

使用Alliance™ iS HPLC System可靠地分析原料药和片剂中的阿司匹林及相关物质

Margaret Maziarz, Paul D. Rainville, Stephanie Harden

Waters Corporation

摘要

稳定可靠的分析检测方法对保障药品质量和安全性至关重要。本研究介绍了一种分析阿司匹林活性药物成分(API)和六种相关物质的高效液相色谱(HPLC)方法。该方法采用配备XSelect™ HSS T3色谱柱的Alliance iS HPLC System。系统适应性、线性、准确度、日内和日间方法性能的评估结果良好，满足USP要求（USP43-NF38，阿司匹林片剂）。本研究还证明，应用该方法能够可靠、准确地测定原料药和片剂中的阿司匹林含量及相关物质含量。

优势

- 一种可靠、快速（用时不到7.6 min）的方法，可同时测定原料药和片剂中的阿司匹林含量及相关物质（杂质）
- 该方法在Alliance iS HPLC System上运行时的精密度、重复性、线性和准确度良好，日内和日间方法性能优异

简介

为确保符合现行的药品生产质量管理规范(CGMP)要求,制药商必须证明药品成分、规格、质量和纯度¹。这就要求质量控制(QC)实验室建立稳健的分析检测方法,以便在常规分析中获得准确可靠的结果。

阿司匹林是一种常用药物,可缓解轻微疼痛、退低烧,还能预防心脏病发作和轻微中风。阿司匹林有口服片剂规格,每片含81~650 mg阿司匹林²。有文献中提出了一种同时分离阿司匹林及其六种相关物质的方法,详见欧洲药典中有关乙酰水杨酸的内容³。美国药典(USP)中的阿司匹林片剂专论只规定了一种杂质⁴。

本研究开发了一种分析阿司匹林API及其相关物质的方法,并在Alliance iS HPLC System上分析了阿司匹林样品。研究期间评估了几项关键的方法性能特征,包括系统适应性、线性、准确度,以及日内和日间性能。分析结果后,与阿司匹林片剂USP专论中的可接受标准做了比较⁴。该方法表现出优异的日内和日间性能,峰面积和保留时间的相对标准差(RSD)分别为 $\leq 0.25\%$ 和 $\leq 0.03\%$,符合USP标准。此外,本研究还证明该方法适用于测定原料药和片剂中的阿司匹林含量及相关物质(杂质)含量。

实验

标准品溶液

用稀释剂(含0.1%甲酸的60:40水/乙腈)制备相关物质及阿司匹林API的单标储备液,浓度分别为1.0 mg/mL和5.0 mg/mL。用稀释剂将API储备液稀释至0.1 mg/mL,添加浓度为10%的相关物质制成混标溶液。欧洲药典中规定的阿司匹林及六种相关物质见表1³。

名称	化合物	分子式	单同位素质量数 (Da)	结构
阿司匹林API	2-乙酰氧基苯甲酸， O-乙酰水杨酸	$C_9H_8O_4$	180.04	
杂质A	对水杨酸， 4-羟基苯甲酸	$C_7H_6O_3$	138.03	
杂质B	4-羟基-1,3-苯二甲酸， 4-羟基间苯二甲酸	$C_8H_6O_5$	182.02	
杂质C	水杨酸， 2-羟基苯甲酸	$C_7H_6O_3$	138.03	
杂质D	乙酰水杨酰水杨酸， 2-(乙酰氧基)苯甲酸	$C_{16}H_{12}O_6$	300.06	
杂质E	2-((2-羟基苯甲酰基)氧基)苯甲酸， 双水杨酯	$C_{14}H_{10}O_5$	258.05	
杂质F	2-乙酰氧基苯甲酸酐， O-乙酰水杨酸酐	$C_{18}H_{14}O_7$	342.07	

表1.阿司匹林及相关物质（杂质）的化学信息

阿司匹林样品溶液

通过超声处理10 min，将磨碎的片剂（含81 mg阿司匹林）溶于稀释剂（含0.1%甲酸的60:40水/乙腈）中，使阿司匹林的浓度达到1.6 mg/mL。萃取后，在3000 rpm下将样品测试溶液离心10 min，然后稀释至0.1 mg/mL供阿司匹林含量测定使用。用稀释剂（含0.1%甲酸的60:40水/乙腈）制备浓度为0.5 mg/mL的片剂和原料药样品，供相关物质检测使用。

临分析之前，用0.2 μm尼龙注射器（沃特世P/N: [WAT200524](#) <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/sample-preparation--filtration/wat200524-acrodisc-syringe-filter-nylon-13-mm-02--m-aqueous-100-pk.html>>) 过滤溶液。

条件

液相色谱系统：

配备TUV检测器的Alliance iS HPLC System

样品瓶：

LCMS最大回收样品瓶，2
mL，P/N: 600000749CV

色谱柱：	XSelect HSS T3, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm (P/N: 186004786)
柱温：	40 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	15 μL
流动相：	A: 0.1%甲酸水溶液 B: 0.1%甲酸的乙腈溶液
清洗溶剂：	清除/样品清洗液：60:40水/乙腈 密封清洗液：90:10水/乙腈
检测：	237 nm

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	1.8	95.0	5.0	6
0.10	1.8	95.0	5.0	6
7.60	1.8	5.0	95.0	6
9.20	1.8	5.0	95.0	6
9.30	1.8	95.0	5.0	6
13.00	1.8	95.0	5.0	6

软件

色谱数据软件 (CDS):	Empower™ 3.6.1
---------------	----------------

使用Empower软件采集和分析数据。使用Empower项目提供的报告模板生成汇总报告。

结果与讨论

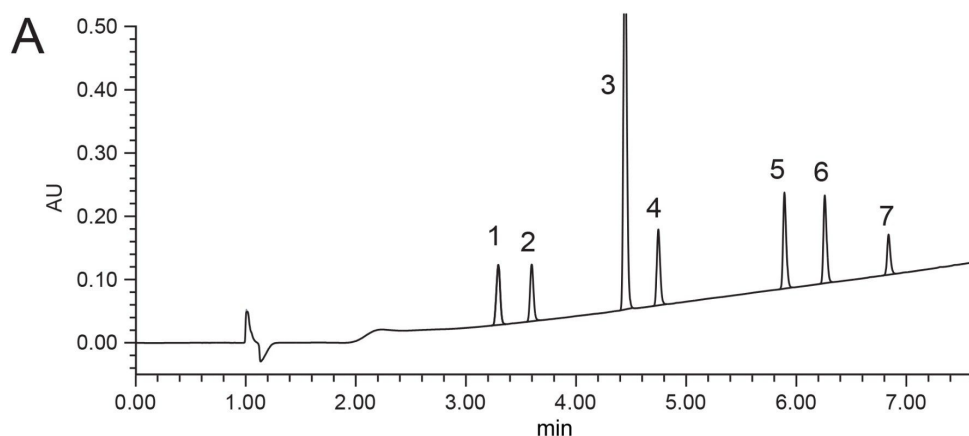
我们在Alliance HPLC iS System上运行这种新开发的方法，用时不到7.6 min就成功分离了阿司匹林API和六种相关物质，最小的USP分离度(USP Rs) ≥ 4.8 ，峰拖尾因子为1.0~1.2，保留因子(k^*) ≥ 2.1 （图1）。

系统适应性

为确保该方法符合阿司匹林片剂USP专论中的适应性要求，对混标溶液执行了5次重复进样以评估系统适应性。含量测定和杂质检测程序的USP适应性要求包括⁴：

- 含量测定：峰拖尾因子不超过(NMT) 2.0，相对标准差(RSD)不超过 2.0
- 杂质：水杨酸与阿司匹林峰之间的分离度不低于(NLT) 2.0，水杨酸的RSD不超过4.0%

该方法满足系统适应性要求，峰面积和保留时间(RT)的RSD分别为0.07%~1.43%和0.02%~0.03%（图1B）。此外，该方法也满足含量测定和杂质检测程序的USP适应性要求。



B

系统适应性
 样品组ID: Sample Set Id 2847
 结果组ID: Result Set Id 2882
 样品: API/Imp mix SS

组分结果

	名称	RT	进样 次数	(平均值)	USP分离度 (平均值)	USP拖尾因子 (平均值)	峰面积 %RSD	RT %RSD
1	杂质A	3.295	5	2.1		1.0	0.20	0.02
2	杂质B	3.588	5	2.4	4.8	1.1	0.13	0.02
3	阿司匹林	4.446	5	3.2	14.9	1.2	0.07	0.03
4	Imp C	4.748	5	3.5	5.3	1.2	0.17	0.02
5	Imp D	5.894	5	4.6	20.3	1.2	0.09	0.02
6	Imp E	6.281	5	5.0	6.6	1.2	0.02	0.02
7	Imp F	6.839	5	5.5	10.4	1.2	1.43	0.02

图1.在Alliance iS HPLC System上运行阿司匹林API及其相关物质重复进样($n=5$)得到的结果。(A)是使用XSelect HSS T3色谱柱得到的色谱分离结果, (B)是系统适应性结果。

日内和日间性能

验证日内和日间性能可确保该方法在Alliance iS HPLC System上运行时始终生成一致的结果, 这对药品质量控制和安全性至关重要。我们在一天内执行四组混标溶液重复进样(每组五次), 通过分析这些重复进样来评估该方法在Alliance iS HPLC System上的日内性能。进样结果比对阿司匹林片剂的USP适应性要求进行评估⁴。日内方法性能十分出色, 满足阿司匹林含量测定和杂质检测程序的USP适应性要求(表2)。在这四组数据中, 阿司匹林

峰面积和保留时间的RSD分别在0.03%~0.08%和0.02%~0.03%范围内。水杨酸（杂质C）峰面积的RSD在0.07%~0.25%范围内。

参数	USP要求 ⁴	系统适应性1 日间	系统适应性2 日内	系统适应性3 日内	系统适应性4 日内
阿司匹林含量测定	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
阿司匹林拖尾因子	不超过(NMT) 2.0	1.2	1.2	1.2	1.2
阿司匹林相对标准差(RSD)	NMT 2.0%	• 峰面积RSD: 0.07% • RT %RSD: 0.03%	• 峰面积RSD: 0.08% • RT %RSD: 0.02%	• 峰面积RSD: 0.03% • RT %RSD: 0.03%	• 峰面积RSD: 0.03% • RT %RSD: 0.02%
杂质	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
水杨酸与阿司匹林之间的 分离度	不低于(NLT) 2.0	5.3	5.3	5.3	5.3
水杨酸的RSD	NMT 4.0%	• 峰面积RSD: 0.17% • RT %RSD: 0.02%	• 峰面积RSD: 0.07% • RT %RSD: 0.02%	• 峰面积RSD: 0.25% • RT %RSD: 0.02%	• 峰面积RSD: 0.13% • RT %RSD: 0.02%

表2. 实测日内方法性能与阿司匹林片剂USP专论⁴规定的USP适应性标准

为了评估该方法在Alliance iS HPLC System上的日间性能，我们分几天（包括第1、2和5天）分析了混标溶液。该方法表现出优异的性能，在每个测试日都得到了相当的结果，且满足所有USP适应性标准（表3）。

参数	USP要求 ⁴	第1天	第2天	第5天
阿司匹林含量测定	N/A	N/A	N/A	N/A
阿司匹林拖尾因子	不超过(NMT) 2.0	1.2	1.2	1.2
阿司匹林相对标准差(RSD)	NMT 2.0%	• 峰面积RSD: 0.07% • RT %RSD: 0.02%	• 峰面积RSD: 0.03% • RT %RSD: 0.03%	• 峰面积RSD: 0.07% • RT %RSD: 0.02%
杂质	N/A	N/A	N/A	N/A
水杨酸与阿司匹林之间的 分离度	不低于(NLT) 2.0	5.3	5.3	5.3
水杨酸的RSD	NMT 4.0%	• 峰面积RSD: 0.14% • RT %RSD: 0.02%	• 峰面积RSD: 0.24% • RT %RSD: 0.03%	• 峰面积RSD: 0.15% • RT %RSD: 0.02%

表3. 分几天测得的日间方法性能与阿司匹林片剂USP专论⁴规定的USP适应性标准

线性和范围

在样品前处理时制备的API工作溶液(0.1 mg/mL)的80%~120%浓度范围内绘制阿司匹林API的标准曲线。浓度相对于各浓度水平的峰面积构成的标准曲线的相关系数(R^2) ≥ 0.999 （图2）。此外，计算出的X值（即浓度）的偏差百分比在-0.35%~0.81%范围内。

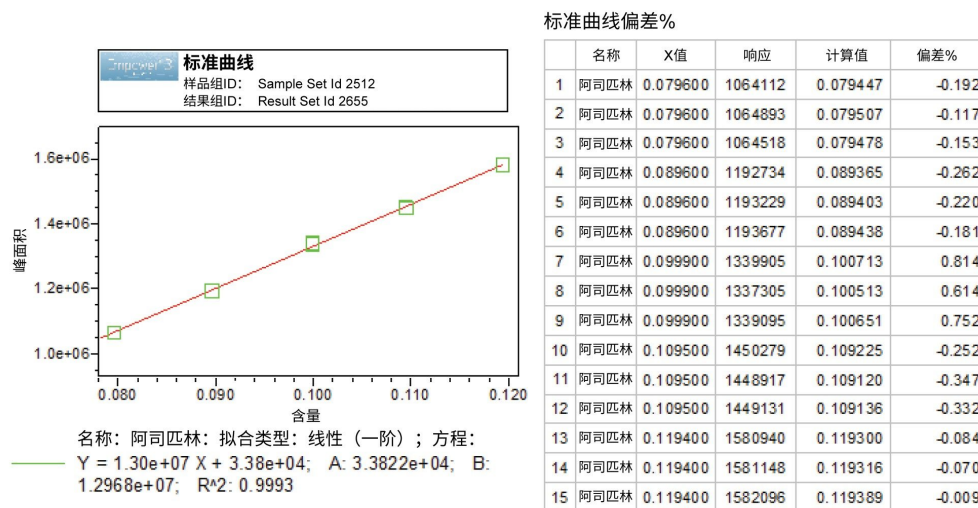


图2.工作溶液浓度(0.1 mg/mL) 80%~120%范围内阿司匹林API的标准曲线以及测定结果的偏差百分比。UV检测波长为237 nm。

阿司匹林含量测定

测定含量时，用稀释剂（含0.1%甲酸的60:40水/乙腈）溶解含有81 mg阿司匹林的片剂，制得浓度为0.1 mg/mL的样品溶液。使用标准曲线对样品溶液进行定量，以便计算回收率(%)。六个样品的含量测定结果在93.4%~93.6%范围内（图3），满足USP可接受标准，即不低于(NLT)阿司匹林标示量的90.0%且不超过(NMT)阿司匹林标示量的110.0%⁴。

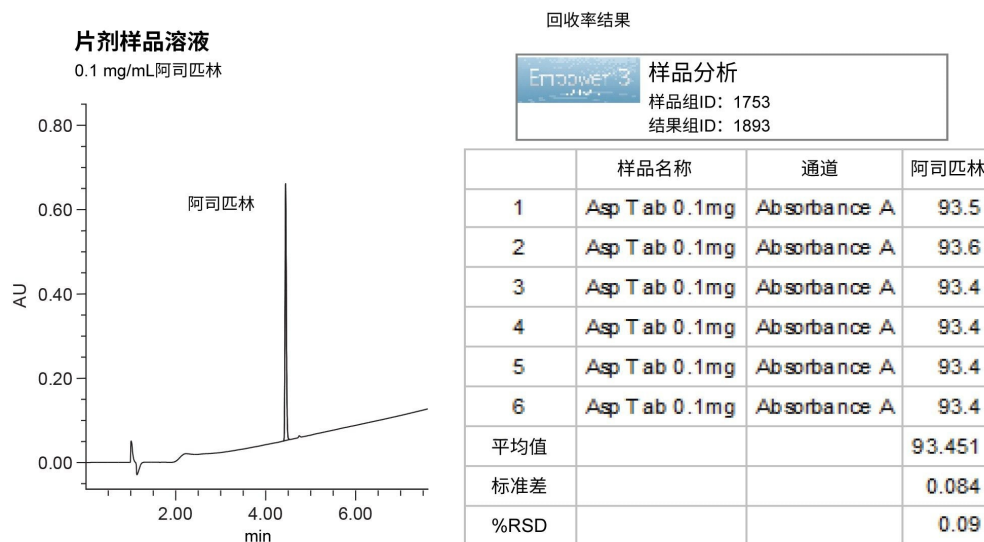


图3.片剂药中阿司匹林的含量测定。含量测定结果符合阿司匹林片剂的USP标准（在阿司匹林标示量的90.0%~110.0%范围内⁴）。

相关物质

通过比较每种相关物质的峰面积与阿司匹林API峰面积来确定相关物质含量（%杂质）（图4）。

分析结果表明，阿司匹林片剂样品中存在两种杂质（杂质C和D，含量分别为0.91%和0.05%），原料药样品中存在杂质C，含量为0.15%（图5）。结果符合关于水杨酸（杂质C）的USP可接受标准：不超过0.3%，包衣片剂不超过3.0%⁴。

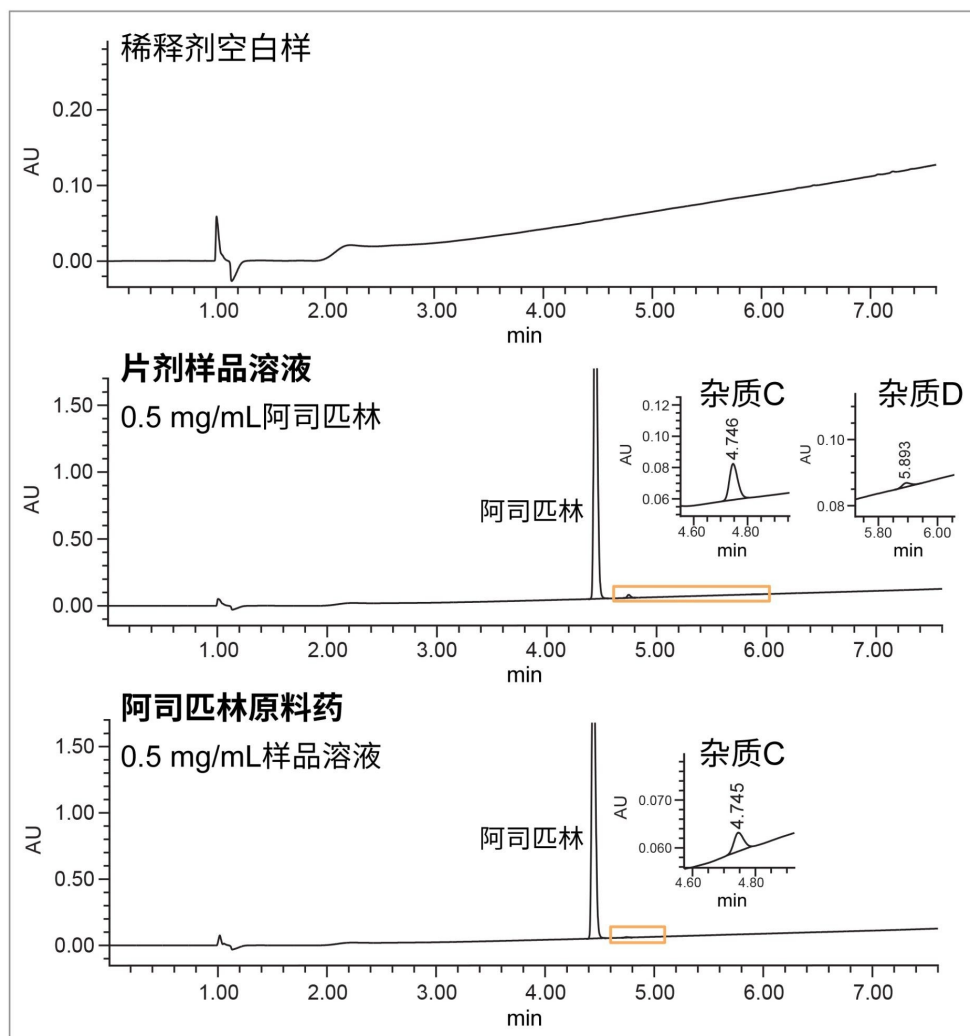


图4.相关物质分析中的样品溶液。UV检测波长为237 nm。

Empower 3	样品分析
	样品组ID: 1753
	结果组ID: 1926

%杂质 按时间汇总的杂质响应			
	样品名称	杂质C	杂质D
1	Asp Tab 0.5mg	0.906	0.050
2	Asp Tab 0.5mg	0.899	0.047
3	Asp Tab 0.5mg	0.908	0.044
4	Asp Tab 0.5mg	0.907	0.045
5	Asp Tab 0.5mg	0.906	0.045
6	Asp Tab 0.5mg	0.909	0.048
平均值		0.91	0.05
标准差		0.004	0.002
% RSD		0.40	4.42

Empower 3	样品分析
	样品组ID: 1753
	结果组ID: 1926

%杂质 按时间汇总的杂质响应		
	样品名称	杂质C
1	Asp Drug Sub 0.5mg	0.140
2	Asp Drug Sub 0.5mg	0.145
3	Asp Drug Sub 0.5mg	0.149
4	Asp Drug Sub 0.5mg	0.149
5	Asp Drug Sub 0.5mg	0.149
6	Asp Drug Sub 0.5mg	0.161
平均值		0.15
标准差		0.007
% RSD		4.61

图5.阿司匹林片剂和原料药的相关物质（杂质%）结果。UV检测波长为237 nm。

结论

本研究开发了一种分析阿司匹林及六种相关物质的LC方法，我们在Alliance iS HPLC System上运行该方法后发现，其性能优异，适用于同时测定阿司匹林原料药及片剂中API及六种相关物质（杂质）的含量。系统适应性结果符合阿司匹林含量测定和杂质检测程序的标准。该方法具有优异的线性、准确度以及日内和日间性能。实验结果表明，Alliance iS HPLC System性能稳健、可靠，重现性高，适用于常规分析检测。

参考资料

1. Current Good Manufacturing Practice (CGMP) Regulations | FDA <
<https://www.fda.gov/drugs/pharmaceutical-quality-resources/current-good-manufacturing-practice-cgmp-regulations>> .

2. <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682878.html> <
<https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682878.html>>
3. Ph.Eur.Monograph.Acetylsalicylic Acid. *The European Pharmacopeia* 10.0.01/2017:0309.
4. USP monograph for Aspirin Tablets. *United States Pharmacopeia USP 43-NF 38*, official 1st May 2020.

特色产品

Alliance iS HPLC System <

<https://www.waters.com/nextgen/global/products/chromatography/chromatography-systems/alliance-is-hplc-system.html>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007994ZH, 2023年8月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号