

• 综 述 •

液液分配色谱及其与液相色谱联用分离天然花色苷的研究进展

孙恒勉, 鲍虹蕾, 童胜强*

浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014

摘 要: 液液分配色谱 (liquid-liquid partition chromatography, LLC) 是一种连续高效的分配色谱技术, 如今已广泛应用于天然产物领域。天然花色苷是一种黄酮类天然色素, 具有多种生理活性。花色苷极不稳定, LLC 因其具有操作条件温和、可避免样品不可逆吸附等特点目前已广泛应用于天然花色苷的制备性分离。综述了 2010—2019 年 LLC 及其与液相色谱联用 (liquid-liquid partition chromatography-liquid chromatography, LLC-LC) 分离纯化天然花色苷的研究进展。

关键词: 液液分配色谱; 液液分配色谱-液相色谱联用; 花色苷; 分离纯化; 二维色谱

中图分类号: R284.13 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)22-5856-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.22.024

Research progress on separation of natural anthocyanin by liquid-liquid partition chromatography and combination with liquid chromatography

SUN Heng-mian, BAO Hong-lei, TONG Sheng-qiang

College of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract: Liquid-liquid partition chromatography (LLC) is a continuous and efficient chromatography technique now widely used in the field of natural products. Natural anthocyanin is a flavonoid natural pigment with many physiological activities. Anthocyanin is very unstable and LLC has been widely used in the separation of natural anthocyanin because of its mild operating conditions and the avoidance of irreversible adsorption of samples. The research progress on separation of natural anthocyanin by LLC and combination with liquid chromatography from 2010 to 2019 is reviewed in this paper.

Key words: LLC; LLC-LC; anthocyanin; purification; two-dimensional chromatography

天然花色苷为植物中分布最广的黄酮类色素群之一, 是树叶、蔬菜、水果和花朵呈现红、蓝、紫和黑等颜色的原因, 其较人工合成色素具有安全性高、资源可再生、色彩自然艳丽和来源丰富等优势, 在食品、化妆品和药品行业中已逐渐得到应用。除了作为天然色素的运用, 花色苷还具有抗氧化活性等生物学功能^[1]。大量研究表明花色苷有一定的生物活性, 如调节糖脂代谢^[2]、改善大脑功能^[3]、预防心血管疾病^[4]等。

为了方便对不同来源的天然花色苷进行定性和定量分析, 需要大量制备分离得到高纯度花色苷标准品, 但花色苷结构中的黄酮类阳离子显著增加了

化学合成的难度。因此, 从植物中提取分离花色苷成为获得单体花色苷的主要途径。天然花色苷常以混合物形式存在。由于单体花色苷难以获取, 目前对植物花色苷生理活性的研究大多以植物中提取的总花色苷为基础。目前自然界中已发现的天然花色苷超过 500 种, 究竟是哪一种花色苷发挥了生物活性不得而知^[5]。

若要进一步探索不同单体花色苷的生物活性, 更高效的分离手段需要应用于分离纯化天然花色苷化合物。液液分配色谱 (liquid-liquid partition chromatography, LLC) 已广泛的应用于天然产物中, 具有条件温和、不破坏目标化合物等优点, 但极性

收稿日期: 2020-03-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21978266)

作者简介: 孙恒勉, 女, 在读硕士, 研究方向为药物分析。E-mail: sheryltahiti@163.com

*通信作者 童胜强, 教授, 博士, 主要研究方向为逆流色谱技术原理与应用、天然产物和合成产物以及手性药物等的分离纯化。

Tel: (0571)88320984 E-mail: sqtong@zjut.edu.cn

相似的两种或多种组分在色谱中常发生重叠而难以分离。液液分配色谱-液相色谱联用 (liquid-liquid partition chromatography-liquid chromatography, LLC-LC) 可以有效规避上述单一色谱技术分离花色苷的劣势, 近年来逐渐应用于分离天然花色苷。

1 天然花色苷的化学结构

天然花色苷是植物次代谢产生的类黄酮化合物, 属于超级抗氧化剂酚类或多酚类家族中的重要一员^[6], 它视为植物中最最重要的水溶性色素群, 其基础结构是花色苷元, 即花青素, 如图 1 所示。已报道的花青素有 23 种, 其中自然界中最常见的主要有矢车菊素、飞燕草素、矮牵牛素、芍药素、天竺葵素和锦葵素 6 大类^[7], 自然条件下游离的花青素极少见, 多以花色苷形式存在。糖基和以 C₆-C₃-C₆ 为骨架的花青素结合形成花色苷, 葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和鼠李糖是最常见的糖基, 普遍以 C₃ 位单糖苷化或 C₃ 和 C₇ 位双糖苷化存在^[8]。花色苷的酰基化也较为常见, 酰基基团有香豆酸、芥子酸、咖啡酸等^[9]。

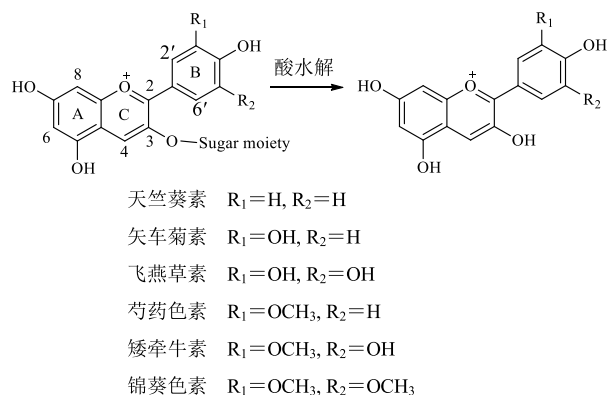


图 1 植物中常见的花色苷和花色苷元的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of representative anthocyanins and anthocyanidins in plants

2 LLC

现代 LLC 主要分为逆流色谱 (countercurrent chromatography, CCC) 和离心分配色谱 (centrifugal partition chromatography, CPC), 其主要特征是固定相不需固体支撑基质, 即流动相和固定相均为液体的色谱技术。LLC 消除了在传统液相色谱中常见的样品吸附问题从而避免了样品的失活、变性等。这种技术是液-液萃取的自动化版本, 它基于分析组分在互不相溶的两相溶剂中有不同分配系数而完成分离, 在具体使用中需根据目标化合物极性调整两

相溶剂体系组成以获得更好的分离效果^[10]。从 20 世纪 80 年代开始 CCC 和 CPC 就被广泛应用于分离纯化各种天然化合物。目前, 已经有许多文献对利用 LLC 从不同植物中分离多种花色苷单体进行了报道^[11-13]。在花色苷的分离纯化中仅通过一次分离就可获得几百毫克的纯品花色苷, 包括单糖基化、高度糖基化和酰化的花青素衍生物^[14]。

2.1 两相溶剂系统选择

众所周知, 选择合适的溶剂体系对 LLC 分离至关重要。花色苷多具极性, 因此分离纯化花色苷多采用极性较强的溶剂体系, 常用正丁醇 (BuOH) 和水作为两相基本溶剂, 同时因为花色苷在较低 pH 值 ($pH < 2$) 下以稳定的花色阳离子形式, 因此溶剂体系中也常有三氟乙酸 (TFA)^[15]。研究中用来分离花色苷最常用的溶剂体系由水、BuOH、甲基叔丁基醚 (MTBE)、乙腈 (ACN) 及其少量 TFA 组成 (表 1), TFA 的溶剂浓度 0.01%~0.1% 不等^[32-33], 收集目标组分时可于 40 °C 条件下真空浓缩至小体积, 氮吹 10 min 以除去残留的 TFA^[19]。花色苷极性大且彼此相似, 两项溶剂的选择非常关键。目标化合物在两相溶剂中的分配系数 (K) 是逆流色谱中的一个重要参数, 范围一般为 0.5~2。 K 值太小得到的分离度常不理想, 而 K 值过大往往导致样品峰过度展宽和洗脱时间过长。因为 BuOH 对整个溶剂体系的极性贡献最大, 所以可以通过改变 BuOH 的比例来调整溶剂体系的极性, 且不同花色苷单体性质各不相同, 实际应用中要结合具体目标化合物的性质对溶剂体系进行筛选和调整。研究表明, 适当调高 BuOH 比例的溶剂体系, 更有利于极性较弱的酰基化花色苷单体的分离^[34]。如 Qiu 等^[17]采用水-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:4:1:1:0.001) 为两相溶剂系统从紫薯中成功分离出 3 种酰基化花色苷单体, 质量分数均不小于 95%。除了上述提及的两相溶剂体系外, 醋酸乙酯 (EA)、BuOH、水和 TFA 组成的溶剂体系也可以用于分离花色苷单体。2013 年, Li 等^[22]采用 BuOH-MTBE-ACN-0.1% TFA (0.715:1.0:0.134:1.592) 和 BuOH-EA-ACN-0.1% TFA (1.348:1.0:0.605:2.156) 2 个溶剂体系联用, 成功地从木瓜花瓣中分离出飞燕草素 3-*O*-葡萄糖苷等 6 种花色苷单体。

2.2 其他因素对花色苷分离效果的影响

影响 LLC 最佳分离条件的因素除了两相溶剂体系外, 还有仪器转速、流动相体积流量、分离温

表 1 2010—2019 年部分 LLC 纯化的天然花色苷
Table 1 Partially purified natural anthocyanins by LLC from 2010 to 2019

来源	体积流量/ (mL·min ⁻¹)	转速/ (r·min ⁻¹)	溶剂体系	分离产物	质量分数/%	得率/%	检测分析	文献
桑葚	3	700	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:3:1:1:0.001)	cyanidin 3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> - α -rhamnopyranosyl- β - <i>D</i> -glucopyranoside)、 cyanidin 3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> - α -rhamnopyranosyl- β - <i>D</i> -galactopyranoside)、 cyanidin 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside、cyanidin 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> - galactopyranoside、cyanidin 7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside	>95.0	—	HPLC-ESI-MS/ MS	16
紫薯	1.5	880	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:4:1:1:0.001)	peonidin 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -(<i>E</i>)-caffeoyl-2- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosyl- β - <i>D</i> - glucopyranoside)-5- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside、cyanidin 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>p</i> - coumaroyl)- β - <i>D</i> -glucopyranoside、peonidin 3- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - (<i>E</i>)-caffeoyl- β - <i>D</i> -glucopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>E</i>)-caffeoyl- β - <i>D</i> -glucopyr anoside)-5- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside、peonidin 3- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - (<i>E</i>)-feruloyl- β - <i>D</i> -glucopyranosyl)-6- <i>O</i> -(<i>E</i>)-caffeoyl- β - <i>D</i> -glucopyr anoside)-5- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside	95.5、95.0、 97.8、96.3	7.5、3.5、 5.0、6.0	HPLC-ESI-MS/ MS、NMR	17
黑胡萝卜	4	850	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:2:2:1:0.001)	cyanidin 3-xylosyl (sinapoylglucosyl) galactoside、cyanidin 3-xylosyl-(feruloylglucosyl) galactoside、cyanidin 3-xylosyl (coumaroylglucosyl) galactoside	85.0、92.0、 96.0	—	HPLC-DAD、HPLC- ESI-MS	18
紫锥菊花	2	850	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (6:3:2:1:0.001)	cyanidin 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside、cyanidin 3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> - malonyl- β - <i>D</i> -glucopyranoside)	95.1、98.2	—	HPLC-UV、HPLC- MS	19
紫甘蓝	2	800	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:2:2:1:0.01)	—	91.5	4.3	HPLC	20
杨梅	2	850	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (10:3:2:4:0.1)	cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside	96.0	—	HPLC-MS	21
木瓜花瓣	2	800	两步 HSCCC: BuOH-MTBE- ACN-0.1%TFA (0.715:1.0:0.134: 1.592)、BuOH-EA-ACN-0.1%TFA (1.348:1.0:0.605:2.156)	delphinidin 3- <i>O</i> -glucoside、cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside、peonidin 3- <i>O</i> -glucoside、delphinidin、peonidin、malvidin	97.5、5.8、 8.6、98.3、 97.0、7.3	7.4、12.7、 4.3、8.7、 7.7、8.5	HPLC-UV、ESI- MS、NMR	22
桑葚	1.5	850	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:3:1:1:0.05)	cyanidin 3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> - α -rhamnopyranosyl- β -galactopyranoside)、 cyanidin 3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> - α -rhamnopyranosyl- β -glucopyranoside)、 petunidin 3- <i>O</i> - β -glucopyranoside	>95.0	—	HPLC-ESI-MS/ MS	23
玫瑰茄花萼	2	850	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (6:3:1:1:0.001)	delphinidin 3- <i>O</i> -sambubioside、cyanidin 3- <i>O</i> -sambubioside	97.8、96.2	—	HPLC-UV、HPLC- ESI-MS	24
蓝冬忍果	2	850	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:2:2:1:0.01)	cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside	98.1	22.8	HPLC-ESI-MS	25
蓝莓、黑胡椒 和蔓越莓	1.5	800	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:2:2:1:0.01)	19 ACs	—	—	HPLC-ESI-MS	26
草莓	2	850	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:2:2.5:2.5:0.01)	pelargonidin 3- <i>O</i> -glucoside	97.26	—	HPLC-DAD、HPLC- ESI-MS、NMR	27
喀什小檗	2	850	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:2:2:1:0.01)	—	≤92	37.60	HPLC-DAD、HPLC- UV	28
药桑	1	850	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:2:2:1:0.01)	cyanidin 3- <i>O</i> -rutinoside、pelargonidin 3- <i>O</i> -rutinoside、cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside、pelargonidin 3- <i>O</i> -glucoside	99.24、88.5、 99.9、96	—	HPLC-DAD-ESI- MS	29
紫苏叶	3	800	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN (5+0.1%TFA:2:2:1)	2 ACs	96.7、97.5	—	HPLC-DAD	30
黑果枸杞	1	1 200	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:1.5:2.5:1:0.001)	—	89	—	HPLC、HPLC-ESI- MS	31

度、进样量等可通过影响固定相保留影响分离效果。仪器转速与流动相体积流量大小直接影响固定相保留率,保留率是 LLC 中影响色谱峰分离度的一个非常重要的参数。通常低体积流量会得到更好的固定相保留率^[35],而固定相保留率高会使分离度更好^[36]。如 Zou 等^[27]在分离草莓中的 3 种花色苷时发现流动相体积流量为 1 mL/min 时固定相的保留率更好,峰分辨率更高,而 3 mL/min 的体积流量反而会降低固定相保留率和峰分辨率;仪器转速一般设定为 800~900 r/min^[35],在此范围内对花色苷分离效率无显著影响。进样量过大会降低目标物峰的分离度, Li 等^[37]在分离红酒中花色苷时将样品量控制在 100 mg,同时将温度设定为 25 °C 以维持样品稳定性,采用 2.0 mL/min 的体积流量最后得到了 41.7% 的固定相保留率。

3 LLC-LC

虽然 LLC 具有样品回收率高、无不可逆吸附、制备量大和重复性好等优点,由于其分离效率相对较低,当分离对象为复杂样品时,仅通过一次分离很难得到理想的分离效果。另外,该技术中的梯度洗脱不如传统液相色谱方便,耗时长、效率相对较低^[38]。高效液相色谱(HPLC)是分离天然花色苷最常见的液相色谱,具有分析时间短、分辨率高、无热分解的危险和需样量少等优点^[39],目前研究多采用逐级分离技术使花色苷的分离趋于简单化,如 Wang 等^[40]先后采用大孔吸附树脂和半制备型高效液相色谱(semi-HPLC)结合的方法从野生蓝莓中分离得到了锦葵色素 3-O-葡萄糖苷、牵牛花色素 3-O-葡萄糖苷和飞燕草色素 3-O-葡萄糖苷,质量分数分别为 97.7%、99.3%、95.4%。2018 年,Chen 等^[41]发现制备型液相色谱(prepare-HPLC)耦合循环制备液相色谱可从紫甘蓝中分离得到质量分数高达 99% 的 10 种主要花色苷单体。对于高相对分子质量的酰化花色苷单体,Zhang 等^[42]结合多种柱色谱和半制备液相色谱法从紫薯中分离得到 2 种酰化花色苷单体,为从不同天然产物中分离酰化花色苷单体提供了研究思路。然而,制备型液相色谱的固体固定相上存在非等温吸附曲线使得其负载能力非常有限从而限制了液相色谱在分离天然花色苷中的应用,且传统液相色谱相比 LLC 制备量小很多,不适合制备性分离单体花色苷。事实上,由于单体花色苷结构彼此相似且极性差别微弱,仅用单一色谱技术对它们进行分离非常困难。

3.1 二维色谱 LLC-LC

二维色谱是利用 2 种色谱联用分离样品,一种色谱体系作为第一维色谱,另一种色谱体系作为第二维色谱^[43-46]。二维色谱最大的优点是可以有效的减少组分之间的出峰重叠现象从而扩大峰容量。当选用的 2 种色谱体系具有完全不同的分离机制并且对各个组分的选择性差异明显时,二维色谱的优势可以发挥到最大。因此,从制备的角度出发,分离机制不同的两种色谱联用使得峰分辨率提高将更有利于得到高质量分数的目标产物^[47]。第一维和第二维色谱的正交性可用于评估二维色谱的分离能力。Schoenmakers 等^[48]将正交性定义为二维色谱中拥有 2 种不同分离机制的色谱仪器,样品在这 2 种色谱系统中的保留时间在统计学上是独立、不相关的。正交分离机制取决于样品、溶质和 2 种分离体系间特定的物理化学反应。2 个色谱体系存在正交性是因为二者对样品中各个目标组分的选择性不同,正交性越好,二维色谱的分离能力越好^[49]。近年来,LLC-LC 的离线联用在复杂天然产物中得到了逐渐地重视与应用。由于 2 种色谱体系不同的分离机制,理论上其二维色谱体系正交性应更显著,且较传统单一 LLC 有更好的分辨率和更高的峰容量。与二维液相色谱相比,二维色谱 LLC-LC 具有以下几个显著的优点:分离机制不同,即使均采用反相洗脱模式,由于不同的分离原理也使得 2 种反相色谱也具有良好的分离体系正交性;同时,2 种色谱技术的反相体系使得 2 种技术的联用更为容易,也为在线联用提供了良好的技术基础。

3.2 LLC-LC 分离花色苷单体

为了获得更好的分离效率和得到质量分数更高的花色苷单体,近年来采用 LLC-LC 分离纯化天然花色苷的研究报道逐年增加(表 2)。Xu 等^[36]发现天然花色苷在 CCC 中的洗脱顺序和在 HPLC 中完全不同:在 CCC 分离体系中,花色苷的洗脱顺序主要取决于和苷元以糖苷键相连的糖的结构,连有双糖的花色苷会先于和单糖成苷的花色苷洗脱出来,洗脱顺序依次为桑布双糖苷、芸香双糖苷、半乳糖苷、葡萄糖苷、阿拉伯糖苷。当不同花色苷中与苷元相连的糖相同时出峰顺序则取决于 B 环取代程度,三取代花色苷先于双取代花色苷洗脱出来,洗脱顺序先后为飞燕草色素、矮牵牛色素、锦葵色素、矢车菊色素、芍药色素、天竺葵色素。对于传统的 HPLC 分离,花色苷出峰顺序则主要由结构中

表 2 2010—2019 年 LLC-LC 纯化天然花色苷

Table 2 Partially purified natural anthocyanins by LLC-LC from 2010 to 2019

来源	第一维色谱		第二维色谱		分离产物	质量分数/%	检测分析	文献
	仪器	溶剂体系	仪器	溶剂体系				
象牙果	HSCCC	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:2:2:1:0.01%)	prep-HPLC	H ₂ O-FA-ACN (87:10:3, A)、(40:10:50, B); 90%A、10%B 等度洗脱	cyanidin 3- <i>O</i> -rutinoside、cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside、peonidin 3- <i>O</i> -rutinoside、peonidin 3- <i>O</i> -glucoside、cyanidin 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -malonyl)glucoside、cyanidin 3- <i>O</i> -sambubioside	—	HPLC-PDA、HPLC-ESI-MS ⁿ 、NMR	50
树茄果、安第斯浆果	MLCCC	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:2:2:1:0.1%)	prep-HPLC	H ₂ O-FA-ACN (87:10:3, A)、(40:10:50, B); 95%A、5%B 等度洗脱	delphinidin 3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside、cyanidin 3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl-6"- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside)、cyanidin 3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> - α -rhamnopyranosyl)- β -glucopyranoside、cyanidin 3- <i>O</i> -rutinoside、delphinidin 3- <i>O</i> -rutinoside、pelargonidin 3- <i>O</i> -rutinoside	—	HPLC-UV/Vis、HPLC-MS/MS、HPLC-TOF-MS、 ¹ D/ ² D-NMR	51
红葡萄渣	HSCCC	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:2:2:1:0.1%)	prep-HPLC	H ₂ O-FA-ACN (87:10:3, A)、(40:10:50, B) 梯度洗脱	delphinidin 3- <i>O</i> -glucoside、cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside、malvidin 3- <i>O</i> -glucoside、petunidin 3- <i>O</i> -glucoside、peonidin 3- <i>O</i> -glucoside、malvidin 3- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl-glucoside	—	HPLC-ESI-MS ⁿ 、NMR	52
紫马铃薯	HSCCC	H ₂ O-BuOH-EA-TFA (5:3:1:0.1%)	semi-prep HPLC	H ₂ O-ACN-MeOH (80:15:5) 等度洗脱	petunidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinoside-5-glucoside、peonidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinoside-5-glucoside	97.8、97.7	HPLC-UV/Vis、HPLC-ESI-MS/MS	39
红酒	HSCCC	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (50:40:1:1:0.01%)	semi-prep HPLC	H ₂ O-MeOH 梯度洗脱	malvidin 3- <i>O</i> -glucoside、delphinidin 3- <i>O</i> -glucoside、peonidin 3- <i>O</i> -glucoside	92.74、91.03、91.21	UPLC-Q-TOF-MS/MS	37
草莓、覆盆子、蓝莓、桑葚、杨梅和蔓越莓	semi-prep HPLC	ACN-5%FA 梯度洗脱	HSCCC	H ₂ O-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:2:2:1:0.01)	18 ACs	>95	HPLC-ESI-LC/MS/MS、NMR	36
茶树紫芽	HSCCC	0.1%TFA-BuOH-EA-ACN (60:35:8:13)	semi-prep HPLC	1%AcOH-ACN 梯度洗脱	5 ACs	40.68、4.38、35.75、90.61、60.53	HPLC-UV	53

的氢氧根和甲氧基数目决定,极性大的化合物总是先于低极性化合物洗脱,非酰化花色苷会先于酰化花色苷洗脱,因此花色苷在 HPLC 中出峰顺序依次为飞燕草色素、矢车菊色素、矮牵牛色素、芍药色素、天竺葵色素、锦葵色素。上述洗脱顺序与大部分分离纯化天然花色苷的研究相符合,如 Zou 等^[27]在水-BuOH-MTBE-ACN-TFA (5:2:2.5:2.5:0.01)的溶剂系统中利用 CCC 和制备型 HPLC 分离天然花色苷的色谱图见图 2 (I、II、III 分别为矢车菊素 3-*O*-葡萄糖苷,天竺葵素 3-*O*-葡萄糖苷和天竺葵素 3-*O*-芸香糖苷)。鉴于天然花色苷在 CCC 和 HPLC 中的上述保留特性,可以先通过 CCC 对花色苷提取物进行初步分离,再进一步利用 HPLC 制备分离得到高质量分数的花色苷单体。如 Li 等^[37]将高速逆流色谱耦合 semi-HPLC 法,并优化得到最佳分离条件,最终成功从红酒中分离出了 4 种花色苷单体,质量分数均大于 90%。为了获得质量分数更高

的花色苷单体,吴奇辉^[39]先利用高速逆流色谱对紫马铃薯肉花色苷提取物进行初步分离,再借助制备液相色谱进一步纯化得到的花色苷,最终分离得到 2 种主要花色苷,质量分数分别为 97.8%、97.7%。2019 年,张拓等^[53]选择 EA-BuOH-ACN-0.1% TFA (8:35:13:60)为最佳溶剂体系,先用 CCC 对茶树紫芽花色苷粗提物进行初步分离,得到总花色苷质量分数为 43.64%,进一步结合 semi-HPLC 成功分离得到 5 种花色苷组分,质量分数最高达 90%,相比只用高速逆流色谱分离得到的花色苷质量分数相比有较大提高,但某些组分因为分离条件的限制仅有 20%以上,后续需要对该组分和分离条件做出优化。也有研究把液相色谱作为第一维色谱而逆流色谱作为第二维色谱成功得到了高质量分数的花色苷单体,如 Xu 等^[36]采用 semi-HPLC 和 CCC 联用的方法从 6 种不同的浆果中分离得到了 15 种花色苷单体,质量分数可达 95%。

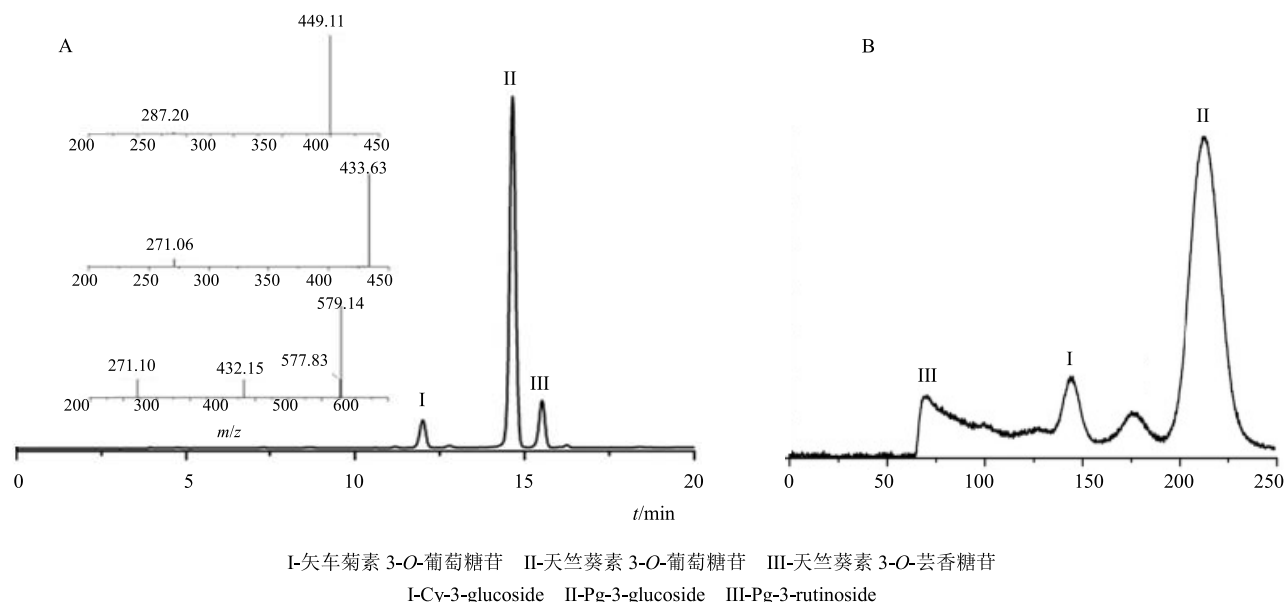


图 2 花色苷粗提物的 HPLC 色谱图和质谱图 (A) 和花色苷粗提物的 HSCCC 色谱图 (B)

Fig. 2 HPLC and mass spectra of crude anthocyanin extract (A) and HSCCC of crude anthocyanin extract (B)

4 结语及展望

近年来对天然花色苷的研究主要集中于其生理活性,如抗氧化、抗炎、抗辐射和抗糖尿病等功能。花色苷单体种类繁多且结构和极性彼此相似,为了更好的研究不同花色苷单体发挥生物活性的可能机制,良好的制备分离是至关重要的第 1 步。传统分离纯化方法常将大孔树脂色谱和离子交换色谱联用富集得到花色苷粗品,再利用 prep-HPLC 进一步分离得到花色苷单体。然而,这些传统分离纯化方法耗时长、存在因固体固定相吸附导致的低回收率和重现性差等劣势而难以大规模分离得到高质量分数的花色苷单体^[54-55]。LLC 已成功应用于天然产物中多种花色苷单体的制备性分离,且展示出良好的优越性及与传统液相色谱技术的互补性,特别是百分之百的样品回收率、无可逆吸附、一次进样量大以及运行维护成本低等优势显著^[56-57]。

一定情况下单一分离技术可制备分离得到较高质量分数的花色苷,但对于结构多样化、极性相似的不同花色苷单体,仅用一种色谱模式往往不能提供足够的分离度和系统峰容量,需要构建多维色谱模型解决这一问题^[36,39]。LLC 和 HPLC 构建的二维色谱充分利用了 LLC 的制备能力和 HPLC 的分离效率,实现了 2 个机制的互补,从而提高了系统的正交性,提供比一维色谱更高的峰容量和选择性^[58]。

目前 LLC 用于分离天然花色苷的溶剂体系较为单一,基本依靠调整 BuOH 比例来控制整个溶剂

体系的极性,在后续收集得到 CCC 初步分离的天然花色苷再利用 HPLC 进一步纯化时, BuOH 不易通过蒸发或浓缩除去。因此在分离天然花色苷的后期研究中有必要探索和尝试新的溶剂体系。此外,天然花色苷在 LLC 和 HPLC 中的出峰顺序值得进一步深入研究:出峰顺序相反的现象并不适用于所用来源的天然花色苷分离情况;目前对葡萄糖苷和半乳糖苷研究较多,糖基为木糖、鼠李糖等花色苷单体研究甚少;酰化花色苷单体出峰顺序尚不明确;相同糖基取代位置改变是否影响出峰顺序等。

同时, LLC-HPLC 分离模型在分离天然花色苷中多采取离线模式,即首先利用第一维色谱对样品进行初步分离,然后将收集到的各个组分分别进样到第二维色谱中进一步分离。由于离线模式在实际运用中存在分离时间偏长、不易实现自动化和样品容易被污染等问题。因此,二维逆流色谱离线模式分离花色苷单体的制备技术和分离条件还需在后续研究中得到优化。

参考文献

- [1] 梁 敏, 包怡红. 花色苷生物学功能的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(10): 1785-1790.
- [2] 阎芙洁. 桑葚花色苷对糖代谢的调控作用及其机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [3] Afzal M, Redha A, Alhasan R. Anthocyanins potentially contribute to defense against Alzheimer's disease [J]. *Molecules*, 2019, 24(23): 4255.
- [4] Vendrame S, Klimis-Zacas D. Potential factors influencing

- the effects of anthocyanins on blood pressure regulation in humans: a review [J]. *Nutrients*, 2019, 11(6): 1431.
- [5] 单建伟, 刘晓津, 索海琴, 等. 植物花色苷的研究进展 [J]. 南方农业学报, 2019, 50(2): 278-285.
- [6] Bueno J M, Sáez-Plaza P, Ramos-Escudero F, *et al.* Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part II: chemical structure, color, and intake of anthocyanin [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2012, 42: 126-151.
- [7] Kong J M, Chia L S, Goh N K, *et al.* Analysis and biological activities of anthocyanins [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(5): 923-933.
- [8] Clifford M N. Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden [J]. *J Sci Food Agric*, 2000, 80(7): 1063-1072.
- [9] 郑杰, 丁晨旭, 赵先恩, 等. 花色苷化学研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(5): 970-978.
- [10] Mieres-Castro D, Schmeda-Hirschmann G, Theoduloz C, *et al.* Antioxidant activity and the isolation of polyphenols and new iridoids from Chilean *Gaultheria phillyreifolia* and *G. poeppigii* berries [J]. *Food Chem*, 2019, 291: 167-179.
- [11] Jeon H, Choi J, Choi S-J, *et al.* Rapid isolation of cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside from black rice (*Oryza sativa*) using high-performance countercurrent chromatography and reversed-phase column chromatography [J]. *Nat Prod Sci*, 2015, 21(1): 30-33.
- [12] Thornton D, Barton L, Hsu L. The development of an automated countercurrent chromatography process for isolation of anthocyanins [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1575: 66-71.
- [13] Choi S J, Choi J, Lee C U, *et al.* Rapid separation of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside from crude mulberry extract using high-performance countercurrent chromatography and establishment of a volumetric scale-up process [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(11): 1828-1836.
- [14] Schwarz M, Hillebrand S, Habben S, *et al.* Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins [J]. *Biochem Eng J*, 2003, 14(3): 179-189.
- [15] 栗瑜婉, 刘清清, 徐贞贞. 高速逆流色谱分离纯化花色苷研究进展 [J]. 中国食物与营养, 2017, 23(2): 39-43.
- [16] Du Q, Zheng J, Xu Y. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity [J]. *J Food Compos Anal*, 2008, 21(5): 390-395.
- [17] Qiu F, Luo J G, Yao S, *et al.* Preparative isolation and purification of anthocyanins from purple sweet potato by high-speed counter-current chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2009, 32(12): 2146-2151.
- [18] Montilla E C, Arzaba M R, Hillebrand S, *et al.* Anthocyanin composition of black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) cultivars Antonina, Beta Sweet, Deep Purple, and Purple Haze [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(7): 3385-3390.
- [19] 李佳银, 罗晋, 李觅路, 等. 高速逆流色谱法分离紫锥菊花色苷及其抗氧化性研究 [J]. 分析测试学报, 2012, 31(1): 51-56.
- [20] 易建华, 潘毛头, 朱振宝. 高速逆流色谱分离纯化紫甘蓝花色苷 [J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 129-132, 213.
- [21] Sun C D, Zheng Y X, Chen Q J, *et al.* Purification and anti-tumour activity of cyanidin-3-O-glucoside from Chinese bayberry fruit [J]. *Food Chem*, 2012, 131(4): 1287-1294.
- [22] Li S N, Guo L P, Liu C M, *et al.* Combination of supercritical fluid extraction with counter-current chromatography to isolate anthocyanidins from the petals of *Chaenomeles sinensis* based on mathematical calculations [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(21/22): 3517-3526.
- [23] Sheng F, Wang Y N, Zhao X C, *et al.* Separation and identification of anthocyanin extracted from mulberry fruit and the pigment binding properties toward human serum albumin [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(28): 6813-6819.
- [24] 刘雪辉, 王振, 吴琪, 等. 高速逆流色谱法分离玫瑰茄中的花色苷 [J]. 现代食品科技, 2014, 30(1): 190-194.
- [25] Chen L, Xin X L, Lan R, *et al.* Isolation of cyanidin 3-glucoside from blue honeysuckle fruits by high-speed counter-current chromatography [J]. *Food Chem*, 2014, 152: 386-390.
- [26] Jin Y H, Shin H J, Ahn H J, *et al.* Identification of anthocyanins in berry species using LC-ESI-MS combined with high-speed counter-current chromatography [J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2016, 37(10): 1618-1624.
- [27] Zou H, Ma Y, Xu Z Z, *et al.* Isolation of strawberry anthocyanins using high-speed counter-current chromatography and the copigmentation with catechin or epicatechin by high pressure processing [J]. *Food Chem*, 2018, 247: 81-88.
- [28] 苏亚丽. 高速逆流色谱分离制备喀什小檗花色苷的研究 [D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2012.
- [29] 杨玲, 苏亚丽, 陈敏. 新疆药桑葚中花色苷的分离与鉴定 [J]. 食品科学, 2012, 33(21): 145-148.
- [30] 胡晓丹, 孙爱东, 张德权. 高速逆流色谱分离紫苏叶花色苷的研究 (英文) [J]. 中药材, 2010, 33(10): 1586-1588.
- [31] 裴海润, 曹雪丽. 圆盘嵌入式螺旋管高速逆流色谱仪及其在花青素分离中的应用 [J]. 食品科学, 2012, 33(11): 1-7.

- [32] 尚远宏, 曾 楨, 田金凤. 应用高速逆流色谱分离天然产物中成分的研究进展 [J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2016, 42(2): 156-161.
- [33] Renault J, Thépenier P, Zéches-Hanrot M, *et al.* Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1997, 763(1/2): 345-352.
- [34] Kähkönen M P, Heinämäki J, Ollilainen V, *et al.* Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities [J]. *J Sci Food Agric*, 2003, 83(14): 1403-1411.
- [35] Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1065(2): 145-168.
- [36] Xu Y, Xie L H, Xie J H, *et al.* Pelargonidin-3-O-rutinoside as a novel α -glucosidase inhibitor for improving postprandial hyperglycemia [J]. *Chem Commun*, 2019, 55(1): 39-42.
- [37] Li Y Y, Li L X, Cui Y, *et al.* Separation and purification of polyphenols from red wine extracts using high speed counter current chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1054: 105-113.
- [38] Berthod A, Friesen J B, Inui T, *et al.* Elution-extrusion countercurrent chromatography: Theory and concepts in metabolic analysis [J]. *Anal Chem*, 2007, 79(9): 3371-3382.
- [39] 吴奇辉. 紫色马铃薯花色苷分离纯化及降脂减肥活性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [40] Wang E L, Yin Y G, Xu C N, *et al.* Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using combined chromatographic techniques [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1327: 39-48.
- [41] Chen Y J, Wang Z K, Zhang H H, *et al.* Isolation of high purity anthocyanin monomers from red cabbage with recycling preparative liquid chromatography and their photostability [J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 991.
- [42] Zhang J L, Luo C L, Zhou Q, *et al.* Isolation and identification of two major acylated anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cultivar Eshu No. 8) by UPLC-QTOF-MS/MS and NMR [J]. *Int J Food*, 2018, 53(8): 1932-1941.
- [43] Stoll D R, Li X P, Wang X L, *et al.* Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1168(1/2): 3-43.
- [44] Dugo P, Cacciola F, Kumm T, *et al.* Comprehensive multidimensional liquid chromatography: theory and applications [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1184(1/2): 353-368.
- [45] Guiochon G, Marchetti N, Mriziq K, *et al.* Implementations of two-dimensional liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1189(1/2): 109-168.
- [46] François I, Sandra K, Sandra P. Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations: A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 641(1/2): 14-31.
- [47] Marlot L, Faure K. Preparative two dimensional separations involving liquid-liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1494: 1-17.
- [48] Schoenmakers P J, Marriott P, Beens J. Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography-an update [J]. *LC-GC Eur*, 2003, 16(6): 335-339.
- [49] Shellie R A, Haddad P R. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 386(3): 405-415.
- [50] Osorio C, Acevedo B, Hillebrand S, *et al.* Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from (*Bactris guineensis*) fruit [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(11): 6977-6985.
- [51] Osorio C, Hurtado N, Dawid C, *et al.* Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits [J]. *Food Chem*, 2012, 132(4): 1915-1921.
- [52] Veličkovska S K, Mirhosseini H, Bogeve E. Isolation of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and application of the color activity concept to different varieties of red grape pomace from Macedonia [J]. *J Nutr Food Sci*, 2013, 3(6): 243.
- [53] 张 拓, 刘林峰, 林 玲, 等. 高速逆流色谱结合半制备型液相色谱分离茶树紫芽花色苷研究 [J]. 茶叶通讯, 2019, 46(2): 192-200.
- [54] Wang E L, Yin Y G, Xu C N, *et al.* Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using combined chromatographic techniques [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1327: 39-48.
- [55] 张素敏, 隋洪涛, 隋韶奕, 等. 葡萄花色苷的研究进展及应用前景 [J]. 北方果树, 2007(3): 1-3.
- [56] Valls J, Millán S, Martí M P, *et al.* Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(43): 7143-7172.
- [57] 薛宏坤, 李鹏程, 钟 雪, 等. 高速逆流色谱分离纯化桑葚花色苷及其抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2020, 41(15): 96-104.
- [58] 张玲玲. 全二维 HSCCC×HPLC 色谱系统的构建和应用 [D]. 厦门: 厦门大学, 2014.