

- Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua* [J]. *Biootechnol 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]. *Biootechnol 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]. *Biootechnology*, 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]. *Biootechnol 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 amopha-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. Amopha-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, 贵晓霞, 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, 样品的分配系数与其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、分离纯度和效率高等优点^[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/L 三乙胺作为保留碱, 下层加入 10 mmol/L 盐酸作为洗脱酸, 实验中分别进样 2.0 g、6.5 g、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、canadaine、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* Bailon 茎皮中将几种生物碱分成两部分, 一部分是 pervilleine, 另一部分是几种莨菪芳香酯碱的混合物。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* 根中分离纯度吲哚生物碱时, 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/L 三乙胺作为保留碱, 下层加入 10 mmol/L 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%。所用的溶剂体系是甲

* 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

基叔丁基醚-乙腈-水(2:2:3),上层有机相加入5~10 mmol 氨水作为保留碱,下层水相加入5~10 mmol 盐酸作为洗脱酸。

1.2 酸性成分的分离:W interhalteer 等^[9]利用该技术分离得到了胭脂红酸。研究表明紫花松果菊对治疗白血病具有不错的效果,因此在国外被广泛用于制药工业。学者们从这一植物中分离得到菊苣酸,值得指出的是在分离该化合物时,共连续用了3次pH 区带精制逆流色谱。第1次得到的不纯的目标物质,第2次纯度达到87.7%,第3次的分离产物纯度达到了95%以上。所用的溶剂体系为甲基叔丁基醚-乙腈-水(4:1:5),并且在上层有机相加入10 mmol 三氟乙酸作为保留酸,下层加入10 mmol 氨水作为洗脱碱^[10]。

2 pH 区带精制逆流色谱在其他方面的应用

2.1 植物染料的分离:目前市场上所用的染料可大体分成化学染料和植物染料。过去,pH 区带精制逆流色谱为化学染料的分离纯化做过积极的贡献,尤其在分离 Yellow No. 203 Red No. 106 等化学染料时,取得了突破性的成果。化学染料染色的纺织品含有甲醛等有害物质,对人体伤害很大。植物染料及其工艺都是环保的,因此近年来备受人们的青睐,但植物染料的提纯量化问题一直困扰着许多专家学者。利用pH 区带精制逆流色谱实现分离纯化较为环保的植物染料,这几年已有学者做过大量的研究。Wada 等^[11]在分离高粱色谱和紫胶色素时得到几种新的物质。其中在分离高粱色素时得到了卤代苯基化合物、*p*-香豆酸和甲基类化合物。溶剂体系为乙醚-乙腈-水(4:2:5),下层水相加入20 mmol 氨水作为洗脱碱,上层有机相加入三氟乙酸作为保留酸,泵入速度为2.0 mL/min。在分离紫胶色素时得到虫胶红酸A、B、C 和E 4种酸性成分。溶剂体系为甲基叔丁基醚-乙腈-水(2:1:5),下层水相加入20 mmol/L 氨水作为保留碱,上层有机相加入20 mmol 三氟乙酸作为洗脱酸,流动相加入17.5 mmol 三乙胺作为配位剂,体积流量3 mL/min,分离纯度可达到96%以上。利用pH 区带精制逆流色谱从红酒中分离花青苷,甜菜中分离甜菜素(betalains),黄栀子中分离类胡萝卜素,红茶中分离theaflavic acid 也取得了不错的效果^[12]。因此,利用pH 区带精制逆流色谱来分离纯化植物染料,将是解决植物染料提取分离难题的一项不错的技术。

2.2 其他:pH 区带精制逆流色谱分离一些真菌发酵产物、异构体和氨基酸及其衍生物都有比较好的前景。Harris 等^[13]利用pH 区带的精制逆流色谱分离真菌发酵产物,得到了糖基化聚酮和 arthrinosides A~C。该技术在分离构造异构和立体异构体时都取得了较好的效果。对两个不同取代位的磺酸类化合物3-SPA 和4-SPA^[14],能够实现几乎完全的分离。药物对映异构体的分离是目前医药和化学方面的难点。Perez 等^[15]利用这一技术成功分离了血管舒张药心得乐和抗凝血药 warfarin 的对映异构体。姜黄素中酸性黄的分离^[16],一些染料的构造异构体的分离^[17]都是很好的应用实例。氨基酸及其衍生物的分离集中在20世纪90年代,近几年来有关利用pH 区带的精制逆流色谱分离氨基酸类化合物的

报道几乎没有。

3 结语

pH 区带精制逆流色谱采用为数有限的几套溶剂体系实现了很多物质的分离。文献中报道所选择的保留酸碱和洗脱酸碱也是相对固定的^[18]。相对于传统的高速逆流色谱,pH 区带精制逆流色谱实验条件的优化更加容易一些。

可以看出这一技术既可用于中药的粗提物去除杂质,也可用于最后产物的精制,甚至可以用来对从未处理的粗提物进行纯化得到纯品。因此该技术在对中国有效成分的提取分离方面具有相当广阔的应用前景。

References

- [1] Ito Y, Ma Y. pH-Zone-refining countercurrent chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1996, 753(1): 1-36.
- [2] Gong Y, Guo Y, Huang J G, et al. Research and improvement of pH-zone-refining countercurrent chromatography [J]. *Anal Chem* (分析化学), 2004, 32(4): 529-533.
- [3] Yang F Q, Ito Y. pH-Zone-refining countercurrent chromatography of lappaconitine from *Aconitum sinense* Nakai I. separation of prepurified extract [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 923(1-2): 281-285.
- [4] Chadwick L R, Wu C D, Kinghorn A D. Isolation of alkaloids from Goldenseal (*Hydrastis canadensis* rhizomes) using pH-refining countercurrent chromatography [J]. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2001, 24(16): 2445-2453.
- [5] Chin Y W, Jones W P, Waybright T J, et al. Tropane aromatic ester alkaloids from a large-scale re-collection of *Erythroxylum pervillei* stem bark obtained in madagascar [J]. *J Nat Prod*, 2006, 69(3): 414-417.
- [6] Okunji C O, Iwu M M, Ito Y. Preparative separation of indole alkaloids from the rind of *Picralima nitida* (stapf) T. Durand & H. Durand by pH-Zone-refining countercurrent chromatography [J]. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2005, 28(5): 775-783.
- [7] Yuan L M, Chen X X, Ai P, et al. Preparative separation of alkaloids from green tea by pH-zone-refining countercurrent chromatography [J]. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2004, 27(3): 365-369.
- [8] Wang X, Geng Y L, Li F W, et al. Large scale separation of alkaloids from *corydalis decumbens* by pH-zone-refining countercurrent chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1115(1-2): 267-270.
- [9] Winterhalter P, Degenhardt A. Food analysis-current trends: foundation and implementations of countercurrent chromatography [J]. *Lebensmittelchemie*, 2002, 56(3): 42-45.
- [10] Wang X, Geng Y L, Li F W, et al. Preparative separation of cichoric acid from *Echinacea purpurea* by pH-zone-refining countercurrent chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1103(1): 166-169.
- [11] Wada K, Koda T, Aoki H. Analytical and preparative separation of Kaoliang and lac colors by pH-zone refining countercurrent chromatography [J]. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2005, 28(12-13): 2097-2106.
- [12] Degenhardt A, Winterhalter P. Isolation of natural pigments by high speed CCC [J]. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2001, 24(11, 12): 1745-1746.
- [13] Harris G H, Dai P. Application of pH-zone-refining CCC to the isolation of antifungal fermentation products [J]. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2001, 24(11, 22): 1775-1790.
- [14] Weisz A, Eugene P M, Constance M M, et al. Preparative separation of isomeric sulphthalic acids by conventional and pH-zone-refining countercurrent chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 966(1-2): 111-118.
- [15] Perez E, Santos M J, Minguillon C. Application of cellulose and amylose arylcarbamates as chiral selectors in countercurrent chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1107(1-2): 165-174.
- [16] Patel K, Krishna G, Sokołowski E, et al. Preparative separation of curcuminoids from crude curcumin and turmeric powder

der by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. *J Liq Chromatogr Related Technol*, 2000, 23 (14): 2209-2218.

[17] Weisz A, Mazzoza E P, Matusik J E, et al. Preparative separation of isomeric 2-(2-quinoliny)-1H-indene-1,3(2H)-dione monosulfonic acids of the color additive D&C Yellow NO.

10 (Quinoline Yellow) by pH-zone-refining counter-current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 923(1-2): 87-96.

[18] Cao X L. *The Application of High-speed Countercurrent Chromatography* (高速逆流色谱分离技术及应用) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.

中药中农药、重金属残留的分析方法概述

石世学, 聂万达, 潘力佳*

(天津中新药业集团股份有限公司, 天津 300457)

目前, 随着中药事业的不断发展, 中药产品在世界范围内防病、治病的作用被重新认识, 提高中药产品的内在质量、制定合理的质控标准愈来愈受到人们的关注。在提高中药产品内在质量方面不仅要对其有效成分(活性成分)的质和量进行有效的控制, 而且应对中药产品中有毒、有害成分进行限量控制。中药中的农药、重金属残留和污染严重影响了中药产品的内在质量。本文就中药中农药、重金属残留的分析方法进行综述。

1 农药残留的分析方法

1.1 气相色谱法: 由于具有操作简便、分析速度快、分离效能高、灵敏度高以及应用范围广等特点^[1], 其仍是目前农药残留测定的主要分析手段, 尤其在有机氯和有机磷农药的分析领域中占绝对优势。王会丽等^[2]采用气相色谱-电子捕获检测器法检测西洋参中的有机氯农药(六六六、DDT 异构体及七氯、艾氏剂)的残留量, 最低检测浓度为 0.032~1.4 ng/g, 回收率为 80%~133.18%。张曙明等^[3]采用气相色谱-氮磷检测器法对中药中的 8 种有机磷农药残留量进行了测定, 其回收率为 74.96%~116.8%, 检出限为 0.011~0.336 pg。梁祈等^[4]采用气相色谱碱离子化检测器法对黄芪中的氨基甲酸酯农药(呋喃丹、西维因、甲霜灵)残留量进行了测定, 当添加水平为 2×10^{-5} 时, 回收率为 89.33%~98.18%, 线性相关系数 r 为 0.9970~0.9985, 检测限可达 19.0 pg。楼健等^[5]采用气相色谱-火焰光度检测器对中药材天花粉中的 8 种有机磷农药残留量进行了测定, 最低检测量为 0.0020~0.0165 ng。

1.2 高效液相色谱法: 是以液体作为流动相的一种色谱方法, 适合于分析热不稳定性和强极性农药及其代谢产物。梁祈等^[6]采用高效液相色谱测定中药材黄芪中有机氮农药(涕灭威、呋喃丹、西维因、甲霜灵)残留量, 当添加水平为 7×10^{-8} ~ 7×10^{-7} 时, 回收率为 81.7%~95.1%, RSD 为 3.3%~6.4%, 检出限为 1.2×10^{-11} ~ 5.3×10^{-10} , $r=0.9999$ 。Trajkovska 等^[7]采用固相萃取-高效液相色谱/二级

管阵列检测器检测葡萄酒中的特丁津、敌草胺、灭菌丹和亚胺硫磷农药, 检测限为 3.8~4.6 ng, 定量限为 12.7~15 ng。

1.3 气相色谱-质谱法: 随着质谱技术的发展, 质谱法已成为农药残留分析的有效手段, 用色谱保留时间和质谱指纹数据对化合物进行分析, 最大限度地保证了分析的可靠性。李拥军等^[8]采用微量化学法和固相萃取技术, 用丙酮-正己烷(1:1)萃取, 活性炭和中性氧化铝小柱净化, 用气相色谱-质谱法可同时测定茶叶中 6 种拟除虫菊酯类农药的残留量。方法回收率在 84.6%~115.1%, RSD 为 3%~7%, 最低定量检出质量分数为 0.010~0.20 mg/kg。孙秀燕等^[9]采用气相色谱法-正化学电离-质谱法对中药材中有机磷农药残留进行了检测, 应用选择离子监测技术, 排除了杂质的干扰, 提高了分析灵敏度。

1.4 高效液相色谱-质谱法: 高效液相色谱及大气压电离质谱主要用来分析低浓度、难挥发、热不稳定性和强极性农药, LC-MS 先后产生 4 种接口技术: 热喷雾、粒子束、电喷雾电离、大气压化学电离。潘元海等^[10]报道, 采用高效液相色谱-大气压化学电离质谱快速分析水中痕量有机磷农药二嗪农与啶硫磷, 检出限分别达 0.09、0.1 ng。Granby 等^[11]采用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析氨基甲酸酯类及其相关极性农药, 当添加水平为 0.02、0.04 和 0.20 mg/kg 时, 回收率为 70%~120%。

1.5 超临界流体色谱: 是以超临界流体作为流动相的色谱分离检测技术, 常用于分析不便于用气相色谱分析的一些极性和吸附性强、热稳定性差、难挥发的组分, 分析所需时间一般比高效液相色谱快, 可以和许多高效液相色谱难以使用的检测器联用。超临界流体色谱虽不能代替气相色谱和高效液相色谱, 但可弥补它们的不足。Jablonska 等和 Murugaveri 等分别报道了用毛细管超临界流体色谱-质谱测定有机氯和氨基甲酸酯类农药的残留, Mol 等用超临界流体色谱连接火焰光度检测器分析番茄和洋葱中的乐果、马拉硫磷等^[12]。

1.6 免疫分析法: 是利用抗原、抗体的特异性免疫反应对微

* 收稿日期: 2006-04-12

基金项目: 国家科技攻关课题(50 种中药中有毒残留物检测方法与限量标准研究, 2001BA701A 57)

作者简介: 石世学(1978—), 男, 内蒙古人, 硕士学位, 现主要从事残留物检测分析研究工作。E-mail: shishixue@163.com

* 通讯作者 潘力佳 Tel: (022)27020916 E-mail: panlijia@yahoo.com.cn