



杜琪珍 · 著

低速逆流 色谱技术

上海科学技术出版社

低速逆流色谱技术

杜琪珍 著

上海科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

低速逆流色谱技术 / 杜琪珍著. — 上海: 上海科学技术出版社, 2009.7

ISBN 978 - 7 - 5323 - 9810 - 2

I. 低... II. 杜... III. 逆流色谱法 - 研究 IV .0658.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 052593 号

上海世纪出版股份有限公司
上海科学技术出版社 出版、发行

(上海钦州南路 71 号 邮政编码 200235)

新华书店上海发行所经销

常熟市兴达印刷有限公司印刷

开本 787 × 1092 1/32 印张 6.125

字数: 119 千字

2009 年 7 月第 1 版 2009 年 7 月第 1 次印刷

ISBN 978 - 7 - 5323 - 9810 - 2/O · 296

定价: 30.00 元

本书如有缺页、错装或损坏等严重质量问题,

请向工厂联系调换

内 容 提 要

本书重点介绍低速逆流色谱技术的原理、仪器的设计及其在天然产物分离上的应用。主要包括建立低速逆流色谱技术的理论基础、低速逆流色谱仪器的设计基础与研究方法、低速逆流色谱技术在实验室分离制备和工业化分离上的应用。

本书可供从事天然产物研究和天然产物产品开发的工程技术人员、教学科研人员、研究生等参考。

前 言

逆流色谱技术是一项值得关注的新的植物活性成分分离技术,利用这一技术可从植物中分离纯化出对人体有益的植物活性成分,用来生产天然的功能性食品添加剂或天然药物。

20 世纪 90 年代初,对茶儿茶素生物活性的研究在世界范围内已广泛展开,但从茶叶中分离茶儿茶素的各种单体却仍是一个难题。笔者对各种分离方法进行了研究,最终找到了用高速逆流色谱技术从茶叶中分离茶儿茶素单体的方法。该方法成功地解决了茶儿茶素单体的克量级制备,为美国、英国及国内许多实验室开展茶叶中活性成分的研究提供了宝贵的样品,极大地推动了以茶多酚为主要产品的茶叶深加工产业的发展。随着茶儿茶素活性成分的深入研究,茶儿茶素中的表没食子儿茶素表没食子酸酯(EGCG)的抗癌活性被不断证实,美国食品与药品管理局将其列入潜在的抗癌物。之后,EGCG 的利用进入了临床研究。而用高速逆流色谱技术进行分离,要获得较大量的 EGCG 是很难的。由此,笔者 1998 年开始建立低速逆流色谱系统。

1999 年,笔者开创性地将螺纹型螺旋管用于低速逆流色谱柱的制备,大大地提高了固定相的保留率,并建立了 10 L 柱容积的低速逆流色谱系统,实现了 100 g 级的 EGCG 分离,这是具有突破性的。现在,已设计制造出一台目前世界上柱容积(40 L)最大的低速型逆流色谱仪,并已获得国家专利。

用这台仪器可实现一些天然活性成分的半工业化分离。比如,从茶叶中分离出可作为食品抗氧化添加剂的抗癌成分茶儿茶素,再从茶儿茶素中分离出其主要的抗癌成分 EGCG;从杏仁中分离抗癌成分苦杏仁苷;从水曲柳皮中分离抗感冒成分水杨苷;从南瓜、丝瓜、苦瓜等一些中国传统蔬菜中分离活性成分等。

2006 年 8 月,在美国国立卫生研究院召开的第四届国际逆流色谱学术会议上,低速逆流色谱技术的发展受到与会专家的肯定,笔者因此获得国际逆流色谱协会(International Society of Countercurrent Chromatography)首次设立的爱德华-周奖(Edward Chou Award)。

在低速逆流 10 多年的研究中,得到了国家留学基金委员会、德国洪堡基金会、中德科学基金、国家科技部、浙江省科技厅和教育厅、浙江工商大学、德国不伦瑞克工业大学、中国农业科学院茶叶研究所的资助,在此深表感谢。研究工作得到逆流色谱创立者 Yoichiro Ito 博士、哈佛大学 David Lee 博士、德国不伦瑞克工业大学 Peter Winterhalter 教授、浙江大学原副校长吴平东教授的指导和支持,在此向他们表示诚挚的谢意。部分实验结果应该归属于同事们及学生们的辛勤劳动,感谢他们为本书作出的贡献。

杜琪珍

2008 年 10 月

目 录

前 言

第 1 章 绪论	1
§ 1.1 逆流色谱的应用现状与前景	1
§ 1.2 逆流色谱分离实例	2
1.2.1 分离低极性组分	2
1.2.2 分离中等极性组分	4
1.2.3 分离强极性组分	8
1.2.4 分离超强极性组分	11
§ 1.3 逆流色谱仪器的进展与现状	14
1.3.1 同步式仪器(I-IV型)	16
1.3.2 非同步式仪器(VI和VII)	19
1.3.3 非行星式仪器(V型)	20
§ 1.4 逆流色谱柱设计的发展	20
§ 1.5 流通型螺旋管逆流色谱仪的发展方向	21
第 2 章 小型低速逆流色谱仪设计与应用	28
§ 2.1 低速逆流色谱原理	28
§ 2.2 小型低速逆流色谱仪的设计	29
2.2.1 螺旋柱的设计	30
2.2.2 流体进出色谱柱设计	47
2.2.3 电机功率	49
2.2.4 小型低速逆流色谱仪及性能指标	51

§ 2.3	低速逆流色谱仪配套设备	52
§ 2.4	小型低速逆流色谱仪应用实例	52
2.4.1	低速逆流色谱对丝瓜中皂苷的制备性分离	52
2.4.2	低速逆流色谱法分离丝瓜中的酚类糖苷	57
2.4.3	低速逆流色谱法分离烟叶提取物中的茄尼醇	62
2.4.4	低速逆流色谱法分离葛根异黄酮	66
2.4.5	低速逆流色谱与高速逆流色谱仪分离茶提取物比较	71
第3章	低速逆流色谱仪器的放大	79
§ 3.1	基础研究	79
3.1.1	大孔径管的固定相保留率	79
3.1.2	溶质在大孔径管中两相间的分配	80
3.1.3	流速增加对峰宽的影响	82
3.1.4	进样量增加对峰宽的影响	83
3.1.5	柱长对峰分离度的影响	85
3.1.6	结论	86
§ 3.2	带旋转密封接头的低速逆流色谱仪的设计及分离实验	87
3.2.1	带旋转密封接头的低速逆流色谱仪的设计	87
3.2.2	分离实验	89
§ 3.3	不带旋转密封接头的大型低速逆流色谱仪的设计	94
3.3.1	不带旋转密封接头的低速逆流色谱仪的	

设计.....	94
3.3.2 40 L 型低速逆流色谱系统分离矢车菊素-3- 葡萄糖苷.....	95
3.3.3 40 L 型低速逆流色谱系统分离茶儿茶素 ...	99
3.3.4 结论	101
第 4 章 低速逆流色谱仪的溶剂系统.....	102
§ 4.1 氯仿系列溶剂系统	102
§ 4.2 正己烷系列溶剂系统	105
§ 4.3 乙酸乙酯系列溶剂系统	109
§ 4.4 正丁醇系列溶剂系统	111
§ 4.5 两相比重对固定相保留率和最佳转速的影响	116
第 5 章 低速逆流色谱分离硫代葡萄糖苷.....	119
§ 5.1 硫代葡萄糖苷	119
§ 5.2 低速逆流色谱分离绿花菜籽中的莱菔子苷 ...	125
5.2.1 提取	125
5.2.2 逆流色谱溶剂系统选择	125
5.2.3 高速逆流色谱分离	127
5.2.4 低速逆流色谱放大分离	129
§ 5.3 低速逆流色谱分离油菜籽饼粕中的硫代葡萄 糖苷	135
5.3.1 实验材料	135
5.3.2 粗提物制备	135
5.3.3 分析	135
5.3.4 溶剂系统选择	136
5.3.5 低速逆流色谱分离	136

5.3.6 结论	141
§ 5.4 低速逆流色谱分离萝卜籽中的硫苷	142
5.4.1 萝卜籽硫苷提取	142
5.4.2 低速逆流色谱溶剂系统选择	143
5.4.3 逆流色谱转速确定	144
5.4.4 低速逆流色谱分离	145
5.4.5 回收溶剂分离硫代葡萄糖苷	152
第 6 章 逆流色谱模型研究	159
§ 6.1 固定相保留率预测模型	159
6.1.1 仪器与溶剂系统	160
6.1.2 S_F 值测定程序	161
6.1.3 结果	161
§ 6.2 逆流色谱保留时间预测模型	165
6.2.1 模型的建立	165
6.2.2 模型的验证	168
§ 6.3 逆流色谱流出曲线预测模型	171
6.3.1 模型的建立	171
6.3.2 模型的求解	175
6.3.3 模型的验证和评价	176
6.3.4 小结	178
索引	182

第 1 章 绪 论

§ 1.1 逆流色谱的应用现状与前景

生物材料(植物、微生物、动物)中天然产物的分离与纯化通常是耗时费力的。然而,从生物材料中分离几百毫克到几千克某种化合物的单体用于生物测试、半合成或作为药剂是经常碰到的。另外,矿物中的某些稀有元素的分离纯化也是非常困难的,也有待开发新的分离技术。色谱在分离纯品方面是极其重要的工具。逆流色谱(countercurrent chromatography)是近三十年来发展起来的一种液-液色谱技术^[1-6]。它的优点之一是不使用固体吸附材料,可以避免其他色谱技术中那种不可逆吸附、样品降解等缺点;优点之二是能对样品完全回收。因此,逆流色谱技术已日益广泛地用于植物、海洋生物、微生物发酵产物等材料中生物活性组分的分离。在类黄酮及其糖苷、多酚类及其糖苷、氧杂蒽酮类、木质素、单宁、香豆素及其糖苷、类蒽酮、萜类及其糖苷、皂素及其糖苷、生物碱类、类胡萝卜素及其糖苷、姜醇类、染料、多炔醇类、抗生素类、多肽、生物活性蛋白等天然产物方面均有很多成功分离的实例。作为实验室中的一种分离制备技术,逆流色谱已表现出高效液相色谱无法比拟的优点:对样品纯净度要求低、进样量大、操作简便等。可以肯定,随着逆流色谱技术的进一步改进与完善,特别是柱容量的放大,逆流色谱将不仅能作为一种实验

室的分离手段,而且可以应用到制药等行业的工业化分离纯化上。

§ 1.2 逆流色谱分离实例

1.2.1 分离低极性组分

1. 番茄提取物中番茄红素的分离

番茄红素(lycopene)是类胡萝卜素的一种,是一种很强的抗氧化剂,有防治前列腺癌、脑血管疾病、提高免疫力、延缓衰老等功效。目前,番茄红素产品已在欧美、日本和我国港台地区被广泛接受。

番茄红素是脂溶性色素,用有机溶剂提取的番茄红素粗品,其番茄红素含量在5%~15%,Wei等^[1]用高速逆流色谱(high-speed countercurrent chromatography, HSCCC)分离粗品中的番茄红素取得了很好的效果。其方法如下。

样品制备:新鲜番茄干燥、粉碎,用二氯甲烷作为萃取液进行固液萃取,最后将萃取液真空浓缩,得到含番茄红素含量9%的番茄红素粗品。用20 mL固定相溶解100 mg粗品,即为HSCCC分离样品溶液。

仪器:GS A2 高速逆流色谱仪(北京新技术应用研究所),分离柱由平均内径1.6 mm的聚四氟乙烯(PTFE)管绕制而成,柱容量160 mL。

分离:柱转速800 rpm;两相溶剂系统,正己烷-二氯甲烷-乙腈(体积比为10:3.5:6.5)(下文出现的比例若无特殊说明均为体积比);固定相,下相;流动相流速2 mL/min。

分离结果:图1-1为HSCCC分离谱图。进样含9%番茄

红素的粗品 100 mg, 得到 8.3 mg 番茄红素产品, 番茄红素纯度达 98% (图 1-2)。

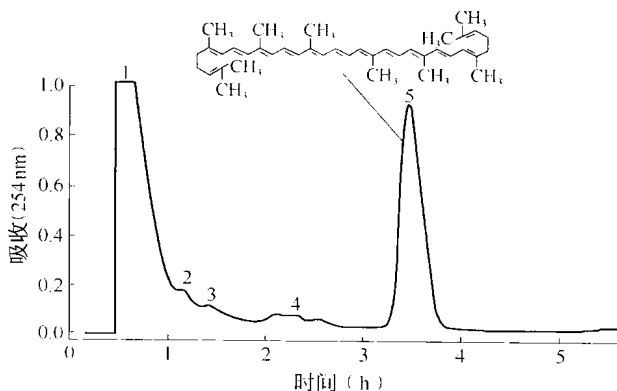


图 1-1 高速逆流色谱分离番茄红素粗品^[7]

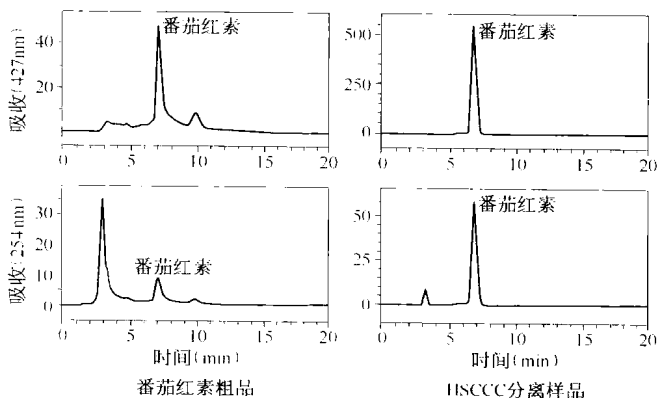


图 1-2 番茄红素粗品和高速逆流色谱分离
获得的番茄红素组分的 HPLC 分析^[7]

分析柱: Supelcoils ODS($5\mu\text{m}$, $4.6 \times 250\text{mm}$ I.D.); 流动相: 乙腈-甲醇-氯仿
(体积比 47 : 47 : 6); 流速: $1.0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 254 nm, 427 nm。

2. 微藻提取物中角鲨烯的分离

角鲨烯(squalene)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^[8]用 HSCCC 分离了这种微藻提取物中的角鲨烯。

样品制备:用 120 mL 甲醇-氯仿(体积比 2 : 1)在室温下提取 8 g 冻干的微藻细胞,10 h,至提取液蒸发干,所得油状物用 40 mL 甲醇-丙酮(7 : 3)溶解, -20 °C 静置 30 h,上清液浓缩至干,得 1.4 g 角鲨烯粗提物。用 20 mL 流动相溶解 150 mg 粗提物,即为 HSCCC 分离样品溶液。

仪器: CCC-1000 高速逆流色谱仪(Pharma-Tech Research, MD, USA),分离柱由内径 2.6 mm 的 PTFE 管绕制而成,柱容量 332 mL。

分离:柱转速 1 000 rpm;两相溶剂系统,正己烷-甲醇(2 : 1);固定相,下相;流动相流速 2 mL/min。

分离结果:图 1-3 为 HSCCC 分离谱图。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%。

1.2.2 分离中等极性组分

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。Du 等^[9]用高速逆流色谱仪对其乙醇提取物的乙酸乙酯萃取物进行了分离。

样品制备:将 50 g 白水曲柳皮乙醇提取物(湖南金农生物制品有限公司)溶解在 1 L 水中,用等体积的乙酸乙酯萃取

两次。乙酸乙酯萃取液 40 °C 减压浓缩至浆状,冷冻干燥得到 11.6 g 粗提物。用 10 mL 初始流动相溶解 0.6 g 粗提物,即为 HSCCC 分离样品溶液。

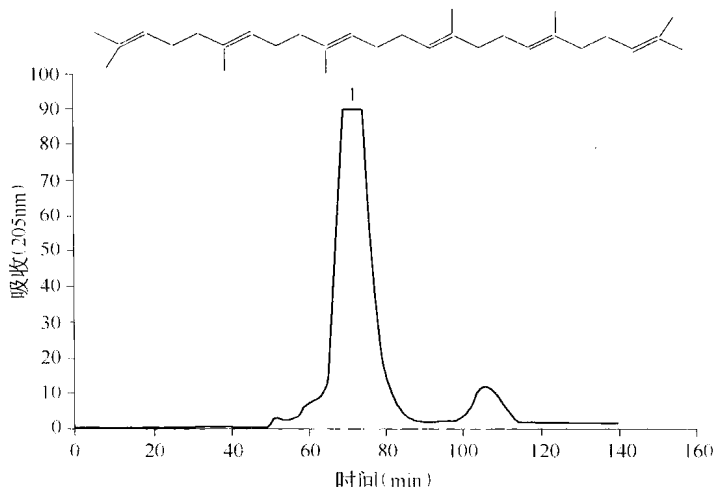


图 1-3 高速逆流色谱分离微藻
Thraustochytrium ATCC 26185 提取物^[8]

仪器:高速逆流色谱仪(P. C. Inc., MD, USA),分离柱由内径 2.6 mm 的 PTFE 管绕制而成,柱容量 380 mL。

分离:柱转速 650 rpm;两相溶剂系统,水-甲醇-乙酸乙酯-正己烷(3 : 2 : 2 : 2);固定相,上相;流动相流速 3 mL/min。

分离结果:图 1-4 为 HSCCC 分离谱图。获得组分 I 613 mg,组分 II 20 mg,组分 III 29.5 mg 和组分 IV 50 mg。组分 II、III、IV 为 6-羟基萘醌(eriodictyol)、5,7-二羟基萘醌(5,7-dihydroxy-chromen-4-one),和 4,5,7-三羟基萘醌(naringenin)。

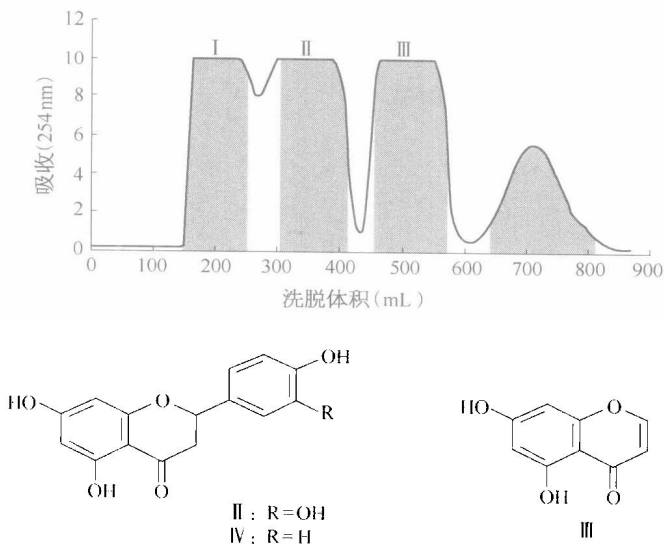


图 1-4 白水曲柳皮中黄酮化合物的高速逆流色谱分离

II: 荭草酚; III: 5,7-二羟基黄酮; IV: 4,5,7-三羟基黄酮。

2. 积雪草酸和积雪草苷的分离

积雪草(*Centella asiatica*)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愈合、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 1-5)。积雪草酸和积雪草苷的极性有较大的差异, Du 等^[10]通过高速逆流色谱-梯度洗脱法分离了积雪草提取物。

样品制备: 将 50 g 积雪草乙醇提取物(湖南金农生物制品有限公司)溶解在 600 mL 水中, 用 600 mL 乙酸乙酯萃取

脱脂,然后用 600 mL 正丁醇萃取。正丁醇萃取液 50 °C 减压浓缩至浆状,冷冻干燥得到 7.8 g 粗提物。用 10 mL 初始流动相溶解 0.6 g 粗提物,即为 HSCCC 分离样品溶液。

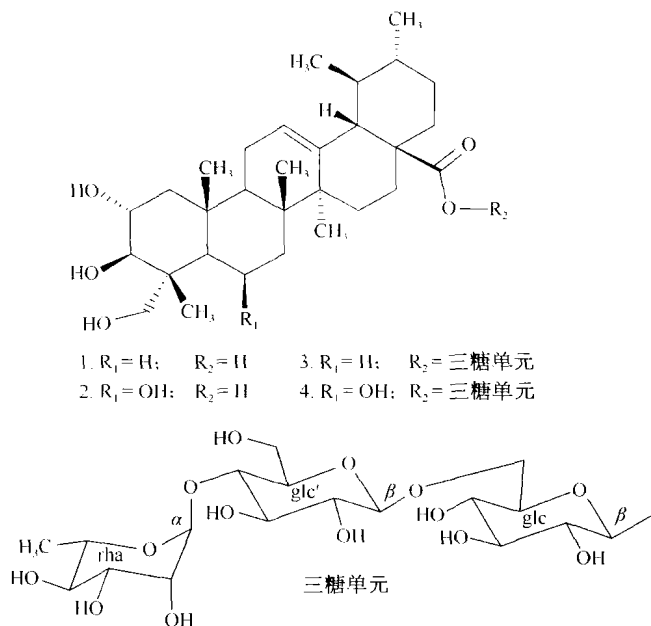


图 1-5 积雪草酸及积雪草苷的化学结构

仪器: 高速逆流色谱仪 (P. C. Inc., Potomac, MD, USA), 分离柱由内径 2.6 mm 的 PTFE 管绕制而成, 柱容量 380 mL。

分离: 柱转速 800 rpm 进行 HSCCC 分离。以溶剂系统正己烷-正丁醇-0.05 mol/L NaOH (5 : 1 : 6) 的下相为固定相。先以该溶剂系统的上相为起始流动相洗脱 50 min