DOI:10.16016/j.1000-5404.201505118

技术方法

# 水杨酸苯酚贴膏中有关物质测定方法及应用

姜爱霞,历 娜 (264210 山东 威海,山东药品食品职业学院经营管理系)

[摘要] **目的** 建立HPLC法测定水杨酸苯酚贴膏中的有关物质。**方法** 采用Agilent Zorbax Eclipse XDB-$C_{18}$色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),以乙腈-2%冰乙酸溶液(20∶80)为流动相,检测波长为270 nm,流速:1.0 mL/min。检测水杨酸苯酚贴膏中4-羟基苯甲酸、4-羟基间苯二甲酸及其他杂质含量。**结果** 样品中各成分的分离度及检出灵敏度能满足有关物质限度的测定要求。4-羟基苯甲酸检测限(s/n=3)为4ng/mL,定量限(s/n=10)为12 ng/mL;4-羟基间苯二甲酸检测限(s/n=3)为13 ng/mL,定量限(s/n=10)为51 ng/mL。**结论** 本方法简便、专属,可用于水杨酸苯酚贴膏中有关物质的测定。

[关键词] 水杨酸苯酚贴膏;有关物质;高效液相色谱法;4-羟基间苯二甲酸;4-羟基苯甲酸
[中图法分类号] R982 [文献标志码] B

水杨酸苯酚贴膏是用于治疗脚部鸡眼的外用药[1]。该药的质量标准收载于《国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准》第10册,原质量标准中无有关物质的测定[2]。水杨酸苯酚贴膏是由水杨酸、苯酚和基质组成[3],其中水杨酸是由苯酚合成,合成过程中主要采用了苯环的亲电取代反应,所以在合成的过程中也产生了其他杂质,主要有4-羟基苯甲酸、4-羟基间苯二甲酸及苯酚[4]。《中国药典》2010版采用HPLC法对水杨酸中的4-羟基苯甲酸、4-羟基间苯二甲酸及苯酚三种杂质进行了测定[5]。为了更好的控制水杨酸苯酚贴膏的质量,通过对水杨酸苯酚贴膏中的有关物质进行系统研究,建立了HPLC法测定有关物质4-羟基苯甲酸、4-羟基间苯二甲酸的方法[6-8],该法简便、专属性好,灵敏度高,可有效控制水杨酸苯酚贴膏的质量。

## 1 仪器与试药

HP1100型高效液相色谱仪、Agilent Zorbax Eclipse XDB-$C_{18}$色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)、UV检测器。水杨酸苯酚贴膏(自制);4-羟基苯甲酸、4-羟基间苯二甲酸(中国药品生物制品检定所);乙腈(天津四友精细化学品有限公司)为色谱纯、水为纯化水,其他试剂为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱为Agilent Zorbax Eclipse XDB-$C_{18}$色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为乙腈-2%冰乙酸溶液(20∶80);检测波长为270 nm;进样量为10 μL;流速为1 mL/min。理论塔板数按4-羟基苯甲酸和4-羟基间苯二甲酸峰计算,均应不低于2 000;RSD≤2.0%;分离度R≥2。

### 2.2 溶液的配制

2.2.1 对照液配制 分别精密称取4-羟基苯甲酸和4-羟基间苯二甲酸适量,加流动相制成每1 mL含4-羟基苯甲酸5 μg和4-羟基间苯二甲酸2.5 μg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试液配制 精密称取样品约0.4 g,置具塞锥形瓶中,精密加入流动相50 mL。称量,微热,振摇,使水杨酸溶解后,放冷至室温,称量,用流动相补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液备用。

### 2.3 专属性考察

2.3.1 对比试验 精密取供试液20 mL,至50 mL容量瓶中,静置6 h,加入适量流动相稀释至刻度,摇匀,备用。

2.3.2 强酸试验 精取供液20 mL,至50 ml容量瓶中,加入5 mol/L的盐酸溶液5 mL,静置6 h,加入适量5 mol/L的氢氧化钠溶液中和,加入适量流动相稀释至刻度,摇匀,备用。

2.3.3 强碱试验 精供试液20 mL,至50 mL容量瓶中,加入5 mol/L的氢氧化钠溶液5 mL,静置6 h,加入适量5 mol/L的盐酸溶液中和,加入适量流动相稀释至刻度,摇匀,备用。

2.3.4 高温试验 精取供试液20 mL,至50 mL容量瓶中,于90 ℃水浴锅中加热6 h,取出,放冷,加入适量流动相稀释至刻度,摇匀,备用。

2.3.5 氧化试验 精取供液20 mL,至50 mL容量瓶中,加入30%的过氧化氢溶液2 mL,静置6 h,加入适量流动相稀释至刻度,摇匀,备用。

分别精密吸取上述5项下供试品溶液各10 μL,

[通信作者] 姜爱霞,E-mail:jaix@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150722.0905.012.html(2015-07-22)

注入液相色谱仪,测定、记录色谱图(图1~5)。可见,本品在强酸、强碱、高温及氧化等各种条件下,水杨酸均有不同程度的降解反应,但是在各种破坏条件下产生的降解产物峰与4-羟基苯甲酸、4-羟基间苯二甲酸、苯酚和水杨酸峰均能达到良好分离。

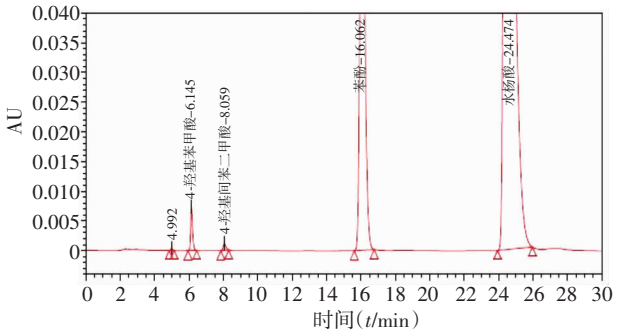



**图1 对比供试品色谱图**

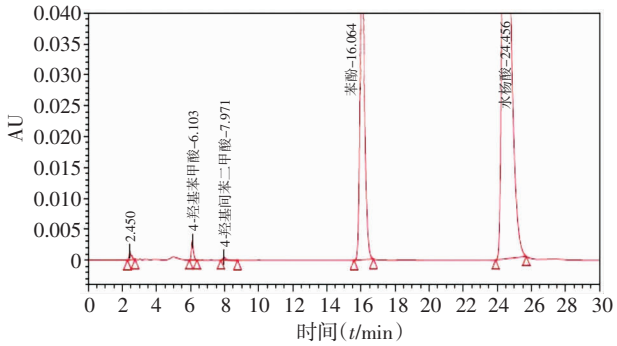



**图2 对比供试品强酸破坏色谱图**

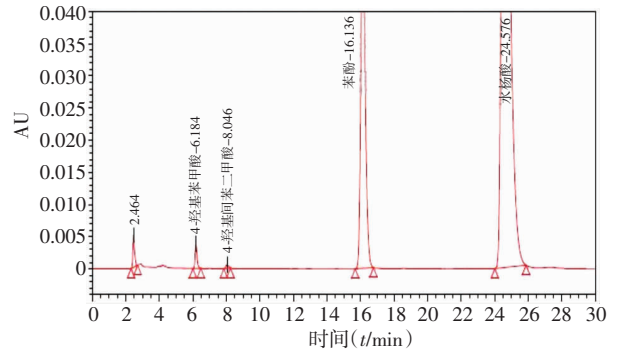



**图3 对比供试品强碱破坏色谱图**

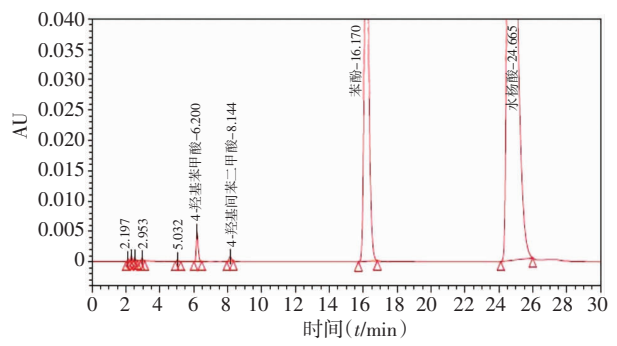



**图4 对比供试品高温破坏色谱图**

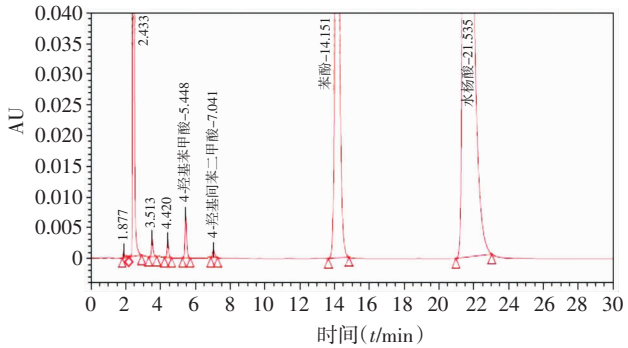



**图5 对比供试品氧化破坏色谱图**

## 2.4 线性试验

分别精密称取4-羟基苯甲酸和4-羟基间苯二甲酸适量,加流动相制成每1 mL含4-羟基苯甲酸10 μg和4-羟基间苯二甲酸5 μg的混合对照品原液A。分别精密量取对照品原液A 1、3、5、7、9 mL,至10 mL量瓶中,加流动相稀释并定容至刻度,制成4-羟基苯甲酸浓度为1、3、5、7、9 μg/mL,4-羟基间苯二甲酸浓度为0.5、1.5、2.5、3.5、4.5 μg/mL的混合液,将上述5份溶液按2.1的色谱条件进行测定,结果见表1、2。

**表1 不同浓度4-羟基苯甲酸对照品峰面积表**

| 序号 | 对照品浓度 μg/mL | 峰面积 |
|---|---|---|
| 1 | 1.20 | 45401 |
| 2 | 3.60 | 134841 |
| 3 | 5.99 | 229524 |
| 4 | 8.39 | 314292 |
| 5 | 10.79 | 410731 |

**表2 不同浓度4-羟基间苯二甲酸对照品峰面积表**

| 序号 | 对照品浓度 μg/mL | 峰面积 |
|---|---|---|
| 1 | 0.55 | 8025 |
| 2 | 1.65 | 23997 |
| 3 | 2.74 | 39318 |
| 4 | 3.84 | 56882 |
| 5 | 4.94 | 72271 |

由上述拟合线性方程表可知,相关系数$R^2$为0.999 6和0.999 7,线性良好。

## 2.5 检测限与定量限

精密量取"2.2.1"的混合对照液1 mL,至100 mL容量瓶中,加流动相稀释至刻度,再依次逐级稀释,分取10 μL进样分析,4-羟基苯甲酸检测限(s/n=3)为4 ng/mL,定量限(s/n=10)为12 ng/mL;4-羟基间苯二甲酸检测限(s/n=3)为13 ng/mL,定量限(s/n=10)为51 ng/mL。

2.6 准确度

2.6.1 对照液制备 分别精密称取4-羟基苯甲酸和4-羟基间苯二甲酸适量,加流动相制成每1 mL含4-羟基苯甲酸25 μg和4-羟基间苯二甲酸12.5 μg的混合对照品原液B。精密吸取1 mL混合对照品原液B至5 mL量瓶,用流动相稀释定容至刻度线,制成每1 mL含4-羟基苯甲酸5 μg和4-羟基间苯二甲酸2.5 μg的混合对照品溶液。

2.6.2 供试液制备方法同"2.2.2"。

2.6.3 回收率溶液制备 取本品约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入混合对照品原液B 5 mL,精密加入流动相45 mL。称重,微热,振摇,使水杨酸溶解后,放冷至室温,称定重量,用流动相补足减失的重量,摇匀,过滤,取续滤液备用,即得。重复上述操作处理6个样品。

2.6.4 测定法 分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液和回收率溶液各10 μL,注入液相色谱仪,测定,测定结果见表3、表4。

**表3 4-羟基苯甲酸回收率**

| 准确性 | 回收率溶液峰面积 | 供试品质量(g) | 对照品峰面积 | 回收率 | RSD |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 135086 | 0.1712 | 230282 | 98.098% | 0.398% |
| 2 | 139131 | 0.1952 | 230282 | 98.916% | |
| 3 | 138320 | 0.1958 | 230282 | 98.144% | |
| 4 | 138435 | 0.1911 | 230282 | 98.771% | |
| 5 | 137472 | 0.1826 | 230282 | 98.888% | |
| 6 | 139795 | 0.2003 | 230282 | 98.919% | |

备注:供试品溶液所称供试品质量:0.4468g;供试品溶液峰面积:57772

**表4 4-羟基间苯二甲酸回收率**

| 准确性 | 回收率溶液峰面积 | 供试品质量(g) | 对照品峰面积 | 回收率 | RSD |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 27463 | 0.1712 | 40897 | 100.448% | 0.680% |
| 2 | 28631 | 0.1952 | 40897 | 101.404% | |
| 3 | 28691 | 0.1958 | 40897 | 101.588% | |
| 4 | 28321 | 0.1911 | 40897 | 100.698% | |
| 5 | 27818 | 0.1826 | 40897 | 99.929% | |
| 6 | 28870 | 0.2003 | 40897 | 101.573% | |

备注:供试品溶液所称供试品质量:0.446 8 g;供试品溶液峰面积:18070

由试验结果可知,6个供试品溶液的回收率均应在98%~102%之间,RSD≤2.0%,回收率良好。

2.7 溶液稳定性

取"2.2.1"项下的样品溶液,每隔3 h进样一次,测定结果如表5。

**表5 溶液稳定性供试品峰面积**

| 时间(h) | 4-羟基苯甲酸 | 4-羟基间苯二甲酸 |
|---|---|---|
| 0 | 60904 | 14363 |
| 3 | 60804 | 14644 |
| 6 | 61713 | 14321 |
| 9 | 61998 | 14302 |
| 12 | 61877 | 14065 |
| 18 | 62530 | 14112 |
| 24 | 62647 | 14423 |
| RSD | 1.16% | 1.36% |

2.8 精密度试验

取"2.2.1"项下的对照品溶液,连续进样6次,按峰面积计算RSD为0.9%,表明该方法精密度良好。

由上述实验结果可知:本检验方法适合进行4-羟基苯甲酸、4-羟基间苯二甲酸的测定。说明本方法能有效检测水杨酸苯酚贴膏有关物质。

2.9 有关物质测定

按"2.2"项下方法配制对照品溶液和供试品溶液,照"2.1"项下色谱条件进行测定,测定结果见表6。

**表6 有关物质的测定(%)**

| 批号 | 4-羟基苯甲酸 | 4-羟基间苯二甲酸 | 其他杂质 | 杂质总和 |
|---|---|---|---|---|
| 140201 | 0.05 | 0.01 | 0.01 | 0.09 |
| 140202 | 0.06 | 0.02 | 0.01 | 0.08 |
| 140203 | 0.05 | 0.03 | 0.02 | 0.11 |

标准限度:供试品溶液的色谱图中如有与对照品溶液中保留时间一致的色谱峰,按外标法以峰面积计算,4-羟基苯甲酸不得过0.1%,4-羟基间苯二甲酸不得过0.05%;其他单个杂质峰面积不得大于对照品溶液中4-羟基间苯二甲酸峰面积(0.05%);各杂质峰面积的和不得大于对照品溶液中4-羟基苯甲酸峰面积的2倍(0.2%)。

## 3 讨论

使用乙腈-冰乙酸系统进行测定,可以有效改善主峰与杂质峰的分离效果,各峰之间的分离度均大于3,主成分峰的n均大于3 000。曾采用乙腈-2%冰乙酸溶液(20∶80)、(40∶60)、(30∶70),最终综合多方因素考虑确定为(20∶80)。

水杨酸苯酚贴膏收载于《部颁标准》第10册,原质量标准中无有关物质的测定[2]。水杨酸苯酚贴膏中杂质的含量应小于0.1%,杂质含量超过0.1%需要做毒理实验。2010版《中国药典》采用HPLC法只对水杨酸原料药中的4-羟基苯甲酸、4-羟基间苯二甲酸及苯酚三种杂质进行了测定[5]。通过上述实验,采用

HPLC法不仅测定了水杨酸苯酚贴膏中4-羟基苯甲酸、4-羟基间苯二甲酸含量，还能够测定水杨酸苯酚贴膏中其他杂质含量，为水杨酸苯酚贴膏制剂中有关杂质的控制提供了有效的检测方法，该法操作简便、专属性好，灵敏度高，可有效控制水杨酸苯酚贴膏质量。

**参考文献：**

[1] 余振喜，张才煜，程奇蕾，等. 水杨酸苯酚贴膏质量标准的研讨[J]. 中国药师，2010，13(10)：1532－1533.
[2] 国家药典委员会. 国家药品标准[S]. 化学药品地方标准上升国家标准，第十册. 2002：58.
[3] 余小平. HPLC法同时测定水杨酸苯酚贴膏中两组分含量[J]. 药品评价，2005，2(2)：128－130.
[4] 蒋忠文，余小平. 水杨酸苯酚贴膏(鸡眼膏)质量状况的调研[J]. 中国药品标准，2006，7(3)：55－56.
[5] 国家药典委员会. 中国药典(2010年版)二部[S]. 北京：化学工业出版社，2010.
[6] 毛桂福. HPLC法测定水杨酸苯酚洗剂中苯酚和水杨酸的含量[J]. 药学实践杂志，2005，23(4)：226－227.
[7] 李兵，钟慧敏. 水杨酸苯酚贴膏含量测定方法的改进[J]. 现代食品与药品杂志，2007，17(1)：49－50.
[8] 张吟，郑兴中，黄慧玲. 反相高效液相色谱法同时测定止痒酊中水杨酸及苯酚含量[J]. 海峡药学，2001，13(2)：30－31.

(收稿：2015-05-22；修回：2015-07-15)
(编辑　邓强庭)

(上接1598页)

染、止血及对症支持治疗，记引流量并观察引流物性质变化，术区于第3天换药，术后5 d拔出引流管。于术后6 d顺利出院。术后1个月复诊，双乳未发现包块，超声未提示材料残留及积液。

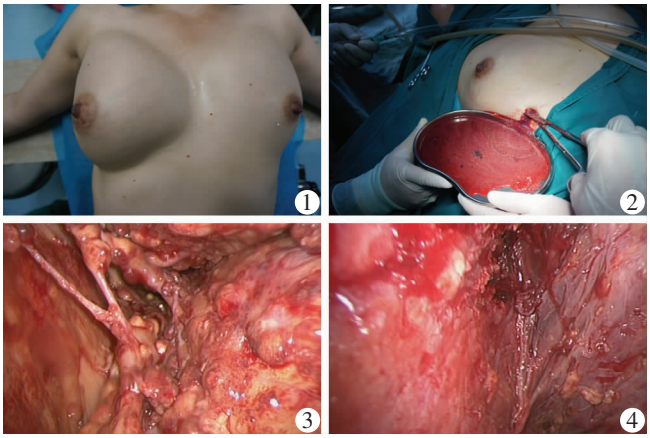


**图1　术前可见右乳明显肿大**

**图2　切口及血性液体混杂隆乳材料及变性组织流出**

**图3　腔镜下可见裸露的血管及肉芽肿**

**图4　VERSAJET° Ⅱ水刀系统清除腔体内壁上的肉芽肿**

## 2　讨论

PAHG隆乳术后远期的并发症较多，虽然临床上早已禁止使用，但是由于其使用期间接受此手术的人群数量不小，更有机构非法继续使用过，所以目前对其并发症的处理仍是整形外科需要面对的一大难题。由于PAHG是注射剂，进入乳房组织内部后位置可能不易固定，目前尚无办法将其完全取净。使用内窥镜进行注射式隆乳材料去除已是比较常见和有效的办法[2-3]，在可视下可以更好、更多的去除材料残留，本病例为出血病例，内镜的优势更加明显，便于我们寻找出血点，做好止血处理。

术中内镜发现裸露血管，可能因组织变性溶解造成，使其失去了组织保护，外力作用下更容易发生破裂，加之周围腔隙疏松，形成血肿的风险较大。患者入院当天13:00查血常规HGB 126 g/L、HCT 37.8%，18:00 HGB 110 g/L、HCT33.9%，提示出血正在进行中，及时有效地补充血容量及精确的手术止血是治疗的关键。传统的内镜手术可以止血，对腔体内的残留材料进行冲洗，搔刮，但是对肉芽肿组织却不易处理。利用VERSAJET° Ⅱ水刀系统对腔体内肉芽肿组织进行类似清创的处理，VERSAJET° Ⅱ水刀系统通过可调性的超音速高速水流原理，起初用于伤口清创(急性和慢性伤口、烧伤)、软组织清创，其对软组织的切割可以做到高效可控(通过水冲击的流速来切割不同组织，包括肌肉腱膜、脂肪、皮肤纤维组织等)，最终形成了良好的内部创基，合并放置多槽的持续负压引流，为Ⅰ期愈合封闭创腔、减少积液提供了有力保障，此方法可供借鉴。

**参考文献：**

[1] 周智，柳大烈，鲁开化，等. 聚丙烯酰胺水凝胶注射隆乳并发症的研究及防治方法分析[J]. 中国实用美容整形外科杂志，2005，16(6)：353－356.
[2] 范林军，姜军，杨新华，等. 腔镜技术在隆乳剂取出术中的应用：附45例报道[J]. 中华乳腺病杂志：电子版，2009，3(6)：600－609.
[3] 朱婧，朱大江，陈双全，等. 微创手术取注射式隆乳剂聚丙烯酰胺水凝胶35例[J]. 分子影像学杂志，2014，37(4)：241－244.

(收稿：2015-04-22；修回：2015-05-20)
(编辑　王小寒)