

中草药活性成分的层析纯化新策略

摘要

中药现代化及新药物的研究、开发经常要面对有效成分的问题。中药的化学成分极其复杂，要获得大量高纯度的单一有效成分，常要综合性地利用各种溶剂提取法及层析方法。传统上，中药用水煎服，许多有效成分如生物碱、有机酸、甙类、黄酮、多酚、多糖等都较为亲水，极性高，传统的硅胶或氧化铝层析效果有时不太理想。本文根据中药中各类亲水性有效成分的特性，提出了层析纯化平台概念。所用的层析方法，包括反相层析（RPC）、离子交换（IEX）、凝胶色谱(Sephadex LH20)都具有选择性高、载量大、有机溶剂用量少、易于工艺放大等特点。利用这些层析纯化平台概念，希望能够更系统、快速、有效的提取、制备中药有效成分或组分。

前言

中国地大物博，天然资源丰富，文化历史悠久。中医药经历数千年探索与实践，维系了中华民族的繁衍和健康生存，抵御了人类自身疾病的侵袭和恶劣的生存环境，成为我国宝贵的知识财富。现有中药资源种类 1 万 2 千多种⁷，常用的达 400 多种。中医药丰富而深刻的文化与科学内涵也引起世界医药产业界的倾心。随着全球经济一体化的发展，中国加入 WTO，给中草药和天然药物走向国际化带来良好的契机，同时亦将面对全球性的竞争压力。中药研究亟待加以继承、发展以实现中药现代化，提高我国在中草药、天然药物方面的国际竞争力。2002 年出台的《中药现代化发展纲要》为中药现代化提出了具体目标：在 2010 年开发出 100 个中药新产品；完成 100 个传统中成药的二次开发；完成现有国家中成药标准品种整理；扩大高附加值、高科技含量中药品的出口；争取 2 - 3 个中药品种进入国际医药主流市场⁷。

全球植物药品、保健品市场及相关药审条例

全球食品添加剂、传统植物药物和保健品市场销售总额不同资料来源的统计有一定差异，欧盟植物药顾问公司 2003 年的数据为 510 亿美元，植物类（herbal）只占 39%，其余为维他命（41%）和其它体育保健品。各地区的销售总额为：北美 163 亿（32.2%）、欧洲 150 亿（29.6%）、日本 72 亿（14.1%）、其余亚洲地区 78 亿（15.4%）美元¹⁰。而中国的市场份额则众说纷纭，一般认为约 3-5%¹，低于韩国，箇中原因，值得我们深省。就拿原产自中国的银杏来讲，德国医药公司发现其具有治疗心血管病的病理作用，提纯成为植物药并获得专利。从中国进口原料精加工后打入国际市场。德国仅此一项产品每年在国际市场的销售额即达 5 亿美元，相当于我国年出口总销售额。

近年来，人们对天然药物的需求呼声越来越高，美国 FDA 2000 年发表的“Draft Guidance on Botanical Drug Product for Industry”允许有确切疗效的植物药直接进入 II、III 期临床试验⁹；2001 年 8 月再发表《天然植物药品研究指南》草案：1. 允许中药以混合剂形式进入临床试验；2. 可以按食品添加剂（food supplement）形式上市；3. 证实安全有效后，可被批准为新药¹。欧盟各国对传统草药有不同规定，EMA2001 年 8 月公布的《传统药物产品法令》草案注名：1. 在欧盟境内使用超过 30 年即可注册为传统草药制品（herbal remedy）；2. 在欧盟境外使用超过 30 年，须提供药品曾广泛使用的详细科学文献。

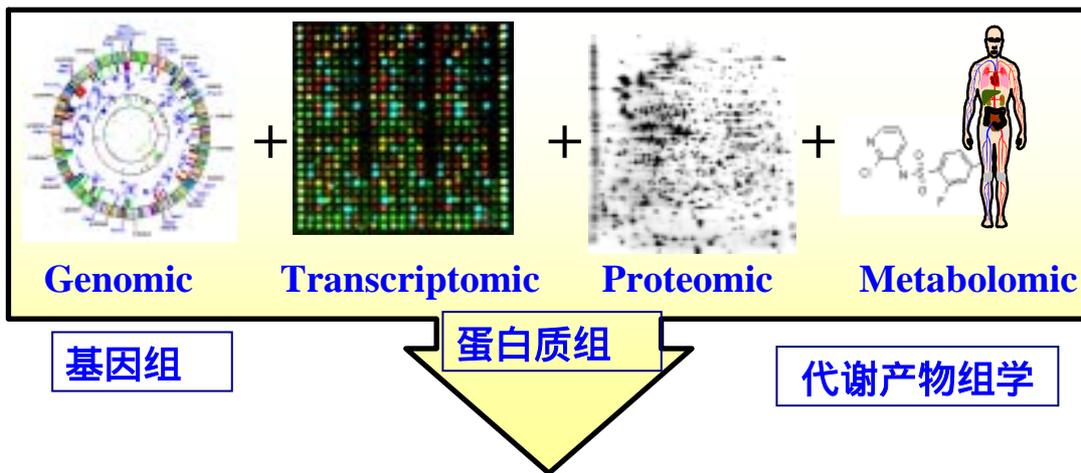
考虑到许多传统药物是经历许多年临床反复实践得到，目前未能阐明其药效物质和作用机理，西方药审部门采取的是‘以证据为基础’（Evidence Based）的策略，并严格控制所呈报的适应症。根据所呈报的相关学术、临床文

中草药活性成分的层析纯化新策略

献，将传统草药制品依次分为 A、B、C、T 几个证据级别，级别高的才允许用以治疗重要疾病，价值也往往高许多倍。这说明了中草药要打入国际医药主流市场，不能仅依靠传统优势如丰富的自然资源、传统中药生产经验、廉价的劳动力等²，而需要利用现代科学和管理技术对中药进行创新和二次开发⁷。

利用生物技术方法加强中药现代化研究和开发

中药现代化并非盲目的西药化或单体化。传统中药是根据中药理论，多以复方的形式使用，体现的是综合效应和整体疗效，治疗作用机理往往是多成份、多靶点、多途径的，这使中药研究和开发变的十分复杂。近年来，中药指纹图谱的应用广泛推动了中药化学成分的研究，要在这些化学信息的基础上进一步研究有效成分或组分的药理活性和药效作用，可利用近年发展蓬勃的生物技术的基因组 genomics、蛋白质组 proteomics、新的代谢物组 metabolomics 和整体的系统生物学 system biology 手段多层面的进行系统关联性研究，也就是新兴的中药生物指纹图谱。例如，中药材 DNA 图谱可有助中草药的鉴定、原材料控制等³。透过中药中不同化学成份或化学物群，如总黄酮作用前后转录物组图谱的比较，可以帮助寻找有效成份或组分。由于药物主要作用的靶点是蛋白质，可用蛋白质组技术如双向电泳图谱的比较来研究作用机制³。新兴的代谢物组学图谱能同时反映代谢网络中多个生物化学途径的成千上百个化合物，为药物筛选、安全性评价，药物作用机制提供研究方法⁶。这些都是中药走向国际市场和新药开发的基础。



生命科学知识, 药物开发, 疾病基因, 药物靶点, 代谢调控

图一：现代生物技术方法可有助中草药有效成分研究、制剂工艺改进，药效物质基础、作用机制研究，质量控制。

中药有效成分的提取和纯化

中药现代化、国际化进程是全方位的发展和革新。它不仅包括建立原材料控制体系的指纹图谱数据库，也包括中药生产过程中的技术现代化、工艺工程化、质量标准化、产品规范化、药理药效明朗化、以致销售标准化等(即 GAP、GLP、GCP、GEP、GMP、GSP 链条)¹。这使得一二类新中药或复方药开发都要面对有效成分的问题，有效成分可能是单体，也可能是复方化学成分。而复方化学成分研究可以用系统分离法：系统分离各成分；三元论结构分析法：将各成分按极性分为大、中、小极性和酸性、碱性、中性；和化合物群分离法：将复方分离为性质类似的化合物群如：黄酮、皂甙、生物碱、多糖等⁸。无论如何，只有弄清了药效物质基础，才能以现代科技阐明作用机制，提高临床用药准确性，强化‘可控’、‘稳定’的生产工艺和改进剂型⁷。提取、纯化有效单体、有效部

中草药活性成分的层析纯化新策略

位和有效部位群，尽量去处无效甚至有害的成分，解决中药‘粗、大、黑’的老难题⁷，助传统中药走向国际市场。

通常中药材用石油醚、95%乙醇和水，可以把绝大部分中药成分提取出来，再要获得高纯度的单一成分，就需要结合各种层析方法。层析分离具有快速、重复性好、可在线检测和监控、易于自动化、流程化、工艺放大等优点。由于中药的化学成分极其复杂，许多文献表明，灵活及综合性地利用各种层析技术，包括正相层析(NPC)、反相层析(RPC)、离子交换(IEC)、凝胶色谱(Sephadex LH20)、高速逆流色谱(HSCCC)。

中草药层析方法	优点、常用范围	局限性
正相硅胶 Normal Phase Chromatography	常用于植化研究，经济。常压操作，加压可提高效率。	不可逆吸附，只用一次或数次。使用大量有害有机溶剂。国产硅胶验证文件不健全。
反相硅胶 Reverse Phase Chromatography	常用于检测、少量制备；有硅胶基架的 C4, C8, C18, 和聚苯乙烯基架的 SOURCE 介质多种选择，分辨率高。	HPLC 设备和柱成本高。介质昂贵、放大困难。
大孔树脂 Macroporous media	常用于组分的粗提，流速快，经济，吸附少。	选择性少，验证文件不健全。合成原料及溶剂残留问题；缺乏公认统一药用标准，条件的规范化、重现性 ⁴
聚酰胺 polyacrylamide	多用于提取和纯化黄酮、内脂类成分，经济。	流速慢，验证文件不健全。
超临界萃取 Super Critical Fluid	快速，回收率高，CO ₂ 成本低。无需处理有机溶剂。	设备成本高。CO ₂ 属非极性溶剂，强极性物质的提取受限制 ⁴ 。
葡聚糖凝胶 Sephadex LH20	特别适合含羟基、氨基、羧基、芳香环的甙类、黄酮、多酚、单宁等。可使用很多次。	流速慢。比硅胶更适合亲水物质，与硅胶为互补技术
离子交换(e.g. Sepharose HP) Ion exchange chromatography	适合含生物碱、有机酸等的分离。有些阴离子交换介质也适合甙类、皂甙、黄酮纯化。	受限制于代电荷的物质
高速逆流色谱 HSCCC	无不可逆吸附，回收率高，分辨率高，溶剂消耗较少。	分离时间较一般层析长，放大困难。

传统中药大多用水煎服，许多有效成分如生物碱、有机酸、黄酮、甙类等都较为亲水，极性高，一般硅胶或氧化铝层析效果有时不太理想。以下根据中药中各类亲水性、强极性化学成分的特性，建立相关的层析纯化平台，希望加快中药有效成分或组分的研究。

中草药有效成份类别	层析纯化平台	本文例子
生物碱 Alkaloid	<pH3 酸水提取 → 阳离子交换 SP Sepharose HP → 中、高压反相	粉防己碱、虫草素

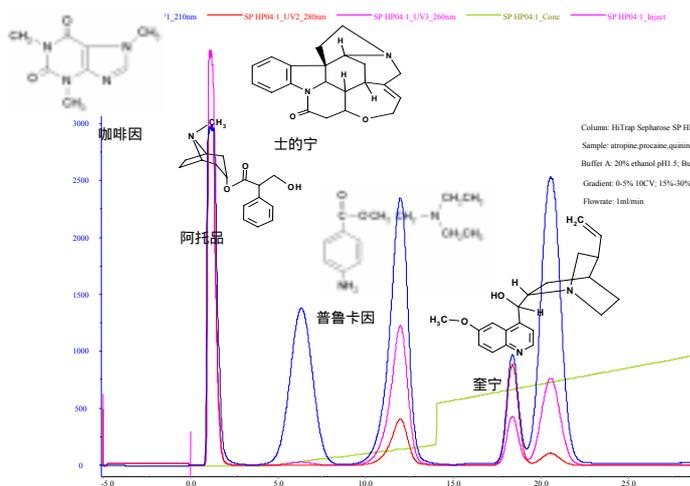
中草药活性成分的层析纯化新策略

有机酸 Organic acid	<pH12 碱水提取→阴离子交换 Q Sepharose HP →Sephadex LH-20	三七素、迭迷香酸
皂甙 Saponin	阴离子交换 Q Sepharose HP + 反相硅胶	柴胡皂甙 C、甘草酸
黄酮、黄酮甙 Flavone, Flavonoid	Q Sepharose HP 去色素→硅胶、Sephadex LH-20	葛根素、大豆异黄酮、红花素、银杏黄酮
多酚 Polyphenol	正相硅胶→Sephadex LH-20	茶多酚、白藜芦醇
萜类 Terpene	中压正相硅胶、高压反相硅胶	紫杉醇
动物小分子毒素 Toxin	离子交换 IEX Sepharose HP→SOURCE 中压反相	天花粉毒素、蛇毒、蝎毒
多糖 Polysaccharides	Sephadex G50, 100, 200 ; Superdex 200 PG ; Sephacryl 300, 400, 500	很多, 可参考文献

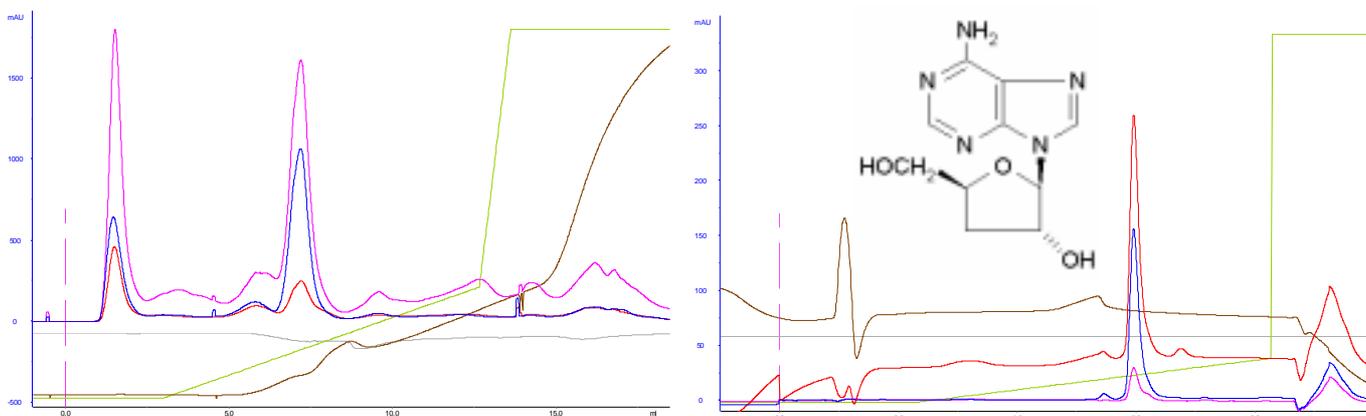
生物碱纯化平台 - <pH3 的酸水提取 →阳离子交换 SP Sepharose HP → 中、高压硅胶反相

生物碱是来源于植物界的含氮有机化合物，很多都具有很强的生理、药理活性，为非常重要的中草药有效成分。生物碱的种类非常繁杂，以其来源或化学结构分类的方法亦有多种。常见的即包括吡咯类、哌啶类、吲哚类、咪唑类、奎宁类、苯并二氮卓类等。生物碱主要分布在高等植物中，一般是数种或数十种生物碱共存，而且往往来源于同一个前体，因此结构类似，含量低。由于生物碱带碱性，在传统的硅胶或氧化铝层析上效果往往不理想。建议用 <pH3 的酸水提取生物碱，直接上阳离子交换介质 SP Sepharose HP，这种介质载量高，易于直接放大，对生物碱有特殊的选择性，可以从酸水粗提物中分离结构近似的十几种生物碱，一步到达 60-80% 的纯度(图一至四)，然后再上中、高压反相层析如 SOURCE15RPC 或 C18 硅胶可将纯度提高到 90% 以上。SOURCE 是(聚苯乙烯)为基架的反相介质，可耐受 1M 强酸强碱，比传统的如 C8、C18 硅胶反相介质使用范围更宽广，寿命更长。以下介绍的虫草素、粉防己碱²⁷ 的整个纯化流程都不使用有机试剂，十分有利于工艺放大(图二、三)。另外，Sephadex LH-20 也适合分离生物碱，已发表的例子包括纯化治疗各种疼痛症的川穹里的腺嘌呤¹¹；纯化治疗肺虚久咳的贝母里的腺甙浙贝宁、茄啶¹²；及纯化有回阳补逆效用的日本附子里的乌头碱等¹³

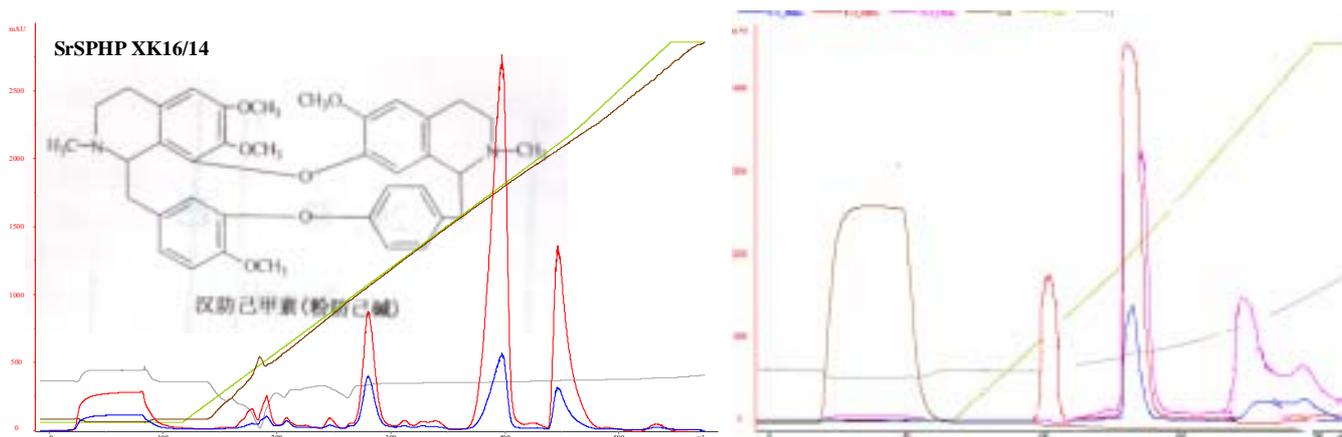
中草药活性成分的层析纯化新策略



图一：五种中药中常见的生物碱包括用于兴奋中枢神经的士的宁、咖啡因；用于镇痛、解毒的阿托品、局部麻醉药普鲁卡因及抗疟疾药奎宁在 SP Sepharose HP 阳离子交换层析柱上得到了很好的分离效果，pKa 值越高越晚洗脱。

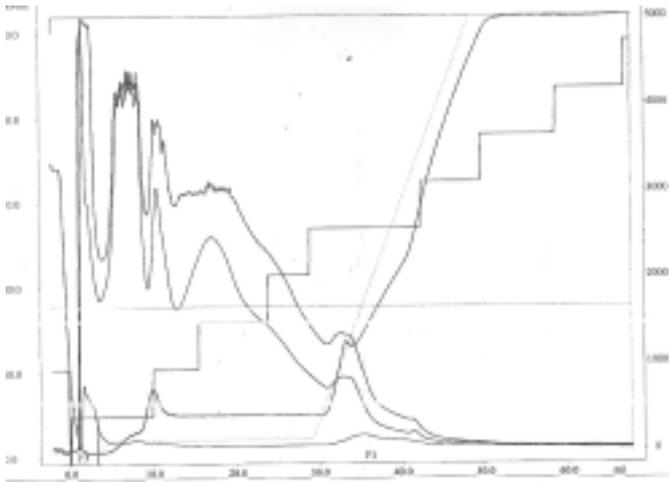


图二：虫草素的纯化工艺：pH3 的酸水、乙醇提取（含量<math><10\%</math>）→阳离子交换 SP Sepharose HP（纯度>80%）→硅胶中压反相（纯度>95%）。



图三：粉防己碱的纯化工艺：pH3 的酸水、乙醇提取（纯度<math><2\%</math>）→ 阳离子交换 SP Sepharose HP（纯度>90%）→SOURCE15RPC 中压反相（纯度>98%）²⁷。

中草药活性成分的层析纯化新策略

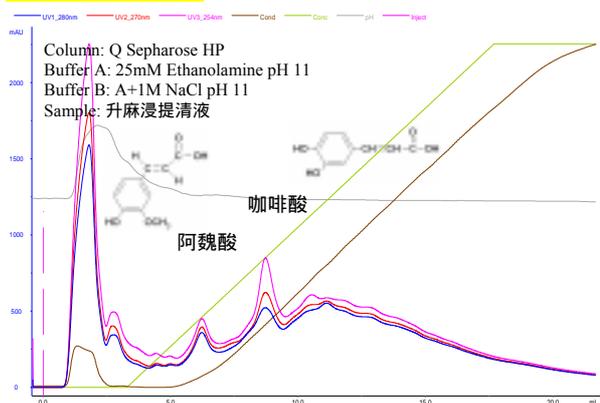


图四：用 SP Sepharose High Performance 阳离子交换凝胶制备百克级用于治疗心血管疾病的一种生物碱，工艺已放大到数百生产规模，30 厘米内径层析柱层析结果与实验室小试非常接近。

有机酸 - >pH11 的碱水提取 → 阴离子交换 Q Sepharose HP 或 Sephadex LH20 → 中、高压硅胶反相

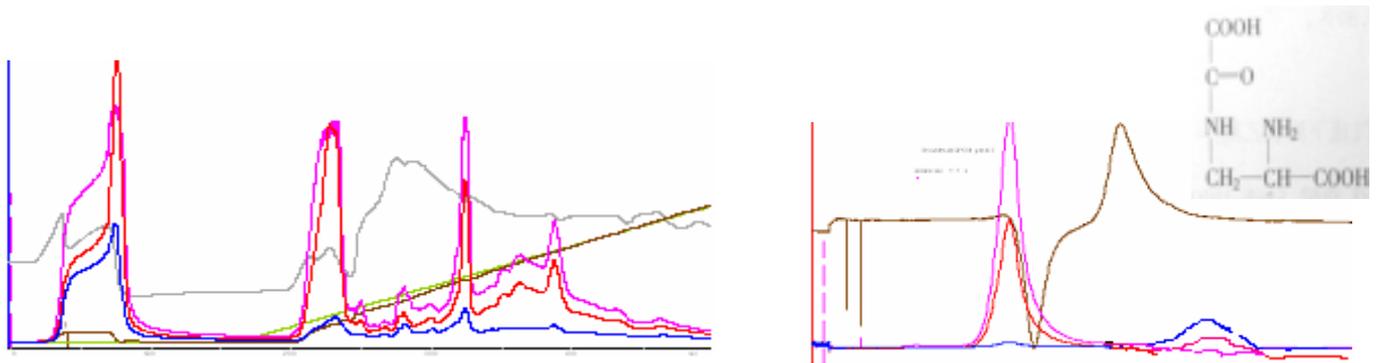
有机酸多与钾、钙、钠或生物碱结合成盐，亲水性强，广泛存在于植物中。有机酸也以游离的形式存在而发挥生理作用，例如：柠檬酸、酒石酸、苹果酸、抗坏血酸（维生素 C）、乳酸常被作为有机酸味剂，琥珀酸具抗抑郁活性。咖啡酸和阿魏酸为异构体，同时存在于川芎、升麻内；原儿茶酸和香草酸也是同分异构体，同时存在于四季青中和香草内，是主要的抑菌成分（图五）。与生物碱相反，有机酸带负电荷，纯化建议用 >pH12 的碱水和醇提取有机酸，直接上阳离子交换介质 Q Sepharose HP，一步纯度可达 50% 以上，然后再上（或直接上）Sephadex LH-20 或反相层析将纯度提高到 90% 以上。

升麻有机酸分离



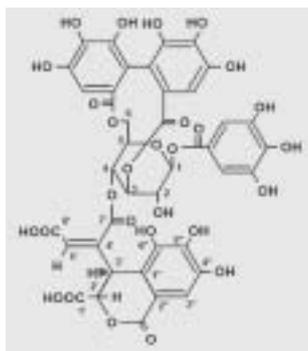
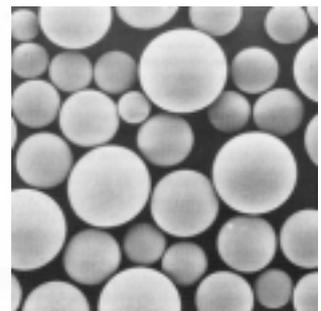
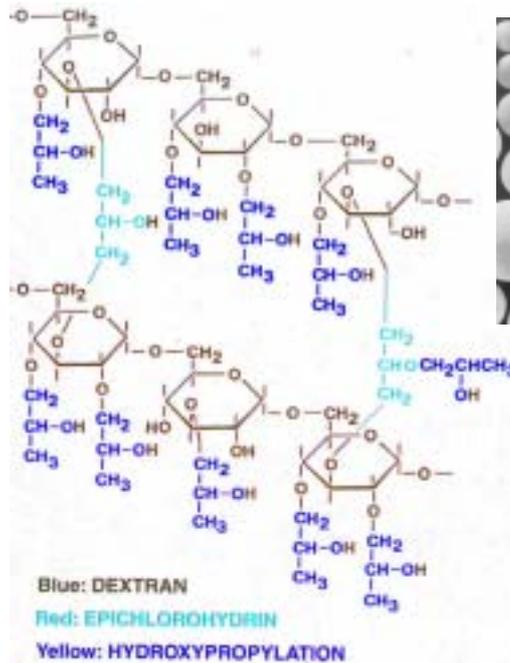
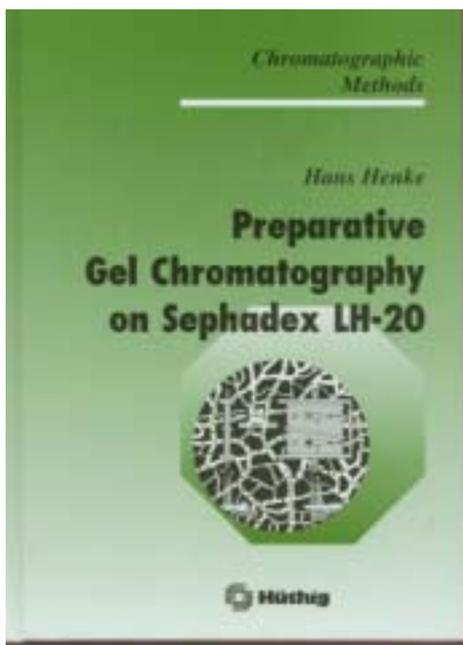
图五：川芎中纯化咖啡酸和阿魏酸：>pH11 碱水提取（纯度<10%）→ 阳离子交换 SP Sepharose HP（纯度>90%）。

中草药及天然药物活性成分的分离纯化



图六：三七素的纯化工艺：>pH11 碱水提取（纯度<5%）→ 阳离子交换 SP Sepharose HP（纯度>90%）→SOURCE15RPC 中压反相（纯度>97%）。

Sephadex LH-20 由葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 交联亲脂性羟丙基而制备，是同时具备吸附层析、分配色谱和分子筛功能的独特层析介质。由于它不受溶剂系统限制，可使用水、任何醇类、丙酮、乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯等各种溶剂，大量文献证明它非常适合中草药中含羟基、羧基的亲水成分如有机酸、甙类、黄酮、多酚等的纯化。透过筛选不同溶剂系统，Sephadex LH-20 能有效分离这些物质中结构极近似的同分异构体。以往，含许多羟基和羧基的单宁（tannic）类分子的纯化一直是个难题。近年用 Sephadex LH - 20 在被用于治疗传染性肝炎、肠炎的传统中药珍珠草中²⁸，分离出一种单宁类物质（见下图），如具有显著抗艾滋病病毒 HIV - 1 反转录酶作用²⁹。

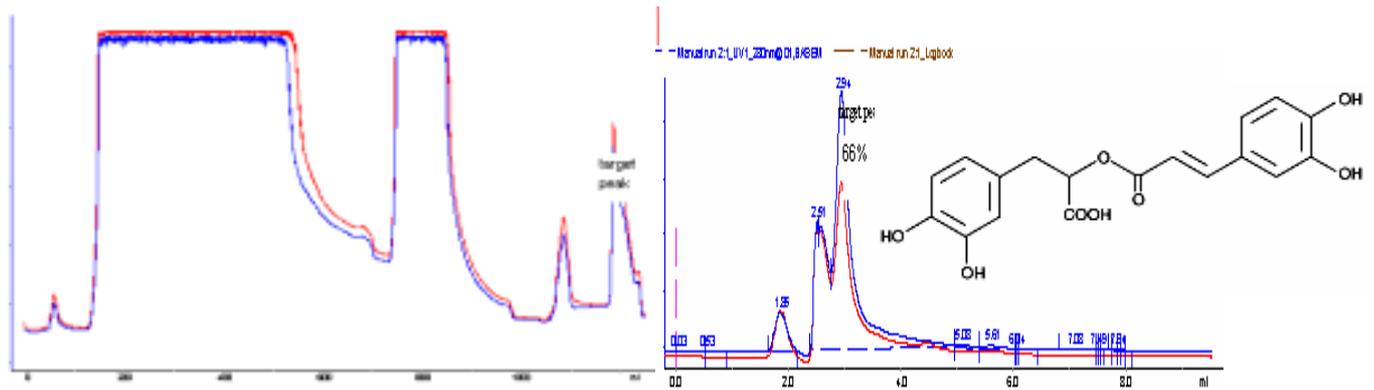


图七：Sephadex LH-20 由葡聚糖凝胶结构图。德国著名植物化学家 Prof. Hans Henke 著有

《Sephadex LH-20 制备凝胶色谱分离》专著，书中包括了过千种化合物的制备纯化³⁰，（GE Healthcare 货号 18-1113-89）。右

中草药及天然药物活性成分的分离纯化

下图是从珍珠草中分离出的抗艾滋病毒的单宁类物质。



图八：迷迭香酸的纯化工艺：水和醇提取（纯度<3%）→ Sephadex LH20 纯度（>66%）→C18 反相（纯度>95%）。

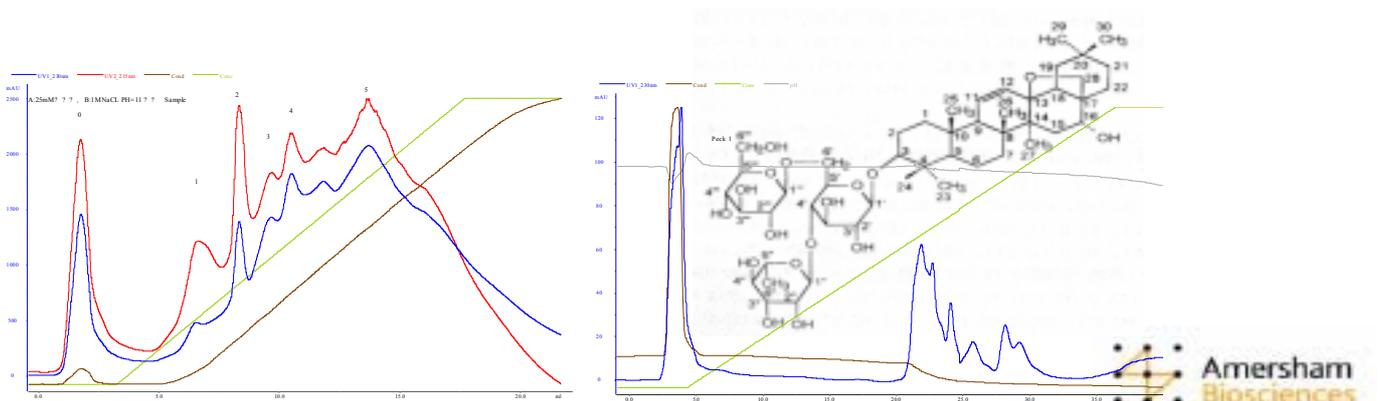
迷迭香酸(Rosmarinic acid, RosA)是 Ellis 最早从名为迷迭香 (Rosemarnus officinalis L) 的植物中提取分离出的一种多酚类化合物。它在植物界中的分布非常的广泛，从低等苔藓，蕨类植物到高等的双子叶植物都有迷迭香酸的存在。它是一种完全水溶性的天然抗氧化剂，其抗氧化作用至少是维他命 C 的 20 倍，而且在油炸烘烤 (180 /356) 处理时，性质依旧稳定。它的主要生理作用为：(1) 抗氧化抗衰老(2) 抗病毒活性(3) 抗炎作用(4) 抗血栓、抗血小板聚集(5) 抗菌。作为一种天然的抗氧化剂，迷迭香酸已获得美国 FDA 认可的公众安全食品原料(GRAS,21 CFR Chapter 21,part182)，具有广阔的市场前景。国内的诸多厂家只是将低纯度（20%UV）的原材料以极低廉的价格销往国外，Sephadex LH-20 一步就可以将纯度从 3%提高至>66%，透过洗脱醇溶剂的梯度优化还可增加上样量和分辨率。利用 AKTA explore 全自动层析设备结合 Sephadex LH-20 可以从不同中草药中快速开拓实用高效的迷迭香酸纯化工艺。

甙类（含糖苷分子）、皂甙

许多中草药有效成份都含糖苷，统称为甙类分子，它由亲水的糖基部分和甙元结合而成，常见甙元的有甾体、黄酮、生物碱、内酯、芳稠环等。甙类分子具有抗菌消炎、抗肿瘤、增强机体免疫等不同活性。甙的纯化方法因其结构的包罗万象而多种多样，建议的纯化平台为>pH11 的碱水提取，上阴离子交换 Q Sepharose HP 柱或 Sephadex LH20，再用中、高压反相硅胶提高纯度。

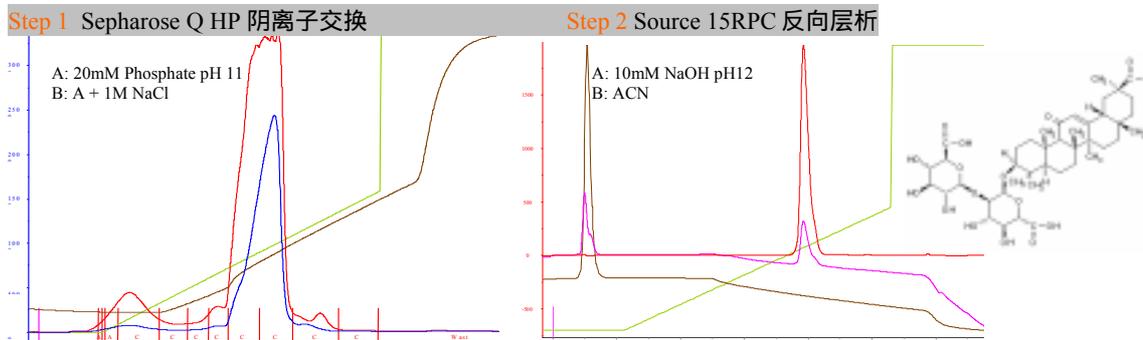
皂甙 - >pH11 的碱水提取 →阴离子交换 Q Sepharose HP → 中、高压硅胶反相

皂甙是不少常用中草药的有效成份之一，如人参、柴胡、甘草、桔梗等。皂甙类分子由于同时具有强极性的糖基和弱极性的甾体，化学性质有些类似去污剂，振荡后会产生气泡，纯化常常遇到困难。不少皂甙含羧基，可用碱水加醇提取，直接上阴离子交换 Q Sepharose HP，它对皂甙类分子有特殊的选择性和纯化效果，如以下柴胡皂甙 C 和甘草酸的纯化。



中草药及天然药物活性成分的分离纯化

图九：柴胡皂甙 C 的纯化工艺：>pH11 的碱水提取（纯度<5%）→ 阴离子交换 Q Sepharose HP (>70%) → C18 反相（纯度>95%）。

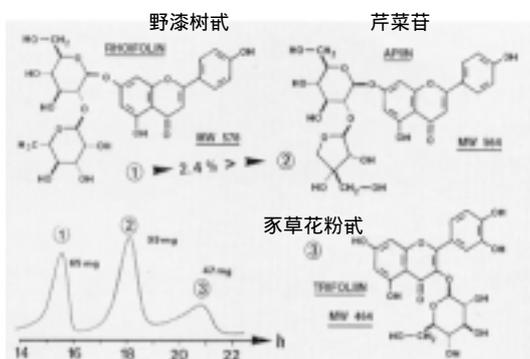


图十：甘草酸的纯化工艺 - 甘草酸半成品纯度约 50%，溶于碱水中→ 阴离子交换 Q Sepharose HP (>90%) → C18 反相（纯度>95%）。

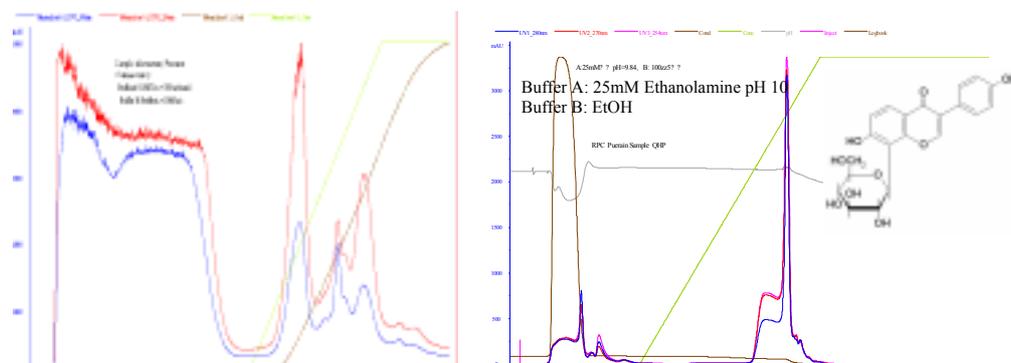
黄酮甙 - 水和醇提取 → 阴离子交换 Q Sepharose HP 去色素 → Sephadex LH20 → 中、高压硅胶反相

Sephadex LH-20 由葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 交联亲脂性羟丙基而制成，它的一种特殊的纯化功能是分离甙元相同但所带糖基数量或种类不同的分子，糖基数量越多越早被洗脱。即使糖基数量相同，结构稍有不同，也可调节流动相将之分开²³。Sephadex LH-20 用于分离中药中黄酮、黄酮甙类分子的例子众多，包括从治疗心血管疾病的银杏叶中分离银杏黄酮甙³⁰，从治疗肿痛、头晕的夏枯草中分离夏枯草黄酮甙、皂甙³⁶，从治疗头痛、咽喉肿痛的升麻中分离酰胺甙^{13,14}，从用于化痰止咳的水蔓菁中分离水蔓菁甙¹⁵，从治疗风湿的鹿衔草中分离鹿蹄草甙²¹，从补肾壮阳的淫羊藿中分离羊藿甙²²，从多种中草药中分离抗菌消炎的芦丁芸香甙等³⁴。

中药的黄酮甙粗提物常含大量深色的植物色素，在层析过程中掩盖了目标黄酮甙，无法进行柱后紫外检测或追踪，增加了后期纯化的难度。阴离子交换 Q Sepharose FF 是去处植物色素的有效方法。例如，葛根素是一种二羟基异黄酮类物质，具有扩张血管、促进代谢、改善微循环等多种药理作用。提取葛根素时，大量的色素也被提取出来，利用 Q Sepharose FF 可对粗品进行第一步纯化，不仅大大提高了葛根素的纯度，而且除去了绝大多数色素，再使用 Sephadex LH-20 进行精细纯化，就可达到纯度为 95% 以上的葛根素。



图十一：Sephadex LH-20 分离甙元相同但所带糖基种类不同的分子



中草药及天然药物活性成分的分离纯化

葛根素

图十二：葛根素的纯化工艺：葛根素半成品纯度约 20% → 阴离子交换 Q Sepharose HP 除色素 (>80%) → C18 反相 (纯度 >95%)。



图十三：黄酮甙 Q sepharose FF 去色素：9.1：上样 9.2：Q sepharose FF 清洗后 9.3：样品上样前后的色素比较

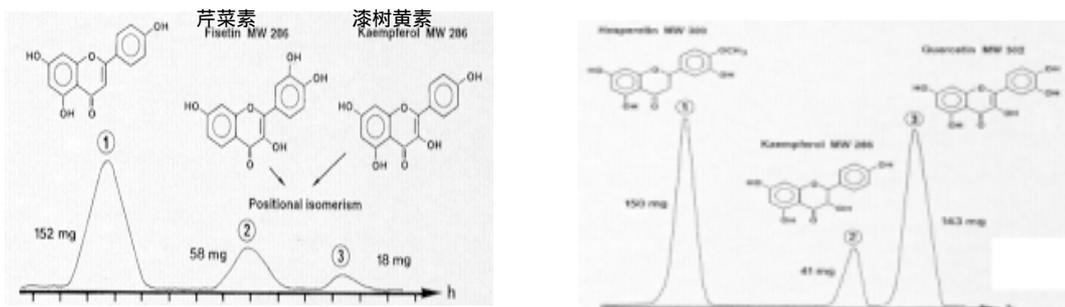
黄酮、萘醌 - 水和醇提取 → Sephadex LH20 → 中、高压硅胶层析

植物黄酮为最常见的中草药有效成分之一，数量之多列天然酚类化合物之首。其生理作用是多种多样的。例如，菟丝子是一种温补肾阳的植物，其发挥药理作用的主要是黄酮类化合物²⁴，杜鹃素具有止咳祛痰作用，水飞蓟素有保肝作用，汉黄芩素具有抑制肿瘤的作用。红茶中的黄酮化合物，作用类似于抗氧化剂，能防止中风和心脏病。

Sephadex LH-20 广泛地应用在黄酮类物质的分离纯化中，在《中草药》杂志上发表的文章甚多（参考文献附录）。许多结构极为近似的黄酮及可根据所含羟基的数量、位置或氢键位置的不同，在 Sephadex LH-20 上得到很好的分离效果。总括来说黄酮所含羟基数量越多，与 Sephadex LH-20 介质所形成的氢键数量越多，结合越强³⁰。已发表的例子包括分离具有活血散瘀功效的红花中的槲皮素、芦丁、山柰酚、红色素等多种黄酮^{18,19}；分离用于肺燥干咳的麦冬中的麦冬黄酮²⁰；分离用于风湿痹痛的鹿蹄草中的儿茶素²¹；分离有抗癌、抗炎、避孕疗效的紫草中的萘醌、苯酚³⁷；分离用于治疗肝炎的水飞蓟素等等。

Sephadex LH-20 分离制备银杏黄酮、红色黄花素、大豆异黄酮

近年掀起热潮的用于治疗心血管疾患及预防老人痴呆症的银杏，主要活性成份包括多个黄酮及内酯。槲皮素、山柰酚及异鼠李素三个黄酮化合物，具有扩张血管和解除痉挛作用，能扩张冠脉血管、增加冠脉流量，另外还与降低血脂、改善血液流变学、降低 LPO、提高 SOD 活力有关。Sephadex LH-20 以甲醇洗脱系统可分离银杏中结构极为近似的多个黄酮：橙皮素、山柰酚、槲皮素、异鼠李素³⁰。



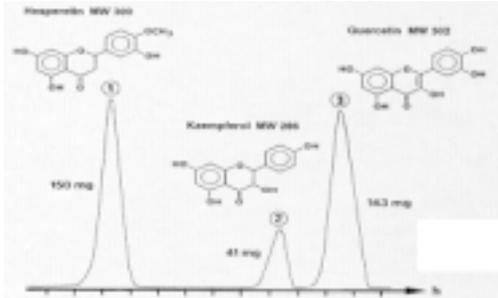
中草药及天然药物活性成分的分离纯化

橙皮素

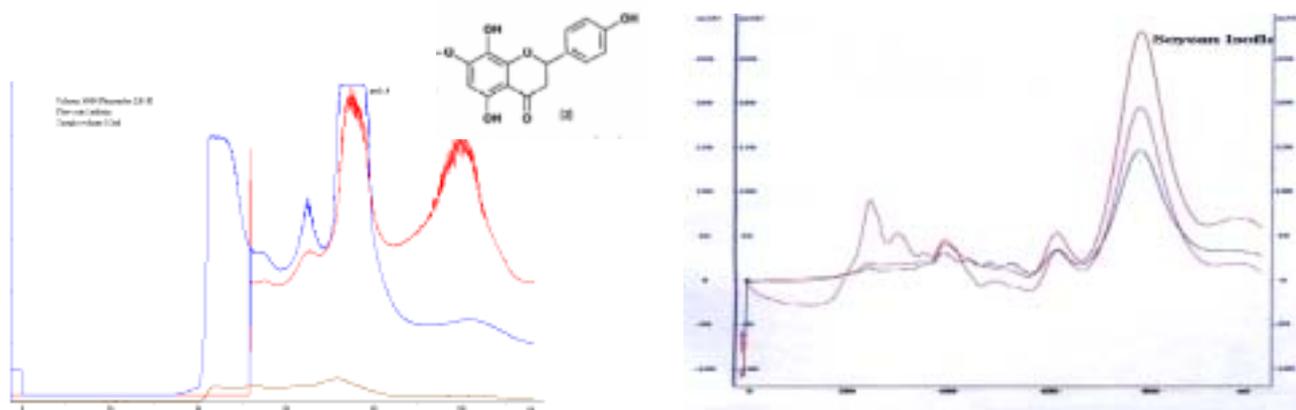
山奈酚

槲皮素

图十四：Sephadex LH-20 分离银杏中结构非常相近的多个黄酮



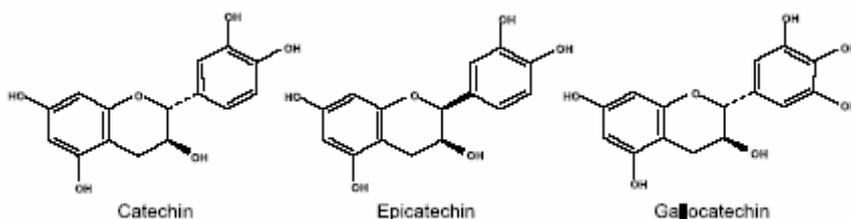
红花中红色黄花素和羟基红色黄花素具有活血化淤之功效；而大豆异黄酮是具双向调节作用的天然植物雌激素，近年广泛用于妇女更年期综合症、骨质疏松症的预防和治疗。利用 Sephadex LH-20 也可分离红花中的黄酮醇类成分²⁷。利用 AKTA explore 层析系统配合 Sephadex LH-20 柱，可将 40% 的黄花素粗品、将 40 - 60% 的大豆异黄酮半制品，纯度提高到 90% 以上。此方法具有上样量大，洗脱时间短，纯化、检测过程全部自动化的特点，此两项工艺均已应用于大规模生产。



图十五：Sephadex LH-20 分离、制备红色黄花素（左图）、大豆异黄酮（右图）。

多酚类 水和醇提取 → Sephadex LH20 → 中、高压硅胶层析

东方人喜欢喝茶，西方人喜欢喝红酒，东西方虽各处地球一方，但都选择了有利于身体健康的饮料。在茶和红酒中都含多种具有抗癌、抗氧化作用的多酚物质。Sephadex LH-20 也被茶多酚生产商用于大规模纯化，批产量达公斤级。Sephadex LH-20 近年被越来越多地应用于多酚的纯化、制备中。与黄酮纯化类似，多酚的纯化也可根据所含羟基、芳香环、双键的数量、位置，以及与 Sephadex LH-20 介质所形成的氢键的数量、强度的不同进行分离。总括来说多酚所含羟基、芳香环数量和所形成的氢键数量越多、越强，结合也越强，洗脱也较晚³⁰（如各种茶多酚、白藜芦醇的纯化）。

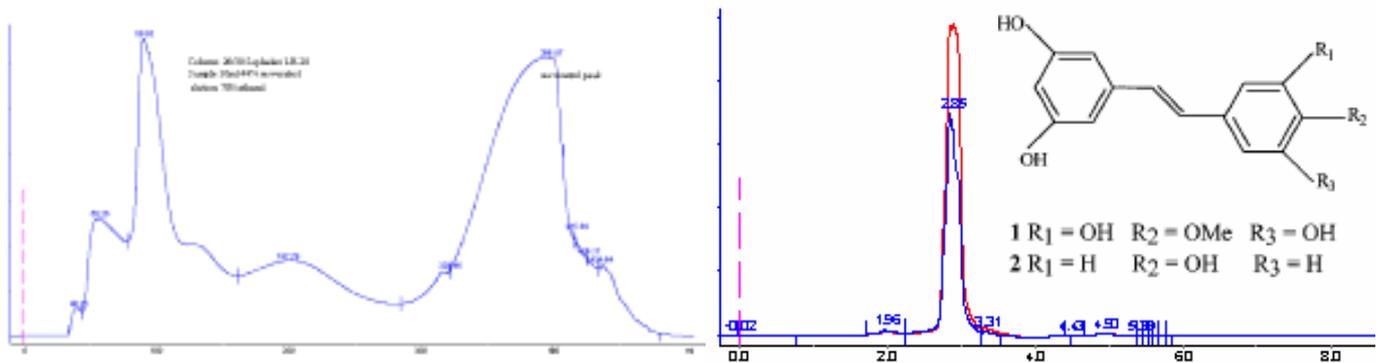


中草药及天然药物活性成分的分离纯化

图十六：Sephadex LH-20 可大规模分离、制备茶叶中多个茶多酚。

白藜芦醇

白藜芦醇于 1940 年首次从毛叶藜芦的根部提取，具有抗炎，抗氧化及抑制血小板聚集。常用于治疗炎症，脂代谢和心脏疾病。最近，人们发现白藜芦醇通过抑制细胞增殖而对肿瘤及其它疾病具有治疗作用，令市场需求大增。利用 AKTAexplore 层析自动筛选不同溶剂、梯度系统，配合 Sephadex LH-20 柱，可将不同植物中提取的白藜芦醇的粗品纯度提高到 70% 以上，再用加压硅胶层析进一步精细纯化，达到纯度 95% 以上。

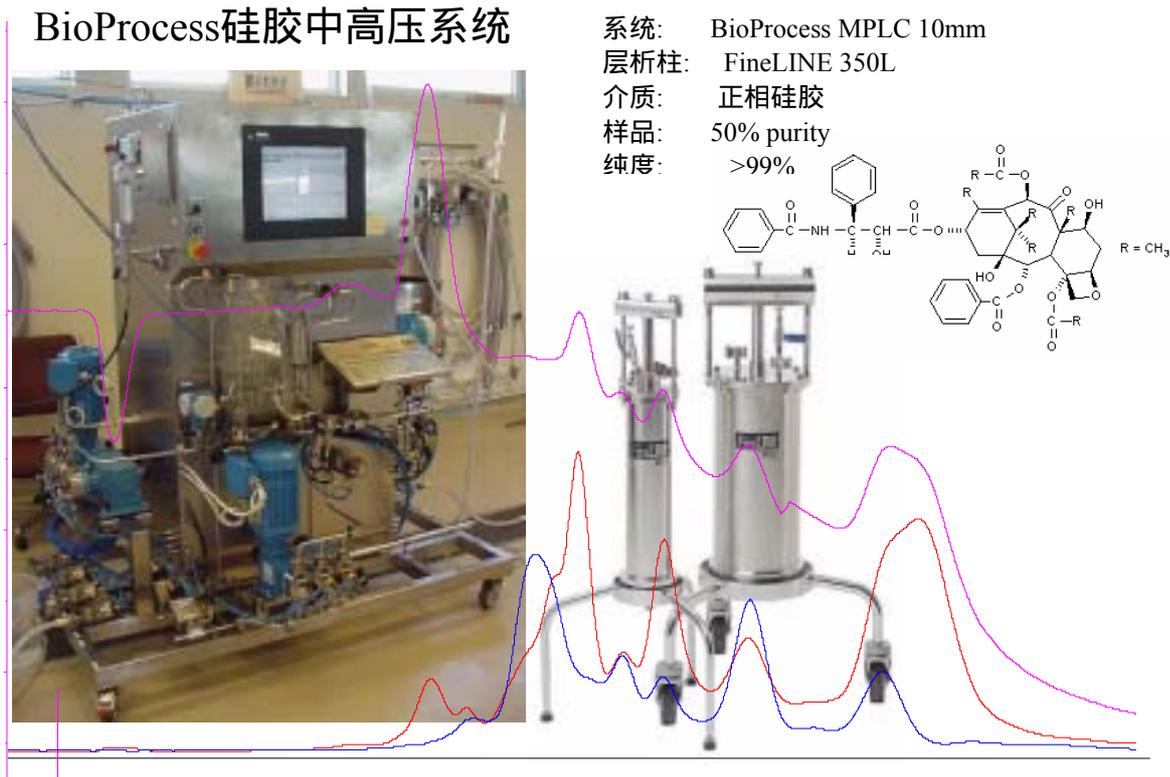


图十七：Sephadex LH-20 柱，可将白藜芦醇的粗品纯度提高到 70%，再用加压反向硅胶层析精纯至纯度 95% 以上。

内脂、萜类 Sephadex LH20 或中、高压硅胶层析

中草药中的内脂、萜类大都较为弱极性分子，以传统的萃取、结晶、加上硅胶或氧化铝层析纯化。常压开放式的硅胶或氧化铝层析速度慢、重复性受到每次装柱效果的影响，加上大量使用有害有机试剂，破坏环境、有一定危险性。要将实验室工艺提高到生产规模，管道化的加压硅胶层析可在密闭的环境下操作，大大提高生产速度、重复性、安全性、可控性。自从 90 年代中美国 FDA 连续批准了紫杉醇成为治疗卵巢癌、乳腺癌等多个转移性癌症的药物，紫杉醇项目在国内也成了投资的热点。由于紫杉醇疗效显著、市场需求量大而资源有限，用植物细胞大规模培养紫杉醇也一直是研究重点。目前，GE Healthcare Biosciences 生产的 BioProcess 防爆防腐中、高压层析生产系统配和 Fineline 350 或 HPLC 层析柱已成功在国内外应用于紫杉醇的大规模生产。全自动的加层析生产系统不仅可以将原本速度慢、重复性差的常压硅胶层析周期从 5 天减少到 8 小时，回收率从 65% 上升到 79%，批生产能力从 25~50 克上升到 650~850 克，企业年生产力从 30 公斤上升至 200 公斤，全自动、管道化控制还大大改善了生产环境，达到了美国 FDA 和中国 SFDA 的 cGMP 生产标准。

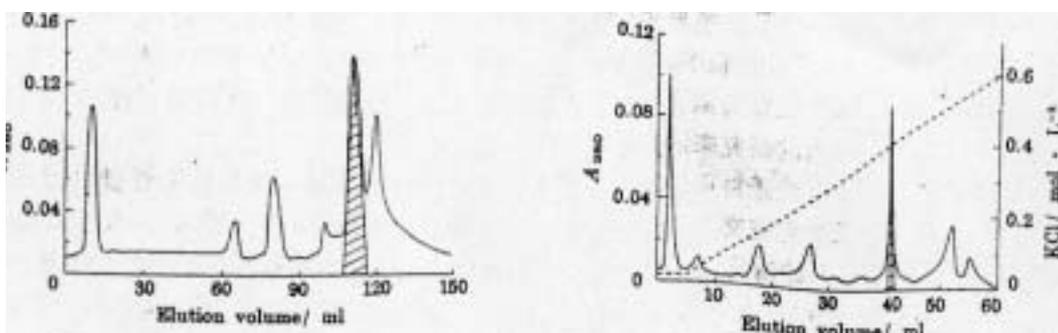
中草药及天然药物活性成分的分离纯化



图十八：Sephadex LH-20 柱，可将白藜芦醇的粗品纯度提高到 70%，再用加压反向硅胶层析精纯至纯度 95% 以上。

蛋白质、活性肽、动植物毒素 - Sepharose 离子交换；Superdex/Sephacryl 分子筛层析；SOURCE RPC 反相层析

近年不断发现许多常用中药中的蛋白质、糖蛋白都具药理活性，如枸杞子糖蛋白^{59,60}、银杏花粉蛋白⁶¹、芦荟糖蛋白等⁶³。对中药大分子的研究陆续开发了许多中药中具不功效的蛋白酶、凝集素及活性肽等。如可驱除寄生虫的木瓜酶，可抗炎症的菠萝酶，具有抗肿瘤活性的天花粉蛋白^{56,58}、苦瓜子蛋白、蓖麻毒蛋白、肥皂草毒蛋白⁶²，具有溶血作用的蜂毒肽，兴奋中枢神经的蝎毒肽⁵⁵，治疗风湿性关节炎的蜂毒明肽，抗凝血药水蛭素、蛇毒酶⁴¹⁻⁵⁴。大部分蛋白酶在纯化时需留意保持其空间结构，避免失活，所以一般采用温和的离子交换和分子筛层析，肽分子则可使用反相层析。

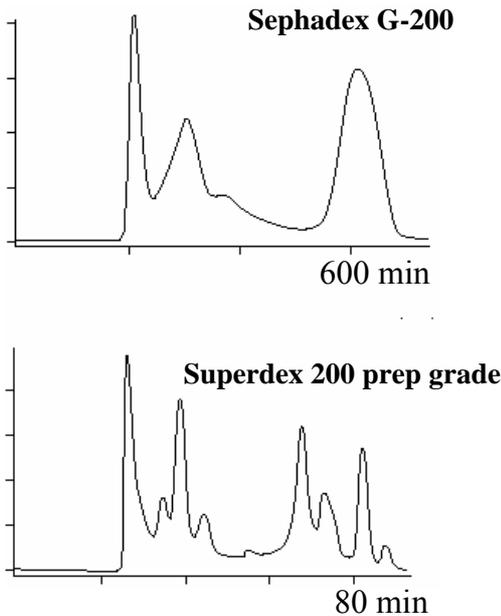


图十九：Superose 12 凝胶过滤、MonoQ 阴离子交换柱纯化天花粉蛋白、银杏花粉蛋白

多糖 - 水、醇提取 → 穿透式 Sepharose 离子交换脱蛋白 → Superdex 200/Sephacryl 300-1000 分子筛层析

中草药及天然药物活性成分的分离纯化

中药中的多糖很多具有独特的预防和治疗作用，如灵芝多糖⁶⁸、香菇多糖³³、黄芪多糖⁶⁷、人参多糖⁶⁹、猪苓多糖、螺旋藻多糖⁷¹均被报道具有增强免疫力、抗肿瘤作用；银耳多糖可助保护肝细胞、茶叶多糖可降糖降脂^{72,35}；银杏多糖³²、大黄多糖^{63,64}、牛膝多糖也是目前研究的热点。一种中药中往往含多种多糖，结构、性质、功效不一。如香菇中含水溶性、酸溶性、碱溶性多糖，综合利用分子筛及离子交换层析可进一步获各组份纯品³³。如黄芪水提取液经 DEAE 弱阴离子交换层析及 Sephadex G100 分子筛层析纯化⁶⁷，可获 AH-1, AH-2 及 AG-2 等多个单一组份多糖。大黄水提取液经乙醇提取及 Sephadex G200 分子筛层析获得 DHP-1, DHP-2 两个单一组份多糖^{63,64}。传统的多糖纯化大多数用 Sephadex G 系列分子筛层析介质，新一代的 Superdex 200 分子筛层析介质选择性与 Sephadex 相同，而流速、分辨率、化学稳定性大大增加，比往 Sephadex G 系列能分离出多数倍的多糖组分，时间更由以往的一天缩短到一小时（图十五）。



图二十：新一代的 Superdex 200 分子筛介质比往 Sephadex G 能分离出多数倍的多糖组分，流速也快了数倍。

多糖药物的提纯一般经数步酒精沉淀和提取，仍存一定含量的蛋白质，须尽量去处以避免临床副作用。Sevag 脱蛋白方法往往需反复数十次，才能获满意效果，难应用于生产。穿透式阴阳离子交换法可以一、两步快速去除多糖中残存的蛋白质，此法简便并易于放大和自动化，实验证明人参多糖经离子交换法去除蛋白质效果十分有效。

中草药纯化层析系统 - 完整的纯化技术解决方案

GE Healthcare（原安玛西亚）公司集四十多年的层析纯化经验，积累大量理论技术和实践经验，供应从 ng 到 Kg 级的高、中、低压层析纯化设备。由于实验室研究、中试设备 ÄKTA 和大规模生产设备 Bioprocess 系统采用的是同一控制平台 Unicorn，保证了实验室工艺到生产规模的线性放大。GE Healthcare 在 Sephadex（葡聚糖）、Sephacryl（琼脂糖）、Monobeads、SOURCE（聚苯乙烯）等基架上开发出新一代凝胶过滤、离子交换、金属螯合、亲和层析、反相层析等多种类型和多种性质的数百种层析介质，大多具有选择性高、载量大、有机溶剂用量少、工艺可线性放大等特点，为中草药各种有效成分的分离纯化提供广泛的选择性。

中草药及天然药物活性成分的分离纯化

实验室研究	ÄKTAbasic 10 ml. 25	ÄKTApurifier 10 ml. 25MPa
开发	ÄKTAexplorer/ÄKTApilot 100ml. 800ml. 4-10MPa	
中试生产	BioProcess systems 2-2000l/h. 0.3-10MPa	
大规模生产	UNICORN 统一平台	



快速工艺开拓系统： ÄKTAexplorer System

先进概念型层析纯化和工艺开拓系统，整机测试，整机出厂，完全符合 GMP 的要求，由通过 FDA 验证的 Unicorn 软件控制。内置方法模板库、缓冲液库、层析柱库，可连续进行 99 次不同条件的实验和自动数据处理，在极短时间内摸索到最佳工艺条件。

系统最大流速 100ml/min，可用于 ug-g 级配备。备有连续三波长紫外、电导、温度、pH、压力检测器，通用数据采集和通用设备控制接口选件，能与其他厂家提供的检测器和设备兼容，是科学研究和工艺开拓的首选仪器。



中、高压层析生产系统： BioProcess MPLC, HPLC System

标准的制药工业卫生系统，有 3、6、10、12mm 系统，流速可达 12~2000 升/小时，压力 1-10MP，按照欧洲和美国的防爆防腐工业标准设计和制造，由 Unicorn 软件控制，可直接将 AKTA 系统上的工艺放大。所有部件均有反馈调节，兼容任意第三方设备，完全符合 cGMP 要求。有 BPG、BPSS、INdEX、FineLINE、HPLC 等各种规格的层析柱（最大内直径 2m）供选择。

