技术方法 文章编号:0253-3626(2009)02-0206-04

现场快速检测青蒿药材质量的方法研究

左巨波[1],代广会[1],杨俊卿[1,2],母昭德[1,2],尚京川[1,2]
(1. 重庆医科大学药学院药物分析教研室,重庆 400016;2. 重庆医科大学医药研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立一种简便、快速、准确、灵敏的现场测定青蒿药材中青蒿素含量的检测方法。方法:以索氏提取 - 高效液相色谱法为对照,采用超声波提取 - 紫外分光度法进行现场快速检测青蒿药材质量。结果:得出现场快速检测青蒿素的含量关系式为:MRD(mg/g)=(A × V × 2.2984)/(As × 3)+1.2067。结论:超声波提取 - 紫外分光度法测定青蒿质量,简化了操作程序,缩短了提取时间,在 1.5h 内就可完成青蒿素的含量测定,是目前快检速测青蒿药材质量较理想的方法。

【关键词】青蒿;青蒿素;快速检测;紫外分光光度法;高效液相色谱法
【中国图书分类法分类号】R917;R282 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-16

An on-the-spot method for rapid determination of quality of artemisiae annuae, herba

ZUO Ju-bo, et al
(*Department of Drug Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a simple, fast, exact and sensitive method to determine the quality of arteannuin on the spot. *Methods*: In contrast to the results based on HPLC in the aid of soxhlet extraction, an on-the-spot determination of Artemisinin by UV aided by ultrasonic extraction was proposed. *Results*: The content of Artemisinin extracted with on-the-spot method for rapid determination is computed by equation : MRD(mg·g-1)=(A × V × 2.2984)/(As × 3) +1.2067.*Conclusion*: This method with ultrasonic extraction of arteannuin and UV determination simplified the procedure and saved work time. It proved to be an satisfactory method for determination of arteannuin.

【Key words】Artemisiae annuae; Herba; Artemisinin; Rapid determination; UV; HPLC

青蒿素系列药物是当前治疗疟疾最安全有效的药物,因全球青蒿使用量巨大,市场供不应求,一些不法商贩趁机利用劣质青蒿或伪品冒充正品出售,给青蒿素提取厂商造成了很大的损失。因此,有必要研究一种简单、快速、准确的分析方法对青蒿药材的现场收购进行质量监控。常规的青蒿药材检测主要是重量法(有机溶液如石油醚回流提取,结晶称重),但该方法检测繁琐费时,不适应现场快速检测。本实验以索氏提取-高效液相色谱法为对照,建立超声波提取-紫外分光度法进行现场快速检测青蒿素的方法。该方法简便、快速、准确、灵敏,已用于现场快速检测青蒿药材质量。

作者介绍:左巨波(1978-),男,硕士,
研究方向:药物制剂,药物分析。
通讯作者:尚京川,男,副教授,E-mail:sjc20@126.com。
基金项目:重庆市科委攻关课题(CSTC,2006AC5012)。

1 仪器与试药

青蒿素标准品(纯度>99.5%,中国药物生物制品检定所);青蒿素原料药(重庆青阳药业有限公司,纯度>99.0%,批号 200411);青蒿药材(采集于重庆各青蒿种植区县);石油醚(30~60℃,分析纯),甲醇,乙腈(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司),其余试剂均为分析纯。

紫外分光光度仪(上海菁华仪器厂);高效液相色谱仪(Agilent 1100,美国 Agilent 公司);KQ2200B 型超声波清洗器(昆山市超声洗器有限公司);索氏提取器(上海洪纪仪器设备有限公司)。

2 方法与结果

2.1 青蒿素的提取

2.1.1 索氏提取 称取 60 ~ 80 目的青蒿药材粉末 0.5g,置索氏提取器中。用 70 ml 石油醚提取 30 h,收集提取液,记录体积 V。取提取液 0.5 ml 于 10 ml 刻度离心管中,沸水浴中挥

干石油醚，待用[1-3]。

2.1.2 超声波提取 称取 60～80 目的青蒿药材粉末 0.5 g，置具塞磨口锥形瓶中，加入 15 ml 石油醚，放入超声波清洗器中超声 15 min（超声期间注意换超声波清洗器中的水）。超声结束后，记录石油醚溶液体积 V，精密量取提取液 0.3 ml 于 10 ml 刻度离心管中，沸水浴中挥干溶剂石油醚，待用[4,5]。

2.2 青蒿素的检测

2.2.1 溶液的制备 青蒿素标准溶液制备。精密称取青蒿素对照品，95%乙醇溶解制成 0.1 mg/ml 的对照品贮备液，4℃冰箱保存。

供试品溶液的制备 于“2.1”项下，残留供试品残渣的刻度离心试管中分别准确加入 95%乙醇溶解残渣 3 ml，再准确加入 0.2%NaOH 溶液 7 ml。于（50±1）℃水浴加热 30 min，进行衍生，取出，冷水快速冷却，0.22 μm 纤维素滤膜滤过，得到经索氏提取和超声波提取的两种供试品溶液。

2.2.2 检测方法

2.2.2.1 高效液相色谱法（HPLC）[6-10] 色谱条件 色谱柱：Agilent Eclipse XDB C8 柱（5 μm，4.6×150 mm）；流动相：乙腈：醋酸缓冲液（0.01 mol/L，pH=5.8）=22：78；温度：25℃；流速：1 ml/min；检测波长：260 nm。

测定方法 量取一定体积的索氏提取供试品溶液与 0.08 mol/L 醋酸溶液等体积混合，混匀后，精密吸取 20 μl，注入 HPLC 进行检测。

按照上述色谱条件分别取空白溶液，对照品溶液和供试品溶液，注入高效液相色谱仪分析，色谱图见图 1。青蒿素峰理论塔板数为 13 100，保留时间约为 5.3 min，分离度大于 3，与相邻杂质峰的分离良好。

2.2.2.2 紫外分光光度法（UV） 以空白溶液为参比，将超声波提取的供试品溶液，在 292 nm 下紫外测定[11]。得吸光度 AUV。根据对照品比较法，将 AUV 代入公式，即得出样品的含量：

$$MUX(mg/g)=(AUV\times V\times 2)/(ASUV\times 3) \quad (1)$$

式中，MUX 为超声波提取的样品含量，AUV 为样品吸光度，V 为提取后样品的体积，ASUV 为经同等方法同等处理的 0.1 mg/ml 青蒿素标准品的紫外吸光度。

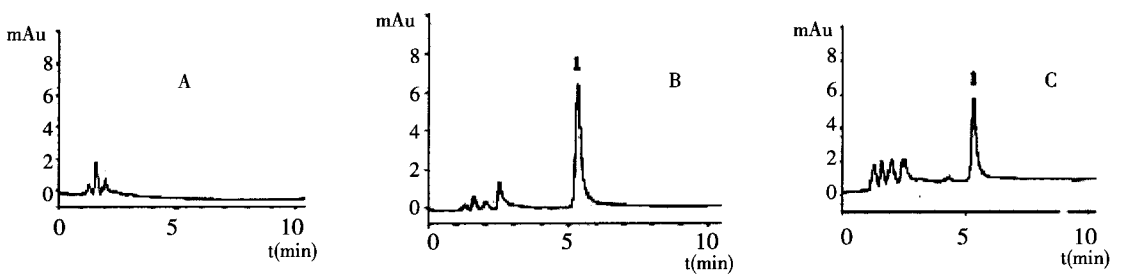
2.2.3 线性关系及检测限 配置浓度为 0.030、0.048、0.060、0.072、0.100、0.120、0.150 mg/ml 一系列标准溶液，衍生，按照测定方法检测，以 UV 测得吸光度 A 和 HPLC 测得峰面积 A 对浓度 C 进行线性回归，得到回归方程分别为：UV：C=4.963 3 AUV+0.008 9（r=0.999 8）；HPLC：C=239 5.3AHPLC+1.359 1（r=0.999 9），表明青蒿素在 0.03～0.15 mg/ml 范围内线性关系良好，检测限为 0.003 mg/ml。

2.2.4 稳定性试验 精密吸取“2.2.1”项下的标准品溶液，衍生后按照测定方法，分别在 0、1、2、3、4、6、8、10、12 h 进行检测，考察青蒿素衍生物的稳定性。结果，UV 和 HPLC 测定得到的吸光度和峰面积的 RSD 分别为 1.58%、1.14%，表明衍生后的青蒿素在 12 h 内基本稳定。

2.2.5 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下标准品溶液，衍生后按照测定方法，连续测定 5 次，考察方法的日内精密度；连续 5 d 测定上述供试品溶液，考察方法的日间精密度。结果，UV 和 HPLC 检测的日内精密度的吸光度和峰面积的 RSD 分别为 4.29%和 1.94%；日间精密度的分别为 5.72%和 2.24%。表明两种检测方法的重复性良好。

2.2.6 重复性实验 称量同一批号的 5 份样品，提取后衍生检测，结果显示紫外测得青蒿素的平均含量为 4.47 mg/g，RSD 为 3.12%；HPLC 测得青蒿素平均含量为 2.35 mg/g，RSD 为 3.08%。

2.2.7 方法的回收率 称量青蒿样品数份，均为 0.5 g，分别加入青蒿素对照品 1、2、3 mg，提取，按“2.2.1”项制备供试品溶液，检测，计算回收率。结果两种检测方法的平均回收率均大于 99%，RSD 小于 3.5%，表明回收率测定合格。



A. 空白溶液　　B. 标准品溶液　　C. 样品溶液

图 1 高效液相色谱图

2.3 青蒿现场快速检测方法的建立

2.3.1 青蒿素超声波提取与索氏提取关系的建立 按照上面方法对重庆各地区的 44 份青蒿样品分别进行超声波提取－紫外分光度法检测和索氏提取－高效液相色谱法检测青蒿素含量，结果见表 1，两者的关系见图 2。

从图 2 中可以得出，青蒿素的超声波提取与索氏提取关系可归结为：

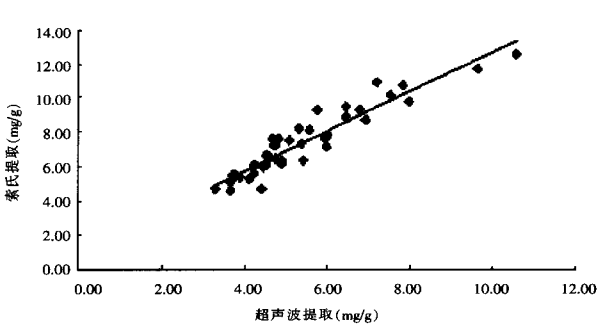


图 2 青蒿素的索氏提取与超声提取关系(n=5)

表 1 不同提取检测方法所得青蒿素含量(n=5)

序号	MUX(mg/μg)	MSX(mg/μg)	序号	MUX(mgμg)	MSX(mgμg)
001	4.21 ± 0.16	5.65 ± 0.19	023	3.27 ± 0.36	4.76 ± 0.18
002	4.54 ± 0.18	6.07 ± 0.19	024	7.52 ± 0.35	10.17 ± 0.33
003	4.44 ± 0.18	6.02 ± 0.22	025	6.77 ± 0.24	9.29 ± 0.35
004	4.09 ± 0.13	5.34 ± 0.18	026	5.94 ± 0.22	7.67 ± 0.26
005	4.41 ± 0.15	4.76 ± 0.18	027	6.01 ± 0.20	7.80 ± 0.29
006	4.19 ± 0.15	6.05 ± 0.21	028	4.53 ± 0.18	6.62 ± 0.21
007	3.67 ± 0.14	4.65 ± 0.17	029	7.81 ± 0.27	10.77 ± 0.30
008	9.61 ± 0.36	11.71 ± 0.44	030	4.65 ± 0.20	7.62 ± 0.18
009	6.43 ± 0.30	8.92 ± 0.29	031	4.60 ± 0.18	6.54 ± 0.18
010	10.54 ± 0.45	12.53 ± 0.23	032	5.29 ± 0.17	8.19 ± 0.22
011	4.89 ± 0.21	6.35 ± 0.24	033	4.27 ± 0.20	6.04 ± 0.31
012	4.57 ± 0.17	6.45 ± 0.26	034	4.73 ± 0.19	7.20 ± 0.21
013	6.93 ± 0.27	8.67 ± 0.27	035	3.68 ± 0.13	5.50 ± 0.26
014	6.46 ± 0.25	9.50 ± 0.21	036	3.89 ± 0.13	5.37 ± 0.20
015	7.20 ± 0.24	10.87 ± 0.32	037	4.71 ± 0.19	7.22 ± 0.34
016	5.74 ± 0.23	9.30 ± 0.26	038	4.82 ± 0.16	7.64 ± 0.22
017	5.41 ± 0.21	6.40 ± 0.25	039	4.75 ± 0.18	7.50 ± 0.31
018	4.88 ± 0.18	6.20 ± 0.24	040	3.75 ± 0.22	5.54 ± 0.21
019	5.96 ± 0.19	7.11 ± 0.31	041	5.37 ± 0.15	7.38 ± 0.22
020	7.96 ± 0.22	9.75 ± 0.32	042	3.66 ± 0.19	5.14 ± 0.19
021	4.73 ± 0.23	6.47 ± 0.24	043	5.07 ± 0.15	7.49 ± 0.17
022	6.93 ± 0.19	8.72 ± 0.34	044	5.54 ± 0.19	8.51 ± 0.20

$$MSX=1.1492MUX+1.2067(r=0.9127) \quad (2)$$

由公式(1)和(2)，可以得出快速检测法检测青蒿素含量的公式为：

$$MRD(mg/g)=(A\times V\times 2.2984)/(As\times 3)+1.2067 \quad (3)$$

其中，SX 表示索氏提取，UX 表示超声波提取，RD 表示现场快速提取，A 为样品吸光度，V 为提取后样品的体积，As 为 0.1 mg/ml 青蒿素标准品吸光度。

2.3.2 现场快速检测青蒿素的方法验证 以实验建立的现场快速检测方法、索氏提取－高效液相色谱法和现行工业使用的重量法（石油醚回流提取，结晶称重）检测相同青蒿样本，对三种方法的提取含量进行比较，检验方法的可行性。结果见下表 2。

表 2 青蒿素含量测定

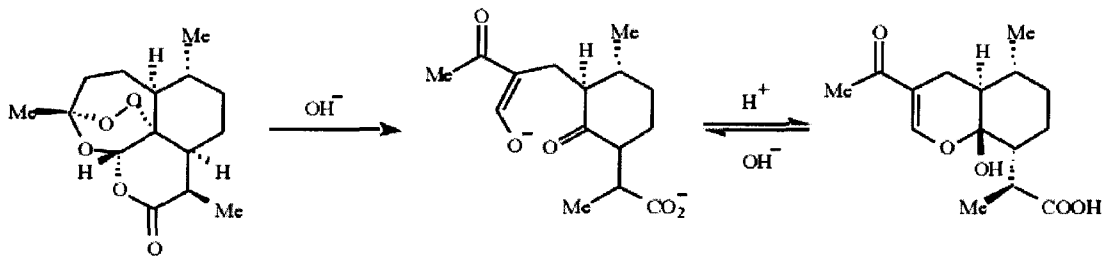
序号	MRD(mg/g)	MWM(mg/g)	MSX(mg/g)	序号	MRD(mg/g)	MWM(mg/g)	MSX(mg/g)
001	9.77	9.20	9.18	009	6.34	5.62	5.43
002	9.35	8.90	9.13	010	7.30	5.69	6.12
003	8.80	7.10	7.97	011	5.89	7.34	7.56
004	9.93	8.60	8.88	012	7.12	7.82	6.06
005	9.38	8.50	8.54	013	5.55	5.87	5.78
006	4.25	5.90	6.58	014	6.77	5.23	5.43
007	7.77	6.82	7.40	015	6.30	5.44	7.54
008	6.55	5.87	7.23	016	5.99	5.74	5.04

对于上述结果进行方差分析，F=0.39，P=0.68，3 组结果没有显著性差异，可见，通过套用现场快速检测法建立的公式能够用简单的超声波提取－紫外分光度法测定青蒿药材中青蒿素的实际含量，与索氏提取－高效液相色谱法和现行工业使用的重量法没有显著性差异，表明现场快速检测法是可行的。

3 讨 论

青蒿素在紫外区 203 nm 处有较弱的末端吸收，但与碱反应后，产生一化合物(Q292)，该物质在

292 nm 处有最大吸收。化合物 Q292 在 pH5.58~6.04 条件下，又可定量地转化为化合物 Q260，该物质在 260 nm 处有最大吸收，可以用于做 HPLC 测定，反应式如下。



ART　　Q292　　Q260

青蒿中青蒿素以及其它成分在不同溶剂中的溶解度不同，本实验分别以 15 ml 乙醚、氯仿、正己烷、石油醚(30~60℃)为溶剂，超声 15 min，紫外测定，结果氯仿和乙醚提取的吸光度均较高，石油醚、正己烷提取的吸光度则较小。但乙醚和氯仿在波长 200~250 nm 之间有很强的杂质峰，乙醚和正己烷次之，石油醚最小。考虑到乙醚及氯仿的挥发性、刺激性气味和正己烷回收温度较高，所以石油醚为较适宜的溶剂[1-4]。

根据文献报道[2]，青蒿素在 60℃以上时，其有效结构过氧桥结构便被破坏。在挥干溶液的时候，实验考察了温度对青蒿素的影响，水浴挥干温度分别为 60℃、80℃、100℃和 N_2 吹干的方式。结果每克青蒿药材分别能提取 3.81、3.76、3.78、3.84 mg 青蒿素。可以看出，N_2 吹干溶剂时，青蒿素的提取量最大，80℃水浴挥干溶剂时，青蒿素的提取量最小，两者相差 0.08 mg/g，差异很小，结果表明，以 N_2 吹干为标准，选择的水浴温度没有破坏青蒿素有效结果。

在做线性关系时，我们还考察了 UV 和 HPLC 测定结果的关系，结果 HPLC 检测的峰面积与 UV 检测的吸光度存在线性方程：AHPLC=483.6AUV +6.570 1(r=0.999 6)，表明青蒿素在 0.03~0.15 mg/ml 范围内，UV 测定结果与 HPLC 测定的结果在趋势上是一致的。

公式(1)(3)是通过简单的对照品比较法得来，这样更符合现实检验需要，如果用标准曲线的方法虽然可以更精确，但是不符合现场检验的需要。由线性关系可知，青蒿素在 0.03~0.15 mg/ml 范围内线性关系良好，而根据我们的实验方法检测的 400 多个不同地区的样品中，98%以上的样品所含的青蒿素浓度很好的落在了这个范围内，只有 5 例伪青蒿的浓度在线性关系以外，经索氏提取-高效液相色谱法检测，伪青蒿的青蒿素含量几乎为零。这说明对绝大多数的青蒿样品，本方法是可行的，但是对极少数的伪青蒿，本方法不能准确的测定其青蒿素真实含量，但这不影响正常的现场检测。

本方法因为通过和索氏提取-高效液相色谱法的比较，建立函数关系，能够将现行复杂费时的青蒿药材检测通过简单的超声波提取-紫外分光光度法完成，在操作时简单准确快速，能适应现场快速检测的要求，但是还需要在长时间的实践中自我论证，使其更加的完善、准确。

参 考 文 献

[1] 韦国锋，梁　峰，覃特营. 青蒿不同提取工艺的研究[J]. 数理医药学杂志，2002，15(2)：170-171.

[2] 赵　兵，王玉春，吴　江，等. 青蒿素提取条件研究[J]. 中草药，2000，31(6)：421-423.

[3] 张　玲，杜小英，姜锦花. 青蒿素提取分离工艺研究[J]. 现代中药研究与实践，2005，19(6)：57-58.

[4] 赵　兵，王玉春，吴　江. 超声波用于强化石油醚提取青蒿素[J]. 化工冶金，2000，21(3)：310-313.

[5] 郝金玉，韩　伟，施超欧，等. 黄花蒿中青蒿素的微波辅助提取[J]. 中国医药工业杂志，2002，33(8)：385-387.

[6] 喻凌寒，宋之光，陈江韩，等. 快速溶剂萃取反相高效液相色谱法测定青蒿中的青蒿素[J]. 分析试验室，2006，25(8)：68-71.

[7] 赵世善，曾美怡. 高效液相色谱法测定青蒿植物中的青蒿素[J]. 药物分析杂志，1986，6(1)：3-5.

[8] Singh A，Vishwakarma R A，Husain A. Evalutation of artemisia annua strains for higher artemisinin production[J]. planta Med，1988，54(5)：475-478.

[9] 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(自然科学版)，1994，19(2)：194-196.

(责任编辑：冉明会)