

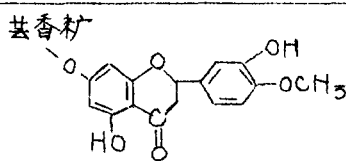
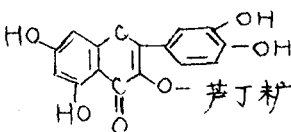
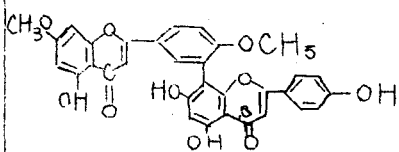
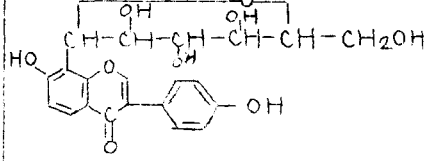
黄酮类化合物的研究方法

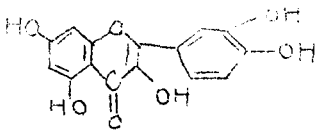
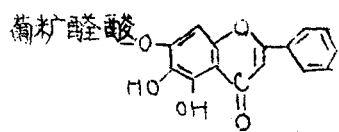
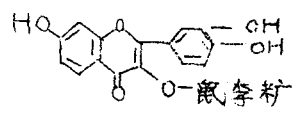
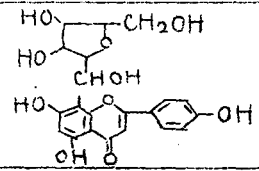
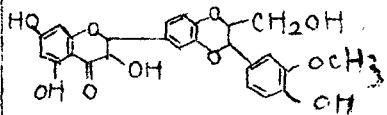
(一) 黄酮类化合物的药理作用, 结构类型, 命名和分布。

黄酮类化合物在临床治疗上的作用是大家已经认识的了。我国劳动人民很早就懂得利用含黄酮类化合物的植物药治疗疾病。在无产阶级文化大革命的推动下、广大医务人员和药物研究工作, 遵照毛主席“中国医药学是一个伟大的宝库, 应当努力发掘, 加以提高”的教导大力开展对祖国医药学的发掘和研究, 取得了很大的成绩, 就黄酮类化合物而言, 不但发现了一些新的结构类型, 而且在药理方面的作用, 也有不少新的发现。

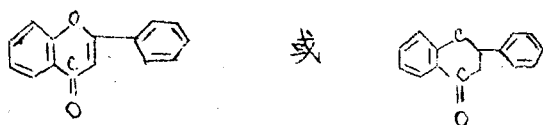
举例: 见图表(1)

图(1)

药理作用	名称	结构
治疗心血管 管疾病	橙皮甙 (Hesperidin)	
	芦丁 (Rutin)	
	银杏双黄酮 (Ginkgetin)	
	葛根素 (Puerarin)	

类肾上腺素作用	槲皮素 (Quercetin)	
抑菌消炎	黄芩素 (Baicalin)	
利尿	槲皮甙 (Quercitrin)	
抑制肿瘤细胞	牡荆素 (vitexin)	
护肝	乳薹黄酮 (Silymarin)	

从表(1) 中可以见到, 许多黄酮类化合物都具有如下环系

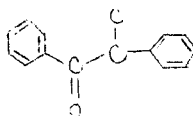
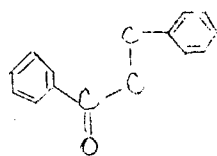


除此以外, 黄酮类化合物还包括一些其它结构类型的化合物, 见表(2)。

从表(2) 所列举的黄酮类化合物, 虽然有各种类型碳架, 但有一共同规律, 它们都含有下述基本碳架。

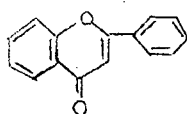


主要是两种类型:

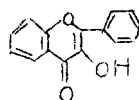


因此，把具有这类结构的化合物，称为黄酮类化合物。

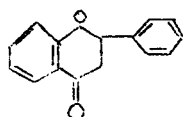
图2 黄酮类化合物的碳架类型（举例）



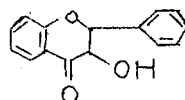
黄酮类
(Flavones)



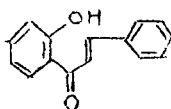
黄酮醇类
(Flavonols)



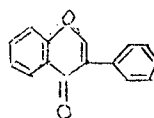
双氢黄酮类
(Flavanones)



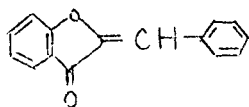
双氢黄酮醇类
(Flavanols)



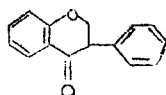
查耳酮类
(Chalcones)



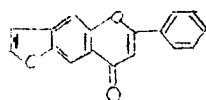
异黄酮类
(Isoflavones)



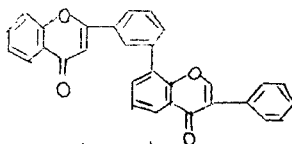
奥酮类
(Aurones)



异双氢黄酮类
(Isoflavanones)

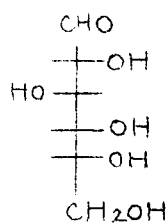


呋喃黄酮类
(Furanoflavones)

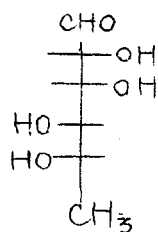


双黄酮类
(Biflavones)

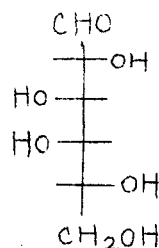
此外，我们还见到，黄酮类的糖元可以挂在黄酮貳元的不同位置的羟基上参见图(2) 现在已知的黄酮貳中，常见的糖有葡萄糖，半乳糖，鼠李糖，芸香糖等，见图(3)：



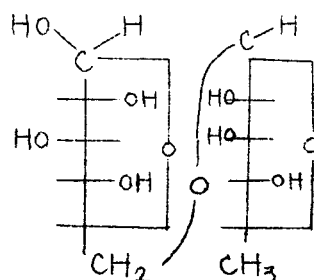
葡萄糖



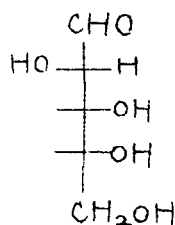
鼠李糖



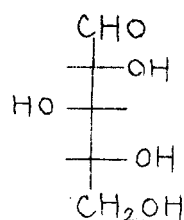
半乳糖



芸香糖

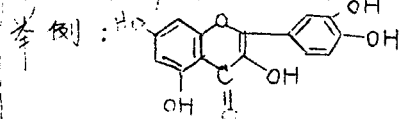


阿拉伯糖

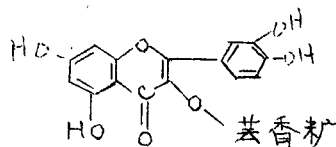


木糖

黄酮貳命名(续下页)



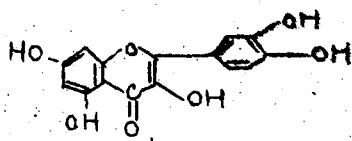
3,5,7,3',4'-五羟基黄酮



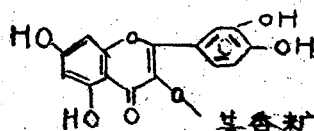
5,7,3',4'-四羟基黄酮

3-芸香糖貳

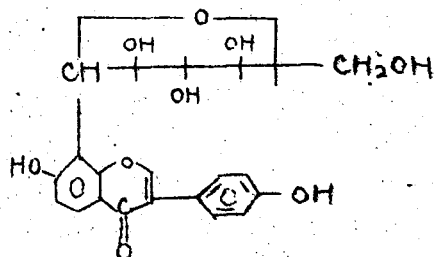
习惯上往往以俗名称呼。



槲皮素
(Quercetin)



芦丁
(Rutin)

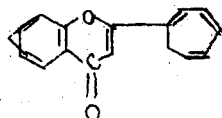


葛根素(Puerarin)

关于黄酮类化合物的命名。

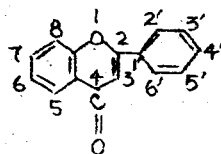
1 先要知道母体骨架的名字

① 母体骨架的名字



Flavone
(黄酮)

② 编号



③ 骨架上的一些基团看作取代基

黄酮类化合物在自然界的分布是很广的，主要是分布于植物，动物中也有发现（如蝴蝶的翼中）。根据中国医学科学院对中草药进行黄酮预试结果表明，发现有57个科，152种植物中有明显的黄酮反应，但根据目前已知的规律，黄酮主要分布于裸子植物（松、柏、杉……等）和被子植物（单、双子叶）

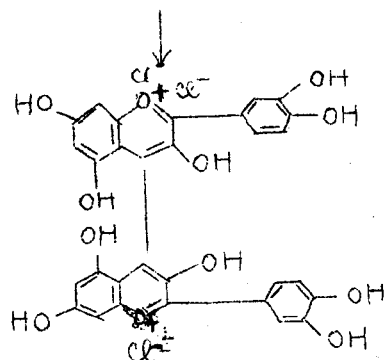
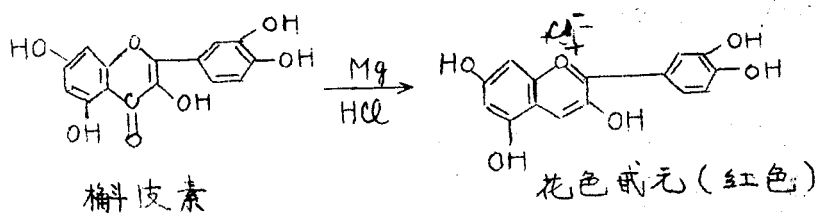
黄酮类化合物在植物器官中的分布，目前也总结了一些规

律，例如木犀部主要为黄酮甙元，花、果、叶中的黄酮往往以甙的形式存在，大多数是花青素，黄酮，查耳酮，噢吟类的甙。树皮，根，根状茎，树木的树脂状渗出物也发现含有甙。

二、黄酮类化合物的粘识

1、盐酸—镁粉反应

粘液 1 ml. + 浓盐酸 (4-5 滴)，1-2 分钟後，若含黄酮类化合物，一般显红色。



作这个试验时应作一空白对照，如果只加浓盐酸而不加镁粉，也能显红色，则可能是花青素而不是黄酮类化合物。

也有些类型的黄酮类化合物与镁粉，浓盐酸反应不显颜色的，遇此情况，也可改用锌粉代替镁粉进行试验，或用钠—汞齐，硼氢化钠等还原剂进行试验 [参见表 (4)]

(2) 三氯化铝反应

将样品滴于滤纸上（或依纸层析法，用适当的溶剂展开）
 喷上 1% 三氯化铝乙醇溶液，干燥后显黄色斑点，并在紫外光下
 观察，若出现显著的荧光，则可能表示有黄酮成分存在。

(3) 三氯化铁反应：

黄酮是含酚羟基的化合物，因此对三氯化铁应能产生颜色反应。可往枯液中加入 1% FeCl_3 水溶液（或乙醇溶液），如含黄酮，应显赭、蓝赭等颜色。

黄酮类化合物还与许多试剂产生颜色反应（参见表 4）。

表(4)

黄酮类型	颜色反应								
	氯 (可见光)	氯 (U.V)	AlCl_3 (可见光)	AlCl_3 (U.V)	NaOH	H_2SO_4	ArSO_3H	$\text{Mg}+\text{HCl}$	Na-Hg
黄烷酮类	无	无→浅黄	—	赭—黄	黄→橙	橙	无	红 紫, 蓝	红
黄酮	黄	亮黄	浅黄	赭黄 荧光	黄	黄→橙	黄	黄→红	红
黄酮醇	—	亮黄→赭	黄	黄或赭 荧光	黄→橙	黄→橙	黄	红→洋红	黄→浅红
异黄酮	无色	浅紫— —浅黄	无色	黄— —荧光	黄	黄	—	黄	浅红— —紫红
异黄烷酮	—	—	—	—	黄	黄	—	—	黄
查耳酮	黄, 橙	橙红 紫	黄—橙	橙, 棕	橙→ 红	橙→ 红	橙— 浅紫	—	很浅黄
双氢查耳酮	—	—	—	—	无色 →浅黄	无→ 浅黄	—	—	—
呋喃	橙 橙紫	黄—橙	浅黄 橙	赭或 棕	红→紫	红→ 洋红	橙— 浅紫	—	很浅黄

三、黄酮类化合物的提取，分离，单离。

1. 提取

植物中的黄酮类化合物，有些以甙形式存在，有些则以甙的形式存在。甙一般极性较大，所以要用极性大一些的溶剂，例如60%左右的乙醇丙酮，有时可以用热水提取，甙元一般极性较小，溶剂的极性相对地要减小一些，例如用95%乙醇，甚至用乙醚，苯，或氯仿。

浸提一般用渗漉法，也可以间歇冷浸提或热抽提。

对于黄酮甙，应注意防止水解，（酶水解或酸水解）尤其是新鲜植物更应注意。将药材迅速投入沸腾的乙醇中，可使酶失去活性以避免酶水解，植物中往往含有机酸，在抽提过程中也可分离，会使甙水解，所以，一般加入少许 CaCO_3 以中和植物中所含的有机酸。

2. 分离

提取实际上是一种聚集的过程。当然，更广义一点，提取和分离实际上是分不开的。因为聚集的过程实际上也起了初步分离的作用。这里讨论分离方法，是要进一步把提取过程中挟带过来的杂质（非黄酮类化合物）除去，同时也把各类黄酮初步分离，在此过程中，往往可以获得黄酮单体，但一些较难分离的性质较相似的黄酮，更须作进一步的分离。（在第3小节讨论）下列分别介绍几种常用的分离方法。

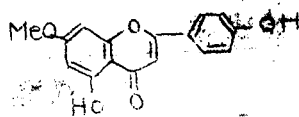
(1) 利用不同强度的碱进行分离。

这是一种经典的方法，将提取得到的总黄酮溶液先用饱和的 NaHCO_3 溶液，接着用5% Na_2CO_3 溶液，后用0.5%、1%—5%的 NaOH 溶液提取，这样可以将不同酸度的黄酮分离开。

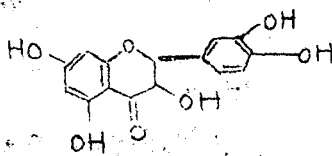
例：从 *Prunus Puddum* 用下法分离得

花旗松素 taxifolin 及 genkwanin 芫花素。

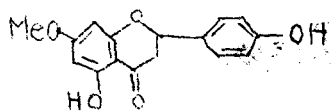
木头预先用60—80°C石油醚抽提去蜡状物，然后继用沸乙醇浓缩后，残渣用乙醚抽提，乙醚液先用饱和 NaHCO_3 ，5% Na_2CO_3 ，0.1%及5% NaOH 抽提， NaHCO_3 及 Na_2CO_3 部分酸化后得 Taxifolin (mp 234°C) 0.1% NaOH 抽提部分酸化后析出沉淀，经用醇重结晶得 Genkwanin。



Genkwanin (葛花素)

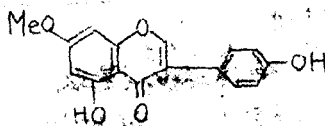


Taxifolin (花旗松素)



Sakuranetin

樱花素



Prunetin

李山昇黄酮

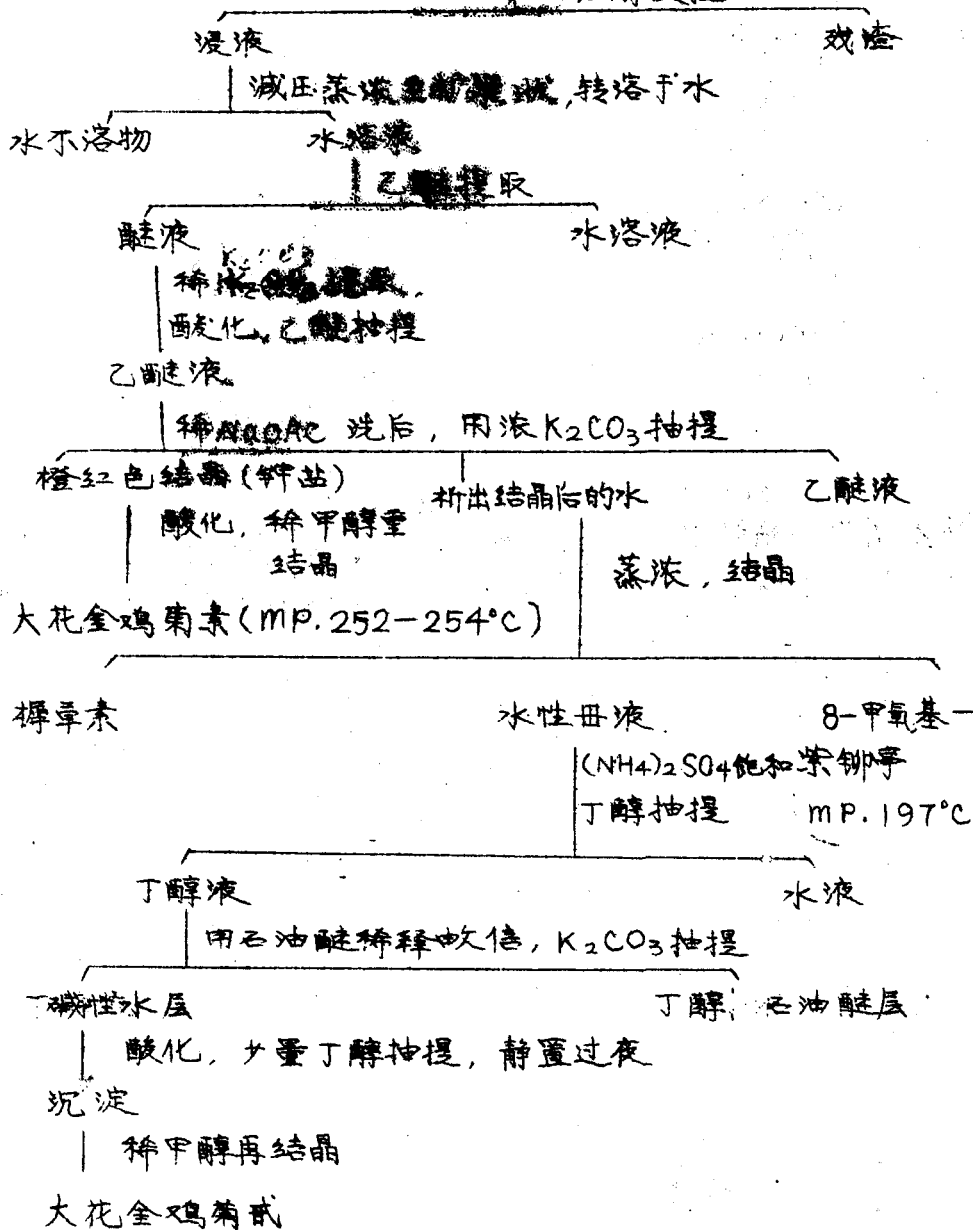
在5% NaOH提取液中，酸化得 Sakuranetin 及 Prunetin，接着用苯-乙酸混合物，前者溶解，后者不溶解。

另一个例子可参考图(5) 旬大花金鸡菊中提黄酮甙。

13) (5) 大花金鸡菊 (*Coreopsis grandiflora*)

大花金鸡菊的鲜花

95% 醇浸提

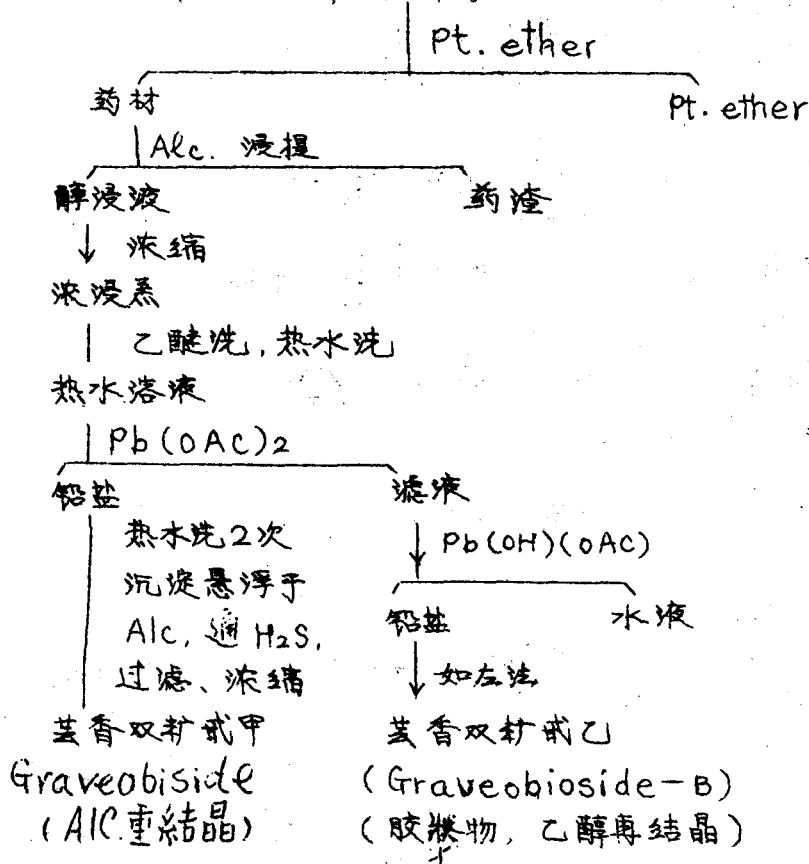


2. 应用醋酸铅法分离

许多黄酮（例如黄酮醇及邻位二羟基黄酮）能与 $Pb(OAc)_2$ 溶液生成不溶于水或稀醇的黄色或红色铅盐沉淀，一部分黄酮不能与 $Pb(OAc)_2$ 生成沉淀，但能与碱性醋酸铅生成铅盐沉淀，利用这一特性，可把黄酮与许多杂质分开，同时也能把两种类型的黄酮类成分分开。

举例：自芹属种子提取黄酮甙（表6）

表(6) 芹属种子



3. 离子交换法

通常用H型的阴离子交换树脂，黄酮被吸着，而其它水溶性成分（矿，有机酸及其盐，无机物等）则通过树脂柱，用水洗去这些杂质后，用稀醇（20%异丙醇洗脱甙型成分，用95% Alc洗脱甙元成分，本法不能分开个别甙元，只能初步提纯。

例：自 *chlorophora tinctoria* 提取色素(morin)及桑酮(maclurin)

植物树心磨成粉末(一公斤)

↓ 45.5升热蒸馏水提取数次

抽取液

↓ 通过5cmX1.2m的Amberlite IRC-50

↓ H型树脂柱

↓ 水洗树脂柱至流出液无色

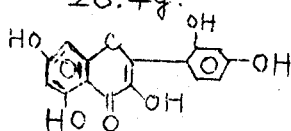
↓ 95%乙醇洗脱(每柱1升)

合併洗脱液、浓缩

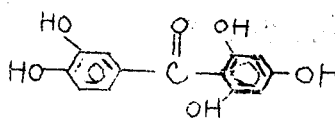
↓ 冰箱放置过夜, 过滤

粗桑色素

26.4g.



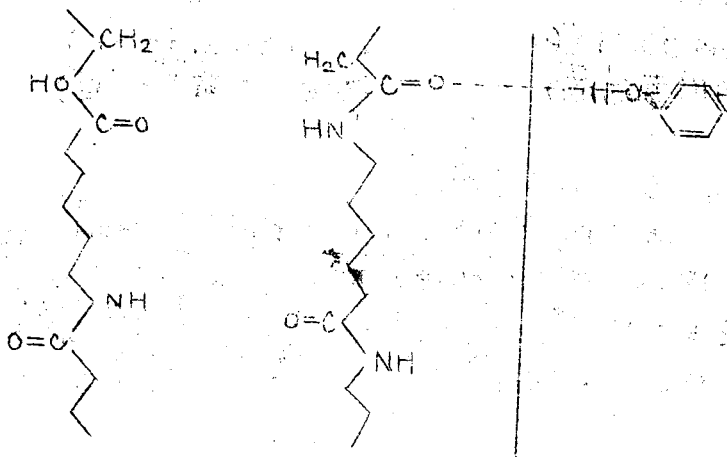
母液(主要为桑酮)



注意：用离子交换法分离时，易引起水解。

4. 聚酰胺法。

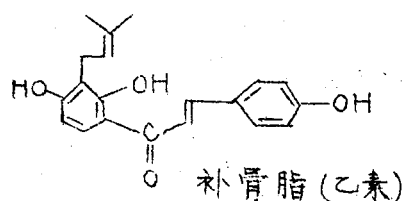
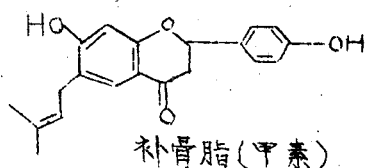
含有酚羟基的有机物，能被聚酰胺吸附，利用这个特点，可将酚性有机物(包括黄酮)与其它成分分离。



用聚酰胺法进行黄酮分离，是一个较好的方法，一方面，它的吸附容量较大，（比一般层析法大100倍），另一方面，它可以把各种类别的黄酮分开，（一般是吸附后，先用水淘洗，继用10%，30%，50% 75% 95% Ale, 含1-5% NH_3 乙醇洗脱），

例：补骨脂黄酮的分离。

总甙溶于乙醚，加少量聚酰胺拌匀，挥去醚后，上柱，先用水冲洗，继用50% 甲醇洗得甲素，继用70% 洗得乙素。



利用聚酰胺法很易将黄酮甙及其甙元分开，黄酮甙在聚酰胺柱上吸附较弱，较易被水或稀醇溶液洗脱下来，而甙元一般在浓度较高的乙醇中才能被洗脱。

3. 单 离 { 一般采用各种类型的层析法（包括制备性薄层层析）
适用的吸附剂 { 聚酰胺，硅酸，水合硅酸镁，纤维粉，

(1) 聚酰胺法。

聚酰胺法主要是用来分离不同类别的黄酮，但有时条件选择恰当，也可以单离。

在聚酰胺层析中，最常用的溶剂是水—乙醇系统，利用这一溶剂系统，一般是酚性羟基愈多，吸附愈强（但邻—二元羟基，邻—三元酚基视着与一元的差不多），同时 COH 若形成甙键则由于一方面少了一个酚基，一方面羟基增加了水溶性故易于被洗脱。

黄酮及酚类在聚酰胺柱上被吸附后，溶剂的洗脱能力按下到次序排列：

$\text{DMF} > \text{甲酰胺} > \text{稀 NaOH 溶液} > \text{丙酮} > \text{甲醇} > \text{水}$

这个规律可供选择洗脱剂（或展开剂）时参考。

实践证明：水：乙醇：丁酮：乙酰丙酮（65+15+15+5）是分离黄酮或比较理想的展开剂；水—甲醇：丁酮（40+30+30）也很好（洗脱力更大一些），在应用聚酰胺的制备性薄层析分离时，可供参考。可参见图（7）

上述溶剂分离黄酮可参见图7

若分离成元，可参考应用

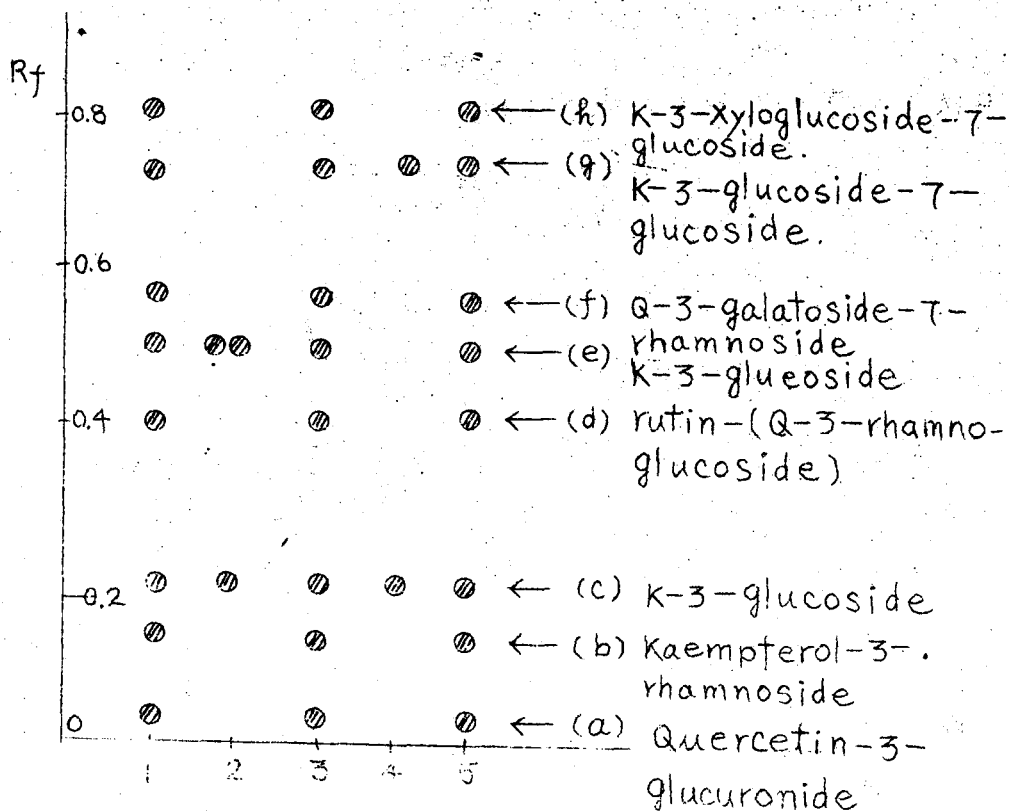
CH_2Cl_2 —甲醇：丁酮（60+26+14）

石油醚—苯—丁酮— CH_3OH （50+40+5+5）

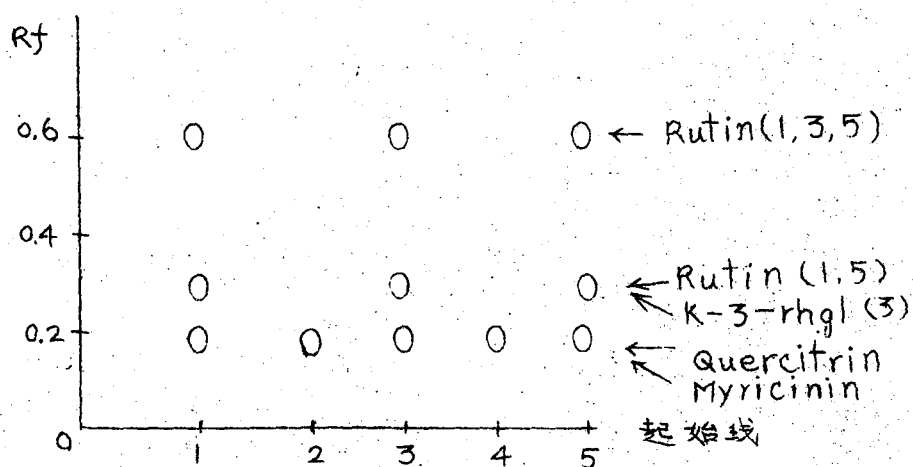
或（60+30+5+5）

图（7） 利用水—乙醇—丁酮—乙酰丁酮（65+15+15+5）

为展开剂可将下列黄酮或分离



图(8) 利用聚酰胺薄层层析分离黄酮类化合物的例子,

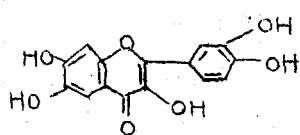


(2) 水合硅酸镁

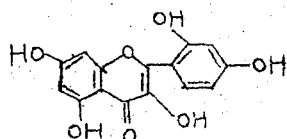
水合硅酸镁是分离黄酮类化合物的较理想的吸附剂, 外国商品名叫 Magnesol, 或 Florisil.

应用水合硅酸镁为吸附剂进行层析分离时, 通常甙比甙元更易吸附, 而含羟较多的甙又比含羟较少的甙更易被吸附。

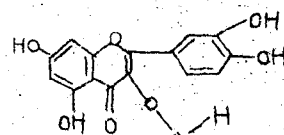
例如: 有人利用水合硅酸镁分离了下列各组分。



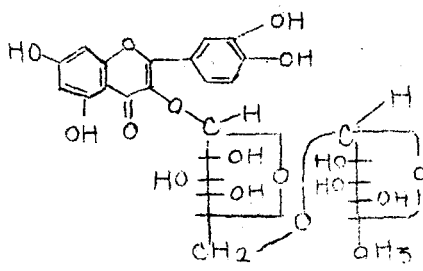
Quereetin
槲皮素



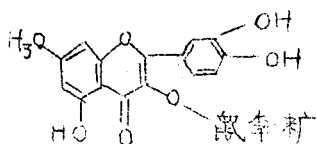
Morin (桑色素)



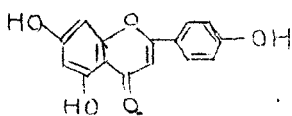
Quercetrin
槲皮甙



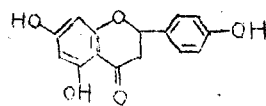
Rutin 芦丁



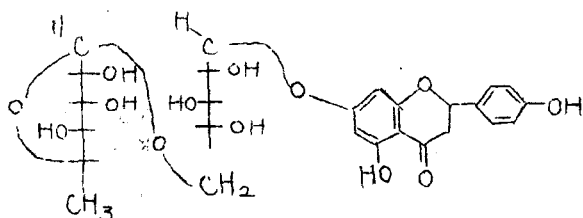
Xanthorhamnin
鼠李素甙



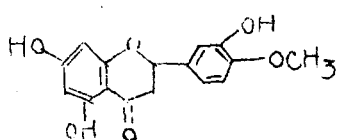
Apigewin
芹菜素



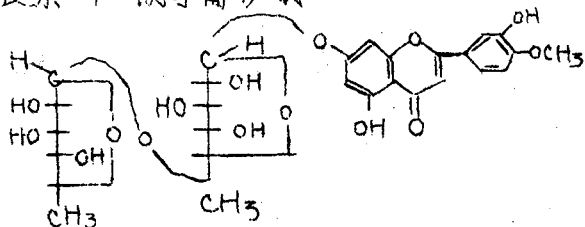
narigltuin
柚皮素



naringin 柚皮素-7-鼠李糖甙



Hesperetin
橙皮素



Hesperidin
橙皮素-7-B-芦丁甙

利用水合硅酸镁进行层析分离时，一般的操作方法是：

将水合硅酸镁与干丙酮调成稀浆状装柱，将黄酮混合物(预先经离子交换分离)溶于丙酮，通过柱体，并用湿的乙酸乙酯淘洗，接着用含水乙醇，最后用95%乙醇淘洗极性极强的黄酮。

如果粉末太细，流速太慢，可以掺入一定比例(3:1, 4:1, 5:1)的助滤剂(Celite)，以增加渗透速率。

(3) 硅胶 (或硅酸)

硅胶也是常用的吸附剂，一般黄酮或元及极性较小的甙均可分离，对于极性较大的黄酮甙，以用水合硅酸镁或纤维素柱为宜，当然也可以用硅胶进行分配层析分离：

有时也把硅胶与水合硅酸镁交替使用，可收到好的效果。