

# 青蒿素及其衍生物的高压液相色谱含量测定研究

王仲山 朱耀华 张叔良 吕湘林

(上海药品检验所)

**摘要** 在对抗疟药青蒿素及甲基还原青蒿素等衍生物的正、反相色谱行为研究的基础上, 使用胆固醇为内标建立了高压液相色谱含量测定方法。

青蒿素(I)<sup>(1)</sup>是我国科学工作者从植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 中提取的抗疟有效成分。李英<sup>(2)</sup>等合成了一系列衍生物, 对疟原虫有不同程度的杀灭作用, 其中尤以甲基还原青蒿素 $\beta$ 体实用价值较大。本文在研究了青蒿素及其衍生物在硅胶柱与十八烷基键合相硅胶柱上色谱行为的基础上, 选用胆固醇为内标, 在正相硅胶柱上对青蒿素与甲基还原青蒿素 $\beta$ 体作了定量测定, 获得较为满意的结果。

## 实 验 部 分

### (一) 材料

1. 仪器 高压液相色谱仪 Perkin-Elmer Series 3型配备有可变波长紫外分光光度检测器 LC-55 B型,  $\Sigma$  10型数据处理器或岛津 ITG-4 AX 积分仪, 0.56双笔记录器。色谱柱为(1) 硅胶柱, Silica A 0.26  $\times$  20 cm (无定形全孔微粒硅胶, 粒径  $13 \pm 5 \mu$ , 比表面积  $400 \text{ m}^2/\text{g}$ ); (2) ODS 键合相硅胶柱, PEAB-ODS-SIL-X  $5 \mu$  0.46  $\times$  10 cm, PEAB-ODS-SIL-X  $10 \mu$  0.46  $\times$  10 cm (均为十八烷基键合于全孔球形硅胶上的固定相); (3) 进样器, Rheodyne 7105 无隔膜注射进样器。

2. 试剂 异辛烷(2, 2, 4 三甲基戊烷)分析纯; 无水乙醇 分析纯; 甲醇 紫外分光纯 以上试剂均经蒸馏处理。水 离子交换后蒸馏 自备; 胆固醇(VII)分析纯。

### 3. 化合物

I 青蒿素 由云南昆明制药厂及广西药检所提供, 标准品由本所精制

II 甲基还原青蒿素 $\alpha$ 型 R =  $\cdots\cdots\text{OCH}_3$  (见结构式)

III 甲基还原青蒿素 $\beta$ 型 R =  $-\text{OCH}_3$

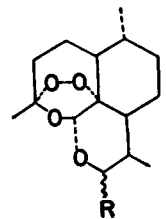
II、III 及 III 的标准品由中科院药物所植化室提供

IV 乙氧基甲酰还原青蒿素 $\alpha$ 型 R =  $\cdots\cdots\text{OC}(=\text{O})-\text{OC}_2\text{H}_5$

V 丙氧基甲酰还原青蒿素 $\alpha$ 型 R =  $\cdots\cdots\text{OC}(=\text{O})-\text{OC}_3\text{H}_7$

VI 异丁氧基甲酰还原青蒿素 $\alpha$ 型 R =  $\cdots\cdots\text{OC}(=\text{O})-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

IV~VI 由中科院药物所合成室提供, 上述化合物结构式及构型均已确定。



### (二) 方法

**正相洗脱** 取异辛烷、分别加甲醇、乙醇各 20, 5, 2.5, 1, 0.4% (V/V), 混合均匀,

超声波脱气约 5 分钟后作流动相，在 Silica A 硅胶柱上洗脱，流量为 1 ml/min，柱压约 3 MPa，UV 检测器， $\lambda$  215~220 nm，aufs 0.18，样品溶于与流动相组成相同的溶剂中，制成约 0.5~1.0% 的溶液（可加少量乙醇助溶）每次注射 5  $\mu$ l。

**反相洗脱** 取甲醇分别加入适量水使含水量为 20, 10, 5%, 0%(V/V)，混合均匀、超声波脱气后作流动相，在 PEAB-ODS 10  $\mu$  柱上洗脱，流量为 1~2 ml/min，柱压 3~8 MPa 不等，UV 检测器  $\lambda$  215~220 nm，aufs 0.18；另用 PEAB-ODS 5  $\mu$  柱，方法同上。样品配成 0.5~1% 甲醇液，每次注射 5~10  $\mu$ l，用数据处理器自动记录图谱及出峰时间，各化合物分别在不同色谱条件下计算容量因子  $k'$ 。

**青蒿素的含量测定** 取样品与胆固醇（内标）适量（各约 50 mg）精密称定，加乙醇 2 ml 溶解，必要时温热，冷后加异辛烷到 10 ml，每次注射 5  $\mu$ l，色谱柱用 Silica A 流动相为含 2%(V/V)甲、乙醇的异辛烷液，检测波长为 216.5 nm。

**甲基还原青蒿素  $\beta$  体的含量测定** 同青蒿素，惟样品及胆固醇用流动相溶解，流动相用含 1%(V/V)甲、乙醇的异辛烷液。

含量测定均用自动积分仪记录出峰面积或用数据处理器自动积分及计算含量。

## 结果与讨论

1. 青蒿素(I)与衍生物甲基还原青蒿素  $\alpha$ 、 $\beta$  差向异构体(II、III)以及衍生物 IV, V, VI 无论在硅胶柱上作正相吸附色谱还是在 ODS 键合相柱上作反相色谱，均可获得满意的分离。在正相洗脱时，使用含甲、乙醇各 1% 的异辛烷作洗脱液，对青蒿素的理论塔板数为 1900，I, II, III 与 VII 可完全分离，其色谱图见图 1。用含甲、乙醇各 0.4% 的异辛烷作流动相洗脱时 I, III~VI 可基本分离，反相洗脱用含水 10% 甲醇作流动相，PEAB-ODS 10  $\mu$  柱对青蒿素理论塔板数为 2400，I, II, III 可完全分离，出峰次序与正相完全相反。在 5  $\mu$  PEAB-ODS 柱上，用含水 20% 甲醇液洗脱，对青蒿素理论塔板数为 5300，I, III~VI 可完全分离，出峰次序亦与正相完全相反，其色谱图见图 2，在上述诸分离条件下，相邻色谱峰的分度度大

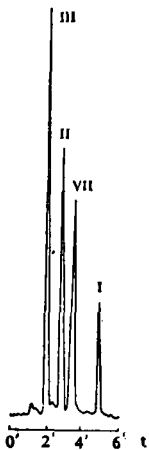


图 1 青蒿素及其衍生物的 HPLC 分离图。硅胶柱 Silica A，用含 1% 甲、乙醇的异辛烷液洗脱，UV 检测器。化合物标号见正文

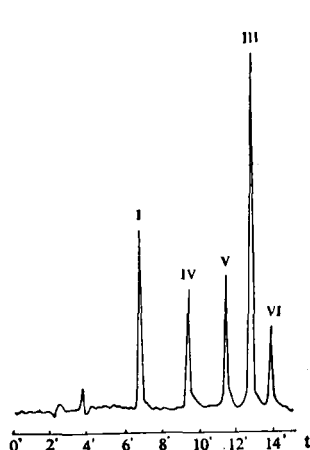


图 2 青蒿素及其衍生物的 HPLC 分离图。色谱柱 PEAB-ODS-SIL-X 5  $\mu$ ，用含水 20% 甲醇液洗脱，UV 检测器。图内化合物标号见正文

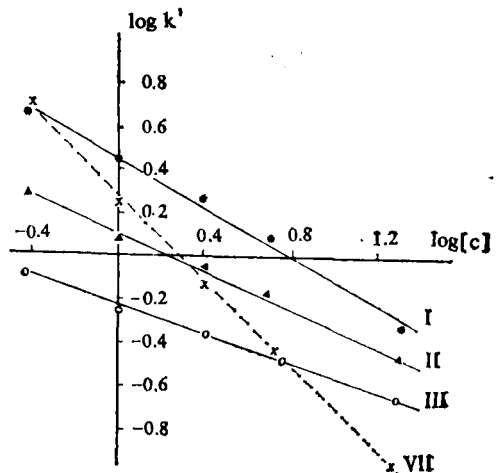


图 3 正相洗脱容量因子  $k'$  与洗脱液中极性溶剂的关系。图中  $[c]$  为 100 ml 洗脱液中含甲、乙醇的毫升数。化合物标号见正文

都在 1.5 以上。

2. 洗脱液的组成对各化合物高压液相色谱的分离有显著影响。本实验在正相吸附色谱中, 以各化合物的容量因子的对数值  $\log k'$  对洗脱液中极性溶剂(甲、乙醇)含量的对数值作图成一直线, 即符合下式:

$$\log k' = b_1 + b_2 \log c$$

其中  $c$  为洗脱液中甲、乙醇的含量。以 I、II、III 及 VII 为例, 此种线性关系见图 3。各化合物用最小二乘法计算直线的斜率  $b_2$  与截距  $b_1$  结果见表 1。可供各化合物定性鉴别参考。反相洗脱与文献<sup>(3,4)</sup>一致, 即符合  $\log k' = b_1 + b_2 c$ 。

表 1 青蒿素及衍生物正相洗脱溶剂组成与  $\log k'$  的关系

化 合 物	$\log k' = b_1 + b_2 \log c^*$		
	$b_1$	$b_2$	R (相关系数)
I	0.429	-0.545	0.97
II	0.106	-0.520	0.96
III	-0.258	-0.319	0.99
IV	0.197	-0.482	0.97
V	0.0745	-0.442	0.96
VI	0.0503	-0.430	0.87
VII	0.212	-0.909	0.99

\*  $c$  为 100 ml 流动相中含甲、乙醇(等量)的 ml 数

3. 青蒿素及甲基还原青蒿素  $\beta$  体在近紫外区无吸收峰, 但其末端吸收可用于色谱定量测定。I、II、III 与 VII 相同浓度(约 0.05% g/ml)的乙醇溶液的紫外吸收光谱只有在波长 215~220 nm 范围内吸收值较为接近, 低于 215 nm 胆固醇 VII 吸收剧增, I~III 增加缓慢, 大于 220 nm VII 吸收太小, 故波长应选择在 215~220 nm 范围内, 本实验含量测定选用 216.5 nm, 可稍有变动, 但每次测定应严格固定同一波长、不得更动, 标准品与样品应同时测定。在波长 216.5 nm 处 I 与 III 的吸收系数  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  分别约为 6.5 与 5.4, 本实验条件下灵敏度约为 0.5  $\mu\text{g}$ 。含量测定所用溶剂在 215~220 nm 的吸收应越小越好。如异辛烷对

表 2 内标(VII)与样品(I, III)重量之比与面积之比的关系

化 合 物	No.	$W_T/W_{is}$	$A_T/A_{is}$	$\frac{A_T/A_{is}}{W_T/W_{is}}$	线性回归相关系数
I (青蒿素)	1	1.528	1.060	0.693	R=0.9989
	2	1.294	0.928	0.717	
	3	1.093	0.774	0.708	
	4	1.024	0.718	0.701	
	5	0.883	0.615	0.697	
	6	0.788	0.551	0.699	
	7	0.620	0.435	0.702	
III (甲基还原青蒿素 $\beta$ 体)	1	1.251	0.826	0.6603	R=0.9978
	2	1.111	0.753	0.678	
	3	0.989	0.656	0.663	
	4	0.906	0.601	0.663	
	5	0.799	0.528	0.661	

$W_T$  为样品 I、III (系用标准品) 精确重量,  $A_T$  为峰面积

$W_{is}$  为内标(VII) 精确重量,  $A_{is}$  为内标峰面积

空气吸收度大于 0.8 (215 nm, 1 cm), 则测定时噪声大, 如在 0.5 以下可获较好结果。溶剂吸收小可提高结果准确性与重现性。

4. 以胆固醇为内标, 用正相洗脱, 可对青蒿素及其衍生物进行定量测定。以 I、III 为例, 分别用含 2% 甲、乙醇与 1% 甲、乙醇在 Silica A 柱上洗脱, 胆固醇与样品均能完全分离, 可满足定量测定要求, 内标与样品 (I, III) 重量之比与出峰面积之比在一定范围内有线性关系, 见表 2。在测定试样含量时, 根据表 2 的结果, 试样与内标重量之比应控制在 0.8~1.2 范围内为佳。每次测定均取五次平均值 (即同一试样注射五次)。我们取 I、III 的标准品与胆固醇按 1:1 重量比分别配制五个试样以测定方法的重复性, 结果 I 的变异系数为 0.76%, III 为 0.93%, 以标准品为 100% 测定不同批号样品结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果

青 蒿 素			甲 基 还 原 青 蒿 素 $\beta$ 体		
批 号	含 量		批 号	含 量	
	内 标 法	归 一 化 法		内 标 法	归 一 化 法
标 准 品	100% C. V*=0.76%	100%	标 准 品	100% C. V=0.93%	100%
云 79601-1	101.64%	97.68%	沪 8011	98.66%	99.19%
云 79601-2	104.42%	96.65%	沪 8012	98.51%	97.35%
云 79601-3	100.75%	97.76%	沪 780718	96.72%	99.50%
云 79601-4	101.19%	96.73%	沪 一	99.25%	100%
云 79601-5	99.25%	96.55%			
广 西	98.51%	97.17%			

\* C. V 变异系数

致谢 本实验承中科院药物所李英、朱大元同志, 云南昆明药厂王典五同志, 广西药检所丁济同志提供样品, 特此致谢。

### 参 考 文 献

1. 青蒿素结构协作组: 一种新型的倍半萜内酯—青蒿素. 科学通报 22:142, 1977
2. 李英等: 青蒿素衍生物的合成. 科学通报 24:667, 1979
3. Snyder L R, et al; *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, p 462, John Wiley & Sons, New York, 1974
4. Engelhardt H: *High Performance Liquid Chromatography*, p 125, Springer-Verlag, Berlin, 1979

# DETERMINATION OF ARTEMISININE AND ITS DERIVATIVES BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Wang Zhongshan, Zhu Yaohua, Zhang Shuliang and Lü Xianglin

(*Shanghai Institute for Drug Control*)

## ABSTRACT

Artemisinin, a new antimalarial drug discovered by Chinese scientists, and its derivatives were successfully separated by HPLC both in normal and reversed phases in which silica A and PEAB-ODS-SILX columns were used, respectively. The packed column with variable components of solvents as eluents had been used to study the chromatographic behavior of each compound exhibiting a linear relationship between  $\log k'$  and the logarithm of the concentration of the strong solvents in eluents made up of 2,2,4-trimethylpentane and equal volumes of ethanol and methanol.

The quantitative methods for artemisinin and  $\beta$ -methylhydroartemisinin were given by using cholesterol as internal standard and their coefficients of variation were 0.76 and 0.93% respectively.