

- [20] Agric Sci Technol (甘肃农业科技), 2001, 7(1): 38-39.
- [21] Yu Y X. Studies on artificial culture of *Cordyceps sinensis* [J]. J Fungal Res (菌物研究), 2004, 2(2): 42-46.
- [22] Zeng W, Yin D H. Studies on *Metarrhizium muscardine* of *Cordyceps sinensis* host insect [J]. Tradit Chin Med Sci Technol (中国中医药科技), 1995 (2): 17.
- [23] Yang Y X, Yang D R, Shen F R, et al. Studies on *Hepialid* larvae for being infected by Chinese "Insect Herb" fungus; (*Cordyceps sinensis*) [J]. Zool Res (动物学研究), 1989, 10 (3): 227-231.
- [24] Zeng W, Yin D H, Li Q S, et al. The growth of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. in the infection and parasitic phases [J]. Mycosystema (菌物系统), 2006, 25(4): 646-650.
- [25] Zhang Q M, Zhang J F. General situation on *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. and its zymolysis [J]. Shandong Ind Med (山东医药工业), 1998, 17(1): 13-15.

提高青蒿素产量的生物技术研究进展

吴 静, 丁 伟, 张永强, 周宇杰

(西南大学植物保护学院, 重庆 400716)

摘 要: 青蒿素是目前治疗疟疾的特效药, 主要来自于中药黄花蒿。由于自然资源有限, 人们试图通过各种栽培方法来获得高产量的青蒿素。对自青蒿素大量应用以来的获得高产量青蒿素的生物技术研究进行了比较详尽的综述, 包括育苗栽培多次收割法、组织培养法、转基因克隆法。

关键词: 青蒿素; 高产; 多次收割; 组织培养; 转基因

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)02-0305-04

Advances in studies on biotechnology of getting high-yield artemisinin

WU Jing, DING Wei, ZHANG Yong-qiang, ZHOU Yu-jie

(College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Key words: artemisinin; high-yield; multi-harvest; tissue culture; transgene

黄花蒿 *Artemisia annua* L. 为菊科蒿属植物。从黄花蒿中提取的青蒿素是我国独有的抗疟新药。其对脑型疟、恶性疟、间日疟及抗氯喹株疟有高效、速效、低毒的特点^[1], 被国际卫生组织指定为抗疟疾中药。目前青蒿素虽然能够通过人工合成, 但是由于其成本高, 难度和毒性大, 未能投入工艺化生产^[2], 所以青蒿素主要还是从我国天然黄花蒿中提取。以往人们注重以改善黄花蒿的生长环境, 如改善其光照条件、温热条件、施用微量元素及生长素、密植、引种等方式来提高青蒿素在黄花蒿中的积淀。最近通过研究发现, 可以通过特殊的栽培、组织培养、转基因方式提高青蒿素产量。

1 育苗栽培多次收割法

Kumars 等^[3,4]报道青蒿素在黄花蒿体内的沉积量因黄花蒿的种类、生长发育时段及组织器官不同而变化。这是因为叶是光合作用的器官, 也是青蒿素主要的积累器官, 其中含青蒿素的量较高, 而茎中的量仅为叶的 10%。通常, 幼叶比老叶量高, 但是幼苗在越冬期的青蒿素量也低。在黄花蒿叶内, 青蒿素约从 3、4 月份渐渐开始合成和积累, 在 5、6 月开始升高, 在 8、9 月达到顶峰。正在开花的植株中, 青蒿素在叶中的量约占总量的 30%, 而在冠状花序中约含 40%, 根中的量在整个生长过程中都较低^[4,5]。

不过冠状花序中由于瘦果油的出现导致青蒿素提取较

困难。植株在生活力较强时收割, 90% 的青蒿素聚集在叶和优质茎中, 是化学提取的最佳时期, 所以必须采用合适的栽培及收割方式才能很好地提高青蒿素的产量^[5]。

为了提高青蒿素的产量, 首先要延长黄花蒿生长期。第一步得进行浸种催芽, 整地做垄, 播种施肥, 得到较早的幼苗。黄花蒿种子无休眠现象, 播种前不需特殊处理, 但可以进行浸种催芽以提高种子的利用率。要特别注意种子的净度, 种子净度对播种量有很大的影响。种子在光照条件下, 15~25℃ 时萌发。在选好的地上以每公顷 3~3.75×10⁴ kg 有机肥施入地面, 然后翻耕土地, 做垄 20 cm。下种前 15 d 可用稀腐熟人类尿水对苗床进行淋施。种子同一定比例的细土混匀, 匀撒畦面, 播种后覆盖一层薄细土掩种, 再用喷雾器喷清水将苗床淋湿。为保温、保湿, 可用农用地膜将苗床覆盖, 如果条件允许可以在塑料大棚育苗。苗期宜追施清淡人畜粪水, 也可追施一些氮肥, 以每公顷 90 kg 为宜, 出苗后要注意防旱保苗^[6]。

通过大田移栽, 获得壮株, 并注意田间管理。应选择水源有保证的田地, 苗高 5~10 cm 时便可移栽, 移栽时选择阴天或晴天下午进行, 栽后淋足定根水。移栽按株行距 26.5 cm×26.5 cm 畦内挖穴, 每穴栽 1 株, 每公顷 1.13×10⁵~1.8×10⁵ 株。许成琼^[6]认为移栽时间一般为 3 月上旬, 而根

收稿日期: 2006-10-23

作者简介: 吴 静(1983—), 女, 西南大学植物保护学院农药学专业在读硕士, 主要从事植物源农药研究与开发。

Tel: (023) 68250218 E-mail: jingw998@163.com

外追肥可以提高黄花蒿的产量,叶面喷肥可以提高青蒿素在叶面的沉积量。中耕及病虫害的防治同普通种植法。

Kumars 等^[4]认为采用多次收获法(multi-harvest)可以提高黄花蒿产量^[4]。由于此次黄花蒿是提前种植的,大大地扩展了黄花蒿的生育期。一些适宜的环境条件中可以进行多次收割,3月上旬移栽,于6月中旬,8月上旬,9月中旬及11月中旬收割,共收割4次。韦霄^[7]认为:这一段时间内,不仅要求有合适的自然的光照和气温,还要求保证黄花蒿生长发育所需的充足的水分和养分,多施氮肥,调控田间的土壤含水量。为了保证苗的再生,应在植株顶部距地面40~50 cm 剪断枝头,每株上都应保留一些嫩梢,收割时用花枝剪剪去老叶和顶部部分幼嫩的组织,促使枝条向侧面发枝^[4,5]。收割下来的叶子进行青蒿素的提取,其中的青蒿素量要远远高于其他组织^[4,5]。

Irfan 等^[8]通过实验发现,盐类或重金属类可以改变植物体内的渗透压,以至改变黄花蒿体内活性氧的量,加速了黄花蒿酸向青蒿素的转化。所以在最后一次收获之前,如果不是黄花蒿的留种田,可以在收割前10~15 d 喷洒少量的氯化钠盐溶液或醋酸铅溶液。虽然这样会导致黄花蒿枯萎,不能继续生长或生长缓慢,但是由于青蒿素沉积量变化较大,依旧提高了青蒿素的产量。而且这还可以减少青蒿素提取过程中的工作量和资源消耗量。

Kumars 等^[4]报道,3月移栽的幼苗,间歇地收割了4次,11月完成其全部生育过程,所得的青蒿素产量达到了62 kg/hm²,这要比普遍的栽培收割法的产量(25 kg/hm²)高得多。目前进行的大田实验中,所测得的各个性状的比例及相关分析说明了一个普遍存在的现象:收割多次的叶的总产量比1次或2次的高。这是因为间歇性的收割会促使植株的再生,产生新叶。这样,富含青蒿素的叶被及时收获,避免了青蒿素的流失及叶的脱落。显而易见,黄花蒿尽管是一年生植物,但其生长期长,具有健壮的根系、极其丰富的茎叶,枝叶排列有序,不相互遮光,具有较高的光合利用率,植株再生能力、抗病虫能力、根系吸收营养的能力强,从而可进行多次根上收获。

2 组织培养法

利用植物组织培养来生产青蒿素是目前青蒿素研究的另一热点,可能成为大规模生产青蒿素的重要手段。自20世纪80年代以来,进行了大量的植物组织培养生产青蒿素的研究工作,Fulzedipl 等^[9,10]在黄花蒿愈伤组织、悬浮细胞、芽和毛状根等培养物中及各种培养体系进行了青蒿素合成的探索。

许多研究认为黄花蒿愈伤组织中不含青蒿素。但贺锡纯^[11]在愈伤组织伴随芽分化形成时,检测到青蒿素约为干质量的0.008%。而Brown 等^[12]和Tawfit 等^[13]在分化苗长成的植株中,青蒿素的量达到干质量的0.92%,高于野生植株。同时在其分化的芽和黄花蒿悬浮细胞培养液中发现青蒿素^[14]。由此可见,在未分化的黄花蒿植物组织中不含或含有极低水平的青蒿素,而一定的组织分化则可促进青蒿素的合成。所以在黄花蒿的组织培养过程中,应该使用大量的物质

刺激愈伤组织分化成苗,从而获得高产量的青蒿素^[10,14,15]。

不过愈伤组织形成是整个组织培养的基础,不应忽视。愈伤组织的诱导:在无菌条件下将已消毒的黄花蒿花序、花枝及叶片剪碎,分别接种于含有6-BA1 mol/L+2,4-D 0.5 mol/L 及6-BA1 mol/L+Kt 0.5 mol/L 的MS培养基上,在24~28℃条件下避光培养9 d,诱导愈伤组织,5~10 d 后伤口处即生长出白色或淡黄色的愈伤组织。将诱导15~20 d 的愈伤组织转继于新的培养基,并于恒温光照下培养。愈伤组织约15 d 转接一次^[10]。

将所得愈伤组织分别转入含有IAA 0.1 mol/L+6-BA1 mol/L 及IAA 0.1 mol/L+Kt1 mol/L 的芽分化培养基上,每日光照8 h,分化出芽。在芽的分化过程中,影响青蒿素合成的因素很多,如黄花蒿的基因型、激素和基本培养基都对芽的发生有显著影响,而光强在1 000~6 000 lx 和温度在20~30℃对丛生芽的发生影响不大;尽量选用高产的黄花蒿来做接种物;诱导丛生芽的激素组合是IAA 0.1 mol/L+6-BA1 mol/L 及IAA 0.1 mol/L+Kt1 mol/L;Woerdenbag 等^[16]研究发现,赤霉素(gibberellin)和水解酪蛋白等对黄花蒿芽中的青蒿素合成具有较强的刺激作用,Panieg 等^[17]试验,在诱导青蒿素芽的培养基中添加适量的赤霉素,会使得芽中的青蒿素量提高3~4倍^[8]。另外,氧离子在黄花蒿丛生芽的诱导和青蒿素的生物合成过程中起着非常重要的作用^[18,19]。

Weathers 等^[20]利用发根农杆菌15834感染黄花蒿的芽尖和叶片,获得黄花蒿毛状根培养物,并且检测到青蒿素的量约为干质量的0.43%。黄花蒿发根的诱导:消毒后的黄花蒿幼茎剪成2 cm左右的小段,无菌滤纸吸取多余水分,插入不含任何激素的培养基^[14]。用接种针挑取活化的细菌涂抹于茎端切面上,25℃持续光照培养。等到接种部位发根长到1 cm以上时,剪下发根置于添加赛孢霉素或羧苄青霉素的固体培养基上进行杀菌培养。已完全无菌的发根在无激素培养基上继代培养,接种时只接1~2 cm的根尖,为25℃暗培养。在此种培养基中,pH约为5.5~6.5时最适于毛状根的生长及青蒿素的合成。而在变温开始25℃,后来30℃条件下培养,利于毛状根的生长及青蒿素的合成^[20]。而光强为3 000 lx,时间为16 h最佳^[18,19]。

目前,黄花蒿组织培养的研究工作主要集中在利用生物技术的手段来进行组织培养物的改进,如通过改进培养器皿,从而得到高产青蒿素^[21]。Fulzele 等^[22]利用1 L生物反应器进行黄花蒿芽的悬浮培养,经过30 d的分批培养可获得再生的植株,生物量提高了4~5倍。Park 等^[23]利用2 L的长方形雾化培养器(mist culture system)培养黄花蒿芽,经过4周的培养,培养物增殖8倍,获得的黄花蒿芽可长出不定根。中国科学院植物研究所的一些专家通过摇瓶、气升式内环流生物反应器(internal loop airlift bioreactor)^[24]及雾化生物反应器(novel mist bioreactor)^[25]获得高产黄花蒿及青蒿素。在气升式内环流生物反应器中,毛状根培养物均匀分布在生物反应器的筛网间,或以不锈钢网为附着点向周围生长,在25℃和12 h的光周期下,经20 d获得培养物的生

物量的干质量为 22.57 g/L, 青蒿素产量 374.4 mg/L^[24]。为进一步利用生物反应器进行黄花蒿组织大规模培养生产青蒿素的研究工作奠定基础。气升式内环流生物反应器的工作流程图及黄花蒿和青蒿素的产量图表, 充分说明气升式内环流生物反应器是目前比较合理的黄花蒿组织培养发生器。黄花蒿组织培养中运用该反应器, 既能减少材料的浪费又能很好的提高青蒿素的产量。

用组织培养技术获得青蒿素, 此种方法有不破坏自然资源、不受自然条件限制的优点, 还可能通过各种细胞及基因工程的手段获得高产青蒿素的新品系, 具有其他方法无法替代的优越性, 此类方法可能成为大规模生产青蒿素的重要手段。

3 转基因克隆法

目前, 研究人员又通过转基因方法来提高青蒿素的产量, 是一种目前认为最有发展潜力的提高青蒿素产量的方法。一般认为青蒿素的生物合成经由三大步骤: 醋酸(acetic acid)形成法尼基焦磷酸(FPP), 由 FPP 合成倍半萜(sesquiterpenes), 倍半萜内酯化形成青蒿素, 而目前也认为这 3 个步骤分别与法尼基焦磷酸合成酶、倍半萜环化酶(epicedrol synthase), 以及酶形成过程中的加氧酶或氧化酶有关^[2]。

在黄花蒿转基因过程中, 多数是用农杆菌携带外源基因感染健壮黄花蒿植株, 把外源基因插入到目标 DNA 的特定部位^[22], 最后对获得外源基因的植株进行继代培养, 以得到性状稳定的高产黄花蒿品系^[23]。一些与青蒿素合成有关的基因被克隆, 并且一部分被转移到大肠杆菌或黄花蒿中进行表达, 如法尼基焦磷酸合成酶基因、倍半萜环化酶基因、萜类合成酶基因、杜松烯合成酶基因^[25, 26]。

同时由于青蒿素及其衍生物的生物合成受到多个限速酶所调控, 且一些编码限速酶基因的表达可能具有高度的组织和时空特异性^[27], 因此通过导入过量表达的相关限速酶基因或抑制其他分支途径的反义基因, 可望提高转基因器官或植株中青蒿素及其衍生物的量。将改良的绿色荧光蛋白(GFP)基因, 插入到植物表达载体中, 构建双 CaMV 35S 启动子驱动下的植物表达载体 PBIGFP。Southern blotting 分析表明, 外源 GEP 基因已整合到转基因黄花蒿芽 G21 系的基因组中。在荧光显微镜下, 观察到转基因黄花蒿芽中有较强的绿色荧光, 表明绿色荧光蛋白基因在转基因黄花蒿芽中已表达^[27]。

这方面的研究虽然很多, 但是由于种种因素的限制, 同时人们对转基因物质始终存在排斥心理, 所以这一方面的文献报道相对较少。

4 结语

由于现代科学的发展速度并不能完全消灭疟疾, 目前还没有发现比青蒿素更有效的治疗疟疾的药物, 且青蒿素具有高效、速效、低毒, 不会产生抗药性的特点。所以在相当长的一段时间内, 青蒿素依旧是最佳的治疗疟疾的药物。目前大部分的青蒿素是从黄花蒿植株中提取的, 只有少量的是通过人工合成。所以通过提高黄花蒿产量方法来提高青蒿素的产

量是研究人员不懈追求的目标。

在今后的几年里, 青蒿素高产的研究应以下几个方向进行深入研究: (1) 不同品种的黄花蒿高产栽培及收割模式的研究; (2) 黄花蒿组织培养生物反应器系统及培养物质的研究, 努力实现青蒿素大规模组织培养产业化生产; (3) 青蒿素合成关键酶基因的研究, 以及在合适的黄花蒿体系中的高效表达。

References:

- [1] Klayman D L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China [J]. *Science*, 1985, 228: 1049-1055.
- [2] Liu C C, Wang Y C, Ou Y F, et al. Advances in artemisinin research [J]. *Prog Chem* (化学进展), 1992, 11(1): 41-48.
- [3] Huang Z F, Zheng G H, Li D C. A study on factors influencing artmisinin contents of *Artemisia annua* [J]. *J Southwest Agric Univ* (西南农业大学学报), 1997, 19(1): 93-94.
- [4] Kumar S, Gupta S K, Singh P. High yields of artemisinin by multi-harvest of *Artemisia annua* crops [J]. *Ind Crop Prod*, 2004, 19: 77-90.
- [5] Zhong F L, Chen H, Cheng M. The study on the best time, part and desiccation quomodo recovery of *Artemisia annua* [J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 1997, 22(7): 405-407.
- [6] Xu C Q, Wei X, Li F. Studies on propagation technique of *Artemisia annua* [J]. *Guihaia* (广西植物), 1998, 18(3): 271-274.
- [7] Wei X, Li F, Xu C Q. The effect of different cultivation measures on yield and arteannuin content of *Artemisia annua* [J]. *J Guangxi Acad Sci* (广西科学院学报), 1999, 15(3): 132-136.
- [8] Irfan Q, M, Israr M, Abdin M Z, et al. Responses of *Artemisia annua* L. to lead and salt-induced oxidative stress [J]. *Environ Exp Bot*, 2005, 53: 185-193.
- [9] Fulzledp L. Tissue culture of *Artemisia annua*: organogenesis and artemisinin production [J]. *Phytother Res*, 1991, 5: 149-153.
- [10] Ye X C, Zheng M Y. Oallus induction and regeneration of plantlets from *Aetemesia annua* and changes of qinhaosu contents [J]. *J Integr Plant Biol* (植物学报), 1983, 25(1): 88-90.
- [11] He X C, Zeng M Y, Li G F, et al. Oallus induction and regeneration of plantlets from *Artemisia annua* and changes of qinhasu contents [J]. *J Integr Plant Biol* (植物学报), 1983, 25: 87-90.
- [12] Brown G D. Distribution of artemisinin in *Artemisia annua* [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57: 975-977.
- [13] Tawfiq N K, Anderson L A, Roberts M F, et al. *Artemisia annua* L.: dedifferentiated and differentiated cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 1989, 8: 425-428.
- [14] Zheng L, Ye H C, Li G F. Related factors of artemisinin biosynthesis in clone strain of *Artemisin annua* [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2004, 10(3): 227-280.
- [15] Geng S, Ji S D. Factors affecting induction of shoot cluster of *Artemisia annua* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(5): 566-572.
- [16] Woerdengbag H J, Jos F J, Win van Uden, et al. Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 1993, 32: 247-257.
- [17] Paniego N B, Giulietti A M. *Artemisia annua* L.: Dedifferentiated and differentiated cultures [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 1994, 36: 163-168.
- [18] Qin M B, Li G Z, Yun Y, et al. Induction of hairy root from *Artemisia annua* with *Agrobacterium rhizogenes* and its culture *in vitro* [J]. *J Integr Plant Biol* (植物学报), 1994, 36: 165-170.
- [19] Cai G Q, Li G Z, Ye H C, et al. Hairy root culture of *Artemisia annua* L. by plasmid transformation and biosynthesis of artemisinin [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 1995, 11: 315-320.
- [20] Weathers P J, Cheetham R D, Follansbee E, et al.

- Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua* [J]. *Biotechnol Lett*, 1994, 16: 1281-1286.
- [21] Liu C Z, Wang Y C, Ouyang F, et al. Production of artemisinin by hairy root cultures of *Artemisia annua* L. [J]. *Biotechnol Lett*, 1997, 19: 927-929.
- [22] Fulzele D P, Heble M R, Rao P S. Production of terpenoid from *Artemisia annua* L. plantlet cultures in bioreactor [J]. *Biotechnology*, 1995, 40: 139-143.
- [23] Park J M, Hu W S, Staba E J. Multiple shoot culture of *Dianthus caryophyllus* using mist culture system [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1989, 34: 1209-1213.
- [24] Liu C C, Wang Y C, Ou Y F. Production of artemisinin by *Artemisia annua* hairy root culture in a internal loop airlift bioreactor [J]. *J Integr Plant Biol*, 1999, 41(2): 181-183.
- [25] Mercke P, Bengtsson M, Bouwmeester H J, et al. Molecular cloning, expression and characterization of amorpho-4, 11-diene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 381: 173-180.
- [26] Wallaart T E, Bouwmeester H J, Poppinga H L, et al. Amorpho-4, 11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug Artemisinin [J]. *Planta*, 2001, 212: 460-465.
- [27] Chen D H, Ye H C, Li G F. Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation [J]. *Plant Sci*, 2000, 155: 179-185.

pH 区带精制逆流色谱在中药中的研究进展

黄娟, 童胜强, 黄晓霞, 颜继忠*

(浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014)

pH 区带精制逆流色谱 (pH-zone-refining counter-current chromatography) 最早是在普通制备型高速逆流色谱的基础上发展起来的^[1]。利用取代色谱的特点, 由一系列的溶质区带组成, 样品在区带之间的界面富集, 杂质则在区带的边缘。这种技术需要在有机相中加入有机酸或碱, 水相中加入无机反离子。有机相和水相都可以作为流动相或固定相。当流动相穿入固定相时, 由于酸碱反应, 最终达到平衡。有机酸在有机相和固定相中的分配系数作为量度, 样品的分配系数与它的差距决定各样品的出峰时间。当样品进入柱中时被分离物质便以一串矩形峰的形式被洗脱出来, 并且依据 pKa 和疏水性所决定的 pH 值的大小依次排开。

同普通的高速逆流色谱相比, pH 区带精制逆流色谱具有分离容量大、分离纯度和效率高优点^[2]。特别适用于分离那些在较宽的 pH 1~10 内, 可形成稳定的可离子化的物质。目前在国际上 pH 区带精制逆流色谱广泛用于生物碱、植物中的酸性成分、染料、对映异构体、氨基酸及其衍生物的分离制备, 取得了良好的效果。本文主要综述近 5 年来该技术在分离纯化中药有效成分及其他方面的最新研究进展。

1 pH 区带精制逆流色谱在中药有效成分提取中的应用

1.1 生物碱的分离: 生物碱是人类最早研究的植物有效成分, 在植物中的分布相当广泛。pH 区带精制逆流色谱是分离制备生物碱的非常有效的方法。Ito 等^[3]利用该技术纯化乌头中的生物碱, 得到了 4 种非常纯的生物碱成分, 溶剂体系为甲基叔丁基醚-四氢呋喃-蒸馏水 (2:2:3), 上层有机相加入 10 mmol 三乙胺作为保留碱, 下层加入 10 mmol 盐酸作为洗脱酸, 实验中分别进样 2.0、6.5、10.5 g, 都取得了非常好的效果, 而且随着进样量的增加, 峰宽明显增大, 经 HPLC 检验分离纯度达到 99% 以上。在北美, 白毛茛作为药

用植物有着悠久的历史, 研究表明其含有的生物碱成分具有很强的生物活性, 但在分离时, 普通的方法难以取得良好的效果。利用 pH 区带精制逆流色谱, 通过对其溶剂体系和其他一系列条件的摸索, 发现四氢呋喃的加入可以促进样品的溶解, 实现了样品的成功分离, 所得的生物碱分别为盐酸小檗碱、canadoline、氢化小檗碱、β-北美黄连碱和异紫堇杷明碱^[4]。利用这一色谱技术从 *Erythroxylum pervillei* Baillon 茎皮中将几种生物碱分成两部分, 一部分是 pervilleine, 另一部分是几种萜芳芳香酯碱的混合物。所用溶剂体系为甲基叔丁基醚-水 (1:1), 并让其平衡过夜, 上层有机相加入 2 mL 的三乙胺作为保留碱, pH 调节到约为 10, 下层水相加入 1 mL 37% 盐酸作为洗脱酸, pH 调节到约为 2, 流动相的泵入速度为 3 mL/min^[5]。从 *Picralima nitida* 根中分离纯度吡啶生物碱时, Okunji 等^[6]首先利用硅胶柱色谱, 但该方法只能获得很少的纯品, 为了得到大量的纯品, 采用了高速逆流色谱, 但由于固定相在柱中的保留甚少, 无法实现很好的分离, 所以采用 pH 区带精制逆流色谱, 并实现了对样品的成功分离。所选溶剂体系为甲基叔丁基醚-乙腈-水 (2:2:3), 上层有机相加入三乙胺作为保留碱, pH 调节到 10.7, 下层水相加入盐酸作为洗脱酸, pH 调节到约为 1.7, 样品以 1:1 的比例分别溶解在流动相和固定相中。从他们的研究中可以发现在分离一定种类的样品时, pH 区带精制逆流色谱具有不可比拟的优越性。Yuan 等^[7]从绿茶中分离得到咖啡因和茶碱, 所选溶剂体系为甲基叔丁基醚-水 (1:1), 上层有机层加入 10 mmol 三乙胺作为保留碱, 下层加入 10 mmol 盐酸作为洗脱酸, 整个过程总共耗时仅 4 h, 大大缩短了分离时间。Wang 等^[8]从夏天无中得到 495 mg 原鸦片碱, 626 mg 四氢巴马亭和 423 mg 荷包牡丹碱, 分离纯度可达到 93%。所用

收稿日期: 2006-06-29

作者简介: 黄娟 (1983-), 女, 江苏溧水人, 浙江工业大学药学院硕士研究生, 从事天然产物的提取分离工作。

* 通讯作者 颜继忠 Tel: (0571) 88320613 E-mail: zyx@zjut.edu.cn