

常见天然类黄酮色素的分离纯化及应用实例

类黄酮色素的应用开发现状

许多的天然类黄酮色素都是对人体有益的天然活性成分,具有抗氧化、预防心血管疾病、防癌、抗炎等多种生理功效,特别在医药方面,有良好的应用和开发前景。

色素类黄酮化合物广泛分布于植物界,几乎绝大多数植物都能合成黄酮类。近年来,人们对类黄酮化合物的抗氧化功能和机理进行了比较深入的研究,证实该类化合物是一种很强的活性氧自由基清除剂。迄今已发现了 2000 多种黄酮类化合物,它们多数以甙的形式存在,少数以游离形式存在。黄酮类化合物泛指具有 C₆-C₃-C₆ 基本骨架的化合物,包括黄酮、黄酮醇、异黄酮、查尔酮及它们的二氢衍生物和黄烷醇等。主要有本犀草素、芦丁、橘皮色素、红花黄色素、原花青素等。

类黄酮色素的分离纯化方法

天然黄酮类色素多有酚羟基取代,因此是极性较强的化合物。按照相似相溶原理,可溶于极性化合物,所以对天然黄酮类色素的提取一般用甲醇、乙醇、丙酮水溶液等极性溶剂。对于花色素类用酸性极性溶剂提取,以保持它的稳定性。

柱层析是分离纯化天然黄酮类化合物的一种主要工具。以前的研究中通常用聚酰胺、硅胶、氧化铝等做填充料,由于这些材料吸附量大,前处理烦琐,回收率低等缺点,现极少应用。对于酚类化合物的分离纯化现阶段普遍使用的填充料是交联葡聚糖凝胶。

LH-20(SePhadexLH-20)分离黄酮类色素特性如下:

交联葡聚糖凝胶是一种高度交联的葡聚糖,在它上面可以根据分子筛效应将物质,以分子大小递减的次序洗脱得以分离。其中羟基丙醇葡聚糖凝胶(即 SePhadexLH-20)是通过葡聚糖与甘油聚合,在分离花色素、黄酮类化合物得到了成功的应用。

Sephadex LH-20 是羟基丙醇葡聚糖凝胶,适用于纯化一些植物次生代谢产物,不但具有分子筛效应,还可以在极性与非极性溶剂组成的系统中起反相层析的作用,所以,它结

合了凝胶、分配色谱、吸附层析于一身，能分离结构相近的分子。Sephadex LH-20 有较强的吸附能力和分辨能力，以水-乙醇为流动相进行梯度洗脱，反复分离，可以对花色素、多聚体花色素进行比较单一的分。

用 Sephadex LH-20 分离黄酮类化合物的机理是：分离黄酮苷元时，主要是吸附起作用，分离次序取决于游离酚羟基的数目；分离黄酮苷时，分子筛起作用，相对分子质量的大小或含糖的多少决定化合物被分离的次序。黄酮苷元游离酚羟基越多，越难以洗脱，相对分子量越大，苷元上连接的糖越多，越容易洗脱。

在前处理上，Sephadex LH-20 可以用有机溶剂溶胀而不影响它的溶胀度，在分离样品时改变洗脱的极性。当分离结束后，再用大量水-丙酮(1:1)冲洗，可以吸附再生后重复使用，分离效果保持十几年不变。

北京慧德易科技有限责任公司是 GE HealthCare Sephadex LH-20 填料的中国区的独家代理，因此具有较为突出的性价比，同时提供相应成熟的技术服务。

类黄酮色素的应用实例

实例 1 原花色素的提取、分离

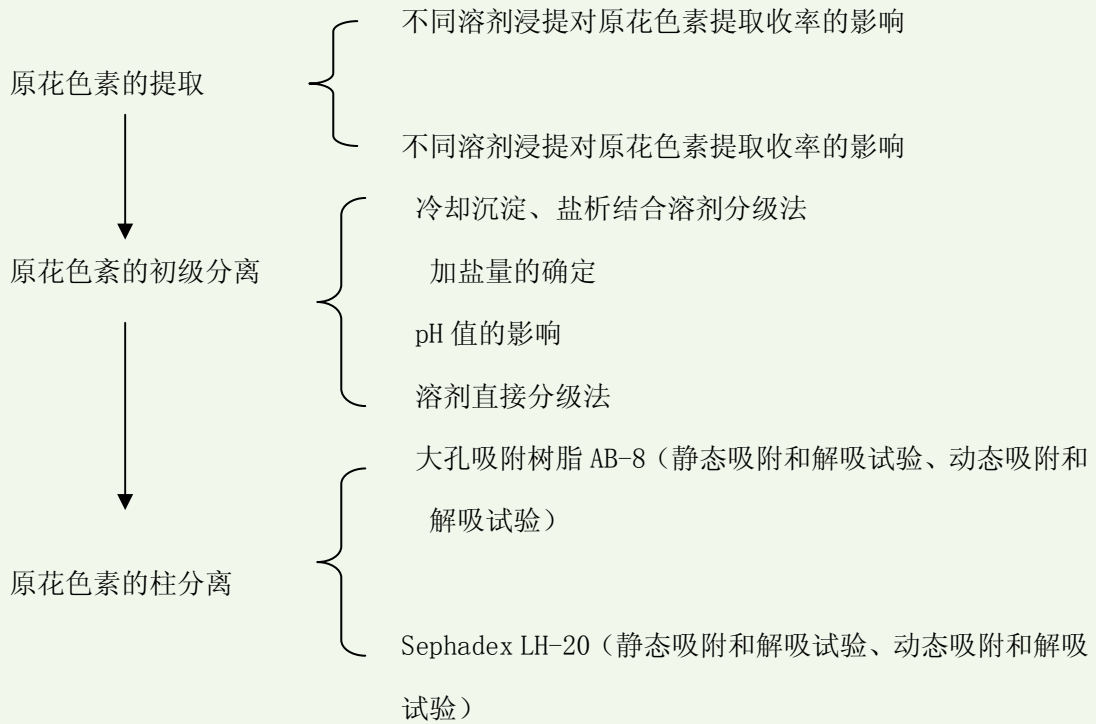
(摘自郑州大学硕士学位论文《葡萄籽中原花色素的提取，分离与抗氧化性研究》作者 时国庆)

概述

原花色素又叫原花青素，原花青定，为多羟基酚类化合物，衍生于黄烷类化合物，分子骨架为 C₆C₃C₆，属生物类黄酮，是植物生长过程中的次生代谢产物。按照分子量大小，原花色素又可分为黄烷醇单体及聚合体。

近年来，随着研究的深入在医药、食品、化妆品等附加值较高的领域原花色素制品有广泛应用。特别在医药方面，例如，原花色素具有防治胃溃疡的生理功能，这是因为原花青素的低聚物具有清除自由基的抗氧化活性，可使胃壁不受自由基引起的伤害，同时原花青素可与蛋白质紧密结合而具有保护胃壁的功效。它不仅可用作食用脂肪、油、化妆品的抗氧化剂，而且在抗变异原性、抑制动脉硬化、胃溃疡、大肠癌、白内障及糖尿病并发症等也有疗效。在其广泛的应用中，最引人关注的是它可以抗菌消炎、治疗心血管疾病等。

实验流程图



实验过程及实验结果

主要讲解柱层析填料 AB-8 和 sephadex LH-20 分别进行静态吸附和解吸试验、动态吸附和解吸试验。

1、静态吸附实验

静态吸附试验可了解填料对原花色素的吸附能力和吸附速率。取经预处理的 AB-8 与 Sephadex LH-20 进行静态吸附试验，结果见图 1.1 与表 1.1

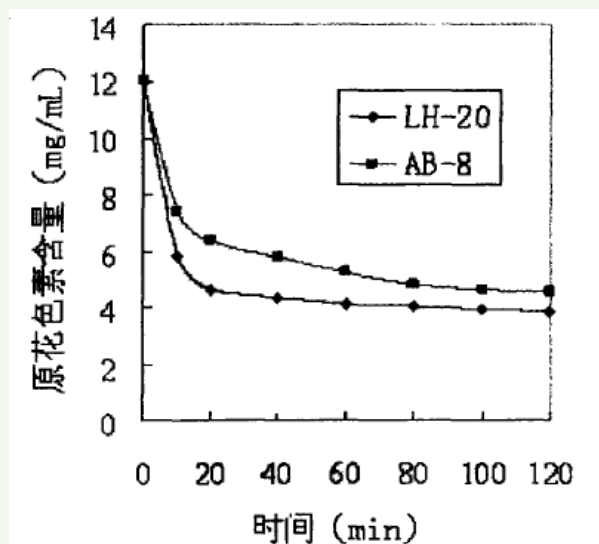


图 1.1 水溶液中原花色素含量随吸附时间的变化

表 1.1 水溶液中原花色素含量随吸附时间的变化

时间 (min)	10	20	40	60	80	100	120
原花色素 (mg/ml) LH-20	5.87	4.67	4.36	4.14	4.04	3.95	3.91
原花色素 (mg/ml) AB-8	7.42	6.38	5.78	5.24	4.85	4.64	4.62

图 6.1 与表 6.1 表明:两种固定相对原花色素均具有较强的吸附能力, 在 1 小时内均快速吸附水溶液中的原花色素, 1 小时后基本达到吸附平衡, 其中 LH-20 无论吸附量还是吸附速率均优于 AB-8。

2、静态解吸实验

静态解吸试验可了解填料在洗脱剂的作用下, 与原花色素分离的情况。取经过吸附平衡的 AB-8 与 Sephadex LH-20 进行静态解吸试验, 结果见表 1.2。

表 1.2 静态解吸试验

洗脱剂	20%乙醇	40%乙醇	60%乙醇	80%乙醇	100%乙醇	50%丙酮
LH-20	吸附量 (mg)	404.5	404.5	404.5	404.5	404.5
	洗脱液中原花色素含量 (mg)	12.7	60.9	213.6	365.5	151.8
	洗脱率 (%)	3.1	15.1	52.8	90.4	37.5
AB-8	吸附量 (mg)	369.0	369.0	369.0	369.0	369.0
	洗脱液中原花色素含量 (mg)	200.0	307.3	350.9	364.5	330.0
	洗脱率 (%)	54.2	83.3	95.1	98.8	89.4

表 1.2 表明 80%乙醇和 50%丙酮的解吸能力较强。

3、动态吸附实验

将处理好的 AB-8 湿法装柱, 进行动态吸附试验以确定最佳上样和洗脱速率。结果见图 1.2 由于 Sephadex LH-20 对原花色素的吸附能力较强, 分子间空隙较小, 在重力作用下, 洗脱液的流速很慢, 没有对其进行动态吸附试验。

图 1.2 表明较低的流速有利于充分吸附，但太低的流速不利于生产，因此本试验选取 1.5ml/min 作为上样和洗脱速率。

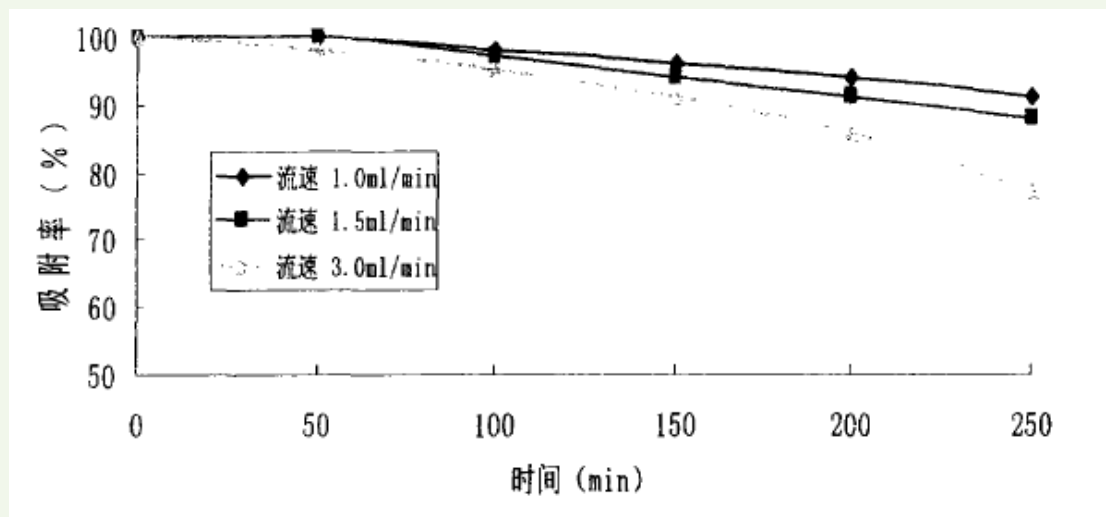


图 1.2 AB-8 对原花色素的动态吸附曲线

4、动态洗脱实验

将处理好的 AB-8 和 Sephadex LH-20 湿法装柱，分别加入 10ml 和 0.5ml 浓度为 507mg/ml 的低聚原花色素浓缩液。用不同洗脱液洗脱，测洗脱液中原花色素的量，结果见表 1.3 和表 1.4。

表 1.3 Sephadex LH-20 动态洗脱结果

洗脱液	蒸馏水	20%乙醇	40%乙醇	60%乙醇	80%乙醇	100%乙醇	50%丙酮
原花色素的量(mg)	0.5	3.0	4.1	108.2	106.8	17.9	7.4

Sephadex LH-20 动态洗脱时，60%和 80%的乙醇洗脱所得洗脱液原花色素的量最高，据有关文献报道 60%–80%乙醇洗脱液的分子量分布在 300–1000。因此产品 3 可能主要为原花色素二聚体和三聚体的混合物。Sephadex LH-20 法分离原花色素的获得率为 97.8%，但耗时极长，为 7–8 天。

表 1.4 AB-8 动态洗脱结果

洗脱液	蒸馏水	20%乙醇	40%乙醇	60%乙醇	80%乙醇	100%乙醇	50%丙酮
原花色素的量(mg)	0	0	0	2806	1328	0	0

AB-8 动态洗脱时，原花色素全部被 60%和 80%乙醇洗脱下来，这表明 AB-8 对不同聚合度和结构的原花色素吸附和解吸的选择性不是很好。原花色素的获得率为 81.5%，一部分原花色素不能被洗脱(可能是流速较快的缘故)。洗脱液中 60%洗脱液第 8, 9 两试管原花色素含量最高，这说明原花色素的洗脱高峰相对比较集中，动态条件下，只用很少量的洗脱剂就可使 AB-8 上吸附的原花色素解吸。选取 60%洗脱液中的第 5 管和 80%洗脱液中的第 3 管上入 sephadexLH-20，分别能被 60%和 100%乙醇液洗脱。这说明只要层析柱足够长，由于不同分子量和结构的原花色素在 AB-8 大孔吸附树脂上的洗脱顺序不一样，AB-8 亦有可能将原花色素分离。

实验结论

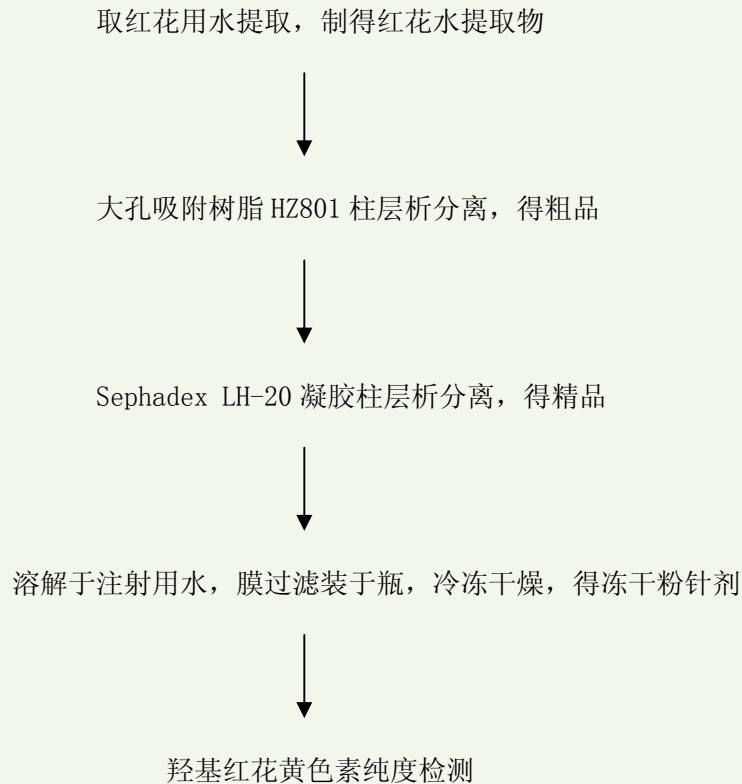
- 1、Sephadex LH-20 和 AB-8 对原花色素均具有较强的吸附能力，在 1 小时内均快速吸附水溶液中的原花色素，1 小时后基本达到吸附平衡，其中 LH 一加无论吸附量还是吸附速率均优于 AB-8。
- 2、较低的流速有利于原花色素的充分吸附和解吸，但太低的流速不利于生产，对于本试验所用 AB-8 大孔吸附树脂层析柱，1.5ml/min 的上样和洗脱速率是较适宜的。
- 3、SephadexLH-20 动态洗脱时，60%和 80%的乙醇洗脱所得洗脱液原花色素的量最高，据有关文献报道 60%-80%乙醇洗脱液的分子量分布在 300-1000。因此产品 3 可能主要为原花色素二聚体和三聚体的混合物。
- 4、AB-8 对不同聚合度和结构的原花色素吸附和解吸的选择性不是很好。

实例 2 红花黄色素分离纯化

概述

红花为菊科植物红花的干燥花。具有活血通经、祛瘀止痛的功效，是传统的活血化瘀类中药。红花黄色素是从红花中提取的有效成分，是含有多种有效成分的水溶性混合物。具有扩冠、降压、抗血栓、耐缺氧，免疫抑制等多种药理学功效，有良好的开发和应用前景。特别在心脑血管方面，有着广泛的应用。

生产流程图



实验结果

红花黄色素精品纯度为 75%-95%，以其中所含的有效成分羟基红花黄色素 A 量计算。

学习园地

Sephadex LH-20 填料应该怎样装柱

制备凝胶悬浮液

装填的重要原则之一就是需要形成一个稳定均一的柱床。胶颗粒越均一（粒径分布越窄），越容易获得稳定均一的柱床。但是对于 Sephadex LH-20 而言，25~100 μm 的粒径范围相对于许多用于制备色谱的填料而言，不能说分布均一，也就是说其粒径分布较宽。然而

当胶溶胀后就相对容易得到均一的柱床。这对于长柱（最高至 250cm）而言也是同样的。在装柱前，层析柱和储槽都必须进行彻底的清洗。

Sephadex LH-20 在使用之前必须进行溶胀。在溶胀的过程中，要尽量避免过分搅拌，否则会破坏球形胶粒，且要避免使用磁力搅拌器。

1. 在室温下，将凝胶溶胀于层析溶剂中至少三小时，溶胀后胶体积的大小决定于所使用的溶剂系统，请参考后页之干胶溶胀表计算特定柱体积所需要干胶的量。
2. 使溶胀胶体积沉淀之后占总体积的 75%，上层溶剂占 25%，这时，悬浮液从一个容器倒入另一容器时胶粒可移动。
3. 将溶胀后的凝胶根据装柱要求均匀倒入柱内，在保证胶粒不变形的前提下，应在尽可能高的压力下装柱，反压不要超过 1.5ba。

平衡

上样前，用洗脱液平衡层析柱至少两个柱体积直到基线变得平稳为止，如改变溶剂应该注意凝胶在新溶剂中的溶胀性质，并根据性质确定柱高调节器的位置，如使用相同的溶剂，在以后的层析中柱平衡可以省略。

洗脱液

为确保延长层析柱的使用寿命，所有的缓冲液都应该离心或经过 0.45um 的膜过滤以除去杂质。

样品

样品体积应该占柱总体积的 1-2%，同样在使用之前样品应该离心或经过 0.45um 的膜过滤。

洗脱

洗脱流速应根据情况而定，最大线性流速约 12cm/min（反压 1.5ba），建议流速为 1-10cm/h。总体来说，较低的流速，具有较高的分辨率。

再生

凝胶再生通常是先用 2-3 个柱体积的洗脱液进行清洗，如更换洗脱液，则需要重新平衡。

溶胀体积

由于 Sephadex LH-20 的溶胀体积依赖于溶剂，所以对于不同直径的柱可根据比例增加

或减少旧柱体积以便计算出新体积。

$$\text{新体积} = \text{旧体积} \times (\text{新柱体积} / \text{旧柱体积})$$

胶的性质

Sephadex LH-20 同时具备亲水和亲脂双重性质，且被分离物质的极性在分离过程中起着重要作用。

排阻极限	4-5KD (与所用溶剂有关)
上样量	
吸附模式	取决于所需分辨率
分子量大小	小于总体积的 20%
正相分配	小于总体积的 1%
胶粒形状	球形，多孔
颗粒大小 (干)	18-111um (直径)
颗粒大小中间值 (干)	70um (直径)
颗粒大小 (甲醇)	27-163 um (直径)
颗粒大小中间值 (甲醇)	103 um (直径)
最大线性流速	720cm/min
参考线性流速	60 cm/min
pH 的稳定性	
操作中	2-11
清洗中	2-13
化学稳定性	在许多水溶液及有机溶剂系统中都稳定。在 pH2 以下或强氧化剂中不稳定
高压灭菌	121℃可忍受 20 分钟
操作温度	4℃到 40℃
保存条件	
新填料	4-25℃ (干燥)

使用后填料

4-8℃, pH6-8, 切勿冷冻, 加入抑菌剂(如 20%乙醇, 0.04%叠氮钠)

干胶溶胀表

溶剂	床体积 (mL 凝胶/g 干胶粉末)
Dimethyl sulphoxide 二甲亚砜	4.4~4.6
Pyridine 吡啶	4.2~4.4
Water 水	4.0~4.4
Dimethylformamide 二甲基甲酰胺	3.8~4.2
Saline 生理盐水	3.9~4.1
Methanol 甲醇	3.8~4.1
Methane dichloride 二氯乙烷	3.8~4.1
Chloroform ¹ 氯仿	3.8~4.1
Propanol 丙醇	3.7~4.0
Ethanol ² 乙醇	3.6~3.9
Isobutanol 异丁醇	3.6~3.9
Formamide 甲酰胺	3.6~3.9
Methylene dichloride 二氯甲烷	3.6~3.9
Butanol 丁醇	3.5~3.8
Isopropanol 异丙醇	3.3~3.6
Tetrahydrofuran 四氢呋喃	3.3~3.6
Dioxane 二氧杂环己烷	3.2~3.5
Acetone 丙酮	2.4~2.6
Acetonitrile ³ 乙腈	2.2~2.4
Carbon tetrachloride 四氯化碳	1.8~2.2
Benzene 苯	1.6~2.0
Ethyl acetate 乙酸乙酯	1.6~1.8
Toluene 甲苯	1.5~1.6

1. 包含 1% 的乙醇 2. 包含 1% 的苯 3. 溶胀胶体积小于 2.5mL/g 的溶剂没有使用价值

保值期 8 年

供货方式 干粉

北京总公司:

地址: 北京回龙观西大街龙冠大厦 719 室

邮编: 102208

热线: (10)-51528296, 51528297, 51528298,

传真: (10)-51528299

邮箱: sales@prep-hplc.com

网站: www.prep-hplc.com

上海办事处:

地址: 上海张江益丰路 55 弄春港丽园 67 号 201 室

邮编: 201203

电话: 021-58950178

传真: 021-58950178