

基于高效液相色谱法分析乙酰氨基酚片中乙酰氨基酚的定性定量方法研究

宋兴萍*

(迪庆藏族自治州检验检测院, 香格里拉 674499)

摘要: **目的** 本研究聚焦于药品质量控制关键环节, 深入探究基于高效液相色谱法(HPLC)对乙酰氨基酚片中乙酰氨基酚的定性定量分析方法。**方法** 选取不同生产批次的对乙酰氨基酚片作为研究对象, 使用超声波清洗器促进样品在溶剂内分散与溶解, 制作不同比例甲醇-水体系进行对比, 通过液相色谱对乙酰氨基酚的有效含量定性分析; 借助离心机快速分离样品溶液中的不溶物, 并用电子天平精准, 对乙酰氨基酚片中乙酰氨基酚成分定量分析。**结果** 在优化的色谱条件下, 对乙酰氨基酚与相邻杂质峰的分离度达到1.8, 峰形对称。仪器的相对标准偏差(RSD)为0.8%, 表明仪器性能稳定, 进样重复性好。重复性试验RSD为0.3%, 说明该方法对同一批样品的分析具有良好的重现性。稳定性试验RSD为0.5%, 显示供试品溶液在12 h内性质稳定。加样回收率平均为99.7%, RSD为0.8%。**结论** 该方法能快速且精准地完成乙酰氨基酚片有效成分的定性定量分析, 为乙酰氨基酚片质量把控提供坚实技术支撑, 对相关药品研发、生产及监管意义重大。

关键词: 高效液相色谱法; 乙酰氨基酚片; 定性; 定量; 有效成分

0 引言

在医药领域, 确保药品质量与疗效对保障患者健康至关重要。乙酰氨基酚片作为常用的解热镇痛药, 其有效成分乙酰氨基酚的含量及纯度直接关乎药效和用药安全。传统分析方法在准确性、灵敏度等方面存在局限, 难以满足日益严格的药品质量控制需求。高效液相色谱法凭借高分辨率、高灵敏度、分析速度快等优势, 在药物成分分析中备受青睐。本研究聚焦于运用高效液相色谱法, 探索一种精准可靠的乙酰氨基酚片中有效成分乙酰氨基酚定性定量分析方法^[1]。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

仪器: 高效液相色谱仪(岛津 LC20AD 型), 配备高灵敏度 PDA 检测器; 电子天平(梅特勒-托利多 XS205DU 型), 精度达十万分之一, 确保称量样品和试剂的准确性, 对实验结果可靠性至关重要^[2]; 超声波清洗器(昆山超声 KQ-500DE 型), 频率为 40 kHz, 功率为 100 W; 离心机(KH20R-II), 最大转速可达 18600 r/min, 能快速分离样品溶液中的不溶物, 使后续的分析测试更加准确^[3]。

试剂: 药品样品选取不同生产批次的对乙酰氨基酚片作为研究对象, 具有广泛代表性; 对照品为高纯度的对乙酰氨基酚对照品(批号 100018-202111, 中国食品药品检定研究院, 含量: 100%); 有机溶剂甲醇选用默克公司生产的色谱纯甲醇, 乙腈则采用赛默飞世尔科技的色谱纯乙腈。缓冲试剂磷酸为分析纯级别, 购自国药集团化学试剂有限公司, 用于调节流动相 pH 值, 优化色谱分离条件; 实验用水为娃哈哈纯净水, 购自杭州娃哈哈集团有限公司, 最大限度地降低水中杂质对实验结果的影响^[4]。

1.2 对照品溶液制备

精密称取对乙酰氨基酚对照品 10.00 mg, 将其放置在 100 mL 容量瓶内, 使用甲醇溶液并定容至刻度, 将其摇匀即可获得 100 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。提前准备 5 个 50 mL 规格的容量瓶, 分别向 5 个容量瓶内加入 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 的储备液, 使用甲醇分别将其稀释至刻度, 配制成浓度分别为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液^[5]。

1.3 供试品溶液制备

取适量的对乙酰氨基酚片样品, 将其研细, 精密称取 0.5 g, 并置于 50 mL 规格的具塞锥形瓶内, 向瓶内加入 30 mL 的甲醇并密封, 称定重量。使用超声提取 30 min

* 通信作者: 宋兴萍, 主管药师, 研究方向为药品检验。E-mail: 1076881842@qq.com

之后将其放冷，再称定质量，使用甲醇补足减失的质量，并将溶液摇匀。使用离心机，参数为 10000 r/min，持续 10 min，取上清液，使用规格为 0.45 μm 的微孔滤膜过滤，即可得到供试品溶液^[6]。

2 结果与分析

2.1 色谱条件优化

2.1.1 流动相和色谱柱选择

甲醇-水体系中，将甲醇比例从 20% 缓慢提升至 80%，发现对乙酰氨基酚的保留时间逐步缩短，分离度在甲醇比例为 40%~60% 时产生波动。乙腈-水体系中，

随着乙腈比例变化，峰形、分离度也产生了变化。向其进一步添加不同缓冲盐体系，如磷酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液等^[7]。本实验使用的是对乙酰氨基酚片，当采用乙腈-0.1% 磷酸水溶液(体积比为 30:70)作为流动相时，分离度达到 1.8，满足分离要求，且峰形对称，见表 1。

对比了 C18 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm , 安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18)、C8 柱(100 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μm , 沃特世 Atlantis C8)以及苯基柱(125 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm , 菲罗门 Luna Phenyl)对乙酰氨基酚片中对乙酰氨基酚的分离效果。以相同样品进样分析，结果如表 2 所示。

表 1 不同流动相体系对对乙酰氨基酚分离效果的影响

流动相体系	甲醇/乙腈比例	分离度	峰形
甲醇-水	20%~80%	波动, 40%~60% 时不稳定	较宽, 不对称
乙腈-水	20%~80%	随比例改变, 30% 时较好	较对称
乙腈-0.1% 磷酸水溶液(体积比为 30:70)	—	1.8	对称

表 2 不同色谱柱对对乙酰氨基酚的分离效果

色谱柱类型	保留时间/min	分离度	杂质与成分分离情况
C18 柱	12~15(适中)	1.5~2.0	有效分离
C8 柱	8~10(较短)	1.2~1.5	部分不完全分离
苯基柱	12~14(适中)	< 1.0	重叠严重

结合表 2 数据可知，C18 柱对对乙酰氨基酚的保留时间适中，分离度为 1.5~2.0，可有效分离杂质与目标成分；C8 柱保留时间较短，分离度为 1.2~1.5，部分杂质与对乙酰氨基酚分离不完全；苯基柱对某些结构相似杂质的分离效果不佳，对乙酰氨基酚峰与杂质峰重叠严重。从综合方面考量，C18 柱对多数药品有效成分均具有较好的保留能力、分离能力，因此选用 C18 柱作为实验用色谱柱。

2.1.2 流速与柱温优化

流速分别设置为 0.8、1.0 和 1.2 mL/min 展开实验^[8]。流速为 0.8 mL/min，对乙酰氨基酚与杂质分离效果较好，但分析时间较长，为 30 min；流速为 1.0 mL/min，分离度达到 1.6，分析时间为 20 min，可在较短时间内达到较为理想的分离效果；流速为 1.2 mL/min，分析时间缩短至 15 min，但分离度下降明显，为 1.3。因此，将流速设置为 1.0 mL/min 较为适宜。

在柱温方面，对实验样品温度设定为 25~35 $^{\circ}\text{C}$ 范围进行考察，分别设定为 25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 。实验中，在柱温达到 25 $^{\circ}\text{C}$ 时，峰形较宽，分离度为 1.4；柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ 时，分离度为 1.7，峰形相对稳定；柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$ 时，虽然峰形较为稳定，但部分杂质峰与对乙酰氨基酚峰分离度会下降到 1.5。因此，最终确定最佳柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ ，既能够保证有良好的分离效果，也可以维持峰形的相对稳定性。

2.2 定性分析

2.2.1 保留时间定性

在优化后色谱条件下，分别注入对照品溶液、供试品溶液。10 个不同批次供试品溶液的检测结果如表 3 所示，对照品溶液中对乙酰氨基酚的保留时间为 12.5 min，供试品溶液中在 (12.5 $\pm$ 0.2) min 范围内出现色谱峰，初步判定该色谱峰为对乙酰氨基酚^[9]。该色谱峰保留时间的相对标准偏差为 1.2%，表明具有较好的保留时间重复性，可用于初步定性。

表 3 不同批次供试品中目标色谱峰的保留时间

批次	保留时间/min
1	12.45
2	12.48
3	12.52
4	12.49
5	12.50
6	12.47
7	12.51
8	12.46
9	12.53
10	12.48

2.2.2 光谱定性

利用二极管阵列检测器，在 200~400 nm 波长范围内扫描对照品溶液和供试品溶液中对乙酰氨基酚色谱峰的光谱图。对照品在 260 nm 处有最大吸收峰，供试品溶液中相应色谱峰在 259 nm 处也出现最大吸收峰，且光谱图的吸收峰形状及吸收强度比值与对照品光谱图基本一致，如图 1 所示。对 5 个不同批次供试品进行光谱扫描分析，吸收峰位置的相对标准偏差(RSD)为 0.8%，进一步确认该成分。各批次供试品最大吸收峰位置及与对照品吸收强度比值的数据见表 4。

2.3 方法学验证

2.3.1 标准曲线绘制

向高效液相色谱仪内分别注入不同浓度的对照品溶液，记录峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标，对照品浓度(X , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标，绘制标准曲线^[10]。得到回归方程为 $Y=1000X+50(r^2=0.9998)$ ，表明在 2.0~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内，峰面积与浓度呈良好的线性关系^[4]。

表 4 不同批次供试品光谱特征数据

批次	最大吸收峰位置 /nm	与对照品吸收强度比值
1	259	0.98
2	258	0.99
3	260	1.02
4	259	1.01
5	259	0.99

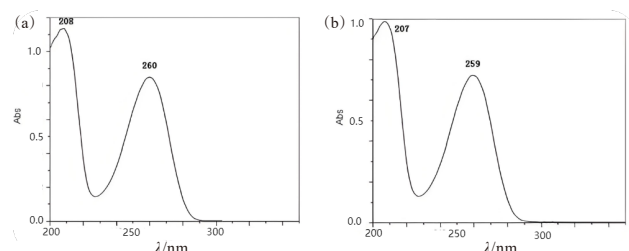


图 1 对照品溶液(a)和供试品溶液(b)紫外吸收光谱图

2.3.2 精密度、重复性、稳定性和加样回收率试验

取同一对照品溶液(浓度为 6.0 $\mu\text{g/mL}$)，连续进样 6 次，计算峰面积的 RSD 为 0.1%，表明仪器精密度良好。

取同一批对乙酰氨基酚片样品 6 份，按供试品溶液制备方法平行制备 6 份供试品溶液，分别进样测定，对乙酰氨基酚含量分别为 98.5%、98.8%、99.2%、98.9%、99.0%、98.7%，计算含量的 RSD 为 0.3%，说明该方法重复性良好^[5]。

取同一供试品溶液，分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样测定，记录峰面积。峰面积分别为 3311125、3301168、3315621、3314185、3305714，计算 RSD 为 0.2%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

取已知含量为 99.0% 的对乙酰氨基酚片样品适量，精密称定 6 份，分别加入不同量的乙酰氨基酚对照品(加入量为样品中所含对乙酰氨基酚量的 80%、100%、120%)，按供试品溶液制备方法处理，进样测定，计算回收率。6 次回收率分别为 98.5%、99.2%、100.5%、99.8%、100.2%、99.0%，平均回收率为 99.7%，RSD 为 0.8%，表明该方法准确性良好。

2.4 样品含量测定

对多个批次的对乙酰氨基酚片样品进行含量测定，结果显示不同批次样品中对乙酰氨基酚的含量存在一定差异。通过大量批次样品的测定，统计出平均含量为 99.8%，标准偏差为 1.1%。这表明尽管存在细微差异，但整体含量较为稳定，符合药品质量标准要求^[9]。

3 讨论与结论

(1)HPLC 方法优势。相比传统方法，HPLC 能将乙酰氨基酚以及与其共存成分有效分离，减少杂质干扰，极大提升了定性、定量分析精度。

(2)实验条件影响。流动相组成、色谱柱类型、流速及柱温等因素对分离效果影响显著。流动相的选择决定了各成分在色谱柱中的保留行为。色谱柱类型不同，其固定相性质和孔径大小有别，直接影响对成分的分离选择性^[10]。

(3)方法可靠性。通过精密度试验表明，试验所用仪器性能稳定，进样重复性好，试验方法对同一批样品的分析具有良好的重现性，供试品溶液性质稳定。

本研究建立的基于高效液相色谱法对乙酰氨基酚片主要有效成分乙酰氨基酚进行定性定量分析的方法，具有良好的准确性、精密度、重复性和稳定性，操作简便、快速，满足该药品质量控制的要求，为药品研发、生产和质量监督提供了重要的技术手段。

参考文献

- [1] 李华, 张正悬, 张贤达, 等. 基于多指标成分一测多评及多模式识别方法的陈香露白露片质量分析[J]. 品牌与标准化, 2025, (1): 122-124.
- [2] 王坤, 吕霞, 刘贝妮, 等. 高效液相色谱法测定高效氯氟氰菊酯微囊悬浮剂的优化研究[J]. 现代农药, 2024, 23(3): 57-61.
- [3] 张秋燕, 陈宁. 超高效液相色谱法在药物检验分析中的应用研究[J]. 中国科技期刊数据库医药, 2022, (1): 2-6.
- [4] 姜璇, 赫畅, 戴译文. 高效液相色谱法在中药制剂有效成分含量测定中的运用分析[J]. 饮食科学: 下半月, 2020, (10): 78-81.
- [5] 许源升, 刘姣, 张恬, 等. 酶联免疫吸附测定法用于中药质量控制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(4): 12-20.
- [6] 杨秋琛, 张琼琼, 王桂群, 等. 基于UPLC四神丸方中19种有效成分定量测定以及提取工艺优化研究[J]. 中草药, 2024, 55(11): 3679-3688.
- [7] 齐娅楠. 在进行药品检验中采取高效液相色谱法的效果与安全性[J]. 中文科技期刊数据库(全文版)医药卫生, 2022, (3): 3-5.
- [8] 梁雨彤. 高效液相色谱法在中药成分分析中的应用[J]. 中文科技期刊数据库(全文版)医药卫生, 2021, (8): 33-38.
- [9] 赵珺睿, 贺英, 张娇娇. 超高效液相色谱法在药物分析中的应用进展[J]. 商品与质量, 2020, (7): 5-6.
- [10] 葛娜. 高效液相色谱法在药品检验中的应用探讨[J]. 科学与财富, 2020, (10): 1-2.