

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.12.006

青蒿琥酯及其制剂中有关物质的测定方法探讨*

赵 画^{1,2}, 曾令高^{1△}

(1. 重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121; 2. 上海市食品药品包装材料测试所, 上海 201203)

摘要:目的 建立分离及测定青蒿琥酯及其制剂中有关物质含量的高效液相色谱法。方法 采用 Dikma Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以磷酸缓冲液(pH=3.0)-乙腈(56:44)为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 外标法测定, 检测波长为 216 nm。结果 青蒿琥酯与已知杂质 A, B, I 能完全分离, 相对保留时间一致, 并可通过简单加热破坏方法得到杂质 I, 用于定性检测。结论 该方法准确、快速、专属性强, 适用于青蒿琥酯及其制剂中有关物质的测定。

关键词:青蒿琥酯制剂; 高效液相色谱法; 双氢青蒿素; 青蒿素; 脱水双氢青蒿素; 含量测定

中图分类号: R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)12-0019-03

Content Determination of Related Substances in Artesunate and Its Preparations

Zhao Hua^{1,2}, Zeng Linggao¹

(1. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 401121; 2. Shanghai Food and Drug Packaging Material Control Center, Shanghai, China 201203)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for content determination of related substances in artesunate and its preparations. **Methods** The Dikma Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted with external standard method, the mobile phase was composed of buffer (pH=3.0) - acetonitrile (56:44), the flow rate was 1.0 mL/min, and the detection wavelength was 216 nm. **Results** Artesunate could be completely separated from the known impurities A, B, I, and the relative retention time was consistent, and the impurity I could be obtained by a simple heating failure method for qualitative detection. **Conclusion** The method is accurate, rapid and specific, which is suitable for the determination of related substances in artesunate and its preparations.

Key words: preparation of artesunate; HPLC; dihydroartemisinin; artemisinin; dehydrated dihydroartemisinin; content determination

青蒿素是从中药青蒿中提取的有过氧基团的倍半萜内酯类化合物, 具有抗疟疾作用, 由我国在 20 世纪 70 年代独立研制, 并于 1986 年获批为国家一类新药。由于其生物利用度低, 后续研发出双氢青蒿素、青蒿琥酯等半倍萜内酯化合物青蒿素的衍生物, 均作为一类新药获准上市^[1]。青蒿琥酯作为其衍生物之一, 具有更好的生物利用度, 临床用于疟疾、寄生虫病甚至肿瘤、病毒等的治疗^[2-9]。其合成工艺大多以青蒿素为起始原料, 合成过程中易引入起始原料青蒿素、中间体双氢青蒿素及降解产物等潜在杂质, 在合成及储存过程中受热易分解产生双氢青蒿素、脱水双氢青蒿素等降解产物。因此, 对青蒿琥酯及其制剂的工艺杂质及降解产物进行研究和控制十分有必要。目前, 2016 年版《国际药典》和 2015 年版《中国药典(二部)》^[10]收录了青蒿琥酯及其制剂中有关物质的检查方法, 但杂质 I 的获取和结构表征未见报道。本研究中对已收载的检测方法进行了比较及优化, 最终确定了适合青蒿琥酯及其片剂和注射用制剂的检测方法, 并对难以获得对照品的杂质 I(脱水双氢青蒿素)提供了定性获取方法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪; XS205 型电子天平

(梅特勒公司, 感量为 0.01 mg/0.1 mg); CP224 型电子天平(赛多利斯公司); FD240 型烤箱(德国宾德公司)。

1.2 试剂

青蒿琥酯(市售品); 青蒿琥酯片(市售品, 规格为每片 50 mg 或 100 mg); 注射用青蒿琥酯(市售品, 规格为每瓶 60 mg); 青蒿琥酯对照品(批号为 100200-201003), 双氢青蒿素对照品(批号为 100184-200401), 青蒿素对照品(批号为 100202-201004), 均购自中国食品药品检定研究院; 脱水双氢青蒿素对照品(上海药明康德新药开发有限公司, 含量为 83.73%); 乙腈为色谱纯; 试验用水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱条件: 色谱柱为 Dikma Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为磷酸盐缓冲液(pH=3.0)-乙腈(56:44); 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 216 nm; 柱温为 30 ℃; 进样量为 20 μL。青蒿琥酯无共轭吸收, 参考《国际药典》标准, 检测波长选用 216 nm。采用外标法测定。

系统适用性试验: 取经 100 ℃ 热破坏 30 min 的青蒿琥酯原料干粉 0.101 90 g, 青蒿素对照品 0.010 71 g, 双氢青蒿素对照品 0.012 11 g, 置 100 mL 容量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度, 即得系统适用性试验溶液, 取

*基金项目: 全球基金项目-国家药品标准提高课题[GF2012-42]。

第一作者: 赵画, 女, 硕士研究生, 工程师, 主要从事药物、辅料和包装材料分析工作, (电子信箱) cry-927@163.com。

△通信作者: 曾令高, 男, 硕士研究生, 主任药师, 研究方向为药品标准及质量控制, (电子信箱) 243910029@qq.com。

20 μL 进样, 色谱图见图 1。双氢青蒿素(峰 2)和青蒿琥酯(峰 3)分离度为 2.97, 各杂质峰相对于青蒿琥酯的保留时间, 双氢青蒿素为 0.57 和 0.91, 青蒿素为 1.31, 杂质 I 为 2.74。

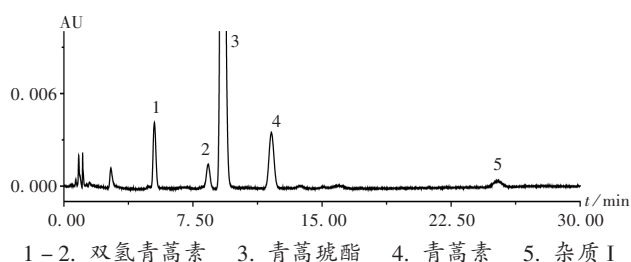


图 1 青蒿琥酯系统适用性试验色谱图

2.2 溶液制备

供试品溶液: 取青蒿琥酯或注射用青蒿琥酯粉末 40 mg, 分别置 10 mL 容量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为青蒿琥酯相应供试品溶液; 取青蒿琥酯片, 研为细粉, 取适量(约相当于青蒿琥酯 40 mg), 置 10 mL 容量瓶中, 加乙腈适量, 振摇或超声 15 min 使溶解, 冷却, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 作为青蒿琥酯片供试品溶液。

对照溶液: 精密量取青蒿琥酯、注射用青蒿琥酯和青蒿琥酯片供试品溶液各 1 mL, 分别置 100 mL 容量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 分别作为其对照溶液。

2.3 测定方法

精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μL , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 4 倍。

2.4 方法学考察

专属性试验: 1) 酸破坏, 取青蒿琥酯约 100 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 加 1 mol/L 盐酸溶液 5 mL, 水浴加热 5 min, 取出放冷, 用氢氧化钠溶液调至中性, 加乙腈至刻度, 滤过; 2) 碱破坏, 取青蒿琥酯约 100 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 5 mL, 振摇 5 min, 用盐酸溶液调至中性, 加乙腈至刻度, 滤过; 3) 氧化破坏, 取青蒿琥酯约 40 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 加 30% H_2O_2 溶液 2 mL, 水浴加热 10 min, 取出放冷, 加乙腈至刻度, 滤过; 4) 光破坏, 取青蒿琥酯, 在 4500 lx 光强度照射下, 7 d 后取样 40 mg, 加乙腈 10 mL 溶解; 5) 高温破坏, 取青蒿琥酯置平皿中, 敞口放于 100 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中, 6 h 后, 取样 40 mg, 加乙腈 10 mL 溶解。按上述有关物质检查法各进样 20 μL 测定, 记录色谱图。结果表明, 上述高效液相色谱(HPLC)法能使按强制破坏方法获取的各杂质与青蒿琥酯有效分离, 专属性强。

耐用性试验: 照 2.1 项下色谱条件和方法配制系统适用性溶液, 分别考察了在不同品牌填料的色谱柱中青

蒿琥酯峰与 10-异构-双氢青蒿素峰的分离情况。结果各型号色谱柱均能达到分离要求, 表明该色谱系统适用于目前市场上的绝大多数 C_{18} 色谱柱。

相对响应因子考察: 称取青蒿琥酯、双氢青蒿素、青蒿素和杂质 I(含量 83.73%) 对照品 0.010 18, 0.010 09, 0.010 42, 0.010 14 g, 置同一 10 mL 容量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度。按 2.1 项下色谱条件测定, 计算各峰与青蒿琥酯峰的响应因子。因考虑到双氢青蒿素在乙腈中溶解度不好, 故未考察 4 mg/mL 的质量浓度响应因子。结果见表 1。

表 1 相对响应因子考察结果

名称	峰面积	称样量	比值
双氢青蒿素(面积和)	578 624	0.010 09	0.81
青蒿琥酯	718 517	0.010 18	1.00
青蒿素	654 530	0.010 42	0.92
杂质 I	7 275 004	0.008 490 2	10.13

定量限及检测限测定: 取相对响应因子考察项下溶液 5.0 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 得双氢青蒿素、青蒿素和杂质 I 质量浓度分别为 0.050 45, 0.052 10, 0.050 70 mg/mL 的溶液, 量取 5 μL 进样, 记录色谱图。以信噪比(S/N)为 3 或 10 计算检测限及定量限, 双氢青蒿素为 0.105 4 μg 和 0.351 3 μg , 10-异构-双氢青蒿素为 0.299 1 μg 和 0.997 0 μg , 青蒿素为 0.182 6 μg 和 0.608 6 μg , 杂质 I 为 0.031 4 μg 和 0.104 8 μg 。

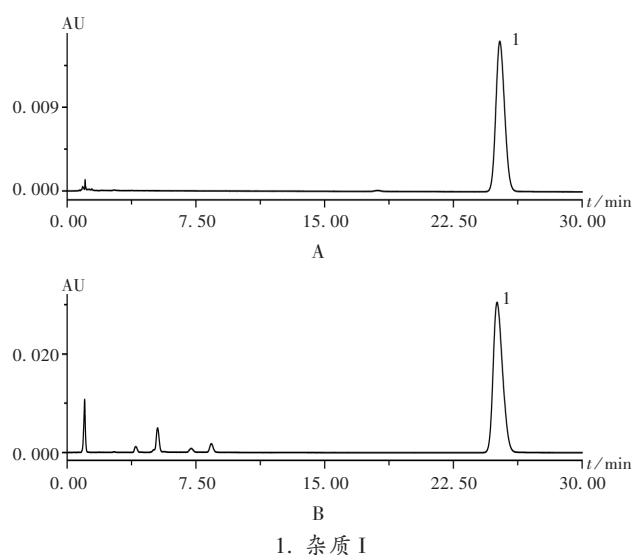
2.5 杂质 I 结构确认

在热破坏中发现, 相对保留时间 2.7 处有 1 个较大杂质, 2016 年版《国际药典》中提出其为杂质 C(脱水双氢青蒿素), 2015 年版《中国药典》命名为杂质 I。为确保热破坏产生的杂质即为杂质 I, 对其进行了结构确认。

定性获取: 采用 Waters 2695 型高效液相色谱仪试验。色谱条件为 Phenomenex Luna C_{18} (2) 色谱柱(100 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μm), 流速 1.0 mL/min, 流动相为磷酸缓冲液($\text{pH}=3.0$)-乙腈(56:44)。为确保热破坏获得的杂质 I 满足检测限要求, 首先采用极限破坏试验, 取 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热破坏 31 h 的原料干粉 0.01 g, 置 25 mL 容量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度, 得供试品热破坏溶液。在长时间热破坏条件下, 青蒿琥酯峰绝大多数降解为杂质 I。

保留时间确认: 取杂质 I 对照品适量, 用乙腈配置成质量浓度为 1 g/L 的溶液, 取此溶液和供试品热破坏溶液各 20 μL , 进样, 色谱图见图 2。结果保留时间一致。

二级质谱确认: 取杂质 I 对照品和供试品热破坏溶液进行分子量确认。仪器为 Waters TQD-UPLC 型超高效液相质谱联用仪。质谱条件为, 电喷雾正离子化, 喷雾电压 3 kV, 锥孔电压 35 V; 二级质谱扫描子离子模式,



1. 杂质 I
A. 杂质 I 对照品溶液 B. 青蒿琥酯供试品热破坏溶液
图 2 杂质 I 确认高效液相色谱图

碰撞能量 8 eV。色谱条件为, AIQUITY UPLC BEH C_{18} 柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m), 流速为 0.5 mL/min, 流动相为乙腈-水 (44:56)。通过对 2 种溶液中杂质 I 的一级质谱及二级质谱的比对, 发现其质谱裂解行为一致。

相对分子质量确认: 对供试品热破坏溶液中杂质 I 的分子量进行确认。仪器为 Waters 四极杆飞行时间串联质谱-超高效液相色谱仪。质谱条件为, 电喷雾正离子化, 喷雾电压 3 kV, 锥孔电压 35 V。色谱条件为 AIQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m), 流速为 0.5 mL/min, 流动相为乙腈-水 (44:56)。结果推测出来的相对分子质量为 267.1578, 提供的结构式仅为 $I_5H_{23}O_4$, 这与 2011 年版《国际药典》提供的杂质 I (脱水双氢青蒿素) 的分子式和相对分子质量一致, 确认热破坏的杂质峰即为杂质 I。

2.6 样品有关物质测定

取青蒿琥酯、青蒿琥酯片和注射用青蒿琥酯供试品, 照 2.1 项下系统适用性试验方法处理, 结果有不同程度的杂质检出。结果见表 2。

3 讨论

对青蒿琥酯进行强制降解试验, 并对其降解产物进行分析, 发现青蒿琥酯对强光条件稳定。在高温条件下, 容易降解产生杂质脱水双氢青蒿素; 在强氧化, 强酸和强碱条件下均不稳定, 产生双氢青蒿素及其他未知杂质, 通过对已知杂质对照品的液相保留时间确认确定了双氢青蒿素、青蒿素的出峰顺序和与青蒿琥酯的相对保留时间。

由于市售脱水双氢青蒿素对照品难以购买, 《中国药典》采用相对保留时间对杂质 I 进行定位。但在实际检验中, 以相对保留时间定位杂质可能会出现混淆, 难以对特定杂质进行准确定位。为更准确定位杂质 I, 采

表 2 青蒿琥酯原料及其制剂有关物质测定结果 (%)

剂型	批号	有关物质 (%)				
		双氢青蒿素	青蒿素	杂质 I ($\times 0.07$)	最大单个杂质	杂质总和
青蒿琥酯	120801	0.05	0	0	0.06	0.108
原料	120802	0	0.081	0	0	0.081
	120803	0.04	0	0	0	0.040
	120617	0.11	0	0.023	0	0.13
注射用青蒿琥酯	120711	0.019	0	0.017	0	0.036
	120903	0.15	0	0.015	0	0.17
青蒿琥酯片剂	120701	0.1	0.068	0.013	0	0.78
	120705	0.07	0	0.011	0	0.18
	120502	0.22	0	0.019	0	0.08
	120702	0.087	0.081	0.017	0	0.24

用热破坏后, 与对照品保留时间和二级质谱的方法同时对其进行确认, 并经过试验发现, 热破坏 30 min 即可产生杂质 I, 在不采用杂质对照品的同时准确定位杂质 I, 便于检测过程中进行定性控制。

通过杂质对照品和二级质谱的方式对已知杂质进行了确认, 发现其相较主要成分保留稳定, 并对其检测限和定量限进行了测试, 结果表明, 该方法可以准确地分析样品中的已知和未知杂质。

参考文献:

- [1] 刘旭. 青蒿琥酯的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(22): 1918-1923.
- [2] 李晶晶, 陈飞飞, 宋丽艳, 等. 青蒿素及其衍生物的抗肿瘤研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2017, 37(3): 10-14.
- [3] 林青, 付美丽, 刘小鹏, 等. 青蒿琥酯抗鸭乙型肝炎病毒的体内实验[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2006, 33(5): 308-310.
- [4] 蒋红艳, 姚安贵, 江尚飞. 青蒿琥酯诱导肿瘤细胞凋亡的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(6): 181-183.
- [5] 李哲, 袁守军, 聂丽平, 等. 青蒿琥酯诱导肿瘤细胞凋亡与抑制存活蛋白表达有关[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(6): 607-611.
- [6] 王勤, 吴理茂, 李爱媛, 等. 青蒿琥酯抗肝癌作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 707-709.
- [7] 王勤, 吴理茂, 赵一, 等. 青蒿琥酯抗肿瘤作用的机制研究[J]. 药学学报, 2002, 37(6): 477-478.
- [8] 郭燕, 王俊, 陈正堂. 青蒿素类药物的药理作用新进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(6): 615-620.
- [9] 熊锐华, 李景怡, 陈贝克, 等. 青蒿琥酯对乙型肝炎病毒复制及肝癌细胞株 HepG2. 2.15 凋亡的影响[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2010, 19(1): 71-74.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 591-593.

(收稿日期: 2017-12-28)