

黄花蒿中青蒿素含量的 RP-HPLC 法测定

刘金磊, 李典鹏*, 韦霄, 黄永林, 卢凤来, 蒋运生

(广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006)
中国科学院

摘要: 建立黄花蒿中青蒿素的高效液相色谱测定方法, 采用柱前衍生 RP-HPLC 法测定黄花蒿中青蒿素的含量, 采用 ZORBAXXDB-C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-0.01 mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲液 (pH 5.8, 体积比 62 : 38) 为流动相; 检测波长: 260 nm; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 30 °C。对广西、沈阳、北京、郑州、苏州和杭州等不同产地的野生黄花蒿样品、以及同一产地不同采集时间黄花蒿样品进行检测, 结果表明不同地区青蒿素含量差异很大, 同一地区不同采集时间黄花蒿样品的青蒿素含量也有差异。该法准确可靠、重现性好, 能准确地反映青蒿素含量的检测。

关键词: RP-HPLC; 黄花蒿; 青蒿素; 含量测定

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)05-0808-03

Determination of artemisinin in *Artemisia annua* with RP-HPLC

LIU Jin-Lei, LI Dian-Peng*, WEI Xiao, HUANG Yong-Lin,
LU Feng-Lai, JIANG Yun-Sheng

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

Abstract: The content of artemisinin in *Artemisia annua* was determined with the method of pre-column reaction to RP-HPLC. The column was ZORBAXXDB-C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), with mobile phase CH₃OH-0.01 mol/L NaAC-HAC buffer (pH=5.8, 62 : 38), flow rate 0.8 mL/min, column temperature at 30 °C. The results showed that there are great diversity in the content of artemisinin in *Artemisia annua* from different places and different harvest time. The method is accurate, sensible and repeatable, and can be used for the quality control of this herbal medicine.

Key words: RP-HPLC; *Artemisia annua* L.; artemisinin; determination

青蒿素是从中草药黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 中提取的有效成分, 是我国唯一得到国际承认的抗疟新药, 也是我国第一个以一类新药出口的化学药品。青蒿素是一种含有过氧基团的倍半萜内酯, 对脑型及抗氯喹性疟疾有特殊疗效。目前, 青蒿素的研究已引起国际上的高度重视, 原料药材的规范化栽培, 品种的选择, SOP 的制定等问题已提上

议程。因此青蒿素的含量测定及测定方法的可信度对于黄花蒿引种栽培以及控制药材质量有重要意义。黄花蒿中青蒿素的含量测定方法文献已报道的有: 重量法 (中华人民共和国药典), 比色法 (李典鹏等, 1995), 高效液相色谱法 (赵世善等, 1986; 黄海滨等, 1994)。由于文献报道的色谱检测方法因为保留时间过长, 分离效果不明显, 为此我们建立一种高压

收稿日期: 2007-02-09 修回日期: 2007-06-16

基金项目: 国家自然科学基金 (30660222); 广西科技攻关项目 (0663003); 中国科学院农办项目 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (30660222); Key Technologies Research and Development Program of Guangxi (0663003); the Chinese Academy of Sciences]。

作者简介: 刘金磊 (1980-), 男, 内蒙古赤峰市人, 研究实习生, 主要从事植物资源的开发利用研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: ldp@gxib.cn)

液相色谱法,该方法原料提取方法简便,便于操作,且测定准确、快速、灵敏,重复性好。通过此法对广西、沈阳、北京、郑州、苏州和杭州等不同产地的野生黄花蒿样品、以及同一产地不同采集时间黄花蒿样品进行了青蒿素的含量测定。

1 仪器与材料

Agilent-1100 分析型高效液相色谱仪,包括二极管阵列多波长检测器 DAD、四元梯度泵、在线真空脱气机、7725i 手动进样器、HP 化学工作站(美国 Agilent 公司);R-114 型旋转蒸发仪(瑞士 Büchi 公司制造)。

青蒿素对照品(中国药品与生物制品检定所(0202-9501),纯度 99.1%);黄花蒿(*A. annua*)样品采自不同地区(阴干干燥后,磨成粉过 40 目筛备用),并经广西植物研究所韦发南研究员鉴定。石油醚(沸点 60~90 °C)、无水乙醇、醋酸、醋酸钠、氢氧化钠均是分析纯,甲醇为色谱纯,水为二次蒸馏水。

2 色谱条件

色谱柱:ZORBAX XDB-C18 柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);柱温:30 °C;流动相:甲醇-0.01 mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲液(pH5.8,体积比 62:38);流速:0.8 mL/min;检测波长:260 nm;进样量:10 μL。理论塔板数按衍生后青蒿素计算应不低于 2 500。在本条件下,对照品衍生前色谱图(C)与衍生后色谱图(B)与供试品衍生后色谱图(A)如图 1。

3 溶液的制备

3.1 对照品溶液

精密称取青蒿素对照品 25 mg 于 25 mL 的容量瓶中,加入无水乙醇溶液定容,配制成 1.0 mg/mL 的溶液备用。

3.2 供试品溶液

称取黄花蒿样品干品约 0.5 g(过 40 目筛)包于滤纸纸袋中,置索氏提取器,精密量取石油醚(沸点 60~90 °C)80 mL,加热回流提取 5 h 后,放冷,取出提取液挥干石油醚,再置于 25 mL 容量瓶中,加入无水乙醇定容备用。精密吸取样品溶液 1.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中,加入 0.2% 氢氧化钠溶液 5

mL,混合均匀后放入 50 °C 的恒温水浴中加热 30 min,取出冷却至室温,加入 0.08 mol/L 的醋酸定容至刻度混合均匀后,分别用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液作为供试品溶液备用。

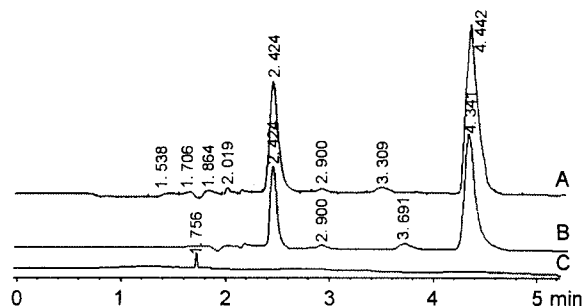


图 1 青蒿素对照品和样品的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatogram of *Artemisia annua*

4 方法学考察

(1)线形关系的考察:分别精密量取 1.0 mg/mL 青蒿素对照品溶液配制成 0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mg/mL 的青蒿素对照品溶液。精密量取上述不同浓度的青蒿素对照品溶液 1.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中,加入 0.2% 氢氧化钠溶液 5 mL,混合均匀后放入 50 °C 的恒温水浴中加热 30 min,取出冷却至室温,加入 0.08 mol/L 的醋酸定容至刻度混合均匀后,分别用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,各精密吸取 10 μL 滤液,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,以进样时的溶液浓度为横坐标,色谱峰面积数值为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程如下: $Y=2849.5X+9.334$ ($r=0.9991$)。结果表明进样量在 0.009~10.00 μg 范围内呈良好的线形关系。

(2)仪器精密度实验:分别吸取对照品衍生溶液 10 μL 连续进样 5 次,测定峰面积。测得青蒿素峰面积的 RSD 为 0.3%。

(3)稳定性实验:分别吸取青蒿素衍生液,分别于 0、1、3、5、10、24 h 进样 10 μL,测定,结果峰面积的 RSD 值为 1.3%。

重复性实验:分别称取黄花蒿样品 6 份,按“3.2”项的方法处理,依次测定平均含量为 0.485%,RSD1.6%。

(4)加样回收率实验:取已知青蒿素含量的黄花蒿样品 0.5 g,共 5 份,提取、旋干,加入一定量无水

乙醇后再分别精密加入青蒿素对照品溶液(0.2 mg/mL)1 mL 定容到 25 mL 容量瓶中,按供试品溶液的衍生方法操作,平行测定,进样 10.0 μ L,结果平均加样回收率是 96.14%,RSD 2.1%(表 1)。

表 1 黄花蒿的加样回收率 (n=5)
Table 1 Recovery rate of *Artemisia annua*

样品量 Size of sample (g)	样品中青 蒿素含量 Artemisinin content (mg)	测得量 Content of additived (mg)	加样回 收率 Recovery rate (%)	平均值 Average (%)	RSD (%)
0.5020	0.348	0.546	99.0		
0.5031	0.351	0.540	94.5		
0.5032	0.352	0.543	95.2	96.14	2.1
0.5025	0.349	0.538	94.5		
0.5033	0.358	0.553	97.5		

5 样品测定

分别称取不同产地的黄花蒿样品,按照 3.2 供试品溶液的制备方法处理,在上述色谱条件下进行含量测定,结果见表 2。

分别称取同一产地不同采集时间的黄花蒿样品,按 3.2 供试品溶液的制备方法处理,在上述色谱条件下进行含量测定结果见表 3。

表 2 不同产地黄花蒿样品青蒿素
含量测定结果 (% , n=4)

Table 2 Determination of artemisinin content in
Artemisia annua from different places

序号 No.	产地 Locality	采集时间 Harvest time	青蒿素含量 Content(%)
1	广西南宁	2006 年 9 月	0.901
2	广西崇左	2006 年 9 月	0.943
3	广西柳州	2006 年 9 月	0.646
4	广西平果	2006 年 9 月	0.892
5	广西河池	2006 年 9 月	0.591
6	广西玉林	2006 年 9 月	0.613
7	广西梧州	2006 年 9 月	0.404
8	广西贺州	2006 年 9 月	0.605
9	广西钦州	2006 年 9 月	0.423
10	广西宾阳	2006 年 9 月	0.438
11	广西北海	2006 年 9 月	0.334
12	广西兴安	2006 年 9 月	0.587
13	广西阳朔	2006 年 9 月	0.992
14	广西融安	2006 年 9 月	0.569
15	辽宁沈阳	2006 年 9 月	0.086
16	北京	2006 年 9 月	0.147
17	河南郑州	2006 年 9 月	0.124
18	江苏苏州	2006 年 9 月	0.075
19	浙江杭州	2006 年 9 月	0.126

表 3 同一产地不同采集时间黄花蒿
样品含量测定结果 (% , n=4)

Table 3 Determination of artemisinin content in
Artemisia annua harvested in different times

批次 No.	采集时间 Harvest time	青蒿素含量 Content
05001	2005 年 6 月 20 日	0.39
05002	2005 年 7 月 11 日	0.46
05003	2005 年 7 月 20 日	0.62
05004	2005 年 7 月 30 日	0.86
05005	2005 年 8 月 20 日	0.99
05006	2005 年 8 月 29 日	1.02
05007	2005 年 8 月 30 日	1.08
05008	2005 年 9 月 04 日	1.11
05009	2005 年 9 月 20 日	1.09
05010	2005 年 10 月 1 日	1.12

6 讨论

(1)关于青蒿素的检测,现多数以紫外一可见分光光度法居多。本文用 HPLC 法对青蒿素的衍生液进行检测,通过色谱图说明,由于未衍生的 1 mol/L 青蒿素对照品色谱峰面积过小不在线性范围内,未衍生青蒿素样品峰面积几乎与基线相平,所以说在二极管阵列多波长检测器 DAD 的条件下青蒿素的检测只能以衍生状态方为可行。对照品在上述色谱条件下只有单一峰型,同时对照品色谱峰没有出现在对照品衍生后所对应的位置,这说明衍生后所测定的色谱峰为单纯的青蒿素衍生所产生的。

(2)衍生反应完成后加入醋酸,中和衍生后所多出的无机碱;所产生的化合物在 260 nm 处有最大吸收峰。本文采用甲醇-0.01 mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲液(pH5.8,体积比 62:38)为流动相,分离效果好,保留时间适中,且无干扰。方法简便、快速,重现性好,适用于黄花蒿中青蒿素含量的测定。

(3)本文用高压液相色谱法分析我国北方的沈阳、北京;中部的郑州、苏州等地的黄花蒿样品以及广西不同产地的野生黄花蒿样品结果显示:不同产地野生黄花蒿样品之间青蒿素含量均有明显的差异,广西野生黄花蒿中青蒿素含量在 0.334%~0.992%之间,而沈阳、北京、郑州、苏州和杭州等地野生黄花蒿中青蒿素的含量则低于 0.147%。可见我国北部和中部的野生黄花蒿样品的含量明显偏低;而广西野生的黄花蒿样品青蒿素含量普遍较高。

(4)对青蒿素含量进行质量监控,可确定黄花蒿
(下转第 724 页 Continue on page 724)

面的研究具有重要意义,本研究旨在为长江源区的生态环境保护与治理提供科学的参考价值。

参考文献:

- 王伯荪,李鸣光,彭少麟. 1989. 植物种群学[M]. 广州:中山大学出版社:115-120
- Cao YH(曹永慧),Lai PM(赖培森). 2003. Study on *Manglietia yuyuanensis* natural forest community interspecific association (乳源木莲天然林群落种间联结的研究)[J]. *J Fujian Coll Fore* (福建林学院学报),23(2):124-127
- Greig-Smith P. 1983. Quantitative Plant Ecology[M]. 3rd edition. Oxford:Blackwell Scientific Publications,105-112
- Guo XY(郭道宇),Zhang JT(张金屯),Gao HW(高洪文). 2003. A study on interspecific association of dominant species in *Bothriochloa ischaemum* community(白羊草群落优势种间联结性的分析)[J]. *Acta Prat Sin* (草业学报),12(2):14-19
- Huang SN(黄世能),Li YD(李意德),Luo TS(骆土寿). 2000. Dynamic of associations between tree species in a secondary tropical montane rain forest at Jianfengling on Hainan Island(海南岛尖峰岭次生热带地雨林树种间联结动态)[J]. *Acta Phytoecol Sin* (植物生态学报),24(5):569-574
- Kershaw KA,Looney JH. 1985. Quantitative and Dynamic Plant Ecology[M]. London:Edward Arnold Publication,78-94
- Li W(李伟),Zhong Y(钟扬). 1995. Association and correlation analyse of the shoreline wetland plants in Futouhu Lake(湖北斧头湖湖滨湿地植物的联结与相关分析)[J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究),13(1):65-69
- Myster RW,Pickett ST. 1992. Dyanmic of association between plants in ten old fields during 31 years of succession[J]. *J Ecol*,80:291-302
- Schluter D. 1984. A variance test for detecting species association with some example application[J]. *Ecology*,65:998-1005
- Wang BS(王伯荪),Peng SL(彭少麟). 1985. Studies on the measuring techniques of interspecific association of lower-sub-tropical evergreen-broadleaved forests. I. The exploration and the revision on the measuring formulas of interspecific association(南亚热带常绿阔叶林种间联结测定技术研究 I. 种间联结测式的探讨与修正)[J]. *Acta Phytoecol et Geobot Sin* (植物生态学与地植物学丛刊),9(4):274-285
- Wen XQ(温秀卿),Yang GH(杨改河),Wang DX(王得祥),et al. 2004. Vegetation compartmentalization in source regions of Yangtze River and Yellow River(江河源区植被分区)[J]. *J Northwest Sci-Tech Univ Agric Fore* (Nat Sci Edi) (西北农林科技大学学报(自)),32(2):5-13
- Wu YH(吴玉虎). 2000. The floristic characteristics in the source of Changjiang(Yangtze) River(长江源区植物区系研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报),20(6):1086-1101
- Wu H(吴豪),Yu XG(虞孝感). 2001. Ecological environment in the nature preserve of the source region of Changjiang River with the delineation of its ecological functioning zones(长江源自然保护区生态环境状况及功能区划分)[J]. *Res Environ Yangtze Basin* (长江流域资源与环境),10(3):252-257
- Xing F(邢福),Song R(宋日),Qi BL(祁宝林),et al. 2002. Analysis to the interspecific association of *Stellera chamaejasme* population and other main plant species in *Cleistogenes squarrosa* steppe(糙隐子草草原狼毒种群与其他主要植物的种间联结分析)[J]. *Acta Prat Sin* (草业学报),11(4):64-51
- Zhou XY(周先叶),Wang BS(王伯荪),Li MG(李鸣光). 2000. An analysis of interspecific associations in secondary succession forest communities in Heishiding Natural Reserve, Guangdong Province(广东黑石顶自然保护区森林次生演替过程中群落的种间联结性分析)[J]. *Acta Phytoecol Sin* (植物生态学报),24(3):332-339
- Zhu GL(朱桂林),Yang HQ(杨洪琴),Wei ZJ(卫智军),et al. 2004. Interspecific associations in *Stipa breviflora* desert steppe community(短花针茅草原群落种间联结研究)[J]. *Acta Prat Sin* (草业学报),13(5):33-38

(上接第 810 页 Continue from page 810)

最佳采收期。对于同一地点不同采收时间黄花蒿样品进行检测,结果表明黄花蒿最佳采收期为八月初到九月末,这与文献报道的相同(韦霄等,1999)。目前对于不同产地黄花蒿中青蒿素的含量差异原因还有待继续研究。

参考文献:

- 国家药典委员会. 2005. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社:309
- Huang HB(黄海滨),Cen JM(岑家铭). 1994. Determination of Qinghaosu in *Artemisia annua* RP-HPLC(RP-HPLC 测定青蒿中青蒿素的含量)[J]. *J Guangxi Univ* (广西大学学报),19(2):194
- Li DP(李典鹏),Liang XY(梁小燕),Chen XZ(陈秀珍). 1995. Determination of Qinghaosu in *Artemisia annua* in various counties, Guangxi by TLC-UV spectrophotometer(采用薄层层析-紫外分光光度法测定不同产地黄花蒿中青蒿素含量)[J]. *Guihaia* (广西植物),15(3):254
- Li F(李锋),Wei X(韦霄). 1997. The investigation on the forms of *Artemisia annua* in Guangxi(广西黄花蒿类型调查研究)[J]. *Guihaia* (广西植物),17(3):231
- Wei X(韦霄),Li F(李锋). 1999. The effect of different cultivation measures on yield and arteannuin content of *Artemisia annua*(不同措施对黄花蒿产量和青蒿素含量的影响)[J]. *J Guangxi Acad of Sci* (广西科学院学报),15(3):132
- Zhao SS(赵世善),Zeng MY(曾美怡). 1986. Determination of Qinghaosu in *Artemisia annua* by High Performance Liquid Chromatography(高效液相色谱法测定青蒿植物中的青蒿素)[J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志),6(1):3