

RP-HPLC 法测定羟苯苄酯有关物质的含量

赵 恂, 邵方娴, 袁耀佐*, 张 玫, 谭 力

(江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210008)

摘 要 为了建立用于分析羟苯苄酯有关物质的 RP-HPLC 方法, 分离条件为: Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 色谱柱, 以甲醇-1% 冰醋酸为流动相梯度洗脱, 检测波长为 254 nm, 对其方法学进行了研究。结果显示, 羟苯苄酯和对羟基苯甲酸的质量浓度分别在 0.051~101.88 $\mu\text{g/mL}$ ($r=1.00$) 和 0.050~99.48 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9998$) 范围内与峰面积呈良好线性关系, 对羟基苯甲酸的平均加样回收率(%) 为 100.3, RSD(%) 为 0.95, 对羟基苯甲酸定量限为 0.24 ng。研究中还采用 UPLC-Q-TOF 对检出杂质结构进行了推测与鉴定。该研究为羟苯苄酯质量控制提供了理论依据。

关键词 羟苯苄酯; 有关物质; 对羟基苯甲酸; HPLC

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2017)03-0317-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170311

引用本文 赵恂, 邵方娴, 袁耀佐, 等. RP-HPLC 法测定羟苯苄酯有关物质的含量[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(3): 317-321.

Cite this article as: ZHAO Xun, SHAO Fangxian, YUAN Yaozuo, et al. Determination of the related substances of benzyl hydroxybenzoate by RP-HPLC[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(3): 317-321.

Determination of the related substances of benzyl hydroxybenzoate by RP-HPLC

ZHAO Xun, SHAO Fangxian, YUAN Yaozuo*, ZHANG Mei, TAN Li

Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China

Abstract An RP-HPLC method was established to separate the related substances of benzyl hydroxybenzoate. The separation was carried out on a Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl column. The mobile phase was methanol-0.1% glacial acetic acid, using linear gradient elution, and the detection wavelength was 254 nm. There was a good linear relationship between 0.051-101.88 $\mu\text{g/mL}$ ($r=1.00$) and 0.050-99.48 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9998$) for benzyl hydroxybenzoate and *p*-hydroxybenzoic acid, respectively. The average recovery of *p*-hydroxybenzoic acid was 100.3% and the RSD was 0.95%. The LOQ of *p*-hydroxybenzoic acid was 0.24 ng. The detected impurities were also identified by UPLC-Q-TOF. The established method is accurate and reproducible, and could be used for the quality control of benzyl hydroxybenzoate.

Key words benzyl hydroxybenzoate; related substances; *p*-hydroxybenzoic acid; HPLC

羟苯苄酯(benzyl hydroxybenzoate, benzylparaben, 图1), 也称对羟基苯甲酸苄酯, 可作为防腐剂或香料等被广泛应用于医药、化妆品及食品等领域^[1]。《英国药典》2015年版(BP2015)^[2]和《国际药典》2015年版(Ph. Int. 2015)^[3]及《中华人民共和国药典》2015年版(ChP. 2015)收录了羟苯苄酯的质量标准, 其中 ChP. 2015 关于羟苯苄酯的标准起草工作由本课题组承担。

标准起草过程中进行文献检索时发现, 该品种在 2011 年版的《国际药典》中未有羟苯苄酯有关物质检查项, 在 BP2015 中有关物质采用的是 TLC 法, 为半定量方法。为此, 本课题组建立了专属性好、灵敏度高、操作简便的用于羟苯苄酯的有关物质测定的 HPLC 方法, 可以有效区分不同来源羟苯苄酯的质量, 研究过程还采用 UPLC-Q-TOF 对检出的主要杂质进行了结构推定, 并对检出主要杂质的相对校

正因子进行了测定。目前,本研究所建立的方法已经被《中华人民共和国药典》2015 版四部采用。

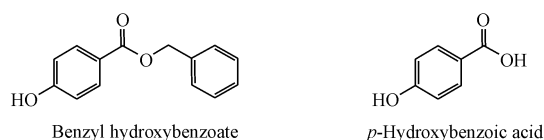


Figure 1 Chemical structures of benzyl hydroxybenzoate and *p*-hydroxybenzoic acid

1 材料

1.1 药品与试剂

甲醇为色谱纯(美国 Tedia 公司),其他试剂均为分析纯,水为经 0.22 μm 滤膜滤过的去离子水。羟苯苄酯对照品、对羟基苯甲酸对照品(加拿大 Toronto Research Chemicals 公司)、羟苯苄酯样品分别由国内 A 公司、国内 B 公司和美国 Sigma-Aldrich 公司提供。

1.2 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(包括 DAD 检测器, EZ Chrom 数据处理软件, 美国安捷伦科技有限公司); Waters 2695 高效液相色谱仪(包括 Waters 2996 检测器, Empower 数据处理软件)[美国沃特世科技(上海)有限公司]; UPLC-Q-TOF(包括 Agilent 1290 Infinity, 布鲁克 MAXIS Impact)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为苯基柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 和 Waters XBridgeTM Phenyl (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)。流动相: 甲醇-1% 冰醋酸, 梯度洗脱: 0 ~ 17 min, 甲醇 60%, 17 ~ 40 min, 甲醇 60% \rightarrow 100%, 40 ~ 45 min, 甲醇 100%, 46 ~ 52 min, 甲醇 100%。检测波长: 254 nm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL 。

2.2 质谱条件

离子源为 ESI 源; 离子源温度: 180 $^{\circ}\text{C}$; 毛细管电压: 3 800 V; 雾化室压力: 0.15 MPa; 干燥气流速: 4.0 L/min; 离子扫描范围: 50 ~ 600 m/z ; 正离子方式检测。

2.3 系统适用性试验

取羟苯丁酯与羟苯苄酯对照品, 加溶剂溶解并

稀释制成每毫升各含 10 μg 的溶液, 作为系统适用性溶液, 取系统适用性溶液 20 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 羟苯丁酯与羟苯苄酯峰之间的分离度应大于 3.0。

2.4 样品有关物质检查

精密称取羟苯苄酯适量, 用溶剂[甲醇-1% 冰醋酸(60:40)]溶解并定量稀释制成每毫升含羟苯苄酯 1.0 mg 的溶液, 作为有关物质测定用供试品溶液, 精密量取该溶液适量, 用溶剂稀释制成每毫升含羟苯苄酯 0.01 mg 的溶液作为对照溶液。取对羟基苯甲酸对照品适量, 加溶剂溶解并制成每毫升含对羟基苯甲酸 10 μg 的溶液, 作为杂质对照品溶液。取对照溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 调节检测灵敏度, 使主成分峰的峰高约为满量程的 20%, 再精密量取供试品溶液、对照溶液和杂质对照品溶液各 20 μL , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 供试品溶液色谱图中如有与对羟基苯甲酸峰保留时间一致的峰, 按外标法以峰面积计算, 其他杂质峰面积按不加校正因子的自身对照外标法计算。

3 结果

3.1 方法专属性

取羟苯苄酯经酸(1 mol/L 盐酸溶液, 80 $^{\circ}\text{C}$, 3 h)、碱(1 mol/L 氢氧化钠溶液, 20 min)、光照(4 500 lx, 24 h)、氧化(双氧水溶液)和高温(80 $^{\circ}\text{C}$, 12 h)等破坏试验。结果(图 2)表明, 经酸、碱破坏后, 羟苯苄酯产生主要杂质为对羟基苯甲酸, 而高温、氧化和光破坏后, 产生杂质很少。优化后的色谱条件能使主成分、主要有关物质与相邻杂质有效分离。

3.2 线性范围

精密称取羟苯苄酯和对羟基苯甲酸对照品各适量, 加溶剂溶解并定量稀释制成含羟苯苄酯 0.051 ~ 101.88 $\mu\text{g/mL}$ 的 11 个浓度的溶液, 含对羟基苯甲酸 0.050 ~ 99.48 $\mu\text{g/mL}$ 的 11 个浓度的溶液, 照“2.1”项下的色谱条件, 进行测定。以进样浓度(c , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标, 峰面积(A)为纵坐标, 进行线性回归, 得羟苯苄酯与对羟基苯甲酸的回归方程和相关系数(表 1)。结果表明, 羟苯苄酯与对羟基苯甲酸在上述浓度范围内线性关系良好。

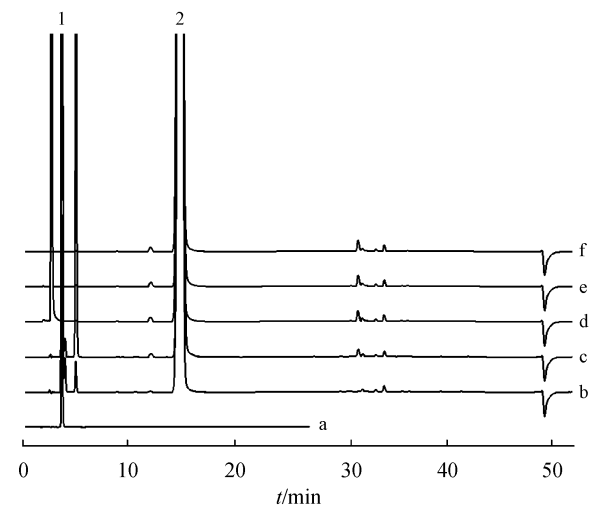


Figure 2 HPLC chromatograms of benzyl hydroxybenzoate and its stress tests solutions
a: *p*-Hydroxybenzoic acid; b: Alkaline hydrolysis; c: Acid hydrolysis; d: Oxidative degradation; e: UV degradation; f: Thermo degradation
1: *p*-Hydroxybenzoic acid; 2: Benzyl hydroxybenzoate

3.3 检测限和定量限

取“3.2”项下的对照品溶液逐级定量稀释,进样并记录色谱图,按信噪比分别为 10 和 3 计算定

Table 1 Standard curves, LOQ and LOD of benzyl hydroxybenzoate and *p*-hydroxybenzoic acid (*n* = 11)

Component	Linear equation	<i>r</i>	Range/(μg/mL)	LOQ/ng	LOD/ng
Benzyl hydroxybenzoate	$A = 182\ 857c + 2\ 194.9$	1.00	0.051-101.88	1.04	0.35
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	$A = 256\ 986c + 55\ 168.8$	0.999 8	0.050-99.48	0.24	0.08

3.5 对羟基苯甲酸的加样回收率

有关物质测定中,对羟基苯甲酸采用的是外标法进行定量,因此对其进行了加样回收率的考察。分别取对羟基苯甲酸适量(80%,100%,120%限度),加入已知对羟基苯甲酸量的羟苯苄酯样品中,按外标法进行计算,加样回收率结果为 100.3%,RSD=0.95% (*n* = 9)。

3.6 耐用性考察

通过调节柱温、流速和流动相比比例,考察羟苯苄酯与可能的杂质峰之间的分离度及主峰的拖尾因子的变化情况,拖尾因子均小于 2.0。尝试了 3 种含有苯基的色谱柱,其中两种是苯基-己基填料(Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 与 Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl),另一种是苯基填料(Waters XBridge™ Phenyl),以系统适用性溶液对各色谱柱上羟苯丁酯与羟苯苄酯之间分离度进行考察,分离度依次为 6.7,6.9 和 4.2,结果显示各种色谱柱上各个峰之间的分离度均大于 4.0,可

量限与检测限,羟苯苄酯和对羟基苯甲酸的定量限与检测限结果见表 1。

3.4 方法精密度

精密量取“2.4”项下的对照品溶液 20 μL,连续进样 6 次,记录色谱图,以峰面积计算 RSD,考察进样精密度。羟苯苄酯和对羟基苯甲酸的 RSD (*n* = 6)分别为 0.05% 和 0.04%。

精密称取羟苯苄酯适量,共 6 份,考察重复性,按照“2.4”项下配制有关物质测定样品,按“2.1”项下进行检测,按外标法以峰面积计算,对羟基苯甲酸的量为 0.008%,RSD% 为 2.13% (*n* = 6);总杂质量按自身对照法计算,为 0.42%,RSD 为 0.91%。

精密称取羟苯苄酯适量,考察中间精密度。按照“2.4”项下配制样品,于不同人在另一色谱仪上按“2.1”项下条件测定,每天每台仪器每个人测定两份样品,共 3 d,合并计算 12 份数据,按外标法以峰面积计算,对羟基苯甲酸的量为 0.008%,RSD (%) 为 11.6 (*n* = 6);总杂质量按自身对照法计算,为 0.41%,RSD 为 4.9%。

见方法耐用性良好。

3.7 样品有关物质检查结果

对 3 批羟苯苄酯样品进行有关物质检查,采用外标法对对羟基苯甲酸的量,以及采用不加校正因子的主成分自身对照法对最大杂质和总杂质的量进行计算,结果显示,不同生产厂家的羟苯苄酯有关物质差异较大(表 2),国内厂家生产的羟苯苄酯含有较高的对羟基苯甲酸,而国外公司羟苯苄酯的对羟基苯甲酸量则很低。总体而言,国内厂家生产的羟苯苄酯样品中,其有关物质的量均高于国外公司产品。

Table 2 Related substances of benyl hydroxybenzoate sample from different producer

Source	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid/%	Maximum impurity/%	Sum of impurities/%
Company A	2.953	0.440	0.872
Company B	3.108	0.443	0.901
Sigma-Aldrich	0.009	0.142	0.447

3.8 部分杂质的结构推定

在研究中发现,Sigma-Aldrich 公司和国内公司提供的羟苯苄酯样品的杂质不同(图 3),本研究采用 UPLC-Q-TOF 研究其杂质结构。羟苯苄酯在正离子模式下,准分子离子峰 $[M + Na]^+$ 为 m/z 251.069 2 和 $[M + H]^+$ 为 m/z 229.086 3。在 Sigma-Aldrich 公司提供的羟苯苄酯中,主要的杂质($t_R \approx 13.3$ min)的准分子离子峰为 m/z 237.052 7 和 m/z 215.070 7,与羟苯苄酯的 $[M + Na]^+$ 、 $[M + H]^+$ 均相差 14,推测是与羟苯苄酯相差一个 CH_2 的同系物。

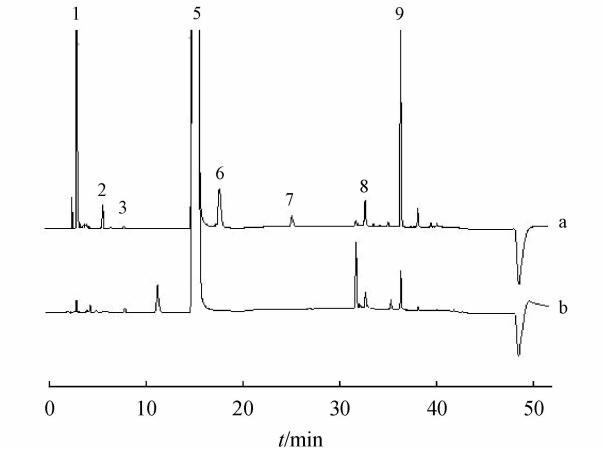


Figure 3 Chromatogram of relative substance of benzyl hydroxybenzoate sample from different producer
a: Company A, b: Sigma-Aldrich. 1: *p*-Hydroxybenzoic acid; 3: Propylparaben; 5: Benzyl hydroxybenzoate

Table 3 Related substances in benzyl hydroxbenzoate sample from Company A identified by UPLC-Q-TOF

Peak	Name	t_R /min	Predicted value $[M + H]^+ (m/z)$	Measured value $[M + H]^+ (m/z)$	Diff($\times 10^{-6}$)
1	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	3.0	139.039 0 $[M + H]^+$	139.039 5	-4.0
5	Benzyl hydroxybenzoate	15.1	229.085 9 $[M + H]^+$ 251.067 9 $[M + Na]^+$	229.086 3 251.069 2	-2.0 -5.5
6	Isomer of benzyl hydroxybenzoate	17.7	251.067 9 $[M + Na]^+$ 229.085 9 $[M + H]^+$	251.061 3 229.079 6	26.1 27.8

4 讨 论

4.1 色谱条件的选择

4.1.1 色谱柱类型的选择 考虑到色谱柱类型对羟苯苄酯检出的影响,以对羟基苯甲酸、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯、羟苯丁酯和羟苯苄酯之间的分离度为指标,分别考察了不同类型的色谱柱及多种组成和比例的流动相,实验结果显示,在其他条件相同的情况下,首先考察了 C_{18} 柱,发现不同品牌

在公司 A 提供的羟苯苄酯样品中(图 4,表 3),1 号杂质的 m/z 为 139.039 5,预测分子式为 $C_7H_7O_3$,经对照品验证为对羟基苯甲酸;6 号杂质准分子离子峰 m/z 251.061 3 和 m/z 229.079 6,和主峰基本一致,推测为其同分异构体。原来色谱图中出现的羟苯丙酯因量太低在质谱中未有检出,其余 2 号、4 号、7 号、8 号和 9 号杂质峰的 m/z 分别为 147.038 4、372.280 6、448.311 7、341.107 1 和 341.108 4 的结构仍需进一步研究。

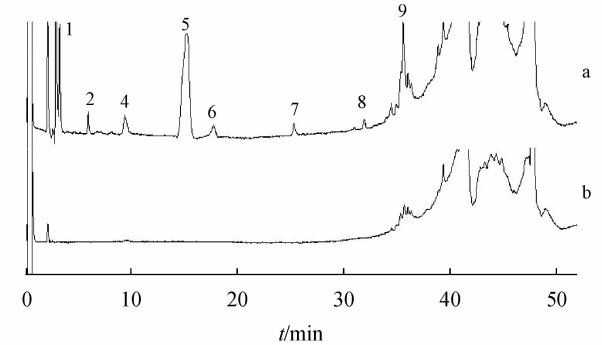


Figure 4 TIC in benzyl hydroxybenzoate by LC-ESI⁺-MS
a: Sample from company A; b: Blank. 1: *p*-Hydroxybenzoic acid; 5: Benzyl hydroxybenzoate

色谱柱下,羟苯丁酯与羟苯苄酯的分离度不一致,有的可以达到 2.9,有的则分不开。于是又考察了苯基柱,发现两者在所考察的 3 种苯基柱下均有很好的分离,且分离度均好于 C_{18} 柱,因此选用了苯基己基柱。
4.1.2 洗脱方式的选择 优化后期发现,样品在 60 min 以后有强保留的成分存在,于是羟苯苄酯出峰后,加上了梯度,将强保留的成分洗脱出。在优化后的流动相条件下,对羟基苯甲酸、羟苯甲酯、羟

苯乙酯、羟苯丙酯、羟苯丁酯和羟苯苄酯均达到明显的基线分离。考虑到标准操作的实用性,仅将最难分离的羟苯丁酯与羟苯苄酯的分离订入系统适用性溶液。

4.1.3 检测波长的选择 BP 在羟苯酯类抑菌剂上采用的检测波长是 272 nm,经过对比,发现在 254 nm 波长处能检出更过量的杂质,且 254 nm 波长下基线更为平稳,而且羟苯苄酯的最大吸收波长也更接近 254 nm,因此选在 254 nm 作为检测波长。

4.1.4 供试品溶液浓度的确定 参考了《中华人民共和国药典》2010 年版中羟苯酯类防腐剂有关物质项下的浓度,采用了 1 mg/mL 作为本品有关物质的供试品浓度。

4.2 对羟基苯甲酸校正因子测定

在研究中发现,国内生产的羟苯苄酯中对羟基

苯甲酸量较高。为了对它准确控制,除了采用外标法外,还对对羟基苯甲酸的校正因子进行了测定,以便在没有对照品的时候可以用加校正因子的自身对照法对它进行控制。

分别配制对羟基苯甲酸和羟苯苄酯 0.05 ~ 100 μg/mL 的对照品溶液,采用不同色谱柱和不同仪器(Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl 柱和 Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl 柱,安捷伦 1260 高效液相色谱仪和 Waters 2695 高效液相色谱仪),按照“2.1”项下条件进样,以各溶液浓度(*c*)为横坐标,峰面积(*A*)为纵坐标,分别测定对羟基苯甲酸和羟苯苄酯的线性方程及回归系数 *r*,以羟苯苄酯和对羟基苯甲酸线性方程的斜率计算校正因子 *f*,结果见表 4。采用外标法和加校正因子的主成分自身对照法计算对羟基苯甲酸的结果显示两种算法结果基本一致。

Table 4 Determination results of the correction factor of *p*-hydroxybenzoic acid

Peak	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid		Benzyl hydroxybenzoate		<i>f</i>	\bar{f}
	Slope	<i>r</i>	Slope	<i>r</i>		
1	3.959 66 × 10 ⁻⁶	0.999 7	5.474 27 × 10 ⁻⁶	0.999 9	0.723 3	0.719
2	8.192 75 × 10 ⁻⁶	0.999 7	1.136 54 × 10 ⁻⁵	0.999 9	0.720 9	
3	3.890 08 × 10 ⁻⁶	0.999 8	5.468 74 × 10 ⁻⁶	1.000	0.711 3	

4.3 有关物质控制成分及限度的确定

研究结果显示,对羟基苯甲酸的相对校正因子为 0.719,且在国内外的产品中含量差别较大,故采用外标法对其进行控制。除此之外,最大单个杂质和总杂质采用不加校正因子的自身对照法进行计算。BP 中其他羟苯酯类有关物质中对羟基苯甲酸的限度为 0.5%,单个杂质限度为 0.5%,总杂质限度为 1.0%,考虑到对药用辅料从严要求并结合国内羟苯苄酯生产的实际情况,暂要求对羟基苯甲酸不得超过 1.0%,单个杂质不得超过 0.5%,杂质总量不得超过 1.0%。

参 考 文 献

[1] Yang ZX, Zhang AQ, Sun CT, *et al.* Synthesis of benzyl *p*-hydroxybenzoate by ultrasonic phase transfer catalysis [J]. *Chem Propellants Polym Mater*(化学推进剂与高分子材料),2004,2(6):34-36.

[2] The British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia: Volume I* [M]. London: The Stationery Office, 2015: 1268-1269.

[3] World Health Organization. *The International Pharmacopoeia: Volume 1* [M]. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 2006:156-157.