天然产物活性成分分离

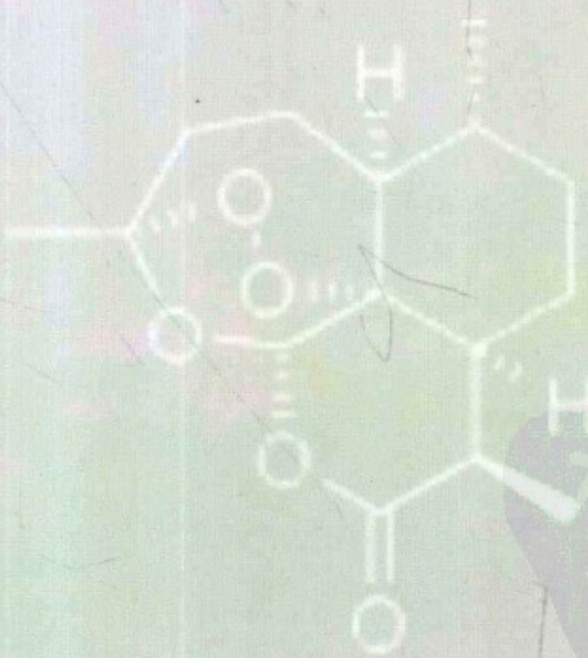
徐任生　赵维民　叶　阳　主编

科学出版社

北京

天然产物活性成分分离

徐任生 赵维民 叶 阳 主编



科学出版社

(O—4524.0101)

在我国，中草药应用历史悠久，植物资源丰富，是天然产物研究的核心内容之一。研究其有效成分，分析其活性，进行合成或结构修饰，可以创制新药治愈令人类措手无策的疾病；也可以从中获取天然杀虫剂、甜味剂与色素等，满足人们对于绿色食品的迫切需求。因此，天然产物活性成分的研究有广阔的前景，是永远研究不完的领域，并为国际同行所羡慕。《天然产物活性成分分离》一书的出版，将满足广大科研工作者的需要，对于推动天然产物的研究和发展将具有重要的作用。

本书介绍了天然产物化学成分提取与分离的新技术和新方法，其中包括超临界流体萃取、微波辅助萃取、高速逆流色谱、凝胶色谱、高效液相色谱与联用技术、波谱解析化学结构、结构修饰与前药制备、优化传统提取技术及生物活性筛选等。同时还介绍了有实际应用价值的各类常用天然活性成分的分离方法。许多内容是作者自己的实践经验总结。在附录中收集了各种常用色谱显色剂、缓冲溶液配制方法、大孔树脂性能表及超滤膜性能表等。

本书实用性和可操作性强，可作为天然产物化学、有机化学、药物化学、植物化学、分析化学等领域教学与科研工作者及中西药制药公司、农业和食品工业有关人员的参考书和案头常用的工具书。

www.sciencep.com

ISBN 978-7-03-032656-0

9 787030 326560 >

科学出版中心　化学化工分社
电　话：010-64001053
E-mail:zhouqiaolong@mail.sciencep.com

销售建议：化学／有机化学、分析化学
药学／药物化学、植物化学

定 价：98.00 元

主编的话

为了满足中草药科研蓬勃发展和中药现代化的需要，1970 年我与中国科学院上海药物研究所植物化学室同仁编写了《中草药有效成分提取与分离》一书，由上海人民出版社出版。1983 年进行了补充与修改，由我和陈仲良主编，作为第二版由上海科学技术出版社出版。1989 年又加印了一次，前后共印 15 000 册。由于书中所写内容大都是我们自身的经验与体会，比较实用，深受读者欢迎，直到今天还有同行想购买这本书，也有朋友建议更新内容。考虑到近 30 年来科学技术的发展，新技术不断涌现，因而与叶阳、赵维民一起邀请了一批年轻一代的科学家们对该书进行撰写，增加了对分离提取新技术与新方法的介绍，包括超临界流体萃取、微波辅助萃取、高速逆流色谱、液质联用、大孔吸附树脂应用、凝胶色谱和优化传统提取与分离技术等。同时，还增加了波谱解析化学结构、结构修饰与前药制备、结晶与纯化及生物活性筛选等内容。在各类化合物分离中主要介绍有实际应用价值的常用天然活性成分，增加了海洋天然产物、蛋白质与酶、多糖与寡糖的内容。所涉及的天然产物，除药用外，也包括农业与食品工业常用的杀虫剂、甜味剂、色素等，故将书名改为《天然产物活性成分分离》。在附录中收集了各种常用色谱显色剂，常用溶剂常数，缓冲溶液配制方法，大孔树脂与离子交换树脂性能表，凝胶填料与超滤膜性能表等。希望本书能成为天然产物化学，有机化学，药物化学及农业与食品工业科研与教学人员所喜爱并乐于翻阅的参考书与工具书。在资讯发达的今天，许多资料可以在互联网上找到，近年来也出版了不少类似书籍，但如果手头有一本具有特色的、资料较全的实用工具书，将为读者提供许多方便。本书所介绍的方法与资料大多是作者亲身经历过或深思熟虑后认为值得推荐和参考的。虽然不一定全是最新、最好的，但却是比较成熟的。

在我国，中草药应用历史悠久，植物资源丰富，是天然产物研究的核心内容之一。研究其有效成分，分析其活性，进行合成或结构修饰，以创制新药，是我们得天独厚的优越条件，有广阔的前景，是永远研究不完的领域，并为国际同行所羡慕。除药用外，在农业与食品工业领域，人们也希望能够越来越多地采用天然的杀虫剂、甜味剂与色素。希望这本册子能对此起点作用。由于作者学识所限，书中不足之处在所难免，欢迎读者给予批评指正，以便再版时补充与更正。

在化学领域，英语已经成为一种最通行的语言，并已为业界科研人员普通接受和习惯。尤其是在一些反应式和图表中，英文表示简洁明了，若翻译为中文，反而

会显得啰嗦。另外，本书中提及的不少化合物名称，迄今为止还没有对应的中文译名。鉴于以上两种原因，本书酌情保留了一部分英文表示。特此说明。

本书部分章节承蒙赵守训教授审阅，赵维民、杨培明、李吉楠等为编辑与组织索引等作了大量工作，在此一并致谢。

徐任生

2011 年 9 月

前　言

二萜化合物在生源上均是以焦磷酸香叶基香叶酯作为前体衍生而来的一大类天然化合物，多含有 20 个碳原子，相当于四个异戊烯基结构单元，化学结构丰富多样，根据骨架环系类型主要可分为无环、二环、三环、四环和大环二萜，以及与其相关环系骨架的多种降、断裂、碳链移位、基团位移和骨架重排等多种类型的化合物，广泛分布于高等植物、真菌、昆虫和海洋生物中。在高等植物中，二萜化合物主要发现存在于一些裸子植物和唇形科、菊科、大戟科、瑞香科等科属植物中。在众多的萜类化合物中，二萜类化合物是除倍半萜类化合物外迄今为止结构类型最丰富和发现化合物种类最多的一类天然产物。

二萜化合物的研究始于 1824 年对裸子植物中某些松科植物的非挥发性成分树脂酸（Resin acid）结构的探讨，直到 1953 年，才由捷克著名学者 Ruzicka 确定了树脂酸中一个主要成分松香酸的平面结构。此外在 1828 年，Peretti 发现欧洲红豆杉的叶片中含有苦味物质；Lucas 于 1856 年从中提取得到一种味极苦的白色粉末状生物碱物质，被称为紫杉碱。但直到 1971 年，Wall 等才从太平洋紫杉中分离得到抗肿瘤活性二萜化合物紫杉醇。因此，可以说二萜化合物的研究是从 20 世纪 50 年代才开始步入了一个新的发展阶段。之后随着新的、更有效的分离、分析方法及材料的发现和应用，以及萜类化合物在生源上的异戊二烯规则生物合成途径的阐明，二萜类化合物才得到了真正迅速的发展。在 1950 年由 Simonsen 和 Barton 合著的“The Terpene”（Vol. III，1951 年出版）一书中，仅记载了属于 8 种骨架类型的 17 个二萜化合物的平面结构；1972 年由 Devon 和 Scott 合著的“Handbook of Naturally Occurring Compounds”（Vol.II）一书中，收集了归属于 70 种骨架类型的 650 个二萜化合物；在 1986 年由 Dev 和 Misra 合著的“Handbook of Terpenoids”（Vol.I~II）一书中则叙述了归属于 176 种骨架类型的 2000 多个二萜化合物；1992 年由 Connolly 和 Hill 合著的“Dictionary of Terpenoids”一书中则记载了经系统整理归并后的共 87 种骨架类型的约 2500 余个二萜化合物。尤其是近 10 年来，由于一系列新的、高效分离材料和以高效液相色谱（HPLC）为代表的分析分离技术的迅速发展和广泛应用，二维核磁共振（2D-NMR）、高效液相色谱与固相微萃取和核磁共振联用（LC-SPE-NMR）、色谱与质谱联用（以 LC-MS/MS 为主）及单晶 X 射线衍射分析等现代波谱技术的广泛应用，以及以紫杉醇为代表的许多二萜化合物被发现具有各种较强的生物活性，如抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、杀虫、免疫调节等，使得二萜化合物化学研究进入了一个空前发展的时期。根据 2006 年版的天然化合物库（Dictionary of Natural Products CD-ROM）的记载，迄至 2006 年，已发现了 120 多种骨架类型的 12500 余个二萜化合物，是近些年来发现新化合物数量最多、开展生物活性探讨最广泛并取得显著进展最多的一大类天然产物。二萜化合物的研究在天然产物化学、生物合成、有机合成、生物化学和新药研发等学科领域中得到了广泛的关注。

《二萜化学》为《天然产物化学丛书》的分册之一。该书由六个章节构成，即链状及相关二萜，双环二萜，三环二萜，四环二萜，紫杉烷二萜和大环及其它类型二萜。每一类二萜化合物都由概述、结构分类及分布、提取与分离、理化性质、谱学特征及结构测定、化学合成、生物合成、

生物活性及应用等内容构成。本书各章节的主要编撰人员（黎胜红、李蓉涛、肖伟烈、黄胜雄、普建新博士）均为有丰富实践经验的、年富力强的中青年科技工作者，他们在二萜等天然产物化学方面做出了重要贡献，较为熟悉所编撰的内容，能较好地抓住本编撰的主线，给读者对二萜类化合物一个完整的概念和研究方法。另外，编撰者们尽力查阅和总结了近 10 多年国内外在该领域取得的成就与进展，引用了大量文献供读者参阅。我们期望该书的出版将有助于同行和相关领域的科技工作者对二萜化学有更多、更深入的了解，也将为我国二萜类化学研究水平的提升与发展以及二萜化合物的开发和应用起到推动作用。

本分册可为从事植物化学、药物化学、有机化学和中药化学等相关研究、教学和生产的科教工作者、专业技术人员和研究生提供有益的参考与帮助，促进二萜等天然产物化学和相关研究领域的发展。

由于科研与教学任务繁重和水平有限，加之涉及内容近年发展极为迅速，因此疏漏和不妥之处在所难免，恳请读者批评指正！

孙汉董

2011 年 6 月于昆明

内 容 简 介

本书介绍了天然产物化学成分提取与分离的新技术和新方法：其中包括超临界流体萃取，微波辅助萃取，高速逆流色谱，凝胶色谱，高效液相色谱与联用技术，波谱解析化学结构，结构修饰与前药制备，优化传统提取技术及生物活性检测等。同时还介绍了有实际应用价值的各类常用天然活性成分的分离方法。除药用成分外，还介绍了农业与食品工业中常用的杀虫剂、甜味剂、色素等。许多内容是作者自己实践经验的总结。在附录中收集了各种常用色谱显色剂，缓冲溶液配制方法，大孔树脂性能表及超滤膜性能表等。

本书可作为天然产物化学，有机化学，药物化学，植物化学，分析化学等领域教学、科研工作者及中西药制药公司与农业和食品工业有关人员的参考书和案头常用的工具书。

图书在版编目(CIP)数据

天然产物活性成分分离/徐任生，赵维民，叶阳主编. —北京：科学出版社，2012

ISBN 978-7-03-032656-0

Ⅰ.①天… Ⅱ.①徐… ②赵… ③叶… Ⅲ.①天然有机化合物-成分-分离 Ⅳ.①O629

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 224647 号

责任编辑：周巧龙 吴 迪 / 责任校对：陈玉凤

责任印制：钱玉芬 / 封面设计：陈 敬

科 学 出 版 社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

http://www.sciencep.com

骏 走 印 刷 厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012 年 1 月第 一 版 开本：B5(720×1000)

2012 年 1 月第一次印刷 印张：39 3/4

字数：800 000

定价：98.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

目　录

主编的话 …… 徐任生

第一篇　分离方法与技术

第 1 章　中草药有效成分的提取与分离 …… 赵维民　3
第 2 章　结晶与纯度鉴别 …… 徐任生　31
第 3 章　超临界流体萃取技术的应用 …… 蔡建国　36
第 4 章　微波辅助萃取技术的应用 …… 许海燕　杨培明　62
第 5 章　大孔吸附树脂的应用 …… 王芝祥　徐　伟　76
第 6 章　高效液相色谱及其联用技术 …… 唐春萍　叶　阳　96
第 7 章　高效快速中压制备色谱 …… 徐志红　111
第 8 章　逆流色谱 …… 杜琪珍　杨培明　119
第 9 章　凝胶色谱 …… 邹忠梅　141
第 10 章　优化传统提取与分离技术 …… 李慧梁　张　薇　陈海生　154
第 11 章　天然产物的结构鉴定 …… 吴　剑　赵维民　198
第 12 章　结构修饰与前药制备 …… 徐任生　赵维民　219
第 13 章　天然产物的生物活性筛选 …… 李　佳　228

第二篇　各　论

第 14 章　生物碱 …… 徐任生　叶　阳　273
第 15 章　黄酮类化合物 …… 孔德云　305
第 16 章　酚类和木脂体类化合物 …… 宣利江　336
第 17 章　香豆素 …… 陆　阳　362
第 18 章　蒽醌和花青素 …… 陆　阳　371
第 19 章　萜类化合物 …… 汪　豪　383
第 20 章　皂苷 …… 王红敏　赵维民　423
第 21 章　强心苷 …… 徐任生　449
第 22 章　核苷 …… 徐志红　456
第 23 章　多糖及寡糖 …… 丁　侃　王　滢　478
第 24 章　肽、蛋白质与酶 …… 徐志红　497

第 25 章　海洋天然产物 …… 林文翰　517
第 26 章　其他生物活性成分 …… 杨培明　548

附录 …… 杨培明　564
主题词索引 …… 615
动、植物名称索引(拉丁文) …… 628

4.1.1 概述……206
4.1.2 结构分类与生源关系……206
4.1.3 谱学特征及结构测定……216
4.1.4 化学转化与全合成……222
4.1.5 生物活性及应用……224
4.2 扁枝杉烷、阿替生烷、贝叶烷、绰奇烷及木藜芦烷二萜……227
4.2.1 扁枝杉烷二萜……227
4.2.2 阿替生烷二萜……229
4.2.3 贝叶烷二萜……232
4.2.4 绰奇烷二萜……234
4.2.5 木藜芦烷二萜……237
4.3 赤霉烷二萜……243
4.3.1 概述……243
4.3.2 结构分类……244
4.3.3 谱学特征及结构测定……247
4.3.4 生物合成及生物转化……250
4.3.5 化学转化及全合成……255
4.3.6 生物活性及应用……259
4.4 C-9 成桥环的四环二萜……260
4.4.1 阿菲敌可烷二萜……260
4.4.2 孪生花烷二萜……264
4.4.3 滨海孪生花烷和 Villanovane 型二萜……267
4.4.4 野甘草烷二萜……269
参考文献……271

第 5 章 紫杉烷二萜……黎胜红 278
5.1 概述……278
5.2 紫杉烷二萜的结构分类及分布……279
5.2.1 紫杉烷二萜结构分类……279
5.2.2 紫杉烷二萜的分布……280
5.3 紫杉烷二萜的提取与分离……292
5.4 紫杉烷二萜的理化性质……294
5.5 紫杉烷二萜谱学特征及结构测定……294
5.5.1 红外光谱（IR）……294
5.5.2 紫外光谱（UV）……294
5.5.3 质谱（MS）……295
5.5.4 核磁共振氢谱（^{1}H NMR）……296
5.5.5 核磁共振碳谱（^{13}C NMR）……297
5.5.6 紫杉烷二萜的核磁共振图谱举例……298
5.6 紫杉烷二萜结构修饰与构效关系……319
5.6.1 结构修饰……319

5.6.2 构效关系……326
5.7 紫杉烷二萜化学合成……326
5.7.1 紫杉醇的半合成……326
5.7.2 紫杉醇的全合成……330
5.8 紫杉烷二萜的生物转化……338
5.9 紫杉烷二萜生物合成……340
5.9.1 紫杉醇前体 GGPP 的生物合成……341
5.9.2 紫杉醇核心骨架紫杉二烯的生物合成……344
5.9.3 紫杉醇生物合成的下游途径及相关酶和基因……345
5.10 紫杉烷二萜生物活性及应用……354
5.10.1 紫杉烷二萜对肿瘤细胞的细胞毒活性……354
5.10.2 紫杉烷二萜促进微管蛋白聚合和抑制微管解聚的活性……355
5.10.3 紫杉烷二萜促进多药耐药肿瘤细胞中长春新碱的积累作用……356
5.10.4 紫杉烷二萜的抗血小板集聚活性……357
5.10.5 紫杉烷二萜抑制微生物的活性……357
5.10.6 紫杉烷二萜的毒性……357
5.10.7 紫杉烷二萜的应用……358
参考文献……360

第 6 章 大环及其它类型二萜……肖伟烈，石一鸣 367
6.1 概述……367
6.2 大环二萜……367
6.2.1 西松烷二萜……367
6.2.2 卡司烷二萜……373
6.2.3 贾白榄烷二萜……373
6.2.4 续随子烷二萜……374
6.2.5 维替生烷二萜……375
6.2.6 朵蕾烷二萜……376
6.2.7 尤尼斯烷二萜……376
6.2.8 阿斯贝斯蒂烷二萜……377
6.2.9 珊瑚烷二萜……378
6.2.10 齐尼阿菲烷二萜……378
6.2.11 齐尼卡烷二萜……379
6.2.12 巴豆烷二萜……380
6.2.13 巨大戟烷二萜……380
6.2.14 麻风树烷二萜……381
6.2.15 曼西烷类二萜……381
6.2.16 愈创木烷二萜……382
6.2.17 马齿苋醇型二萜……383
6.2.18 十一烷二萜……383
6.2.19 可别特烷二萜……383

6.3 大环二萜之间的生源关系……384
6.4 大环二萜的化学合成研究……385
6.4.1 西松烷二萜 (±)-Anisomelic acid 的全合成研究……385
6.4.2 西松烷二萜(±)-Isolobophytolide 的全合成研究……386
6.4.3 贾白榄烷二萜化合物的全合成研究……387
6.5 金钱松二萜……388
6.5.1 概述……388
6.5.2 提取与分离……389
6.5.3 结构解析……390
6.5.4 生物活性……393
6.5.5 全合成研究……394
6.6 其它类型二萜……397
参考文献……402

索引……409

二、间接药物设计方法 …… (202)
第二节 基于多维定量构效关系的各种 MD QSAR 模型化方法 …… (204)
一、2D QSAR 模型化方法 …… (204)
二、3D QSAR 模型化方法 …… (205)
三、4D QSAR 模型化方法 …… (208)
四、5D QSAR 模型化方法 …… (209)
第三节 基于配体 - 受体理论的 CADD 方法及应用 …… (210)
第四节 计算机辅助 RNA 药物设计 …… (214)
第五节 生物信息学在药物设计中的应用 …… (218)
第六节 CADD 技术在中药现代化中的应用 …… (222)
总结 …… (228)

第一篇　分离方法与技术

PDG

第 1 章　中草药有效成分的提取与分离

1.1　概　　述

随着生活水平的不断提高，人们更关注自身的健康，对安全、高效治疗药物的需求更加迫切。研究新药需要对大量化合物进行活性筛选，发现新药先导化合物。天然产物是新药先导化合物的重要来源之一。据统计，在 1981～2002 年全世界新发现的 877 个小分子药物中，61%源于天然产物或其结构类似物[1]。地球上预计存在的 50 万种开花植物中只有半数有文字记载，人们只对其中 10%的植物进行过化学研究，而且很多研究工作还很粗浅。

中草药是中华医学宝库中的瑰宝，是中华民族几千年与疾病作斗争的经验总结。从《神农本草经》记载的 365 味药发展到明末李时珍《本草纲目》收录的 1892 味药，人们对中药的认识不断深入。1994 年出版的《中国中药资源志要》收载了全国药用植物、动物、矿物等中药资源及部分从国外引种栽培或饲养的药用资源共计 12 694 种，其中药用植物分布于 383 科 2313 属共 11 020 种（含种下等级 1208 个）[2]。中草药有效成分是中草药发挥功效的物质基础。药用植物中有效成分的含量与植物的生长区域、植物的采集季节、植物的部位、加工储存条件以及气候与生态的变化有关。除有效成分外，药用植物中还可能存在一些与其具有协同、拮抗作用的成分以及有毒副作用的化学物质。研究确定中草药的有效成分是建立质控方法，保证及提高中草药及中成药质量的前提，也是发现新药先导化合物的有效途径。中草药一般具有多种临床用途，因此我们在寻找它的有效成分时首先应该确定寻找目标，分别寻找其中有某种疗效的有效成分，然后通过提取、分离纯化和相应的体外、动物体内模型筛选以及临床验证，这样多次反复实践才能达到目的。例如目前临床上作五加皮使用的药材主要有两类：一类是五加科植物细柱五加 *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith 的干燥根皮，《中华人民共和国药典》（简称《中国药典》）规定其正名为五加皮，别名南五加皮；另一类为萝藦科植物杠柳 *Periploca sepium* Bge. 的干燥根皮，《中国药典》规定其正名为香加皮，别名北五加皮。旧本草中五加皮没有南、北之分，统称为五加皮。香加皮具有祛风湿，壮筋骨的作用，其中含有强心苷类成分，如果过量饮用以香加皮泡制的药酒会导致中毒。近期研究还发现香加皮含有的一些孕甾烷糖苷在多种自身免疫性疾病动物模型上显示良好治疗效果[3～6]。

天然产物的分离纯化与结构鉴定曾是十分耗时的工作。随着色谱和波谱技术的进步，许多纯化工作可以通过自动化仪器来实现，大部分结构解析工作也可在较短时间内完成。人们逐渐把目光转向生物活性跟踪分离。研究发现新活性天然产物需加强化学与生物活性测试等方面的协作。对筛选发现的活性提取部位进行跟踪分离可减少工作的盲目性，且不容易漏掉可能存在的微量生物活性成分。鉴于中草药临床用途的多样性及中草药成分可能具有的多靶点作用，选择相关及适当广泛的筛选模型进行测试会促进发现新的有效成分。

1.2 文献检索与预试验

天然产物源于动物、植物、微生物和矿物，中草药主要以植物类为主。本章主要介绍植物化学成分的提取和分离方法。植物的化学成分很复杂，普遍含有蛋白质、糖类、淀粉、纤维素、树脂、叶绿素及无机盐等。此外，植物还可能分别含有生物碱、萜类、甾体、类黄酮、苯丙素、糖苷、有机酸、氨基酸等小分子次生代谢产物。

尽管植物中的化学成分通常比较复杂，但同科、同属植物资源所含的化学成分具有结构相似性。因此，在着手研究一种中草药的有效成分时，首先应通过文献检索，了解同科属植物中含有哪些类型的化学成分、这些化学成分及其类似物已报道具有哪些生物活性，从而将粗提物或部位在相关筛选模型上进行测试，对有活性的粗提物或部位进行生物活性导向的跟踪分离，这样有利于更有效地发现生物活性成分。*SciFinder*、*Reaxys* 和 *Combined Chemical Dictionary*（CCD）等数据库使检索同科、同属植物化学成分及生物活性变得十分方便。

在信息检索的基础上，可对植物粗提取物进行薄层色谱（TLC）分析，采用不同极性的展开剂可帮助初步了解粗提物中主要小分子化合物的数目、各化合物之间的大致含量比例，是否含有高极性糖苷类化合物等信息。对展开后的薄层板用各种定性试剂显色，可进一步判断所含化合物的结构类型，如用碘化铋钾（Dragendorff）试剂检测是否含有生物碱类化合物、用三氯化铁试剂检测是否含有酚类化合物等。定性试剂显色也会有例外情况发生，影响到预试验的结果。如碘化铋钾试剂对香豆素和萜类内酯也发生显色反应，而咖啡因虽是生物碱，但对碘化铋钾试剂却呈阴性反应。粗提物中如含有 Vc 等还原性物质，也会将三氯化铁试剂中的三价铁离子还原成亚铁离子，产生颜色反应。由于植物所含成分复杂且可能产生相互干扰，其中的低含量化学成分通常也难以用定性试剂检测发现。

随着各种液质联用（LC-MS）分析仪器的普及，对植物粗提物或分离得到的部位进行 LC-MS/LC-UV 分析，并结合文献检索得到的同科、同属植物已知天然产物的相对分子质量和具有共轭基团化合物的紫外光谱特征，可以对粗提物或部位中的化学成分有更清晰的认识，了解哪些为未报道过的化合物。对分离得到的纯

化合物，若相对分子质量与数据库中收集的同科、同属植物中某一化合物的相对分子质量相同，选用与其相同的溶剂测定核磁共振氢谱（对氢谱信号复杂的化合物，如皂苷等，可进一步测定核磁共振碳谱），通过与文献报道数据的比较，可快速鉴定多数已知结构化合物。掌握各种数据库的检索功能对提高工作效率十分重要。

1.3　天然产物的提取

在提取天然产物前通常需对所提取的天然材料进行粉碎。粉碎程度不仅影响到提取效率，而且关系到有效成分的提出。如采用超微粉碎设备对灵芝孢子粉进行破壁，才可将其中的活性成分有效溶出；采用粉碎机械进行药材粉碎时，由于高速撞击摩擦会导致药材温度升高，可能破坏药材中热不稳定化合物；先用液氮或冰箱放置对药材降温再进行粉碎有助于避免热不稳定化合物的化学结构变化。

选择适当的提取方法不仅可以保证所需成分被提出，还可以尽量避免不需要成分的干扰，简化后续的分离工作。有时只经过一步提取，即可获得单体成分。以低极性溶剂提取可得到亲脂性的组分，醇类溶剂则对极性与非极性物质都可溶出。若开始阶段采用极性大的溶剂提取，接着用溶剂萃取方法可将提取物按极性大小分成不同的部位。

1.3.1　传统溶剂提取法

传统溶剂提取法包括浸渍法、渗漉法、煎煮法、回流提取法及连续回流提取法等。

浸渍法提取天然产物，即将粉碎的天然原材料在容器内加溶剂浸泡，经过一段时间后倒出溶剂再加入新的溶剂浸泡，如此反复几次至所需成分基本提取完全。

渗漉法是将粉碎的天然原材料置于一下面开口的容器内，不断加入新溶剂，并通过控制下面出口大小连续收集浸提液（图 1.1）。由于原料不断与新溶剂或含有低浓度提取物的溶剂接触，始终保持一定的浓度差，渗漉法提取效果要比浸渍法好。根据需要可以采用单一溶剂进行渗漉，也可使用几种溶剂依次进行渗漉。根据药材体积的大小，可采用玻璃、陶瓷或不锈钢等材料制成的不同大小的渗漉装置进行提取。当用渗漉法提取植物花和叶等材料时，可在材料上部加一重物以减小体积。药材的浸渍法和渗漉法一般提取温度较低，提取物中所含杂质较少。采用渗

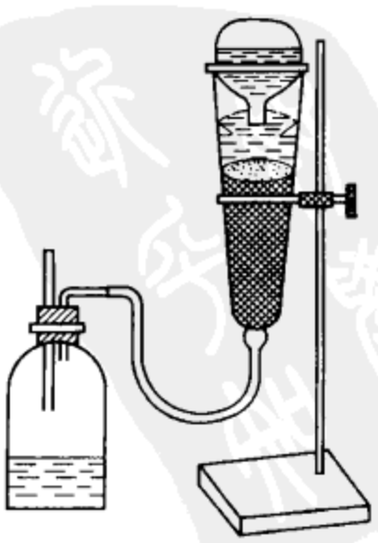


图 1.1　渗漉提取装置示意图[7]

漉法提取时，样品不宜过细，以免溶剂流经原料层时速度太慢，影响传质过程。

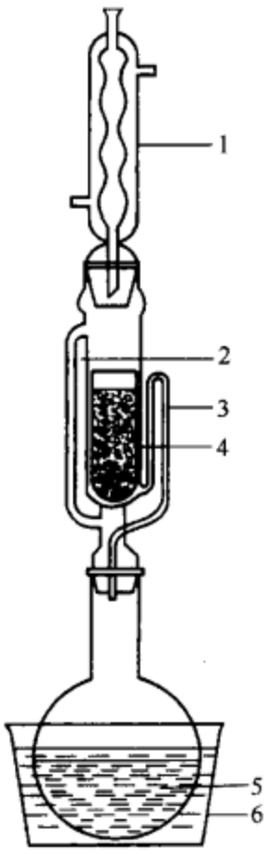


图 1.2 索氏提取器示意图[8]

1. 冷凝管；2. 溶剂蒸气上升管；3. 虹吸管；4. 装有原料的滤纸筒；5. 溶剂；6. 加热装置

与上述两种方法相比，煎煮法、回流提取法及连续回流提取法在较高温度下对天然成分进行提取，提取效率更高，但杂质也相对较多。材料量少时以索氏（Soxhlet）提取器进行连续回流提取，具有操作简单、节省溶剂的特点（图 1.2）。在不了解植物所含成分是否稳定的情况下，一般应避免高温提取，以防植物成分发生变化。

用溶剂提取天然材料时需考虑所用溶剂的沸点（沸点过高不易回收）、毒性及成本等因素。所用有机溶剂通常需呈惰性，即与所处理化合物不起化学反应。但惰性也不是绝对的，例如所用的甲醇、乙醇或正丁醇有时会与天然产物中的羧基形成相应的酯；用乙酸乙酯提取分离时，可能发生乙酰基转移；使用丙酮时，可能会与天然产物中的二醇基团形成缩酮结构。充分考虑上述因素，有助于判断所分得的化合物是否是真正的天然产物。在可用的提取溶剂中，水的成本最低，且非常安全。一些商品化的天然产物，如小檗碱、芸香苷、甘草酸等在制备过程中采用水为提取溶剂。但用水提取，提取液中的杂质较多，如无机盐、蛋白质、糖和淀粉等，给进一步分离带来许多困难。乙醇是最常用的有机溶剂，具有低毒、价廉、沸点适中、便于回收利用等特点，且对植物细胞的穿透能力强，除了蛋白质、黏液质、果胶、淀粉和部分多糖等外，大多数有机化合物都能在乙醇中溶解。当植物中所含成分较为简单或某一成分含量较高时，可根据其极性大小或溶解性能，选择一种适当的溶剂把所需的成分提取出来，而杂质留在植物残渣里。例如，细辛中含有一种中性物质细辛素，用石油醚回流，提取液浓缩即析出细辛素结晶，被石油醚一起提出的挥发油则留在母液中。又如，将橘络粗粉置于索氏提取器中，用甲醇或乙醇回流提取，冷却即析出橙皮苷结晶。

如果有效成分是酸性或碱性化合物，常可加入适当的酸或碱，再用有机溶剂提取。例如，生物碱在植物体中一般与酸结合成盐存在，在生药中加入适量的碱液，拌匀，使生物碱游离出来，再用有机溶剂提取。同样，有机酸可加酸使其游离，然后用有机溶剂提取。反之，可以用酸性乙醇提取弱碱性生物碱。生物碱一般不溶于碱水，但有些酚性生物碱（如吗啡）却能溶于氢氧化钠溶液中；有些生物碱的盐不溶

于水而溶于有机溶剂，不能用酸液提出。

为方便提取分离，有时要先对粉碎药材进行一些预处理。如种子类药材常含有大量油脂，可先采用石油醚脱脂或压榨法除去油脂再用其他高极性溶剂提取。

1.3.2　水蒸气蒸馏法

此法适用于提取能随水蒸气蒸馏而不被破坏的植物成分。这些化合物与水不相混溶或仅微溶，且在约100 ℃时有一定的蒸气压。当水加热沸腾时，能将该物质一并随水蒸气带出。例如植物中的挥发油，某些小分子生物碱如麻黄碱、烟碱、槟榔碱等，以及某些小分子的酸性物质如丹皮酚等均可应用本法提取，对一些在水中溶解度较大的挥发性成分可用低沸点非极性溶剂如石油醚、乙醚抽提出来。如将徐长卿加水浸泡，然后水蒸气蒸馏，蒸馏液用乙醚提取，醚提取液经浓缩即析出丹皮酚结晶。在对中药香加皮的乙醇提取液进行减压浓缩时，其中含有的4-甲氧基水杨醛会随溶剂蒸发并冷凝于溶剂回收瓶中。在对一种新植物材料进行研究时，应注意避免具有该性质成分的损失。在提取天然材料时，也应注意使用回收溶剂可能引入的其他成分。

1.3.3　超声提取法

超声波是在弹性介质中传播的一种振动频率高于声波(20 kHz)的机械波，能产生并传递强大的能量，给予媒质(如固体小颗粒或团聚体)极大的加速度。当颗粒内部接受的能量足以克服结构的束缚能时，固体颗粒(或团聚体)被破碎(或解聚)，从而促使细胞内有效成分的溶出。这种能量作用于液体，振动处于稀疏状态时，液体会撕裂成很小的空穴，这些空穴一瞬间即闭合，闭合时产生高达几十个大气压的瞬间压力，即称为空化现象。超声提取技术的基本原理主要是利用超声波的空化作用加速植物有效成分的浸出，另外超声波的次级效应，如机械振动、乳化、扩散、击碎、化学效应等也能加速欲提取成分的扩散释放并充分与溶剂混合，利于提取。与常规提取法相比，超声提取法具有提取时间短、产率高、无需加热等优点。郭等[9]用正交试验对苦瓜黄酮的超声提取工艺进行了优化，并与传统提取法进行了比较。选取了超声波功率、提取时间、料液比为考察因素，每个因素设计了3个水平，由方差分析得出超声波功率的改变对提取影响最大，其次是提取时间和料液比。综合考虑各因素得出苦瓜黄酮超声提取工艺条件为以90%的乙醇提取，超声波功率为80 W，提取20 min，料液比为1∶30(g∶mL)，与传统提取方法对比，提取量为传统方法的1.36倍，提取时间为传统提取方法的1/9。国内目前已有厂家生产连续逆流超声提取设备，可用于天然资源的大量提取。

此外，超临界流体萃取、微波辅助萃取、空气爆破等提取技术近年来在天然产物提取中也获得日益广泛的应用，缩短了提取时间、提高了提取效率。相关内容请

参见本书第 3 章、第 4 章及其他相关资料。

1.4 活性天然产物的分离

1.4.1 经典方法

这里的经典分离方法是指从早期迄今一直被采用的方法，通常操作比较简单，无需复杂、昂贵的仪器。

1.4.1.1 液-液萃取法

天然产物的结构千差万别，分子结构中极性基团的多少及取代位置决定了其在不同溶剂中的溶解性。极性化合物易溶于极性溶剂，非极性化合物易溶于非极性溶剂。对筛选发现的活性提取物，用溶剂分配法可快速将提取物按极性大小进行划分，通过进一步活性测试可确定活性成分所在部位。结合使用各种去除叶绿素、鞣质、多糖的方法，可以减小后续分离的规模。该方法被广泛用于从天然资源中寻找生物活性成分。

在提取分离皂苷类成分时，可先用工业酒精提取，对浓缩后的水液依次用低极性溶剂，如氯仿、乙酸乙酯从水中萃取出亲脂性成分，然后通过正丁醇与水分配可使皂苷类成分富集于正丁醇部位，从而起到初步纯化作用。在分离生物碱类成分时，在调节水相 pH 后，利用有机溶剂进行萃取，可使生物碱类成分得到富集，并可使强碱性生物碱与弱碱性生物碱得到初步分离。此外，在提取内酯类化合物时，可利用其不溶于水，但遇碱水解成为羧酸盐而溶于水，加酸酸化后又回复原物而不溶于水的性质，从而与其他杂质分开。

在用同体积溶剂进行液-液萃取时，一般重复 3～5 次即可。可先进行小样试验，如容易产生乳化现象，大量萃取时不宜剧烈振摇。被萃取溶液浓度不宜过稀，以减少萃取溶剂用量。进行萃取时，如遇到两相溶剂颜色都很深或颜色接近，可用灯光近距离照射，有助于分清界面。

1.4.1.2 固相萃取法

固相萃取法(solid phase extraction，SPE)是一种利用固相吸附剂纯化样品的方法。固相萃取可以达到去除杂质、脱盐及浓缩被分析物的目的。固相萃取时可采用多种吸附剂，并可采用自动化仪器对大量样品进行常规纯化，已被广泛用于样品制备、分离及对分析样品、活性测试样品进行预处理。

固相萃取法可以采用下面两种方式：

(1) 样品中的干扰性杂质被吸附于萃取柱上，而所需的化合物被洗脱下来。

这种情况下的操作包括萃取柱活化(洗涤除去柱内的杂质并用低洗脱能力的溶剂交换)、上样(将样品溶解加入萃取柱,此时所需化合物会随洗脱液流出,故需开始收集)和洗脱(用溶剂进一步洗净萃取柱残留的所需组分,合并收集液)。在植物提取物中含有少量叶绿素时,可采用装填 C-18 反相硅胶的固相萃取柱,将溶于甲醇或乙醇的样品液通过萃取柱,其中叶绿素可被吸附于 C-18 反相硅胶,而所需化合物随醇溶液流出。

(2) 需要的化合物被保留在柱上,而干扰性杂质被洗脱下来。在这种情况下,操作包括萃取柱活化(洗涤除去柱内的杂质并用低洗脱能力的溶剂交换)、上样(将样品用一定体积洗脱能力低的溶剂溶解,加入萃取柱并使组分保留在柱上)、淋洗(用适当溶剂洗涤,除去尽可能多的不需要组分)和洗脱(用小体积洗脱能力更强的溶剂将组分洗脱下来并收集)。此时,固相萃取可起到样品浓缩的作用。

除使用商品化的预装固相萃取柱(如 Bond Elut®、Sep-Pak® 系列产品)外,也可在实验室根据样品量和样品性质自行装填相应尺寸的固相萃取柱。硅胶、氧化铝、键合相硅胶、离子交换树脂等都可用作固相萃取的吸附剂。Hakala 等将番茄酱的石油醚提取物通过装有硅胶的短柱,并用石油醚进行洗脱,除番茄红素之外的胡萝卜素类化合物都被洗脱下来。用氯仿可将番茄红素洗脱下来,经过进一步半制备型高压液相色谱分离后得到纯品[10]。

1.4.1.3　分馏法

利用提取成分具有不同沸点的性质,可使用分馏法对植物成分进行分离。如在分离毒芹总碱中的毒芹碱和羟基毒芹碱时,以及分离石榴皮中的伪石榴皮碱、异石榴皮碱和甲基异石榴皮碱时,均可利用常压或减压分馏法进行初步分离,然后再精制纯化。分馏法近期被用于从植物温郁金中提取抗肿瘤原料药榄香烯(elemene)[11]。

1.4.1.4　沉淀法

利用有机物的溶解性或与某些试剂产生沉淀的性质可实现植物成分的初步分离。对所分离成分来讲,这种沉淀反应应是可逆的。中药提取中常用的水提醇沉法,即将中药水提液浓缩后向其中加入乙醇达到一定比例,提取液中的多糖、蛋白质、无机盐等物质可以析出,通过过滤即可将其除去。对于一些低极性物质需要用醇类溶剂提取,此时也可将浓缩液加水沉淀,析出其中低极性的成分,如用此法来沉淀叶绿素。沉淀法是一种简便的分离方法,适用于大量样品的处理。

中药絮凝分离技术也是一种利用沉淀进行分离的方法。将絮凝剂加到中药的水提液中,通过絮凝剂的吸附、架桥、絮凝作用以及无机盐电解质微粒和表面电荷产生凝聚作用,使许多不稳定的微粒如蛋白质、树胶、鞣质等连接成絮团沉降,经过

滤达到分离纯化的目的。絮凝剂有鞣酸、明胶、壳聚糖等，目前应用最广泛的是壳聚糖澄清剂。与水提醇沉法相比，絮凝分离技术具有成本低、操作安全简单、分离效果好的特点，已开始在中药生产中应用[12]。

1.4.1.5 膜分离法

利用小分子物质在溶液中可通过具有一定孔径的膜，而大分子物质不能通过的性质可达到分离的目的。膜分离法常用于蛋白质、多肽、多糖等大分子化合物与无机盐、单糖、双糖等小分子化合物的分离，如大豆蛋白的工业化生产中即采用膜分离法。根据所用膜的孔径大小不同可将膜分离法分为超滤及纳滤。膜分离法因不使用大量有机溶剂而具有很大优越性，随着膜分离技术的不断改进，膜分离法在天然药物的研发与生产中将得到更加广泛的应用。

1.4.1.6 升华法

固体物质加热时，不经过液态阶段直接变成气态，此现象称为升华，气态遇冷可凝结成原来的固体。植物中凡具有升华性质的化合物，均可用此法进行纯化。樟木中的樟脑，茶叶中的咖啡因以及存在于植物中的一些香豆素、有机酸成分具有升华的性质。升华法简单易行，但往往产率低，还可能伴有分解现象。

1.4.1.7 结晶法

植物成分中大半是固体化合物，其中一些化合物可以通过结晶达到分离纯化的目的。有时植物中某一成分含量特别高，即可找到合适的溶剂进行提取，提取液放冷或稍浓缩，便可得到结晶。利用结晶法进行植物成分的分离纯化，不需复杂的仪器设备，相对于制备色谱分离方法，成本低、适于大量制备。需利用 X 射线衍射方法确定化合物分子结构时，获得好的单晶十分关键。结晶所选用溶剂最好能对所需成分的溶解度随温度的不同而有显著的差别，即加热时溶解，冷却则析出。对杂质来说，在该溶剂中应不溶或难溶。亦可采用对杂质溶解度大而对欲分离物质不溶或难溶的溶剂，用洗涤法除去杂质后再用合适溶剂结晶。一些结晶中也会含有杂质，此时可用相同溶剂或不同溶剂进行重结晶以获得更高纯度的样品。对于有关结晶与重结晶的详细介绍请见本书第 2 章。

1.4.1.8 植物中几种杂质的去除

1）鞣质

鞣质是一种有涩味的、能与生物碱和蛋白质产生水不溶沉淀的多酚性化合物，鞣质能溶于水和乙醇，不溶于低极性有机溶剂，因此生药的水或乙醇提取液中常杂有大量的鞣质。在进行生物活性测试时，有时需从植物提取物或某一部位中去除

鞣质类物质。使用聚酰胺柱色谱法可有效脱除鞣质类成分。Tan 等将该方法用于筛选植物提取物对 HIV-Ⅰ型逆转录酶的抑制活性，并比较了几种去除鞣质的方法[13]。对于少量用于生物活性测试的植物提取物，可取 3 mg 该提取物溶于最少量的水中，然后加到装有 400 mg 聚酰胺粉的玻璃柱(10 cm×0.6 cm)上。依次用 2 mL 水、2 mL 50%甲醇及 5 mL 无水甲醇洗脱，收集所有的流分。甲醇可将含有两个或三个酚羟基的非鞣质类化合物洗脱下来，即大部分的黄酮类化合物可被回收。该方法存在的问题在于一些具有酚羟基的非鞣质类物质也可能被除去。如果想要除去所有的酚类化合物，采用乙酸铅沉淀法是最有效的途径。

2) 叶绿素

叶绿素是植物中普遍存在的绿色色素，叶片中含量最高，能溶于一般有机溶剂，难溶于水。如用乙醇提取含有叶绿素的植物材料，浓缩提取液加水至乙醇含量为 15%～20%时，低温放置，绝大部分叶绿素可沉淀析出，通过过滤可予以去除。需注意的是，植物中存在的一些低极性物质可能会和叶绿素一同析出，因此应对沉淀物进行薄层检测，必要时需再次进行沉淀处理或进行柱色谱分离除去叶绿素。将含有较多叶绿素的植物提取物用十八烷基硅胶(C-18)或 MCI 树脂拌样，加到装有相同固定相的色谱柱顶端，以梯度醇-水洗脱，除起到分离作用外，也可将叶绿素吸附于固定相上，最后可用丙酮等低极性溶剂洗净固定相上的叶绿素。此外，叶绿素也溶于氢氧化钠等碱性溶液。在从毛花洋地黄叶中提取地高辛时，在叶粉发酵后用 70%乙醇提取，提取液浓缩后，先用氯仿与稀碱溶液洗涤去除叶绿素，再用丙酮提取产物[14]。

3) 蛋白质和多糖

用水提取时，蛋白质和多糖可以用乙醇或甲醇沉淀除去。水提取液加热煮沸，使蛋白质变性沉淀出来，也是一种简便去除蛋白质的方法。用有机溶剂提取时，蛋白质和多糖不会被大量提出。利用大孔吸附树脂、MCI 树脂、反相硅胶等填料进行柱色谱分离，用水洗脱可除去提取物中的这些极性大分子物质。若有效成分溶于乙酸乙酯、氯仿等有机溶剂，则可用这些溶剂与水液进行分配，将有效成分提出。

4) 蜡状物质

蜡状物质(简称为蜡质)可溶于石油醚和乙醚，可用这些溶剂先去除植物所含的蜡质，再进一步用其他溶剂提取。也可用乙腈处理植物提取物除去其中所含的蜡质。Zheng 在对植物大花黄花蒿[*Artemisia annua* (Asteraceae)]中具有细胞毒性的黄酮类和萜类物质进行分离的过程中，也采用了乙腈沉淀的方法[15]。对该植物的地上部位先以己烷提取，提取物溶于 20 mL 氯仿中，蜡状物质在加入 180 mL 乙腈后析出。

1.4.2 色谱分离方法

色谱分离方法是利用不同物质在固定相与流动相中不同的平衡分配系数来进行分离的一种方法，它具有很高的分离能力，远远高于分馏、萃取等传统分离方法。随着现代色谱仪器和色谱填料的不断创新，色谱分离所需时间越来越短，且自动化程度不断提高，工作强度较以往显著降低。

在色谱分离中，试样混合物在固定相和流动相之间连续不断地进行分配平衡，不同的化合物由于它们之间的理化性质的差异，在两相中存在量也各不相同。色谱分离所用的固定相与流动相互不相溶。流动相只能是气相和液相，固定相只能是固相和液相。当流动相为液体时，称液相色谱；当流动相为气体时，称气相色谱。多数有机化合物不能气化，不适合用气相色谱进行分离。在活性天然产物制备分离中，用得最多的是液相色谱，本书只对液相色谱进行介绍。

按液相色谱分离过程的机理来分类，利用吸附剂表面对不同组分吸附性能的差异来达到分离的目的，称为吸附色谱；利用不同组分在流动相和固定相之间的分配系数不同而分离的，称为分配色谱；利用分子大小不同而阻滞作用不同进行分离的，称为尺寸排阻色谱；利用不同组分对离子交换剂亲和力不同进行分离的，称为离子交换色谱；另外，根据固定相与流动相的相对极性大小，又可分为正相色谱与反相色谱。一般地，极性较小的化合物在正相中流出较快而极性较大的化合物在反相中流出较快，在这两种方式中化合物的选择性不同，并且流出顺序通常相反。

1.4.2.1 液-固色谱

1）液-固色谱的固定相

常用液-固色谱分离的固定相种类有多种，如硅胶、键合相硅胶、氧化铝、聚酰胺、葡聚糖凝胶、离子交换树脂等。上述各种固定相具有各自的特点，可选择用来分离不同类型的化合物。天然产物化学研究中往往需采用不同的固定相进行多次有针对性的色谱分离，才能得到纯化合物。下面简单介绍几种常用的固定相。

（1）硅胶。硅胶为一多孔性物质，可用通式 $SiO_2 \cdot xH_2O$ 表示。它具有多孔性的硅氧环（siloxane）及—Si—O—Si—的交联结构，其骨架表面的硅醇（silanol）基团能通过氢键与极性或不饱和分子相互作用。硅胶的吸附性能取决于硅胶中硅醇基的数目及含水量。随着水分的增加，吸附能力降低。若吸水量超过 12%，吸附能力极弱，不能用作吸附色谱，只可用作分配色谱的载体。硅胶的表面积、表面结构、微孔体积及微孔半径均直接影响着色谱分离的效果。有时可向硅胶中掺入某种试剂，以改良吸附性能，提高分离效果。通常，用硝酸银处理过的硅胶对不饱和烃类有极好的分离作用。改良吸附剂的制备一般是将含 1%～10%添加试剂的水或丙酮溶液与硅胶混匀，待稍干后于 110 ℃干燥即可。

目前在大多数制备液相色谱分离中仍采用硅胶，硅胶的优点在于价格低廉，分

离速度快，可供选择的洗脱剂种类多，且所用大多数溶剂沸点较低，分离后易于除去。一般采用分析型硅胶薄层色谱来摸索分离条件，选择不同比例的两种或两种以上溶剂混合作为流动相。

（2）键合相硅胶。硅胶表面的硅羟基通过化学反应可连接上不同基团，得到具有不同分离选择性能的键合相硅胶。图 1.3 为几种键合相硅胶组成示意图[16]。

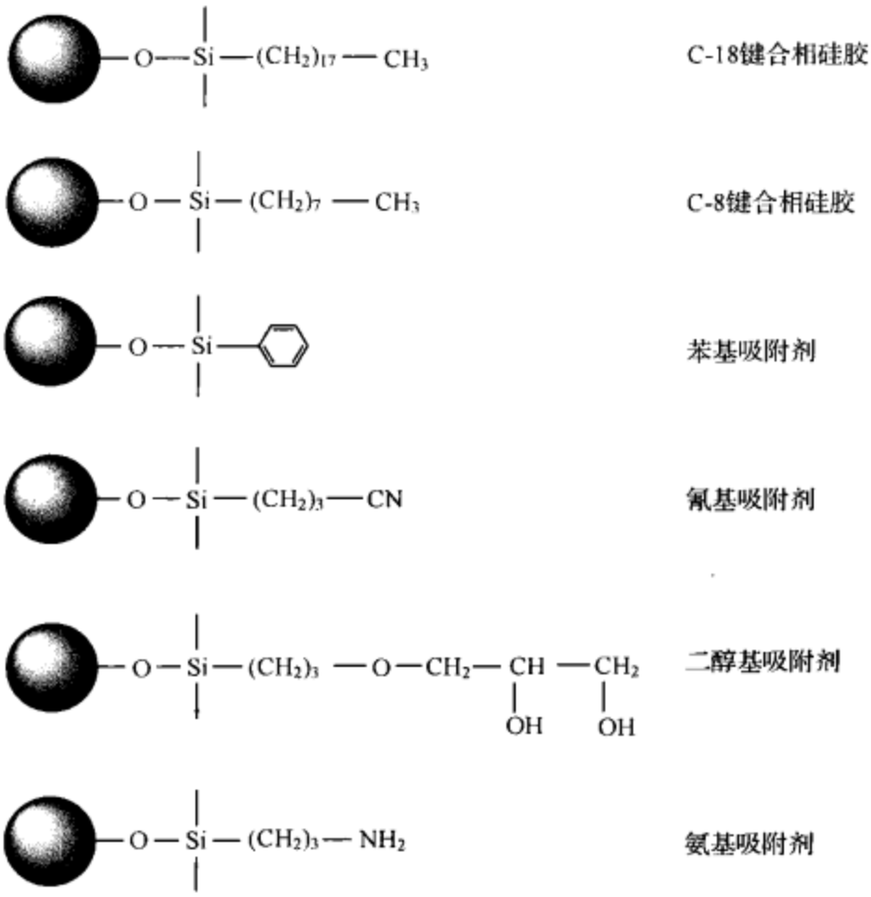


图 1.3　几种键合相硅胶组成示意图

在键合相硅胶中，以 C-18 反相硅胶应用最为普遍，它对极性及非极性化合物均可适用。在利用键合相硅胶进行反相色谱时，甲醇-水、乙腈-水混合溶剂是最为常用的洗脱剂。可用具有相同键合相硅胶的薄层色谱或分析型高压液相色谱进行制备型柱色谱的洗脱剂选择。氰基和氨基吸附剂既可用于正相色谱分离，也可用于反相色谱分离。氨基吸附剂适于分离糖类、核苷酸、生物碱。键合相硅胶在液相色谱中占有重要地位，被普遍用于高效液相色谱。键合相硅胶可多次反复使用，样品被破坏的危险小，不可逆吸附少。

（3）氧化铝。氧化铝是一种常用的吸附剂，为两性氧化物，能溶于无机酸和碱性溶液中，是由氢氧化铝直接在高温（约 600 ℃）下脱水制得。由于制造关系常带有微碱性，对于分离植物中的碱性成分如生物碱颇为理想，但不宜用于醛、酮、酯和内酯等化合物的分离，因为有时碱性氧化铝可与这些化合物发生反应，如异构化和

氧化反应等。可用水洗除去氧化铝中的碱性杂质，再活化即得中性氧化铝。氧化铝的活性与含水量关系极大，一般在 200 ℃左右加热 4～6 h 活化，可除去其中水分；若要降低活性，可加入一定量的水。活化时氧化铝表面的氧能与水分子结合形成羟基，具有离子交换性质，但温度不宜过高（＞400 ℃），否则会引起氧化铝晶格的改变，造成不可逆的吸附力下降，而不能供色谱用。

同硅胶色谱一样，在氧化铝色谱中，极性溶剂的洗脱能力较非极性溶剂大，所以逐步递增溶剂的极性，可使吸附在氧化铝柱上的不同化合物依极性大小依次洗脱，达到分离的目的。在实际操作中主要根据薄层色谱的展层来选择柱色谱洗脱剂。徐任生等从植物胀果甘草中分离甘草查耳酮时，经多次探索发现将甘草的氯仿提取物经聚酰胺柱分离后，再用氧化铝柱分离，氯仿洗脱，顺利得到结晶性产物[17]。

（4）聚酰胺[18]。聚酰胺（polyamide）是通过酰胺基聚合而成的一类高分子化合物，分子中含有丰富的酰胺基，可与酚类、酸类、醌类、硝基化合物等形成氢键结合而被吸附，与不能形成氢键的化合物分离。

化合物分子中酚羟基数目越多，则吸附力越强，芳香核、共轭双键多的吸附力也大。易形成分子内氢键的化合物，会使化合物的吸附力减少。从聚酰胺柱上洗脱被吸附的化合物是通过一种溶剂分子取代酚性化合物来完成的，即以一种新的氢键代替原有氢键的脱吸附而完成。如黄酮苷元与苷的分离，当用稀醇作洗脱剂时，黄酮苷比其苷元先洗脱下来；而非极性溶剂洗脱其结果恰恰相反，即黄酮苷元比其苷先洗脱下来，这表明聚酰胺具有“双重色谱”的性能，因聚酰胺分子中既有非极性的脂肪键，又有极性的酰胺基团。当用含水极性溶剂为流动相时，聚酰胺作为非极性固定相，其色谱行为类似反相分配色谱，所以黄酮苷比其苷元容易洗脱。当用非极性氯仿-甲醇为移动相时，聚酰胺则作为极性固定相，其色谱行为类似正相分配色谱，所以苷元比其苷容易洗脱，故聚酰胺色谱除了上述化合物外亦可用于分离萜类、甾体、生物碱及糖类。

色谱中常用的聚酰胺是由己内酰胺聚合而成的尼龙-6 及由己二酸与己二胺聚合而成的尼龙-66，既亲水又亲脂，性能比较好，可分离水溶性物质，也可分离脂溶性物质。它可溶于浓盐酸、甲酸，微溶于乙酸、苯酚等溶剂，不溶于水及甲醇、乙醇、丙酮、乙醚、氯仿和苯等常用有机溶剂，对碱较稳定，对酸的稳定性较差，尤其是无机酸，在温度高时更敏感。

装填制备柱时是将颗粒状聚酰胺混悬于水中湿法装柱，在用非极性溶剂系统进行色谱分离时，则用组分中低极性的溶剂装柱。一般每 100 mL 聚酰胺可上样 1.5～2.5 g，实际上其比例视具体情况而定。样品先用洗脱溶剂溶解，使浓度至 20%～30%。若不溶解于洗脱剂，可选用易挥发的有机溶剂溶解，拌入干粉中后将溶剂减压蒸去，湿法装入柱顶。洗脱剂常采用水，递增乙醇至浓乙醇液或氯仿、氯仿-甲醇，递增甲醇至纯甲醇洗脱。若仍有物质未洗脱下来，可采用稀氨水或稀甲酸铵溶

液洗脱，分段收集。使用过的聚酰胺一般用 5% NaOH 洗涤，然后水洗，再用 10% HOAc 洗涤，最后用蒸馏水洗至中性即可。

聚酰胺薄膜色谱是检出上述化合物的重要手段，它是将聚酰胺溶于甲酸中涂布在涤纶片基上所制成的膜片，待甲酸挥发干燥后即可使用。可用作聚酰胺柱色谱探索分离条件，又可检查柱色谱各流分的成分和纯度。若在各种溶剂系统中加入少量酸或碱，可克服色谱中拖尾现象，使斑点清晰。市售聚酰胺薄膜可根据需要大小进行裁剪。对于酚类混合物，可用三氯化铁试剂显色观察分离效果，其他在紫外灯下无法观察的样品可考虑用特征显色剂或碘显色。

(5) 活性炭。活性炭色谱是用来分离水溶性物质的主要方法之一。对植物中的某些苷类、糖类及氨基酸等成分具有一定的分离效果。由于它来源容易，价格便宜，因此适用于大量制备型分离。

目前市售的医药用活性炭及色谱用活性炭多以木屑做原料，加氯化锌在700～800 ℃高温炭化，活化，经适当处理除去杂质而制成，通常呈粉末状或颗粒状。粉末状活性炭颗粒极细、吸附力强，但流速慢，色谱过程中需要加压或减压操作，难以达到理想的流速。因此，色谱用活性炭通常是颗粒状，虽然总表面积减少，但流速易于控制。

活性炭的吸附作用，在水溶液中最强，在有机溶剂中较弱，故用有机溶剂脱吸附。例如，以乙醇-水进行洗脱时，则随乙醇浓度的递增而洗脱力增加，有时亦用稀甲醇、稀丙酮、稀乙酸溶液洗脱。

活性炭对芳香族化合物的吸附力大于对脂肪族化合物；对大分子化合物的吸附力大于对小分子化合物；对极性基团(如 COOH，NH_2，OH 等)多的化合物的吸附力大于对极性基团少的化合物。因此可以利用这些吸附性能的差别，将水溶性芳香族化合物与脂肪族化合物、氨基酸与肽、单糖与多糖分开。

使用前先应将活性炭于 120 ℃加热 4～5 h，使所吸附的气体除去。使用过的活性炭可用稀酸、稀碱交替处理，然后水洗，加热活化。有时将粉末状活性炭制成颗粒状锦纶活性炭(1∶2)或与硅藻土(1∶1)混合后装柱，以增加流速，但颗粒状活性炭吸附性能要比粉末状活性炭低。方等[19]从垂盆草(*Sedum sarmentosum*)中分离水溶性垂盆草苷时，曾用颗粒状活性炭柱去除杂质，再反复进行硅胶柱色谱分离得到结晶。

(6) 离子交换剂[20]。离子交换是不溶性固体物质(通常为树脂)上能够解离成离子的部分与溶液中的离子发生交换的一种反应。这种带有可交换离子的不溶性固体称为离子交换剂。离子交换剂是高分子物质，具解离性离子交换基团，在水溶液中能与其他阳离子或阴离子起交换作用，而这种交换作用是可逆的。当两种以上的成分被“吸附”在离子交换剂上，用洗脱液洗脱时，它们的被洗脱能力决定于各物质洗脱反应的平衡常数，利用物质“吸附”及脱“吸附”能力的不同进行分离即为离子交换色谱。目前大部分采用合成离子交换剂，一种是单体在聚合前本身就

含有交换基团；另一种是首先形成聚合物，然后引进交换基团。其中用途最广的是离子交换树脂。另外也有在纤维素或多聚糖上人工引入交换基所成的离子交换剂，它们大多用于植物大分子蛋白质、核酸、酶及多糖的分离精制。

离子交换树脂可分为两大类，即阳离子交换树脂与阴离子交换树脂：

阳离子交换树脂　强酸型 $-SO_3H$

　　弱酸型 $-COOH$

阴离子交换树脂　强碱型 $-N-(CH_3)_3X$

　　$-N-(CH_3)_2(C_2H_4OH)X$

　　弱碱型 $-NR_2$

　　$-NHR$

　　$-NH_2$

离子交换色谱在中药有效成分的分离方面应用得非常广泛，主要用于生物碱类、氨基酸类、肽类、有机酸类以及酚类等化合物的分离精制。如可以将中药的水提取液依次通过阳离子交换树脂和阴离子交换树脂，然后分别洗脱，即可获得碱性（阳离子交换树脂的洗脱物）、酸性（阴离子交换树脂的洗脱物）和中性（阳离子交换树脂和阴离子交换树脂均不吸附的物质）三部分提取物（图 1.4）。也可将天然药物的酸水提取液直接通过阳离子交换树脂，然后碱化，用有机溶剂洗脱，获得总生物碱或总碱性物；还可将中药的碱水提取液直接通过阴离子交换树脂，然后酸化，用有机溶剂洗脱，获得总有机酸或总酸性物。

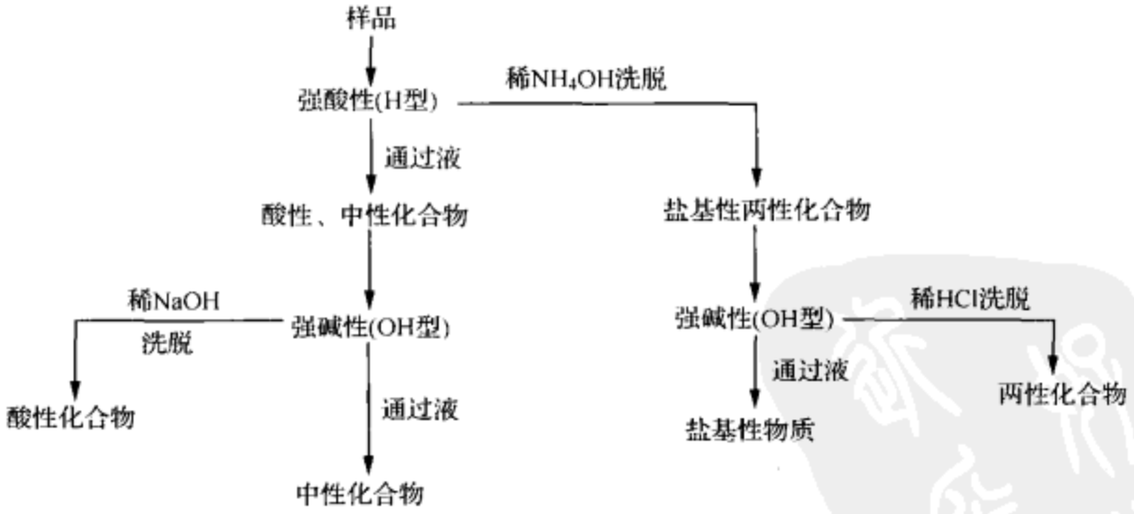


图 1.4　利用离子交换剂分离酸碱及两性成分

影响离子交换的有关因素包括：

溶液的酸碱度：离子交换剂可以简单地理解为一种高分子不溶性酸或碱，因此溶液的酸碱度对离子交换有很大的影响。当交换溶液中氢离子的浓度显著增高时，因同离子效应，抑制了阳离子交换剂中的酸性基团的解离，故离子交换反应就

很少进行，甚至不进行。通常强酸性交换剂交换液的 pH 应大于 2，弱酸性交换剂的交换液 pH 应在 6 以上。同样在阴离子交换剂中，当溶液的 pH 增大时，亦会发生同样的情况，故强碱性交换剂的交换液的 pH 应在 12 以下，弱碱性应在 7 以下。

交换离子的选择性：离子交换剂对交换化合物来说，主要取决于化合物的解离离子的电荷、半径及酸碱性的强弱。解离常数大，酸碱性强者容易置换，但洗脱相对来说较难。解离离子价数越高，电荷越大，它的吸附性越强，越容易交换在交换树脂上，碱金属、碱土金属及稀土元素还与它们的原子序数有关，前者原子序数大则交换吸附就强，稀土元素的原子序数小，其交换吸附弱。

被交换物质在溶液中的浓度：离子交换操作通常是在水溶液或含有水的极性溶剂中进行，这样有利于解离与交换。浓度低的溶液对离子交换剂的选择性大。在高浓度时解离度会趋向减少，有时会影响吸附次序及选择性。浓度过高时，还会引起树脂表面及内部交联网孔收缩，影响离子进入网孔，所以一般实验操作时，所用的溶液的浓度应略稀，有利于提取分离。

温度的影响：稀溶液温度的改变对交换的性能影响不大，但在 0.1 N[①] 以上浓度时，温度升高对水合倾向大的离子容易交换吸附，同时离子的活性系数增大。对弱酸、弱碱交换剂来说，其交换率有较大的影响，一般温度增高，离子交换速度加快。

溶剂的影响：通常在水中进行交换，亦可采用含水的极性溶剂。

此外对交换树脂本身来说，交联度大，结构中的网眼较小，大分子离子就不容易进入。反之交联度小，交联网孔直径大，则易于离子的扩散与交换，因此交联度的大小可以增加交换树脂对被交换物质的选择性。树脂颗粒的大小亦会影响交换速率。颗粒小，表面积大，有利于与溶液中的离子接触，增加交换速度。强酸和强碱性的交换树脂交换基团的解离能力强，容易与溶液中的离子交换。

利用离子交换树脂可从八角茴香（*Illicium verum* Hook. f.）中纯化莽草酸（shikimic acid），用作合成抗流感药物达菲（磷酸奥司他韦，oseltamivir phosphate）的原料。将原料八角粉碎后用乙醇加热回流提取两次，合并两次提取液，减压回收乙醇得到浸膏。用水溶解浸膏，过滤除去沉淀，滤液上碱性阴离子树脂柱，依次用水和含有冰醋酸或盐酸的乙醇溶液洗脱，回收乙醇溶液，静置析出沉淀。沉淀用乙醇进行重结晶，得到白色莽草酸结晶[21]。

（7）大孔吸附树脂。请见本书第 5 章。

（8）凝胶。请见本书第 9 章。

（9）MCI GEL。日本三菱化学公司生产的 MCI 树脂是在 Diaion 和 Sepabeads 大孔吸附树脂基础上设计的一种反相精细分离填料，具有更高的色谱分离

① N 为非法定单位，为遵循学科与读者阅读习惯，本书仍沿用这一用法。

性能。MCI 填料具有球形颗粒，颗粒尺寸分布很窄，粒度范围广，从 4 μm 到 300 μm，可应用于装填分析和制备柱，适用于从分析制备到工业规模纯化天然产物。其中 MCI GEL CHP20P(75～150 μm)是聚苯乙烯型填料，在天然产物化学实验室应用最为广泛。与反相柱色谱方法类似，用 MCI GEL CHP20P 进行柱色谱时，可先将色谱柱用水或低浓度醇水混合液交换，用少量水或尽可能低浓度的醇溶解样品液体上样(对水或醇难溶解的样品可取少量 MCI GEL CHP20P 填料拌样固体上样)，然后用浓度依次增加的醇溶液梯度洗脱。可将装有 MCI GEL CHP20P 填料的色谱柱与检测器连接或用 TLC 检测所收集到的各流分。Nie 等在研究大叶石头花(*Gypsophila pacifica* Kom.)根中的三萜皂苷时发现，MCI GEL CHP20P 填料比 D101 大孔树脂和 C-18 反相硅胶对齐墩果烷型三萜皂苷有更好的富集和分离效果[22]。

2) 液-固色谱分离方法

液-固色谱固定相可呈薄层形式铺在玻璃板、铝板、不锈钢板或其他载体上，也可装在不同材质的色谱柱内，前者称为薄层色谱，后者称为柱色谱。

(1) 薄层色谱。薄层色谱的固定相有多种，如硅胶、键合相硅胶、氧化铝、聚酰胺、纤维素等。根据实验目的可分为分析型薄层色谱和制备型薄层色谱。

分析型薄层色谱：分析型薄层色谱主要用于样品的纯度和含量分析、制备色谱分离条件的选择、与对照样品的比较及化学反应监测等。分析用预制薄层板在国内外已有多家公司生产销售，使用方便。其中预制高效薄层板采用更细、颗粒更均匀的吸附剂(5 μm，10 μm)，具有快速、高效、灵敏的特点。分析型薄层色谱操作如下：

A. 样品溶解：将样品溶于挥发性高的有机溶剂，浓度不宜太浓或太稀。样品太浓容易产生拖尾现象，影响薄层色谱的分辨率；样品太稀则微量成分难以被观测到。

B. 薄层点样：用毛细管进行点样，点样位置距离底边 1 cm 左右，对多个样品同时进行分析比较时，样品应点于距离薄层板底边相同距离的直线上；正相硅胶薄层或氧化铝薄层的点样直径可在 2～10 mm，斑点之间可保留 5 mm 左右的距离，以免展开后难以区分。一些成分复杂的样品，如植物粗提物的点样量和点样直径可适当加大，以便于观察存在的微量成分。点样样品中含有水时，如反相柱色谱的洗脱流分，在硅胶板上点样后应先用电吹风低温吹干再进行展开。高效反相薄层板由于价格和分辨率都较高，点样斑点的直径和斑点之间的距离应尽可能缩小(如 1～2 mm)，这要求采用更细的毛细点样管。

C. 展开剂的选择：根据样品斑点的 R_f 可相应调整展开剂的极性。常用溶剂的极性强弱顺序如下：

石油醚(低沸点→高沸点)＜四氯化碳＜苯＜二氯甲烷＜氯仿＜乙酸乙酯＜丙

酮＜乙醇＜甲醇＜水

单糖、寡糖、氨基酸、季铵盐等成分极性很高，进行硅胶薄层色谱时需采用高极性展开剂；一些低极性成分在进行反相薄层色谱时也不妨采用丙酮、乙醇代替乙腈、甲醇与水混合，也许会获得更好的分离效果。在进行硅胶薄层色谱时，一些具有酸、碱性的成分会产生拖尾现象，可在展开剂中加入几滴酸碱，如甲酸、二乙胺等以改变分离效果。皂苷类成分结构中通常含有多个羟基，进行硅胶薄层色谱时采用适当比例的氯仿-甲醇-水展开系统也可克服拖尾现象。在硅胶薄层色谱选择不到好的分离条件时，可尝试采用键合相硅胶、氧化铝、聚酰胺等薄层色谱以得到好的分离条件。在用薄层色谱选择柱色谱分离条件时，由于固定相组成不尽相同，薄层色谱板上 R_f 小的样品在柱色谱分离时可能比 R_f 大的样品先被洗脱出来。

D. 薄层展开：当点样溶剂挥干后，将薄层板倾斜放置在盛有展开剂的密闭展开室中（点样斑点不能浸泡在展开剂中），展开剂受毛细作用从薄层板的底端向上展开，带动化合物在薄层板上向上移动。由于展开室内溶剂的蒸气密度不同，在薄层板展开时经常会出现边缘效应，即样品斑点在薄层板两边的比移值较中间的高。为克服这一现象，可将下端浸在展开剂中的滤纸贴在展开室的内壁，以使溶剂蒸气在展开室内达到饱和。另外，可在展开室边缘涂适量凡士林，以增加容器密封性。

E. 薄层色谱分离效果的观察：首先在可见光下观察，划出有色物质的斑点位置。有些化合物本身无色，在紫外灯下也不显荧光，则可在吸附剂中加入荧光物质制成荧光薄层进行色谱分离，展开后的薄层置于紫外灯下照射，由于薄层板本身显荧光，而样品斑点处不显荧光，即可检出样品的色谱位置。常用的荧光物质多为无机物，其一是在 254 nm 紫外线激发下显出荧光的，另一种为在 365 nm 紫外线激发下发出荧光的。通常只有结构中含有共轭结构的化合物才可在紫外灯下观测到斑点，具有不同共轭结构的化合物在上述两种波长紫外线照射下可能会呈现不同的颜色。由于天然化合物的结构类型多种多样，难以用一种检测方法确定分离效果。通常在薄层展开结束后，首先在可见光和紫外灯下观察有无斑点，用铅笔在薄层上划出斑点的位置及标出颜色特征，再选择显色剂显色。一些常用显色试剂配制方法请见本书后附录及查阅有关书籍。可采用喷雾或浸泡方式使液体显色试剂润湿薄层板，有些需要用电热板或电吹风加热才能显色。喷雾及加热过程中应注意避免吸入有毒蒸气。

薄层板一次展开后如果紫外灯下观察到斑点的 R_f 太小，可将板晾干或低温吹干，改变展开剂的极性进行第二次展开。有些样品与硅胶长时间接触会发生变化。用二维硅胶薄层色谱可确定这一变化，即将样品点于方形硅胶薄层的一角进行展开，然后拿出放置一段时间后再用相同展开剂横向展开。如两次展开距离相同则斑点应接近对角线。如横向出现两个斑点，说明偏离对角线的斑点为新产生的物质。对接触硅胶结构易变化合物不适合用常压或低压硅胶柱色谱长时间分离，需

考虑采用其他方法进行纯化。

将待鉴定样品与对照品进行共薄层色谱时，如样品与对照品的 R_f、斑点形状颜色都完全相同，则可初步确定是同一化合物。为排除样品浓度不完全相同等原因造成的 R_f 差异，可增加点样样品与对照品的混合点，但一些结构类似物的薄层色谱表现可能非常相似，需采用波谱方法或化学反应方法进行核对。

随着液相色谱仪器的进步，先用分析型 HPLC 摸索分离条件，再线性放大进行半制备型、制备型 HPLC 分离是一种明智的选择。此外，也可尝试用 Sephadex LH-20 和 Toyopearl HW-40 等尺寸排阻色谱柱进行分离。

制备型薄层色谱：相对于分析型薄层色谱，制备型薄层色谱是以获得纯化的样品为目的。它具有简便易行，快速灵敏等优点，固定相具有很多种类，可用来分离亲脂或亲水性物质。在传统的制备型薄层色谱中，流动相靠毛细管作用力流经固定相。此外，流动相可靠外力强迫流经固定相，如离心薄层色谱和加压薄层色谱。

A. 传统制备型薄层色谱：可以用来分离毫克至克量级的样品。该方法可配合柱色谱用于天然产物分离，是最简单的制备型分离方法之一。

对于几毫克至几十毫克的混合物可选用市售分析用高效薄层板进行制备型分离，每块薄层板的上样量需根据成分间的 R_f 差别而定。制备用预制薄层板也有公司出售，但考虑到价格和易得性等因素，用于更大量样品制备型分离的薄层色谱板一般在实验室自制。根据样品量和层析缸的尺寸可制备不同大小和固定相厚度的薄层板。殷等[23]曾报道用铺制的巨型薄层板（涂层尺寸为 60 cm×50 cm×0.1 cm～60 cm×50 cm×0.5 cm）分别分离 7.2 g 的苦草水溶性成分和 8.5 g 的陕西窝儿七的脂溶性成分。可采用如下方法手工制备硅胶薄层板。

*羧甲基纤维素钠溶液的配置：*向加热的纯净水中加入羧甲基纤维素钠，边加边搅拌，使之完全溶解，使最终羧甲基纤维素钠浓度在 0.1%～0.5%。

*与硅胶混合：*将羧甲基纤维素钠溶液倒入研钵中，然后加入硅胶（溶液与硅胶的比例为 3∶1），在研钵中研磨均匀并赶尽气泡。

*铺板：*将研磨好的硅胶匀浆倒在玻璃板上，用手将玻璃板在桌面或玻璃板下方中间垫的物体上轻轻掂动，使得硅胶匀浆均匀分布在包括边缘在内的玻璃板表面而又不外溢。掂好的板，表面看上去要光滑平整，没有气孔。

*晾干：*将铺好的薄层板放置在水平的台面上以使硅胶薄层的厚度均匀，室温自然晾干。

*活化：*将晾干的板子在 105 ℃烘箱中干燥 30 min，取出，放入干燥器中备用。

在实验室还可以根据需要制备特殊的硅胶薄层板。例如，分离碳原子数相等而其中碳碳双键数目不等的系列化合物，如不饱和醇、不饱和酸时，可采用硝酸银络合薄层，其主要机理是由于不饱和碳碳键能与硝酸银形成络合物，而饱和的碳碳

键则不与硝酸银络合。因此在硝酸银薄层上，化合物可由饱和程度不同而获得分离。色谱时饱和化合物由于吸附最弱而 R_f 最高，含一个双键的较含两个双键的 R_f 高。此外，顺式双键与硝酸银络合较反式双键易于进行，还可用硝酸银薄层来分离顺反异构体。制备硝酸银薄层时，可在吸附剂中加入硝酸银水溶液代替水制成均匀糊状，再按常法制成薄层，避光阴干，活化后避光储存。也可先把硝酸银用少量水溶解，再用甲醇稀释成 10%溶液，把预先制好的硅胶 G 薄层浸入此溶液中约 1 min，取出避光阴干，活化储存。

薄层板最好先用溶剂展开一次，以减少所需化合物从吸附剂上洗脱下来时可能混入的杂质。上样前先将样品溶于少量溶剂，低挥发性溶剂可引起点样带变宽，分离效果变差，因此最好选用挥发性溶剂。如点样带太宽，用高极性的溶剂（如甲醇）将薄层板展开至点样带上端约 2 cm 处，可使样品带变窄，将薄层板干燥后再用所需溶剂展开。PTLC 板的分离效果受许多因素影响。一般来讲，一块 1 mm 厚的 20 cm×20 cm 硅胶板或氧化铝板可分离 10～100 mg 的样品。色谱板的尺寸可根据样品量与展开容器的大小而定，当样品量较大时，可在展开容器内放入多块制备型薄层板同时展开。为尽量减少边缘效应，可在容器四周放一张浸入展开剂的滤纸促进容器被展开剂蒸气饱和。PTLC 所用的洗脱剂条件可由分析型 TLC 来选择确定。由于两者所用吸附剂的颗粒大小几乎相同，可将分析型 TLC 的展开剂条件直接用于 PTLC。同进行分析型 TLC 一样，通过采用多次展开的方法可以提高 PTLC 的分离效果。在展开完成后，一般在紫外灯下进行观察或在板边缘进行化学试剂显色，用铅笔标记色带的位置，将色带位置的硅胶刮下，放入砂芯漏斗或塞有棉花的小玻璃柱，使用适当溶剂将组分洗脱，将洗脱溶剂蒸干即得到纯化的样品。洗脱过程中应避免化合物与吸附剂接触的时间过长，以防化合物被破坏。甲醇可溶解硅胶及其中含有的一些杂质，不适用于从吸附剂上洗脱被分离的化合物，较合适的溶剂是丙酮，乙醇或氯仿。PTLC 吸附剂中含有黏合剂及荧光指示剂，很可能也被提取出来。可用 Sephadex LH-20 凝胶柱过滤除去存在的这些杂质。

B. 离心薄层色谱（centrifugal thin layer chromatography）：传统的制备型薄层色谱具有一些不足之处，主要包括需将被分开的化合物色带从薄层板上刮下，并将其从吸附剂上提取出来；分离所需时间较长（通常需要几小时）；在用溶剂对色带内化合物进行提取后，可能混入来自于吸附剂的杂质。为克服上述缺点，人们发明了离心薄层色谱法。离心薄层色谱技术主要是在传统的 PTLC 基础上运用离心力，促使流动相加速流经固定相。离心薄层色谱分离过程如图 1.5 所示。在加入样品后，随着洗脱液的洗脱，可得到各组分的同心圆状色带。圆的色谱薄层板被置于覆盖石英玻璃的色谱室内，这样可借助紫外灯对无色但有紫外吸收的色带进行观察。在色谱板的边缘，色带快速旋转脱离色谱板，并经色谱室内流出管收集。然后可利用薄层色谱对所收集的流分进行分析。为防止样品被氧化，可持续向色谱

室内通入氮气[24]。

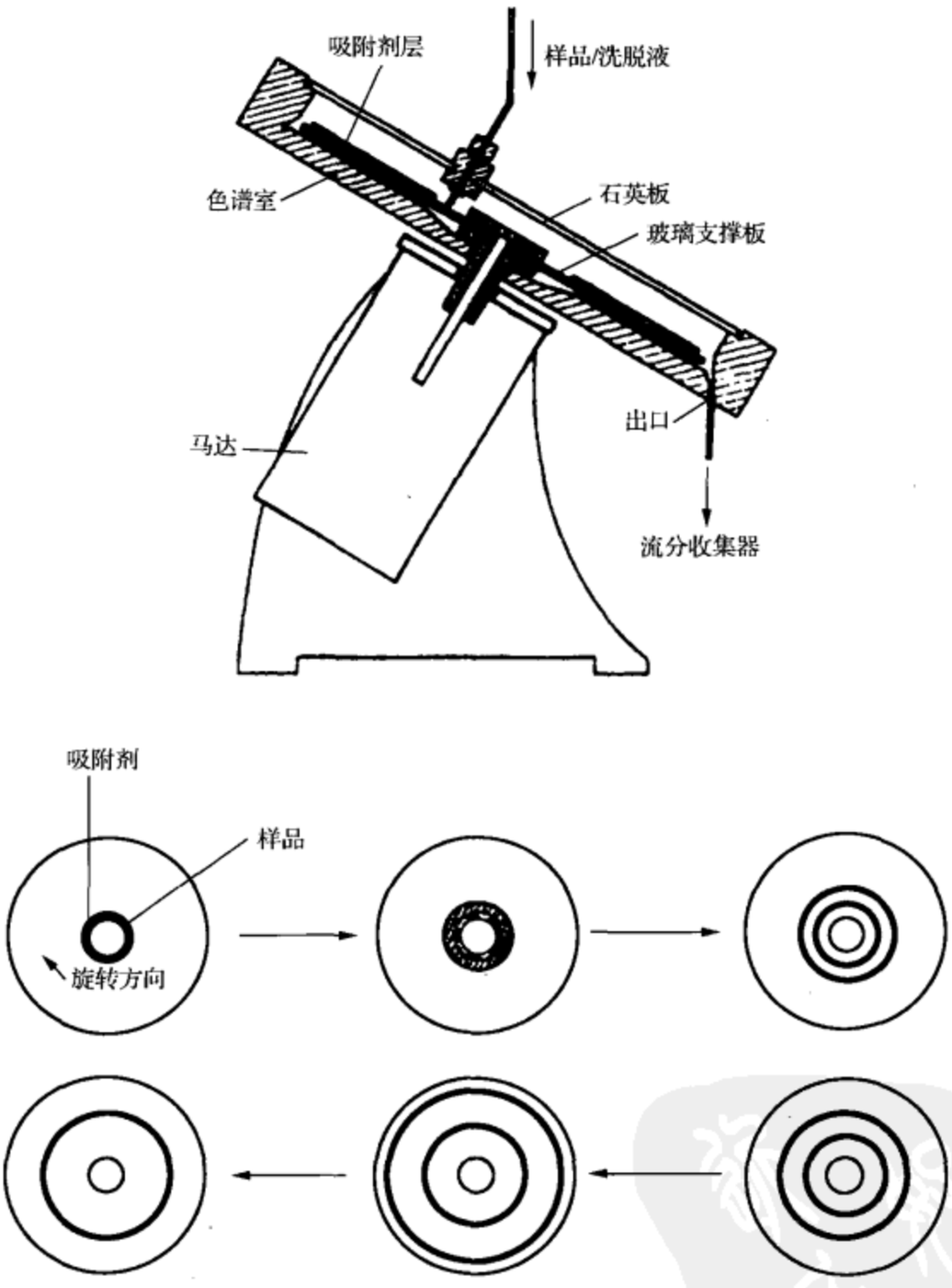


图 1.5 离心薄层色谱分离仪器和分离过程示意图[24]

制备型离心薄层色谱可用于分离 100 mg 左右的样品。其分辨能力低于制备型 HPLC,但操作简单,分离所需时间短。它与传统制备型薄层色谱相比,主要优点在于产物可被洗脱下来,而无需将吸附剂刮下;可采用梯度洗脱方式;薄层经处理后,可反复使用。

(2) 柱色谱。相对于制备型薄层色谱,柱色谱由于其色谱柱的直径和固定相

的种类可以有更多的选择，在天然产物分离中具有更为广泛的应用。

市售各种色谱填料的一个重要参数是填料的粒度大小。色谱填料的粒度分布存在一个范围，由于不同粒度的固定相在装柱时沉降速度会有所差别，洗脱液易于流经色谱柱内填料颗粒度大即具有较小阻力处，为保证色谱柱同一截面填料的粒度基本相同以获得较高柱效，装填时应尽量将固定相粉末或悬浆一次性倒入色谱柱。

通常用分析型薄层（如硅胶、氧化铝、聚酰胺及一些键合相硅胶薄层）色谱或分析型柱色谱（主要用于制备型 HPLC 和 MPLC 色谱条件的选择）来选择制备型柱色谱的固定相和洗脱条件。一些凝胶和树脂填料没有相应的薄层和分析柱可供预先判断色谱分离效果，只能通过薄层色谱或 HPLC 检测每一流分所含是否为单一成分或混合物。

在柱色谱操作时，被分离样品在加样时可采用干法，亦可将样品溶解后上样。采用干法上样时，可先将样品溶于适量丙酮、甲醇等低沸点溶剂，再加入 1∶1～1∶2的相同种类固定相置于通风橱挥干溶剂；液体上样时，应尽可能选择洗脱能力低于洗脱剂的溶剂溶解样品，以便被分离的成分可以被吸附。为获得较好的分离效果，样品溶液不应太浓，同时相对于柱长溶液体积又应尽可能小，以使色谱条带变窄，提高色谱柱的分辨能力。

为提高色谱柱的分离效果及缩短分离时间，对成分复杂样品的柱色谱分离一般采用梯度洗脱方式进行，即逐步递增洗脱剂的洗脱能力，避免开始时溶剂洗脱能力过强导致样品以混合物状态被洗脱下来，同时避免溶剂洗脱能力过低，接收几十甚至上百个相同流分导致的时间、试剂的浪费。在正相色谱中，逐渐增加洗脱溶剂的极性；在用大孔吸附树脂进行分离及以键合相硅胶为固定相的反相色谱中逐渐减少水的含量。可程控的双泵输液系统能方便地进行线性梯度洗脱。当只有单输液泵时，可采用商品化的梯度混合器实现线性梯度洗脱。没有输液泵时，可采用阶梯式梯度洗脱，但溶剂洗脱能力不能变化太大，以免不同组分一起被洗脱下来。

常压柱色谱：常压柱色谱是靠重力驱动流动相流经固定相的一种分离方法，因其操作简单而得到普遍应用。但常压柱色谱分离速度慢，只适合使用颗粒度较大的固定相，如大孔吸附树脂、Sephadex LH-20 凝胶、30～60 目聚酰胺粉、100～200 目硅胶等。在洗脱之前，可在样品上端覆盖一层砂子或玻璃珠，以防样品界面被破坏。常压柱色谱通常被用于粗提物的初步分离或用于 R_f 差别很大的混合物的分离。采用梯度洗脱的方式可以提高常压柱色谱的分辨能力。

为克服常压柱色谱的不足之处，不断有人对制备型柱色谱方法进行改进。下面依次介绍几种常用的制备型柱色谱分离方法。

制备型加压液相柱色谱：制备型加压液相柱色谱包括利用各种装置施加压力进行的液相色谱。加压使得在液相色谱中可使用颗粒度更小的吸附剂，从而获得更好的分离效果，另外还可加快洗脱剂的流速，缩短分离时间。在对敏感化合物进

行长时间的常压色谱分离时，化合物的结构可能会发生转变，通过缩短分离时间则可避免这种转变的发生。

根据分离中所用压力的大小可将制备型柱色谱分为快速色谱（约 2 bar，1 bar=10^5 Pa，下同），低压液相色谱（<5 bar），中压液相色谱（5～20 bar）及高压液相色谱（>20 bar）。低压、中压与高压液相色谱的压力范围之间会存在一定交叠，只是为了区分方便，才分成这样三类。分离中所用色谱柱及固定相颗粒的大小需根据分离的难易程度而定。一般对于难分离的样品，应采用小颗粒的固定相及稍长的色谱柱，分离所需压力也会加大。

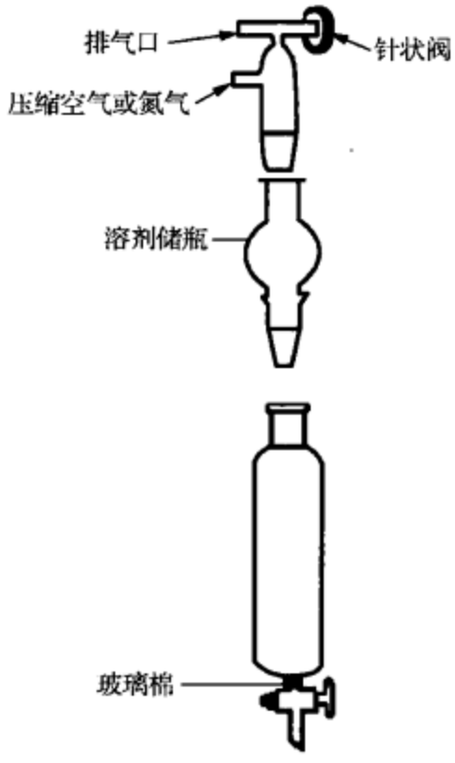


图 1.6 快速色谱分离装置示意图[26]

快速色谱：快速色谱（flash chromatography）也称闪式色谱，是 Still 等为缩短常压柱色谱的操作时间于 1978 年首次报道[25]。图 1.6为一典型的快速色谱分离装置。该装置包括一装有活塞、长度适合的玻璃柱，可用干法或湿法将固定相加入其中。干法装柱效果更好，但需用大量溶剂使固定相完全润湿。在固定相的顶部最好加一层砂子，固定相的上端应留有足够的空间以便反复加入洗脱剂。另外，也可在柱顶部加一球形磨口储液槽。加样后，可施加高于大气压 1 bar 的压力以加速样品的洗脱。在气体入口处可利用一针式阀门控制压缩气体的流速。利用不同尺寸的色谱柱对 0.01～10.0 g 样品所进行的分离通常可在15 min内完成。

快速色谱中使用最广泛的固定相为硅胶。一些粒度范围较窄的球形硅胶是专门为快速色谱而设计的。此外，也可采用具有一定粒度范围的非球形硅胶。

可采用硅胶快速色谱对天然产物进行最终纯化，但更常见的是用此方法对粗提物或混合物进行初步纯化，然后再利用其他具有更高分辨率的色谱技术进行纯化。Nakatani 等在研究苦木质素类昆虫拒食活性成分时发现一些化合物在常压硅胶柱上逐渐被破坏，只有使用快速色谱分离和半制备型 HPLC 技术才能最终获得纯品[27]。

经典的快速色谱使用气压加压，可固体与液体上样，手工收集流分。目前，自动化程度更高、分离速度更快的成套快速色谱仪器已商品化，这类装置一般带有输液泵、检测器、自动流分收集器、工作站，可实现梯度洗脱，并有不同规格的预装色谱柱出售。

低压液相色谱：目前使用最广泛的低压液相色谱系统是 E. Merck 公司生产的 Lobar 柱系列产品。预制色谱柱是由玻璃制成，规格分为 A，B，C 三种型号，预制色谱柱的填料有硅胶、RP-18、RP-8、NH_2、CN 及 diol 键合相硅胶等。表 1.1 列出了各种规格色谱柱的尺寸及最大上样量。色谱柱中的固定相被柱两端的熔融玻璃封闭。色谱柱两端连有聚四氟乙烯环的金属管可与输液泵相连，金属管及聚四氟乙烯环被柱端的旋钮固定于柱体(图 1.7)。

表 1.1　Lobar 预制柱的各项参数

柱长/mm	内径/mm	上样量		固定相质量/g
		/g	/mL	
240	10	<0.2	<1	~20
310	25	<1	<5	~70
440	37	<3	<10	~220

图 1.7　Lobar 预制柱示意图[28]

Lobar 柱可用于分离克数量级的样品，其分离效果有时可接近 HPLC 的分辨率。为获得更高的分辨率或更大的上样量，可将几根柱串联起来使用。Lobar 分离装置的简单性是这类色谱柱得以普遍采用的原因。Lobar 柱可以反复使用，反相柱比正相柱的使用寿命要长得多。Lobar 柱的固定相颗粒度相对较大(40～60 μm)，因此在低压操作条件下，洗脱液保持较高流速。可用注射器或输液泵将溶于适当溶剂中的样品加进柱内。因分离过程中需使用输液泵，一般采用组成恒定的洗脱剂。Zhao 等[29]利用反相 Lobar RP-18 色谱柱从草药山甘草(*Mussaenda pubescens*，Rubiaceae)中分离得到三萜皂苷类成分，所用溶剂系统为乙醇-水(1.1∶1)和乙腈-水(1∶1)。

中压液相色谱：Lobar 色谱分离系统具有使用方便，分辨率较高的优点。然而，用这些色谱柱难以分离 5 g 以上的样品。中压液相色谱可采用更长、具有更大内径的色谱柱，可以一次性分离更多的样品。中压液相色谱比低压液相色谱使用的填料颗粒度更小，分辨率更高，需使用更大的压力来维持适当的流速，所需压力可由压缩空气或往复泵提供。先利用分析型 HPLC 可以十分有效地选择适当的溶剂系统。Schaufelberger 和 Hostettmann 介绍了将高压液相色谱溶剂系统转换为中压液相色谱溶剂系统的方法[30]。

Büchi 公司生产全套的中压液相色谱装置，其中包括各种规格的中压色谱柱，可用于分离 100 mg～100 g 的样品。活塞泵及可替换泵头可在最大压力为 40 bar 时，使流速在 3～160 mL·min^{-1}调节。该系统接有溶剂梯度形成装置，并可用各种紫外检测仪检测(图 1.8)。该系统的色谱柱由带有塑料保护膜的强化玻璃制成，因此可以观测到分离的进展情况。柱体大小可从 130 mL 直至 1880 mL，还可将色谱柱连接起来使用以提高分离能力。

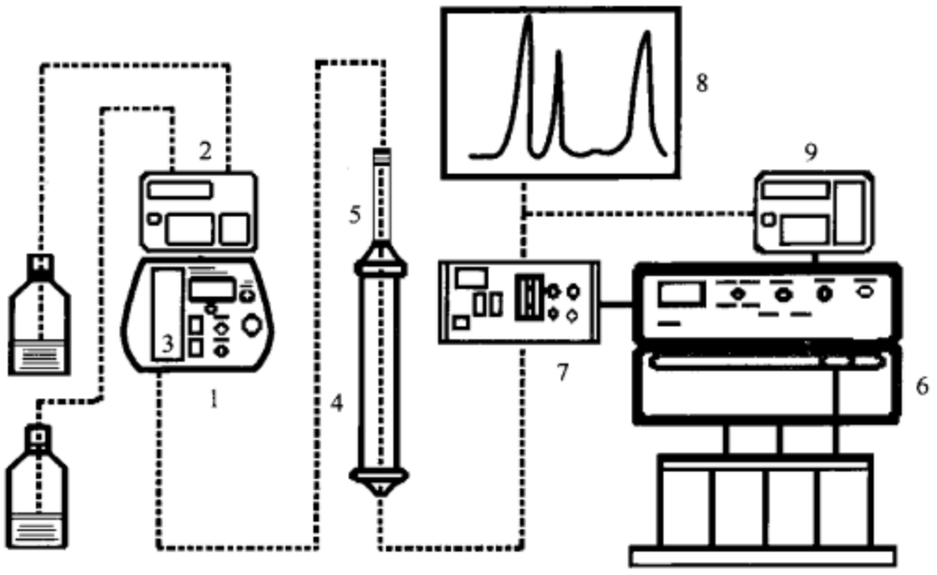


图 1.8 Büchi B-688A 中压液相色谱系统[31]

1. B-688 泵；2. 梯度形成器；3. 进样装置；4. 玻璃柱；5. 前置柱；6. 流分收集器；7. 检测器；8. 记录仪；9. 峰位检测器

在进行中压硅胶柱色谱分离时，可以用干法或湿法装柱。与湿法装柱相比，干法装柱可使固定相填充密度提高 20%。虽然该类色谱柱的最大承受压力只有 40 bar，但使用颗粒度为 15 μm 的固定相可以获得同 HPLC 柱类似的分离效果[30]。应用键合相固定相时，应采用湿法装柱。可以用注射器将样品直接加到色谱柱上或使用进样器进样。如在色谱柱前连接一小的样品柱，也可以采用固体上样法。在制备型色谱柱前连一前置柱，可在每次分离后将被污染的填料除去，利用甲醇—乙酸乙酯—己烷的冲洗顺序对硅胶固定相进行再生，但在重复使用几次之后，应将固定相废弃。键合相色谱柱更易于清洗，并具有更长的使用寿命，有时也采用聚酰胺或纤维素为固定相。

高压液相色谱：请见本书第 6 章。

减压液相色谱：减压液相色谱(vaccum liquid chromatography，VLC)也称为真空液相色谱，是利用真空为动力来加速流动相流经固定相的一种色谱分离方法。与常压柱色谱相比，减压柱色谱可采用更细小颗粒的固定相，因而具有更好的分离效果。柱床填装高度要根据所使用固定相的颗粒大小而定，固定相采用薄层色

谱用硅胶 H 时，柱床高度不宜超过 10 cm，以缩短分离时间。硅胶、键合相硅胶、MCI 树脂、氧化铝、聚酰胺等填料都可用于减压液相色谱的固定相。一种便于使用的带有砂芯、标准磨口和抽气口的减压液相色谱柱如图 1.9 所示。在玻璃柱中加入吸附剂干粉或匀浆，通过敲击柱壁及抽真空使吸附剂装填紧密。可将待分离样品溶于适当的溶剂中直接加在柱上部，然后减压缓慢地将样品抽入吸附剂，也可将样品用相同吸附剂拌样后干法上样。上样后可在柱床上部加一层脱脂棉、吸附剂或砂子以免添加溶剂时破坏柱床。根据所用固定相的种类，选择洗脱能力逐渐增强的梯度溶剂系统可获得更好的分离效果。在更换接收瓶前可将柱体抽干，以减少流分之间的相互交叉。Zarate 等利用减压液相色谱法分离姜（*Zingiber officinale*）中的辛辣成分，将姜醇与姜烯酚完全分开[32]。可用减压液相色谱法替代快速色谱法，在进行高压液相色谱及其他复杂分离之前，对植物提取物进行初步分离。

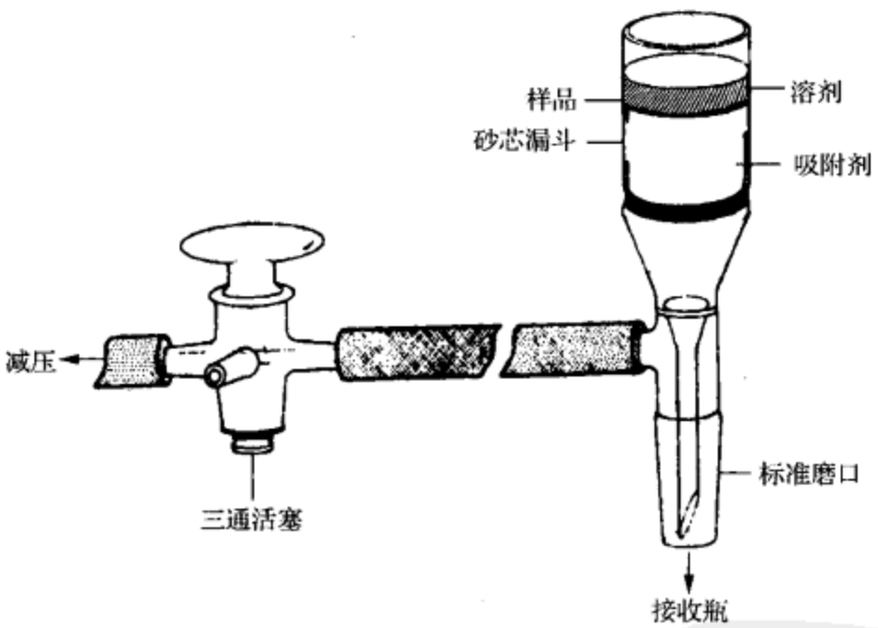


图 1.9　减压液相色谱装置示意图[33]

1.4.2.2　液-液色谱

1）纸色谱

纸色谱是以纸为载体，由于纤维素上的羟基具亲水性使部分水或其他物质束缚在纤维素周围，不易扩散而成为固定相。由于分配系数的不同，那些分配系数大的分子，随展开剂向上移动得快，形成的色带集中在滤纸的上部；而分配系数小的分子，随展开剂向上移动得慢，形成的色带集中在滤纸的下面。纸色谱以往常被用于糖和氨基酸等亲水性化合物的分离、鉴定，其缺点在于色谱速度较慢，由于斑点扩散较大导致分辨率下降。该方法目前已逐渐被各种薄层色谱和柱色谱方法

取代。

2) 高速逆流色谱(high speed counter-current chromatography)

请见本书第 8 章。

1.5 结　　语

进行天然产物分离纯化的目的决定了所采取的分离策略。在分离天然标准品、医药化工原料时，由于所需要的成分已知，工艺简单、成本低是要考虑的重要因素；在寻找新颖结构化合物、新天然活性成分时，采用各种色谱-波谱联用技术及色谱-波谱-生物活性检测联用技术，尽早排除已知化合物和已知活性化合物(dereplication)，确定所需分离目标化合物进行有针对性的分离，可以有效地提高研究效率；以快速建立天然产物样品库为目的的分离则宜采用柱效和自动化程度高的色谱分离仪器配以广谱检测器(如 MS、ELSD 等)及高效流分浓缩装置。

溶剂分配及沉淀过滤法虽然简单，却可快速将天然总提取物划分成几个部位并除去其中杂质。当对大量样品进行色谱分离时，应先采用处理量大、可重复使用和/或相对便宜的固定相。此外，配合使用不同填料的色谱分离方法及试验采用不同的流动相也有助于样品分离。随着分离的进行，操作规模不断减小，应尝试尽早采用制备型 HPLC 等高效分离手段。随着制备型 HPLC 仪器的普及，对于初始分离材料的量就比较少的样品，将样品处理后首先进行制备型 HPLC 分离可减少每个流分中化合物的数目，缩短分离工作所需时间。

作为一门实验科学，不断尝试、掌握各种分离方法，积累实际操作经验对天然产物分离纯化工作十分重要，从一些专业书籍[34~38]及互联网获取相关知识，与他人交流实验心得也不可或缺。

参 考 文 献

[1] Newman D J, Cragg G M, Snader K M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J Nat Prod, 2003, 66: 1022～1037.

[2] 中国药材公司. 中国中药资源志要. 北京：科学出版社，1994.

[3] Wang L Y, Chen Z H, Zhou Y et al. Structural revision of periplocosides and periperoxides, natural immunosuppressive agents from the genus *Periploca*. Phytochemistry, 2011, 72: 2230～2236.

[4] Zhang J, Ni J, Chen Z H et al. Periplocoside A prevents experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing IL-17 production and inhibits differentiation of Th17 cells. Acta Pharmacologica Sinica, 2009, 30: 1144～1152.

[5] Wan J, Zhu Y N, Feng J Q et al. Periplocoside A, a pregnane glycoside from *Periploca sepium* Bge, prevents concanavalin A-induced mice hepatitis through inhibiting NKT-derived inflammatory cytokine productions. International Immunopharmacology, 2008, 8: 1248～1256.

[6] Zhu Y N, Zhao W M, Yang Y F et al. Periplocoside E, an effective compound from *Periploca sepium*

Bge, inhibited T cell activation *in vitro* and *in vivo*. J Pharmacol Exp Ther, 2006: 662～669.

[7] 汪茂田，谢培山，王忠东，王海棠，吴云骥，周海梅. 天然有机化合物提取分离与结构鉴定. 北京：化学工业出版社，2004：14.

[8] 汪茂田，谢培山，王忠东，王海棠，吴云骥，周海梅. 天然有机化合物提取分离与结构鉴定. 北京：化学工业出版社，2004：15.

[9] 郭青枝，赵二劳，陈婕. 正交试验优选苦瓜黄酮超声波提取工艺. 酿酒科技，2007：36～37.

[10] Hakala S H, Heinonen I M. Chromatographic purification of natural lycopene. J Agric Food Chem, 1994, 42: 1314～1316.

[11] 仇德安. 从温郁金中提取分离榄香烯抗癌原料药生产工艺. 中国专利，ZL200510049615.4，2007.

[12] 李锋涛，潘金火. 絮凝剂在中药制剂中的应用. 时珍国医国药，2006，17：647～649.

[13] Tan G T, Pezzuto J M, Kinghorn A D. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. J Nat Prod, 1991, 54: 143～154.

[14] 湖南医药工业研究所. 中草药资料汇编(2)，1970：91.

[15] Zheng G Q. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. Planta Medica, 1994, 60: 54～57.

[16] Varian 公司，样品前处理技术和产品选择指南.

[17] 徐任生，文广玲，江书发，王长根. 甘草查耳酮的分离、结构与全合成. 化学学报，1979，37：289～295.

[18] 徐任生，陈仲良. 中草药有效成分提取与分离. 上海：上海科学技术出版社，1983：103.

[19] 方圣鼎，严修泉，李静芳，范芝云，徐小异，徐任生. 垂盆草化学成分的研究 IV，垂盆草甙及异垂盆草甙的结构. 化学学报，1982，40：273～279.

[20] 徐任生，陈仲良. 中草药有效成分提取与分离. 上海：上海科学技术出版社，1983：119.

[21] 缪剑华，袁经权，许旭东，董悦生，杨峻山. 高纯度莽草酸分离纯化工艺. 中国专利，CN101225043. 2008.

[22] Nie W, Luo J G, Wang X B et al. An insight into enrichment and separation of oleanane-type triterpenoid saponins by various chromatographic materials. Separation and Purification Technology, 2009, 65: 243～247.

[23] 殷梦龙，陈仲良. 巨型板色谱分离制备中草药化学成分. 中草药，1989，20：14～16.

[24] 霍斯泰特曼 K，马斯顿 A，霍斯泰特曼 M. 制备色谱技术——在天然产物分离中的应用. 赵维民，张天佑译. 北京：科学出版社，2000：26.

[25] Still W C, Kahn M, Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. J Org Chem, 1978, 43: 2923～2925.

[26] 霍斯泰特曼 K，马斯顿 A，霍斯泰特曼 M. 制备色谱技术——在天然产物分离中的应用. 赵维民，张天佑译. 北京：科学出版社，2000：88.

[27] Nakatani M, Huang R C, Okamura H et al. Limonoid antifeedants from Chinese *Melia azadarach*. Phytochemistry, 1994, 36: 39～41.

[28] 霍斯泰特曼 K，马斯顿 A，霍斯泰特曼 M. 制备色谱技术——在天然产物分离中的应用. 赵维民，张天佑译. 北京：科学出版社，2000：99.

[29] Zhao W, Xu J P, Qin G W et al. New triterpenoid saponins from *Mussaenda pubescens*. J Nat Prod, 1994, 57: 1613～1618.

[30] Schaufelberger D, Hostettmann K. Analytical and preparative reversed-phase liquid chromatography of secoiridoid glycosides. J Chromatography, 1985, 346: 396～400.

[31] 霍斯泰特曼 K,马斯顿 A,霍斯泰特曼 M. 制备色谱技术——在天然产物分离中的应用. 赵维民,张天佑译. 北京:科学出版社,2000:109.

[32] Zarate R, Yeoman M M. Application of two rapid techniques of column chromatography to separate the pungent principles of ginger, *Zingiber officinale* Roscoe. J Chromatography, 1992, 609: 407～413.

[33] 霍斯泰特曼 K,马斯顿 A,霍斯泰特曼 M. 制备色谱技术——在天然产物分离中的应用. 赵维民,张天佑译. 北京:科学出版社,2000:49.

[34] 冯淑华,林强. 药物分离纯化技术. 北京:化学工业出版社,2004.

[35] 刘小平,李湘南,徐海星. 中药分离工程. 北京:化学工业出版社,2005.

[36] 徐任生,陈仲良. 中草药有效成分的提取和分离. 第二版. 上海:上海科学技术出版社,1983.

[37] 汪茂田,谢培山,王忠东,王海棠,吴云骥,周海梅. 天然有机化合物提取分离与结构鉴定. 北京:化学工业出版社,2004.

[38] 霍斯泰特曼 K,马斯顿 A,霍斯泰特曼 M. 制备色谱技术——在天然产物分离中的应用. 赵维民,张天佑译. 北京:科学出版社,2000.

（赵维民）

第 2 章　结晶与纯度鉴别

结晶是化合物在特定条件下形成晶体(菱形,矩形,针状等)的过程,重结晶是将已有的晶体溶于溶剂,通过浓缩或添加另一个相对溶解度更低的溶剂使它达到饱和状态后再次析出结晶的过程。通过结晶与重结晶可将杂质或其他成分留在结晶时的溶剂(也称母液)中,而得到高纯度化合物。因此结晶的过程也是化合物的分离纯化的过程,通过重结晶分离纯化一种化合物,而在母液中有时又可分离出另一种化合物,如此反复,以达到分离的目的(见延胡索生物碱分离实例)。结晶和重结晶的另一个目的是要得到能够符合 X 射线衍射结构分析所要求的晶体,因为针状、片状等晶形均不符合 X 射线测定的要求。再一个目的是化学鉴定工作的需求,有一些化合物即使已达到很纯的程度,但还是不能结晶,如核苷类、肽等。此时就要将它们制备成衍生物或盐,通过它们的结晶再回复到原来化合物以作鉴定。所以结晶技术是天然化学家必备的基本技术之一。我国老一辈科学家如赵承嘏、朱任宏等经过毕生实践,积累了丰富的结晶经验,往往能从墨黑的胶状提取物中仅通过添加适当溶剂分离出一个又一个结晶。众所周知,青霉素的过敏是极其严重的问题,主要是微量杂质引起,而青霉素是一个有机酸,它的钾盐水溶性很强,要得到结晶去其微量杂质,极其困难,当年赵承嘏先生却做到了,这是对中国制药工业的重要贡献。虽然今天有了很多分离、纯化、鉴别的先进仪器,但天然产物化学毕竟是一门实验科学,一个训练有素、造诣深厚的化学家必定是个实验技术精湛、思路敏捷、心灵手巧的科学家。掌握结晶技术是重要一环。结晶技术不仅在研究工作中重要,而且在天然物生产中也同样重要。均匀单一的结晶是产品质量的指标之一。有时在实验室中提取或合成的化合物呈胶状透明物质,可通过 TLC 或 HPLC 继续纯化和鉴别,然后再用溶剂处理得到结晶和重结晶。可是在大规模的生产中则要尽量避免用层析处理以减少产品的损失,降低成本。如我们在西地兰的提取分离中,当洋地黄叶提取物经过碱与氯仿处理去除叶绿素后得到的是暗绿色胶质,难以进一步纯化,但用层析处理,损失太大。经过反复试验,发现在胶质中滴加少量甲醇与水后可析出透明的针状结晶。用丙酮-乙醚混合液洗涤,进一步纯化成含苷甲、乙、丙的均匀结晶,再用溶剂分配法分离出苷甲、乙、丙三种单一化合物(见强心苷一章)。在实验中若不细心地观察,粗心地将提取物直接进行色谱柱处理,虽然可以得到一些单体,但往往会失去获得大量结晶的机会,如柑橘皮用甲醇提取、浓缩、冷却后就可析出橙皮苷结晶;穿心莲叶用氯仿热提后也可得到穿心莲内酯结晶;又如唐宗俭在研究蕹菜素时,当提取后的烧瓶用肥皂水洗涤时发现

析出许多白色结晶，由此启发将獐菜素乙醇提取物浓缩后用 4% NaOH 溶液洗涤后就可得到大量獐菜素(Rorifone)结晶。这都说明了结晶和重结晶方法的重要性，实用性和不可取代性。

2.1 结晶条件

2.1.1 溶剂

溶剂是结晶必需的条件，一个干燥的粉末状固体提取物若不加任何溶剂永远不可能成结晶，只有在加入溶剂后使其有足够的浓度，静置片刻或放置更长时间，待溶剂逐渐挥发至一定浓度时才会渐渐析出结晶。若不成功，需要更换溶剂。一般情况下，比较理想的溶剂是丙酮或甲醇，乙醇因含水分而用得较少，如制备生物碱盐酸盐时，在乙醇溶剂中滴加盐酸往往不能成结晶，必须使生物碱溶于无水乙醇中再滴加饱和盐酸的无水乙醇溶液至刚呈酸性，放置使析出结晶。在非极性溶剂中比较理想的是无水乙醚、己烷或苯，但苯毒性太大，近年已很少使用，有时可使用混合溶剂。一般先用易溶解的极性大的溶剂(如丙酮)使化合物溶解后再滴加难溶的溶剂(如乙醚、己烷或石油醚)至微浑浊，加盖密闭，静置片刻，当溶液澄清后即析出结晶。有时需要反复试验，摸索经验。

2.1.2 温度与湿度

多数情况下，温度与湿度越低越容易结晶。在没有空调的年代，夏天由于天气炎热，湿度又大，很难结晶，而冬天气温低，干燥，利于结晶，但温度过低，可能有杂质同时析出而“污染”结晶，比较理想的结晶温度在－5 ℃左右，可放置在冰箱中，湿度在 40%左右。

2.1.3 化合物的纯度

化合物的纯度越高越容易结晶。因为它在溶剂中容易达到结晶需要的浓度，有时一些化合物在提取物中虽然浓度不高，但由于所选溶剂特别利于它结晶，也会先行析出。多数情况下，含量最高的化合物先结晶析出。在混合物结晶时，一旦发现某一个化合物先析出结晶，此时应摸索出该结晶不易溶解而能溶解杂质的溶剂，将它集中收集滤出，此时母液中另一个化合物可能又会析出结晶。如此反复，使结晶一个一个分别析出，否则它们在系统中互相干扰，都不容易得到结晶。

2.1.4 制备衍生物

一些化合物即使纯度很高也很难结晶。此时可通过制备衍生物达到结晶的目

的。常见的是生物碱与无机酸或有机酸成盐而结晶，邻羟基化合物可与酮反应成缩酮，有时邻二醇化合物在提取或重结晶过程中使用过丙酮也会成缩酮。含有羟基、胺基等活泼氢的化合物可通过酰化而成结晶。如垂盆草苷是粉末，其六乙酰化合物为结晶，并通过 X 射线衍射分析确证了结构。这些衍生物结晶纯化后再用稀酸或碱处理又可还原成原物。

2.2　结晶技术

结晶技术和结晶条件是密不可分的。结晶的条件是必需的，而结晶技术则是天然化合物研究者可根据经验和条件的掌控，以期达到目标纯度和目标晶形。

2.2.1　溶剂的选择

溶剂是结晶必需的，而溶剂的选择则是结晶的重要技术。因为一个化合物在某种溶剂中不能结晶，而在另一种溶剂中又很容易结晶。所以选择溶剂时要考虑此化合物的极性大小，它在各种溶剂中的溶解度，而化合物的溶解度常常需要进行小量试验，由此结果决定采用结晶溶剂。如喜树碱只有在氯仿-甲醇(1∶1)混合溶剂中才能结晶。

2.2.2　结晶速度的调控

结晶的形状和析出的速度有关，速度越快，晶形越细，反之，速度慢，晶形较大。因此在重结晶时，用一种易溶溶剂溶解样品后滴加难溶溶剂时不能操之过急，此时后者若加得过快，过量则有时反成油状物，不能结晶，而应该加至刚呈浑浊状，静置，使结晶慢慢析出，所得晶形较为理想，有时结晶过大，常会带有溶剂或结晶水，干燥后失重较多，尤其是工厂产品，在质量分析时，达不到要求。

当然，结晶的速度不是都能控制的，有时会有意外，如天花粉蛋白质第一次结晶的获得就很意外。蛋白质是很难结晶的，但它的提取物在冰箱中的长时间放置居然结晶出来了。后经吕植桢等研究，在天花粉纯浓溶液中加少量乙醇至微显浑浊，冰箱放置，析出结晶，所以结晶速度又和所选溶剂，温度等都是相关的。

2.2.3　刮壁

一种简易的经验式方法，用增加摩擦加速化合物分子定向排列，形成晶体。将一些难以结晶的化合物，溶于溶剂后，用刮刀或玻璃棒在瓶壁反复刮擦。因为刮擦会产生热量，所以有时边刮擦同时用冷水冲瓶壁可加速结晶的析出。实验室常用三角瓶(锥形瓶，Erlenmeyer flask)。它的优点是让溶剂慢慢挥发，待化合物在溶剂中达到一定浓度时沿瓶壁析出结晶，也便于刮壁时结晶，冲壁的水滴不会侵入瓶内。

2.2.4 添加晶种

在一个混合物或较杂的提取物中加入其中一个化合物的晶种，它会慢慢地析出该化合物的结晶，因此须细心地将它单独挑出，作为下次结晶时的晶种，但要排除有时析出的是无机盐。一般情况下，先析出的结晶应该是混合物中的主要成分。植入晶种可大大加速结晶的过程。

2.2.5 晶体培养

当实验得到一个新化合物，须用 X 射线衍射分析来解析其结构时，晶体的形态需满足 X 射线衍射分析的要求。实践中得到的晶体以针状、片状或细小粒状居多，而 X 射线衍射分析要求晶体比较大并以立方形、短矩形、较对称的菱形等为佳，即要求三维空间比较等矩的晶体。在培养这种晶体时，就需要调整溶剂，控制速度和巧用混合溶剂等技术来得到所需的晶体。如用一个小的培养皿，将样品溶解于较易溶解的溶剂，然后滴加入另一种溶剂，将此小皿放在一个玻璃钟罩中，放置在室温较低处，静置任其挥发，直至结晶析出。此法和常用二种溶剂结晶不同之处在于样品浓度偏稀，第二种溶剂也不是加到微浑浊出现，而溶剂的挥发空间有限度。也可同样操作，只是将小皿换成 NMR 细长测试管，往往会在管壁两个溶剂的界面析出所需晶形的结晶。如果结晶的时间过长或晶形仍不够理想，就需要另换溶剂。

2.3 纯度鉴别

我们从天然物中分离得到的有效成分，无论它是结晶、粉末或液体，都需要首先判断它是否为单体及纯度。随着科技的日新月异，天然产物的纯度鉴别也逐渐由经典的凭借晶形、熔点、熔距大小而走向现代仪器的量化鉴别。

2.3.1 晶形

结晶化合物的晶形均一是纯度标准之一。最早的酒石酸铵盐镜像对映体的混合结晶是巴士德在显微镜下手工分开的，当然天然化合物很少有镜像对映体，大多为左旋或右旋化合物。个别情况下，同一均匀晶形含有几个类似化合物，如前面提到的洋地黄苷甲、乙、丙。再有如乌头碱含有少量次乌头碱与新乌头碱时，也呈单一结晶，因此必须用 TLC 与 HPLC 作进一步鉴别。

2.3.2 熔点和熔距

每个化合物都有自己不同的熔点，它是鉴别化合物纯度的标准之一。测熔点时必须用干燥样品，测定的详细方法参考《中国药典》的规定。熔距的大小也是判断化合物纯度的标准，但各类化合物的熔距差别较大，如生物碱熔距在 1 ℃左右，

其盐有时与皂苷相同，熔距在 2～3 ℃或仅有裂解点，即未见熔融仅见样品变黑后裂开。有些化合物有两个熔点，如汉防己乙素(Fangchinoline)在丙酮中所得结晶含 1 分子丙酮，熔点为 237 ℃，若用甲醇重结晶，丙酮分子消失，其熔点则为 178 ℃。同时汉防己乙素还具有双熔点特性，它在 176 ℃熔化后，继续升温后又固化直至 242 ℃时又分解。

2.3.3　薄层色谱(TLC)与高压液相色谱(HPLC)

一种化合物在 TLC 与 HPLC 系统中显示只有一个斑点或一个吸收峰，没有杂质点和峰，说明该化合物纯度很高。但也可能不是绝对纯，如放线菌素 K 进入药典时认为它是有荧光的物质，后来有人改换了 TLC 的溶剂系统后，发现原来此荧光物质为杂质，并非放线菌素 K 本身。同样，有时碰到异构体，特别是差向异构体则往往显示一个斑点或一个吸收峰，因此在用 TLC 和 HPLC 鉴别纯度时，最好用不同溶剂系统再检测一次。总之，TLC 与 HPLC 方法具有微量、快速、灵敏、准确的优点。

细节请参阅本书第 1 章和第 6 章。

2.3.4　核磁共振(NMR)与质谱(MS)分析

NMR 谱除了可以鉴别化合物结构、纯度与其所含杂质外，还在鉴别差向异构体中发挥特殊的作用。如差向异构体雷公藤内酯与异雷公藤内酯(差别在于 14-OH 分别为 β 和 α 构型)；或雷公藤乙素和雷公藤丙素(差别在于 2-OH 分别为 β 和 α 构型)。它们彼此的 TLC 与 HPLC 极其相近，MS 更为近似，这时只有靠 ^{1}H NMR谱中质子信号的积分差异来鉴别各异构体的含量。这种鉴别的重要性还在于异雷公藤内酯是完全没有免疫抑制活性的，所以实用中必须与雷公藤内酯区别出来。又如我们在研究分离大叶桉 robustadial A 和 B 时，各种溶剂系统 HPLC 都显示一个峰，又是液体，但 ^{1}H NMR 显示为一对差向异构体，最后经酰化于 HPLC 显示两个峰，经 HPLC 制备分离成功。

质谱对样品纯度的鉴别非常敏感和高效，微量即能给出分子离子峰与分子内各碎片的信号，其分子离子峰附近除 M+1、M+2、M−1、M−18、M−15 等信号外，若有其他信号则表示为样品的杂质信号，而它们与分子离子峰高度的差别表示杂质含量的多寡。

光谱分析细节请参阅本书相关章节。

综上所述，判断一个化合物的纯度，需要几种方法综合考虑，只凭单一方法，容易出错，须谨慎。

(徐任生)

第 3 章　超临界流体萃取技术的应用

3.1　概　　述

超临界流体技术是利用流体在临界点附近所具有的特殊溶剂性质而进行的一系列过程技术。

我们通常看到的物质有三种状态，即固态、液态和气态。所谓超临界流体是指物质所处的温度和压力分别超过其临界温度（T_c）和临界压力（P_c）时的流体。处于临界点状态的物质可实现液态到气态的连续过渡，两相界面消失，汽化热为零。超过临界点的物质，不论压力有多大都不会使其液化，压力的变化只是引起流体密度的变化。故超临界状态流体有别于固态、液态和气体。通常超临界流体用 SCF 表示。

早在 19 世纪 70 年代末，人们就认识了超临界流体这一概念。当时发现一些低挥发性的物质如氯化钴、碘化钾、溴化钾等能溶解在超临界乙醇中，而当压力降低时又可以析出。后来，人们又认识到地球演变过程中水对岩石的形成、甲烷对石油的形成和迁移都与超临界流体的溶解作用有关。到了 1942 年，苏联科学家提出，将超临界流体技术应用于石油脱沥青过程，而基础理论研究和实际应用的研究到 50 年代后期开始进行。70 年代，全球能源危机使节能成为研究的热点，超临界流体萃取等新分离技术应用发展起来。许多研究者研究了用超临界流体分离有机物的水溶液，期望以此取代能耗较高的精馏过程。目前，超临界流体作为一门技术，不仅用于超临界流体萃取，还用于超临界流体反应、超临界流体色谱、超临界流体沉析（重结晶）提纯或制备微细颗粒材料等，可应用于化工、食品、医药、生物、香料、材料、催化剂制备及环境保护等方面。

超临界流体萃取是建立在该流体在临界点附近温度和压力对流体溶解能力改变的基础上。例如二氧化碳，它具有无毒、无臭、不燃和廉价等优点，临界温度 31.04 ℃，临界压力 7.38 MPa，只需改变压力，就能够在近常温的条件下分离萃取物和回收溶剂二氧化碳。而传统的液-液萃取过程，通常要用加热和蒸馏等方法才能够把溶剂和溶质分离，不仅能耗大，在不少情况下还会造成萃取物中低挥发性组分或热敏性物质的损失，得到的萃取物通常含有残留的有机溶剂，产品可能有异味或残毒，影响产品的质量。采用超临界流体技术可以克服这些弊端。

3.2　超临界流体萃取基本原理

3.2.1　超临界流体的基本性质

超临界流体最重要的性质是密度、黏度和扩散系数。物质临界点的特征可表示为 $\left(\frac{\partial p}{\partial v}\right)_{T_c}=0$；$\left(\frac{\partial^2 p}{\partial v}\right)_{T_c}=0$。即在临界点附近，微小的压力变化会引起流体密度的巨大变化。在临界点附近，相当于对比温度 $T_r=1\sim1.2$ 时，流体有很大的可压缩性。在对比压力 $p_r=0.7\sim2$ 时，适当增加压力可使流体的密度很快增大到接近普通液体的密度，使超临界流体具有类似于液体的溶解能力，且密度随着温度和压力的变化连续变化。流体的密度大，溶解能力也大。

超临界流体的黏度受温度和压力的影响也很大，通常它的对比黏度 μ_r 只有 1～3，而普通液体的 μ_r 在 12 以上。同样超临界流体的扩散系数要比普通液体的扩散系数大得多。

将超临界流体和常温常压下的气体、液体的三个基本性质密度、黏度和扩散系数进行比较，列于表 3.1。由比较可知，超临界流体具有接近液体的密度，即具有类似于液体的溶解能力，而黏度和扩散系数接近气体。这就意味着萃取过程将有较高的传质速率和很快达到平衡的能力。

表 3.1　超临界流体与气体和液体的物性比较

物性 / 流体	密度 ρ/(g·mL^{-1})	黏度 μ/(Pa·S)	扩散系数 D/(cm^2·s^{-1})
气体 15～30 ℃，常压	$0.6\times10^{-3}\sim2\times10^{-3}$	$1\times10^{-5}\sim3\times10^{-5}$	0.1～0.4
超临界流体，T_c，p_c	0.2～0.5	$1\times10^{-5}\sim3\times10^{-5}$	0.7×10^{-3}
超临界流体，T_c，$4p_c$	0.4～0.9	$1\times10^{-5}\sim9\times10^{-5}$	0.2×10^{-3}
液体，15～30 ℃，常压	0.6～1.6	$0.2\times10^{-3}\sim3\times10^{-3}$	$0.2\times10^{-5}\sim2\times10^{-5}$

用于超临界流体萃取的溶剂很多，表 3.2 列出了一些常见溶剂的临界参数。从表中我们可以看到如下的趋势：(1)大部分碳氢化合物其临界压力在 5 MPa 左右；(2)对低碳烃化物，如乙烯、乙烷等，其临界温度接近常温，环状的脂肪烃和芳香烃具有较高的临界温度；(3)二氧化碳具有温和的临界温度和相对适中的临界压力，为最常用的超临界流体；(4)水和氨具有较高的临界温度和压力，这是因为极性大和氢键的缘故。对于临界温度在 0～100 ℃的流体，适用于提取天然植物有效成分。

表 3.2 某些超临界流体的物性

参数 / 流体名称	临界温度 T_c/℃	临界压力 p_c/MPa	临界密度 ρ_c/(g·mL^{-1})	相对分子质量
乙烯	9.25	5.04	0.227	28
三氟甲烷	26.15	4.86	—	70
三氟一氯甲烷	28.8	3.87	0.578	104
二氧化碳	31.04	7.38	0.468	44
乙烷	32.25	4.88	0.203	30
一氧化二氮	36.5	7.24	0.457	44
六氟化硫	45.6	3.76	0.737	146
丙烯	91.8	4.60	0.233	42
丙烷	96.6	4.25	0.217	44
氨	132.4	11.35	0.236	17
异丙醇	235.15	4.76	0.273	60
乙醚	193.6	3.68	0.267	74
甲醇	239.45	8.09	0.272	32
乙醇	240.75	6.14	0.276	46
苯	288.9	4.89	0.302	78
甲苯	318.6	4.10	0.292	92
水	374.2	22.12	0.326	18

3.2.2 二氧化碳的超临界特性

二氧化碳为最常用的超临界流体，其压力、温度及物性状态如图 3.1 所示[1]。图中的熔点线、沸点线和升华线把图分成固相、液相和气相区。临界点处，温度 T_c=31.04 ℃，压力 p_c=7.38 MPa，当温度和压力都超过上述值的二氧化碳称之为超临界二氧化碳。超临界二氧化碳的溶解能力与温度和压力有关，并有接近液体的密度和接近气体的黏度和扩散速度等特点，故具有较大的溶解能力、较高的传质速率和较快达到平衡的能力。

图 3.2 为二氧化碳的压力-密度图。纵坐标为对比压力，横坐标为对比密度。若温度低于临界温度并作等温压缩，见图 3.2 中曲线 A，点①处状态为饱和蒸气，进一步压缩时部分二氧化碳会液化。点①与点②间为气液共存，点②处则为全部液体。可以预料在点②处的液体二氧化碳会有很好的溶解能力。若系统的温度大于临界温度 T_c，并作等温压缩，见曲线 B，气体不会发生冷凝和液化，然而气体的密度会增加到与液体二氧化碳相当的水平。此超临界二氧化碳会有与点②处液化

二氧化碳相近的密度、分子间作用力和溶解能力。图 3.2 还清楚地表明，在临界点附近，密度对压力和温度变化非常敏感，很小的温度和压力变化都会引起密度较大的变化，从而引起溶解能力较大的变化。故改变过程的温度或压力可实现萃取、分离的目的。

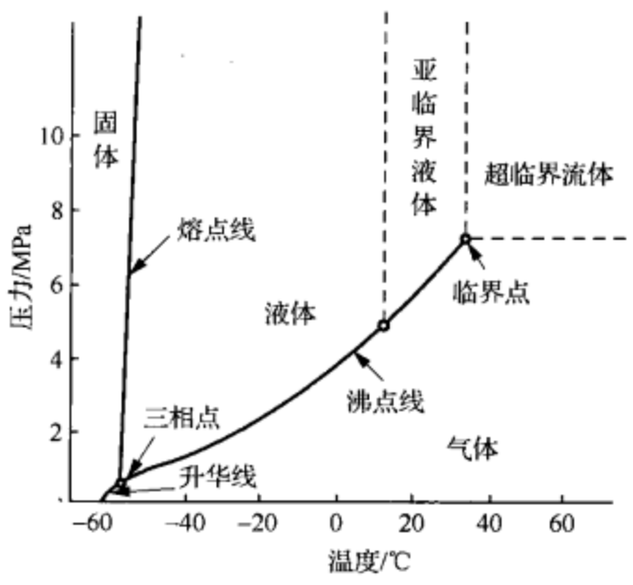


图 3.1　CO_2 的 p-T 相图

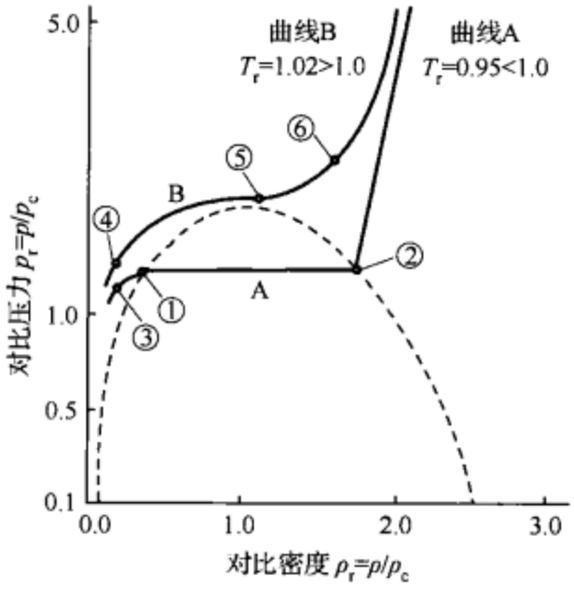


图 3.2　CO_2 的 p_r-ρ_r 半对数坐标图

3.2.3　固体在超临界流体中的溶解度计算

对于任意两相，一相用“′”表示，另一相用“″”表示，当两相平衡时，必须满足如下的热力学关系：

$$f_i' = f_i'' \quad (i = 1,2,3,\cdots,m) \tag{3.1}$$

式中，f_i 为组分 i 的逸度；m 为组分数。

对于固体与超临界流体系统，平衡时，由式(3.1)可得组分的逸度在超临界流体相中可表示为

$$f_i^{SCF} = y_i \phi_i^{SCF} p \tag{3.2}$$

式中，f_i^{SCF} 和 ϕ_i^{SCF} 分别为组分在超临界流体中的逸度和逸度系数；y_i 为组分的溶解度；p 为系统压力。

纯固体组分 i 逸度用 f_i^{OS} 表示如下[2]：

$$f_i^{OS} = p_i^{sub}(T)\phi_i^{sub}(T,p_i^{sub})\exp\left[\int_{p_i^{sub}}^{p}\left(\frac{v_i^{OS}}{RT}\right)\mathrm{d}p\right] \tag{3.3}$$

式中，$p_i^{sub}(T)$ 是纯固体组分 i 在系统温度下的升华饱和蒸气压；v_i^{OS} 是纯固体组分 i 的摩尔体积；$\phi_i^{sub}(T,p_i^{sub})$ 是纯固体在温度为 T 和压力为 p_i^{sub} 时的逸度系数，指数项为纯固体组分 i 逸度的修正项，通常称为 Poynting 修正。合并式(3.2)和式

(3.3)得非挥发性固体在超临界流体中的溶解度为

$$y_i = \frac{p_i^{sub}(T)}{p}\frac{\phi_i^{sub}(T)}{\phi_i^{SCF}}\exp\left[\int_{p_i^{sub}}^{p}\left(\frac{v_i^{OS}}{RT}\right)dp\right] \tag{3.4}$$

式(3.4)中右边第一项为理想溶解度,是温度和压力的函数;第二项是对流体非理想性的考虑;第三项为 Poynting 校正,表示压力对凝聚相逸度的影响。

对于非挥发性固体,p_i^{sub}相当小,故 ϕ_i^{sub}可近似为 1,则式(3.4)可变成:

$$y_i = \frac{p_i^{sub}}{p}\frac{1}{\phi_i^{SCF}}\exp\left[\int_{p_i^{sub}}^{p}\left(\frac{v_i^{OS}}{RT}\right)dp\right] \tag{3.5}$$

定义:

$$E_i = \frac{1}{\phi_i^{SCF}}\exp\left[\int_{p_i^{sub}}^{p}\left(\frac{v_i^{OS}}{RT}\right)dp\right] \tag{3.6}$$

式(3.6)中,E 为增强因子,其物理意义是固体溶质在超临界流体相中溶解度增大的量度。

在常压到 10.0 MPa 范围内,式(3.6)中的 Poynting 修正数仍不大于 2,因此表现为组分在超临界流体中非理想性的 ϕ_i^{SCF}是导致高增强因子的主要因素。例如乙烯-萘体系,在压力为 10.0 MPa 时,萘在气相中的逸度系数远小于 1,使增强因子高达 25000。

3.2.4 液体在超临界流体中的溶解度计算

液体溶质在超临界流体中的溶解度为气-液两相的平衡关系。当两相平衡时液体溶质在两相中的逸度相等,在系统压力、温度下,式(3.1)变成

$$f_i^{SCF}(T,p,y_i) = f_i^{L}(T,p,x_i) \tag{3.7}$$

式中,f_i^{L} 为组分 i 在液相中的逸度;x_i 为组分在液相中的摩尔分数;y_i 为组分 i 在超临界流体相中的摩尔分数。

对于每一相中,逸度可表示为

$$f_i^{SCF}(T,p,y_i) = y_i\phi_i^{SCF}p \tag{3.8}$$

$$f_i^{L}(T,p,x_i) = x_i\phi_i^{L}p \tag{3.9}$$

联合式(3.7)~(3.9)就可以计算出液体在超临界流体中的溶解度。

根据热力学分析可以看到,超临界流体具有较大溶解度的主要原因在于这种状态下溶剂和溶质间相互作用而导致的溶剂性质的非理想性,因此可以得到很大的增强因子。增强因子的计算归结为溶质组分在超临界流体相中逸度系数的计算,而逸度系数则可通过各种状态方程计算而得。

3.2.5 使用夹带剂的超临界 CO_2 过程

在超临界流体萃取过程中,有两种不同的效应会影响组分在 SCF 中的溶解和

SCF 对组分的选择性。一种是流体密度在临界区附近有高度的可压缩性，且随温度和压力的变化很大，从而使组分的溶解度发生很大的变化，此称为“密度效应”。另一种是当携带剂加入 SCF，可大大提高溶质的溶解度，例如当 5%甲醇加到吖啶和 SCF-CO_2 的混合物中，吖啶的溶解度上升百分之几百，当 1%的甲醇加到 SCF-CO_2-吖啶-蒽的系统中时，吖啶在混合溶剂中的选择性会成倍增加，这是因为加入的夹带剂甲醇与吖啶分子间由氢键作用缔合的结果，此称为“携带剂效应”。

关于夹带剂的选择，通常选用一些有一定极性的小分子有机溶剂。夹带剂的加入可以从两个方面影响溶质在超临界流体中的溶解度和选择性：一是超临界 CO_2（溶剂）的密度；二是溶质与溶剂分子间的相互作用。研究表明，影响溶解度与选择性的决定因素是改变了溶剂与溶质间的作用力。相比较，夹带剂与溶质分子间的范德华作用力和夹带剂与溶质定向分子间作用，如形成氢键等，后者的影响更大。对于定向分子间作用，同时具有氢键接受能力和给予能力的夹带剂分子比单向接受氢键能力的夹带剂分子的影响要大[3]，前者如甲醇、乙醇等，后者如丙酮等。

涉及分子间缔合作用的过程，需用缔合模型（association models）来进行处理。一般地说，有两种方法可将缔合平衡和状态方程相结合。

（1）同时解缔合组分间的化学平衡和所有组分间的相平衡法。假设一种纯缔合物是一个缔合物 A_i 的混合物，其中每一个多聚体含 i 个单体 A_1，所经历的缔合反应为：

$$iA_1 = A_i \tag{3.10}$$

一旦纯物质的虚拟组分设定后，要解的方程如下：

化学平衡方程

$$i\mu(T,p,x) = \mu_i(T,p,x) \tag{3.11}$$

式中，μ_i 和 μ_1 分别为物种 A_i 和 A_1 的化学位。

相平衡方程

$$\mu_i^{\mathrm{I}}(T,p,x) = \mu_i^{\mathrm{II}}(T,p,x) \tag{3.12}$$

式中，上标Ⅰ、Ⅱ分别代表平衡的两相。

用化学平衡常数 K_i 将各物种间的化学位联系起来，则有：

$$\mu_i^{\ominus}(T) - i\mu_1^{\ominus}(T) = \Delta G^{\ominus}(T) = -RT\ln K_i(T) \tag{3.13}$$

把理想气体状态下的纯 A_i 作为气、液两相中 A_i 的标准态。这样的标准态选择便于 EOS 的计算，因为所有相中缔合常数都相同，且只与温度有关。

如果缔合物种的残余化学位可用非极性混合物的 EOS 进行计算，则式（3.13）就可以进行数值解。Wenzal 等[4]用 Schmidt-Wenzal 立方形方程达到了上述目标。

（2）缔合与状态方程相结合的方法。此法的特点在于分析地解出某一假定的缔合模型的化学平衡表达式，并将其和状态方程有机地结合起来。为此选择一种

连续缔合模型比较理想，因为这种模型能够只用一个有效缔合常数，对缔合系统的热力学行为能提供一个满意的近似。

Heidemann 与 Prausnitz[5]提出了一种将 vdW 型 EOS 和连续线性模型(continuous linear model)相结合的方法。对连贯的缔合 $A_i + A_1 = A_{i+1}$，假设其平衡常数是相等的，$K_{i,i+1} = K$，该文作者采用一简单的通用 EOS 表示如下：

$$p = \frac{RTZ_{rep}(\xi)}{V} - \frac{a}{b^2}\Pi_{att}(\xi) \tag{3.14}$$

式中，a、b 为普遍化的 vdW 参数；Z_{rep}、Π_{att}都是对比密度 ξ 的函数。

计算中采用简单的二次方程式的混合规则。进入 EOS 中的缔合效应通过因子(n_T/n_0)进行表达，此处 n_T 是缔合的总摩尔数，n_0 是没有缔合时物质的摩尔数。此因子等于平均缔合数的倒数。最后得到的表达方程为：

$$Z = \frac{2}{1 + [1 + 4RTK\exp(g)/V]^{1/2}} Z_{rep} - \frac{a}{RTb\xi}\Pi_{att} \tag{3.15}$$

式中

$$g = \int_0^{\xi} [(Z_{rep} - 1)/\xi] d\xi \tag{3.16}$$

上式表达了缔合对压缩因子影响的明显形式。由此可见，此法与第一种方法有本质不同，状态方程形式因缔合的存在发生了很大的变化，把缔合的因素结合在状态方程之内。

3.3 超临界流体萃取过程分析

超临界流体从固体物料中萃取有效成分可分为两步：①萃取；②分离。萃取过程流体通过物料固定床的方式可从上到下，也可以从下到上。超临界流体的性质前面已讨论过，而固体物料的性质对萃取过程极为重要，现讨论如下。

3.3.1 超临界流体萃取过程的传质

3.3.1.1 固体相中的传质

用超临界流体从天然植物中萃取有效成分，物质传递发生在固体内部和植物结构的界面上。由于几何形状的差异，萃取过程的物质传递受到影响。即使是同一物质，不同的萃取阶段其传递速率也可能不同。

一般，可溶性物质从固体物料中萃取出来要经历这样几个过程：①原料吸收超临界流体，细胞壁即细胞内的通道扩张，使传质阻力下降；②原料吸收溶剂的同时发生溶剂化反应，超临界流体溶解溶质；③被溶解物质迁移到固体外部表面，此过程中扩散是主要的传递机理；④被溶物通过外部界面并有可能发生相变化；⑤被溶

物进入超临界流体主体相并与超临界流体一起离开固体物料主体。

原料固体基质在固定床中如图 3.3 所示。萃取器内的固定床由植物原料颗粒组成，颗粒则由植物细胞组织构成。植物细胞结构如图 3.4 所示，萃取物溶解在细胞质或液泡内。细胞的基体，像包含液泡的细胞质、细胞壁、细胞间的空腔和原生质膜、细胞原浆的气压和细胞壁的凹陷，决定了萃取过程的传质。

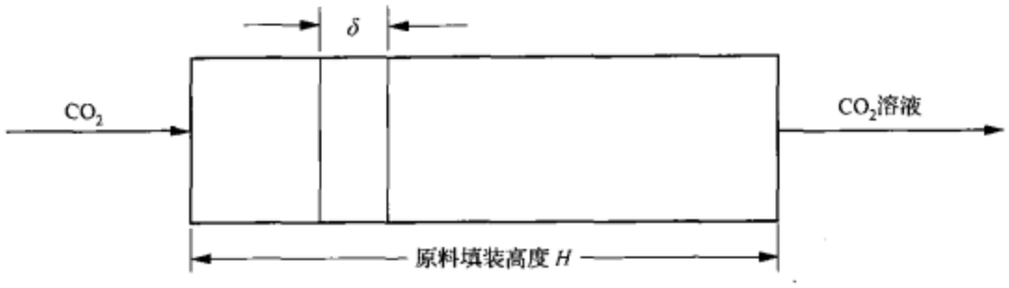


图 3.3　固定床固体基质示意

δ 为 CO_2 接触原料后发生溶解反应至饱和该段时间内经过的填料层长度，称之为过渡层

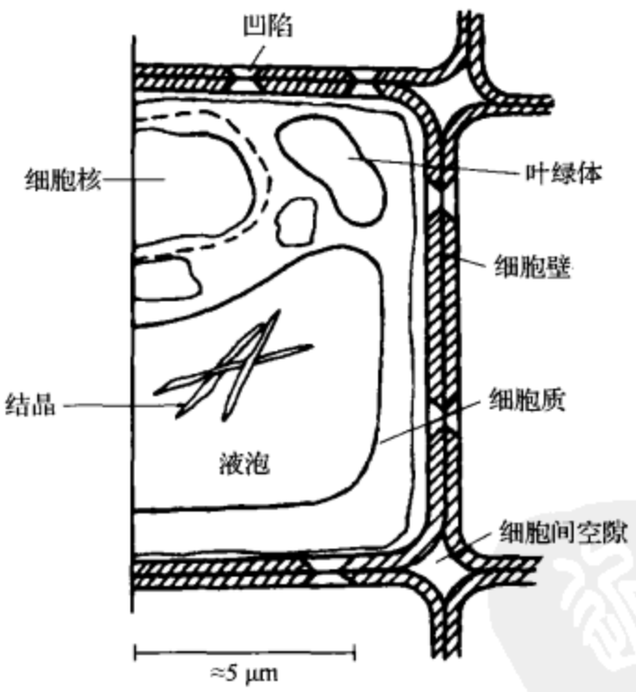


图 3.4　植物细胞剖面图[6]

在细胞汁液内可有结晶存在，像咖啡因之类物质，还有糖类、脂肪、蛋白质和可溶性盐。这些物质的传递需要各种膜的网络。基础膜是网络膜的部分，基础膜上有孔能让水和脂类通过，这样一个基础膜的动力学模型能解释水在萃取过程中的作用。基础膜内的油脂支柱随水的浓度而变化，当物料体系中水分不足时，支柱将膜关闭，使之成为非渗透性膜，当有足够水时，膜变为可渗透性。

生物细胞的基础膜是半透性的，它能让溶剂通过，但不能让溶质通过。细胞壁有几层组成使之有一定的稳定性，在某些点上，细胞壁凹陷深至中间层，即基础膜层，通过这些点可以进行物质传递。细胞壁间形成空腔，细胞壁部分和空腔形成一个长而空的中间层供传递物质。

另一方面，若植物被粉碎，细胞和细胞组织被破坏，则可缩短传质途径，增加传质速率。这样，通过膜的阻力变得次要，而其他的传质机理如固体内部扩散、固体表面的脱附及溶剂层流层的扩散变成主要因素。如图 3.3 所示，对于足够细小的颗粒，萃取过程 CO_2 对溶质的溶解主要发生在过渡层 δ 区间内，即在 T_R（CO_2 经过过渡层 δ 所需要的时间）内 CO_2 达到饱和。而当颗粒内部扩散阻力为主时，过渡层 δ 的宽度变大；当过渡层 δ 的宽度大于原料床层的长度时，即 T_R 大于 T_{Rmax}（CO_2 经过图 3.3 中 H 所需要的时间）时，流出的 CO_2 尚未饱和[7]。

3.3.1.2 拟稳态萃取模型

超临界流体从天然植物中提取有效成分，萃取体系包含固相和溶剂相，固体在萃取器内，溶剂通过萃取器溶解提取有效成分。模型化的目的是用量少但物理意义明确的参数以简单的方程有效、定量地描述过程。

拟稳态的假设基于：萃取过程较慢，溶剂停留时间为 min 级，萃取时间从10 min 到几个小时不等。

单位时间内的萃取量表示如下：

$$\frac{dm}{dt} = \dot{m} = -m_s \frac{dc_m}{dt} \tag{3.17}$$

式中，$\dot{m}$ 为被萃取组分的质量；m_s 为固体原料的质量；C_m 为固体中被萃取物平均浓度。

萃取物从固体相传递到固-溶剂界面，然后进入溶剂主体：

$$\dot{m} = \beta_s A(c_m - c_0) \tag{3.18}$$

$$\dot{m} = \beta_f A(c_0 - c_\infty) \tag{3.19}$$

当固-溶剂界面没有相转移时，总的传质阻力为

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{\beta_s} + \frac{1}{\beta_f} \tag{3.20}$$

式中，β_s 为固相中的传质系数；β_f 为溶剂相中的传质系数；A 为传质面积；c_0 为固体相中被萃取物的初始平均浓度；c_∞ 为溶剂主体中被萃取物浓度；K 为总的传质阻力。

若固-溶剂界面出现相转变，则界面平衡需考虑在内。

当 K 为常数时，可得如下等式计算固相中被萃取物的平均浓度：

$$\frac{c_m - c_\infty}{c_0 - c_\infty} = \exp\left(-\frac{KA}{m_s c_0} t\right) \tag{3.21}$$

假设过程是由固相中传质阻力控制，则

$$\frac{1}{\beta_f} \ll \frac{1}{\beta_s}$$

所以 $K \approx \beta_s$。

式(3.21)能表达萃取过程，但不包括起始段，起始阶段较复杂，很难用简单模型表达。

通常传质系数 β_s、β_f 和 K 的实际值无法获得，但可通过总质量平衡或根据传递模型求算。

3.3.1.3　萃取速率

图 3.5 为两种常见的萃取速率曲线。曲线 1 为固体原料中具有较高浓度被萃取物时的萃取速率曲线。曲线的第一阶段表示由固体与流体界面间的物质迁移决定传质过程，故萃取传质恒定(操作条件不变)。

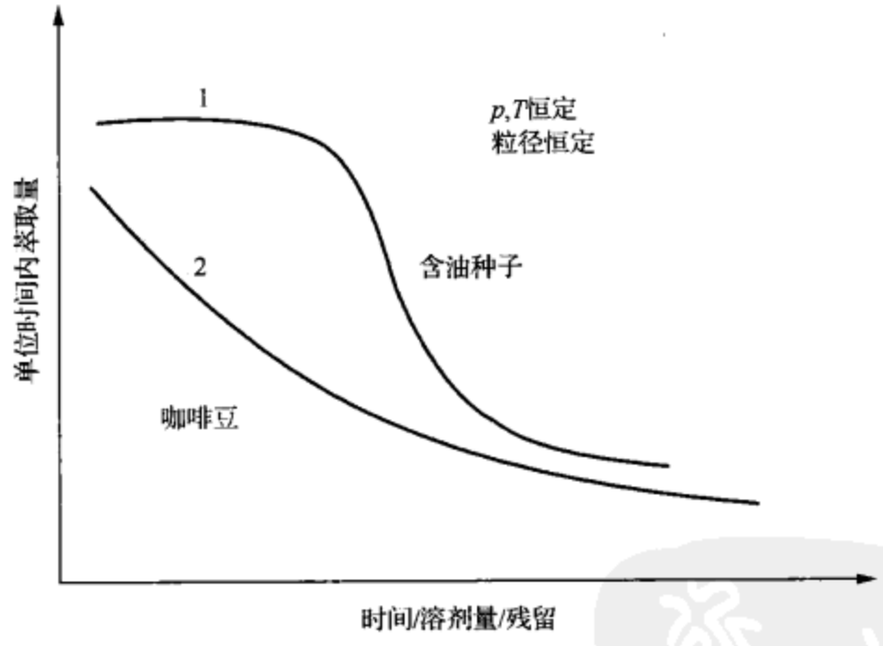


图 3.5　萃取速率曲线

曲线 1 的第二阶段萃取速率递减。有两个原因可能引起溶剂中溶质浓度的下降，使萃取速率下降。

(1) 固定床中大部分靠近溶剂与固体界面的原料中被萃取物量减少，萃取物需从固体内部扩散到界面，故传质阻力增加，影响萃取速率。

(2) 由图 3.3 可知，固体床中过渡层 δ 内的传质是恒定的，且 δ 随着萃取的进行、时间的延续会从固定床的一端移到另一端，由于萃取的进行，使具有原始浓度的原料固定床长度减少，当原料的有效床层小于过渡层 δ 时，流体流经此减少了的床层的时间不足以让溶剂饱和，速率曲线出现下降。

曲线 2 通常表明原料中被萃取物含量递减的萃取过程速率，因此从萃取一开始固体内部的传质就起主要作用，从而影响了萃取速率，从图 3.3 的示意中可知，此时 δ 大于床层高度 H。曲线 2 与曲线 1 的第二阶段趋势是一致的。由萃取速率曲线可看出，随着萃取的进行，萃取速率会愈来愈小，固体中被萃取物的残留也会愈来愈少。

除此之外，萃取速率曲线还存在一个起始段，在起始段内，萃取速率会随着时间的增加而增加。这是由于萃取刚开始时，由于设备结构固有的原因，靠近出口的流体没有与原料接触，故出萃取器的溶剂中没有溶质或尚未饱和，随着时间的进行，流出的流体中溶质会逐渐增加，直至饱和(像曲线 1 的情况)。起始段的影响程度与流体的停留时间有关，停留时间短(流体与物料比大)，则起始段的影响小；相反，流体的停留时间长(流体与物料比小)，起始段的影响就显得重要，这时，分析结果时就必须考虑溶剂在萃取器中的停留时间。另外，由于被萃取物往往是一个组分复杂的混合物，有些被萃取物在溶剂中可能起到夹带剂的作用，这时的速率曲线也会出现一个起始段[7]。从固体物料中萃取的过程常常是非稳态的，故速率曲线的起始段不可避免。

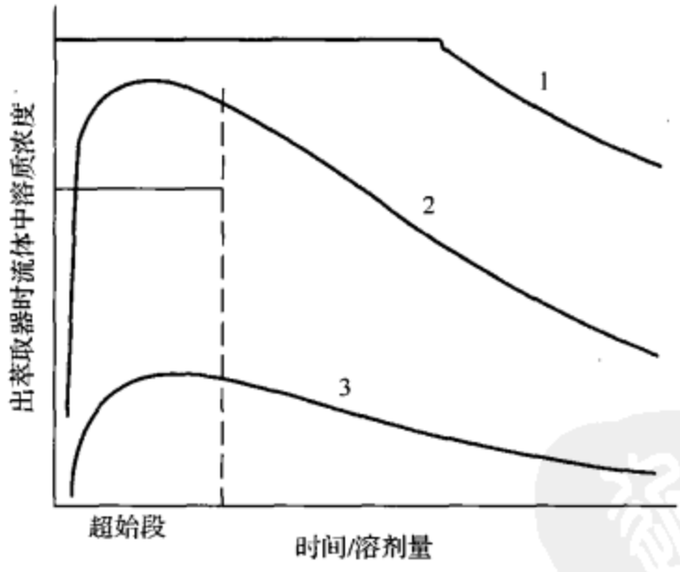


图 3.6 萃取过程溶质浓度曲线

3.3.1.4 萃取过程溶质浓度

超临界流体从固体物料中萃取有效成分，流体中有效成分浓度常见曲线如图 3.6所示。图中稳态型(曲线 1)和非稳态型(曲线 2、3)两种浓度曲线分别与图 3.5中速率曲线 1 和速率曲线 2 的情况相对应。稳态型曲线的第一部分，流体中溶质浓度为常数，第二部分则随着萃取的进行，溶质浓度下降。稳定型曲线的第一部分情况表明，萃取过程流体相传质阻力控制，在溶剂与固体相界面有足够的被

萃取物溶解到流体主体中，故当流体流速恒定时，流体中溶质浓度恒定。依照图 3.5萃取速率曲线 1 的第二阶段，随着萃取的进行，溶剂中溶质浓度会下降。这是因为在萃取的后阶段，固体中被萃取物减少，使流体中实际溶质浓度低于平衡浓度，且愈来愈低。

流体中溶质浓度的大小取决于传质速率与溶剂比，流体中浓度的最大值为平衡浓度。由于不同的物质其传递阻力和平衡扩散系数不同，因此它们可能以不同的速率被萃取出来，这样超临界流体中溶质最大浓度可能是萃取时间的函数，即为图 3.6 中非稳态型曲线 2、3。

在平衡浓度条件下萃取，可使超临界流体的用量达到最小，但不等于萃取所需的时间最小。在非稳态平衡浓度下萃取，增加溶剂的流率可使单位时间的萃取量大于平衡萃取时的萃取量。在实际工业过程设计中，对于非稳态过程，萃取器的长径比(L/D)大较为合理，多个萃取器串联工艺优于单个萃取器的工艺[7]。

在很多情况下，由于固体原料内组分间的相互作用，被萃取物组分的实际浓度与萃取单独组分的平衡浓度相比要低得多。混合物的平衡数据通常情况下未知，平衡值包括固体的吸附平衡，与固体原料中被萃取物浓度有关。因实际萃取过程中溶质浓度远离平衡浓度，所以可用纯组分的平衡数据简单而有效地模拟萃取过程。

例如，当二氧化碳的温度和压力分别在 350 K，30 MPa 时，纯咖啡因在二氧化碳中的平衡浓度越为 0.4%(质量分数)。用相同条件的二氧化碳从咖啡豆中萃取咖啡因时，其平衡浓度仅为 200 ppm①，且随着萃取的进行，咖啡豆中咖啡因量减少，大部分萃取时间内超临界二氧化碳中咖啡因的浓度低于 100 ppm。

在另外一种情况下，当低挥发性组分中加入一种易挥发性组分时，其平衡浓度会增加。如二氧化碳与菲的二元体系中，加入相对挥发度比菲高的萘时，菲在超临界二氧化碳中的溶解度增加，这在实际应用中表现为添加携带剂的萃取过程。有时在萃取挥发性混合组分时，被萃取的挥发性溶质本身可能就是比较好的助溶夹带剂，此时，溶质在超临界流体中的溶解将随着某些组分的变化而变化，过程的溶解度曲线呈现非稳态情况[7]。

3.3.2　萃取过程影响因素

(1) 压力。当温度恒定时，溶剂的溶解能力随着压力的增加而增加；经一定时间萃取后原料中有效成分的残留，随着压力的增加而减少。

(2) 温度。当萃取压力较高时，较高的温度可以获得较高的萃取速率。原因之一是在相对高的压力下，温度增加，组分蒸气压上升占优；原因之二是传质速率

① ppm 为非法定用法，一般可改为“$\times 10^{-6}$”，也可根据具体情况改为诸如 μg/g，mg/L，μL/L 等。

随着温度的增加而增加，使得单位时间内的萃取量增加。

（3）流体密度。溶剂的溶解能力与其密度有关。密度大，溶解能力大，但密度大时，传质系数小。在恒温时，密度增加，萃取速率增加；在恒压时，密度增加，萃取速率下降。

（4）溶剂比。当萃取温度和压力确定后，溶剂比是一个重要的参数。在低溶剂比时，经过一定时间萃取后，固体中被萃取物残留量大。用非常高的溶剂比时，萃取后固体中残留趋于低限。

溶剂比的大小必须考虑其经济性，其在两个方面影响产品成本：一是高溶剂比时，萃取时间短。由于溶剂比大，溶剂中溶质浓度低，引起操作成本增加。此外，溶剂比大时溶剂循环设备大，投资增大；二是高溶剂比时，生产能力增加，产品成本降低。

溶剂比增加时，萃取速率增加。但由于溶剂停留时间缩短，溶剂中溶质的浓度下降。在某个溶剂比下，萃取速率将达到最大。

若投资成本突出时，溶剂比取达到最大萃取速率为目标。若产品成本中循环费用突出时，应取最小溶剂比。调节溶剂的流速，使溶剂流出萃取器时溶质浓度达到平衡时溶剂量为最小。实际过程最适溶剂比应视各个过程的特点而定，在过程优化时，需考虑溶剂再生，尤其要考虑某些限制，如萃取时间对于产品质量的影响。

（5）颗粒度。超临界流体通过固体物料时的传质，在很多情况下将取决于固体相内的传质速率。固体相内传递路径的长度决定了质量传递速率，一般情况下，萃取速率随着颗粒尺寸减小而增加。当颗粒过大时，固体相内传质控制，萃取速率慢，在这种情况下，即使提高压力、增加溶剂的溶解能力，也不能有效地提高溶剂中溶质浓度。另一方面，传质必须到达溶剂相内，若颗粒尺寸小到影响流体在固定床

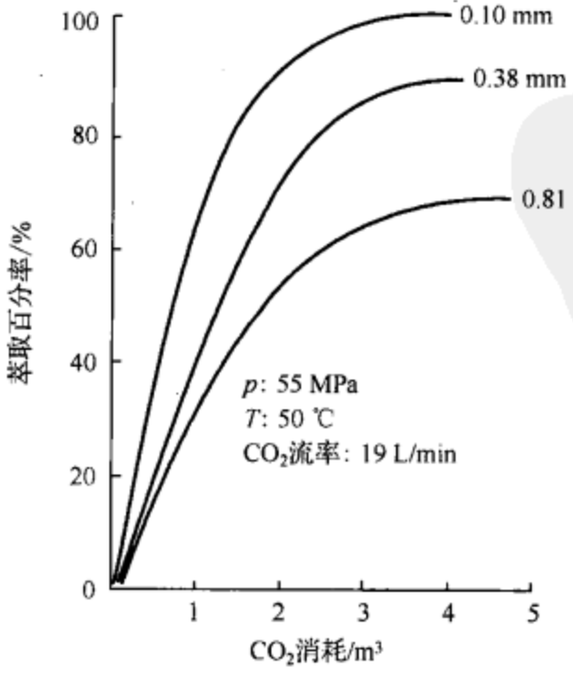


图 3.7 颗粒度与萃取效率的关系

中通过时，传质速率亦下降，因为细小的颗粒会形成高密度的床层，阻塞溶剂流动通道而影响传质。图 3.7 所示为超临界二氧化碳萃取豆油时的情况，萃取速率随着豆片厚度的减小而增加，当厚度为0.10 mm时，97%的油被萃取，当厚度增加到0.81 mm时，萃取率仅为67%。

3.3.3　超临界流体萃取的特点

超临界流体的溶解能力、传质性能和溶剂回收等方面具有突出的优点：

(1) 由于超临界流体的密度与普通液体溶剂相近，因此用超临界流体萃取具有与液体相近的溶解能力。同时它又能保持气体所具有的传递特性，即比液体溶剂渗透得快，渗透得深，能更快地达到平衡。

(2) 操作参数主要为压力和温度，而这两者比较容易控制。在接近临界点处，只要温度和压力有微小的变化，流体的密度会有显著的变化，即溶解能力会有显著变化。因此，萃取后溶质和溶剂的分离容易。精确地控制超临界流体的压力或温度，还能得到类似于精馏的效果，使溶质逐一分离。

(3) 超临界流体萃取集精馏和液-液萃取特点于一体，故有可能分离一些用常规方法难以分离的物系。

(4) 超临界流体，尤其是超临界 CO_2 流体，可在近常温的条件下操作，故特别适用于热敏性、易氧化物质的提取分离。如提取天然香料、中草药有效成分等产物，几乎可全部保全热敏性本真物质，过程中有效成分损失少，收率高。

超临界流体萃取存在的不足之处：

(1) 高压下萃取，过程相平衡较复杂，物性数据缺乏。

(2) 高压装置和高压设备，投资费用高，安全要求亦高。

(3) 超临界流体中溶质浓度相对较低，故需要大量流体循环。

(4) 超临界流体萃取过程以固体物系居多，连续化生产较困难。

3.4　超临界流体萃取的应用

3.4.1　常见工艺流程

超临界流体萃取过程基本上由萃取和分离阶段组成。图 3.8 为具有代表性的四种工艺流程示意：(a)变压萃取分离法(等温法)；(b)变温萃取分离法(等压法)；(c)吸附萃取分离法(吸附法)；(d)稀释萃取分离法(惰性气体法)。其中变压萃取过程是应用最为方便和常见的一种流程。

等温变压萃取过程是应用最方便的一种流程。萃取剂经压缩升压达到超临界状态，如图 3.9 所示的状态点①，流体经换热后(一般为冷却)进入萃取器与萃取物

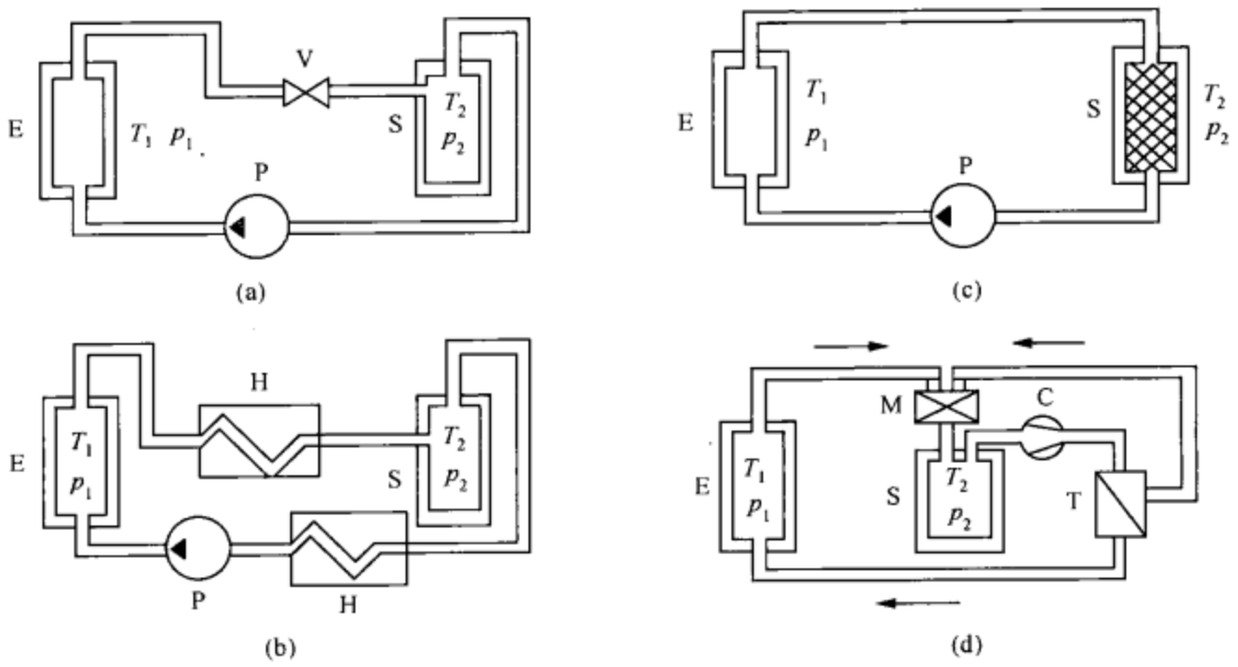


图 3.8 常见超临界流体萃取流程

E 萃取器；S 分离器；P 泵；C 压缩机；V 节流阀；H 换热器；M 气体混合器；T 气体分离(膜分离)

(a) 等温法，$T_1=T_2$，$p_1>p_2$；(b) 等压法，$p_1=p_2$，$T_1\neq T_2$；(c) 吸附法，$p_1=p_2$，$T_1=T_2$；

(d) 惰性气体法，$p_1=p_2$，$T_1=T_2$

料接触。因超临界流体有较高的扩散系数，传质过程很快就达到平衡，此过程维持压力不变到达状态点②。随后萃取物流进入分离器减压分离，到达状态点③，这时超临界流体的溶解能力减弱，溶质从流体中析出。减压了的流体再经过压缩机升压后回到状态点①，这样可周而复始地进行。

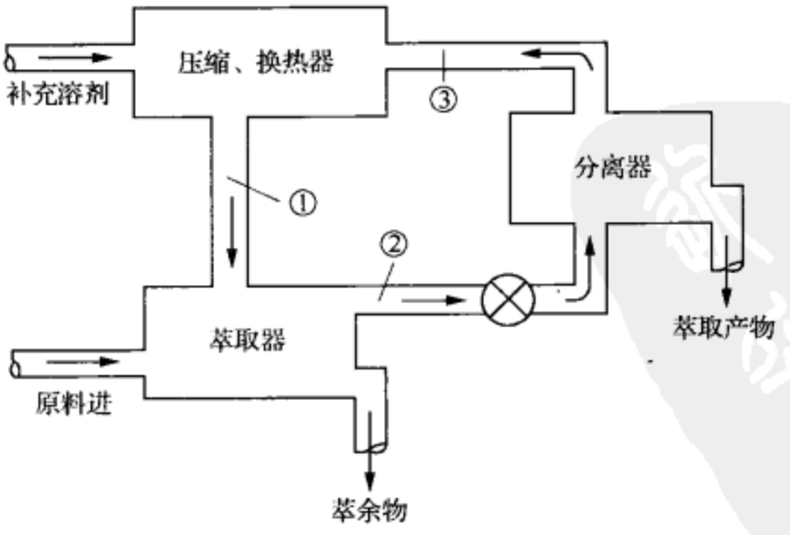


图 3.9 超临界流体萃取过程

在等压条件下，通过改变过程的操作温度也可实现溶质与溶剂的分离，但温度

对流体溶解能力的影响比压力的影响要复杂。当等压升温时，超临界流体密度下降，溶解能力亦下降，但此时溶质的蒸气压会升高，溶解度会有所增加。两者消长的结果会造成在某一压力范围内（通常为较高压力段），温度升高使流体的溶解能力增加；而在另一压力范围内（通常为较低压力段），温度升高使流体的溶解能力下降。因此等压变温过程需视压力和物系来确定是升温还是降温。

分离器内放置能吸附萃取物的吸附剂可实现萃取剂再生。这样，整个循环可在等压、等温下进行，适用于萃取物量少或去除少量杂质的过程。

在超临界流体内加入惰性气体，例如二氧化碳内加入氮气或氩气能降低流体的溶解能力，达到分离溶质和溶剂的目的。此过程在恒温恒压下得到被萃取物，但混合流体的分离需通过膜分离过程。

3.4.2　流体的循环方式

在超临界流体萃取工业化过程中，流体的增压设备可用泵或压缩机。为了获得设计所需的热力学数据，现以 CO_2 循环过程的温度-熵图说明不同的循环方式各点流体的状态及能量消耗。

（1）泵循环过程——萃取剂 CO_2 利用泵循环时各个过程的流体状态如下：

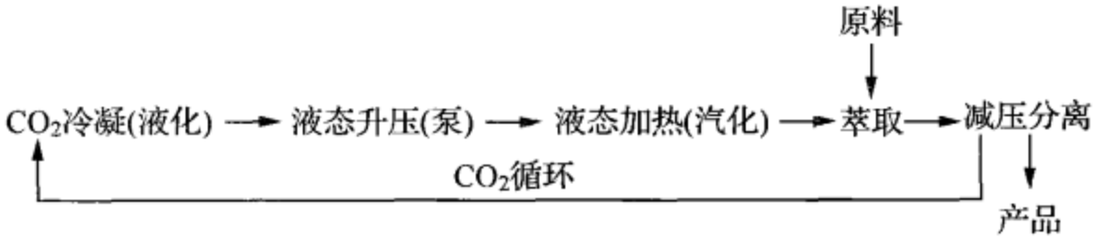


图 3.10 为超临界 CO_2 用泵循环时的 T-S 示意图。分离时流体膨胀到亚临界状态，流体经过泵增压后恒压升温。对其所需的热能和电能进行计算，其总能量列于表 3.3[6]。

表 3.3　泵循环过程能量消耗

过程步骤	能量传递/(kJ · kg^{-1})	热量排放/(kJ · kg^{-1})	冷却量/(kJ · kg^{-1})	电能/(kJ · kg^{-1})
5→1	−175.5	0	175.5	10.9
1→2	50.0	0	0	50.0
2→3	7.3	7.3	0	0
3→4	0	0	0	0
4→5	119.5	0	0	0

注：萃取条件 40 MPa，339 K；分离条件 6 MPa，301 K。

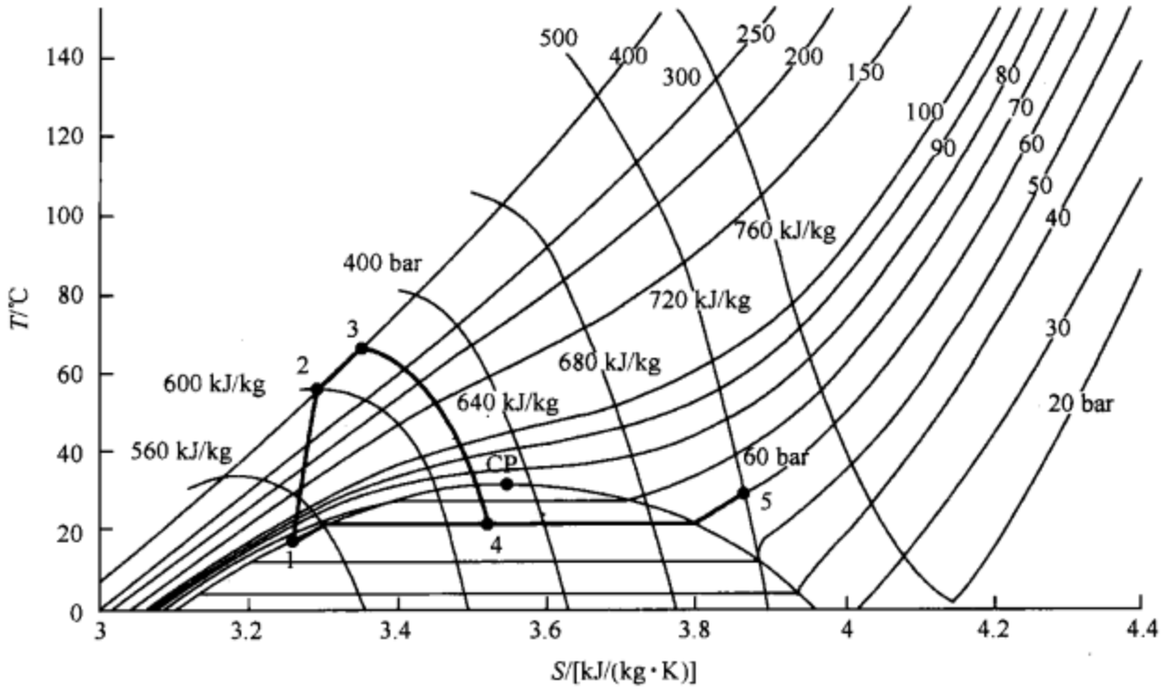


图 3.10 泵循环 *T*-*S* 示意图

1→2，液体增压；2→3，恒压汽化；3，萃取；3→4，节流膨胀；4→5，溶剂再生；5→1，冷凝

bar 为非法定单位，1 bar=10^5 Pa，下同

（2）压缩机循环过程——采用压缩机增压循环时各过程的流体状态如下：

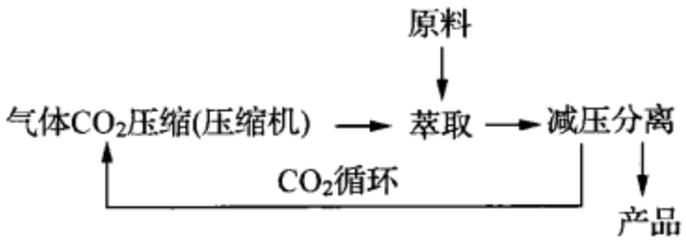


图 3.11 为 CO_2 用压缩机循环时的 *T*-*S* 图。此过程与泵循环过程的主要区别是循环按逆时针进行。减压分离时，膨胀到亚临界状态，过程气体的冷却(2→3)可用气体冷凝器加热蒸发液体(4→5/1)。循环过程需要的热能和电能计算列于表 3.4[6]。

表 3.4 压缩机循环过程能量消耗

过程步骤	能量传递/(kJ·kg^{-1})	热量排放/(kJ·kg^{-1})	冷却量/(kJ·kg^{-1})	电能/(kJ·kg^{-1})
4→5/1	168.2	0	0	0
1→2	38.7	0	0	38.7
2→3	−206.1	0	36	0.3
3→4	0	0	0	0

注：萃取条件 40 MPa，313 K；分离条件 5 MPa，299 K。

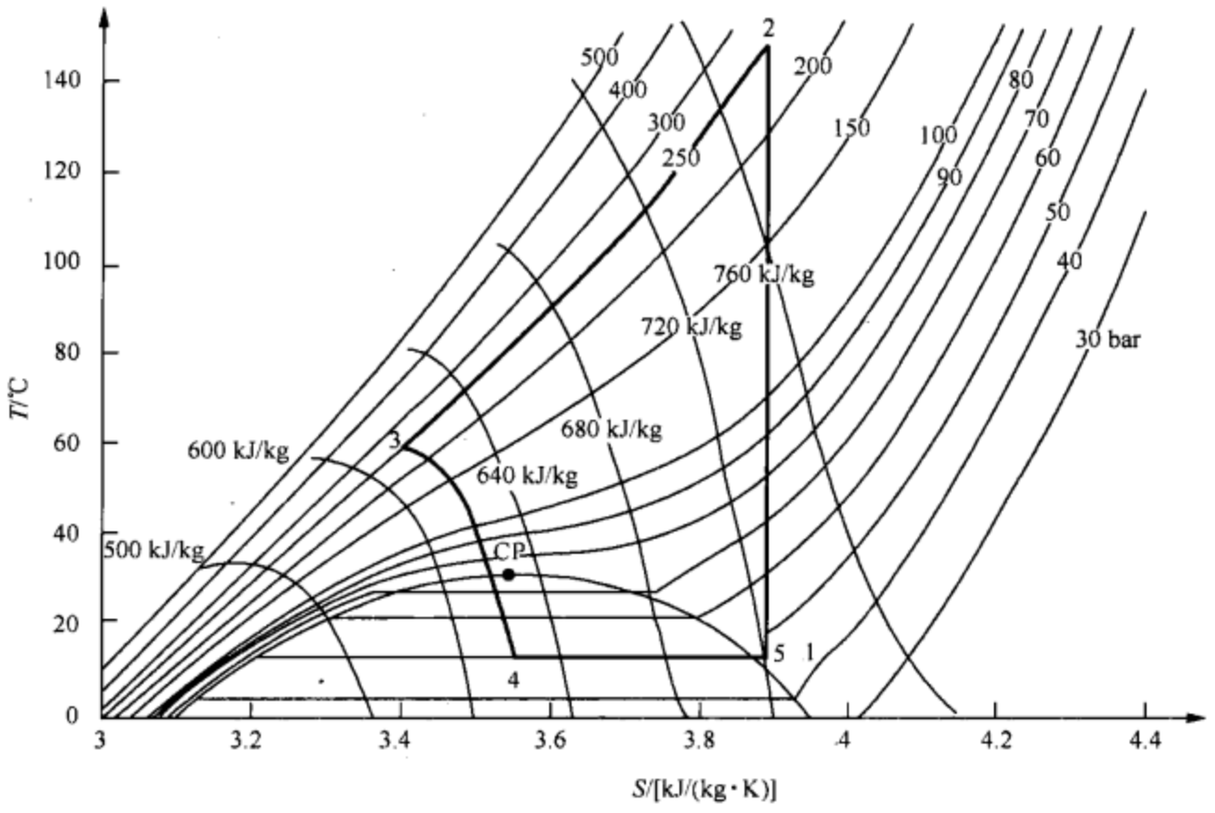


图 3.11　压缩机循环 *T-S* 示意图

1→2，增压；2→3，恒压冷却；3，萃取；3→4，节流膨胀；4→5/1，溶剂再生

图 3.12 和表 3.5[6] 比较了压缩机循环和泵循环两个过程的能耗。当萃取压力增加时，能量消耗增加；分离压力提高时，能耗减少；当分离压力处于临界状态

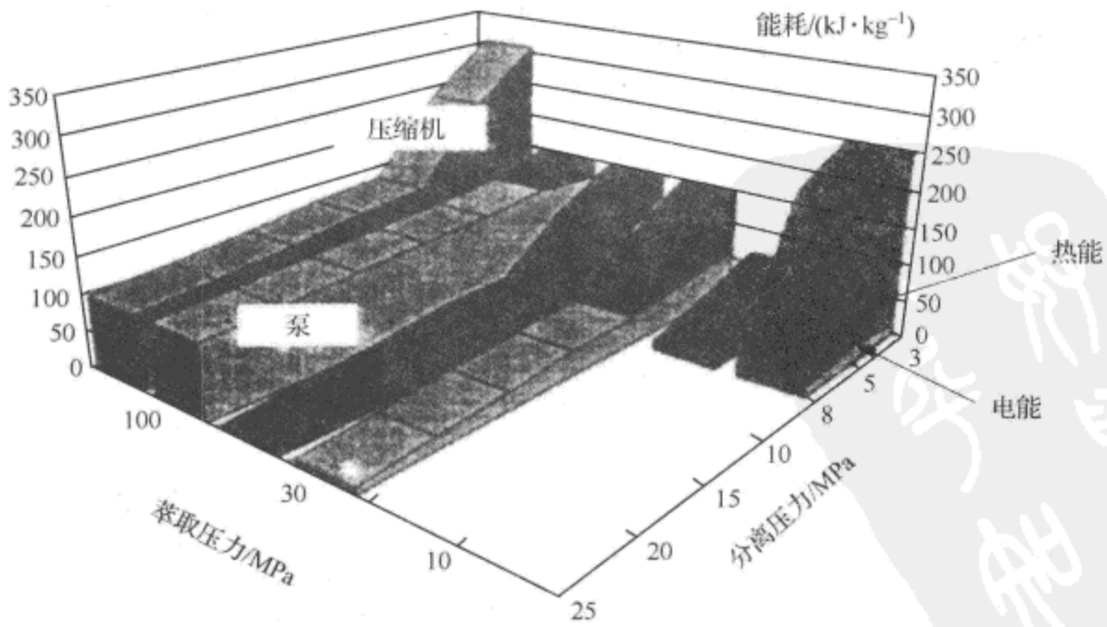


图 3.12　压缩机和泵循环能耗比较(萃取温度 313 K)

时，两者的能耗相差不大，即使当萃取压力在 30 MPa 左右，分离压力在亚临界状态时，压缩机循环和泵循环两者的能耗相差也不大；萃取压力较高时，压缩机循环过程能耗大，萃取压力较低时，泵循环过程能耗较大，尤其是热能的消耗。

表 3.5 超临界 CO_2 萃取循环能耗比较（$kJ \cdot kg^{-1}$）

分离压力/MPa	泵循环			压缩机循环		
	萃取压力/MPa					
	10	30	100	10	30	100
3	12.9	51.4	127.9	65.2	150	307
5	24.2	47.4	131.3	34.5	103.8	240
8	13.7	36	122.3	11	38.5	138.1
10		33.2	118.2		35.9	132.2
15		24.7	114		24.8	120
20		17.1	106.9		17.2	110.2
25		9.9	101.5		9.6	101.5

泵循环的优点是泵的投资比压缩机小；流体流量易于控制；当压力大于 30 MPa时，能耗比压缩机小。

泵循环的缺点是需要热交换器和冷凝器及冷凝剂，此外，在较低压力下萃取时，冷凝所需的能耗相对较大。

实际工业设计时，是选用压缩机还是选用泵应根据具体情况综合考虑。

3.4.3 超临界流体萃取设备

超临界流体萃取的一般工艺流程如图 3.13。从图中可以看出，超临界流体萃取过程设备主要包括流体储罐、压缩机、萃取器、分离器、吸附器、恒温及控制系统。

超临界流体萃取过程是一个高压操作过程，装置的设计压力一般大于 32 MPa，主要设备都是二类或三类压力容器。另外，被萃取物料大多是固体，间歇操作是过程的特点之一，萃取器顶盖需频繁开启进出料，故对萃取器、分离器的设计要求较高，即要求物料进出口的拆卸要方便、安全、可靠，对疲劳设计、快开密封结构设计、厚壁容器的传热及拆卸料的自动化等提出了更高的要求。

除了压力容器外，增压设备也是超临界流体萃取过程中的一个重要设备。流体的压缩可采用压缩机（柱式或隔膜式压缩机），也可以用高压泵。前者设备体积较大，流体循环过程无相变；后者设备体积相对较小，但流体循环过程有相变，故需要配置冷冻装置。

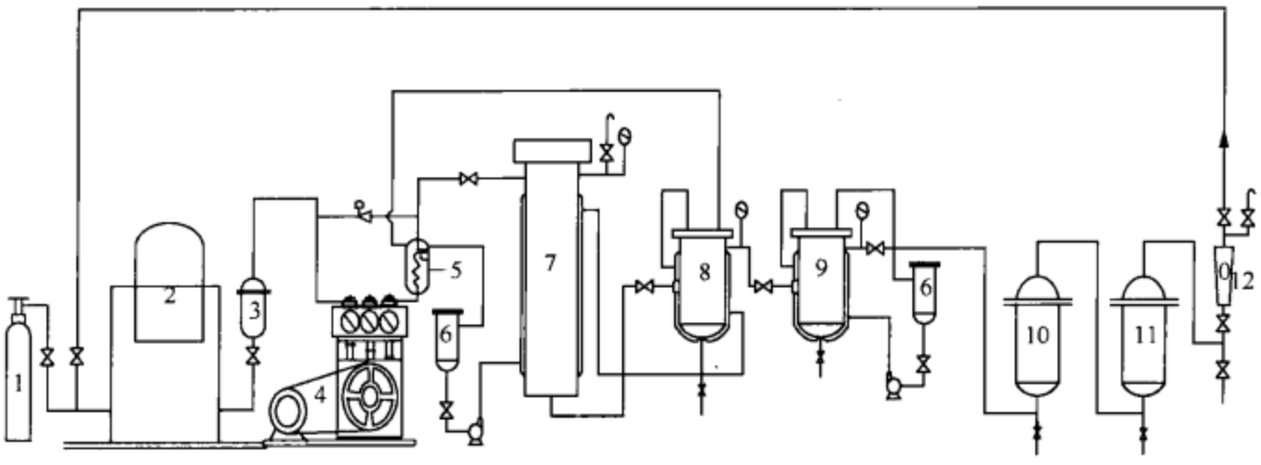


图 3.13　超临界流体萃取工艺流程图

1. CO_2 钢瓶；2. 储气罐；3. 过滤器；4. 压缩机；5. 换热器；6. 恒温水槽及循环泵；7. 萃取器；8. 一级分离器；9. 二级分离器；10. 过滤器；11. 气水分离器；12. 流量计

3.4.4　超临界流体萃取中草药有效成分

中药有效成分提取的手段主要是水提取和醇提取或水蒸气蒸馏，为了强化过程，有时采用外加能量等方法强化提取。对水提取液和醇提取液通常需进行纯化，纯化的手段根据要求，通常有水提取醇沉、醇提取水沉、加絮凝剂沉淀、吸附等。

超临界流体萃取，以其独特的提取和溶剂分离方式在中药有效成分提取过程中得到体现，尤其是使用超临界 CO_2 萃取，溶剂本身无毒、价廉易得及近常温的操作温度，可以提取中草药挥发油成分、萜类成分、脂肪酸、生物碱及醌类等有效成分物质，可取代传统的水蒸气蒸馏法和部分有机溶剂提取过程。表 3.6 列出了部分用超临界流体技术萃取的中草药成分和产品。

表 3.6　超临界流体技术萃取中草药有效成分及产品

原料	萃取溶剂	萃取物及形态	收率/%
白芍	CO_2+95%乙醇	含芍药苷浸膏	2.5
白芷	CO_2	浸膏	0.9
薄荷草	CO_2	薄荷油	4.8
丹参	CO_2+95%乙醇	丹参酮	2.1
草珊瑚	CO_2+95%乙醇	浸膏	2.3
苍耳子	CO_2	油状物	6.5
柴胡	CO_2	油状物	1.9
穿心莲	CO_2+95%乙醇	穿心莲内酯	8.3
川芎	CO_2	浸膏	5.6
当归	CO_2	油状物	2.5

续表

原料	萃取溶剂	萃取物及形态	收率/%
丁香	CO_2	油状物	20
杜仲	CO_2+60%乙醇	桃叶珊瑚苷等	—
莪术	CO_2	浸膏	6.0
防风草	CO_2	浸膏	3.5
蜂蜡	CO_2	蜡状物	2～6
广藿香	CO_2	浸膏	2.9
虎杖	CO_2+夹带剂	白藜芦醇等	2～3.5
苦参	CO_2+表面活性剂	苦参碱	1.2
苦马豆	CO_2	油状物	6.8
苦楝皮	CO_2+夹带剂	膏状物	3.1
红花	CO_2	浸膏	2.4
黄花蒿	CO_2	青蒿素	2.8
厚朴	CO_2	浸膏	5.2
藿香	CO_2	浸膏	约1
茴香	CO_2	油状物	1.3
木香	CO_2	油状物	2.5
辣椒	CO_2	含辣椒碱油状物	3
连翘	CO_2	浸膏	3
葡萄籽	CO_2	油状物	18
肉豆蔻	CO_2	浸膏	15
秋水仙根	CO_2+95%乙醇	含秋水仙碱浸膏	—
砂仁	CO_2	油状物	—
生姜粉	CO_2	姜油	5.3
珊瑚姜	CO_2	油状物	10.2
石菖蒲	CO_2	油状物	1.5
蛇麻籽	CO_2	油状物	10
威灵仙	CO_2	浸膏	0.4
五味子	CO_2	油状物	4
杏仁	CO_2	油状物	33
鱼腥草	CO_2	油状物	0.17
月见草籽	CO_2	月见草油	24
紫草籽	CO_2	油状物	28
紫草根	CO_2	膏状紫草色素	2.3
紫苏籽	CO_2	油状物	23～40
沙棘籽	CO_2	油状物	17
灵芝孢子	CO_2	油状物	2.5

3.4.4.1　丹参酮的超临界 CO_2 萃取

从丹参中萃取丹参酮。丹参根茎，产地安徽。原料粉碎至 20 目下，然后采用二氧化碳结合夹带剂进行萃取。

超临界 CO_2 对丹参酮有一定的溶解能力。在 55 ℃，32 MPa 条件下，萃取物收率以丹参原料计为 1.6%，总丹参酮含量 13%。当在萃取过程中超临界 CO_2 中夹带 2.4%(质量比)的乙醇时，萃取物收率为 1.87%，液相色谱分析结果显示，总丹参酮含量 41%，其中丹参酮ⅡA 的含量 14.3%。若在上述条件下萃取后，采用二级分离，第一级分离条件：15 MPa，55 ℃，第二级分离条件 5 MPa，40 ℃，在第一级分离釜中可得到含少量乙醇的红色丹参酮固体，总丹参酮含量大于 90%，其中丹参酮ⅡA 的含量为 40%～60%。

3.4.4.2　生物碱的超临界 CO_2 萃取[8]

从植物博落回中萃取生物碱。博落回植物茎部组织，产地安徽。原料经粉碎机粉碎至 20 目以下，然后用超临界 CO_2 萃取。

1) 夹带剂的影响

超临界流体对物质的溶解与溶质的极性、蒸气压和相对分子质量密切相关。由于二氧化碳为非极性溶剂，故对非极性的或极性较低的溶质如酯、醚、内酯和含氧化合物等有较好的溶解能力。生物碱具有一定的极性，二氧化碳中夹带少量极性溶剂，可以通过极性溶剂分子对溶质分子的作用，改善其对生物碱的萃取能力。图 3.14 为温度 318.15 K、压力 35.0 MPa 的条件下，采用动态加入甲醇、乙醇和丙酮作为夹带剂时对总生物碱的萃取率和萃取物中生物碱含量的研究结果。结果可以看出，使用合适的夹带剂，总生物碱的萃取率可以从 0.0436%增加到 0.1651%，增加近 3.4 倍。

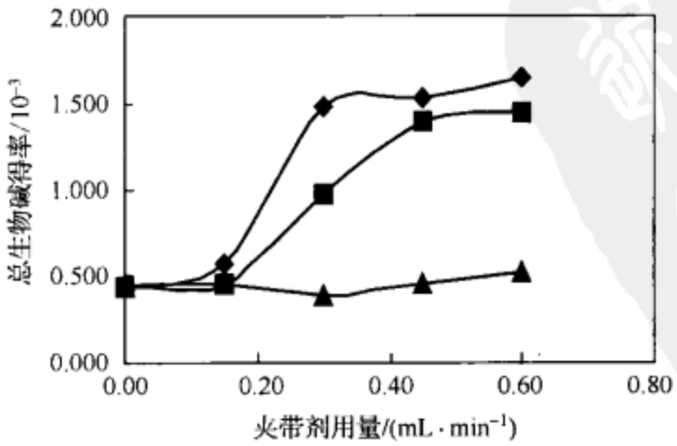


图 3.14　不同夹带剂对于博落回总生物碱萃取率的影响

—◆— 甲醇；　—■— 乙醇；　—▲— 丙酮

2）碱化剂的影响

研究条件如下：

a. 单纯的超临界 CO_2 萃取，温度 318.15 K，压力 35.0 MPa；

b. 超临界 CO_2 中动态加入甲醇做夹带剂，流量 0.3 mL·min^{-1}，温度 318.15 K，压力 35.0 MPa；

c. 原料经 Na_2CO_3 碱化处理，超临界 CO_2 中动态加入甲醇做夹带剂，流量 0.3 mL·min^{-1}，温度 318.15 K，压力 35.0 MPa。

将以上实验所得的博落回提取物，分别加入适量 1 mol·L^{-1} 盐酸水溶液，使博落回生物碱在加热的条件下溶解，过滤去除杂质得到澄清的橘黄色溶液，用氨水调节其 pH 为 9～10，使溶液中生物碱析出，静置 48h，使悬浮颗粒充分沉淀，过滤后干燥，得到精制的黄褐色博落回总生物碱。

对上述条件下得到的博落回总生物碱进行元素分析，然后依据生物碱中氮元素的量，计算总生物碱的平均相对分子质量，元素分析和相对分子质量计算结果如表 3.7所示。

表 3.7 不同条件下博落回总生物碱的元素分析及平均相对分子质量

实验条件	N 含量/%	C 含量/%	H 含量/%	O 含量/%	平均相对分子质量
a	4.18	59.19	5.50	31.12	334.63
b	4.10	67.70	5.54	22.67	341.57
c	3.51	67.58	5.81	23.10	400.23

可以看出，使用夹带剂和碱化剂能够改变超临界 CO_2 萃取博落回总生物碱的能力。单纯的超临界 CO_2 萃取，得到的总生物碱的平均相对分子质量为 334.63；使用了甲醇作为夹带剂，总生物碱的平均相对分子质量增加到 341.57，这说明极性夹带剂的存在，提高了流体溶解相对分子质量大的物质的能力，提取物中相对分子质量较大的生物碱所占的比例有所增加。当使用极性夹带剂和碱化剂的时候，不仅生物碱的提取率增加，而且其平均相对分子质量达到了 400.23，进一步表明碱化剂的使用，可以使生物碱盐游离成生物碱，从而使超临界 CO_2 萃取更多的大分子生物碱。

3.4.4.3 木香内酯的超临界 CO_2 萃取[9]

木香所含挥发油具有行气止痛、消食健脾之功效。木香，产自云南省宜良县，原料木香切片后粉碎，过 20 目筛。

超临界 CO_2 萃取木香挥发油，在 35 ℃、15～20 MPa、2.5～3.5 kg CO_2/kg 木香原料条件下，可得到具有本真特香的木香挥发油。与常规的水蒸气蒸馏法比较，

超临界 CO_2 萃取可在近常温的条件下，保留了更多热敏性成分。超临界 CO_2 萃取和水蒸气蒸馏法提取挥发油以及气相色谱分析比较结果如表 3.8 所示。可以看出，超临界 CO_2 萃取的木香挥发油，不仅挥发油收率高，而且活性成分之一的去氢木香内酯含量也高。

表 3.8　超临界 CO_2 萃取法和水蒸气蒸馏法比较

方法	挥发油收率/%	提取时间/h	去氢木香内酯含量/%
超临界 CO_2 萃取	2.5	2	37
水蒸气蒸馏	0.53	12	11.5

3.4.4.4　威灵仙挥发油的超临界 CO_2 萃取[10]

药材威灵仙产自辽宁。将药材粉碎小于 20 目后，加入萃取器内，然后用超临界 CO_2 萃取，萃取条件为温度 40 ℃，压力 15 MPa，萃取 2 h。把超临界 CO_2 萃取的产物与用水蒸气蒸馏法的产物，用 GC-MS 联用技术对其进行了分离测定，结果由表 3.9 所示。水蒸气蒸馏提取物得率以原料计为 0.15%，测定了 24 个化合物。超临界萃取物得率以原料计为 0.45%，测定了 21 个化合物。

表 3.9　GC-MS 联用测定威灵仙提取物结果

提取方法			
超临界 CO_2 萃取法		水蒸气蒸馏法	
成分	相对含量/%	成分	相对含量/%
正辛酸	0.30	正己酸	0.38
顺-四氢-5-甲基糠醇	0.27	正庚酸	0.16
香草醛	0.11	3A,4,7,7A-四氢-3A-甲基-2(3H)-苯并呋喃酮	0.19
1-(2-羟基-4-甲氧基苯)-乙酮	0.11	苯乙醇	0.15
2-甲基-6-丙基十二烷	0.05	4-乙基苯甲醛	0.22
未鉴定	0.11	未鉴定	0.38
顺-细辛脑	0.14	1,2,4-三乙苯	0.48
正十五酸	0.28	1-(2-羟基-5-甲基)-乙酮	0.18
7-烯 16 酸甲酯	0.64	未鉴定	0.27
正十六酸	26.97	1-(2-羟基-5-苯甲醛)-乙酮	0.54
正十六酸乙酯	0.17	顺-细辛脑	0.35
正十七酸	0.63	细辛脑	0.17
亚油酸甲酯	0.41	未鉴定	3.07

续表

提取方法			
超临界 CO_2 萃取法		水蒸气蒸馏法	
成分	相对含量/%	成分	相对含量/%
9,12-十八二烯酸	48.56	γ-桉叶油醇	0.97
亚油酸乙酯	4.09	未鉴定	0.24
邻苯二甲酸二-(2-乙基)己酯	0.43	正十四酸	0.30
五味子素	0.43	正十五酸	1.26
未鉴定	2.10	环十六酸	0.25
5-烯麦角甾醇	1.91	9-烯十六酸甲酯	0.14
豆甾醇	3.13	正十六酸甲酯	1.04
γ-谷甾醇	7.58	邻苯二甲酸丁酯	4.20
羽扇豆醇	0.96	正十六酸	65.06
4-烯豆甾醇	0.61	正十七酸	0.30
		亚油酸甲酯	3.14
		9,12-十八二烯酸	14.83
		邻苯二甲酸二庚酯	0.66
		邻苯二甲酸二-(2乙基)丁酯	0.58
		葵二酸二-(2-乙基)己酯	0.49

3.4.4.5 当归油的超临界 CO_2 萃取

当归产地甘肃，含水量小于10%，粉碎后经过40目过筛。

较好的萃取工艺为萃取釜压力20～35 MPa，温度40 ℃；萃取2 h，分离釜压力8 MPa，温度40 ℃。当归油萃取率按原料质量计可达2%～4%。

超临界 CO_2 萃取的当归挥发油，经过GC-MS分离检测，可以鉴定出50多种化合物，经高效液相色谱分析，提取物中蒿苯内酯含量为达20%～40%，蒿苯内酯的收率比其他方法要高。

参考文献

[1] Prausnitz J M. Molecular Thermodynamic of Fluid-Phase Equilibria. Englewood Cliffs, N. J.: Prentice Hall, 1969.

[2] Lim B, Holder G D, Shah Y T. Mass transfer in gas-solid systerms at supercritical condition. J Supercritical Fluids, 1990, 3, 186.

[3] 袁萍，蔡建国，彭国荣等. 红外光谱测量法研究超临界 CO_2 中夹带剂与溶质的相互作用. 化工学报，2007，58(12)：732～736.

[4] Wenzel H, Moorwood R A S, Baumgartner M. Calculation of vapour-liquid equilibrium of associated systems by an equation of state. Fluid Phase Equilib, 1982, 9: 225.

[5] Heidemann R A, Prausnitz J M. A van der Waals-type equation of state for fluids with associating molecules. Proc Nat Acad Sci, 1976, 73: 1773.

[6] Brunner G. Gas Extraction. New York: Springer, 1994.

[7] 蔡建国，周永传，许振良. 超临界流体萃取过程中溶质浓度的非稳态现象. 化学工程，1997，25(5)：47～50.

[8] 蔡建国，张涛，陈岚. 超临界 CO_2 流体萃取博落回总生物碱的研究. 中草药，2006，37(6)：852～854.

[9] 陈虹，邓修. 超临界 CO_2 萃取木香挥发油的研究. 中草药，1997，28(6)：337～339.

[10] 何明，蔡建国. 威灵仙中挥发性成分的 GC-MS 分析. 中草药，1999，30(11)：811～812.

（蔡建国）

第 4 章　微波辅助萃取技术的应用

4.1　微波的定义和特点

微波是电磁波的一种形式，波长范围 1～100 mm，频率为 300～300 000 MHz，介于红外线和无线电波之间。微波技术始于 20 世纪 30 年代，在第二次世界大战中得到飞跃发展。与其他电磁波一样，微波也具有波粒二象性。微波的量子能级属于范德华力（分子间作用力）的范畴，与物质相互作用时，不改变物质分子的内部结构，只改变其运动状态。

极性分子在微波场中做高速极性变换运动，分子间相互摩擦碰撞，因而迅速产生大量热能。微波在传输过程中依介质性质不同，会产生反射、吸收和穿透现象，这取决于材料本身的几个主要特性参数：介电常数、偶极矩、介质损耗因数等。对于玻璃、塑料和瓷器，微波几乎是穿透而不被吸收。水和一些强极性物质可以吸收微波，而金属类物质则会反射微波。

4.1.1　穿透性

微波波长比其他用于辐射加热的电磁波如红外线、远红外线等更长，因此具有更好的穿透性。微波透入介质时，由于介电损耗引起介质温度的升高，使介质材料内部、外部几乎同时加热升温，形成体热源（body heat source）状态，大大缩短了常规加热中的热传导时间，使物料内外加热均匀一致。

4.1.2　选择性加热

物质吸收微波的能力，主要取决于其介电损耗因子。介电损耗因子大的物质对微波的吸收能力强，而介电损耗因子小的物质吸收微波的能力弱。由于各物质的介电损耗因子存在差异，微波加热就表现出选择性加热的特点。物质不同，产生的热效果也不同。水分子属极性分子，介电常数较大，其介电损耗因子也很大，对微波具有强吸收能力。而蛋白质、碳水化合物等的介电常数相对较小，其对微波的吸收能力比水小得多。因此，对于食品来说，含水量的多少对微波加热效果影响很大。

4.1.3　热惯性小

微波对介质材料是瞬时加热升温，能耗也很低。另一方面，微波的输出功率随时可调，介质温度可无惰性地随之改变，不存在“余热”现象，极有利于自动化控制和连续化生产的需要。

微波能通常由直流电或50 MHz交流电通过一种特殊的器件来获得。可以产生微波的器件有许多种，但主要分为两大类：半导体器件和电真空器件。电真空器件是利用电子在真空中运动来完成能量变换的器件，也称为电子管。在电真空器件中能产生大功率微波能量的有磁控管，多腔速调管，微波三、四极管，行波管等。目前微波加热领域特别是工业应用中使用的主要是磁控管和速调管。

4.2　微波辅助萃取技术

1986年，匈牙利学者Ganzler首次提出微波辅助萃取技术(microwave-assisted extraction，MAE)，并从土壤、种子、食品、饲料中成功萃取分离化合物[1]，为有机物质的提取分离开辟了一条新的道路。经过近几十年的研究发展，MAE技术的应用范围已从最初的环境分析样品的制备扩展到了药品、食品、化工和农业等领域。目前，MAE技术在中药活性成分的提取中有广泛应用，相对于传统的提取方法如加热回流法、室温浸提法、索氏提取法等，具有萃取时间短、溶剂用量少、提取率高、产品质量好、成本低等优势，因而受到药学工作者的极大关注。

4.2.1　微波辅助萃取技术的原理

由于不同物质的介质损耗数值不同，对微波能的吸收程度也不同。微波辅助萃取即是利用不同物质的这种差异，对体系中不同组分进行选择性加热，从而使被萃取物质从基体或体系中分离出来，进入萃取溶液中。

微波辅助萃取的机理还不十分清楚，目前主要有两种观点。Pare提出的细胞壁破裂理论认为，当使用微波透明溶剂(即非极性溶剂)时，溶剂不吸收微波能，而植物组织细胞因含有大量的水，能非常迅速地吸收微波能，使胞内温度迅速升高，细胞膨胀。当胞内压力超过细胞壁的承受能力时，细胞壁破裂，有效成分流出到周围的溶剂中。因微波只选择性地加热植物细胞，不需耗能加热溶剂，故能大大降低能耗。同时溶剂可以快速冷却流出的有效成分，防止有效成分长时间处于高温下可能导致的分解。而另一种相反的观点则认为，应当采用极性溶剂来进行微波辅助萃取。原因是极性溶剂有高的介电常数，能够吸收更多的微波能量，并能将所吸收的能量传递给其他物质分子，加速其热运动，缩短萃取组分的分子由物料内部扩散到萃取溶剂界面的时间，从而使萃取速率提高数倍，同时还降低了萃取温度，所

以使用极性溶剂比非极性溶剂好。

微波应用工程系统采用的微波频率为 915 MHz 和 2450 MHz，目前国内用于微波中药提取的微波频率大多采用 2450 MHz。

4.2.2 微波辅助萃取仪器设备

微波辅助萃取仪器一般由磁控管、炉腔、萃取罐、压力和温度监控装置及其他电子元件组成，根据萃取状态的不同可分为密闭高压微波萃取和常压回流微波萃取两大类。其中密闭高压微波萃取仪器使用较为方便，但对萃取罐的要求较高，要求萃取罐能耐高温高压和耐腐蚀。常压回流微波萃取易引起萃取溶剂暴沸，故常采用间断式的微波辐射，即微波辐射一段时间后停止辐射，使物料冷却后再继续辐射。国内实验室中常采用普通微波炉或带有冷凝装置的改良微波炉进行微波辅助萃取。此外还有用于样品前处理的仪器，可同时处理 10～20 个样品，但容量较小，多为 200 mL 以下。

美国 CEM 公司作为全球最大的专业微波化学仪器生产商，率先设计出了可自动精密控温、控制加热功率和时间的 MARS-X 系列微波装置。加拿大于 20 世纪 90 年代由环保部门与 CWT-TRAN 公司联合开发了用于工业生产的大型微波辅助提取系统，并相继在多国取得了专利许可。该系统日处理能力从 1 t 到 500 t 不等，可以适应不同工业的应用需要。法国 PROLABO 公司于 1994 年研制出 SOS-1100 微波提取仪，并在美国、日本、韩国、墨西哥及西欧一些国家申请了专利。近年来微波辅助萃取系统在国内的发展也非常迅速，一系列的新产品被开发出来。

4.2.3 微波辅助萃取技术的影响因素

微波辅助萃取技术的影响因素包括萃取溶剂种类、微波能量(时间和功率)、物料粉碎度、物料溶剂比、萃取次数等。

4.2.3.1 萃取溶剂种类

和传统萃取法一样，微波辅助萃取技术要求待萃取物质能溶于萃取溶剂。在这一前提下，溶剂的介电常数越大，萃取率越高。若萃取溶剂介电常数太小，可加入少量极性溶剂以改善微波吸收能力，提高萃取率。药材中含有的少量水分即可使体系温度迅速升高。在干燥的药材中加入少量水使之润湿，或在微波萃取前加水浸泡均有利于目标成分的萃取。

有人用微波辅助萃取技术从绿茶中提取茶多酚(tea polyphenols)和咖啡因(caffeine)[2]时发现，用丙酮做溶剂时茶多酚的提取率高于以甲醇、水、乙醇为溶剂的提取率。用甲醇做溶剂时咖啡因的提取率高于以水、乙醇、丙酮为溶剂的提取率。当以乙醇水溶液为提取溶剂进行考察时发现，50%的乙醇为溶剂时，茶多酚和

咖啡因的提取率均为最高。提取前药材先在室温下浸泡 90 min，茶多酚的提取率可从 28.06%升高到 29.59%，咖啡因的提取率可从 3.55%升高到 4.04%。

研究发现[3]，用微波辅助萃取技术提取葡萄籽中的酚类化合物，多酚的含量以每克粗提物含鞣酸等价物(TAE)量计，当向提取溶剂中加水 10%以增加溶剂极性时，多酚的提取率增至 15.2%，含量增至 429 mg TAE/g 粗提物。

开管微波辅助萃取雪茄中的尼古丁(nicotine)时[4]，分别以极性的甲醇和非极性的异辛烷作为提取溶剂。结果发现以甲醇为溶剂提取尼古丁的得率高于以异辛烷为提取溶剂，其主要原因是尼古丁的盐在甲醇中的溶解性优于在异辛烷中。

4.2.3.2　微波能量(时间和功率)

微波辅助萃取所需的时间和功率随样品量、溶剂体积、容器形状大小的不同而不同，有人认为以能量密度作为参数比以能量水平作为参数更合理[5]。对高温不稳定和易分解的物质来说，高能量的微波辐射对提取有消极影响。低能量微波仍然可促使分子产生高速偶极旋转，辅以高温和高压迅速克服基质与被分离物间的分子作用力，使被分离物从基质中解析出来并快速进入萃取溶剂中。由于被分离物瞬间溶出，避免了长时间高温导致的样品分解，有利于萃取热不稳定物质，保持待萃取物的分子状态，因此特别适合于处理热敏性组分或从天然物质中提取有效成分。

采用微波辅助萃取鼠曲草中的黄酮类化合物[6]：在微波功率为 500 W，乙醇体积分数为 10%，料液比为 1∶50 ($g \cdot mL^{-1}$)的条件下，研究了不同微波作用时间对鼠曲草黄酮提取率的影响规律。发现黄酮提取率随微波作用时间的延长先升高再降低，这可能是因为微波在短时间内对细胞膜的破碎作用比较大，溶出物多，黄酮提取率也就高。随时间增加样品中黄酮类化合物可能会受到破坏，影响黄酮物质的浸出。在乙醇体积分数为 10%，料液比为 1∶50 ($g \cdot mL^{-1}$)，微波作用时间为 2 min 的情况下，研究了不同微波炉功率对鼠曲草黄酮提取率的影响规律。发现随着微波功率的增大，总黄酮提取率先升高再降低，这可能是因为随着微波功率不断增加，分子运动加剧，细胞膜破碎程度加大，黄酮浸出率也随着升高；但细胞膜并不会无限制破碎，当微波炉功率太大时，微波对细胞内物质的选择性加热性能差异则减小，一些易溶于水的物质先被溶解，从而造成黄酮提取率的降低。

4.2.3.3　物料粉碎度

从理论上说，药材粉碎度越高，与浸出溶剂的接触面越大，扩散面也越大，故扩散速度越快，萃取效果越好。但粉碎度太高，药材颗粒易粘连，且加大后续处理如过滤的难度。

采用密闭微波辅助提取技术提取玄参中的玄参苷(rhinanthin)[7]。筛取玄参

粉不同粒度的样品，在相同条件下(70% 乙醇为提取溶剂，微波辐射时间 10 min，物料质量与提取溶剂的体积比为 1∶20，提取 2 次)进行密闭微波辅助提取，发现随着玄参颗粒的减小，玄参有效成分的提取率明显增加。玄参粒径小，使其比表面积增加，液-固界面增加，提高了提取效率。但样品颗粒过细，不易操作处理，在实际应用中的意义不大，故选择 180 目的样品作为考察对象。

4.2.3.4 物料溶剂比

物料溶剂比是影响提取率的一个重要因素。从传质速率的角度讲，主要表现在影响固相主体和液相主体之间的浓度梯度，即传质推动力。溶剂比小，浓度梯度小，从而传质推动力小。溶剂比的提高必然会在较大的程度上提高传质推动力，但也降低了提取物浓度，提高了生产成本及后续处理的难度，故溶剂比不宜太高。

采用微波预处理法提取金银花中的绿原酸(chlorogenic acid)[8]。在固定乙醇浓度为 75%、微波预处理时间 60 s、水温 70 ℃、水量 100 mL 及洗涤 10 min 的条件下，考察了微波预处理法中乙醇溶液用量的影响。结果表明，乙醇溶液用量为 10 mL 即为样品质量的 1.25 倍时，绿原酸的提取率最高。溶液用量少，干金银花细胞组织不能很好被湿润；溶液用量多，在一定微波加热量下多出部分的溶液蒸发不但消耗了微波能，而且使渗透到细胞内的溶液汽化不充分。

4.2.3.5 萃取次数

理论上，萃取次数越多，萃取越完全，萃取率越高，成本也越高，对微波辅助萃取也是如此。因此，寻求合理的萃取次数也就具有十分重要的意义。

采用密闭微波辅助萃取技术提取玄参中的玄参苷时[7]，分 4 次提取，每次用乙醇水溶液 200 mL，玄参苷收率见表 4.1。由表 4.1 可知，当提取到第 2 次时，提取出来的玄参苷已很少，此时的提取率已达 97.3% ，尽管此时的提取还没有达到完全，但从第 3 次以后提取出来的数量已非常少，从溶剂的处理量、成本、工艺操作等方面考虑应选择 2 次为宜。

表 4.1 不同提取次数时玄参苷的收率

试验号	提取次数	玄参苷总收率/%	占总提取量的比例/%
1	1	0.191	84.5
2	2	0.029	12.8
3	3	0.004	1.8
4	4	0.002	0.9
合计		0.226	100.0

4.3　微波辅助萃取技术在中药有效成分提取中的研究实例简述

微波辅助萃取技术提取中药中的有效成分是一项新技术，在中药活性成分如挥发油、苷类、多糖、萜类、生物碱、黄酮、甾体、有机酸、油脂类等物质的提取中均有应用。

4.3.1　微波辅助萃取萜类和挥发油

微波辅助萃取青蒿素(artemisinin)[9]：将 10 g 黄花蒿粉碎至直径小于 0.125 mm 的颗粒，放入三颈瓶中，加入 113 mL 提取溶剂，将三颈瓶放入微波辅助萃取装置中提取 60 s，取出三颈瓶，用凉水使之冷却到室温。然后再放入微波辅助萃取装置中提取 60 s，再用凉水使之冷却到室温，如此反复，直到提取时间相加共为 12 min 为止。该方法与索氏提取、超临界 CO_2 萃取和普通搅拌提取相比，提取率最高(92.1%)，耗时最少。

微波辅助萃取生姜挥发油(ginger oil)[5]：将干的生姜粉碎，称取 5 g 放入 250 mL石英提取容器中，加入 30 mL 乙醇，置于微波辅助萃取装置中(Soxwave-100 气压聚焦提取系统)，功率为 150 W，提取 2 min。与索氏提取比较，提取率高，耗时少。

微波辅助萃取无梗五加果挥发油[10]：取无梗五加果干粉，过 20 目筛，取 20 g 置于 250 mL 玻璃烧杯中在微波炉中提取。以乙醚为提取溶剂时，最佳工艺参数为：功率中火，提取时间 90 s，液固比($mL \cdot g^{-1}$)12.5∶1；以乙醇为提取溶剂时，最佳工艺参数为：功率中高火，提取时间 60 s，液固比($mL \cdot g^{-1}$)10∶1，原料浸泡时间 20 min。

4.3.2　微波辅助萃取苷类

微波辅助萃取人参皂苷(ginseng saponin)[11]：称取 5 g 药材粉末，放入 250 mL石英提取容器中，加入 50 mL 80%甲醇，置于微波辅助萃取装置中(Soxwave-100 气压聚焦提取系统)，在微波频率为 2450 MHz，功率为 300 W，常压的条件下提取 4 次，每次 30 s。和回流提取 12h 所得粗提物得率、皂苷得率和总皂苷成分无明显差异。

微波辅助萃取技术与大孔树脂联合提取地榆皂苷(sanguisorbin)[12]：通过正交实验考察了提取溶剂浓度、pH、地榆与提取溶剂质量比、微波萃取功率和时间对提取的影响。结果表明：溶剂 pH 对提取具有显著性影响，影响因素排序为：pH＞提取时间＞提取功率＞提取溶剂浓度＞地榆与提取溶剂质量比，优化提取条件为：

pH=7 的 70%乙醇为提取剂，地榆与提取溶剂质量比为 1∶267，微波功率 800 W 下提取 30 s。以 S-8 树脂为皂苷的有效精制树脂，静态吸附时间 2 h，树脂与皂苷溶液的质量比为 16～20∶1，吸附率高。

微波辅助萃取黄芪皂苷(astragaloside)[13]：黄芪粉碎过筛，取粉末 20 g，加水 20 倍量，置于微波炉中加热提取。经正交实验后得到的优化工艺条件为微波输出功率 800 W，60 目黄芪微波水提 15 min。直观分析得到黄芪皂苷提取影响因素的大小顺序为微波功率＞药材粒径＞提取时间。由方差分析可以看出，药材粒径和微波功率对黄芪皂苷的提取具有高度显著影响，时间对皂苷提取影响显著。在上述条件下提取 2 次，提取液离心分离(4000 r/min)10 min，上清液旋转蒸发至约 30 mL，用水饱和的正丁醇萃取 3 次，20 mL/次。合并萃取液，用氨试液洗涤 2 次，20 mL/次。洗涤后减压回收正丁醇，真空冷冻干燥至干，得到黄芪皂苷粗品。

4.3.3 微波辅助萃取生物碱

微波辅助萃取喜树碱(camptothecin)[14]：称取 5 g 药材粉末，放入 100 mL 烧瓶中，加入 100 mL 90%甲醇，置于微波炉(MCG-LG，MG583，Mumbai，India)中提取 3 min，功率为 100 W。结果发现，与索氏提取、超声提取和搅拌提取相比，提取率最高(2.67%)，耗时最少。

4.3.4 微波辅助萃取醌类

微波辅助萃取丹参酮(tanshinone)[15,16]：称取 10 g 丹参药材，加入 100 mL95% 乙醇，置于改良的家用微波炉中，微波萃取 2 min(首先微波辐射 25 s，使温度升至 80 ℃，然后关掉微波放置 10 s 使温度降低，再微波辐射 2 s，之后再关掉微波放置 10 s，如此反复以免暴沸)。与室温提取、加热回流、超声提取和索氏提取相比，该方法避免了丹参酮长时间处于高温下引起的不稳定和易分解，提取率相等或更高，耗时最少。

微波辅助萃取决明子中的大黄素(emodin)[17]：精密称取决明子粗粒 1.0241 g，加水 100 mL 浸泡 30 min，置于微波炉内加热提取 5 min，过滤得提取液，共提取 5 次，所得大黄素的提取率为 0.0766%。采用加热回流法(精密称取决明子粗粒 1.0260 g，加水 100 mL 浸泡 30 min，回流加热法提取 30 min，过滤得提取液，共提取 5 次)所得大黄素的提取率为 0.0758%。微波辅助萃取大大缩短了提取时间，提高了提取效率。此外，因决明子粉黏性大，提取时易黏附于容器壁影响提取效果，因此，在粉碎时应注意不宜粉碎过细，且充分浸泡使其粗粒沉于容器底部再进行提取。

微波辅助萃取紫草中的紫草素(alkannin)[18]：通过正交实验得出最佳提取条件。具体提取方法如下：准确称取紫草干燥粉末(过 3 号筛、50 ℃干燥 3 h)5 g，置

于锥形瓶中，加入无水乙醇至1000 mL，摇匀，密闭。置于微波辅助萃取器中（WT-10型连续微波反应器），在功率为700 W，温度为55 ℃下提取45 min。测得新疆软紫草中的紫草素含量平均为3.08%。

4.3.5　微波辅助萃取黄酮类

微波辅助萃取菜芙蓉花中的总黄酮[19]：菜芙蓉花自然风干后，置于50 ℃恒温干燥箱中干燥，取出后粉碎，混合均匀，将粉末依次通过40、80目筛分级后准确称取1.0 g于150 mL锥角瓶中，加入一定量的溶剂进行微波萃取。通过正交实验考察乙醇浓度、微波时间、微波功率及固液比（$g \cdot mL^{-1}$）对所提总黄酮含量的影响。结果发现最佳提取条件为：提取溶剂为70%乙醇，微波时间为30 s，功率为360 W，固液比为1∶50，颗粒度≤80目，所得总黄酮的含量为5.673%。

微波辅助萃取槐米中的芦丁（rutin）[20]：将槐米研磨粉碎后，精密称取1 g细粉，加蒸馏水100 mL浸泡30 min，置于微波炉内加热至沸，再低火处理（功率450 W，提取10 min），待样品温度冷却至室温后再次提取，提取3次，合并提取液、过滤、水浴加热浓缩。实验结果表明，利用微波提取槐米中的芦丁与传统加热回流法相比，提取时间仅为后者的1/3，而芦丁提取量和芦丁含量均有所提高，分别为150.9 mg和14.66%。

微波辅助萃取蜂胶中的黄酮类化合物[21]：考察微波萃取条件（溶剂浓度、微波功率、提取时间、料液比）对蜂胶中黄酮类化合物提取率的影响，采用分光光度法测定提取液中黄酮的含量。结果表明，乙醇浓度为80%，微波萃取功率为80 W，提取时间为1.5 min，料液比为1∶4时，提取效果最佳，黄酮类化合物的提取率为28.32%。微波辅助法与传统提取法相比，具有提取效率高、时间短、节省溶剂等特点。采取的微波辅助间歇式萃取法，避免了萃取液始终处于被辐射状态而导致的有效成分分解。

4.3.6　微波辅助萃取多糖类

微波辅助萃取黄芪中的多糖[22]：比较微波、超声、碱水、酶法、加热回流提取黄芪中的多糖，对其中最佳的微波辅助萃取法的工艺条件分别进行了单因素和正交试验研究，所得最佳提取工艺为微波萃取，控温70 ℃，提取3次，每次10 min。该工艺条件同样适用于放大试验。

微波辅助萃取茯苓中的茯苓多糖（pachman）[23]：以水为提取液，选用了对提取率有影响的3个因素，即微波作用时间 X_1（2～30 min）、微波占空比 X_2（28%～100%，总功率800 W）、固液比 X_3（固定液体质量为50 g，固体质量1～8 g），每个因素确定15个水平，按 $U_{15}(15^8)$ 均匀设计表进行试验如下：将块状茯苓粉碎为小颗粒状，称取一定质量的茯苓粉末，固定溶剂水的体积为50 mL，按均匀设计表的

试验条件，在一定微波占空比下回流提取一定时间后过滤，残渣依法再提取两次，合并滤液，移至量瓶中，加水至刻度。以苯酚-硫酸法测定茯苓多糖的量，并求算提取率。得出最佳的试验条件为微波占空比为 42%，固液比为 1∶50，时间为 18 min，该条件下所得到的茯苓多糖的提取率是 2.792%。微波法与传统回流法中提取率最高的一组（时间 1 h，固液比 1∶10，温度 100 ℃，提取 2 次，提取率 1.352%）相比，时间大大缩短，提取率是传统法的两倍；与超声提取（时间 40 min，固液比 1∶50，温度 60 ℃，提取 3 次，提取率 1.706%）相比，提取时间不到一半，提取率提高 63.5%。

微波辅助萃取枸杞中的枸杞多糖（*Lycium barbarum* polysaccharide）[24]：运用正交法设计实验，选用 3 因素 3 水平来确定微波法提取枸杞多糖的最佳条件。结果发现，微波辅助萃取最佳工艺条件是时间 90 s，微波功率 540 W，提取液固比 30∶1（得率 19.1%）。与通过单因素实验得出的传统热水提取最佳工艺条件（50 ℃加热 3 h，液固比 30∶1，提取 2 次，得率 15.2%）相比，提取率高、速度快。

微波预处理提取天麻中的天麻多糖[25]：采用正交实验研究了温度、物料比、时间对天麻多糖提取工艺的影响，并对比了两种不同的试验预处理（超声波法和微波法）在天麻多糖纯化工艺中的应用。结果发现各因子对天麻多糖萃取率影响的重要程度依次为浸提温度、浸提时间、料水比。水提最佳工艺为物料比 1∶40，浸提温度 120 ℃，浸提时间 3 h。微波预处理效果明显优于超声波，预处理 8 min 即可，天麻多糖得率达 6.44%。而超声波预处理天麻多糖得率仅为 5.83%。若再延长微波预处理的时间，天麻多糖得率反而有下降的趋势，这可能是微波沸腾时间太长，水蒸气蒸发过量，物料太干，导致传质困难所致。

微波预处理提取龙眼中的龙眼多糖[26]：采用微波预处理-热水浸提新工艺提取龙眼多糖时，单因素考察及正交实验结果表明，在所考察的实验范围内，龙眼多糖的最佳提取工艺条件为微波前处理功率 700 W，处理时间 60 s，热水浸提料液比 1∶15，浸提温度 100 ℃，浸提时间 7 h，搅拌速率 240 rpm。在此条件下，龙眼多糖收率可达 9.00 mg/g 龙眼（干重）。紫外和红外光谱分析结果显示，所获得的龙眼多糖是具乙酰氨基结构的 β 型吡喃酸性杂多糖。实验发现，当微波预处理时间为 60 s 时，龙眼多糖的收率最高。过长的处理时间易引起溶剂温度过高甚至暴沸，导致目标产物损失，收率降低。

4.3.7 微波辅助萃取甾体类

微波辅助萃取三峡隔山牛皮消中的 C_{21} 甾体酯苷[27]：采用微波辅助萃取技术对隔山牛皮消的活性成分 C_{21} 甾体酯苷进行提取，通过 4 因素 3 水平的正交试验，用分光光度法测定三峡隔山牛皮消中的 C_{21} 甾体酯苷含量。结果发现最佳微波萃取的工艺条件是：62 ℃时，用 25 倍量的含乙酸和水各 1.5%的甲醇溶液微波辐射

萃取 6 次，每次辐射萃取 50 s。微波辐射萃取法的得率比普通乙醇(95%)提取法提高了 4 mg/g。影响 C_{21} 甾体酯苷萃取得率的主要因素是甲醇的组成及浓度，其次的因素是单次辐射萃取时间和萃取次数(或累计辐射萃取时间)，料液比的影响较小。微波萃取前，将干燥的三峡隔山牛皮消块根切片磨碎后，再以水分润湿，放置 24 h，使其含水百分率为 15%，有利于 C_{21} 甾体酯苷的提取。

微波辅助萃取湖北山麦冬中的总甾体酯苷[28]：以湖北山麦冬(产于三峡库区)的块根为原料，采用微波萃取技术对其活性成分总甾体酯苷进行提取，通过 4 因素 3 水平的正交试验，用 HPLC 法测定湖北山麦冬中的总甾体酯苷含量，最后确定最佳微波萃取的工艺条件是：62 ℃时，用 20 倍量的含乙酸和水各 1.5%的甲醇溶液微波辐射萃取 6 次，每次辐射萃取 50 s。

4.3.8　微波辅助萃取有机酸类

微波辅助萃取甘草中的甘草酸(glycyrrhizic acid)[29]：采用正交实验，考察甘草粒度、提取剂用量、提取时间 3 个因素，以甘草酸粗品收率为指标，比较微波辅助萃取与传统索氏提取方法对甘草酸的提取效果。采用索氏提取方法时粒度对于甘草酸提取影响最大，溶剂用量对于甘草酸提取影响最小。在实验范围内，最佳条件为取 10 g 甘草药材，其粒径大于 2.1 mm，蒸馏水用量 12 倍，提取时间 2 h。微波辅助萃取时粒度对于甘草酸提取影响亦最大，且粗、中、细粉具有显著性差异。微波正交实验得出的最佳工艺为药材粒径小于 0.63 mm，蒸馏水用量 12 倍，加热 6 次，每次 60 s。结果发现微波辐照 8 min 的提取效果与索氏提取 3 h 效果相当，提取速率是索氏的 10～20 倍。

微波辅助萃取五倍子中的单宁酸(tannin)[30]：采用正交实验，研究了料液比、提取时间、提取功率对微波法提取五倍子中单宁酸的影响。各因素对单宁酸提取的重要性为提取时间＞提取功率＞料液比。微波辅助提取最优方法为料液比 1∶30，微波功率中高火，提取时间为 4 min。在本研究中微波辅助提取法显著优于传统的水提取方法，提取率是水提取法的 1.5 倍。

4.3.9　微波辅助萃取木脂素类

微波辅助萃取五味子中的木脂素[31]：采用微波辅助萃取五味子中的木脂素类有效成分。以五味子醇甲和总木脂素为考察指标，采用均匀设计优选微波萃取五味子的工艺。取粉碎的五味子饮片约 50 g，按均匀设计 $U_{10}(10^8)$ 进行微波萃取，过滤，旋转蒸发减压浓缩后转入蒸发皿中水浴蒸干，转至真空干燥器中，减压干燥成干浸膏。实验发现微波萃取五味子的优化工艺为微波功率 850 W，乙醇浓度 90%，固液比 1∶12，加热时间 5 min，粉碎度 80 目。采用此优化工艺所提浸膏得率为 24.18%，五味子醇甲含量为 4.82%，五味子木脂素含量为 10.76%，五味子

醇甲转移率为 94.75%。对比传统加热回流提取方法，虽然微波萃取法的提取浸膏得率降低了 14.16%，但浸膏中五味子醇甲的含量提高了 35.39%，五味子总木脂素含量提高了 26.44%，五味子醇甲的转移率提高了 16.21%，并且提取时间为回流提取的 1/72。

4.3.10 微波辅助萃取油脂类

微波辅助萃取石榴籽油(pomegranate seed oil)[32]：比较了常规回流萃取与微波辅助萃取法对石榴籽油的提取率，并采用正交实验法优选微波辅助萃取最佳工艺条件。结果发现，二者出油率有显著性差异($p<0.01$)，微波萃取出油率高，其提取最佳工艺条件为料液比 1∶5 ($g \cdot mL^{-1}$)，微波处理时间为 50 s×5(即每次处理50 s，间歇处理 5 次)，微波功率为 480 W。具体实验方案为取干燥石榴籽，粉碎至 60 目，准确称取 60 g，放入 500 mL 圆底烧瓶中，加入 300 mL 正己烷，将烧瓶放入微波炉中，调功率 480 W(中档火)，间歇辐射 250 s(辐射 5 次，每次 50 s)，其中每次辐射完后用冷水冷却到室温，擦干瓶外的水分，再放入微波炉中辐射，取出用抽滤瓶过滤。滤渣用 80 mL 的正己烷洗涤，合并滤液及洗涤液放入圆底蒸发瓶中，在 45 ℃条件下，减压回收正己烷得到石榴籽油，出油率为 15.92%。

微波辅助萃取苍耳子油[33]：通过对不同溶剂、微波功率、微波作用时间以及料液比对微波辅助提取苍耳子油的影响进行单因素考察，以确定最佳提取工艺。试验结果表明：较佳的工艺条件为用无水乙醇提取，在微波功率为 595 W 条件下处理 12 min，料液比为 1∶10。与传统提取方法相比，该法提取时间短、提取效率高，且提取的苍耳子油与传统方法提取的苍耳子油的成分无明显差异。

4.4 微波辅助萃取技术的发展前景

美国国家环境保护局(USEPA)通过对 17 种稠环芳香碳氢化合物、14 种苯酚类化合物，8 种碱性/中性化合物以及 20 种有机农药的研究证实了微波萃取不会破坏被测分析物的分子结构。Kwon 等[11]比较了微波辅助萃取与传统提取方法提取人参中的人参皂苷。结果表明，这两种方法的粗提物得率、皂苷得率和总皂苷成分(TLC 显示)无明显差异，由此可见，人参皂苷在微波辅助萃取条件下是稳定的。Brachet 等[34]采用聚焦微波辅助萃取(FMAE)古柯叶中的可卡因和 benzoylecgonine。结果发现，FMAE 提取物与采用传统固液萃取法所得提取物大体一致。

也有研究认为微波会破坏待提取物质的结构。傅荣杰等[35]考察微波萃取技术在中药多糖类成分提取中的应用，对微波萃取与水煎提取多种多糖的提取率做比较，并比较了两种提取方法对多糖糖链的影响。结果发现水煎提取比微波萃取多糖溶出率高，且微波照射比水煎提取更易引起多糖糖链的裂解。因此认为微波

萃取技术不利于中药中多糖的溶出，并对多糖有一定的破坏作用。有人认为这是因为微波加热使分子高速振动，从而引起高分子聚合物的分散，如多糖等大分子间的氢键被破坏，相对分子质量聚集态减小，颗粒直径减小[36]。

微波辅助萃取还对某些成分具有选择性萃取的作用。Pan 等[2]用微波辅助萃取技术从绿茶中提取茶多酚和咖啡因。与超声提取、加热回流提取相比，利用微波辅助萃取时茶多酚和咖啡因在粗提物中的含量最高（超声提取为 75%、10%；加热回流提取为 72%、9%；MAE 为 77%、10%），说明微波辅助萃取具有选择性提取茶多酚和咖啡因的作用。Jones 等[37]比较了超声和微波两种方法提取烟草中的生物碱。结果显示，超声提取更方便可行。Chiasson 等[38]用微波辅助提取、水中蒸馏（DW）和直接蒸气蒸馏（DSD）三种方法从苦艾和艾菊中提取挥发油，并检测提取物的杀螨活性。结果表明，DSD 为最佳提取方法，MAE 不能提取出其中一种主要的活性成分。

微波辅助萃取技术还可用于生物样品的提取。如有人用微波炉和沸水浴从藻青菌细胞中提取肝毒素[39]。研究表明，微囊藻毒素并未受到微波炉和沸水浴的影响。该研究为快速分析微囊藻毒素（microcystin）和 nodularins 提供了一种低消耗、简单直接的快速提取方法。

此外，微波辅助萃取也广泛应用于农产品、食品、环境土壤检测、化妆品、造纸、石化等领域。例如监测土壤、淤泥中有毒有害物质的污染情况，萃取 PVC 中增塑剂，提取化妆品中的遮光剂等。

微波辅助萃取技术因其显著的优势，用于中药有效成分的提取分离具有广泛的应用前景。在国外，微波萃取生产线在薄荷、海藻中提取有效物质均获得成功。国内对微波辅助萃取提取中药有效成分的研究方兴未艾，但是用于研究的仪器设备却相对落后。大部分研究者采用家用微波炉萃取，从而给实验带来诸多不便，如微波辐射易引起溶剂暴沸，研究者不得不取出容器置于冷水中使之迅速冷却，再置于微波场中再次接受辐射，如此往复。所幸近年来微波辅助萃取系统在国内的发展也非常迅速，开发了一系列新产品，并已用于中试生产。如张家界华清厚德绿色药业有限公司已兴建符合 GMP 标准的国内首家微波植物提取中试工厂，采用微波辅助萃取技术快速提取葛根素。目前在张家界市已经开始二期大型微波萃取生产线的基建工作。

在微波萃取机理、对各成分的选择性、微波萃取是否会改变大分子的高级结构、微波用于中药提取的工程放大等方面也需要进一步的深入研究。

微波污染作为现代污染的一种，越来越多地引起了人们的关注。在大规模工业生产中如何降低微波污染、加强安全防护也是一个值得深入研究的课题。

参考文献

[1] Ganzler K, Salgo A, Valko K. Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatog-

raphy. J Chromatogr, 1986, 371: 299～306.

[2] Pan X, Niu G, Liu H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. Chemical Engineering and Processing, 2003, 42: 129～133.

[3] Hong N, Yaylayan V A, Raghavan G S et al. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from grape seed. Nat Prod Lett, 2001, 15: 197～204.

[4] Ng L K, Hupe M. Effects of moisture content in cigar tobacco on nicotine extraction. Similarity between soxhlet and focused open-vessel microwave-assisted techniques. J Chromatogr A, 2003, 1011: 213～219.

[5] Alfaro M J, Bélanger J M R, Padilla F C et al. Influence of solvent, matrix dielectric properties, and applied power on the liquid-phase microwave-assisted processes (MAP™) 1 extraction of ginger (*Zingiber officinale*). Food Research International, 2003, 36: 499～504.

[6] 王世宽，潘明，郭春晓等. 鼠曲草中黄酮类化合物的微波辅助提取研究. 时珍国医国药，2007，18(3)：552～554.

[7] 程存归，刘幸海，朱培曦. 应用密闭微波辅助提取技术提取玄参中玄参苷. 南京理工大学学报(自然科学版)，2006，30(2)：243～247.

[8] 韦藤幼，赵群莉，阮莉姣等. 微波预处理法提取金银花中的绿原酸. 中成药，2003，25(7)：534～537.

[9] Hao J Y, Han W, Huang S D et al. Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. Separation and Purification Technology, 2002, 28: 191～196.

[10] 冯颖，王建国，孟宪军等. 微波法提取无梗五加果挥发油工艺研究. 食品工业科技，2008，29(1)：207～209.

[11] Joong-Ho K, Jacqueline M R, Bélanger J R et al. Application of the microwave-assisted process (MAP™) to the fast extraction of ginseng saponins. Food Research International, 2003, 36: 491～498.

[12] 高虹，黎碧娜，郑鹏等. 微波联合树脂提取地榆中皂苷化合物的研究. 中药材，2007，30(7)：868～870.

[13] 胡如桂，张晶晶，张全斌等. 微波水提黄芪皂苷的工艺研究. 时珍国医国药，2007，18(5)：1074～1075.

[14] Fulzele D P, Satdive R K. Comparison of techniques for the extraction of the anti-cancer drug camptothecin from *Nothapodytes foetida*. J Chromatogr A, 2005, 1063: 9～13.

[15] Pan X, Niu G G, Liu H. Comparison of microwave-assisted extraction and conventional extraction techniques for the extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Biochemical Engineering Journal, 2002, 12: 71～77.

[16] Pan X, Niu G G, Liu H. Microwave-assisted extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge with analysis by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A, 2001, 922: 371～375.

[17] 陈燕芬，王燕玲，陈丽娟. 决明子的微波提取与含量测定. 中国中药杂志，2007，32(2)：160～161.

[18] 兰卫，高晓黎，兰文军等. 紫草素微波提取工艺的研究. 中成药，2007，29(6)：899～900.

[19] 仇燕. 菜芙蓉花中总黄酮微波提取的研究. 中药材，2006，29(4)：387～390.

[20] 陈燕芬，陈丽娟，杨柳. 微波技术提取槐米中芦丁的研究. 中药材，2007，30(7)：866～867.

[21] 吴玉敏，何锦风，蒲彪等. 微波辅助萃取蜂胶中黄酮类化合物的研究. 现代食品科技，2007，23(5)：50～52.

[22] 许海燕，杨义芳，黄春跃. 微波提取黄芪中多糖的工艺研究. 中草药，2008，39(10)：1496～1499.

[23] 聂金媛，吴成岩，吴世容等. 微波辅助提取茯苓中茯苓多糖的研究. 中草药，2004，35(12)：1346～1348.

[24] 陈金娥，李成义，张海容. 微波法与传统工艺提取枸杞多糖的比较研究. 中成药，2006，28(4)：573～576.

[25] 朱晓霞，罗学刚. 天麻多糖提取工艺优化. 时珍国医国药，2007，18(4)：906～907.

[26] 杨翠娴，李清彪，凌雪萍等. 应用微波前处理-热水浸提技术提取龙眼多糖. 化工学报，2007，58(8)：2004～2009.

[27] 贺艳，董玲玲，方丽等. 三峡隔山牛皮消中 C_{21} 甾体酯苷的分离提取研究. 时珍国医国药，2006，17(12)：2530～2532.

[28] 李于善，贺艳，庄海棠. 正交设计优化湖北山麦冬中总甾体酯苷的提取工艺. 三峡大学学报(自然科学版)，2007，29(4)：363～366.

[29] 郭锦棠，杨俊红，李雄勇等. 微波与索氏提取甘草酸的正交实验研究. 中国药学杂志，2002，37(12)：919～922.

[30] 姜宁，刘晓鹏，易先辉等. 微波辅助提取五倍子中单宁酸的研究. 中国实用医药，2007，2(25)：81～83.

[31] 黄天辉，沈平嬗. 均匀设计优选微波萃取五味子的工艺研究. 中成药，2006，28(8)：1111～1113.

[32] 李文敏，敖明章，余龙江等. 石榴籽油的微波提取和体外抗氧化作用研究. 天然产物研究与开发，2006，18(3)：378～381.

[33] 赵文英，朱庆书，金青. 微波辅助提取苍耳子油的研究. 食品科技，2008，2 ：203～205.

[34] Brachet A，Christen P，Veuthey J L. Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. Phytochem Anal，2002，13：162～169.

[35] 傅荣杰，冯怡，陶俊. 中药多糖类组分微波萃取与传统水煎提取的比较. 中成药，2005，27(12)：1382～1384.

[36] 邸倩倩，杨俊红，张铁军等. 当归微波提取物相对分子质量的分布特征研究. 中草药，2008，39(4)：541～543.

[37] Jones N M，Bernardo-Gil M G，Lourenco M G. Comparison of methods for extraction of tobacco alkaloids. J AOAC Int，2001，84：309～316.

[38] Chiasson H，Belanger A，Bostanian N et al. Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. J Econ Entomol，2001，94：167～171.

[39] Metcalf J S，Codd G A. Microwave oven and boiling waterbath extraction of hepatotoxins from cyanobacterial cells. FEMS Microbiol Lett，2000，184：241～246.

（许海燕　杨培明）

第 5 章　大孔吸附树脂的应用

5.1　吸附树脂的概念

吸附树脂是一类人工合成的高分子聚合物，能与外界的有机物进行可逆的吸附-解吸作用，从而达到浓缩、分离的目的[1]。通常所说的吸附树脂是指大孔吸附树脂，所谓大孔(macroporous，high porous)树脂仅仅相对于一般凝胶(gel)树脂而言，有时用大网(macroreticular)树脂代替大孔树脂。一般讲大孔吸附树脂要具备以下条件：①湿态下，外观乳白，为白坚状不透明体；②表观密度与真密度之差大于 0.05 $g \cdot mL^{-1}$；③比表面大于 5 $m^2 \cdot g^{-1}$；④孔径大于 50 Å[2]。

吸附树脂是具有多孔性海绵状立体结构的小颗粒，在整个颗粒内部及外部都具有表面活性，主要是以范德华力或氢键的作用为基础，吸附树脂一般不含有能简单地按化学计量精确计算的化学功能基团，在吸附性能上与活性炭很相似，大都可以定量的解吸，重复使用。而活性炭的吸附性能虽好，由于存在不可逆吸附，再生往往是比较困难。

另外，吸附树脂不溶于一般的酸、碱和溶剂，为不熔不溶的热固性物质，可在较高温度下使用，这大大扩大了吸附树脂的应用范围。目前吸附树脂主要应用于废水处理、医药工业、化学工业、分析化学、临床鉴定和治疗等领域。近年来也广泛应用于天然药物精制、中成药制备和质量控制等方面。

5.2　吸附树脂的分类

吸附树脂的吸附特性主要取决于其表面的化学性质、比表面积和孔径。由于大孔吸附树脂的基质是合成的高分子化合物，因此可以通过选择各种适当的单体、致孔剂和交联剂，根据要求对孔结构进行调制；同时还可通过化学修饰改变表面的化学状态，因此与其他吸附材料相比品种更多，可以反复使用，性能更为优异。另外，大孔吸附树脂的应用范围广泛并可以用水、有机溶剂、酸溶液、碱溶液等对被吸附物进行洗脱，所以使用更为方便。按照树脂的表面性质，吸附树脂一般分为非极性、中等极性和极性三类。

非极性树脂是指由偶极矩很小的单体聚合制得的不带任何功能基的吸附树脂。典型的例子是苯乙烯-二乙烯苯体系的吸附树脂。这类吸附树脂孔表面的疏水性较强，可通过与被吸附物质的疏水部分相互作用吸附溶液中的有机物。因此，

最适合由极性溶剂(如水)中吸附非极性物质。

中等极性吸附树脂是指含酯基的吸附树脂。例如,丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯与双甲基丙烯酸乙二醇酯等交联的一类共聚物,其表面疏水性部分和亲水性部分共存。因此,既可用于由极性溶剂中吸附非极性物质,又可用于由非极性溶剂中吸附极性物质。

极性吸附树脂是指含酰胺基、腈基、酚羟基等含氮、氧、硫极性功能基团的吸附树脂。它们通过静电相互作用和氢键作用等进行吸附,适用于由非极性溶剂中吸附极性物质。

除此之外,有时把含氮、氧、硫等配体基团的低交换量离子交换树脂称作强极性吸附树脂。表 5.1 列出了国外主要吸附树脂的分类情况。

表 5.1　国外主要吸附树脂的分类情况

表面极性	树脂结构	牌　号
非极性	苯乙烯-二乙烯苯	Diaion:HP10,HP20(SS),HP21,HP30,HP40,HP50
		Sepabeads:SP70,SP825,SP850,SP700,SP20SS,SP207
		Amberlite:XAD-1,-2,-3,-4,-16,1180,1600
		Amberchrom:CG161,CG1000,CG300,XT20,XT30
		Purolite:AP250,AP400,MN-100,MN-200,MN-300,MN-400,MN-500
中等极性	丙烯酸酯	Amberlite:XAD-6
	甲基丙烯酸酯	Amberlite:XAD-7,XAD-8
		Diaion:HP1MG,HP2MG,HP3MG
极性	亚砜	Amberlite:XAD-9
	丙烯酰胺	Amberlite:XAD-10
	氧化氮类	Amberlite:XAD-11,XAD-12
	乙烯吡啶	Diaion:EX0021
	氨基糖	Diaion:CRB02

5.3　吸附树脂的生产情况

5.3.1　国外吸附树脂的生产情况

吸附树脂是大孔结构聚合物发展的结果。从骨架结构来讲,大孔吸附树脂与大孔离子交换树脂没有什么区别,只是吸附树脂不带离子交换基团。树脂内部有很多适当大小的孔穴,故能有效地吸附各种有机物质,解吸亦很容易。因此被认为是一种介于离子交换树脂和活性炭之间的优良新型吸附剂。

1966 年美国的罗门哈斯(Rohm & Haas)公司首次正式开发了以交联聚苯乙烯和聚丙烯酸酯为基础的数种非极性和中等极性大孔吸附树脂，即 Amberlite XAD 系列。从此以后，大孔吸附树脂材料成为一个崭新的技术领域，受到欧美及日本等的高度重视，研制开发了一批类型不同、性能良好的吸附树脂，并形成了商品供应。60 年代末，日本三菱(Organo)化学公司也开发生产了 Diaion HP 系列大孔吸附树脂，后来还开发了 Sepabeads 系列。这些优良的吸附剂成为一直应用至今的经典的吸附剂。

近年来，为满足精细分离和医药工业的需求，各公司又陆续开发出了颗粒更细、粒径分布更窄、残留更低的吸附树脂产品。其中有代表性的有罗门哈斯的 Amberchrom 系列和三菱化学的 MCI-GEL 系列。

目前，美、英、法、德及日本等国均有专业公司研究生产。其中最有代表性的是美国的罗门哈斯公司和日本的三菱化学，其开发的种类也最为齐全。表 5.2 列出了三菱化学目前供应市场的主要产品及其技术指标，表 5.3 列出了罗门哈斯公司目前供应市场的主要产品及其技术指标。

表 5.2 三菱化学公司目前供应市场的主要产品及其技术指标

树脂型号		树脂结构	比表面积 /($m^2 \cdot g^{-1}$)	平均孔径 /nm	孔容/($mL \cdot g^{-1}$)	表观密度 /($g \cdot L^{-1}$)	相对密度	含水量/%	粒径范围和/或粒径分布/μm
Diaion	HP 20	聚苯乙烯类	600	46 (>20)	1.3	680	1.01	55～65	200～600 >250(>90%)
	HP 21		570	8	1.1	625		50～60	200～600 >250(>90%)
	HP 50		400	90 (>50)	1.0		1.01	49	200～600 >250(>90%)
	HP2MG	聚甲基丙烯酸酯类	500	20	1.2	720	1.09	55～65	200～600 >250(>90%)
	HP 20SS		600	46 (>20)	1.3	680		55～65	>150:<15% 150～63:>70% <63:<20%
Sepabeads	SP825	聚苯乙烯类	1000	5.7	1.4	690	1.01	52～62	200～600 >250(>90%)
	SP850		1000	3.8	1.2	670		46～52	200～600 >250(>90%)
	SP700		1200	9	2.3	690	1.01	65	450
	SP70		800	7	1.7		1.01	60	450
	SP207	聚苯乙烯类(溴化)	600	11	1.3	780	1.18	43～53	200～600 >250(>90%)
	SP20SS	聚苯乙烯类							>75:<38% 75～63:>70% <63:<15%

续表

树脂型号		树脂结构	比表面积/($m^2 \cdot g^{-1}$)	平均孔径/nm	孔容/($mL \cdot g^{-1}$)	表观密度/($g \cdot L^{-1}$)	相对密度	含水量/%	粒径范围和/或粒径分布/μm
MCI-GEL	CHP 10M	聚苯乙烯类	640	14	1.45				4
	CHP 5C		540	14	1.39				9～11 10
	CHP 55A		580	14	1.54				15～20 18
	CHP 55Y		590	14	1.55				25～35 30
	CHP 20Y		560	22	1.67				25～35 30
	CHP 20P		520	30	1.17				37～75 75～150
	CHP 20SS		540	29	1.35				63～150 100
	CHP2MG M	聚甲基丙烯酸酯类	460	27	1.09				4
	CHP2MG		590	20	1.13				9～11
	CHP2MG Y		510	23	1.15				25～35 31

表 5.3　罗门哈斯公司目前供应市场的主要产品及其技术指标

树脂名称		化学结构	平均比表面积/($m^2 \cdot g^{-1}$)	平均孔径/nm	相对密度	平均粒径(粒径分布)/μm	均一系数 D90/D40[①]	孔容	含水量/%	备注
Amberlite	XAD4	聚苯乙烯	750	10	1.01～1.03	640 (490～690)	1.6	≥0.50mL·mL^{-1}	54～60	
	XAD16		800	15		700	1.6			
	XAD1600		800	15	1.015～1.025	400 (350～450)	1.2	>1.4mL·g^{-1}	66～73	
	XAD1180		500	40	1.015～1.025	530 (350～600)	1.6	>1.4mL·g^{-1}	61～67	
	XAD7HP	酯类	500	45	1.06～1.08	560 (560～710)	1.7	≥0.50mL·mL^{-1}	61～69	
	XAD761	酚醛类	200	60	1.070～1.130	700 (560～760)	1.5	0.95～1.18mL·g^{-1}	62～70	

续表

树脂名称		化学结构	平均比表面积/($m^2 \cdot g^{-1}$)	平均孔径/nm	相对密度	平均粒径(粒径分布)/μm	均一系数 D90/D40[①]	孔容	含水量/%	备注
Amberchrom	CG161	聚苯乙烯	900	15		35 70 120	1.7			
	CG300		700	40		35 70 120	1.7			
	CG1000		200	100		35 70 120	1.7			
	CG71	酯类	500	50		35 70 120	1.7			
	XT20	聚苯乙烯		30		20				60 bar
	XT30			30		30				
	HPR10			30		10				100 bar

① D90/D40 是指树脂中的 90%能通过时的筛孔直径(即 D90)除以该树脂中的 40%能通过时的筛孔直径(即 D40)。

5.3.2 国内吸附树脂的生产情况

我国对大孔吸附树脂的研究,从 20 世纪 70 年代由天津南开大学何炳林教授开始,相继北京、上海、四川的科研单位,如中国科学院化学研究所、上海医药工业研究院、四川晨光化工研究院等在国内研制并开发了各类产品,分别由天津南开大学化工厂、上海金山树脂厂、华东理工大学华震公司、华北制药厂树脂分厂等推出了各种类型的大孔吸附树脂系列产品。目前,国内吸附树脂生产厂家众多,如南开大学化工厂、沧州宝恩化工有限公司、上海华震科技有限公司、西安蓝深特种树脂有限公司等,相应的树脂牌号也很多,表 5.4 列出了国内主要吸附树脂的技术指标。

表 5.4 国内主要吸附树脂技术指标

生产企业		树脂名称	极性类别	比表面积/($m^2 \cdot g^{-1}$)	孔径/nm	孔容/($mL \cdot g^{-1}$)	孔隙率/%	表观密度/($g \cdot mL^{-1}$)	骨架密度/($g \cdot mL^{-1}$)	湿真密度/($g \cdot mL^{-1}$)	堆积密度/($g \cdot mL^{-1}$)	粒径分布/mm	含水量/%	有机残留
天津市大钧科技开发公司	天津市海光化工有限公司	D101	非极性	≥400	93.1	1.6824	70.5	0.3475	0.8369	1.1778	0.65～0.7	0.3～1.25	65～75	
		D101-I	非极性	≥600	81.4	1.6169	68.3	0.3606	0.9637	1.138	0.65～0.7	0.3～1.25	65～75	
		DA201	极性	≥150	80.9	1.1057	50.3	0.5096	1.1620	1.1659	0.65～0.7	0.3～1.25	65～75	
		DM301	中极性	≥330	33.5	0.8016	44.4	0.6612	1.4160	1.1881	0.64～0.7	0.3～1.25	65～75	
		DS401(AB-8)	非极性	≥480	13～14	0.73～0.77			1.13～1.17	1.05～1.09	0.64～0.7	0.3～1.25	65～75	
沧州宝恩化工有限公司		HPD100	非极性	650～700	85～90			0.28～0.34		1.03～1.07	0.68～0.75	0.3～1.2	65～75	
		HPD100A	非极性	650～700	95～100			0.28～0.34		1.03～1.07	0.68～0.75	0.3～1.2	65～75	
		HPD300	非极性	800～870	50～55			0.28～0.34		1.03～1.07	0.68～0.75	0.3～1.2	65～75	
		HPD400	中极性	500～550	75～80			0.28～0.34						
		HPD400A	中极性	500～550	85～90					1.03～1.07	0.68～0.75	0.3～1.2	65～75	
		HPD450	弱极性	500～550	90～110					1.03～1.07	0.68～0.75	0.3～1.2	65～75	
		HPD500	极性	500～550	55～75					1.03～1.07	0.68～0.75	0.3～1.2	65～75	
		HPD600	极性	550～550	80					1.03～1.07	0.68～0.75	0.3～1.2	65～75	
		HPD700	非极性	650～700	85～90					1.03～1.07	0.68～0.75	0.3～1.2	65～75	
		HPD750	中极性	650～700	85～90					1.03～1.07	0.68～0.75	0.3～1.2	65～75	
		HPD800		700～750	90					1.03～1.07	0.68～0.75	0.3～1.2	65～75	
		HPD850		1100～1300	85～95					1.03～1.07	0.68～0.75	0.3～1.2	55～65	

续表

生产企业	树脂名称	极性类别		比表面积/($m^2 \cdot g^{-1}$)	孔径/nm	孔容/($mL \cdot g^{-1}$)	孔隙率/%	表观密度/($g \cdot mL^{-1}$)	骨架密度/($g \cdot mL^{-1}$)	湿真密度/($g \cdot mL^{-1}$)	堆积密度/($g \cdot mL^{-1}$)	粒径分布/mm	含水量/%	有机残留
天津欧瑞生物科技有限公司	药用皂苷类吸附树脂	SA-1	强	120～150	20～35	1.20～1.30			1.01～1.10			0.3～1.2	60～70	苯≤2 ppm 甲苯≤0.001% 二甲苯 ≤0.0005% 苯乙烯 ≤0.0005% 二乙烯苯 ≤0.0005%
		SA-2		120～150	15～35	1.10～1.25			1.01～1.10			0.3～1.2	60～70	
		SA-3	弱极性	550～650	15～25	0.6～0.7			1.01～1.20			0.3～1.2	55～65	
	药用黄酮类吸附树脂	FL-1	强	120～150	20～35	1.20～1.30			1.01～1.20			0.3～1.2	60～70	
		FL-2	中	120～150	20～35	1.20～1.30			1.01～1.10			0.3～1.2	50～65	
		FL-3	弱	120～150	20～35				1.01～1.10			0.3～1.2	60～70	
	药用生物碱类吸附树脂	AL-1	非	500～650	20～35				1.01～1.10			0.3～1.2	60～70	
		AL-2	中	450～600	15～25				1.01～1.10			0.3～1.2	60～70	
		AL-3	强						1.01～1.10			0.3～1.2	50～65	
	药用复方类吸附树脂	ME-1	非	550～650	20～35				1.01～1.10			0.3～1.2	60～70	
		ME-2	弱	550～650	20～35				1.01～1.10			0.3～1.2	60～70	

续表

生产企业	树脂名称	极性类别	比表面积/($m^2 \cdot g^{-1}$)	孔径/nm	孔容/($mL \cdot g^{-1}$)	孔隙率/%	表观密度/($g \cdot mL^{-1}$)	骨架密度/($g \cdot mL^{-1}$)	湿真密度/($g \cdot mL^{-1}$)	堆积密度/($g \cdot mL^{-1}$)	粒径分布/mm	含水量/%	相应国外树脂牌号
上海华震科技有限公司	HZ-801	非极性							1.05～1.10	0.60～0.70	0.315～1.25	60～70	
	HZ-816	非极性							1.0～1.10	0.65～0.75	0.315～1.25	55～65	
	HZ-818	非极性							1.0～1.10	0.60～0.70	0.315～1.25	60～70	
	HZ-820	非极性							1.0～1.10	0.60～0.70	0.315～1.25	62～72	
	HZ-826	非极性							1.0～1.10	0.60～0.70	0.315～1.25	58～68	
	HZ-806	中极性							1.02～1.12	0.70～0.80	0.315～1.25	68～78	
	HZ-803	非极性	500～600	60					1.0～1.10	0.65～0.75	0.315～1.25	48～58	XAD4
	HZ-802	非极性	450～550	100					1.03～1.09	0.62～0.72	0.315～1.25	52～62	XAD2
	HZ-841	弱极性	500～600	90					1.03～1.08	0.70～0.80	0.315～1.25	57～65	
安徽三星树脂科技有限公司	YPR-II								1.25～1.29	0.77～0.87	0.315～1.25	45～55	
	CAD-40	中极性	450～500	50～60						0.65～0.75	0.25～0.84	55～65	
	D101	非极性	500～550	9～10						0.65～0.75	0.25～0.84	65～75	
	D1300	非极性	≥550		1.35～1.65					0.65～0.85	0.28～0.90	≤70	
	X-5	非极性	500～600						1.03～1.07		0.315～1.25	45～60	
	AB-8	弱极性	480～520	13～14					1.05～1.09		0.315～1.25	60～70	

除表中列出的外，常用的树脂还有：

1. 河北沧州远威化工有限公司的 YWD-01～YWD-07 系列[根据残留物不同分为工业级、精制级和超净级，各种级别树脂重金属含量以铅计均不大于 1 $mg \cdot kg^{-1}$（干基）]。
2. 西安蓝深特种树脂有限公司的 LS 系列。

5.4 吸附树脂的有关法规

吸附树脂的有关标准和法规主要包括其制备和使用两个过程。尽管吸附树脂很早就应用到医药工业中，但直到 20 世纪 80 年代美国才对苯乙烯类吸附树脂有了相关的规定(21CFR173.65，21CFR177.2710，见表 5.5)。当前，欧美和日本等对吸附树脂的制备和使用没有统一的标准。就目前各国药品监督部门对吸附树脂的规定来看，由于其品种繁多以及生产上的保密性和使用过程中的特殊性，很难对药用吸附树脂制定一个统一的标准[3]。

表 5.5 美国对苯乙烯系树脂制备和使用的主要规定

参数	标准
二乙烯苯	>79%
苯乙烯	15%～20%
非共聚物	<4%
使用温度	<79.4 ℃
乙醇(50%)萃取物	<50 ppb①

① 非法定用法，此处 ppb 可改为"$\times 10^{-9}$"。

日本完全参照 FDA 对药用级吸附树脂所制定的标准，对二乙烯苯原材料的纯度、泄漏含量和不挥发性有机物含量进行严格控制，而对其他类型的吸附树脂没有制定相应的指标。

为安全使用吸附树脂，我国对吸附树脂的应用也提出了要求。国家食品药品监督管理局颁布了《应用大孔吸附树脂分离纯化工艺生产的保健食品申报与审评规定(试行)》，并于 2005 年 7 月 1 日起实施，其中明确提出应用苯乙烯骨架型树脂分离纯化工艺的保健食品应符合以下要求[4]：

(1) 大孔吸附树脂使用前应进行预处理，预处理以后的大孔吸附树脂中的有机残留物应控制在安全范围内，对苯乙烯骨架型树脂要求苯的残留量小于 2 $mg \cdot kg^{-1}$、二乙烯苯小于 20 $mg \cdot kg^{-1}$。对其他类型的大孔吸附树脂，根据具体情况确定限量标准。

(2) 一般情况下，不得使用再生后的比吸附量仍下降达 30%以上的大孔吸附树脂。

(3) 应用以大孔吸附树脂分离纯化工艺生产保健食品原料的生产企业，应当对原料的大孔吸附树脂残留物进行检验或复核。对用苯乙烯骨架型树脂制备的原料中二乙烯苯含量要求为小于 50 $\mu g \cdot kg^{-1}$，并将此列入企业标准。如果原料质量达到上述标准的，可以免测该保健食品终产品的大孔吸附树脂残留物的含量。

(4) 建立树脂残留物的检测方法和标准，并列入企业标准。

(5) 对保健食品生产过程中应用苯乙烯骨架型树脂分离纯化工艺的保健食品，其产品中二乙烯苯含量要求为小于 50 $\mu g \cdot kg^{-1}$。

因此在实际药物生产过程中对国产吸附树脂的残留物应制定相应的指标，并由生产厂家提供一些通用的技术指标，如二乙烯苯泄漏含量、微生物(细菌) 含量，以保证树脂的安全使用。国内已有厂家制定了企业内部标准，对残留物进行控制，以满足药品和保健品的提取和分离要求。

不过，我国对吸附树脂的制备过程还没有统一的标准和要求。我国树脂厂大都采用含量在 50%～60%的二乙烯苯，这与美国规定的原材料标准有一定的差距，所以要生产质量良好的药用级吸附树脂还要从原材料入手。

5.5　吸附树脂的应用方法

吸附树脂的应用方法分为动态法和静态法，即柱法和反应器法两种。由于柱法具有吸附分离效率较高，便于连续和自动化操作等优点，一般都用柱法操作；反应器法多应用于吸附树脂吸附性能的研究中，在工业化过程中适合批量处理，其优点是处理量大，便于操作，缺点是不能连续化操作，占地面积较大，故应当根据工艺选择采用柱法或反应器法，也可以二者结合。

5.5.1　吸附树脂的选择

5.5.1.1　粒径的选择

树脂的选择首先要明确使用吸附树脂的目的，是浓缩还是分离。如果仅仅是对目标产物进行提取或富集，选择的吸附树脂(表 5.6)就要求是大颗粒(如 200～1000 μm)，以增大流速，提高效率；如果是为了去除杂质，得到纯度较高的目标产物，就要选择能进行精细分离的理论塔板数相对较高的细颗粒(10～150 μm)。粒径越小对色谱系统的要求也就越高，相应的会增加设备和填料的成本，适合于具有高附加值的产品。

表 5.6　吸附树脂粒径选择

目的	系统特点	吸附树脂粒径/μm
分析色谱	高压分离	<10
制备色谱 (精细分离)	中压分离	10～35
	低压分离	35～75
	常压分离	75～150
提取和富集	常压、静态或动态	200～1000

5.5.1.2 吸附树脂类型的选择

树脂的选择还要根据所分离化合物的大致结构特征来确定。首先要知道所要分离化合物分子体积的大小，其次要知道该分子中是否存在一些特征的功能团，如酚羟基、羧基或碱性氮原子，由此确定树脂的类型。

另外，在选择树脂时还有一个最基本的“类似物吸附类似物”原则。即非极性（或疏水）分子能够被非极性（或疏水）表面所吸附，极性（或亲水）分子易被极性（或亲水）表面吸附。如果一种有机分子既有亲水端也有疏水端，那么在流动相中疏水端就能被疏水性吸附树脂吸附。中等极性的树脂兼有亲水性和疏水性，因此对亲水和疏水物质都有吸附。所以应根据所分离化合物的极性来选择合适的吸附树脂，同时还要考虑氢键的影响。当然最终的选择还是要通过实验来确定。

5.5.1.3 孔径的选择

一般而言，吸附树脂孔径与吸附分子直径之比以(2～6)∶1 为宜，孔径太大不会提高扩散速度，却浪费空间[5]。在选择好适当的孔径后，再尽可能地选择那些比表面大的树脂，以增大对目标产物的吸附量。

5.5.2 测试方法

5.5.2.1 静态吸附

静态吸附是将树脂直接投放于待吸附物质的溶液中进行吸附。对于选择树脂的类型和条件的优化是很方便和有用的。在实验中，需要考虑的参数有：吸附树脂的体积、pH、温度和平衡的时间。如果目标化合物有一个或多个离子基团，pH 常常影响树脂的吸附能力。为了得到最大的吸附载量，应将 pH 调到化合物的等电点，使之非离子化。

其中，树脂吸附能力（单位体积树脂吸附化合物的量）通过下面的公式来计算：

$$C=1000(W_t-W_s)/V$$

式中，C 表示树脂的吸附能力（$g \cdot L^{-1}$ 吸附树脂）；W_t 表示吸附前溶液中目标化合物的量（g）；W_s 表示经树脂吸附后溶液中的目标化合物的量（g）；V 表示使用的树脂的体积（mL）。及时记录一系列数据就可以进行吸附动力学的研究。多种树脂可进行平行测试，其中吸附量较大的树脂就是最合适的。

5.5.2.2 动态吸附

筛选出的树脂，应用动态吸附来进一步测试其性能。动态吸附就是指柱色谱。这里要重点考察洗脱的情况，包括洗脱液的组成、流速、分离效果等。当目标化合

物是中性非离子形态时，与水互溶的有机溶剂如醇或丙酮常作为洗脱剂；而对可离子化（即更有水溶性）的化合物来说可以用缓冲液或缓冲液/有机溶剂的混合液。

5.5.3　吸附树脂的预处理

如前所述，在吸附树脂生产过程中一般均采用工业级原料，所以产品必须经过净化处理，在除去树脂内部残留的单体、致孔剂和其他有机物杂质后才能使用。国外进口树脂价格较贵，其净化处理工艺完善，产品出厂质量标准严格，所以树脂买来开封后就能直接使用；而国产树脂生产企业为迎合用户低价格的要求，往往是以简化后处理等生产工艺来降低成本，把本应该除去的少量残留杂质转嫁给用户自己去做，所以买来的树脂不能直接使用，而必须进行预处理，以除去树脂生产过程中引入的杂质。

常用吸附树脂的预处理方法简述如下。

5.5.3.1　吸附树脂水合

吸附树脂通常以湿态保存，如果暴露在空气中树脂可能部分干燥失水。由于吸附树脂是疏水性的，需防止简单的再湿过程。为使树脂再度水合，应将脱水的吸附树脂放在甲醇或其他水溶性溶剂（如丙酮、乙醇）中充分浸泡，以便从孔中赶出空气泡。浸泡之后，用水冲洗取代有机溶剂。

需要注意的是，如果已有部分树脂变干，直接加入可能是不能使之恢复到以前的溶胀程度的。正确的方法是依次用与水互溶的有机溶剂、水进行溶胀[6]。

另外，如果所用的吸附树脂具有很高的比表面积，还需要进行真空脱气。

5.5.3.2　吸附树脂的柱前预处理

将准备装柱使用的新树脂，用 2 倍左右体积的甲醇或其他水溶性溶剂（如乙醇、丙酮）浸泡 2 h，并不时搅动，使树脂充分溶胀。

5.5.3.3　吸附树脂装柱

在装柱之前应先在柱中加入一定量的水，然后将带水的吸附树脂浆液倒入柱中，一般按下列步骤进行。

（1）将树脂-水浆液加入已带有一定量水的吸附柱中。

（2）再将过量的水通过柱底排出，保持液面高于树脂层面 3 cm 以上直到所有树脂全部转移到柱中。吸附树脂的床层高度最小 45 cm，树脂一般只填充大约柱空间的 1/2～2/3，以便进行反洗。

5.5.3.4 吸附树脂残留溶剂的处理

去除残留溶剂的常用方法有回流法、渗漉法和水蒸气蒸馏法等[7]，所采用的溶剂主要有乙醇、甲醇、丙酮、异丙醇、稀盐酸、稀氢氧化钠溶液等。目前大多采用渗漉法，即将树脂装柱，加有机溶剂浸泡，洗脱，再浸泡，洗脱，加 2%～5%盐酸溶液浸泡，洗脱，水洗至 pH 中性，加 2%～5%氢氧化钠溶液浸泡，洗脱，水洗至 pH 中性。以下列出了树脂残留溶剂常用的处理过程。

将甲醇(或丙酮、乙醇)以每小时 3～4 个柱体积的流速通过吸附柱，直至流出液滴入水中不出现浑浊，此过程至少需要 5 个柱体积的甲醇。甲醇处理之后，以每小时 6～8 个柱体积的流速将 20 个柱体积的纯水通过吸附柱，以便置换掉甲醇。所有操作过程需使树脂始终处于液体浸泡中，防止吸附树脂失水；也可以配制 NaOH(5%～10%)的丙酮溶液处理，然后水洗至中性。

常用的处理方法成本高(溶剂用量约为 10～20 柱体积)，时间长(树脂预处理周期约为 3～5 天)，效果差，而且环境污染大。为了克服这些缺点，贾存勤等[7,8]较为深入地研究了 HPD 系列、D-101 型吸附树脂的预处理方法，得出结论：HPD、D-101树脂经 2% NaOH 浸泡洗脱后，在 60 ℃，用乙醇浸泡、洗脱，洗脱流速为 2 $BV \cdot h^{-1}$，乙醇用量为 3～4 倍柱体积，洗脱液的紫外吸收值为 0.2～0.5，预处理的树脂经 GC 检测，苯未检出，其他有机残留物均低于 10 $mg \cdot L^{-1}$，即达到药用要求。

以前，据大多数文献报道，预处理合格的指标多为“醇提液加水不显浑浊”，也有以滤液蒸干后无残留物或提取液紫外吸收值(波长在 254 nm)小于 0.03 作为指标。事实上，树脂处理至醇提液加水不显浑浊，仍有一些树脂残留物未洗净，仅以醇提液加水不显浑浊作为指标，不够全面，应进一步研究，建立更合理的标准。如对于苯、甲苯、二甲苯等含有共轭双键的残留物可用紫外吸收来作为指标；对于不挥发性有机残留物的检查可参照美联邦条例第 170～199 部分 3 卷 21 条(1998 年修订)以洗脱液中有机残留物总量(重量法)为指标。对于处理合格的树脂及提取成品中树脂残留物的检查，气相色谱(顶空进样)是一种较好的方法[9～11]。合理的预处理方法必须经过工艺验证，对树脂残留物进行检查，达到国家药监局 SFDA 对吸附树脂应用的要求[4]。

5.5.4 树脂的操作条件

在选择好树脂后，就需要考虑操作条件了。在实际应用时大多使用动态吸附，因为动态吸附操作方便、对目标产物的吸附量大同时还有较好的分离性能。典型的柱纯化包括以下几步：上样吸附，淋洗，洗脱，再生。如此循环可以反复使用。

5.5.4.1　上样吸附

当溶液自上而下通过吸附柱时，吸附过程连续进行。典型的吸附过程是将待处理溶液以每小时 2～16 个柱体积的流速通过吸附柱，直到运行终点。

首先将充分溶胀的树脂的 pH 调节到与上样液一致，再以恒定的流速上样，在选择上样液的体积时要充分考虑到树脂的吸附能力，流出液应与检测器连接，及时检测，以确保目标化合物没有从柱中漏出。一般而言，上样液浓度不应太大，低浓度有利于树脂吸附容量的提高。另外，由于吸附树脂主要是通过范德华力对目标产物进行作用，所以分子形态有利于吸附，这就要求碱性物质在碱性条件下吸附，而酸性物质在酸性条件下吸附，以减少目标分子的解离。

5.5.4.2　淋洗

上样结束后，柱中填充的仍然是上样液，含有未被吸附的杂质，这就需要在洗脱前进行淋洗，一般用水（或缓冲液），也有的用低浓度醇液，要求不能将目标产物洗脱下来，用量以能将上样液置换下来为宜，一般是 0.5～1.0 个床体积。

5.5.4.3　洗脱

洗脱时选择合适的洗脱液过柱以得到目标化合物，可选用线性梯度洗脱或分步洗脱。洗脱条件的选择至关重要，尤其是在要分离两种结构很接近的化合物时。

洗脱剂的选择与溶质和溶剂的物理化学特性有关，可以用溶剂的溶解度参数来预测。一般来说，溶剂的溶解度参数越小，其洗脱效率越高。几种常见有机溶剂的溶解度参数列在表 5.7 中。甲醇是一种较好的洗脱剂，它很容易洗出被吸附的物质，但大量使用会损害人的视神经；乙醇与丙酮也是很好的洗脱剂，工业化生产应当列为首选洗脱剂。

表 5.7　几种常用有机溶剂的溶解度参数

溶剂	溶解度参数
丁酮	9.3
丙酮	10.0
正丁醇	11.4
正丙醇	11.9
乙醇	12.7
甲醇	14.5
水	23.2

由于吸附树脂以范德华力对被吸附物质进行吸附，因此通过改变被吸附分子

的疏水-亲水平衡便可改变其吸附作用。例如，弱酸的酸型比盐型更容易被吸附，因此可以用碱进行洗脱。相反，脂肪胺则以游离碱型被吸附，可用酸进行洗脱。

重复利用柱子时，应先用水冲洗。水冲洗分两步进行，第一个柱体积的冲洗流速与再生流速相同，因为冲洗初期实际上是进一步完成再生的过程。第二个柱体积的冲洗流速一般与吸附流速相同。吸附树脂经冲洗之后再调节合适的 pH 便可投入下一吸附循环。

在经过几个周期后，发现树脂的吸附能力下降或有明显的污染时，就需要对树脂进行复原处理，以恢复其吸附能力。

5.5.4.4 再生

为了能循环使用吸附树脂，在每一个周期后应进行再生(regeneration)，再生情况取决于所使用的洗脱液。洗脱液应该充足直到所有组分被洗脱出来。当目标化合物洗脱后，可用极性更小的溶剂洗脱。

5.5.4.5 周期测定

当确定了具体的操作条件之后，下一步就需要评估纯化过程的平均产量和树脂的使用寿命。周期测定应按照前面的要求进行重复。在大多数的纯化应用中，溶液中都含有大量杂质，有些杂质将累积在树脂的表面，洗脱液无法除去，树脂的纯化能力会逐渐下降。所以预期的平均纯化能力决定了树脂复性之间的使用周期。一般情况下，纯化同一种药物的吸附树脂，当其吸附量下降 30%以上时，则应视其为不宜使用[4]。

5.5.4.6 复原方法

当柱子被重复使用，一些杂质与树脂之间会发生不可逆吸附，树脂逐渐被污染。这些杂质不能在正常的洗脱条件下被去除，所以树脂的复原(rejuvenation)至关重要。复原就是使用那些更剧烈的试剂如 NaOH 或 2-丙醇洗涤树脂，需要考虑的因素还有温度、浓度、接触的时间等，这些视污染的程度而定。对一些受到严重污染的柱子，有时会用到氧化剂如次氯酸钠，但是要引起注意的是，这些试剂可能会破坏树脂本身。

5.5.4.7 保存

尽管吸附树脂理化性质稳定，但如果需要长期保存，还是有一些要注意的地方。一般来说，树脂应保持溶胀状态，存放于密闭容器中，置于阴凉处，保持水分，避免热源和紫外辐射，不能冰冻以免结冰时破坏树脂的孔道结构。另外，尽管树脂不能被生物降解，但微生物的生长将影响其性能，应该最小程度地减少微生物的污

染，可将树脂保存在浓的 NaCl 溶液或乙醇溶液中，一些试剂如 NaN_3 也是很有效的，但考虑到其毒性应慎用。

5.6　吸附树脂在中草药分离中的应用

对天然产物或中草药的分离和提取，传统的方法主要是有机溶剂萃取法，缺点是要消耗大量的有机溶剂、易造成环境污染。而用吸附树脂进行分离，水煮液直接上柱，不必浓缩，吸附完毕后用稀醇洗脱，洗脱液经浓缩、干燥后，即可得到纯度高、不吸潮的产品；另外，吸附技术还有设备简单、操作方便、生产周期短、能源省、成本低、不加辅料可以成型等优点，因而，吸附树脂在天然产物提取与分离的研究与生产中的应用将日益广泛。

现代研究结果证明，中草药的有效成分主要是生物碱、黄酮苷类、酚类、甾醇、蒽酮、木质素、有机酸、氨基酸、多糖、蛋白质、多肽、酶以及挥发油、萜类等。至今为止，研究的主要对象集中在生物碱、皂苷、黄酮、多糖类等成分上。表 5.8 列举了用吸附树脂精制纯化的中草药成分类型。

表 5.8　吸附树脂在纯化中草药成分中的应用

中药成分名	树脂型号	吸附量 /(mg·g^{-1})	洗脱液	解吸率 /%	产品纯度/%	文献
银杏叶总黄酮	HZ-841	265①	无水乙醇		37.3	[12]
黄精总皂苷	LSA-30	11.76	95%乙醇	95		[13]
断血流总皂苷	D101	13.00	70%乙醇	86.8	7.7～11.8	[14]
葛根黄酮	X-5	51.8	70%乙醇	87.7	/	[15]
川草乌总生物碱	AB-8	/	80%乙醇	85	/	[16]
甘草酸	DM130	119①	10%乙醇	/	94.6	[17]
	X-5	58.86	90%乙醇	95.41	95.2	[18]
三七皂苷	D101	174.5	50%乙醇	80	71	[19]
薤藜皂苷	D101	6	80%乙醇	96	/	[20]
毛冬青皂苷	D101	120	50%乙醇	95	71	[21]
丹参酚酸	ADF8	32.7	30%乙醇	95	7.2～53.8	[22]
喜树碱	ME-3	12.65	50%乙醇	/	5.08	[23]
	AB-8	16.84	氯仿：乙醇 (1：2)	/	/	[24]
喜树苷	ME-3	36.16	50%乙醇	/	67.16	[23]
茶多酚	NKA-9	30.4	80%乙醇	92.5	>70	[25]

续表

中药成分名	树脂型号	吸附量 /(mg·g^{-1})	洗脱液	解吸率 /%	产品纯度/%	文献
紫草宁	AB-8	40.77	丙酮	94	/	[26]
人参总皂苷	D101	105	50%乙醇	60.1	90	[27]
	D101	108.5	50%乙醇	/	85	[28]
苦豆子生物碱	DF01	17①	乙醇-水(80∶20)	/	/	[29]
麻黄碱	D151(弱酸)	240.4①	0.08mol·L^{-1}盐酸	>90%	>80	[30]
	XAD4	122.1①	0.02mol·L^{-1}盐酸-甲醇(1∶1)			
	XAD7	87.0①	0.08mol·L^{-1}盐酸			
苦参碱	SP825	706.19	无水乙醇		96.7	[31]
大叶钩藤总生物碱	D101	112.5①	0.08mol·L^{-1}盐酸	94.01	36.7	[32]
淫羊藿总黄酮	AB-8	/	70%乙醇	>86%	80	[33]
白芍总苷	HPD100	95.62	30%乙醇	>90%	>30	[34]
紫杉醇	HZ818	3.6	85%甲醇	98.6%	1.02～8.1	[35]
赤芍总苷	DA201	/	20%乙醇	/	>80(芍药苷)	[36]
川射干异黄酮	DM-401	27.30	80%乙醇	88.74%	24.64～58.70	[37]
玉米花粉黄酮类	AB-8	7.08	95%乙醇	97.9%	/	[38]
秦艽龙胆苦苷	HPD100	18.22	30%乙醇	/	>80	[39]
银杏外种皮多糖	AB-8	425	水	92～93	81.3	[40]
大豆异黄酮	HPD600	1.73	80%乙醇	63.01	/	[41]
天麻苷	AB-8	7.32	50%乙醇	96.77	/	[42]
天麻总苷		16.25		96.25	18.96	
化橘红柚皮苷	HPD450	71.7	90%乙醇	95.8	51.3～85	[43]
亚麻木酚素	X-5	8.31	20%乙醇	95.1	65.7	[44]
甘草总黄酮	AB-8	25.31	80%乙醇	82.68	>50	[45]
鬼针草总黄酮	D301	/	20%乙醇	/	60	[46]
何首乌	HPD500	151.7	60%乙醇	81.82	75.3	[47]
二苯乙烯苷	S-8	40	30%、50%乙醇		>60	[48]
黄芪皂苷	D101	65.2	70%乙醇	97.2	5.4～45	[49]
黄芩苷	AB-8	69.48	50%乙醇	96.88	90	[50]
金银花总有机酸	HPD100	54.46	95%乙醇	80%	64.26	[51]
荔枝核黄酮	HPD300	100.3	70%乙醇	93	31～82	[52]
山楂叶总黄酮	D101	/	70%乙醇	97	67.22	[53]
菟丝子黄酮	H103	/	60%乙醇	/	88	[54]

续表

中药成分名	树脂型号	吸附量 /(mg·g^{-1})	洗脱液	解吸率 /%	产品纯度/%	文献
香叶木苷	AB-8	27	50%乙醇	/	42	[55]
异甘草素	AB-8	0.5	70%乙醇	92.1	2.02～29.1	[56]
三七总皂苷	HPD100	74	70%乙醇	98	79.6	[57]
野菊花总黄酮	AB-8	/	70%乙醇	/	4.34	[58]
肿节风总黄酮	HPD400	9.5①	70%乙醇	/	/	[59]
槲皮苷	AB-8	26.8	70%乙醇	91.6	/	[60]
苜蓿皂苷	D101	/	60%乙醇	/	0.37～5.8	[61]
降香总黄酮	AB-8	49.5	70%乙醇	88.95	19.80～43.35	[62]

①单位为 mg·mL^{-1}。

参考文献

[1] 何炳林，黄文强. 离子交换与吸附树脂. 上海：上海科技教育出版社，1995.

[2] 钱庭宝，刘维琳，李金和. 吸附树脂及其应用. 北京：化学工业出版社，1990.

[3] 浦宇，王芝祥. 吸附树脂及其在天然产物和抗生素中的应用. 中国医药工业杂志，2003，34(12)：636～644.

[4] 应用大孔吸附树脂分离纯化工艺生产的保健食品申报与审评规定(试行). 中国食品卫生杂志，2005，17(4)：373～374.

[5] 江邦和，胡效忠. 离子交换与吸附树脂在中药有效成分提取中的应用. 离子交换与吸附，2001，17(4)：379～384.

[6] Hiroaki T，Junji F，Eiji M et al. Non-ionic adsorbents in separation processes. Downstream processing of natural products. New York：John Wiley & Sons Ltd，1996.

[7] 贾存勤，李阳春，屠鹏飞等. D-101型大孔吸附树脂预处理方法的研究. 中草药，2006，37(2)：193～196.

[8] 贾存勤，李阳春，屠鹏飞等. HPD系列大孔吸附树脂预处理方法研究. 中国中药杂志，2005，30(18)：1425～1427.

[9] 张文生，宋晓涛，武珊珊. 气相色谱法测定提取物中苯、甲苯、间二甲苯、对二甲苯、邻二甲苯和苯乙烯的残留量. 药物分析杂志，2006，26(3)：393～395.

[10] 贾存勤，李阳春，屠鹏飞等. 气相色谱法检测大孔吸附树脂中的有机残留物. 色谱，2005，23(6)：655～658.

[11] 常增荣，张小茜. 中药提取物中的大孔吸附树脂残留物限量检查研究. 中国中药杂志，2004，29(6)：585～586.

[12] 周小华，曾晖，李端华. HZ-841吸附树脂精制银杏叶总黄酮. 天然产物研究与开发，2005，17(1)：76～80.

[13] 齐斌，谷文英. 大孔吸附树脂对黄精总皂苷的吸附特性研究. 科研开发，2005，21(2)：14～16.

[14] 张毅，鄢丹，韩玉梅等. 大孔吸附树脂纯化断血流总皂苷工艺研究. 中药材，2005，28(10)：942～945.

[15] 鄢贵龙. 大孔树脂对葛根素吸附行为的研究. 食品工业研究，2007，28(1)：63～66.

[16] 杨桦，邓晓静等. 大孔吸附树脂用于川草乌中总生物碱的分离提取，中成药，2000，22(8)：535～538.
[17] 傅冬和，刘爱玲，邓克尼. DM130 树脂对甘草酸的吸附性能及提纯应用研究. 天然产物研究与开发，2002，14(1)：60～63.
[18] 乔五忠，王艳辉，李美粉等. 利用大孔吸附树脂精制甘草酸的研究. 中成药，2006，28(6)：794～796.
[19] 刘中秋，蔡雄. 大孔吸附树脂富集三七皂苷工艺研究. 中国实验方剂学杂志，2001，7(3)：4～6.
[20] 金京玲. 大孔吸附树脂法提取蒺藜总皂苷. 延边大学医学学报，1999，22(1)：29～30.
[21] 刘中秋，蔡雄. 大孔吸附树脂富集纯化毛冬青总皂苷. 中药新药与临床药理，2001，12(1)：51～54.
[22] 房信胜，谭晓梅，王建华. 大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸的工艺研究. 中草药，2006，37(10)：1502～1504.
[23] 王瑞芳，欧来良，孔德领等. 孔吸附树脂对喜树果中喜树碱和喜果苷的分离纯化研究. 中草药，2005，36(6)：849～851.
[24] 王萍，王博文，王倩等. 大孔吸附树脂分离喜树碱的研究. 林业科技，2005，30(6)：52～54.
[25] 萧伟祥. 应用树脂吸附分离制取茶多酚. 天然产物研究与开发，1999，6(11)：44～49.
[26] 孟琴，张兵. 大孔吸附树脂对紫草宁的吸附性的研究及重细胞培养液中提取紫草宁的探索. 离子交换与吸附，1999，15(1)：36～42.
[27] 蔡雄，刘中秋，王培训等. 大孔吸附树脂富集纯化人参总皂苷工艺. 中成药，2001，23(9)：631～634.
[28] 彭拓华，陈洁炜，黄湘兰等. 大孔树脂富集纯化人参总皂苷工艺条件优选. 中药材，2006，29(4)：392～394.
[29] 秦学功，元英进. 用大孔吸附树脂吸附分离苦豆子生物碱，中国中药杂志，2002，27(6). 428～429，470.
[30] 任海彧，查丽抗. 大孔吸附树脂分离提取麻黄碱的研究. 离子交换与吸附，2002，18(2)：97～111.
[31] 林强，霍清. 大孔吸附树脂对苦参碱的吸附分离研究. 北京联合大学学报(自然科学版)，2005，19(4)：80～82.
[32] 黄永林，阮俊，沈晓琳等. 大孔吸附树脂分离提取大叶钩藤总生物碱. 广西科学，2006，13(2)：127～129.
[33] 李冬梅，尹晓飞，蔡大伟. AB-8 大孔吸附树脂分离纯化淫羊藿中总黄酮的研究，中国药师，2006，9(12)：1109～1111.
[34] 张亚军，徐莲英. HPD100 大孔吸附树脂在白芍纯化工艺中的应用研究. 中药材，2006，29(9)：968～970.
[35] 郭立佳，陶文沂，徐锋等. HZ-818 树脂在紫杉醇除分离工艺中的应用. 食品与生物技术学报，2006，25(5)：40～43.
[36] 王汀，刘青云，邓英杰. 赤芍总苷制备工艺优化研究，中成药，2006，28(9)：1380～1383.
[37] 陈勇，柳伟，戈宝莹等. 大孔树脂对川射干异黄酮的分离纯化工艺研究. 中国药学杂志，2007，42(1)：40～43.
[38] 查磊，任顺成，罗浪峰. 大孔树脂对玉米花粉黄酮类的吸附分离特性研究. 河南工业大学学报，2007，28(1)：21～24.
[39] 蔺建新，李茂星，张汝学等. 大孔吸附树脂纯化秦艽中龙胆苦苷. 中草药，2006，37(11)：1666～1668.
[40] 仰榴青，徐佐旗，茆广华等. 大孔吸附树脂纯化银杏外种皮多糖的研究. 中药材，2006，29(10)：1098～1100.
[41] 高荣海，李长彪，刘长江等. 大孔吸附树脂对大豆异黄酮吸附性能的研究. 食品工业科技，2006，27(10)：49～52.
[42] 李文兰，范玉奇，季宇彬等. 大孔吸附树脂法对天麻中天麻苷和总苷的分离纯化. 中国医院药学杂志，

2007,27(1):18～21.
[43] 韦敏,杨中林,吴建民. 大孔吸附树脂法分离纯化化橘红中柚皮苷的研究. 中成药,2007,29(3):352～354.
[44] 张文斌,许时婴. 大孔吸附树脂法分离纯化亚麻木酚素的研究. 食品工业科技,2006,27(10):96～99.
[45] 应雪,陈文,江发寿等. 大孔吸附树脂分离纯化甘草总黄酮工艺研究. 中国药房,2006,17(17):1355～1357.
[46] 魏英勤,马毅,王云云. 大孔吸附树脂分离纯化鬼针草总黄酮的研究. 时珍国医国药,2006,17(11):2257～2258.
[47] 朱海升,蔡光明,刘鄂湖等. 大孔吸附树脂分离纯化何首乌有效成分二乙烯苷的研究. 解放军药学学报,2006,22(4):269～273.
[48] 欧阳臻,江涛涛,杨雨等. 大孔吸附树脂法分离制何首乌中的二乙烯苷. 中国医药工业杂志,2006,37(7):460～462.
[49] 黄绳武,吴智慧. 大孔吸附树脂分离纯化黄芪皂苷的工艺研究. 中药材,2006,29(12):1352～1355.
[50] 宣寒,陈钧,杜丰玉等. 大孔吸附树脂分离纯化黄芩中黄芩苷的工艺研究. 时珍国医国药,2006,17(10):1992～1994.
[51] 刘恩荔,李青山. 大孔吸附树脂分离纯化金银花中总有机酸的研究. 中草药,2006,37(12):1792～1796.
[52] 汤建萍,周春山,丁立稳. 大孔吸附树脂分离纯化荔枝核黄酮类化合物的研究. 离子交换与吸附,2006,22(6):551～558.
[53] 许英爱,范国荣,高申. 大孔吸附树脂分离纯化山楂叶总黄酮的研究. 中药材,2007,30(2):228～230.
[54] 吴春,陈林林. 大孔吸附树脂分离纯化菟丝子黄酮的研究. 中草药,2006,37(11):1663～1666.
[55] 卢卫红,王静,于晓敏. 大孔吸附树脂分离纯化香叶木苷. 天然产物研究与开发,2006,18:896～899.
[56] 付玉杰,刘晓娜,侯春莲等. 大孔吸附树脂分离纯化异甘草素的研究. 离子交换与吸附,2006,22(4):315～322.
[57] 谢茵,邢桂琴,刘秀芬. 三七提取液中三七总皂苷的分离纯化工艺研究. 山西医科大学学报,2006,37(6):613～615.
[58] 盛萍,帕丽达·阿不力孜,刘波等. 大孔树脂吸附法富集野菊花总黄酮的工艺研究. 中草药,2005,37(8):1170～1173.
[59] 徐国良,肖兵华,邹胡斌等. 大孔吸附树脂分离肿节风中总黄酮的研究. 中草药,2006,37(7):1014～1017.
[60] 杨庆胜,张京健,张龙海等. 大孔吸附树脂分离纯化侧柏叶中槲皮苷的研究. 中草药,2006,37(7):1026～1028.
[61] 许舒雯,龚祝南,丛晓东等. 大孔树脂分离纯化苜蓿皂苷工艺研究. 安徽农业科学,2006,34(13):3176～3177.
[62] 黄丽容,陆金环,谭健星等. AB-8大孔吸附树脂纯化降香总黄酮的工艺研究. 广东药学院学报,2006,22(3):270～271.

（王芝祥　徐　伟）

第 6 章　高效液相色谱及其联用技术

高效液相色谱(high performance liquid chromatography，HPLC)是近年来发展非常迅速的一种高效、快速和灵敏的分析和分离方法。目前该技术在天然产物化学、化工、医药、生化、环保、农业、食品等诸多领域已经获得了非常广泛的应用。针对天然产物成分复杂、分离难度大的特点，高效液相色谱技术可以充分发挥高分离度、高效快速、高灵敏度的优势，成为天然产物化学实验室所必备的常规实验手段。

高效液相色谱技术的发展近期有两个特点。一方面，其自身技术不断突破，如诞生了超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography，UPLC)新技术。超高效液相色谱采用整体设计，大幅度地改善了液相色谱的分离度、样品通量和灵敏度。其分离系统通过采用低于 2 μm 颗粒填料，可以得到更高的柱效、更窄的色谱峰宽，即更高的灵敏度。超高效液相色谱极大地提高了分离效率，通常比常规 HPLC 分离效率高 5～10 倍。UPLC 只有 1～2 s 的色谱峰宽度，在复杂天然产物的分离中，能够以更短的柱子、更快的速度、更少的溶剂获得更高的分辨率和灵敏度。另一方面，高效液相色谱在原有的紫外光谱、蒸发光散射等检测技术的基础上，又增加了与质谱、核磁共振波谱、圆二色谱等多种波谱技术手段联用，促进了高效液相色谱在更广泛领域内的应用。这些联用技术在保持高效液相色谱强大分离能力的同时，能够为化学家提供丰富的分子结构信息。经过几十年的发展，这些技术日益成熟并获得广泛的应用。

就上述技术在天然产物化学领域的应用，下面分别举例加以说明。

6.1　高效液相色谱和超高效液相色谱在天然化合物分析和分离中的应用

6.1.1　蔓生百部中绿原酸类化合物的分析与分离[1]

绿原酸目前泛指一类化学结构类似的化合物，包括 3 位、4 位以及 5 位氧取代的咖啡酰奎宁酸及其类似物[2]。这类化合物报道有抗氧化、保护肝细胞、抗突变活性、抑制 HIV-1 逆转录和抗 SARS 病毒的活性[3～7]。

在抗禽流感病毒天然化合物的活性筛选中，研究人员发现这类结构具有较好的抑制活性，同时还发现在蔓生百部(*Stemona japonica*)非生物碱提取物中存在

大量具有该类结构的化合物。这些绿原酸类化合物结构类似，色谱行为差异小，用传统方法分离费时费力，样品损失大。为了快速获得该类化合物进行抗禽流感病毒筛选，研究人员采用高效液相色谱技术，通过优化色谱条件，首先获得具有较好分离度的分析色谱条件，再将分析型色谱参数转化为制备型色谱参数(图 6.1)，建立了相应的 HPLC 制备方法，一次进样就能获得其中 7 个纯化合物，有 5 个样品纯度超过 95%，2 个样品纯度超过 90%(图 6.2，图 6.3)。高效液相色谱在该类复杂天然提取物的分析和分离中充分显示了快速高效的特点。

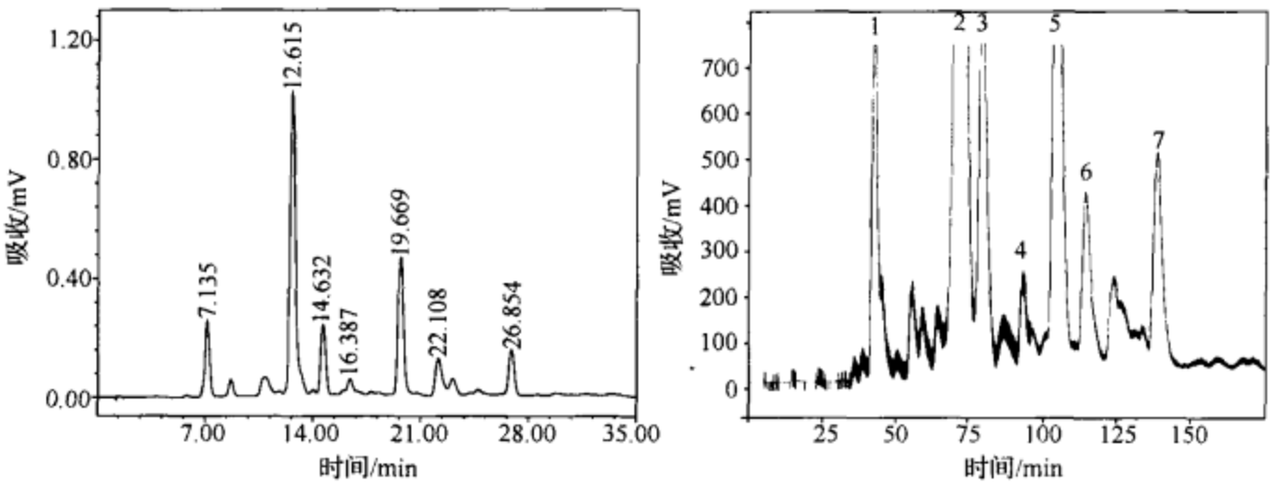


图 6.1　将分析型 HPLC 条件转化为制备型 HPLC 条件，用于从百部科植物蔓生百部的非生物碱部位中分离绿原酸类化合物

(左) 蔓生百部根提取物的分析型高效液相色谱图。系统：Waters 2695；色谱柱：LiChrospher 100 RP18e，5 μm，4 mm×125 mm；流动相：乙腈/0.1% 甲酸水溶液；流速：1 mL·min^{-1}；梯度：8%～20%（乙腈）0～30 min。(右) 蔓生百部根提取物的制备型高效液相色谱图。系统：Varian ProStar；色谱柱：LiChrospher 100 RP18，12 μm，25 mm×220 mm；流动相：乙腈/0.1% 甲酸水溶液；流速：15 mL·min^{-1}；梯度：8%～20%（乙腈）0～180 min；进样体积：5 mL；样品浓度：40 mg·mL^{-1}甲醇

6.1.2　石油菜中倍半萜成分的 HPLC 和 UPLC 分析

石油菜为荨麻科冷水花属植物波缘冷水花(*Pilea cavaleriei* Levl)的干燥全草，临床用于治疗肺结核等症。研究人员在对该种植物进行研究的过程中，发现了一个富含蛇麻烷型和丁香烷型倍半萜的组分。研究人员尝试了分别用 HPLC 和 UPLC 技术对该组分进行分析，结果发现，在分辨率基本相同的情况下，UPLC 仅需 15 min 便可完成一个分离过程(图 6.4)，耗费溶剂 6 mL，而 HPLC 的分析时间则长达 40 min(图 6.5)，需要溶剂量为 40 mL。

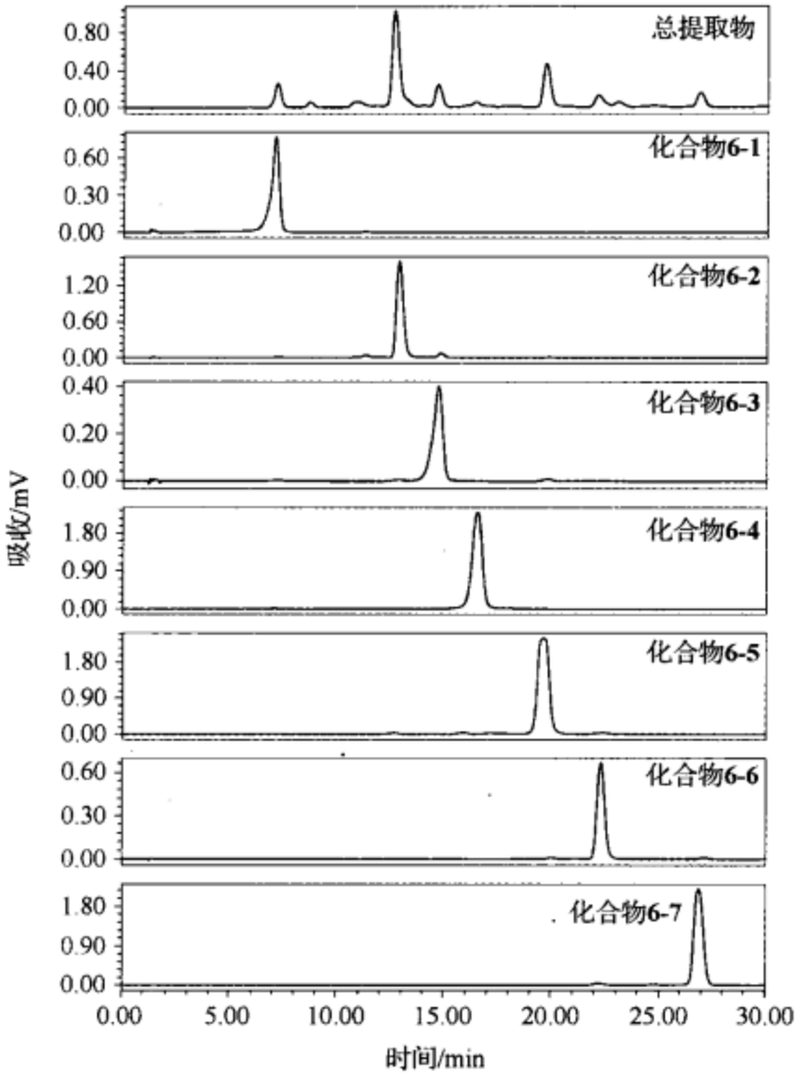
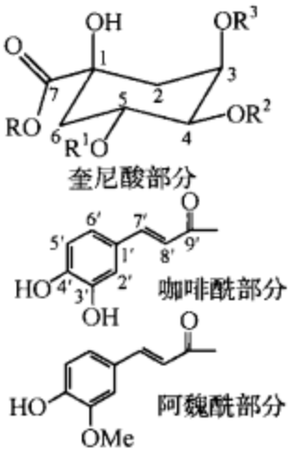


图 6.2 蔓生百部根提取物与从制备型 HPLC 中获得的 7 个化合物的分析型高效液相色谱图

分析色谱条件同图 6.1



化合物	R	R^1	R^2	R^3
6-1	H	H	H	feruloyl
6-2	H	H	feruloyl	H
6-3	methyl	H	H	feruloyl
6-4	methyl	caffeoyl	H	H
6-5	methyl	H	feruloyl	H
6-6	ethyl	H	H	feruloyl
6-7	ethyl	H	feruloyl	H

图 6.3 化合物 **6-1**～**6-7** 的化学结构

化合物分别为 3-*O*-阿魏酰奎尼酸（**6-1**），4-*O*-阿魏酰奎尼酸（**6-2**），3-*O*-阿魏酰奎尼酸甲酯（**6-3**），5-*O*-咖啡酰奎尼酸甲酯（**6-4**），4-*O*-阿魏酰奎尼酸甲酯（**6-5**），3-*O*-阿魏酰奎尼酸乙酯（**6-6**），4-*O*-阿魏酰奎尼酸乙酯（**6-7**）

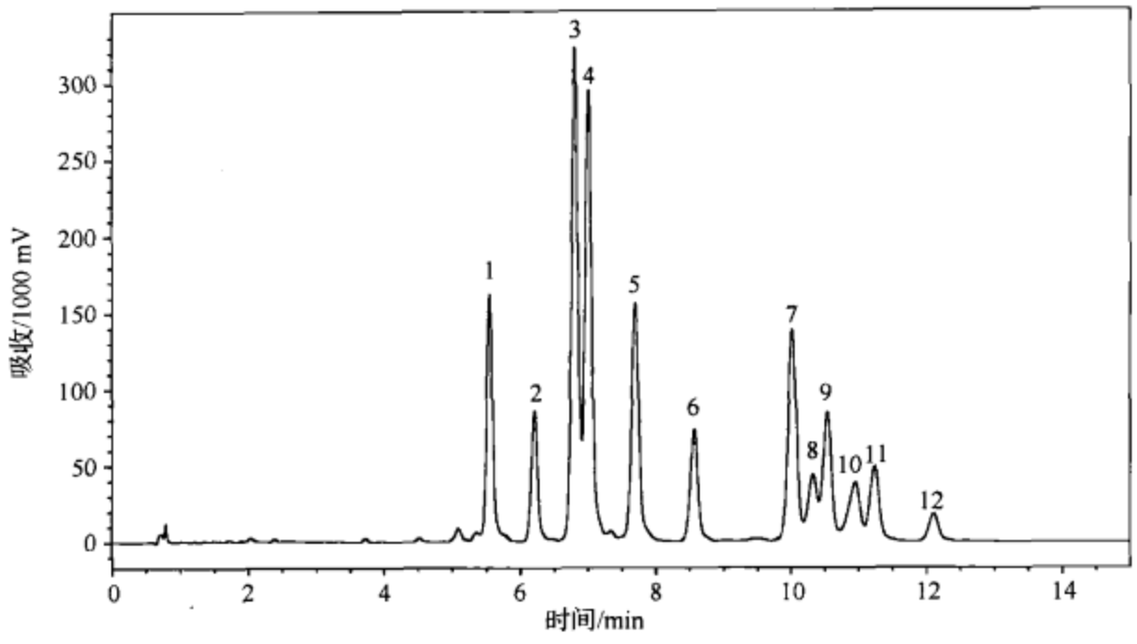


图 6.4　UPLC 分析色谱图

系统：Agilent 1290；色谱柱：Waters ACQUITY UPLC® BEH shield RP-C18，1.7 μm，2.1 mm×100 mm；柱温：40 ℃；检测波长：290 nm；溶剂系统：乙腈/0.1% 甲酸水溶液；流速：0.4 mL·min^{-1}；梯度：48%～55%（乙腈）0～15 min

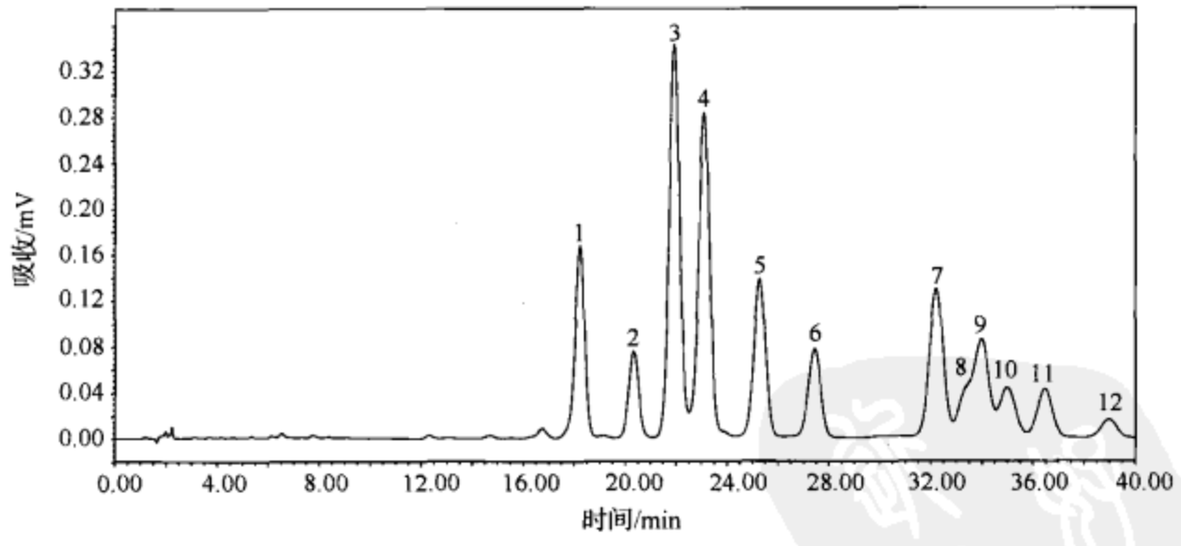


图 6.5　HPLC 分析色谱图

系统：Waters 2695 系统；色谱柱：Waters Symmetry® RP-C18，5 μm，4.6 mm×150 mm；柱温：40 ℃；检测波长：290 nm；溶剂系统：乙腈/0.1% 甲酸水溶液；流速：1.0 mL·min^{-1}；梯度：48%～55%（乙腈）0～40 min

6.2　液相色谱-质谱联用技术(LC-MS，LC-MS/MS)的应用

高效液相色谱虽然是复杂天然产物分析和分离的强有力工具，但其本身并不

能提供所分析或分离化合物的分子特征信息。质谱不仅能够提供化合物的相对分子质量的信息，而且可以通过碎片离子提供关于分子结构的丰富信息。高效液相色谱与质谱联用，不仅可以体现液相色谱的强大分离能力，同时还可以得到色谱峰所对应化合物的质谱特征信息。天然产物化学家可以借助该技术快速甄别已知化合物，避免重复分离已知成分，达到对未知化合物进行跟踪分离的目的。

6.2.1 越南百部 *Stemona cochinchinensis* 中已知生物碱成分的快速甄别

百部生物碱是百部科百部属植物的特征性化学成分，目前从该属植物中已经分离得到大约 100 个生物碱成分，其中大多数生物碱具有吡咯并[1,2-a]氮杂萘骨架结构[8]。由于百部生物碱成分受品种、地点、生长环境等因素影响很大，即使是不同地点采集同一品种，其中的次生代谢产物尤其是生物碱成分的差别也非常大[9]。液质联用技术为掌握百部中生物碱成分随不同条件变化的规律提供了很好的方法。

研究人员对已分离得到的化合物加以整理，对它们的质谱裂解规律进行总结，通过液质联用技术，优化色谱条件，以液相色谱的保留时间，以及化合物的一级和二级质谱图为基础参数，建立已知生物碱成分的 LC-MS/MS 数据库。在此基础上，选择合适的总生物碱提取物，在相同的色谱条件下进样分析，获得提取物中主要组分的保留时间与质谱参数，将这些数据与数据库中的基础数据进行自动匹配，快速鉴定主要组分的化学结构。

以越南产百部品种 *Stemona cochichinesis* 为例。图 6.6(下)为该百部品种总生物

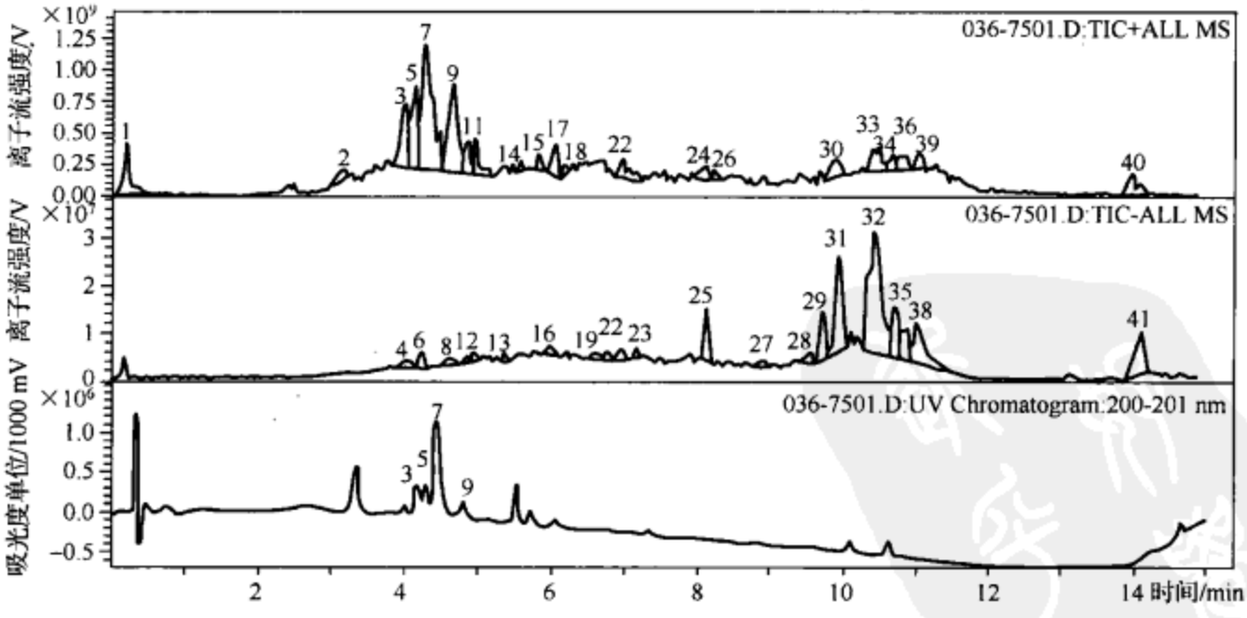


图 6.6 *Stemona cochichinesis* 的总生物碱提取物 LC-MS 分析图

(上)正总离子流图；(中)负总离子流图；(下)紫外 200 nm 检测的 HPLC 图。HPLC 系统：Agilent 1100；色谱柱：Merck LichroCART 55-2 RP 18e，3 μm；柱温：35 ℃；检测波长：200 nm；溶剂系统：乙腈/0.05% 甲酸水溶液；流速：0.5 mL·min^{-1}；梯度：0～100%（乙腈）0～9.5 min，100%（乙腈）9.5～12.2 min，0%（乙腈）12.3～15 min。质谱系统：Bruker Esquire3000 Plus

碱提取物在紫外 200 nm 检测的色谱图，图中可以观察到如 3、5、7、9 等主要峰。研究人员分别提取了这些峰的液相和质谱数据。将以上获得的数据与已知生物碱数据库匹配，其中峰 3、5、6、7 为已知生物碱成分，而峰 9 为未知的生物碱成分(图 6.7)。

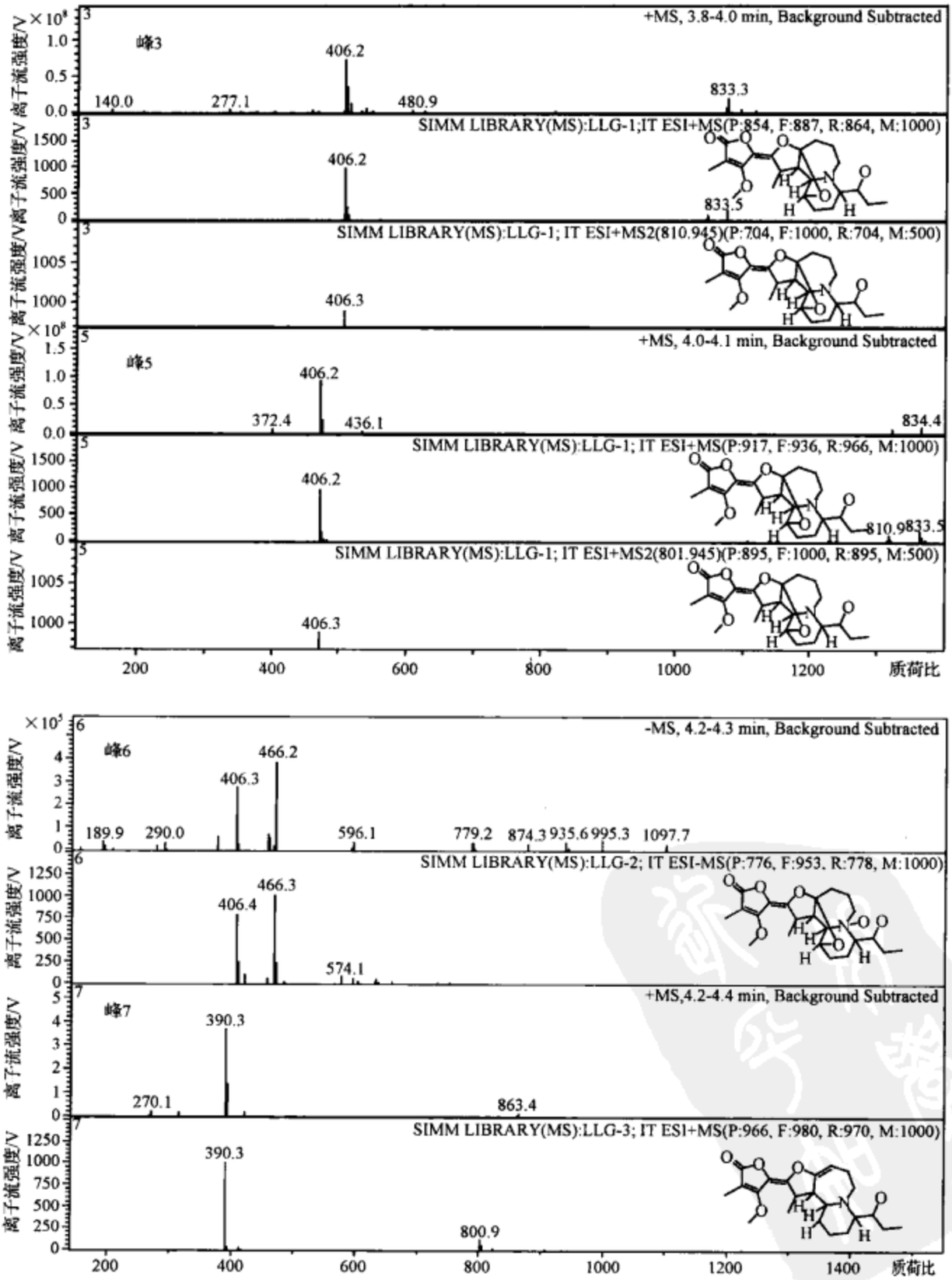


图 6.7　数据库自动匹配色谱峰 3、5、6、7 的图谱

通过以上的快速甄别，利用 LC-MS 作为检测的工具之一，研究人员有目的地对该提取物进行了快速分离，得到了一系列新生物碱成分[10, 11]。

6.2.2 越南百部 *Stemona saxorum* 中生物碱成分的快速分析鉴定

大多数百部生物碱具有吡咯并[1,2-a]氮杂萘骨架结构，但有一小部分百部生物碱具有吡啶并[1,2-a]氮杂萘骨架。该类骨架于 2003 年首次报道，目前仅从越南和泰国的百部品种中分离得到[12, 13]。研究人员运用传统方法对越南产的一个百部品种 *Stemona saxorum* 进行了系统的植物化学研究，从中获得了 5 个吡啶并[1,2-a]氮杂萘骨架类型的生物碱[14]。为了对该类生物碱有更深入的认识、发现可能的新化合物，研究人员综合运用多级电喷雾质谱（ESI/MS^n）技术和 LC-MS/MS 技术，对 *Stemona saxorum* 的总生物碱提取物中的化学成分进行了快速分析鉴定[15]。

研究人员首先以分离获得的 5 个吡啶并[1,2-a]氮杂萘骨架类型的生物碱为参考化合物（图 6.8），通过 ESI/MS^n 对这 5 个化合物的 ESI 质谱裂解行为进行了研究，获得该类化合物的质谱裂解规律，然后应用 HPLC-MS^n 的方法，从 *Stemona saxorum* 的总生物碱提取物的 LC-MS 的正离子流图谱中（图 6.9），提取对应生物碱的离子流峰，快速鉴别了 41 个化合物，其中具有吡啶并[1,2-a]氮杂萘骨架类型的生物碱 12 个，4 个为具有新相对分子质量的生物碱。该方法简便灵敏，尤其适合复杂天然提取物中的微量成分的研究。在具有一定研究基础的前提下，可以快速甄别已知化合物，发现未知化合物，从而指导有目的的分离。

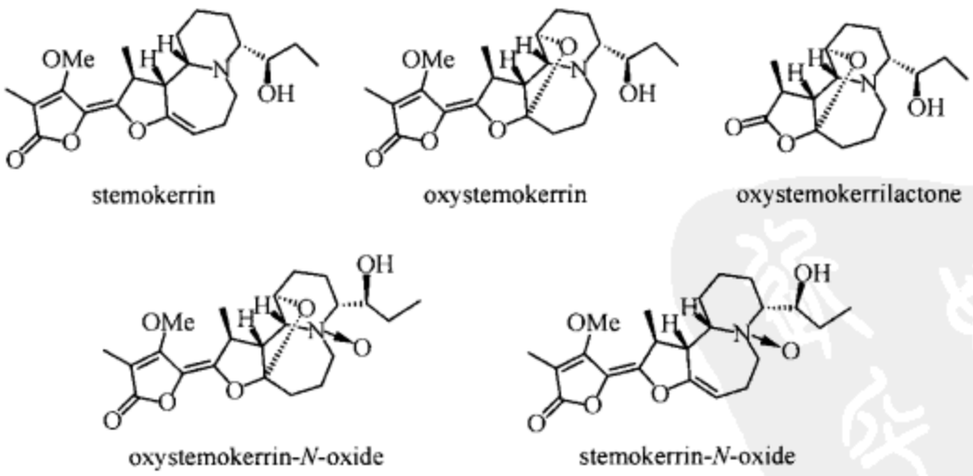


图 6.8 5 个吡啶并[1,2-a]氮杂萘骨架类型的生物碱

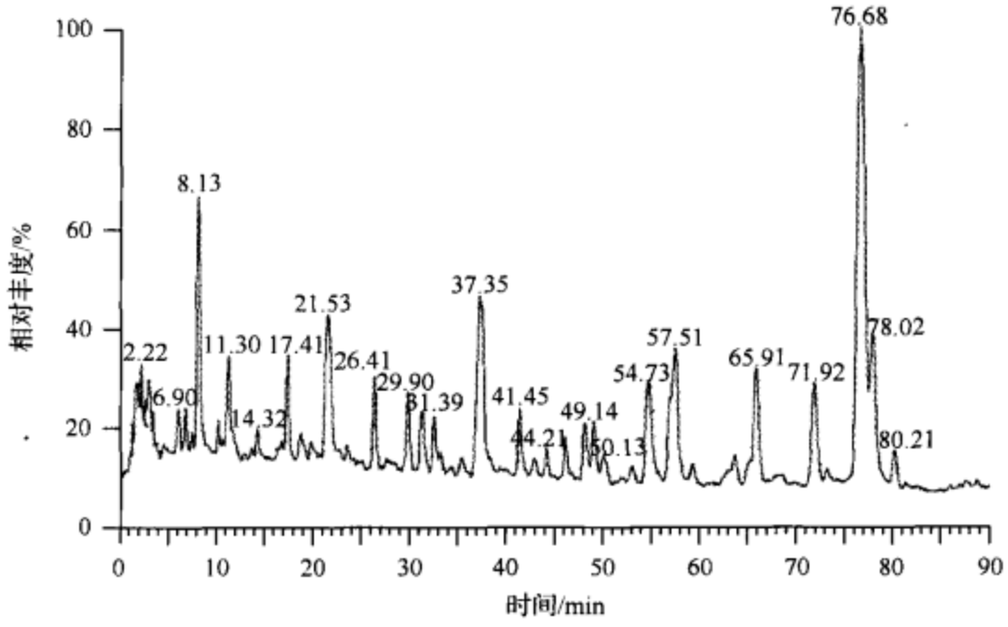


图 6.9　*Stemona saxorum* 的总生物碱提取物的 LC-MS 的正离子流图谱

色谱系统：Agilent HP 1100；色谱柱：Waters XBridge TM C18，3.5 μm，3.0 mm×100 mm；柱温：25 ℃；进样体积：15 μL；流动相：水/乙腈（0.1% 氨水）；流速：0.3 mL·min^{-1}；梯度：20%（乙腈）0～5 min；20%～40%（乙腈）5～80 min；40%～55%（乙腈）80～90 min。质谱系统：LCQ Deca 离子阱质谱；喷雾电压：4.5 kV；毛细管温度：275 ℃；鞘流气：氮气；全扫描：50～800 质荷比

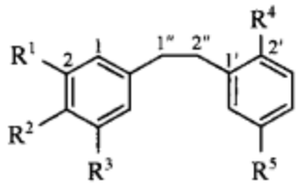
6.3　液相色谱-核磁共振联用（LC-NMR）技术的应用

核磁共振技术（NMR）可以给出丰富的有机化合物结构信息，而且能够区分大部分化合物立体异构体、构象异构体和光学异构体，在给定化合物相对分子质量的情况下，可以鉴定一个新化合物的结构。将高效液相色谱与核磁共振技术有机结合，可用于分析鉴定微量复杂混合物成分的化学结构。经过近二十年的发展，液相色谱-核磁共振技术已经解决了高效液相色谱和核磁共振波谱连接、核磁共振检测灵敏度低、溶剂峰抑制和氘代试剂替代等技术难题，并且与液相色谱-质谱联用技术实现优势互补，在天然产物混合物成分的结构鉴定中起到了不可替代的作用[16～24]。

下面以直立百部中联苄类化合物的分离鉴定为例来介绍液相色谱-核磁共振联用技术的应用。

联苄类化合物作为百部中一类主要的非生物碱成分，化合物结构之间差异小，成分复杂，单个化合物分离难度较大。在对直立百部（*Stemona sessilifolia*）的系统分离中，研究人员通过综合运用 LC-DAD-MS，LC-UV-NMR 和离线的 HR-EIMS 技术对直立百部中一个富含联苄类化合物的组分进行了快速的分离鉴定[25]。

首先，研究人员利用 LC-DAD-MS 检测到了一个富含联苄类化合物的组分。为了快速鉴定这一组分中的化学成分，研究人员应用 LC-UV-NMR 的停流技术模式对该组分进行分析(图 6.10)，用氘代水和氘代乙腈做流动相，采用 WET(water suppression enhanced through T_1 effects)技术压制溶剂峰，流速为 2.0 mL·min^{-1}，在线获得了比较理想的 4 个主要联苄化合物的^{1}H NMR，^{1}H-^{1}H COSY 和 NOESY数据(表 6.1)。



6-8 R^1, R^3=OH; R^2=Me; R^4, R^5=H
6-9 R^1, R^3=OH; R^2=Me; R^4=OMe; R^5=H
6-10 R^1, R^5=OH; R^2=H; R^3, R^4=OMe
6-11 R^1, R^3=OH; R^2=H; R^4, R^5=OMe

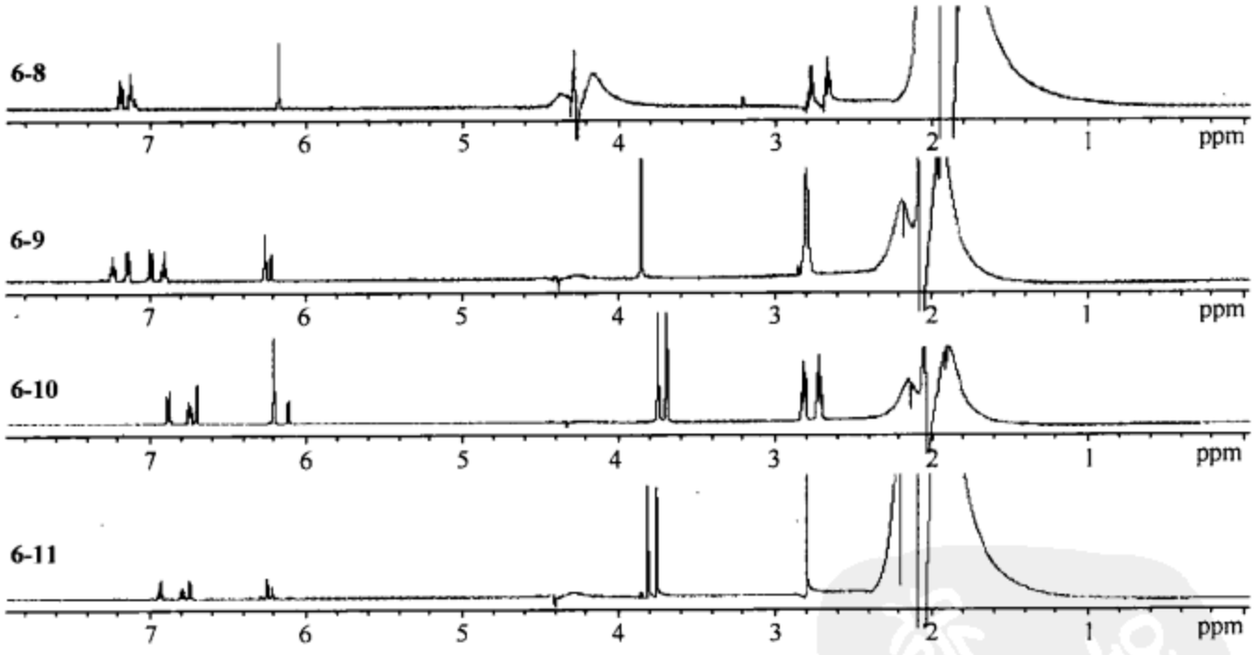


图 6.10 停流模式下获得的直立百部中化合物 **6-8**～**6-11** 的 LC-^{1}H NMR 图谱
具体仪器参数见文献[25]

表 6.1 停流模式下获得的化合物 6-8～6-11 的氢谱 (600 MHz) 数据 (δ/ppm, J/Hz)

No	6-8	6-9	6-10	6-11
2	6.20 s	6.28 s	6.28 br s	6.27 br s
4			6.28 br s	6.24 br s
6	6.20 s	6.28 s	6.29 br s	6.27 br s
2′	7.13 m		6.72 d (2.9)	

续表

No	6-8	6-9	6-10	6-11
3′	7.21 m	6.94 dd (7.3, 7.2)		6.98d (8.5)
4′	7.15 m	7.26 dd (8.0, 7.8)	6.76 dd (8.7,2.9)	6.83 dd (8.5, 2.8)
5′	7.21 m	7.02 br d (7.7)	6.90 d (8.7)	
6′	7.15 m	7.17 br d (7.3)		6.77 d (2.8)
1″	2.67 m	2.81 m	2.76 m	2.79 br s
2″	2.79 m	2.81 m	2.83 m	2.79 br s
5-OMe			3.71 s	
2′-OMe		3.86 s	3.76 s	3.81 s
5′-OMe				3.76 s

然后，根据 LC-UV-NMR 的分析结果对组分中的主要成分分别进行收集，用离线的 HR-EIMS 获得它们的精确质量数，得到准确的分子式。结合分子式和获得的核磁数据，研究人员快速鉴定出化合物 **6-8** 和 **6-9** 均为已知化合物，而根据化合物 **6-10** 和 **6-11** 液相出峰时间（分别为 15.89 min 和 19.69 min）及相同的加氢准分子离子峰（均为 m/z 275），判断应为一对同分异构体。氢谱和高分辨质谱显示二者均为四取代的联苄化合物，取代基包括两个甲氧基和两个羟基基团。在进一步的 NOESY 实验中，化合物 **6-10** 中的一个甲氧基（δ_H 3.71）与 H-4 和 H-6 位有相关信号，说明取代在 C-5 位，另外一个甲氧基（δ_H 3.76）与 H-3′ 和 H-2″有相关信号，说明取代在 C-2′位，同时可以推断 C-3 和 C-3′位应由羟基取代，因此化合物 **6-10** 鉴定为 3,3′-二羟基-5,6′-二甲氧基联苄。而化合物 **6-11** 的 NOESY 相关信号出现在一个甲氧基（δ 3.81）与 H-2″ 和 H-3′之间，以及另外一个甲氧基（δ 3.76）与 H-4′和 H-6′之间，说明两个甲氧基分别连接在 C-2′和 C-5′位，两个羟基分别取代在 A 环的 C-3 和 C-5 位。所以，化合物 **6-11** 鉴定为 3,5-二羟基-2′,5′-二甲氧基联苄。化合物 **6-10** 和 **6-11** 经鉴定均为新化合物。为进一步获得更多的信息，研究人员利用半制备 HPLC 柱，参照上述色谱条件，定向分离得到了这两个新化合物，通过各种波谱实验，确证了这两个化合物的结构，并归属了化合物所有的氢和碳信号。

LC-NMR 联用技术可以获得复杂提取物的初步信息，有助于了解其大致成分和性质。由于该技术可以避免不必要的分离步骤，所以特别适合成分复杂、样品量较少的植物提取物研究。LC-NMR 与 LC-MS^n 结合使用，可获得更全面的数据，有助于快速识别已知化合物和进行新化合物结构研究。随着技术的进步，HPLC-NMR 在天然产物分析中逐渐显示出高效、快速、微量的优势，今后将会对天然产物研究产生重大影响。

6.4 液相色谱-圆二色谱在线联用技术(LC-CD)确定光学异构体的绝对构型

在天然产物的结构鉴定中,绝对构型的确定仍是极富挑战性的工作。传统的方法通常要求首先将化合物分离纯化,然后再通过如 CD、Mosher 法(针对含羟基官能团的化合物)等来解决化合物的立体化学问题。近来,研究人员通过 LC-CD 在线联用技术,并结合计算机辅助计算的方法,成功地解决了在线快速鉴定化合物绝对构型的问题,为分离难度大,甚至在室温下互变的对映异构体的绝对构型的鉴定提供了解决的方法。

6.4.1 细花百部中苯乙基苯醌二聚体立体构型的确定

细花百部(*Stemona parviflora*)为仅产于我国海南的百部品种。研究人员在系统的化学成分研究中获得了一类新骨架成分——苯乙基苯醌二聚体 parvistemin A～parvistemin D[26]。该类二聚体的两个单体通过 C—C 键连接,由于邻近基团的空间位阻使单键的自旋受到阻碍,从而产生旋转对映异构现象(atropisomerism),形成一对光学异构体。该类二聚体在植物中含量非常低,而且异构体之间化学和物理性质非常接近,仅在氢谱和碳谱的某些位置上信号存在极小的差异,分离难度极大。虽然通过一维和二维的波谱技术确定了这类联苯类化合物的平面结构,但是其中的轴手性通过常规的手段却难以解决。因此,研究人员通过优化色谱条件,采用手性 HPLC 柱对该类二聚体实现了基线分离,并结合在线 CD 检测,首次检测到了两个轴手性对映异构体的存在,并得到各自的 CD 谱图,然后以量子化学辅助 CD 计算,最终确定了它们各自的立体构型(图 6.11)。

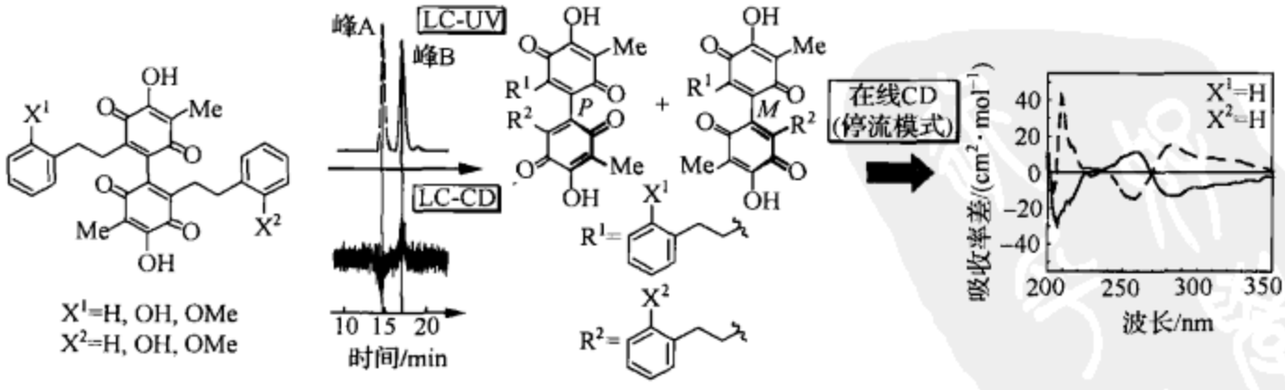


图 6.11 利用 LC-CD 在线联用技术确定细花百部中苯乙基苯醌二聚体立体构型流程图

6.4.2　石仙桃中 9,10-二氢菲类化合物二聚体绝对构型的确定

二聚 9,10-二氢菲类衍生物是从石仙桃(*Pholidota chinensis*)中分到的一系列同样存在着旋转对映异构现象的化合物[27, 28]。这些化合物由一个 9,10-二氢菲与另一个菲类、9,10-二氢菲或另一个芪类通过碳-碳或者碳-氧-碳键聚合而成。其中由碳-碳键相连的二聚体分子,从它们的结构上推测,如果存在足够的空间位阻,分子中应该存在着手性轴,但是在文献中零星报道的这类化合物均未涉及其中手性轴绝对构型的确定[29, 30]。

研究人员首先对该类化合物的联苯轴的扭转模式进行几何扫描,并运用半经验 P3 法计算化合物的旋转能垒[31],结果发现邻位三取代和四取代的部分化合物的旋转能垒接近或大于 20 kcal · mol^{-1},说明这些化合物可能存在旋转对映异构现象。通常情况下,旋转能垒远小于该数值的化合物,由于单体可以围绕连接键自由旋转,可以认为不存在光学异构的现象。而上述邻位三取代和四取代的化合物,虽然从理论上推测应该存在光学异构体,但是化合物在氢谱和碳谱上均只表现出一套核磁信号,旋光值测定结果也为零或者可以忽略不计,这说明这些化合物即使存在稳定的对映异构体,也应该是以消旋体的形式存在的。

以化合物 gymconpin C(**6-12**)和 flavanthrin(**6-13**)为例(图 6.12)[27],其旋转能垒分别为 20.0 kcal① · mol^{-1} 和 25.0 kcal · mol^{-1},说明可能存在着阻转异构体。研究人员将同时含有这两个化合物的组分在分析型手性 HPLC 柱进行分析检测(图 6.13),与计算预测一致,gymconpin C 和 flavanthrin 各自的两个阻转异构体都能够实现基线分离并在 LC/CD-LC/UV 上在线检测到(图 6.14)。当 UV/CD 达到最大时,采用停流技术对化合物进行扫描,得到相对应的 CD 谱图(图 6.15),然后与计算所得的 CD 谱相比较,从而确定了 gymconpin C 和 flavanthrin 的对映异构体的绝对构型。

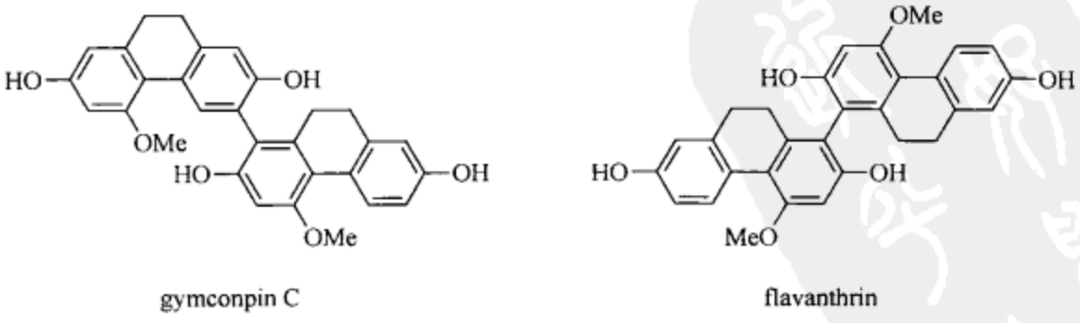


图 6.12　从石仙桃中分离得到的 9,10-二氢菲二聚体 gymconpin C 和 flavanthrin 的化学结构

① kcal 为非法定单位,1 kcal=4180J。

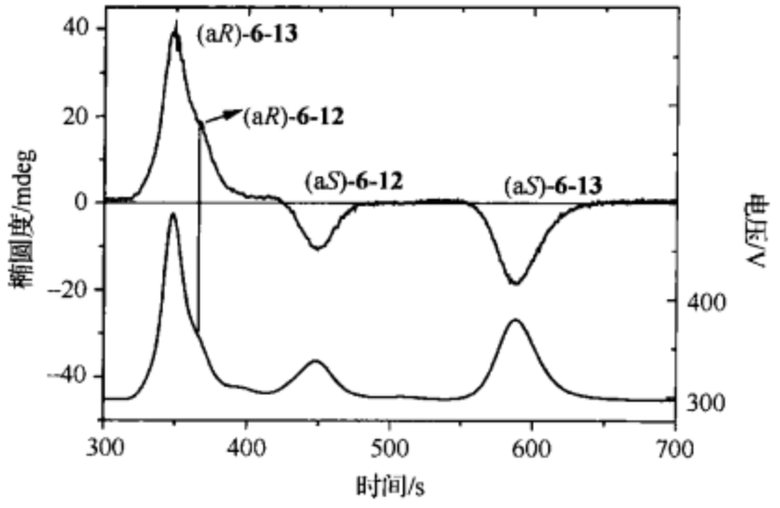


图 6.13 同时含化合物 gymconpin C 和 flavanthrin 的组分的 LC/CD(上)和 LC/UV(下)分析色谱图
具体色谱条件见文献[27]

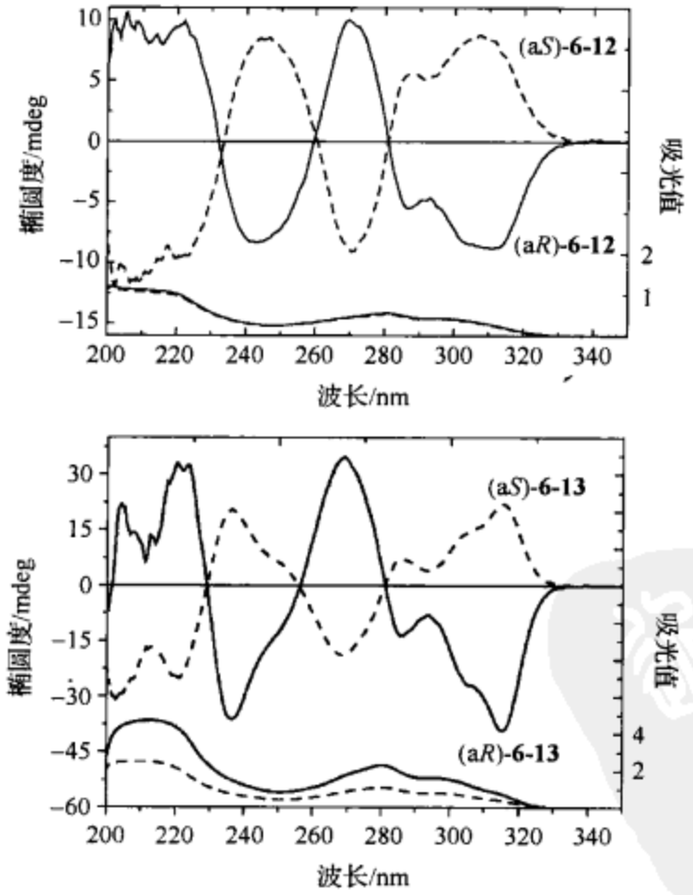


图 6.14 (上)化合物 gymconpin C 两个对映异构体的 CD 图谱(虚线为 aS 构型,实线为 aR 构型,溶剂为环己烷/乙醇 7∶3);(下)化合物 flavanthrin 两个对映异构体的 CD 图谱(虚线为 aS 构型,实线为 aR 构型,溶剂为环己烷/乙醇 7∶3)

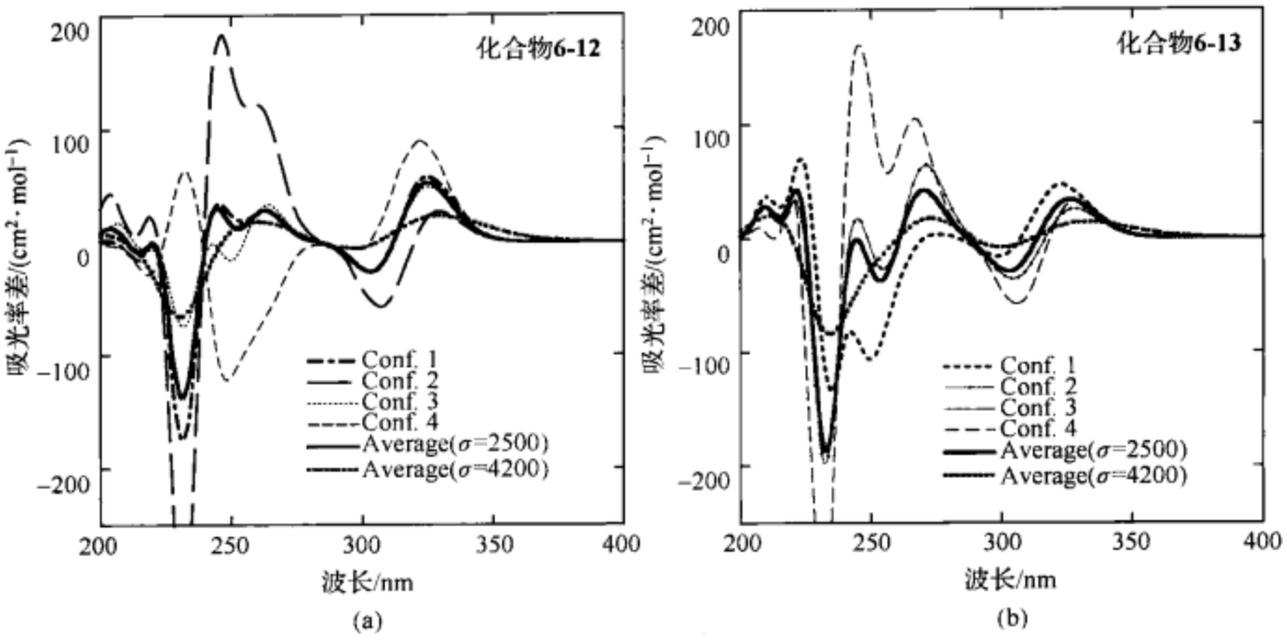


图 6.15　化合物 gymconpin C (a)和 flavanthrin (b)的各种不同 MP3 结构通过 ZINDO 计算得到的 CD 谱以及在室温条件下根据 DFT 能量得到的各自的 Boltzmann 加权平均值。在不同的高斯带宽下(σ=2500 和 4200 cm^{-1}半高宽),每个化合物都表现出两条平均的谱线

参 考 文 献

[1] Ge F, Ke C Q, Tang W et al. Isolation of chlorogenic acids and their derivatives from *Stemona japonica* by preparative HPLC and evaluation of their anti-AIV (H5N1) activity *in vitro*. Phytochem Anal, 2007, 18: 213.

[2] Clifford M N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden. J Sci Food Agric, 2000, 80: 1033.

[3] Santos M D, Martins P R, Santos P A et al. Oxidative metabolism of 5-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), a bioactive natural product, by metalloporphyrin and rat liver mitochondria. Eur J Pharm Sci, 2005, 26: 62.

[4] Xiang T, Xiong Q B, Ketut A et al. Studies on the hepatocyte protective activity and the structure-activity relationships of quinic acid and caffeic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera bournei*. Planta Med, 2001, 67: 322.

[5] Stavric B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. Food Chem Toxicol, 1994, 32: 79.

[6] Chang C W, Lin M T, Lee S S et al. Differential inhibition of reverse transcriptase and cellular DNA polymerase-α activities by lignans isolated from Chinese herbs, *Phyllanthus myrtifolius* Moon, and tannins from *Lonicera japonica* Thunb and *Castanopsis hystrix*. Antiviral Res, 1995, 27: 367.

[7] 左建平,赵维民,杨以阜等. 绿原酸的医学用途及它的制剂:中国,ZL03129007. 8. 2004-09-01.

[8] Greger H. Structural relationships, distribution and biological activities of *Stemona* alkaloids. Planta Med, 2006, 72: 99.

[9] Jiang R W, Hon P M, Zhou Y et al, Alkaloids and chemical diversity of *Stemona tuberosa*. J Nat Prod, 2006, 69: 749.

[10] Lin L G, Tang C P, Dien P H et al. Cochinchistemonine, a novel skeleton alkaloid from *Stemona co-*

chinchinensis. Tetrahedron Lett, 2007, 48:1559.

[11] Lin L G, Dien P H, Tang C P et al. Alkaloids from the roots of *Stemona cochinchinensis*. Helv Chim Acta, 2007, 90:2167.

[12] Kaltenegger E, Brem B, Mereiter K et al. Insecticidal pyrido[1,2-a]azepine alkaloids and related derivatives from *Stemona* species. Phytochemistry, 2003, 63:803.

[13] Mungkornasawakul P, Pyne S G, Jatisatienr A et al. Phytochemical and larvicidal studies on *Stemona curtisii*: structure of a new pyrido[1,2-a]azepine *Stemona* alkaloid. J Nat Prod, 2004, 67:675.

[14] Wang Y Z, Tang C P, Dien P H et al. Alkaloids from the roots of *Stemona saxorum*. J Nat Prod, 2007, 70:1356.

[15] Peng S Y, Shi T, Wang Y Z et al. Rapid structural determination of *Stemona* alkaloids in crude extract of *Stemona saxorum* by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization coupled with tandem mass spectrometry. Rap Comm Mass Spectrom, 2009, 23:3621.

[16] Watanabe N, NIKI E. Direct-coupling of FT-NMR to high performance liquid chromatography. Proc Jpn Acad Ser B, 1978, 54:194.

[17] Bayer E, Albert K, Nieder M et al. On-line coupling of high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance. J Chromatogr A, 1979, 186:497.

[18] Dorn H C. ^{1}H NMR: a new detector for liquid chromatography. Anal Chem, 1984, 56:747.

[19] Laude D A, Wilkins C L. Nuclear magnetic resonance for the on-line identification of liquid chromatography eluents. Trends Anal Chem, 1986, 5:230.

[20] Griffiths L. Optimization of NMR and HPLC conditions for LC-NMR. Anal Chem, 1995, 67:4091.

[21] Spraul M, Freund A S, Nast R E et al. NMR sensitivity for LC-NMR-MS using a cryoflow probe: application to the analysis of acetaminophen metabolites in urine. Anal Chem, 2003, 75:1536.

[22] Jaroszewski J W. Hyphenated NMR methods in natural products research, Part 1: direct hyphenation. Planta Med, 2005, 71:691.

[23] Exarchou V, Krucker M, van Beek T A et al. LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis. Magn Reson Chem, 2005, 43:681.

[24] Kovacs H, Moskau D, Spraul M. Cryogenically cooled probes-a leap in NMR technology. Progr Nucl Magn Res Spectr, 2005, 46:131.

[25] Yang X Z, Yang Y P, Tang C P et al. Rapid identification of bibenzyls of *Stemona sessilifolia* using hyphenated LC-UV-NMR and LC-MS methods. Chem Res Chin Univ, 2007, 23:48.

[26] Yang X Z, Gulder T A M, Reichert M et al. Bringmann G. Parvistemins A-D, a new type of dimeric phenylethyl benzoquinones from *Stemona parviflora* Wright. Tetrahedron, 2007, 63:4688.

[27] Yao S, Tang C P, Ye Y et al. Stereochemistry of atropisomeric 9,10-dihydrophenanthrene dimers from *Pholidota chinensis*. Tetrahedron Asymm, 2008, 19:2007.

[28] Yao S, Tang C P, Li X Q et al. Phochinenins A-F, dimeric 9,10-dihydrophenanthrene derivatives from *Pholidota chinensis*. Helv Chim Acta, 2008, 91:2122.

[29] Matsuda H, Morikawa T, Xie H H et al. Antiallergic phenathrenes and stilbene from the tubers of *Gymnadenia conopsea*. Planta Med, 2004, 70:847.

[30] Majumder P L, Banerjee S. Structure of flavanthrin, the first dimeric 9,10-dihydrophenanthrene derivative from the orchid *Eria flava*. Tetrahedron, 1988, 44:7303.

[31] Stewart J J P. Optimization of parameters for semi-empirical methods Ⅰ. Method. J Comput Chem, 1989, 10:209, ibid, 221.

（唐春萍　叶　阳）

第 7 章　高效快速中压制备色谱

高效快速中压制备色谱(high-performance flash chromatography，HPFC)是通过恒流泵输送流动相产生压力，或用泵输送溶剂、通过压缩惰性气体提供压力，加速流动相通过预填充柱子的制备型液相色谱。柱压一般介于 50～150 psi(1 psi＝6 894.76 Pa，下同)。吸附剂颗粒大小一般在 40～60 μm，孔径约 60 Å。柱效(理论塔板数)一般高于传统的低压柱，样品色谱带宽度也窄得多。自 HPFC 问世以来，自动快速纯化系统的生产厂家越来越多，其中包括 Biotage、Yamazen、Intechim、Teledyne ISCO、Buchi、Agela(天津博纳艾杰尔)、Lisui(苏州利穗)等公司。仪器主要包括主控机、泵和自动收集器三大部分(以 Biotage 的 Horizon™仪器为例，见图 7.1)。所有仪器都配备紫外、紫外-可见检测仪，少数还配有蒸发光散射检测(ELSD)仪。洗脱程序的运行由电脑控制，流分被自动收集。电脑屏幕显示的峰型和试管编号相对应，目标化合物在所收集的各流分中的位置一目了然。用户可以根据编号，找到相对应的试管。多数仪器的实验数据和图谱在层析过程完成后自动保存。与常规的色谱柱相比，运用 HPFC 分离样品具有方便、快捷、安全、分得的样品纯度高、重现性好的特点，而且分离过程全自动化。洗脱剂使用量少，流速快而恒定，一般只需要 20 min 左右就能完成大量样品的纯化，分得的化合物纯度可高达约 95%。

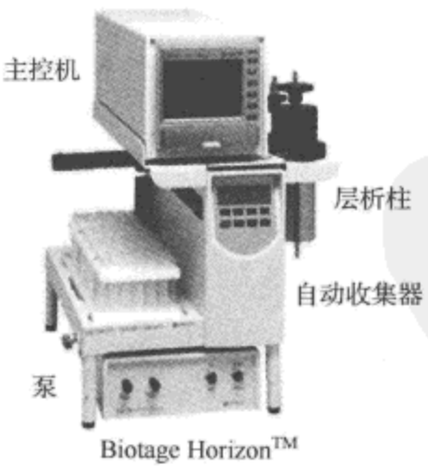


图 7.1　高效快速中压制备色谱仪

传统的分离方法，如反复进行低压柱色谱等(柱效一般比较低，柱压＜50 psi)，往往得率不高而且费时、费力、费溶剂。特别是对于某些不稳定化合物，多次上柱问题更大。另外，为了提高制备效率，传统的制备色谱常常是在样品超载的情况下

进行，洗脱流速慢而且时常不恒定，导致色谱峰变宽、分辨率低、分离效果差。

虽然高效液相色谱(HPLC)的分离效果好，但价格昂贵，而且单次纯化样品载样量小，因此一般多用于样品最后阶段的纯化。虽然 HPFC 的分辨率不如 HPLC 高，但是 HPFC 的设备及色谱耗材价廉，而且能够快速分离大量样品(几毫克到几百克)，因此 HPFC 在实验室和工业上广泛用于大量样品的浓缩和纯化。在很多情况下，HPFC 已经能够满足大量制备的要求。如果对样品的最后纯度要求特别高，则仍需要使用 HPLC 进行纯化。通常这个阶段的样品已经比上 HPFC 柱之前的混合物容易分得多了。

因为吸附剂颗粒越小、越均匀，柱效和分辨率就越高，所以现在有将吸附剂颗粒越做越小的趋势(15～40 μm)。但是泵和色谱柱的压力会随之相应增加，特别是在使用反相柱时，由于高黏度溶剂(如甲醇和水)的使用，柱压可能会超过 500 psi。Intechim 公司选用 HPLC 高压泵输送流动相通过各种小颗粒(15 μm 或 30 μm)吸附剂预填充柱，最大流速可以达到 200 mL·min^{-1}，压力上限为 435 psi。

7.1 通过薄层色谱选择分离条件

薄层色谱是选择合适的洗脱剂的常用方法，特别是对等度洗脱柱色谱条件的选择和优化。为了能够有效地将薄层色谱条件模拟到柱色谱上，薄层板和色谱柱应尽量使用相同或非常相似的固定相，如相同的颗粒大小、形状、孔径、活度等。各厂家生产的多种色谱柱都配有相同固定相的薄层板，为分析和检测样品提供了方便。虽然如此，由于敞开的薄层色谱板上的固定相中含有黏合剂以及溶剂是通过毛细管作用向上展开，而快速柱色谱分离过程中溶剂主要是通过质量和压力在封闭的柱中向前推进，因此通过薄层色谱预测的柱色谱条件往往与实际结果有些偏差。

在寻找正相色谱展开剂时，应该多尝试几种比例和成分不同的混合溶剂。首先可以尝试高极性/低极性的体积比为 1∶3 的混合溶剂，若色谱斑点有分开的迹象，则进一步调整溶剂的比例(改变溶剂强度)使待分离化合物的比移值(R_f)在 0.10～0.35，否则应当考虑更换溶剂。若 R_f 太大(>0.5)，待分离化合物就会被过快地洗脱出来，造成分离效果差；若 R_f 太小，样品的柱保留时间则太长。

溶剂强度直接影响到化合物的 R_f 和分辨率。常见洗脱剂的溶剂强度见表 7.1[1]。可根据混合溶剂中各组分所占的比例计算溶剂的强度：

混合液的溶剂强度 =(溶剂 A% ×溶剂 A 的强度 + 溶剂 B%×溶剂 B 的强度 + …)/100

表 7.1　常用洗脱剂的溶剂强度

溶剂	强度	溶剂	强度
甲醇	0.95	二氯甲烷	0.42
乙醇	0.88	氯仿	0.40
异丙醇	0.82	乙醚	0.38
乙腈	0.65	甲苯	0.29
乙酸乙酯	0.58	己烷	0.01
四氢呋喃	0.57	庚烷	0.01
丙酮	0.56	异辛烷	0.01

由于 R_f 与样品在色谱柱上的洗脱时间成反比，而洗脱体积数（或柱体积数，column volumes，CV）与样品在柱上的洗脱时间成正比，因此当将薄层色谱展开剂条件模拟到制备柱洗脱条件时，使用柱体积数。柱体积是色谱柱的空体积，相当于洗脱在柱上没有任何吸附力的样品所需的溶剂体积。生产预填充柱的厂家基本上都会提供柱体积的数据。柱体积数与 R_f 之间的转换关系是：$CV = 1/R_f$。CV 是把某一成分从柱中洗脱出来所需要柱体积的数目，与柱子的大小无关。例如，一个 $R_f = 0.2$ 的化合物理论上需要相当于 5 倍柱体积（5 CV）的溶剂从色谱柱上洗脱下来。更多的比移值和柱体积数之间的转换见表 7.2。

表 7.2　比移值和柱体积数的转换

比移值	柱体积数	比移值	柱体积数
0.90	1.11	0.35	2.86
0.80	1.25	0.30	3.33
0.70	1.43	0.25	4.00
0.60	1.67	0.20	5.00
0.50	2.00	0.15	6.67
0.40	2.50	0.10	10.00

合适的展开剂不仅使样品的 R_f 在 0.1～0.35（柱体积数 2.9～10），而且应当使化合物之间有较大的 ΔR_f。在具体操作中往往使用 ΔCV，而不是 ΔR_f 来预测混合物中的化合物在色谱柱中的分辨率。ΔCV 越大，分辨率就越高。当两个化合物的 $\Delta CV \geqslant 1$，一个好的溶剂系统就能够在 3～6 CV 将它们分开。如果样品的 R_f 为 0.10～0.35，但 ΔCV 很小，则应当考虑尝试其他具有相同的溶剂强度和不同选择性的溶剂系统。

在优化反相色谱展开剂条件时，一般先改变有机相与水相的比例，再考虑改变溶液的 pH，最后可考虑加入离子对试剂或其他试剂。

7.2 高效制备色谱条件的优化

一般首次粗分大量样品时，特别是对一些黏度较大的混合物，最好使用颗粒较大的固定相以提高洗脱速度。

为了提高分离样品的效率和纯品的得率，应尽量提高分辨率以及减少柱色谱的次数。若将两个相邻的化合物完全分开，则色谱峰的分辨率应该达到 1.5 左右[2]。分辨率与柱效、上样量和样品的保留时间等因素有关，分辨率越高就越容易分离得到纯品。在分离化合物时，主要可通过选择适当的固定相、调节洗脱剂的组分和比例以及缩短色谱时间等方法来提高分辨率。

常用的快速色谱固定相包括硅胶，氧化铝，硅藻土，各种离子交换、手性和反相色谱材料以及其他键合的固定相（如氰基、酰胺及二醇基键合的硅胶等）。如果样品易溶于己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷或丙酮，则首选正相色谱。由于氧化铝的两性特征，常被应用于需要特定 pH 范围（酸性、中性或碱性）的色谱。一般来说，硅胶对多数化合物分离效果好，而且价格便宜，因此仍被广泛使用。选择合适的色谱柱至关重要。并不是所有 230～400 目的硅胶柱都是一样的。一个柱子的性能与其中固定相颗粒的活性、pH、形状、大小、孔径、均匀程度和金属杂质的含量等有关。颗粒较小和均匀程度好的固定相柱效较高。很多厂家为了方便客户，提供了很多与其纯化系统相配备的色谱柱的信息，包括固定相材料的结构、纯度、颗粒大小、表面活度、柱空体积、柱尺寸和质量等。根据样品和柱子的具体情况，预填充柱可使用一次或重复使用多次。

常用的正相柱洗脱剂包括（环）己烷-乙酸乙酯、（环）己烷-丙酮、二氯甲烷-丙酮、二氯甲烷-甲醇、二氯甲烷-乙腈等。有时根据化合物的特性，可用含水的溶剂（如乙酸乙酯-异丙醇-水），含碱（如三乙胺、吡啶）的溶剂，含酸（如乙酸）的溶剂等来改善分离效果。常用的反相柱洗脱剂包括甲醇-水，乙腈-水等。选择合适的洗脱剂非常重要，不同配比的溶剂具有不同的洗脱能力。另外，如果样品在流动相中的溶解度不好，则在谱图中会出现毛刺峰。

在实际操作中，应当选择合适的洗脱速度，因为色谱带的宽度不仅与柱效有关，还与样品在色谱柱上的保留时间成正比。保留时间过长，则色谱带的宽度变大，分辨率会降低。洗脱速度过快，则样品和固定相之间不能充分相互作用，分辨率也会降低。一般厂家会对其生产的预装柱建议合适的洗脱流速。以不同大小的 Agela 预填充柱子为例，12 g 硅胶柱的建议流速为 15 mL · min^{-1}，80 g 硅胶柱的建议流速为 45 mL · min^{-1} 等。

载样量、洗脱剂的用量、洗脱流速以及单个试管收集体积主要由色谱柱的大小来决定。

为了达到较好的分离效果，一般上样量不超过固定相质量（几克到几十千克）的百分之一以及柱体积的百分之十。应尽可能用最少的溶剂溶解最大量的样品。若样品过载，则在谱图中会出现毛刺峰。另外，为了提高分离效果，在上样之前最好先润柱。润柱溶剂体积因预填充柱的大小而异。一般厂方会对不同规格的柱子建议选择不同的上样量和润柱溶剂体积。具体的上样量又因不同化合物柱体积数的差异（ΔCV）而不同。相同内径的色谱柱的上样量和润柱溶剂体积与柱子的长度成正比。以 Biotage 预填充硅胶柱为例[3]，列表（表 7.3）说明如下：

表 7.3　Biotage 预填充硅胶柱润柱溶剂体积和上样量一览表

预填充柱型号	柱大小 /(mm ID×cm L)	柱质量/g	柱体积 /mL	润柱溶剂 体积/mL	上样量/mg ΔCV=1	上样量/mg ΔCV=2	上样量/mg ΔCV=6
FLASH 12+S	12×7.5	4.5	6	12	4～20	20～100	100～200
FLASH 12+M	12×15	9	12	24	8～40	40～200	200～400
FLASH 25+S	25×7.5	20	24	48	15～80	80～400	400～800
FLASH 25+M	25×15	40	48	96	30～160	160～800	800～1600
FLASH 40+S	40×7.5	50	66	126	40～200	200～1000	1000～2000
FLASH 40+M	40×15	100	132	258	80～400	400～2000	2000～5000

洗脱剂的用量（柱体积数）可由样品的薄层色谱 R_f 计算得到。色谱柱越大，柱体积就越大，所耗费的溶剂量也就越多。

一般情况下，自动收集仪中每个试管中的流分最好不要超过色谱柱空体积的三分之一。另外，可以通过进一步减少每个流分收集体积的办法来获得高纯度的样品。

运行洗脱程序时，可采用等度洗脱、分步洗脱、梯度洗脱或分步梯度洗脱的方法将样品依次从色谱柱上洗脱下来。

当样品的 $\Delta CV \geqslant 2$ 时，可以考虑进行等度洗脱。为了达到理想的分离效果，不同的 ΔCV 对样品的 R_f 有不同的要求[4]。当 $\Delta CV = 10$ 时，样品的 R_f 一般应该在 0.1～0.3。如果以 X%极性溶剂为展开剂，其中一个化合物的 $R_f = 0.5$，则建议等度洗脱溶剂为 $1/4X$ 或 $1/5X$。当 $\Delta CV = 5$ 时，样品的 R_f 可以在 0.1～0.45。在理想条件下，柱色谱的峰形呈高斯曲线。但在实际操作中由于色谱材料不适合、颗粒不均匀或待分离化合物与固定相间的相互作用等各种因素的影响，各种峰形都有可能出现，往往需要更换色谱柱或在洗脱剂中添加某种试剂来改变峰形。

与等度洗脱相比，分步洗脱和梯度洗脱的分离效果一般要好一些。与分步洗脱相比，梯度洗脱的谱图峰型通常更窄一些。梯度洗脱优点较多，包括省时、溶剂用量小、样品流分少、分离效果好、得率高等。利用薄层板优化梯度洗脱条件时，主要是对两种不同极性溶剂的选择。混合物中各化合物的 R_f 应该在其中一种纯溶

剂(溶剂 A)中很小,而在另一种纯溶剂(溶剂 B)中很大。梯度洗脱通常由多个步骤组成。在梯度洗脱时,洗脱梯度应该从溶剂 A 到混合溶剂(溶剂 B 含量上升)再到溶剂 B 的顺序,在 n 个 CV 的流动相体积范围内完成。在输入柱子规格、流动相 A 与流动相 B 的比例、洗脱柱体积数后,仪器会自动生成洗脱梯度,用户可以根据需要对洗脱梯度进行添加或删除。用户可以根据需要设置洗脱流速、初始废液体积、收集规格或试管架类型、单个试管收集体积、运行单位(常用 CV)、柱体积、收集波长等洗脱参数。参数的设定也可参照厂方提供的建议数据或通过软件设定洗脱程序。例如,Teledyne Isco, Inc. 公司的自动快速纯化系统配有通过 R_f 计算线性梯度洗脱条件的软件程序,将混合物在两个不同的展开剂中进行薄层色谱,然后将两个薄层板上的 R_f(0.2～0.8)和相应的展开剂条件输入电脑中,软件就会设定出分离该样品所需的梯度洗脱程序。

7.3 高效制备色谱规模的缩小和放大

在使用 HPFC 系统时,经常会碰到大、小色谱柱之间换用的情况。无论是放大还是缩小色谱规模,都应该保持洗脱剂通过各色谱柱横截面的线性速度相同,因此需要改变洗脱剂的流速。洗脱流速和柱横截面面积成正比。在改变了色谱柱的直径后,为了对样品保持同样的分辨率,洗脱剂的用量(柱体积数)和柱空体积的比例必须保持恒定。为了便于色谱规模的缩放,现在多用柱体积代替时间作为运行单位。因此,无论使用多大的色谱柱,洗脱剂的用量(恒定的柱体积数)始终是由相应的柱体积决定的。其他的参数都可根据具体的缩放比例来设定。另外,同一台仪器既可用于正相柱色谱,也可用于反相柱色谱。无论是正相换反相,还是反相换正相,都需要用中介溶媒剂(如异丙醇)清洗管路。

7.4 通过 HPLC 优化洗脱条件

对水溶性化合物的分离,除了通过薄层色谱选择合适的分离条件外,也可以根据分析型 HPLC 的实验结果设置和优化 HPFC 的洗脱条件。首先以 100%溶剂 A(如水或缓冲液等)到 100%溶剂 B(如甲醇或乙腈等)的线性梯度对混合样品进行洗脱。找出更窄的适合样品分离的洗脱剂范围(如 X%到 Y%的溶剂 B),确保样品的保留时间大于 5 min。再用此梯度对混合物进行 HPLC 分析柱色谱。然后计算出目标化合物出峰时的溶剂比例,并根据这个数据在小型 HPLC 制备柱上进一步优化色谱条件。样品的柱体积数可通过如下公式计算:

$$\text{CV}=\text{样品的保留时间}/\text{空时间}$$

其中,空时间是洗脱在柱上没有任何吸附力的样品所需的时间。

最后将色谱条件放大，应用到大型制备柱上。

7.5　操作实例

Raman 等[5]利用 HPLC 分析柱（Novopak C-18）对柚皮芸香苷（narirutin，**7-1**）和柚皮苷（naringin，**7-2**）的混合物进行了梯度色谱分析。洗脱条件如下：

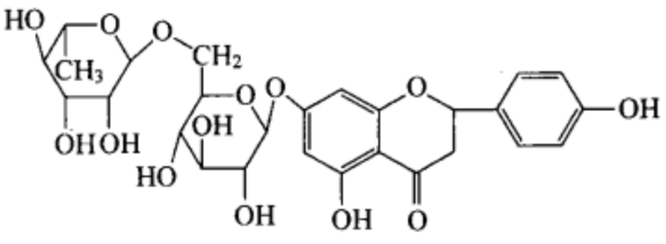
溶剂 A：10% MeCN/0.03 mol·L^{-1} H_3PO_4 水溶液

溶剂 B：24% MeCN/0.03 mol·L^{-1} H_3PO_4 水溶液

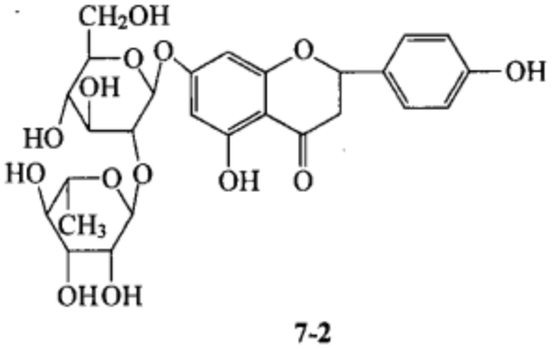
洗脱程序：100%溶剂 A 到 100%溶剂 B

洗脱时间：60 min

洗脱流速：1 mL·min^{-1}



7-1



7-2

HPLC 谱图中两个二氢黄酮苷的保留时间相差 4 min，经计算，洗脱浓度分别为 19% MeCN（柚皮芸香苷）和 20% MeCN（柚皮苷）。随后，Biotage 自动快速纯化系统被用来进行样品的小型制备（上样量 100 mg），采用 KP C18-HS 柱（12 mm ID×7.5 cm，颗粒大小 35～70 μm）进行摸索、优化制备条件。分步洗脱条件如下：

洗脱程序：以 19%～20%的 MeCN /0.03 mol·L^{-1} H_3PO_4 水溶液分步洗脱

洗脱剂柱体积数：每步 1 CV

洗脱流速：2.5 mL·min^{-1}

对样品分离的进一步放大是通过 KP C18-HS 柱（75 mm×30 cm，颗粒大小 35～70 mm，孔径 60 Å）来完成的，耗时 2 h。上样前先以 19%的 MeCN /0.03 mol·L^{-1} H_3PO_4 水溶液润柱。将 4 g 葡萄柚的二氢黄酮苷混合物溶解在 10 mL 甲醇/水（1∶1）的混合液中，上样后以 19%、20%、21% 和 22% 的 MeCN /0.03 mol·L^{-1} H_3PO_4 水溶液分步洗脱（每步用 1 CV），流速为 50 mL·min^{-1}。每步收集 10 个流分，每个流分 100 mL。经 HPLC 检测后，合并相同的流分。分别从流分 4～11 中得到柚皮芸香苷 273 mg，从流分 15～24 中得到柚皮苷 430 mg，纯度约 90%。

参考文献

[1] Sherma J. Flash chromatography: TLC for method development and purity testing of fractions. Encyclo-

pedia of Chromatography, 2010, 2: 874～877.

[2] Fair J D, Kormos C M. Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data. J Chromatogr A, 2008, 1211: 49～54.

[3] Biotage Inc. Horizon™ HPFC system operator's manual. 2003, 2008.

[4] Stevens W C Jr, Hill D C. General methods for flash chromatography using disposable columns. Mol Divers, 2009, 13: 247～252.

[5] Raman G, Jayaprakasha G K, Brodbelt J et al. Isolation of structurally similar citrus flavonoids by flash chromatography. Anal Lett, 2004, 37: 3005～3016.

（徐志红）

第8章 逆流色谱

8.1 逆流色谱发展概况

采用液-液色谱的方式分离纯化天然产物是一种较好的方法，这种方法可以消除传统的气-固或液-固色谱中被分离组分的不可逆吸附及其他各式各样的复杂情况，以保证样品在分离过程中无损失。最早的液-液色谱分离法为20世纪50年代产生的逆流分溶法(countercurrent distribution，CCD)，该法曾被广泛应用于分离天然产物[1]。然而，该法的液-液分配不是一个连续的过程，分离过程耗时长、仪器设备庞大且易损坏。20世纪70年代，一种新型的液-液分离方法，即液滴逆流色谱(droplet countercurrent chromatography，DCCC)诞生，它结合了逆流分溶法和色谱分离的优点[2]，即液-液分配是一个连续的过程。所以，这种方法最初被命名为“逆流色谱”(countercurrent chromatography，CCC)。同时期，Ito博士发现了转动螺旋管中的逆流现象，并利用这种现象开发了新的、具有高效率的液-液分配色谱技术，即是目前广泛应用于天然产物分离的螺旋管逆流色谱技术[3]。在螺旋管逆流色谱技术中，基于螺旋管的运转状态已开发出三种主要的仪器设备，高速逆流色谱仪(high-speed countercurrent chromatograph，HSCCC)、正交轴逆流色谱仪(cross axis countercurrent chromatograph，CA-CCC)和低速逆流色谱仪(slow rotary countercurrent chromatograph，SRCCC)。

8.2 逆流色谱原理

8.2.1 螺旋管中的逆流分配

当螺旋管中灌满固定相，不论是上相或是下相，从螺旋管首端加入另一相(流动相)，选择适当的转动方向转动螺旋管，两相在螺旋管中的分布与混合状态随螺旋管转动的速度变化有三种情况：

(1) 螺旋管以很慢的速度转动时(1 r/min左右)，固定相保留的比率(固定相保留率)高，两相在螺旋管中接触混合度低；

(2) 当螺旋管以中等速度转动时(20～150 r/min)，固定相有较高的保留率，两相在螺旋管中接触混合度高；

(3) 当螺旋管以较高的速度转动时(300 r/min以上)，固定相有较高的保留

率，两相在螺旋管中接触混合度低。

以上三种情况中第二种情况符合液-液连续分配的基本要求，如螺旋管的首端主要为固定相，流动相流经固定相时与固定相混合-分层-再混合-再分层……尾端则主要为流动相（如图 8.1）。如被分离组分进入分离柱后，就会在两相之间实现连续的分配，分离系数有差异的组分的迁移速度就会产生差异，从而实现色谱分离。低速逆流色谱即基于这一原理。图 8.2 即是氯仿-水两相溶剂系统以上相为固定相、下相为流动相时，固定相保留率随转速的变化情况。图 8.3 是以柱转速 75 r/min 分离咖啡因和可可碱的色谱图[4]，分离柱为直径 5.5 mm 的聚四氟乙烯（PTEF）管绕成，总容积 2750 mL。

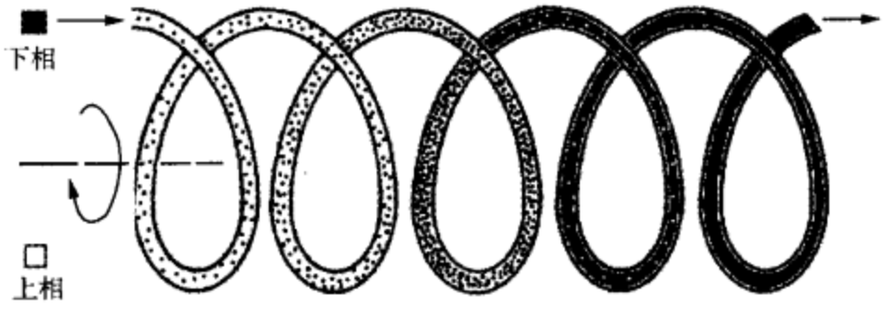


图 8.1 两相溶剂在自转螺旋管里的分布图

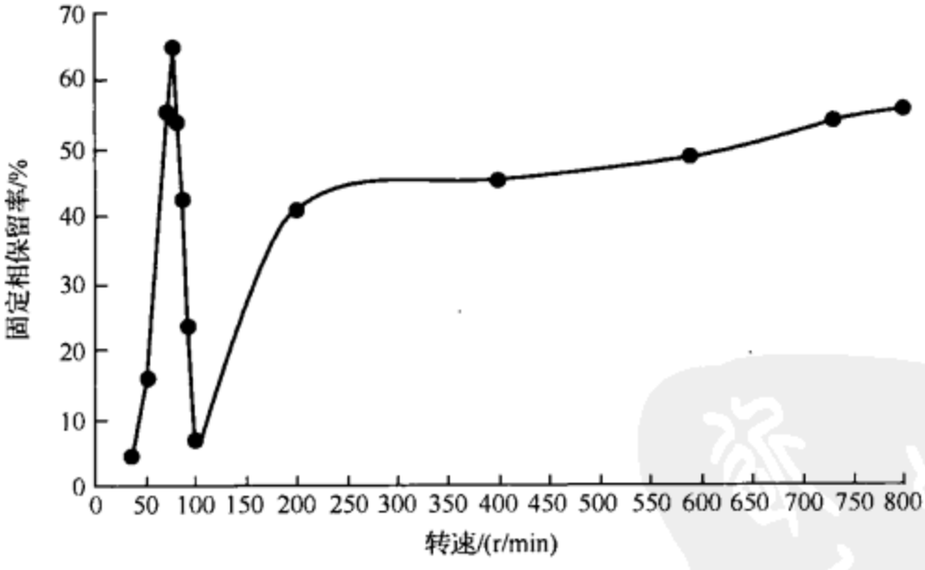


图 8.2 固定相保留率随转速的变化情况

溶剂系统：氯仿-水；固定相：上相；流动相：下相；流速：50 mL · min^{-1}

8.2.2 高速逆流色谱（HSCCC）原理

在自转的螺旋管里，虽然转速高时（300 r/min 以上）有很高的固定相保留率，但两相在螺旋管中混合程度低，因而在此种状态下不能实现逆流色谱。然而，如让高速自转的螺旋管再绕着平行于自转轴的中心轴公转（如图 8.4），则不仅有很好

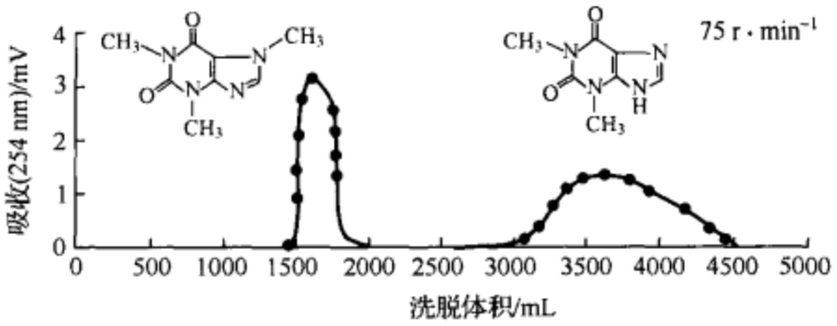


图 8.3 低速逆流色谱分离咖啡因和可可碱

溶剂系统：氯仿-水；固相：上相；流动相流速：5 mL · min^{-1}；样品溶液：10 g 咖啡因和 0.5 g 可可碱的混合物溶于 60 mL 流动相

的固定相保留，且固定相和流动相在位于中心轴侧会很好地混合（如图 8.5）；因此，在此种状态下流动相流经固定相时会与固定相产生混合-分层-再混合-再分层……的现象，如被分离组分进入分离柱后，就会在两相之间实现连续的分配，从而实现色谱分离[5]。图 8.6 即是高速逆流色谱分离土茯苓（*Smilax glabra*）提取物中黄酮苷 astilbin 和 isoastilbin 的谱图[6]。

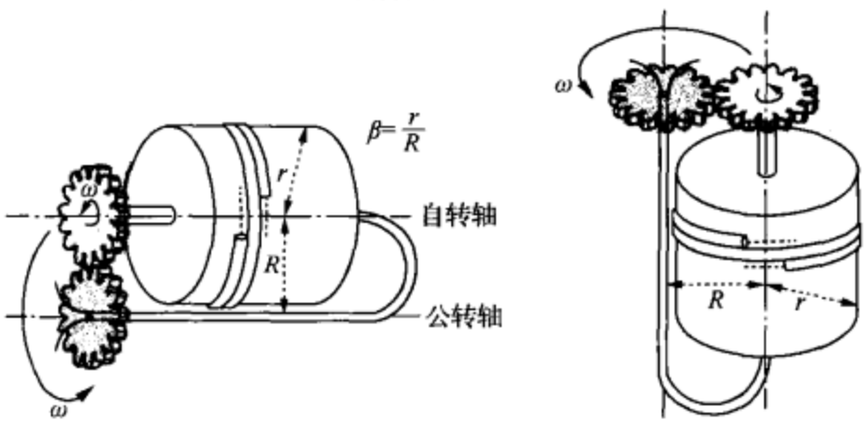


图 8.4 高速逆流色谱螺旋管运行示意图

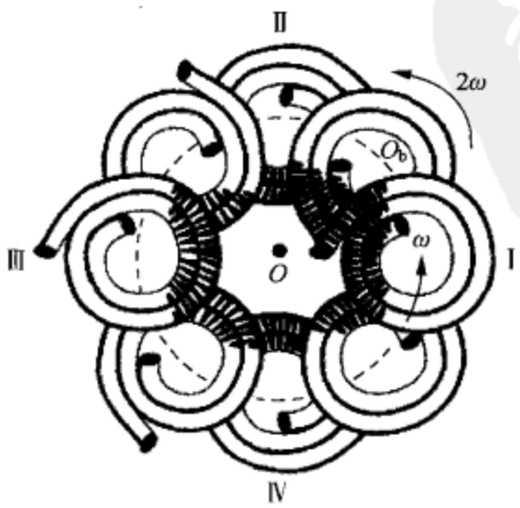


图 8.5 两相溶剂在水平行星式运转的螺旋管内的混合

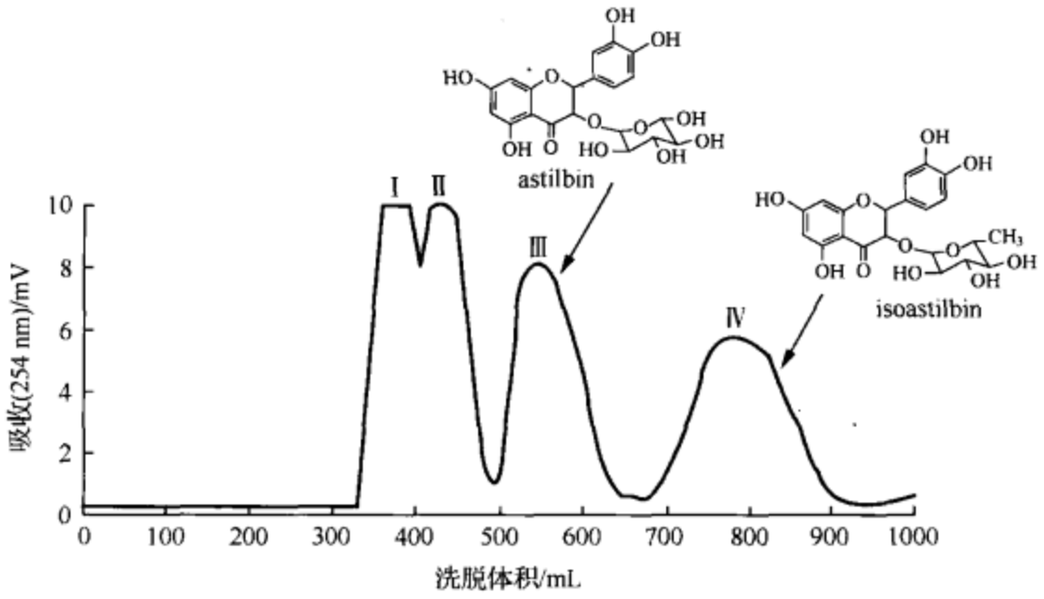


图 8.6 高速逆流色谱分离土茯苓提取物中黄酮苷

溶剂系统：正己烷-正丁醇-水(1∶1∶2)，固定相：上相，流速：2 mL·min^{-1}，转速：700 r/min

8.2.3 正交轴行星式运转逆流色谱原理

正交轴行星式运转是指螺旋管自转轴与螺旋管公转轴呈垂直状态(图 8.7)，在这种运转状态下，固定相有较高的保留率，而且流动相流经固定相时会与固定相产生混合-分层-再混合-再分层……的现象，能在这种条件下实现色谱分离。这种条件下两相的混合比起平行轴行星式逆流色谱要温和得多，不易造成乳化现象，对黏度高的溶剂系统(如双水相系统)亦有保留[7]，可应用于蛋白质及糖等高分子化合物的分离[8](图 8.8)。

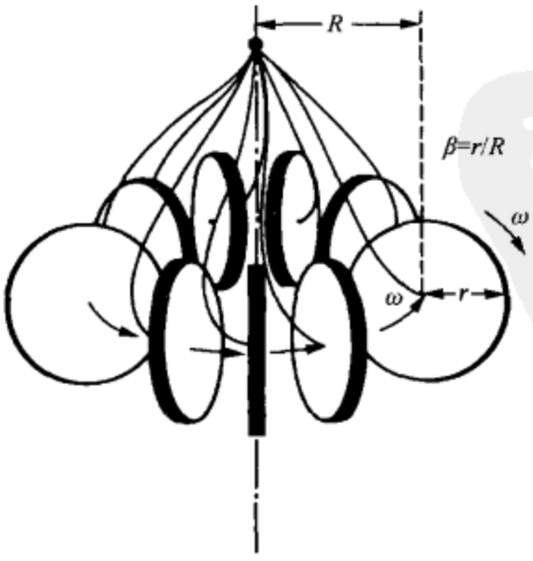


图 8.7 螺旋管正交轴行星式运转示意图

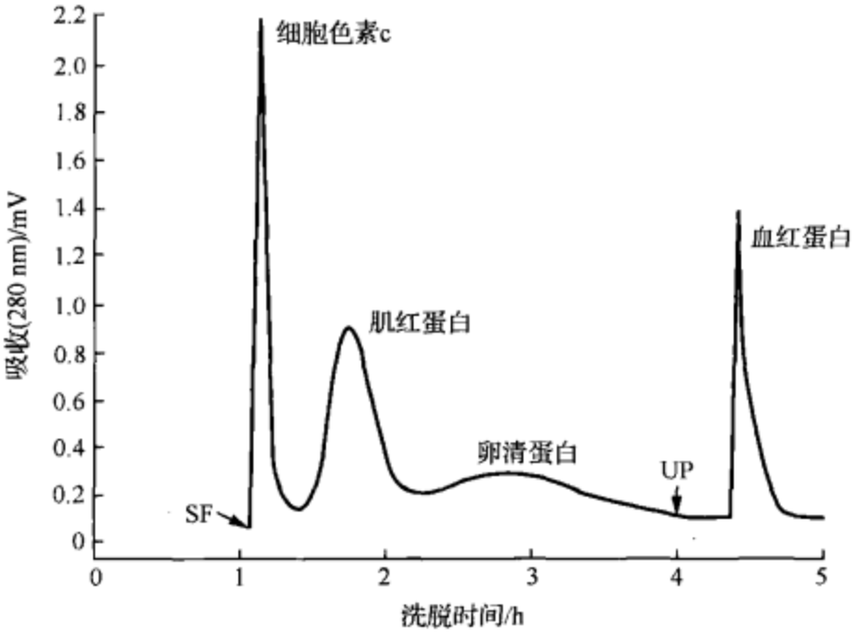


图 8.8 正交轴逆流色谱分离蛋白质

SF 指溶剂前沿;UP 指上相

柱容量:250 mL(2.6 mm 管径),溶剂系统:12.5% PEG1000-12.5% K_2HPO_4;

流速:2 mL·min^{-1};柱转速:750 r/min

8.3 逆流色谱仪器

螺旋管逆流色谱仪在其发展过程中经历了多种设计尝试,如单层多柱组合高速逆流色谱仪、多层多柱组合高速逆流色谱仪、多层柱高速逆流色谱仪、倾斜转子角高速逆流色谱仪、低速旋转逆流色谱仪、正交轴逆流色谱仪等。通过实践的检验,目前被采用的螺旋管逆流色谱仪可归为三类:高速逆流色谱仪、正交轴逆流色谱仪和低速逆流色谱仪。本节对这三种逆流色谱仪的构造作一介绍。

8.3.1 高速逆流色谱仪

图 8.9 是 Ito 发明的高速逆流色谱仪的剖面图[5]。马达通过齿型同步皮带驱动装有螺旋柱和与螺旋柱平衡的配重件的旋转框架,该框架绕着固定的中心轴(黑体部分)旋转,螺旋柱则受中心轴上的齿轮传动作与旋转框架等速的自转运动。进出口管通过固定的中心轴进入螺旋柱自转轴与螺旋柱相连,由于螺旋柱自转的速度与旋转框架转动的速度一致,故进出口管在旋转一周后恢复至原状,从而实现转动过程中的液体流通。

图 8.10 是在美国国立卫生研究院设计制造的第一台高速逆流色谱仪的照片。该台仪器的螺旋柱由一根长 140 m、内径 1.6 mm 的聚四氟乙烯(PTFE)管绕成,

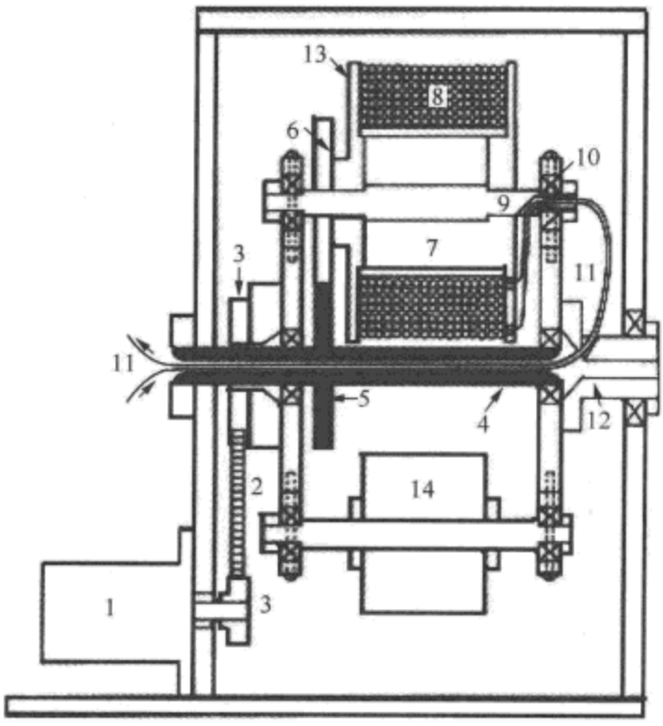


图 8.9 高速逆流色谱仪剖面图

1. 马达;2. 齿型同步带;3. 齿轮;4. 固定中心轴;5. 固定中心齿轮;6. 螺旋柱传动齿轮;7. 柱支持体;8. 螺旋管;9. 螺旋柱轴;10. 进出口管串行孔;11. 进出口管;12. 转动匹配短轴;13. 螺旋柱法兰边;14. 配重件

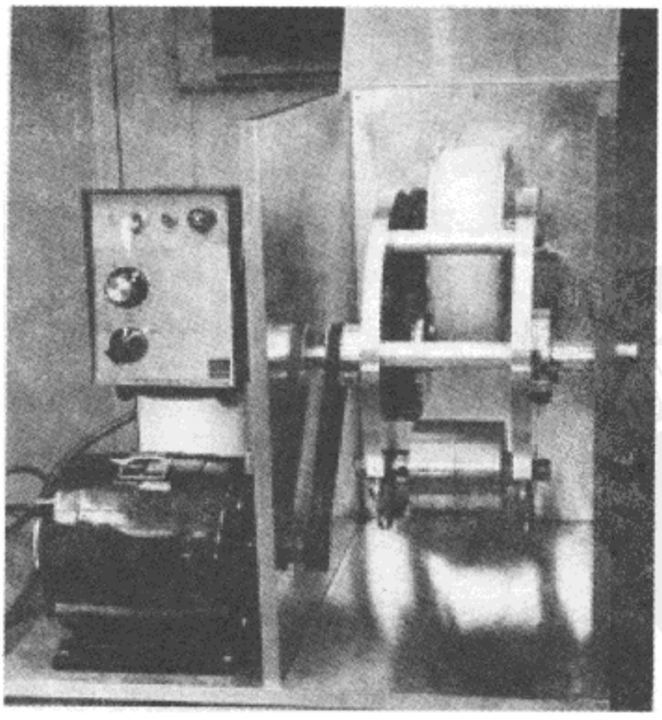


图 8.10 美国国立卫生研究院设计制造的第一台高速逆流色谱仪照片

柱容量 280 mL。仪器的旋转速度在 0～1000 r/min 可调。在框架上装载一个螺旋柱需要配重件。P. C. Inc. (Potomac, USA)生产的商业仪器采用此种设计，螺旋柱由内径 2.6 mm PTFE 管制成，柱容量 385 mL，进一步的改进，即在框架上装载三个螺旋柱，并将它们串联起来，这样不仅有效地利用了空间，也解决了运转平衡问题，更使分离柱容量增加到单柱仪器的 3 倍(图 8.11)。Pharma Tech. Corp. (Baltimore, USA) 和上海同田生化技术有限公司生产的商业仪器即是采用此种设计。前者螺旋柱由内径 2.6 mm PTFE 管制成，每只柱的容积为 285 mL，串联后总容积为 850 mL。后者螺旋柱由内径 1.6 mm PTFE 管制成，每只柱的容积为 87 mL，串联后总容积为 260 mL。

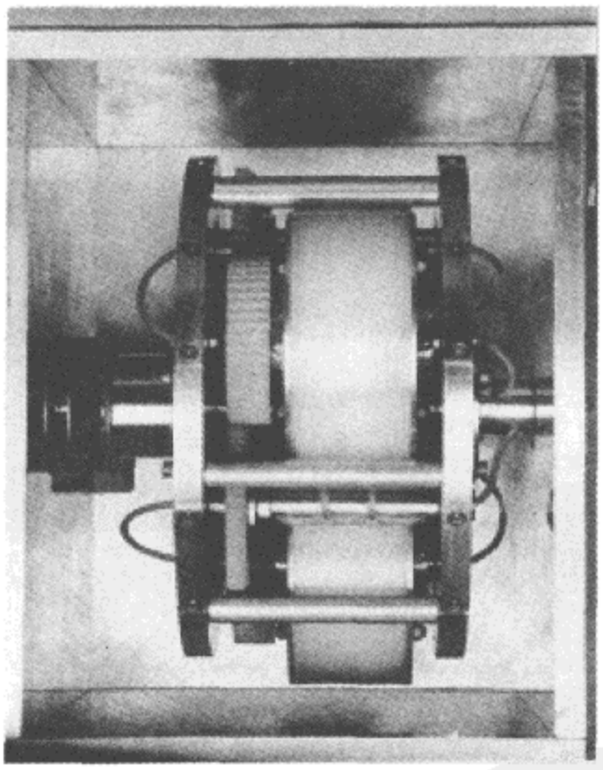


图 8.11 三柱串联高速逆流色谱仪照片

8.3.2 正交轴逆流色谱仪

正交轴逆流色谱仪的螺旋柱自转的方向与装载螺旋管柱的框架的旋转轴成垂直状态。但螺旋管柱装载的位置离装载螺旋管柱的框架的旋转轴的距离可以按不同的要求设计。最早由美国国立卫生研究院设计制造的正交轴逆流色谱仪如图 8.12，分离柱由内径 1.6 mm PTFE 管制成，柱容量 280 mL。后来单柱的仪器改进为双柱串联(图 8.13)，并采用管径更大的 PTFE 管制备螺旋柱，最大柱容量的仪器总容量达 2.5 L。

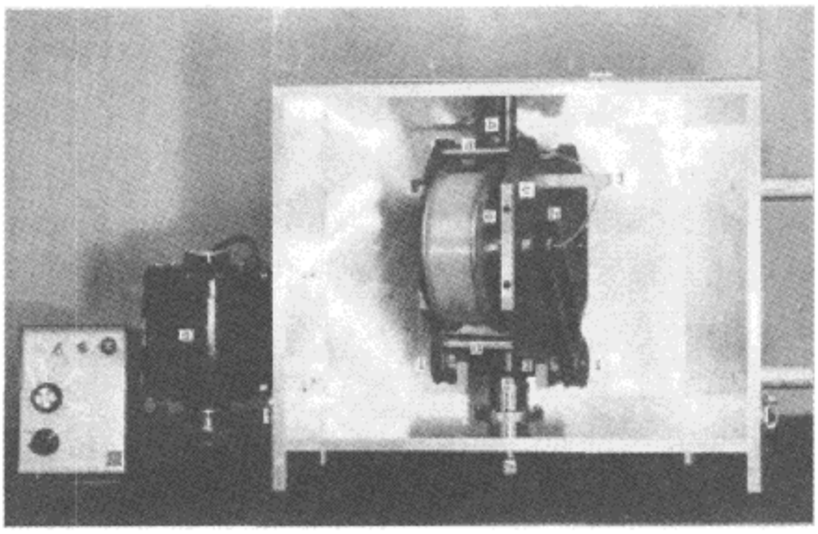


图 8.12 分离柱装载在中心位置的正交轴逆流色谱仪

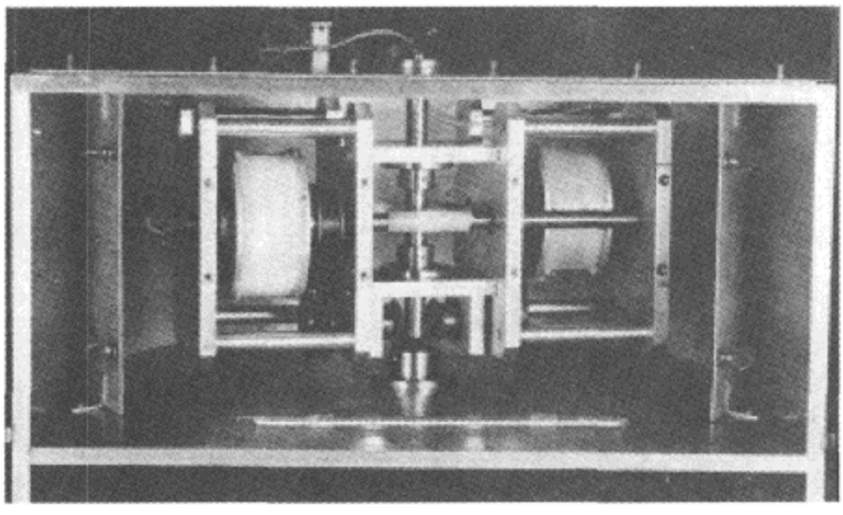


图 8.13 分离柱装载在偏离中心位置的正交轴逆流色谱仪

8.3.3 低速逆流色谱仪

低速逆流色谱仪[9,10]的螺旋柱不作行星式运转，没有公转、仅有自转。柱容量较小的逆流色谱仪可以采用如图 8.14 的设计，使进出管在运转时避免折断而不使用旋转密封接头。图 8.14 是笔者设计制造的一台柱容量 1 L 的低速逆流色谱仪。由于图 8.15 中的框架不能承受柱容量较大的分离柱，所以柱容量较大的低速逆流色谱仪则采用图 8.16 的设计。该种设计使用了一对旋转密封接头，从而使得仪器的机构非常简单。特制的旋转密封接头使用了聚四氟乙烯衬套，可以耐腐蚀、承受高达 200 kg/cm^2 的压力。笔者设计制造的一台柱容量为 40 L 的半工业化低速分离仪可以分离数百克至上千克的样品[11]。

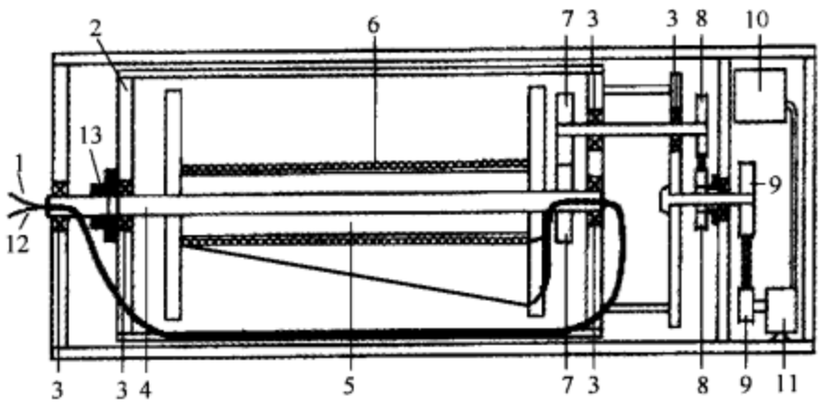


图 8.14 不用旋转密封接头的低速逆流色谱仪示意图

1. 液体流入管;2. 螺旋柱装载框架;3. 轴承;4. 螺旋柱轴;5. 螺旋柱支持体;6. 螺旋管;7. 传动齿轮;8. 传动皮带轮;9. 传动车轮;10. 调速器;11. 马达;12. 液体流出管;13. 连接匹配件

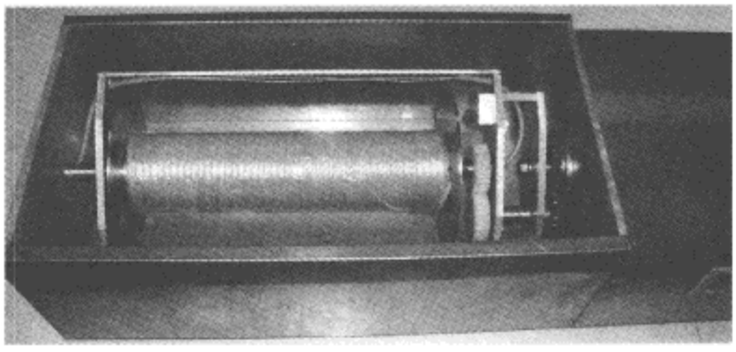


图 8.15 不用旋转密封接头的柱容量 10 L 的低速逆流色谱仪

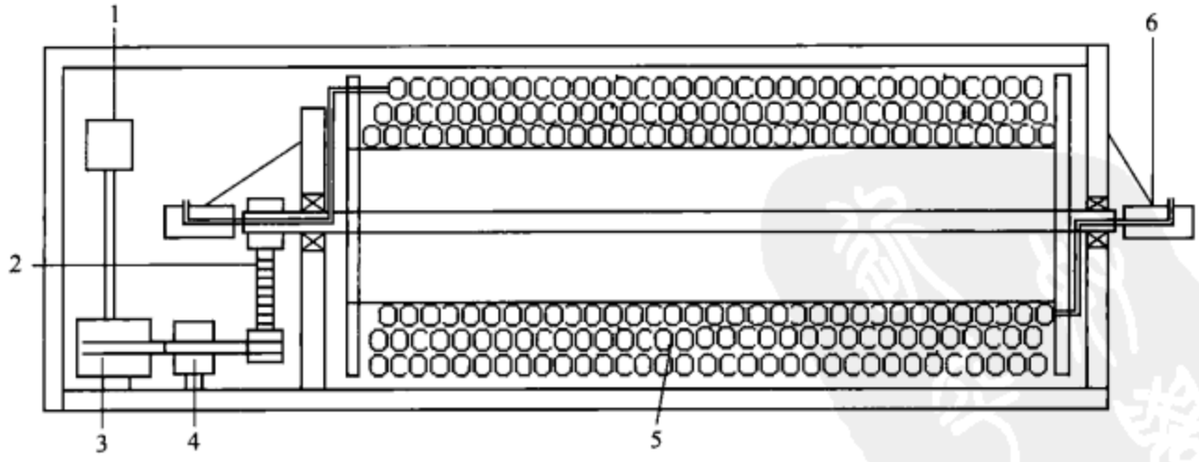


图 8.16 使用旋转密封接头的低速逆流色谱仪设计示意图

1. 调速器;2. 齿型传动皮带;3. 马达;4. 减速箱;5. 螺旋管;6. 旋转密封接头

8.4 逆流色谱理论

逆流色谱作为一种色谱技术，其一般的特征描述可沿用经典的色谱术语，如保留时间、分离度、分配系数等。逆流色谱作为一种真正的液-液色谱，有其不同于传统的液相色谱、气相色谱的地方，如逆流色谱柱容积、固定相保留率等。

8.4.1 逆流色谱柱容积

逆流色谱柱容积值(V_c)等于固定相所占的体积(V_s)和流动相(V_m)所占的体积之和，即：

$$V_c = V_s + V_m$$

8.4.2 固定相保留率

逆流色谱柱中固定相的体积占柱总体积的比率，称固定相保留率(S_F)。

$$S_F = V_s/V_c$$

固定相保留率取决于溶剂系统的性质和流速、柱转速、螺旋管的β值等。固定相保留率常用百分率表示，即：

$$S_F = V_s/V_c \times 100\%$$

8.4.3 分配系数

逆流色谱分离是基于被分离组分在固定相和流动相之间的分配与传质，因此分配系数(K)是一个非常重要的参数。通常，分配系数定义为溶质在固定相中的浓度(C_s)与其在流动相中的浓度(C_m)的比值。

$$K = C_s/C_m$$

分配系数在0.5～3时是较理想的。分配系数太小，溶质的保留时间就少，分离度会受影响。分配系数太大，就会延长分离时间，增加溶质的扩散使峰变宽。

8.4.4 保留体积

组分经过色谱柱的体积称为保留体积(V_R)，即从进样到分离峰的最大值所需的流动相体积。当$K=1$时，$V_R=V_c$；当$K\neq1$时，保留体积可用下面的方程式表示：

$$V_R = V_c[1 + S_F(K-1)]$$

8.5 逆流色谱溶剂系统

8.5.1 溶剂系统的构成

逆流色谱溶剂系统必须是由互不相溶的固定相和流动相组成，主要采用极性强的水、甲醇、乙腈和其他弱极性及中等极性的有机溶剂构成[12]。其次，聚乙二醇(PEG)和盐溶液也能形成两相体系[7]。因此，逆流色谱溶剂系统可大致分为卤代烷系列溶剂系统(表8.1)、乙酸乙酯系列溶剂系统(表8.2)、丁醇系列溶剂系统(表8.3)、烷烃系列溶剂系统(表8.4)、非水相系列溶剂系统(表8.5)和双水相系列溶剂系统(表8.6)。溶剂系统两相的极性越强，则可适用于分离极性越大的组分。

表8.1 卤代烷系列溶剂系统

溶剂系统组成	组成比例
氯仿-0.2 mol/L磷酸钾缓冲液	
氯仿-甲醇-水	5∶6∶4，4∶4∶2，7∶13∶8，10∶10∶5，13∶7∶8
氯仿-甲醇-0.5%盐酸	5∶5∶3
氯仿-甲醇-1%乙酸	2∶2∶1
氯仿-甲醇-0.5%氢溴酸	5∶5∶3
氯仿-甲醇-正丁醇-水	7∶6∶3∶4，5∶6∶1∶4
氯仿-甲醇-异丙醇-水	5∶6∶1∶4
氯仿-甲醇-异丁醇-水	7∶6∶3∶4
氯仿-苯-甲醇-水	5∶5∶7∶2
四氯化碳-甲醇-水	5∶4∶1
四氯化碳-氯仿-甲醇-水	2∶2∶3∶1
四氯化碳-二氯甲烷-甲醇-水	5∶5∶6∶4
二氯甲烷-甲醇-水	5∶3∶1
二氯甲烷-己烷-甲醇-水	20∶5∶17∶8，1∶4∶5∶3，2∶5∶4∶3

表8.2 乙酸乙酯系列溶剂系统

溶剂系统组成	组成比例
乙酸乙酯-己烷-甲醇-水	8∶2∶5∶5，16∶8∶7∶10
乙酸乙酯-环己烷-甲醇-水	5∶4∶3∶3
乙酸乙酯-石油醚-甲醇-水	1∶1∶1∶1
乙酸乙酯-乙醇-水	2∶1∶2
乙酸乙酯-正丙醇-水	35∶2∶2，140∶8∶80
乙酸乙酯-己烷-正丙醇-水(pH 2)	7∶0.5∶0.4∶4
乙酸乙酯-己烷-甲醇-水	2∶1∶1∶1
乙酸乙酯-甲醇-水	4∶1∶3
乙酸乙酯-正丁醇-水	3∶2∶5，4∶1∶5

表 8.3 丁醇系列溶剂系统

溶剂系统组成	组成比例
正丁醇-乙酸乙酯-水	2∶2∶5
正丁醇-正丙醇-水	2∶1∶3, 4∶1∶5
正丁醇-丙酮-水	8∶3∶10
正丁醇-正己烷-水	4∶1∶5
正丁醇-甲基叔丁基醚-乙腈-水	4∶1∶1∶5, 2∶1∶1∶5, 2∶2∶1∶5

表 8.4 烷烃系列溶剂系统

溶剂系统组成	组成比例
己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	3∶2∶3∶2, 17∶7∶13∶3, 9∶1∶5∶5
己烷-乙酸乙酯-乙醇-水	6∶3∶2∶5
己烷-乙酸乙酯-乙腈-水	8∶5∶7∶1
己烷-乙酸乙酯-正丁醇-乙酸-盐酸 1%	2∶1∶3∶1∶5
己烷-乙酸乙酯-甲醇-0.5%氯化钠	6∶4∶5∶5
己烷-乙酸乙酯-甲醇-0.5%氯化钠	7∶3∶5∶5
己烷-乙酸乙酯-甲醇-0.5%氯化钠	6∶4∶5∶5
己烷-乙酸乙酯-甲醇-0.5%氯化钠	7∶3∶5∶5
环己烷-乙酸乙酯-甲醇-水	3∶2∶2∶2
环己烷-丙酮-乙醇-水	7∶6∶1∶3
环己烷-乙酸乙酯-丙酮-水	5∶3∶4∶5
戊烷-叔丁基甲基醚-甲醇-水	10∶1∶10∶1
异辛烷-乙酸乙酯-甲醇-水	7∶3∶6∶4
石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水	10∶5∶5∶1
石油醚-乙酸乙酯-乙醇-水	9∶3∶7∶2

表 8.5 非水相系列溶剂系统

溶剂系统组成	组成比例
己烷-乙腈	
己烷-甲醇	
己烷-丁醇-甲醇	5∶1∶5
己烷-丁醇-乙腈	5∶1∶5
己烷-乙酸乙酯-乙腈-甲醇	5∶2∶5∶4

表 8.6 双水相系列溶剂系统

溶剂系统组成	组成比例
PEG 1000-H_2O-KH_2PO_4-K_2HPO_4(pH 8.0)	12.5 : 100 : 7.5 : 4.5
PEG 1000-H_2O-KH_2PO_4-K_2HPO_4(pH 9.2)	12.5 : 100 : 7.5 : 4.5
G 1000-H_2O-KH_2PO_4-K_2HPO_4(pH 8.0)	16 : 100 : 8.3 : 5.0
PEG 8000-H_2O-Dextran T500	4.4 : 100 : 7.0
PEG 8000-H_2O-Dextran T500-KH_2PO_4-K_2HPO_4-NaCl	4.4 : 100 : 7.0 : 0.005 : 0.00 : 50
PEG 8000-H_2O-Dextran T500-KH_2PO_4-K_2HPO_4-NaCl	4.4 : 100 : 7.0 : 0.005 : 0.005 : 1
PEG 8 000-H_2O-Dextran T500-KH_2PO_4-K_2HPO_4-NaCl	4.4 : 100 : 7.0 : 0.005 : 0.005 : 2
PEG 8 000-H_2O-Dextran T500-KH_2PO_4-K_2HPO_4-NaCl	4.4 : 100 : 7.0 : 0.005 : 0.005 : 3

8.5.2 溶剂系统的选择

选择用于逆流色谱仪的溶剂系统时，应注意以下几方面：不造成样品的分解或变性；足够高的样品溶解度；样品在系统中合适的分配系数值；固定相能实现足够高的保留。

溶剂系统的选择可以通过考察被分离样品中各组分在两相之间的分配差异来决定。原则上，组分之间分配系数之间的差异越大就越容易分离。但要获得较佳的出峰时间，则有必要将分配系数调整到合适的范围。当把分配系数定义为：溶质在固定相中的浓度 C_s 与溶质在流动相里的浓度 C_m 之比，即 $K=C_s/C_m$ 时，把目标组分的分配系数调整到 1～0.5，就能保证快速而有效的分离。当固定相的保留值低于 50%时，把分配系数值调整到 1～2 或更大值，才能有效地提高色谱峰的分辨度。因为逆流色谱法中可以用上相或下相作为流动相，所以分配系数值在 2～0.5 就能得到最满意的出峰时间[13]。

分配系数的测定可以用目标组分的纯品或标准品，在装有两相溶剂的试管中进行分配试验获得。具体的方法是用 TLC、HPLC、UV 等方法测定目标组分在充分分配后的各相中的浓度，再根据 8.4.3 节中的公式计算得出。如果得不到该标准品、样品混合物中每个组分的分配系数，也可以用高效液相色谱法分析，对含样品并达到平衡的两相溶剂系统的各相层分别进行精确的测定，通过峰面积的比值即可获得各组分的分配系数值。

在利用逆流色谱技术分离多种样品的工作中，已经积累了不少关于选择两相溶剂系统的经验。查阅相关的文献对溶剂系统的选择会有一定的指导作用。

8.6 逆流色谱分离实例

8.6.1 分离低极性组分

8.6.1.1 烟草提取物中茄尼醇的分离

茄尼醇(solanesol)是一种不饱和的聚异戊二烯醇,由九个异戊二烯单元组成,其化学名称为"九聚异戊二烯伯醇"。它是药物合成的重要原料,是泛醌类药物不可替代的关键中间体,即辅酶 Q10 和维生素 K2 的侧链。而茄尼醇本身也具有抗菌、消炎、治疗心血管疾病及抗溃疡等医疗作用,是保健食品开发的重要原料。茄尼醇是广泛存在于高等植物、哺乳动物和微生物体内的一种天然产物,烟叶、马铃薯叶和桑叶中含量突出,尤其是烟叶中茄尼醇高达 0.3%～3%。笔者及其合作者[14]用低速逆流色谱法(SRCCC),以油酸-乙醇为两相溶剂系统,用下相(油酸相)为固定相、上相(乙醇相)为流动相对烟叶浸膏中的茄尼醇进行了分离实验。采用柱容量 1100 mL 的低速逆流色谱仪(柱管径 5.7 mm),进样含 17%茄尼醇的烟叶浸膏 3 g,茄尼醇与相邻组分得到了较好的分离(图 8.17)。低速逆流色谱法获得的茄尼醇产品,经硅胶柱色谱脱油酸,得到 410 mg 茄尼醇产品。高效液相检测,获得的茄尼醇产品纯度达 71%(图 8.18)。该方法可望放大为工业化分离,作为食用级茄尼醇产品生产技术。

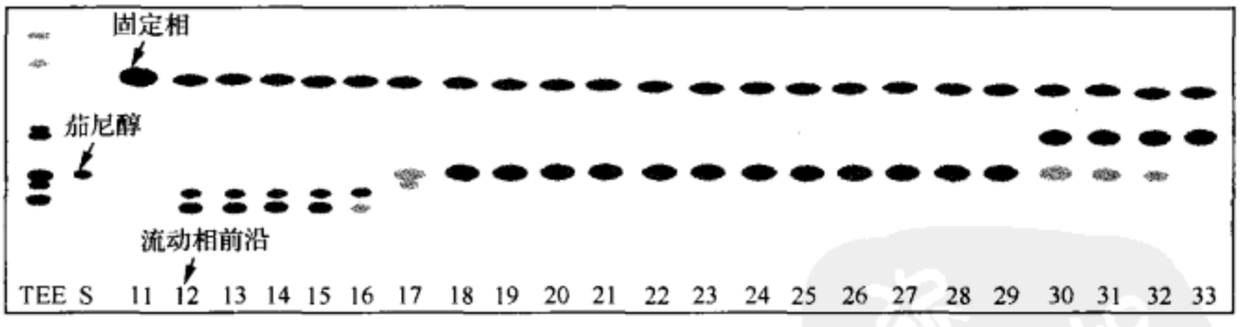


图 8.17 低速逆流色谱分离烟叶浸膏中的茄尼醇

TLC 分析:GF_{254}铝膜板,展开剂正己烷-乙酸乙酯(4∶1),显色剂:硫酸-香草醛-冰醋酸(5∶5∶90,v/v),显色温度 110℃

8.6.1.2 微藻提取物中角鲨烯的分离

角鲨烯能增加机体组织氧的利用能力,抵抗机体因缺氧而引起的各种疾病,并提高人体耐力,改善心功能,增强体质。微藻 *Thraustochytrium* ATCC 26185 中含有一定量的角鲨烯。Lu 等[15]用一台 Pharma-Tech CCC1000(柱容量 332 mL,

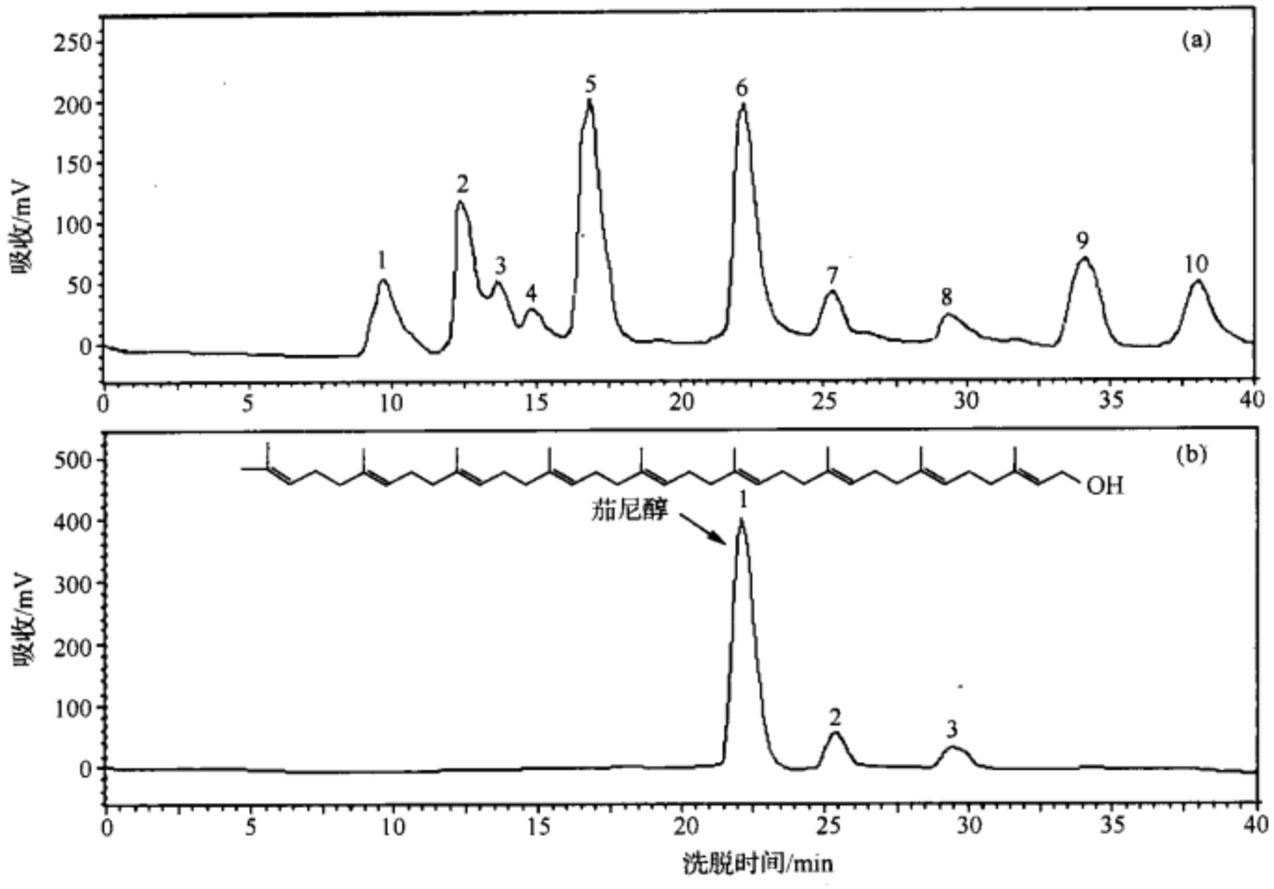


图 8.18　烟叶浸膏(a)和低速逆流色谱分离获得的茄尼醇(b)的 HPLC 分析

柱：YMC-Pack ODS-AQ (5 μm，250 mm×4.6 mm)，流动相：乙腈-异戊醇(65∶35，v/v)；流速：1.0 mL·min^{-1}；检测波长：213 nm

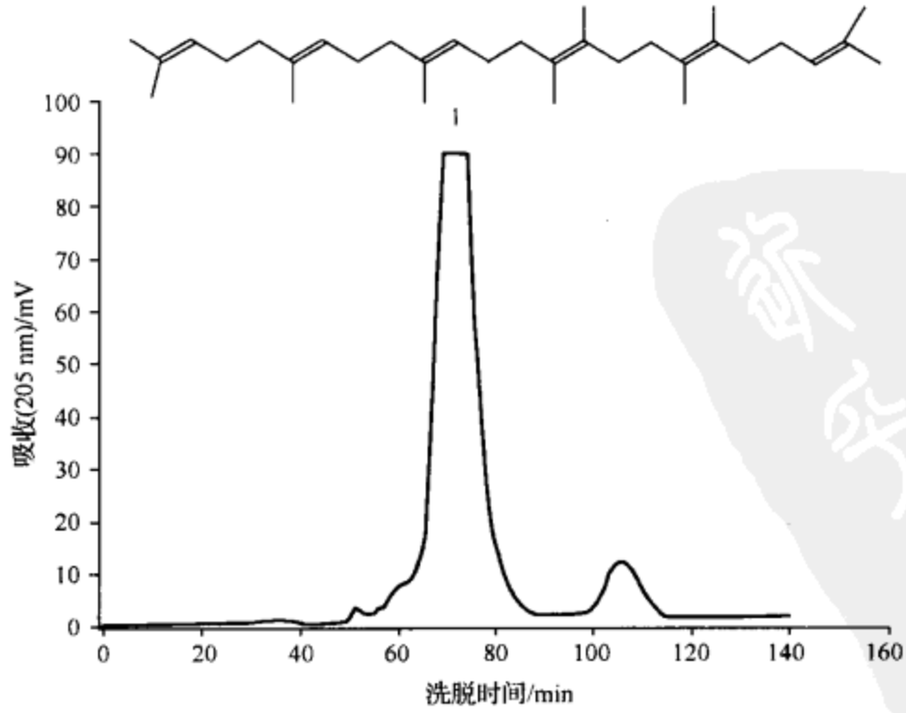


图 8.19　高速逆流色谱分离微藻 *Thraustochytrium* ATCC 26185 提取物色谱图

柱管径 2.6 mm)分离了这种微藻提取物中的角鲨烯(squalene)(图 8.19)。溶剂系统为非水相的正己烷-甲醇(2 ∶ 1, v/v),下相为固定相,上相为流动相,流速 2 mL·min^{-1}。一次分离含 0.14%角鲨烯的提取物 150 mg,得到 0.2 mg 96%的角鲨烯。分离时间仅 1.5 h,角鲨烯回收率达 95%。

8.6.2 分离中等极性组分

8.6.2.1 白水曲柳皮提取物中黄酮类化合物的分离

水曲柳(*Salix alba*)皮提取物有抗菌消炎、镇痛等作用。其乙醇提取物中含有丰富的黄酮类化合物。笔者及其合作者用高速逆流色谱仪(2.6 mm 管径、380 mL柱容量)对其乙醇提取物的乙酸乙酯萃取物进行了分离[16]。图 8.20 为 1 g 乙酸乙酯萃取物的 HSCCC 分离谱图,经 254 nm 波长紫外光谱检测出现 4 个峰,各峰的相应部分(图中阴影部分)分别收集后,经减压蒸发浓缩去除有机溶剂,再经冷冻干燥去除水分,获得 613 mg 组分Ⅰ、120 mg 组分Ⅱ、29.5 mg 组分Ⅲ和50 mg 组分Ⅳ。组分Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ分别为圣草酚、5,7-二羟色酮、5,7,4′-三羟黄烷酮(柑橘黄)。

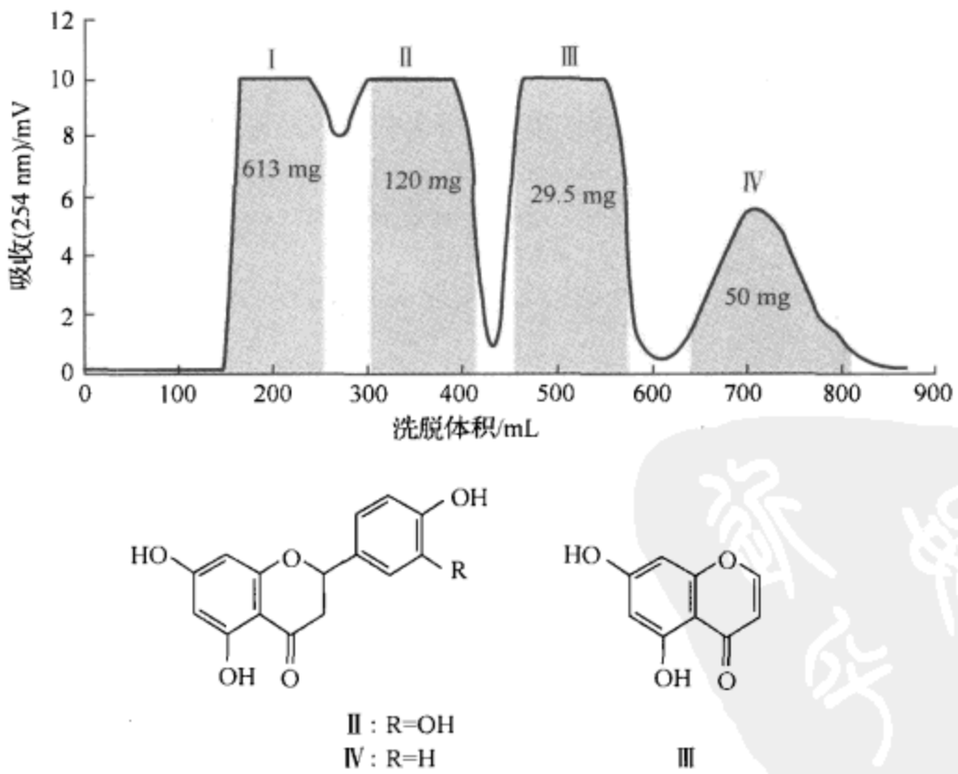


图 8.20 白水曲柳皮中黄酮化合物的高速逆流色谱分离

Ⅱ:圣草酚;Ⅲ:5,7-二羟色酮;Ⅳ:5,7,4′-三羟黄烷酮(柑橘黄素)

8.6.2.2 积雪草酸和积雪草苷的分离

积雪草(*Centella asiatica*)在国内外常用于湿热黄疸,痈肿疮毒,跌打损伤的治疗。其提取物具有促进正常肉芽组织形成,激活上皮组织,增强网状内皮系统功能,加速伤口及溃疡组织的愈合,抑制成纤维细胞增殖,减少瘢痕形成的作用。研究表明积雪草提取物中的有效成分为积雪草酸及积雪草苷(图 8.21)。积雪草酸和积雪草苷的极性有较大的差异,笔者及其合作者[17]通过高速逆流色谱-梯度洗脱法分离了 600 mg 积雪草提取物。采用的仪器管径为 2.6 mm、柱容量为 380 mL。以两相溶剂系统为正己烷-正丁醇-0.05 mol·L^{-1} NaOH (5∶1∶6,v/v)的下相为固定相,上相为起始流动相洗脱 50 min(4.0 mL·min^{-1})后,再依次以 0.05 mol·L^{-1} NaOH 饱和的正己烷-正丁醇(1∶1)的流动相洗脱 70 min (3.0 mL·min^{-1})、0.05 mol·L^{-1} NaOH 饱和的正己烷-正丁醇(1∶2)的流动相洗脱 100 min (2.0 mL·min^{-1})、0.05 mol·L^{-1} NaOH 饱和的正己烷-正丁醇(1∶4)的流动相洗脱 300 min (1.05 mL·min^{-1}),分别得到积雪草酸 18 mg(洗脱体积 270～315 mL)、羟基积雪草酸 13 mg (330～360 mL)、积雪草苷 140 mg (415～615 mL)和羟基积雪草苷 75 mg (870～1065 mL)(图 8.22)。

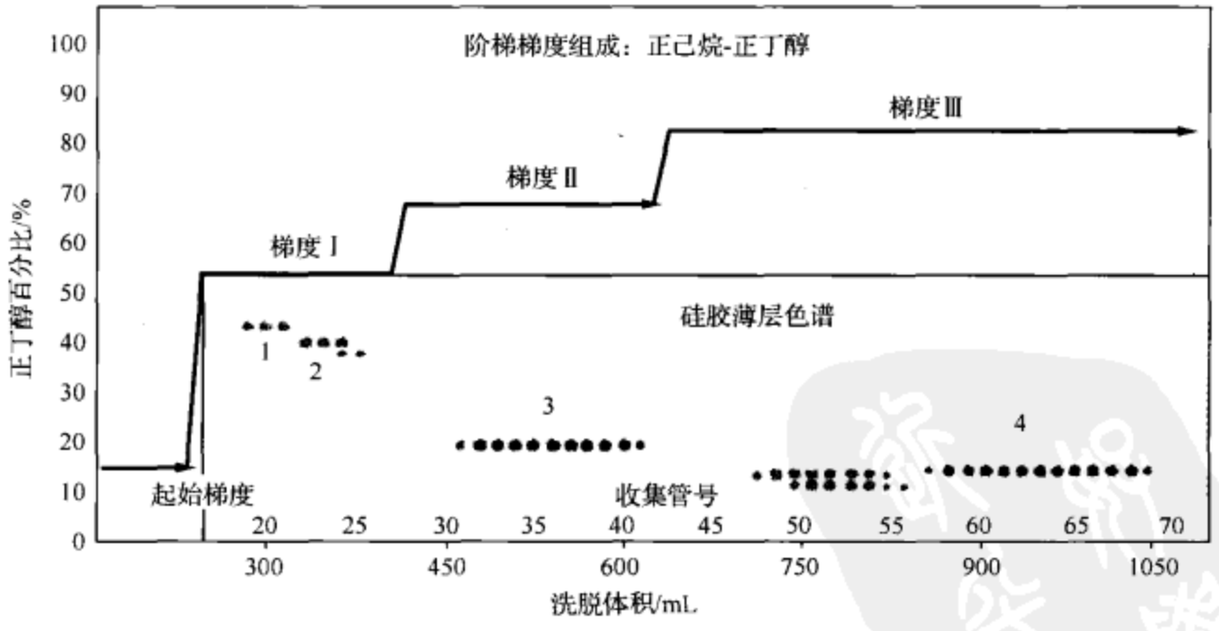


图 8.21 阶梯式梯度高速逆流色谱分离积雪草提取物

TLC 分析:GF_{254}铝膜板,展开剂:乙酸乙酯-甲醇-水(8∶2∶1),显色剂:硫酸-乙醇(3∶97),显色温度:110 ℃

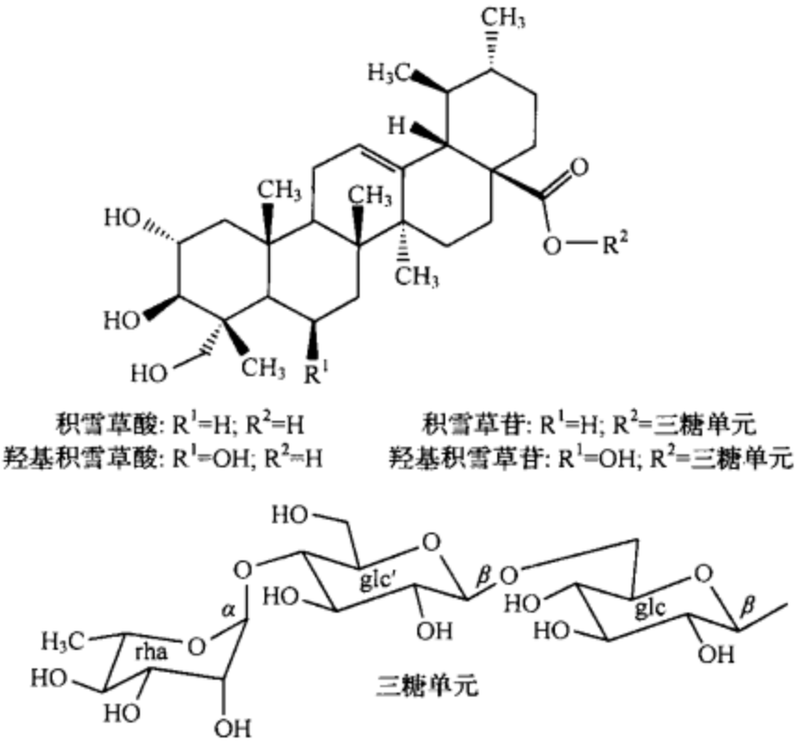


图 8.22 积雪草酸及积雪草苷等的化学结构

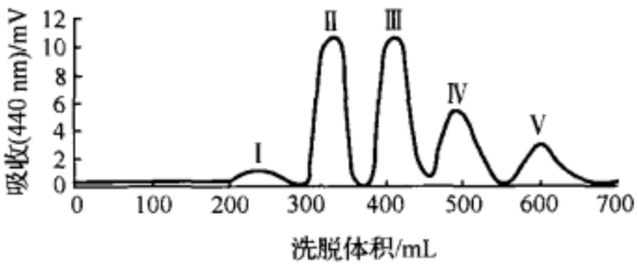
8.6.3 分离强极性组分

8.6.3.1 越橘花色苷的分离

越橘 (*Vaccinium myrtillus*, Ericaceae)中含有丰富的花色苷,长期服用能保持人的视力经久不衰、强化心脑血管及动脉血管。花色苷是一类强极性的化合物,且在中性和碱性条件下不稳定,采用常规分离技术极难分离。笔者及其合作者[18]通过一台管径 2.6 mm、柱容量 380 mL 的高速逆流色谱仪,采用溶剂系统甲基叔丁基醚-正丁醇-乙腈-水-三氟乙酸(1∶4∶1∶5∶0.01,v/v)的上相为固定相、下相为流动相(1.5 mL·min^{-1})分离了越橘花色苷粗提物,检测波长 440 nm,每次进样 500 mg 产生 5 个色谱峰(图 8.23),其中Ⅱ(130 mg)为 delphinidin-3-*O*-sambubioside、Ⅲ(77 mg)为 cyanidin-3-*O*-sambubioside。

8.6.3.2 三七皂苷的分离

三七皂苷具有抑制血小板聚集和增加脑血流量的作用,用于脑血管后遗症、视网膜中央静脉阻塞、眼前房出血等。中成药三七皂苷片的主要成分是三七(*Panax notoginseng*)总皂苷提取物。笔者及其合作者[19]通过高速逆流色谱仪(2.6 mm 管径、380 mL 柱容量)对三七皂苷片中三七皂苷进行了分离,采用的溶剂系统为正己烷-正丁醇-水(3∶4∶7,v/v),上相为固定相,下相为流动相(2.5 mL·min^{-1})。从



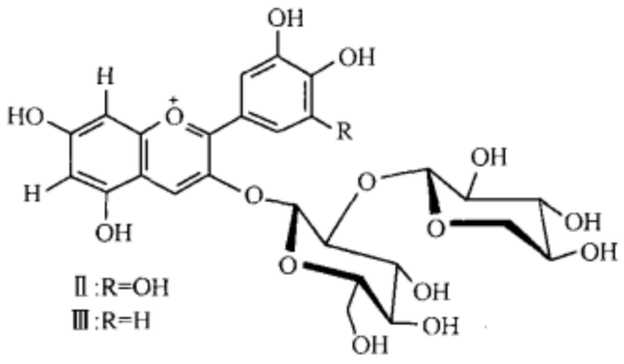
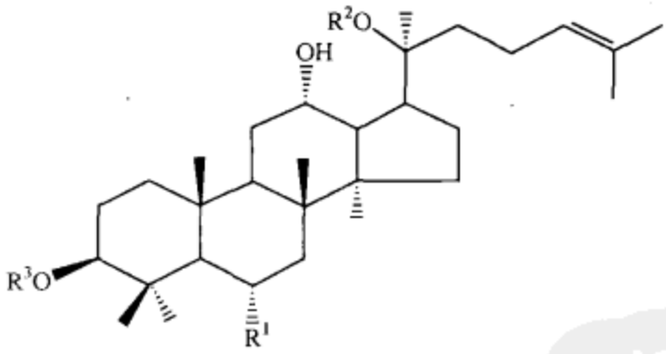


图 8.23 高速逆流色谱分离越橘花色苷

三七皂苷片中获得的 283 mg 三七皂苷，经分离获得四个组分：人参皂苷 Rb_1（洗脱体积211～290 mL）157 mg、三七皂苷 R_1（311～430 mL）17 mg，人参皂苷 Re（451～570 mL）13 mg 和人参皂苷 Rg_1（511～790 mL）56 mg（图 8.24）。



	R^1	R^2	R^3
人参皂苷Rb_1	H	Glu(6→1)Glu	Glu(2→1)Glu
三七皂苷R_1	O-Glu(2→1)Xyl	Glu	H
人参皂苷Re	O-Glu(2→1)Rha	Glu	H
人参皂苷Rg_1	O-Glu	Glu	H

图 8.24 从三七皂苷片中分离获得的四种皂苷结构

8.6.4 分离超强极性组分

8.6.4.1 硫代葡萄糖苷的分离

硫代葡萄糖苷是广泛存在于十字花科植物中的含硫次生代谢产物。此类化合

物的降解产物异硫代氰酸盐具有广泛的生物活性，不仅可以抑制细菌和微生物的生长，还具有很好的抗癌活性。由于硫代葡萄糖苷的极性很强，采用常规的分离技术很难分离出高纯度的单体成分。采用高速逆流色谱技术可以很好地分离多种植物材料中的硫代葡萄糖苷单体成分[20]。笔者[21]采用低速逆流色谱技术亦成功地从绿花菜籽的甲醇提取物中分离出 4-甲基亚磺酰丁基芥子油苷(glucoraphanin)。采用一台柱管径 3 mm、容积 400 mL 的高速逆流色谱仪，以正丁醇-乙腈-10%硫酸铵溶液(1∶0.5∶2.2)的下相为固定相，上相为流动相，可以一次性进样 1.6 g 提取物(溶于 60 mL 流动相中)。流动相流速为 2.5 mL·min^{-1}。图 8.25 是分离后的 TLC 分析结果，62～86 管为 glucoraphanin 组分。干燥后得 159 mg 91%的 glucoraphanin 产品，回收率为 95%。笔者用管径 17 mm、柱容量 40 L 的低速逆流色谱仪进行放大分离试验，单次进样量可到 1 kg，流动相流速可提升到 20 mL·min^{-1}。产品得率与小试一致，纯度达到 87%。

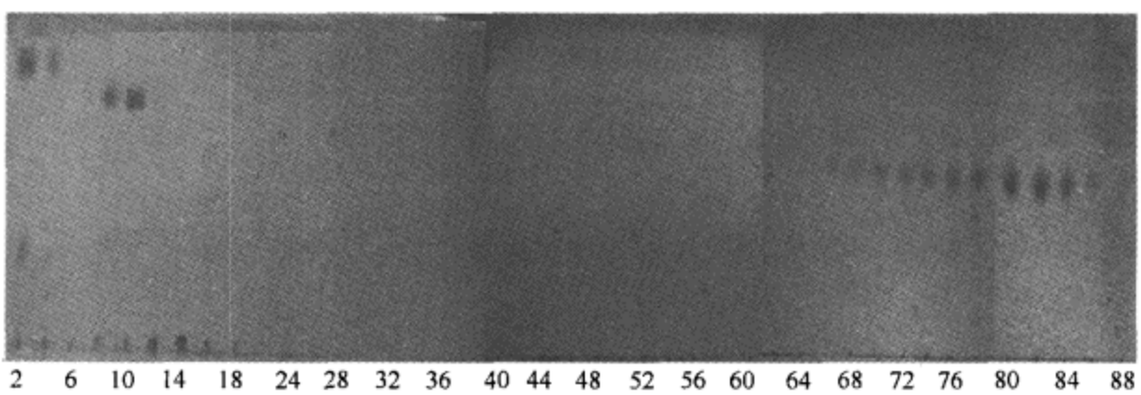


图 8.25 低速逆流色谱分离绿花菜籽的甲醇提取物

8.6.4.2 蛋清蛋白的分离

鸡蛋清具有来源广泛、成本低廉的特点，其组分如卵转铁蛋白、卵白蛋白和溶菌酶均具有一定的生物学活性和应用价值。郅等[22]利用 TBE-2300V 型高速逆流色谱仪(2.6 mm 管径、120 mL 柱容量)研究了聚乙二醇 1000 (PEG1000)-磷酸盐双水相体系对鸡蛋清样品的分离。鸡蛋清中的主要蛋白质成分卵转铁蛋白、卵白蛋白和溶菌酶在 pH 9.2 的 15.0% PEG1000-17.0%磷酸钾盐体系中也具有最大的分配系数差异。采用该体系，在检测波长 280 nm、流速 1.0 mL·min^{-1}和转速 850 r/min 的条件下，成功地分离了 4 mL 鸡蛋清样品(图 8.26)。得到的卵白蛋白、溶菌酶和卵转铁蛋白的电泳纯度分别为 100%、100%和 60%(图 8.27)，收率均大于 90%。

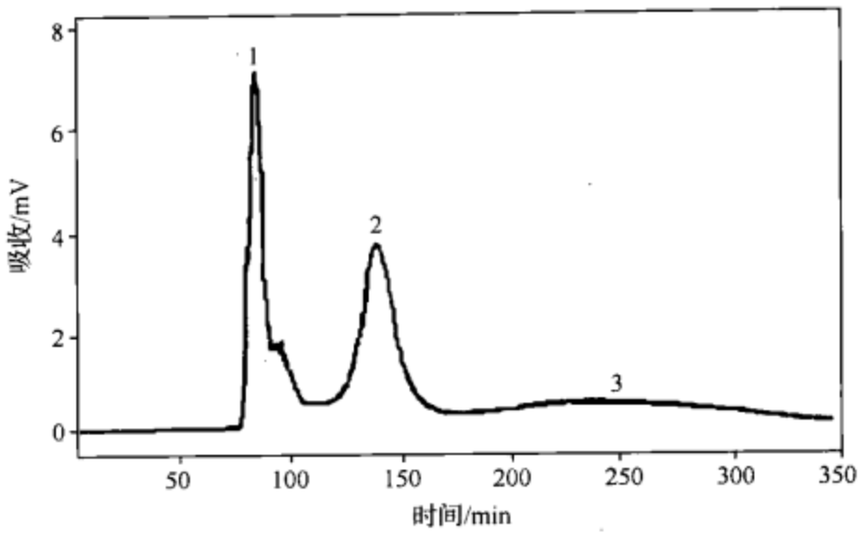


图 8.26 鸡蛋清的高速逆流色谱洗出曲线

1. 转铁卵蛋白；2. 卵白蛋白；3. 溶菌酶

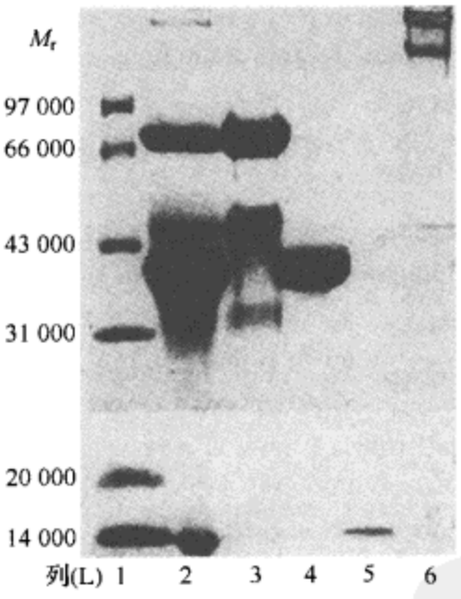


图 8.27 鸡蛋清样品高速逆流色谱洗脱峰的 SDS-PAGE 分析结果

L1：蛋白标记物；L2：蛋清；L3：逆流色谱峰 1；L4：逆流色谱峰 2；
L5：逆流色谱峰 3；L6：逆流色谱固定相中组分

参 考 文 献

[1] Craig L G. Comprehensive Biochemistry. Vol 4. Amsterdam: Elsevier, 1962. 1.

[2] Taniimura T, Pisano J J, Ito Y et al. Droplet countercurrent chromatography. Science, 1970, 169: 54.

[3] Conway W D. Countercurrent Chromatography: Apparatus, Theory and Applications. New York: VCH, 1990.

[4] Wu C, Du Q, Ito Y. Retention of stationary phase and partition efficiency of mutililayer helical column

rotated around its horizontal axis. J Liq Chromatogr & Related Technol, 2000, 23: 2219.

[5] Ito Y. Apparatus and methodology of high-speed countercurrent chromatography//Ito Y, Conway W D, eds. High-Speed Countercurrent Chromatography. New York: Wiley-Interscience, 1996.

[6] Du Q, Li L, Jerz G. Purification of astilbin and isoastilbin in the extract of *Smilax glabra* rhizome by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A, 2005, 1077: 98.

[7] Shinomiya K, Hirozane S, Kabasawa Y et al. Protein separation by cross-axis coil assembles using polyethylene glycol-dextran solvent system. J Liq Chromatogr & Related Technol, 2000, 23: 1119.

[8] Shibusawa Y, Iino S, Shindo H et al. Separation of chicken egg white proteins by high-speed countercurrent chromatography. J Liq Chromatogr & Related Technol, 2001, 24: 2007.

[9] Du Q, Wu P, Ito Y. Low-speed rotary countercurrent chromatography using a convoluted multilayer helical tube for industrial separation. Anal Chem, 2000, 72: 3363.

[10] Du Q, Ito Y. Slow rotary countercurrent chromatography. J Liq Chromatogr & Related Technol, 2003, 26: 1827.

[11] Du Q, Jerz G, He Y et al. Semi-industrial isolation of salicin and amygdalin from plant extracts using slow rotary counter-current chromatography. J Chromatogr A, 2005, 1074: 43.

[12] Hostettmann K, Marston A, Hostettmann M. Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation. 2nd Ed. Berlin: Springer-Verlag, 1998, 135～172.

[13] Ito Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. J Chromatog A, 2005, 1065: 145.

[14] Zhao Y, Du Q. Separation of solanesol in tobacco leaves extract by slow rotary counter-current chromatography using a novel non-aqueous two-phase solvent system. Chromatogr A, 2007, 115: 193.

[15] Lu H T, Jiang Y, Chen F. Preparative separation and purification of squalene from the microalga *Thraustochytrium* ATCC 26185 by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A, 2003, 994: 37.

[16] Du Q, Jerz G, Winterhalter P. Preparation of three flavonoids from the bark of *Salix alba* by high-speed countercurrent chromatographic separation. J Liq Chromatogr & Related Technol, 2004, 27: 3257.

[17] Du Q, Jerz G, Chen P et al. Preparation of ursane triterpenoids from *Centella asiatica* using high speed countercurrent chromatography with step-gradient elution. J Liq Chromatogr & Related Technol, 2004, 27: 2201.

[18] Du Q, Jerz G, Winterhalter P. Isolation of two anthocyanin sambubiosides from bilberry (*Vaccinium myrtillus*) by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A, 2004, 1045: 59.

[19] Du Q, Jerz G, Waibel R et al. Isolation of dammarane saponins from *Panax notoginseng* by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A, 2003, 1008: 173.

[20] Fahey J W, Wade K L, Stephenson K K et al. Separation and purification of glucosinolates from crude plant homogenates by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A, 2003, 996: 85.

[21] Fu Y, Du Q, Wang K. Scale-up of slow rotary countercurrent chromatographic isolation of glucoraphanin and glucoraphenin from broccoli seeds and radish seeds. Acta Chromatographica, 2008, 20(4): 697～707.

[22] 郅文波，邓秋云，宋江楠等．高速逆流色谱双水相体系分离蛋白质．色谱，2005，23：12.

（杜琪珍　杨培明）

第9章　凝胶色谱

凝胶色谱是用化学惰性的多孔物质作固定相，液体为流动相，根据分子大小和形状来分离混合物的一种色谱方法。因凝胶具有网状结构，小分子物质能进入其内部，而大分子物质却被排阻于外部，在过滤的过程中，溶液中的物质按不同相对分子质量筛选分开，达到分离纯化的目的。这一技术又称为分子筛色谱（molecular sieve chromatography），或叫凝胶过滤色谱（gel filtration chromatography，GFC）、体积排阻色谱（size exclusion chromatography，SEC）、凝胶渗透色谱（gel permeation chromatography，GPC）等。

凝胶色谱是20世纪50年代发展起来的一种分离分析技术[1]，固定相为具有一定孔径范围的多孔凝胶，当混合溶液通过凝胶过滤色谱柱时，溶质分子在凝胶上进行选择性扩散，组分保留程度取决于分子大小，比凝胶孔径小的分子可渗透进入凝胶孔内而被滞留，中等分子产生部分渗透作用，而大分子则完全不能进入而被排斥，因此最先流出。凝胶色谱具有设备简单、操作方便、分离迅速及不影响分子生物学活性等优点。目前凝胶色谱已被广泛应用于高分子化学和生物化学领域，能分离和纯化如蛋白质、酶、多肽、激素、核酸以及多糖这样一些大分子化合物，利用凝胶的分子筛特性，可对这些物质的溶液进行脱盐、浓缩、去热源和脱色，并可用来估测大分子的摩尔质量。在中草药有效成分和天然活性物质的研究中，凝胶色谱也得到广泛应用。

目前使用较多的主要有葡聚糖凝胶（如Sephadex）、天然琼脂糖凝胶（如Sapharose）、聚丙烯酰胺凝胶（如Bio-Gel）和聚苯乙烯凝胶（如Styrogel），其后还发展了凝胶的各种衍生物，如羧甲基-交联葡聚糖（CM-Sephadex）、二乙基氨乙基-交联葡聚糖（DEAE-Sephadex）等种类。

琼脂糖凝胶是依靠糖链之间的次级链如氢键来维持网状结构，网状结构的疏密取决于琼脂糖的浓度。琼脂糖凝胶的结构稳定，可以在许多条件下使用（如水，pH 4～9的盐溶液），但在40 ℃以上开始融化，且不耐高压，因此不能高温高压消毒，可用化学灭菌处理。其商品名很多，常见的有Sepharose（Pharmacia，Amersham，GE Healthcare）、Bio-Gel-A（美国Bio-Rad）等。

聚丙烯酰胺凝胶是一种人工合成凝胶，以丙烯酰胺为单位，由甲叉双丙烯酰胺交联而成，经干燥粉碎或加工成形制成粒状。控制交联剂的用量可制成各种型号的凝胶，交联剂越多，孔隙越小。聚丙烯酰胺凝胶的商品有生物胶-P（Bio-Gel P），从P-2至P-300共10种，P后面的数字再乘1000就相当于该凝胶的排阻

限度。

聚苯乙烯凝胶具有大网孔结构，机械强度好，洗脱剂可用甲基亚砜，用于分离相对分子质量 1600～40 000 000 的生物大分子，适用于有机多聚物相对分子质量测定和脂溶性天然物的分级。

本章主要介绍应用最广的葡聚糖凝胶及其色谱方法。

9.1 葡聚糖凝胶的种类及性质

葡聚糖凝胶是由直链的葡聚糖和交联剂 3-氯-1，2-环氧丙烷交联而成的具有多空网状结构的高分子化合物(结构见图 9.1)，其网孔大小决定能进入凝胶内部的被分离物质相对分子质量范围。网孔大小由葡聚糖和交联剂比例调节，交联度越大，网孔结构越紧密，吸水性小；相反交联度越小，网孔结构越疏松，吸水性大。葡聚糖凝胶可分离样品的相对分子质量范围从几百到几十万。商品名以 Sephadex G 表示，“G”反映凝胶的交联程度、膨胀程度及分布范围。G 值越小，交联度越大，吸水性越小；G 值越大，交联度越小，吸水性就越大，二者呈反比关系，G 值大约为吸水量的 10 倍。例如，G-25 为每克凝胶膨胀时吸水 2.5 g，由此可以根据床体积而估算出葡聚糖凝胶干粉的用量。表 9.1 列出了 Sephadex 各种型号的物理特性。

以颗粒直径表示粒度大小：粗 100～300 μm、中 50～150 μm、细 20～80 μm 和超细 10～40 μm。颗粒越细，流速越慢，分离效果越好。

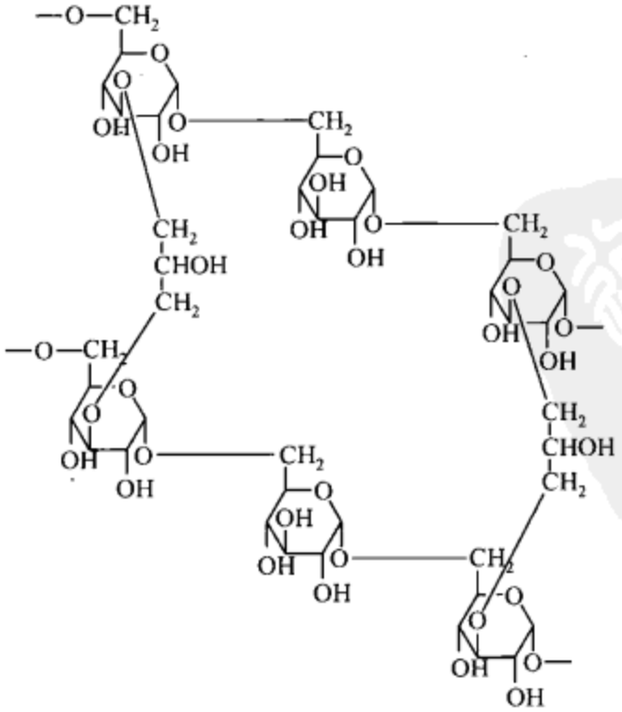


图 9.1 葡聚糖凝胶的结构

表 9.1 Sephadex 的种类与特性[2]

型号	吸水量 /(mL·g^{-1})	最小溶胀时间/h		溶胀体积(mL)/干凝胶(g)	分离范围(相对分子质量)
		20～25 ℃	100 ℃		
G_{10}	1.0±0.1	3	1	2～3	<700
G_{15}	1.5±0.2	3	1	2.5～3.5	<1500
G_{25}	2.5±0.2	3	1	4～6	<5000
G_{50}	8.0±0.3	3	1	9～11	1500～20000
G_{75}	7.5±0.5	24	1	12～15	3000～70000
G_{100}	10.0±1.0	72	1	15～20	4000～15000
G_{150}	15.0±1.5	72	1	20～30	5000～800000
G_{200}	20.0±2.0	72	1	30～40	5000～300000

9.2 凝胶色谱原理

凝胶是一种多孔性的不带表面电荷的物质，当带有多种成分的样品溶液缓慢地流经凝胶色谱柱时，各分子在柱内同时进行着两种不同的运动：垂直向下的移动和无定向的扩散运动。大分子物质由于直径较大，不能进入凝胶孔内，而在凝胶间几乎是垂直地向下运动，而小分子物质除了可在凝胶颗粒间隙中扩散外，还可以进入凝胶颗粒的微孔中，在向下移动的过程中，从一个凝胶内扩散到颗粒间隙后再进入另一凝胶颗粒，如此不断地进入和扩散，小分子物质的下移速度落后于大分子物质，从而使样品中分子大的先流出色谱柱，中等分子的后流出，分子最小的最后流出，这种现象叫分子筛效应。

对某物质在凝胶柱内洗脱体积 V_e、V_o 和 V_i 之间的关系可用下式表示：

$$V_e = V_o + K_d \cdot V_i$$

式中，V_e 为洗脱体积，指自样品加入后，到组分最大浓度出现时所需洗脱液体积；V_i 简称内水体积，可由 $g \cdot W_r$ 求得（g 为干凝胶质量，单位为 g，W_r 为凝胶吸水量，以 mL·g^{-1} 表示）；V_o 简称为外水体积，等于被完全排阻的大分子的洗脱体积，可以用一个已知相对分子质量远超过凝胶排阻极限的有色分子，如常用的蓝色葡聚糖-2000 溶液通过柱床，即可测出柱床的外水体积；K_d 为每个溶质分子在流动相和固定相之间的一个特定的分配系数，也可以说是相对分子质量不同的溶质在凝胶内部和外部的分配系数，它只与被分离物质分子大小和凝胶颗粒内孔隙大小分布有关，而与柱的长短粗细无关，对某一特定物质是一个常数。

当 $K_d=0$ 时，则 $V_e=V_o$，说明这种溶质相对分子质量大，完全不能进入凝胶颗粒微孔内，被排阻于凝胶颗粒之外而最先洗脱下来，洗脱体积等于外水体积。当

$0<K_d<1$ 时，意味着溶质分子只有部分向凝胶颗粒内扩散，K_d 愈大，进入凝胶颗粒内的程度愈大。当 $K_d=1$ 时，即 $V_e=V_o+V_i$，说明这种溶质的相对分子质量小，可完全向凝胶颗粒内扩散，洗脱体积等于外水体积和内水体积之和，在洗脱过程中将最后流出柱外。

由此可以看出，对某一凝胶介质，两种全排出的分子，虽然分子大小有差别，但它们的 K_d 都等于零，因此不能有分离效果。同样两种分子如都能进入内部空隙，即 K_d 都等于 1，它们即使分子大小有不同，也没有分离效果。因此不同型号的凝胶介质，有其一定的使用范围，针对不同的分离组分，应该选择合适型号的凝胶。

有时 $K_d>1$，表示凝胶对组分有吸附作用，此时 $V_e>V_o+V_i$。例如一些芳香族化合物的洗脱体积远超出理论计算的最大值，这些化合物的 $K_d>1$。又如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸在 Sephadex G-25 中的 K_d 值分别为 1.2、1.4 和 2.2。

9.3 葡聚糖凝胶色谱实验技术

9.3.1 凝胶的选择

实验中选用何种型号的凝胶应根据被分离混合物分子的大小及目的来确定，如除盐和除游离的荧光素，则可选用粗、中粒度的 G28 或 G500、G250 多用于分离蛋白质单体，G200 多用于分离蛋白质凝胶聚合体等。

9.3.2 凝胶的处理

商品凝胶一般是干燥的颗粒，使用前要先用欲使用的冲洗液浸泡，使其充分膨胀，否则有引起凝胶柱破裂的危险。热胀法是常用的前处理法，即把浸于冲洗液中的凝胶加热，让它膨胀并除去气泡，温度够高的话（加温至近沸腾）也可消毒杀菌。凝胶处理过程不能剧烈搅拌，否则易使颗粒破裂，影响流速。

9.3.3 装柱和平衡

根据分离样品的种类和样品的数量选择合适的色谱柱，一般选用细长的柱作凝胶色谱。纯化蛋白质时，柱体积应为样品体积的 25～100 倍。去盐、游离荧光素约为样品体积的 4～10 倍。柱太短，分离效果差；柱长一些，分离效果好，但柱太长，则延长分离时间，样品也稀释过度。色谱柱的内径也要选择适当，内径过细，会发生“器壁效应”，即靠近管壁的流速要大于中心的流速影响分离效果。色谱柱的内径和高度应有一定的比例，对于除盐来说可用 1∶5～1∶25；而纯化蛋白质常为 1∶20～1∶100。

先在柱中加入约 1/3 体积的冲洗液，边轻轻搅拌边将溶胀好的凝胶悬浮液倒

入其中，自然沉降，同时打开下方出口让洗脱液流出，上面不断加入悬浮液，等到沉积到离顶部约 3～5 cm 处停止，让 3～5 倍柱床体积的缓冲液流过色谱柱，使柱平衡后即可使用。

9.3.4 加样与洗脱

样品体积不宜过多，最好为柱体积的 1%～5%，最多不要超过 10%。样品浓度也不宜过大，浓度过大则黏度大，分离效果差，一般不超过 4%。洗脱液应与膨胀时用的溶剂一致，更换溶剂会使凝胶体积发生变化，影响分离效果。洗脱液要有一定的离子强度和 pH。分离血清蛋白常用 0.029～0.1 mol·L^{-1}、pH 6.9～8.0 的 PBS 液（含 0.14 mol·L^{-1} NaCl）和 0.1 mol·L^{-1}、pH 8.0 Tris-HCl 缓冲盐溶液（含 0.14mol·L^{-1} NaCl）。

加样时，打开洗脱液出口使冲洗液流到距表面 1～2 cm，关闭出口，用滴管缓缓加入样品再打开出口，样品完全渗入凝胶后，加入冲洗液，出口处接上收集瓶开始色谱。

为了延长凝胶的使用寿命，所用溶剂和样品用之前都应该离心或经过 0.45 μm 的膜过滤以除去杂质。

9.3.5 凝胶柱的重复使用、再生与保存

在洗脱过程中，所有组分一般都可被洗脱下来，所以一般使用过的凝胶柱不需要任何处理，只在色谱结束后，用缓冲液稍加平衡即可进行下一次色谱。但多次使用后，往往有一些污染物沉积在柱床表面，可将此部分凝胶用刮刀挖掉；若凝胶颗粒逐渐沉积压紧，导致流速变慢，则需将凝胶自柱内倒出，重新填装，或使用反冲法，使凝胶松散冲起，然后自然沉降，形成新的柱床，这样流速会有所改善。如果色谱柱中凝胶严重污染，则需将凝胶再生，重新装柱。常用 50 ℃左右的 0.5 N 氢氧化钠和 0.5 N 氯化钠混合液浸泡，再用水洗净。

葡萄糖凝胶为碳水化合物，能被微生物（如细菌和霉菌）分解。这样会破坏凝胶的特性，影响分离效果。为防止细菌生长和发酵，可用 0.02% 叠氮化钠（NaN_3）、0.05% 三氯叔丁醇（仅在弱酸有效）或 0.002% 洗必泰、0.01% 乙酸苯汞（在弱碱中有效）以及 0.1 mol·L^{-1} 氢氧化钠溶液等作防腐剂。色谱前再用水或平衡液将防腐剂洗去。

凝胶的保存方法有以下 3 种：

（1）经常使用的凝胶保存在液相中最方便，即于凝胶悬液中加入防腐剂（一般为 0.02% NaN_3 或 0.002% 洗必泰）或高压灭菌后 4 ℃保存。此法至少可以保存半年以上。

(2) 凝胶用完后，以水冲洗，然后用60%～70%乙醇冲洗，凝胶体积缩小，即在半收缩状态下保存。

(3) 长期不用者，最好以干燥状态保存，即水洗除去碎颗粒和杂质后，再用不同浓度的乙醇，由70%、90%到95%逐步脱水，在60～80 ℃下烘干。

9.4 Sephadex LH-20 凝胶性能

Sephadex G-10、Sephadex G-25这些葡聚糖凝胶是在水溶液中使用，若要用有机溶剂作为流动相，则可在葡聚糖分子上引入一个基团，增加其亲脂性。比如Sephadex LH-20就是在Sephadex G-25上引入羟丙基而得到的一种凝胶(结构式见图9.2)。

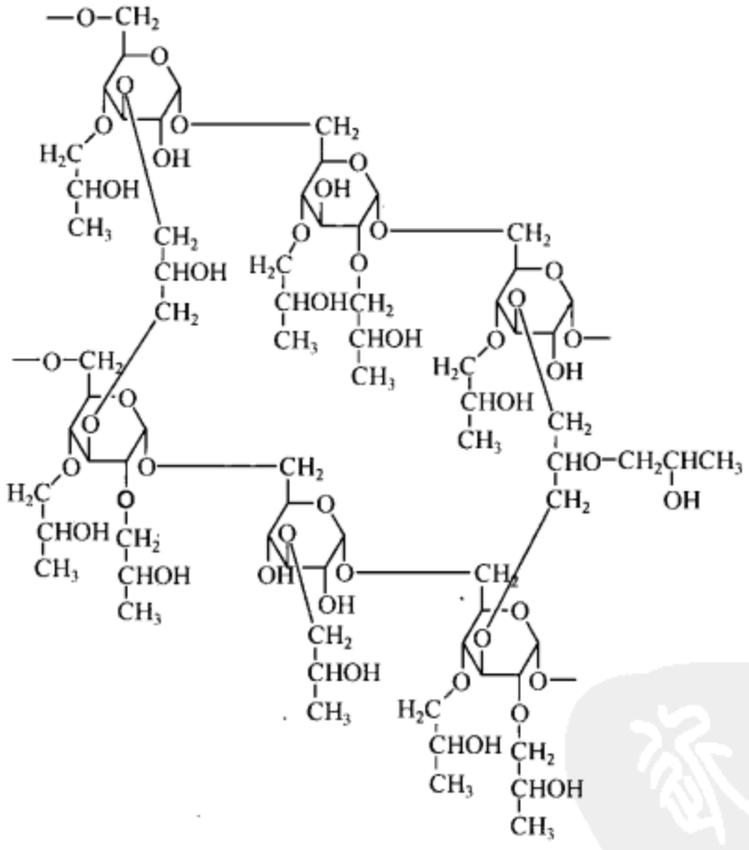


图9.2 Sephadex LH-20的结构

Sephadex LH-20凝胶的物理性质和色谱参数见表9.2。Sephadex LH-20凝胶既具有亲水性，又具有亲脂性。它不仅能在强极性溶剂中溶胀，也可在弱极性或中等极性溶剂中溶胀，因此其使用不受溶剂系统限制，可使用水、任何醇类、丙酮、乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯等各种溶剂。但在不同溶剂中具有不同溶胀体积，在水、甲醇等极性溶剂中溶胀体积最大(表9.3)。Sephadex LH-20

在最大程度溶胀时，排阻极限是5000，也就是说，相对分子质量大于5000的分子将不被Sephadex LH-20凝胶柱保留，直接流出柱外。因此，Sephadex LH-20凝胶适于分离相对分子质量小于5000的小分子化合物，尤其适用于天然产物在有机溶剂中的纯化。例如：类固醇、萜类、脂类以及小分子多肽等，同时适用于分子类别非常相似的物质的分离和工业规模的制备，既可用于初步纯化步骤，也可用于最终精制步骤，如非对映同分异构体的分离。

表9.2 Sephadex LH-20的物理性质和色谱参数①

胶粒形状		球形、多孔
颗粒直径	干	18～111 μm，平均70 μm
	甲醇	27～163 μm，平均103 μm
pH稳定性	操作中	2～11
	清洗中	2～13
化学稳定性		在大多数水溶液和有机溶剂中稳定。在pH 2以下或强氧化剂中不稳定
高压耐受性		121 ℃少于20 min稳定
操作温度		4～40 ℃
最大线性流速		12 cm · min^{-1}
推荐线性流速		1 cm · min^{-1}
上样量	吸附模式	取决于所需分辨率
	分子筛模式	床体积的2%
	分配模式	床体积的1%
排阻极限		肽4 kD(大约35个氨基酸，与所用溶剂有关)，有机小分子5 kD(与所用溶剂有关)

① 有关数据由GE Healthcare公司提供。

Sephadex LH-20除具备分子筛功能外，还具备吸附和分配色谱特性。因此其分离原理以凝胶过滤为主，同时兼有反相分配和吸附作用。如果使用正相溶剂洗脱，这主要靠凝胶过滤作用来分离，大分子的化合物保留弱，先被洗脱下来，小分子的化合物保留强，最后被洗脱出柱。如果使用反相溶剂洗脱，Sephadex LH-20对化合物还起反相分配的作用，所以极性大的化合物保留弱，先被洗脱下来，极性小的化合物保留强，后被洗脱出柱。

表 9.3 Sephadex LH-20 在不同溶剂中的溶胀体积[①]

溶剂	溶胀体积/mL·g^{-1}干凝胶
二甲基亚砜	4.4～4.6
嘧啶	4.2～4.4
水	4.0～4.4
二甲基甲酰胺	3.8～4.2
生理盐水	3.9～4.1
甲醇	3.8～4.1
二氯乙烷	3.8～4.1
氯仿[②]	3.8～4.1
丙醇	3.7～4.0
乙醇[③]	3.6～3.9
异丁醇	3.6～3.9
甲酰胺	3.6～3.9
二氯甲烷	3.6～3.9
丁醇	3.5～3.8
异丙醇	3.3～3.6
四氢呋喃	3.3～3.6
二氧杂环己烷	3.2～3.5
丙酮	2.4～2.6
乙腈[④]	2.2～2.4
四氯化碳	1.8～2.2
苯	1.6～2.0
乙酸乙酯	1.6～1.8
甲苯	1.5～1.6

① 有关数据由 GE Healthcare 公司提供；② 含 1%的乙醇；③ 含 1%的苯；④ 溶胀体积小于 2.5 mL·g^{-1}的溶剂没有使用价值。

9.5 凝胶色谱在天然产物化学中的应用

尽管其他凝胶也被应用到天然产物化学研究中，但是可以说 Sephadex LH-20 是专门为小分子化合物尤其是天然产物分离纯化而设计的凝胶，非常适合含羟基、羧基的亲水成分如有机酸、苷类、黄酮、多酚等的纯化，而且也适合亲脂性成分如生物碱、萜类和内酯等成分的分离。其载量可高达 300 mg 样品/mL 凝胶，极少需要

再生，可以非常经济地用于大规模制备天然产物，现已广泛应用于天然产物的分离纯化和制备中，Sephadex LH-20 凝胶色谱已成为天然产物化学研究中一个常规的分离纯化技术。

Sephadex LH-20 凝胶色谱适合大部分天然产物的分离纯化，可弥补硅胶等色谱介质的不足，尤其在去除色素、富集和精制所需成分等方面都非常有效，在各种天然产物如苷、生物碱、黄酮、内酯、多酚、甾类等分离纯化的大量文献报道中都有应用，成为天然产物分离常用色谱方法。德国植物化学家 Hans Henke 教授著有《Sephadex LH-20 制备凝胶色谱分离》专著，包括了上千种化合物的制备纯化[2]。下面介绍 3 个实例。

9.5.1 中国绿茶中儿茶素类成分的分离[3]

儿茶酚是茶叶中黄烷醇类物质的总称。儿茶素（catechin）是茶多酚中最重要的一种，约占茶多酚含量的 75%～80%，具有抗氧化、抗突变、预防肿瘤、抗艾滋病毒、抗血小板凝聚、减少低密度脂蛋白、抑菌等多种功效，是茶叶的重要活性物质，也是茶的苦涩味的来源之一。但由于分子中含有多个酚羟基，不易分离制备纯的对照品。加拿大学者应用 Sephadex LH-20 凝胶色谱从中国绿茶中分离得到 4 个儿茶素类成分。操作流程如下（参见图 9.3）：

取 50 g 市售绿茶，用热水（80 ℃）提取，得到儿茶酚粗提取物。将 Sephadex LH-20 用乙醇溶胀，装柱（1.6 cm×90 cm），平衡后，取 0.5 g 儿茶酚粗提取物溶于 5 mL 乙醇中，湿法上样，用乙醇洗脱，流速 1.2 mL·min^{-1}，用流分收集器收集流分，合并得到 6 份（Ⅰ～Ⅵ）。

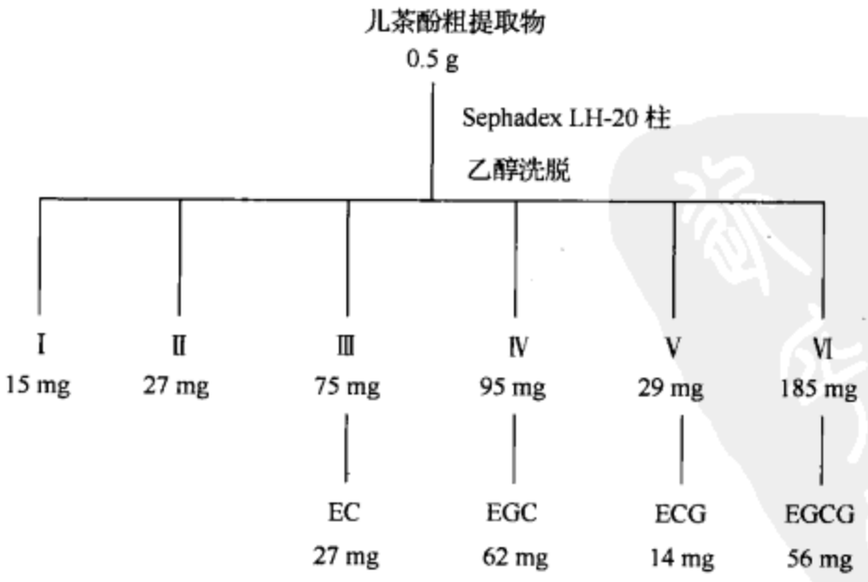


图 9.3 从中国绿茶中提取分离儿茶素类成分的流程

各流分经 TLC 检测[硅胶板，$CHCl_3$-MeOH-H_2O（65∶35∶10）下层]，发现在流分Ⅲ～Ⅵ中均含有一个主要的儿茶酚类成分，R_f 分别为 0.39（Ⅲ）、0.28（Ⅳ）、0.30（Ⅴ）和 0.19（Ⅵ）。HPLC 色谱图中显示各流分中均有一个主要成分（图 9.4），经半制备 HPLC 纯化得到 4 种儿茶素类成分，保留时间分别为 9.10 min（Ⅲ）、8.21 min（Ⅳ）、14.85 min（Ⅴ）和 9.82 min（Ⅵ），鉴定为表儿茶酚（epicatechin，EC）、表没食子儿茶酚[(－)-epigallocatechin，EGC]、表儿茶酚没食子酸酯[(－)-epicatechin-3-gallate，ECG]和(－)-表没食子儿茶素没食子酸酯[(－)-epigallocatechin-3-gallate，EGCG]。

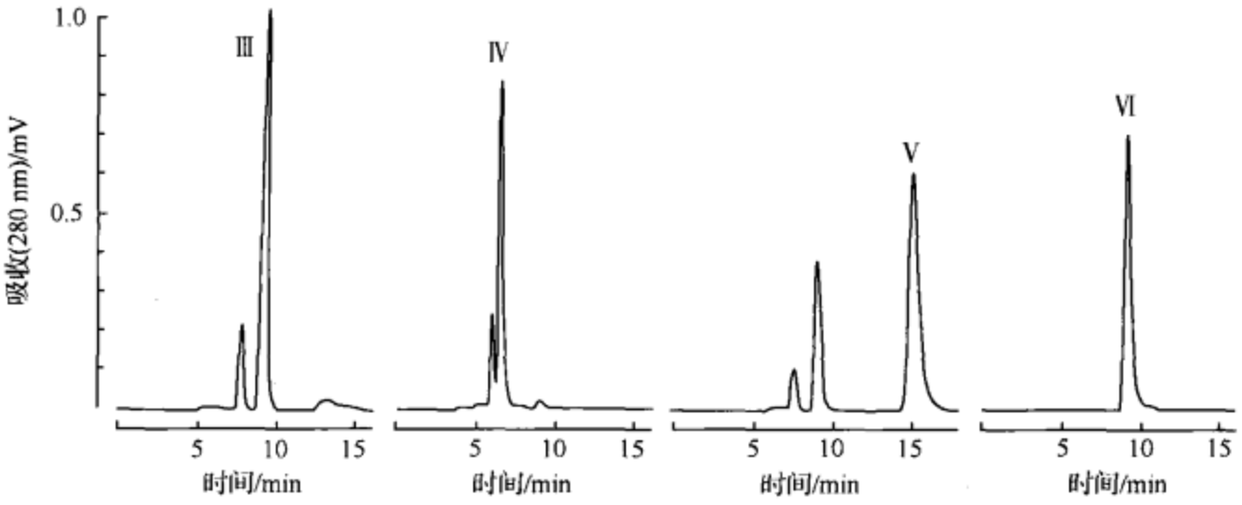


图 9.4 绿茶提取物经 Sephadex LH-20 色谱得到的流分Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ的 HPLC 色谱图[3]

9.5.2 金龟子绿僵菌中绿僵菌素的分离

绿僵菌素(destruxins)是金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 产生的一类环缩羧肽类毒素(部分结构见图 9.5)，具有较强而又多样化的生物活性，分析和活性研究需求大量的绿僵菌素对照品，但是通常菌株中绿僵菌素含量很低，分离纯化得到单体化合物非常困难，合成产率很低也难满足需求。因此，至今为止，除绿僵菌素 A 外，其他绿僵菌素均还没有绿僵菌素对照品出售。

奥地利 Seger 课题组应用 Sephadex LH-20 凝胶色谱和高效逆流色谱建立了从绿僵菌发酵物快速分离制备绿僵菌素的方法[4]。首先将绿僵菌发酵物用二氯甲烷提取，得到的提取物经制备 Sephadex LH-20 色谱柱来富集这些环肽类成分，色谱条件为：150 g Sephadex LH-20 用二氯甲烷-丙酮（85∶15）溶胀，装柱（100 cm×4 cm），用 1 L 二氯甲烷-丙酮（1∶1）混合液冲洗，然后用 1L 二氯甲烷平衡后，取 3.5 g 绿僵菌培养物二氯甲烷提取物溶于 15 mL 二氯甲烷，湿法上样，分别用 1000 mL 二氯甲烷、500 mL 二氯甲烷-丙酮（85∶15）、500 mL 二氯甲烷-丙酮（1∶1）和 500 mL 丙酮洗脱，流速 1.2 mL·min^{-1}，用流分收集器收集流分，每份 6 mL，收集的流分用 HPLC 分析(图 9.6)，合并得到 4 个部分：CF1(120 mL，2.1 g)、CF2(228 mL，0.4 g)、CF3(30 mL，11 mg) 和 CF4(48 mL，38 mg)，从

图 9.6可以看出，凝胶色谱起到了初步分离和成分富集作用。进一步在 HPLC 监控下，应用高效逆流色谱从 CF1 中分离得到绿僵菌素 A、B 和 E，从 CF2 中分离得到绿僵菌素 C、C1 和另外一个相对分子质量为 579 的绿僵菌素，而 CF3 和 CF4 的主要成分分别为绿僵菌素 E-diol 和绿僵菌素 D。

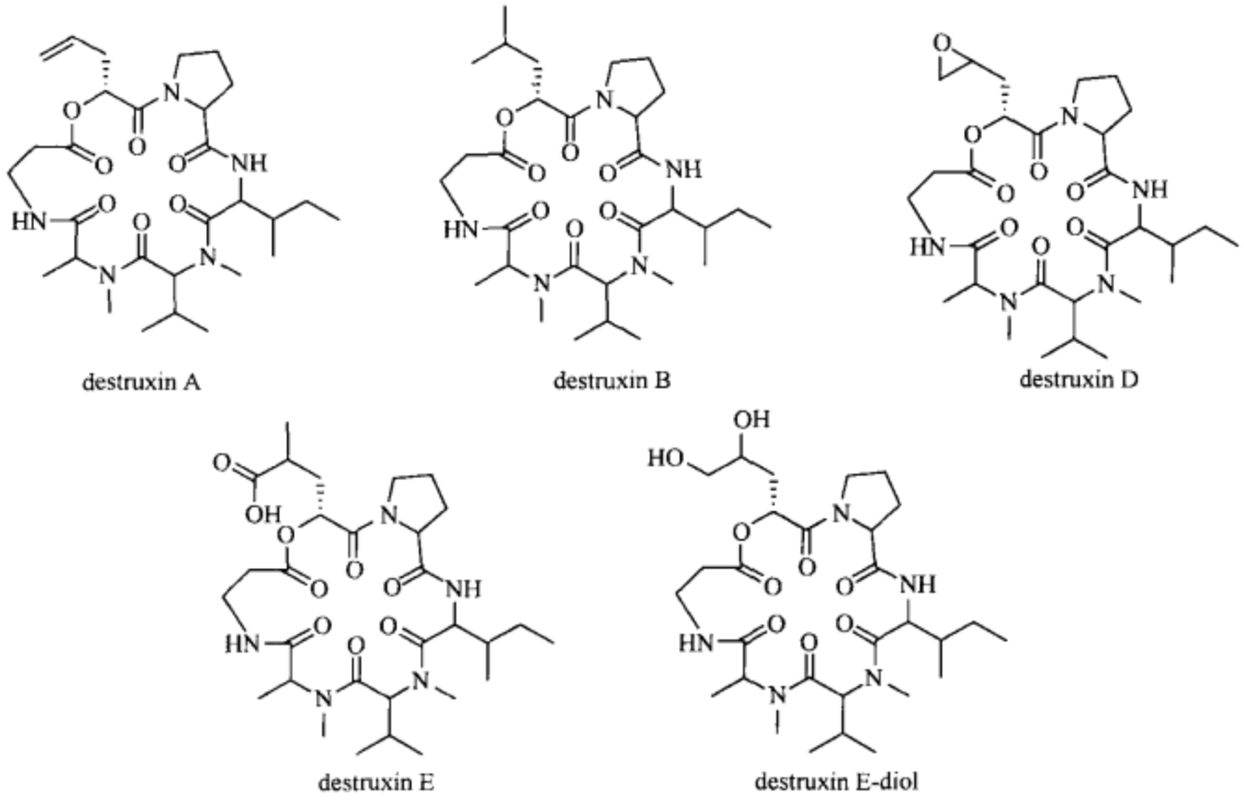


图 9.5 几个主要绿僵菌素类成分的结构

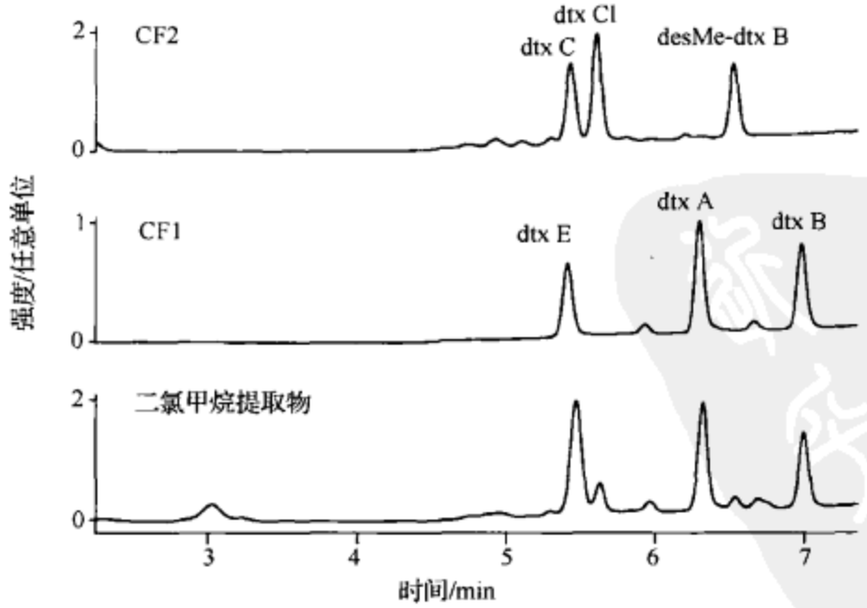


图 9.6 Sephadex LH-20 色谱柱分离富集的流分 CF1 和 CF2 的 HPLC-DAD 色谱图[4]
色谱条件：Zorbax SB-C18 色谱柱(150 mm×2.0 mm，3.5 μm)，水-乙腈梯度洗脱(0 min，30% CAN；4 min，98% CAN；5.3 min，98% CAN；5.4 min，30% CAN)，流速 0.3 mL·min^{-1}，检测波长 210 nm。
dtx 为绿僵菌素的缩写符号

9.5.3 应用 Sephadex LH-20 去除色素类杂质

Sephadex LH-20 凝胶色谱在天然产物化学研究中除了直接分离纯化各类天然产物外，更普遍的是用于去除色素，富集所需要的成分。有各种方法用于色素的去除，如活性炭吸附、大孔树脂等，但以 Sephadex LH-20 凝胶色谱除色素效果好、操作简单、样品损失小。下面仅以羊耳菊化学成分分离纯化为例，介绍 Sephadex LH-20 在去除色素方面的应用。

羊耳菊(*Inula cappa* DC)为菊科旋覆花属植物，又名白牛胆(云南、广东、广西、湖南、浙江)、山白芷(广东、四川、浙江、云南)、见肿消(云南)，分布我国南方各省区，其地上部分和根入药，味辛、性平，具有祛风痰、散热毒作用，用于治疗哮喘等病证。在傣族，羊耳菊又名“纳罕”，为傣医名方“雅叫哈顿散”的主药之一，该复方临床上用于治疗感冒发烧、喉炎、咳嗽咳血、虚痨、心悸、月经不调及产后流血等症有肯定的疗效。在研究其全草化学成分时[5,6]，发现其乙醇提取物中色素多，干扰化合物的富集和纯化。分离中采用 Sephadex LH-20 凝胶色谱结合硅胶色谱，获得较好效果。如乙酸乙酯部分经硅胶柱色谱分离得到 3 个部分(S1～S3)，S1 部分在 TLC 上无法观察到样品斑点，无法继续分离。Sephadex LH-20 用甲醇溶胀，装柱(3.5 cm×100 cm)，平衡后，取 1.5 g S1 溶于 5 mL 甲醇湿法上样，用甲醇洗脱，流速 1.2 mL·min^{-1}，甲醇洗脱，色素首先被洗脱下，随后其他化合物被富集或分离(图 9.7)。

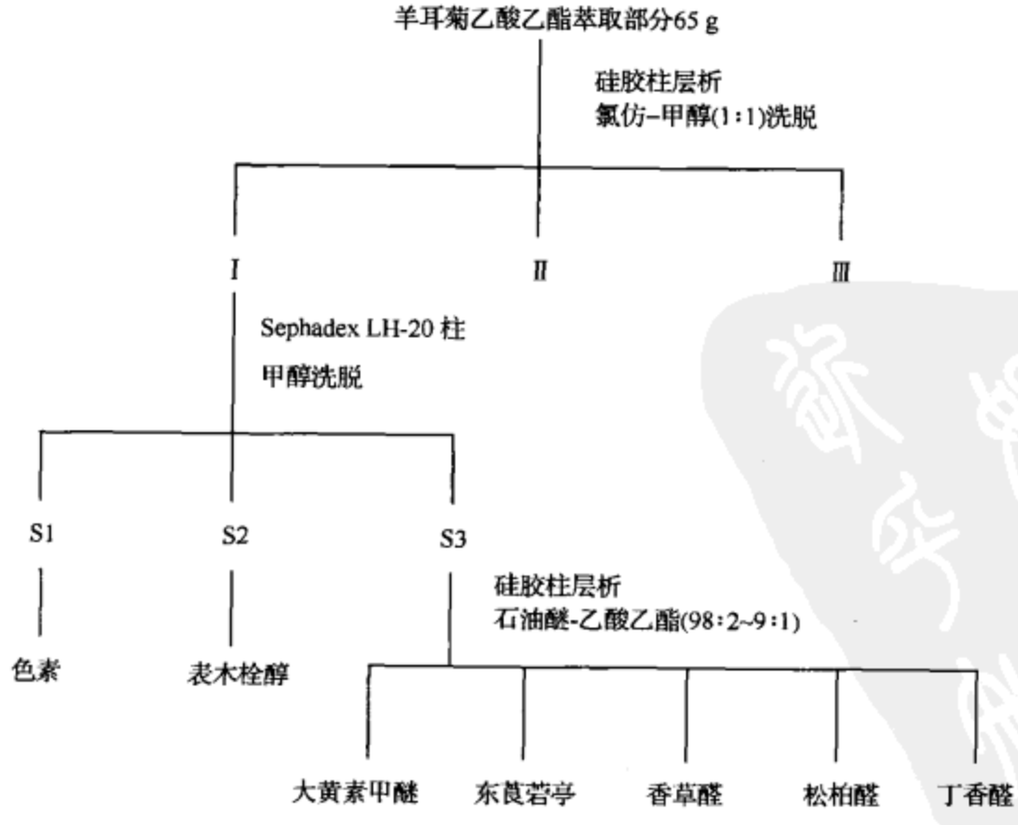


图 9.7 羊耳菊乙酸乙酯部分的分离

参考文献

[1] Porath J, Flodin P. Gel filtration: a method for desalting and group separation. Nature, 1959, 183: 1657～1659.

[2] Henke H. Preparative Gel Chromatography on Sephadex LH-20. Heidelberg, Germany: Hüthig Verlag, 1995.

[3] Amarowicz R, Shahidi F. A rapid chromatographic method for separation of individual catechins from green tea. Food research International, 1996, 29(1): 71～76.

[4] Seger C, Eberhart K, Sturm S et al. Apolar chromatography on Sephadex LH-20 combined with high-speed counter-current chromatography. High yield strategy for structurally closely related analytes-Destruxin derivatives from *Metarhizium anisopliae* as a case study. J Chromatogr A, 2006, 1117(1): 67～73.

[5] 谢红刚，张宏武，张江等. 羊耳菊的化学成分. 中国天然药物，2007，5(3)：193～196.

[6] Xie H G, Chen H, Cao B et al. Cytotoxic germacranolide sesquiterpene from *Inula cappa*. Chem Pharm Bull, 2007, 55(8): 1258～1260.

（邹忠梅）

第 10 章　优化传统提取与分离技术

10.1　传统中药提取工艺

中药及天然药物多数为植物药，其化学成分十分复杂，在天然产物的生物合成中属初级代谢产物，如纤维素、叶绿素、淀粉、蛋白质、树脂、树胶，蜡质等。由初级代谢途径衍生出来的次级代谢产物，如生物碱，萜类、甾体、黄酮、香豆素、醌类等大多具有一定生物活性，但这些成分在植物体内的含量很低，多则百分之几，少则百万分之几。提取和分离其中的有效成分是一个去粗取精的过程，经过提取分离纯化，最后得到所需的有效成分。传统的或经典的提取工艺大多利用各种成分在官能团极性、溶解度、酸碱性等方面的差异来进行，方法比较简便易行，一般能得到简单成分和高含量成分，但对微量成分和结构性质相似的成分，往往无法分离。另外，在实验操作中，一定程度上依赖于个人实验技能和试验经验。

10.1.1　传统萃取方法

10.1.1.1　简单萃取法

传统的简单萃取通常是利用混合物中各成分在两种互不相溶的溶剂中分配系数的不同而达到分离的方法。混合物中各成分在两相溶剂中分配系数相差越大，则分离效率越高。如果在水提取液中的有效成分是亲脂性物质，一般多采用亲脂性有机溶剂，如苯、氯仿或乙醚进行萃取；如果有效成分是偏于亲水性的物质，在亲脂性溶剂中难溶解，就需要改用与水不相混溶而具有一定程度亲水性的有机溶剂，如乙酸乙酯、正丁醇等萃取。

10.1.1.2　连续萃取法

为克服使用分液漏斗多次萃取的操作麻烦，Kutcher 和 Steude 在 1903 年发明了连续萃取器，其利用的是两溶剂的密度不同自然分层和分散相液滴穿过连续相溶剂时发生传质的性质。选择连续萃取法时，需视所用溶剂的密度大小而采用不同式样的仪器，溶剂在进行萃取后，可自动流入加热器中，蒸发成为气体，遇冷凝器复变成液体，再进行萃取，如此循环不已。此法简便且可避免乳化，由于两相呈动态逆流相遇，并经常能保持较大的浓度差，萃取过程能连续不断地进行，所以溶剂用量不多且萃取效率较高。

10.1.2　传统分离纯化方法

10.1.2.1　溶剂分离法

药材经水提取，提取液经适当浓缩后所得浸膏可依次用石油醚、乙醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、乙醇分别溶解，可初步得到不同极性的成分；也可于水浸膏中拌入适量惰性填充剂如硅藻土、纤维素等，低温干燥并粉碎后，再选用不同极性溶剂依次提取，这样使提取物中各种成分依其在不同极性溶剂中溶解度的差异达到初步的分离。如果药材用乙醇提取，醇提取液减压浓缩基本去尽醇后的醇浸膏也可按上法处理，或者再加适量水混悬后以不同极性的有机溶剂如石油醚、乙醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇等依次萃取，将总提取物划分为若干部位供进一步分离。

10.1.2.2　逆流分溶法

当物质的分配系数接近时，则需要采用逆流分溶法(counter current distribution，CCD)分离。当一纯化合物溶于一溶剂而与另一互不相溶的溶剂混合振摇时，此化合物即分配于两层溶剂中。假使所用二溶剂的体积相等，并假设 1 个单位纯化合物在此二溶剂内的分配系数$K=1$，于第一次振摇后，上下两层溶剂各含所有溶解物的一半(即管 1)，而加新的上层溶剂于原管(即管 0)。振摇两管后，将上层溶剂分别各向右移置一管(即管 1 的上层移入管 1；管 0 的上层移入管 1)。逆流分配仪即由若干乃至数百支特制的管子组成。由于逆流分溶法具有分离混合物各组分的能力，曾经成为中药成分常用的分离方法。

10.1.2.3　液滴逆流分配法

液滴逆流分配法(droplet counter current chromatography，DCCC)又称液滴逆流色谱法。它是在逆流分溶法基础上改进的两相溶剂萃取法，原理与逆流分溶相似，是利用混合物中各组分在两液相间的分配系数的差别，由流动相形成液滴，通过作为固定相的液柱而达到分离纯化的目的。

10.1.2.4　pH 梯度萃取法

当提取物中含有不同碱性成分(生物碱)或酚酸性成分时，常采用 pH 梯度萃取法分离。如混合生物碱的氯仿溶液，用不同酸性的水溶液萃取，可使不同强弱碱性的生物碱得到初步分离。如混合的酚酸类成分的氯仿溶液，用不同碱性的水溶液萃取，可使不同酸性成分得到初步分离。

10.1.2.5　沉淀法

在中草药提取液中加入某些试剂使产生沉淀，以获得有效成分或除去杂质，这

是经典分离方法之一，常用铅盐沉淀法。中性乙酸铅可与酸性或酚性成分结合成不溶性铅盐，因此可沉淀有机酸、蛋白质、氨基酸、黏液质、鞣质、酸性皂苷、树脂、部分黄酮苷和花青苷等。碱式乙酸铅沉淀范围更广，除上述中性乙酸铅能沉淀的物质外，还可沉淀某些苷类、糖类及一些生物碱等碱性成分。铅盐沉淀悬浮于水或稀醇中进行脱铅，即可回收原物。脱铅方法有通硫化氢气体使铅变成硫化铅沉淀出来，或加硫酸钠或磷酸钠饱和水溶液使铅成为硫酸铅或磷酸铅沉淀或加入强酸性阳离子交换树脂脱铅。硫化氢脱铅比较彻底，但溶液中可能存在多余的硫化氢。水溶性生物碱和氨基酸可用雷氏铵盐沉淀而分离。

10.1.2.6 透析法

利用小分子成分在溶液中可通过半透膜，而大分子成分不能通过半透膜的性质达到分离。在分离和纯化皂苷、蛋白质、多肽、多糖等成分时用透析法可除去无机盐、单糖、双糖等杂质。反之也可将大分子杂质留在半透膜内，让小分子成分通过半透膜进入膜外溶液达到分离和精制。透析膜有动物膜、火棉胶膜、羊皮纸膜、蛋白质胶膜、玻璃纸膜等。为快速透析，需经常更换清水使透析膜内外溶液的浓度差加大，也可用电透析法。

10.1.2.7 重结晶法

通过重结晶可对化合物实现进一步的分离纯化。大部分结晶是纯的化合物，但有时结晶也会是混合的。同时，有些成分即使很纯仍不一定结晶，而只呈无定形粉末。形成结晶难易往往是取决于一个化合物的属性，如大部分萜类在大多数溶剂中都能结晶，而皂苷类多数难形成结晶。

10.1.2.8 离子交换法

离子交换剂是一种高分子化合物，分子中具有解离性离子交换基团，当流动相通过交换柱时，这些解离性离子交换基团能与存在于流动相中的阳离子或阴离子物质起交换作用，而这种交换是可逆的。离子交换树脂是最普遍应用的一种离子交换剂，它由苯乙烯通过二乙烯基苯交链聚合而成。采用不同型号的离子交换树脂可将中草药中具有一定水溶性的酸性、碱性、两性和中性成分分开。当两种以上成分被吸着在离子交换剂上用洗脱液洗脱时，它们被洗脱的难易取决于各洗脱反应的平衡常数，离子交换色谱即是利用各成分被洗脱的难易不同来进行分离。

10.1.2.9 色谱法

色谱技术是 20 世纪 40～50 年代发展起来的分离方法。它的分离速度快、效率高，与各种高灵敏度的检测器和自动收集、记录装置结合后，更趋向于自动化，高

速化和微量化。它的发展和应用，对中药及天然药物有效成分的分离起着重大的推动作用，成为当今分离工作的主要手段。不同的色谱技术在其他章节中有专门叙述。

总之，中药及天然药物的有效成分的传统提取和分离工艺在中药及天然药物的有效成分研究及中药新药开发中曾起过积极的作用。随着科学技术的发展，提取和分离技术水平不断提高。但是，我国的中药提取生产水平与世界先进的天然药物提取生产水平差距甚大，影响了我国中药产品在世界药品市场的地位。国内中药和天然产物生产企业要想在竞争中赢得主动，必须采取先进的提取分离技术，才可能使我国中药产品生产和销售在国际市场占有更多的份额。因此，国家已将提取分离技术作为今后重点发展的技术之一。随着多学科相互渗透和对浸提原理及过程研究的深入，新的提取技术不断出现，提高了中药制剂的质量。因此，我国在大力研发推广适宜于工业化应用的提取分离新技术、新设备的同时，应加强自主创新和技术集成，才能使我国中药提取技术水平和产品质量整体大幅度提高，加强在国际市场的竞争力，将资源优势转变成经济效益。

10.2　优化传统提取技术

随着现代科技的发展，越来越多的现代制药技术应用于传统中药领域，为中药及天然药物研究注入新的活力。尤其是中药提取领域新技术的应用，使得中药及天然药物的提取水平有了很大飞跃。新技术的应用大大提高了有效成分的收率和纯度，加快了中药及天然药物制剂向速效性、可控性和稳定性发展的步伐。

10.2.1　提取材料的粉碎技术

粉碎是中药前处理过程中的必要环节。通过粉碎，可增加药物的表面积，促进药物的溶解与吸收，加速药材中有效成分的浸出。近年来，超微细粉化技术在中药粉碎中的应用日趋增多，应用超声粉碎、超低温粉碎等现代超细微加工技术，可将原生药从传统粉碎工艺得到的中心粒径 150～200 目的粉末(75 μm 以下)，提高到现在的中心粒径为 5～10 μm，在该细度条件下，一般药材细胞的破壁率≥95%。这种新技术的采用，不仅适合于各种不同质地的药材，而且可使其中的有效成分直接暴露出来，从而使药材成分的溶出和起效更加迅速完全。由于粉碎过程中不产生局部过热，且在低温状态下进行，粉碎速度快，因而最大程度地保留了中药材中生物活性物质及各种营养成分，可提高药效。对某些特殊药材的粉碎，应根据其特点选择恰当的方法。根据中药不同来源与性质，粉碎可采用单独粉碎、混合粉碎、干法粉碎和湿法粉碎等方法。对一些富含糖分、具一定黏性的药材可采用传统粉碎方法如串料法；对含脂肪油较多的药材可用串油法；对珍珠、朱砂等可采用“水飞

法”;对热可塑性的物料可采用低温粉碎等方法。

10.2.1.1 超微粉碎技术[1]

超微粉碎技术是近 20 年迅速发展形成的一种新技术,它可以将原材料加工成微米级甚至纳米级的超细微粉,并已经在各行各业得到了广泛的应用。在发达国家超微粉碎技术被广泛应用于冶金、食品、医药、化妆品、航天航空等国民经济部门及军事领域;在国内,该项技术主要应用于中药、农产品和食品等领域。通过超微粉碎的物料,具有巨大的比表面、空隙率和表面能,从而具有高溶解性、高吸附性、高流动性等多方面的活性和物理化学方面的新特性。

1) 超微粉碎技术的原理

超微粉碎的原理与普通粉碎相同,只是细度要求更高,它利用外加机械力,使机械力转变成自由能,部分地破坏物质分子间的内聚力,来达到粉碎的目的。天然植物的机械粉碎过程,就是用机械方法来增加天然植物的表面积,表面积增加了,亦引起自由能的增加,但不稳定,因为自由能有趋向于最小的倾向,故微粉有重新结聚的倾向,使粉碎过程达到一种粉碎与结聚的动态平衡,于是粉碎便停止在一定阶段,不再向下进行,所以要采取措施阻止其结聚,以使粉碎顺利进行。

2) 超微粉碎技术的定义

超微粉碎技术是利用机械或流体动力的方法,将物料颗粒粉碎至微米级甚至纳米级微粉的过程。超微粉碎技术是粉体工程中的一项重要内容,包括对粉体原料的超微粉碎、高精度的分级和表面活性改变等内容。据原料和成品颗粒的大小或粒度,粉碎可大概分为粗粉碎、细粉碎、微粉碎和超微粉碎 4 种类型(表 10.1)[2]。

表 10.1 粉碎类型

粉碎类型	原料粒度/mm	成品粒度/mm
粗粉碎	10～100	5～10
细粉碎	5～50	0.1～5
微粉碎	5～10	<100 μm
超微粉碎	0.5～5	10～25 μm

3) 超微粉体的特性[3～5]

当颗粒粒度变化到某一范围时,必将伴随有从量变到质变的过程,尤其在超微粉碎阶段表现得更为突出。因此经过超微粉碎后的超微粉体处于微观粒子和宏观物体之间的过渡状态,具有很多优良特性,如具有巨大的表面积和孔隙率,质量均匀,很好的溶解性,很强的吸附性、流动性,化学反应速度快,溶解度大,烧结温度低且烧结体强度高,填充补强性能好,又具有独特的光、电、磁性能等。

4）超微粉碎的方法

（1）普通超微粉碎方法。目前超微粉碎技术有化学合成法和机械粉碎法两种：化学合成法产量低、加工成本高、应用范围窄；机械粉碎法成本低、产量大，是制备超微粉体的主要手段，现已大规模应用于工业生产。机械法超微粉碎可分为干法粉碎和湿法粉碎（表 10.2）[6]，根据粉碎过程中产生粉碎力的原理不同，干法粉碎有气流式、高频振动式、旋转球（棒）磨式、锤击式和自磨式等几种形式；湿法粉碎主要是胶体磨和均质机。

表 10.2　超微粉碎分类

类　型		原　理
干法	气流式	利用气体通过压力喷嘴的喷射产生剧烈的冲击、碰撞和摩擦等作用力实现对物料的粉碎
	高频振动式	利用球或棒形磨介的高频振动产生冲击、摩擦和剪切等作用力实现对物料的粉碎
	旋转球磨式	利用球或棒形磨介在水平回转时产生冲击和摩擦等作用力实现对物料的粉碎
湿法	胶体磨	通过转子的旋转，产生急剧的速度梯度，使物料受到强烈的剪切、摩擦和湍动作用来粉碎物料
	均质机	利用急剧的速度梯度产生强烈的剪切力，使液滴或颗粒发生变性和破裂以达到微粒化的目的

（2）低温超微粉碎方法[1]。在微粉制备过程中，针对具有韧性、黏性、热敏性和纤维类物料的超微粉碎，一直是生产研究中的难点和重点。近年来，随着技术的进步，一种新的超微粉碎方法应运而生，这就是低温超微粉碎方法。该方法不同于普通的超微粉碎法，它是利用物料在不同温度下具有不同性质的特性，将物料冷冻至脆化点或玻璃体温度之下，使其成为脆性状态，然后再用机械粉碎或气流粉碎方式，使其超细化的方法。

天然植物具有极明显的韧性，应用普通超微粉碎方法很难将其完全超微化。研究发现，植物的韧性在低温下出现均匀地降低，虽然没有出现脆性转折点，但随温度降低其脆性增加的规律是存在的，且有一个最合适的低温范围，在该低温范围内，植物脆性最大。在快速降温过程中，物料各部位出现不均匀收缩而产生内应力，导致脆弱部位极易发生破裂和龟裂、内部组织力降低。这时，施加一定的冲击，经快速降温处理过的物料，极易破碎成细粉。

将物料在快速低温状态下粉碎，有三种方法：①先将物料在液氮－196 ℃快速降温至低温催化状态，迅速将其投入常温粉碎机中粉碎；②将常温的物料，投入粉碎机中粉碎，粉碎机内部是低温状态；③粉碎物料和粉碎机内部，均为低温进行粉

碎操作。

低温超微粉碎法可粉碎在常温下难以粉碎的物料，如纤维类、热敏性和受热易变质的物质(血液制品、蛋白质及酶等)；对含芳香性、挥发性成分的天然植物进行低温超微粉碎，可避免有效成分的损失；在低温环境下细菌的繁殖受到抑制，避免产品污染；有利于改善物料的流动性；可提高对易燃、易爆物品粉碎的安全性。但其生产成本极高，对于低附加值的产品难以承受，故多用于附加值较高的生物类产品的超微粉化。

5) 超微粉碎技术在中医药领域的应用研究

超微粉碎技术已经在中药生产中显露出特有的优势。该技术提高了细胞破壁率、比表面积、有效成分溶出度、生物利用度，能增强药理作用、减少用药量、节约药材、保护资源，同时还可以改善气味、口感，提高药品质量。宋丽丽等[7]对六味地黄方超微细粉的有效成分熊果酸与丹皮酚溶出特性的研究表明，六味地黄方经超微细粉后，其化学成分的组成没有明显变化，但溶出速度和溶出量均明显提高。刘产明等[8]进行的不同粒度三七的体外溶出试验中，测定了三七微粉、细粉、粗粉和颗粒在 45 min 时溶出物的含量和三七总皂苷的溶出量，结果表明，粒度越小溶出度越大。据研究，肠胃对物质颗粒的最佳吸收粒度为 15 μm 左右，而微米中药的颗粒就达到了这个最佳吸收细度水平；由于微米中药有效成分在胃肠道的溶解度明显增加，从而增加药物的生物利用度，加快了药物起效时间。

中药大部分是复方，复方由各药材组成，细胞破壁后，细胞内的水分及油分迁出，使微粒子表面呈现半湿润状态，粒子与粒子之间会形成稳定的粒子团(或称之为微颗粒)，每一个粒子团都包含相同比例的中药成分。该粒子团的物理结构随组分的 HLB 值(亲水、亲油平衡值)、延展性、破碎性、含水(油)率、相对密度等不同组合和不同的相互作用而不同。这种结构会使中药材各有效成分均匀化，使各种成分均匀地被人体吸收，这也可以增强药物的作用效果。灵芝含有丰富的氨基酸和微量元素，具有激活免疫功能、抗肿瘤、抗血栓等作用，超微粉碎后，疗效发挥更全面[9]。

药材超细粉在仁术健胃颗粒中的应用，是中药颗粒剂制法的创新，节省了辅料，保留了药材的有效成分，有利于制剂的成型，改善颗粒剂的稳定性[10]。崔秀君等[11]以胎盘超微粉碎技术进行颗粒制备，试验发现胎盘超微粉粒度、色泽、味道、分散程度较好，经薄层鉴别、氨基酸分析与普通粉无显著差异，质量控制方法专属性强。孙强等[12]将当归进行微米级别的超微粉碎，与辅料均匀混合后，用粉末直接压片法制备片剂，结果显示质量稳定，微粉化当归片中阿魏酸的含量高于市售当归片。

10.2.1.2 破碎提取法[13,14]

破碎提取法的应用原理是通过对植物材料在适当溶剂中充分破碎而达到提取

分离的目的。根据流体力学原理，研制出一种新型的破碎提取器，这种提取器主要由高速电机、破碎刀具、容器、底座、主柱及调速开关等组成。电机转速分快慢两档，破碎提取一次仅需 1～2 min，提取后药材被破碎成匀浆状。袁珂等用不同方法从冬凌草中提取萜类成分，结果破碎提取法较其他提取法提取的冬凌草甲素含量高，时间仅需 2 min，杂质少，易脱色，单体易结晶。胡润淮等对忍冬叶不同提取工艺进行研究，以绿原酸含量为指标，研究表明，破碎提取法所提取的绿原酸含量比较高，且杂质较少。袁珂等对车前草采用 5 种不同的提取方法，对提取物的收率进行比较，并以乌苏酸为考察指标分别进行含量测定，结果破碎提取法所提取的乌苏酸含量较高。破碎提取法目前仅局限于实验室，要应用于工业化大生产，仍需进一步研究[13,14]。

10.2.2　常温超高压萃取[15]

超高压萃取技术(ultrahigh-pressure extraction，UPE)也是一种萃取新技术，其工作原理是在升压状态下溶剂快速进入细胞内，使细胞内充满溶剂；在保压状态下有效成分充分溶解在溶剂中；卸压时溶解了有效成分的溶液由细胞内释放出来，进行分离纯化，达到萃取的目的。影响超高压萃取技术的因素主要包括溶剂的选择、浓度、压力、保压时间、浸泡时间等。

10.2.2.1　超高压萃取技术特点

(1) 提取效率高。由于压力较高，溶剂能在极短时间渗透到细胞内，使有效成分迅速达到溶解平衡。且超高压法的提取液澄清度、稳定性较传统工艺高，杂质含量少，简化了后续的分离纯化工作。

(2) 保留提取物生理活性。超高压提取过程中压力每升高 100 MPa，温度约升高 3 ℃。由于高压容器和外界环境有良好的热交换，在整个提取过程中基本可以维持在室温下进行，因而最大程度地保留了中药中生物活性物质，避免了因高温而引起的有效成分变性、损失和药理活性降低等问题。

(3) 能耗低。超高压萃取只是在升压阶段消耗能量，在保压、卸压过程并没有能量的消耗，超高压萃取的运行成本远低于常规萃取方法和超临界 CO_2 萃取技术。

(4) 绿色环保。超高压萃取过程是在一个封闭系统下进行，没有溶剂的挥发，绿色环保。

10.2.2.2　超高压提取的影响因素

(1) 提取溶剂的影响：依据“相似相溶”原理，中药中的亲水性成分易溶于亲水性溶剂，亲脂性成分易溶于亲脂性有机溶剂。此外，溶剂的选择要综合考虑溶剂

极性、被提取成分及共存的其他成分性质，同时还需兼顾溶剂是否使用安全、价廉易得和浓缩方便等。

(2) 溶剂浓度的影响：中药有效成分复杂，需要根据所提化合物分子结构中功能基的极性大小和数量等情况选择合适浓度的提取溶剂。不同浓度的有机溶剂极性大小不同，因而对提取产物的溶解性也不同。

(3) 提取压力的影响：压力是超高压提取的一个重要因素，压力的影响主要表现在：①对药材浸润速率的影响，在溶剂通过药材颗粒表面毛细孔浸润到细胞内部过程中，增加压力、升高温度、增大药材颗粒的比表面都可以加快浸润速率；②对有效成分扩散速率的影响，溶剂浸润到细胞内部后，有效成分溶解在溶剂中，在卸压过程中增大细胞内外的渗透压差，加快了有效成分向外扩散的速率；③对传质阻力的影响，超高压可以破坏细胞壁和细胞内各种膜，降低了有效成分的传质阻力。在升压和卸压过程中，细胞壁和细胞膜的破坏使有效成分充分暴露，溶出更加迅速完全。

(4) 溶剂和原料比的影响：提取过程中，提取溶剂与原料的比值越大，则提取效率高，但当料液比过大时，有效成分在溶剂中的浓度过低，会导致分离纯化的困难。

(5) 提取时间的影响：超高压条件下，中药细胞内外有效成分扩散迅速，在极短时间内溶解扩散达到平衡。

10.2.2.3 超高压提取工艺流程及设备

(1) 超高压提取工艺流程。具体特点说明如下：①原料筛选，从原药材中筛选所需的叶、根、茎等；②预处理，药材的干燥、粉碎等前处理；③与溶剂混合，药材与提取溶剂按照一定的料液比混合后包装并密封；④超高压处理，按照设定的工艺参数值进行处理；⑤除去残渣，采用离心或过滤的方法；⑥挥干溶剂，减压蒸馏等回收处理；⑦纯化，进行萃取、层析、重结晶等纯化处理；⑧有效成分，可进行相关的定性鉴别和定量测定。

(2) 超高压提取设备：间歇式超高压提取。将中药与溶剂按照一定的料液比混合后装在耐压、无毒、柔韧并能传递压力的软包装内密封，然后放入高压容器内，启动高压泵。首先将容器内的空气排出，然后升高到所需的压力，并在此压力下保持一定的时间；迅速打开控制高压回路的阀门，卸除压力；取出高压处理后的料液，进行后续处理。

10.2.2.4 超高压技术在中药提取中的应用

(1) 黄酮类：李宏伟等采用超高压提取山楂叶总黄酮，确定提取工艺参数溶剂 50%乙醇，压力 400 MPa，料液比 1∶45，温度 60 ℃，时间 3 min，黄酮收率达到

9.67%。王丽娟用热回流法提取 2 h 的收率为 7.25%，微波辅助提取的收率为 8.38%。综合比较，超高压法耗时分别为热回流法的 1/40、微波辅助提取的 1/45，收率分别高出二者 2.42%和 1.29%。由此可见，超高压法与热回流法和微波辅助法相比，具耗时短、效率高的优点。刘春明等通过试验确定超高压法提取淫羊藿中总黄酮的工艺参数如下：溶剂 50%乙醇，压力 350 MPa，时间 5 min。以淫羊藿总黄酮为指标，此条件下的收率为 9.67%，而回流法提取 4 h 的收率为 6.14%；用超声法提取 20 min 的收率为 7.64%。可见，超高压法的收率比回流法和超声法分别提高 53%和 2.03%，且耗时分别为热回流的 1/48 和超声法的 1/4。所以超高压法为淫羊藿总黄酮的提取提供了一个快速、高效的新方法。张守勤等使用超高压法提取水飞蓟素，工艺参数如下：溶剂 75%乙醇，压力 400 MPa，料液比 1∶50，时间 3 min。以水飞蓟素为指标，超高压提取 3 min 的收率为 2.424%，热回流提取 3 h 的收率为 2.16%。由此可见，超高压提取法耗时仅为热回流提取法的 1/60，收率却与热回流法相当。

(2) 皂苷类：使用超高压提取人参皂苷，溶剂 50%乙醇，料液比 1∶75，压力 500 MPa，时间 2 min。该法与水煮法、回流法和超声法进行比较，以人参皂苷的提取率为指标，超高压法提取 2 min 的人参皂苷收率为 7.335%，水煮法提取 4 h 的收率为 5.75%，超声法提取 30 min 的收率为 5.89%。可见，超高压提取法无论在提取时间还是在有效成分收率上均优于其他三种方法，为人参皂苷的生产提供了一种新技术。张守勤等使用超高压提取西洋参中人参皂苷，并和索氏提取法、热逆流法、超声辅助提取、微波辅助提取和超临界 CO_2 萃取进行比较，以人参三醇的提取率为指标，超高压法 2 min 的提取率为 0.861%，而超临界 CO_2 萃取、热回流等提取方法耗时在 15 min～6 h，收率在 0.284%～0.661%。可见，超高压法在提取西洋参皂苷方面较其他方法有一定的优势。

(3) 多糖类：吴华等通过超声辅助超高压提取灵芝孢子多糖，工艺参数为溶剂 5%乙醇，超声波处理时间 10 min，提取压力 400 MPa，保压时间 5 min。在该条件下，灵芝孢子的破壁率高达 88%。薛艳华等经实验证明，超临界 CO_2 破壁处理法处理，即超临界时间 1 h，超高压处理时间 12 h，破壁率为 85.7%；若不经高压处理，则破壁率仅为 10.0%；匀浆法处理 30 min 的破壁率为 26.7%；超高压法处理 60 min 的破壁率为 15.3%。可见超高压工艺处理时间最短，破壁率最高，而且该工艺最大的特点在于能一次加工处理完成灵芝孢子的破壁和提取，从而在实际应用中可降低提取成本，增加收益。

(4) 生物碱类：宁志刚等采用超高压提取乌头原碱，工艺条件如下：乙醇浸泡 2 h，压力 600 MPa，料液比 1∶10，时间 5 min。以乌头原碱的提取率为指标，超高压提取 5 min 的收率为 5.21 mg·g^{-1}药材，热回流提取 6 h 的收率为 1.06 mg·g^{-1}药材，煎煮法提取 1 h 的收率为 0.76 mg·g^{-1}药材，即超高压法耗时分别为热

回流法的 1/72、煎煮法的 1/14，而提取率分别为热回流法的 5 倍、煎煮法的 77 倍。可见，超高压法克服了传统提取法耗时长、效率低的特点。

10.2.2.5 超高压提取技术存在的问题

超高压提取技术虽然在提取方面有许多优点，但该技术仍然存在以下几点不足：①超高压条件下虽然不会影响生物小分子的结构，但能够影响蛋白质、淀粉等生物大分子的立体结构。因此，该技术在提取中不适合提取活性成分主要为蛋白质类的中药，且当药材中含有大量淀粉时，压力过高可引起淀粉的糊化，从而阻碍有效成分溶入提取溶剂中；②超高压提取法需要特定的提取设备；③目前，超高压提取法主要在单味药提取中应用，在复方制剂的提取中的应用研究还未见报道；④该提取技术应用研究还处于起步阶段，提取工艺参数之间的协同效应等问题尚需做进一步的深入研究。

10.2.3 半仿生提取法

10.2.3.1 半仿生提取法原理

半仿生提取法(semi-bionic extraction，SBE)是近几年提出的新方法。它是从生物药剂学的角度，将整体药物研究法与分子药物研究法相结合，模拟口服药物经胃肠道转运吸收的环境，采用活性指导下的导向分离方法；是经消化道口服给药的制剂设计的一种新的提取工艺。该法模仿口服药物在胃肠道的转运过程，采用选定 pH 的酸性水和碱性水依次连续提取，其目的是提取含指标成分高的“活性混合物”。由于此法工艺条件要适合工业化生产，而不可能与人体条件完全相同，仅“半仿生”而已，故称“半仿生提取法”。这种提取法的特点是可以提取和保留更多的有效成分，能缩短生产周期，降低成本。此法与纯化学观点的酸碱法不能等同，酸碱法是针对单体成分的溶解度与酸碱度有关的性质，将溶液调至一定 pH 范围，使单体成分溶解或析出。

10.2.3.2 半仿生提取法特点

提取过程符合中医配伍、临床用药的特点和口服药物在胃肠道转运吸收的特点。在具体工艺选择上，既考虑活性混合成分又以单体成分作指标，这样不仅能充分发挥混合物的综合作用，又能利用单体成分控制中药制剂的质量，且有效成分损失少。

10.2.3.3 半仿生提取法的方法

以人工胃、人工肠为基础，依据正交实验法、均匀设计法、比例分割法，优选最

佳条件(例如,pH、温度、时间、酶/底物浓度等),并加以搅拌设备(模拟胃肠道蠕动)。若应用到生物药和植物药可根据具体情况改换某个因素。例如,对于生物药,由于酸性中胃蛋白酶水解后存在大量 H^+,给后续的工艺带来麻烦,如有腥味,制成的药物口感也不好。胃蛋白酶的水解不是一个必要步骤,然而将胃蛋白酶改为木瓜酶,既可免除胃蛋白酶的腥味,又因木瓜酶为非专一性酶,可水解成更多的氨基酸、小分子肽。对于植物药可用纤维素酶代替胃蛋白酶,对水解植物纤维更有利。食物中蛋白质最终水解为氨基酸才被吸收,水解的二肽、三肽还有另外的吸收途径;此外,还可能有另外的水解产物。

10.2.3.4　半仿生提取技术在中药有效成分提取中的应用[16~18]

在对多个单味中药和复方制剂的研究中,半仿生提取法已经显示出较大的优势和广泛的应用前景。刘娟等为了探讨 SBE 法提取中药淫羊藿、补骨脂对小白鼠的性激素样作用,将中药淫羊藿、补骨脂用 SBE 和常规水煎提取,并用器官重量法对未成熟小白鼠进行性激素样作用探讨。结果表明淫羊藿、补骨脂均有性激素样作用,SBE 法提取的药液比常规水煎液效果好。沈红等以盐酸麻黄碱为化学成分指标,采用半仿生提取法与水煎煮法、湿浸法、酸性乙醇回流提取法、水蒸气蒸馏法等常规的提取方法,对麻黄进行平行比较研究。结果麻黄碱的提取得率为半仿生法>水煎煮法>酸性乙醇回流提取法>温浸法>水蒸气蒸馏法。战旗等采用 SBE 法和 WE 法对麻黄的提取液成分含量进行比较,以麻黄总生物碱、麻黄碱、浸膏收率为指标,结果 SBE 法显著优于 WE 法。杨敏等采用 SBE 法、水煎法、有机溶剂浸提法等方法对补骨脂黄酮溶出进行了研究,结果表明,SBE 法的提取液补骨脂黄酮的含量最高。吕青淘等选择乙肝颗粒剂的提取工艺分别采用半仿生提取法、半仿生提取醇沉法、水提取法、水提醇沉法,以黄芪甲苷、虎杖苷、柴胡皂苷 C、五味子乙素及干浸膏为指标,对 4 种提取液的成分进行比较研究,综合评价结果表明,半仿生提取液中的 5 个指标成分含量最高,且 SBE 法的生产成本较低。孟宪生等以葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘草酸作为指标,采用原处方的 2 倍处方量,以半仿生提取法进行提取,均匀设计法设计试验,获得最佳条件。张学兰等对黄柏进行"饮片颗粒化"的研究。以小檗碱、总生物碱、干浸膏量为指标,对黄柏作半仿生法提取法和水提取法相比较,结果表明黄柏半仿生法提取液明显优于水提取液。张学兰等以小檗碱、黄芩苷、栀子苷为指标成分,作黄连解毒颗粒剂的 4 种方法提取液的指标成分比较,结果总含量顺序为 SBE 液>SBAE 液>WE 液>WA 液。陈晓娟等为优选杜仲叶中绿原酸和黄酮提取最佳工艺,以绿原酸和黄酮含量为考察指标,通过正交实验对半仿生法和酶法两种提取方法进行了优化和比较。半仿生法的工艺条件为:杜仲叶为原料,以磷酸氢二钠-柠檬酸的缓冲溶液作为提取液,m(杜仲叶):m(提取液)=1:20,提取液 pH 分别为 2.0、7.5、8.3,在 70 ℃,提取

1 h/次，提取 3 次。果胶酶提取的工艺条件为：杜仲叶为原料，以磷酸氢二钠-柠檬酸的缓冲溶液作为提取液，m(杜仲叶)：m(提取液)＝1：15，果胶酶酶解温度为 60 ℃；提取液 pH 3.6；每 5 g 杜仲叶中加入质量分数为 0.5%的果胶酶 1.5 mL，酶解 2 h 后，升温至 80 ℃，1 h/次，提取 3 次。在此条件下，半仿生法提取杜仲叶中绿原酸和黄酮，绿原酸的得率达 1.44%，黄酮得率达 0.044%，均比酶法提取的绿原酸得率 1.29%和黄酮得率 0.043%高。半仿生法提取与酶法提取相比提取成本低、耗能低，可以提取和保留更多的有效成分，得到含药理指标高的活性混合成分，是一种行之有效的提取方法，为提取杜仲叶中绿原酸和黄酮提供了重要参考。

10.2.4 超声提取法[19]

超声提取法是利用超声波增大物质分子运动频率和速度，增加溶剂穿透力，提高药物溶出速度和溶出次数，缩短提取时间的浸提方法。研究表明超声提取不会改变有效成分的结构，并且缩短了提取时间，提高了提出率，从而为中草药成分的提取提供了一种快速、高产的新方法。

10.2.4.1 超声提取的基本原理

当大能量的超声波作用于提取介质，在振动处于稀疏状态时，介质被撕裂成许多小空穴，这些小空穴瞬时即闭合，闭合时产生高达几千大气压的瞬时压力，即空化现象。超声波对各种成分的提取分离的强化作用主要源于其空化作用。空化中微小气泡的爆裂产生的极大压力使被破碎物细胞壁及整个生物体的破裂在瞬间完成，同时超声波产生的振动作用加强了胞内物质的释放、扩散及溶解显著。超声波破碎过程是一个物理过程，过程中无化学反应，被浸提的生物活性物质保持不变。在空化发生时液体中的微小气泡核在高强度超声波作用下发生振荡、生长、收缩及崩溃等一系列动力学过程，同时在崩溃的极短时间内，在空化泡周围产生高温、高压，强烈冲击波和时速 400 km 以上的微射流，对固体表面的剥离、凹蚀和粉碎作用创造了新的活性表面，界面效应使传质表面积增大。空化时产生的湍动效应使固液界面中传质边界层变薄，导致界面层中溶质的浓度梯度减少速度大大高于其他方法。空化产生的微扰效应使固液传质过程的微孔扩散得以强化，使得涡流扩散加强，加快提取过程。超声频率提高，提取时间延长，超声场产生的聚能效应导致提取液温度升高。湍流效应、微扰效应、界面效应、聚能效应与超声场的频率、功率及体系的温度等有关。在天然产物提取过程中，细胞的破壁、溶质的扩散和平衡速度等与单位面积超声功率相关，而且均会对提取效率和回收率产生影响，因此一般选用低频大功率超声。

10.2.4.2　超声提取技术的特点

超声提取技术和设备具有显著的特点和优势，主要包括：

（1）效率高：提取时间短，提取时间仅为常规提取方法的几分之一到几十分之一。

（2）提取能耗低：小功率超声波即可破碎提取大量物料，一般均在室温下提取，无须大功率搅拌和加热，能耗较常规提取方法可降低 50%。

（3）提取产品质量高：最大限度保持了各种有效成分的活性，特别是各种热敏性成分，可达到提高药效、减少用量的目的。同时，由于提取时间短，提取产品中其他无用的杂组分含量减少，可显著降低单一组分等其他高端产品的生产成本。

（4）目标提取物提取得率高：由于采用超声破碎提取技术，使药材中的有效成分得以充分释出，从而使目标提取物的提取率提高。甚至有些用常规方法难于提出的组分亦能快速提取出来。

（5）适用范围广：同时适用于挥发性和非挥发性提取介质，适用于各种天然产物提取的实验研究、中试试验以及工业化生产，不受提取物分量大小、极性等限制。

（6）自动化程度高、操作简便：可进行间歇提取或多级连续提取。提取时间、提取温度、循环速度等主要参数均可设定和自动控制，减少了人为因素对产品质量的影响，有利于保证产品质量。多级连续动态提取时，提取液和药渣在全封闭条件下运行，能节约大量劳动力和符合 GMP 要求。

（7）产品性价比高：设备占地面小，可不要蒸汽等辅助设施，因而节省投资。

10.2.4.3　超声技术在中草药成分提取中的应用

（1）皂苷类：皂苷类成分常用加水煎煮法或有机溶剂浸泡进行提取，耗时长、提出率低。采用超声技术则可缩短提取时间，提高提出率。宋小妹等从长梗绞股蓝中提取其主要有效成分绞股蓝皂苷，以 75%乙醇回流为对照，超声提取 3 次，每次 80 min，可明显提高绞股蓝皂苷的得率；邵静枸等从党参中提取党参皂苷，以常规的溶剂浸渍法为对照，党参细粉经超声处理 40 min 后，党参皂苷的提出率高出常规法（甲醇冷渍 48 h）1 倍多，时间缩短了 98.6%，而且经超声提取的党参皂苷得到的粗品量是常规法的近 2 倍，纯度也高；有关专家从穿山龙根茎中提到主要有效成分薯蓣皂苷，以 70%乙醇浸泡 48 h 为对照，用 20 kHz 的超声波提取 30 min，其提出率是对照组的 12 倍，并用 1 MHz 的超声波提取 30 min，其提出率是对照组的 1.34 倍，此工艺可以节约药材 23.4%。由此看出，超声提取皂苷类成分具有省时、节约药材、杂质少、提出率高等优点。

（2）生物碱类：从中草药中用常规提取生物碱一般提取时间长、收率低，而经

超声处理后可以获得很好的效果。从黄柏中提取小檗碱，以饱和石灰水浸泡 24 h 为对照，用 20 kHz 的超声波提取 30 min，提出率比对照组高 18.26%，且小檗碱的结构未发生改变；郭孝武等从黄连根茎中提取黄连素，实验证明超声法优于浸泡法，即用 20 kHz 的超声波处理 30 min，其提出率高达 8.12%。在我国 1985 年版药典中，曾用超声技术提取木鳖碱(士的宁)、马钱子碱这些毒性成分，并明确规定：在药物含量测定时，用超声波处理 40 min，相当于冷浸 24 h。由此看出，应用超声技术提取得生物碱类成分的工艺简便、省时、提出率高。

(3) 黄酮类：黄酮类成分常用加水煎煮法，碱提酸沉法或乙醇、甲醇浸泡提取，费时、费工、提取率低，而超声提取则可提高提出率，缩短提取时间。从黄芩根茎中提取主要有效成分黄芩苷，以水为溶剂，仅超声提取 10 min 就高于加水煎煮 3 h 的提取率，并以 20 kHz 超声波提取 40 min 的黄芩苷的提出率为最高。从槐米中提取芦丁，超声提取 40 min，其提出率为 22.53%，是目前大生产得率的 1.7～2 倍，经对比试验可知，节约药材 30%～40%，具有较高的经济效益。

中草药药用成分大多为细胞内产物，提取时往往需要将细胞破碎，而现有的机械或化学破碎方法有时难于取得理想的破碎效果，超声波在中草药的提取中已显示出了明显的优势。超声提取技术能避免高温高压对有效成分的破坏，但它对容器壁的厚薄及容器放置位置要求较高。因会影响药材浸出效果而且目前实验研究都是处于很小规模，要用于大规模生产，还有待于进一步解决有关工程设备的放大问题[20]。

10.2.4.4 循环超声技术[21]

虽然超声提取在实验室小量样品制备中效果很好并且已经广泛应用，特别是在分析样品的处理中，其快速、高效的特点已被广泛认同，但超声场的范围和强度限制了每次处理的物料量，缺乏有效的工程放大手段和方法，限制了其在大规模生产中的应用。循环超声技术解决了超声提取的工程放大问题，大大拓宽了超声提取的应用范围。循环超声技术及设备不仅适用于各种天然产物提取，而且还可以用于超声分散、乳液制备、缓释药物超微胶囊和纳米胶囊制备等，应用领域扩展到药品、保健品、化妆品、食品及农产品深加工等多个领域。

1) 循环超声提取技术及设备的特点

新型高效循环超声提取装置的提取时间、提取温度、超声功率、循环速度等主要参数均可设定和自动控制，提取效率是常规提取的几倍到几十倍，提取温度由 100 ℃可降低到室温(SY 系列产品还可实现低温提取)，设备性能达到了国际先进水平，同传统方法比较可节省能耗 50%以上，提取成本可降低 25%以上，可以进行间歇提取和多级连续动态提取，物料在封闭管道中运行，提取液和药渣连续排出，液-固连续自动分离，能实现手动、半自动和全自动控制，能节约大量劳动力，符合

GMP要求。

2）循环超声提取技术在中药研发和生产中的应用

从中药中提取天然成分的首要条件是被提取物能够快速、高效地进入提取介质，由于中药有效成分多为胞内产物，提取过程中一般需要破坏原料细胞壁。循环超声提取技术装置目前已经成功地用于数十种中药材原料中天然产物的提取。

（1）萜类、内酯类：青蒿素一般在50 ℃以下采用石油醚、汽油冷浸或搅拌提取，提取率60%左右，提取时间24～48 h。用HF-2B循环超声提取机提取青蒿素，分别研究了流体循环流动基本特性、超声时间、超声强度、固液比、提取温度、搅拌（循环）速度对青蒿素提取率和石油醚损耗的影响。采用循环超声提取法青蒿素提取率达到90%以上，较常规提取方法提高25%以上，提取时间缩短为20 min，石油醚回收率达90%，较常规提取方法有显著提高。

（2）黄酮类：在银杏黄酮提取时，常规水煮4 h提取率为56.5%；室温下，用HF-2B提取10 min，提取率为82.6%，提取30 min，提取率为88.3%；40 ℃下，用HF-50G型循环超声提取机提取30 min，提取率为91.6%，高于常规100 ℃水煮6 h的银杏黄酮提取率。蜂胶黄酮提取时，常规浸提48 h，提取率36%；用HF-2B室温提取30 min，提取率为41.8%。30 ℃条件下，用50%乙醇HF-2B提取淫羊藿30 min，黄酮提取率87%。甘草黄酮提取时，用HF-20B提取60 min，80%乙醇时总黄酮得率为11.5%，85%乙醇时总黄酮得率为8.8%。

（3）生物碱类：从肉苁蓉中用水提取甜菜碱时，用HF-2B提取20 min与常规浸提24 h和100 ℃回流6 h甜菜碱提取率相当。用HF-2B以1‰酸水为提取剂，提取砂生槐中总生物碱，室温超声提取30 min，提取两次，提取率超过85%，三次效果更佳；比常温浸提4～6 h/次，提取三次效果更好，比渗滤24 h效果也高；以氯仿为提取剂，超声提取7次，比常规连续提取一周效果更好。

（4）苷类：从肉苁蓉中用甲醇提取肉苁蓉苷类物质时，用HF-2B提取30 min与常规浸提24 h和80 ℃回流5 h肉苁蓉苷提取率相当。30 ℃条件下，用50%乙醇HF-2B提取淫羊藿30 min，淫羊藿苷提出率90%。

（5）多糖：从肉苁蓉中用水提取多糖时，用HF-2B提取20 min高于常规浸提24 h和100 ℃回流6 h多糖提取率。用HF-2B从海带中提取硫酸酯多糖时，30 ℃下提取20 min，即可达到水煮法（100 ℃）提取5 h相同的提取率。

循环超声提取技术及设备有效地解决了超声提取工程放大的难题，为超声提取在中药大规模生产中的应用奠定了基础。由于具有良好的使用效果，循环超声提取设备正在被越来越多的大学、研究机构和生产企业使用，它的应用领域已扩展到药品、保健品、化妆品、食品及农产品深加工等多个领域。同现有其他相关技术相比，它具有显著的技术经济优势，因此，具有广泛的应用前景。

10.2.5 超临界流体萃取法

参见第一篇第3章。

10.2.6 旋流提取法

旋流提取法可有不同的形式装置，实验室可采用组织搅拌机搅拌，搅拌速度为8000 r·min^{-1}，原料不必预先加以粉碎。提取用水温度分别为20 ℃和100 ℃，处理时间为20～30 min。旋流法(8000 r·min^{-1})提取侧金盏花，对提取液中黄酮类、皂苷、有机酸等化合物进行分析，表明旋流法的提取效率提高[22]。

螺旋式连续逆流动态提取机组：最早用于从甜菜丝中提取甜菜糖。其物料特征是松散，拦液量小，菜内糖分容易溶。其核心设备是一个带夹套的长槽形螺旋输送器，固体物料从首端连续加入，由螺旋叶片将它推往尾端，再经排渣机卸出。溶剂则由尾端加入自由流向首端，经过滤排入提取液储罐。其间固体物料完全浸泡在溶剂中，溶质逐渐溶入液相，从而完成连续逆流提取过程。过程所需的热量由夹套中的蒸汽供给。由于固体在液相中是连续的，逆流移动时其所吸附包裹的提取液会一并带向低浓度端，又由于固液比的限制，溶剂在机内的流量较小，所以在固体颗粒表面上的流速较低，界面更新的速度相应受到阻碍。将它引用到中药提取生产之时，因固体物料的粒谱很宽，细小颗粒和淀粉、树脂常常堵塞了液体的通道，使界面更新的情况急剧恶化，造成了比较严重的返混，使提取的效率大大降低。在某些情况下大部分溶剂只从固相物料表层流过，而不能深入料层内部，以致萃取效率极差。为了弥补缺陷，螺旋式连续逆流动态提取机组的长度要达到15 m，规模较大的更长达28 m以上。目前螺旋式连续逆流动态提取机组的最高日处理量可达10 000 kg原料[23]。

10.2.7 双水相萃取[24]

双水相萃取(aqueous two-phase extraction，ATPE)是1896年由Beijerinck最早发现，1956年瑞典Lund大学的Albertsson第一次用来提取生物物质，1979年德国的Kula等将双水相萃取用于生物产品分离纯化。此后，双水相体系的研究和应用逐步展开，并取得很大进展。目前双水相萃取技术已被广泛用于蛋白质、酶、核酸、病毒、细胞、细胞器等生物产品及食品、化工、药物等领域的分离和纯化，并逐步向工业化生产迈进，展现了巨大应用前景。

10.2.7.1 双水相萃取技术的基本原理及常见的双水相系统

双水相萃取是两种水溶性不同的聚合物或者一种聚合物和无机盐的混合溶液，在一定的浓度下，体系就会自然分成互不相溶的两相。被分离物质进入双水相

体系后由于表面性质、电荷间作用和各种作用力(疏水键、氢键和离子键)等因素的影响,在两相间的分配系数不同,导致其在上下相的浓度不同,从而达到分离目的。

目前常见的不同种类的双水相体系有5类:聚合物-聚合物-水、高分子电解质-聚合物-水、高分子电解质-高分子电解质-水、聚合物-低相对分子质量组分-水、聚合物/无机盐。水溶性高聚物有聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、甲基纤维素、聚丙烯乙二醇、吐温、聚氧乙烯类表面活性剂等,聚乙二醇/葡聚糖和聚乙二醇/无机盐是常用的双水相体系,由于葡聚糖价格昂贵,因此聚乙二醇/无机盐体系应用更为广泛。聚乙二醇/无机盐中所用无机盐主要是磷酸盐和硫酸盐。

10.2.7.2　双水相萃取技术的特点

双水相萃取技术目前已成为生物工程、医药等领域的提取分离的研究热点,具有如下的特点:①生产能力高,被萃物的分配系数一般大于3,有较高的回收率,耗能较小,速度快;②可以直接从含有菌体的发酵液和培养液中提取所需的蛋白质,不破碎直接提取细胞内酶,省略了破碎或过滤等步骤,降低成本;③分相时间短,一般只有5～15 min;④不存在有机溶剂残留问题,高聚物一般是不挥发性物质,因而操作环境对人体无害;⑤操作条件温和,整个操作过程在常温常压下进行,亲和双水相萃取技术可以提高分配系数和萃取的选择性;⑥各种参数按比例放大后,而产物收率并不降低,易于工艺放大和连续操作实现工业化,设备简单,且可直接与后续提纯工序相连接,无需进行特殊处理;⑦含水量高,在接近生理环境的体系中进行萃取,不会引起生物活性物质失活或变性;⑧由于影响双水相体系的因素比较多,如:聚合物的浓度和相对分子质量、无机盐的种类和浓度、pH以及温度等均能影响被分配物质在两相间的分配,所以在提高选择性或提高收率方面可以采取多种手段。

10.2.7.3　双水相萃取技术在中药及天然产物中提取与分离的应用

中草药有效成分分子中多具有疏水性结构,因此双水相萃取技术在中草药有效成分分离纯化中具有一定的应用价值。

1) 传统双水相萃取系统

目前双水相萃取在中草药有效成分提取方面使用较多的为聚乙二醇/无机盐溶液体系。有效成分分子中多具有疏水性结构,萃取时一般进入聚乙二醇相;无机盐主要有硫酸铵、磷酸氢二钾、磷酸钾等,使用硫酸铵和磷酸钾时分相相对较快,分离效率一般在80%以上。霍清等用聚乙二醇/硫酸铵双水相体系(最佳体系配比:聚乙二醇1500质量分数20%,硫酸铵质量分数16%,系统总量20 g)处理葛根提取液,离心分相后葛根素富集于聚乙二醇醇相(上相),反萃取法分离葛根素后,最大收率可达99%。

白藜芦醇又称芪三酚，存在于许多植物中，李梦青等采用聚乙二醇-硫酸铵-水双水相体系提纯白藜芦醇，使虎杖提取液中的各物质按极性不同在两相中得到分离。双水相萃取时，白藜芦醇的含量达34.29%，远高于有机溶剂萃取。黄芩苷是黄芩主要有效成分，通过采用非离子表面活性剂聚乙二醇-磷酸氢二钾-水双水相体系分离纯化黄芩苷，萃取率为98.6%。此方法所形成双水相体系操作简便，萃取率高，方法重复性好，可适用工业化生产。

2）新型双水相萃取系统[25]

传统双水相系统主要使用黏稠的水溶性高聚物，后处理比较烦琐，目前乙醇、丙酮等与水互溶的有机溶剂也被引入到双水相系统中。

甘草的主要有效成分是甘草皂苷。林强等采用与水互溶的有机溶剂的新型双水相体系萃取研究从甘草中提取甘草酸盐的新工艺，结果表明，提取甘草酸盐的最佳溶剂为乙醇/磷酸氢二钾双水相体系，此体系的两相分配完全，分配系数达12.8，收率为98.3%。蜕皮激素和20-羟基蜕皮激素的提取是用新型的UCON50-HB-5100（即50%环氧乙烷和50%环氧丙烷的无规共聚物）/羟内基淀粉温度诱导双水相系统，提取中，蜕皮激素和20-羟基蜕皮激素进入富含UCON的上相，而细胞碎片、蛋白质和其他杂质则分配在下相。移出上相并升温诱导则形成水和浓缩的UCON两相，此时，蜕皮激素和20-羟基蜕皮激素大部分分配在几乎不含UCON的水中，而UCON可回收利用[26]。李中华等研究了葛根素在环氧乙烷-环氧丙烷共聚物（EOPO）/磷酸氢二钾（K_2HPO_4）体系中的分配行为。利用温度诱导相双水相体系，结果当EOPO型号为EOPOSDP30，诱导温度为70 ℃，诱导时间为60 min，EOPO质量分数为28%，K_2HPO_4质量分数为24%时，葛根素最大总收率可达42.26%。该方法解决了传统双水相萃取技术中聚合物回收的难题，可以使EOPO循环使用，且方法设备投资少、操作简单，为工业化提取葛根黄酮提供了一条新途径。

10.2.8 动态逆流提取法

10.2.8.1 *动态逆流提取*

1）动态逆流提取技术的基本原理和特点[27]

溶剂进入药材细胞后可溶性成分大量溶解，当浸出溶剂溶解大量药物成分后，细胞内液体浓度显著增高，使细胞内外出现浓度差和渗透压差。所以，外侧纯溶剂或稀溶液向细胞内渗透，细胞内高浓度的液体可不断地向周围低浓度方向扩散，至内外浓度相等，渗透压平衡时，扩散终止。因此，浓度差是渗透或扩散的推动力，生产中最重要的是保持最大的浓度梯度。要达到快速完全地提取物料中的有效成分，就必须经常更新固液两相界面层，使浓度差保持在较高的水平，创造最大的浓

度梯度是浸出设备设计的关键。动态逆流提取即是根据这一原理进行工作的，在提取过程中物料和溶剂同时作连续相向的逆流运动，物料在运动的过程中不断改变与溶剂的接触情况，使物料在提取过程中与溶剂充分接触，同时在设备内部不断更新溶剂，溶剂在流动过程中不断获得物料的有效成分，浓度不断提高，在连续进液和连续出液的过程中，溶剂中存在连续的浓度梯度，从而使提取液可以获得比较快的浸出速度，也可以获得比较高的提取液浓度并从相反方向流出。此项技术利用了固液两相浓度梯度差，逐级将物料中的有效成分扩散至起始浓度相对较低的提取液中，达到最大限度转移天然产物中有效溶解成分的目的。

动态逆流提取与一般的提取方法相比，具有显著的优点：提高有效成分的收率，提取过程中固液两相浓度梯度大，溶液始终未达到饱和状态，溶剂与物料间的相对运动使溶剂与物料间界面层更新快，有效成分的收率和提取效率都得到提高；能连续作业，生产效率高，动态逆流提取设备适于大规模生产，可连续不间断工作，生产效率高并节约能源；应用范围广，动态逆流提取作业一般可在 25～100 ℃任意选择，既适于热稳定好的物料的提取，又适于热敏性物料的提取，既适用于水为溶媒的提取，又适用于有机溶媒的提取；降低生产成本，动态逆流提取出液系数小，所需的提取溶剂少，浸出液浓度高。

2）常用动态逆流提取设备及应用情况

随着科学技术的不断发展，国内外研究生产出了多种动态逆流提取设备，并已广泛地应用于中药材的提取和生产中。

（1）罐组式动态逆流提取设备。罐组式动态逆流提取是将两个以上的动态提罐机组串联，提取溶剂沿着罐组内各罐药料的溶质浓度梯度逆向地由低向高顺次输送通过各罐，并与药料保持一定提取时间并多次套用。罐组式逆流提取整个过程可分为“梯度形成阶段”和“逆流提取阶段”，其中逆流提取阶段由与提取罐组数（提取单元）相等的几个提取阶段组成。每次循环提取前，先对最后一次提取的罐内药材投入溶剂，提取液作为最后罐药材的溶剂，最后一次提取的罐药材在排除药渣后，再投入干药材作为下一轮罐组循环提取的最末罐。

采用罐组式逆流提取工艺，能有效地利用固液两相的浓度梯度，增大浓度差，提取速率快，提取液的浓度增高，提取周期短，提取的同时利用药材本体作滤层，可提高澄明度。

（2）螺旋式连续逆流提取设备。螺旋式连续逆流提取，主要用于对植物尤其是中药材的有效成分进行提取。其装置结构主体为螺旋或旋桨推进式逆流浸出提取器或提取器组，该装置具有支架、筒体、螺旋推进器、筛板等，螺旋推进器上具有刮板和排料板。工作时固体物料从首端连续加入，由螺旋叶片将它推往尾端，再经排渣机卸出。溶剂由尾端加入自由流向首端，经过滤排入提取液储罐。其间固体物料完全浸泡在溶液中，并受到螺旋桨片的搅动，溶质逐渐溶入液相，从而完成连

续逆流提取过程。目前螺旋式连续逆流提取设备已经进行过不少中药材和中药复方的中试生产试验，如益母草、甘草、青蒿、刺五加、黄芩、银杏叶等单味中药以及一些中药的复方提取（含赤芍、甘草、枳实、大枣、干姜、桔梗等），还有蓝莓、辣椒、葡萄籽、豆、绿茶、红茶等天然保健品提取。该类设备比目前广泛使用的多功能提取罐的有效成分提取率高 10%左右，比罐组式动态逆流提取率高 2%～4%，且其节能优势更加明显，可以减少 60%的蒸汽和水消耗。目前螺旋式连续逆流提取设备已实现微机自动化操作，生产过程全程控制产品质量稳定。

此外螺旋式连续逆流提取设备可以实现常温提取、高温提取、超声提取、微波提取、有机溶剂提取等结合新技术手段的多样化生产。相应试验的结果显示，对于热溶性的物料，高温提取和微波提取收率高；对于热不敏感的物料，有机溶剂提取和超声提取有显著效果。

（3）U 型槽式逆流提取机。U 型槽链板逆流提取机采 U 型提取槽，在链轮刮板推动下，药材由高端进入提取槽，与提取溶酶接触，进行充分提取后，药渣从另一高端提出，与溶酶分开。而溶酶靠提取槽的倾斜角度，从高端流向低处泵入药液贮罐排出。其间药材与溶酶呈相反方向运动，从而实现逆流连续提取工艺，该机采用稍微倾斜的直线提取段和两端呈弧形上延的进、出料段共同组成 U 型提取槽，在提取槽内，采用由输送链条与刮板组成的物料链板推进器推动药材等物料与逆向流动的水充分接触，从而完成药材等有效成分的提取过程。

使用该设备，提取速度快，有效成分提取充分，得率高，溶酶耗量少，提取温度和时间参数易于控制，药材有效成分充分提取，而非药用成分浸出较少，从而得到质量较好的提取液。与螺旋推进式逆流提取装置相比较，本装置由于采用链轮刮板推进药材，不易出现药材卡堵停机检修等现象。设备操作稳定性和生产能力均优于螺旋式逆流提取装置。对于不宜过分煎煮的药材可以选择中间投料口进料。也可以通过调速器改变送料速度，适于各种物料提取，也适于大批量连续性的生产，药材提取过程在与外界隔离状态下自行完成，所有接触物料的部分均采用不锈钢制造，易于清洗，完全符合药品生产质量管理规范（GMP）要求。

（4）其他连续逆流提取器。肯尼迪式连续逆流提取器由多个具有半圆断面槽水平或倾斜排列构成，槽内有能够旋转的 4 片叶桨，通过它的旋转带动药材沿槽顺序向前移动，并与溶剂发生接触而提取，通过改变桨的旋转速度和叶片数目，可适应不同品种药材的提取。波尔曼式连续提取器是一种连续混流式提取器，其设计也部分采用了逆流提取原理。提取器右边固液两相成并流而左边固液两相则成逆流接触进行提取，由于提取器内有许多悬于无端链上的篮子，故又称为篮式连续提取器。

此外，在国内外中药及天然药物的提取中，利用了逆流提取原理的工程设备还有平转式连续提取器、千代田式 L 型连续浸取器，以及多台组合式逆流萃取分离

设备等。还有采用微波、电磁、超声波等手段进行强化以加速浸取过程。由此可见，动态逆流提取技术已越来越广泛地应用到中药制剂的生产实践中，发挥着越来越重要的作用。

10.2.8.2　动态循环阶段连续逆流提取[28,29]

动态循环阶段逆流提取于 20 世纪 90 年代初开始应用。首先出现的是外循环式动态提取罐，其特点为外加热，外循环溶液动态提取，排渣口有滤网、滤板，可自身过滤，具多功能，可单罐提取、罐组顺流、逆流提取。双向外加热式外循环动态提取罐，除了和外循环动态提取罐特征一样外，还具有以下的特点：在罐体中央有一圆柱式内加热器，外夹层分上下两段，蜂窝焊接，循环泵流量大，扬程低。

动态循环阶段逆流提取是通过多个提取单元之间物料和溶剂的合理的浓度梯度排列和相应的流程配置，结合物料的粒度、提取单元组数和提取温度，循环组合，对物料进行提取的一种新的技术。该提取工艺设计原理是利用固液两相的浓度梯度差，逐级将药料中有效成分扩散至起始浓度相对较低的套提溶液中，以最大限度转移物料中溶解成分。

1）结构及工作原理

动态循环阶段连续逆流提取装置由提取单元、热水机组和通风装置等组成。几个相同的循环提取单元通过总管连接组成提取装置。每一个提取单元由提取罐、储液罐、循环泵、阀门、管道等组成。热水机组为加热提取提供热源，通风装置用于电器的防爆，热水机组和通风机组应置于安全区，并与提取单元和提取溶剂隔离。

动态循环阶段连续逆流提取是针对中药常规提取方法溶剂用量大的不足，将多个提取单元科学组合，单元之间的浓度梯度（物料和溶剂）合理排列并进行相应的流程配置。每个单元利用机械手段采用强制循环方式，使溶剂自上而下或自下而上连续循环，流动浸出，促使固液两相产生较高的相对运动速度，提高固液扩散界面层的更新速度，提高浸出效率。

整个提取过程分为和单元数相等的阶段连续进行，每个单元进行各自独立的提取作业。当某一阶段提取过程结束时，有效成分被提净的单元进行排渣和加料作业；其他未提净的单元被提净单元的下一单元的饱和溶剂排至后道浓缩工序，不饱和溶剂按有效成分含量递减的反方向隔一个的单元进行单元组数减 1 次的迁移；新鲜溶剂加入到无溶剂的单元。上述各项步骤完成后各单元重复下一个过程。

2）动态循化阶段连续逆流提取技术优势

采用了阶段连续逆流的方法和多个提取单元组成阶段连续逆流提取工艺流程，使每个提取单元的溶剂参与了对所有提取罐内物料的提取，每个提取罐的物料均被所有溶剂提取，通过溶剂的反复套用，降低了溶剂对物料的绝对用量。

采用液体湍流式、自循环或机械搅拌式动态循环提取技术，使固液两相的相对运动速度显著增加，扩散界面层更新快，缩短了有效成分从物料内部迁移至表面的时间，提高了有效成分从物料表面扩散到溶剂的速度，实现了提取过程中物料与溶剂中有效成分的快速平衡，缩短了提取时间。

通过调整或改变提取单元组数、阶段提取时间、提取温度、溶剂用量及颗粒形状或饮片尺寸，可以获得最佳提取效果。

目前动态循环阶段连续逆流提取工艺的研究主要集中在单味中药，中药复方在该领域的研究资料较少；由于设备制造因素，几乎所有的研究实例都是中试规模，实验室对该方法的研究比较少，限制了对该方法进行深入的基础研究。因此，在整体水平上，动态循环阶段连续逆流提取工艺还有待进一步深入研究。

10.2.9 浓缩技术[30]

浓缩是影响中成药产品质量的重要环节之一，中药提取液在浓缩操作过程中通常要求高浓缩比、高相对密度、高浓缩效率，同时又不能损失中药的有效成分，这就对所采用的浓缩工艺和设备提出了更高的要求。为了提高浓缩效果和药品质量，近年来开发了许多有价值的中药浓缩新工艺和新技术。合理引进这些先进实用的技术和装置，可以提升中药制药业的科技含量和整体制造水平。涉及的浓缩新方法有冷冻浓缩、蒸发浓缩、膜浓缩和吸附树脂分离浓缩等。

10.2.9.1 冷冻浓缩

冷冻浓缩根据结晶方式的不同，分为悬浮结晶冷冻浓缩和渐进冷冻浓缩。

1）悬浮结晶冷冻浓缩

悬浮结晶冷冻浓缩时，冰晶自由悬浮于母液中。悬浮结晶冷冻浓缩在速溶咖啡、速溶茶、橙汁、甘蔗汁、葡萄酒、乳制品等的浓缩上有一定的研究，20 世纪 70 年代开始应用于工业生产。近年来，悬浮结晶冷冻浓缩在中药水提取液的浓缩以制备抗病毒口服液方面进行了中试研究。结果表明，该冷冻浓缩制得的冰晶粒径小于 1 mm；分离后得到的冰晶色泽与冰块无异；与三效真空蒸发浓缩相比，可改善口服液的口感。但是，冷冻浓缩产品的指标成分含量比三效真空蒸发浓缩产品的稍低，这是由于母液夹带所致。悬浮结晶冷冻浓缩将晶核生成、晶体成长、固液分离 3 个主要过程分别在不同的装置中完成。由于母液中产生了大量毫米级的冰晶，单位体积冰晶的表面积很大，造成冰晶与母液的分离和有效回收微小悬浮结晶表面附着的浓缩液比较困难。另外，由于低温条件下，浓缩液黏度较大，也增加了固液分离的难度。因此，悬浮结晶冷冻浓缩对重结晶器的过冷度的控制要求比较严格，以避免二次晶核的生成，使冰晶缓慢成长，制得粒度较大的冰晶，利于固液分离。这些使装置系统比较复杂，投资大、操作成本高，限制了此法的实际应用。

2）渐进冷冻浓缩

针对悬浮结晶冷冻浓缩存在的问题，提出了渐进冷冻浓缩工艺和技术。渐进冷冻浓缩时，冰晶沿结晶器冷却面生成并成长为整体冰块。在固液相界面，溶质从固相侧被排除到液相侧。渐进冷冻浓缩目前在葡萄糖液、咖啡液、番茄汁液、柠檬汁液等的浓缩方面取得了较好的效果。番茄汁液和咖啡液等的小试和中试浓缩实验研究表明，该方法可以将一定浓度的稀溶液浓缩到原体积的 1/4～1/5。进料浓度低时，冰晶融解液中的溶质浓度较低，分离较为彻底。也可实现高浓度液体的浓缩。进料浓度高时，冰晶融解液中的溶质浓度较高，分离不很彻底。如果进行二次处理或与膜过滤组合使用，溶质也容易回收。渐进冷冻浓缩需要进一步解决的难题主要是：如何消除结晶初期的过冷却，以避免形成树枝状冰晶；如何提高冰晶纯度，以减少溶质损失；如何增大溶液与传热面的接触面积，以提高传热效率；如何促进固液界面的物质传递，以提高浓缩效果。渐进冷冻浓缩最大的特点是形成一个整体的冰晶，固液相界面积小，母液与冰晶的分离容易。同时，由于冰晶的生成、成长、与母液的分离及脱冰操作均在一个装置内完成，无论是设备数量还是动力消耗都少于悬浮结晶冷冻浓缩，装置简单且容易控制，设备投资与生产成本降低。

冷冻浓缩具有可在低温下操作，微生物繁殖、溶质的变性及挥发性成分的损失可控制在极低的水平等优点，应用于中药提取液的浓缩有利于保证浓缩产品的质量。但是，目前的冷冻浓缩研究大多针对水提取液，醇提取液的冷冻浓缩尚未见报道；冷冻浓缩对于浓度和黏度较大的提取液的适应性也需研究；冷冻浓缩的浓缩比率一般在 1～1/10，尚难以使比率小于 1/10；从系统论角度考虑，冷冻浓缩与低温提取、冷冻粉碎、冷冻干燥等操作组合使用，才会充分发挥冷冻浓缩的优势，达到提高药品质量和节能降耗的目的。

10.2.9.2　蒸发浓缩

蒸发浓缩既能保持中医药的特色，又对中药品种具有很强的适应性，在中药制药中应用最早也最广泛。蒸发浓缩过程的温度和受热时间等是影响浓缩液质量的关键因素。自 20 世纪 70 年代以来，开发应用了多种类型的中药提取液蒸发浓缩工艺和装置，这些装置包括：夹套浓缩器、升膜浓缩器、降膜浓缩器、刮板薄膜浓缩器、离心薄膜浓缩器、滚筒刮膜浓缩器、双滚筒真空浓缩器、自然外循环两相流浓缩器和在线防挂壁三相流浓缩器。

10.2.9.3　膜浓缩

蒸发浓缩属于热浓缩工艺，存在着浓缩温度较高、热敏性有效成分容易受破坏和挥发性成分容易逸散等影响产品质量的因素。因此，寻找非热浓缩工艺就成了追求的目标。

前述的冷冻浓缩是非热浓缩方法之一，膜浓缩也是一种具有发展前景的非热浓缩工艺和技术。膜浓缩分离分为反渗透、纳滤、超滤和微滤，膜蒸馏、渗透蒸馏、联合膜技术等也属于膜浓缩范畴。特点是常温操作、无相变、热敏性成分及芳香性成分得以保护、设备规模小、能耗低、分离效率高。对于中药提取液的浓缩，反渗透、膜蒸馏、渗透蒸馏具有重要借鉴意义。

1）反渗透

反渗透是以压力为传质推动力，通过膜对物质进行分离和浓缩的过程。反渗透膜浓缩时，温度的控制非常重要，过高的温度不仅会影响到浓缩效率，还会缩短膜的使用寿命，适宜的温度范围为 1～45 ℃。膜的清洁是保证工作效率和使用寿命的重要因素，因此，待浓缩液的预处理很重要。自 20 世纪 80 年代以来，反渗透研究主要集中在苹果、葡萄及番茄等果蔬汁液的浓缩。

采用反渗透浓缩的主要问题是浓缩倍数较小。浓缩倍数取决于浓缩液的渗透压。在浓缩过程中，随着待浓缩液浓度的提高，其渗透压也增高。同时，浓差极化现象的存在也使膜表面处的渗透压更高。当渗透压增至一定值时，所需的操作压力将很高，浓缩将无法继续进行。所以，很难一步把待浓缩液浓缩到蒸发浓缩所达到的浓度。这一缺陷使反渗透浓缩的工业化进展缓慢。

2）膜蒸馏

膜蒸馏是 20 世纪 80 年代新发展的一种是以疏水性的微孔膜两侧温差而引起的水蒸气压力差为传质推动力的膜浓缩过程。同其他膜分离方式相比，膜蒸馏可以在低温常压下得到更高的分离能力以及更少的膜堵塞，在浓缩热敏性和高渗透压的溶液时，具有广阔的应用前景。膜蒸馏按其种类可分为：直接接触式膜蒸馏、气隙式膜蒸馏、扫气式膜蒸馏、真空膜蒸馏、渗透膜蒸馏等。

近年来，膜蒸馏的研究成果逐渐在牛奶、果汁、咖啡等溶液的浓缩中应用。中药提取液的膜蒸馏研究刚刚开始。鲜益母草提取液的真空膜蒸馏浓缩研究表明，膜蒸馏用于浓缩益母草提取液是可行的。益母草提取液从 3%浓缩到 10%的过程中，透过液中没有发现益母草的有效成分。对于膜蒸馏，待浓缩液一侧没有外加压力作用，浓差极化可以忽略。但是，膜蒸馏时膜的通量不稳定，在长期使用某一膜组件后，堵塞无法解决。

3）渗透蒸馏

渗透蒸馏也是新近开发的与膜蒸馏相似的膜分离过程。该过程在疏水性微孔膜的纯水一侧添加渗透剂，例如饱和食盐水溶液，使渗透压远高于待浓缩溶液的渗透压。从传质角度分析，膜蒸馏和渗透蒸馏的脱水速度均依赖于膜两侧保持一定的水蒸气的压力差，不同的是，膜蒸馏的水蒸气压力差是由膜两侧温差而引起，而渗透蒸馏则取决于膜两侧的表观渗透压差。与蒸发浓缩和反渗透相比，膜蒸馏和渗透蒸馏这两个过程不需要加压，在低温常压下运行，特别是渗透蒸馏也能在室温

下进行，这样避免了待浓缩液受高温或高压的影响，较好地保持了原有的色香味，也可减少膜污染程度。尤其在高倍浓缩时，膜蒸馏的透水速率明显高于反渗透。膜浓缩的最大局限性是浓缩倍数低，高倍浓缩不经济。该技术如与蒸发浓缩设备配套使用较为经济合理。尽管膜浓缩技术具有潜在的应用前景，但是，研究多局限于食品、轻工等行业，尚未见到真正成功应用于中药提取液浓缩的报道。

10.2.9.4　吸附树脂分离浓缩

近 10 余年来，大孔吸附树脂在中药及天然药物活性成分和有效部位的分离、纯化中应用越来越多。大孔吸附树脂分离浓缩可以提取有效部分，去除无效部分，达到分离、富集或浓缩有效部位(群)或有效成分(群)的目的，显著降低用药剂量。研究表明，可以使中药有效部位(群)或有效成分(群)的含量提高 10～14 倍，临床用药剂量下降 6～7 倍。经过该工艺和新技术处理后，得到的固形物仅为原生药的 2%～5%，而水提取液的普通浓缩后，得到的固形物为原生药的 30%，醇提取液普通浓缩后，得到的固形物为原生药的 15%。

大孔吸附树脂分离浓缩物更适合于制作各种现代制剂，工艺简便易行。因此，这里归类为中药提取液的浓缩技术之一。进一步研究的内容是采用化学和药效学对比实验，评价对复方中药浓缩分离的必要性和合理性，以确保浓缩前后药物的“等效性”。

10.2.10　微波辅助提取技术

参见第一篇第 4 章。

10.3　优化传统分离技术

10.3.1　吸附澄清技术[31]

吸附澄清技术是应用吸附澄清剂(主要是絮凝剂)对不稳定的胶体溶液或混悬液进行处理，达到固液快速分离的一种新兴制剂技术。20 世纪 50 年代，有机高分子絮凝剂的研制成功带动了吸附澄清技术的发展，现已广泛运用于食品、医药等部门的固液分离过程。近年来，在中药的提取工艺中，许多药学工作者经过大量的研究和实践证明运用水提醇沉法去除中药煎煮液中无效成分的同时，也造成了有效成分的大量损失，难以保证成品制剂的有效性且成品的稳定性较差。而运用吸附澄清技术可选择性地除去无效成分，提高有效成分含量，保证成品质量稳定性。因此，吸附澄清技术在中药的提取中是一项值得推广的技术。

10.3.1.1 吸附澄清技术的作用原理

中药提取液多为悬浮液，由于其中固体微粒太细，并带有同性电荷而形成布朗运动。且中药提取液中还含有蛋白质、果胶、淀粉等复杂成分，这些物质共同形成1～100 nm的胶体分散体系，它们分子上有亲水极性基团，对水具有强亲和力，在分子的周围保持较厚水层，有形成真溶液的趋向。悬浮液依靠细微粒度，同性电荷及在水中的溶解作用形成稳定状态。吸附澄清剂主要分为无机凝聚剂和有机絮凝剂两大类，类型不同其作用原理也不尽相同。

1）无机凝聚剂的凝聚作用

无机凝聚剂如碳酸钙、硅藻土、高岭土等的凝聚作用即在悬浮液中加入无机电解质，通过电性中和作用，减少表面电排斥解除微粒的布朗运动，使微粒能够靠近接触而聚集在一起形成絮团，当絮团大到一定程度后就加速了沉降。这类凝聚剂凝聚作用比较慢、凝聚强度大、得到的絮团含水率低。

2）有机絮凝剂的絮凝作用

有机絮凝剂有天然的和人工合成的，由于天然的高分子絮凝剂无毒可降解，所以广泛用于药物的澄清工艺中。这类物质主要有明胶、甲壳素及其衍生物、海藻酸钠、101果汁澄清剂等，其中运用得最多的是甲壳素及其衍生物。高分子絮凝剂的絮凝作用即吸附架桥作用：高分子聚合物有许多官能团，形成较长的线状结构，可在同一个分子上吸附多个微粒，使体系中粒度较大的颗粒及具有斯托克斯沉淀趋势的悬浮颗粒絮凝沉淀形成大块絮团加快沉降和滤过速度，而保留绝大多数有效的高分子物质，并利用高分子天然亲水胶体对疏水胶体的保护作用，提高制剂的稳定性及澄明度。研究表明，当高分子絮凝剂覆盖微粒表面的部分接近一半时，絮凝作用最佳，沉降和滤过速度最快。

10.3.1.2 吸附澄清技术的特点

（1）专属性强，吸附澄清效率高。不同吸附澄清剂具有不同的去除杂质的能力，有针对性地选择吸附澄清剂可以专属地除去淀粉、蛋白质、鞣质等无效成分，这是醇沉法无可比拟的。在适宜的pH、药液浓度等条件下，加入合适量的澄清剂，选择最佳的絮凝温度和搅拌速度后，药液中微粒及大分子杂质可迅速絮凝沉降，滤液吸光度变小，澄明度提高，并长期保持稳定状态。

（2）操作简便，安全无毒。吸附澄清技术用于精制中药提取液，只需加入吸附澄清剂进行适当处理即可，无须任何特殊设备，可操作性强且静置时间短，可缩短工期。并且吸附澄清剂一般为天然的有机高分子材料，本身无毒无味，能自然降解，在精制提取液的过程中可随絮团一起沉降，不污染环境。

（3）降低成本，提高生产效益。与醇沉法相比，采用吸附澄清技术可以在不增

加任何投资的前提下，降低生产成本，提高生产效益，且吸附澄清剂本身成本低廉。因此，吸附澄清技术作为取代水提醇沉工艺的一门新技术，在中药生产中可望取得巨大的经济效益和社会效益。

10.3.1.3　吸附澄清技术在中药制剂澄清中的应用

吸附澄清技术主要应用于制备制剂的中药提取液的精制过程中。运用此技术是否成功的关键在于药液的最佳 pH、絮凝温度、澄清剂的加入量和搅拌速度等重要参数的筛选；此外，针对药液中微粒的性质使用适宜的吸附澄清剂对去除无效成分和最大限度地保留有效成分也是极其重要的。因此，在进行中药提取液的精制工艺前应针对以上因素进行一定的预试验。

101 果汁澄清剂是一种新型食用果汁澄清剂，安全，无味无毒，不会引入任何杂质，并可随沉淀后的不溶物质一并滤去。101 果汁澄清剂为水溶性胶状物质，因其在水中分散速度较慢，通常配制成 5%水溶液后备用，其在提取液中的添加量为 2%～20%左右。郭美雅等用 5% 101 果汁澄清剂澄清黄芪茯苓药液，可使混悬杂质基本沉淀完全。

甲壳素是自然界生物（甲壳类的蟹、虾、昆虫的外壳等）所含的氨基多糖，经稀酸处理后得到的物质。脱乙酰甲壳素即壳聚糖可生物合成，也可生物分解，不会造成二次污染。它是利用天然胶体保护作用使制剂澄清并较多地保留药液中的成分。甲壳素类澄清剂资源丰富，成本低，使用方便，具有广阔的使用前景。倪健等用甲壳素澄清单味白芍提取液，结果表明，澄清效果肯定，对白芍苷无影响，成品成本低，有效地保留了指标成分及多糖类成分，指标成分的含量和产品稳定性均优于水醇法。

ZTC1＋1 澄清剂是一种新型食品添加剂，安全无毒，是人工合成絮凝的理想代替品。它由两组分组成，两组分要依次加入，第一组分加入后，在不同的可溶性大分子间“架桥”连接，使分子迅速增大，第二组分在第一组分所形成的复合物基础上，再“架桥”使絮状物尽快形成，以达到除杂的目的。卞益民等选择Ⅳ型 ZTC1＋1 天然澄清剂用于中草药制剂的生产中，发现其澄清速度快，保留有效成分多，降低成本，缩短生产周期，制剂稳定性优于水醇法。

10.3.2　膜分离技术[32]

膜分离是在 20 世纪初出现，20 世纪 60 年代后迅速崛起的一门分离新技术。膜分离技术由于兼有分离、浓缩、纯化和精制的功能，又有高效、节能、环保、分子级过滤及过滤过程简单、易于控制等特征，因此，目前已广泛应用于食品、医药、生物、环保、化工、冶金、能源、石油、水处理、电子、仿生等领域，产生了巨大的经济效益和社会效益，已成为当今分离科学中最重要的手段之一。

随着国民经济的迅速发展，膜分离技术的应用领域不但会越来越广泛，而且其

会被越来越多的人认识和接受。据初步统计，2001 年全世界膜和膜组件的销售额已接近 80 亿美元，成套设备和膜工程的市场则已达到数百亿美元，而且每年还在以 10%～20%的幅度递增，显示出这一新兴产业的广阔前景。

10.3.2.1 膜分离技术的原理

膜分离技术是指在分子水平上不同粒径分子的混合物在通过半透膜时，实现选择性分离的技术。半透膜又称分离膜或滤膜，膜壁布满小孔，根据孔径大小可以分为：微滤膜(MF)、超滤膜(UF)、纳滤膜(NF)、反渗透膜(RO)等，膜分离都采用错流过滤方式。

10.3.2.2 膜分离技术的分类、特征与应用范围

以膜为滤过介质，按所能截留的微粒最小粒径，分离技术可分为四类(图 10.1)。

1) 微滤

微滤(MF)是一种精密过滤技术，它与反渗透、超滤均是通过压力而驱动的。所分离的组分直径为 0.03～15 μm；主要除去微粒、亚微粒和细粒物质。它多用于半导体工业超纯水的终端处理，反渗透的首端预处理。在啤酒与其他酒类的酿造中，用于除去微生物与异味杂质等。张艳等采用氢氧化镁吸附与无机陶瓷微粒膜相结合的方法对印染废水进行了脱色处理，脱色率可达 98%以上，并对膜污染和清洗进行了研究，取得了较好效果。

我国微滤膜的研究与国外水平相比，常规微滤膜的性能和国外同类产品的性能基本一致，折叠式滤芯在许多场合代替了进口产品，但在错流式微滤膜和组器技术及其在工程中的应用等方面，仍落后于国外，这就抑制了微滤技术在较高浊度水质深度处理中的应用。

2) 超滤

超滤(UF)和反渗透相类似，分离的组分直径为 0.005～10 μm，介于反渗透与微滤之间。反渗透、超滤和微滤三者组成了一个可分离从离子到微粒的膜分离过程。超滤在水处理方面应用十分广泛。它可以与反渗透联合制备高纯水；可以处理生活污水；处理工业废水，包括电泳涂漆废水、含油废水、含聚乙烯醇(PVA)废水等；从羊毛精制废水中回收羊毛脂；纤维加工油剂废水处理等。近年来超滤膜技术发展很快。与国际产品相比，国产超滤膜组件品种单一，通量和截流率综合性能较低，抑制了超滤膜技术在水处理以外领域的应用进展步伐。但现在，已有许多共混超滤膜的研究。由于共混超滤膜具有单一组分膜所无法比拟的优点，因此这是一个发展趋势。

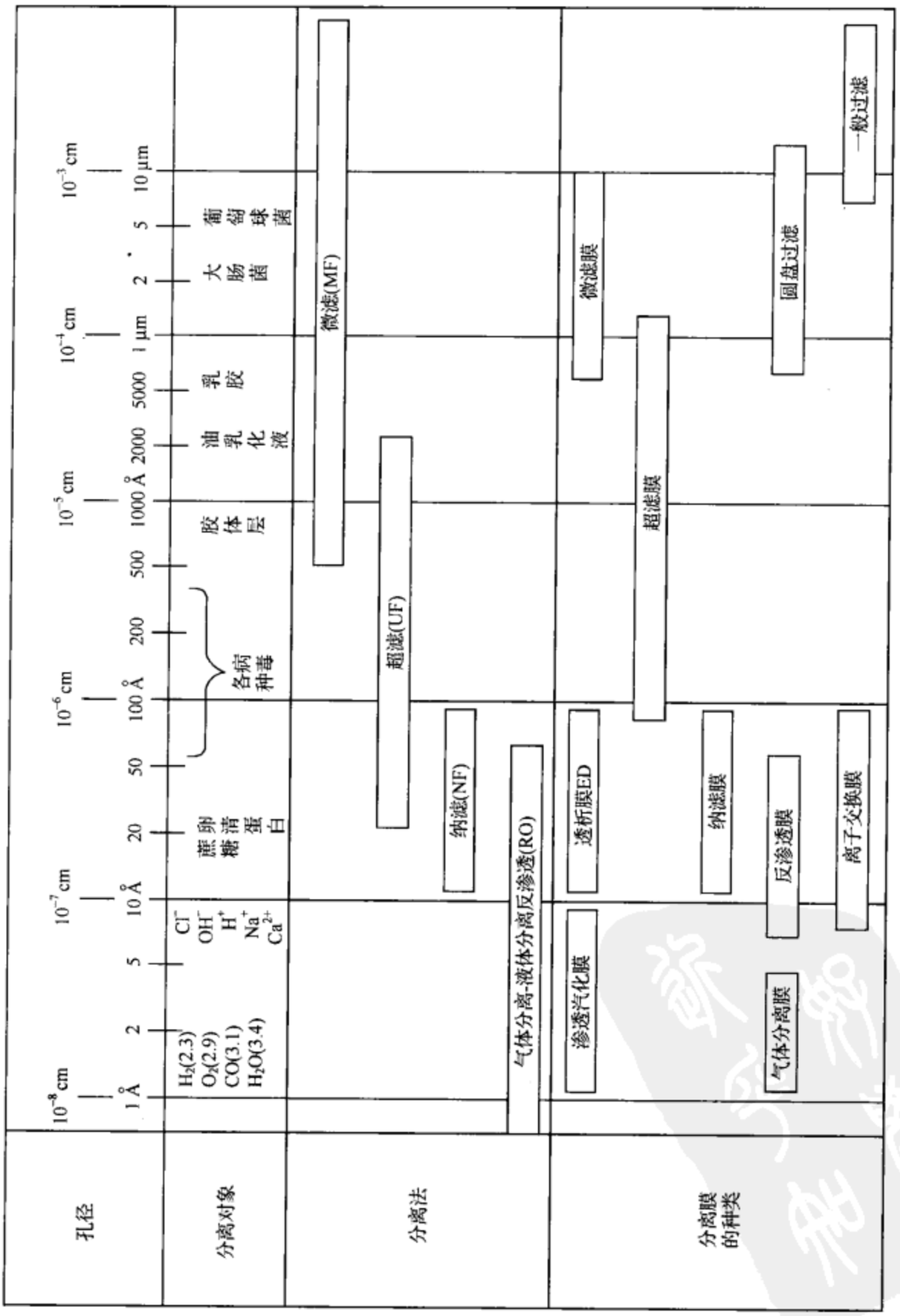


图 10.1　膜及膜分离技术的分类

3）纳滤

纳滤(NF)膜是孔径介于反渗透与超滤膜之间的压力渗透膜。它对相对分子质量介于200～1000的有机物和高价、低价、阴离子无机物有较高的截留性能。纳滤被广泛用于水软化、有机生物活性物质及化工中间化的除盐和净化浓缩、水中三卤代物前趋物的去除、废水脱色等领域。近几年，纳滤恒容除盐已有研究。由于纳滤膜对物料中的盐和其他有效组分之间的选择性透过(即纳滤膜选择透过低相对分子质量的盐，而对其他相对分子质量较大的有效组分则全部截留)，盐随着渗透溶剂而被不断去除，从而达到对物料的除盐净化目的。曾有研究以海洋高硬度苦咸水为水源，采用纳滤膜软化技术制备饮用水，系统连续运行27个月，淡化水符合国家生活饮用水卫生标准，并对纳滤的分离特点及高硬度下实际运行的注意点作了进一步的探讨。我国纳滤技术的研究虽在20世纪80年代末就开始了，但目前仍在实验室研究开发阶段，尚无产品投放市场。

4）反渗透

反渗透(RO)技术在20世纪50年代才开始研究，到60年代末制成具有工业价值的反渗透膜，1971年开始有工业性反渗透装置在电厂投入运行，现在反渗透法进行水处理工艺遍及美国、日本、法国、意大利等国家，我国于70年代末开始引进反渗透装置于发电厂的水处理。90年代反渗透膜的开发研制成为热点。现在反渗透技术已有大范围的应用。

10.3.2.3 膜分离技术在中药生产中的应用

目前，膜技术在中药生产中的应用主要有以下几个方面。

1）制备注射用水

丁绍敏等比较了超滤水与去离子水的质量，发现在使用了超滤工艺后输液的澄明度有了明显的提高。顾纪龙采取超滤工艺制备注射用水，可以有效滤除0.03 μm以上的微粒(包括微生物和热源)。邵卫栋运用反渗透膜制备注射用水，结果表明水质合格，能耗小。

2）制备中药注射液

黄伟文等研究了超滤法和原工艺制备丹参及复方丹参注射液的质量对比，发现超滤制品在澄明度、除杂质效率、有效成分保留率等方面均优于原工艺制品。全山丛等进行了超滤法和水醇法制备补骨脂注射液的比较研究，结果显示超滤法工艺流程短(1～2 d)，有效成分损失少，成品澄明，TLC斑点明显，主要成分补骨脂素及异补骨脂素含量均高于水醇法。

3）制备中药口服液

杨张渭将超滤工艺用于人参口服液的生产中，并于1994年进行了中试生产研究，结果所得产品符合一等品质量标准，成本降低。刘洪谦等用超滤法精制升脉饮

口服液，与采用传统工艺制备的成品制剂相比，超滤法不仅能够更好地除去杂质，并能有效地保留原方配伍成分，有效成分损失较少，成品稳定性优于传统产品。

4）制备其他中药制剂

1992年公布的中药口服液超滤膜除杂新工艺的发明专利不仅适用于中药口服液，也适用于片剂、针剂等中药提取液的除杂工序。俞加林论述了用超滤法制备中药浸膏制剂（片剂、胶囊剂、浓缩丸等）的理论依据、生产工艺和产品的质量检查，认为超滤法能有效除去有机杂质、大分子杂质、胶体、细菌等，能较多地保留有效成分，提高产品质量，降低成本，增加效益，是一项值得推广的技术。

5）中药活性物质的提取

中药的活性物质和非活性物质的相对分子质量差别较大，用截留相对分子质量适宜的膜能够将两者分开。与传统的化学分离方法相比，膜分离法提取中药中的活性物质不仅提取效率高、操作简便、缩短生产周期，而且成本低、经济效益好、减小环境污染，与常规的分离单元操作相结合，适用于规模化生产。

10.3.3　高速离心法[33]

中药水提液中常混有药渣、泥沙、粗纤维等固体杂质，给中药制剂的成型带来严重影响，是造成中药制剂“粗、大、黑”的主要原因之一；同时药液中还含有许多极细微粒以及大分子物质，如多糖、蛋白质、鞣质、树胶等，严重影响到中药水提液的澄清度和稳定性。因此，有关中药的分离与精制，便成为实现中药制剂现代化的瓶颈问题之一，而离心分离技术的应用与推广，则是诸多分离除杂手段中的一种有效而可行的方法。

10.3.3.1　离心分离原理

离心分离法是目前使用最普遍的一种分离方法。物体在高速旋转中要受到离心力的作用而沿旋转切线脱离，其本身的重力、旋转速度、旋转半径不同，从而所受的离心力也不同，在旋转条件相同的情况下，离心力与重力成正比。中药制剂采用离心分离法分离是利用混合液中各成分的密度差异，借助于离心机的高速旋转产生的不同离心力来达到分离的目的。一般在制剂生产中，遇到含水率较高、含不溶性微粒的粒径很小或黏度很大的滤液，或需将两种密度不同且不相混溶的液体混合物分开，而用其他方法难以实现时，可考虑选用适宜的离心机进行分离。

10.3.3.2　离心分离过程

离心机是利用离心力进行固-液、液-液或液-液-固相离心分离的机械。离心分

离按过程原理可分为离心过滤、离心沉降和离心分离3种。

1）离心过滤

离心转鼓周壁开孔为过滤式转鼓，转鼓内铺设滤布或筛网，旋转时悬浮液被离心力甩向转鼓周壁，固体颗粒被筛网截留在鼓内，形成滤饼，而液体经滤饼和筛网的过滤由鼓壁开孔甩离转鼓，从而达到固液分离的目的。离心过滤适用于固相含量较多、颗粒较粗的悬浮液的分离。

2）离心沉降

离心转鼓周壁为沉降式转鼓，旋转时，悬浮液在离心力作用下，相对密度较大的固体颗粒先向转鼓沉降形成沉渣，澄清液由转鼓顶端溢出，甩离转鼓，从而达到悬浮液澄清的目的。离心沉降适用于固相含量较少、颗粒较细的悬浮液的分离。

3）离心分离

转鼓周壁无孔，转速更高。旋转时，乳浊液在离心力的作用下分为两层，相对密度大的液体首先沉降紧贴鼓壁在外层，相对密度小的液体则在里层，在不同部位分别将其引出转鼓，从而达到液液分离的目的。当乳浊液中含有少量固体颗粒时，则能进行液-液-固三相分离。我们专门称乳浊液的分离为离心分离。

10.3.3.3 离心技术在中药制剂中的应用

1）离心技术在口服液制备中的应用

中药提取液一般体积较大，有效成分含量低，杂质多，常需要进一步分离和精制。目前，大多数中药口服液的生产是采用水煎醇沉法。离心分离法与醇沉法相比较具有较多的优点，如缩短了工艺流程，节约了大量乙醇，生产更趋安全，且可减少有效成分丢失，是值得推广和进一步探讨的方法。

采用高速离心法制备中药口服液，离心速度为16 000 $r \cdot min^{-1}$，和传统的水醇法比较，简单、省时，药液澄明度好，久置出现的沉淀少，具有广泛生理活性的多糖类成分基本上得以保留。在壮腰健肾口服液制备中应用超速离心法，产品的稳定性好，久置不浑浊，同时又避免了药液反复浓缩、转溶使有效成分受热破坏所造成的含量降低。用高速离心法制备清热解毒口服液，并与水醇法进行比较，检测其黄酮含量，结果表明，高速离心工艺流程短，成本低，有效成分损失少，成品色泽深且澄明，黄酮含量显著高于水醇法。同时以有效成分含量为指标，对高速离心法、多级过滤法、水醇法用于制备中药口服液进行了比较研究，结果表明，用高速离心法制备的归脾汤、小柴胡汤、一贯煎等中药口服液在保留多糖、黄芪甲苷、黄芩苷等有效成分的含量及保证成品的澄明度上明显优于水醇法。

2）离心技术在中药固体制剂中的应用

中药口服制剂在制备流浸膏的工艺上，传统方法多以水提醇沉法进行纯化处

理以除去杂质，但不少有效成分也被沉淀除去，而且大量乙醇的使用增加了成本。采用管式离心机(20 000 r·min^{-1})来代替醇沉法制备流浸膏取得了预期的效果，用此方法制备的乙肝冲剂及缩宫止痛冲剂其溶化性、澄明度都达到了有关规定，成品的质量也得到较大提高。用超速离心技术，将制成的颗粒剂与未经离心和常规离心制得的颗粒剂样品作比较，以君药黄芪中黄芪甲苷含量为指标，结果表明经离心后制得的颗粒剂与未经离心制得的颗粒剂相比，每克颗粒的含固量下降了38.82%，每克颗粒的黄芪甲苷含量则上升了61.54%。

离心技术在制粒、包衣方面的应用是一种新的尝试。离心造粒法利用包衣制粒机转盘平面旋转所产生的离心力和物料间产生的摩擦力使若干单一母核在运动状态下吸附黏合剂雾滴，黏附主辅料干粉，逐渐增大并趋于圆整平滑。采用正交试验对温胆汤颗粒剂和芩黄颗粒剂离心包衣造粒所需的物料条件进行了优化研究，结果两种颗粒剂离心包衣造粒生产收率均稳定在90%左右。既减少了单剂量服用量，提高分剂量准确度，又改善了颗粒的物理性状。

10.3.4　分子蒸馏技术[34]

分子蒸馏技术(molecular distillation，MD)又称为短程蒸馏(short path distillation，SOD)，是一种对高沸点、热敏性物料进行有效分离的手段。自20世纪30年代以来，得到了世界各国的重视。至20世纪60年代，为适应浓缩鱼肝油中维生素A的需要，分子蒸馏技术得到了规模化的工业应用。分子蒸馏是近年来开始用于中药产业的高新技术。

10.3.4.1　分子蒸馏技术的基本原理

分子蒸馏不同于一般的蒸馏技术。它是运用不同物质分子运动平均自由程的差别而实现物质的分离，因而能够实现在远离沸点下操作。

根据分子运动理论，液体混合物的分子受热后运动会加剧，当接受到足够能量时，就会从液面逸出而成为气相分子，随着液面上方气相分子的增加，有一部分气体就会返回液体，在外界条件保持恒定情况下，就会达到分子运动的动态平衡。从宏观上看达到了平衡。

液体混合物为达到分离的目的，首先进行加热，能量足够的分子逸出液面，轻分子的平均自由程大，重分子平均自由程小，若在离液面小于轻分子的平均自由程而大于重分子平均自由程处设置一冷凝面，使得轻分子不断被冷凝，从而破坏了轻分子的动态平衡而使混合液中的轻分子不断逸出，而重分子因达不到冷凝面很快趋于动态平衡，不再从混合液中逸出，这样，液体混合物便达到了分离的目的。其分离过程如图10.2所示。

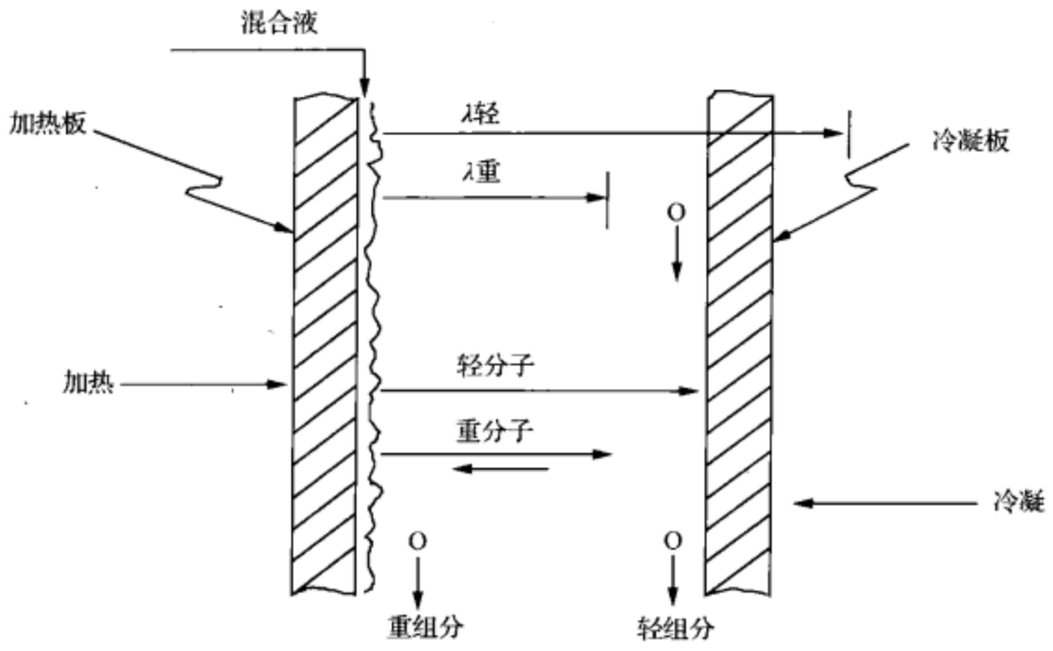


图 10.2 分子蒸馏原理图

分子蒸馏装置就是通过降低蒸发空间的压力 0.0133～1.3300 Pa，使冷凝表面靠近蒸发表面，当其间的垂直距离小于轻气体分子的平均自由程而大于重分子的平均自由程时，从蒸发表面气化的轻气体分子，就可以不与其他分子碰撞，直接到达冷凝表面而冷凝。分子蒸馏器的结构有很多形式，但发展到现在主要有离心薄膜式和转子刮膜式两种结构形式。

分子蒸馏一般经过以下 4 个步骤：①分子从液相主体向蒸发面扩散；②分子从蒸发面(加热面)上自由蒸发；③分子从蒸发面向冷凝面飞射，在飞射过程中，可能与残存的空气分子碰撞，也可能相互碰撞。但只要有合适的真空度，使蒸发分子的平均自由程大于或等于两面(蒸发面与冷凝面)之间的距离即可，过高提高真空度毫无意义；④分子在冷凝面上冷凝，冷凝面形状合理且光滑，从而完成对该物质分子的分离提取。

10.3.4.2 分子蒸馏技术的特点

由分子蒸馏的原理可以看出，分子蒸馏有许多常规蒸馏所不具备的特点。

(1) 分子蒸馏的操作真空度高。由于分子蒸馏的冷热面间的间距小于轻分子的平均自由程，轻分子几乎没有压力降就达到冷凝面，使蒸发面的实际操作真空度比传统真空蒸馏的操作真空度高出几个数量级。分子蒸馏的操作残压一般约为 0.1～1 Pa 数量级。

(2) 分子蒸馏的操作温度低。分子蒸馏依靠分子运动平均自由程的差别实现分离，并不需要到达物料的沸点，加之分子蒸馏的操作真空度更高，这又进一步降

低了操作温度。

(3) 分子蒸馏分离过程中物料受热时间短。分子蒸馏在蒸发过程中，物料被强制形成很薄的液膜，并被定向推动，使得液体在分离器中停留时间很短。特别是轻分子，一经逸出就马上冷凝，受热时间更短，一般为几秒或十几秒。这样，物料受到的热损伤很小，特别对热敏性物质的分离过程提供了传统蒸馏无法比拟的操作条件。

(4) 分子蒸馏的分离程度更高。由分子蒸馏的相对挥发度可以看出：

$$\alpha_r = \alpha \cdot \sqrt{\frac{M_2}{M_1}}$$

式中，M_1 为轻分子相对分子质量；M_2 为重分子相对分子质量；而常规蒸馏相对挥发度 $\alpha = P_1/P_2$，由于 $M_2 > M_1$，所以 $\alpha_r > \alpha$。

由以上特点可以看出，分子蒸馏技术，能分离常规蒸馏不易分离的物质，特别适宜于高沸点、热敏性物质的分离。因此，它作为一项有效提纯分离手段在维生素工业中具有广阔的应用前景。

10.3.4.3　分子蒸馏技术在中药提取分离过程中的优势与不足

由于分子蒸馏真空度高，操作温度低和受热时间短，能较好地保护中药有效成分，尤其对于高沸点和热敏性及易氧化物料的分离，有常规方法不可比拟的优点。能有效除液体中的低分子物质，如有机溶剂、臭味等，并有利于脱色，因此能有效改善中药成品的色泽，保持终产品的纯天然、无污染。分离能力强，可分离出常规蒸馏不易分离的物质，且分离后有效成分高度富集，可提高药物质量。

但分子蒸馏技术在中药生产中同样存在局限性，如：①分子蒸馏是纯粹的分离技术，不具备提取功能，必须与提取方法联用；②分子蒸馏是一种液-液分离技术，要求进样物料呈液态，至少在系统循环加热介质的最高温度以下为液态，并且分离后的组分也应为液态，以免堵塞管道；③目前，分子蒸馏主要用于脂溶性成分的分离精制，对于水溶性成分的分离还有一定的难度；④分子蒸馏是在低于沸点条件下进行的，其蒸发面的气化量要比常规蒸馏在沸腾状态下的气化量少得多。同时，由于加热面积受设备结构的限制，在空间尺寸相同时生产水平低于常规蒸馏，因此分子蒸馏的生产能力有限；⑤由于分子蒸馏特殊的技术要求，如要求高真空度、蒸发面与冷凝面距离要小(一般为 1～5 cm)，故其设备内部结构复杂，辅助设备多，设计、制作技术要求高，初期一次性投资较大。

应用实例： 从甜橙油中提取类胡萝卜素的工艺研究。

现代研究表明，类胡萝卜素是人们必需的维生素来源，它具有抗菌、提高免疫力等作用。从甜橙皮中提取类胡萝卜素的常规方法是采用丙酮、己烷等有机溶剂，从切碎的外果皮中浸提色素，然后蒸馏除去溶剂和不需要的组分。由于该方法使

用了有机溶剂，使类胡萝卜素的应用受到一定的限制。为了克服上述缺点，钟耕等采用分子蒸馏器、旋转蒸发仪、德国蒸馏提香设备分别提取类胡萝卜素，结果发现以分子蒸馏效果最佳，故对分子蒸馏提取类胡萝卜素的工艺进行了研究。根据冷榨甜橙油的物理性质和分子蒸馏器的工作原理，选择真空度、温度和进样速度 3 种因素，以色素的色价(E)作为评价指标进行正交试验，试验结果可知，分子蒸馏操作的最佳工艺条件为：温度 95 ℃，真空度 126.66 Pa，进料速度 10 mL · min^{-1}。

10.3.5 大孔吸附树脂法

参见第一篇第 5 章。

10.3.6 分子印迹技术[35]

分子印迹技术(molecular imprinting technology，MIT)是 20 世纪末出现的一种高选择性分离技术，这种技术的基本思想是源于人们对抗体-抗原专一性的认识，利用具有分子识别能力的聚合物材料——分子印迹聚合物(molecule imprinting polymer，MIP)来分离、筛选、纯化化合物的一种仿生技术。因为制备的材料有着极高的选择性及卓越的分子识别性能，很快在固相萃取、人工酶学、手性拆分、生物传感器、不对称催化等方面得到了广泛的应用。

10.3.6.1 基本原理

MIT 是选用能与印迹分子产生特定相互作用的功能性单体，通过共价或非共价作用在溶剂中形成印迹分子-功能单体复合物，加入交联剂，在引发剂的引发下与带有特殊官能团的功能单体进行光或热的聚合，形成三维交联的聚合物网络，然后，用合适的溶剂除去印迹分子，在聚合物网络中形成空间和化学功能与印迹分子相匹配的空穴。这种空穴与印迹分子结构完全一样，可对印迹分子或与之结构相似的分子实现特异性的识别。因此，分子印迹技术具有构效预知性、特异识别性和广泛适用性 3 个特点。

目前，分子印迹过程机理还缺乏定量和系统的研究。从本质上讲，分子印迹聚合物(MIP)对分子的识别源于它与模板分子之间在化学基团以及三维空间结构上的相互匹配，即 MIP 的选择性与模板分子和功能单体之间相互作用的数量与强度以及模板分子的形态与刚性有关。目前认为 MIP 的形成过程以及 MIP 与印迹分子之间识别过程均受热力学定律制约，相应的自由能变化可通过下式计算：

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{t+r} + \Delta G_r + \Delta G_h + \Delta G_{vib} + \sum \Delta G_p + \Delta G_{conf} + \Delta G_{vdw}$$

式中，ΔG_{bind}是形成复合物时 Gibbs 自由能的变化；ΔG_{t+r}是分子转动引起的自由能减少；ΔG_r 是分子内旋受限引起的自由能减少；ΔG_h是疏水作用引起的自由能增加；ΔG_{vib}是基团振动引起的自由能变化；$\sum \Delta G_p$ 是极性基团相互作用对自由能的

贡献；ΔG_{conf}是由构型变化引起的自由能变化；ΔG_{vdw}是由非范德华力引起的自由能减少。由上式可以分析影响 MIP 形成和识别过程的因素，并进而改善 MIP 的设计与制备。

10.3.6.2　分子印迹聚合物的制备

分子印迹聚合物的制备过程可分为 3 步：第一步是印迹，将印迹分子和功能单体按比例混合，使其存在一定的分子间作用力；第二步是聚合，加交联剂，使复合物通过聚合反应形成聚合物；第三步是去除印迹分子，反复洗脱水解，使其形成具有一定空穴的分子印迹聚合物。根据功能单体和印迹分子间作用力的差异，MIP 的制备方法可分为以下 3 类。

(1) 共价键法(也称预先组织法)。印迹分子与功能单体通过可逆的共价键结合，加入交联剂共聚后，印迹分子通过化学方法从聚合物上断开，再用极性溶剂将印迹分子洗脱下来，使其形成具有高密度空腔的分子印迹聚合物。其主要的反应类型有形成硼酸酯、席夫碱、缩醛(酮)、酯等。共价键法的优点是空间位置固定，选择性高，峰展宽和拖尾少，常用于诸如糖类、氨基酸类、芳基酮类等多种化合物的特定性识别。由于共价键比较稳定，因而会生成较多的键合位点，印迹效率要高于非共价键印迹法。其缺点是功能单体选择有限，使模板限制较大且难以除去。因此，在选择模板时共价键键能必须适当，否则会使在识别过程中结合与解离速度偏慢，难以达到热力学平衡。

(2) 非共价键法(也称自组装法)。印迹分子与功能单体通过氢键、金属配位键、偶极作用、离子化作用、疏水作用、静电引力、范德华力等多种非共价键作用力生成分子自组装体，在合适的引发条件下生成聚合物，将聚合物研磨为粉末并用合适的溶剂除去模板分子。这种过程是模拟生物中多重分子间作用而具有立体效应。其优点是可使用多种功能单体，模板分子多样且易于用适宜的溶剂洗脱。这种方法制得的 MIP 因使用多种作用的结合，具有选择性高、分离能力强、识别速度快等特点。缺点是在聚合前，模板分子与单体可形成多种分子络合物，制备的 MIP 结合位点不均匀，常导致非特异性结合。在洗脱过程中，由于很难将聚合物中的模板分子除去，就会造成“模板渗漏”。但由于该法灵活方便，制备过程简单，使得此法比共价键法更适用。

(3) 半共价印迹法(也称空间牺牲法)。即聚合时功能单体和模板分子通过共价作用形成稳定的配合物，而在对印迹分子的识别过程中，仅通过非共价作用力来进行重新键合。这种方法由于模板分子和单体用共价键结合，使生成的聚合物结构完整，结合点均匀整齐。在洗脱过程中用强极性溶剂反复洗涤，从而解决了非共价键法的“模板渗漏”对待测物的影响。

10.3.6.3 MIT 在中药提取分离中的应用

由于含量低、结构复杂且类型多样，使中药活性成分分离困难。高效液相色谱法、硅胶柱色谱法等常规的分离方法溶剂消耗量大、效率低，且容易造成微量的有效成分丢失。MIT 与上述色谱分离技术相比，具有分子识别性强、固定相制备简便快速、操作简单、性质比较稳定(耐酸碱，耐高温、高压等)、溶剂消耗量小、模板和 MIP 都可以回收再利用等优点，在中药有效成分的提取分离中有很好的应用前景。

目前，有关 MIT 在药学领域的文献半数以上涉及手性物的分离和分析，而其在中药活性成分的分离纯化中的应用虽然还不是很多，但都收到了较好的效果。

黄酮：目前所报道的利用 MIT 分离纯化的黄酮类化合物多以槲皮素为模板、丙烯酰胺为功能单体。例如，北京大学化学与分子工程学院的谢建春等首先将槲皮素 MIP 直接用于银杏叶提取物水解液的分离，得到了槲皮素和与其结构相似的山柰酚，其中槲皮素的回收率为 89%，从而证明了利用 MIP 直接从中药中获得具有相同药效的化合物的可能性。Zhu 等则以槲皮素为模板制备的 MIP 作为固相萃取材料，筛选到了藏药缘毛锦鸡儿中两活性比槲皮素强的表皮生长因子受体抑制剂：(*E*)-piceatannol 和 butein，两者回收率分别为 80%和 76%。

此外，谢建春等还以 2,2-羟甲基丁醇三甲基丙烯酯(TRIM)为交联剂制备了槲皮素 MIP，将其用于分子印迹固相萃取(MIP-SPE)，从服用了银杏叶提取物水解液的大鼠血浆中分离并测定出槲皮素和异鼠李素，表明该 MIP-SPE 能有效洁净水溶性生物样品，并直接进行定量测定。

多元酚：茶多酚中的儿茶素类成分结构相似，尤其是表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)和其对映体没食子儿茶素没食子酸酯(GCG)，常规方法难以分离。中南大学化学化工学院的雷启福等尝试以 EGCG 为模板，以 α-甲基丙烯酸为功能单体，以乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂制备了 MIP，从茶多酚中分离富集 EGCG 获得了满意效果。该院的向海艳等以白藜芦醇为模板，以丙烯酰胺为功能单体，以偶氮二异丁腈为引发剂制备了 MIP，并对虎杖提取液进行了分离，仅经过两步洗脱(甲醇淋洗后，5%乙酸甲醇溶液洗脱)，就得到了白藜芦醇及少量白藜芦醇苷，且两者达到了良好的分离效果。

生物碱：MIT 在生物碱中的应用较多，特别是手性异构体的分离与测定。例如，Dong 等以中药麻黄中的成分(－)-ephedrine 为模板，以甲基丙烯酸为功能单体，合成了(－)-ephedrine 分子印迹聚合物，该聚合物对(－)-ephedrine 有良好的选择性和亲和力。将其用于分子印迹固相萃取(MIP-SPE)，直接从麻黄中提取出了(－)-ephedrine，经高效液相分析，纯度较高，回收率和精密度良好，表明 MIP-SPE 能直接用于麻黄中(－)-ephedrine 的定量测定。

甾体：甾体类化合物结构相似，采用常规方法很难对某一组分进行分离纯化和定量测定。而甾体分子含有羟基取代基，可以利用其和功能单体形成氢键或酯键，制备出相应的 MIP，使之得到高效分离。目前，应用 MIT 选择性分离、分析甾体分子已成为关注的热点，但多数涉及人体内的一些活性物质，如胆固醇、皮质醇等，用于植物中甾体成分的分离纯化较少。

香豆素：Hu 等用 MIP-SPE 从秦皮中提取得到了秦皮乙素，并通过选择洗涤和洗脱溶剂，设计了一个分离秦皮乙素和其结构类似物秦皮甲素、香豆素、7-氧基香豆素及瑞香素的方案。

虽然 MIT 在中药分离中的应用研究已日益广泛，而且与其他色谱分离技术相比，它具有许多独特的优点，包括分子识别性强、固定相制备简便快速、操作简单且溶剂消耗量小、模板和 MIP 都可以回收再利用等。但是，作为一种新型的分离手段，MIT 本身还存在许多有待解决的问题，如分子印迹和识别过程的机制和定量描述、功能单体和交联剂的选择局限性等。首先，MIT 应用的有些模板往往十分昂贵或难以得到，且通常每合成 1 g 干聚合物就需要 50～100 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 的模板，模板需要量较大，回收率也有待进一步提高。其次，MIT 在特殊的分离领域的应用还需大力研究，由于结合位点的非均匀性和实际可利用官能团的数量有限，MIP 作为高效液相色谱（HPLC）固定相时常常出现色谱峰过宽和拖尾的情况，从而使柱效降低，影响了分离效果。因此，为获得较大批量的产物，达到较大规模的制备水平，需要进一步增加聚合物中的实际有效结合位点以增加分离柱容量。三是目前制备相对分子质量较高的成分的 MIP 有一定困难，所以现在使用的模板均为小分子的苷元，需要进一步开发中药活性成分的模板。MIP 的聚合方法多样，包括溶液聚合（本体聚合）法、悬浮聚合法、原位聚合法、种子聚合法、表面印迹法等，而在上述文献中，多用溶液聚合法。这种方法需研磨过筛，费时费力，材料损失也较多。

尽管 MIT 具有上述种种局限性，还有待进一步深入研究，但由于其具备很高的选择性以及优良的理化特性，必然会随着技术本身的不断发展和应用的逐渐增多，而在中药活性成分分离纯化领域发挥越来越大的作用。

10.3.7　高速逆流色谱技术

参见第一篇第 8 章。

10.4　各种技术的有机组合及综合运用

鉴于中药、天然药物所含成分的复杂性，中药、天然药物的提取、分离与纯化、浓缩与干燥等工艺的研究，应在分析处方组成和复方中各味药之间的关系，参考各

味药所含成分的理化性质和药理作用的研究基础上，根据与治疗作用相关的有效成分或有效部位的理化性质，结合制剂制备上的要求、大生产的实际情况、环境保护的要求，进行工艺路线的设计，工艺方法和条件的筛选，制定出方法简便、条件确定的稳定工艺。因此在实际生产中，一种提取纯化的方法往往达不到预期的目的，所以需要采用多种技术的综合运用。以银杏叶总黄酮的提取为例：

银杏叶为银杏科植物银杏(*Ginkgo biloba* L.)的干燥叶。秋季叶尚绿时采收，及时干燥。性味甘、苦、涩、平。归心、肺经。具有敛肺、平喘、活血化瘀、止痛的功效，临床用于改善微循环，防治心脑血管疾病等。从 20 世纪 60 年代起，国内开始对银杏叶的化学成分、药理作用进行研究，并相继研制成制剂应用于临床，取得了良好的效果。有研究表明银杏叶提取物(EGB)改善冠心病、心绞痛总有效率为 91.33%，改善心电图总有效率为 73.99%。由于银杏叶独特的药理和临床治疗效果，近年来在回归大自然的潮流下，人们对绿色产品的渴求更加强烈，因而使其成为全球研究药物的热点。

银杏叶的化学成分十分复杂，迄今为止，在银杏叶中发现的化合物已达 160 多种，但其中最重要的活性成分是黄酮类化合物和银杏内酯；此外，还有有机酸类、酚类、聚戊烯醇类、原花青素类和营养成分等。

10.4.1 水提取法

以水为溶剂的提取有水浸提法和水蒸气蒸馏法两种。这两种方法使用设备简单，成本低，产品安全，但是浸出率低，水溶性杂质含量高且不易去除，资源浪费严重，现在很少使用。

10.4.2 有机溶剂萃取法

这是目前国内外普遍采用的方法。提取的工艺程序较多，提取步骤大致可归纳为两步：

第一步是有机溶剂萃取得粗提物。这种方法是将银杏叶干燥、粉碎过筛，颗粒大小约在 50～70 目，然后用有机溶剂浸泡、萃取、过滤，滤液中的有机溶剂用减压蒸馏去除，得粗提物浸膏，通常为棕黑色，其中黄酮类含量为 7%～10%，萜类内酯为 0.6%～1%。这种方法影响有效成分产率主要因素是有机溶剂的选取，研究表明用不同的有机溶剂提取对黄酮产率的影响各不相同，其中以甲醇为溶剂，黄酮得率为 17.96 $mg \cdot g^{-1}$；以 60% 丙酮为溶剂，黄酮得率为 18.11 $mg \cdot g^{-1}$；以 $(NH_4)_2SO_4$ 为溶剂，黄酮得率为 6.03 $mg \cdot g^{-1}$；以乙醇为溶剂，不同浓度乙醇对黄酮得率有一定影响，最佳萃取条件：以 70% 乙醇为溶剂，温度控制在 70 ℃，黄酮得率为 17.87 $mg \cdot g^{-1}$，以 90% 乙醇为溶剂，温度控制在 50 ℃，黄酮得率为 16.79 $mg \cdot g^{-1}$。研究发现丙酮提取效果最好，但丙酮成本较高；70% 乙醇成本低，提取

液黄酮含量较高，且蛋白质含量少(即纯度高)，是较好的提取溶剂，值得推广。

第二步是在第一步基础上进一步精制。此过程有液-液萃取和树脂吸附法两种。液-液萃取虽然设备简单，工艺成熟，但成本较高，操作繁琐，且有机溶剂残留多，污染环境，不宜工业化生产。葛洪等在传统工艺的基础上，采用新型膨化和连循环逆流 6 级萃取工艺，萃取率(以黄酮计)达 99%，此方法操作简单，生产稳定，值得推广；树脂吸附法近年来研究较多，相对于液-液萃取操作程序简单，成本低，回收率高，有机溶剂残留少，影响此工艺提取率的因素主要是树脂、溶剂浓度、溶剂量和温度；王若谷等研究发现提取的最佳工艺条件：用 5 倍和 4 倍 70%乙醇回流温度下加入一定量的 2%甲壳素絮凝剂，过滤，滤液上大孔树脂柱，梯度洗脱，分别浓缩干燥，以 70%(体积分数)乙醇以 5 倍和 4 倍量加热回流提取 2 h，回收乙醇以后，调整适当比例，加入 7%量的 2%甲壳素絮凝剂过滤，滤液上树脂柱，梯度洗脱，洗脱液分别浓缩干燥；用此方法提取黄酮的得率为 27.41%，内酯得率 8.7%，超过国际标准。应国清等以水为溶剂，以 D201 型树脂为吸附剂，20%乙醇为脱洗剂进行分离纯化，总黄酮得率为 71%。

10.4.3　超临界 CO_2 萃取法

该技术是一种新型分离技术，利用超临界 CO_2 作为萃取剂从液体中提取某种高沸点成分，以达到分离纯化的目标。它综合了气相色谱法(GC)和高效液相色谱法(HPLC)的优点，近年来在中药现代化的产业开发中研究和应用比较广泛。与溶剂法相比，该方法具有提取效率高，无溶剂残留，无毒性，活性成分和热不稳定性成分不易被分解破坏而保持其天然的特征等优点，同时还可以通过控制临界温度和压力以及加入极性改良剂(改变 CO_2 极性)等达到分离和纯化的目的。影响提取工艺效果的因素主要有萃取压力、萃取温度、CO_2 的流量和改良剂(调整 CO_2 和溶剂极性)。侯峰等通过改良 CO_2 的极性，在提取的过程中有效去除银杏酚酸而活性成分银杏黄酮、内酯几乎没有损失。邓启焕等以银杏叶有效成分分离为对象，建立了一套超临界流体小试、中试装置和实验方法，所得的提取物中银杏黄酮含量为 28%，银杏内酯含量为 7.2%，均高于国际现行公认标准。

10.4.4　其他方法

除去以上的方法之外，还有细胞和组织培养合成法、微波预处理提取法和酶提取法。目前银杏有效成分主要来源于银杏叶，而银杏叶有效成分的含量受地域、环境、气候、采收时间、工艺条件等影响有较大差别，细胞组织培养合成法具有生长速度快，克隆性、遗传性稳定，筛选方便等特点，现已发展成为一种培养系统，在维护生态环境平衡发展的情况下，此法有很大的发展前景。微波预处理提取法机制是银杏叶在提取前经微波照射，细胞结构被破坏，有效成分得到充分解吸，后续提取

速度比醇法快。此法具有萃取效率高，萃取时间短等优点。酶提取法是在醇/水浸提之前对原料进行酶降解处理。中南大学的王晖等研究了银杏叶黄酮的酶法提取，黄酮得率为 2.01%，高于直接醇/水浸提取得率 1.29%。许明淑等在醇/水浸提时加入 Suhong 475 转苷酶，以麦芽糖为糖基，温度为 50 ℃，pH 为 6.0～6.5，反应时间为 10 h，总黄酮得率为 44%。

由此可见，中药、天然药物提取纯化的工艺路线是以保证中药、天然药物的安全、有效为目的，根据中医临床用药及组方特点，以及制剂成型要求所制定的工艺、方法、条件和程序的最基本的规定，直接影响药物的安全、有效性，决定着制剂质量的优劣，也关系到大生产的可行性和经济效益。因此，工艺路线是中药、天然药物工艺科学性、合理性和可行性的基础和核心。工艺路线的设计应以使中药、天然药物的生产工艺具有科学性、先进性及生产的可行性为原则。在中药的提取分离以及纯化过程中，应当根据目标化合物的性质，有针对性地采用多种方法和手段的结合和综合运用，最终达到纯化的目的，保证药品临床使用的安全性和有效性。

参 考 文 献

[1] 杨再，陈俊平，陈佳铭. 超微粉碎技术的原理和应用. 饲料博览，2007，(19)：36～38.
[2] 苗青. 中药动态温浸工艺技术. 中成药，2002，24(2)：136.
[3] 张憋，王亮. 超微粉碎在食品加工中的研究进展. 无锡轻工大学学报，2003，22(4)：106～110.
[4] 盖国胜，徐政. 超细粉体过程中物料的理化特性变化及应用. 中国粉体技术，1997，3(6)：41～43.
[5] 李中华. 现代高新技术在食品中的应用. 海军医学杂志，2003，(4)：344～346.
[6] 孙文格，郑倩，刘凤琴等. 中药超微粉碎技术及粉体特征的研究进展. 中国药业，2009，18(22)：75～76.
[7] 宋丽丽，张启明，范丙义等. 六味地黄方超微细粉的有效成分熊果酸与丹皮酚溶出特性的研究. 中成药，2002，24(7)：498～500.
[8] 刘产明，杨洪元. 不同粉碎度三七体外溶出试验. 中成药，1998，20(2)：17～19.
[9] 王爱武，吕文海，耿晖. 超微粉碎在中药生产中应用概况及展望. 时珍国医国药，2000，11(7)：669.
[10] 金顺福，刘美辉，濮存海. 超微粉碎技术在仁术健胃颗粒剂中应用. 中成药，2005，27(1)：15.
[11] 崔秀君，程立方. 产舒康颗粒的制备及质量标准研究. 中国药房，2007，18(6)：433～435.
[12] 孙强，何应. 当归微粉化片剂的研制与质量控制. 食品与药品，2007，9(7)：11～13.
[13] 冯育林，谢平，孙叶兵等. 中药提取工艺应用进展. 中药材，2002，25(12)：908～911.
[14] 贾立革，刘锁兰，李秀青等. 中药提取分离新技术的研究进展. 解放军药学学报，2004，20(4)：279～283.
[15] 宁娜，周晶. 超高压提取技术在中药提取中的研究进展. 天津医科大学药学院，2008，20(5)：62～64.
[16] 王宇卿，闫明，贺金华等. 中药半仿生提取法的研究进展. 医药导报，2007，26(7)：754～756.
[17] 杨茉，周晶. 半仿生技术在复方中药提取中的应用进展. 时珍国医国药，2008，19(8)：1946～1947.
[18] 卢艳华，魏东芝，蒋晓萌等. 中药有效成分提取分离技术. 北京：化学工业出版社，2008.
[19] 秦梅颂. 超声提取技术在中药中的研究进展. 安徽农学通报，2010，16(13)：54～55.
[20] 曾惠玲. 中药化学成分提取新技术研究进展. 海峡药学，2005，17(5)：1～3.
[21] 赵兵，尹辉. 循环超声技术及其在中药研发和生产中的应用. 中草药，2006，37(1)：154～156.
[22] 娜日斯，包金莲. 中蒙药有效成分提取方法新进展. 中国民族医药杂志，2006，(6)：51～54.

[23] 周俊培. 综述传统中药提取装置. 医药工程设计. 2009,30(5):34～39.
[24] 戈延茹,曹恒杰. 双水相萃取技术及其在药物提取分离中的应用近况. 中国现代应用药学杂志,2009,26(8):623～627.
[25] 国大亮,朱晓薇. 双水相萃取法在天然产物纯化中的应用. 天津药学,2006,18(1):64～67.
[26] 张昕,张奇,杨艺虹等. 双水相萃取技术应用在医药工业中的展望. 医药工程设计杂志,2001,22(5):22～26.
[27] 李希,谢守德,冯建安等. 动态逆流提取技术在中药提取中的应用. 实用中医药杂,2008,24(12):806～808.
[28] 曾国顺. 中药静、动态提取工艺比较. 中成药,1989,11(3): 8.
[29] 王生瑶. 连续逆流提取工艺的设备及其应用. 应用能源技术,2007,2: 18.
[30] 刘明言,余根,王红. 中药提取液浓缩新工艺和新技术进展. 中国中药杂志,2006,31(03): 184～187.
[31] 陈浩,田景振,赵海霞. 吸附澄清技术. 山东中医杂志,2000,19(03): 176～179.
[32] 华耀祖等. 膜分离技术与应用丛书. 北京:化学工业出版社,2004.
[33] 翁幼武,刘艺,张琦. 高速离心法在中药口服制剂工艺中的应用. 中国药业,2005,14(11): 79～80.
[34] 杨村. 分子蒸馏技术. 北京:化学工业出版社,2004.
[35] 谭天伟. 分子印迹技术及应用. 北京:化学工业出版社,2010.

（李慧梁　张　薇　陈海生）

第 11 章　天然产物的结构鉴定

化合物的结构鉴定是天然产物化学研究的重要内容之一。化学降解和化学转化曾对天然产物的结构鉴定发挥了重要作用。随着分析仪器的进步，确定化合物的化学结构所需时间已大大缩短。进行天然产物化学结构鉴定常用的“四谱”包括核磁共振谱（NMR，属于波谱），质谱（MS，属于物质粒子的质量谱），紫外光谱（UV，属于光谱）和红外光谱（IR，属于光谱）。熟悉各类天然产物的结构特征，并记住特征谱学数据对结构鉴定十分重要[1]。此外，对利用旋光测定、化学相关法、X 射线单晶衍射、圆二色谱（CD）、CD 激子手性法和振动圆二色谱（VCD）等手段确定所分离天然产物的绝对构型也已成为天然产物化学工作者普遍追求的目标。目前已鉴定结构的天然产物数目已超过十万个，充分利用 SciFinder、Beilstein、CCD 等数据库的检索功能，熟悉前人从同科属生物中分得化合物的结构类型，将相关谱学数据与文献报道值进行比较，有助于研究人员在短时间内确定已知天然产物的结构，将更多精力用于新化合物的结构鉴定和其他研究。随着 LC-UV、LC-MS 和 LC-NMR 等联用技术的发展，快速从混合物中鉴别已知组分甚至鉴定新化合物的化学结构也已成为可能。下面就几种分析仪器在结构鉴定中的应用作一简要介绍。

11.1　核磁共振谱

核磁共振（NMR）波谱是一种基于特定原子核在外磁场中吸收了与其裂分能级间能量差相对应的射频场能量而产生共振现象的分析方法。核磁共振波谱通过化学位移值、耦合常数值、谱峰相对强度和在各种二维谱及多维谱中呈现的相关峰，提供分子中原子的连接方式、空间的相对取向等定性的结构信息。近年来，具有更高灵敏度和分辨率的高兆周核磁共振仪获得广泛应用，这对微量和结构复杂化合物的结构鉴定起到了促进作用。

11.1.1　核磁共振氢谱（^{1}H NMR）

由于^{1}H 是具有磁矩的原子核，在外磁场作用下能发生能级分裂，核磁矩以不同取向绕外磁场回旋。当一个垂直于外磁场的射频磁场同时作用于该核，并且照射场的频率等于核在外磁场中的回旋频率时即发生核磁共振，处于低能级的核跃

迁到高能级，并产生吸收信号。天然产物中的氢核因所处的化学环境不同而在不同的频率跃迁，产生不同的吸收信号。

在核磁共振氢谱中，一个信号的位置可描述为它与另一参照物信号的偏离程度，称为化学位移。化学位移是一个相对值，原始的单位是 Hz，但是不同磁场强度的仪器测得的同一化学环境氢核的化学位移值不相同。为解决这个问题，采用位移常数 δ（单位：ppm）来表示化学位移。$\delta=(\nu_s-\nu_r)/\nu_o$，其中 ν_s 为样品中氢核的共振频率，ν_r 为参照物中氢核的共振频率，ν_o 为仪器的输出频率（单位：MHz）。这样可消除因为测试仪器不同引起的不便，也方便后来者参考前人的工作。常用的化学位移参照物是四甲基硅烷（TMS），其优点是化学惰性；单峰；信号处在高场，与绝大部分样品信号之间不会互相重叠干扰；沸点很低（27 ℃），容易去除。在以重水为溶剂时，可用 3-三甲基硅基丙酸钠-d_4（TSP）或 2,2-二甲基-2-硅戊基-5-磺酸钠（DSS）作为参照物，也可用氘代溶剂中残留的氢核信号作为化学位移参考值（表 11.1）。选择恰当的氘代试剂，可避免溶剂峰和水峰对样品信号的干扰，如不太适合用氘代二甲基亚砜为溶剂测定糖苷类化合物的氢谱。在分离纯化化合物时，获得的化合物极性和显色特征可为选择氘代试剂提供参考。所用氘代试剂不同，化合物中同一基团的化学位移会有差别，在与文献氢谱数据进行比较时需加以注意。

表 11.1　常用氘代溶剂中残留氢核信号的化学位移和峰形（δ，ppm）

氘代试剂	溶剂峰	峰数	氘代试剂	溶剂峰	峰数
氯仿	7.24	单峰	吡啶	7.22,7.58,8.74	单峰
丙酮	2.09	五重峰	二甲基亚砜	2.50	五重峰
甲醇	3.31	五重峰	苯	7.15	单峰

电子效应、磁各向异性、空间效应、氢键等因素决定了氢核的化学位移。邻近的原子对氢核外的电子吸电能力越强，此氢核的化学位移值就会越大，例如氧原子的电负性比氮原子的要强，吸电能力比氮强，所以氮甲基信号化学位移相比氧甲基位于高场。磁各向异性影响化学位移也十分明显，处于去屏蔽区的氢核化学位移位于低场，如苯环和烯键上的氢核较炔氢位于更低场。氢键的影响往往使氢核信号往低场移动，如黄酮 3 位和 5 位有羟基取代时，由于羟基氢核可与 4 位羰基可形成氢键，所以化学位移值分别为 10 ppm 和 12 ppm 左右。

此外，改变核磁共振样品的测试温度，也能使一些氢核信号的化学位移发生变化，可被用于克服化合物结构解析时关键氢核信号的重叠[2]。

对核磁共振氢谱中每组信号峰的面积进行积分，可得到各组峰面积比例，即氢核数比例。根据各组氢信号的比例是否合理可判断样品的纯度。氢谱中少量杂质信号的存在对于结构鉴定可能不会产生影响，但对于一个新的化合物，杂质的存在会影响到测定旋光、红外光谱和(或)紫外光谱的准确性。在一些生物活性跟踪分离的研究实例中，微量杂质也可能是真正的活性成分，需加以反复确证。

羟基、氨基、羧基等活泼氢信号有时不出现或积分数值偏小，在采用重水、氘代甲醇为 NMR 溶剂时尤为如此。利用重水交换方法，即向核磁管中加入一滴重水后摇匀再测 NMR 谱，可帮助确定那些消失的信号为活泼氢信号。活泼氢信号对于进一步应用二维核磁共振谱确定化合物的相对构型和取代基位置具有重要作用。对于已采用重水、氘代甲醇等溶剂使活泼氢被交换为氘的样品，可采用反复加水、干燥的方法是使氘再变为氢。由于与溶剂形成氢键的原因，采用氘代丙酮或氘代二甲基亚砜有助于观察到上述活泼氢信号。化合物 tricholomalide A 和 tricholomalide B 的结构中羟基取向曾被误定，后经全合成方法得到修正(图 11.1)[3,4]。

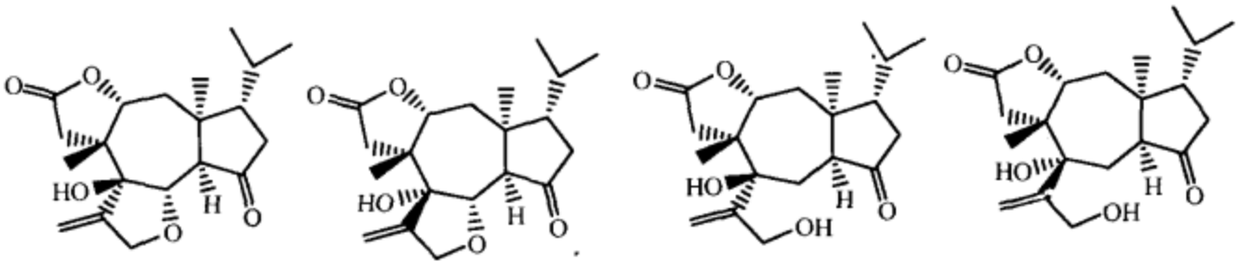


图 11.1 化合物 tricholomalide A 和 tricholomalide B 修正前后的化学结构

另外值得注意的是，一些苯环上位于酚羟基邻位的氢核在氘代甲醇、氘代三氟乙酸等试剂中放置会发生 C—H→C—D 交换，使氢信号的相对积分面积变小或完全消失。图 11.2 显示以氘代甲醇为溶剂测定化合物根皮苷(phloridzin)的核磁共振氢谱，样品经过 9 天的放置再测定时，H-3′和 H-5′信号几乎消失。在鉴定新化合物结构时，这一变化会影响到后续其他图谱的测定和信号的观测，意识到这一点也有助于避免结构解析中的困惑[5]。

核磁共振氢谱提供的另一重要信息是耦合常数(J 值，单位：Hz)。根据耦合常数的数值可判断不同氢核之间的位置和取向，如根据异头氢的耦合常数确定糖的相对构型，根据烯氢之间的耦合常数确定碳碳双键的顺、反式，记住一些结构片段中氢核的耦合常数特征有助于结构解析。

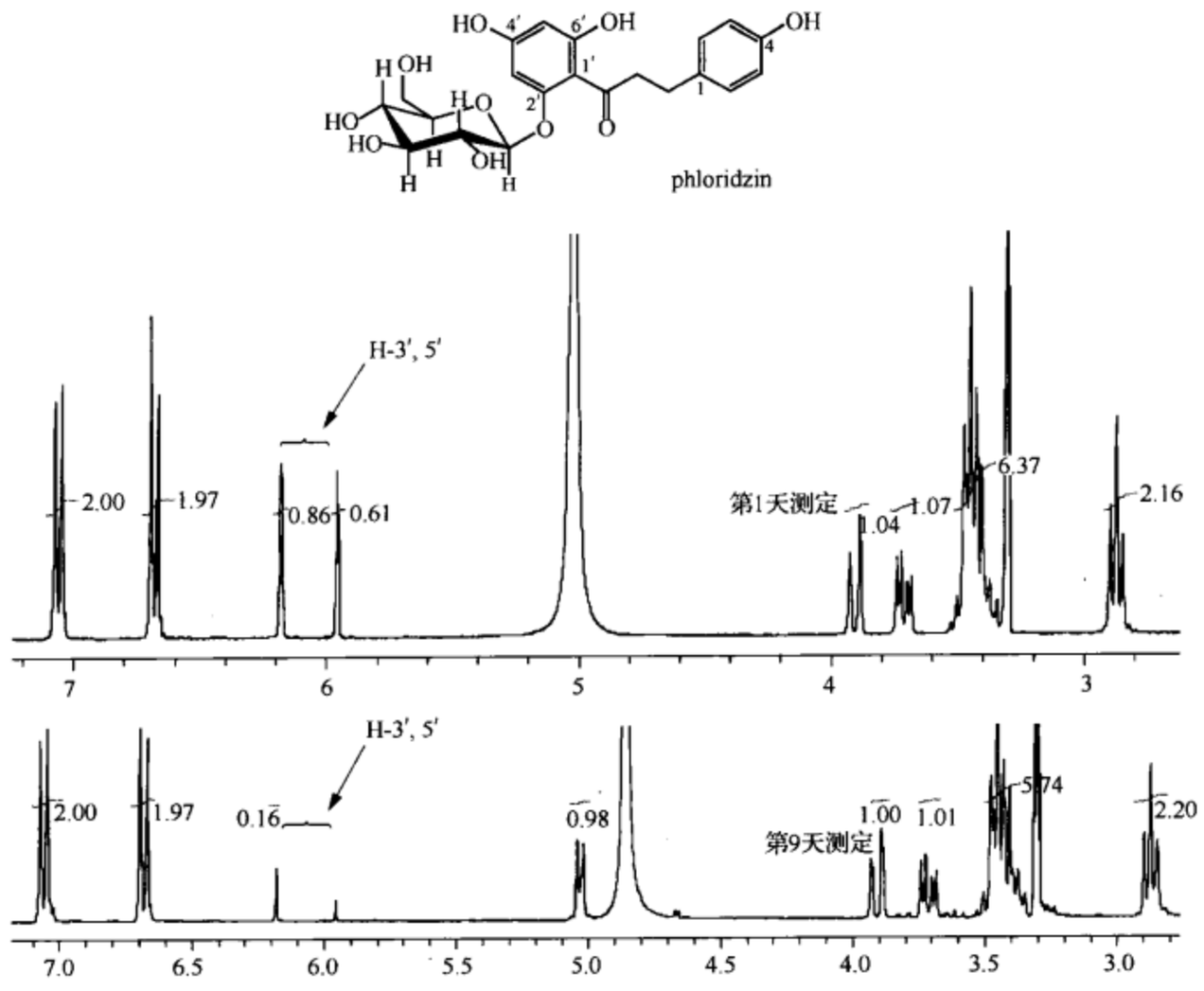


图 11.2　化合物根皮苷在氘代甲醇中核磁共振氢谱信号随时间的变化

只凭借一张氢谱很难完全确定结构，但熟悉各类天然产物的基本结构特点（如三萜、二萜、倍半萜和单萜类化合物在高场区具有的甲基数目有所差别），掌握各类氢核信号的分布区域、积分数值和裂分特征（如分布于 6～8 ppm 的信号属于芳香氢核，3～4 ppm 区域的信号属于连氧氢核，分布于 1～2 ppm 的信号属于脂肪族氢核，甲氧基信号呈单峰信号位于 3～4 ppm，等等），并根据化合物的极性大小和显色特征，参考前人从同科、同属生物中已鉴定的化合物结构，可判断大部分化合物的结构类型。图 11.3 是几个化合物的核磁共振氢谱，分属于黄酮、木脂体、二萜和三萜类化合物，供初学者参考。

对于结构复杂或结构未知的样品，需要结合其他分析手段方能最终确定结构。

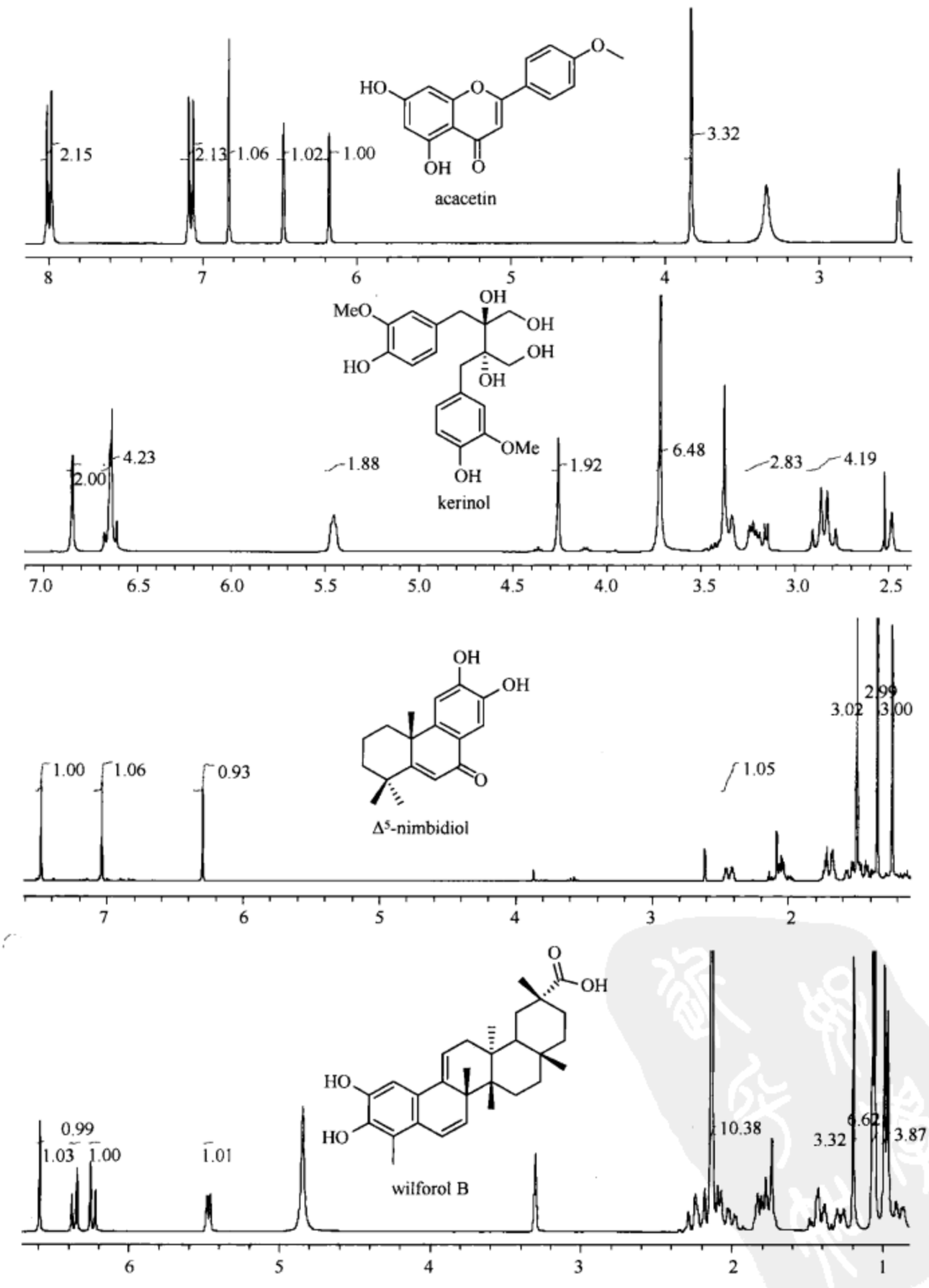


图 11.3 几个天然产物的核磁共振氢谱示例

11.1.2　核磁共振碳谱(^{13}C NMR)

与氢谱相比，核磁共振碳谱的优点在于信号化学位移分布范围宽，重叠少，可观测到那些不与氢核相连的季碳信号。碳谱能更好地反映出分子结构上的微小差异，通过与文献碳谱数据比较，可帮助确定已知化合物的结构及确定同类化合物之间的结构差异之处。

通常得到的核磁共振碳谱包括宽带全去耦谱(BB 谱)和偏共振去耦谱(DEPT 谱)。宽带全去耦谱显示所有的碳信号；偏共振去耦谱包括有几种，DEPT-45 谱显示的是所有连氢的碳信号，DEPT-90 谱显示的是所有 CH 信号，而在 DEPT-135 谱中，甲基、次甲级信号朝上方，亚甲基信号朝下方。在 BB 谱和 DEPT 谱中，碳信号的高度不与碳的个数成比例。但在一张碳谱中，往往同类碳的信号高度类似，根据碳信号的高度和宽窄也可初步判断是否存在信号重叠。当甲基与亚甲基信号重叠时，在 DEPT-135 谱中会导致信号的正负相抵而消失，可能被误认为季碳，可采用 DEPT-45 谱或其他二维核磁共振方法确证。

根据碳和氢的数目，并结合考虑杂原子的种类、数目以及质谱数据可初步推断化合物的分子式。对于新化合物的分子式确定还需高分辨质谱的数据。

在核磁共振碳谱中，样品的化学位移可以 TMS 为标准(0 ppm)，也可用溶剂碳信号定标，氘代试剂的碳化学位移见表 11.2。

表 11.2　氘代试剂的碳化学位移

氘代试剂	溶剂峰	峰数	氘代试剂	溶剂峰	峰数
氯仿	77.23	三重峰	吡啶	123.9,135.9,150.2	三重峰
丙酮	29.9,206.7	七重峰、单峰	二甲基亚砜	39.5	七重峰
甲醇	49.2	七重峰	苯	128.4	三重峰

记住不同类型碳的常见化学位移对于解析结构十分重要。

脂肪 C：δ <50 ppm；连杂原子 C：C—O，C—N δ 40～100 ppm；C—OCH_3：δ 50～60 ppm；糖上连氧 C：δ 60～90 ppm；糖端基 C：δ 90～110 ppm；炔 C：δ 60～90 ppm；芳香碳、烯碳：δ 120～140 ppm；连氧芳碳、烯碳：δ 140～170 ppm(其邻位芳碳、烯碳：δ 90～120 ppm)；C═O：δ 160～220 ppm(酮：δ 195～220 ppm；醛：δ 185～205 ppm；醌：δ 180～190 ppm；羧酸：δ 160～180 ppm；酯及内酯：δ 165～180 ppm；酰胺及内酰胺：δ 160～170 ppm)。一些常见的天然产物的碳谱数据可参见龚运怀、丁立生主编的《天然产物核磁共振碳谱分析》一书[6]。图 11.4 为几个天然产物的 BB 谱和 DEPT 谱。

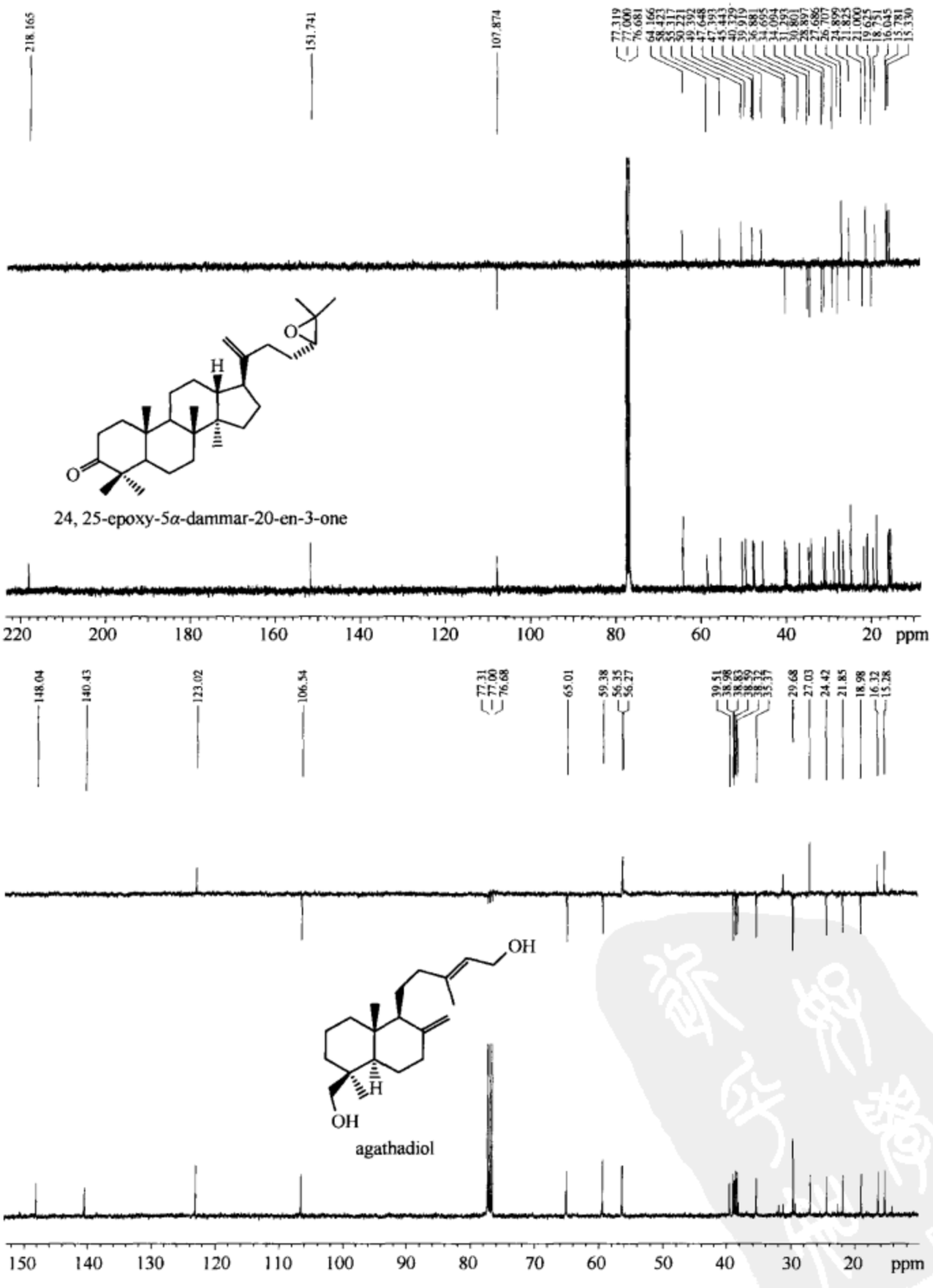


图 11.4　几个天然产物的 BB 谱和 DEPT 谱示例

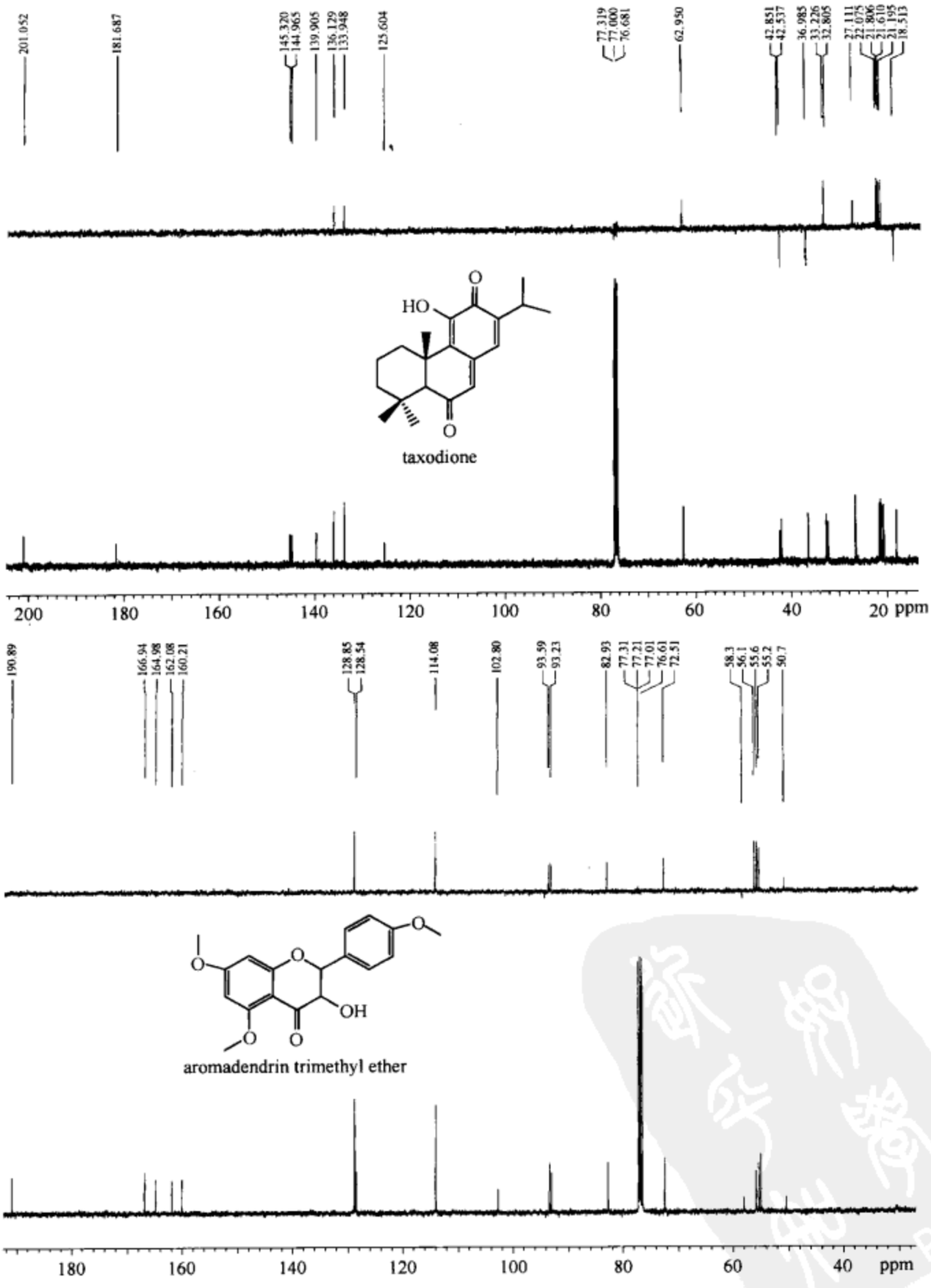

201.052
181.687
145.320
144.965
139.905
136.129
133.948
125.604
77.319
77.000
76.681
62.950
42.851
42.537
36.985
33.226
32.805
27.111
22.075
21.806
21.610
21.195
18.513
HO
O
O
taxodione
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20 ppm
190.89
166.94
164.98
162.08
160.21
128.85
128.54
114.08
102.80
93.59
93.23
82.93
77.31
77.21
77.01
76.61
72.51
58.3
56.1
55.6
55.2
50.7
O
O
O
OH
O
O
aromadendrin trimethyl ether
180
160
140
120
100
80
60
40
ppm

图 11.4　（续图）

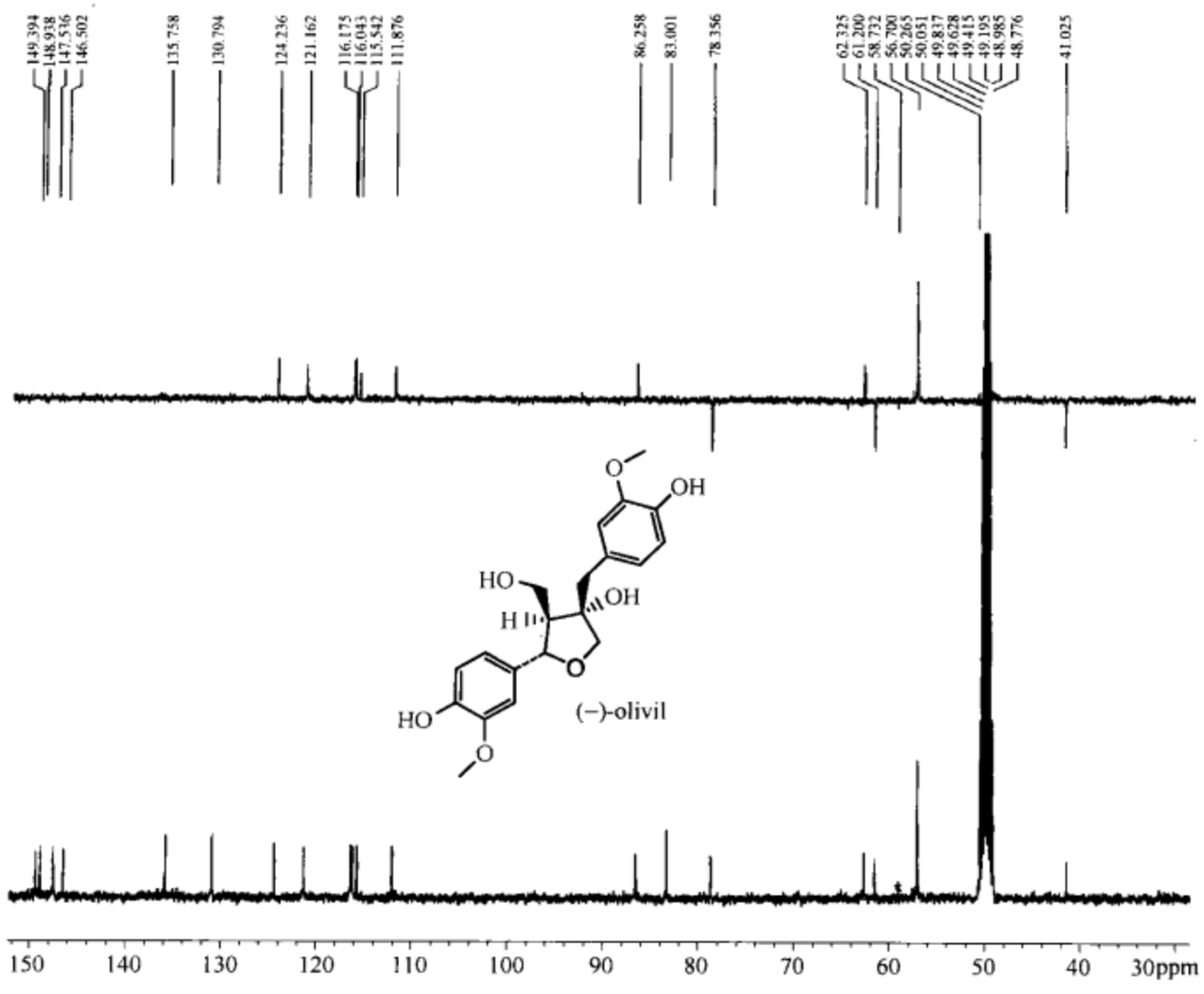


图 11.4 （续图）

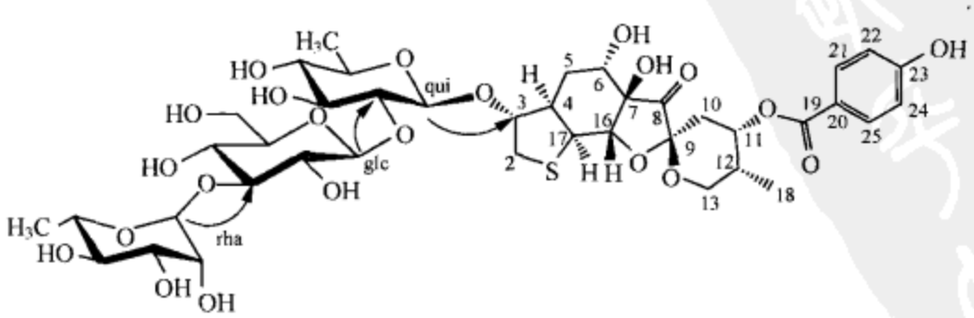
11.1.3 二维核磁共振谱

二维核磁共振谱的特点是将化学位移、耦合常数等核磁共振参数展开在二维平面上，这样在一维谱中重叠在一个频率坐标轴上的信号分别在两个独立的频率坐标轴上展开，这样不仅减少了谱线的拥挤和重叠，而且提供了自旋核之间相互作用的信息。这些对推断一维核磁共振谱图中难以解析的复杂化合物结构具有重要作用。

在获得氢谱、碳谱和相对分子质量信息后，如在数据库中没有搜索到合适的结构，可初步推定该化合物为新化合物，这时可利用 HMQC(HSQC)、^{1}H-^{1}H COSY、TOCSY、HMBC 和 NOESY(ROESY)等二维核磁共振谱来进一步确定结构。

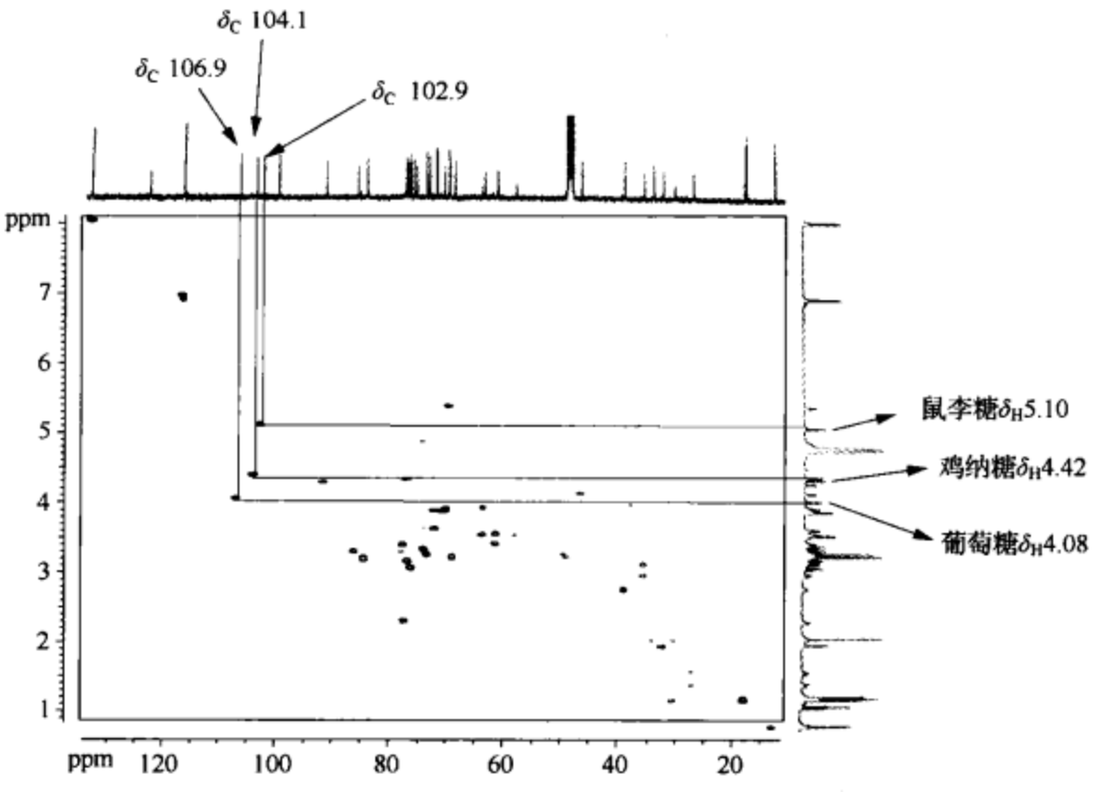
HMQC(HSQC)谱显示的是化合物分子中^{1}H-^{13}C 直接相关信号；^{1}H-^{1}H COSY 显示的是同一个耦合体系中间隔 2 个键(偕耦)和 3 个键(邻耦)氢核之间的相关关系，可据此确定氢核之间的连接顺序；TOCSY 谱为^{1}H-^{1}H 全相关谱，从一个氢核信号引线，可观测到同一耦合体系内间隔多键的氢核信号，进一步结合^{1}H-^{1}H COSY 谱和 HMQC 谱可确定结构片段；HMBC 谱一般显示的间隔 2～4 个键的^{1}H-^{13}C 远程相关信号，信号的强弱与设置的参数有关，利用 HMBC 谱可将结构片段连接成完整的平面分子结构；NOESY(ROESY)谱是空间效应谱，主要反映了有机化合物结构中核与核之间空间距离的关系，而与两者间相距多少个化学键无关，对确定化合物的构象、相对构型具有重要作用。对于分子质量在 1000 Da 左右的中等大小分子，有些应出现的 NOE 信号在 NOESY 谱中不显示，需采用 ROESY 实验[7]。从植物黑面神中分得的含硫倍半萜糖苷 breynin C 的结构、HSQC 谱、^{1}H-^{1}H COSY 谱、TOCSY 谱和 HMBC 谱分别如图 11.5(a)～11.5(e)所示[8]。在二维谱的解析过程中，先用 HSQC 谱将直接相连的碳和氢归属，图 11.5(b)中所标出的是三个糖上的异头氢和异头碳的相关点[葡萄糖 δ_H 4.08 (1H, d, J = 7.4 Hz), δ_C 106.9；鸡纳糖 δ_H 4.42 (1H, d, J = 7.7 Hz), δ_C 104.1；鼠李糖 δ_H 5.10 (1H, d, J = 1.5 Hz), δ_C 102.9]；然后通过^{1}H-^{1}H COSY 谱分析得出结构片段，图 11.5(c)标出的是 C(3)H-C(4)H-C(5)H_2 和 C (13)H_2-C(12)H-C(18)H_3 两个片段连线。从 TOCSY 谱可得出每个自旋体系内各质子化学位移，并可与从^{1}H-^{1}H COSY 谱推得的结论进行补充验证，图 11.5(d)中标出的是自旋体系 C(17)H-C(4)H-C(5)H_2-C(6)H；然后用 HMBC 将这些碎片连接起来，图 11.5(e)中标注的是异头氢和与该糖连接碳的相关信号($H_{葡萄糖}$-1/$C_{鸡纳糖}$-2；$H_{鸡纳糖}$-1/C-3；$H_{鼠李糖}$-1/$C_{葡萄糖}$-3)。

此外，采用三维核磁共振谱(如 HSQC-TOCSY、HSQC-NOESY 等)和 1D TOCSY 谱有助于分析肽类、寡糖链等信号重叠严重化合物的结构。详细介绍可见相关参考书籍[9]。

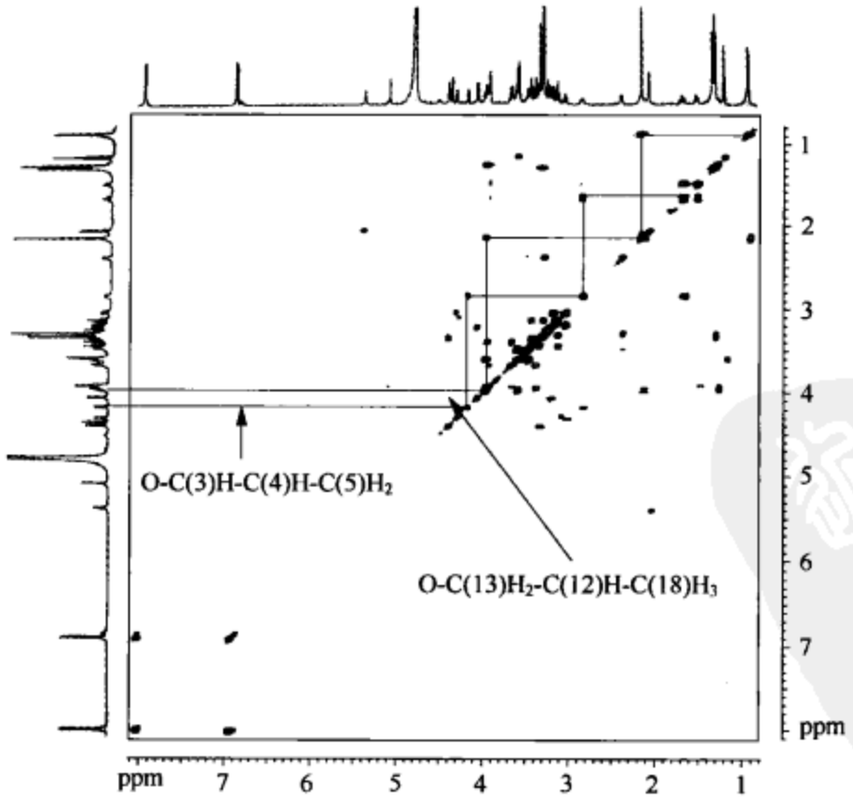


(a) breynin C 的结构(弯箭头表示HMBC谱中几个主要$^{1}H \rightarrow ^{13}C$相关信号)

图 11.5　breynin C 的结构及其 4 种谱图

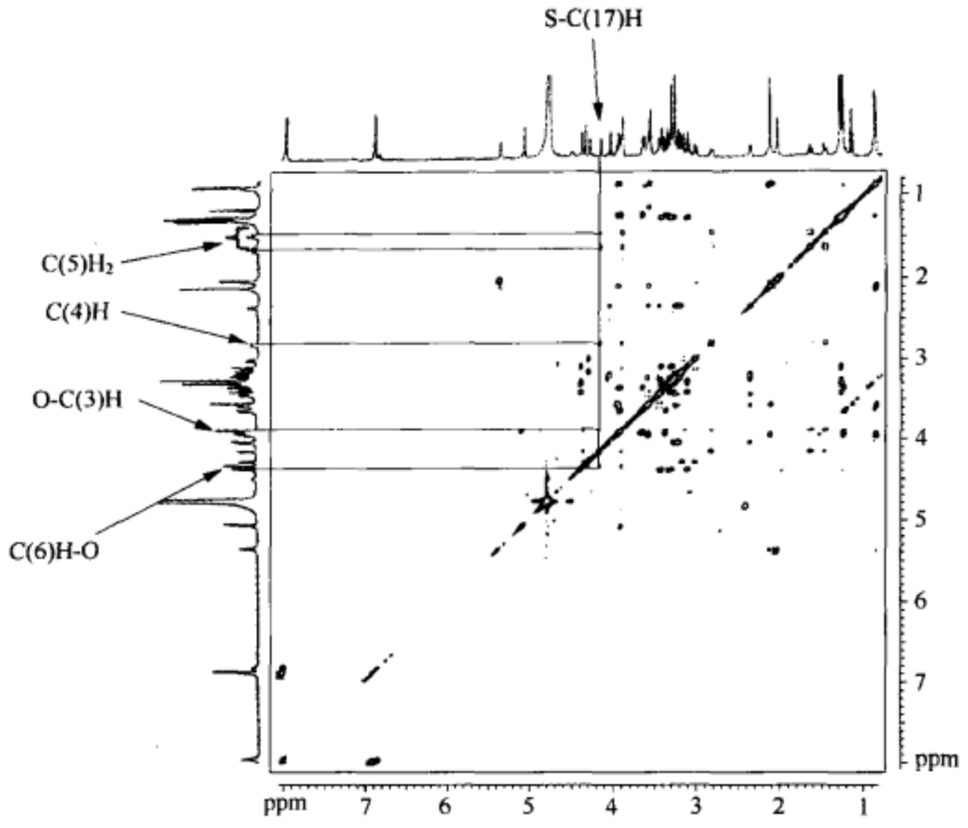


(b) breynin C 的HSQC谱

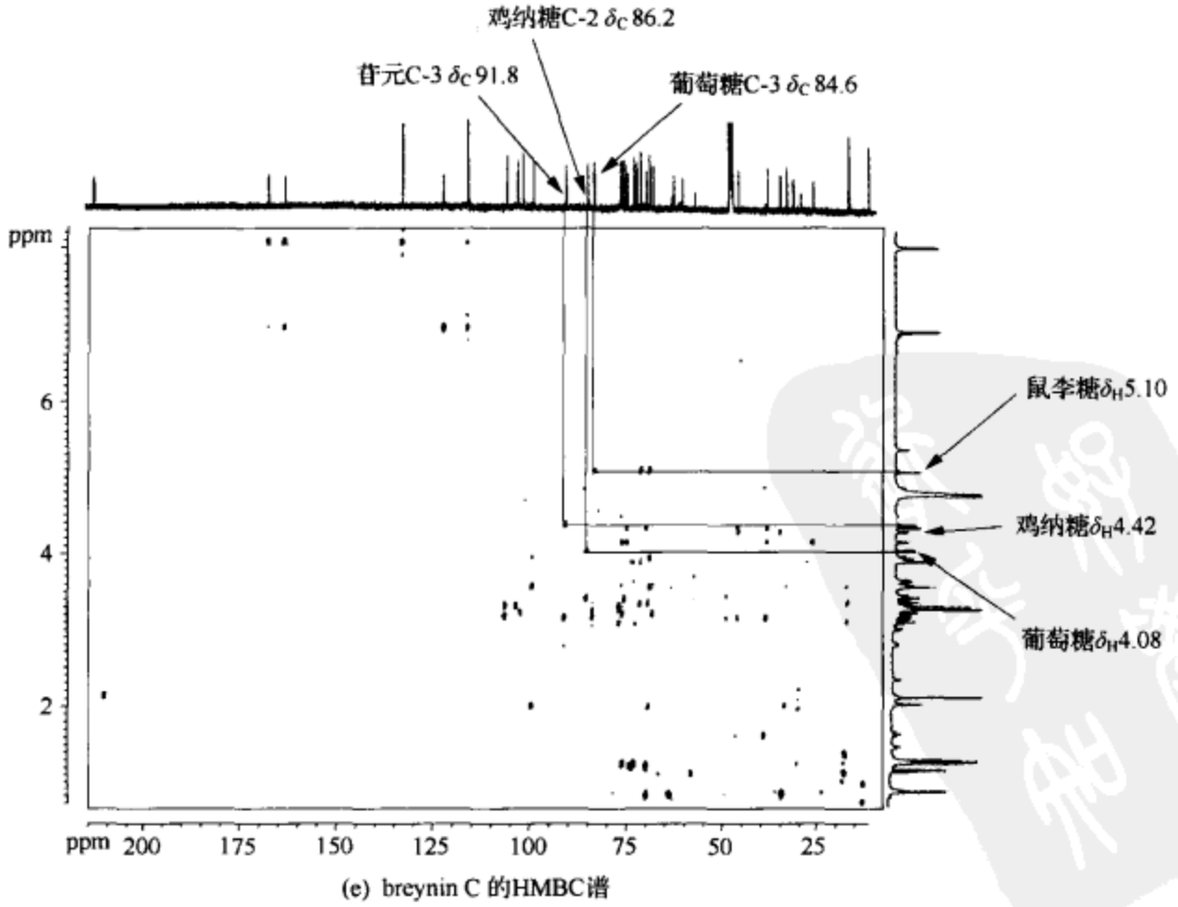


(c) breynin C的^{1}H-^{1}H COSY谱

图 11.5 （续图）



(d) breynin C 的TOCSY谱



(e) breynin C 的HMBC谱

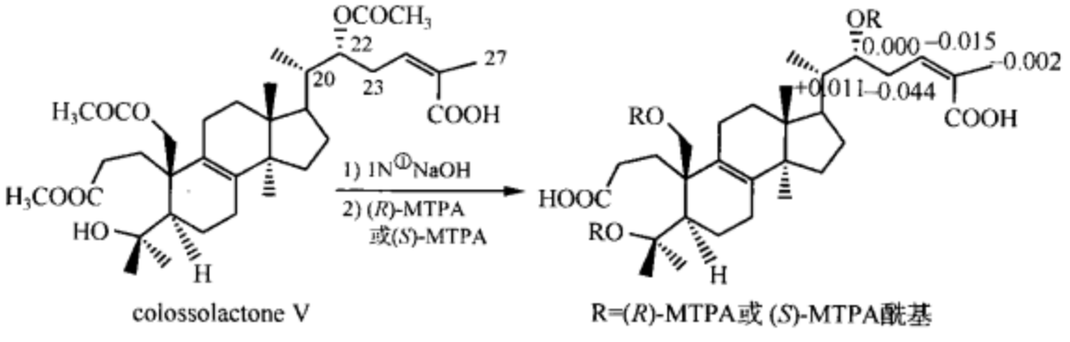
图 11.5　（续图）

11.1.4 利用 Mosher 法测定化合物的绝对构型

将手性试剂(*R*)-和(*S*)-MTPA(α-甲氧基-α-三氟甲基苯乙酸)或其酰氯与化合物中的仲醇基团反应成酯后,由于手性试剂中芳香环的磁各向异性,导致反应产物中取代基受到的屏蔽作用不同,通过比较(*R*)-MTPA 酯与(*S*)-MTPA 酯的氢谱化学位移($\Delta\delta_H=\delta_S-\delta_R$),可判定化合物的绝对构型[10]。与经典方法相比,NMR 法具有适用范围广,样品用量少,衍生物制备简单,测定快速,准确等特点。

具体方法如下:分别得到(*R*)-和(*S*)-MTPA 与化合物中的仲羟基成酯产物后,测定核磁共振氢谱,尽可能多地归属这两个非对映异构体的氢核信号,并算出这些氢核的 $\Delta\delta=\delta_S-\delta_R$ 值;建立化合物的分子模型,确定所有的正的 $\Delta\delta$ 值都放在 MTPA 平面的右侧,所有的负的 $\Delta\delta$ 值都在 MTPA 平面的左侧;$\Delta\delta$ 值的绝对值通常与该氢核到 MTPA 平面的距离成反比;$\Delta\delta$ 值与样品的浓度无关。

Dine 等在测定三萜化合物 colossolactone V 边链 C-22 位的绝对构型时,先将该化合物碱解脱去乙酰基,再将露出的羟基与(*R*)-MTPA 和(*S*)-MTPA 反应成酯,根据 C-22 位附近碳上的氢化学位移的差别,将 C-22 位的绝对构型定为 *R*(图 11.6,表 11.3)[11]。



colossolactone V　　R=(*R*)-MTPA或(*S*)-MTPA酰基

图 11.6　colossolactone V 的碱解及成 Mosher 酯反应

表 11.3　Colossolactone V 的(*R*)-Mosher 酯和(*S*)-Mosher 酯衍生物部分氢谱数据(in $CDCl_3$)

碳原子位置	δ_H		
	(*S*)-Mosher 酯	(*R*)-Mosher 酯	$\Delta\delta_{SR}$
20	1.495	1.484	+0.011
23	2.529	2.573	−0.044
24	6.613	6.628	−0.015
27	1.917	1.919	−0.002

以往需将两个反应得到的非对映异构体分离纯化再分别测氢谱,也有报道在核磁管中加入手性试剂进行反应后直接测定氢谱,或者将反应产物进行 HPLC-UV-MS 和 HPLC-NMR 在线检测来快速测定化合物的绝对构型[12]。采用核磁共

振方法测定化合物绝对构型的详细介绍可参见 Seco 等的综述文章[13]。

11.1.5　核磁共振样品的准备

通常获得的天然产物量都比较少，核磁共振谱可以提供丰富的化合物结构信息，又不会破坏及损耗样品，一般先于红外、紫外等谱图测定。

准备进行核磁共振测试的样品应充分干燥，除去其中残留的水分和有机溶剂。通常选用的 NMR 溶剂包括氘代氯仿、氘代丙酮、氘代甲醇、氘代吡啶、氘代二甲基亚砜、氘代苯、氘代三氟乙酸和重水等。理想的 NMR 溶剂是对样品有好的溶解度，溶剂峰和水峰又不会对样品信号产生干扰。为了减少碳谱的测定时间，样品溶液应尽量浓一些，但不宜过于黏稠。样品溶液保持较好的流动性可以减少分子间的相互作用，避免谱线过宽。所谓的样品浓度指的是摩尔浓度，浓度太稀，需要延长测试时间来获得较好的信噪比，其代价是测试时间和费用的增加。样品的浓度与加在核磁管中氘代试剂的高度有关，对于 5 mm 核磁管来说，样品溶液的高度在 3～3.5 cm(即 0.5 mL)就可以得到满意的图谱。

11.2　质　　谱

任何一个化合物都具有确定的相对分子质量，利用高分辨质谱可以确定化合物的分子式。通过质谱测试得到的化合物相对分子质量是一个简单但却十分明确的结构信息。在获得了一个化合物的相对分子质量后，查阅数据库中同科、同属生物中具有相同相对分子质量的化合物结构，可缩小检索范围至几个或几十个。进一步通过比较在相同溶剂中测得的核磁共振氢谱或碳谱数据，可很快鉴定出已知化合物的结构，并判断出哪些化合物可能是新化合物，值得进行更多的波谱测试及化学、生物学研究。

质谱分析是一种测量离子质荷比(质量-电荷比)的分析方法，其基本原理是使样品在离子源中发生电离，生成不同质荷比的离子，经加速电场的作用，形成离子束，进入质量分析器。在质量分析器中，再利用电场和磁场使发生相反的速度色散，将它们分别聚焦而得到质谱图，从而确定其质量。高分辨质谱可以帮助确定化合物的分子式，对复杂结构化合物的鉴定具有重要作用。

应根据样品的热稳定性和电离难易程度来选择合适的离子源，以获得分子离子峰或准分子离子峰。电子轰击质谱(EI-MS)和电喷雾电离质谱(ESI-MS)分析是目前常用的测定相对分子质量的方法。前者适合于中低极性、小分子化合物的相对分子质量测定，可与气相色谱联用，得到的是分子离子峰$[M]^+$；后者更适合于中高极性化合物的测定，可测定相对分子质量大的样品，得到的是准分子离子峰，被广泛用于液相色谱的在线检测。电喷雾电离质谱在负离子模式检测时，检测

到的是$[M-H]^-$、$[M+HCOO]^-$或$[2M-H]^-$等准分子离子；在正离子模式检测时，检测到的是$[M+H]^+$、$[M+Na]^+$或$[2M+Na]^+$等准分子离子。

采用直接进样方式测定样品的质谱时，可能在质谱中观测到样品中微量杂质出现的分子离子峰或准分子离子峰，给质谱分析带来困扰。利用 GC-MS 或 HPLC-MS 分析，可排除或减小微量杂质对样品质谱的干扰。一些天然产物的结构对溶剂和酸敏感，当反相液相色谱洗脱溶剂含有少量酸时，一些样品可能在检测过程中发生结构变化，给出非原来样品的质谱图。知母皂苷 B-Ⅰ（timosaponin B-Ⅰ）和知母皂苷 B-Ⅱ（timosaponin B-Ⅱ）在使用水＋0.05%甲酸和乙腈＋0.05%甲酸梯度溶剂系统进行 HPLC-ESI-MS 分析时，观测到知母皂苷 B-Ⅰ给出和知母皂苷 B-Ⅱ相同的保留时间和相同的准分子离子峰 921 $[M+Na]^+$，而未观测到知母皂苷 B-Ⅰ本身的准分子离子峰 935 $[M+Na]^+$。同样情况也发生在知母皂苷-Ⅰ（anemarrhenasaponin-Ⅰ）和知母皂苷-Ⅰa(anemarrhenasaponin-Ⅰa)的 HPLC-ESI-MS 检测过程中。知母皂苷 B-Ⅱ和知母皂苷 B-Ⅰ在不同条件下的互变反应见图 11.7[14]。通过采用直接进样方式进行 ESI-MS 分析，则可测到知母皂苷 B-Ⅰ和知母皂苷-Ⅰ的真实准分子离子峰。由此可推测，利用液质联用技术进行天然产物粗提取物分析时，偶尔也难免会得到不符合实际的结果。

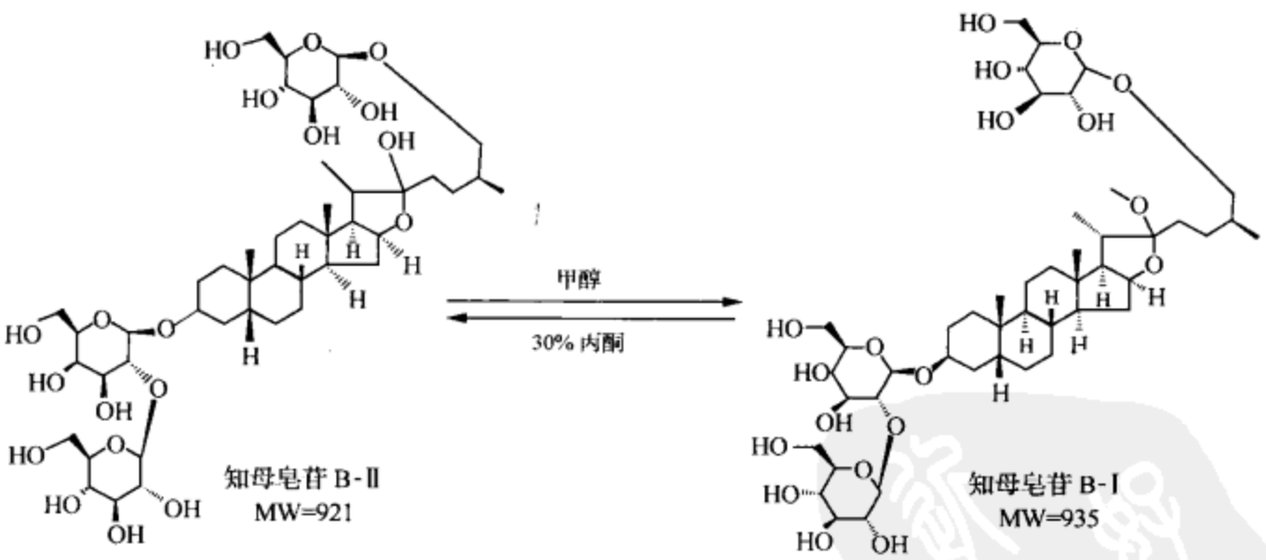


图 11.7 知母皂苷 B-Ⅱ和知母皂苷 B-Ⅰ在不同条件下的互变反应

基质辅助激光解析飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）主要是由基质辅助激光解析电离离子源（MALDI）和飞行时间质量分析器（TOF）两部分组成。其原理是样品分子分散在基质分子中形成共结晶，激光照射时，基质从激光中吸收能量，传递给样品分子，使其瞬间气化，并将质子转移到样品分子中使其离子化，然后进入飞行时间质量飞行器，根据它们各自的质荷比（m/z）进行检测。基质辅助激光解析飞行时间质谱是一种“软”电离质谱，在生物大分子和一些合成高聚物的测定中

应用比较广泛。MALDI-TOF-MS 具有灵敏度高、准确度高及分辨率高等特点，为生命科学等领域提供了一种强有力的分析测试手段，并正发挥着越来越重要的作用。

除利用质谱确定化合物相对分子质量外，质谱碎片也可提供丰富的化合物结构信息，将其用于化合物的结构确证也至关重要，可阅读相关参考书籍[15,16]。

11.3　紫外-可见光谱和红外光谱

紫外光谱是分子中某些价电子吸收了一定波长的电磁波，由低能级跃迁到高能级而产生的一种光谱。波长范围在 200～400 nm 的区域为近紫外区，也称石英紫外区；波长为 400～800 nm 的区域为可见光区。目前使用的紫外-可见光光谱仪波长范围是 200～800 nm。用不同波长的光依次照一定浓度的被测样品溶液时，就会发现部分波长的光被吸收。如果以波长 λ 为横坐标（单位 nm），吸光度（absorbance）A 为纵坐标作图，即得到紫外-可见光谱。

紫外-可见光谱可给出有关共轭生色基和助色基的信息。黄酮、蒽醌等一系列具有共轭生色基的天然产物具有特征的紫外-可见光谱。在利用 HPLC-UV-MS 联用仪器分析样品时，通过样品的紫外全谱也可获得其结构信息。如果两个化合物结构并非属于一类，只要生色基相同，也会得到几乎相同的紫外-可见谱线。随着核磁共振技术的发展，紫外光谱的受重视程度有所降低，但在用其他方法鉴定一个天然产物的结构后，考虑其紫外吸收波长和强度是否符合所确定的结构仍有必要。对于含有不饱和季碳过多、无法用二维核磁共振方法确定其结构的化合物，紫外-可见光谱也有其用武之地。实际工作中一个值得注意的问题是，样品结构中实际没有共轭生色基，但其中含有微量的有强紫外吸收的杂质，这时用紫外光谱的结果分析结构会把思路引入歧途，故可通过其他谱图的综合分析加以识别。

红外光谱是基于红外线引起的分子振动能级和转动能级的跃迁，又称振转光谱。一般红外光谱仪测量吸收光的波数（频率的倒数）范围为 400～4000 cm^{-1}。典型的红外光谱横坐标为波数，纵坐标为透光率或吸光度。对于未知结构样品，红外光谱可以给出存在的官能团等结构信息。振动过程中能引起偶极矩变化的键才能产生吸收光谱。H_2、O_2、N_2 等双原子分子，H—C≡C—H、对称 R—C≡C—R 中的—C≡C—振动时都不引起偶极矩改变，观察不到红外吸收，>C=O 振动引起的偶极矩变化大，吸收强度大。一个基团几种振动方式的吸收峰会同时出现在红外图谱中，确定一种基团的存在时，要将该基团的几种振动吸收峰一并考虑才能得到可靠的结论。分析红外图谱应注意峰的吸收频率、峰的形状（钝、锐）、峰的强度[一般分为强（s）、中强（m）和弱（w）]以及测定条件（液体涂片、KBr 压片），文献中往往只报道化合物的几个最大红外吸收峰位置。

红外光谱提供的化合物结构信息往往不能与核磁共振谱相比，但对一些难以用核磁共振技术确定的结构，红外光谱仍可发挥重要作用。化合物 zamamistatin 是 D. Uemura 小组最先从海绵 *Pseudoceratina purpurea* 中分离鉴定的，后来 H. Kigoshi 小组也分离到该化合物，并修正为另外一个结构。该化合物在丙酮中不稳定，在其脱水产物的红外光谱中观测到 2258 cm^{-1} 处的 CN 吸收峰。H. Kigoshi 小组通过将样品无限稀释后重新测定 ESI 质谱，发现原来 ESI 质谱给出的是双分子的准分子离子峰。最终确定化合物 zamamistatin 实际为已知化合物 aeroplysinin-1(图 11.8)[17]。

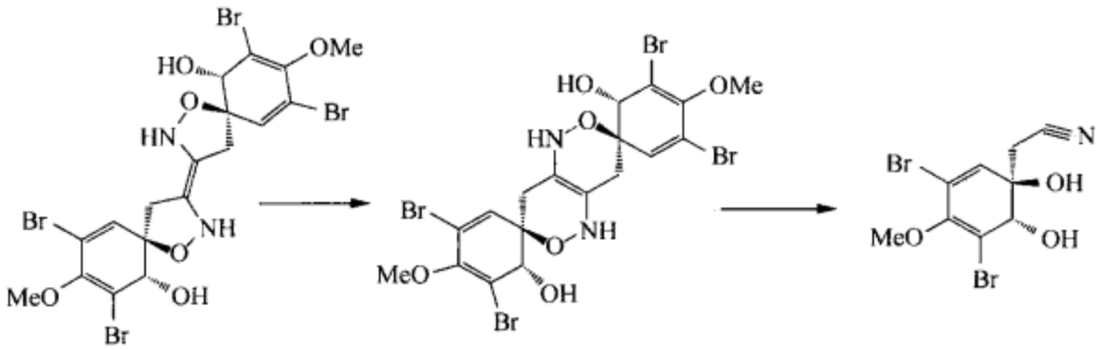


图 11.8 化合物 zamamistatin 修正前后的化学结构

由上述例子可见，针对一特定化合物的结构，每种谱学方法都有可能显示其特长和鞭长莫及之处。多记住一些基团的紫外-可见光谱和红外光谱的谱学特征，有助于天然产物的结构鉴定。有关这两种光谱原理的详细介绍和具体数据可参考相关书籍[9,18]。

11.4 单晶 X 射线衍射分析[19]

单晶体是指样品中所含分子(原子或离子)在三维空间中呈规则、周期排列的一种固体状态。X 射线为短波长电磁波。当 X 射线照射在被测样品上时，因光的干涉作用而产生衍射效应，形成以确定规律分布在空间的衍射图像，衍射点的数目，依据化合物相对分子质量大小(药物小分子、生物大分子、复合物等) 和分子的排列规律(对称性)而异。单晶 X 射线分析可以独立完成全新的分子结构测定，获得被测样品分子的准确立体结构(构型、构象)，包括全未知化合物正确分子三维结构，成键原子的键长、键角、二面角值和分子的立体结构信息，溶剂(及结晶水)含量等。近年来，随着单晶 X 射线衍射仪器的发展、结构分析计算方法的成熟和结构解析软件的高度智能化、自动化，确定单晶体化学结构所需时间也在缩短。

对于用其他谱学方法一时难以鉴定的化合物，用单晶 X 射线衍射分析具有简

便、快速、准确的特点。在初步鉴定一新骨架天然产物的结构后，用该方法加以确证也十分必要。化合物 11,11′-dideoxyverticillin A 是从药用真菌竹黄菌(*Shiraia bambusicola*)中分得的具有肿瘤细胞毒性和蛋白酪氨酸激酶抑制活性的化合物。该化合物的结构具有对称性，含有多个杂原子和多个季碳，仅凭信号简单的核磁共振谱难以获得更多的结构信息，而通过采用单晶 X 射线衍射分析则可在较短时间内鉴定其结构(图 11.9)[20~22]。

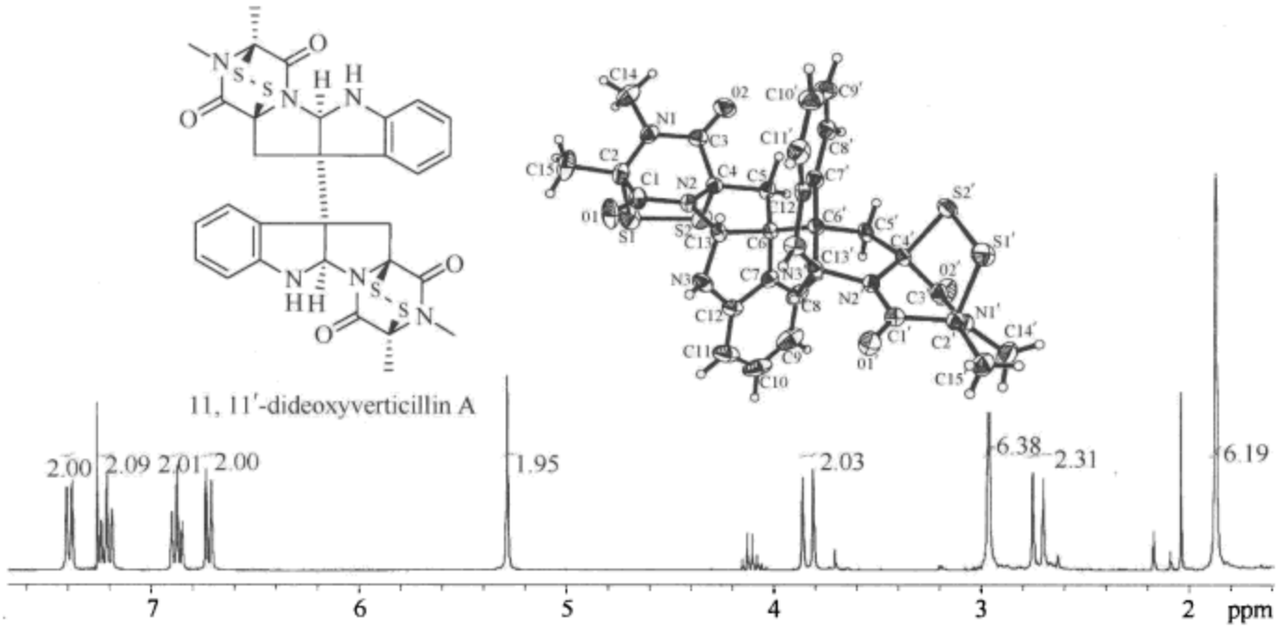


图 11.9　11,11′-dideoxyverticillin A 的化学结构、单晶 X 射线衍射分析获得的晶体结构和核磁共振氢谱

应用单晶 X 射线分析方法除可确定化合物的相对构型外，还可确定其绝对构型，常用的方法有以下几种：

(1) 应用反常散射法测定分子绝对构型。利用分子中所含原子(特别是重原子)的 X 射线反常散射(色散) 效应，可以准确地测定分子构型；

(2) 不含重原子的分子绝对构型测定。抗疟新药青蒿素的分子绝对构型测定就是利用非重原子 C、O 的反常散射效应实现的。因为 C、O、N 原子的反常散射效应弱，故在 X 射线衍射实验中需要采用 Cu K_α 辐射，以准确地测量反常散射点对的衍射数据；

(3) 利用分子中已确认的局部构型信息确定分子绝对构型。对于非新骨架的分子，根据文献或波谱数据，可以确定其局部取代基的构型，以此为参照，可确定待测化合物分子的绝对构型；

(4) 引入手性溶剂确定分子绝对构型。在进行化学药物样品的重结晶过程中，选择引入手性试剂(如 D 或 L-酒石酸等)而形成共晶的单晶体，从单晶 X 射线衍射分析所得共晶组分的立体结构图中，以手性试剂的已知构型为参照，即可获得

待测分子的绝对构型。

缩环脉叶碱 A 是一个笼状结构的 C19 降碳重排虎皮楠生物碱，其立体结构比较难确定。樊等在制备该化合物的碘化季铵盐后得到该衍生物的单晶，进一步通过单晶 X 射线衍射法确定了其绝对构型(图 11.10)[23]。

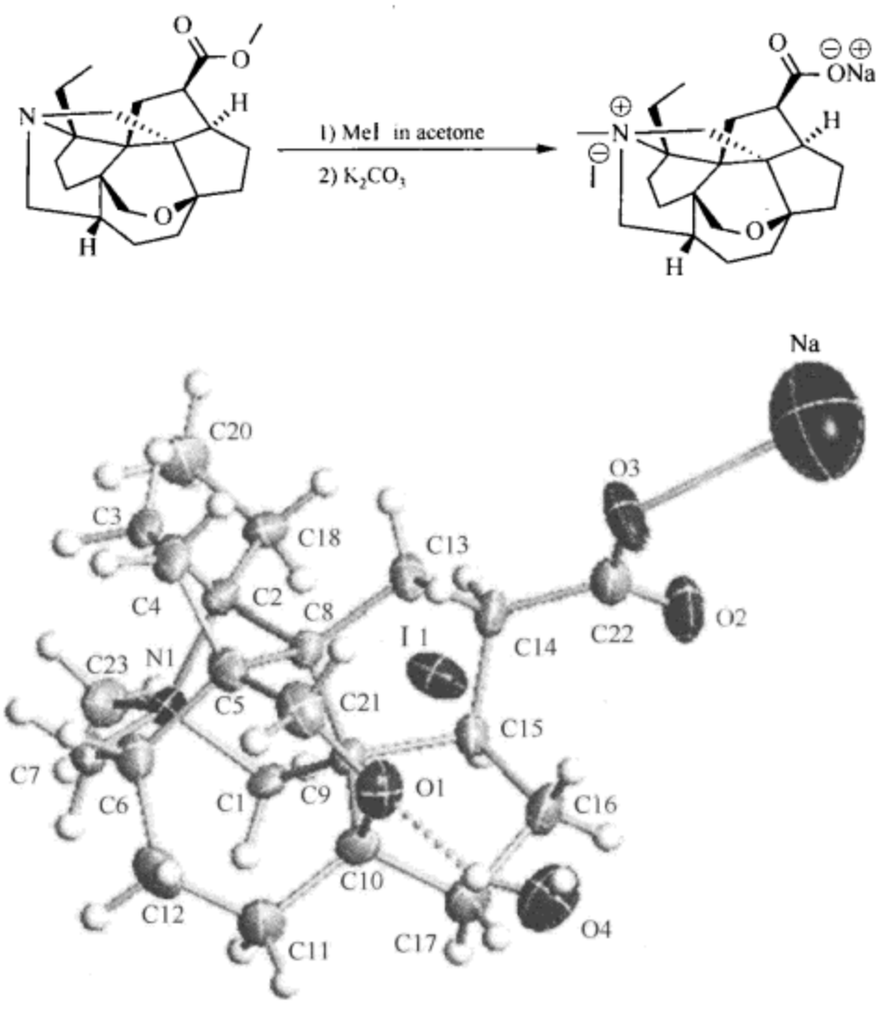


图 11.10 通过引入重原子，利用单晶 X 射线衍射分析确定缩环脉叶碱 A 的绝对构型

11.5 小 结

随着分离手段和分析仪器的不断进步，利用最简单的方法快速鉴别已知化合物，集中精力于具有生物活性、结构新颖化合物的研究成为天然产物化学工作者的关注目标。由于前人对每种天然原料所进行的化学成分研究状况不同，每个研究者可以便捷应用的分析仪器、数据库不同，因此，对每个具体天然产物的结构解析方法也会有很大不同。尽管核磁共振谱和质谱在目前天然产物结构研究中受到特别重视，鉴于天然产物结构误定仍时有发生，对紫外光谱和红外光谱数据的合理解释仍是结构鉴定正确的有力保证。阅读波谱解析方面的专业书籍，积累实际解决

问题的经验，以及通过必要的化学合成手段进行结构验证也是避免错误的有效途径[24,25]。

参 考 文 献

[1] Pretsch E 等著. 波谱数据表——有机化合物的结构解析. 荣国斌译. 上海：华东理工大学出版社，2002.

[2] Zhao W M, Wolfender J L, Hostettmann K et al. Sesquiterpene glycosides from *Dictamnus dasycarpus*. Phytochemistry, 1998, 47: 63～68.

[3] Tsukamoto S, Macabalang A D, Nakatani K et al. Tricholomalides A-C, new neurotrophic diterpenes from the mushroom *Tricholoma* sp. J Nat Prod, 2003, 66: 1578～1581.

[4] Wang Z, Min S J, Danishefsky S J. Total synthesis and structural revision of (±)-tricholomalides A and B. J Am Chem Soc, 2009, 131: 10848～10849.

[5] Chen Z H, Zhang R J, Wu J et al. New dihydrochalcone glycosides from *Lithocarpus litsei folius* and the phenomenon of C-H→C-D exchange observed in NMR spectra of phenolic components. J Asian Nat Prod Res, 2009, 11: 508～513.

[6] 龚运怀，丁立生主编. 天然产物核磁共振碳谱分析. 昆明：云南科技出版社，2006.

[7] Bothner-By A A, Stephens R L, Lee J et al. Structure determination of a tetrasaccharide: transient nuclear Overhauser effects in the rotating frame. J Am Chem Soc, 1984, 106: 811～813.

[8] Meng D H, Chen W L, Zhao W M. Sulfur-containing spiroketal glycosides from *Breynia fruticosa*. J Nat Prod, 2007, 70: 824～829.

[9] 宁永成编著. 有机化合物结构鉴定与有机波谱学. 北京：科学出版社，2000.

[10] Trost B M, Belletire J L, Godleski S et al. On the use of the *O*-methylmandelate ester for establishment of absolute configuration of secondary alcohols. J Org Chem, 1986, 51: 2370～2374.

[11] Dine R S E, Halawany A M E, Ma C M et al. Anti-HIV-1 protease activity of lanostane triterpenes from the Vietnamese mushroom *Ganoderma colossum*. J Nat Prod, 2008, 71: 1022～1026.

[12] Guilet D, Gunthern A, Ioset J R et al. Absolute configuration of a tetrahydrophenanthrene from *Heliotropium ovali folium* by LC-NMR of its Mosher esters. J Nat Prod, 2003, 66: 17～20.

[13] Seco J M, Quinoa E, Riguera R. The assignment of absolute configuration by NMR. Chem Rev 2004, 104: 17～117.

[14] 马百平，董俊兴，王秉伋等. 知母中呋甾皂甙的研究. 药学学报，1996，31: 271～277.

[15] 丛浦珠编著. 质谱学在天然有机化学中的应用. 北京：科学出版社，1987.

[16] 麦克拉弗蒂 F W 著. 质谱解析. 王光辉等译. 北京：化学工业出版社，1987.

[17] Kita M, Tsunematsu Y, Hayakawa I et al. Structure of zamamistatin-a correction. Tetrahedron Lett, 2008, 49: 5383～5384.

[18] 唐恢同编著. 有机化合物的光谱鉴定. 北京：北京大学出版社，1994.

[19] 吕扬，吴云山，郑启泰. X 射线衍射分析技术在新药及制药研究中的应用进展. 现代仪器，2004，10(3): 6～9，19.

[20] Byeng W S, Jensen P R, Kauffman C A et al. New cytotoxic epidithiodioxopiperazines related to verticillin A from a marine isolate of the fungus *Penicillium*. Nat Prod Lett, 1999, 13: 213～222.

[21] Chen Y, Miao Z H, Zhao W M et al. The p53 pathway is synergized by p38 MAPK signaling to mediate 11,11′-Dideoxyverticillin-induced G_2/M arrest. FEBS Letters, 2005, 579: 3683～3690.

[22] Zhang Y X, Chen Y, Guo X N et al. 11,11′-Dideoxyverticillin: a natural compound possessing growth

factor receptor tyrosine kinase-inhibitory effect with anti-tumor activity. Anti-cancer Drugs, 2005, 16: 515～524.

[23] Fan C Q, Yin S, Xue J J et al. Novel alkaloids, paxdaphnines A and B with unprecedented skeletons from the seeds of *Daphniphyllum paxianum*. Tetrahedron, 2007, 63: 115～119.

[24] 西尔弗斯坦 R 等著. 有机化合物的波谱解析. 药明康德新药开发有限公司分析部译. 上海:华东理工大学出版社,2007.

[25] Maier M E. Structural revisions of natural products by total synthesis. Nat Prod Rep, 2009, 26:1105～1124.

（吴　剑　赵维民）

第 12 章　结构修饰与前药制备

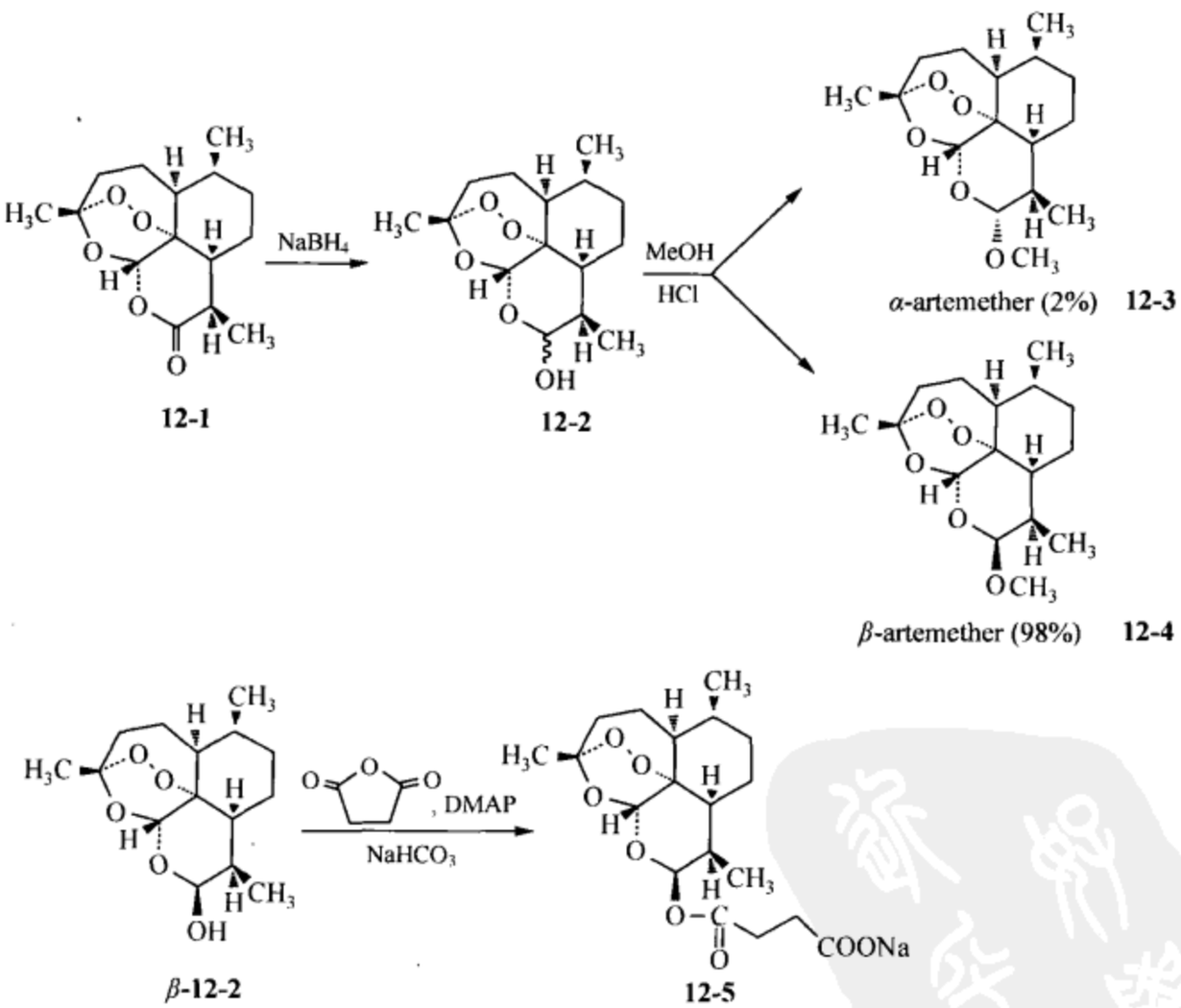
中药有效成分是中草药发挥功效的物质基础。近百年来国内外科学家从中草药中先后分离报道了几千个单一化学成分，并对其中许多进行过生物活性研究。有的活性成分已被广泛用于临床。然而，到目前为止由中药活性成分发展成为真正被国际公认的新药仅有青蒿素一个。即使这一个药也由于对自主知识产权认知不够，没有申请专利。原因是多方面的，研究不够深入，筛选模型不足，难以反映一些中药成分的临床疗效，如抗胃肠道感染的黄连素与广谱抗菌药穿心莲内酯等都不能在常规的抗菌模型中反映，是代谢产物有效，还是其他原因尚不得而知。其次，许多有效成分溶解度差，它们在中药汤剂中为粗提成分，容易溶解并为体内吸收，而在药理模型中较难测试。再就是我国制药企业重生产，轻研究，研发投入少，而科研单位又往往重视发表论文，追求发现新化学成分，不重视自主知识产权的保护，加之学科、部门之间协调不足，近来虽有改善，但长期形成的习惯与体制，也不是短期能见效的，更难与跨国制药集团对研究与开发的重视与投入相抗衡。

我国加入世界贸易组织后，制药工业面临缺少有自主知识产权新药的压力，迫切需要研制自己的新药。利用中草药活性成分研发新药是我们的特色和大家公认的捷径。除利用筛选发现的活性化合物发展新药外，在已知的中草药有效成分基础上进行结构修饰、优化结构或制成前药(prodrug)以提高溶解性能与生物利用度应是创制新药并进入国际医药市场的捷径之一。目前一些国际制药公司或在中国成立自己的研发机构，或在国内广泛收购中草药化学成分，热衷于从中草药开发新药，因此我们迫切需要利用自己丰富的中草药资源，临床资料积累与对中医药的深度理解等优势，结合现代科学技术加速新药的研究与开发。为此仅举一些成功的实例，以供参考。

12.1　青　蒿　素

青蒿，学名黄花蒿(*Artemisia annua*)，是一种传统中药，早在汉朝就已用于治疗痔疮。《本草纲目》记载青蒿用于治疗疟疾，寒热。屠呦呦等从青蒿全草中分得抗疟有效成分青蒿素(artemisinin，Qinghaosu，**12-1**)。周维善等经研究确定了其化学结构，以后又经全合成证明为具有过氧基团的新型倍半萜内酯。经生物、药理、毒理、药代及临床研究证明对氯喹敏感株疟，恶性疟及脑型疟有显著疗效，且可用于治疗对其他抗疟药有耐药性的病人，已成为国际公认的迄今为止最好的抗疟

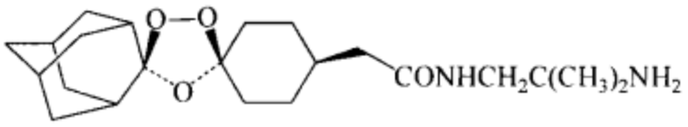
药。它的发现引起了国际对中药有效成分研究的重视，且经久不息。青蒿素不溶于水，生物体内吸收度很差，口服后绝大部分以原型排除，生物利用度低。用钠硼氢还原成二氢青蒿素(**12-2**)后抗疟作用显著提高，进一步在酸性催化条件下在甲醇中制成的蒿甲醚(artemether，**12-4**)能溶于油，可制成油针剂，进一步提高抗疟作用。而二氢青蒿素与琥珀酸酐或酰氯作用生成琥珀酸酯(**12-5**)前药，其钠盐青蒿琥酯钠(sodium artesunate)水溶性极好，可制成粉针剂，也可制成口服片剂，口服生物利用度提高到 23.3%(表 12.1)，使青蒿素的抗疟功能得到更好的发挥。近年来又发现青蒿素对白血病、结肠癌细胞有很强的抑制作用，可望成为新的副作用少的抗肿瘤药，使青蒿素用途进一步扩大。



青蒿素的特殊疗效引起了国际的重视。全球每年疟疾感染人数高达 1.2 亿，依赖从植物资源提取的青蒿素难以满足临床应用的需要，因而国际上许多科学家进行了组织培养、化学合成等多方面研究，以期能大规模生产青蒿素。最近美国加州大学 Berkley 分校的 J. D. Keasling 教授正在研究利用生物基因工程，将青蒿植物基因嵌入大肠杆菌，产生青蒿素前体 amorphadiene，再进一步合成青蒿素，从而

可以大规模生产青蒿素。他的研究也得到盖茨基金 4200 万美元的资助，希望借此加速研究的进展。

另外在化学合成方面，虽然全合成已有一些报道，但距离能实际生产仍有很大距离。内布拉斯加大学药学院的 J. V. Vennerstorm 等研究完成一系列三氧戊环(trioxolanane)带螺金刚烷与螺己烷环的衍生物，具有显著抗疟作用，其中 OZ 277 (RBX-11160)(**12-6**)疗效最好，口服生物利用度超过青蒿琥酯钠(表 12.1)，且副作用小，合成方法简单，目前正在进行临床试验，可望成为新一代抗疟药[1]。



OZ 277或RBx-11160 **(12-6)**

表 12.1　青蒿素衍生物生物利用度

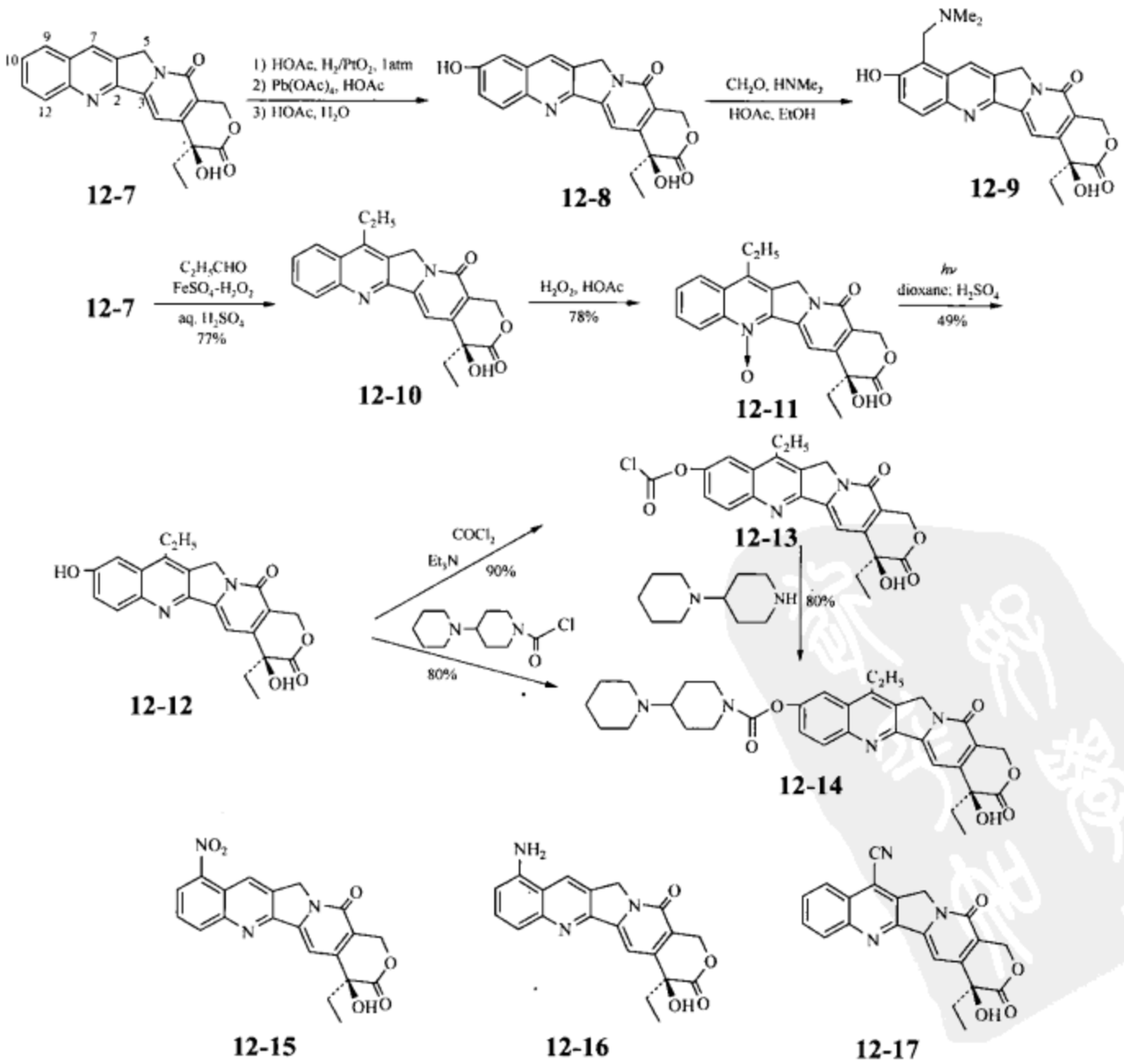
青蒿素衍生物	剂量/(mg · kg^{-1})	生物利用度/%
蒿甲醚	50	1.4
青蒿琥酯钠	10	23.3
OZ 277	17.4	35.0

12.2　喜　树　碱

喜树碱(camptothecin，**12-7**)是 Wall 等于 1966 年从中国特有植物喜树(*Camptotheca acuminata*)树干中分得的新型喹啉类生物碱内酯，经动物试验表明有明显的抗肿瘤作用。但美国缺乏植物资源难以进一步开展，我们看到报道后即利用上海药物所院内的喜树开展了研究。同时分别测定了树干，树根，树皮及果子中喜树碱的含量。发现喜树果中喜树碱与另一抗癌活性更强的 10-羟基喜树碱含量最高，分别为万分之三与十万分之三，比树皮中含量高过 3 倍，而且喜树果易于采集，有充足的药源，不损伤喜树，保护了生态环境。我们经过药理，毒理等试验后，在国际上首先将喜树碱内酯开环的钠盐针剂用于临床治疗胃癌、膀胱癌，但有了尿血等副作用。10-羟基喜树碱用于临床治疗肝癌与头颈部肿瘤(**12-8**)，疗效显著，副作用较小[2,3]。后来由于种种原因未能进一步发展。1985 年 Hsiang 等发现喜树碱的抗癌作用机理是其抑制了参与 DNA 复制与转录的拓扑异构酶Ⅰ(topoisomerase Ⅰ)，而其他大多数抗癌药物为抑制拓扑异构酶Ⅱ，因而喜树碱的研究又引起国际的重视。喜树碱不溶于水与一般有机溶剂，为此人们进行了不少类似物与前药的研究，以改善溶解度，优化结构，提高生物利用度。拓扑泰康(topote-

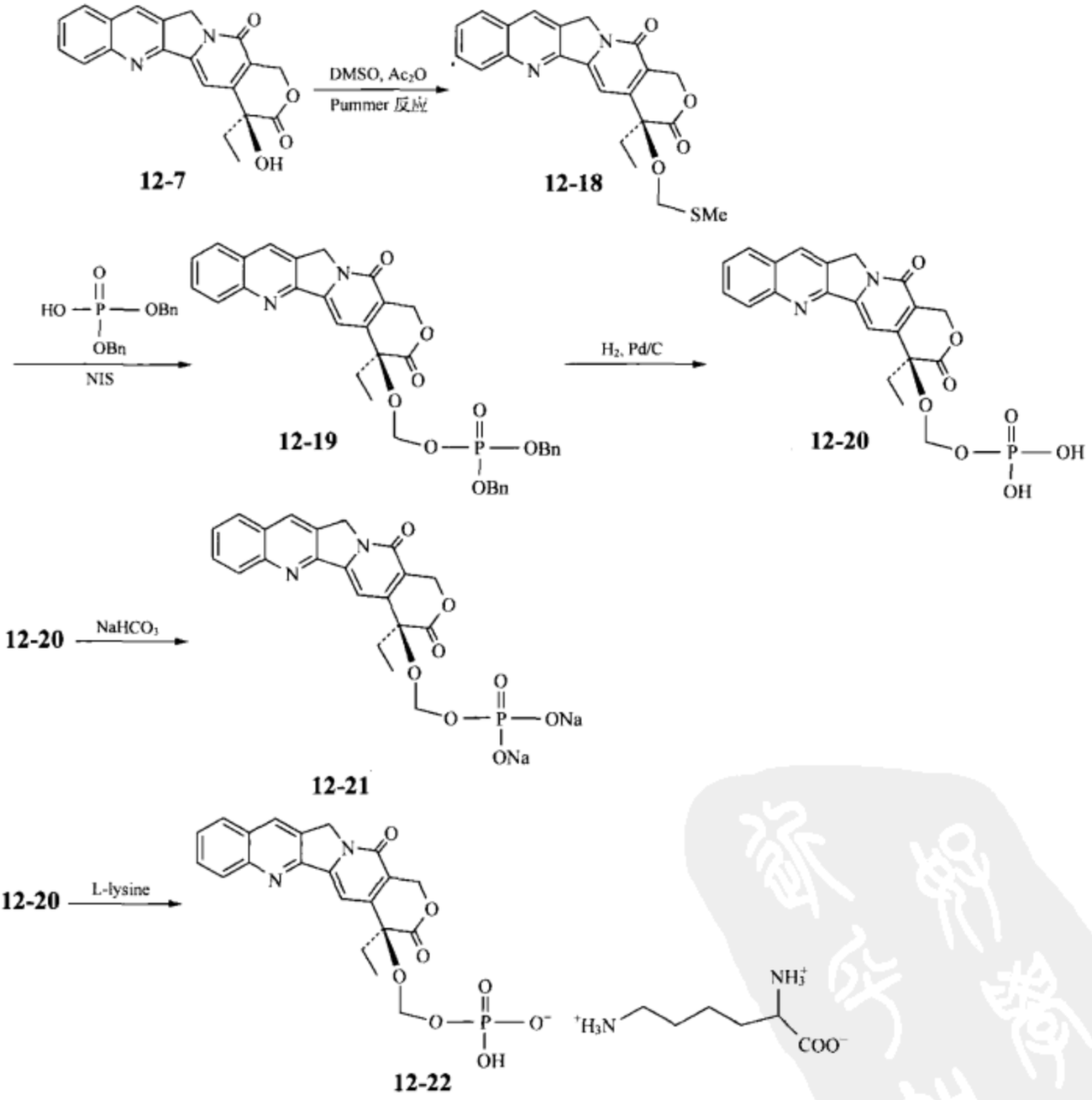
can，**12-9**）是在 10-羟基喜树碱基础上于 37% 甲醛与 40% 二甲胺水溶液中进行 Mannich 反应而制成的带二甲胺基甲基的新药。它的盐酸盐水溶性极好，而且溶液呈酸性可避免内酯环开环而降低活性。该药已于 1996 年经美国 FDA 批准由 Smithkline-Beechem 公司生产，用于治疗卵巢癌与小细胞肺癌。

喜树碱-11（CPT-11）又名依林诺泰康（irinotecan，**12-14**），是先将喜树碱混于丙醛，硫酸亚铁与浓硫酸混合液中，滴入 30% 过氧化氢制成 7-乙基喜树碱，再于 30% 过氧化氢和乙酸溶液中加热成氮氧化合物，进一步于二氧环己烷及稀硫酸中进行光照（450 W 汞灯）反应制成 7-乙基-10-羟基喜树碱（**12-12**），而后在吡啶中与 4-哌啶-哌啶酰氯或于三乙胺的二氧环己烷溶液中与光气作用生成酰氯化物，再与 4-哌啶-哌啶酰氯反应制成前药 irinotecan。该药也于 1996 年经美国 FDA 批准，由日本第一药厂与 Pharmacia-Upjohn 分别生产，用于治疗卵巢癌及已转移的直肠结肠癌。



12-7 **12-8** **12-9** **12-10** **12-11** **12-12** **12-13** **12-14** **12-15** **12-16** **12-17**

这两个药的特点是在 10-羟基喜树碱基础上加个基团，以增加水溶性，并提高生物利用度[4]。喜树碱类似物的研究，至今仍是抗癌药物的研究热点，有多种衍生物在临床试验之中，如 9-硝基喜树碱(**12-15**)、9-氨基喜树碱(**12-16**)、7-氰基喜树碱(**12-17**)等。喜树碱来源于我国特有植物喜树，资源丰富，希望不久能看到我国自制的新药上市。



最近还发展了一种氧代磷酸甲醚 POM(phosphonoxymethyl ether)前药，不仅水溶性好，而且体内转换率高，稳定性强。其制备方法是先将喜树碱与二甲亚砜

(DMSO)在乙酐中进行 Pummer 反应,制成甲基硫醚,而后与二苄基磷酸在 NIS (碘代琥珀酰胺 *N*-iodosuccinamide)中生成喜树碱二苄磷酸甲醚,再还原成磷酸衍生物(**12-20**),后者与碳酸氢钠反应生成钠盐(**12-21**),或与赖氨酸生成赖氨酸盐(**12-22**),它们目前正在临床试验中。这类氧代磷酸甲基衍生物(POM)特别适用于结合在母体带有立体障碍的叔羟基,因而有广泛的应用性,可用于多种药物以制成水溶性的前药。但反应难度较大,关键是第一步 Pummer 反应[5]。

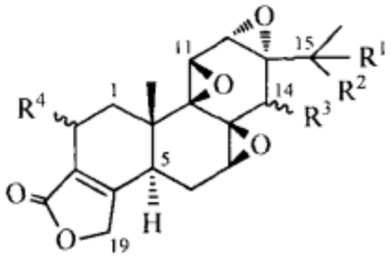
12.3 雷公藤内酯醇

雷公藤(*Tripterygiun wilfordii*)是近年备受关注的一味中药,其提取物制成的雷公藤多苷胶囊与雷公藤内酯片是市售中药制剂,用于治疗风湿性关节炎,红斑狼疮,慢性肾炎等自身免疫疾病。但副作用较大,如白细胞减少、皮肤过敏、恶心、呕吐……已报道雷公藤中分出雷公藤内酯醇(triptolide, PG490)等近百种二萜,三萜,生物碱等成分。我们的研究发现 PG490(**12-23**)及其同植物中三环氧二萜内酯醇类 **12-24**～**12-28** 的免疫抑制作用与其粗提物基本相当。PG490 是作用很强的免疫抑制剂,可用于器官移植,单独用要强于环孢霉素(cyclosporine),合并用药则与环孢霉素产生协同作用[6]。因而,对其进行了深入研究与开发。

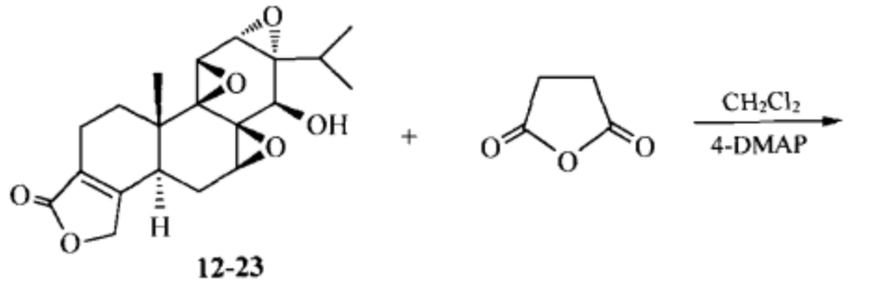
内酯醇 PG490 化学结构特殊,含三个环氧基团与内酯基团,结构专一性强,在 pH 9 加热后环氧基团异构化成 **12-29**、**12-30** 并失去活性。14-羟基如成反式(α-羟基)则活性大大降低。C-12、C-13 位的环氧基团在酸性条件下可开环形成氯代内酯醇(**12-31**),但在体内又闭环而复原,因而不影响活性。

PG-490 不溶于水,为改善其水溶性及提高生物利用度,将其制成了琥珀酸酯钠盐前药(PG-490-88,**12-33**)。它具有稳定性高,血浆内生物转换率高的特点,并强烈抑制 TNF-α 诱导的核因子 NF-κB,对多种癌细胞(如非小细胞肺癌,前列腺癌等)抑制率达 90%以上,而且不受基因 P53 的影响,可用于治疗对抗癌药物耐药的肿瘤患者。同时,PG-490-88 还与紫杉醇、阿霉素等多种抗癌药物有协同作用,增强其抗癌作用,减小它们的用量和毒副作用,目前正在临床试验中。

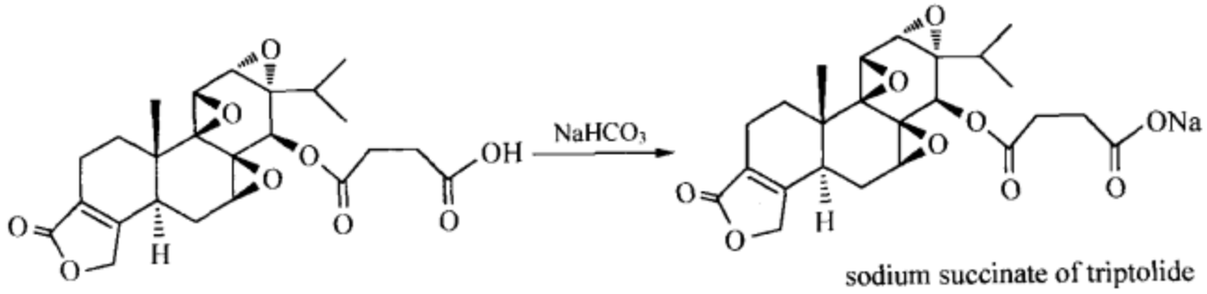
雷公藤内酯醇琥珀酸酯钠盐的制备:PG490 360 mg(1 mmol),琥珀酸酐 300 mg(3 mmol),4-二甲胺基吡啶 122 mg(1 mmol,用量较多,太少则反应不完全)混合溶于 20 mL 无水二氯甲烷中,在氮气下室温搅拌反应至 TLC 检测无 PG490 为止。过滤去析出的琥珀酸沉淀。溶液减压蒸干。分批加至 5% 的碳酸氢钠溶液(84 mg, 1 mmol)中,搅拌 2 h。冷冻干燥,得率 100% (作者经验)。



		R^1	R^2	R^3	R^4
12-23	triptolide	H	CH_3	β-OH	H
12-24	tripdiolide	H	CH_3	β-OH	β-OH
12-25	tripterolide	H	CH_3	β-OH	α-OH
12-26	triptonide	H	CH_3	=O	H
12-27	triptolidenol	OH	CH_3	β-OH	H
12-28	16-hydroxy-triptolide	H	OH	β-OH	H

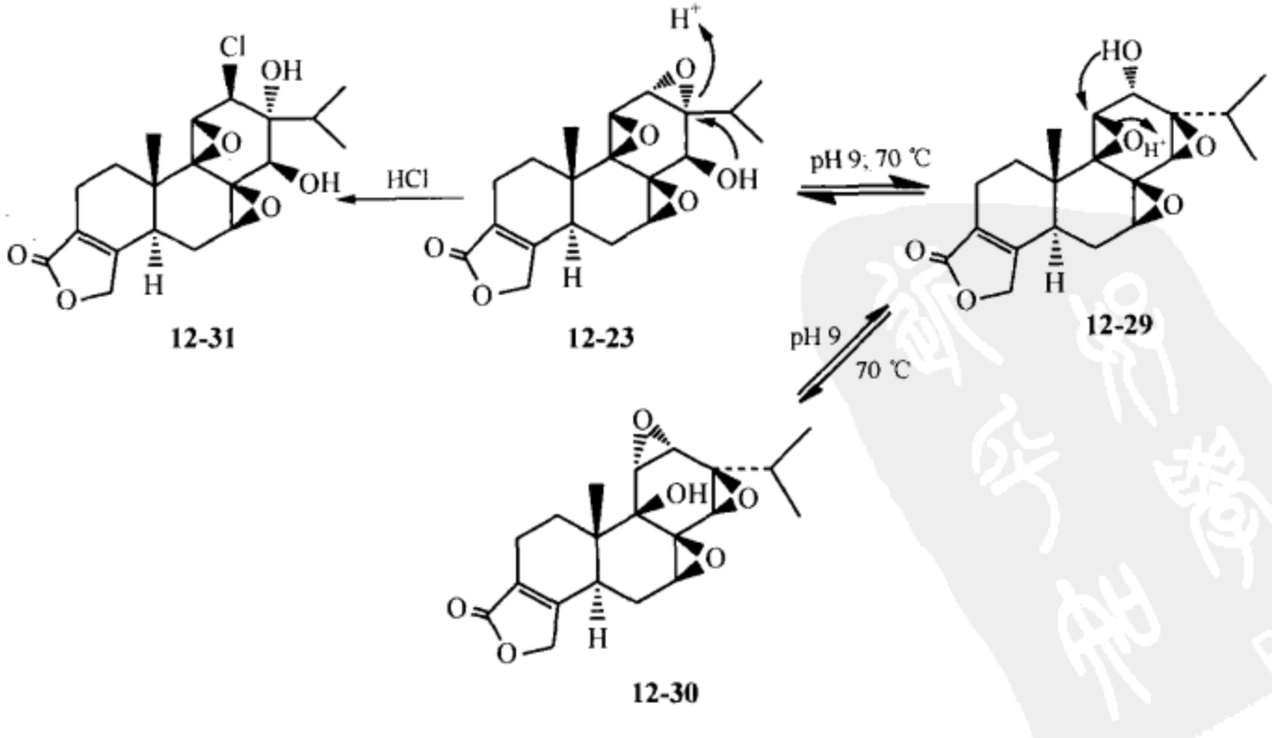


12-23



12-32

sodium succinate of triptolide
(PG490-88)

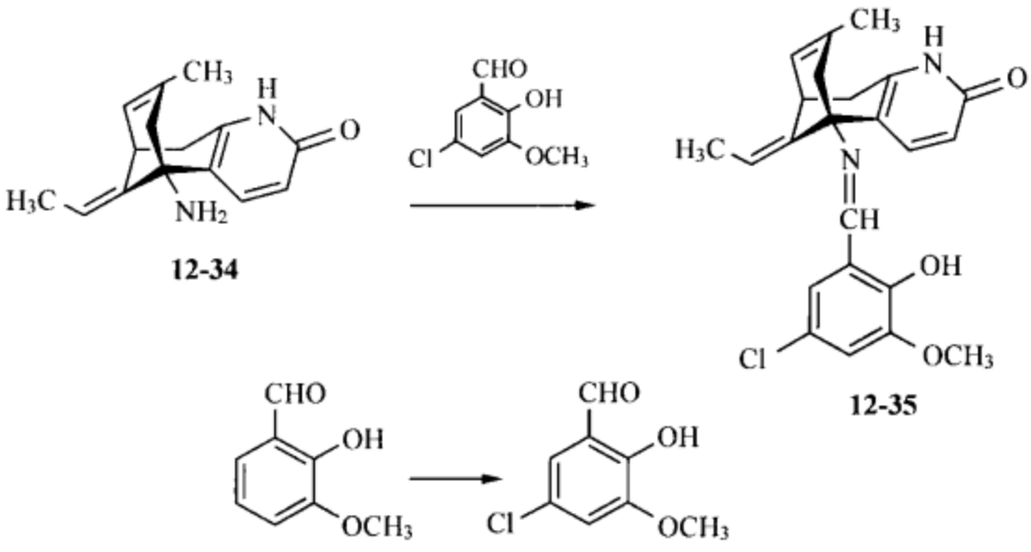


12-31　　**12-23**　　**12-29**

12-30

12.4 石杉碱甲

治疗智障新药石杉碱甲(huperzine A,**12-34**)是从草药蛇足石杉(*Huperzia serrata*)中分离出的新型吡啶酮类生物碱,对乙酰胆碱酯酶(AchE)有选择性抑制作用,已用于临床改善老年性记忆障碍,是我国自行开发的新药。为提高石杉碱甲的疗效,朱大元等对其进行了系列结构修饰以优化结构,发现石杉碱与氯异香草醛缩合而成的席夫碱(Schiff base)希普林(Schiprine,**12-35**)对改善老年性记忆障碍的药效优于石杉碱及他克林(Tacrine),目前正在进行临床试验。该化合物已申请了专利,可望成为一个新的治疗阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)的新药。



上面一些实例表明中草药单味成药(如雷公藤多苷胶囊)可成为发展新药的基础。而有效成分经过制备前药或结构修饰以增加溶解度或改变生物利用度,变低效为高效,则是我国发展新药的简捷途径。从中草药中筛选寻找新的有效成分也不应受到排斥,虽然这是一项比较长期与艰苦的工作,需要有大量人力物力的投入,但可能会获得新的突破,如青蒿素的发现那样。

制备前药是许多制药公司常用的方法,简单易行,但制成品在生物体内必须转换率高、速度快、稳定性强。一般而言,磷酸盐较琥珀酸盐优越。结构修饰也是新药研究的常用方法,成功的诀窍在于知识丰富,熟悉研究对象的全部资料,思路清晰,设计巧妙,成果因人而异,有时也会是巧合。计算技术的发展使我们能够对药物靶位、受体的三维结构进行分析,提供合理的药物设计,然而到目前为止成功的实例仍然很少。较简便的方法是在尽量不触动分子母核结构,保留可能的有效基团(内酯,酰胺,环氧……)的基础上进行修筛,如上述几例。然而这一工作看似简

单，实践起来会有许多意想不到的困难。许多天然物往往是整体分子有效，结构的轻度改变即失去药效。如雷公藤内酯醇的 C-14 位羟基由 β 转为 α 位，即几乎全部失效，环氧移位也失去药效，因此需要与生物活性测试密切结合[7]。

类似物的合成也是艰苦的工作，如雷公藤内酯醇的三个环氧基团与 14 位羟基为有效基团。然而据此合成的包含这些基团的化合物并没有活性。而上述依据青蒿素过氧基团合成的 OZ 277 等三桥氧化物则又是成功的实例。

天然产物往往含量少，资源有限，也受环境保护的限制，因此天然产物发展成新药后利用基因工程发展的生物合成工作更为重要，也是新近发展的方向，有可能改田间种植为发酵生产，上述青蒿素的生物工程是一个实例。

中华民族是勤劳智慧的民族，近年来中国科学家（无论他们在哪一个国家）在各学科的成就可从他们在 *Science*，*Nature* 等国际著名杂志发表的论文略见一斑。我国改革开放以来科学技术已有了显著进步，相信在不久的将来我国科学家也会在新药研究领域，基于中草药及其有效成分开发出更多获得国际公认的新药，为人类做出贡献。

参 考 文 献

[1] Vennerstrom J L, Arbe-Barnes S, Brun R et al. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development. Nature, 2004, 430: 900.

[2] 徐任生，赵志远，林隆泽，胥传凤. 抗癌植物喜树化学成分的研究. 化学学报，1977，35(3，4)：194.

[3] 中国科学院上海药物研究所. 10-羟基喜树碱抗癌作用的研究. 中华医学杂志，1978，58(10)：598.

[4] 徐任生，叶阳. 植物来源抗癌药物研究的进展，药物化学进展，2003，2：66.

[5] Stella V J, Eygmunt J J, Georg I G et al. Water Soluble Prodrugs of Hindered Alcohols. US patent US6204257B1, 2001.

[6] Xu R S, Fidler J M, Musser J H. Bioactive compounds from *Tripterygium wilfordii*//Atta-ur-Rahman. Studies in Natural Products Chemistry. 32. Amsterdam: Elsevier Sciences B. V. 2005: 773.

[7] 朱大元. 天然产物的结构修饰//徐任生，叶阳，赵维民. 天然产物化学（第二版）. 北京：科学出版社，2004：754.

（徐任生　赵维民）

第 13 章　天然产物的生物活性筛选

13.1　天然产物生物活性筛选的靶标与模型建立

20 世纪下半叶以来，生命科学和生物技术的研究成果成为最激动人心的科学成就之一。这些领域日新月异的发展，推动药物研究与医药产业进入了一个变革的新时代。随着人们对疾病过程更深刻的认识，明确了越来越多的生物大分子（如酶、受体、离子通道等）在生理、病理过程中的关键作用，而分子生物学技术的成熟又为蛋白质分子在人体外表达提供了工具。用基因重组技术将与疾病重要相关的酶、受体等蛋白质在合适的表达系统中表达，从而建立以分子为靶向的分子或细胞水平药物筛选模型，该模型具有特异性强、灵敏度高、微量快速等优点，并可结合自动化技术发展高通量筛选（high-throughput screening），每日筛选样品可达数万次、甚至数十万次。自 20 世纪 80 年代以来，国外大的制药公司都在使用这一筛选技术从事先导化合物的发现。在靶向药物发现策略和高通量筛选技术的推动下，国际上创新药物研究的发展趋势呈现出两个显著的特点：一是生命科学前沿技术，如功能基因组、蛋白质组和生物信息学等与药物研究紧密结合，以发现和验证新型药物靶点作为主要目标，取得了显著的进展；二是理论和结构生物学、计算机和信息科学等一些新兴学科越来越多地参与到新药的发现和前期研究中，使新药研究的面貌发生了巨大的变化，出现了一些新的研究领域和具有重要应用价值的新技术，对创新药物的研究与开发产生了深远的影响。

高通量筛选、分子模拟、药物设计方法和各种生物技术在药物研究中的应用，大大加快了药物研究工作的速度。采用这些新技术，诺华（Novartis）公司的科学家在 20 世纪 80 年代后期，以融合基因 Bcr-Abl 的表达产物——酪氨酸激酶为靶标，开发了对慢性骨髓白血病有较好疗效的新药 Gleevec（STI571）。随后洛克菲勒大学的科研人员又以 STI571 与 Bcr-Abl 酪氨酸激酶复合物的晶体结构为基础进行了新一轮的药物设计和筛选，获得了活性更高的先导化合物，并克服了 STI571 易产生抗药性的缺陷。美国 Millennium 医药公司的一个研究小组利用芯片技术研究患者对抗高血压药物的敏感性，在 1000 多个高血压相关基因中发现血管紧张素转换酶 2（ACE-2）为药敏的主要调控蛋白，并在模建三维结构的基础上设计了新的 ACE-2 抑制剂，仅用不到两年的时间就将其投入Ⅰ期临床试验。

上述技术上的进展不仅加速了“重磅炸弹”式药物的发现（例如治疗高脂血症

药物 HMG-CoA 还原酶抑制剂和抗炎药物环氧酶-2 抑制剂等），而且也拓展了药物研究的范围，针对一些原先缺乏治疗手段的疾病（如自身免疫系统疾病、神经退行性疾病、生殖系统疾病等）也开发出了一些疗效较好的药物。

然而，在过去的 15～20 年，整个制药工业界很大程度上降低了其从天然产物中发现先导化合物并开发成药物的努力，许多大制药公司甚至终止了天然产物的生物活性筛选。这在一定程度上是由于天然产物本身的一些局限性造成的：产生天然产物的陆地、海洋动植物资源难以大量获得；天然产物样品量很少；其分离和提取需要较长的周期和繁琐的步骤；难以配合高通量筛选对化合物数量的巨大需求；结构改造难以进行。世界各大制药公司在新药发现阶段普遍采用高通量筛选结合组合化学进行先导化合物发现。组合化学在短期内能够迅速扩充化合物数量，解决了自高通量筛选技术广泛应用以来在药物发现阶段的瓶颈问题——化合物大量短缺。从初期的组合化合物库中也确实发现了不少有药物研究开发潜力的先导化合物，但其中大多数往往最终无法开发为可上市新药，其中一个重要原因可能是初期组合化学产生的化合物库中的结构与生物体共容性不好。对天然产物研究的忽视可能是近年来创新药物研发效率降低的一个关键原因。实际上，即使在被忽视的情况下，2001～2005 年仍然有 23 个天然产物来源的创新药物上市，用于治疗包括细菌、真菌感染、肿瘤、糖尿病、脂代谢紊乱、异位性皮炎、老年痴呆症、酪氨酸血症、免疫抑制和疼痛等众多疾病。因此，制药工业界正在反思创新药物研发的策略并重新积极投入研发力量用于天然产物来源靶向先导化合物的发现和药物研发。

13.1.1　药物靶标

治疗性药物在机体内调节的生物大分子主要有 4 种类型：蛋白质、多糖、脂质、核酸，但是绝大多数药物都是通过与蛋白质结合并调节它们发挥作用。因此，蛋白质为药物靶标提供了最好的资源。依据蛋白质的结构，近一半的药物靶标可以分成 7 大基因家族：G-蛋白偶联受体（GPCR）、离子通道、蛋白激酶、锌金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、核受体以及磷酸二酯酶[1]。据推测，人类基因组中药物作用的靶标有 5000～10 000 个，甚至可能更多[2,3]。但是目前，现有治疗药物的靶标大约 500 个。尽管药物靶标的数量非常巨大，但是仍然不清楚这些靶标中到底有多少与疾病相联系。因为现在，建立疾病与靶标的联系的唯一方式是对新靶标的调节剂进行临床评价。

20 世纪 80 年代，分子生物学技术使蛋白靶标的克隆用于新药发现的生物筛选。这些新技术使从事蛋白靶标研究的公司的数量剧增，这些公司或者将蛋白靶标本身作为治疗剂，或者试图发现这些蛋白靶标的小分子调节剂。为了取得与众不同的优势，很多生物技术公司选择针对特定靶标类别，甚至集中在一个靶标上。

这种针对性有很多优势，可以使公司更深刻地探讨靶标与疾病的生物学联系，集中研究某一靶标的医学化学特性及结构特征，而且可以从很多治疗领域中选择出与某类靶标相关的领域。

13.1.1.1 G 蛋白偶联受体作为新药发现的靶标

目前已经发现的人类 G 蛋白偶联受体至少超过 300 个，这还不包括感受不同气味的 G 蛋白偶联嗅觉受体。估计人类基因组有一个包含 2000～3000 个以上的 G 蛋白偶联受体成员的大家族（大约为基因组的 1%），其中 500～1000 个以上 G 蛋白偶联受体成员与嗅觉受体无关，可能成为寻找新药的潜在药靶。表 13.1 列出了与人类疾病相关的 GPCR 潜在药物靶标。

表 13.1 GPCR 潜在药物靶标

GPCR	相关疾病
α_{1A}-肾上腺素	老年性痴呆
α_{2A}-肾上腺素	注意力缺陷多动症、运动病
α_{2B}-肾上腺素	高血压、冠状动脉疾病、肥胖
α_{2C}-肾上腺素	心脏衰竭
腺苷-A_{2A}	恐慌症
促肾上腺皮质激素	家族促肾上腺皮质激素抵抗
血管紧张素 AT_1	糖尿病肾病
血管紧张素 AT_2	恐慌症
β_1-肾上腺素	肥胖、焦虑、心脏衰竭、高血压、老年性痴呆
β_2-肾上腺素	β 阻断治疗所引起的心脏衰竭、哮喘、肥胖、代谢综合征、青光眼、高血压、心肌梗死、慢性阻塞性肺病、风湿性关节炎、囊肿性纤维化、心律不齐
β_3-肾上腺素	肥胖、Ⅱ型糖尿病、高血压
缓激肽 B1	冠状动脉疾病
缓激肽 B1	冠状动脉疾病、哮喘
$GABA_A$	癫痫
Ca^{2+}感受型 GPCR	良性低尿钙高血钙症、新生儿甲状旁腺机能亢进
降钙素	高血压、骨质疏松症
大麻素 CB_1	物质滥用、精神分裂症
大麻素 CB_2	自身免疫病易感性
CCK_A	肠易激综合征、恐慌症、帕金森氏症、精神分裂症、物质滥用、胆石形成、Ⅱ型糖尿病
CCK_B	恐慌症、帕金森氏症、Ⅱ型糖尿病
趋化因子 CCR2	Ⅰ型糖尿病、子宫内膜异位、动脉硬化、高血压、骨质疏松症

续表

GPCR	相关疾病
趋化因子 CCR3	哮喘
趋化因子 CCR5	HIV、高血压、糖尿病肾病
CRTH2	哮喘
CRF1	肥胖
趋化因子 CX3CR1	黄斑变性、急性冠状动脉综合征、动脉硬化
趋化因子 CXCR6	HIV
白细胞三烯 CysLTR	哮喘
多巴胺 D_1	情感性精神病
多巴胺 D_2	精神分裂症、物质滥用、肥胖、高血压
多巴胺 D_3	强迫障碍、迟发性运动障碍、精神分裂症、人格障碍
多巴胺 D_4	强迫障碍、注意力缺陷多动症、精神分裂症、人格障碍、抽动症
多巴胺 D_5	注意力缺陷多动症、睑痉挛
内皮素 ETA	偏头痛
内皮素 ETB	先天性巨结肠(肠管无神经结细胞症)
FPR1	牙周炎
FSH	不育症
GHRH	生长激素缺陷
胰高血糖素	肥胖、高血压
GnRH	低促性腺激素性性腺功能减退症 (central hypogonadism)
GPR10	高血压
GPR50	情感性精神病
GPR54	促性腺激素分泌不足所引起的性腺功能减退症(hypogonadotropic hypogonadism)
GPR56	双侧额顶多小脑回畸形 (bilateral frontoparetal polymicrogyria)
GPR154	哮喘
Ghrelin	Ⅱ型糖尿病
组胺 H_1	自身免疫病
$5HT_{1A}$	焦虑、抑郁
$5HT_{1B}$	注意力缺陷多动症
$5HT_{1D}$	注意力缺陷多动症、神经性厌食
$5HT_{2A}$	肠易激综合征、老年性痴呆、药物成瘾、强迫障碍、恐慌症、心肌梗死、精神分裂症、高血压、迟发性运动障碍、秽语综合征
$5HT_{2C}$	迟发性运动障碍、精神抑制药引起的体重增加、精神分裂症、神经性厌食、肥胖、偏头痛、恐慌

续表

GPCR	相关疾病
$5HT_{5A}$	精神分裂症
$5HT_6$	精神分裂症、帕金森氏症、老年性痴呆
IL-8	慢性阻塞性肺病、哮喘
LH	男性假两性畸形
黑皮质素 MC_1	皮肤癌
黑皮质素 MC_3	肥胖
黑皮质素 MC_4	肥胖
褪黑素浓缩激素 MCHR1	肥胖
褪黑素 MT1a	风湿性关节炎
毒蕈碱 M_1	老年性痴呆
毒蕈碱 M_2	抑郁、物质滥用
毒蕈碱 M_3	哮喘
δ-阿片剂	神经性厌食
μ-阿片剂	强迫障碍、药物滥用、癫痫症
后叶催产素	孤独症
甲状旁腺激素 PTH/PTHrP	布洛姆斯特兰软骨发育异常
嘌呤能 P2Y1	形成血栓
嘌呤能 P2Y12	动脉硬化
视紫质	视网膜色素变性
生长激素抑制素	情感性精神病
血栓烷 A_2	哮喘、特应性皮炎
尾加压素Ⅱ	Ⅱ型糖尿病
抗利尿激素 1B	抑郁
抗利尿激素 V2	肾原性尿崩症
GPR39	肥胖
组胺 H_4	过敏炎症
NOP	疼痛、物质滥用、心血管疾病、免疫性疾病
TGR5	代谢相关疾病
FPR_SC	代谢相关疾病

13.1.1.2 细胞膜离子通道蛋白作为新药发现的靶标

人们发现多种疾病是由于离子通道基因缺陷引起的离子通道蛋白功能异常所

致。人类和其他种属基因组测序发现的大量新的离子通道基因以及成功建立的钾离子通道三维晶体结构，不但极大地增加了人们对离子通道的研究兴趣，也为获得治疗这些疾病的方法提供了可能性。特别重要的是这些研究显示各种离子通道具有广泛的生理和病理调节功能，因此，以各种离子通道蛋白或其辅助亚基为药靶，为新药发现和发展提供了广阔的前景。表 13.2 和表 13.3 分别列出了与人类疾病相关的钾离子通道（可简称为“钾通道”）和其他离子通道潜在药物靶标。

表 13.2　以钾离子通道为药靶的潜在治疗药物

作为药靶的钾通道类型	治疗适应证	潜在药物或化合物
钾通道开放剂		
ATP-敏感型钾通道	高血压	pinacidil
	缺血性心脏病	diazoxide，BMS180448
	心衰	nicorandil
	哮喘	aprikalim
	秃头症	P1075，minoxidil
	尿失禁	ZM244085，ZD6169，WAY133537
	勃起功能异常	PNU83757
钙敏感型钾通道	脑缺血	BMS-204352，NS2004
	缺血性心脏病	NS1608，NS1619
	安定药、尿失禁、尿频	NS8
KCNQ2/KCNQ3	癫痫	retigabine
钾通道阻断剂		
ATP-敏感型钾通道	室性心律失常、心衰	HMR1098，HMR1883
	第Ⅱ型糖尿病	tolbutamide，chlorpropamide，glibenclmide，glipizide，nategliniide，repagliniide
电压敏感型钾通道（Kv1.3）	免疫抑制剂	CP30308408，UK78282
电压敏感型钾通道（Kv1.5）	心房纤维颤动	CP30308408，UK78282
其他敏感型钾通道（Kv）	多发性硬化病	fampridine
	癫痫、脑缺血	BIIA0388
hERG/Ikr	心房纤维颤动/扑动	dofetilide
	心律失常	ibutilide，almokalant，E4031，MK499
Iks 和 Ikr	心律失常、心绞痛	ambasilide，azimilide
Ito	心律失常	clofilium
KCNQ3/KCNQ4	老年痴呆症	DMP543
TREK1	抑郁症	SSRIs（selective serotonin-reuptake inhibitors）

表 13.3 以其他离子通道为药靶的潜在治疗药物

作为药靶的离子通道类型	治疗适应证	潜在药物或化合物
TRP	疼痛	辣椒素、icilin
TRPV1	偏头痛、牙痛、骨关节炎、神经痛	AMG517，GRC6211，NGD8243，SB-705498
M2	流行性感冒	rimantidine，amantadine

TRP：瞬时感受器电位(transient receptor potential)。

13.1.1.3 细胞核受体作为新药发现的靶标

几乎所有天然细胞核受体的配基早已广泛应用于临床治疗各种内分泌、代谢、炎症、自身免疫等相关疾病或临床综合征。同时，细胞核受体也是发展抗激素治疗的优良药靶。另外，随着孤立性细胞核受体的发现，为孤立性细胞核受体寻找配基并且以它们作为潜在药靶，也成为研究的热点。表 13.4 列出了目前已确定的细胞核受体靶标及相关适应证。

表 13.4 以核受体为药靶的潜在治疗药物

核受体类型	治疗适应证	潜在药物或化合物
孤立性细胞核受体 Nur77	癌症、低血糖	壳囊孢酮 B(cytosporone B)
LXR	动脉硬化症	GW3965
ERα	乳腺癌	它莫西芬
	骨质疏松症	雷洛西芬
	绝经期综合征	结合型马雌激素(conjugated equine estrogens)
PR	避孕	诺孕酯
	避孕	炔诺酮
AR	前列腺癌	卡鲁胺(bicalutamide)
	前列腺癌	氟他胺
GR	抗炎症	地塞米松
MR	高血压	依普利酮(eplerenone)
RXRα、RXRβ 和 RXRγ	顽固性皮肤 T 细胞淋巴瘤	蓓萨罗丁(bexarotene)
PARα、PARβ 和 PARγ；RXRα、RXRβ 和 RXRγ	卡波西(Kaposi)肉瘤	阿维 A 酸胶囊(alitretinoin)
RARα、RARβ 和 RARγ	急性早幼粒细胞白血病	全反维生素 A 酸
	严重结节性痤疮	异维甲酸

续表

核受体类型	治疗适应证	潜在药物或化合物
维生素 D 受体	由于慢性肾衰竭及甲状旁腺功能减退所引起的低血钙症	骨化三醇
	家族性低磷酸盐血症、甲状旁腺功能减退、抗维生素 D 佝偻病	麦角骨化醇
TRα 和 TRβ	甲状旁腺功能减退、甲状腺肿、桥本甲状腺炎	左旋甲状腺素
PPARγ	糖尿病	吡格列酮
	糖尿病	罗格列酮
PPARα	IIa、IIb、IV 及 V 型高脂血症	非诺贝特
	IIb、IV 及 V 型高脂血症	二甲苯氧庚酸

13.1.1.4　*酶作为新药发现的靶标*

1）信号转导通路中的蛋白激酶作为新药发现的靶标

蛋白质磷酸化由蛋白激酶、蛋白磷酸化酶共同调控，蛋白质磷酸化是细胞生命活动的重要过程，可以调节很多信号转导通路，从而进一步调节细胞增殖、分化、代谢、存活、运动及基因转录。蛋白质磷酸化是一种很复杂的过程，需要分子引发，补偿机制、细胞腔隙及短暂出现的因子，最终导致了细胞微环境中生物学功能的特异性。

蛋白激酶是人类基因组中具有结构同源性的最大蛋白质家族。目前，从人类基因组中已经鉴别出了 500 多个蛋白激酶的基因，大约占人类基因的 2%。染色体图谱显示，244 个蛋白激酶与疾病及癌症相关[4]。大多数蛋白激酶的催化结构域是由 250～300 个氨基酸组成的 ATP 或底物蛋白结合口袋。根据催化结构域的序列比较，蛋白激酶可以分为 AGC（如 PKA、PKG 和 PKC 蛋白激酶家族）、CaMK（如钙调蛋白激酶家族）、CMGC（如 CDK、MAPK、GSK 及 CKII 蛋白激酶家族）、TK（如 EGFR 及 Src 酪氨酸激酶家族）及 OPK（如其他蛋白激酶）。自 Src 酪氨酸激酶被发现后，大量生物学研究逐步揭示了细胞信号转导通路的复杂机制，例如生长因子受体酪氨酸激酶（如 EGFR 家族、VEGFR 家族、PDGFR 家族和 FGFR 家族）、非受体型酪氨酸激酶（如 Abl 和 FAK）、生长因子受体丝氨酸/苏氨酸激酶（如 TGFβB）、非受体型丝氨酸/苏氨酸及双位点特异性激酶（如 CDK 家族、Raf、MEK、MAPK、PI3K、PKC、PKB/Akt 及 mTOR）等。这些激酶中的很多成员成为了抗癌药物发现中的重要靶标。表 13.5 列出了目前已用于临床实验的蛋白激酶小分子抑制剂及相关适应证。

表 13.5 已用于临床试验的小分子蛋白激酶抑制剂

化合物	蛋白激酶	相关疾病
STI-571	Bcr-Abl, PDGFR, Kit	慢性骨髓性白血病(CML)、肠胃间质细胞瘤(GIST)
AMN-107	Bcr-Abl, PDGFR, Kit	CML、慢性淋巴细胞白血病(ALL)
BMS-354825	Bcr-Abl, SFK	CML
SKI-166	Bcr-Abl, SFK	CML、实体瘤
AZD-530	SFK, Bcr-Abl	实体瘤
ZD-1839	EGFR	非小细胞肺癌(NSCLC)
OSI-774	EGFR	NSCLC
CI-1033	EGFR, HER2	多种实体瘤
PKI-166	EGFR, HER2	实体瘤
EKB-569	EGFR, HER2	NSCLC、直肠癌
GW-572016	EGFR, HER2	NSCLC、实体瘤
PTK787/ZK222584	VEGFR, PDGFR, Kit	直肠癌、实体瘤
AMG-706	VEGFR, PDGFR, Kit, RET	NSCLC、直肠癌、GIST
SU-6668	VEGFR, PDGFR, Kit	实体瘤
SU-11248	VEGFR, PDGFR, Kit, Flt-3	GIST、实体瘤、急性骨髓性白血病(AML)
CGP53716	PDGFR	脑瘤
ZD-6474	VEGFR, Kit	实体瘤
CEP-7055	VEGFR	实体瘤
CP-547632	VEGFR, FGFR	卵巢癌、NSCLC
MLN-518	Flt-3, PDGFR, Kit	AML
PKC-412	Flt-3, VEGFR, PDGFR, Kit	AML、骨髓增生异常综合征
GEP-701	Flt-3, VEGFR, Trk	AML
BAY-43-9006	Raf	肾癌、乳腺癌、肺癌
PD-184352	MEK	乳腺癌、胰腺癌
flavopiridol	CDK	头颈部肿瘤、实体瘤
CYC202	CDK	NSCLC、淋巴瘤
BMS-387032	CDK	转移性难控制实体瘤
UCN-01	PKC, CDK	难控制的实体瘤及淋巴瘤
AP23537	mTOR	恶性血液病、多种实体瘤
CCI-779	mTOR	肾癌、乳腺癌、前列腺癌
RAD001	mTOR	GIST、易复发或难控制的 CML 或 AML

2) 信号转导通路中的蛋白磷酸酶作为新药发现的靶标

人类基因组中已经鉴别出了 100 多个蛋白磷酸酶[5]，这些磷酸酶组成了包括

酪氨酸磷酸酶(如 PTP1B、SHP2、PEST、PTPH1、PTPα 及 CD45)、双特异性蛋白磷酸酶(如 VHR、CDC25、PTEN 及 MKP-4)及丝氨酸/苏氨酸磷酸酶(如 PP1 和 PP2A)在内的磷酸酶超家族。受体型及非受体型酪氨酸磷酸酶在信号转导通路中都发挥着关键作用,调节细胞生长、增殖、细胞周期、细胞骨架解聚、细胞分化及代谢。典型例子是 PTP1B,PTP1B 基因敲除证明酪氨酸磷酸酶 PTP1B 能够去磷酸化已活化的胰岛素受体激酶。其他研究也证明了 PTP1B 在胰岛素信号通路中的负调控作用[6]。这些研究成果表明新的小分子抑制剂可能提高Ⅱ型糖尿病中胰岛素的敏感性或者可以有效地治疗肥胖。双特异性磷酸酶可以归为酪氨酸磷酸酶家族的一个亚类,它们能够特异性地水解底物磷蛋白酪氨酸、丝氨酸及苏氨酸残基的磷酸酯键。双特异性磷酸酶在胞内信号转导通路中也发挥着重要作用,已经证明其具有调节丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase,MAPK)信号转导通路及细胞周期的功能。由于蛋白磷酸酶在细胞生命活动中的重要作用,以这些酶为靶标研发药物,对人类疾病的治疗具有重要意义。表 13.6 列出了蛋白磷酸酶的部分潜在药物靶标。

表 13.6　蛋白磷酸酶部分潜在药物靶标

靶标	人类疾病
PTP1B	糖尿病、肥胖症
PTPα	糖尿病、癌症
LAR	糖尿病、创伤性神经损伤(神经保护)
SHP2	肥胖症
CDC25A, B	癌症
FAP-1	癌症
CD45	自身免疫性疾病、炎症、器官移植
HePTP	骨髓增生异常综合征和髓细胞白血病
PTPε	骨硬化症
PTP-SL/STEP	创伤性神经损伤(神经保护)
Yersinia PTP	斑块
Salmonella PTP	食物源性疾病(沙门菌感染和伤寒样发热)
PTEN	癌症
PRL-1, 2, 3	癌症
MKP-1	风湿性关节炎
MKP-3	癌症、创伤性神经损伤(神经保护)
MTM1	X 连锁肌管肌病
MTMR1	先天肌强直性营养不良
MTMR5	男性不育、癌症

3）磷酸二酯酶作为新药发现的靶标

磷酸二酯酶（phosphodiesterase，PDE）具有水解细胞内第二信使——环磷酸腺苷（cAMP）或环磷酸鸟苷（cGMP）的功能，降解细胞内的 cAMP 或 cGMP，从而终结这些第二信使介导的信号。

人和动物组织中，包含 11 个 PDE 家族的 21 个基因，通过选择性剪切转录为 60 余种功能特异的同工酶。各种组织中均含有多种 PDE 同工酶，但通常只有个别 PDE 同工酶占优势。同时，中枢神经各部位 PDE 活性也存在很大差异。PDE 活性由大至小顺序依次为大脑、小脑、延脑、脊髓。在中枢神经系统，PDE 分布和活性大小存在的这种差异可能是中枢神经组织各部位特定功能存在的物质基础。这些同工酶参与不同的信号转导，从而调节特定的生理和病理生理过程，如阴茎勃起、哮喘、T 细胞活化、视觉反应、平滑肌松弛、血小板聚集及心肌收缩等。

PDE 分子包含 3 个主要的功能结构域：N 端剪接区，调节区，近 C 端的水解区。11 个 PDE 家族成员的 30%～50%氨基酸保守区段位于水解区，约 300 个氨基酸。PDE 家族的 N 端剪接区功能尚不清楚，可能涉及变构调节（如钙调素、环核苷酸、金属离子结合、磷酸化位点）和膜定位。调节区包含各种结构域，可能与调节 PDE 水解活性或与其他信号系统相互作用有关。PDE 超家族成员对底物有选择性。PDE5、PDE6、PDE9 的特异性底物为 cGMP，PDE4、PDE7、PDE8 的特异性底物为 cAMP，而 PDE1、PDE2、PDE3、PDE10 和 PDE11 对两种核苷酸都具有选择性。

随着磷酸二酯酶基因的克隆及相关结构的阐明，很多磷酸二酯酶抑制剂被发现，并且有些已经应用于疾病的治疗。表 13.7 列出了部分已经被批准用于疾病治疗的 PDE 抑制剂。

表 13.7 磷酸二酯酶抑制剂

PDE 类型	抑制剂类名	相关疾病治疗
PDE3，PDE4	茶碱	哮喘、肺气肿、支气管炎
PDE3，PDE4	氨茶碱	哮喘、肺气肿、支气管炎
PDE3	奥普利侬（olprinone）	急性心功能不全
PDE3	米立农	急性心脏衰竭
PDE3	氨联吡啶酮	高血压、急性心脏衰竭
PDE3	西洛他唑	间歇性跛行
PDE5	西地那非（sildenafil）	勃起功能障碍、肺动脉高血压
PDE5	伐地那非（vardenafil）	勃起功能障碍
PDE5	他达拉非（tadalafil）	勃起功能障碍
PDE1，PDE5	迪普莱达莫（dipyridamole）	血小板聚集

13.1.1.5　脱氧核糖核酸和核糖核酸作为新药发现的靶标

1）脱氧核糖核酸作为新药发现的靶标

从药靶的角度来看脱氧核糖核酸的结构，脱氧核糖核酸是以脱氧腺嘌呤-胸腺嘧啶(dA-dT)或脱氧鸟嘌呤-胞嘧啶(dG-dC)重复配对的二核苷酸相连形成华生-克拉克(Watson-Crick)双股螺旋链形分子。在碱基配对的二核苷酸经磷酸二酯键相连时形成交替出现的脱氧核糖核酸分子“凹槽”。这些大小凹槽是序列特异性脱氧核糖核酸结合蛋白的辨识结构。一些序列选择性的药物常常是通过与该部位的辨识结构相互作用产生药理作用。DNA 分子在大小凹槽内的辨识和非辨识序列结构之间的区别是序列相关的脱氧核糖核酸分子构象变化。在细胞核内，脱氧核糖核酸是以基因组的形式存在。基因组脱氧核糖核酸常常与非特异性蛋白分子如组蛋白和特异性蛋白分子如转录因子以及其他调节蛋白结合，装配成染色体。基于脱氧核糖核酸的结构特点，主要从以下方面选择药靶。

(1) 以脱氧核糖核酸二级结构为药靶。脱氧核糖核酸分子内的二级结构常常出现在与脱氧核糖核酸转录功能有关的部位，例如启动子和上游调节成分结合部位。这些二级结构常常以发夹或十字形结构形式出现，为蛋白质转录因子与脱氧核糖核酸的相互作用提供特异性辨识部位和高亲和力结合部位。研究证明，单链脱氧核糖核酸形成的二级结构是几个常用的小分子转录抑制剂的药靶，如抗肿瘤药 actionomycin D(AMD)通过妨碍转录因子对单链 DNA 区的辨认，阻断转录因子 SP1 与原癌基因 c-myc P1 启动子结合。另外，以 DNA 二级结构为药靶的小分子也可能通过稳定这些二级结构增加转录因子与启动子的结合，导致上述调节基因转录。

(2) 以脱氧核糖核酸四股螺旋结构为药靶。染色体的末端(即端粒区以及某些原癌基因的转录调节区)部位的脱氧核糖核酸序列是嘌呤富集区并形成连续的鸟嘌呤链(GGGG)，后者可以形成 DNA 四股螺旋结构，称为 G-4 螺旋(G-quadruplex)。G-4 螺旋的出现常常与几个重要的细胞生物学功能包括复制、重组、转录和端粒 DNA 分子延长等相关。已经发现几个不同类型结构的化合物可以同 G-4 螺旋结构相互作用，进而影响相关的 DNA 分子生物学功能。如 2,6-diamidoanthraquinone、二奈嵌苯(perylene)和 porphyrins。

(3) 基于双股链脱氧核糖核酸特殊序列为药靶-加合物的作用。寡核苷酸链能够以序列特异性方式结合到双股螺旋脱氧核糖核酸分子内形成三股螺旋脱氧核糖核酸链。适合引入第三条链的结构是脱氧核糖核酸分子内的大口袋区。利用脱氧核糖核酸序列辨识特异性在其分子内加入额外一条核酸链形成的三股螺旋正在成为涉及抗基因药物的新靶点。同时，其也可为分子生物学研究基因表达提供新的方法。

2）核糖核酸作为新药发现的靶标

核糖核酸在许多重要的细胞生物学过程包括蛋白质合成、信息核糖核酸剪接、转录调节和反向复制等方面发挥了关键作用。天然或化学合成的小分子通过与核糖核酸相互作用，可以阻止其他生物大分子如蛋白质或核糖核酸与其结合；或通过抑制核糖核酸的催化活性或改变核糖核酸的三维结构构象而影响核糖核酸的生物活性。因此，核糖核酸成为疾病治疗中的重要靶标。

（1）以信使核糖核酸（mRNA）作为药靶。信息核糖核酸药靶十分具有吸引力。选择信息核糖核酸作为药靶不仅具有无限多的选择性，而且所开发出的药物比传统药物更具特异性。研究表明，至少有 4 种主要方法可以利用信息核糖核酸作为药靶达到抑制基因表达的效果：①利用寡核苷酸提供替换性结合位点（所谓“圈套”），使其与信息核糖核酸相互作用，从而使信息核糖核酸的蛋白质分子被该寡核苷酸封闭，导致信息核糖核酸的稳定性降低，最终被降解破坏。②核糖核酸干预（RNA interference，RNAi）法或转录后基因静止法，即将基因特异性的双链核糖核酸引入细胞，导致该基因的信息核糖核酸降解，妨碍基因表达。③利用蛋白体酶的催化切割性质攻击信息核糖核酸靶，从而特异性地抑制基因表达。④将反义核酸或反义寡核苷酸引入细胞，以华生-克拉克杂交互补的形式相互作用，与所攻击的信息核糖核酸某些区域的序列形成互补的双股信息核糖核酸链。由于双链信息核糖核酸不能被翻译成蛋白质，导致该基因的表达被抑制或封闭。

（2）以核糖体核糖核酸作为药靶。核糖体是细胞内蛋白质合成的重要细胞器，由核糖核酸和蛋白质组成。不同种属细胞的核糖体由大小不同的亚单位组成。真核细胞核糖体由 30S 和 50S 两个亚基组成，某些原核生物核糖体则由 16S 和 24S 两个亚单位组成。由于核糖体在蛋白质合成中的重要作用，将核糖体核糖核酸作为药靶似乎不太合适。但是原核生物与真核生物核糖体结构上的微妙差异，使核糖体核糖核酸成为抗菌治疗的首选药靶。大多数以核糖体核糖核酸为药靶的抗生素都是通过阻止细菌蛋白的合成抑制细菌生长而发挥作用的。这些抗生素包括四环素、氯霉素和大环内酯物。虽然不同药的作用机制不同，但是它们都干扰核糖体的功能从而阻止蛋白质的合成，最终导致细菌生长的减慢或停止。而氨基糖苷则可以引起细菌的快速死亡。

13.1.1.6 展望

近年来，随着计算机技术、现代合成技术的应用以及药物化学与结构生物学、分子生物学、遗传学、计算机和信息科学等学科的交叉渗透与发展，越来越多与人类疾病相关的药物靶标被发现，并且其中一些已经得到确证，基于这些靶标发现和发展创新药物已成为现代新药研制的主流和新经典模式。据介绍，现有的治疗药物靶标不超过 500 个，因此有效的靶标成为创新药物研究的重要瓶颈，寻找和发现

新靶标是当代新药和基础研究的热点。20 世纪 90 年代，人类和其他生物基因组测序计划以及后续的功能基因组等组学计划的实施，为靶标发现和新药开发研究提供了前所未有的机遇，国际上开始利用生物信息学的方法和功能基因组学技术，从庞大的基因组数据中发现药物靶标。据估计，从可作为药物靶标的角度推测，人类基因组中药物作用的靶标有 3000 个，结合疾病相关的基因，估计可用的药物靶标数量仍有 1500 个。然而，几年来的研究工作证明，这种靶标发现和确证的模式是极为艰难的。目前，大部分制药公司放弃了用基因组技术发现和确证靶标的工作。如何充分利用“组学”的研究成果，综合运用化学基因组学、基因操作、RNA 沉默技术和生物信息学、系统生物学、疾病病因学和药理学等方法发现和确证新药物靶标仍是世界范围面临的重要挑战。

13.1.2　筛选模型的建立

13.1.2.1　生化检测

通常用体外生化检测方法进行筛选的靶点是与疾病相关的关键性酶、受体以及蛋白与蛋白相互作用。体外生化检测方法包括从简单到复杂的多个系统，这一方法的优点在于化合物更容易接近靶点、化合物的作用靶点和作用机制非常明确、筛选易于降低成本、易于使用更新的技术、易于微量化和自动化。

体外生化检测的方法有两种：异相检测和均相检测（图 13.1）。

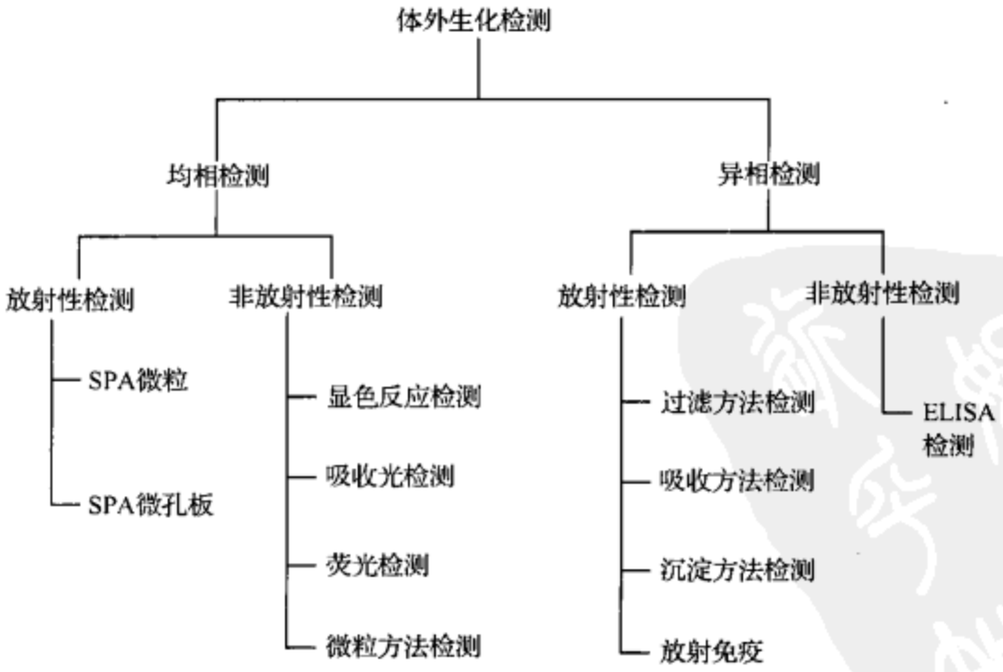


图 13.1　体外生化检测方法

异相检测包括非放射活性和放射活性两种检测方法。非放射活性检测主要指酶联免疫吸附实验(ELISAs);放射活性异相检测方法包括过滤检测、吸收检测、沉淀检测、放射免疫。异相检测为多步检测,涉及多次加样、孵育、洗涤、转移、过滤和信号读取等步骤。这些检测方法较费人力、步骤多,实现自动化和进行高通量筛选有一定的困难。

均相检测技术一个重要的特点是,除了一些试剂需要事先吸附于固相表面,其他所有的反应成分均可共存于溶液中,经一定时间孵育后,可由检测仪直接读取信号而无需其他步骤。由于荧光信号具有非常灵敏、易于检测、适于微量化,以及荧光检测对环境和人体不会造成有害污染等诸多特点,目前大多数的均相检测方法都是建立在荧光标记技术基础上的。近几年来,纳米技术得到了迅猛发展,出现了DNA 微阵列芯片、量子点、纳米颗粒等新材料,也为建立一些以荧光、化学发光、放射性同位素为基础的新的均相检测方法提供了机遇,出现了在超高密度板中进行超高通量筛选(uHTS)的技术。目前发展的基于荧光技术的检测法包括:①荧光强度检测法,如荧光生成检测法、荧光猝灭检测法、荧光猝灭弛豫检测法;②荧光偏振(FP)检测法,利用偏振信号与分子大小成正比的原理进行检测;③荧光共振能量转移(FRET)检测法;④均相时间分辨荧光(HTRF)检测法、均相时间分辨荧光共振能量转移(TR-FRET)检测法或 Lance 检测法,这些方法均是利用荧光共振能量从母体分子转移至受体分子来进行检测的;⑤荧光聚焦显微技术;⑥荧光成像分析;⑦荧光报告系统,如绿色荧光蛋白(GFP)和 β-内酰胺酶报告系统。除了荧光检测外,还出现了一些以电化学发光、化学发光为基础的均相检测方法。另外,放射性同位素均相检测法则包括以下几类:①亲近闪烁(SPA)检测法,该方法已被广泛应用。同位素标记的生物分子能够识别包被在 SPA 颗粒上的特异性蛋白或抗体,当两者靠近时就能产生闪烁信号,从而可以被检测(图 13.2);②FlashPlate 法;③Cytostar 检测技术,闪烁体包被在微孔板的孔壁上,闪烁体上固定有特异性的抗体或受体,当有同位素与之结合时,就能产生信号,而未被结合的同位素也无须从溶液中分离出来;④将 SPA 和显像技术结合在一起的 leadseeker 技术。此外,等离子体共振技术也正在逐步地应用于均相检测,使之更能满足 HTS 的要求。

例如,在专门设计用于寻找以蛋白酶为靶点的抑制剂筛选中,待检测化合物与酶混合后,加入特殊底物,通过检测底物转化为产物上的标记或产物本身独特的光谱学特性(吸收、荧光、化学发光等)来观察产物的形成情况。如果某一化合物,能使观察到的信号显著减弱,则证实该化合物为活性化合物。以酶为靶点进行高通量筛选的优化及标准化涉及以下步骤:确定反应条件(如缓冲液、pH、温度)、确定天然或合成的底物、研究酶动力学、评价信号窗口以及对已知抑制剂的反应情况。

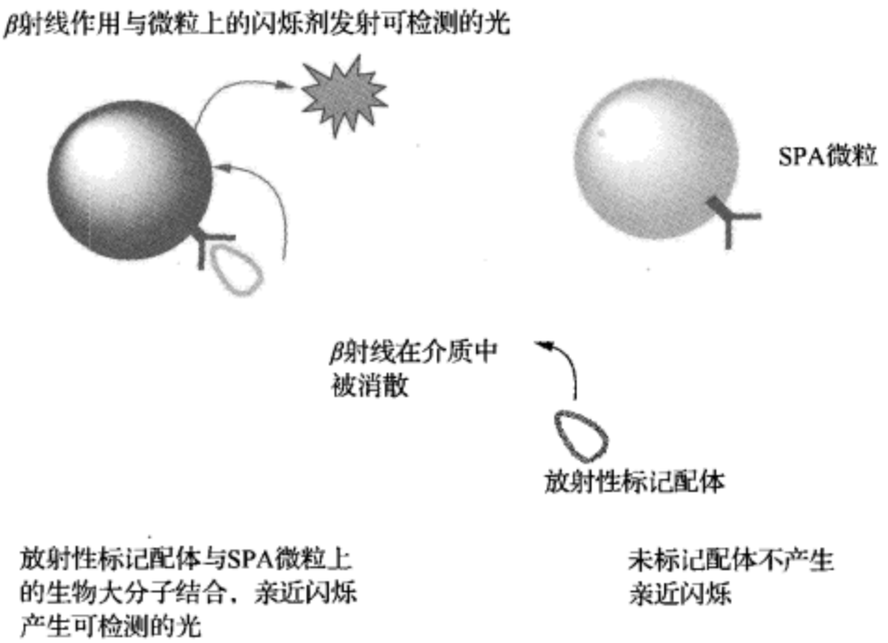


图 13.2　SPA 工作原理

如图 13.3 和图 13.4 所示，针对蛋白水解酶、激酶、磷酸酶，甚至 DNA 连接酶和解旋酶等其他各类酶类靶标，均可以选择不同的检测手段建立这些靶标的生化水平筛选模型。至于具体选择哪种检测方法，则要综合考虑实验室的条件以及实验者对于不同方法的熟悉程度后确定。

经典的受体结合实验通过使用放射性同位素标记的配体完成，如^{3}H 和^{125}I 等。膜类受体可从自身表达该受体的细胞或组织中获得，也可以从可以高效表达该受体的工程细胞株中获得。但无论通过何种方式，关键还是要建立起合适的条件，从而产生可溶的并且保留与天然配体相结合的受体或膜悬液。制备受体过程中的差异经常会严重影响其与配体的亲和力。这些差异包括工程细胞株的生长条件、天然组织的来源及收集、缓冲液、pH、离子强度以及缓冲液添加剂等。典型的受体结合实验是放射性物质标记的配体和受体的拮抗剂或激动剂的竞争性结合。与受体结合的配体在与自由的配体分离后，通过测定同位素的强度（代表了结合的强度）便可以确定激动剂或拮抗剂的活性。目前实现受体结合高通量筛选时的检测方法是通过膜过滤（异相生化检测）或 SPA 完成的。该方法是通过检测结合与未结合标记配体的比例来实现的，两者都可通过 96 孔板或 384 孔板完成。目前已有文献报道使用 1536 孔板通过成像技术进行检测的方法。

蛋白质之间相互作用靶点的筛选可通过标记其中一种、两种或全部蛋白质并应用合适的检测技术测定其结合程度而完成。SPA、均相时间分辨荧光（HTRF）以及 ELISA 方法都能实现这类筛选。由于蛋白质之间相互作用时表观结合亲和力比典型受体与配体的结合亲和力相对较弱，均相非分离方法（SPA、HTRF）要优于可能会改变蛋白质结合平衡的 ELISA 方法和膜过滤方法。

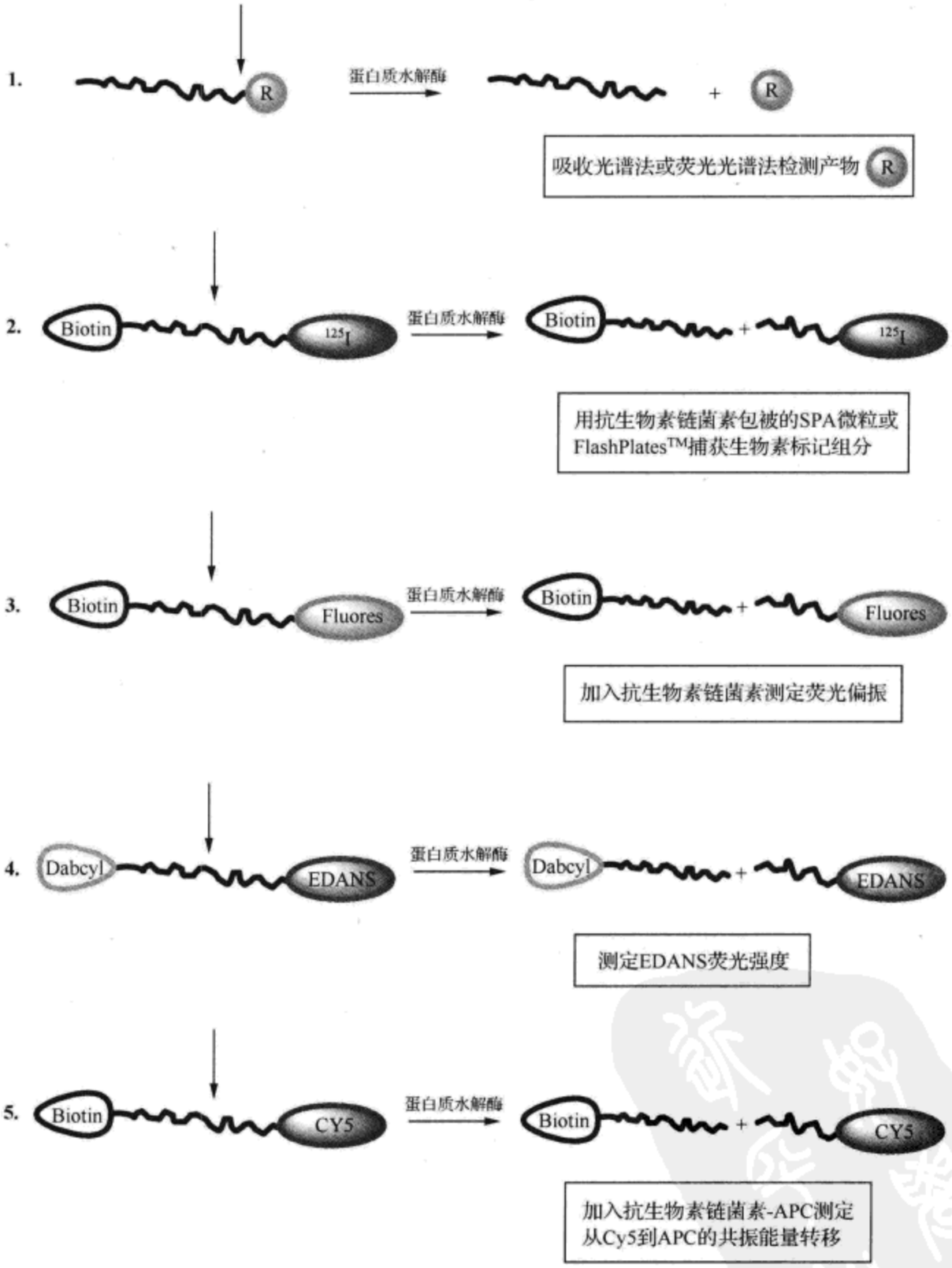


图 13.3 常用的蛋白水解酶检测模型示意图

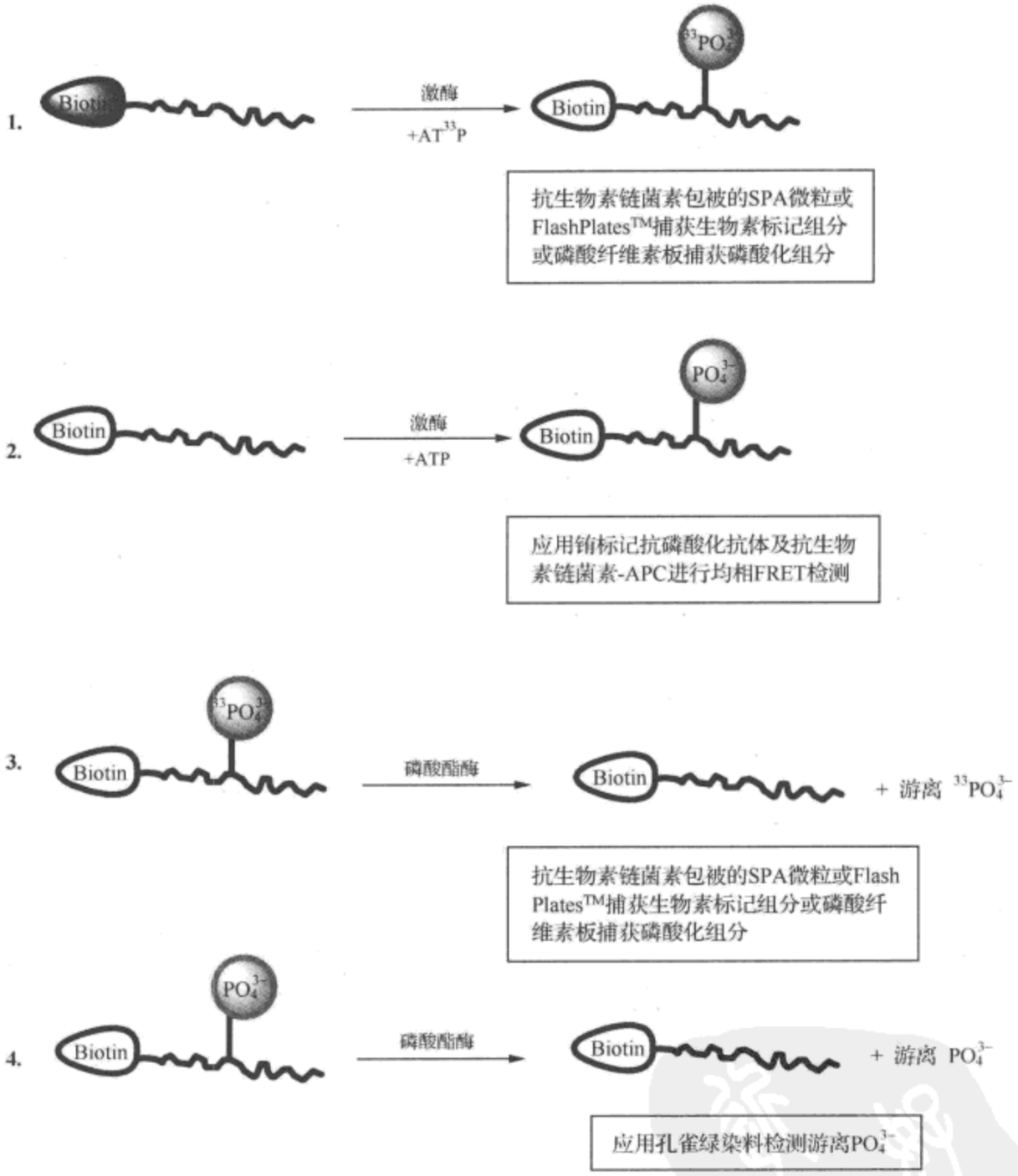


图 13.4　常用的激酶和磷酸酯酶检测模型示意图

13.1.2.2　细胞水平检测

细胞水平的检测实验非常接近活细胞的环境，因此被广泛用于验证经初级体外生化检测得到的先导化合物，也用于暂时无法通过体外生化方法进行检测的高通量筛选靶点。除用于寻找抗生素的筛选模型外，涉及信号转导及转录调节的 G 蛋白偶联受体和其他蛋白质也是这一筛选方式的主要靶点。即使是应用体外生化

检测筛选的靶点(受体和酶),95%以上的二级和三级筛选仍然需要进行细胞水平的检测。以前,由于繁琐的步骤,细胞水平检测通量较低,因而筛选通常以中通量或低通量的方式运行。但随着分子技术、检测技术、仪器水平的发展,均相细胞水平的筛选已经进入到高通量筛选时代。细胞水平的筛选不仅可以揭示细胞膜的通透性、细胞毒性及靶点作用机理与假说之间的相关性,同时也可以得到有关细胞和化合物相互作用以及化合物稳定性的信息。

很明显,细胞水平筛选系统的特点使其较体外生化筛选得到的化合物能够更快地开发成为药物,由于细胞表面或细胞中有数千个药物作用的潜在靶点,这些靶点可能与不同的疾病存在相关性,从而使得经细胞水平筛选得到的活性化合物对目标靶点有一定程度的选择性。这样的活性化合物往往能够很快地优化成先导化合物分子,并被选为进入临床前研究的药物候选物。

与体外生化检测相同,细胞水平检测也分为异相检测和均相检测两种,如图 13.5 所示。

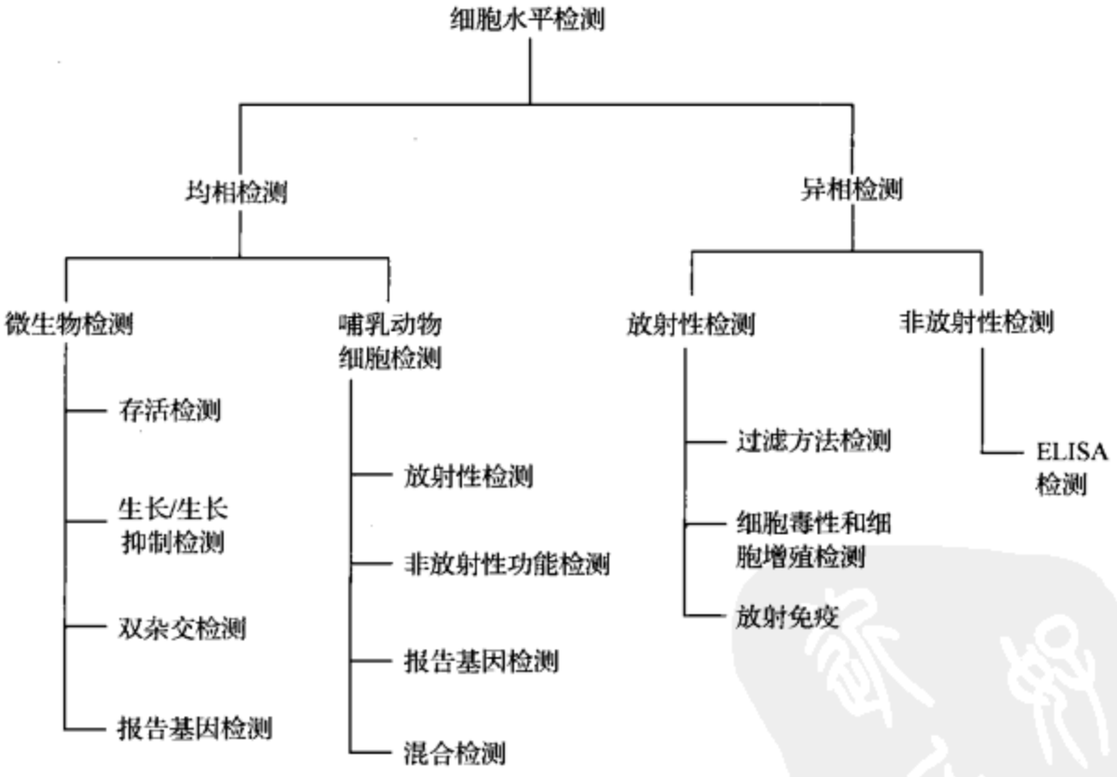


图 13.5 细胞水平检测

1) 以微生物为基础的细胞水平生物活性筛选方法

生物技术的发展使得在微生物系统中表达哺乳动物蛋白成为现实。如今在微生物系统中,异源性地表达大量蛋白质已经用于生化和蛋白质结构研究或者临床治疗。

尽管把感兴趣的靶点克隆到微生物系统很容易,但是微生物为了在环境中生

存，往往会进化形成非通透性的细胞壁和细胞膜。因此在利用微生物细胞进行高通量筛选时，化合物往往难于接近靶点。通常哺乳动物细胞比微生物细胞的通透性更好，因此利用微生物筛选系统进行筛选时，很可能会错过那些不能穿过进化后的微生物细胞壁和细胞膜的化合物。而且，很多微生物也具有将化合物有效泵出系统，致使得到假性结果。但是，由于微生物系统具有廉价、快速的特点，人们采用遗传学和分子生物学技术开发出了通透性更好的酵母和大肠杆菌，使微生物筛选系统成为活跃的领域，其中以酿酒酵母和大肠杆菌最为常用。酿酒酵母是真核生物，因此被认为是更接近于哺乳动物筛选靶点的系统。然而，酵母比大肠杆菌生长缓慢，要 48 h 才能长到可以检测的密度，而大肠杆菌只要 6～8 h 就可以用了；另外，大肠杆菌的增殖操作比酵母容易得多，通透性也比酵母好，因此二者各有优缺点。以酿酒酵母和大肠杆菌验证靶点和筛选药物最简单的方法就是利用一种功能互补衍生的筛选方法，此时异源基因的活性是生存所必需的。比较复杂的方法是操作异源表达的基因以获得替代表型，从而产生“设计微生物”。例如，应用酿酒酵母系统筛选免疫抑制剂、GPCR 拮抗剂和激动剂、离子通道阻断剂和开放剂；应用酵母双杂交系统筛选蛋白质相互作用阻断剂。

2）应用哺乳动物细胞的筛选方法

当代筛选技术的发展使得利用完整哺乳动物细胞进行功能性筛选和受体结合筛选实验成为可能。与生化检测方法不同的是，哺乳动物细胞水平的筛选需要几天的准备时间，完成筛选也需要几个小时。均相的测量方法包括放射性法、化学发光法和荧光法。

基于细胞水平的筛选应当注意在构建了靶点基因的细胞中，靶点蛋白最好能稳定表达。瞬时表达的靶点基因有时也能用来进行功能性的复筛，但不可用来筛选大规模的化合物库。原因是瞬时表达时不同的批次存在差异，并且要得到足够的转染细胞需要大量的 DNA。由于其费时费力并需要大量的试剂，而且难于保证对其进行每天的质量控制，因而不适用于 HTS。对用于 HTS 的细胞株有一些要求，如：用常规的组织培养试剂就能培养；标准的培养条件，如 5%的 CO_2、37 ℃的温度；增殖一代的时间最好少于 48 h；稳定的信号至少能保持 20 代；不需要太多细胞（＜100 000 个/孔）；没有支原体污染；冻存后的细胞仍能生长并且生长曲线不变；细胞中靶点蛋白的表达量足够高等适合于高通量的条件。另外，方法必须可靠，信噪比至少为 4∶1，且复孔间差异不大；每天的操作必须一致；筛选方法适于微型化。

细胞水平的均相放射性方法早已用于功能性筛选和受体-配体实验，主要包括膜受体结合实验、GTP-γ-S 结合实验、胞内 cAMP 检测实验。而非放射性功能筛选实验主要包括胞内 cAMP 检测、Ca^{2+} 内流和报告基因检测。

其中，报告基因检测法应用非常广泛。该方法通过可调控的转录控制元件调

控报告基因编码蛋白的表达，而所表达的报告基因蛋白拥有独特的酶活性，且其活性检测适用于高通量筛选。对应于不同的细胞株，目前可有多种报告基因和载体可供选择，如萤火虫荧光素酶、分泌型碱性磷酸酯酶（secreted alkaline phosphatase，SEAP）、氯霉素乙酰转移酶（chloramiphenicol acetyltransferase，CAT）、β-半乳糖苷酶、β-内酰胺酶和绿色荧光蛋白（GFP）等。

3）混合检测

先导化合物和一些令人感兴趣的先导候选化合物按常规需要进行细胞毒性、细胞色素 P450 异构酶（CYPs）抑制作用、在 Caco-2 细胞的渗透性和其他一些活性特异性检测。例如，利用雌激素受体筛选得到的化合物必须在其他激素核受体模型上进行检测，如雄性激素、孕酮、糖皮质激素和 TSH。

13.1.2.3 基于小动物筛选模型

20 世纪初期，生物学家就已经尝试利用简单且易处理的生物体建立实验体系，以研究复杂生物学过程的基本问题，如基因调控、细胞增殖、组织及胚胎发育。细菌和噬菌体是最早被用于实验的生物，很多重要的发现都是通过研究这些原核生物和病毒的生物化学和遗传特性而产生的。将遗传和生物化学技术相结合，在分子水平上分析细菌和噬菌体的代谢、生理信号通路及形态学特征，产生了很多基础生物学发现。这些发现已经成为现代分子生物学的基石，而现代分子生物学又为人们认识更复杂生物的遗传、生物化学及生理特性奠定了基础。现在，几种生物已经成为模式生物被广泛用于生物学相关的基础及应用研究。

由于生长快，繁殖期短，营养要求低，遗传信息少，简单的真核生物模型，如酿酒酵母、丝状真菌（脉孢菌）、阿米巴（盘基网柄菌）、线虫（秀丽隐杆线虫）及果蝇（黑腹果蝇）已经被广泛用于科研。

更复杂的生物，如脊椎动物斑马鱼（*Danio rerio*）、非洲爪蟾（*Xenopus laevis*）和小鼠（*Mus musculus*）也已经被作为模式生物广泛用于科学研究。最近，几种模式生物已跨越了基础研究的界限，进入了药物研究及开发领域。很多制药公司已经将这些模式生物应用于药物发现的各个阶段，包括从新药靶标的发现到药物毒理的研究。

将模式生物用于药物发现，直接影响了与疾病相关靶标的发现及确证研究。这些研究包括过表达或敲除某特定基因，然后通过观察转基因生物的表型来确定这些基因的功能。这种解释基因功能的方式被称为逆遗传。在过表达中，一个包含特定基因的质粒被转入动物，然后，通过分析这些动物来确定这一特定基因在动物生命活动中的作用。在基因敲除中，基因通过随机化学基因突变或 siRNA 及吗啉而丧失本应具有的功能。吗啉是一种用来修饰基因表现的分子，由 18～25 个碱基组成，具有比 DNA 及 RNA 更好的反义特征。

1）筛选工具——非洲爪蟾

非洲爪蟾的研究为生物学很多领域（如胚胎细胞生物学、生物化学等）的研究奠定了基础。胚胎生物学家已经将非洲爪蟾作为模式生物，用于研究脊椎动物早期胚胎发育和器官形态发生的复杂机制。但是在药理学及药物发现中，人们主要利用它的细胞——卵母细胞及黑色素细胞进行科学研究。总体上来说，这些细胞主要被用于研究和筛选离子通道及 G-蛋白偶联受体。由于非洲爪蟾卵母细胞在表达哺乳动物膜蛋白上的多功能性，已经被广泛用于表达和表现离子通道及人类 G-蛋白偶联受体的特点。黑色素细胞，是一种存在于鱼类及两栖类动物中较大的细胞，细胞内有颗粒型细胞器（色素颗粒），色素颗粒中包含黑色素。在细胞内，腺苷酸环化酶和磷脂酶 C 的激活，可以产生甘油二酯，cAMP 与甘油二酯的浓度可以调节色素颗粒的再分布。在真核细胞内，腺苷酸环化酶和磷脂酶 C 信号通路都是 GPCR 受体下游的重要信号通路。而且，色素颗粒的位置、富集及分布变化可以直接通过光透过率来检测。因此，可以利用色素颗粒来筛选 GPCR 受体的显效剂及拮抗药物。但是非洲爪蟾四倍体的基因组阻碍了遗传学及基因组的分析，因此，近年来，体积相对小、基因组为二倍体的热带爪蟾（*Xenopus tropicalis*）作为一种新的脊椎动物模式生物已经被用于科研。对热带爪蟾的基因组分析完善了以前研究中欠缺的遗传及基因组信息。

2）筛选工具——黑腹果蝇

遗传学已经渗入到现代分子生物学中，以果蝇作模式生物产生了大量基础发现。在 20 世纪初，果蝇就已经成为生物学家青睐的模式生物。很多诺贝尔奖得主都利用果蝇开展研究，更突出了这一模式生物的重要性。2000 年，伯利克果蝇基因组计划（Berkeley Drosophila Genome Project）与 Celera Genomics 公司合作，完成了黑腹果蝇基因组测序。黑腹果蝇基因组测序通过鸟枪法测序快速完成，在鸟枪法测序中，随机产生的复杂基因组片段通过电子计算机软件重组。鸟枪法测序成了一种普遍使用的方法，而且这种方法后来被成功地用于人类基因组测序。更为重要的是，将黑腹果蝇整个基因组与人类疾病基因对比，发现果蝇 287 个基因中有 178 个是保守的，保守率为 62%[7]。因此，黑腹果蝇也是研究人类多种疾病（如癌症、神经及代谢疾病等）基因的一种首选模式生物。现在，很多基因组的处理方法，如转基因动物的产生、将可换位元件用于基因组筛选等，都是在黑腹果蝇的研究中建立起来的。

在黑腹果蝇中进行的遗传相互作用及遗传筛选的研究，加深了人们对人类复杂疾病（如癌症和糖尿病）的认识。黑腹果蝇遗传学研究突出了很多在生长因子受体，如酪氨酸激酶和胰岛素/类胰岛素下游分子成分的重要性。

最近，数个研究小组已经利用黑腹果蝇遗传筛选来揭示人类抑癌基因的作用。抑癌基因突变失活，会导致细胞生长和增殖的失控。剖析哺乳动物抑癌基因的作

用非常复杂，因为控制细胞生长的关键基因发生纯和突变会产生致死效应。利用先进的遗传工具进行眼睛、头部等组织的纯和突变，发展了黑腹果蝇的遗传筛选。

3）筛选工具——斑马鱼

斑马鱼是最早用于药物发现的模式生物。与秀丽线虫相似，斑马鱼也具有非常适合表现型的特点：表型明显、个体小（胚胎可生长于 96 孔板中），可规模化培养（每个雌鱼可产卵 300 个）。作为模式生物的一个最大优点是，斑马鱼为脊椎动物，能够用来研究特定发育及疾病的过程，而这种研究在前述的模式生物中是无法进行的。斑马鱼也是大规模正向遗传（large forward genetic screen）筛选中用到的第一个脊椎动物[8]。这种筛选大部分集中在发育生物学，可产生数千个不同的突变。另外，附加筛选主要集中在疾病生物学，包括多囊肾疾病、胆固醇加工处理、组织再生、心脏病、贫血、癌症及神经错乱。

斑马鱼基因组的测序由 Sanger Center 完成。人类基因与斑马鱼基因组有 80%以上的相似性。同黑腹果蝇和秀丽线虫一样，不同物种间的基因保守性使人们可以在斑马鱼上研究人类疾病。在 RAF 激酶家族成员之一 BRAF 的直接功能研究中，为获得痣及黑色素瘤发育中的功能性突变信息，将人类野生型基因 BRAF 或基本激活突变 $BRAF^{V600E}$ 转入斑马鱼形成了转基因斑马鱼。转基因斑马鱼是通过显微注射或者由 BRAF 或 $BRAF^{V600E}$ 转入而产生的。结果显示野生型 BRAF 斑马鱼没有生长痣，但是 10%的 $BRAF^{V600E}$ 型转基因斑马鱼 8 周后生长了痣。组织学显示这些痣发育良好，无局部组织侵袭性。当 $BRAF^{V600E}$ 转基因斑马鱼同时缺少肿瘤抑制因子 P53 时，这种损伤就会发展成为具有组织侵袭性的黑色素瘤。这种新的转基因黑色素瘤模型证明了 $BRAF^{V600E}$ 在斑马鱼痣及黑色素瘤发生中的作用。

斑马鱼除了用于遗传筛选及动物模型上的靶标确证，还用于小分子筛选。在小分子筛选中，利用自动化显微技术检测表型的变化可以检测大量化合物。这种检测方式在其他任何一种动物模型中都是不存在的。例如，对于可以拯救患有血管缺陷的斑马鱼胚胎躯干和尾部缺血化合物的筛选，这种筛选在 96 孔板中进行，在解剖显微镜下通过形象地评价血流循环来检测化合物的活性。同样，斑马鱼筛选也用于化合物毒性的评价。新药发现的当今潮流是在药物发现的早期进行药物毒性检测，以提高化合物的质量。斑马鱼毒理学方法在体外方法中占有优势，因为他们与生理相关，而且在体外高通量检测时就可以反映出代谢中的毒性。用于检测心脏毒性的两个斑马鱼毒理学筛选模型已经建立。这两种筛选都利用显微技术来检测经药物处理后的斑马鱼心脏跳动，并且可以分辨诱导引起的心动过缓。

4）筛选工具——鼠

虽然啮齿动物的成本和个体大小限制了他们在药物发现初期的大规模应用，但是啮齿动物与人类的相似性使他们更利于评价针对特定药理学特征（如药效、毒

性、药代动力学)的小分子库。非常典型的,啮齿动物可以用于进一步分析体外预筛选之后在细胞水平上被证明有效的化合物,也可以在预测模型上证明药物的潜在药性及生物利用率。然后,可以在小鼠模型上从一大类相关化合物中筛选出最有希望的候选药物。

在小鼠和大鼠上进行化合物的药代动力学检测经常成为制约药物发现进程的瓶颈,因此有必要寻找加速这种检测的方法。复合生物流体(complex biological fluid)中化合物检测的提高,使"盒子(cassette)式"研究或者"多进一"的定量给药方式("N-in-one" dosing)成为可能。在这种方式中,多种化合物溶解在一种溶剂中,同时用到小鼠或大鼠上,进行药代动力学行为的平行检测。正如样品中的每个化合物可以单独评价一样,这种方法使很多化合物同时被检测。虽然这样在同一代谢通路中,不同的化合物之间会形成干扰,导致其中一些化合物药代动力学特征上的假象,但是很多情况下,这一问题可以通过初步研究包含在其中的化合物特征而减少到最小。

药效学或有机体上的化合物效果评定,是评价药物功效和毒性的重要标准,更容易得到药效替代物标志的确证,加速化合物药代动力学评价。例如,临床上越来越多的证据表明,癌症患者经表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂治疗后会产生皮疹,这与抗肿瘤反应率(antitumor response rate)的提高相关[9]。如果这一现象被证实,皮疹就可以作为药物起作用的早期标志。同样,在利用小鼠上进行的化合物筛选中,替代物标志的证明也可以加速候选小分子化合物的筛选,以选择那些最后可能具有药物疗效的化合物。在一个小鼠异种移植模型中,植入纤维素瘤中EGFR磷酸化的抑制作用与较远表皮角质化细胞中 EGFR 的磷酸化水平相关。因此,治疗后,通过简单的皮肤活体检查就可以快速预测药物对肿瘤的效果。将来,这种相对简单的方法将可能用于支持预临床模型上的药物筛选及预测病人接受治疗后的药物疗效。

毒理基因组学利用微阵列技术评价外源性化合物对靶器官(如肝脏)内成千上万基因表达的影响[10]。通过候选药物靶基因表型与已知的毒性化合物之间的对应关系,可以观察到药物潜在毒性的早期信号。这种技术最后将取代药物发现中正在使用的基于信号通路的笨重且高成本的药物毒性研究方式。代谢组学是一种相对较新的技术,可以在实验动物上快速筛选对代谢混乱有作用的化合物。这一技术的应用是基于这样一个事实——内源性及外源性因子可以打破很多可预测的代谢通路中的自身稳定。通过质谱及核磁共振波谱分析得到生物体液(如血清、尿液)的代谢表型,可以进一步得到某一特定因子代谢产物的肽链图谱。虽然这一技术的潜在作用目前尚不十分明确,但是它很有可能成为快速评价药物安全性和毒性的强有力工具。

在具有特定功能的化合物筛选中,小鼠遗传模型很快成了一种有用的工具。

对小鼠进行遗传修饰，使他们的基因型及表型与人类疾病相一致，可以在与疾病更相关的模型系统中评价化合物。与临床指征有遗传相关性的模型上起作用的化合物，在病人中将获得更高的成功率。在这一技术中，将包含在人类慢性骨髓白血病中的基因转入小鼠骨髓细胞中，然后将这些细胞转入小鼠中，会产生白血病胚细胞危象。非常重要的是，这些胚细胞对一种可能成为癌症靶向治疗的小分子——ST1671 敏感。小鼠遗传模型的主要缺点是成本很高，而且如果没有明显的替代物生物标志，筛选量就只能依赖于体外筛选，从而使筛选量受到限制。其他遗传模型依赖简单的检测点，更有利于更高通量化合物的筛选。将高度敏感的荧光检测与表达荧光素酶的转基因鼠结合，开辟了候选药物评价的新途径。例如，血管内皮细胞生长因子受体 2 启动子可启动转基因鼠中荧光素酶的表达。地塞米松在损伤-修复模型(wound-healing model)中可以抑制荧光素酶的表达及血管发生。利用这些生物影像学技术，化合物药效、生物分布、毒性的平行检测将可能在活体动物上进行。

虽然利用小鼠进行药物筛选的优缺点并存，但是在用于支持药物发现的新靶标筛选中，小鼠的运用是非常关键的。选择性删除或敲除小鼠中某特定已知的基因所产生的表型与采用抑制这一基因蛋白表达的药物所引起的表型相似。条件性基因敲除(在这种方法中，被敲除的基因与可被切除的 LOXP 序列相邻)鼠已经用于检测特定组织或发育中基因敲出后的效果，这可以避免如传统基因敲除所引起的新生致死效应等许多问题。这种技术通过环化重组酶(cyclization recombinationase enzyme, CRE)完成，CRE 可以识别并切除 LOXP 序列及干涉序列(intervening sequences)。通过控制特定组织或可诱导的启动子系统中 CRE 基因的表达，可以控制小鼠中靶基因的敲除。啮齿动物中选择性下调基因表达的更先进方法是 RNA 沉默或 RNAi。RNA 沉默或 RNAi 与编码目的蛋白的不稳定 RNA 转录本相互作用。利用基于小发夹 RNAs 的慢病毒载体(lentiviral vector)产生了转基因鼠，在这种转基因鼠中，目的基因可以被有效地沉默。与传统的基因敲除技术不同，RNA 干扰不能完全抑制靶蛋白的表达。因此可以更有效地模拟药物作用。在这些小鼠中利用条件启动子系统甚至可以在合成靶向活性化合物之前就预测它们的药物效果。基因陷阱(gene trap)及基因化学突变已经被用于研究疾病表型中包含的但目前不知道或没有被重视的基因，如利用 *N*-乙烷基-亚硝基脲随机诱导小鼠胚胎的点突变。与经典基因敲除技术相比，这一技术的优势是在很多情况下，被改变基因的功能只是部分丧失，这可以避免新生致死。但是，其缺点是通过表型的改变不能准确地确定靶基因。

13.2 天然产物的保存与管理

天然产物的获取存在一些局限性：产生天然产物的动植物资源难以大量获得；

天然产物样品量很少；其分离和提取需要较长的周期和繁琐的步骤；难以配合高通量筛选对化合物数量的巨大需求；结构改造难以进行。虽然包括生物合成、高效分离技术在内的许多新技术的应用，使得天然产物的获取变得较以前相对容易，天然产物的保存与管理仍然是整个天然产物活性筛选过程中最基本的内容，它不仅可以为筛选提供高质量的样品及纯化合物，而且还可以保证天然产物在适宜的条件下长期保存，再按照一定标准进行分组和筛选。

13.2.1　天然产物的收集和加工

天然产物样品除最后分离获得的天然产物纯化合物外，往往包括天然产物提取分离过程中不同阶段的粗提物样品组分。以往的研究中，由于天然产物粗提物样品制备时难以进行明确的质量标准规定，所制备的很多样品成分非常复杂。例如，在制备传统中草药天然产物粗提物样品时，曾经有过 1 种中草药入药部位制备为 10 个不同分离组分的方法，依照这样的方法所制备的粗提物样品往往成分是相当复杂的，里面可能仍然有上千种不同的天然化合物。这样的粗提物样品在经过生物活性筛选后出现阳性的概率，既可能由于化合物种类丰富而变得很大，也可能由于化合物浓度太低或太复杂而变得很小，特别是，这样的粗提物样品在进行进一步活性指导跟踪分离时难以有明确的分离目标，活性指导跟踪分离的步骤很多而成功的可能性很低。经过长期的摸索和实践，目前认为在制备天然产物粗提物样品组分库时，还是希望每一组分中不要包含太多的化合物，最好是只包含结构骨架比较类似的 10～50 个化合物组成的较纯的组分。这样的组分库在活性指导跟踪分离时也会更加有效率和成功的可能性。

大的药物研究科研机构和大多数制药公司内部均有专业的天然产物制备部门，负责制备天然产物粗提物组分库、分离天然产物和合成天然产物类似物，至少他们筛选的一部分天然产物或者天然产物类似物是内部分离和进一步结构改造的。明确而详细地记录资源获取、分离提取、结构鉴定、合成路线等信息，可以更合理地利用这些天然产物或类似物，保证其精确再分离与合成。管理自己分离或合成的化合物信息相对容易些，但管理外来天然产物信息就相对困难，而且管理的工作量也会更大。对于化合物供应量较大的外部供应者，最好要求他们熟悉标准的化合物制备、储存数据款项及格式。但是，对于提供少量化合物的合作者，他们就可能因缺少经验，而不能提供完整的化合物信息。对于这种情况，最好将熟悉标准的化合物制备、储存数据款项及格式作为合作项目中的一部分。从一个供应者到另一个供应者，提取物组分或化合物的信息在内容和精确度上都会有变化，因此，有必要最初就建立清晰的基本标准，如提取物组分中包含化合物的数量；怎样确定已给出的化合物结构；能接受的最小纯度是多少；溶液的浓度会被检验吗；怎样检验；能接受的化合物浓度变化范围是多少。通过内部随机抽样或检验程序确定供

应者所提供的天然产物数据也很重要。与天然产物供应者建立良好的信任关系，保证他所提供的天然产物与所提供的数据相一致需要花很长时间，因此往往就不再愿意接受新的供应者所提供的天然产物。

尽管这样，但是当供应者所提供的天然产物的价格很低时，也可以冒险尝试。当内部天然产物分离及合成量不能满足筛选要求时，就有必要从外面购买。从外面购买化合物使公司在分离及合成能力与技术掌握上有一定的灵活性。以前美国和欧洲国家的供应商信用度较高，他们的技术和制造能力也较高。但是最近几年，发展中国家的天然产物生产能力及生产量日益提高，如中国、印度及其他亚洲国家所提供的产品质优价廉。这种扩大的生产力及激烈的竞争给美国和欧洲市场带来了压力。在当今学术界一再强调技术创新与提高的大背景下，天然产物生产能力和技术必将得到更进一步提高。

13.2.2 天然产物样品的保存与管理

不同的科研机构对天然产物采取不同的管理办法，有的将天然产物纯化合物和天然产物提取物单独建立其子库，与其他化合物库隔离开来；也有的将天然产物纯化合物作为化合物库的一个部分，和其他合成来源纯化合物混合建库，而将天然产物提取物单独建立子库。无论如何，上述 10～50 个化合物组成的较纯的组分甚至可以被当作纯化合物进行保存和管理。天然产物纯化合物以及这样的组分库作为广义化合物库的一个重要组成部分，其保存与管理充分借鉴了其他合成化合物的保存与管理方法，进行严格的信息管理和流程操作。

13.2.2.1 固态样品的保存与供给

随着初筛和复筛中化合物活性信息的增多，筛选者通常需要使用固态化合物配制新鲜溶液或用其他溶剂溶解化合物，以替换通常液态化合物储存时所用的溶剂 DMSO。更进一步的合成也需要以固态化合物作为媒介。

在 Pfizer 公司 Sandwich 研发中心，自动化固态样品储存库(automated dry sample bank，ADSB)储存了 500 000 多个样品，并且每个样品都独立分装于约 12 cm^3 的小瓶中。这种储存设备由 REMP AG 公司生产并安装[11]。ADSB 大大提高了工作效率，从申请到得到化合物所需要的时间从以前的 4 天减少到现在的不到 24 h。ADSB 包括两个自动化储存室、一个可以重复称量和盖瓶盖的自动化装置、一个在软件控制下手动操作天平的储存库，以及一个将这些设备集中管理的软件。图 13.6 展示了这个操作系统的流程。去瓶盖、称量、盖瓶盖工作站(the decapping，weighing，and capping station，DWCS)负责称量空瓶的皮重，然后把它送到化学实验室。

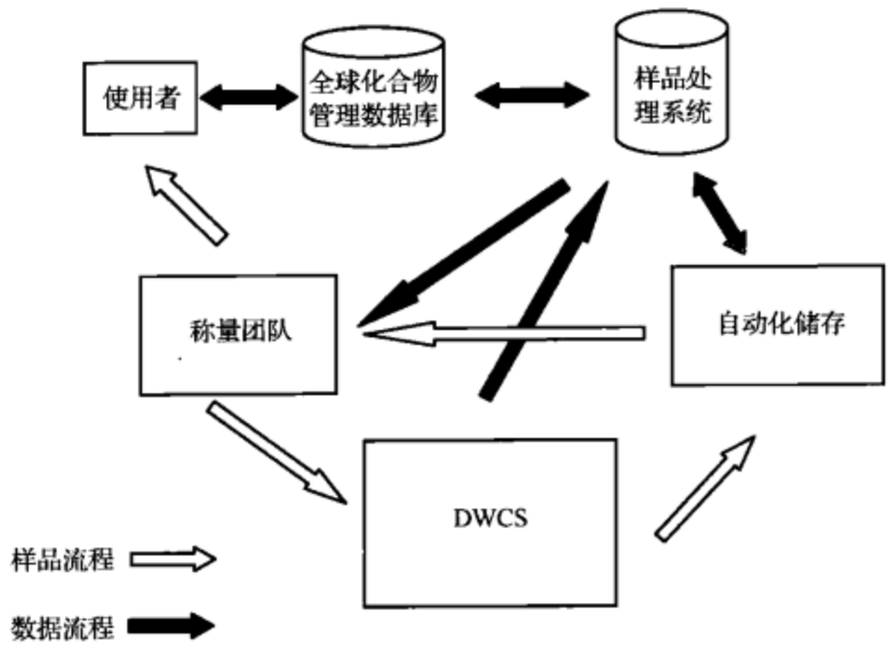


图 13.6　ADSB 操作系统流程

当提交新合成的样品时，被提交样品的质量在 DWCS 被检测，然后样品被储存。如果已经有这种化合物的需求信息，那么这个化合物就会在被储存之前先被转到称量组，被称量后，再回到 DWCS 重复以上程序。这种健全的检测步骤保证了所储存化合物库存量的准确性。

除了能够储存约 12 cm^3 样品的这个主要储存库外，还有另外一个储存库，相对于主要储存库，这个库较小，仅能够容纳 26 000 个 30 mL 的瓶子，用来储存“大量”的固态样品。一些较大的制药公司都拥有相似的固态样品储存供给系统。另外，除了 REMP AG 公司，也有其他很多公司提供功能相似的系统及操作程序。

13.2.2.2　液态样品的储存和供给

1）最初的自动化

比较老的液体储存库是由曼彻斯特生产的自动化液态样品储存库(automated liquid sample bank，ALSB)。这套系统与当时为 Eli Lilly HTS operation Sphinx 设计的系统有相似性，都是－20 ℃储存，并且整合了液体解冻及处理加工的程序。ALSB 在 Pfizer 新药发现中发挥了巨大作用，但是随着时间推移，也暴露出了缺陷。Pfizer 的大量筛选都采用 384 孔板，而 ALSB 只能分装 96 孔板，这样大多数样品必须手工重新分装。由于样品储存在可以多次使用的小管中，分装的过程中必然会反复冻融，这有损于样品的完整性，甚至可能致使样品沉淀。而且这个程序能分装的最小液体体积是 10 μL，远大于很多筛选所需的最小体积，这时这个程序就失去使用价值。这些缺陷，远不能满足 Pfizer 的需求，因此，第二代新的自动化液态样品储库应运而生。

2）现在的自动化

2004 年 4 月，第二个自动化液态储存库 SREMP 投入使用，由 REMP AG 公司生产。样品也是－20 ℃储存于 100%的 DMSO 中，但是这个库的工作模式与 ALSB 完全不同，可以将样品分装入 384 孔板，而且分装管仅单次使用。

在 SREMP 储藏库中，每个可以重复加样 17 次的样品被装入一个封闭的微管中，这个微管安装在 16×24(384)矩阵支架上，这个矩阵与标准的微孔板配套。

每个多次重复加样的样品都以两种体积储存：2 μL(4 mmol/L)，足够单点复筛；10 μL(4 mmol/L)，可以满足多点 IC50 的检测。因为每次用于筛选的化合物都来自于一次性管子，就不会再出现反复冻融的问题。使用 SREMP，样品的传递要比 ALSB 快得多，而且可以直接分装到用于筛选的 384 孔板中。

3）样品储存条件的基本原理

很多制药公司储存液态化合物，但并不是所有的液态化合物都储存在－20 ℃。实验室中，样品一般储存在冰箱冷藏室或冷冻室中，分别维持在 4 ℃和－20 ℃。正是针对这种使用方式，ALSB 及 REMP 公司设计了具有功能针对性的储存库。瑞士 Novartis 的液态样品储存方式有所不同，他们将样品储存在 4 ℃、90%的 DMSO 中。样品储存在 4 ℃，使用时不需要解冻，可是在相对较高的温度下，样品稳定性有可能下降。但是 Novartis 的样品储存时间确实超过 5 年。有的液态样品为了保存更长时间，储存在－80 ℃，在这种极低的温度下，手工取化合物还相对容易些，但是机器自动化系统操作起来就很困难。

前几年，很多学术文章强调最佳储存条件的问题。如 Kozikowski 等关于室温下化合物稳定性的报道[12]表明，在 DMSO 中化合物至少可以存 6 个月。对于储存在－20 ℃，经过反复冻融的样品，特别是经过 10～25 次冻融的样品，其质量有所损坏。对解冻过程中在空气中暴露 2 h 以上的化合物进行组分分析，显示样品并没有出现多余的峰，但是很多样品出现了沉淀，因此可以推断，这一过程中化合物量的减少是由于沉淀而不是降解。但是沉淀产生的原因是，化合物暴露在空气中，DMSO 的浓度由于吸收水分发生了变化，而不是因为反复冻融。实验室内部资料显示，存放于多次使用容器中的样品，由于吸取的过程中多次接触空气，也出现了明显的沉淀。而且，以前的研究也显示当存放样品的小管在样品冻融的过程中一直处于封闭状态时，即使样品经过 20 多次反复冻融，样品的浓度也没有改变。因此，引进样品制备、使用及储存的过程中可以减少水分吸入的仪器应该可以解决这个问题。

4）化合物溶液质量的控制

在适宜温度下，储存于干燥、密封、避光环境中的固态化合物很稳定，可以存放很多年。但是保存在溶液中，特别是溶解在 DMSO 中的化合物，其稳定性就不同了。少量水分对 DMSO 中化合物，特别是对经过反复冻融的化合物溶液的影响很

大。因此，保持 DMSO 的无水状态很重要，但是这种状态很难维持，因为，在化合物溶解及分装的过程中由于 DMSO 的吸水特性总会不可避免地吸入少量水分。而且，很多公司的陈旧设备在当时设计的时候根本就没有考虑这些，直到现在人们才认识到 DMSO 吸水对化合物储存质量的影响。

已经公布的结果表明，所检测的溶解在 DMSO 中的化合物浓度远低于所标注的浓度，从 Amphora、GSK 及 Pfizer 公司抽调的具有代表性的不同批次化合物都存在这一问题。利用激发光散射检测技术（evaporative light scattering detection）对新配制的样品进行检测，发现所检测出的样品浓度与标注值之间的差异是在样品制备时引入的，而不是因为不恰当的储存条件。

因此，化合物实际浓度与所要配制浓度间的差异来自于化合物的质量、样品的制备以及用 DMSO 对化合物的再稀释等过程中。如果化合物是从信誉较高的供应商那里买到的晶体材料，那么化合物经过称量、溶解后，其浓度可能与所要求配制的浓度非常接近。

13.2.3　备用化合物

13.2.3.1　初筛样品分配：BasePlate

SREMP 和 GREMP 储存库可以提供初筛后复筛的液态样品。而 CoE 模型（the center of emphasis model）直接提供包含筛选中每种样品的储存板，这些储存板上的每个发现点（discovery site）能够提供初筛样品。图 13.7 是 Pfizer 公司 Sandwich 研发中心所用的样品分装过程流程图。其初筛的样品由 BasePlate（由英国 Automation Partnership 公司开发的一种微孔板快速重复加样装置）分配。分配时，浓度为 4 mmol/L、于 −20 ℃储存在 384 孔板中的样品先被稀释到 200 μmol/L 的母板（mother plate）上，然后再从这些较低浓度的母板中分配到用于高通量筛选的子板（daughter plate）中。4 mmol/L 的储液可以存放数年，200 μmol/L 的母板储液可以存放数月，而用于初筛的子板储液只是随时使用。通过详细的使用说明，Pfizer 公司所有的分公司都采用这种分配方法，只是不同的地点所使用的设备有所不同。

13.2.3.2　化合物子库及压缩式筛选

Pfizer 公司的化合物库中有数百万个样品，从这个巨大的库中挑选一部分进行筛选可以大大减少工作量。虽然这个巨大样品库中化合物的最可靠代表仍然是库中全部化合物，但是已有的很多工具可以通过分析化合物的选择性从整体上研究化合物的多样性及具有代表性的化学特征。

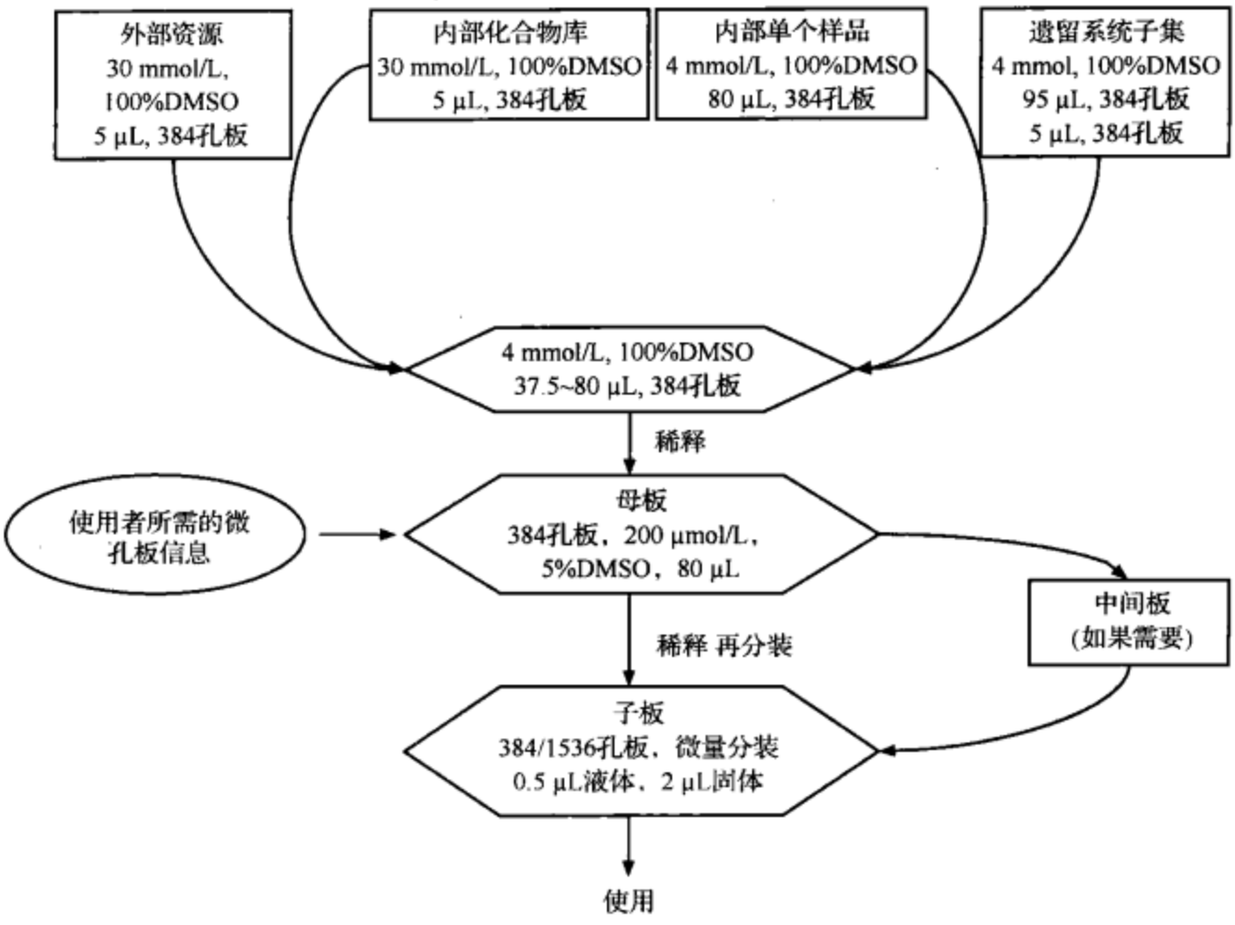


图 13.7 高通量筛选微孔板样品制备流程图

另外也有为不同目的而汇集到一起的化合物子库，并且已在 Pfizer 的所有分公司使用。这些化合物子库当然也包括所有化合物中通过随机取样而得到的随机化合物库。另外，也有特定化合物所组成的子库，如针对 G-蛋白偶联受体或激酶的，选择可能对这些生物学靶标有活性的样品而组建的子库。另一种化合物子库对不同化学特性或传统化学特性具有广泛代表性。这个广泛代表性化合物子库(global diverse representative subset，GDRS)，是通过电子计算机技术最大限度地集合具有不同化学特性的样品而建立的。GDRS 又可以进一步根据低相对分子质量“片段”、类药性、是否符合 Lipinski “rule of five”、碱性、中性等原则分为有所重叠的不同部分，这样可以针对特定靶标选择一个化合物子库，从而找到更多靶标特异性的有效信息。利用 GDRS 所筛选出的有确定活性的化合物，不仅可用于进一步研究，而且可以围绕这一化合物研究与之结构类似的化合物，然后再从筛到的化合物中研究与之结构类似的化合物，直到鉴别出合适的先导化合物。研究数据表明，利用这种方式筛选，只需要筛选化合物总库中 5%的化合物，就可以得到 40%的活性化合物。另一种可能，如果最初筛到的活性化合物恰好是化合物库系列中的一个，那么所要筛选的化合物就可以直接从母板上挑取，而不需要单个从总

库中挑取。

BasePlate 与专利软件包 Mosaic 联合工作，还可以把整个库中的一部分样品分配到新的库中。除了上面所描述的化合物子库外，组成一个化合物子库的化合物还可以是来自特定供应者的化合物，也可以是化合物合成计划中所合成的一批化合物，或者是针对某一特定生物学靶标的化合物。Mosaic 能够在同一个储存装置(Platesafe 储料匣，一次可以存 26 块装有化合物的微孔板)中将来自同一化合物子库的微孔板合并，这样可以以储料匣的方式快速选择化合物子库，而不再以单个微孔板的方式。当需要单个微孔板的时候，Mosaic 目录可以通过 BasePlate 将所需要的单个微孔板放置到适当的化合物库中。Platesafe 储料匣能避免溶剂蒸发，所以微孔板不需要密封，这样可以快速有效地将样品分装到 384 或 1536 孔板中。

筛选化合物子库可以降低筛选成本，但它不能筛选到化合物总库中的每一个样品。Pfizer 公司还使用另一种筛选方式——压缩式筛选(compression)，即每个孔中有多个化合物，每个化合物至少出现在两个孔中。采取自我去卷积运算法则(self-deconvoluting algorithm)鉴别混合物中单个活性化合物。目前这种压缩式筛选方案对筛选的化合物浓度有一定限制，所以有必要开发另一种压缩式运算法则，以筛选高浓度化合物。Pfizer 公司的大多数筛选都使用 384 微孔板，现在越来越多地使用 1536 孔板，这样可以有效利用试剂，合理维持较高的日筛选量。一般来说，较大的制药公司使用 384 或 1536 孔板，有些仍然偏爱于 384 孔板，较小的制药公司或生物技术公司则偏爱于混合使用 96 或 384 孔板，用来筛选较小的化合物库。

13.3　中国的天然产物生物活性筛选及创新药物研究

13.3.1　青蒿素：一个里程碑

青蒿素的发现是一个极佳的例子，充分显示了中国天然产物活性筛选及创新药物研究的进程。一系列的药理学证实，从黄花蒿乙醇萃取的中性粗提物不论对 Camp 种系(氯喹敏感性)还是 Smith 种系(氯喹不敏感)恶性疟原虫都有明显的抑制作用。毒理学研究证实，这种乙醇萃取物不仅在动物上没有明显的毒副作用，临床研究在 30 个病例上也得到了满意的效果。随后，于 20 世纪 70 年代首次纯化出其中的活性化合物，该化合物被证实是一种内过氧化物的倍半萜内酯，即青蒿素。一群中国科学家通过 X 射线衍射分析证实了它的结构[13]。青蒿素结构独特，虽然它缺少在抗疟疾药物中很常见的一个含氮杂环，但大量的研究证实它对包括多重耐药性种系在内的疟疾具有极其显著的治疗作用。从黄花蒿中分离并且鉴定出青

蒿素，被认为是当代草药研究中最重要的发现之一[14]。

青蒿素具有良好的疟疾治疗效果，但其仍存在两个严重的缺点：不溶于水或油，且口服效果差，导致制剂过程中的诸多困难。为了克服这些不足之处，我们对其进行了结构优化并进行了体内代谢过程的研究，发现从尿液中提取的所有代谢产物均不具有抗疟疾效果，而主要原因是由于这些代谢产物不含有内过氧桥结构，这说明内过氧桥是负责青蒿素生物活性的一个重要活性基团。于是，科学家们合成了一系列青蒿素衍生物，并在患疟疾的动物模型上进行了测试，发现 20 多种该类型的衍生物具有良好的、强于青蒿素的抗疟疾效果。例如，在青蒿素合成过程中，将 $NaBH_4$ 及 BF_3-Et_2O 加入到四氢呋喃(THF)中，由此得到的脱氧青蒿素与青蒿素相比，其在体内治疗抗氯喹疟疾的效果增强了 8 倍；而 α-对羧基苯甲醚是稳定的、水溶性的、青蒿素衍生而来的强效抗性疟原虫化合物。

蒿甲醚是一种青蒿素甲醚衍生物，其活性同样强于青蒿素。双氢青蒿素经还原后能得到一种差向异构体混合物，该混合物经甲醇和一种酸催化剂进一步处理后，合成得到蒿甲醚，其通过肌肉注射的方法可有效治疗脑型疟疾。蒿甲醚是双氢青蒿素乙醚 β-异头物，最初是由在上海药物研究所工作的化学家们合成的[15]。该化合物以麻油溶液的形式，以 160 mg/mL 的浓度，通过肌肉注射应用于临床前和临床研究。蒿甲醚几乎不溶于水，但可溶于 50%～100%乙醇和一系列油溶液中。其在加速稳定性研究中被证实能在 50 ℃条件下维持稳定达几个月。其在体外以及不同的动物模型体内都有很好的抗恶性疟原虫药物敏感株的效果。目前，蒿甲醚已在 27 个国家注册，包括法国、泰国、巴基斯坦、苏丹和尼日尔等。

血吸虫病在世界范围内的流行区域和受感染人数仅次于疟疾，排在世界寄生虫疾病的第二名。20 年前，中国的科学家研究发现，蒿甲醚能有效预防血吸虫感染[16]。经详尽的研究后发现，蒿甲醚对寄生虫幼虫的活性最高，而对成虫的效果则显著降低。蒿甲醚杀血吸虫的效果被证实是由于其能导致曼氏血吸虫广泛的超微结构破坏所致。蒿甲醚以 6 mg/kg 口服剂量(每隔 2～3 周)使用时并未出现药物相关性不良事件，并大大降低了血吸虫病的发病率和人体感染血吸虫的程度[17]。吡喹酮与蒿甲醚联合用药时的治疗效果要比其中一种单独使用时更有效。这些研究结论表明，当蒿甲醚与其他控制措施共同使用时，对于治疗不同流行病学阶段的血吸虫病有很大的潜力。

研究表明，肿瘤细胞具有典型的铁离子高摄入量特点，而青蒿素及其类似物可在增加进入肿瘤细胞的铁离子浓度的条件下，选择性的杀死肿瘤细胞。在有二价铁离子存在时，青蒿素具有毒性，从而发挥其抗疟疾作用。全铁转铁蛋白(holo-transferrin)能增加肿瘤细胞中二价铁离子的浓度，青蒿素类似物——双氢青蒿素与其共同使用时，可在体外有效杀死一种耐辐射的人类乳腺癌细胞。而同样的处理可大大减少对正常细胞的影响[18]。进一步研究表明，青蒿素衍生物主要作用于

细胞周期的 G1 期，并具有诱导细胞凋亡的能力。当青蒿素类似物——对羧基苯甲醚与转铁蛋白相互作用时，生成的复合物能选择性杀死人类白血病细胞[19]。通过这些研究成果，揭示了一种崭新的防治某些癌症的治疗策略。

13.3.2　癌症药物

13.3.2.1　砷剂

砷是一种常见的自然存在的物质，作为中药使用已超过 2000 年历史。这一古老的处方含有 95%三氧化二砷(As_2O_3)，除了抗疟疾和鼠疫，曾一度用于治疗癌症(如用于治疗慢性骨髓性白血病)。由于其毒性以及现代医学的进步，这种疗法在 20 世纪初被废止。在 20 世纪 70 年代初期，中国医师发现静注 1%的三氧化砷，可使三分之二的患有急性早幼粒细胞白血病(APL)患者完全缓解[20]。继这一发现之后，一系列的临床研究显示，85%～90%的初诊和复发 APL 患者经砷化合物治疗后均得到完全缓解[21]。因此，有人建议，在 APL 缓解后适当使用砷化合物能防止复发，实现更长的生存时间。进一步的调查表明，三氧化二砷对 APL 细胞能剂量依赖性地发挥双重作用：高浓度诱导细胞凋亡；低浓度启动部分分化。这两个作用都是通过对原癌基因早幼粒细胞白血病维甲酸受体-a(PML-RARa)的快速调控和降解引起的[22]。不久前，商品化的砷化合物 trisenox，在美国、欧洲和日本被批准上市，用于治疗持续和复发的 APL。

13.3.2.2　靛玉红

在中国，中西医结合的处方——当归芦荟丸用来治疗各种慢性疾病已有一段时间了。它涉及的药用植物有当归、芦荟、龙胆、栀子、黄芩、黄柏、黄连、大青叶、木香等。科学家们发现，使用小鼠源 L7212 白血病模型，在这个处方中唯一的有效成分是青黛。虽然已经证实了它具有止血、抗解热、抗炎、镇静、抗细菌和抗病毒的特性，但相关的副作用也不可忽视。由药物化学家和药理学家的共同努力，一个后来确定为靛玉红的活性化合物被证明对大鼠 Walker 肿瘤、小鼠 Lewis 肺肿瘤、C615 乳腺癌和 L7212 白血病存在不同程度的抑制效果。这一化合物在每日 100～500 mg 口服剂量范围内没有表现明显副作用及骨髓抑制作用。临床研究证实其治疗慢性粒细胞白血病缓解率为 87.3%。该化合物已被批准上市，并可能用于治疗其他骨髓增生疾病和嗜酸增生性疾病[23]。

研究靛玉红的作用机制表明，它不仅是一种细胞周期蛋白依赖性激酶的抑制剂，还与其他激酶相互作用，如糖原合成酶激酶 3β。这些结果表明，靛玉红不仅可研发成一种广谱抗癌药，也可作为一种针对某一中枢神经系统(CNS)疾病，包括阿尔茨海默病的新治疗药物。为了进一步提高抗肿瘤疗效，减少副作用，在充分研究

其构效关系(SAR)的基础上,已经发现了更有效的衍生物。

13.3.2.3 斑蝥素

大斑芫菁帕拉斯被中医用来治疗甲状腺肿大。研究显示,其主要活性成分斑蝥素能够抑制实验肝癌细胞株和某些小鼠肉瘤。临床数据显示,在不影响外周白细胞数的前提下其对原发性肝癌的具有良好疗效[24]。实验室研究表明,在肝癌细胞(Hep3B 细胞)上斑蝥素是一种急性细胞毒制剂。该化合物的主要副作用涉及泌尿和消化系统。经过生物活性引导结构改造研究发现了两个毒性较低的类似物,去甲斑蝥和 *N*-羟基斑蝥,两者已被用于治疗原发性肝癌。

13.3.2.4 沙尔威辛

沙尔威辛是一种由传统中药唇形科植物红根草分离出来后,经结构改造的新型二萜醌天然产物[25]。过去 10 年中,各种体内外研究表明,沙尔威辛的药理活性包括抑制恶性肿瘤细胞/移植瘤生长和转移、抑制肿瘤多药耐药作用(MDR)、阻断血管生成[25~28]。沙尔威辛可显著抑制各种实体瘤生长,包括肺、胃、肝、结肠、卵巢癌和宫颈癌,甚至比阳性对照(如长春新碱,依托泊苷)具有更好的疗效。它也显示了对肺癌和胃癌的一些选择性作用。研究发现,沙尔威辛可抑制人微血管内皮细胞和鸡胚绒毛尿囊膜血管新生迁移和管的形成,且能对抗血管生成。另一个重要发现是,沙尔威辛明显抑制了人类乳腺肿瘤原位植入裸鼠体内后的转移。这种抗癌活性与其能够诱导肿瘤细胞凋亡有关,沙尔威辛可时间、浓度依赖性地促使 HL-60 细胞凋亡及端粒酶活性下调。一个令人兴奋的有趣发现是,沙尔威辛对各种多药耐药细胞株具有明显的细胞毒性。最近的研究发现,沙尔威辛是一种新型的拓扑异构酶Ⅱ非配位抑制剂[29]。它促进 K562/A02 细胞 c-jun 基因的表达并抑制多药耐药基因 mdr-1 的表达,通过这一机制,沙尔威辛表现出广泛的抗多药耐药活性作用。沙尔威辛的专利申请已在中国获得批准,并授予了商业开发权。这个化合物的临床试验目前正在中国医学科学院/北京协和医学院进行。

13.3.3 神经退行性疾病药物

13.3.3.1 石杉碱甲和希普林

石杉是最常用的中草药之一,用于治疗挫伤、淤血和腹胀等。石杉碱甲是从石杉中分离出来的一种生物碱。药理学研究显示,石杉碱甲能选择性持续抑制大脑中的乙酰胆碱酯酶,在大鼠以及小鼠模型中,石杉碱甲能很好地促进学习和记忆。临床研究报告显示,石杉碱甲通过增加中枢神经系统中乙酰胆碱而加强胆碱神经能传递。石杉碱甲的活性大约是广泛用于治疗阿尔茨海默氏症的药物四氢胺吖啶

的 100 倍。此外，石杉碱甲的毒性低于其他乙酰胆碱酯酶抑制剂。现在，石杉碱甲在中国市场上是治疗阿尔茨海默氏症专利药。由于石杉碱甲的含量很低，从植物中提取出纯的石杉碱甲是很困难的。因此，化学合成石杉碱甲是批量生产常用的方法。然而，构效关系研究显示，通过有机合成的石杉碱甲需克服其效能差、副作用大、毒性强等缺点。以天然化合物为先导，我国科学家通过化学修饰，根据构效关系研究合成了一系列石杉碱甲类似物，找到了更高选择性、更低毒性的乙酰胆碱酯酶抑制剂希普林(ZT-1)。经体内外研究显示，与石杉碱甲、多奈哌齐、他克林、利斯的明等目前治疗阿尔茨海默氏症的处方药相比，希普林具有对乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶很好的选择性、更好的生物可利用度、更低的毒性和更好地恢复认知损伤作用[30]。希普林作为药物候选物在世界范围内广泛开展临床研究，其临床一期研究已经在欧洲完成。研究结果显示，希普林在(1～3 mg)剂量范围内能明显抑制乙酰胆碱酯酶活性并恢复由东莨菪碱诱导的认知损伤。所有体内指标，包括血液、尿检、生物诊断、血压、心率、心电图和体温在希普林服用前后都没有明显变化，表明希普林没有严重的副作用。因此，在欧洲临床实验中心阿尔茨海默病主任布鲁斯维拉斯教授的指导下，希普林已在欧洲 35 家医院开展临床二期研究。临床二期以及三期结果显示，希普林可能成为由中国科学家研发进入主流国际市场的巴比妥盐丸剂。

13.3.3.2　天麻素

天麻是医用植物，用于治疗中枢神经系统疾病和心血管疾病已有 2000 多年历史(《中华人民共和国药典》，1995)。羟基甲苯吡喃葡萄糖苷是分离得到的天麻的主要活性成分，具有镇静、抗痉挛、抗心脏病和止痛作用，被命名为天麻素[31]。天麻由于根茎中所含天麻素浓度极低，合成方法已解决并应用于工业生产。研究显示，天麻素能保护培养的神经元，降低外围的血管抵抗，增加心肌细胞心率，增强心肌收缩，促进能量代谢[32]。此外，Hsieh 及其同事报道天麻素可以在受到剧烈刺激时巩固并恢复记忆。研究显示，天麻素没有明显毒性。349 例临床诊断显示天麻素治愈神经衰弱症及其综合征和偏头痛的治愈率分别在 89%、86%和 67%。由于天麻是稀有植物，因此，在化学合成以前，从天然产物中分离是极其昂贵的。自 1980 年化学合成后，天麻素生产成本降低了 100 倍。天麻素在中国有多家公司生产和销售。

13.3.4　心血管药物

13.3.4.1　银杏内酯

银杏(*Ginkgo biloba*)长久以来作为一种草药并被正式列入《中华人民共和国

药典》。它是被全世界公认的用于治疗脑血管和心血管疾病、神经衰弱、失眠症、短暂性失忆以及其他伴随老化的认知功能障碍的药物。银杏内酯是从银杏的根、皮以及叶子中提取出来的，有着非常重要的药理性质。在对银杏内酯的结构研究中发现，其具有独特的分子结构，为结合一个叔丁基以及六个五元环的双萜类，包括银杏内酯 A、B、C、M、J 等 5 类化合物。银杏内酯能特异性地抑制血小板活化因子结合到它的受体上，从而阻止血小板的凝集。这一类的天然化合物毒性小并且不容易被代谢，所以长时间以来被人们所应用。在这 5 类化合物中，银杏内酯 B 的生物活性最高。在 20 世纪 90 年代末期，人们运用 CoMFA 这种三维立体定量 SAR 研究方法，对银杏内酯类似物的物理化学性质以及体外的生物活性关系进行了研究。基于 CoMFA 的分析结果，科学家设计了一些新的化合物，其中有三个化合物的生物活性相对于银杏内酯有 2～4 倍的升高[33]。

13.3.4.2 丹参缩酚羧酸盐类

鼠尾草属植物丹参(*Salvia miltiorrhiza*)的根是一种传统中药，一直被作为临床上的常规药物，用于治疗脑血管障碍、心绞痛以及高血压。它不仅具有很好的疗效，而且副作用较小。其中一种有效成分丹参酮Ⅱ-A (tanshinone Ⅱ-A)是一种自发的 L-型 Ca^{2+} 通道阻断剂，可以通过减少心肌以及平滑肌细胞的钙流入从而使周围血管扩张[34]。其中另一有效成分是紫草酸镁 B(MLB)，将 MLB 注入缺血后的兔子心脏可以降低心肌膜的损伤；对大鼠进行静脉注射 MLB(30 mg/kg)后导致血压降低，而心率不变。MLB 对心脏的保护机制可能是其可以直接对抗凋亡，因为 MLB 可以抑制 JNK3 激酶以及应力激活蛋白激酶的活性[35]。

在中国至少有 1000 万人被慢性心绞痛这种疾病折磨着，而包括 MLB 在内的丹参缩酚羧酸盐(depside salts)是一种正在研发之中的用于治疗慢性心绞痛的药物。MLB 作为其中药品质量控制的标准成分，不同于其他丹参制剂。丹参缩酚羧酸盐化学物质组成清晰，通过严格的质量控制程序获得。化学加工过程包括运用冷冻干燥保持多酚化合物的稳定性。实验数据表明，该药物可以在体内以及体外明显地降低心肌梗死的面积并减弱局部缺血性心肌损伤。由于缺乏血液动力学影响，丹参缩酚羧酸盐类可能应用于联合治疗，而不必担心形成低血压以及心动过缓的副作用。另外，它还可以抑制血小板的凝集以及血栓的形成[36,37]。最近这类药物在国内的临床实验已经完成，结果表明丹参缩酚羧酸盐药物具有以下作用：①很好的耐受性；②改善运动引起的心肌缺血症状；③缓解心绞痛。丹参缩酚羧酸盐于近期被批准上市，作为治疗冠状动脉疾病的一种新药。与现有的基于 *S. miltiorrhiza* 的药物相比，丹参缩酚羧酸盐在质量、安全以及功效方面有明显的优势，可以做为中药现代化的一个很好的典范。

13.3.4.3　关附甲素

关附甲素(guanfu base A,GFA)是从黄花乌头(*Aconitum coreanum*)的块茎中提取出来的化学单体。一系列的药理学研究表明 GFA 的生物活性包括:①剂量依赖地降低窦性心律;②调整心律失常模型的心节律。这些活性可能与其在缺乏心肌收缩力的情况下降低心脏的耗氧以及促进冠状血液循环的能力相关。它还可以缓和心肌的快速与慢速反应动作电位。电生理研究表明,GFA 阻断了 Na^+ 的快速流动从而稳定了心肌细胞膜并且延长了有效不应期[38]。GFA 通过静脉注射进入人体以及大鼠体内会被代谢成为 GFI、GFA 氧化物、GFA 葡糖醛酸以及硫酸化物。临床试验结果表明 GFA 对于治疗心律失常以及突发性心悸亢进有显著疗效,并且作用迅速、毒副作用小。作为一类新型抗心律失常以及减慢心律药物,GFA 在市场上拥有广阔的销售前景。

13.3.5　代谢性疾病药物

小檗碱(berberine, BBR)是一种植物碱,在中国有着悠久的药用历史,作为一种非处方药用于治疗细菌性腹泻。它存在于北美黄连(*Hydrastis canadensis*)的根、茎及茎皮中。BBR 的化学结构于 1910 年被发现,1969 年实现了人工合成。BBR 浸膏剂以及汤剂具有很好的抗菌作用,并可抵抗多种病原微生物,如细菌、噬菌体、真菌、原生动物、蠕虫及衣原体。目前 BBR 在临床中主要应用于细菌性腹泻、肠内蠕虫病以及眼睛颗粒性结膜炎。BBR 具有多种与抑制细菌相关的药理学性质:①抑制微生物的新陈代谢;②抑制细菌肠菌素的形成,肠液积累以及离子分泌;③消炎;④抑制结肠与膀胱癌细胞系中环氧化酶-2(COX-2)的转录以及 *N*-乙酰转移酶的活性;⑤抑制小鼠肉瘤细胞的生长。在对 BBR 几十年的研究中,发现了一些对心血管系统及脂类代谢有利的影响,包括抑制血小板凝集及快速性心律失常,在初次及继发性血小板减少症中增加血小板的数量,通过增加脾脏及巨噬细胞系统的血流量进行免疫调节,刺激胆汁及胆红素的分泌并降低血脂。

在尝试筛选新型降低胆固醇药物的进程中,发现 BBR 可以增加 HepG2 细胞中低密度脂蛋白受体(LDLR)的表达。对 32 个高胆固醇患者进行口服 BBR 治疗,可以降低 29%的血清胆固醇、35%的甘油三酯类以及 25%的 LDL 胆固醇。用 BBR 治疗患有高脂血症的仓鼠可以降低 40%的血清胆固醇以及 42%的 LDL 胆固醇,而且肝脏中 LDLR 信使 RNA 水平及 LDLR 蛋白分别有 3.5 倍及 2.6 倍的升高。用 BBR 处理肝细胞瘤细胞,发现它可以通过结合到 LDLR mRNA 3′端非编码区的 5′端区段增加信使 RNA 的稳定性,从而上调 LDLR 的表达,这种调控不依赖于固醇类调控元件结合蛋白,而依赖于胞外信号调控激酶的活性,表明这类药物的机制与他丁类药物是不同的[39]。这些发现表明,BBR 可以单独应用于治疗高

胆固醇血症或者与他丁类药物进行联合用药，目前这类研究受到了全世界的关注。

13.3.6 抗感染药物双环醇

肝炎是一种主要的公共健康疾病，影响了中国近 10%的人口。基于从五味子中通过分离提取到的化合物联苯双酯(二羧酸联苯二甲酯)的成功发现，刘及其同事通过构效关系(SAR)研究合成了其类似物双环醇，比其母体化合物具有更好的肝保护作用[40]。药理研究结果表明，双环醇能够通过降低谷氨酸/天冬氨酸转氨酶水平和肝脏病理变化从而减少药物毒性带来的肝损伤。此外，双环醇能够抑制病毒感染的细胞中肝炎病毒的 DNA 复制过程和 B 型肝炎表面抗原/e 抗原(HBsAg/HbeAg)的分泌[41]。目前没有该化合物具有明显毒副作用的报道。

进一步机制研究发现，双环醇的肝保护作用主要通过清除自由基进而稳定细胞膜及核 DNA。在人类肝癌细胞系 HepG2 和 Bel7402 中，双环醇能够引起细胞凋亡并促进甲胎蛋白的表达[42]。最新研究发现，双环醇通过抑制肝脏内 Fas/FasL 的表达和抑制肿瘤坏死因子 TNF-α 的释放，从而减少由伴刀豆球蛋白引起的肝损伤[43]。

对慢性乙型肝炎和丙型肝炎患者进行的多中心双盲随机试验表明，双环醇能够显著改善患者的临床症状和肝酶活性，具体表现在：①2/3 的受试者在服药三个月后症状没有明显加重，这表明服用该药后患者肝炎的复发率较低；②一些受试者出现 HbeAg 阴性和 HbeAg 阳性转换，尤其是那些症状严重的患者；③在已测试的剂量浓度下没有出现明显的毒副作用。目前在 15 个国家和地区的知识产权保护下，双环醇已于 2001 年批准上市，其在治疗病毒性肝炎上表现出了较好的应用前景。

13.4 展　望

自 20 世纪 90 年代以来，特别是近几年来，生物活性筛选技术进入到一个前所未有的快速发展阶段。基因组学、蛋白组学提供给我们如此多的靶点，以至于我们还无法及时确证靶点的可靠性。而天然产物化学方面新技术、新手段的组合应用也已经提供给我们大量的天然产物来源化学实体，以至于我们无法及时地在不同的靶点上筛选它们。同时，现代技术的进步已经使新的筛选模型，新的检测方法、新的数据处理方式、自动化系统等不断地涌现。作为一个现代药物研究者，如何有效地运用这些资源，提高筛选的效率将是一件非常有挑战性的工作。

国内医药研究机构和企业已经越来越注重原始创新，而作为医药产业源头的化合物活性筛选，在药物发现过程中举足轻重的地位也越来越受到他们的广泛认同。尽管“药物发现”作为“产业”在国内的形成还有待时日，但我们已欣喜地看到

随着医药产业近年来的快速发展和国家对创新研究的不断倡导及持续支持，“药物发现”已经拥有形成产业的资本、技术、人才、市场等基本要素。因此随着“药物发现”的发展，天然产物活性筛选必将得到更进一步提高，它在我国创新药物研发中必将发挥越来越大的作用。

参 考 文 献

[1] Knowles J, Gromo CR. A guide to drug discovery: Target selection in drug discovery. Nat Rev Drug Disc, 2003, 2: 63～69.

[2] Bailey D, Zanders E, Dean P. The end of the beginning for genomic medicine. Nat Biotechnol, 2001, 19: 207～209.

[3] Drews J. Drug discovery: a historical perspective. Science, 2000, 287: 1960～1964.

[4] Manning G, Whyte D B, Martinez R et al. The protein kinase complement of the human genome. Science, 2002, 298: 1912～1937.

[5] Alonso A, Sasin J, Bottini N et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. Cell, 2004, 117: 699～711.

[6] Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. Science, 1999, 283: 1544～1548.

[7] Adams M D, Celniker S E, Holt R A et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science, 2000, 287: 2185～2195.

[8] Eisen J S. Zebrafish make a big splash. Cell, 1996, 87: 967～977.

[9] Pérez-Soler R. Can rash associated with HER1/EGFR inhibition be used as a marker of treatment outcome? Oncology (Williston Park), 2003, 17: 23～28.

[10] Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J et al. Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. Mol Carcinogen, 1999, 24: 153～159.

[11] REMP A G. http://www.remp.com.

[12] Kozikowski B A, Burt T M, Tirey D A et al. The effect of freeze/thaw cycles on the stability of compounds in DMSO. J Biomol Screen, 2003, 8: 210～215.

[13] Liu J M, Ni M Y, Fan J F et al. The structure and reaction of arteannuin. Acta Chim Sin, 1979, 37: 129～141.

[14] Klayman D L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. Science, 1985, 228: 1049～1055.

[15] Li Y, Yu P L, Chen Y X et al. Studies on analogues of artemisinin. Acta Pharmacol Sin, 1981, 16: 429～439.

[16] Xiao S, Tanner M, N'Goran E K et al. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. Acta Tropica, 2002, 82: 175～181.

[17] Xiao S, Shen B G, Utzinger J et al. Transmission electron microscopic observations on ultrastructural damage in juvenile *Schistosoma mansoni* caused by artemether. Acta Tropica, 2002, 81: 53～61.

[18] Singh N P, Lai H. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. Life Sci, 2001, 70: 49～56.

[19] Lai H, Sasaki T, Singh N P et al. Effects of artemisinin-tagged holotransferrin on cancer cells. Life

Sci, 2005, 76: 1267～1279.

[20] Zhang P, Wang S Y, Hu L H. Arsenic trioxide treated 72 cases of acute promyelocytic leukemia. Chin J Hematol, 1995, 17: 58～62.

[21] Wang Z Y. Ham-Wasserman lecture: treatment of acute leukemia by inducing differentiation and apoptosis. Hematology (American Society of Hematology Education Program), 2003, 1～13.

[22] Zhou G B, Zhao W L, Wang Z Y et al. Retinoic acid and arsenic for treating acute promyelocytic leukemia. PLoS Med, 2005, 2: 0033～0038.

[23] Tang L. Studies on indirubin and its derivatives. Acta Univ Sci Med Chongqing, 2000, 25: 219～221.

[24] Wang G S. The clinical studies of Canthairidin. Acta Pharmacol Sin, 1980, 15: 119～123.

[25] Zhang J S, Ding J, Tang Q M et al. Synthesis and antitumour activity of novel diterpenequinone salvicine and the analogs. Bioorg Med Chem Lett, 1999, 9: 2731～2736.

[26] Qing C, Zhang J S, Ding J. In vitro cytotoxicity of salvicine, a novel diterpenoid quinone. Acta Pharmacol Sin, 1999, 20: 297～302.

[27] Meng L H, He X X, Zhang J S et al. DNA topoisomerase Ⅱ as the primary cellular target for salvicine in *Saccharomyces cerevisiae*. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22: 741～746.

[28] Miao Z H, Ding J. Transcription factor c-Jun activation represses mdr-1 gene expression. Cancer Res, 2003, 63: 4527～4532.

[29] Lu H R, Meng L H, Huang M et al. DNA damage, c-myc suppression and apoptosis induced by the novel topoisomerase II inhibitor, salvicine, in human breast cancer MCF-7 cells. Cancer Chemother Pharmacol, 2005, 55: 286～294.

[30] Zhu D Y. Structure modification of natural products // Xu RS, Ye Y, Zhao WM. Natural Product Chemistry. 2004, 759～760, 2nd edn. Beijing, China: Science Press.

[31] Zhou J, Yang Y B, Yang C R. Chemical studies on *Gastrodia elata* Blume. I. Isolation and characterization of chemical components. Acta Chim Sin, 1979, 37: 183～189.

[32] Lu G P, Wang C Q, Cai Z Q. Pharmacological and clinical studies on injectable gastrodin. Chin Tradit Herb Drugs, 2002, 33: S3～S5.

[33] Chen J L, Hu L H, Jiang H L et al. A 3D-QSAR study on ginkgolides and their analogues with comparative molecular field analysis. Bioorg Med Chem Lett, 1998, 8: 1291～1296.

[34] Xu C Q, Fan J S, Hao X M et al. Blocking effect of tanshinone II-A on L-type Ca^{2+} current of single ventricular myocyte from guinea pig. Chin J Pharmacol Toxicol, 1996, 10: 81～84.

[35] Yang L M, Xiao Y L, Ou-Yang J H. Inhibition of magnesium lithospermate B on the c-Jun N-terminal kinase 3 mRNA expression in cardiomyocytes encountered ischemia/reperfusion injury. Acta Pharmacol Sin, 2003, 38: 487～491.

[36] Wang W, Wang Y P, Sun W K et al. Effects of magnesium lithospermate B on aggregation and 5-HT release in rabbit washed platelets. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21: 859～863.

[37] Wu X J, Wang Y P, Wang W et al. Free radical scavenging and inhibition of lipid peroxidation by magnesium lithospermate B. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21: 855～858.

[38] Chen W, Chen W Z. Discovery of specific bradycardic agent from traditional Chinese medicine. Chin Pharm J, 1998, 33: 132～134.

[39] Kong W, Wei J, Abidi P et al. Berberine is a novel cholesterollowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. Nat Med, 2004, 10, 1344～1351.

[40] Liu G T. Bicyclol tablets: class I new drug for hepatitis in China. Infect Dis Inform, 2002 15: 3～4.

[41] Liu G T. The anti-virus and hepatoprotective effect of bicyclol and its mechanism of action. Chin. J New Drug Clin, 2001, 10: 325～327.

[42] Li Y. Pharmacological studies and clinical application of bicyclol. Infect Dis Inform, 2002, 15: 60～61.

[43] Li M, Liu G T. Inhibition of Fas/FasL mRNA expression and TNF-a release in concanavalin A-induced liver injury in mice by bicyclol. World J Gastroenterol, 2004, 10: 1775～1779.

（李　佳）

第二篇　各　　论

第14章　生　物　碱

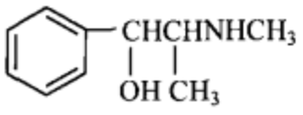
生物碱是植物中含氮的碱性有机化合物(除氨基酸及维生素乙以外),大都有明显的生理活性,是研究得最早最多的一类生物活性成分,也常常是很多中草药中的有效成分。例如,阿片中的镇痛成分吗啡,止咳成分可待因;麻黄中的止喘成分麻黄碱;三棵针、黄连中的抗肠胃道感染成分小檗碱(黄连素);颠茄中的解痉成分阿托品;金鸡纳皮中的抗疟成分奎宁;后来研究较多的萝芙木中的降高血压成分利血平;长春花中的抗癌成分长春碱,等等。生物碱化学的研究大大促进了有机化学与药物化学的发展,并为合成药物提供了新的线索,例如奎宁化学结构的确定促进了氯奎等抗疟药物的合成。可卡因化学的研究导致了局部麻醉药普鲁卡因等的合成。虽然生物碱往往是许多中草药的主要有效成分,但也有不少例外,例如各种乌头和贝母中的生物碱并不代表原生药的疗效。有些甚至是中草药的有毒成分,如马钱子中的士的宁。有些中草药虽然含有几个或几十个生物碱,但有效的往往只有一两种,通常是其中含量最高的一种,其他则无药效。如麻黄中麻黄碱有效,而伪麻黄碱、甲基麻黄碱则无效。又如鸦片中的吗啡与可待因同为有效成分,而蒂巴因却无疗效。随着药学的发展,人们对一些原来被认为是无效成分或有毒的生物碱,现已找到了新的用途,如蒂巴因可用作合成某些强效镇痛药物的原料,士的宁可作为中枢神经兴奋剂。这些都是在研究生物碱时应引起注意的问题。

生物碱在中草药中分布很广,特别是在豆科、茄科、防己科、罂粟科、毛茛科等含量较高。如麻黄、苦参、延胡索、贝母、乌头、三棵针、洋金花、龙葵、百部、麦角、常山、益母草、马钱子等常用中草药,含量高低不等,金鸡纳树皮中奎宁含量高达10%以上,黄连根茎中的小檗碱为8%,而长春花中的长春新碱仅为百万分之一左右。生物碱一般含量在1%就算是比较高了。同一植物中往往含有几个甚至几十个化学结构相类似的生物碱。这些生物碱在植物体内一般均与有机酸或无机酸结合成盐而存在(如奎宁与奎宁鞣酸,吗啡与罂粟酸,其他也常与草酸、枸橼酸及硫酸、盐酸等成盐),只有弱碱往往呈游离状态。还有一些是与糖结合成苷而存在,如藜芦中的 veratrosine 就是由 veratramine 和一个葡萄糖组成的苷。

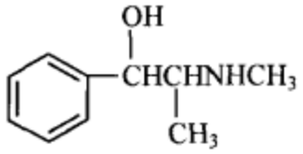
14.1 生物碱的分类

14.1.1 有机胺类

如麻黄中的麻黄碱(ephedrine,**14-1**)及伪麻黄碱(pseudoephedrine,**14-2**)。



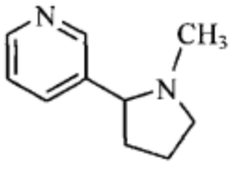
14-1



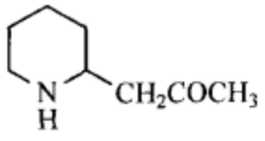
14-2

14.1.2 吡啶衍生物类

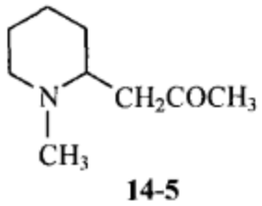
如烟草中烟碱(nicotine,**14-3**),石榴皮中的异石榴碱(isopelletierine,**14-4**)和甲基异石榴碱(methylisopelletierine,**14-5**)。



14-3



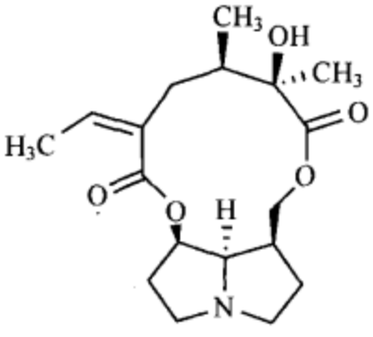
14-4



14-5

14.1.3 吡咯衍生物类

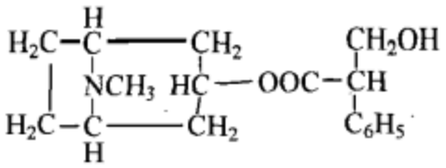
如狗舌草中的狗舌草碱(platyphylline,**14-6**)。



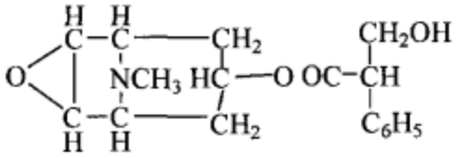
14-6

14.1.4 莨菪烷衍生物类

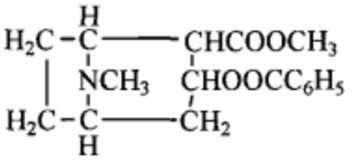
如颠茄、洋金花中的莨菪碱(hyoscyamine,**14-7**)、东莨菪碱(scopolamine,**14-8**)及古柯叶中的可卡因(cocaine,**14-9**)。



14-7



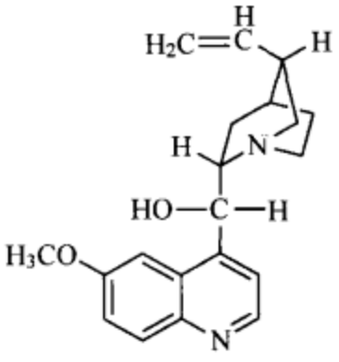
14-8



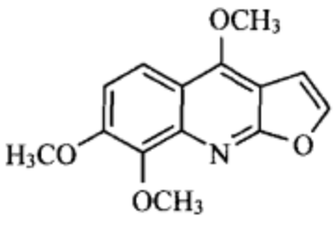
14-9

14.1.5 喹啉衍生物类

如奎宁(quinine,**14-10**)及茵芋碱(skimmianine,**14-11**)等。



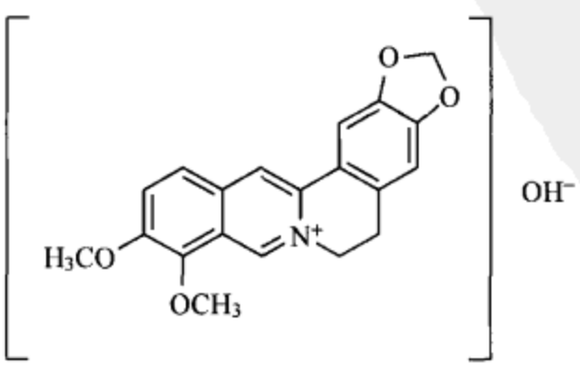
14-10



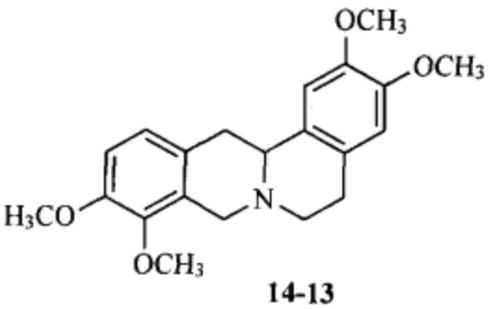
14-11

14.1.6 异喹啉衍生物类

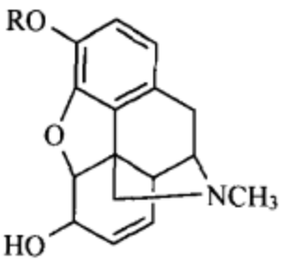
如小檗碱(berberine,**14-12**)、延胡索乙素(四氢巴马丁，tetrahydropalmatine,**14-13**)、吗啡(morphine,**14-14**)、可待因(codeine,**14-15**)、石蒜碱(lycorine,**14-16**)、加兰他敏(galanthamine,**14-17**)及防己科、石蒜科、罂粟科中的许多生物碱都属于这一类。



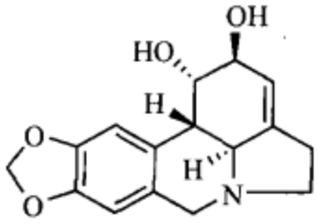
14-12



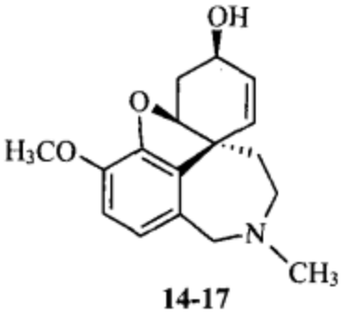
14-13



14-14 R = H; 14-15 R = CH_3



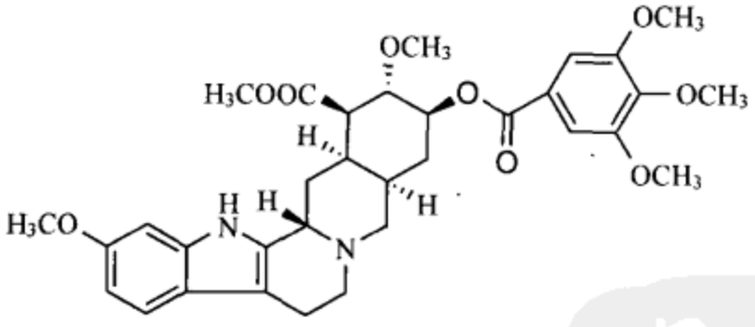
14-16



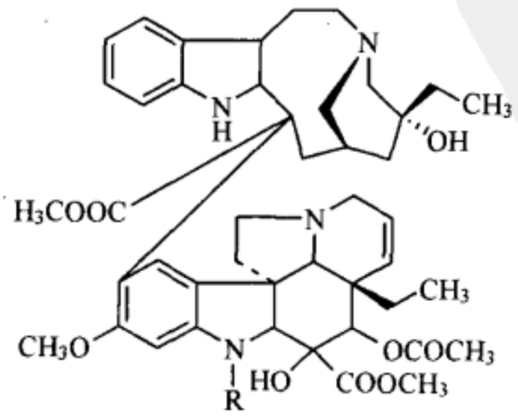
14-17

14.1.7 吲哚衍生物类

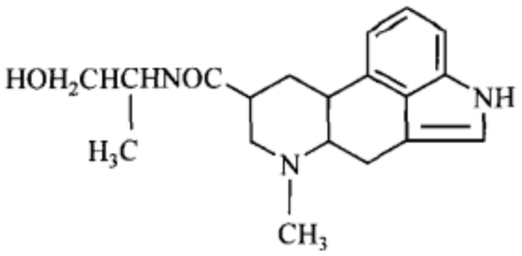
如利血平(reserpine, **14-18**)、长春碱(vinblastine, **14-19**)、长春新碱(vincrisine, **14-20**)、麦角新碱(erometrine, **14-21**)、士的宁(strychnine, **14-22**)、马钱子碱(brucine, **14-23**)等。



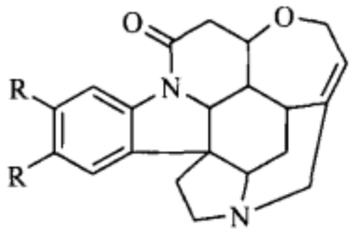
14-18



14-19 R = CH_3; 14-20 R = CHO



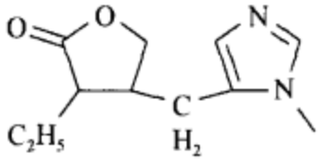
14-21



14-22 R=H; **14-23** R=OCH_3

14.1.8 亚胺唑衍生物类

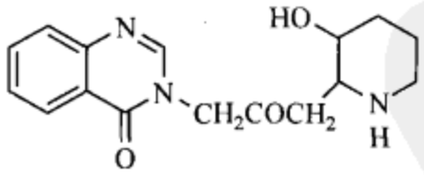
如毛果芸香碱(pilocarpine,**14-24**)。



14-24

14.1.9 喹唑酮衍生物类

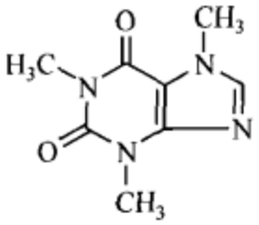
如常山碱(β-dichroin 或 febrifugine,**14-25**)。



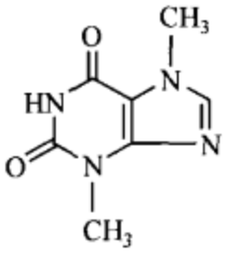
14-25

14.1.10 嘌呤衍生物类

主要有茶叶及可可中的咖啡因(caffeine,**14-26**)、可可豆碱(theobromoine,**14-27**)等几种。



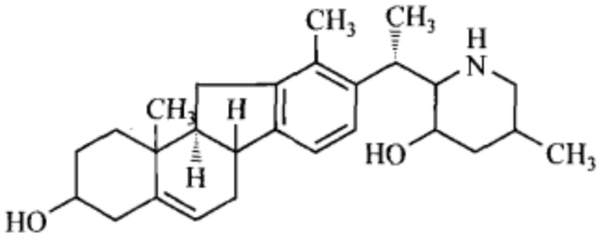
14-26



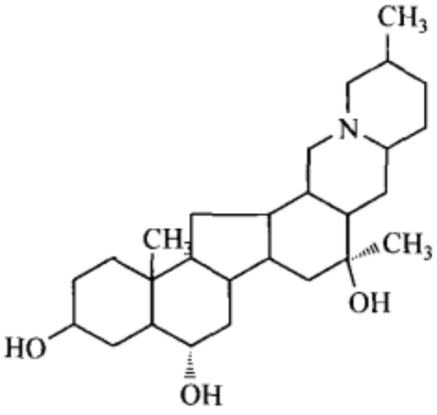
14-27

14.1.11 甾体生物碱类

如藜芦中的藜芦胺(veratramine,**14-28**)和贝母中的贝母碱(peimine 或 verticine,**14-29**)。



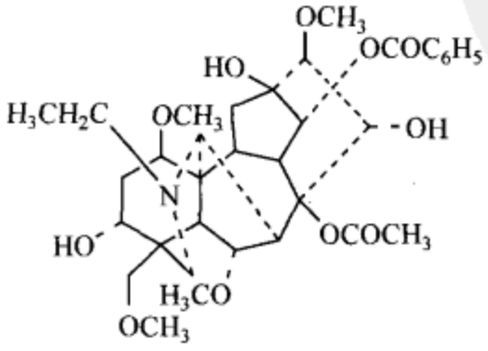
14-28



14-29

14.1.12 二萜类生物碱类

主要为各种乌头碱(aconitine,**14-30**)。



14-30

这种分类方法是比较经典式的，随着新生物碱的不断发现，分类愈加细致，新的类型也不断增加，因不是本书的主要内容，不作详细叙述。

14.2 生物碱的性质

除少数为液体（如烟碱、毒芹碱）外，生物碱多数为结晶性物质，味苦，一般具有旋光性，能溶于氯仿、丙酮、乙醇等有机溶剂中，大部分不溶于水。酚性生物碱能溶于苛性碱溶液。生物碱的碱性有强有弱，一般能与无机酸或有机酸成盐，大部分盐能溶于水，因此它比植物中一些不溶于水的中性成分更便于推广与应用，而凸显其优越性。如临床上常用的硫酸黄连素、盐酸麻黄碱、磷酸可待因、硫酸长春碱等制成的片剂与针剂。某些特殊无机酸（如硅钨酸、磷钨酸）及一些有机酸（如苦味酸等）与生物碱成盐后不溶于水，有时利用这一特性鉴别和分离生物碱。此外，生物碱能和一些显色试剂反应显示各种不同的颜色。

14.3 生物碱的颜色反应

生物碱的显色试剂很多，它们往往因生物碱的结构不同而显示不同的颜色。常用试剂如下。

14.3.1 Mandelin 试剂

Mandelin 试剂为 1%钒酸铵的浓硫酸溶液。阿托品显红色，奎宁显淡橙色，吗啡显蓝紫色，可待因显蓝色，士的宁显蓝紫色到红色。

14.3.2 Fröhde 试剂

Fröhde 试剂为 1%钼酸钠或 5%钼酸铵的浓硫酸溶液。乌头碱显黄棕色，吗啡显紫色转棕色，可待因显暗绿色至淡黄色，黄连素显棕绿色，秋水仙碱显黄色，阿托品、士的宁等不显色。

14.3.3 Marquis 试剂

Marquis 试剂为 0.2 mL 30%甲醛溶液与 10 mL 浓硫酸混合。吗啡显橙色至紫色，可待因显洋红色至黄棕色，可卡因和咖啡因不显色。

14.3.4 浓硫酸

秋水仙碱显黄色，可待因渐显淡蓝色，小檗碱显绿色，阿托品、可卡因、吗啡及士的宁等不显色。

14.3.5 浓硝酸

吗啡显红蓝色至黄色，可待因显黄色，士的宁显黄色，乌头碱显红棕色，阿托品、可卡因、咖啡因不显色。

14.3.6 浓盐酸

藜芦碱显红色，小檗碱在加氯水情况下可显红色，其他大部分生物碱均不显色。

14.4 生物碱的鉴别

生物碱的鉴别常用的方法有两种。一种方法为，取 2 g 生药粉末，用 80%左右乙醇热提 2 次(每次 20 mL 左右)，合并提取液，蒸去乙醇，浓缩后滴加 5%盐酸使成酸性，过滤，滤液待试。

另一个方法为，取 2 g 生药粉末，加 1 mL 12%氨水及 20 mL 氯仿浸泡 2 h，过滤，滤液用 2 mL 5%盐酸提取，提取液待试。但此方法不适用于鉴别水溶性生物碱。

将上述待试液滴在滤纸上，滴加碘化铋钾试剂(见附录)，显棕色或橙色斑点为阳性反应。也可在待试液中滴加碘化汞钾试剂(见附录)或 5%硅钨酸水溶液，有浑浊或白色、淡黄色沉淀生成为阳性反应。同时可用薄层色谱展开后用碘化铋钾试剂或碘蒸气显色，以棕色斑点显示有几个生物碱。

14.5 生物碱的提取方法

14.5.1 有机溶剂提取

常用二氯甲烷或氯仿。因生物碱在植物体内常与酸结合成盐，提取时应先将生药粉末与少量碱水(如 10%的氨水、碳酸钠或石灰水溶液)拌匀或磨匀至湿润为止，使生物碱转成游离状态，再用有机溶剂浸泡或渗漉(溶剂用量一般约为生药量的 10 倍)，浸出液中的生物碱用稀酸水(如 1%～2%盐酸)提取 3～5 次，至提取液不含生物碱为止。每次酸水量为溶剂量的 1/10～1/5，这时生物碱与酸成盐而转溶于酸水。酸水液滤清后，用石油醚洗涤 1～2 次以除去一些脂溶性杂质。而后，酸水液加碱水碱化(这时如有沉淀或结晶析出则滤出重结晶)。碱水液先用乙醚(或己烷)，后用二氯甲烷或氯仿分别提取 3～5 次，提取溶剂再用水洗涤 1～2 次以除去水溶性成分及碱水，用无水碳酸钾干燥，分别蒸干溶剂，常可借此分得两种性

质不同的总生物碱(见实例3)。这样,当乙醚提取不完全,则二氯甲烷或氯仿又可补充提取,但这种提取液中常含杂质较多,增加了分离工作的难度。提取溶剂可在碱化前即加入,这样,碱化时刚游离出来的生物碱立即转入有机溶剂,提取效率较高。过去曾用苯提取,纯度更高,可同时去除油脂,但苯毒性大,损害造血系统,易燃,现已很少应用。氯仿损害肝脏,二氯甲烷与二氯乙烷毒性小些,但使用时也应注意安全。

用二氯甲烷或氯仿提取时往往出现乳化现象,如酸水提取液用苛性碱碱化,提取时乳化现象更多,因此提取时应尽量避免剧烈振摇,特别在第1次提取时,浓度较高,更易产生乳化层。所以,加入二氯甲烷或氯仿后只需轻轻摇晃分液漏斗即行分层。如此提取2～3次后,在第4次提取时再适当振摇分液漏斗,以期提取完全。如出现乳化层,则先单独分出,而后继续加氯仿提取,这时,乳化现象即明显减少,分出的乳化层可通过静置过夜,或离心、抽滤(必要时可通过硅藻土层滤过),以破坏乳化层。

14.5.2 极性溶剂提取

常用60%～80%的乙醇。将生药粉末用乙醇回流或室温渗漉提取,生物碱及其盐都能被提出。乙醇用量为生药量的7～10倍。提取液蒸去乙醇后,所得浓水液加酸酸化,滤出酸水,用乙醚(或己烷,石油醚)洗涤,酸水用氨水、碳酸钠或石灰水溶液碱化,游离出来的生物碱分别用乙醚、二氯甲烷或氯仿提取,即得总生物碱。若有水溶性生物碱,则留在溶剂提取后的水溶液中(见实例5,石蒜碱等的分离)。这个方法所得的生物碱含杂质较多,但用乙醇比较经济,安全,所以适用于工业生产。

14.5.3 水或酸水提取

生药粉末直接用水或酸水(一般用0.5%～1%硫酸或乙酸)浸泡渗漉或加热提取,然后将酸水液通过强酸性或弱酸性阳离子交换树脂,交换后,用水冲洗柱体,稀氨水洗脱,浓缩洗脱液,即得总生物碱。也可用稀碱洗脱,洗脱液用有机溶剂提取游离生物碱,或加酸使生物碱成盐。如用稀酸洗脱,洗脱液浓缩后可得到生物碱的盐(见实例1)。

除用离子交换法外,也可以将水提液加饱和盐水盐析,使生物碱或其盐类沉淀析出;或将水提液浓缩后加碱碱化;或同时加盐水盐析再用氯仿等溶剂提取。有时加选定的酸于水提液中,使生成不溶于水的盐析出(见实例2)。这种方法简单易行,消耗溶剂不多,适用于工业生产,也便于土法生产。

14.5.4 弱碱的提取

弱碱性生物碱在植物中往往以游离状态存在，因此，可以用二氯甲烷或氯仿等有机溶剂直接提取；而强碱仍以盐的状态留在植物体内。提取前应先用适量水湿润生药，使植物细胞膨胀后，再用有机溶剂提取，以提高提取效率。或用稀的有机酸，如柠檬酸水等湿润生药，以便使一些中等强度的碱也成盐而留在植物体内，再用有机溶剂提取。提取液经酒石酸水抽提，酸水液碱化，二氯甲烷或氯仿抽提即得弱碱部分的总碱（见实例 6）。若生药用水或稀醇提取，浓缩提取液，则因生药中常含一些有机酸而使浓缩液呈弱酸性（如喜树渗漉液浓缩后，pH 5.4），用二氯甲烷或氯仿等有机溶剂振摇，即可将游离弱碱提出，若提取液中混杂有机酸，可视具体情况，用小苏打溶液等洗去（见实例 7）。

14.5.5 水溶性生物碱和季铵碱的提取

这些生物碱不能被一般有机溶剂从水溶液中提出。可先加酸使溶液成酸性，再通过阳离子交换树脂或加雷氏铵盐{Reineckate ammonium，$NH_4[Cr(NH_3)_2(SCN)_4]H_2O$}、磷钨酸、硅钨酸等，使成不溶于水的复盐析出，再通过树脂或用化学方法提出游离碱（见实例 5，伪石蒜碱的提取）。此外，也可用丁醇或戊醇等从碱水溶液中直接萃取，如益母草中的水溶性益母草碱甲就是用戊醇提出的。

14.5.6 一般挥发性生物碱的提取

挥发性生物碱（如麻黄碱）可以用水蒸气蒸馏法提取（见实例 1）。而易升华的生物碱可用升华法提取（如将茶末直接加热升华后，冷凝即得咖啡因）。

14.5.7 超临界流体萃取

近年来超临界流体萃取（SFE）已逐渐推广应用于包括生物碱在内的各类天然物成分。具体内容见第 3 章。

14.6 生物碱的分离和纯化

前面已经提到，一个植物中往往含有几种或几十种生物碱，因此，用上述方法得到的总生物碱还需进一步分离才能得到单体。特别是醇提法与水提法所得的总碱常含有较多杂质，所以在分离前应先进一步纯化总碱，即将总碱溶于酸水，碱化，溶剂提取，这样反复处理几次，或溶于少量二氯甲烷或氯仿等溶剂再通过氧化铝（10 倍量以下）短柱，使杂质留在柱上。然后用薄层色谱检查，以初步判断一下总碱中生物碱的数量和极性大小。如色谱显示生物碱不多，则一般用下述前两法就

能分到单体。

一般常用下述几种分离纯化方法。

14.6.1 分步结晶

利用各种生物碱在不同溶剂中的不同溶解度以达到分离目的。先将总碱溶于少量乙醚、丙酮或甲醇，放置，如果析出结晶，过滤，母液浓缩至少量或加入另一种溶剂，往往又可得到其他生物碱结晶。如实例3中延胡索中6个生物碱都是根据这一原理分离的。

14.6.2 制备衍生物

许多生物碱的盐往往比游离碱更易于结晶，因此，可利用其盐在各种溶剂中的不同溶解度进行分离，分纯后再使转成游离碱。常用作制备盐的无机酸有盐酸、硝酸、硫酸、磷酸、氢溴酸、氢碘酸及过氯酸，有时也用氯金酸和氯铂酸；有机酸则有酒石酸、草酸、水杨酸、苦味酸和苦酮酸。其中以氢碘酸盐、过氯酸盐，酒石酸及苦味酸盐最易成结晶。如用莲心碱制备各种盐时，仅过氯酸盐得到结晶。操作时将总碱溶于适量丙酮或乙醇，滴加酸液（最好用饱和氯化氢乙醇溶液，或5%～10%硫酸乙醇溶液等）至刚呈酸性为止。放置使析出结晶。如有胶质析出，则倾去酸液，胶质反复用丙酮、甲醇或无水乙醇处理；或加热溶解，放冷；或溶于乙醇后加乙醚等极性小的溶剂至微浑浊，放置，往往能析出结晶。有些生物碱的盐有吸水性，应用无水乙醇及无水乙醚反复处理。而一些易于和酸成盐的生物碱，制备时只需在乙醇中加酸至酸性即能析出结晶。生物碱的盐如为结晶，由于纯度提高，则转为游离碱后往往也能得到结晶。即把盐溶于水，碱水碱化，有机溶剂提取，蒸去溶剂即可析出游离碱结晶，也可以用离子交换法转成游离碱。但转化苦味酸盐时要先加18%盐酸少量浸泡1 h，滤去析出的苦味酸，酸水用乙醚洗去残留的苦味酸至无黄色为止。再行碱化，有机溶剂提取，蒸去提取液即得游离碱。

含仲胺碱及叔胺碱的总碱，可以利用仲胺与亚硝酸（常用$NaNO_2+H_2SO_4$）生成亚硝基衍生物、与氯乙酰或氯甲酸乙酯生成相应的酯，而叔胺则与之不起作用的性质，使两者分离。仲胺衍生物加酸水解后又得原物。例如，石榴皮中的异石榴碱（**14-4**）和甲基异石榴碱（**14-5**）的分离即利用氯甲酸乙酯使前者生成相应的氨基甲酸乙酯（沸点150～165 ℃/13 mmHg），而和后者（沸点114～117 ℃/26 mmHg）不起作用，可蒸馏分开。石榴皮碱的氨基甲酸乙酯与浓盐酸加热至120～130 ℃即析出纯石榴皮碱，同时放出二氧化碳及氯乙烷。

有些总生物碱含酚性及非酚性生物碱，如鸦片中的酚性碱吗啡及非酚性碱可待因，则可利用酚性化合物的弱酸性能与苛性碱生成可溶于水的酚盐这一性质而与非酚性碱分开。即将总碱溶于有机溶剂如二氯甲烷或氯仿，乙醚，用2%NaOH

抽提，酚性碱进入碱液，而非酚性碱留在溶剂中，碱液用稀酸中和，氨水或碳酸钠水碱化，有机溶剂提取即得酚性碱（见实例 3）。

含内酯生物碱，可利用内酯溶于碱液开环成盐，加酸又闭环的特点与非内酯生物碱分开（见实例 7）。

14.6.3 利用不同酸碱度

碱度不同的混合生物碱在酸水溶液中，加适量的碱液，有机溶剂萃取，则弱碱先游离析出转入有机溶剂层，强碱与酸成盐仍留在水溶液中。如逐步添加碱量，则游离出生物碱的强度也逐步增强。反之，将总碱溶于有机溶剂，添加不足以中和总碱的适量酸水提取，则强碱先成盐而优先转入酸水层，提出生物碱的碱度随添加酸水量的增加而减弱。根据上述原理，可分离不同碱度的生物碱。操作时可用 pH 控制（见实例 5，加兰他敏的分离），或把添加的酸碱分成几个等分。如将总碱溶于计算量（即中和每克总碱至酸性时所耗酸的量，可预先小量试验求出）的酸中，加一定量的碱使中和一部分（1/5 或 1/10）酸，用有机溶剂萃取，然后再加一份碱，再用溶剂提取，这样即可得 5 份或 10 份先弱后强的不同碱度的生物碱。如加入酸计算量为 100 mL 0.1 mol/L 盐酸，则每次加碱 0.1 mol/L 氨水或苛性碱 20 mL 或 10 mL，即得相应 5 份和 10 份不同碱度的生物碱。如所加碱的浓度为 1 mol/L，则相应的只需加 2 mL 或 1 mL。也可直接用不同 pH 的缓冲液提取（见实例 8）。

14.6.4 分馏

由不同沸点组成的液体生物碱总碱，往往可通过常压或减压分馏分离。如毒芹 *Conium maculatum* 中的毒芹碱和羟基毒芹碱，石榴皮中的伪石榴皮碱、异石榴皮碱和甲基异石榴皮碱等都可通过减压分馏法分离出来。

14.6.5 色谱法

当用一些简便方法还未能达到分离目的时，往往采用柱色谱法，常用硅胶或氧化铝吸附色谱分离，以乙醚、二氯甲烷等溶剂洗脱（见有关章节），若柱色谱结果仍不理想，可采用薄层色谱制备性分离。色谱法的分离能力很强，能使一些含量低、组分复杂的生物碱分到单体。如从长春花中分到 60 多个生物碱，从萝芙木中分到 30 多个。又如过去认为是单体的乌头碱（aconitine）和蝙蝠葛碱（dauricine），通过色谱法又分出了 3 个单体。

在实践中，往往是上述几种分离提纯方法交叉与反复使用，一般首先试用分步结晶或成盐的方法，把能够分出的生物碱先分出，然后它的母液再用柱色谱或利用不同酸碱度方法进一步分离。有时使用不同酸碱度或色谱法只得到有效部位而不能分出单体时，可将有效部位再用分步结晶或成盐方法进行分离。总之，应根据具

体情况灵活掌握上述各种方法。

14.7 生物碱提取分离实例

为了进一步熟悉各种提取分离方法，我们选择几个运用上述各种方法且目前仍在应用的生物碱实例以供参考。一种生物碱可以同时用几种不同的方法分到，因此，实例里介绍的方法不一定是最完善的，主要只是为了说明某一种方法的应用。此外，有些方法用氯仿、乙醚及苯，应改用二氯甲烷，二氯乙烷，或己烷，石油醚。其中水蒸气蒸馏及离子交换法，我们选用了麻黄碱与假石蒜碱的分离；酸水提取、盐析分离生物碱，则选用小檗碱和巴马汀；延胡索生物碱是采用经典的溶剂方法分离；而石蒜与三尖杉中各生物碱则是用溶剂法配合控制 pH 和色谱进行分离的；长春碱、长春新碱和喜树碱等是从复杂的生物碱中提取分离弱碱性生物碱的例子；最后马钱子生物碱与常山生物碱是利用不同溶解度分离的一个代表。虽然前面归纳了几种常见的提取分离方法，但在具体实践中总是灵活运用的，因此在选择一个新植物品种中生物碱的提取分离方法时，得在实践中综合具体情况进行探索，以便找出有效与简便的方法。

实例 1 麻黄碱

麻黄碱(**14-1**)是从麻黄科植物木贼麻黄(*Ephedra equisetina* Bunge)和草麻黄(*Ephedra sinica* Stapf.)中提出的一种生物碱，临床上用其盐酸盐治疗支气管哮喘、过敏性反应、鼻黏膜肿胀和低血压症等。麻黄是常用治喘中药，为我国特产药材之一。

麻黄中主要生物碱是 *l*-麻黄碱和 *d*-伪麻黄碱(**14-2**)，其中麻黄碱占 80%以上。麻黄碱为无色蜡状或晶形固体，常带半分子结晶水，熔点 40 ℃，沸点 152～153 ℃/25 mmHg，$[\alpha]_D$ −11.2，能溶于水、乙醇、氯仿、乙醚及苯；其水溶液碱性较强；其盐酸盐熔点 216～220 ℃(分解)；其草酸盐熔点 249 ℃(分解)，难溶于水。伪麻黄碱是麻黄碱的立体异构体，熔点 119 ℃，$[\alpha]_D$ +51.2，难溶于水。其盐酸盐熔点 181～183 ℃，能溶于氯仿；其草酸盐熔点 218 ℃，能溶于水。麻黄碱和伪麻黄碱与多数生物碱不同，它们分子中的氮原子不在杂环内，而在芳香环的侧链上，因此它们与碘化汞钾等试剂不生成沉淀，仅与碘化铋钾试剂呈阳性反应。

生产上常根据麻黄碱与伪麻黄碱草酸盐在水中的不同溶解度和它们的盐酸盐在氯仿中的不同溶解度加以分离。分出的伪麻黄碱可经盐酸等处理使转化成麻黄碱。麻黄碱在水中溶解度较大，所以提取时常将水溶液盐析后再用有机溶剂萃取。这里仅简单介绍两个实验室方法[1]。

溶剂萃取法：麻黄草粉用0.5%盐酸浸泡，水浸液加碳酸钠中和到pH 6，浓缩至每克生药1 mL左右，再加碳酸钠碱化，氯化钠饱和，乙醚提取，提取液蒸至少量后滴加氯化氢乙醇溶液至酸性，析出盐酸麻黄碱粗品，过滤，用氯仿洗去伪麻黄碱盐酸盐，乙醇重结晶，即得盐酸麻黄碱。

水蒸气蒸馏法：麻黄草粉盐酸浸取液减压浓缩至1/4，加石灰碱化，水蒸气蒸馏，收集馏出液于草酸溶液中，析出的草酸麻黄碱使溶于热水，加氯化钙水溶液分解，滤去沉淀的草酸钙，滤液用活性炭脱色，浓缩即得盐酸麻黄碱，乙醇重结晶得纯品。草酸麻黄碱母液中的伪麻黄碱加氯化钙水液同样处理即得伪麻黄碱盐酸盐。

实例2　小檗碱

小檗碱又称黄连素(Berberine，**14-12**)是毛茛科黄连(*Coptis chinensis* Fran.)和芸香科黄柏(*Phellodendron amurense* Rup.)等植物中提出的一种黄色生物碱。因黄连为贵重中药，现多用十大功劳属(*Mahonia* Nutt)及小檗属(*Berberis* L.)植物三颗针(*Berberis julianae* Schneid)等提取。临床上小檗碱的盐酸盐常用于治疗肠胃道感染，对痢疾杆菌、葡萄球菌和链球菌等均有抑制作用。

小檗碱是一种季铵碱，微溶于水，能溶于热水及乙醇中。盐酸盐难溶于水，但易溶于热水，而硫酸盐则易溶于水，生产上即利用这些性质提取盐酸小檗碱。其方法如下：

取三颗针的根粉碎后用0.5%～1%硫酸浸泡一昼夜，次日倾出或渗漉，提取液(一般可收集8～10倍量，后一半留作下一批套用)加氯化钠饱和，10%盐酸中和至酸性，放置过夜，滤取析出的盐酸小檗碱粗品。精制时将粗品加热水溶解，用石灰乳调节到pH 8.5～9.8，冷却，滤除杂质，滤液加浓盐酸至pH 2，冷却至30 ℃以下，滤取析出的沉淀，水洗至中性，再用5～10倍量稀乙醇溶液(约70%)加热至溶解，过滤，冷却，滤取析出的盐酸小檗碱精品[1]。

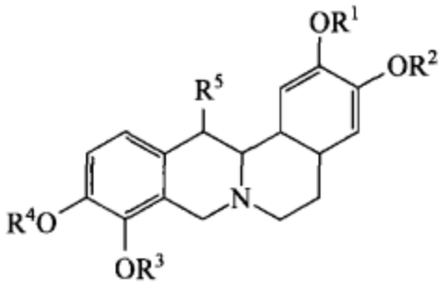
实例3　延胡索生物碱

延胡索(罂粟科紫堇属 *Corydalis turtshaninovii* Bess. f. *yanhusuo* Y. H. Chow et C. C. Hsü)，过去误定为 *Corydalis ambigua* Cham. et Sch.，是常用中药，能活血散瘀，利气止痛。赵承嘏曾从中分得13个生物碱，现除辛素由于当时条件限制，没有分纯之外，我们已对其余的结构进行了鉴定(实际只有9个，有些是同一化合物，延胡索壬素和延胡索癸素相同；延胡索己素、延胡索子素与延胡索丑素相同)，结果如表14.1所示[2]。

表 14.1 延胡索中的生物碱

名称	熔点/℃	鉴定
延胡索甲素	136	d-延胡索碱(d-corydaline，**14-31**)
延胡索乙素	148	dl-四氢巴马汀(dl-tetrahydropalmatine，**14-13**)
延胡索丙素	201	普托品(protopine，**14-35**)
延胡索丁素	204	l-四氢黄连碱(l-tetrahydrocoptisine，**14-32**)
延胡索戊素	219	dl-四氢黄连碱(dl-tetrahydrocoptisine)
延胡索庚素	242	紫堇球碱(corybulbine，**14-33**)
延胡索癸素	118	d-海罂粟碱(d-glaucine，**14-37**)
延胡索丑素	236	l-四氢非洲防己胺(l-tetrahydrocolumbamine，**14-34**)
延胡索寅素	160	α-别隐品碱(α-allocryptopine，**14-36**)

其中镇静镇痛作用较强的延胡索乙素已成常用药品。延胡索丑素也有较强的镇静镇痛作用。这里介绍一种分离 6 种生物碱的简单分离方法。主要利用某些生物碱的盐酸盐能溶于氯仿而与其他不溶部分分开，再配合分步结晶法分离[3]。

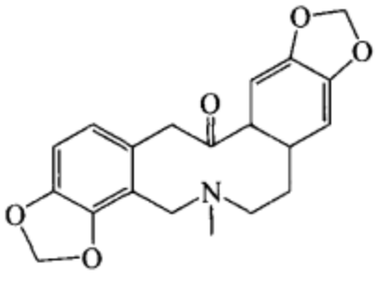


14-31 $R^1=R^2=R^3=R^4=R^5=CH_3$

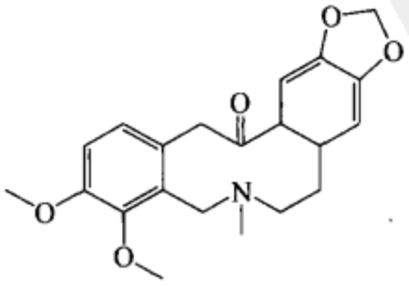
14-32 R^1, $R^2=R^3$, $R^4=-CH_2-$; $R^5=CH_3$

14-33 $R^1=H$; $R^2=R^3=R^4=R^5=CH_3$

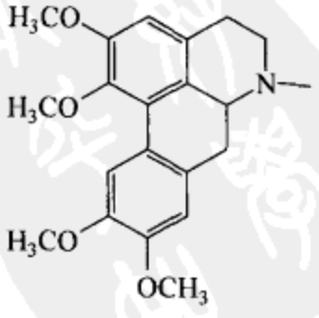
14-34 $R^2=R^3=R^4=CH_3$; $R^1=R^5=H$



14-35



14-36



14-37

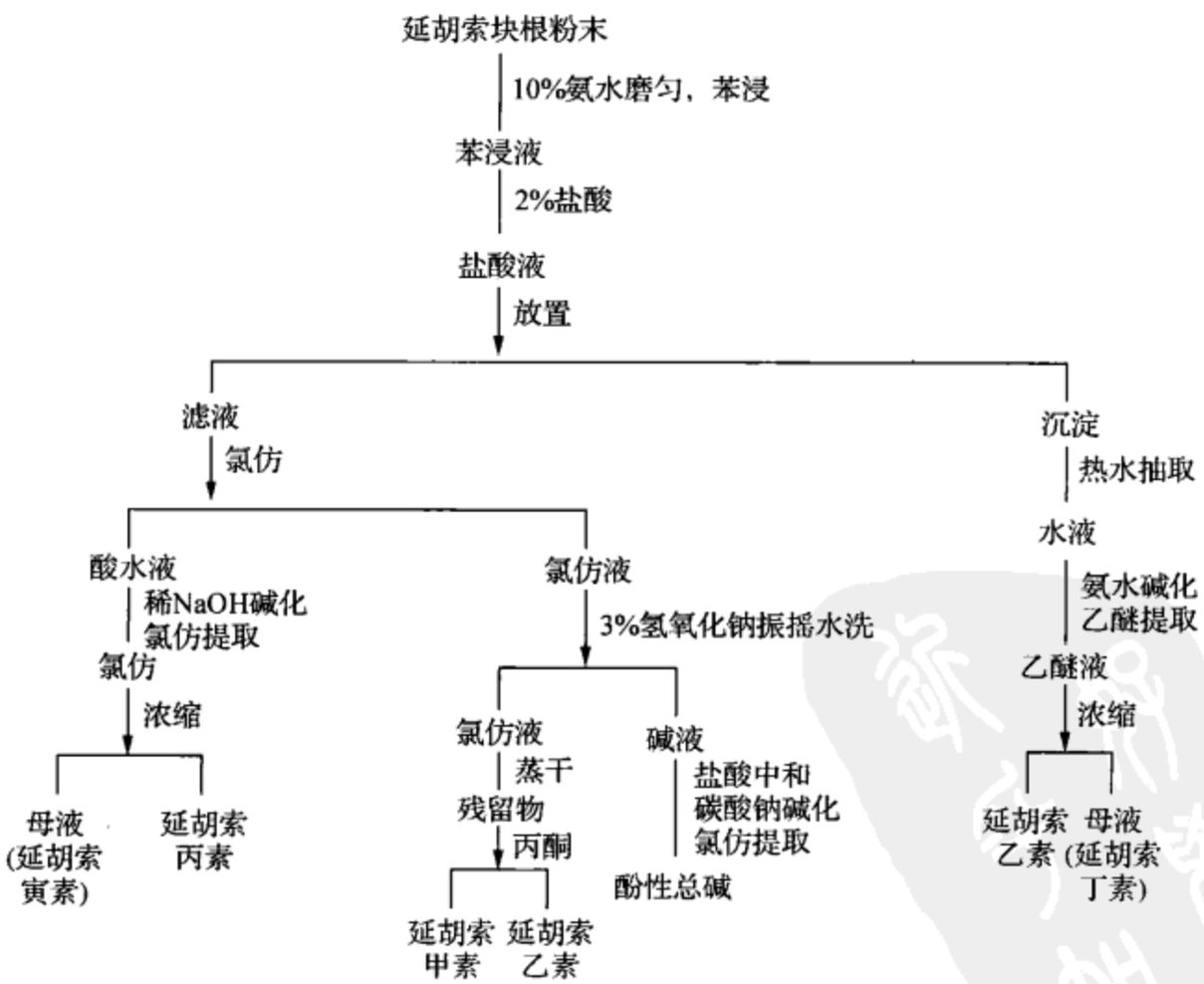
操作：

取 4.8 kg 延胡索块根磨粉，用 10%氨水湿润磨匀后加苯浸泡 7 d，苯浸液用 2%盐酸提取数次，至酸提液对碘化铋钾试剂显色很淡为止。酸提液合并放置，析出不溶于水的生物碱盐酸盐沉淀，过滤。

将沉淀溶于热水，过滤，滤液加氨水碱化，乙醚提取，蒸干，残渣用氯仿乙醇混合液结晶，得延胡索乙素片状结晶，熔点 148 ℃。母液中分得易溶于氯仿的针状结晶；熔点 204 ℃，为四氢黄连碱（延胡索丁素）。

滤去沉淀后的酸水，用氯仿洗涤，少量生物碱盐进入氯仿层，将氯仿液用 3%氢氧化钠振摇，再加水洗涤后，用无水碳酸钾干燥，蒸干氯仿，加适量丙酮析出延胡索乙素。氯仿重结晶，熔点 236 ℃（分解）。母液中又得另一结晶延胡索甲素，用乙醇重结晶，熔点 136 ℃。

提取流程：



3%氢氧化钠液以稀盐酸中和，碳酸钠碱化，氯仿提取得酚性生物碱，未作进一步分离。

氯仿提取后的酸水加稀氢氧化钠碱化，氯仿提取，提取液浓缩后先析出球形结晶，延胡索丙素，熔点 201 ℃（丙酮重结晶）。母液中又析出针状结晶延胡索寅素，丙酮重结晶，熔点 160 ℃。

实例 4 棕榈碱与延胡索乙素

防己科黄藤（*Fibraurea tinctoria* Lour.）中含棕榈碱（巴马汀，palmatine）高达3%左右，经氢化后即得镇痛镇静药物延胡索乙素（四氢巴马汀），而后者在延胡索中含量很低，仅万分之几，这就为生产延胡索乙素提供了丰富的资源[4]。

提取流程：

$$\text{黄藤生药粗粉} \xrightarrow[\text{渗漉}]{1\%\text{乙酸}} \text{渗出液} \xrightarrow[\text{氯化钠盐析}]{\text{NaOH pH 9}} \text{棕榈碱粗品}$$

$$\xrightarrow[\text{回馏，精制}]{80\%\text{乙醇，HCl}} \text{盐酸棕榈碱精品} \xrightarrow{Zn,\ H_2SO_4} \text{硫酸延胡索乙素}$$

操作：

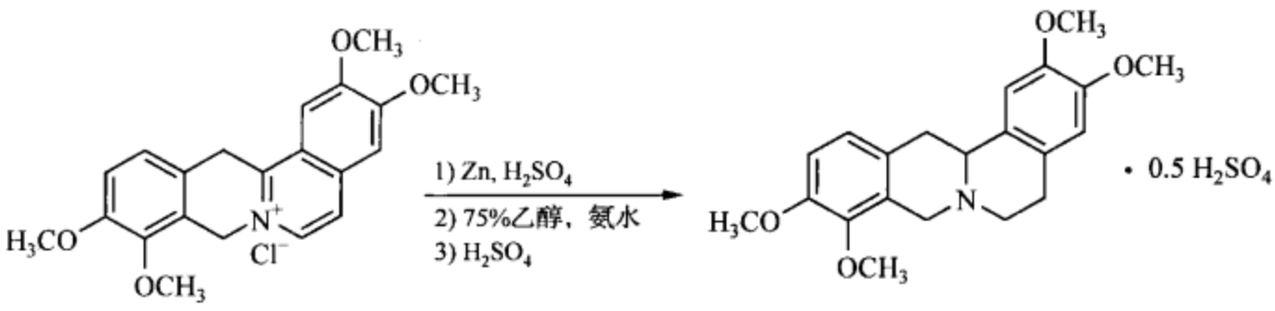
渗漉和盐析：取黄藤生药粉碎，用 1%乙酸润湿，放置渗漉桶内，用 1%乙酸渗漉，每浸 1 次为 24 h，如此浸 5～6 次，最后 1 次用水浸，以所得浸出液为生药量的 12～13 倍为度。第 4～6 次浸出液，作下批的溶剂；第 1～3 次浸出液，加入 7%氯化钠盐析，并用氢氧化钠调节至 pH 9，搅拌均匀，静置一夜。吸去上清液，所得沉淀继续用布袋过滤，得到棕榈碱粗品，再离心去水，于 70 ℃下干燥。

精制：将干燥的棕榈碱粗品粉碎，用 80%乙醇加热回流，提取 5 次，每次 1～2 h，第 3～5 次提取液作为重提下批之用；第 1～2 次提取液，加入盐酸至 pH 2，滤取析出物，离心去水，于 70 ℃下干燥，得鲜黄色盐酸棕榈碱精品。

还原：取盐酸棕榈碱精品，加水、硫酸及锌粉共热还原，不时搅拌，即得延胡索乙素重硫酸盐沉淀。将此沉淀物用 75%乙醇加热回流 40 min，趁热过滤，滤液移入储有氨水的容器中，立即搅拌均匀，静置放冷，滤取结晶，得游离延胡索乙素，于 50 ℃下干燥。

成盐：于反应锅中，加入 4 倍量于延胡索乙素的蒸馏水，再加入计算量的硫酸，混合，加热至 90 ℃，迅速投入延胡索乙素强力搅拌 30 min 以上，并加热至沸腾，调节 pH 4.8～5.6，使完全溶解，趁热过滤，放冷，并常常搅拌，逐渐析出结晶，静置一夜，用离心机脱水后，于 50 ℃以下干燥即得。

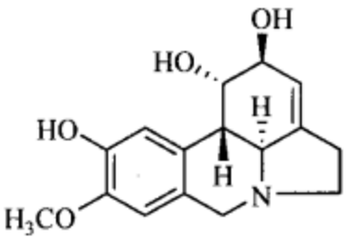
盐酸棕榈碱精品经还原成盐生成硫酸延胡索乙素的反应式可表示如下：



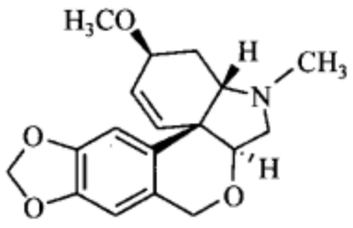
实例 5　加兰他敏

加兰他敏(**14-17**)是很好的乙酰胆碱酯酶抑制剂，用于治疗小儿麻痹后遗症及重症肌无力等症，近来发现可用于延缓老年痴呆病情的恶化，其类似物与衍生物也在研究中。在我国可从紫花石蒜(*Lycoris squamigera* Maxim.)鳞茎中提出，并已投入生产。

紫花石蒜中除加兰他敏外，还有石蒜碱(lycorine，**14-16**)、假石蒜碱(pseudolycorine，**14-38**)及多花水仙碱(tazettine，**14-39**)等多种。



14-38



14-39

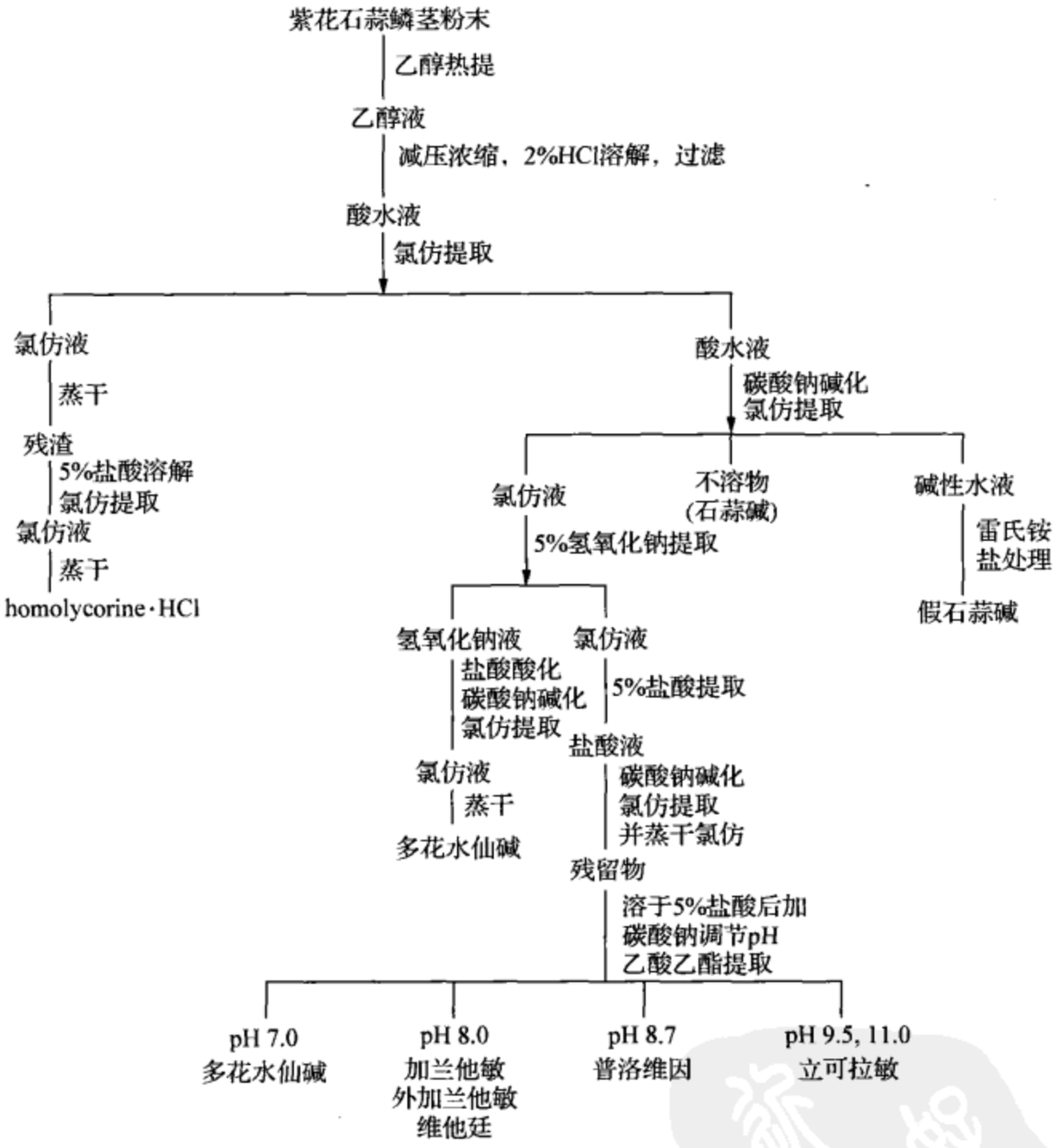
用乙醇法提取总碱，分离时先利用同系石蒜碱(homolycorine)盐酸盐溶于氯仿使从酸水液中分出，再利用假石蒜碱与多花水仙碱溶于氢氧化钠，石蒜碱不溶于水等性质分别处理。其余部分再经过控制不同 pH，并配合氧化铝色谱分离加兰他敏等几种碱[5]。

操作：

生药粉末用乙醇回流提取 6 h，冷却，过滤，反复提取 3 次，滤液合并，浓缩至干。残渣用 2%盐酸溶解，过滤，滤液用氯仿洗涤，氯仿液中除含杂质外，还有少量生物碱盐酸盐。将氯仿蒸干后，用 5%盐酸溶解，过滤，滤液用氯仿提 2 次，蒸干氯仿得同系石蒜碱盐酸盐。乙醇重结晶，熔点 286 ℃(分解)。

氯仿洗涤后的酸水液加碳酸钠碱化，氯仿提取，这时在氯仿层与碱水层中间析出石蒜碱固体，滤取后用 2%盐酸溶解，浓缩，即析出石蒜碱盐酸盐，熔点 212 ℃。

提取流程：



碱水液加盐酸至 pH 2 后加雷氏铵盐饱和水液到不再产生沉淀为止，过滤，水洗，将沉淀溶于丙酮并加等量水，而后用饱和硫酸银溶液分解后，再加氯化钡溶液以除去银离子，滤取水溶液，减压蒸干，残渣用乙醇提取，提取液浓缩到小体积后，放冷，析出无机盐，过滤，滤液浓缩到小量后加丙酮析出结晶，甲醇重结晶，得假石蒜碱盐酸盐，分解点 268 ℃。

另一种方法是取所得雷氏铵盐沉淀 115 g，用 750 mL 丙酮溶解，过滤，滤液加等体积水，然后将此溶液通过 120 mL 强酸性阳离子交换树脂 zerolit 225 柱进行

交换，再用 50%丙酮水溶液洗涤柱体，最后用 4 N 氨水洗脱，洗脱液每 80 mL 为 1 流分，单独蒸干，假石蒜碱主要集中在第 2～4 流分，得 3.6 g，甲醇重结晶，熔点 244 ℃(分解)。

氯仿提取液用 5%氢氧化钠提取，提取液加盐酸酸化，再加碳酸钠碱化，氯仿提取，蒸干氯仿后残渣先用甲醇，后用丙酮重结晶，得多花水仙碱，熔点 210 ℃。

氢氧化钠提取后的氯仿先用 5%盐酸提取，而后酸水液用碳酸钠碱化，氯仿提取，氯仿液蒸干得残渣。取 50 g 残渣用 580 mL 5%盐酸溶解，滴加饱和碳酸钠水溶液，依次在 pH 7.0，8.0，8.7，9.5 及 11.0 分别用 100 mL 乙酸乙酯提取一次，提取液分别蒸干得粗生物碱：

pH 7.0 的粗碱 4.4 g，加少量丙酮放置 1 d，析出多花水仙碱结晶，熔点 212 ℃。

pH 8.0 的粗碱 19.7 g，加少量丙酮溶解，通氢溴酸气体，析出胶质，放置半小时，倾去上层清液，沉淀用丙酮洗 2 次，再用无水乙醇溶解，放置 1 d，析出加兰他敏氢溴酸盐结晶。95%乙醇重结晶，熔点 255 ℃。析出胶质后的丙酮母液和沉淀洗涤液合并，减压蒸干后加水溶解，加碳酸钠碱化，氯仿提取，蒸干得粗生物碱。取 6 g 粗碱溶于少量氯仿后，经氧化铝(120 g)柱进行色谱分离，依次用 300 mL 氯仿、160 mL 丙酮及乙醇洗脱。洗脱液每 20 mL 为一流分。氧化铝薄层色谱检查，氯仿为展开剂，碘蒸气显色，将 R_f 相同的流分合并。第 2～7 流分合并，制成氢溴酸盐，得加兰他敏氢溴酸盐。第 8，9 流分合并，苯重结晶得外加兰他敏(epigalanthamine)，熔点 190 ℃。第 15，16 流分合并，蒸干，加丙酮溶解，过滤，滤液浓缩得维他廷(vittatine)结晶，熔点 208～209 ℃。

pH 8.7 的粗碱 8.3 g，用丙酮加热溶解后，放置一夜，析出普洛维因(pluviine)结晶，丙酮重结晶，熔点 217 ℃。

pH 9.5 的粗碱 19.3 g，用丙酮重结晶得立可拉敏(lycoramine)，熔点 120 ℃，母液制成过氯酸盐，熔点 140 ℃，为立可拉敏过氯酸盐。

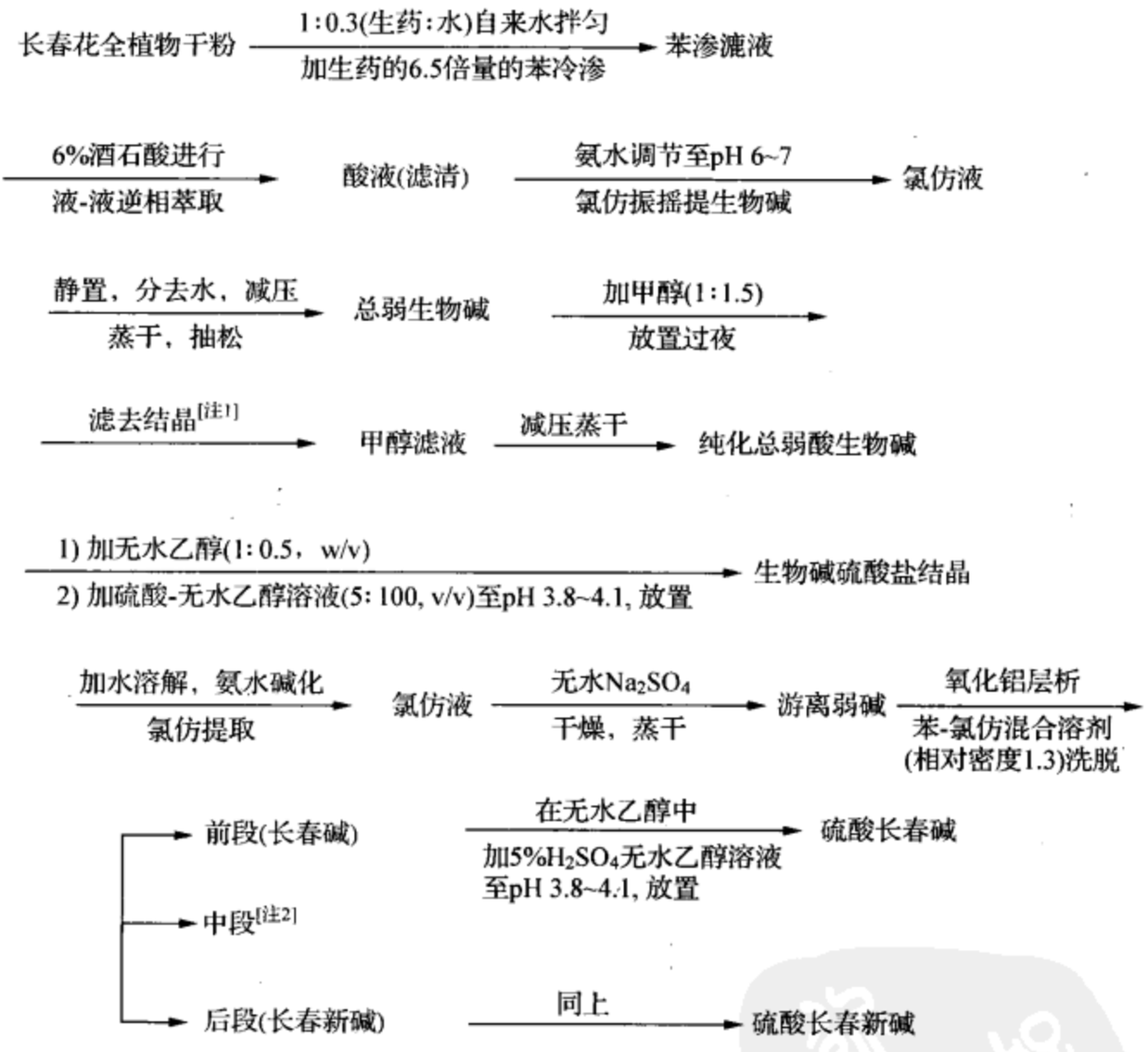
pH 11.0 的粗碱 2 g，经制成过氯酸盐，证明仍为立可拉敏。

实例 6　长春碱与长春新碱[6]

长春碱(vinblastine，**14-19**)和长春新碱(vincristine，**14-20**)系从夹竹桃科植物长春花(*Catharanthus roseus*)中提取出来的两种生物碱。临床上用它们的硫酸盐治疗何杰金氏病、急性淋巴细胞性白血病、淋巴肉瘤、绒毛膜上皮细胞癌等。我国长春花资源极为丰富，是生产长春碱的有利条件。但是长春花全草中所含生物碱多达 60 种以上，其中仅长春碱等少数几种有实用价值，而它们的含量又极低，均为万分之一以下，长春新碱则仅为百万分之一。这里介绍一个比较简便而且得率较高的生产方法。

方法主要根据这两个生物碱都是弱碱的特点，用苯（似可用己烷或石油醚替代）渗漉生药，酒石酸提取弱碱，再通过控制 pH 制备硫酸盐粗结晶，而后经转成游离碱，通过一次氧化铝色谱分离即分得主要为这两个生物碱的单体。

提取流程：



操作：

渗漉和萃取：长春花全植物粉（过 80 目筛孔）加自来水以 1∶0.3（生药∶水）比例拌匀，放置约 0.5 h，投入预先放好苯的渗漉桶中浸没，加盖密闭浸 48 h 后开始渗漉，随时添加苯，不使表面流干。收集生药 5 倍量的苯渗漉液，与 6%酒石酸在 4 支串联的玻璃管中进行液-液逆流萃取[注3]。当第一管酸水 pH 为 4 时，放出，换入新配的酒石酸溶液继续萃取，直至苯液全部交换完，放出第 1～3 管中的酸水液，置分液漏斗中，先加入 0.4 倍的氯仿，然后加约 14%的氨水调节至 pH 6～7，振摇，放出氯仿层，以后又用水溶液体积的 0.2 倍的氯仿摇三次，氯仿提取液静置去

水，减压蒸干，然后加少量丙酮抽松，得总弱生物碱。

纯化：将总弱生物碱加甲醇 1～1.5 倍溶解，放置过夜，滤去结晶[注1]，甲醇滤清液，减压蒸干，抽松，将此游离碱加无水乙醇 0.5 倍溶成浓液，然后加 5%硫酸乙醇溶液至 pH 3.8～4.1，放置过夜，析出混合长春碱硫酸盐。滤出，加蒸馏水1.5～2 倍溶解，移入分液漏斗中，先加 1.5 倍量氯仿，然后加氨水调节到 pH 7～8，振摇，将游离碱提入氯仿，直至最后振摇的氯仿不显明显的生物碱反应为止，共约提 6 次，氯仿提取液加无水硫酸钠干燥，滤出，减压蒸干，得纯化游离弱碱。

长春碱、长春新碱的分离：将上述纯化游离弱碱，在真空干燥器充分干燥后，按 1 g 游离弱碱用 30 g 氧化铝(化学纯)的比例，在氧化铝柱上色谱分离[注4]，洗脱溶剂用重蒸的苯-氯仿混合溶剂(相对密度 1.30)冲洗，分段收集，用板色谱检查[注5]，相同流分合并。前段减压蒸去溶剂，抽干，放 P_2O_5 的真空干燥器中抽干 12 h以上，称重，加无水乙醇 1.5～2 倍溶解，再加 5%H_2SO_4，使无水乙醇溶液至 pH 3.8～4.1，25 ℃以下放置 48 h，析出长春碱硫酸盐结晶，滤出，少量无水乙醇洗后，立即移置真空干燥器中干燥，即为硫酸长春碱粗品，中段为交叉混合物(另行处理)。后段经板层检查的相同流分合并，减压，蒸去溶剂，抽干，置真空干燥器干燥，称重，加无水乙醇 1.5～2 倍溶解，加 4%H_2SO_4 无水乙醇溶液至 pH 3.8～4.1(偏 3.8)，塞紧，在 25 ℃以下放置 48 h，即析出长春新碱的硫酸盐粗品。

精制：硫酸长春碱粗品，加蒸馏水和甲醇使在 60 ℃加热全溶，滤过，容器用甲醇洗，滤液合并，减压回收甲醇，立即将 150 倍量预先加热至沸的无水乙醇加入，迅速摇匀后放置，很快析出白色针晶，放置一段时间后，滤出干燥，即得硫酸长春碱的精制品，熔点 284 ℃(分解)。

硫酸长春新碱粗品，加少量甲醇溶解，过滤，减压浓缩掉部分甲醇，将 30 倍量无水乙醇加入，摇匀，放置过夜，滤出析出的结晶，放干燥器抽干，即为精制硫酸长春新碱，熔点 218～220 ℃。

[注 1] 总弱生物碱加甲醇放置析出结晶，为异长春碱(leurosine)，也有疗效，但只有长春碱的十分之一，所以未用于临床。

[注 2] 纯化游离弱碱用氧化铝色谱分离时，中段是长春次碱和长春新碱的混合物，用 120 倍量氧化铝再色谱分离，洗脱溶剂用苯-氯仿混合液(相对密度 1.28)，分部收集，先出次碱；后出长春新碱，这样还可分得一部分长春新碱。

[注 3] 提取苯与酒石酸进行管道液-液逆相萃取时，4 支玻璃管的直径 3.5～4 cm，长度 1.98 m，1.5 m，1.46 m，1.47 m，装的酸水量分别为 1000 mL，700 mL，500 mL，65 mL，苯自高位槽中流下速度为 6～7 L/h(以投料 120 kg 计算)。

[注 4] 氧化铝预处理：用化学纯氧化铝，加蒸馏水于 60 ℃浸泡 10 min，吸滤，重复 5 次，滤干，在 100～140 ℃烘 6～12 h，冷后用 120 目筛过筛，然后加 10%乙

酸(按400 g加4.5～5 mL的量)降活性,控制在对苏丹红的比移值为(0.30±1)为度,密闭保存备用。冲洗溶剂,用水洗3次,加无水$CaCl_2$干燥12 h,蒸馏调节至相对密度为1.30后,再加0.8%无水乙醇入内即可。

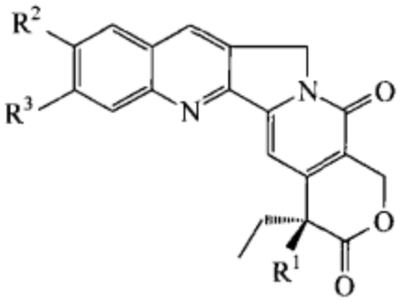
[注5]板层检查的氧化铝,用前加5%～10%水,使活性降至对苏丹红比移值为0.35～0.4即可用。

展开剂:氯仿-乙醚-石油醚(沸程30～60 ℃)(10∶10∶1)。

显色剂:1%硫酸铈铵的磷酸溶液(长春碱显紫红色,长春新碱显蓝色)。

实例7 喜树中的生物碱

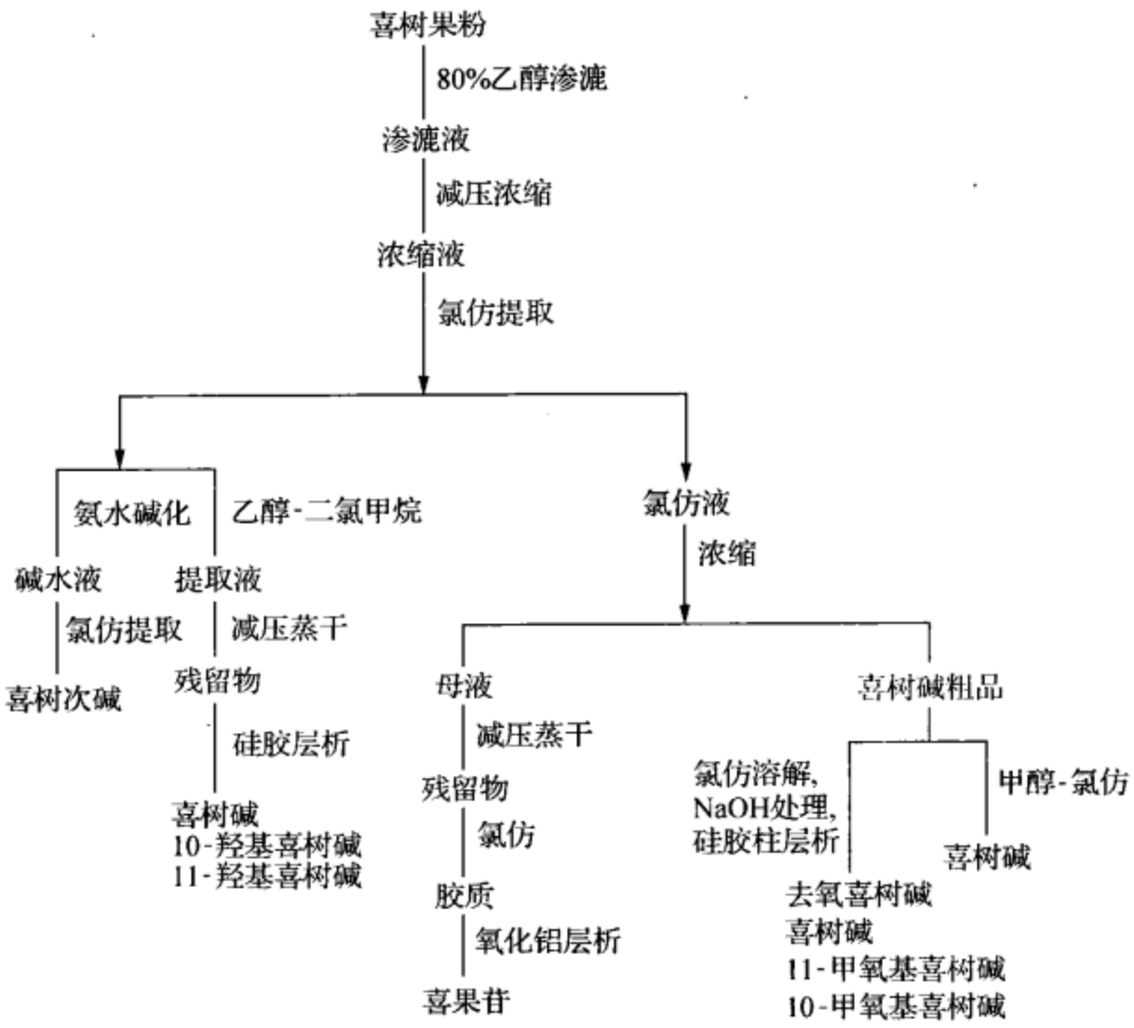
喜树(珙桐科 *Camptotheca acuminata* Decne)是我国特有乔木,分布于长江以南各地区。从其根和果中分得的喜树碱(camptothecin, **14-40**)与10-羟基喜树碱(**14-41**)经临床试用证明对胃癌、肝癌、膀胱癌及白血病等恶性肿瘤有较好的近期疗效。同时还分得10-甲氧基喜树碱(**14-42**)、11-羟基喜树碱(**14-43**)、11-甲氧基喜树碱(**14-44**)、脱氧喜树碱(**14-45**)、喜树次碱(venoterpine)、喜果苷(vincoside-lactam),除脱氧喜树碱、喜树次碱外均对动物肿瘤有明显的抑制作用。



14-40 R^1=OH, R^2=R^3=H
14-41 R^1=OH, R^2=OH, R^3=H
14-42 R^1=OH, R^2=OCH_3, R^3=H
14-43 R^1=OH, R^2=H, R^3=OH
14-44 R^1=OH, R^2=H, R^3=OCH_3
14-45 R^1=R^2=R^3=H

上述各化合物除脱氧喜树碱外都不具有一般生物碱特性,对碘化铋钾反应阴性,不溶于一般有机溶剂,与酸不成盐,都是近中性的弱碱性生物碱,因此提取时不在碱性溶液,而是在弱酸性情况下用氯仿等有机溶剂提取过来的。以后配合柱色谱,碱溶解开内酯环及各种溶剂分步结晶法进行分离[7,8]。

提取流程:



操作：

喜树果粉用80%乙醇浸泡24 h后开始渗漉，收集10倍量渗漉液，减压浓缩至0.6倍生药量，静置过夜，布袋过滤，滤液为弱酸性(pH 5.4)，用二氯甲烷或二氯乙烷，氯仿提取5次(每次用量约为水液的1/4)，蒸干提取液后残留物用200倍以上量的甲醇-氯仿(1∶1)混合液重结晶几次，至薄层色谱(硅胶G，展开剂为氯仿-丙酮=7∶3，v/v)检查为一个斑点为止，得淡黄色片状喜树碱结晶(0.03%)，熔点264～266 ℃。

上述氯仿提取后的水液加0.3倍量乙醇后用二氯甲烷或二氯乙烷、氯仿提取5次(每次用量亦为水液的1/4)，蒸干提取液后用少量甲醇溶解，加提取物3倍量的硅胶拌匀，晾干，再用氯仿浸泡约4次(每次浸泡1 h，用量约为提取物的10倍)，配合上述薄层色谱检查，至喜树碱斑点不明显为止，蒸去提取液又得喜树碱。而后改用氯仿-甲醇混合液(96∶4，v/v)同样浸泡5～6次，蒸去提取液后用300倍量以

上的氯仿-甲醇(1∶1,v/v)混合液重结晶2～3次,得黄色柱状结晶10-羟基喜树碱(得率约0.002%),熔点266～267 ℃(分解)。

如氯仿提取后的水液用氨水碱化,氯仿提取,蒸去提取液,丙酮重结晶,得喜树次碱,熔点129～130 ℃。

喜树碱粗品用30倍量丙酮回流1 h,滤去不溶的喜树碱,滤液蒸干后用二氧六环重结晶,先滤去少量不溶的喜树碱,母液浓缩后即析出淡黄色结晶11-甲氧基喜树碱,熔点264～265 ℃(分解)。

喜树碱粗品先用大量氯仿溶解,氯仿液再用2%NaOH提去喜树碱(喜树碱等开内酯环成钠盐而溶于碱液)。水洗,无水硫酸镁干燥,蒸去溶剂,氯仿-甲醇(1∶1,v/v)混合溶液重结晶几次,得淡黄色针状结晶脱氧喜树碱,熔点272～274 ℃(分解)。

10-羟基喜树碱的母液经甲醇-氯仿(1∶1)混合溶液反复重结晶,配合薄层色谱检查至一个斑点为止,得黄色柱状结晶11-羟基喜树碱,熔点327～330 ℃(分解)。

上述碱液用稀酸中和后析出一些沉淀,不加分离即用含10%甲醇的氯仿溶液提取,提取液蒸干后用少量甲醇调成糊状,用40倍量硅胶柱色谱,先用氯仿,后用含1%甲醇的氯仿液洗脱,先后得脱氧喜树碱、喜树碱、11-甲氧基喜树碱、10-甲氧基喜树碱,甲醇-氯仿(1∶1)重结晶,得淡黄色结晶,熔点254 ℃(分解)。

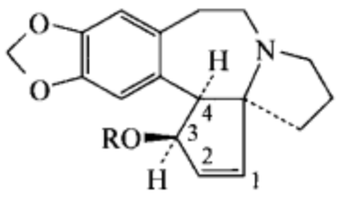
上述喜树碱粗品的母液减压蒸干后用氯仿回流2次,冷却,取出胶状物,使溶于甲醇,通过约10倍量的氧化铝色谱柱,甲醇洗脱,洗脱液浓缩至少量,析出无色针状结晶喜果苷。甲醇重结晶,熔点210 ℃。

上述分离工作均配合硅胶TLC检查,荧光下显色,展开剂为氯仿-丙酮(7∶3,v/v),R_f分别为脱氧喜树碱0.67(蓝色)、喜树碱0.5(蓝白色)、11-甲氧基喜树碱0.53(亮蓝色)、10-甲氧基喜树碱0.50(亮蓝色)、11-羟基喜树碱0.20(暗红色)、10-羟基喜树碱0.18(红黄色)。

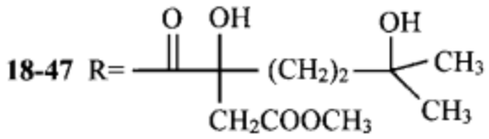
实例8 三尖杉中的生物碱

三尖杉(*Cephalotaxus foytunei* Hook.)是生长在我国长江以南的长绿灌木或乔木,从其枝叶中分得的三尖杉酯碱与高三尖杉酯碱,经临床试用证明对急性非淋巴型白血病有较好的疗效。

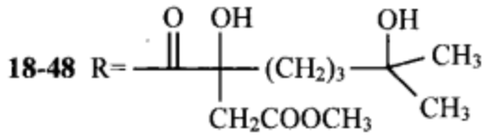
分离方法主要利用不同酸碱度，先后从三尖杉枝叶中分得三尖杉碱（cephalotaxine，**14-46**）、三尖杉酯碱（harringtonine，**14-47**）、高三尖杉酯碱（homoharringtonine，**14-48**）与（+）-乙酰三尖杉碱[9]。



18-46 R=H



18-47 R=



18-48 R=

三尖杉枝叶粗粉用 8 倍量 85%乙醇浸泡 24 h 后开始渗漉，渗漉液合并后蒸去乙醇，于浓水液中加饱和酒石酸液至 pH 2～3，过滤，于滤液内加饱和碳酸钠溶液至 pH 9 以上，氯仿提取，提取液用水洗过，减压蒸干，得总生物碱约 0.16%～0.26%。

将总碱溶于 6%柠檬酸溶液（用量约为生药量的 2%），徐徐加入饱和碳酸钠溶液调节 pH 依次为 6、7、8 和 9。

pH 8～9 部分的生物碱用 10 倍量无水乙醇加热溶解，放置，析出三尖杉碱，乙醚重结晶，熔点 135～137 ℃。

pH 7～8 部分生物碱的氯仿液合并，浓缩至 1/6 后先用等体积的 pH 6.7 的缓冲溶液提取 2 次，提取液用饱和碳酸钠溶液碱化至 pH 9 后用氯仿提取，蒸干氯仿后又得部分三尖杉碱。

经 pH 6.7 缓冲液提取过的氯仿溶液，再用等体积的 pH 5 缓冲液提取 6 次，合并 pH 5 提取液，饱和碳酸钠液碱化，氯仿提取液蒸干，即得混合碱。将此混合碱先用少量氯仿溶解，再经 40 倍量氧化铝柱色谱分离，氯仿洗脱，配合硅胶 G 薄层色谱[展开剂为氯仿-甲醇（9∶1），碘蒸气显色]检查，将含三尖杉酯碱与高三尖杉酯碱的混合物的流分合并（得率约 0.005%），再经 400 倍量硅胶柱分配色谱（流动相为 pH 5 缓冲液饱和的氯仿；固定相为氯仿饱和的 pH 5 缓冲液）分离，配合薄层色谱检查，相同流分合并，可先后得高三尖杉酯碱（甲醇重结晶，熔点 144～146 ℃，得率约 0.002%）与三尖杉酯碱（乙醚重结晶，熔点 70～72 ℃，得率亦约 0.002%）。

最后将 pH 5 缓冲液提取过的氯仿溶液再用 pH 3 缓冲溶液同法处理，所得生物碱为(+)-乙酰三尖杉碱(乙醇重结晶，熔点 140～142 ℃)。

实例 9 士的宁与马钱子碱[10]

马钱子为番木鳖(*Strychnos nux-vomica* L.)的种子，味极苦，剧毒，民间有将马钱子作毒饵除兽。所含生物碱主要为士的宁(strychnine，**14-22**)及马钱子碱(brucine，**14-23**)，士的宁硝酸盐或盐酸盐为中枢兴奋剂。马钱子碱供分析试剂之用，对各种硝酸盐呈特殊红色反应，灵敏度极高，有色金属分析中用马钱子碱测定铋含量。

过去，番木鳖药材及这两种生物碱均需依赖进口，近年来，发现云南地区所产皮氏马钱(*Strychnos pierriana* A. W. Hill.)质量优于进口，其中马钱子碱含量较高，是提取士的宁和马钱子碱较理想的原料。经过反复实践，采用了较简便的工艺，生产出注射用的硝酸士的宁和分析规格的马钱子碱。

从马钱子中提取分离士的宁和马钱子碱，采用马钱子粉碱化，使全部生物碱游离，用苯提取，溶于苯中的生物碱以盐酸抽提，则生物碱从苯转溶入酸液，使油脂去除。为了进一步去粗取精，将酸液碱化，析出的游离生物碱用氯仿提取，得士的宁与马钱子碱的混合物。这两种生物碱虽然结构大同小异，许多理化性质相似，但经过反复实践认识到马钱子碱较易结合成硫酸盐在水中析出结晶，而士的宁则较易结合成盐酸盐，在水中析出结晶，利用这些差异，即可使混合物得到初步分离。再选择适当的有机溶剂分别洗涤各生物碱，并进一步纯化制得单体。现将具体操作方法简述于下：

(1) 提取总生物碱及初步分离：马钱子甚坚硬，形似纽扣，直接磨粉难以粉碎。需先经拌沙炒熟，直火加热，虽然沙中高温近 300 ℃，实践证明炒后马钱子生物碱质与量均无显著变化，说明这种中药炮制方法是科学的。沙炒时间宜短，沙热后才加料，不断翻拌，使其中淀粉变熟，外形膨胀，发出爆响声即可。磨成细粉，使溶剂易渗入组织中，生物碱便于提出。从磨粉开始及以后一切操作中，工作人员必须戴口罩，注意安全防护。马钱子碱虽为剧毒，但皮肤不渗入。

马钱子细粉加 1/10 量石灰拌匀，以适量水润湿，加苯回流 7 次，每次 40 min，加苯量以盖没原料为度。合并苯浸液，常压浓缩，最后体积勿小于原料量的 2 倍，用 6%盐酸提取，加酸量为苯液 1/10，即有白色盐酸士的宁析出，滤出待进行精制时用。苯母液续以 2%盐酸抽提多次，直至提净生物碱为止，合并酸提取液，加 1/3 容量的氯仿，以氨水或氢氧化钠碱化至 pH 12，充分振摇。析出的杂质易乳化，可离心或过滤使分清。再用较少量氯仿提取数次至提净生物碱为止。合并氯仿液，蒸干，即得胶状总生物碱。其中士的宁与马钱子碱含量比例，薄层色谱法初步测试，以乙酸乙酯-苯(2∶1)作展开剂，碘蒸气显色。提得的总碱中如士的宁与马钱

子碱相差不悬殊，即可制硫酸盐进行分离。如士的宁含量远超过马钱子碱，则需将总碱先制成盐酸盐（总碱加 7 倍量以上的水加热近沸，盐酸中和至微酸性），析出盐酸士的宁结晶，滤出待精制用。母液碱化得胶状沉淀，将此生物碱游离体制硫酸盐，析出生物碱硫酸盐结晶，取样进行薄层色谱检查，如马钱子碱多于士的宁，即可供精制马钱子碱用。

（2）马钱子碱的精制：将马钱子硫酸盐粗品（含较少量士的宁），加 5～6 倍水，结晶热溶后，加 3%活性炭微沸 20 min 脱色，趁热抽滤，过夜静置，滤出结晶，反复结晶至无色。每次重结晶均使马钱子碱提纯，士的宁则留在母液中。将较纯的马钱子碱硫酸盐无色结晶，研磨至极细，以 95%乙醇反复洗涤，每次乙醇量为湿结晶的 1/3，搅匀调成糊状，然后吸滤去乙醇液，直至结晶在板层上为一点，干燥后即为纯硫酸马钱子碱。

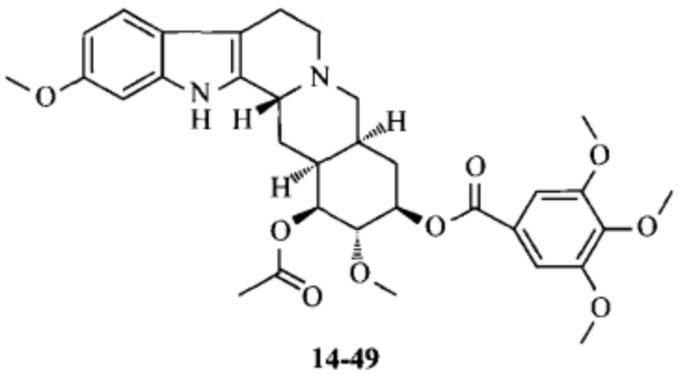
如需制备马钱子碱游离体，可将纯硫酸马钱子碱加水热溶，加氨水碱化至 pH 10 以上，冷后吸滤，游离碱用少量水洗，吸干后加适量 95%乙醇溶液使恰好溶解，在不断搅拌下加 80 ℃水稀释成 80%乙醇溶液，冷后即析出球状簇晶，滤出水洗，80 ℃烘干，为马钱子碱，熔点 178 ℃。

（3）士的宁的精制：盐酸士的宁粗制品，反复进行重结晶。每次用水量为湿结晶 5～6 倍，活性炭 3%微沸脱色 20 min。混杂其中的少量马钱子碱在逐次重结晶中均残存于母液中，最后所得较纯的白色结晶（板层检查仅含微量马钱子），加水热溶，氨水碱化至 pH 10 以上，冷却后抽滤，士的宁游离碱加适量甲醇调成糊状，滤去甲醇液，再以同量甲醇拌洗，至士的宁板层显示一点为止。得白色粉末状纯士的宁，熔点 290 ℃。

（4）硝酸盐制备：湿的游离碱加 10 倍量水共热，浓硝酸稀释成 1∶4，小心中和至 pH 6.5～7，硝酸切勿过量，注意溶液中游离碱固体绝大部分溶解即可，加 3%活性炭续热 20 min，抽滤，冷后所得结晶以 7 倍量水加活性炭重结晶，100 ℃烘干得硝酸士的宁。

实例 10　利血平

利血平（reserpine，**14-49**）是 20 世纪 50 年代从印度蛇根草（*Rauwolfia serpentina*）中分离得到的降血压有效成分，是吲哚类生物碱。它的发现曾掀起了又一阵天然产物的化学研究热潮，并促使抗癌药长春碱、长春新碱的发现。我国化学先驱赵承嘏、傅丰永、姜达衢、刘铸晋等都曾先后对国产萝芙木属植物进行过研究。以云南萝芙木（*Rauwolfia yunnanensis*）总生物碱为主制备的降压灵至今仍在国内临床应用，主要成分仍是利血平。现介绍两种提取方法。



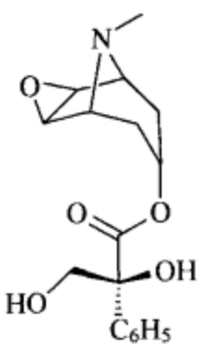
14-49

云南萝芙木根粉 120 kg 用 0.1%盐酸乙醇提取，提取液用氨水沉淀，得总生物碱 1.7 kg，总碱以 10% 乙酸溶解，过滤，滤液先后用 10% 氨水与水洗至中性，减压蒸干得红褐色粉末。该粉末先用乙醚研磨，滤去乙醚，残留物用苯-氯仿混合液溶解，苯部分经硅胶柱色谱分离，1%无水乙醇-苯洗脱至显生物碱反应为止，柱体分段切割，甲醇-氯仿洗脱，TLC 检查，合并含利血平部分，乙醇-氯仿重结晶得到利血平，熔点 257～259 ℃，$[\alpha]_D$ −121.9(*c* 0.42，$CHCl_3$)[11]。

另一种方法是通过制备硫氰酸盐得到利血平纯品。根粉先用水湿润，而后用苯回流提取。提取液浓缩后使溶于甲醇、乙酸与水的混合液(1 g 提取物用甲醇 8 mL，乙酸 1.5 mL，水 6 mL)中，搅拌，过滤，加硫氰酸钾 0.7 g，室温放置使析出利血平硫氰酸盐结晶。纯化时先用甲醇 20 mL 与 5%氨水 7.5 mL 加热溶解，放冷，析出结晶，再用丙酮-甲醇重结晶。熔点 264～265 ℃[12]。

实例 11　樟柳碱

樟柳碱(anisodine，**14-50**)是从唐古特山莨菪(*Anisodus tanguticus*)分得的莨菪烷类生物碱，是我国独立研制的新药，临床用其氢溴酸盐治疗偏头痛型血管性头痛、视网膜血管痉挛、有机磷农药中毒等症。



14-50

两种提取方法如下：

药材根粉用 80%乙醇室温浸渍，浸渍液减压浓缩，氨水碱化，氯仿提取，提取液中生物碱用 15%硫酸提取后再用氨水碱化，CCl_4 提取，冷却，析出莨菪碱(hyo-

syamine)，过滤，滤液用15%硫酸提取，酸液用氨水调节至pH 6，再加碳酸氢钠搅拌调节至pH 8，氯仿提取，氯仿提取液用无水硫酸钠干燥，蒸干得樟柳碱粗品。

上述第一次 CCl_4 提取后的碱水液也可经酸碱反复处理得樟柳碱粗品。

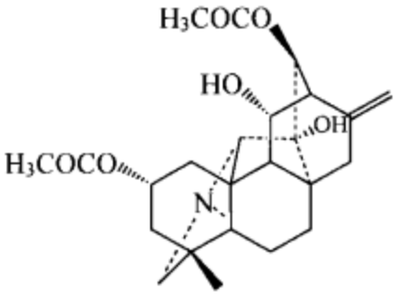
樟柳碱粗品用异丙醇加热溶解，加40% HBr调节至pH 3，加乙醚至微混，冷却，析出樟柳碱氢溴酸盐结晶，乙醇重结晶，熔点193 ℃，$[\alpha]_D$ −29(*c* 1, H_2O)[13]。

樟柳碱也可以从唐古特山莨菪茎叶中分得。

茎叶粉用乙醇回流提取，提取液浓缩至少量，冷却，使叶绿素沉淀，水液用氨水碱化，氯仿提取，氯仿液无水硫酸钠干燥，减压浓缩至干燥得总碱。将总碱加热溶于乙醇，冷却，滴加48% HBr调节至pH 4，放冷，析出结晶用乙醇重结晶得樟柳碱氢溴酸盐，得率约0.06%[14]。

实例12　关附甲素(杨春华，刘静涵)

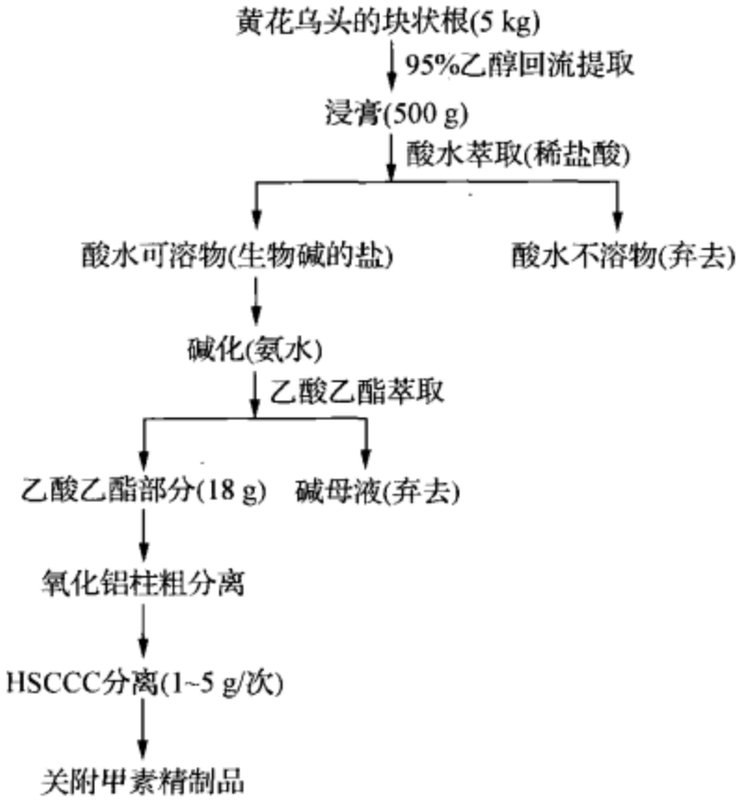
关附甲素(Guan Fu base A，**14-51**)是从毛茛科乌头属植物黄花乌头[*Aconitum coreanum* (Lèvl.) Rapaics]的干燥块根[18]分离出的生物碱。刘等经多年研究创制成我国特有的抗心律失常新药[16~19]，盐酸关附甲素针剂于2005年经国家食品药品监督管理局批准上市。



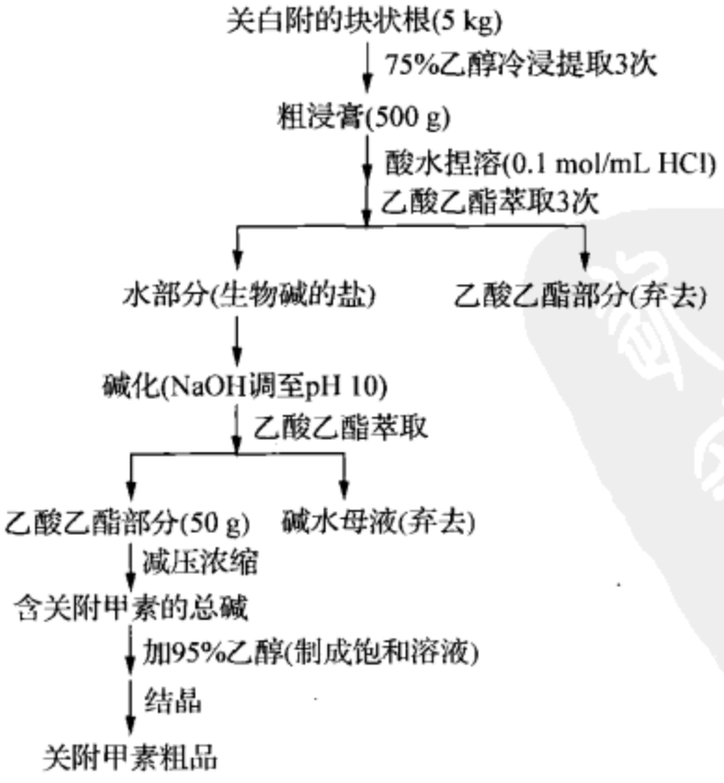
14-51

提取与分离[15~20]：

逆流色谱分离法：将干燥粉碎的关白附的块根5 kg，加入95%乙醇回流提取12 h，共3次，每次溶剂约50 L，过滤，合并滤液，减压浓缩，得粗浸膏约500 g，用0.1 mol/L HCl溶解，弃去酸水不溶物，取水层，以氨水调至pH 10，用3倍体积乙酸乙酯萃取3次。合并乙酸乙酯萃取液，浓缩至无乙酸乙酯味，得浸膏约30 g，采用氧化铝柱色谱，1∶20上样，乙醚洗脱，按极性大小分段收集，分成A、B、C 3部分。取中间极性样品B，选择氯仿-甲醇-0.2 mol/L HCl(10∶3∶3)系统，高速逆流色谱分离，进样量1～5 g。色谱条件：流动相流速2 mL/min，转速800～850 r/min，等体积收集，每流分1/5柱体积，减压浓缩，薄层色谱点样[$CHCl_3$-MeOH(9∶1)展开]，相同斑点样品合并，减压浓缩，得关附甲素和其他生物碱的精制品[23](纯度大于95%)，以流程图表示它们的提取和分离过程。



有机溶剂提取法：将干燥粉碎的关白附的块根 5 kg，加入 75%乙醇冷浸48 h，共 3 次，每次溶剂约 50 L，过滤，合并滤液，减压浓缩，得粗浸膏约 400～500 g，用约 1 L 0.1 mol/mL HCl 溶解，加入 3 倍体积的乙酸乙酯萃取 3 次，取水层，以



NaOH 调至 pH 10，用 3 倍体积乙酸乙酯萃取 3 次。合并乙酸乙酯萃取液，浓缩至无乙酸乙酯味，得总碱浸膏约 50 g，将总浸膏以 95%乙醇在室温下溶解制成饱和溶液，放置入 4 ℃冰箱冷却，析出固体即为含关附甲素的粗晶体。上述流程图显示了它们的提取和分离过程。

参 考 文 献

[1] 徐任生，陈仲良. 中草药有效成分提取与分离. 第二版. 上海：上海科学技术出版社，1989：270～271.

[2] 朱大元，宋纯清，高耀良等. 延胡索己素、壬素、癸素和子素的结构鉴定. 化学学报，1981，39：280～283.

[3] 朱任宏，何林兴，陈嬿. 中国延胡索之研究——Ⅰ. 浙江东阳延胡索中的植物碱. 化学学报，1962，23：196.

[4] 朱任宏，陈锐翠，方圣鼎. 中药黄藤化学成分的研究. 化学学报，1962，28：89.

[5] 洪山海，马广恩. 石蒜科生物碱的研究 Ⅲ. 紫花石蒜和其他两种石蒜中的生物碱及新生物碱紫花石蒜碱. 药学学报，1964，11：1.

[6] 徐任生，陈仲良. 中草药有效成分提取与分离. 第二版. 上海，上海科学技术出版社，1989：280～283.

[7] 徐任生，赵志远，林隆泽等. 抗癌植物喜树化学成分的研究 Ⅱ. 喜树果中的化学成分. 化学学报，1977，35：193～199.

[8] 林隆泽，宋纯清，徐任生. 抗癌植物喜树化学成分的研究 Ⅳ. 11-羟基喜树碱等化学成分的分离鉴定. 化学学报，1982，40：86～89.

[9] 马广恩，林隆泽，赵志远等. 三尖杉属植物中生物碱的研究 Ⅰ. 三尖杉中抗癌有效成分的分离和鉴定及新生物碱(+)-乙酰三尖杉碱. 化学学报，1977，35：201～208.

[10] 徐任生，陈仲良. 中草药有效成分提取与分离. 第二版. 上海：上海科学技术出版社，1989：290～292.

[11] 冯孝章，付丰永. 云南萝芙木生物碱的研究. 药学学报，1981，16：510～518.

[12] 中国医科院药物所. 中草药有效成分的研究(第一分册). 北京：人民卫生出版社，1972：200.

[13] 成都制药一厂. 氢溴酸樟柳碱生产工艺. 医药工业，1975，12：12～15.

[14] 中国医科院药物所. 中草药通讯，1976，6：10.

[15] 中国科学院植物研究所主编. 中国高等植物图鉴. 第一册. 北京：科学出版社，1972：624.

[16] 后德辉，李玲，王秋娟等. 关附庚素与关附甲素及壬素抗心律失常的比较. 南京药学院学报，1987，18：268～271.

[17] 后德辉，邬利娅，徐为人等. 关附庚素与关附甲素及壬素抗心律失常的比较. 中国药科大学学报，1987，18：268～271.

[18] 高宏谨，岳凤先，朱任宏. 中国乌头的研究——X. 关白附子中的新生物碱. 药学学报，1966，13：186～193.

[19] Chen D C, Yan W M. Alkaloids of the Chinese herb guan-bai-fu (*Aconitum koreanum*): guan-fu bases Y and A. Tetrahedron, 1986, 42: 6621～6626.

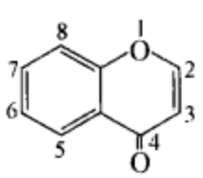
[20] 蒋凯，杨春华，刘静涵等. 黄花乌头中 Hetisine 型生物碱的高速逆流色谱分离与结构鉴定. 药学学报，2006，41：128～131.

（徐任生　叶　阳）

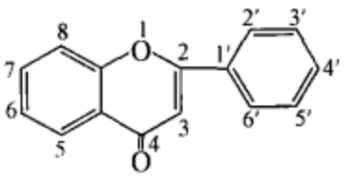
第 15 章　黄酮类化合物

15.1　前　　言

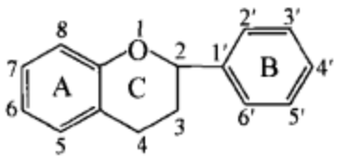
黄酮类化合物(flavonoids)是广泛存在于植物中的一类天然产物，其在植物体内大部分以苷的形式存在，一部分以游离态(苷元)的形式存在。黄酮类化合物原先主要是指基本母核为 2-苯基色原酮(2-phenyl chromone)的一类化合物，现在则泛指两个苯环(A 环与 B 环)通过中央三碳相互联结而成的一系列化合物。有关黄酮类化合物在植物体内的分布、结构类型及特征鉴别等，已有多本黄酮类化合物专著[1~7]问世。由于黄酮类化合物具有多种生物活性，近十几年来，对其药用价值的研究开发更趋广泛和深入。本章将主要侧重于该类化合物提取分离工艺的介绍，以期为黄酮类化合物的开发应用提供一定的参考。



色原酮



2-苯基色原酮



C_6-C_3-C_6

15.2　黄酮类化合物的理化性质

黄酮类化合物的溶解度像其他各类成分一样，因其结构不同而有很大差异。一般来说黄酮苷元难溶或不溶于水，易溶于甲醇、乙酸乙酯、氯仿等有机溶剂中；黄酮苷类则易溶于水、甲醇等强极性溶剂，难溶或不溶于苯、氯仿等有机溶剂。由于黄酮类化合物多数均含有酚羟基，故显酸性，可溶于碱性水溶液(如碳酸钠水溶液)、碱性有机溶剂(如吡啶、甲酰胺、二甲基甲酰胺)。

对于黄酮苷元，分子内含有不对称碳原子的双氢黄酮、双氢黄酮醇、双氢异黄酮及其衍生物等具有旋光性，其余苷元则无旋光性。黄酮苷类因结构中含有糖分子，故均有旋光性且多为左旋。

黄酮、黄酮醇及其苷类多为灰黄至黄色；查耳酮为黄至橙黄色；双氢黄酮、双氢黄酮醇无交叉共轭体系，一般不显色，但在紫外灯下有特征的颜色或荧光，氨熏后

颜色会发生变化；异黄酮类因共轭较少，显微黄色；花色素所显颜色与 pH 有关，一般显红（pH＜7）、紫（pH＝8.5）、蓝（pH＞8.5）等颜色。

黄酮类化合物可与镁粉（或锌粉）/盐酸、硼氢化钠（还原显色）；三氯化铝、二氯氧化锆、乙酸镁（络合显色）；氢氧化钠（碱性显色）等试剂产生特征的颜色反应，可用于黄酮类化合物的鉴别。

15.3 黄酮类化合物的提取分离

15.3.1 黄酮类化合物的提取

由于黄酮类化合物种类较多，其存在状态及结构的不同，使它们的溶解性能相差甚大，没有一种能适合于所有黄酮类成分的提取溶剂，而必须根据目标成分的性质及杂质的类别来选择溶剂，一般原则是非极性溶剂（如乙醚、苯、乙酸乙酯、氯仿等）适用于大多数的苷元及其高度甲基化的衍生物，如多甲氧基黄酮类苷元可用苯来提取。而极性溶剂（如乙酸乙酯、丙酮、乙醇、水、甲醇等）及其混合溶剂（如 1∶1 的甲醇-水溶液）则主要适用于各种黄酮苷类和极性稍大的苷元（如羟基黄酮、双黄酮类、查耳酮等），一些多糖苷类可用热水提取，而且在各种苷类的提取中要事先破坏酶的活性。同时在选择溶剂时，要考虑到原料中伴存的杂质，对于非极性杂质（如油脂、叶绿素、甾体等）可用石油醚预先除去，而水溶性杂质则可用乙酸乙酯或丁醇抽提的方法，或者用铅盐沉淀法等除去。常用的提取方法有以下几种。

15.3.1.1 溶剂提取法

某些黄酮苷可用热水提取，提取时常将原料投入沸水以破坏酶的活性，如自槐花米（*Sophora japonica* L.）中提取芦丁（rutin）；从黄芩（*Scutellaria baicalensis* Georgi）中提取黄芩苷（baicalin）。乙醇或甲醇是最常用的黄酮类化合物提取溶剂，高浓度的醇（如 90%～95%）适用于提取苷元，60%左右的醇适用于提取苷类。提取的次数一般是 2～4 次，可用冷浸法、渗漉法和回流法。冷浸法相对提出的杂质较少，但提取时间长，效率低；渗漉法因保持一定的浓度差，提取效率较冷浸法高，浸出液杂质亦较少，但同样费时较长且溶剂用量大，操作麻烦；回流法效率较前两者高，但成分受热易破坏的药材不宜用该方法。有时为了研究植物中的黄酮类成分，也采用系统溶剂提取法即用极性由小到大的溶剂依次提取，如先用石油醚或己烷脱脂，接着用苯提取多甲氧基黄酮或含异戊烯基、甲基的黄酮，再用乙醚、氯仿、乙酸乙酯依次提取出大多数的苷元，然后用丙酮、乙醇、甲醇、甲醇-水（1∶1）提取出多羟基黄酮、双黄酮、查耳酮等成分，最后用稀醇、沸水可以提取出苷类，而花色素等成分可用 1%HCl 水溶液进行提取。

15.3.1.2　碱性水或碱性稀醇提取法

由于黄酮类成分大多具有酚羟基，具有一定的酸性，故可用碱性水（如碳酸钠、氢氧化钠、氢氧化钙水溶液）或碱性稀醇（如 50%的乙醇）提取，提取液经酸化后有时就可析出黄酮类化合物。常用的碱性溶液为稀氢氧化钠或氢氧化钙水溶液。稀氢氧化钠水溶液的浸出能力较强，但同时带出的杂质也多，使后续纯化不便。氢氧化钙水溶液（石灰水）浸出能力虽较稀氢氧化钠弱，但其可使含有多羟基的鞣质，或含有羧基的黏液质、果胶等水溶性杂质形成水不溶的钙盐沉淀，有利于后续的纯化。但用该法要注意碱浓度不宜过高，以免加热时过强的碱性会破坏黄酮类化合物的结构。

15.3.1.3　超临界 CO_2 流体萃取法

超临界 CO_2 流体萃取对黄酮类化合物的提取，不失是一种可供选择的方法。何等[8]采用乙醇浸提与超临界 CO_2 萃取的方法从银杏叶中提取黄酮类化合物，结果表明，在较低的操作压力下，可有效地提取出银杏叶中的黄酮类化合物，银杏黄酮的提取率达到 2.61%，纯度达到 27.7%，其纯度是直接用乙醇提取的 2.43 倍。在对茶多酚的提取中，目前大都采用溶剂萃取法，溶剂消耗量大。李等[9]首次尝试了用超临界 CO_2 流体来萃取茶叶中的茶多酚；李等[10]研究了用超临界 CO_2 流体萃取甘草中甘草素、异甘草素、甘草查耳酮 A 及甘草查耳酮 B 等有效成分，发现选择乙醇作为夹带剂对萃取甘草的有效成分非常有效。在所选取的萃取体系中，随着乙醇浓度的增大，甘草中有效成分的萃取率提高；在实验条件下，温度升高，甘草有效成分在萃取体系中的溶解度增大，萃取率升高，确定了最佳萃取温度为 40 ℃，萃取压力为 35 MPa。萃取体系 CO_2-H_2O-EtOH 与物料的质量比为 4～5，萃取时间为 5 h。

随着科学技术的发展，现在有各种新的提取技术不断被应用到中草药的研究和生产领域，并取得了较好的效果，如超声提取（ultrasonic extraction，UE）、微波提取（microwave extraction，ME）、酶提取（enzymic extraction，EE）、双水相萃取（aqueous two phase extraction，ATPE）等技术的应用已得到了广泛的关注及研究。

15.3.2　黄酮类化合物的分离

黄酮类化合物的分离包括黄酮类化合物与非黄酮类化合物的分离，以及黄酮类化合物之间各单体的分离。常用的分离方法有溶剂萃取法、碱提酸沉法、薄层色谱法、聚酰胺柱色谱法、硅胶柱色谱法、铅盐法、硼酸络合法、pH 梯度萃取法、凝胶柱色谱法等，它们在黄酮类化合物的分离纯化中得到了广泛的应用。随着对黄酮

类化合物研究的深入，一些新的分离手段，如超滤（ultrafiltration，UF）、大孔吸附树脂柱色谱（macroporous adsorption resin chromatography，MARC）、高效液相色谱（high-performance liquid chromatography，HPLC）、胶束薄层色谱（micellar thin layer chromatography，MTLC）、微乳薄层色谱（microemulsion thin layer chromatography，ME-TLC）、分子印迹技术[11]（molecular imprinting technology，MIT）、高速逆流色谱[12]（high speed countercurrent chromatography，HSCCC）等技术也得到了广泛的研究及应用。有关上述提取分离方法的详细介绍请参见本书的有关章节。

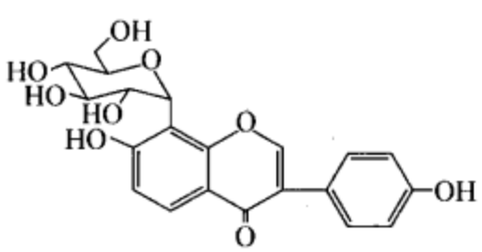
15.4 黄酮类化合物提取分离实例

以下为一些植物中黄酮类成分提取分离工艺的简介，以供参考。

15.4.1 葛根素及同系物

葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata*（Willd.）Ohwi 的干燥根，葛根素（puerarin，**15-1**）是葛属植物的特有成分，亦为主要有效成分，具有显著降血糖活性以及扩张冠脉和脑血管、降低心肌耗氧量、改善心肌收缩功能、促进血液循环等作用。葛根乙醇浸膏片和葛根总黄酮注射液治疗伴有颈项强痛和头痛、头晕的高血压病，心绞痛和突发性耳聋等均有显著疗效。

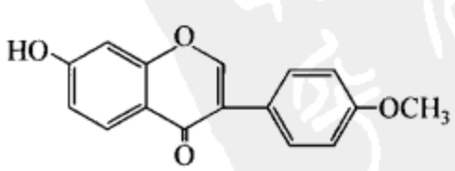
现已知葛根所含的黄酮类成分有葛根素，芒柄素（formononetin，**15-2**），葛香豆雌酚（puerarol，**15-3**），芒柄花苷（ononin，**15-4**）、大豆苷元-7，4′-二葡萄糖苷（daidzein-7，4′-diglucoside，**15-5**）、大豆苷元-4′-葡萄糖苷（daidzein-4′-glucoside，**15-6**）、3′-甲氧基葛根素（3′-methoxypuerarin，**15-7**）、3′-羟基葛根素（3′-hydroxypuerarin，**15-8**）、葛根素芹菜糖苷（mirificin，**15-9**）、大豆苷、大豆苷元、染料木素、染料木苷等[13,14]。



15-1

$C_{21}H_{20}O_9$，白色簇状结晶，

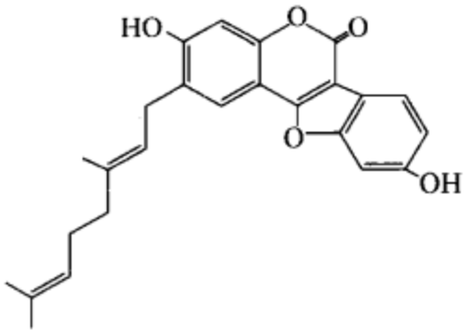
mp 202~206 ℃（氯仿-甲醇）



15-2

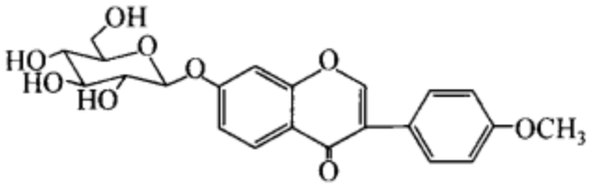
$C_{16}H_{12}O_4$，淡黄色片晶，

mp 253~255 ℃（氯仿-甲醇）



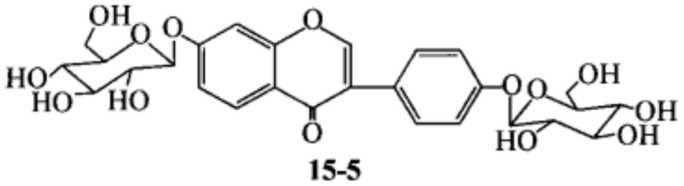
15-3

$C_{25}H_{24}O_5$, 白色粉末, mp 208~210 ℃(氯仿-甲醇)



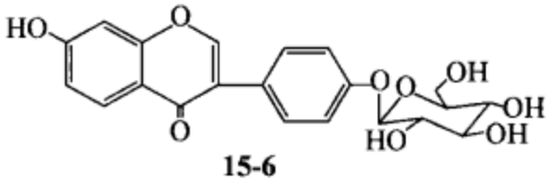
15-4

$C_{22}H_{22}O_9$, 白色粉末, mp 216~218 ℃(氯仿-甲醇)



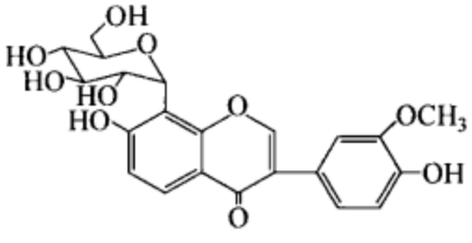
15-5

$C_{27}H_{30}O_{14}$, 白色粉末, mp 222~224 ℃(甲醇)



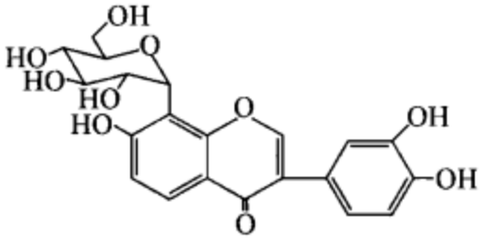
15-6

$C_{21}H_{20}O_9$, 白色粉末



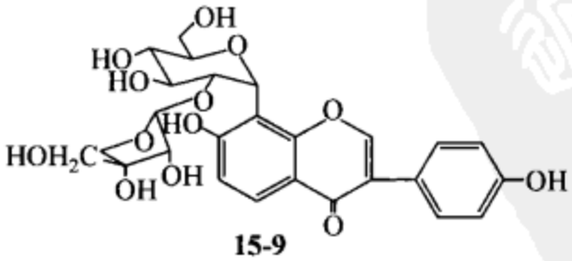
15-7

$C_{22}H_{22}O_{10}$, 白色粉末, mp 215~217 ℃(甲醇)



15-8

$C_{21}H_{20}O_{10}$, 白色簇状晶, mp 215~217 ℃(甲醇)



15-9

$C_{26}H_{28}O_{13}$, 白色粉末, mp 188~190 ℃(甲醇)

葛根总黄酮的提取纯化工艺报道较多，但主要可归结为水提法、醇提法、正丁醇法、柱色谱法（大孔吸附树脂、硅胶、氧化铝、聚酰胺）等以及这些方法的综合运用。

水提法得率较高，但总黄酮含量很低，由于药材中的淀粉、纤维素及一些糖类在水中有一定的溶解度，造成溶液黏稠使固液分离困难，费时耗力。醇提法中总异黄酮的含量较高，固液分离也较水提法容易得多，故此法具有工业化生产的价值。硅胶、氧化铝、聚酰胺等的柱色谱法多应用于葛根中单一成分的分离提纯，由于此类填料极性较大，在分离纯化葛根素等极性较大的有效成分时极易造成吸附损失，虽加水钝化可消除部分影响，但需经反复多次层析才可得纯品且再生不易，操作中还需应用某些有机溶剂等。

由于葛根药材所含葛根素的量差异较大，要达到能够使葛根素析出的总黄酮含量仅靠醇提较难实现，但可结合其他方法进行。

葛根素作为碳-碳苷在酸水中性质稳定而它的衍生物易水解得到葛根素，故人们在葛根素的提取工艺中有采用酸水解法从而以增加葛根素产率。

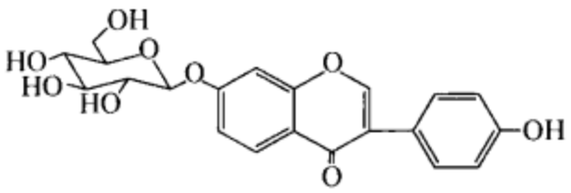
潘等[15]取葛根干粉 2 kg，以 60%乙醇冷浸 12 h，在 60 ℃下浸提 2 次，每次 6 h，提取液合并、过滤，减压浓缩，得葛根总黄酮 385.6 g，得率为 19.28%。将得到的葛根黄酮加入 1.2 L 5%HCl 溶液加热回流 4 h 水解，水解液趁热过滤，待滤液冷却至室温，用 1 L 乙酸乙酯分两次萃取，萃取后的水相放置 4 天，析出葛根素粗品，将其用甲醇与乙酸混合物(1∶1)重结晶两次，得到无色针状葛根素产品 27.2 g，产率为 1.36%。

张尊听[16]以甲醇冷浸法从野葛根中提取总黄酮，所得总黄酮以 6%盐酸水解 3 h，由薄层扫描法(TLC-Scan)测得葛根素得率为 1.2%。该工艺从葛根中提取分离葛根素操作简便、步骤少，容易实现工业化生产。

谭等[17]以乙酸溶液为流动相，在寡聚 β-环糊精键合 Sepharose HP 介质上分离葛根素，其纯度大于 97%，收率 32.4%。由于整个工艺都在常压或低压下操作，运行成本较低，而且该技术能提高葛根素的收率和产品纯度，同时解决了生产放大后压力过高的问题，反应条件温和，所用纯化介质环糊精没有毒性，使工业化大生产成为可能。

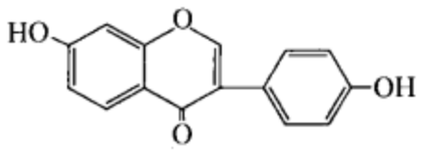
15.4.2 大豆苷及染料木苷

(1) 大豆(*Glycine max* Merrill)为豆科一年生草本植物，含有多种异黄酮成分，含量较高的有大豆苷(daidzin，**15-10**)，大豆苷元(daidzein，**15-11**)，染料木素(genistein，**15-12**)和染料木苷(genistin，**15-13**)等 4 种，主要存在于大豆种子的子叶和胚轴中。大豆异黄酮为具有改善妇女更年期综合征，预防心血管疾病，防止骨质疏松及抑制癌细胞生长等[18,19]多种生理功能的优质天然食品，被人们广泛应用于医药制品和保健食品中。



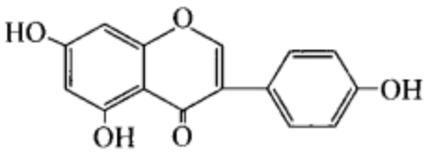
15-10

$C_{21}H_{20}O_9$, 白色针晶, mp 234~235 ℃(甲醇)



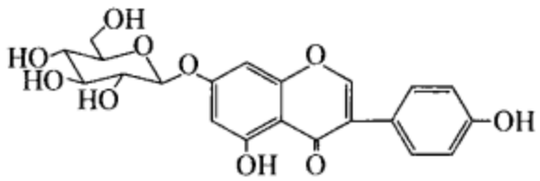
15-11

$C_{15}H_{10}O_4$, 无色针晶, mp 315 ℃(氯仿-甲醇)



15-12

$C_{15}H_{10}O_5$, 无色针晶, mp 288~289 ℃(氯仿-甲醇)



15-13

$C_{21}H_{20}O_{10}$, 白色粉末, mp 257~258 ℃(甲醇)

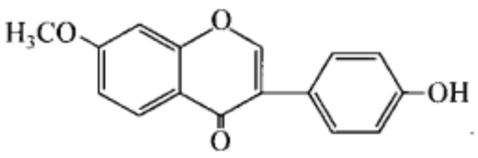
刘等[20]将机械去油的大豆饼粉碎后，用 5 倍量(L · kg^{-1} 豆饼)的石油醚(60～90 ℃)浸提脱脂，以 12 倍量(L · kg^{-1} 豆饼)的工业乙醇回流提取 3 次，减压浓缩回收乙醇，得浸膏 527 g。依次用正己烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取，回收分别得正己烷提取物 3 g，乙酸乙酯提取物 43 g，正丁醇提取物 325 g。乙酸乙酯提取物经硅胶柱色谱，以 $CHCl_3$-CH_3OH[(12～4) ∶ 1, v/v]梯度洗脱，每 10 mL 接收一流分，用 TLC 作为检测手段，相同部分合并，第 86～116 流分合并浓缩得一混合物。将混合物用 Sephadex LH-20 柱进一步分离得染料木苷 12 mg 和大豆苷 20 mg。将正丁醇提取物经上述同样方法，分别分离得染料木苷 6 mg 和大豆苷 8 mg。

徐等[21]将 10 kg 大豆粉碎后，以大豆粉 2 倍体积的 80%乙醇 80 ℃回流提取 2 h，重复 3 次，合并乙醇溶液后抽滤，滤液蒸干后用正己烷脱脂至正己烷相无色为止，剩余物用乙酸乙酯反复抽提，合并抽提液并蒸干。再将乙酸乙酯不溶部分用水饱和正丁醇反复抽滤，合并正丁醇，浓缩至干。将水饱和正丁醇提取物用 DMSO 溶解后上 Saphadex LH-20 柱，用甲醇、水梯度洗脱。合并 40%～60%的甲醇洗脱液，浓缩后再用 DMSO 溶解，上 MCI 柱，用甲醇、水梯度洗脱。合并 50%的甲醇洗脱液，浓缩后再用 DMSO 溶解，上 HW-40 柱，仍用甲醇、水洗脱。反复多次上 HW-40 柱，可得到大豆苷和染料木苷两个化合物。

(2) 豆科植物红车轴草(*Trifolium pratense* L.)主要含有异黄酮类。近年来发现红车轴草总黄酮提取物具有多种生理功能而引起人们的关注。

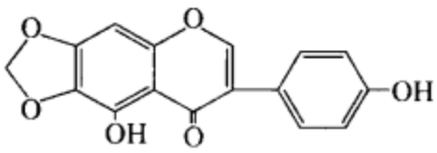
黄等[22]取红车轴草 15 kg，用 95%乙醇回流提取 3 次(10、8 和 6 倍量)，合并提取液，减压浓缩得乙醇浸膏 500 g。将乙醇浸膏悬浮于 2 L 水中，依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取 5 次，减压回收溶剂，分别得到石油醚提取物 36 g、乙酸乙酯提取物 92 g、正丁醇提取物 72 g 和水相浸膏 300 g。取乙酸乙酯提取物约 30 g，

用甲醇溶解后，加入硅胶适量拌样，进行硅胶柱色谱分离，以氯仿-甲醇[(100∶1)～(1∶1)]梯度洗脱，TLC 检查，合并组分相同的流分，共分成 130 个流分，其中流分 Fr. 36～40、Fr. 41～45、Fr. 46～50、Fr. 61～65、Fr. 66～80、Fr. 81～92、Fr. 93～106 和 Fr. 107～116 减压浓缩放置后有沉淀析出，滤出沉淀，沉淀用甲醇溶解后，加入硅胶适量拌样，再进行硅胶柱色谱分离，分别以氯仿-甲醇[(40∶1)～(10∶1)]梯度洗脱，合并组分相同的流分，各流分以甲醇溶解，分别用葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20 进行柱色谱分离，以甲醇洗脱，收集组分相同的流分，浓缩后再用甲醇或甲醇-水重结晶，得樱黄素(prunetin，**15-14**)83 mg、德鸢尾素(irilone，**15-15**)65 mg、鹰嘴豆芽素 A(biochanin A，**15-16**)2.1 g、芒柄花素 4.6 g、红车轴草素(pratensein，**15-17**)58 mg、染料木素 72 mg、毛蕊异黄酮(calycosin，**15-18**)69 mg 和大豆素 46 mg。



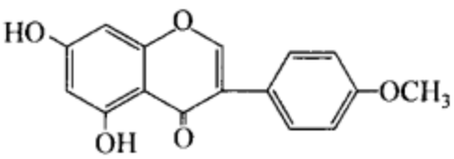
15-14

$C_{16}H_{12}O_4$，白色颗粒状结晶，mp 168~169 ℃



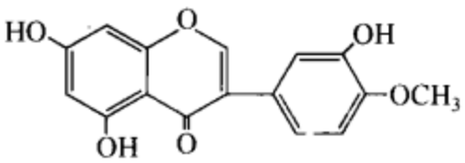
15-15

$C_{16}H_{10}O_6$，无色针晶，mp 236~237 ℃



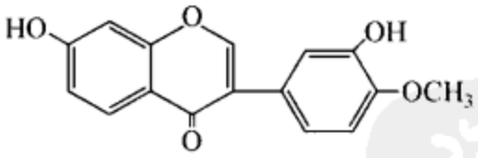
15-16

$C_{16}H_{12}O_5$，淡黄色颗粒状结晶，mp 215~216 ℃



15-17

$C_{16}H_{12}O_6$，无色针晶，mp 272~273 ℃



15-18

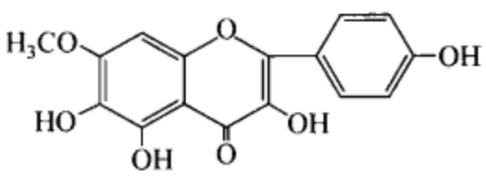
$C_{16}H_{12}O_5$，无色针晶，mp 230~232 ℃

15.4.3 灯盏花素

灯盏花为菊科植物短葶飞蓬[*Erigeron breviscapus*（Vant.）Hand.-Mazz.]的全草。临床用于治疗脑血栓形成、脑栓塞、多发性神经炎、慢性蛛网膜炎等脑血管意外所致的瘫痪症。以灯盏花总黄酮成分制成的片剂和注射液用于治疗脑血栓所致瘫痪，总有效率为 95.8%。灯盏花素(breviscapin)是从中药灯盏细辛中提取的灯盏甲素、灯盏乙素的混合物。药理研究表明，灯盏花素具有扩张脑血

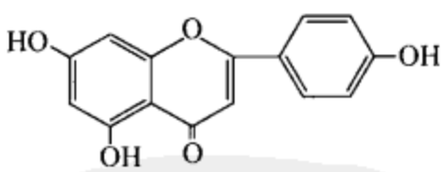
管的作用、能降低脑血管阻力、增加脑血流量、改善微循环，并有对抗血小板聚集的作用。

张等[23,24]取灯盏花全草 50 kg(采自云南省昆明市)，用 80%乙醇渗漉提取后，减压回收乙醇液后用水分散，依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取。乙酸乙酯部分回收溶剂得浸膏 398 g，硅胶柱色谱分离，氯仿-甲醇(10∶1～3∶1) 梯度洗脱，得到 8 个部位。部位 5 (49 g) 经氯仿-甲醇(5∶1)洗脱得 3,5,6,4′-四羟基-7-甲氧基黄酮(3,5,6,4′-tetrahydroxy-7-methoxyflavonoid，**15-19**) 35 mg 和 5,7,4′-三羟基黄酮(5,7,4′-trihydroxyflavonoid，**15-20**) 42 mg；部位 6 (56 g) 经氯仿∶甲醇(4∶1) 洗脱得 3,5,6,7,4′-五羟基黄酮 (3,5,6,7,4′-pentahydroxyflavonoid，**15-21**)27 mg 和高山黄芩素(scutellarein，**15-22**) 18 mg；部位 7 (65 g) 经氯仿-甲醇(3∶1)洗脱得化合物 5,7,4′-三羟基双氢黄酮(5,7,4′-trihydroxyflavanone，**15-23**) 47 mg。正丁醇部分用大孔吸附树脂色谱分离，依次用水，20%、50%、80% EtOH 洗脱得到 5 个部位，20%乙醇层用硅胶柱色谱分离，$CHCl_3$-MeOH-H_2O 洗脱，再用 Sephadex LH-20 柱色谱分离，MeOH-H_2O 洗脱，得灯盏乙素(scutellarin，**15-24**) 120 mg 和 5,6,4′-三羟基黄酮-7-*O*-*β*-D-半乳糖醛酸苷(5,6,4′-trihydroxyflavone-7-*O*-*β*-D-galactopyranosiduronic acid，**15-25**) 26 mg。50% 乙醇层用 C18 反相硅胶柱色谱分离，MeOH-H_2O 洗脱，然后用硅胶柱色谱分离纯化，洗脱剂为 $CHCl_3$-MeOH(4∶1)，得灯盏甲素(4′-hydroxybaicalein-7-*O*-*β*-D-glucopyranosiduronic acid methylester，**15-26**) 15 mg 和高山黄芩素-7-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷(scutellarein-7-*O*-*β*-D-glucopyranoside，**15-27**) 27 mg。



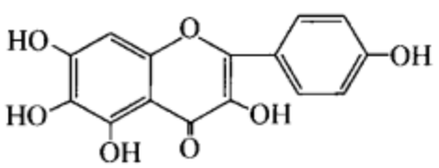
15-19

$C_{16}H_{12}O_7$，黄色粉末，mp 300 ℃(分解)



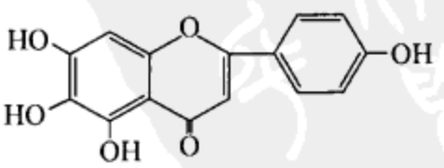
15-20

$C_{15}H_{10}O_5$，黄色粉末，mp 300 ℃(分解)



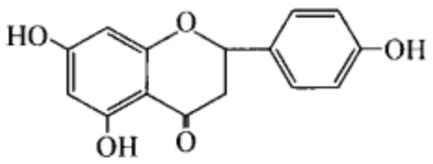
15-21

$C_{15}H_{10}O_7$，黄色粉末，mp 310 ℃(分解)



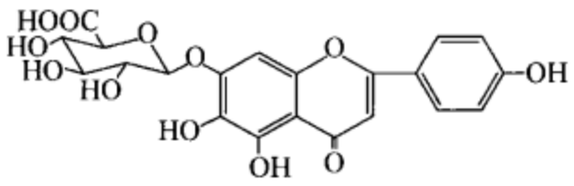
15-22

$C_{15}H_{10}O_6$，黄色粉末，mp 295 ℃(分解)



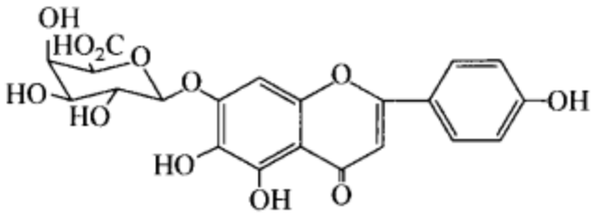
15-23

$C_{15}H_{12}O_5$, 淡黄色粉末, mp 217~218 ℃



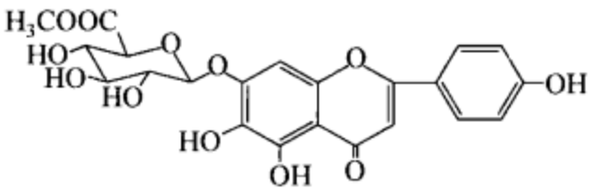
15-24

$C_{21}H_{18}O_{12}$, 黄色粉末, mp 300 ℃(分解)



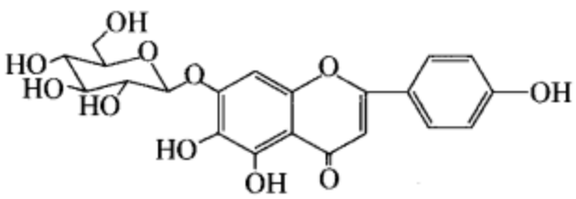
15-25

$C_{21}H_{18}O_{12}$, 淡黄色粉末, mp 292 ℃(分解)



15-26

$C_{22}H_{20}O_{12}$, 黄色粉末, mp 250 ℃(分解)



15-27

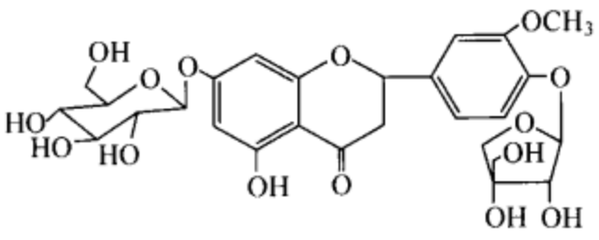
$C_{21}H_{20}O_{11}$, 黄色粉末, mp 258~259 ℃

15.4.4 槲寄生中黄酮类成分

中药槲寄生为桑寄生科槲寄生属槲寄生[*Viscum coloratum* (Kom.)Nakai]的带叶茎枝，该植物用于治疗心血管疾病有较好的疗效。对其进行的药理实验表明，其有增加冠脉流量，能增强心肌收缩力，减慢心率与改善冠脉循环，抑制血小板聚集和抗血栓形成的功能。

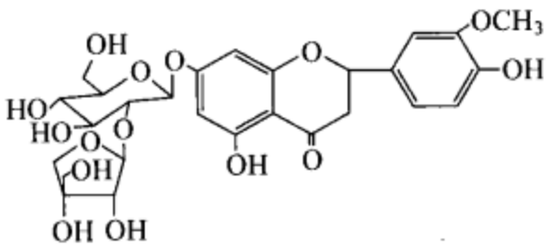
孔等[25~27]取槲寄生药材 20 kg(1986 年春购于黑龙江省尚志县)，切碎，以药用乙醇回流 5 次，乙醇用量分别为 8、6、6、6、6 倍量，合并提取液，减压回收至一定体积，得析出物约 2 kg，除去析出物的浓缩液，回收乙醇得浸膏，加入 20%稀乙醇

搅拌均匀，依次用石油醚（60～90 ℃）、乙酸乙酯、正丁醇抽提。正丁醇萃取液用5%碳酸钠溶液振摇数次，碱萃取液以 10%盐酸酸化，再用乙酸乙酯萃取，回收乙酸乙酯得约 20 g 提取物。该提取物上聚酰胺细粉柱进行低压柱色谱分离，依次用不同浓度的乙醇洗脱，每 500 mL 为一流分。合并 10%～15%乙醇洗脱部分，反复进行硅胶低压柱色谱分离，以氯仿-甲醇（1∶1）洗脱得槲寄生新苷Ⅰ（viscumneoside Ⅰ，**15-28**）25 mg、槲寄生新苷Ⅲ（viscumneoside Ⅲ，**15-29**）120 mg 和槲寄生新苷Ⅴ（viscumneoside Ⅴ，**15-30**）80 mg。25%～30%乙醇洗脱部分蒸去乙醇后放置得高圣草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷（homoeriodictyol-7-*O*-*β*-D-glucoside，**15-31**），其母液减压浓缩后经高效液相制备得槲寄生新苷Ⅵ（viscumneoside Ⅵ，**15-32**）51 mg。将 35%～75%乙醇洗脱液分段合并进行硅胶低压柱色谱分离，用不同比例的氯仿-甲醇洗脱，在氯仿-甲醇 4.5∶1、3.5∶1 和 3∶1 部分得槲寄生新苷Ⅱ（viscumneoside Ⅱ，**15-33**）40 mg、槲寄生新苷Ⅳ（viscumneoside Ⅳ，**15-34**）90 mg、鼠李秦素-3-*O*-*β*-D-葡萄糖苷（rhamnezin-3-*O*-*β*-D-glucoside，**15-35**）和异鼠李秦素-3-*O*-*β*-D-葡萄糖苷（isorhamnezin-3-*O*-*β*-D-glucoside，**15-36**）。在 2.5∶1～2∶1 部分得槲寄生新苷Ⅶ（viscumneoside Ⅶ，**15-37**）62 mg 和异鼠李秦素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷（isorhamnezin-7-*O*-*β*-D-glucoside，**15-38**）。将 85%～95%乙醇洗脱部分进行硅胶柱色谱分离，在氯仿-甲醇6∶1 和 5∶1 洗脱部分得鼠李秦素（rhamnezin，**15-39**）、高圣草素（homoeriodictyol，**15-40**）和槲皮素（quercetin，**15-41**）。



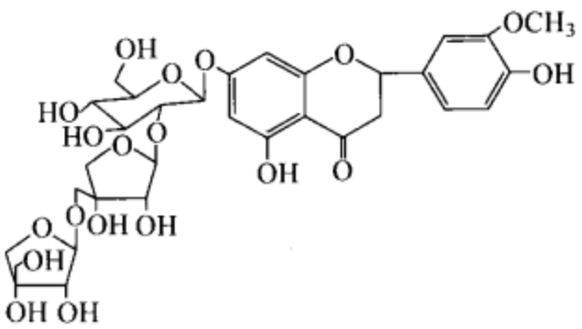
15-28

$C_{27}H_{32}O_{15}$，白色粉末状物，mp 134～136 ℃



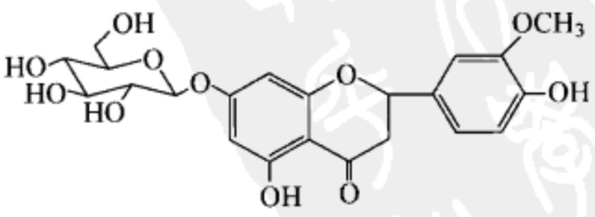
15-29

$C_{27}H_{32}O_{15}$，白色粉末状物，mp 208～210 ℃



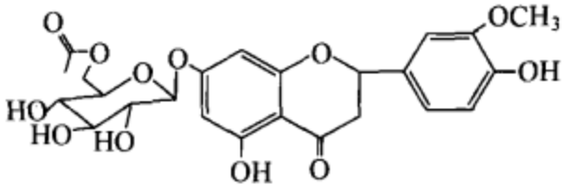
15-30

$C_{32}H_{40}O_{19}$，白色无定形粉末，mp 136～139 ℃



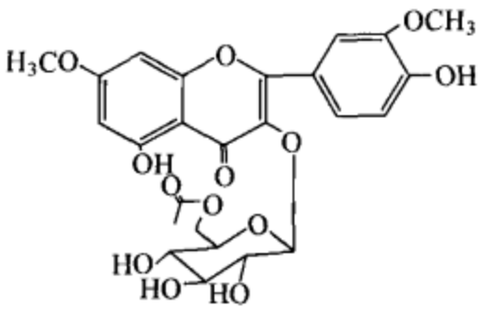
15-31

$C_{22}H_{24}O_{11}$，白色簇状针晶，mp 158～160 ℃



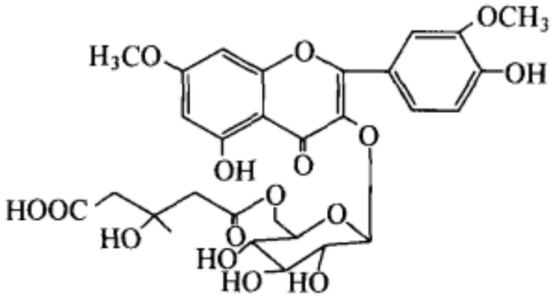
15-32

$C_{24}H_{26}O_{12}$, 白色粉末状物, mp 124～126 ℃



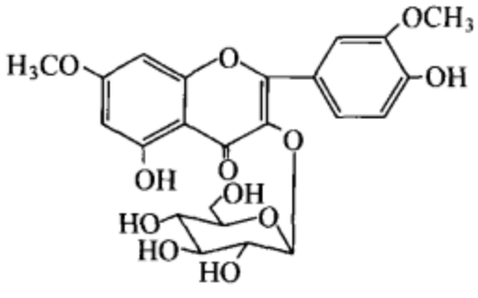
15-33

$C_{25}H_{26}O_{13}$, 黄色针晶, mp 121～123 ℃



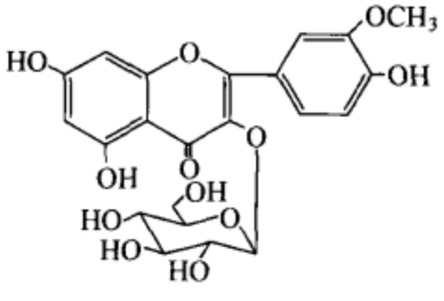
15-34

$C_{29}H_{32}O_{16}$, 黄色针晶, mp 195～197 ℃



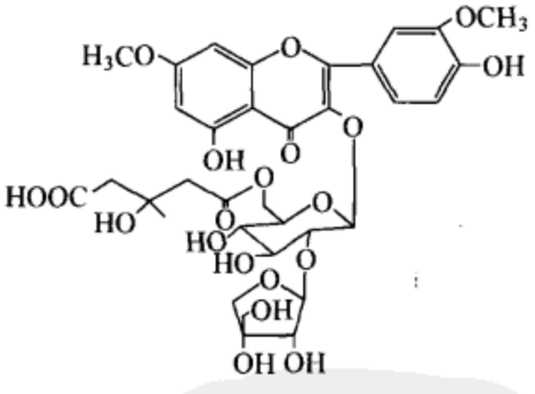
15-35

$C_{23}H_{24}O_{12}$, 浅黄色针晶, mp 178～180 ℃



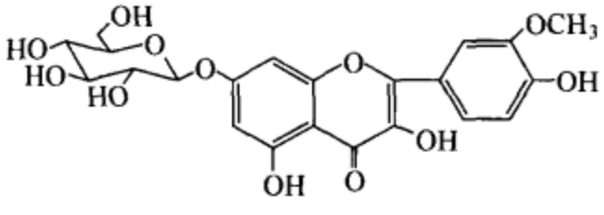
15-36

$C_{22}H_{22}O_{12}$, 浅黄色针晶, mp 165 ℃



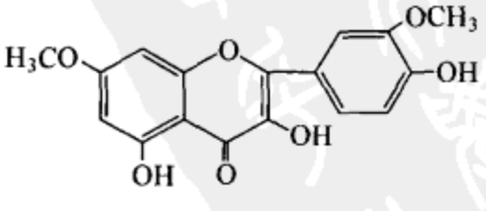
15-37

$C_{34}H_{40}O_{20}$, 黄色糊状物



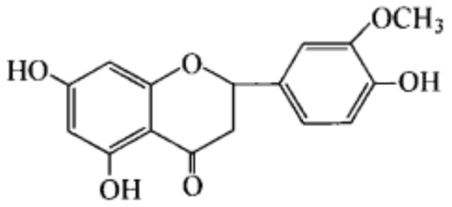
15-38

$C_{22}H_{22}O_{12}$, 浅黄色针晶, mp 249~251 ℃



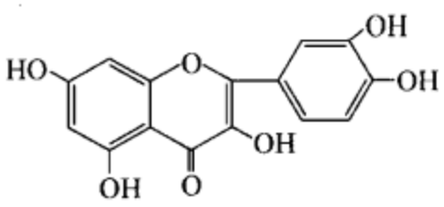
15-39

$C_{17}H_{14}O_7$, 浅黄色针晶, mp 217~219 ℃



15-40

$C_{16}H_{14}O_6$, 米色针晶, mp 223~224 ℃



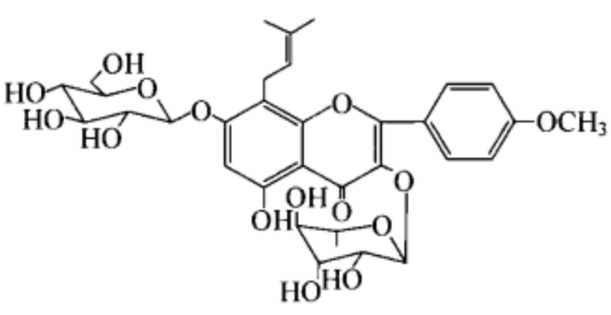
15-41

$C_{15}H_{10}O_7$, 黄色针晶, mp 308~310 ℃

15.4.5　淫羊藿黄酮

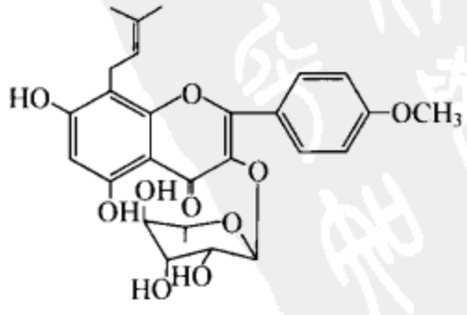
淫羊藿为多年生草本小檗科植物淫羊藿(*Epimedium grandiflorum* Morr.)、心叶淫羊藿(*Epimedium brevicornum* Maxim.)和箭叶淫羊藿(*Epimedium sagittatum* Maxim.)的全草。始载于《神农本草经》,列为中品,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿之功效,常用于肾阳虚之阳痿滑精、小便淋漓、筋骨痿软、风寒湿痹、肢体麻木等症。现代研究表明其有效成分主要为淫羊藿苷、淫羊藿总黄酮及多糖类成分。

郭等[28]报道,将淫羊藿地上部分 4.5 kg 粉碎,用 95%乙醇回流提取 3 次,浓缩得浸膏 440 g;浸膏溶于热水,过滤,滤液依次用石油醚(60～90 ℃)、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取,正丁醇萃取液浓缩即得总黄酮浸膏 220 g;将总黄酮浸膏 120 g 上聚酰胺柱色谱,乙醇梯度洗脱,收集 10%醇液、30%醇液、50%醇液 3 个流分;10%醇液流分上硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇梯度洗脱分得两种析出物,分别用甲醇重结晶得淫羊藿苷(icariside,**15-42**)620 mg 和宝藿苷-Ⅰ(baohuoside Ⅰ,**15-43**)210 mg,将色谱洗脱的极性较大部分再经聚酰胺层析,以氯仿-甲醇梯度洗脱,用 Sephadex LH-20 柱色谱纯化,得大花淫羊藿苷 C(ikarisoside C,**15-44**)96 mg;30%醇液流分用硅胶 H、聚酰胺反复色谱分离,氯仿-甲醇系统洗脱,Sephadex LH-20 凝胶柱色谱分离,甲醇重结晶,分得鼠李糖基淫羊藿次苷-Ⅱ(2‴-*O*-rhamnosyl icariside-Ⅱ,**15-45**)52 mg、箭藿苷 B(sagittatoside B,**15-46**)245 mg 和大花淫羊藿苷 F(ikarisoside F,**15-47**)47 mg;50%醇液流分上硅胶 H 柱色谱,氯仿-甲醇系统梯度洗脱,甲醇重结晶,得宝藿苷-Ⅱ(baohuoside-Ⅱ, **15-48**)62 mg。



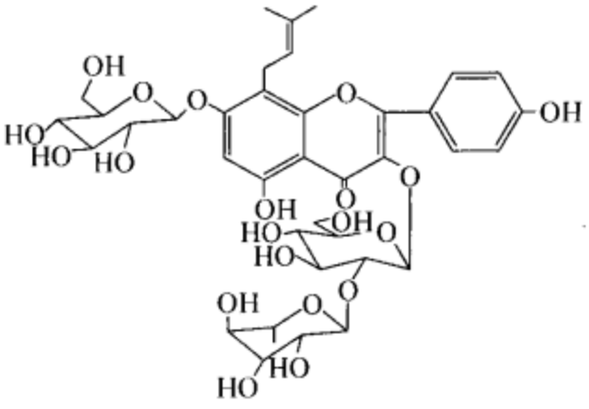
15-42

$C_{33}H_{40}O_{15}$, 淡黄色针晶, mp 231~232 ℃(含水吡啶)



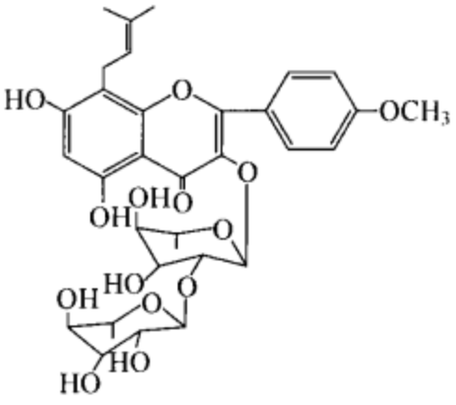
15-43

$C_{27}H_{30}O_{10}$, 黄色针晶, mp 206~207 ℃(甲醇)



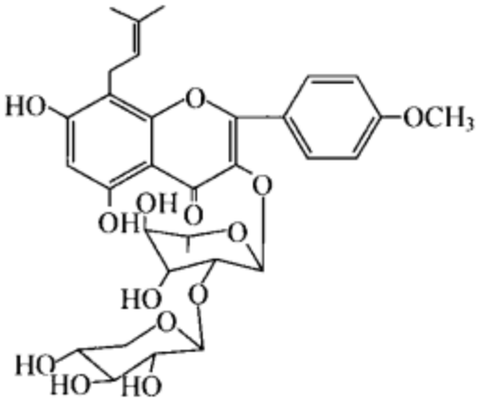
15-44

$C_{38}H_{48}O_{20}$, 黄色粉末, mp 192~196 ℃(甲醇)



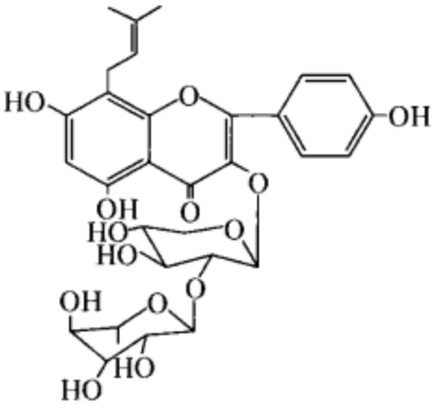
15-45

$C_{33}H_{40}O_{14}$, 黄色粉末, mp 159~163 ℃(甲醇)



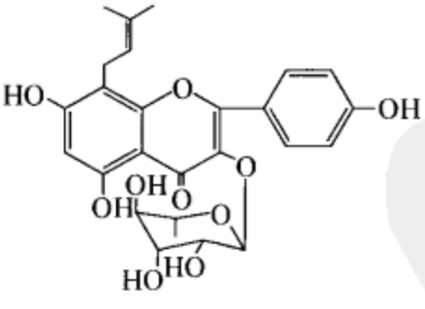
15-46

$C_{32}H_{38}O_{14}$, 黄色针晶, mp 175~176.5 ℃(甲醇)



15-47

$C_{31}H_{36}O_{14}$, 黄色针晶, mp 171~174 ℃(甲醇)



15-48

$C_{26}H_{28}O_{10}$, 黄色针晶, mp 151~152 ℃(甲醇)

梁等[29]报道将淫羊藿甲醇粗提物(含 icariside 22.78%,HPLC),用约 6 倍量的 30%乙醇超声提取两次,每次 40 min, 50 ℃, 合并两次提取液,提取液直接上处理好的聚酰胺柱,上样完毕接着用 15 倍量的 30%乙醇洗脱, 收集所有柱流出液, 减压浓缩至约流出液的 1/5 体积。浓缩液依次用氯仿萃取 3 次(除去极性小

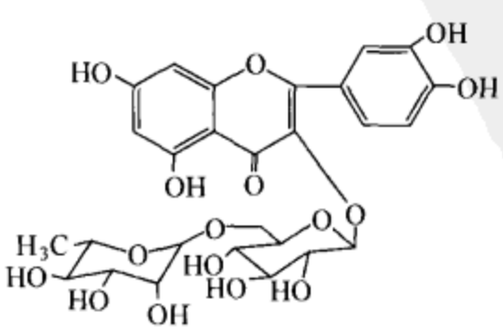
的杂质)和乙酸乙酯萃取 3 次,每次萃取剂的用量为待萃取液体积的 2 倍,合并乙酸乙酯液,浓缩后得黄色粉末。用 60%乙醇重结晶,得到淡黄色结晶。该工艺除杂率达 77.69%,icarrin 的回收率为 83.67%。

黎等[30]以淫羊藿苷含量为指标,对淫羊藿的提取工艺进行研究。通过对加乙醇量、乙醇浓度、回流时间、回流次数共 4 个因素的正交实验,优选出最佳提取工艺为 15 倍量 70%乙醇溶液回流提取 2 次,每次 1 h。含量测定采用 HPLC,其色谱条件为:WG C18 9712002 柱,粒径 10 μm,4.6 mm×240 mm(大连依利特色谱公司)。流动相为乙腈-0.1 mol·L^{-1} NaH_2PO_4(35∶100),流量 1.0 mL·min^{-1},柱温 35 ℃,波长 270 nm,0.0100 AUFS。

15.4.6　芦丁

芦丁(rutin,**15-49**)是一种分布广泛的黄酮类化合物,这类化合物主要存在于槐米、芸香、荞麦、沙棘、山楂、桉树叶和烟叶等多种植物中,其中以槐米、荞麦、桉树叶含量最高,可作为提取芦丁的原料。芦丁既可作为治疗药物,又可作为保健品。芦丁具有维生素 P 样作用,能降低毛细血管通透性和脆性,促进细胞增生和防止血细胞凝聚,以及抗炎、抗过敏、利尿、解痉、镇咳、降血脂等方面的作用。临床上,芦丁主要用于高血压病的辅助治疗和用于防治脑血管出血、高血压、视网膜出血、急性出血性肾炎、慢性气管炎、血液渗透压不正常、恢复毛细血管弹性等症,同时还可用于预防和治疗糖尿病及合并高脂血症[31]。

我国各地大都从槐花米(*Sophora japonica* L.)中提取芦丁,槐花米加水直火加热,在不断搅拌下加石灰乳调 pH 8～8.5,升温到 80 ℃时,加硼砂,搅拌后直火加热至沸,95 ℃保温 50 min,趁热过滤。滤液加 10%HCl 调 pH 6.0～6.5,放置过夜,倾去上清液后抽滤得沉淀。抽滤物先用 pH 2 盐酸水洗一次,再用冷蒸馏水洗至中性,抽干,90 ℃以下烘干得粗芦丁。粗芦丁加水溶解,加热煮沸,加稀 NaOH 溶液使全溶,趁热抽滤。滤液加稀 HCl 调 pH 6～6.5,放冷即析出结晶,抽滤得精制芦丁[32]。



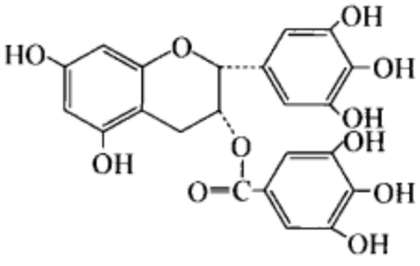
15-49

$C_{27}H_{30}O_{16}$, 浅黄色针晶, mp 176~178 ℃(水)

15.4.7 儿茶素和茶多酚

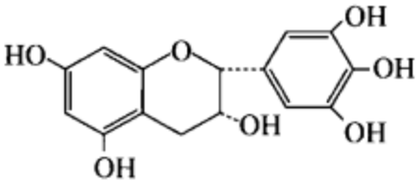
茶多酚的主要组分是儿茶素(catechin),它主要由 6 种单体组成,即 L-表没食子儿茶素没食子酸酯(L-EGCG,**15-50**)、L-表没食子儿茶素(L-EGC,**15-51**)、L-表儿茶素没食子酸酯(L-ECG,**15-52**)、L-表儿茶素(L-EC,**15-53**)、D,L-没食子儿茶素(D,L-GC,**15-54**)和 D,L-儿茶素(D,L-C,**15-55**)。

表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是茶多酚中儿茶素的主要单体,约占儿茶素含量的 50%～60%。有研究表明 EGCG 是一种重要的生物活性物质,具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、降血脂、降血压及抑菌等多方面的功效,并具有优良的清除自由基、防护脂质过氧化及抗突变的功效。其性能优于儿茶素的其他单体,可广泛应用于油脂、食品、医药、日化等领域,具有广阔的应用前景。因此对高纯度 EGCG 单体的分离、纯化技术研究成为茶多酚开发的一个新热点。



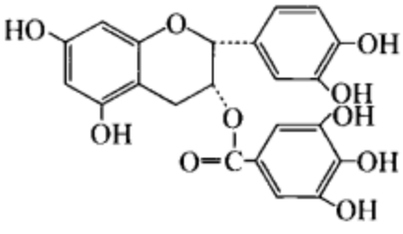
15-50

$C_{22}H_{18}O_{11}$, 白(灰白)色无定形粉末



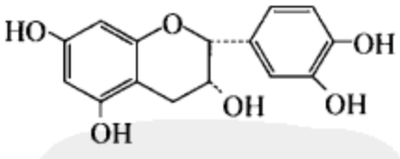
15-51

$C_{15}H_{14}O_7$, 灰白色无定形粉末



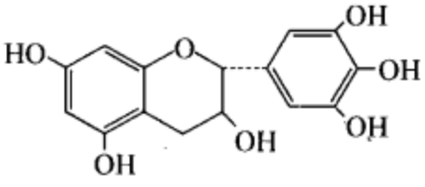
15-52

$C_{22}H_{18}O_{10}$, 白(类白)色无定形粉末



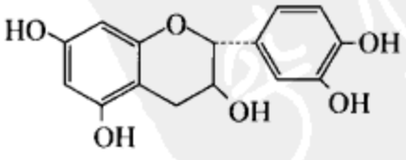
15-53

$C_{15}H_{14}O_6$, 灰白色无定形粉末



15-54

$C_{15}H_{14}O_7$, 灰白色无定形粉末



15-55

$C_{15}H_{14}O_6$, 针状结晶, mp 93~96 ℃(水/乙酸)
mp 175~177 ℃(不含结晶水)

有关茶多酚的制备方法通常采用:溶剂浸提法、络合沉淀法、树脂吸附法。

王等[33]报道了将茶叶用热水或乙醇浸渍，茶汁经真空浓缩后用氯仿萃取，除去其中的叶绿素和咖啡因，再用乙酸乙酯进行萃取，将含茶多酚的乙酸乙酯真空回收，即可制得粗产品茶多酚，收率为 10%。如果先用水溶液将茶多酚浸提出来，再利用茶多酚可与 Bi^{2+}、Ca^{2+}、Ag^{+}、Hg^{2+}、Sb^{3+} 等金属离子产生络合沉淀的原理，通过离心分离、酸转溶和溶剂萃取过程，可得到纯度较高的茶多酚。向叶汁中投入氢氧化钙，使茶多酚沉淀，将过滤后的沉淀物用硫酸转溶，然后再用乙酸乙酯萃取即可获得产品。如果以 $AlCl_3$ 作为沉淀剂可使茶多酚含量达到 99.5%，提取率达到 10.5%。

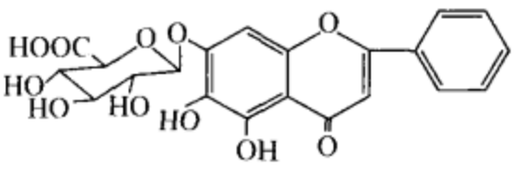
高等[34]报道将新鲜老龄茶叶 100 kg(于 2005 年 4 月采自浙江省富阳茶园)去杂质后，经检测水分含量 60%，EGCG 含量 4.93%(以干品计)，高温杀酶液固比 10∶1，杀酶温度为 95 ℃，杀酶时间为 7 min。而后匀浆萃取液固比 10∶1，匀浆萃取 3 min，萃取温度 85 ℃。匀浆液离心所得固形物(122 kg)再以负压空化混旋固液萃取，液固比 9∶1，空化混旋时间 25 min，负压空化混旋固液萃取 2 次。所得萃取液(553.5 kg)与上述的匀浆液(316.5 kg)合并，通过孔径为 0.2 μm 的无机陶瓷膜分离，操作压力为 0.35 MPa，温度 13 ℃。超滤液用管道泵输送至相对分子质量为 1000 的卷式纳滤膜分离系统，操作入口压力 0.7 MPa，出口压力 0.64 MPa，温度为 15 ℃。滤液用管道泵输送至反渗透浓缩装置进行茶多酚的浓集，操作入口压力 1 MPa，出口压力 0.95 MPa，温度为 15 ℃，在上述条件下经反渗透浓缩装置后得浓缩液。浓缩液上聚酰胺树脂纯化(EGCG-树脂为 1∶40)，在室温条件下，充分吸附后，加入去离子水洗涤至无色，加入 5%乙醇溶液洗脱除杂后，用 950 kg 80%乙醇洗脱，EGCG 收率为 68.23%。乙醇洗脱液负压(0.06 MPa)薄膜浓缩(温度为低于溶剂沸点温度 5～10 ℃)获得 EGCG 粗品浓缩液 109.3 kg。以体积比 1∶1 加入乙酸乙酯(100 L)负压空化混旋液液萃取后，通气量 3 VB·h^{-1}，萃取时间为 20 min，液液空化混旋萃取次数为 2 次，合并总的乙酸乙酯萃取液，得总乙酸乙酯萃取液 180 L，乙酸乙酯萃取液经负压薄膜浓缩后，再经真空干燥得粉末 1.89 kg，EGCG 收率为 53.58%，EGCG 含量为 55.89%。

一般对于低档茶叶，产地对茶多酚及 EGCG 的含量影响不大，但茶叶储存时间影响较大。由于儿茶素的易氧化性，同等级茶叶存放时间过长则导致茶多酚和 EGCG 提取率下降较大，茶液色泽变深变暗；而次等新茶与等级陈茶在提取率方面虽差别不大，但陈茶提取物颜色明显深于新茶。从成本及成品质量考虑，宜选用次等新茶为生产茶多酚和 EGCG 的原料。在提取溶剂方面，乙醇可较明显降低茶多酚尤其是 EGCG 的氧化速率，从而能提高茶多酚及儿茶素的收率。

15.4.8　黄芩苷

黄芩为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的干燥根，是中医临床常用的一味中药。黄芩苷(baicalin，**15-56**)是从其根中提取分离出来的一种黄酮

类化合物，具有显著的生物活性，药理上证实其具有抑菌、清热、降压、镇静、利尿、利胆、抗炎、抗变态反应、解毒、抗癌等作用；同时，它还能吸收紫外线，清除氧自由基，抑制黑色素的生成，是一种很好的功能性美容化妆品原料，具有较高的开发利用前景。



15-56

$C_{21}H_{18}O_{11}$，黄色结晶，mp 223 ℃

淡黄色细针晶，mp 223~225 ℃(甲醇)

黄芩苷为葡萄糖醛酸苷，具有弱酸性，其可在碱性溶液中溶解，形成钠盐，而在酸性条件下黄芩苷分子被还原析出。故调节溶剂的 pH 可达到较好的提取效果。

李等[35]报道的提取工艺为：黄芩粗粉，加 10 倍量水，加热煮沸两次，每次 1 h。合并提取液，加酸(浓 HCl)调至 pH 1～2，加热至 70～80 ℃保温 60 min。静置 12～24 h，过滤。沉淀物加水搅拌使成混悬液，用碱调 pH 7～7.5 至溶解后，加乙醇搅拌，过滤。再加酸调 pH 1～2，80 ℃保温，得到黄芩苷结晶。

莫等[36]采用 60%乙醇回流提取、酸沉、碱溶、酸沉的方法提取黄芩苷，该法快速、简便、低成本、易操作、高产率。具体提取工艺为：黄芩粗粉加 4 倍量 60%乙醇浸泡过夜，次日 90 ℃回流提取 3 次(加醇量依次为 4，3，2 倍)，每次 30 min，过滤，合并滤液，滤液回收乙醇至无醇味。水液加热至 80 ℃，盐酸调至 pH 1～2，保温 30 min，室温静置 24 h，离心。沉淀加 10 倍水搅拌成混悬液，20%NaOH 调至 pH 7，静置，离心，上清液加热至 40 ℃，搅拌下加入等体积乙醇(1∶1)，混匀，静置，离心，上清液盐酸调至 pH 1～2，80 ℃保温 30 min，室温放置，沉淀，离心，沉淀干燥得粗黄芩苷。

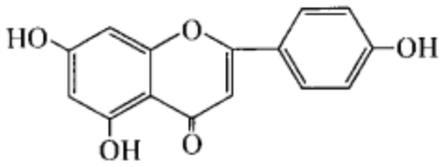
雷等[37]考察了温浸法、煎煮法、加碱温浸法 3 种方法，及粒度、提取时间和次数、分离方式等因素对黄芩苷收率的影响，得出黄芩苷的最佳提取工艺：黄芩粉碎为 40 目，加水煎煮 2 次，物料比为 1∶10 和 1∶5，时间 60 min 和 30 min，双层滤布过滤再离心分离，滤液 60 ℃用盐酸调至 pH 1～2，70 ℃保温 60 min，静置 3 h，蒸馏水洗涤沉淀 2 次，干燥得黄芩苷粗品。黄芩苷收率可达 13.67%，含量为 85.7%。黄芩苷在高温和强碱性溶液中极不稳定，在低温和酸性条件下比较稳定，提取 pH 不宜过 4，酸沉保温温度不宜太高。

所得黄芩苷粗品可加 8 倍量的蒸馏水，加热至 70 ℃时，加碱调至 pH 7，使粗品完全溶解，再用 HCl 调节到 pH 6，加乙醇至溶液含醇量约 70%，过滤，滤液再用 HCl 调至 pH 2，冷却静置至黄芩苷完全沉淀，过滤、干燥，即得黄芩苷精制品[38]。

15.4.9 芹菜素

芹菜素(apigenin，**15-57**)又称芹黄素，广泛存在于各类植物中，具有多种生物

学活性和药理作用，以抗肿瘤作用最为突出。



15-57

$C_{15}H_{10}O_5$，黄色针晶，mp 345~350 ℃

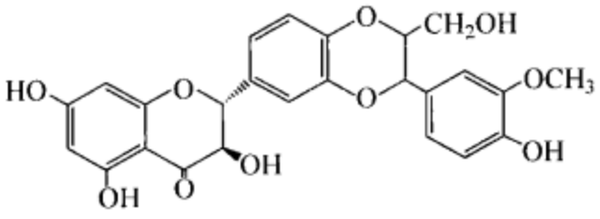
Kuroyanagi 等[39]取夏天采集的菊科植物 *Baccharis genistelloides* 干燥地上部分 2.5 kg，用甲醇提取，甲醇提取物用水与乙酸乙酯分配萃取，得乙酸乙酯部分 200 g，经硅胶柱色谱分离，用氯仿-甲醇梯度洗脱，合并相同流分，得Ⅰ～Ⅵ部分。Ⅵ部分再经硅胶柱色谱分离，分得芹菜素 200 mg。取冬天采集的干燥地上部分 2 kg，同法进行提取分离，得到芹菜素 1 g。该实验说明，同一药材不同的采集时间，其成分含量会有较大差异。

由于芹菜素具有酚羟基，故可利用该特性进行分离。Nakasugi 等[40]对巴西民间用于治疗肝病及风湿病的药材菊科植物 *Baccharis trimera* Less. 进行抗突变有效成分的研究。作者取药材 3.5 kg，甲醇加热提取 2 次，每次 2 h，甲醇用量第一次 19 L，第二次 12.7 L。合并两次提取液，减压回收甲醇得 346.82 g 提取物。300 g 提取物加水 1.2 L 搅匀，用 5%HCl 调至 pH 3，用 1.2 L 乙酸乙酯萃取（芹菜素在酸性条件下呈游离状态溶于有机相），共萃取 3 次。乙酸乙酯萃取液（显示有强的抗突变活性）3.16 L，浓缩至 2.0 L，用 2 L 5%$NaHCO_3$ 萃取 3 次（芹菜素呈弱酸性，在弱碱下不成盐，碱提除去酸性物质）。乙酸乙酯层回收溶剂得 89.18 g。用氯仿-甲醇梯度洗脱，合并相同流分，得 A～D 部分，质量分别为 24.42 g、23.27 g、17.83 g 和 8.72 g。B 部分（显示有强的抗突变活性）再进行硅胶柱色谱分离分别得到 B1（1.87 g）、B2（7.69 g）、B3（4.18 g）、B4（3.36 g）和 B5（1.88 g）。B3 和 B4 部分分别再进行 Sephadex LH-20 柱色谱分离，用甲醇洗脱，从 B3 部分得芹菜素 67 mg，从 B4 部分得芹菜素 24 mg。

15.4.10　水飞蓟宾

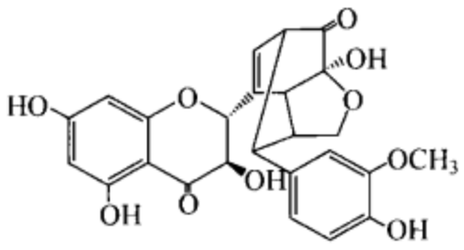
水飞蓟素（silymarin）是菊科植物紫花水飞蓟［*Silybum marianum*（L.）Gaertn］的干燥果实经提取、精制而得到的一类新型黄酮类化合物。其中包括水飞蓟宾（silybin，**15-58**）、水飞蓟宁（silydianin，**15-59**）、水飞蓟亭（silychristin，**15-60**）和异水飞蓟宾（isosilybin，**15-61**）等。在水飞蓟素中，水飞蓟宾、水飞蓟宁、水飞蓟亭、异水飞蓟宾比例为 3∶1∶1∶1。水飞蓟素具有保护肝细胞膜、改善肝功能、降血脂、保护心肌及抗糖尿病的作用[41]。其中最主要的活性成分是水飞蓟宾，具有苯骈二氧六环骨架结构，含 1 分子水的晶体。溶于丙酮、乙酸乙酯、甲醇、乙醇，微溶于氯仿，在水中的溶解度为 0.0401 mg·mL^{-1}。水飞蓟宾及异水飞蓟宾各有 2

个异构体，水飞蓟宾 A(silybin A，**15-62**)和水飞蓟宾 B(silybin B，**15-63**)，异水飞蓟宾 A(isosilybin A，**15-64**)和异水飞蓟宾 B(isosilybin B，**15-65**)[42]。



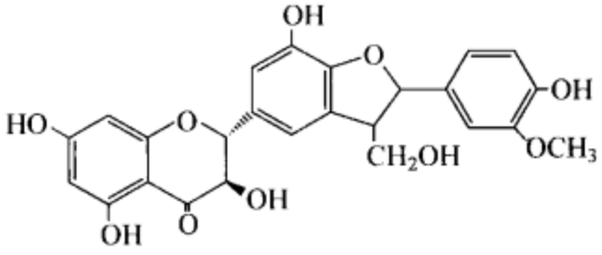
15-58

$C_{25}H_{22}O_{10}$, mp 167℃, 180 ℃(分解)



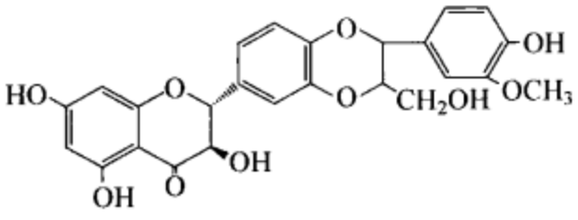
15-59

$C_{25}H_{22}O_{10}$, 白色片晶, mp 173~175 ℃(丙酮-甲醇, 1:2)



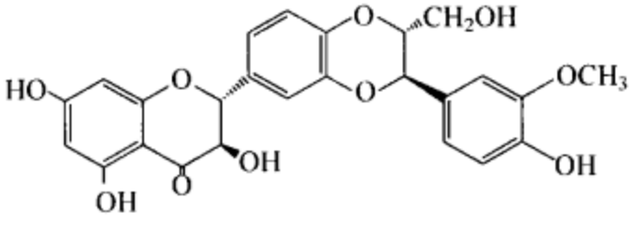
15-60

$C_{25}H_{22}O_{10}$, 白色针晶, mp 174~176 ℃



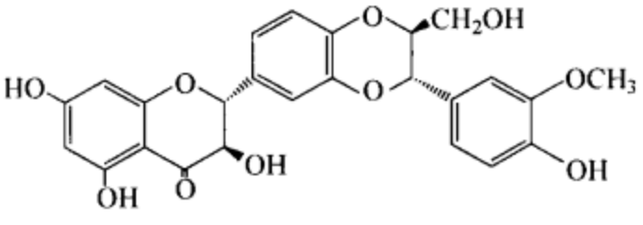
15-61

$C_{25}H_{22}O_{10}$, 白色针晶(EtOAc), mp 239~214 ℃



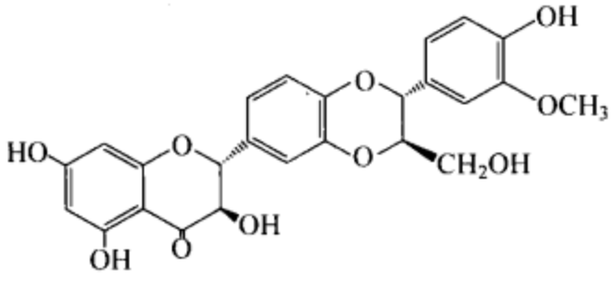
15-62

$C_{25}H_{22}O_{10}$, 淡黄色片晶, mp 162~163 ℃(甲醇-水)



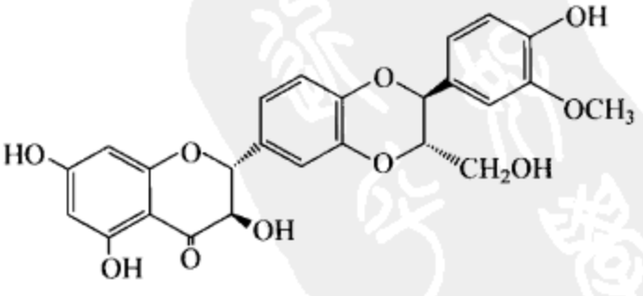
15-63

$C_{25}H_{22}O_{10}$, 黄色粒晶, mp 158~160 ℃(甲醇-水)



15-64

$C_{25}H_{22}O_{10}$, 无色针晶, mp 201~203 ℃(甲醇-水)



15-65

$C_{25}H_{22}O_{10}$, 无色针晶, mp 236~238 ℃(甲醇-水)

水飞蓟素大多采用有机溶剂浸取热回流的提取方法得到，主要有醇提法和乙酸乙酯提取法等。此外，在有机溶剂浸取条件下还有利用索氏提取法、超声提取法

进行水飞蓟素提取的研究。但这些方法普遍存在能耗高、生产周期长、产率低、产生大量有机废液等问题。针对上述问题，考虑到水飞蓟素为黄酮类物质，含有酚羟基，可以加碱成盐提高水溶性。

李等[43]用硅胶填充柱：将 100～200 目柱色谱硅胶，用氯仿-甲醇(20∶1)搅拌均匀，将玻璃柱均分为 6 等分，灌入约 4/6 柱高的硅胶，下口用脱脂棉塞住。将 6 g 水飞蓟素溶于乙酸乙酯(或甲醇)中，滤去不溶解的杂质，向滤液中加入约等于 1/6 柱的硅胶，充分拌匀。使溶剂挥干，装入柱中，上面用脱脂棉塞住。用氯仿-甲醇(20∶1)洗脱，接收洗脱液，直至洗脱液无色透明为止。将洗脱液减压浓缩后，用薄层色谱检测单斑的为纯品水飞蓟宾，将接收瓶中含纯品的液体合并，回收溶剂，浓缩干燥得白色晶体即为水飞蓟宾。

李等另取水飞蓟素，用少量甲醇(乙醇)加热溶解，滤去不溶物，室温放置。2 天后抽滤，固体用少量甲醇洗 3 次，再用少量石油醚洗 3 次，抽干。母液再在室温下放置 3 天，将 2 次获得的水飞蓟宾粗品(白色微黄色松散颗粒)用甲醇(或乙醇)加热使其溶解，加入 0.2 g 活性炭，微沸 3 min，趁热过滤，用少量热甲醇(或乙醇)洗 1 次，浓缩滤液，室温放置，析出白色晶体。过滤，用石油醚(60～90 ℃)和乙酸乙酯(1∶1)洗 2 次，抽干得晶体，母液浓缩一半后放置，过滤得白色晶体，合并两次晶体，得水飞蓟宾纯品约 0.38 g。

何等[44]取水飞蓟果实油渣粉碎，过 60 目筛，称取 400 g 粉末置索氏提取器中，用石油醚(30～60 ℃)脱脂 12 h 以上，至几乎脱尽为止。挥尽石油醚的粉末，再用丙酮回流提取 32 h，至提取液不再显黄酮反应($AlCl_3$ 试剂呈现黄绿色荧光)。回收丙酮，黄色油膜残留物用石油醚再次脱脂，残渣用甲醇回流提取 24 h，提取液用活性炭脱色，滤液于 3～5 ℃放置过夜，析出黄白色结晶，过滤，母液浓缩至 1/3 体积。如前放置，又析出结晶，滤过，将两次结晶合并溶于热乙酸乙酯中，加活性炭脱色，滤液稍浓缩，加入石油醚，使显微浑浊，放置过夜，析出白色结晶，过滤，用石油醚及少许乙酸乙酯洗涤，再用乙酸乙酯重结晶两次，60 ℃下干燥 24 h，获得白色结晶物 3.84 g，即水飞蓟宾，得率 0.96%。

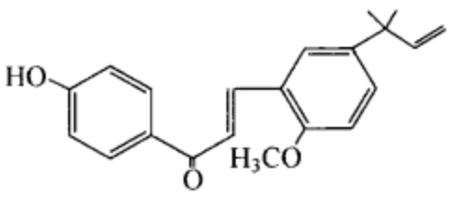
何等另取按上述方法脱脂后的水飞蓟油渣粉末，用乙酸乙酯回流提取约24 h，至提取液不再显示黄酮反应($AlCl_3$ 试剂呈现黄绿色荧光)，回收乙酸乙酯，得黄棕色浸膏 28 g。将浸膏与 2 倍量硅胶研磨均匀后，上硅胶柱(100 cm×6.5 cm)色谱，用苯、苯-乙酸乙酯(4∶1)、苯-乙酸乙酯(1∶1)依次洗脱，分段收集，共得 34 个组分(每流分 100 mL)。第 17～28 分段为水飞蓟果实中的主要药理有效成分的洗脱液，合并回收溶剂后，用热甲醇溶解，放置过夜析出白色粉末状结晶，甲醇重结晶，得黄白色结晶物 2.60 g，得率 0.65%。

15.4.11　甘草黄酮及查耳酮

甘草是豆科甘草属植物，其根及根茎为常用中药。具有益气补中、清热解毒、

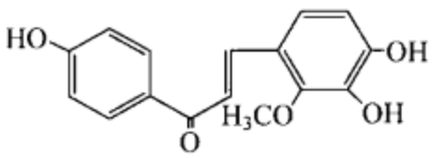
祛痰止咳、缓急止痛、调和药性，用于心气不足的心动悸、脉结代、脾气虚弱的倦怠乏力、食少便溏、腹腔及四肢挛急作痛以及热毒疮疡等症。其中主要含甘草黄酮及甘草查耳酮类成分。

杨等[45]取新疆甘草即胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.)废渣 1.5 kg 加 10 倍量 95%工业乙醇室温浸泡提取 24 h，提取液浓缩，浸膏加水混悬，氯仿萃取，回收氯仿，得浸膏约 50 g。取氯仿浸膏经硅胶柱色谱分离，氯仿-甲醇梯度洗脱，洗脱液经硅胶 TLC 检识，合并成 9 个流分。流分 1(12 g)经硅胶色谱分离，石油醚-丙酮梯度洗脱，得到化合物甘草查耳酮 A(licochalcone A，**15-66**)约 3 g。流分 2 经过反复硅胶柱色谱分离，氯仿-乙酸乙酯梯度洗脱，得到淡黄色结晶，再经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱分离，甲醇洗脱，得到化合物甘草查耳酮 B(licochalcone B，**15-67**)15 mg、刺甘草查耳酮(echinatin，**15-68**)10 mg，流分 3 经过反复硅胶柱色谱分离，石油醚-乙酸乙酯(4∶1)洗脱，再经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱分离，甲醇洗脱，得到化合物甘草黄酮(licoflavone，**15-69**)20 mg、5，7，4′-三羟基-8-异戊烯基黄酮(5，7，4′-trihydroxy-8-prenyl-flavone，**15-70**)30 mg，流分 4 经凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱，甲醇洗脱，得到化合物 7，4′-二羟基黄酮(7，4′-dihydroxyflavone，**15-71**)20 mg。



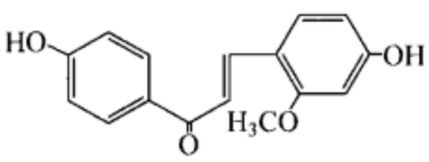
15-66

$C_{21}H_{22}O_4$，橙黄色针晶，mp 102~103 ℃(甲醇)



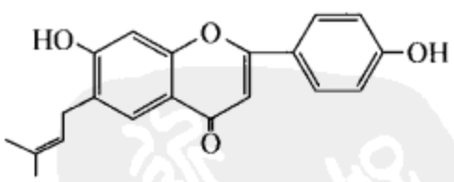
15-67

$C_{16}H_{14}O_5$，黄色针晶，mp 195~197 ℃(甲醇)



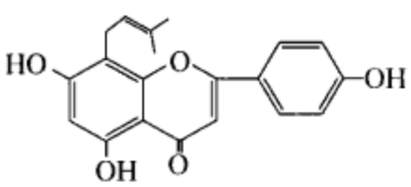
15-68

$C_{16}H_{14}O_4$，黄色结晶，mp 207~209 ℃(甲醇)



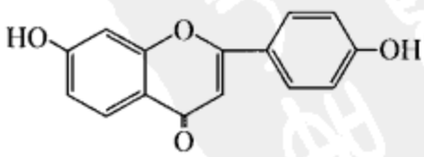
15-69

$C_{20}H_{18}O_4$，淡黄色结晶，mp 204~205 ℃(甲醇)



15-70

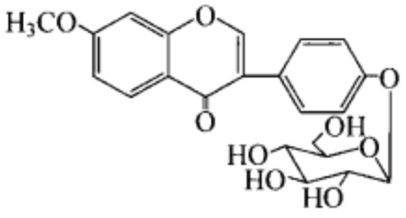
$C_{20}H_{18}O_5$，淡黄色结晶，mp 240 ℃(甲醇)



15-71

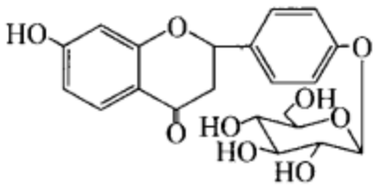
$C_{15}H_{10}O_4$，淡黄色结晶，mp 314~315 ℃(甲醇)

张等[46]取乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)根粉 3 kg，用 80%EtOH 渗漉，渗漉液浓缩至干得糖浆状棕色物 956 g。糖浆状物加 H_2O 热溶后用 EtOAc 萃取，浓缩得棕色固体 267 g，水溶液再用 *n*-BuOH 萃取，浓缩得浅棕黄色固体 110 g。取正丁醇萃取物 28 g，经聚酰胺(60～80 目)柱色谱分离，EtOH-H_2O 梯度洗脱，洗脱液 TLC 检识合并成 6 个流分。流分 2(3.82 g)经硅胶中压柱色谱分离，$CHCl_3$-MeOH 梯度洗脱，得化合物异芒柄花素-4′-葡萄糖苷(isoformononetin-4′-glucoside，**15-72**)80 mg 和化合物甘草苷(liquiritin，**15-73**)300 mg；流分 3(2.1 g)经 Sephadex LH-20 柱色谱和制备 TLC，展开剂 $CHCl_3$-MeOH(8∶2)，得化合物异甘草苷(isoliquiritin，**15-74**)300 mg；流分 4(1.9 g)经硅胶夹板色谱分离，$CHCl_3$-MeOH (2∶1)展开，割取色带 3(自上至下)，用 EtOH 洗脱，再经低压聚酰胺柱色谱、EtOH-H_2O 梯度洗脱和制备硅胶 TLC、展开剂 $CHCl_3$-MeOH(5∶1)，分别得化合物甘草素-7，4′-二葡萄糖苷(liquiritigenin-7，4′-diglucoside，**15-75**)50 mg 和化合物新异甘草苷(neoisoliquiritin，**15-76**)120 mg。



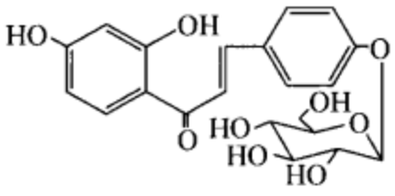
15-72

$C_{22}H_{22}O_9$，白色针晶，mp 216~218 ℃(甲醇)



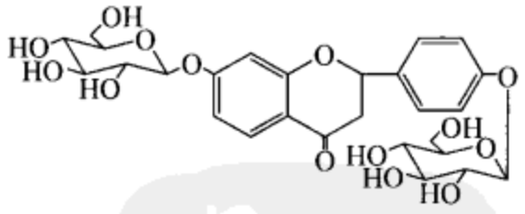
15-73

$C_{21}H_{22}O_9$，无色结晶，mp 212 ℃(甲醇)



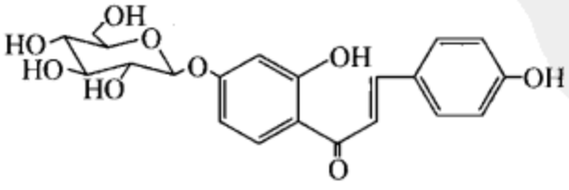
15-74

$C_{21}H_{22}O_9$，黄色针晶，mp 148~150 ℃(甲醇)



15-75

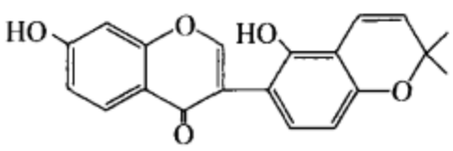
$C_{27}H_{32}O_{14}$，白色针晶，mp 270~273 ℃(甲醇)



15-76

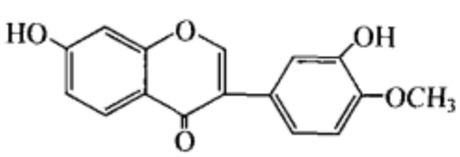
$C_{21}H_{22}O_9$，黄色粉末，mp 228~230 ℃(甲醇)

张等[47]取黄甘草(*Glycyrrhiza eurycarpa* P. C. Li)粗粉 30 kg,用 95%EtOH 回流提取,减压浓缩成稠膏 11 kg,加水溶解,依次用石油醚,CH_2Cl_2,EtOAc 及 *n*-BuOH 萃取成 4 个部分,得 CH_2Cl_2 萃取物 0.5 kg。取 CH_2Cl_2 萃取物 474 g,经硅胶柱色谱分离,CH_2Cl_2-MeOH 梯度(10∶0,9∶1,7∶3,5∶5,3∶7,0∶10)洗脱,每流分 500 mL,浓缩第 84～98 流分,再经硅胶柱色谱分离,CH_2Cl_2-MeOH 梯度洗脱,合并第 24～42 流分,浓缩后再进行硅胶柱色谱分离,CH_2Cl_2-MeOH 梯度洗脱,分别浓缩此柱的第 13～18 流分,第 36～41 流分和第 42 流分,再经 Sephadex LH-20 柱纯化,得到化合物黄甘草异黄酮 B(eurycarpin B,**15-77**)22 mg、毛蕊异黄酮(calycosin,**15-78**)16 mg 和芒柄花素 19 mg。合并第 23～35 流分,经聚酰胺柱色谱分离,CH_2Cl_2-MeOH 梯度洗脱及 Sephadex LH-20 柱纯化,得到化合物黄甘草异黄酮 A(eurycarpin A,**15-79**)40 mg 和菜豆异黄酮 A(licoisoflavone A,**15-80**)180 mg。



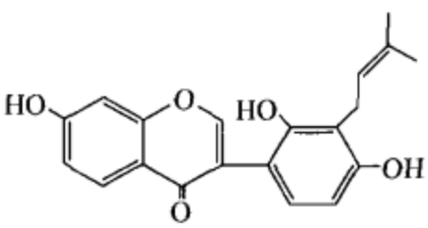
15-77

$C_{20}H_{16}O_5$, 淡黄色针晶, mp 227~229 ℃(甲醇)



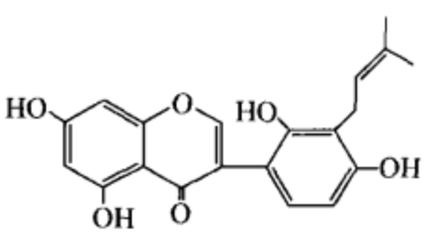
15-78

$C_{16}H_{12}O_5$, 白色针晶, mp 204~205 ℃(甲醇)



15-79

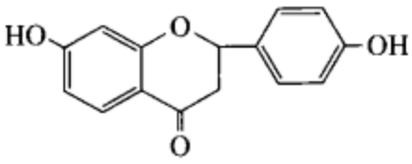
$C_{20}H_{18}O_5$, 淡黄色粉末, mp 85~87 ℃(甲醇)



15-80

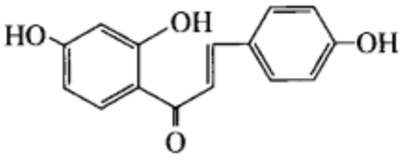
$C_{20}H_{18}O_6$, 淡黄色粉末, mp 69~70 ℃(甲醇)

杨等[48]取采自甘肃酒泉地区的胀果甘草(*Glycyrrhiza inflate* Bat.)根 48 kg,粉碎后用乙醇回流提取 3 次,合并浓缩得膏状物 8 kg。取 500 g 膏状物加水溶解,水不溶部分 400 g。将其用乙醇溶解,回收乙醇后经硅胶柱色谱分离,用二氯甲烷-乙酸乙酯(10.5∶10)展开,切割成 20 流分。7、11、13、14、15、17 和 20 流分再分别经聚酰胺中压柱色谱分离,以不同比例氯仿-甲醇洗脱,得化合物甘草查耳酮 A、甘草查耳酮 B、甘草黄酮、甘草苷元(liquiritigenin,**15-81**)、异甘草苷元(isoliquiritigenin,**15-82**)、7,4′-二羟基黄酮、芒柄花苷。



15-81

$C_{15}H_{12}O_4$, 无色针晶, mp 206~207 ℃(甲醇)

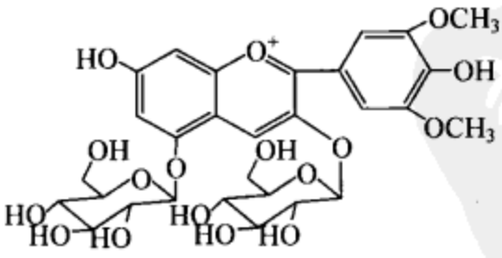


15-82

$C_{15}H_{12}O_4$, 黄色针晶, mp 212~213 ℃(甲醇)

15.4.12　锦葵花色素苷

锦葵(*Malva sylvestris* L.)是广泛分布于我国南北各地的 2 年生草本植物。锦葵全花入药,具有降血压、抗坏血病和利尿的功效,对支气管炎和咳嗽有缓解疗效。锦葵花色素苷(malvin)是天然的食品红色素,常以氯化物形式存在于植物细胞中。杨等[49]借鉴前人使用含无机酸的低沸点醇作溶剂提取植物中花色素的常用方法,用含盐酸的甲醇为溶剂,提取锦葵花色素苷。取锦葵干花 10 g,粉碎并过 400 目筛,加入甲醇-盐酸(95 ∶ 5)溶液刚好浸没干粉,搅拌。0.5 h 后,装入渗漉器,再用 150 mL 甲醇盐酸溶液徐徐加入渗漉筒,36 h 开始渗漉,收集淡红色渗漉液。在 50 ℃水浴中,真空度 680 mmHg 条件下浓缩得到约 40 mL 的浓缩物。冷却后,加入 120 mL 乙醚以去除果胶等杂质,静置过夜,第二天用漏斗过滤得红黑色树脂状物。在此红黑色物质中加入 15 mL 甲醇,振摇 2 h,再加入 50 mL 乙醚,于 4 ℃静置过夜,第二天过滤,得固态残余物。再用 15 mL 甲醇洗,振摇 2 h,又加入 50 mL 乙醚,再于 4 ℃静置过夜,第二天过滤分离得暗红色沉淀物,于 45 ℃干燥 2 h,即收得锦葵花色素苷(malvin,**15-83**)0.8 g。



15-83

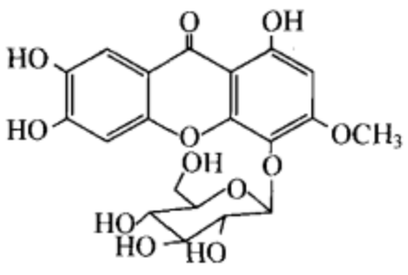
暗红色粉末, mp 165~170 ℃

15.4.13　吖酮类化合物芒果苷

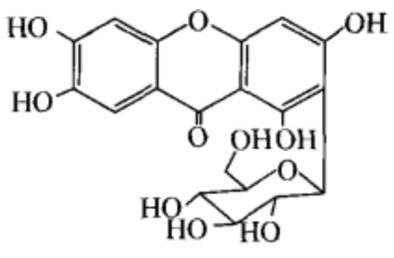
芒果叶为漆树科芒果(*Mangifera indica* L.)的叶。芒果叶具有平喘止咳祛痰、保肝利胆、抗脂质过氧化、抗病毒、抗肿瘤、抗菌、抗炎、镇痛等作用。芒果苷

(mangiferin)是芒果叶中的主要活性成分，研究发现芒果苷是治疗呼吸系统疾病的主要有效成分，此外，芒果苷还具有明显的中枢神经兴奋作用。

陆等[50]取 2 kg 芒果叶粗粉用乙醇回流 3 次，提取液浓缩至每毫升 0.3～0.4 g 生药。放置，过滤。滤渣用 50%乙醇及活性炭处理重结晶，得黄色结晶 20 g，取此结晶 800 mg，拌以适量聚酰胺粉，置于 60 g 聚酰胺粉的干柱上进行低压柱色谱分离，以甲醇为洗脱溶剂，合并在聚酰胺薄膜色谱上 R_f 为 0.5 的荧光斑点部分(展开剂为甲醇)，蒸干得黄色固体。用石油醚、氯仿处理后再以 55%乙醇重结晶，得到高异芒果苷(homoisomangiferin，**15-84**)300 mg；合并 R_f 为 0.4 的荧光斑点部分，蒸干，重结晶得芒果苷(mangiferin，**15-85**)。将滤液部分去鞣质后浓缩至每毫升 0.5 g 生药，上聚酰胺柱色谱，依次用水及不同浓度稀乙醇洗脱。按纸色谱上呈不同荧光斑点合并[展开剂为 MeOH-HOAc-H_2O(1 ∶ 0.5 ∶ 8.5)]。其中 30%的乙醇洗脱液分段收集成 a～d 4 部分，b 部分经浓缩后析出固体 650 mg，经纤维素干柱色谱(15%乙酸为洗脱剂)，收集纸色谱上 R_f 为 0.23 的荧光部分(展开剂为 15%乙酸)，蒸干后重复一次纤维素干柱色谱，得黄色粗晶。用 50%乙醇重结晶 2 次得淡黄色针晶，即异芒果苷(isomangiferin，**15-86**)。

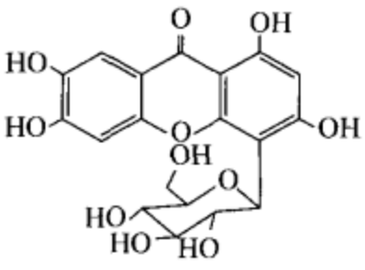


15-84



15-85

$C_{19}H_{18}O_{11}$，淡黄色针晶，mp 272~273 ℃



15-86

$C_{19}H_{18}O_{11}$，淡黄色针晶，mp 225 ℃

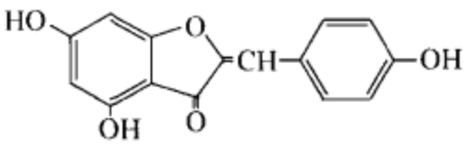
邓等[51]取芒果叶 200 kg(芒果苷含量平均 1.71%)，刀片式粉碎机将芒果叶打成 0.25 cm^2 细度的粉，90%以上的乙醇作提取溶剂，50 ℃搅拌提取 1 h，得粗品 3.129 kg(芒果苷含量 79.44%)。芒果苷粗品用 50%乙醇水溶液溶解成 0.5%的

溶液，先上 D101 柱，流出液再上 D296 柱，收集流出液，回收乙醇，析出芒果苷得芒果苷精品 2.073 kg(芒果苷含量 97.04%)，芒果苷的转移率为 58.92%。

15.4.14　橙酮或噢哜类(aurones)化合物

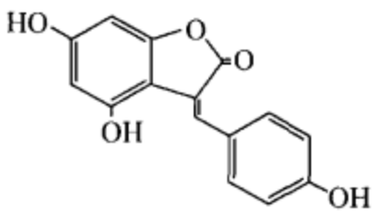
藏药生等系鼠李科猫乳属植物西藏猫乳(*Rhamnella gilgitica* Mansf. et Melch.)茎的干燥木质部。具有祛风湿、敛干黄水、消肿止痛等功效，可治疗风湿、黄水病、高山多血症，外用能消肿、治疮毒等症。

潘等[52]取西藏猫乳去皮的木部 41.5 kg，70%乙醇回流提取，减压回收溶剂后得浸膏 1.4 kg，以少量水溶解后，用石油醚、乙醚、乙酸乙酯和正丁醇依次萃取。乙醚提取物重结晶后的母液，经硅胶柱色谱[氯仿-甲醇(98∶2)～(6∶4)梯度洗脱]分为 Fr.1～40，进一步经硅胶柱色谱和聚酰胺柱色谱，从 Fr.30 中得到顺-4，6，4′-三羟基噢哜[(*Z*)-4，6，4′-trihydroxyaurone，**15-87**]200 mg 和 4，6，4′-三羟基异噢哜(4，6，4′-trihydroxyisoaurone，**15-88**) 9 mg。



15-87

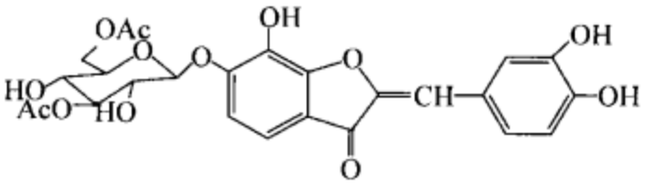
$C_{15}H_{10}O_5$，橙黄色针晶，mp 286~289 ℃(分解)



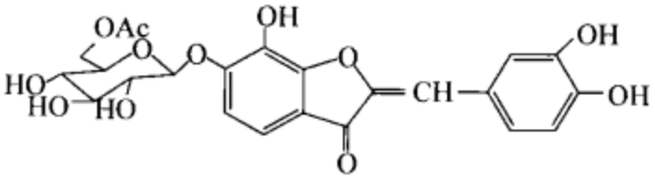
15-88

$C_{15}H_{10}O_5$，橙色针晶，mp 295~298 ℃(分解)

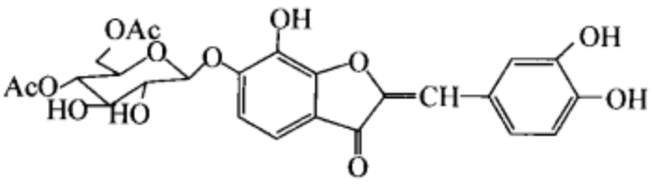
婆婆针(*Bidens bipinnata* L.)是菊科鬼针草属植物，具有清热解毒、散瘀消肿等功效。马等[53]取婆婆针药材 6.2 kg，粉碎，用工业乙醇回流提取 3 次，合并提取液，浓缩，去除叶绿素，浓缩液平均分为两部分，取其中一部分经聚酰胺和硅胶柱色谱分离，不同比例含水醇及氯仿-甲醇溶剂系统反复洗脱，分别得到 7，3′，4′-三羟基-6-*O*-(3″，6″-二乙酰氧基-*β*-D-吡喃葡萄糖基)-橙酮[6-*O*-(3″，6″-diacetyl-*β*-D-glucopyranosyl)-6，7，3′，4′-tetrahydroxyaurone，**15-89**]4.8 mg，7，3′，4′-三羟基-6-*O*-(6″-乙酰氧基-*β*-D-吡喃葡萄糖基)-橙酮[6-*O*-(6″-acetyl-*β*-D-glucopyranosyl)- 6，7，3′，4′-tetrahydroxyaurone，**15-90**]9.8 mg，7，3′，4′-三羟基-6-*O*-(4″，6″-二乙酰氧基-*β*-D-吡喃葡萄糖基)-橙酮[6-*O*-(4″，6″-diacetyl-*β*-D-glucopyranosyl)-6，7，3′，4′-tetrahydroxyaurone，**15-91**]25 mg。



15-89



15-90

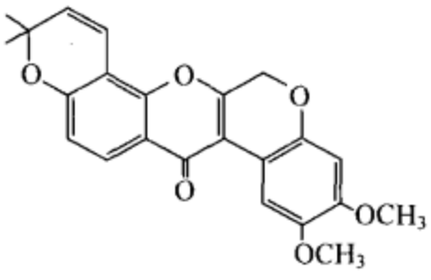


15-91

15.4.15 鱼藤酮类化合物

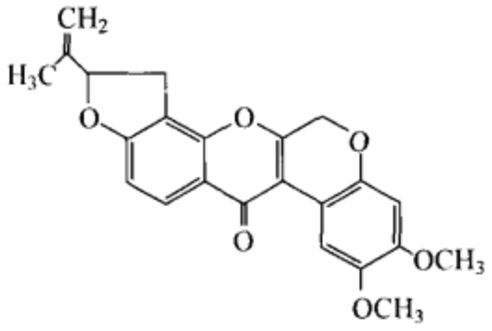
鱼藤酮(rotenoids)是从鱼藤属植物中提取分离出来的一种有杀虫活性的物质。主要存在于豆科植物中,特别是鱼藤属和灰叶属(*Tephrosia*)等植物中[54]。

徐等[55]取三叶鱼藤(*Derris trifoliata* Lour.)地上部分 10 kg,粉碎,分别用 95%乙醇、50%乙醇加热回流提取。提取物分别用石油醚、乙酸乙酯萃取 3 次。乙酸乙酯提取物 150 g 进行硅胶柱色谱分离,以 $CHCl_3$-CH_3OH(99∶1～1∶1)梯度洗脱,其中 Fr. 1 进行硅胶柱色谱分离,正己烷-乙酸乙酯(20∶1～1∶1)梯度洗脱,其中第 63 流分经重结晶得化合物去氢鱼藤素(dehydrodeguelin,**15-92**)8 mg;第 68～76 流分合并,经重结晶得化合物去氢鱼藤酮(dehydrorotenone,**15-93**)23 mg;第 89～96 流分合并,经反复硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 柱色谱、反相硅胶柱色谱分离,得粗品 500 mg,HPLC 制备[MeOH-H_2O(71∶29),7 mL·min^{-1}]得化合物 12α-羟基鱼藤酮(12α-hydroxyrotenone,**15-94**)30 mg 和化合物灰叶素(tephrosin,**15-95**)20 mg;Fr. 3 经硅胶柱色谱[氯仿-乙酸乙酯(20∶1)～(1∶1)]、Sephadex LH-20 柱色谱、HPLC 制备,得化合物 12$\alpha\beta$-hydroxyrot-2′-enonic acid(**15-96**)。



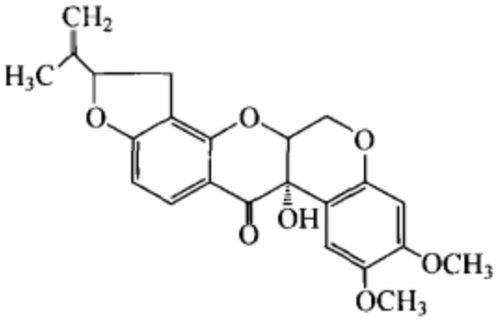
15-92

$C_{23}H_{20}O_6$, 黄色针晶, mp 227 ℃(丙酮)



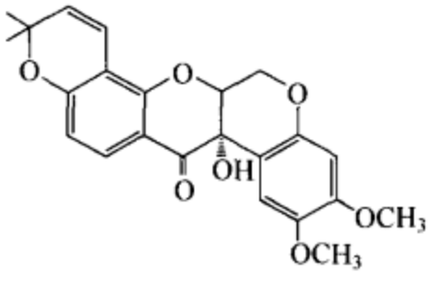
15-93

$C_{23}H_{20}O_6$, 黄色针晶, mp 218 ℃(丙酮)



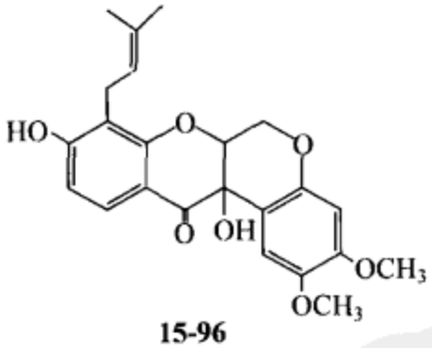
15-94

$C_{23}H_{22}O_7$, 黄色粉末, mp 140~141 ℃(氯仿-甲醇)



15-95

$C_{23}H_{22}O_7$, 黄色粉末, mp 198~199 ℃(氯仿-甲醇)



15-96

$C_{23}H_{22}O_7$, 黄色粉末(甲醇)

参 考 文 献

[1] 中国科学院上海药物研究所植物化学研究室编译. 黄酮体化合物鉴定手册. 北京：科学出版社，1981.

[2] Agrawal P K, et al. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Oxford, New York: Elsevier, 1989.

[3] Harborne J B. The Flavonoids: Advances in Research since 1986. London, New York: Chapman& Hall, 1994.

[4] Harborne J B, Baxter H. Handbook of Natural Flavonoids. Vol 2. Chichester: Wiley, 1999.

[5] Veitch N C, Grayer R J. Flavonoids and their glycoside, including anthocyanins. Nat Prod Rep, 2007, 25: 555～611.

[6] 张培成主编. 黄酮化学. 北京：化学工业出版社，2009.

[7] 唐浩国等著. 黄酮类化合物的研究,北京:科学出版社,2009.
[8] 何扩,李玉锋,张秀媛等. 超临界流体萃取银杏叶黄酮类物质的研究. 山西食品工业,2005,(4):2～5.
[9] 李军,冯耀声. 超临界二氧化碳萃取茶多酚的研究. 天然产物研究与开发,1996,8(3):42～47.
[10] 李国钟,李楠,保宇等. 超临界 CO_2 萃取甘草素. 化学工程,1994,22(5):26～28.
[11] 谢建春,骆宏鹏,朱丽荔等. 利用分子烙印技术分离中草药活性组分. 物理化学学报,2001,17(7):582～585.
[12] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用. 北京:化学工业出版社,2005.
[13] 桑已曙,闵知大. 峨嵋葛根的化学成分研究. 中国药科大学学报,2000,31(6):408～410.
[14] 桑已曙,史海明,闵知大. 峨嵋葛根的化学成分研究(Ⅱ). 中草药,2002,33 (9):776～778.
[15] 潘娓婕,刘谦光. 酸水解法从葛根中提取分离葛根素和大豆苷元. 天然产物研究与开发,2000,12(6):66～69.
[16] 张尊听. 葛根素和大豆苷元提取纯化工艺探讨. 中草药,2000,31(3):183～185.
[17] 谭天伟,王满意,贺湘凌等. 环糊精键合凝胶介质分离纯化黄酮化合物. 石河子大学学报(自然科学版),2005,23(6):265～268.
[18] Aedin C, Bryn H, Rosa M. Isoflavones, lignans and stibenes-origins, metabolism and potential importance to human health. J Sci Food Agric, 2000,80:1044～1047.
[19] Stephen B. Evolution of the health benefits of soy isoflvonens. PSEBM,1998,217:38～42.
[20] 刘苹苹,李云政,张青山. 大豆中异黄酮类化学成分的研究. 精细化工,2004,21(3):200～201.
[21] 徐德平,江汉湖,肖凯等. 大豆异黄酮的分离鉴定与抗氧化作用的研究. 南京农业大学学报,2001,24(3):89～92.
[22] 黄胜阳,屠鹏飞. 红车轴草异黄酮化合物的分离鉴定. 北京大学学报(自然科学版),2004,40(4):544～549.
[23] 张卫东,陈万生,王永红等. 灯盏花黄酮苷化学成分的研究. 中草药,2000,31(8):565～566.
[24] 张卫东,陈万生,王永红等. 灯盏花黄酮类化学成分的研究. 中国中药杂志,2000,25(9):536～538.
[25] 孔德云,罗思奇,李惠庭等. 槲寄生化学成分的研究Ⅲ. 药学学报,1988,23(8):593～600.
[26] 孔德云,罗思奇,李惠庭等. 槲寄生化学成分的研究Ⅳ. 药学学报,1988,23(9):707～710.
[27] 孔德云,李惠庭,罗思奇. 槲寄生化学成分的研究Ⅶ. 药学学报,1990,25(8):608～611.
[28] 郭宝林,余竞光,肖培根. 淫羊藿化学成分的研究. 中国中药杂志,1996,21(5):290～292.
[29] 梁冉,周乐,刘洪英等. 淫羊藿苷分离方法的研究. 西北农业学报,2005,14 (2):141～144.
[30] 黎万寿,陈幸. 淫羊藿苷提取工艺研究. 时珍国医国药,2000,11(11):971～172.
[31] 胡杰,邓宇. 芦丁提取工艺的综述. 中国食品添加剂,2006,5:94～99.
[32] 孙文基主编. 天然药物成分提取分离与制备. 北京:中国医药科技出版社,1994,324:64.
[33] 王栋,康健. 茶多酚的功效、提取和应用前景. 新疆大学学报(自然科学版),2007,24(2):217～221.
[34] 高彦华,祖元刚,杨磊. 茶多酚提取及 EGCG 纯化新工艺研究. 东北林业大学,2006.
[35] 李彤彤,李宏,侯茂君等. 黄芩化学成分及黄芩苷提取方法研究进展. 天津药学,2002,14(3):7～8.
[36] 莫金钢,赵骥民,张黎丽. 黄芩苷提取工艺的研究. 长春师范学院学报(自然科学版),2008,27(2):47～50.
[37] 雷泞菲,彭书明,周嘉峪等. 黄芩中黄芩苷提取工艺的研究. 时珍国医国药,2007,18 (11):2664～2666.
[38] 詹国平,韩军伟,向颖. 黄芩苷的提取与精制. 中医药信息,2006,23(2):46～47.
[39] Kuroyanagi M, Fujita K, Kazaoka M et al. Studies on the constituents of *Baccharis genistelloides*. Chem Pharm Bull,1985,33(11):5075～5078.

[40] Nakasugi T, Komai K. Antimutagens in the Brazilian folk medicinal plant Carqueja (*Baccharis trimera* Less.). J Agric Food Chem, 1998, 46: 2560～2564.
[41] 闫玉峰，于健东. 水飞蓟的化学成分及药理研究进展. 中国药事，2000，14(5)：335～337.
[42] Lee D Y, Liu Y. Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A, and isosilybin B, isolated from *Silybum marianum* (milk thistle). J Nat Prod, 2003, 66(9): 1171～1174.
[43] 李继平，刘丹华，周颖等. 水飞蓟宾精制方法的比较与改进. 辽宁化工，2006，35(12)：712～713，721.
[44] 何维明，杨菁，毛根年等. 水飞蓟有效成分的研究——水飞蓟宾的提取、分离鉴定. 畜牧兽医学报，1996，27(2)：154～158.
[45] 杨琳，车庆明，毕诚等. 甘草废渣中黄酮成分的研究. 中草药，2007，38(5)：671～673.
[46] 张海军，刘援，张如意. 乌拉尔甘草中黄酮甙类成分的研究. 药学学报，1994，29(6)：471～474.
[47] 张聿梅，许旭东，胡碧煌等. 黄甘草异黄酮成分的研究. 药学学报，1997，32(4)：301～304.
[48] 杨世林，刘永濯. 胀果甘草的化学成分. 植物学报，1988，30(2)：176～182.
[49] 杨振国，余光录，刘克. 锦葵花色素苷的提取与鉴定初报. 中国野生植物资源，1992，(1)：36～38.
[50] 陆仲毅，毛铱德，何孟如等. 芒果叶化学成分研究. 中草药，1982，13(3)：3～6.
[51] 邓家刚，李学坚. 提取高纯度芒果苷的工艺研究. 中国中医药科技，2008，15(1)：50～51.
[52] 潘勤，杨培全，陈桂红等. 藏药"生等"的化学成分研究(Ⅰ). 中草药，1998，29(2)：76～79.
[53] 马明，王建平，徐凌川. 婆婆针化学成分的研究. 中草药，2005，36(1)：7～9.
[54] 徐汉虹，黄继光. 鱼藤酮的研究进展. 西南农业大学学报，2001，23(2)：140～143.
[55] 徐鲁荣，李杉，吴军等. 三叶鱼藤的鱼藤酮化学成分. 中药材，2007，30(6)：660～662.

（孔德云）

第 16 章　酚类和木脂体类化合物

16.1　酚类化合物

广义地说，酚类化合物是芳香族羟基衍生物的总称。酚类成分是植物体内的重要次生代谢产物，广泛分布于药用植物中，如忍冬科(Caprifoliaceae)的金银花(又称忍冬，*Lonicera japonica*)，蔷薇科(Rosaceae)的托盘根(又称牛叠肚，*Rubus crataegifolius*)，菊科(Compositae)的蒲公英(*Taraxacum mongolicum*)、灯盏花(又称短葶飞蓬，*Erigeron breviscapus*)，唇形科(Labiatae)的鼠尾草(*Salvia japonica*)，橄榄科(Burseraceae)的方榄(*Canarium bengalense*)，伞形科(Umbelliferae)的当归(*Angelica sinensis*)、川芎(*Ligusticum chuanxiong*)等。很多酚类化合物与烷基、酰基或糖结合成衍生物或苷的形式存在。可以这样说，凡是植物中存在的芳香化合物，都有以其羟基衍生物伴随存在。它们虽然在酚性基团的性质上是共同的，但由于基本母核不同，因此又有各不相同的性质。

酚类化合物是一种良好的抗氧化剂，这是因为酚类化合物中的酚羟基是优良的氢或中子给予体，对能引起生物组织膜因产生过氧化作用而导致结构和功能损伤的羟基自由基(·OH)、过氧自由基(·OOH)等有明显的清除作用。自由基被认为是引起人体衰老和某些慢性疾病发生的原因之一，当人体内的自由基产生过多或清除过慢时，就会转而攻击各种细胞器官并使之受到损伤，从而加速机体的衰老过程并诱发各种疾病。

16.1.1　酚类化合物的颜色反应

酚性化合物的定性实验主要利用酚羟基能被氧化成醌以及利用芳香化合物能与重氮盐偶合呈色的性质。最常用的是三氯化铁呈色反应，酚类化合物(或生药提取物)的水或乙醇溶液遇三氯化铁(1%～3%)的乙醇或水溶液，由于不同母核及分子大小、羟基多少而呈蓝、绿、黑色，个别也有呈红、紫等颜色。此外，酚类化合物常用的鉴别反应还有 4-氨基安替比林-铁氰化钾反应、对氨基苯磺酸重氮盐法、明胶-氯化钠反应、溴水反应、乙酸铅-硫酸铁铵反应、香草醛-浓硫酸反应、对二甲氨基苯甲醛反应、甲醛浓盐酸-硫酸铁铵反应等。

16.1.2　酚类化合物的提取分离和应用

酚性化合物的化学性质具有弱酸性，一般均能溶于氢氧化钠等强碱中，有些则能溶于碳酸钠及氢氧化铵溶液中。其能溶于碱溶液，而遇酸则析出，能转溶于有机试剂的性质，可用作酚性物质的提取分离方法，另外也可利用酚羟基能与金属成盐的性质而采用铅盐（乙酸铅）、铜盐（氢氧化铜）沉淀法，石灰吸附法，离子交换法等，对某些小分子酚性化合物还可以用水蒸气蒸馏法提取分离。

由于植物中的酚性物质常常有许多同系物共同存在，因此在分离纯化及结晶方面有时会带来一定的困难，有些要在纯度较高的情况下才能析出结晶，常用的分离纯化方法为硅胶色谱、聚酰胺色谱及凝胶柱色谱。例如，以 Sephadex LH-20 为填充剂用于不同相对分子质量酚类的分离，缺点是不稳定，对某些酚类化合物有很强的吸附力，不易洗脱干净而影响填充剂的使用寿命。采用聚乙烯凝胶 Toyopearl HW-40F 柱色谱分离时，填料可用碱水再生而可长期使用。又如，液滴逆流色谱和离心分离色谱法目前已成为酚类化合物常用的分离手段，它的优点是避免了酚类因吸附而损失。大孔吸附树脂 Dianion HP-20 和 MCI-gel CHP-20P 常用于各种极性大的酚类化合物的分离。

天然酚性化合物常有广泛的生理作用，一般简单的酚性化合物多具有抗菌作用。紫金牛酚Ⅰ和紫金牛酚Ⅱ（ardisinol Ⅰ 和 ardisinol Ⅱ）、愈创木酚（guaiacol）等都有较好的抗菌作用，从牡丹（*Paeonia suffruticosa*）皮及徐长卿（*Cynanchum paniculatum*）中分得的丹皮酚（paeonol）具有镇痛抗炎作用。麝香草酚（thymol）抗菌作用较强，早期曾用于驱肠虫。从须松萝（*Usnea barbata*）中分得的松萝酸（usnic acid）为地衣类中得到的广谱抗菌物质，对结核杆菌也有较强的抑制作用；临床试用对链霉素有协同作用，但由于毒性较大，临床未正式使用。这些化合物的结构如图 16.1 所示。

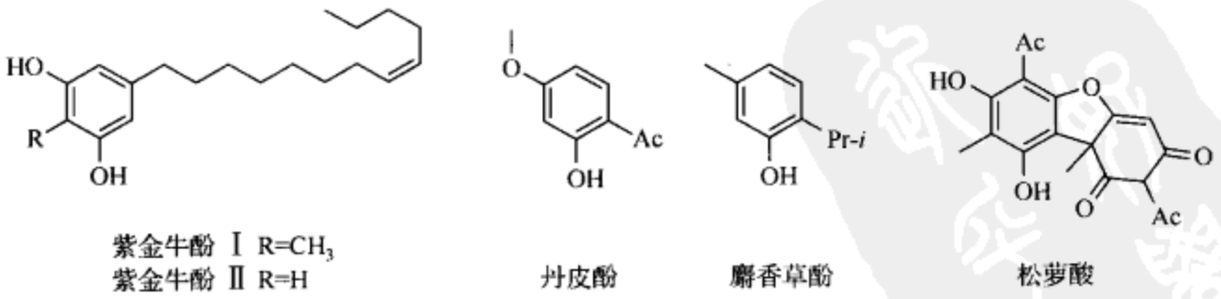
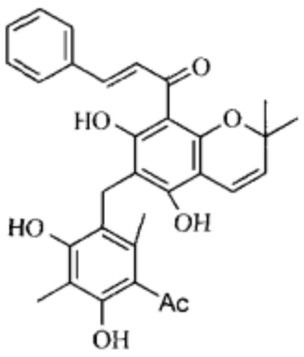


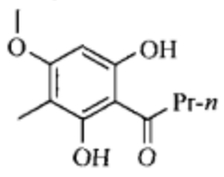
图 16.1　部分活性天然酚性化合物的结构

人们熟知的鳞毛蕨属植物绵马贯众（又称粗茎鳞毛蕨，*Dryopteris crassirhizoma*）和大戟科植物菲岛楸（又称粗糠柴，*Mallotus philippensis*）是历来重要的驱虫药，并曾列入各国药典。它们的有效成分均为间苯三酚类化合物。菲岛楸的有

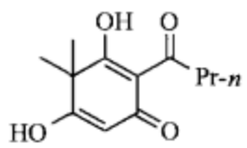
效成分槭毒素(rottlerin)有驱绦虫作用,并有较强的细胞毒作用。对贯众及其他鳞毛蕨属植物也进行了比较广泛的化学研究,从中分得一系列绵马酚(aspidinol)和绵马酸(filicinic acid)组成的二聚、三聚和四聚体,如绵马根酸(filixic acid)。根据我国曾有民间使用越冬仙鹤草(又称龙芽草,*Agrimonia pilosa*)根芽治疗绦虫病的经验,从中分得有效成分鹤草酚(agrimophol),临床治绦虫病,有效率基本上可达100%,并且不须加服泻药。从仙鹤草的全草中除可分得少量鹤草酚外,还分得仙鹤草酚(agrimol)A、B、C、D、E,它们均有抗疟作用,但由于有强烈的致腹泻、呕吐副作用,临床未曾使用。仙鹤草酚类并有细胞毒作用。本类型化合物均有不同程度的驱蛔虫、绦虫作用,并均有呕吐、腹泻、下痢等副作用,现已很少使用。这些化合物的结构如图16.2所示。



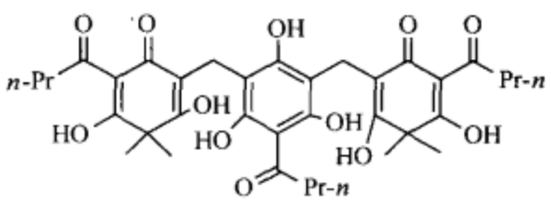
槭毒素



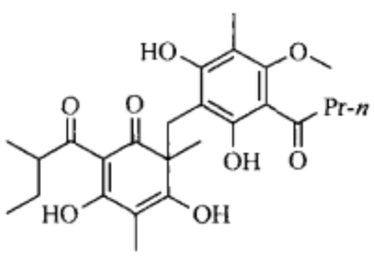
绵马酚



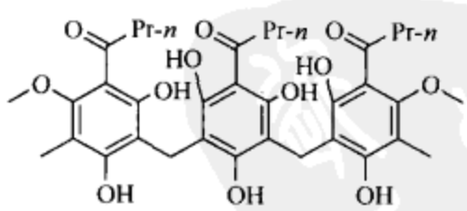
绵马酸



绵马根酸



鹤草酚



仙鹤草酚C

图16.2 部分间苯三酚类化合物的结构

从大麻(*Cannabis sativa*)中分得萜酚类化合物,很多具有镇痛、安眠、镇静、致幻等生理作用。目前从大麻中分得的大麻酚类约20多种,其中3-双键四氢大麻酚类 Δ^3-THC(图16.3)对中枢神经系统作用最强。国外学者进行大量结构改造,总

结构效关系，其 DMH(二甲基庚基)衍生物能提高药效 500 倍，已成强镇痛及催眠镇静作用的水溶性衍生物并在临床试用。长期使用这类化合物会产生成瘾性，因此作为麻醉品类应严格控制其使用。

棉酚(gossypol，图 16.4)系从陆地棉(*Gossypium hirsutum*)种子中分得的有毒成分，有抗生育作用，曾试用作男用避孕药。棉酚在动物试验对单纯疱疹病毒和淋巴白血病有效。

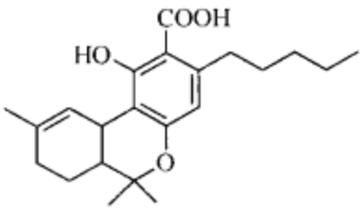


图 16.3　四氢大麻酚酸结构

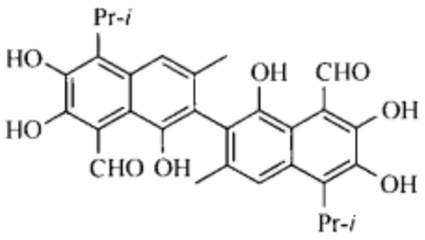


图 16.4　棉酚结构

当归(*Angelica sinensis*)、川芎(*Ligusticum chuanxiong*)、蒲公英(*Taraxacum mongolicum*)等中药材的水溶性提取物中的主要活性成分阿魏酸(ferulic acid，图 16.5)具有明确的药理活性和分子改造前景，在临床上用于心脑血管疾病的治疗。

硝基菲酸类如马兜铃(*Aristolochia debilis*)中的马兜铃酸(aristolochic acid，图 16.6)具有细胞毒作用和抗生育作用，低剂量能增强人和动物吞噬细胞的吞噬作用，在欧洲曾作为促进免疫功能药物而批准销售。但因较大剂量有致癌作用而停用，近年又发现硝基菲酸类具有肾脏毒性。西方发达国家对含有马兜铃酸类的中药及复方均停止进口。

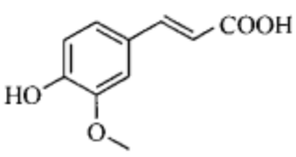


图 16.5　阿魏酸结构

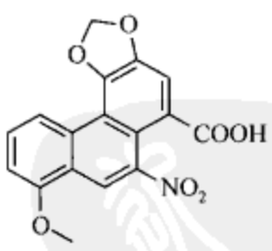


图 16.6　马兜铃酸 A 结构

另外，自然界存在另一类酚性化合物，称为鞣质(单宁)，鞣质一般为多种复杂酚性化合物的总称，如一般酚性化合物、还原型的黄酮(黄烷)花青色素及其他复杂的含氧杂环化合物。它们在植物中往往含量不低，但由于多种同系物共同存在、酚羟基基团较多，有些以苷的形式和缩合鞣质的形式存在，并且由于水溶性较大和多酚性化合物容易氧化，因而分离纯化比较困难。单宁类酚性化合物一般均有抗菌作用，很多并有细胞毒和抗肿瘤作用。

16.1.3 酚类化合物的提取分离实例

16.1.3.1 马兜铃酸

马兜铃酸(aristolochic acid)是3,4-亚甲二氧基-10-硝基-1-菲酸类化合物,也是天然产物中发现的第一类含硝基化合物,结构多样。马兜铃酸类化合物的结构如图16.7和表16.1所示[1~3],最简单的为马兜铃次酸Ⅱ。马兜铃总酸为黄色针状结晶或粉末,微溶于水,可溶于醇、乙醚、氯仿等有机溶剂[4]。其普遍存在于马兜铃科植物,其他科属也有存在[5,6],2000年美国食品及药品管理局(FDA)发布的有关植物主要包括马兜铃科(Aristolochiaceae)马兜铃属(*Aristolochia*)植物马兜铃(*Aristolochia debilis*)、关木通(*Aristolochia manshuriensis*)、广防己(*Aristolochia fangchi*)、青木香(北马兜铃 *Aristolochia contorta* 的根)、天仙藤(北马兜铃 *Aristolochia contorta* 的茎叶)、朱砂莲(*Aristolochia cinnabaria*)、寻骨风(*Aristolochia mollissima*),细辛属(*Asarum*)植物细辛(*Asarum sieboldii*)、杜衡(*Asarum forbesii*),木通科(Lardizabalaceae)木通属(*Akebia*)植物木通(*Akebia quinata*),毛茛科(Ranunculaceae)铁线莲属(*Clematis*)植物川木通(*Clematis armandii*)、威灵仙(*Clematis chinensis*),防己科(Menispermaceae)风龙属(*Sinomenium*)植物青风藤(*Sinomenium acutum*),千金藤属(*Stephania*)植物粉防己(*Stephania tetrandra*),蝙蝠葛属(*Menispermum*)植物北豆根(蝙蝠葛 *Menispermum dauricum* 的根茎),菊科(Asteraceae)川木香属(*Dolomiaea*)植物川木香(*Dolomiaea souliei*),云木香属(*Aucklandia*)植物木香(*Aucklandia lappa*)等。中国学者经研究[5,6],排除了杜衡及后十余种药用植物。

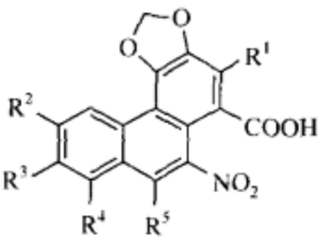


图16.7 马兜铃酸类化合物的基本骨架

表16.1 马兜铃酸类化合物的结构

马兜铃酸	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
aristolochic acid Ⅰ	H	H	H	OCH_3	H
aristolochic acid Ⅰa	H	H	H	OH	H
aristolochic acid Ⅱ	H	H	H	H	H
aristolochic acid Ⅲ	H	OCH_3	H	H	H
aristolochic acid Ⅲa	H	OH	H	H	H
aristolochic acid Ⅳ	H	OCH_3	H	OCH_3	H
aristolochic acid Ⅳa	H	OH	H	OCH_3	H
aristolochic acid Ⅴ	H	OCH_3	OCH_3	H	H
aristolochic acid Ⅴa	H	OH	OCH_3	H	H

续表

马兜铃酸	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
aristolochic acid Ⅵa	OH	H	H	OCH_3	H
aristolochic acid Ⅶ	H	H	OCH_3	OCH_3	H
aristolochic acid Ⅶa	H	H	OH	OCH_3	H
aristolochic acid Ⅷa	H	H	OCH_3	OH	H
9-methoxy aristolochic acid Ⅱ	H	H	H	H	OCH_3
9-hydroxy aristolochic acid I	H	H	H	OCH_3	OH
aristoloside	H	OGlu	H	OCH_3	H
aristolochic acid Ⅲa-6-*O*-*β*-D-glucoside	H	OGlu	H	H	H

在发生“中草药肾病(Chinese herb nephropathy, CHN)”之前，关于马兜铃酸的研究主要侧重于它的活性研究，认为马兜铃酸是马兜铃属中药的活性成分，它具有抗感染、抗癌及增强细胞免疫功能等活性[7,8]，其他药理作用包括利尿、祛痰、扩张支气管、强心、降血压、抗心律失常、扩张冠状动脉、镇静、催眠、促递质释放，以及抗菌、抑制肿瘤、抗变态反应、抗炎、解热镇痛等[9]。20 世纪 90 年代，由于长期大量服用含有广防己的减肥药，比利时发生了 100 多例中末期肾病，原因是广防己中的马兜铃酸具有致癌和致肾间质纤维化毒性，由此提出了所谓的“中草药肾病”问题[10]。急性毒性实验表明，马兜铃酸对大、小鼠给药的 LD_{50} 分别为 183.9 mg·kg^{-1}和 55.9 mg·kg^{-1}，静脉给药时分别为 74.0 mg·kg^{-1}和 38.4 mg·kg^{-1}[11]。以马兜铃酸为主要成分的关木通单次口服 10 g 即可引起中毒。基因水平研究表明，马兜铃酸及其肠内代谢产物马兜铃酸内酰胺 I 都可以与 DNA 形成加合物，毒性以肾毒性为主，同时有肝毒性和致癌性[12,13]。由于马兜铃酸存在肾毒性，中国国家食品药品监督管理局(SFDA)分别于 2003 年 4 月 1 日和 2004 年 8 月 5 日发出通知，要求取消关木通、广防己、青木香的药用标准，将关木通、广防己、青木香分别替换为木通(木通科)、防己(防己科)、土木香(菊科)，其他含马兜铃酸的中药必须严格按处方药管理。因此，目前在开发新药的时候，对含有马兜铃酸的中药一般要进行去除马兜铃酸处理以达到其限量标准。

1) 去除药材中的马兜铃酸的方法[14]

通用方法：药材采用浓度为 0.01～0.2 N 的盐浸泡 12～48 h，盐水用量为 5～10 倍(v/w)，优选 6 倍量 0.05 N 的 $NaHCO_3$ 浸泡24 h；清水淋洗 3～5 次，洗去药材中残余的盐溶液及残余的马兜铃酸钠；切片 2～12 mm，优选 5～6 mm；清水浸泡 2～6 h，优选 3 h；重复上述盐泡-淋洗-清水浸泡-淋洗过程 3～12 次，优选 6～7 次；沥干，再用米醋进行浸泡或淋洒，焖制 3 h，文火炒干，米醋用量为原药材量的 10%～40%(v/w)，优选 20%。

实例 1　关木通炮制

称取关木通生品 500 g，用浓度为 0.1 N 的 $NaHCO_3$ 溶液 10 倍量浸泡 24 h，以清水洗 3 次，每次约 10 倍量的水，洗至无色时再浸泡下一次，重复浸泡-淋洗 5 次，沥干，醋制，焖透，炒干，得到去除马兜铃酸的关木通制品，米醋用量为原药材的 20%(v/w)。HPLC 分析制品中马兜铃酸的去除率为 93%以上。

实例 2　青木香炮制

河北国安青木香生品 10 kg，用浓度为 0.05 N 的 $NaHCO_3$ 溶液 6 倍量浸泡 24 h，以清水洗 3 次，切片 5～6 mm，清水浸泡 3 h，重复上述碱泡-淋洗-清水浸泡-淋洗过程 6 次，沥干，醋制，焖制 3 h，文火炒干，得到去除马兜铃酸的青木香饮片，米醋用量为原药材的 20%(v/w)。HPLC 分析制品中马兜铃酸的去除率达 99%以上。

实例 3　细辛炮制

称取细辛生品 3 kg，用浓度为 0.05 N 的 $NaHCO_3$ 溶液 6 倍量浸泡 24 h，以清水洗 3 次，清水浸泡 3 h，重复上述碱泡-淋洗-清水浸泡-淋洗过程 5 次，沥干，醋制，焖制 3 h，文火炒干，得到去除马兜铃酸的细辛制品，米醋用量为原药材的20%(v/w)。HPLC 分析制品细辛中马兜铃酸的去除率达 99.99%以上。

2) 马兜铃酸的提取及分离方法

方法一：关木通中马兜铃酸 A(aristolochic acid Ⅰ)的分离[15]

马兜铃总酸的提取：将关木通中药饮片用微型植物粉碎机粉碎，过 3 号筛后准确称量 150 g。将称量的关木通药粉用滤纸包装好后置于 1000 mL 索氏提取器中，加入 700 mL 无水乙醇加热回流(80 ℃)，至滤纸包周围的无水乙醇无色时终止提取并取出提取的药液。将提取的药液置于旋转蒸发仪中减压浓缩(0.09 MPa，55 ℃)，仔细收集浓缩液并置于真空干燥箱(0.09 MPa，55 ℃)中，得到浸膏，将浸膏用饱和 $NaHCO_3$ 溶液溶解，充分搅拌后放置于 4 ℃冰箱静置分层 24 h。吸取上层油层，并用饱和 $NaHCO_3$ 溶液溶解，充分搅拌后放置于 4 ℃冰箱静置分层 24 h，下层澄清液备用。待上层油层的 $NaHCO_3$ 溶液再次分层后，弃去再次分层的上层油层，下层澄清液和第一步分层得到的下层澄清液合并备用。将合并后的下层澄清液用 5 $mol \cdot L^{-1}$ HCl 溶液调节至 pH3，充分搅拌后放置 3 h，过滤，将得到的沉淀用丙酮充分溶解，置于旋转蒸发仪中减压浓缩(0.09 MPa，55 ℃)，将浓缩液放置冷却，待析出结晶后过滤，弃去滤液，将获得的结晶用氯仿重结晶，初步获得马兜铃总酸粗品。

马兜铃酸 A 的分离：将提取得到的马兜铃总酸以硅胶 G 粉为柱材料进行柱色谱分离，洗脱液为氯仿∶乙酸乙酯∶苯(2∶1∶1)，收集洗脱液于旋转蒸发仪中减

压浓缩(0.09 MPa，55 ℃)，将浓缩液放置冷却，待析出结晶后过滤，弃去滤液，将获得的结晶用乙醇重结晶，得马兜铃酸 A 结晶。

方法二：木通马兜铃中马兜铃酸的分离[16]

木通马兜铃[关木通(*Aristolochia manshuriensis* Kom)采集于吉林省延边]茎皮 7 kg 粉碎后用 90%乙醇渗漉提取，提取液回收至 2000 mL。用石油醚-EtOAc (3∶1)萃取得浸膏 158 g，为 A 部分；母液用 EtOAc 萃取，萃取液再用 Na_2CO_3 溶液萃取后，回收 EtOAc，得浸膏 170 g，为 B 部分；Na_2CO_3 液酸化后 EtOAc 萃取并反复重结晶去除大量马兜铃酸Ⅰ(含少量马兜铃酸Ⅱ)得浸膏 15 g，为 C 部分。

B 部分经柱色谱，$CHCl_3$-MeOH 梯度洗脱，收集 250 mL 为一个流分，得马兜铃酸Ⅰ80 mg(50～70 流分)。C 部分经柱色谱，$CHCl_3$(冰醋酸酸化)-MeOH 梯度洗脱，收集 250 mL 为一个流分，依次得马兜铃酸Ⅱ400 mg(5～6 流分)，马兜铃酸Ⅳ 40 mg(8～10 流分)，马兜铃酸Ⅳa 20 mg(30～32 流分)，马兜铃酸Ⅲa 30 mg (36～38 流分)。

16.1.3.2　阿魏酸

阿魏酸(ferulic acid)，化学名 3-(4-羟基-3-甲氧苯基)-2-丙烯酸，亦称 3-甲氧基-4-羟基香茅醛酸、咖啡酸-3-甲基醚、松柏酸。其分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$，结构式见图 16.5。

阿魏酸为芳香族有机酸类，在植物体内既存在游离态的阿魏酸，也存在结合态的阿魏酸(通常与木脂体、多糖相结合参与细胞壁的形成)。阿魏酸有顺式和反式两种，通常从植物分离出来的是阿魏酸的反式异构体，但也有例外，Ruan 等[17]就报道从大戟属植物 *Hylonoma* 的根中分离出顺式阿魏酸异构体。室温条件下，在水中保存顺式或反式阿魏酸时，两周后溶液内两种异构体达到平衡，其中 23%为顺式，77%为反式。顺式阿魏酸无结晶，为黄色油状物。反式阿魏酸可在热水中形成无色针状斜方晶，相对分子质量 194.19，熔点 174 ℃，微溶于冷水，可溶于热水，易溶于乙醇、甲醇、丙酮，难溶于苯、石油醚，无臭、无味。

现代医学研究表明，阿魏酸作为药品具有抗炎、止痛，抗血栓形成，抗紫外线辐射，抗自由基以及调节人体免疫功能的作用；在临床上用于冠心病、脑血管病、脉管炎、白细胞和血小板减少等疾病的治疗；在食品、化妆品中则主要作为抗氧化剂使用，阿魏酸已被欧美国家批准用作食品抗氧剂。

阿魏酸可以通过增强机体免疫力来减轻癌症放疗和化疗的不良反应。用阿魏酸预处理能够保护肝细胞抵抗 γ 射线导致的细胞损害，有望在辐射治疗时发展成有效的辐射防护剂。因为阿魏酸具有抗氧化潜力，在许多病症中表现出很强的消炎特性。阿魏酸能够干扰 β-淀粉样纤维的形成，因此可能成为治疗阿尔茨海默病的关键分子[18]。

研究显示阿魏酸是一些治疗心血管病中药复方的活性成分之一。阿魏酸、醇基阿魏酸酯和 γ-谷维素(阿魏酸与植物甾醇的结合酯),均表现出强的降胆固醇和抗动脉粥样化的特性。Lowell 大学的最近一项猕猴喂养研究发现,谷糠油具有使胆固醇降低 40%和在不影响高密度脂蛋白(HDL)的情况下使低密度脂蛋白(LDL)下降 30%的独特功能,而使谷糠油具有这些功能的主要是其抗皂化部分中的 γ-谷维素。已经证实阿魏酸具有抑制 LDL 氧化修饰的作用。阿魏酸与抗坏血酸协同作用能够缓解线粒体功能紊乱。

阿魏酸的生物合成途径见图 16.8。最初由苯丙氨酸解氨酶(PAL)和酪氨酸解氨酶(TAL)分别催化苯丙氨酸和酪氨酸生成反式-肉桂酸和对-香豆酸,肉桂酸可进一步经肉桂酸-4-羟化酶(C4H)催化生成对-香豆酸。对-香豆酸经羟基化作用生成咖啡酸,再以甲硫氨酸(S-腺苷-L-甲硫氨酸)为甲基供体,在咖啡酸 3-氧-甲基转移酶(COMT)的催化下生成阿魏酸[18,19]。近年来有研究表明在特定部位阿魏酸还可以通过另一途径——咖啡酰辅酶 A-氧-甲基转移酶(CCoAOMT)途径进行生物合成[20]。该途径的起始反应也是从苯丙氨酸和酪氨酸开始获得对-香豆酸,

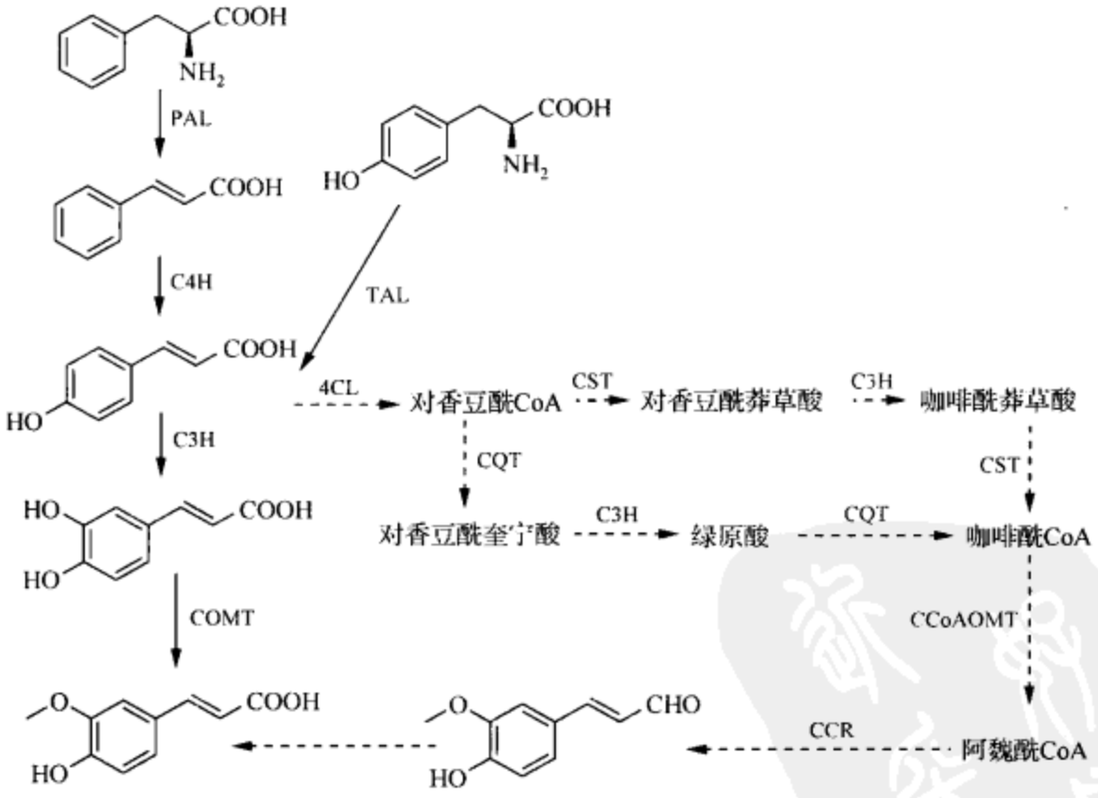


图 16.8 阿魏酸两条生物合成路线(COMT 途径和 CCoAOMT 途径)

——→ COMT途径; - - - - - → CCoAOMT途径

PAL 苯丙氨酸解氨酶;TAL 酪氨酸解氨酶;COMT 3-氧-甲基转移酶;C4H 肉桂酸-4-羟化酶;C3H 香豆酸-3-羟化酶;CCH 香豆酰辅酶 A-3-羟化酶;4CL 4-香豆酸辅酶 A 连接酶;CCoAOMT 咖啡酰辅酶 A-3-氧-甲基转移酶;CCR 肉桂酰辅酶 A 还原酶;CST 羟基肉桂酰辅酶 A 莽草酸羟基肉桂酰转移酶;CQT 羟基肉桂酰辅酶 A 奎尼酸羟基肉桂酰转移酶

后续的反应过程则更复杂，既可能经对香豆酰 CoA、对香豆酰莽草酸、咖啡酰莽草酸，也可经对香豆酰奎宁酸、绿原酸获得咖啡酰 CoA，然后经关键酶 CCoAOMT 催化生成阿魏酰 CoA，最后经松柏醛氧化生成阿魏酸。

我国的某些中药材富含阿魏酸，如当归(*Angelica sinensis*)、川芎(*Ligusticum chuanxiong*)等，通常以阿魏酸为有效成分来评价这些药材的优劣。《中国药典》(2005 年版)中规定当归以阿魏酸为指标，按干燥品计算，合格当归的阿魏酸量不得少于 0.05%。

中药中阿魏酸的提取方法[21]：

以藁本、当归、川芎任选一为原料，取药材 1000 g，粉碎成细粉 40 目；以溶媒乙醚：甲醇(15：2)、温度 55～70 ℃回流提取 3.5 h，加甲酸调 pH 3～5，得提取液，回收溶媒，得残渣；残渣用甲醇：水(3～5：1)洗涤，得滤液，回收甲醇，得浓缩液；将浓缩液真空冷冻干燥，得阿魏酸纯品。经 HPLC 法检测，成品纯度在 90%以上，收率为 65%以上。

天然原料提取阿魏酸一直是阿魏酸生产中重要部分，但由于阿魏酸在植物体内的含量较低，大多数以酯的形式(即谷维素)存在于植物细胞壁和不溶性纤维中，和纤维类物质以化学键的形式紧密结合，不游离存在，且不容易释放分离，所以提取的得率一直不高。然而，阿魏酸一般在谷糠和麦麸、甜菜等农副产品下脚料(俗称黑脚)中含量较高，碱水解黑脚中的 γ-谷维素可以有效制备阿魏酸。

米糠中阿魏酸的提取方法[22]：

取 1000 kg 米糠油生产过程中产生的副产物黑脚，其阿魏酸酯含量为 34.25%，相当于阿魏酸的含量为 10.96%，加入到反应釜中，然后在反应釜中注水 1000 kg，加入 30%液碱 230 kg，脂肪酸钠 4 kg，通入蒸汽加热，加压 0.2 MPa，搅拌，溶液温度升至 110 ℃时，停止加热，继续加压搅拌 4 h，黑脚溶散、水解。水解液冷却，经离心除去不溶性杂质，得阿魏酸盐的水溶液，将溶液酸化，由此阿魏酸沉淀下来，所使用的稀硫酸的浓度为 10%～30%，水溶液的 pH 为 1～4，溶液温度至 25～30 ℃时，阿魏酸酸化沉淀完成，将含阿魏酸的水溶液过滤得阿魏酸粗品 104.5 kg，将阿魏酸粗品溶解于 90～100 ℃的热水中，冷却后得阿魏酸纯品 91.7 kg。

16.1.3.3　丹参中的丹参乙酸镁

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)是我国传统的活血化瘀中药之一，临床上广泛用于冠心病、心绞痛、心肌梗死、缺血性中风等心脑血管疾病的治疗，涉及丹参的中药制剂数以百计，包括丹参注射剂、丹参酮ⅡA 磺酸钠注射液以及复方制剂等。其活性成分包含脂溶性的二萜醌类化合物和水溶性的多酚酸盐类化合物(主要成分见图 16.9)[23]。早期的研究主要集中在丹参酮类化合物以及结构相对简单的丹

参素。丹参乙酸镁(magnesium lithospermate B,丹酚酸 B 镁,magnesium salvianolate B)作为其多酚酸盐活性成分中含量最高、活性最强的化合物,近年来受到了极大的关注,引发了以该化合物为核心的丹参制剂的研制热潮[24]。有意思的是,该类化合物以盐的形式存在于生药材内,其中包括镁盐、二钾盐以及钾铵盐等,药理学研究结果显示盐的生理活性(尤其是镁盐)优于酸。尽管目前许多中药制剂的质量标准以丹参乙酸(或丹酚酸 B)来标示,但实际上,只要制备工艺中没有酸碱处理步骤,含有的应该为丹参乙酸的盐。

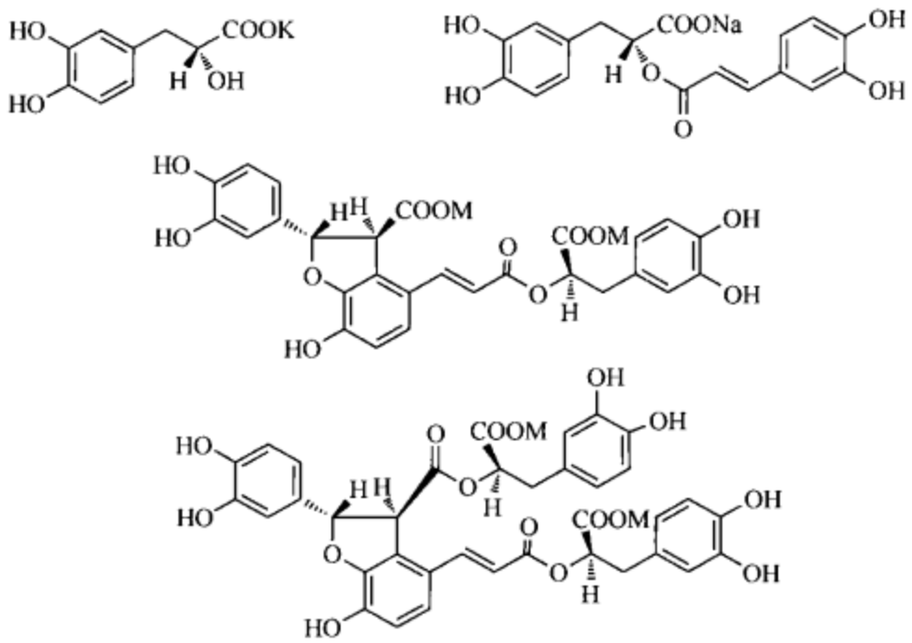


图 16.9 丹参中主要的多酚酸盐成分

丹参乙酸最早从紫草(*Lithospermum officinale*)中以甲基化产物形式发现[25],而后又在丹参中以游离酸形式获得[26],其后日本学者又发现其以盐的形式存在于生药材中[27]。该化合物为丹参素的四聚体,多个酚羟基以及羧酸盐的结构特点决定了其易溶于水、光热不稳定的理化性质特点,而不同的盐的存在形式也使得该化合物的分离较为困难,例如酸碱处理、硅胶的使用就只能获得游离酸。因此需要采用反向色谱担体进行分离,如 Sephadex LH-20、MCI gel、Toyopearl HW-40F 等。丹参乙酸镁和其他盐,如丹参乙酸二钾等在这些色谱担体上会表现出不同的色谱分离行为,利用水-甲醇梯度洗脱可以将不同的盐加以分离获得,而热、酸碱处理则可能促成化合物的酸化和降解,如丹酚酸 A 在生药材中含量甚微,可以通过加碱、加热来提高含量。

丹参乙酸镁的分离具体可以采用如下步骤分离获得:粉碎丹参药材,80%丙酮浸泡提取,提取液减压浓缩去除有机溶剂,过滤去除脂溶性的丹参酮类化合物,吸附于 MCI gel,水洗脱去除无机盐、糖以及蛋白质等,以水-甲醇梯度洗脱,依次可获得丹参素钠、紫草酸二钾、丹参乙酸二钾、紫草酸镁、丹参乙酸镁、迷迭香酸钾等多

酚酸盐类化合物，由于不同的盐在 TLC 或 HPLC 上表现为相同的保留时间，因此需要根据分离流程中化合物的浓度变化来加以区分，最终的盐的确定可通过原子吸收光谱、离子色谱仪或者 ICP-MS 技术加以鉴定。

16.1.3.4　白藜芦醇

白藜芦醇(resveratrol)，是一种含有芪类结构的非黄酮类多酚化合物，又称芪三酚，化学名称为 5-[(1*E*)-2-(4-羟基苯基)-乙烯基]-1，3-苯二酚，分子式 $C_{14}H_{12}O_3$，结构式见图 16.10，相对分子质量 228.25，白色针状晶体，熔点 256～257 ℃，升华 261 ℃，难溶于水，易溶于乙醚、氯仿、甲醇、乙醇、乙酸乙酯、丙酮等有机溶剂，在 365nm 紫外线照射下产生荧光。白藜芦醇很不稳定，常与葡萄糖结合成苷，白藜芦醇及其糖苷都有顺式和反式之分，在自然界中主要以反式存在，其反式异构体生理活性要强于顺式异构体。白藜芦醇广泛存在于种子植物中，目前至少已在 21 个科、31 个属、72 种植物中发现白藜芦醇，其中葡萄(*Vitis vinifera*)、虎杖(*Reynoutria japonica*)和落花生(*Arachis hypogaea*)中白藜芦醇含量较高，它是许多植物受到真菌感染、紫外照射或病理状况下产生的一种植物抗毒素，可以提高植物抵抗病原体的能力。早在 1924 年人们就发现白藜芦醇[28]，日本人 Tokaoka 在 1940 年首次从毛叶藜芦(*Veratrum grangiflorum*)根部分离得到，因此被命名为白藜芦醇[29]；1963 年 Nonomura 等提出白藜芦醇是某些草药治疗炎症、脂类代谢紊乱和心脏疾病等的有效成分[30]。现代药理学研究证明，白藜芦醇生理活性显著，高效低毒，有抗病毒、抗肿瘤、抗氧化清除自由基、抗诱变、降血脂、保护肝脏、保护心血管和抗心肌缺血等功能[31]，被誉为继紫杉醇之后又一新的绿色抗肿瘤药物；同时具有延缓衰老、美容等功效，因而其在医药、保健食品领域具有很广阔的开发前景。

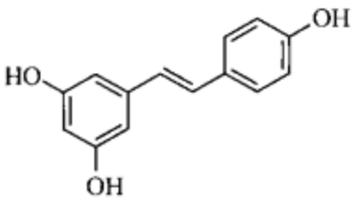


图 16.10　白藜芦醇结构

虎杖中白藜芦醇的提取方法：

虎杖为蓼科(Polygonaceae)植物虎杖(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.)的根茎，是我国一种传统中药。多生于山谷，溪旁或岸边，为多年生灌木状草本。性味苦、平，具有祛风、利湿、破瘀、通经的功效；用于治疗风湿、筋骨疼痛、湿热黄疸、淋浊带下、妇女经闭、产后恶露不下、疮漏下血、跌扑损伤、烫伤、恶疮癣疾等疾病。虎杖分布于江苏、浙江、江西、福建、山东、河南等中南部地区，春秋均可采挖。虎杖植物的化学成分研究已较为深入，脂溶性成分主要有蒽醌类、萘醌类、黄酮类等，肖凯等对虎杖水溶性部分进行了细致研究，用反相色谱的方法分离得到一系列 stilbene 类化合物[32, 33]。现代药学研究证明其具有多种药理作用，主要表

现在抗癌和抗心血管疾病两方面。白藜芦醇是其主要活性成分，多数以白藜芦醇苷形式存在，常见提取方法包括有机溶剂直接提取法、酶解法及超声提取法。

（1）有机溶剂直接提取法。将干燥虎杖根茎粉碎后，用60%丙酮提取3次，每次提取溶剂用量为药粉重量的5倍，合并提取液，减压蒸馏浓缩至原提取液体积的1/20。所得浓缩物中再加入该浓缩物体积1～2倍的水，用碱性物质调至pH 7.5～8.0。再分别用5倍和4倍体积的乙酸乙酯萃取两次，合并2次萃取液，减压蒸馏浓缩至萃取液体积的1/15～1/20，最后所得的浓缩物是粗提物，可以通过柱色谱法和结晶法进行分离及纯化。色谱柱填充物是硅胶，第一次色谱洗脱液为氯仿-甲醇（乙醇）[(4～8)∶1]或乙酸乙酯-乙醇[(90～100)∶(0～10)]，将第一次柱色谱中收集到的白藜芦醇洗脱组分浓缩，进行第二次色谱分离，色谱洗脱液为三氯甲烷-乙酸乙酯[(70～100)∶(20～30)]，将第二次洗脱液浓缩、室温下静置，析出白藜芦醇结晶，用丙酮-氯仿[1∶(8～10)]重结晶，得到纯度达97%以上的结晶，产品收率达70%[34]。

（2）酶解法提取。由于虎杖根茎中游离白藜芦醇含量仅为0.1%～0.2%，而白藜芦醇苷含量约为2%～5%，可先酶解，再提取游离白黎芦醇，此法能取得更高的收率。目前有采用植物自体酶、加入外酶和通过接种微生物产生酶等3种方法。例如，侯等[35]将新鲜虎杖打浆，在10～50 ℃下搅拌放置24～120 h后用乙酸乙酯萃取，再经进一步纯化处理，白藜芦醇的收率较直接提取法提高了2倍；也可用水浸润虎杖后，在15～50 ℃发酵24～96 h，然后用乙酸乙酯萃取，白藜芦醇含量可提高2倍[36]。加入的外酶以纤维素酶和酒曲报道较多，例如，李等[37]将虎杖粗粉加入纤维素酶和水进行酶解，滤渣用乙醇回流提取可获得白藜芦醇，收率为1.5%；林等[38]将虎杖粗粉与适量酒曲40 ℃酶解3h，收率比直接提取法提高近2倍。

（3）超声提取法。超声波是一种强弹性波，由振动产生强大能量，给媒质质点以很大速度和加速度，将植物体快速穿透，使溶剂能与植物中有效成分充分接触。应用超声技术可有效提高收率，缩短提取时间，同时在低温条件下，超声提取能维持虎杖等原料有效成分，避免高温时有效成分转化为其他物质而造成收率降低，故超声波辅助法提取虎杖中白藜芦醇等有效成分受到人们青睐。江等[39]比较了回流提取、超声提取和超临界CO_2萃取3种方法从虎杖中提取白藜芦醇，发现超声波的效果最好。

白藜芦醇作为一类有特殊医疗保健功能多酚物质，在化妆品、保健品、药品及多种饮料产品中有着广泛地开发应用价值，我国富含白藜芦醇的植物资源非常丰富，国内许多企业都在积极投入生产，但得到的以白藜芦醇粗品为主，因此，深入开展白藜芦醇制备方法的研究，对日益增长的白藜芦醇市场需求具有重要意义。

16.2　木脂体类化合物

木脂体(lignan)是一类由苯丙素氧化聚合而成的天然产物，由两个 C6-C3 构成(图 16.11)。通常所指的是二聚体，少数为三聚体和四聚体等。1961 年 Freudenberg 等把苯丙素 C6-C3 单元编号为 1～9，第二个 C6-C3 单元编号为 1′～9′，最早木脂体素是指 8-8′连接的二聚体。后来发现，许多木脂体类并非 8-8′相连，Gottieb 把 8-8′以外连接的木脂体类称为新木脂体类(neolignan)，后来又把两个 C6-C3 单元之间以氧原子连接的化合物称为氧木脂体类(oxyneolignan)。

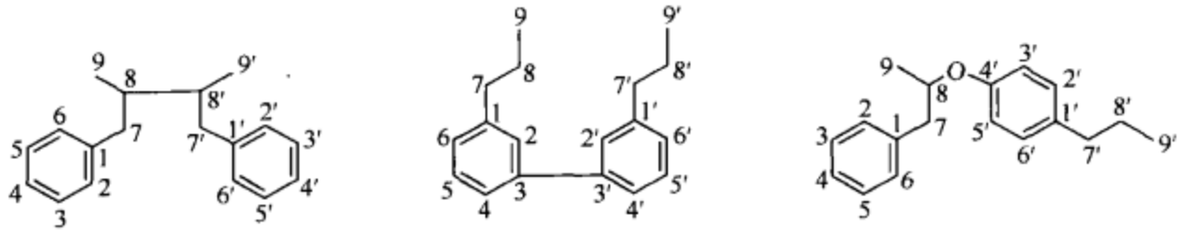


图 16.11　木脂体的基本骨架

16.2.1　木脂体的特性

由于它往往存在于树脂状物质中，或者刚开始析出来时往往呈树脂状，故称木脂体。

木脂体在提取分离过程中主要存在于脂溶性部分，多数可用硅胶色谱分离。若含酚羟基，则与酚性成分的分离方法类似。在薄层色谱上，可用 5%磷钼酸乙醇液、30%硫酸乙醇液等喷洒后于 100 ℃加热数分钟，各类木脂体可显示不同的颜色，并可依此初步推断其结构类别。超临界流体萃取已在木脂体的分离中得到有效的应用。

大部分木脂体分子中有内酯结构，如牛蒡(*Arctium lappa*)中的牛蒡子素(arctigenin)，桃儿七(*Sinopodophyllum hexandrum*)中的鬼臼毒素(podophyllotoxin)等；也有含内酯醇的，如荜澄茄素(cubebin)；从芝麻(*Sesamum indicum*)中得到的芝麻素(sesamin)具有五元环醚键。这些化合物的结构见图 16.12。木脂体本身虽然难溶于乙醚，但往往用乙醚连续抽提，而以苷形式存在的木脂体仍提不出来，所以要用乙醇等极性大的溶剂提取，然后按一般的苷类提取法处理。例如，中药牛蒡子用乙醚连续提取时，牛蒡子苷元易析出，提过的药渣再用乙醇提，乙醇提取液蒸干，残留物溶解于水，加乙酸铅处理，滤液通硫化氢脱铅，浓缩即得牛蒡子苷(arctiin)。

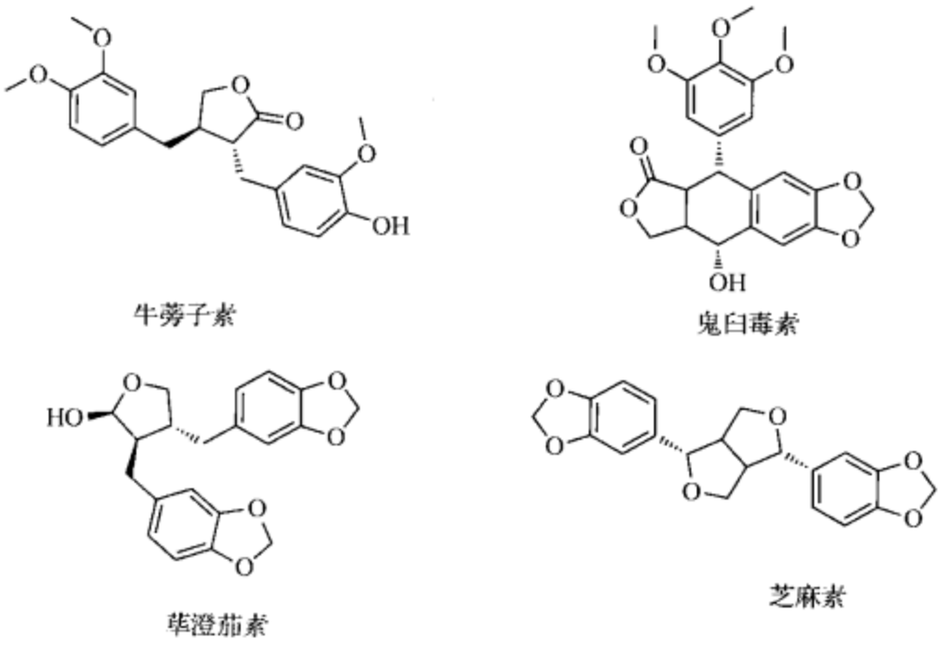


图 16.12 具有内酯、内酯醇及环醚结构的木脂体

不少木脂体具有细胞毒作用，可以抑制肿瘤细胞的生长。其中鬼臼毒素是研究得较多的一种细胞毒成分，它存在于小檗科(Berberidaceae)的许多植物中，如八角莲(*Dysosma versipellis*)、窝儿七(又称南方山荷叶，*Diphylleia sinensis*)、桃儿七(*Sinopodophyllum hexandrum*)等。从这些植物中提取的树脂，民间曾用作泻剂、治疣等。后来学者发现其中所含的木脂体类成分具有抑制肿瘤细胞增殖的作用，鬼臼毒素为主要活性成分，曾将其提纯并试用于治疗皮肤癌、湿疣等，但毒性较大，临床上难以推广应用。后经结构改造，合成了一系列化合物，其中依托泊苷(etoposide)和替尼泊苷(teniposide)(图 16.13)已在临床上广泛应用。

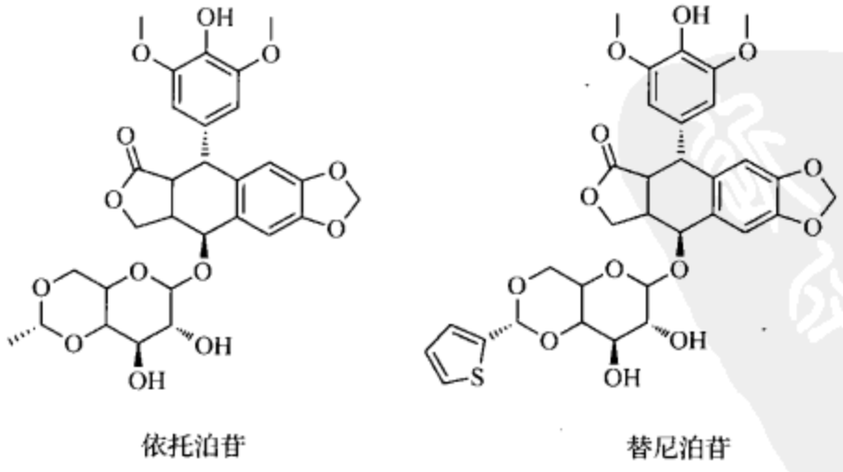


图 16.13 具有细胞毒活性的木脂体衍生物

从五味子(*Schisandra chinensis*)中分得的 gomisin G 有抑制 HIV 增殖的作

用(图 16.14)。

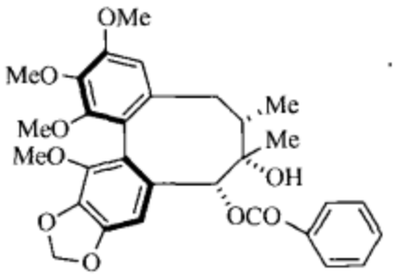


图 16.14　gomisin G 的结构

五味子和华中五味子(*Schisandra sphenanthera*)果实中含有的联苯环辛烯类木脂体,有保肝和降低血清谷丙转氨酶(SGPT)作用。如五味子酯甲(schisantherin A)和五味子丙素(schizandrin C),其结构中的亚甲二氧基可能是重要的活性基团。在化学合成五味子丙素时发现中间体联苯双酯(bifendate)也具有降低转氨酶、改善肝炎症状的作用,临床上曾用于迁延性肝炎的治疗,结构见图 16.15。

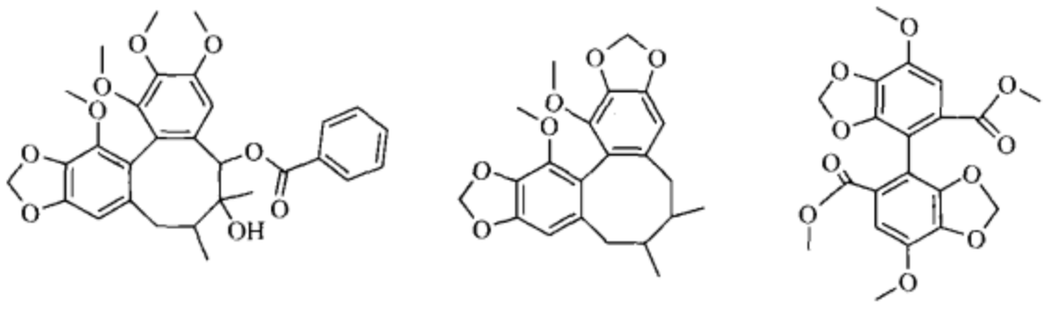


图 16.15　五味子中的活性木脂体结构

16.2.2　木脂体提取分离实例

16.2.2.1　细辛素

细辛素(asarinin)是 furofuran 类木脂素,这类木脂素由一对 C6-C3 单元形成呋喃并呋喃的双环结构。很多的植物中含有的天然产物属于 furofuran 类木脂素,这类化合物有一个核心结构即两个二氢呋喃环融合形成的双环结构。在双环上与氧原子相邻的 2,6 位各由一个邻苯二酚基团取代形成对称结构。这类化合物包括芝麻素(sesamin)、细辛素、松脂醇(pinoresinol)、桉素(eudesamin)等,它们 3,7 位的氢都是顺式构象,可以在盐酸乙醇溶液中发生可逆异构反应[除芝麻林素(sesamolin)在酸条件下降解外]。3,7 位的氢呈反式构象的 *trans*-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]辛烷,是个空间受力紧张的结构,不能发生可逆的异构反应,因为融合的环结构打开后不能重新闭合[40]。

芝麻素和细辛素都有 furofuran 骨架，与降莰烷和双环[3.3.0]辛烷类似。细辛素在 *exo*、*endo* 位置上各有一个取代基，D-细辛素(**16-1**)和 L-细辛素(**16-2**)的 2,6-二芳基分别位于呋喃双环骨架的 *endo*,*exo* 两面。而芝麻素在 *exo* 位置上有两个取代基，2,6 位取代基的 *exo* 构象比 *endo* 构象稳定，所以芝麻素的结构比细辛素更稳定。大部分 furofuran 类木脂素的 2,6-二芳基大部分都如芝麻素一样，位于双环骨架的 *exo* 面，也有 2,6-二芳基以 *endo*,*endo* 方式取代的报道[41](图 16.16)。

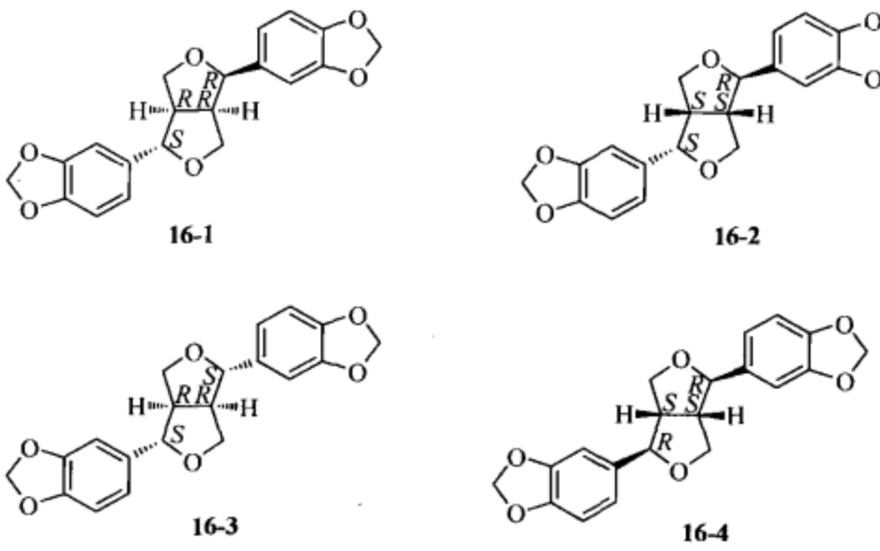


图 16.16 细辛素和芝麻素的结构

已有实验证明，在酸催化条件下芝麻素可以向细辛素的方向转化[42]。天然存在的芝麻素是右旋的 D-芝麻素，用盐酸处理可以促使 2 位芳香基团的差向异构化，转化为异芝麻素/D-细辛素，反应是可逆的，得到 D-芝麻素(**16-3**)和异芝麻素/D-细辛素的混合物。细辛素是左旋的 L-细辛素，L-细辛素是异芝麻素的旋光对映体，在盐酸中可以生成 L-芝麻素(**16-4**)，这个反应也是可逆的，得到 L-细辛素和 L-芝麻素的混合物。细辛素、芝麻素与桉素、松脂醇之间的联系已经通过化学反应证实。L-细辛素水解亚甲二氧基得到 L-桉素。同样的，D-芝麻素可以转化为桉素的对映体 D-松脂醇二甲醚，见图 16.17。

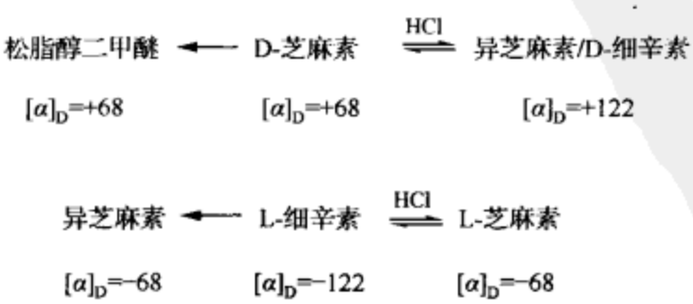


图 16.17 细辛素和芝麻素的转化反应

早在 1936 年就有人从细辛(*Asarum sieboldii*)中首次分离出细辛素[43]，并很快发现了它的杀虫增敏剂作用[44, 45]，其他生物活性有抗肿瘤、抗过敏等[46, 47]。马兜铃科(Aristolochiaceae)细辛属(*Asarum*)植物辽细辛(*Asarum heterotropoides* Fr. var. *mandshuricum* Kitag)的根在传统中药中用作镇痛、止咳、祛痰、治疗风湿和哮喘，并可促进血液循环、清除血瘀。

Furofuran 类木脂素在细辛属植物中广泛存在，然而在实际的分离过程中，芝麻素和细辛素的相对比例取决于提取方法。不同提取方法得到不同含量比的芝麻素和细辛素。常温下用丙酮浸泡得到相近含量的芝麻素和细辛素；而真空蒸馏(10 mmHg，140℃，15min)或是蒸汽蒸馏(110℃，3 h)得到细辛素的量大约是芝麻素的 2 倍。

将细辛用 95%乙醇提取后，再用正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇萃取，正己烷部分通过硅胶柱色谱，用氯仿-苯[(1∶9)～(2∶8)][47]或者正己烷-乙酸乙酯[(9∶1)～(1∶1)]洗脱，可以得到细辛素[48]。

16.2.2.2　桃儿七中的鬼臼毒素和脱氧鬼臼毒素

鬼臼毒素(podophyllotoxin)又称鬼臼素、鬼臼毒、鬼臼脂素，是一种具有抗肿瘤活性的天然产物，属木脂素类化合物中的环木脂内酯(图 16.12)。国外曾在美洲的盾叶鬼臼、印度的足叶草中提取分离鬼臼毒素。在中国，桃儿七属(*Sinopodophyllum*)植物桃儿七(*Sinopodophyllum hexandrum*)、山荷叶属(*Diphylleia*)植物窝儿七(南方山荷叶 *Diphylleia sinensis*)和八角莲属(*Dysosma*)植物八角莲(*Dysosma versipellis*)是常用的提取鬼臼毒素的植物资源[49, 50]。也有文献曾比较桃儿七与窝儿七中鬼臼毒素粗晶的得率，结果显示，桃儿七中鬼臼毒素粗晶得率较高[51]。

桃儿七[*Sinopodophyllum hexandrum*(Royle) Ying]又称桃耳七、鬼臼、小叶莲，为小檗科植物，生长于山中林下阴湿的地方，分布四川、陕西、甘肃、青海、云南、西藏等地，地下部分或果实入药，其性温味苦，有和血、止血、除风湿、解毒、消肿之功效。

鬼臼类植物在民间主要用于虫蛇咬伤、痈疖肿痛、跌打损伤、风湿筋骨痛、尖锐湿疣和气管炎等症状，20 世纪 40 年代，King 和 Shliivan 首次报道了鬼臼毒素具有类似秋水仙碱的作用，引起了人们的广泛注意，长期以来，对鬼臼毒素的研究主要集中在抗癌方面，其抗癌机理在于鬼臼毒素能抑制细胞有丝分裂中期。国内外对鬼臼毒素结构及其衍生物作了一系列研究，如抗癌药物依托泊苷(VP16)、替尼泊苷(VM26)等对霍吉金氏病、非霍吉金氏病、白血病、脑瘤、肺癌均有相当的疗效[52～54]。近年来高纯度鬼臼毒素用于治疗尖锐湿疣取得显著疗效，人们还发现鬼臼毒素及其衍生物对 HIV 病毒、疱疹病毒有一定的治疗效果。

鬼臼毒素现行的提取分离工艺有超临界 CO_2 萃取法、甲醇回流-水-氯仿纯化法和柱分谱法等。其中超临界 CO_2 萃取法选择性好，产品质量高，但设备昂贵，成本较高。甲醇回流-水-氯仿纯化法用到氯仿，氯仿剧毒且挥发性大，对鬼臼毒素和主要杂质黄酮的溶解性都很大，不利于纯化。为了避免以上工艺上的缺点，保护日益减少的鬼臼毒素植物资源，促进鬼臼毒素的应用，张等对以往的柱分谱提取方法进行了改良[55]。

1）从桃儿七中提取鬼臼毒素的方法

将桃儿七根茎经超微粉碎后，在超声波条件下用醇类溶剂加热至 50～60 ℃提取 3 次，合并 3 次提取液，合并提取液浓缩醇类溶剂，得到相对密度为 1.0～1.2 的红褐色浸膏；再加入 1～2 倍浸膏体积的水得到鬼臼毒素醇水相；鬼臼毒素醇水相用等体积的二氯甲烷萃取 3 次，合并 3 次的二氯甲烷，浓缩得到纯度为 40%～50%的淡黄色鬼臼毒素粗品；淡黄色鬼臼毒素粗品用二氯甲烷溶解，上样至硅胶为 300～400 目的高压柱，用丙酮-二氯甲烷溶剂的混合洗脱液洗脱，收集产品段洗脱液，过滤浓缩后，烘干即得到纯度大于 99%的鬼臼毒素精品，测得熔点为 183.3～184.0 ℃（图 16.18）。

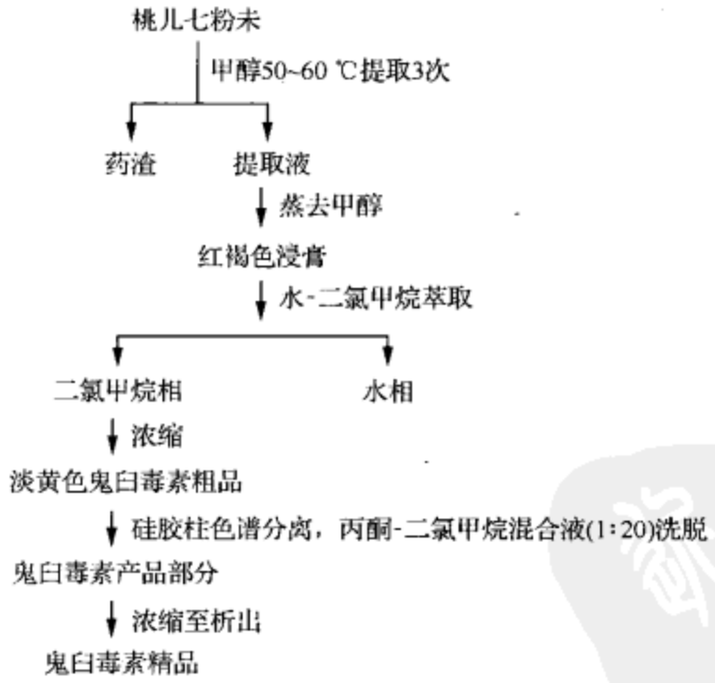


图 16.18 鬼臼毒素提取流程

该方法的优点如下：

（1）原料经超微粉碎，在超声波条件下加热浸泡，使细胞中有效组分全部释放出来，提取完全彻底，提取效率高。

（2）去除了过去用苯、氯仿等毒性较大的溶剂化学结晶的方法，而采用毒性相对低的丙酮和二氯甲烷溶剂进行柱色谱分离，对人体危害更小，对环境污染低。

(3) 使用高压柱进行色谱分离，上样量大，周期短，分离效果好，产品纯度高，硅胶可重复利用。

该方法得到的鬼臼毒素纯度大于99%。

实例

50 kg超微粉碎粒径10 μm以下的桃儿七根茎用300 L甲醇50 ℃浸泡，用功率为5000 W超声波提取3次，每次3 h，合并3次提取液浓缩得到48.6 L相对密度为1.1的红褐色浸膏，转入萃取罐并加入100 L水，共用150 L二氯甲烷分3次萃取，合并3次二氯甲烷相，无水硫酸钠干燥过滤后浓缩干，并采用60 ℃烘干得6240 g淡黄色鬼臼毒素粗品粉末。淡黄色鬼臼毒素粗品粉末20 L二氯甲烷溶解，湿法上样至填料为300～400目硅胶高压柱，其中高压柱的柱压为2.5～3.5 MPa，高压柱内径为200 mm，色谱柱径高比为1∶12.5，用比例为1∶20的丙酮和二氯甲烷混合液洗脱，收集鬼臼毒素产品部分，浓缩至大量产品析出，过滤，采用60 ℃鼓风干燥烘干得到白色粉末1534 g，HPLC检测纯度为99.37%。

2) 具有抗肿瘤活性的鬼臼毒素类衍生物

目前为止，鬼臼毒素还是治疗尖锐湿疣最有效的药剂，主要有鬼臼毒素的乙醇溶液和鬼臼毒素膏两种药剂形式。由于鬼臼毒素的乙醇溶液不稳定，在治疗剂量上很难把握，加之鬼臼毒素的毒性太大，在1940～1960年，鬼臼毒素作为抗肿瘤药物，在使用上受到很大的限制。1947年后证实了鬼臼毒素对动物癌细胞的破坏作用，引起了人们对此进行广泛的医学、生物学和化学研究。20世纪50年代，国外很多研究机构(包括国家癌症治疗中心)开始对鬼臼毒素进行了很多结构改造工作，以期得到毒副作用小，但能保留鬼臼毒素的抗肿瘤活性的化合物。Sandoz制药公司的研究者分别在1966年和1967年成功地合成了依托泊苷(etoposide，VP-16)和替尼泊苷(teniposide，VM-26)，见图16.13。这两个化合物被证明对治疗AML(aeutemyeloid leukaemia)、霍吉金氏病、非霍吉金氏淋巴瘤、肺癌(包括小细胞和非小细胞肺癌)、胃癌、乳腺癌、卵巢癌有效。VP-16在1983年通过FDA的审批，成为目前临床使用较多的抗肿瘤药物。VP-16是鬼臼毒素类临床应用的典型代表，它是4′-去甲表鬼臼葡萄糖苷的缩醛衍生物，由植物成分鬼臼毒素经多步化学合成衍化而来，是一种重要的抗肿瘤药物，曾多次被国际卫生组织推荐为首选抗癌药物之一，也是我国抗肿瘤基本药物之一。

尽管依托泊苷和替尼泊苷有非常好的治疗效果，但它们的实际临床使用却常常被一些问题所阻碍，例如，①抗瘤谱较窄，活性不够高；②难溶于水，生物利用度低且限制了其给药途径；③耐药性的形成降低了其临床应用的有效率；④其结构中D环易代谢失活等。其中最主要的问题就是易产生耐药性、水溶性差和骨髓抑制的毒副作用[56]。为了克服上述问题，寻找更有效的肿瘤治疗药物，人们开展了大

量研究工作。

磷酸依托泊苷(etopophos)是依托泊苷的水溶性前药，是 4′-OH 的磷酸酯化衍生物。流程图 16.19 显示了磷酸依托泊苷的制备过程，其特征是 4′-OH 的苄基磷酸酯化和 C4 位的乙酸糖苷化。以鬼臼毒素为起始原料的制备总收率达到 19% 以上[57]。

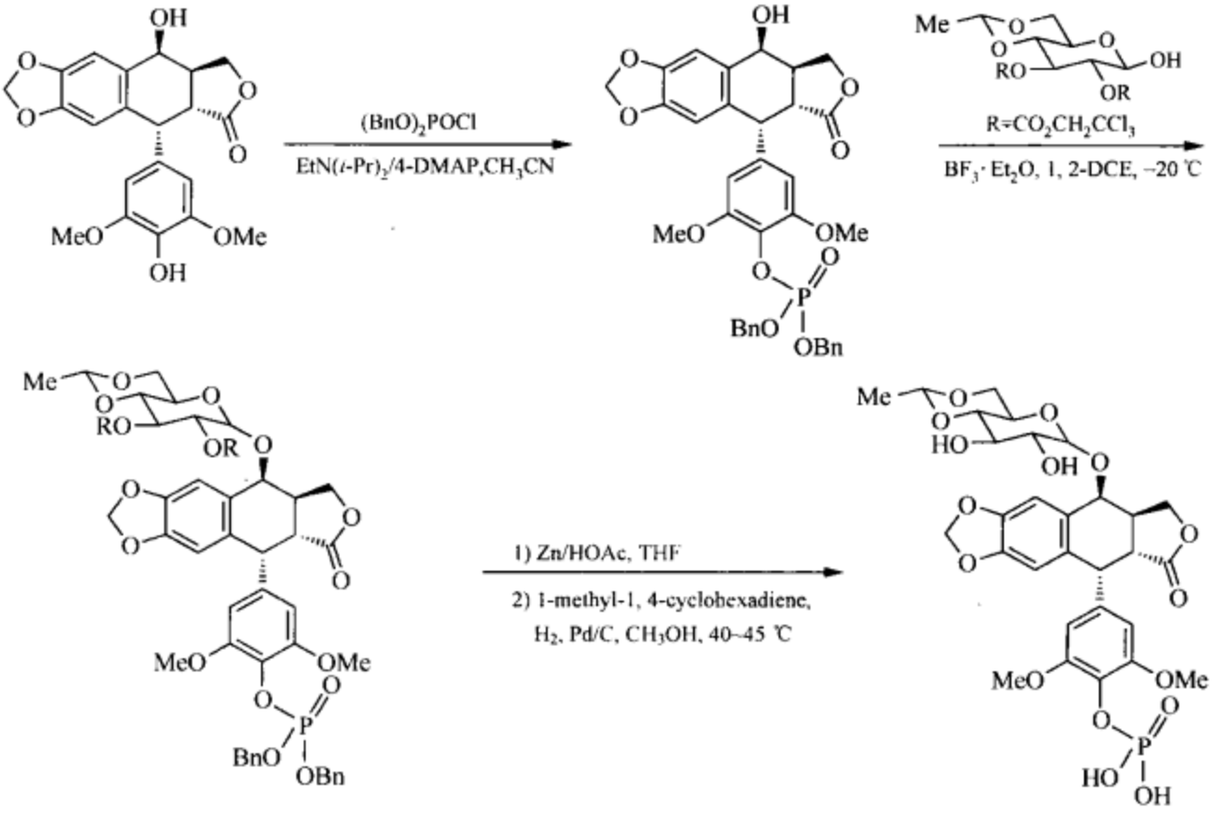


图 16.19 磷酸依托泊苷的制备流程

在体内抗肿瘤模型实验中，磷酸依托泊苷显示出比依托泊苷更好的活性及更低的毒副作用，而且它在水中的溶解度达到 20 mg · mL^{-1}，很好地解决了依托泊苷的水溶性差的问题。在体内磷酸依托泊苷很容易完全地被内在的磷酸酯酶转变为活性的依托泊苷药物，且显示出与依托泊苷类似的药理学和药代动力学性质[58, 59]。更重要的是，优良的水溶性使磷酸依托泊苷比 VP-16 在体内的生物利用度方面有显著的提高，更适合常规临床使用。在 1996 年，美国 FDA 批准磷酸依托泊苷可以在临床上注射使用。

鬼臼毒素及其衍生物的研究仍在广泛进行，全合成方法为寻找更多新颖的活性化合物创造了条件。随着肿瘤的发生、发展机制的进一步阐明，药物作用新靶点的不断发现，以及鬼臼毒素和依托泊苷类化合物的抗肿瘤机制、构效关系的更加深入的研究，更高效、更安全的鬼臼毒素抗肿瘤化合物将会不断问世，并运用到癌症的临床治疗中。

16.2.2.3　五味子醇甲

现代化学研究结果显示，木脂素类成分为五味子的主要成分之一，以五味子醇甲(schisandrin)为代表的联苯环辛烯类木脂素是一类很重要的天然产物，被认为是五味子属(*Schisandra*)植物中主要的活性物质。在不同的产物中，苯环上的亚甲二氧基可由两个甲氧基代替，八元环的脂架部分也可以具有一个或多个羟基(或其酯基)，如从五味子果实中获得的五味子甲素(schisandrin A)、五味子乙素(schisandrin B)和五味子丙素(schisandrin C)。结构式如图 16.20 所示。

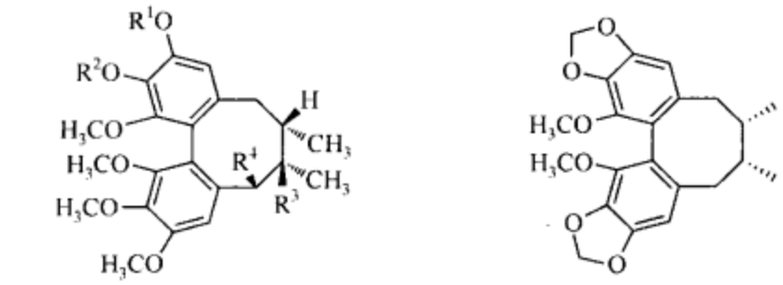


图 16.20　五味子中的联苯环辛烯类木脂素

该类化合物有多个手性因素，立体异构体较多，以联苯 *S* 和 *R* 构型分为两大系列(图 16.21)。

八元辛烯环的构象多数为扭曲的船-椅式(TBC)，少数为扭曲的船式(TB)(图 16.22)。

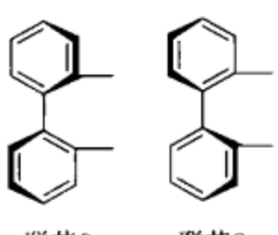


图 16.21　联苯环辛烯类木脂素的立体构型

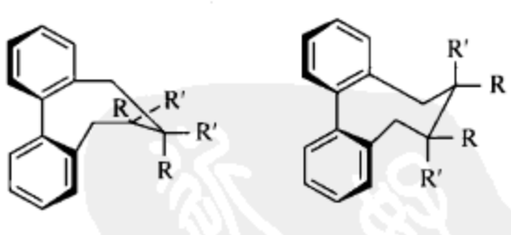


图 16.22　联苯环辛烯类木脂素的八元辛烯环的构象

这些结构类型的化合物集中存在于五味子科(Schisandraceae)五味子属和南五味子属(*Kadsura*)植物中，具有联苯骈环辛二烯结构。此类结构成分通常是一种成分多个名称，如 schisandrin 又名 schisandrol A、schizandrol A、wuweizi alcohol A、wuweizichun A，schisandrin B 又名 schizandrin B、wuweizisu B、γ-schisandrin。

五味子醇甲，$C_{23}H_{32}O_7$，mp 130 ℃，水溶性较好，为五味子注射剂等含五味子

的制剂中的主要活性成分。药理学研究表明，其可对抗戊四唑、烟碱及北美黄连碱的强直性惊厥，并对脑神经细胞有一定的保护作用，对化学物质引起的小鼠肝损伤具有降低血清氨基转移酶升高的功能。

五味子属中的联苯环辛烯类木脂素是许多中药制剂中的药理活性成分。例如，更年安系用中药材经科学方法提取、精取而成，用于妇女更年期综合征的中药制剂。收载于《中国药典》(1999 年版)中。五味子为其主要组成部分，五味子甲、乙素又为其中的药理活性成分。中药复方"鼻敏宁"的活性成分为 γ-五味子素(五味子乙素)。

现代药理学实验表明，五味子素有很强的抗氧化作用。不但可高效清除羟基自由基(·OH)和超氧阴离子自由基($\cdot O_2^-$)，还可有效保护细胞膜免受自由基损伤。

五味子为常用中药，对迁延性和慢性病毒性肝炎血清谷丙转氨酶(SGPT)升高患者有较好的疗效。五味子素也可用于艾滋病的治疗，目前五味子素正进入临床前的各项研究工作。五味子因其果实甘、酸、辛、苦、咸五味俱全，故名五味子。因主产于我国东北各地，又称辽五味子，始载于《神农本草经》，列为上品，具有益气强阴、养五脏、明目、壮筋骨等多种功效。但是，作为北五味子原产地的辽宁省，目前尚没有一个通过审定的北五味子栽培品种，这主要是因为没有对五味子有效成分进行有效检测的良好提取工艺。在中国药典中，五味子是以其所含的五味子醇甲(schisandrin)作为药材的质量控制指标。

五味子的种子和果实中主要的木脂素类成分为五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素，其提取纯化的方法有很多种，包括传统的方法和现代的方法。

上述几种五味子素的传统分离方法为乙醇提取后进行硅胶柱色谱或者大孔树脂色谱分离[60]。

对于五味子醇甲的提取，鉴于五味子中含有大量鞣质，根据鞣质与碱成盐后难溶于醇的性质，采用醇液调 pH 的方法去除鞣质，可达到纯化目的。一般将 pH 调为 7 时，五味子醇甲的提取率较高[61]。具体的提取方法和过程如下：五味子 *Schisandra chinensis*(Turcz) Baill 药材(购于南京市药材公司，经江苏省中医药研究所鉴定为正品)粉碎后加 10 倍量的水提取 3 次，每次 1.5 h，将提取液浓缩至生药 1.4 g·mL^{-1}，加乙醇醇沉到 80%，静置 12 h，过滤，醇液用氢氧化钠溶液调至 pH 7，所得五味子醇甲的含量为 4.26 mg·g^{-1}[22]。

随着现代分离技术的不断提高，越来越多的先进分离方法用于五味子素的分离提取过程中。例如，超临界 CO_2 萃取法、高速逆流色谱法(HSCCC)、毛细管电泳法，国内对运用超临界高速逆流 CO_2 萃取法用于五味子的研究主要集中于采取正交实验方法，控制影响实验过程中的诸多因素，如药材中水分的含量、萃取压力、萃取温度、萃取时间、CO_2 流量、分离压力等，最终确定超临界 CO_2 萃取的最佳提取工艺为五味子粉碎成 24 目，水分 4.7%左右，萃取压力 25 MPa，萃取温度 50℃，

分离压力 7 MPa，分离温度 60 ℃，萃取 2.5 h，CO_2 流量 15 kg·h^{-1}，五味子醇甲的收率为 11.38% [62]。

高速逆流色谱是一种基于液液分配的新型色谱技术，可以在短时间内实现高效分离和制备，并且可以达到几千个理论塔板数[63]。与高效液相色谱不同的是，它不使用固相载体作固定相，克服了固相载体带来的样品吸附、损失、污染和峰形拖尾等缺点[64]。基于上述高速逆流色谱的优点，人们已经开始利用硅胶柱色谱和逆流色谱联用的技术分离纯化五味子中的木脂素单体成分。高速逆流色谱已经成功地用于五味子属中联苯环辛烯类木脂素的分离，不仅克服了常规柱色谱分离方法分离步骤多、产物回收率低的缺点，还缩短了分离周期，大大提高分离效率。文献报道，高速逆流色谱实现了从 100 mg 五味子石油醚提取物中一步分离五味子甲素(8 mg)和五味子乙素(12 mg)[65]。

参 考 文 献

[1] 王勇，邓晓春. 马兜铃酸结构多样性及其复方毒性研究进展. 中草药，2006，37(8)：附 3.

[2] 王瑛，潘竞先，贾忠建. 马兜铃属植物化学成分及生物活性研究进展. 天然产物研究与开发，1999，12(6)：84.

[3] David B M. The aristolochic acids and aristolactams. J Nat Prod，1982，45(6)：657.

[4] 张万明，马淑兰. 马兜铃酸及含有马兜铃酸中药的研究概述. 河北北方学院学报(自然科学版)，2007，23(6)：35.

[5] 鲁静. 马兜铃相关中药材的探讨. 中国药品标准，2002，3(2)：49.

[6] 英锡相，袁昌鲁，曲贤广等. 11 种中药材及 3 种中成药马兜铃酸的含量测定. 辽宁中医杂志，2003，30(5)：404.

[7] 王瑛，潘竞先，高建军等. 中药关木通中的抗肿瘤成分研究. 北京医科大学学报，2000，32(1)：18.

[8] 朱大元，黄宝山，陈仲良. 马兜铃属植物的化学、药理和临床. 国外医学文摘(药学分册)，1979，6(2)：83.

[9] 周娟娟，潘金火. 关木通研究进展. 医药导报，2009，28(5)：620.

[10] Gillerot G，Jadoul M，Arlt V M et al. Aristolochic acid nephropathy in a Chinese patient：time to abandon the term "Chinese herbs nephropathy"? American Journal of Kidney Diseases：the Official Journal of the National Kidney Foundation，2001，38(5)：E26.

[11] Mengs U. Acute toxicity of aristolochic acid in rodents. Arch Toxicol，1987，59(5)：328～331.

[12] 秦秋. 含马兜铃酸中药毒性作用机理阐明. 药物不良反应杂志，2006，8(1)：72.

[13] 曾美怡，李敏民，赵秀文. 关于马兜铃酸类的毒性反应. 中药新药与临床药理，1995，6(2)：48.

[14] 王智民，高慧敏，王金华等. 一种去除中药中马兜铃酸的方法及其限量标准：中国，CN101264116 A. 2008.

[15] 王典仁，王彦英，陆彦等. 关木通中马兜铃酸 A 的提取及含量测定. 中国畜牧兽医，2008，35(4)：147.

[16] 楼风昌，彭国平，王颖等. 木通马兜铃化学成分研究. 药学学报，1995，30(8)：588.

[17] Ruan H，Zhou X，Zhang Y et al. Ferulic acid esters from *Euphorbia hylonoma*. Fitoterapia，2007，78(1)：72～73.

[18] 刘敬，李文建，王春明等. 当归中有效成分阿魏酸的生物合成及调控. 中草药，2008，39(12)：

1909～1912.

[19] 耿飒，徐存拴，李玉昌. 木质素的生物合成及其调控研究进展. 西北植物学报，2003，23(1)：171～181.

[20] Barriere Y, Ralph J, Mechin V et al. Genetic and molecular basis of grass cell wall biosynthesis and degradability. Ⅱ. Lessons from brown-midrib mutants. Comptes Rendus Biologies, 2004, 327(9-10): 847～860.

[21] 陶丽华，高峰，董艳辉等. 阿魏酸的提取纯化工艺：中国，CN1621402 A. 2005.

[22] 童舜火，王瑞华，崔升官等. 一种天然阿魏酸的制备方法：中国，CN101434535 A. 2009.

[23] 徐任生. 丹参-生物学及其应用，北京：科学出版社，1990.

[24] Hilbert W, Dieter W, Wolfram S. Structure of lithosperic acid from *Lithopermum officinale*. Tetrahedron Lett, 1975, 8: 547～550.

[25] 王逸平，宣利江. 中药现代化的示范性成果—丹参多酚酸盐及其注射用丹参多酚酸盐的研究与开发. 中国科学院院刊，2005，20(5)：377～380.

[26] 陈政雄，顾文华，黄慧珠. 丹参中水溶性酚性酸成分的研究. 药学通报，1981，16(9)：24～25.

[27] Tanaka T, Morimoto S, Nonaka G et al. Magnesium and ammonium-potassium lithospermates B, the active principles having a uremia-preventive effect from *Salvia miltiorrhiza*. Chem Pharm Bull, 1989, 37(2): 340～344.

[28] 陈镇泉，林娇健. 科学新发展与葡萄新品种. 葡萄栽培与酿酒，1997,(3)：54～56.

[29] Takaoka M. Phenolic substance of white hellebore(*Veratrum grandiflorum* Loes fil.). Ⅲ. Constitution of resveratrol. Nippon Kagaku Kaishi(1921-47), 1940, 61: 30～34.

[30] 张兰胜，刘光明. 白藜芦醇的研究概述. 大理学院学报，2007，6(4)：72～74.

[31] 牛培勤，郭传勇. 白藜芦醇药理作用的研究进展. 医药导报，2006，25(6)：524～525.

[32] Xiao K, Xuan L J, Xu Y M et al. Stilbene glycoside sulfates from *Polygonum cuspidatum*. J Nat Prod, 2000, 63(10): 1373～1376.

[33] 肖凯，宣利江，徐亚明. 虎杖的水溶性成分研究. 中草药，2003，34(6)：496～498.

[34] 孙狄，章震兴. 白藜芦醇和白藜芦醇甙分离方法及其应用：中国，CN1277954 A. 2003.

[35] 侯团章，曾建国，梁桦等. 一种从虎杖中制备白藜芦醇的方法：中国，CN1341587 A. 2002.

[36] 瞿卫林，陈晓祥，赵伯涛等. 酶解法提高虎杖中白藜芦醇含量的研究. 中国野生植物资源，2005，24(4)：52～55.

[37] 李梦青，聂媛，张洁等. 酶解法提取虎杖中白藜芦醇、白藜芦醇苷、大黄素. 精细化工，2008，25(5)：467～470.

[38] 林玉叶，易跃能. 酶解法提取虎杖中白藜芦醇. 中南药学，2009，7(4)：62～65.

[39] 江曙，朱蓉蓉，井山林等. 虎杖中白藜芦醇的提取及工艺的优化. 南京中医药大学学报，2006，22(3)：197～199.

[40] Beroza M. Epiasarinin, a diastereoisomer of sesamin and asarinin. Stereochemistry of 2, 6-diaryl-cis-3, 7-dioxabicyclo [3. 3. 0] octane. J Amer Chem Soc, 1956, 78(19): 5082～5084.

[41] Ward R. Lignans, neolignans and related compounds. Nat Prod Rep, 1997, 14(1): 43～74.

[42] Li C Y, Chow T J, Wu T S. The epimerization of sesamin and asarinin. J Nat Prod, 2005, 68(11): 1622～1624.

[43] Kaku T, Kutami N, Takahashi J. New constituent of *Asarum*, *l*-asarinin, and its relation to *d*-sesamin. Yakugaku Zasshi, 1936, 56: 361～376.

[44] Haller H L, LaForge F B, Sullivan W N. Some compounds related to sesamin: their structures and their synergistic effect with pyrethrum insecticides. J Org Chem, 1942, 7(2): 185～188.

[45] Haller H L, Mcgovran E R, Goodhue L D et al. The synergistic action of sesamin with pyrethrum insecticides. J Org Chem, 1942, 7(2): 183～184.

[46] Takasaki M, Konoshima T, Yasuda I et al. Inhibitory effects of shouseiryu-to on two-stage carcinogenesis. Ⅱ. Anti-tumor-promoting activities of lignans from Asiasarum heterotropoides var. mandshuricum. Biol Pharm Bull, 1997, 20: 776～780.

[47] Hashimoto K, Yanagisawa T, Okui Y et al. Studies on anti-allergic components in the roots of *Asiasarum sieboldi*. Planta Med, 1994, 60(2): 124～127.

[48] Ju Y, Still C C, Sacalis J N et al. Cytotoxic coumarins and lignans from extracts of the northern prickly ash(*Zanthoxylum americanum*). Phytother Res, 2001, 15(5): 441～443.

[49] 王宝玺，王日升. 植物桃耳七中鬼臼毒素的提取及 HPLC 分析. 中国医药工业杂志，1999，30(11)：484～486.

[50] 张杰，周春山，刘韶等. 小八角莲中鬼臼毒素的提取工艺研究. 中药材，2007，30(1)：103～104.

[51] 王晓玲，杨伯伦，刘谦光等. 鬼臼毒素的提取及其溶剂加合物的表征. 中草药，2003，34(4)：330～331.

[52] Issell B F, Rudolph A R, Louie A C. Etoposide(VP-16-213): an overview // Issell B F, Muggia F M, Carter S K. Current Status and New Developments. USA: Academic Press, 1984: 1～13.

[53] Gordaliza M, Garcia P A, del Corral J M M et al. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. Toxieon, 2004, 44(4): 441～459.

[54] 马维勇，张椿年. 鬼臼毒素类抗肿瘤物的研究进展. 中国医药工业杂志，1997，28(2)：65～69.

[55] 张伟中，蔡志香，仝泽彬等. 高卅. 一种从桃儿七中制备高纯度鬼臼毒素的方法：中国，CN101503410 A. 2009.

[56] Duca M, Guianvarc'h D, Meresse P et al. Synthesis and biological study of a new series of 4′-demethyl-epipodophyllotoxin derivatives. J Med Chem, 2005, 48(2): 593～603.

[57] Topcu Z. DNA topoisomerases as targest for anticancer drugs. J Clinic Pharm Ther, 2001, 26(6): 405～416.

[58] Loike J D, Howritz S B. Effect of VP-16-213 on the intracellular degradation of DNA in HeLa cells. Biochem, 1976, 15(25): 5443～5448.

[59] Chen G L, Ynag L, Rowe T C et al. Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase Ⅱ. J Biol Chem, 1984, 259(21): 13560～13566.

[60] Seo S M, Lee H J, Park Y K et al. Lignans from the fruits of *Schizandra chinensis* and their inhibitory effects on dopamine content in PC12 cells. Nat Prod Sci, 2004, 10(3): 104～108.

[61] Fan C Y, Wei H H, Shi Y F et al. Study on the extraction and purification process of schisandrin. Zhongguo Yaofang, 2007, 18(12): 896～898.

[62] 张怡. 北五味子的超临界 CO_2 萃取研究. 中成药，2005，27(8)：880～883.

[63] 戴德舜，王义明，罗国安. 高速逆流色谱研究进展. 分析化学，2001，29(5)：586～591.

[64] 陆向红，王定海，计建炳. 高速逆流色谱分离茶叶中咖啡因和茶碱. 中草药，2005，36(10)：1492～1494.

[65] Huang T H, Shen P N, Shen Y J. Preparative separation and purification of deoxyschisandrin and gamma-schisandrin from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A, 2005, 1066(1-2): 239～242.

（宣利江）

第17章　香　豆　素

香豆素(coumarin)类化合物是具有苯并-α-吡喃酮母核的天然产物(图 17.1)，已从自然界中分离得到近千种香豆素类化合物。大多数香豆素类化合物的 7 位有羟基或烃氧基取代，通常依据 α-吡喃酮上取代基的不同，将其分为简单香豆素(Ⅰ)、呋喃香豆素(Ⅱ：直线型呋喃香豆素；Ⅲ：角型呋喃香豆素)、吡喃香豆素(Ⅳ：$C_{5,6}$-吡喃并香豆素；Ⅴ：$C_{6,7}$-吡喃并香豆素；Ⅵ：$C_{7,8}$-吡喃并香豆素)和其他香豆素类化合物 4 种类型。

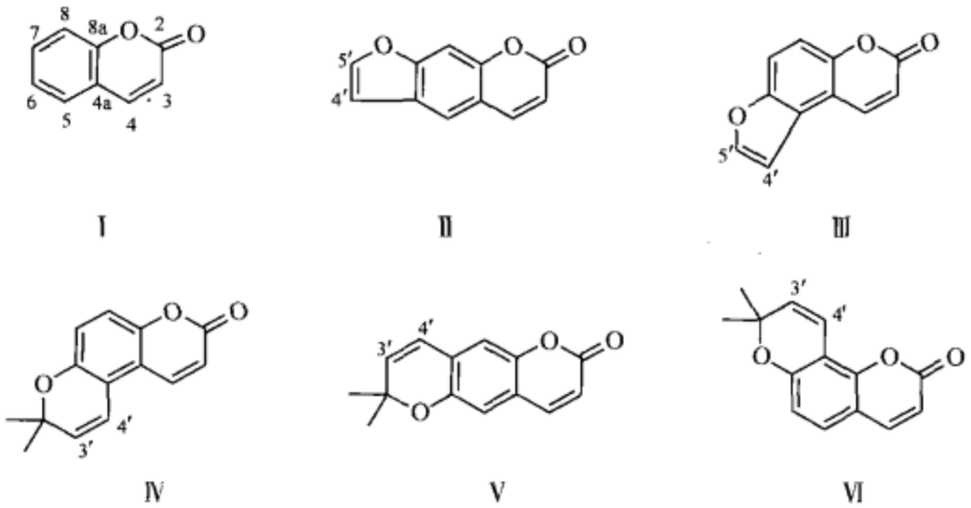


图 17.1　香豆素类化合物的结构类型

香豆素是广泛分布于植物界的次生代谢产物，常与生源密切的桂皮酸、黄酮类、木脂素等伴生。香豆素在高等植物，尤其伞形科、芸香科、菊科、豆科、兰科、茄科、瑞香科、虎耳草科和木樨科等植物的各个部位均可能存在。在微生物代谢产物中和动物中也发现香豆素。

天然香豆素类化合物具有广泛的生物活性作用。最主要的活性作用包括解痉、扩冠及利胆，并有光敏、雌激素样、维生素 P 样以及抗肿瘤、抗凝血等活性。如从柚皮中分离得到的香豆素类化合物美洲花椒素、黄木亭和软木花椒素，具有松弛去甲肾上腺素引起的鼠大动脉持续性僵硬收缩的作用。天然香豆素胡桐素 A(calanolide A)作为抗 AIDS 的非核苷酸类的热点候选药物，在美国已进入临床研究[1]。

17.1 香豆素的性质

17.1.1 物理性质

香豆素类化合物是低极性的中性不饱和化合物，通常为白色或黄色结晶性物质。游离的香豆素味苦，具有特异香气，小分子香豆素能升华，而多数香豆素苷无香气，也不能升华。香豆素苷可溶于水、甲醇、乙醇与碱液，难溶于苯、乙醚等有机溶剂。香豆素难溶于冷水，能溶于沸水，易溶于甲醇、乙醇、氯仿、乙醚及碱液。

香豆素类化合物及其衍生物在紫外灯下多具有荧光，在碱性条件下荧光更明显。有的香豆素在可见光下也能观察到荧光，遇到浓硫酸时能产生特征的蓝色荧光。香豆素荧光的有无和强弱与分子中取代基的种类和取代位置有关。

17.1.2 显色反应

香豆素类化合物具有内酯环结构，在碱性条件下可开环，与盐酸羟胺酸铁缩合成异羟肟酸，再在酸性条件下与三价铁离子络合成盐而显红色。含有酚羟基的香豆素能与三氯化铁试剂产生颜色反应，通常显蓝绿色。Gibb′s 试剂[2,6-二氯(溴)苯醌氯亚胺]在弱碱性条件下可与香豆素中酚羟基对位含活泼氢的碳缩合成蓝色化合物。Emerson 试剂(2% 4-氨基安替比林和 8%铁氰化钾试剂)可与酚羟基对位含活泼氢的碳反应生成红色化合物。

17.2 香豆素类化合物的提取与分离

利用香豆素的溶解性、挥发性以及具有内酯结构等性质可进行对此类化合物的提取分离。游离的香豆素类化合物大多数具有亲脂性，而香豆素苷的极性较高，因此系统溶剂法是提取分离香豆素及其苷类较合适的方法。但有时香豆素类成分不稳定，酸、碱、热、色谱吸附剂，甚至结晶溶剂都可能使之发生变化，生成次生物质。

17.2.1 系统溶剂法

植物中香豆素类化合物一般用石油醚、苯、乙醚、乙酸乙酯、丙酮和甲醇依次萃取。游离的香豆素用低极性溶剂提取，浓缩后放置冰箱即可直接得到结晶或混合结晶。混合结晶可单独使用分步结晶分离手段，也可结合分步沉淀进一步纯化。由于香豆素在石油醚中的低溶解度，因此在香豆素的乙醚萃取液中，逐步加入石油醚，可使不同溶解度的香豆素分步沉出。

从新鲜的当归叶子提取香豆素时，先用甲醇提取，提取物用正己烷处理，除去叶绿素及其他脂质后，再用适当溶剂萃取其中的香豆素成分。但是，提取黄香草木樨中的香豆素时，用一些高极性溶剂（水、甲醇和乙醇）的提取效果要优于用中、低极性溶剂（乙酸乙酯、乙醚、氯仿等）的提取效果。

17.2.2 酸碱法

香豆素类化合物多呈中性或弱酸性，所以天然状态下常与中性、弱碱性杂质共存。可以利用香豆素内酯遇碱开环成盐、加酸后能恢复的特性将其与其他酸、碱物质相分离。通常植物的乙醚萃取物先以碳酸氢钠水溶液处理，抽出酸性成分，再以稀和冷的氢氧化钠或氢氧化钾的水溶液或醇溶液处理，抽出酚性成分（包括酚性香豆素），剩余的中性部分蒸去乙醚后，用氢氧化钠（或氢氧化钾）的水溶液或醇溶液处理，香豆素转变为邻羟基桂皮酸盐而溶于碱水，碱水液以酸中和后，再用乙醚萃取出非酚性的香豆素成分。此经典方法不适用于对酸碱敏感的香豆素类化合物的分离。另外需注意，C8 位有酰基的香豆素类化合物开环后不易闭环，C5 位有羟基的香豆素类化合物开环后闭环可能发生异构化。

17.2.3 真空升华和水蒸气蒸馏

高真空升华是热稳定香豆素的一种简便的纯化方法，但需注意，加热有可能会诱导分子重排或降解。例如，受热可导致某些香豆素分子中的异戊烯氧基长链失去而形成酚羟基。水蒸气蒸馏也曾被用来分离某些相对不稳定易分解的酚性香豆素。例如，花椒内酯就是利用水蒸气蒸馏而与其他香豆素成分分开。

17.2.4 色谱法

色谱法是用于香豆素的一种最普遍而有效的分离和纯化手段，其中以柱色谱和薄层色谱用得最多，通常几种色谱手段配合或反复使用能取得较好的分离和纯化效果。吸附剂常用硅胶、聚酰胺、中性或酸性氧化铝，碱性氧化铝常会使香豆素分子发生降解，故须慎用；洗脱剂常用石油醚、正己烷与乙酸乙酯等混合溶剂。离子交换树脂、大孔吸附树脂也常用来富集、分离或纯化香豆素。除了柱色谱外，其他色谱方法如薄层色谱、气相色谱、高效液相色谱、高速逆流色谱法（HSCCC）等也都可以用于香豆素的分离[2]。对于 HSCCC，一般认为样品的溶剂系统分配系数在 0.5～2 就能得到满意的分离效果。非极性样品，首先试验非水体系；中等极性的样品，试验中等极性的含水体系；极性较强的样品，试验以正丁醇-水为主的溶剂体系。分离香豆素类常用的溶剂体系是三氯甲烷-甲醇-水和乙酸乙酯-正丁醇-水系统。

17.2.5 超临界 CO_2 萃取法

超临界 CO_2 萃取新技术已被广泛应用于香豆素类成分的提取。极性小的游离香豆素可直接提取，而香豆素苷类则可通过加入乙醇等极性溶剂作夹带剂来提取。该技术用于提取白蜡树属植物中单羟基香豆素类成分、欧白芷(*Archangelica officinalis*)果实中的呋喃香豆素。

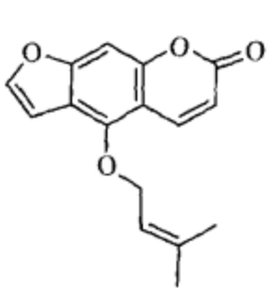
17.2.6 分子印迹技术

分子印迹技术(molecular imprinting technique，MIT)是将功能单体在模板分子的存在下交联聚合，然后洗脱除去模板分子，制得的聚合物在立体空穴和功能基排布上与目标分子具有互补的结构。香豆素的内酯键可以与酸性功能单体的羧基形成氢键，从而具备印迹要求。如以香豆素为模板分子，乙腈为溶剂，以甲基丙烯酸为功能单体制备的香豆素分子印迹聚合物(MIP)的吸附效果最好，其高亲和力结合位点和低亲和力结合位点的最大表观结合量分别为105.3 $mg \cdot g^{-1}$和288.7 $mg \cdot g^{-1}$。而以秦皮乙素(esculetin)为模板分子，丙烯酰胺为功能单体制备了秦皮乙素 MIP，通过优化洗脱条件，从秦皮中特异性地分离出秦皮乙素[3,4]。

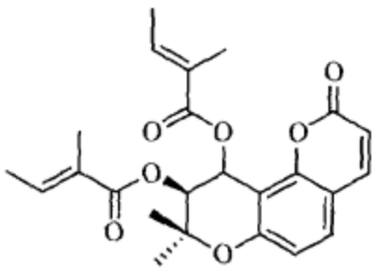
17.3 香豆素类化合物的提取分离实例

17.3.1 小前胡

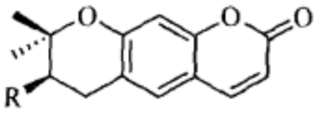
取干燥的小前胡(*Angelica czenaevia* Kitaforma dentate Yook)根 1 kg，粉碎后用乙醚 4 L 冷浸 2 周，除去溶剂后得到干浸膏 40 g，从中取约 15 g 进行硅胶柱色谱分离，用正己烷-乙酸乙酯进行梯度洗脱，得到 5 个香豆素类成分，即正己烷-乙酸乙酯 5∶1 洗脱得到异欧前胡素(isoimperatorin)，3∶1 洗脱得到紫花前胡次素(decursidin)和紫花前胡素(decursin)，2∶1 洗脱得到 7-羟基香豆素(7-hydroxycoumarin)，1∶1 洗脱得到紫花前胡醇(decursinol)；乙醚提取后的残渣用 70% 甲醇 5 L 温浸提取 8 h，回收甲醇，得到干浸膏 20 g，取其中 10 g 进行硅胶柱色谱分离，用氯仿-甲醇-水(7∶3∶0.4，v/v)进行等度洗脱，相应部位合并，蒸干，分别用甲醇重结晶，得到紫花前胡苷元(nodakenetin，marmesin)和紫花前胡苷(nodakenin)(图 17.2)[5]。



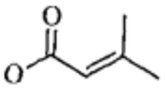
异欧前胡素



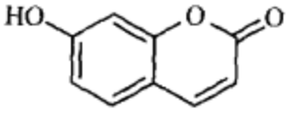
紫花前胡次素



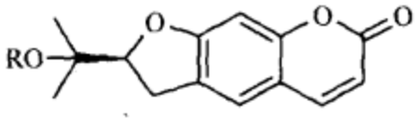
紫花前胡素 R=



紫花前胡醇 R=OH



7-羟基香豆素



紫花前胡苷元 R=H

紫花前胡苷 R=Glu

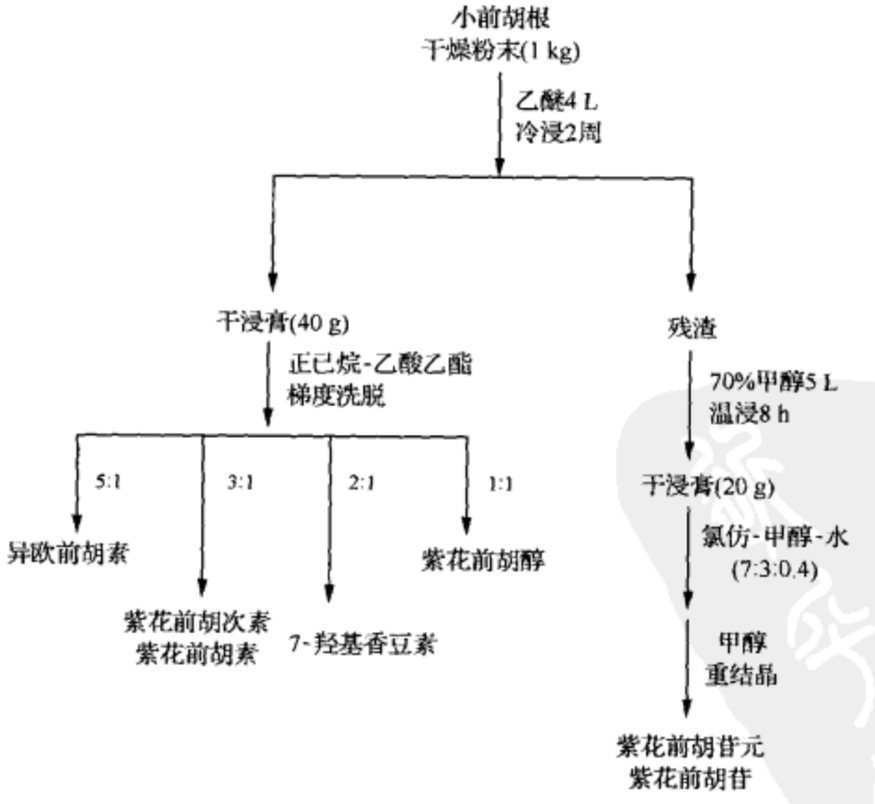
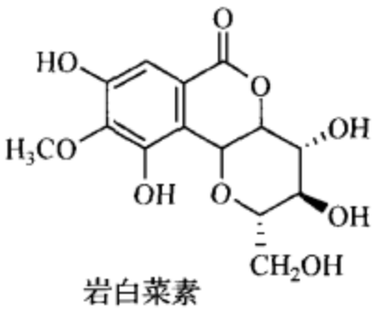


图 17.2 小前胡的提取分离流程

17.3.2 青梅

取龙脑香科青梅(*Vatica mangachapoi* Blanco)茎 8.5 kg,粉碎后,用 70%的乙醇加热回流提取 3 次。合并提取液,减压浓缩得深褐色浸膏。将浸膏溶于适量水中后依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,各萃取部位经减压浓缩得到浸膏。将乙酸乙酯萃取物拌硅胶过色谱柱,以石油醚-乙酸乙酯-甲醇梯度淋洗。收集各组分再经反复柱色谱,重结晶,得到岩白菜素(bergenin)300 mg,白色针状结晶,mp 300 ℃[6]。



岩白菜素

17.3.3 紫花前胡

紫花前胡[*Peucedanum decursivum* (Miq.)Maxim.]根于 60 ℃干燥,打粉,过 30 目筛。干燥粉末 100 g 加入 500 mL 石油醚,提取 3 次,分别回流 2 h、2 h 和 1 h。提取液过滤后,在 40 ℃减压蒸干溶剂,得到约 9.0 g 黄色油状糖浆物质。

HSCCC 实验所用溶剂系统为石油醚-乙酸乙酯-甲醇-水(5∶5∶7∶4,v/v),按其比例分别将各种溶剂加入分液漏斗中,剧烈振荡使溶液充分混合,分相平衡后,分出上相和下相,使用前分别用超声波脱气。将溶剂系统的上相(固定相)和下相(流动相)以体积比 50∶50 泵入 HSCCC(上海同田生物技术有限公司)的多层螺旋管中,当螺旋管完全充满后,以 2.0 mL·min^{-1}的流速泵入下相(流动相),同时将螺旋管转速调为 900 r·min^{-1}。达到动力学平衡后(约 90 min),将 5.0 mL 含 150 mg 粗提物的样品溶液注入分离螺旋管;柱后流出物以紫外检测器检测,检测波长为 254 nm。进样 30 min 后开始采集数据并根据出峰情况手动收集样品,收集得到的流分减压回收溶剂,得到紫花前胡内酯(marmesin)(2.8 mg,纯度 88.3%)、化合物Ⅱ(6.1 mg,纯度 98.0%)、化合物Ⅲ(7.3 mg,纯度 94.2%)、欧芹素(ostruthin)(4.7 mg,纯度 97.1%)、紫花前胡次素(7.8 mg,纯度 97.8%)、紫花前胡次素 C(11.2 mg,纯度 98.4%),如图 17.3 所示。其中化合物Ⅱ和Ⅲ为新化合物[7]。

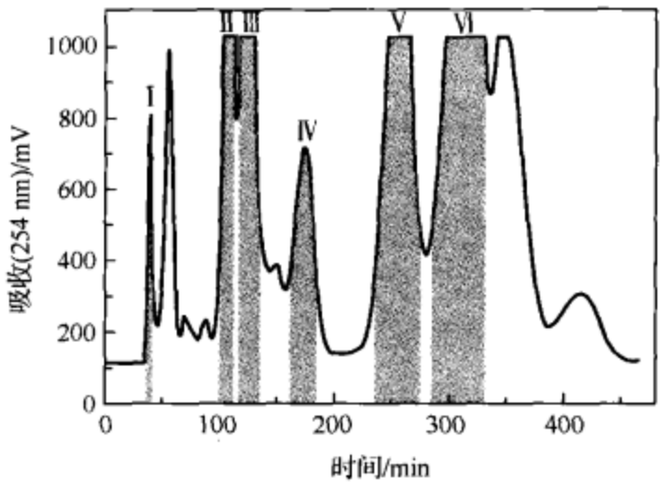
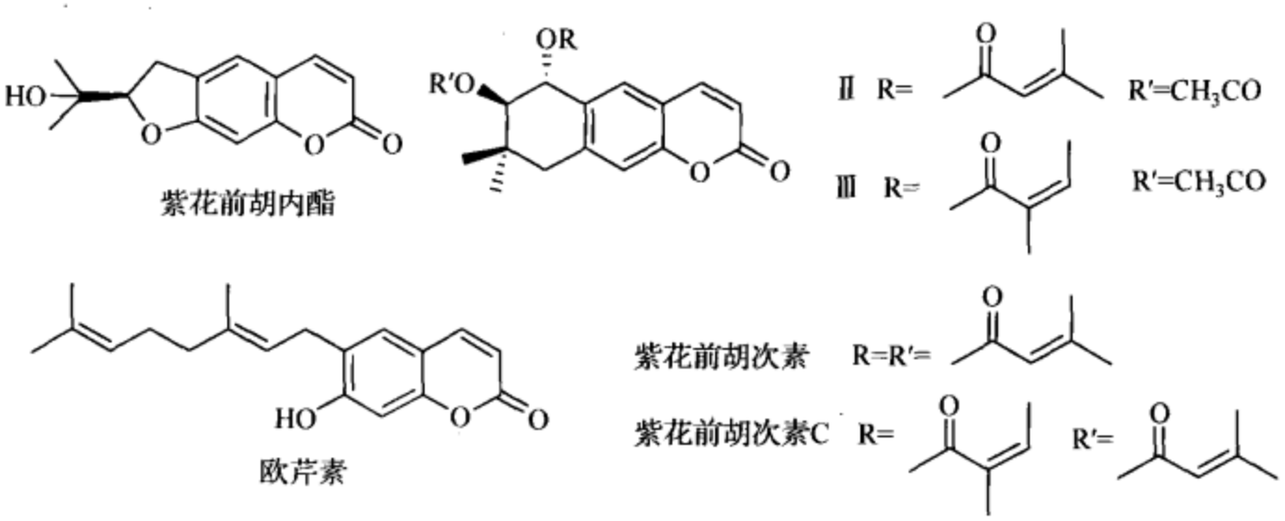


图 17.3 紫花前胡粗提物 HSCCC 液相色谱图

Ⅰ. 紫花前胡内酯；Ⅳ. 欧芹素；Ⅴ. 紫花前胡次素；Ⅵ. 紫花前胡次素 C



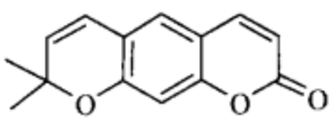
17.3.4 脐橙

将脐橙(*Citrus sinensis*)干燥根 467 g 在室温条件下分别用环已烷、二氯甲烷和甲醇提取 3 次，减压蒸干溶剂，得到环已烷部分 5.7 g，二氯甲烷部分 7.6 g 和甲醇部分 17.6 g，合并上述所得浸膏。

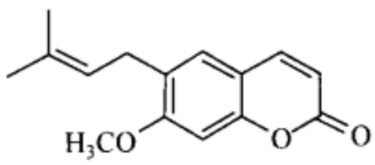
HSCCC 实验所用溶剂系统为正已烷-乙醇-乙腈-水(10∶8∶1∶1，v/v)，按其比例分别将各种溶剂加入分液漏斗中，剧烈振荡使溶液充分混合，分相平衡后，分出上相和下相，使用前分别用超声波脱气。

将下相作为固定相并泵入 HSCCC 螺旋管，当螺旋管完全充满后，以 3.0 mL·min^{-1}的流速将上相(流动相)由尾端泵入流动相，同时将螺旋管转速调为 850 r·min^{-1}。达到动力学平衡后，将 5.0 mL 含 1.2 g 粗提物的样品溶液注入分离螺旋管；柱后流出物以紫外检测器检测，检测波长为 220 nm 和 270 nm。样品

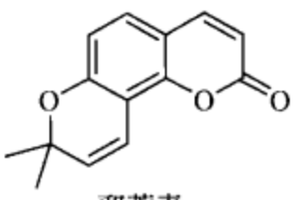
每 10 mL 收集一管，共收集 100 个流分，并通过 TLC 检测合并相同成分的流分。其中，流分 36～41，47～53，55～63，71～94 分别含软木花椒素（suberosin）（30.8 mg，纯度 93%），邪蒿素（seselin）（17 mg，纯度 89.5%），黄木亭（xanthoxyletin）（36.4 mg，纯度 89.5%）和美洲花椒素（xanthyletin）（128.5 mg，纯度 90%）[8]。



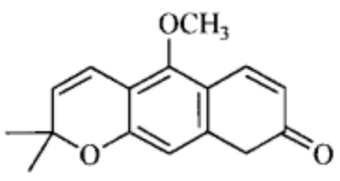
美洲花椒素



软木花椒素



邪蒿素

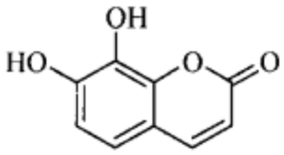


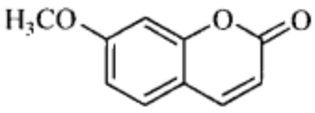
黄木亭

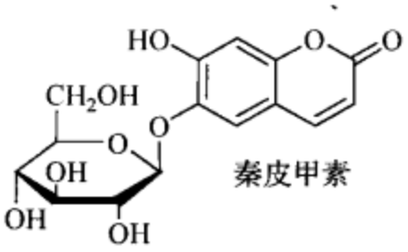
17.3.5 秦皮

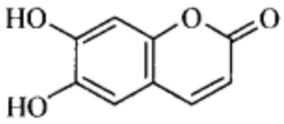
将 0.1781 g（1 mmol）七叶亭，0.2843 g（4 mmol）丙烯酰胺，4 g（约 20 mmol）二甲基丙烯酸和 15 mg 偶氮二异丁腈置于 25 mL 圆底烧瓶中，加入 14 mL 乙醇，然后将该混悬液用 N_2 脱气并超声 5 min 后，转移到安培管中，于真空密封条件下置于 60 ℃热水中 24 h。随后取出安培管中的聚合物用研钵研碎，筛出 40～64 μm 的颗粒，分别用乙醇-乙酸（8∶2，v/v）和乙醇淋洗至无七叶亭为止。干燥后取 400 mg的填料装成 150 mm×10 mm 的固定相萃取柱。

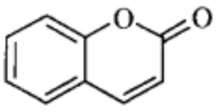
取 0.5 g 秦皮（Ash bark）粉末置于 100 mL 圆底烧瓶中，加入 50 mL 水，煮沸 2 h。将上清液用 0.45 μm 滤膜过滤，取 10 mL 滤液用水稀释定容到 100 mL，并取出 5 mL 稀释液加入自制的固定相萃取柱，分别用 5 mL 水（pH 8），2×5 mL 乙醇-水溶液（1∶9，v/v）淋洗；然后用 N_2 吹 10 min，再用 5 mL 的乙醚-氯仿溶液（1∶9，v/v）淋洗；然后用 N_2 吹 2 min，再分别用 5 mL 的水-乙醇-二甲基甲酰胺（5∶4∶1，v/v）淋洗 2 次，10 mL 的乙醇淋洗 1 次。所得流分若不足 5 mL，分别用相对应的流动相加至 5 mL。其中，秦皮乙素主要存在于乙醇-水溶液（1∶9，v/v）部位，而香豆素（coumarin）和 7-甲氧基香豆素（7-methoxycoumarin）主要集中于乙醚-氯仿溶液（1∶9，v/v）部位，此外，该部位还存在少量的秦皮甲素（esculin）（7%）；秦皮甲素和瑞香素（daphnetin）主要富集于水-乙醇-二甲基甲酰胺（5∶4∶1，v/v）中[9]。


瑞香素


7-甲氧基香豆素


秦皮甲素


秦皮乙素


香豆素

参 考 书 目

[1] 徐任生主编. 天然药物化学(第二版). 北京:科学出版社,2004:589～609.

[2] 徐任生主编. 天然产物化学导论. 北京:科学出版社,2006:286～305.

[3] Murray R D H, Mendez J, Brown S A. The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry. New York: John Wiley & Sons, 1982:13～20; 21～53; 55～95; 131～161.

[4] 徐任生,陈仲良. 中草药有效成分提取与分离(第二版). 上海:上海科学出版社,1983:335～339.

[5] 吴立军主编. 天然药物化学(第5版). 北京:人民卫生出版社,2007:107～119.

参 考 文 献

[1] Kulkarni M V, Kulkarni G M, Lin C H et al. Recent advances in coumarins and 1-azacoumarins as versatile biodynamic agents. Curr Med Chem, 2006, 13(23): 2795～2818.

[2] Skalicka-Woźniak K, Mroczek T, Garrard I et al. Isolation of the new minor constituents dihydropyranochromone and furanocoumarin from fruits of *Peucedanum alsaticum* L. by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A, 2009, 1216:5669～5675.

[3] 郭利飞,宋承成,陈永强. 分子印迹技术分离中草药功能因子的研究与应用. 药物分析杂志,2009,29(6):1055～1062.

[4] 陈晖,戴红霞. 分子印迹技术在中药研究中的应用. 亚太传统医药,2009,5(3):138～140.

[5] 金京玉,刘向前,陆昌沫. 小前胡中香豆素类成分研究. 天然产物研究与开发,2006,18:7～8.

[6] 莫峥嵘,陈光英,韩长日等. 青梅茎的化学成分研究(Ⅰ). 中山大学学报(自然科学版),2007,46(2):126～128.

[7] Liu R, Sun Q, Shi Y et al. Isolation and purification of coumarin compounds from the root of *Peucedanum decursivum* (Miq.) Maxim by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A, 2005, 1076(1,2):127～132.

[8] Cazal C M, Domingues V C, Batalhão J R et al. Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ants' symbiotic fungus, by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A, 2009, 1216(19):4307～4312.

[9] Hu S G, Li L, He X W. Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of Chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. J Chromatogr A, 2005, 1062(1):21～27.

(陆 阳)

第 18 章　蒽醌和花青素

蒽醌类化合物是蒽醌(anthraquinone)各种衍生产物的总称。蒽醌(9,10-蒽二醌)的 1,4,5,8 位称 α 位,2,3,6,7 位称 β 位,9,10 称 *meso* 位(图 18.1)。植物中存在的蒽醌成分包括蒽醌衍生物及其不同程度的还原产物(如氧化蒽酚、蒽酚、蒽酮及蒽酮的二聚体等)。天然产物中绝大多数蒽醌含有羟基,常以游离蒽醌或蒽醌苷的形式存在。

花青素(anthocyanidin)又称花色素,其基本母核是 2-苯基苯并呋喃阳离子,即花色基元(图 18.1)。大多数花青素是在花色基元的 C3,C5,C7 位上连有取代基的黄酮类化合物。由于花色基元 A 环和 B 环各碳位上的取代基种类(羟基、甲氧基和/或糖基)和数目不同,形成了呈色各异的多种花青素。目前已知的花青素有 20 多种,常见的花青素有天竺葵色素或花葵素、矢车菊色素或芙蓉花色素、翠雀素或飞燕草色素、芍药色素、牵牛花色素、锦葵色素等。

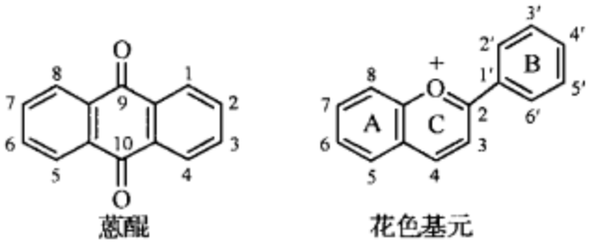


图 18.1　蒽醌和花色基元的结构

在植物界蒽醌类化合物存在于百合科的芦荟,豆科的决明子、番泻叶,茜草科的茜草、鼠李,蓼科的大黄、虎杖、何首乌、拳参等高等植物中。蒽醌化合物还存在于低等植物地衣和菌类的代谢产物中。自然条件下游离状态的花青素较少见,天然花青素常通过糖苷键与一个或多个糖等形成花青素苷。已知天然存在的花青素苷有 200 余种。花青素苷中苷元的羟基和/或糖的羟基还可以与一个或多个分子的香豆酸、咖啡酸、对羟基苯甲酸等芳香酸和脂肪酸通过酯键形成酰基化的花青素(苷)酯。

花青素是一类广泛存在于植物中的水溶性天然色素[1],是植物花瓣和果实中的主要呈色物质。花青素为植物二级代谢产物,有重要的生物学功能。花瓣和果实的颜色可吸引动物进行授粉和种子传播。花青素存在于 27 个科 73 个属的被子植物的花、果实、茎、叶、根等器官的细胞液中。花青素含量较高的植物有葡萄、山楂、松针、紫薯、银杏、花生、苹果、茶叶、沙棘等植物,其中以葡萄皮、黑醋栗、草莓、

树莓、越橘等植物部位的含量最为丰富，从红葡萄渣中提取的葡萄皮红是最早发现且最丰富的花青素。玫瑰茄色素（玫瑰茄红）是食用红（至紫）色素，用于 pH 4 以下，不需高温加热的食品（如糖浆、冷点、果冻等）。玫瑰茄色素由玫瑰茄的花萼提取精制而来，主要成分有飞燕草素-3-接骨木二糖苷、矢车菊素-3-接骨木二糖苷。花青素的生物合成分 3 个阶段：由苯丙氨酸到香豆酰 CoA 是酚类次生代谢产物共有的生物合成步骤；由香豆酰 CoA 到二氢黄酮醇是类黄酮代谢的关键反应，该阶段产生的黄烷酮和二氢黄酮可转化为花青素和其他类黄酮；最后是各种花青素的生物合成。

蒽醌类化合物具有致泻、抗炎、抗菌、利尿以及抗肿瘤、抗病毒等多种活性，如从芦荟（*Aloe saponaria* Haw）中得到的芦荟苷具有较强的抑制革兰氏阳性菌的活性；目前临床上常用的抗肿瘤药物阿霉素及米托蒽醌的基本母核亦是蒽醌结构。抗氧化是花青素类化合物最主要的活性之一，研究发现葡萄中的花青素类抗氧化活性相当于维生素 C 的 70%以上，而从红葡萄酒中提取的花色苷能有效地清除超氧自由基和羟自由基；此外，花青素类化合物还具有抗突变、保护肝脏、预防心脑血管疾病、抑制肿瘤细胞发生等多种活性。

18.1 蒽醌和花青素的理化性质

18.1.1 物理性质

植物药中天然蒽醌化合物母核上一般都有酚羟基，由于酚羟基的助色作用，绝大多数蒽醌化合物都是有色晶体，其颜色为黄、橙、棕红、紫红等，蒽醌化合物取代的助色基团越多，颜色越深。含蒽醌化合物的水溶液中显淡黄色或黄色，当溶液至偏碱性时呈橙黄色。含羟基的蒽醌衍生物遇空气和阳光易被氧化，随时间推移，颜色逐渐加深，直至成为黑褐色的物质。蒽醌及其苷类在不同 pH 下可能产生不同的荧光。花青素分子中吡喃环上的氧原子是以鎓盐形式存在，花青素具有碱的性质；因为花青素分子中常含有酚羟基，所以又具有酸的性质。花青素类物质具有随介质 pH 而改变结构，从而改变其颜色的性质。在可见光下花青素的颜色随介质的 pH 改变而改变[2]。在酸性条件下为红色鎓盐（Ⅰ）结构，近中性时为无色的 α-羟基色元烯中间体（Ⅱ），Ⅱ不稳定，会开环形成查耳酮（Ⅳ）；进一步碱化则生成蓝色的醌式结构（Ⅲ），如图 18.2 所示。

花青素分子中存在大共轭体系，在紫外与可见光区域均具有较强的吸收，紫外区最大吸收波长在 280 nm 附近，可见光区域最大吸收波长在 500～550 nm。

游离的蒽醌衍生物极性小，一般可溶于乙醇、乙醚、氯仿等有机溶剂，基本上不溶于水，而蒽醌苷极性显著增大，几乎不溶于低极性有机溶剂，而易溶于甲醇、乙醇

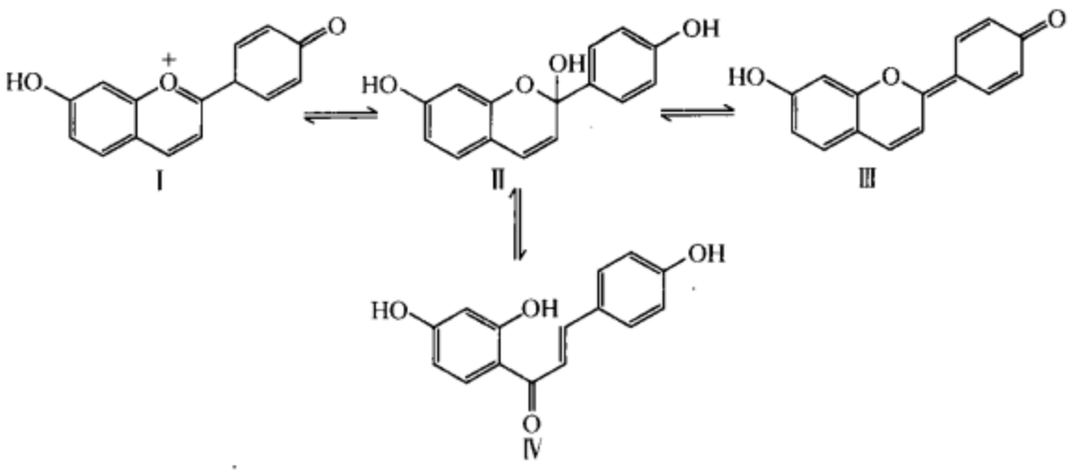


图 18.2　不同 pH 溶液中花青素的结构

和热水中，在冷水中溶解度仍偏低。花青素类化合物为极性分子，可溶于水、甲醇、乙醇、丙二醇等极性溶剂及冰醋酸、柠檬酸等酸性溶液和碱性水溶液，随温度的升高其溶解度加大。花青素不溶于苯、甲苯、氯仿、石油醚、四氯化碳等非极性溶剂。花青素类化合物能被活性炭吸附，其与乙酸铅试剂作用会生成沉淀。花青素容易与氯化氢生成结晶形状的盐，所以花青素常以氯化物的形式进行处理。

18.1.2　酸性

蒽醌类化合物多带有酚羟基，故具有一定的酸性。其酸性强弱与分子中酚羟基数目和位置以及是否存在羧基有关。含有羧基的蒽醌衍生物的酸性较强，可溶于 $NaHCO_3$ 水溶液；含 β-羟基的蒽醌衍生物，受羰基吸电子作用的影响，β-羟基的酸性较强，一般可溶于 Na_2CO_3 水溶液中；α-羟基可与相邻羰基形成分子内氢键，其酸性较弱，一般可溶于 NaOH 水溶液中。

18.1.3　颜色反应

蒽醌类化合物具有一些重要的颜色反应，可以用于植物药中这类成分的检识。

羟基蒽醌的衍生物（包括蒽醌苷）遇碱显橙、红、红紫、青紫和蓝色，此反应是检识植物药中羟基蒽醌类成分存在的最常用的方法之一。但蒽醌的还原衍生物如蒽酚、蒽酮、二蒽酮类化合物则需要氧化形成羟基蒽醌类化合物以后才能显色。碱性条件下，蒽醌类化合物经加热能迅速与醛类及邻二硝基苯反应生成紫色化合物。乙酸镁的甲醇溶液与羟基蒽醌化合物反应显橙红色或紫色，所显颜色随分子中羟基数目和位置有所不同。借此性质可以推测羟基在蒽醌环中的结合位置和数目。

18.2 蒽醌和花青素的提取和分离

18.2.1 蒽醌和花青素类化合物的提取

不同植物药中所含蒽醌化合物各不相同，而且游离蒽醌和蒽醌苷的极性和溶解性差别很大，所以可采用的提取分离方法各异。花青素的提取方法的选择取决于花青素本身的性质及所希望达到的目的。如果要对花青素进行定性或定量分析，应选择使花色素尽可能处于天然状态的提取方法；如果提取出来的花色素用于食物，应更多地注意提取物的安全性、着色力及稳定性。

花青素在中性或弱碱性溶液中不太稳定，而酸性溶液在破坏植物细胞膜的同时有助于溶解水溶性花青素，因此提取过程中常采用酸性溶液。虽然从花青素的物理性质考虑，甲醇非常适合花青素的提取，但考虑到甲醇的毒性，许多场合特别是提取用于食物着色的花色素时，还是采用提取得率低于甲醇的酸化乙醇液。盐酸乙醇液的 pH 低，它能改变复杂色素的原始状态。为了获得更接近于天然状态的花色苷，也常采用中性溶剂进行初步提取，可采用的中性溶剂主要有甲醇、乙醇、丙酮、水或者它们的混合物等。

18.2.1.1 蒽醌类化合物碱提酸沉法

含有游离酚羟基的蒽醌化合物具有一定的酸性，其酚羟基能与碱成盐而溶于碱水溶液中，加酸酸化后酚羟基被游离，蒽醌类化合物又沉淀析出。根据蒽醌类化合物的游离羟基的位置和数目不同，其酸性强弱不同，故可用不同强度的碱水溶液选择性提取。取含蒽醌类化合物的植物药粉末，用氨水或 0.1%～0.5%氢氧化钠溶液室温提取。碱提取液先用乙醚等除去脂溶性杂质，然后将水液酸化，再用乙醚等抽提，回收溶剂。残渣用甲苯、甲醇、乙醇等重结晶精制，得游离蒽醌类化合物。在已除去游离蒽醌的粗提物的乙醇溶液中加入氢氧化钾，使蒽醌苷的钾盐从乙醇中沉淀，沉淀经乙酸处理后，得总蒽醌苷。

18.2.1.2 有机溶剂提取法

有机溶剂提取法是应用最广泛的蒽醌类提取方法。一般蒽醌类化合物采用常温或加热回流的方式提取，常用的溶剂包括己烷、氯仿、丙酮、乙腈、乙酸乙酯、甲醇等。游离醌类化合物的极性较小，故用极性较小的有机溶剂（如氯仿、苯等）提取，有时在提取液浓缩过程中即可析出结晶。蒽醌苷多与酶伴存于植物药中，在提取中苷容易酶解而产生苷元或次级苷，可采用 70%以上的甲醇、乙醇或 80 ℃以上热水提取，在此提取条件下苷类的溶解度增大，而酶等蛋白质类物质凝

固变性与苷类直接分开。蒽醌类苷和苷元也可以同时提取。例如，取植物药粉末，用 90%乙醇加热，提取液减压浓缩，浓缩液用氯仿等有机溶剂萃取，可获得游离蒽醌；除去游离蒽醌的溶液可进一步采用正丁醇等极性较大的有机溶剂萃取，获得蒽醌苷。由于蒽醌类化合物大多含有羟基或羧基，在植物体内它们常以钠、钾、钙、镁等金属盐的形式存在，所以提取前常先用酸处理使之完全游离后，再用有机溶剂提取。

溶剂提取法是花青素的常规提取方法。在醇提取溶剂中加入一定浓度的盐酸或者甲酸，可防止提取过程中非酰基化的花青素降解，应用酸性醇提取时，应小心避免在蒸发浓缩过程中这些酸可导致酰基化的花青素部分或全部水解。在一些植物花青素的提取中，少量的酸会使酰基化的花色苷部分或全部水解。例如，对从葡萄中提取花青素的多种方法进行的比较证明，当溶液中 HCl 达到0.12 mol·L^{-1}时能使酰基化的花色苷部分水解。对于含有较多脂溶性成分提取物的样品，可采用低极性有机溶剂（如正己烷、石油醚、乙醚等）萃取浓缩的提取液，以除去脂溶性成分。

传统的溶剂加热提取方法提取时间长，提取效率较低，且热溶剂易造成花青素降解导致提取物生物活性降低。从植物中提取花青素，国外采用低温（4～8 ℃）或者常温（25 ℃）避光条件下用 1% HCl 甲醇溶液浸提 1～20 h，或者采用 0.5%、1%三氟乙酸的甲醇溶液，4 ℃条件下浸提 24 h；国内多采用热溶剂（50～70 ℃）浸提 1～2 h的方法，溶剂可选择不同浓度的醇溶液或酸化的水溶液。另外为了避免常规酸性醇提取法提取花青素时酰基化的花青素水解，也可选择弱酸（如酒石酸、柠檬酸）代替盐酸。

18.2.1.3　物理场强化提取

在传统的溶剂提取中加入微波或超声波等物理场，可提高提取效果。超声处理技术利用超声空化的作用，使物质内部微气核在超声场中振动、生长和破裂。超声波的机械效应和热效应也能加速有效成分的扩散释放，并充分与溶剂混合，利于提取。应用超声处理能显著强化和改善植物药中蒽醌类成分的提取效率，提高其溶出速度。由于超声处理过程在较低温度下进行，能避免热敏性蒽醌类的分解。微波处理的特点是在植物内部迅速加热，并可使内部组织在很短的时间内破裂，微波萃取可显著降低溶剂用量，减少提取时间，提高收率。

对葡萄中花青素的提取率影响的结果显示，与相同条件下热浸提相比，超声波辅助提取花青素等酚类化合物的效率可以提高 50%以上。对紫甘薯中花青素的超声波辅助提取方法研究发现，一次提取率可达到 89.45%。

高压脉冲电场（PEF）作为一种辅助提取手段，具有提取时间短、提取温度低、节能、不污染环境等优点。将 PEF 技术应用于天然产物的提取，可以规避目前普

遍采用的热溶剂提取过程，因长时间加热而导致的天然产物的性状发生变化等问题。经 PEF 前处理的葡萄皮用于葡萄酒的发酵，能够增加酿造酒的色度，花青素含量和总酚含量均比对照组高。

18.2.1.4 铅盐法

在除去游离蒽醌的总蒽醌类化合物的水溶液中，加入乙酸铅溶液可使蒽醌苷沉出。该沉淀经过过滤，水洗，悬浮于水中，通硫化氢气体去铅，过滤，含蒽醌苷的滤液调至中性，蒸干，得总蒽醌苷。总蒽醌苷可通过硅胶柱色谱法或通过在适宜溶剂中重结晶，进一步纯化。

18.2.2 蒽醌和花青素类化合物的分离

18.2.2.1 蒽醌类化合物的分离

蒽醌类化合物含有游离羟基的位置和数目不同，其酸性强弱不同，可用不同强度的碱水溶液选择性提取不同的蒽醌类化合物，从而达到分离的目的。

最常用的蒽醌类化合物的分离方法是色谱法，色谱法对含有游离酚羟基的蒽醌类化合物的分离比较有效。处理结构相近的蒽醌衍生物时，往往需要经过反复应用多种色谱法才能有效地分离。通常酸性强的蒽醌衍生物被吸附的作用也强，酸性相近的蒽醌衍生物被吸附的程度很相似，用柱色谱较难完全分离，此时可将混合物乙酰化再进行分离。在色谱法分离蒽醌类化合物时，一般不用氧化铝做吸附剂，因为氧化铝对羟基蒽醌吸附能力太强，难以洗脱；常用的固定相有磷酸氢钙、硅胶、聚酰胺、葡聚糖凝胶等。当选用磷酸氢钙色谱时，预先用磷酸调节磷酸氢钙的酸度，可改善分离效果。应用硅胶柱色谱分离游离蒽醌时可在硅胶中加入少量的草酸或柠檬酸，以抑制蒽醌的解离。使用较多的预填充反相硅胶柱有 Lichroprep RP-18 和 Lobar RP-18，常使用的反相大孔聚合物有 Diaion HP-20、Kogel BG 4600、MCI Gel CHP-20P、D301[3]。聚酰胺色谱是利用蒽醌羟基与聚酰胺形成的氢键强弱差异来进行分离的，洗脱剂可采用甲醇。葡聚糖凝胶色谱常用的葡聚糖凝胶是 Sephadex LH-20。

为了提高色谱分离的效果，经常需要对样品进行预处理或采用有针对性的提取方法。例如，在蒽醌苷类化合物的色谱分离中，在分离之前，可采用溶剂法或铅盐法处理粗提物，除去大部分杂质，制得较纯的总苷后再进行色谱分离。

高效液相法是传统色谱方法的重要补充，用于蒽醌类化合物的精制。当用硅胶柱分离羟基蒽醌类时，羟基蒽醌类与硅胶柱会有较强的吸附，而高速逆流色谱法没有固相载体，可以很有效地解决这个问题。闪柱色谱法的特点是色谱柱短，采用球型硅胶且加压而使洗脱速度加快，因此分离周期短，溶剂所需量少，且有较好的

分离效果。

18.2.2.2　花青素类化合物的分离

从植物中初步分离得到的天然花青素产品，通常是多种花青素的混合物，杂质含量较高，品质偏低，稳定性和着色性均不好，需要进一步的纯化精制。

花青素纯化方法包括色谱法、离子交换树脂法、吸附法、膜分离法、超滤乙酸纤维膜纯化和浓缩、重结晶法以及酶法等。色谱法是主要的分离纯化方法。

常规的硅胶柱色谱用于分离纯化极性的花青素，遇到的主要问题是分离纯化效率不够理想，限制其广泛应用。而高速逆流色谱、C18 反相柱色谱和聚酰胺柱色谱等可较有效地避免硅胶固定相的不可逆吸附，在花青素分离纯化中应用较广泛[4]。离子交换树脂法已用于纯化萝卜皮色素，在纯化过程中可除去糖、有机酸、无机盐等物质。超滤法具有浓缩与净化双重功能，是目前纯化天然色素较理想的方法。酶法是纯化色素的新方法，已用于叶绿素的除臭。超滤法和酶法将是今后的发展方向。

在对花青素进行纯化过程中，仅用一种手段很难达到对其纯化的目的，往往需要两种或两种以上的纯化手段配合使用。例如，粗提物可用柱色谱进行粗分离，同时用薄层色谱快速检测，再用制备高效液相或高速逆流色谱法分离出更纯的花青素类化合物。

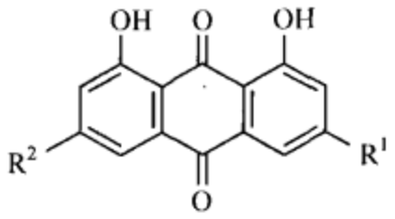
18.3　蒽醌和花青素类化合物的提取分离实例

18.3.1　大黄

将大黄(*Rheum palmatum* L.)切成小碎片，加入 20%硫酸溶液和氯仿(1∶5)混合物，在水浴上回流数小时，倾出氯仿液，残渣再如法重复数次，合并氯仿液。水洗，得氯仿提取液，分离后的氯仿液用 5%氢氧化钠溶液振荡提取数次，直至无色。合并深红色的水层溶液，加盐酸至酸性，得黄色沉淀，过滤，水洗，干燥后得到大黄粗提物。

在室温下分离正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(9∶1∶5∶5，v/v)混合物的上下相，上相加入三氟乙酸使其浓度为 5 mmol·L^{-1}；下相加入浓氨水，使得下相中氨浓度为2 mmol·L^{-1}。HSCCC 主机正转 800 r·min^{-1}；进样量为 5 mL 含 20 mg 大黄粗提物的样品溶液；流动相由首端向尾端洗脱，流速 1 mL·min^{-1}；90 min后，再向剩余流动相中加 25%的氨水，使下相中氨浓度变为 4.8 mmol·L^{-1}，继续洗脱；当峰 5 完全出现后，主机反转，转速为 400 r·min^{-1}，并更换流动相，以上相作为流动相，流速 1 mL·min^{-1}，收集峰 3～峰 7，分别为大黄酸(rhein)(14.80%)，大黄素

(emodin)(2.43%),芦荟大黄素(aloe-emodin)(2.01%),大黄素甲醚(physcion)(2.36%)和大黄酚(chrysophanol)(0.55%)[5]。

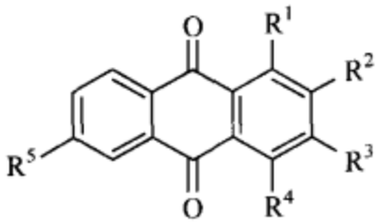


大黄酸	R^1=COOH, R^2=H
大黄素	R^1=OH, R^2=H
芦荟大黄素	R^1=CH_2OH, R^2=H
大黄素甲醚	R^1=OCH_3, R^2=CH_3
大黄酚	R^1=H, R^2=CH_3

18.3.2 茜草

将茜草(*Rubia cordifolia* L.)根 10 kg 粉碎后用 95%乙醇回流提取,回收溶剂,得浸膏 A。药渣继续用 70%乙醇回流提取,回收溶剂得浸膏 B。浸膏 A 加水稀释后,依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇萃取;浸膏 B 加水稀释后用乙醚萃取。将各萃取液减压回收溶剂后得相应的浸膏。

取氯仿部位浸膏 60 g,经硅胶柱色谱,以石油醚-氯仿、氯仿-乙酸乙酯、氯仿-甲醇梯度洗脱,在氯仿-乙酸乙酯(10∶1)洗脱部位得晶体 1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌(**18-1**)60 mg,242 ℃升华。取乙醚部位浸膏 3 g,经硅胶柱色谱分离,以石油醚-氯仿梯度洗脱,于 2∶1 和 1∶4 洗脱部位分别得到晶体 1-羟基蒽醌(**18-2**)17 mg(mp 134～137 ℃)和晶体 1,2,4-三羟基蒽醌(**18-3**)47 mg(mp 257～259 ℃)。取乙酸乙酯部位浸膏 28 g,经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇梯度洗脱,将 5∶2 洗脱部位再经硅胶柱色谱于氯仿-丙酮(3∶1)洗脱得到晶体 1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌-3-*O*-*β*-D-吡喃葡萄糖苷(**18-4**)43 mg,(mp 278～279 ℃)。取正丁醇部位 33 g 经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇(85∶15)洗脱的第 120～122 流分,经反相柱 RP-18 甲醇-水(7∶3)洗脱,得晶体 1,2-二羟基蒽醌-2-*O*-*β*-D-吡喃木糖(1→6)-*β*-D-吡喃葡萄糖苷(**18-5**)13.8 mg(mp 268～269 ℃);以氯仿-甲醇(85∶15)洗脱的第 132～135 流分,经硅胶制备薄层,再以丙酮-乙酸乙酯-水(1.1∶1∶1.3)展开,得晶体 1,3-二羟基-2-羟甲基蒽醌-3-*O*-*β*-D-吡喃木糖(1→6)-*β*-D-吡喃葡萄糖苷(**18-6**)30 mg (mp 210～212 ℃);以氯仿-甲醇梯度洗脱,在 9∶1 洗脱部位得晶体 1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌-3-*O*-*β*-D-吡喃木糖(1→2)-*β*-D-(6′-*O*-乙酰基)-吡喃葡萄糖苷(**18-7**)17 mg(mp 284～286 ℃)[6]。



18-1 R^1=R^3=R^5=OH, R^2=CH_3, R^4=H
18-2 R^1=OH, R^2=R^3=R^4=R^5=H
18-3 R^1=R^2=R^4=OH, R^3=R^5=H
18-4 R^1=R^5=OH, R^2=CH_3, R^4=H, R^3=O-Glu
18-5 R^1=OH, R^2=O-Glu $\overset{6\,1}{}$ Xyl, R^3=R^4=R^5=H
18-6 R^1=OH, R^2=CH_2OH, R^3=O-Glu $\overset{6\,1}{}$ Xyl, R^4=R^5=H.
18-7 R^1=R^5=OH, R^2=CH_3, R^3=O-(6′-O-Ac)Glu $\overset{2\,1}{}$ Xyl, R^4=H

18.3.3　何首乌蒽醌

取何首乌(*Polygonum multiflorum* Thumb.)干燥块根 10 kg,粉碎,90%乙醇渗漉 4 次,合并渗漉液,浓缩至无醇味,得到总浸膏 1 kg。将浸膏混悬于水中,依次用氯仿、乙酸乙酯、正丁醇萃取,得到 3 部分浸膏。取氯仿萃取物 116 g,经硅胶柱色谱,石油醚-乙酸乙酯[(50∶1)～(1∶2)]梯度洗脱,每 500 mL 收集一份,合并相同流分,流分 18～23 经乙酸乙酯重结晶得 0.3 g 大黄素甲醚;流分 77～100 经硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 柱纯化,得到 30 mg 大黄素-6,8-二甲醚(emodin-6,8-dimethyl ether);流分 130～162 经氯仿-甲醇重结晶得到 0.4 g 大黄素;流分207～226 经硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 柱纯化,得到 80 mg 大黄素-8-甲醚(questin)。取乙酸乙酯萃取物 425 g 经硅胶柱色谱,以氯仿及氯仿-甲醇(5%～100%)梯度洗脱,15%甲醇洗脱部分(9.8 g)经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇[(10∶1)～(1∶1)]梯度洗脱,5∶1 洗脱部分得到 0.25g 大黄素-8-*O*-β-D-吡喃葡萄糖苷(emodin-8-*O*-β-D-glucoside),7∶1 洗脱部分经反复硅胶柱色谱和 Sephadex LH-20 柱纯化,得到20 mg大黄素-8-*O*-(6′-*O*-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷[emodin-8-*O*-(6′-*O*-acetyl)-β-D-glucoside]和 25 mg 大黄素甲醚-8-*O*-β-D-吡喃葡萄糖苷(physcion-8-*O*-β-D-glucoside)[7]。

18.3.4　越橘

越橘(*Vaccinium myrtillus*)为杜鹃花科越橘属植物,其果实呈蓝色,俗称蓝莓(blueberry),越橘特有的紫色果皮是其花色素最丰富的部位。

越橘果实用 10 倍量的 0.5%HCl 的甲醇溶液提取,收集提取液并减压蒸干。采用 HSCCC(Potomac 公司),将 90 mL 甲基丁二酯、360 mL 正丁醇、90 mL 乙腈、450 mL 水和 0.8 mL 三氟乙酸装入分液漏斗后摇晃并静置,在使用前将上下相分别倒出。将上相作为固定相并泵入 HSCCC 螺旋管,当螺旋管完全充满后,以 1.5 mL·min^{-1} 的流速将下相(流动相)由头部泵入,同时将螺旋管转速调为 650 r·min^{-1}。等达到动力学平衡后,将溶解于 20 mL 下相中的浸膏 500 mg 注入分离螺旋管,柱后流出物以紫外检测器检测,检测波长为 440 nm。进样后开始采集数据并根据峰形收集流动相,共得到 5 个流分(Ⅰ～Ⅴ,图 18.3),减压回收溶剂,称量,其中流分Ⅱ为 delphinidin-3-*O*-sambubioside(得率 26%),流分Ⅲ为 cyanidin-3-*O*-sambubioside(得率 15.4%)[8]。

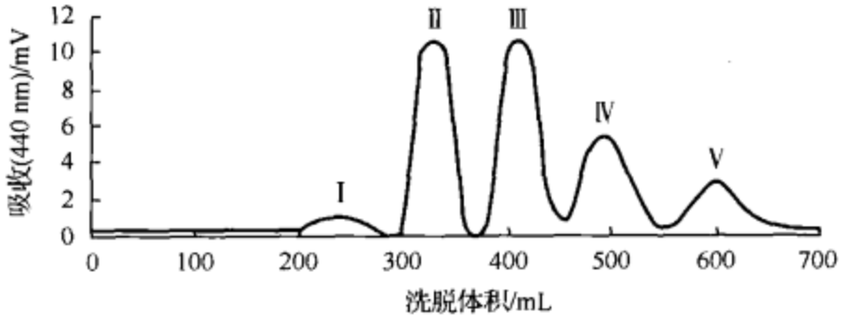
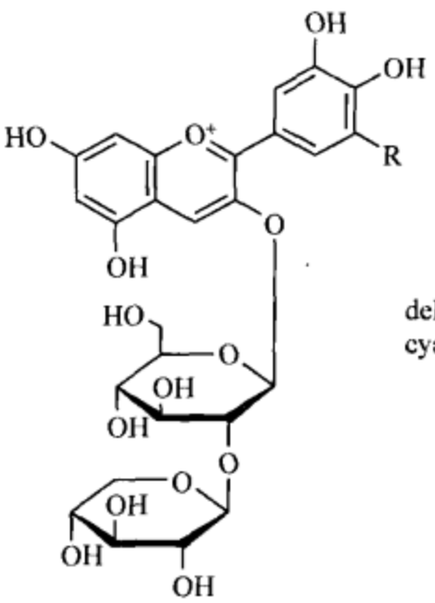


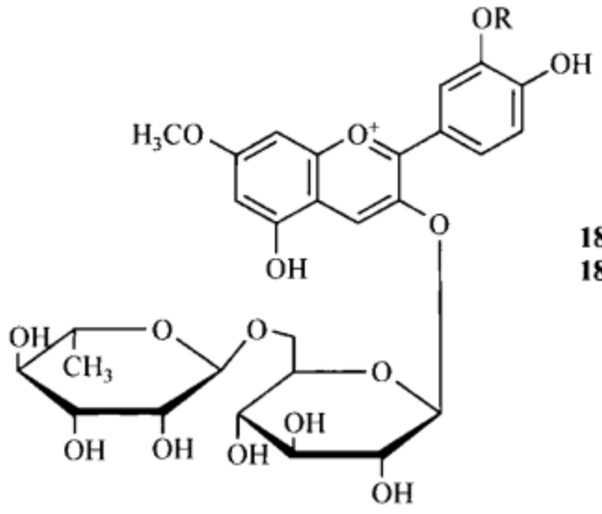
图 18.3 越橘粗提物 HSCCC 图



delphinidin-3-*O*-sambubioside R=OH
cyanidin-3-*O*-sambubioside R=H

18.3.5 长春花

夹竹桃科长春花(*Catharanthus roseus*)在马达加斯加既是观赏植物又是重要的药用植物,其花用于治疗淋巴癌。取 43 g 干燥的长春花,用 15 L 5%乙酸溶液于室温浸渍过夜,提取液过 Diaion HP-20 大孔吸附树脂柱,花青素吸附在柱上,用 5 L 水洗柱子,再用 MeOH-HOAc-H_2O(75∶5∶20)洗脱,洗脱液浓缩后用 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱分离,用 MeOH-HOAc-H_2O(6∶1∶12)洗脱,相应的组分进一步通过制备 HPLC 纯化,用 Inertsil ODS-2 柱,HOAc 洗脱液,分离得到 2 个 7-*O*-甲基花色苷 **18-8**(23 mg)和 **18-9**(15 mg)[9]。

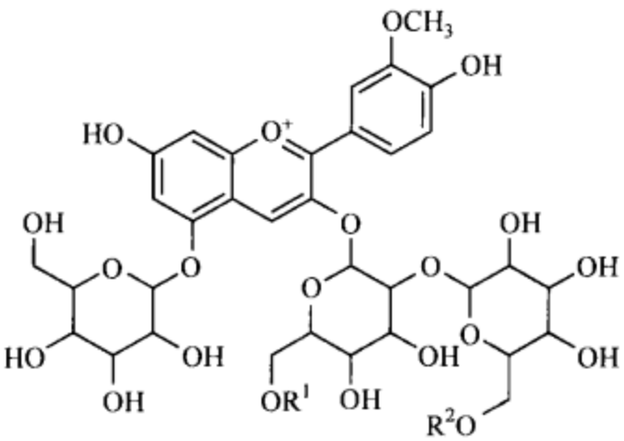


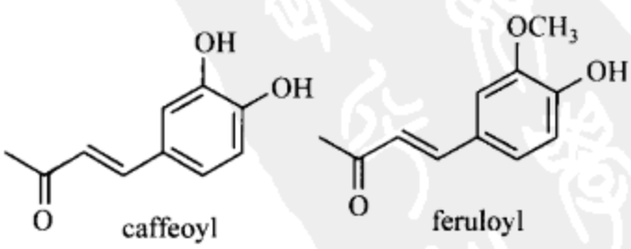
18-8 R=H
18-9 R=CH_3

18.3.6　紫甘薯

将 300 g 紫甘薯的根切碎，在室温下浸渍在 2.5 L 0.1%盐酸乙醇内，过滤。固体残渣用 500 mL0.1%盐酸乙醇洗 3 次。滤液合并，于 40 ℃减压蒸干，得到 30 g黑紫色粗提物，存放在－20 ℃，用于 HSCCC 分离。

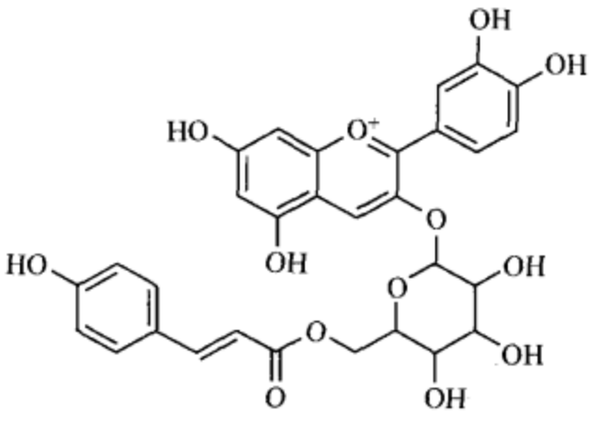
采用 TBE-300 型高速逆流色谱仪，溶剂系统为甲基叔丁基醚-正丁醇-乙腈-水-三氟乙酸(1∶4∶1∶5∶0.01，v/v)，相应体积的溶剂分别加入分液漏斗，在室温下放置平衡，分离上相和下相，使用前 30 min 分别通过超声波脱气。将上相(固定相)泵入 HSCCC 管路，待固定相充满整个管路后，启动主机，转速调至880 r·min^{-1}，然后以 1.5 mL·min^{-1}的流速泵入下相(流动相)。当流动相至出口流出时，管路内固定相和流动相达到动力学平衡状态。将样品溶液(200 mg 的粗提物溶于4 mL下层溶液)由进样阀引入管路，室温分离，管路中流出物用紫外检测器于 520 nm 处检测，手动收集相应峰的流出物，减压蒸发，分别得到 **18-10** (15 mg)，**18-11**(7 mg)，**18-12**(10 mg)，**18-13**(12 mg)，通过 HPLC 分析其纯度分别为 95.5%，95.0%，97.8%，96.3%[10]。





caffeoyl　　feruloyl

	R^1	R^2
18-10	caffeoyl	H
18-11	caffeoyl	caffeoyl
18-12	caffeoyl	feruloyl



18-13

参 考 书 目

[1] 徐任生主编. 天然药物化学(第二版). 北京:科学出版社,2004:573～588.
[2] 徐任生主编. 天然产物化学导论. 北京:科学出版社,2006:270～285.
[3] Thomson R H. Naturally Occurring Quinones Ⅳ, Recent Advances. London: Chapman and Hall, 1996.
[4] 徐任生,陈仲良. 中草药有效成分提取与分离(第二版). 上海:上海科学出版社,1983:329～334.
[5] 吴立军主编. 天然药物化学(第5版). 北京:人民卫生出版社,2007:155～181.
[6] 陆阳主编. 醌类化学. 北京:化学工业出版社,2009:70～91.

参 考 文 献

[1] Ben Mansour H, Latrach Tlemcani L. Are natural food dyes good food additives? Phytotherapie, 2009, (4): 202～210.
[2] Stintzing F C, Carle R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. Trends Food Sci Tech, 2004,15(1):19～38.
[3] 许汉林,陈军,邵继征, 孙芸, 张赤志. 大孔树脂分离纯化大黄总蒽醌的研究,中国中药杂志,2006, 31(14): 1163～1165.
[4] Degenhardt A, Hofmann S, Knapp H et al. Preparative isolation of anthocyanins by high-speed counter-current chromatography and application of the color activity concept to red wine. J Agri Food Chem, 2000, 48(12): 5812～5818.
[5] 黄健光, 李总成. 利用高速逆流色谱分离大黄活性成分. 顺德职业技术学院学报,2006,4(1):31～33.
[6] 王素贤,华会民, 吴立军等. 茜草中蒽醌类成分研究. 药学学报,1992,27(10):743～747.
[7] 张志国,吕泰省,姚庆强. 何首乌蒽醌类化学成分研究. 中草药,2006,37(9):1311～1313.
[8] Du Q, Jerz G, Winterhalter P. Isolation of two anthocyanin sambubiosides from bilberry (*Vaccinium myrtillus*) by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A,2004(1045): 59～63.
[9] Toki K, Saito N, Irie Y et al. 7-O-Methylated anthocyanidin glycosides from *Catharanthus roseus*. Phytochemistry,2008, 69: 1215～1219.
[10] Qiu F, Luo J, Yao S et al. Preparative isolation and purification of anthocyanins from purple sweet potato by high-speed counter-current chromatography. J Sep Sci, 2009, 32(12): 2146～2151.

(陆　阳)

第 19 章　萜类化合物

19.1　概　　述

19.1.1　萜类的含义及分类

萜类化合物(terpenoid)是一类骨架庞杂、种类繁多、数量巨大、结构千变万化又具有广泛生物活性的一类重要的天然药物化学成分。从化学结构上来看，它是异戊二烯的聚合体及其衍生物，其骨架一般以 5 个碳为基本单位，少数也有例外。但是，大量的实验研究证明，甲戊二羟酸(mevalonic acid，MVA)才是萜类化合物生物合成途径中的关键的前体物，而不是异戊二烯结构。因此，凡由甲戊二羟酸衍生，分子式符合$(C_5H_8)_n$通式的衍生物均称为萜类化合物。萜类化合物常常根据分子结构中异戊二烯单元的数目进行分类，如单萜、倍半萜、二萜等(表 19.1)。同时可根据各萜类分子结构中碳环的有无和数目的多少，进一步分为链萜、单环萜、双环萜、三环萜、四环萜等，如链状单萜、单环单萜、双环单萜等。萜类大多数是含氧衍生物，所以萜类化合物又可分为醇、醛、酮、羧酸、酯及苷等。

表 19.1　萜类化合物的分类及分布

分类	碳原子数	通式$(C_5H_8)_n$	存在
半萜	5	$n=1$	植物叶
单萜	10	$n=2$	挥发油
倍半萜	15	$n=3$	挥发油
二萜	20	$n=4$	树脂、苦味质、植物醇
二倍半萜	25	$n=5$	海绵、植物病菌、昆虫代谢物
三萜	30	$n=6$	皂苷、树脂、植物乳液
四萜	40	$n=8$	植物胡萝卜素
多聚萜	$7.5\times10^3\sim3\times10^5$	$(C_5H_8)_n$	橡胶、硬橡胶

萜类化合物在自然界分布广泛，种类繁多，除主要分布于植物外，近来从海洋生物中发现了大量的萜类化合物。在天然药物化学成分研究中，萜类成分的研究一直是较为活跃的领域，是寻找和发现天然药物活性成分的重要来源。本章主要

介绍单萜、挥发油类、倍半萜、二萜、三萜化合物。

单萜类化合物是多种植物挥发油中低沸程(140～180 ℃)部分的主要组成成分,能随水蒸气蒸馏出来,但若以苷的形式存在,则不具挥发性,也不能被水蒸气蒸馏出来。倍半萜类化合物是挥发油较高沸程(250～280 ℃)部分的主要组成成分,与单萜化合物常共存于植物挥发油中。单萜的含氧衍生物和倍半萜的含氧衍生物多具有较强的生物活性和香气,是医药、食品和化妆品工业的重要原料。挥发油多具有祛痰、止咳、平喘、祛风、健胃、解热、镇痛、抗菌消炎作用,例如,丁香油(clove oil)有局部麻醉和止痛的作用;土荆芥油有驱虫作用。在倍半萜含氧衍生物中,某些倍半萜内酯常具有特殊的生物活性,例如,青蒿中的青蒿素(artemisinin)有较强的抗疟活性,蛔蒿中的山道年(santonin)有驱蛔虫的作用,堆心菊中的堆心菊内酯(florilenalin)具有抗癌活性,因而引起了人们的注意。

二萜类化合物在自然界分布很广,如叶绿素、植物体分泌的乳液、树脂等均含有二萜类衍生物。一些二萜的含氧衍生物具有多方面显著的生物活性,有的已成为临床使用的药物。例如,穿心莲中的穿心莲内酯(andrographolide)有抗菌作用,雷公藤中的雷公藤内酯(triptolide)和紫杉中的紫杉醇(taxol)有抗肿瘤活性,近年来又从海洋药物中发现 100 余种二萜类化合物,进一步扩大了二萜化学研究范围。

三萜及其皂苷具有较广泛的生物活性,例如,从女贞子中分离得到的齐墩果酸(oleanolic acid)临床上有治疗肝炎的作用;柴胡皂苷(saikosaponin)等具有降低血浆脂质中胆固醇含量的作用;从酸枣仁中得到的白桦醇(betulinol)和白桦脂酸(betulinic acid)具有抗肿瘤和抗艾滋病的作用。

19.1.2 萜类的提取分离

1) 溶剂提取法

游离的萜类化合物一般极性较小,通常采用有机溶剂提取。成苷的萜类化合物常用乙醇、水或含水乙醇提取,提取液经浓缩后,用正丁醇或乙酸乙酯进行萃取得到苷类化合物的提取部位。对于具有挥发性的单萜和倍半萜可采用水蒸气蒸馏法或有机溶剂法提取。含苷类成分提取时要避免接触酸、碱,防止在提取过程中发生水解,而且应按提取苷类成分的常法事先破坏酶的活性。

2) 碱提酸沉法

利用含有内酯结构的萜类化合物在热碱液中开环成盐而溶于水,酸化后又闭环析出原内酯化合物的特性来提取倍半萜内酯类化合物。但当用酸、碱处理时,可能引起构型的改变,应加以注意。

3) 吸附法

(1) 活性炭吸附法。苷类的水提取液用活性炭吸附,经水洗除去水溶性杂质后,再用合适的有机溶剂如稀醇、醇依次洗脱,回收溶剂,可能得到纯品,如桃叶珊

瑚苷(aucubin)的分离。

(2) 大孔树脂吸附法。将含苷的水溶液通过大孔树脂吸附,同样用水、稀醇、醇依次洗脱,然后再分别处理,也可得到纯的苷类化合物,如甜菊苷(stevioside)的分离。

4) 萜类提取分离新技术

(1) 超临界流体萃取技术。超临界流体萃取(supercritical fluid extraction, SFE)技术是一种新型的分离技术。它是利用超临界流体处于临界温度和临界压力以上兼有气体和液体的双重特点,对物质具有良好的溶解能力,从而用作溶剂进行萃取分离。CO_2 以其无毒无色、使用安全、临界压力(7.37 MPa)较低、临界温度(37.1℃)接近于常温等优点被广泛用作超临界流体。目前至少有50余种中草药用SFE方法进行了研究。与传统提取方法相比,SFE法无论是提取效率还是提取时间都明显优于传统方法。此外,SFE法尚有操作简便、安全,对中药中易挥发组分或生理活性物质极少损失破坏,无溶剂残留,有效成分含量高等特点。

李等[1]在65℃、30 MPa条件下,用SFE萃取川芎挥发油,收率达到5.60%。雷等[2]在50℃、28 MPa条件下,用 CO_2 超临界流体萃取法萃取广藿香挥发油,收率达到2.85%。马等[3]在44℃、8 MPa条件下,用 CO_2 超临界流体萃取法萃取薄荷原油,薄荷醇收率达到78.33%。陈等[4]用该法提取花椒挥发油,得到58个化学组分,而水蒸气蒸馏只得到22个化学组分。目前,应用 CO_2 超临界流体萃取技术已成功地从中药中提得挥发油、萜类、生物碱、苯丙素、黄酮类、有机酸类等。

(2) 分子蒸馏技术。分子蒸馏(molecular distillation)是在高真空度下进行分离操作的连续蒸馏,可使分离混合物的沸点远低于常压,各组分在系统中受热停留时间短。因此适于分离沸点高、黏度大、热敏性的天然物料。

胡等[5]用分子蒸馏分离技术有效地提高广藿香油中广藿香醇和广藿香酮的含量,为广藿香的产业化与新药开发奠定基础。分子蒸馏技术目前面临的主要课题是扩大应用领域,尤其是对一些分离难度大的天然药物的应用。

(3) 微波萃取技术。微波萃取(microwave extraction)技术的机理首先是由于微波产生的电磁场加速了被萃取部分的成分向萃取溶剂界面扩散的速度从而提高萃取效率。该法与传统萃取法相比具有溶剂用量少、耗能低、萃取快、产率高,对萃取物具有高选择性,安全、无污染等优点,广泛用于萜类、苷类、黄酮类、多糖、生物碱等成分的提取。郭等[6]应用正交实验法,以皂苷含量为指标研究微波对三七中皂苷浸取作用的影响效果。实验表明,经过微波处理后,三七中皂苷物质的浸取速度至少是未经微波处理的4倍,因此提取效率得到了较大的提高。

(4) 膜分离技术。膜分离(membrane separation)技术以选择性透过膜为分离递质,当膜两侧存在某种推动力(如压力差、浓度差、电位差等)时,原料侧组分选择

性地透过膜，达到分离、提纯目的。膜分离技术具有过程简单、无相变、分离系数大、节能、高效、无二次污染、可常温连续操作、可直接放大等优点。肖等[7]采用微滤、超滤和纳滤集成技术从七叶参中提取皂苷取得了满意的效果。

(5) 高速逆流色谱分离技术。高速逆流色谱(high speed counter current chromatography, HSCCC)分离法是一种不用任何固态载体或支撑体的液液分配色谱技术，该技术分离效率高，产品纯度高，不存在载体对样品的吸附和污染，具有制备量大和溶剂消耗少等优点，可广泛应用于生物工程、医药、化工、食品等领域。应用该技术研究生物碱、黄酮、蒽醌、香豆素、萜类等成分的分离都取得了较好的效果[8]。研究表明，氯仿-甲醇-水(9∶12∶8)的溶剂系统可从龙胆中分离出一个纯度较高的裂环烯醚萜苷[9]。高速逆流色谱分离法不仅适用于非极性化合物的分离，也适用于极性化合物的分离，还可以应用于中药粗提物中各组分的分离或进一步的纯化精制。该技术有望成为中药有效成分质量标准研究、分析的一种新方法，也会成为中药制剂生产的一种新型分离技术。

(6) 高效毛细管电泳法。高效毛细管电泳(high performance capillary electrophoresis, HPCE)法是近年来迅速发展的一种新型分离分析技术，以高质电场为驱动力，以毛细管为分离通道，依据样品中各组分之间的迁移速度和分配行为上的差异而实现的类液相分离技术。该技术用于分析中草药，具有以下优势：分离模式多；适合于中草药中存在的各类物质的分析；简化对样品前处理的要求；分析时间一般比 HPLC 短；由于柱效高，有可能使同一个分离条件适合多种样品中多组分的分析；HPCE 所采用的毛细管柱易于全面清洗，不必担心柱污染而报废；所用的化学试剂少，价廉，分析成本低。

(7) 分子印迹技术。分子印迹技术(molecular imprinting technique, MIT)是以待分离的化合物为印迹分子(也称模板、底物)，制备对该类分子有选择性识别功能的高分子聚合物——分子印迹聚合物，然后以这种分子印迹聚合物为固定相来进行色谱分离的技术。其最大的特点是分子识别性强，选择性高，而且制得的分子印迹聚合物有高度的交联性，固定相不易变形，有良好的机械性能和较长的使用寿命。分子印迹分离技术是一种高效的中药有效成分分离技术[10,11]。

采用常规的提取分离方法对齐墩果烷提取，效率不高。Claude 等[12]用齐墩果烷三萜化合物(18-β-glycyrrhetinic acid)为模板分子，甲基丙烯酸为功能单体，乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂，氯仿为致孔溶剂，通过热聚法合成了分子印迹聚合物(molecular imprinted polymer, MIP)，其印迹效果显著，对齐墩果烷三萜的吸附容量为 0.194 mg·g^{-1}。4 个结构相似的齐墩果烷三萜化合物(18-β-glycyrrhetinic acid, oleanolic acid, echinocystic acid, erythrodiol)被用于评价该 MIP 的选择性，结果表明三萜骨架上官能团的影响很显著。用该 MIP 成功地从甘草根中提取了 18-β-glycyrrhetinic acid，且收率达到了 98%。许多研究表明，以上这些新技术在萜类

提取分离方面具有广泛的应用前景。现代化提取分离技术的应用对提高天然药物制剂质量，加快新药开发和中药现代化起着至关重要的作用。

19.2　单　　萜

19.2.1　概述

单萜类(monoterpenoid)是由2个异戊二烯单位构成，含10个碳原子的化合物类群，广泛分布于高等植物的腺体、油室和树脂道等分泌组织中，是植物挥发油的主要组成成分，在昆虫激素及海洋生物中也有存在。它们的含氧衍生物多具有较强的生物活性和香气，是医药、化妆品和食品工业的重要原料。有些单萜在植物体内以苷的形式存在，不具有挥发性，不能随水蒸气蒸馏出来。单萜按分子的基本碳骨架分为无环(链状)和环状单萜，其中环状单萜又根据环的多少可分为单环、双环及三环等类型，以单环和双环型单萜所包含的化合物数量最多。

绝大多数单萜类化合物均存在于挥发油之中。挥发油(volatile oil)又称精油(essential oil)，是一类具有芳香气味的油状液体的总称。在常温下能挥发，可随水蒸气蒸馏。挥发油是具有广泛生物活性的一类常见的重要成分，不仅在医药上具有重要的作用，在香料工业中应用也极为广泛。

挥发油类成分在植物界分布很广，含有挥发油的药材也很多，在我国野生与栽培的芳香药用植物有数百种之多。挥发油为多种类型化合物的混合物，所含化学成分都比较复杂，由几十种到一百多种成分组成。构成挥发油的成分类型大体上可分为如下4类，其中以萜类化合物为多见。

1) 萜类化合物

挥发油中的萜类成分，主要是单萜、倍半萜和它们的含氧衍生物，而且含氧衍生物多半是生物活性较强或具有芳香气味的主要组成成分。如松节油中的蒎烯(pinene)含量为80%左右，薄荷油含薄荷醇(menthol)8%左右，山苍子油含柠檬醛(citral)8%，樟脑油含樟脑(camphor)约为50%等。

2) 芳香族化合物

在挥发油中，芳香族化合物仅次于萜类，存在也相当广泛。挥发油中的芳香族化合物，有的是萜源衍生物，如百里香草酚(thymol)。有一些是苯丙烷类衍生物，其结构多具有C6-C3骨架，多有一个丙烷基的苯酚化合物或其酯类，如桂皮醛(cinnamaldehyde)、茴香醚(anethole)。

3) 脂肪族化合物

一些小分子脂肪族化合物在挥发油中常有存在。例如，正庚烷(*n*-heptane)存在于松节油中。在一些挥发油中还常含有小分子醇、醛及酸类化合物，如正壬醇

(*n*-nonyl alcohol)存在于陈皮挥发油中。

4) 其他类化合物

除上述3类化合物外,还有一些挥发油样物质,如芥子油(mustard oil)、挥发杏仁油(volatile bitter almond oil)等,也能随水蒸气蒸馏,故也称之为"挥发油"。

19.2.2 主要结构类型

1) 无环(链状)单萜

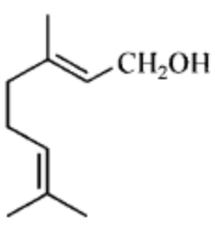
无环(链状)单萜中比较重要的化合物是一些含氧衍生物,如萜醇、萜醛类。

香叶醇(geraniol,**19-1**)又称"牻牛儿醇",是香叶油、玫瑰油等的主要成分,具有似玫瑰的香气。香叶醇可与无水氯化钙形成结晶性的分子复合物,利用此性质可方便地把它从挥发油中分离出来,所得结晶复合物加水分解后,再经真空蒸馏即可提纯。

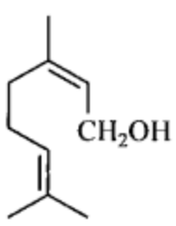
橙花醇(nerol,**19-2**)存在于橙花油、柠檬草油和其他多种植物的挥发油中。橙花醇能与二苯胺基甲酰氯[$(C_6H_6)_2NCOCl$]形成结晶性二苯胺基甲酸酯,此化合物加碱皂化后,再经过真空蒸馏即可提纯。

柠檬醛(citral)具有顺反异构体,反式为 α-柠檬醛,又称香叶醛(geranial,**19-3**),顺式为 β-柠檬醛,又称橙花醛(neral,**19-4**),通常是混合物,以反式柠檬醛为主。柠檬醛存在于多种植物的挥发油中,以柠檬草油和香茅油的含量较高,在香茅油中可达70%~85%。从挥发油中分离柠檬醛是采用加入亚硫酸氢钠时形成结晶性的加成物,经分离后用稀酸和碱液分解,再用真空蒸馏进行提纯。柠檬醛具有柠檬香气,作为柠檬香味原料应用于香料和食品工业。含有大量柠檬醛的挥发油如香茅油,具有止腹痛和驱蚊作用,故在医药中有广泛的应用。

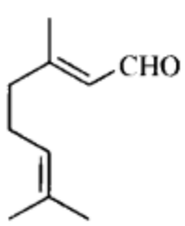
香茅醛(citronellal,**19-5**)是香茅醇的氧化产物,大量存在于香茅油中,也存在于桉叶油、柠檬油等挥发油中。它同样可形成亚硫酸氢钠加成物,经分离后再用蒸馏法加以提纯。香茅醛也是重要的柠檬香香料。



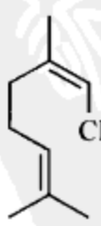
19-1



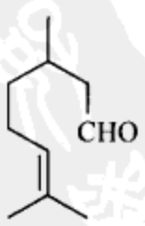
19-2



19-3



19-4

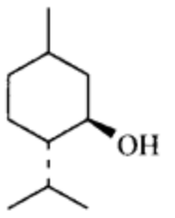


19-5

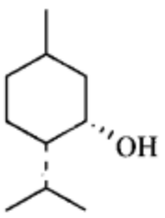
2) 单环单萜

单环单萜是由链状单萜环合作用衍变而来,由于环合方式不同,产生不同的结构类型,代表化合物是薄荷醇(menthol)。薄荷醇是日本薄荷(*Mentha arvensis*

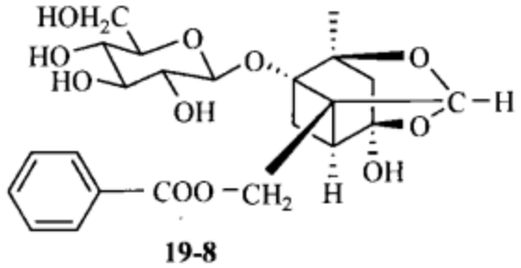
var. *piperascens* Malinvaud)的主要成分，一般占薄荷油的 50%以上，最高可达 85%，薄荷醇分子中存在着 3 个不对称碳原子，所以它产生 8 个手性立体异构体，除了(－)-薄荷醇(**19-6**)和(＋)-新薄荷醇(**19-7**)存在于天然薄荷油，其他异构体都是由合成法制得的。由于薄荷醇在薄荷油中占主要地位，工业上一般用直接冷冻法，即将薄荷油在－5 ℃下放置，直接析出薄荷醇结晶，经反复结晶后得纯品。



19-6



19-7

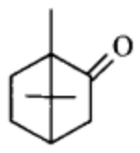


19-8

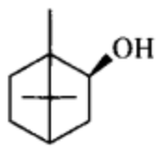
3) 双环单萜

(1) 蒎烷单萜。芍药苷(paeoniflorin，**19-8**)是毛茛科芍药属植物芍药(*Paeonia albiflora* Pall.)根中的蒎烷单萜苦味苷，通常以苯甲酸酯的形式存在，白色无定形粉末，$[\alpha]_D^{16}$ －12.8(*c* 4.6，MeOH)[13]，具有镇静、镇痛、抗炎活性。

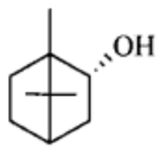
(2) 樟烷及异樟烷单萜。樟烷单萜化合物一般以含氧衍生物的形式存在于植物界，如樟脑(camphor，**19-9**)、龙脑(borneol，**19-10**)和异龙脑(isoborneol，**19-11**)等。樟脑是重要的医药和工业原料，我国的天然樟脑产量占世界第一位，它在自然界中分布不太广泛，主要存在于樟树[*Cinnamomum camphora* (Linn.) Preal]的挥发油中。樟脑在医药上主要作为刺激剂和强心剂，其强心作用是由于在人体内被氧化成 π-氧化樟脑(*trans*-π-oxocamphor，**19-12**)和对氧化樟脑(*p*-oxocamphor，**19-13**)等而导致的。樟烯(camphene，**19-14**)属于异樟烷衍生物，存在于樟油和其他挥发油中。



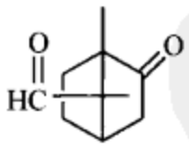
19-9



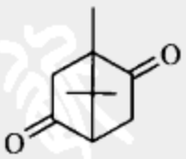
19-10



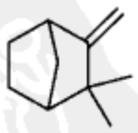
19-11



19-12



19-13

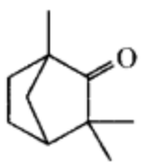


19-14

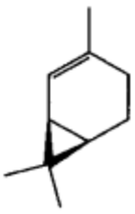
(3) 葑烷单萜。葑烷(fenchane)又称茴香烷。茴香酮(fenchone，**19-15**)是樟脑的异构体，存在于小茴香和侧柏的挥发油。(＋)-茴香酮，mp 3～5 ℃，bp 193.5 ℃，$[\alpha]_D^{29}$ ＋63，$[\alpha]_D^{21}$ ＋48($CHCl_3$)[13]。

(4) 蒈烷型衍生物。蒈烷型(carane)化合物，如 2-长松针烯(2-carene，**19-16**)、3-长松针烯(3-carene，**19-17**)、β-长松针烯(β-carene，**19-18**)、长松针酮(carone，**19-19**)等。(＋)-3-长松针烯，bp 123～124 ℃/2.0 mmHg，168～169 ℃/7.5 mmHg。

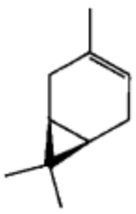
MS:m/z 136(M^+),121,105,93,79,65,53[13]。



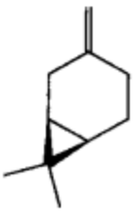
19-15



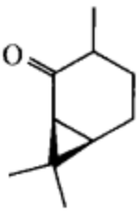
19-16



19-17

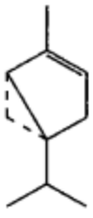


19-18

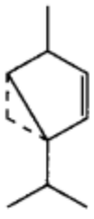


19-19

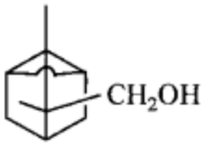
(5) 苎烷单萜。苎烷(thujane)又称侧柏烷,侧柏烯由于分子中双键位置不同而有多种异构体,例如,α-侧柏烯(α-thujene,**19-20**),β-侧柏烯(β-thujene,**19-21**)存在于侧柏枝叶的挥发油中;油冬青烯[(+)-sabinene]存在于桧油中。



19-20



19-21



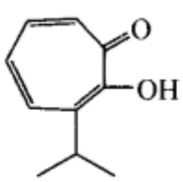
19-22

4) 三环单萜

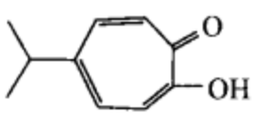
三环白檀醇(teresantalol,**19-22**)存在于檀香(*Santalum album* L.)木部挥发油中。

5) 莕酚酮

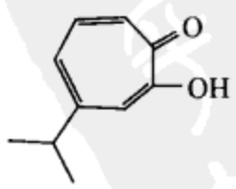
莕酚酮(troponoide)是一类变形的单萜,它们的碳架不符合异戊二烯定则。较简单的莕酚酮类化合物是一些霉菌的代谢产物,在许多柏科植物的心材中也含有此类化合物。α-崖柏素(α-thujaplicin,**19-23**)和 γ-崖柏素(γ-thujaplicin,**19-24**)在欧洲产崖柏(*Thuja plicata* D. Don)、北美崖柏(*Thuja occidentalis* L)以及罗汉柏[*Thujosis dolabrata*(L. f.)Sieb. et Zucc.]的心材中存在;β-崖柏素,也称扁柏酚(hinokitiol,**19-25**),存在于台湾扁柏(*Chamaecyparis taiwanensis*)及罗汉柏心材中。



19-23



19-24



19-25

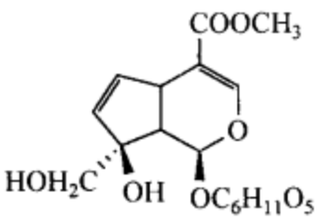
6) 环烯醚萜及其苷类

环烯醚萜(iridoid)为臭蚁二醛(iridoidial)的缩醛衍生物。从化学结构看,环烯

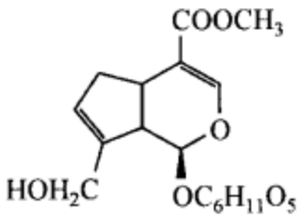
醚萜又是含有环戊烷结构单元且具有一定特殊性质的环状单萜衍生物。该类化合物包括取代环戊烷环烯醚萜(iridoid)和环戊烷开裂的裂环环烯醚萜(secoiridoid)两种基本碳架。环烯醚萜及其苷在植物界分布广泛,以双子叶植物,尤其是玄参科、唇形科、茜草科和龙胆科等植物中较为常见。

环烯醚萜苷和裂环环烯醚萜苷大多数为白色结晶体或粉末,多具有旋光性,味苦。其苷类易溶于水、甲醇;可溶于乙醇、正丁醇等溶剂;难溶于氯仿、乙醚、苯等亲脂性溶剂。

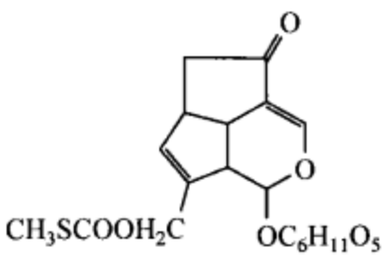
栀子苷(gardenoside,**19-26**)、京尼平苷(geniposide,**19-27**)和京尼平苷酸(geniposidic acid)是清热泻火中药山栀子的主要成分;鸡屎藤苷(paederoside,**19-28**)是鸡屎藤[*Paederia scandens*(Lour.) Merr.]的主要成分;梓醇(catapol,**19-29**)又称梓醇苷,是地黄[*Rehmannia glutinosa*(Gaertn.)Libosch. ex Fisch. et Mey.]中降血糖作用的主要有效成分;龙胆苦苷(gentiopicroside, gentiopicrin,**19-30**)是龙胆科植物龙胆(*Gentiana scabra* Bunge)、当药(*Swertia pseudochinensis* Hara.)、獐牙菜[*Swertia bimaculata*(sieb. et Zucc.)Hook. f. et Thoms.]等植物中的主要有效成分和苦味成分。



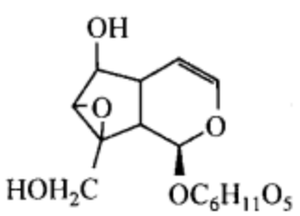
19-26



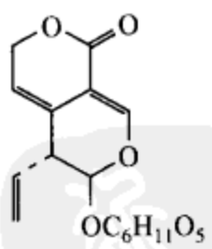
19-27



19-28



19-29



19-30

19.2.3　挥发油的提取分离方法

19.2.3.1　挥发油的提取方法

1) 蒸馏法

蒸馏法是从中药材中提取挥发油最常用的方法。将原料粉碎后放入水中浸泡,然后采用直接蒸馏或水蒸气蒸馏法将挥发油蒸馏出。得到的馏分因油水共存,形成乳浊液,常采用盐析法促使挥发油从水中分出,然后用分液漏斗或用低沸点的

有机溶剂萃取获得挥发油。

2）溶剂提取法

溶剂提取法是用石油醚或乙醚等低沸点有机溶剂，在室温冷浸渗漉或连续回流浸出，蒸去溶剂即得挥发油。最近几年来，超临界 CO_2 萃取（super-critical carbon dioxide extraction，SFE-CO_2）法越来越引起人们的关注。

3）压榨法

压榨法又称冷压法，是最简单的一种，是通过物理挤压的方法来得到挥发油。含挥发油量较高的材料，如鲜橘皮、柠檬皮等，可用机械压榨的方法把挥发油从植物组织中挤压出来。此法在常温下进行，不会引起成分变化，且能保持新鲜植物的香气，但所得产品不纯，可能含有水分、黏液质及细胞组织等杂质，因而常呈浑浊状态。获得含细胞或细胞液的粗精油再经离心或过滤，获得挥发油。工业生产上的柑橘类精油大都通过此方法获得。

19.2.3.2 挥发油的分离方法

经蒸馏法、溶剂法或压榨法得到的挥发油都是混合物，要想得到单一的成分必须进一步分离纯化。目前常用的分离法有分馏法、化学分离法和色谱法。实际工作中往往几种方法配合使用才能达到分离的目的。

1）分馏法

挥发油中由于成分类别不同，它们的沸点差异较大。萜类成分的各类碳原子一般相差 5 个，加上双键数目、位置和含氧官能团的不同，各成分的沸点有一定的差距，且有一定的规律性。在单萜中，沸点随着双键的减少而降低，即沸点从大到小排序为三烯＞二烯＞一烯；在含氧单萜中，沸点随官能团极性的增大而升高，即沸点从小到大排序为醚＜酮＜醛＜醇＜酸。由于相对分子质量增大，酯的沸点比相应醇的沸点高。挥发油中某些成分在沸点温度下往往被破坏，所以通常采用减压分馏法进行分离，对于未知成分则要预先测试沸程再进行分馏。

2）化学分离法

化学分离法是根据挥发油中各组分的结构或官能团不同，采用化学方法进行处理，使各组分得到分离的方法。

（1）碱性成分的分离。分离挥发油中的碱性成分时可将挥发油溶入乙醚中，加 1%盐酸或硫酸萃取，分取酸水层后经碱化再用乙醚萃取，蒸去乙醚即得碱性成分。

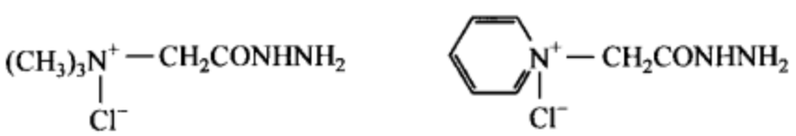
（2）酸、酚性物质的分离。分离挥发油中酸性成分时，可先用 5%碳酸氢钠直接进行萃取，酸性成分形成钠盐而溶于碱水层中，分出碱液后加稀酸酸化，再用乙醚振摇萃取，蒸去乙醚，可分得酸性成分。除去酸性物质后的挥发油，再以 2%氢氧化钠或氢氧化钾萃取，碱溶液酸化后，用乙醚萃取，蒸去乙醚分得酚性物质或其

他弱酸性成分。

(3) 羰基化合物的分离。挥发油中的醛、酮类化合物与多数羰基试剂形成加成物，如缩氨脲、肟、苯腙、Girard 腙、亚硫酸氢钠加成物等，最常用的是亚硫酸氢钠和 Girard 试剂，它们能使亲脂性的羰基化合物转变为亲水性的加成物而加以分离。亚硫酸氢钠只能与醛和部分酮形成加成物，而 Girard 试剂则对所有的羰基化合物都适用。

亚硫酸氢钠分离法：在提出酸性成分后的挥发油乙醚溶液中加入 30% 亚硫酸氢钠溶液，在低温下短时间振摇提取，一般即有结晶加成物析出或生成的加成物溶于水，与其他精油分开，分离后再加酸或碱溶液处理进行分解，即获得原来的羰基加成物。此法应注意操作条件，提取时间过长或温度过高，有使亚硫酸氢钠加成到双键的可能，形成不可逆的双键加成物。

Girard 试剂分离法：Girard 试剂是分子内带有酰肼及季铵基团试剂的总称，常用的有 Girard 试剂 T 和 Girard 试剂 P，它们的酰肼基团能与羰基反应，生成 Girard腙。去除酸、酚性成分的挥发油中性母液，加入 Girard 试剂的乙醇液和 10% 的乙酸以促进反应的进行，加热回流，生成能溶于水的衍生物，使含羰基化合物转溶于水层，加水稀释，再以乙醚除去不含羰基的精油后，分出水层加酸（如 HCl）酸化，再用乙醚萃取，蒸去乙醚后可得原羰基化合物。



Girard T　　Girard P

(4) 醇的分离。常用的方法是与过量的邻苯二甲酸酐或丙二酸酰氯等反应生成酯转溶于碳酸钠溶液中，用乙醚洗去未作用的挥发油，将碳酸钠溶液酸化，再用乙醚提取所生成的酯，蒸去乙醚，残留物经皂化，分得原来的醇类化合物。伯醇容易形成酯，仲醇反应较慢，而叔醇则较难反应。

上述挥发油成分初步纯化方法中的有些操作过程需要酸、碱处理，因此对酸、碱敏感的化合物不能应用，所以在研究挥发油的过程中，一般除去酸、酚性化合物后，往往采用重结晶、真空精馏、氧化铝或硅胶层析等方法，能将挥发油中大部分成分提纯。

19.2.4　提取分离实例

19.2.4.1　薄荷醇

薄荷醇(menthol)来源于唇形科植物薄荷(*Mentha haplocalyx*. Brig.)的全草，辣薄荷(*Mentha piperita* L.)等；金钱草[*Glechoma longituba*(Nakai) Kupr.]的全草，尖

紫苏[*Perilla fruescens*(L.)Britt. var. *acata* (Thunb.) Kudo]等的叶也有存在。

薄荷醇(又称薄荷脑):白色针状结晶,mp 42～43 ℃,bp 212 ℃,$[\alpha]_D^{18}$ −50(C_2H_5OH)。薄荷醇微溶于水,易溶于乙醇、氯仿、乙醚和石油醚等,是薄荷挥发油的主要成分,一般含量占50%以上,最高可达85%。薄荷醇具有祛风、矫味、消炎和局部止痛的作用。

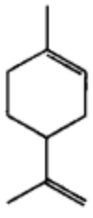
提取分离[14]:

(1) 冷冻分离法。将薄荷全草装入蒸馏烧瓶内,用水蒸气蒸馏法得到薄荷油,薄荷油在−10 ℃冷冻12 h,得到油和粗脑。薄荷油用常压蒸馏去水后,将其在−20 ℃冷冻24 h得到粗脑,合并粗脑。粗薄荷脑加热熔融后在0 ℃下冷冻结晶,再用乙醇重结晶得到薄荷醇。

(2) 分馏法。将薄荷全草装入蒸馏烧瓶内,用水蒸气蒸馏法得到薄荷油,薄荷油在0～5 ℃下冷冻后过滤,得到薄荷醇结晶和油状物。油状物常压分馏,收集200～220 ℃的馏分,馏分在0～5 ℃冷冻析出薄荷醇结晶。

19.2.4.2 柠檬烯

柠檬烯(又称苧烯,limonene,**19-31**)是枸橼属(*Citrus*)植物果皮挥发油的主要成分,如化州柚[*Citrus grandis*(L.) Osbeck var. *tomentosa* Hort]、柠檬(*Citrus limonia* Osbeck)等。常用中药香附、砂仁、荆芥、青蒿和紫苏等挥发油中都含有柠檬烯。柠檬烯是一种无色油状液体,有似柠檬的香气,有旋光性,右旋柠檬烯(d-limonene)$[\alpha]_D$+123.8,左旋柠檬烯(l-limonene)$[\alpha]_D$−101.3。消旋柠檬烯(dl-limonene)称为二戊烯,存在于各种松节油中,bp 180～182 ℃(100.66 kPa)[14]。



19-31

提取分离[15]:

将荆芥穗除杂切碎,用石油醚浸提,固液比为1∶15,在45 ℃下提取50 min一次。将石油醚提取的荆芥穗精油,用减压泵减压至1330.32 Pa,收取70 ℃以下的馏分,即得柠檬烯。

19.2.4.3 樟脑

樟脑(camphor)来源于樟科植物樟树[*Cinnamomum camphora* (Linn.) Presl]的根茎。樟脑为白色结晶状固体或无色透明的硬块,易升华,具有特殊穿透性芳香气味。mp 179 ℃,bp 204 ℃,$[\alpha]_D^{20}$ +54.9(*c* 5,C_2H_5OH)。

提取分离：水蒸气蒸馏法[16]

将樟木碎块经水蒸气蒸馏得樟脑油，于 0～5 ℃放置，过滤得粗制樟脑和樟油。将樟油在常压下分馏，收集 185～210 ℃馏分，冷冻后又得到粗制樟脑。将两次所得粗制樟脑合并，升华，得精制樟脑。

19.2.4.4　龙脑

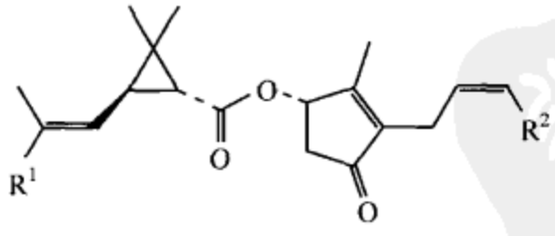
龙脑(borneol)科植物龙脑香(*Dryobalanops aromatica* Gaetn. f.)的油树脂中主要含右旋龙脑(梅片)，樟科植物樟[*Cinnamomum camphora* (L.) Presl]的新鲜枝条、叶中也存在。菊科植物艾纳香[*Blumea balsamifera* (L.) DC.]的叶及嫩枝中主要含左旋龙脑(艾片)，而化学合成的龙脑(冰片)为消旋龙脑(机片)。龙脑是片状结晶，具有似胡椒又似薄荷的香气，有升华性，mp 204～208 ℃，$[\alpha]_D^{20}$ +37.7 (C_2H_5OH)和$[\alpha]_D^{20}$ −37.7(C_2H_5OH)，具有发汗、兴奋、镇痉和防止腐蚀等作用，还有显著的抗氧功能[14]。此外，在工业中也作为香料。

提取分离：水蒸气蒸馏法[17]

将新鲜樟树枝用水蒸气法蒸馏后，分离油水。再将油层冷冻、离心，所得固相升华冷却即得右旋龙脑产品。

19.2.4.5　除虫菊酯

除虫菊酯(pyrethrin)来源于菊科植物除虫菊(*Pyrethrum cinerariifolium*)(异名：*Chrysanthemum cinerariifolium* Trev)干花提取物，包括除虫菊酯Ⅰ、Ⅱ(pyrethrinⅠ、Ⅱ，**19-32**、**19-33**)，瓜菊酯Ⅰ、Ⅱ(cinerinⅠ、Ⅱ，**19-34**、**19-35**)，茉酮菊酯(茉莉菊酯)Ⅰ、Ⅱ(jasmolinⅠ、Ⅱ，**19-36**、**19-37**)6 个化合物，具有极强的杀虫活性[18]。



	R^1	R^2
19-32	Me	$CH=CH_2$
19-33	CO_2Me	$CH=CH_2$
19-34	Me	Me
19-35	CO_2Me	Me
19-36	Me	Et
19-37	CO_2Me	Et

微波萃取[19]：

将除虫菊干花磨碎后，准确称量 40 g，装入烧瓶中。加入 100 mL 正己烷，放入微波炉辐射 40 s 后，取出用冷水冷却至室温，然后倒出大部分溶剂（注意不要将物料倒出）。再加入 40 mL 新鲜正己烷，重新放入微波炉中辐射 40 s 后拿出，冷却至室温后倒出大部分溶剂。重复以上步骤直至辐射时间累积到 200 s，共用溶剂 240 mL。用 30 mL 溶剂洗涤烧瓶中的残渣，将此液体与前几步倒出的溶剂经过滤后集中于一锥形瓶中。用无水 Na_2SO_4 干燥 24 h 后过滤。所得滤液经常压蒸馏或减压蒸馏回收溶剂，得萃取产物。

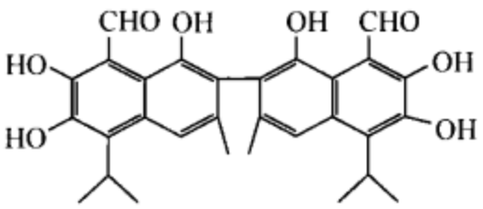
分离纯化[20]：反相 HPLC 分离纯化天然除虫菊酯

将浓度 70%的除虫菊酯精油 1 mL 用 5 mL 丙酮溶解后，再加 94 mL 乙腈稀释至 100 mL。将稀释后的溶液抽滤后装入棕色瓶中，放入 4 ℃冰箱中储存，准备高效液相色谱分离。高效液相色谱条件：NUCLEODUR C18 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm），采用二元流动相梯度洗脱，A 液为超纯水，B 液为 90%乙腈（体积分数），柱温 40 ℃，检测波长 235 nm，进样量 20 μL。进行梯度洗脱：0～30 min 流速为 0.6 mL · min^{-1}；30～65 min 流速 0.6～0.7 mL · min^{-1}；65～75 min 流速为 0.7～0.65 mL · min^{-1}；75～85 min 流速为 0.65～0.85 mL · min^{-1}；85～90 min 流速为 0.85 mL · min^{-1}；90～100 min 流速为 0.85～0.6 mL · min^{-1}。收集的流分除去溶剂后，可获得 6 种白色粉末物质，分别为瓜叶菊酯Ⅱ、除虫菊酯Ⅱ、茉酮菊酯Ⅱ、瓜叶菊酯Ⅰ、除虫菊酯Ⅰ、茉酮菊酯Ⅰ。

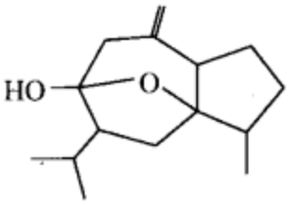
19.3 倍 半 萜

19.3.1 概述

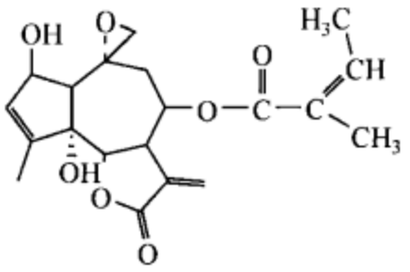
倍半萜类（sesquiterpenoid）基本碳架由 15 个碳原子构成，即 3 个异戊二烯单位，常和单萜一起共存于植物挥发油之中，是挥发油高沸程的组成成分，bp250～280 ℃，也存在一些低沸点的固体，大多数为手性化合物，具有光学活性。倍半萜类化合物生物活性是多样的，具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、昆虫激素、昆虫拒食等作用，例如，众所周知的抗疟药物青蒿素（artemisinin），具有杀精子及抗菌杀虫活性的棉酚（gossypol，**19-38**），抗肿瘤活性的有莪术醇（curcumol，**19-39**），以及存在于圆叶泽兰中的抗肿瘤成分泽兰苦内酯（euparotin，**19-40**）和泽兰氯内酯（eupachlorin，**19-41**），还有在一种巴西双翅目昆虫白蛉（*Lutzomyia longipalpis*）中分离得到的化合物 3-menthyl-α-himachalane（**19-42**）为一种性外激素[13]，近年从樟科木姜子属植物轮叶木姜子（*Litsea verticillata*）中分离得到的化合物 litseaverticillol A（**19-43**）具有抗 HIV 活性[21]等。



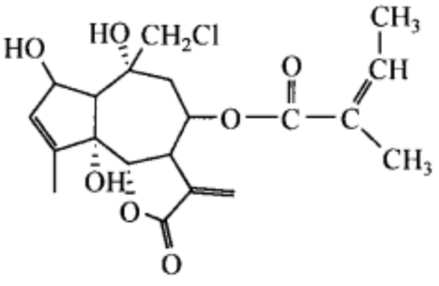
19-38



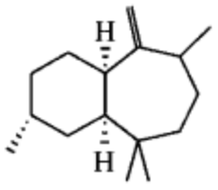
19-39



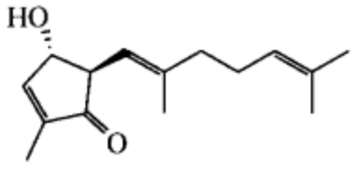
19-40



19-41



19-42



19-43

据估计，倍半萜类化合物有数千个，主要来源于植物、霉菌和海洋生物，拥有约 200 多种骨架，这些骨架可按环数目分为无环(开链)、单环、双环、三环和四环等结构种类，其碳环可有五、六、七甚至十二元的大环。也可按结构中所含有的官能团分类，如倍半萜烯、醇、醛、酮和内酯等。

19.3.2　倍半萜类化合物的提取分离方法

19.3.2.1　倍半萜类的提取方法

1) 水蒸气蒸馏法

由于倍半萜类化合物多具有挥发性，多存在于挥发油中，故可采用水蒸气蒸馏，沸点随其结构中双键数、含氧基团数的升高而规律性地升高。倍半萜往往是挥发油中的高沸点主要成分，一般用水蒸气蒸馏所得的挥发油，经分馏蒸出低沸点的单萜部分，高沸点部分采用色谱柱分离，可得到多种倍半萜化合物。

2) 有机溶剂萃取法

将采集后不久晾干的粗粉，先以石油醚提取除去油脂，然后用甲醇或乙醇进行提取，蒸去溶剂后，以 20%～50%的乙醇处理，尽量使倍半萜溶于醇中，再以苯、乙醚、乙酸乙酯、氯仿萃取，分别蒸去溶剂后，根据其是否带苦味，并作定性检查。有时上述提取液浓缩时，即有结晶析出。将上述提取物分别进行硅胶或氧化铝吸附色谱分离，个别结构极为相似、化学性质相似的，可采用高效液相分离，以进一步分离得纯品。值得注意的是有时石油醚提取物中可能含有倍半萜内酯，可直接浓缩后析出结晶或采用色谱法使其纯化。

3）碱溶酸沉法

含有内酯结构的倍半萜类化合物，其内酯结构在热碱溶液中开环成盐溶于水，酸化后闭环而与水不相溶，此特性可将倍半萜内酯提取或纯化。但对酸碱敏感而导致化合物构型发生变化的萜类化合物，不宜采用此法。

倍半萜类化合物的提取还有一些新的方法，比如超临界流体萃取法（supercritical fluid extraction，SFE）、超声波萃取法（ultrasound extraction）、微波辅助提取法（microwave extraction）、高速逆流色谱法（high-speed counter-current chromatography，HSCCC）等，由于在前面章节中均有详细的介绍，这里不再赘述。

19.3.2.2 倍半萜的分离纯化方法

1）色谱分离方法

传统的柱色谱法主要为柱色谱法和平板色谱法，其中硅胶柱色谱是分离倍半萜类化合物的常用方法。硅胶柱色谱中使用的硅胶为中性无色的颗粒，但由于制作过程中常常带有酸性，通常酸性不强于 pH 5 时即可使用，硅胶有较大的吸附容量，分离范围广，可分离极性和非极性化合物，适用于倍半萜的分离。常用的洗脱剂多以石油醚、正己烷及环己烷等单一溶剂分离烯萜，或混以不同比例的乙酸乙酯或乙醚分离含氧萜，对于多羟基的萜醇可再加入甲醇或用氯仿-乙醇进行洗脱。对于单纯以硅胶为吸附剂难以洗脱的倍半萜类化合物，可用硝酸银络合柱色谱分离，采用硝酸银-硅胶进行络合吸附，其分离的原理是利用硝酸银可与双键形成 π 络合物，而双键数目、位置及立体结构不同的倍半萜类化合物在络合程度及络合物稳定性方面存在差异，利用此差异即可进行分离，而所采用的洗脱剂与上述相同。

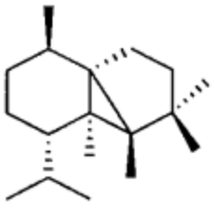
2）气相色谱法

气相色谱法出现于 1952 年，目前已成为分离科学中较为成熟、使用最为普遍、运行较简易的一种分离分析方法，该方法分离效率高、速度快、操作简便、样品使用量少、灵敏度高、选择性好，可将物理、化学性质相近的组分分离，适合分离低沸点、易挥发以及热稳定的化合物，适用于倍半萜类化合物的分离。例如，Gansser 等采用制备 GC 从链霉菌中分离出倍半萜烯醇 4*S*,7*R*-吉玛烷-1(10)*E*,5*E*-二烯-11-醇；利用制备 GC 从苔藓类植物中分离倍半萜类的报道屡见不鲜[22,23]。

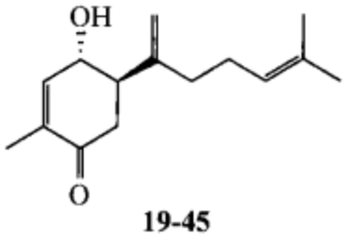
3）高效液相色谱法

高效液相色谱（high performance liquid chromatography，HPLC），其原理与经典液相色谱相同，但采用了高效色谱柱、高压泵以及高灵敏度检测器，因此分辨率、分析速度和灵敏度大大提高，在倍半萜的分离分析和制备中应用十分广泛。例如，陈晓辉等利用制备高效液相色谱法，从日本产杉材（*Cryptomeria japonica* D. Don）中分离制备倍半萜化合物，在 YWC-Pack C18 柱上，以异丙醇-甲醇-正己

烷-水(50∶35∶10∶5)为流动相,流速为 5 mL·min^{-1},制备了 2 种倍半萜类化合物(−)-cubebo(**19-44**)和(+)-2,7(14),10-bisabolatrien-1-ol-4-one(**19-45**),所制备的纯度分别为 98.7%和 99.1%[24]。



19-44

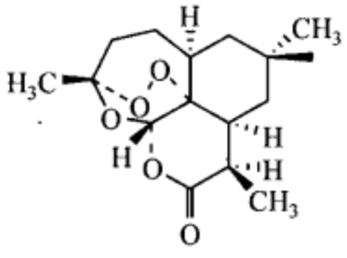


19-45

19.3.3　提取分离实例

19.3.3.1　青蒿素

青蒿素(artemisinin,**19-46**)来源于菊科植物黄花蒿(*Artemisia annua* L.)的干燥地上部分[25],药理作用为抗疟疾、抗肿瘤、提高免疫力。青蒿素为无色针状结晶,bp 156～157 ℃,$[\alpha]_D^{17}$ +66.3(*c* 1.64,$CHCl_3$)[26]。薄层参数:硅胶 G 或硅胶-CMC-Na 薄层板,用石油醚-乙酸乙酯(8∶2,v/v)或苯-乙醚(4∶1,v/v)展开;以香草醛-浓硫酸(φ=1%)检识,青蒿素呈鲜黄色斑点,继而又变为潮蓝色[27]。



19-46

提取分离:

(1) 传统提取分离方法[28]。称取青蒿干燥茎叶粗粉 5.0 kg 置 20 000 mL 圆底烧瓶中,加 3 倍石油醚回流提取 4 次,每次 1 h,趁热过滤,合并滤液,减压回流石油醚至浸膏。浸膏加 10 倍量 70%乙醇热熔,2.5%活性炭回流脱色 1 h,浓缩至浸膏,拌入 1.5 倍硅胶粉,晾干。上硅胶柱,用石油醚-乙酸乙酯(95∶5)洗脱,1000 mL 锥形瓶收集洗脱液,TLC 法跟踪监测。合并符合要求的收集液,用 70%乙醇精制得结晶。

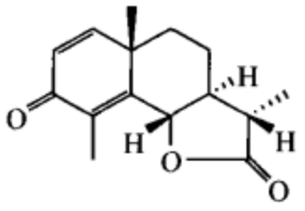
(2) 超临界流体萃取法[29]。黄花蒿草经粉碎筛选后(粒径 60～80 目)装入萃取器,从钢瓶出来的 CO_2 冷却成液态,再由高压泵压缩后进入缓冲罐,经预热器进入萃取器,与原料黄花蒿进行接触和传质。溶有溶质的超临界 CO_2 经两级预热、两级减压后,进入分离器Ⅰ和分离器Ⅱ。从分离器Ⅲ顶部出来的 CO_2(压力约为 5 MPa)经流量计测量流量后放空(或循环使用)。预热器、萃取器和分离器温度均由

恒温水浴控制恒定温度。最佳工艺条件：萃取压力 20 MPa，萃取温度 50 ℃，CO_2 流量 1 kg·(h·kg 原料)$^{-1}$，萃取时间 4 h，萃取率达到 95%以上，萃取物纯度 10%以上。

19.3.3.2 山道年

山道年(santonin)存在于菊科植物山道年蒿(*Artemisia cina* Berg)、灰色茵蒿(*A. incana* Druce)、雪芩蒿(*A. schrenkiana* Ledeb)等的花头，以及白茎绢蒿[*Seriphidium terrae-albae* (Krasch.) Poljak]的全草[30,31]。山道年有 α、β 两种异构体，α-山道年是驱蛔药物，而 β-山道年驱蛔作用不明显。α-山道年(**19-47**)为无色棱柱状结晶，bp 171～172 ℃，$[\alpha]_D^{25}$ −175.4(90% C_2H_5OH)，常用作驱蛔虫药。

薄层参数：硅胶 G-0.1CMC 薄层板；乙醇-氨水(8∶0.3，v/v)展开剂；用高锰酸钾溶液检识，薄层背景为红色，斑点为黄色；R_f 0.45[32]。



19-47

提取分离：

(1) 方法一。将茵蒿草加水(茵蒿草∶水=1∶20，质量比)及石灰乳，于 80～90 ℃浸煮 3 次，浸煮液用盐酸中和至 pH 为 7，然后蒸发浓缩至原体积的 1/15～1/16。浓缩液用硫酸酸化至 pH 为 1，在 70～75 ℃保温 15 min，放置 20 h，并用水冷却，离心过滤，滤饼用碱水中和，水洗，滤干得沉淀物。沉淀物再用石灰水提取 3～4次，提取温度为 90～95 ℃，提取液加活性炭脱色后，用盐酸酸化至 pH 为 1，在 70～75 ℃保温 10 min，放置 20 h，在冷水冷却下放置 20 h，过滤，得粗品，于 60～70 ℃干燥后，加 13～15 倍乙醇与 5%活性炭，加热回流 30 min，趁热过滤，滤液冷却至 10 ℃以下，过滤，滤饼用乙醇洗涤至白色，60～70 ℃干燥得山道年。

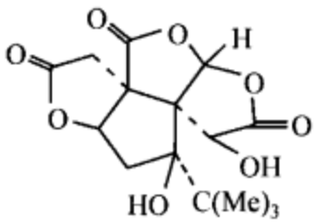
也可以将茵蒿草加石灰水一起加热，用盐酸中和 pH 至 2，使内酯环合，直接用苯和氯仿抽提，可获得山道年纯品。

(2) 方法二[31]。取 7.5 kg 白茎绢蒿干燥全草，粉碎后分别经 95%、75%乙醇室温浸泡提取 4 次，每次 7 天。减压浓缩去醇后，得浸膏 400 g。浸膏用水悬浮后依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取，得到石油醚部分 50 g、氯仿部分 70 g、乙酸乙酯部分 60 g、正丁醇部分 160 g。取氯仿部分 70 g 上硅胶柱色谱，氯仿-丙酮梯度洗脱，依次得到化合物 α-山道年、胡萝卜苷和二十五烷酸-α-单甘油酯。

19.3.3.3　白果内酯

白果内酯(又称银杏新内酯,bilobalide,**19-48**)来源于银杏科植物银杏(*Ginkgo biloba* L.)的叶。白果内酯为白色晶体,mp 300 ℃(分解),$[\alpha]_{578}^{20}$ −64.3(*c* 2, CH_3COCH_3),可溶于甲醇、丙酮,不溶于水,硫酸不显色,碘显黄色(在空气中放置逐渐成白色)。白果内酯拮抗血小板活化因子作用较弱,但对神经系统有保护作用,可用于治疗脱髓鞘脑、脊髓和神经疾病[33]。

提取分离:



19-48

(1) 柱色谱分离[34]。称取 156 g 白果内酯初提物,以石油醚-乙酸乙酯(6∶4)为洗脱剂,洗脱速度为 2 L·h^{-1},进行硅胶柱色谱分离。收集 7～10 流分,减压浓缩(温度为 50℃),得白果内酯结晶 85.59 g(质量分数约为 82%),然后将结晶溶解于 50%的乙醇(温度 60 ℃、固液比 1∶5)中,室温放置结晶,反复结晶 3 次,得到质量分数为 98%的白果内酯单体 60.15 g,得率为 80.31%。

(2) 高速逆流色谱分离法[35]。首先将银杏鲜叶于 60 ℃烘干、粉碎、过 50 目筛,然后用 25%乙醇在 70 ℃热提取,每次提 2 h,直至提取液无色,合并提取液,浓缩烘干,再将其溶于适量的蒸馏水中,按 100 mL 溶液加入 3 g 乙酸钠的比例加入,乙酸乙酯等体积萃取 2 次,有机相浓缩烘干。将得到的干粉用 60%的乙醇溶解,上 D-101 大孔吸附树脂柱,用乙醇浓度逐渐递增的乙醇液洗脱,白果内酯主要富集于醇浓度为 40%左右,浓缩干燥,之后用 pH 4.0 的 Al_2O_3 柱(可以有效地除去银杏黄酮成分)纯化,最后用高速逆流色谱分离制备目的物白果内酯,其采用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水为两相溶剂,以 4∶5∶3∶5 的比例进行分离。此法所得白果内酯质量分数最高可达 97.50%以上,合并回收率为 39.39%。

薄层参数:薄层板,硅胶 G,展开剂,甲苯-乙酸乙酯-丙酮-甲醇(10∶5∶5∶0.6);检识,乙酐蒸气熏蒸 15 min,140～160 ℃加热 30 min,置紫外灯下检识[36]。

19.4　二　　萜

19.4.1　概述

二萜类化合物是一类以 20 个碳原子为骨架的碳氢化合物,通常用$(C_5H_8)_4$ 来

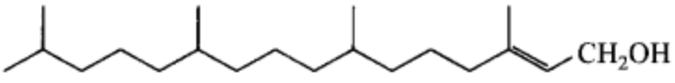
表示。二萜类化合物在自然界分布广泛，包括植物、动物、海洋动物以及一些菌类。二萜类化合物分布的植物种类主要集中在唇形科(Labiatae)，马鞭草科(Verbenaceae)，卫矛科(Celastraceae)，大戟科(Euphorbiaceae)，瑞香科(Thymelaeaceae)，杜鹃花属(*Rhododendron*)，红豆杉属(*Taxus*)。

焦磷酸香叶基香叶酯(gerranylgeranyl pyrophosphate，GGPP)是二萜类合成的前体，GGPP 脱去焦磷酸基形成环化碳正离子后，经反式 1，2-加成位移反应，即可衍生成多种二萜类化合物。

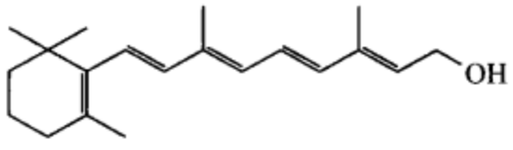
19.4.2 主要结构类型

1) 无环和单环二萜

植醇(phytol，**19-49**)、维生素 A(vitamin A，**19-50**)。



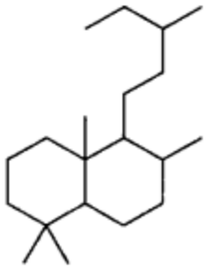
19-49



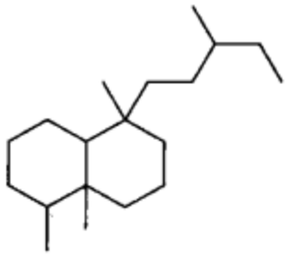
19-50

2) 二环二萜

半日花烷(labdane，**19-51**)、克罗烷(clerodane，**19-52**)。



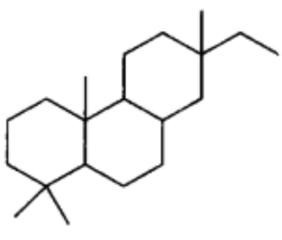
19-51



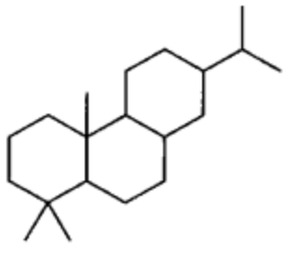
19-52

3) 三环二萜

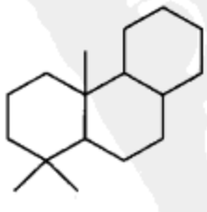
海松烷(pimarane，**19-53**)、松香烷(abietane，**19-54**)、罗汉松烷(podocarpane，**19-55**)、卡山烷(cassane，**19-56**)、桃拓烷(totarane，**19-57**)、玫瑰烷(rosane，**19-58**)。



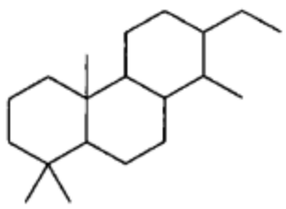
19-53



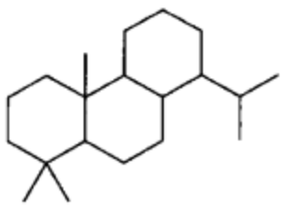
19-54



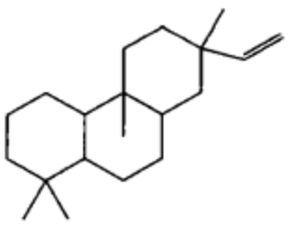
19-55



19-56



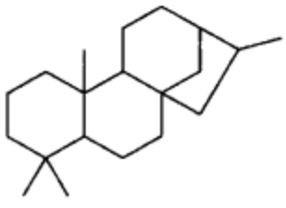
19-57



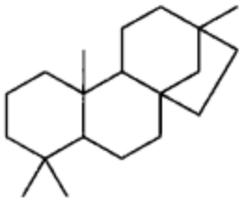
19-58

4）四环二萜

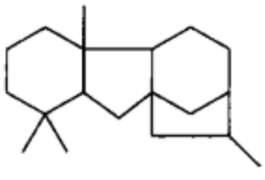
贝壳杉烷（kauane，**19-59**）、贝叶烷（beyerane，**19-60**）、赤霉烷（gibberellane，**19-61**）、阿替生烷（atisane，**19-62**）。



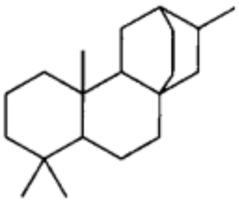
19-59



19-60



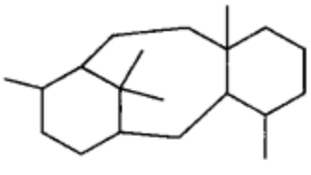
19-61



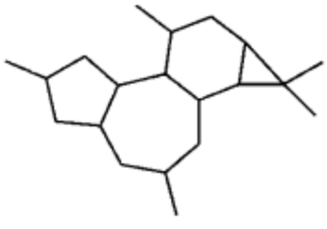
19-62

5）大环二萜

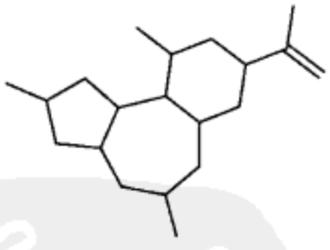
紫杉烷（taxane，**19-63**）、巴豆烷（tigliane，**19-64**）、瑞香烷（daphnane，**19-65**）、巨大戟烷（ingenane，**19-66**）、假白桄烷（jatrophane，**19-67**）、续随子烷（lathyrane，**19-68**）。



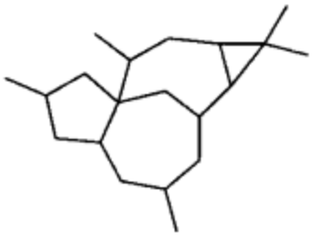
19-63



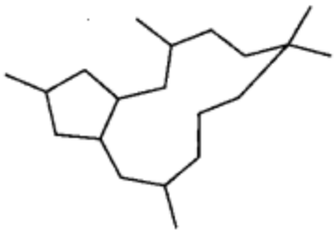
19-64



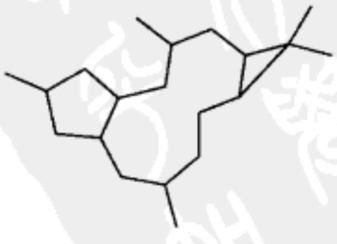
19-65



19-66



19-67

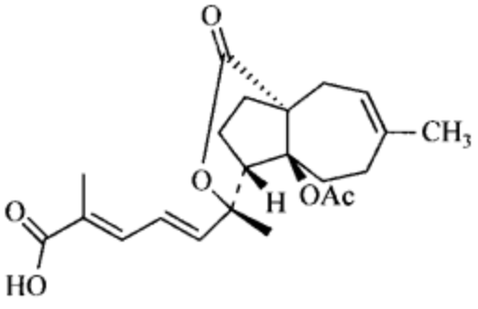


19-68

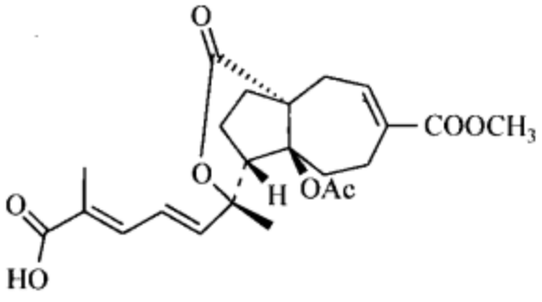
19.4.3 提取分离实例

19.4.3.1 土槿皮酸

土槿皮酸，主要包括土槿皮甲酸（pseudolaric acid A，**19-69**）和土槿皮乙酸（pseudolaric acid B，**19-70**）。存在于松科植物金钱松（*Pseudolarix kaempferi* Gorden）的根皮和近根树皮。土槿皮具有抗真菌、抗肿瘤、抗生育、使胆囊自截的药理作用[37]。



19-69



19-70

提取分离[38]：

称取 1 kg 土槿皮粗粉用苯渗漉，渗漉液用 5%的 $NaHCO_3$ 萃取 3 次，萃取液合并后加盐酸酸化到 pH 6 左右，滤去析出物，滤液继续酸化，直至白色沉淀完全析出。滤取沉淀，水洗，抽干，以乙醚-石油醚结晶，得簇针状土槿皮酸的粗品（8～10 g）。

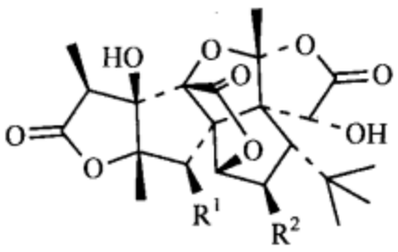
称取 10 g 的土槿皮酸粗品，用适量的甲醇溶解后，吸附在约 30 g 硅胶上，挥发除去甲醇，置于装有 300 g 硅胶的柱上端，以石油醚-无水乙醚（1∶2）为洗脱剂洗脱，每 100 mL 为一个流分，从 1～4 流分中分到了脂肪酸和甾醇样物质；5～8 流分浓缩析出约 300 mg 棱晶土槿皮甲酸（甲醇），mp 218～219 ℃，$[\alpha]_D^7$ −46.4（*c* 0.84，C_2H_5OH）。9～20 流分浓缩析出 6 g 棱柱状晶体（乙醚-石油醚）或针晶（丙酮）土槿皮乙酸。土槿皮乙酸棱柱状结晶（乙醚-石油醚），mp 127～128 ℃，针状晶体（丙酮），mp 145～146 ℃，$[\alpha]_D$ −30.1（*c* 0.83，C_2H_5OH）。

薄层色谱用硅胶 H 加 CMC 制板，无水乙醚展开，喷茴香醛-浓硫酸试剂后 110 ℃加热显色，土槿皮甲酸呈蓝色，R_f 0.56；土槿皮乙酸呈紫色，R_f 0.46。

19.4.3.2 银杏内酯

银杏内酯（ginkgolide）A、B、C 和 J（**19-71**、**19-72**、**19-73**、**19-74**）来源于银杏科植物银杏（*Ginkgo biloba* Linn.）的叶和根皮，可抑制血小板活化因子，对中枢神经系统有保护作用，保护谷氨酸盐引起的鼠海马神经元的损伤，用于治疗哮喘、内毒

素休克、器官移植排斥反应、心脑血管疾病[13]。



19-71　$R^1=R^2=H$
19-72　$R^1=OH, R^2=H$
19-73　$R^1=R^2=OH$
19-74　$R^1=H, R^2=OH$

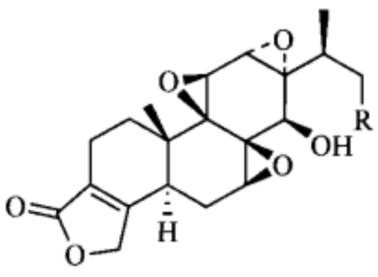
提取分离[39]：

取干燥银杏叶 10.0 kg，粉碎，以 95%乙醇回流提取 3 次，合并提取液，减压浓缩，与硅藻土拌样，置索式提取器中，依次用石油醚、乙酸乙酯、甲醇回流提取。乙酸乙酯提取物经硅胶柱（200～300 目）反复层析，CH_2Cl_2-MeOH[（100∶1）～（100∶100），v/v] 梯度洗脱，将所得流分 50～70 经重结晶后得到总萜内酯，再经制备型 RP-HPLC 进行纯化，分别得到白色针晶（MeOH）白果内酯 300 mg、银杏内酯A 60 mg、银杏内酯 B 50 mg、银杏内酯 C 180 mg、银杏内酯 J 20 mg。

银杏内酯 A，白色针晶（MeOH），mp＞300 ℃（分解），易溶于甲醇、丙酮，不溶于水，硫酸不显色，碘显黄色；银杏内酯 B，白色针晶（MeOH），mp＞300 ℃（分解），易溶于甲醇、丙酮，不溶于水，硫酸不显色，碘显黄色；银杏内酯 C，白色针晶（MeOH），mp＞300 ℃（分解），易溶于甲醇、丙酮，不溶于水，硫酸不显色，碘显黄色；银杏内酯 J，白色针晶（MeOH），mp＞300 ℃（分解），易溶于甲醇、丙酮，不溶于水，硫酸不显色，碘显黄色结晶。

19.4.3.3　雷公藤二萜

雷公藤二萜存在于卫矛科植物雷公藤（*Tripterygium wilfordii* Hook.），包括雷公藤内酯醇（又称雷公藤甲素，triptolide，**19-75**）；16-羟基雷公藤内酯醇，（16-hydroxytriptolide，**19-76**）。雷公藤有抗炎，免疫抑制，抗肿瘤，抗 HIV，抗异体排斥和抗生育作用[13]。



19-75　R=H
19-76　R=OH

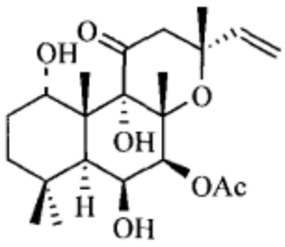
提取分离[40]：

称取雷公藤干叶 10 kg，分别用 17 L 水在 95～100 ℃提取 3 次，每次 1 h。将水提液合并减压浓缩，在浓缩液中加入适量乙醇（浓缩液与乙醇之比为 6∶18），过滤，滤液减压浓缩，浓缩液分别用 6 L 氯仿萃取 3 次，合并氯仿萃取层，用无水

Na_2SO_4 干燥后减压浓缩得棕色浸膏(100 g),继续用约 150 mL 氯仿溶解浸膏,上样于硅胶柱(1000 g)分离,用氯仿-乙醇系统梯度洗脱,各流分以 TLC 进行检识,氯仿-乙醇(99∶1)的洗脱流分中含有雷公藤内酯醇,合并流分后浓缩并用石油醚和氯仿进行重结晶,得到雷公藤内酯醇(白色针状结晶,mp 227～229 ℃)。收集氯仿-乙醇(95∶5)洗脱流分,合并流分并减压干燥,所得固体溶解在 20 mL 氯仿-乙醇(95∶5)中,并上样于硅胶柱分离,用环己烷-丙酮(5∶3) 系统进行低压(N_2,0.1 mPa·cm^{-2})洗脱,将含有 16-羟基雷公藤内酯醇的流分合并,浓缩以及甲醇重结晶得到 16-羟基雷公藤内酯醇纯品[105 mg,白色簇状结晶(甲醇),mp 232～233.5 ℃]。

19.4.3.4 鞘蕊花素

鞘蕊花素(又称毛猴鞘蕊花林素,forskolin,**19-77**)主要来源于唇形科植物毛喉鞘蕊花[*Coleus forskohlii*(Willd.) Briq.]。纯品为针状晶体,mp 230～232 ℃;$[\alpha]_D$ −26.2(*c* 1.68,$CHCl_3$);^1H NMR($CDCl_3$)δ:5.45(d,J=4Hz),4.45(t),2.20(d,J=3Hz)。鞘蕊花素可以激活腺苷酸环化酶,具有增强肌肉的收缩力,抗高血压,降低眼球内压的作用[41]。



19-77

提取分离[42]:

毛喉鞘蕊花根粉末 100 g(粒径 100～1000 μm),在 60 ℃加甲苯搅拌提取 3 次,每次加甲苯 500 mL,提取 2 h。合并提取液,40 ℃下减压浓缩至 15 mL。向浓缩液中缓缓加入 150 mL 正己烷并不断搅拌,析出沉淀,过滤,得褐色粉末 1.6 g。

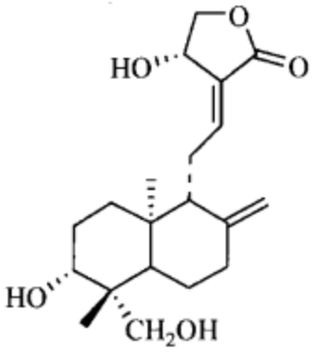
将粉末上样于活性炭色谱柱(活性炭 6 g,7.5 mm ×17 mm),依次用甲醇(2 次,每次 20 mL)和乙腈-甲醇(1∶1,v/v,3 次,每次 20 mL)洗脱,洗脱过程保持低压(100～200 mmHg),TLC 检识。将乙腈-甲醇洗脱的黄褐色流分合并,在 40 ℃下减压蒸干,得到固体 500 mg。

向所得固体中加入正己烷(3 次,每次 15 mL),除去可溶于正己烷的杂质,过滤,抽干,再溶解在 5 mL 氯仿中,然后向氯仿溶液中缓缓加入 50 mL 正己烷并不断搅拌,得淡黄色沉淀,为鞘蕊花素粗品。将粗品用乙酸乙酯溶解,然后在不断搅拌下加入石油醚(bp40～60 ℃)至总体积为 30 倍量的乙酸乙酯-石油醚(25∶75,v/v),得鞘蕊花素。重复上述结晶过程,得鞘蕊花素白色沉淀。再将沉淀用 20 倍

量乙醚-正己烷(1∶15)重结晶,得鞘蕊花素纯品 72.5 mg。将结晶过程的母液合并,按上述方法重结晶又可得到鞘蕊花素纯品 24.6 mg。

19.4.3.5　穿心莲内酯

穿心莲内酯(又称穿心莲乙素,andrographolide,**19-78**)来源于爵床科植物穿心莲[*Andrographis paniculata*(Burm. f.) Nees]的全草或叶。穿心莲内酯为无色棱晶,mp 230～231 ℃,$[\alpha]_D$ +127[43]。易溶于丙酮、甲醇、乙醇,微溶于氯仿、乙醚,难溶于水、石油醚、苯。



19-78

提取分离:

(1) 乙醇提取法[44]。将穿心莲粉用 90%的乙醇热浸,醇提取液浓缩,尽量蒸去溶剂后用石油醚振摇除去叶绿素等杂质,再用氯仿振摇,放置过夜,分为三层,上层为水溶液,中层为析出物,下层为氯仿提取液。将中层析出物用乙醇热溶,放冷析晶,晶体即为穿心莲内酯,mp 230～232 ℃。

(2) 超临界 CO_2 流体萃取法[45,46]。将 200 g 穿心莲(粉碎为 40 目)投入超临界萃取釜中,通过 SPE-CO_2 流程[CO_2 钢瓶-冷冻系统-高压泵-萃取釜-解析釜Ⅰ-解析釜Ⅱ-冷冻系统(循环)]进行萃取。通过正交试验得到超临界 CO_2 流体萃取的最佳工艺条件:萃取釜压力为 25 MPa,温度为 46 ℃;解析釜Ⅰ压力为 6 MPa,温度为 65 ℃;解析釜Ⅱ压力为6 MPa,温度为 45 ℃,流量为 40 kg·h^{-1}。经过 HPLC 含量测定得到广东产的穿心莲内酯含量为 7.09%,亳州产的穿心莲内酯含量为 11.67%。

张等应用超临界 CO_2 对穿心莲内酯进行重结晶。此方法分四步:①原料前处理,即先用乙醇在 45 ℃温水浴下溶解首次结晶原料,固液比 1∶3,再沉淀过滤。②将滤液通过料管(或料泵)移入萃取结晶釜中,且料液的最大高度以不没及结晶板下端为准。③根据设计的试验工艺参数进行超临界 CO_2 二次梯度结晶滤液。④采用扫描电子显微镜(SEM)、高效液相色谱(HPLC)对试验结果选择性取样观察分析。以首次梯度结晶压力 16 MPa,温度 55 ℃,时间 90 min,CO_2 流量 20 L·min^{-1}时,优选出适宜的二次梯度结晶工艺参数为结晶压力 14 MPa,温度 55 ℃,时

间 60 min，CO_2 流量 20 L·min^{-1}。按照此工艺参数，穿心莲内酯纯度达 90%以上，最高达到 92.5%，重结晶率超过 45%。

19.4.3.6 丹参酮

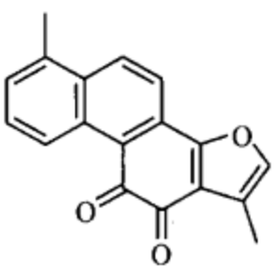
丹参酮(又称丹参醌，tanshinone)来源于唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)的根，具有活血祛瘀，调经止痛，除烦安神，凉血消痛的功效[47]。

丹参酮Ⅰ(tanshinoneⅠ，**19-79**)，棕红色结晶(甲醇)，mp 233～234 ℃，易溶于乙醇、丙酮、乙醚、苯等有机溶剂，微溶于水。MS：m/z 276(M^+)，261，248，220，219，191，189，176，165，139[48]。

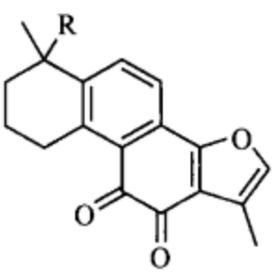
丹参酮ⅡA(tanshinoneⅡA，**19-80**)，樱红色针状结晶(甲醇)，mp 209～210 ℃，易溶于乙醇、丙酮、乙醚、苯等有机溶剂，微溶于水。MS：m/z 294(M^+，100%)，279，261，251，233，222，178，165，152，116[48]。

丹参酮ⅡB(tanshinoneⅡB，**19-81**)，紫红色针状结晶(甲醇)，mp 202～204 ℃，$[\alpha]_D^{23}$ −15.3(c 0.28，CH_3COCH_3)。EI-MS：m/z 310(M^+)，292，279，279，261，251，235，233，222，221，178，165，152[49]。

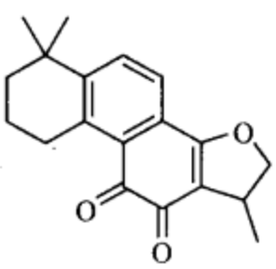
隐丹参酮(cryptotanshinone，**19-82**)，橙色针状结晶(甲醇)，mp 184～185 ℃，MS：m/z 296(M^+)，281，268，253，235，178，171，165，152[48]。易溶于乙醇、丙酮、乙醚、苯等有机溶剂，微溶于水。



19-79



19-80 R=CH_3
19-81 R=CH_2OH



19-82

提取分离[49]：

将丹参粉末用 95%乙醇热提，醇浸膏用适量苯回流，苯液浓缩后用氧化铝柱色谱分离，用苯冲洗，待色带分离后按其色带进行切割，分成紫红色段、橙红色段、暗红色段。各段分别处理。

紫红色段：将此段的氧化铝置于小柱内，继续用苯冲洗，苯洗脱液稍浓缩就可析出棕红色柱状结晶，即丹参酮Ⅰ，用乙醇重结晶，熔点 233 ℃。母液继续浓缩，析出红色针状结晶，即丹参酮ⅡA，乙醇重结晶后测熔点 209～210 ℃。

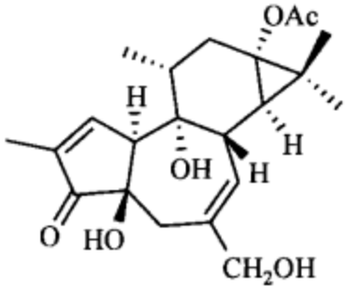
橙红色段：将此段的氧化铝置于小柱内，用苯冲洗，待二色带完全分离后，按色带切割，第一色带部分以丙酮洗脱，浓缩后析出板状结晶，为丹参酸甲酯，熔点

183～184 ℃。第二色带部分，用丙酮洗脱，浓缩后析出橙红色结晶，为隐丹参酮，熔点 180～182 ℃。母液继续浓缩可析出左旋二氢丹参酮，熔点 223～224 ℃。

暗红色段：将此段的氧化铝置于短柱内，用苯-乙醇(10∶1)冲洗，洗脱液减压蒸干后，再以无水乙醇重结晶，得红色细柱状结晶，即丹参酮 ⅡB，熔点 202～204 ℃。

19.4.3.7　平卧稻花素

平卧稻花素(又称澳杨亭，prostratin，12-deoxyphorbol-13-acetate，**19-83**)可从我国大戟科植物狼毒大戟(*Euphorbia fischeriana* Steud.)根[50]中提取分离得到。国外有报道从 *Homalanthus acuminatus*[51]，*Homalanthus nutans*[52]，草乌桕[*Stillingia sylvatica* (L.) Mull.]根[53]，总花假瑞香(*Daphnopsis racemosa* Griseb.)根(收率 0.0004%)[54]，平卧稻花(*Pimelea prostrata* Willed.)根茎(收率 0.05%)[55]中都提取得到过 prostratin，有抗炎、镇静镇痛、抗病毒、治艾滋病作用。平卧稻花素为白色结晶，mp 225 ℃[50]，$[\alpha]_D$ +62.6(*c* 0.8，MeOH)[52]。



19-83

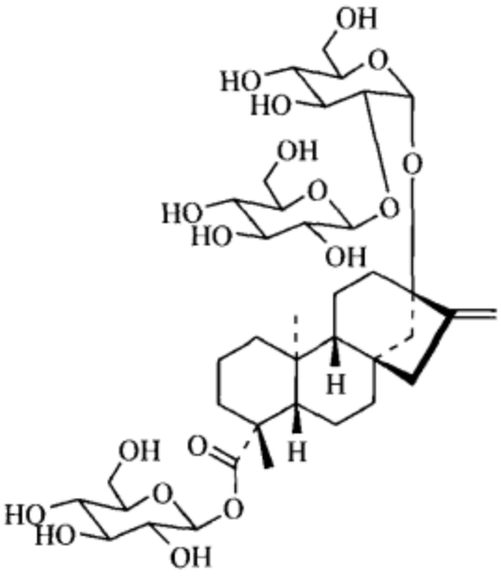
提取分离[50]：

狼毒大戟根粉末用 95%的乙醇浸提，提取液除去乙醇后，加水使处于混悬状态，依次用石油醚、乙醚和正丁醇萃取，分别得到提取物 1000 g、400 g、300 g。乙醚提取物上硅胶柱，用石油醚-丙酮(3∶1)洗脱，依次可得到 langduin A 30 mg、12-deoxyphorbol-13-hexadecanoate 150 mg、prostratin 400 mg。

19.4.3.8　甜叶菊苷

甜叶菊苷(又称糖菊苷、甜茶素，stevioside，**19-84**)存在于菊科甜菊属植物甜菊[*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl.]的叶及蔷薇科甜茶(*Rubus suavissimus* S. Lee)的叶中，可生津止渴，利尿降压，降血糖，抗高血压，促进新陈代谢，用于治疗胃酸过多。

甜叶菊苷，mp 198 ℃，$[\alpha]_D^{25}$ −39.3(*c* 5.7，H_2O)，吸湿性结晶，1 g 溶于800 mL 水，能溶于二氧六环，微溶于乙醇[56]。$[\alpha]_D^{25}$ −30.3(*c* 0.56，C_5H_5N)[57]。



19-84

提取分离[58]：

取干叶粗粉加水煎煮，每次煮沸 0.5 h，至提取液基本上无甜味(约 3～4 次)，过滤，合并各次滤液。上述滤液中加入铁盐搅拌使杂质沉淀，用氢氧化钙调节至中性放置过夜，滤取清液，滤液经国产大孔树脂柱吸附，先用水洗去部分杂质，继用氢氧化钙的饱和液洗去色素，再以蒸馏水洗至中性，最后用乙醇洗脱，醇液减压回收至无醇味，转入蒸发皿中在水浴上蒸干即得粗苷。粗苷经干燥后，加适量甲醇或乙醇热溶重结晶(如色深可用活性炭脱色)，过滤、放置，析出白色针晶，mp 197～199 ℃，用硅胶-CMC 板薄层色谱分离，氯仿-甲醇-水(30∶20∶4)展开值 0.56，碘蒸气显棕色单一斑点。母液经处理后又可得到部分结晶，精品得率一般稳定在 7%左右。

19.5 三　　萜

19.5.1 概述

多数三萜(triterpene)是由 30 个碳原子组成的萜类化合物，根据异戊二烯定则，认为是 6 分子异戊二烯聚合而成。三萜类化合物的通式为$(C_5H_8)_6$。从生源途径来看，三萜类化合物是由二分子焦磷酸金合欢酯缩合成链状鲨烯同时闭环转位而成。少数三萜化合物分子中的碳原子多于或少于 30 个，如齿孔酸(eburicoic，$C_{31}H_{50}O_3$)和 4,4-二甲基-胆甾二烯醇(4,4-dimethyl-cholestadienol，$C_{29}H_{28}O$)等，过去认为它们不属于三萜类范畴，后来，从植物生源关系的进一步探索，才明确地将它们划入三萜类化合物。

三萜类化合物在中草药中分布很广，是萜类化合物中最多的一类，有的以游离

形式存在，有的以酯及糖苷的形式存在。以游离或酯类形式存在的三萜化合物，几乎都不溶或难溶于水，可溶于常见的有机溶剂；三萜糖苷多数可溶于水。该类糖苷因振摇后可产生持久性似肥皂液的泡沫而通称为三萜皂苷（triterpenoid saponin）。具有羧基的皂苷称为酸性皂苷，酸性皂苷几乎都是三萜衍生物。有些苦味素类成分，也属于三萜类。

三萜类化合物广泛存在于植物界，菌类、蕨类、单子叶、双子叶植物，动物及海洋生物中均有分布，尤以双子叶植物中分布最多，其中，五加科、豆科、桔梗科、玄参科等植物中三萜含量较高。由真菌灵芝中也曾分离出许多三萜成分。三萜也存在于动物体中，如从羊毛脂中分离得到羊毛脂醇。Jean-Paul Vincken 等[59]统计整理了从不同植物中分离得到的三萜，发现其在双子叶植物纲约 220 余种植物以及单子叶植物纲约 50 种植物中都有分布。1927 年，Kofler[60]就已经列出了 472 种含有三萜苷类的植物。除陆地生物外，从海参、软珊瑚等海洋生物中也分离出多种类型的三萜化合物。

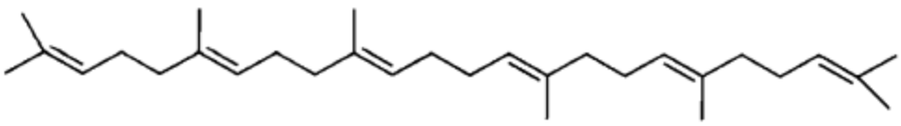
三萜类化合物具有广泛的药理活性。通过对三萜类化合物的生物活性及毒性研究结果显示，其具有溶血、抗癌、抗炎、抗菌、抗病毒、降低胆固醇、杀软体动物、抗生育等活性。由于分离纯化及结构测定方法的进展，使一些复杂三萜类化合物的分离、结构鉴定能较为顺利地进行。因而三萜类的研究进展很快，发现了不少新的化合物，其应用也极其广泛。例如，人参皂苷能促进 RNA 蛋白质的生物合成，调节机体代谢，增强免疫能力。七叶皂苷具有明显抗渗出、抗炎、抗淤血的作用，能恢复毛细血管正常渗透性。一些游离的三萜单体已作为药物应用于临床。例如，甘草次酸具有促肾上腺皮质激素（ACTH）样活性，临床作为抗炎药，并用于胃溃疡病的治疗；齐墩果酸具有降低转氨酶的功能，临床用于治疗急性黄疸肝炎；川楝素临床被用作驱蛔虫药。近年来发现白桦酸具有抗病毒及抗肿瘤活性，正吸引人们从构效关系及作用机理等方面进行深入研究。三萜被认为是许多中药的有效成分，得到了国内外学者的普遍重视，成为天然药物化学较为活跃的一个研究领域。

目前已发现的三萜化合物，除个别是无环和三环三萜外，主要是四环三萜和五环三萜，而以五环三萜为常见。

19.5.2　主要结构类型

19.5.2.1　无环三萜

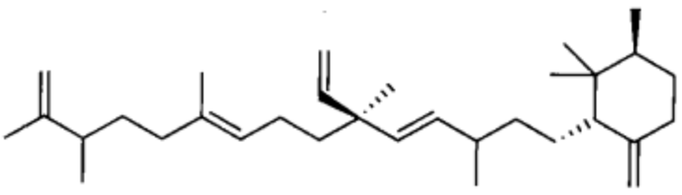
鲨烯类成分中最经典的成分鲨烯（squalene，**19-85**）主要存在于鲨肝油的不皂化部分，一些植物油如橄榄油、茶籽油等中也有存在。鲨烯的直链结构被氧化及环合后可形成一系列手性中心。



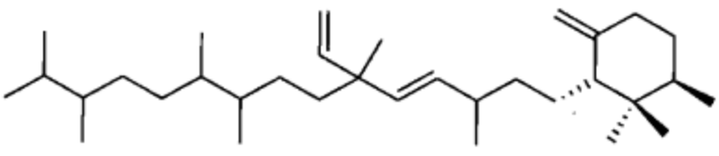
19-85

19.5.2.2 单环三萜类

从葡萄藻科植物葡萄藻(*Botryococcus braunii*)中得到一单环三萜类化合物braunicene(**19-86**)[61]。从 Sacred 湖底沉积物中分离得到单环三萜化合物 sacredicene(**19-87**)[62]。



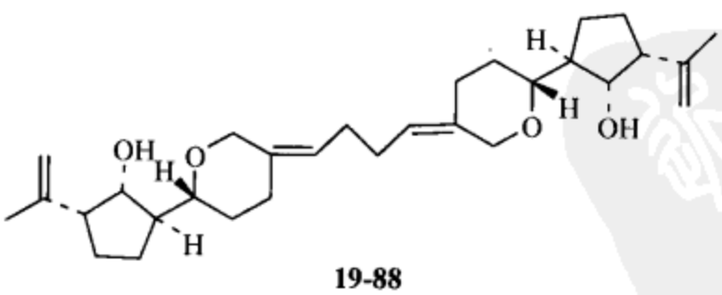
19-86



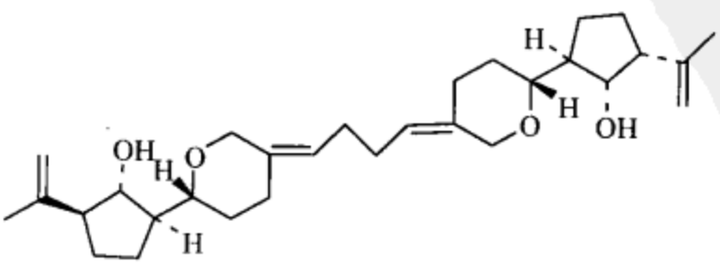
19-87

19.5.2.3 双环三萜类

从无脊椎动物 *Pleurobranchus testudinarius* 中分离得到双环三萜类化合物 testudinariol A(**19-88**)和 B(**19-89**)[63]。



19-88

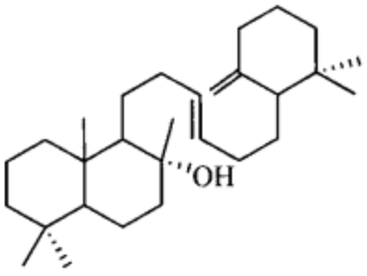


19-89

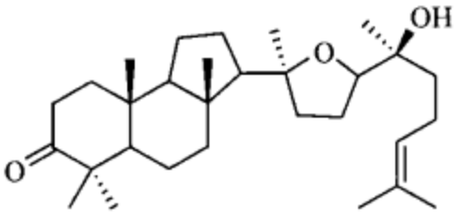
19.5.2.4　三环三萜类

龙涎香醇(ambrein,**19-90**)是龙涎香(*Ambergris*)的成分,龙涎香是抹香鲸肠道排泄的灰色块状物,作为贵重香料应用。但龙涎香醇本身没有香味,在空气中发生变化产生香味,另外龙涎香中还含有二氢-α-紫罗兰酮(dihydro-α-ionone)及其他极香的物质。

马拉巴醇(malabaricol,**19-91**)是从 *Ailantus malabarica* DC. 的树干渗出的树脂状物中得到的主要成分。



19-90

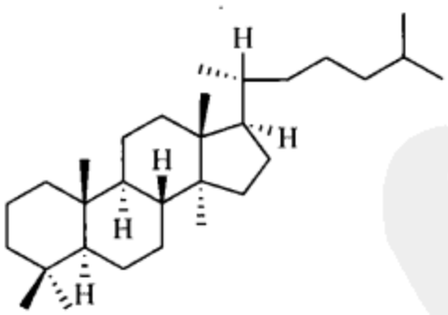


19-91

19.5.2.5　四环三萜类

1) 羊毛甾烷型

羊毛甾烷(lanostane,**19-92**)型四环三萜的结构特点是 A/B、B/C、C/D 环均为反式。C10 位和 C13 位均有 β-甲基,C14 位有 α-甲基,C17 位为 β 侧链,C20 位为 *R* 型。如存在部分植物乳液中的羊毛脂醇(lanosterol)。



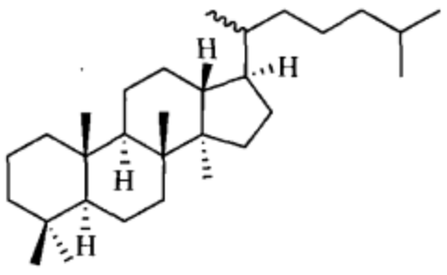
19-92

2) 达玛烷型

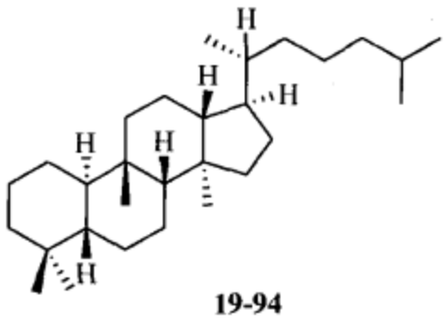
达玛烷(damarane,**19-93**)型四环三萜结构特点是 C8 位有角甲基,且为 β 构型。此外,尚有 C13 位 β-H、C10 位有 β-甲基、C14 位有 α-甲基、C17 位有 β 侧链,C20 位构型有 *R* 或 *S* 两种构型。五加科著名植物药材人参和三七中的皂苷元均为达玛烷型三萜。

3）葫芦烷型

葫芦烷(cucurbitane，**19-94**)型三萜是一类通常具有苦味及高氧化程度的四环三萜。葫芦烷型三萜 A/B 环上的取代和羊毛甾烷型不同，有 C8 位 β-H、C9 位 β-甲基、C10 位 α-H，其余与羊毛甾烷一样。葫芦科的多个属植物中含有此类物质，统称葫芦苦素类(cucurbitacin)。



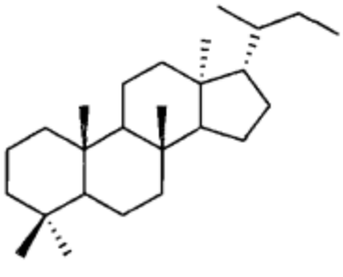
19-93



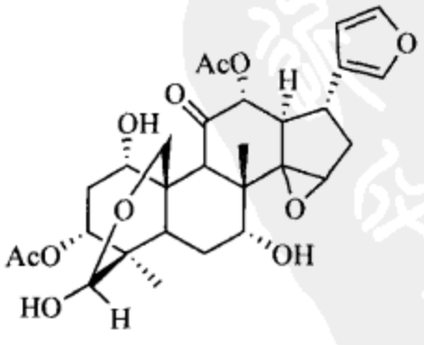
19-94

4）苦楝素型

苦楝素(meliacane，**19-95**)型三萜类化合物结构骨架有 26 个碳构成，又称四去甲三萜(tetranortriterpenoid)。其结构特点是 A/B、B/C 和 C/D 均为反式稠合，C8 位和 C10 位有 β-甲基，C13 位为 α-甲基，C17 位上侧链为 α 构型。如从楝科植物川楝(*Melia toosendan* Sieb. et Zucc)皮中分离得到的川楝素(chuanliansu，**19-96**)等，该类化合物有驱蛔虫作用。



19-95

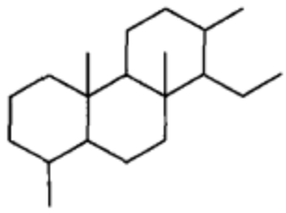


19-96

5）苦木苦素型

苦木苦素(quassinane，**19-97**)型化合物的基本骨架为苦木烷，分子结构中具有 20 个碳。以往认为苦木苦素型化合物为二萜类，现在则认为是由阿朴大戟醇或其

差向异构体阿朴甘遂醇形成三种分别具有 25 个碳、20 个碳和 19 个碳的不同碳架的化合物，大多数苦木苦素类化合物具有 20 个碳的苦木烷骨架。

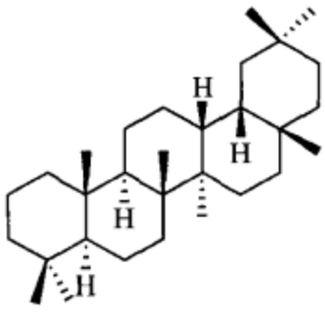


19-97

19.5.2.6　五环三萜

1）齐墩果烷型

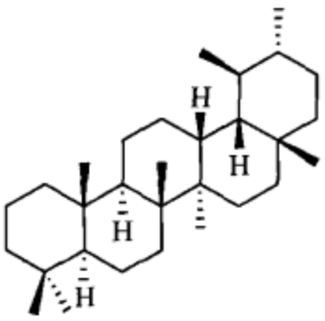
齐墩果烷(oleanane，**19-98**)型三萜又称 β-香树脂烷(β-amyrin)型三萜。结构中 5 个环皆为六元环，A/B、B/C、C/D 环为反式排列，D/E 环为顺式排列。8 个甲基分别取代在 C4 位、C4 位、C8 位、C10 位、C14 位、C17 位、C20 位和 C20 位。该类三萜在植物界分布广泛。



19-98

2）乌苏烷型

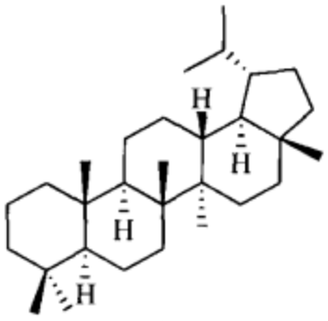
乌苏烷(ursane，**19-99**)型三萜又称 α-香树脂烷(α-amyrin)型三萜。同齐墩果烷型三萜一样，结构中 5 个环皆为六元环，A/B、B/C 和 C/D 环为反式排列，D/E 环为顺式排列。8 个甲基分别取代在 C4 位、C4 位、C8 位、C10 位、C14 位、C17 位、C19 位和 C20 位。



19-99

3）羽扇豆烷型

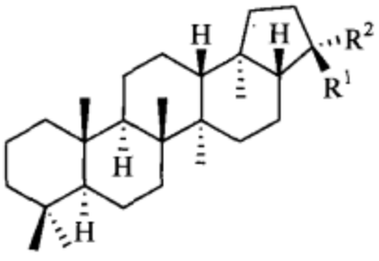
羽扇豆烷(lupane,**19-100**)型三萜结构中E环为五元碳环,且在E环C19位有异丙基以α构型取代,A/B、B/C、C/D及D/E环皆为反式排列。



19-100

4）何伯烷型和异何伯烷型

何伯烷(hopane,**19-101**)型和异何伯烷(isohopane**19-102**)型三萜结构中E环为五元碳环,且在E环C21位有异丙基取代,A/B、B/C、C/D及D/E环皆为反式排列。何伯烷型和异何伯烷型三萜结构差别在于C21位异丙基的构型不同,前者为α构型,后者为β构型。



19-101 R^1=H R^2=isopropyl
19-102 R^1=isopropyl R^2=H

19.5.3 三萜类化合物的提取分离方法

19.5.3.1 三萜类化合物的性质

三萜类化合物多有较好结晶,能溶于石油醚、苯、乙醚、氯仿等有机溶剂,不溶于水。三萜化合物若与糖结合成为苷类,尤其寡糖皂苷,由于糖分子的引入,使羟基数目增多,极性加大,不易结晶,因而皂苷大多数为无色无定形的粉末,可溶于水,易溶于热水、稀醇、热甲醇中,几乎不溶或难溶于乙醚、苯等极性小的有机溶剂,含水丁醇或戊醇对皂苷的溶解度较好,因此是提取和纯化皂苷时常采用的溶剂。另外,三萜类化合物结构常有羟基、酮基、醛基、双键和羧基等功能基。由于功能基的种类、数目、位置的不同,导致了三萜类化合物具有各种不同的化学性质。三萜化合物在无水条件下,与强酸(硫酸、磷酸、高氯酸)、中强酸(三氯乙酸)或Lewis酸(氯化锌、三氯化铝、三氯化锑)作用,会出现颜色变化或呈荧光。

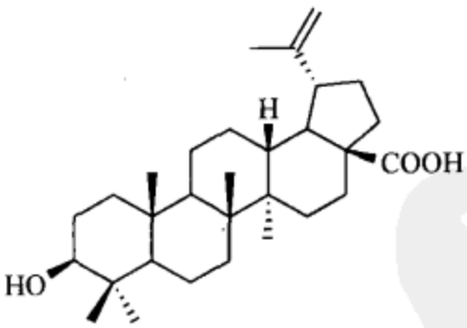
19.5.3.2　提取与分离

三萜化合物的提取和分离方法大致分四类：①用乙醇、甲醇或稀乙醇提取，提取物直接进行分离；②用醇类溶剂提取后，提取物依次用石油醚、氯仿、乙酸乙酯等溶剂进行分步提取，然后进一步分离，三萜成分主要从氯仿部位中获得；③制备成衍生物再作分离，即将提取物先用乙醚提取，用重氮甲烷甲基化，制成甲酯衍生物，或将提取物按常法进行乙酰化制成乙酰衍生物，然后进行分离；④有许多三萜化合物在植物体中是以皂苷的形式存在，可由三萜皂苷水解后获得，即将三萜皂苷进行水解，水解产物用氯仿等溶剂萃取，然后进行分离。但有些三萜在酸水解时，由于水解反应比较强烈，发生结构变异而生成次生结构，得不到原生皂苷元，如欲获得原生皂苷元，则应采用温和的水解条件，两相酸水解、酶水解或 Smith 降解等方法。三萜化合物的分离通常是采用反复硅胶吸附柱色谱，先经常压或低压硅胶柱做初步分离，样品纯度有所提高，再经中压柱色谱、薄层制备、高效液相制备等方法。硅胶柱色谱常用的溶剂系统为石油醚-氯仿、苯-乙酸乙酯、氯仿-乙酸乙酯、氯仿-丙酮、氯仿-甲醇、乙酸乙酯-丙酮。

19.5.4　提取分离实例

19.5.4.1　白桦脂酸

白桦脂酸（betulinic acid，**19-103**）存在于桦树（*Betula platyphylla* Suk.）茎皮、酸枣仁（*Zizphus jujuba* var. *spinosa* Hu.）种子中。



19-103

提取分离[64]：

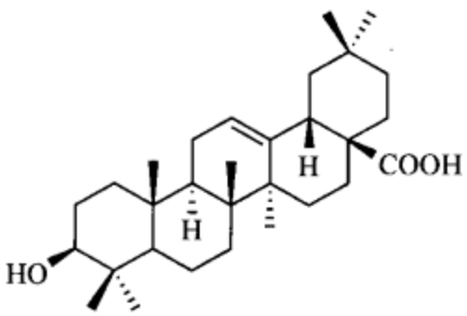
将酸枣仁粉末 100 g 用 3 倍量的水加热煮沸 2 次，每次 30 min，过滤，以水冲洗滤渣至洗液无色后烘干。滤渣用 3 倍量的 60～90 ℃石油醚浸泡 5 min 后，超声提取 4 次，每次 40 min，抽滤，烘干。继续用 2.5 倍量的 95%乙醇超声提取滤渣 3 次，每次 30 min，合并提取液，减压回收乙醇。将所得浸膏加入 95%乙醇溶解后，加活性炭脱色，过滤。滤液加入 5%的氢氧化钠，调节至 pH 11，充分搅拌，静置，过滤，滤液用盐酸调节至 pH 4，静置，过滤。滤出物水洗后烘干，无水乙醇溶解重

结晶，得白色针状结晶 84 mg。

19.5.4.2 齐墩果酸

齐墩果酸(oleanolic acid，**19-104**)首先从木犀科油橄榄(*Olea curopaea* L.)的叶中分得，有抗炎、镇静、降转氨酶等作用。它广泛分布在植物界，如在女贞果实、青叶胆全草中以游离形式存在，但大多数与糖结合成苷的形式存在。

齐墩果酸为无色针状结晶(甲醇)，mp 300 ℃，比旋度$[\alpha]_D^{25}$ +82.3(*c* 0.96，$CHCl_3$)[37]。



19-104

提取分离：从生产女贞子糖浆的药渣中提取齐墩果酸[65]

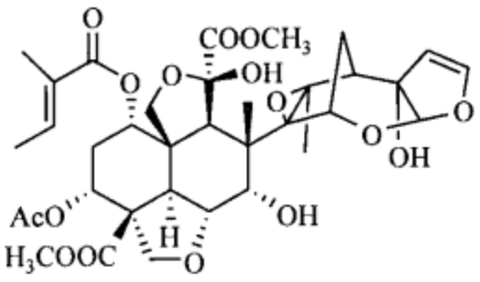
制备女贞子糖浆药渣粗粉，加入 3 倍量 95%工业乙醇回流提取 3 次，回收乙醇得稠浸膏，加水搅拌煮沸片刻，放冷，吸取上清液，重复操作 1～2 次，至水液色淡，弃去水液，将水不溶物加入 10 倍量乙醇加热溶解，10%量活性炭脱色过滤。滤液加入 10%量氢氧化钠(pH 11)，充分搅拌后，静置，过滤。滤液加入浓盐酸(pH 1)酸化放置，抽滤。抽滤得到的母液浓缩过滤后得到的滤出物与抽滤的滤出物合并，加入 6～8 倍量 5%氢氧化钠水溶液煮沸 30 min，趁热过滤，重复操作 2～3 次至碱水液色淡。碱洗物加入 8 倍量水搅拌煮沸，趁热过滤。水洗物加入约 10 倍量乙醇溶解，10%活性炭脱色过滤，滤液用盐酸调 pH 1，放置过滤，得到的结晶用沸水洗 4～5 次，烘干后得到齐墩果酸成品。

19.5.4.3 印楝素

印楝素(azadirachtin，**19-105**)存在于楝科植物印楝(*Azaditachta indica* A. Juss)的种子。印楝素为微晶或粉末状，mp 154～158 ℃。旋光度$[\alpha]_D$ −65.4(*c* 0.2，$CHCl_3$)。有杀虫、拒食、抑制生长发育、抑制昆虫激素分泌和降低昆虫生育能力等药理作用。

提取分离[66]：

将粉碎的印楝种仁粉 10 g 用 30 mL 石油醚搅拌脱脂 2 h，过滤，滤饼加入新的石油醚继续脱脂，重复 3 次，得脱脂滤饼。将超声波探头插入装有上述脱脂滤饼和



19-105

一定体积的甲醇中(料液比 1∶2),冰水浴中进行超声波萃取(因超声波萃取时超声波细胞粉碎仪放热,以防印楝素分解),在功率为 200 W 下超声波作用 1 min,间歇 1 min,超声萃取 15 min。超声后过滤,滤饼加入甲醇再次超声萃取,重复 3 次。合并提取液,在不超过 40 ℃条件下旋转蒸发回收甲醇,得到半固体萃取物,为印楝素萃取品。印楝素的萃取率为 0.38%。

分离纯化[67]:

将印楝素萃取品溶于甲醇,用 XAD-1180 大孔树脂分离,吸附条件:印楝素质量浓度为 2.23 mg·mL^{-1}(溶剂为 30%甲醇-水溶液),流速 1 柱体积·h^{-1},饱和吸附量 4.5～5 柱体积;解吸条件:用体积分数为 50%、60%、70%的甲醇-水溶液梯度解吸。HPLC 在线检测,将纯度相近的流出液合并,并加食盐饱和,以乙酸乙酯萃取,萃取液用旋转蒸发仪浓缩除去乙酸乙酯,得纯化产品印楝素 A。

19.5.4.4　川楝素

川楝素(又称苦楝素,toosendanin,chuanliansu)来源于楝科植物川楝(*Melia toosendan* Sieb. et Zucc.)、楝(*Melia azedarach* L.)、南岭楝(*Melia dubia* Cav.)、罗甸楝(*Melia lutienensin* Tiennen Tai sp. Nov. ined.)的干燥树皮及根皮和成熟果实[68,69]。药理作用包括驱虫、镇痛、抗炎等[70]。

川楝素为无色针状结晶(甲醇-氯仿-石油醚),mp 244～245 ℃(分解),$[\alpha]_D^{28}$ −13.1(c 1.75,丙酮)。易溶于甲醇、乙醇、丙酮、吡啶,微溶于苯及氯仿,几乎不溶于水和石油醚。

提取分离:

(1) 方法一[71]。取苦楝皮粗粉 100 kg 分置 3 个大缸中,用 60%乙醇按次序轮流冷浸 3 次,浸出液合并,常压回收乙醇,至馏出液极少时为止,放冷,上层液体依次送入 3 支以氯仿为固定相的萃取管。下层膏状物用适量氯仿溶解,然后将氯仿液合并,放置,分取氯仿层,常压回收,析出苦楝素结晶。将粗结晶合并,混悬于适量氯仿中,微热,边摇边加少量乙醇,至刚溶解为止,过滤,滤液浓缩,放置,析出苦楝素结晶 500 g(得率 0.43%)。

(2) 方法二[72]。称取粉碎的苦楝树皮 10 g,置于 250 mL 索氏提取器中,按料

液比为 1∶15 加 70%乙醇-水溶液，重复回流提取 5 次，合并提取液，过滤、浓缩。进行醇沉处理，除去蛋白质、多糖、鞣质等杂质，再减压回收乙醇。将浓缩液采用 S-8 型大孔树脂对苦楝素进行吸附分离纯化，适宜工艺条件：上柱液质量浓度 9.127 mg·mL^{-1}，吸附温度 40 ℃，液体流速 2 BV·h^{-1}（BV：树脂床体积），溶液处理量为 12BV，上柱液 pH 8.0；洗脱剂为 70%乙醇-水溶液，洗脱液流速 1 BV·h^{-1}，树脂重复使用 3 次需进行再生处理。

参 考 文 献

[1] 李淑芬，宋慧婷，田松江等. 超临界 CO_2 萃取当归及川芎研究//陈开勋等. 全国第三届超临界流体技术学术及应用研讨会论文集. 西安，2000.

[2] 雷正杰，张忠义，王鹏等. 超临界 CO_2 萃取广藿香产物的化学成分研究//陈开勋等. 全国第三届超临界流体技术学术及应用研讨会论文集. 西安，2000.

[3] 马海乐. 薄荷醇的超临界 CO_2 提纯的试验研究//张镜澄等. 全国第二届超临界流体技术学术及应用研讨会论文集. 广州，1998.

[4] 陈振德，许重远，谢立. 超临界 CO_2 萃取花椒挥发油化学成分的研究. 中国中药杂志. 2001，26(10)：687～688.

[5] 胡海燕，彭劲甫，黄世亮. 分子蒸馏技术用于广藿香油纯化工艺的研究. 中国中药杂志. 2004，29(4)：320～322.

[6] 郭子杰，黄儒强. 微波对三七中皂苷浸取作用的影响效果研究. 中药材，2007，30(2)：232～234.

[7] 肖文军，刘仲华，龚志华等. 膜技术分离七叶参皂甙研究. 食品科学，2004，25(2)：52～56.

[8] 袁黎明，傅若表，张天佑. 高速逆流色谱在植物有效成分提取中的应用. 药物分析杂志，1998，8(1)：60～64.

[9] Tan R X, Kong L D, Wei H X. Secoiridoid glycosides and an antifungal anthranilate derivative from *Gentiana tibetica*. Phytochemistry, 1998, 47(7): 1223～1226.

[10] 苏立强，毛俊涛，何丹凤等. 水杨酸分子印迹分离介质的水相制备及色谱行为. 化学通报，2006，69(3)：216～219.

[11] 雷建都，谭天伟. 酮洛芬分子印迹拆分及分离过程热力学研究. 化学学报，2002，60(7)：1279～1283.

[12] Claude B, Morin P, Lafosse M et al. Selective solid-phase extraction of a triterpene acid from a plant extract by molecularly imprinted polymer. Talanta, 2008, 75(2): 344～350.

[13] 徐任生，叶阳，赵维民. 天然产物化学（第二版）. 北京：科学出版社，2006：180～204.

[14] 肖崇厚，杨松松，洪筱坤等. 中药化学. 上海：上海科学技术出版社，1997：429～504.

[15] 王海涛，张天胜. 荆芥穗中提取柠檬烯的研究. 化学工程师. 2001，84(3)：19～21.

[16] 北京中医学院. 中草药化学. 1974：198.

[17] 宋永芳，孙秀全，罗嘉梁等. 天然龙脑的开发与应用，香料香精化妆品. 1998，54(3)：33～36.

[18] 方起程. 天然药物化学研究. 北京：中国协和医科大学出版社，2006：622.

[19] 郝金玉，黄若华，王平艳等. 微波萃取除虫菊酯. 精细石油化工，2001，(2)：47～49.

[20] 段伟，李正国，王国民等. 反相高效液相色谱分离纯化天然除虫菊酯. 分析化学，2006，34(12)：1776～1778.

[21] Zhang H J, Tan G T, Hoang V D et al. A aprototypic litseane sesquiterpene from *Litsea verticillata*. Tetrahedron Lett, 2001, 42: 8587～8591.

[22] Gansser D, Pollak F C, Berger R G et al. A sesquiterpene alcohol from *Streptomyces citreus* CBS 109.60. J Nat Prod, 1995, 58: 1790～1793.

[23] Hardt I, König W A. Preparative enantiomer separation with modified cyclodextrins as chiral stationary phases. J Chromatogr A, 1994, 666: 611～615.

[24] 陈晓辉，张晖芬，毕开顺，等. 制备反相高效液相色谱法用于从杉材中分离制备倍半萜类化合物. 色谱，2005，23(1)：85～87.

[25] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010 版一部). 北京：化学工业出版社，158.

[26] 青蒿素结构研究协作组. 一种新型的倍半萜内酯——青蒿素. 科学通报，1977，3：142.

[27] 阚毓铭，黄泰康. 中药化学实验操作技术. 北京：中国医药科技出版社，1988：193～197.

[28] 张玲，杜小英，姜锦花. 青蒿素提取分离工艺研究. 现代中药研究与实践，2005，19(6)：57～58.

[29] 钱国平，杨亦文，吴彩娟等. 超临界 CO_2 从黄花蒿中提取青蒿素的研究. 化工进展，2005，24(3)：286～290.

[30] 孙文基，绳金房. 天然活性成分简明手册. 北京：中国医药科技出版社，1998：499.

[31] 滑艳，何荔，汪汉卿. 白茎绢蒿化学成分的研究. 天然产物研究与开发，2005，15(3)：219～221.

[32] 罗淑荣，何丽一. 茵蒿中 α-山道年和 β-山道年的薄层分离及光密度法定量. 药学学报，1980，15(11)：693～695.

[33] Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B et al. Neuroprotective effects of bilobalide, a component of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in global brain ischemia and in excitotoxicity-induced neuronal death. Pharmacopsychiatry, 2003, 36(1): 89～94.

[34] 潘见，高香兰，杨毅等. 银杏叶提取物中白果内酯的分离纯化. 中草药，2009，40：135～137.

[35] 苏静，谈锋，李连强等. 高速逆流色谱法分离纯化银杏叶中白果内酯和银杏内酯 A、B、C. 中草药，2008，39(11)：1644～1648.

[36] 李强，夏晓晖. 新编常用中药有效成分手册. 北京：中国协和医科大学出版社，2008：233～235.

[37] 宋永锋，陈虹，李灵芝. 土槿皮的研究进展. 天津药学，2001，13(6)：9～10.

[38] 李珠莲，潘德济，胡昌奇等. 土槿皮新二萜成分的研究-Ⅰ. 土荆甲酸和土槿乙酸的化学结构测定. 化学学报，1982，40(5)：447～456.

[39] 楼凤昌，凌娅，唐于平等. 银杏萜内酯的分离、纯化和结构鉴定. 中国天然药物，2004，2(1)：11～14.

[40] 马鹏程，吕燮余，杨晶晶等. 雷公藤中的一种新活性成分 16-羟基雷公藤内酯醇. 中国药学杂志，1992，1(2)：12～18.

[41] 张敏生. 毛喉鞘蕊花中具有生物活性的二萜物质 forskohlin 的化学. 中国药学杂志，1990，25(7)：395.

[42] Saleem A M, Dhasan P B, Rafiullah M R M. Simple and rapid method for the isolation of forskolin from *Coleus forskohlii*. J Chromatogr A, 2006, 1101: 313～314.

[43] 徐任生. 天然产物化学. 北京：科学出版社，1993：316.

[44] 肖崇厚，杨松松，洪筱坤等. 中药化学. 上海：上海科学技术出版社，1997：465.

[45] 葛发欢，林秀仙，黄晓芬等. 地肤子超临界 CO_2 萃取物抗阴道滴虫药效学研究. 中药材，2003，984(1)：147～151.

[46] 张文成，潘见，陈克勋等. 穿心莲内酯超临界 CO_2 重结晶工艺初探. 农业工程学报，2004，20(5)：203～206.

[47] 江苏新医学院编. 中药大辞典(上册). 上海：上海科学技术出版社，1977.

[48] 房其年，张佩玲，徐宗沛. 丹参抗菌有效成分的研究等，化学学报，1976，34(3)：197～209.

[49] 钱名堃，杨保津，顾文华等. 丹参有效成分的研究-Ⅰ. 丹参酮ⅡA 磺酸钠和次甲丹参醌的化学结构. 化学学报，1978，36(3)：199～205.

[50] Ma Q G, Liu W Z, Wu X Y et al. Diterpenoids from *Euphoria fischeriana*. Phytochemistry, 1997, 44(4): 663～666.

[51] Boyd M, Cox Paul, Cragg C et al. Antiviral composition of prostratin for treating AIDS. US Pat. Appl. US 530562.

[52] Gustafson K R, Cardellina J H, McMahon J B et al. A nonpromoting phorbol from the samoan medicinal plant *Homalanthus nutans* inhibits cell killing by HIV-1. J Med Chem, 1992, 35(11): 1978～1986.

[53] Adolf W, Hecker E. New irritant diterpene-esters from roots of *Stillingia sylvatica* L. (Euphorbiaceae). Tetrahedron Lett, 1980, 21(30): 2887～2890.

[54] Adolf W, Hecker E. On the active principles of the Thymelaeaceae Ⅱ. Skin irritant and cocarcinogenic diterpenoid factors from *Daphnopsis racemosa*. Planta Med, 1982, 45(3): 177 ～182.

[55] Zayed S, Hafez A, Adolf W et al. New tigliane and daphnane derivatives from *Pimelea prostrata* and *Pimelea simplex*. Experientia, 1977, 33(12): 1554～1555.

[56] Wood H B, Allerton R, Diehl H W et al. Stevioside. I. The structure of the glucose moieties. J Org Chem, 1955, 20: 875.

[57] Ogawa T, Nozakia M, Matsui M et al. Total synthesis of stevioside. Tetrahedron. 1980, 36(18): 2641～2648.

[58] 孙礼富，杨学运，沈敏敏等. 新甜味剂——甜叶菊甙的提取分离. 现代应用药学. 1987, 4(2) : 22, 31.

[59] Vincken J P, Heng L, Groot A et al. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry, 2007, 68: 275～297.

[60] Yukio K, Haruhisa K, Yukinori M et al. Studies on the constituents of *Clematis* species Ⅷ. Triterpenoid Saponins from the aerial parts of *Clematis tibetana* Kuntz. Chem Pharm Bull, 2001, 49: 635～638.

[61] Huang Z, Pouler C D, Wolf F R et al. Total synthesis of stevioside. J Am Chem Soc, 1988, 110: 3959.

[62] Huang Y, Murray M, Eglinton G. Sacredicene, a novel monocyclic C33 hydrocarbon from sediment of Sacred Lake, a tropical freshwater lake, Mount Kenya. Tetrahedron Lett, 1995, 36: 5973～5976.

[63] Spinella A, Mollo E, Trivellone E et al. Testudinariol A and B, two unusual triterpenoids from the skin and the mucus of the marine mollusk *Pleurobranchus testudinarius*. Tetrahedron, 1997, 53(49): 16891～16896.

[64] 杨昕，杨光，赖玲等. 酸枣仁中白桦脂酸的提取和分离. 中国中药杂志，2006, 31(5): 437.

[65] 唐峰柏，余克健，高加其等. 齐墩果酸提取工艺改进. 中草药，1989, 20(8): 17.

[66] 王秋芬，宋湛谦，赵淑英等. 超声波辅助溶剂萃取印楝素条件优化. 农药，2004, 43(8) : 351～353.

[67] 王秋芬，宋湛谦. 大孔树脂对印楝素 A 吸附纯化的研究. 林产化学与工业，2006, 26(1): 53～56.

[68] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2005 版一部). 北京：化学工业出版社，2005.

[69] 常新全，丁丽霞. 中药活性成分分析手册. 北京：学苑出版社，2002: 292～294.

[70] 唐英，谭世语，张进. 楝属植物中药用成分的研究开发. 化工进展，2002, 21(5): 334～337.

[71] 广西壮族自治区医药研究所. 苦楝素生产工艺的研究. 中草药通讯，1971, (2): 30～36.

[72] 王争刚，路绪旺，崔鹏等. 大孔树脂吸附法提纯苦楝素的研究. 天然产物研究与开发. 2008, 20: 1080～1083.

（汪　豪）

第 20 章　皂　　苷

20.1　前　　言

皂苷是苷元为三萜或螺旋甾烷的糖苷类化合物，根据苷元的不同可区分为三萜皂苷和甾体皂苷。皂苷类化合物广泛存在于人类的食物（如大豆、燕麦）及药用植物（如人参、甘草、柴胡）中，具有多种生理功能，是许多植物药的主要活性成分。例如，人参及其他多种药用植物中的皂苷具有调节人体免疫系统的功能；三七皂苷对心肌缺血和再灌注损伤具有保护作用；黄芪皂苷能显著改善心肌收缩性，减少冠脉血流，对心肌功能具有保护作用；一些薯蓣皂苷可减少心绞痛，调节新陈代谢，对治疗冠心病有效；从酸枣仁中分得的酸枣仁皂苷具有中枢神经系统镇静作用；从几种七叶树科植物中提取得到的七叶皂苷具有抗炎、消肿、增加静脉张力等功效，已被用于临床治疗脑水肿等病症；柴胡皂苷具有退热及保肝作用；甘草皂苷具有促肾上腺皮质激素（ACTH）样活性，临床用作抗炎药，并用于胃溃疡病的治疗；甘草皂苷及罗汉果皂苷还具有甜味，被用作甜味剂添加于食品。随着化学和生物学科的发展，对皂苷类化合物进行进一步深入的研究，有望阐明其新的作用机理及发现新的用途。

20.2　皂苷类化合物的理化性质

皂苷类化合物大多是白色无定形粉末，只有少数皂苷文献报道为结晶形态。在皂苷的化学结构中，由于苷元具有不同程度的亲脂性，糖链具有较强的亲水性，使皂苷成为一种表面活性剂，用力振荡其水液可产生持久性的泡沫。富含皂苷的一些植物，如皂角、无患子等被用作天然洗涤剂。由于极性较高，皂苷类化合物可溶解于醇、水、吡啶和二甲基亚砜。有些纯化的含有葡萄糖醛酸单元的皂苷在水和醇中的溶解度可能较差。一些皂苷分子中糖上的羟基被酯化，由于化合物的极性降低，使其也可溶于氯仿、乙酸乙酯等较低极性溶剂中。

20.3　皂苷类化合物的提取分离

20.3.1　皂苷类化合物的提取

皂苷类化合物由于极性较大，需用醇、水或其混合物将其提取出来。除采用渗

漉、回流等传统方法外，一些较新的提取技术也被用于含有皂苷生物材料的提取。舒等[1]采用超声提取法以70%乙醇为溶剂提取菠奠总皂苷，总皂苷得率高于70%乙醇回流提取和水煮醇沉提取法，且操作时间缩短10～20倍。陈等[2]采用超高压法在常温条件下提取西洋参中皂苷，人参皂苷Re的得率比微波提取法高5%，比热回流提取法高9%，同时具有提取时间短、能耗低、热损失少等优点。

提取液减压浓缩后，可用氯仿或乙酸乙酯与水液进行分配，除去脂溶性成分，再用水饱和的正丁醇与剩余水液进行分配，浓缩正丁醇溶液即得皂苷富集部位。在实验室浓缩含皂苷类化合物的水溶液时，溶液很容易起泡冲出，导致样品损耗。向溶液中加入少量正丁醇再减压浓缩可避免起泡现象。当水溶液体积不大时，采用冷冻干燥方法除去水分更为容易。

20.3.2 皂苷类化合物的纯化

作为一种初步的纯化方法，沉淀法过去常被用于皂苷类化合物的分离。向富含皂苷的甲醇或乙醇液中倾入大量的乙醚或丙酮，可将皂苷类化合物沉淀出来。此外，利用甾体皂苷在乙醇中能与胆甾醇形成难溶沉淀的特性也可对皂苷进行初步纯化。为进一步获得皂苷单体，现多采用色谱方法进行纯化。

20.3.2.1 大孔吸附树脂法

大孔吸附树脂处理样品能力大，色谱分离工艺简单、操作安全、节省成本且分离效果较好，在目前皂苷类成分的研究及工业生产中获得广泛应用。与皂苷共存的糖类、蛋白质或无机盐等高极性物质在应用大孔吸附树脂时，通过水洗即可除去。用水洗脱后，一般采用甲醇-水或乙醇-水梯度洗脱，由于大孔吸附树脂对化合物吸附能力的差异，可实现皂苷和其他苷类物质，如黄酮苷、环烯醚萜苷等的分离，有利于后续的进一步纯化。刘等[3]将D101型大孔树脂用于分离三七皂苷，结果吸附量为174.5 mg·g^{-1}，用50%乙醇解吸，解吸率达80%，产品纯度71%。蔡等[4]研究用D101型大孔吸附树脂富集、纯化人参总皂苷的工艺条件及参数。人参总皂苷富集于50%乙醇洗脱液中，洗脱率在90%以上，50%乙醇洗脱液干燥后总固物中人参总皂苷纯度可达60.1%。大孔吸附树脂的分离效果可受被分离成分的性质、树脂的类型、吸附溶剂和洗脱剂的种类、用量、流速等因素的影响，在分离过程中应予以考虑[5]。

除传统的大孔吸附树脂外，日本三菱化学公司生产的MCI-gel CHP-20P型树脂颗粒度小，用于分离皂苷和其他类天然产物效果也不错，已被许多天然产物化学实验室采用。

用大孔吸附树脂通常也只能获得皂苷混合物，为获得皂苷单体，还需采用其他色谱分离方法。除使用常规的正相硅胶柱色谱外，现多选用反相柱色谱，或使用葡

聚糖凝胶过滤及液-液分配色谱进行分离。

20.3.2.2 硅胶柱色谱

作为一种传统的液相色谱固定相，硅胶在皂苷的分离工作中仍被使用。但硅胶对高极性皂苷类化合物的吸附作用大，会导致样品的损耗，不适用于微量皂苷成分的分离。由于多采用氯仿、甲醇等有机溶剂作流动相，洗脱液浓缩速度快，硅胶柱色谱常被作为继大孔吸附树脂分离后的一种初步分离手段。在用硅胶色谱分离皂苷类化合物时，可在氯仿-甲醇溶剂系统中加入适量的水，以克服皂苷类化合物进行硅胶色谱时产生的拖尾现象，获得更好的分离效果。过去常采用一定比例氯仿-甲醇-水混合液的上相或下相作为流动相，根据化合物的极性不同，配置 7∶3∶0.5、3∶1∶0.1 等比例明确的氯仿-甲醇-水单相溶液作为流动相，不仅快速方便，而且节约溶剂。在某些情况下，如用氯仿-甲醇-水三元溶剂系统分离效果不好，也不妨摸索其他溶剂系统。

20.3.2.3 反相色谱

在反相色谱填料出现之前，要分得微量皂苷单体是一项困难的工作。反相色谱最常用的固定相是十八烷基硅烷键合硅胶，其他反相固定相由于可能会有不同的分离效果，也值得尝试使用。在分离皂苷类化合物时，常用不同比例的甲醇-水、乙醇-水或乙腈-水作为洗脱剂。由于乙醇-水溶剂系统会产生高柱压，通常不用于 HPLC 分离。乙腈-水和甲醇-水溶剂系统会有不同的分离效果，分离前可先摸索更适合的分离条件。增大流动相中有机溶剂的比例可提高流动相的洗脱能力。用反相色谱填料分离皂苷类化合物时，也可根据分离目的和分离难度的不同而采用减压色谱、常压色谱及加压色谱等多种方式。一般要采用高效反相 TLC 或反相分析 HPLC 对反相柱色谱的分离效果进行检测，用正相硅胶 TLC 检测反相柱色谱流分，有时会将已分开的样品错误合并。Merck 公司生产多种规格的高效反相薄层板。在对一些皂苷进行 RP-18 反相薄层检测时，需要展开剂中水的比例超过 50%，这时可采用吸附剂中加入亲水性物质的 Merck RP-18 WF254 型反相薄层板。对于一些结构中只含有不共轭双键的皂苷类化合物，进行柱色谱分离时可用紫外检测器在 205 nm 左右进行检测；使用固定比例流动相进行洗脱时，可采用示差检测器；或采用柱后分流方式用蒸发光散射检测器进行检测。

20.3.2.4 液-液分配色谱

液-液分配色谱的优点在于不会对极性高的皂苷类化合物造成不可逆吸附。由于没有 TLC 或 HPLC 之类的快速、方便的分析方法准确预测分离结果，用液-液分配色谱实现皂苷类化合物的成功纯化可能会耗时较长。作为目前应用较广的

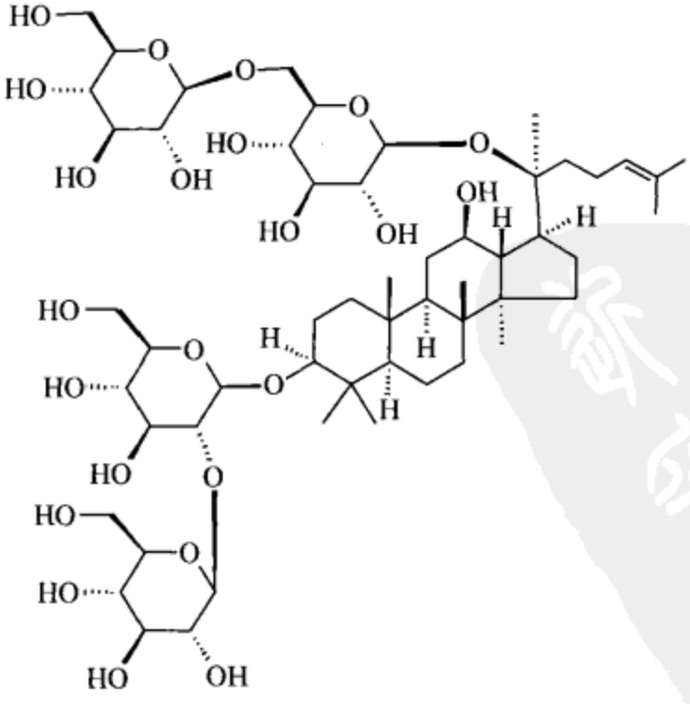
液-液分配色谱法，高速逆流色谱法(HSCCC)已被成功用于人参皂苷、三七皂苷和积雪草皂苷单体的制备，相关内容于下面分离实例部分介绍。

20.4 皂苷类化合物提取分离实例

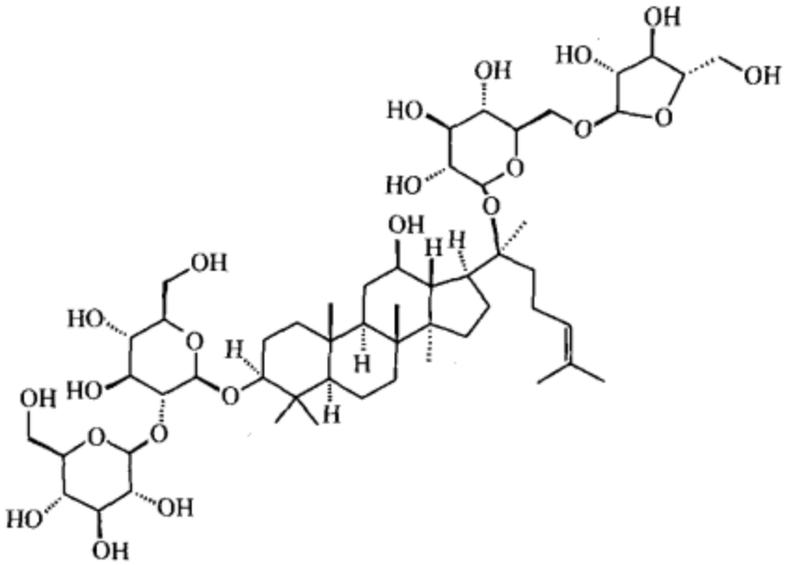
20.4.1 人参皂苷

著名中药人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)属于五加科人参属植物，药用其根，具有益气固脱、大补元气等功效[6]。人参皂苷(ginsenoside)是人参的主要活性成分，含量约为4%。现代药理学研究表明，人参皂苷具有抗衰老、抗氧化、提高免疫力和增强记忆力等多种作用。

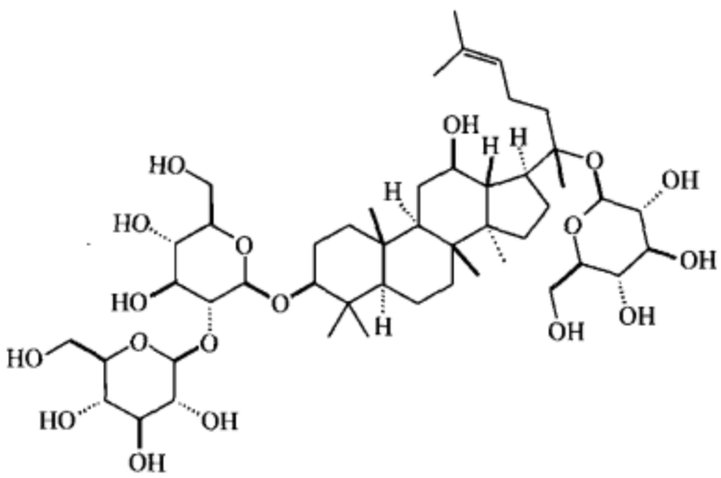
根据苷元的不同，可将人参皂苷分成A、B、C三种类型。A、B型皂苷元分别为20-(*S*)-原人参二醇和20-(*S*)-原人参三醇，它们都属于达玛烷型三萜；C型皂苷元是齐墩果烷型三萜。这些皂苷多数是无色结晶，能溶于水，属于双糖链皂苷，可在温和条件下被水解。A型人参皂苷如Rb_1(**20-1**)、Rc(**20-2**)、Rd(**20-3**)；B型人参皂苷如Re(**20-4**)、Rg_1(**20-5**)、Rg_2(**20-6**)；C型皂苷如Ro(**20-7**)。不同类型三萜皂苷的生理活性有显著差异。人参总皂苷没有溶血作用，但经分离纯化后的B型和C型人参皂苷具有显著的溶血作用，A型皂苷则有抗凝血作用；A型人参皂苷能抑制中枢神经，而B型人参皂苷则有兴奋中枢神经的作用。



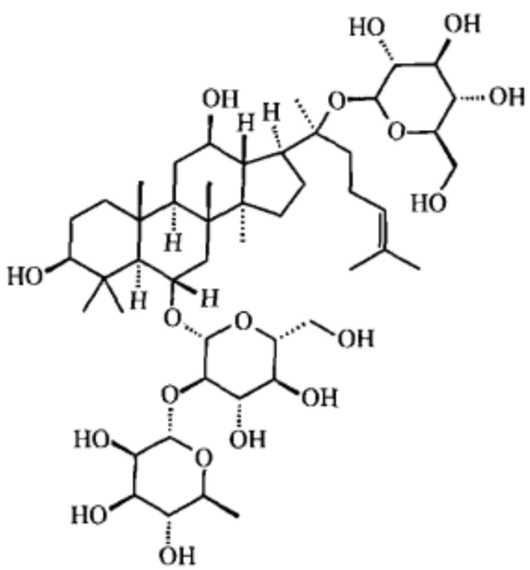
20-1 人参皂苷Rb_1



20-2 人参皂苷Rc

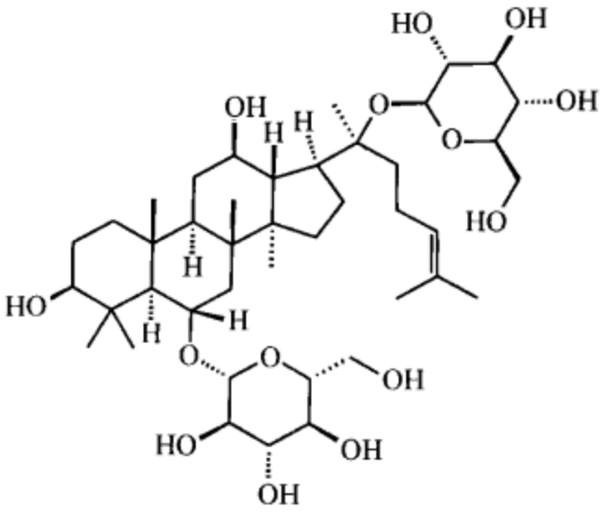


20-3 人参皂苷Rd

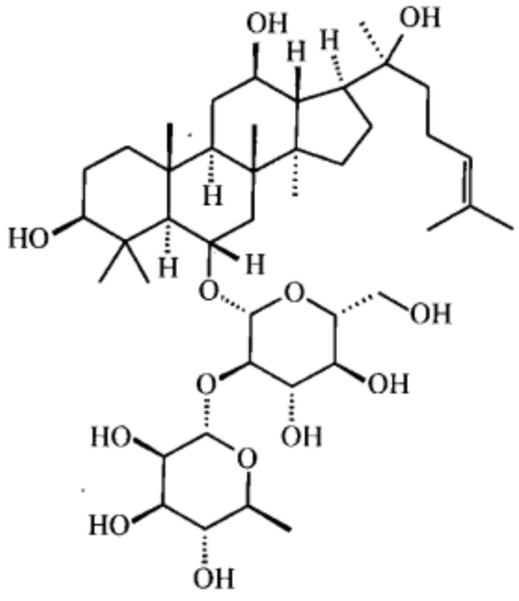


20-4 人参皂苷Re

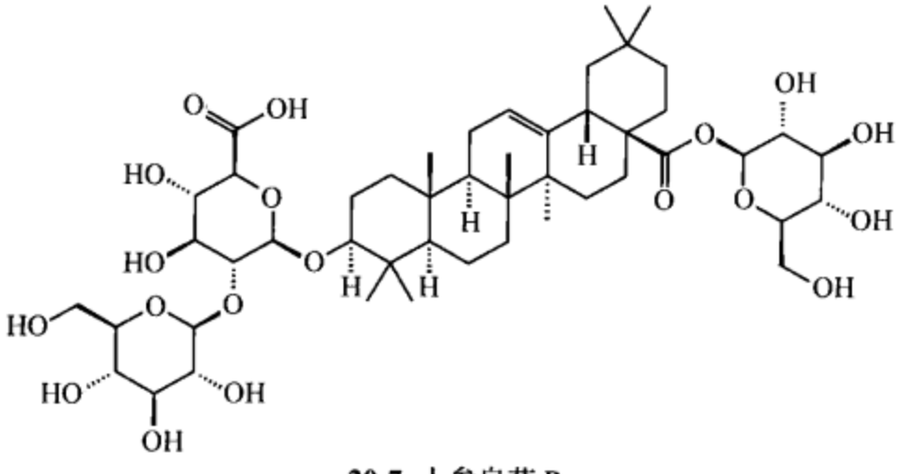
近年来，人参皂苷的抗肿瘤活性受到广泛关注，如发现人参皂苷具有抑制肿瘤内新生血管形成[7]、诱导肿瘤细胞凋亡、阻止脱落癌细胞在血管的着床、抗浸润、抗转移、抑制癌细胞增殖的作用等[8,9]。野山参和红参中含有抗癌单体皂苷 Rh_2 和 Rg_3。人参皂苷 Rh_2（ginsenoside Rh_2，**20-8**）可诱导癌细胞分化、使癌细胞自然凋亡，并可抑制肿瘤增生、抑制癌细胞浸润转移、减缓癌细胞分裂生长。实验已证实人参皂苷 Rh_2 对黑色素瘤、卵巢癌等有明显的防癌、抗癌效果，是比人参皂苷 Rg_3（ginsenoside Rg_3，**20-9**）更具发展前景的抗肿瘤药物[10~13]。



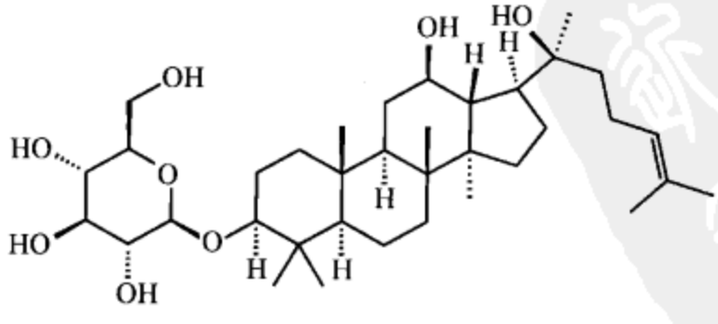
20-5 人参皂苷 Rg_1



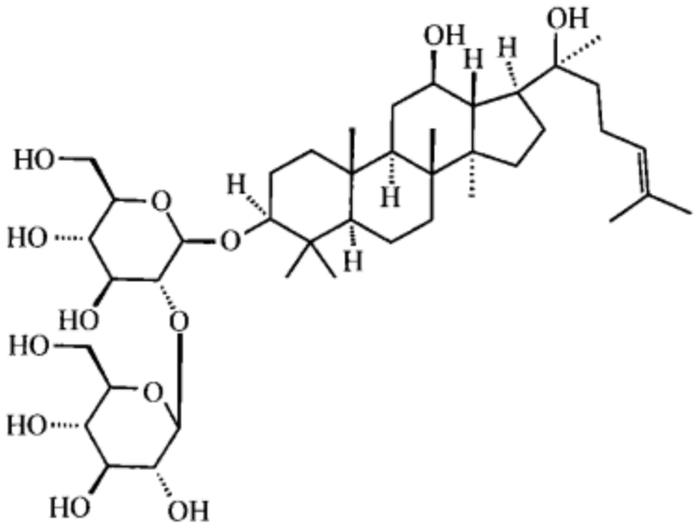
20-6 人参皂苷 Rg_2



20-7 人参皂苷 Ro



20-8 人参皂苷 Rh_2



20-9 人参皂苷 Rg_3

人参皂苷的提取方法很多。高等对比了水煎煮和超声提取工艺，结果表明超声提取人参皂苷提取率较水煎煮法高[14]。比较大孔树脂吸附和溶剂萃取两种不同精制工艺，正丁醇溶剂萃取精制得到的人参皂苷含量较大孔树脂吸附高，再经 Al_2O_3 脱色，得到人参皂苷含量均在 90%以上。Kwon 等在这基础上又提出微波辅助提取工艺，这种方法的优点在于其提取时间、得率、皂苷提取物的质量和天然性质等方面都比传统方法有所改进[15]。

人参皂苷各种单体化合物间的理化性质差异小，分离制备人参皂苷纯品的难度很大。文献报道的方法包括硅胶柱色谱法、醇-吸附树脂法、醇提-醚(酮)沉淀法、透析法、碱沉淀法、有机溶剂萃取法，但上述任何一种方法的单独使用均无法实现皂苷的有效分离。

李等报道通过溶剂选择、溶剂极性调整和添加溶解度改良剂等方法扩大各人参皂苷单体的溶解度差异，通过简单的沉淀或/和萃取手段来实现人参皂苷的大批量分离制备[16]。

窦等运用高速逆流色谱法(HSCCC)从人参茎叶总皂苷(HPLC 检测人参皂苷含量大于 80%)中分离出高纯度的人参皂苷 Re 和 Rg_1[17]。所用高速逆流色谱仪的柱体积为 320 mL，主机转速为 800 r·min^{-1}，以乙酸乙酯-正丁醇-水(4∶1∶5)的上相为流动相，流速为 1.5 mL·min^{-1}。待体系平衡后进样，以 2 mL 上相和 2 mL下相充分溶解样品，进样量为每次 120 mg，分离时间为 4 h，每 10 min 收集一个流分。分别以氯仿-甲醇-水(69∶27∶4)、乙酸乙酯-正丁醇-水(4∶1∶5)的上相和正丁醇-乙酸乙酯-水(4∶1∶1)为 TLC 展开剂，并与标准品对照。合并流分 13 和 14 以及 16～18，浓缩得人参皂苷 Rg_1(18 mg)和 Re(25 mg)。该方法分离效果和重现性好，简单易行，特别适用于人参皂苷 Re 和 Rg_1 的分离纯化。

Ha 等也利用 HSCCC 方法从高丽红参中分离得到人参皂苷 Rg_3、Rk_1、Rg_5 和 F_4 四个单体化合物[18]。取高丽红参总皂苷(350 mg),以二氯甲烷-甲醇-水-异丙醇(6∶6∶4∶1,v/v)的上相为流动相,得到人参皂苷 Rg_5(28.6 mg;收集155～175 min 部分),Rk_1(26.6 mg,收集 185～205 min 部分),F_4(8.1 mg,收集 250～275 min 部分)和 Rg_3(32.2 mg,收集 325～370 min 部分)。经 HPLC-ELSD 检测,人参皂苷 Rg_5、Rk_1、F_4 和 Rg_3 的纯度分别为 95.1%、96.2%、98.3%和 99.5%。

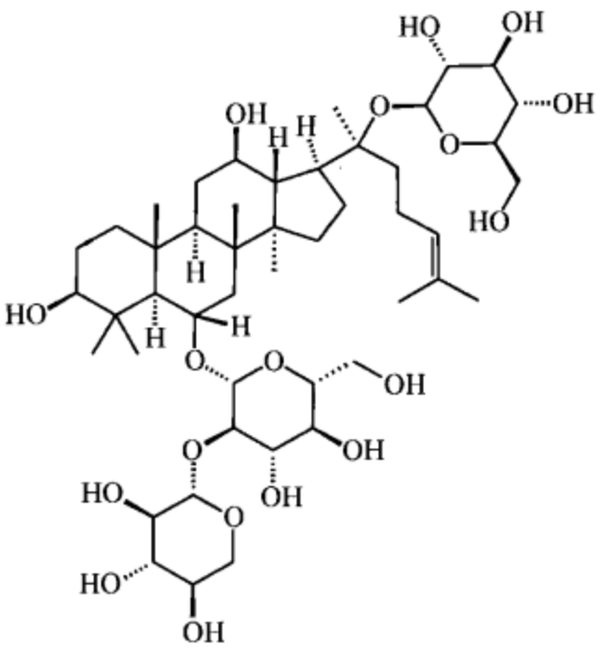
王等[19]将 100 g 西洋参粉碎成粗粉,用 70% 乙醇加热回流提取 3 次(400 mL×3),合并浓缩得西洋参粗提液 50 mL。提取液经 D101 大孔树脂富集得西洋参总皂苷 6.0 g。总皂苷用 30 mL 70%乙醇溶解,加 300 mL 丙酮搅拌,析出沉淀,放置,过滤,干燥,得棕黄色干燥疏松粉末 4.2 g,为 A 部分。将母液旋干,得棕黄色疏松粉末 1.8 g,为 B 部分。A 部分用 20 mL 水溶解,加 200 mL 丙酮搅拌,析出沉淀,静置,过滤,沉淀再用 20 mL 水溶解,加 200 mL 丙酮同法处理,静置,过滤,减压干燥,得黄白色干燥疏松粉末 2.6 g,为人参皂苷 Rb_1。HPLC 检测,人参皂苷 Rb_1 的含量为 95%。A 部分丙酮沉淀的母液旋干,得量 1.6 g,与 B 部分合并。B 部分用 30 mL 95%乙醇溶解,加 300 mL 丙酮搅拌,析出沉淀,静置,过滤,母液回收至干,再重复以上方法用丙酮沉淀两次,回收溶液减压干燥,得人参皂苷 Re 0.5 g。HPLC 检测,人参皂苷 Re 的含量为 92%。取含量为 95%的人参皂苷 Rb_1 2.6 g,甲醇溶解,冰箱放置析晶,过滤,甲醇再重结晶一次,过滤,减压干燥,得 2.0 g 白色沙状粉末。HPLC 检测含量为 98.5%。取含量为 92%的人参皂苷 Re 0.25 g,70%乙醇溶解,冰箱放置析晶,过滤,甲醇再重结晶一次,过滤,减压干燥,得 0.25 g 无色结晶。HPLC 检测含量为 97.5%。该方法利用人参皂苷 Re 和 Rb_1 在丙酮中的溶解度不同,人参皂苷 Rb_1 不溶于丙酮而沉淀,人参皂苷 Re 溶于丙酮而留在母液中,达到了分离纯化 Re 和 Rb_1 的目的。该方法简便、实用,适用于工业生产。

Paik 等[20]取人参粗皂苷 12.5 g 用 50 mL 乙腈-水(40∶60)溶解,利用制备液相色谱分离(PAK-500/C18 Column),分 5 次进样,每次进样量为每 10ml 2.5 g,流动相为乙腈-水(40∶60),流速 12 mL·min^{-1},等度洗脱 100 min,得 8 个流分(Ⅰ～Ⅷ)。流分Ⅱ经半制备液相色谱分离(μBondapak C18 柱),乙腈-水(21∶79)等度洗脱,流速为 5 mL·min^{-1},得流分Ⅱ-1 和Ⅱ-2。Ⅱ-1 和Ⅱ-2 经 HPLC 分析分别为人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re。流分Ⅲ经 μBondapak carbohydrate 柱半制备分离,乙腈-水(81∶19)等度洗脱,流速为 5 mL·min^{-1},得单体化合物人参皂苷 Rf。流分Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ分别经 μBondapak carbohydrate 柱半制备分离,乙腈-水(80∶20)等度洗脱,流速为 6 mL·min^{-1},得单体化合物人参皂苷 Rb_1、Rb_2 和 Rc。流分Ⅷ同样用 μBondapak carbohydrate 柱半制备分离,乙腈-水(82∶18)洗脱,得单体化合物人参皂苷 Rd。

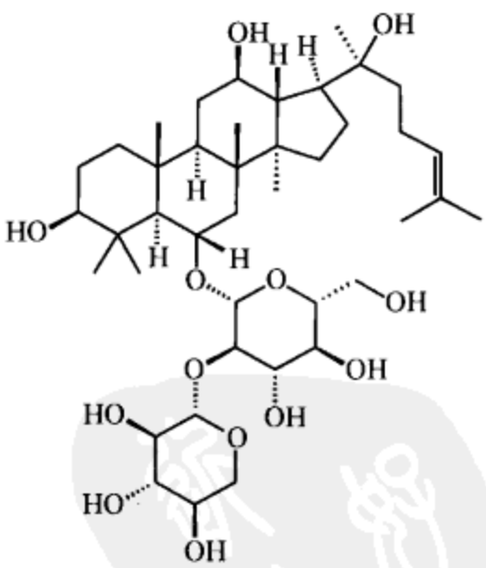
20.4.2 三七皂苷

三七(*Panax notoginseng*)是五加科人参属植物,又名田七,人参三七,盘龙七(四川),金不换(江西),常用其干燥根入药,具有止血、补血及活血化瘀等功效。三七主产于云南、广西、四川、江西、西藏,多为栽培。三七总皂苷是从中药三七中提取的主要有效成分,具有活血祛瘀,通脉止血,保护脊髓、视神经及心脑缺血性损伤等作用。近年来研究发现,三七总皂苷或其单体可通过直接杀伤肿瘤细胞、抑制肿瘤细胞生长或转移、诱导肿瘤细胞凋亡或分化、刺激和增强机体免疫功能等多种方式起到抗肿瘤作用[21]。

三七皂苷为达玛烷型四环三萜皂苷,总皂苷含量可达12%。所含单体有人参皂苷 Rb_1、Rb_2、Rd、Re、Rf、Rg_1、Rg_2、Rh_1 和三七皂苷 R_1(**20-10**)、R_2(**20-11**)、R_3(**20-12**)、R_4(**20-13**)和 R_6(**20-14**)等20余种,其中人参皂苷 Rg_1 和 Rb_1 是三七总皂苷中含量最高的两个成分,而三七皂苷 R_1(**20-10**)则是三七总皂苷的特征化合物。三七总皂苷水解所得苷元为人参二醇和人参三醇,与人参总皂苷所不同的是缺少齐墩果酸苷元。

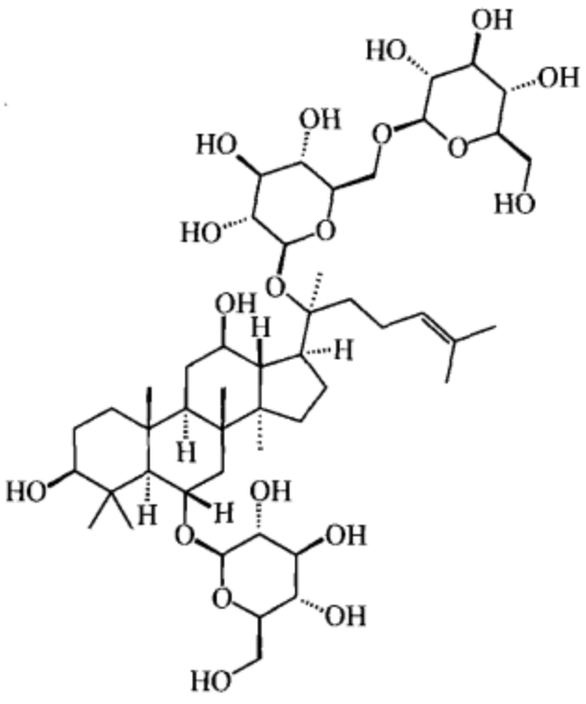


20-10 三七皂苷 R_1

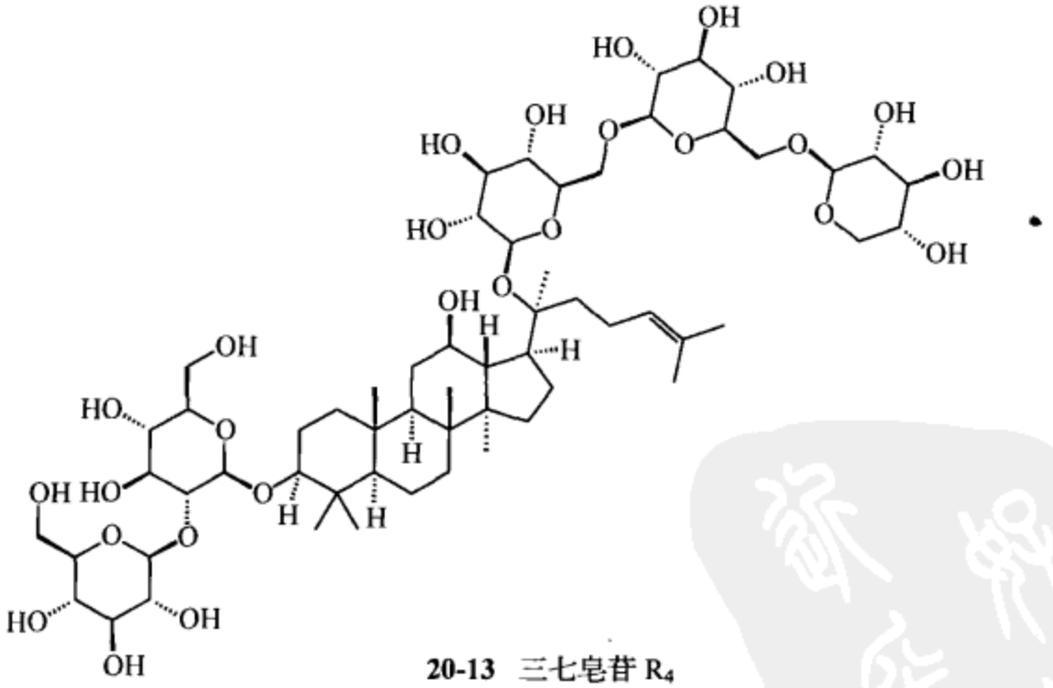


20-11 三七皂苷 R_2

周等[22]报道了批量提取分离三七皂苷 R_1、R_2 及人参皂苷 Rg_1 有效部位群的方法。取三七干燥根、茎4.8 kg,粉碎,用10倍量70%乙醇回流提取3次,每次2 h,合并、蒸干提取液得三七粗皂苷1.9 kg。粗皂苷1.9 kg用少量水溶解,经大孔树脂纯化,得三七总皂苷750 g。取750 g总皂苷用硅胶柱色谱分离,氯仿-甲醇-水(9∶1∶0.1)洗脱,每4 L为1个流分,共接收10个流分,合并第4、5流分,干燥

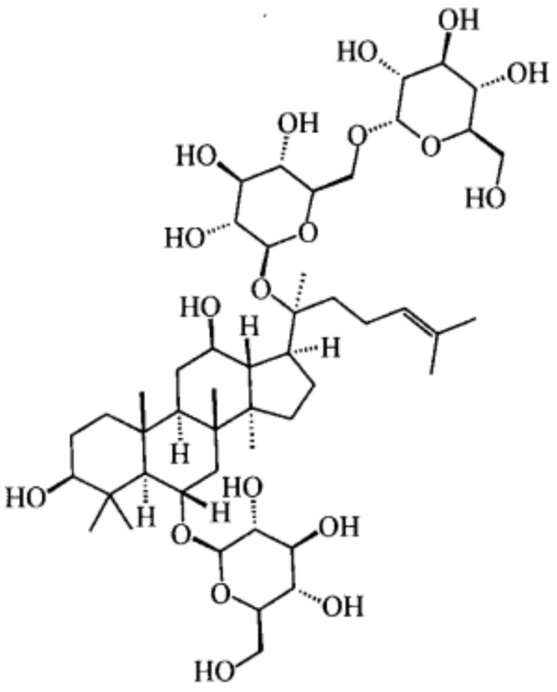


20-12 三七皂苷 R_3



20-13 三七皂苷 R_4

得 350 g 淡黄色粉末。通过进一步柱色谱分离，以氯仿-甲醇-水(8.5∶1.5∶0.15)洗脱，得到淡黄色粉末 220 g，该部位含有三七皂苷 R_1、R_2 及人参皂苷 Rg_1，可测成分含量达到 60%以上。



20-14 三七皂苷 R_6

Du 等[23]报道利用高速逆流色谱法(HSCCC)从 283 mg 三七总皂苷中成功分离得到三七皂苷 R_1，人参皂苷 Rb_1、Re 和 Rg_1。具体操作如下：将三七皂苷片(50 mg×5 片)用甲醇提取 3 次得三七总皂苷 283 mg。对三七总皂苷进行 HSCCC 分离，以正己烷-正丁醇-水(3∶4∶7，v/v)的上相为流动相，流速为2.5 mL·min^{-1}，得到三七皂苷 R_1(17 mg)，人参皂苷 Rb_1(157 mg)、Re(13 mg)和 Rg_1(56 mg)。

董等[24]取云南文山产三七干燥药材 250 g，粉碎后用 5 倍量 70%乙醇加热回流提取 3 次(每次 1 h)，水饱和的正丁醇萃取 3 次，得三七总皂苷 25 g。经硅胶 H 柱分离，氯仿-甲醇-水(50∶10∶1)洗脱，TLC 检测合并 R_f 相同的部分。组分 2(261.7 mg)上 S038 型大孔树脂柱，用水-10%乙醇-20%乙醇-30%乙醇-40%乙醇梯度洗脱，TLC 检测收集 R_f 值相同部分(20%乙醇部分)，浓缩得白色粉末 11.3 mg(收率 0.00452%)，即三七皂苷 R_2。

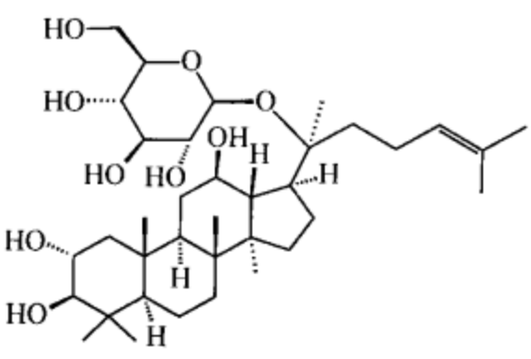
20.4.3 绞股蓝皂苷

绞股蓝(*Gynostemma pentaphyllum* Makino)为葫芦科多年生草质藤本植物，又名七叶胆、小苦药等。绞股蓝皂苷(gypenoside)是从绞股蓝中提取出的一类达玛烷型三萜皂苷，是绞股蓝的主要功效成分。研究表明绞股蓝皂苷具有人参皂苷的适应原样作用，是一种强化剂和免疫增强剂，同时具有抗衰老、抗肿瘤、抗溃疡、抗紧张、抗疲劳活性及镇静、镇痛、催眠、降血脂、促进细胞新陈代谢、滋润皮肤美容、治疗白发、补肾虚等功效。

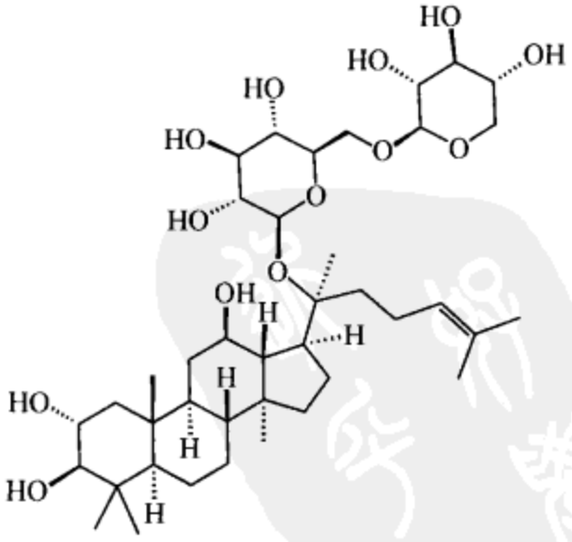
1976 年日本人永井正博等在绞股蓝中分离得到人参二醇和 2α-羟基人参二醇，首次揭示了绞股蓝中含有达玛烷型皂苷类成分。随后，人们对绞股蓝的化学成分进行了大量的研究，至 2008 年已发现绞股蓝皂苷达 136 种，其中绞股蓝皂苷Ⅲ、Ⅳ、Ⅷ、Ⅻ与人参皂苷 Rb_1、Rb_3、Rd 和 F_2 完全相同。此外，还分得人参皂苷 Rd_3 和 K，其余为人参皂苷的类似物。

沈等[25]采用正交试验法确定了醇提绞股蓝皂苷的最佳提取条件为 70%乙醇溶液，料液比 1∶12，在 40℃下浸提 3 次，每次 2 d。绞股蓝皂苷精制工艺中应用较多的是大孔吸附树脂法。曹等[26]考察了大孔吸附树脂法的最佳吸附条件，用 40%～60%乙醇提取，调节提取液至 pH 2，加氯化钠至浓度为 4%再上柱吸附，发现氯化钠等三种无机盐能显著增加 D101 树脂对人参总皂苷的吸附容量。由于氯化钠价廉易得，且不被树脂所吸附，最终不会进入产品中而影响其质量，若此种作用在大规模生产得到进一步证实并应用，其经济价值将非常可观。

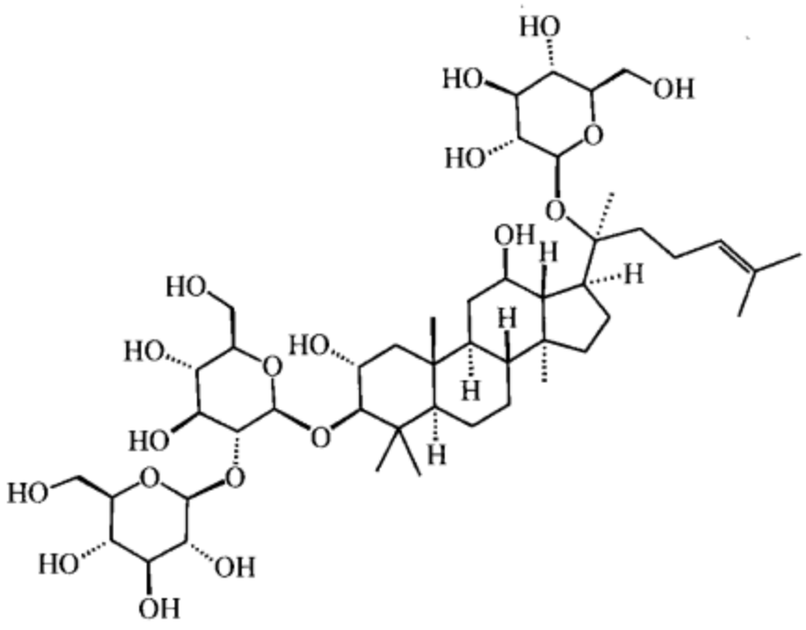
刘等[27]取绞股蓝干燥全草 2 kg，粉碎后用 60%乙醇渗漉，渗漉液除去乙醇后经 D101 大孔吸附树脂纯化，以 25%～70%乙醇洗脱，得粗皂苷 80 g。将此粗皂苷(60 g)经硅胶柱色谱分离，氯仿-甲醇梯度洗脱，收集 15%～60%甲醇洗脱部分，得 5 个组分，前 3 个中低极性组分分别以 ODS(10%～85%甲醇梯度洗脱)和 Sephadex LH-20 柱(洗脱剂为甲醇)进一步纯化，得到 gynosaponin TN-1(**20-15**)13.6 g、gypenoside LXXVII(**20-16**)5.1 g、gypenoside XLVI(**20-17**)2.8 g 和 ginsenoside Rd 900 mg。



20-15 gynosaponin TN-1



20-16 gypenoside LXXVII



20-17 gypenoside XLVI

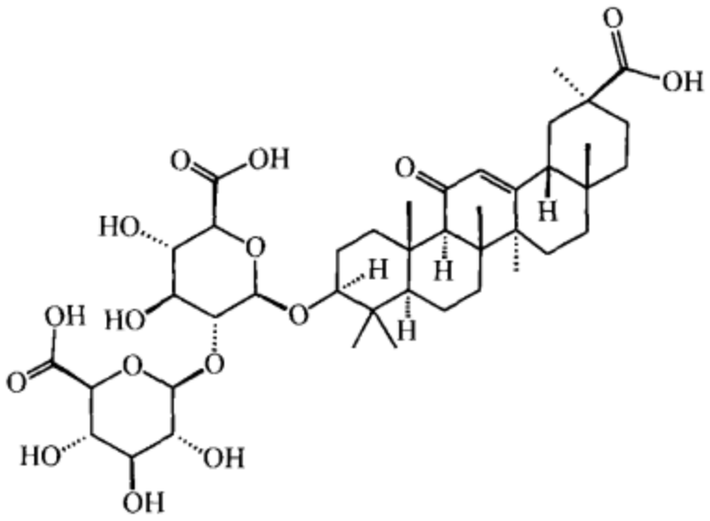
20.4.4 甘草皂苷

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)是豆科甘草属植物,具有补脾益气、清热解毒、调和诸药等功能。甘草属近20种植物,广泛分布于欧亚大陆、北美洲和南美洲温带地区。

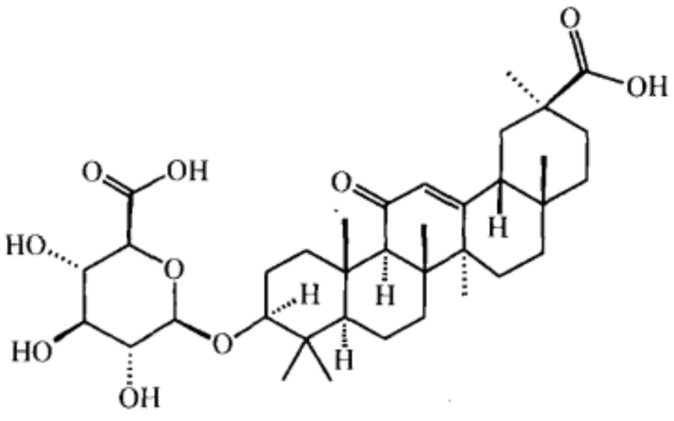
甘草皂苷(glycyrrhizin,**20-18**)作为甘草的主要有效成分一直以来为国内外学者所关注,并对其药理作用进行了广泛研究,发现它具有免疫调节、抗病毒等多方面作用[28]。目前,甘草皂苷制剂临床被用于治疗慢性乙型肝炎、胃及十二指肠溃疡、血小板减少性紫癜、流行性腮腺炎等疾病。

甘草皂苷酸水解时,得到齐墩果烷型三萜——甘草皂苷元(glycyrrhizinic acid,GA)及2分子葡萄糖醛酸。甘草皂苷元的某些生理活性要强于甘草皂苷。如果去除甘草皂苷分子中1个糖基,就得到单葡萄糖醛酸基甘草皂苷元(MGGA,**20-19**)。为了选择性部分水解甘草皂苷制备MGGA,吴等[29]用生物转化的方法,分别利用米曲霉39和黑曲霉UV-48酶水解法及液体发酵转化法进行转化,将甘草皂苷转化为MGGA。

目前甘草皂苷的提取方法有水提法、氨提法和微波提取法,纯化方法有重溶解法、二次沉淀法和大孔树脂吸附法等。李等通过设计实验比较这3种提取方法所得粗品的纯度和收率,发现氨提法最高,水提法次之,微波法最次[30]。李等[31]研究了甘草皂苷的大孔树脂最佳纯化工艺:将质量浓度为5 mg·mL^{-1}(甘草总皂苷含量)的提取液调为pH 7.0,以2 BV·h^{-1}的流速上至D101大孔吸附树脂,2 BV水洗净,pH 8.0～9.0的50%乙醇以2 BV·h^{-1}的速率洗脱,收集4 BV的洗脱液。回收乙醇,浓缩物60℃真空干燥得甘草总皂苷提取物。



20-18 甘草皂苷



20-19 单葡萄糖醛酸基甘草皂苷元

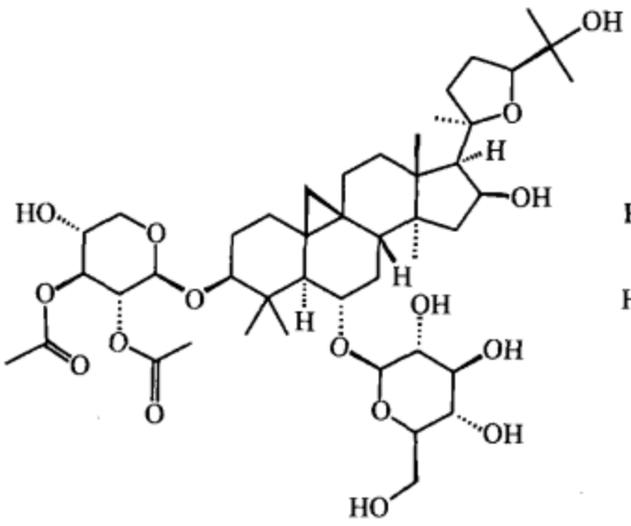
Jiang 等[32]用高速逆流色谱法(HSCCC)成功从甘草粗皂苷中分离得到纯度为 96.8%的甘草皂苷。具体操作方法:将甘草干燥根磨成粉(23 g),用 400 mL 70%甲醇超声提取 15 min。过滤,药渣再用 300 mL 70%的甲醇超声提取 2 次。合并提取液,浓缩至 25 mL。向浓缩液中滴加 3 mol·L^{-1}的盐酸(约 1.5 mL)至无沉淀析出为止。过滤沉淀,冻干得粗皂苷 1.90 g。取粗皂苷 130 mg 用 10 mL 两相溶剂(与 HSCCC 分离所用溶剂体系相同)溶解。分离体系以氯仿-甲醇-水(5∶2∶5)的上相为固定相,下相为流动相头-尾洗脱,流动相流速为 1.5 mL·min^{-1},得甘草皂苷 42.2 mg。经 HPLC 分析其纯度为 96.8%,甘草皂苷回收率达 95.2%。该方法简便,高效,仅需一步分离,甘草皂苷的纯度就从 34.1%提高到 96.8%。

20.4.5 黄芪皂苷

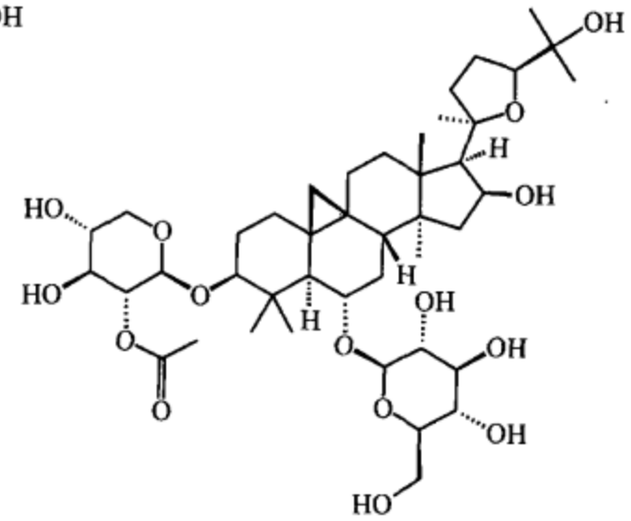
《中国药典》规定,药用黄芪为豆科植物蒙古黄芪[*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus*(Beg.) Hsiao]或膜荚黄芪[*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.]的干燥根。黄芪味甘、性微温,具有补气固表、利尿、排毒和生肌的功效。黄芪主要含有皂苷、黄酮和多糖等化学成分。药理研究证明黄芪皂

苷具有消炎、降血压、抗心肌缺氧等作用。

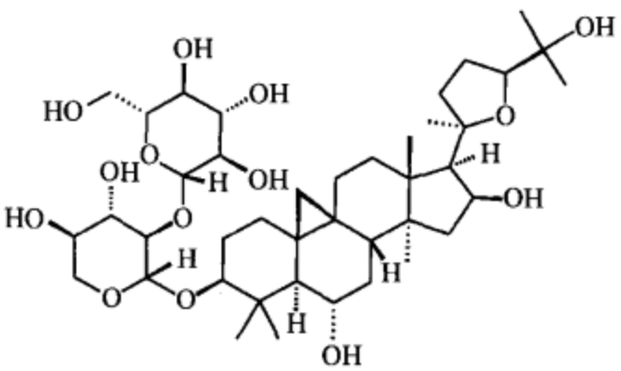
迄今已从黄芪及其同属近缘植物中分离鉴定了40余种三萜皂苷类化合物，其结构为四环三萜或五环三萜苷类，其中黄芪皂苷有20多种，包括黄芪皂苷Ⅰ(**20-20**)、黄芪皂苷Ⅱ(**20-21**)、黄芪皂苷Ⅲ(**20-22**)和黄芪皂苷Ⅳ(**20-23**)，乙酰黄芪皂苷Ⅰ，



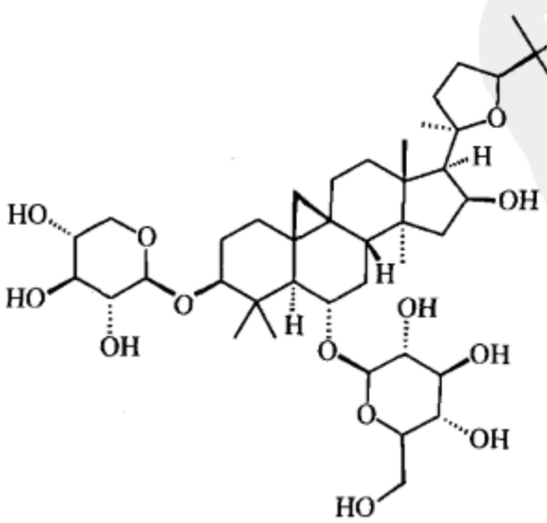
20-20 黄芪皂苷Ⅰ



20-21 黄芪皂苷Ⅱ



20-22 黄芪皂苷Ⅲ



20-23 黄芪皂苷Ⅳ

异黄芪皂苷Ⅰ～Ⅳ，绵黄芪皂苷Ⅰ～Ⅻ等。其中黄芪皂苷Ⅳ又称黄芪甲苷，是黄芪主要活性成分之一，也是《中国药典》2010 年版用以控制黄芪药材质量的指标成分。

黄芪中皂苷含量相对较低（以黄芪甲苷计，质量分数为 0.04%～0.30%），其皂苷元属于羊毛脂烷型四环三萜，黄芪皂苷类化合物的分离多先采用醇类溶剂（如乙醇或甲醇等）提取，然后以正丁醇萃取，如果要分离皂苷单体则需进一步色谱分离。

姜等[33]对近年来黄芪皂苷类成分的提取分离方法研究进展进行了归纳，列举并对比了水提法、醇提法、微波辅助提取法、柱前衍生化法、超临界 CO_2 萃取等方法的优缺点及适用范围，为黄芪及其制剂中皂苷类成分的提取分离提供了参考。

李等[34]将 5 kg 干燥黄芪根用 70%乙醇回流提取 3 次，合并提取液，减压回收至 5 L，水沉后用 D101 大孔树脂精制，收集 70%洗脱液，浓缩得 1∶1 浓缩液。用水饱和正丁醇萃取，水层弃去，正丁醇层用 1%NaOH 溶液萃取，得到的正丁醇层用饱和水洗至中性，旋干得 10 g 黄色粉末。经进一步硅胶柱色谱分离，氯仿-甲醇梯度洗脱，得到黄芪甲苷结晶。

肖等[35]报道了用硅胶柱色谱分离黄芪皂苷转化产物的方法。具体操作：将微生物产生的糖苷酶液与黄芪总皂苷溶液等体积混合，在恒温釜（40 ℃）中反应24 h。反应液用水饱和的正丁醇萃取 4 次，合并萃取液，低压蒸干，得转化产物 11.38 g，产物得率为 75.38%。产物经薄层检测，总皂苷中部分多糖基皂苷转化为黄芪甲苷。之后对转化产物进行硅胶柱色谱分离，以氯仿-甲醇（9.8∶0.2，9.7∶0.3，9.5∶0.5，9.3∶0.7）不同比例梯度洗脱，得黄芪甲苷 1.51 g，得率 10.07%。

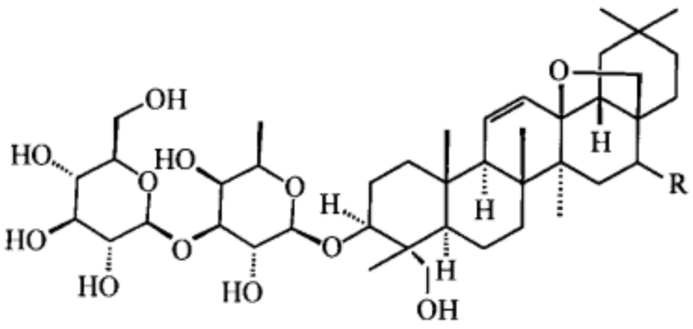
20.4.6 柴胡皂苷

柴胡为伞形科（Umbelliferae）植物柴胡（*Bupleurum chinense* DC.）或狭叶柴胡（*Bupleurum scorzoneri flium* Wild.）的根。按性状不同，分别习称“北柴胡”及“南柴胡”。中药柴胡具有和解表里、疏肝、升阳的功效，用于治疗感冒发热、寒热往来、胸胁胀痛、月经不调、子宫脱垂及脱肛等症。

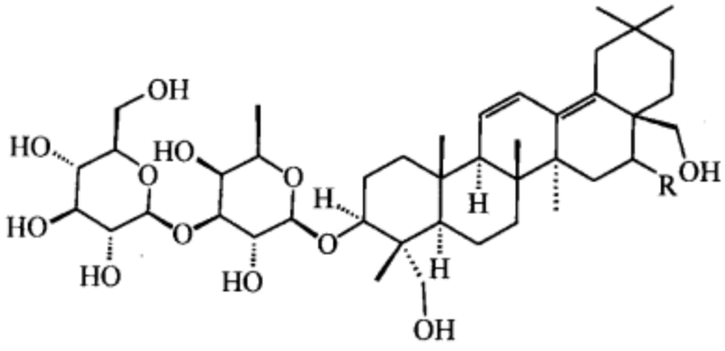
柴胡皂苷（saikosaponin）作为柴胡的一类主要活性物质，具有镇静、抗惊厥、解热、抗病毒、免疫调节、抗炎、保肝护肾和抗肿瘤等多方面药理活性。在已鉴定的多种柴胡皂苷中，以柴胡皂苷 a（**20-24**）、d（**20-25**）、b_1（**20-26**）、b_2（**20-27**）和 c（**20-28**）含量最高，人们对柴胡皂苷 a 和 d 的提取纯化工艺和药理活性研究最为广泛。

宋等[36]报道了用大孔吸附树脂分离柴胡皂苷的最佳工艺，即先用 30%乙醇洗去杂质，再用 70%乙醇洗脱含 2 个糖基或 3 个糖基的柴胡皂苷。柴胡总皂苷的提取率为 1.96%。由于柴胡中所含皂苷数量多，结构相近，往往要配合使用多种色谱方法才能得到单体。

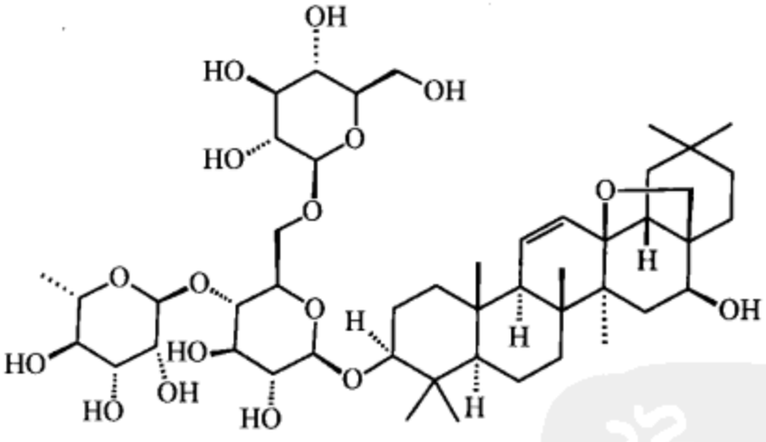
Kim 等[37]将 5 g 粉碎的干燥狭叶柴胡根用 70%乙醇在 45 ℃水浴中加热提取 7 h。室温静置 17 h，过滤。将提取液在 30 ℃减压浓缩，得粗皂苷。粗皂苷用 50 mL蒸馏水溶解后，分别用 150 mL 乙醚萃取 3 次，100 mL 正丁醇萃取 2 次。浓



20-24 柴胡皂苷 a R=β-OH
20-25 柴胡皂苷 d R=α-OH



20-26 柴胡皂苷 b_1 R=β-OH
20-27 柴胡皂苷 b_2 R=α-OH



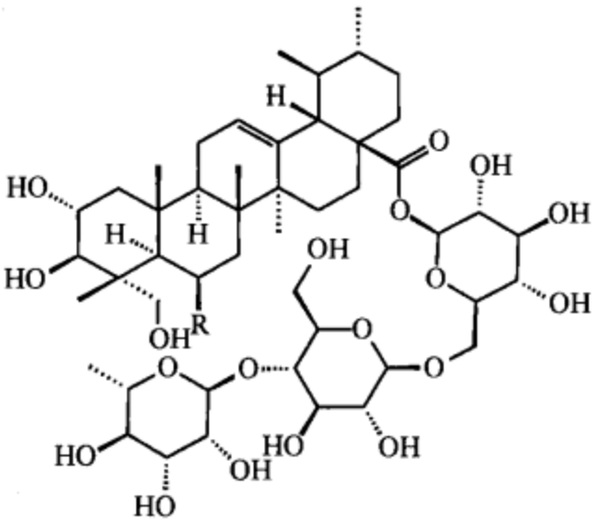
20-28 柴胡皂苷 c

缩正丁醇萃取液，向浓缩液中加入丙酮，摇匀，离心，取上清液浓缩，得干燥粉末。将该干燥粉末用 5 mL 甲醇溶解，过滤，用制备 HPLC 分离（ODS-2 色谱柱，10 mm×250 mm），乙腈-水梯度洗脱，流速为 3 mL·min^{-1}，进样量为 300 μL，得柴胡皂苷 a、c 和 d。进一步检测 3 种柴胡皂苷单体的纯度，分别为 96.8%、94.3% 和 97.2%。该方法简化了传统有机溶剂萃取后，再经 Al_2O_3 或者 HP-20 树脂的纯化工艺，且用该方法分离得到的单体纯度和收率都较高。

20.4.7 积雪草皂苷

积雪草是伞形科植物 *Centella asiatica*（L.）urban 的干燥全草，广泛分布于我

国华南、华北、中南及西南地区。据《神农本草经》记载，积雪草性苦、辛、寒，具有清热利湿，解毒消肿的功效，民间常用其治疗湿热黄疸、中暑腹泻、砂淋血淋、痈肿疮毒及跌扑损伤，外用及内服治病已有 2000 多年历史，现多被用于美容保健、减肥、抗菌、调节免疫功能和抗溃疡等方面。积雪草的主要成分为积雪草苷(asiaticoside，**20-29**)和羟基积雪草苷(madecassoside，**20-30**)。



20-29 积雪草苷 R=H

20-30 羟基积雪草苷 R=OH

何等[38]将 14 kg 积雪草干燥全草粉碎后用工业酒精回流提取，提取液经活性炭脱色，浓缩成浸膏。浸膏加水分成水溶和水不溶两部分。水溶部分经大孔树脂精制，依次用 30%、50%和 90%乙醇洗脱，30%洗脱部分浓缩，经甲醇重结晶，即得积雪草苷。

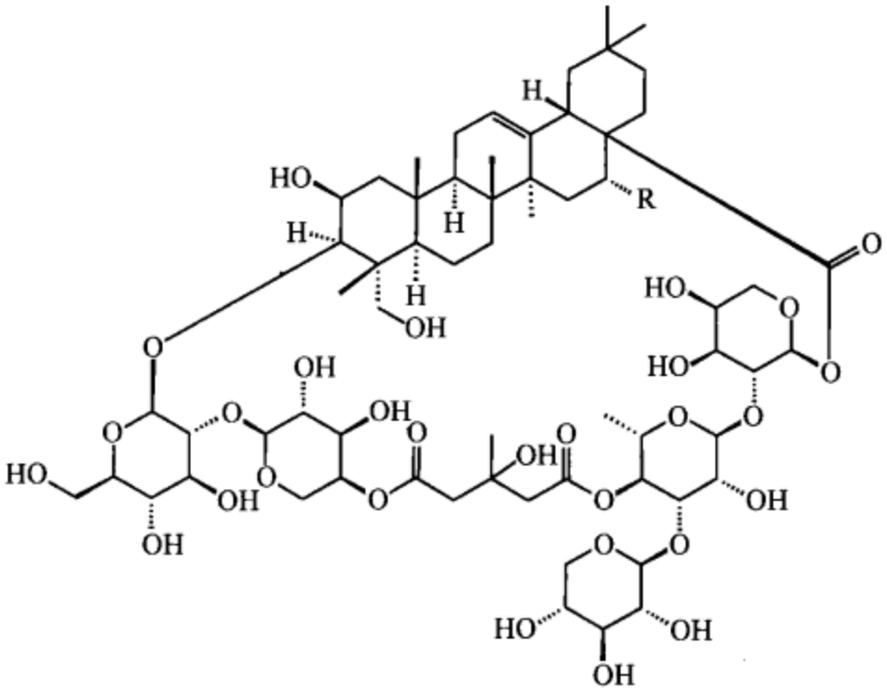
Du 等[39]利用 HSCCC 法成功从 600 mg 积雪草提取物中分离得到积雪草酸(18 mg)，羟基积雪草酸(13 mg)，积雪草苷(140 mg)和羟基积雪草苷(75 mg)。分离过程中以正己烷-正丁醇-0.05 mol·L^{-1} NaOH(5∶1∶6，v/v) 的下相为固定相，上相为流动相，流动相逐渐变为正己烷-正丁醇(0.05 mol·L^{-1} NaOH 饱和) 1∶1，1∶2 和 1∶4。

20.4.8 土贝母皂苷

土贝母[*Bolbostemma paniculatum*(Maxim.) Franquet]别名假贝母、地苦胆、草贝等，为葫芦科土贝母属植物，以鳞茎入药，具有清热解毒、消肿散结的功效，主治乳痈、瘰疬痰咳、疮疡肿毒、疣赘、蛇虫咬伤。皂苷类化合物是土贝母中含量较高的成分，也是主要的活性成分。

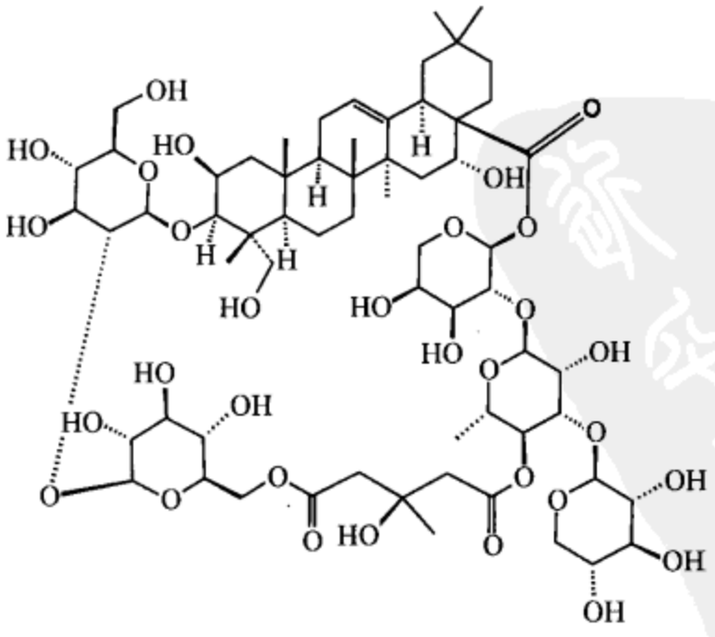
20 世纪 80 年代初，中国科学院上海药物研究所徐任生教授课题组[40~42]对陕西西安产土贝母的化学成分进行了研究，从中分离得到土贝母苷甲、乙、丙、丁和戊(tubeimoside Ⅰ **20-31**，Ⅱ **20-32**，Ⅲ **20-33**，Ⅳ **20-34**，Ⅴ **20-35**)。具体分离过程如

下：将土贝母皂苷 10 kg 用 75%乙醇浸取 3 次，合并浸取液，减压蒸去乙醇。浓缩液依次用氯仿、正丁醇萃取 3 次。正丁醇提取液减压浓缩至小体积，放置即析出总皂苷。总皂苷经硅胶 H 低压柱色谱分离得到 A、B 两组分。A 组分用甲醇重结晶得土贝母苷甲。B 组分经半制备 HPLC 分离，得到土贝母苷乙和土贝母苷丙。正丁醇母液部分浓缩，经硅胶柱(200～300 目)色谱分离，氯仿-甲醇-水(10∶3.5∶0.5)洗脱，收集极性小于苷甲的流分，用 RP-18 预装柱分离，得土贝母苷丁和土贝母苷戊。

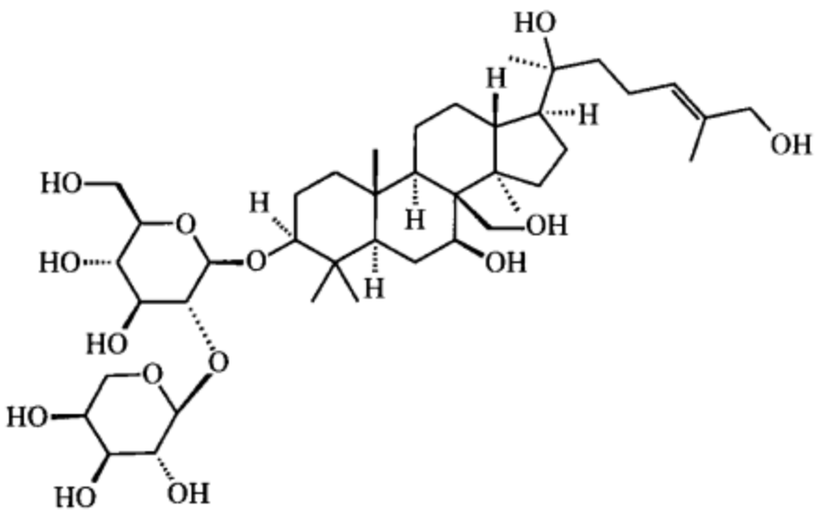


20-31 土贝母苷甲 R=H

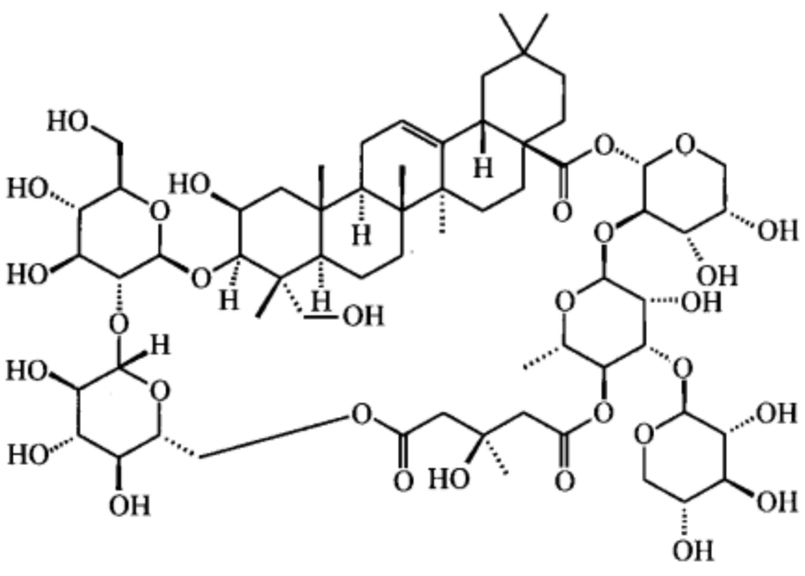
20-32 土贝母苷乙 R=OH



20-33 土贝母苷丙



20-34 土贝母苷丁



20-35 土贝母苷戊

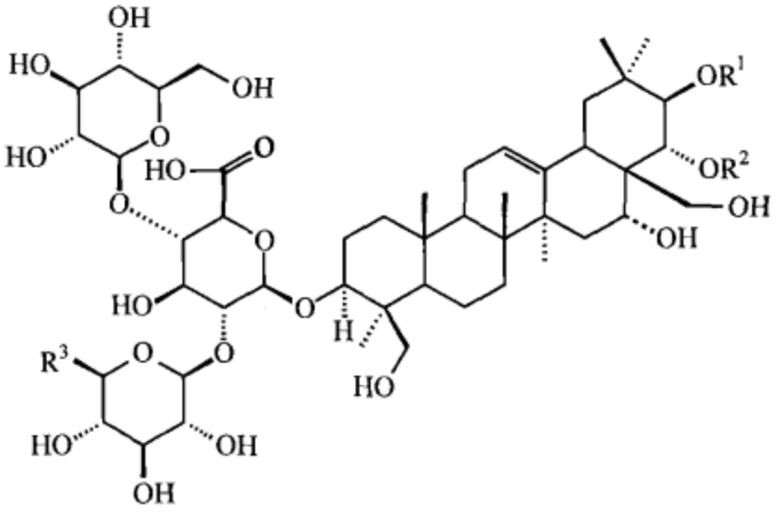
土贝母苷甲、乙、丙和戊是一类环状双糖链苷，其特征是一个五环三萜酸的 3 位羟基和 28 位羧基都连有糖链，两个糖链分别与 3-羟基-3-甲基戊二酸的两个羧基成酯形成环状结构。其中土贝母苷甲含量达 1.9%，具有抗肿瘤、抗病毒等多种药理活性[43]。

汤等[44]也曾报道取土贝母药材 1.8 kg 粉碎，用 95%乙醇回流提取 3 次，减压蒸干得浸膏 280 g。浸膏经石油醚脱脂后用正丁醇萃取。正丁醇提取液减压蒸干得粗皂苷 31 g。粗皂苷经快速硅胶柱色谱（氯仿-水饱和正丁醇-甲醇梯度洗脱，1∶1∶0 下层→0∶1∶0→0∶20∶1→0∶6∶1）分离，得 9 个组分。活性跟踪显示组分 6 和 7 对稻瘟霉有生长抑制活性。组分 7（3.0 g）经反复低压硅胶柱色谱分离，氯仿-甲醇-水梯度洗脱得土贝母苷丙（462.6 mg）；组分 6（4.1 g）依次经 Sephadex LH-20 柱过滤（甲醇∶水＝2∶1）和反相硅胶柱色谱（甲醇∶水＝3∶2）分离得

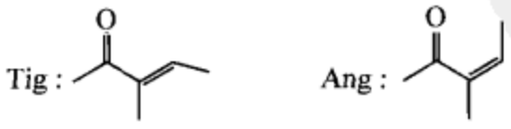
土贝母苷乙(208.4 mg)、土贝母苷丙(102.8 mg)和一个混合组分(2.3 g),该混合组分经RP-HPLC制备(流动相:65% 甲醇,流速:1.9 mL·min^{-1}),得到土贝母苷甲(550 mg)和土贝母苷戊(17.2 mg,**20-35**)。

20.4.9 七叶皂苷

七叶皂苷(escin或aescin)是从七叶树(*Aesculus chinensis* Bge.)、浙江七叶树(*Aesculus chinensis* var. *chekiangensis* Fang)或天师栗(*Aesculus wilsonii* Rehd.)的果实或种子(娑罗子,aesculi)中提取得到的多种五环三萜皂苷的混合物。七叶皂苷主要存在形式为α-七叶皂苷(异七叶皂苷)和β-七叶皂苷。当β-七叶皂苷的水溶液加热到100 ℃时,结构中21位或22位羟基的乙酰基迁移至28位羟基,而转化成α-七叶皂苷。β-七叶皂苷为主要的活性异构体,其制备成钠盐后,水溶性增加,便于临床应用,其抗炎、抗渗出、消肿胀、改善微循环的作用明显,临床用途极其广泛。从娑罗子中分离得到的部分皂苷结构(**20-36**～**20-47**)如下:

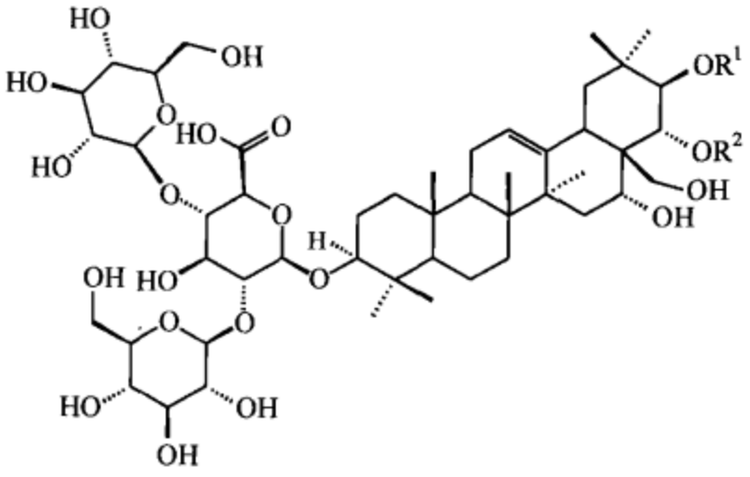


		R^1	R^2	R^3
20-36	七叶皂苷Ia	Tig	Ac	CH_2OH
20-37	七叶皂苷Ib	Ang	Ac	CH_2OH
20-38	七叶皂苷Ⅱa	Tig	Ac	H
20-39	七叶皂苷Ⅱb	Ang	Ac	H

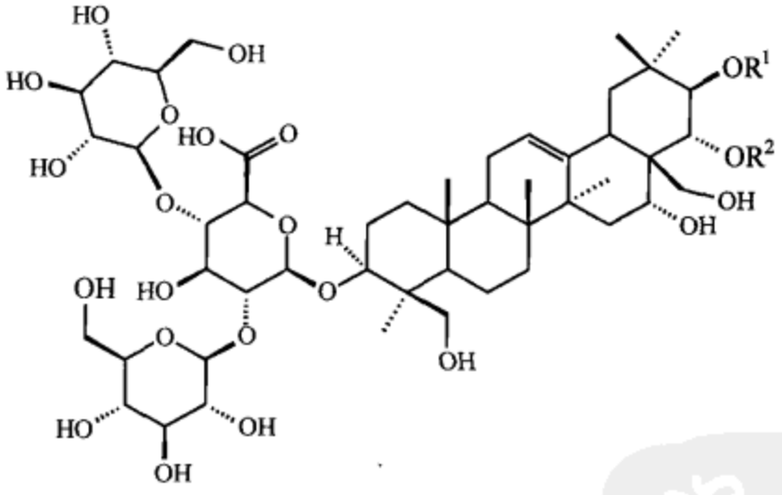


湛等[45]建立了用制备型高效液相色谱从β-七叶皂苷钠原料中分离纯化七叶皂苷Ia和Ib的方法,所采用的是Waters HRC18型制备色谱柱,流动相为乙腈-1%乙酸(28∶72),流速为42 mL·min^{-1},检测波长为220 nm。经HPLC检查,

所得单体化合物纯度达 98.0%以上。该方法可靠、准确，适合于七叶皂苷 Ⅰa 和七叶皂苷 Ⅰb 的制备分离。

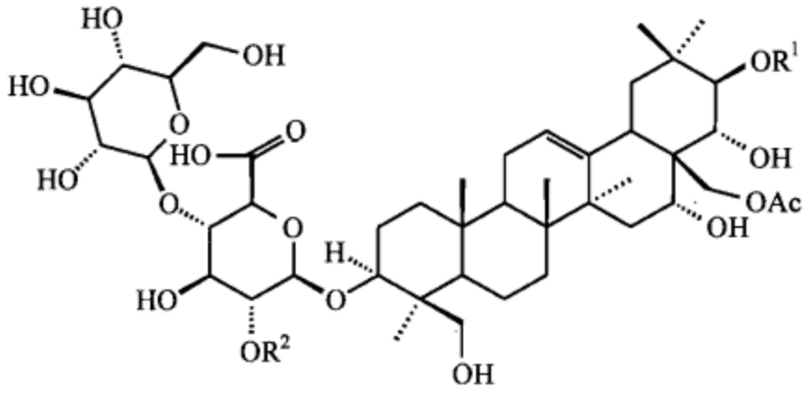


		R^1	R^2
20-40	七叶皂苷 Ⅲa	Tig	Ac
20-41	七叶皂苷 Ⅲb	Ang	Ac



		R^1	R^2
20-42	七叶皂苷 Ⅴ	$COCH(CH_3)_2$	Ac
20-43	七叶皂苷 Ⅵ	$COCH(CH_3)CH_2CH_3$	Ac

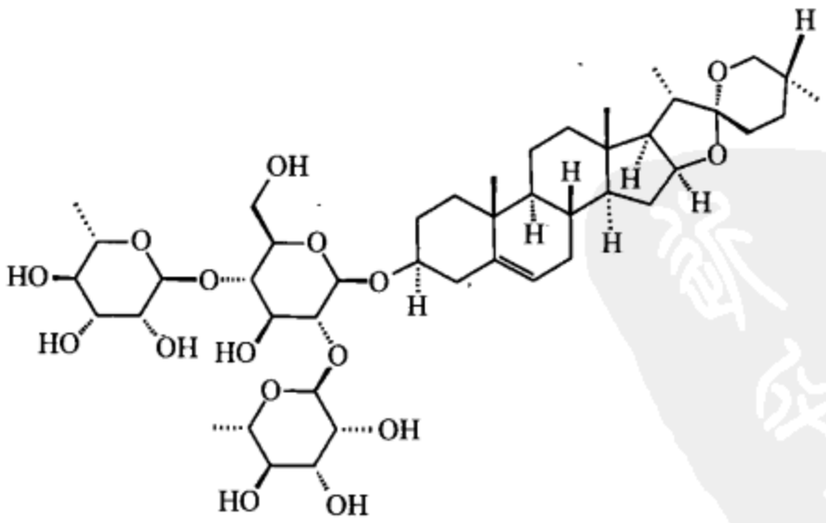
赵等[46]取日本七叶树种子粗粉 3.0 kg，用 3 倍量 70%乙醇回流提取 3 次，每次 2 h。减压浓缩后，依次用乙酸乙酯和正丁醇萃取，正丁醇萃取液浓缩后得 454.3 g 浸膏。取正丁醇浸膏 450 g 经 D101 大孔吸附树脂分离，依次用水、20%乙醇、40%乙醇和 95%乙醇洗脱。将 40%乙醇解吸物 19.1 g 溶于甲醇，配制成 100 mg·mL^{-1}浓度，进行 HPLC 制备分离，分别得七叶皂苷 Ⅰa 3.2 g 和七叶皂苷 Ⅰb 1.6 g。



		R^1	R^2
20-44	异七叶皂苷 Ia	Tig	Glc
20-45	异七叶皂苷 Ib	Ang	Glc
20-46	异七叶皂苷 IIa	Tig	Xyl
20-47	异七叶皂苷 IIb	Ang	Xyl

20.4.10 薯蓣皂苷

薯蓣皂苷(dioscin,**20-48**)系从薯蓣科薯蓣属植物穿龙薯蓣(*Dioscorea nipponica* Makino)、盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis*)或黄山药(*Dioscorea panthaica* Prain et Burkill)等植物根茎中提取得到的一种甾体皂苷。薯蓣皂苷及其衍生物具有多种药理活性,是一些中药的主要活性成分,也是合成甾体激素类药物的重要原料。



20-48 薯蓣皂苷

薯蓣皂苷在一些植物中的含量很高。将薯蓣根粉用甲醇回流提取 3 次,每次 3 h,合并提取液,减压浓缩后残留物加水溶解,水液用石油醚脱脂,水饱和正丁醇

提取，提取液减压浓缩，向浓缩液中加入大量丙酮，析出沉淀，过滤沉淀，用水洗涤数次，然后用甲醇重结晶 2 次，即得薯蓣皂苷[47]。

胡等[48]报道将 1 kg 穿山龙在 50 ℃用 95%乙醇浸泡 6 h，浸泡液用纱布和滤纸过滤，再用 3 倍的去离子水稀释蒸馏后所得的穿山龙溶液，过夜沉淀。将上清液弃掉，离心后取沉淀，用 95%乙醇将沉淀溶解，蒸干得到穿山龙总皂苷 24.3 g。取总皂苷 20 g，经硅胶柱色谱分离，氯仿-甲醇(9∶1)洗脱，得薯蓣皂苷单体 3.9282 g，得率为 19.6%。利用高效液相色谱进行纯度测定，得到薯蓣皂苷单体的纯度超过 90%。

参 考 文 献

[1] 舒孝顺，吕金海，高中兴等. 均匀设计法优选薤白总皂苷的超声提取工艺. 中草药，2006，37(4)：550～551.

[2] 陈瑞战，张守勤，王长征等. 超高压提取西洋参皂苷的工艺研究. 农业工程学报，2005，21(5)：150～154.

[3] 刘中秋，蔡雄，赖小平等. 大孔吸附树脂富集纯化冬青总皂苷工艺研究. 中国实验方剂学杂志，2001，7(3)：4～6.

[4] 蔡雄，刘中秋，王培训等. 大孔吸附树脂富集纯化人参总皂苷工艺. 中成药，2001，23(9)：631～634.

[5] 梁少玲，蔡宇，杨燕霞等. 大孔树脂吸附在黄酮及皂苷类成分分离纯化中的应用. 时珍国医国药，2006，17(2)：277～278.

[6] 庄文选，孙莉华，蒋晓琴. 人参与西洋参的临床应用比较. 时珍国医国药，2003，14(8)：486.

[7] Suda K，Murakami K，Hasegawa H et al. An intestinal bacterial metabolite(M1) of ginseng protopanaradiol saponins inhibits tumor induced neovascularization. J Trad Med，2000，17：144～150.

[8] Hasegawa H，Uchiyama M. Application of the microware-assisted process(MAP™) to the fast extraction of ginseng saponins. Planta Med，1998，64：696～700.

[9] Suba K，Murakami K，Hasegawa H et al. Induction of apoptosis in Lewis lung carcinoma cells by an intestinal bacterial metabolite resulted from orally administered ginseng protopanaxadiol saponina. J Trad Med，2000，17：236～244.

[10] Popovich D G，Kitts D D. Generation of ginsenosides Rg_3 and Rh_2 from North American ginseng. Phytochemistry，2004，65(3)：337～344.

[11] Liu W K，Xu S X，Che C T. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. Life Sci，2000，67(11)：1297～1306.

[12] Liu Z Q，Luo X Y et al. Can ginsenosides protect human erythrocytes against free-radical-induced hemolysis? Biochim Biophy Acta，2002，1572(1)：58～66.

[13] Popovich D G，Kitts D D. Structure-function relationship exists for ginsenosides in reducing cell proliferation and inducing apoptosis in the human leukemia(THP-1) cell line. Arch Biochem Biophys，2002，406(1)：1～8.

[14] 高彩霞，王成章. 人参皂苷的提取和精制工艺研究. 林产化工通讯，2005，39(5)：5～8.

[15] Kwon J H. Amorphous foods and pharmaceutical systems. Food Res Int，2003，36(5)：491～498.

[16] 李洪刚，杨义，何克江等. 分组和单体人参皂苷的批量制备. 首都医药，2004，11(14)：52～53.

[17] 窦德强，陶佳颐，付丈卫等. HSCCC 法从人参总皂苷中分离制备人参皂苷 Re 与 Rg_1. 中药研究与信息，2005，7(2)：15～16.

[18] Ha Y W, Limb S S, Ha I J et al. Preparative isolation of four ginsenosides from Korean red ginseng (steam-treated *Panax ginseng* C. A. Meyer), by high-speed counter-current chromatography coupled with evaporative light scattering detection. J Chromatogr A, 2007, 1151: 37～44.

[19] 王箭，袁崇均，陈帅等. 从西洋参中提取分离纯化人参皂苷 Rb_1 和人参皂苷 Re 的研究. 天然产物研究与开发，2008，20(2)：357～359.

[20] Paik N H, Park M K, Choi K J et al. Isolation of ginsenosides Rb_1, Rb_2, Rc, Rd, Re, Rf and Rg_1 from Ginseng root by high performance liquid chromatography. Arch Pharm Res, 1982, 5(1): 7～12.

[21] 杨志刚，陈阿琴，俞颂东. 三七药理研究新进展. 上海中医药杂志，2005，39(4)：59～62.

[22] 周家明，马妮，曾鸿超等. 从三七根、茎中快速批量分离提取三七皂苷 R_1、R_2 及人参皂苷 Rg_1 有效部位群的方法. 特产研究，2010，1：43～45.

[23] Du Q Z, Jerz G, Waibel R et al. Isolation of dammarane saponins from *Panax notoginseng* by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A, 2003, 1008: 173～180.

[24] 董阿玲，郑俊华，果德安等. 从三七中分离微量成分三七皂苷 R_2 的方法. 中国中药杂志，2002，27(10)：793～794.

[25] 沈宏伟，肖彦春，车仁国等. 绞股蓝化学成分的研究现状，安徽农业科学，2008，36(4)：1332～1336.

[26] 曹宪明，李教社，祝忠民. 绞股蓝总皂甙提取工艺的研究. 西安医科大学学报，1993，14(3)：277～279.

[27] 刘欣，叶文才，萧文鸾等. 绞股蓝的化学成分研究. 中国药科大学学报，2003，34(1)：21～23.

[28] 杨旭. 国外医学中医中药分册，甘草皂苷的药理研究. 1987，9(5)：54～56.

[29] 吴少杰，杨志娟，朱丽华等. 甘草皂苷的生物转化研究. 中草药，2003，34(6)：516～518.

[30] 贺小贤，陈合. 甘草提取工艺研究. 陕西科技大学学报，2004，22(6)：26～29.

[31] 李跃辉，李超，杨永华等. 大孔吸附树脂纯化甘草总皂苷. 中国医药学杂志，2008，28(24)：2097～2100.

[32] Jiang Y, Lu H T, Chen F. Preprarative purification of galcyrrhizin extracted from the root of liquorice using high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A, 2004, 1033: 183～186.

[33] 姜波，王宝秋，谢家全等. 黄芪皂苷类有效成分提取分离技术. 中医药信息，2009，26(2)：31～32.

[34] 李继红，李永吉，李秋红等. 黄芪化学成分的研究. 黑龙江医药，2004，17(2)：97～99.

[35] 肖丽丽，吴晓倩等. 黄芪皂苷生物转化物质的提取分离. 大连轻工业学院学报，2006，25(2)：86～88.

[36] 宋海梅，苏小凤，李楠等. 柴胡皂苷的提取与鉴定. 大连轻工业学院学报，2005，24(1)：15～18.

[37] Kim N, Park L S. Purification of saponin compounds in *Bupleurum falcatum* by solvent partitioning and preparative LC. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(7): 1648～1651.

[38] 何明芳，孟正术，沃联群. 积雪草化学成分的研究. 中国药科大学学报，2000，81(2)：91～93.

[39] Du Q Z, Jerz G, Chen P et al. Preparation of ursane triterpenoids from *Centella asiatica* using high speed countercurrent chromatography with step-gradient elution. J Liq Chromatogr Related Technol, 2004, 27(14): 2201～2215.

[40] Kong F H, Zhu D Y, Xu R S et al. Structural study of tubeimoside Ⅰ, a constituent of Tu-bei-mu. Tetrahedron Lett, 1986, 27(47): 5765～5768.

[41] 孔凡华，朱大元，徐任生. 土贝母化学成分的研究Ⅳ：土贝母苷乙，丙，丁的结构. 化学学报，1988，46(4)：409～411.

[42] 孔凡华，朱大元，徐任生. 土贝母化学成分的研究Ⅲ：土贝母甲的结构. 化学学报，1988，46(8)：772～778.

[43] 于立坚，马润娣，于廷曦. 土贝母苷甲和苷乙的抗肿瘤作用. 中国新药杂志，2002，11(9)：692～694.

[44] 汤海峰，易杨华，李玲，孙鹏，王忠壮，赵越平. 土贝母中1个活性皂苷的分离和鉴定. 药学服务与研究，

2005,5(3):216～223.

[45] 湛建峰,牛剑钊,张启明等. 七叶皂苷 A、B 的制备液相色谱法分离和结构确证. 中国药事,2009,23(12):1184～1186.

[46] 赵静,杨秀伟. 日本七叶树化学成分的研究Ⅰ. 七叶皂苷 Ⅰa 和 Ⅰb 的分离鉴定. 中草药,1999,30(5):327～332.

[47] 上海药物研究所. 中药有效成分提取分离. 上海:上海人民出版社,1972,229～230.

[48] 胡湘春,鱼红闪,金凤燮. 穿山龙薯蓣皂苷的分离纯化. 大连轻工业学院学报,2004,23(1):25～29.

(王红敏　赵维民)

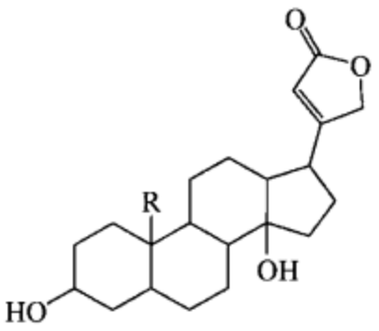
第21章　强　心　苷

强心苷是存在于植物中的具有强心作用的甾体配糖体。目前我国临床上常用的有西地兰(cedilanid,去乙酰基毛花洋地黄苷丙)、狄戈辛(digoxin,异羟基洋地黄毒苷)、洋地黄毒苷(digitoxin)、黄夹桃苷(强心灵)、铃兰毒苷(convallatoxin)及毒毛旋花子苷K(K-strophanthin)等。强心苷在中草药中分布不多,主要在玄参科、夹竹桃科和百合科植物的果、叶或根中。如毛花及紫花洋地黄叶、夹竹桃果、铃兰草、羊角拗种子及万年青根等。同一植物中往往含有几个或几十个结构类似而且理化性质很近似的苷。

21.1　强心苷的性质与鉴别

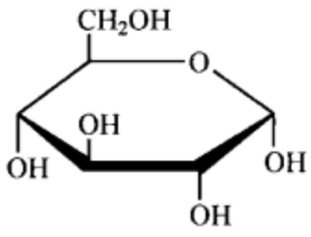
强心苷都是中性化合物,大部分为结晶,味苦,一般有旋光性(左旋),能溶于乙醇、甲醇或水,难溶于氯仿、醚、苯等极性小的溶剂中。苷易被无机酸水解成苷元与糖原两部分。酶也能水解掉一部分糖。苷元比苷的极性要小,较易溶于氯仿、乙酸乙酯等有机溶剂中,一般含糖部分越多的苷在极性溶剂中的溶解度越大。强心苷的苷元均为甾体结构(**21-1**),通常带五元(少数为六元)内酯环的侧链。这些苷元都和几个糖分子结合成苷[一般和甾体3位的羟基(C3-OH)结合],最多的有四个糖,除常见的葡萄糖(glucose,**21-2**)、鼠李糖(rhamnose,**21-3**)及黄夹糖(thevetose,**21-4**)外,大部分为α-去氧糖,如洋地黄毒糖(digitoxose,**21-5**)、夹竹桃糖(oleandrose,**21-6**)及沙门糖(sarmentose,**21-7**)等。毛花或紫花洋地黄中的苷都有四个糖(三个洋地黄毒糖和一个葡萄糖),这是植物中的原生苷,即在植物中天然存在的配糖体。由于植物中有酶存在,在干燥、储存或提取过程中,原生苷有时被酶水解掉一个糖(一般为末位葡萄糖)而生成次生苷。例如,紫花洋地黄的原生苷甲被酶解掉一个葡萄糖而生成相应的次生苷——洋地黄毒苷(digitoxin)。

强心苷的鉴别:生药粉末用稀乙醇热提后,过滤,提取液浓缩至少量后供试验。将试样滴在滤纸上,滴加Kedde试剂(附录)显红棕色为阳性反应,证明为含α,β-不饱和内酯环强心苷。

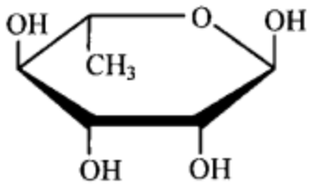


R=CH_3、CHO或CH_2OH

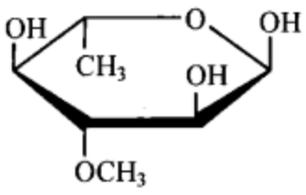
21-1



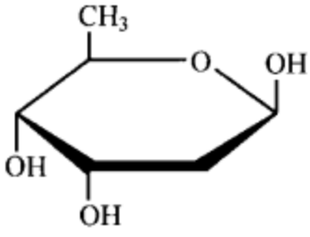
21-2



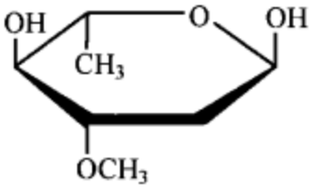
21-3



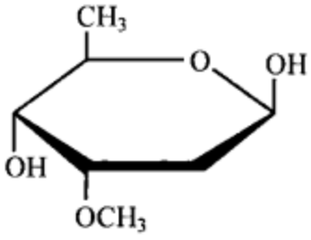
21-4



21-5



21-6



21-7

21.2 强心苷的提取和分离[1,2]

从植物中分离提纯强心苷是比较复杂与困难的工作，因为它在植物中的含量一般都比较低(1%以下)；又常常与性质相类似的皂苷等混杂在一起，如洋地黄叶中含洋地黄皂苷(digitonin)。而且同一植物又常含几个或几十个性质近似的强心苷；每一个苷又有原生苷、次生苷与苷元的区别，这些都增加了分离提纯工作的难度。所以用一般分离方法常常要通过多次反复处理才能分得纯品。例如，研究得最早的紫花洋地黄，从 1808 年开始到 1933 年才摸到一些规律，第一次用溶剂分配分离法分到了原生苷紫花洋地黄苷甲、乙两种。而在此以前分到的不是苷的混合物就是次生苷，甚至是苷元。目前使用硅胶柱分配色谱等方法可以比较容易地分离到单一纯品。

21.2.1 原生苷的提取

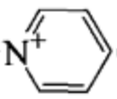
前面已经提到，由于植物中的酶容易水解原生苷，因此提取原生苷时首先要抑

制酶的作用。一般可用乙醇破坏酶的活力或用硫酸铵等无机盐盐析使酶沉淀除去。原料最好用新鲜植物经低温(60 ℃以下)烘干或晒干。将生药粉末在低温下与等量硫酸铵调成糊状后装入布袋,压汁,渣中的原生苷用乙酸乙酯或氯仿等溶剂提取。或者生药粉末直接用稀乙醇(最好80%左右)加热提取。上述乙酸乙酯、氯仿提取液或醇提取液减压浓缩后,加水,过滤,滤液进一步用下述几种方法提纯。

(1) 铅盐法:滤液先用乙醚等极性小的溶剂提去其中叶绿素和油脂等杂质,然后加饱和乙酸铅水溶液至不再产生沉淀为止。过滤,滤液加适量乙醇使成50%的浓度,按常法用饱和硫酸钠水溶液、稀硫酸或通硫化氢脱铅。过滤,滤液浓缩至小体积后即析出总苷。实验室小量试验时,可用新鲜配制的氢氧化铅混悬液,这样滤液中剩余的铅离子很少,也不像使用乙酸铅时,滤液脱铅后有过量的乙酸,有时滤液不经脱铅处理,浓缩至小体积也能得总苷。

(2) 吸附法:滤液用新煅烧的氧化镁或活性炭吸附,再用甲醇或其他适当溶剂解析,浓缩即得总苷。有时先用铅盐法或溶剂法处理后,再用吸附剂吸附纯化。

(3) 溶剂法:滤液用氯仿等极性小的溶剂洗涤以除去脂溶性杂质(原生苷极性较大,一般不转入氯仿层),然后加乙醇使成20%左右浓度,再加氯仿或乙酸乙酯提取,蒸干提取液即得总苷。

(4) 化学方法:一些含醛基的强心苷,如铃兰苷、羊角拗苷等和 Girard 试剂 T [$NH_2NHCOCH_2N^+(CH_3)_3Cl^-$]或 Girard 试剂 P($NH_2NHCOCH_2$—  Cl^-),加热片刻,使结成水溶性的腙,水液用氯仿等溶剂洗涤,以去除不含醛基的杂质,再加酸至酸性,腙即水解,含醛基强心苷成沉淀析出。或者用氯仿等溶剂提取,蒸去溶剂即得总苷。

21.2.2 次生苷的提取

一些次生苷的药理作用与原生苷相仿,如狄戈辛和西地兰。次生苷的提取远比原生苷简便,也无需顾虑植物储存中的酶解破坏作用。通常先利用植物中的酶自行水解后再进行提取。即将生药粉末加等量水拌匀湿润后,在30～40 ℃保持6～12 h以上,进行发酵酶解,然后用乙酸乙酯或乙醇等按上述提取原生苷方法提取和纯化,即得次生苷。也可先提取原生苷再进行酶解,即将原生苷单体或总苷的水溶液加原植物中分离出来的酶(一般为原植物用水低温浸泡的提取液)或其他来源性质相同的酶,如能酶解 β-D-葡萄糖苷的苦杏仁酶(emulsin)在30～40 ℃保持6～12 h以上,使酶解完全后用有机溶剂提取,即得相应的次生苷。

如果供提取的原料是种子,则在种子磨碎后先压榨去油,再用石油醚脱脂,然后用上述方法提取。

苦杏仁酶的制备:取苦杏仁种子100 g,捣碎后用乙醚浸泡2次(每次约

100 mL)去除油脂，倾去乙醚，将苦杏仁子晾干，去皮。加 0.1 mol · L^{-1} 氨水 250 mL及 150 mL 水浸泡过夜。次日，用纱布过滤。滤渣再用上述氨水溶液 2/3 量浸提一次，两次浸提液合并，加乙酸至 pH 4，滤去析出的蛋白质沉淀，滤液加乙醇 200 mL，滤去析出的沉淀。于滤液内再加 4 倍量乙醇，放置冰箱，次日滤取析出的苦杏仁酶沉淀，乙醇洗一次后即置干燥器中干燥，备用(约可得 500 mg)。

酶解：取试样 100 mg，加 40 mg 苦杏仁酶及 10～20 mL 水溶解后室温放置(或 27 ℃左右)48 h，时时振摇，配合薄层色谱检查，至水解完全后用氯仿等溶剂提取苷元，蒸去氯仿可得苷元。水液可用以析出葡萄糖。

21.2.3 强心苷的分离和纯化

上述方法所得总苷，一般应先选择适当溶剂进行多次分步结晶以分离纯品，如狄戈辛的纯化；或反复用分配分离法，即利用混合苷中各单体在两相溶剂中分配系数不同而进行分离。

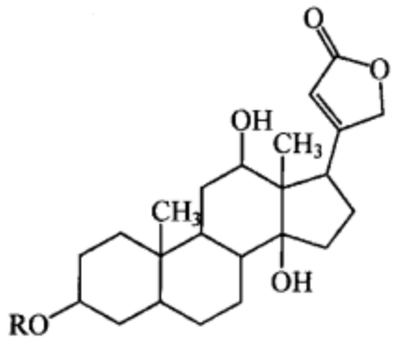
实验室小量制备时可用色谱方法分离，常用硅胶吸附色谱和分配色谱或氧化铝吸附色谱。但由于强心苷一般极性较大，氧化铝吸附色谱用得较少。

分到的纯品需经薄层色谱(常用硅胶 G 板)鉴别纯度。

21.3 强心苷的提取分离实例

21.3.1 毛花洋地黄中的西地兰和狄戈辛

西地兰和狄戈辛(**21-8**)都是从玄参科植物毛花洋地黄(*Digitalis lanata* Ehrh.)叶中提出来的。西地兰是其中一个原生苷——毛花洋地黄苷丙的脱乙酰基化合物。熔点 265～268 ℃(分解)。$[\alpha]_D$ +12(75%乙醇)，溶于甲醇，微溶于乙醇和水，不溶于氯仿、乙醚。



21-8

毛花洋地黄苷丙(lanatoside C)

R＝葡萄糖基(1→4)3-乙酰洋地黄毒糖基(1→4)洋地黄毒糖基(1→4)洋地黄毒糖基

西地兰(去乙酰基毛花洋地黄苷丙)

R＝葡萄糖基(1→4)洋地黄毒糖基(1→4)洋地黄毒糖基(1→4)洋地黄毒糖基

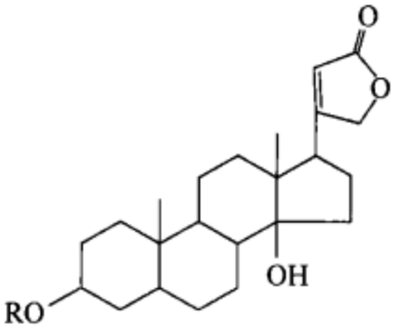
狄戈辛(异羟基洋地黄毒苷)

R＝洋地黄毒糖基(1→4)洋地黄毒糖基(1→4)洋地黄毒糖基

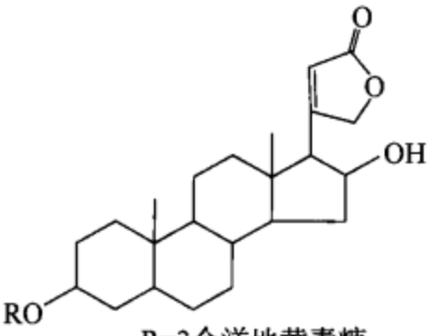
而狄戈辛是由去乙酰基毛花洋地黄苷丙酶解掉末位葡萄糖而成的一个次生

苷。熔点 265 ℃(分解),可溶于稀乙醇、吡啶及氯仿-乙醇混合液,不溶于氯仿、丙酮。

人们最早是用紫花洋地黄(*Digitalis purpurea* L.)的叶作强心药物的。化学研究证明,其中含 20 多个强心苷,主要是紫花强心苷甲、乙两种,它们的糖原部分相同(3 个洋地黄毒糖和 1 个葡萄糖),苷元部分结构也很相似,仅苷乙比苷甲多一个羟基。它们经酶解掉末位葡萄糖后分别得洋地黄毒苷(digitoxin,**21-9**)和羟基洋地黄毒苷(gitoxin,**21-10**)。临床上常用洋地黄毒苷治疗心肌衰竭等心脏病。后来人们发现同属植物毛花洋地黄叶的强心作用比紫花的要强 3～4 倍,并且作用快,排泄快,因而很快得到推广应用,逐渐取代了紫花洋地黄的地位。随着化学研究的深入,人们发现毛花洋地黄中也有 20 多个强心苷,但是主要是甲、乙、丙三种苷。而苷甲、苷乙与紫花洋地黄苷甲、苷乙相比较,仅在糖原部分第三个洋地黄毒糖中多一个乙酰基,其余部分完全相同,这种乙酰基很容易被碱液在室温下脱去。



21-9



R=3个洋地黄毒糖

21-10

毛花洋地黄苷丙是毛花洋地黄中所特有的成分,也是主要的有效成分。它的糖原部分与甲、乙两苷相同,苷元结构也近似,仅羟基位置不同。其脱乙酰基化合物称西地兰,因稳定性与溶解度都比苷丙大,所以临床上用得较多。西地兰酶解产物称狄戈辛,也称异羟基洋地黄毒乙醇。毛花洋地黄苷丙、西地兰、狄戈辛都用于治疗急、慢性充血性心力衰竭、心房纤维颤动等病症。临床上常用西地兰针剂作急救用,狄戈辛则制成片剂作治疗药用。

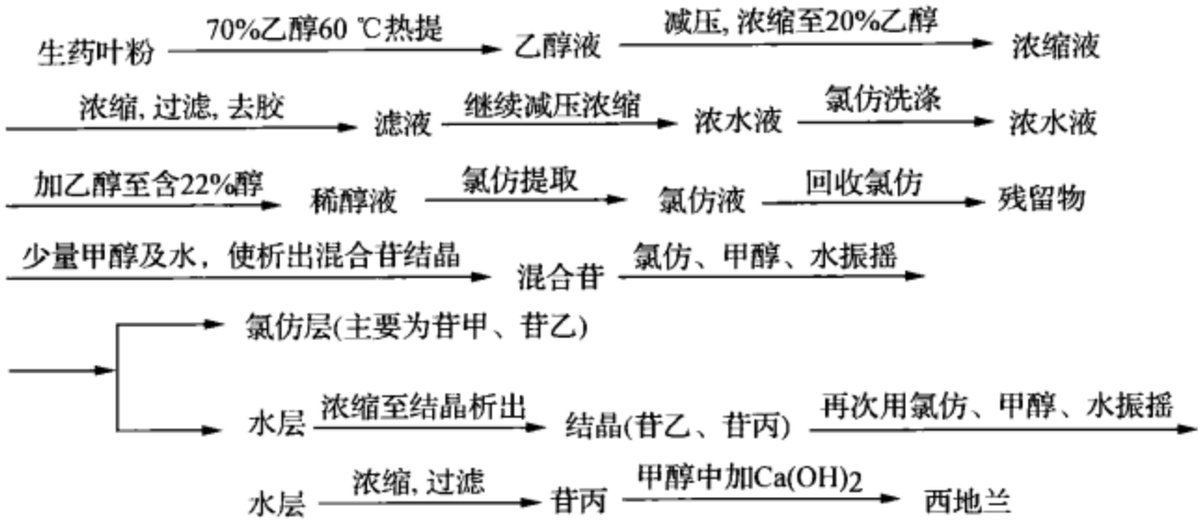
提取方法:工业上多用乙醇法提取西地兰和狄戈辛。提取液中的杂质分别经过氯仿及苛性钠碱液处理去除,再进一步分离纯品。原生苷总苷用分配分离法分离苷丙,因为甲、乙、丙等苷在稀醇液和氯仿中的分配系数不同,而苷丙最难溶于氯仿,分得的苷丙用氢氧化钙脱乙酰基即得西地兰。

次生苷总苷则直接用分步结晶法,利用 3 种次生苷在 80%乙醇中的溶解度不同(洋地黄毒苷易溶,狄戈辛次之,羟基洋地黄毒苷难溶)而分得狄戈辛。分子中的乙酰基是在提取总苷过程中用氢氧化钠碱液处理时脱去的。

西地兰、狄戈辛都可用硅胶柱分配色谱提纯。下面介绍的是我们过去在工厂实践过的方法,供参考。

21.3.1.1 西地兰的提取

西地兰的提取流程如下所示：



操作：生药叶粉加 5 倍量 70%乙醇于 60 ℃搅拌加热 2 h，过滤，滤渣再用 3 倍量 70%乙醇提取 2 次，提取液合并，减压浓缩到含醇量为 15%～20%，冷却，布袋过滤，滤液减压浓缩到相当生药量为止，用 1/3 量氯仿洗涤一次，水液加乙醇使含醇量为 22%左右，氯仿提取 3 次，每次氯仿用量均为稀醇液的 1/3，提取液合并，减压蒸干至残留物为疏松状。加入少量甲醇及水(10 g 总苷加 3～5 mL 甲醇及 0.25 mL水)，使析出甲、乙、丙混合苷结晶，加丙酮-乙醚(1∶1)混合液后过滤，洗涤，烘干。

纯化苷丙：按混合苷-甲醇-氯仿-水(1∶100∶500∶500)比例，使混合苷先溶于甲醇，过滤，滤液加氯仿与水振摇，静置分层，氯仿层主要含苷甲、苷乙，水层主要为苷乙、苷丙。取水层减压浓缩至少量，放冷，即析出乙、丙混合苷粉末，过滤后再按上述比例重复一次，所得的水层浓缩后即得苷丙。氯仿层中的苷甲、苷乙另行处理。

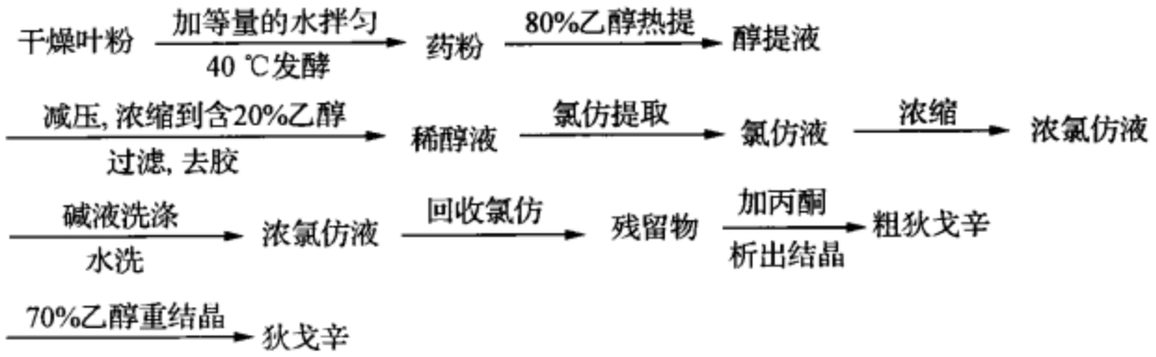
苷丙脱乙酰基：取苷丙 3 g，溶于 5 倍量甲醇，加等量新鲜配制的 0.15%氢氧化钙水溶液，室温放置过夜，次日如溶液 pH 为 7.0(否则加 1%HCl 调到中性)，即减压浓缩至少量，析出西地兰结晶，甲醇重结晶，熔点 265 ℃(分解)。

21.3.1.2 狄戈辛的提取

操作：干燥叶粉加等量水拌匀，保持 40～50 ℃发酵酶解 20 h 左右，每 2 h 翻动一次，然后分别用 4 倍及 3 倍量 80%乙醇回流搅拌提取 2 次，每次 2 h，冷却，过滤，滤液合并减压浓缩到约含 20%乙醇，放冷，析出叶绿素等胶质，用布袋滤取上层清液，滤液用氯仿提取 3 次，每次用量为水液的 1/5，合并氯仿液，浓缩到生药量

1/5 左右，用 10%NaOH 水液洗涤数次，每次为氯仿的 1/10，以脱去乙酰基，并去除残留叶绿素等杂质，至碱液基本无色为止。最后用 1%NaOH 溶液洗一次，再用水洗到中性，将氯仿液蒸干，所得残留物用少量丙酮溶解，静置过夜。析出的狄戈辛用 70%乙醇（并加少量活性炭脱色）重结晶 1～2 次，即得纯品。

狄戈辛的提取流程如下所示：



如用乙酸乙酯代替乙醇提取西地兰和狄戈辛，则所得产品较纯，纯化手续更简便，得率也较高，但是用乙醇经济，安全，所以常为工业采用。

参 考 文 献

[1] 徐任生，陈仲良. 中草药有效成分提取与分离. 第二版. 上海：上海科学技术出版社，1989：296～310.

[2] 孙文基. 天然药物成分提取分离与制备. 第三版. 北京：中国医药科技出版社，2006：129～134.

（徐任生）

第 22 章　核　　苷

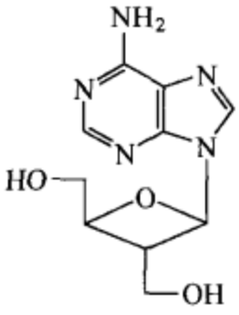
核苷是核酸的组成部分，在人体和其他生物体中起着重要作用。目前核苷衍生物作为药物被广泛地应用在临床上。例如，扎西他宾（zidovudine）、地丹诺幸（didanosine）、司他夫定（stavudine）、拉米夫定（lamivudine）等被用于治疗艾滋病毒的感染。拉米夫定也被用来医治乙型肝炎病人。这类核苷药物作用于病毒逆转录酶（reverse transcriptase，RT），是病毒脱氧核糖核酸（DNA）链终止剂。阿昔洛韦（aciclovir）属于开环核糖类核苷类似物，作用于病毒 DNA 聚合酶，临床上用于疱疹病毒的治疗。利巴韦林（ribavirin）适用于医治多种 DNA 和核糖核酸（RNA）病毒的感染，目前作为气雾剂，主要用于治疗高危婴儿的呼吸合胞体病毒（RSV）感染，亦可与 α-干扰素联合使用治疗丙型肝炎（HCV）。另外，用于实体肿瘤治疗的核苷药物卡莫氟，是 5-氟尿嘧啶（5-FU）的前体药物，对结肠、直肠癌的疗效较高。目前核苷类药物应用的主要障碍是毒副作用和耐药性等，很多学者已经把注意力投向天然次生代谢产物，并分离纯化出一些低毒或无毒的新核苷类似物。天然活性核苷类似物主要来自土壤中分离出的细菌、真菌和海洋生物。最近有报道从蜘蛛的毒液中检测到鸟（嘌呤核）苷和黄（嘌呤核）苷类似物[1]。人们已经从多种放射菌培养液，以及海藻、海绵、柳珊瑚、后鳃亚纲类软体动物和海鞘等海洋生物中提取和分离出了具有多种生理活性的核苷类化合物。一个典型的例子是来自海绵的抗病毒、抗癌物质阿糖腺苷（Ara-A）。由于从土壤中分离出的微生物所产生的抗生素与某些海洋生物的活性次生代谢产物在结构上相同或相似，很多研究者认为从海洋生物中分离出的次生代谢产物实际上是由共生的微生物产生的。

22.1　核苷的分类

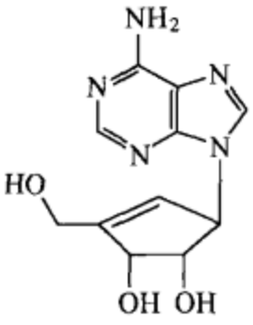
含氮碱和糖组分通过糖苷键结合成核苷。由于核苷分子中的含氮碱和糖组分不同而类别较多，其主要类型有 RNA 中的腺嘌呤核苷（A，adenosine）、鸟嘌呤核苷（G，guanosine）、胞嘧啶核苷（C，cytidine）、尿嘧啶核苷（U，uridine），DNA 中的腺嘌呤脱氧核苷（dA，deoxyadenosine）、鸟嘌呤脱氧核苷（dG，deoxyguanosine）、胞嘧啶脱氧核苷（dC，deoxycytidine）、胸腺嘧啶脱氧核苷（T，thymidine）。很多从自然界分离出的活性核苷化合物属于腺嘌呤（脱氧）核苷、鸟嘌呤核苷、尿嘧啶核苷和胞嘧啶脱氧核苷类衍生物。

已报道的天然核苷类化合物根据其化学结构主要可分为 14 类。

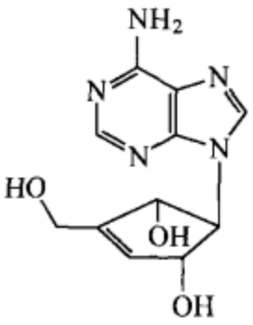
(1) 腺嘌呤核苷类：如细菌 *Bacillus megaterium* 的次生代谢物 oxetanocin[2] (**22-1**)、真菌 *Ampullariella regularis* 中的 neplanocin A(**22-2**)和 neplanocin F[3] (**22-3**)等。



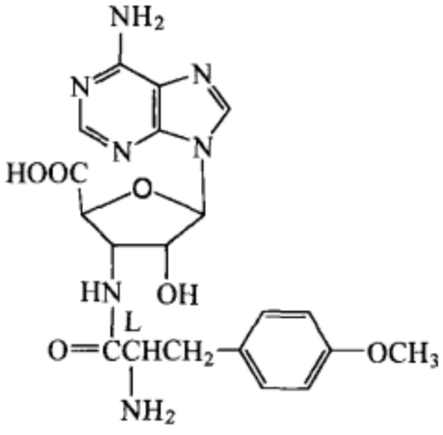
22-1



22-2



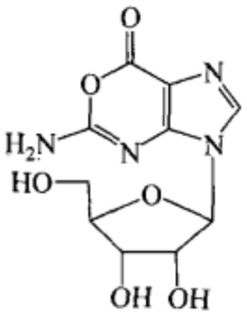
22-3



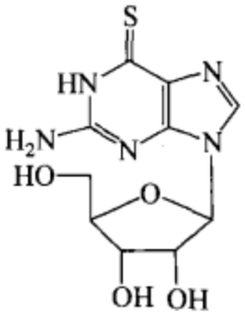
22-4

(2) 氨酰腺嘌呤脱氧核苷类：如真菌 *Chrysosporium pannorum* 中的 chrysscandin[4] (**22-4**)等。

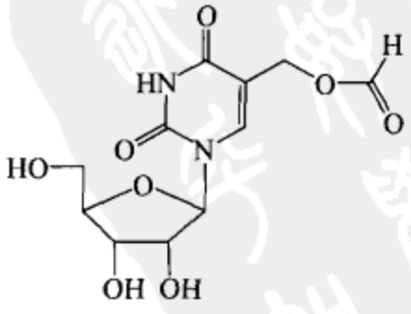
(3) 鸟嘌呤核苷类：如链霉菌 *Streptomyces capreolus* 分泌的 oxanosine[5] (**22-5**)和幅动菌株 *Actinoplanes* sp. 产生的 6-硫代鸟苷(6-thioguanosine，**22-6**)[6]。



22-5

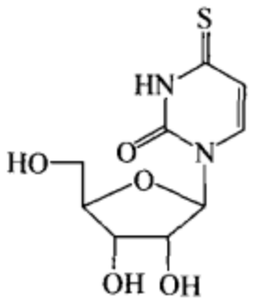


22-6

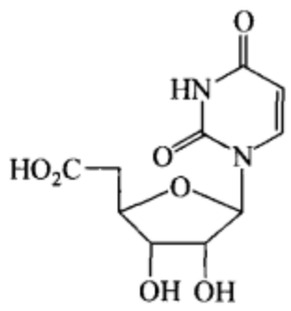


22-7

(4) 尿嘧啶核苷类：如从细菌 *Serratia plymuthica* 培养液中分出的 5-甲酰氧甲基尿苷[7] (**22-7**)、链霉菌 *Streptomyces libani* 产生的 4-硫代尿苷(4-thiouridine，



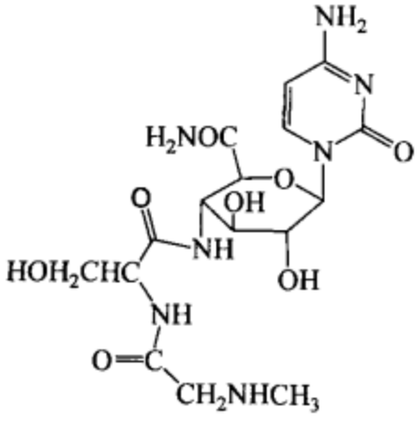
22-8



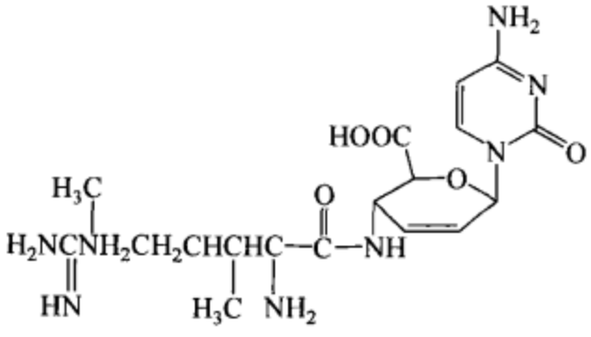
22-9

22-8)[8]及真菌(AJ117510)中的抗凝血成分 AJP117510[9](**22-9**)等。

(5) 氨酰胞嘧啶吡喃糖脱氧核苷类:如从链霉菌 *Streptomyces gougerotii* 培养液中提取的 gougerotin[10](**22-10**)及从 *Streptomyces arginensis* 培养液中分出的 arginomycin[11](**22-11**)等。

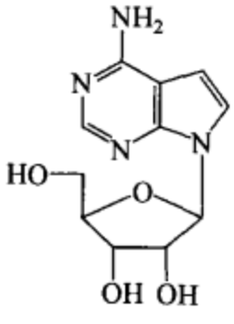


22-10

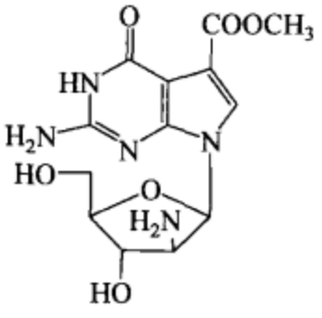


22-11

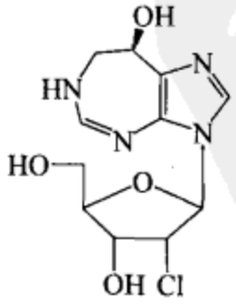
(6) 吡咯并嘧啶核苷类(氮杂嘌呤):如链霉菌 *Streptomyces hygroscopicus* 的代谢物 tubercidin[12](**22-12**)及幅动菌株 *Actinoplanes kanagawaensis* 产生的 kanagawamicin[13](**22-13**)等。



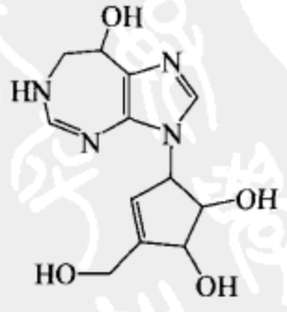
22-12



22-13



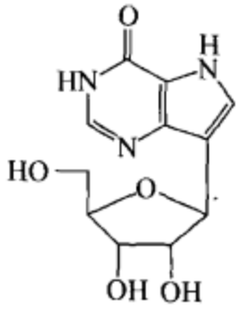
22-14



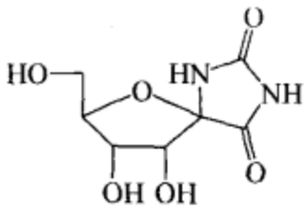
22-15

(7) 四氢咪唑并二氮杂草核苷类:如从放射菌 *Actinomadura* sp. 的培养滤出液中分出的 adechlorin[14](**22-14**)及链霉菌 *Streptomyces* sp. 的代谢物 adecypenol[15](**22-15**)等。

(8) 碳核苷类：如来自链霉菌 *Streptomyces albus* 的 pyrrolosine[16] (**22-16**)和 *Streptomyces hygroscopicus* 的代谢物 hydantocidin[17] (**22-17**)等。Hydantocidin 在结构上非常特殊，含氮碱与糖组分通过螺环结合成核苷。

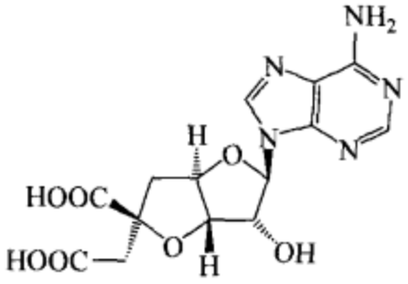


22-16

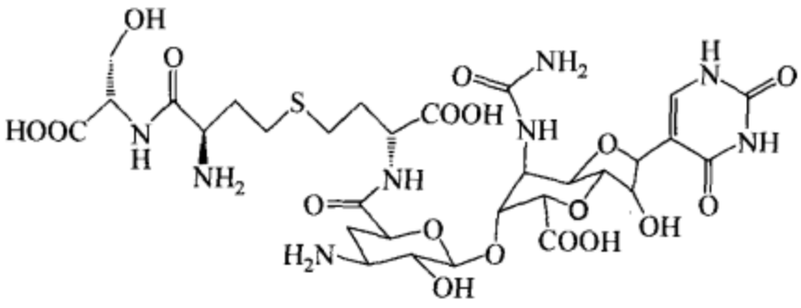


22-17

(9) 高碳糖核苷类：如来自链霉菌 *Streptomyces griseoaurantiacus* 的 griseolic acid C[18] (**22-18**)及 *Streptomyces lividans* 的 RS-10[19] (**22-19**)等。

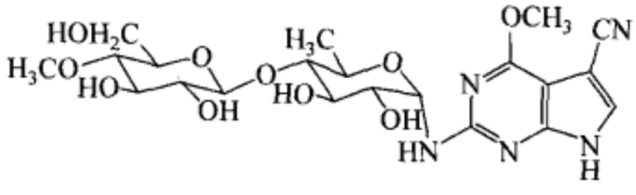


22-18

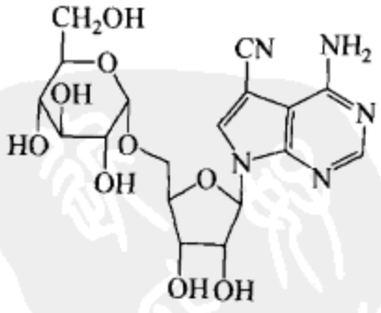


22-19

(10) 糖基核苷类：如从单孢丝菌 *Micromonospora* sp. 中分出的 dapiramicin A[20] (**22-20**)及海藻 *Tolypothrix tenuis* 中的 toyocamycin[21] (**22-21**)等。



22-20

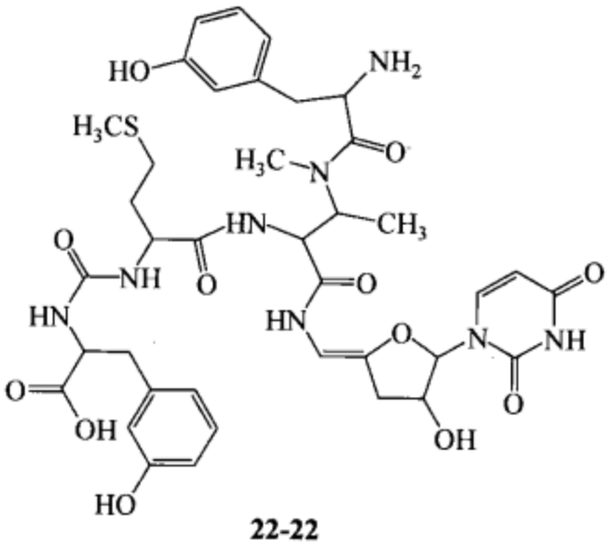


22-21

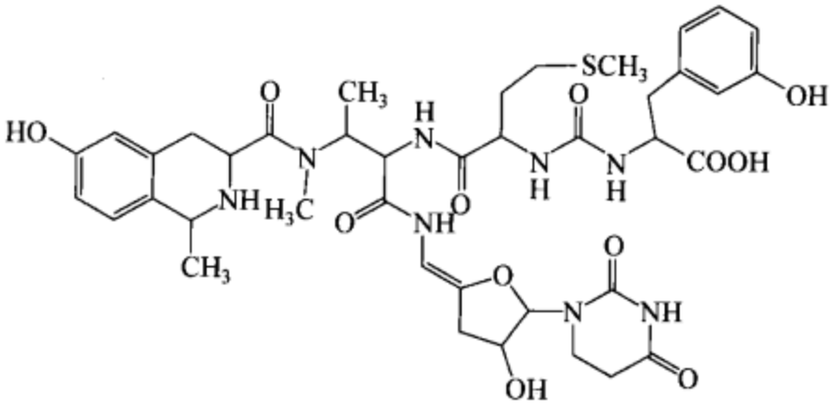
(11) 肽基核苷类：如链霉菌 *Streptomyces flavidovirens* 的代谢物 mureidomycin A[22] (**22-22**)、来自 *Streptomyces* sp. 的 napsamycin D[23] (**22-23**)及抗菌成分 muraymycin A1[24] (**22-24**)等。

(12) 脂酰核苷类：如来自细菌 *Streptoverticillium fervens* 的代谢产物 FR-900848[25] (**22-25**)、来自链霉菌 *Streptomyces griseosporeus* 的抗生素 liposidomy-

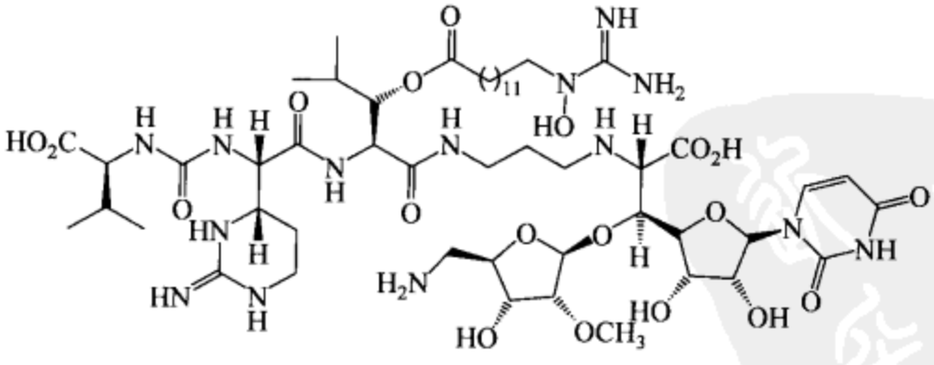
cin B[26]（**22-26**）及被囊动物 *Aplidium multiplicatum* 中的 shimofuridin A[27]（**22-27**）等。



22-22



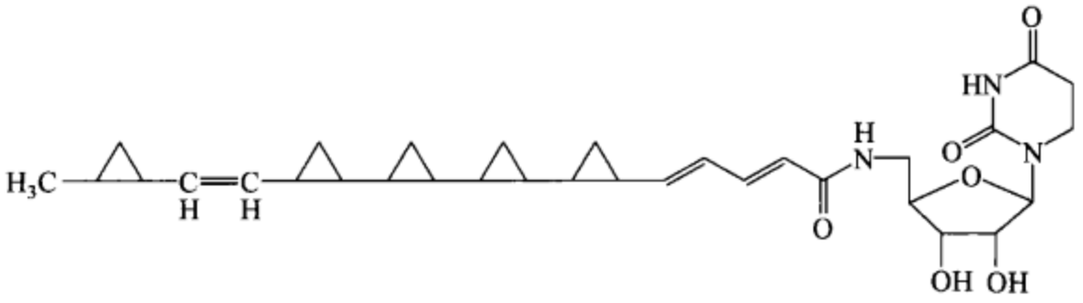
22-23



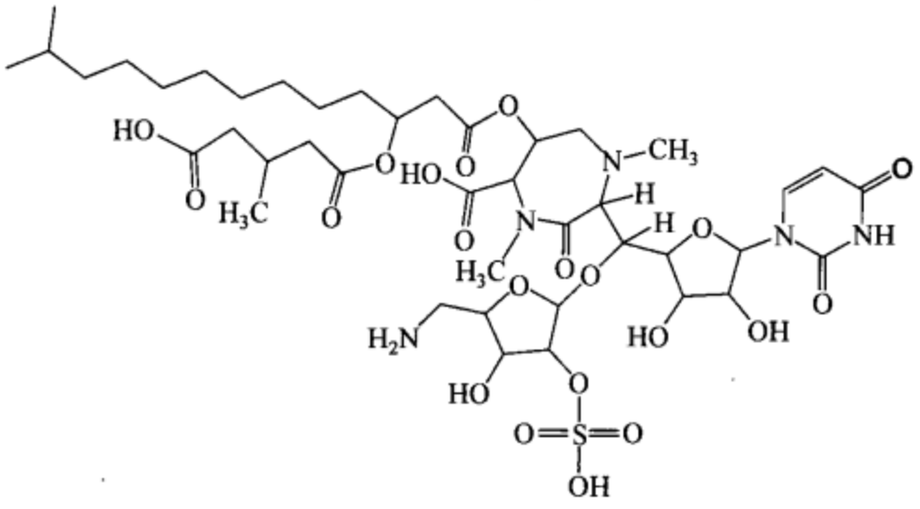
22-24

（13）核苷酸类：如来自非致病土壤杆菌 *Agrobacterium radiobacter* 的代谢物 agrocin 84[28]（**22-28**）及荧光假单胞菌 *Pseudomonas viridiflava* 的抗生素 fosfocytocin[29]（**22-29**）等。

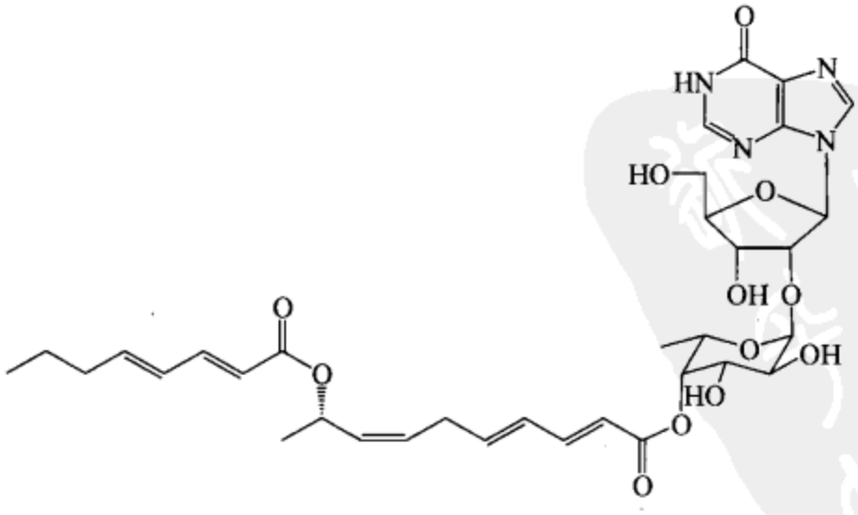
（14）其他类型核苷[12]：包括一些结构特异的核苷衍生物，如 5-氮杂胞苷（5-azacytidine，**22-30**，来自放射菌 *Actinoplanes awajinensis*）、bredinin（**22-31**，来自真菌 *Eupenicillium brefeldianum*）、neosidomycin（**22-32**，来自链霉菌 *Streptomyces hygroscopicus*）、clitocine（**22-33**，来自蘑菇 *Clitocybe inverse*）及 aplysidine[30]（**22-34**，来自海绵 *Aplysina* sp.）等。



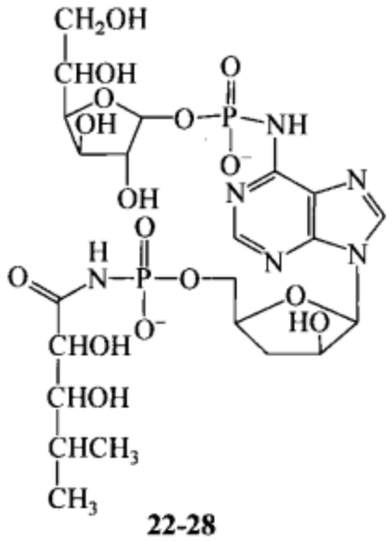
22-25



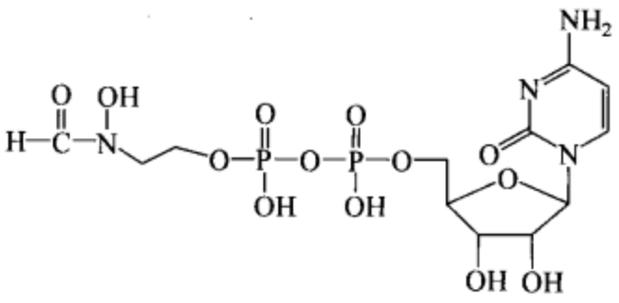
22-26



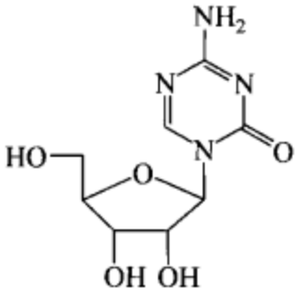
22-27



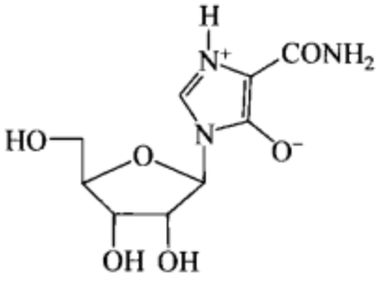
22-28



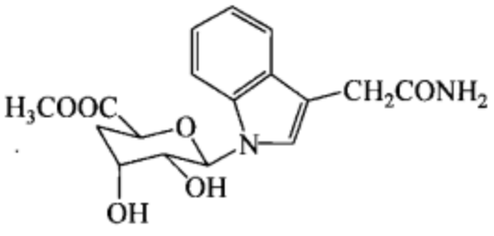
22-29



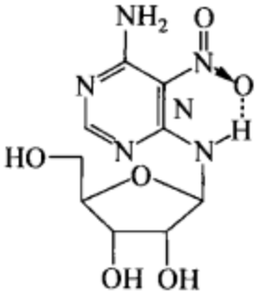
22-30



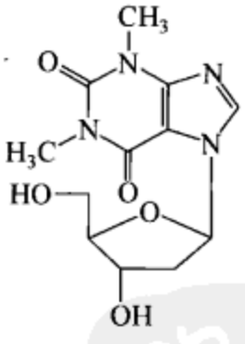
22-31



22-32



22-33

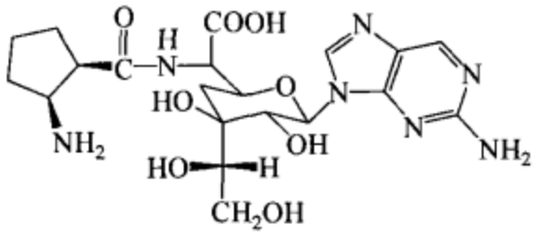


22-34

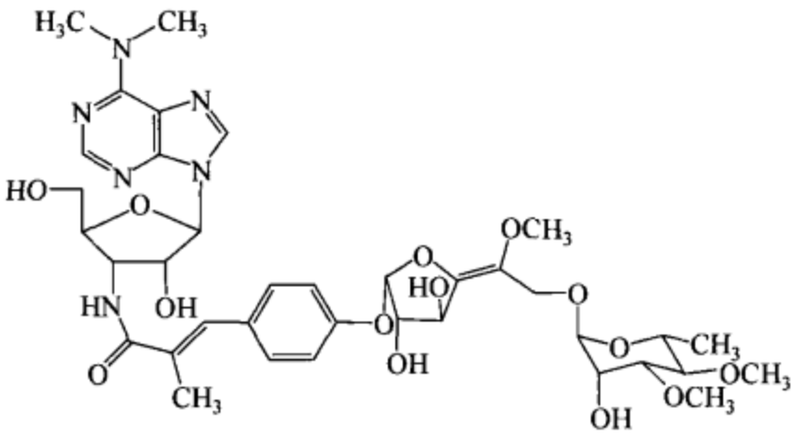
22.2 核苷的性质

核苷类化合物多为无色固体、无色晶体、白色或类白色粉末，具有旋光性。此类衍生物均为碱性或两性化合物，大多数在稀酸和(或)稀碱溶液中稳定，人们常利用此性质分离核苷类似物。这类化合物一般易溶于水，但在各种溶剂中的溶解度因分子母体结构和取代基的不同而有很大差异。例如，氨基嘌呤霉素(amipurimycin[31, 32]，**22-35**，来自链霉菌 *Streptomyces novoguineensis*)易溶于水，微溶于二甲亚砜、醇、吡啶和乙酸，不溶于有机溶剂；而 A201A[33](**22-36**，来自链霉菌 *Strepto-*

myces capreolus)溶于甲醇、丙酮、氯仿、乙酸乙酯、乙腈、四氢呋喃、0.1 N HCl 和 0.1 N NaOH,不溶于己烷、苯、乙醚和水。核苷类似物在结构上都包含碱基和糖组分,有的还连接了氨基酸。因此,这类化合物能和一些生物碱、糖和氨基酸的显色试剂反应显各种不同颜色。另外,每个化合物都有特征的紫外吸收,此性质常被用来观察和鉴别核苷类化合物。



22-35



22-36

22.3 核苷的鉴别

(1) 核苷类化合物对波长 260 nm 左右的紫外线有强吸收(主要来自碱基)。对于不同 pH 的溶液,最大吸收峰的位置会出现在不同波长处。另外,对碱基的鉴别也可用生物碱的显色试剂,如碘化铋钾。但应该注意的是,并不是所有的核苷类似物都呈阳性反应,如 amipurimycin 等对 Dragendorff 试剂呈阴性反应。

(2) 核苷类化合物中氨基酸和氨基糖的鉴别可用茚三酮喷洒剂。

(3) D-核糖与浓酸、甲基间苯二酚混合后,加热呈绿色;D-2-脱氧核糖和二苯胺在酸性条件下一同加热呈蓝色。这两个反应可作为 RNA 和 DNA 的检测基础。二苯胺反应(Dische 反应)对嘧啶脱氧核糖核苷不灵敏,但如果胞嘧啶脱氧核苷(dC)和胸腺嘧啶脱氧核苷(T)被溴预处理后,再进行 Dische 反应,显色会有明显增强[34]。

(4) 氯-联甲苯胺显色反应[35],薄层色谱显色灵敏度高,可检出核苷含量多于 0.2 μg 的色谱斑点。试剂配制方法:取 160 mg 联甲苯胺溶于 30 mL 乙酸,加入蒸

馏水稀释至 500 mL，再加入 1 g 碘化钾配成联甲苯胺喷洒剂。取一色谱缸，在色谱缸中放入一小烧杯。小烧杯中加入高锰酸钾水溶液，待用。另取一色谱缸，进行薄层色谱分离。展开剂可用氯仿-甲醇或其他溶剂系统。色谱分离完成后，薄层板需要加热干燥再冷却到室温。滴加浓盐酸到高锰酸钾水溶液中后会有氯气产生。将冷却后的薄层板放入含有氯气的色谱缸内。5 min 后取出薄层板，待板上的氯气挥发干净之后，喷洒联甲苯胺试剂。核苷类似物显蓝色斑点。当使用稀释 4 倍后的联甲苯胺喷洒剂，斑点颜色会因不同类型的核苷而不同(黄色或蓝色)。

22.4 核苷的提取和分离

从土壤中分离得到的细菌经过发酵培养数日后，其培养液中含有大量的次生代谢产物。培养液中的固体杂质可通过离心分离或过滤除去。将滤出液的 pH 调节到适当范围后，通过阳离子交换树脂(如 Dowex 50W X-8)除去阳离子，用稀氨水洗脱。然后合并含有核苷类化合物的洗脱液，调节 pH 至中性。再将此溶液通过活性炭柱，用清水洗涤除去无机盐。被吸附在活性炭上的总核苷类似物随后可用丙酮的水溶液洗脱出来。将含有总核苷类似物的洗脱液减压浓缩回收溶剂后得到总抽提物。

真菌的菌丝体粉碎后可用丙酮或醇溶液提取，回收溶剂后得到流体浸膏。此浸膏用水稀释后，依次用不同极性的有机溶剂萃取。各部分萃取液回收有机溶剂后得到分部总浸膏。

海洋生物新鲜材料除去内脏或洗净后冷冻干燥，提取前切碎或搅碎成肉末状。用乙醇水溶液或甲醇浸泡提取，回收溶剂后得到流浸膏。此流浸膏依次在水和不同极性的有机溶剂间分配，回收溶剂后得到各分部总浸膏。

从粗抽提物中分离出具有生物活性的核苷类似物单体，需要生物筛选的配合，采用活性追踪法，经过多次色谱分离。如用柱色谱，其条件的选择可根据薄层色谱[36]的结果和样品的性质。进一步分离可根据具体情况选择下列一种或几种方法配合使用。

(1) 硅胶柱色谱：常用的洗脱剂有氯仿-甲醇及己烷-乙酸乙酯等溶剂系统。

(2) 活性炭吸附色谱：常用丙酮的水溶液洗脱。

(3) 凝胶过滤色谱：如羟丙酰基交联葡聚糖凝胶(Sephadex LH-20)，常用乙醇或甲醇的水溶液或氯仿-甲醇溶剂系统洗脱。

(4) 纤维素色谱：常用丁醇-乙酸-水溶剂系统洗脱。嘧啶类与嘌呤类化合物能够得到很好的分离，通常嘧啶类化合物先被洗脱出来。

(5) 离子交换色谱：包括阴离子交换色谱和阳离子交换色谱。阴离子交换树脂如 DEAE-纤维素、ECTEOLA-纤维素、PEI-纤维素、安珀莱特(Amberlite)IR-4B

等；阳离子交换树脂如 Dowex 50W X-8 和 X-16，以及 Amberlite IRC-50 和 CG-50 等。常用的洗脱剂有盐酸、甲酸、氨水和盐的水溶液，包括碳酸铵、氯化钠及磷酸盐等。离子交换色谱对很多核苷类化合物的分离起着重要作用。

(6) 高效液相色谱色谱(HPLC)：常用甲醇或乙腈-水(缓冲液)系统梯度洗脱，紫外检测波长 254 nm。值得一提的是，液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术对判断化合物的类型和确定目标化合物的色谱峰位置非常有帮助，它在天然产物分离和鉴定中的应用日益广泛。

22.5 核苷的提取分离实例

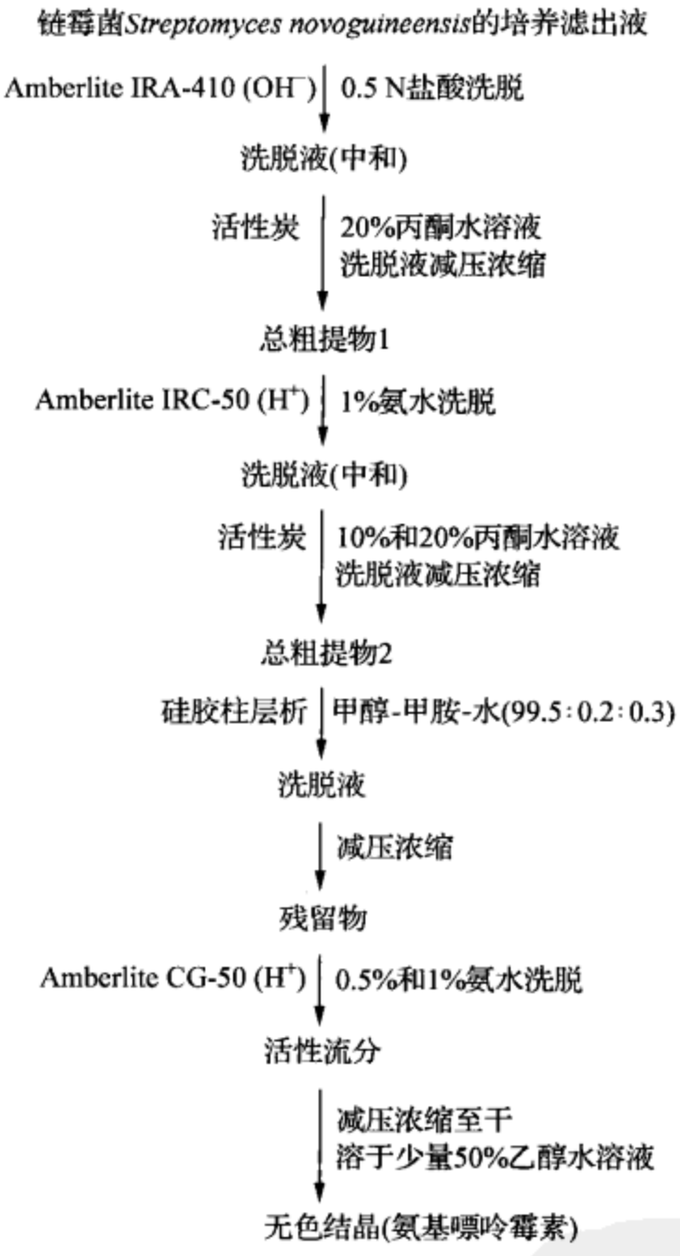
22.5.1 链霉菌 *Streptomyces novoguineensis* 培养液中氨基嘌呤霉素的提取分离

氨基嘌呤霉素，来自新几内亚岛土壤中的链霉菌 *Streptomyces novoguineensis*，具有抗真菌 *Pyricularia oryzae* 和 *Trichophyton mentagrophytes* 等植物致病菌的作用。从 50% 的乙醇水溶液中析出的氨基嘌呤霉素结晶为无色棱柱状，其中水的含量占 3.64%，分子式为 $C_{20}H_{29}N_7O_8 \cdot H_2O$，mp 217 ℃(分解)，$[\alpha]_D$ −3.2 (c 0.62，H_2O)。

具体操作[32]：

链霉菌 *Streptomyces novoguineensis* 的培养液过滤后，滤液通过强阴离子交换树脂 Amberlite IRA-410。由于氨基嘌呤霉素分子中含有羧基，会被交换在树脂上，进而被 0.5 N HCl 洗脱。流出液被碱中和后通过活性炭柱，先用水洗去无机盐，再用 20% 的丙酮水溶液将吸附在活性炭上的总化合物洗脱下来，洗脱液减压浓缩后得到总粗提物。氨基嘌呤霉素的进一步分离、纯化采用生物活性筛选的配合。粗提物通过 Amberlite IRC-50 阳离子交换树脂除去混合物中的无机阳离子，用 1% 的氨水洗脱。流出液用酸中和后再通过活性炭柱，用 10% 和 20% 的丙酮水溶液分步洗脱。合并有生物活性的流分，减压浓缩至干，进一步用硅胶柱色谱分离，以含有甲胺和水的甲醇溶液为洗脱剂。各流分中含有的化合物可通过薄层色谱分析，在紫外灯下观察。合并有生物活性的流分，减压浓缩至干，可见淡黄色固体析出。加水溶解后，继续进行 Amberlite CG-50 阳离子交换色谱分离，用 0.5% 和 1% 的氨水分步洗脱。合并活性流分、浓缩至干，再溶于少量 50% 的乙醇溶液，放置，析出结晶得纯品。本实验中所用的两种型号的阳离子交换树脂的不同之处在于颗粒的大小，Amberlite CG-50 型由于树脂颗粒较小而适合色谱分离化合物。

提取分离流程[32]：

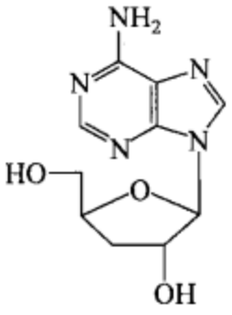


22.5.2 中药冬虫夏草中核苷的分离和检测

各种快速分离和检测混合物中目标化合物的技术为直接检测和比较中草药的有效成分提供了基础。这些检测技术包括毛细管电泳(CE)、核磁共振(NMR)、液相色谱-质谱联用(LC-MS)及气相色谱-质谱联用(GC-MS)等。

中药冬虫夏草中最重要的活性成分是核苷化合物。Guo 等[37]应用 LC-MS 技术对野生虫草 *Cordyceps sinensis* 和其培植品种 *Cordyceps mycelia* 中的核苷进行了分离和定性、定量检测，发现同一核苷化合物的含量随着品种和采集地的不同而不同。抗病毒成分冬虫夏草菌素(cordycepin，**22-37**)在野生和培植品种中的含量有很大差别，每克野生虫草最高仅含 0.0103 mg，而每克培植品种中的含量可高

达 0.5420 mg。检测精确度和准确度分别在 1.5%～5.3% 和－3.5%～5%。该实验证实了利用 LC-MS 技术对中药已知活性成分的检测是可行的，具有样品需要量少、操作方便、检测灵敏度高、分析时间短等特点。



22-37

分离、检测方法[37]：

(1) 标准液的配制：将市售乌嘌呤溶解在 0.1 mmol·L^{-1} 的 HCl 中配制成 0.1 mg·mL^{-1}浓度的母液；分别将市售尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺嘌呤、腺苷、冬虫夏草菌素和 2-氯腺苷溶解在甲醇中配制成 0.2 mg·mL^{-1}浓度的母液。所有母液都冷藏在冰箱中，临用时用甲醇稀释至所需浓度。

(2) 待测样品的配制/冬虫夏草中核苷的提取：冬虫夏草药材在 37 ℃干燥 2 h 后碾成粉末，随后取出 1 g 药粉放入含有 20 mL 蒸馏水的容器内。将此容器放入超声波水浴中振荡 2 h 后，滤除药渣，滤液浓缩至干，再溶解在 10 mL 甲醇中，冷藏在冰箱中备用。

(3) 洗脱溶剂：高效液相色谱用水和甲醇，洗脱剂临用前须过滤和脱气。

溶剂 A：40 mmol·L^{-1}的乙酸铵水溶液，pH 5.2

溶剂 B：甲醇

(4) 质谱检测和柱色谱分离条件：LC-MS 分析仪，Shimadzu LC/MS-2010；质谱检测模式，选择离子检测(SIM)；紫外检测波长，260 nm；分析柱，Shimadzu VP-ODS；进样体积，5 μL；流速，0.2 mL·min^{-1}；柱色谱分离洗脱条件，见表 22.1。

(5) 标准曲线和标准图谱的测定：每个标准化合物配制 7 个不同浓度(0.5～130 μg·mL^{-1})的待测样品，所加内标化合物 2-氯腺苷的浓度是 10 μg·mL^{-1}，每个样品注射 3 次。将所得峰积分面积的平均值(纵坐标)对样品浓度(μg·mL^{-1}，横坐标)作图，得到各化合物的标准曲线。混合标准化合物配制成 20 μg·mL^{-1}(每个化合物在混合液中的浓度)的检测液，内标化合物浓度为 10 μg·mL^{-1}，样品注射后所得光谱即为标准图谱。

表 22.1 柱色谱分离洗脱程序

步骤	时间/min	溶剂 A/%	溶剂 B/%
1	0	95	5
2	10	85	15
3	15	85	15
4	18	80	20
5	23	80	20
6	28	95	5

(6) 待测样品的定性、定量检测：注射冬虫夏草待测液，通过所得图谱各峰的 R_f、峰积分面积和相对分子质量与标准曲线和标准图谱对照，即可得到目标化合物的定性、定量测试结果。

22.5.3 被囊动物 *Aplidium multiplicatum* 中脂酰次黄苷衍生物的提取分离

被囊动物 *Aplidium multiplicatum* 中脂酰次黄苷衍生物 shimofuridin A 含量较高，占动物湿重的 0.01%。纯品为无色固体，$[\alpha]_D^{19}$ −186（*c* 1.4，吡啶），分子式为 $C_{34}H_{44}N_4O_{12}$，具有抗肿瘤、抗真菌、抗革兰氏阳性菌及抑制蛋白激酶 C 的作用。其甲醇溶液的紫外光谱最大吸收峰在波长 261 nm 处。

提取分离方法[27]：

被囊动物 *A. multiplicatum*（湿重 1 kg）采自日本冲绳岛海滩，用甲醇浸泡提取 2 次，每次 1.5 L。回收溶剂后，流浸膏在 500 mL 乙酸乙酯和 500 mL 浓度为 1 mol·L^{-1} 的氯化钠水溶液间分配。用乙酸乙酯分配 3 次后，合并有机相，减压回收乙酸乙酯后得浸膏 2.7 g。取出其中 1.4 g，经硅胶柱色谱，依次以氯仿-甲醇溶剂系统分步洗脱。合并氯仿-甲醇（7∶3）流分，减压回收溶剂至小体积，再进行凝胶 Sephadex LH-20 柱色谱分离，以氯仿-甲醇（1∶1）洗脱。含有核苷的流分再通过一根粗短的反相 C18 柱粗分，以甲醇的水溶液为洗脱剂。收集 40%～70% 甲醇的流出液，减压浓缩至小体积后，进一步通过 HPLC 分离，从 70% 甲醇的洗脱液中可得到 8.9 mg 纯品 shimofuridin A。

22.6 核苷的结构修饰及实例

核苷的结构修饰包括对含氮碱及糖组分的结构改造。新结构的设计可根据活性化合物的结构和目标酶的具体情况而定。可将各种杂环含氮碱与各种糖组分缩合成新的化合物，也可直接在母体官能团上引入取代基。碱环和糖环骨架的变化包括环的大小、数目、原子种类的不同及糖环开环等，连接的取代基多见酰基、烷

基、磷酸、脂肪酸、氨基酸、肽类和糖基等。另外，糖苷键的位置变换及糖环构型的转变等也会导致生物活性的变化。这些核苷类似物由于结构与正常核苷相似，能够被靶细胞受体和酶识别而发挥药物作用。又由于结构与正常酶底物的差异，其对细胞内的某些代谢酶稳定而难被降解。核苷的结构修饰可通过化学合成或酶反应来完成，其主要目的包括增强药物活性和稳定性、降低毒性以及帮助药物进入靶细胞等。

1）核苷的化学合成

核苷的化学合成主要包括三种方法[38]：①熔接反应，含氮杂环如嘌呤等和端羟基乙酰化的全保护糖在 Lewis 酸的催化下，经高温熔融缩合得到核苷衍生物，产率一般不超过 70%。②金属盐法，含氮杂环的金属盐（如银、汞或钠盐等）和 1-卤代全保护糖反应，总体上产率不高。为了避免毒性，目前很少有人使用汞盐。③Hilbert-Johnson 反应，传统的 Hilbert 和 Johnson 将 2,4-二甲氧基嘧啶和碘甲烷在室温下的反应产物用酸处理后，得到 1-甲基尿嘧啶，该方法产率较低；Silyl-Hilbert-Johnson 反应，Vorbrueggen 等用三甲基硅烷化的杂环碱与全乙酰保护糖在非质子溶剂中反应，以 Lewis 酸如 $SnCl_4$ 或 TMSOTf（三甲基硅三氟甲基磺酸酯）为催化剂，该反应的反应条件温和，大幅度提高了核苷的收率。

另外，其他合成糖苷键常用的化学方法[39]还包括 Mitsunobu 反应、杂环碱与不饱和化合物的加成及钯络合物催化下的核苷合成等。在 Mitsunobu 反应条件下，含有端位自由羟基的保护糖与含氮杂环反应得到核苷。

2）取代基的连接

糖基主要通过两种途径与核苷相连。其一是被保护的双糖或多糖与含氮杂环合成糖苷键，另一种方法是活化的糖基与核苷中的自由羟基反应形成 *O*-配糖键。

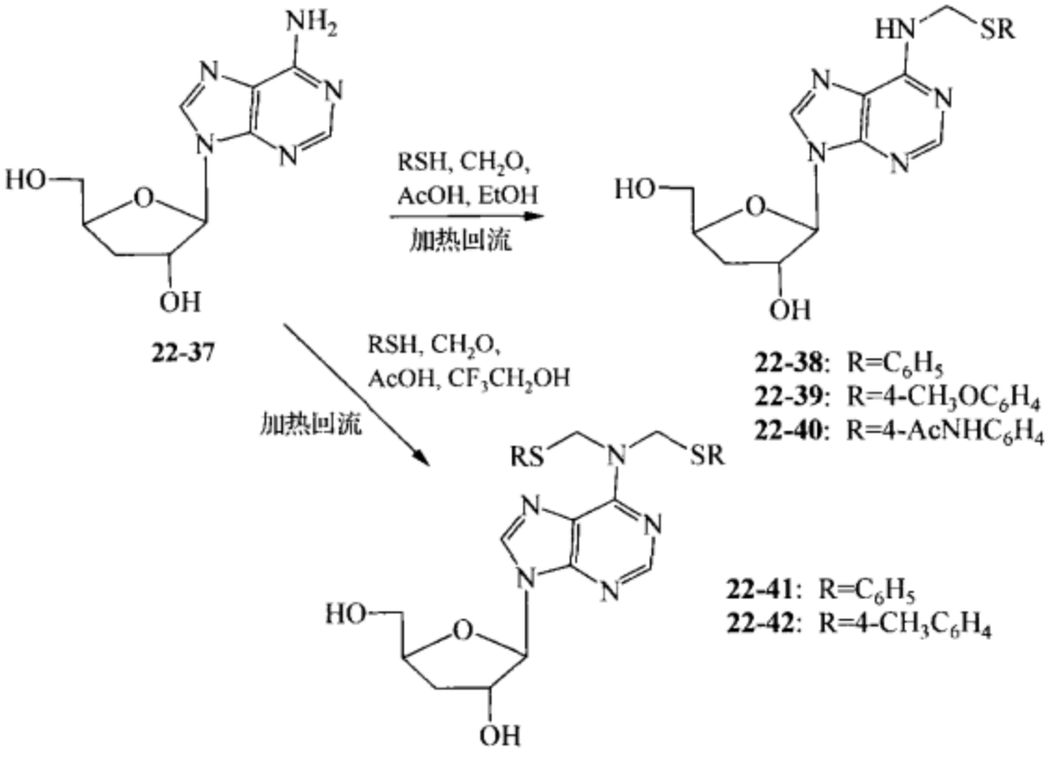
酰基、烷基、氨基酸和肽可经过酰化或烷基化反应，通过母体化合物中的羟基和氨基等连接到核苷上。脂肪酸可通过酯键与核苷相接。

常见的磷酸衍生物包括一磷酸、二磷酸及三磷酸化合物。核苷一磷酸的合成一般是通过磷酰氯（$POCl_3$）直接磷酸化得到，也可用其他方法，例如，Mitsunobu 反应以及氰乙基磷酸在缩合剂作用下合成单磷酸酯等。核苷二磷酸的合成主要通过两种途径，即对活化的一磷酸化合物进一步磷酸化和对核苷的直接二磷酸化。核苷三磷酸的合成方法[40]较多，如可通过对核苷的直接三磷酸化，也可用焦磷酸盐与活化的一磷酸化合物或一磷酸与活化的二磷酸化合物反应得到等。其中最重要的方法之一是核苷的亚磷酸酯通过一个间三磷氧六元环中间体途径得到三磷酸衍生物。

22.6.1 冬虫夏草菌素衍生物的合成

冬虫夏草菌素（cordycepin，**22-37**）在生物体内由于腺苷脱氨酶的作用而快速

转变成无活性的代谢产物 3′-脱氧肌苷，其作为药物的应用因此而受到严重限制。为了克服这一困难，Chang 等[41]对冬虫夏草菌素中的碱基进行了结构修饰，将腺嘌呤的氨基烷基化，合成了一类芳硫代甲基衍生物。该衍生物不再是腺苷脱氨酶的作用底物，但在水溶液中能自动水解释放出母体活性化合物冬虫夏草菌素。各衍生物水解半衰期($t_{1/2}$)因所接取代基的不同而不同。药理实验证明，化合物 **22-38**、**22-39** 和 **22-40** 与冬虫夏草菌素相比，生物活性明显增强。合成方法如下[41]：



化合物	得率
22-38	57%
22-39	48%
22-40	50%
22-41	51%
22-42	54%

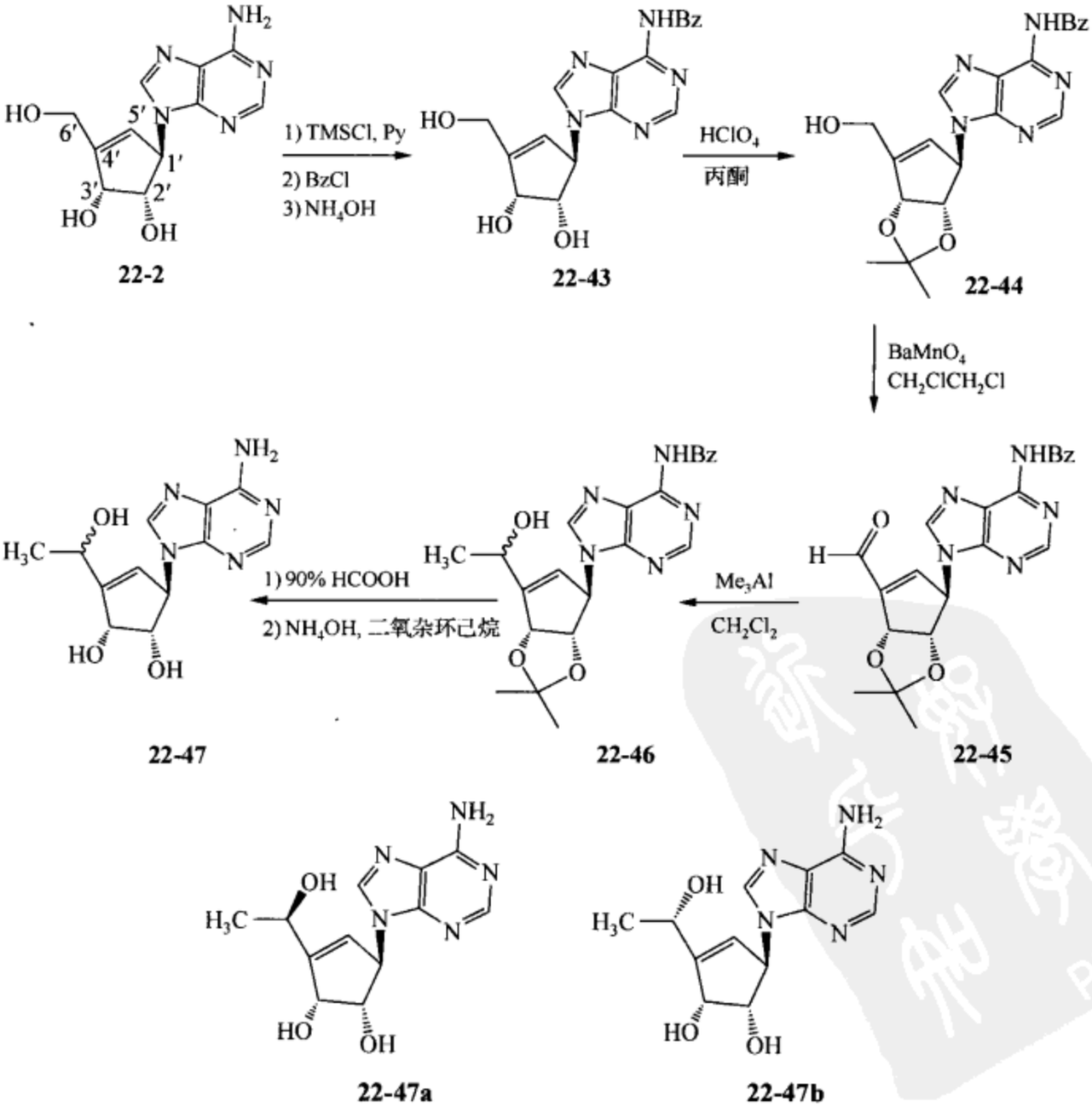
具体操作[41]：

在装有乙醇的圆底烧瓶中加入冬虫夏草菌素(1 倍量)、芳基硫醇(3～4 倍量)和 37%的甲醛水溶液(2.8～3.6 倍量)，搅拌均匀。再加入适量冰醋酸(0.1～0.2 mmol·mL^{-1}冬虫夏草菌素)，加热回流过夜，可用薄层色谱检测反应进行的程度。反应完成后，减压浓缩至干。随后进行硅胶柱色谱分离，以二氯甲烷-甲醇(95∶5)为洗脱剂分离出目标化合物。回收溶剂后得到白色粉末(**22-38**、**22-39** 或 **22-40**)，产率在 50%左右。当用三氟乙醇代替乙醇作溶剂时，产物为双烷基衍生物(**22-41** 和 **22-42**)。

22.6.2　碳环核苷 MNPA 的合成

天然碳环核苷 neplanocin A(NPA,**22-2**)来自真菌 *Ampullariella regularis*,具有抑制 *S*-腺苷高半胱氨酸水解酶的作用。该酶的转甲基作用直接影响到病毒信使核糖核酸的成熟和病毒复制。然而,由于 NPA 的 6′-羟基能被正常细胞的酶磷酸化而产生较大的毒性,以及 NPA 能被腺苷脱氨酶快速转化成无活性的肌苷,其作为药物的可能性受到了限制。Shuto 等[42]通过化学合成的方法在 C6′位上连接了一个甲基,生成 MNPA(**22-47**),改变了 6′-羟基附近的立体结构,因此该衍生物不能被腺苷激酶磷酸化,从而使毒性大幅度降低。

MNPA 的合成路线[42]:



22-2　**22-43**　**22-44**　**22-45**　**22-46**　**22-47**

22-47a　**22-47b**

具体操作[42]：

首先是对 NPA(1 倍量)中官能团的保护。①对碱环上氨基的保护：在室温下，将三甲基氯硅烷(5 倍量)加入 NPA 的吡啶溶液中。搅拌 15 min 后，加入苯甲酰氯(5 倍量)。反应 2 h 后，用冰浴冷却。随后加入 25%的氨水，在室温下搅拌 45 min后得到化合物 **22-43**。反应液浓缩后在乙酸乙酯和水之间分配，水层浓缩后，有白色固体析出(大部分 **22-43**)。②对糖环上邻二羟基的保护：丙酮、化合物 **22-43** 和少量 70%高氯酸的混合物在室温下搅拌 3 h 后，用 0.75 N 的碳酸氢钠溶液中和。随后过滤除去无机盐。滤液浓缩后在氯仿和盐水间分配，氯仿层回收溶剂后，加入乙醚，有白色固体 **22-44** 析出。

化合物 **22-44** 和锰酸钡(1∶15.6)在二氯乙烷中加热回流 3 h 后，滤出液减压浓缩至干，得到化合物 **22-45**。用二氯甲烷溶解后，在低温下缓慢加入约 4 倍量的三甲基铝的己烷溶液(约 20 min)。继续搅拌 2 h 后(−75 ℃)，加入适量2 N 的氯化铵溶液及 4 N 的盐酸溶液。反应生成的化合物 **22-46** 可用有机溶剂萃取，再经硅胶柱色谱分离，以氯仿-甲醇(80∶1)为洗脱剂分离得到。最后用 90%的甲酸和氨水对官能团脱保护，得到目标产物 **22-47**。**22-47** 是 *R* 异构体 RMNPA (**22-47a**)和 S 异构体 SMNPA(**22-47b**)的混合物，可采用 HPLC 对其进一步分离纯化。以 7%的甲醇水溶液为洗脱剂，*R* 异构体首先从色谱柱 RP-C18 中被洗脱出来。

酶实验结果表明，RMNPA 和 SMNPA 对 *S*-腺苷高半胱氨酸水解酶和腺苷脱氨酶表现出不同的性质。RMNPA 具有抑制 *S*-腺苷高半胱氨酸水解酶的作用，但 SMNPA 却无活性；SMNPA 能被腺苷脱氨酶作用失活，而 RMNPA 却具有抵抗脱氨基的作用[43]。说明 C6′位立体结构对该类核苷的生物活性有重要影响。

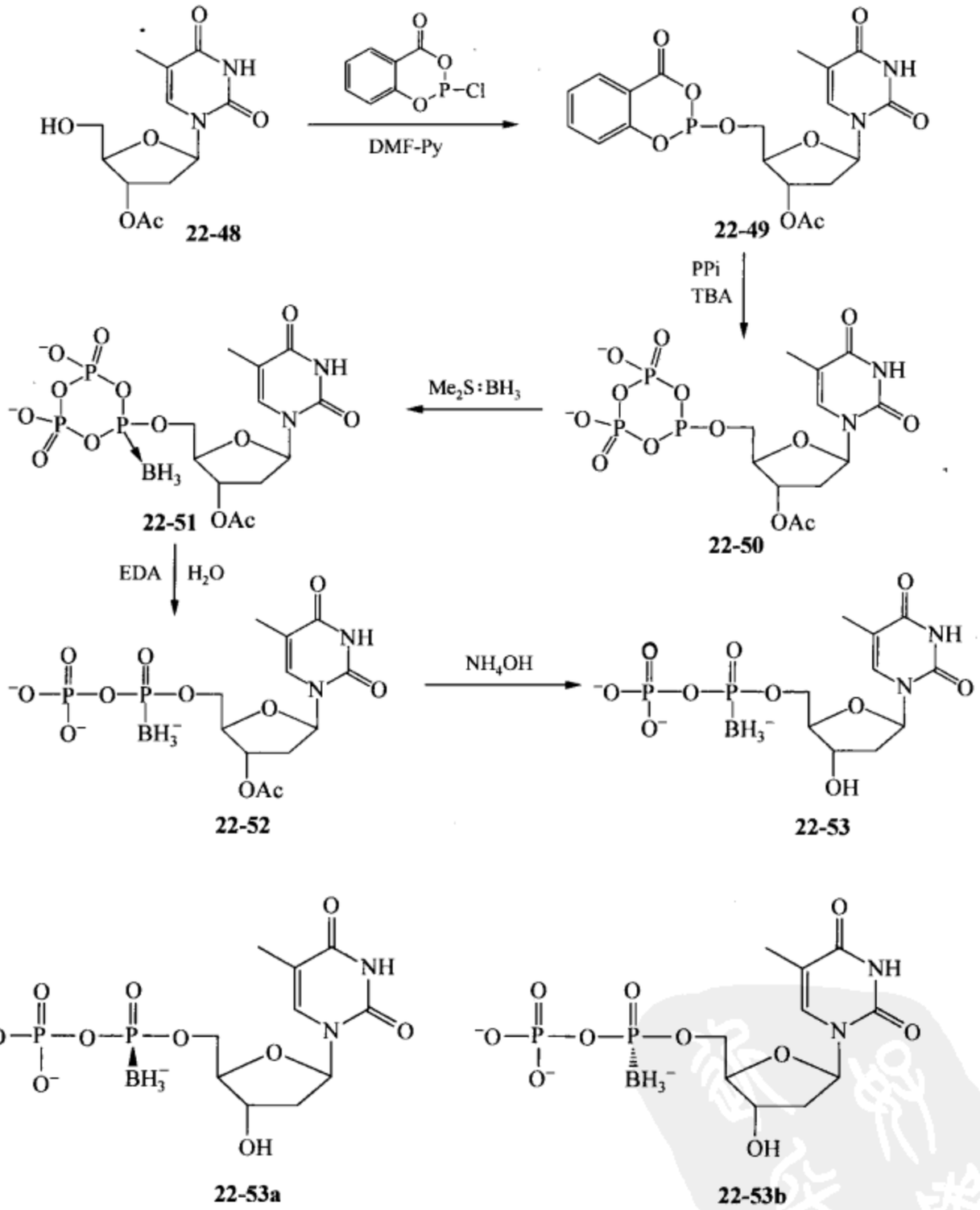
22.6.3 *α-P*-硼烷基核苷-5′-二磷酸的合成

双去氧核苷三磷酸衍生物是艾滋病毒逆转录酶的底物，是病毒 DNA 链终结者。然而，核苷类病毒逆转录酶抑制剂活性的正常发挥通常受到严重限制。其中一个重要原因是在其进入被感染的细胞后，不能有效地在细胞内核苷磷酸化酶或一系列核苷酸激酶的作用下磷酸化成为酶的活性底物三磷酸衍生物，因而导致被感染细胞内活性药物的浓度远远低于有效治疗浓度。另一个重要原因是由于艾滋病毒变异而导致的对该类化合物的耐药性，这方面涉及由病毒逆转录酶参与催化的 DNA 修复机制。研究表明，核苷的结构修饰对核苷磷酸化酶及病毒逆转录酶的活性具有非常重要的影响，一个典型的例子就是用甲硼烷取代 α 位磷原子上的非桥氧原子。甲硼烷的引入不仅增强了核苷二磷酸激酶对各种双去氧核苷二磷酸的磷酸化，而且对病毒的 DNA 修复具有明显的抑制作用[44~46]。现以胸腺嘧啶脱

氧核苷为例，具体说明 α-*P*-硼烷基核苷-5′-二磷酸（TDPαB，**22-53**，分子式 $C_{10}H_{18}BN_2O_{10}P_2$）的合成方法[47,48]。

所用化学试剂和反应原料必须预先干燥。在室温条件下，所有反应均在同一圆底烧瓶内连续完成。反应在惰性气体（氮气或氩气）保护下进行，反应试剂被依次加入烧瓶内。在加入反应试剂时若有热量产生，则需用冰浴冷却至室温。各步反应在^{31}P-NMR 谱（乙腈中）的监测下进行，反应进行的程度可根据谱中各峰积分面积的大小来判断。实际操作中可能会由于反应混合液中各成分含量有所差异而导致磷谱峰位置的微小变化。在装有市售 3′-*O*-乙酰胸腺嘧啶脱氧核苷（**22-48**，0.25 mmol，1 倍量）和 2 mL 二甲基甲酰胺-吡啶（DMF-Py，1∶1）的 10 mL 圆底烧瓶中缓慢加入水杨亚磷酸氯（1.1 倍量）的二氯甲烷溶液，此时注意用冰浴冷却混合液至室温。室温下反应 10 min 后，磷谱显示～95%的起始物 **22-48** 已转化为核苷亚磷酸衍生物 **22-49**（δ_P 约 130 ppm，双峰）。随后，三丁胺（TBA，4 倍量）和新鲜配制的三丁胺焦磷酸盐（PPi，1.5 倍量）/DMF（1 mL）被同时加入反应混合液中，室温下搅拌至沉淀消失。此时的磷谱出现两个主要的峰（$\delta_{\alpha P}$约 110 ppm，三重峰；$\delta_{\beta P}$约－16 ppm，双峰），显示间三磷氧六元环中间体 **22-50** 的生成。随后加入 8 倍量硼化试剂（$Me_2S:BH_3$）进行硼化反应。大约 15 min 后，α 位磷的峰位置移至约93 ppm，β-位磷的峰位置移至约－18 ppm（**22-51**）。随后加入 5 倍量的乙二胺（EDA），室温下搅拌约 1 h 后，加入 1 mL 蒸馏水，继续搅拌 10 min，得到化合物 **22-52**。减压回收有机溶剂后，加入适量蒸馏水和乙醚进行液液分配。水相浓缩后（约 2 mL），加入适量碱（约 8 mL 浓氨水）处理，搅拌 6～8 h 后得到目标化合物 **22-53**（TDPαB，R_P 异构体与 S_P 异构体的混合物，$\delta_{\alpha P}$约 80 ppm，复杂宽峰；$\delta_{\beta P}$约－6 ppm，双峰，水中），收率约 30%。反应完成后，将混合液减压浓缩至小体积。先采用阴离子交换色谱分离（QA-52），用 5～200 mmol·L^{-1}的碳酸氢铵水溶液梯度洗脱，将非对映异构体混合物 **22-53** 从反应浓缩液中分离出。再用 HPLC 细分，以 2%的乙腈-乙酸三乙铵（TEAA，20 mmol·L^{-1}）水溶液为洗脱剂，将 **22-53** 中的 R_P 异构体（**22-53a**）和 S_P 异构体（**22-53b**）从反相色谱柱 RP-C18 上依次洗脱出来。酶学实验证明，只有 TDPαB 的 R_P 异构体是核苷二磷酸激酶的底物。

22-53 的合成路线如下[47]：



22-48 22-49 22-50 22-51 22-52 22-53

22-53a 22-53b

参 考 文 献

[1] Taggi A E, Meinwald J, Schroeder F C. A new approach to natural products discovery exemplified by the identification of sulfated nucleosides in spider venom. J Am Chem Soc, 2004, 126: 10364～10369.

[2] Shimada N, Hasegawa S, Harada T et al. Oxetanocin, a novel nucleoside from bacteria. J Antibiot, 1986, 39: 1623～1625.

[3] Yaginuma S, Muto N, Tsujino M et al. Studies on neplanocin A, a new antitumor antibiotic. Ⅰ. Producing organism, isolation and characterization. J Antibiot, 1981, 34: 359～366.

[4] Yamashita M, Tsurumi Y, Hosoda J et al. Chryscandin, a novel peptidyl nucleoside antibiotic. Ⅰ. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. J Antibiot, 1984, 37: 1279～1283.

[5] Shimada N, Yagisawa N, Naganawa H et al. Oxanosine, a novel nucleoside from actinomycetes. J Antibiot, 1981, 34: 1216～1218.

[6] Isono K. Current progress on nucleoside antibiotics. Pharmac Ther, 1991, 52: 269～286.

[7] Isshiki K, Sawa T, Naganawa H et al. A novel nucleoside antibiotic, 5-formyloxymethyluridine. J Antibiot, 1990, 43: 584～585.

[8] Nishikiori T, Hiruma S, Kurokawa T et al. Microbial production of 4-thiouridine. J Antibiot, 1992, 45: 1376～1377.

[9] Sato S, Futaki F, Fukuchi N et al. A new nucleoside derivative, AJP117510, as an inhibitor of integrin $\alpha_2\beta_1$-collagen binding. J Antibiot, 2006, 59:251～253.

[10] Kanzaki T, Higashide E, Yamamoto H et al. Gougerotin, a new antibacterial antibiotic. J Antibiot, 1962, Ser A 15: 93～97.

[11] Argoudelis A D, Baczynskyj L, Kuo M T et al. Arginomycin: production, isolation, characterization and structure. J Antibiot, 1987, 40: 750～760.

[12] Isono K. Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis. J Antibiot, 1988, 41: 1711～1739.

[13] Naruto S, Uno H, Tanaka A et al. Kanagawamicin, a new aminonucleoside analog antibiotic from *Actinoplanes kanagawaensis*. Heterocycles, 1983, 20: 27～32.

[14] Omura S, Imamura N, Kuga H et al. Adechlorin, a new adenosine deaminase inhibitor containing chlorine. Production, isolation and properties. J Antibiot, 1985, 38: 1008～1015.

[15] Omura S, Tanaka H, Kuga H et al. Adecypenol, a unique adenosine deaminase inhibitor containing homopurine and cyclopentene rings. J Antibiot, 1986, 39: 309～310.

[16] Ikegami S, Isomura H, Tsuchimori N et al. Structure of pyrrolosine: a novel inhibitor of RNA synthesis, from the actinomycete *Streptomyces albus*. J Am Chem Soc, 1990, 112: 9668～9669.

[17] Nakajima M, Itoi K, Takamatsu Y et al. Hydantocidin: a new compound with herbicidal activity from *Streptomyces hygroscopicus*. J Antibiot, 1991, 44: 293～300.

[18] Takahashi S, Nakagawa F, Sato S. Griseolic acids B and C, an inhibitor of cyclic adenosine 3′,5′-monophosphate phosphodiesterase. J Antibiot, 1988, 41: 705～706.

[19] Isono K, Yamaguchi I, Ko K et al. Antibiotic RS-10, production method and agricultural fungicide: Nippon Kokai Tokkyo Koho, JP 9086784. 1990.

[20] Nishizawa N, Kondo Y, Koyama M et al. Studies on a new nucleoside antibiotic, dapiramicin. Ⅱ. Isolation, physico-chemical and biological characterization. J Antibiot, 1984, 37: 1～5.

[21] Stewart J B, Bornemann V, Lu C J et al. Cytotoxic, fungicidal nucleosides from blue green algae belonging to the Scytomemataceae. J Antibiot, 1988, 41: 1048～1056.

[22] Inukai M, Isono F, Takahashi S et al. Mureidomycins A-D, novel peptidylnucleoside antibiotics with spheroplast forming activity. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical properties. J Antibiot, 1989, 42: 662～666.

[23] Chatterjee S, Nadkarni S R, Vijayakumar E K S et al. Napsamycins, new *Pseudomonas* active antibiot-

ics of the mureidomycin family from *Streptomyces* sp. HIL Y-82, 11372. J Antibiot, 1994, 47: 595～598.

[24] McDonald L A, Barbieri L R, Carter G T et al. Structures of the muraymycins, novel peptidoglycan biosynthesis inhibitors. J Am Chem Soc, 2002, 124: 10260～10261.

[25] Yoshida M, Ezaki M, Hashimoto M et al. A novel antifungal antibiotic, FR900848. I. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. J Antibiot, 1990,43: 748～754.

[26] Ubukata M, Isono K, Kimura K et al. The structure of liposidomycin B, an inhibitor of bacterial peptidoglycan synthesis. J Am Chem Soc, 1988, 110: 4416～4417.

[27] Kobayashi J, Doi Y, Ishibashi M. Shimofuridin A, a nucleoside derivative embracing an acylfucopyranoside unit isolated from the Okinawan marine tunicate *Aplidium multiplicatum*. J Org Chem, 1994, 59: 255～257.

[28] Roberts W P, Tate M E, Kerr A. Agrocin 84 is a 6-*N*-phosphoramidate of an adenine nucleotide analogue. Nature, 1977, 265: 379～381.

[29] Katayama N, Tsubotani S, Nozaki Y et al. Fosfadecin and fosfocytocin, new nucleotide antibiotics produced by bacteria. J Antibiot, 1990,43: 238～246.

[30] Kondo K, Shigemori H, Ishibashi M et al. Aplysidine, a new nucleoside from the Okinawan marine sponge *Aplysina* Sp. Tetrahedron, 1992, 48: 7145～7148.

[31] Goto T, Toya Y, Ohgi T et al. Structure of amipurimycin, a nucleoside antibiotic having a novel branched sugar moiety. Tetrahedron Lett, 1982, 23: 1271～1274.

[32] Harada S, Kishi T. Isolation and characterization of a new nucleoside antibiotic, amipurimycin. J Antibiot, 1977,30: 11～16.

[33] Kirst H A, Dorman D E, Occolowitz J L et al. The structure of A201A, a novel nucleoside antibiotic. J Antibiot, 1985,38: 575～586.

[34] Brady T G, McEvoy-Bowe E. Application of the Dische diphenylamine reaction to pyrimidine deoxynucleosides. Nature, 1951, 168: 299～300.

[35] Issaq H J, Barr E W. Detection reagent for adenine, guanine, uracil, cytosine and their alkylated bases, nucleotides and nucleosides on thin-layer plates. J Chromatogr, 1977, 132: 121～127.

[36] Sherma J, Fried B. Handbook of Thin-layer Chromatography. 3rd Edition. New York: Marcel Dekker, Inc, 2003: 733～737.

[37] Guo F Q, Li A, Huang L F et al. Identification and determination of nucleosides in *Cordyceps sinensis* and its substitutes by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. J Pharm Biom Ana, 2006, 40: 623～630.

[38] Vorbruggen H, Ruh-Pohlenz C. Handbook of Nucleoside Synthesis. New York: John Wiley & Sons, 2001: 4～46,76～85.

[39] 姚其正. 核苷化学合成. 北京:化学工业出版社,2005: 235～262.

[40] Burgess K, Cook D. Syntheses of nucleoside triphosphates. Chem Rew, 2000, 100: 2047～2059.

[41] Chang H M, Oakes J, Olsson A et al. Synthesis and *in vitro* evaluation of adenosine deaminase resistant N-6 aminal and thioaminal prodrugs of cordycepin. Lett Drug Des Discovery, 2005, 2: 133～136.

[42] Shuto S, Obara T, Toriya M et al. New neplanocin analogues. 1. Synthesis of 6′-modified neplanocin A derivatives as broad-spectrum antiviral agents. J Med Chem, 1992, 35: 324～331.

[43] Shuto S, Obara T, Yaginuma S et al. New neplanocin analogues. Ⅸ. A practical preparation of(6′R)-

6′-C-methylneplanocin A(RMNPA), a potent antiviral agent, and the determination of its 6′-configuration. Diastereoselective deamination by adenosine deaminase. Chem Pharm Bull, 1997, 45:138～142.

[44] Schneider B, Meyer P, Sarfati S et al. Activation of anti-reverse transcriptase nucleotide analogs by nucleoside diphosphate kinase: improvement by α-boranophosphate substitution. Nucleos Nucleot Nucl, 2001, 20: 297～306.

[45] Dobrikov M I, Zinaida Z A, Shaw B R. Incorporation of(α-*P*-borano)-2′,3′-dideoxycytidine 5′-triphosphate into DNA by drug-resistant MMLV reverse transcriptase and taq DNA polymerase. Nucleos Nucleot & Nucl Acids, 2003, 22: 1651～1655.

[46] Shaw B R, Dobrikov M I, Wang X et al. Reading, writing, and modulating genetic information with boranophosphate mimics of nucleotides, DNA, and RNA. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1002: 12～29.

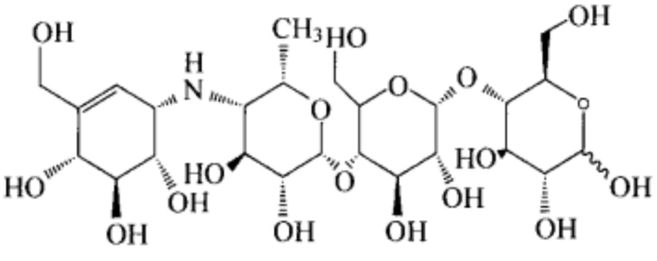
[47] Xu Z, Liu H, Li P et al. Synthesis of nucleoside α-*P*-borano- and α-*P*-thiodiphosphates by a salicyl chlorophosphite approach. AAPS Annual Meeting and Exposition: Nashville, TN, USA, Nov 2005.

[48] Li P, Xu Z, Liu H et al. Synthesis of α-P-modified nucleoside diphosphates with ethylenediamine. J Am Chem Soc, 2005, 127: 16782～16783.

（徐志红）

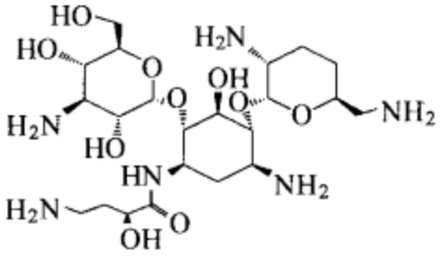
第 23 章　多糖及寡糖

多糖及寡糖普遍存在于生物体内，但是长期以来人们对它们的认识只局限于能量供应以及细胞结构方面上，随着科学家对糖类化合物的研究不断增加，人们开始逐渐认识到它们的重要性。糖类化合物的重要生物学作用被药学家重视起来，并且开始将它们运用到药物的诊断和治疗作用上。目前糖类药物的使用和销售已在药物市场上占有很大的比例。据不完全统计，全球至少有 30 余个多糖正在分别进行正规的抗肿瘤、抗艾滋病及糖尿病治疗等临床实验。新一代糖类药物的范围将会扩展到诸如基于神经节苷脂的肿瘤疫苗、氮杂糖类的抗病毒、抗 HIV 药物及基于寡糖、聚糖结构的抗炎、抗肿瘤药物等[1]。目前已经上市的糖类药物有治疗糖尿病的 acarbose(**23-1**)，抗病毒药物 arbekacin(**23-2**)等，现正处于临床研究的药物有治疗帕金森的 sygen(**23-3**)等[2]。近几年来，糖类化合物已经受到人们的广泛关注，全世界对糖类药物的研制与开发达到空前活跃，这些都与人们对糖类的认识越来越深入密切相关。



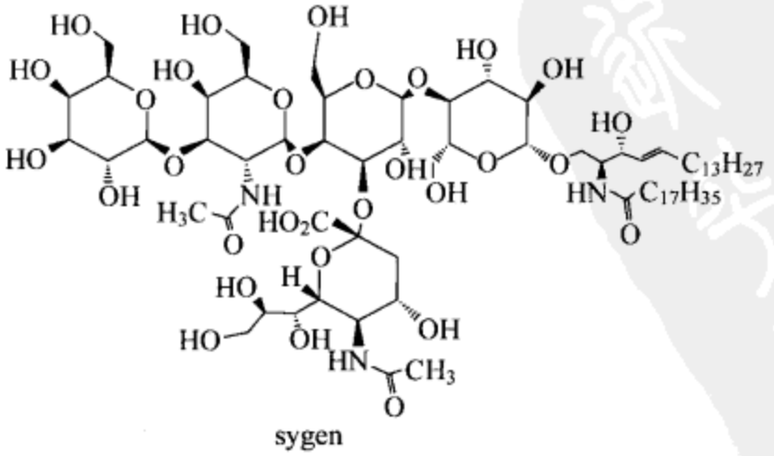
acarbose

23-1



arbekacin

23-2



sygen

23-3

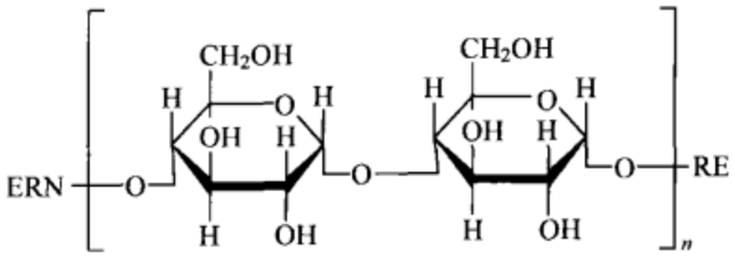
23.1　多糖及寡糖的性质

多糖在原核生物、真核生物中均有广泛分布。现在研究的糖类化合物，大多限制在植物中。多糖是由 10 个以上的一种或多种单糖，并由一个糖的还原性端基 C1 位与另一糖 C2、C3、C4 或 C6 位的羟基彼此脱水缩合连接而成的大分子化合物，构造复杂，不再具有原来单糖的性质，而成为无味的碳水化合物[3]。多糖也称聚糖，是高分子化合物，相对分子质量极大，相对分子质量常随着来源不同而异，在水中的溶解度通常随相对分子质量的增大而降低，它们大多不溶于有机溶剂，也不溶于水，虽然酸或碱能使之转变为可溶性的，但分子会遭受降解。多糖属于非还原糖，由于链端可能有自由还原基，具有微弱的还原能力外，一般不具有还原性。多糖有旋光活性，但不呈变旋作用，经某些酶或酸作用，可以水解生成寡糖或单糖，有些还产生各种单糖的衍生物，如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸、己糖胺，甚至乙醇、硫酸等非糖化合物[4]。

按来源不同，多糖可分为真菌多糖、高等植物多糖、藻类地衣多糖、动物多糖、细菌多糖五大类[5]；按由一种还是多种单糖单位组成，可分为同多糖和杂多糖；按多糖的生物功能，可分为储存或储能多糖和结构多糖。属于储存多糖的有淀粉(**23-4**)、糖原、右旋糖酐和菊粉等。纤维素(**23-5**)、壳多糖、许多植物杂多糖、细菌杂多糖和动物杂多糖(糖胺聚糖)都属于结构多糖。其中，单糖、寡糖或多糖可与蛋白质和脂质连接形成糖缀合物，形成糖蛋白和糖脂的糖部分，这类化合物与人类疾病密切相关，在体内具有非常重要的作用，与作为储存多糖的同多糖不同，一般都是复合的杂多糖。糖缀合物分成三大类：连接脂质的聚糖、通过氮原子与蛋白质连接的聚糖(**23-6**)和通过氧原子与蛋白质连接的聚糖(**23-7**)。研究表明，肿瘤细胞转移的可能性与细胞表面糖蛋白唾液酸化的增加密切相关，唾液酸化的增加是由高度转移性细胞中复合型 *N*- 连接寡糖分支的增加造成的[6]。

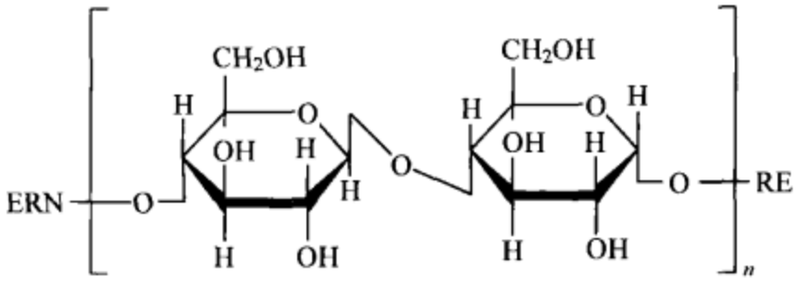
越来越多的研究证明，多糖类化合物能刺激免疫系统，调节体液和细胞免疫性，从而在抵抗病毒感染和抗癌上具有很好的作用。而且多糖作为药物其细胞毒极小，在治疗肿瘤时，它不像一般化疗药物直接杀死生长着的肿瘤细胞，而是促进细胞和体液免疫反应，如激活巨噬细胞或 T-淋巴细胞和 B-细胞，对正常细胞影响很小[7,8]。

寡糖是一类由 2～10 个单糖经脱水缩合形成糖苷键并由其连接成直链或带支链的聚合糖。寡糖又称低聚糖，相对分子质量约 300～2000。构成寡糖的单糖主要是五碳糖和六碳糖，如葡萄糖、果糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖等，这些单糖以直链或分支结构形成寡糖。到目前为止，确认的寡糖有 1000 种以上。根据构成单糖的性质可将寡糖分为同源性寡糖和异源性寡糖。同源性寡糖是指相同单糖



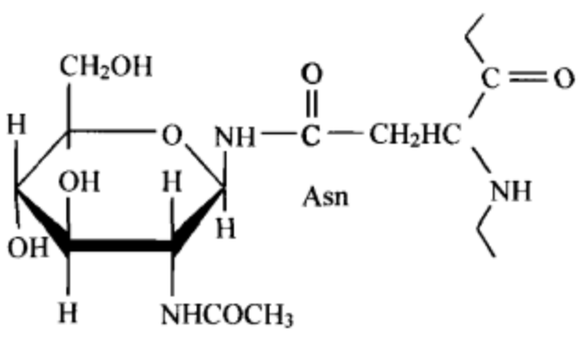
α 1→4 连接淀粉

23-4



β 1→4连接纤维素

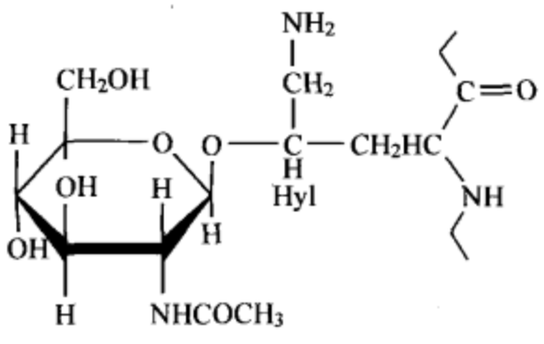
23-5



β-GlcNAc 多肽链

N-糖肽键

23-6



β-Gal 多肽链

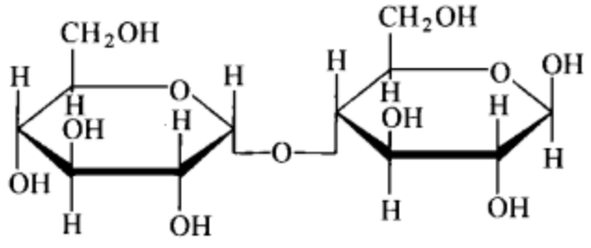
O-糖肽键

23-7

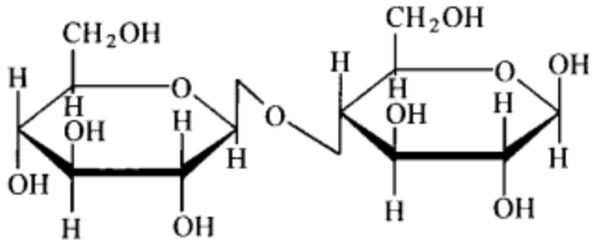
合成的寡糖，异源性寡糖是指两种及两种以上的不同单糖合成的寡糖。还有一类寡糖是在侧链上修饰不同的化学基如胺基、羧基、硫酸基等，此类产物有糖醛酸、胺基糖、脱氧糖等，另外也有在寡糖的还原末端加上氢离子而合成的糖醇类寡糖。几种常见的食用性寡糖有乳糖寡糖、果糖寡糖、木糖寡糖、甘露糖寡糖等[9]。

寡糖具有稳定、安全、无残留的性质，能够抑制细菌、真菌生长，同时具有抗癌作用，在疾病诊断与抗病等方面的应用具有巨大潜力[10,11]。寡糖还是一类重要的生物信息分子，在细胞之间的通讯、识别和相互作用等方面起着重要作用。通过改变细胞表面生长因子受体的寡糖结构从而重塑这些受体，与肿瘤细胞的功能和生物行为有关[12]。一些不能被人体消化吸收的寡糖可通过促进人体内有益细

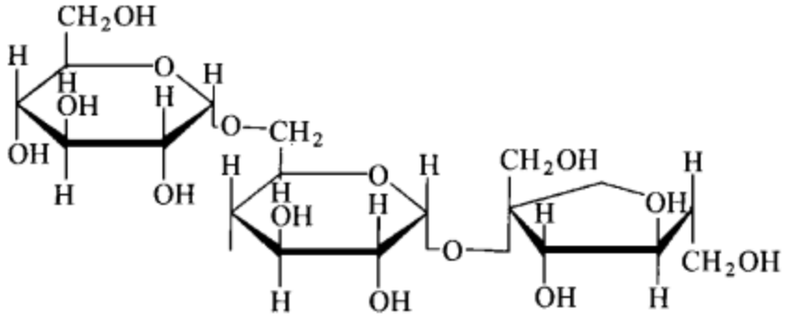
菌——双歧杆菌的增殖，从而抑制肠道内腐败菌的生长，改善肠道微生态环境，减少有毒发酵产物的形成，在防治胃肠道疾病、肝脏疾病等方面发挥重要的功能[13,14]。同时寡糖的结构较多糖简单，不仅可以从植物中提取，还可以由多糖降解、通过有机合成等手段得到大量寡糖，因此寡糖的应用前景越来越广阔而成为科学家们研究的热点。下面列举了三个常见的寡糖：麦芽糖(**23-8**)，纤维素二糖(**23-9**)和棉子糖(**23-10**)。



23-8



23-9



23-10

23.2　多糖及寡糖的提取和分离

多糖和寡糖提取的第一步都必须先将动植物体粉碎，也可以使用超声波技术将动植物或真菌孢子的细胞壁粉碎，这样能够提高糖的提取效率。由于细胞壁大多是由脂质包围，因此脱脂是必要的。一般采用 95%的工业酒精浸泡一周，重复 2～3 次，这样可以将大部分脂溶性物质除去，并取代组织中的水分，晾干后，即可提取。但同一类多糖，由于分离和精制方法或采用的植物原料不同，其性质往往有很大的差别。

23.2.1　多糖及寡糖的提取

根据欲提取多糖及寡糖的性质，可选择各种溶剂。较为简单的提取方法是先用 90～100 ℃水提取，以 4～6 h，重复 2～3 次，至苯酚-硫酸法检测到没有明显颜色反应为止。然后残渣用 5%的氢氧化钠溶液在 4 ℃条件下，提取 2 次，每次 4 h，

中和至 pH 约为 7，透析。这样就分别得到了水提和碱提两部分。将收集到的两部分滤液分别浓缩至一定体积，透析 2 d 除去小分子杂质。但是必须注意的是，由于寡糖的相对分子质量小，在透析时，应该仔细选择透析袋的截阻范围，不要轻易将袋外溶液丢弃。水提部分主要得到中性糖，而碱提主要得到的是酸性糖。但是大多数由碱提得到的糖不溶于水，而目前的分离纯化方法的最基本要求就是欲分离的粗糖应该溶于水，这就可能会对进一步的纯化过程造成了一定的影响。

由于有些特殊的需要，如需要在温和的条件下加速多糖的释放，提取时可以采用生物酶提取法。例如使用纤维素酶可以破坏植物的细胞壁，这样能加速多糖的释放。但是酶解法也有不足之处，如酶价格高，限制了大规模应用；通用性差，不同原料需选用不同的酶；不易确定最佳溶解条件等。酶解法提取多糖需要进一步的研究探索[15]。

近年来，微波和超声波法亦越来越多地应用于多糖的提取。利用微波技术辅助提取可以增加多糖的得率，并且缩短提取时间。虽然超声波辅助提取不能提高其得率，但可显著缩短提取时间。值得注意的是，超声波辅助提取与热提取得到的多糖可能会有差别。Zhang 等[16]报道了利用超声波从 *Pleurotus tuber-regium* 的菌丝体和麦角菌硬粒中提取了一种水溶性的多糖，并将超声提取与热提取进行比较，发现两者得到的多糖的糖组成和蛋白质含量不同，并且发现水提比超声提取得到的寡糖的生物活性更高。

当用碱溶液提取多糖类时，大部分蛋白质会分解或变质，因此当多糖类加乙醇等从水溶液中沉淀时，可使蛋白质残留在母液中而除去。若用热水进行萃取，用乙醇沉淀时亦会一起沉淀，因此在进一步分离前，应该进行除蛋白操作。一般的做法为配置 2%的粗多糖溶液，加入等体积的 40%三氯乙酸，在 4 ℃条件下放置 2～3 h，用 10%的氢氧化钠中和，离心去除蛋白质，扎袋透析。这种做法的效率高，可以适用于大规模的生产，其对多糖有一定的破坏作用，如若多糖中含有阿拉伯糖，会使之降解。较温和的脱蛋白方法还可以使用 Sevag 方法，利用氯仿-正丁醇溶液(4∶1)，振摇离心，除去蛋白质。但是，此方法不适用于大规模的应用。

寡糖可以通过多糖降解得到，这样可以将一些溶解性不好的活性多糖转变成水溶性较好的该多糖的寡糖。以降解透明质酸为例，透明质酸又称黏多糖，其相对分子质量可达几百万，它的水溶液极为黏稠，通过降解之后发现，其水溶性变得非常好。常用降解的方法有酸降解和酶降解。Grandpierre 等[17]在温和条件下比较了用 TFA 及 H_2SO_4 水解和用葡聚糖酶水解的方法得到的寡糖。得出结论：酸水解不能达到酶水解的产率，且不能运用于大规模工业生产，而通过酶水解能够得到可以控制的、大量的 β-1,3- 连接的葡萄糖寡糖。但是有时候由于多糖纯化的困难，在选择合适的酶方面，就要耗费很大的工夫。微波和超声波也应用于寡糖的制备中，这样可以显著缩短反应时间，而且在由多糖水解得到寡糖的过程中，运用超

声波可以得到比较均一的寡糖。通过控制超声波的功率和脉冲，可以得到不同的DP值。Miyazaki 等[18]对透明质酸的超声波降解进行研究，发现超声波降解与功率、离子强度、反应物起始相对分子质量、浓度有关。Dřímalová 等[19]比较酸降解，超声波降解以及微波降解三种不同方法的不同，实验证明，以透明质酸为例，超声波辅助的降解被认为是最适合的反应过程，可得到相对分子质量更小的透明质酸，并且没有对多糖进行化学修饰。

随着合成技术的不断发展，越来越多的寡糖可以被合成，通过合成可以得到大量的所需寡糖，因此可以解决寡糖的应用问题。但是由于每个单糖的反应位点很多，同时各个位点的反应活性相差不大，并且糖苷键还有两种不同的构型，因此要想得到目标产物相当困难。很多科学家经过几十年的努力，现在已经有一些常用的保护基在合成寡糖中有相当重要的作用，这其中包括端基保护基、酯类保护基还有缩醛及缩酮保护基等。在合成过程中根据结构的需要选择不同的保护基，这是很关键的步骤[2]。

近年来又发展了不少新的方法，如酶促合成和固相合成。糖基转移酶对底物结构的专一性非常强，一个糖基转移酶一般只合成一种糖苷键，这样更容易得到目标产物。Weijers 等[20]在文献中详细阐述了糖基转移酶作为寡糖的合成工具，其反应机理和酶特性与转换反应的立体构象和所要求的构象有关。Ono 等[21]成功地运用糖基转移酶合成氨基葡聚糖连接区域的四糖。由于目前能获得的糖基转移酶的数量非常有限，糖苷键酶促合成的应用还很少。固相合成与传统的液相合成相比，固相合成的优势在于它使分离纯化的过程大大简化，避免了寡糖合成中常见的柱色谱分离操作，从而使合成效率大大提高。Seeberger[22]将糖基受体固定在聚苯乙烯树脂上，进行寡糖的自动合成。尽管对寡糖固相合成的研究很多，但是仍未取得突破性进展，在寡糖液相合成尚不成熟的情况下，寡糖的固相合成更显困难[2]。

23.2.2　多糖及寡糖的粗分离

用热水提取的糖一般含有小分子及一些水溶性的杂质，得到的提取液必须经过醇沉，即用不同浓度的乙醇或丙酮进行沉淀分离，以除掉上述杂质。这是根据不同的多糖在低级醇或酮（通常是乙醇或丙酮）中，具有不同溶解度而进行分离。相对分子质量大的多糖较相对分子质量小的多糖在乙醇或丙酮中的溶解度小，逐步加大乙醇或丙酮的浓度可将不同相对分子质量的多糖分别沉淀出来。向粗多糖饱和水溶液中加入乙醇，使乙醇的最终浓度依次为 25%、35%、50%和 70%[23]，离心每次所得的沉淀，可将粗多糖分成五个等级。利用这种醇沉方法分离寡糖时必须注意，当乙醇浓度较高时，寡糖会留在上清液中而不是沉淀下来。将上清液浓缩得到的沉淀冻干，即可得到粗寡糖。还可以用季铵盐沉淀法分离不同大小的多糖分

子，这种方法常用于分离酸性多糖及中性高相对分子质量多糖。常用的季铵盐有十六烷基三甲基铵盐的溴化物(CTAB)及其碱(CTAB-OH)和十六烷基氯化吡啶(CPC)。

23.3 多糖及寡糖的干燥

用上述方法得到的多糖含有水分，会使得多糖容易变质，不利于储存，应设法将其中的水分除去。较简单的方法是将醇沉后得到的多糖用水溶煮沸，此时可将大部分残余的乙醇除去，然后冻干成粉末状。或者依次加入无水乙醇、丙酮洗涤，离心后将沉淀放入真空干燥箱进行烘干。如果在含有水分的情况下缓慢干燥，多糖往往会变成角质块状物，一旦生成后，要使它再度溶解，就需要很长时间[3]。

寡糖由于相对分子质量小，在空气中容易吸潮，故将得到的寡糖冻干之后，应立即放入干燥器中，避免吸潮发霉。

23.4 多糖及寡糖的精制方法

虽然利用上述的分级沉淀方法已经可以得到不同相对分子质量大小的多糖及寡糖，但是要得到更纯的糖类化合物，还要使用其他方法进行纯化，如柱色谱、超速离心、电泳、超滤等手段。

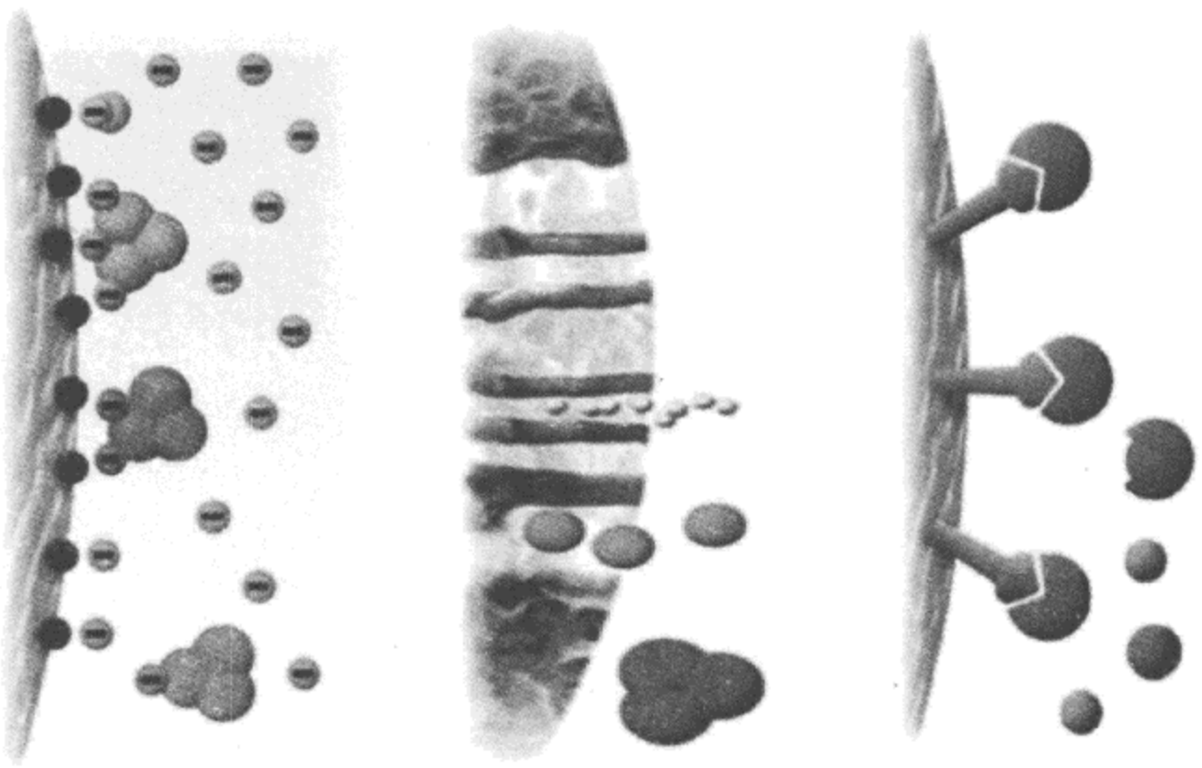
23.4.1 柱色谱

目前糖类化合物分离纯化应用最多的方法是柱色谱方法。现在有很多种类的柱色谱，这里重点叙述分离糖类化合物常用的两种——离子交换柱色谱和凝胶柱色谱。

23.4.1.1 离子交换柱色谱

离子交换柱色谱是生物化学、分子生物学研究中应用非常广泛的分离、提纯技术，并大量地应用于生产中。由于近年来研制出许多先进的仪器设备和新型的离子交换剂，使得这一技术又有了很大的发展。如图 23.1 所示，常用的离子交换剂一般有三种类型：①离子交换树脂；②离子交换纤维素；③离子交换球型多糖。此外，还有其他类型的离子交换剂，其应用形式也较多，如离子交换柱、离子交换膜、离子交换薄层板及离子交换纸等。根据离子交换剂的性质，又可分为阳离子交换剂、阴离子交换剂、兼性离子交换剂、吸附性交换剂等[25]。

阴离子交换柱色谱，如图 23.1(a)所示，是目前多糖纯化中应用得最普通的一种方法，通过柱色谱使多糖溶液得到初步纯化，有的多糖通过该步骤就可得到各种



(a) 阴离子交换柱色谱　　(b) 凝胶柱色谱　　(c) 亲和柱色谱

图 23.1　柱色谱示意图[24]

均一多糖。应用最广泛的阴离子交换剂有二乙基氨基乙基纤维素(DEAE-cellulose)、DEAE-葡聚糖(DEAE-Sephadex)及 DEAE-琼脂糖(DEAE-Sepharose)三种,其中以 DEAE-cellulose 应用得最广泛。阴离子交换柱色谱适合于分离各种酸性、中性多糖及黏多糖,它是利用吸附与解吸附的原理。有些交换剂还具有分子筛的作用,如 DEAE-葡聚糖及 DEAE-琼脂糖。多糖在交换剂上的吸附力与多糖结构有关,吸附力一般随多糖分子中酸性基团的增加而增加。对于线状分子,相对分子质量大的中性多糖较相对分子质量小的易吸附。对于直链多糖与支链多糖,前者吸附力大于后者。装柱前,通过 HCl 预处理,使树脂带上 Cl^-。上样后,先用水作洗脱剂将中性多糖洗脱下来,再改变洗脱剂的离子强度,一般采用 NaCl 溶液,改变其浓度,可以是梯度洗脱也可以是分段洗脱,将带有不同酸性基团的多糖洗脱下来,这样就可以将中性多糖和不同的酸性多糖分离。若用 NaOH 预处理,则可使树脂带上 OH^-,此时中性多糖也能吸附。但是由于上述三种交换剂在使用时存在流速过慢、柱床高度会随缓冲液浓度及 pH 的改变而改变,且稳定性差,使用寿命短等缺点,现在很多实验室会使用 Pharmacia 公司生产的 Sepharose 系的离子交换剂 Sepharose FF 和 Sepharose HP。Sepharose FF 由于它的高流速和高载量,最适合于进行大量粗制产品的纯化工作。Sepharose HP 的功能类似于 Q

Sepharose FF，是琼脂糖凝胶中颗粒最细、分辨率最高的品种，其化学稳定性和 pH 稳定性好，其流速和载量均适合实验室或大量制备应用。阴离子交换树脂在寡糖的纯化中也是可行，但与多糖不同的是，当采用不同离子强度的溶液梯度洗脱时，寡糖需通过柱色谱进行脱盐，常用的是 Sephadex G-25。

23.4.1.2 凝胶柱色谱

凝胶过滤又称分子筛色谱、凝胶渗透和排阻色谱等。凝胶柱色谱是根据多糖分子的大小和形状的不同进行分离，在多糖的分离纯化上应用得很普遍，如图 23.1(b)所示。适合用于凝胶过滤的介质很多，为了取得预期的分离纯化效果及保持色谱分离后的产品不因之变性失活，应选用最合适于被分离物的介质和色谱分离条件，凝胶过滤介质的性质、筛孔大小、颗粒的均一性、机械强度及化学稳定性等应符合于凝胶过滤的要求。常用的凝胶有各种型号的葡聚糖凝胶(Sephadex G)、聚丙烯酰胺葡聚糖(Sephacryl)、琼脂糖凝胶(Sepharose)、聚丙烯酰胺凝胶 Bio-Gel-P，还有交联聚苯乙烯凝胶 Bio-Bead 以及一种由 Phamarica 公司提够的新型凝胶过滤介质 Superdex 等。不同型号的凝胶介质分离多糖及寡糖的相对分子质量不一样，实验时，当样品用阴离子交换树脂分离后，必须通过高效液相分析，得出分离得到的主要多糖的相对分子质量，根据这一信息选择合适型号的凝胶介质，对纯化多糖很有帮助[3]。

寡糖的分离纯化，大致与多糖的过程相同，但是由于寡糖的相对分子质量较小，因此在运用凝胶柱色谱进行分离时，要得到纯的寡糖，会碰到一些困难。当这种情况出现时，应该根据目标寡糖的分子结构，选择合适的分离方法，而不是只局限在利用体积排阻原理进行纯化。

23.4.1.3 其他柱色谱

除上述两种常用的柱色谱外，还有纤维素柱色谱、亲和柱色谱。纤维素柱色谱目前已经用得很少，一般都用 DEAE-纤维素柱色谱代替。DEAE-纤维素柱色谱也有纤维素的性质，但是这些交换剂具有比纤维素更高的电荷密度，故交换容量很大，分离效果更好。亲和柱色谱，如图 23.1(c)所示，是利用生物分子间的亲和吸附和解离而设计的色谱方法。通过固定在水不溶性的载体上的配体的特异和可逆性的吸附，从而使所需纯化的物质提纯。一般配体选择欲分离的可亲和的分子，然后流动相为含有欲分离的糖溶液，这时溶液中只有能和配体具有亲和力的糖分子被结合而吸附，其他糖则流出柱外，然后再改变流动相的离子强度及 pH，使配体与糖分离，则纯化的糖就流出柱外。江等[26]对巴戟天多糖亲和柱色谱纯化的研究进行了探讨，得到最佳吸附条件为 pH 7.5、NaCl 浓度 0.1 mol · L^{-1}，确定的最佳脱附条件为 pH 6.5。Dévédec 等[27]利用金属亲和柱色谱将壳聚糖低聚物(COS)

分离开，分离得到了 95%的二聚体，90%的三聚体，并且产量都为 60%～95%。可见，亲和柱色谱的效率非常高，特别是分离含量较少的糖。使用这种色谱柱可以浓缩几百倍，甚至几千倍，但是要找到一个理想的配体固定在载体上是很不容易的，所以目前在糖的纯化上用得不多。

对于寡糖的纯化过程中，还可以采用比较特殊的方法——硅胶柱，这种分离柱利用硅胶对不同羟基个数的寡糖的吸附力不同，通过合适的展开剂，将具有不同 DP 值的寡糖进行分离。已经有人在这方面进行了尝试，房等[28]利用高效液相色谱法(HPLC)结合薄层色谱法(TLC)，探讨了 KS-802 寡糖分析柱分析甲壳胺寡糖的条件，并尝试了几种薄层色谱展开剂对甲壳胺寡糖组分的展层条件。采用乙酸乙酯-甲醇-水-氨水(5∶9∶1∶1.5，v/v)混合液作为硅胶薄板展开剂，可将不同聚合度的甲壳胺寡糖很好地分开，且色谱分离重现性高，糖残基数目和 R_f 具有很好的线性关系。

23.4.2　超速离心法

利用超速离心机分离多糖，多糖在超速离心的条件下，由于分子大小有差异，其沉积比率亦不同从而得到分离。超速离心法可分为两种类型：一种是差速离心法，它是采用逐步增加离心速度，使不同大小的多糖分批分离出来；另一种是密度梯度区带离心法，这种超速离心法在多糖中应用较多，特别是用这种方法检测多糖的纯度。它的主要依据是多糖在惰性梯度介质中离心并达到平衡后，不同相对分子质量的多糖(或其他溶质)分配到梯度中某一特定位置上，形成不同区带，然后将不同区带进行分离，即得到不同的多糖组分。

23.4.3　电泳法

电泳技术是以电场为驱动力的一类分离分析手段。电泳是带有电荷的胶粒或分子在电场作用下，向阳极或阴极移动的现象。糖类在电场的作用下，按其分子大小、形状及电荷的不同而移动不同的距离。高效毛细管电泳以其快速、高效、简便、高分辨及样品和溶剂消耗少等优点在最近十几年内成为分离和分析生物活性物质的有力工具之一，但是由于糖类化合物结构的高度复杂性和分离检测的困难，使得糖类化合物的高效毛细管电泳较其他生物分子存在更大的困难[29]。为了使糖类化合物能产生电迁移而得以相互分离，将毛细凝胶电泳与激光诱导的荧光检测器结合，在糖的应用上具有很大的潜力。近年来这种毛细凝胶电泳得到越来越广泛的应用。与此同时，仪器制造商 Beckman Coulter 发明了一种试剂盒用于他们的仪器 ProtemeLab-PA 800。这种试剂盒包括荧光标记的 1-氨基比林-3，6，8-三磺胺吡啶(ATPS)、毛细管、胶状电解质以及系统适用性标准[30]。

23.4.4 超滤法

超滤法是一种根据溶液中分子的大小和形态，在埃米数量级选择性的过滤膜分离技术，它所采用的超滤膜能够从水和其他液体中分离出很小的胶体和大分子。由于超滤膜具有不对称微孔结构，且采用摩擦流道和湍流促进结构，可以减少膜污染，使得在分离过程中大分子溶质和微粒随溶液切向流经膜表面，而小分子物质和溶剂则在压力驱动下穿过致密层上的微孔而进入膜另一侧，因而超滤膜可以长期连续使用并保持较恒定的产量和分离效果。将超滤膜用于多糖这种生物活性物质的分离，具有不损害活性、分离效率高、能耗低、设备简单、可连续生产、无污染等优点[31]。

23.4.5 酶解法

由于酶具有高度的特异选择性，因此可以利用它破坏不需要的多糖成分而保留所需的多糖成分。

以上为常用的分离纯化方法，但是在实验过程中，应该根据实际条件和实验的需要选择合适的方法以达到最佳效果。

23.5 多糖及寡糖结构的解析

通过许多显色方法可以区分和测量醛糖、酮糖、氨基糖和糖醛酸等。在检测收集多糖时，采用最多的是苯酚-硫酸显色法，该法可与游离的或寡糖、多糖中的己糖、糖醛酸（或甲苯衍生物）呈显色反应，己糖在 490 nm 处（戊糖及糖醛酸在 480 nm）有最大吸收，吸收值与糖含量呈线性关系，还可以用蒽酮-硫酸法进行检测。这两种方法测量的原理都是一样，都是糖在硫酸的作用下形成糠醛或其衍生物，再与苯酚或蒽酮缩合产生颜色反应。利用四硼酸钠的硫酸溶液-间羟联苯法可以鉴别和测量己糖醛酸。氨基己糖经碱性乙酰化反应后能与对二甲氨基苯甲醛呈色而进行定量[4]。

多糖结构的微观不均一性使得完整的结构解析比较困难，通常需要巧妙配合各种化学手段及波谱学方法，有时候也会运用生物学方法进行解析，得到来自各个角度的信息和数据，从而构成推断糖链以及结构的基础[4]。

现在已经有一些成熟的化学方法用来分析多糖的结构，如甲基化分析和 Smith 选择性断裂邻二羟基等方法来推测单糖的连接方式等经典分析方法。这些方法虽然很古老，但是对于多糖一级结构的鉴定是非常重要的[4]。

近几年来，新的仪器和方法推动着研究天然产物的发展，这些重要的先进技术为阐明化合物的结构提供了更新更有利的工具，这些技术包括 GC-MS、HPLC-PAD-MS-NMR 等[32~34]。这些方法能直接、快速地分析天然产物，这些手段的不

断发展也推动了糖化学的不断前进，使我们能够推测出复杂糖类结构，为糖生物学的研究提供必要的结构信息。

高效液相色谱(HPLC)是糖类研究方法学中的重要组成部分。在糖类化合物的分离和分析的过程中，HPLC 具有快速、方便、分辨率高、分离效果好、重现性好和不破坏样品等优点，并且特别适合于某些热敏糖类的测定[35]。

糖纯度的标准不能用通常化合物的标准来衡量，它指的是一定相对分子质量范围的均一组分，代表相似链长的平均分布。所以当得到的多糖在高效液相中得到一个对称的单一峰，就可以认为得到了纯品。为进一步确认多糖为纯品，可以测定其灰度、含氮量、甲氧基值、乙酰基、中和值、皂化值、结合硫酸值以及物理常数如比旋光度、黏度等，可作为控制纯度的指标。将该物质分成几个等分，测定上述参数，若这些值保持不变，可以认为该多糖确为纯品[4]。

在解析糖结构时，核磁共振(NMR)方法极为重要，它的引入大大推动了这一领域的发展。早期 NMR 主要解决糖结构中糖苷键的构型以及重复结构中单糖的数目，通过^{1}H NMR，可以看到该糖是以什么构型连接的[36]。一般 α 型的化学位移要比 β 型的大，α 连接的异头碳上 H 的化学位移大约为 5.20 ppm，而 β 连接的异头碳上的 H 则为 4.41 ppm，这样很容易推断出该糖的连接构型。^{13}C NMR 中可以看出一些特征的峰，如醛基、甲基的峰，这些在碳谱上是很特殊的，可以很容易地找出来。随着 NMR 技术的发展，尤其是二维核磁共振(2D NMR)的出现和发展，NMR 逐渐成为获得多糖结构信息最有力的工具[37]。二维核磁共振确实在糖结构的解析中具有重要的作用，运用得非常广泛[38~40]。随着高场 NMR 技术的飞速发展，核磁共振技术在糖的结构研究中发挥着日益重要的作用，不仅对共价结构，而且对于糖在溶液中或固体状态下的构象以及动力学特征研究也是最有力的工具[41]。同时，NMR 技术也一直持续地在发展，近年来出现了具有重要意义的新技术脉冲场梯度[42]和多糖的^{13}C 标记技术[43]。

质谱技术在近年的发展速度超过了核磁共振，正成为越来越重要的结构分析手段，快速解决寡糖和糖缀合物的结构问题。质谱，尤其是 GC-MS(EI 或 CI 方式)早已用于单糖分析。现在 GC-MS 已广泛用于糖组成分析及甲基化分析，以确定糖残基的连接方式。近年来，各种软电离技术的诞生，如快原子轰击质谱、电喷雾质谱、基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱等，使糖化学和糖生物学的研究取得了日新月异的进展[44]。

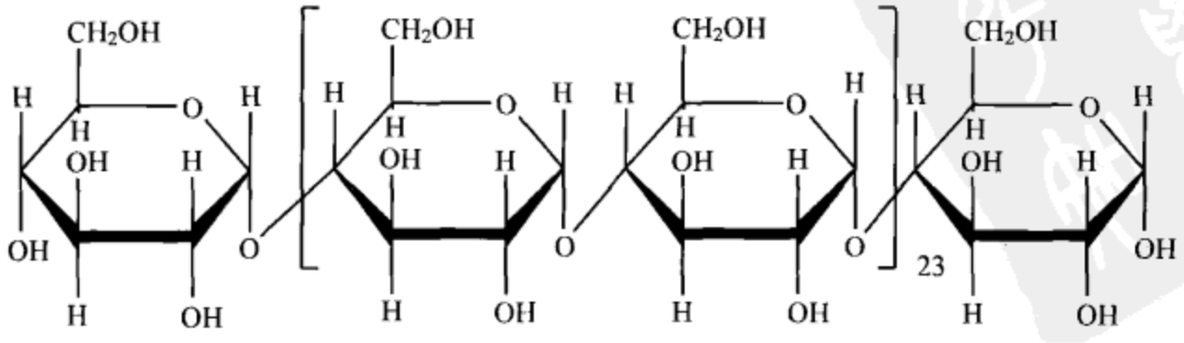
总之，随着仪器的巨大发展，对糖结构的分析越来越方便。但是对于结构类似且复杂、相对分子质量大的糖分子，还有待科学技术的不断发展。未来的进步在于生物学手段和谱学手段的联用，如近期出现的用多种糖苷水解酶和质谱联用来解析 *N*- 连接寡糖和肝素类寡糖的结构。Morelle 等[45]用 MALDI-TOF-MS 及多种基体研究复杂的寡糖，发现 2,5-DHB 是最适合的基体。将外切糖苷酶水解与

MALDI-TOF-MS 结合可对 pmol 级糖缀合物和寡糖进行结构鉴定。Geyer 等[46]在水中以 6-氮杂-硫胸腺嘧啶(ATT)作为基体,在使用前用低浓度挥发性缓冲液(如乙酸铵)使酶透析,再用质谱对所得产物进行分析,可提供有关反应完全度和糖缀合物性质,如单糖序列、分支情况等的信息。结果表明,在含有 ATT 的基质中,所有使用的外切糖苷酶能保持其活性。

23.6 多糖及寡糖的提取分离实例

23.6.1 甘草葡聚糖[47]

干燥的甘草根经粉碎后,乙醇回流 24 h,先用沸水提取,提取 12 次,每次4 h,直到用苯酚-硫酸法检测无棕红色为止。提取后的残渣经 2%的碳酸氢钠在 10 ℃下提取过夜,碱性提取液用盐酸中和,离心。提取液浓缩至小体积后,用 3 倍体积 95%的乙醇溶液沉淀后,用三氟乙酸法去除蛋白,离心,上清液透析,乙醇再沉淀,沉淀依次经丙酮和乙醚洗涤后,干燥,得到棕色多糖混合物 GB。GB 经 Cellex-D (Cl^-型)柱色谱分离,去离子水洗脱,旋光检测,分部收集得到一个组分,该组分再经 Sephadex G-100 LKB 柱色谱分离,从 0.2 mol·L^{-1} NaCl 水溶液洗脱,示差检测,收集高峰部分,透析,冷冻干燥,得到白色粉状组分即甘草葡聚糖(GBW)。GBW 经糖组成分析表明为单一的葡萄糖组成,甲基化分析表明 GBW 为 1,4-连接的葡聚糖,且糖链上无分支。GBW 进行过碘酸盐氧化反应,发现氧化反应需要 7 天才能进行完全。其过碘酸盐的消耗以及甲酸生成的最终值分别为单位己糖的 1.09 mol 和 0.07 mol,与理论值 1.08 mol 和 0.08 mol 相近。然后将氧化完全的多糖进行 Smith 降解,降解产物经衍生化后再行 GC 分析,发现只含赤藓醇。赤藓醇为 1,4 连接的 Glc 残基的降解产物。这表明过碘酸盐氧化和 Smith 降解的结果与甲基化一致。由于 GBW 与 KI-I_2 无反应,UV 检测于 500 nm 以上无紫外吸收,说明该多糖不具有淀粉的 α-螺旋结构,与直链淀粉的立体结构不一致。文献报道的一些 α-(1→4)葡聚糖都有分支,该多糖无分支,而且相对分子质量较小,是一种新的葡聚糖。结构如 **23-11** 所示。



23-11

23.6.2　猴头菇聚糖[48]

取干燥的猴头菇子实体 1.5 kg，用 95%乙醇索氏提取 6 h 脱脂，按图 23.2 所示的流程进行提取。

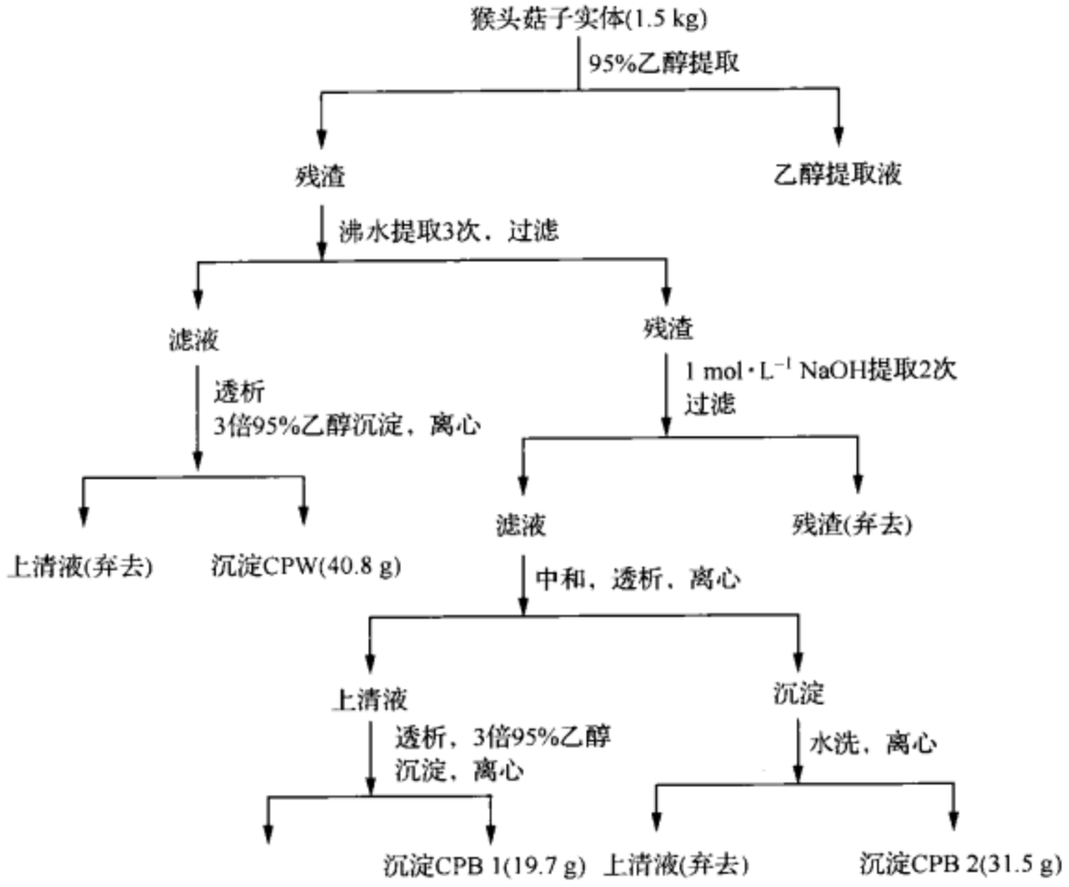


图 23.2

取粗多糖 CPW 20 g，以 Sevag 法(氯仿：正丁醇＝4：1)脱蛋白 5 次，直到 Lowry 反应呈阴性，得完全脱蛋白后的粗多糖 14.7 g。以 DEAE-纤维素柱(80 cm×6 cm，Cl^-型)分多次上样进行色谱分离，先后以蒸馏水及0.1 mol·L^{-1}、0.2 mol·L^{-1}、0.4 mol·L^{-1}和 0.8 mol·L^{-1} NaCl 溶液洗脱，以苯酚-硫酸法检测糖含量，收集合并主峰位。其中蒸馏水洗脱和 0.2 mol·L^{-1} NaCl 洗脱部分经浓缩、透析和冷冻干燥后分别得 HEPA 1 和 HEPA 3。HEPA 1 上 Sephadex G-200柱色谱分离，以 0.2 mol·L^{-1} NaCl 洗脱，得 HEP-1(230 mg)。HEPA 3(1 g)以 Sephadex G-75 柱纯化，得 HEP-2(115 mg)。

取 CPB 1 样品 10 g，分多次上 DEAE-纤维素柱(80 cm×6 cm，OH 型)，分别以蒸馏水及 0.01 mol·L^{-1}、0.02 mol·L^{-1}、0.04 mol·L^{-1} NaOH 溶液洗脱，收集 0.04 mol·L^{-1} NaOH 溶液洗脱含糖部分，以 1 mol·L^{-1} HCl 中和，透析、浓缩、冷冻干燥，得多糖 HEP-3(1.4 g)。

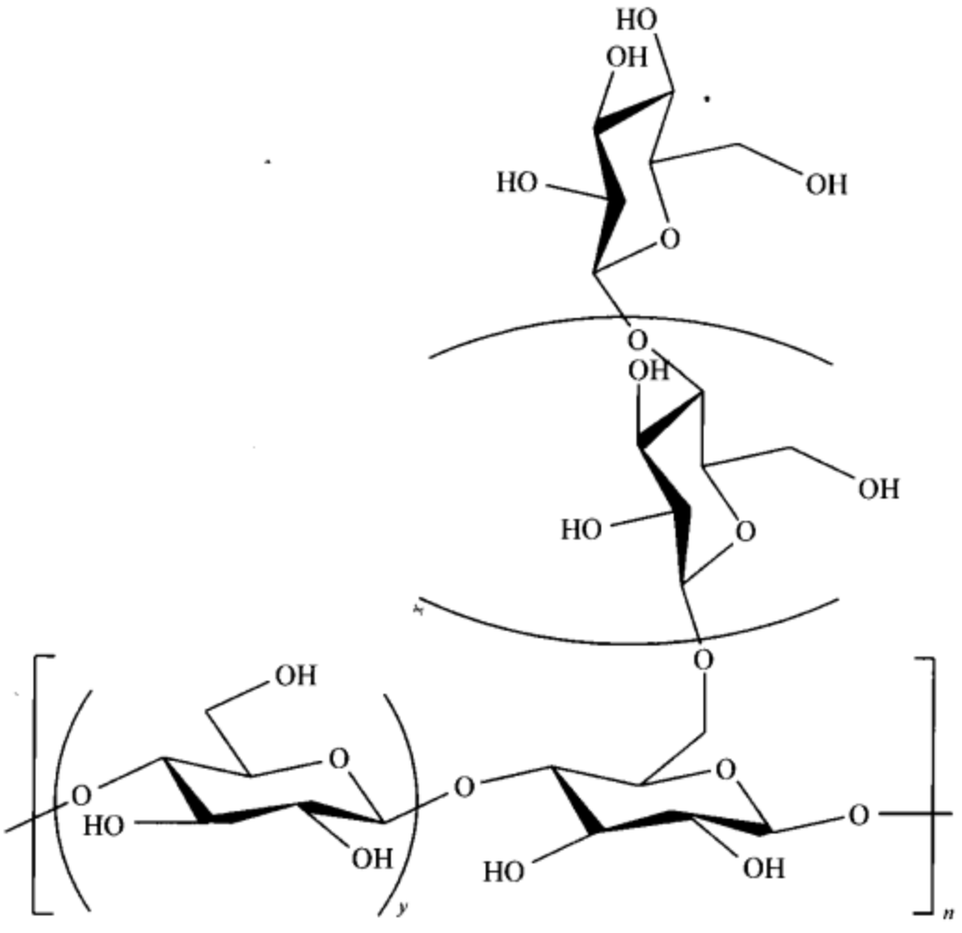
取 CPB 2 样品 5 g，溶于 500 mL 0.5 mol·L^{-1} NaOH 溶液中，搅拌使充分溶解，离心除去不溶物。上清液在搅拌下缓缓滴加 Fehling 试剂，至不再产生沉淀时，离心(6000 r·min^{-1})。沉淀部分在 0 ℃以含 5% HCl 的乙醇分解铜复合物，再一次以乙醇和无水丙酮洗涤，产物以 Fehling 试剂按照上述方法反复沉淀 3 次，得到浅黄色粉末 HEP-4(670 mg)。上清液以 25%冰醋酸中和，透析后用 3 倍体积乙醇沉淀，得白色粉末 HEP-5(3.3 g)。

HEP-1、HEP-2 和 HEP-3 以 HPGPC 法检测，均出现对称的单峰，可以鉴定为均一的多糖。其中 HEP-1 和 HEP-2 的相对分子质量分别为 1.8×10^4 和 1.2×10^5，HEP-3 的相对分子质量则超过 100 万。HEP-4 和 HEP-5 在水中不溶解，在测定条件无法进行 HPGPC 分析，故首先将它们分别溶解于 0.5 mol·L^{-1} NaOH，再上 Sephadex S-300 柱，以 0.5 mol·L^{-1} NaOH 洗脱，分部搜集。以苯酚-硫酸法检测，得到的洗脱曲线呈单一对称峰。HEP-4 以 Fehling 试剂反复纯化 3 次，最后一次纯化过程中各取少量以不同体积 Fehling 试剂所沉淀下来的多糖作组成分析，糖组成基本不变，可以判断为均一的多糖。

这几种多糖的结构分析可以按照上述所列的一些方法进行分析。从本实验分离得到的两种杂多糖(HEP-1 和 HEP-4)、α-葡聚糖(HEP-5)和一种含糖醛酸的葡聚糖(HEP-2)均是首次从猴头菇子实体中分离得到，其中 HEP-1 和 HEP-2 的糖基构成在以前报道的真菌多糖中未见类似报道。上述结果表明，猴头菇中的多糖主要为中性多糖，且大多以葡萄糖为主要构成单元。

23.6.3 天麻多糖[49]

将 20 kg 粉碎后的天麻，用 95%的乙醇浸泡，脱脂后取出晾干。取 5 kg 天麻加水提取 4 次，每次 4 h。将提取液浓缩至小体积，透析 48 h。透析内液约 10 L，加入 30%三氟乙酸至终浓度约为 15%。用 10% NaOH 中和至 pH 为 7 后，扎袋透析 48 h。将去蛋白透析内液浓缩至小体积，离心，加入 3 倍体积的乙醇，醇沉过夜。沉淀离心后，用乙醇洗涤 2 次后烘干，得天麻粗多糖 WGEW。称取天麻粗多糖 10 g，以 DEAE-纤维素柱(80 cm × 6 cm，Cl^-型)分多次上样进行色谱分离。以蒸馏水洗脱后，再用 0.1 mol·L^{-1} NaCl 进行洗脱，以苯酚-硫酸法检测糖含量，收集合并主峰位，浓缩，透析得到 WGEW。经 HPLC 分析得到较为单一对称的峰。对 WGEW 进行结构分析表明，其为一个 α-(1,4)连接的葡聚糖，且在 6 位上连有 α-1,4 连接的支链，结构如 **23-12** 所示。将 WGEW 按照吡啶-氯磺酸法进行硫酸化，经 ^{13}C NMR 分析发现，硫酸化位置在 6 位，且研究表明，硫酸化程度越高，其对控制登革热感染的作用力越大。



$x+y=16$

23-12

23.6.4　夹竹桃寡糖[50]

取 2 g 夹竹桃粗多糖(经水提醇沉得到的粗多糖),用 0.1 mol·L^{-1} TFA 在 100 ℃的条件下降解 4 h(应尽可能让粗多糖溶于所配的 TFA 溶液中)。用甲醇将未反应的三氟乙酸蒸干,用 70%的乙醇醇沉过夜,取上清液,浓缩后冻干,得到夹竹桃粗寡糖。利用硅藻土∶活性炭=1∶1 的柱进行分离,分别用去离子水、5%的乙醇和 50%的乙醇进行分离。将 50%的乙醇洗脱液保留,其余丢弃,这样将粗寡糖中的单糖、二糖、三糖除掉了。将样品中大部分乙醇旋干后,放入冷冻干燥机上冻干。用 Bio-Gel-P2 柱进行反复分离纯化,可以得到 3 个不同相对分子质量大小的寡糖 OJ1,OJ2,OJ3。经完全酸水解后,TLC 分析可知,这 3 个寡糖中不含糖醛酸,GC 分析全是半乳糖。甲基化分析结果表明,Gal 为 1,4 连接。从氢谱异头碳上氢的位移可知,Gal 为 β 连接方式。ESI-MS 分析得到三个寡糖的相对分子质量分别为 990.40,828.33,1801.61。综合上述结果,可得它们分别为六糖(OJ1)、五糖(OJ2)及十一糖(OJ3),且都为 β-(1,4)连接的半乳糖。药理活性表明,OJ2 与

OJ3 具有抗血管生成作用，但是 OJ1 不具有。同时 OJ3 是首次被报道的寡糖结构。

参 考 文 献

[1] 方积年，丁侃．天然药物——多糖的主要生物活性及分离纯化方法．中国天然药物，2007，5(5)：338～347.

[2] 蔡孟深．糖化学．北京：化学工业出版社，2007.

[3] 徐任生主编．中草药有效成分提取与分离(第二版)．上海：上海科学技术出版社，1989.

[4] 徐任生主编．天然产物化学(第二版)．北京：科学出版社，2004.

[5] 张万秋，朱大勇，林治华．生物多糖的研究进展．重庆工学院学报，2008，22(2)：39～43.

[6] 张树政．糖生物学与糖生物工程．北京：清华大学出版社，2002.

[7] Mantovani M S, Bellini M F, Angelia J P F et al. β-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. Mutation Research, 2008, 658(3): 154～161.

[8] Tong H B, Xia F G, Feng K et al. Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. Bioresource Technology, 2009, 100(4): 1682～1686.

[9] 王镜岩．生物化学(第三版)．北京：高等教育出版社，2002.

[10] Brooks S A, Carter T M, Royle L et al. Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumour strategies. Anticancer Agents Med Chem, 2008, 8(1): 2～21.

[11] Daniel B, Seeberger P H. Synthesis and medical applications of oligosaccharides. Nature, 2007, 446: 1046～1051.

[12] Zhao Y Y, Takahashi M, Gu J G et al. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. Cancer Sci, 2008, 99: 1304～1310.

[13] 归莉琼，魏东芝．生物活性——低聚半乳糖．中国乳品工业，1998，26(4)：9～125.

[14] 魏远安，姚评佳．蔗果低聚糖的研究和生产应用．食品与发酵工业，1999，26(1)：48～54.

[15] 袁龙刚，何云，刘林丽．现代提取分离技术在食药用菌多糖分离纯化中的应用．2006，5：76～79.

[16] Zhang M, Zhang L, Cheng P C K et al. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium*. Carbohydr Polymers, 2004, 56: 123～128.

[17] Grandpierre C, Janssen H G, Laroche C et al. Enzymatic and chemical degradation of curdlan targeting the production of beta-(1→3)oligoglucans. Carbohydr Polymers, 2008, 71: 277～286.

[18] Miyazaki T, Yomota C, Okada S. Ultrasonic depolymerization of hyaluronic acid. Polymer Degradation and Stability, 2001, 74: 77～85.

[19] Dřimalová E, Velebny V, Sasinková V et al. Degradation of hyaluronan by ultrasonication in comparison to microwave and conventional heating. Carbohydr Polymers, 2005, 61: 420～426.

[20] Weijers C A, Franssen M C, Visser G M. Glycosyl transferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. Biotechnology Advances, 2008, 26: 436～456.

[21] Yasunari Ono, Motohiro Kitajima, Shusaku Daikoku et al. Sequential enzymatic glycosyltransfer reactions on a microfluidic device: Synthesis of a glycosaminoglycan linkage region tetrasaccharide. Lab Chip, 2008, 8: 2168～2173.

[22] Seeberger P H. Automated oligosaccharide synthesis. Chem Soc Rev, 2008, 37: 19～28.

[23] 蔡鹰，丁安伟．利咽含片醇沉工艺的优选．中国实验方剂学杂志，2007，13(2)：16～18.

[24] 凝胶过滤层析手册．Amersham Biosciences.

[25] 吴冠芸．生物化学与分子生物学实验常用数据手册．北京：科学出版社．2000.

[26] 江咏，李琳，陈玲等．巴戟天水溶性多糖分离纯化的研究．食品化学，2007，28：95～99.

[27] Dévédec F, Bazinet L, Furtos A et al. Separation of chitosan oligomers by immobilized metal affinity chromatography. J Chromatogr A, 2008, 1194: 165～171.

[28] 房子，刘万顺，位晓娟等．甲壳胺寡糖的液相色谱及薄层层析分析．中国海洋大学学报，2005，35(1)：113～115.

[29] 张剑波，田庚元．糖类的高效毛细管电泳．有机化学，1998，18：88～96.

[30] Domann P J, Pardos-Pardos A C, Fernandes D L et al. Separation-based glycoprofiling approaches using fluorescent labels. Proteomics, 2007, Suppl 1: 70～76.

[31] 何江川，韩永萍．超滤膜分离法在多糖分离提取中的应用．食用菌，2005，1：3～6.

[32] Wolfender J L, Ndjoko K, Hostettmann K. The potential of LC-NMR in phytochemical analysis. Phytochem Anal, 2001, 12: 2～22.

[33] Wolfender J L, Ndjoko K, Hostettmann K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectrometry: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. J Chromatogr A, 2003, 1000: 437～455.

[34] Koleva I I, Niederlander H A, van Been T A. An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures. Anal Chem, 2002, 72: 2323～2328.

[35] 方积年，魏远安．高效液相色谱法在糖类研究中的应用．色谱，1991，9(2)：103～107.

[36] Ye L B, Zhang J S, Yang Y et al. Structural characterisation of a heteropolysaccharide by NMR spectra. Food Chem, 2009, 112: 962～966.

[37] 李波，陈海华，许时婴．二维核磁共振谱在多糖结构研究中的应用．天然产物研究与开发，2005，17(4)：523～536.

[38] Drzewiecka D, Arbatsky N P, Stalczek P et al. Structural and serological studies of the O-polysaccharide of strains from a newly created Proteus 078 serogroup prevalent in Polish patients. Immunol Med Microbiol, 2008, 54: 185～194.

[39] Wang X S, Dong Q, Zuo J P et al. Structure and potential immunological activity of a pectin from *Centella asiatica* (L.) Urban. Carbohydr Res, 2003, 338: 2393～2402.

[40] Liu L, Dong Q, Dong X T et al. Structural investigation of two neutral polysaccharides isolated from rhizome of *Polygonatum sibiricum*. Carbohydr Polymers, 2007, 70: 304～309.

[41] 王展，方积年．高场核磁共振波谱在多糖结构研究中的应用．分析化学，2000，28(2)：240～247.

[42] Norwood T J. Magnetic field gradients in NMR: friend or foe? Chem Soc Rev, 1994, 23: 59～66.

[43] Suda M, Ohno N, Adachi Y et al. Gel-to-sol transition of ^{13}C-labeled 1-3-β-D-glucan, ^{13}C-SSG, assessed by ^{13}C nuclear magnetic resonance (^{13}C NMR) spectroscopy. Carbohydr Res, 1995, 270: 107～113.

[44] 刘翠平，方积年．质谱技术在糖类结构分析中的应用．分析化学，2001，29 (6)：716～720.

[45] Morelle W, Michalski J-C. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. Nature, 2007, 2: 1585～1602.

[46] Geyer H, Schmitt S, Wuhrer M et al. Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS. Anal Chem, 1999, 71(2): 476～482.

[47] 刘丙灿，方积年．甘草葡聚糖的分离纯化与化学结构．药学学报，1991，26(9)：672～675.

[48] 贾联盟，刘柳，董群，方积年．猴头菇子实体中的主要多糖成分．中草药，2005，36(1)：10～12.

[49] Qiu H，Tang W，Tong X K et al. Structure elucidation and sulfated derivatives preparation of two α-D-glucans from *Gastrodia elata* Bl. and their anti-dengue virus bioactivities. Carbohydr Res，2007，342：2230～2236.

[50] Hu K，Liu Q，Wang S C et al. New oligosaccharides prepared by acid hydrolysis of the polysaccharides from *Nerium indicum* Mill and their anti-angiogenesis activities. Carbohydr Res，2009，344(2)：198～203.

（丁 侃 王 滢）

第 24 章　肽、蛋白质与酶

从动植物到微生物，从陆地、湖泊到海洋，肽、蛋白质和酶在生物界普遍存在，它们在生命活动中起着重要作用。蛋白质不仅是一切细胞和组织的重要组成部分，也是生物体内种类和含量较多的高分子化合物。生物界蛋白质的种类繁多，约为 10^{10} 数量级[1]。人体所含蛋白质约有 10^5 种，其中每个细胞的蛋白质就有 9000 种左右[2]。人体内蛋白质含量约占人体总固体量的 45%，细菌中一般含有 50%～80%，干酵母中约含 47%，高等植物的细胞原生质和种子中也含有较多的蛋白质，如黄豆中可达 40%[1]。

近年来，不断有报道从食物和其他天然产物中分离出各种活性肽、蛋白质和酶，为人类防病治病提供了诸多的选择途径。例如，从苦瓜（*Memordia cherantia*）中发现具有降血糖作用的胰岛素；从栝楼（*Trichosanthes kirilowii*）的根中提取天花粉蛋白用于中期引产和抗癌；从夏威夷菠萝（*Ananas comosus*）的茎中制得的菠萝蛋白酶具有抗水肿及抗炎作用；从木瓜（*Carica papaya*）中制取木瓜蛋白酶（又称为木瓜酵素），广泛应用于医药、食品、美容、饲料及皮革各行业中；从无花果（*Ficus glabrata*）中制取无花果蛋白酶，广泛用于食品加工、饮料、医药及保健品生产等行业。另外，从多花紫茉莉（*Mirabilis multiflora*）和纪氏云实（*Caesalpinia gilliesii*）等植物中也发现了活性蛋白质或多肽化合物[3]。

动物来源的肽和蛋白质类药物较多，仅血液制品就有 10 多种。活性多肽用于疾病治疗和诊断药物有了很大发展，如垂体多肽、消化道激素、下丘脑激素及脑啡肽等[1]。动物是抗菌肽类化合物的重要来源。一些带正电荷、呈 α-螺旋结构的链状肽能在微生物的细胞膜上形成孔隙，具有抗菌活性。例如，从美国鲎 *Limulus polyphemus* 中分离得到了具有抗菌和抗艾滋病毒活性的 polyphemusin Ⅱ（NH_2-RRWCFRVCYKGFCYRKCR-$CONH_2$）[4]。后来根据 polyphemusin Ⅱ 的结构，合成了类似物 T22（NH_2-RRWCYRKCYKGYCYRKCR-$CONH_2$），该化合物具有极强的抗艾滋病毒作用（$EC_{50}=2.6\ nmol \cdot L^{-1}$）[5]。另外，来自杂交鲈鱼（*Morone saxatilis* x *M. chrysops*）的 piscidin 1[6] 和亚洲蛙 *Hylarana guntheri* 的 brevinin-2Gub[7] 都有抗菌作用。值得注意的是，brevinin-2Gub 还有很强的降血糖作用。生物毒素主要来源于蛇、蜘蛛、蛙、蟾蜍、蝾螈、蜥蜴、吸血蝙蝠、蜗牛、水蛭、蜈蚣、毒蜂以及某些海洋生物，广泛用于诊断、治疗及研究活性机理。例如，从南美响尾蛇 *Crotalus durissus terrificus* 中发现的 crotalphine，是强镇痛剂[8]；从蝮蛇 *Agkistrodon contortix* 中分出的解离素 contortrostatin，具有抑制血小板凝集和抑制肿

瘤转移的作用[9]；水蛭(蚂蟥)的唾液腺分泌物水蛭素(hirudin，小分子蛋白)，具有极强的活血化淤作用。由于具有活性高、结构稳定、不易失活以及纯化成本低的优点，水蛭素是开发抗凝、溶栓药物的理想原料[10]。Exendin-4 是从毒蜥 *Heloderma suspectum* 的唾液中得到的多肽，可与 GLP-1 受体结合，刺激胰岛细胞分泌出大量胰岛素，从而降低血糖[10, 11]，现已开发成新型抗糖尿病和强力减肥药，商品名为 Exenatide(Byetta™)。另外，肽毒素是研究多种细胞受体和识别、分离各种离子通道的有力工具。从自然界分离得到的肽毒素类离子通道抑制剂较多，包括从非洲鸟蛛 *Stromatopelma calceata* 和 *Heteroscodra maculata* 中分得的钾离子通道抑制剂 ScTx1(IC_{50}s = 1.2～21.4 nmol·L^{-1})和 HmTx2(IC_{50} = 1.2 nmol·L^{-1})[12]、从蜘蛛 *Segestria florentina* 毒液中分得的钙离子通道抑制剂 SNX-325(IC_{50}s = 3～30 nmol·L^{-1})[12]、从蜗牛 *Conus magus* 中分出的钙离子通道抑制剂 ziconotide(临床上用于治疗慢性疼痛)[13]、从南美鸟蛛 *Psalmopoeus cambridgei* 中分得的酸敏感离子通道阻断剂 PcTx1(IC_{50} = 0.9 nmol·L^{-1})[12]以及从蜗牛 *Conus geographus* 中分得的钠离子通道抑制剂 GTX Ⅱ(～0.2 μmol·L^{-1})[14]等。蛙及蟾类一直被作为药物应用，其皮肤组织中的活性多肽具有广泛的生物活性和药理作用，对动物胃肠道、心血管以及中枢神经系统都有作用。又如蝎毒中具有药理活性的蛋白质，有抗肿瘤、镇痛、抗癫痫及抗菌作用。蝎毒多肽(scorpion polypeptide)在临床上可用于治疗急慢性及各种顽固性疼痛，其生物制品已生产上市[10]。

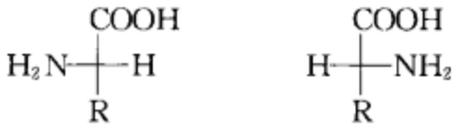
酶是由活细胞产生的生物催化剂。除有催化作用的 RNA 之外，几乎都是蛋白质。酶根据功能可分为 6 个主要类型：氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶及连接酶(或合成酶)。酶的催化特性包括高效性、专一性、可调性等，主要是因为酶和它的底物之间存在着特殊的相互作用力。可以根据酶和底物间作用力的特异性分离手性化合物，也可以根据酶的催化特性用来去毒。例如杀虫剂的长期使用使土壤、河流，以及某些生物体或农作物体内积累了有机磷化合物，能够引起各种慢性疾病和基因变异。人们利用芳二烷基磷酸酶(ADPase)能够催化水解大多数正磷酸酯或烷基磷酸酯及其衍生物的功能，通过生物工程大量生产，已成功地应用于检测和去除多种有机磷化合物[15]。酶的药物在临床上应用广泛，用于预防、治疗和诊断的酶已有近百种。除了在家畜的血液及脏器中制取各种酶制品外，还从生物毒素如蛇毒、蜂毒、蛛毒及蜈蚣毒中制取多种药用酶。以蛇毒为例，蛇毒中酶约占蛇毒蛋白组分的 50%，现已从中发现含有近 40 种酶，故认为蛇毒是自然界中酶类最集中的酶源之一。目前我国蛇毒制剂生产厂有 100 余家[10]。吸血蝙蝠(Desmodontidae)的唾液中含有多种抗凝血的血纤维蛋白溶酶原激活剂，该类酶能阻止血栓的形成而使被咬的伤口处血流不止。从 *Desmodus rotundus* 的唾液中分出的酶 desmoteplase 在临床上被用来治疗急性缺血性中风以及减轻和预防血栓的形成[13,16]。另外，超氧化物歧化酶(superoxide dismutase，SOD)是广泛存在

于陆地和海洋动植物和微生物中的金属酶，是一种重要的氧自由基清除剂，已有产品作为药用酶在美国、德国、澳大利亚等国上市。

海洋生物为了适应特殊的生存环境和防御天敌，代谢产生了许多结构新颖、功能独特的活性肽、蛋白质和生物酶类。例如，很多鱼类的成熟精巢组织中的碱性鱼精蛋白除具有降血压、助呼吸、促消化、抑制血液凝固、提高血糖浓度外，还具有较强的抑菌活性，可用于食物防腐。另外，在已报道的来自海洋生物的各类抗肿瘤化合物中，由特殊氨基酸组成的活性肽类细胞毒作用尤其突出。

24.1　肽和蛋白质的分类

目前市售药物主要包括小分子化合物，肽和蛋白质类。氨基酸是组成肽和蛋白质的基本单位。自然界的氨基酸多为 α-氨基酸。除了存在于细菌中的少数例外，自然界的氨基酸为 L-型异构体。



L-氨基酸　　D-氨基酸

(Fischer 投影结构，R 为 α-取代基)

天然蛋白质由 20 种 α-氨基酸组成，习惯上以三个或一个英文字母符号表示。例如，用 Arg 或 R 代表精氨酸，用 Met 或 M 代表甲硫氨酸等。这些氨基酸有的呈酸性，有的呈碱性，有的呈中性。不同类型的氨基酸在蛋白质中的相对含量大小对蛋白质的结构和性质起着重要作用。

24.1.1　肽的分类

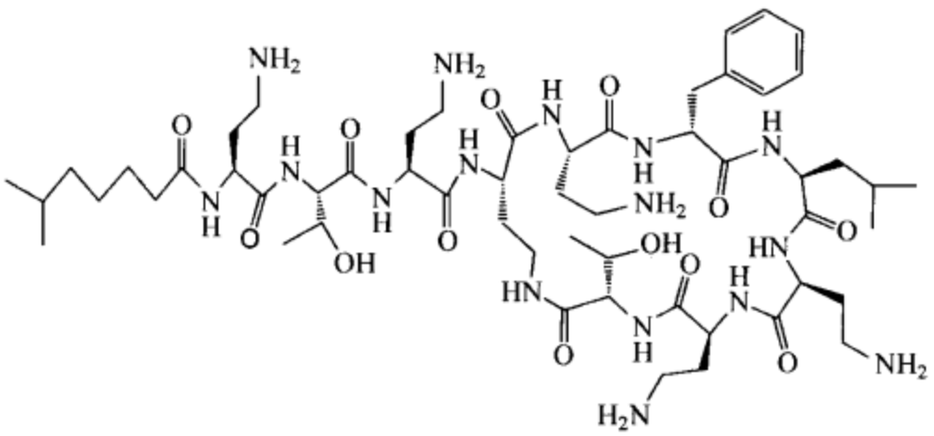
由两个以上氨基酸通过酰胺键(或肽键)连接起来的化合物，称为肽。组成肽的氨基酸因参与肽键的形成，已经不是完整的分子，故称其氨基酸残基。由两分子氨基酸组成的肽，称为二肽。由三分子氨基酸组成的肽，称为三肽，如此类推。多数学者称介于 2～20 个氨基酸的肽为寡肽，多于 20 个氨基酸的肽为多肽。也有报道将相对分子质量在 10 000 以下，能透过半透膜以及不被三氯乙酸或硫酸沉淀的称为多肽[17]。活性肽化合物多为生物体的中间代谢产物，包括链状肽和环状肽。在书写链状肽结构时，通常将含游离氨基 NH_2 的末端(N 端)氨基酸残基写在左边，含游离羧基的末端(C 端)氨基酸残基写在右边。

防御性的化合物在生物体内广泛存在，如细菌等微生物产生的肽类抗生素、无脊椎动物的免疫系统产生的活性肽等。有些活性肽还可通过实验对生物体有目的的感染而激发免疫反应产生，但不是每种免疫反应都能“对症下药”。例如，对果蝇

Drosophila melanogaster(Oregon-R 株)感染微球菌 *Micrococcus luteus* 和大肠杆菌 Escherichia coli 1106 后,会诱导其产生抗真菌(IC_{50} = 0.6～4.2 μmol·L^{-1})的链状多肽 drosomycin (**24-1**),但没有抗细菌的活性[18]。有些活性肽还是重要的研究工具,例如由多黏菌 *Bacillus polymyxa* 产生的 polymyxin B (**24-2**),通过竞争性地抑制钙调蛋白与牛心磷酸二酯酶(PDE1)的结合,对 PDE1 具有强抑制作用(IC_{50} = 80.5 nmol·L^{-1})[19]。由于它影响钙调蛋白的功能,常被用于研究与蛋白激酶 C 相关的生理活性。

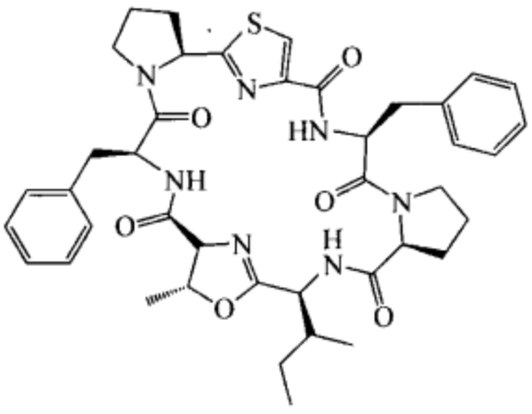
DCLSGRYKGPCAVWDNETCRRVCKEEGRSSGHCSFSLKCWCEGC

24-1

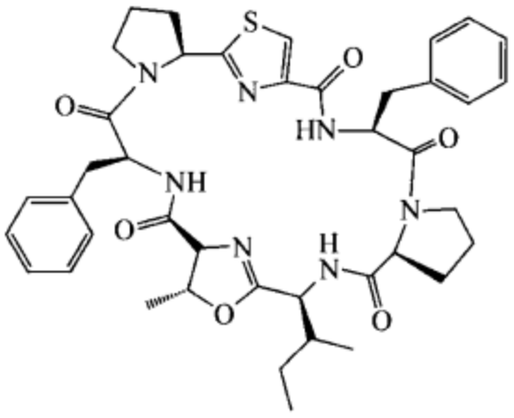


24-2

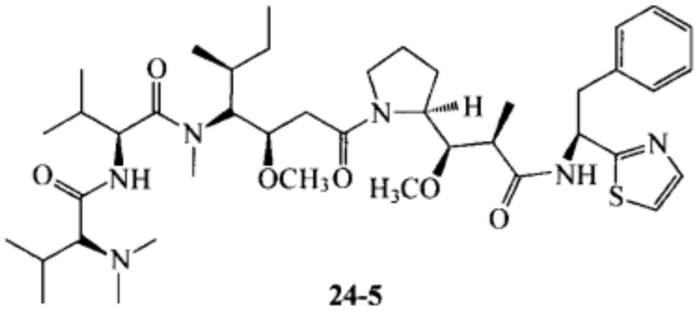
海洋生物中存在一些活性很高的抗炎、抗肿瘤和抗病毒的肽类。代表性的化合物包括从红海藻 *Ceratodictyon spongiosum* (含共生海绵 *Sigmadocia symbiotica*)中分出的七环肽 ceratospongamide[20],其反式异构体(**24-3**)具有很强的抗炎作用(ED_{50}=32 nmol·L^{-1}),而顺式结构(**24-4**)却无活性。从海兔 *Dolabella auricularia* 中发现了抗肿瘤寡肽 dolastatin 10 (**24-5**, ED_{50}=4.6×10^{-5} μg·mL^{-1},抗 P388 血癌)和 dolastatin 15(**24-6**,IC_{50}s=3～5 nmol·L^{-1},抗 L1210 血癌,仓鼠卵巢癌和伯基特淋巴瘤)[21]。从海鞘 *Tridemnun solidum* 中得到了一系列环肽 didemnin[22],其中 didemnin B 具有很强的抗肿瘤作用(**24-7**,IC_{50}=2 ng·mL^{-1},抗 P388,A549,HT-29 和 MEL-28)。Arenastatin A(**24-8**)是从海绵 *Dysidia arenaria* 中分得的抗肿瘤环状酯肽,对 KB 细胞具有极强的抑制作用(IC_{50} = 5 pg·mL^{-1})[23]。另外,从海绵 *Theonella* 属中分得了较多的活性化合物,包括抗肿瘤(P388)的活性肽 orbiculamide A(**24-9**,IC_{50}=4.7 ng·mL^{-1})[24]以及从 *Theonella mirabilis* 和 *Theonella swinhoei* 中分出的抗艾滋病毒的环状酯肽 papuamides A(**24-10**)和 B(**24-11**)(EC_{50}=～4 ng·mL^{-1})[25],它们的分子中含有一些特殊的氨基酸。



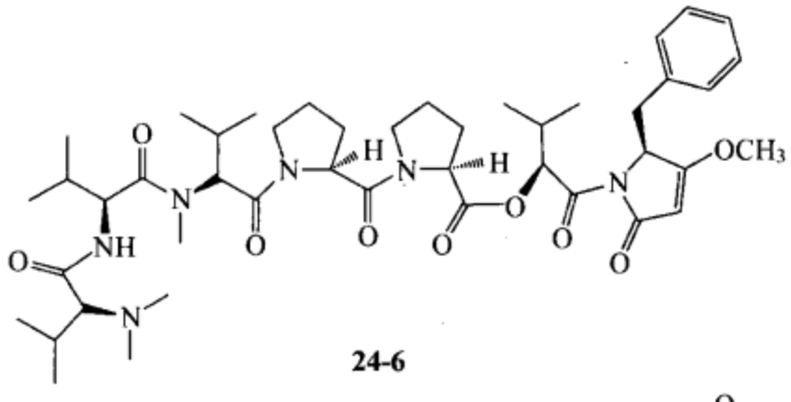
24-3



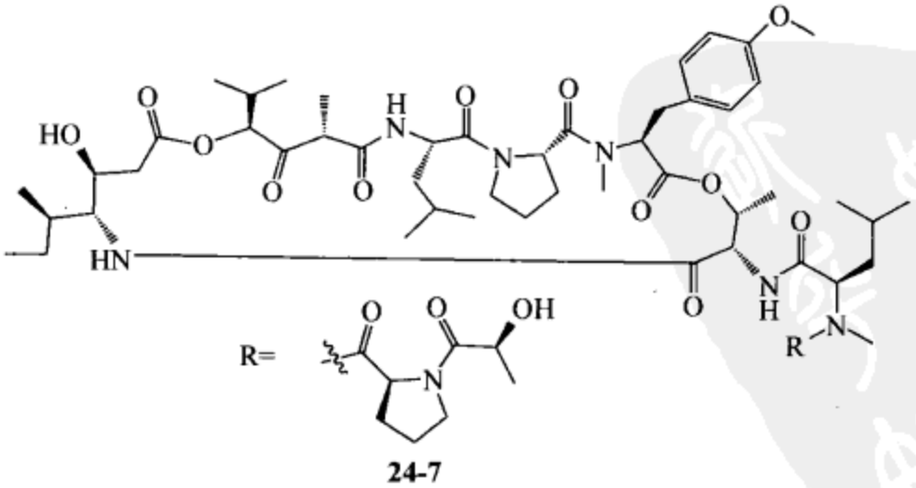
24-4



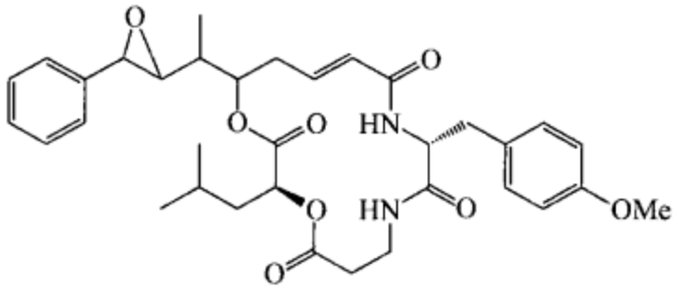
24-5



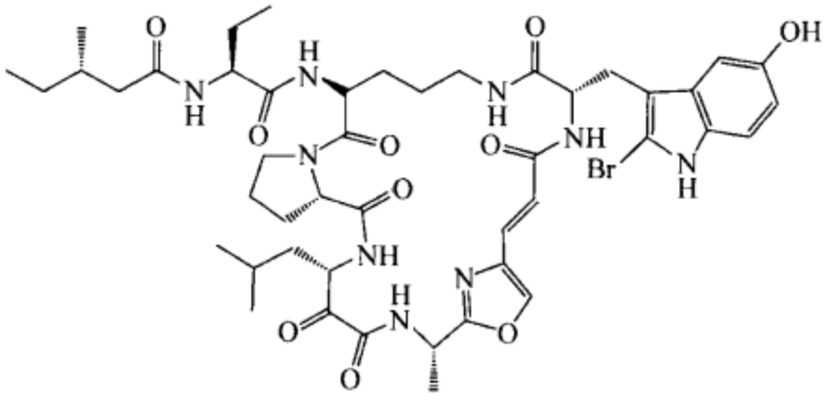
24-6



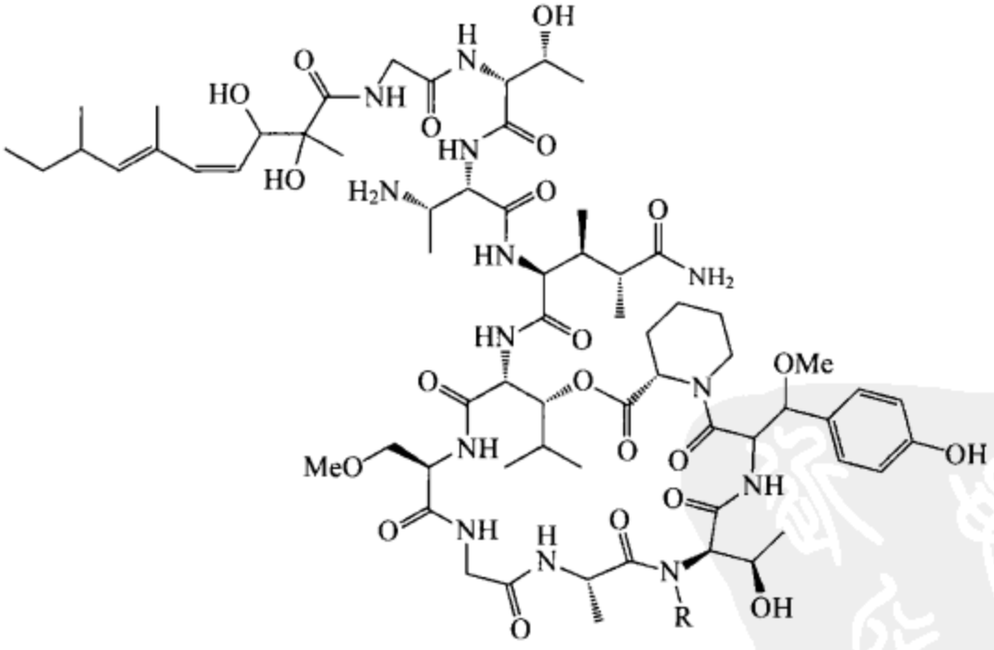
24-7



24-8



24-9



24-10 R=CH_3
24-11 R=H

24.1.2 蛋白质的分类

当组成多肽的氨基酸数目等于或大于 50 时，人们称之为蛋白质。生物体内的蛋白质根据功能可分为结构蛋白和功能蛋白，功能蛋白又可分为活性蛋白和信息

蛋白。根据分子的形状，蛋白质可分为纤维状蛋白和球状蛋白，其中球状蛋白多为功能蛋白。根据分子的组成成分，蛋白质又可分为单纯蛋白和结合蛋白。单纯蛋白仅由氨基酸组成；结合蛋白除含有氨基酸外，还含有辅基（如糖、脂类、核酸、含金属的色素等非蛋白组分，通过共价键与蛋白质部分相连）。天然活性蛋白质包括单纯蛋白和结合蛋白，数量众多。蛋白质功能多样，有的起抗病或免疫保护作用，有的起运动与支持作用，有的起生物催化作用（酶），有的起传递信息和代谢调节作用，有的起物质转运与存储作用，有的作用于生物生长及其他生理活动。

从藻青菌 *Scytonema varium* 的提取液中分离出的蛋白质 scytovirin（**24-12**）含 95 个氨基酸残基，2 个不同的亚基由二硫键相连，能够与 HIV 病毒外壳的 gp120 和 gp41 糖蛋白结合，具有强效抗艾滋病毒作用（EC_{50} = 4.5 nmol · L^{-1}）[26]。Cyanovirin-N是从藻青菌 *Nostoc ellipsosporum* 提取液中分离出的强效抗艾滋病毒单链蛋白（LGKFSQTCYNSAIQGSVLTSTCERTNGGYNTSSIDLNSVIEN-VDGSLKWQPSNFIETCRNTQLAGSSELAAECKTRAQQFVSTKINLDDHIA-NIDGTLKYE，含有 101 个氨基酸残基），它通过与病毒外壳糖蛋白 gp120 结合，阻止病毒进入宿主细胞，能够不可逆地使各种艾滋病毒失活。Cyanovirin-N 在溶液中主要以单体形式存在，但以二聚体形成结晶（**24-13**）[27]。

24-12　线条代表二硫键

24-13　Cyanovirin-N二聚体结晶的带状图[27]

很多从真菌中分离出的多糖和糖蛋白具有免疫调节和抗癌作用，著名的包括糖蛋白 PSP（从云芝 *Coriolus versicolor* COV-1 株中分得，富含鼠李糖和阿戊糖）

和糖蛋白 PSK(从云芝 *Coriolus versicolor* CM-101 株中分得，含海藻糖)等。PSP 和 PSK 结构相似，相对分子质量都在 100 000 左右，肽链中多含谷氨酸和天门冬氨酸。与 PSK 相比，PSP 对 P388 的抗癌效果更好一些[28]。

24.2 肽、蛋白质和酶的性质

24.2.1 相对分子质量

蛋白质和酶是高分子化合物，其溶液具有亲水胶体特性。相对分子质量范围跨度较大。例如胰岛素仅含有 51 个氨基酸残基，肌联蛋白则由 26 926 个氨基酸组成，相对分子质量高达 3×10^6 左右。多数蛋白质含有 100～1000 个氨基酸残基。通常可将测得的蛋白质相对分子质量除以 120(氨基酸残基平均相对分子质量)，便可得知其中所含的氨基酸残基大概数目。可以根据肽或蛋白质分子大小的差异，采用凝胶过滤的方法分离目标化合物。一般分散系统可分为三类：分散相质点小于 1 nm 的为真溶液，介于 1～100 nm 的为胶体溶液，大于 100 nm 的为悬浊液。蛋白质分子的直径一般在 2～20 nm，所以其溶液为胶体溶液，具有胶体溶液的所有性质。例如，其水溶液具有黏性大和半通透性等。由于蛋白质分子的颗粒较大，不能通过半透膜，可利用此性质进行透析分离。

24.2.2 旋光性

一般短肽的旋光度约等于肽中各氨基酸旋光度的总和。多肽和蛋白质的旋光度则需测定得知。

24.2.3 紫外吸收

待测样品中是否含多肽或蛋白质类化合物，一般可通过紫外光谱仪和颜色反应来检测。280 nm 吸收法以及 280 nm 和 260 nm 吸收差法是两个常用的定性、定量方法。一般多肽或蛋白质在 280 nm 左右有最大吸收。在分离蛋白质时，当溶液中混有核酸类杂质(在 260 nm 左右有最大吸收)时，常采用 280 nm 和 260 nm 吸收差法测定样品中蛋白质的含量。经验公式为：蛋白质浓度($mg\cdot mL^{-1}$)$=1.45A_{280}-0.74A_{260}$[29]。

24.2.4 多维结构性

蛋白质和酶的空间结构与生物活性密切相关。氨基酸以共价键相连组成肽和蛋白质的一级结构。由于分子中各基团和各组分间的相互作用，蛋白质还存在二级、三级及四级结构。这些作用力包括氢键、范德华力、疏水作用、盐键(静电作用)

及二硫键，破坏了这些作用力会导致蛋白质立体结构的变化，从而使蛋白或酶失活。因此，在分离药用蛋白质和酶时要注意分离条件的选择和控制，尽量避免目标蛋白立体结构的变化。

24.2.5　电化学性

肽和蛋白质是由氨基酸组成的，因此也是两性电解质。除了末端的氨基和羧基，肽和蛋白质还含有众多的侧链 R 基可以解离。另外，如果是结合蛋白，还包括辅基的解离基团。蛋白质分子所带电荷的性质和数量主要由分子中可解离基团的种类和数量以及溶液的 pH 所决定。当溶液在某一 pH 时，不同基团的解离程度还因其在蛋白质分子中的位置（在分子表面或内侧）和与邻近基团间的相互作用而不同。当蛋白质分子所带正、负电荷相等，分子净电荷为 0，此时溶液的 pH 就称为该蛋白的等电点。各种不同结构的蛋白质的等电点是不同的。蛋白质处于等电点时，其黏度、溶解度、渗透压等均达到最低值。可利用此性质调节溶液的 pH，分级沉淀蛋白质而达到分离目的。在 pH 小于等电点的溶液中，蛋白质带正电荷；在 pH 大于等电点的溶液中，蛋白质带负电荷。同种分子带相同电荷，互相排斥，因此可以稳定存在于溶液中。也可利用此性质用电场或离子交换色谱分离肽和蛋白质。

24.2.6　酸碱性

肽和蛋白质中的可解离基团在不同的 pH 条件下可充当质子的供体或受体。小肽的酸碱性质主要取决于末端游离的氨基和羧基以及侧链基团 R 的解离程度。多肽类化合物的酸碱性质主要取决于侧链基团的 pK_a。蛋白质分子可被看作是一个多价离子，其中多数可解离基团的 pK_a 可由分析蛋白的滴定曲线得到。通常蛋白质末端羧基的 pK_a 大于游离的氨基酸，而蛋白质末端氨基的 pK_a 小于游离的氨基酸。两者侧链 R 基的 pK_a 相差不大[29]。蛋白质中酸性氨基酸与碱性氨基酸的比例和蛋白质的等电点有一定关系。某些富含碱性氨基酸（如赖氨酸、组氨酸和精氨酸）的蛋白质（如组蛋白）的等电点位于碱性范围，这些蛋白质属于碱性蛋白质；而某些富含酸性氨基酸（如天门冬氨酸和谷氨酸）的蛋白质（如胃蛋白酶）的等电点位于酸性范围，这些蛋白质则属于酸性蛋白质。通常酸性和碱性蛋白在生理活性上有较大差别。

24.2.7　溶解性

多数肽类易溶于水和极性有机溶剂。因此很多肽类化合物的最后纯化可用 HPLC 来完成。在约 0～40 ℃，多数球状蛋白在水中的溶解度随温度升高而升高。蛋白质的等电点还受到水溶液里中性盐[如 $MgCl_2$、$(NH_4)_2SO_4$ 等]浓度的影响。

低浓度时，中性盐促进蛋白质的溶解，这种现象称为盐溶。可能是因为盐离子屏蔽了蛋白质分子中的某些电荷，帮助蛋白质分子分开，或者蛋白质吸附了某类离子后产生带电层，增加了蛋白质分子间的排斥力以及蛋白质分子与水分子之间的作用力。高浓度时，中性盐降低蛋白质的溶解度，大量蛋白质沉淀出来，这种现象称为盐析。可能是因为盐离子中和了蛋白质分子的大量电荷，使蛋白质的等电点发生改变，也使蛋白质分子表面失去同种电荷，蛋白质就能聚集而沉淀。另外，蛋白质分子之所以能够稳定存在于水溶液中，除了因为带相同电荷的蛋白质分子间的排斥力外，还与存在于蛋白质分子表面的水化层有关。蛋白质表面的极性 R 基与水分子相互作用使蛋白质分子表面结合了一层水分子，称为水化膜。此水化膜促进了蛋白质在水溶液中的稳定性。如果高浓度的中性盐与蛋白质分子争夺水分子，破坏了水化膜，也可使蛋白质分子因相互碰撞而聚集沉淀。因此，可根据这些性质调节溶液的中性盐浓度，分级沉淀蛋白质。另外，与水互溶的有机溶剂（如乙醇、丙酮等）的加入也能够使蛋白质在水中的溶解度显著降低。蛋白质的水溶液是高介电常数胶体溶液，而有机溶剂的介电常数低，加入后改变了介质的介电常数，减弱了蛋白质表面可解离基团的离子化程度，水化程度降低，从而使蛋白质的溶解度受到影响。另外，有机溶剂还与蛋白质分子直接争夺水化膜，导致蛋白质的聚集而沉淀。因此，可以通过逐步增加水溶液中有机溶剂的百分比，使不同种类的蛋白质分级沉淀而达到分离目的。或者也可通过加入脱水剂（如聚乙二醇）使蛋白质沉淀。蛋白质的溶解性除受溶液的 pH、温度、溶剂的极性以及溶液中盐离子浓度等因素的影响外，还与蛋白质分子的结构和形状有关。球状蛋白比纤维状蛋白容易溶解得多，主要因为在球状蛋白的分子内部包裹了疏水性氨基酸，而亲水性氨基酸的极性 R 基分布在球状分子的表面。

24.2.8 蛋白质对配体的特异亲和性

酶和它的底物之间存在的相互作用力受到溶液的 pH、温度、酶和底物浓度以及其他试剂的影响。与此类似，很多蛋白质分子对某些化合物或官能团具有特殊的识别能力，它们之间存在着特殊的相互作用，该作用力的强弱受到周围环境的影响。因此可利用这些性质进行亲和色谱分离或通过免疫沉淀反应，将目标蛋白质从复杂的混合物中分离出来。

24.2.9 蛋白质的变性

天然蛋白质受到某些物理或化学因素影响后，高级结构遭到破坏，导致其理化性质的改变及生物活性的消失，这种现象称为蛋白质的变性。多数变性是不可逆的过程。大多数蛋白质在低温下比较稳定，在 40～50 ℃以上，很多蛋白质开始变性。因此蛋白质的提取、分离一般都在 0 ℃左右进行。在室温下，有机溶剂的加入

也能使蛋白质变性。如果控制在低温，搅拌中缓慢加入有机溶剂，并缩短处理时间，则可减少蛋白因变性造成的损失。多数酶在 20%～50%（体积百分比）的丙酮水溶液中能被沉淀出来。丙酮的加入量一般不超过 55%。另外，X 射线、紫外线、超声波、高压、稀释、强酸、强碱、清洁剂、尿素、三氯乙酸及重金属盐等都能引起蛋白质变性。在提取、分离蛋白质和酶的过程中要特别注意避免这些因素的影响。

24.2.10　水解性质

肽和蛋白质的强酸或强碱溶液在加热条件下，肽键断裂，可完全水解产生自由氨基酸。也可通过控制水解，产生一系列肽，再经分离纯化得到相对分子质量更小的目标肽。生物摄入食物中的蛋白质是通过体内酶催化水解而得到肌体所需的各种氨基酸的。

24.2.11　颜色反应

可以利用颜色反应对肽和蛋白质进行定性鉴别和定量测定。肽和蛋白质中末端游离的氨基、羧基以及侧链基团 R，可以发生与氨基酸中相应的基团类似的反应，在此不再详述。另外，双缩脲反应（biuret reaction）是凡含两个或两个以上肽键结构的肽和蛋白质所特有的反应。在稀 $CuSO_4$ 和浓碱水溶液（NaOH）中，二价铜离子与肽键螯合形成紫罗兰色/紫红色复合物，该复合物在 540 nm 处有最大吸收。自由氨基酸和二肽无此反应。

薄层色谱斑点显色一般可通过茚三酮（紫色）、荧光胺（产生荧光）等反应，或通过考马斯亮蓝 G-250 显色，或将薄层板放入碘蒸气中显色，或在紫外灯下直接观察。另外，有些化合物的斑点可由下列方法帮助检测[30]。

桑色素反应：在薄层板上喷洒 0.05% 的桑色素（3,5,7,2′,4′-五羟基黄酮）甲醇溶液，加热（100 ℃）2 min 后，N 端被保护氨基酸或肽类衍生物在绿色荧光背景下显现黄绿色荧光，在紫外灯下显黑色斑点。

凝胶板显色：用干滤纸贴在凝胶薄层板面上，稍等片刻后，将湿滤纸小心揭开、干燥（110 ℃），或将凝胶板和滤纸一起干燥（120 ℃）。随后将干滤纸浸入显色试剂中（0.6 g 酰胺黑 Amido Black 10 B 溶于 750 mL 甲醇或乙醇，加入 450 mL 水和 100 mL 冰醋酸）15 min，再用 1%的乙酸溶液漂洗 3 次，每次 30 min。滤纸上的蛋白质可被着色成蓝-黑色斑点。

24.3　肽、蛋白质和酶提取分离的一般方法

肽、蛋白质和酶的提取、分离方法多样，主要根据分离目的和目标化合物的性质来决定。有的是为了药用，有的是为了发现新的活性成分，有的是为了研究构效

关系。一些传统的制药工艺目的在于增加制品的纯度或比活(活力单位数/毫克蛋白质),并不要求其纯度达到100%[31]。而对新的活性成分的结构确定或对其构效关系的研究,往往对样品纯度的要求极高。对已知结构类型的化合物,例如那些通过蛋白质工程而大量获得的活性蛋白质和酶,其纯化过程比较简单,通常只通过一步亲和色谱即可将目标产物从混合物(如培养滤出液)中分离出来。对结构类型未知的活性肽、蛋白质和酶,则需要摸索条件,在实践中找出合适的分离方法。

对肽、蛋白质和酶的提取、分离一般都在低温下进行,特别是在蛋白质和酶的纯化过程中,要注意避免导致蛋白变性的因素。对肽、蛋白质和酶的提取首先涉及实验材料的预处理和组织破碎[32],然后用缓冲液或其他溶剂在低温下提取。动物材料应先去除脂肪、结缔组织等非蛋白部位,细胞可用超声波、电动捣碎机或匀浆器破碎。新鲜植物可用加沙研磨、电动搅碎,或用纤维素酶处理。如果是种子类材料,破碎后在加入适当的缓冲液之前,可先用易挥发的石油醚、乙醚等脱脂。植物中多含酚类化合物,这类物质容易被植物中的酚氧化酶(phenol oxidase)氧化而成色素附着在蛋白质和酶上。这些以共价键结合到酶上的色素能使很多酶失去活性,可以通过两种办法解决这个问题。一种方法是在植物中加入含硫化合物如巯基乙醇来降低酚氧化酶的活性;另一种方法是在植物中加入吸附酚类化合物的物质如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。细菌可用低温冰冻、超声波、加沙研磨、溶菌酶或化学试剂处理。细胞不溶物可用离心或过滤除去。如果样品过黏,可加入硅藻土帮助过滤。如果目标蛋白主要集中在某一细胞组分,则可利用差速离心将它们分开,或使用化学试剂(如1%～3%的非离子清洁剂Triton X-100等)将蛋白质溶解出来。微生物的提取液中常含有大量核酸,可在其提取液中加入鲑鱼精蛋白或鲱精蛋白等沉淀核酸,或加入脱氧核糖核酸酶水解DNA。酵母可用加沙研磨或高速搅拌器破碎细胞壁,其提取液中的低密度颗粒可用20%～25%的丙酮在0 ℃沉降除去。

对多数链状肽和环状肽的提取可使用醇类试剂(如甲醇、95%的乙醇等)。减压回收大部分溶剂后,浸膏在水相和不同极性的有机相间分配,将粗提物分成几个大的部分。各部分浸膏再用硅胶和(或)LH-20凝胶进一步色谱分离,目标化合物最后可用C18反相高效液相色谱(HPLC)纯化得到。环蛋白一般对高温和酶解稳定,在很大程度上是由于分子结构中存在特征的环状胱氨酸结(CCK)。可在室温下将粉碎后的原材料(含环蛋白)在二氯甲烷-甲醇(1∶1)的混合液中浸泡过夜,然后直接加水稀释,待分层后取水层,减压浓缩后得粗浸膏。再根据生物活性筛选的结果,将活性部分进一步分离、纯化。为了提高分离效率,可先将粗浸膏进行C18反相高效快速中压色谱(HPFC)分离,用20%、80%和100%的乙腈水溶液(可根据需要加入适量三氟乙酸)分步洗脱,将粗浸膏分成几个大的部分。进一步细分可用RP-C18 HPLC,以含乙腈的缓冲液(如四亚乙基五胺缓冲液等)梯度洗脱。

获得多肽或蛋白质初提液后,也可根据溶解度不同对样品进行粗分离。一般

采用盐析(蛋白质浓度大于 1 mg · mL^{-1}[32])、等电点沉淀(调节溶液的 pH)或加入有机溶剂分级沉淀等方法,把样品粗分成几个大的部分。再采用各种其他方法(如色谱)对活性部分进一步分离、纯化。盐析所用中性盐多为硫酸铵,因为它在水中的溶解度很大,在室温时可配制成浓度高于 4 mol · L^{-1}的溶液。盐析处理过程中蛋白质一般不会变性,沉淀了的蛋白质可重新溶解于少量缓冲液中。另外,根据不同分子在不相溶的两相中的分配系数不同,可采取两相分配的分离方法。如果在蛋白质的水溶液中加入适当比例的亲水聚合体右旋糖酐和聚乙二醇,就能产生不互溶的两相,上层含较多的聚乙二醇,下层含较多的右旋糖酐[32]。也可直接采用高速逆流色谱分离蛋白质[33],但应用有限。

进一步细分主要根据化合物分子的大小和电荷差异以及不同分子与各类型固定相间作用力的差别来设计分离流程。主要方法概述如下:

(1) 根据分子的大小采用透析、超过滤或密度梯度离心,再用凝胶过滤进行分离。这 4 种方法也常用于样品脱盐、置换缓冲液或除去小分子杂质。透析是将欲纯化的蛋白质水溶液放入半透膜袋内,置于流水或搅拌的水中过夜,水溶性的小分子杂质可透过半透膜扩散入流水中而被除去。超过滤是在压力和离心力的作用下,使小分子(如水和盐离子等)强行通过半透膜而达到浓缩和脱盐的效果。密度梯度离心是蛋白质在具有密度梯度介质(如聚蔗糖等)中离心时,不同质量和密度的蛋白在离心管内形成各自独立的区带,由上到下密度递增,可被分部收集。凝胶过滤的固定相常用交联葡聚糖、聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶等,流动相用缓冲液。待分离化合物根据相对分子质量从大到小依次被洗脱下来。

(2) 根据分子所带电荷和酸碱性不同采用离子交换色谱或电泳进行分离。离子交换色谱固定相常用纤维素和交联葡聚糖(兼有分子排阻作用)为基质的离子交换剂。固定相包括阳离子交换树脂(如 CM-纤维素等)和阴离子交换树脂(如 DEAE-纤维素等)。选择固定相时应该考虑到分离的目的、蛋白质的等电点以及样品中待分离化合物和杂质的分子大小。流动相常用离子强度递增的缓冲液梯度洗脱,必要时可通过改变洗脱液的 pH(对阳离子交换树脂,升高洗脱液的 pH;对阴离子交换树脂,降低洗脱液的 pH)来增强洗脱效果。由于多数蛋白的等电点小于 7,一般选用阴离子交换树脂和 pH 大于 8 的缓冲液进行色谱分离。离子交换色谱条件温和,活性蛋白质和酶的回收率高,是理想的分离方法。量少的化合物可通过电泳分离。电泳法一般被用于分析,很少用于制备蛋白质,原因是目前还没有解决制备型电泳仪的散热问题。电泳的类型很多,包括聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦和毛细管电泳等。另外,聚焦色谱是等电聚焦和离子交换色谱技术相结合的产物,分离效果很好。其原理是利用特种缓冲液(含多种两性电解质,商品名 Polybuffer)流经色谱柱中的多缓冲交换剂时,会在柱中自上而下建立起连续的 pH 梯度。阳离子交换柱内固定相由上到下 pH 递增,阴离子交换柱内固定相由上到下

pH 递减。该梯度会随着流动相的移动而慢速移动。色谱柱上样品中的各蛋白质分子在与各自等电点相应的 pH 区段处聚焦，并随着固定相 pH 梯度的移动而移动，最后被移动相从柱中依次洗脱出来。

(3) 利用不同分子与其他固定相间的非离子作用力(如氢键、范德华力等)的差别，尝试使用不同种类的吸附色谱和亲和色谱等。常用的吸附剂有硅胶、氧化铝、活性炭、羟基磷灰石以及疏水吸附剂苯基琼脂糖、辛基琼脂糖等。吸附剂对各化合物的吸附力受到各种因素的影响，包括化合物的分子结构、温度、吸附剂状态、洗脱剂的 pH 和离子强度等。采用疏水吸附色谱时，流动相中应含有一定浓度的盐以增加目标分子与吸附剂间的疏水作用。然后可以通过逐步降低洗脱液的离子强度，改变洗脱液的 pH，在洗脱液中添加与固定相有更强吸附力的置换剂(如乙二醇、丁胺等)，或增加有机溶剂的比例来提高流动相的洗脱能力。在进行疏水吸附色谱时，要特别小心避免蛋白质的变性。常用的亲和色谱包括凝集素亲和色谱、染料配体色谱、金属螯合色谱和免疫亲和色谱等。在亲和色谱中，待纯化的蛋白质通常因与琼脂糖凝胶等载体表面上的配体之间有特殊的亲和力而被吸附。被结合的蛋白质随后可用含游离配体的溶液洗脱下来。

(4) 采用高效液相色谱(HPLC)或快速蛋白质液相色谱(FPLC)纯化目标分子。快速蛋白质液相色谱只适用于分离微量蛋白质。很多肽类和蛋白质的最后纯化是通过 HPLC 来完成的。利用 HPLC 可以进行反相色谱、正相吸附色谱、分配色谱、疏水色谱、离子交换色谱、分子过滤和亲和色谱等多种色谱。其中反相色谱应用最为广泛，常用的固定相有 C4，C8 和 C18-硅烷等，洗脱剂包括各种缓冲液和含醇、乙腈或四氢呋喃的缓冲液等。反相色谱能够有效分离肽、小分子蛋白质(相对分子质量小于 2 万)或蛋白质碎片。高效离子交换色谱也能够成功地纯化一些肽类化合物(小于 30 个氨基酸残基[34])。

在分离、纯化的各阶段，生物活性和化学成分的检测是必要的。有的化合物本身有颜色，如螯合了金属的血红蛋白和血蓝蛋白等，但很多化合物是无色的。对于无色的肽或蛋白分子，一般可通过仪器(如紫外检测仪)或在薄层色谱板上喷洒化学试剂显色观察。薄层色谱既可用于快速检测各柱色谱流分中的肽和蛋白质，也可用于少量制备。常用固定相材料包括硅胶(一般经过特殊处理)、纤维素、硅胶和纤维素的混合物、羟基磷灰石、交联凝胶类(如葡聚糖凝胶)等。纤维素和预处理过的硅胶板均有市售。展开剂常用混合液，如正丁醇-乙酸-水(4∶1∶1)，正丁醇-乙酸-吡啶-水(15∶3∶10∶12)，0.1 N 盐酸-乙醇(1∶1)，正丁醇-丙酮-乙酸-5%氨水-水(9∶3∶2∶2∶4)，氯仿-甲醇(3∶1)，异丁醇-吡啶-水(7∶7∶6)，丁醇-二噁烷-水(4∶5∶1)，正丙醇-氨水(7∶3)，以及不同比例的甲酸、水和乙腈的混合液等[30]。具体的展开条件需要通过实验摸索确定。

对于某些化合物，结晶是一个重要步骤。特别是某些活性蛋白和酶，晶体的获

得对其一级结构和高级结构的确定，以及构效关系的研究都起着关键性的作用。此步骤通常对待结晶物质的纯度和浓度要求较高。最常用的方法是通过悬挂式或平坐式蒸汽扩散方法获得晶体[35]。结晶的最佳条件需要摸索，通过调节温度、pH、溶液中盐（硫酸铵）的浓度，以及添加适量有机溶剂或试剂等办法使溶液略处于过饱和状态。在培养结晶的过程中，缓冲液中应含有抑制微生物和真菌生长的试剂，如 0.02% 的叠氮化钠。培养结晶要有耐心，晶核的形成需要两三天，甚至几个月。大约 80% 的蛋白质晶种形成是在 1～2 个星期。很多肽和蛋白质已得到晶体，也有很多化合物很难培养出结晶。

一般从自然界分离得到可供药用的肽类、蛋白质和酶含量较小，难以满足治病的需要。目前用化学全合成的方法获得的肽类药物链长仍然有限。此类药用化合物（特别是活性蛋白质和酶）的大量生产可以通过基因工程或蛋白质工程来完成。基因工程是对携带遗传信息的分子在生物体外进行设计和生产的过程，包括基因重组、克隆和表达。当某些药物分子的 DNA 密码已知时，也可以通过基因工程表达出来。这个过程包括遗传物质（DNA）在体外被人工剪切、组合和拼接（基因重组），再通过载体（生物质粒、噬菌体和病毒）导入微生物或细胞内进行无性繁殖（克隆），生产出目标分子化合物（基因表达）。借助基因重组改变 DNA 的结构，可获得自然界不存在的化合物。当目标分子是蛋白质时，此过程又称为蛋白质工程。一些生物体内微量存在的蛋白质可通过克隆基因的大量表达来制备。也可依赖基因工程进行结构改造，获得突变型蛋白质和多肽。对肽和蛋白质类化合物的结构修饰一般包括特殊氨基酸的引入，氨基酸种类、数目和排列顺序的改变，氨基酸间缩合方式的改变，以及对官能团的修饰。为了便于分离，可以在基因重组时在 DNA 的末端接上识别基团的密码，当整个目标分子被表达出来后，通过亲和色谱即可轻松达到分离目的。该分子因识别基团（如六组氨酸 hexahistidine）与亲和色谱柱中载体上的配体间（如 MagneHis Ni^{2+} 颗粒，Promega 公司出售）有特异的结合而被吸附，随后可被适当的洗脱液洗脱下来。最后，识别基团可通过适当的酶或试剂切除。由于该分离、纯化步骤简单、高效，由基因重组获得的蛋白质也可通过仪器自动分离得到[36]。

24.4　肽、蛋白质和酶的提取分离实例

24.4.1　海蜗牛“大理石锥”的碱性链状寡肽的分离

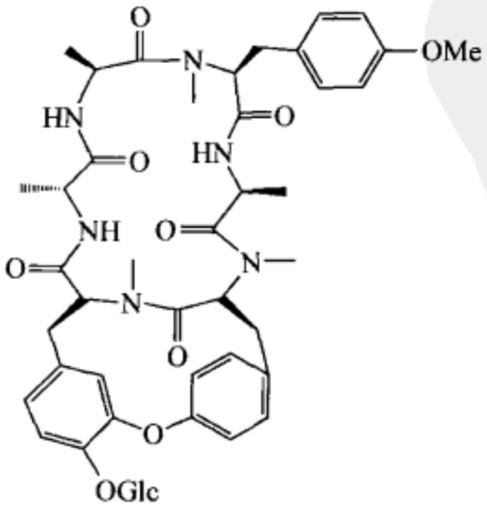
来自印度太平洋，俗称“大理石锥”的掠夺性海蜗牛 *Conus marmoreus* 中含有的活性肽具有强抗伤害（如镇痛）作用。在 4 ℃时，首先用凝胶（Sephadex G25）过滤，以 1.1% 乙酸缓冲液为洗脱剂，流速约为 18.3 $mL \cdot h^{-1}$，将粗提液按分子大小

分成几个大的部分(紫外检测波长 233 nm)。小分子活性流分冷冻干燥后,溶于 0.1% 的三氟乙酸(TFA)水溶液中,经 C18 高效液相色谱(HPLC),以含约 0.1% TFA 和 60%乙腈的水溶液,1 mL·min^{-1}的流速(下述色谱流速与此相同)进行梯度洗脱(检测波长 214 nm)。新的活性流分冷冻干燥后再溶于 0.05% 的七氟丁酸(HFBA)溶液中,通过 C18 HPLC,以含 0.05% HFBA 和 60% 乙腈的水溶液进一步梯度洗脱(检测波长 214 nm)。活性流分冷冻干燥后,溶于 10 mmol·L^{-1} NaH_2PO_4 和 50% 乙腈的缓冲液中(pH 2.5),通过强阳离子交换树脂(Vydac protein-SCX)进行纯化,以 10 mmol·L^{-1} NaH_2PO_4,250 mmol·L^{-1} NaCl 和 50% 乙腈的缓冲液洗脱(检测波长 220 nm)。最后用反相 HPLC 柱脱盐得到活性碱性链状寡肽 mr10a(NGVCCGYKLCHOC)[37]。

一般从海洋腔肠动物(如海葵)或软体动物(如蜗牛)中分得的与离子通道相作用的活性肽多为碱性链状肽。可以通过综合利用凝胶过滤、阳离子交换树脂和高效液相色谱等技术达到纯化目的。若粗提缓冲液中含有酸性肽化合物,可以借助阴离子交换树脂将其从混合物中分开。

24.4.2 茜草科类型环肽化合物的纯化

中药茜草为茜草科植物茜草 *Rubia cordifolia* L. 的干燥根及根茎,其中环肽类化合物具有抗肿瘤作用,是一类双环六肽类化合物。其提取、分离的工艺较成熟[38],简述如下:茜草粉末用甲醇提取,回收甲醇后的浓缩液再用正己烷提取。回收正己烷后的浓缩液加水稀释,加入氯仿分配抽提。氯仿提取物经正相硅胶柱色谱(用氯仿、乙酸乙酯、氯仿-甲醇依次洗脱),其氯仿-甲醇(3∶2)洗脱部分再进行活性炭柱色谱分离,用乙酸乙酯洗脱。所得肽类油状混合物最后经过反相低压硅胶柱色谱,以 80% 的甲醇水溶液为洗脱剂,即可得到多个纯品环肽类化合物。其中 RA-VII(**24-14**,无定形粉末,$C_{46}H_{58}N_6O_{14}$,$[\alpha]_D$ −270.0, CH_3OH, *c* 0.2)曾被用作抗肿瘤先导化合物。



24-14

24.4.3　植物凝集素的分离

植物凝集素(lectin)是一大类对糖类受体有特殊亲和力的蛋白，具有多种生物活性，包括抗菌、抗肿瘤、免疫调节和抗艾滋病毒等作用，也可以用作人类细胞蛋白中某些碳水化合物的诊断试剂。对各种植物凝集素的分离，传统上多采用凝胶过滤、离子交换色谱和亲和色谱相结合的方法，往往费时费力，而且对混合物中的微量凝集素的纯化困难较大。最近有报道将各种糖分子通过化学反应固定在金纳米颗粒上制成 SGNP(sugar-immobilized gold nanoparticle，颗粒直径 2～10 nm)，用于快速分离植物中的凝集素[39]。

以小量提取香蕉的凝集素为例，将 1 g 果浆与 5 mL PBS 缓冲液(100 mmol·L^{-1}磷酸盐缓冲液，pH 7.2，0.9% NaCl，含 10 mmol·L^{-1} 2-巯基乙醇)混合，在 4 ℃搅拌 2 h 后，离心 30 min(每分钟 8000 转)，取上清液。上清液过滤后，滤液中的蛋白质用 60%(质量/体积)的硫酸铵沉淀，离心 10 min(4 ℃，每分钟 10 000 转)，再将沉淀溶解在 2.5 mL PBS 缓冲液中制成香蕉提取液。Suda 等采用 11 种 SGNP 颗粒(Glcα-GNP，Glcβ-GNP，Galα-GNP，Galβ-GNP，GlcNAcα-GNP，GlcNAcβ-GNP，GalNAcα-GNP，GalNAcβ-GNP，Fucα-GNP，Fucβ-GNP 和 Manα-GNP，颗粒均匀分散在 PBST 缓冲液中，PBST：100 mmol·L^{-1}磷酸盐缓冲液，pH 7.2，0.9% NaCl 和 0.05% 吐温 20)来分离和检测香蕉中的凝集素蛋白。将 30 μL SGNP 颗粒溶液加入 10 μL 香蕉提取液中充分混匀，在 4 ℃浸泡过夜后，若观察到植物凝集素聚集在纳米颗粒上，离心沉降 10 min(4 ℃，每分钟 10 500转)，除去上清液，再用 50 μL PBST 缓冲液和蒸馏水依次洗涤沉淀。然后在沉淀中加入 10 μL 0.2 mmol·L^{-1}游离的糖溶液(与 SGNP 颗粒上的糖分子相同，如葡萄糖加入 Glcα-GNP，*N*-乙酰葡萄糖加入 GlcNAcα-GNP，甘露糖加入 Manα-GNP 等)。各种凝集素可被游离的糖溶液从纳米颗粒上溶解出来。据 Suda 等报道，SGNP 颗粒能够高效捕获混合液中的目标凝集素[39]。这种分离方法和亲和色谱的原理相同，分得的目标凝集素纯度很高。由于植物凝集素对其有特殊亲和力的糖链有识别能力，也可以利用此方法有效检测植物粗提液中所含凝集素的类型。例如在上述香蕉提取液测试中[39]，只有含葡萄糖、*N*-乙酰葡萄糖和甘露糖的纳米颗粒混合液出现了沉淀，说明香蕉中所含凝集素属于对葡萄糖、*N*-乙酰葡萄糖、甘露糖及其衍生物有亲和力的一类蛋白。该类实验对植物中凝集素种类信息的获得和进一步大量分离目标凝集素的方法设计都有重要的意义。

24.4.4　巴西矛头蝮蛇 *Bothrops jararacussu* 毒液中凝血酶的分离

蛇毒一般包括多肽、酶类和其他神经毒素化合物。很多酶和蛋白质的提取分离方法类似，但要更加注意避免失活。Jararacussin-Ⅰ是从巴西矛头蝮蛇 *Bothrops*

jararacussu 的毒液中分离出的凝血酶，等电点 5.0，相对分子质量在 28 000 左右。分离方法[40]：将 400 mg 干燥的粗提毒物溶解在 3 mL 磷酸盐缓冲液（0.02 mol·L^{-1}，pH 7.8）中，离心除去不溶物。上清液过滤后通过阳离子交换树脂（Resource 15S），以上述磷酸盐缓冲液为洗脱剂，流速为 3 mL·min^{-1}，收集不被树脂吸附的洗脱液。经检测，其中含蛋白质的流分具有凝血作用。该流分再通过一根亲和色谱柱（Benzamidine Sepharose 6B），未被特异性吸附的蛋白质和其他杂质随着流动相磷酸盐缓冲液（0.02 mol·L^{-1}，pH 7.8，0.5 mol·L^{-1} NaCl）被洗出柱外。然后改变洗脱剂，用 0.02 mol·L^{-1}的甘氨酸-盐酸缓冲液（pH 3.2）将目标蛋白质洗脱下来。随后立刻把样品放在磷酸盐缓冲液（0.02 mol·L^{-1}，pH 7.8）中透析，浓缩后的样品（16 mg·mL^{-1}）放在 80 ℃左右的冰柜中冷藏。Jararacussin-Ⅰ的晶体可通过悬挂式蒸汽扩散方法获得。经过多次优化结晶条件，最后用 2 mL 蛋白质溶液与同体积的试液（pH 6.5，0.1 mol·L^{-1}二甲胂酸钠，0.2 mol·L^{-1}乙酸钙和 12% 聚乙二醇 8000）混合培养，得到了理想的单晶（大小约 0.2 mm）。随后结晶被转移到 20% 的甘油溶液中速冻冷藏。

参 考 文 献

[1] 陈琼华．生物化学，第二版．北京：人民卫生出版社，1987：4～5，71，434～437.

[2] Stoker H S. Organic and Biological Chemistry, 4th Edition. Boston: Houghton Mifflin, Inc., 2007: 312.

[3] 林启寿．中草药成分化学．北京：科学出版社，1977：2～6.

[4] Miyata T, Tokunaga F, Yoneya T et al. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, *Tachyplesin* II, and *Polyphemusins* I and II: chemical structures and biological activity. J Biochem, 1989, 106: 663～668.

[5] Tamamura H, Kuroda M, Masuda M et al. A comparative study of the solution structures of tachyplesin I and a novel anti-HIV synthetic peptide, T22 ([$Tyr^{5,12}$, Lys^{7}]-polyphemusin II), determined by nuclear magnetic resonance. Biochim Biophys Acta, 1993, 1163: 209～216.

[6] Sung W S, Lee B J, Lee D G. Fungicidal effect of piscidin on *Candida albicans*: pore formation in lipid vesicles and activity in fungal membranes. Biol Pharm Bull, 2008, 31: 1906～1910.

[7] Conlon J M, Power G J, Abdel-Wahab Y H A et al. A potent, non-toxic insulin-releasing peptide isolated from an extract of the skin of the Asian frog, *Hylarana guntheri* (Anura: Ranidae). Regul Peptides, 2008, 151: 153～159.

[8] Ruiz de Torrent R M, Bongiovanni B, Leiva L C et al. Neurotoxicological effects of a thrombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus* terrificus venom (preliminary study). Toxicon, 2007, 50: 144～152.

[9] Trikha M, Rote W E, Manley P J et al. Purification and characterization of platelet aggregation inhibitors from snake venoms. Thromb Res, 1994, 73: 39～52.

[10] 刘岱岳，余传隆，刘鹊华．生物毒素开发与利用．北京：化学工业出版社，2007：3，47，142～149，344～348.

[11] Andersen N H, Brodsky Y, Neidigh J W et al. Medium-dependence of the secondary structure of ex-

endin-4 and glucagon-like-peptide-1. Bioorgan Med Chem, 2002, 10: 79～85.

[12] Corzo G, Escoubas P. Pharmacologically active spider peptide toxins. CMLS Cell Mol Life Sci, 2003, 60: 2409～2426.

[13] Fox J W, Serrano S M T. Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. Curr Pharm Design, 2007, 13: 2927～2934.

[14] Ohizumi Y, Minoshima S, Takahashi M et al. Geographutoxin Ⅱ, a novel peptide inhibitor of Na channels of skeletal muschles and autonomic nerves. J Pharmacol Exp Ther, 1986, 239: 243～248.

[15] Efremenko E, Votchitseva Y, Plieva F et al. Purification of His6-organophosphate hydrolase using monolithic supermacroporous polyacrylamide cryogels developed for immobilized metal affinity chromatography. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 70: 558～563.

[16] Gardell S J, Duong L T, Diehl R E et al. Isolation, characterization, and cDNA cloning of a vampire bat salivary plasminogen activator. J Biol Chem, 1989, 264: 17947～17952.

[17] 高占先. 有机化学, 第二版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 557.

[18] Fehlbaum P, Bulet P, Michaut L et al. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. J Biol Chem, 1994, 269: 33159～33163.

[19] Martinez-Luis S, Perez-Vasquez A, Mata R. Natural products with calmodulin inhibitor properties. Phytochemistry, 2007, 68: 1882～1903.

[20] Tan L T, Williamson R T, Gerwick W H. *cis*, *cis*- and *trans*, *trans*-Ceratospongamide, new bioactive cyclic heptapeptides from the Indonesian red alga *Ceratodictyon spongiosum* and symbiotic sponge *Sigmadocia symbiotica*. J Org Chem, 2000, 65: 419～425.

[21] Pettit G R, Kamano Y, Herald C L et al. Isolation of dolastatins 10-15 from the marine mollusk *Dolabella auricularia*. Tetrahedron, 1993, 49: 9151～9170.

[22] Sakai R, Rinehart K L, Kishore V et al. Structure-activity relationships of the didemnins. J Med Chem, 1996, 39: 2819～2834.

[23] Kobayashi M, Aoki S, Ohyabu N et al. Arenastatin A, a potent cytotoxic depsipeptide from the Okinawan marine sponge *Dysidea arenaria*. Tetrahedron Lett, 1994, 35: 7969～7972.

[24] Fusetani N, Sugawara T, Matsunaga S. Orbiculamide A: a novel cytotoxic cyclic peptide from a marine sponge *Theonella* sp. J Am Chem Soc, 1991, 113: 7811～7812.

[25] Ford P W, Gustafson K R, McKee T C et al. Papuamides A-D, HIV-inhibitory and cytotoxic depsipeptides from the sponges *Theonella mirabilis* and *Theonella swinhoei* collected in Papua New Guinea. J Am Chem Soc, 1999, 121: 5899～5909.

[26] Bokesch H R, O'Keefe B R, McKee T C et al. A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. Biochemistry-US, 2003, 42: 2578～2584.

[27] Yang F, Bewley C A, Louis J M et al. Crystal structure of cyanovirin-N, a potent HIV-inactivating protein, shows unexpected domain swapping. J Mol Biol, 1999, 288: 403～412.

[28] Ng T B. A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae). Gen Pharmac, 1998, 30: 1～4.

[29] 张洪渊. 生物化学原理. 北京: 科学出版社, 2006: 100, 110.

[30] Sherma J, Fried B. Handbook of Thin-layer Chromatography, 3rd Edition. New York: Marcel Dekker,

Inc, 2003: 749～764.

[31] 徐任生,陈仲良. 中草药有效成分提取与分离,第二版. 上海:上海科学技术出版社,1989: 431～432.

[32] Scopes R K. Protein Purification. 2nd Edition. New York: Springer-Verlag, Inc, 1987: 14～33, 215～218.

[33] 张扬,黄少烈. 高速逆流色谱在化工分离中的应用. 广东化工,2005,32:56～58.

[34] Lottspeich F, Henschen A, Hupe K P. High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemisty. Berlin, New York: de Gruyter, 1981: 25.

[35] McRee D E. Practical Protein Crystallography. California: Academic Press, Inc, 1993: 6～11.

[36] Doyle S A. High Throughput Protein Expression and Purification. New York: Humana Press, 2009: 129～141.

[37] McIntosh J M, Corpuz G O, Layer R T et al. Isolation and characterization of a novel *Conus* peptide with apparent antinociceptive activity. J Biol Chem, 2000, 275: 32391～32397.

[38] 刘斌,倪健. 中药有效部位及成分提取工艺和检测方法. 北京:中国中医药出版社,2007: 337.

[39] Nakamura-Tsuruta S, Kishimoto Y, Nishimura T et al. One-step purification of lectins from banana pulp using sugar-immobilized gold nano-particles. J Biochem, 2008, 143: 833～839.

[40] Bortoleto R K, Murakami M T, Watanabe L et al. Purification, characterization and crystallization of jararacussin-Ⅰ, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. Toxicon, 2002, 40: 1307～1312.

（徐志红）

第 25 章　海洋天然产物

海洋生物资源是保留最完整、资源最丰富、最具新药开发潜力的领域。海洋生物独特的生境(高盐度,高压,缺氧,避光)、生物合成途径和酶反应系统与陆地生物相比有着显著的差异,导致海洋生物往往产生化学结构奇特、新颖、生物活性多样的海洋药物先导化合物,为新药研究与开发提供了大量的模式结构和药物前体。国际上规模化开展海洋天然产物研究始于 20 世纪 60 年代初。40 多年来,海洋天然产物的数量呈直线上升趋势。全世界海洋天然产物数量已有近 2 万种。近 10 年来,每年发现的新海洋化合物为 700～800 种,而 1975～1980 年 5 年内才发现 200 种。多数海洋天然产物具有一定的生物活性。其中,具有显著抗肿瘤活性的化合物有 160 多种,活性化合物的筛选率比陆生生物(包括中药)高 100 倍。目前,约 30 种海洋先导候选物已进入Ⅰ～Ⅲ期临床研究,其中抗肿瘤药占 75%,其余为镇痛、抗老年痴呆、治疗牛皮癣和哮喘药物。

海洋生物活性物质的分离与制备是海洋药物研究的技术关键,海洋生物活性物质制备的导向之一为生物活性筛选。药物快速筛选技术包括高通量技术和高内涵技术,已应用到海洋药物的筛选过程。过去,海洋天然产物研究采用钓鱼式的筛选模式,活性天然化合物发现速度慢,漏筛情况严重。随着高通量制备和筛选仪器的出现,以及配套软件和数据库的完善,改变了传统海洋药物研究模式。通过高通量的天然产物制备、高通量的活性筛选,大大提高了研发速度。

海洋生物发酵工程主要是通过对富含活性物质的海洋微生物进行发酵培养,从中获得大量的产物。利用生物反应器培养微藻,开发海洋生物活性物质,也是世界上的一个研究热点。美国有公司利用发酵法培养异养微藻,生产 EPA 和 DHA,已经达到工业化生产规模。

开展海洋生物活性物质研究的最终目的是将其开发成产品投放市场,因此海洋生物活性物质的分离、纯化及产品制备等技术,是海洋生物活性物质的重要研究方向。近年来,有许多新的、先进的技术应用于海洋生物活性物质的分离、纯化及产品制备过程中,如超临界流体萃取、双液相萃取、灌注色谱、分子蒸馏、膜分离等现代分离技术,提高化合物活性的分子修饰、组合化学技术,加速药物研制的计算机辅助药物设计技术等。随着科技发展,现有的技术将不断完善,新的技术会不断出现,将带动海洋生物活性物质的研究与开发以更快的速度发展。本章就海洋天然产物制备过程的环节进行阐述。

25.1 海洋天然产物分离基本方法

对海洋生物中天然产物的分离和制备，首先应掌握生物体中代谢产物的结构特点。海洋天然产物结构官能团的特征包括：①具有高度共轭键（如陆地生物中罕见的乙炔键和丙二烯键）；②高度氧化、多羟基、侧链高度分支、硫酸酯化、碳链断裂而形成开环甾体结构或 A 环失碳等；③共价结合的含卤有机物（常见的是溴，其次是氯，然后是碘）；④奇特的重排萜、卤代萜和环状萜等；⑤聚醚类毒素；⑥特殊的含氮代谢物等。此外，海洋次生代谢产物主要以中低极性成分为主，如甾体、萜类、大环内酯类、烃类、聚醚类、肽类、长链脂肪酸类、醌类、生物碱等。

近年来，由于色谱、波谱技术的快速发展，化学家发现越来越多的高极性海洋生物成分具有很好的生物活性和结构多样性，如棘皮动物海参和海星中的甾体和三萜皂苷具有抗肿瘤、灭螺等生物活性。此外，从不同种属的海绵中也陆续发现了新的皂苷类成分，具有细胞毒、抗菌等活性。例如，Kubanek 从加勒比海海绵 *Erylus formousus* 中分离得到的三萜皂苷具有明显的导致鱼类拒食的生态活性；Peter Proksch 从印尼海绵 *M. sarassinorum* 的水溶性提取物中分离得到一系列非羊毛脂甾烷类三萜皂苷。

海洋生物体内活性次生代谢产物往往很微量。此外，陆地的热、光、空气、pH 等外因很容易引起海洋天然产物的结构变化。海洋生物体中盐类物质对水溶性活性成分分离纯化工作也带来很大影响。因此，分离与纯化多采用多种色谱的联合使用[1,2]。

25.1.1 海洋生物的采集和储存

海洋生物的采集和储存方法是决定次生代谢产物是否保存原形的关键。海洋生物采集后，需马上冷冻以防止酶促化学反应的发生，或直接浸泡在 95% 乙醇中，并在实验室中低温储藏[2]。

25.1.2 海洋生物的提取方法

25.1.2.1 有机溶剂提取法

该方法为最常用的海洋生物提取技术，操作简单，不需要精密的仪器，但需耗费大量的有机溶剂。海洋动植物经粉碎或匀浆后，用丙酮在室温下动态提取 2～3 次。每 100 g 生物量用 1 L 丙酮，使细胞蛋白质（酶）变性失活，并破坏细胞，释放胞内次生代谢产物，再用甲醇动态提取 3 次。合并丙酮和甲醇提取溶液，低温旋转蒸干（温度控制在 35～40 ℃），并真空干燥获得固体或油状物。海洋微生物通常将

培养液过滤分成菌液和菌丝体两部分，菌液常用乙酸乙酯萃取后减压浓缩，菌丝体一般用甲醇、丙酮动态提取后浓缩。美国国立癌症研究所的提取方法为，冻干生物样品粉碎，在 4 ℃下用水提取，通过冻干除去水以避免不稳定性成分热分解。剩余物用 MeOH-CH_2Cl_2(1∶1，v/v)、MeOH(100%)分别提取，有机溶剂减压浓缩后合并[2]。

25.1.2.2　超临界流体萃取法

对于海洋生物中易挥发、热稳定性差的低极性生物活性物质，采用超临界 CO_2 萃取分离。对于极性稍大的成分可以通过调整温度、压力以改变密度或夹带有机溶剂(如甲醇、乙醇或二氯甲烷)进行提取。由于该方法的设备及操作复杂，超临界流体萃取法具有一定的局限性。

25.1.3　分离策略

海洋天然产物的分离应注意以下因素：提取物的复杂程度，样品的极性、稳定性、溶解度，样品量和分离技术的互补性等。随着分离的深入，操作规模会不断减小，产物纯度不断提高，相应地导致样品量减少。因此，往往采用相对便宜的固定相(硅胶、氧化铝、大孔吸附树脂 XAD 等)进行常压柱色谱、快速色谱、减压柱色谱等粗分，然后采用 Sephadex LH-20、离子交换树脂、C18 等色谱柱完成样品的初步纯化，再选择制备型 HPLC 作最后的纯化[3]。海洋天然产物的分离常采用 Kupchan 溶剂分配方法，如图 25.1 所示[1]。

海洋生物总提取物常用不同极性的溶剂由低到高(正己烷/石油醚→乙酸乙酯/二氯甲烷→正丁醇)从浸膏水分散液中萃取出不同的极性部位。对各部位进行化学分析(TLC、HPLC、NMR、MS 或色谱-波谱联用技术)和生物活性筛选(动物、细胞、蛋白、基因水平活性筛选等)，选择有活性和有特征代谢产物信号的组分进一步分离。石油醚和乙酸乙酯或二氯甲烷部位主要是一些中低极性代谢产物，如萜类、甾体、生物碱、肽、苯醌、烃类、不饱和脂肪酸等；正丁醇和水中主要是高极性化合物，如皂苷、生物碱盐、氨基酸、多羟基甾体和大分子水溶性化合物等。根据不同极性化合物特点，采用不同的组合策略进行分离[4]。

25.1.3.1　亲水性海洋天然产物的组合色谱分离

海洋生物提取物中含有大量的无机盐，分离前常用疏水型大孔吸附树脂除去大量盐并可逆性地吸附待分离的小分子高极性组分[5]。大孔吸附树脂也可用于从海洋生物提取物中富集皂苷。例如，将海星水提取物加到大孔吸附树脂柱上，用水洗脱水溶性杂质，用甲醇富集海星皂苷，再进一步用其他色谱手段分离纯化。

对于含水溶性小分子海洋生物提取物，也可利用 Sephadex G10、Bio-Gel P-2

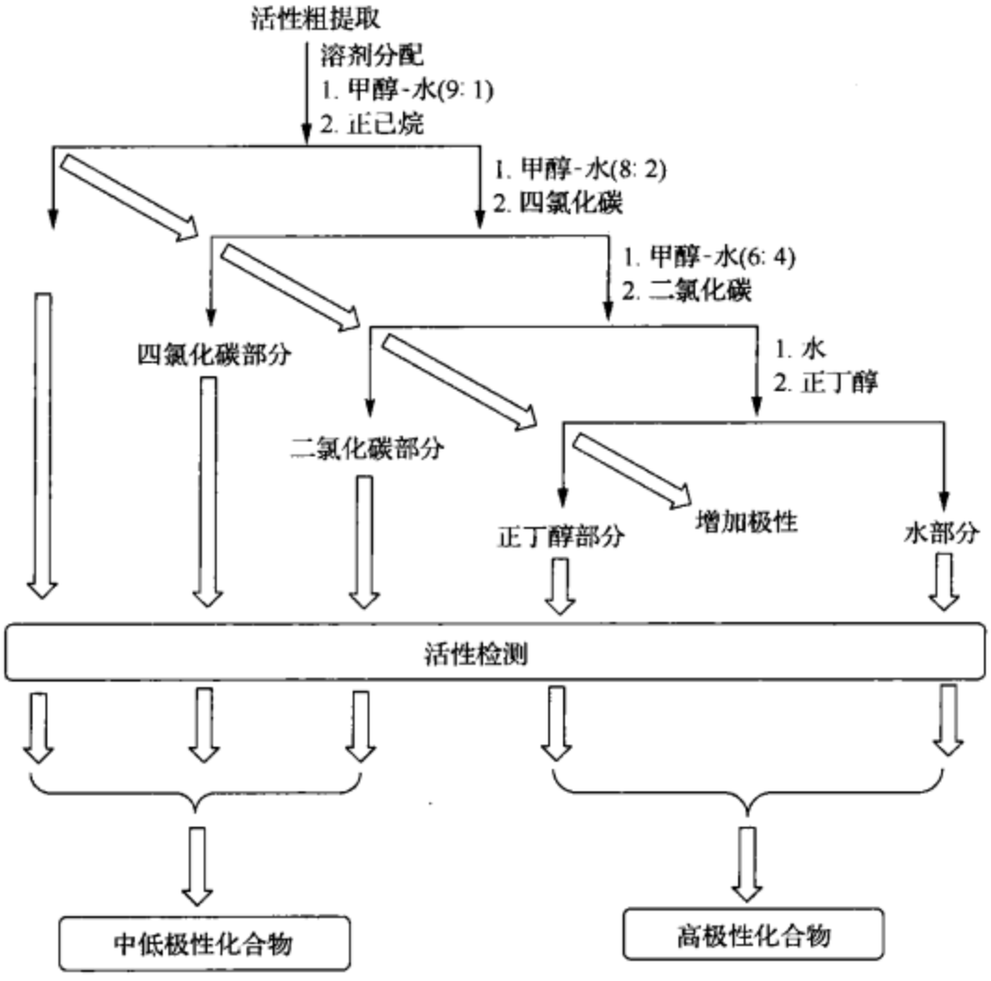


图 25.1 Kupchan 溶剂分配方法

凝胶柱除盐。利用 Sephadex LH-20 及 TSK Toyopearl HW 进行分子排阻色谱-凝胶过滤，对海洋天然产物的进一步分离和纯化起重要作用。Sephadex LH-20 不仅可作为一种初步分离手段，除去其中残留的微量固体杂质、盐类或其他外来杂质，还可以用于分离纯化，且不会造成样品损失。

25.1.3.2 亲脂性海洋天然产物的分离

由于海洋天然产物的不稳定性(如异臭椿烷型三萜)，在分离纯化过程中要注意以下几点：①避免长时间光照，选择棕色瓶装样品，必要时对色谱柱采取避光处理；②避免长时间接触溶剂，注意色谱填料和溶剂对样品的影响(如氧化铝会引起结构重排、催化脱氢和水合等反应)；硅胶会产生氧化反应，发生结构重排，*N*-脱甲基和 *O*-脱甲基等反应。部分溶剂如丙酮、甲醇、乙二醇、二氯甲烷可能会生成加成物。氯仿露置在日光、氧气或湿空气中，特别是和铁接触时容易被氧化分解成氯化氢和有毒的光气，在海洋天然产物的分离中常用二氯甲烷替代氯仿。核磁实验中氘代氯仿也可能引起对 pH 敏感成分的化学降解等；③防止空气氧化，选择充氮

气的方法，同时多用快速色谱、减压柱色谱、制备型 HPLC 等方法分离，缩短与空气长时间接触。

25.1.3.3　手性海洋天然产物的分离

作者在研究海绵 *Xestospongia testudinaria* 的溴代脂肪化合物时，发现提取物中存在大量的对应异构体或差向异构体，设计了手性色谱与反相色谱相结合的方法，成功地对手性分子进行了拆分。例如，采用制备型反相 C8 柱（乙腈-水）可将两组溴代多烯烷差向异构体化合物 **25-1/25-2** 与化合物 **25-3/25-4**（图 25.2）分开，每组差向异构体包含两个对映异构体，再采用 AD-H 手性柱（异丙醇-正己烷）将对映异构体 **25-1** 与 **25-2** 分开，另一组化合物 **25-3/25-4** 采用 MTPA 酯化后形成新的手性中心继而进一步用制备型反相 C8 柱成功分开。

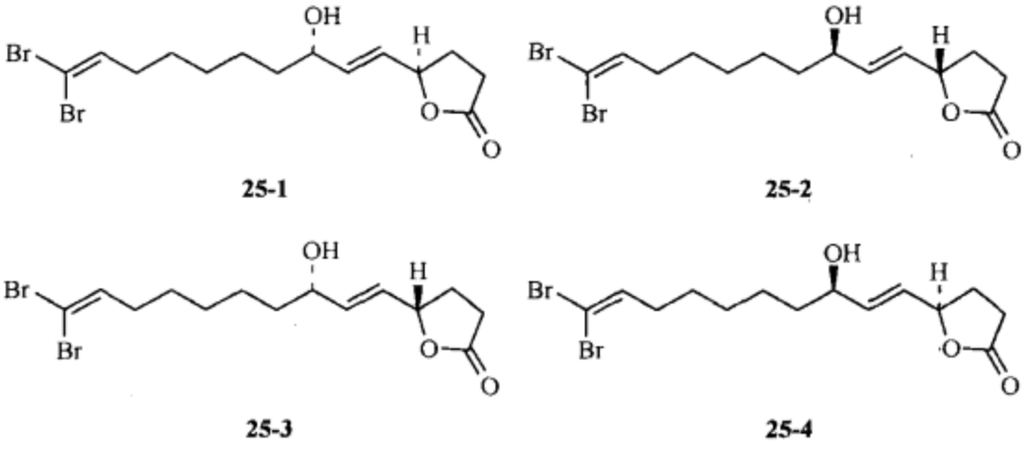


图 25.2　海绵 *Xestospongia testudinaria* 的手性分子

25.1.4　海洋天然产物分离研究进展

应用 LC-MS、LC-NMR、LC-NMR-MS 等色谱-波谱集成技术为化学筛选方法，结合高通量筛选技术，加快了结构新颖海洋天然化合物的发现速度，并改变了传统植物化学技术在海洋天然产物研究的应用。因此，建立快速分离和鉴定体系是开发海洋药物和快速发现药物先导化合物的关键。

25.1.4.1　化学筛选方法

由于天然产物化学成分复杂，传统方法为系统分离，但缺乏明确的结构信息，化合物分离和结构鉴定的盲目性较大，工作强度大且造成大量的人力和物力浪费。以化学筛选（TLC、HPLC、NMR、MS 及色谱-波谱联用技术）对海洋生物提取物的代谢产物的结构类别和多样性进行分析，建立靶向分离方案，成为海洋天然产物的主要研究方法。

通过 HPLC-DAD 指纹图谱的峰位、峰高的分析，可了解海洋生物中代谢产物的数量、极性分布和分离难易程度等，从而对特征峰进行分离制备。NMR 不仅在纯品结构鉴定中发挥举足轻重的作用，而且可提供大量有关混合物的成分信息。获得海洋生物提取物的混合^{1}H NMR 谱是一个值得推荐的方法。根据提取物的核磁特征信号，结合物种的化学分离和文献信息，可获得提取物的主要特征结构或官能团信息。例如，长链脂肪酸在高场区的 δ 0.5 ～ 1.5 ppm 出现大量亚甲基信号；而 δ 0 ppm 左右的信号提示可能含三元碳环官能团化合物，对分离具有重要的指导价值[6]。提取物的 ESI-MS 或 ESI-MS/MS 谱不仅可确定主要成分的相对分子质量，而且可判断可能的功能团，具有高灵敏度。还可通过液质联用对混合物进行成分鉴定，Cichewicz[7]从海绵 *Didiscus aceratus* 中分离得到一系列立体异构的仙茅酚类二聚体，基于仙茅酚母核的相对分子质量 M，用 MS 定位其他组分，如相对分子质量为 M^+ 和 $2M$ 等组分可快速分离得到同系列化合物和二聚体，成为用质谱分析指导海洋天然产物分离的实例。

随着色谱-波谱联用技术的发展，可从定性和定量角度研究复杂的海洋天然产物提取物。多种波谱手段如 FT-IR、PDA、UV-Vis、MS 和 NMR、HPLC 可以联用，这些联用技术不局限于两种技术联用，还可应用于 LC-PDA-MS、LC-MS-MS、LC-NMR-MS、LC-PDA-NMR-MS 等联合技术[8]。由于 LC-MS 比 LC-NMR 分辨率更高，LC-MS 多用于天然产物混合物的分析从而避免重复分离。由于很多海洋生物产生含卤族元素化合物，应用 ESI-MS 对提取物进行分析，可获得卤族元素种类和数目信息。

25.1.4.2 活性筛选导向的化学制备

以生物活性筛选为导向的化学分离已成为海洋天然产物化学的常规研究方法。高通量和高内涵筛选技术在海洋药物活性筛选生物技术中发挥了重要的作用，但其检测模型均建立在单个药物作用靶分子的基础上，无法全面反映被筛样品的生物活性特征，只得到有限的数据，初筛得到的阳性结果需要进一步确认。

将色谱-高通量活性筛选的联机技术用于微量不稳定的海洋天然产物分离，建立 HPLC 指纹谱中的生物活性变化曲线，锁定高活性分子群或高活性化合物群，将快速确定海洋天然产物提取部位中的生物活性成分或分子群。

25.1.4.3 高通量快速分离机制

为了快速获得适合于高通量活性筛选的样品，人们发展了自动化高效率色谱分离技术。高效率快速色谱技术主要包括平行分离色谱、序列分离色谱和串联色谱技术，这些技术能够同时或连续进行多个样品的快速分离纯化，利用梯度洗脱能够快速按极性把复杂的生物体分离成数十个含有不同成分组的部位（或单体），或

通过不同色谱填料的串联使用和自动化控制，把复杂混合样品分离成一系列高纯度单一化合物，使复杂样品的分离纯化速度得到极大提高。

25.2　不同类型海洋天然产物的提取分离方法

25.2.1　萜类化合物

海洋萜类化合物的极性较小，提取及分离纯化的方法与其他低级性化合物的方法基本相同。但是，萜类化合物结构复杂多样，彼此之间差别较大，提取分离的方法也有很大不同。由于从海洋生物中所分离的萜类多数不稳定，对萜类成分的分离应尽量少用硅胶，且应提高分离速度，如采用硅胶快速柱色谱或真空液相硅胶柱色谱等。

含倍半萜的海洋生物提取常用甲醇或二氯甲烷-甲醇(1∶1)提取。提取物经浓缩后，先用正己烷或乙酸乙酯在水中分配，低极性部位用硅胶柱色谱分离，以正己烷-乙酸乙酯梯度洗脱。倍半萜类化合物的纯化一般用正相或反相 HPLC 制备。

含二萜的海洋生物提取常用氯仿-甲醇(1∶1)提取，也可用甲醇、异丙醇提取。提取物经浓缩后用正己烷或者乙酸乙酯与水分配，有机层浓缩后进行硅胶柱色谱分离，用正己烷-乙酸乙酯、正己烷-丙酮梯度洗脱(也可用石油醚替换正己烷)，或采用硅胶快速柱色谱。二萜类化合物的纯化一般用正相或反相 HPLC、Sephadex LH-20色谱。

含二倍半萜的海洋生物提取常用甲醇，也可用二氯甲烷-甲醇(1∶1)。提取物浓缩后用正己烷与水分配，或者在二氯甲烷和水中分配，有机层浓缩后进行硅胶快速柱层析。二倍半萜类一般用反相 HPLC、Sephadex LH-20 进行纯化。

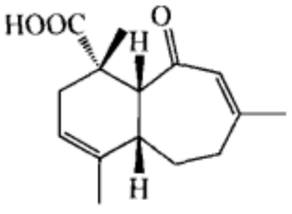
三萜类化合物在海洋天然产物中分布相对较少。目前，从海绵中发现了一系列异臭椿型三萜，该类化合物容易发生光异构化。因此，在实验过程中应该注意避光，对所用的玻璃瓶需用铝箔包裹或使用棕色瓶，流分或纯化合物低温保存。一般提取方法为采用乙醇或甲醇在室温下浸泡提取，粗提取物经硅胶柱色谱初步分离，或采用硅胶快速柱色谱如真空液相柱色谱，流分进一步经 Sephadex LH-20 或 ODS 柱色谱，最后采用反相 HPLC 纯化。由于部分异臭椿型三萜类化合物结构中含羧基，可采用重氮甲烷进行甲酯化后，再用正相和反相 HPLC 分离纯化。

25.2.1.1　倍半萜类化合物

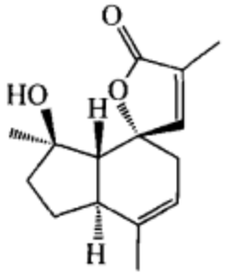
软珊瑚 *Sinularia* sp. 的提取分离方法：样品(湿重 1.0 kg)经匀浆后用甲醇浸泡提取，提取液经浓缩后在水与乙酸乙酯中分配得到乙酸乙酯部分(9.8 g)，该部分经硅胶柱色谱，正己烷-乙酸乙酯梯度洗脱，其中正己烷-乙酸乙酯(1∶4)洗脱部分过 Sephadex LH-20 凝胶柱，丙酮洗脱后，经正相 HPLC (正己烷-丙酮，8∶1)得

到化合物 Sinularianin A 和 B[9]。

软珊瑚 *Paralemnalia thyrsoides* 经乙醇浸泡提取后得乙醇提取物，经水和乙酸乙酯分配得到乙酸乙酯部分，其经硅胶柱色谱初步分离，用正己烷-乙酸乙酯进行梯度洗脱。正己烷-乙酸乙酯(3∶1)部分采用反相 HPLC(Purospher RP-18e，5 μm，10 mm×250 mm)，用乙腈-水(2∶1)进行洗脱，得到新骨架的倍半萜。另一个部分正己烷-乙酸乙酯(2∶1)经反相 HPLC，乙腈-水(2∶1)洗脱，洗脱部分进一步用正相 HPLC(Lichrosorb Si 60，7 μm，25 mm×250 mm)处理，用正己烷-乙酸乙酯(5∶1)洗脱得到化合物 **25-5** 和 **25-6**[10]。

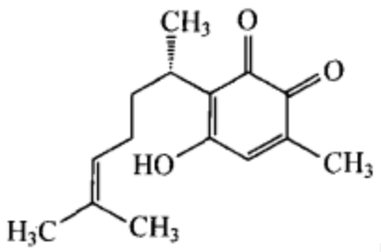


25-5



25-6

从 *Pseudopterogorgia rigida* 中可分离得到一个邻苯醌倍半萜类化合物 rigidone(**25-7**)。制备方法：将冻干样品分别用乙酸乙酯和甲醇提取。具有生物活性的乙酸乙酯提取物经反相 C18 硅胶柱色谱分离、乙腈-水(80∶20)洗脱，流分收集后经 RP-C18 TLC 检测，进一步用 RP-C18 PTLC(乙腈-水 25∶75)分离，最后通过正相硅胶 HPLC 纯化、正己烷-乙酸乙酯(85∶15)洗脱，得到倍半萜类化合物 **25-7**[11]。

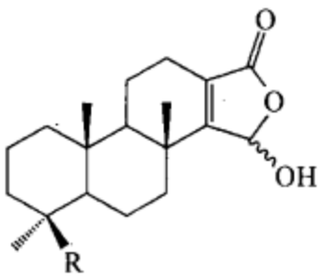


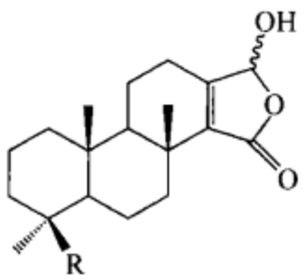
25-7

25.2.1.2 二萜类化合物

海绵 *Spongia* sp. 的主要成分为二萜类化合物。制备方法：冻干样品用甲醇提取，提取物在水和乙酸乙酯中分配，有机层经真空液相硅胶柱色谱，用正己烷-乙酸乙酯梯度洗脱。20%正己烷-乙酸乙酯洗脱部分得到化合物(+)-spongia-13(16)，14-diene-19-oic acid；40%正己烷-乙酸乙酯洗脱部分经正相 HPLC 纯化，正己烷-乙酸乙酯(1∶1)洗脱得到 spongiabutenolide A(**25-8**)和 spongiabutenolide B(**25-9**)的混合物，spongiabutenolide C(**25-10**)和 spongiabutenolide D(**25-11**)。spongiabutenolide A 和 B 的混合物采用重氮甲烷甲酯化，再用反相 HPLC 进行分

离纯化，30% 水-甲醇洗脱得到 spongiabutenolide A 的甲酯（**25-12**）和 spongiabutenolide B 的甲酯（**25-13**）[12]。





25-8 R=COOH
25-9 R=COOH
25-10 R=CH_2OH
25-11 R=CH_2OH
25-12 R=COOMe
25-13 R=COOMe

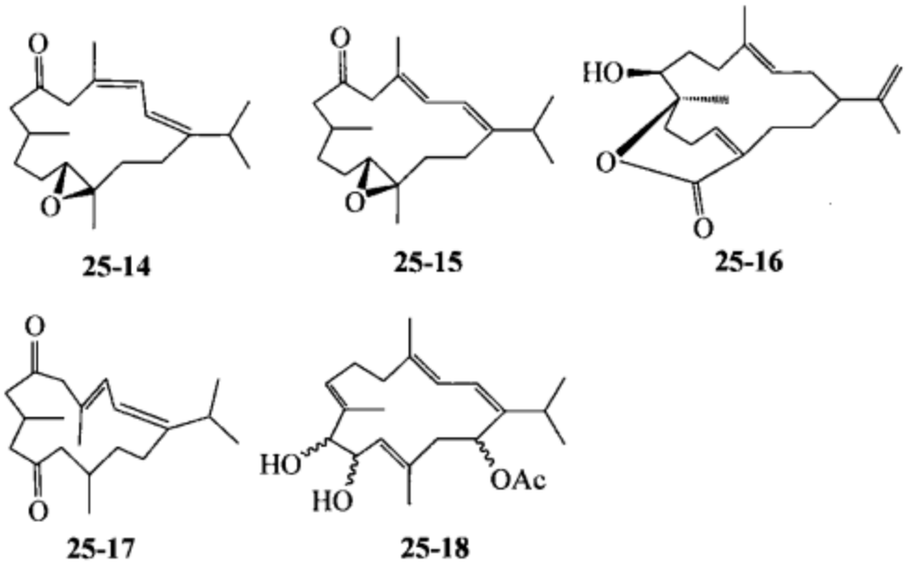
海洋软体动物 *Chromodoris obsoleta* 的主要成分为二萜类化合物，其具有细胞毒作用。制备方法：样品用氯仿-甲醇（1∶3）提取，提取液减压浓缩后，在水和氯仿中分配，氯仿层减压浓缩后经 Sephadex LH-20 凝胶柱，氯仿洗脱得到 5 个流分，第 2～4 流分分别经硅胶柱色谱，正己烷-乙酸乙酯（3∶1）洗脱，洗脱所得流分再经反相 HPLC 分离纯化，80%或者 90%甲醇-水洗脱得到一系列二萜类化合物[13]。

从海绵 *Junceella juncea* 中分离得到具有抗污作用的 briarane 型二萜。其制备方法：冻干样品用乙醇-二氯甲烷（2∶1）在室温下提取 3 次，提取物在水和乙酸乙酯中分配，乙酸乙酯提取物经硅胶柱色谱，石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱得各流分，各流分过 Sephadex LH-20 凝胶柱，氯仿-甲醇（1∶1）洗脱分离，最后用反相 C18 半制备 HPLC[Luna C18(2)，250 mm×10 mm，5 mL·min^{-1}]，甲醇-水（64∶36）洗脱得到各化合物[14]。

柳珊瑚 *Pseudopterogorgia kallos* 的主要成分为西松烷二萜类化合物，具有细胞毒作用。其制备方法：将冷冻珊瑚在室温下用 CH_2Cl_2-MeOH（1∶1）提取，CH_2Cl_2-MeOH（1∶1）提取物减压浓缩后得棕绿色浸膏。该浸膏混溶于水后，分别用正己烷、氯仿和乙酸乙酯萃取，得正己烷部位、氯仿部位和乙酸乙酯部位。氯仿部位通过硅胶柱色谱分离，以乙酸乙酯-己烷（1∶5）洗脱，得 bipinnatin N（0.0021%）。乙酸乙酯部位通过 Bio-Beads SX-3 柱色谱，甲苯洗脱，分别得到 bipinnatin E 和 providencin（0.0018%）。针对氯仿部位，采用 HPLC 进行分离纯化得到其他 8 种西松烷二萜类化合物[15]。

西松烷二萜为软珊瑚的特征次生代谢产物，其化学结构不稳定，分离与纯化有一定的困难。以 *E. mammosa* 中西松烷二萜制备为例，将冷冻软体动物在室温下用 $CHCl_3$-MeOH（1∶1）提取，提取物减压浓缩后得浸膏。粗提取在水与正己烷中分配，得正己烷提取物。该部分通过 Bio-Beads SX-2 柱色谱，甲苯洗脱，得到橘红色油状浸膏，然后经过硅胶柱色谱，乙酸乙酯-己烷洗脱，得到不同部位。最后应用反复硅胶和 HPLC(ODS)色谱制备，得到各化合物[15]。采用类同的方法，从软

珊瑚 *Eunicea tourniforti* 中分离得到西松烷型二萜。制备方法：*Eunicea tourniforti* 样品用丙酮提取，提取物在水与二氯甲烷中分配，得二氯甲烷部分，经过硅胶柱色谱，正己烷-丙酮洗脱，得到一个非极性部分，进一步采用制备 TLC（正己烷-丙酮）和反相 HPLC（甲醇-水）制备纯化得到各化合物（**25-14**～**25-18**）[16]。



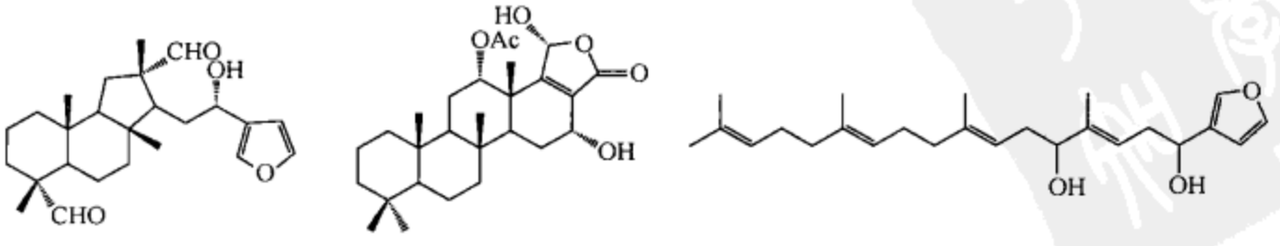
25-14 **25-15** **25-16**

25-17 **25-18**

25.2.1.3 二倍半萜类化合物

作者等对采集于中国海南三亚附近海域的南海海绵 *Hyrtios erectus* 进行了化学成分和生物活性研究[17]。利用硅胶柱色谱、HPLC 等现代色谱分离技术，从中共分离得到 16 个二倍半萜类化合物，具体分离方法如下。

海绵样品采集后直接浸泡于 95%的工业乙醇中储存。将样品剪碎匀浆后过滤，固体物用工业甲醇动态搅拌提取 3 次，每次 24h，合并提取液，减压回收溶剂。经薄层检查，95%的工业乙醇浸泡物与甲醇提取物基本一致，将两者合并，减压浓缩得浸膏。浸膏悬浮于水中，用等体积氯仿萃取 3 次，取氯仿层，减压回收溶剂。水层经减压浓缩后，溶解于一定量的无水甲醇中，过滤、脱盐，甲醇液经减压浓缩，得浓缩物 A（14.8 g）。氯仿提取物重新分配于含 10%水的甲醇和石油醚中，减压浓缩 90%甲醇层得到浸膏 B。石油醚浸膏大多为油状脂肪酸酯、脂肪酸和甾体等原生代谢产物。浸膏 B 经多次硅胶柱色谱分离并结合 ODS 柱色谱，得系列二倍半萜类化合物 **25-19**～**25-21**（图 25.3）。



25-19 **25-20** **25-21**

图 25.3 海绵 *Hyrtios erectus* 中不同骨架二倍半萜类化合物

海绵 *Sarcotragus* sp. 中主要成分为呋喃环二倍半萜。由于同系物的极性较近，分离具有一定的难度。具体提取分离方法为冻干海绵样品经匀浆后在室温下用甲醇提取，甲醇提取物在水与二氯甲烷中分配后，二氯甲烷部分在 90%甲醇和正己烷中分配，90%甲醇部分经过反复反相 ODS 快速硅胶柱（YMC Gel ODS-A，60 Å 500/400 目）色谱分离，甲醇-水梯度洗脱，再经反相 ODS HPLC（YMC ODS-H80，250 mm×10 mm，40 μm），甲醇-水（6∶1）洗脱得到 6 个部分，最后通过 CN-HPLC（YMCPack CN，250 mm×10 mm，5 μm，120 Å）纯化得到 7 个呋喃二倍半萜类化合物[18]。

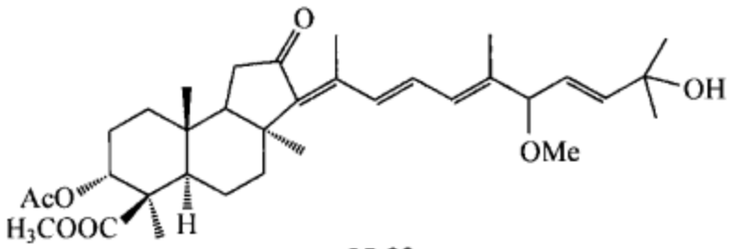
以生物活性为导向进行分离是海洋活性成分研究的重要方法。以抗 FXR 生物活性为导向，从海绵 *Spongia* 中分离得到 6 个 scalarane 型二倍半萜类化合物。冻干海绵样品（23.0 kg）用甲醇-二氯甲烷（1∶1）提取，在甲醇和正己烷中分配，甲醇可溶部分再在水和乙酸乙酯中分配，得到乙酸乙酯可溶部分（10.0g），经快速硅胶柱色谱，乙酸乙酯-正己烷梯度洗脱，得到 21 个流分，具有抗 FXR 生物活性的流分再经反相 HPLC（Optimapak，250 mm×10 mm，5 μm，100 Å，UV＝210 nm）分离，乙腈-水（85∶15）洗脱得到 6 个二倍半萜类化合物[19]。

海绵 *Lendenfeldia* sp. 中主要成分为二倍半萜类化合物。制备方法：取部分冻干样品 *Lendenfeldia* sp.，采用氯仿-甲醇（2∶1）提取，提取物按照 Kupchan 方法分配，四氯化碳部分经反复 Sephadex LH-20 凝胶柱，丙酮洗脱，然后过真空液相硅胶柱色谱，正己烷-丙酮梯度洗脱，正己烷-丙酮（95∶5）洗脱部分得到 dehydrofurodendin，正己烷-丙酮（85∶15）部分经反相 HPLC（Merck purospher STAR RP-18e column）分离，乙腈-甲醇（90∶10）洗脱纯化得到二倍半萜类化合物。另取部分样品，按照前面的提取分配方法，制备四氯化碳部分，经重氮甲烷甲酯化后，经 Sephadex LH-20 凝胶柱反复制备，得到其他二倍半萜类化合物[20]。

25.2.1.4　三萜类化合物

异臭椿型三萜如结构 **25-22** 是海绵的特征代谢产物，具有特殊结构骨架和显著细胞毒作用。由于该类化合物不稳定，易产生光化异构、氧化降解等，分离难度很大。作者建立了该类化合物的制备方法。例如，海绵 *Jaspis* sp. 中异臭椿型三萜制备方法为，冻干海绵样品用甲醇室温下浸泡提取 3 次，得到甲醇提取物，接着采用 Kupchan 分配的方法进行分配，得到具有生物活性的氯仿部位。经中压硅胶柱色谱色谱，以 0～5%的 MeOH-CH_2Cl_2 梯度洗脱，于 2% MeOH-CH_2Cl_2 部分中得到一黄色组分，加入过量的重氮甲烷在室温下处理 30min 后，甲酯化产物进行正相 HPLC 纯化，其中非极性部位经 96%的正己烷-2-丙醇洗脱得到甲酯化物和 globostellatic acid E 的甲酯化物，而从相对极性部分经 94%的正己烷-2-丙醇得到 globostellatic acid B 的甲酯化物，jaspiferoic acid B 的二甲酯化物和 globostellatic

acid C[21,22]。

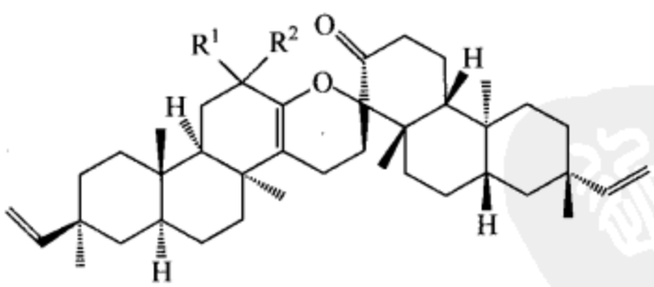


25-22

以生物活性为导向，对海绵 *Stelletta globostellata* 的异臭椿型三萜进行制备。其提取分离方法为，冻干海绵样品用乙醇浸泡提取，减压浓缩后在水和乙酸乙酯中分配得到乙酸乙酯部位，然后再在正己烷和 90%甲醇中分配，具有活性作用的甲醇部分经快速 ODS 柱色谱，甲醇-水(3∶1 和 1∶1)、甲醇、氯仿-甲醇-水(7∶3∶0.5)梯度洗脱，甲醇洗脱部分经凝胶柱色谱(二氯甲烷∶甲醇=1∶1)分离，再经快速 ODS 柱色谱得到 2 个活性部分乙腈-水(8∶2)和乙腈-水(95∶5)，经反复的反相 HPLC 制备得到 29-hydroxystelliferin D，3-*epi*-29-hydroxystelliferin E，3-*epi*-29-hydroxystelliferin A，stelliferin A 和 stelliferin D[23,24]。

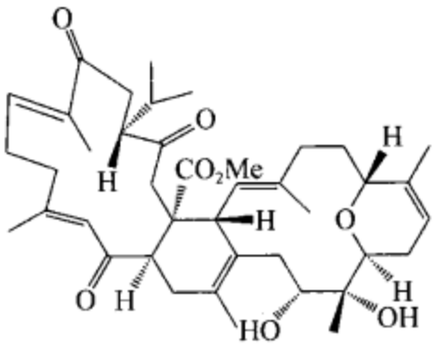
25.2.1.5 四萜类化合物

红树林 *Ceriops tagal* 中含新骨架的四萜类化合物，其具体提取分离方法为，将 *C. tagal* 红树林茎枝经乙醇在室温下浸泡 2 次，得黑色浸膏，在水和石油醚分配得到石油醚部分。经硅胶柱色谱，石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱得到 10 个部分(A～J)。B 部分再经硅胶柱色谱，石油醚-二氯化碳(9∶4)洗脱得到化合物 tagalsin I(**25-23**)和 tagalsin J(**25-24**)[25]。

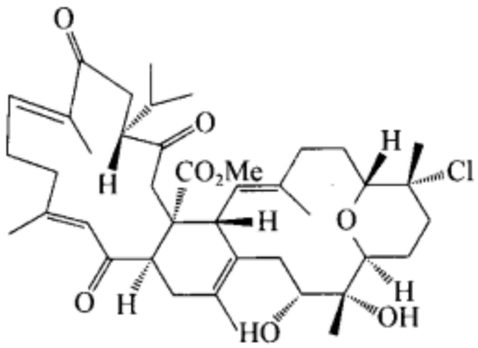


25-23 $R^1=R^2=H$
25-24 $R^1+R^2=O$

软珊瑚 *Sarcophyton glaucum* 中特征成分为双十四元环西松烷类型的四萜。制备方法：样品在室温下用丙酮浸泡提取，提取物分别用正己烷、二氯甲烷和乙酸乙酯提取，得到正己烷部分和二氯甲烷部分，后者经反复真空液相柱色谱(Merck，Kieselgel 60)分离，再用半制备薄层色谱(Merck，Kieselgel GF254；正己烷-乙酸乙酯)和反相 ODS HPLC(Inertsil ODS；甲醇-水)分离纯化得到 methyl sarcophytoate (**25-25**)和 methyl chlorosarcophytoate (**25-26**)[26]。



25-25



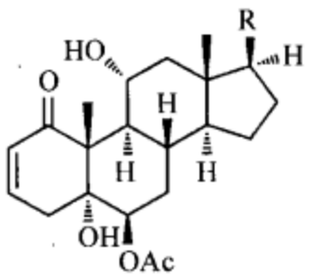
25-26

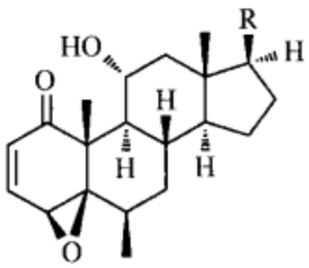
25.2.2　甾体类化合物

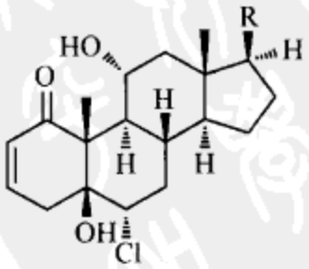
海洋生物甾体类化合物的极性比较低，并且经常与脂肪酸类成分一起，故一般采用二氯甲烷或者甲醇提取，也有用二氯甲烷-异丙醇(1∶1)提取的，浓缩提取物经快速硅胶柱色谱或者真空液相柱色谱进行分离，然后采用正相硅胶 HPLC 和反相 C18-HPLC 纯化。

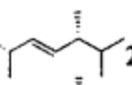
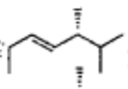
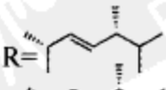
Yonarasterol A、B(**25-27**、**25-28**)和 yonarasterol D～F(**25-29**～**25-31**)是从软珊瑚 *Clavularia viridis* 中分离得到的甾体类化合物。生物样品用甲醇和乙酸乙酯在室温下浸泡提取，总提取液经减压浓缩，在水中分别与乙酸乙酯、正丁醇分配，正丁醇部分经硅胶柱色谱梯度洗脱，经 C2 快速反相硅胶柱色谱，后用正相和反相 HPLC 纯化[27]。采用同样方法，从软珊瑚 *Clavularia viridis* 中还分到了 3 个带氯原子的甾体化合物 yonarasterol G～I(**25-32**～**25-34**)[28]。

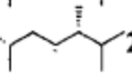
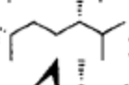
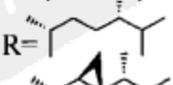
海绵中细胞毒甾体化合物 kiheieteronee A 和 kiheieteronee B 的制备方法为，冻干海绵样品用 CH_2Cl_2-2-丙醇(1∶1)提取，经减压浓缩后得到深红色固体，在 EtOAc-CH_2Cl_2-H_2O(1∶1∶1)中分配，得到上层液，再在正己烷-MeOH (2∶1)中分配，得到 0.5 g 的甲醇可溶部分，经快速硅胶柱色谱，正己烷-乙醚梯度洗脱和反相 HPLC (MeOH-H_2O, 9∶1)制备得到化合物[29]。

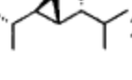
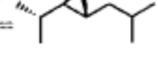




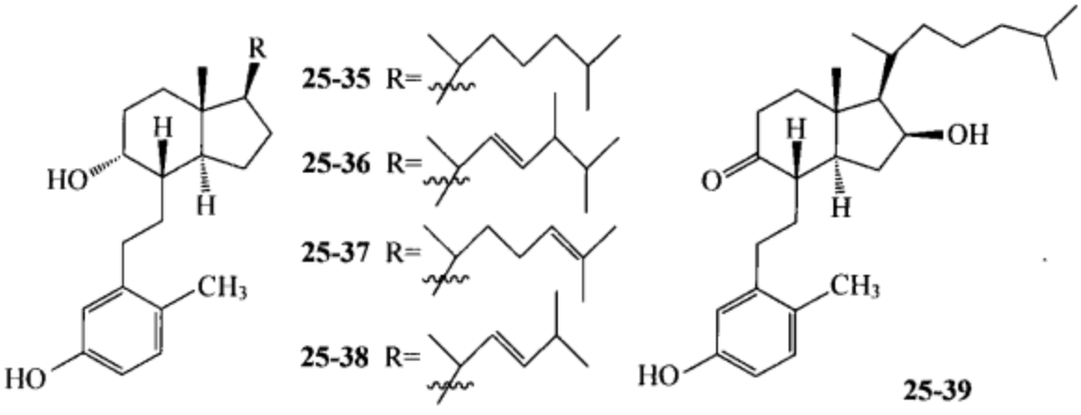


25-27 yonarasterol A R=  　**25-29** yonarasterol D R=  　**25-32** yonarasterol G R= 

25-28 yonarasterol B R=  　**25-30** yonarasterol E R=  　**25-33** yonarasterol H R= 

25-31 yonarasterol F R=  　**25-34** yonarasterol I R= 

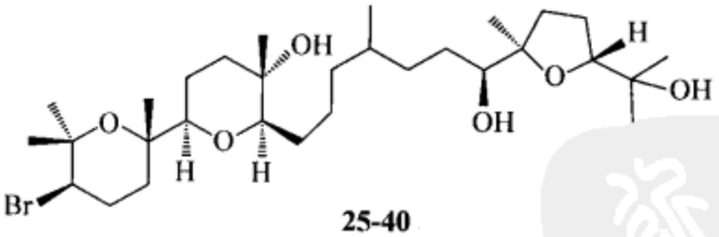
软珊瑚 *Muricella.* 的特征成分为 9，10 位开裂的甾体 calicoferol F～L（**25-35**～**25-39**）。样品用 CH_2Cl_2 反复提取 3 次得粗提取物，经真空液相快速硅胶柱色谱，用正己烷-EtOAc 梯度洗脱，其中极性部分（20%～25% EtOAc-正己烷）经半制备硅胶 HPLC（YMC silica column）制备，再用反相 HPLC 纯化（100% CH_3CN）得到各甾体化合物[30]。

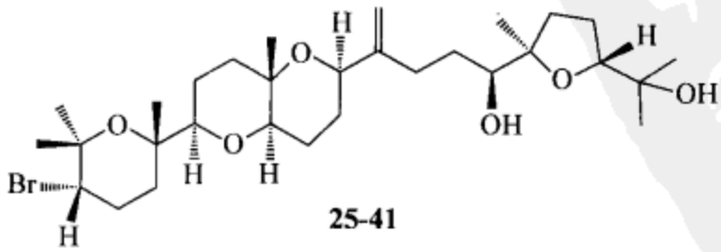


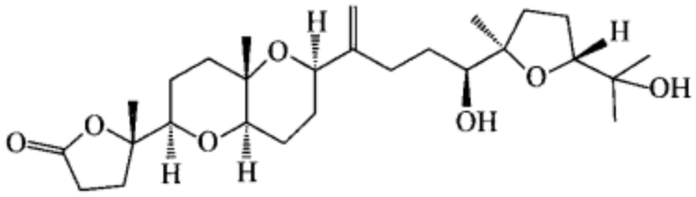
25.2.3 聚醚类化合物

聚醚类化合物一般采用氯仿-甲醇（1∶1）提取，也有用二氯甲烷和乙醇提取。粗提取物一般经硅胶柱色谱或者硅胶快速柱色谱初步分离，Sephadex LH-20 柱进一步分离，反相 HPLC 进行纯化。

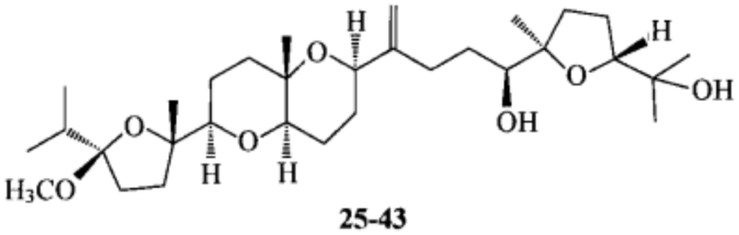
从海藻 *L. viridis* 中分离得到聚醚类化合物 **25-40**～**25-44**，具体提取分离流程见图 25.4[31]。



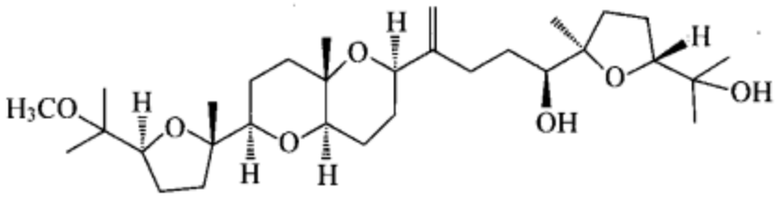




25-42



25-43



25-44

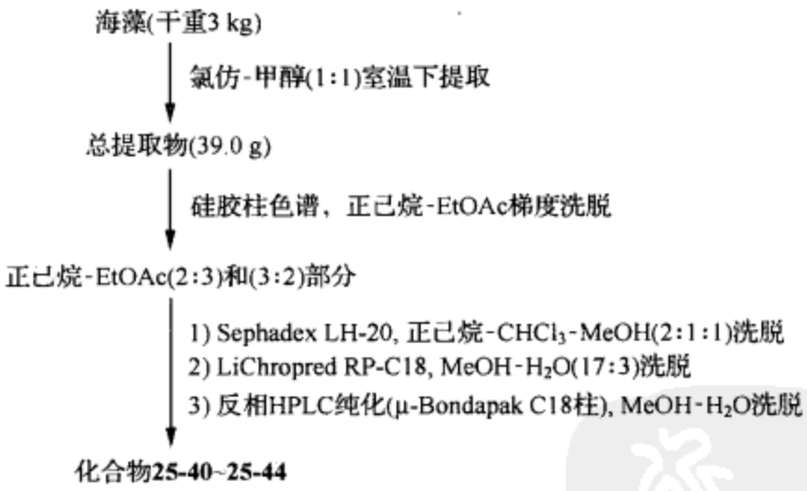
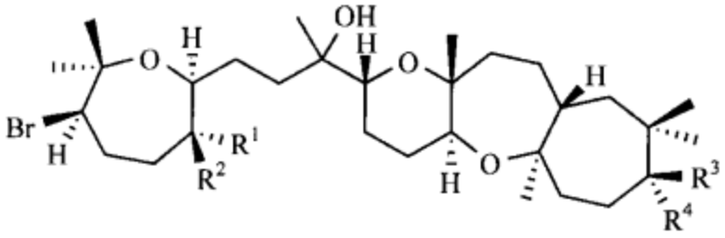


图 25.4　海藻 *L. viridis* 的提取分离流程图

海藻 *Chondria armata*. 中主要成分为溴代聚醚类化合物 armatol A～D (**25-45**～**25-48**)。具体提取分离方法为，样品用乙醇提取，提取物分别与石油醚、氯仿、正丁醇在水中分配，得到抗病毒活性的氯仿可溶部分。氯仿提取物经 Sephadex LH-20 凝胶柱，氯仿-甲醇(1 ∶ 1)洗脱，洗脱部分进一步过硅胶柱色谱，石油醚-乙醚梯度洗脱，洗脱部分用分析型反相 HPLC 制备，乙腈-水(9 ∶ 1)和乙腈-水(8 ∶ 1)洗脱得到溴代聚醚类化合物 armatol A～D[32,33]。

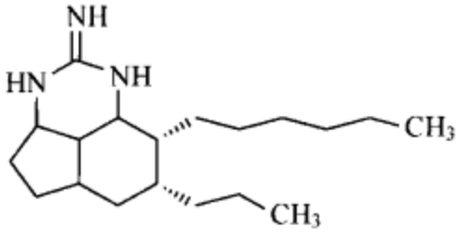


25-45 R^1=Me, R^2=OH, R^3=H, R^4=Br
25-46 R^1=OH, R^2=Me, R^3=H, R^4=Br
25-47 R^1=Me, R^2=OH, R^3=Br, R^4=H
25-48 R^1=OH, R^2=Me, R^3=Br, R^4=H

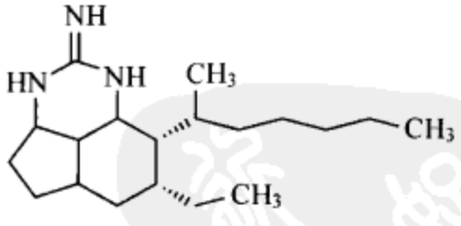
25.2.4 生物碱类化合物

海洋生物中存在大量特殊结构生物碱。一般用甲醇、异丙醇、氯仿-甲醇(2∶1)等提取，提取物经反复 Sephadex LH-20 或真空液相柱色谱分离纯化，部分还需经反相 HPLC 纯化制备。

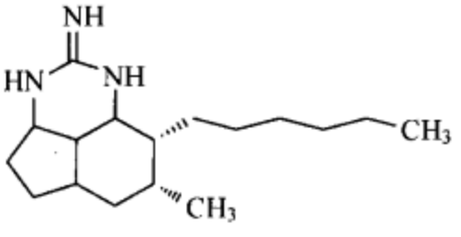
Netamine A～G(**25-49**～**25-55**)是从海绵 *Biemna laboutei* 分离得到的生物碱，其结构上都含有胍基。制备方法：冻干海绵 *Biemna labouti* 用氯仿-甲醇(2∶1)提取得到粗提取物。粗提取物采用 Kupchan 分配的方法得到二氯甲烷部分，经反复 Sephadex LH-20 凝胶柱，用正己烷-甲醇-氯仿(2∶1∶1)洗脱得到化合物 **25-49**，**25-50** 和 **25-55**。其中，从 Sephadex LH-20 凝胶柱洗脱的一部分再经真空液相硅胶柱色谱，正己烷-乙酸乙酯梯度洗脱得到化合物 **25-54**。同样从同一种海绵中采用不同的色谱学方法得到化合物 **25-51**～**25-52**[34]。



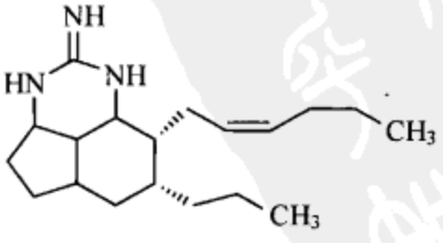
25-49



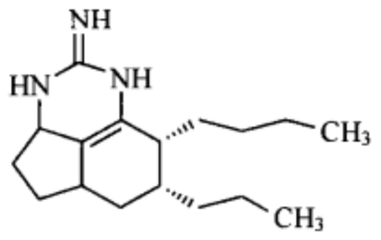
25-50



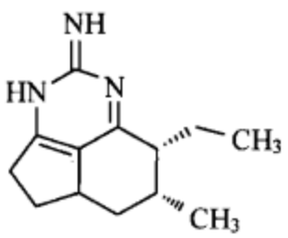
25-51



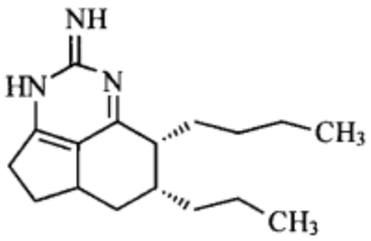
25-52



25-53

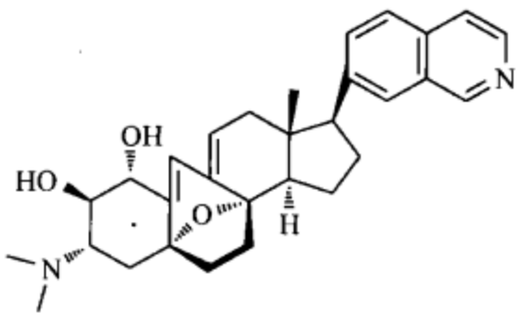


25-54



25-55

对海绵 *Corticium simplex* 的研究，以生物活性为导向，追踪具有抗人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖的活性成分。对具有活性的部位进行 Sephadex LH-20 凝胶柱，甲醇洗脱，接着用 HPLC（ODS 柱，MeOH-H_2O 洗脱，加 0.1% Et_3N；5-NH_2 柱，CH_3CN-$CHCl_3$-H_2O 洗脱）纯化得到一系列甾体类生物碱 cortistatin A～L。其中 cortistatin A(**25-56**)和 cortistatin J 都有强的抗人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖的作用，而其他则具有较弱的活性[35-37]。

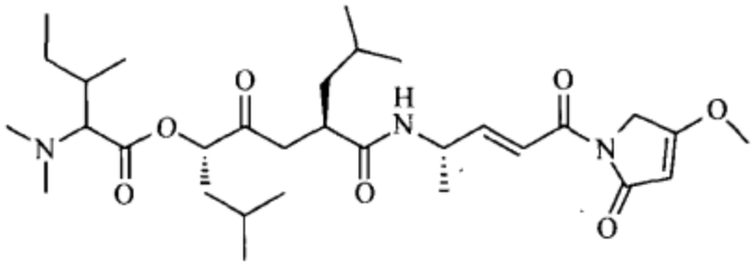


25-56

25.2.5　多肽类化合物

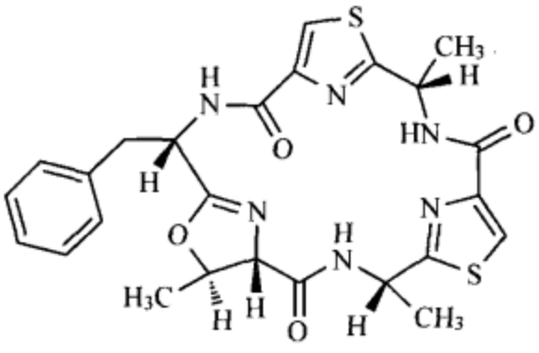
多肽类化合物主要是从海洋生物海绵和微生物中分离得到。对于海洋微生物，其菌液先过 0.45μm 的滤膜快速过滤，后经大孔吸附树脂除去盐和缓冲液，再经真空液相色谱或者 Sephadex LH-20 柱分离，反相 HPLC 纯化制备。而从动物中分离的多肽类一般先用甲醇或者氯仿-甲醇(2∶1)提取，其后的分离纯化基本与微生物的类似。

从海洋微生物 *Schizothrix* sp. 中分离得到一个链肽化合物 gallinamide A (**25-57**)，其具有抗微生物活性。制备方法：冻干样品在室温下用 MeOH-CH_2Cl_2 (1∶2，6×500 mL)提取，合并提取液后，加 H_2O(300mL)分配，有机层浓缩得浸膏(556mg)。其通过硅胶柱色谱，正己烷-乙酸乙酯梯度洗脱，其中，正己烷-乙酸乙酯(2∶8)部分再经过 C18-SPE 小柱，100%MeOH 洗脱，其后再经过反相 C18-HPLC (Phenomenex Jupiter C18 柱，250 mm×4.6 mm，5 μm，210 nm，1 mL·min^{-1})制备，MeOH-H_2O(67∶33)洗脱，得到化合物 **25-57**[38]。

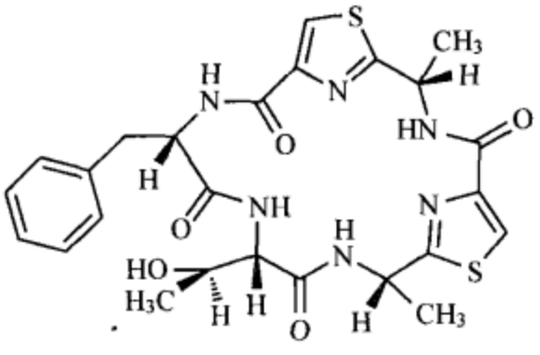


25-57

海鞘 *Didemnum molle* 中含环七肽化合物 didmolamide A 和 didmolamide B。样品用氯仿-甲醇(2∶1)提取得到浸膏，按照 Kupchan 的分配方法，得到氯仿部分，其经反复的 Sephadex LH-20 凝胶柱，正己烷-氯仿-甲醇(2∶1∶1)洗脱得到 didmolamide A(**25-58**)和 didmolamide B(**25-59**)[39]。



25-58



25-59

25.2.6 多烯炔类化合物

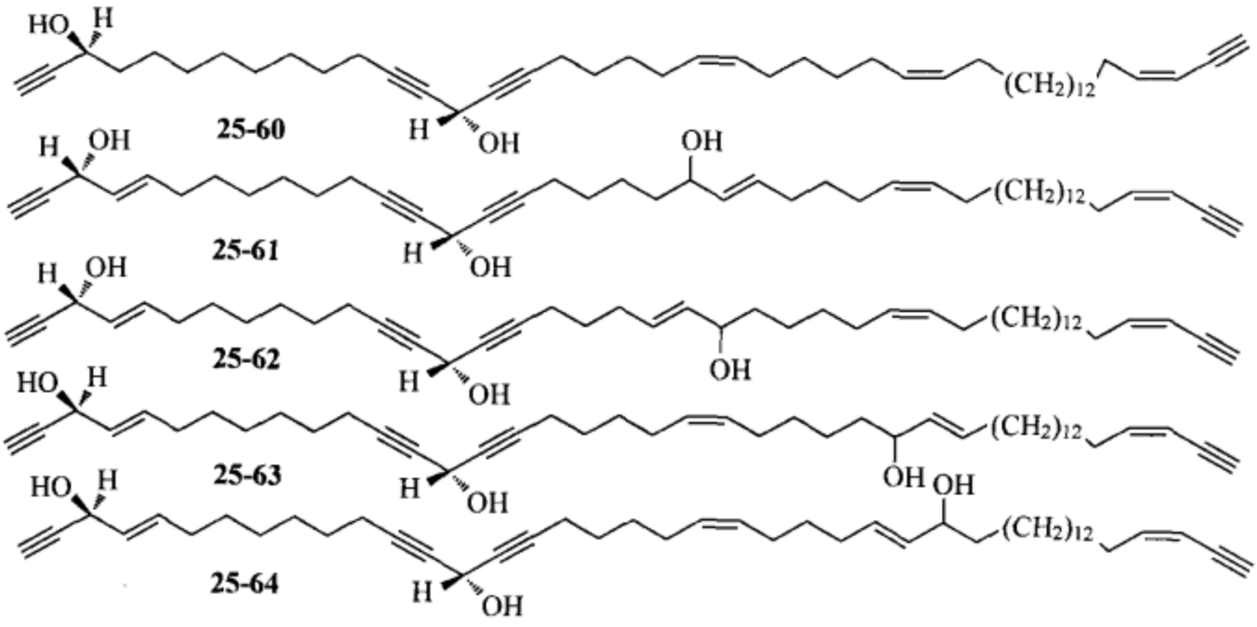
海洋生物如海绵存在很多多烯炔类化合物。该类化合物一般用甲醇、二氯化碳提取，提取物经液液分配后各部分经快速硅胶柱色谱或者快速真空液相柱色谱分离，其后用正相或者反相 HPLC 纯化。

从海绵 *Petrosia* sp. 中分离得到 5 个 C46 多烯炔类化合物 petrocortyne D～H(**25-60～25-64**)。其提取分离流程见图 25.5[40]。

作者对采自中国南海的海绵 *Xestospongia testudinaria* 进行了化学成分研究，分离得到了一系列溴代多烯(炔)类化合物，在本实验中发现并总结了该类化合物分离的色谱特点。

基于溴代多烯(炔)类化合物的特点，在整个实验过程中要采取隔氧措施，建立一套快速高效的溴代多烯(炔)类化合物的导向定位、分离、鉴定方法。

导向定位：综合利用 TLC、DAD-HPLC、^{1}H NMR、HPLC-MS 多种色谱和光谱技术，完成溴代多烯(炔)类化合物导向定位工作。



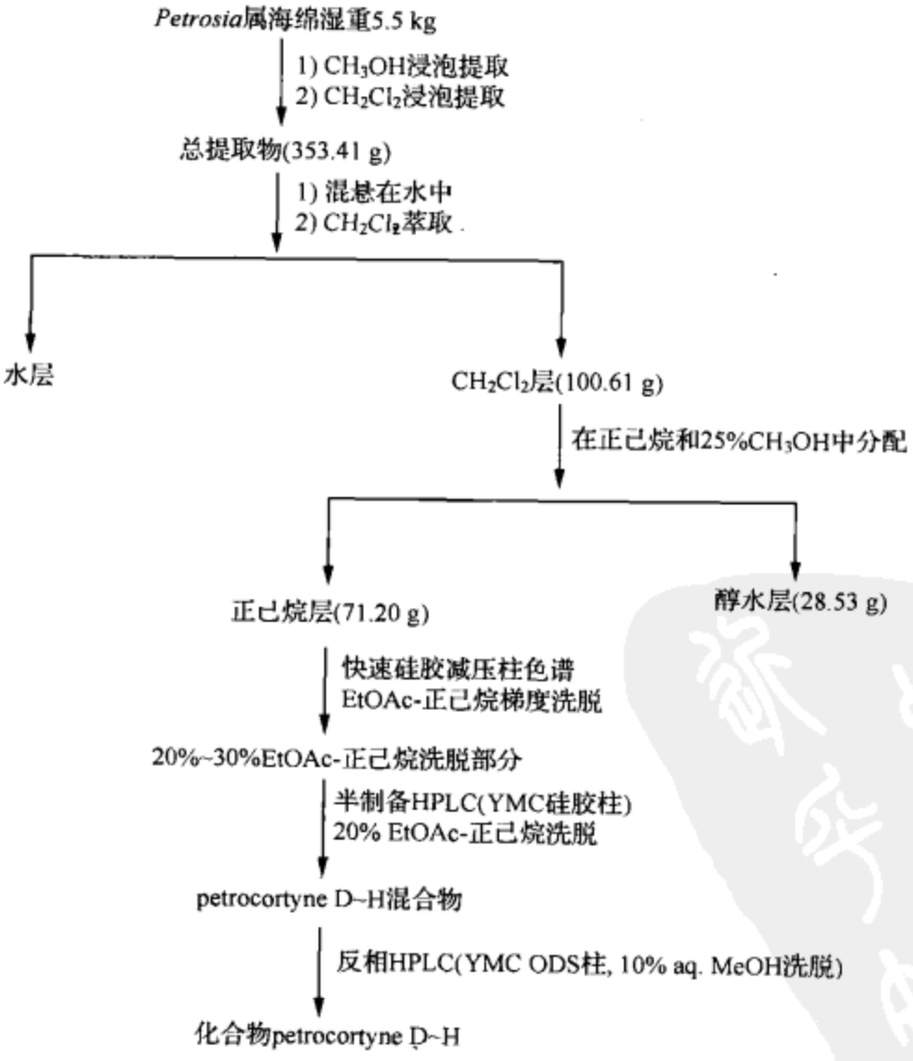


图 25.5　化合物 petrocortyne D～H 的提取分离流程图

1) TLC 初步识别

运用 TLC 对物种的甲醇提取物进行初步识别。溶剂系统为石油醚-丙酮(3∶1)，R_f 约 0.5，254 nm 下有微弱暗斑，茴香醛显鲜艳的紫红色斑点(实验结果证实这些斑点为 C14 溴代多烯类化合物)。将甲醇提取物除盐，总浸膏水分散后，用乙酸乙酯萃取。

2) ^{1}H NMR 进一步识别

结合文献，分析图 25.6 的^{1}H NMR 谱图，发现粗谱中低场区 δ_H 6.70，6.40，6.10 左右的三组峰分别对应于 C16 溴代多烯炔类化合物末端(14,16-二溴)上的 H-15，H-16 和 H-13 三个烯质子信号。除三个烯质子外，可以看到在 δ_H 4.5～6.5 有许多积分高度不等的烯氢信号，判断混合物里的溴代多烯(炔)类化合物除了末端的两个双键外，中间的碳链上也存在个数不等的烯双键，即化合物具有多不饱和的特点。δ_H 3.0～4.5 的信号提示结构中有氧取代。烯双键的位置和个数可能不同，取代基的种类和个数也有可能发生变化。由此，推测这一部位存在同系物。通过混合氢谱还观察到 δ_H 3.70 左右并没有观察到甲酯的甲基信号，因此后期分离得到的含有甲酯的化合物可能是实验过程中的人工产物。在^{1}H NMR 跟踪指导下，用正相减压柱，将这一分子群导向定位在石油醚-丙酮＝(5∶1)～(1∶1)部位，运用反相减压柱将其锁定在 MeOH-H_2O＝60%～90%部位，从而除去乙酸乙酯部位里面的脂肪族以及甾醇类化合物，得到所要化合物分子群。

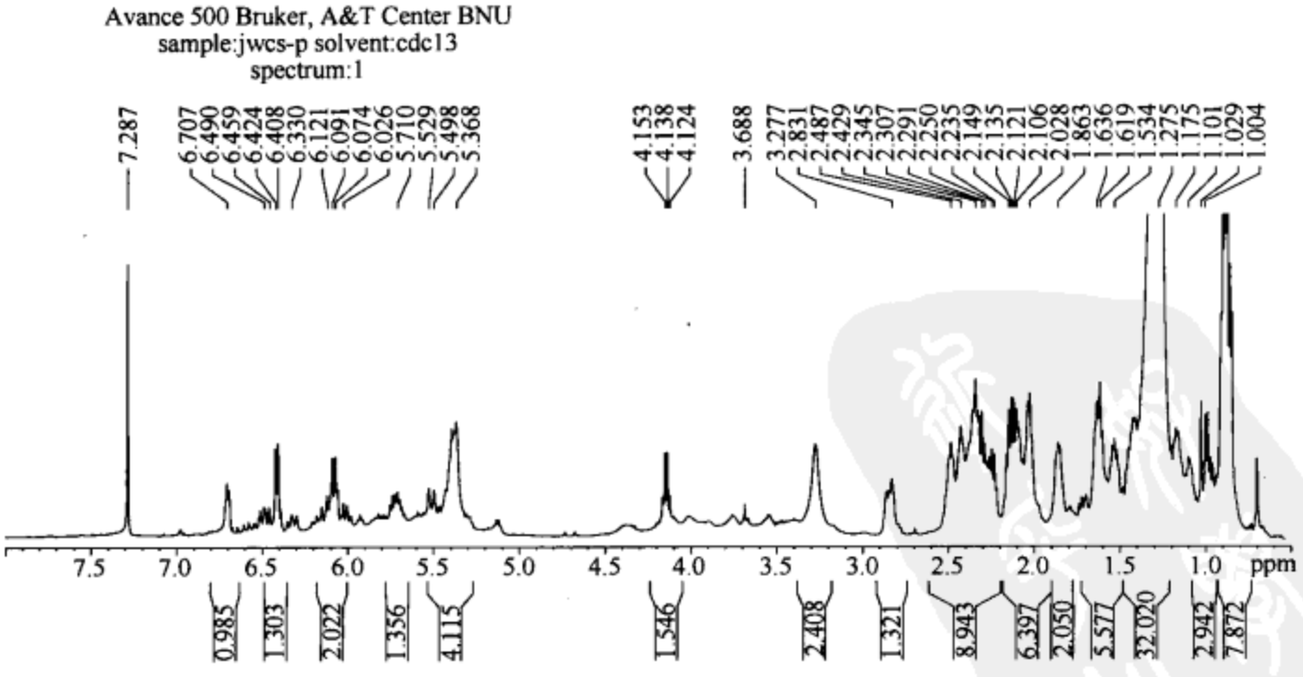


图 25.6 海绵 *Xestospongia testudinaria* 乙酸乙酯提取物的^{1}H NMR 谱

3）HPLC-MS 确证识别

对富集得到的分子群，应用 HPLC 及 HPLC-MS 检测。结果如图 25.7 和图 25.8所示。

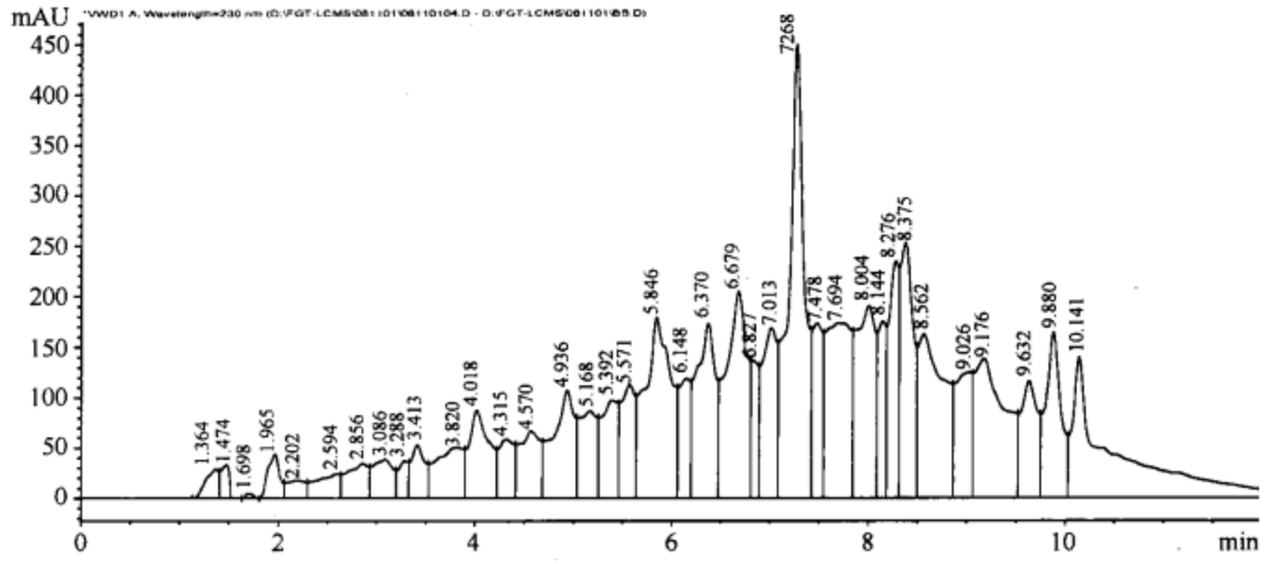


图 25.7　海绵 *Xestospongia testudinaria* 乙酸乙酯提取物的 HPLC 检测图

（RP-C18，0.46 cm×15 cm，CH_3CN-H_2O=50%～90%）

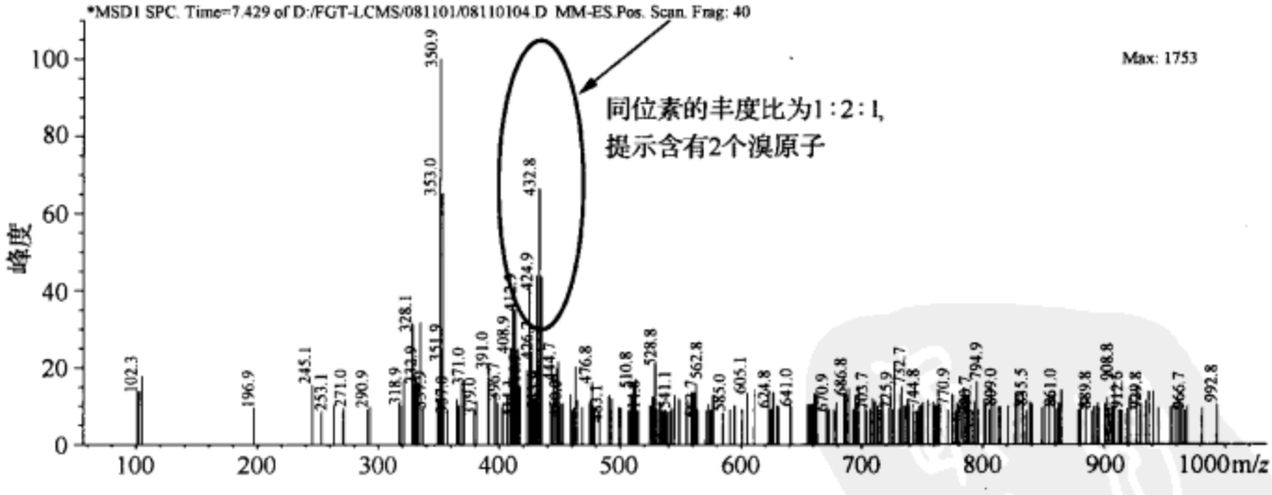


图 25.8　海绵 *Xestospongia testudinaria* 乙酸乙酯提取物的 HPLC-MS(7.429′)检测图

由混合体系的 ESI-MS 谱中同位素丰度比及分子离子峰，可初步判断化合物的结构类别和结构中溴原子取代个数。

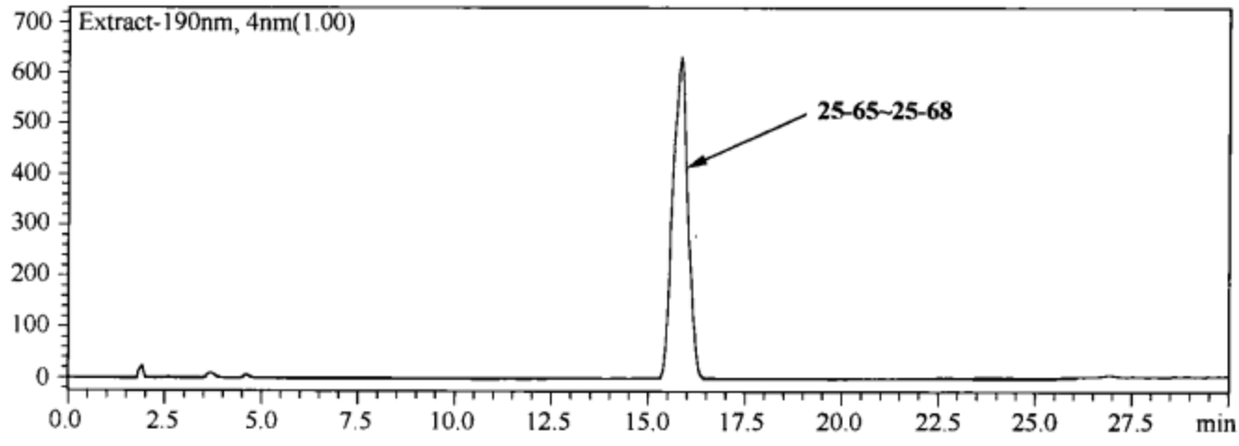
4）DAD-HPLC 细分识别

溴代多烯(炔)类的 DAD-HPLC 有四种不同的紫外吸收，对应不同类型的化合物。最大吸收峰在 200 nm 对应 C14 的溴代多烯类化合物(TLC 茴香醛显紫色)；最大吸收峰在 225 nm 对应 C16 的溴代多烯或炔类化合物(TLC 茴香醛显淡

黄色)；最大吸收峰在 237 nm 对应 C18 的溴代多烯炔类化合物(TLC 茴香醛显浅黄色)；最大吸收峰在 244 nm 对应 C16 但含多羟基、结构中有烯醇结构的溴代多烯类化合物(TLC 茴香醛显淡黄色)，并且随着紫外吸收的红移，化合物稳定性渐差。

快速分离：对于富集得到的多烯(炔)类化合物，用 ODS 柱快速切段后，充分运用 HPLC 进行分离和制备。

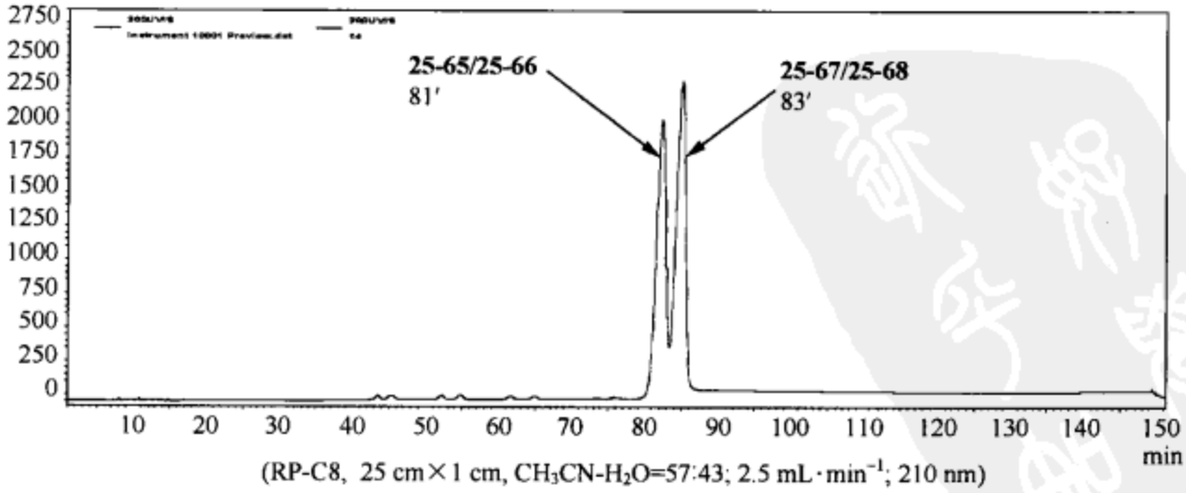
通常先用 RP-C18 柱(甲醇-水为流动相)分离同分异构体(图 25.9)。异构体的^{1}H NMR 高度重叠，但^{13}C NMR 谱中，化合物手性碳附近的^{13}C NMR 化学位移有差别，表明为差向异构体。



(RP-C18, 0.46 cm×15 cm, MeOH-H_2O=60%~90%; 1.0 mL min^{-1}; 30′)

图 25.9 化合物 **25-65** 和 **25-68** 的 HPLC 检测图

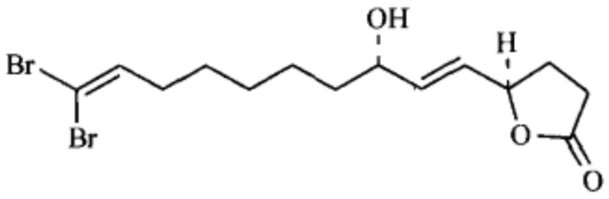
运用 RP-C8 柱(乙腈/水为流动相)，可将差向异构体分开(图 25.10)。



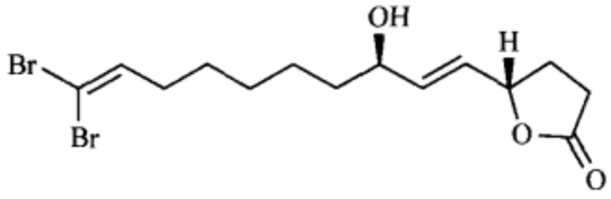
(RP-C8, 25 cm×1 cm, CH_3CN-H_2O=57:43; 2.5 mL·min^{-1}; 210 nm)

图 25.10 化合物 **25-65/25-66** 和 **25-67/25-68** 的 HPLC 检测图

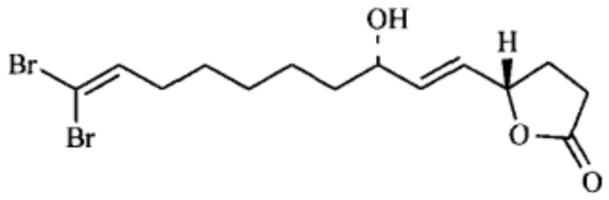
而后采用 AD-H 手性柱(异丙醇-正己烷为流动相)，可将对映异构体分开(图 25.11)。对于 AD-H 手性柱难以分离的对映异构体，可将化合物接上 MTPA 成酯后，再进一步用 RP-C8 柱分离。



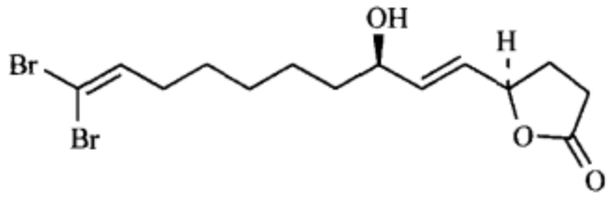
25-65



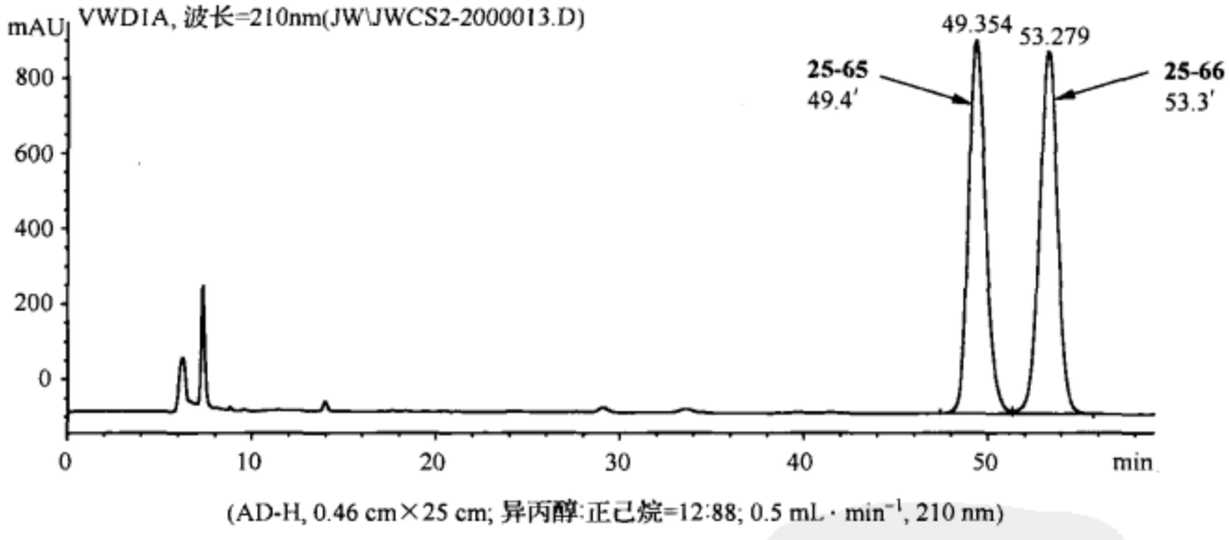
25-66



25-67



25-68



(AD-H, 0.46 cm×25 cm; 异丙醇:正己烷=12:88; 0.5 mL · min^{-1}, 210 nm)

图 25.11　化合物 **25-65** 和 **25-66** 的 HPLC 检测图

25.3　高极性化合物的提取分离

随着分离手段和色谱水平的提高，越来越多的海洋天然化合物从自然界中被发现。过去的几十年，科学家主要从事低极性海洋天然产物研究。其原因在于，一方面认为海洋天然产物只有在低极性才可以保存于生物体中，另一方面是水溶性分子的分离纯化仍然是一个极其困难的过程，困扰着很多科学家。近年来，高极性海洋天然产物不断被发现，如海参皂苷等，引起科学家对高极性海洋天然产物的兴趣。

由于水溶性成分在生物体中经常处在一个相对保护的状态，因此，要想充分地提取水溶性成分，需要先破坏生物体中的保护状态。保护条件包括细胞隔膜和很多水溶性成分被脂溶性成分所包裹。破坏这种保护状态有好几种方法，其一为用极性溶剂如甲醇或乙醇提取水溶性成分。另外，破坏隔膜的方法还有超声法、冻融法、冷冻干燥法、加热法和酶消化法等。这些方法经常在实验中结合使用。

在高极性化合物的提取分离中，存在问题之一是细菌对成分的影响和干扰。由于水溶性成分中经常会含有糖分，细菌比较容易生长。因此，在提取分离中，需要抑制细菌的增长，使用有机溶剂提取可以抑制细菌的生长，也可加入抑菌剂如叠氮化物等。另一个问题是生物体中酶的激活，如肽酶、葡萄糖苷酶、硫酸酯酶、氧化酶等。如果目标成分与这些酶相遇，有可能导致目标成分的降解。因此，在提取分离之前需先使酶失活，酶失活的方法主要有：加醇法，但有时候加醇并不能完全使酶失活；加热法，可能会破坏目标成分。鉴于上述的一些缺点，建议使用一种尽快除去大分子物质酶的方法：超滤法和凝胶过滤法。

从海洋生物体中提取水溶性成分，经常会伴随着盐的存在。因此，在分离纯化过程中，很重要的一点就是脱盐。脱盐的方法很多，但具体要根据所分离成分来选择脱盐的方法。例如，所要分离的水溶性成分具有一定的脂溶性，采用脱盐的方法是反相柱色谱法，如 C18 硅胶柱或者其他一些非离子树脂（XAD-2，XAD-4，XAD-7）。但是该方法并不适用于强极性和离子型化合物的分离，如氨基酸或者糖等。另一种脱盐的方法是分子排阻法，如 Sephadex G-10，Bio-gel P-2 等。高极性化合物提取分离的一般程序见图 25.12[41]。

在海洋生物中，高极性化合物一般采用甲醇或者乙醇提取，提取物再经正己烷、二氯甲烷、正丁醇分配后，高极性化合物一般存在于正丁醇部分和水部分中，而后再对其进行分离，采用非离子树脂或者凝胶色谱的方法，最后采用反相 HPLC 进行纯化。在对高极性化合物的分离中还使用了逆流色谱进行分离。

25.3.1 多羟基甾体类化合物

作者对采集于中国海南三亚附近海域的南海软珊瑚 *Sinularia dissecta* 进行了比较深入的化学成分和生物活性研究。利用硅胶柱色谱、HPLC 等现代色谱分离技术，从中共分离得到 18 个甾体类化合物。具体分离方法：软珊瑚样品采集后直接浸泡于 95%乙醇溶液中，切碎匀浆后过滤。滤液减压浓缩后得乙醇提取物。滤渣用工业甲醇动态提取 3 次，过滤，合并滤液，减压浓缩得甲醇提取物，再将乙醇提取物和甲醇提取物合并，用甲醇溶解脱盐 3 次，减压浓缩，得总浸膏。总浸膏在水和乙酸乙酯（1∶1，v/v）间分配 3 次，过滤，乙酸乙酯提取物合并后得有机层，水减压浓缩后得水层部位，残渣。有机层经硅胶柱色谱（200～300 目），氯仿-甲醇梯度洗脱，得 5 个组分。各组分经 Sephadex LH-20 柱和 ODS 常压柱，获得各化合物。

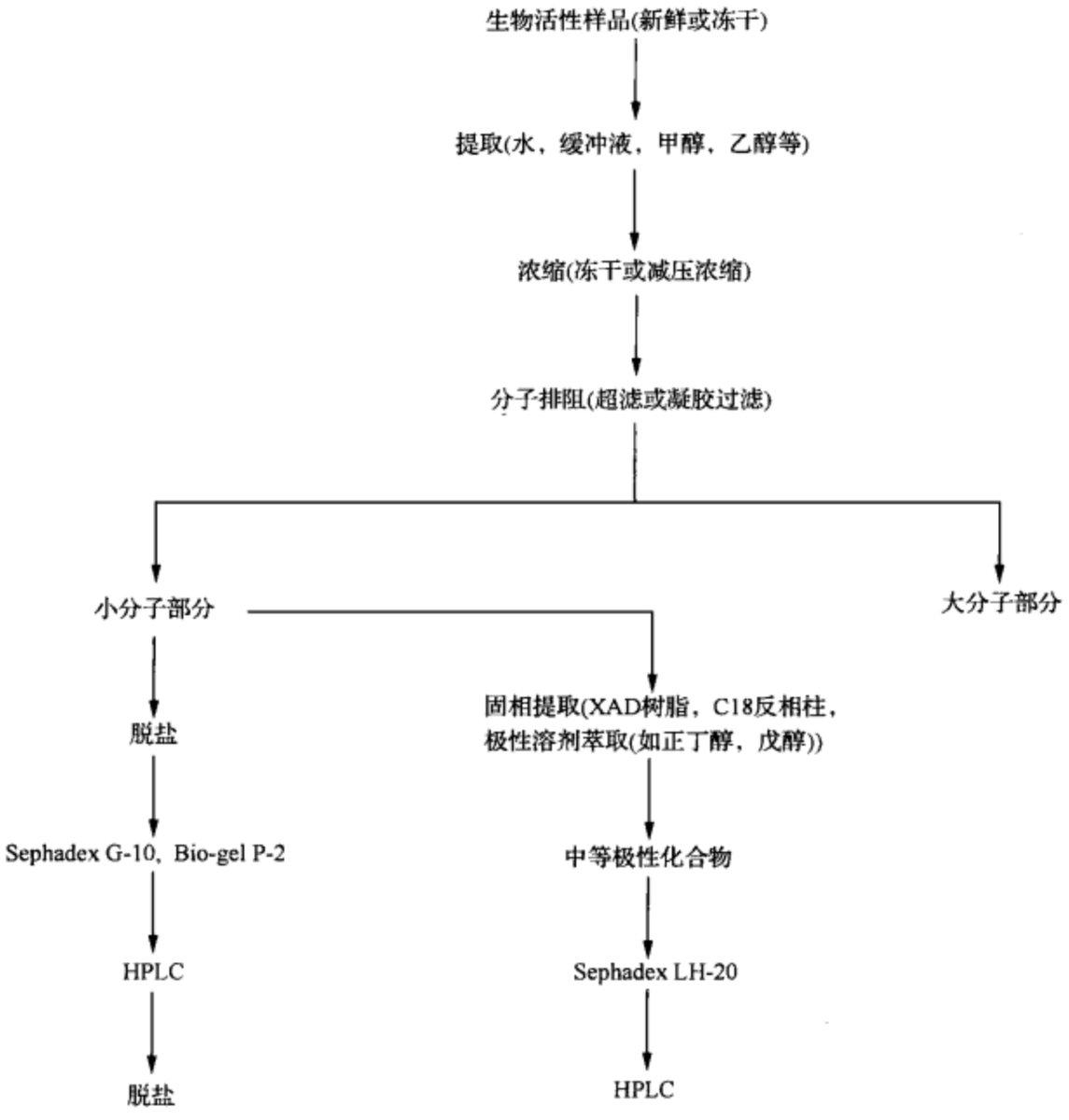
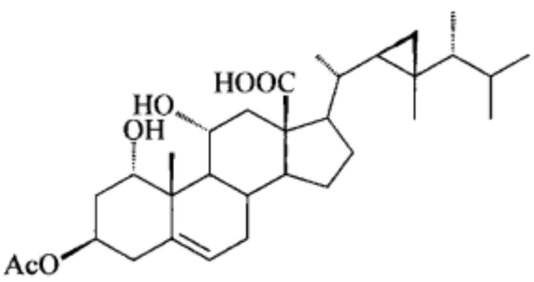


图 25.12　高极性化合物提取分离流程图

海绵 *Lamellodysidea herbacea* 中主要成分为多羟基甾体。制备方法：海绵样品在室温下用甲醇提取，甲醇提取物经分配得到正己烷、二氯化碳、甲醇和水部分。其中 CH_2Cl_2 可溶部分经硅胶柱色谱分离，CH_2Cl_2-MeOH 梯度洗脱，50% CH_2Cl_2-MeOH 部分再经反相硅胶柱，甲醇-水(60 ∶ 40)洗脱，得到 6 个部分，第四部分经硅胶柱色谱，二氯化碳-甲醇(95 ∶ 5)洗脱，最后经反相 HPLC 纯化，MeOH-H_2O(85 ∶ 15)洗脱(流速 0.8 mL · min^{-1})得到一系列的多羟基甾体[42]。

海星 *Asterias rathbuni* 中主要成分为甾体苷类化合物。制备方法：将冻干的海星样品切碎，用乙醇浸提 2 次，将合并的提取液减压浓缩，残留物溶于水，水溶液部分通过 Amberite XAD-2 树脂，用水洗脱，直到氯离子呈负反应后，用甲醇洗脱。合并的甲醇洗脱液经减压浓缩后得棕色物质。后者在 Sephadex LH-20 柱上层

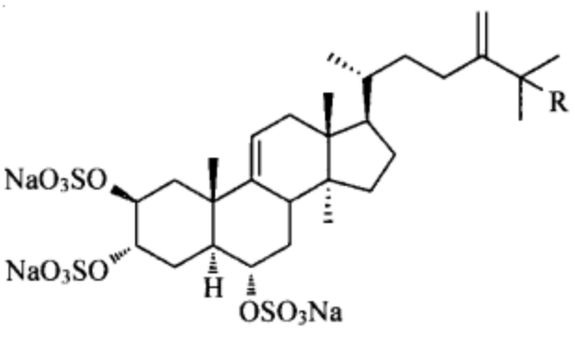


多羟基甾体

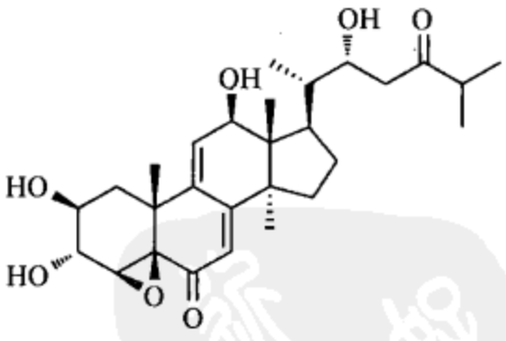
析，用 MeOH-H_2O(2∶1)溶剂洗脱。将 2 份含多羟基甾醇的流分合并浓缩后经硅胶柱色谱分离，$CHCl_3$-EtOH[(8∶1)～(1∶2)]梯度洗脱，每一流分过 Florisil 柱色谱，$CHCl_3$-EtOH[(8∶1)～(2∶1)]梯度洗脱。最后通过反相 HPLC 法，MeOH-H_2O (70∶30)洗脱得到化合物[43]。

25.3.2 硫酸酯甾体类化合物

海绵 *Xestospongia* sp. 中存在硫酸酯甾体和多羟基甾体。制备方法：海绵样品在室温下用 MeOH 提取，获得白色沉淀，白色沉淀进一步通过 ToSoHaas TSK HW-40 凝胶，用 MeOH-H_2O(1∶1)分配，得到 ibisterol sulfate B(**25-69**)和 ibisterol sulfate C(**25-70**)。醇提取液进一步用乙酸乙酯和水进行分配，有机相进一步采用反相 HPLC(C18 Dynamax 60 Å 柱)，50%MeOH～100% MeOH 梯度洗脱，得到化合物 **25-71**[44]。



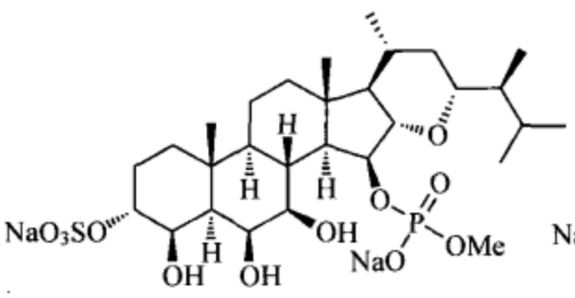
25-69 R=H
25-70 R=Me



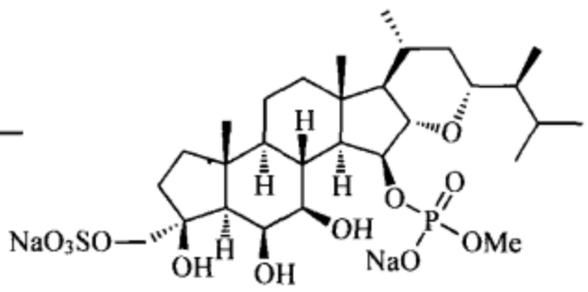
25-71

以抑制 MT1-MMP 活性为导向进行分离，从海绵 *Cribrochalina* sp. 中分离得到 2 个多羟基磷酸酯甾体，均具有抑制 MT1-MMP 活性。制备方法：冻干样品经 50%甲醇、甲醇、氯仿-甲醇(1∶1)、乙酸乙酯分别提取，总提取物按照 Kupchan 方法分配，具有活性的氯仿部分和 60%甲醇部分合并经 ODS 快速柱色谱分离，甲醇-水、乙腈-水、丙二醇-水梯度洗脱，80%～100%甲醇部分再经 Sephadex LH-20 凝胶柱(60%甲醇)得到 3 个流分，第一个流分经反相 ODS HPLC(COSMOSIL 5C18 AR-II)纯化，15%～60%甲醇(加 250 mmol · L^{-1} 高氯酸钠)梯度洗脱，得到化合

物 **25-72** 和 **25-73**[45]。



25-72



25-73

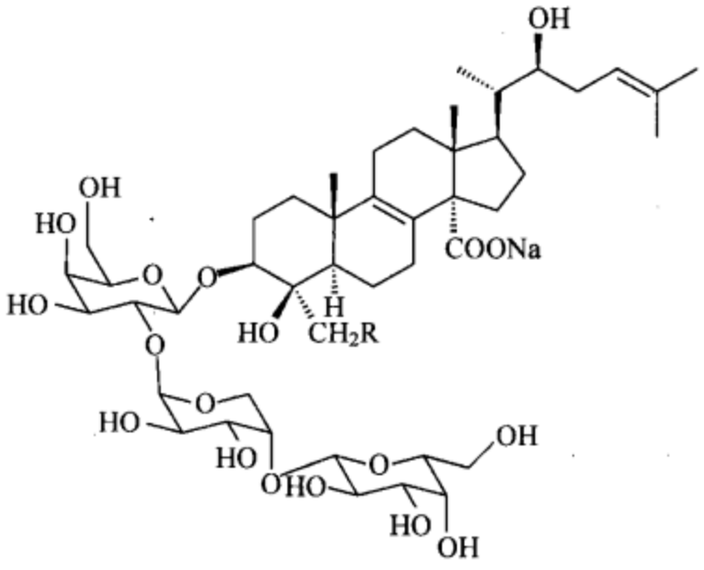
25.3.3　甾体糖苷类化合物

海绵 *Pandaros acanthifolium* 中含大量甾体糖苷类化合物。制备方法：将冻干的海绵样品在室温下用 MeOH-CH_2Cl_2(1 ∶ 1)提取，减压浓缩后得到粗提物。粗提物经过反相快速 ODS 柱，MeOH-H_2O[(0 ∶ 1)～(1 ∶ 0)]梯度洗脱，然后 MeOH-CH_2Cl_2[(1 ∶ 0)～(0 ∶ 1)]梯度洗脱。其中 MeOH-H_2O(3 ∶ 1)部分进一步经过反相 ODS 柱，MeOH-H_2O [(5 ∶ 95)～(100 ∶ 0)]梯度洗脱，MeOH-H_2O(3 ∶ 1)部分进一步经过反相半制备 HPLC(Phenomenex, Luna C18)制备，MeOH-TFA-H_2O 洗脱，得到的亚部分再进一步经过分析型 HPLC 制备(CH_3CN-H_2O-甲酸)得到甾体糖苷类化合物[46-48]。

25.3.4　三萜皂苷类化合物

科学家首次从海绵 *Asteropus* sp. 中发现三萜皂苷。制备方法：冻干海绵样品经乙醇在室温浸泡提取后，得到乙醇提取物，乙醇提取物在氯仿和 30%甲醇分配萃取，有机层部分进一步经 Sephadex LH-20 柱(甲醇-氯仿 1 ∶ 1)后，得到 5 个流分。第二流分用氯仿清洗，不溶部分经反相 HPLC，甲醇-水(75 ∶ 25)洗脱得 sarasinoside A_1[49,50]。

从海绵 *Ectyoplasia ferox*. 中分离得到 2 个三萜皂苷 ectyoplaside A 和 ectyoplaside B，它们具有弱细胞毒作用。制备方法：海绵样品在室温下经甲醇浸泡测定提取，提取物在正己烷和 90%甲醇中分配得正己烷非极性部分；90%醇水层等分为 2 部分，第一部分调整到含醇量为 20%，用四氯化碳分配萃取，第二部分调整到含醇量为 40%，用氯仿分配萃取，分别得到中等极性的四氯化碳部分和氯仿部分；醇水层挥至无醇味后用正丁醇分配萃取，得到极性部分。正丁醇部分经 MPLC(硅胶 230～400 目)，乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱，甲醇-乙酸乙酯(7 ∶ 3)部分经反相 HPLC[甲醇-水(8 ∶ 2)，0.7 mL · min^{-1}]进一步纯化得 ectyoplaside A (**25-74**)和 ectyoplaside B (**25-75**)[51]。



25-74 ectyoplaside A, R=H
25-75 ectyoplaside B, R=OH

25.4 结　　语

海洋天然产物的制备是海洋药物研究的重要环节。与陆地生物天然产物相比，海洋生物的代谢产物仍然存在众多的未知。国际上对海洋天然产物的研究已经从常量成分向微量成分研究探讨，包括微克级成分的制备和结构确定。随着色谱技术、波谱技术和活性筛选技术的发展，海洋天然产物研究方法越来越依赖于不同技术的联机方法。我国海洋天然产物起步较晚，我国对海洋生物研究的物种不到我国海域物种的 5%。因此，提高色谱制备水平，建立快速分析和制备技术，扩大化合物的结构多样性，成为海洋药物研究的技术瓶颈。

参 考 文 献

[1] Ebada S S, Edrada R A, Lin W H et al. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. Nature Protocol, 2008, 3:1～13.

[2] Houssen W E, Jaspers M. Isolation of marine natural products // Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Natural Products Isolation (Methods in Biotechnology 20). 2nd Edition. Totowa: Humana Press, 2005: 353～390.

[3] 霍斯泰特曼 K，马斯顿 A，霍斯泰特曼 M. 制备色谱技术——在天然产物分离中的应用. 赵维民，张天佑译. 北京：科学出版社：2000.

[4] Riguera R. Isolating bioactive compounds from marine organisms. J Mar Biotechnol, 1997: 187～193.

[5] Shimizu Y. Bioactive marine natural products, with emphasisi on handling of water-soluble compounds. J Nat Prod, 1985, 48:223～235.

[6] 王建农，顾士萍，谭仁祥等. 基于植物代谢组学混合物氢谱测定概念快速发现先导化合物的方法学研究. 中草药，2007，38:812～814.

[7] Cichewicz R H, Clifford L J, Holman T R et al. Stereochemical determination and bioactivity assessment of (S)-(+)-curcuphenol dimers isolated from the marine sponge *Didiscus aceratus* and synthesized through laccase biocatalysis. Bioorg Med Chem, 2005, 13:5600～5612.

[8] Sarker S D, Nahar L. Hyphenated techniques. Methods in Biotechnology (2005), 20 (Natural Products Isolation (2nd Edition)):233～267.

[9] Chao C, Hsieh C, Chen S. Sinularianins A and B, novel sesquiterpenoids from the Formosan soft coral *Sinularia* sp. Tetrahedron Lett, 2006, 47:5889～5891.

[10] Huang H, Wen Z, Chao C. Novel sesquiterpenoids from the Formosan soft coral *Paralemnalia thyrsoides*. Tetrahedron Lett, 2006, 47:8751～8755.

[11] Freyer A J, Patil A D, Killmer L. Rigidone, a sesquiterpene quinone from the gorgonian *Pseudopterogorgia rigida*. J Nat Prod, 1997, 60:309～311.

[12] Mitchell S S, Harper M K, Faulkner D J. Spongiabutenolides A-D: Minor γ-hydroxybutenolide diterpenoids from a Philippines *Spongia* sp. Tetrahedron, 1999, 55:10887～10892.

[13] Miyamoto T, Sakamoto K, Arao K. Dorisenones, cytotoxic spongian diterpenoids, from the *Nudibranch Chromodoris obsoleta*. Tetrahedron, 1996, 52:8187～8198.

[14] Zhang Q S, Zhang S, Qian P. Ten new antifouling briarane diterpenoids from the South China Sea gorgonian *Junceella juncea*. Tetrahedron, 2006, 62:9123～9130.

[15] Rodriguez A D, Li Y, Dhasmana H. New marine cembrane diterpenoids isolated from the Caribbean gorgonian *Eunicea mammosa*. J Nat Prod, 1993, 56:1101～1113.

[16] Marville K L, McLean S, Reynolds W F. New cembrane diterpenes of the marine octocoral *Eunicea tourniforti* from the Eastern Caribbean. J Nat Prod, 2003, 66:1284～1287.

[17] Qiu Y, Deng Z W, Pei Y H et al. Sesterterpenoids from the marine sponge *Hyrtios erectus*. J Nat Prod, 2004, 67:921～924.

[18] Liu Y, Bae B H, Alam N. New cytotoxic sesterterpenes from the sponge *Sarcotragus* species. J Nat Prod, 2001, 64:1301～1304.

[19] Paloma L G, Randazzo A, Minale L. New cytotoxic sesterterpenes from the new caledonian marine sponge *Petrosaspongia nigra* (Bergquist). Tetrahedron, 1997, 53:10451～10458.

[20] Nam S, Ko H, Ju M K. Scalarane sesterterpenes from a marine sponge of the genus *Spongia* and their FXR antagonistic activity. J Nat Prod, 2007, 70:1691～1695.

[21] Tang S G, Pei Y H, Fu H Z et al. Jaspolides A-F, six new isomalabricane-type terpenoids from the sponge *Jaspis* sp. Chem Pharm Bull, 2006, 54(1):4～8.

[22] Tang S G, Deng Z W, Proksch P et al. Jaspolides G and H, unique bisisomalabaricanes from the Chinese marine sponge *Jaspis* sp.. Tetrahedron Letters, 2007, 48:5443～5447.

[23] Lv F, Xu M J, Deng Z W et al. Rhabdastrellins A-F, Isomalabaricane Triterpenes from the Marine Sponge *Rhabdastrella* aff. *distincta*, J Nat Prod, 2008, 71:1738～1741.

[24] Lv F, Deng Z, Li J et al. Isomalabaricane-type compounds from the marine sponge *Rhabdastrella* aff. *distincta*. J Nat Prod, 2004, 67:2033～2036.

[25] Zhang Y, Lu Y, Mao L et al. Tagalsins I and J, two novel tetraterpenoids from the mangrove plant, *Ceriops tagal*. Org Lett, 2005, 7:3037～3040.

[26] Leone P, Bowden B, Carrou N A. Studies of Australian soft corals, XLIX. A new biscembranoid and its probable biosynthetic precursors from the soft coral *Sarcophyton tortuosum*. J Nat Prod, 1993, 56:

521～526.

[27] Iwashima M, Nara K, Iguchi K. New marine steroids, yonarasterols, isolated from the Okinawan soft coral, *Clavularia viridis*. Steroids, 2000, 65:130～137.

[28] Iwashima M, Nara K, Nakamichi Y. Three new chlorinated marine steroids, yonarasterols G, H and I, isolated from the Okinawan soft coral, *Clavularia viridis*. Steroids, 2001, 66:25～32.

[29] Carney J R, Yoshida W Y, Scheuer P J. Kiheieteronee, new cytotoxic steroids from a Maui sponge. J Org Chem, 1992, 57:6637～6640.

[30] Seo Y, Cho K W, Chung H. New secosteroids from a gorgonian of the genus *Muricella*. J Nat Prod, 1998, 61:1441～1443.

[31] Souto M L, Manriquez C P, Norte M. Novel marine polyethers. Tetrahedron, 2002, 58:8119～8125.

[32] Ciavatta M L, Wahidulla S, D'Souza L. New bromotriterpene polyethers from the Indian alga *Chondria armata*. Tetrahedron, 2001, 57:617～623.

[33] Biard J, Roussakis C, Kornprobst J. Bistramides A, B, C, D, and K: a new class of bioactive cyclic polyethers from *Lzaaoclznum bzstratum*. J Nat Prod, 1994, 57:1336～1345.

[34] Sorek H, Rudi A, Gueta S. Netamines A-G seven new tricyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Biemna laboutei*. Tetrahedron, 2006, 62:8838～8843.

[35] Aoki S, Watanabe Y, Sanagawa M. Cortistatins A, B, C, and D, anti-angiogenic steroidal alkaloids, from the marine sponge *Corticium simplex*. J Am Chem Soc, 2006, 128:3148～3149.

[36] Watanabe Y, Aoki S, Tanabe D. Cortistatins E, F, G, and H, four novel steroidal alkaloids from marine sponge *Corticium simplex*. Tetrahedron, 2007, 63:4074～4079.

[37] Aoki S, Watanabe Y, Tanabe D. Cortistatins J, K, L, novel abeo-9(10-19)-androstane-type steroidal alkaloids with isoquinoline unit, from marine sponge *Corticium simplex*. Tetrahedron Lett, 2007, 48: 4485～4488.

[38] Linington R G, Clak B R, Trimble E E. Antimalarial peptides from marine cyanobacteria: isolation and structural elucidation of gallinamide A. J Nat Prod, 2009, 72:14～17.

[39] Rudi A, Chill L, Aknin M. Didmolamide A and B, two new cyclic hexapeptides from the marine ascidian *Didemnum molle*. J Nat Prod, 2003, 66:575～577.

[40] Shin J, Seo Y, Cho K W. Five new polyacetylenes from a sponge of the genus *Petrosia*. J Nat Prod, 1998, 61:1268～1273.

[41] Shimizu Y. Bioactive marine natural products, with emphasis on handling of water-soluble compounds. J Nat Prod, 1985, 48:223～235.

[42] Sauleau P, Kondracki M L B. Novel polyhydroxysterols from the Red Sea marine sponge *Lamellodysidea herbacea*. Steroids, 2005, 70:954～959.

[43] Anjaneyulu A S R, Murthy M V R K, Gowri P M. New steroid glycosides from the starfish *Asterias rathbuni*. J Nat Prod, 2000, 63:1425～1426.

[44] Melissa L, Lerch D, Faulkner J. Unusual polyoxygenated sterols from a Philippines sponge *Xestospongia* sp. Tetrahedron, 57:4091～4094.

[45] Fujita M, Nakao Y, Matsunaga S. Isolation and structure elucidation of two phosphorylated sterol sulfates, MT1-MMP inhibitors from a marine sponge *Cribrochalina* sp. revision of the structures of haplosamates A and B. Tetrahedron, 2001, 57:3885～3890.

[46] Cachet N, Regalado E L, Genta-Jouve G. Steroidal glycosides from the marine sponge *Pandaros acan-*

thifolium. Steroids, 2009, 74:746～750.

[47] Cobar O M, Rodriguez A D, Padilla O L. A new steroidal glycoside from a Caribbean gorgonian, *Eunicea* sp.. J Nat Prod, 1997, 60:1186～1188.

[48] Kalinovsky A I, Antonov A S, Afiyatullov S S. Mycaloside A, a new steroid oligoglycoside with an unprecedented structure from the Caribbean sponge *Mycale laxissima*. Tetrahedron Lett, 2002, 43:523～525.

[49] Schmitz F J, Ksebati M B, Gunasekera S P. Sarasinoside A: a saponin containing amino sugars isolated from a sponge. J Org Chem, 1988, 53:5941～5947.

[50] Ulososide B. A new unusual norlanostane triterpene glycoside and its genuine aglycone from the Madagascar sponge *Ulosa* sp.. Tetrahedron Lett, 1998, 39:3807～3808.

[51] Cafieri F, Fattorusso E, Taglialatela-Scafati O. Ectyoplasides A-B unique triterpene oligoglycosides from the Caribbean sponge *Ectyoplasia ferox*. Eur J Org Chem, 1999, 1: 231～238.

[52] Lee H, Seo Y, Cho K W. New triterpenoid saponins from the sponge *Melophlus isis*. J Nat Prod, 2000, 63:915～919.

（林文翰）

第 26 章　其他生物活性成分

26.1　含氰化合物

氰苷类(cyanogenetic glycoside)是天然苷类中的一种，其分子中含有氰基，并根据糖基与氰基的位置分为 α-氰苷和 γ-氰苷。前者如苦杏仁苷(amygdalin，lactrile)、叶下珠苷等，在自然界发现的大多属于这一类，后者如垂盆草苷(sarmentosin)。氰苷常形成含水化合物，故不易结晶。大多数化合物在水中的溶解度比较大，在乙醇中溶解度较小，但往往可溶于沸乙醇及乙酸乙酯等溶剂中，在乙醚、苯、二硫化碳、四氯化碳等溶剂中几乎不溶。若制备成相应的乙酰化物，则可溶于非极性溶剂中。氰苷通常容易水解，甚至在水溶液中亦可逐渐分解，当有酸和酶存在时，可加速水解反应的进行。碱性状态下稳定性较差。

26.1.1　氰苷类的鉴别

检查植物中是否含有氰苷，主要基于在酶的存在下，测得氰苷分解所释放的氢氰酸而实现。此属非特异性检出，仅限于酶解能释放氢氰酸的 α-氰苷类。

鉴别方法为将欲试植物捣碎，置于试管中，加一滴氯仿，另取苦味酸-碳酸钠试剂或联苯胺-乙酸铜试剂湿润后的滤纸条，悬置于试管口，用塞子密闭。35 ℃恒温酶解，前者滤纸呈橙红-红褐色，后者呈蓝色表明正性反应。若有硫化氢、二氧化硫、醛、酮等挥发性成分存在时，会对苦味酸试剂有干扰。也有采用硝基苯甲醛-二硝基苯试剂的，若有 CN^-，则呈紫色。如果欲试植物样品经处理后所产生的氢氰酸量极微，则取样量相应要多，并用水蒸气蒸馏等方法将所产生的氢氰酸收集于合适的试剂中，再进行检出。此外，也可用气相色谱法检出。至于分离后提纯的样品，则可选择一些非特异性的试剂，如碱性高锰酸钾溶液、50%硫酸液、萘并间苯二酚硫酸液来检查纯度及柱色谱流分。

26.1.2　氰苷类的提取与分离、纯化

氰苷类的提取分离通常是先将植物干燥粉碎，先用非极性溶剂提取除去类脂质后，再用乙醇、甲醇、水或其他混合溶剂提取。若材料为新鲜植物，为了避免所含酶引起成分的变化，先用干冰或液氮处理固化，粉碎。不过一般不用此法，而采用80%乙醇或加水煮沸数分钟，破坏其中酶活性，然后继续采用回流、温浸或冷渗等

方法提取。若是醇提取液则浓缩去醇，残渣加水用石油醚或氯仿提取除去脂溶性成分，再用柱色谱进行分离纯化，其填料一般用硅胶、硅藻土、硅酸镁、活性炭、纤维素或彼此合并使用。若遇易结晶的氰苷，当原料用乙醇回流提取，提取液浓缩放冷，即可析出。故操作时应注意每一步，不是非用色谱不可。

1）活性炭色谱

活性炭的种类很多，常采用色谱用颗粒状活性炭，洗脱溶剂依次为水、含水乙醇、无水乙醇或乙醇加其他非极性溶剂混合使用。

2）凝胶色谱

用葡聚糖凝胶 LH-20 柱色谱，以不同配比的乙醇-水混合液洗脱，分段收集。

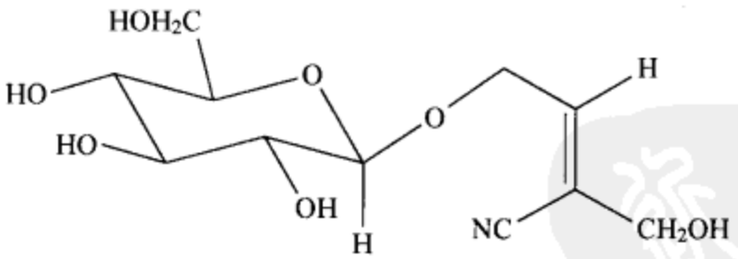
3）硅胶柱色谱

常用来分离纯化氰苷类化合物。由于它对极性化合物具有较大的亲和力，所以能达到较好的分离效果。最常用的展开剂是氯仿-甲醇，其配比(5∶1，8∶3 或 4∶3，v/v)视化合物的极性强弱而定。

26.1.3　垂盆草中的有效成分——垂盆草苷

26.1.3.1　垂盆草苷的特性

垂盆草苷(sarmentosin)为一种 γ-氰苷化合物(**26-1**)，是从景天科多年生草本植物垂盆草(*Sedum sarmentosum* Bunge)中分离得到的具降低血清谷丙转氨酶的有效成分，其临床有效剂量为每日 100 mg。形状为无色透明胶状物，分子式 $C_{11}H_{17}NO_7$。垂盆草苷味苦，比旋光度$[\alpha]_D^{25}$ −17.4(c 0.6，H_2O)，100 ℃以上受热分解；极易溶于水，用各种有机溶剂不能结晶。



26-1

垂盆草苷对 α-萘酚试剂呈阳性反应，不能还原费林溶液，用酸水解后则具有还原性；用苦杏仁酶水解，可得 β-D-葡萄糖。垂盆草苷五乙酰衍生物为针状晶体，熔点 79～80 ℃，比旋光度$[\alpha]_D^{25}$ 0(c 1，氯仿)。五乙酰垂盆草苷在甲醇中用甲醇钡 $Ba(OCH_3)_2$ 室温放置片刻，即可脱乙酰基恢复到垂盆草苷。

垂盆草苷遇碱不稳定，在稀苛性碱液中室温下放置，即能定量地转变成异垂盆草苷(isosarmentosin)，并失去其原有的生理活性。

26.1.3.2 分离方法

方等[1]对垂盆草的新鲜全草进行提取分离。60 ℃干燥后磨成粗粉，称取10 kg，用95 %乙醇热回流提取3次，每次2 h。醇提取液合并，减压浓缩除去乙醇，残渣加水磨溶，过滤，滤液用氯仿提取3次，水层减压浓缩至500 mL左右，以3.5 mL·min^{-1}的流速通过色谱用颗粒状活性炭柱(6.8 cm×105 cm)，然后先用约5 L蒸馏水洗涤，继用70%乙醇洗涤，收集醇洗脱液21 L，减压浓缩，得86 g糖浆状残渣。取43 g残渣，用甲醇溶解，加约80 g硅胶拌和，低温干燥后加入硅胶柱(450 g，5 cm×57 cm)中，先用4 L水饱和过的乙酸乙酯洗涤，再用乙酸乙酯-甲醇(8∶1，v/v)洗涤，分部收集；经过硅胶薄层色谱，以乙酸乙酯-丙酮(3∶2，v/v)为洗脱液，分部收集，合并垂盆草苷的流分，浓缩后得6.5g糖浆状残渣，此残渣再经硅胶柱色谱纯化，用氯仿-甲醇(5∶1)洗脱。合并纯垂盆草苷流分，减压浓缩，得4.7 g透明无色胶状物，得率约0.1%。硅胶薄层色谱检查呈一斑点。

Nishida等[2]还从喜鹊蛾 *Abraxas grossulariata* L. 的虫体中分离得到了垂盆草苷，具体方法是取8只成年蛾的乙醇提取液真空浓缩，然后以溶剂萃取，分成己烷层和水层，水层(14 mg)分3部分先后在短的反相C18预制柱上以2 mL水、4 mL 20%甲醇及4 mL 60%甲醇洗脱，结果在20%甲醇洗脱部得到苦味成分5.1 mg，继而以HPLC(YMC-Pack ODS-AM-312 S-5，150 mm×6 mm)4%甲醇1.5 mL·min^{-1}进行洗脱，在215 nm下检测，在6.1 min时得到纯的垂盆草苷4.6 mg。

侯等[3]从高山红景天[*Rhodiola sinoalpina*(Frod.)S. H. Fu]的干燥根及根茎中分离得到垂盆草苷，其方法是对1 kg粉碎的干燥根及根茎，以95%乙醇回流提取3次，提取液减压浓缩，依次以石油醚、乙酸乙酯及正丁醇萃取。正丁醇萃取部(60 g)进行硅胶柱色谱，以石油醚-乙酸乙酯、乙酸乙酯-甲醇系统梯度洗脱，得10个流分，其中的第9流分依次用Sephadex LH-20柱(甲醇)、ODS柱(甲醇-水梯度洗脱)、半制备HPLC(ODS柱，甲醇-水)分离纯化，得到垂盆草苷(10 mg)。

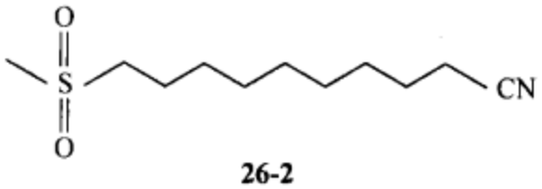
26.1.4 蔊菜中的有效成分——蔊菜素

26.1.4.1 蔊菜素的特性

蔊菜为十字花科一年生草本植物，学名 *Rorippa indica*(Linn)Bailay 或 *Rorippa montana*(Wall.)Small，具祛痰止咳、降压利尿、凉血止血的功效，民间用于治疗慢性支气管炎、头昏脑涨、高血压病、小便热涩不利、尿血、崩中带下。蔊菜不仅仅有药用价值，还可作为蔬菜食用。在湖北，蔊菜分为红蔊菜和刺蔊菜，为常见物种，红蔊菜可作蔬菜食用。花期4～5月，生于路旁、田野，产于华东地区。在上海

地区俗称江剪刀草。

从蕺菜中分离得到一个白色长柱状结晶，熔点 45～46 ℃，分子式 $C_{11}H_{21}NO_2S$，命名为蕺菜素（rorifone，**26-2**），此结晶遇碘化铋钾试剂呈现橙红色，易溶于氯仿、苯等有机溶剂中，但难溶于冷水，不溶于酸水或碱水，故为中性化合物。



26-2

已有科学家对此化合物进行了结构改造，用羧基取代氰基后，疗效不变，但毒性大减。

蕺菜素经临床使用发现其祛疾作用较强，镇咳作用次之，平喘作用微弱，尤其对痰热咳嗽，慢性支气管哮喘有一定效果，可使痰量减少，咳喘减轻。蕺菜素对肺炎球菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌及大肠杆菌均有抑制作用。

26.1.4.2　分离方法

唐等[4]将蕺菜的水煎液，经过减压浓缩，用 95%乙醇进行沉降，蒸去上层澄清液中的乙醇，可得蕺菜素粗品。再用 4%NaOH 处理，乙醇精制及硅胶色谱分离，即得纯品。

取蕺菜全草（干）321 kg，加水浸没，分 2 次加热煮沸，时间分别为 1.5 h，1 h。滤取水煎液，合并滤液，减压浓缩至草药量的 1/3，在不断搅拌下加入 95%乙醇，使最后含醇量达 75%，吸出乙醇的澄清液，不溶物用 90%乙醇洗涤 2 次，合并乙醇液，减压浓缩至 30 L 左右，再加水 20 L，减压浓缩至 30 L，低温放置（10 ℃以下）。待固体析出完全，吸滤，滤液另保存。固体用 6 L 4%NaOH 液搅拌均匀，10 ℃放置 2 h，吸滤；固体物若色深，再用 6 L 4%NaOH 同法处理。吸滤所得固体，用水反复洗涤至中性，吸干，即为蕺菜素粗品。将蕺菜素粗品溶于氯仿中，分去水层，合并氯仿液，过滤，蒸去氯仿，得固体物 685 g，得率为 0.21%。

将上述固体 685 g 用 2～3 倍的 95%～99.5%乙醇溶解，趁热过滤，放冷，析出结晶，过滤得黄白色柱晶 392 g（得率 0.21%）。

称取硅胶 789 g，湿法装柱，将上述 392g 结晶加适量乙酸乙酯溶解，加样于柱顶，用乙酸乙酯洗脱，收集对碘化铋钾试剂呈橙色的洗脱液部分，合并洗脱液，减压浓缩乙酸乙酯至少量，加乙醚至浑浊，立即析出结晶，吸滤，乙醚洗涤，干燥器中干燥，得蕺菜素 353 g（得率约 0.11%）。

26.2 天然色素

26.2.1 天然色素的特性及分离

天然色素在植物体中大量分布，并广泛参与植物体的生理活动。植物的根、叶、茎、花、果实、种子中均发现有色素存在。从细胞水平看，色素主要存在于质体、液泡等细胞器及细胞壁内，分别称质体色素、胞液色素和膜色素。例如，叶绿体中的叶绿素(chlorophyll)、液泡细胞液中的花青素(anthocyanin)是形成植物界万紫千红缤纷色彩的关键要素。研究发现，植物色素往往与蛋白质、糖类等物质产生较稳定的结合。一直以来，细胞学、植物学等学科对质体进行划分的主要依据都是色素的类型，即叶绿体含有叶绿素、叶黄素(carotenol)；有色体含有胡萝卜素、番茄红素(lycopene)、玉米黄质(zeaxanthin)等。此外天然色素是代谢过程中仅次于萜类的第二大类植物次生物质，其中部分化合物兼有抗菌、防腐等功能。

26.2.2 鉴别

其鉴别一般是采用纸色谱方法，根据各种色素组合在色谱纸上分配系数的不同，选择理想的展开剂使各组分以不同速度移动而达到分离，根据颜色鉴别。

26.2.3 提取与分离

天然色素的提取技术主要是直接破碎原料、溶剂浸提、物理技术辅助浸提及现代仪器提取分离等。

1) 直接破碎原料

某些植物色素富含于果实、种子等外皮或外壳中，粉碎原料即可使色素从破坏的表皮组织中透出，直接收集利用。如对番茄红素的原始提取法，影响因素主要为原料破碎程度。

2) 溶剂浸提

以冷水或热水浸提并经过滤、蒸发浓缩处理的原始浸提法，可用于收集色素粗产品，其成品纯度偏低，原料损耗大，直接用于工业化生产，经济性较差。现代溶剂浸提法必须综合考虑溶剂种类、浓度、浸提时间、温度、pH、液比等多种因素及浸提前后的其他工艺条件。

3) 物理技术辅助浸提

目前，大多采用微波辅助浸提、超声波辅助和大孔树脂吸附提取等方式。

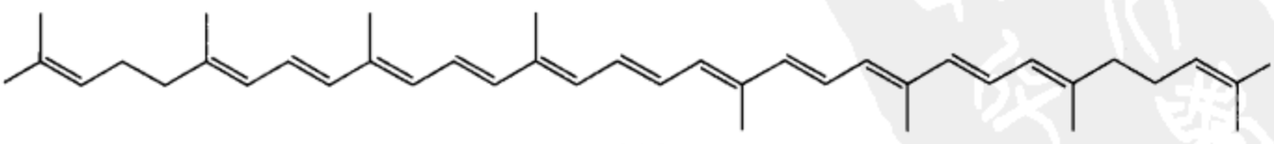
4）现代仪器提取分离

溶剂法生产的色素常存在纯度差、有异味和溶剂残留等缺点，无法满足国际市场对高品质色素的需求。各种辅助浸提方式虽能加速成分溶出、增加产品得率，但对色素纯度的提高、颗粒的均匀微细化分布等要求仍难以实现。目前，超临界流体萃取(SFE)等现代仪器提取分离技术克服了传统溶剂萃取色素纯度低及溶剂残留等缺点，已在辣椒红色素、番茄红素、β-胡萝卜素提取等技术上成功应用。

26.2.4　类胡萝卜素——番茄红素

26.2.4.1　番茄红素的特性

番茄红素，英文名 lycopene 或 licopin(**26-3**)，又称 ω-胡萝卜素，属于异戊二烯类化合物，是不含氧的类胡萝卜素的一种，它是番茄中所含的一种天然红色素，是胡萝卜素的母体化合物。与各种胡萝卜素一样同属四萜类复烯色素。由于它最早从茄科植物西红柿(*Solanum lycopersicum*)的成熟果实中分离制得，故称番茄红素。过去人们一直认为，只有那些具备 β-紫罗酮环并能转化为维生素 A 的类胡萝卜素，如 α-胡萝卜素、β-胡萝卜素等才与人类的营养和健康有关，而番茄红素因缺乏此结构，不具有维生素 A 的生理活性，故对此研究很少。然而，最近科学研究发现，番茄红素具有优越的生理功能。人体内的单线态氧和氧自由基是侵害人体自身免疫系统的罪魁祸首，而番茄红素清除自由基的功效远胜于其他类胡萝卜素和维生素 E，其猝灭单线态氧速率常数是 β-胡萝卜素的 2 倍、维生素 E 的 100 倍，是迄今为止自然界中被发现的最强抗氧化剂之一。它不仅具有抗癌抑癌的功效，而且对于预防心血管疾病、动脉硬化等各种成人病、增强人体免疫系统以及延缓衰老等都具有重要意义，有“植物黄金”之称，被誉为“21 世纪保健品的新宠”。它是自然界中最强的抗氧化剂，在清除人体“万病之源”——自由基方面，番茄红素的作用比 β-胡萝卜素更强大，是一种很有发展前途的新型功能性天然色素。因此，近年来它受到世界各国专家的关注。



26-3

番茄红素的分子式为 $C_{40}H_{56}$，相对分子质量为 536.85，纯品为针状深红色晶体，在分子结构上由 11 个共轭双键和 2 个非共轭双键组成的非环状平面多不饱和脂肪烃，经过环化可形成 β-胡萝卜素。

由于番茄红素分子中有 11 个共轭双键及 2 个非共轭双键，使得番茄红素的稳

定性比较差，天然存在的番茄红素都是全反式，但通过高温下的蒸煮、油炸等加工方式可使番茄红素由反式构型向顺式构型转变，干燥番茄或干燥番茄渣中的顺式构型也会有部分的转变。研究还表明，番茄红素的顺式异构体与反式异构体的物理和化学性质有所不同，与反式异构体相比，番茄红素的顺式异构体的熔点低，摩尔消光系数小，极性强，不易结晶，更易溶解，生理功能最强，但在室温放置过程中可能会恢复到全反式状态。

番茄红素是脂溶性色素，可溶于其他脂类和非极性溶剂中，番茄红素不溶于水，难溶于甲醇、乙醇等强极性溶剂，可溶于乙醚、石油醚、己烷、丙酮，易溶于氯仿、苯、二硫化碳等有机溶剂。番茄红素在各种溶剂中的溶解度随着温度的上升而增大，然而当样品越纯时，溶解越困难。结晶的番茄红素溶解缓慢，倾向于形成一种超饱和状态，虽然提高温度可加速其溶解，但冷却时可能会出现结晶，这时可利用超声波加速其溶解。纯的番茄红素虽然不溶于水，但当它与某些物质如蛋白质结合形成复合物时，则具有较高的溶解度。

近年的研究证实，番茄红素不仅分布在番茄中，还存在于西瓜、南瓜、李子、柿子、胡椒果、桃、木瓜、芒果、番石榴、葡萄、葡萄柚、红莓、云莓、柑橘等的果实，茶的叶片及萝卜、胡萝卜、芜菁甘蓝等的根部。番茄及其制品的番茄红素是西方膳食中的类胡萝卜素最主要的来源，人体从番茄中获得的番茄红素占总摄入量的 80% 以上。

26.2.4.2 分离方法

番茄红素的提取比较方便，但是分离纯化较难，因为存在各种类似物，特别是含一个或两个环氧化的类似物。番茄切碎后用丙酮提取，皂化，将非皂化物用氧化铝柱色谱分离，石油醚-乙醚洗脱，各流分再经 PTLC 反复分离[5]。

李等[6]将 100 g 番茄红素油树脂与 50 mg BHA 分散到 4～6 倍的正己烷中，搅拌均匀后加入等量的经 KOH 饱和的乙醇，在充氮条件下，于 75℃ 恒温搅拌 30 min。反应结束后，加入适量蒸馏水，使整个反应体系分为两层：有机层和水层。上层为有机层，含有大部分番茄红素等类胡萝卜素，下层有一些含有羟基类胡萝卜素和一些乳化了的类胡萝卜素，将底层通过正己烷，加 2 倍水回收番茄红素。合并得到的正己烷溶液，用等量的水洗涤 3～5 次，以除去其中的碱，接着用乙醇液洗涤数次。

将上述得到的番茄红素的正己烷溶液，经无水 Na_2SO_4 柱脱水，于 35 ℃用真空旋转蒸发仪蒸去部分溶剂。将此样品加入到经正己烷预洗的硅胶柱中，采用石油醚与苯的混合液进行洗脱，控制洗脱流速为 1 mL/min。每 50 mL 收集一次洗脱液，测定其紫外吸收，收集富集番茄红素的洗脱液。

先使番茄红素在二氯甲烷中达到饱和状态，然后加入无水乙醇，使相平衡破

坏，从而使溶液达到过饱和状态，番茄红素晶体析出，纯度 100%(HPLC)。

王等[7]取适量的 95%乙醇浸泡过的 PRP-6 树脂，同时超声 20 min，使其混合均匀并除去气泡。搅拌均匀后湿法装柱，使其自然沉降。装好后用 2 倍柱体积的质量分数为 95%的乙醇冲洗柱子去除杂质，准备上样。

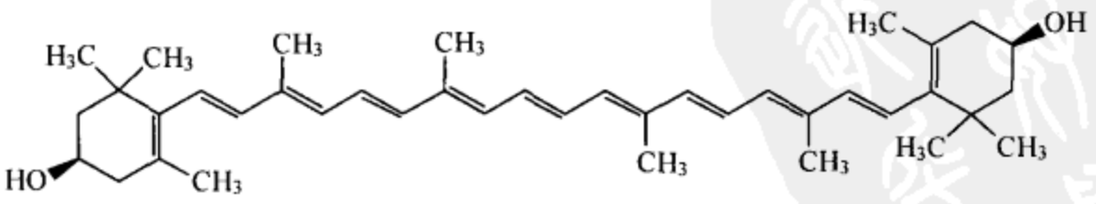
向 3 kg 番茄酱中加入 415 kg 质量分数为 95%的乙醇，在室温下搅拌 1 h，以除去水分和水溶性色素，离心分离混合物得酱渣。向酱渣中加入 2000 mL 乙酸乙酯，在 55 ℃下搅拌浸提 40 min 得浸提液。将浸提液浓缩至 300 mL 左右，加入乙醇浸泡的 PRP26 树脂 30 mL，减压蒸干，用研钵研磨树脂使其混合均匀，干法装入色谱柱中准备色谱分离。

分别用 95%乙醇，二氯甲烷-乙醇混合液(体积比分别为 1∶9、2∶8、4∶6、6∶4)，二氯甲烷洗脱液进行 6 个梯度洗脱，收集二氯甲烷洗脱液，在－12℃的条件下冷冻结晶。过滤，真空冻干，得深红色针状晶体约 600 mg，纯度为 99.8%(HPLC)，得率为 0.02%。

26.2.5　功能性色素——玉米黄质

26.2.5.1　玉米黄质的特性

在视网膜中央，有近千种黄色色素密集的细小碟形区域，称为黄斑点，负责中央视力。黄斑点主要由黄体素和玉米黄质两种胡萝卜素组成，可以预防眼睛受紫外线的伤害，也可预防自由基对眼睛组织的伤害。玉米黄质是一种新型的油溶性天然色素，是维生素 A 源之一。在自然界中，广泛存在于绿色叶类蔬菜、花卉、水果、枸杞和黄玉米中。玉米黄质(zeaxanthin，3，3′-二羟基-β-胡萝卜素，分子式 $C_{40}H_{56}O_2$，**26-4**)属于异戊二烯类，常与隐黄素(cryptoxanthin，3-羟基-β-胡萝卜素)、β-胡萝卜素、叶黄素(3，3′-二羟基-α-胡萝卜素)等共存，组成类胡萝卜素混合物，玉米黄质是典型的叶绿体色素。



26-4

玉米黄质是含紫罗酮环的二羟基类胡萝卜素，在自然界广泛存在。大量的流行病学证据表明，玉米黄质在视觉保护、减少心血管疾病发病率、增强免疫功能和减少癌症的发生和发展等方面具有独特的生理功效，是目前国际上功能性食品成分研究中的一个热点。玉米黄质分子中有 11 个共轭双键，并且尾端基团上带有羟

基，此结构使得它具有较强的抗氧化能力。在体内，可通过猝灭单线态氧、清除自由基等抗氧化行为来保护机体组织细胞，从而保护生物系统免受一些由于过量氧化反应所产生的潜在的有害作用。

玉米黄质在大多数植物原料中含量较少。它的两个紫罗酮环都是β型，C5 位和 C6 位间的β-紫罗酮环双键与共轭多烯链结合在一起，活性较弱。但是，紫罗酮环 C5 位上的 C18 甲基和 C8 位上的氢之间发生强烈的空间作用，这种作用迫使紫罗酮环的双键与共轭多烯链平面约成 40°角。这种结构可由光谱学和化学理论来解释。在大多数高等植物中，玉米黄质常以 3*R*，3′*R*-玉米黄质形式存在，其 C3 和 C3′位都是 *R* 立体化学结构。在许多动物中还发现不常见的立体异构体 3*S*，3′*S*-玉米黄质和 3*R*，3′*S*-内消旋玉米黄质。人体内含有大量 3*R*，3′*S*-内消旋玉米黄质，在人眼视网膜中心浓度较高。动物组织中的这些异构体是在体内生化代谢过程中形成的。

26.2.5.2 分离方法

张等[8]取玉米蛋白粉提取物 1 g 用正己烷溶解，用 50 mL NaOH-乙醇饱和溶液在 60 ℃下搅拌 1 h 后取几滴皂化液加入热水振荡，如液面上无油滴漂浮，则皂化完全，否则，继续皂化。然后加入丙酮，挤出肥皂，过滤，浓缩母液得浓缩膏。

中性氧化铝经烘干预处理后用洗脱剂湿法装入色谱柱(3.0 cm×45 cm)中，按照 20 mg·mL^{-1}柱体积准确称取皂化后浓缩膏溶解于少量正己烷中，加到柱上方，用正己烷-丙酮(7∶3)洗脱剂洗脱，流速 0.5 mL·min^{-1}，色带展开明显，可清楚看到 3 个色带，1、2 色带洗脱后，换用正己烷-丙酮(2∶1)洗脱色带 3，得玉米黄质液，浓缩后加入无水乙醇少量，冷却，可得到含量＞90%(HPLC)的紫色结晶性粉末玉米黄质。

26.3 有 机 酸

有机酸是指含羧基(—COOH)的酸性有机化合物，它广泛存在于植物的叶、花、茎、果、种子、根等各部位。除游离态外，一般都以盐、脂肪、蜡、酯等结合态存在。

有机酸参与植物的新陈代谢。植物新陈代谢的特点是可在细胞中聚积有机酸，几乎所有食用果实的酸味均由这种聚积所致。在生理氧化反应中，有机酸是糖类分解的中间产物；在蛋白质合成反应中，又是氨基酸的“碳架”。

某些有机酸具有一定的生理活性，最简单的乙酸、酒石酸、苹果酸、柠檬酸、水杨酸等都在医药中应用。

另外在生物的代谢途径中，有一种称为莽草酸代谢的代谢方式存在于大量高等植物与微生物中。所谓莽草酸代谢，就是以莽草酸为中间物质，在生物体内进一

步合成分解，生成其他化合物。换而言之，莽草酸存在于大量高等植物或微生物。由于八角科植物的果实中含有较大量的莽草酸，在广西产八角茴香中莽草酸含量大约在 12%，经常被作为提取莽草酸的资源植物。

除了植物，莽草酸还广泛存在于微生物中，通过微生物发酵也能提取莽草酸。莽草酸通过影响花生四烯酸代谢，抑制血小板聚集，抑制动、静脉血栓及脑血栓形成，莽草酸具有抗炎、镇痛作用，莽草酸还可作为抗病毒和抗癌药物中间体。莽草酸多用作制药中间体，具有一定刺激性，请勿直接使用。罗氏公司公布的可有效对付致命的 H5N1 型禽流感病毒的药物“达菲”(Tamiflu) 的合成原料就是提炼自八角中的莽草酸。

26.3.1　有机酸的性质

有机酸具有一般羧酸的性质，可生成酯、酰氯、酰胺等衍生物。8 个碳以下的低级脂肪酸及不饱和脂肪酸常温时多为液体。

有机酸的溶解度与结构有关。在水中的溶解度随有机酸分子中极性基团的增加而增加，含羟基数目多的有机酸水溶性大，而芳香酸类难溶于水。一般有机酸能溶于乙醇或乙醚等有机溶剂，但难溶或不溶于石油醚。

有机酸能与碱金属、碱土金属结合成盐。其一价金属盐都易溶于水，而二价或三价金属盐较难溶于水。常利用此性质从中草药中提取分离有机酸。

26.3.2　有机酸的鉴别

纸色谱和薄层色谱是常有的鉴别方法。由于有机酸的酸性比较强，有较大的解离度，故展开剂选择不当，在色谱分离过程中会出现离子状态及未完全解离的分子状态，这样，在纸上或薄层上就可能产生拖尾现象。要克服此现象，常用的方法是调节溶剂系统的 pH，从而控制有机酸在纸上或薄层上的解离度。如在溶剂中加入高浓度的挥发酸，如甲酸、乙酸；或在溶剂中加浓氨水，使有机酸转为铵盐，均可得到集中的斑点。

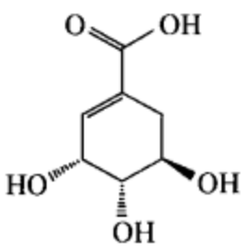
显色剂常用一些酸碱指示剂，如溴酚蓝、溴甲酚绿等。但是这些指示剂有时灵敏度不高，因此也可使用苯胺-葡萄糖(aniline-glucose)、吖啶(acridine)等显色剂。还有一种氧化还原显色剂，它由两种溶液组成，溶液Ⅰ为 0.075%溴甲酚绿(BCG)及 0.025%溴酚蓝(BPB)的无水乙醇液；溶液Ⅱ为 0.5% $KMnO_4$ 与 1% $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ 的水溶液。喷射时，将二者等量混合，立即使用。不同的酸可显示不同的颜色，但此显色剂不稳定，二液混合后即发生氧化还原反应，喷射后 2～5 min，有机酸显示的特征颜色消失，留下黄色斑点。故两种溶液需分别置之，用时混合。

此外，也可将有机酸制成易结晶的衍生物进行鉴别，如盐、酯、酰胺等。

26.3.3 八角茴香中的有效成分——莽草酸

26.3.3.1 莽草酸的特性

八角为生长在湿润、温暖半阴环境中的常绿乔木，高可至 20 m，主要分布于中国和越南，其果实为茴香，味道辛辣，类似甘草，是东方烹调的传统调味品，也是法国绿茴香酒和茴香甜酒等利口酒的主要香料。一般还可用来增加糖果、茴香酒和烟草的香味，值得注意的是同属植物莽草又称野八角（*Illicium simonsii* Maxim.）的果实与八角非常相似，但有毒，应避免混淆。八角茴香的主要有效成分为莽草酸，英文名 shikimic acid（**26-5**），分子式为 $C_7H_{10}O_5$，化学名为 3,4,5-三羟基-1-环己烯-1-羧酸。通常莽草酸为白色精细粉末，易溶于水，在水中的溶解度为 18g·100 mL^{-1}，难溶于氯仿、苯和石油醚。熔点 185～187 ℃，旋光度－180，气味辛酸。



26-5

26.3.3.2 分离方法

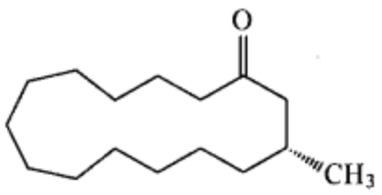
孙等[9]报道了一种从八角茴香分离莽草酸的简便方法，即取市售八角茴香粗粉 200 g，用 95%乙醇（500 mL×3）回流提取各 20 min，合并乙醇提取液，减压浓缩至干，所得褐色浸膏用乙酸乙酯（40 mL×2）于 50 ℃浸泡数分钟，倾去溶液，残留物用丙酮（40 mL×2）回流数分钟，过滤，得淡黄色固体，为莽草酸粗品。用甲醇-丙酮重结晶 2 次后，得白色固体莽草酸 8.0 g，收率 4%，mp 186 ℃（分解），$[\alpha]_D^{15}$ －183（*c* 2，EtOH）。

26.4 麝香中的有效成分——麝香酮

26.4.1 麝香酮的特性

麝香酮，英文名 muscone，化学名为 3-甲基环十五烷酮（**26-6**），是从鹿科动物林麝（*Mosochus bersxoxskii* Fleror）或原麝（*Moschus moschiferus* L）成熟雄体香囊的干燥分泌物麝香中蒸馏提取得到的活性成分之一，也是麝香的主要芳香成分。麝香酮是名贵香料，药理研究表明其具有芳香开窍、通经活络、消肿止痛和能引起

β-肾上腺素能作用。小剂量对中枢神经有兴奋作用，大剂量则有抑制作用。对离体蛙心脏有兴奋作用，并有雄性激素样作用及抗炎作用。具有扩张冠状动脉及增加冠脉血流量的作用，对心绞痛有一定疗效。一般于用药（舌下含服、气雾吸入）后 5 min 内见效，缓解心绞痛的功效与硝酸甘油略相近似。临床上用于治疗冠心病心绞痛、血管性头痛、坐骨神经痛、白癜风等，也是六神丸的主要成分。



26-6

麝香酮为微黄色油状液体，分子式为 $C_{16}H_{30}O$。天然麝香酮为左旋化合物，有强烈的麝香香气。沸点 328 ℃；d_4^{17} 0.9221；n_D^{17} 1.4802；$[\alpha]_D^{17}$ −11.3（c 0.91，MeOH）；极微溶于水，能与乙醇混溶，有特殊香味。

26.4.2　分离方法

天然麝香酮多用乙醚索氏提取器回流提取，提取液用石油醚及少量蒸馏水萃取可去掉一些杂质而不影响麝香酮含量，然后点样于硅胶板上，可分离出麝香酮。严修泉等[10]将提取液滤过，回收乙醚后得到的红棕色蜡状总醚溶性提取物以少量三氯甲烷溶解，点样于硅胶 GF_{254} 制备板上，以苯展开，R_f 0.46～0.67 为荧光区，刮取此部位，用乙醚抽提，过滤，回收溶剂，得淡黄油状物，为麝香酮。

由于天然的麝香酮目前已经禁止使用，因此国内已经成功合成了人工麝香酮。试验发现，人工合成品的药理作用与天然麝香酮相似。但是天然的麝香酮为左旋体，合成的一般为右旋体。

董研[11]对人工合成的麝香酮及其异构体进行了分离，具体做法是将干净玻璃棉装入柱下端，玻璃色谱柱长 1.7 m，直径 7 cm，加入 500 mL 石油醚。把 2 kg 120～200 目硅胶用石油醚拌成糊状装入柱中（即湿法装柱）。静置 5 min 左右，打开柱下端阀门，石油醚自然流出，并保持柱上端石油醚液面高度为 10 cm，待硅胶不再下沉时，合上阀门。

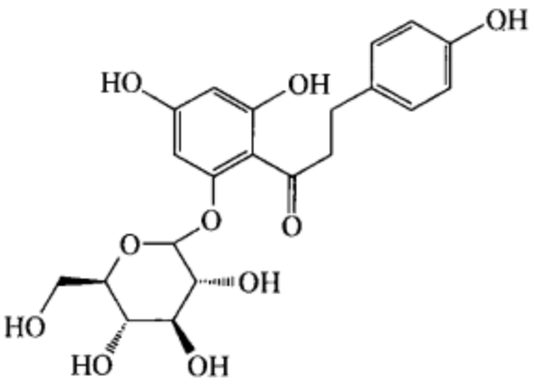
将含 β-麝香酮及 γ-麝香酮的粗品 70 g，用 140 g 硅胶拌成干样（硅胶：样品＝2：1）放置 12 h 后，装入硅胶柱上端。

打开上下端阀，先用石油醚（60～90℃）冲洗，收集前 60 份（500mL/份），回收溶剂后得 6.6 g 麝香混醇，换石油醚-乙醚洗脱液（100：1，v/v），冲洗收集 61～79 份（500 mL/份），回收溶剂后得 24.5 g β-麝香酮，分析结果显示纯度为 97.8%，其中含 1.8%的 γ-麝香酮。

26.5 苹果中的有效成分——根皮苷

26.5.1 根皮苷的特性

根皮苷，英文名 phlorizin(**26-7**)，是从苹果、苹果树皮、茎及叶等中提取而得，它是苹果树体内的酚类物质。研究表明，苹果树体内酚类物质总含量中，根皮苷占到 95%，它的含量如此高，以至它的存在状态可影响到酚类物质总体的存在状态。根皮苷是由根皮素和配糖体葡萄糖在 2′位结合生成的苷，糖基水解形成葡萄糖，加之含量高，被许多学者认为是碳水化合物的一种储藏形式，它属于黄酮化合物中的二氢查耳酮苷。二氢查耳酮苷在自然界存在极少，被称为“少数黄酮类”。最近国内外的临床研究表明，根皮苷是一种甜度极高的天然非糖替代品，其甜味是葡萄糖的 300 倍，它是一种肾葡萄糖转移的竞争抑制剂，它对糖尿病及其并发症有良好的防治作用。另外还发现根皮苷具有抗肿瘤活性，对皮肤癌有治疗效果，面部用品中使用可抑制黑色素的形成，减淡茶褐色、灰色斑和雀斑的色泽。



26-7

自然界中，梨(*Pyrus communis*)、苹果、樱桃以及其他蔷薇科的果树的树皮中均富含根皮苷。根皮苷含量的高低可以决定香石竹(*Dianthus caryophyllus*)的花瓣颜色。

根皮苷分子式为 $C_{21}H_{24}O_{10}$，白色轻质细长针状小结晶，味先甜而后苦，有毒。熔点 109 ℃，能溶于热水、乙醇、甲醇、戊醇、丙酮、乙酸乙酯、吡啶、冰醋酸等，不溶于醚、氯仿和苯。低含量时，水溶性很好；高含量水溶性较差。旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ −52，主要用于生化检验。

26.5.2 分离方法

Lu 等[12]曾经报道将新西兰皇家嘎啦苹果籽 25 g 粉碎成 1 mm 的碎粒，依次以正己烷(3×50 mL)、70%丙酮(3×50 mL)萃取，得到油状的正己烷部位 5.0 g

以及丙酮萃取部位的冷冻干燥粉 1.6 g。取丙酮萃取物 1.5 g 溶于 5 mL 水中，湿法上样于 HP20 柱(20 cm×1.5 cm)，然后用 100 mL 水洗脱以除去糖类化合物，后用含水甲醇(甲醇含量 10%～70%，按每 50 mL 递增 10%的比例)洗脱，收集每 20 mL洗脱液以紫外检测，将流分 11、12 合并，冷冻干燥后得纯度为 95%(HPLC)的根皮苷。

李等[13]采用超声波辅助提取多穗柯(*Lithocarpus polystarch*)中的根皮苷，用 HPLC 法测定根皮苷的含量，通过大孔树脂对多穗柯中根皮苷的吸附和解析研究，得到根皮苷的最佳纯化工艺。D101 型大孔树脂对多穗柯中的根皮苷具有较好的吸附和解吸效果，D101 对多穗柯中的根皮苷的最佳纯化工艺条件为吸附速率 2.5 mL·min^{-1}，洗脱剂浓度 90%，pH 8，解吸速率 4 mL·min^{-1}，通过极差分析发现各因素的影响次序为洗脱剂浓度＞解吸速率＞pH＞吸附流速。研究表明，大孔树脂 D101 是纯化多穗柯中的根皮苷的最佳树脂，纯度达到 95.6%。

李等[14]取阴干的苹果树枝，用植物粉碎机粉碎均匀，然后称取一定量苹果树枝的粉末，用 80%乙醇水溶液(料液比 1∶20)，60 ℃恒温水浴振荡提取 2 次，每次提取 90 min，合并 2 次滤液，旋转减压浓缩，残留物真空冷冻干燥后，置于干燥器中备用。

取 150 mg 根皮苷乙醇粗提物，溶于正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水(1∶5∶1∶5，v/v)下相中，剧烈振荡使之完全溶解。

采用上相(有机相)作为固定相(下降洗脱模式)，旋转之前，首先将固定相以 10 mL/min 流速充满转子。然后调节转子转速至 1500 r·min^{-1}，流动相流速为 3.0 mL·min^{-1}的下降洗脱模式泵入 HPCPC 转子中。当流动相从柱中流出时，系统达到流体动力学平衡，待测样品溶于下相，注入进样阀。经色谱柱流出的分离产物在 287 nm 下紫外检测器连续检测，将根皮苷峰对应的收集液浓缩，冷冻干燥，得根皮苷纯化产物，纯度为 91.20%。

26.6　含硫化合物

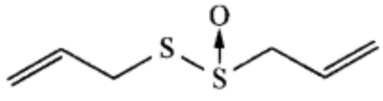
含硫天然化合物是较不常见的一类化合物。一些具有臭味的植物如大蒜、葱、韭菜、芥子等与中草药中都含有硫化物。许多十字花科植物，如菘蓝(其叶中药名为大青叶，其根为板蓝根)、葶苈子、萝卜、芥菜等也都因含硫而有异味。这些含硫化合物一般都有生物活性。

26.6.1　大蒜中的有效成分——大蒜新素及二烯丙基三硫

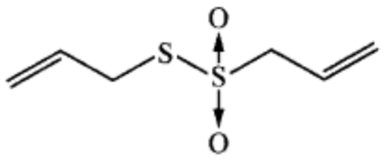
26.6.1.1　大蒜新素及二烯丙基三硫的特性及分离

大蒜为百合科植物大蒜(*Allium sativum*)的鳞茎，为众所周知的药食两用植

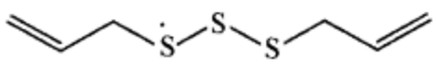
物，有悠久的应用历史，具有抗菌、消炎、抗原虫、降血脂及防治肿瘤的功效。大蒜本身无臭味，但在粉碎加工过程中产生的一种挥发性有机硫化合物蒜辣素（allicin，二烯丙基硫代亚磺酸酯，diallyldisulfide oxide，**26-8**）具有臭味。一般认为蒜辣素是大蒜的主要抗菌成分，同时也是大蒜驱虫的主要成分。但是其稳定性极差，在室温放置两天即成失活的黏稠液。而另一成分大蒜新素（diallyl thiosulfonate，**26-9**），稳定性好，已经通过药理、毒理试验并制成针剂[15]。郎[16]还发现大蒜中抗真菌的有效成分应该是较稳定的二烯丙基三硫（allicinin，diallyltrisulfide，**26-10**），该成分常常带有强烈的刺激味。



26-8



26-9



26-10

26.6.1.2 *分离方法*

刘等[17]选用广东产的新鲜大蒜 1000 g，捣碎研成浆状物，放入 10000 mL 圆底烧瓶中，加水 5000 mL，装好冷凝装置，在油浴上加热回流 5～6 h 直至几乎没有油状物分出为止。从提取分离器中收集到 3.4 g 黄色油状物，粗品得率 3.4 ‰，相对密度 d^{20} 为 1.049～1.054。将重复 2 次试验的油状物 5.0 g 静置过夜，除去少量水分，置梨形瓶内减压分馏，收集 87～102 ℃/2 mmHg 馏分，得 3.5 g 淡黄色透明油状物，n_D^{20} 1.5798。再取 2 g 上述淡黄色油状物经快速色谱分离，用不同比例石油醚-乙酸乙酯洗脱，TLC 跟踪，分得极性较大的组分 0.82 g，得率为 1 ‰，经鉴定为大蒜新素。

蒜辣素只在大蒜的植物细胞被破坏时才存在，它是由蒜氨酸在大蒜酶的作用下形成的，蒜辣素虽然是手性的，但是在自然界中常以消旋体的形式存在，这种消旋体也可由二烯丙基双硫化物氧化而得。

由于蒜辣素在 pH 3 以下就会不可逆地失活，因此，蒜辣素通常在新鲜大蒜或大蒜粉中是无法生成的，此外蒜辣素是不稳定的，在 23 ℃时 16h 就会分解。

郎[16]将 50 kg 大蒜粉碎后加等量水，经过水蒸气蒸馏，用冰盐水冷却蒸馏液，分出大蒜油 170 g，得率 3.4 ‰，再进一步蒸馏收集 85～100 ℃/1 mmHg 馏分 120 g，得率为 2.4 ‰，经过分析主要为稳定的二烯丙基三硫（含量在 40%左右，n_D^{20} 1.572～1.582）。

参 考 文 献

[1] 方圣鼎，严修琼，李静芳等．垂盆草化学成分的研究Ⅳ．垂盆草苷及异垂盆草苷的结构．化学学报，1982，40(3)：273～280.

[2] Nishida R，Rothschild M，Mummery R. A cyanoglucoside，sarmentosin，from the magpie moth，*Abraxas groddulariata*，geometridae：Lepidoptera. Phytochemistry，1994，36(1)：37～38.

[3] 侯奋争，姚桂斌，徐伟等．高山红景天首次分离的化合物(Ⅰ)．中国现代中药，2009，11(4)：18～20.

[4] 唐宗俭，陈嬿，奚国良．蕹菜有效成分的研究．中国科学，1974，1：15～20.

[5] Ben-Aziz A，Britton G，W. Goodwin T，Carotene Epoxides of *Lycopersicon Esculentum*. Phytochemistry，1973，12(11)：2759～2764.

[6] 李伟，肖刚，丁霄霖等．番茄红素标准样的制备及定性定量分析．食品与发酵工业，2002，28(9)：29～33.

[7] 王志华，亓国秀，陈超等．利用 PRP-6 树脂制备高纯度全反式番茄红素．北京化工大学学报，2005，32(1)：109～111.

[8] 张金娟，张雪霞，张丽等．高纯度玉米黄色素纯化方法研究．中国药学会学术年会暨第八届中国药师周论文集，2008.

[9] 孙快麟，尤启冬．从八角茴香分离莽草酸的简便方法．医药工业，1988，19(1)：489.

[10] 严修泉，钱贯华，邵文霞等．我国不同产地麝香中麝香酮和雄性激素的含量测定．中成药研究，1981，1：21.

[11] 董研．麝香酮及其异构体的分离．广西化工，1996，25(2)：15～17.

[12] Lu Y R，Foo L Y. Constitution of some chemical components of apple seed. Food Chem，1998，61(1/2)，29～33.

[13] 李胜华，伍贤进，牛有芽．D-101 大孔树脂纯化多穗柯中根皮苷的工艺研究．食品科技，2010，35(7)：217～221.

[14] 李荣涛，焦中高，刘杰超等．高效离心分配色谱(HPCPC)分离纯化苹果树枝中的根皮苷．果树学报，2010，27(4)：645～649.

[15] 上海第二制药厂．大蒜有效化学成分的研究．中草药通讯，1976，10：8.

[16] 郎彝江．大蒜有效成分的研究．中草药，1981，12(1)：4～6.

[17] 刘秋琼，王植材，廖明祥等．大蒜有效成分的提取和鉴定．广东化工，1995，(8)：22～23.

(杨培明)

附　录

附录 1　薄层色谱及纸色谱常用显色剂配制和显色方法

一、通用显色剂

1.1　碘

检查物质：含有杂原子、双键、芳环等的一般有机物。

方法：在密封色谱缸或其他密封容器内预先放入少许碘结晶，然后放入经展开后晾干的色谱薄层，数分钟后，大部分的有机化合物呈现斑点。为了增加碘的饱和蒸气，加快碘的显色速度，色谱缸可在恒温水浴上适当加热，放置时间过长，整个色谱薄层会呈现棕色。该方法为一种可逆性色谱，显色后的色谱薄层暴露于空气中一段时间，显色的斑点可褪去颜色。

1.2　硫酸

检查物质：含有羟基、双键的一般有机物。

喷洒剂的配置方法：5%浓硫酸乙醇溶液，或者 15%浓硫酸正丁醇溶液。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，置于空气中干燥 15 min，再在 110 ℃以上加热直至出现颜色或者荧光。

1.3　重铬酸钾-硫酸

检查物质：一般有机物。

喷洒剂的配制方法：将 5 g 重铬酸钾溶于 100 mL 40%硫酸溶液，再于 150 ℃加热直至斑点显色，不同的化合物会显不同的颜色。

1.4　磷钼酸

检查物质：具有还原性的化合物、类脂体、生物碱、甾体等。

喷洒剂的配置方法：将 5 g 磷钼酸溶于 100 mL 的乙醇中。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，于 120 ℃加热直至出现斑点，还原性物质显蓝色，再用氨气熏，则背景变为无色。

二、糖类显色剂

2.1　茴香醛-硫酸试剂

检查物质：各种糖

喷洒剂的配制方法：在 50 mL 1%的茴香醛乙醇溶液中加入 1 mL 浓硫酸。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，在100～110 ℃烘烤，各种糖显示不同的颜色。

2.2　3,5-二氨基苯甲酸磷酸试剂

检查物质：α-去氧糖

喷洒剂的配制方法：取3,5-二氨基苯甲酸二盐酸1 g，溶于25 mL 80%的磷酸中，加水稀释至60 mL。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，于100 ℃烘烤15 min，α-去氧糖在日光下显棕色，在紫外下显黄绿色的荧光。

2.3　α-萘酚试剂

检查物质：糖类，苷类

显色剂的配制方法：取10 g α-萘酚，用100 mL乙醇溶解即得。

方法：取1 mL样品的稀乙醇或水溶液，加入试剂数滴，再沿管壁加入少量浓硫酸，与硫酸的接触面产生紫红色的环。

三、醌类显色剂

3.1　无色亚甲蓝试剂

检查物质：苯酚类和萘醌类。

喷洒剂的配制方法：取100 mg亚甲蓝溶于100 mL乙醇中，加入1 mL冰醋酸、1 g锌粉，缓缓振摇直至蓝色消失即可。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，在白色的背景下显蓝色斑点。

3.2　氢氧化钾试剂

检查物质：香豆素类、蒽醌类、黄酮类等。

喷洒剂的配制方法：取5 g氢氧化钾溶于100 mL甲醇中。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，在日光和紫外灯下检视斑点。

四、黄酮类显色剂

4.1　碱试剂

检查物质：具有酚羟基的黄酮类。

喷洒剂的配制方法：氨水，10%的氢氧化钠溶液，1%或5%碳酸钠溶液等。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，观察日光下和紫外灯下斑点前后的变化。

4.2　三氯化铝试剂

检查物质：具有酚羟基的黄酮类。

喷洒剂的配制方法：1%或5%三氯化铝溶液。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，观察日光下和紫外灯下斑点前后的变化。

4.3　乙酸镁试剂

检查物质：具有酚羟基的黄酮类。

喷洒剂的配制方法：2%的乙酸镁甲醇溶液。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，观察日光下和紫外灯下斑点前后的变化。

4.4 硼氢化钾试剂

检查物质：二氢黄酮类。

喷洒剂的配制方法：溶液 1，1%硼氢化钾的异丙醇溶液。溶液 2，浓盐酸。

方法：在色谱薄层上先喷洒溶液 1 以后，5min 后，放入具有浓盐酸的蒸汽槽中熏，显示红色、橙红色斑点。

4.5 硼酸-枸橼酸试剂

检查物质：黄酮类。

喷洒剂的配制方法：溶液 1，饱和的硼酸丙酮溶液。溶液 2，枸橼酸的丙酮溶液。

方法：在色谱薄层上先喷洒溶液 1 以后，再喷洒溶液 2，显示有颜色的斑点。

五、苯丙素类显色剂

5.1 稀氢氧化钠试剂

检查物质：香豆素、酚类化合物。

喷洒剂的配制方法：5%的氢氧化钠的甲醇溶液。

方法：在色谱薄层上先喷洒显色剂后，在短波长的紫外线下观察荧光，比较喷洒前和喷洒后的荧光变化。

5.2 异羟肟酸铁试剂

检查物质：酯类和内酯类物质。

喷洒剂的配制方法：溶液 1，取盐酸羟胺 5 g，溶于 12 mL 水中，用乙醇稀释到 50 mL，置于冷处保存备用；取氢氧化钾 10 g，用很少量的水溶解，再用乙醇稀释到 50 mL，置于冷处保存，将盐酸羟胺备用液和氢氧化钾备用液以 1∶2 混合，滤去氯化钾沉淀即得。溶液 2，取三氯化铁 10 g，用 20 mL 浓盐酸溶解，加入 200 mL 乙醚，振摇溶解，密封储存。

方法：在色谱薄层上先喷洒溶液 1，置于室温干燥后，再喷洒溶液 2，可显淡红色斑点。

六、有机酸显色剂

6.1 甲基红指示剂

检查物质：有机酸类。

喷洒剂的配置方法：取甲基红 0.1 g，用 100 mL 乙醇溶解。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，有机酸即可显色。

6.2　溴甲酚绿指示剂

检查物质：有机酸类等。

喷洒剂的配制方法：取溴甲酚绿 0.04 g，用 100 mL 乙醇溶解，用 0.1 mol·L^{-1}氢氧化钠溶液调至蓝色刚刚出现。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，有机酸即可在蓝色背景上显黄色。

6.3　吖啶试剂

检查物质：有机酸类等。

喷洒剂的配制方法：取吖啶 5 mg，用 100 mL 乙醇溶解。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，在荧光灯下显黄色荧光。

七、强心苷类显色剂

7.1　3,5-二硝基苯甲酸试剂

检查物质：α,β-不饱和内酯等。

喷洒剂的配制方法：取 1 g 3,5-二硝基苯甲酸，用 50 mL 甲醇溶解，加入 1 mol·L^{-1}氢氧化钾溶液 50 mL，混合即得。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，显紫红色斑点，几分钟后褪色。

7.2　三氯乙酸试剂

检查物质：强心苷类等。

喷洒剂的配制方法：取 25 g 三氯乙酸，用 100 mL 乙醇或氯仿溶解。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，110 ℃烘烤 5～10 min，荧光下观察呈蓝色或者黄色荧光斑点。

7.3　Keller-Kiliani 试剂

检查物质：α-去氧糖。

喷洒剂的配制方法：在 100 mL 冰醋酸中加入 0.5 mL 三氯化铁试剂即可。

方法：取样品 1 mg，加入 2 mL 试剂，溶解后沿试管壁滴入浓硫酸 2 mL，接触面即显棕色，逐渐变为浅绿色，蓝色，最后乙酸层全部变为蓝色。

7.4　苦味酸试剂

检查物质：活性次甲基。

喷洒剂的配制方法：取 0.9 g 苦味酸，用 25 mL 甲醇溶解，加入 2.5 mL 1%氢氧化钠溶液，最后用蒸馏水稀释至 50 mL 即得。

方法：取样品 1 mg，用少量甲醇溶解，加入 2 mL 试剂，放置 15 min，显红色。

八、挥发油显色剂

8.1　茴香醛-浓硫酸试剂

检查物质：萜类和挥发油等。

喷洒剂的配制方法：将 1 mL 浓硫酸加到 50 mL 冰醋酸中，冷却加入 0.5 mL 茴香醛即得。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，150 ℃烘烤，各成分显不同颜色。

8.2 硝酸铈试剂

检查物质：醇类化合物。

喷洒剂的配制方法：取硝酸铈胺 6 g，加 4 mL 硝酸溶液 100 mL 溶解即得。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，醇类化合物在黄色的背景上显棕色斑点。

8.3 对二甲氨基苯甲醛试剂

检查物质：奠类及奠前体化合物。

喷洒剂的配制方法：取对二甲氨基苯甲醛 0.25 g，加冰醋酸 50 g，85%磷酸 5 g，蒸馏水 20 mL，混合溶解即得。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，奠在室温下就能形成蓝紫色斑点。奠前体化合物 80 ℃加热 10 min 显示蓝紫色斑点。

九、酚和鞣质显色剂

9.1 三氯化铁试剂

检查物质：酚类及羟肟酸等。

喷洒剂的配制方法：5%三氯化铁的水溶液或者乙醇溶液，加盐酸少许。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，酚类呈蓝色或者绿色斑点，羟肟酸显红色斑点。

9.2 氯化钠明胶试剂

检查物质：鞣质等。

喷洒剂的配制方法：取明胶 1 g，用 50 mL 水溶解，然后加入 10 g 氯化钠使溶解，加水稀释到 100 mL 即可。

方法：试管反应。

十、三萜、甾体类显色剂

10.1 磷钼酸试剂

检查物质：三萜、甾体等。

喷洒剂的配制方法：25%的磷钼酸的乙醇溶液。

方法：色谱薄层上喷洒显色剂后，140 ℃ 烘烤 5～10 min，显深蓝色斑点。

10.2 三氯乙酸试剂

检查物质：三萜、甾体等。

喷洒剂的配制方法：三氯乙酸与乙酸 1∶2 的混合溶液。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，100 ℃ 烘烤 5～10 min，显黄色斑点。

10.3　五氯化锑试剂

检查物质：三萜、甾体等。

喷洒剂的配制方法：五氯化锑与氯仿的 1∶4 混合溶液。

方法：在色谱上喷洒显色剂后，120 ℃烘烤 5～10 min，荧光下观察斑点。

10.4　香兰醛-硫酸试剂

检查物质：三萜、甾体等。

喷洒剂的配制方法：取 1 g 香兰素溶于 100 mL 浓硫酸中。

方法：在色谱上喷洒显色剂后，120 ℃烘烤 5～10 min 直至出现斑点。

10.5　乙酐-浓硫酸反应

检查物质：三萜、甾体等。

方法：样品溶解于 0.5 mL 乙酐中，滴加 1 滴浓硫酸，呈现不同颜色。

十一、生物碱显色剂

11.1　改良碘化铋钾试剂

检查物质：生物碱类、内酯类化合物、生物胺类。

喷洒剂的配制方法：溶液 1，取次硝酸铋 0.85 g，加入 10 mL 冰醋酸和 40 mL 水，混合即得。溶液 2，取碘化钾 8 g，加 20 mL 水溶解即得。取溶液 1 和溶液 2 等量混合即得混合液。取混合液 1 mL，加入 2 mL 冰醋酸和 10 mL 水，混合即得显色剂。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，生物碱和某些含氮化合物显橙色斑点。

11.2　碘-碘化钾试剂

检查物质：生物碱类。

喷洒剂的配制方法：取碘 1 g 和碘化钾 10 g，用 50 mL 水加热溶解，加入2 mL 冰醋酸，用水稀释到 100 mL。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，生物碱显橙色斑点。

11.3　改良碘化铋钾-碘-碘化钾试剂

检查物质：生物碱类。

喷洒剂的配制方法：改良碘化铋钾试剂和碘-碘化钾试剂 1∶1 混合溶液。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，生物碱显不同颜色的斑点。

11.4　钒酸钠-浓硫酸试剂

检查物质：生物碱类。

喷洒剂的配制方法：取钒酸钠 1 g，用 100 mL 浓硫酸溶解即得。

方法：在色谱薄层上喷洒显色剂后，与多种生物碱显不同颜色的斑点。

11.5　硅钨酸试剂

检查物质：生物碱类。

喷洒剂的配制方法：取硅钨酸 5 g，用 100 mL 蒸馏水溶解，用 10%的盐酸调成酸性即得。

方法：试剂与试液相遇，产生白色或者浅黄色沉淀。

十二、氨基酸显色剂

12.1 茚三酮试剂

检查物质：氨基酸类。

喷洒剂的配制方法：试剂 1，取 0.3 g 茚三酮，用 100 mL 正丁醇溶解，加入 3 mL冰醋酸，混合均匀即得。试剂 2，取 0.2 g 茚三酮，用 100 mL 乙醇溶解即得。

方法：在色谱薄层上喷洒试剂 1 和试剂 2，然后在 110 ℃加热直至斑点显色。

12.2 双缩脲反应

检查物质：蛋白质、肽类。

喷洒剂的配制方法：1% 的硫酸铜溶液和 40%氢氧化钠水溶液的等量混合溶液。

方法：取样品溶液 1 mL，加入试剂，振摇，冷时显紫色。

附录 2 薄层色谱常用吸附剂

型号	所含成分	石膏含量/%	粒度/μm	孔径/mm	生产厂家
硅胶 H	不含黏合剂	—	10～40	80～100	青岛海洋化工厂、北京化工厂
硅胶 G	含石膏	12～14	10～40	80～100	青岛海洋化工厂、北京化工厂
硅胶 HF_{254}	只含荧光粉	—	10～40	80～100	青岛海洋化工厂
硅胶 GF_{254}	含石膏及荧光粉	12～14	10～40	80～100	青岛海洋化工厂、北京化工厂
氧化铝 G	含石膏	—	—	—	上海试剂五厂
硅胶 150	不含黏合剂	—	—	—	Schleicher & Schuell Co.
硅胶 150G	含石膏	15	—	—	Schleicher & Schuell Co.
硅胶 $150GS_{254}$	含石膏和荧光粉	15	—	—	Schleicher & Schuell Co.
硅胶 kieselgel G	含石膏	13	—	—	E. Merck
硅胶 kieselgel GF_{254}	含石膏和荧光粉	13	—	—	E. Merck
硅胶 kieselgel H	不含石膏	—	—	—	E. Merck
Aluminium oxide G	含石膏	15	—	—	E. Merck
Aluminium oxide GF_{254}	含石膏和荧光粉	15	—	—	E. Merck

注：表中的石膏均指煅石膏。

附录 3　常用溶剂物理常数和精制方法

溶剂	沸点/℃	介电常数	相对密度	一般精制处理	备注
石油醚	30～60 60～90 90～120			工业石油醚 1 L 用工业硫酸 80 mL 充分振摇，放置，分出下层，可根据硫酸层颜色的深浅，酌情振摇 2～3 次，石油醚用少量稀氢氧化钠洗，再用水洗至中性，无水氯化钙干燥，重蒸，按沸程收集	国外一般将沸程 30～70 ℃称 Petroleum ether；50～70 ℃称 Petroleum benzine；75～120 ℃称 Ligroin
苯	80.1	2.3	0.879	处理同上	
乙醚	34.6	4.5	0.713	工业乙醚用硫酸亚铁或 10% 亚硫酸氢钠溶液振摇（除去过氧化物和水溶性杂质）1～3 次，无水氯化钙干燥，重蒸	
氯仿	61.2	5.2	1.489	以稀氢氧化钾洗涤，再用水洗 2～3 次，以无水氯化钙或无水碳酸钾干燥，重蒸	氯仿不能用金属钠干燥，易引起爆炸
乙酸乙酯	77.1	6.1	0.902	工业用乙酸乙酯用 5% 碳酸钠洗 1～2 次，以无水氯化钙干燥，重蒸	
丙酮	56.2	21.5	0.790	工业丙酮加 0.1% 高锰酸钾，摇匀，放 1～2 d（或回流 4 h，至高锰酸钾颜色不褪，以无水硫酸钠干燥，重蒸）	不宜用金属钠、五氧化二磷脱水，不宜用于处理氧化铝。经高锰酸钾处理后，重蒸时务必小心，蒸至小体积即可，不得蒸干。因有时候能产生过氧化物，引起爆炸
乙醇	78.8	25.8	0.794*	工业酒精加生石灰回流 2～4 h，重蒸	
甲醇	64.6	31.2	0.792	一般重蒸即可，如含有醛酮，可以用高锰酸钾大致测定醛酮含量，加过量的盐酸羟胺回流 4 h 后，重蒸	
吡啶	115.4		0.987*	用氢氧化钾干燥重蒸	

注：本表所列重蒸一般可收集沸点上下 2 ℃的馏出部分，所列相对密度均为 20 ℃时测定，* 则为 15 ℃时测定。

附录 4 常用有机溶剂与水的互溶度表

品名		A/B[①]/%			B/A[①]/%			备注
A	B	10 ℃	20 ℃	30 ℃	10 ℃	20 ℃	30 ℃	
丙酮	水							任意混溶，不共沸
乙酸	水							任意混溶，不共沸
1-戊醇	水	2.6		2.1	6.4		7.2	(v/v)共沸点：96.0 ℃
2-戊醇	水	7.5		5.3	8.0		8.8	(v/v)共沸点：92.5 ℃
3-戊醇	水	8.0		5.5	8.2		9.1	共沸点：91.7 ℃
苯	水	0.163	0.175	0.190	0.036	0.050	0.072	共沸点：69.3 ℃
正丁醇	水	8.9	7.8	7.1	19.7	20.0	20.6	共沸点：92.4 ℃
异丁醇	水	10.0[②]	8.5		15.0[②]	16.4		共沸点：89.9 ℃
四氯化碳	水		0.08		0.0071	0.0084	0.0109	
氯仿	水		0.097		0.06	0.097		共沸点：56.1 ℃
乙醚	水	8.9	6.6	5.1	1.1	1.2	1.3	共沸点：34.3 ℃
二乙酮	水		3.4			2.6		
二氧六环	水							任意混溶，不共沸
乙醇	水							任意混溶，共沸点 78.2 ℃
乙酸乙酯	水	8.88	7.94	7.22	2.61	3.01	3.04	共沸点：70.4 ℃
正己醇	水		0.58			7.2		
甲醇	水							任意混溶，不共沸
正丙醇	水							任意混溶，共沸点 87.7 ℃
异丙醇	水							任意混溶，共沸点 80.4 ℃
1,2-二氯乙烷	水	0.83	0.80	0.85	0.11	0.16	0.20	
二甲基甲酰胺	水							任意混溶
二甲亚砜	水							任意混溶
乙二醇	水							任意混溶
1,2-丙二醇	水							任意混溶

①A/B 表示 A 溶于 B 中的质量百分比；B/A 表示 B 溶于 A 中的质量百分比；②为 15 ℃时测定。

附录5　常用有机溶剂的物理常数表

溶剂	mp/℃	bp/℃	d_4^{20}	n_D^{20}	ε	R_D	μ
乙酸(acetic acid)	17	118	1.049	1.3716	6.15	12.9	1.68
丙酮(acetone)	−95	56	0.788	1.3587	20.7	16.2	2.85
乙腈(acetonitrile)	−44	82	0.782	1.3441	37.5	11.1	3.45
苯甲醚(anisole)	−3	154	0.994	1.5170	4.33	33	1.38
苯(benzene)	5	80	0.879	1.5011	2.27	26.2	0.00
溴苯(bromobenzene)	−31	156	1.495	1.5580	5.17	33.7	1.55
二硫化碳(carbon disulfide)	−112	46	1.274	1.6295	2.6	21.3	0.00
四氯化碳(carbon tetrachloride)	−23	77	1.594	1.4601	2.24	25.8	0.00
氯苯(chlorobenzene)	−46	132	1.106	1.5248	5.62	31.2	1.54
氯仿(chloroform)	−64	61	1.489	1.4458	4.81	21	1.15
环己烷(cyclohexane)	6	81	0.778	1.4262	2.02	27.7	0.00
丁醚(dibutyl ether)	−98	142	0.769	1.3992	3.1	40.8	1.18
邻二氯苯(*o*-dichlorobenzene)	−17	181	1.306	1.5514	9.93	35.9	2.27
1,2-二氯乙烷(1,2-dichloroethane)	−36	84	1.253	1.4448	10.36	21	1.86
二氯甲烷(dichloromethane)	−95	40	1.326	1.4241	8.93	16	1.55
二乙胺(diethylamine)	−50	56	0.707	1.3864	3.6	24.3	0.92
乙醚(diethyl ether)	−117	35	0.713	1.3524	4.33	22.1	1.30
1,2-二甲氧基乙烷 (1,2-dimethoxyethane)	−68	85	0.863	1.3796	7.2	24.1	1.71
N,*N*-二甲基乙酰胺 (*N*,*N*-dimethylacetamide)	−20	166	0.937	1.4384	37.8	24.2	3.72
N,*N*-二甲基甲酰胺 (*N*,*N*-dimethylformamide)	−60	152	0.945	1.4305	36.7	19.9	3.86
二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide)	19	189	1.096	1.4783	46.7	20.1	3.90
1,4-二氧六环(1,4-dioxane)	12	101	1.034	1.4224	2.25	21.6	0.45
乙醇(ethanol)	−114	78	0.789	1.3614	24.5	12.8	1.69
乙酸乙酯(ethyl acetate)	−84	77	0.901	1.3724	6.02	22.3	1.88
苯甲酸乙酯(ethyl benzoate)	−35	213	1.050	1.5052	6.02	42.5	2.00
甲酰胺(formamide)	3	211	1.133	1.4475	111.0	10.6	3.37
六甲基磷酰胺(hexamethylphosphoramide)	7	235	1.027	1.4588	30.0	47.7	5.54

续表

溶剂	mp/℃	bp/℃	d_4^{20}	n_D^{20}	ε	R_D	μ
异丙醇(isopropyl alcohol)	−90	82	0.786	1.3772	17.9	17.5	1.66
异丙醚(isopropyl ether)	−60	68		1.36			
甲醇(methanol)	−98	65	0.791	1.3284	32.7	8.2	1.70
2-甲基-2-丙醇(2-methyl-2-propanol)	26	82	0.786	1.3877	10.9	22.2	1.66
硝基苯(nitrobenzene)	6	211	1.204	1.5562	34.82	32.7	4.02
硝基甲烷(nitromethane)	−28	101	1.137	1.3817	35.87	12.5	3.54
吡啶(pyridine)	−42	115	0.983	1.5102	12.4	24.1	2.37
叔丁醇(*tert*-butyl alcohol)	25.5	82.5		1.3878			
四氢呋喃(tetrahydrofuran)	−109	66	0.888	1.4072	7.58	19.9	1.75
甲苯(toluene)	−95	111	0.867	1.4969	2.38	31.1	0.43
三氯乙烯(trichloroethylene)	−86	87	1.465	1.4767	3.4	25.5	0.81
三乙胺(triethylamine)	−115	90	0.726	1.4010	2.42	33.1	0.87
三氟乙酸(trifluoroacetic acid)	−15	72	1.489	1.2850	8.55	13.7	2.26
2,2,2-三氟乙醇(2,2,2-trifluoroethanol)	−44	77	1.384	1.2910	8.55	12.4	2.52
水(water)	0	100	0.998	1.3330	80.1	3.7	1.82
邻二甲苯(*o*-xylene)	−25	144	0.880	1.5054	2.57	35.8	0.62

注：mp 熔点；bp 沸点；d_4^{20} 密度；n_D^{20} 折射率；ε 介电常数；R_D 摩尔折射率；μ 偶极矩。

附录 6　常用有机溶剂的二元共沸溶液表

序号	溶剂	质量百分比/%	沸点 (770 mmHg)/℃	介电常数 (±0.0525 ℃)
1	乙酸乙酯 环己烷	46.0 54.0	71.6	3.95
2	异丙醇 二异丙醚	16.3 83.7	66.2	5.75
3	乙酸甲酯 环己烷	83.0 17.0	54.9	5.80
4	乙醇 氯仿	8.0 92.0	59.4	6.05

续表

序号	溶剂	质量百分比/%	沸点（770 mmHg)/℃	介电常数（±0.0525 ℃）
5	乙醇 四氯化碳	16.0 84.0	65.0	6.30
6	乙醇 苯	31.70 68.3	68.0	7.50
7	乙醇 庚烷	48.0 52.0	72.0	9.50
8	甲醇 氯仿	12.6 87.4	53.4	9.80
9	甲醇 二氯甲烷	7.3 92.7	37.8	10.50
10	甲醇 乙酸乙酯	17.7 82.3	53.9	10.75
11	丁酮 庚烷	73.0 27.0	77.0	10.75
12	甲醇 苯	39.1 60.9	57.5	13.40
13	丙酮 环己烷	67.5 32.5	58.0	13.75
14	乙醇 甲苯	68.0 32.0	76.5	17.25
15	丁酮 氯仿	83.0 17.0	79.9	17.30
16	丙酮 四氯化碳	87.4 12.6	56.0	19.30
17	甲醇 丙酮	12.0 88.0	56.4	22.05
18	水 乙醇	4.0 96.0	78.2	25.40

附录 7 常用有机溶剂的三元共沸溶液表

序号	溶剂	质量百分比/%	沸点(770 mmHg)/℃	介电常数(±0.0525 ℃)
1	甲醇 乙酸甲酯 氯仿	21.6 27.0 51.4	56.4	13.65
2	乙醇 丙酮 氯仿	10.4 24.3 65.3	63.2	13.90
3	甲醇 丙酮 氯仿	23.0 30.0 47.0	57.5	19.30
4	乙醇 苯 环己烷	30.4 10.8 58.8	65.05	6.56
5	甲醇 乙酸乙酯 环己烷	17.8 48.6 33.6	50.8	8.35
6	甲醇 丙酮 环己烷	16.0 43.5 40.5	51.1	13.25

附录 8 乙醇浓度稀释表

[浓乙醇 1000 mL 稀释时所需加水量(mL)(20 ℃)]

原乙醇浓度/%	拟稀释浓度/%												
	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
35	167												
40	335	114											
45	505	290	127										
50	647	436	255	114									
55	845	583	384	229	103								
60	1017	730	514	344	207	95							
65	1189	878	644	460	311	190	88						
70	1360	1027	774	577	417	285	175	81					
75	1535	1177	906	694	523	382	264	163	79				
80	1709	1327	1039	812	630	480	353	246	153	70			
85	1884	1478	1172	932	738	578	443	329	231	144	68		
90	2061	1630	1306	1052	847	677	535	414	310	218	138	65	
95	2239	1785	1443	1174	957	779	629	501	391	295	209	133	64

注：1) 将 95%(容量比)乙醇 1000 mL 稀释成 75%(容量比)乙醇，查表得知需加水 295 mL。

2) 将 75%(容量比)乙醇稀释成 40%乙醇，每 1000 mL 浓乙醇中需加水 906 mL。

3) 现需用 75%乙醇 100 mL，应取 95%乙醇的体积可通过如下计算得出：

需用浓度×需用量＝现有浓度×现有浓度溶液应取量

75%×100＝95%×现有浓度溶液应取量

应取 95%乙醇量＝0.75×100/0.95＝78.94 mL

即取 95%乙醇 78.94 mL，加水稀释至 100 mL 即得。

附录 9　常用商品酸碱浓度表

试剂名称	密度(20℃)/(g·mL^{-1})	浓度/(mol·L^{-1})	质量分数/%
浓硫酸	1.84	18.0	96.0
浓盐酸	1.19	12.1	37.2
浓硝酸	1.42	15.9	70.4
磷酸	1.70	14.8	85.5
冰醋酸	1.05	17.45	99.8
浓氨水	0.90	14.53	56.6

注：表中数据录自 John A. Dean. Lange's Handbook of Chemistry. 13th ed. 1985.

附录 10　常用酸碱浓度及配制方法

名称(分子式)	相对密度	质量分数	近似摩尔浓度	配制 1L 溶液所用的体积/mL(或质量/g)			
	(d)	/%	/(mol·L^{-1})	6 mol·L^{-1}	3 mol·L^{-1}	2 mol·L^{-1}	1 mol·L^{-1}
盐酸(HCl)	1.18～1.19	36～38	12	500	250	167	83
硝酸(HNO_3)	1.39～1.40	65～68	15	381	191	128	64
硫酸(H_2SO_4)	1.83～1.84	95～98	18	84	42	28	14
冰醋酸(HAc)	1.05	99.9	17	253	177	118	59
磷酸(H_3PO_4)	1.69	85	15	39	19	12	6
氨水($NH_3 \cdot H_2O$)	0.90～0.91	28	15	400	200	134	77
氢氧化钠(NaOH)				(240)	(120)	(80)	(40)
氢氧化钾(KOH)				(339)	(170)	(113)	(56.5)

附录 11　相对密度与波美度换算表

(适用于相对密度大于水的溶液)

二者换算公式：相对密度＝145/(145－波美度)

相对密度	波美度	相对密度	波美度	相对密度	波美度	相对密度	波美度
1.007	1	1.098	13	1.261	30	1.559	52
1.014	2	1.107	14	1.283	32	1.593	54
1.021	3	1.115	15	1.306	34	1.629	56
1.028	4	1.124	16	1.330	36	1.666	58
1.036	5	1.133	17	1.355	38	1.706	60
1.043	6	1.142	18	1.381	40	1.747	62
1.051	7	1.151	19	1.408	42	1.770	64
1.058	8	1.160	20	1.436	44	1.835	66
1.066	9	1.179	22	1.465	46	1.883	68
1.074	10	1.198	24	1.495	48	1.933	70
1.082	11	1.218	26	1.526	50	2.000	72.5
1.090	12	1.239	28				

附录 12 常用缓冲液的配制

附表 12.1 Na_2HPO_4-柠檬酸缓冲液

pH	0.2 mol·L^{-1} Na_2HPO_4/mL	0.1 mol·L^{-1} 柠檬酸/mL	pH	0.2 mol·L^{-1} Na_2HPO_4/mL	0.1 mol·L^{-1} 柠檬酸/ mL
2.2	0.40	19.60	5.2	10.72	9.28
2.4	1.24	18.76	5.4	11.15	8.85
2.6	2.18	17.82	5.6	11.60	8.40
2.8	3.17	16.83	5.8	12.09	7.91
3.0	4.11	15.89	6.0	12.63	7.37
3.2	4.94	15.06	6.2	13.22	6.78
3.4	5.70	14.30	6.4	13.85	6.15
3.6	6.44	13.56	6.6	14.55	5.45
3.8	7.10	12.90	6.8	15.45	4.55
4.0	7.71	12.29	7.0	16.47	3.53
4.2	8.28	11.72	7.2	17.39	2.61
4.4	8.82	11.18	7.4	18.17	1.83
4.6	9.35	10.65	7.6	18.73	1.27
4.8	9.86	10.14	7.8	19.15	0.85
5.0	10.30	9.70	8.0	19.45	0.55

注：本表中的 0.2 mol·L^{-1} Na_2HPO_4 是由 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 制备而成；0.1 mol·L^{-1}柠檬酸是由柠檬酸·H_2O 制备而成。

附表 12.2 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(0.1 mol·L^{-1})

pH	0.1 mol·L^{-1} 柠檬酸/mL	0.1 mol·L^{-1} 柠檬酸钠/mL	pH	0.1 mol·L^{-1} 柠檬酸/mL	0.1 mol·L^{-1} 柠檬酸钠/mL
3.0	18.6	1.4	5.0	8.2	11.8
3.2	17.2	2.8	5.2	7.3	12.7
3.4	16.0	4.0	5.4	6.4	13.6
3.6	14.9	5.1	5.6	5.5	14.5
3.8	14.0	6.0	5.8	4.7	15.3
4.0	13.1	6.9	6.0	3.8	16.2
4.2	12.3	7.7	6.2	2.8	17.2
4.4	11.4	8.6	6.4	2.0	18.0
4.6	10.3	9.7	6.6	1.4	18.6
4.8	9.2	10.8			

注：本表中的 0.1 mol/L 柠檬酸是由柠檬酸·H_2O 制备而成；0.1 mol/L 柠檬酸钠是由柠檬酸钠·H_2O 制备而成。

附表 12.3　甘氨酸-盐酸缓冲液(0.05 mol·L^{-1})

pH	0.2 mol·L^{-1} 甘氨酸/mL	0.2 mol·L^{-1} HCl/mL	pH	0.2 mol·L^{-1} 甘氨酸/mL	0.2 mol·L^{-1} HCl/mL
2.2	50	44.0	3.0	50	11.4
2.4	50	32.4	3.2	50	8.2
2.6	50	24.2	3.4	50	6.4
2.8	50	16.8	3.6	50	5.0

注：取表中与 pH 相对应体积的甘氨酸与盐酸混合再加水稀释至 200 mL，即得所需 pH 的缓冲液。

附表 12.4　邻苯二甲酸-盐酸缓冲液(0.05 mol·L^{-1})

pH (20 ℃)	0.2 mol·L^{-1} 邻苯二甲酸氢钾/mL	0.2 mol·L^{-1} HCl /mL	pH (20 ℃)	0.2 mol·L^{-1} 邻苯二甲酸氢钾/mL	0.2 mol·L^{-1} HCl /mL
2.2	5	4.670	3.2	5	1.470
2.4	5	3.960	3.4	5	0.990
2.6	5	3.295	3.6	5	0.597
2.8	5	2.642	3.8	5	0.263
3.0	5	2.032			

注：取表中与 pH 相对应体积的邻苯二甲酸氢钾与盐酸混合再加水稀释到 20 mL。

附表 12.5　乙酸缓冲液(0.2 mol·L^{-1})

pH (18 ℃)	0.2 mol·L^{-1} NaAc	0.2 mol·L^{-1} HAc	pH (18 ℃)	0.2 mol·L^{-1} NaAc	0.2 mol·L^{-1} HAc
3.6	0.75	9.25	4.8	5.90	4.10
3.8	1.20	8.80	5.0	7.00	3.00
4.0	1.80	8.20	5.2	7.90	2.10
4.2	2.65	7.35	5.4	8.60	1.40
4.4	3.70	6.30	5.6	9.10	0.90
4.6	4.90	5.10	5.8	9.40	0.60

注：本表中的 0.2 mol/L NaAc 是由 $NaAc \cdot 3H_2O$ 制备而成。

附表 12.6 磷酸盐缓冲液(0.2 mol · L^{-1})

pH	0.2 mol · L^{-1} Na_2HPO_4/mL	0.2 mol · L^{-1} NaH_2PO_4/mL	pH	0.2 mol · L^{-1} Na_2HPO_4/mL	0.2 mol · L^{-1} NaH_2PO_4/mL
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
5.9	10.0	90.0	7.1	67.0	33.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.1	15.0	85.0	7.3	77.0	23.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.3	22.5	77.5	7.5	84.0	16.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.5	31.5	68.5	7.7	89.5	10.5
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.7	43.5	56.5	7.9	93.0	7.0
6.8	49.5	51.0	8.0	94.7	5.3
6.9	55.0	45.0			

注：$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 的相对分子质量为 178.05，0.2 mol · L^{-1} 溶液相当于 35.61g · L^{-1}；$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 的相对分子质量为 358.22，0.2 mol · L^{-1} 溶液相当于 71.64 g · L^{-1}；$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 的相对分子质量为 138.0，0.2 mol · L^{-1} 溶液相当于 27.6 g · L^{-1}；$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 的相对分子质量为 156.03，0.2 mol · L^{-1} 溶液相当于 31.21g · L^{-1}。

附表 12.7 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液(0.05 mol · L^{-1})

pH (20 ℃)	0.2 mol · L^{-1} KH_2PO_4/mL	0.2 mol · L^{-1} NaOH/mL	pH (20 ℃)	0.2 mol · L^{-1} KH_2PO_4/mL	0.2 mol · L^{-1} NaOH/mL
5.8	5	0.372	7.0	5	2.963
6.0	5	0.570	7.2	5	3.500
6.2	5	0.860	7.4	5	3.950
6.4	5	1.260	7.6	5	4.280
6.6	5	1.780	7.8	5	4.520
6.8	5	2.365	8.0	5	4.680

注：取表中与 pH 相对应体积的磷酸二氢钾与氢氧化钠混合再加水稀释到 20 mL。

附表 12.8　巴比妥缓冲液

pH (18 ℃)	0.04 mol·L^{-1}巴比妥钠/mL	0.2 mol·L^{-1}盐酸/mL	pH (18 ℃)	0.04 mol·L^{-1}巴比妥钠/mL	0.2 mol·L^{-1}盐酸/mL
6.8	100	18.4	8.4	100	5.21
7.0	100	17.8	8.6	100	3.82
7.2	100	16.7	8.8	100	2.52
7.4	100	15.3	9.0	100	1.65
7.6	100	13.4	9.2	100	1.13
7.8	100	11.47	9.4	100	0.70
8.0	100	9.39	9.6	100	0.35
8.2	100	7.21			

附表 12.9　硼酸-硼砂缓冲液(0.2 mol·L^{-1}硼酸根)

pH	0.05 mol/L 硼砂/mL	0.2 mol·L^{-1}硼酸/mL	pH	0.05 mol·L^{-1}硼砂/mL	0.2 mol·L^{-1}硼酸/mL
7.4	1.0	9.0	8.2	3.5	6.5
7.6	1.5	8.5	8.4	4.5	5.5
7.8	2.0	8.0	8.7	6.0	4.0
8.0	3.0	7.0	9.0	8.0	2.0

注：本表中 0.05 mol/L 硼砂由 $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 制备而成；十水硼砂易失去结晶水，必须在带塞的瓶中保存。

附表 12.10　甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(0.05 mol·L^{-1})

pH	0.2 mol·L^{-1}甘氨酸/mL	0.2 mol·L^{-1} NaOH/mL	pH	0.2 mol·L^{-1}甘氨酸/mL	0.2 mol·L^{-1} NaOH/mL
8.6	50	4.0	9.6	50	22.4
8.8	50	6.0	9.8	50	27.2
9.0	50	8.8	10.0	50	32.0
9.2	50	12.0	10.4	50	38.6
9.4	50	16.8	10.6	50	45.5

注：取表中与 pH 相对应体积的甘氨酸溶液与氢氧化钠溶液混合，再加水稀释到 200 mL。

附表 12.11 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液(0.1 mol·L^{-1})

pH		0.1 mol·L^{-1} Na_2CO_3 /mL	0.1 mol·L^{-1} $NaHCO_3$ /mL
20 ℃	37 ℃		
9.16	8.77	1	9
9.40	9.12	2	8
9.51	9.40	3	7
9.78	9.50	4	6
9.90	9.72	5	5
10.14	9.90	6	4
10.28	10.08	7	3
10.53	10.28	8	2
10.83	10.57	9	1

注：本表中 0.1 mol·L^{-1} Na_2CO_3 由 $Na_2CO_2 \cdot 10H_2O$ 制备而成；Ca^{2+}、Mg^{2+}存在时不得使用。

附表 12.12 Tris-盐酸缓冲液(0.05 mol·L^{-1},25 ℃)

pH	X/mL	pH	X/mL
7.10	45.7	8.10	26.2
7.20	44.7	8.20	22.9
7.30	43.4	8.30	19.9
7.40	42.0	8.40	17.2
7.50	40.3	8.50	14.7
7.60	38.5	8.60	12.4
7.70	36.6	8.70	10.3
7.80	34.5	8.80	8.5
7.90	32.0	8.90	7.0
8.00	29.2		

注：配制方法为 25 mL 0.2 mol·L^{-1}(Tris)溶液与 X mL 0.1 mol·L^{-1}盐酸加水稀释至 100 mL。Tris 溶液可从空气中吸收二氧化碳，使用时注意将瓶盖严。

附表 12.13　硼砂-氢氧化钠缓冲液(0.05 mol·L^{-1}硼酸根)

pH	0.5 mol·L^{-1}硼砂/mL	0.2 mol·L^{-1} NaOH/mL	pH	0.5 mol·L^{-1}硼砂/mL	0.2 mol·L^{-1} NaOH/mL
9.3	50	0.0	9.8	50	34.0
9.4	50	11.0	10.0	50	43.0
9.6	50	23.0	10.1	50	46.0

注：本表中0.5 mol·L^{-1}硼砂由$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$制备而成。取表中与pH相对应体积的硼砂溶液与氢氧化钠溶液混合，再加水稀释到200 mL。

附录13　用于有机溶剂的中等强度的干燥剂

干燥剂	容量①	相对速率②	注
$CaSO_4$	$1/2H_2O$	极快(1)	以商品名Drieritt出售，加或不加颜色指示剂；非常有效，干时，指示剂($CaSO_4$)呈蓝色，吸水后变成粉红色(容量$CaSO_4 \cdot 6H_2O$)；适用的温度范围为−50～+86 ℃。某些有机溶剂能使$CaSO_4$沥出或改变颜色(如丙酮、醇类、吡啶等)
$CaCl_2$	$6H_2O$	极快(2)	不是很有效；只用于烃或卤代烃(与含氮和含氮化合物形成溶剂化物、络合物或发生反应)
$MgSO_4$	$7H_2O$	极快(4)	出色的通用干燥剂；非常惰性，但可能呈弱酸性(避免用于对酸极敏感的化合物)，可能溶于某些有机溶剂
4 Å分子筛	高	快(30)	非常有效；建议先用普通干燥剂后再用此物(见下述有关分子筛的详情)，3Å分子筛也是出色的干燥剂
Na_2SO_4	$10H_2O$	慢(290)	非常温和，非常有效，便宜，高容量；很适于初步干燥，但不可以使溶剂受热
K_2CO_3	$2H_2O$	快	对于酯、腈、酮，特别是醇，是良好的干燥剂，不可以用于酸性化合物
NaOH，KOH	极高	快	高效，但只适用于不会使它们溶解的惰性溶液；特别适用于胺
H_2SO_4	极高	极快	极为有效，但只限于用来干燥饱和烃、芳香烃或卤代烃(硫酸会与烯或其他碱性化合物作用而使之损失)
氧化铝或硅胶	极高	极快	特别适用于烃，应该研细；用过后加热(SiO_2为300 ℃，Al_2O_3为500 ℃)就可以重新活化

① 每摩尔干燥剂吸收的水的摩尔数(最大量)；② 相对速率，前五行中括号内的数字是指苯的相对干燥速率，数字小的表示干燥快；溶剂改变时候，吸水率低的干燥剂的次序会发生变化。

附录 14　国产主要大孔吸附树脂性能表

型号	生产企业	含水量/%	密度/(g·mL^{-1})		比表面积/(m^2·g^{-1})	粒度/目	平均孔径/Å	操作条件		用途
			湿真密度	湿视密度				最高使用温度/℃	树脂装柱高度/m	
SIPI-5B	上海亚东核级树脂有限公司	60～70	1.03～1.07	0.66～0.73	950～1100		15～20	180	2	维生素 B_{12}、黄酮、蒽醌类的提取
SIPI-7	上海亚东核级树脂有限公司	62～73	1.06～1.10	0.68～0.72	450～500		75～80	180	2	提取甜叶菊、茶多酚、黄酮甾醇、酚类
SIPI-8	上海亚东核级树脂有限公司	65～70	1.01～10.5	0.63～0.70	850～1000	13～47	25～50	150	2	
SIPI-10	上海亚东核级树脂有限公司	65～75	1.01～1.05	0.60～0.70	500～650	13～47		150		
SIPI-21	上海亚东核级树脂有限公司		1.01～1.05	0.62～0.70	360～500	13～47	520	150	1.1～2	
SIPI-40	上海亚东核级树脂有限公司	65～75	1.01～1.05	0.60～0.70	550～650	13～47	45～50	150	2	提取银杏黄酮、大豆异黄酮等黄酮类
SIPI-1300	上海亚东核级树脂有限公司	48～52		0.64～0.70	＞480	20～60				
SIPI-700	上海亚东核级树脂有限公司	75～85	1.02～1.10	0.60～0.70	150～260	13～47	20～30			制糖、医药工业中脱除水溶性及醇溶性色素和杂质
SIPI-YD-318	上海亚东核级树脂有限公司	57～65	1.03～1.08	0.7～0.8	500～600	20～50	90			水处理的前置处理代替活性炭，中草药的提取和脱色，天然色素的提取

续表

型号	生产企业	含水量/%	密度/(g·mL^{-1})		比表面积/(m^2·g^{-1})	粒度/目	平均孔径/Å	操作条件		用途
			湿真密度	湿视密度				最高使用温度/℃	树脂装柱高度/m	
SIPI-HZ-802	上海亚东核级树脂有限公司	57～94	1.05～1.10	0.65～0.67	450～550	20～50	100			水处理的前置处理代替活性炭，中草药的提炼和脱色，辅酶A和色氨酸的提取
SIPI-HZ-803	上海亚东核级树脂有限公司	48～54	1.05～1.10	0.65～0.67	550～600	20～50	60			抗生素的提炼和精制，糖类的脱色，食用香精的提取，α-环糊精的精制，工业废水的处理
SIPI-HZ-841	上海亚东核级树脂有限公司	57～65	1.03～1.08	0.7～0.8	500～600	20～50	90			水处理的前置处理代替活性炭，中草药的提炼和精制，天然色素的提取，工业废水的处理
SIPI-HP-10	上海亚东核级树脂有限公司	55～65	1.01～1.08	0.60～0.70	≥720	13～47	720			
SIPI-XAD-1	上海亚东核级树脂有限公司	48～52	1.05～1.15	0.65～0.79	800～1000	13～47	26～32			酚的浓缩分离及有机工业废水处理，特别用来处理含酚及其衍生物的废水，对胺、苯胺类有机物的回收
SIPI-XAD-4	上海亚东核级树脂有限公司	60～65	1.01～1.05	0.62～0.70	≥550	13～47		260		维生素B_{12}及多种抗生素的提取
SIPI-XAD-5	上海亚东核级树脂有限公司	60～65	1.01～1.05	0.63～0.70	560～700		25～30	180	2	提取银杏黄酮、辅酶A、抗生素、人参皂苷，脱色
SIPI-XAD-10	上海亚东核级树脂有限公司		1.02～1.07	0.60～0.70	420～460		60～70			在生产低度白酒时用于除去高级脂肪酸酯类
SIPI-XAD-16	上海亚东核级树脂有限公司	62～70		0.70～0.75	≥830	13～47		260		头孢霉素等抗生素的提取，对阿维菌素、亿维菌素、氯洁霉素磷酸酯具有好的吸附效果，从极性溶液中去除非极性化合物

续表

型号	生产企业	含水量/%	密度/(g·mL^{-1})		比表面积/(m^2·g^{-1})	粒度/目	平均孔径/Å	操作条件		用途
			湿真密度	湿视密度				最高使用温度/℃	树脂装柱高度/m	
D101	天津市海光化工有限公司	65～70			≥400	16～60				分离纯化非极性有机化合物
DA-201	天津市海光化工有限公司	65～75			≥150	16～60				分离纯化带极性的有机化合物
DM-301	天津市海光化工有限公司	65～70			≥150	16～60				分离纯化带极性的有机化合物
DS-401	天津市海光化工有限公司	65～70			≥500	16～60				分离纯化弱极性的有机化合物
1100	江苏太仓争光树脂有限公司	58～64		～0.65	400～500	16～50				水处理的前置处理，医药工业的提炼和脱色，处理工业废水中的非极性有机物
1300	江苏太仓争光树脂有限公司	58～64		～0.65	700～800	16～50				水处理的前置处理代替活性炭，医药工业生物和中草药的提炼和脱色，抗生素的提炼，工业废水的处理
DA-53	江苏太仓争光树脂有限公司	50～60		～0.65	550～600	20～50	～30			头孢菌素 C、洁霉素、红霉素、利福霉素、皂苷、辅酶 A 等有机物吸附，甜叶菊、妥布霉素等脱色，水处理，气体吸附，血液灌流，新抗生素筛选常用材料
D_2	南开大学				382		133			
D_6	南开大学				466		73			
D_8	南开大学				712		66			
DS_2	南开大学				642		59			

续表

型号	生产企业	含水量/%	密度/(g·mL^{-1})		比表面积/(m^2·g^{-1})	粒度/目	平均孔径/Å	操作条件		用途
			湿真密度	湿视密度				最高使用温度/℃	树脂装柱高度/m	
DM_2	南开大学				266		24			广泛用于头孢霉素的吸附提取，对依维菌素、阿维菌素、氯洁霉素磷酸脂具有较好的吸附效果
D_{101}	南开大学				400		100			主要用于银杏黄酮、人参皂苷、三七皂苷、双花链翘、茶多酚、大豆异黄酮、葛根素、甜菊糖、甘草酸、叶绿素等天然药物的提取和精制
CD180	山东鲁抗				40～90					用于提取分离丁胺卡那霉素等氨基糖苷类半合成抗生素
CAD40	山东鲁抗				550～600		90～100			
CAD45	山东鲁抗				450～500		50～60			维生素 B_{12} 及其他抗生素的吸附提取，生化制药(辅酶)
DM11	山东鲁抗				≥500		70～80			广泛用于头孢霉素以及甜菊糖苷、人参皂苷等的吸附提取，对依维菌素、阿维菌素、氯洁霉素磷酸脂具有较好的吸附效果
DM130	山东鲁抗				500～550		90～100			主要用于银杏黄酮、人参皂苷、茶多酚等天然药物的提取和精制
GDX-104	天津试剂二厂				590					
GDX-401	天津试剂二厂				370					
GDX-501	天津试剂二厂				80					
GDX-601	天津试剂二厂				90					

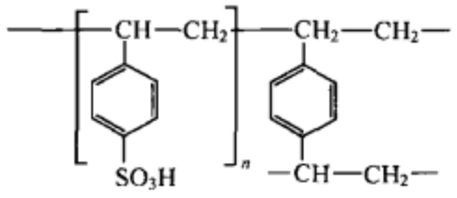
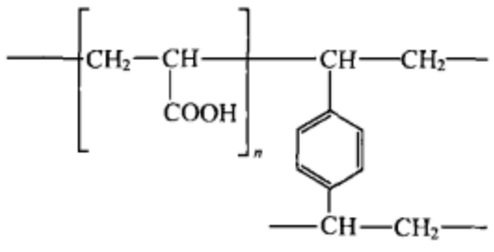
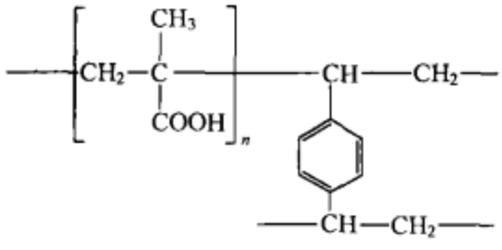
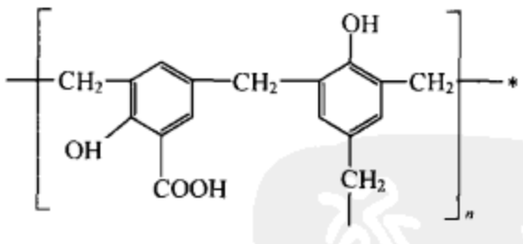
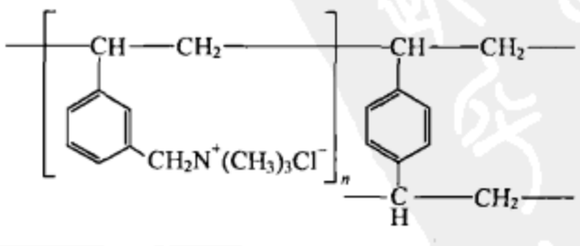
附录 15　国外主要大孔吸附树脂性能表

型号	生产企业	树脂结构	极性	骨架密度 /(g·mL^{-1})	比表面积 /(m^2·g^{-1})	孔径 /nm	孔度/%
Amberlite XAD-1	美国 Rohm&Haas	苯乙烯	非极性	1.07	100	20	37
Amberlite XAD-2	美国 Rohm&Haas	苯乙烯	非极性	1.07	330	6	42
Amberlite XAD-3	美国 Rohm&Haas	苯乙烯	非极性		526	4.4	
Amberlite XAD-4	美国 Rohm&Haas	苯乙烯	非极性	1.08	750	5	51
Amberlite XAD-5	美国 Rohm&Haas	苯乙烯	非极性		415	6.8	
Amberlite XAD-6	美国 Rohm&Haas	丙烯酸酯	中极性		498	6.3	
Amberlite XAD-7	美国 Rohm&Haas	α-甲基丙烯酸酯	中极性	1.24	450	8	55
Amberlite XAD-8	美国 Rohm&Haas	α-甲基丙烯酸酯	中极性	1.23	140	25	52
Amberlite XAD-9	美国 Rohm&Haas	亚砜	极性	1.26	250	8	45
Amberlite XAD-10	美国 Rohm&Haas	丙烯酰胺	极性		69	35.2	
Amberlite XAD-11	美国 Rohm&Haas	氧化氮类	强极性	1.18	170	21	41
Amberlite XAD-12	美国 Rohm&Haas	氧化氮类	强极性	1.17	25	130	45
Amberlite XAD-16	美国 Rohm&Haas		强极性			150	
Amberlite XAD-1600	美国 Rohm&Haas					150	
Amberlite XAD-1180	美国 Rohm&Haas					400	

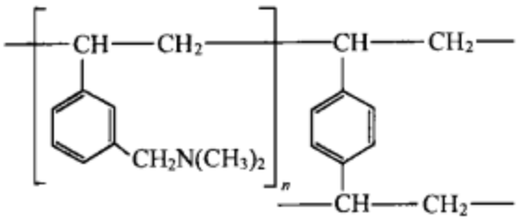
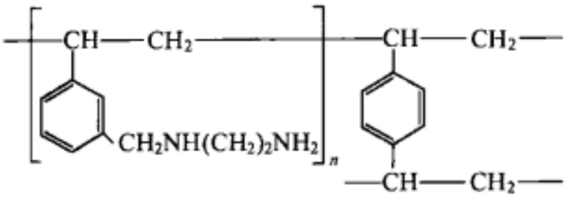
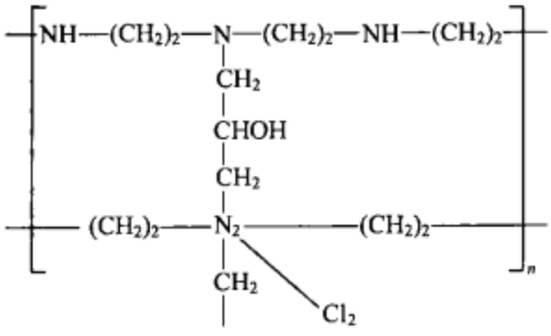
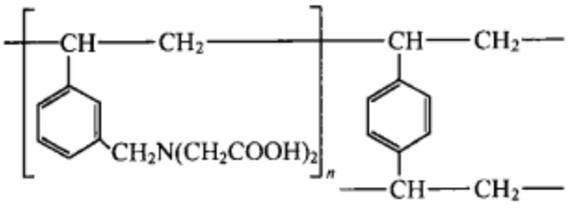
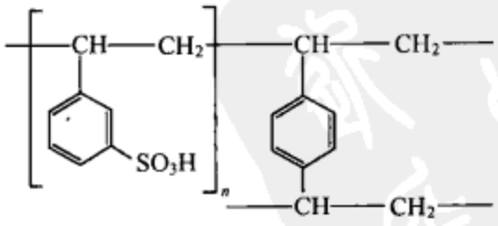
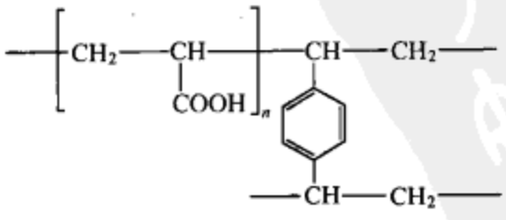
续表

型号	生产企业	树脂结构	极性	骨架密度 /(g·mL^{-1})	比表面积 /(m^2·g^{-1})	孔径 /nm	孔度/%
Amberlite XAD-7HP	美国 Rohm&Haas					450	
Amberlite XAD-761	美国 Rohm&Haas					600	
Diaion HP-10	日本 Organo 三菱化成	苯乙烯	非极性	0.64	400	3	小
Diaion HP-20	日本 Organo 三菱化成	苯乙烯	非极性	1.16	600	4.6	大
Diaion HP-21	日本 Organo 三菱化成	苯乙烯	非极性	1.1	570	8	
Diaion HP-30	日本 Organo 三菱化成	苯乙烯	非极性	0.87	500～600	2.5	大
Diaion HP-40	日本 Organo 三菱化成	苯乙烯	非极性	0.63	600～700	2.5	小
Diaion HP-50	日本 Organo 三菱化成	苯乙烯	非极性	0.81	400～500	9.0	
Diaion HP2MG	日本 Organo 三菱化成	异丁烯	中极性	1.2	470	17	
Sepabeads SP850	日本 Organo 三菱化成	苯乙烯	非极性	1.2	1000	3.8	
Sepabeads SP825	日本 Organo 三菱化成	苯乙烯	非极性	1.4	1000	5.7	
Sepabeads SP70	日本 Organo 三菱化成	苯乙烯	非极性	1.6	800	7	
Sepabeads SP700	日本 Organo 三菱化成	苯乙烯	非极性	2.3	1200	9	
Sepabeads SP207	日本 Organo 三菱化成	苯乙烯	非极性	1.3	630	10.5	

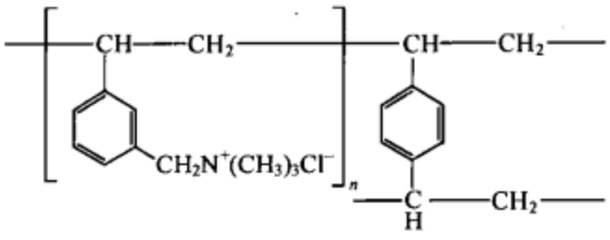
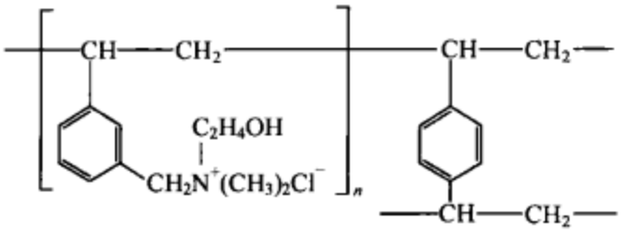
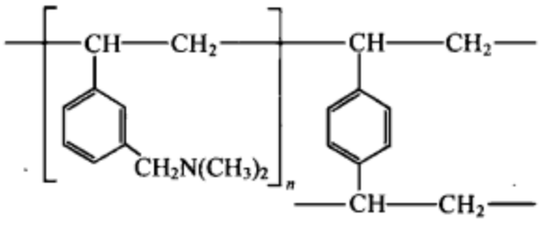
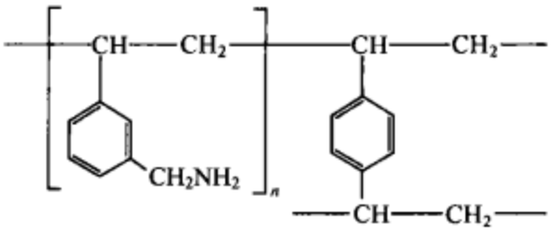
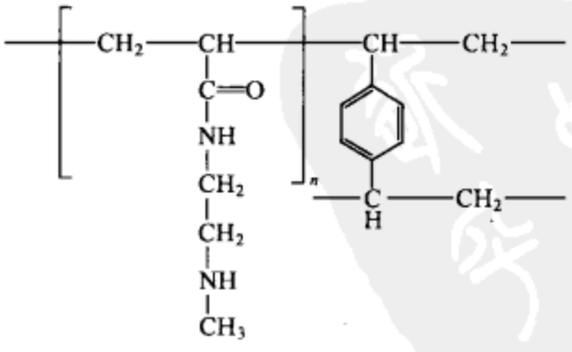
附录 16 离子交换树脂形态、分类、全名称、结构与型号对照表

形态	分类	全名称	结构	型号
凝胶型	强酸性	强酸性苯乙烯阳离子交换树脂		001
	弱酸性	弱酸性丙烯酸阳离子交换树脂		111
				112
		弱酸性酚醛系阳离子交换树脂		122
	强碱性	强碱性季铵Ⅰ型阴离子交换树脂		201

续表

形态	分类	全名称	结构	型号
凝胶型	弱碱性	弱碱性苯乙烯系阴离子交换树脂		301
				303
		弱碱性环氧系阴离子交换树脂		331
	螯合性	螯合性胺羧基离子交换树脂		401
大孔型	强酸性	大孔型强酸苯乙烯系阳离子交换树脂		D001
	弱酸性	大孔弱酸丙烯酸系阳离子交换树脂		D111

续表

形态	分类	全名称	结构	型号
大孔型	强碱性	大孔强碱性季铵Ⅰ型阴离子交换树脂		D201
		大孔强碱性季铵Ⅱ型阴离子交换树脂		D202
	弱碱性	大孔弱碱性苯乙烯系阴离子交换树脂		D301
		大孔弱碱性苯乙烯系阴离子交换树脂		D302
		大孔弱碱性丙烯酸系阴离子交换树脂		D311

附录 17　国外主要尺寸排阻凝胶填料性能表

附表 17.1　Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(Amersham 公司)性能表

项目	性能
排阻极限	4～5 kD(与所用溶剂有关)
上样量	取决于所需分辨率
尺寸排阻模式	小于总体积的 20%
正相分配模式	小于总体积的 1%
胶粒形状	球形、多孔
颗粒大小(干)	18～111 μm(直径)
颗粒大小中间值(干)	70 μm(直径)
颗粒大小(甲醇)	27～163 μm(直径)
颗粒大小中间值(甲醇)	103 μm(直径)
最大线性流速	720 cm · min^{-1}
线性流速	60 cm · min^{-1}
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 pH 2 以下或强氧化剂中不稳定
高压灭菌	121 ℃可忍受 20 min
操作温度	4～40 ℃
保存条件	
新填料	4～25 ℃(干燥)
使用后填料	4～8 ℃,pH 6～8,切勿冷冻,加入抑菌剂 (如 20%乙醇,0.04%叠氮钠)

附表 17.2　SEC 凝胶过滤填料(Amersham 公司)性能表

种类	产品	分离范围(球蛋白)	颗粒大小/μm	特性/应用	pH 稳定性工作(清洗)	耐压/MPa	最高流速/(cm·h^{-1})
Superdex	Superdex 30 perp grade	<10 000	22～44	重组蛋白肽类、多糖、小蛋白等	3～12(1～14)	0.3	90
	Superdex 75 perp grade	3000～70 000	22～44	重组蛋白、细胞色素	3～12(1～14)	0.3	90
	Superdex 200 perp grade	10 000～600 000	22～44	单抗、大蛋白	3～12(1～14)	0.3	90
Superose	Superdex 6 perp grade	5000～5×10^6	20～40	肽类蛋白、多糖、寡核苷酸、病毒	3～12(1～14)	0.4	40
	Superdex 12 perp grade	1000～300 000	20～40	肽类蛋白、多糖	3～12(1～14)	0.7	40
Sephacryl	Sephacryl S-100 HR	100～100 000	25～75	肽类、激素、小蛋白	3～11(2～13)	0.2	60
	Sephacryl S-200 HR	5000～250 000	25～75	蛋白质、如血清蛋白、白蛋白、血液抗体、单抗(IgG/MAB)	3～11(2～13)	0.2	60
	Sephacryl S-300 HR	10 000～1.5×10^6	25～75	蛋白质,如膜蛋白和血清蛋白、血液抗体、单抗(IgG/MAB)	3～11(2～13)	0.2	60
	Sephacryl S-400 HR	20 000～8×10^6	25～75	多糖、具延伸结构的大分子如蛋白多糖,脂质体<25 000 bp DNA 限制片段	3～11(2～13)	0.2	60
	Sephacryl S-500 HR	葡聚糖 40 000～2×10^7	25～75	<25 000 bp DNA 限制片段	3～11(2～13)	0.2	50
	Sephacryl S-1000 HR	葡聚糖 5×10^5～1×10^8	40～105	巨大多糖分子,如蛋白多糖;小颗粒分子,如<300～400 nm 的膜结合囊或病毒	3～11(2～13)	0.2	40
Supharose Fast Flow	Sepharose 6 Fast Flow	<10 000～4×10^6	45～165	巨大分子,如 DNA 质粒、病毒	2～12(2～14)	0.1	300
	Sepharose 4 Fast Flow	60 000～20×10^6	45～165	巨大分子,如重组乙型肝炎表面抗原、病毒	2～12(2～14)	0.1	250

续表

种类	产品	分离范围（球蛋白）	颗粒大小/μm	特性/应用	pH 稳定性 工作(清洗)	耐压 /MPa	最高流速 /(cm·h^{-1})
Sepharose	Sepharose 2B	70 000～4×10^6	60～200	蛋白质、大分子复合物、病毒、不对称分子，如核酸和多糖(蛋白多糖)的分离、相对分子质量的测定	4～9(3～11)	0.004	10
	Sepharose 4B	60 000～20×10^6	45～165	蛋白质、多糖、肽类、相对分子质量的测定	4～9(3～11)	0.008	11.5
	Sepharose 6B	10 000～4×10^6	45～165	蛋白质、多糖、肽类相对分子质量的测定	4～9(3～11)	0.02	14
Sepharose CL	Sepharose CL-2B	70 000～40×10^6	60～200	蛋白质、大分子复合物、病毒核酸、蛋白多糖相对分子质量的测量，特别是不能溶解/凝集于水溶液的分子	3～13(2～14)	0.005	15
	Sepharose CL-4B	60 000～20×10^6	45～165	大蛋白质、肽类、多糖，特别是不能溶解/凝集于水溶液的分子的测定	3～13(2～14)	0.0012	26
	Sepharose CL-6B	10 000～4×10^6	45～165	蛋白质、肽类、多糖，特别是不能溶解/凝集于水溶液的分子的测定	3～13(2～14)	0.02	30
Sephadex	Pharmadex G-10	<700	干粉 40～120	分离相对分子质量接近的小分子、去除单核细胞、实验室中的缓冲液交换、脱盐、去除酶的小分子	2～13(2～13)		40
	Sephadex G-15	100～1500(肽)	干粉 40～120	实验室中的缓冲液交换，脱盐，去除酶的分子，分离相对分子质量接近的小分子、肽等	2～13(2～13)		—
	Sephadex G-25 Coarse	1000～5000(肽)	干粉 100～300	工业上去盐及交换缓冲液用	2～13 (2～13)		—
	Sephadex G-25 Medium	1000～5000	干粉 50～150	工业上去盐及交换缓冲液用	2～13(2～13)		150

续表

种类	产品	分离范围（球蛋白）	颗粒大小/μm	特性/应用	pH稳定性 工作(清洗)	耐压/MPa	最高流速/(cm·h^{-1})
Sephadex	Sephadex G-25 Fine	1000～5000	干粉 20～80	工业上去盐及交换缓冲液用	2～13(2～13)		60
	Sephadex G-25 Super Fine	1000～5000	干粉 20～50	工业上去盐及交换缓冲液用	2～13(2～13)		20
	Sephadex G-50 Coarse	1000～30 000	干粉 100～300	肽类分离、脱盐、清洗生物提取液、相对分子质量测定	2～10(2～13)		—
	Sephadex G-50 Medium	1000～30 000	干粉 50～150	肽类分离、脱盐、清洗生物提取液、相对分子质量测定	2～10(2～13)		—
	Sephadex G-50 Fine	1000～30 000	干粉 20～80	肽类分离、脱盐、清洗生物提取液、相对分子质量测定	2～10(2～13)		60
	Sephadex G-50 Super Fine	1000～30 000	干粉 20～50	肽类分离、脱盐、清洗生物提取液、相对分子质量测定	2～10(2～13)		—
	Sephadex G-75	3000～30 000	干粉 40～120	蛋白质的纯化和分离、相对分子质量的测定，平衡常数的测定	2～10(2～13)		77
	Sephadex G-75 Super Fine	2000～70 000	干粉 20～50	肽类分离、脱盐、清洗生物提取液、相对分子质量测定(需较高分辨率)	2～10(2～13)		18
	Sephadex G-100	2000～12×10^4	干粉 40～120	蛋白质的纯化和分离、相对分子质量的测定，平衡常数的测定	2～10(2～13)		50
	Sephadex G-100 Super Fine	2000～9×10^4	干粉 20～50	肽类分离、脱盐、清洗生物提取液、相对分子质量测定(需较高分辨率)	2～10(2～13)		12
	Sephadex G-150	5000～3×10^5	干粉 40～120	蛋白质的纯化和分离、相对分子质量的测定、平衡常数的测定	2～10(2～13)		23

附表 17.3　TOYOPEARL SEC 尺寸排阻凝胶树脂(TOSOH 公司)性能表

型号	粒径/μm	孔径/Å	样品相对分子质量范围		
			聚乙二醇	右旋糖酐	蛋白质
HW-40S	20～40	50	100～3 000	100～7 000	100～10 000
HW-40F	30～60				
HW-40C	50～100				
HW-50S	20～40	125	100～18 000	500～20 000	500～80 000
HW-50F	30～60				
HW-55S	20～40	500	100～150 000	1000～200 000	1000～700 000
HW-55F	30～60				
HW-65S	20～40	1000	500～1 000 000	10 000～1 000 000	40 000～5 000 000
HW-65F	30～60				
HW-75F	30～60	>1000	4000～5 000 000	100 000～10 000 000	500 000～50 000 000

附表 17.4　MCI GEL 尺寸排阻凝胶(三菱化学公司)性能表

型号	基材	粒径/μm	孔径/nm	排阻限
CQP06	聚羟基甲基丙烯酸酯(HMA)	10	12	1×10^3
CQP10	HMA	10	20	1×10^4
CQP30	HMA	10	60	1×10^6
CQP30P	HMA	30	60	1×10^6

附录 18　主要离子交换凝胶性能表

附表 18.1　糖基 IEC 凝胶填料(Amersham 公司)性能表

离子交换凝胶基架	产品	分离范围(球蛋白)	颗粒大小/μm	特性/应用	pH 稳定性 工作(清洗)	耐压/MPa	最高流速/(cm·h^{-1})
Sepharose High Performance	Q Sepharose H. P	70 mg BSA	34	经济的精细纯化	2～12 (2～12)	0.5	150
	SP Sepharose H. P	55 mg 核糖核酸酶	34	经济的精细纯化	4～13 (3～14)	0.5	150

续表

离子交换凝胶基架	产品	分离范围（球蛋白）	颗粒大小/μm	特性/应用	pH 稳定性 工作(清洗)	耐压/MPa	最高流速/(cm·h^{-1})
Sepharose XL	Q Sepharose XL Virus Lic	>130 mg BSA	90	高载量,有效纯化病毒	3～13 (2～14)	0.3	700
	Q Sepharose XL	>130 mg BSA	90	高载量	3～13 (2～14)	0.3	700
	SP Sepharose XL	>160 mg BSA	90	高载量	4～13 (3～14)	0.3	700
Sepharose Big Beads	Q Sepharose Big Beads		200	只用于特别应用	2～12 (2～14)	0.3	1800
	SP Sepharose Big Beads		200	只用于特别应用	4～13 (3～14)	0.3	1800
Sepharose Fast Flow	Q Sepharose F. F.	120 mg HAS	90	快速、高产量纯化	2～12 (1～14)	0.3	750
	SP Sepharose F. F.	70 mg 核糖核酸酶	90	快速、高产量纯化	4～13 (3～14)	0.3	750
	S Sepharose F. F.		90	快速、高产量纯化	4～13 (3～14)	0.3	400～700
	DEAE Sepharose F. F.	110 mg HAS	90	快速、高产量纯化	2～13 (1～14)	0.3	750
	CM Sepharose F. F.	500 mg 核糖核酸酶	90	快速、高产量纯化	4～13 (2～14)	0.3	750
	Anx		90	快速、高产量纯化	3～13 (2～14)	0.3	300～500
	Anx Sepharosex F. F.	43 mg BSA	90	快速、高产量纯化	3～10 (2～14)	0.3	300～500
	Q Sepharosex F. F.		90	快速、高产量纯化	2～12 (1～14)	0.3	750
	S Sepharosex F. F.		90	快速、高产量纯化	4～13 (3～14)	0.3	750
Sepharose CL-6B	DEAE Sepharose CL-6B	170 mg HAS	90		3～12 (2～14)	0.3	150
Sephadex	CM Sepharose CL-6B	1720 mg 核糖核酸酶	90		3～12 (2～14)	0.3	150

续表

离子交换凝胶基架	产品	分离范围（球蛋白）	颗粒大小/μm	特性/应用	pH 稳定性 工作(清洗)	耐压/MPa	最高流速/(cm·h^{-1})
Sephadex	QAE Sephaedex A-25	10 mg HSA	干粉 40～120	低相对分子质量蛋白质、多肽、核苷酸以及巨大分子(M_w >2×10^5)	2～13 (2～13)	0.11	475
	QAE Sephaedex A-50	80 mg HAS 40～120	干粉 (30～200 kD)	中等大小的生物分子	2～12 (2～12)	0.01	45
	SP Sephadex C-25	230 mg 核糖核酸酶	干粉 40～120	小蛋白质以及巨大分子(M_w >2×10^5)	2～13 (2～13)	0.13	475
	SP Sephadex C-50	110 mg 牛碳氧血红蛋白	干粉 40～120	中等大小的生物分子(3×10^4～2×10^5)	2～12 (2～12)	0.01	45
	DEAE Sephadex	140 mg α-乳清蛋白	干粉 40～120	小蛋白以及巨大分子(M_w > 2×10^5)	2～13 (2～13)	0.11	475
	DEAE Sephadex A-25	110 mg HSA	干粉 40～120	中等大小的生物分子(3×10^4～2×10^5)	2～12 (2～12)	0.11	45
	CM Sephadex C-25	190 mg 核糖核苷酸	干粉 40～120	小蛋白质以及巨大分子(M_w >2×10^5)	2～13 (2～13)	0.13	475
	CM Sephadex C-50	140 mg 牛碳氧血红蛋白	干粉 40～120	中等大小的生物分子(3×10^4～2×10^5)	2～12 (2～12)	0.01	45

附表 18.2 TOYOPEARL IEC 阴离子交换树脂(TOSOH 公司)性能表

型号	产品名称	粒径/μm	离子交换容量 /(meq* · mL^{-1}树脂)	吸附容量 /(mg · mL^{-1}树脂)
TSK-GEL	SuperQ-5PW(20)	15～25	0.12～0.18	52～88
	SuperQ-5PW(30)	20～40	0.12～0.18	52～88
	DEAE-5PW(20)	15～25	0.05～0.11	25～45
	DEAE-5PW(30)	20～40	0.05～0.11	20～40
TOYOPEARL	QAE-550C	50～150	0.28～0.38	60～80
	SuperQ-650S	20～50	0.20～0.30	105～155
	SuperQ-650M	40～90	0.20～0.30	105～155
	SuperQ-650C	50～150	0.20～0.30	105～155
	DEAE-650S	20～50	0.08～0.12	25～35
	DEAE-650M	40～90	0.08～0.12	25～35
	DEAE-650C	50～150	0.05～0.11	25～35

* eq 为非法定单位。为遵从学科和读者阅读习惯,本书仍沿用该单位。下同。

附表 18.3 TOYOPEARL IEC 阳离子交换树脂(TOSOH 公司)性能表

型号	产品名称	粒径/μm	离子交换容量 /(meq · mL^{-1}树脂)	吸附容量 /(mg · mL^{-1}树脂)
TSK-GEL	SP-5PW(20)	15～25	0.06～0.12	20～40
	SP-5PW(30)	20～40	0.06～0.12	20～40
TOYOPEARL	SP-550C	50～150	0.14～0.18	80～120
	SP-650S	20～50	0.13～0.17	40～60
	SP-650M	40～90	0.13～0.17	40～60
	SP-650C	50～150	0.12～0.18	35～55
	CM-650S	20～50	0.08～0.12	30～50
	CM-650M	40～90	0.08～0.12	30～50
	CM-650C	50～150	0.05～0.11	25～45
	MegaCap SP-550EC	100～300	0.14～0.18	60～90

附表 18.4 MCI GEL 离子交换凝胶(SCK,SCA 系列)(三菱化学公司)性能表

产品	基材	功能团	对抗离子	平均粒径/μm	离子交换容量/(meq · g^{-1})
SCK	ST/DVB	RSO_3^-	H^+	11	25
SCA	HMA	QA	Cl^-	5	30

注：ST/DVB 苯乙烯-二乙烯苯共聚物(styrene-divinylbenzene copolymer)；HMA 羟基丙烯酸甲酯(polyhydroxymethacrylate)；QA 季铵盐(quaternary ammonium)。后同。

附表 18.5　MCI GEL 阳离子交换树脂(CK,AFR 系列)(三菱化学公司)性能表

产品	基材	功能团	对抗离子	平均粒径/μm	交联率/%	离子交换容量/(meq·g^{-1})
CK02A	ST/DVB	RSO_3^-	Na^+	20	2	>0.5
CK04S	ST/DVB	RSO_3^-	Na^+	11	4	>0.8
CK06S	ST/DVB	RSO_3^-	Na^+	11	6	>1.5
CK08S	ST/DVB	RSO_3^-	Na^+	11	8	>1.9
CK08E	ST/DVB	RSO_3^-	Na^+	9	8	>1.9
CK08Y	ST/DVB	RSO_3^-	Na^+	25	8	>1.9
CK08P	ST/DVB	RSO_3^-	H^+	75/100	8	>1.9
CK10S	ST/DVB	RSO_3^-	Na^+	11	10	>2.0
CK10F	ST/DVB	RSO_3^-	Na^+	7	10	>2.0
CK10U	ST/DVB >2.0	RSO_3^-	Na^+	5	10	>2.0
CK10M	ST/DVB	RSO_3^-	Na^+	4	10	>2.0
CK10Y	ST/DVB	RSO_3^-	Na^+	25	10	>1.9
AFR2	ST/DVB	RSO_3^-	H^+	25	—	>1.9

附表 18.6　MCI GEL 阴离子交换树脂(CA,CDR 系列)(三菱化学公司)性能表

产品	基材	功能团	对抗离子	平均粒径/μm	交联率/%	离子交换容量/(meq·g^{-1})
CA06S	ST/DVB	QA	Cl^-	11	6	>1.2
CA08S	ST/DVB	QA	Cl^-	11	8	>1.2
CA08F	ST/DVB	QA	Cl^-	7	8	>1.2
CA08Y	ST/DVB	QA	Cl^-	25	8	>1.2
CA08P	ST/DVB	QA	Cl^-	75/150	8	>1.3
CA10S	ST/DVB	QA	Cl^-	11	10	>1.2
CDR10	ST/DVB	QA	Cl^-	7	—	>0.3

附表 18.7 Hisep 离子交换填料(强酸型)SU-Sulfoacid(北京慧德易公司)性能表

产品	粒径/μm	应用范围
SU10LL	10	LL 型强酸型离子交换填料系列适用于碱性中和蛋白质、多肽及生物碱、低聚糖、氨基糖等的分离纯化和生产制备
SU20LL	20	
SU50LL	50	
SU10LM	10	强酸型离子交换填料系列载量高、流速快、反压低、易放大,适用于碱性和中性蛋白质、多肽、低聚糖、氨基糖等各类生物药物和天然药物的分离纯化和大规模生产制备
SU20LM	20	
SU50LM	50	
SU10LH	10	
SU20LH	20	
SU50LH	50	

附表 18.8 Hisep 离子交换填料(弱酸型)TM-Carboxyl(北京慧德易公司)性能表

产品	粒径/μm	应用范围
TM10LL	10	LL 型弱酸型离子交换填料系列适用于在中低压条件下碱性和中性蛋白质、多肽、低聚核苷酸等的分析和生产制备
TM20LL	20	
TM50LL	50	
TM10LM	10	弱酸型离子交换树脂适用于碱性和中性蛋白质、多肽、低聚核苷酸等的分析和生产制备,与生物分子的相互作用比较温和
TM20LM	20	
TM50LM	50	
TM10LH	10	
TM20LH	20	
TM50LH	50	

附表 18.9 Hisep 离子交换填料(强碱型)AM-Quaternary ammonium(北京慧德易公司)性能表

产品	粒径/μm	应用范围
AM10LL	10	LL 型强碱型离子交换填料适用于酸性和中性蛋白质、多肽、糖蛋白等在中低压条件下的纯化和生产制备
AM20LL	20	
AM50LL	50	
AM10LM	10	强碱型离子交换填料载量高、流速快、反压低、易放大,适用于酸性和中性蛋白质、多肽、核苷酸、糖蛋白等各类生物药物和天然药物的分析纯化和大规模生产制备
AM20LM	20	
AM50LM	50	
AM10LH	10	
AM20LH	20	
AM50LH	50	

附表 18.10　Hisep 离子交换填料(弱碱型)PB-Weak basic(北京慧德易公司)性能表

产品	粒径/μm	应用范围
PB10LL	10	LL 型弱碱型离子交换填料适用于酸性和中性蛋白质、多肽、免疫球蛋白、核苷酸等在中低压条件下的纯化和生产制备
PB20LL	20	
PB50LL	50	
PB10LM	10	弱碱型离子交换填料适用于酸性和中性蛋白质、多肽、核苷酸等各类生物药物和天然药物的分析纯化和大规模生产制备，与生物分子的相互作用比较温和
PB20LM	20	
PB50LM	50	
PB10LH	10	
PB20LH	20	
PB50LH	50	

附录 19　国外主要亲和色谱凝胶填料性能表

附表 19.1　AFC 糖基凝胶金属螯合介质填料(Amersham)性能表

产品	目标配体	颗粒大小/μm	每毫升结合量	应用	pH 稳定性 工作(清洗)	最高流速/(cm·h^{-1})
Chelating Sepharose Fast Flow	亚氨双乙酸	45～165	24～30 μmol Zn^{2+}	可与金属作用的蛋白质、肽类、核苷酸等	3～13 (2～14)	370
Ni Sepharose HP	亚氨双乙酸	34	～15 μmol Ni >40 mg His 蛋白	同上，Ni^{2+} 脱落极低	3～12 (2～14)	<150

附表 19.2　AFC 糖基凝胶活化偶联介质填料(Amersham)性能表

产品	目标配体	颗粒大小/μm	每毫升结合量	偶联条件	pH 稳定性 工作(清洗)	最高流速/(cm·h^{-1})
NHS activated Sepharose 4FF	$-NH_2$	45～165	最小 12 mg IgG，尤其适合较小的分子	pH 8～10 1～2 h	3～13 (2～13)	700
CNBr activated Sepharose 4FF	$-NH_2$	45～165	13～26 mg 胰蛋白酶原	pH 8～10 1～16 h	2～11 (2～11)	700
CNBr activated Sepharose 4B	$-NH_2$	45～165	25～60 mg 胰蛋白酶原	pH 8～10 1～16 h	2～11 (2～11)	75

续表

产品	目标配体	颗粒大小/μm	每毫升结合量	偶联条件	pH 稳定性 工作(清洗)	最高流速 /(cm·h^{-1})
CNBr activated Sepharose 6MB	—NH_2	250～350	结合带配体的细胞以作细胞亲和色谱	pH 8～10 1～16 h	视结合细胞而定	450
Activated CH Sepharose 4B	—NH_2	45～165	10～14 μmol 甘氨酰白氨酸	pH 5～10 1～16 h	2～11 (2～11)	75
EAH Sepharose 4B		45～165	7～11 μmol 氨基	pH 4.5 1.5～24 h	3～14 (3～14)	75
ECH Sepharose 4B		45～165	12～16 μmol 羧基	pH 4.5 1.5～24 h	3～14 (3～14)	75
Epoxy-activated Sepharose 6B	—NH_2 —OH —SH	45～165	19～40 μmol 环氧基	pH 9～13 >16 h	2～14 (2～14)	75
Activated Thiol	—SH	45～165	1 μmol	pH 4～8	2～11	75
Thiopropyl Sepharose 6B	—SH	45～165	18～31 μmol 活化硫基	pH 4～8 3～16 h	2～13 (2～13)	75

附表 19.3 AFC 糖基凝胶小配体亲和介质填料(Amersham)性能表

产品	每毫升配体含量	颗粒大小/μm	应用	偶联条件	pH 稳定性 工作(清洗)	最高流速 /(cm·h^{-1})
Arginine Sepharose 4B	14～20 μmol 精氨酸	45～165	/	丝氨酸蛋白酶、凝固因子、血纤维蛋白溶酶原和血纤维蛋白溶酶原激活剂	2～13 (2～13)	75
Benzamidine Sepharose 6B	7 μmol 苯甲酰胺	45～165	13 mg 胰蛋白酶	专一结合丝氨酸蛋白酶、胰蛋白酶	2～13	
Benzamidine Sepharose 6B	12 μmol 苯甲酰胺	45～165	35 mg 胰蛋白酶	专一结合丝氨酸蛋白酶、胰蛋白酶;更快速	2～8 (1～9)	600
Benzamidine Sepharose 4FF L-Sub		5～165		专一结合丝氨酸蛋白酶、胰蛋白酶	2～8 (1～9)	600

续表

产品	每毫升配体含量	颗粒大小/μm	应用	偶联条件	pH 稳定性工作(清洗)	最高流速/(cm·h^{-1})
Calmodulin Sepharose 4B	0.9～1.3 mg 钙调节因子	45～165	13 mg 胰蛋白酶	ATP 酶、蛋白激酶、磷酸二酯酶、神经传递素、干扰素、促肾上腺皮质素	4～9 (4～9)	75
Gelatin Sepharose 4B	4.5～8 mg 明胶	45～165	1 mg 血浆纤维结合素	一步纯化或去除纤维结合素	2～13 (2～10)	75
Gelatin Sepharose 4Fast Flow		45～165		一步纯化或去除纤维结合素	2～13 (2～10)	450
Glutathione Sepharose 4FF	120～320 μmol 谷胱甘肽	45～165	11 mg GST 融合蛋白	羧端含谷胱甘肽 S-转移酶的重组融合蛋白或依赖 S-转移酶或谷胱甘肽的蛋白质	6～9	450
Glutathione Sepharose 4B	7 μmol 谷胱甘肽	45～165	>5 mg 谷胱甘肽 S-转移酶	羧端含谷胱甘肽 S-转移酶的重组融合蛋白或依赖 S-转移酶或谷胱甘肽的蛋白质	4～10 (3～11)	75
Heparin Sepharose CL-6B	2 mg 肝素	45～165	2 mg 抗凝血酶Ⅲ	抗凝血酶Ⅲ、凝血因子、脂蛋白、酯酶、蛋白合成因子；激素、类胆固醇受体、核酸结合酶	5～10 (5～10)	150
Heparin Sepharose 6 Fast Flow	5 mg 肝素	45～165	2 mg 抗凝血酶Ⅲ	抗凝血酶Ⅲ、凝血因子、脂蛋白、酯酶、蛋白合成因子；激素、类胆固醇受体、核酸结合酶	4～12 (4～13)	>300
Lysine Sepharose 4B	4～7 μmol 赖氨酸	45～165	0.6 mg 血纤维蛋白溶酶原	纯化核蛋白体核糖核酸、血纤维蛋白溶酶原和血纤维蛋白溶酶原激活剂	2～11 (2～11)	75
IgG Sepharose 6 Fast Flow	人类 IgG	45～165	>2 mg 蛋白 A	一步纯化原核试验生物表达系统产生的蛋白 A 融合产物	4～10 (3～11)	建议流速 150
Streptavidin Sepharose HP	>300 μmol 生物素	34	6 mg 生物素标记的血清蛋白	利用生物素和抗生素的结合作用做亲和色谱，如使用生物素标记的抗体纯化相应抗原	2～10.5	建议流速 150

附表 19.4 AFC 糖基凝胶抗体亲和介质填料(Amersham)性能表

产品	每毫升配体含量	颗粒大小/μm	应用	偶联条件	pH 稳定性 工作(清洗)	最高流速/(cm·h^{-1})
Mabselect	6 mg 重组蛋白 A	40～130	500 mg 人类 IgG	目前单抗载量最高,基因脱落最少,最专一的单抗亲和介质,稳定性最好	3～10 (2～12)	建议流速 500
rProtein A Sepharose Fast Flow	6 mg 重组蛋白 A	60～165	50 mg 人类 IgG; 30 mg 小鼠 IgG; 每毫升结合量	目前单抗载量最高,基因脱落最少,最专一的单抗亲和介质,稳定性最好	3～10 (2～11)	建议流速 300
rProtein A Sepharose Fast Flow	6 mg 蛋白 A	45～165	35 mg 人类 IgG	抗体纯化,无任何动物衍生组分	3～9 (2～10)	>1300
Protein A Sepharose 4 Fast Flow	6 mg 蛋白 A	45～165	35 mg 人类 IgG; 3～10 mg 小鼠 IgG	抗体纯化	3～9 (2～10)	>1300
Protein A Sepharose CL-4B	2～3 mg 蛋白 A	45～165	16～25 mg 人类 IgG; 2 mg 小鼠 IgG	纯化体液或细胞培养液中的免疫球蛋白	3～9 (2～10)	150
Protein A Sepharose 6MB	1～1.5 mg 蛋白 A	250～350	4.5～9 mg IgG	可在不影响细胞存活率下分离被挂上 IgG 的细胞	3～9 (2～10)	450
rmpProtein A Sepharose 4 Fast Flow	6 mg 重组蛋白 A	60～165	35 mg 人类 IgG	低脱落,一步高纯度纯化单抗和多抗	3～10 (2～11)	300
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	2 mg 蛋白 G	45～165	24 mg 人类 IgG; 17 mg 天竺鼠 IgG; 19 mg 山羊 IgG; 23 mg 牛 IgG; 7 mg 大鼠 IgG; 10 mg 小鼠 IgG		3～9 (2～9)	>1300

附表 19.5　AFC 糖基凝胶颜料亲和介质填料(Amersham)性能表

产品	每毫升配体含量	颗粒大小/μm	应用	偶联条件	pH 稳定性 工作(清洗)	最高流速/(cm·h^{-1})
Blue Sepharose 6 Fast Flow	6.7～7.9 μmol Cibacron Blue	45～165	>18 mg HAS	纯化蛋白、干扰素，需要核苷酸辅助的酶、α_2-巨球蛋白、凝血因子等	4～12 (3～13)	370
Blue Sepharose CL-6B	1.7～2.3 mmol Cibacron Blue	45～165	5 mg HAS	纯化蛋白、干扰素，需要核苷酸辅助的酶、α_2-巨球蛋白、凝血因子等，属于较传统的介质	4～12 (3～13)	150
Red Sepharose CL-6B	1.7～2.3 μmol Procion Red HE 3B	45～165	2 mg 兔乳酸脱氢酶	依赖 $NADP^+$ 的脱氢酶、醛和二氢叶酸还原酶、羧肽酶 G、干扰素、血纤维蛋白溶酶原和激活剂	4～12 (3～13)	150

附表 19.6　AFC 糖基凝胶抗体外源凝集亲和介质填料(Amersham)性能表

产品	每毫升配体含量	每毫升结合量	应用	pH 稳定性 工作(清洗)	最高流速/(cm·h^{-1})
ConA Sepharose	10～16 mg 刀豆球蛋白 A	20～45 mg 甲状腺球蛋白	能纯化糖蛋白、膜蛋白、糖脂、多糖、带甘露苷或葡萄糖苷残基的膜囊泡、IgM；激素；脂蛋白等	4～9 (4～9)	476
Lentil Lectin Sepharose 4B	1.9～4.2 mg 扁豆外源凝集素	16～35 mg 甲状腺球蛋白	能纯化糖蛋白、膜蛋白，特别是末端含甘露吡喃葡萄糖(α-D-gluco-sepyranosyl)、甘露吡喃糖(α-D-mannopyranosyl)或相类似的残基分子	3～12 (4～10)	467
Wheat Germ Lectin Sepharose 6MB	5 mg 麦芽外源凝集素	2×10^7～5×10^7 个细胞	分离细胞或亚细胞颗粒和含糖基的可溶性分子	4～9 (4～9)	550

附表 19.7 AFC 糖基凝胶核酸 (DNA & nucleotide)亲和介质填料(Amersham)性能表

产品	每毫升配体含量	每毫升结合量	应用	pH 稳定性 工作(清洗)	最高流速 /(cm·h^{-1})
2′,5′-ADP Sepharose 4B	2 μmol 2′,5′-AMP	0.4 mg 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	纯化 NADP 依赖脱氢酶和其他对 NADP$^+$ 有亲和作用的酶如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	4～10 (4～10)	540
5AMP Sepharose 4B	2 μmol 5 AMP	10 mg 乳酸脱氢酶	纯化 NAD$^+$ 依赖脱氢酶、醛类和甲酸脱氢酶、ATP 依赖脱氢酶、CAMP 依赖蛋白激酶	4～10 (4～10)	896
Poly(A) Sepharose 4B	0.25 mg Poly(A)	>0.8 mg S-poly(U)	纯化 mRNA-结合蛋白、poly(A)-结合 RNA、病毒 RNA、DNA 依赖 RNA、聚合酶、针对核酸的抗生素	4～10 (4～10)	414
Poly(U) Sepharose 4B	0.5 mg Poly(U)	150 mg mRNA	纯化 mRNA、逆转录酶、干扰素、植物的核酸	4～10 (4～10)	438
Plasmidselect	4 mg 2-mercaptopyridine	>0.4 mg	用于纯化超螺旋 DNA 质粒	3～11 (2～13)	1046
SUpercoiled Plasmid Purifiction 1 Pack			用于治疗用超螺旋质粒 DNA 的纯化		760

附表 19.8 TOYOPEARL AFC 亲和色谱介质(TOSOH 公司)性能表

型号		产品描述	粒径 /μm	配体密度	吸附容量
TOYOPEARL LABPAK		AFFIPAK ACT (AF-Epoxy, AF-Tresyl-650M)	65		
		AFFIPAK(AF-Amino-, AF-Formyl-650M)	65		
TSK-GEL 树脂		Tresyl-5PW(10)	10		
TOYOPEARL AFC	组特异型树脂	AF-Blue HC-650M		>16 μmol·mL^{-1}	>18 mg·mL^{-1}(HSA)
		AF-Red-HC-650ML		7 μmol·mL^{-1}	2.5～4.5 mg·mL^{-1}
		AF-Chelate-HC-650M		25～45 μeq·mL^{-1}	≥60 mg·mL^{-1}
	反应型树脂	AF-Amino-650M		70～130 μeq·mL^{-1}	
		AF-Carboxy-650M		80～120 μeq·mL^{-1}	
		AF-Formyl-650M		40～70 μeq·mL^{-1}	
	激活型树脂	AF-Epoxy-650M		600～1000 μeq·g^{-1}	≥60 mg·g^{-1}
		AF-Tresyl-650M		80 μmol·mL^{-1}	≥60 mg·g^{-1}

附录 20　国外主要疏水色谱凝胶填料性能表

附表 20.1　HIC 预处理及中度纯化介质疏水色谱填料(Amersham 公司)性能表

产品	每毫升载量	颗粒大小/μm	每毫升结合量	特性/应用	pH 稳定性 工作(清洗)	最高流速/(cm·h^{-1})
Butyl Sepharose 4 Fast Flow	50 μmol 正丁基	45～165	7 mg IgG 26 mg HAS	疏水性最弱,适合含脂肪族配体的生物分子	3～13 (2～14)	600
Butyl Sepharose 4FF High sub Butyl-S Sepharose 6FF	正丁基	45～165		疏水性最弱,适合含脂肪族配体的生物分子	3～13 (2～14)	600
Octyl Sepharose 4 Fast Flow	50 μmol 正辛基	45～165	26 mg IgG 7 mg HAS	疏水性中等,适合各种蛋白质的分离和纯化	3～13 (2～14)	600
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)	20 μmol 苯基	45～165	10 mg IgG 24 mg HAS	适合含芳香族配体的蛋白质,特别是单抗	3～13 (2～14)	600
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)	40 μmol 苯基	45～165	300 mg IgG 36 mg HAS	疏水性最强,载量高,适合含芳香族配体的生物分子的预处理	3～13 (2～14)	600
Phenyl Sepharose Big Beads		100～300		疏水性最强,载量高,适合含芳香族配体的生物分子的预处理	3～14 (2～14)	1800

附表 20.2　HIC 中度分离及最终纯化介质疏水色谱填料(Amersham 公司)性能表

产品	每毫升载量	颗粒大小/μm	每毫升结合量	特性/应用	pH 稳定性 工作(清洗)	最高流速/(cm·h^{-1})
Phenyl Sepharose High Performance	25 μmol 苯基	22～44	20 mg IgG 24 mg HSA	以高分辨率纯化难以分离的重组蛋白天然形式和修饰变种,及各种抗体	3～12 (2～14)	150
Butyl Sepharose HP	正丁基	24～44		高分辨率	3～12 (2～14)	150

附表 20.3 HIC 经典疏水色谱介质疏水色谱填料(Amersham 公司)

产品	每毫升载量	颗粒大小/μm	每毫升结合量	特性/应用	pH 稳定性 工作(清洗)	最高流速 /(cm·h^{-1})
Butyl Sepharose 4B	6～14 μmol 正丁基	45～165	视不同样品而定	大分子,复合分离原理包括疏水性及离子性分离		50
Octyl Sepharose CL-4B	40 μmol 正辛基	45～165	15～20 mg HSA	纯化疏水性较弱的蛋白质或膜蛋白,因其经去污剂处理后仍有强疏水性	3～12 (2～14)	50
Phenyl Sepharose CL-4B	40 μmol 苯基	45～165	15～20 mg HSA	疏水性较正辛基弱,适用于分离和纯化对疏水性尚未了解的蛋白质	3～12 (2～14)	50

附表 20.4 TOYOPEARL HIC 疏水作用色谱介质(TOSOH 公司)性能表

产品	粒径/μm	吸附载量 /(mg 溶菌酶·mL^{-1}树脂)	排阻限
Ether-650S	20～50	10～30	1×10^6
Ether-650M	40～90	10～30	1×10^6
Phenyl-650S	20～50	30～50	1×10^6
Phenyl-650M	40～90	30～50	1×10^6
Phenyl-650C	50～150	30～50	6×10^5
Butyl-650S	20～50	30～50	1×10^6
Butyl-650M	40～90	30～50	1×10^6
Butyl-650C	50～150	30～50	6×10^5
Hexyl-650C	50～150	30～50	6×10^5
Ether-5PW(20)	10～30	10～30	—
Ether-5PW(30)	20～40	10～30	—
Phenyl-5PW(20)	10～30	10～30	—
Phenyl-5PW(30)	20～40	10～30	—

附表 20.5 MCI GEL 疏水色谱凝胶(三菱化学公司)性能表

产品	基材	官能团	粒径/μm	孔径/nm
CQH3BS	HMA	丁基	10	60
CQH3ES	HMA	乙基	10	60
CQH3PS	HMA	苯基	10	60
CQH3BP	HMA	丁基	30	60
CQH3PP	HMA	苯基	30	60

附表 20.6　Hisep 疏水色谱凝胶(北京慧德易公司)性能表

产品	粒径/μm	pH(工作/清洗)	应用范围
PH10MH	10	2～13/1～14	疏水性最强，适于蛋白质、肽、糖类、天然药物有效成分的快速高效疏水纯化
PH20MM	20		
PH50ML	50		
BU10MH	10	2～13/1～14	疏水性较弱，适于各种蛋白质、肽、糖类、天然药物有效成分的快速高效疏水纯化。20 μm，50 μm 粒径的填料易于装柱，重复性好，尤其适合于大规模生产制备
BU20MM	20		
BU50ML	50		
IS10MH	10	2～13/1～14	
IS20MM	20		
IS50ML	50		
OC10MH	10	2～13/1～14	
OC20MM	20		
OC50ML	50		
ET10MH	10	2～13/1～14	疏水性最弱，适于脂蛋白等脂质配体生物分子、肽、糖类、天然药物有效成分的快速高效疏水纯化
ET20MM	20		
ET50ML	50		

附录 21　国产主要超滤膜和组件性能表①

单位	类型	膜材料	截留相对分子质量/10^3
国家海洋局杭州水处理中心	卷式、平板	CA，CTA，PAN，PS，PSA，PES，PVDF	5～10
天津纺织工学院	中空	PS	6～50
中科院大连化物所	中空、平板	PS，PSA	10～100
中科院生态环境研究中心	中空、平板、管式	PS，PSA	10～100
上海纺织科学研究院	中空	PS	6～25
无锡市超滤设备厂	平板、管式	CA，PAN，PVC，PS，PSA	3～150
常州能源设备总厂	中空	PS	6～50
辽源市膜分离设备厂	卷式、中空、平板、管式	PS，CA，PAN，PSA	3～10
湖州水处理设备厂	中空、平板、管式	PS，CA	6～100
武汉仪表厂	中空	PS	6～1000
山东招远膜分离设备厂	中空	PS	6～100
沙市水处理设备厂	管式	CA，PS，PSA	10～100
中科院上海原子核研究所	平板、管式、圆盒式	PEK，SPS，PS，PAN	4～70
上海医药工业研究院	中空、卷式	PS，PP	10～50

① 数据源自：刘茉娥．膜分离技术．北京：化学工业出版社，2000.

注：CA 二乙酸纤维素；CTA 三乙酸纤维素；PAN 聚丙烯腈；PES 聚醚砜；PEK 聚醚酮；PP 聚丙烯；PS 聚砜；PSA 聚砜酰胺；PVC 聚氯乙烯；PVDF 聚偏氟乙烯；SPS 磺化聚苯乙烯。

附录 22 国外主要超滤膜和组件性能表①

公司	类型	膜材料	截留相对分子质量(10^3)
Alcoa/Membralox	管式	γ-氧化铝-α-氧化铝	—
Pall	中空	PES	1～100
Amicon	盘式、中空、卷式	PS, PVDF, PAV	1～100
Asahi	中空	PAN	6～7
Daicel	平板、管式	PAN, PES	5～40
DDS	平板	CA, PS, TFC	6～30
Desalination Systems INC/DSI	卷式	PS, TFC	35～500
Fluid Systems	卷式	PES	6～10
Koch Membrane Systems	卷式、管式	PES, PVDF	1～600
Nitto/Hydranautics	卷式、管式、中空	PS, PO, PI	8～100
Osmonics/Sepa	卷式	CA, PS, PF	1～100
Rhone-Poulenc/Iris	平板	PAN, PVDF, SPS	10～25
Romicon	中空	PS	1～100

① 数据源自：刘茉娥．膜分离技术．北京：化学工业出版社，2000.

注：CA 二乙酸纤维素；PAN 聚丙烯腈；PAV 聚氯化铝；PES 聚醚砜；PEK 聚醚酮；PF 酚醛树脂；PI 聚酰亚胺；PO 聚烯烃；PS 聚砜；PSA 聚砜酰胺；PVC 聚氯乙烯；PVDF 聚偏氟乙烯；SPS 磺化聚苯乙烯，TFC 超薄复合膜。

附录 23 国产主要微滤膜和组件性能表①

单位	类型	膜材料	膜孔径/μm
国家海洋局杭州水处理中心	折叠滤芯、平板滤膜	CN-CA, PAN	0.22～70
无锡市超滤设备厂	折叠滤芯、平板滤膜	CN-CN, CA-CTA	0.22～0.8
无锡化工研究院	折叠滤芯、平板滤膜	CA-CTA	0.22～0.8
核工业部八所	折叠滤芯、平板滤膜	CN-CA	0.22～1.0
庆江化工厂	平板滤膜	CN-CA, CA, Nylon	0.2～10
上海医工院	平板滤膜	CN-CA	0.2～3.0
旅顺化工厂	平板滤膜	PSA	0.2～0.8
辽源市膜分离设备厂	平板、管式	PSA	0.1～3
机电部北京第十设计研究院	蜂房滤芯	PP、棉纤维	0.8～75
化工部南通合成材料实验厂	折叠滤芯、平板滤膜	尼龙 66	0.2～0.8
苏州净化设备厂	平板滤膜	CN-CA	0.2～3
上海第十制药厂	平板滤膜	CN-CA	0.2～3
上海集成过滤器材厂	折叠滤芯、平板滤膜	—	—
中科院大连化物所	平板滤膜	PSA	0.2～0.8
天津纺织工学院	中空	PP	—
中国纺织大学	中空	PP	—

① 数据源自：刘茉娥．膜分离技术．北京：化学工业出版社，2000.

注：CA 二乙酸纤维素；CN 硝酸纤维素；CTA 三乙酸纤维素；PAN 聚丙烯腈；PSA 聚砜酰胺；PP 聚丙烯。

附录 24　国外主要微滤膜和组件性能表①

公司	类型	膜材料
A/G Technology	中空	PS
Akzo (Enka Division)	中空、平板	PP，尼龙-6
Alcan	平板	陶瓷
Alcoa	管式	陶瓷
Amicon (W. R. Grace)	中空	PS
Asahi	中空	PP，PTFE
Hoechst	中空	PP
Celanese	平板	—
Ceramem	整块	陶瓷
Cuno (Commercial Intertech)	平板	尼龙-66，PTFE
DDS	平板	PS，PVDF
Dominick Hunter	平板	CA-CN，尼龙-66，PTFE
Filterite (Memtec)	平板	PS，PTFE
Fuji	平板	PS
Gelman Sciences	平板	CTA，CA，CA-CN，PVC，PS，PVDF，PTFE，尼龙-66，PP，PAA
W. L. Gore	平板、管式	PTFE
Kinetek Systems	中空	PS
Kuraray	中空	PVA
Microgon	中空	CA-CN
Mitsubishi Rayou	中空	PP，PE
Millipore	平板、管式	陶瓷，CA-CN，PVDF，PTFE，PC
MFS	平板	CN，CA，CA-CN，PTFE
MSI	平板	CA-CN，尼龙-66
Nitto Denko	平板	PTFE
Nuclepore (Costar)	平板	PE，PC
Pall	平板	尼龙-66，PTFE，PVDF
Poretics	平板	PE，PC
Sartorius	平板	CA，CN，PTFE
Schleicher-Schuell	平板	CN，CA，CA-CN，PTFE
Whatman	平板	CA，CA-CN，PTFE
X-Flow B. V.	中空	PS，PE

① 数据源自：刘茉娥．膜分离技术．北京：化学工业出版社，2000.

注：CA 二乙酸纤维素；CTA 三乙酸纤维素；CN 硝酸纤维素；PAA 聚丙烯酸；PE 聚乙烯；PP 聚丙烯；PS 聚砜；PTFE 聚四氟乙烯；PVA 聚乙烯醇；PVC 聚氯乙烯；PVDF 聚偏氟乙烯。

附录 25 《中国药典》筛号与筛孔内径、目数对照表

筛号	筛孔内径(平均值)/μm	目号/目
一号筛	2000±70	10
二号筛	850±29	24
三号筛	355±13	50
四号筛	250±9.9	65
五号筛	180±7.6	80
六号筛	150±6.6	100
七号筛	125±5.8	120
八号筛	90±4.6	150
九号筛	75±4.1	200

（杨培明）

主题词索引

阿魏酸　339,343
氨基嘌呤霉素　465
氨酰胞嘧啶吡喃糖脱氧核苷　458
氨酰腺嘌呤脱氧核苷　457
澳杨亭　409
八角莲　350,353
白果内酯　400
白桦脂酸　417
白藜芦醇　347
斑马鱼　250
斑蝥素　262
半仿生提取法　164
薄层色谱　18,112,507,510
宝藿苷-Ⅰ　317
宝藿苷-Ⅱ　317
保留体积　128
北豆根　340
倍半萜　396
苯乙基苯醌二聚体　106
吡咯并嘧啶核苷　458
吡喃香豆素　362
苹澄茄素　349
L-表儿茶素　320
L-表儿茶素没食子酸酯　320
L-表没食子儿茶素　320
L-表没食子儿茶素没食子酸酯　320
薄荷醇　393
菜豆异黄酮 A　328
苍耳子油　72
茶多酚　64,73
柴胡　438
柴胡皂苷　438
长春花　380
长春碱　292
长春新碱　292
常温超高压萃取　161
常压柱色谱　23
超高效液相色谱　96
超过滤　509
超临界流体萃取　36
超临界流体萃取过程分析　42
超临界流体萃取基本原理　36
超滤法　487
超声提取法　7,166
超速离心法　487
超微粉碎技术　158
沉淀法　9
重结晶　31
除虫菊酯　395
川楝素　419
川木通　340
川木香　340
川芎　345
穿龙薯蓣　444
穿心莲内酯　407
穿心莲乙素　407
传统溶剂提取法　5
垂盆草　549
垂盆草苷　549
纯度鉴别　31,34
刺甘草查耳酮　326
大豆　310
大豆苷　308,310
大豆苷元　308,310
大豆苷元-4′-葡萄糖苷　308
大豆苷元-7,4′-二葡萄糖苷　308

大豆素 312
大花淫羊藿苷 C 317
大花淫羊藿苷 F 317
大黄 377
大黄酚 378
大黄素 68,377,379
大黄素-8-*O*-β-D-吡喃葡萄糖苷 379
大黄素-6,8-二甲醚 379
大黄素甲醚 378,379
大黄素-8-甲醚 379
大黄素甲醚-8-*O*-β-D-吡喃葡萄糖苷 379
大黄素-8-*O*-(6′-*O*-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷 379
大黄酸 377
大孔吸附树脂 76
大孔吸附树脂法 424
大理石锥 511
大麻 338
大蒜 561
大蒜新素 562
丹酚酸 B 镁 346
丹皮酚 337
丹参 345
丹参醌 408
丹参缩酚羧酸盐 264
丹参酮 68,408
丹参酮的超临界 CO_2 萃取 56
丹参乙酸 346
丹参乙酸镁 345,346
单晶 X 射线衍射分析 214
单宁酸 71
单萜 387
G 蛋白偶联受体 230
蛋白质的变性 506,510
蛋白质工程 508,511
蛋白质和多糖 11
当归 345
当归油的超临界 CO_2 萃取 60
德鸢尾素 312
灯盏甲素 313
灯盏乙素 313
等电点沉淀 509
低速逆流色谱 138
低速逆流色谱法 132
低速逆流色谱仪 119,123,125
狄戈辛 449,454
地榆皂苷 67
电化学性 505
电泳 509
电泳法 487
靛玉红 261
丁醇系列溶剂系统 129
冬虫夏草菌素 466,469
动态逆流提取法 172
毒毛旋花子苷 K 449
杜衡 340
盾叶薯蓣 445
多酚 148
多羟基甾体 540
多穗柯 561
多肽 533
多糖及寡糖 478
多维结构 504
多烯炔 534
蒽醌 371
D,L-儿茶素 320
二聚 9,10-二氢菲 106
7,4′-二羟基黄酮 326,328
5,7-二羟色酮 134
二氢青蒿素 220
二萜 401
番茄红素 553
反相色谱 425
非水相系列溶剂系统 129
非洲爪蟾 249
分级沉淀 505,506,509

分离策略 519
分馏法 9
分配系数 128
分子筛 141
分子印迹技术 190,365
分子蒸馏技术 187
粉防己 340
呋喃香豆素 362
茯苓多糖 69
富集 149
甘草 435
甘草查耳酮 A 326,328
甘草查耳酮 B 326,328
甘草苷 327
甘草苷元 328
甘草黄酮 326,328
甘草葡聚糖 490
甘草素-7,4′-二葡萄糖苷 327
甘草酸 71
甘草皂苷 435
苷类 148
高三尖杉酯碱 298
高山红景天 550
高山黄芩素 313
高山黄芩素-7-*O*-β-D-吡喃葡萄糖苷 313
高圣草素 315
高圣草素-7-*O*-β-D-葡萄糖苷 315
高速离心法 185
高速逆流色谱-梯度洗脱法 135
高速逆流色谱仪 119,123,134
高碳糖核苷 459
高效快速中压制备色谱 111
高效液相分离 508
高效液相色谱 96,112,510,512
高效液相色谱及其联用技术 96
高效制备色谱条件的优化 113
高异芒果苷 330
藁本 345
葛根素 308
葛根素芹菜糖苷 308
葛香豆雌酚 308
根皮苷 559
枸杞多糖 70
固定相保留率 128
固相萃取法 8
关附甲素 264,302
关木通 340,342,343
广防己 340
硅胶 12
硅胶柱色谱 425
鬼臼毒素 349,353,354
鬼臼毒素类衍生物 355
过滤 511
海洋天然产物 517
蔊菜素 551
蒿甲醚 220
何首乌 379
核磁共振谱 198
核苷 456
核苷的分类 456
核苷的鉴别 463
核苷的性质 462
核苷酸 460
核糖核酸 238
鹤草酚 338
黑腹果蝇 249
红车轴草 311
红车轴草素 312
红外光谱 215
猴头菇聚糖 491
胡桐素 A 362
槲寄生 314
槲寄生新苷Ⅰ 315
槲寄生新苷Ⅱ 315
槲寄生新苷Ⅲ 315
槲寄生新苷Ⅳ 315

槲寄生新苷Ⅴ 315
槲寄生新苷Ⅵ 315
槲寄生新苷Ⅶ 315
槲皮素 315
虎杖 347
花青素 371
华中五味子 351
化学筛选方法 521
槐花米 306,319
黄甘草 328
黄甘草异黄酮A 328
黄甘草异黄酮B 328
黄木亭 369
黄芪皂苷 68,436
黄芩 306,321
黄芩苷 321
黄山药 445
黄酮 148
黄酮类化合物 134
灰叶素 332
活性蛋白质 503,508,511
活性筛选导向 522
活性肽 497,499,500,508,511,512
活性炭 15
积雪草 439
积雪草苷 135
积雪草酸 135
积雪草皂苷 439
基因工程 511
加兰他敏 290
加压液相柱色谱 23
3′-甲氧基葛根素 308
7-甲氧基香豆素 369
夹竹桃寡糖 492
减压液相色谱 26
键合相硅胶 13
箭藿苷B 317
箭叶淫羊藿 317
胶体特性 504
绞股蓝 433
绞股蓝皂苷 433
角鲨烯 134
结晶 31,503,510,511,514
结晶法 10
结晶技术 33
结晶条件 32
金属盐法 469
锦葵 329
锦葵花色素苷 329
晶体培养 34
精制 149
聚焦色谱 509
聚醚类化合物 530
聚酰胺 14
咖啡因 64,73
抗癌 497,503,504
抗病毒 500
抗菌 497,498,513
可卡因 72
苦楝素 419
快速分离 522
蜡状物质 11
雷公藤 224
雷公藤甲素 405
雷公藤内酯醇 224,405
离心薄层色谱 21
离子交换剂 15
离子交换色谱 505,509,510
离子通道抑制剂 498
梨 560
利血平 300
联苄类化合物 103
连续萃取法 154
两相分配 509
量子化学辅助CD计算 106
林麝 558

磷酸依托泊苷 356
铃兰毒苷 449
硫代葡萄糖苷 138
硫酸酯甾体 542
龙脑 395
芦丁 69,319
芦荟 372
芦荟大黄素 378
卤代烷系列溶剂系统 129
绿原酸 66,96
氯-联甲苯胺显色反应 463
卵白蛋白 138
卵转铁蛋白 138
麻黄碱 285
马兜铃 340
马兜铃酸 339
马兜铃酸 A 342
马钱子碱 299
蔓生百部 96
芒柄花苷 308,328
芒柄花素 312,328
芒柄素 308
芒果 329
芒果苷 330
芒果叶 330
莽草 558
莽草酸 558
毛猴鞘蕊花林素 406
毛花洋地黄 452
毛蕊异黄酮 312,328
矛头蝮蛇 513
酶 235,497～500,503,504,506,508
酶解法 488
D,L-没食子儿茶素 320
美洲花椒素 369
蒙古黄芪 436
密度梯度离心 509
绵马酚 338
绵马根酸 338
绵马酸 338
棉酚 339
免疫调节 503,513
膜分离法 10
膜分离技术 181
膜荚黄芪 436
木通 340
木通马兜铃 343
木香 340
木香内酯的超临界 CO_2 萃取 58
木脂素 71
木脂体 348
纳米颗粒 513
尼古丁 65
逆流分溶法 119
逆流色谱 119
逆流色谱溶剂系统 128
逆流色谱柱容积 128
鸟嘌呤核苷 457
尿嘧啶核苷 457
凝集素 510,513
凝胶 511
凝胶过滤 504,509,512,513
凝胶色谱 141
凝胶色谱原理 143
柠檬烯 394
苧烯 394
牛蒡 349
牛蒡子苷 349
牛蒡子素 349
浓缩技术 176
欧白芷 365
欧芹素 367
α-*P*-硼烷基核苷-5′-二磷酸 472
平卧稻花素 409
婆婆针 331
破碎提取法 160

葡聚糖凝胶 141
七叶树 443
七叶皂苷 443
脐橙 368
齐墩果酸 418
其他类型核苷 461
茜草 378,512
3′-羟基葛根素 308
7-羟基香豆素 365
12α羟基鱼藤酮 332
强心苷 449
鞘蕊花素 406
茄尼醇 131
亲和色谱 506,508,510,511,513,514
亲水成分 148
芹菜素 322
秦皮 369
秦皮甲素 369
秦皮乙素 365,369
青风藤 340
青蒿琥酯钠 220
青蒿素 67,219,259,399
青梅 366
青木香 340,342
楸毒素 338
去氢鱼藤素 332
去氢鱼藤酮 332
染料木苷 308,310
染料木素 308,310,312
人参 426
人参皂苷 67,72,137,426
溶剂系统的选择 131
溶解性 505,506
溶菌酶 138
熔接反应 469
鞣质 10
软木花椒素 369
瑞香素 369
三尖杉酯碱 298
三七 430
三七皂苷 136,430
7,3′,4′-三羟基-6-O-(3″,6″-二乙酰氧基-β-D-吡喃葡萄糖基)-橙酮 331
7,3′,4′-三羟基-6-O-(4″,6″-二乙酰氧基-β-D-吡喃葡萄糖基)-橙酮 331
5,7,4′-三羟基黄酮 313
5,6,4′-三羟基黄酮-7-O-β-D-半乳糖醛酸苷 313
5,7,4′-三羟黄烷酮 134
5,7,4′-三羟基双氢黄酮 313
7,3′,4′-三羟基-6-O-(6″-乙酰氧基-β-D-吡喃葡萄糖基)-橙酮 331
4,6,4′-三羟基异噢哚 331
5,7,4′-三羟基-8-异戊烯基黄酮 326
三萜 410
三萜皂苷 543
三叶鱼藤 332
桑色素反应 507
色谱分离 11
色素 149
3,5,6,4′-四羟基-7-甲氧基黄酮 313
沙尔威辛 262
筛选模型 241
山道年 400
蛇足石杉 224
麝香草酚 337
麝香酮 558
砷剂 261
升华法 10
生姜挥发油 67
生物毒素 497,498
生物碱 148,273,531
生物碱的超临界 CO_2 萃取 57
生物碱的鉴别 280
生物碱的颜色反应 279
圣草酚 134

石榴籽油 72
石杉碱甲 224,262
石仙桃 106
石油菜 97
士的宁 299
疏水吸附色谱 510
鼠 250
鼠李秦素 315
鼠李秦素-3-*O*-β-D-葡萄糖苷 315
薯蓣皂苷 444
双环醇 266
3-双键四氢大麻酚 338
双水相萃取 170
双水相体系 138
双水相系列溶剂系统 129
双缩脲反应 507
水飞蓟宾 323
水飞蓟宾 A 324
水飞蓟宾 B 324
水飞蓟宁 323
水飞蓟亭 323
水解 498,507,508
水蒸气蒸馏法 7
顺-4,6,4′-三羟基噢哚 331
四氢咪唑并二氮杂草核苷 458
酸碱性 505,509
蒜辣素 562
肽基核苷 459
碳核苷 459
碳环核苷 MNPA 470
糖基核苷 459
糖菊苷 409
桃儿七 349,353～355
特异亲和性 506
提取分离 507,511
替尼泊苷 350,355
天麻多糖 70,492
天麻素 263
天然产物的结构鉴定 198
天然产物的收集和加工 253
天然产物的提取 5
天仙藤 340
甜茶素 409
甜叶菊苷 409
萜类 148
萜类化合物 383,523
通过 HPLC 优化洗脱条件 116
透析 504,509,514
土贝母 440
土贝母皂苷 440
土槿皮甲酸 403
土槿皮酸 403
土槿皮乙酸 403
脱氧核糖核酸 238
烷烃系列溶剂系统 129
威灵仙 340
威灵仙挥发油的超临界 CO_2 萃取 59
微波辅助萃取技术 62,63
微囊藻毒素 73
窝儿七 350,353
乌拉尔甘草 327
五加果挥发油 67
3,5,6,7,4′-五羟基黄酮 313
五味子 350,351
五味子丙素 351,357
五味子醇甲 356,357
五味子甲素 357
五味子乙素 357
五味子酯甲 351
西地兰 449,453
西红柿 553
西藏猫乳 331
吸附澄清技术 179
吸附色谱 510
吸附树脂的选择 85
吸附树脂的预处理 87

希普林 262
喜鹊蛾 550
喜树碱 68,221,295
细胞核受体 234
细胞膜离子通道蛋白 232
细花百部 106
细辛 342,353
细辛素 351～353
D-细辛素 352
L-细辛素 352
狭叶柴胡 438
仙鹤草酚 338
腺嘌呤核苷 457
香豆素 362,369
香石竹 560
小檗碱 265,286
小前胡 365
邪蒿素 369
心叶淫羊藿 317
新异甘草苷 327
须松萝 337
玄参苷 65,66
旋光性 504
旋流提取法 170
旋转对映异构现象 106
旋转能垒 107
血栓 498
寻骨风 340
岩白菜素 367
延胡索生物碱 286
延胡索乙素 289
盐溶 506
盐析 509
颜色反应 504,507
洋地黄毒苷 449
氧化铝 13
药物靶标 229
野八角 558
野葛 308
叶绿素 11
液滴逆流色谱 119
液-固色谱 12,18
液相色谱-核磁共振联用 103
液相色谱-圆二色谱在线联用技术 105
液相色谱-质谱联用技术 99
液-液萃取法 8
液-液分配色谱 425
液-液色谱 27
依托泊苷 355
乙酸乙酯系列溶剂系统 129
异甘草苷 327
异甘草苷元 328
异芒柄花素-4′-葡萄糖苷 327
异芒果苷 330
异欧前胡素 365
异鼠李素素-3-*O*-β-D-葡萄糖苷 315
异鼠李素素-7-*O*-β-D-葡萄糖苷 315
异水飞蓟宾 323
异水飞蓟宾 A 324
异水飞蓟宾 B 324
银杏内酯 263,404
银杏新内酯 400
淫羊藿 317
淫羊藿次苷-Ⅱ 317
淫羊藿苷 317
印楝素 418
樱黄素 312
鹰嘴豆芽素 A 312
柚皮苷 117
柚皮芸香苷 117
有机酸 148
玉米黄质 555
原麝 558
越橘 379
越橘花色苷 135
越南百部 100

甾体类化合物 529
甾体糖苷 543
C_{21}甾体酯苷 70
皂苷 423
樟柳碱 301
樟脑 394
胀果甘草 326,328
正交轴逆流色谱仪 119,123,125
芝麻 349
芝麻素 349,351,352
D-芝麻素 352
L-芝麻素 352
脂酰次黄苷衍生物 468
脂酰核苷 459
直立百部 103
纸色谱 27
酯肽 500
制备型薄层色谱 20
质谱 211
轴手性 106
朱砂莲 340
柱色谱 22
柱体积数 113
紫草素 68
紫甘薯 381
紫花前胡 367
紫花前胡醇 365
紫花前胡次素 365,367
紫花前胡次素C 367
紫花前胡苷 365
紫花前胡苷元 365
紫花前胡内酯 367
紫花前胡素 365
紫花水飞蓟 323
紫金牛酚Ⅰ 337
紫金牛酚Ⅱ 337
紫外-可见光谱 213
紫外吸收 504
棕榈碱 289
组织破碎 508
6-*O*-(6″-acetyl-β-D-glucopyranosyl)- 6,7,3′,4′-tetrahydroxyaurone 331
agrimol 338
agrimophol 338
alkannin 68
allicin 562
aloe-emodin 378
andrographolide 407
anisodine 301
anthocyanidin 371
anthraquinone 371
apigenin 322
arctigenin 349
arctiin 349
ardisinol Ⅰ 337
ardisinol Ⅱ 337
aristolochic acid 339
artemisinin 67,219,399
asarinin 351
Ash bark 369
aspidinol 338
astilbin 121
astragaloside 68
atropisomerism 106
azadirachtin 418
baicalin 321
baohuoside Ⅰ 317
baohuoside-Ⅱ 317
benzoyl-ecgonine 72
bergenin 367
betulinic acid 417
bilobalide 400
biochanin A 312
borneol 395
brucine 299
caffeine 64

calanolide A 362
calycosin 312,328
camphor 394
camptothecin 221,295
camptothecin 68
chlorogenic acid 66
chrysophanol 378
column volumes 113
cordycepin 466
coumarin 362,369
cubebin 349
cyanidin-3-*O*-sambubioside 379
D,L-C 320
D,L-GC 320
daidzein 310
daidzein-4′-glucoside 308
daidzein-7,4′-diglucoside 308
daidzin 310
daphnetin 369
decursidin 365
decursin 365
decursinol 365
dehydrodeguelin 332
dehydrorotenone 332
delphinidin-3-*O*-sambubioside 379
6-*O*-(3″,6″-diacetyl-β-D-glucopyranosyl)-6,7,3′,4′-tetrahydroxyaurone 331
6-*O*-(4″,6″-diacetyl-β-D-glucopyranosyl)-6,7,3′,4′-tetrahydroxyaurone 331
diallyl thiosulfonate 562
7,4′-dihydroxyflavone 326
Dische 反应 463
echinatin 326
Emerson 试剂 363
emodin 68,378
emodin-6,8-dimethyl ether 379
emodin-8-*O*-(6′-*O*-acetyl)-β-D-glucoside 379
emodin-8-*O*-β-D-glucoside 379
esculetin 365
esculin 369
etopophos 356
etoposide 350,355
eurycarpin A 328
eurycarpin B 328
ferulic acid 339,343
filicinic acid 338
filixic acid 338
formononetin 308
forskolin 406
genistein 310
genistin 310
Gibb 试剂 363
ginger oil 67
ginkgolide 404
ginseng saponin 67
glycyrrhizic acid 71
gomisin G 350
gossypol 339
Guan Fu base A 302
harringtonine 298
Hilbert-Johnson 反应 469
homoeriodictyol 315
homoeriodictyol-7-*O*-β-D-glucoside 315
homoharringtonine 298
homoisomangiferin 330
HPFC 111
HPLC 96,112
huperzine A 224
4′-hydroxybaicalein-7-*O*-β-D-glucopyranosiduronic acid methylester 313
7-hydroxycoumarin 365
3′-hydroxypuerarin 308
12α-hydroxyrotenone 332
12αβ-hydroxyrot-2′-enonic acid 332
icariside 317

ikarisoside C 317
ikarisoside F 317
irilone 312
isoastilbin 121
isoformononetin-4′-glucoside 327
isoimperatorin 365
isoliquiritigenin 328
isoliquiritin 327
isomangiferin 330
isorhamnezin-3-*O*-β-D-glucoside 315
isorhamnezin-7-*O*-β-D-glucoside 315
isosilybin 323
isosilybin A 324
isosilybin B 324
Jararacussin-I 513,514
LC-CD 105
LC-DAD-MS 103
LC-MS, LC-MS/MS 99
LC-NMR 103
LC-UV-NMR 103
licochalcone A 326
licochalcone B 326
licoflavone 326
licoisoflavone A 328
limonene 394
liquiritigenin 328
liquiritigenin-7,4′-diglucoside 327
liquiritin 327
lycopene 553
L-EC 320
L-ECG 320
L-EGC 320
L-EGCG 320
magnesium lithospermate 346
magnesium salvianolate B 346
malvin 329
mangiferin 330
marmesin 367
MCI GEL 17
menthol 393
7-methoxycoumarin 369
3′-methoxypuerarin 308
microcystin 73
microwave-assisted extraction, MAE 63
mirificin 308
Mitsunobu 反应 469
molecular imprinting technique, MIT 365
mr10a 512
muscone 558
neoisoliquiritin 327
nicotine 65
nodakenetin, marmesin 365
nodakenin 365
nodularins 73
oleanolic acid 418
ononin 308
ostruthin 367
pachman 69
paeonol 337
3,5,6,7,4′-pentahydroxyflavonoid 313
PG490 224
phlorizin 559
physcion 378
physcion-8-*O*-β-D-glucoside 379
podophyllotoxin 349,353
pomegranate seed oil 72
pratensein 312
prostratin 409
prunetin 312
pseudolaric acid A 403
pseudolaric acid B 403
puerarin 308
puerarol 308
pyrethrin 395
quercetin 315
questin 379

RA-VII 512
reserpine 300
resveratrol 347
rhamnezin 315
rhamnezin-3-*O*-β-D-glucoside 315
2‴-*O*-rhamnosyl icariside-Ⅱ 317
rhein 377
rhinanthin 65
rorifone 551
rottlerin 338
rutin 69,319
sagittatoside B 317
sanguisorbin 67
santonin 400
sarmentosin 549
schisandrin 357
schisandrin A 357
schisandrin C 357
schisantherin A 351
schizandrin C 351
scutellarein 313
scutellarein-7-*O*-β-D-glucopyranoside 313
scutellarin 313
Sephadex LH-20 146
sesamin 349,351
seselin 369
shikimic acid 558
shimofuridin A 468
silybin 323
silybin A 324
silybin B 324
silychristin 323
silydianin 323
Silyl-Hilbert-Johnson 反应 469
stevioside 409
strychnine 299
suberosin 369
tannin 71
tanshinone 68,408
tea polyphenols 64
teniposide 350,355
tephrosin 332
3,5,6,4′-tetrahydroxy-7-methoxyflavonoid 313
Δ^3-THC 338
thymol 337
toosendanin,chuanliansu 419
(*Z*)-4,6,4′-trihydroxyaurone 331
5,7,4′-trihydroxyflavanone 313
5,6,4′-trihydroxyflavone-7-*O*-β-D-galactopyranosiduronic acid 313
5,7,4′-trihydroxyflavonoid 313
4,6,4′-trihydroxyisoaurone 331
5,7,4′-trihydroxy-8-prenyl-flavone 326
triptolide 224,405
UPLC 96
vinblastine 292
vincristine 292
viscumneoside Ⅰ 315
viscumneoside Ⅱ 315
viscumneoside Ⅲ 315
viscumneoside Ⅳ 315
viscumneoside Ⅴ 315
viscumneoside Ⅵ 315
viscumneoside Ⅶ 315
xanthoxyletin 369
xanthyletin 369
zeaxanthin 555

动、植物名称索引(拉丁文)

Abraxas grossulariata L. 550
Aesculus chinensis Bge. 443
Akebia quinata 340
Allium sativum 561
Aloe saponaria Haw 372
Angelica czernaevia Kitaforma dentate Yook 365
Angelica sinensis 345
Archangelica officinalis 365
Arctium lappa 349
Aristolochia manshuriensis Kom 343
Aristolochia contorta 340
Aristolochia debilis 340
Aristolochia manshuriensis 340
Aristolochia mollissima 340
Asarum forbesii 340
Asarum sieboldii 340,353
Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge. 436
Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge. var. *mongholicus*(Beg.) Hsiao 436
Aucklandia. lappa 340
Baccharis genistelloides 323
Baccharis trimera Less. 323
Bidens bipinnata L. 331
Bolbostemma paniculatum (Maxim.) Franquet 440
Bothrops jararacussu 513
Bupleurum scorzoneriflium Wild. 438
Bupleurum chinense DC. 438
Cannabis sativa 338
Catharanthus roseus 380
Centella asiatica(L.) urban 439
Citrus sinensis 368
Clematis armandii 340
Clematis chinensis 340
Derris trifoliata Lour. 332
Dianthus caryophyllus 560
Dioscorea nipponica Makino 444
Dioscorea panthaica Prain et Burkill 445
Dioscorea zingiberensis 445
Diphylleia sinensis 350,353
Dolomiaea souliei 340
Dysosma versipellis 350,353
Epimedium brevicornum Maxim. 317
Epimedium grandiflorum Morr. 317
Epimedium sagittatum Maxim. 317
Erigeron breviscapus (Vant.) Hand.-Mazz. 312
Glycine max Merrill 310
Glycyrrhiza eurycarpa P. C. Li 328
Glycyrrhiza inflata Bat. 326,328
Glycyrrhiza uralensis Fisch 327,435
Gynostemma pentaphyllum Makino 433
Huperzia serrata 224
Illicium simonsii Maxim. 558
Ligusticum chuanxiong 345
Lithocarpus polystarch 561
Lycium barbarum 70
Malva sylvestris L. 329
Mangifera indica L. 329
Menispermum dauricum 340
Moschus moschiferus L 558
Mosochus bersxoxskii Fleror 558
Panax ginseng C. A. Mey 426
Panax notoginseng 430

Peucedanum decursivum (Miq.)Maxim. 367
Pholidota chinensis 106
Pilea cavaleriei 97
Polygonum cuspidatum Sieb. et Zucc. 347
Polygonum multiflorum Thumb. 379
Pueraria lobata (Willd.)Ohwi 308
Pyrus communis 560
Rhamnella gilgitica Mansf. et Melch. 331
Rheum palmatum L. 377
Rhodiola sinoalpina (Frod.)S. H. Fu 550
Roripa indica (Linn)Bailay 550
Roripa montana (Wall.)Small 550
Rubia cordifolia L. 378
Salvia miltiorrhiza Bunge 345
Schisandra chinensis 350
Schisandra sphenanthera 351
Scutellaria baicalensis Georgi 306,321
Sedum sarmentosum Bunge 549
Sesamum indicum 349
Silybum marianum (L.) Gaertn 323
Sinomenium acutum 340
Sinopodophyllum hexandrum 349,353
Solanum lycopersicum 553
Sophora japonica L. 306,319
Stemona cochinchinensis 100
Stemona japonica 96
Stemona parviflora 106
Stemona saxorum 102
Stemona sessilifolia 103
Stephania tetrandra 340
Trifolium pratense L. 311
Tripterygiun wilfordii 224
Usnea barbata 337
Vaccinium myrtillus 379
Vatica mangachapoi Blanco 366
Viscum coloratum (Kom.)Nakai 314