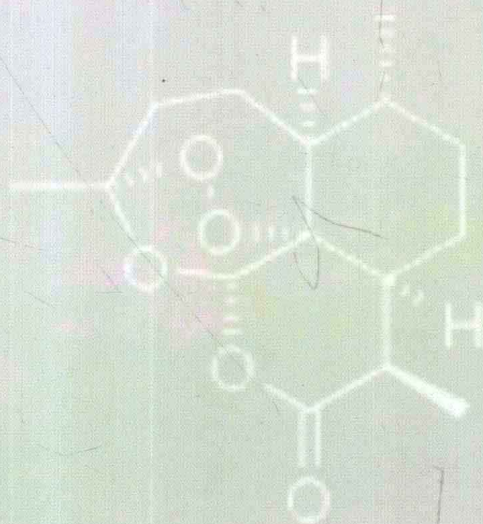


# 天然产物活性成分分离

徐任生 赵维民 叶 阳 主编



科学出版社

# 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

## 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>

装 订 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)

## 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遍接受和习惯。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

# 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 |

# **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

## 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<sup>[1]</sup>。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》收录了全国药用植物、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)<sup>[2]</sup>。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甾甙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<sup>[3~6]</sup>。

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,从而将粗提取物或部位在相关筛选模型上进行测试,对有活性的粗提取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取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,如用碘化铯钾(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。如碘化铯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,但对碘化铯钾试剂却呈阴性反应。粗提取物中如含有 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,对植物粗提取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,可以对粗提取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

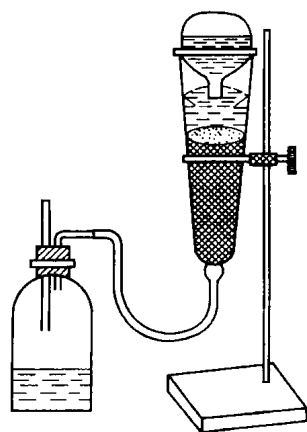


图 1.1 渗漉提取装置示意图<sup>[7]</sup>

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。

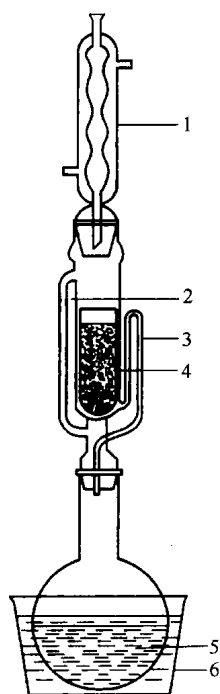


图 1.2 索氏提取器示意图<sup>[8]</sup>

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(S 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 °C 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<sup>[9]</sup>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<sup>®</sup>、Sep-Pak<sup>®</sup> 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<sup>[10]</sup>。

#### 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)<sup>[11]</sup>。

#### 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淀法,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<sup>[12]</sup>。

#### 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