

HPLC-ELSD 法测定黄花蒿提取物中青蒿素

惠玉虎, 何锦伟, 杨朝昆, 寇玉锋, 陆福来

(西安皓天生物工程技术有限责任公司, 陕西 西安 710075)

摘要:目的 建立 HPLC-ELSD 法对黄花蒿提取物中青蒿素的测定方法。方法 采用 HPLC-ELSD 法。色谱柱: Inertsil ODS-3 (150 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水 (69:31, 用三氟醋酸调 pH 至 3); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测器漂移管温度: 45 $^{\circ}$ C; 载气体积流量: 1.0 L/min; 分流: 开; 柱温: 25 $^{\circ}$ C。结果 青蒿素在 0.589 3~5.893 5 mg/mL 时面积的常用对数值与其质量浓度的常用对数值线性关系良好 ($r=0.989$); 样品平均回收率为 98.71% (RSD 为 0.42%, $n=6$)。结论 该方法灵敏、准确可靠, 可作为黄花蒿提取物中青蒿素的定量方法。

关键词: 黄花蒿提取物; 青蒿素; HPLC-ELSD

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)07-1020-02

Determination of artemisinin in *Artemisia annua* extract by HPLC-ELSD

HUI Yu-hu, HE Jin-wei, YANG Zhao-kun, KOU Yu-feng, LU Fu-lai

(Xi'an Haotian Bio-Engineering Technology Co., Ltd., Xi'an 710075, China)

Key words: *Artemisia annua* L. extract; artemisinin; HPLC-ELSD

青蒿为菊科植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分, 具有清热解毒、抗疟以及促进免疫等作用。青蒿素是从青蒿中提取分离的一种特效抗疟药, 具有疗效高且毒性很低的特点。关于青蒿素的测定方法已有报道, 有 UV、HPLC-UV 等, 但是由于青蒿素结构特殊, 没有生色基, 又热不稳定, 在紫外检测前须与氢氧化钠反应定量转化成另一种在紫外下有吸收的物质^[1~3]。这些方法操作繁琐且不易精确控制, 影响定量的准确性。本实验对黄花蒿提取物中青蒿素的测定采用反相高效液相色谱法, 利用蒸发光散射检测器直接进行检测。该方法不需要复杂的前处理过程, 操作简单, 结果准确、可靠, 可用作青蒿素的质量控制。

1 仪器与试药

Waters 1525 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司), Alltech ELSD 2000ES 型蒸发光散射检测器 (美国 Alltech 公司), Empower 色谱数据工作站 (美国 Waters 公司), KQ-250 型超声波清洗器 (江苏昆山超声仪器厂)。

青蒿素对照品 (质量分数为 99%, 公司外购)。黄花蒿粗提物 (西安皓天生物工程技术有限责任公司)。乙腈为色谱纯, 水为二次重蒸馏水, 三氟乙酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Inertsil ODS-3 (150 mm×

4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水 (69:31, 用三氟醋酸调 pH 至 3); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}$ C。ELSD 检测器条件: 漂移管温度: 45 $^{\circ}$ C; 气体体积流量: 1.0 L/min; 分流: 开。在上述色谱条件下, 青蒿素保留时间约为 6.3 min, 理论板数大于 3 000 见图 1。

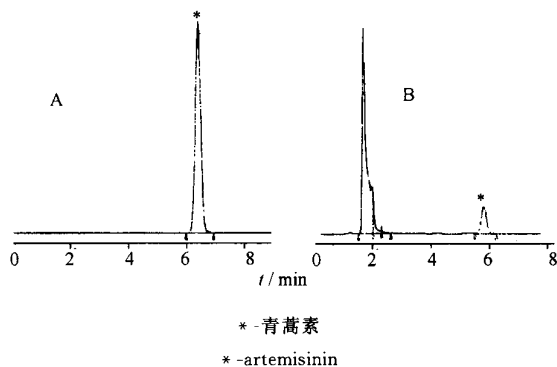


图 1 青蒿素对照品(A)和黄花蒿提取物(B)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of artemisinin reference substance (A) and *A. annua* extract (B)

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取青蒿素对照品约 25 mg 于 25 mL 量瓶中, 加乙醇溶解并定容, 即得对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 精密称取黄花蒿提取物 0.2 g 于 25 mL 量瓶中, 加乙醇约 20 mL, 超声 20 min, 静置至室温后定容。用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.4 标准曲线的制备:精密称取青蒿素对照品 24.12 mg 置 25 mL 量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,作为贮备液。精密吸取一定量贮备液,配制质量浓度为 0.589 3、0.964 8、1.178 7、2.357 4、5.893 5 mg/mL 青蒿素对照品溶液,分别进样 5 μ L,进行 HPLC-ELSD 分析。以峰面积(Y)的常用对数为纵坐标,以对照品质量浓度(X)的常用对数为横坐标,绘制标准曲线。得其回归方程为:lgY = 1.345 31 g X + 6.223 8, $r=0.989$ 。由此可知青蒿素在 0.589 3~5.893 5 mg/mL 与峰面积具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验:精密吸取同一份供试品溶液重复进样 6 次,每次进样 5 μ L,测定青蒿素峰面积,计算得其 RSD 为 0.70% ($n=6$)。

2.6 重现性试验:精密称取同一批黄花蒿提取物样品适量,6 份,制备供试品溶液,测定。结果青蒿素的平均质量分数为 15.30%,RSD 为 0.89%。

2.7 稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液,每隔 1 h 进样测定 1 次,进样量 5 μ L,测定峰面积。结果青蒿素峰面积的 RSD 为 0.86% ($n=9$)。结果表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验:精密称取含青蒿素 15.30% 的黄花蒿提取物约 0.1 g,精密加入 7.521 0 mg/mL 青蒿素对照品溶液 2 mL,制备供试品溶液,进行测定,按标准曲线法计算结果。结果平均回收率为 98.71%,RSD 为 0.42% ($n=6$)。

2.9 样品测定:精密称取黄花蒿提取物样品 10 批,制备供试品溶液,测定。每批样品测定 3 份,按标准曲线法计算结果,以 3 次测定结果的平均值作为测

定值,结果见表 1。

表 1 黄花蒿提取物中青蒿素的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of artemisinin in *A. annua* extract ($n=3$)

批号	青蒿素/%	RSD/%	批号	青蒿素/%	RSD/%
050428	15.45	0.22	050601	15.15	0.42
050509	15.14	0.56	050606	15.25	0.60
050512	15.21	0.34	050607	15.66	0.59
050518	15.84	0.59	050608	15.37	0.24
050520	15.30	0.82	050610	15.28	0.30

3 讨论

3.1 蒸发光散射检测器条件的选择:考虑到青蒿素具有热不稳定性 and 影响 ELSD 响应信号的基本参数为气体体积流量和漂移管温度的因素。因此,本试验通过不同气体体积流量 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2 L/min 和不同漂移管温度 40、45、50、55、60 $^{\circ}$ C 对青蒿素响应信号强度的影响进行了最佳检测条件选择。最终确定 ELSD 最佳检测条件为气体体积流量为 1 L/min,漂移管温度为 45 $^{\circ}$ C。

3.2 流动相比比例的确:在上述色谱条件下,本实验分别选择了不同流动相比比例的甲醇-水、乙腈-水及磷酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、三氟醋酸进行试验。结果证明:流动相选择乙腈-水(69:31,用三氟醋酸调节 pH 至 3)时,青蒿素与杂质分离效果最好。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Huang H B, Cen J M, Feng J F. Determination of artemisinin in *Artemisia annua* L. by RP-HPLC [J]. *J Guangxi Univ* (广西大学学报), 1994, 19 (2): 194-196.
- [3] Wang W L. Determination of artemisinin in Rheumatoid Capsule by HPLC [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2003, 9 (12): 43-47.

黄连与生地不同配伍比例对黄连丸中小檗碱的影响

夏旋¹, 杨明炜^{1*}, 王文清², 方建国², 汪秋兰², 陆付耳¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所, 湖北 武汉 430030;

2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 药学部, 湖北 武汉 430030)

黄连丸出自孙思邈《千金要方》,由黄连、生地等组成。黄连为君,生地为臣,相须为用,共奏滋阴清热之功效,主治消渴(相当于现代医学之糖尿病)。尽管

原方配伍比例为 1:1,但在临床工作发现采用大剂量的生地配伍黄连能明显增强黄连丸的降糖效应,与其他学者的报道十分类似^[1]。因此,本研究采用高

收稿日期:2006-02-16

基金项目:湖北省卫生厅 2004 年度中医药中西医结合课题(2005.1-2006.12)

作者简介:夏旋(1980—),男,湖北宜昌人,在读研究生,研究方向为中西医结合内分泌专业。

Tel: (027) 83663304 Fax: (027) 83662148 E-mail: xiakuan_2003@sina.com

* 通讯作者 杨明炜 Fax: (027) 83662220 E-mail: mwyang@tjmu.edu.cn