

- 变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 64-68.
- [3] 龚义明, 邓广海, 林华. 不同煎煮时间对熟附子生物碱的影响[J]. 今日药学, 2011, 21(12): 727-733.
- [4] 秦素红, 章津铭, 何宇新. 基于化学组分动态变化的附子配伍甘草煎煮条件研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 20-23.
- [5] 丘小惠, 何洁. 煎煮时间及甘草配伍剂量对附子中酯型生物碱含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 3015-3016.
- [6] 黄臻. 李可老中医“破格救心汤”治疗充血性心力衰竭的临床研究[D]. 广州: 广州中医药大学第二临床医学院, 2012: 17-20.
- [7] 张丽, 李锦, 王玉明, 等. HPLC法测定附子配伍前后乌头类生物碱含量[J]. 天津中医药大学学报, 2010, 29(4): 206-209.
- [8] 余葱葱. 附子临床汤剂应用有效物质基础研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 64-68.
- [9] 董欣, 王述敏, 李晓明. HPLC测定附子与“半蒺贝菖及”各药材配伍前后3种双酯型生物碱的含量变化[J]. 中药材, 2011, 34(12): 1891-1894.
- (编辑: 修春)

HPLC-ECD 法测定青蒿素溶解度及油水分配系数

王振华¹, 梁家龙¹, 曾令清², 田 军², 马国辉¹(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学科技产业园有限公司, 广东 广州 510445)

摘要: **目的** 建立一种便捷灵敏的青蒿素含量测定方法, 并测定其在不同溶剂中的溶解度及油水分配系数。 **方法** 均匀试验设计优化青蒿素的柱前衍生条件, 采用 HPLC-ECD 法进行测定。 **结果** 优化的青蒿素柱前衍生条件为: 1 mL 青蒿素无水乙醇溶液与 4 mL 氢氧化钠 0.01 mol·L⁻¹ 于 70 ℃ 水浴中反应 50 min 后, 冷却至室温, 再加入 5 mL 醋酸 0.06 mol·L⁻¹。青蒿素在 0.0015~0.7500 μg 范围内线性关系良好。 **结论** 建立的柱前衍生 HPLC-ECD 法专属性强、灵敏度高, 适用于青蒿素的测定。

关键词: 青蒿素; HPLC-ECD; 柱前衍生

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0352-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.029

Determination of Solubility and Oil-water Partition Coefficient of Artemisinin by HPLC-ECD

WANG Zhenhua¹, LIANG Jialong¹, ZENG Lingqing², TIAN Jun², MA Guohui¹(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Science and Technology Park Co., Ltd, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510445, China)

Abstract: **Objective** To establish a sensitive assay method for artemisinin, and to detect the solubility as well as its oil-water partition coefficient in different solvents. **Methods** The pre-column derivatization of artemisinin was optimized by uniform design, and the determination of artemisinin was performed by HPLC-ECD. **Results** The optimal pre-column derivatization conditions were as follows: one milliliter of artemisinin anhydrous ethanol solution and 4 mL 0.01 mol·L⁻¹ sodium hydroxide were reacted in 70 ℃ water bath for 50 min, and then cooled to room temperature with 5 mL of 0.06 mol·L⁻¹ acetic acid added. The content of artemisinin showed good linearity in the range of 0.0015~0.7500 μg. **Conclusion** The pre-column derivatization HPLC-ECD method is highly specific and sensitive, and can be used for the assay of artemisinin.

Keywords: Artemisinin; HPLC-ECD; Pre-column derivatization

收稿日期: 2013-11-26

作者简介: 王振华, 男, 副教授, 博士, 研究方向: 新剂型、新技术应用。Email: wzh@gzucm.edu.cn。

基金项目: 中柬第三方检测平台建设项目(2012年广州市白云区国际科技合作计划项目)(2012-KQ-23)。

青蒿素(Artemisinin)是我国药学工作者 1972 年从菊科植物黄花蒿(*Artemisia annua* L)叶中提取分离到的一种具有过氧桥的倍半萜内酯类化合物,具有抗疟、抗菌等药理作用^[1]。

溶解度和油水分配系数是药物研究中的重要理化参数,与药物的吸收及生物体内膜渗透性具有相关性,对它们进行测定,有助于预测药物动力学性质。有关青蒿素溶解性能的研究^[2-4]并不详尽,本试验测定青蒿素的表观溶解度及油水分配系数,可为开发、研制青蒿素制剂研究提供依据。

目前青蒿素测定方法主要有高效液相法、毛细管电泳法、气相和电化学方法等,其中高效液相检测法尤为常见。近年来有报道^[5]用蒸发光检测器对青蒿素进行检测,定量下限是 0.118 μg 。紫外检测器直接对青蒿素进行测定,由于青蒿素本身只有末端紫外吸收,灵敏度及专属性差,定量下限为 0.10117 μg ^[6]。对青蒿素进行开环处理,再用紫外检测器检测,柱前衍生法^[7-8]的定量下限是 0.0099 μg ,柱后衍生法^[9]的为 0.001 μg 。液质联用^[10-11]检测的定量下限可以达到 0.01 ng。

虽有使用单因素考察优化柱前衍生的条件^[12],结果未全面地反映因素的作用,也忽略因素间可能存在的交互作用。目前并未见柱前衍生后使用电化学检测器测定青蒿素的报道,本试验拟对青蒿素的柱前衍生条件采用均匀设计考察,以高效液相-库仑阵列电化学色谱法(HPLC-ECD),对青蒿素在不同溶剂中的表观溶解度和油水分配系数进行含量测定,以期建立一种简便,快捷,专属性强、灵敏度高的分析方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相库仑阵列电化学色谱仪(Model 5600A Coularray 检测器、Model 582 泵、Model 542 自动进样器),美国 ESA 公司;Genpure 超纯水机,德国 TKA 公司;德国赛多利斯公司;KQ5200DE 数控超声波清洗器,昆明市超声仪器有限公司;电热恒温水浴锅,上海医疗器械五厂;PH-25 型 pH 计,上海雷磁仪器厂。

1.2 试剂 青蒿素对照品,中国药品生物制品检定所,批号:100202-200603;青蒿素原料药,广东新南方青蒿科技有限公司,纯度 99%;乙腈,色谱纯,美国 Honeywell 公司;甲醇,色谱纯,美国 Honeywell 公司;水为纯水机制超纯水;其他试剂均

为分析纯。

2 方法与结果

2.1 青蒿素 HPLC-ECD 测定方法的建立

2.1.1 青蒿素适用于电化学检测形式的考察 采用 HPLC-ECD 法在 -600 mV~750 mV 条件下检测青蒿素衍生物,结果峰形及分离度良好,响应值较稳定。

最终确定的色谱条件为:Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm),流动相 A(甲醇:乙腈:20 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钠水溶液 = 63:32:5):流动相 B(20 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钠水溶液)=20:80, pH=7.0, 检测柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$, 检测电极电压为 750 mV, 流速:1 mL·min⁻¹, 进样量:15 μL 。

2.1.2 柱前衍生条件的考察

2.1.2.1 醋酸加入量的影响 取 0.51 mg·mL⁻¹ 青蒿素无水乙醇液 1 mL 与 0.05 mg·mL⁻¹ 氢氧化钠水溶液 4 mL 置 10 mL 量瓶中,密封,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后,将量瓶置水中快速冷却,用不同浓度的醋酸溶液(0.04, 0.08, 0.40, 0.80 和 1.00 mg·mL⁻¹)分别定容至 10 mL,过滤,按 2.1.1 项测定。每一浓度平行处理 3 份样品。对结果进行单因素方差分析,得到 $P > 0.05$,表明不同浓度的醋酸处理后,被检测物质的峰面积之间无显著性差异,即酸的浓度对测定影响不显著。

2.1.2.2 碱的浓度、水浴温度和时间对开环的影响 样品处理过程同 2.1.2.1 项下,醋酸浓度为 0.06 mol·L⁻¹,考察氢氧化钠浓度、水浴温度、水浴时间的影响,以 $U_{15}(15^3)$ 均匀实验设计表安排试验,按 2.1.2.1 项下操作并测定,以响应值为指标。其中氢氧化钠浓度为 X_1 、水浴温度为 X_2 、水浴时间为 X_3 ,结果见表 1、表 2。

经逐步回归法进行多元线性回归分析,建立多元回归方程,得 $Y = -79.893 + 154.902X_1 + 2.313X_2 - 4.322X_1X_2 + 0.006X_3^2$ 。方差分析得 $P < 0.001$,表明回归方程有统计学意义。各步引入对回归方程影响最大的变量时的偏回归系数的显著性检验,见表 3。

表 3 的标准化系数数据说明,对 Y 影响最大的变量依次是 X_1X_2 , X_2 , X_1 , X_3^2 。经 t 检验,上述变量均具有统计学意义,当中包含交互项 X_1X_2 ,说明氢氧化钠的浓度和水浴温度具有交互效应,所用的氢氧化钠浓度产生的响应值会因水浴温度的变化而变化,反之亦然。

对方程最优化求解,得到条件如下: $X_1=0.01$,

表 1 因素与水平表

Table 1 Factors and levels of uniform test

水平	因素		
	$X_1/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$X_2/^{\circ}\text{C}$	X_3/min
1	0.01	30	10
2	0.05	30	10
3	0.09	30	10
4	0.13	40	20
5	0.17	40	20
6	0.21	40	20
7	0.25	50	30
8	0.29	50	30
9	0.33	50	30
10	0.37	60	40
11	0.41	60	40
12	0.45	60	40
13	0.49	70	50
14	0.53	70	50
15	0.57	70	50

表 2 试验安排及结果表

Table 2 Schedule and results of uniform test

实验号	因素			响应值/ μC
	$X_1/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$X_2/^{\circ}\text{C}$	X_3/min	
1	0.01	40	30	15.3
2	0.05	50	50	50.6
3	0.09	60	20	51.9
4	0.13	30	50	7.6
5	0.17	40	20	10.0
6	0.21	50	40	34.3
7	0.25	70	20	41.8
8	0.29	30	40	5.5
9	0.33	40	10	5.4
10	0.37	60	40	27.9
11	0.41	70	10	26.1
12	0.45	30	30	3.9
13	0.49	30	10	2.3
14	0.53	60	30	18.1
15	0.57	70	50	4.8

表 3 偏回归系数及 t 检验

Table 3 The partial regression coefficients and t -test

模型	非标准化系数		标准化系数	t	显著性
	B	标准误	Beta		
4 (常量)	-79.893	12.994		-6.157	0.000
X_2	2.313	0.243	2.062	9.511	0.000
X_1X_2	-4.322	0.645	-2.866	-6.704	0.000
X_1	154.902	33.156	1.593	4.672	0.001
X_3^2	0.006	0.002	0.284	3.249	0.009

$X_2=70$, $X_3=50$, Y 的预测值范围为 75.31 ~ 113.38 (当 $\alpha=0.05$ 时, Y 值的 95 % 预测区间)。经验证, 峰面积在理论范围内, 且比均匀实验设计表中 15 个试验号的峰面积有较大提高。

通过均匀实验, 最终获得青蒿素检测灵敏度较高、专属性强的衍生处理方法, 即 1 mL 青蒿素无水乙醇液与 0.01 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 4 mL 混合后置 70 °C 水浴锅中反应 50 min, 取出置水中冷却至室温, 再加 5 mL 的 0.06 mol·L⁻¹ 醋酸定容至刻度。

2.1.3 青蒿素 HPLC-ECD 色谱法测定方法学考察

2.1.3.1 色谱条件及专属性 按 2.1.2.2 项下方法制备青蒿素空白与青蒿素无水乙醇衍生样品, 按 2.1.1 项下色谱条件进行测定, 测定结果见图 1。

2.1.3.2 线性关系考察 精密称取对照品 10 mg 置于 10 mL 量瓶, 无水乙醇定容至刻度, 摇匀, 得对照品母液(1 mg·mL⁻¹)。取该母液, 用无水乙醇稀释至浓

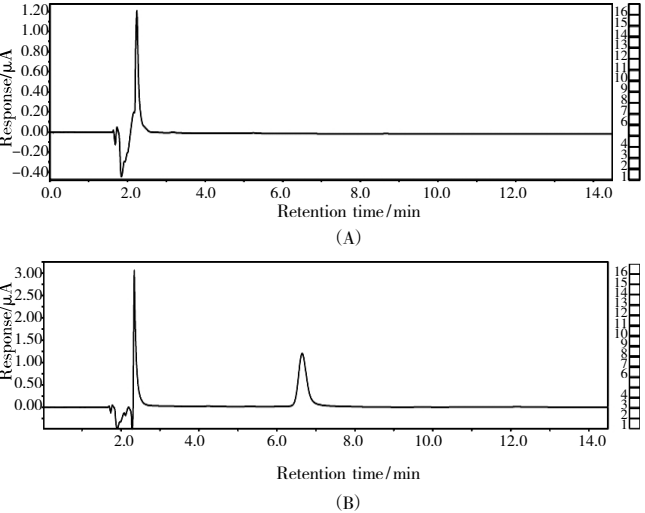


图 1 空白(A)和青蒿素无水乙醇液衍生后(B)色谱图
Figure 1 Chromatograms of blank (A) and derivatization of artemisinin(B)

度分别为 50, 25, 12.5, 6.25, 2.5, 0.5, 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准溶液, 按 2.1.2.2 项下方法处理, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 记录峰面积。以峰面积为纵坐标, 青蒿素浓度为横坐标进行线性回归, 回归方程为: $Y=1.5438X-0.0586$, $r=0.9999$ 。结果表明青蒿素在 0.0015~0.7500 μg 范围内线性良好, 按信噪比 3 : 1 计算, 最低检测限为 0.000222 μg 。

2.1.3.3 仪器精密度试验 取浓度为 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的青蒿素对照品, 按上述色谱条件连续进样 6 次, RSD 为 0.823 %, 结果表明仪器精密度良好。

2.1.3.4 重复性试验 分别选取浓度为 0.5, 6.25, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的青蒿素供试品溶液, 按样品处理项方法各平行处理 3 份, 进样检测, RSD 依次为 1.58 %、1.59 %、0.72 %, 结果表明重复性良好。

2.1.3.5 稳定性试验 取青蒿素供试品溶液, 按 2.1.2.2 项下进行处理, 分别于 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h 进样测定, 结果表明, 检测峰面积 RSD 为 1.88 %, 当检测到 8.5, 9 h 时, 结果 RSD 已超过 2 %, 故样品在处理完后必须在 8 h 内检测。

2.1.3.6 加样回收试验 取已知含量的青蒿素供试品溶液, 加入已知含量的高、中、低 3 个浓度的青蒿素对照品溶液, 按照 2.1.2.2 项下样品处理的方法各平行处理 3 份样品, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 4。结果表明, 本方法分析误差较小, 方法可靠。

2.2 青蒿素溶解度的测定 在盛有 1 mL 溶剂的密闭

表 4 青蒿素衍生物加样回收率试验结果

Table 4 Results of recovery test for artemisinin						
序号	样品量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	31.25	12.50	44.06	102.48	102.48	1.07
2	31.25	12.50	44.12	102.96		
3	31.25	12.50	44.00	102.00		
4	31.25	31.25	62.32	99.42	100.54	
5	31.25	31.25	62.78	100.90		
6	31.25	31.25	62.91	101.31		
7	31.25	50.00	81.36	100.22	100.65	
8	31.25	50.00	82.00	101.50		
9	31.25	50.00	81.36	100.22		

容器中, 加入过量青蒿素原料药, 密封, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温放置 24 h 使其完全达到饱和状态, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 滤液稀释到适当浓度, 按 2.1.2.2 项进行样品处理, 并按 2.1.1 项进行含量测定, 结果见表 5。

表 5 青蒿素在不同溶剂中的溶解度

Table 5 Solubility of artemisinin in different solvents

溶剂	水	PEG300	甲醇	乙腈	无水乙醇	正丙醇	丙二醇	丙酮	正丁醇	乙醚	乙酸乙酯	三氯甲烷	苯	环己烷	石油醚
溶解度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.0671	19.00	50.00	263.00	32.20	28.58	9.11	197.20	26.80	26.50	120.00	499.60	269.22	2.70	2.60

青蒿素在不同溶剂中的溶解度大小顺序为: 三氯甲烷>苯>乙腈>丙酮>乙酸乙酯>甲醇>无水乙醇>正丙醇>正丁醇, 乙醚>PEG300>丙二醇>环己烷, 石油醚>水。

2.3 青蒿素表观油水分配系数(P)的测定 取约 0.1 g 青蒿素分别溶于 10 mL 三氯甲烷和正丁醇中, 倒入装有 10 mL 纯水的分液漏斗中, 充分振摇, 放置 24 h, 经两相分配后, 测定有机层和水层中青蒿素的浓度, 实验重复 3 次。计算公式为: $P=C_{\text{油相}}/C_{\text{水相}}=C_o/C_w$ 。青蒿素在三氯甲烷与水中的 lgP 值为 2.86, 在正丁醇与水中的 lgP 值为 2.27, 其具有一定的脂溶性。

3 讨论

试验中曾用 HPLC-ECD 法在 -600 mV~750 mV 条件下对青蒿素原形药物检测, 由于其结构的原因, 无响应信号。对青蒿素衍生条件进行初步摸索, ECD 能检测到衍生物。进一步考察衍生物酸化与不酸化的情况, 发现不酸化的响应值高于酸化后, 但不酸化时出峰较快, 并且峰会相互干扰, 而酸化后峰型和分离度较好, 柱子分离后有响应的青蒿素水解碎

片有 4~6 个。通过改变流动相的比例, 证实第 1 个高峰始终是 1 个峰, 响应值最大, 较稳定, 峰形很好, 峰面积与青蒿素浓度有良好的线性关系, 将此物质作为检测的对象。

通过对青蒿素衍生条件的考察, 不同的衍生条件下, 峰面积响应值的差别可达 20 倍之多, 最小峰面积为 2.26, 最大峰面积为 51.9, 表明衍生条件对青蒿素测定灵敏度影响较大。文献多选用 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 30 min 的衍生条件, 本研究选用的条件为 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液, 在 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 50 min。

在青蒿素衍生过程中存在一些副反应产物, 虽然本研究优化的条件落在因素水平范围的边界, 但在该条件下, 这些物质并不过多地干扰对目标物的测定。当增大碱的浓度, 或者延长水浴温度和时间时, 会使副产物增多, 对测定造成干扰。

综上所述, 本研究所建立的柱前衍生 -HPLC-ECO 法专属性强, 灵敏度高, 适用于青蒿素的测定。

参考文献:

[1] 郑全芳, 杨志刚, 孙红祥. 青蒿素及其衍生物药理作用研究进展

- [J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(1): 40-44.
- [2] 高伟祺, 栾淑伟, 王锐利, 等. 青蒿素在不同溶剂中平衡溶解度和表观油水分配系数的测定[J]. 药物评价研究, 2013, 01: 35-38.
- [3] Liu Y, Lu H, Pang F. Solubility of artemisinin in seven different pure solvents from (283.15 to 323.15)K[J]. Chem Eng Data, 2009, 54(3): 762-764.
- [4] Nti-Gyabaah J, Gbewonyo K, Chiew YC. Solubility of artemisinin in different single and binary solvent mixtures between (284.15 and 323.15) K and NRTL interaction parameters[J]. J. Chem. Eng. Data, 2010, 55(9): 3356-3363.
- [5] 胡向荣, 余凤华. HPLC-ELSD 测定不同产地青蒿中青蒿素的含量[J]. 现代食品与药品杂志, 2006, 03: 34-36.
- [6] 向文, 李琳, 刘吉华, 等. UPLC-UV 法测定不同产地青蒿中青蒿素的含量[J]. 中国野生植物资源, 2012, 04: 28-31.
- [7] 马玉樊, 陈涛, 卢婷利, 等. RP-HPLC 法测定 O/W 型青蒿素脂肪乳剂中青蒿素的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 12: 1976-1979.
- [8] 刘丽芳, 王茜, 李海燕, 等. 柱前衍生-RP-HPLC 法测定青蒿中青蒿素的含量[J]. 中国野生植物资源, 2004, 06: 60-62.
- [9] 申薇薇, 王锐利, 胡爽, 等. 高效液相-柱后衍生法测定青蒿素含量[J]. 中国药物与临床, 2007, 09: 657-659.
- [10] 冯怡, 刘奕明, 谈博, 等. 液相色谱-串联质谱法测定人血中的青蒿素和哌喹浓度[C]// 中国药理学会临床药理专业委员会. 第十三次全国临床药理学学术大会论文汇编. 成都: 中国药理学会, 2012: 242-246.
- [11] 李超, 王锐利, 张丽锋, 等. 液相色谱-质谱联用法测定犬血浆中青蒿素浓度[J]. 中国药物与临床, 2011, 07: 748-749.
- [12] 杨小明, 梁健, 王驰芳, 等. 银杏酸平衡溶解度和表观油水分配系数的测定[J]. 时珍国医国药, 2010, 10: 2586-2587.
- (编辑: 修春)

HPLC 法测定小柴胡颗粒中柴胡皂苷 b_2 的含量

李娉婷, 林丽蓉, 林丽华, 王术玲, 刘树强, 高晓玲(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 建立小柴胡颗粒中柴胡皂苷 b_2 含量的测定方法。方法 采用 HPLC 法, phenomenex® Luna 色谱柱, 以乙腈-0.2%二乙胺(35:65)为流动相, 流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 检测波长 254 nm 。结果 柴胡皂苷 b_2 线性范围 $0.3632\sim3.6320\text{ }\mu\text{g}$, $R^2=1.00$; 平均加样回收率为 102.2% , RSD 为 2.5% 。结论 该方法准确、稳定, 重现性好, 可用于小柴胡颗粒的质量控制。

关键词: HPLC; 小柴胡颗粒; 柴胡皂苷 b_2 ; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)03-0356-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.030

Determination of Saikosaponin b_2 in Xiaochaihu Granules by HPLC

LI Pingting, LIN Lirong, LIN Lihua, WANG Shuling, LIU Shuqiang, GAO Xiaoling (School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of saikosaponin b_2 in Xiaochaihu Granules. **Methods** HPLC was performed on Phenomenex Luna column. The mobile phase was a mixture of acetonitrile-0.2% diethylamine (35:65). The detection wavelength was set at 254 nm . The flow rate was $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and column temperature was $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. **Results** The linear range of saikosaponin b_2 was within $0.3632\sim3.6320\text{ }\mu\text{g}$, $R^2=1.00$. The average recovery was 102.2% , and $\text{RSD}=2.5\%$. **Conclusion** The established method is simple, stable and reproducible. It can be used for the quality control of Xiaochaihu Granules.

Keywords: HPLC; Xiaochaihu Granules; Saikosaponin b_2 ; Content determination

收稿日期: 2013-12-14

作者简介: 李娉婷, 女, 硕士研究生, 研究方向: 心血管疾病中医药防治机制及新产品开发。Email: mydearpainting@163.com。通讯作者: 王术玲, 副教授, 研究方向: 中医药防治动脉粥样硬化。Email: jinggelwang@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81102530)。