

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)02-0087-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.02.018



高效液相色谱法测定曲匹地尔片中主成分含量*

杨园, 王婧[△]

(武汉药品医疗器械检验所, 湖北 武汉 430075)

摘要:目的 建立测定曲匹地尔片中曲匹地尔含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为依利特 SinoChrom ODS-BP 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调 pH 为 2.5) - 乙腈(85:15, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 307 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL。结果 曲匹地尔质量浓度在 0.023 1~0.207 9 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2 = 1.000 0, n = 5$); 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%, 平均加样回收率为 101.36%, RSD 为 0.59% ($n = 9$)。结论 该方法灵敏度高、重复性和稳定性良好, 专属性强, 结果准确可靠, 可为曲匹地尔片的质量控制和标准提升提供参考。

关键词: 曲匹地尔; 含量测定; 高效液相色谱法; 质量控制

Determination of Principal Component Content in Tripidil Tablets by HPLC

YANG Yuan, WANG Jing[△]

(Wuhan Institute for Drug and Medical Device Control, Wuhan, Hubei 430075, China)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of principal component content in Tripidil Tablets. **Methods** The chromatographic column was Elite SinoChrom ODS-BP column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.01 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution (adjusted to pH 2.5 with phosphoric acid) - acetonitrile (85:15, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 307 nm, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of tripidil was 0.023 1 - 0.207 9 mg/mL ($R^2 = 1.000 0, n = 5$). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0%. The average recovery was 101.36%, with an RSD of 0.59% ($n = 9$). **Conclusion** The established method is sensitive, with good repeatability, stability and the results are accurate and reliable, which can provide a reference for the quality control and standard improvement of Tripidil Tablets.

Key words: tripidil; content determination; HPLC; quality control

曲匹地尔为三唑啉衍生物, 可选择性抑制环核苷酸磷酸二酯酶(PDE)活性和抑制血小板衍生生长因子(PDGF)活性^[1], 临床主要用于治疗缺血性心脑血管疾病, 也可用于防治短暂性脑缺血发作及高血压引起的系列并发症^[2-9]。近年研究发现, 曲匹地尔可改善糖尿病心肌病的心肌细胞凋亡、肥大及纤维化, 从而改善心脏功能、缓解症状, 发挥治疗作用^[2-9]。对其研究主要聚焦于药理作用及以质谱法为主的血药浓度测定^[10-13]。有关物质的研究亦有报道^[14-15], 且其中的杂质A与杂质B已被多国药典收载。然而, 在曲匹地尔片的含量测定方面, 现有方法的专属性与灵敏度仍存在一定不足。为此, 本研究中建立了测定曲匹地尔中主成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260型HPLC仪, 配备二极管阵列检测器(美国Agilent公司); XS105型及AE-200型电子天平

(精度分别为0.01 mg及0.1 mg), SevenEasy型酸度计, 均购自瑞士Mettler Toledo公司; SK8200HP型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); CLXXXUVM2型纯水机(法国ELGA公司)。

1.2 试剂

曲匹地尔片(武汉迪奥药业有限公司, 批号分别为20170101, 20180301, 20180901, 20161002, 规格均为每片50 mg); 曲匹地尔对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为100440-200301, 含量98.95%); 杂质A、杂质B对照品(EP, 批号分别为T1820002, T1820004, 含量均为100%); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: 依利特 SinoChrom ODS-BP 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调 pH 至 2.5) - 乙腈(85:15, V/V); 流速:

* 基金项目: 国家药品监督管理局药物制剂质量研究与控制重点实验室开放课题[YWZJZD-202201]。

第一作者: 杨园, 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向为药品质量控制及药品标准, (电子信箱)40892110@qq.com。

[△]通信作者: 王婧, 女, 博士, 副主任药师, 研究方向为药品质量控制及药品标准, (电子信箱)whdxwj75@163.com。

1.0 mL/min; 检测波长: 307 nm(系统适用性溶液为307 nm及204 nm); 柱温: 35 °C; 进样量为10 μL。

2.2 溶液制备

对照品溶液:取对照品适量,精密称定,加流动相,制成每1 mL含1.155 mg的对照品贮备液;精密量取2 mL,置20 mL容量瓶中,加流动相定容,摇匀,即得对照品溶液1。取对照品100 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,用流动相溶解并定容,得对照品溶液2。

供试品溶液:取样品20片,研细,取细粉适量(约相当于曲匹地尔50 mg),精密称定,置100 mL容量瓶中,加流动相约70 mL,超声(功率500 W、频率53 kHz)处理20 min,使溶解,用流动相定容,摇匀,经0.45 μm滤膜过滤,精密量取续滤液2 mL,置10 mL容量瓶中,用流动相定容,即得。

空白对照溶液:取空白辅料适量,以流动相溶解,即得。

系统适用性溶液:取曲匹地尔、杂质A与杂质B对照品适量,加流动相溶解并稀释,制成每1 mL中含曲匹地尔2 mg、杂质A与杂质B各约2 μg的混合溶液,即得。

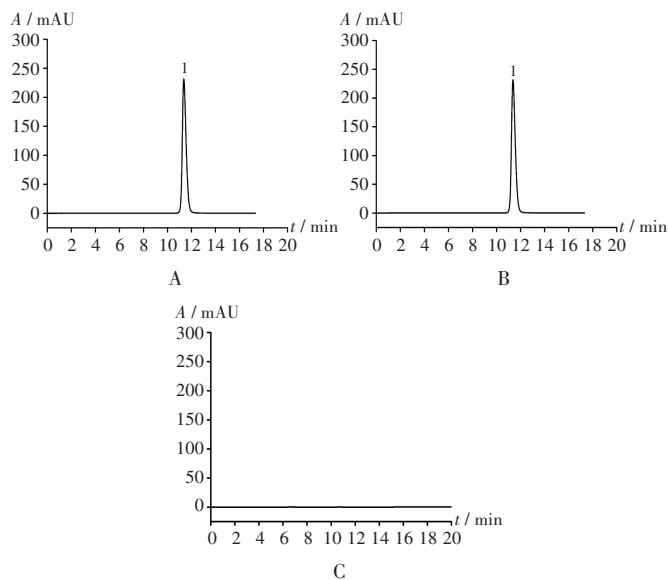
2.3 方法学考察

专属性试验与系统适用性试验:取2.2项下对照品溶液1、供试品溶液及空白对照溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果供试品溶液在与对照品溶液1色谱相同保留时间处有相应色谱峰,且空白对照无干扰。详见图1。取2.2项下系统适用性溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果系统适用性溶液色谱在204 nm波长处可见主成分及杂质A、杂质B及流动相的吸收峰,且各成分峰的分离度 ≥ 6.0 ,分离良好。详见图2。

线性关系考察:精密量取2.2项下对照品贮备液0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 mL,分别置25 mL容量瓶中,加流动相定容,摇匀,即得系列对照品溶液。按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以曲匹地尔质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 46468.48X + 24.38$ ($R^2 = 1.0000$, $n = 5$)。结果表明,曲匹地尔质量浓度在0.023 1~0.207 9 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

定量限考察:取2.2项下对照品溶液1适量,倍比稀释,以信噪比为10时的质量浓度计算定量限。结果曲匹地尔的定量限为0.654 ng。

强制破坏试验^[16]:取5 mL对照品溶液2,加0.5 mol/L盐酸溶液5 mL,水浴加热2 h,放冷,用0.5 mol/L氢氧化钠溶液5 mL中和,即得酸破坏溶液;取5 mL对照品溶液2,加0.1 mol/L氢氧化钠溶液5 mL,水浴加热2 h,放冷,用0.1 mol/L盐酸溶液5 mL中和,即得碱破坏溶液;取5 mL对照品溶液2,水浴加热7 h,即得热破坏溶



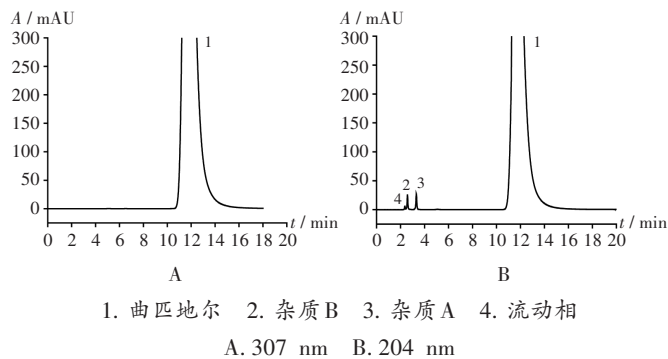
1. 曲匹地尔
A. 对照品溶液1 B. 供试品溶液 C. 空白对照溶液

图1 专属性试验高效液相色谱图

1. Tripidil

A. Reference solution 1 B. Test solution C. Blank reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of specificity test



1. 曲匹地尔 2. 杂质B 3. 杂质A 4. 流动相

A. 307 nm B. 204 nm

图2 系统适用性溶液高效液相色谱图

1. Tripidil 2. Impurity B 3. Impurity A 4. Mobile phase

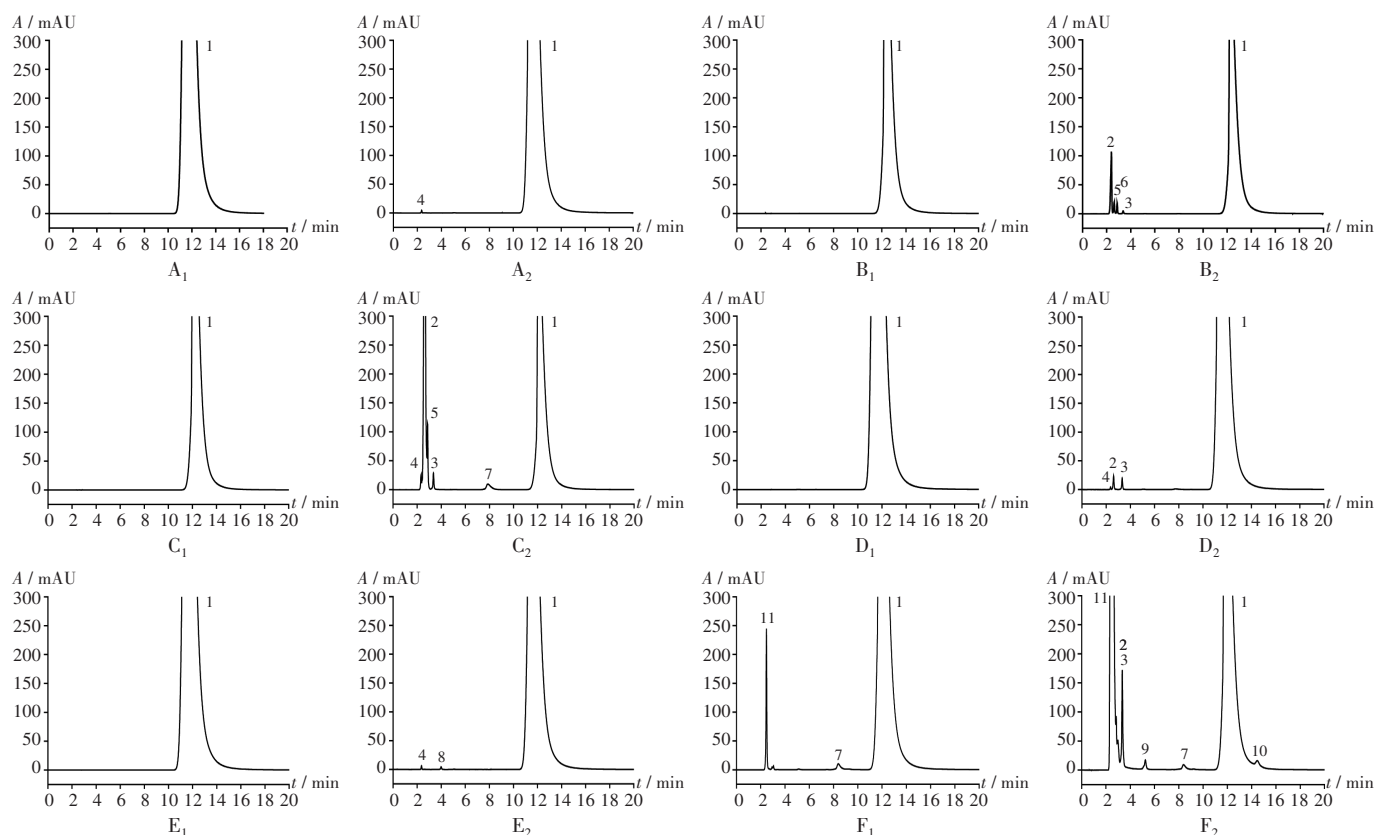
A. 307 nm B. 204 nm

Fig. 2 HPLC chromatograms of system suitability solution

液;取5 mL对照品溶液2,置太阳光下照射8 h,即得光破坏溶液;取5 mL对照品溶液2,加30%过氧化氢溶液2.5 mL,水浴加热10 min,放冷,即得氧化破坏溶液。精密量取上述溶液各10 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果降解产生的各杂质与主成分均能完成分离(分离度 > 2.0)。详见图3。

精密度试验:精密吸取2.2项对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的RSD为0.06% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液(批号为20180301),分别于室温放置0, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为0.26% ($n = 12$),表明供试品溶液室



1. 曲匹地尔 2. 杂质B 3. 杂质A 4. 溶剂 5 - 10. 其他杂质 11. 过氧化氢

A₁ - F₁, 307 nm A₂ - F₂, 204 nm

A₁, A₂. 对照品溶液 2 B₁, B₂. 酸破坏溶液 C₁, C₂. 碱破坏溶液 D₁, D₂. 热破坏溶液 E₁, E₂. 光破坏溶液 F₁, F₂. 氧化破坏溶液

图3 强制降解试验高效液相色谱图

1. Trapidil 2. Impurity B 3. Impurity A 4. Solvent 5 - 10. Other impurities 11. Hydrogen peroxide

A₁ - F₁, 307 nm A₂ - F₂, 204 nm

A₁, A₂. Reference solution 2 B₁, B₂. Acid degradation solution C₁, C₂. Alkali degradation solution D₁, D₂. Thermal degradation solution

E₁, E₂. Light degradation solution F₁, F₂. Oxidation degradation solution

Fig. 3 HPLC Chromatograms of forced degradation tests

温放置 48 h 内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为20180301)适量,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果曲匹地尔平均含量为101.10%,RSD为0.20%(n=6)。

加样回收试验:取样品适量,共9份,精密称定,分别置100 mL容量瓶中,分别精密加入曲匹地尔对照品20 mg、25 mg、30 mg,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量及加样回收率。结果见表1。

范围试验:取样品(批号为20180301)细粉适量(相当于曲匹地尔40 mg、50 mg、60 mg),精密称定,相当于含量测定浓度的80%,100%,120%,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进行测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果曲匹地尔平均含量为101.20%,RSD为0.80%。

耐用性试验:分别取2.2项下供试品溶液和对照品

表1 加样回收试验结果(n=9)

Tab. 1 Results of the recovery test(n=9)

| 取样量(g) | 样品含量(mg) | 加入量(mg) | 测得量(mg) | 回收率(%) | \bar{X} (%) | RSD(%) |
|--------|----------|---------|---------|--------|---------------|--------|
| 0.1306 | 21.2496 | 19.48 | 41.0751 | 101.77 | | |
| 0.1345 | 21.8842 | 20.08 | 42.3603 | 101.97 | | |
| 0.1337 | 21.7540 | 20.06 | 42.1391 | 101.62 | | |
| 0.1548 | 25.1871 | 25.67 | 51.2608 | 101.57 | | |
| 0.1691 | 27.5138 | 26.18 | 53.9708 | 101.06 | 101.36 | 0.59 |
| 0.1684 | 27.3999 | 25.20 | 53.0531 | 101.80 | | |
| 0.1793 | 29.1734 | 31.97 | 61.5020 | 101.12 | | |
| 0.1850 | 30.1009 | 30.29 | 60.7857 | 101.30 | | |
| 0.1702 | 27.6928 | 30.95 | 58.6471 | 100.01 | | |

溶液1适量,按2.1项下色谱条件(分别设置色谱柱、流动相中水相比例、流动相pH、检测波长、流速和柱温),进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果的RSD为0.36%。结果表明,色谱条件一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性较好。详见表2。

表2 耐用性试验结果

Tab. 2 Results of the durability test

| 参数 | 拟订条件 | 含量(%) |
|-------|--|--------|
| 色谱柱 | SinoChrom ODS - BP柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm) | 101.30 |
| | Inertsil ODS - 3柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) | 101.71 |
| | Phenomenex Luna C ₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) | 102.11 |
| | Ultimate XB C ₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) | 101.78 |
| 流动相比例 | 80%水相 | 102.20 |
| | 90%水相 | 101.90 |
| 流动相pH | 2.3 | 102.16 |
| | 2.7 | 101.72 |
| 波长 | 307 nm | 101.31 |
| | 305 nm | 101.36 |
| | 309 nm | 101.36 |
| 流速 | 0.8 mL/min | 101.22 |
| | 1.2 mL/min | 101.19 |
| 柱温 | 33 °C | 101.30 |
| | 37 °C | 101.30 |

2.4 样品含量测定

取4批样品各适量,按2.2项下方法分别制备供试品溶液,共2份,按2.1项下色谱条件进样测定,按外标法计算样品含量。结果批号为20161002,20170101,20180301,20180901的样品含量分别为101.32%,98.23%,102.01%,104.61%,平均101.52%。

3 讨论

3.1 检测波长的确定

预试验中,曲匹地尔在220 nm及307 nm波长处均有强紫外吸收。虽然文献中存在多种检测波长选择(如292 nm用于多组分分析^[1],305 nm用于避开辅料干扰^[16]),但本研究中需同时兼顾主成分含量测定灵敏度与有关物质检查的专属性。考虑到所用流动相中乙腈的末端吸收干扰,最终确定采用双波长检测方法,其中307 nm用于主成分含量测定,该波长下曲匹地尔响应值高,辅料无干扰;204 nm则用于系统适用性检查(杂质A、杂质B在该处有无强吸收^[15]),实现了单一色谱条件下,同步监控主成分含量与关键杂质分离效能的目的。

3.2 流动相的选择

预试验中系统评估了文献报道的几种流动相体系^[12-13],结果显示,甲醇-10 mmol/L甲酸铵体系黏度较大,柱压较高;乙腈-醋酸钠缓冲液体系下峰形稍显拖尾。最终,选定乙腈-0.01 mol/L磷酸二氢钾缓冲液(磷酸调pH至2.5)体系,该酸性条件有效抑制了曲匹地尔及其杂质中碱性基团的电离,使主峰与杂质峰均获得对称峰形和适中保留时间。在此条件下,曲匹地尔理论板数大于18 000,各降解产物及辅料峰与主峰分离度良好,满足了高效分离与快速分析的双重需求。

3.3 已知杂质控制及其在制剂质控中的意义

杂质A与杂质B是曲匹地尔合成工艺中可能引入的关键中间体或降解产物,已被多国标准(如英国药典、欧洲药典及我国的国家药品标准)收载为特定杂质。本研究中的强制降解试验证实,二者是曲匹地尔在酸、碱、热、氧化等强制破坏条件下的主要降解产物,尤其是在碱性条件下,杂质B的生成尤为显著。提示在制剂的生产、储存及使用过程中,需严格避免碱性环境,以控制该杂质的生成。因此,在质量标准中对相应杂质进行监控,不仅是法规符合性的要求,更是评估药品稳定性和预测其货架期的关键指标。本研究中将曲匹地尔与杂质A、杂质B的混合溶液用于系统适用性试验,结果显示,所建含量测定方法即使在制剂中有杂质共存时也具备高度的专属性,从而将杂质控制理念直接嵌入到日常含量检测的质控环节中,提升了质控效率。

3.4 本研究的局限性

本研究的方法验证主要基于实验室配制的样品和有限的批次,其在监测长期稳定性试验中大批量、多时间点样品时的长期表现,有待更多、更全面的数据进一步验证。

3.5 展望

基于本含量测定方法已建立的稳定基础,后续研究可向以下更具衔接性的方向深入:第一,应用拓展。可将本方法直接应用于加速稳定性试验和长期稳定性试验中,系统考察曲匹地尔片在贮藏过程中主成分含量的变化规律,为有效期的科学制订提供关键数据。第二,方法转化与普适性验证。可在不同生产厂家的多个批次产品中应用该方法,以验证其跨品牌、跨批次的普适性。第三,可将该方法应用于不同厂家或不同批次的曲匹地尔片,考察其普适性,并探索建立更快速的溶出度检测方法的可能性。

参考文献

- [1] 闫凯. 曲匹地尔的结构确证及质量控制[D]. 石家庄:河北医科大学,2008.
- [2] 李虔楨,陈良万. 曲匹地尔的药理作用及机制[J]. 中国实用医药,2007,2(3):111-114.
- [3] 伍前发,张宜青,林青. 冠状动脉介入治疗后血管再狭窄的药物防治进展[J]. 武警医学院学报,2010,19(9):753-756.
- [4] TERRES W, MEINERTZ T. New aspects in antithrombotic therapy - platelet inhibitors[J]. Herz,1996,21(1):1-11.
- [5] MEINERTZ T, LEHMACHER W. Trapidil is as effective as isosorbide - dinitrate for treating stable angina pectoris: a multinational, multicenter, double-blind, randomized study[J]. Clin Res Cardiol,2006,95(4):217-223.
- [6] GALASSI AR, TAMBURINO C, NICOSIA A, et al. A randomized comparison of trapidil (triazolopyrimidine), a platelet-derived growth factor antagonist, versus aspirin in