

天然产物提取分离技术研究进展

邱玲^{1#}, 刘宇^{1#}, 郑楠楠¹, 宋敏¹, 陈能花¹, 冯瑞冰¹, 王泽雨¹, 周燕青¹, 张庆文^{1,2*}

(1. 澳门大学中华医药研究院中药质量研究国家重点实验室, 澳门; 2. 澳门大学健康学院药物科学系, 澳门)

[摘要] 天然产物是生物在自然界长期进化和生长过程中不断被选择和优化的结果。天然产物具有独特的化学结构和良好的生物活性, 是新药设计和研发的重要源泉。随着社会经济和科学技术的不断发展, 天然产物化学的研究手段取得了较大的进展。对天然产物的提取分离技术进行总结, 以期天然产物的化学研究提供参考和思路。

[关键词] 天然产物; 提取; 分离; 色谱

[中图分类号] R93

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2022) 03-0184-14

Advances in Research on the Extraction and Isolation Techniques of Natural Products

QIU Ling^{1#}, LIU Yu^{1#}, ZHENG Nannan¹, SONG Min¹, CHEN Nenghua¹, FENG Ruibing¹, WANG Zeyu¹, ZHOU Yanqing¹, ZHANG Qingwen^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macao, China; 2. Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Macau, Macao, China)

[Abstract] Natural products are synthesized as a result of continuous selections and optimizations of the organisms during long-term evolution and growth. Natural products, due to their unique chemical structures and good drug-like properties, are important sources for the design, research and development of new drugs. With the continuous development of social economy and science and technology, great progress in the research methods of natural product chemistry has been made. In this paper, the methods of extraction and separation of natural products are summarized, so as to provide references and ideas for the chemical research of natural products.

[Key words] natural product; extraction; separation; chromatography

在人类历史长河中, 天然药物一直是人类用于治疗疾病和保健强身的一种重要资源。天然产物是生物在进化过程中为适应环境而产生的一类次生代谢产物, 具有丰富多样的化学结构以及独特的生物学功能, 在新药研究中扮演着举足轻重的角色。19世纪以来, 人类已经从各类生物中获得了一系列化学结构和生理活性令人瞩目的天然产物, 如吗啡、紫杉醇、青蒿素等, 类似重要的发现至今仍层出不穷。目前, 天然产物的提取分离技术依然是天然产物化学研究领域中最活跃的研究方向之一。本文对天然产物的提取分离技术进行总结, 以期天然产物化学研究提供参考和思路。

1 天然产物的提取

提取的目的是从天然原料里获得含有目标天然产物的粗提物, 是分离纯化天然产物的第一步。其中溶剂萃取法是最常用的传统提取方法。在天然产物提取过程中, 溶质在溶剂中的扩散度和溶解度是影响提取率的关键因素, 即任何能够促进溶质在溶剂中扩散或溶解的条件都能提高其提取率^[1-4]。

传统的提取方法包括浸渍、渗漉、煎煮、回流等。特点通常是在常压下, 用大量的水或有机溶剂作为溶剂进行提取, 提取时间一般较长且提取率较低。现代或更加环保的提取方法一般是通过加压等辅助手段提高目标产物的提取率, 如超临界流体萃取、加压液体萃取和微波辅助萃取, 上述方法具有节省溶剂、缩短提取时间、高选择性等优点^[5]。

1.1 传统提取法

1.1.1 渗漉法 渗漉法(percolation)与浸渍法(maceration)是两种最简单的溶剂提取法。由于提取过程往往不需要加热, 所以特别适用于热不稳定性物质的提取。渗漉法比浸渍法更高效, 因为它

接受日期: 2022-01-04

项目资助: 澳门科学技术发展基金 (No. 0017/2019/AKP); 澳门大学研究基金 (No. MYRG2019-00150-ICMS); 广东省自然科学基金广东省基础与应用基础研究基金 (No. 2021A1515012098)

* **通信作者:** 张庆文, 副教授;

研究方向: 中药化学;

Tel: (+853) 8822 4879; **E-mail:** qwzhang@um.edu.mo

贡献等同

是一个持续的动态过程, 新鲜的溶剂会不断置换出饱和的浸出液, 从而可更充分地提取出天然原料中的化学成分。通过渗漉法所得到的提取物相对比较干净, 但提取较耗时。Li 等^[6]研究了药材粒径和堆积厚度对渗漉效果的影响, 发现所有高度的渗漉过程都会产生较大的渗漉压降, 且压降大小与药材的堆积厚度呈正相关, 堆积越厚消耗能量越多。为解决传统单筒渗漉法的上述缺点, 作者采用了多层渗漉法, 在药材总量相同的情况下提高了药材的孔隙性和渗透性^[7]。Yang 等^[8]采用 90% 甲醇对中药黄蜀葵花进行渗漉提取, 最终分离得到 1 个新化合物 quercetin-8-(2''-pyrrolidinon-5''-yl)-3'-O-β-D-glucopyranoside 和 11 个已知化合物。

1.1.2 水煎法 水煎法 (decoction) 以水作为提取溶剂, 对小极性天然产物提取不完全, 提取物通常混有大量水溶性杂质, 同时由于其需要较高温度的加热, 可引起热不稳定化合物的分解以及挥发性物质的流失, 故水煎法在以分离为目的的天然产物研究中并不常用。但由于水煎法是传统中药的常用制备方法, 所以水煎煮过程中成分的变化也一直是研究的关注点。近年来, 人们除了对药材中的小分子天然化合物进行研究外, 也越来越关注多糖等生物大分子, 水煎法已被广泛用于药材中多糖类成分的提取。Zhao 等^[9]通过水提醇沉的方法对干燥金银花和 4 种干燥山银花 (灰毡毛忍冬、菰腺忍冬、黄褐毛忍冬和华南忍冬) 中的多糖类成分进行提取, 提取率分别为 6.9%、6.3%、5.7%、7.2% 和 5.5%。通过分析发现, 与蛋白质结合的多糖部分均具有相似的化合物组成, 并都有显著的降糖效果, 提示这 4 种山银花可以作为金银花的替代品种, 用于治疗 2 型糖尿病。Zhang 等^[10]利用水提醇沉法从山药中提取多糖, 得率为 4.39%, 并从中分离得到 1 个新的平均相对分子质量为 10 000 (约为 1 200~12 000) 的 1, 4-β-半乳糖。

水煎法因为长时间在水沸腾温度提取, 常引起药材中化学成分发生变化。Li 等^[11]在研究独参汤时发现, 白参在水煎煮过程中人参皂苷类成分会发生水解、脱水、脱羧、加成等反应。Chen 等^[12]发现许多菊科植物含有的毒性成分苍术苷在水煎煮过

程中会被分解、水解和皂化破坏。中药复方中含有多种药材, 其在煎煮过程中的成分变化更为复杂, 除各单味药材自身可发生成分变化外, 一种药材的成分还可能对另一种药材的成分产生助溶、沉淀和降解作用。霍志鹏等^[13]对黄连-大黄不同配伍比例进行合煎时发现, 配伍黄连对大黄中主要蒽醌类成分芦荟大黄素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚有助溶作用。Kim 等^[14-15]分别利用 11 种和 16 种标记物探究芍药、甘草复方以及肉桂、芍药、甘草复方在不同比例水煎液中提取成分的变化。研究发现在其他药材存在的情况下, 煎煮可能会引起单一药材标记物含量的减少, 随着单一药材比例的增加, 其总提取物中相应标记物的提取率会增加, 但随着总药材量的增加, 其标记物的含量却会相应减少, 这可能是中药复方中某些成分影响了其他药材中标记物的溶出。

1.1.3 回流法 回流法 (reflux extraction) 与浸渍法和渗漉法相比, 能够缩短提取时间、节省提取溶剂, 是天然产物化学研究中最常用的提取方法。但由于该方法需采用加热的方式, 故也不适合热不稳定性物质的提取。Hu 等^[16]以乙醇为溶剂, 采用回流法从三七中提取皂苷, 并且根据 Box-Behnken 设计响应面法对提取时间、乙醇浓度、固液比和提取次数进行考察, 最终确定用 60% 乙醇提取 1.51 h, 以 10 倍药材体积的溶剂提取 3 次, 可获得最大得率的皂苷。另一方面, Sun 等^[17]在提取花青苷的研究中发现, 当回流提取温度高于 41.2℃ 时, 花青苷开始降解, 在 70℃ 条件下回流 2 min 后, 花青苷的提取率会随着提取时间延长而不断下降。

1.1.4 索氏提取法 索氏提取法 (Soxhlet extraction) 在热回流的基础上, 增加了虹吸装置, 该装置能保证药材不断被新鲜溶剂提取, 因此索氏提取法同时具有热回流法和渗漉法的优点, 可缩短提取时间并减少溶剂消耗, 但同样不适合热不稳定性物质的提取。为了探究不同提取条件对提取物含量的影响, Yue 等^[18]依照 2015 版《中华人民共和国药典》, 以人参为对象, 氯仿为溶剂, 考察了水浴位置、虹吸次数和回流次数对提取物中 3 个特征化合物人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Re 含量的影响, 发现水浴位置可影响虹吸次数和回流次数, 并对提

取物中人参皂苷 Rb₁ 的含量影响最大。索氏提取法还被广泛用于种子油的提取。Zhao 等^[19] 发现以石油醚为溶剂, 通过索氏提取法能提高辣木籽的出油率, 达到 39.2%, 并且提取的辣木籽油质量高, 主要含油酸、多种三酰甘油、 β -谷甾醇和豆甾醇。

1.1.5 水蒸气蒸馏提取法 水蒸气蒸馏提取法 (steam distillation) 是提取挥发油类成分的常用方法, 但一些成分会由于热不稳定而被破坏。为了发掘天然环保的抗菌剂, Gao 等^[20] 通过水蒸气蒸馏提取法提取佛手精油, 并利用 GC-MS 对其成分进行含量测定。结果显示, 佛手精油的提取率为 1.45%, 并从中鉴定出 113 个化合物, 占精油总含量的 93.4%。其中, 以 *D*-柠檬烯为主的萜萜类成分为佛手精油的主成分。另外, 为了优化水蒸气蒸馏提取法的提取性能, Xing 等^[21] 将超声技术结合水蒸气蒸馏法对佛手精油进行提取, 提取率比使用传统水蒸气蒸馏法提高了 118% (0.48% vs 0.22%)。

1.2 现代提取法

1.2.1 超临界流体提取法 超临界流体提取法 (supercritical fluid extraction) 是使用超临界流体为溶剂的提取方法。当接近临界点时, 压力和温度的微小变化即能引起超临界流体密度的巨大变化, 且黏度较液体溶剂小, 因此对天然产物的溶解范围广, 并能增加天然产物在溶剂中的扩散度, 提高提取效率。由于二氧化碳具有较低的临界温度 (31 °C) 和压力 (7.3 MPa), 以及化学惰性、低成本、无毒等特点, 因此超临界二氧化碳是最常使用的超临界流体, 其对非极性化合物 (如脂质和挥发油成分) 有很好的提取效果。而对于极性物质的提取, 可以通过向超临界二氧化碳中添加改性剂来改善提取效率。为了更快、更全面地探究陈皮的亲脂性成分, Zheng 等^[22] 通过超临界流体提取法和 UHPLC-Q Exactive Orbitrap/MS 技术分别对 18 批陈皮进行了提取和成分鉴别。结果共检测到 57 个化合物, 其中 2 个黄酮、6 个有机酸、9 个香豆素、3 个醛类、7 个酯类、3 个萜类、1 个柠檬苦素以及 5 个其他类型化合物为首次从陈皮中检测出, 说明超临界二氧化碳提取法更有利于对陈皮中化学成分的全面深入研究。为了更充分利用盒子草的果仁资源, Zheng 等^[23] 采用超

临界二氧化碳提取法对其进行提取, 与索氏提取法和冷榨法相比, 超临界流体提取法能获得更高的产油量和油回收率, 其富含油酸、亚油酸、角鲨烯、维生素 E 和植物甾醇。

1.2.2 加压溶剂提取法 根据溶剂沸点随压力增加而升高的特性, 在加压溶剂提取法 (pressurized liquid extraction) 中, 可通过增加体系压力, 使溶剂温度升至其常温下的沸点以上仍保持液体状态。该方法具有更好的渗透性, 并能保证溶质在溶剂中的高溶解度和高扩散速度, 有效地缩短提取时间, 从而提高提取效率。与其他提取方法相比, 加压溶剂提取法是一种能够减少提取时间、降低溶剂消耗, 并提高重复性的一种现代提取手段。与超声辅助提取法的效果比较, 加压溶剂提取法能提高对酚类物质的提取效率, 并减少溶剂消耗, 提示加压溶剂提取法可成为提取桑葚中天然产物的新方法^[24]。

一些天然产物在高温条件下会发生降解, 其降解率与反应速度和时间成正比。加压溶剂提取法虽在高温下提取, 但提取时间短, 因此学者们对加压溶剂提取法是否可用于热敏天然产物的提取这一问题产生了分歧。Vergara-Salinas 等^[25] 对葡萄皮渣中抗氧化物质进行加压溶剂提取时发现, 200 °C 时有美德拉反应产生。当温度从 150 °C 上升至 200 °C 时, 西番莲副产物的总提取率降低, 这可能和一些热不稳定性物质的分解有关^[26]。不过也有研究表明, 加压流体萃取法是对薄荷中的酚类物质和精油进行同时提取的最合适方法^[27]。

1.2.3 超声波辅助提取法 超声波辅助提取法 (ultrasound assisted extraction) 又被称为超声波提取法, 是一种利用超声波技术来辅助溶剂提取的一种方法。由于超声波在溶剂中产生的空化效应能促进溶质在溶剂中的扩散和溶解, 同时还能有效传递热量, 因而能缩短提取时间、提高提取效率。另外, 超声辅助提取法操作简便, 并能节约溶剂和减少能源消耗。Drouet 等^[28] 采用超声波辅助提取法对水飞蓟素进行提取研究。结果发现, 获得的水飞蓟素得率约为传统浸渍法提取效果的 6 倍, 且水飞蓟素中的 6 个主要化合物的含量也明显提高。同时, 该方法获得的水飞蓟素仍具有显著的抗氧化和抗衰老作

用, 提示超声波辅助提取法或许可以成为一种更环保的水飞蓟素提取方法。

值得注意的是, 近年来有研究者指出超声波辅助提取的频率和功率可能会对一些活性化合物产生影响^[29], 这可能与低频率提取过程中产生的自由基有关^[30], 但当以甲醇为溶剂时可以削弱自由基的产生^[31]。Liao 等^[32]发现, 当超声频率从 20 kHz 提高到 45 kHz 时, 提取得到的黄酮含量最多, 但当超声频率太高(超过 60 kHz)时其提取率会明显降低, 这可能与减弱的空化效应有关。当超声能量过高时也可产生类似的影响, 使药材局部产生温度和压力, 从而不利于有效成分的提取^[31]。

1.2.4 微波辅助提取法 基于离子传导和偶极子旋转机制, 微波通过与极性分子(水分子或药材中化合物分子)相互作用而产热。在微波辅助提取法(microwave assisted extraction)中, 热量传递和质量传递的方向是一致的, 这两种作用同时加速了提取过程, 从而提高提取效率。微波辅助提取法具有可缩短提取时间、减少有机溶剂使用量、避免对提取成分产生热降解和对药材选择性加热的特点, 也被认为是一种环保的提取方法。一般分为无溶剂提取法(一般适用于不稳定化合物)和有溶剂提取法(一般适用于稳定化合物)。与索氏提取法相比, Alara 等^[33]采用 60% 乙醇水作为溶剂, 通过微波辅助提取法获得的扁桃斑鸠菊叶提取物中总酚和总黄酮的含量更高, 分别为 $(114.03 \pm 1.25) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (没食子酸当量) 和 $(96.29 \pm 1.70) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (槲皮素当量), 相应地也具有更好的抗氧化活性。

1.2.5 脉冲电场辅助提取法 脉冲电场辅助提取法(pulsed electric field extraction)通过破坏细胞膜结构来促进物质转移, 能有效缩短提取时间、提升提取效率。该方法是一个非加热的提取方法, 因而适用于热不稳定物质的提取。该方法主要受电场强度、输入比能量和脉冲数等因素的影响。为了比较脉冲电场辅助提取法与传统提取法的效果, Lakka 等^[34]利用脉冲电场辅助提取法对药用植物番红花、酿酒葡萄和一种毒马草属植物进行提取, 并分别对提取条件进行优化, 分别获得最大的总酚提取率。结果发现, 当脉冲电压为 $12 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 时, 番红花和毒马

草属植物的提取物中总酚含量比用传统提取法时分别提高了 35.25% 和 44.36%, 其中番红花提取物中紫云英苷的含量提高了 64%, 毒马草植物提取物中芹苷元-7-葡萄糖苷含量提高了 56%。当脉冲电压为 $14 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 时, 酿酒葡萄提取物中总酚含量比用传统提取法时提高了 49.15%, 其中芦丁的含量提高了 85%。

1.2.6 酶辅助提取法 细胞膜和细胞壁的结构、多糖和蛋白质等大分子所形成的胶束以及蛋白质在高温下的凝聚和变性是天然产物提取的主要障碍。由于酶对细胞壁和细胞膜成分以及细胞内大分子的水解作用可促进天然产物的释放, 因此利用酶可辅助提高提取效率。纤维素酶、 α -淀粉酶和果胶酶是酶辅助提取法(enzyme assisted extraction)中比较常用的几种酶。中药内生菌被证实可能与宿主产生相同的次级代谢产物。Ma 等^[35]从中药黄芩中分离得到一株能产生黄芩苷的短小芽孢杆菌, 向黄芩内生菌发酵液中加入该内生菌的特定纤维素酶辅助提取。结果发现, 用该方法提取的黄芩苷含量比通过索氏提取法获得的黄芩苷含量增加了 79.31%, 提示酶辅助提取法可能对中药活性成分的提取富集具有高选择性。Nguyen 等^[36]发现纤维素酶 A 能促进迷迭香叶中迷迭香酸的溶出, 提高提取效率。

1.3 其他新型提取方法

由于天然产物的复杂性, 一些新型的提取方法也不断地被开发出来, 如闪式提取法, 以期获得更高效、更环保的效果。闪式提取法又被称为组织破碎提取法, 是通过高速机械剪刀和超分子渗滤技术, 瞬间将药材破碎成细微颗粒, 以促进组织内部成分的溶出。Xu 等^[37]结合闪式提取法, 最终从山参中分离鉴定出 23 个人参皂苷类化合物, 其中三七皂苷 R₁ 为第一次从山参中分离得到。

此外, 越来越多的研究表明将多种提取方法结合使用可能会提高天然产物的提取效率, 并且可克服采用单一方法时的局限性^[38-39]。另外, 将一些特殊的材料用来辅助提取时还可使提取过程更加环保。如选择含有 30% 水, 以丙二醇为氢键供体、氯化胆碱为氢键受体(摩尔比为 1:1)的深共晶溶剂, 通过超声辅助提取能最大程度地获得鹰嘴豆中的异黄

酮成分^[40]。

2 天然产物的分离

经不同提取方法得到的粗提物所含的化学成分往往比较复杂, 需要经过进一步的分离纯化后才能得到纯度较高或单一的天然产物。而分离方法的选择则取决于目标成分和其他类型天然产物间的物理或化学性质的差异。分离方法根据不同的分类标准主要有以下几种。

2.1 吸附柱色谱法

吸附柱色谱法根据天然产物对表面吸附剂亲和度的不同而进行分离, 由于其操作简单、容量大、成本低等优点, 被广泛应用于天然产物的分离, 特别是在分离的初期阶段。为了实现天然产物的良好分离, 并最大限度地回收目标化合物, 以及避免目标化合物在吸附剂上的不可逆吸附, 固定相和流动相的选择至关重要。

2.1.1 硅胶 硅胶是天然产物化学研究中应用最为广泛的吸附剂。据估计, 近 90% 的天然产物的化学分离是通过硅胶而实现。硅胶是一种富含硅醇基团的极性吸附剂, 目标分子通过氢键和偶极-偶极相互作用而被硅胶吸附保留。因此, 极性天然产物在硅胶柱中的保留时间比非极性天然产物长。Cao 等^[41] 采用硅胶柱层析, 以石油醚-乙酸乙酯为流动相洗脱, 并结合高效逆流色谱, 从椿叶花椒的石油醚部位中分离得到了 4 个具有抗肿瘤活性的化合物 xanthyletin、hinokinin、luvangetin 和 asarinin。Tang 等^[42] 采用有机溶剂回流提取法从桑叶中获得白藜芦醇的粗提物, 以氯仿-甲醇 (10:1) 为洗脱剂, 经硅胶柱色谱纯化, 将白藜芦醇的纯度从 0.8% 提高到 99.3%。Jiang 等^[43] 研究土壤源真菌 *Clonostachys rosea* YRS-06 的化学成分, 分离过程分别以二氯甲烷-甲醇、石油醚-丙酮、二氯甲烷-丙酮、二氯甲烷-乙酸乙酯等为流动相, 将乙酸乙酯萃取部位及其各亚馏分经反复硅胶柱色谱分离纯化, 并结合其他方法, 最终分离了 9 个生物碱, 包括 2 个新颖的 2,5-二酮哌嗪类生物碱 clonorosin A 和 clonorosin B。在硅胶上分离生物碱时可能会出现严重的拖尾效应, 可通过添加少量氨或三乙胺等有机胺减少拖尾现象。

刘为等^[44] 采用硅胶柱层析法, 以石油醚-二乙胺或石油醚-乙酸乙酯-二乙胺为流动相, 从丽江乌头根中分离得到 11 个二萜生物碱, 包括 1 个新生物碱 8-*O*-methyl-14-*O*-anisoylchasanine。

2.1.2 氧化铝 氧化铝是一种强极性吸附剂, 适合生物碱类天然产物的分离。由于 Al^{3+} 的强正电场和氧化铝中的碱性位点对极性化合物的影响, 目标分子在氧化铝上的吸附作用不同于在硅胶上的吸附作用。陈佩佩^[45] 比较了正相碱性氧化铝、硅胶以及反相 C18 同时分离纯度为 18% 的紫杉醇样品的柱性能, 结果发现最终得到的紫杉醇纯度依次为 79%、30% 和 90%。在正相柱层析中, 碱性氧化铝的分离纯化效果较好。因氧化铝在分离过程中可使化合物催化脱氢、分解或异构化, 近年来在天然产物分离中的应用明显减少。有学者报道了使用碱性氧化铝从东北红豆杉愈伤组织培养物中分离紫杉醇的方法, 发现紫杉醇的回收率超过 160%, 其原因为氧化铝催化 7-*epi*-紫杉醇产生了异构化。另外, 在氧化铝柱层析中, 少量的紫杉醇还可以被分解为 baccatin III 和 10-deacetylbaccatin III^[46]。

2.1.3 聚酰胺 采用不同种类流动相时, 聚酰胺柱层析过程中会发生疏水基和 / 或氢键相互作用。聚酰胺柱层析是分离蒽醌类、酚酸类、黄酮类等天然多酚类物质的常用方法, 其机制为聚酰胺吸附剂、流动相和化合物之间形成氢键。李传厚等^[47] 将小花鬼针草 80% 乙醇提取物的乙酸乙酯部位经硅胶柱分离后, 将得到的亚馏分经聚酰胺柱分离, 二氯甲烷-甲醇梯度洗脱, 结合凝胶柱色谱和高效制备液相色谱, 从该植物中发现了 1 个新的聚炔类化合物和 1 个新的异烟酸葡萄糖酯苷类化合物。另外, 聚酰胺也可用于生物碱类成分的分离, Jin 等^[48] 建立了用以乙酸乙酯-甲醇为流动相的聚酰胺柱色谱分离儿茶酚胺异喹啉生物碱的方法, 从药用植物马齿苋中分离出 10 个水溶性儿茶酚胺异喹啉生物碱, 包括 3 个新化合物。

2.1.4 大孔吸附树脂 大孔吸附树脂是具有大孔结构但没有离子交换基的聚合物吸附剂, 可以选择性地吸附几乎任何类型的天然产物。其优势包括高吸附能力、相对低成本、易再生和易于放大, 已被广泛应用于预处理过程的一部分, 用于去除杂质或富集

目标化合物。大孔吸附树脂与天然产物之间静电力的作用大小及其比表面积、孔径、极性是影响树脂性能的关键因素^[49]。热毒宁注射液处方由金银花、栀子和青蒿三味中药组成, 将热毒宁注射液浓缩物经 HP-20 大孔树脂分离, 分别用水、30% 和 95% 乙醇水洗脱得到 A、B、C 3 个馏分, C 馏分进一步经硅胶柱色谱和高效制备液相色谱分离纯化, 得到 2 个新的萜类成分^[50]。中药草乌中含有大量的二萜生物碱, 其中 aconitine、mesaconitine、hypoaconitine、benzoylaconine、benzoylmesaconitine 和 benzoylhypoaconitine 是其主要的药效成分和毒性成分。有学者研究了大孔树脂分离纯化上述 6 种生物碱的方法, 进一步比较了 7 种型号大孔树脂 (NKA-II、D101、X-5、AB-8、S-8、HPD722 和 HPD750) 的富集和纯化效果, 并考察了样品溶液的 pH 值、样品初始浓度、洗脱剂乙醇-水的比例和 pH 值等因素对树脂吸附和解吸性能的影响。最终发现, 样品溶液的 pH 值、洗脱剂乙醇-水的比例和 pH 值为大孔树脂吸附和解吸率的主要影响因素, pH 值为 2 的乙醇-水 (95:5) 溶液为最佳的解吸溶液, NKA-II 型大孔树脂在最佳 pH 值下具有最高的吸附和解吸能力。通过 NKA-II 型大孔树脂柱分离纯化, 6 种生物碱的纯度可提高到 60.3%, 回收率为 75.8%^[51]。有学者认为, 大孔树脂对多酚类成分的吸附机制主要是树脂醚键的氧原子与酚羟基的氢原子之间形成氢键, 溶液的 pH 值对氢键相互作用力有显著影响^[52-53]。

2.2 基于分配系数的分离

2.2.1 分配色谱法 分配色谱法 (partition chromatography) 是根据天然产物在 2 种不混溶液体中的相对溶解度的不同, 对目标分子进行分离的一种方法, 其遵循液-液萃取原理。在早期, 将一种液体作为固定相涂布在固体基质 (硅胶、碳和纤维素等) 上, 另一种液体则用作流动相, 固定相容易脱落和重复性差的缺点导致该分配色谱法目前使用较少。而键合固定相法则克服了上述缺点, 在键合固定相中, 液体固定相通过化学键键合到惰性载体上, 用作固定相。市售的烷基, 如 C8、C18、芳基、氰基和氨基取代的硅烷常被用作键合相, 广泛用于分离各类天然产物, 尤其是在最终纯化的步骤中。使用甲醇-

水 (78:22) 系统作为流动相, 2 个新骨架倍半萜 curcumane A 和 curcumane B 在 C18 键合硅胶色谱柱上实现了很好的分离^[54]。Cai 等^[55] 合成了一种新型的基于聚丙烯酰胺的二氧化硅固定相, 并以乙醇-水为流动相, 成功对半夏半乳糖低聚糖和皂苷类成分进行了分离。环亚麻肽 (linusorbs) 是一组源自亚麻籽油的环状疏水肽, 具有良好的保健效果, 但由于该类物质的分离纯化和结构鉴定比较困难, 限制了其研究和应用。Liu 等^[56] 将环亚麻肽粗提物通过苯基-己基键合相硅胶色谱柱进行分离, 以乙腈-水 (40:60) 至乙腈-水 (80:20) 梯度洗脱, 洗脱时间 21 min, 流速 $16 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 通过离线 MS/MS 验证获得 12 种环亚麻肽, 纯度超过 95.5%。

2.2.2 逆流色谱 逆流色谱 (counter-current chromatography) 是通过重力或离心力保持液相固定相的分配色谱。与使用固态固定相的常规柱分离方法相比, 流体静力和流体动力逆流色谱法均具有一些优势, 包括消除不可逆的吸附和峰拖尾, 高载量、样品回收率高、样品变性风险小、溶剂消耗少等优势^[57]。而逆流色谱的局限性在于其仅适用于相对较窄极性范围内的化合物的分离。在过去的 20 年, 高速逆流色谱 (high speed counter-current chromatography)、高效逆流色谱 (high performance counter-current chromatography) 和离心分配色谱 (centrifugal partition chromatography) 在分离科学研究领域引起了极大的关注, 并已广泛应用于天然产物的分离中。Wang 等^[58] 开发了一种使用两相溶剂系统 (包括乙酸乙酯-正丁醇-乙醇-水, 5:2:5:2, 6:1:6:1.2) 的高速逆流色谱方法, 从东南亚植物革秘里中分离出 5 个新的聚炔类天然产物 longifolione A~E, 其中 longifolione D 和 longifolione E 为新化合物。挥发油很难通过常规柱色谱法进行分离, 高速逆流色谱、高效逆流色谱和离心分配色谱也已成功地应用于挥发油的分离。运用高速逆流色谱法, 使用正己烷-乙酸乙酯-甲醇-水 (7:3:5:5)、正己烷-甲醇-水 (3:2:1) 和正己烷-氯仿-乙腈 (6:2:5) 组成的 3 种不同溶剂系统, 对 600 μL (350 mg) 生姜挥发油中的天然产物进行分离, 最终得到 35 mg 的 6-gingerol、23 mg 的 zingerone 和 105 mg 的倍半萜混合物, 其纯度依次

是 98.6%、99.4% 和 99.2%^[59]。使用两相溶剂系统(包括正庚烷-丁醇乙酸乙酯-甲醇-水, 5:2:5:2)的离心分配色谱法, 并结合凝胶柱色谱和硅胶柱色谱法对洋甘菊挥发油进行分离纯化, 共得到 9 个化合物^[60]。

2.3 基于分子大小的分离

目前, 基于分子大小分离天然产物的方法主要为膜分离法和凝胶色谱法。

2.3.1 膜分离 膜分离(membrane filtration)利用混合物中化合物分子大小不同, 小分子物质在溶液中可通过半透膜, 而大分子物质不能通过半透膜的性质, 对混合物进行分离。膜分离法根据所用膜孔径(微滤、超滤和纳滤)的大小可对不同分子大小的天然产物进行分离, 已广泛用于食品和制药行业中。当单一的膜分离效果不理想时可以采用耦合膜分离。魏涵伟^[61]采用 PALL Minimate 超滤系统和 Omega 改性聚醚砜超滤膜对玉米胚芽多肽进行了超滤分级分离优化实验。根据玉米胚芽多肽的相对分子质量大小及超滤膜包的选用原则, 选择截留相对分子质量分别为 10 000、5 000 和 1 000 的超滤膜包, 最终分离纯化得到 4 个玉米多肽组分, 分别为 ZF1 (ZF1 > 10 000)、ZF2 (5 000 < ZF2 < 10 000)、ZF3 (1 000 < ZF3 < 5 000) 和 ZF4 (ZF4 < 1 000)。布拉氏酵母菌(*Saccharomyces boulardii*)用于抗菌肽的生产, 有关学者报道了一种结合凝胶 G50 柱色谱和超滤多孔透析膜(截留相对分子质量为 10 000)从布拉氏酵母菌提取物中分离纯化抗菌肽的方法, 该抗菌肽的相对分子质量为 5 792^[62]。

2.3.2 凝胶过滤色谱 凝胶过滤色谱(gel filtration chromatography)也称为凝胶渗透色谱法或尺寸排阻色谱法, 小分子化合物在凝胶过滤色谱上的保留时间比大分子化合物久。

葡聚糖凝胶(Sephadex)由葡聚糖和甘油基醚键交联而成, G 型 Sephadex 可用于分离亲水性化合物, 如肽^[62]、寡糖和多糖^[63]。Sephadex LH-20 为一种 Sephadex G25 的羟丙基化衍生物, 兼具亲水性和疏水性。Sephadex LH-20 的分离原理除按照相对分子质量大小, 同时还可根据吸附作用对化合物进行分离。Sephadex LH-20 可用于在含水或不含水的洗脱

剂体系中分离多种不同类型的天然产物。Liu 等^[64]采用 Sephadex LH-20, 以甲醇-水(75:25)体系和二氯甲烷-甲醇(1:1)体系对益母草的正丁醇部位进行反复分离, 并结合硅胶薄层制备色谱和反相 C18 色谱, 最终分离纯化得到 4 个环肽、9 个生物碱和 3 个黄酮苷, 其中包含 2 个新的环肽。莪术中富含倍半萜类成分, 将莪术乙醇提取物的乙酸乙酯部位经硅胶柱色谱进行初步分离后, 再经 Sephadex LH-20, 以二氯甲烷-甲醇(1:1)或石油醚-二氯甲烷-甲醇(5:5:1)洗脱, 结合中压液相色谱和高效液相色谱进行分离纯化, 从莪术中分离鉴定出 7 对新的倍半萜对映异构体 (+)/(-)-phaeocaulines A-G^[65]。此外, 聚丙烯酰胺凝胶(商品名: bio-gel P)^[66]和交联琼脂糖凝胶^[67]也常被用于天然产物的分离。

2.4 基于离子强度的分离

离子交换色谱(ion-exchange chromatography)是基于化合物的净表面电荷差异进行分离的方法。一些天然产物, 如生物碱和有机酸, 其结构中含有能够电离的官能团, 可以通过离子交换色谱进行分离。通过改变流动相的离子强度, 如改变 pH 值或盐溶液的浓度, 带电分子可以被离子交换树脂捕获和释放。阳离子交换树脂适用于生物碱的分离, 阴离子交换树脂适用于有机酸和酚类物质的分离。核苷酸结构中含有 3 个高度极性的基团, 磷酸基、核碱基和糖取代基。Jiang 等^[68]通过离子交换色谱, 结合超滤、凝胶过滤色谱和反相高效液相色谱分离, 离子阱串联质谱法分析, 从大豆蛋白水解物中鉴定出 2 种三肽化合物 Gly-Ser-Arg 和 Glu-Ala-Lys。

2.5 其他现代分离技术

2.5.1 分子蒸馏 分子蒸馏(molecular distillation)是一种在远低于化合物沸腾温度的真空条件下, 通过蒸馏法分离化合物的方法, 适用于具有热敏性和高相对分子质量的化合物的分离。

藻油中富含二十二碳六烯酸(DHA), 为增加其含量, He 等^[69]开发了一种结合使用 1, 3-特异性固定化脂肪酶进行乙醇分解和分子蒸馏, 从而富集藻油中的 DHA 的方法。将含有 45.94% DHA 的藻油与乙醇混合后, 泵入固定化脂肪酶(Lipozyme® TL IM)填充的色谱柱, 室温下循环 4 h, 真空蒸馏

回收乙醇。当蒸馏温度达到 150℃时, 残留物分离为 3 个组分, 分别为富含 DHA 甘油酯的高相对分子质量组分 [三酰甘油 (TG)、二酰甘油 (DG) 和单酰甘油酯 (MG)]、低相对分子质量组分 [棕榈酸 (PA)] 和 DHA 乙酯 (EE)。结果表明, 76.55% 藻油中的 DHA 主要存在于高相对分子质量组分中, 其含量为 70.27%。

2.5.2 制备型高效液相色谱 制备型高效液相色谱是目前天然产物分离纯化领域应用最广泛的, 发展最快速的分离纯化技术, 具有载样量大、分离度高、重现性好等优点, 反相制备型高效液相色谱是目前实际生产和科研事业中的主流技术, 其固定相一般为 C8、C18、芳基、氰基和氨基键合硅胶; 流动相一般为甲醇-水或乙腈-水, 可依据化合物的本身性质在流动相中添加酸、碱、缓冲盐, 改善其色谱行为, 得到分离度良好的色谱峰; 常用的检测器为紫外检测器。

2.5.2.1 反相制备型高效液相色谱 Li 等^[70]以生物活性为导向, 结合高效液相色谱对链霉菌发酵液中的抗真菌类化学成分群进行定位以及分离纯化。通过考察带正电荷的 C18、带负电的 C18 和 C8 的分离性能, 发现几种固定相交替使用时分离性能最佳, 因此, 首先使用带正电荷的 C18 色谱柱将链霉菌发酵液提取物分离为几个粗馏分, 后将几个粗馏分进行抗真菌活性测试, 选择具有抗真菌活性的馏分交替使用带负电荷的 C18 色谱柱和 C8 柱进行分离纯化, 最终从链霉菌发酵液分离鉴定出 4 个具有抗真菌活性的化合物——polyoxins A、K、F 和 H。Chen 等^[71]对粗茎鳞毛蕨的化学成分进行了研究, 粗茎鳞毛蕨的干燥根茎用 95% 乙醇提取后, 提取物用石油醚萃取, 将石油醚部位经硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、中压柱色谱进行初步分离得到粗馏分, 进一步将各馏分经制备型高效液相色谱, 以 C18 色谱柱 (5 μm, 20×250 mm) 为固定相, 乙腈-甲酸水为流动相进行分离, 最终从粗茎鳞毛蕨中分离鉴定出 5 种 β-生育酚衍生物 drycrasspherols A-E, 其中 drycrasspherols C 和 drycrasspherols D 为新骨架化合物, drycrasspherols E 为 β-生育酚衍生物的二聚体化合物。

2.5.2.2 正相制备型高效液相色谱 正相高效液相色谱虽然应用较少, 但是由于挥发油以及一些弱

极性化合物在含水的反相流动相中难溶或不溶, 正相制备型高效液相色谱在挥发油以及一些弱极性化合物的分离纯化过程中具有一定的优势, Zhou 等^[72]对广藿香挥发油进行了研究, 首先通过硅胶、中压柱色谱、凝胶柱色谱对其进行初步分离, 对得到的粗馏分通过正相制备型高效液相色谱, 固定相为半制备硅胶色谱柱, 流动相为正己烷-异丙醇 (100:1), 从广藿香挥发油中发现了 2 个新的倍半萜类成分。

2.5.2.3 手性分离高效液相色谱 对于化学组成、物理性质和分子结构相同的化合物, 不同的构型可能会导致其截然不同的生物活性/毒性, 且目前使用的药物大部分具有手性性质, 所以对映体分离一直是药品质量控制的重要保障手段之一。但由于不同构型对映体仅表现出不同的旋光性, 所以对映体分离也是色谱分析中的难点之一。高效液相色谱法、超临界流体色谱和逆流色谱法等是实现手性分离 (chiral separation) 的重要技术^[73-75]。高效液相色谱法由于具有高灵敏度和高重现性的特点, 现已被广泛用于对映体的分离和测定。一般来说, 手性环境是分离对映体的必要条件, 所以选择具有手性选择性识别特性的固定相是关键, 目前常用的手性固定相包括环多糖、糊精、杯芳烃和冠醚等^[75-77], 同时, 一些新类型的固定相也在被探索应用^[78-79]。Meng 等^[80]利用纤维素类手性柱 Lux[®] Cellulose-3 (5 μm), 从篦子山尖杉枝中分离得到 2 对新的去甲木质素糖苷异构体。另外, 流动相中盐的种类和含量、pH、添加的有机改性剂等也是导致分离效果差异的几个重要因素^[79]。Zhou 等^[81]利用 Daicel Chiralpak AD-H 手性色谱柱, 分别控制流动相的比例、流速 2 个条件, 从红莓中分离得到 4 对苯丙烷类对映体。

2.5.2.4 亲水相互作用高效液相色谱 传统反向液相色谱分离需要通过高比例水相才能提高对目标化合物的保留时间, 但高比例的水相可能会导致固定相的反浸润, 且对某些强极性的亲水性化合物仍保留较弱或无保留。亲水相互作用液相色谱 (hydrophilic interaction liquid chromatography), 又被称为“含水正相色谱”, 采用强极性固定相, 且能适用于水或缓冲液/有机物的流动相, 因而能弥补正相和反相色谱的不足, 对大极性的水溶性化

合物有很好的分离效果, 例如酚类、糖类、黄酮类等。苯胺、苏丹红等 6 种酚类物质因与酰胺包埋的二氧化硅固定相之间保留作用的大小不同而达到分离^[82]。另外, 流动相的 pH 值、缓冲液浓度等条件也是影响化合物在亲水相互作用液相色谱中分离效果的重要因素。向乙腈-水流动相中加入 0.8% 甲酸和 30 mmol·L⁻¹ 甲酸铵, 可以有效改善灵芝多糖酸水解产物的拖尾峰型, 提高分离效率和检测灵敏度; 能快速鉴别不同产地的灵芝单糖和寡糖组成及含量, 有利于灵芝的质量控制^[83]。Abdulrahman 等^[84] 使用 ZIC-HILIC 柱对红茶和绿茶中的非瑟酮进行分离, 并且评估了流动相对其分离效果的影响, 确认 85% 乙腈和 30 mmol·L⁻¹ (pH 5) 的醋酸钠缓冲液对非瑟酮有最好的分离效果。该方法能快速有效地对红茶和绿茶中的非瑟酮进行含量测定。

2.5.3 制备型气相色谱 气相色谱具有分离度高、分析和分离速度快的特点, 是挥发性化合物分离的理想制备方法。由于目前缺乏商业性的制备型气相色谱 (preparative gas chromatography, Pre-Gc), 普通气相色谱仪的进样口、色谱柱、分流装置、收集系统需通过改进来达到高效分离制备目标化合物的目的^[85]。有学者报道了对土耳其植物 *Prangos heyniae* H.Duman & M.F.Watson 挥发油的化学成分研究, GC-MS 和 GC-FID (火焰离子化检测器) 分析结果表明, 该植物挥发油中富含倍半萜类成分, 包括 germacrene D (10.3%~12.1%)、 β -bisabolene (14.4%)、kessane (26.9%)、germacrene B (8.2%)、elemol (3.4%~46.9%)、 β -bisabolonal (14%~70.7%)、 β -bisabolanol (8.4%) 和 1 个桉烷型倍半萜 (16.1%)。进一步使用制备型毛细管气相色谱, 从该植物中分离纯化了 1 个新的桉烷型倍半萜 3, 7(11)-eudesma-dien-2-one^[86]。制备型气相色谱也可用于天然异构体的分离。蜘蛛的前额腺分泌物中主要含有 4-hydroxy-5-octyl-4,5-dihydro-3H-furan-2-one 的 2 个异构体化合物, 为确定其构型, Raspotnig 等^[87] 通过化学结构修饰获得了 4-hydroxy-5-octyl-4,5-dihydro-3H-furan-2-one 的 4 个异构体衍生物, 并通过手性气相色谱分离纯化, 通过比对, 发现分泌物中 2 个异构体的构型为 (4*S*,5*R*)-100 (含

量 90%) 和 (4*S*,5*S*)-100 (含量 10%)。目前, 制备型气相色谱也存在一些缺点, 如缺乏商用设备、需消耗大量载气、操作温度高、馏分萃取困难和产量低等, 因此其应用仍然受到限制。

2.5.4 超临界流体色谱 超临界流体色谱 (supercritical fluid chromatography) 以超临界流体作为流动相。超临界流体具有高溶解力、高扩散性和低黏度的特性, 因此兼具气相色谱和液相色谱的优点, 可实现快速、有效的分离。在超临界流体色谱中广泛使用的流动相 (超临界二氧化碳) 的极性与正己烷接近, 因此一般适用于非极性化合物的分离, 如脂肪酸、萜类和挥发油。通过在流动相中添加极性改性剂 (如甲醇和乙腈), 可以拓展超临界流体色谱在极性天然产物分离中的应用^[88-90]。Zhang 等^[91] 利用半制备超临界流体色谱法, 采用 YMC-Pack NH₂ 半制备柱 (250 mm×10.0 mm, 5 μ m) 分离, 以超临界二氧化碳-乙醇 (97:3) 为流动相, 从刺槐乙醇提取物中分离纯化获得了欧前胡素和蛇床子素。

2.5.5 分子印迹技术 近十年来, 分子印迹技术 (molecular imprinted technology) 因其高选择性、低成本和易于制备的独特性质, 引起了越来越多天然产物研究领域学者的关注。其原理为当洗脱分子印迹聚合物 (molecular imprinted polymer) 将内部的模板分子除去后, 聚合物内部就留下许多与模板分子形状、大小和官能团相互匹配的印迹空穴。因此, 模板分子及其衍生物对于分子印迹聚合物具有特异性识别和选择性吸附的作用。目前, 分子印迹聚合物已广泛应用于天然产物的分离或作为固相萃取吸附剂用于植物样品的制备。Liu 等^[92] 以咖啡酸为模板分子、丙烯酰胺为功能单体, 从甘川铁线莲提取物中富集咖啡酸及其类似物 (200 mg), 结合高速逆流色谱法从中纯化得到 3 个咖啡酸类似物, 包括咖啡酸 (26.30 mg)、香豆酸 (84.20 mg) 和阿魏酸 (44.40 mg)。Özcan 等^[93] 使用甲基丙烯酰胺基安替普林-铁 (III) 金属螯合物制备橄榄苦苷的印迹聚合物, 最后从 1 g 橄榄叶提取物中分离纯化出 24.2 mg 的橄榄苦苷。该印迹聚合物具有可以选择性吸附、吸附量大 (可达 140 mg·g⁻¹) 和可重复利用 (至少 10 次) 的优点。Ma 等^[94] 以苦参碱和氧

化苦参碱为模板分子, 制备了可特异性识别苦参碱型生物碱的双模板分子印迹聚合物, 开发了一种基于双模板分子印迹固相萃取结合高效液相色谱和串联质谱的方法, 并从青藏高原产苦参中提取和纯化得到了苦参碱、氧化苦参碱和槐果碱。

2.5.6 模拟移动床色谱 模拟移动床色谱 (simulated moving bed) 使用多根串联的色谱柱作为固定相 (床), 通过旋转阀门模拟固定相与流动相的逆流流动。模拟移动床色谱工作过程中, 每隔一段固定的时间, 4 个外部的进出口 (feed、extract、raffinate 和 desorbent) 同时向流动相的流动方向切换一个位置, 从而实现固定相与流动相的模拟逆流移动。模拟移动床色谱溶剂消耗量低、分离速度快, 是一种适合于大规模天然产物连续分离的方法。近年来, 已经开发出可用于精制阶段的模拟移动床等新技术, 以连续高纯度地分离糖苷^[95]。Wen 等^[96]开发了一种使用模拟移动床色谱法分离黑果腺肋花楸果中花青素的方法, 将黑果腺肋花楸果提取物超声溶解于含 1% 乙酸的 25% 乙醇溶液中, 浓度为 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 使用配备 8 根 C18 色谱柱 ($150 \times 10 \text{ mm}$, $30 \mu\text{m}$) 的模拟移动床色谱分离 (4 个区域的色谱柱配比为 2/2/2/2), 以含 1% 乙酸的 25% 乙醇为流动相洗脱, 最终将花青素提纯至 85%。通过 UPLC-QTOF-MS 技术, 确定花青素 3-O-半乳糖苷和花青素 3-O-阿拉伯糖苷为其主要成分。

2.5.7 多维色谱分离 天然产物提取物中的成分相当复杂, 通常通过一次柱色谱的分离很难获得单一的化合物。多维色谱分离技术通过固相萃取技术和多根不同固定相色谱柱的联用, 大大提高了分离效率。目前, 越来越多的多维分离设备已实现了商业化, 天然产物分离正逐渐变得更加的快速、高效和自动化。有学者报道了一种利用增强全自动二维液相色谱技术, 从大豆粉中分离亲水性蛋白质的方法。通过使用 2 个多端口切换阀将第一维色谱柱与第二维色谱柱实现在线连接, 第一维色谱柱为尺寸排

阻色谱柱 MabPac SEC-1 ($150 \times 4.6 \text{ mm}$) + Security Guard Cartridge (GFC-2000, $4 \times 3.0 \text{ mm}$), 连接在左侧泵上; 第二维色谱柱为 Aeris wide-pore XB-C18 column ($150 \times 4.6 \text{ mm}$) + security guard column (ULTRA Cartridges UHPLC WIDEPOR C18), 连接在右侧泵上。左侧 10 通切换阀上连接有一根 C4 色谱柱 ($50 \times 4.6 \text{ mm}$), 用于捕集第一维色谱的分离馏分。整个工作流程中包含 1 个捕集器清洗脱盐步骤, 从第一根色谱柱的洗脱液中去缓冲液残留物, 并提高第二根色谱柱的色谱性能, 从而克服了第一维和第二维色谱的溶剂、洗脱液成分和 pH 值不相容的问题^[97]。还有学者报道了一种使用高效薄层色谱联合高效液相色谱-二极管阵列检测-高分辨质谱 (HPTLC-UV/Vis/FLD-HPLC-DAD-ESI-MS) 技术, 共同分离和表征柠檬香蜂草中一对三萜异构体熊果酸和齐墩果酸的方法^[98]。

3 结语与展望

天然产物提取分离技术研究, 对于发现新的天然化合物, 以及新药研发、农药、食品、有机化学、生物学和药理学的发展均有很大的促进作用。天然产物提取技术种类繁多, 各有特点, 而现代提取技术由于具有溶剂消耗少、提取时间短、提取效率高等特点, 已经引起越来越多的关注。然而, 设备投资大等缺点, 使得其主要用于质量控制领域, 目前以分离为目的的提取方法依然以传统方法为主, 如回流法等。近年来, 随着大量新型分离材料的不断涌现, 越来越多的新骨架天然产物被发现。但由于提取物中化学成分复杂、单体成分含量低以及天然产物分离过程耗时长、效率低等问题, 天然产物的分离仍是限制天然产物实现高通量活性筛选的瓶颈问题。因此, 新分离技术、新分离材料 (如新型手性分离材料) 的开发以及多种分离技术的联用和自动化分离技术的运用, 将为提升天然产物的分离效率提供极大的帮助。

【参考文献】

- [1] Du G, Zhao H, Song Y, et al. Rapid simultaneous determination of isoflavones in *Radix puerariae* using high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with novel shell-type column[J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(19): 2576-2585.

- [2] Yi Y, Zhang Q W, Li S L, *et al.* Simultaneous quantification of major flavonoids in “Bawanghua”, the edible flower of *Hylocereus undatus* using pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography[J]. *Food Chem*, 2012, 135(2): 528–533.
- [3] Zhou Y Q, Zhang Q W, Li S L, *et al.* Quality evaluation of *Semen oroxyli* through simultaneous quantification of 13 components by high performance liquid chromatography[J]. *Curr Pharm Anal*, 2012, 8(2): 206–213.
- [4] Li P, Yin Z Q, Li S L, *et al.* Simultaneous determination of eight flavonoids and pogostone in *Pogostemon cablin* by high performance liquid chromatography[J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2014, 37(12): 1771–1184.
- [5] Zhang Q W, Lin L G, Ye W C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review[J]. *Chin Med*, 2018, 13: 20. DOI:10.1186/s13020-018-0177-x.
- [6] Li J, Wu J, Wang X. Influence of 80-mesh traditional Chinese medicine particle stack thickness on percolation performance[J]. *J Phys Conf Ser*, 2021, 1732: 012011. DOI:10.1088/1742-6596/1732/1/012011.
- [7] Li J, Wu J, Wang X. Research on performance of a new-type percolation equipment used to extract effective medicine components[J]. *J Phys Conf Ser*, 2021, 1732: 012162. DOI:10.1088/1742-6596/1732/1/012162.
- [8] Yang S Y, Zhao Y M, Li Z L, *et al.* Flavonoids from flowers of *Abelmoschus manihot*[J]. *Chem Nat Compd*, 2018, 54(2): 257–260.
- [9] Zhao X, Wang D, Qin L, *et al.* Comparative investigation for hypoglycemic effects of polysaccharides from four substitutes of *Lonicera japonica* in Chinese medicine[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 109: 12–20.
- [10] Zhang C Q, Chen X, Ding K. Structural characterization of a galactan from *Dioscorea opposita* Thunb. and its bioactivity on selected bacteroides strains from human gut microbiota[J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 218: 299–306.
- [11] Li S L, Lai S F, Song J Z, *et al.* Decocting-induced chemical transformations and global quality of Du-Shen-Tang, the decoction of ginseng evaluated by UPLC-Q-TOF-MS/MS based chemical profiling approach[J]. *J Pharm Biomed*, 2010, 53(4): 946–957.
- [12] Chen L Y, Hu A R, Chang C J. The degradation mechanism of toxic atractyloside in herbal medicines by decoction[J]. *Molecules*, 2013, 18(2): 2018–2028.
- [13] 霍志鹏, 王玉, 张兰兰, 等. 黄连-大黄合煎蒽醌类成分溶出变化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(3): 1–4.
- [14] Kim J H, Shin H K, Seo C S. Chemical interaction between *Paeonia lactiflora* and *Glycyrrhiza uralensis*, the components of Jakyakgamcho-tang, using a validated high-performance liquid chromatography method: herbal combination and chemical interaction in a decoction[J]. *J Sep Sci*, 2014, 37(19): 2704–2715.
- [15] Kim J H, Ha W R, Park J H, *et al.* Influence of herbal combinations on the extraction efficiencies of chemical compounds from *Cinnamomum cassia*, *Paeonia lactiflora*, and *Glycyrrhiza uralensis*, the herbal components of Gyejei-tang, evaluated by HPLC method[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 129: 50–59.
- [16] Hu Y, Cui X, Zhang Z, *et al.* Optimisation of ethanol-reflux extraction of saponins from steamed *Panax notoginseng* by response surface methodology and evaluation of hematopoiesis effect[J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1206. DOI:10.3390/molecules23051206.
- [17] Sun Y, Xue H K, Liu C H, *et al.* Comparison of microwave assisted extraction with hot reflux extraction in acquirement and degradation of anthocyanin from powdered blueberry[J]. *Int J Agr Biol Eng*, 2016, 9(6): 186–199.
- [18] Yue Y, Qiu Z D, Qu X Y, *et al.* Discouring on soxhlet extraction of ginseng using association analysis and scanning electron microscopy[J]. *J Pharm Anal*, 2018, 8(5): 312–317.
- [19] Zhao B, Li H, Lan T, *et al.* Characterization of the chemical composition of Chinese *Moringa oleifera* seed oil[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2019, 96(5): 523–533.
- [20] Gao Z, Zhong W, Chen K, *et al.* Chemical composition and anti-biofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle against *Listeria monocytogenes*[J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 144: 112036. DOI:10.1016/j.indcrop.2019.112036.
- [21] Xing C, Qin C, Li X, *et al.* Chemical composition and biological activities of essential oil isolated by HS-SPME and UAHD from fruits of bergamot[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2019, 104: 38–44.
- [22] Zheng G, Liu M, Chao Y, *et al.* Identification of lipophilic components in Citri Reticulatae Pericarpium cultivars by supercritical CO₂ fluid extraction with ultra-high-performance liquid chromatography-Q Exactive Orbitrap tandem mass spectrometry[J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(17): 3421–3440.
- [23] Zheng L, Zhang T, Xie L, *et al.* Physicochemical characteristics of *Actinostemma lobatum* Maxim. kernel oil by supercritical fluid extraction and conventional methods[J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 152: 112516. DOI:10.1016/j.indcrop.2020.112516.
- [24] Espada B E, Ferreiro G M, Barbero G F, *et al.* Alternative extraction method of bioactive compounds from Mulberry (*Morus nigra* L.) pulp using pressurized-liquid extraction[J]. *Food Anal Methods*, 2018, 11(9): 2384–2395.
- [25] Vergara-Salinas J R, Bulnes P, Zúñiga M C, *et al.* Effect of pressurized hot water extraction on antioxidants from grape pomace before and after enological fermentation[J]. *J Agr Food Chem*, 2013, 61(28): 6929–6936.

- [26] Dos Santos L C, Mendiola J A, Sanchez-Camargo A P, *et al.* Selective extraction of piceatannol from *Passiflora edulis* by-products: application of HSPs strategy and inhibition of neurodegenerative enzymes[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6248. DOI:10.3390/ijms22126248.
- [27] Cam M, Yuksel E, Alasalvar H, *et al.* Simultaneous extraction of phenolics and essential oil from peppermint by pressurized hot water extraction[J]. *J Food Sci Technol*, 2019, 56(1): 200–207.
- [28] Drouet S, Leclerc E A, Garros L, *et al.* A green ultrasound-assisted extraction optimization of the natural antioxidant and anti-aging flavonolignans from Milk Thistle *Silybum marianum* (L.) Gaertn. fruits for cosmetic applications[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(8): 304. DOI:10.3390/antiox8080304.
- [29] Agrahari S, Kesharwani V, Kushwaha N. A review on modern extraction techniques of herbal plants[J]. *Int J Pharmacog*, 2021, 8(5): 177–188.
- [30] Miljevic B, Hedayat F, Stevanovic S, *et al.* To sonicate or not to sonicate PM filters: reactive oxygen species generation upon ultrasonic irradiation[J]. *Aerosol Sci Tech*, 2014, 48(12): 1276–1284.
- [31] Karabegovic I, Stojicevic S, Velickovic D, *et al.* Direct ultrasound-assisted extraction and characterization of phenolic compounds from fresh houseleek (*Sempervivum marmoratum* L.) leaves[J]. *Hem Ind*, 2018, 72(1): 13–21.
- [32] Liao J, Guo Z, Yu G. Process intensification and kinetic studies of ultrasound-assisted extraction of flavonoids from peanut shells[J]. *Ultrason Sonochem*, 2021, 76: 105661. DOI:10.1016/j.ultsonch.2021.105661.
- [33] Alara O R, Abdurahman N H, Ukaegbu C I, *et al.* Extraction and characterization of bioactive compounds in *Vernonia amygdalina* leaf ethanolic extract comparing soxhlet and microwave-assisted extraction techniques[J]. *J Taibah Univ Sci*, 2019, 13(1): 414–422.
- [34] Lakka A, Bozinou E, Makris D P, *et al.* Evaluation of pulsed electric field polyphenol extraction from *Vitis vinifera*, *Sideritis scardica* and *Crocus sativus*[J]. *Chem Eng*, 2021, 5(2): 25. DOI:10.3390/chemengineering5020025.
- [35] Ma X D, Zhang X G, Guo S J, *et al.* Application of enzyme-assisted extraction of baicalin from *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2021, 51(3): 241–251.
- [36] Nguyen H C, Nguyen H N T, Huang M Y, *et al.* Optimization of aqueous enzyme-assisted extraction of rosmarinic acid from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves and the antioxidant activity of the extract[J]. *J Food Process Preserv*, 2021, 45(3): e15221. DOI:10.1111/jfpp.15221.
- [37] Xu L, Xu J, Shi G, *et al.* Optimization of flash extraction, separation of ginsenosides, identification by HPLC-FT-ICR-MS and determination of rare ginsenosides in mountain cultivated ginseng[J]. *RSC Adv*, 2020, 10(72): 44050–44057.
- [38] Zhao C, Ren X, Li C, *et al.* Coupling ultrasound with heat-reflux to improve the extraction of quercetin, kaempferol, ginkgetin and sciadopitysin from *Mairei Yew* leaves[J]. *Appl Sci*, 2019, 9(4): 795. DOI:10.3390/app9040795.
- [39] Xu X, Shen J, Mei Z, *et al.* Optimization of ultrasound-assisted enzymatic extraction and antioxidant activity of polysaccharide from radix *Morindae officinalis* by response surface methodology[J]. *Pharmacogn Mag*, 2020, 16(71): 662–669.
- [40] Shang X, Dou Y, Zhang Y, *et al.* Tailor-made natural deep eutectic solvents for green extraction of isoflavones from chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts[J]. *Ind Crops Prod*, 2019, 140: 111724. DOI:10.1016/j.indcrop.2019.111724.
- [41] Cao X L, Xu J, Bai G, *et al.* Isolation of anti-tumor compounds from the stem bark of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb. & Zucc. by silica gel column and counter-current chromatography[J]. *J Chromatogr B*, 2013, 929: 6–10.
- [42] Tang Z H, Qin J P, Xu X N, *et al.* Applying silica gel column chromatography purify resveratrol from extracts of *Morus alba* L. Leaf[J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5(14): 3020–3027.
- [43] Jiang C X, Yu Bo, Miao Y M, *et al.* Indole alkaloids from a soil-derived *Clonostachys rosea*[J]. *J Nat Prod*, 2021, 84(9): 2468–2474.
- [44] 刘为, 任佳俐, 李信瑜, 等. 丽江乌头根中的二萜生物碱成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33: 419–425.
- [45] 陈佩佩. 紫杉醇的分离纯化工艺研究及其缓释载体的构建[D]. 北京: 北京化工大学, 2019.
- [46] Zhang Z Q, Su Z G. Recovery of taxol from the extract of *Taxus cuspidate* callus cultures with Al₂O₃ chromatography[J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2000, 23(17): 2683–2693.
- [47] 李传厚, 朱彦军, 于绍华, 等. 小花鬼针草中 1 个新的聚炔和 1 个新的异烟酸葡萄糖酯苷[J]. *药学报*, 2020, 55(3): 489–494.
- [48] Jin T Y, Li S Q, Jin C R, *et al.* Catecholic isoquinolines from *Portulaca oleracea* and their antiinflammatory and β_2 -adrenergic receptor agonist activity[J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(4): 768–777.
- [49] Li J, Chase H A. Development of adsorptive (non-ionic) microporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources[J]. *Nat Prod Rep*, 2010, 27(10): 1493–1510.
- [50] Li H B, Yang B, Ge W, *et al.* Two new terpenoids from Reduning Injection[J]. *Chin Herb Med*, 2020, 12(2): 183–187.
- [51] Liu J J, Li Q, Liu R, *et al.* Enrichment and purification of six Aconitum alkaloids from *Aconiti kusnezoffii* radix by macroporous resins and quantification by HPLC-MS[J]. *J Chromatogr B*, 2014, 960: 174–181.

- [52] 王小梅, 赵晨曦, 彭霞辉, 等. 甲氧基修饰的大孔交联树脂对苯酚的吸附机理 [J]. 化学学报, 2010, 68(5): 453-456.
- [53] Liu W, Zhang S, Zu Y G, *et al.* Preliminary enrichment and separation of genistein and apigenin from extracts of pigeon pea roots by macroporous resins[J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(12): 4667-4675.
- [54] Liu Y, Liu F, Qiao M M, *et al.* Curcumanes A and B, two bicyclic sesquiterpenoids with significant vasorelaxant activity from *Curcuma longa*[J]. *Org Lett*, 2019, 21(4): 1197-1201.
- [55] Cai J F, Cheng L P, Zhao J C, *et al.* A novel polyacrylamide-based silica stationary phase for the separation of carbohydrates using alcohols as the weak eluent in hydrophilic interaction liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1524: 153-159.
- [56] Liu X, Cai Z Z, Lee W J, *et al.* A practical and fast isolation of 12 cyclolinopeptides (linusorbs) from flaxseed oil via preparative HPLC with phenyl-hexyl column[J]. *Food Chem*, 2021, 351: 129318. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129318.
- [57] Guzlek H, Wood P L, Janaway L. Performance comparison using the GUESS mixture to evaluate counter-current chromatography instruments[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 4181-4186.
- [58] Wang M L, Zou H J, Chen Q B, *et al.* Isolation of new polyacetylenes from the roots of *Eurycoma longifolia* via high-speed counter-current chromatography[J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1055-1056: 39-44.
- [59] Wang C X, Wang L X, Li C Y, *et al.* Anti-proliferation activities of three bioactive components purified by high-speed counter-current chromatography in essential oil from ginger[J]. *Eur Food Res Technol*, 2020, 246(4): 795-805.
- [60] Skalicka-Wozniak K, Walasek M, Ludwiczuk A, *et al.* Isolation of terpenoids from *Pimpinella anisum* essential oil by high-performance counter-current chromatography[J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(16): 2611-2614.
- [61] 魏涵伟. 玉米胚芽多肽的提取、分离以及生物活性的研究 [D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2020.
- [62] Naimah A K, Abd Al-Manhel A J, Al-Shawi M J. Isolation, purification and characterization of antimicrobial peptides produced from *Saccharomyces boulardii*[J]. *Int J Pept Res Ther*, 2018, 24(3): 455-461.
- [63] Shang X L, Liu C Y, Dong H Y, *et al.* Extraction, purification, structural characterization, and antioxidant activity of polysaccharides from Wheat Bran[J]. *J Mol Struct*, 2021, 1233: 130096. DOI:10.1016/j.molstruc.2021.130096.
- [64] Liu J, Peng C, Zhou Q M, *et al.* Alkaloids and flavonoid glycosides from the aerial parts of *Leonurus japonicus* and their opposite effects on uterine smooth muscle[J]. *Phytochemistry*, 2018, 145: 126-136.
- [65] Liu F, Chen J F, Qiao M M, *et al.* Seven pairs of new enantiomeric sesquiterpenoids from *Curcuma phaeocalis*[J]. *Bioorg Chem*, 2020, 99: 103820. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103820.
- [66] Li J, Cheong K L, Zhao J, *et al.* Preparation of inulin-type fructooligosaccharides using fast protein liquid chromatography coupled with refractive index detection[J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1308: 52-57.
- [67] Tan T W, Su Z G, Gu M, *et al.* Cross-linked agarose for separation of low molecular weight natural products in hydrophilic interaction liquid chromatography[J]. *Biotechnol J*, 2010, 5(5): 505-510.
- [68] Jiang M Z, Yan H, He R H. Purification and a molecular docking study of alpha-glucosidase-inhibitory peptides from a soybean protein hydrolysate with ultrasonic pretreatment[J]. *Eur Food Res Technol*, 2018, 244(11): 1995-2005.
- [69] He J L, Hong B H, Lu R, *et al.* Separation of saturated fatty acids from docosahexaenoic acid-rich algal oil by enzymatic ethanolysis in tandem with molecular distillation[J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(5): 2234-2241.
- [70] Li Z, Dai Z, Jiang D, *et al.* Bioactivity-guided separation of antifungal compounds by preparative high-performance liquid chromatography[J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(12): 2382-2390.
- [71] Chen N, Li W, Zhang J, *et al.* Isolation and structural elucidation of β -tocopherol derivatives from *Dryopteris crassirhizoma*[J]. *Ind Crops Prod*, 2021, 172: 114010. DOI:10.1016/j.indcrop.2021.114010.
- [72] Zhou Q M, Chen M H, Li X H, *et al.* Absolute configurations and bioactivities of guaiane-type sesquiterpenoids isolated from *Pogostemon cablin*[J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(9): 1919-1927.
- [73] Huang X Y, Pei D, Liu J F, *et al.* A review on chiral separation by counter-current chromatography: development, applications and future outlook[J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1531: 1-12.
- [74] Tong S, Zheng Y, Yan J, Application and comparison of high performance liquid chromatography and high speed counter-current chromatography in enantioseparation of (+/-)-2-phenylpropionic acid[J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1281: 79-86.
- [75] Miller L, Yue L. Chiral separation of underivatized amino acids in supercritical fluid chromatography with chiral crown ether derived column[J]. *Chirality*, 2020, 32(7): 981-989.
- [76] Scriba G K E. Chiral recognition in separation sciences. Part I: Polysaccharide and cyclodextrin selectors[J]. *TrAC-trend Anal Chem*, 2019, 120: 115639. DOI:10.1016/j.trac.2019.115639.
- [77] Wang Y, Chen Y, Bian H, *et al.* Highly selective and sensitive chiral recognition to deoxynucleosides by calixarene oligomers modified silver nanoparticles[J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2021: 341. DOI:10.1016/j.snb.2021.130044.
- [78] Pei Y, Li X, Zeng G, *et al.* Chiral stationary phases based on lactide derivatives for high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1661: 462705. DOI:10.1016/j.chroma.2021.

- 462705.
- [79] Zhou M, Long Y, Zhi Y, *et al.* Preparation and chromatographic evaluation of a chiral stationary phase based on carboxymethyl- β -cyclodextrin for high-performance liquid chromatography[J]. *Chin Chem Lett*, 2018, 29(9): 1399–1403.
- [80] Meng F C, Liu H, Huang X J, *et al.* Four new norlignan glycoside isomers from the twigs of *Cephalotaxus oliveri* Mast[J]. *Tetrahedron Asymmetry*, 2017, 28(12): 1686–1689.
- [81] Zhou L, Yao G D, Song X Y, *et al.* Neuroprotective effects of 1,2-diarylpropane type phenylpropanoid enantiomers from red raspberry against H₂O₂-induced oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(1): 331–338.
- [82] Kalogiouri N, Samanidou V. Advances in the optimization of chromatographic conditions for the separation of antioxidants in functional foods[J]. *Rev Sep Sci*, 2019, 1(1): 17–33.
- [83] Zhao H, Lai C J, Yu Y, *et al.* Acidic hydrolysate fingerprints based on HILIC-ELSD/MS combined with multivariate analysis for investigating the quality of *Ganoderma lucidum* polysaccharides[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 163: 476–484.
- [84] Abdulrahman S K, Rasheed A S, Qassim A W. Identification and determination of fisetin in black and green teas by ZIC-HILIC column coupled with UV detection[J]. *Sys Rev Pharm*, 2021, 12(2): 289–294.
- [85] 王海坤, 杨丰庆, 夏之宁. 制备气相色谱仪的改进及应用研究进展[J]. *化学通报*, 2011, 74(1): 3–9.
- [86] Özek G, Bedir E, Tabanca N, *et al.* Isolation of eudesmane type sesquiterpene ketone from *Prangos heymaniae* H.Duman & M.F.Watson essential oil and mosquitocidal activity of the essential oils[J]. *Open Chem*, 2018, 16(1): 453–467.
- [87] Raspotnig G, Anderl F, Kunert O, *et al.* A novel class of defensive compounds in harvestmen: hydroxy- γ -lactones from the phalangiid *Egaenus convexus*[J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(11): 3278–3286.
- [88] Speybrouck D, Lipka E. Preparative supercritical fluid chromatography: a powerful tool for chiral separations[J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1467: 33–55.
- [89] Hartmann A, Ganzera M. Supercritical fluid chromatography-theoretical background and applications on natural products[J]. *Planta Med*, 2015, 81(17): 1570–1581.
- [90] Eisath N G, Sturm S, Stuppner H, *et al.* Supercritical fluid chromatography in natural product analysis - an update[J]. *Planta Med*, 2018, 84(6/7): 361–371.
- [91] Zhang L H, Sun A L, Li A F, *et al.* Isolation and purification of osthole and imperatorin from *Fructus cnidii* by semipreparative supercritical fluid chromatography[J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2017, 40(8): 407–414.
- [92] Liu H L, Gong C C, Liao Z X, *et al.* Isolation and purification of three analogues from clematis akebioides by molecularly imprinted solid-phase extraction and HSCCC[J]. *Chromatographia*, 2017, 80(11): 1651–1658.
- [93] Özcan A A, Demirli S. Molecular imprinted solid-phase extraction system for selective separation of oleuropein from the olive leaf[J]. *Sep Sci Technol*, 2014, 49(1): 74–80.
- [94] Ma X B, Lin H L, Zhang J Y, *et al.* Extraction and identification of matrine-type alkaloids from *Sophora moorcroftiana* using double-templated molecularly imprinted polymers with HPLC-MS/MS[J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(7): 1691–1703.
- [95] Cardoso J A. *Production and Application of Novel Bio-active Compounds by Endophytic Microbes*[M]. Berlin: Springer-Verlag, 2019: 1–40.
- [96] Wen H C, Cui H, Tian H H, *et al.* Isolation of neuroprotective anthocyanins from black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) against amyloid-induced cognitive impairment[J]. *Foods*, 2020, 10(1): 63. DOI: 10.3390/foods10010063.
- [97] Nardiello D, Melfi M T, Pignatelli C, *et al.* Enhancing online protein isolation as intact species from soy flour samples by actively modulated two-dimensional liquid chromatography (2D-LC)[J]. *J Pharm Biomed*, 2020, 179: 112976. DOI:10.1016/j.jpba.2019.112976.
- [98] Mórícz Á M, Lapat V, Morlock G E, *et al.* High-performance thin-layer chromatography hyphenated to high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry for characterization of coeluting isomers [J]. *Talanta*, 2020, 219: 121306. DOI:10.1016/j.talanta.2020.121306.



【专家介绍】张庆文：博士，澳门大学中华医药研究院副教授。2000年从中国药科大学获得药物化学（植物化学方向）博士学位，之后进入亚利桑那州立大学肿瘤研究所进行博士后研究。2003年至2006年任职 ChromaDex Analytics, Inc. 高级化学研究员。2007年进入澳门大学担任助理教授，2013年至今担任副教授，主要从事常用中药尤其是常用岭南中药活性成分的分离和分析以及中药活性成分的结构优化研究，主持或参与多项国家级科研项目与澳门特别行政区科研项目，参与中国药典、美国药典中部分中药的质量标准制定工作。至今已在国际和国内专业期刊上发表论文近200篇，其中SCI论文100余篇，国际著名出版社出版的5个书章，已申请中国专利5项，获广东省科学技术奖一等奖（2016年）、澳门科技进步二等奖（2018年）和广东省科技进步一等奖（2020年）各一项。