

植物化學 方法

● ZHIWUHUAXUEFANGFA

○ 第二版(1984)

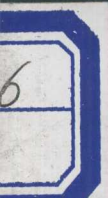
● 植物分析现代技术导论

[英] J. B. 哈本 著

张凤章 译

陈家璠 校

厦门大学出版社



植物化学方法

—植物分析现代技术导论

第二版(1984)

[英] J.B.哈本 著

张凤章 译

陈家瑞 校

厦门大学出版社

1991年1月

内 容 简 介

本书概述植物化学分析的现代方法,包括常规的实验操作和详细的参考资料。在总的介绍植物化学技术后又分章描述酚型化合物。帖类、脂肪酸、含氮化合物、碳水化合物、大分子化合物的特性、分布及一般的分离和鉴定方法。本书在植物物质分类方面具有特色,编排条理清晰,叙述简明扼要。

本书可供作大专院校植物化学专业教材,亦可供从事药物化学、食品化学、有机化学、农业化学、植物生理学及有关的植物学科的工作者和师生参考。

J. B. Harborne
Phytochemical Methods
A GUIDE TO MODERN TECHNIQUES
OF PLANT ANALYSIS
Second Edition
Chapman and Hall Press, London, 1984

植 物 化 学 方 法 ——植物分析现代技术导论

第二版(1984)

〔英〕J.B.哈本 著

张凤章 译

陈家瑞 校

*

厦门大学出版社出版发行
福建省新华书店经销
福建第二新华印刷厂印刷

*

开本787×1092 1/16 15印张 364千字
1991年1月第一版 1991年1月第一次印刷

印数: 1—2000册

ISBN 7-5615-0362-8/Q·14

定价: 8.00元

第二版序言

自从本书第一版出版以来,植物化学技术又有几项重要的发展,现在, ^{13}C 核磁共振谱的引入,提供了有关复杂分子的更详细结构信息。而高效液相色谱(HPLC),为层析库增加了一件有力的高灵敏的分析工具。就高效液相色谱来说,它能完成非挥发性化合物的分离,就象用气液色谱分离挥发性物质一样。在质谱技术方面也出现了惊人的发展;例如利用快原子轰击(fast-atom bombardment)源,能以FAB-MS联用方法测定很不稳定的和非挥发性的植物化合物的分子量。在新版的适当章节中将简要叙述这些技术。

近十年来,有关植物新化合物结构的报道数目大大增加,在这短短的时间内,在某些类天然成分中,已知物质的数目已翻了一番。由于所有这些活动的结果,植物化学文献资料与其保持同步的问题宜给予适当的注意,尽管化学文摘的机检能提供方便,减轻植物化学家的负担。为了帮助学生读者,第二版的参考资料已广泛注意到最新发展。另外,加入一些新的实验,以帮助学生发展研究技能,例如介绍植物抗毒素(phytoalexin)和植物之间的异株克生(allelopathic)作用等等。

自第一版以来,植物化学技术在生态学研究中的价值增加了,人们逐渐认识到次生成分在决定那些草食动物的食物选择方面有明显的作用。在分析植物种群的毒素或拒食剂(deterrents)方面作出很大努力。除了植物单宁以外,大多数这样的化合物在第一版已包括进去,因此,在新版的第二章中增加新的一节讨论单宁的分析。

趁这次新版之机,加入两个附录:各类植物物质的薄层层析步骤的对照表和对于植物化学家有用的地址表。第一版中的一些错误已经纠正,但可能还有一些错误,作者欢迎有关进一步改进的建议。

与第一版一样,作者得到许多同行的帮助和建议。作者特别感谢植物化学组的同事及其学生,他们一直致力于发展新的植物化学步骤。

术 语

一般缩写

TLC 薄层层析
GLC 气液色谱
PC 纸层析
UV 紫外
IR 红外
NMR 核磁共振
HPLC 高效液相色谱

MS 质谱
R_F 相对于前沿的迁移率
RR_i 相对保留时间
nm 纳米
MW 分子量
M 克分子

化学药品

BSA
PVP
BHT
EDTA
Tris
PMSF
SDS

N, O-双(三甲基硅)乙酰胺
聚乙烯吡咯烷酮(除酚试剂)
丁基化的羟基甲苯(抗氧化剂)
乙二醇四乙酸(螯合剂)
三羟甲基氨基甲烷(缓冲剂)
苯甲烷磺酰氟
十二烷基磺酸钠

层析载体

Kieselguhr
Decalco
DEAE-cellulose
PEI-cellulose
ECTEOLA-cellulose
PPE
TXP
OV
SE
DEGS
Apiezon L
Carbowax
Chromosorb
XE
Embacel
Poropak

硅藻土
硅酸铝钠
二乙氨基乙基纤维素
聚乙烯亚胺处理的纤维素
3-氯-1, 2-环氧丙烷-三乙醇胺-碱处理的纤维素
聚苯乙醚
三-二甲苯基磷酸酯
甲基硅氧烷聚合物
硅 油
琥珀酸二乙醇酯
活塞的润滑脂(阿比松L)
聚乙二醇
火砖载体
硅 脂
酸洗的硅藻土载体
聚苯乙烯载体

ODS

层析溶剂

MeOH	甲 醇
EtOH	乙 醇
iso-PrOH	异丙醇
n-BuOH	正丁醇
iso-BuOH	异丁醇
PhOH	苯 酚
NHEt ₂	二乙胺
Et ₂ O	乙 醚

十八烷基硅烷

HCO ₂ H	甲 酸
HOAc	乙 酸
CHCl ₃	氯 仿
CH ₂ Cl ₂	二氯甲烷
EtOAc	乙酸乙酯
Me ₂ CO	丙 酮
MeCOEt	甲乙酮
C ₆ H ₆	苯

目 录

第二版序言

术 语	(1)
第一章 植物分析方法	(1)
1.1 引 言	(1)
1.2 提取和分离	(2)
1.3 分离方法	(5)
1.4 鉴定方法	(10)
1.5 结果分析	(20)
1.6 应 用	(21)
第二章 酚型化合物	(27)
2.1 引 言	(27)
2.2 酚类和酚型酸	(28)
2.3 苯丙烷类	(33)
2.4 类黄酮色素	(40)
2.5 花色素苷	(45)
2.6 黄酮醇和黄酮类	(50)
2.7 稀有的黄酮类化合物, 咕吨酮和芪	(56)
2.8 单 宁	(62)
2.9 醌色素类	(65)
第三章 萜 类	(74)
3.1 引 言	(74)
3.2 精 油	(76)
3.3 二萜类和赤霉素类	(86)
3.4 三萜类和甾族化合物	(89)
3.5 类胡萝卜素	(96)
第四章 有机酸, 脂质和有关的化合物	(108)
4.1 植物酸	(108)
4.2 脂肪酸和脂质	(113)
4.3 烷烃及其有关的碳氢化合物	(120)
4.4 多炔类	(123)
4.5 硫的化合物	(127)

第五章 氮的化合物	(134)
5.1 引 言	(134)
5.2 氨基酸	(135)
5.3 胺 类	(142)
5.4 生物碱	(145)
5.5 生氰糖苷	(152)
5.6 吡啶类	(155)
5.7 嘌呤, 嘧啶和细胞分裂素	(157)
5.8 叶绿素	(161)
第六章 糖类及其衍生物	(169)
6.1 引 言	(169)
6.2 单糖类	(169)
6.3 寡糖类	(175)
6.4 糖醇和环多醇	(179)
第七章 大分子类	(185)
7.1 引 言	(185)
7.2 核 酸	(185)
7.3 蛋白质	(190)
7.4 多 糖	(199)
附录 A	(211)
附录 B	(214)

第一章 植物分析方法

1.1 引言

最近几年,植物化学这门学科已发展成为天然产物有机化学和植物生物化学之间的一门专门学科,并且同这两方面紧密关联。植物化学涉及大量的由植物精制和积累起来的各种各样的有机物质,它研究这些物质的化学结构、合成、转化和代谢、天然分布及其生物学功能。

所有这些工作,均需要分离、纯化和鉴定植物中存在的许多不同成分的方法。因而,我们所了解的植物化学的进展,是与已有技术的成功开发,以及不断发展解决植物化学中出现的突出问题的新技术直接相关。植物化学的挑战之一是用极少量的材料进行上述所有操作。生物学问题,譬如植物生长调节作用、植物—动物相互作用的生物化学、或者了解化石植物的起源等问题的解决,常常取决于鉴定一系列只能用微量量级研究的复杂的化学结构。

本书的目的是首次提供目前可以利用的植物物质的分析方法入门,提供有关该学科文献的一把钥匙。这里所叙述的方法并无新奇之处。实际上,其目的是概述已经最广泛采用的那些方法,这样,学生和研究工作者可以最快地发展自己的技术,以解决自己的问题。

我们采用一些简单的化学实验室技术训练作基础,因为许多技术简单而又明瞭,对于化学知识很少的植物学家和其他植物科学家来说,是能够从事植物化学工作的。从事其它实际课题的研究时,学生们必须发展自己的经验。没有什么准确地写下来的处方,可以代替平时实验室的常识和由基本原理进行思考的能力。随后的大部分章节提供一些实际的实验例子,通过这些实验可以获得工作经验。它们适于作为实验课程;许多方法早已用于此目的。

植物产生的各种分子结构的范围和数目是巨大的,我们现有的有关植物成分的知识进展是如此之快,以致植物化学研究的一个主要问题是核对有关每一类特殊化合物的资料。例如,曾经估计过,目前已知有5500种以上的植物生物碱。由于医药上对新奇生物碱的兴趣如此之大,以致于这种新生物碱可能正以每天一个的速度被发现和描述。

由于已知物质的数目是相当之大,因此在本书的每一章中均作了专门介绍,指出在每类化合物之内存在的结构的多样化,扼要说明那些普遍存在的化合物并说明具有代表性的分子式的化学多样性。尽可能列出每类已知化合物的最新文献,包括大多数最普通的植物成分的 R_F 值、显色反应以及特殊性质的表。这些表主要是说明性的或作比较之用,并不详尽。

从植物中筛选化学物质的快速而精密的方法的发展,大大有助于植物化学的进展。因此本书的侧重点放在层析技术上。这些方法已经表明,许多原来认为相当稀有的物质,在植物界却几乎普遍存在。植物的生物学活性物质的连续调查的重要性无需强调。当然,在随后的各章中相当详细地讨论特殊化合物类的初步检测方法。

虽然“植物”一词在这里指的是植物界这个整体,但侧重于高等植物,而对微生物的分析方法不详细讨论。作为一般的原则,鉴定高等植物中的生物碱、氨基酸、醌类和萜类所用

的方法亦可直接用于微生物系统。在许多情况下，分离要容易得多，因为通常不存在诸如单宁和叶绿素这样的杂质。在少数情况下，分离可能比较困难，由于微生物细胞壁有弹性因而需要采用机械破碎以释放出存在的某些物质。

由于篇幅的限制，有许多在微生物中发现的有机化合物如青霉素（Penicillin）和四环素（tetracycline）抗菌素（Turner, 1971; Turner和Aldridge, 1983），它们的鉴定不包括在内。地衣类亦制造一系列特殊的色素，包括缩酚酸环醚和缩酚（羧）酸类。这些化合物根据其显色反应，层析和光谱技术等特殊的微量化学方法进行分析。Culberson(1969)对地衣化学做出了全面的阐明。地衣色素在第二章中将简要地叙述。

植物的化学成分可以用许多不同的方法分类。本书系根据生物合成来源、溶解度性质以及存在某些关键的官能团分类。第二章讲述酚型化合物，是一类根据其亲水性以及其共同来源于芳香族的前体莽草酸（Shikimic acid）而很容易辨认的物质。第三章讨论萜类，它们均具有酯类性质，其生物合成来源为异戊烯焦磷酸（isopentenyl Pyrophosphate）。第四章专述有机酸、脂质以及由乙酸酯生物合成而获得的其它化合物。第五章为植物氮的化合物，以对水合茚三酮（ninhydrin）或 Dragendorff 试剂*的阳性反应辨认的碱性物质。第六章涉及水溶性碳水化合物及其衍生物。最后，第七章主要包括植物的大分子即核酸、蛋白质和多糖，这些化合物以其高分子量容易同其它成分分开。

在引论这章的其余部分，概括地讨论提取、分离和鉴定的方法。最后一节包括植物化学方法应用于不同植物科学领域的一些例子。

可以利用的有关植物分析方法的主要参考资料为 Peach 和 Tracey（1956—1984）主编的、用英文和德文写作的七卷论文，这部著作现在虽然已显过时，但可供作本学科必要的基础读物。涉及植物化学方法的许多其它教科书，列在本章及以后各章末尾的参考文献中。可以查阅的有关最新技术的杂志有《层析杂志》（Journal of Chromatography），《植物化学》（Phytochemistry），《分析生物化学》（Analytical Biochemistry），《层析科学杂志》（Journal of Chromatographic Science）和《植物学》（Planta）。

1.2 提取和分离

1.2.1 植物材料

最理想的植物材料应采用新鲜的植物组织，且材料应在收集的几分钟时间内浸入沸乙醇中。有时候，手头没有要研究的植物，材料可能要由住在另一个大陆的收集家供应。在这种情况下，将新鲜采摘的组织干燥在塑料袋中，在几天的航空邮寄的时间内，通常能保持良好的分析条件。

或者，可在提取之前将植物干燥。干燥操作必须在控制的条件下进行，以避免太多的化学变化发生。应尽可能快地干燥，不用高温，可用一台质量好的风干机风干。植物一旦完全干燥之后，即可在分析之前长时期储藏。确实，许多年前曾成功地用标本的植物组织进行类黄酮、生物碱、醌类和萜类的分析。

*将次硝酸铋1.5克悬浮于20ml热水中，加入碘化钾7克及稀盐酸20滴而成。

利用标本材料的一个例子是精油的分析,其材料是薄荷叶的模式标本,它是1800年前林奈(Linneaus)的原始采集获得的(Harley和Bell, 1967)。在叶和果实组织中,精油的含量可能随时间发生变化,这种可能性必须考虑到。例如, Sanford和Heing (1971)发现,肉豆蔻果中的肉豆蔻醚(myristicin)的含量在储藏时慢慢地增加,而挥发性较大的 β -蒎烯(β -Pinene)的含量却随着时间的推移而降低。另一方面,虽然时间推移,植物标本中的类黄酮和生物碱类却相当稳定,如原来在1675年采集的马钱子(*Strychnos nuxvomica*)的叶样品仍含有1—2%重量的生物碱(Phillipson, 1982)。

显而易见,必须注意把所研究的植物组织同其它混杂的植物分开。例如,要采用无病的植物,即不受病毒、微生物或真菌感染影响的植物。因为在这样的植物中,不仅可能检出微生物的合成产物,而且感染还可能严重地改变植物的代谢,可能大量地产生预料不到的产物。

在收集低等植物材料做分析时,亦能产生混杂现象。采集寄生在树上的真菌时,重要的是除去样品中的所有树木组织。由于污染的缘故,早期有关两种真菌中绿原酸(Chlorogenic acid)(一种典型的高等植物产物)的报告几乎可以肯定是不正确的(Paris等, 1960)。在小心弄干净后的材料上作重复分析并没有显示该化合物存在的证据(Harborne, J. B. 和 Hora, F. B., 未发表的结果)。苔藓类(mosses)常常与高等植物紧密结合生长,因此,要得到没有枯枝层混杂的苔藓有时是件难事。最后,就高等植物而言,有时可能错误地采集植物的混合物。在田野里并排生长的两种很相似的草,可能被不正确地认为是同一种,或者可能采集了一种植物而没有觉察到有一种寄生物(诸如菟丝子, *Cuscuta epithimum*)与它纠缠在一起。

在植物化学分析中,所研究的植物的植物学鉴定,必须由某一研究时期所公认的权威确证。过去在植物鉴定方面出了这么多的错误,所以无论报道植物的新物质,还是报道新植物来源的已知物质,必不可少的是确证其材料。材料的鉴定应当是无可争辩的(例如由一个野外工作的植物学家在预期的生境采集的一个普通种),或者应尽可能由分类学家证实其鉴定。为此,目前植物化学研究中的普遍惯例是在一个公认的植物标本室,存放所研究的经证实的植物标本,以便将来需要时,作为研究该植物的进一步参考。

1.2.2 提取

正确的提取方法自然取决于被提取的植物材料的构成和含水量,取决于被分离的物质的类型。一般地说,需要把植物组织“杀死”,即防止酶的氧化作用或水解作用发生。把新鲜的叶或花组织(有必要时适当地切碎)投入沸乙醇中是达到这个目的的好方法。总之,任何情况下乙醇用于初步提取是一种良好的全效型溶剂。随后,将材料置于捣碎器中浸解并过滤,但这种方法只有打算完全提取时才有必要。从绿色组织分离物质时,醇提取的成效与进入溶剂的叶绿素的量直接相关。当反复提取至组织碎片无绿色时,可以认为,所有低分子量的化合物都已提取完毕。

从植物干组织(心材、干种子、根、叶)获得有机成分的经典化学方法是,在索氏(S Soxhlet)提取器中,用一系列溶剂连续提取经粉碎了的材料:开始依次用乙醚、石油醚和氯仿提取(分离脂肪和萜类),然后用乙醇和乙酸乙酯提取(极性较大的化合物)。在克量级操作时,此方法是有用的;但是,人们很少达到成分的完全分离,同样的成分可见于(不同比例)

几种不同溶剂提取的组分中。

将提取液通过硅藻土，用水泵抽滤净化，然后真空浓缩。现在常用旋转蒸发器进行浓缩，它能在不太强烈的条件（即在 $30^{\circ}\text{--}40^{\circ}\text{C}$ 温度）下，把大体积的溶液浓缩为小体积。从植物中提取挥发性成分要特别小心，这些将在第三章讨论。

人们通过实践，可以简化提取步骤。例如，从叶组织中分离水溶性组分时，严格地说，应在浓缩前用石油醚反复洗涤水抽提物以除去其中的脂类化合物。实际上，将乙醇提取液直接在旋转蒸发器中浓缩时，几乎所有的叶绿素和脂类物质均沉积在烧瓶的壁上。在熟练时，浓缩恰到好处，这时用导管吸出水浓缩液，则几乎可完全地除去脂类杂质。

浓缩后的提取液放置时可能析出结晶，如是，过滤收集结晶，并用几种溶剂进行层析检验其均一性（见下一节）。

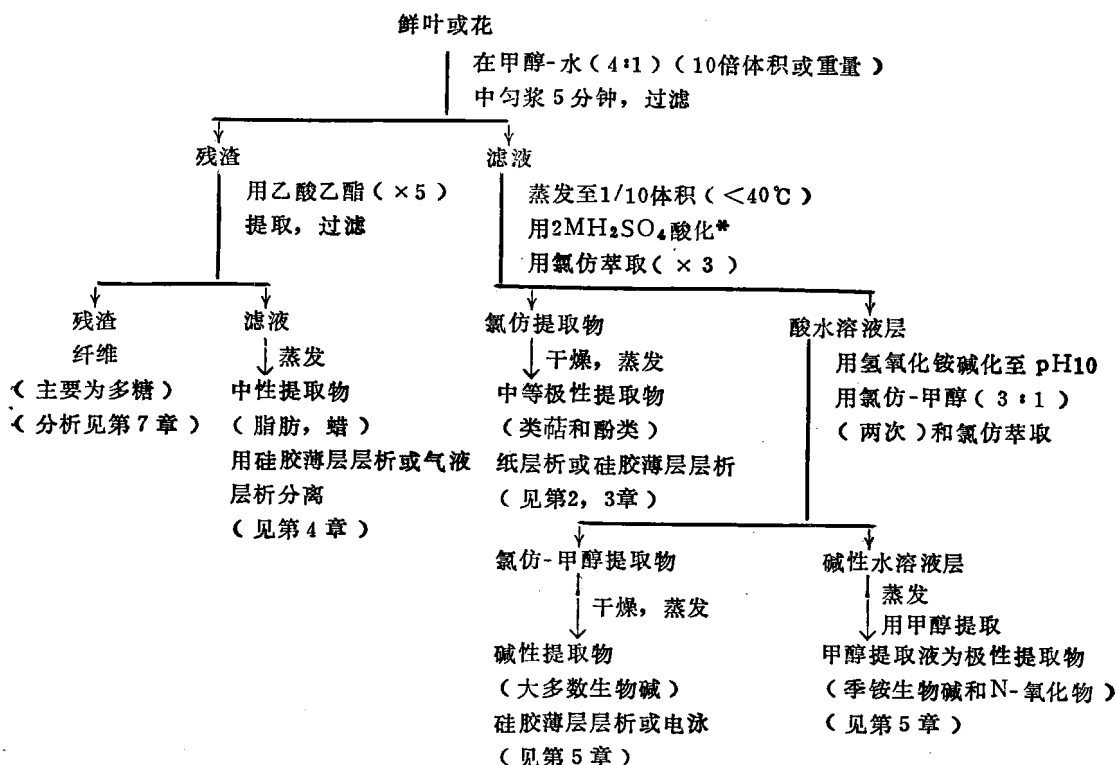


图1.1 提取新鲜植物组织并根据极性分部为不同类成分的一般步骤

如果为单一物质，则此结晶经重结晶纯化，即可用于进一步分析。在大多数情况下，结晶中可能存在一些物质的混合物，这样就有必要把它们重新溶于一种适当的溶剂，用层析法将其成分分开。在结晶母液中亦保留许多化合物，这些化合物亦应经层析分离。预防物质损失的一个标准方法是将浓缩过的提取液储藏在冰箱中，并加入痕量的甲苯以防止霉菌生长。

研究一个指定的植物种的植物化学全貌时，粗提取物的分部是必要的，以便在层析前将主要几类成分彼此分开。图1.1中所示是根据成分的极性不同分离的一个程序，它可应用于

*译者注：原文为酸化至 $2\text{MH}_2\text{SO}_4$ ，可能有误。

含生物碱的植物的成分分离。当然,分离到不同部分中的化合物的数量与类型,将因植物不同而异。还有,当研究不稳定物质时,这程序可能要作些变动。

1.3 分离方法

1.3.1 一般方法

植物成分的分离和提纯主要是采用四种层析技术即纸层析、薄层层析、气液色谱和高效液体色谱中的一种或结合进行的。技术的选择大大地依赖于被分离的化合物的溶解性和挥发性。纸层析法特别可用于水溶性的植物成分,即碳水化合物、氨基酸、核酸碱基、有机酸及酚型化合物。薄层层析是分离所有脂溶性化合物(即脂类、甾族化合物、类胡萝卜素、简单的醌和叶绿素)所选用的方法。相反,第三种技术即气液色谱主要应用于分离挥发性化合物——脂肪酸、单萜和倍半萜类、烃类及硫的化合物。但是,把高沸点的植物成分转化为酯和三甲基硅醚可以增进其挥发性,因此没有几类化合物是完全不适合气液层析分离的。挥发性低的成分还可以用高效液体色谱分离,这是一种兼具柱效率和分析速度的分离方法。此外,还应指出,可以适当地交叉使用上述技术,通常是将纸层析与薄层层析、薄层层析与高效液相色谱、或薄层层析与气液色谱结合使用,这可能是分离某类植物成分的最好方法。

上述技术微量和大量均可使用。制备分离时可在一厚层的吸附剂上进行薄层层析,在一张厚滤纸上进行纸层析。要分离更大量的样品时,通常采用配有自动分部收集的柱层析,这种方法能制备克量级的纯化合物。

电泳是植物化学中应用相当广泛的一种更进一步的技术。起初,这种技术只应用于带电荷的化合物,即氨基酸、一些生物碱、胺类、有机酸和蛋白质。但是,还有一些中性化合物(糖类、酚类),转化为金属复合物(例如用 Na_3BO_3)即能在电场中移动。Sargent(1969)对电泳技术做了简单的介绍。

除了已述的技术外,在植物化学研究中,偶尔还采用其它一些技术。用简单的液-液萃取分离,在类胡萝卜素的分离分析方面仍有价值(第3章)。有时也可采用自动的液-液萃取方法,如用Craig所设计的反流分配(逆流分容)装置,但它只是在其它技术失败时,被作为最后的手段。最近已发展了一套更方便的液-液萃取装置,即所谓的点滴反流层析(DCCC),它主要应用于水溶性成分的制备量分离(Hostettmann, 1981)。植物蛋白质和核酸的分离常常需要采用这里尚未提到的特殊技术,如Sephadex(葡聚糖)凝胶过滤、亲和层析和差速超离心等等。

因为有关层析法技术已有众多的著述(见Heftmann, 1983等),因此在这里仅需讨论一下应用于植物化学研究的那些主要分离技术,并给出一些引向其它有用教科书的有关的参考文献。

1.3.2 纸层析

纸层析的主要优点之一是非常方便,即简单地在滤纸条上进行分离,滤纸既作分离介质,又作载体。另一优点是纸上测定的 R_F 值重现性好,因此它是阐明新的植物化合物的有价值

的参数。确实,对于诸如花青苷 (anthocyanins) 这类无其它明显特征的物理性质的物质,其 R_F 值是描述和鉴别各种不同色素的最重要方法 (Harborne, 1967)。

纸层析通常包括分配层析和吸附层析。在分配层析中,化合物在水不溶混的醇溶剂 (例如正丁醇) 和水之间分配。经典的混合溶剂正丁醇-乙酸-水 (4:1:5, 顶层) (缩写为BAW) 被设计作为增加正丁醇层的水含量的一种方法,因而改善了这种溶剂混合物的利用率。确实,BAW仍广泛作为许多类植物成分的一般溶剂。相反,吸附力是在水性溶剂中纸层析的主要特性之一。纯水是一种值得注意的通用层析溶剂,它一般可用来分离普通的嘌呤类和嘧啶类,亦可应用于酚类和植物糖苷类的分离。

纸层析装置的选择,在某些程度上取决于可利用的实验空间的大小。例如,水平的或圆形的纸层析所占的空间要比标准的薄层层析槽稍为大些,其分辨率相当高,因而被用来分离类胡萝卜素类化合物。在大多数实验室中,纸层析以下行法进行,槽中滤纸的大小为 $46 \times 57 \text{ cm}$ (Whatman滤纸)。下行法纸层析是最有用的,因为在必要时易于让溶剂跑过头。它对双向分离亦较方便些。

一系列重要的“改良的”商品滤纸可用于完成特殊的层析分离。例如将硅胶或氧化铝掺入纸中可以降低纤维素的极性,使滤纸较适合于分离脂类。滤纸也可以在实验室中改良,例如,把它们浸渍在石蜡或硅油中,便可进行“逆相”层析分离脂类。大量分离可以用厚层滤纸 (Whatman 3号或3MM纸),这种滤纸每张可以分离几毫克的物质。

在纸层析中,化合物的检测通常是用一种生色试剂喷雾或浸渍,使之与被检测的化合物反应生成有色的或紫外荧光斑点。大张滤纸,浸渍通常容易些,但其喷雾溶剂量应当改进,以利快干,这样可避免浸渍时的扩散作用。然后可将滤纸加热使之显色。

R_F 值是一种化合物在层析时相对于溶剂前沿的移动距离。它由以下方法测得:测量原点到该物质产生的斑点中心的距离,此距离除以原点到溶剂前沿的距离 (即溶剂移动的距离)。 R_F 值总是一个分数,其数值在0.01和0.99之间。为方便起见,常将 R_F 值乘以100。本书所引用的 R_F 均为 $R_F (\times 100)$ 。另外,有时把 $R_F (\times 100)$ 称为 hR_F 值。

比较一系列结构上相关的化合物的 R_F 值时,指定另一个层析参数即 R_M 值是有用的,它和 R_F 的关系用下式表示:

$$R_M = \log\left(\frac{1}{R_F} - 1\right)$$

此式在表达层析迁移率同化学结构关系方面很有价值,因为在同系列中, ΔR_M 值通常是常

表1.1 黄酮醇5-甲醚的 R_F 数据: 实验值与由 ΔR_M 计算的理论值比较

黄 酮 醇	$R_F (\times 100) ^*$			
	Forestol	50%HOAc	PhOH	BAW
茨非醇	62	44	58	91
栎 精	45	31	28	76
杨梅黄酮	29	21	10	41
茨非醇5-甲醚 实验值	70	43	78	82
理论值	70	41	76	89
栎精5-甲醚 (杜鹃黄素)	53	29	42	55
杨梅黄酮5-甲醚	37	21	23	27

*在Whatman 1号纸上测量。溶剂缩写见正文。

数。以黄酮类化合物为例,对分子中存在的羟基和糖基取代数目来说, ΔR_M 是个常数(Bate-Smith和Westall, 1956)。这一方法可用来计算一系列化合物中的未知成员的 R_F 值,有利于检查植物提取液中的特殊化合物。例如,采用这样的方法表征一种新的茨非醇甲醚时,预测的(理论值)和实验的 R_F 值非常一致(表1.1)(Harborne, 1969)。

在大量有关纸层析的文献中,Peereboom(1971)所写的介绍性文章对初学者是有用的。Lederer和Lederer(1957),Linskens(1959)及Sherma和Zweig(1971)等人所著有关纸层析的书,是有特殊价值的 R_F 数据来源。

1.3.3 薄层层析

同纸层析相比,薄层层析的特别优点是多用性,速度和灵敏度。多用性是由于除纤维素外,还可以把许多不同的吸附剂涂布在玻板上或其它载体上而用于层析。虽然硅胶使用得最广泛,但板层可以由氧化铝、硅藻土、氢氧化钙、离子交换树脂、磷酸镁、聚酰胺、Sephadex(葡聚糖凝胶)、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、以及上述两种或两种以上物质的混合物组成。薄层层析的速度较快是由于涂布在玻板上的吸附剂比较紧密,分离不稳定的化合物时,速度快是个优点。最后,薄层层析的灵敏度较高,必要时可以完成小于微量物质的分离。

薄层层析原先的缺点之一是吸附剂涂板很费劲。几年前,由于引入自动涂布机而减轻了劳动。尽管如此,仍需小心操作。玻璃板必须小心用丙酮清洗以除去油脂。其次,水调和的硅胶浆(或其它吸附剂)在涂布之前必须剧烈振荡一定的时间间隔(例如90秒)。根据吸附剂的颗粒大小,可能需要添加硫酸钙半水合物(15%)帮助吸附剂粘固在玻板上。最后,将涂布后的板层风干,然后在100—110℃的烘箱中加热活化30分钟。在某些分离中,以加无机盐来(例如加 AgNO_3 进行银化薄层层析)改良吸附剂的性质,最好在涂板时加入。在实验室仍然使用涂布的层析板的另一个原因是可以控制硅胶的湿度,这是一些分离的关键因素。

但是,新近在大多数工作中通常采用厂商生产的预涂板,因为这些板比较一致,因而能提供重现性较好的结果。有一系列的商品板可以使用,以不同的吸附剂涂布在玻板、铝板或塑胶板上。这些板可能含或不含荧光指示剂。含荧光指示剂的板可用于那些能使荧光淬灭的化合物,在254nm的紫外光下照射即可检测。最新类型的薄层层析板是用微粒硅胶涂制的,这种板层的硅胶颗粒与高效液体色谱柱中使用的一样细。这种层析法称为高效薄层层析(HPTLC),用其分离通常比普通的硅胶层更有效和更快速。

已应用于薄层层析的溶剂比应用于纸层析的溶剂范围更广泛;而且,一般地说,在一个溶剂系统中采用不同溶剂的精确比例有更大的幅度,但 R_F 值的重现性比纸层析差得多,因此必须有一个或多个的参考化合物作为标准物质。精确测量薄层层析的 R_F 值的条件标准化是可能的;但是,这是一个很烦琐的过程。薄层层析通常在一个有纸衬里的槽中以上行法进行,因此槽内的气相被溶剂相饱和。当层析板需要用溶剂溢流或采用薄层层析-电泳结合时,可采用水平的薄层层析。

薄层层析板上的化合物通常用喷雾法检测。板的面积较小(20×20cm),使这种方法相对地简单。玻璃板可以用浓硫酸喷雾,这比纸层析优越。浓硫酸是检测甾族化合物和脂质的有效试剂。

制备薄层层析采用厚层吸附剂(厚达1mm)代替薄层吸附剂(0.10—0.25mm)。可用

商品板。将已展开的板上的适当位置的吸附剂刮下来，用溶剂（如乙醚）洗涤这些粉末，最后离心除去吸附剂，则可回收已分离的成分。玻板上吸附剂层的强度很大，所以一片板能够用一种或几种不同溶剂系统反复展开（两次展开之间要先干燥）。或者可以使用Van Sumere（1969）设计的多次消去（multiple elimination）薄层层析系统。这种系统包括一个复杂分离的适当阶段，用玻璃刀切下一长条涂有吸附剂的长方型玻璃，在两次分离之间，把新鲜的吸附剂喷洒在这块板上。在下述的有关薄层层析的书中，叙述了许多其它改进方法。

有关薄层层析的文献非常庞大。Stahl（1969）编辑的书最具综合性。Truter（1963）编写了一本简单的引论。其它重要的书有Bobbitt（1963）、Kirchner（1978）及Touchstone和Dobbins（1978）的著作。

1.3.4 气液色谱法

同纸层析和薄层层析相比，气液色谱所需的装置较高级且昂贵。但在原理上，气液色谱并不比其它层析方法复杂。

气液色谱的仪器装置有如下四个主要部件：

（1）柱，通常为—根窄长（如3m×1mm）的金属管，弯成蛇形以减少空间。柱中充填涂在惰性粉末（如硅藻土、火砖载体W等）上的固定相（如5—15%硅油）。不一定用填充的柱，也可以采用开放的硅胶柱，在这种柱中，固定相是涂在内表面的一层薄膜（毛细管气液色谱）。

（2）加热色谱柱的加热器。必要的话，柱温以一标准的速率从50℃逐渐升高到350℃并保持在高温限的温度上。柱入口的温度单独控制，以便使样品一进入柱即迅速汽化。溶于乙醚或已烷的样品用一支皮下注射器穿过橡皮隔膜注入入口处。

（3）气流由氮气和氩气等惰性载气组成。这些气体以控制的速率通过层析柱，使化合物在柱上分离。

（4）化合物通过柱时，需要检测装置测量。检测常常以火焰电离和电子捕获的原理为基础。前一种方法需要在气体混合物中加入氢气，并在实际的检测器中烧尽。检测器连接一台电位测量记录仪，记录仪以一系列强度不同的峰记录分离的结果（图1.2）。

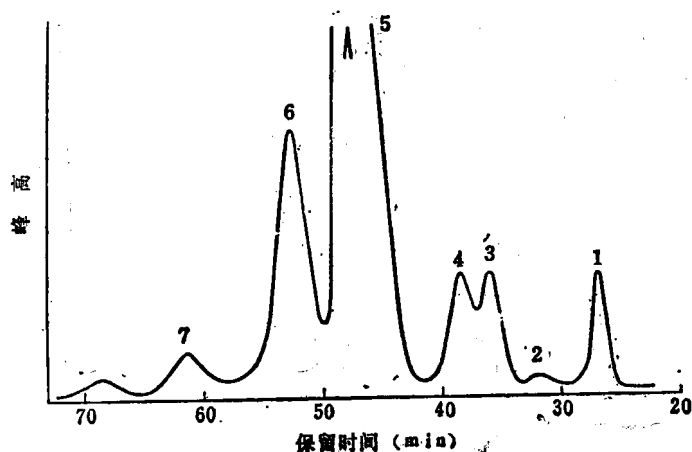


图1.2 燕麦种子中的甾醇乙酸酯混合物的气液色谱分离

1. 胆甾醇；2. 菜籽甾醇；3. 菜油甾醇；4. 豆甾醇；5. 谷甾醇；6. $\triangle^6$ -燕麦甾醇；7. $\triangle^7$ -燕麦甾醇，固定相为1%环己烷=甲醇丁=酸酯+2%聚乙烯吡咯烷酮，涂在酸洗的Gas Chrom P225载体上。（自Knights, 1965）。

气液色谱的结果可以用保留体积 R_v 这个术语表示, R_v 为从柱上洗脱一个组分所需的载气的体积;或者用保留时间 R_t 表示, R_t 为洗脱样品所需的时间。这些参数几乎总是以一个相对于一种标准化合物的术语(如 RR_v 或 RR_t)表示。标准化合物可以加到样品提取液中,或者作为溶解样品的溶剂加入。

气相色谱的主要可变量是柱的固定相的性质和操作温度,这两个条件随被分离的化合物的极性和挥发性不同而变化。按常规,许多物质在进行气液色谱测定之前被转化为衍生物(特别是转化为三甲基硅醚),因为这样能在较低的温度下分离。

气液色谱提供有关植物物质的定性和定量数据,因为测量气液色谱轨迹(图1.2)所显示的峰面积与原始混合物中不同组分的浓度直接相关。有两个测量这些峰面积的一般公式:(a)峰高 $\times$ 半峰高处的峰宽=94%的峰面积(这只适用于对称峰);(b)峰面积等于通过折点引切线所围成的三角形面积。峰面积可以自动测量,例如使用电子积分仪测量。

气液色谱仪可以与其它分析系统连接,使被分离的成分进一步进行光谱分析或其它分析。气相色谱仪最常与质谱测定自动连接。色谱-质谱(GS-MS)联用仪近年来已作为所有植物化学分析技术中最重要的技术之一。

虽然有许多有关气液色谱的书和评论文章,但为从事植物化学工作的读者写的却寥寥无几。从实践的观点出发,Simpson(1970)的著作是一本有用的引论性教科书,Burrefield和Storrs(1962)的著作是一本涉及气液色谱的生化应用更专业化的参考书。

1.3.5 高效液相色谱(HPLC)

高效液相色谱在其灵敏度及一次操作即能提供定性和定量方面类似于气相色谱,差别在于键合到多孔聚合物上的固定相系装在窄径不锈钢柱中,而液体流动相在相当大的压力下强力通过。高效液相色谱仪比气相色谱仪更贵,主要是需要一个合适的压力泵系统,所有连接必须用螺丝以承受内在的压力。流动相是可混溶的溶剂混合物,其比例或者保持恒定(常液分离),或者利用一个溶剂混合室连续改变其比例(梯度洗脱),用检测器监测从柱中洗脱的化合物,通常测定其紫外光吸收。且配上一台积分仪处理测定的数据,全部操作可通过一台微处理机控制。

高效液相色谱与气液色谱的主要区别在于,前者在正常室温下操作。因此,分离时不会出现化合物热重排的可能性。但是,对于精密分离,控制高效液相色谱柱的温度可能是有益的。因此需要一个恒温控制的夹套。层析柱通常装填颗粒很小的硅胶,硅胶上涂着或键合上固定相。它对杂质中毒特别敏感,因此,在样品注射入柱头之前,将植物提取液提纯和过滤是必需的工作。

高效液相色谱主要用于非挥发性化合物的分析,即高级萜类、所有类型的酚型化合物、生物碱、脂质和糖类。在紫外和可见光谱区可以检测的化合物,其工作最佳。图1.3是以高效液相色谱分离黄酮类化合物的一个例子。糖类在紫外光区没有任何吸收,可用折射率检测器,但这是一个低灵敏度的方法。蛋白质的分离已用改良的葡聚糖凝胶,硅胶或离子交换剂柱的高效液相色谱进行。

在最现代化的高效液相色谱分离中采用预装柱,且有许多类型预装柱商品可以使用。但是,利用硅胶微孔颗粒柱(对非极性化合物)或逆相 C_{18} 键合相柱(对极性化合物)进行大