

# HPLC法测定双氢青蒿素哌喹片中双氢青蒿素的含量<sup>Δ</sup>

周琳\*(重庆市食品药品检验检测研究院/重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心,重庆 401121)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)24-3393-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.24.29

**摘要** 目的:建立测定双氢青蒿素哌喹片中双氢青蒿素含量的测定方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Waters YMC-Pack ODS-AQ,流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为 1.0 ml/min,检测波长为 216 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 20 μl。结果:双氢青蒿素质量浓度在 0.009 650~1.930 mg/ml 范围内与峰面积呈良好线性关系( $r=0.999\ 9$ );精密度、稳定性、重复性试验的 RSD≤0.5%;平均加样回收率为 100.76%,RSD 为 0.95%( $n=9$ )。结论:该方法准确、简便、快速,可用于双氢青蒿素哌喹片中双氢青蒿素的含量测定。

**关键词** 高效液相色谱法;双氢青蒿素哌喹片;双氢青蒿素;含量测定

## Content Determination of Dihydroartemisinin in Dihydroartemisinin and Piperaquine Phosphate Tablets by HPLC

ZHOU Lin(Chongqing Institute For Food and Drug Control/Chongqing Engineering Research Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Chongqing 401121, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for content determination of dihydroartemisinin in Dihydroartemisinin and piperaquine phosphate tablets. METHODS: HPLC was performed on the column of Waters YMC-Pack ODS-AQ with mobile phase of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 216 nm, column temperature was 30 ℃, and injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range of dihydroartemisinin was 0.009 650-1.930 mg/ml( $r=0.999\ 9$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 0.5%; average recovery was 100.76% (RSD=0.95%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate, and can be used for the content determination of dihydroartemisinin in Dihydroartemisinin and piperaquine phosphate tablets.

**KEYWORDS** HPLC; Dihydroartemisinin and piperaquine phosphate tablet; Dihydroartemisinin; Content determination

双氢青蒿素哌喹片为双氢青蒿素和磷酸哌喹的复方制剂。双氢青蒿素为青蒿素衍生物<sup>[1-2]</sup>,是青蒿素体内活性物质,对疟原虫无性体有较强杀灭作用,能迅速杀灭疟原虫,控制疾病症状。双氢青蒿素和磷酸哌喹合用具有协同作用,可延缓疟原虫耐药性的产生<sup>[3]</sup>。《中国药典》2010年版第一增补本收录了双氢青蒿素哌喹片,并采用高效液相色谱(HPLC)法测定双氢青蒿素的含量,但该方法不能有效排除磷酸哌喹的影响。本文参考《国际药典》2011 V2.2版中双氢青蒿素的含量测定方法<sup>[4]</sup>,对现行标准中的测定方法进行了改进。

### 1 材料

2695型 HPLC 仪,包括 2998型二极管阵列检测器和 Empower 工作站(美国 Waters 公司);KQ5200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:200 W,频率:40 kHz);ME215S型十万分之一天平(德国 Sartorius 公司)。

双氢青蒿素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100184-201202,纯度:99.94%),青蒿素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100202-201004,纯度:100%);双氢青蒿素哌喹片(华立岩康制药有限公司,批号:011110、010212、010512);乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为纯化水。

### 2 方法与结果

<sup>Δ</sup>基金项目:全球基金项目国家药品标准提高课题(No.GF2012-39);重庆市集成示范计划项目(No.cstc2013jcsf00004-6)

\*主管药师,硕士。研究方向:药物分析。E-mail:zhouzhou\_abcd@163.com

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Waters YMC-Pack ODS-AQ(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:216 nm;进样量:20 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0	60	40
15	60	40
20	100	0
21	60	40
30	60	40

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取双氢青蒿素对照品约 25 mg,精密称定,置于 25 ml 量瓶中,加乙腈-水(60:40, V/V)适量,超声处理 10 min 使溶解,放冷,用乙腈-水(60:40, V/V)稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 临用新制。取本品 10 片,精密称定,研细,取粉末适量(相当于双氢青蒿素约 25 mg),精密称定,置于 25 ml 量瓶中,加乙腈-水(60:40, V/V)适量,超声处理 10 min 使溶解,冷却,用乙腈-水(60:40, V/V)稀释至刻度,摇匀,离心,取上清液作为供试品溶液。

2.2.3 空白溶液 按处方比例配制无双氢青蒿素的阴性对照品,精密称取相当于双氢青蒿素约 25 mg 的粉末,置于 25 ml 量瓶中,加乙腈-水(60:40, V/V)适量,超声处理 10 min 使溶解,冷

却,用乙腈-水(60:40, *V/V*)稀释至刻度,摇匀,离心,取上清液作为空白溶液。

### 2.3 系统适用性试验

取双氢青蒿素、青蒿素对照品各适量,精密称定,加乙腈-水(80:20, *V/V*)超声处理10 min,并稀释制成每1 ml中含双氢青蒿素和青蒿素各1 mg的系统适用性溶液。精密吸取20  $\mu$ l注入HPLC仪,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,双氢青蒿素(呈两个色谱峰)第一个色谱峰与青蒿素峰相比,相对保留时间为0.6;各组分峰之间的分离度 $>2.0$ ;理论板数以 $\beta$ -双氢青蒿素峰计算 $>3\ 000$ 。色谱见图1。

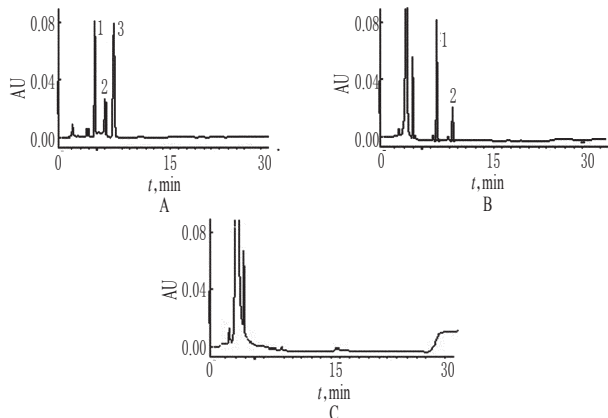


图1 高效液相色谱图

A.系统适用性溶液;B.供试品溶液;C.空白溶液;1. $\alpha$ -双氢青蒿素;2. $\beta$ -双氢青蒿素;3.青蒿素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.system suitability solution; B.test solution; C.blank solution; 1. $\alpha$ -dihydroartemisinin; 2. $\beta$ -dihydroartemisinin; 3.artemisinin

### 2.4 空白干扰试验

分别精密吸取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、空白溶液各20  $\mu$ l,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。按外标法计算供试品溶液中双氢青蒿素的含量,色谱见图1。结果表明,空白溶液无干扰。

### 2.5 线性关系考察

精密称取双氢青蒿素对照品0.482 5 g,置于200 ml量瓶中,加乙腈-水(60:40, *V/V*)适量,超声处理10 min使溶解,置37  $^{\circ}$ C水浴中保温1 h,冷却后用流动相稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为2.412 mg/ml的双氢青蒿素标准溶液。精密量取双氢青蒿素标准溶液适量,用乙腈-水(60:40, *V/V*)稀释并制成双氢青蒿素质量浓度分别为1.930、0.965 0、0.482 5、0.096 50、0.048 25、0.009 650 mg/ml的标准溶液。按“2.1”项下色谱条件分别进样20  $\mu$ l测定,记录色谱图。以质量浓度( $x$ )为横坐标、双氢青蒿素两个峰面积之和( $y$ )为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y=3.086\ 8\times 10^7x+28.833$ ( $r=0.999\ 9$ )。结果表明,双氢青蒿素的质量浓度在0.009 650~1.930 mg/ml范围内与峰面积呈良好线性关系。

### 2.6 双氢青蒿素双峰转换

精密称取双氢青蒿素原料10.00 mg,精密加入乙腈-水(60:40, *V/V*)10 ml,超声处理10 min使溶解,连续进样30次(每次运行时间14 min,等度)。结果,峰面积之和的RSD为0.80%,表明双氢青蒿素溶液在6 h内两峰面积间的比例变化较大,但两峰面积之和基本一致,对测定结果无影响。

### 2.7 定量限与检测限

精密称取双氢青蒿素对照品20.04 mg,置于100 ml量瓶中,加乙腈-水(60:40, *V/V*)适量,超声处理10 min使溶解,并稀释至刻度,摇匀;再精密量取1.0 ml,置于100 ml量瓶中,加乙腈-水(60:40, *V/V*)稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样5  $\mu$ l测定,记录色谱图。按信噪比为10计算定量限、以信噪比为3计算检测限。结果, $\alpha$ -双氢青蒿素的定量限、检测限分别为1.78、0.533 ng; $\beta$ -双氢青蒿素的定量限、检测限分别为7.39、2.22 ng。

### 2.8 精密度的试验

精密吸取“2.2.2”项下供试品溶液20  $\mu$ l,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图,按外标法以双氢青蒿素两个峰面积之和计算。结果,RSD为0.21%,表明仪器精密度的良好。

### 2.9 稳定性试验

精密吸取“2.2.2”项下供试品溶液适量,在室温下放置0、1.5、3、4.5、6.5、8.5、10.5、14.5 h时按“2.1”项下色谱条件分别进样20  $\mu$ l,以双氢青蒿素两个峰面积之和计算。结果,RSD为0.31%,说明供试品溶液在14.5 h内稳定性良好。

### 2.10 重复性试验

取同一批样品(批号:011110)适量,按“2.2”项下方法制备供试品溶液6份,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,按外标法以双氢青蒿素两个峰面积之和计算。结果,RSD为0.5%,表明本方法重复性良好。

### 2.11 加样回收率试验

精密称取同一批样品(批号:011110)适量,共9份,每3份为一组,分别精密加入相当于双氢青蒿素对照品质量浓度80%、100%、120%的溶液各适量,按“2.2”项下方法制成供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 2 Results of recovery tests( $n=9$ )

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
24.54	19.98	44.63	100.44		
24.89	21.91	46.80	100.26		
24.73	19.66	44.31	99.43		
24.87	25.90	51.08	101.19		
25.19	26.50	51.59	99.42	100.76	0.95
25.08	25.63	51.41	101.96		
24.61	30.58	55.54	101.38		
24.82	30.59	55.87	101.70		
24.57	30.80	55.68	101.10		

### 2.12 样品含量测定

取3批样品及双氢青蒿素对照品各适量,按照“2.2”项下方法配制供试品和对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按外标法计算样品含量,结果以标示量的百分含量表示,详见表3。

表3 样品含量测定结果( $n=3$ )

Tab 3 Results of content determination of samples( $n=3$ )

品名	批号	占标示量的百分比,%
双氢青蒿素哌嗪片	011110	96.7
	010212	94.4
	010512	95.1

## 3 讨论

# 除湿丸的质量标准研究<sup>△</sup>

曾祖平<sup>1\*</sup>,王宏<sup>1</sup>,钱珊<sup>2</sup>,彭冰<sup>1</sup>,韩旭阳<sup>1</sup>,车晓平<sup>3</sup>,何薇<sup>1#</sup>(1.首都医科大学附属北京中医医院/北京市中医研究所,北京 100010;2.北京中医药大学东方学院中药系2009级,河北廊坊 065001;3.首都医科大学附属北京中医医院,北京 100010)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)24-3395-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.24.30

**摘要** 目的:为建立除湿丸的质量标准提供参考。方法:采用显微鉴别法、薄层色谱(TLC)法对方中牡丹皮、白鲜皮、当归、茜草、栀子进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定丹皮酚、黄芩苷的含量。色谱柱为Kromasil 100-5 C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-水-磷酸(47:53:0.2, V/V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl。结果:显微鉴别中,白鲜皮、牡丹皮的显微特征明显,其他药材无干扰;TLC鉴别中,当归、茜草、栀子的特征斑点清晰,阴性对照无干扰。丹皮酚、黄芩苷进样量分别在0.106 24~2.124 8、0.059 04~1.180 8 μg范围内与峰面积呈良好的线性关系( $r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 9$ );精密度、稳定性、重复性试验的RSD均≤2.06%;平均加样回收率分别为101.56%、100.16%,RSD分别为1.68%、1.13%( $n=9$ )。结论:该方法操作简便、结果准确、重现性好,可作为除湿丸的质量控制标准。

**关键词** 除湿丸;薄层色谱法;高效液相色谱法;丹皮酚;黄芩苷;质量标准;显微鉴别

## Study on Quality Standard of Chushi Pill

ZENG Zu-ping<sup>1</sup>, WANG Hong<sup>1</sup>, QIAN Shan<sup>2</sup>, PENG Bing<sup>1</sup>, HAN Xu-yang<sup>1</sup>, CHE Xiao-ping<sup>3</sup>, HE Wei<sup>1</sup>(1. Beijing Institute of TCM, Beijing Hospital of TCM Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China; 2. Grade 2009, Dongfang College, Beijing University of Chinese Medicine, Hebei Langfang 065001, China; 3. Beijing Hospital of TCM Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the quality standard of Chushi pill. METHODS: Microscopic identification and TLC were adopted for the qualitative identification of *Cortex moutan*, *C. dictamni*, *Angelica sinensis*, *Rubia cordifolia* and *Gardenia fructus* in Chushi pill; HPLC was performed to determine the contents of paeonol and baicalin. It was performed on column of Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> with mobile phase of methanol-water-phosphoric acid (47:53:0.2, V/V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 280 nm, the temperature was 25 ℃ and the volume was 10 μl. RESULTS: The microscopic identification showed microscopic characteristics of *C. moutan* and *C. dictamni*, and characteristics of *A. sinensis*, *R. cordifolia* and *G. fructus* were identified by TLC; the linear range of paeonol was 0.106 24-2.124 8 μg ( $r=0.999\ 9$ ) and baicalin was 0.059 04-1.180 8 μg ( $r=0.999\ 9$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no more than 2.06%; average recoveries were respectively 101.56% (RSD=1.68%,  $n=9$ ) and 100.16% (RSD=1.13%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the quantity control of Chushi pill.

**KEYWORDS** Chushi pill; TLC; HPLC; Paeonol; Baicalin; Quality standard; Microscopic identification

双氢青蒿素哌啶片现行质量标准收载于《中国药典》2010年版第一增补本<sup>[5]</sup>中,其双氢青蒿素含量测定方法为HPLC法,检测波长为210 nm,本文参照国际药典2011 V2.2版<sup>[4]</sup>将检测波长改为216 nm,既能保证双氢青蒿素含量测定的灵敏度,同时又能相对减少末端吸收的影响。

现行质量标准流动相为乙腈-水(60:40, V/V),等度洗脱。本试验中发现,等度洗脱时磷酸哌啶的保留时间较长,不易洗脱,而且磷酸哌啶的色谱峰会影响双氢青蒿素的色谱峰,出现峰重叠等现象。因此,本文采用乙腈和水的梯度洗脱方式,将磷酸哌啶洗脱,避免其对双氢青蒿素含量测定的影响。

综上所述,本方法准确、简便、快速,可用于双氢青蒿素哌

啶片中双氢青蒿素的含量测定。

## 参考文献

- [1] 韦国峰,何有成,黄祖良.双氢青蒿素的制备及其含量测定[J].右江民族医学院学报,2001,23(5):691.
- [2] 王满元.青蒿素类药物的发展历史[J].自然杂志,2012,34(1):44.
- [3] 韩涛,代勇.简述使用青蒿素联合西药疟疾的研究进展[J].当代医药论丛,2015,13(6):10.
- [4] World Health Organization. *The international pharmacopoeia* Fourth Edition Second Supplement[EB/OL]. (2011) [2013-07-25]. <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:第一增补本[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:271.

(收稿日期:2014-12-04 修回日期:2015-06-03)

(编辑:刘柳)

△基金项目:北京市中医研究所苗圃科研项目(No.MP-2013-01)

\*主任药师,硕士。研究方向:中药制剂及中药成分分析。电话:010-52176919。E-mail:zpz600@sohu.com

#通信作者:主任药师。研究方向:中药化学和中药制剂。电话:010-52176919。E-mail:hewei571124@163.com