

氢核磁共振波谱法测定复方对乙酰氨基酚片中阿司匹林、咖啡因和对乙酰氨基酚

王震芳¹, 张智强²

1. 郑州大学附属肿瘤医院 药学部, 河南 郑州 450000

2. 天津药物研究院药业有限责任公司, 天津 300301

摘要: **目的** 建立复方对乙酰氨基酚片中阿司匹林、咖啡因和对乙酰氨基酚测定的氢核磁共振波谱方法。**方法** 采用氘代甲醇为溶剂, 马来酸为内标。采用 zg30 脉冲序列获取 ¹H-NMR 谱图。测试温度: 300 K; 谱宽: 8 012 Hz; 采集时间: 4.01 s; 弛豫时间: 20 s, 样品扫描次数: 64 次; 空扫次数: 2 次。并采用 HPLC 法测定进行比较。**结果** 阿司匹林、对乙酰氨基酚和咖啡因平均回收率分别为 101.29%、101.68%、99.13%, RSD 值分别为 1.15%、1.73%、1.92%。qNMR 法测定结果与 HPLC 法测定结果基本一致。**结论** 氢核磁共振波谱法操作简便、快速, 能准确测定复方对乙酰氨基酚片中阿司匹林、咖啡因和对乙酰氨基酚。

关键词: 复方对乙酰氨基酚片; 咖啡因; 对乙酰氨基酚; 阿司匹林; 核磁共振定量法

中图分类号: R914; R966

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2019)08-2598-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.09.005

Determination of acetaminophen, aspirin, and caffeine in Compound Paracetamol Tablets by proton nuclear magnetic resonance

WANG Zhen-fang¹, ZHANG Zhi-qiang²

1. Department of Pharmacy, Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Pharmaceutical Co., Ltd, Tianjin 300301, China

Abstract: **Objective** To establish a proton nuclear magnetic resonance (qNMR) method for simultaneous determination of acetaminophen, aspirin, and caffeine in Compound Paracetamol Tablets. **Methods** CD₃OD was employed as solvent and maleic acid was used as an internal standard. The ¹H-NMR spectra were obtained by using zg30 pulse sequence. The parameters were following as test temperature: 300 K, spectral width: 8 012 Hz, acquisition time: 4.01 s, relaxation time: 20 s, sample scanning times: 64 times, and air scanning times: 2 times. The determination results were compared with those of determined by HPLC. **Results** The average recoveries were 101.29%, 101.68%, and 99.13%, with RSD of 1.15%, 1.73%, and 1.92%, respectively. The determination result of qNMR was basically in line with that of HPLC. **Conclusion** It is a simple, rapid and accurate method for the determination of aspirin, caffeine, and paracetamol in Compound Paracetamol Tablets by qNMR method.

Key words: Compound Paracetamol Tablets; caffeine; acetaminophen; aspirin; qNMR

复方对乙酰氨基酚片是含阿司匹林、咖啡因和对乙酰氨基酚的复方制剂, 用于感冒引起的发热, 缓解头痛、牙痛、关节痛、痛经等^[1]。现行标准是卫生部药品标准化学药品及制剂第一册。由于复方对乙酰氨基酚片中有效成分具有不同的酸碱性, 采用 HPLC 内标法测定其含量时, 流动相的 pH 值对测定结果影响很大^[2]。各成分对内标物质的相应值存在一定的差异, 因此在一定程度上也会影响含量

测定结果的准确性。据报道^[3], HPLC 法测定复方对乙酰氨基酚片中有效成分时, 随着测定时间的延长, 含量测定结果越不准确。《中国药典》2015 年版测定阿司匹林片含量时, 需将水解产物水杨酸折算成阿司匹林进行计算。因此建立一种快速、简单、准确的含量测定方法对复方对乙酰氨基酚片进行质量控制显得意义重大。近年来, 核磁共振波谱仪越来越多地应用于食品、药品、农药等定量分析领

收稿日期: 2019-01-10

作者简介: 王震芳 (1988—), 药师, 硕士, 研究方向为医院药学。E-mail: wzf55208@126.com

域^[4-6]。核磁共振定量法(qNMR)被中国、美国、欧盟、日本及英国等各国药典均进行了收载。本研究采用 qNMR 法同时测定复方对乙酰氨基酚片中阿司匹林、咖啡因和对乙酰氨基酚 3 种有效成分,结果符合快速、简单、准确的要求。

1 仪器与试药

Bruker AVANCE III 600 型核磁共振仪(瑞士布鲁克公司);分析天平(十万分之一天平,德国 Sartorius 公司);氘代甲醇(CD_3OD , 氘代度 99.8%, 美国 Sigma-Aldrich 公司);马来酸(质量分数为 99.7%, 批号 190015-201606)、阿司匹林(质量分数为 99.6%, 批号 100113-201504)、对乙酰氨基酚(质量分数为 99.8%, 批号 100018-201703)、咖啡因(质量分数为 99.5%, 批号 171215-201708)对照品均购自中国食品药品检定研究院;复方对乙酰氨基酚片(贵州缔谊健康制药有限公司,规格 0.5 g/片,批号 20180225、20180227、20180301)。

2 方法与结果

2.1 内标和对照品溶液的配制

精密称取马来酸对照品 104.0 mg 置于 100 mL 量瓶中,加入约 80 mL 的 CD_3OD 超声溶解后放置 30 min。继续用 CD_3OD 加至刻度线,即得质量浓度为 1.04 mg/mL 的内标溶液。

精密称取经干燥处理的阿司匹林对照品 9.90 mg,置于 10 mL 量瓶中,加入约 8 mL 的内标溶液,超声溶解后放置 30 min。继续用 CD_3OD 加至刻度线,即得 0.99 mg/mL 的阿司匹林对照品溶液。对乙酰氨基酚、咖啡因对照品溶液同法配制,分别得质量浓度为 1.02、0.90 mg/mL 的对照品溶液。

2.2 样品溶液的配制

取复方对乙酰氨基酚片 10 片,于研钵中研细,精密称取 0.5 g 置于 5 mL 量瓶中,加入内标溶液约 4 mL,在功率 100 W、频率 40 kHz 条件下超声 10 min。放置 30 min 后继续用内标溶液加至刻度线。0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液转移 0.5 mL 置核磁管中,即得复方对乙酰氨基酚片的供试品溶液,用于测定咖啡因含量。取续滤液 0.5 mL,并继续加入内标溶液 2 mL 充分混匀后,转移 0.5 mL 至核磁管中,用于测定复方对乙酰氨基酚片中阿司匹林和对乙酰氨基酚含量。

2.3 测试条件

采用 zg30 脉冲序列获取 ^1H -NMR 谱图。测试温度: 300 K;谱宽: 8 012 Hz;采集时间: 4.01 s;

弛豫时间: 20 s,样品扫描次数: 64 次;空扫次数: 2 次。

2.4 定量峰和内标物质的选择

2.4.1 定量峰的选择 采用 qNMR 法测定复方对乙酰氨基酚片中阿司匹林、咖啡因和对乙酰氨基酚 3 种成分的含量时,选择合适的定量峰尤为重要。定量峰一般要求易于识别,并且与其他信号峰完全分离,无干扰。分别对阿司匹林、咖啡因和对乙酰氨基酚对照品进行 ^1H -NMR 扫描,结果见图 1。最终选择 a、b、c 信号峰分别作为对乙酰氨基酚(δ 6.72~6.80),咖啡因(δ 3.26~3.40)和阿司匹林(δ 8.00~8.09)的定量峰。

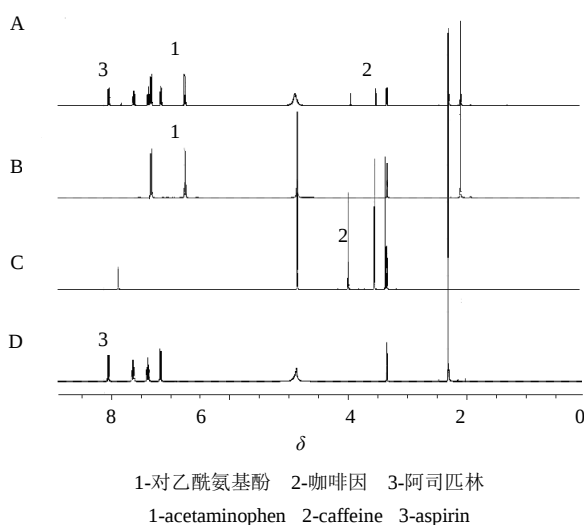


图 1 复方对乙酰氨基酚片(A)和 3 个成分(B-D)的 ^1H -NMR 图谱

Fig. 1 ^1H -NMR spectrum of Compound Paracetamol Tablets (A) and three components (B — D)

2.4.2 内标的选择 氘代甲醇作为氘代溶剂时,由于活泼质子交换作用,可消除对乙酰氨基酚中-NH、-OH 和阿司匹林中-COOH 中的活泼氢对 ^1H -NMR 谱图基线的影响。因此复方对乙酰氨基酚片 ^1H -NMR 谱图的基线较为平整,其中在 δ 5.50~6.70 无其他质子峰(图 1)。qNMR 法的内标物质一般选择孤立、尖锐的单峰,且不与样品峰相互干扰。本实验选用 CD_3OD 作为溶剂时,所选用的内标物质在 CD_3OD 中应有较好的溶解度。前期对马来酸、香豆素、富马酸二甲酯等内标物质进行了考察。结果发现,马来酸化学位移为 δ 6.26~6.33,位于复方对乙酰氨基酚片 ^1H -NMR 图谱无其他质子峰 δ 5.50~6.70,因而适合作为内标物质。复方对乙酰氨基酚片与马来酸混合物的 ^1H -NMR 图谱显示,马来酸内

标峰与咖啡因样品定量峰、阿司匹林定量峰及对乙酰氨基酚定量峰之间均互不干扰,专属性较高。复方对乙酰氨基酚片与内标马来酸混合物的¹H-NMR谱图见图2。

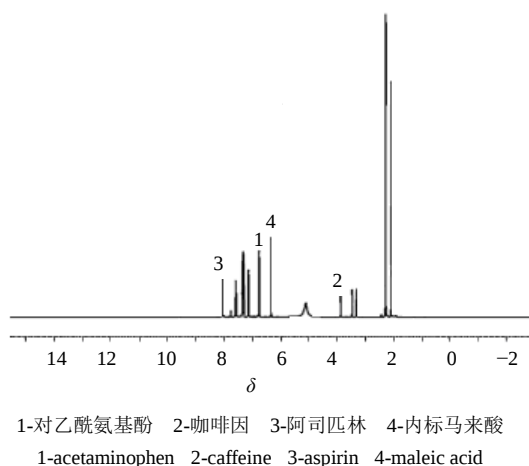


图2 复方对乙酰氨基酚片与马来酸混合物的 qNMR 图谱
Fig. 2 qNMR spectrum of the mixture of Compound Paracetamol Tablets and maleic acid

2.5 线性关系考察

取内标溶液配制 4.04、8.08、10.10、16.16、20.20 mg/mL 阿司匹林对照品溶液。采用内标溶液配制 0.98、1.96、3.92、7.84、9.80 mg/mL 对乙酰氨基酚对照品溶液。采用内标溶液配制 0.90、1.80、2.70、4.32、5.40 mg/mL 咖啡因对照品溶液。阿司匹林、对乙酰氨基酚和咖啡因与马来酸定量峰面积比对质量比进行线性回归,得回归方程 $Y=2.698\ 4\ X+0.103\ 7$ ($r=0.999\ 4$)、 $Y=2.268\ 6\ X+0.156\ 2$ ($r=0.999\ 1$) 和 $Y=3.015\ 0\ X-0.087\ 1$ ($r=0.999\ 0$)。表明阿司匹林、对乙酰氨基酚和咖啡因分别在 4.04~20.20、0.98~9.80、0.90~5.40 mg/mL 的线性关系良好。

2.6 检出限与定量限

以信噪比 (S/N) 为 3 时对应的质量浓度作为检出限 (LOD), S/N 为 10 时对应的质量浓度作为定量限 (LOQ)。取阿司匹林、对乙酰氨基酚和咖啡因对照品溶液逐步稀释,测定 LOD 值和 LOQ 值。结果显示,阿司匹林、对乙酰氨基酚、咖啡因的 LOD、LOQ 分别为 4.40、8.08, 5.44、19.6, 9.90、27.0 μg/mL。

2.7 方法学试验

选取定量峰或内标峰峰型轮廓线与水平基线交叉处作为积分区域^[5],且内标峰与定量峰均 5 次

积分,并选取平均值,进而进行方法学研究。

2.7.1 精密度试验 取复方对乙酰氨基酚片样品 (批号 20180225) 制备的供试品溶液,连续测定 6 次,获取¹H-NMR 调整相位并积分,分别考察阿司匹林、对乙酰氨基酚和咖啡因样品的定量峰与内标峰面积的比值。结果显示,3 个有效成分的定量峰与内标峰面积比值的 RSD 值分别为 0.67%、0.82%、1.19%。

2.7.2 稳定性试验 取复方对乙酰氨基酚片样品 (批号 20180225) 制备的供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进行测定,获取¹H-NMR 调整相位并积分,计算阿司匹林、对乙酰氨基酚和咖啡因样品的定量峰与内标峰面积的比值。结果显示,3 个有效成分的定量峰与内标峰面积比值的 RSD 值分别为 0.72%、0.90%、1.38%。提示样品溶液在 24 h 内稳定。

2.7.3 重复性试验 取复方对乙酰氨基酚片样品 (批号 20180225) 平行配制 6 供试品溶液,进行测定,获取¹H-NMR 图谱,调整相位并积分,分别计算阿司匹林、对乙酰氨基酚和咖啡因的质量分数。结果显示,3 个有效成分质量分数的 RSD 值分别为 1.92%、1.23%、1.58%。

2.7.4 回收率试验 平行配制 9 份供试品溶液。分别加入 1.01、2.02、4.04 mg/mL 阿司匹林对照品溶液 1 mL,获取¹H-NMR 图谱,调整相位,积分,计算回收率。结果显示平均回收率为 101.29%,RSD 值为 1.15%。同法测得对乙酰氨基酚平均回收率为 101.68%,RSD 值为 1.73%;咖啡因平均回收率为 99.13%,RSD 值为 1.92%。

2.8 qNMR 法计算方法

将测得的¹H-NMR 进行相位校正,分别对定量峰和内标峰积分 5 次,求取平均值,计算复方对乙酰氨基酚片中有效成分的含量。

$$W_u = W_s \cdot A_u \cdot E_u / (A_s \cdot E_s)$$

式中 W_u 为阿司匹林、咖啡因或对乙酰氨基酚质量; A_u 为定量峰面积; A_s 为马来酸内标峰面积; W_s 为马来酸内标质量; E_u 为阿司匹林、咖啡因或对乙酰氨基酚的质子当量 (阿司匹林、咖啡因或对乙酰氨基酚相对分子质量与定量峰代表的质子数之比); E_s 为马来酸的质子当量 (马来酸相对分子质量与内标峰代表的质子数之比)

2.9 HPLC 法测定样品

2.9.1 色谱条件 Agilent Zorbax Extend C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.05

mol/L 磷酸二氢钾 (稀磷酸调 pH 3.3) (41:59); 波长: 216 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 进样体积: 20 μ L; 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

2.9.2 标准曲线制备 分别精密称取阿司匹林、对乙酰氨基酚和咖啡因对照品 30.30、18.62、12.08 mg, 分别溶于 10 mL 甲醇中, 即得各个对照品溶液储备液。分别采用流动相稀释得质量浓度分别为 303.0、242.4、181.8、151.5、90.9 μ g/mL 阿司匹林对照品溶液, 18.62、14.90、11.17、9.31、5.59 μ g/mL 对乙酰氨基酚对照品溶液以及 6.04、4.83、3.62、3.02、1.81 μ g/mL 咖啡因对照品溶液。分别进 HPLC 后, 以峰面积对质量浓度进行线性回归, 得阿司匹林、对乙酰氨基酚和咖啡因的线性回归方程分别为 $A=2.2519C+0.1702$ ($r=0.9998$)、 $A=2.3108C+0.1246$ ($r=0.9995$)、 $A=2.1916C+2.2009$ ($r=0.9999$), 线性范围分别为 90.9~303.0、5.59~18.62、1.81~6.04 μ g/mL。

2.9.3 定量限和检测限 取 3 种成分对照品溶液逐步稀释, 信噪比 (S/N) 为 10 时作为定量限, S/N

为 3 时作为检测限。分析结果显示阿司匹林定量限是 15.0 ng/mL, 检测限是 5.0 ng/mL; 对乙酰氨基酚定量限是 12.5 ng/mL, 检测限是 6.0 ng/mL; 咖啡因定量限是 6.5 ng/mL, 检测限是 2.5 ng/mL。

2.9.4 方法学验证 经方法学考察, 日内精密度 RSD 值均小于 0.11% ($n=6$), 6 d 内的日间精密度 RSD 值均小于 0.34% ($n=6$)。稳定性试验显示, 样品溶液在 48 h 内 3 种成分含量变化的 RSD 值均小于 0.37% ($n=6$)。重复性试验显示, 复方对乙酰氨基酚片中 3 种成分含量变化的 RSD 值均小于 0.59% ($n=6$)。回收率试验结果表明, 复方对乙酰氨基酚片中 3 种成分平均回收率分别为 99.16%、100.43%、98.79%, RSD 值均小于 1.19%。

2.10 qNMR 法和 HPLC 法测定结果比较

取 3 批复方对乙酰氨基酚片, 按照已确定的 qNMR 方法测定阿司匹林、对乙酰氨基酚和咖啡因含量。同时采用 HPLC 法对复方对乙酰氨基酚片中 3 种成分进行测定, 见表 1。结果表明, qNMR 法测定结果与 HPLC 法测定结果基本一致。

表 1 不同方法测定复方对乙酰氨基酚片中 3 种成分 ($n=3$)

Table 1 Result of three components in Compound Paracetamol Tablets by different methods ($n=3$)

批号	方法	阿司匹林/(mg·片 ⁻¹)	对乙酰氨基酚/(mg·片 ⁻¹)	咖啡因/(mg·片 ⁻¹)
20180225	qNMR 法	230.86 $\pm$ 1.45	125.14 $\pm$ 1.33	31.13 $\pm$ 0.58
	HPLC 法	231.93 $\pm$ 0.53	126.04 $\pm$ 0.36	30.21 $\pm$ 0.17
20180227	qNMR 法	232.04 $\pm$ 1.66	126.37 $\pm$ 1.22	31.31 $\pm$ 0.69
	HPLC 法	230.91 $\pm$ 0.42	125.11 $\pm$ 0.29	30.42 $\pm$ 0.20
20180301	qNMR 法	229.83 $\pm$ 1.73	125.46 $\pm$ 1.09	32.07 $\pm$ 1.02
	HPLC 法	230.36 $\pm$ 0.31	126.15 $\pm$ 0.14	30.44 $\pm$ 0.18

3 讨论

qNMR 应用于含量测定时, 弛豫时间、扫描次数、采集时间等参数需要逐一考察^[4-6]。以阿司匹林、对乙酰氨基酚和咖啡因样品定量峰与内标峰的比值为参考, 分别对弛豫时间 (5、10、15、20、25、30 s) 和对扫描次数 (8、16、32、64、96、128 次) 进行考察。结果显示, 当弛豫时间大于 20 s、扫描次数大于 64 次时, 各样品定量峰与内标峰的比值全部趋于稳定。为保证 FID 信号衰减完全, 对采集时间进行考察, 结果表明当采集时间大于 4.01 s 时, ¹H-NMR 图谱完全满足分析要求。因此, 弛豫时间设定为 20 s, 扫描次数为 64, 采集时间为 4.01 s。

本研究采用 qNMR 法同时测定复方对乙酰氨基

酚片中阿司匹林、对乙酰氨基酚和咖啡因 3 种有效成分, 整个测试过程无需对照品, 不需要各成分的分离过程, 无需引入校正因子, 操作过程简单, 结果准确、快速。经与 HPLC 测定结果对比, qNMR 法的测定结果与 HPLC 法基本一致。

综上所述, 本研究为复方对乙酰氨基酚片中有有效成分的定量测定提供了一种新方法, 同时也丰富了 qNMR 法应用于制剂质量控制的经验, 为 qNMR 法在化工、医药研发等研究领域中的推广和普及提供了有益的借鉴。

参考文献

- [1] 王川平, 任进民, 亢泽坤, 等. 复方对乙酰氨基酚片在健康人体的药代动力学和相对生物利用度 [J]. 中国

- 临床药理学杂志, 2006, 22(2): 130-133.
- [2] 王燕桓, 刘国瑞, 傅承光, 等. HPLC 法测定阿咖酚散中3种有效成分及相关杂质含量的研究 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(5): 692-695.
- [3] 王英瑛, 王 黎, 李 俊. 复方对乙酰氨基酚片溶出度方法研究及溶出行为评价 [J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(1): 34-37.
- [4] 秦雯雯, 袁 松, 张晓明, 等. 核磁共振法测定甲磺酸阿帕替尼原料药中甲磺酸阿帕替尼 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(12): 1887-1890.
- [5] 李承欣, 王雪萍, 崔 锋, 等. ^1H -核磁共振定量法测定盐酸厄洛替尼含量 [J]. 医药导报, 2017, 36(12): 1398-1401.
- [6] 孙文霞, 钟家亮, 侯佳威, 等. 氢核磁共振定量法测定槲皮素原料药中的槲皮素 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(1): 59-62.