

“十二五”国家级民族药学实验教学示范中心系列教材



化学生物学实验

舒广文 洪宗国 尹世金 主编

HUAXUE SHENGWUXUE
SHIYAN



化学工业出版社

“十二五” 国家级民族药学实验教学示范中心系列教材

化学生物学实验

舒广文 洪宗国 尹世金 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

《化学生物学实验》在内容上主要分为两大部分。第一篇介绍化学生物学实验中涉及的基本实验技术,包括天然小分子化合物和蛋白质的提取分离技术、化学生物学实验分析技术以及细胞培养技术;第二篇则从化学生物学因素的分离提取与相互作用、化学生物学因素对细胞生命活动的影响和化学生物学因素对动物生命活动的影响三个不同角度,安排了35个操作性较强的学生实验进行介绍。通过本书的学习,学生可以训练化学生物学基本实验技能,巩固化学生物学基础理论知识,培养从事化学生物学科研工作的基本能力。

《化学生物学实验》是“十二五”国家级民族药实验教学示范中心系列教材之一,也是2015年湖北省高等学校省级教学项目“化学生物学实验课程传统与半开放模式协同教学的探索与研究(2015195)”的成果之一,可作为普通高等院校化学生物学专业、药学及相关专业开设化学生物学实验课程的教材,也可以作为从事化学生物学专业技术工作者的参考书使用。

图书在版编目(CIP)数据

化学生物学实验/舒广文,洪宗国,尹世金主编. —北京:化学工业出版社,2016.3

“十二五”国家级民族药实验教学示范中心系列教材

ISBN 978-7-122-25968-4

I. ①化… II. ①舒…②洪…③尹… III. ①生物化学-实验-教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第000016号

责任编辑:褚红喜 宋林青

文字编辑:张春娥

责任校对:边涛

装帧设计:关飞

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印装:三河市万龙印装有限公司

710mm×1000mm 1/16 印张12 $\frac{3}{4}$ 字数254千字 2016年4月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:30.00元

版权所有 违者必究

《化学生物学实验》编写组

主 编：舒广文 洪宗国 尹世金

编 者（以姓氏笔画为序）：

尹世金 帅 丽 胡 鑫 洪宗国

徐 婧 黄 蓉 程 寒 舒广文

前言

近几十年来,生命科学各分支学科取得了巨大的进展。这些新成果鼓舞着人们不仅仅满足于在分子水平去不断认识生命现象的本质,而且更渴望依据一定的需求对生命活动进行人为干预以满足人们生产生活的需要。在生命科学飞速发展的同时,化学经历了几个世纪的发展也日趋成熟。目前,研究和解决与生命现象相关的化学问题,已经成为化学学科近几十年发展的主要动力。随着化学与生命科学的日益融合渗透,科研工作者把生物化学、结构生物学、天然产物化学、药物化学等学科有机地结合起来,提出了“化学生物学”(chemical biology)这一崭新的学科概念。美国加利福尼亚大学药学院网站主页对化学生物学给出的定义是:“composition, structure, properties, and interactions of chemicals within living organisms”,即认为化学生物学是一门研究与生命体相关化学物质的组成、结构、性质及其相互作用的学科。

发现和鉴定具有生物学活性的化合物是化学生物学的核心研究内容之一。包括中医、民族医药在内的祖国传统医学典籍记载了大量天然药材对疾病的治疗作用。这就暗示着从传统药材中制备的化学分子很有可能对与其适应证相关的生命活动具有较强的干预能力。这无疑为发现新的能够干预生命活动的化学小分子提供了重要线索。此外,化学生物学研究可以不断揭示传统医药治疗疾病的活性物质基础,为传统医药向现代化、正规化方向发展不断注入源头活水。为了适应推动祖国传统医药和化学生物学这一新兴学科有机融合的需求,中南民族大学药学院开设了化学生物学这一本科专业。本专业旨在培养具有坚实的化学与生物学基础理论知识、具有熟练的化学与相关生物学实验技能、具备从事药物研究开发和化学生物学交叉领域科学研究工作基本能力的复合型人才。

化学生物学学科是一门实验性很强的学科。化学生物学实验教学在化学生物学专业人才培养中扮演着举足轻重的作用。

中南民族大学药学院化学生物学教研室的几位同仁，结合自己的教学、科研工作经历，参考国内外相关文献资料，编写了这本《化学生物学实验》教科书。本书可作为普通高等院校化学生物学专业或相关专业开设“化学生物学实验”课程的教材，也可以作为从事化学生物学专业技术工作者的参考书。从内容上看，本书大体可以分为两大部分。第一篇介绍化学生物学实验中可能涉及的一些基本的分离提取、定性与定量分析以及细胞培养技术；第二篇从化学生物学因素的分离提取与相互作用、化学生物学因素对细胞生命活动的影响和化学生物学因素对动物生命活动的影响三个不同角度，安排了 35 个操作性较强的学生实验供读者参考。其中第一篇的第一章与第二章，第二篇中实验十四、十八、二十四、二十五、三十三、三十四、三十五由舒广文编写；第一篇的第三章，第二篇中实验四、十、十九、二十、二十一、二十二由黄蓉编写；尹世金编写实验二十三、二十七、二十八、二十九、三十、三十一；徐婧编写实验一、三、六、八、十一、十二、三十二；帅丽编写实验二、五、七、九、十三；洪宗国编写实验十六、十七；程寒编写实验十五；胡鑫编写实验二十六。舒广文将以上内容汇编成书，洪宗国、尹世金审阅全书。

本书的编写和出版得到了国家级民族药实验教学示范中心的资助，得到了中南民族大学舒广文副教授主持的 2015 年湖北省高等学校省级教学研究项目“化学生物学实验课程传统与半开放模式协同教学的探索与研究（2015195）”的资助，得到了中南民族大学药学院领导班子的大力支持以及化学工业出版社的大力协助，在此向他们表示诚挚的谢意。

尽管我们做出了很大的努力，但由于编写时间和编者学识有限，书中对某些问题的理解难免有不妥之处，恳请读者批评指正。

编者

2015 年 10 月

于南湖畔

目 录

第一篇 化学生物学实验基本技术 / 1

第一章 天然小分子化合物和蛋白质的提取分离技术	2
第一节 植物提取物的制备与质量控制	2
第二节 蛋白质的提取与纯化	15
第二章 化学生物学实验分析技术	27
第一节 滴定分析	27
第二节 电泳分析	39
第三节 生物荧光分析	50
第三章 细胞培养技术	64

第二篇 化学生物学综合实验 / 74

第四章 化学生物学因素的分离提取与相互作用	75
实验一 植物总 DNA 的提取	75
实验二 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	78
实验三 铜配合物氧化断裂 DNA 研究	81
实验四 钨酸钾-过氧化氢体系检测单链 DNA 中的鸟嘌呤位点	84
实验五 四链 DNA 的合成及鉴定	87
实验六 Brachet 检测细胞中的 DNA 与 RNA	89
实验七 SDS-PAGE 电泳法测定牛血清蛋白的相对分子质量	91
实验八 多酚氧化酶的提取、蛋白质含量及催化活力测定	96
实验九 首乌总提取物对乙酰胆碱酯酶的抑制	99
实验十 基于核酸适配子的非标记荧光法检测凝血酶	105
实验十一 绿原酸抗脂质过氧化能力的检测	108
实验十二 凝胶过滤色谱法分离血红蛋白	111
实验十三 土豆磷酸化酶的分离及直链淀粉的酶合成	114

实验十四	大蒜 SOD 的提取与分离	117
实验十五	尼龙固定化木瓜蛋白酶及其应用	123
实验十六	植物挥发油的水蒸气回流提取	126
实验十七	初生态微晶法制备药物纳米胶囊	129
实验十八	果蔬中维生素 C 含量的测定	132
第五章	化学生物学因素对细胞生命活动的影响	136
实验十九	MTT 法测定 5-氮杂胞苷对乳腺癌细胞的毒性	136
实验二十	基于 γ -H2AX 的免疫荧光法检测细胞中 DNA 双链断裂	140
实验二十一	Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术检测细胞凋亡	144
实验二十二	阳离子脂质体转染宫颈癌细胞实验	147
实验二十三	大肠杆菌中诱导表达红色荧光蛋白	150
实验二十四	细胞凝集反应和细胞膜通透性的观察	154
实验二十五	聚乙二醇诱导的细胞融合	157
第六章	化学生物学因素对动物生命活动的影响	160
实验二十六	地塞米松诱导小鼠脾淋巴细胞凋亡	160
实验二十七	化学生物学因素对离体蛙心舒缩活动的影响	163
实验二十八	调节家兔呼吸运动的化学生物学因素	166
实验二十九	辣椒素受体激动剂和抑制剂对小鼠痛觉行为的调节作用	170
实验三十	家兔心血管活动调节的化学生物学因素	174
实验三十一	家兔尿生成调节的化学生物学因素	178
实验三十二	环境对斑马鱼胚胎发育的干扰检测	183
实验三十三	高脂饲料喂养对小鼠肝脏脂肪酸 β -氧化的影响	186
实验三十四	环磷酸胺对小鼠巨噬细胞吞噬功能及 NO 分泌能力的 影响	189
实验三十五	黄芪多糖的提取及其对小鼠脾细胞增殖能力的影响	193

第一篇

化学生物学实验

基 本 技 术

第一章

天然小分子化合物和蛋白质的提取分离技术

第一节 植物提取物的制备与质量控制

化学生物学研究的最终目的之一是实现利用化学分子对生命活动的人为调节。显然,疾病是一种生命活动,只不过是异常的生命活动,是会对机体产生不利影响的生命活动。对疾病的治疗,也就是要调节这种异常的生命活动,使之向着正常方向发展。治疗疾病的手段很多,通俗地来讲,有“吃药”、“打针”、“按摩”、“放疗”、“手术”等。其中最常用的“打针”和“吃药”都是运用化学分子来调节异常的生命活动。“按摩”、“放疗”和“手术”是以物理手段为主的治疗方法,显然,它们的应用范围远不及“吃药”和“打针”。此外,即使在“手术”过程中,也需要使用很多药物对病人实施医学干预。那么,人们常说的“药物”这个词究竟是指什么?《现代汉语词典》(第6版)对于“药物”的解释就是“能防治疾病、病虫害等的物品”。英文版“维基百科”对相应英文单词“drug”的解释则更为详尽——“A drug is, in the broadest of terms, a chemical substance that has known biological effects on humans or other animals. In pharmacology, a drug is ‘a chemical substance used in the treatment, cure, prevention, or diagnosis of disease.’”依据这一解释,广义的“药物”可以指任何对人类或其他动物具有生物学效用的化学物质,而药理学研究领域的“药物”则专指能用于治疗、预防或者诊断疾病的化学物质。我国高等学校《药物分析》课程教科书上则一般把“药品”定义为“用于预防、治疗、诊断人的疾病,有目的地调节人的生理机能并规定有适应证和用法用量的物质”。无论哪一种对“药”的定义,都与“化学物质”和“疾病”有关的表述紧密相关。因此,探索研发药物的过程,很大程度上就是寻找对某种疾病相关异常生命活动具有特异性调节作用的化学物质的过程。由此可见,医药是化学生物学

的重要应用领域，也是化学生物学研究的前沿阵地之一。

那么，首要问题就是，能够用于医药的化学分子从哪里来？在中国传统医学里，“药”与植物有着不解之缘。唐朝学者司马贞在《三皇本纪》篇中写到：“神农氏尝百草，始有医药”。此中的“百草”泛指各种植物。神农氏是我国传说中远古的圣贤君主，他通过“尝”这种人类与生俱来的最朴素、最天然、最直接的方法来认识植物对人体的作用，从而建立了原始的医药体系，服务于当时人的健康，从而赢得了人们的拥戴。在古书《说文解字》中，也将“药”解释为“治病草”，即具有治疗疾病功效的植物。古人的经验从一个侧面反映出植物中富含能够调节人类生命活动的化学物质。这一经验也得到了当代科学的证实。因此，分析植物有效成分对生命活动的调节作用也就成为化学生物学研究的重点内容之一。要分析植物有效成分的生物活性，首先就需要把植物的有效成分提取出来，然后以一定浓度的植物提取物作用于生物系统，以此研究该物质的活性及作用机制。因此，这里首先介绍植物有效物质的提取、制备与分析技术。

一、植物次生代谢产物是生物活性分子的重要来源

1. 植物天然产物与药物研发的“先导化合物”

药物研发工作具有其独到的内在规律性。一般而言，药物研发工作都起始于一个对某种生命活动具有潜在调节作用的“先导化合物”。先导化合物的生物学活性可能还没有达到治疗的要求，也可能具有一定的毒性，但这些并不影响先导化合物存在的价值，因为“先导化合物”本身通常并不作为药物直接用于临床。在得到特定的先导化合物后，通常下一步研究工作要解决的问题就是通过化学结构修饰改造以及药效/毒性评价来获得药效更好、毒性更低的化学实体用于临床。可以说，有了“先导化合物”，下一步的研究工作才得以开展。

那么，先导化合物从哪里来？这个问题包含两个方面：一是研究者可以从哪些资源获得先导化合物；二是研究者通过何种手段去了解哪个或者哪些化合物具有药学家们想要的生物学活性。生物化学、分子与细胞生物学、结构生物学、遗传学、病理学等生命科学与医学的理论研究为解决第二个方面的问题提供了很好的策略性指导。通过理论研究，人们不断地揭示出一系列生物大分子（如酶、受体、转录因子等）的表达水平、翻译后折叠与修饰等因素异常与某些重大疾病的发生发展密切相关。

根据这些理论成果，人们可以首先在分子或者细胞水平设计出一系列的活性检测系统，比如，如果某一种酶的活性与某种疾病密切相关，则可以在体外构建该酶的活性测试系统，利用这样的系统来挑选那些能够增加或降低该酶活性的物质作为潜在的先导化合物。例如 α -葡萄糖苷酶是影响血糖吸收的关键酶，通过在体外构建该酶的活性测试体系，可以筛选出具有潜在缓解糖尿病活性的先导化合物；又如 β -羟基- β -甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶（HMG-CoA 还原酶）是胆固醇合成代谢的关键酶，人们既可以在分子水平构建该酶的活性测试体系，筛选能够抑制该酶活

性的化合物，又可以在细胞水平构建该酶的表达水平报告系统（用该酶编码基因的启动子带动荧光素酶基因的表达，通过测量荧光素酶的活性来代表该酶的蛋白表达水平），筛选能够抑制该酶表达水平的化合物。这些物质都是潜在的降胆固醇药的先导化合物。又如，为了筛选抗肿瘤的药物，可以在体外分别构建肿瘤细胞和正常细胞的培养物，在一定浓度范围内可以有效地杀死肿瘤细胞，但对正常细胞影响较小的物质则可以作为抗肿瘤药物的先导化合物等。先导化合物筛选的手段多种多样，令人应接不暇。

随着生产自动化的进一步提高，有的高通量筛选系统可以在较短的时间内从成千上万种不同的化合物中辨析出有潜力的化合物来。那么剩下的问题就是筛选的对象从哪里来？从目前的经验来看，往往需要筛选成千上万的不同的化合物才能得到一两个好的化合物。那么，人们又到哪里才能找到这么多结构各异的化合物来支持高通量筛选系统呢？

从古到今，人类能够得到的化合物一般有两个来源：一是人工合成的化合物；二是天然化合物。一般认为，天然化合物成为药物开发先导化合物的潜力比人工合成的化合物要大。从数量上看，天然化合物种类的数目远远超过了人工合成的化合物。尽管近年来人们开发了动态组合化学的方法来合成为数众多的化合物，但是由于合成这些化合物的原料结构难免过于单调，它们表面结构的复杂性仍然远远不及天然化合物。从合成过程来看，天然化合物是通过一系列酶促反应由生命体自主合成的。在生物体内，天然化合物的合成一般都需要经过十几步甚至几十步酶促化学反应才能完成。也就是说，一个天然化合物在其合成过程中需要经过多次与蛋白质的相互作用。而人工合成的化合物则不同，它们在产生过程中没有或者很少与蛋白质分子发生相互作用。由于大多数药物都是通过影响蛋白质的结构和功能来达到调节细胞或机体生命活动的目的，因此，化学分子与以蛋白质为代表的生物大分子相互作用就构成了化学分子调节生命活动过程中的关键环节和必由之路。由此可见，由酶蛋白催化产生的天然产物自然就比较没有经过酶促反应的人工合成化合物与其他蛋白质发生相互作用的能力强一些，天然化合物成为先导化合物的潜力也就会大一些。

那么，为什么是植物而不是高等动物最后成为了药物开发先导化合物的主要来源呢？问题的答案就隐藏在动物和植物适应自然生存环境的不同机制之中。动物和植物最大的区别就是动物会“动”。因此，动物对环境中的不利因素最有效的应对手段就是逃避或远离。对于已经入侵到体内的外源性物质，高等动物体内则有一套高度进化的免疫系统来应对。植物则不同，植物体内没有免疫系统，不能逃避环境中的入侵者。然而，植物在环境中遇到的挑战却并不比动物少，比如有细菌或者真菌的感染、高等动物或昆虫的啃食以及其他植物对生存资源的竞争等。合成大量的次生代谢产物如多糖、皂苷、黄酮、生物碱、挥发油、萜类、甾醇等，这些物质是植物应对环境挑战的重要手段。这些物质有的可以杀灭或者抑制细菌、真菌的生长；

有的能够抑制其他植物竞争生存环境；有的可以给啃食植物的动物或者昆虫带来不适的感觉……它们为植物在大自然激烈的生存竞争中占有一席之地做出了重要的贡献。从纯粹的自然进化的角度来看，植物产生这些化合物的本意并不是给人类制造医药。而值得注意的是，植物来源的天然产物目前已经成为人类正在使用药物的重要组成部分。人类可以充分利用植物来源的天然化合物为自身的生命健康服务，这不能不说是人类智慧的集中体现之一。

2. 植物及中草药提取物是现阶段利用植物活性成分的重要形式

说到植物来源的天然产物的潜在药用价值，就不能不提到中草药。中草药是中国传统文明和文化的瑰宝之一。在中华民族繁衍发展的历史长河中，我们的祖先不断地利用植物来源为主的天然产物和疾病做斗争，并将斗争的经验用当时较为先进的阴阳五行范畴加以概括总结，形成了一套独具特色的中医药理论体系。所谓中草药，一般是指在中医药理论的指导下应用的植物药。很多中草药或中草药复方以其简、效、便、廉的特征和优势至今仍在广泛应用。然而，中草药及其复方在应用过程中也存在不少问题，主要有以下两方面。

其一，中草药的有效成分是植物药材中的天然化合物。这些物质在药材中的含量会受植物生长环境、生长年限、采收时间与采收技术等诸多不易控制因素的影响。当中草药的有效成分含量发生波动时，其疗效也就不可避免地受到了影响。如何才能保证每一批药品疗效的一致性呢？

其二，很多中草药复方都是由几味甚至十几味药材组合而成，这样多的药材汇集在一起，其重量、体积都会比较大，病人携带不方便。同时，中草药的煎煮过程相对比较耗时耗力，病人服用不方便。如何才能有效缩减其重量和体积，便于病人使用呢？

这些问题给中草药产业的发展提出了新的要求。一种最符合当代制药工业理念的发展模式是从中草药或中草药复方中提取出对其发挥治疗药效起到关键作用的有效成分作为先导化合物。然后对先导化合物进行化学结构修饰改造获得药效更好、毒性更小的衍生物，将衍生物进一步开发成合适的剂型，制定相应的质量控制标准。青蒿素系列抗疟疾药物的研发过程就是这样一种模式的一个很好的例子。但遗憾的是，并不是每一味药材、每一个复方在现阶段都能找到它们的关键性药效成分，而且在很多情况下，一个中草药复方需要在一类成分或者多个成分的协同作用下才能发挥作用，仅仅只分离一两种物质不能发挥药效。鉴于这种情况，人们便考虑试着把整个中草药或中草药复方中可能的有效成分全部提取出来，以提取物的形式规定一定的质量控制标准制成制剂供患者使用。到目前为止，已有部分中草药以这种形式开发为中成药产品。

“小柴胡汤”是中草药复方以提取物的形式开发为成药的典型例子。“小柴胡汤”是东汉名医张仲景在我国古代医学著作《伤寒论》中记载的一个千古名方，由柴胡、黄芩、人参、甘草、半夏、生姜、大枣共七味药材组合而成，主治中医伤寒

少阳诸症候，至今仍有广泛的临床应用。经典的服用方法为每副药取柴胡 12g、黄芩 9g、人参 9g、半夏（姜制）9g、甘草 5g、生姜 9g、大枣 4 枚，以水 1.2L，煎煮后取 600mL，去滓，再煎取 300mL，分两次温热服用。在经典用法中，每副药的重量都在 50g 以上，而煎煮的过程也需要大量的时间。目前已经将“小柴胡汤”中草药方剂改进成为“小柴胡片”和“小柴胡颗粒”两种成药，收载入 2015 年版《中国药典》。以“小柴胡片”为例，其组方与传统的“小柴胡汤”类似，仅是为了节省成本，把价格昂贵的人参换成了价格相对便宜但疗效相似的党参。其处方为柴胡 445g、黄芩 167g、党参 167g、姜半夏 222g、甘草 167g、生姜 167g、大枣 167g（总共约 1.5kg）。“小柴胡片”的制备过程：备足以上七味药材，从中取党参 45g、甘草 45g 粉碎为细粉；剩余的党参与甘草、柴胡、黄芩、大枣加水煎煮 2 次，每次 1.5h，合并煎液，滤过，滤液浓缩至适量；姜半夏、生姜用 70% 的乙醇作溶剂，浸渍 24h 后，缓缓渗漉，收集渗漉液约 1670mL，回收乙醇，与上述浓缩液合并，浓缩成稠膏，加入上述细粉及适量辅料，混匀，干燥，粉碎成细粉，制颗粒，干燥，压制成 1000 片，或包薄膜衣，即得。从以上制备过程来看，首先用水作为溶剂，用煎煮的办法制得了柴胡、黄芩、党参、甘草和大枣五味药材的总提取物。然后用 70% 的乙醇作为溶剂，用浸渍和渗漉制得了姜半夏和生姜两味药材的总提取物。之所以选取的提取溶剂和提取方法不同，是因为前五味药材的有效成分极性较高，易溶于水，对热稳定，不易挥发，故选取水作为溶剂，用煎煮法制备总提取物。而姜半夏和生姜两味药材的有效成分中含有一定量的挥发油。这类成分极性较小，不易溶于水，故选取极性比水小的乙醇作为主要溶剂来提取。提取过程中要尽量避免高温，故使用浸渍和渗漉的方法而不是煎煮的方法来制备姜半夏和生姜的提取物。最后将提取物合并制成制剂——“压制成 1000 片”。显然，1000 片药片的重量和体积比起始的药材量都要小很多，对药片的化学成分分析也比直接分析药材中的化学成分要方便许多。

类似的例子还有“银杏叶颗粒”、“复方丹参颗粒”、“复方丹参滴丸”、“六味地黄颗粒”、“六味地黄胶囊”等。除了将中草药的总提取物制成成药用于临床外，还有将中草药的一类有效成分提取出来用于临床的例子，如“香菇多糖注射液”、“人参多糖注射液”、“注射用丹参多酚酸盐”、“葛根总黄酮”、“骨碎补总黄酮”、“大豆磷脂”等品种。由于中药提取物在临床上已经有了较为广泛的应用，故在本书中，也载有分析中药提取物对生命活动影响的实验，供参考。

二、植物总提取物的基本制备方法

以中草药为代表的植物中存在着大量的次生代谢产物，而这些化学物质可能对人体生命活动具有一定的调节作用，因此可以当作药物来预防和治疗人类的疾病。植物总提取物是现代中草药成药的重要形式，也可以作为现代中药科学研究的主要对象之一。那么，植物提取物是如何制备的呢？植物原材料中有效成分的物理化学

性质是制定植物提取物制备方法的重要依据。只有充分理解和认识植物中有效成分的物理和化学性质,才能够选择合理的提取方法进行有效的提取。主要的植物提取物制备方法有溶剂提取法、水蒸气蒸馏法和升华法。不同的方法有着不同的适用情形和优缺点,以下分别进行介绍。

1. 溶剂提取法

溶剂提取法是目前制备植物提取物的主要方法之一,其主要原理是不同物质之间的相似相溶,即利用中草药中各种成分在不同溶剂中的溶解性差异,选用合适的溶剂将有效成分从药材组织内溶解出来的方法。在选择溶剂时,要遵循以下几个基本原则:①溶剂不能与中草药的有效成分起化学反应;②溶剂对有效成分溶解度大、对杂质溶解度小;③在大规模使用的情况下,溶剂要经济、易得、使用安全等。在提取操作前,一般需将药材充分干燥并粉碎,这样做有利于增大溶剂与药材的接触面积,提高溶解效果。当将合适的溶剂添加到粉碎的中草药原料中后,溶剂在自由扩散和渗透的作用下逐渐浸润整个中草药材,将中草药材中易溶于溶剂的物质溶解。这样,中草药材内溶液的浓度高而中草药材组织外溶液的浓度低,中草药材内的浓溶液不断向中草药材外扩散,而没有溶解溶质的溶剂又可以进入到中草药材内。如此反复,直到中草药材内外的溶剂对相应的溶质达到饱和。这时可以将饱和溶液从提取系统中过滤出来,向中草药材中添加新的溶剂,直到材料中有效成分完全溶出或绝大部分溶出。

用于抽提的常见溶剂一般主要有以下三类,下面对这三类溶剂的特点及用途分别进行简单介绍。

(1) 水

水是一种强的极性溶剂,用于提取中草药中亲水性的成分,如无机盐、糖类、小分子的多糖类、鞣质、氨基酸、蛋白质、有机酸盐、生物碱盐及皂苷等。在某些条件下可以采用酸水或碱水用于增加物质的溶解性。例如植物中的生物碱类物质,易在酸性水溶液中与酸成盐而易溶于水;而有机酸类、内酯类、黄酮类、蒽醌类、多酚类物质则可以与碱成盐,这些物质在碱性水溶液中容易溶出。当水的温度升高时,植物有效成分在水中的溶解度增大,有利于它们的溶出。故中药的汤剂制备方法都是沸水煎煮。由于水无毒无害,且是自古习用的煎煮中草药的溶剂,一般可以作为制备植物提取物的首选溶剂。但是用水作溶剂也有一些不可避免的缺点。首先,水只能用来提取草药中高级性的成分,低级性的物质在水中的溶解度较低,不能用水来提取。其次,某些含有果胶类成分的中草药,其水提取液的黏度往往较高而难以进行后续处理。淀粉含量高的植物材料在用沸水提取时容易发生淀粉糊化,也会增加后续处理的困难。不仅如此,水提取物对保藏条件的要求也较高,如保藏不当容易发霉变质。如有这些情况,则不能选用水作为溶剂。

(2) 亲水性有机溶剂

该类溶剂可以与水混溶,如乙醇、甲醇、丙酮等。这类溶剂对植物细胞壁的穿

透能力较强,故提取效能一般比水高。植物材料中的亲水性成分除蛋白质、果胶和部分多糖外在这些溶剂中的溶解性能往往也比较好。而难溶于水的亲脂性成分,在这类溶剂中的溶解度也较大。因此这类溶剂在植物提取物的制备中有着较为广泛的应用。其中一个典型的例子就是乙醇,乙醇极性适中,基本无毒,价格相对便宜,来源比较广泛,乙醇提取液的极性还可以通过调节乙醇和水的比例来加以控制。乙醇对植物中大多数种类的次生代谢产物都有比水更强的溶解能力,故用乙醇提取时可以降低溶剂的用量,缩减提取的时间。不仅如此,乙醇提取物不易发霉变质,提取后的乙醇还可以回收和反复利用,故在条件允许的情况下,使用乙醇作为溶剂也是不错的选择。

(3) 亲脂性有机溶剂

这类溶剂与水不能混溶,常见的有氯仿、石油醚、苯、乙酸乙酯、乙醚、二氯乙烷等。这些溶剂的选择性强,不能或不容易提出亲水性杂质。它们透入植物组织的能力较弱,往往需要长时间反复提取才能提取完全。由于这类溶剂往往有毒,价格相对昂贵,故在实际工作中使用频率较小。

常见的溶剂提取方法主要有浸渍法、渗漉法、煎煮法和回流法四种。此外,值得注意的是,除提取方法外,植物材料的粉碎程度、提取搅拌的剧烈程度以及提取温度等因素也会对提取效率产生影响。以下对这四种方法分别进行介绍。

① 浸渍法

将中草药材料研磨成粉末或碎块,装入合适的容器中。向容器中添加一定体积合适的溶剂(一般是水和一定浓度的乙醇),浸渍药材以溶解出其中的成分。本法在操作上比较简单,对仪器设备也没有特殊的要求。但提取效率相对偏低,如果以水作为提取溶剂,提取液在一定的条件下有可能发霉变质,需做一定的防腐处理。

② 渗漉法

这是将中草药粉末装在渗漉器中,缓缓添加合适的新鲜溶剂,使溶剂在重力的作用下自上而下从渗漉器下端流出浸出液的一种中草药有效成分提取方法。一般地,在渗漉溶剂流速控制得当时,渗漉的提取效率高于浸渍。但在渗漉的过程中,需要反复添加溶剂,操作上会带来一定的麻烦。

③ 煎煮法

煎煮法是我国最传统的中草药有效成分提取方法。一般是把药材置于砂罐或者陶罐之中(一般避免使用金属器皿),用适量水浸泡一段时间后,置火加热至沸腾,不时搅拌,让中草药中的水溶性有效成分充分溶于水。在现代化工业生产中,一般用水蒸气加热来代替直火加热进行水煎。这样,中草药原料受热更加均匀、提取效率更高。

④ 回流法

采用有机溶剂提取中草药有效成分时,在直火加热的同时需要配备回流装置,以避免溶剂的挥发损失。用回流法提取时,提取体系的温度可以调得比较高以增加

提取效率，但要求待提取的活性成分必须耐热。

对这四种方法的操作过程以及它们的优缺点对比如表 1-1 所示。

表 1-1 部分溶剂提取方法的操作过程及其优缺点

方法	操作	优点	缺点
浸渍法	用溶剂浸渍药材粉末	简单易行	浸出率较差
渗漉法	反复添加新溶剂进行提取	浸出效果较好	需要反复添加溶剂
煎煮法	加水直火加热煎煮	可大规模使用	容易焦糊
回流法	加回流装置进行加热提取	浸出效果好	活性成分须耐热

2. 水蒸气蒸馏法

水蒸气蒸馏法是通过将含有挥发性活性成分的中药材与水共同蒸馏，使挥发性成分随水蒸气一并带出，经冷凝后收集挥发性成分的提取方法。该法适用于可以随水蒸气挥发出来而不会被破坏的中草药成分的提取。这些物质的沸点基本高于 100℃，与水不能互溶或仅仅微溶，且在该温度下具有一定的挥发性，故在水蒸发时能够将这些挥发性物质一并带出。水蒸气蒸馏法一般可用于提取挥发油、小分子酚类等有效成分。

3. 升华法

有些固体物质在受热后不是熔化为液体而是直接气化为气体，气体再遇冷后又直接凝固为固体，这样的物态变化过程分别被称为升华和凝华。这些性质为人们从中草药中提取有效成分提供了极大的便利。常见的能够发生升华与凝华的物质如樟木中的樟脑、茶叶中的咖啡碱、游离羟基蒽醌等。部分香豆素类、有机酸类成分也具有升华的性质。升华法操作方便，产物纯度较高。但采用该方法产率低，对实验条件控制得精密程度高，稍不小心会因温度过高而发生分解。不仅如此，中草药炭化后产生的焦油状物也会黏附在升华物上，不利于对产物的进一步精制除去。

三、植物提取物成分分析与质量控制

植物提取物在现代中成药制造领域有着广泛的应用。为了保证药物的疗效可靠和患者的用药安全，国家对任何上市销售用于临床的药物都必须规定一定的质量标准。达到质量标准的药物才可以在市场上流通，而没有达到质量标准的药物则为不合格药品，不能在市场上销售流通。对于生产、销售不合格药物的药品生产者和经营者，还需给予相应的处罚。一般西药的原料药是结构比较简单的单一化合物，如阿司匹林、维生素 C 等，对于这一类药物的质量标准是容易界定的。而将植物提取物用于药品生产，更需要引入相应的质量标准。植物提取物归根到底还是一个由许多成分组成的复杂系统，要合理地规定和表述相应的质量标准，就离不开对植物提取物的成分分析。

1. 利用薄层色谱进行定性分析

薄层色谱是较为简单的植物提取物有效成分定性分析技术之一。薄层色谱是将