

UHPLC

作者

Njies Pedjie

PerkinElmer, Inc.
Shelton, CT 06484 USA

利用配备PDA检测器的PerkinElmer Flexar FX-15系统分析头痛药中的活性物质

简介

对乙酰氨基酚和阿司匹林是缓解常见头痛的首选药物。对乙酰氨基酚也称作扑热息痛，被广泛的用作缓解疼痛（镇痛剂）和减退发烧（退热剂）。由于其作用快（摄入11min），对乙酰氨基酚被认为非常有效，但是其滥用（超过每日成人的限量4g）可导致致命的肝损坏。事实上，在美国，对乙酰氨基酚引起急性肝功能衰竭是用药过量的主要原因。在头痛药中，另外常用的有效成分是乙酰水杨酸（阿司匹林），其是镇痛剂、退热剂、消炎药，且可通过抗血小板的作用来防止心脏病发作和中风。尽管阿司匹林药效明显且价格便宜，但其仍具有副作用。对于很多人而言，阿司匹林通过损坏胃黏膜从而引起或者加剧胃溃疡，这成为阿司匹林药物受限制的主要因素。在设计专门用来治疗常见头痛（紧张性头痛）的药物配方时，对乙酰氨基酚和阿司匹林通常和咖啡因结合使用，咖啡因不仅仅提高这两种药物的功效，且能刺激中枢神经系统和暂时消除疲劳。

在美国，对乙酰氨基酚引起急性肝功能衰竭是用药过量的主要原因。在头痛药中，另外常用的有效成分是乙酰水杨酸（阿司匹林），其是镇痛剂、退热剂、消炎药，且可通过抗血小板的作用来防止心脏病发作和中风。尽管阿司匹林药效明显且价格便宜，但其仍具有副作用。对于很多人而言，阿司匹林通过损坏胃黏膜从而引起或者加剧胃溃疡，这成为阿司匹林药物受限制的主要因素。在设计专门用来治疗常见头痛（紧张性头痛）的药物配方时，对乙酰氨基酚和阿司匹林通常和咖啡因结合使用，咖啡因不仅仅提高这两种药物的功效，且能刺激中枢神经系统和暂时消除疲劳。

对乙酰氨基酚的肝毒性与阿司匹林胃出血的风险两者相结合是严重的健康问题，该问题可以通过准确的标签注解和适当的医药指示来避免。这就是为什么在医药工业中常规测定药物有效成分的精确含量是标准的程序，并且也是食品药品监督管理局要求的一部分。

本应用文献对美国药典（USP）的方法进行了修改，采用表面多孔填料的色谱柱及PE UHPLC系统对阿司匹林，对乙酰氨基酚和咖啡因进行分析。本应用文献对USP的方法修改，主要是为了增加通量，减少溶剂消耗量。本文所描述方法的操作条件及性能，对两种治疗头痛的药物（一种品牌药物，一种为通用药品）进行测试，以确定各自的有效组分。

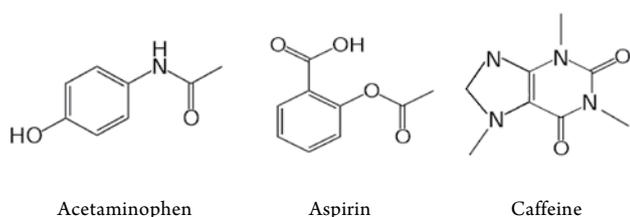


图1 被分析药物的分子结构式

试验

称取一定量的固体纯物质，加入流动相稀释，涡旋1min后，超声2-3min，使标准储备溶液对乙酰氨基酚和阿司匹林的浓度为0.25mg/mL，咖啡因浓度为0.065mg/mL。移取4.0mL的标准储备溶液和0.3mL的内标溶液（6mg/mL苯甲酸甲醇溶液）于10mL容量瓶中，流动相定容，得到工作溶液，对乙酰氨基酚和阿司匹林的浓度为0.1mg/mL，咖啡因浓度为0.026mg/mL和内标物质的浓度为0.18mg/mL。将工作溶液进样7次测定以评估方法重复性。线性测定范围为0.1μg/mL-100.0μg/mL。品牌药物片剂和通用药物胶囊两种药物的成分标签均注明含量为250/250/65mg（对乙酰氨基酚/阿司匹林/咖啡因），称取净重相等的片剂和胶囊分别于100mL的容量瓶中，均加入流动相涡旋1min，然后超声15min。分别移取上述溶液2.0mL和1.5mL内标溶液至不同的50mL的容量瓶中，样品充分混匀，进样前经0.2μm尼龙滤膜过滤。

一台配有Flexar FX PDA光电二极管阵列检测器的PerkinElmer® Flexar™ FX-15 UHPLC为本实验的检测设备，使用PE Brownlee SPP C-18, 100 x 2.1 mm, 2.7 μm的色谱柱进行分离，运行时间为4.4min，压力为4000psi(276bar)。

表1 UHPLC系统及色谱条件

| 自动进样器 | Flexar™ FX UHPLC | | | | | | | | |
|----------|--|----------|---------|-------|-----|---------|-----|---------|-----|
| 设置 | 50 μL 采用环和15 μL 进样针，局部循环模式 350 μL 混合器体积 进样体积 10 μL, 2 μL; 进样器清洗: 水 | | | | | | | | |
| HPLC色谱柱 | PE Brownlee分析C18, 100 x 4.6mm, 5 μm 部件号: N9303512 柱温45 °C | | | | | | | | |
| 流动相 | B: 69:28:3 水/甲醇/乙酸乙酯 1.0 mL/min, 12 min | | | | | | | | |
| UHPLC色谱柱 | PE Brownlee SPP C18, 100 x 2.1 mm, 2.7 μm 部件号: N9308404, 柱温55°C | | | | | | | | |
| 流动相 | B: 69:28:3 水/甲醇/乙酸乙酯 0.25 mL/min, 4.4 min | | | | | | | | |
| PDA检测器 | 扫描范围190-700nm, 记录275nm 改变设置为275nm, 波长优化 | | | | | | | | |
| | <table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>波长 (nm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1-1.3</td> <td>245</td> </tr> <tr> <td>1.3-2.5</td> <td>275</td> </tr> <tr> <td>2.5-4.4</td> <td>232</td> </tr> </tbody> </table> | 时间 (min) | 波长 (nm) | 1-1.3 | 245 | 1.3-2.5 | 275 | 2.5-4.4 | 232 |
| 时间 (min) | 波长 (nm) | | | | | | | | |
| 1-1.3 | 245 | | | | | | | | |
| 1.3-2.5 | 275 | | | | | | | | |
| 2.5-4.4 | 232 | | | | | | | | |
| 操作软件: | Chromera® Version 3.0 | | | | | | | | |
| 采样速率: | 5pt/s | | | | | | | | |

结果和讨论

第一，USP方法的分析条件是：100 x 4.6 mm，粒径5 μm的传统C18高效液相色谱柱，柱温45°C，流速1.0 mL/min，所有的色谱峰在12min内流出色谱柱（图2）。本应用文献使用长度较短，粒径较小的PE Brownlee SPP C-18, 100 x 2.1 mm, 2.7 μm的色谱柱，柱温55°C，并且采用流动相作为稀释溶剂代替USP方法使用的甲醇和冰醋酸（95:5）的混合液，柱压力约为4000psi，运行时间从原来的12min减少至4.4min。

第二，本方法分辨率和灵敏度明显提高（图3）。运行样品之前，注射一针标准溶液，以确定每个峰的最大吸收波长并优化记录波长，从而使得紫外吸收值增加了5倍（见图4和图5）。通过标准溶液的色谱图，创建一个谱库（图6），该谱库可用作样品中物质的鉴定和确证（图7和图8）。

第三，本方法减少了3倍的色谱运行时间，流速从1.0mL/min减少至0.25mL/min。因此，利用UHPLC的方法，运行时间减少了63%，溶剂使用量减少了90%，使作为危险废弃物处理的溶剂用量减少。综上，将传统的HPLC方法转变成UHPLC的方法，劳动力及化学品消耗成本明显降低，提供了更为绿色的实验室操作。

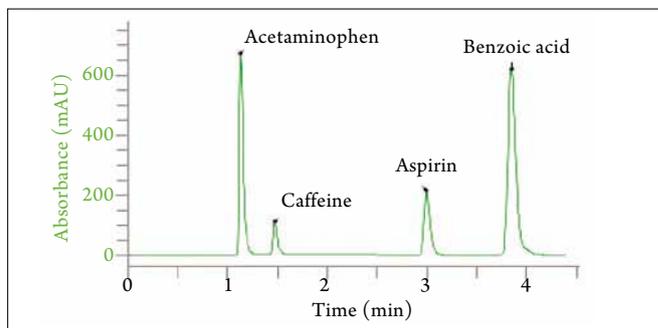


图5 标准品的波长设置优化色谱图

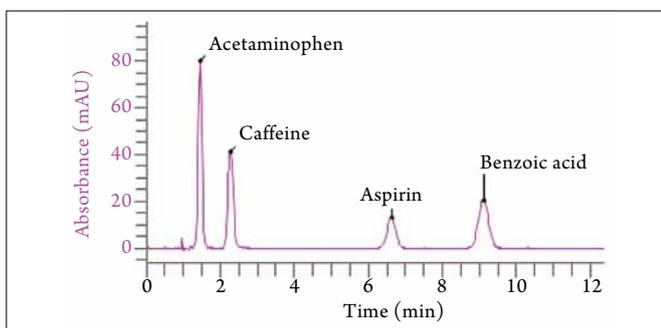


图2 各化合物标准品传统C18色谱柱分析的色谱图

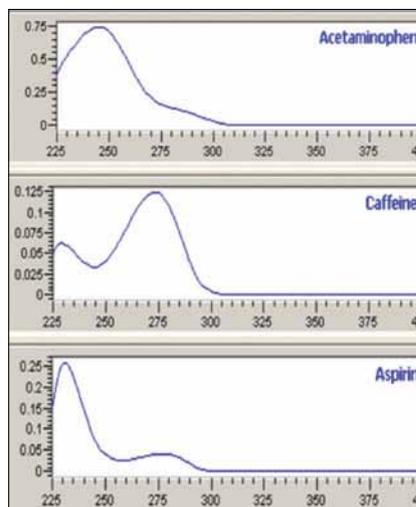


图6 运行标准品溶液的紫外扫描图谱

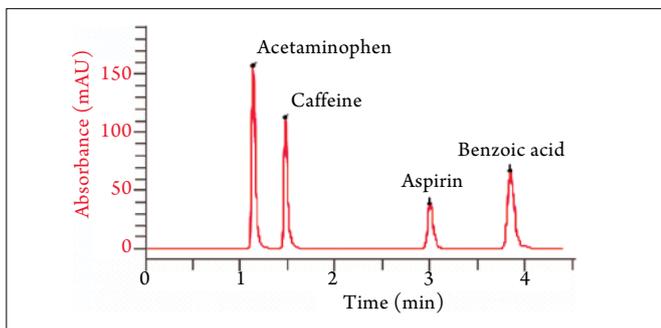


图3 各化合物标准品表面多孔填料C18色谱柱分析的色谱图

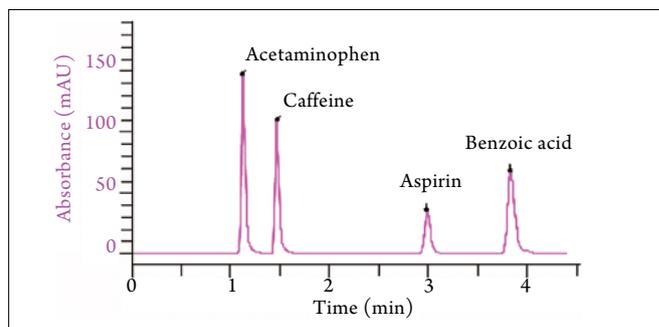


图7 通用头痛药分析色谱图

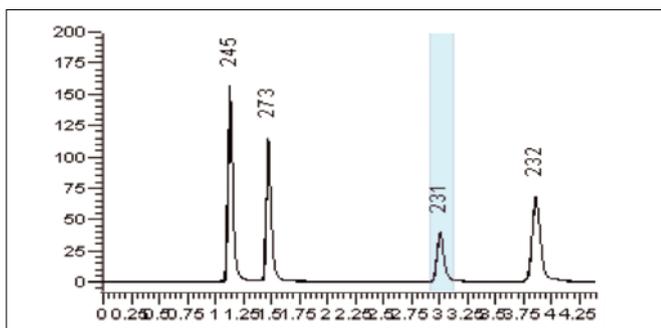


图4 标准品的每个峰最大吸收色谱图

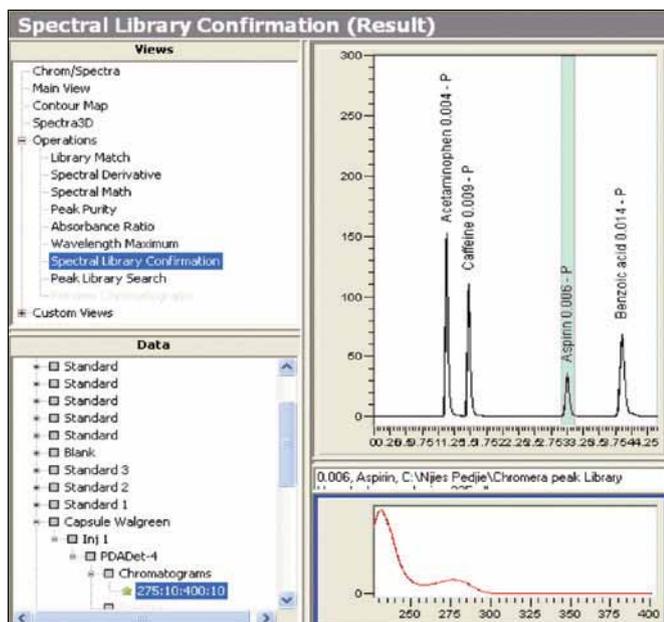


图8 利用谱库鉴定通用头痛药中的化合物

本应用文献建立了性能优越的实验方法，各分析物的线性相关系数的平方 (R^2) 值为0.9999或者1，精密度（相对标准偏差RSD%）范围从0.58%至0.98%之间。详细的方法性能、样品测定结果见表2所示。

表2 精密度, 线性和样品测定含量

| | RSD% (n=7) | 线性 r^2 | 范围 ($\mu\text{g/mL}$) | 传统药物 | 品牌药物 |
|--------|---------------|----------|----------------------------|--------|-------|
| 对乙酰氨基酚 | 0.76 | 1 | 0.6-100 | 100.5% | 96.9% |
| 咖啡因 | 0.58 | 1 | 0.16-26 | 98.2% | 97.6% |
| 阿司匹林 | 0.98 | 0.9999 | 1.25-100 | 93.3% | 93.8% |
| 平均值 | 0.77 | 1 | NA | 97.3% | 96.1% |

NA=不适用

结论

本采用文献建立的UHPLC分析头痛药中对乙酰氨基酚、阿司匹林和咖啡因的方法运行时间减少了63%，溶剂使用量减少了90%。PE的Flexar FX-15 UHPLC系统及Brownlee SPP C-18, 100 x 2.1 mm, 2.7 μm 的色谱柱解决三种活性物质的分析，方法的线性相关系数的平方 $R^2 \geq 0.9999$ ，精密度 $RSD\% \leq 0.98$ 。测定品牌药物每片含有250/250/65mg（对乙酰氨基酚/阿司匹林/咖啡因），通用药物每片含有275/233/64mg（对乙酰氨基酚/阿司匹林/咖啡因）。本方法测定三种活性物质的含量与标签标明的各物质含量误差符合USP规定的不低于90.0%和不超过110.0%范围。PE的Chromera软件提供了多种数据采集和处理的功能：包括创建谱库，每个峰的最大吸收，该软件是一款解析三维光电二级管阵列色谱信息强有力的工具。谱库创建和搜索功能允许将标准色谱峰储存，以用于后续实际样品中待测物鉴定确认。

参考文献

1. Larson, A.M., Polson, J., Fontana, R.J., et al, December 2005. "Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study." *Hepatology* 42 (6): 1364-72.
2. USP 34. Official USP Monogram; Acetaminophen, Aspirin, and Caffeine Tablets; May 1, 2011, pages 1725, 1726.
3. Drugs.com prescription drug information and side effects. Retrieved August 12, 2011.
4. National Center for Biotechnology Information (NCBI), PubMed Health <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0000521/>
5. U.S. Preventive Services Task Force; "Aspirin for the Prevention of Cardiovascular Disease: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement;" *Annals of Internal Medicine*; March 17, 2011.

注：本应用文献如有更改，恕不另行通知。

PerkinElmer, Inc.

珀金埃尔默仪器（上海）有限公司
地址：上海张江高科园区李冰路67弄4号
邮编：201203
电话：800 820 5046 或 021-38769510
传真：021-50791316
www.perkinelmer.com.cn



要获取全球办事处的完整列表，请访问<http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs>

版权所有 ©2012, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自持有者或所有者的财产。