

# HPLC-UV-ELSD法同时测定青蒿中青蒿素、青蒿乙素和青蒿酸的含量

张东<sup>1</sup>, 杨岚<sup>\*</sup>, 杨立新<sup>1</sup>, 王满元<sup>2</sup>, 屠呦呦<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700 2. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069)

**摘要:** 用 HPLC-UV-ELSD 法同时测定青蒿药材中青蒿素、青蒿乙素和青蒿酸的含量。采用 Nucleodur C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm ID); 以乙腈-0.1% 乙酸水 (50:50) 为流动相; 紫外检测波长 209 nm, 蒸发光散射检测器漂移管温度 50 °C。结果显示, 青蒿素、青蒿乙素和青蒿酸能够达到很好分离。它们的线性范围分别为 0.52~2.6 μg  $r=0.9994$  ( $n=5$ ); 0.022~4.4 μg  $r=0.9999$  ( $n=5$ ); 0.203~8.12 μg  $r=0.9998$  ( $n=5$ )。平均回收率分别为 99.45% (RSD=2.3%,  $n=6$ ); 102.37% (RSD=1.7%,  $n=6$ ); 101.10% (RSD=0.79%,  $n=6$ )。本法简单、准确、快速, 可同时测定青蒿药材中青蒿素、青蒿乙素和青蒿酸的含量。

**关键词:** 青蒿; HPLC-UV-ELSD 青蒿素; 青蒿乙素; 青蒿酸

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2007)09-0978-04

## Determination of artemisinin, arteannuin B and artemisinic acid in Herba Artemisiae Annuae by HPLC-UV-ELSD

ZHANG<sup>1</sup> Dong YANG Lan<sup>\*</sup>, YANG Lixin<sup>1</sup>, WANG Man-yuan<sup>2</sup>, TU You-you<sup>1</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. College of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**Abstract** To establish an HPLC-UV-ELSD method for the determination of the content of artemisinin, arteannuin B and artemisinic acid in Herba Artemisiae Annuae. The analytical column was Nucleodur RP-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm ID). The mobile phase was acetonitrile-0.1% acetic acid (50:50) and the flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup> with a UV detector for artemisinin, the detection wavelength at 209 nm, and the evaporative light-scattering detector (ELSD) for arteannuin B and artemisinic acid, the drift tube temperature 50 °C, the nitrogen flow rate 30 psi and the gain was 50. The resolution of artemisinin, arteannuin B and artemisinic acid was good. The linear calibration curves were obtained over the range of 0.52–2.6 μg for artemisinin ( $r=0.9994$ ,  $n=5$ ), 0.022–4.4 μg for arteannuin B ( $r=0.9999$ ,  $n=5$ ) and 0.203–8.12 μg for artemisinic acid ( $r=0.9998$ ,  $n=5$ ), separately. The mean recoveries of the three compounds were 99.45%, 102.37% and 101.10% with RSD of 2.3%, 1.7% and 0.79%, respectively. This method is simple, rapid, accurate and suitable for the determination of the content of the three compounds in the herbs.

**Key words** Herba Artemisiae Annuae; HPLC-UV-ELSD; artemisinin; arteannuin B; artemisinic acid

青蒿 (Herba Artemisiae Annuae) 为常用中药, 为菊科植物黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 的干燥地上部

分。药理研究表明, 青蒿具有抗疟、调节免疫功能、抗血吸虫病和祛痰、镇咳、平喘、抑制病毒、细菌等作用。20世纪70年代初, 我所研究人员从青蒿中发现了抗疟活性成分——青蒿素, 以青蒿素为先导化合物, 国内外研发了双氢青蒿素、青蒿琥酯、蒿甲醚、蒿乙醚等一系列抗疟药, 为当前抗药性疟

收稿日期: 2007-01-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30572319) 资助。

\* 通讯作者 Tel: 86-10-6401411-2973 Fax:

E-mail: ylan\_66@yahoo.com.cn

疾治疗的首选药物。尽管有关青蒿素的化学合成和生物合成方法均有报道,但还不能实现工业化生产,目前从青蒿中提取是获取青蒿素的唯一途径,我国拥有青蒿资源优势,是青蒿素的主产国。青蒿素、青蒿乙素和青蒿酸为青蒿中倍半萜类成分,均被认为是青蒿素生物合成的前体,具有抗菌、抗真菌等活性<sup>[1,2]</sup>,与青蒿的传统功效一致。文献报道同时测定青蒿中青蒿素、青蒿乙素、青蒿酸的方法有 HPLC-UV-ECD 法<sup>[3]</sup>、HPLC-MS/MS 法<sup>[4]</sup>,作者采用 ELSD 法检测仅有很弱紫外吸收的青蒿素、UV 法检测青蒿中含量较低的青蒿乙素和青蒿酸,建立了同时测定青蒿中这 3 种成分含量的 HPLC-UV-ELSD 法,并对不同产地青蒿药材进行测定。

## 材料与方 法

**仪器与材料** Alliance 高效液相色谱仪及 Empower 2 色谱工作站 (Waters 公司); Waters 2996 紫外检测器, 2420 蒸发光散射检测器 (Waters 公司); NA-5L 氮气发生器 (北京中兴汇利科技发展有限公司); KQ-100 型超声波清洗器 (功率 100W, 频率 40kHz, 昆山超声仪器有限公司); Milli-Q 超纯水机 (美国 Millipore 公司); 青蒿素、青蒿乙素、青蒿酸对照品 (本实验室自制, 经 HPLC 面积归一化法检测, 纯度均大于 99%); 青蒿药材经中国科学院青蒿素研究中心屠呦呦研究员鉴定。

**色谱分析条件** 色谱柱: Nucleodur C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm ID); 流动相: 乙腈-0.1% 乙酸 (50:50); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 25 °C; 青蒿乙素和青蒿酸用紫外检测器检测, 波长为 209 nm; 青蒿素用蒸发光散射检测器检测, 漂移管温度 50 °C, 载气 (N<sub>2</sub>) 压力 30 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa), 增益值为 50; 进样体积为 10 或 30 μL。

**供试品溶液的制备** 取粉碎至细粉 (过三号筛) 青蒿药材 0.5 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入石油醚 (60~90 °C) 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声 (100 W, 40 kHz) 提取 50 min, 放冷, 再称定重量, 用石油醚补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 10 mL, 蒸干, 残渣加甲醇使溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀、过滤, 备用。

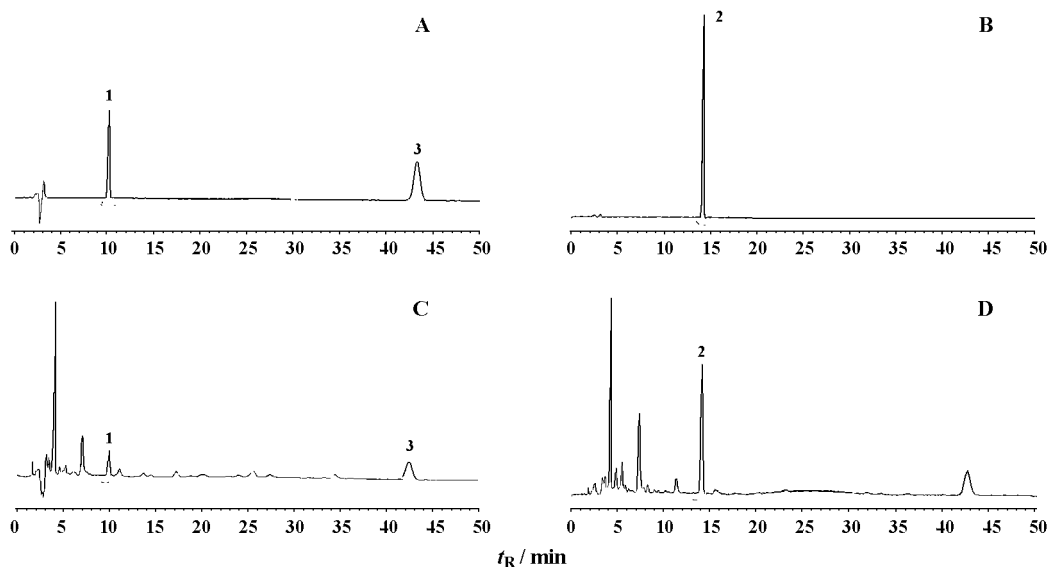
## 结果与讨论

### 1 方法的专属性

对照品与青蒿药材的 HPLC-UV-ELSD 色谱图见图 1, 由图 1 可知, 青蒿素、青蒿乙素和青蒿酸的分离良好。

### 2 线性关系考察

取干燥至恒重的青蒿素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 0.26 mg · mL<sup>-1</sup> 溶液, 为青蒿素对照品溶液。取干燥至恒重的青蒿乙素和青蒿酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成 0.11 mg · mL<sup>-1</sup> 青蒿乙素



**Figure 1** HPLC chromatograms of reference (A, B) and the extract from *Herba Artemisiae Annuae* (C, D).

A, C: UV; B, D: ELSD; 1: Artemisinin; 2: Artemisinin; 3: Artemisinic acid

和  $0.203 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  青蒿酸溶液, 为青蒿乙素和青蒿酸的混合对照品溶液。

分别精密吸取青蒿素对照品溶液 2、4、6、8 和  $10 \mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 用 ELSD 检测器测定峰面积, 以进样量的对数为横坐标 ( $X$ ), 峰面积的对数为纵坐标 ( $Y$ ), 绘制标准曲线, 计算回归方程为:  $Y = 2.3941X + 6.3758$ ,  $r = 0.9994$ , 最低检测限为  $0.26 \mu\text{g}$ , 表明青蒿素在  $0.52 \sim 2.6 \mu\text{g}$  内, 进样量对数与峰面积对数呈良好线性关系。

分别精密吸取青蒿乙素和青蒿酸的混和对照品溶液 1、2、10、20 和  $40 \mu\text{L}$  及稀释 10 倍的对照品溶液  $2 \mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 用 UV 检测器测定峰面积, 以进样量为横坐标 ( $X$ ), 峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 绘制标准曲线, 计算青蒿乙素的回归方程为:  $Y = 2135.000X - 6251$ ,  $r = 0.9999$ , 最低检测限为  $0.011 \mu\text{g}$ , 表明青蒿乙素在  $0.022 \sim 4.4 \mu\text{g}$  内, 进样量与峰面积呈良好线性关系; 青蒿酸的回归方程为:  $Y = 2341.000X - 98750$ ,  $r = 0.9998$ , 最低检测限为  $0.0406 \mu\text{g}$ , 表明青蒿酸在  $0.203 \sim 8.12 \mu\text{g}$  内, 进样量与峰面积呈良好线性关系。

### 3 精密度实验

取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 每次  $30 \mu\text{L}$ , 测得青蒿素、青蒿乙素和青蒿酸峰面积积分值, 以青蒿素峰面积计算 RSD 为  $0.91\%$ , 以青蒿乙素峰面积计算 RSD 为  $1.28\%$ , 以青蒿酸峰面积计算 RSD 为  $0.63\%$ , 表明精密度良好。

### 4 稳定性实验

取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12 和 24 h 进样, 测得青蒿素、青蒿乙素、青蒿酸峰面积积分值, 以青蒿素峰面积计算 RSD 为  $1.20\%$ , 以青蒿乙素峰面积计算 RSD 为  $1.79\%$ , 以青蒿酸峰面积计算 RSD 为  $1.34\%$ , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 5 重复性实验

精密称取同批青蒿药材粉末 5 份, 每份为  $0.5 \text{ g}$ , 按“供试品溶液制备”项下操作, 并取  $10 \mu\text{L}$  进样。测定并计算青蒿素、青蒿乙素、青蒿酸含量, 5 次测定值的 RSD 分别为  $1.74\%$ ,  $0.98\%$  和  $0.73\%$ , 重现性良好。

### 6 回收率实验

采用加样回收法, 取已知含量的同批样品 6 份, 每份  $0.25 \text{ g}$ , 精密称定, 分别精密加入适量青蒿素、青蒿乙素、青蒿酸, 按制备供试品溶液方法制备, 测定并计算青蒿素、青蒿乙素、青蒿酸的回

收率, 结果回收率分别为  $99.45\%$ ,  $102.37\%$  和  $101.10\%$ ; RSD 分别为  $2.3\%$ ,  $1.7\%$  和  $0.79\%$ 。

### 7 青蒿药材的测定

取所收集的 10 个不同产地的青蒿药材, 按“供试品溶液制备”项下操作, 并精密吸取  $10 \mu\text{L}$  或  $30 \mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 测得青蒿素、青蒿乙素、青蒿酸的含量。测定结果见表 1。

**Table 1** Contents of artemisinin, artemisinin B, artemisinin acid in *Herba Artemisiae Annuae* from different sources (%)

Source	Artemisinin	Artemisinin B	Artemisinin acid
Hunan jishou	0.69	0.0045	-
Hunan huxi (wild)	0.823	0.0049	0.034
Hunan huxi (cultivated)	0.589	0.011	0.04
Hunan zhangjiajie	0.549	0.0023	-
Hunan huaihua	0.522	0.015	0.028
Chongqing youyang	0.681	0.0023	0.023
Shanxi guangling	0.164	0.115	0.541
Shanxi yixing	0.081	0.069	0.341
Shanxi diandingshan	0.146	0.049	0.123
Indonesia	0.187	0.0036	-

-: Not detected

### 讨论

青蒿素只有很弱的末端紫外吸收, 不能用 UV 法进行定量分析, 故选择用 ELSD 法检测。用 ELSD 法也可检测青蒿乙素和青蒿酸, 但由于其灵敏度低, 对这两个成分含量低的青蒿药材来说, 该法同时测定 3 种成分较困难, 故采用灵敏度较高的 UV 法对青蒿乙素和青蒿酸进行定量测定。UV 检测器对所测成分性质无任何影响, 据此本文建立了 HPLC-UV-ELSD 同时测定青蒿中 3 种成分的方法。

本实验选择了正己烷、石油醚 ( $60 \sim 90 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 和氯仿为提取溶剂进行考察, 结果正己烷对青蒿乙素提取不完全, 石油醚 ( $60 \sim 90 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 和氯仿均能对 3 种成分提取完全, 两者结果没有差异, 但是氯仿提取的样品杂质多, 出峰较为复杂, 而石油醚 ( $60 \sim 90 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 提取的样品杂峰少, 对所测成分没有干扰, 所以选择石油醚 ( $60 \sim 90 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 作为提取溶剂。文献<sup>[3]</sup>报道测定青蒿乙素和青蒿酸的紫外波长为  $220 \text{ nm}$ , 经过全波长扫描, 选择在  $209 \text{ nm}$  下进行测定, 这两个化合物响应值较高, 且无其他成分的干扰。

对不同产地的青蒿药材测定结果显示, 青蒿素含量高的药材, 青蒿乙素、青蒿酸含量很低; 青蒿素

含量低的药材,青蒿乙素、青蒿酸含量较高。由于青蒿乙素、青蒿酸是青蒿素生物合成的前体化合物,该测定结果对于研究青蒿植物体内青蒿素的生物合成及如何提高青蒿素的含量有一定的参考价值。

## References

- [1] Dhingra V, Pakk iSR, Narasu ML, Antimicrobial activity of artemisin in and its precursors [ J]. Curr Sci 2000 78 708- 710
- [2] Huang L, Liu JE, Liu LX, et al Studies on the antipyretic and anti-inflammatory effects of *Artemisia annua* L [ J]. China J Chin Mat Med (中国中药杂志), 1993, 18 44- 48

- [3] Vandenberghe DR, Vergauwe AN, Montagu MV, et al Simultaneous determination of artemisin in and its bioprecursors in *Artemisia annua* [ J]. J Nat Prod 1995, 58 798- 803
- [4] Filip CW, Van N, Sofie RF, et al Quantitation of artemisin in and its biosynthetic precursors in *Artemisia annua* L by high performance liquid chromatography-electrospray quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [ J]. J Chromatogr A, 2006, 1118 180- 187.

## 《国际药学研究杂志》2008年征订启事

《国际药学研究杂志》原刊名《国外医学药学分册》,由军事医学科学院主管、军事医学科学院毒物药物研究所主办,是以评述性论文为主的综合性药学期刊。设置栏目有综述、专家论坛、研究论著、编译、文摘和医药信息等。本刊根据国内药学科研、教学、临床和生产的需要,追踪报道世界各国药学领域的新进展、新动向、新技术和新成果,包括药物化学、药剂学、药物代谢、药物分析、药理和毒理学、生化药理学和临床药理学等基础研究和应用研究方面的内容。刊登内容既有新颖的基础理论,又有应用研究和临床实践,适合于从事药理学研究的科技人员、临床医师和药师、制药工程技术人员,以及医药院校师生阅读和参考。被国内外多种数据库和检索期刊收录。是中国生物医学核心期刊。

本刊为双月刊,大16开本,80页,国内外公开发行,每期定价10.00元。国内邮发代号:82-135;国外代号:BM 6568;国外发行:中国国际图书贸易总公司(北京399信箱)。欢迎广大读者在当地邮局订阅,也可直接与编辑部联系补订。

地址:北京市太平路27号六所《国际药学研究杂志》编辑部(邮编:100850)

电话:010-66931618, 010-66931637

E-mail: guo@niclmj.ac.cn