

HPLC-ELSD测定青蒿素片中青蒿素的含量

张东¹, 杨岚^{1*}, 王满元², 屠呦呦¹ (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: 目的 建立HPLC-ELSD测定青蒿素片中青蒿素含量的方法, 并用于青蒿素片中青蒿素含量的测定。方法 采用蒸发光散射检测器对青蒿素片中青蒿素进行HPLC分析, Thermo C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以甲醇-水(80:20)为流动相; 流速为1.0 mL·min⁻¹; 柱温为25℃; 蒸发光散射检测器漂移管温度60℃, 载气(N₂)压力5.8 × 10⁻³ Pa 增益值为50。结果 青蒿素在1.002~4.008 μg内呈现良好的线性关系(r=0.9996), 平均加样回收率为99.45% (RSD为2.3%)。结论 本法简单、准确、重复性好, 可用于测定青蒿素片中青蒿素的含量。

关键词: 青蒿素片; 青蒿素; HPLC-ELSD; 含量测定

中图分类号: R284 文献标识码: A 文章编号: 1001-2494(2008)07-0491-02

Determination of Artemisinin in Artemisinin Tablets by HPLC-ELSD

ZHANG Dong¹, YANG Lan^{1*}, WANG Man-yuan², TU You-you¹ (1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700 China; 2. College of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, Capital University of Medical Science, Beijing 100069 China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC-ELSD method for the determination of the content of artemisinin in artemisinin tablets. **METHODS** The analytical column was Thermo RP-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-water (80:20). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The samples were determined by an evaporative light-scattering detector (ELSD) Waters 2420 with the drift tube temperature at 60℃ and the nitrogen flow pressure of 5.8 × 10⁻³ Pa. **RESULTS** The calibration curve was linear in the range of 1.002~4.008 μg (for artemisinin, r=0.9999). The average recovery (n=5) was 99.45% (RSD=2.3%). **CONCLUSION** The method is simple, accurate and with good reproducibility. It can be used as the quality control of artemisinin tablet.

KEY WORDS artemisinin; artemisinin tablet; HPLC-ELSD; determination

青蒿素是从青蒿中提取出来的有效成分, 是我国唯一获得国际承认的抗疟药物。青蒿素片是由我所研制, 该药对间日疟、恶性疟包括凶险型脑疟均有卓效, 尤其对抗氯喹、抗喹哌等抗性疟疾有特效。青蒿素的含量测定方法一般采用双波长薄层扫描法、紫外分光光度法^[1]、柱前衍生-RP-HPLC^[2]、高效液相蒸发光散射检测法^[3]、反相高效液相色谱法^[4]等。目前青蒿素片的含测方法为紫外分光光度法, 该法有干扰, 不准确。本实验采用蒸发光散射检测法测定青蒿素片中青蒿素的含量, 方法可靠, 结果准确, 可以控制青蒿素片的质量。

1 仪器与试剂

Alliance高效液相色谱仪及 Empower2 色谱工作站 (Waters公司); 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300 W, 频率50 kHz, 昆山超声仪器有限公司); Milli-Q超纯水机 (美国 Millipore公司); 青蒿素对照品 (中国药品生物制品检定所, 纯度大于98%, 批号100202-200402); 青蒿素片 (本实验室自制, 批号为060510, 060511, 060512), 甲醇 (色谱纯)。

2 方法与结果

- [2] TOLEDO MARANTE F, J GARCIA CASTELLANO A, ESTEVEZ ROSAS F, et al. Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity [J]. *J Chem Ecol*, 2003, 29 (9): 2049-2069.
- [3] REZANKA T, GUSCHNA IA. Glycosidic compounds of mucic protoconstipatic and alle-muolic acids from lichen of central Asia [J]. *Phytochemistry*, 2000, 54 (6): 635-645.
- [4] REZANKA T, GUSCHNA IA. Further glycosides of lichen's acids from central Asian lichens [J]. *Phytochemistry*, 2001, 56 (2): 181-188.

- [5] DING ZH, DING JK, LOU JF, et al. Chemical constituents from *Parmelia tinctorum* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1990, 12 (1): 99-100.
- [6] LI B, LIN ZW, SUN HD. Chemical constituents from *Lobaria isidiophora* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1990, 12 (4): 447-451.
- [7] NARU IT, SAWADA K, TAKATSUKI S, et al. NMR Assignments of depsides and tripeptides of the lichen family Umbilicariaceae [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48 (5): 815-822.

(收稿日期: 2007-05-07)

作者简介: 张东, 男, 实习研究员 * 通讯作者: 杨岚, 女, 研究员 Tel: (010) 64014411-2971 E-mail: ylan_66@yahoo.com.cn

2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (80:20); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; 蒸发光散射检测器漂移管温度 60 °C, 载气 (N₂) 压力 5.8 × 10⁻³ Pa 增益值为 50 进样体积为 5 μL。

2.2 方法的专属性考察

由青蒿素与溶剂及辅料的 HPLC-ELSD 色谱图可知, 辅料对青蒿素的测定没有干扰, 色谱柱的理论塔板数按青蒿素的峰计算应不低于 4 000。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒重的青蒿素对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.501 mg 的溶液, 为对照品溶液。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取对照品溶液 2, 4, 5, 6, 8 μL 注入液相色谱仪, 计算峰面积, 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: $Y = 1.8784X + 5.9856$ $r = 0.9996$, 表明对照品在 1.002~4.008 μg 内, 进样量对数与峰面积对数呈良好线性关系。

2.5 精密度的实验

精密量取“2.3”项下对照品溶液 5 μL, 连续进样 6 次, 以青蒿素的含量计算 RSD 为 1.83% ($n = 6$), 表明精密度良好。

2.6 样品溶液的制备

取本品 20 片, 精密称定, 研细混匀, 精密称取细粉适量 (约相当于青蒿素 50 mg) 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 100 mL, 称定重量, 超声 (300 W, 50 kHz) 处理 15 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 即为供试品溶液。

2.7 稳定性实验

取同一份 (批号为 060510) 供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 6, 24 h 测定, 测得的峰面积变化趋势不明显, 以青蒿素的含量计算 RSD 为 0.72%, 表明在室温条件下供试品溶液 24 h 内稳定。

2.8 重现性实验

取同一批样品 (批号 060510) 6 份, 分别制备成供试品溶液, 在所确定的 HPLC 条件下, 测定青蒿素的含量, RSD 为 1.86%, 说明方法重现性良好。

2.9 回收率实验

精密称取已知含量同一批号的样品 (批号 060510 含量每片 248.7 mg) 6 份, 每份约 30 mg (含青蒿素约 24 mg), 分别精密加青蒿素对照品适量,

精密加甲醇 100 mL, 按“2.6”方法制成供试品溶液。测定青蒿素的含量, 结果平均回收率为 99.45%, 相对标准偏差为 2.31%, 说明方法是可靠的。

2.10 样品测定

精密吸取对照品溶液 5 μL, 3 批样品溶液 5 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。按外标两点法计算供试品中青蒿素的含量。测定结果见表 1。

表 1 样品测定结果 $n = 3$

Tab. 1 Determination results of samples $n = 3$

No.	Content/mg	RSD %
060510	248.7	0.28
060511	251.2	0.73
060512	252.3	1.01

3 讨论

本实验选择了石油醚、乙酸乙酯、甲醇作为提取溶剂, 结果均能提取完全, 但是石油醚和乙酸乙酯极性较小, 需要回收溶剂后再以流动相溶解后进样, 甲醇不需要回收溶剂, 所以选择甲醇作为提取溶剂。实验还考察了提取时间对提取效率的影响, 发现超声 15 min 就能提取完全, 所以选择超声 15 min。

本实验选择了 3 种不同品牌的色谱柱分别在两台液相色谱仪上对样品进行测定, 所得结果变化很小, RSD 为 1.26%, 说明本方法的耐用性良好。

李锦黎等^[4]采用反相高效液相色谱法测定青蒿素的含量, 青蒿素测定的线性范围为 10.4~104 μg 对样品含量要求较高, 对于微量的青蒿素无法测量, 具有一定的局限性, 应用本法测定青蒿素的线性范围为 1.002~4.008 μg 有效的解决了这个问题, 定量下限降低了一个数量级。

本实验所建立的 HPLC-ELSD 方法测定青蒿素的含量, 准确度高、专属性强, 灵敏度及稳定性均较好, 测定方法可靠, 测定结果能客观反映青蒿素的含量, 可作为该制剂的质量控制方法, 并可作为其他复方制剂的参考。

REFERENCES

- [1] LI D P, LIANG X Y, CHEN X Z, et al. Determination of Qinghaosu in *Artemisia annua* L. in various counties Guangxi by TLC-UV spectrophotometry [J]. *Guhania* (广西植物), 1995, 15(3): 254-255.
- [2] LU L F, WANG Q, LIH Y, et al. Application of precolumn reaction to RP-HPLC of Qinghaosu in *Artemisia annua* [J]. *China Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2004, 23(6): 60-62.
- [3] ZHOU H H, ZHENG W X, GE F H. Determination of Qinghaosu in *Artemisia annua* by HPLC-ELSD [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2006, 29(3): 242-244.
- [4] LI J S, JIANG W Z. Determination of Qinghaosu in *Artemisia annua* by RP-HPLC [J]. *Her Med* (医药导报), 2005, 24(11): 1053-1054.

(收稿日期: 2007-05-29)