
- [4] 李俊, 余丽娟, 苏小建等. 薄层扫描法测定银杏叶黄酮的研究[J]. 广西师范大学学报, 1995, 13(4): 54—57.
- [5] 李吉来, 于留荣, 曾宇珠. 薄层扫描法测定银杏叶中总黄酮醇甙的含量[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(2): 106—108, 128
- [6] 王凌云, 叶绍明, 李药兰等. 薄层扫描法测定长瓣金莲花中牡荆甙和荜草甙的含量[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2002, 23(3): 98—99.
- [7] 王朝周, 程秀民. 薄层扫描法测定槐米中芦丁含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(4): 21—22
- [8] 景仁志, 陈波, 葛绍荣等. 薄层扫描法测定苦荞叶中芦丁的含量[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1997, 34(6): 877—878
- [9] 李伟, 堵年生. 双波长薄层扫描法测定新疆雪莲中芦丁含量[J]. 新疆医学院学报, 1995, 18(2): 97—99
- [10] 王跃生, 罗文毓. 薄层扫描法测定青皮、枳壳和枳实中总黄酮含量的研究[J]. 中国中药杂志, 1989, 14(4): 38—40, 63

- [11] 田振坤, 马英丽, 孟锐等. 双波长薄层扫描法测定黄芪茎叶中黄酮苷的含量[J]. 沈阳药学院学报, 1993, **10**(1): 24—26
- [12] 胡梅, 肖培根. 高效薄层扫描法测定 166 种杜鹃中 6 种黄酮类成分的含量[J]. 药学学报, 1989, **24**(12): 923—931.
- [13] 章育中, 郭希圣. 薄层层析法和薄层扫描法[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1990. 267.
- [14] Merken H M, Beecher G B. Liquid Chromatographic Method for the Separation and Quantification Flavonoides[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, **897**: 177—184.
- [15] Justesen U J, Knuthsen P. Composition of Flavonoids in Fresh Herbs and Calculation of Flavonoid Intake by Use of Herbs in Traditional Danish Dishes[J]. *Food Chemistry*, 2001, **73**: 245—250.
- [16] Chen H, Zuo Y G, Deng Y W. Separation and Determination of Flavonoids and Other Phenolic Compounds in Cranberry Juice by High Performance Liquid Chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, **913**: 387—395.
- [17] Nuutila A M, Kannoviirtti K, Oksanen-Caldentey K M. Comparison of Methods for the Hydrolysis of Flavonoids and Phenolic Acids from Onion and Spinach for HPLC Analysis[J]. *Food Chemistry*, 2002, **76**: 519—525.
- [18] 吴惠勤, 程志青, 张桂英等. 南雄银杏叶黄酮含量的 HPLC 测定[J]. 分析测试学报, 2001, **20**(6): 53—54.
- [19] 陈辉强, 崔宏伟. 苦丁茶中黄酮类化合物(芦丁)的 HPLC 测定[J]. 广西轻工业, 2000, (3): 40—42.
- [20] Markham K R, Porter L J. Flavonoids of the Liverwort *Marchantia Polymorpha*[J]. *Phytochemistry*, 1974, **13**: 1937—1942.
- [21] Markham K R, Porter L J. An Increase in the Luteolin: apigenin Ratio in *Marchantia Polymorpha*[J]. *Phytochemistry*, 1998, **48**(5): 791—794.
- [22] 张玉潜, 陈允抒, 孙效东. RP-HPLC 法同时测定依普黄酮及其代谢物 M-1 血浆浓度及药代动力学研究[J]. 药物分析杂志, 1997, **17**(3): 150—153.
- [23] 邹耀洪, 李桂荣. 反相高效液相色谱分析杨梅叶中抗氧化成分黄酮类化合物[J]. 分析化学, 1998, **26**(5): 531—534.
- [24] 张廷之, 侯镜德, 徐秀珠. 反相高效液相色谱法测定毛竹叶中总黄酮[J]. 理化检验(化学分册), 2001, **37**(3): 117—118.
- [25] 易醒, 谢明勇, 王远兴等. 反相高效液相色谱法测定青钱柳中黄酮类化合物含量[J]. 南昌大学学报(理科版), 2001, **25**(2): 161—164.
- [26] 肖建波, 朱华, 钟世安等. 反相高效液相色谱法用于钱中黄酮类化合物的分离与测定[J]. 分析试验室, 2005, **24**(4): 17—19.
- [27] 高翠芬, 白红梅, 黄齐林等. 微柱高效液相色谱法测定贯叶连翘中的芸香苷[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2004, **13**(4): 318—319.
- [28] 李维莉, 张亚平. 微柱高效液相色谱法测定苦荞中芦丁和槲皮素[J]. 理化检验(化学分册), 2005, **41**(9): 667—668.
- [29] 杨亚玲, 胡秋芬, 杨国荣等. 微柱高效液相色谱法测定葛根中的几种黄酮类成分[J]. 分析科学学报, 2005, **21**(4): 465—466.
- [30] 刘志敏, 赵锁奇, 王仁安等. 超临界流体色谱法测定银杏叶提取物中的黄酮类化合物[J]. 分析化学, 1999, **27**(2): 214—216.
- [31] 王学军, 许振良, 赵锁奇. 银杏叶提取物中槲皮素和芦丁的超临界流体色谱法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2005, **36**(7): 415—417.

Advances of the Chromatography Methods in Determination of Flavonoids

CHEN Cong-Jin HUANG Ke-Ying^a WEI Long-Bin^b

(Chemistry and Chemical Engineering College, Guangxi University, Nanning 530004, P. R. China)

^a(College of Material Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology,

Zhuzhou, Hunan 412006, P. R. China)

^b(Guangxi Cadre School of Forestry, Nanning 530001, P. R. China)

Abstract The chromatography methods for determination of flavonoids were reviewed in this paper by consulting, summarizing references in order to offer reference to the research, development and application. It includes TLC-scanning method, high performance liquid chromatography, supercritical fluid chromatography.

Key words Flavonoids Content, TLC-scanning Method, High Performance Liquid Chromatography, Supercritical Fluid Chromatography.