

NONGYAO

HUOXING TIANRAN CHANWU

JIQI FENLI JISHU

农药活性天然产物

及其分离技术

姬志勤 刘 伟 主编



化学工业出版社

TQ450
J037

NONGYAO

54

HUOXING TIANRAN CHANWU

JIQI FENLI JISHU

农药活性天然产物

及其分离技术

姬志勤 刘 伟 主编



化学工业出版社

· 北京 ·

本书以新农药创制为目的,从农药学的角度介绍了天然产物活性成分的提取和分离技术、高效液相色谱-质谱联用技术在天然产物研究中的应用以及天然产物农药活性成分的筛选及评价方法,并通过部分实例介绍了植物源和微生物源农药活性成分的分离方法,对源于植物和微生物的杀虫剂、杀菌剂和除草剂进行了总结,同时介绍了其他未产业化的农药活性天然化合物。

本书可供从事农药研究与开发,特别是从事新农药创制的研究生、科研及教学人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

农药活性天然产物及其分离技术/姬志勤,刘伟主编.
北京:化学工业出版社,2009.10
ISBN 978-7-122-06695-4

I. 农… II. ①姬… ②刘… III. 农药-生物活性-化学成分-分离 IV. TQ450

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 170255 号

责任编辑:刘 军
责任校对:宋 玮

文字编辑:张春娥
装帧设计:张 辉

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 刷:北京永鑫印刷有限责任公司

装 订:三河市万龙印装有限公司

720mm×1000mm 1/16 印张 19 字数 369 千字 2010 年 1 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:49.00 元

版权所有 违者必究

《农药活性天然产物及其分离技术》 编写人员名单

主 编 姬志勤

刘 伟

编写人员 姬志勤 西北农林科技大学

刘 伟 陕西省农药检定所

师宝君 西北农林科技大学

魏少鹏 西北农林科技大学

前言

创制具有自主知识产权的新农药,是我国农药行业面临的一项迫切而艰难的任务。农药创制的主要途径之一是从天然产物中发现新的先导化合物。天然产物农药的研究是多学科的交叉研究,至少涉及两大学科,即化学与生物学,这就要求科研人员要同时具备化学和生物学的基础理论和实验技术。

当前,我国许多大专院校和科研院所都在从事天然产物农药方面的研究。国内外现有的系统介绍天然产物分离技术的专著主要涉及的是医药领域,从农药学角度进行论述的尚不多见。本书便欲从农药学的视角出发,系统介绍研究天然产物农药活性成分分离方面的基本原理和实验方法。希望此书的出版对我国天然产物农药的研究,特别是对我国新农药创制能有所贡献。

本书简要介绍了天然产物的分离技术原理,然后用较多的研究实例,特别是作者自己的科研实践,说明了相关技术在天然产物农药研究中的应用。全书共分6章。第1章简要说明了研究天然产物农药活性成分对新农药创制的意义及其一般研究程序;第2章系统介绍了天然产物的提取和分离技术,着重介绍了高速逆流色谱以及高效液相色谱的应用技术;第3章着重介绍了电喷雾质谱的原理及其技术,并结合实例说明了高效液相色谱-质谱联用技术在天然产物农药活性成分研究中的意义及其应用技术;第4章从杀虫、杀菌以及除草三个方面系统介绍了建立农药活性天然产物筛选体系的方法,简单介绍了活性植物和微生物的筛选评价方法;第5章列举了部分植物源农药活性成分的分离实例,总结了已实现产业化的植物源杀虫剂、杀菌剂和除草剂品种,对其他未产业化的源于植物的农药活性天然产物也做了简单介绍;第6章首先介绍了微生物次生代谢物的研究概况,论述了发现新抗生素的策略及其研究程序,列举了部分微生物源农药活性成分的分离实例,总结了已实现产业化的农用杀虫、杀菌和除草抗生素,最后介绍了其他微生物源的农药活性成分。

由于作者学识水平有限,特别是书中涉及的学科较多、知识面较广,故难免有欠妥或疏漏之处,热忱欢迎读者及各方面的专家指教。

编者
2009年8月

目 录

1 农药活性天然产物概述	1
1.1 农药活性天然产物研究的意义	1
1.2 农药活性天然产物与生物农药	3
1.3 农药活性天然产物研究的一般程序	4
参考文献	5
2 天然产物的提取分离技术	7
2.1 活性物质的提取	7
2.1.1 超临界流体提取法	8
2.1.2 超声波提取法	9
2.1.3 微波提取法	10
2.2 活性成分的分离	10
2.2.1 沉淀	11
2.2.2 分馏	12
2.2.3 结晶	12
2.2.4 液-液分配	13
2.2.5 逆流色谱	16
2.2.6 薄层色谱	30
2.2.7 开口柱色谱	39
2.2.8 真空柱色谱	49
2.2.9 高效液相色谱	50
2.2.10 反相离子对色谱的应用	67
2.3 分离工作的一般程序	71
2.4 活性成分分离过程中值得注意的问题	72
参考文献	74
3 HPLC-MS 技术在天然产物分离中的应用	77
3.1 概述	77
3.2 质谱仪	77
3.2.1 离子源	78

3.2.2	质量分析器	89
3.2.3	串接质谱	93
3.3	高效液相色谱-质谱联用技术在天然产物研究 中的应用	96
3.3.1	高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS) 技术对于天然产 物研究的意义	96
3.3.2	HPLC-MS 分析方法的建立	98
3.3.3	HPLC-MS 定性分析天然产物	103
	参考文献	126
4	农药活性天然产物的筛选	127
4.1	建立生物活性筛选体系的意义	127
4.2	杀虫杀螨活性筛选体系	128
4.2.1	昆虫活体生物筛选模型	128
4.2.2	离体杀虫活性筛选模型	134
4.3	杀菌活性筛选体系	137
4.3.1	微生物活体筛选方法	137
4.3.2	离体抑菌活性筛选方法	143
4.4	除草活性筛选体系	146
4.5	以特定化合物为目标的筛选体系	149
4.6	生物活性的液质联用筛选法	151
4.7	活性植物和微生物的筛选与评价	152
4.7.1	活性植物的筛选	152
4.7.2	活性微生物的筛选	154
4.8	活性生物的评价	164
4.8.1	活性植物的评价	164
4.8.2	活性微生物的评价	165
	参考文献	166
5	植物源农药	167
5.1	植物源农药研究概述	167
5.1.1	植物源农药的历史与现状	167
5.1.2	植物源农药的研究内容	168
5.2	植物源农药活性成分的提取和分离	170
5.2.1	美国扁柏杀虫活性成分的分离	171

5.2.2	杠柳杀虫活性成分的分离	172
5.2.3	透骨草杀虫活性成分的分离	173
5.2.4	苦皮藤杀虫活性成分的分离	174
5.2.5	<i>Solanum arundo</i> 根皮中除草活性成分的分离	178
5.2.6	芸香中抑菌活性成分分离	178
5.3	植物源杀虫活性化合物	179
5.3.1	产业化的植物源杀虫剂	179
5.3.2	其他植物源杀虫活性物质	194
5.4	植物源杀菌活性成分	204
5.4.1	产业化的植物源杀菌剂	204
5.4.2	其他植物源杀菌活性物质	205
5.5	植物源除草活性成分	208
	参考文献	213
6	微生物源农药	215
6.1	微生物源生物活性成分研究概述	215
6.1.1	研究微生物活性代谢物的意义	215
6.1.2	微生物代谢物研究历程	216
6.1.3	已知微生物活性代谢物的来源	217
6.1.4	微生物代谢物的生物活性类型	218
6.1.5	微生物代谢物的化学结构类型	221
6.2	发现新抗生素的策略	222
6.2.1	扩大微生物的来源	222
6.2.2	组合生物合成	225
6.2.3	抗生素耐药性诱变技术	226
6.3	抗生素的高通量筛选技术	226
6.3.1	基于靶标的高通量筛选	226
6.3.2	基于宏基因组学的开发策略	227
6.4	抗生素分离的一般程序	228
6.4.1	抗生素的早期鉴别	228
6.4.2	发酵液的预处理	232
6.4.3	有效成分的提取	235
6.4.4	有效成分的分离	236
6.5	抗生素分离实例	237
6.5.1	秦岭链霉菌次生代谢物中抑菌活性成分的分离	237

6.5.2	白黄链霉菌 (<i>Streptomyces alboflavus</i>) 313 菌株次生代谢物中抑菌活性成分的分离	241
6.5.3	苦皮藤内生真菌 Hd3 菌株次生代谢物中抑菌活性成分的分离	244
6.5.4	苦皮藤内生真菌 A10 菌株次生代谢物中抑菌活性成分的分离	247
6.5.5	除草霉素的分离	249
6.5.6	homoalanosine 的分离	250
6.5.7	phosphonothrixin 的分离	251
6.5.8	maculosin 的分离	252
6.6	农用抗生素	254
6.6.1	农用抗生素研究概况	254
6.6.2	商品化的微生物源杀虫剂	254
6.6.3	其他微生物源杀虫活性化合物	260
6.6.4	商品化的微生物源杀菌剂	266
6.6.5	其他微生物源杀菌活性物质	276
6.6.6	商品化的微生物源除草剂	280
6.6.7	其他微生物源除草剂活性物质	281
	参考文献	289

1.1 农药活性天然产物研究的意义

自作为一个重要的生产资料类别进入农业生产领域以来,有关农药的争议就没有停止过。一方面,随着人类寿命的延长,全球人口的增长以及人们生活水平的提高,人类对食品的需求不断增长,而要满足这个需求,农药是不可或缺的生产资料。另一方面,在使用农药的过程中,尤其是使用一些高毒、高残留的化学农药,又不可避免地非靶标生物以及环境造成危害。尽管我国早在1975年就提出了“预防为主,综合防治”的植物保护方针,在国际上“有害生物综合治理”(integrated pest management, IPM)也得到了普遍的接受,但毋庸讳言,化学防治在目前及今后相当长的一段时间内仍将是植物保护领域最重要的技术手段。英国的L. Copping博士在2002年曾指出“如果停止使用农药,将使水果减产78%、蔬菜减产54%、谷物减产32%”。据统计,我国因使用农药每年可挽回粮食损失5400万吨、棉花160万吨、蔬菜1600万吨、水果500万吨,减少经济损失达300亿元人民币。如何最大限度地提高农药在农业生产中的收益,同时尽可能地减少其对生态及环境的危害,是当今农药研究面临的一个重要课题,也是现代农药的发展方向。

有机合成农药的发展是一个不断成熟、不断进步的过程。以杀虫剂为例,以有机氯、有机磷和氨基甲酸酯为主体的杀虫剂市场在品种结构上已发生了重大变化。有机氯农药,如六六六、DDT等因为残留问题早已退出历史舞台。有机磷和氨基甲酸酯类农药中的部分品种则因为毒性问题而被各国禁用或限用,而一些结构新颖、生物活性高、环境相容性好的杀虫剂品种则逐渐占据了市场。值得注意的是,在这些新一代杀虫剂的研制过程中,天然产物农药扮演着重要角色。以除虫菊素为先导化合物,开发出了一系列生物活性更为优异的拟除虫菊酯类杀虫剂;以烟碱为先导化合物,开发出了吡虫啉、吡虫清等新烟碱类杀虫剂;以双丙胺膦为先导化合物,人们开发出了新型除草剂——草胺膦。与此类似的例子还有很多。事实上,动植物以及微生物是天然的有机合成大师,各种生物在其生命过程中产生的次生代谢物是药物开发的重要宝库。

据Bérdy统计(表1-1),目前已确定结构的天然产物数量超过一百万,其中具有生物活性的化合物在二十万个以上。值得指出的是,由于这些数据主要是报道的

归纳和总结,有很多化合物的活性评价其实并不全面,因而某些非活性化合物并不一定就是完全没有生物活性。随着今后生物活性评价技术的日趋完善和进步,还可能从已知化合物中发现“新的生物活性”。

表 1-1 已知天然产物的来源及数量

来 源	已知化合物	生物活性化合物
天然产物	≥ 1000000	200000~250000
植物界	600000~700000	150000~200000
微生物	≥ 50000	22000~23000
藻类/地衣	3000~5000	1500~2000
高等植物	500000~600000	100000
动物界	300000~400000	50000~100000
原生动物	数百个	100~200
无脊椎动物	100000	—
海洋动物	20000~25000	7000~8000
昆虫/蠕虫/其他	8000~10000	800~1000
脊椎动物	200000~250000	50000~70000

与传统的化学农药相比,农药活性天然产物具有下述特点。

① 大多数农药活性天然产物对哺乳动物的毒性较低,使用中对人畜比较安全。如鱼藤酮大鼠急性经口 LD_{50} 为 132mg/kg,兔急性经皮 LD_{50} 为 1500mg/kg;除虫菊素 I 和 II 大鼠急性经口 LD_{50} 为 340mg/kg,急性经皮 LD_{50} 为 6000mg/kg。也有些天然产物杀虫剂的毒性较高,如杀虫抗生素阿维菌素 (avermectin) 大鼠急性经口 LD_{50} 仅为 10.06mg/kg,急性经皮 LD_{50} 大于 380mg/kg。然而阿维菌素在制剂中的含量很低,因而在使用中对人畜仍是比较安全的。例如 1.8% 爱力螨克乳油中有效成分 avermectinB₁ 的含量仅 1.8%,大鼠急性经口 LD_{50} 为 650mg/kg,兔急性经皮 LD_{50} 为 2000mg/kg。

② 防治谱较窄,有明显的选择性。以印楝素为例,鳞翅目昆虫对印楝素最敏感,低于 1~50 μ g/g 的浓度就有很高的拒食效果;鞘翅目、半翅目、同翅目昆虫对印楝素相对不敏感,要达到 100% 的拒食效果,需要 100~600 μ g/g 的浓度。倍半萜类化合物苦皮藤素则表现出更为明显的选择性,20% 苦皮藤提取物乳油稀释 2000 倍对鳞翅目昆虫槐尺蠖幼虫即表现出强烈的杀虫活性,而同样的制剂稀释 500 倍对甘蓝夜蛾却没有明显的活性。

③ 对环境的压力小,对非靶标生物安全。农药活性天然产物本身是生物体在其生命过程中合成的,一般只含碳、氢、氧、氮四种元素,在环境中易于降解。和常规化学农药相比,天然产物农药对非靶标生物,特别是对鸟类、兽类、蚯蚓、害虫天敌及有益微生物影响较小。例如田间喷洒印楝素制剂,并不影响果蝇寄生蜂羽化,羽化的寄生蜂能正常交配,寻找新的果蝇寄主。这一特点不仅有利于保持生态平衡,而且有利于有害生物综合治理方案的实施。

④ 大多数农药活性天然产物作用缓慢，在遇到有害生物大量发生、迅速蔓延时不能及时控制危害。一些植物杀虫剂，其主要作用机制是对害虫的拒食作用、忌避作用、抑制产卵作用或干扰昆虫的生长发育等特异性作用，在施药后的短时间内，害虫往往不会死亡，种群数量也不会有大的变化。但也有一些例外，如烟碱就属于速效性的杀虫剂，碱性的烟草水稀释液在施药后 3h 即可发挥其最高的熏蒸和触杀作用，许多体型小的害虫（如蚜虫、蓟马）大多在短时间内死亡。

⑤ 多种成分协同发挥作用 植物源杀虫剂所使用的原料都是从植物中提取的多种成分的混合物。实验结果表明，尽管活性成分含量相同，但提取物往往比其纯品的活性更高，如含量为 60%~75% 的印楝素提取物比印楝素纯品对昆虫的生长发育抑制作用更为强烈，可能提取物中的其他成分对印楝素具有增效作用。

⑥ 延缓抗性 作为多组分体系，植物源杀虫剂对延缓害虫的抗药性也具有明显作用。实验结果表明，以绿色桃蚜 (*Myzus persicae*) 为试虫，用 LC_{50} 剂量的印楝素纯品处理植株，然后接虫，在 35 代以后，试虫对印楝素的抗性仅增长了 9 倍，而在用印楝素含量相同的印楝种子提取物为供试药剂的平行处理试验中，试虫未表现出对印楝素的抗药性。

对于新农药开发而言，农药活性天然产物最大的优点在于其化学结构的多样性。次生代谢物是生物体在生命过程中经过一系列复杂的生物合成而形成的，其合成路线之巧妙、结构之丰富，远非实验室合成可比，可以为有机合成专家开发设计新农药提供重要的借鉴。此外，有些次生代谢物本身就是生物与环境或其他生物体共同作用的结果，天然地具有某种生物活性，如微生物为了拮抗其他微生物可以产生抗生素，与昆虫的相互作用可以产生杀虫剂，与植物的相互作用可以产生除草剂，与动物的相互作用可以产生肿瘤抑制剂、酶抑制剂以及其他药理活性成分等。由以上两点可以看出，天然产物对于新农药的研究与开发具有两个方面的意义，即提供先导化合物以及直接开发商品化农药。

1.2 农药活性天然产物与生物农药

化学农药的广泛使用，在产生巨大经济效益的同时也带来了诸多的负面影响，尤其是对非靶标生物的杀伤及对环境的破坏引起了全世界的广泛关注，一些环保组织甚至呼吁全面禁用化学农药。在这种情况下，生物农药逐渐兴起，但究竟何为生物农药，目前定义尚不统一。美国环保署 (EPA) 把生物农药划分为三类：一是微生物农药，即细菌、真菌、病毒以及原生动物等活体生物，其中使用最广泛的如苏云金杆菌，而微生物次生代谢物，如农用抗生素，则并不在列；二是植物导入保护剂 (plant-incorporated-protectant, PIP)，该术语尚没有规范的翻译，有时也称

其为植物结合性保护剂，主要是指可通过基因工程技术转入植物的一些功能性基因或其表达的蛋白，美国 EPA 只将基因或其表达蛋白作为管理范畴，转基因植物并不在定义范围之内；三是生物化学农药，即是由动物、植物或微生物产生，同时对靶标生物的作用机制不是直接杀死，而是通过影响其生理过程来达到控制防治对象的目的，如昆虫的生长调节抑制剂。英国的农药学家 Leonard G. Copping 博士在其专著“Biopesticide Manual”中对生物农药的定义则包括：①微生物活体；②昆虫病原线虫；③植物的次生代谢物；④微生物次生代谢物（如抑菌性农用抗生素、杀虫农用抗生素）；⑤昆虫信息素；⑥转移到植物中可表达抗虫、抗菌、抗病毒以及耐受除草剂的基因。

上述内容列举了生物农药的两个定义，分别代表了政府（EPA）和学术界对生物农药的不同认识。比较它们的内容可以看出，两者最大的差异在于对农药活性天然产物的认定。按照 Copping 博士的定义，植物和微生物次生代谢物均属于生物农药的范畴，而 EPA 的定义则要狭窄得多，即必须同时满足对非靶标生物的“软杀伤”条件才能列入生物农药。由于 EPA 对生物农药和化学农药在登记和管理措施上有明显的区别，因此 EPA 的定义对生物农药产业的发展起着重大的指导性作用。如前所述，农药天然产物既可以直接加工成农药制剂使用，也可以为新农药的创制提供先导化合物，而且后者的意义要远远大于前者，EPA 的法规虽然会影响到天然产物的直接加工应用，但对于后者则没有直接的影响。

1.3 农药活性天然产物研究的一般程序

研究天然产物的主要意义在于发现新的活性化合物，继而以其作为先导化合物去合成可供产业化的化合物，或以其作为探针发现新的靶标，再针对靶标设计可供产业化的化合物，其目的均是最终实现产业化，而能否实现这个目的，则在很大程度上取决于能否发现有价值的新化合物。研究农药活性天然产物的程序一般如下所述。

① 样品的采集 农药活性天然产物是生物体在生命过程中产生的次生代谢物，而各个生物体受其遗传特性以及生活环境等多因素的影响，产生的次生代谢物存在着明显差异，能否找到理想的生物材料是决定工作成败的首要因素。对于植物样品而言，可以通过查阅文献、调查走访等方法进行初步评估，确定是否具有进一步研究的价值。对于微生物样品而言，采用常规方法从土壤放线菌中发现新抗生素的概率已经非常低，因此首先要扩大菌种的来源，如从极端环境中（高盐碱、高海拔或高寒地域）采集，或从研究较少的植物内生真菌入手，或针对土壤中的稀有放线菌进行筛选。其次要采取快速的识别方法对活性物质进行定性，评估发现新抗生素的概率，再决定是否继续进行研究。

② 有效成分的提取 有效成分在生物材料中的含量通常较低,因此首先要采取适当的方法对其进行必要的富集,这个过程就是有效成分的提取。有效成分的提取方法主要取决于化合物本身的物理化学性质。如果某种微生物活性代谢物是碱性化合物,可以通过阳离子交换树脂从发酵液中提取有效成分;如果是中性水溶性化合物,可以通过大孔吸附树脂进行提取;如果化合物具有一定的脂溶性,则可以采用液-液萃取或大孔吸附树脂提取。

③ 有效成分的分离和纯化 有效成分在自然界中都是以混合物状态存在的,而要研究它的化学结构和生物活性则必须用纯化合物才能进行,因此必须对初步富集的样品进行必要的纯化处理。分离和纯化是农药活性天然产物研究的核心内容,也是整个工作的难点所在。尽管现代仪器分析技术已经十分成熟,但由于天然产物分离过程中常常无法从众多的化合物中确定哪个才是目标化合物,因此在实践中更多的是采用生物活性追踪与仪器分析相结合的方法来指导整个分离过程。

④ 有效成分的结构鉴定 在得到化合物纯品后,首先要对其结构进行鉴定。核磁共振波谱、高分辨质谱、红外光谱以及紫外光谱等有机化合物的结构鉴定技术当前已十分成熟,通常仅需几毫克样品就可完成相关的测试,从而确定其化学结构。再通过化学数据库进行检索,确认得到的化合物是否为新化合物,以及是否有结构类似的化合物的文献报道。

⑤ 生物活性评价 采用标准的测试方法对化合物的农药活性进行评价。

⑥ 综合评价 根据化合物的结构以及生物活性数据进行分析,评估化合物是否有直接利用的价值,以及化学结构是否可以作为先导化合物进行开发等。

(姬志勤)

参 考 文 献

- [1] Bérdy J. Bioactive Microbial Metabolites. J Antibiot, 2005, 58 (1): 1-26.
- [2] Copping L G. The Biopesticide Manual. British Crop Protection Council, 49 Downing Street, Farnham, Surrey. 1998: IX-X.

[illegible][illegible]

最近陳長生還與前駐日大使谷正倫、駐日大使王正廷、駐日公使劉若仁、駐日參贊陳其采等商討，並與駐日各國公使交換意見。王正廷、劉若仁、陳其采等對駐日商團合組總商會，以維護僑商利益，均表贊同。王正廷並電駐日各國公使，促其協助。王正廷並電駐日各國公使，促其協助。

1. 1980年12月25日，中共中央、国务院发出《关于实行科学工作者荣誉制度的决定》，规定对从事科学工作的专家、学者、技术骨干，在政治上、生活上给予关心和照顾，给予荣誉，对有特殊贡献者，授予政府给予的特殊津贴。

(體志) 六

分 子 振 動

$$g(\mathbf{z}) = \frac{1}{2} \mathbf{z}^T \mathbf{G} \mathbf{z} + \mathbf{g}^T \mathbf{z} + g_0, \quad \mathbf{z} \in \mathbb{R}^n, \quad (1)$$

$$g(\mathbf{z}) = \frac{1}{2} \mathbf{z}^T \mathbf{G} \mathbf{z} + \mathbf{g}^T \mathbf{z} + g_0, \quad \mathbf{z} \in \mathbb{R}^n, \quad (2)$$

2.1 活性物质的提取

以分离为目的的活性物质的提取，在溶剂和提取方法的选择方面，主要考虑的问题既不是活性物质的提取率，也不是提取的成本，而是：①如何有效地提取出主要的活性成分，而尽可能少地提取出“杂质”（非活性成分）；②提取过程中尽可能采用温和的条件，以免破坏活性成分的分子结构；③提取应和下一步的有效成分分离综合考虑，甚至提取本身就带有粗分离性质。

以卫矛科植物苦皮藤的活性成分提取为例。苦皮藤素在石油醚、氯仿、乙醚、乙酸乙酯、苯、丙酮、甲醇等中都有一定的溶解性，在石油醚中溶解度较小，在中等极性和极性溶剂中溶解度较大，因此在产业化苦皮藤素制剂生产中以苯为溶剂提取活性成分，但在有效成分分离工作中，则以石油醚（60~90℃）为溶剂，采用加热回流提取，趁热过滤，滤液冷却过夜，析出淡黄色沉淀物。沉淀物富含苦皮藤素，用作下一步分离。本例中，选用石油醚为溶剂，活性成分提取率必定不如苯或乙酸乙酯，但杂质含量相对较少，特别是很少有极性较大的色素、皂苷、鞣质等，从而有利于下一步的分离，而且石油醚热提取物放冷后析出沉淀，这本身就有粗分离的作用（沉淀和石油醚提取物的非沉淀部分分离）。

以活性成分分离为目的的提取，实验室常用浸渍法、渗漉法和回流提取法。浸渍法和渗漉法的优点是，不需要专门的仪器，在室温下进行，可以避免热不稳定性有效成分的分解（如在回流提取或连续回流提取过程中），特别适用于大量样品的同时提取。此外，水蒸气蒸馏法也有采用，但这种方法仅局限于能随水蒸气蒸馏而不被破坏的有效成分的提取。这些有效成分不溶或难溶于水，且在约 100℃时有较高的蒸气压，从而被水蒸气带出。如果有效成分为挥发油或一些小分子的生物碱，则可考虑采用水蒸气蒸馏法提取。例如从猪毛蒿（*Artemisia scoparia*）（室内自然晾干的全草）中提取杀虫成分就是采用水蒸气蒸馏法，得黄绿色精油，出油率为 0.36%，其中主要杀虫活性成分茵陈二炔占精油的 42.5%。又如从烟草中提取杀虫有效成分烟碱亦可采用水蒸气蒸馏法。但在活性成分分离提取过程中，由于尚不知有效成分是哪一类物质，更不了解其理化性质，因此水蒸气蒸馏法一般不被采用。

值得指出的是,20世纪80年代以来发展和完善起来的一些新的提取技术和方法,读者可根据各自的仪器设备情况及提取分离对象选择应用。

2.1.1 超临界流体提取法

所谓超临界流体,是物质处在其临界温度及临界压力以上的状态,物质状态介于气态和液态之间,因而有气体和液体的某些理化性质。常用的超临界流体为二氧化碳,其临界温度为 31.1°C ,达到这个温度以上,则不管加多大压力都不能使之液化,只是随着压力增加而密度加大。二氧化碳的临界压力为 7.39MPa ,如果小于这个压力,则温度无论如何降低,它也不会液化,因此超临界流体又称为高密度气体,其扩散速度大于液体,其黏度小于液体,既具有气体扩散渗透快的特点,又具有液体的溶解能力,并且随着密度增大,溶解能力增强。超临界二氧化碳流体对溶质的溶解度取决于其密度,当在临界点附近,压力和温度发生微小变化时,密度即发生变化,从而引起溶解度的变化。因此,将温度或压力适当变化,可使溶解度在 $100\sim 1000$ 倍的范围内变化,因而具有较高的溶解性。一般情况下,超临界二氧化碳流体的密度越大,其溶解能力就越大。在恒温条件下随压力升高,溶质的溶解度增大;在恒压条件下随温度升高,溶质的溶解度减小。利用这一特性可从植物材料中萃取某些亲脂性成分。超临界二氧化碳流体的高扩散性和流动性,则有助于所溶解的各组分彼此分离,达到萃取分离的目的,并能加速溶解平衡,提高萃取效率。

超临界二氧化碳萃取技术具有下述特点。

- ① 操作范围广。最常用的操作范围是压力 $8\sim 30\text{MPa}$ 、温度 $35\sim 80^{\circ}\text{C}$ 。
- ② 便于调控,选择性好。可通过调控压力和温度,改变超临界 CO_2 的密度,从而改变其对物质的溶解能力,有针对性地萃取某些成分。
- ③ 操作温度低,适用于热敏感性成分的提取。通常可在接近室温条件下萃取,且萃取过程密闭、连续进行,排除了遇空气氧化和见光反应的可能性,使萃取物稳定。
- ④ 从萃取到粗分离可一步完成,萃取后 CO_2 和萃取物分离。
- ⑤ CO_2 廉价易得,可循环使用。

图2-1是金波等(1990)采用超临界 CO_2 提取梔子花头香成分的装置及操作程序。气瓶1中的 CO_2 经净化器2净化后由压缩机3压缩进入抽提器4,当抽提器 CO_2 压力达到 20MPa 时,开启解吸阀5,并将阀门5、6调至适当位置,使抽提器中 CO_2 的压力保持为 20MPa ,而解吸器7中的 CO_2 压力保持为 5MPa ,抽提器和解吸器中 CO_2 的温度分别为 35°C 和 30°C 。 CO_2 在抽提器中与吸附有梔子头香成分的吸附剂充分接触,溶出被吸附的头香成分并在解吸器中将其解吸。解吸后的