



高效液相色谱在生物医药研究中的应用

前 言

中国科学院上海药物研究所张仁斌等编写的《高效液相色谱在医学研究中应用》一书曾受到广大色谱工作者的欢迎,该书出版后不久即销售一空,不少读者来信希望再版,出版社和有关作者认为与迅速发展的色谱学科相比,该书内容显得陈旧,再版意义不大。在色谱杂志编委的倡议和支持下,我们组织了中国科学院上海药物研究所及兰州化学物理研究所有关学科的科研人员,根据近

年来色谱在这方面的新进展和自身的实践经验,编写了“高效液相色谱在生物医药研究中的应用”系列讲座,在色谱杂志上刊登,供从事这方面工作的同志参考。由于高效液相色谱技术发展很快,我们在编写中难免有不足之处,欢迎读者提出宝贵意见和建议。

主持人 徐修容(中国科学院上海药物研究所)

1990年1月

第一讲 高效液相色谱在植物化学中的应用

李 平

(中国科学院兰州化学物理研究所,兰州,730000)

§ 1-1 概 述

植物化学主要是利用化学和物理方法研究植物中的化学成分,寻找具有开发价值的化合物或新化合物。经典植物化学分离方法大多基于各种化合物溶解度的不同而采用由低极性到极性不同溶剂分步提取,用溶剂结晶法进一步纯化。由于植物中化合物组成极其复杂,植物次生代谢产物的结构通常极为类似,并有较多的异构体存在,往往活性成分含量可少到ppm水平。在此复杂混合物中制备纯化活性化合物和含量低的成分都是非常困难的。随着柱色谱和薄层色谱的出现,植物化学分离和鉴定工作有了很大的进步。但是这些方法仍然存在着分离效率差和灵敏度低等问题。气相色谱虽然具有极高的分离效率和灵敏度,但对热不稳定成分或分子量较大的极性化合物容易使活性成分失活和分解,必须对低挥发性或不挥发性物质制成挥发性衍生物后

才能分析,这使分析操作烦琐,还会引起副反应和反应不完全。因此,植物化学研究工作中一直需要有一种分离效率高和适应性广的分离和鉴定方法。

六十年代Giddings把气相色谱理论成功地用于液相色谱,Horvath、Kirkland、Huber等人从实验上研制成功高效液相色谱(HPLC)仪。HPLC和其它分离方法相比具有柱效高、灵敏度高、分离速度快、适用范围广、重复性好和操作方便等优点。这一方法便很快在植物化学研究中得到了广泛的应用。近年来随着HPLC方法自身的发展和完善,它已经成为植物化学研究中不可缺少的主要分离方法之一。

§ 1-2 植物化学中HPLC方法分类

有关植物中化学成分的反HPLC研究,二十多年来已有大量报道。这些报道所采用的分离方法,主要有反相HPLC、正相HPLC、离子交换、凝

胶渗透、亲和色谱和疏水作用色谱等等。其中使用最多的为反相 HPLC，这一方面是由于其操作方便，仪器稳定性和重复性好以及价格便宜；另一方面是因为在经典植物化学分离中由于分离方法的限制，对极性组分的分离有一定的困难。在反相 HPLC 中由于采用了键合固定相以及甲醇、乙腈和水等极性溶剂体系，使得极性成分和在甲醇或乙腈中可以溶解的非极性和弱极性成分在反相 HPLC 中都能有很好的溶解度和分离效率，弥补了经典植物化学方法分离极性成分时的不足。另一种使用较多的是正相 HPLC，其与一般柱色谱一样是以硅胶或氧化铝为固定相，以非极性或弱极性溶剂为流动相，所以一般柱色谱的溶剂洗脱条件可以直接用于正相 HPLC。正相 HPLC 主要用于分离脂溶性或弱极性化合物。其它几种 HPLC 方法在植物化学中的使用较少。

若将 HPLC 在植物化学研究中的应用按样品处理量和工作目的划分时，它们可以被分为两大类：(1) 以分离和定性为目的的分析型 HPLC。所使用的色谱柱内径一般为 2.1—5mm，柱长 10—30cm，最大进样量小于 1mg，进样体积为 5 μ l 左右，流动相流速为 0.8—1.2ml/min。(2) 以制备收集纯化合物为目的的制备型 HPLC。根据制备量的大小又可以分为两种类型：一种是将分析型 HPLC 按比例放大，其色谱操作参数与分析型 HPLC 大致相同的半制备型 HPLC，所用色谱柱内径为 8—10mm，柱长 20—50cm，进样体积 0.2—2ml，流动相流速为 3—5ml/min，一次制备量在毫克数量级；另一种是专用制备型 HPLC，其色谱系统及操作参数与分析型 HPLC 有较大的差别，所用色谱柱内径在 10cm 以上，流动相流速在 5—50ml/min 左右，一次制备量可高达 1000g。以下按后一种分类方法分别介绍 HPLC 在植物化学研究中的应用及注意事项。

§ 1-3 分析型 HPLC

分析型 HPLC 现在主要用于代替薄层色谱来测定植物样品中化合物的种类和个数，对其中的活性成分进行定性和定量测定。对由一般柱色谱分段收集所得洗脱物进行分离比较，以便于对各相应洗脱物进行合并；对经各种分离方法提纯的样品进行纯度检查等等。一般对其要求是：色谱柱效高，检测灵敏度高，检测范围广和分析速度快。根据以上要求在选择仪器时要注意色谱柱、检测器和系统死体积的特点。

1. 色谱柱

现在已有几十种商品化的色谱柱可供选择。首先应该考虑色谱柱的柱效和选择性。只有它能使样品中所含化学成分得到完全分离，才可以用标准样品对被分离成分根据保留时间定性和根据峰高或峰面积进行定量。如果所选色谱柱柱效太低或选择性不好时，有时会得出错误的分析结果。图 1-1 是一个典型的例子，当用柱效 (N 代表理论板数) 较低的色谱柱分离大蔓长春花中 F-2 洗脱物时，只得到单一色谱峰，当用柱效较高的色谱柱时，从该洗脱物中分离出 7 个以上成分(1)，一般来说增加柱长可以增加柱效。但是几乎所有分析工作者都不希望通过增加柱长的方法来提高分离度，因为柱长每增加一倍，分离能力只能增加 50%，可是分析时间、溶剂消耗和色谱柱压却要增加一倍。一般认为

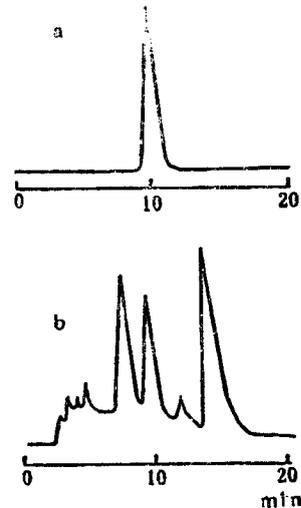


图 1 大蔓长春花收集洗脱物 F-2 的 HPLC 图
 色谱柱： μ -Bondapak C₁₈(300 \times 3.9mm I.D.)
 10 μ m；(a) N_苯=11800 块/米，(b) N_苯=40000 块/米。

流动相：0.02mol/L 磷酸缓冲液 (pH=6.8)；
 甲醇(30:70)；检测器：HP-1040M, 220nm。

每米 50000 块理论板数的柱子对分离比较适宜。当色谱柱效较高而选择性不好时，可以通过改变流动相来提高选择性，改善分离效果。例如在 HPLC 分析生物碱时，由于生物碱分子的存在形式随 pH 的改变而改变，它们的色谱行为在不同 pH 条件下也不同。吲哚生物碱长春胺 (Vincamine) 和 Δ^1 -Vincine 在反相柱上以甲醇和磷酸缓冲液为流动相，pH 2 时要使二者达基线分离需 60 分钟左右，pH 6.5 时只需 10 分钟(2)。如果由于样品中干扰组分

太多而使分离度不好时，可以采用其它方法对样品进行预处理。如在分析苦木中吲哚生物碱时，将生药的乙醇萃取液经中性氧化铝柱过滤后，可除去干扰成分改善分离效果(3)。另外影响柱效的其它因素还有进样量和进样体积，应使色谱柱在进样量和进样体积的线性范围内工作。

其次应该根据被分离样品的特点而选用合适的色谱柱。用HPLC分析含氮化合物时经常会碰到色谱峰拖尾这一问题，解决的办法是在流动相中加入二乙胺、三乙胺或采用缓冲液体系，但这都不能根本解决色谱峰对称性不好的问题；可是当在硅胶柱上采用反相流动相时，部分含氮化合物可得到很好分离且色谱峰对称性良好。图 1-2 为双分子吲哚生物碱长春酰胺在 ODS 和硅胶柱上的分离

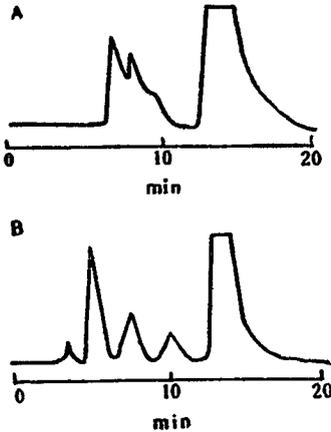


图1-2 长春酰胺及其分解产物的HPLC图
色谱柱：(a) μ -Bondapak C_{18} (300 \times 3.9mm I.D.)
10 μ m；(b)LiChrosphereSI-100(200 \times 5.0mm I.D.)
10 μ m。
流动相：0.02mol/L磷酸缓冲液(pH6.8)：甲醇
(a)30:70, (b)50:50, 检测器：HP-1040M, 220nm。

情况(4)。在分析型HPLC中，有许多专用色谱柱可供选择，用来解决特殊的分离问题。HPLC中，大多采用硅胶基质的色谱柱，硅胶基质在pH较高或较低时会被破坏，所以使用这类色谱柱时，流动相pH一般都控制在2—8范围内。当样品需要在较高或较低pH范围内分离时，可以选用大孔高分子聚合填料柱，植物样品中的糖分析则可采用氨基键合柱或阳离子交换树脂柱。在分析型HPLC中，一般的分析时间需要几到几十分钟，为了缩短时间，发展起了小颗粒填料的快速柱。现在常用快速柱的柱长为2—10cm和填料粒径2—3 μ m。一般来

说使用3 μ m粒径填料快速柱分析药物时，可使分析时间比用常规柱缩短70—80%左右，而且可以保证应有的分离度。为了减少样品和溶剂的消耗量，特别是为了适应与其它分析仪器联用技术的发展，从70年代后期细内径(0.5—2.2mm)柱得到了广泛的采用。中国科学院上海药物研究所和大连化学物理研究所曾成功地研制了内径只有1mm的色谱柱以及与此柱配套使用的HPLC仪器。

2. 检测器

在分析型HPLC中，应该选择灵敏度高和检测范围广的检测器。目前所用的检测器大多是专用的，如现在市售的HPLC多数配有的紫外-可见、荧光和电化学检测器，它们只限于检测那些有紫外吸收和具有显荧光特性和电化学活性的化合物。只有示差折光检测器属通用型的，但其灵敏度差、易受温度变化的影响，用梯度洗脱时检测有困难。在植物样品的实际分析工作中，为了保证样品中所有成分都能被检测出来，首先应使所用检测器的检测信号稳定且灵敏度高，这样才能使含量低的成分被检测。其次最好将几种检测器联合起来使用，比较示差折光检测器和其它检测器的检测结果，这样才能保证各类化合物都有检测信号而不被漏检。

目前HPLC检测器的发展趋势是发展可与HPLC在线联用的光谱检测器，如紫外光谱、傅立叶红外光谱、质谱、核磁共振谱检测器。1975年Garden首次报道用光电二极管阵列检测器(PAD)在HPLC中的应用(5)，1980年惠普公司将二极管阵列分光光度计发展成为商品化的HPLC检测器(6)，从而实现了理想的HPLC-紫外光谱联用。用PAD可以在色谱分离的同时对各成分进行同步紫外光谱扫描，得到精度大约为2nm左右的紫外光谱。现在可与HPLC联用的质谱检测器虽然还不能完全令人满意，但是市场上已有Thermochem, Transport, Thermospray, Plasmaspray等几种接口形式的质谱检测器销售，在医学和药物方面也有大量的应用报告。这种和HPLC联用的质谱检测器可以在色谱分离的同时给出各成分的质谱图，提供大量的化合物精细结构信息。虽然现在还没有适用于HPLC联用的商品化傅立叶红外和核磁共振检测器生产，但是HPLC和这两种检测器联用方面的工作已有报道(7)，据预测很快就会有商品化的仪器生产(8)。由于这些联用光谱检测器一般都配有容量较大的计算机和光谱数据库，可以利用这些光谱数据库对被分离成分进行光谱检索而确定其

结构。这为植物化学中化合物的结构鉴定展现了更加美好的前景。

多年来 HPLC 中化合物的定性都是根据被分离样品中所含化学成分是否与标准样品有相同的保留时间来判断。我们知道用这一方法定性时可以通过变换色谱柱和改变流动相条件进行分离来提高定性的准确性,但实践证明有时仍然会造成误判。随着可与 HPLC 联用的光谱检测器的发展, HPLC 定性的准确性有了很大的提高。此时除了可以根据被分离成分是否与标准样品有相同的保留时间外,还可以根据是否有相同的光谱来判断。另外光谱检测器的应用在判断色谱峰的纯度时是非常有效的。用常规检测器检测时,一般是观察色谱的形状以及用不同波长信号的比率来判断色谱峰的纯度。现在则可以对每一色谱峰的不同部位进行光谱扫描,当一个色谱的不同部位光谱完全相同时表明该色谱峰为单一成分,否则有多个成分存在。从图 1-3 可以看出,色谱峰前、峰顶同峰尾紫外光谱不能完全重叠,表明峰尾仍有杂质组分存在(1)。光谱检测器的应用

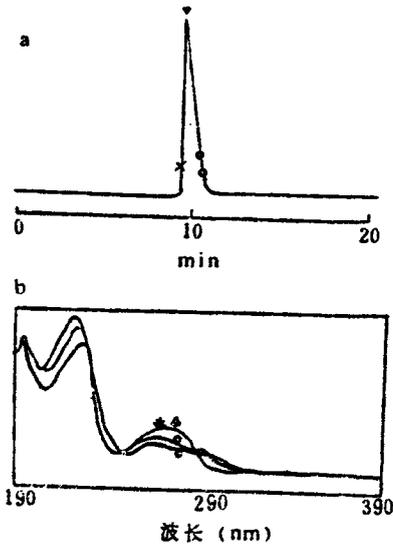


图1-3 长春胺样品的色谱与紫外光谱图 (a)色谱图, (b)色谱峰前(*)、峰顶(Δ)和峰尾(0,0)部位的紫外光谱图

也可以使人们在色谱分离的同时得到大量化合物的结构信息,可以依次将被分离样品中的成分分类,从而根据已有的资料和信息有目的地收集被分离成分,指导制备纯化和结构鉴定,这样做有利于发现新化合物和活性化合物。

3. 仪器系统死体积

在分析型 HPLC 中,要保证得到好的分离度

和高的检测灵敏度还有一个需要注意的问题就是减小色谱仪器系统的死体积,也就是使进样器、检测池、连结管道,特别是柱后连接管道的体积尽可能小,以便于减小色谱峰的扩散。

§ 1-4 制备型HPLC

制备型HPLC 是以分离和制备纯物质为目的,用 BPLC 代替普通柱色谱和制备薄层色谱,对复杂混合物进行分离并收集单一的纯化合物,作为色谱标准样品或进一步结构鉴定用样品,或作为合成的中间原料等等。制备 HPLC 技术过去不为大家所熟悉,近几年才在植物化学研究方面得到了广泛的应用,这可能和以下几个因素有关:

(1) 化合物结构鉴定仪器的发展 随着高分辨质谱、傅立叶红外、超导核磁、计算机检索等结构鉴定仪器和方法的发展,结构鉴定所需样品量越来越少,过去要几百毫克样品才能解决的结构问题,现在只要几个毫克就可解决。由制备型HPLC 方法得到毫克数量级的样品是非常容易的。

(2) 植物化学研究的发展趋势 植物化学经过多年的研究,各种植物中含量较高的易分离成分大多已被分离和研究,而含量较低的成分由于分离方法的限制而不易获得。事实上从这些含量较低的成分中发现新化合物和活性化合物的可能性是大的。制备 HPLC 方法则非常适合于分离纯化含量较低的成分。

(3) 极性及水溶性成分的制备 从中草药治疗疾病中可知,病人服用的草药大多经水煎后服用,因此水溶性部位中应含有主要活性成分。制备 HPLC 在分离纯化水溶性成分时有很大的优势。

(4) 制备型HPLC 仪器价格的下降和普及 在制备型 HPLC 工作中,由于进样量较大,所以检测器的灵敏度和系统死体积就相应地变得不重要了。选择仪器时主要考虑的因素有:色谱柱效、柱容量和分离时间等。

1. 半制备HPLC

人们总是希望能在尽可能小的努力下,用最短的时间得到较多的纯样品,所以必须选用高柱效、高柱容量的色谱柱,而且应使色谱在过饱和和状态下工作。通常把理论塔板数下降10%时的柱容量定为饱和容量。柱子的过饱和和有两种方式,一个是质量过饱和,另一个是体积过饱和。当样品在流动相中的溶解度较大时应采用质量过饱和,当样品在流动相中溶解度较小时应采用体积过饱和。Wehrli(9)和Barford(10)研究了半制备型HPLC 的柱容量和

分离度的关系，从理论上计算了最佳进样体积和进样浓度。Lurie(11)等研究了根据分析型 HPLC 的数据利用计算机进行优化，计算半制备型 HPLC 分离时的最佳进样量和进样体积。另外必须注意，柱子是否过饱和，这同所采用的冲洗方式有关，当利用等比方式冲洗时柱容量较小，用梯度方式冲洗时则可极大地提高柱容量。Baker(12)等在胆甾烯基苯基乙酸酯的制备型 HPLC 分离中发现，利用等比洗脱时 200mg 左右的样品就会出现严重的分离度下降，而利用梯度洗脱时分离提纯 1g 样品的分离度也不见下降。为了增加制备所得的物质质量，在柱子严重过饱和情况下可以采用循环分离技术而使成分得到充分纯化。循环技术就是把从柱子流出的洗脱物再次送入色谱柱中进行分离的方法，其中有单柱循环和双柱循环两种方法。纪晓多(13)曾在硅胶柱上利用单柱循环方法经 11 次循环把细辛脑 (asarone) 异构体完全分离。也可以采用柱切换技术，就是把在第一根柱上部分分离的成分通过切换开关送入第二根色谱柱系统后进一步分离。这时可以清洗和平衡第一根色谱柱。这一技术可以得到纯度较高的样品，每次制备量也较大，可以节约时间。Little(14)曾用这一技术分离制备了增甜剂一卡哈苾苷。

2. 专用制备型 HPLC

对于大规模的专用制备型 HPLC，由于经济效益是最终目的，有时要用牺牲分离度来提高产量而争取最佳经济效益。所以，在分离中，要同时考虑产量、纯度和效益三个因素。由于此时色谱柱的分离度往往不是决定性因素，所以从降低设备造价考虑，没有必要采用 5 μ m 或 10 μ m 的小颗粒填料，而可以采用 20 μ m 的填料，同时没有必要使色谱仪在最佳线速度下工作。

在制备型 HPLC 分离植物化学样品的过程中，若要使色谱系统能够正常运转，需要特别注意以下几个问题：

(1) 应该尽量使用流动相来溶解样品，或能够保证样品在分离系统中不产生沉淀。因为植物萃取液中含有大量叶绿素等杂质成分，有时被分离成分处于饱和状态，如果流动相和溶解样品的溶剂不同时，样品在柱中和流动相相遇后，由于样品溶解度

的改变可能产生沉淀，从而造成柱子的污染和堵塞。

(2) 如果采用体积过饱和进样时，为了不使色谱柱的平衡发生很大变化，应保证样品溶液的 pH 值同流动相的相同，以及样品溶液中的强洗脱剂浓度应比流动相中的低。

(3) 由于制备型色谱柱的价格昂贵，使用时一定要采用保护柱，并注意经常清洗和更换保护柱内的固定相，以保证制备柱不受污染而保持高柱效。

(4) 保证色谱系统在规定的压力、温度、pH 值和溶剂等条件下工作。

以上介绍了植物化学研究中应用 HPLC 方法时所要考虑和注意的问题。介绍了 HPLC 新技术的发展对植物化学研究方法的改进和提高。仅供植物化学研究工作者参考。

参 考 文 献

- (1) 李平、张仁斌、俞惟乐、周韵丽，生物医学液相色谱报告会文集，P.166,1988.
- (2) 李平、张仁斌、俞惟乐、周韵丽，药学报，24(3),212(1989).
- (3) 罗文毓、章育中，药物分析，5(1),11(1985).
- (4) 李平、俞惟乐，分析测试通报，待发表。
- (5) J.S. Garden, Pittsburgh Conf. Anal. Chem. Appl. Spectrosc., 26th Cleveland, Ohio, March 1975, Abstr. No. 434.
- (6) B. G. Willis, Hewlett-Packard UV/VIS Application Note AN 295-5, February 1980.
- (7) P.R. Giffiths et al., Anal. Chem., 58,1349A (1986).
- (8) D. A. Laude et al., Trends Anal. Chem., 5(9),230(1986).
- (9) A. Wehrli et al., J. Chromatogr., 125, 59 (1976).
- (10) R.A. Barford et al., J. Chromatogr., 185, 393 (1979).
- (11) I.S. Lurie et al., J. Chromatogr., 317,427 (1984).
- (12) D.R. Baker et al., J. Chromatogr., 83,233 (1973).
- (13) 纪晓多，色谱，4,353(1986).
- (14) J.C. Little, O. Stanel, J. Chromatogr., 316,105 (1984).

(收稿日期：1989年7月15日)

请向《色谱》编辑部购买《第七次全国色谱学术报告会文集》。每套上、下册共18元，个人购买六折优惠，每套10元。请从邮局汇款，写明汇款人邮政编码及详细地址。