

HPLC-DAD 波长切换法测定阿司匹林 双嘧达莫片的含量及游离水杨酸

田海燕, 刘向国*

(德州市食品药品检验检测中心, 山东 德州 253015)

摘要 目的: 建立 HPLC-DAD 波长切换法测定阿司匹林双嘧达莫片的含量及游离水杨酸的方法。方法: 采用 Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-四氢呋喃-冰醋酸-水(20:5:5:70)为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 276 nm(阿司匹林)、284 nm(双嘧达莫)和 303 nm(水杨酸)。结果: 阿司匹林、双嘧达莫和游离水杨酸分别在 38.37 ~ 383.71、9.60 ~ 96.05 和 1.02 ~ 10.21 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好。平均回收率分别为 99.88% (RSD = 0.23%)、99.01% (RSD = 0.46%) 和 100.99% (RSD = 0.75%)。本法与标准方法含量测定结果无明显差异。含量均匀度 A + 2.2S 在 4.7 ~ 6.4。结论: 建立的含量测定方法, 操作简单, 更适用于阿司匹林双嘧达莫片的质量控制。

关键词: 阿司匹林; 双嘧达莫; 游离水杨酸; 含量测定; 含量均匀度; HPLC-DAD 波长切换法

中图分类号: R 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2024)02-0164-04

doi: 10.19778/j.chp.2024.02.009

Determination of two components and salicylic acid in aspirin and dipyridamole tablets by HPLC-DAD wavelength switching method

TIAN Haiyan, LIU Xiangguo*

(Dezhou Food and Drug Inspection Center, Dezhou 253015, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC-DAD wavelength-switching method for the determination of aspirin dipyridamole tablets and free salicylic acid. **Methods:** An Agilent ZORBAX SB C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted with acetonitrile-tetrahydrofuran-glacial acetic acid-water (20:5:5:70) as the mobile phase, and isocratic elution was performed at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, the column temperature of 30 ℃, and the detection wavelengths were 276 nm for aspirin, 284 nm for dipyridamole and 303 nm for salicylic acid. **Results:** Aspirin, dipyridamole and free salicylic acid had a good linear relationship in the range of 38.37 ~ 383.71, 9.60 ~ 96.05 and 1.02 ~ 10.21 μg · mL⁻¹ respectively. The average recoveries were 99.88% (RSD = 0.23%), 99.01% (RSD = 0.46%) and 100.99% (RSD = 0.75%), respectively. There was no significant difference for the content results between the established method and the standard method. The content uniformity of A + 2.2S ranges from 4.7 to 6.4. **Conclusion:** The established method is simple and suitable for the quality control of aspirin dipyridamole tablets.

Key words: aspirin; dipyridamole; free salicylic acid; content determination; content uniformity; HPLC-DAD wavelength switching method

第一作者简介: 田海燕, 主管药师; 研究方向: 化学药品检验及质量控制。Tel: 0534-2236063; E-mail: thyan2008@163.com

* 通讯作者简介: 刘向国, 副主任药师; 研究方向: 药品质量控制及标准研究。Tel: 0534-2236060; E-mail: 307553805@qq.com

阿司匹林双嘧达莫片是由阿司匹林与双嘧达莫制成的复合双层片。片芯为阿司匹林,外层为双嘧达莫,其质量标准^[1]采用高效液相法分别测定阿司匹林和双嘧达莫的含量,解决了标准^[2]内外层分离的操作导致的准确性问题,但双层片分离费时费力且在测定双嘧达莫时由于内层不能溶解造成供试品溶液体积误差从而导致测定结果不准确。魏会宇等^[3]用 HPLC 法同时测定 2 个组分含量,衣学福等^[4]用 HPLC 法检测游离水杨酸,均按平均片重研磨后取样,因为双层片的原因,均匀性欠佳;李宇等^[5]用紫外分光光度法测定 2 个组分含量,不能测定游离水杨酸。参考有关文献^[6]、标准^[1]及《中国药典》2020 版二部佐匹克隆片^[7]的取样及计算方法,采用 HPLC-DAD 波长切换法同时测定阿司匹林双嘧达莫片中 2 组分及游离水杨酸的含量,并评价双嘧达莫的含量均匀度,操作简单,更适用于阿司匹林双嘧达莫片的质量控制。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(DAD 检测器),KH-300 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司),Mettler Toledo XS205 型电子天平(瑞士梅特勒公司,精密度:0.01 mg)。

1.2 试药

乙腈、四氢呋喃为色谱纯,冰醋酸为分析纯。水为纯化水。阿司匹林对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100113-201405 99.8%)、双嘧达莫对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100244-201003 99.8%)、水杨酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100106-201605,99.3%)。阿司匹林双嘧达莫片(德州某制药公司,批号 A20211102、A20210602、A20211101)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:以乙腈-四氢呋喃-冰醋酸-水(20:5:5:70);流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:30℃;进样量:10 μL;检测波长依次:284 nm(0~6 min,双嘧达莫)、276 nm(6~10 min,阿司匹林)、303 nm(10~15 min,水杨酸)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备液 精密称取阿司匹林对照品

25 mg,双嘧达莫对照品 12.5 mg,水杨酸对照品 10 mg,分别置 50、25、200 mL 量瓶中,加溶剂(含 1% 醋酸的 50% 乙醇溶液)适量,超声溶解后,放至室温,再加溶剂稀释至刻度,摇匀。

2.2.2 对照品溶液 精密量取“2.2.1”项下阿司匹林储备液 3 mL,双嘧达莫储备液 1 mL,水杨酸储备液 1 mL,分别置 10 mL 量瓶中,加溶剂稀释至刻度,摇匀。

2.2.3 混合对照品溶液 精密量取“2.2.1”项下阿司匹林储备液 3 mL,双嘧达莫储备液 1 mL,水杨酸储备液 1 mL,置同一个 10 mL 量瓶中,加溶剂稀释至刻度,摇匀(用于测定波长选择及样品峰定位用)。

2.2.4 供试品溶液 取供试品 10 片,分别用溶剂分次研磨并转移置 100 mL 量瓶中,超声溶解,放至室温,再加溶剂稀释至刻度,摇匀;过滤,精密量取续滤液 5 mL,置 25 mL 量瓶中,加溶剂稀释至刻度,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液。

2.2.5 空白辅料溶液 称取混合均匀的 1 片处方量的辅料置 100 mL 量瓶中,按“2.2.4”项下制备空白辅料溶液。

2.3 方法学考查

2.3.1 系统适用性试验及专属性考查 分别取定位用对照品溶液,混合对照品溶液,空白辅料溶液与供试品溶液按“2.1”项下色谱条件进行测定,见图 1。双嘧达莫、阿司匹林、水杨酸的保留时间分别为 5.3、6.6、12.2 min(定位用对照品溶液色谱图略),空白辅料色谱图在这些位置无干扰。在该色谱条件下,3 个成分的分离度均大于 5.9;理论板数均大于 7300。

2.3.2 线性关系考查 分别取“2.2.1”项下对照品储备液适量,加溶剂制备 7 个浓度的系列对照品混合溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,以对照品溶液浓度($X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程($n=7$):

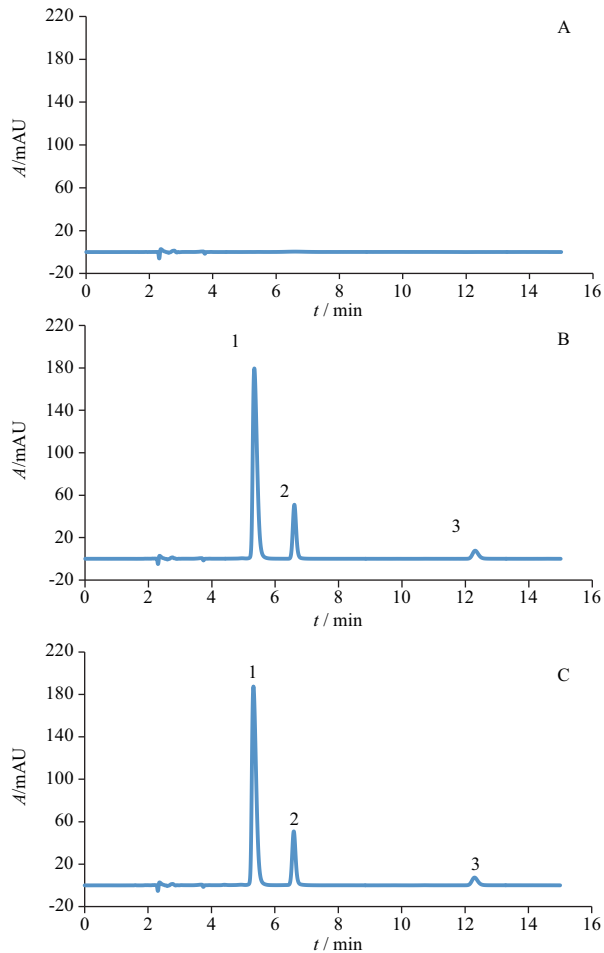
$$Y = 3.7087X - 1.1124 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 34.8420X + 33.745 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 16.2630X - 2.6468 \quad r = 0.9998$$

阿司匹林、双嘧达莫和游离水杨酸分别在 38.37~383.71、9.60~96.05 和 1.02~10.21 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 取“2.2.3”项下混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件,重复进样 6 次,记录色谱峰面积,结果阿司匹林、双嘧达莫以及水杨酸峰面积 RSD 分别为 0.36%、0.20%、2.39%。表明阿司匹林和双嘧达莫精密度良好。水杨酸精密度欠佳,测定时需临用新制。



1. 双嘧达莫 (dipyridamole) 2. 阿司匹林 (aspirin) 3. 水杨酸 (salicylic acid)
A. 空白辅料 (blank) B. 混合对照品溶液 (mixed reference solution)
C. 供试品溶液 (sample)

图1 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms

2.3.4 定量限与检测限 取“2.2.3”项下混合对照品溶液适量,逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以信噪比 10 为定量限,以信噪比 3 为检测限。阿司匹林、双嘧达莫、水杨酸的定量限分别为 620、37 和 31 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限分别为 190、11 和 9 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.5 重复性试验 取同一批号样品 (批号: A20211102)60 片,按“2.2.4”项下制备供试品溶液 (10 片 1 份,共 6 份),分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并进行计算含量,结果阿司匹林、双嘧达莫以及水杨酸含量的 RSD 分别为 0.69%、0.31% 和 0.61%。表明方法的重复性良好 (水杨酸用 2 组中第一片测量的数据计算,临用新制)。

2.3.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在 0、15、30、45 min 及 1、2、4、6、8、10、12h 测定峰面积,

结果阿司匹林和双嘧达莫在 0、1、2、4、6、8、10、12 h 峰面积的 RSD 分别为 0.67%、0.30% ($n=8$);表明供试品溶液中阿司匹林及双嘧达莫在 12 h 内基本稳定。水杨酸在 0、15、30、45 min 峰面积的 RSD 为 1.93% ($n=4$),在 0、15、30、45、60 min 峰面积的 RSD 为 2.39% ($n=5$),60 min 后峰面积的 RSD 大于 2.0,稳定性欠佳。结果表明供试品溶液中游离水杨酸在制样后 0.5 h 内稳定性尚可,不宜长时间放置,需要制样后尽快测定。

2.3.7 回收试验 按本品处方比例精密称取阿司匹林和双嘧达莫对照品及空白辅料适量,按测定浓度的 80.0%、100.0%、120.0% 制备供试品溶液,根据标准^[1]对游离水杨酸的限值,称取适量水杨酸对照品制成适宜浓度的加标供试品溶液。每个浓度供试液配制 3 份,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积计算平均回收率。结果见表 1。

表1 阿司匹林双嘧达莫片中 3 个成分的回收率
Tab. 1 Recoveries of three compounds in aspirin dipyridamole tablets

成分 (component)	加入量 (added amount)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
阿司匹林 (aspirin)	120	100.63	0.12
	150	99.56	0.38
	180	99.46	0.19
双嘧达莫 (dipyridamole)	40	99.32	0.39
	50	98.99	0.20
	60	98.70	0.80
游离水杨酸 (free salicylic acid)	4.0	101.67	0.72
	5.0	101.18	0.73
	6.0	100.11	0.81

2.4 样品测定
取本品 3 个批次,按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,并取“2.2.3”项下方法制得混合对照品,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以外标法计算含量。另按标准^[1]方法分别测定阿司匹林,双嘧达莫含量及水杨酸相当于阿司匹林标示量的含量。结果见表 2。

3 讨论
3.1 保留时间的确定
取“2.2.2”项下 3 种对照品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,双嘧达莫、阿司匹林和水杨酸依次出峰,保留时间分别为 5.3、6.6 和 12.2 min。

表2 含量测定结果(%)

Tab. 2 Determination results of content

成分 (component)	A20211102		A20210602		A20211101	
	标准方法	研究方法	标准方法	研究方法	标准方法	研究方法
	(standard method)	(research method)	(standard method)	(research method)	(standard method)	(research method)
阿司匹林(aspirin)	101.20	100.61	100.71	100.42	100.54	101.15
双嘧达莫(dipyridamole)	98.89	98.65	101.33	100.98	99.27	99.96
游离水杨酸(free salicylic acid)	0.60	0.53	0.77	0.83	0.54	0.51

3.2 波长的确定

取“2.2.2”项下3种对照品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,用HPLC-DAD检测器对3种成分的紫外光谱进行扫描,结果双嘧达莫、阿司匹林和水杨酸分别在284、276和303nm的波长处有最大紫外吸收,分别选择284、276和303nm作为检测波长。

3.3 溶剂的确定

以50%乙醇溶液作为溶剂,阿司匹林稳定性不好;改用溶剂(含1%冰醋酸的50%乙醇溶液)后,抑制了阿司匹林分解,提高了稳定性。

3.4 双嘧达莫含量均匀度

参考有关文献^[7]用阿司匹林和双嘧达莫10片的平均含量作为阿司匹林双嘧达莫片中阿司匹林和双嘧达莫的含量;10片中双嘧达莫的含量可用于双嘧达莫含量均匀度检查,3批含量均匀度A+2.20S值分别为4.7、6.4和5.6。

3.5 水杨酸测定

因水杨酸的稳定性较差,可单独制样,临用新制。

参考文献

[1] 国家食品药品监督管理总局国家药品标准[S]. WS₁-XG-015-2017. 2017.
China Food and Drug Administration National Drug Standard[S]. WS₁-XG-015-2017. 2017.

[2] 国家药品西药标准·化学药品地方标准上升国家标准·第八册[S]. 2002:95.
National standards for pharmaceutical chemicals. Vol VIII [S]. 2002:95.
[3] 魏会宇,刘莹,张瑶纾. 高效液相色谱测定阿司匹林、双嘧达莫双层片含量方法的建立[J]. 天津医科大学学报,2007,13(1):102,108.
WEI HY, LIU Y, ZHANG YS. Determination of aspirin and dipyridamole double-layer tablets by HPLC[J]. J Tianjin Med Univ, 2007,13(1):102, 108.
[4] 衣学福,缪丹丹. 阿司匹林双嘧达莫片中游离水杨酸的HPLC检测方法[J]. 江苏药学与临床研究, 2004,12(3):25.
YI XF, MIAO DD. Determination of free salicylic acid in aspirin dipyridamole tablets by HPLC [J]. Jiangsu Pharm Clin Res, 2004,12(3):25.
[5] 李宇,田海燕,崔晓雨,等. 阿司匹林双嘧达莫片的含量测定及含量均匀度研究[J]. 中国药业,2019,28(18):27.
LI Y, TIAN HY, CUI XU, *et al.* Content determination of aspirin and dipyridamole tablets and study on its content uniformity[J]. China Pharm, 2019, 28(18):27.
[6] 李淑芳,马秉智,张相林,等. 高效液相色谱法同时测定复方双嘧达莫3组分含量及释放度[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(1):128.
LI SF, MA BZ, ZHANG XL, *et al.* Determination of compound dipyridamole by HPLC content and release of 3 components[J]. Chin Hosp Pharm J, 2007, 27(1):128.
[7] 中华人民共和国药典2020年版. 二部[S]. 2020:619.
ChP 2020. Vol II [S]. 2020: 619.

(收稿日期:2023-09-19)