

青蒿素及其类似物提取及分析方法研究进展

余正文^{1,2}, 王伯初^{1*}, 杨占南³, 祝连彩¹

(1. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400030; 2. 贵州师范大学生命科学学院, 贵阳 550001;
3. 贵州师范大学贵州省山地信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵阳 550001)

[摘要] **目的:**介绍青蒿素及其类似物的提取及分析检测方法,为青蒿的深度研发提供参考。**方法:**查阅近年国内外有关青蒿素及其类似物提取及分析方法研究方面的文献 33 篇,并对其进行归纳、分析和总结。**结果:**目前关于青蒿素及其类似物类化合物的提取方法主要包括有机溶剂回流提取法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法、超临界二氧化碳辅助提取法;含量分析方法主要有质量法,紫外分光光度法,近红外光谱法,薄层色谱法,气相色谱-电化学检测法(质谱法、氢火焰离子化法),液相色谱-紫外分光光度法(视差检测法、蒸发光散射检测法、质谱法、电化学检测法及毛细管电泳法),核磁共振波谱法、伏安法及生物学方法。**结论:**各种提取及分析方法均有其优缺点,需根据研究的目的、要求和实验条件灵活运用。

[关键词] 青蒿素及其类似物; 溶剂提取法; 气相色谱; 液相色谱; 综述

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0294-04

Progress of Extraction and Analytical Methods of Artemisinin and Its Analogues

YU Zheng-wen^{1,2}, WANG Bo-chu^{1*}, YANG Zhan-nan³, ZHU Lian-cai¹

(1. Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400044, China;

2. School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;

3. Key Laboratory for Information System of Mountainous Area and Protection of Ecological Environment of Guizhou Province, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To review the extraction and analytical methods of artemisinin and its analogues, it given the reference for the research and development of *Artemisia annua*. **Method:** Literatures on extraction and analytical methods of artemisinin and its analogues in recent years were summarized and analyzed. **Result and Conclusion:** Currently, the extraction methods about artemisinin and its analogues include organic solvent extraction, ultrasonic extraction, microwave assisted extraction, supercritical carbon dioxide assisted extraction, the analytical methods as to these compounds were GC-ECD(MS, FID), HPLC-UV(MS, RID, ELSD, EC, CE), ¹H-NMR, voltammetry and biological methods. Each extraction and analytical method of artemisinin and its analogues have it's advantages and disadvantages, to be flexible use the methods depend on the purpose, requirements and actual conditions.

[Key words] artemisinin and its analogues; solvent extraction methods; GC; HPLC; review

青蒿中的化学成分种类较多,目前发现的已经超过 200 种以上,可分为挥发性和非挥发性成分两大类。非挥发性成分主要包括倍半萜类、黄酮类、香豆素类、三萜类、甾醇类等,

主要活性代谢产物包括青蒿素、青蒿酸、去氧青蒿素、萜萜内酯、猫眼草酚、猫眼草黄素、紫花牡荆素等。挥发性成分主要有蒿酮、樟脑、龙脑、1,8-桉叶素、 β -石竹烯、石竹烯氧化物、大

[收稿日期] 20110308(003)

[基金项目] 重庆大学研究生创新基金(200706B1B0150235)

[第一作者] 余正文,副教授,博士, Tel:0851-6702541, E-mail: yuzhengwen5257@yahoo.com.cn

[通讯作者] *王伯初,教授,博导, Tel:023-65112840, E-mail: wangbc2000@126.com

叶根香烯等^[1]。近年来,关于青蒿的研究大都围绕青蒿素展开,因此青蒿中主要次生代谢产物的提取及分析测定法也大多是针对青蒿素来设计,根据青蒿中不同代谢产物的自身的特性、不同的需要以及提取分离技术的发展;青蒿素类化合物的提取方法也多种多样,其中有机溶剂回流提取法及超声波辅助提取法使用尤为普遍(表1)。

青蒿素及其类似物分析方法主要有气相色谱法、液相色谱法、质量法、紫外分光光度法、薄层扫描法、荧光光谱法、近红外光谱法、气相色谱法、液相色谱法、毛细管电泳法、伏安法及生物学方法。不同方法各有利弊,其中气相和液相色谱法使用较为广泛,其他分析方法应用较少。青蒿素、青蒿素B及去氧青蒿素常用HPLC-ELSD,HPLC-UV,GC-FID,GC-MS法;青蒿酸主要采用HPLC-UV法(表2)。

表1 青蒿主要代谢产物提取方法

提取法	基本原理	实用范围及优缺点
有机溶剂回流提取法	基于青蒿中次生代谢产物与有机溶剂相似相容的特点进行提取	选择适当的溶剂,青蒿中大多数成分都能有效提取,操作简单、对设备要求低、但提取率低、能耗高、后处理麻烦 ^[2]
超声波辅助提取法	利用超声波产生的强烈的空化效应、机械振动、高的加速度、乳化、扩散、击碎和搅拌作用,增大物质分子运动频率和速度,增加溶剂穿透力,从而加速药物有效成分进入溶剂,促进提取的进行	选择适当的溶剂,青蒿中大多数成分都能得到提取,操作简便、快捷、无需加热、提取率高、速度快、提取物的结构未被破坏、效果好。如60目~80目青蒿叶,12 mL·g ⁻¹ 石油醚溶剂量,在超声波条件下(80 W,20 min,800 r·min ⁻¹ ,50 ℃,2 h)提取率为95%;但样品处理量较少,仅适用于分析检测等少量样品的处理 ^[3-6]
微波辅助提取法	利用微波辐射加热,加快物质的传质速度	缩短实验和生产时间、降低能耗、减少溶剂用量以及废物的产生,微波辅助提取4~6 min与传统的热提取、索氏提取法几个小时甚至十几个小时的提取效果相当。同时降低成本,提高收率和提取物的纯度,但对提取溶剂要求严格,仅适合实验室研究 ^[7]
超临界二氧化碳辅助提取法	利用超临界流体的独特萃取溶解能力及超临界状态下物质的溶解度对压力、温度的敏感性特征,通过改变温度和压力实现超临界流体中所溶物质的提取、分离提纯,兼有精馏和萃取2种作用	萃取速度快、生产周期短、萃取能力强、提取率高、工艺简单、操作较方便、操作温度低(接近常温)、产品质量高。在萃取压力20 MPa,萃取温度50 ℃,每千克原料CO ₂ 质量流量1 kg·h ⁻¹ ,分离器I的温度为60 ℃,压力为14 MPa,萃取4 h,萃取率≥95%,萃取物纯度≥15%。缺点是一次性设备投资大,运行成本较高 ^[8-10]

表2 青蒿主要代谢产物分析方法

分析方法	基本原理	实用范围及优缺点
质量法	将石油醚提取青蒿素、经柱层析、乙醇重结晶后直接称重	样品量大(≥100 g),操作麻烦,误差大,不适用于精确分析 ^[11]
紫外分光光度法	通过测定青蒿素碱水解物在292 nm吸光度,间接测定青蒿素含量	此法对仪器要求简单,但操作麻烦,为《中国药典》2005年版二部青蒿素测定方法 ^[5,12-13]
近红外光谱法	用近红外光谱数据及其小波变换处理后的小波系数,将原始数据进行压缩处理,从而测定青蒿素含量	该法实现了对青蒿素的快速无损测定,但谱图中各成分的谱图相互重叠,光谱信息冗余和特征吸收区域不明显等因素干扰实验结果 ^[14]
薄层色谱法	基于青蒿素薄层展开后,对青蒿素与显色剂结合后的点进行薄层扫描定量	省时、灵敏度、精密性与准确度均较高,如用反相薄层色谱法,以0.2%三氟乙酸-乙腈(65:35)为流动相,青蒿酸、青蒿素及青蒿素B的线性范围分别为50~250,200~500,200~1 000 ng。但此方法重现性、实验条件与数据可比性较差 ^[15-16]
GC-ECD	由于青蒿素的热不稳定,主要是通测定青蒿素的分解产物测间接青蒿素含量。	灵敏度高,检出限≤3 mg·L ⁻¹ ,定量限≤9 mg·L ⁻¹ ,样品用量100 mg(干重);但样品前处理麻烦 ^[17]
GC-MS	与GC-ECD类似,仅检测器不同	环境友好,灵敏度高,青蒿素的线性范围为0.02~0.17 g·L ⁻¹ ;但设备成本高 ^[18]
GC-FID	与GC-ECD类似,仅检测器不同	灵敏度高,最低检出限:青蒿素(约30 ng),青蒿素B(5 ng)、青蒿酸(4 ng);化合物之间的峰有时会互相干扰 ^[19]

续表

分析方法	基本原理	实用范围及优缺点
HPLC-UV	利用青蒿素碱性水解产物再进行酸化后的生成物在 260 nm 处有吸收,间接测定青蒿素含量	经碱、酸处理易导致青蒿素破坏而损失,产生多个杂峰;而且青蒿中其他成分极容易干扰青蒿素衍生化反应,影响检测结果,导致稳定性、重复性和回收率差。故该法不适宜测定青蒿素的纯度 ^[20-21]
HPLC-RID	基于待测组分与流动相折射率差异	方法准确度高、重复性好、精密度高、简捷易操作 ^[22] 。青蒿素的线性范围 82.43 ~ 1 648.6 mg·L ⁻¹
HPLC-ELSD	高沸点组分经高压气流雾的后进入散射池,光束穿过散射池产生散射光被光电管接收形成电信号,再经放大、转换成色谱图	样品处理简单,简捷易操作,但灵敏度低于气相色谱法,不适合低含量青蒿样本。青蒿素、3 α -羟基-11-去氧青蒿素,青蒿素 B 的最低检出限分别为 0.18, 0.01 及 0.10 g·L ⁻¹ ^[6, 23-24] 。最低检出限青蒿素(50 ng),青蒿素 B(100 ng)、青蒿酸(\geq 500 ng) ^[18]
HPLC-MS	利用不同化合物的在质谱裂解碎片特征	样品制备简单、检测快捷、灵敏度高,青蒿素、青蒿素 B 及青蒿酸最低检出限分别为 0.000 1, 0.001, 0.04 mg·L ⁻¹ ;但成本高,不易普及 ^[25-26]
HPLC-EC	采用薄层色谱含金汞齐电极对过氧桥青蒿素的响应	灵敏度高、选择性好、测定快速,是测定青蒿素含量的一种好方法,但需除氧等较高要求 ^[27]
HPLC-CE	目标化合物分配系数及电泳淌度的差异	省去了青蒿素提取液进行前处理的步骤,该法简便、快速、准确,青蒿素最低检出限 5.37 mg·L ⁻¹ ^[28-29]
LC-CD	基于青蒿素及其类似物的圆二色谱特征,青蒿素与青蒿素 B 分别在 260, 230 nm 处有特征吸收	灵敏度低,青蒿素及青蒿素 B 的最低检出限分别为 0.08, 0.26 mg·L ⁻¹ , 最低定量限分别为 0.31, 1.02 mg·L ⁻¹ ^[30]
¹ H-NMR	青蒿素分子中质子的峰面积与内标质子峰面积的比值与青蒿素的浓度成正比	减少有机溶剂带来的污染、环境友好、灵敏度高,青蒿素线性范围 90 ~ 900 g·L ⁻¹ ;但设备成本高 ^[31]
伏安法	青蒿素在电极上产生还原峰	用于人工合成样品分析,回收率高于紫外分光光度法,更方便、快捷,避免了前处理对青蒿素的破坏;植物组织中杂质对其干扰大,不适于分析植物样品中的成分 ^[32]
生物学方法	利用青蒿素与酶结合间接测定青蒿素含量	最低检出限 1.5 μ g·L ⁻¹ ,灵敏度约是 HPLC-EC 的 400 倍。但该法成本较高,操作复杂,尚无标准化试剂,青蒿素含量测定结果也由于交叉反应存在而偏高 ^[33]

总之,青蒿素及其类似物的各种提取及分析检测方法各有优缺点,根据不同的实验目的,方法各异。在综合文献的基础上,我们建立了青蒿酸、青蒿素及去氧青蒿素的同时提取分析法以及青蒿中传统功效成分东莨菪内酯、猫眼草酚及猫眼草黄素的同时提取分析法(图 1)。该方法的第一步与工业上提取青蒿素的方法完全一致,莨菪内酯是从提取青蒿素的残渣中获得的,因此,本文建立的方法在青蒿资源的综合利用方面具有重要的理论和应用价值。

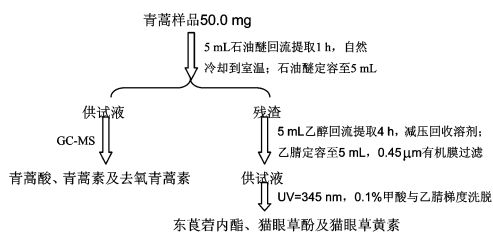


图 1 青蒿中主要化合物提取及分析流程

【参考文献】

[1] Bhakuni R S, Jain D C, Sharma R P, et al. Secondary

metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity [J]. *Curr Sci*, 2001, 80(1):35.

[2] 韦国锋,覃特营,莫少泽,等.提取青蒿素实验条件的研究[J].右江民族医学院学报,1995,17(2):137.

[3] 邓启华,李子成,杨宗伟,等.超声波连续逆流提取青蒿素的新工艺[J].四川化工,2008,11(3):17.

[4] 李再新,王新惠,雷云玲,等.超声波强化提取青蒿素工艺的研究[J].四川理工学院学报:自然科学版,2007,20(2):92.

[5] 张海容,张娜.超声萃取-紫外分光光度法测定不同产地青蒿中的青蒿素[J].药物分析杂志,2007,27(3):414.

[6] Avula B, Wang Y H, Smillie T J, et al. Comparison of LC-UV, LC-ELSD and LC-MS methods for the determination of sesquiterpenoids in various species of artemisia [J]. *Chromatographia*, 2009,70(9):797.

[7] Hao J Y, Han W, Huang S D, et al. Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L[J]. *Sep*

- Pur Technl, 2002, 28:191.
- [8] Tzeng T C, Lin Y L, Jong T T, et al. Ethanol modified supercritical fluids extraction of scopoletin and artemisinin from *Artemisia annua* L[J]. Sep Pur Technl, 2007,56(1):18.
- [9] Kohler M, Haerdi W, Christen P, et al. Extraction of artemisinin and artemisinic acid from *Artemisia annua* L using supercritical carbon dioxide [J]. J Chromatogr A, 1997,785:353.
- [10] 胡森,钱国平,杨亦文,等. 超临界 CO₂ 提取青蒿素的工艺[J]. 江南大学学报, 2006, 5(1):100.
- [11] 李子颖,李士雨,齐向娟. 青蒿素提取技术研究进展[J]. 中药研究与信息, 2002, 4(2):17.
- [12] 元四辉. 不同产地栽培青蒿中青蒿素的含量测定[J]. 中药材, 2007, 30(10):1257.
- [13] 陈迪钊,郑雪花,张智慧,等. 黄花蒿中青蒿素含量的紫外分光光度法测定[J]. 光谱实验室, 2010, 27(2):451.
- [14] 刘浩,黄艳萍,相秉仁,等. 黄花蒿中青蒿素的近红外光谱法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(8):584.
- [15] Bhandari, A P, Gupta B Singh, V K Kaul, et al. Simultaneous densitometric determination of artemisinin, artemisinic acid and arteannuin-B in *Artemisia annua* using reversed-phase thin layer chromatography [J]. J Sep Sci, 2005, 28:2288.
- [16] Koobkokuad T, Chochai A, Kerdmanee C, et al. TLC-densitometric analysis of artemisinin for the rapid screening of High-producing plantlets of *Artemisia annua* L [J]. Phytochem Anal, 2007, 18:229.
- [17] Liu S Q, Tian N, Liu Z H, et al. Affordable and sensitive determination of artemisinin in *Artemisia annua* L. by gas chromatography with electron-capture detection [J]. J Chromatogr A, 2008, 1190: 302.
- [18] Ma C F, Wang H H, Lu X, et al. Metabolic fingerprinting investigation of *Artemisia annua* L. in different stages of development by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2008, 1186:412.
- [19] Peng C A, Ferreira J F S, Wood A J, et al. Direct analysis of artemisinin from *Artemisia annua* L. using high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector, and gas chromatography with flame ionization detector [J]. J Chromatogr A, 2006, 1133:254.
- [20] Wang J W, Zhang Z, Tan R X, et al. Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by the elicitor from the endophytic *Colletotrichum* sp. [J]. Biotechnol Lett, 2001, 23(11):857.
- [21] 黄海滨,岑家铭,奉建芳. RP-HPLC 测定青蒿中青蒿素的含量[J]. 广西大学学报, 2007,19:(2):194.
- [22] 寇彦杰,刘智宇. 高效液相色谱示差折射法测定青蒿中青蒿素的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(B08):277.
- [23] 陈靖,赵瑞,陈俊,等. HPLC-UV-ELSD 联用测定黄花蒿叶片中青蒿素及相关倍半萜的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(11):897.
- [24] 张东,杨岚,杨立新,等. 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[J]. 药学学报, 2007, 42(9):978.
- [25] Filip C W, Van Nieuwerburgh, Sofie R F, et al. Quantitation of artemisinin 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.
- [26] Li L, Pabbisetty D, Carvalho P, et al. Ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the determination of artemisinin in rat serum and its application in pharmacokinetics [J]. J Chromatogr B, 2008, 867:131.
- [27] Acton N, Klayman D L, Rollman I J. Reduction electrochemical HPLC assay for artemisinin (Qinghaosu) [J]. Planta Med, 1985, 51(7):445.
- [28] Cheng Y Q, Chen H L, Fan L Y, et al. On-line conversion and determination of artemisinin and its kinetic parameters using orthogonal design by coupling of flow injection with capillary electrophoresis [J]. Anal Chim Acta, 2004, 525:239.
- [29] 黄宝关,姚程炜. 高效毛细管电泳电导法测定青蒿素的含量[J]. 分析测试学报, 2006, 25(2):109.
- [30] Chen J, Gu J K, Zhao R, et al. Simultaneous nonchiral determination of artemisinin and arteannuin B in *Artemisia annua* using circular dichroism detection [J]. Chromatographia, 2009, 69(3):361.
- [31] Paula C Castilho, Sandra C Gouveia, Ana I Rodrigues. Quantification of artemisinin in *Artemisia annua* extracts by ¹H-NMR [J]. Phytochem Anal, 2008, 19:329.
- [32] 杨培慧,郑志雯,周志军,等. 青蒿素在银电极和玻碳电极上的伏安法测定[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(5):512.
- [33] Ferreira J F S, Janick J. Immunoquantitative analysis of artemisinin from *Artemisia annua* using polyclonal antibodies [J]. Phytochemistry, 1996, 41:97.