

高效液相色谱法测定苯佐卡因含量及其有关物质 Determination of Benzocaine and Its Related Substances by RP HPLC

赵翠红¹, 陆巧燕¹, 闫莲姣¹, 黎 瑞¹, 刘布鸣²

ZHAO Cui-hong¹, LU Qiao-yan¹, YAN Lian-jiao¹, LI Rui¹, LIU Bu-ming²

(1. 南宁市迪智药业有限责任公司, 广西南宁 530003; 2. 广西中医药研究院, 广西南宁 530022)

(1. Nanning Dizhi Pharmaceutical Co. Ltd., Nanning, Guangxi, 530003, China; 2. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要:采用高效液相色谱法测定苯佐卡因的含量及其有关物质。色谱柱为 ODS-BP 柱(250mm×4.6mm, 5 μ m), 流动相为 1.0mol/L 冰醋酸溶液-甲醇(60:40), 流速 1.0 ml/min, 检测波长 290nm。苯佐卡因在 5~125 μ g/ml 浓度范围内线性良好($r=0.9999$)。重复性试验 RSD 为 0.78%, 苯佐卡因峰与其他峰之间的分离良好。本方法操作简单, 测定快速、准确, 专属性好, 适用于苯佐卡因的含量及有关物质的测定。

关键词: 高效液相色谱法 苯佐卡因 含量 有关物质

中图分类号: O657.72 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2010)03-0248-04

Abstract: Method of high performance liquid chromatography (HPLC) was established for the determination of Benzocaine and its related substances. A ODS-BP column (250mm×4.6mm, 5 μ m) was used. The mobile phase was 1.0mol/L acetic acid-methanol (60:40). The flow rate was 1.0ml/min and the detection wavelength was 290nm. Benzocaine and its related substances were completely separated. The calibration curve of Benzocaine was linear in the range of 5 to 125 μ g/ml, which correlation coefficient was 0.9999. RSD of the values of repeatability was 0.78%. The method is simple, specific, accurate with good reproducibility, which can be used for the determination of Benzocaine.

Key words: HPLC, benzocaine, quantification, related substances

苯佐卡因的化学名称为对氨基苯甲酸乙酯, 为白色针状晶体, 临床用做局部麻醉药, 有良好的止痛、止痒作用, 主要用于创面、溃疡面、粘膜表面和痔疮麻醉止痛和痒症, 具有稳定性好、起效快 维持时间长和副作用小等优点。同时, 苯佐卡因又是重要的医药中间体, 可以作为奥索仿、奥索卡因、普鲁卡因等前体原料。苯佐卡因在中国药典 1990 年以来历版均有收载, 在质量标准中, 含量测定一直采用永停滴定法, 2010 版药典新增加了有关物质的控制, 检测方法采用薄层色谱法^[1]。有关 HPLC 测定苯佐卡因含量及有关物质, 未见文献报道。本试验建立高效液

相色谱法测定苯佐卡因的含量以及其有关物质和降解产物。方法准确、可靠。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪、UV-10A 紫外检测器, 威玛龙色谱工作站。

1.2 试剂

苯佐卡因对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号 100454-200501), 苯佐卡因原料(锦 90203), 对硝基苯甲酸、对氨基苯甲酸、对硝基苯甲酸乙酯(中国国药集团有限公司提供)。甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

收稿日期: 2010-06-08

作者简介: 赵翠红(1978-), 女, 工程师, 主要从事药物制剂研究。

2 方法与含量测定结果

2.1 色谱条件

色谱柱为依利特 ODS-BP 柱(4.6mm × 250mm, 5μm), 流动相为 1.0mol/L 冰醋酸溶液-甲醇(60:40), 流速 1.0ml/min, 检测波长 290nm, 进样量 20μl。

2.2 检测波长的选择

取苯佐卡因对照品适量, 以流动相为溶剂, 做紫外吸收光谱扫描, 结果在(290±2)nm 处有最大吸收峰, 故检测波长选择为 290nm。

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品溶液的配制

精密称取苯佐卡因对照品适量, 加甲醇配制成 500μg/ml 的溶液作为对照品储备液。精密吸取对照品储备液适量, 加甲醇配制成 50μg/ml 的溶液作为对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的配制

精密称取苯佐卡因样品 5mg, 置于 100ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.4 系统适应性试验

分别取苯佐卡因、原料对硝基苯甲酸、中间体对硝基苯甲酸乙酯、降解产物对氨基苯甲酸适量, 分别加流动相溶解并稀释制成每 1ml 各含 0.1mg 的样品, 按照上述色谱条件, 分别量取 20μl 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 确定各色谱峰位置。再取上述各溶液适量, 用流动相稀释制成混合溶液, 取 20μl 注入液相色谱仪, 记录色谱图。由图 1 可知, 苯佐卡因峰与其它成分峰分离均较好, 分离度 $R > 1.5$, 按苯佐卡因峰计, 理论板数大于 5000。

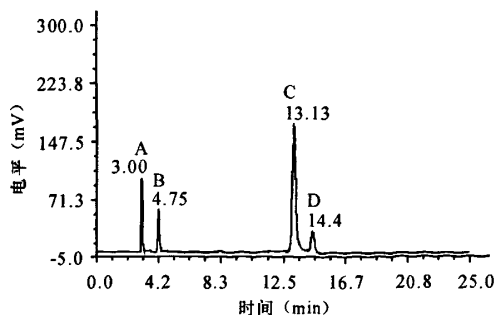


图 1 系统适应性试验溶液 HPLC 色谱

A: 对硝基苯甲酸乙酯; B: 对氨基苯甲酸; C: 苯佐卡因; D: 对硝基苯甲酸。

2.5 定量限及检测限

精密量取苯佐卡因对照品溶液和各相关物质溶

液适量, 配制成各种合适浓度的溶液, 在相同色谱条件下进样, 记录色谱图, 当信噪比为 10:1 时测定定量限, 信噪比为 3:1 时测定最低检测限。结果测得苯佐卡因定量检出限为 1ng, 最小检出限: 苯佐卡因 0.2ng、对硝基苯甲酸 50ng、对硝基苯甲酸乙酯 0.2ng、对氨基苯甲酸 0.1ng。

2.6 线性关系

精密吸取对照品储备溶液 0.1ml、0.5ml、1.0ml、1.5ml、2.0ml、2.5ml 置入 10ml 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 配制成系列标准工作溶液, 分别进样测定。以浓度(C)为横坐标, 对照品峰面积积分值(A)为纵坐标做标准曲线。结果对照品浓度在 5~125μg/ml 范围内呈良好的线性关系, 回归方程为 $A = 29426C - 3463$, 相关系数 $r = 0.9999$ 。

2.7 精密度试验

取同一对照品溶液和同一供试品溶液, 按色谱条件连续测定 6 次, 记录苯佐卡因峰面积。结果对照品溶液和供试品溶液中苯佐卡因峰面积 RSD 分别为 0.80%、1.12%。本方法的精密度较好。

2.8 稳定性考察

取同一供试品溶液, 每隔一定时间测定 1 次, 共测定 6 次, 结果 6 次测定的苯佐卡因峰面积 RSD 为 0.98%, 本方法在 24h 内测定稳定。

2.9 重现性试验

取同一批样品, 按含量测定项下方法平行测定 6 份, 结果苯佐卡因含量平均值为 99.82%, RSD 为 0.78% ($n=6$)。本方法的重现性较好。

2.10 样品含量测定

取苯佐卡因样品 5mg, 精密称定, 按 2.3.2 项方法制备供试品溶液。另取苯佐卡因对照品适量, 精密称定, 按 2.3.1 项方法制备对照品溶液。按色谱条件分别量取 20μl 注入高效液相色谱仪中, 记录色谱图。按外标法以峰面积计算苯佐卡因含量, 3 批苯佐卡因样品含量测定结果为 100.12%、99.75%、100.98% (见表 1)。

表 1 3 批样品苯佐卡因含量测定和有关物质测定结果

| 样品批号 | 苯佐卡因含量 (%) | | 有关物质(总量) (%) | |
|----------|------------|--------|--------------|--------|
| | 药典法 | HPLC 法 | 药典法 | HPLC 法 |
| 20090201 | 99.86 | 100.12 | <1.0 | 0.06 |
| 20090202 | 99.68 | 99.75 | <1.0 | 0.07 |
| 20090203 | 99.77 | 100.98 | <1.0 | 0.09 |

3 有关物质和降解产物

3.1 破坏性试验

3.1.1 加热破坏

取苯佐卡因适量,置恒温箱中 105℃加热 4h 后,取样,按照含量测定项下方法测定,记录色谱图,结果未见降解产物。

3.1.2 酸性破坏

配制适量苯佐卡因水溶液,调节溶液 pH 值为 2,室温放置 4h 后,中和,滤过,按照含量测定项下方法测定,记录色谱图,结果有降解产物出现。

3.1.3 碱性破坏

配制适量苯佐卡因水溶液,调节溶液 pH 值为 11,室温放置 4h 后,中和,滤过,按照含量测定项下方法测定,记录色谱图,结果有降解产物出现。

3.1.4 光照破坏

取苯佐卡因适量,加甲醇溶解并稀释,摇匀,置光照强度为 4500lx 条件下照射 4h 后,取样,按照含量测定项下方法测定,记录色谱图,结果没有见到降解产物。

3.1.5 氧化破坏

取苯佐卡因适量,置于 100ml 容量瓶中,加 30% H₂O₂ 溶液 20ml,振摇,置室温下放置 4h,加甲醇稀释,按照含量测定项下方法测定,记录色谱图,结果有降解产物。

上述试验表明,苯佐卡因可在一定条件下水解,在碱性或酸性水溶液和氧化条件下可以产生降解产物,酸性条件下较慢,碱性条件下较快,中性条件下基本无降解。所产生的降解产物的峰与主峰均能达到基线分离,分离度符合规定,降解产物及杂质均不干扰测定(图 2)。

3.2 有关物质测定

取苯佐卡因样品 25mg,精密称定,置于 25ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每 1ml 中含 1mg 的供试品溶液。精密量取供试品溶液 1.0ml,置于 10ml 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。按照含量测定项下的色谱条件进行试验,取对照溶液 20μl,注入液相色谱仪进行预试,调节仪器检测器灵敏度,使主成分的色谱峰高达满量程的 25%;再取上述两种溶液各 20μl 分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2.5 倍,供试品溶液色谱图中如显示有杂质峰,最大单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 1/2 (0.5%),各杂质峰面积(小于对照溶液主峰面积

0.1%的杂质峰忽略不计)总和,不得大于对照溶液主峰面积(1.0%),面积归一化法计算总杂质的含量。3 批苯佐卡因样品的有关物质测定结果见表 1,有关物质的色谱图如图 3 所示。

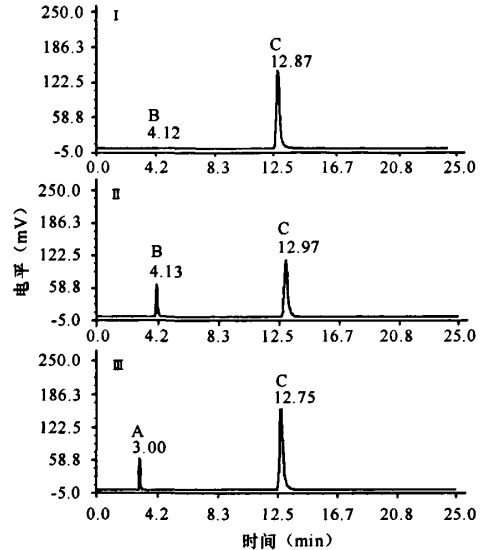


图 2 破坏性试验的 HPLC 色谱

I: 加酸破坏, II: 加碱破坏, III: 氧化破坏, A: 对硝基苯甲酸乙酯, B: 对氨基苯甲酸, C: 苯佐卡因。

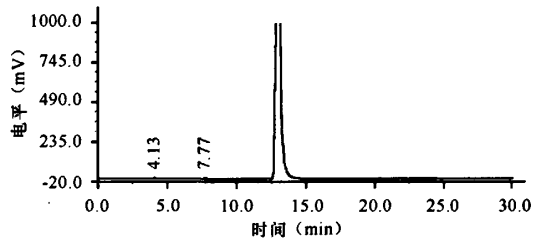


图 3 苯佐卡因有关物质测定的 HPLC 色谱

3.3 药典有关物质测定方法

2010 年版中国药典中苯佐卡因的质量标准新增加了有关物质检查项目,测定方法为薄层色谱法,按中国药典方法,取供试品溶液和 4 个不同浓度的对照溶液,采用无水乙醇-三氯甲烷(0.75:99.25)为展开剂,在紫外灯 254nm 下检视,杂质总量不得过 1.0%。对 3 批苯佐卡因样品进行样品含量和有关物质的测定,结果(表 1)采用薄层色谱法只能进行半定量检查,而 HPLC 法能准确定量测定苯佐卡因中有关物质。

4 结束语

参照苯佐卡因的生产工艺路线^[2],样品中存在的有关物质可能有:(1)原料:对硝基苯甲酸;(2)合

成中间体:对硝基苯甲酸乙酯;(3)降解产物:对氨基苯甲酸。故选取上述3种物质与苯佐卡因混合制备色谱条件系统适应性溶液。

有关物质测定结果显示,本品的单个最大杂质及其他主要杂质峰均在主峰2.5倍保留时间内出峰,且在进行破坏性实验考察时,各破坏条件下的色谱图中,主峰2.5倍保留时间后均无杂质峰出现,因此确定本品有关物质检查的保留时间为主峰保留时间的2.5倍。

中国药典中采用薄层色谱法对苯佐卡因的有关物质进行检查,本实验对药典方法和HPLC法进行了比较,数据结果表明,采用薄层色谱法只能进行半定量检查,而HPLC法能准确定量测定苯佐卡因中

有关物质。

本方法操作简单,测定快速、准确,专属性好,可以同时测定苯佐卡因的含量和有关物质,作为原料的测定方法,对存在的有关杂质和破坏条件下产生的降解产物进行监控。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[Z]. 北京:中国医药科技出版社,2010:439.
- [2] 刘太泽,肖鉴谋,刘奉强,等. 苯佐卡因合成工艺的改进[J]. 化工中间体,2009(9):34-36.

(责任编辑:邓大玉)

(上接第247页)

- [3] Yang X P, Shi B F, Zhang Y H, et al. Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil by constant energy synchronous fluorescence detection[J]. Spectrochimica Acta Part A, 2008, 69: 400-406.
- [4] 冯克亮. 概述多环芳烃在自然环境中的分布与监测[J]. 海洋环境科学, 1991, 10(4): 74-76.
- [5] 张玲金, 苏建茹, 周立军, 等. 固体模拟样品中多环芳烃有机污染物提取方法研究[J]. 岩矿测试, 2003, 22(2): 113-116.
- [6] Zhu Lizhong, Cai Xuefen, Wang Jing. PAHs in aquatic sediment in Hangzhou, China: Analytical methods, pollution pattern, risk assessment and sources [J]. J Environ Sci, 2005, 17(5): 748-755.
- [7] 张兰英, 刘娜, 孙立波. 现代环境微生物技术[M]. 北京:清华大学出版社, 2005: 22.
- [8] 国家环境保护总局. 全国土壤污染调查分析测试方法技术规定[S]. 2006.
- [9] 尤孝方, 李晓东, 倪明江, 等. 商用垃圾流化床焚烧炉多环芳烃排放的环境评价[J]. 环境科学学报, 2003, 23(2): 262-266.
- [10] 毕洪亮, 张浩原, 孙翠香, 等. 蔬菜中多环芳烃的GC-MS分析[J]. 分析测试学报, 2007, 26(4): 530-532.
- [11] 肖荣辉, 马继平, 鹿文慧, 等. 竹炭固相萃取/气相色谱-质谱联用对环境水样中16种多环芳烃的测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(9): 1022-1026.
- [12] 陶敬奇, 王超英, 李碧芳, 等. 固相微萃取-高效液相色谱联用分析环境水样中的痕量多环芳烃[J]. 色谱, 2003, 21(6): 599-602.
- [13] 樊虎, 盛良全, 童红武, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定卷烟主流烟空气中的多环芳烃[J]. 分析测试学报, 2005, 24(1): 103-105.
- [14] 国家环境保护总局. 全国土壤污染状况调查质量保证技术规定[S]. 2006.

(责任编辑:邓大玉)