

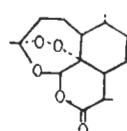
青蒿素和去氧青蒿素荧光薄层扫描测定法

王敦瑞、林性玉、张惠珠 (上海第二医科大学学生化教研室, 上海 200025)

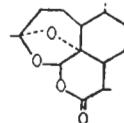
摘要 本实验采用硫酸:冰醋酸浸渍的薄板分离青蒿素和去氧青蒿素等。经加热产生荧光后, 进行荧光薄层扫描定量分析。本法检测下限: 青蒿素为 60 ng, 去氧青蒿素为 10 ng。

关键词 青蒿素; 去氧青蒿素; 薄层分析; 抗疟药; 荧光光谱测定法

青蒿素是我国发现的新型抗疟药⁽¹⁾, 又发现它具有免疫抑制作用⁽²⁾。本文利用荧光薄层析扫描法分离并测定小鼠血清中青蒿素及其代谢物。其原理为根据青蒿素等在硫酸:冰醋酸作用下加热后能产生荧光的现象, 进行荧光薄层扫描定量分析。



Artemisinin



Deoxyartemisinin

方法与结果

材料 硅胶薄板(E Merck 20×20 cm 及中科院药物研究所产品, 10×20 cm)。荧光分光光度计为 Hitachi MPF-4。用荧光扫描仪附件, 将样品室装配成扫描装置。青蒿素为广西

桂林制药厂产品。去氧青蒿素由中科院上海有机所提供。注射用中性油由上海医药工业研究院制剂室提供。

青蒿素及去氧青蒿素特征性荧光光谱 将硅胶薄板浸于硫酸:冰醋酸(1:25)的溶液中 1 min。取出后滴干板上残余液体。置 100℃ 烘干(约 15 min)。放入干燥器内保存备用。

分别配制青蒿素和去氧青蒿素的甲醇溶液(0.1 mg/ml), 用微量注射器吸取 2 μl 点样于酸浸渍板上, 待溶液挥发后, 100℃ 加热 10 min。取出后即于 uv 灯(365 nm)下观察, 可见青蒿素呈蓝色荧光, 去氧青蒿素呈黄色荧光。

置上述薄板于荧光扫描仪上进行薄层扫描(硅胶面朝下), 分别测定青蒿素和去氧青蒿素的特征性激发光谱和发射光谱。

波长选择为: 青蒿素的激发光波长为 390 nm, 发射光波长为 430 nm。去氧青蒿素的激发光波长为 460 nm, 发射光波长为 500 nm。

青蒿素经反应产生的荧光, 其强度随着时间延长会逐渐下降, 衰退方式符合一级反应速度方程。上述薄板在青蒿素产生荧光后, 若立即紧复一块相同大小, 厚薄均匀的玻璃片(1 mm 厚), 则荧光强度略有降低, 但可保持 100 min 不减退(图 1)。

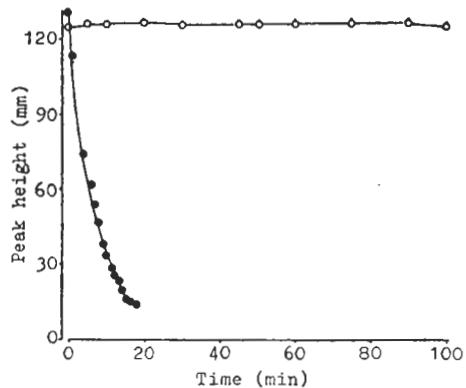


Fig 1. Intensity of fluorescence of the spots of artemisinin with (○) or without (●) cover glass.

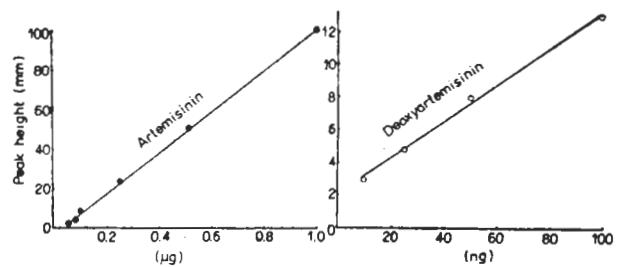


Fig 2. Fluorescence intensity of artemisinin and deoxyartemisinin.

青蒿素和去氧青蒿素的定量测定 青蒿素和去氧青蒿素甲醇液在酸浸渍板上点样后进行层析分离，展开系统为石油醚(30-60℃):石油醚(60-90℃):三氯甲烷:乙酸乙酯=8:2:2:1，层析结束待溶剂蒸发后，薄板于100℃加热10 min。盖上玻片进行薄层扫描定量分析。测定条件：仪器电压700 V，激发光和发射光的狭缝宽度均为10 nm，纸速30 mm/min，仪器灵敏度根据样品荧光强度选择。扫描结果，青蒿素R_F为0.37，去氧青蒿素R_F为0.43。

用甲醇配制系列浓度(60-1000 ng/μl)的青蒿素溶液，并以微量注射器吸取后在酸浸渍板上点样、层析。同样，用甲醇配制系列浓度(10-100 ng/μl)的去氧青蒿素溶液，同上法测定荧光强度。结果(图2)表明青蒿素、去氧青

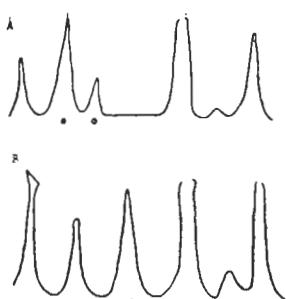


Fig 3. Scan of thin layer chromatograms of 0.2 ml extracts of serum with artemisinin (A) and deoxyartemisinin (B). Excitation/emission (A) 390/430 nm, (B) 460/500 nm. ● Cholesterol, ○ Artemisinin, × Deoxyartemisinin.

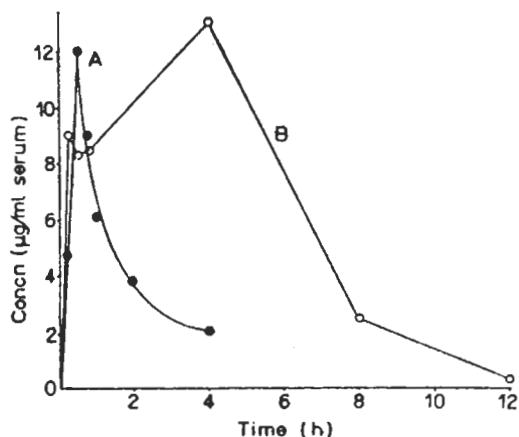


Fig 4. Artemisinin (A) and deoxyartemisinin (B) concentrations in serum of mice after ip artemisinin 500 mg/kg.

蒿素的含量和荧光强度在上述范围内呈线性关系。

血清中青蒿素和去氧青蒿素的定量测定

1. 血清外加青蒿素和去氧青蒿素 荧光扫描图谱 小鼠血清0.2 ml两份，各自加入1.0 mg/ml的青蒿素或去氧青蒿素甲醇溶液5 μl，混匀。另取0.2 ml小鼠血清作对照。上述各管加入0.2 ml蒸馏水，混匀。用1 ml乙醚抽提后，200×g离心1 min。用滴管移醚层于另一试管中。重复此抽提过程3次，共得乙醚合并液约3 ml。于50℃水浴内，将乙醚蒸干。试管内残渣各用20 μl乙醚溶解。用毛细

管将此溶液点样于酸浸渍板($10 \times 20 \text{ cm}$)上，点样处距边缘一端约 1 cm 。点样原点直径不超过 5 mm 。

层析分离后荧光扫描测定同前。扫描方向自原点起至前沿。图3表示血清中青蒿素和去氧青蒿素血清的扫描图谱。

2. 血清外加青蒿素回收测定 小鼠血清 0.2 ml 加入青蒿素(1 mg/ml 甲醇)溶液 $5 \mu\text{l}$ ，混匀。经抽提处理后点样。在同一块板同时点上已知含量的青蒿素甲醇溶液($5.0 \mu\text{g}$)作为标准。层析后扫描测定，测量各外加青蒿素血清管的荧光峰高度与相应标准管荧光峰高度，算得此时回收率为 $92 \pm 8\% (n=5)$ 。

3. 小鼠ip青蒿素后血清内青蒿素和氢化青蒿素含量测定 配制青蒿素注射油剂：青蒿素 20 mg 加入 1 ml 中性油， 65°C 水浴内加热，不断搅拌，待药物全部溶解后备用。

小鼠18只，分为8个时间组，各组小鼠ip青蒿素油剂 500 mg/kg 。对照组ip中性油 25 ml/kg 。不同时间组小鼠分别在 $15, 30, 45 \text{ min}$ 和 $1, 2, 4, 8, 12 \text{ h}$ 取血。合并每时间组及对照组血液，分离血清。

取样品血清 0.2 ml ，同上法测定其中青蒿素和去氧青蒿素的含量，并据此制作血清药浓度—时间曲线(图4)。

结果表明，血清药浓度曲线图型符合二室模型。其代谢动力学的参数为： $\alpha = 0.73 \text{ h}$ ， $\beta = 0.37 \text{ h}$ ， $t_{\frac{1}{2}\alpha} = 0.95 \text{ h}$ ， $t_{\frac{1}{2}\beta} = 1.87 \text{ h}$ 。血清青蒿素浓度在小鼠ip 30 min 即达高峰。经过约 1 h 的分布期后，随着青蒿素在血清中逐渐消除，去氧青蒿素浓度却逐渐升高。 4 h 和 8 h 时，去氧青蒿素的浓度分别为 13.0 和 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 。

讨 论

许多萜类化合物在硫酸作用下，加热以后可产生荧光或其它颜色⁽³⁾，作者利用这一现象对青蒿素及去氧青蒿素(倍半萜)进行含量测定。但这类荧光物质的强度由于酸浸渍板吸收

空气中的水份而很快下降。青蒿素产生荧光后，若即在板上盖一玻片，可使荧光强度在一定时间内稳定。荧光严重减弱时，将薄板放进烘箱内重新加热，荧光仍可重新加强。这表明青蒿素的荧光强度下降是酸浸渍板对水可逆的物理吸附过程。

采用酸浸渍板，对青蒿素及去氧青蒿素进行分离和定量测定，改变了过去层析分析中先展层后喷雾显色的程序。此法可以提高测定的重现性，也可降低喷洒显色剂时雾点中硫酸的腐蚀性及冰醋酸的毒性与气味。同一块薄板上， $1 \mu\text{g}$ 青蒿素连续12次点样，荧光强度的变异系数为 7.17% 。

血浆中青蒿素的含量测定，国内报道较多⁽⁴⁻⁶⁾。其中，薄层扫描定量法，检测甲基还原青蒿素(蒿甲醚)的下限为 0.1 ng 。还原型电化学极谱检测高效液相色谱法测定青蒿酯下限为 $20-800 \text{ ng/ml}$ 。放射免疫法测定青蒿酯和青蒿素的下限达到 $2-10 \text{ ng}$ 。本法结合层析技术和荧光检测技术，可以对生物样品中青蒿素和体内的代谢产物同时进行测定。定量测定去氧青蒿素，在国内还是首次报道，这对于进一步探讨青蒿素在体内的代谢及其生物学作用有一定的意义。同时，本法还可作为一般的药物分析方法，直接利用荧光检测技术测定青蒿素。

参 考 文 献

- 1 青蒿素研究协作组。一种新型的倍半萜内酯——青蒿素。科学通报 1977; 22: 142
- 2 沈明、葛海良、何尧祥、宋千里、张惠珠。青蒿素的免疫抑制作用。中国科学(B辑) 1983; 10: 928
- 3 陈德昌。层析法在挥发油分离和鉴定中的应用。见：北京医学院、北京中医学院，主编。中草药成分化学。第1版。北京：人民卫生出版社，1980: 383
- 4 张银娣、王长根、许帼英、庄怡华、曾衍霖。血浆中甲基还原青蒿素(蒿甲醚)的薄层扫描定量法。药学学报 1982; 17: 212
- 5 杨树德、马建民、孙娟华、宋振玉。还原型电化学极谱检测高效液相色谱法测定人血浆中青蒿酯和双氢青蒿素。同上 1985; 20: 457
- 6 宋振玉、赵凯存、梁晓天、刘春雪、仪明光。青蒿酯和青蒿素的放射免疫测定法。同上 1985; 20: 610

Thin layer chromatographic fluorometry of artemisinin and deoxyartemisinin

WANG Dun-Rui, LIN Xing-Yu, ZHANG Hui-Zhu

(Dept Biochemistry, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025)

ABSTRACT A new thin layer chromatography method with fluorescence detection for the quantitation of artemisinin and its derivative deoxyartemisinin is described. Artemisinin and deoxyartemisinin in the samples were extracted with ether. The fluorescence was produced by heating the plate impregnated with H_2SO_4 : HAc system after TLC and quantitatively determined by *in situ* scanning. The lower limit of the detection of artemisinin and deoxyarte-

misnin were 60 and 10 ng respectively.

Artemisinin reached the highest concentration, the peak value, in mice at 30 min after ip 500 mg/kg. A two-compartment model for artemisinin described the serum concentration time curve.

KEY WORDS artemisinin; deoxyartemisinin; thin layer chromatography; anti-malarials; fluorescence spectrometry