

中药特色;充分利用现代科学技术方法,提高实验水平,在继承的基础上不断创新,使

中药新药研究沿着正确的方向发展到一个新水平。

关于制备柱层析应用的几个问题

第二军医大学药学院 陈海生

层析法(色谱法,色层法,层离法)已有八十多年的历史。1903年Tswett所创用的柱上液体色谱,即经典液体色谱法,由于该色谱技术分离量大,载样品多,操作方便,设备简单,能在单位时间内获得较多量分离组分,所以直到今天仍最常使用。据有人统计,在化学成分分离方面,各种色谱方法都得到了应用,占统计使用量92.3%,其中经典液体色谱法占统计量70%。但是,随着现代液相色谱理论和技术的迅速发展,经典液体色谱在理论和技术上也发生了显著变化和进展。

一、溶剂选择

选择一个合适的溶剂系统是做好制备柱层析的关键。在选用柱层析洗脱剂时首先要考虑三个方面的因素:溶解性(Solubility),亲合性(Affinity),分离度(Resolution)。安登魁等人^[1,2]借助电子计算机选择纸层析和薄层层析溶剂系统。对制备柱层析,通常是利用薄层层析来选择洗脱溶剂。在选择薄层溶剂系统时一是参考类似物的溶剂系统,二是自己摸索溶剂系统。在自己摸索溶剂系统时,通常先用中等极性的溶剂如醋酸乙酯展开,然后根据展开的结果,适当增减溶剂的极性。

醋酸乙酯属于中等极性有机溶剂,由于它具有与硅胶适度的亲合性(Moderate affinity),所以对许多成分都有较好的或适度的溶解性。当溶剂系统中含有醋酸乙酯时,也便于调整溶剂的极性。如,TLC溶剂系统中含醋酸乙酯,展开的结果 $R_f = 0.5$,若

要把它变成 $R_f = 0.3 \sim 0.25$,只要把醋酸乙酯的量减少到原来的1/3就可以了。比如最初溶剂系统含60% EtoAc/40% CH_2Cl_2 ,那么最适制备溶剂系统应改为20% EtoAc/80% CH_2Cl_2 。

醋酸乙酯与其它极性溶剂的关系⁽³⁾

醋酸乙酯	1 : 1
甲基乙基酮	1.7 : 1
丙酮	2.7 : 1
正丁醇	3 ~ 4 : 1
正丙醇	4 ~ 5 : 1
乙醇	5 ~ 6 : 1
甲醇	7 : 1

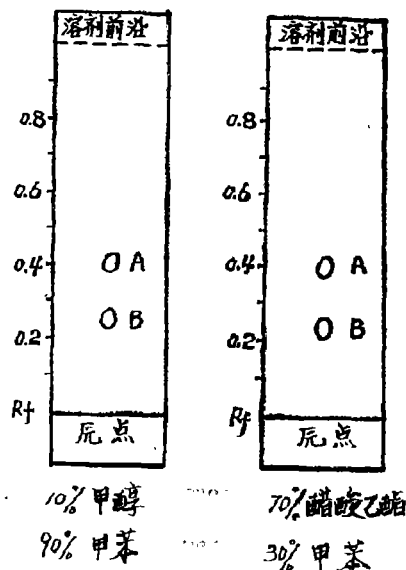


图1 醋酸乙酯与有关极性溶剂互换

二、如何利用TLC选择制备柱层析溶剂

如前所述,选择柱层析溶剂一般通过

TLC来实现。应该注意，适合于TLC的溶剂系统不一定适合于柱层析。主要取决于被分离样品的Rf值的大小，通常把Rf值控制在0.2~0.5之间比较好，也就是5~2柱体积 ($C.V = \frac{1}{Rf}$)，如果样品在TLC上的Rf

值大于0.5，该样品在柱上保留的体积太小，就容易随溶剂前沿出来，达不到分离的目的。若Rf值小于0.2，洗脱的时间长，并需要更多的溶剂。下面列举几种Rf值与洗脱体积的情况：

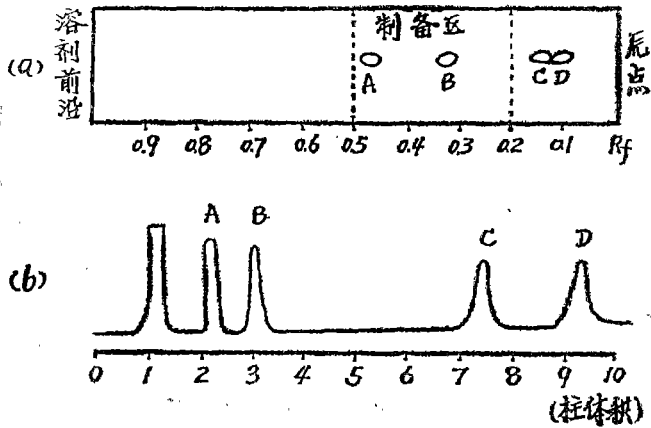


图 2 (a)A、B适于柱分离，C、D、Rf值较小，需增加溶剂极性；(b)洗脱曲线

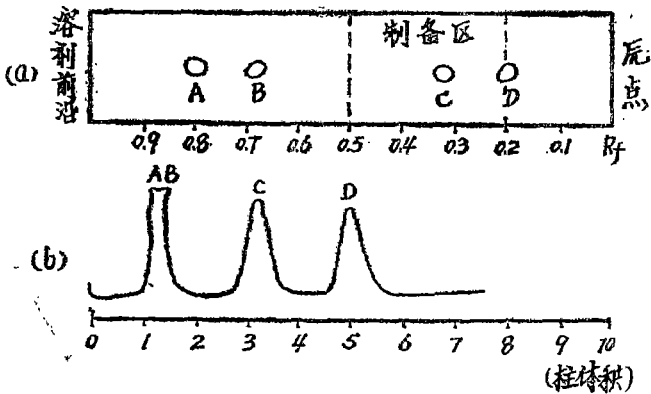


图 3 (a)C、D在制备区适合于柱分离A、B不适于柱分离(b)洗脱曲线

三、低压柱层析

近年来除经典柱层析外，还广泛采用了低压柱层析，压力在0.5~5 Kg，填充剂的粒度(10~40μ)，接近于高效液相层析(5~37μ)，从而使柱层析的分离效果虽不及高效液相层析，但比经典柱层析有显著提高。

低压柱层析是根据高效液相色谱的基本原理设计的。和高效液相色谱一样，低压柱

层析也可用理论塔板数N和理论塔板高度H来衡量柱的分离效能。H与N的关系为：

$$H = \frac{L}{N} \quad (1)$$

L为柱长，H越小，N越大，同时，N与填充剂的颗粒直径的平方成反比。可见，填充剂颗粒越小，N越大，柱效就越高。

通常影响柱效的因素有三个：涡流扩散、纵向扩散和传质速率。它们之间的关系

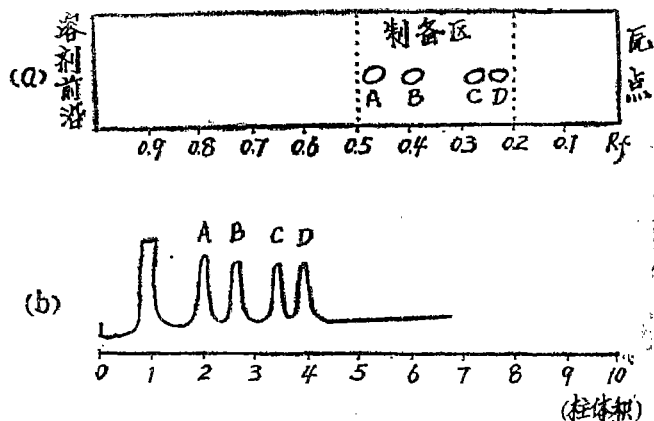


图4 (a) 最适Rf值, A、B、C、D都在制备区 (b) 洗脱曲线

可用Giddings方程表示⁽⁴⁾：

$$H = A + \frac{B}{U} + CU \quad (2)$$

A为涡流扩散项，代表了层析柱内填充剂铺层的均匀性，颗粒的大小和移动相的流速对样品分子所引起的涡流扩散影响。填充剂的颗粒直径越小，直径范围越狭，装柱越均匀。移动相流速越小，A越小，则H变小，柱分离效果就好。但在实际应用中，如果流速太慢会产生色带扩散。

$\frac{B}{U}$ 为样品分子纵向扩散项，在液相中，分子扩散系数为 $10^{-5} \text{CM}^2/\text{S}$ ，该项数值很小，可忽略。

CU为传质速率项，它表示样品分子在固定相和移动相之间的质量交换速率。此项与移动相的流速U成正比，C与填充剂颗粒内孔隙的深浅等因素有关。C越小，说明传质速率越快，层析柱的柱效越高。

因此，低压柱层析比经典柱层析分离效果好的主要原因是采用的填充剂颗粒直径较小，(10~40 μ 或50~75 μ)，经典柱层析的填充剂颗粒一般是100~200 μ 。

低压柱层析所用的柱子为加厚玻璃柱或不锈钢柱，用氮气瓶加压或低压输液泵，可连接紫外检测仪或差示折光仪检测洗脱情

况。

四、过载上样

样品过载上柱是制备柱层析中一个特有的问题。经典柱层析，样品与吸附剂的比例一般是1:50~100。对于难分离的样品，其比例可增加至1:500。近年来制备柱层析大多在样品过载情况下进行的，样品量与柱效之间失去线性关系。为了在短时间内获得较大量的纯品，过载上样是十分必要的。当样品量的增加使分离组分的容量因子 K' 值下降10%或理论塔板高度H值增加2倍以上时，被定义为样品过载。Snyder⁽⁵⁾利用 R_s 值表示这种过载，当 R_s 值小于1.25时称样品过载。但在实际工作中，为了获得较多的纯品，往往都小于这个值。我们也可用指导色谱过程最优化方程(3)来指导在超过载情况下分离最大样品制备量。

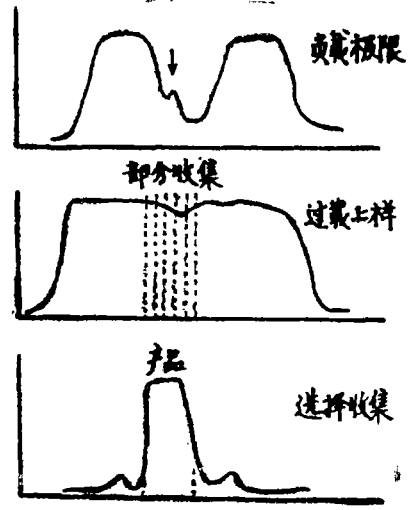
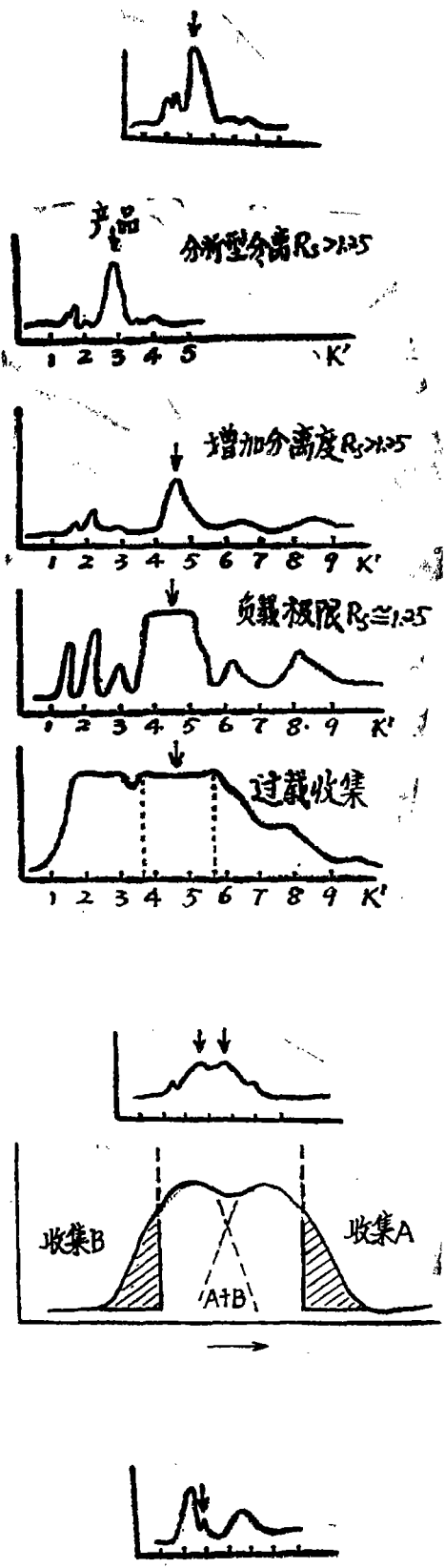
$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{K'}{1 + K'} \right) N^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

方程(3)中， α 为相对保留值； K' 为组分2的容量因子；N为理论塔板数。

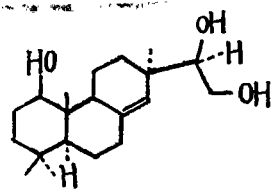
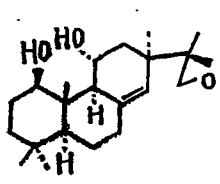
下面列举三种不同类型制备分离情况⁽³⁾：

对于多组分的样品，用梯度洗脱常能收到较好效果。

近年来曾有人用超过载上样进行制备柱



层析。如Bansal等⁽⁹⁾从金合欢属植物 (*Acacia leucophloea*) 树皮中分离二萜类化合物时, 将100克苯提取物用150克硅胶进行层析, 先后以苯-醋酸乙酯 (4:1) 和 (3:1) 洗脱, 得到两种萜醇leucophleoxol (1)和leucophleol(2)。



(1)

(2)

从下表1可以看出, 样品量与吸附剂用量的比例大大缩小到1:1.5~10。

五、短粗柱的应用

最近几年, 在制备柱层析中, 所用柱长度与柱径比逐渐缩小 (柱径: 柱长 = 1:0.7~7)。应用短粗柱层析往往会收到比普通柱层析较好的分离效果。Knox⁽¹³⁾曾提出“柱壁效应”理论, 认为柱短, 柱径相对较粗, 层析集中于柱心进行, 从而消除或减少了“柱壁效应”使柱效提高。柱径增加, 柱长缩短, 表面上看柱体缩短会使柱的理论塔板数减小, 实际上, 由于流速加大, 色带扩

表1 样品量与吸附剂比例实例

样品提取物	吸附剂用量	样品:吸附剂	分离成分	参考文献
100g(苯)	硅胶150g	1:1.5	萜醇类	[6]
100g(苯)	硅胶200g	1:2.0	新木脂素	[7]
200g(己烷)	氧化铝1200g	1:6.0	三萜类	[8]
454g(乙醇)	硅胶3000g	1:6.6	蒽醌类	[9]
55.35g(己烷)	硅胶550g	1:~10	挥发油	[10]
10g(CHCl ₃)	硅胶100g	1:10	桂皮酸类	[11]
50g(油)	硅胶500g	1:10	萜烯类	[12]

散减小,分离度会提高。短粗柱的另一个优点是可采用细粒吸附剂,提高分离效果。

下面列举几个实例,实例1、天麻甙的分离⁽¹⁴⁾;实例2、包公藤甲素的分离⁽¹⁵⁾;

实例3、人参皂甙R₁的制备分离⁽¹⁶⁾;实例4、人参二醇与人参三醇的制备分离⁽¹⁶⁾(见表2)。

表2 短粗柱应用实例

实例	柱径(cm)	柱长(cm)	柱径/柱长	吸附剂粒度	结果
1	5	35	1:7	硅胶100—130目	结晶
2	3.2	9	1:2.8	硅胶	结晶
3	3	5	1:1.7	氧化铝200目	初晶二种(人参二醇三醇)
4	20	14	1:0.7	硅胶200~260目	初晶
	28	20		硅胶10~40μ	初晶

六、结束语

近年来制备柱层析技术发展较快,层析形式也有所不同,如真空柱层析⁽¹⁷⁾,启开式分级转移干柱层析⁽¹⁸⁾等。要做好制备柱层析,主要应注意以下几点:1.选用适当的洗脱剂,用TLC选择洗脱剂时,最好把所需组分的R_f值控制在0.2~0.5范围;2.选用短粗柱,采用细颗粒吸附剂为好;3.保持一定洗脱流速,减少色带扩散,可提高分离度;4.欲制备较大样品时最好采用过柱上样。

主要参考文献

1. 安登魁等 药学报19(10):780, 1984
2. 罗治权 药学报21(1):73, 1986
3. Waters 高效液相色谱分析法讨论会资料 1982
4. Giddings J. C. Analyt Chem. 35: 2215 1963

5. Snyder L. R. J. Chromatogr. Sci. 10: 200, 1972
6. Bansal R. K. et al. Phytochemistry 19: 1979, 1980
7. Filho R. B et al. ibid 19: 659, 1980
8. Sondengam B. L. et al. Phytochemistry 20: 173, 1981
9. Tessier AM et al. Planta Medica 41: 337, 1981
10. Berhardi M. D. et al. ibid 41: 359, 1981
11. Herz et al. Phytochemistry 20: 247 1981
12. 刘铸晋等: 化学学报(增刊) 248 1981
13. Knox J. M. Anal Chem 41: 1599, 1969
14. 冯孝章: 化学学报 37: 175, 1979
15. 姚天荣等: 药学报 14: 731, 1979
16. 崔金有: 中草药 16(3): 14, 1985
17. Pelletiev S. W. J. Nat. Prod. 49(5) 892, 1986
18. 马凤起: 药学报 18(2): 130, 1983