

衍生化条件的优化及不同产地青蒿中青蒿素含量的柱前衍生化-HPLC 法测定

张 伟, 秦民坚^①, 王国凯

(中国药科大学中药资源学研究室 教育部现代中药研究重点实验室, 江苏 南京 211198)

Optimization of derivation condition and determination of artemisinin content in *Artemisia annua* from different locations by pre-column derivation-HPLC method ZHANG Wei, QIN Min-jian^①, WANG Guo-kai (Key Laboratory of Modern Traditional Chinese Medicines of Ministry of Education, Department of Resources Science of Traditional Chinese Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2011, 20(1): 88-90

Abstract: Derivation conditions of pre-column derivation-HPLC method used for determining artemisinin content were compared and selected, and artemisinin content in above-ground part of *Artemisia annua* L. from seventeen locations was compared by optimal pre-column derivation-HPLC method. The optimal derivation condition is selected via comparing of 0.2% NaOH solution addition (3, 4, 5, 6 and 7 mL), derivation temperature (30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C and 50 °C) and derivation time (0, 2, 5, 10, 20, 40 and 60 min) during derivation process. The optimal derivation condition is adding 5 mL 0.2% NaOH solution, then insulating in 40 °C water bath for 10 min. Differences of artemisinin content in *A. annua* from seventeen locations are obvious, the general trend is that artemisinin content decreases gradually with location from south to north, in which artemisinin content in *A. annua* from Youyang of Chongqing is the highest with a value of 7.08 mg · g⁻¹. The method is simple and accurate with good reproducibility, and can be used to determinate artemisinin content in medicinal material of *A. annua*.

关键词: 青蒿; 青蒿素; 柱前衍生化-HPLC 法; 优化; 产地

Key words: *Artemisia annua* L.; artemisinin; pre-column derivation-HPLC method; optimization; location

中图分类号: Q946.8; R284 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2011)01-0088-03

青蒿(*Artemisia annua* L.)又名黄花蒿,其干燥地上部分具有清热解暑、除蒸、截疟等功效^[1],主要含有倍半萜、黄酮、香豆素等成分^[2-4]。青蒿素(artemisinin)是青蒿中的主要有效成分,用于治疗脑型疟、恶性疟、间日疟^[5],具有高效、速效、低毒、使用安全的特点。目前青蒿素主要从青蒿中提取获得^[6],因此准确测定青蒿中青蒿素的含量对青蒿的选种培育、青蒿素药物生产及其药理药效研究都具有重要意义。

青蒿素为含过氧桥的倍半萜类化合物,因紫外吸收较弱其含量测定较困难。近年来,根据青蒿素分子结构的不同特性已获得了多种青蒿素分析测定方法^[7],如柱前衍生化-HPLC 法。该方法的原理为:青蒿素与碱反应后产生在 292 nm 处有最大吸收的化合物 Q292,但该反应后有无机碱存在,易损坏色谱柱,不适宜直接进样测定;化合物 Q292 在 pH 5.58 ~ pH 6.04 条件下可定量转化为化合物 Q260,该物质在 260 nm 处有最大吸收,可直接用于 HPLC 测定^[8]。目前,柱前衍生化-HPLC 法已被广泛用于青蒿素含量的测定,但在已知的衍生化条件下 Q260 转化不完全,对测定结果有一定影响。

为此,作者对柱前衍生化-HPLC 法中的 NaOH 溶液添加量、反应温度和时间进行了优化,旨在建立一种更准确和快捷的青蒿素含量测定方法;同时,采用该优化反应条件测定了不同产地青蒿中的青蒿素含量,以期对药材青蒿的质量评价和进一步开发利用提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试青蒿于 2009 年 7 月至 8 月采自辽宁锦州、天津盘山、北京昌平和海淀、河北承德和石家庄、山东泰安和安丘、河南鹤壁、江苏盐城和南京、安徽安庆和桐城、湖北恩施和赤壁、重庆酉阳以及贵州铜仁 17 个地区,经中国药科大学秦民坚教授鉴定。采集地上部分,阴干并粉碎后过 60 目筛,备用。

青蒿素对照品(批号:100202-200603)购自中国药品生物制品检定所;甲醇(淮阴汉邦科技有限公司)为色谱纯,水为乐百氏纯净水(广州乐百氏食品有限公司),其他试剂为分析纯。

收稿日期: 2010-10-08

作者简介: 张 伟(1985—),女,河北唐山人,硕士研究生,主要研究方向为药用植物种质资源与质量评价。

^①通信作者 E-mail: minjianqin@163.com

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 实验采用美国 Agilent 公司产 1100 型高效液相色谱仪。Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为体积比 60:40 的 0.01 mol·L⁻¹ 乙酸钠-乙酸缓冲液和甲醇; 柱温 30 ℃, 流速 1 mL·min⁻¹, 波长 260 nm, 进样量 20 μL。

1.2.2 衍生化条件的筛选方法

1.2.2.1 供试溶液制备 精密称取重庆酉阳产青蒿样品粉末 3 g, 加入 150 mL 石油醚 (30 ℃~60 ℃), 50 ℃ 回流 2 h, 过滤, 滤液蒸干得到固体粉末, 用无水乙醇溶解并定容至 50 mL。

1.2.2.2 NaOH 添加量的筛选 取 1 mL 上述样品溶液, 分别加入质量体积分数 0.2% NaOH 溶液 3、4、5、6 和 7 mL, 40 ℃ 水浴保温 5 min, 用 0.08 mol·L⁻¹ 乙酸溶液定容至 10 mL。按上述色谱分析条件进样测定, 并计算青蒿素衍生物 Q260 的峰面积及转化率, 同时测定反应液 pH 值。

1.2.2.3 反应温度和时间的筛选 各取 1 mL 样品溶液, 加入质量体积分数 0.2% NaOH 溶液 5 mL, 分别置于 30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃ 和 50 ℃ 水浴中反应 0、2、5、10、20、40 和 60 min, 将反应溶液置于冰水浴中迅速冷却, 用 0.08 mol·L⁻¹ 乙酸溶液定容至 10 mL。按上述色谱分析条件进样测定, 并计算青蒿素衍生物 Q260 的峰面积及其在转化产物中的含量。

1.2.3 不同产地青蒿中青蒿素含量的测定

1.2.3.1 标准曲线绘制 精密称取青蒿素对照品适量, 无水乙醇溶解并定容至 5 mL; 吸取 1 mL, 加入质量体积分数 0.2% NaOH 溶液 5 mL, 40 ℃ 水浴保温 10 min, 用 0.08 mol·L⁻¹ 乙酸溶液定容至 10 mL, 得到 107.2 μg·mL⁻¹ 对照品溶液。

分别精密吸取 5.000、2.500、1.250、0.625、0.313、0.157 和 0.079 mL 对照品溶液, 无水乙醇定容至 10 mL, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积。以对照品溶液质量浓度为横坐标 x 、峰面积为纵坐标 y 进行线性回归分析, 得到的回归方程为: $y = 38.155x + 69.478$, $R = 0.9993$, 在 0.8375~107.2 μg·mL⁻¹ 范围内峰面积与青蒿素质量浓度呈良好的线性关系。

1.2.3.2 样品提取和分析 取不同产地青蒿粉末 1 g, 精密称量后, 加入 50 mL 石油醚 (30 ℃~60 ℃), 50 ℃ 回流 2 h, 用石

油醚补足质量, 过滤, 残渣用少量石油醚洗涤并过滤, 合并滤液, 回收石油醚, 残渣用无水乙醇溶解并定容至 10 mL; 吸取 1 mL, 加入质量体积分数 0.2% NaOH 溶液 5 mL, 40 ℃ 水浴保温 10 min, 用 0.08 mol·L⁻¹ 乙酸溶液定容至 10 mL, 摇匀并过滤, 滤液即为样品溶液。按上述色谱条件进行分析, 计算峰面积并根据标准曲线计算样品中青蒿素的含量, 实验重复 3 次。

1.2.4 方法学考察 取对照品溶液, 按上述反应及色谱条件重复进样 5 次, RSD 为 1.62%, 表明仪器精密密度较好。

取重庆酉阳产青蒿样品溶液, 分别于 0、2、4、6、10 和 12 h 按上述反应及色谱条件进样测定, RSD 为 1.16%, 表明样品溶液稳定性良好, 12 h 内基本稳定。

取重庆酉阳产青蒿粉末样品 5 份, 精密称量后, 按上述样品溶液制备方法、反应条件和色谱条件进行提取和测定, RSD 为 1.24%, 表明本方法重复性较好。

精密称取已知含量的重庆酉阳产青蒿样品粉末 5 份, 每份 1 g, 分别加入 107.2 μg·mL⁻¹ 青蒿素对照品溶液 1 mL, 按上述样品溶液制备方法、反应条件和色谱条件进行提取和测定, 加样回收率平均值为 98.49%, RSD 为 1.40%, 表明本方法的回收率较好。

2 结果和分析

2.1 柱前衍生化-HPLC 法中衍生化条件的优化

2.1.1 NaOH 溶液添加量对 Q260 转化率和反应液 pH 值的影响 图 1-a 显示: 添加 3、4、5 或 6 mL NaOH 溶液, Q260 的转化率均 90% 以上。加入 3、4、5、6 或 7 mL NaOH 溶液, Q260 的峰面积分别为 1 257.3、1 495.3、1 502.7、1 307.1 和 1 028.7; 其中, 加入 4 或 5 mL NaOH 溶液, Q260 的峰面积较大。图 1-b 显示: 添加 5 mL NaOH 溶液, 反应液的 pH 值更接近中性。综合考虑认为, 衍生化过程中 NaOH 溶液的最佳添加量为 5 mL。

2.1.2 反应温度和时间对 Q260 峰面积和转化率的影响 未加热体系中 Q260 峰面积最小, 经水浴保温的体系中 Q260 峰面积较大。图 2-a, b 显示: 在一定反应时间内 (0~10 min),

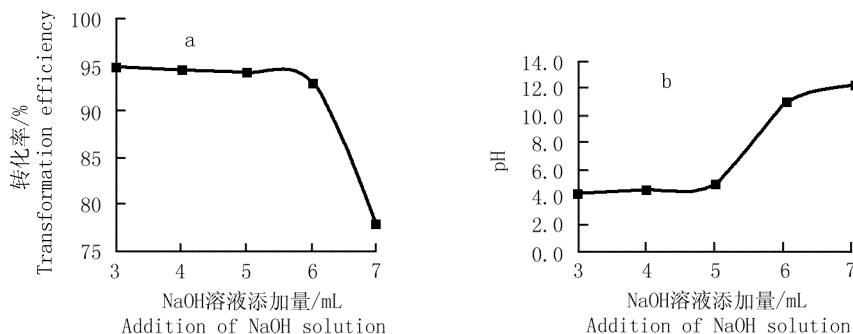


图 1 NaOH 溶液添加量对 Q260 转化率 (a) 和反应液 pH 值 (b) 的影响

Fig. 1 Effect of NaOH solution addition on Q260 transformation efficiency (a) and pH value (b) of reaction solution

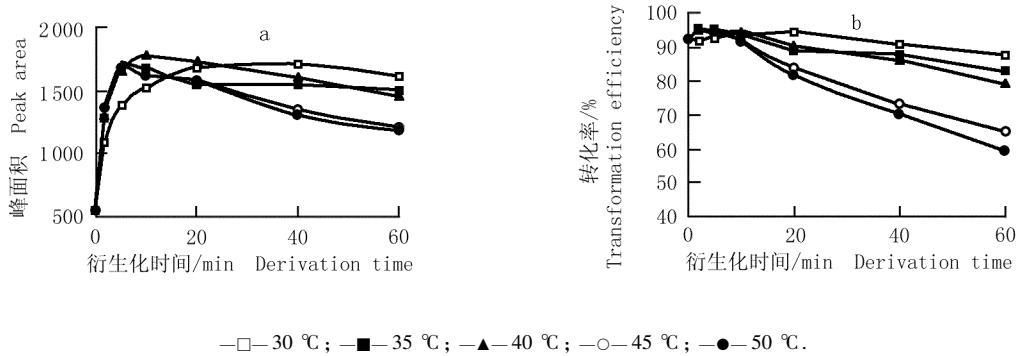


图2 衍生化时间和温度对 Q260 峰面积 (a) 和转化率 (b) 的影响
Fig. 2 Effects of derivatization time and temperature on peak area (a) and transformation efficiency (b) of Q260

Q260 的峰面积随时间延长而增大,之后随时间延长(10~60 min)而减小;且随反应时间的延长,Q260 转化率的变化趋势与之相似。值得注意的是,反应温度越高拐点时间越短。综合考虑认为,衍生化过程中的最佳反应条件为 40 °C 保温 10 min。

综合上述实验结果,确定的衍生化条件为:加入 5 mL 质量体积分数 0.2% NaOH 溶液,置于 40 °C 水浴保温 10 min。

2.2 不同产地青蒿中青蒿素含量的比较

研究结果表明(表 1),不同产地青蒿地上部分的青蒿素含量差异明显,以重庆酉阳产青蒿中的青蒿素含量最高,达到 7.08 mg · g⁻¹。17 个产地青蒿中的青蒿素含量总体呈现由南向北逐渐降低的趋势,与相关文献的报道结果基本一致^[9],这可能与不同产地的气候条件相关。

表 1 不同产地青蒿中青蒿素含量的比较
Table 1 Comparison of artemisinin content in *Artemisia annua* L. from different locations

编号 No.	产地 Location	青蒿素含量/mg · g ⁻¹ Artemisinin content
1	辽宁锦州 Jinzhou of Liaoning	1.50
2	河北承德 Chengde of Hebei	0.09
3	北京昌平 Changping of Beijing	0.14
4	天津盘山 Panshan of Tianjin	0.91
5	北京海淀 Haidian of Beijing	0.78
6	河北石家庄 Shijiazhuang of Hebei	1.25
7	山东泰安 Tai'an of Shandong	0.87
8	山东安丘 Anqiu of Shandong	0.74
9	河南鹤壁 Hebi of He'nan	1.00
10	江苏盐城 Yancheng of Jiangsu	0.33
11	江苏南京 Nanjing of Jiangsu	0.78
12	安徽安庆 Anqing of Anhui	0.30
13	安徽桐城 Tongcheng of Anhui	0.04
14	湖北恩施 Enshi of Hubei	2.58
15	湖北赤壁 Chibi of Hubei	1.99
16	重庆酉阳 Youyang of Chongqing	7.08
17	贵州铜仁 Tongren of Guizhou	5.53

3 讨 论

目前,青蒿素的测定方法主要有紫外-可见分光光度法、HPLC-ELSD 法、柱前衍生化-HPLC 法等,但都有一定的局限性。例如,紫外-可见分光光度法专属性不强;HPLC-ELSD 法灵敏度不高;柱前衍生化-HPLC 法衍生化条件难以控制等,导致测定结果有偏差。作者考察了柱前衍生化过程中涉及的 3 个条件,选择最优化的条件使反应完全可控。经优化的柱前衍生化-HPLC 法分离效果好,保留时间适中,且无干扰。该方法简便、快速,重现性好,适于药材青蒿中青蒿素含量的测定。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2005 年版(一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 137.
- [2] 吕华军, 黄举鹏, 卢健, 等. 青蒿化学成分的研究[J]. 广西中医药, 2007, 30(3): 56-57.
- [3] 陈靖, 周玉波, 张欣, 等. 黄花蒿幼嫩叶的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(11): 866-870.
- [4] 刘鸿鸣, 李国林, 吴慧章. 中药青蒿化学成分的研究[J]. 药学学报, 1981, 16(1): 65-66.
- [5] 张积强, 陈强, 刘宗怀. 抗疟新药青蒿素的研究[J]. 陕西化工, 1996(4): 8-10.
- [6] Lapkin A A, Plucinski P K, Cutler M, et al. Comparative assessment of technologies for extraction of artemisinin [J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(11): 1653-1664.
- [7] 张彝, 邹婷, 王剑文. 青蒿素检测方法的研究近况[J]. 抗感染药学, 2008, 5(4): 201-204.
- [8] 刘丽芳, 王茜, 李海燕, 等. 柱前衍生-RP-HPLC 法测定青蒿中青蒿素的含量[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(6): 60-62.
- [9] 岑丽华, 徐良, 黄荣岗, 等. 不同纬度及不同栽培立地条件对黄花蒿青蒿素含量的影响[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(13): 46-47, 14.