

HPLC 法测定水杨酸原料药的有关物质

黄洁 李锋武 刘鹏鸣 范菲 单敏

(西安市食品药品检验所, 西安 710054)

摘要 目的: 建立 RP-HPLC 法测定水杨酸原料药的有关物质。方法: 采用 Phenomenex Luna C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 流动相为甲醇-水-冰醋酸(60:40:1) 流速 1.0 mL · min⁻¹ 检测波长 270 nm。结果: 水杨酸与 4-羟基苯甲酸、4-羟基间苯二甲酸和苯酚分离度良好, 3 种杂质在 0.958 ~ 19.16 μg · mL⁻¹、0.4912 ~ 9.824 μg · mL⁻¹、0.214 ~ 4.28 μg · mL⁻¹ 之间线性关系良好, 检测限分别为 0.025 μg · mL⁻¹、0.025 μg · mL⁻¹、0.04 μg · mL⁻¹。结论: 本方法简便、准确, 专属性好, 灵敏度高, 可作为水杨酸原料药有关物质的检查方法。

关键词: 高效液相色谱法; 水杨酸; 有关物质; 杂质检测; 羟基苯甲酸; 羟基间苯二甲酸; 苯酚

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)11-2182-03

HPLC determination of related substances of salicylic acid

HUANG Jie, LI Feng-wu, LIU Peng-ming, FAN Fei, SHAN Min

(Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710054, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for determination of related substances of salicylic acid. **Methods:** Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was adopted with methanol-water-acetic acid (60:40:1) as mobile phase at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, detection was set at 270 nm. **Results:** Good separation of salicylic acid and other substance could be achieved. Three kinds of material and linear relationship was good. The detection limits were 0.025 μg · mL⁻¹, 0.025 μg · mL⁻¹ and 0.04 μg · mL⁻¹. **Conclusion:** This method is simple, sensitive, selective and repetitive, accurate for analysis of related substances of salicylic acid.

Key words: HPLC; salicylic acid; related substances; impurity test; hydroxybenzoic acid; hydroxyisophthalic acid; phenol

水杨酸具有溶解皮肤角质等作用, 广泛用于治疗手足癣、体癣等症的抗真菌外用制剂中^[1]。水杨酸系由苯酚合成, 合成主要利用了苯环的亲电取代反应, 在合成水杨酸的同时也产生了其它杂质, 主要有 4-羟基苯甲酸、4-羟基间苯二甲酸以及没有完全反应的苯酚。《中国药典》2005 年版仅对水杨酸中的苯酚进行了限度检查, 未考虑其它杂质, 本文参考文献^[2]建立了高效液相色谱法测定水杨酸中有关物质的方法, 该方法操作简单, 灵敏度高, 可以很好的控制水杨酸的质量。

1 仪器与试剂

戴安 ULTIMATE U-3000 型 HPLC; 普析通用 TU-1901 紫外可见分光光度计。

4-羟基苯甲酸(国药集团化学试剂有限公司, 经面积归一化法含量为 99.97%)、4-羟基间苯二

甲酸(东京化成工业株式会社, 经面积归一化法含量为 99.49%)、苯酚(天津市登峰化学试剂厂, 经面积归一化法含量为 99.89%); 水杨酸(华阴市锦前程药业有限公司, 批号: Y0808037、Y0808038、Y0808039) 甲醇、乙腈(色谱纯, Merck 公司), 水为三蒸水(自制), 其他试剂均为分析纯。

2 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Luna C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-冰醋酸(60:40:1); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 270 nm。

对照品储备液: 精密称取 4-羟基苯甲酸、4-羟基间苯二甲酸、苯酚适量, 用流动相溶解并稀释成浓度分别为 19.16 μg · mL⁻¹、9.824 μg · mL⁻¹、4.28 μg · mL⁻¹ 的储备溶液。

3 系统适用性与专属性试验

3.1 线性关系考察 分别吸取对照品储备溶液 1, 2.5, 5, 10 mL 置 20 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 分别精密吸取 20 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以峰面积为纵坐标, 以进样量为横坐标, 计算标准曲线, 结果见表 1。

表 1 线性范围测定结果

Tab 1 The determination result of linear rang

组分 (component)	回归方程 (regression equation)	r
4-羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid)	$Y = 34795.72X + 484.30$	0.9999
4-羟基间苯二甲酸 (4-hydroxyisophthalic acid)	$Y = 17999.01X - 535.04$	0.9999
苯酚(phenol)	$Y = 9752.3X + 398.45$	0.9999

从上表可以看出 4-羟基苯甲酸、4-羟基间苯二甲酸与苯酚分别在 0.958 ~ 19.16 μ g \cdot mL⁻¹、0.4912 ~ 9.824 μ g \cdot mL⁻¹、0.214 ~ 4.28 μ g \cdot mL⁻¹ 之间线性关系良好。

3.2 精密度试验 取同一对照品溶液, 重复进样 5 次, 3 种组分的 RSD% 分别为 0.19%、0.70% 和 0.56%, 说明该方法精密度良好。

3.3 稳定性试验 取样品测定项下溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 进样, 测定结果水杨酸和 3 种杂质的 RSD% 分别为 0.73%、0.94%、1.40% 和 0.29%。证明样品至少在 12h 内保持稳定。

3.4 检测限和定量限 分别取 4-羟基苯甲酸、4-羟基间苯二甲酸及苯酚的对照品溶液, 逐级稀释进样, 当信噪比为 3 时, 求得检测限分别为 0.025 μ g \cdot mL⁻¹、0.025 μ g \cdot mL⁻¹ 和 0.04 μ g \cdot mL⁻¹, 当信噪比为 10 时, 定量限分别为 0.08 μ g \cdot mL⁻¹、0.07 μ g \cdot mL⁻¹ 和 0.125 μ g \cdot mL⁻¹。

3.5 破坏试验 取本品溶液 5 份, 分别进行光照破坏(4000LX, 48 h)、氧化破坏(加 10% H₂O₂ 溶液 1 mL, 室温放置 1 h)、碱破坏(加 1 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL, 室温放置 1 h, 加 1 mol \cdot L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL 中和)、酸破坏(加 1 mol \cdot L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL, 室温放置 1 h, 加 1 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL 中和)、高温(105 $^{\circ}$ C 干燥 6 h), 进样分析, 记录色谱图, 结果表明: 在选定的色谱条件下, 降解产物峰与主峰分离度均符合要求。从结果得知, 水杨酸在强碱、氧化、光照环境下均不稳定, 在酸中及高温情况下比较稳定。结果见图 1。

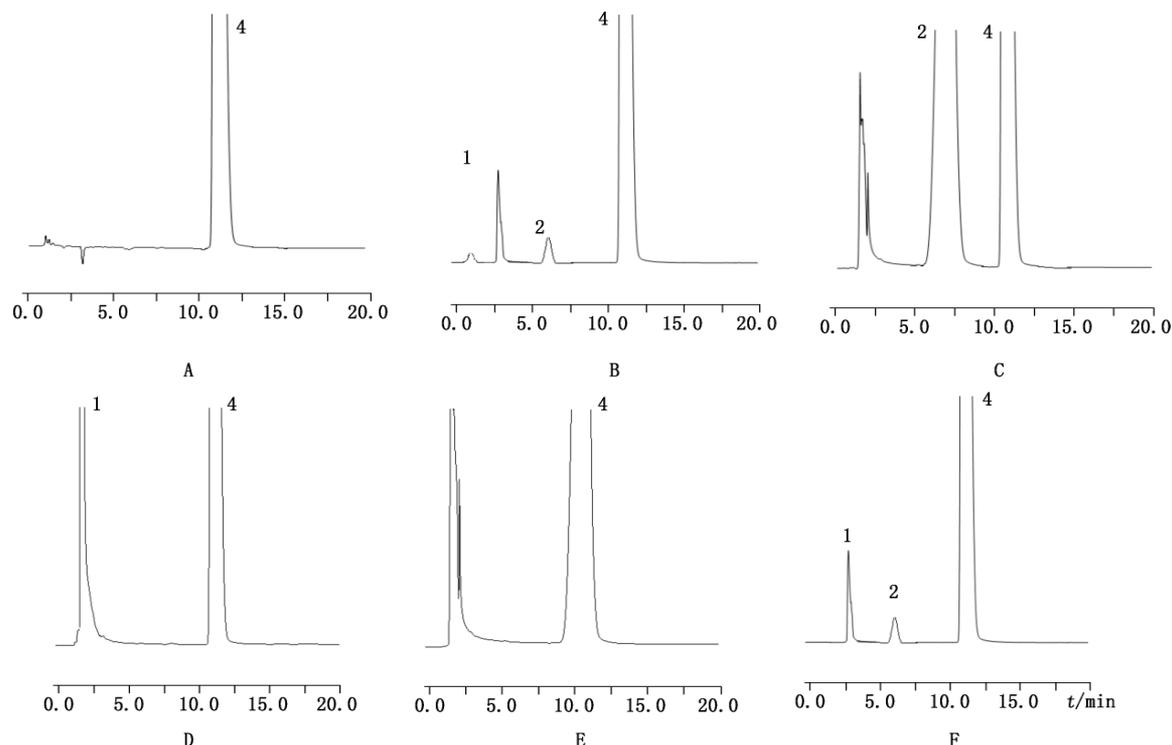


图 1 水杨酸破坏试验色谱图

Fig 1 Chromatograms of destroyed products separation

A 未破坏(standard) B 酸破坏(destroyed by acid) C 碱破坏(destroyed by alkali) D 氧化破坏(destroyed by oxidation) E 光照破坏(destroyed by light radiation) F 高温破坏(destroyed by heat)

1. 4-羟基苯甲酸(4-hydroxybenzoic acid) 2. 4-羟基间苯二甲酸(4-hydroxyisophthalic acid) 3. 苯酚(phenol) 4. 水杨酸(salicylic acid)

3.6 样品测定 称取样品 0.5 g,置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,照上述方法测定,测定结果见表 2。

表 2 水杨酸有关物质检查结果(%)

Tab 2 The determination result of related substances of salicylic acid

批号 (Lot No)	4-羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid)	苯酚 (phenol)	4-羟基间苯二甲酸 (4-hydroxyisophthalic acid)	其它杂质 (othersubstance)	总杂质 (total substance)
Y0808037	0.012	未检出	0.002	未检出	0.014
Y0808038	0.013	未检出	0.002	未检出	0.015
Y0808039	0.010	未检出	0.002	未检出	0.012

限度:参照国外药典,结合实验结果,水杨酸中杂质限度定为:含苯酚不得过 0.02%,含 4-羟基间苯二甲酸不得过 0.05%,含 4-羟基苯甲酸不得过 0.1%,含其它任意杂质不得过 0.05%,杂质总量不得过 0.2%。

4 讨论

4.1 试验设计了 3 个不同比例,分别为(62:38:1)、

(60:40:1)和(58:42:1),结果发现流动相在上述情况下,主峰与各杂质分离度均大于 5,各杂质分离度符合要求,主峰理论塔板数均大于 5000。

4.2 试验分别采用了 DIONEX ACCLAIM120 - C₁₈、Phenomenex Luna - C₁₈和 Agilent Extend - C₁₈ 3 种色谱柱,主峰与各杂质分离度均大于 5,各杂质分离度符合要求,主峰理论塔板数均大于 5000。

4.3 《中国药典》2005 年版中关于水杨酸有关物质检查中只涉及到苯酚的限度检查^[2],根据实验结果,随着工艺的改进,苯酚并不是水杨酸中主要的杂质,本方法的建立,能进一步控制水杨酸的质量。

参考文献

- 1 YANG Mei(杨媚),YU Hong(于泓),LI Ping(李萍) *et al.* IEC determination of salicylic acid and benzoic acid in medicine(药品中水杨酸和苯甲酸的离子排斥色谱分析). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2010, 30(8): 1454
- 2 USP(美国药典). Vol 33(33 版)
- 3 ChP(中国药典). 2005. Vol II(二部): 64

(本文于 2010 年 11 月 21 日收到)

《中国药材标准名录》已出版

科学出版社于 2011 年 4 月出版了由中国食品药品检定研究院林瑞超教授主编的《中国药材标准名录》,该书是在国家药监局的大力支持和全国各省、自治区、直辖市药检所积极配合下,从 2004 年开始,收集整理历版药典、部颁标准、地方标准等大量资料,历时 6 年,进行了细致归纳整理,编写了权威、实用的中药材标准检索专业工具书。该书共收录了 4700 余种药材,涉及 530 个科,内容涵盖药材名、科名、拉丁科名、类别(动物、植物或矿物)原动植物中文名、原动植物拉丁学名、药用部位及出处等;本书科学性强、编写简明、内容实用,是企业、医院、中医药科技工作者必备的、权威的药材标准检索专业工具书。

当当网、卓越网、新华书店及医学书店有售。定价 298.00 元。

邮购联系人:温晓萍;电话:010-64034601,64019031;地址:100717 北京市东黄城根北街 16 号 科学出版社 温晓萍(请在汇款附言注明您购书的书名、册数、联系电话、是否要发票等)。