

HPLC 测定双氢青蒿素软胶囊中双氢青蒿素的含量

詹利之^{1*}, 詹爱琼², 林燕芳¹, 杨兆丽¹, 杨家庆¹, 张美义¹

(1. 广州中医药大学青蒿研究中心, 510405 广州;

2. 广州中西医结合医院药剂科中心药房, 510800 广州)

[摘要] 目的: 建立双氢青蒿素软胶囊中双氢青蒿素含量测定的方法。方法: 采用 Dika Diamonsil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 以 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (pH 2.5)-乙腈 (65:35) 为流动相; 流速 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长为 234 nm, 柱温 18 °C。结果: 双氢青蒿素在 8~40 μg·mL⁻¹ 线性良好, $r=0.999\ 92$, 平均回收率 99.6%, RSD 0.66%。结论: 该法操作简便、快捷、准确; 适用于双氢青蒿素软胶囊中双氢青蒿素含量测定。

[关键词] 双氢青蒿素软胶囊; 高效液相色谱法; 双氢青蒿素

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)19-0112-03

Determination of Dihydroartemisinin from Dihydroartemisinin Soft Capsule by HPLC

ZHAN Li-zhi^{1*}, ZHAN Ai-qiong², LIN Yan-fang¹, YANG Zhao-li¹, YANG Jia-qing¹, ZHANG Mei-yi¹

(1. Research Center for Artemisia annual L., Guangzhou University of Chinese Medicine,

Guangzhou 510405, China; 2. Central Pharmacy of Pharmacy Department,

Guangzhou Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Guangzhou 510800, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the assay of dihydroartemisinin from Dihydroartemisinin Soft Capsules. **Method:** The assay was performed by a Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) and a mobile phase of 0.1 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate (pH 2.5) -acetonitrile with ratio of 65:35, and the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. The wavelength of detector was set at 234 nm and the column temperature was at 18 °C. **Result:** Dihydroartemisinin has a good linearity in the range of 8-40 μg ($r=0.999\ 92$, $n=5$), and the average recovery is 99.6% with RSD 0.7% ($n=9$). **Conclusion:** The method is simple, rapid and accurate and suitable for the determination of dihydroartemisinin in Dihydroartemisinin Soft Capsules.

[Key words] Dihydroartemisinin Soft Capsules; HPLC; dihydroartemisinin

双氢青蒿素软胶囊 (Dihydroartemisinin Soft Capsules) 是双氢青蒿素的胶丸制剂, 是治疗疟疾的直肠给药制剂。用紫外-可见分光光度法^[2] 基质干扰无法排除, 我们采用 HPLC 法^[3-5], 进行双氢青蒿素软胶囊^[6-9] 的专属性试验时发现, 加碱后可使基质大量析出, 可用孔径 0.45 μm 的微孔滤膜滤过除去基质, 可以达到控制双氢青蒿素含量的目的。

1 仪器和试剂

岛津 LC-10ATVP 型高效液相色谱仪 (SIL-10ADVP 自动进样器, CLASS-VP 数据处理系统), SPD-M10AVP 二级管阵列检测器, SH-210R 型电子天平 (德国), CSF-1A 型超声发生器 (汕头超声电子)。双氢青蒿素对照品 (100184-200401 99.8%) 由中国药品生物制品检定所提供。双氢青蒿素软胶囊 (批号 20091210, 20091210, 20091211), 由广州中医药大学青蒿研究中心提供。乙腈为色谱纯, 磷酸二氢钾、磷酸为分析纯, 试验用水为超纯水。

2 色谱条件与系统适用性试验

2.1 溶液制备

[收稿日期] 20120319(010)

[通讯作者] * 詹利之, 主管药师, 从事药物制剂与新药开发研究, Tel: 020-36585428, E-mail: zhanwenzhi@hotmail.com

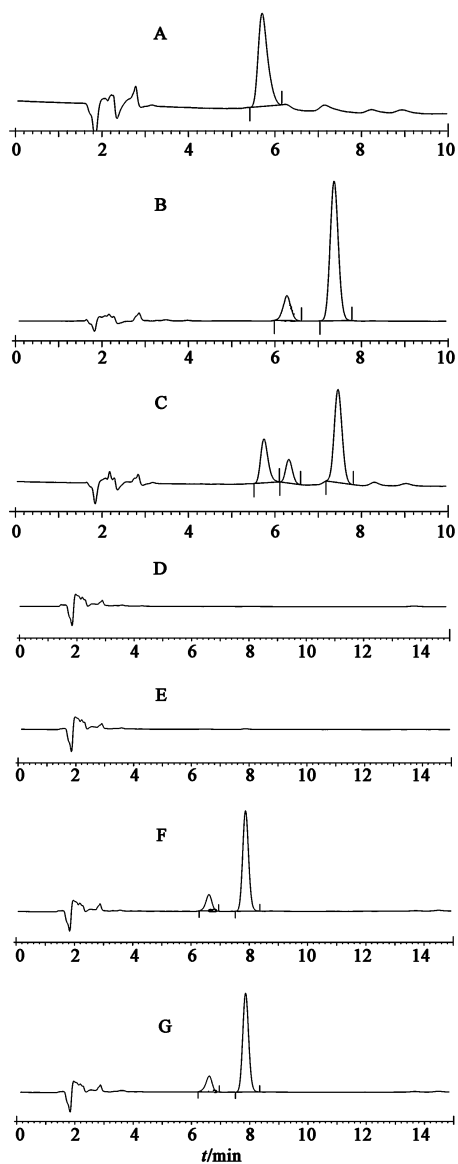
2.1.1 双氢青蒿素对照品溶液的制备 精密称取双氢青蒿素对照品约 30 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加无水乙醇溶液稀释至刻度,摇匀,滤过。精密量取续滤液 5 mL 置 25 mL 量瓶中,用 2% NaOH 溶液稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液置 10 mL 量瓶中,将量瓶置 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,反应 30 min 后,冷至室温。取上述加热反应液 2 mL 置 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,作为双氢青蒿素对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备 取双氢青蒿素软胶囊 50 粒,挤出囊心物研磨均匀,精密称取适量(约相当于双氢青蒿素 30 mg),置 50 mL 量瓶中,加无水乙醇约 40 mL,超声处理 10 min,放冷至室温,自“加无水乙醇约 40 mL”起与双氢青蒿素对照品溶液同法操作,作为供试品溶液。

2.2 系统适用性试验 Dikma Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1 mol \cdot L $^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节至 pH 2.5)-(35:65),流速 0.8 mL \cdot min $^{-1}$,柱温 18 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL ,检测波长 234 nm,理论塔板数按主峰计算不低于 3 000,分离度 >1.5 。

精密称取青蒿素约 30 mg、双氢青蒿素约 12.5 mg,分别置 25 mL 量瓶中,自“加无水乙醇约 20 mL”起与双氢青蒿素对照品溶液同法操作。各取 2 mL 置 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,为 A 和 B;再取 A 和 B 以 1:1 体积比混合,作为 C,分别注入色谱仪,记录色谱图。

2.3 专属性试验 称取双氢青蒿素对照品约 30 mg、供试品 360 mg,基质 345 mg,分别置 50 mL 量瓶中,与供试品溶液同法操作,作为双氢青蒿素对照品溶液、供试品溶液、空白基质溶液。另取 5 mL 无水乙醇置 25 mL 量瓶中,自“加 2% 氢氧化钠溶液至



A. 青蒿素; B. 双氢青蒿素; C. 系统适用性溶液;
D. 空白溶液; E. 空白基质溶液;
F. 双氢青蒿素对照品溶液; G. 供试品溶液

图 1 双氢青蒿素软胶囊专属性 HPLC 色谱

表 1 青蒿素及其并构体 HPLC 分离情况

No.	Name	保留时间	峰面积	峰高	理论板数	分辨率	对称性
1	青蒿素	5.739	89 533	7 339	5 102.87	0.00	1.28
2	DHA 峰 α	6.314	43 146	3 936	7 228.27	1.86	1.14
3	DHA 峰 β	7.449	200 707	15 599	7 348.54	3.52	1.10

刻度”起与供试品溶液同法操作,作为空白溶液。

用选定的色谱条件,空白溶液、空白基质溶液、双氢青蒿素对照品溶液、供试品溶液分别注入色谱仪测定,记录色谱图。

3 方法与结果

3.1 线性关系 精确称取双氢青蒿素对照品适量,

加无水乙醇使溶解成 5 mg \cdot L $^{-1}$ 贮备溶液。分别精密量取 2, 4, 6, 8, 10 mL 置含基质 345 mg 的 50 mL 量瓶中,加无水乙醇约至 40 mL,超声处理 10 min,其他操作按 2.1.1 项下,分别精取 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。以 α 异构体和 β 异构体的峰面积之和 Y 对进样量 (μg) X 进行回归,得回归方程

$Y = -4\ 028.4 + 44\ 334.7X, R^2 = 0.999\ 92 (n = 5)$ 。
线性结果表明,双氢青蒿素软胶囊中双氢青蒿素进
样量在 8 ~ 40 mg·L 与峰面积呈良好的线性关系。

3.2 重复性试验 取同一批样品,照 2.1.2 项下方法,分别制备供试品溶液 6 份,测定双氢青蒿素含量,计算 RSD 0.82% ($n = 6$)。

3.3 准确度试验(回收试验) 取 2.1.2 项下同一批供试品,按低、中、高 3 个浓度,精密称取置 50 mL 量瓶中,照 2.1.2 项下方法制备溶液,测定双氢青蒿素的含量,结果高、中、低 3 个浓度的平均回收率 ($n = 9$) 为 99.6% (RSD 0.66%)。结果见表 2。

表 2 双氢青蒿素加样回收率试验

No.	加入量 /mg	回收量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	23.2	23.1	99.8		
2	23.1	23.0	99.7		
3	22.9	22.9	100.2		
4	31.3	30.9	98.6		
5	28.9	28.8	99.6	99.6	0.66
6	30.7	30.5	99.3		
7	37.6	37.9	100.8		
8	37.5	37.2	99.3		
9	37.8	37.6	99.5		

3.4 检测限与定量限 检测限以信噪比 3:1,定量限以信噪比 10:1 时相应浓度或注入仪器的量确定检测限与定量限并分别计算。双氢青蒿素的最低检测限为 $0.4 \times 10^{-3} \mu\text{g}$,定量限为 $1.2 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ 。

3.5 稳定性试验 取一供试品溶液,于 0,2,4,6,8,12,24 h 分别进样,测定双氢青蒿素以 α 异构体和 β 异构体的峰面积之和,计算 RSD 1.28% ($n = 7$),结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.6 样品测定 取本品 3 批,照 2.1.2 项下方法制备供试品溶液。精密量取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以 α 异构体和 β 异构体的峰面积之和计算含量,测定结果见表 3。

表 3 双氢青蒿素软胶囊含量测定 ($n = 3$)

批号	标示量	RSD	%
20091210	99.6	0.21	
20091211	99.2	0.45	
20091212	100.5	0.33	

4 讨论

双氢青蒿素软胶囊中含有油性基质,考虑如何除去样品溶液油性基质是最大的难点。双氢青蒿素在氯仿中易溶,在丙酮中溶解,在甲醇或乙醇中略溶,在水中几乎不溶。而基质的主要成分大豆油与丙酮、氯仿混溶,在乙醇中溶解极微,在水中也几乎不溶。根据以上性质可知,所选用的溶剂一方面要保证双氢青蒿素完全溶解,另一方面使油性基质在溶剂中溶解度降到最小。通过试验,我们选用乙醇溶液,可以达到要求。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 二部[S]. 2010:70.
- [2] 曾美怡,赵世善. 紫外分光光度法测定双氢青蒿素含量[J]. 药物分析杂志,1986.6(3): 135.
- [3] 李美琴,范琦,张晓松,等. HPLC-ELSD 法测定复方双氢青蒿片中双氢青蒿素的含量[J]. 药物分析杂志,2006,26(8): 1163.
- [4] 董顺玲,胡家焱,张玉英,等. 高效液相色谱法测定双氢青蒿素含量[J]. 药物分析杂志,1996,16(3): 172.
- [5] 朱凯,范琦,张小松,等. 高效液相色谱法测定双氢青蒿素哌嗪片中双氢青蒿素含量[J]. 药物分析杂志,2007,27(9): 1484.
- [6] 郭戎,单鸣秋,于生,等. HPLC 测定五味子油软胶囊中五味子醇甲和五味子乙素[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):72.
- [7] 桑育黎,郝延军,陈沉,等. HPLC 测定独一味软胶囊中 8-epideoxyloganic acid 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(13):107.
- [8] 张芳向,林朝霞. HPLC 法测定温肺止咳软胶囊中甘草酸、6-姜酚、和厚朴酚及厚朴酚[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):83.
- [9] 何希瑞,李茂星,樊鹏程,等. HPLC 法测定独一味制剂中山栀苷甲酯[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):50.

[责任编辑 顾雪竹]