

天然活性小分子物质分离技术研究

姜丽 (安徽理工大学, 安徽淮南 232000)

摘要 现代新保健品和新型药品的研究开发都离不开天然产物。阐述了天然植物化学中活性小分子物质的提取分离纯化方法, 如萃取法、色谱技术 Sephadexlh20 等, 期望为分子结构解析、活性测定和结构修饰打下基础。

关键词 活性小分子; 分离纯化; 色谱

中图分类号 S121 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)15-04563-01

Research of Isolation Method of Active Small Molecule Substance from Natural Products

JIANG Li (Anhui University of Science & Technology, Huainan, Anhui 232000)

Abstract Isolating active small molecule from natural products is the basement of developing new health products and new drugs, the article develops methods of isolating from natural products such as extraction, chromatography Sephadexlh20 and so on, in order to lay a foundation for molecular structure analyzing, activity determination and structure modification.

Key words Active small molecule; Isolation and purification; Chromatography

丰富多样的植物、动物资源是大自然对我们的馈赠。从天然植物、动物资源中寻找利于人们身体健康的保健品和新型药品是现代植物化学的主要研究方向之一。据资料报道, 在天然植物中具有药理活性的化合物分子量基本在 1 000 Da 以下。如何将活性成分分离并鉴定其结构则是进一步开展研究的基础。天然产物活性小分子物质的分离可分为经典方法和色谱分离方法, 其中经典方法是色谱技术的基础。

1 经典方法

1.1 LLE 法 化合物的化学结构复杂多变。大分子物质如多糖的化学结构解析依然是多糖研究中的难点, 并且通过现代波谱学方法仅能解析出多糖大分子复杂结构中的重复单元结构。小分子物质如生物碱, 不同类型的生物碱具有不同的母核结构, 相同的母核结构又由于取代基或构象不同而千差万别。因此, 分子中的原子处于不同的化学环境中, 使得天然化合物分子极性各异。根据这一特点, 采用液相萃取法可以快速、准确地将所需化合物按照极性大小划段。相同的分离段中的化合物具有相同的极性, 为进一步分离、纯化奠定基础。

液相萃取(LLE)需要使用大量的有机溶剂, 具有对环境不友好等缺点。近年来, 出现了一种新型液相微萃取技术——浊点萃取法。浊点萃取原理是基于中性表面活性剂胶束溶液的浊点现象, 通过改变试验条件如溶液 pH、离子强度、温度等使得疏水性物质和亲水性物质产生相分离^[1-2]。这种方法安全高效、绿色环保, 在很多领域已得到广泛应用。

1.2 SPE 法 固相萃取(SPE)是利用固体吸附剂吸附混合液中目标化合物, 再利用洗脱液将其洗脱下来, 达到分离、富集目标物的一种手段。近年来, 发展较快的新方法有基于萃取涂层与样品之间的吸附—溶解—解吸平衡而建立起来的集进样、萃取、浓缩功能于一体的固相微萃取技术(SPME)^[3]; 萃取原理与 SPME 一致, 将聚二甲基硅氧烷(PDMS)套在内封磁芯的玻璃管上作为萃取涂层的搅拌棒吸

附萃取(SBSE)^[4]; 分子印迹固相萃取技术(MISPE)是使用人工合成的聚合物作为分子印迹聚合物, 利用其对特定分子具有特异选择性来提高萃取选择性, 该聚合物简单经济, 对热、有机溶剂、强酸、强碱等都比较稳定^[5]; 免疫亲和固相萃取(IASPE)是将医学免疫与色谱技术融合, 利用抗原抗体相互高度识别的特点将目标化合物分离、浓缩。这种分离技术尤其适用于生物活性小分子的分离识别, 如海洛因和吗啡等生物碱类化合物^[6-7]。

1.3 膜分离法 膜分离法的基本原理类似于“分子筛”, 通过调整膜孔径大小可分离不同分子大小的有机化合物, 根据膜孔径可将膜分离为超滤和纳滤。膜分离技术不使用有机溶剂, 操作过程中化学环境温和和环保, 故在天然活性产物的分离筛选上将会得到更加广泛的应用^[8]。

1.4 沉淀法 沉淀法是利用有机化合物在溶剂中的溶解特点进行分离的一种方法。最典型的应用为采取水提醇沉法提取大分子多糖和蛋白质。这种方法操作简单, 过程温和, 环境友好, 成本低廉, 且适合处理大量样品, 目前已被广泛使用。

2 色谱分离方法

色谱方法根据分离机制可分为吸附色谱、分配色谱、体积排阻色谱、离子交换色谱、亲和色谱、化学键合相色谱、毛细管电色谱和毛细管电泳^[9], 其中亲和色谱主要用于分离纯化蛋白质等生物大分子生化样品, 而毛细管电泳法在生命科学中应用广泛。天然产物化学中生物小分子分离主要使用的有 MG 大孔树脂、Sephadexlh20、rp-8 和正相硅胶色谱等。

2.1 大孔树脂 大孔树脂是人工合成的高分子化合物。它不溶于酸、碱或有机溶剂且对热稳定, 可有效地对有机化合物进行浓缩、分离。影响其吸附、分离效果的因素主要有树脂结构、化合物结构和洗脱剂。在天然产物的分离提取中, 大孔树脂主要用来对化合物的极性、大小进行划段, 为后续分离、纯化工作做准备。

2.2 凝胶色谱 凝胶色谱本质上是一种体积排阻色谱。它具有“分子筛”功能, 其网状结构使得小分子物质可以进入凝

作者简介 姜丽(1979-), 女, 安徽淮南人, 讲师, 博士, 从事天然产物化学方面的研究。

收稿日期 2014-04-28

(下转第 4572 页)

黑 5,其脱色率在 pH 3.5~6.0 条件下明显高于 pH 6.5~8.0 条件,24 h 脱色率可达到 90% 以上^[24]。研究中,在 pH 7.0,介体 ACE 的作用下,菌株 CLb 芽孢漆酶 4 h 对活性黑的脱色率高于 93%;在 pH 9.0,其他条件相同的条件下,脱色率超过 80%。可见,在碱性条件下,菌株 CLb 芽孢漆酶对活性黑的脱色效果优于灵芝。红酵母菌 *Rhodotorula* sp. T-2 对染料脱色的最适 pH 为 3.0,偏酸性。在 pH 3.0~7.0 之间,随着 pH 的增加,其脱色率呈下降趋势^[25]。相对于真菌漆酶,细菌 *Bacillus* sp. CLb 的芽孢漆酶在中性和碱性条件下有较好的稳定性。该研究优化出的乙酰丁香酮是天然介体,价格低,效率高,而且用量少。菌株 *Bacillus* sp. CLb 芽孢漆酶在介体的促进下对染料、模拟染料废水脱色效果的研究,为细菌漆酶应用于工业废水脱色提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] HUSAIN Q. Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water; a review [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2006, 26(4): 201-221.
- [2] FAN L, ZHU S N, LIU D Q, et al. Decolorization of 1-amino-4-bromoanthraquinone-2-sulfonic acid by a newly isolated strain of *Sphingomonas herbicidovorans* [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, 63(1): 88-92.
- [3] PEGGA U, BROWN D. The Degradation of Dye stuffs. Part II. Behavior of Dye stuffs in Aerobic Biodegradation Test [J]. *Chemosphere*, 1986, 15: 479.
- [4] WANG Y F, ZHAO D, MA W H, et al. Enhanced sonocatalytic degradation of azo dyes by Au/TiO₂ [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(16): 6173-6178.
- [5] ZOLLINGER H. *Color Chemistry-Synthesis, Properties and Application of Organic Dyes and Pigment* [J]. VCH Publishers, 1987, 92: 102.
- [6] PEARCE C I, LLOYD J R, GUTHRIE J T. The removal of color from textile wastewater using whole bacterial cells; a review [J]. *Dyes Pigm*, 2003, 58(3): 179-196.
- [7] BRENT S, O'NEAL G, BOYTER H, et al. Decolorizing textile dye wastewater by anoxic/aerobic treatment [J]. *Chemical Technology Biotechnology*, 2006, 82: 16-24.
- [8] HASNAT M A, UDDIN M M, SAMED A J F, et al. Adsorption and photo-

- catalytic decolorization of asynthetic dye erythrosine on anatase TiO₂ and ZnO surfaces [J]. *Hazardous Materials*, 2007, 60: 471-477.
- [9] REN S, GUO J, ZENG G, et al. Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72: 1316-1321.
- [10] SARATALE G, KALME S, BHOSALE S, et al. Biodegradation of kerosene by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146 [J]. *J Basic Microbiol*, 2007, 47(5): 400-405.
- [11] ITOH K, YATOME C, OGAWA T. Biodegradation of anthraquinone dyes by *Bacillus subtilis* [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1993, 50: 522-527.
- [12] SUZUKI Y, YODA T, RUHUL A, et al. Molecular cloning and characterization of the gene encoding azoreductase from *Bacillus* sp. OY 1-2 isolated from soil [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 246: 9059-9065.
- [13] YATOME C, OGAWA T, MATSUI M. Degradation of Crystal violet by *Bacillus subtilis* [J]. *Environmental Science and Health*, 1991, 26: 75-87.
- [14] 李泰仑. 枯草芽孢杆菌 WN02 芽孢漆酶的性质及染料脱色研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010: 20-21.
- [15] 林俊芳, 刘志明, 陈晓阳, 等. 真菌漆酶的酶活测定方法评价 [J]. *生物加工过程*, 2009, 7(4): 1-8.
- [16] 洪俊明, 洪华生. A/O 膜生物反应器组合工艺处理活性染料废水的实验研究 [J]. *厦门大学学报*, 2005, 44(3): 441-444.
- [17] WONG X Y, YU J. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes [J]. *Water Research*, 1999, 33(16): 3512-3520.
- [18] 赵丽艳, 赵敏, 卢磊, 等. 一色齿毛菌漆酶-介体系统在染料脱色中的应用 [J]. *北京林业大学学报*, 2011, 33(4): 130-135.
- [19] 周生飞, 詹怀宇, 周坤, 等. 漆酶-天然介体体系用于硫酸盐竹浆漂白 [J]. *生物技术*, 2011, 30(7): 48-51.
- [20] 高千干, 朱启忠. 漆酶-介体体系(LMS)及其应用 [J]. *环境工程*, 2009, 27(S1): 598-602.
- [21] CANAS A I, CAMARERO S. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes [J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 694-705.
- [22] KURNIAWATI S, NICELL J A. Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(3): 353-361.
- [23] PATHAK H, PATEL S, RATHOD M, et al. In vitro studies on degradation of synthetic dye mixture by *Comamonas* sp. VS-MH2 and evaluation of its efficacy using simulated microcosm [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(22): 10391-10400.
- [24] 赵世光, 张焱, 薛正莲, 等. *Ganoderma lucidum* U-281 漆酶催化偶氮染料活性黑 5 脱色 [J]. *菌物学报*, 2012, 31(6): 867-877.
- [25] 林晓华, 董新皎. 一株染料脱色红酵母菌的分离鉴定及脱色条件研究 [J]. *浙江农业学报*, 2005, 17(4): 196-199.

(上接第 4563 页)

胶内部而大分子物质被排阻开来。在凝胶色谱中, Sephadex-lh20 在生物小分子分离纯化中具有举足轻重的地位。对于 Sephadexlh20, 相对分子质量大于 5 000 的生物分子将随流动相直接流出而不被色谱柱保留, 且这种凝胶不受溶剂系统限制, 所以它特别适合生物碱、联苳类、菲类、萘类等小分子活性物质的分离制备, 既可以用作初步划线又可以用作最终的精制定定。

2.3 硅胶色谱 硅胶色谱不溶于任何溶剂, 化学性质稳定, 除强碱、氢氟酸外与任何物质均成惰性, 常用的规格有 100~300 目, 目数不同, 上样量也不同, 并且目数越细, 上样量越大, 流速越小, 但是耗费时间较长。由于硅胶柱具有死吸附的特点, 在使用过程中要注意把握时间和规格, 以防止微量活性物质损耗过大而分离不出来。

3 展望

在许多植物与中草药中陆续发现众多具有抗氧化、抗肿瘤、细胞毒性和保护神经系统药理功效的小分子化合物如萘类和联苳类。如何采用物理、化学、物理化学相结合、色谱等

现代分离纯化方法将它们温和地提取分离出来是现代新药开发的基础, 也是新型保健品研制的关键点。安全高效、快速温和的预处理技术如微萃取和物美价廉、环保高效的色谱技术如凝胶色谱将是天然活性小分子物质分离技术的主要研究方向。

参考文献

- [1] 吴昊. 液相萃取新方法的建立和应用 [D]. 临汾: 山西师范大学, 2012.
- [2] 王坚刚, 林建原. 油点萃取技术的应用 [J]. *广东微量元素科学*, 2009, 16(3): 17-20.
- [3] 马继平, 王涵文, 等. 固相微萃取新技术 [J]. *色谱*, 2002, 20(1): 16-20.
- [4] 张志刚, 胡玉玲. 搅拌棒吸附萃取技术的研究进展 [J]. *分析化学评述与进展*, 2011, 39(11): 1766-1773.
- [5] 蔡亚歧, 牟世芬. 分子印迹固相萃取及其应用 [J]. *分析测试学报*, 2005, 24(5): 116-121.
- [6] 许莉. 利用免疫亲和和固相萃取检测小分子化合物的方法研究及其应用 [D]. 北京: 北京大学, 2010.
- [7] 孙海红, 钱叶苗, 等. 固相萃取技术的应用与研究新进展 [J]. *现代化工*, 2011, 31(2): 21-24.
- [8] 徐任生, 赵维民, 叶阳. 天然产物活性成分分离 [M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- [9] 杜斌, 郑鹏武. 实用现代色谱技术 [M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2009.