

黄酮类化合物的薄层色谱鉴定

张 钰 综述, 段 定, 郝冠中 审校

(包钢医院药剂科, 内蒙古 包头 014010)

摘要: 黄酮类化合物是一类植物次生代谢产物, 因其在医药、食品及化工方面有着重要的研究价值而得到了广泛关注。各种用于研究黄酮类化合物的分离分析技术也在迅速发展, 薄层色谱技术仍以其快速、简便、准确度高等优点而成为鉴别黄酮类化合物的首选方法。文章综述了薄层色谱法在植物黄酮类化合物中的应用。

关键词: 黄酮类化合物; 薄层色谱法

中图分类号: R 282.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-9388 (2012) 04-0222-03

Thin-layer chromatography identification of flavonoids ZHANG Yu, DUAN Din, HAO Guan-zhong (Affiliated Third Hospital, Inner Mongolia Medical College, Baotou 014010, China)

Abstract: Flavonoids is a class of plant secondary metabolites. Because of their important research value has been widespread concern in the pharmaceutical, food and chemical. A variety of separation techniques for studies of flavonoids is growing rapidly, TLC technology is still fast, simple and accurate high and become the preferred method of identification of flavonoids. The article reviews the application of thin-layer chromatography of plant flavonoids.

Key words: Flavonoids; thin-layer chromatography

黄酮类化合物广泛存在于蔬菜、水果、牧草和药用植物中, 是植物在长期的自然选择中产生的一些次级代谢产物, 许多植物的叶、皮、根和果实中都含有一定量的黄酮类化合物。最初, 黄酮类化合物的粗制品仅被作为染料使用, 直至 20 世纪 20 年代槲皮素、芦丁用于临床后才日渐受到医药界广泛关注。近年的研究发现, 黄酮类化合物对心血管疾病、感染性疾病、肿瘤、免疫功能异常、炎症性疾病、衰老等具有广泛的药理作用。

1 黄酮类化合物的基本结构

以前黄酮类化合物主要是指基本母核 2-苯基色原酮 (2-phenyl-chromone) 类化合物, 现在则是泛指 2 个苯环通过中央三碳链相互联结而成的一系列化合物 ($C_6-C_3-C_6$), 由于这类化合物大多呈黄色或淡黄色, 因此称为黄酮。此类化合物在植物的组织内大多与糖结合, 以黄酮苷的形式存在, 少部分以游离态存在。黄酮类化合物广泛存在于植物界, 其生理活性的多样性引起国内外广泛关注, 研究进展很快。据统计, 目前已分离出的黄酮类化合物已超过 4000 种, 为天然酚类化合物之首^[1]。

黄酮类化合物的基本结构见图 1。

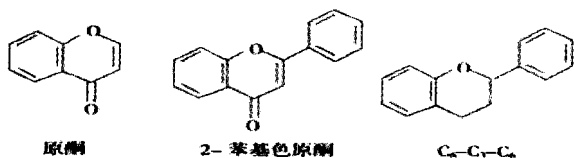


图 1 黄酮类化合物的基本结构

根据三碳链氧化程度、B 环 (苯基) 联结位置 (2 位或 3 位) 以及三碳链是否呈环状等特点, 可将天然黄酮类化合物大致分为: 黄酮类 (Flavones)、黄酮醇类 (Flavonol)、二氢黄酮类 (Flavanones)、二氢黄酮醇类 (Flavanonols)、异黄酮类 (Isoflavones)、二氢异黄酮类 (Isoflavonols)、黄烷-3-醇 (Flavan-3-ols)、查尔酮类 (Chalcones)、黄烷-3, 4-二醇类 (Flavan

-3, 4-diols)、二氢查尔酮类 (Dihydrochalcones)、花色素类 (Anthocyanidins)、双苯吡酮类 (Xanthones)。除了上述 12 种外, 还有橙酮类、新黄烷类化合物, 这 2 种化合物在结构上与以上 12 种稍有差异^[2,3]。

2 黄酮类化合物的药理作用

黄酮类化合物因其广泛的药理活性和较低毒性, 已成为国内外天然药物开发利用研究的热点。该类化合物在医药、食品及化工方面有着重要的研究价值, 已报道其有抗氧化性、抗炎抗菌、抑制血小板凝集及肥大细胞组胺释放等作用, 在癌症及心脏病等疾患上也显示出治疗潜力, 因其在花色素中的存在而可能用来代替毒性合成颜料^[4]。

3 TLC 用于黄酮类化合物定性研究

用薄层析进行黄酮类化合物的定性研究, 目前采用的方法主要是与标准品或与文献对照 Rf 值或将测试样品图谱与标准样品图谱相比较。标准品和样品的 Rf 值、斑点形状颜色及有无荧光等特征都完全相同, 则可作初步结论是同一化合物。但一般需结合化学反应或与紫外光谱等方法联用加以确证。常用系统如下。

4.1 醋酸乙酯-甲酸-水系统 卫星星^[5]从苦麦籽壳提取物中鉴别芦丁和槲皮素两种黄酮类化合物: 在硅胶 G 薄层板上, 以醋酸乙酯-甲酸-水 (8:3:1) 为展开剂、1% 三氯化铝乙醇溶液显色后于紫外灯下观察, 苦麦供试品与对照品芦丁和槲皮素相应的位置上显相同颜色的荧光斑点, 而阴性对照色谱无相同斑点显现。从层析结果可知苦麦籽壳提取物中主要含有芦丁和槲皮素两种黄酮类化合物。朱贲峰等^[6]以薄层层析方法证明江西修水和福建永春的青钱柳的主要黄酮类成分基本相同, 从而为对四氧嘧啶糖尿病小鼠具有显著降血糖作用的青钱柳开发研究提供了有利的证据: 该方法于硅胶 G 薄层板上, 以醋酸乙酯-甲酸-水 (8:1:1) 为展开剂、1% 三氯化铝乙醇溶液显色时, 于紫外灯 (365) 下检视, 两种样品均与对照品色谱相应的位置上, 显黄色的荧

作者简介: 张钰, 药剂科主管药师, 主要从事病房调剂药品、管理工作。

光斑点。甲苯-氯仿-丙酮系统黄绍军等^[7]从荔枝叶中检测黄酮苷:对由HPLC法纯化的晶体以硅胶GF254,展开剂甲苯-氯仿-丙酮(40:25:35)进行TLC分析,其中一种结晶与槲皮素Rf值一致,Rf=0.50;另一种结晶与山萘酚Rf值一致,Rf=0.72;同时结合熔点、液相色谱、红外光谱、核磁共振等分析方法进行结构表征,证实荔枝叶含有黄酮苷,其苷元为槲皮素和山萘酚。

4.3 甲苯-醋酸乙酯-甲酸系统 冯玛莉等^[8]以薄层层析方法建立了沙棘黄酮的质量控制方法:在硅胶GF254薄层板上,以甲苯-醋酸乙酯-甲酸(5:2:1)为展开剂,检出异鼠李素、槲皮素;异鼠李素、槲皮素的Rf值分别为0.60,0.49。该鉴别方法对应的样品色谱斑点清晰,无拖尾、背景无干扰且重复性好。

4 荧光观测及常用显色剂

4.1 荧光观测

4.1.1 溶液滴于滤纸上,干后喷雾醋酸镁甲醇试剂,置紫外灯下观察,二氢黄酮类与二氢黄酮醇类多显天蓝色荧光,黄酮类、黄酮醇类与异黄酮类多显黄色。

4.1.2 醇或甲醇浸出液加1%三氯化铝甲醇液,黄酮醇与5-羟基黄酮因与Al³⁺络合而显鲜黄色。

4.1.3 药材乙醇或甲醇浸出液加2%二氯氧锆(ZrOCl₂)甲醇液,5-羟基黄酮和3-羟基黄酮显鲜黄色。

4.2 显色剂

4.2.1 常用预试显色剂 硫酸是常用氧化剂,有机碳水化合物均可与稀硫酸进行氧化还原反应,按氧化的程度不同而显不同的颜色或荧光,故一般在薄层预试试验时,应先采用10%的硫酸乙醇溶液进行喷雾、烘烤显色、在紫外光灯下观察试验结果的预试方案,为确定复试方案做准备工作。

4.2.2 专属性显色剂 如果所鉴定的成分是明确的单体,可选择专属性较强的颜色反应显色剂。

4.2.3 酮类化合物常用显色剂 黄酮类化合物常用显色剂为三氯化铝醇溶液,其显色原理为黄酮类化合物分子中常含有5-OH-4-酮基、3-OH-4-酮基、邻二酚羟基这些结构单元,与Al³⁺生成黄色荧光络合物。此外还有氨水熏蒸、硫酸醇溶液、碘蒸气熏等方法。杨先国等^[9]对玉竹中黄酮类化合物先以三氯化铝乙醇试液显色,但硅胶板上的荧光很弱,显色效果不理想,故改用氨水熏蒸显色,结果斑点更加清晰,而且显色的条带增多。

5 薄层层析条件选择

用于黄酮类化合物薄层层析常用吸附剂是硅胶、聚酰胺。硅胶是一种极性吸附剂,一般用于弱极性的游离黄酮(黄酮苷);聚酰胺为氢键吸附,吸附能力与酚羟基多少、位置及氢键缔合力大小有关,鉴别黄酮类化合物适用范围广。葛明菊^[10]利用聚酰胺薄层层析分析大血藤黄酮类化合物组成,药用部

位嫩茎含有Rf值为0.88的斑点而在其他部位无此斑点,分析该斑点可能为药用成分。卢端萍等^[11]在硅胶G薄层板上以乙酸乙酯-甲酸-水(67:13:20)展开结果表明葫芦茶中含芦丁成分。黄酮苷类化合物极性大于游离黄酮,如与文献相比,王怀冲^[12]在硅胶G薄层板上鉴别贯叶连翘中黄酮苷类(金丝桃苷)的存在,以极性大的展开剂醋酸乙酯-丁酮-甲醇-水(5:3:1:1)展开得到了很好的分离效果。对于既有较强极性的化合物,又有较弱极性成分的混合样品中,可以采用二次或双向展开。所以鱼藤抽提液中的黄酮类化合物^[13]在硅胶HCMC薄板上用微量圆环技术快速而有效地找到了适合的展开剂,采用双向展开得到了8个斑点,即以氯仿-丙酮-醋酸溶剂在垂直方向展开,再用甲苯-氯仿-丙酮溶剂在水平方向展开。含有多极性成分的黄酮类化合物分离鉴别时可选用聚酰胺。刘嘉宝等^[14]将聚酰胺薄层板以醋酸乙酯-甲醇-甲酸-水(25:1:3:23)为展开剂,紫外分析仪下检视。供试液在以芦丁、槲皮素、黄芩苷各标准液的相应位置出现相同的颜色斑点,它们的比移值Rf分别为0.46、0.20和0.16。因而可作定性分析的依据,说明云南松花粉中主要含有黄酮类黄芩苷、黄酮醇类芦丁及槲皮素3种成分。其他用于黄酮化合物薄层层析的吸附剂有纤维素、氰基 硅胶等,纤维素用于分离极性成分,氰基 硅胶对于含不同极性成分或极性未知的黄酮化合物分离效果较佳^[15]。

6 实例-辟汉草中黄酮类化合物的薄层鉴别

6.1 提取 干燥辟汉草药材粉碎后称取5g,以乙醇40mL回流提取1h,冷后过滤。滤液蒸干后用50mL水混悬,用乙酸乙酯萃取3次,每次20mL,合并乙酸乙酯层,浓缩至约5mL,得乙酸乙酯萃取液。

6.2 薄层色谱 色谱条件经筛选,选定以下两种展开系统分别针对提取物中木樨草素和刺槐苷进行检视。

薄层板1:将乙酸乙酯萃取液、木樨草素对照液和乙酸乙酯萃取液+木樨草素对照液同时点样于硅胶G薄层板上,以展开剂I 环己烷-氯仿-丙酮-甲酸(8:8:5:0.1)展开,喷以1%AlCl₃乙醇溶液进行显色。

薄层板2:将乙酸乙酯萃取液、刺槐苷对照液和乙酸乙酯萃取液+刺槐苷对照液同时点样与硅胶G薄层板上,以展开剂II 乙酸乙酯-甲酸-水(8:1:1)展开,喷以1%AlCl₃乙醇溶液进行显色。

6.3 结果 薄层板1未显色前,在紫外灯(254nm,365nm)下观察,乙酸乙酯萃取液、木樨草素对照液和乙酸乙酯萃取液+木樨草素对照液均在Rf值约为0.45处显黄色斑点。显色后黄色斑点明显变亮。

薄层板2未显色前,在紫外灯(254nm,365nm)下观察,乙酸乙酯萃取液、刺槐苷对照液和乙酸乙酯萃取液+刺槐苷对照液均在Rf值约为0.55处显暗色斑点;显色后暗色斑点变为暗黄色根据以上结

果参照文献^[16,17]可判断可能辟汉草中含有木犀草素和刺槐苷两种物质。木犀草素和刺槐的结构见图2。

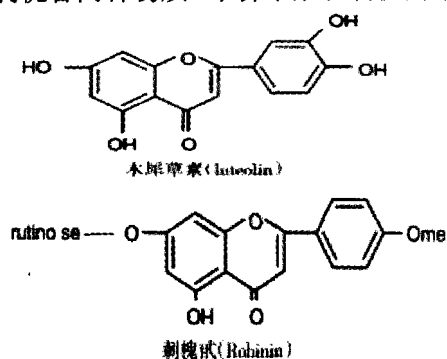


图2 木犀草素和刺槐的结构

6.4 结论 本实验利用 TLC 鉴别法确定辟汉草中含有木犀草素和刺槐苷两种物质,为今后辟汉草的物质药效学研究提供基础。此外,辟汉草中其它化学成分的研究还有一待进行。

7 展望

薄层色谱法在植物尤其是药用植物黄酮类化合物的研究中应用很广泛,由于天然黄酮化合物成分的复杂性,对薄层色谱法的要求也需不断创新和提高,诸如微乳液优于传统展开剂的性能,及生物自显影技术的应用,都是对传统薄层色谱法的提高和改进。因此在现代色谱技术的迅速发展,薄层色谱技术有很大的发展空间,如与其他色谱技术的联用、新型吸附剂及展开剂的发明都可以为薄层色谱法在天然提取化合物乃至合成化合物的应用中发挥更大的作用。而且黄酮类化合物是目前备受关注的天然活性产物之一。近年来,世界上掀起了植物药

开发的热潮,植物药以其天然低毒的特点倍受青睐,而黄酮类化合物更是以其广谱的药理作用引人瞩目。因此在现有的基础上,对黄酮类化合物应当进行更系统的研究。

参考文献

- [1] 杨红. 中药化学实用技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [2] 刘湘, 汪秋安. 天然产物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [3] Bent H, Havsteen. The biochemistry and medical significance of the flavonoids[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2002, 96: 67-202.
- [4] Pawlowska AM, Camangi F, Bader A. Flavonoids of Zizyphus jujuba L. and Zizyphus spina christi (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits[J]. Food Chem, 2009, 112: 858.
- [5] 卫星星. 苦麦籽壳中黄酮类化合物的定性定量研究[J]. 中草药, 2007, 20(4): 5.
- [6] 朱贵峰, 贺肇东, 王政峰, 等. 不同产地青钱柳的总黄酮含量比较[J]. 海峡药学, 2004, 16(3): 88.
- [7] 黄绍军, 黄秋玲, 黄路路, 等. 荔枝叶中黄酮甙元的分离提纯及其表征[J]. 广西林业科学, 2006, 35(3): 136.
- [8] 冯玛莉, 李培毅, 王岳. 沙棘黄酮的薄层色谱鉴别[J]. 沙棘, 2003, 16(3): 31.
- [9] 杨先国, 陈四保, 陈士林, 等. 玉竹中黄酮类成分的薄层色谱指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(2): 104.
- [10] 葛明菊, 金则新, 李钧敏, 等. 大血藤黄酮类化合物组成的初步研究[J]. 浙江林学院学报, 2002, 19(4): 382.
- [11] 卢端萍, 陈志桃, 王立兴, 等. 胡芦茶的质量研究[J]. 海峡药学, 2003, 15(5).
- [12] 王怀冲, 范国荣. 贯叶连翘提取物中金丝桃苷的分析鉴别与稳定性研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(12): 2544.
- [13] 陈欣安, 陆磊. 薄层色谱法分离鱼藤中异黄酮类化合物[J]. 林产化工通讯, 1995, 2: 25.
- [14] 刘嘉宝, 范国栋, 冯武. 云南松花粉中黄酮类成分研究初报[J]. 云南林业科技, 2001, 95(2): 67.
- [15] Ciesla, L. Hajnos, M. W. Two dimensional thin layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites[J]. J. Chromatogr. A, 2009, 1216, 1035.
- [16] 邢俊波, 李会军. 忍冬花蕾化学成分研究[J]. 中国新药志, 2002, 11(11): 8562869.
- [17] 宋永芳, 罗嘉梁, 解荷峰. 刺槐花的化学成分研究[J]. 林产化学与工业, 1992, (12): 30.

[收稿日期: 2011-11-27]

(林金校)

(上接 250 页)

标准“WS287-2008《细菌性和阿米巴性痢疾诊断标准》肛拭子标准采样法: 灭菌直肠棉拭子蘸湿无菌生理盐水, 由肛门插入直肠 3~5cm, 旋转 360°采集, 立即送检”的规定操作才能采到合格的样品。由本所 2008 年对副溶血性弧菌引起的食物中毒调查中显示: “在所有患者的大便中均检出副溶血性弧菌, 唯独两份肛拭子样品未检出副溶血性弧菌, 这应引起卫生医师的高度重视。探肛棉签的好坏、采样技术的掌握程度直接影响检测结果。近期从业人员的健康检查, 致病菌检出率极低, 很大程度上跟卫生医师采样有关”; 再则随着卫生知识的普及, 人群的健康意识的提高, 从业人员在患有肠道疾病期间如腹泻一般不参加体检, 也可能导致检出率降低。

柳州铁路活动性肺结核近几年发病率为十万分之 98.15~196.06^[1], 我单位检出率与流行趋势

差别不大, X 光机初筛, 要求体检医师有较高的诊断水平以及落后诊断仪器的及时更新有关, 同时人群健康意识的提高, 大部分从业人员了解到咳嗽等胸部不适症状期间进行从业人员体检不合格, 也有可能有意地避开肺结核活期体检的情况。

化脓或渗出性皮肤病检出率为 0, 说明此类影响公共卫生的状况极少或即使有少数的患者有可能有意地避开化脓或渗出性皮肤病期间进行体检。

总之, 柳铁地区从事食品、公共场所、学幼、饮水工作的人群健康状况良好, 在一定程度上避免病毒性肝炎、痢疾、伤寒、活动期肺结核、化脓性或渗出性皮肤病等传染性疾病以从业人员为传染源进行传播流行。

参考文献

- [1] 陆玉蛟. 副溶血性弧菌引起食物中毒调查[J]. 疾病监测与控制杂志, 2009, 5(4): 202.

[收稿日期: 2012-01-09]

(威威校)