

RP-HPLC 法测定贝诺酯及其有关物质

晁若冰*, 陈涛**, 丁世致¹

(华西医科大学药学院, 成都 610041; ¹ 成都药业有限责任公司, 成都 610021)

摘要 目的: 为分离并检查贝诺酯及其制剂中的多种微量有机杂质并测定贝诺酯含量。方法: 在 ODS 柱上, 以甲醇-水(56:44, pH 3.5) 为流动相, UV 240 nm 检测。结果: 贝诺酯与对乙酰氨基酚、乙酰扑热息痛、阿司匹林、水杨酸和萨罗酚等 5 种有关物质均可完全分离, 检查了国产贝诺酯及其制剂中的有关物质并测定了贝诺酯的含量。结论: 本法可对以上杂质进行检查并测定贝诺酯的含量。

关键词 贝诺酯; 高效液相色谱法

贝诺酯(benorilate) 是阿司匹林和对乙酰氨基酚所生成的酯, 为常用消炎镇痛药。贝诺酯在生产和贮存过程中产生的杂质主要有对乙酰氨基酚(paracetamol, Par)、乙酰扑热息痛(acetyl paracetamol, AP)、阿司匹林(aspirin, Asp)、水杨酸(salicylic acid, SA) 和萨罗酚(salophen, Sal) 等^[1-3]。中国药典用紫外分光光度法测定贝诺酯及其制剂的含量, 用薄层色谱法检查其中的对乙酰氨基酚和其他有关物质。曾有报道用正相高效液相色谱梯度洗脱的方法检查贝诺酯中的有关物质^[3], 但方法较繁琐。本文建立反相高效液相色谱法同时分离贝诺酯及其中的 5 种有关物质, 国内未见报道。应用所建立的方法检查了国产贝诺酯及其片剂、混悬剂中的有关物质, 并测定了贝诺酯的含量。

实验部分

1 仪器和试剂

日本岛津 LC-6A 液相色谱仪, SPD-6AV 紫外可见检测器, C-R4A 数据处理机, Rheodyne 7725 20 μ L 进样阀。

贝诺酯样品及对乙酰氨基酚、乙酰扑热息痛、阿司匹林和水杨酸对照品由成都药业有限责任公司提供; 贝诺酯对照品由中国药品生物制品检定所提供; 萨罗酚对照品由华法美集团提供。

水为超纯水, 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 含量测定

2.1 色谱条件

由于贝诺酯中有关物质阿司匹林

和水杨酸具酸性, 故宜使用酸性流动相以抑制其离解。经试验后选定的色谱条件为: 日本岛津 Shim-Pack CLC-ODS 柱(150 mm \times 6.0 mm ID), 流动相: 甲醇-水(56:44), 用磷酸调至 pH 3.5, UV 240 nm 检测, 柱温: 35 $^{\circ}$ C, 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹。在选定条件下, 贝诺酯和有关物质可以完全分离(图 1)。混悬剂中的附加剂苯甲酸信号较强, 但和测定组分可以完全分离($t_R = 6.7$ min), 片剂和混悬剂的附加剂均不干扰测定。

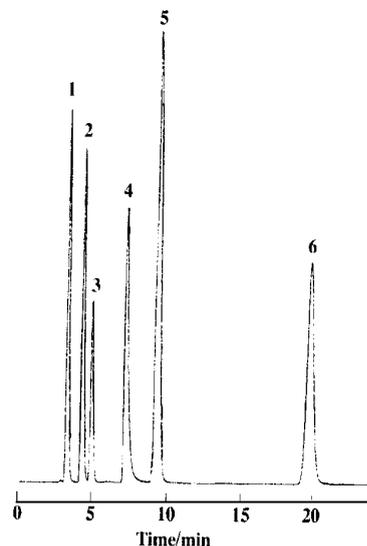


Fig 1 Chromatogram of benorilate and its impurities. 1. Paracetamol ($t_R = 3.2$ min); 2. Acetyl paracetamol ($t_R = 4.3$ min); 3. Aspirin ($t_R = 4.9$ min); 4. Salicylic acid ($t_R = 7.3$ min); 5. Benorilate ($t_R = 9.3$ min); 6. Salophen ($t_R = 19.7$ min).

2.2 试验溶液的配制 经试验, 贝诺酯在混合溶剂(甲醇-四氢呋喃为 4:1) 中的溶解度比在甲醇中大, 所以在含量测定时使用混合溶剂溶解样品。

2.2.1 对照品溶液的制备

收稿日期: 1999-03-11

* Tel: (028) 5501 454, Fax: (028) 5501 454,

E-mail: mailbox@wcu.ms.edu.cn

** 本院 1998 届毕业生

品约 100 mg,精密加入混合溶剂(甲醇—四氢呋喃为 4:1) 50 mL,超声振荡 15 min 使贝诺酯溶解,精密量取 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度。

2.2.2 供试品溶液的制备 贝诺酯原料:精密称取贝诺酯约 100 mg,按对照品溶液的方法制备。

贝诺酯片:取供试品 10 片,精密称定,研细,精密称取适量(约相当于贝诺酯 100 mg),置具塞锥形瓶中,精密加入混合溶剂 50 mL,超声振荡提取 15 min,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度。

贝诺酯混悬剂:取供试品,充分振摇均匀后,精密称取适量(约相当于贝诺酯 100 mg),以下同片剂的方法制备。

2.3 方法的考察

2.3.1 柱效和分离度 按贝诺酯峰计算,测得柱效为 6 300。测得贝诺酯与其相邻杂质水杨酸和萨罗酚的分离度分别为 4.1 和 14.3,贝诺酯与相邻的杂质可完全分离。

2.3.2 精密性 取对照品溶液和混悬剂供试品溶液各 10 μ L,分别于 0,2,4,6,8 h 进样,记录峰面积值,并计算日内精密性,测得对照品溶液和供试品溶液的平均峰面积值分别为 3.640×10^5 和 3.444×10^5 ,RSD 分别为 0.8% 和 0.6%;再分别于 0,2,4,6 d 分别进样 10 μ L,计算日间精密性,测得对照品溶液和供试品溶液的平均峰面积值分别为 3.642×10^5 和 3.465×10^5 ,RSD 分别为 1.2% 和 0.4%。

2.3.3 线性范围 取对照品溶液($0.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2,4,6,8,10 μ L 进样,测定峰面积值,并以峰面积值(A)对进样量(X)回归,得线性方程为:

$$A = 1.297 \times 10^3 + 1.789 \times 10^5 X \quad Y = 1.0000$$

进样量在 0.6 ~ 3.0 μ g 范围内,峰面积和进样量呈良好线性关系。

2.3.4 回收试验 精密称取贝诺酯对照品 60,80,100,120 mg,置 50 mL 量瓶中,按处方比例分别加入片剂、混悬剂辅料,制成模拟制剂,以下按供试品溶液方法制备,得试验溶液。

分别取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L 进样,按外标法计算测得量,并计算回收率,测得片剂的平均回收率为 99.8%,RSD 为 0.6%($n = 12$)。混悬剂的平均回收率为 100.1%,RSD 为 0.8%($n = 12$)。

2.3.5 样品测定 分别取供试品溶液和对照品溶液各 10 μ L 进样,以峰面积按外标法计算含量。贝

诺酯原料:含量 99.8%,RSD 0.4%($n = 4$);片剂:含量 103.5%,RSD 0.6%($n = 3$);混悬剂:含量 100.8%,RSD 0.6%($n = 3$)。

3 有关物质的检查

3.1 色谱条件 同 2 含量测定。

3.2 方法的考察 分离度:测得对乙酰氨基酚和乙酰扑热息痛的分离度为 3.4,乙酰扑热息痛和阿司匹林的分离度 1.9,阿司匹林和水杨酸的分离度为 7.3,水杨酸和贝诺酯的分离度为 4.1,贝诺酯和萨罗酚的分离度为 14.3,以上 6 种组分可完全分离。

检测限:按信噪比为 3:1 计算,测得对乙酰氨基酚、乙酰扑热息痛、阿司匹林、水杨酸和萨罗酚的检测限分别为 0.4,0.4,1.4,1.4 和 1.2 ng。按信噪比为 10:1 计算,测得上述杂质的定量限分别为 1.3,1.4,4.8,4.8 和 3.8 ng。

线性范围:配制混合对照品溶液,使其中 5 种杂质的浓度分别为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,分别取混合对照品溶液 1,2.5,5,7.5,10 μ L 进样,测定峰面积值,以峰面积(A)对进样量(X)回归,各有关物质的线性范围及回归方程为:对乙酰氨基酚 $0.01 \sim 0.1 \mu\text{g}$, $A = 1.357 \times 10^3 + 1.740 \times 10^6 x$, $Y = 0.9996$;乙酰扑热息痛 $0.01 \sim 0.1 \mu\text{g}$, $A = 2.497 \times 10^3 + 1.777 \times 10^6 x$, $Y = 0.9996$;阿司匹林 $0.01 \sim 0.1 \mu\text{g}$, $A = -4.421 \times 10^2 + 5.387 \times 10^5 x$, $Y = 0.9996$;水杨酸 $0.01 \sim 0.1 \mu\text{g}$, $A = 2.583 \times 10^3 + 1.082 \times 10^5 x$, $Y = 0.9998$;萨罗酚 $0.01 \sim 0.1 \mu\text{g}$, $A = 4.568 \times 10^3 + 1.946 \times 10^6 x$, $Y = 0.9993$ 。

相对响应值:取有关物质对照品溶液进样,测定峰面积值,以贝诺酯为标准,按下式计算相对响应值:

$$f = (A_i / m_i) / (A_s / m_s)$$

式中 A_i 和 m_i 分别为杂质的峰面积和进样量, A_s 和 m_s 分别为标准贝诺酯的峰面积和进样量。测得对乙酰氨基酚、乙酰扑热息痛、阿司匹林、水杨酸和萨罗酚的相对响应值分别为 1.07,1.08,0.33,0.66 和 1.17。结果表明,对乙酰氨基酚、乙酰扑热息痛和萨罗酚的相对响应值均接近 1,说明其信号强度与贝诺酯相近,阿司匹林和水杨酸的信号较弱,但作为杂质限量的控制方法,仍可采用峰面积归一化法进行检查。

3.3 有关物质的检查

参照中国药典(1995 年版)及其他国家药典中贝诺酯的杂质限量,将对乙酰氨基酚的限量定为 0.2%,萨罗酚的限量定为 0.5%,其他杂质的限量

定为 0.1 % 进行检查。

3.3.1 对照品溶液的制备 配制混合对照品溶液, 使其中对乙酰氨基酚的浓度为 $0.002 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 萨罗酚的浓度为 $0.005 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其他杂质的浓度为 $0.001 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.3.2 供试品溶液的制备 贝诺酯原料: 精密称取贝诺酯 50 mg, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 超声振荡 10 min 使溶解。

贝诺酯片: 密称取片粉适量(相当于贝诺酯 50 mg), 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 超声振荡 10 min, 滤过, 取续滤液备用。

贝诺酯混悬剂: 取供试品, 充分振摇使均匀后, 精密称取适量(相当于贝诺酯 50 mg), 按片剂方法操作。

在选定条件下, 分别取供试品溶液和杂质混合对照品溶液 10 μL 进样, 记录色谱图, 根据保留时间确定供试品中各杂质的色谱峰, 并与杂质混合对照

品溶液中相应色谱峰的面积比较, 以判断是否超过限量。3 批贝诺酯原料药、片剂和混悬剂的检查结果表明, 有关物质的量均未超过限量。另按峰面积归一化法计算样品中有关物质的相对含量, 结果见表 1、图 2。

Tab 1 Relative contents (%) of benorilate (Bnl) and its impurities in samples

| Sample | Bnl | Par | AP | Asp | SA | Sal | Others |
|------------------|------|------|------|-----|------|------|--------|
| Benorilate 98001 | 99.6 | 0.00 | 0.00 | - | 0.00 | 0.03 | 0.37 |
| Benorilate 98002 | 99.6 | 0.00 | 0.00 | - | 0.02 | 0.05 | 0.33 |
| Benorilate 98003 | 99.7 | 0.01 | 0.00 | - | 0.01 | 0.04 | 0.24 |
| Benorilate 98004 | 99.7 | 0.01 | - | - | 0.05 | 0.06 | 0.28 |
| Tablet 98101 | 99.7 | 0.01 | 0.01 | - | 0.04 | 0.09 | 0.15 |
| Tablet 98102 | 99.4 | 0.02 | 0.01 | - | 0.07 | 0.27 | 0.23 |
| Tablet 98103 | 99.4 | 0.02 | 0.00 | - | 0.05 | 0.33 | 0.20 |
| Suspension 98101 | 99.5 | 0.05 | 0.01 | - | 0.02 | 0.09 | 0.33 |
| Suspension 98102 | 99.6 | 0.03 | 0.01 | - | 0.03 | 0.08 | 0.25 |
| Suspension 98103 | 99.5 | 0.05 | 0.01 | - | 0.03 | 0.09 | 0.32 |

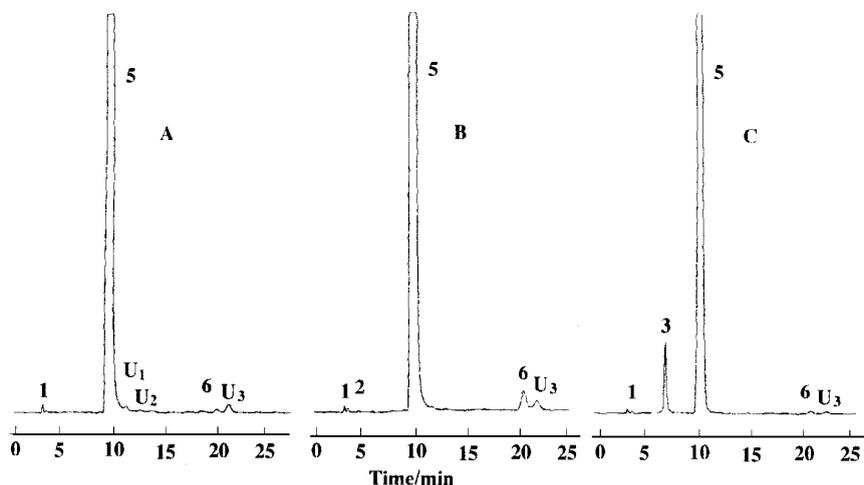


Fig 2 Chromatograms of benorilate and its preparations. A. Benorilate; B. Benorilate tablet; C. Benorilate suspension. 1. Paracetamol ($t_R = 3.2 \text{ min}$); 2. Acetyl paracetamol ($t_R = 4.3 \text{ min}$); 3. Benic acid ($t_R = 6.7 \text{ min}$); 5. Benorilate ($t_R = 9.3 \text{ min}$); 6. Salophen ($t_R = 19.7 \text{ min}$). u_1 . Unknown impurity ($t_R = 11.1 \text{ min}$); u_2 . Unknown impurity ($t_R = 12.4 \text{ min}$); u_3 . Unknown impurity ($t_R = 20.9 \text{ min}$).

以上结果表明, 贝诺酯及其制剂中主要含萨罗酚及极少量的对乙酰氨基酚、乙酰扑热息痛和水杨酸, 未检出阿司匹林。所含杂质的量均未 过限量。超

讨 论

本文首次应用反相高效液相色谱法对国产贝诺酯及其制剂的纯度进行考察, 还用本法对贝诺酯及

混悬剂的稳定性试验样品进行了测定, 结果表明, 贝诺酯稳定性好, 原料药及混悬剂分别在 40°C 及 75°C 加热数月, 药物含量和有关物质的相对含量基本不变。

色谱条件的选择, 曾对乙腈-水系统进行了试验, 结果表明, 萨罗酚与未知杂质 u_3 不能分离。还试验了流动相 pH 值对分离的影响, 结果表明, 流动相 pH 值在 4.5 以上时, 水杨酸峰拖尾, 在 4.5 以下

时,由于离解被抑制,峰形正常。测定了流动相 pH 值为 3.0, 3.5, 4.0 时组分的保留时间,在此范围内,除水杨酸的保留时间随 pH 值的增加略有缩短外,其他组分基本不变,说明在此范围内 pH 值对分离的影响小,故确定流动相的 pH 值为 3.5。在选定条件下,不仅贝诺酯和上述 5 种有关物质可完全分离,还可以分离出 3 个未知杂质,混悬剂中的附加剂苯甲酸不干扰测定。

经试验,本品中的另一有关物质对氨基酚在以上条件下不能被洗脱。

分析结果还表明,片剂中萨罗酚的含量一般高于原料药,提示在制剂生产过程中可能有少量贝诺酯降解成萨罗酚。

在选定条件下,除以上 5 种杂质外,还分离出 3

种未知杂质,对未知杂质的鉴定有待进一步研究。

致谢 法国华法美集团(Sifram Group)张达博士提供萨罗酚对照品并对本工作给予指导。

References

- 1 Cheng XM(陈学敏), Qian CM(钱春梅), Jing LP(井立萍), *et al.* Determination of salophen in benorilate. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1991, **11**: 299
- 2 Jin HG(靳和国), Wang XJ(王晓军). Recovery of esterifying reaction liquid of benorilate. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 1994, **29**: 225
- 3 Chevalier G, Rohrbach P, Bollet C, *et al.* Identification and quantitation of impurities from benorilate (Salipran) by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1977, **138**: 193

DETERMINATION OF BENORILATE AND ITS IMPURITIES BY RP-HPLC

Chao Ruobing (Chao RB), Chen Tao (Chen T) and Ding Shizhi (Ding SZ)¹

(School of Pharmacy, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041;
¹Chengdu Pharmaceutical Inc, Chengdu 610021)

ABSTRACT **AIM:** To investigate the related substances and determine the contents of benorilate with a new RP-HPLC method. **METHODS:** An ODS column was used. The mobile phase consists of methanol and water (56:44, pH adjusted to 3.5 with phosphoric acid). The UV detector was set at 240 nm. **RESULTS:** Benorilate and its related substances paracetamol, acetyl paracetamol, aspirin, salicylic acid and salophen can be separated. The impurities from benorilate products and its preparations were tested and the contents of benorilate were determined. **CONCLUSION:** The new method can be used to detect the related substances and determine the contents of benorilate.

KEY WORDS benorilate; HPLC