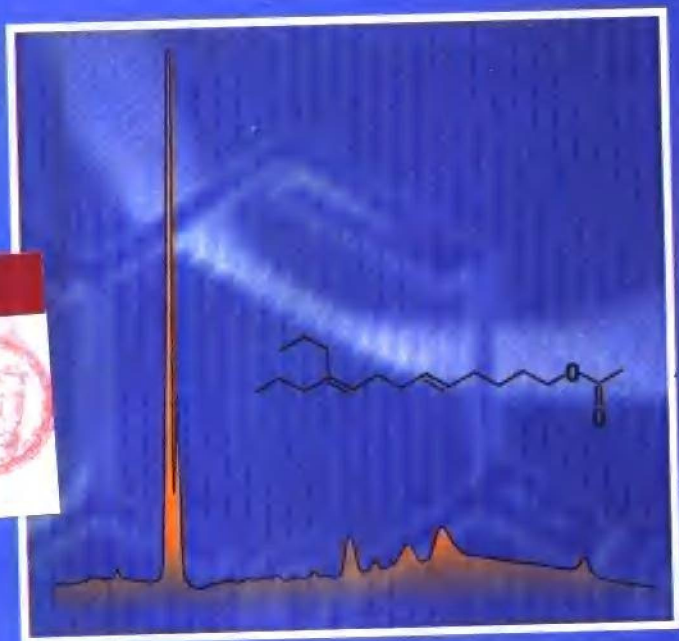


制备色谱技术

—— 在天然产物分离中的应用

〔瑞士〕 K. 霍斯泰特曼
A. 马斯顿
M. 霍斯泰特曼



科学出版社

制备色谱技术

——在天然产物分离中的应用

K. 霍斯泰特曼
〔瑞士〕 A. 马斯顿 著
M. 霍斯泰特曼

赵维民、张天佑 译
徐任生 审校

科学出版社

2000

图字 01-99-0786 号

内 容 简 介

本书引用大量最新参考文献并列举大量应用实例,介绍了在天然产物分离过程中可以应用的各项制备性色谱技术,包括平板色谱、特殊柱色谱、加压液相色谱、制备型气相色谱、逆流色谱等。此外,本书还介绍了大分子及手性分子的分离方法。

本书可供从事天然产物化学、天然药物研究与生产的单位及医药院校相关专业的教师、研究生参考,对从事有机化学、仪器分析领域研究与开发人员也有较大参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

制备色谱技术——在天然产物分离中的应用/[瑞士]K. 霍斯泰特曼等著;赵维民,张天佑译. -北京:科学出版社,2000
ISBN 7-03-008030-0

I. 制… II. ①霍… ②赵… ③张… III. 制备色谱-应用-药物-分离 IV. TQ460.35

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 65965 号

Translation from the English language edition

Preparative Chromatography Techniques by Kurt Hostettmann, *et al.*

Copyright © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1986, 1998

All rights reserved

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号
邮政编码:100717

北京双青印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

2000 年 4 月第 一 版 开本: 850×1168 1/32
2000 年 4 月第一次印刷 印张: 10
印数: 1—3 000 字数: 260 000

定价: 25.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

符号和缩略语表

bar	巴(压力单位)	MeNO ₂	硝基甲烷
CCC	逆流色谱	MeOH	甲醇
CCCC	离心逆流色谱	mol/L	摩尔/升
C ₆ H ₆	苯	MPLC	中压液相色谱
CHCl ₃	氯仿	<i>n</i> BuOH	正丁醇
CO ₂	二氧化碳	<i>n</i> PrOH	正丙醇
CPC	离心分配色谱	OPLC	加压薄层色谱
CSP	手性固定相	psi	磅/英寸 ²
CTLC	离心薄层色谱	PTLC	制备型薄层色谱
DCCC	液滴逆流色谱	RLCC	旋转小室逆流色谱
DMSO	二甲基亚砷	RPC	反相色谱
DNP	二硝基苯基	r/min	转/分钟
EtOAc	乙酸乙酯	SEC	分子排阻色谱
GC	气相色谱	SFC	超临界流体色谱
HIC	疏水作用色谱	SFE	超临界流体提取
HOAc	乙酸	TBME	叔丁基甲基醚
HPLC	高压液相色谱	TFA	三氟乙酸
HSCCC	高速逆流色谱	THF	四氢呋喃
<i>i</i> PrOH	异丙醇	TLC	薄层色谱
IR	红外	VLC	减压液相色谱
LPLC	低压液相色谱	μm	微米

前 言

近年来，从自然资源中寻找具有生物活性化合物的工作日益受到人们的关注。源于植物的抗肿瘤药物紫杉醇及抗疟活性成分青蒿素的发现促使人们特别是工业界进行更广泛的研究。研究人员竭力运用高效的筛选方法，试图从植物、海洋生物及微生物中发现新的先导化合物，同时他们也需要一个快速、有效的分离方法以分离目标化合物。因此，学术界与工业界都需要有效的制备型色谱分离技术及其应用经验。

人们只有将新的天然产物纯化之后才能进一步利用谱学技术鉴定其化学结构，测定其理化性质和生物活性，同时提供其作为制药原料、标准品或供做合成工作的起始原料。从一个粗提物中获得纯的化合物通常需经过许多纯化步骤，这些步骤烦琐、耗时，且花费较大。有时，所需化合物得率很低或性质不稳，因而，需要有尽可能多的分离方法以供选择。尽管有时也可能犯这样或那样的错误，但今天人们已有可能通过对各种方法进行审慎地选择来设计一条恰当的快速分离路线。

目前，有关分析方法方面的文献有很多，但专门论述制备型色谱技术的著作还很少。本书试图填补这方面的缺憾，在分离方法的设计方面向读者提供一些指导。

自本书第一版于 1986 年发行以来，天然产物的研究又取得了重大进展。谱学技术的迅速发展，如二维核磁共振技术的应用、仪器自动化程度的提高及 X 单晶衍射技术的常规化，都极大地简化了天然产物的结构解析工作。因而，如何有效地从有机体（植物、动物和微生物）中提取具有生物活性的纯化合物已成为研究的主要课题。活性物质的极性可能很高或很低，它们在色谱分离过程中可能会经常失去生物活性，因此，一定要采用温和

的分离条件，并需要引入各种新的以及已改进的色谱分离方法来解决工作中遇到的问题。本书在第一版的基础上归纳并选择性地整理了近期发表的各种新的色谱技术与应用实例，以供读者选用，同时在各章后列出了主要参考资料。

本书的第一部分叙述样品预处理的主要方法，色谱分离之前的预处理可以节省许多后续纯化所花费的时间。其次论述液-固色谱分离方法，并着重介绍各种加压色谱方法。此后介绍各种液-液色谱技术及其在分离不稳定化合物中的优越性。大分子及手性物质的分离在本书中被分别列为一章来介绍。这两章的内容对于新型药物、基因产品乃至初级代谢产物的分离都十分重要。本书的最后一章论述的是设计分离路线的策略。

K. 霍斯泰特曼

A. 马斯顿

M. 霍斯泰特曼

Lausanne, 1997 年 7 月

目 录

符号和缩略语表

前言

第一章 引言	(1)
--------------	-------

第二章 样品的制备与纯化	(3)
--------------------	-------

2.1 提取	(3)
--------------	-------

2.2 超临界流体提取(SFE)	(4)
------------------------	-------

2.3 溶剂分配	(7)
----------------	-------

2.4 过滤	(9)
--------------	-------

2.5 凝胶过滤	(9)
----------------	-------

2.6 沉淀	(9)
--------------	-------

2.7 色谱分离的固态上样法	(10)
----------------------	--------

2.8 脱除叶绿素	(10)
-----------------	--------

2.9 去除蜡质	(10)
----------------	--------

2.10 脱除单宁类物质	(11)
--------------------	--------

2.11 固相提取法	(13)
------------------	--------

2.12 制备型高压液相色谱的样品预处理	(14)
----------------------------	--------

2.13 参考文献	(16)
-----------------	--------

第三章 薄层色谱	(18)
----------------	--------

3.1 制备型薄层色谱(PTLC)	(18)
-------------------------	--------

3.1.1 吸附剂	(18)
-----------------	--------

3.1.2 上样	(19)
----------------	--------

3.1.3 流动相的选择及 PTLC 板的展开	(19)
-------------------------------	--------

3.1.4 被分离物质的回收	(20)
----------------------	--------

3.1.5 PTLC 分离的化合物中可能混有的杂质	(21)
---------------------------------	--------

3.1.6 加压薄层色谱(OPLC)	(21)
--------------------------	--------

3.2 离心薄层色谱.....	(23)
3.2.1 发展历程.....	(24)
3.2.2 仪器	(25)
3.2.3 Chromatotron 型仪器的应用	(29)
3.3 参考文献.....	(38)
第四章 特殊柱色谱	(41)
4.1 干柱色谱.....	(41)
4.1.1 应用	(44)
4.2 减压液相色谱.....	(48)
4.2.1 应用	(50)
4.3 参考文献.....	(58)
第五章 制备型加压液相色谱	(61)
5.1 基本原理.....	(62)
5.1.1 分离方法的建立和优化	(64)
5.1.2 色谱柱	(66)
5.1.3 固定相	(67)
5.1.4 装柱方法.....	(74)
5.1.5 加样	(77)
5.1.6 泵	(78)
5.1.7 检测器	(79)
5.1.8 流动相	(80)
5.1.9 被分离物质的收集	(81)
5.1.10 边缘切割和循环色谱分离	(82)
5.1.11 色谱柱的过载和中心切割	(83)
5.1.12 柱转换	(84)
5.1.13 色谱峰的大小	(86)
5.2 各种制备型加压液相色谱方法.....	(87)
5.2.1 快速色谱.....	(87)
5.2.2 低压液相色谱(LPLC)	(99)
5.2.3 中压液相色谱(MPLC)	(106)

5.2.4 高压液相色谱(HPLC)	(120)
5.3 超临界流体色谱(SFC)	(144)
5.3.1 超临界流体	(145)
5.3.2 上样	(146)
5.3.3 特殊点	(146)
5.3.4 大规模分离系统	(147)
5.3.5 超临界流体色谱分离	(147)
5.4 参考文献	(149)
第六章 制备气相色谱	(161)
6.1 色谱柱	(161)
6.2 进样	(162)
6.3 样品的收集	(162)
6.4 应用	(163)
6.5 参考文献	(169)
第七章 逆流色谱	(170)
7.1 液滴逆流色谱	(171)
7.1.1 仪器	(172)
7.1.2 溶剂系统的选择	(173)
7.1.3 应用	(178)
7.1.4 非水溶剂系统	(194)
7.1.5 展望	(195)
7.2 旋转小室逆流色谱	(196)
7.2.1 方法介绍	(196)
7.2.2 溶剂的选择	(198)
7.2.3 应用	(198)
7.2.4 展望	(204)
7.3 离心分配色谱	(204)
7.3.1 仪器	(207)
7.3.2 溶剂系统的选择	(213)
7.3.3 操作技术	(216)

7.3.4 应用	(218)
7.3.5 展望	(245)
7.4 参考文献	(246)
第八章 大分子的分离	(256)
8.1 分子排阻色谱	(257)
8.2 离子交换色谱	(261)
8.3 疏水作用色谱	(265)
8.4 反相色谱	(267)
8.4.1 离子对反相色谱	(270)
8.5 亲和色谱	(271)
8.6 金属作用色谱	(272)
8.7 触角担体	(273)
8.8 缓冲物的影响	(274)
8.9 参考文献	(274)
第九章 手性分子的分离	(276)
9.1 用中压和高压液相色谱分离手性化合物	(276)
9.1.1 纤维素衍生物	(280)
9.1.2 环糊精相	(282)
9.1.3 聚(甲基)丙烯酰胺	(282)
9.1.4 π -酸和 π -碱固定相	(283)
9.1.5 配体-交换色谱	(285)
9.2 快速色谱分离手性化合物	(285)
9.3 气液色谱分离手性化合物	(286)
9.4 逆流色谱分离手性化合物	(287)
9.4.1 液滴逆流色谱	(287)
9.4.2 旋转管逆流色谱	(287)
9.4.3 离心分配色谱	(288)
9.5 参考文献	(290)
第十章 分离的策略及各种分离方法的配合使用	(292)
10.1 亲水性化合物	(293)

10.1.1	液液分配与液相色谱配合使用	(294)
10.1.2	液液分配与分子排阻色谱配合使用	(295)
10.1.3	分子排阻色谱与液相色谱配合使用	(297)
10.1.4	聚合物担体的配合使用	(298)
10.1.5	不同液相色谱法配合使用	(299)
10.2	亲脂性化合物	(299)
10.2.1	液相色谱与薄层色谱法配合使用	(299)
10.2.2	各种液相色谱技术配合使用	(301)
10.3	结论	(303)
10.4	参考文献	(303)
主题索引		(305)

第一章 引言

色谱方法的起源与天然产物的研究工作密切相关。继 1906 年 Tswett 的开创性工作之后, 首次真正意义上的制备型液相色谱分离是于 20 世纪 30 年代对植物代谢产物——色素, 如叶绿素及胡萝卜素等的分离。天然产物的研究与色谱方法持续保持紧密的关系, 每当提及各种生物分子纯化方法的进展时, 都不能不考虑到色谱方法。仅就高压液相色谱技术而言, 其应用就涉及到制药工业、生物技术、生物医学及生物化学研究、能源、食品、化妆品、环境科学、药物及维生素等许多领域。随着从微生物、海洋及陆地高等生物体中发现新的先导化合物的工作日益引起广泛的兴趣, 人们经常需要从大量或少量的混合物中以有效、快速、低成本的方法分离出纯化合物。通常的色谱分离方法很少能同时满足上述三个要求, 因此, 如何选择正确的分离方法无疑非常重要。本书的第一版 (1986) 旨在集合各种制备型的分离方法供读者参考。近年, 各种色谱仪器及其新的应用又有了快速的发展。因此, 提供一本新的、包括目前正飞速发展的生物分子的分离技术的参考书显然十分重要。

一些有关生物活性 (或其他) 物质的具体的提取分离方法的综述文章分别发表在 “Journal of Chromatography”, “Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies”, “Analytical Chemistry”, “Natural Product Reports”, “Phytochemical Analysis”, “LC-GC Magazine” 及其他各种专业杂志上。另外一些有价值的关于天然产物分离的论述可参见 E.L.Ghisalberti 发表在 “Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and structural Determination” (eds S M Colegate, R J Molyneux, CRC Press, Boca Raton, 1993), T A Van Beek 发表在 “Chemicals from Plants” (ed

N J Walton, World Scientific Publishing, London, 1997) 及 “Advances in Natural Products Chemistry: Extraction and Isolation of Biologically Active Compounds” (eds S Natori, N Ikekawa 和 M Suzuki, John Wiley, New York, 1981) 中的有关章节。(中文专著有徐任生, 陈仲良主编的《中草药有效成分提取与分离》, 第二版, 上海科学技术出版社, 1983 年, 1989 年第二次印刷——译者注。)

本书旨在着重介绍各种色谱技术的应用, 而非详细描述这些技术的原理。书中所列举的大部分实例来自次生代谢产物及天然产物, 因为制备型色谱的主要作用是对该类物质的分离。对于大分子的分离与纯化, 色谱分离也用于分离某些重要的药用生物活性蛋白(包括利用重组技术获得的蛋白)、生物治疗品与诊断试剂, 以符合高纯度的要求。因此, 用于生物大分子纯化的一些特殊分离技术, 如亲和色谱和分子排阻色谱等也在本书中作了介绍。光学纯度的治疗药物是另一日益受到重视的研究领域, 本书第九章列入了有关手性分子的分离方法。

第二章 样品的制备与纯化

样品的制备对于复杂的分离与纯化非常重要。恰当的样品预处理可免去后续操作过程中的许多麻烦，使分离纯化变得更为容易。无论样品是来源于混有蛋白质的生物体、生产中混有残存催化剂的工业制品，或混有干扰杂质的植物体，通过简单的预处理就可以除去其中大部分不需要的物质。

样品的预处理特别适用于需要使用昂贵的制备型高压液相色谱柱时。尽管制备样品的目的不尽相同，但其中许多操作与分析型高压液相色谱中所采用的一样。当处理生物样品时问题可能更加复杂，因为样品不仅可能含有复杂的大分子，而且还可能混有前面纯化过程中残留的缓冲液、盐及洗涤剂。因此，必须在预处理中去除上述污染物以免污染高压液相色谱柱。

在设计纯化方案时，通常先使用高效与低分辨率的预处理方法，其中包括一些经典的方法，如选择性溶剂提取、过滤、沉淀、透析、离心及简单的常压柱色谱分离等。而一些较新的方法，如超临界流体萃取、固相萃取等则更具有快速、高效的优点。

生物分子（尤其是生物聚合体）与常见的次生代谢产物性质明显不同，需要使用特殊的预处理方法。除常用的离心、沉淀（如用硫酸铵沉淀蛋白质）、离子交换及凝胶过滤等方法（Wehr, 1990）外，可用透析、超滤等专用方法。

2.1 提 取

合理地选择单一或混合溶剂进行提取是保证正确的样品制备的第一步。首先以低极性溶剂提取可得到亲脂性的组分，而用醇类溶剂提取则可得到大量的极性与非极性物质。若开始阶段采用

极性大的溶剂提取，则接着可用溶剂分配方法将提取物分为极性不同的部位。

在提取操作的各种方法中，搅拌与机械振荡是常用的方法，此外还有渗滤或加压固液提取等手段。在加压固液提取法中，将干燥的植物装在柱中，用泵加压使提取溶剂通过柱床（Härmälä 等，1992）。Dionex 公司生产的适用于该方法的一种提取装置 ASE 200（Accelerated Solvent Extraction），据称每次提取只需 20min，提取温度也可调至高达 200℃，并可选择三种不同大小的提取器：11，22 和 33ml。尽管该仪器价格较高，却代表了提取技术方面的重要进步。

在蛋白质的纯化过程中，提取物的制备是关键的一步，其中有些需要特别注意之处，如有时可能需要加入缓冲溶液、洗涤剂、辅因子或其他一些试剂。

2.2 超临界流体提取（SFE）

该方法尤其适用于对热及化学不稳定的化合物的提取，并主要用于从混合物中提取低极性的组分（Mchuge 和 Krukoniš, 1986; Westwood, 1993; Modey 等, 1996）。例如，原本用水蒸气蒸馏或索氏提取的可用 SFE 法有效替代。这种方法提取速度快，并可通过调节压力，提高溶剂的溶出能力。选择适当的温度与压力能提高提取的选择性能，并获得更干净的提取物，收得率也高于常规的液-液及液-固提取。超临界流体提取不必使用大量的有机溶剂，因而具有显著的安全性。另外，它对环境的污染也很小，特别是它减少了含卤素溶剂的使用。许多超临界流体具有较好的质量传递性能（与液-液及液-固提取相比，具有低粘度和高扩散率，适合于对植物组织的提取），在室温时呈气态，相对惰性、无毒且价格低廉，如二氧化碳、氧化氮和氨气等。也可通过加入甲醇、乙醇、丙醇、乙腈、二氯甲烷及水等溶剂以改善其提取性能。

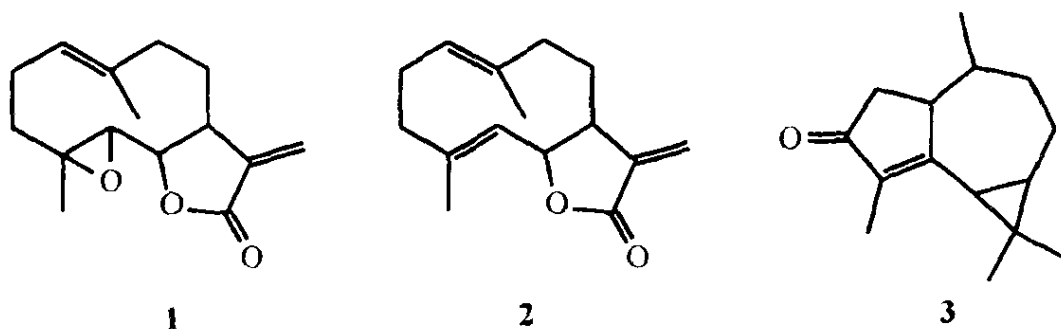
利用 SFE 方法而获得的天然产物的种类正迅速增多 (Bevan 和 Marshall, 1994; Castioni 等, 1995), 不仅有植物样品, 而且还有微生物样品 (Cocks 等, 1995)。其中, 一些较成熟的应用实例包括蛇麻草提取物的制备, 从烟草中提取尼古丁, 从咖啡中提取咖啡因等 (King 和 Bott, 1993)。以 SFE 方法进行香料、调味品及精油的提取更具有重要的经济价值 (King 和 Bott, 1993)。

利用超临界流体二氧化碳从植物星状茴芹 (star anise) 中提取茴香脑 (纯度 >90%) 比用传统的溶剂提取方法更有效, 后者不仅工艺烦琐、费时, 而且成本更高 (Liu, 1996)。

在从石蒜科植物中提取生物碱的过程中, Queckenberg 和 Frahm (1994) 研究了几个可提高收率的因素。在渗滤之后, 采用超临界流体氧化氮提取方法, 获得了很好的效果。

用超临界流体二氧化碳从腰果壳中提取酚性漆树酸 (anacardic acid), 5-十五碳二烯间苯二酚 (cardal) 和腰果酚 (cardanol) 衍生物时, 所得产物比用戊烷提取所得的产物质量更好 (Shobha 和 Ravindranath, 1991)。

用超临界流体二氧化碳从木兰科植物荷花玉兰 (*Magnolia grandiflora*) 的叶子中提取生物活性倍半萜, 比用丙烷近临界流体提取和二氯甲烷标准提取方法具有更高的选择性, 获得的提取物几乎不含叶绿素和脂肪。从 20g 上述植物的叶子中提取得到 36.85mg 提取物, 其中三个倍半萜的含量分别为银胶菊酯 (parthenolide) (1) 194mg/kg, 闭鞘姜酯 (cosfunolide) (2) 37.5mg/kg 和 cyclocolerenone (3) 604.5mg/kg (Castaneda-Acosta 等, 1995)。



在对金盏菊 (*Calendula officinalis*) 中的抗炎三萜活性成分进行跟踪分离过程中, Della Loggia 等 (1994) 首先对 360g 粉碎的金盏菊的花进行超临界流体二氧化碳提取, 得到 15g 蜡状产物, 随后又利用减压液相色谱、低压液相色谱和半制备型高压液相色谱等方法相结合进行了分离。

应用超临界流体提取方法的其他一些例子包括从菊科植物短舌匹菊 (*Tanacetum parthenium*) 中提取抗偏头痛的倍半萜内酯 (Smith 和 Burford, 1992), 从姜科植物姜黄 (*Curcuma longa*) 的根茎部分提取姜黄素类化合物 (cucurminoids) (Sanagi 等, 1993), 从伞形科植物台湾蛇床 (*Cnidium formosanum*) 的果实中提取呋喃香豆素类化合物 (Miyachi 等, 1987), 以及从紫杉科植物短叶紫杉 (*Taxus brevifolia*) 的树皮中提取紫杉醇 (Paclitaxel) (Jennings 等, 1992), 等等。在一项紫杉醇提取方法的研究中发现, 用超临界流体二氧化碳与乙醇的混合物远比单纯使用超临界流体二氧化碳效果更好。

本书中所涉及的超临界流体提取介于工业生产规模 (如从咖啡中脱除咖啡因等) 与分析型超临界流体提取之间。几个制造实验室用超临界流体提取仪器的公司包括 Isco, Supelco, Dionex 和 Suprex 公司等, 仪器的典型构造如图 2.1 所示。尽管昂贵的大容量超临界流体提取设备已经商品化, 一般提取器的容积还只是介于 1~50ml 之间, 而且大多数的仪器的装载样品的容器体积只有 10ml 左右。因此即使将几个容器连接起来, 能够装载的样品量仍很有限。

联机使用的超临界流体提取主要用于分析, 而不联机的超临界流体提取则可直接收集提取物。通过下面几种方法可达到收集提取物的目的:

1. 使超临界流体通过装有色谱材料的柱;
2. 使超临界流体减压通入少量的溶剂;
3. 使含有超临界流体的样品直接扩散进入一带有或不带有低温冷却的空容器, 如此获得的提取物含有很少甚至不含有溶