

- [37] Spiering M J, Moon C D, Wilkinson H H, *et al.* Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum* [J]. *Genetics*, 2005, 169: 1403-1414.
- [38] Spiering M J, Wilkinson H H, Blankenship J D, *et al.* Expressed sequence tags and genes associated with loline alkaloid expression by the fungal endophyte *Neotyphodium uncinatum* [J]. *Fung Genet Biol*, 2002, 36: 242-254.
- [39] Tanaka A, Tapper B A, Popay A, *et al.* A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory [J]. *Mol Microbiol*, 2005, 57(4): 1036-1050.
- [40] Ryan C A, Farmer E E. Oligosaccharide signals in plants: a current assessment [J]. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 1991, 42: 651-674.
- [41] Namdeo A, Patil S, Fulzele D P. Influence of fungal elicitors of production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Biotechnol Prog*, 2002, 18(1): 159-163.
- [42] 王剑文, 郑丽屏, 谭仁祥. 促进黄花蒿发根青蒿素合成的内生真菌诱导子的制备 [J]. *生物工程学报*, 2006, 22(5): 829-834.

高速逆流色谱在中药分离中溶剂体系的筛选

程杰, 符晓晖*, 王维娜

(上海同田生物技术有限公司, 上海 201203)

高速逆流色谱 (high-speed countercurrent chromatography, HSCCC) 是近年来迅速发展起来的新型液-液分配色谱技术。与其他液相色谱分离方法相比, 其不使用固体载体作固定相, 被分离物质在互不相溶两相分配分离, 克服了固体载体带来的样品吸附、变性、污染、峰形拖尾等缺点^[1]。由于其所具有的分离功能强、速度快、制备量大的优势, 在天然产物、生物制品、抗生素^[2,3]的分析、分离工作中得到越来越广泛的应用。

高速逆流色谱在中药领域的分离纯化中得到相当广泛的应用^[4-6], 在黄酮、生物碱、植物多酚、酯类、萜类、木脂素、香豆素、皂苷等几乎所有的天然植物化学成分的分纯化中都有应用。高速逆流色谱应用分离中, 溶剂体系的成功选择是关键。在多年逆流色谱溶剂体系筛选的研究中, 有不少研究学者也对此提出自己的思路和看法^[7,8], 这些信息对应用逆流色谱分离中药的研究工作有较大的借鉴意义。目前溶剂体系的选择和优化多在于实验经验的积累, 没有充分的理论依据, 但却具有较强的实用价值。

本文主要是对逆流色谱分离中药实验中溶剂体系的筛选经验进行论述。

1 溶剂体系的选择原则

溶剂体系的选择是高速逆流色谱分离重要的一个环节。选择逆流色谱的溶剂体系时, 应注意以下几个方面: 不造成样品的分解和变性; 足够高的样品溶解度; 样品在系统中合适的分析系数值; 固定相能实现足够高的保留^[4]。

2 溶剂体系的筛选

通过查阅文献了解待分离物质的理化性质, 如溶解度、极性、酸碱度、稳定性、熔点等, 方便寻找合适的溶剂体系。

构成溶剂体系的各组分组成可根据样品的溶解度来筛选, 在两相体系中选择某一或几种对其溶解度较好的组分和溶解度较差的组分构成新的溶剂体系。

2.1 常用体系: 随着逆流色谱应用的日益广泛, 越来越多的

研究人员针对不同的分离物质及类型进行相应的分离纯化研究。通常的筛选体系参考与待分离目标成分相类似的成分的分实例, 初步确定溶剂体系的组分及比例, 进而根据具体情况做出调整。

以本实验室的实践经验, 氯仿体系和醋酸乙酯体系均为常见的经典体系。如采用氯仿-甲醇-水 (4:3:2) 体系, 从银杏叶粗提物中一次分离得到白果内酯单体^[9]; 采用氯仿-甲醇-水 (4:3:2)、醋酸乙酯-乙醇-水 (10:1:10) 等溶剂体系, 从虎杖根的醋酸乙酯提取物及水提物中分离得到白藜芦醇和虎杖苷^[6]; 应用石油醚-醋酸乙酯-乙醇-水 (4:4:1) 体系从白术中分离出苍术苷和苍术烯丙酯^[10]。在研发中根据样品的性质、实际的应用效果, 参考常见溶剂体系或相应类型和性质的物质的分离文献是个有效的体系筛选方法。

中药的分离通常有3类体系: 非极性或弱极性体系、中等极性体系、亲水性体系。可根据待分离物质的性质来选择。

2.1.1 非极性或弱极性体系: 一般指适合分离在己烷、石油醚、乙醚、四氯化碳等溶剂中易溶, 在甲醇、乙醇等溶剂中溶解的物质。通常选用的溶剂有: 正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水、正己烷-甲醇-水、正己烷-乙醇-水、四氯化碳-甲醇-水、正己烷-甲醇、正己烷-乙腈-醋酸乙酯、正己烷-乙腈-二甲醚等。非极性或弱极性体系溶剂条件筛选模型见图1。

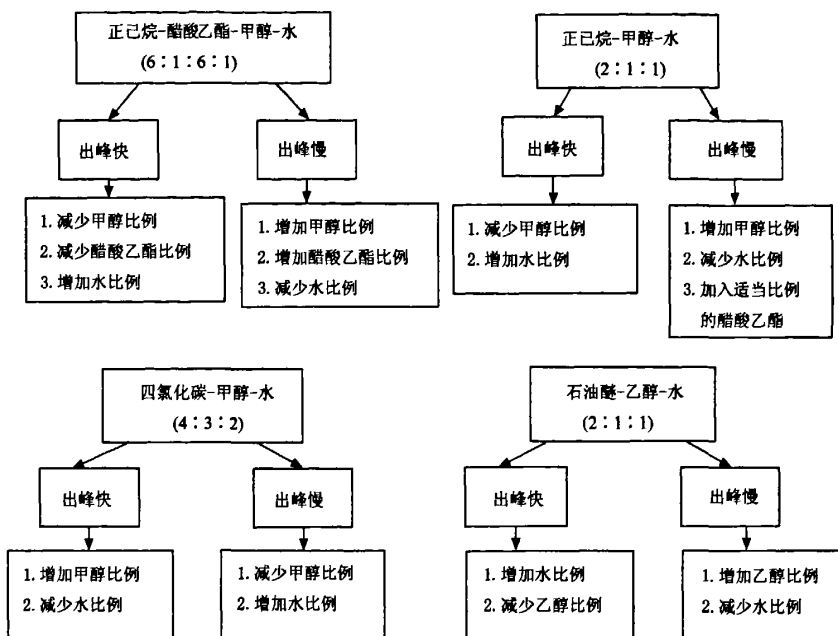
2.1.2 中等极性体系: 一般适合分离在氯仿、醋酸乙酯、丙醇、丁醇等溶剂中易溶, 在甲醇、乙醇溶剂中溶解, 石油醚、己烷等溶剂中不溶或难溶的物质。通常选用的溶剂: 正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水、正己烷-醋酸乙酯-乙醇-水、氯仿-甲醇-水、氯仿-甲醇-丁醇-水。中等极性体系溶剂条件筛选模型见图2。

2.1.3 亲水性体系: 一般适合分离在丁醇、甲醇、乙醇、水等溶剂中易溶, 在石油醚、己烷、氯仿等溶剂中难溶的物质。通常为醋酸乙酯-丁醇-甲醇-水; 醋酸乙酯-丁醇-乙醇-水; 丁醇-水等体系。亲水性体系溶剂条件筛选模型见图3。

2.2 测定分配系数筛选体系: 分配系数 (K) 是分离中一个

收稿日期: 2008-02-29

* 通讯作者 符晓晖 Tel: (021)51320588 E-mail: lab_xh@sina.com



非极性或弱极性体系溶剂条件筛选模型

Fig. 1 Screening model of solvent conditions in nonpolarity or weak polarity systems

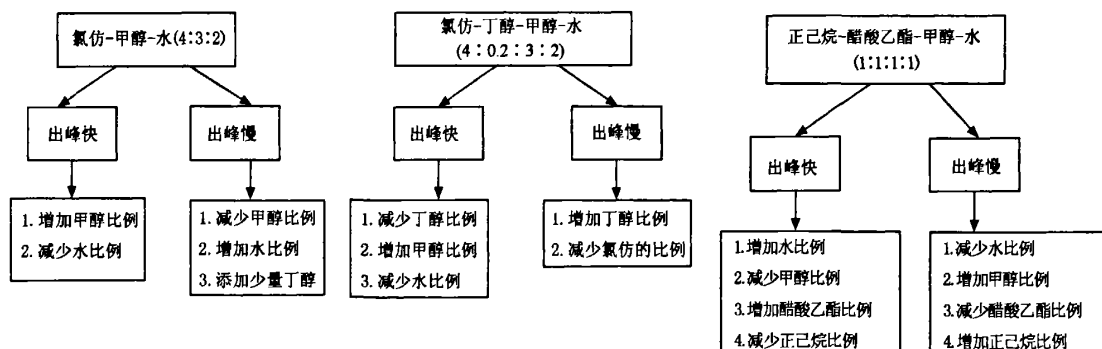


图 2 中等极性体系溶剂条件筛选模型

Fig. 2 Screening model of solvent conditions in moderate polarity system

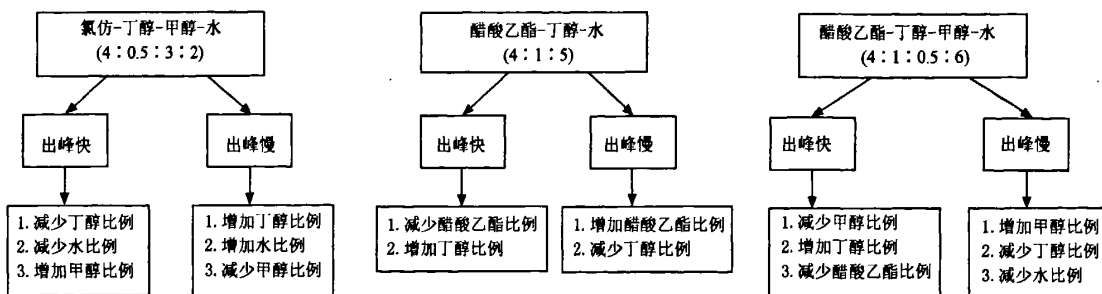


图 3 亲水性体系溶剂条件筛选模型

Fig. 3 Screening model of solvent conditions in hydrophilic system

重要的参数。通常把分配系数定义为溶质在固定相中的质量浓度同溶质在流动相中的质量浓度之比^[11]。测定分配系数常用的方法是高效液相色谱、薄层色谱密度法和分光光度法,分别测定上下相中各组分的响应值,进而计算分配系数。理想的分配系数在0.5~2^[12]。分配系数的测定为筛选的溶剂系统提供一个较好的参考依据。

2.2.1 HPLC法:HPLC法是相对比较准确的 K 值的测定方法。操作方法^[13]为取一定量的样品,再加入等体积的已分配好的体系的上相和下相溶解,充分溶解后,然后再从中取出等量的上相及下相进样,进而进行目标成分峰面积的比值测定,得到 K 值。

以本实验室从红车轴草提取物中分离芒柄花素和鹰嘴豆芽素A为例,说明筛选不同体系鹰嘴豆芽素B和芒柄花素在上下层分配系数的过程。按HPLC测定 K 值的方法,先试用经典体系正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(1:1:1:1)和氯仿-甲醇-水(4:3:2),发现使用氯仿-甲醇-水体系时,目标成分主要分配在下相,分配系数远远小于0.5,故暂时放弃在此体系上调整比例或溶剂。使用正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水,目标成分的分配系数分别为 $K_E=0.43$, $K_M=1.64$ 。通过调整该体系中不同溶剂的用量,最终确定下来的分离溶剂体系为正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水(2:1.5:1.5:2),见表1。根据筛选结果,进行验证实验,结果一致,芒柄花素和鹰嘴豆芽素A保留时间分别为3.6 h。

表1 芒柄花素和鹰嘴豆芽素A分配系数测定结果

Table 1 Determination of partition ratio of onocol and abiochanin A

体系	比例	K_E	K_M
正己烷-醋酸乙酯-甲醇-水	1:1:1:1	0.43	1.64
氯仿-甲醇-水	2:1.5:2	0.39	1.29
	2:1:2:2	0.25	1.14
	2:2.5:2:2	1.16	4.14
	2:1.5:1.5:2	0.61	2.0
	2:2:1:2	8.69	25.25

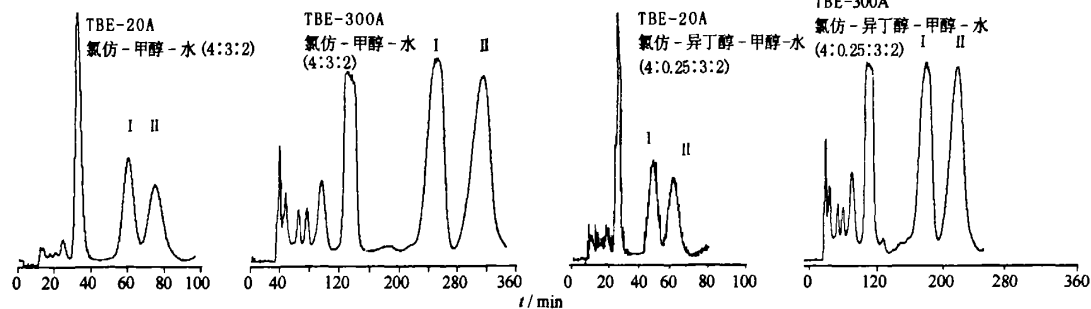


图4 不同逆流色谱分离芦荟苷提取物的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of barbaloin extract separated by different HSCCC

表2 分配系数测定结果

Table 2 Determination of partition ratio

体系	比例	芦荟苷A	芦荟苷B
氯仿-甲醇-水	4:3:2	2.3	2.8
氯仿-甲醇-异丁醇-水	4:3:0.25:2	1.9	2.3

2.2.2 薄层色谱法:薄层色谱法测定 K 值参考高效液相法,把等量的上下相在薄层上展开,分析目标成分的斑点大小、颜色深浅,对样品分配做个初步测定。薄层法因其操作简单快速,在应用中也常用。

薄层色谱法也可选择对HSCCC合适的两相溶剂系统。用水饱和的有机相(即两相中的有机相)作展开剂展开样品,根据待分离的组分的比移值来大致推断实验条件的适合程度及流动相的选择。因为薄层色谱与逆流色谱分离原理不一致,所以这种方法也只能给出筛选溶剂体系的大体指示。

2.2.3 紫外分光光度法:此方法对目标成分有紫外吸收的样品适用。对样品进行吸光度的比较,推测物质的分配情况,进而初步筛选体系。因样品中不同物质的吸收不同可能会对结果产生干扰,所以此方法不多用。

2.3 分析型HSCCC的应用:分析型HSCCC具有体积小、速度快、溶剂消耗量小等特点,对溶剂体系的初步筛选中进行快速实验和适当的比例调整,可以达到事半功倍的效果。以下将以分离芦荟苷提取物为例证明分析型HSCCC是非常有用的溶剂体系筛选方法。

待分离样品为芦荟苷提取物,目标成分为芦荟苷A和芦荟苷B。粗提物在氯仿、甲醇中溶解,在石油醚、己烷等溶剂中难溶,HSCCC溶剂系统初筛由氯仿-甲醇-水(4:3:2)组成,以TBE-20A分析型高速逆流色谱仪试分离,以上相为固定相,下相为流动相,检测波长254 nm,分离图谱见图4。将该实验体系放大到TBE-300A半制备型高速逆流色谱仪上,分离图谱见图4,出峰时间很长。调整体系为氯仿-异丁醇-甲醇-水(4:0.25:3:2),在TBE-20A分析型高速逆流色谱仪试分离,结果可见出峰时间提前,样品达到基本分离,分离图谱见图4。将该实验体系放大到TBE-300A设备上,分离图谱见图4,在合适的时间内达到较好的分离。其中I为芦荟苷A,II为芦荟苷B,质量分数均达到98%。后经HPLC测定溶剂体系的分配系数见表2。

3 讨论与总结

3.1 从样品的溶解度情况来考虑溶剂体系,通过参考文献及常用体系,测定 K 值等来筛选溶剂体系。按照样品疏水性强弱来选择溶剂系统,根据实际应用效果调整。

3.2 常规体系达不到分离的情况下,可通过更换溶剂系统组分、替代溶剂系统组分、重新更换溶剂系统进行调整,以便

取得更大的进展和突破。

3.3 分析型逆流色谱的应用可为溶剂体系的筛选和体系调整起到事半功倍的作用,其与半制备型设备良好的实验重复性也是选择实验的基础。

3.4 逆流色谱的体系可选择的溶剂比较多,任意组合只要能符合分层、稳定的条件都可考虑进行排列组合。在实验的过程中如果常用的溶剂组合对分离度毫无帮助,可尝试应用不常用的试剂,具体实施看情况。

随着逆流色谱技术的普及,越来越多的人致力于体系筛选的研究工作。日趋完善的研究工作将推动逆流色谱技术更好、更快地发展,逆流色谱技术将在各领域的分离制备方面发挥更大的作用。

参考文献:

- [1] 罗国安,王义明. 中药复方有效部位研究方法以及理论初探[J]. 中成药, 1997, 19(8): 44-46.
- [2] 方东升,谢阳,陈勇,等. 高速逆流色谱法分离纯化环孢菌素[J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(1): 48-51.
- [3] 夏兴,戈梅,陈代杰. 利用高速逆流色谱HCCB00106转化液分离转化产物[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(3): 3-4.

- [4] 张天佑. 逆流色谱技术[M]. 北京:北京科学技术出版社, 1993.
- [5] 张天佑. 逆流色谱技术仪在天然药物有效成份制备分离中的应用[J]. 分析仪器, 1995, 1: 6.
- [6] 袁黎明,傅若农,张天佑,等. 高速逆流色谱法分离茶叶中的生物碱[J]. 药物分析杂志, 1998, 18(1): 60-65.
- [7] 戴德舜,伍方勇,王义明,等. 高速逆流色谱实验体系的选择和优化[J]. 分析仪器, 2001, 3: 31-34.
- [8] Ito Y. Countercurrent chromatography [J]. J Chromatogr, 1992, 51-A: 69.
- [9] Ito Y J. Preparative counter-current chromatography with a rotating coil assembly [J]. Chromatography, 1981, 207: 161-170.
- [10] Zhao C X, He C H. Preparative isolation and purification of atractylon and atractylenolide from the Chinese medicinal plant *Atractylodes macrocephala* by high-speed counter-current chromatography [J]. J Sep Sci, 2006, 29: 1630-1636.
- [11] 杨福全. 逆流色谱的基本关系式[J]. 色谱, 1993, 3(11): 136-139.
- [12] Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2005, 1065: 145-168.
- [13] 曹学丽. 高速逆流色谱分离技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2005.

北沙参的生物学与化学成分的研究进展

辛 华^{1,2},丁雨龙¹

(1. 南京林业大学,江苏 南京 210000; 2. 青岛农业大学,山东 青岛 266109)

北沙参是伞形科植物珊瑚菜属珊瑚菜 *Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq. 的干燥根,别名海沙参、野香菜根、莱阳参等,是著名的中药材,具有养阴润肺、祛痰止咳等功效^[1]。北沙参始载于《神农本草经》,列为上品,明代《本草纲目》列为五参(人参、党参、玄参、丹参、沙参)之一。清代《本经逢原》把沙参分为南、北沙参二种,曰:“沙参有二种,北者质坚性寒,南者体虚力微。”今多用北沙参。北沙参幼嫩的茎叶均可食用,也是一种很有发展前途的保健蔬菜。

珊瑚菜原为海滩沙生植物群落的建群种之一,海滩的滥用开发和对该植物的过度采挖,其数量日趋减少,已经处于濒临灭绝的境地,被列为中国珍稀濒危保护植物^[2]。

近年来,关于北沙参的抗菌、免疫、抗癌等药理方面开展了大量的研究,特别是作为扶正药,能够起到直接抑制癌细胞生长的作用^[3-5],从而引起人们极大的关注。现对国内外近年来对北沙参的研究进展做一综述。

1 生物学特性

1.1 形态特征及分布:珊瑚菜为多年生草本,高5~35 cm,主根细长呈圆柱形。茎大部分埋在沙中,一部分露出地面,叶基出,互生,叶柄长,基部鞘状,叶片卵圆形,3出式分裂至2回羽状分裂,复伞形花序顶生,无总苞,小总苞由数个线状披

针形的小苞片组成,花白色,花萼5,花瓣5,雄蕊5,与花瓣互生,子房下位,双悬果近圆球形,有翅,花期5~7月,果期6~8月^[6]。

珊瑚菜分布于北太平洋沿岸,在我国分布于辽宁、河北、山东、江苏、浙江、广东、福建、台湾等地。

1.2 产地及生药性状:商品北沙参现都为栽培,以山东莱阳为地道产地。根呈细长圆柱形,偶有分枝,顶端常留根茎残基,未去皮的表面棕黄色,略粗糙,去皮的表面淡黄白色,较光滑,质硬脆,易折断,断面边缘皮部淡黄白色,中心木部黄色,形成层呈圆环状,气微香,味微甜^[1]。

1.3 结构发育:珊瑚菜的肉质直根为二原型根^[7],包括表皮、皮层和中柱几部分,其皮层薄壁细胞占主导地位,随着次生生长的进行,其结构发生了很大变化,次生结构与大多数双子叶植物相似,但是次生韧皮部发达且分布有分泌道,韧皮部中仍以薄壁细胞为主,这些薄壁细胞中贮藏有大量的淀粉粒。分泌道属于次生分泌道,由一圈分泌细胞围绕一腔道组成,研究表明,分泌道、淀粉粒等可以作为北沙参生药及粉剂中药的鉴别依据^[8]。

珊瑚菜为濒危植物,而种子的萌发是导致其濒危的一个重要因素。其种子属于深度休眠类型,败育率较高,胚及胚乳

收稿日期:2007-10-09

作者简介:辛 华(1967—),女,山东省海阳市人,青岛农业大学教授,在读博士,多年来一直从事植物学研究工作。

Tel: (0532)86080234 E-mail: hxin@qau.edu.cn

高速逆流色谱在中药分离中溶剂体系的筛选

作者: [程杰](#), [符晓晖](#), [王维娜](#)
作者单位: [上海同田生物技术有限公司](#), 上海, 201203
刊名: [中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名: [CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年, 卷(期): 2008, 39(8)
被引用次数: 5次

参考文献(13条)

1. [罗国安](#); [王义明](#) [中药复方有效部位研究方法以及理论初探](#) 1997(08)
2. [方东升](#); [谢阳](#); [陈勇](#) [高速逆流色谱法分离纯化环孢菌素](#) [期刊论文] - [中国抗生素杂志](#) 2005(01)
3. [夏兴](#); [戈梅](#); [陈代杰](#) [利用高速逆流色谱HCCB00106转化液分离转化产物](#) [期刊论文] - [中国抗生素杂志](#) 2007(03)
4. [张天佑](#) [逆流色谱技术](#) 1993
5. [张天佑](#) [逆流色谱技术仪在天然药物有效成份制备分离中的应用](#) [期刊论文] - [分析仪器](#) 1995
6. [袁黎明](#); [傅若农](#); [张天佑](#) [高速逆流色谱法分离茶叶中的生物碱](#) [期刊论文] - [药物分析杂志](#) 1998(01)
7. [戴德舜](#); [伍方勇](#); [王义明](#) [高速逆流色谱实验体系的选择和优化](#) [期刊论文] - [分析仪器](#) 2001(3)
8. [Ito Y](#) [Countercurrent chromatography](#) 1992
9. [Ito Y J](#) [Preparative counter-current chromatography with s rotating coil assembly](#) 1981
10. [Zhao C X](#); [He C H](#) [Preparative isolation and purification of atractylon and atractylenolide III from the Chinese medicinal plant Atractylodes macrocephala by high-speed counter-current chromatography](#) 2006
11. [杨福全](#) [逆流色谱的基本关系式](#) [期刊论文] - [色谱](#) 1993(11)
12. [Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography](#) 2005
13. [曹学丽](#) [高速逆流色谱分离技术及应用](#) 2005

本文读者也读过(10条)

1. [郭丽丽](#), [刘景圣](#), [蔡丹](#) [高速逆流色谱实验在有效成分分离中溶剂体系的选择](#) [期刊论文] - [农产品加工·学术](#) 2010(5)
2. [张云峰](#), [魏东](#), [郭祀远](#), [陈峰](#), [Zhang Yun-feng](#), [Wei Dong](#), [Guo Si-yuan](#), [Chen Feng](#) [应用高速逆流色谱对穿心莲活性成分进行分离](#) [期刊论文] - [华南理工大学学报\(自然科学版\)](#) 2008, 36(4)
3. [贾静](#), [李玉林](#), [赵晓辉](#), [肖远灿](#), [陈桂琛](#), [尤进茂](#), [魏立新](#), [JIA Jing](#), [LI Yu-Lin](#), [ZHAO Xiao-Hui](#), [XIAO Yuan-Can](#), [CHEN Gui-Chen](#), [YOU Jin-Mao](#), [WEI Li-Xin](#) [高速逆流色谱分离纯化川西獐牙菜中3种\(口山\)酮昔元](#) [期刊论文] - [分析化学](#) 2011, 39(4)
4. [伍方勇](#), [戴德舜](#), [王义明](#), [罗国安](#) [高速逆流色谱与质谱联用在中药分析中的应用](#) [期刊论文] - [高等学校化学学报](#) 2002, 23(9)
5. [高荫榆](#), [魏强](#), [范青生](#), [陈秀霞](#), [GAO Yin-yu](#), [WEI Qiang](#), [FAN Qing-sheng](#), [CHEN Xiu-xia](#) [高速逆流色谱分离提取天然产物技术研究进展](#) [期刊论文] - [食品科学](#) 2008, 29(2)
6. [刘高宏](#), [魏立莉](#), [LIU Gao-hong](#), [WEI Li-li](#) [高速逆流色谱技术在中药有效成分分离领域中的应用](#) [期刊论文] - [甘肃中医](#) 2010, 23(11)
7. [王美玲](#), [武彦文](#), [欧阳杰](#) [高速逆流色谱在天然产物分离纯化中的应用](#) [期刊论文] - [安徽农业科学](#) 2010, 38(27)
8. [颜继忠](#), [褚建军](#), [童胜强](#) [中药分离中高速逆流色谱溶剂体系的选择](#) [期刊论文] - [中国现代应用药学](#) 2003, 20(5)

9. [沈平嫒](#) [高速逆流色谱\(HSCCC\)技术与色谱指纹谱](#)[期刊论文]-[中成药](#)2001, 23(5)
10. [管仁军](#), [王岱杰](#), [于宗渊](#), [王晓](#), [蓝天凤](#), [GUAN Renjun](#), [WANG Daijie](#), [YU Zongyuan](#), [WANG Xiao](#), [LAN Tianfeng](#) [高速逆流色谱分离纯化蔓荆子中的活性成分](#)[期刊论文]-[色谱](#)2010, 28(11)

引证文献(5条)

1. [贺凯](#), [李学刚](#), [陈红英](#), [叶小利](#), [邓亚飞](#), [陈新](#), [孙胜亮](#) [薄层色谱-荧光法测定黄连生物碱分配系数](#)[期刊论文]-[分析化学](#) 2011(4)
2. [顾芑芑](#), [陈葵](#), [朱家文](#), [郝玉有](#), [王维娜](#), [张晓勇](#), [杨生武](#) [异戊酰螺旋霉素高速逆流色谱中的溶剂体系](#)[期刊论文]-[化学工程](#) 2011(10)
3. [张维阳](#), [王林丽](#), [周月](#), [张锋](#), [郭淑英](#) [高速逆流色谱法在黄酮类物质分离中的应用](#)[期刊论文]-[吉林医药学院学报](#) 2011(1)
4. [郭丽丽](#), [刘景圣](#), [蔡丹](#) [高速逆流色谱实验在有效成分分离中溶剂体系的选择](#)[期刊论文]-[农产品加工·学刊](#) 2010(5)
5. [谢贵香](#), [王兵](#), [梁逸曾](#), [杨朝晖](#) [高速逆流色谱法对当归中石油醚萃取部位化学成分分离纯化的研究](#)[期刊论文]-[分析测试学报](#) 2010(10)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200808051.aspx