

# 北京产黄花蒿中青蒿酸的含量测定与定向分离

王满元<sup>1</sup>, 张东<sup>2</sup>, 李朝霞<sup>1</sup>, 高伟<sup>1</sup>, 杨岚<sup>2\*</sup>

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

**[摘要]** 目的: 建立北京产黄花蒿中青蒿酸的含量测定及定向分离方法。方法: 采用 HPLC 测定北京产黄花蒿中青蒿酸含量, 以 Agilent Extend-C<sub>18</sub> ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱为固定相, 以甲醇-0.05% 醋酸水溶液 (85:15) 作为流动相, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 220 nm; 采用乙醇冷浸提取、硅胶柱层析和重结晶等手段定向分离青蒿酸。结果: 青蒿酸在 0.11 ~ 2.76 μg 进样量与峰面积之间有良好的线性关系 ( $r=0.9996$ ), 平均回收率 98.39%, RSD 0.81%, 北京产黄花蒿中青蒿酸的含量为 0.36% ~ 0.58%; 建立了从北京产黄花蒿中定向分离纯度 >98% 的青蒿酸的方法。结论: 建立的含量测定方法简便、快速、重复性好, 可用于北京产青蒿中青蒿酸的含量测定; 提取分离路线可用于北京产黄花蒿中青蒿酸的定向分离。

**[关键词]** 黄花蒿; 青蒿酸; 含量测定; 定向分离

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0048-04

**[doi]** 10.11653/syfy2014060048

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000002.html>

**[网络出版时间]** 2014-01-06 11:25

## Targeted Separation and Determination of Arteannuic Acid in *Artemisia annua* Growing in Beijing

WANG Man-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Dong<sup>2</sup>, LI Zhao-xia<sup>1</sup>, GAO Wei<sup>1</sup>, YANG Lan<sup>2\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish targeted separation and determination of the semi-synthesis precursor compound of artemisinin, arteannuic acid, in *Artemisia annua* growing in Beijing. **Method:** Arteannuic acid in plant was determined by HPLC with ODS column. The mobile phase was methanol-0.05% HOAc (85:15) solution at a flow rate of 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. The UV detection wavelength was 220 nm. Arteannuic acid was extracted by maceration using cold 95% ethanol and purified by silica gel chromatography as well as recrystallization. **Result:** Arteannuic acid in sample solution was well separated. The average recovery was 98.39% with RSD of 0.81% ( $n=6$ ) and the linear range was 0.11-2.76 μg. The content range of arteannuic acid was 0.36%-0.58% in *A. annua* growing in Beijing. The purity of arteannuic acid isolated follow the given process was higher than 98%. **Conclusion:** The targeted separation and determination method were simple, affordable and reproducible.

**[Key words]** *Artemisia annua* L.; arteannuic acid; content determination; targeted separation

疟疾是世界上虫媒传染病中发病率和死亡率最高的疾病之一, 给人类带来极大的危害。据世界卫

生组织数据, 2010 年全球仍有 2 亿多人罹患疟疾, 其中至少 65.5 万人死于疟疾<sup>[1]</sup>。基于青蒿素类抗

**[收稿日期]** 20130924(009)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81102752); 北京市自然科学基金项目(2112010); 北京市属高等学校高层次人才引进与培养计划项目(CIT&TCDD201304184)

**[第一作者]** 王满元, 博士, 副教授, 从事中药活性成分及炮制原理研究

**[通讯作者]** \* 杨岚, 硕士生导师, 研究员, 从事中药化学及分析研究, Tel/Fax: 010-64014347, E-mail: ylan\_66@163.com

疟药的联合治疗方案(artemisinin-based combination therapies, ACTs)被 WHO 推荐为疟疾治疗一线药物,治愈率可达 90% 以上<sup>[2-3]</sup>。中药青蒿是一年生菊科植物黄花蒿的干燥地上部分,目前是青蒿素的唯一来源,在疟疾治疗中发挥着重要作用。青蒿酸是从中药青蒿中分离得到的含氧倍半萜化合物,是青蒿素生物合成的前体物质,在青蒿素的生物合成以及半合成研究中备受关注。Keasling J D 以及 Lévesque F 等研究者采用合成生物学方法利用基因工程酵母成功生产青蒿酸,并进一步高效半合成得到了青蒿素<sup>[4-6]</sup>。除了卓越的抗疟疗效,青蒿素类药物在抗肿瘤领域的应用研究多年来也一直被国内外的研究者所关注<sup>[7]</sup>。利用青蒿酸生产青蒿素类药物的研究应该得到进一步的重视。中药青蒿并无特定产区(道地药材产区或主产地),全国各地都有生产。目前,总体上资源利用率不高,除炮制饮片外,只有部分地区的黄花蒿用来提取青蒿素单体化合物,对于其他地区的资源研究不多。以北京为代表的华北地区黄花蒿资源丰富,生于旷野与山坡路边,其中青蒿素含量较低,但是青蒿酸的含量比较高,一般都在千分之三以上。建立北京产青蒿简便、快速、准确的青蒿酸分析方法和成本适宜、工艺简单的青蒿酸的定向分离路线,对于降低青蒿素类药物的成本以及有效利用我国的青蒿酸资源具有现实意义。 $\alpha,\beta$ -不饱和倍半萜酸类物质青蒿酸不仅能够用于生产青蒿素类药物,同时具有解热、抗菌作用<sup>[8]</sup>,应该得到进一步研究,从而充分发挥我国的青蒿酸资源优势。为进一步开发利用中药青蒿,青蒿乙素、东莨菪内酯以及挥发油等药效物质被学者所关注<sup>[9-11]</sup>。但是,针对特定地区黄花蒿资源开展青蒿酸的分析分离研究的并不多。本文对 6 批样品中青蒿酸的含量进行了测定。同时,确定了从北京产黄花蒿中定向分离纯度 > 98% 的青蒿酸的工艺方法。为进一步利用资源、青蒿酸的开发研究以及药材的质量控制提供了依据。

## 1 材料

**1.1 药材** 6 批药材在花前叶茂期产地采集,经中国中医科学院青蒿素研究中心屠呦呦研究员鉴定,均为菊科植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分。

**1.2 仪器与试剂** LC-20A Prominence 型高效液相色谱仪(SPD-M20A 二级管阵列检测器,LCsolution 色谱工作站,日本 Shimadzu 公司),CP224C 型电子分析天平(美国 Ohaus 公司)。青蒿酸对照品为自

制(HPLC 归一化法纯度 > 98%),甲醇为色谱纯,水为超纯水,柱色谱用硅胶(100 ~ 200 目),石油醚(60 ~ 90 °C)和其余所用试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 青蒿酸的含量测定

**2.1.1 色谱条件** 美国 Agilent Extend-C<sub>18</sub> ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.05% 醋酸水溶液(85:15),流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 220 nm,0.5 AUFS,柱温室温,进样量 10 μL,青蒿酸的保留时间约为 14 min。该条件下对照品及样品的 HPLC 色谱见图 1。

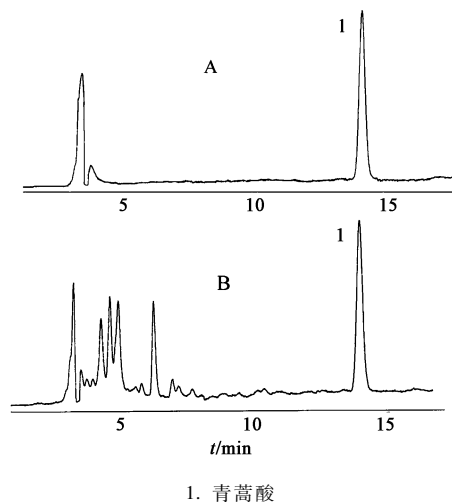


图 1 对照品(A)和青蒿样品(B)的 HPLC

**2.1.2 对照品溶液的制备** 精密称取青蒿酸对照品适量,以甲醇溶解,制成每 1 mL 含青蒿酸 0.1 mg 的对照品溶液。

**2.1.3 线性关系考察** 分别精密吸取对照品溶液 1, 4, 8, 12, 16, 20 μL 注入液相色谱仪,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,并计算回归方程为  $Y = 1\ 310.2X + 17\ 804$  ( $r = 0.999\ 6$ ),线性范围 0.1 ~ 2.0 μg。进样量与峰面积呈良好线性关系。

**2.1.4 供试品溶液的制备** 取黄花蒿 1 g,精密称定,置 100 mL 具塞磨口三角瓶中,准确加入三氯甲烷 25 mL,超声提取 45 min,放冷至室温,补足损失的溶剂质量,摇匀,滤过,弃去初滤液,精密量 10 mL 续滤液减压蒸干,残渣以甲醇溶解,定量转至 5 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,0.45 μm 微孔滤膜过滤,作为供试品溶液。

**2.1.5 精密度试验** 精密吸取同一份供试品溶液 10 μL,连续进样 5 次,测得峰面积积分值,结果表明,精密度良好,RSD 1.16% ( $n = 5$ )。

**2.1.6 稳定性试验** 精密吸取同一份供试品溶液

10  $\mu\text{L}$ , 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 测得峰面积积分值, 结果表明, 供试品溶液在 24 h 内稳定, RSD 1.40%。

**2.1.7 重复性试验** 取黄花蒿粉末 5 份, 每份 1 g, 精密称定, 按 2.1.4 方法处理后, 分别进样 10  $\mu\text{L}$ , 用外标法计算青蒿乙素含量, RSD 2.85%, 表明该法重复性良好。

**2.1.8 回收率试验** 精密称取已知青蒿酸含量样品 6 份, 每份 1 g, 分别精密加入适量青蒿酸对照品, 按 2.1.4 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.9 项操作, 测定, 结果见表 1。

表 1 北京产黄花蒿中青蒿酸加样回收率试验

样品中含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.961 4	1.953 1	99.17		
0.959 0	1.947 5	98.85		
0.961 1	1.938 8	97.77		
0.959 7	1.951 9	99.22	98.39	0.81
0.962 3	1.935 3	97.30		
0.961 3	1.941 6	98.03		

注: 加入量均为 1 mg。

**2.1.9 样品测定** 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 按外标法计算供试品中青蒿酸的含量, 结果见表 2。

表 2 北京产黄花蒿中青蒿酸的含量测定 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

产地	收集时间	含量 /%	产地	收集时间	含量 /%
丰台 1	2013-06-02	0.42	海淀 1	2012-06-10	0.52
丰台 2	2012-06-02	0.58	朝阳 1	2012-08-20	0.37
丰台 3	2012-08-10	0.36	房山 1	2012-08-15	0.41

**2.2 青蒿酸的定向分离** 北京产黄花蒿花前叶茂期采集叶 1 kg, 10 L 95% 乙醇冷浸 3 次, 每次 48 h, 过滤后合并滤液, 减压回收溶剂, 得浸膏 162 g。以 1:2 的比例拌柱色谱硅胶 (100 ~ 200 目), 石油醚湿法装柱并洗脱至无色, 洗脱液经减压回收溶剂, 得浸膏 I 32 g。将浸膏 I 用 100 mL 三氯甲烷溶解, 用 0.5% NaOH 溶液萃取 3 次, 第 1 次 200 mL, 后 2 次各 100 mL, 合并碱水溶液, 浓盐酸调至 pH 1, 用三氯甲烷萃取 3 次, 第 1 次 300 mL, 后 2 次各 200 mL, 合并三氯甲烷液, 无水硫酸钠脱水干燥过夜后, 减压回收三氯甲烷, 得浸膏 II 21 g。浸膏 II 用石油醚溶解后, 加 30 g 柱色谱硅胶拌样, 上硅胶柱 (100 ~ 200 目, 1:15, 315 g), 石油醚-乙酸乙酯 (95:5) 洗脱, 洗

脱 2 个柱床体积后, 合并洗脱液, 经减压回收溶剂, 得浸膏 III 6.2 g。浸膏 III 用丙酮 500 mL 溶解后, 置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱放置 2 h, 4  $^{\circ}\text{C}$  下过滤除去析出的脂肪酸酯等杂质, 滤液回收得青蒿酸粗品 (3.2 g), 丙酮重结晶后得纯度 >98% 青蒿酸结晶 (2.12 g)。经光谱数据以及对对照品比对确证为青蒿酸。

### 3 讨论

孙景灿等利用无水乙醇超声 1 h 提取 3 次, 流动相为乙腈-酸水系统的 HPLC 方法测定黄花蒿中的青蒿酸的含量<sup>[12]</sup>。本文针对北京产青蒿的特点以及青蒿酸的溶解性质等, 选择比较了石油醚、乙酸乙酯、三氯甲烷 3 种提取溶剂, 并考察了超声提取时间, 最终确定供试品溶液采用三氯甲烷超声 45 min 的提取条件, 流动相选择了甲醇-酸水系统。

北京产黄花蒿中青蒿酸测定结果显示, 幼嫩期 (6 月初) 青蒿酸含量相对较高。综合分析生物量和青蒿酸含量数据, 选定了采用花前叶茂期 (8 月中旬) 北京产黄花蒿作为青蒿酸定向分离的对象。

在青蒿酸的定向提取分离中, 考虑到采用三氯甲烷作为提取溶剂成本较高, 不容易推广等因素, 进一步考察了 95% 乙醇冷浸提取的方法。结合黄敬坚等<sup>[13]</sup>报道从青蒿中利用碱提取法提取青蒿酸的工艺, 进一步优化, 避免了叶绿素、蜡质以及其他脂肪酸酯等杂质对分离纯化造成的干扰。文中提供的工艺路线重复性较好, 适宜从北京产黄花蒿中分离青蒿酸。

### [参考文献]

[1] World Health Organization. World Malaria Report 2011 [R]. Geneva, WHO Press, 2011.

[2] 屠呦呦. 青蒿及青蒿素类药物 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.

[3] Eastman R T, Fidock D A. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria [J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(12): 864.

[4] Levesque F, Seeberger P H. Continuous-flow synthesis of the anti-malaria drug artemisinin [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2012, 51(7): 1706.

[5] Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. Nature, 2013, 496(7446): 528.

[6] Westfall P J, Pitera D J, Lenihan J R, et al. Production of amorphaadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(3): E111.

# UPLC-MS-MS 测定麝宁搽剂中苦参碱与氧化苦参碱

朱平川<sup>1</sup>, 岑卫健<sup>1</sup>, 范晓苏<sup>2</sup>, 莫祺红<sup>3\*</sup>

(1. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西大学, 南宁 530004;

2. 广西大学化学化工学院, 南宁 530004; 3. 广西大学生命科学与技术学院, 南宁 530004)

**[摘要]** 目的: 建立同时测定麝宁搽剂中的苦参碱与氧化苦参碱 2 种有效成分含量的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS-MS)分析方法。方法: 采用 C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.1% 甲酸的水溶液为流动相, 流速 0.30 mL·min<sup>-1</sup>。在电喷雾电离(ESI)正离子模式下, 采用多重反应监测模式(MRM)进行检测。结果: 苦参碱与氧化苦参碱的线性范围分别为 0.000 5 ~ 0.6, 0.000 4 ~ 0.5 mg·L<sup>-1</sup>; 检出限分别为 0.2, 0.2 μg·L<sup>-1</sup>; 2 种成分的加样回收率为 95.8% ~ 98.6%, RSD 均 < 1.9%。结论: 该方法简便、准确、快速、高灵敏度, 已成功地用于实际的样品分析。

**[关键词]** 麝宁搽剂; 苦参碱; 氧化苦参碱; 超高效液相色谱-串联质谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0051-04

**[doi]** 10.11653/syfy2014060051

## Simultaneous Determination of Matrine and Oxymatrine in Xianning Linimentum by UPLC-MS-MS

ZHU Ping-chuan<sup>1</sup>, CEN Wei-jian<sup>1</sup>, FAN Xiao-su<sup>2</sup>, MO Qi-hong<sup>3\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Subtropical

Agro-bioresources, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China;

3. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**[Abstract]** **Objective:** A method for simultaneous determination of matrine and oxymatrine in Xianning Linimentum was established by ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UPLC-

**[收稿日期]** 20131007(007)

**[基金项目]** 广西自然科学基金项目(桂科自 0832034)

**[第一作者]** 朱平川, 硕士, 实验师, 从事色谱及质谱联用技术研究, Tel: 0771-3237092, E-mail: zhupingchuan12@163.com

**[通讯作者]** \* 莫祺红, 硕士, 高级实验师, 从事生物开发研究, Tel: 0771-3270736, E-mail: 18978962025@163.com

[7] 王春玲, 赖小平, 吴安国. 和厚朴酚联合青蒿素对 CNE-2 细胞增殖和凋亡的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 157.

[8] 李兰芳, 郭淑英, 张畅斌, 等. 青蒿有效部位及其成分的解热作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(12): 65.

[9] 王满元, 杨岚, 张东. 高效液相色谱法测定不同来源青蒿中青蒿乙素的含量[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(22): 1698.

[10] 杨岚, 王满元, 张东, 等. 青蒿药材中东莨菪内酯的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(10): 10.

[11] 张东, 杨岚, 杨立新, 等. 野生及栽培青蒿挥发油成分的气相色谱-质谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8): 33.

[12] 孙景灿, 曾建立, 赵兵, 等. 反相高效液相色谱法测定青蒿中青蒿酸的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 22(5): 846.

[13] 黄敬坚, 夏志强, 吴莲芬. 青蒿化学成分的研究 I. 11R(-)-双氢青蒿酸的分离和结构鉴定[J]. 化学学报, 1987, 45(6): 609.

[责任编辑 顾雪竹]