

中国药典 2020 年版药用辅料二丁基羟基甲苯 质量标准有关物质检查修订建议*

韩蓓, 胡琴, 张喆, 王铁松, 吴科春**, 戴红**

(北京市药品检验研究院 国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室, 北京 102206)

摘要 目的:针对《中国药典》2020 年版四部二丁基羟基甲苯质量标准中有关物质检查项方法专属性差、重复性不强、耗时较长等问题,建立其有关物质测定的高效液相色谱法,对该辅料质量标准进行修订。**方法:**对 USP43 方法进行了优化,将薄层色谱法检查有关物质修订为高效液相色谱法,并进行方法学验证。**结果:**按修订后方法进行有关物质检查,9 种指定杂质具有良好分离度,4 批样品均符合规定。**结论:**修订后有关物质检查方法操作简单,灵敏度高,实验结果准确可靠,可替代《中国药典》2020 年版四部二丁基羟基甲苯质量标准现有有关物质检查方法。

关键词:二丁基羟基甲苯;有关物质;中国药典;质量标准修订;高效液相色谱

中图分类号:R 921.2 文献标识码:A 文章编号:1009-3656(2023)02-0000-00

doi:10.19778/j. chp. 2023. 02. 00?

Revision suggestion for relevant substance testing of the Chinese Pharmacopoeia 2020 of the quality standard of dibutylhydroxytoluene for pharmaceutical excipients*

HAN Bei, HU Qin, ZHANG Zhe, WANG Tiesong, WU Kechun**, DAI Hong**

(Beijing Institute For Drug Control, NMPA Key Laboratory of Generic Drug Research and
Evaluation, Beijing 102206, China)

Abstract Objective: In view of the problems of poor specificity, poor repeatability, and long time consumption of related substances in the quality standards of the four dibutylhydroxytoluene quality standards of the 2020 edition of the Chinese Pharmacopoeia, a high-performance liquid chromatography method for the determination of related substances was established. In order to revise the quality standard of this excipient. **Methods:** The USP43 method was optimized, and the TLC method for related substances testing was revised to high performance liquid chromatography, and the method was verified. **Results:** The inspection of related substances was carried out according to the revised method, and the 9 designated impurities had good separation degree, and the 4 batches of samples were all in compliance with the regulations. **Conclusion:** The revised testing method for related substances is simple in operation, high in sensitivity, accurate and reliable in experimental results, and can replace the existing methods for related substances testing in the 2020 edition of the *Chinese Pharmacopoeia*, Part Four of the Quality Standards for

* 基金项目:国家药典委员会药品标准制修订研究课题(2019Y041)

第一作者简介:韩蓓,高级工程师;研究方向:药品质量标准。Tel:010-52779509;E-mail:terryjordan@163.com

** 通讯作者简介:吴科春,主管药师;研究方向:药物分析与药品质量标准研究。Tel:010-52779789;E-mail:wukechun@bidc.org.cn
戴红,主任药师;研究方向:药物分析与药品质量标准研究。Tel:010-52779687;E-mail:daihong9718@163.com

Dibutylhydroxytoluene.

Key words: butylated hydroxytoluene; related substances; *Chinese Pharmacopoeia*; revision of quality standards; HPLC

二丁基羟基甲苯 (Butylated Hydroxytoluene, BHT) 为脂溶性抗氧化剂,它能够与自由基反应,从而中断自由基的链式反应,发挥其抗氧化作用^[1-2]。因其抗氧化能力较强,无特异臭,且价格低廉,所以在我国被广泛作为药品和食品^[3-4]中的抗氧化剂使用。二丁基羟基甲苯在强酸、强碱及强氧化剂中均不稳定,在合成过程中(图1)易受温度、起始物和试剂纯度影响,产生游离酚及氧化不完全的醚、醛类工艺杂质,影响质量(表1)。

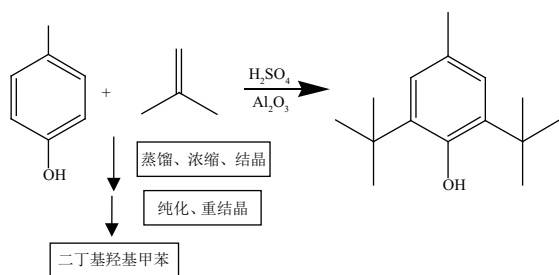


图1 二丁基羟基甲苯合成工艺路线示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the synthesis process route of dibutylhydroxytoluene

二丁基羟基甲苯质量标准收载于《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2020年版四部^[5],有

表1 二丁基羟基甲苯有关物质信息

Tab. 1 Information on related substances of dibutylhydroxytoluene

编号 (No.)	指定杂质 (Specified impurity)	生产厂家 (Manufacturer)	批号 (Batch No.)	纯度 (Purity/%)
ZZ-1	间甲酚(3-methylphenol)	EHRENSTORFER	C990433	99.5
ZZ-2	对甲酚(4-methylphenol)	EHRENSTORFER	111804	99.0
ZZ-3	2-叔丁基-4-甲基苯酚(2-tert-butyl-p-cresol)	TCI	ZN6WJ. AF	98.0
ZZ-4	2-叔丁基-5-甲基苯酚(2-tert-butyl-5-methylphenol)	TCI	DMRLF. PN	97.0
ZZ-5	2,6-二叔丁基苯酚(2,6-di-tert-butylphenol)	国药集团化学试剂有限公司	20190308	98.0
ZZ-6	3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲酸(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoic acid)	TCI	GK01-OMZJ	98.0
ZZ-7	3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲醛(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde)	TCI	FIK02-ANJS	98.0
ZZ-8	4-羟基-3-叔丁基苯甲醚(4-hydroxy-3-tert-butylanisole)	TCI	QKRIC. AN	98.0
ZZ-9	4,6-二叔丁基间甲酚(4,6-di-tert-butyl-m-cresol)	TCI	WBTBF-KT	95.0

二丁基羟基甲苯对照品(批号:190065-201602,含量99.9%)购自中国食品药品检定研究院。9种指定杂质对照品(编号ZZ-1~ZZ-9)的来源、批号及含量见表1。

二丁基羟基甲苯样品共4批,3批来自江西阿

关物质检查项现行标准为滴定法和薄层色谱法,分别测定游离酚及其他杂质含量。滴定法测定游离酚含量时,空白与供试品消耗滴定液体积过于接近(消耗滴定液体积差值 ≤ 0.1 mL),导致测定结果不准确,误差较大。薄层色谱法通过比对样品中杂质斑点与自身对照溶液主斑点的颜色检查杂质含量是否超限,灵敏度较差。USP43^[6]有关物质检查方法为高效液相色谱法。本研究对USP43方法进行了优化,并进行了方法学验证,测定了1批进口样品及3批国产样品的有关物质,新建方法可对9种指定杂质进行有效分离和测定,4批样品检测结果均符合规定,新建方法可替代现行标准,提高该辅料品种质量控制水平,为科学监管提供有力的技术支撑。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

岛津20A高效液相色谱仪(Shimadzu公司,日本,包括LC-20AB泵,SIL-20ACHT自动进样器,SFD-M20A二极管阵列检测器,CTO-20AC柱温箱,Shimadzu LC solution工作站),Milli-Q纯水机(Merck millipore公司,德国),电子天平(赛多利斯天平公司,德国)。

尔法高科药业有限公司,1批来自默克化工技术(上海)有限公司。

乙腈为色谱纯,实验用水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

色谱柱选用不同品牌、型号及不同规格的6种

色谱柱,详见表2。

1.2 色谱条件

采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(250 mm×4.6 mm,5 μm 或效能相当);流动相为乙腈-5% 醋酸溶液(65:35),流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 278 nm,进样量 20 μL,分析时间为主成分峰保留时间的 2 倍。

1.3 溶剂选择及溶液配制

USP43 以流动相乙腈-5% 醋酸溶液(65:35)为溶剂,操作过程中发现,样品在该溶剂中不能完全溶解,故选择乙腈作为溶剂。

1.3.1 对照品溶液 精密称取对照品 50 mg,置 5 mL 量瓶中,加乙腈适量,超声使溶解,加乙腈稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液(10 mg·mL⁻¹)。

1.3.2 杂质对照品储备液 精密称取 ZZ1~ZZ9 各约 10 mg,分别置 50 mL 量瓶中,加乙腈适量,超声使溶解,加乙腈稀释至刻度,摇匀,即得 ZZ1~ZZ9 对照品储备液(0.2 mg·mL⁻¹)。

1.3.3 杂质对照品溶液 精密量取上述 ZZ1~ZZ9 对照品储备液各 1 mL,分别置 20 mL 量瓶中,加乙腈稀释至刻度,摇匀,即得 ZZ1~ZZ9 对照品溶液(10 μg·mL⁻¹)。

1.3.4 系统适用性溶液 精密量取对照品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加乙腈稀释至刻度,摇匀。精密量取 2 mL,置 20 mL 量瓶中,再分别精密量取 ZZ1~ZZ9 对照品储备液各 1 mL,置同一 20 mL 量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀,作为系统适用性溶液(各组分均为 10 μg·mL⁻¹)。

表3 不同色谱柱分离效果比较

Tab.3 Comparison of separation effects of different chromatographic columns

色谱柱(Column)	ZZ-1/ZZ-2	ZZ-8	ZZ-6	ZZ-3/ZZ-4	ZZ-7	ZZ-9	ZZ-5	主成分(BHT)
相对保留时间(Relative retention time)								
1#	0.13	0.20	0.22	0.29	0.39	0.67	0.77	1.00
2#	0.15	0.24	0.26	0.32	0.43	0.69	0.80	
3#	0.12	0.20	0.22	0.29	0.40	0.67	0.78	
4#	0.12	0.20	0.22	0.29,0.30	0.40	0.67	0.78	
5#	0.12	0.19	0.21	0.27	0.39	0.63	0.77	
6#	0.13	0.21	0.22	0.29	0.38	0.66	0.78	
分离度(Resolution)								
1#	/	5.5	1.0	3.7	5.1	13.3	3.9	7.8
2#	/	8.8	1.5	4.0	5.1	9.3	3.8	5.6
3#	/	8.8	1.7	4.3	5.4	10.2	3.1	5.1
4#	/	15.5	3.0	7.9,0.6	9.0	18.5	5.8	8.9
5#	/	11.5	2.5	6.0	10.0	17.4	7.3	10.0
6#	/	12.5	2.2	6.7	7.9	18.7	6.2	9.2

注(note):间甲酚/对甲酚在该系统中无法分离(m-cresol/p-cresol cannot be separated in this system)

1.3.5 供试品溶液 根据二丁基羟基甲苯在乙腈中的溶解度及方法灵敏度,确定供试品溶液浓度为 10 mg·mL⁻¹。精密称取供试品溶液适量,加乙腈溶解并定量稀释制成浓度约为 10 mg·mL⁻¹的溶液,作为供试品溶液。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件优化

2.2.1 色谱柱选择 因 USP43 指定色谱柱规格(3.0 mm×150 mm,3 μm)较为特殊,故本文选取 6 种常用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(表2)开展研究,通过比较各杂质峰相对保留时间和分离度等参数(表3)发现,不同品牌型号色谱柱对色谱峰的分离影响较大,Angela Venusil MP-C18 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,4#)对于已知杂质的分离效果最好,且保留时间最接近的 ZZ3 峰与 ZZ4 峰之间的分离度达到 0.6,优于 USP43 指定色谱柱(1#)的分离效果,故选择 4#柱开展方法学研究(图2)。

表2 不同色谱柱信息

Tab.2 Information on different chromatographic columns

编号 (Number)	色谱柱 (Column)	规格 (Specifications)
1#	Waters Atlantis T3 C18	3.0 mm×150 mm, 3 μm
2#	Techmate C18 CFJ-STII	4.6 mm×250 mm, 3 μm
3#	Agela Venusil MP-C18	4.6 mm×150 mm, 5 μm
4#	Agela Venusil MP-C18	4.6 mm×250 mm, 5 μm
5#	Angilent ZOBAX SB-C18	4.6 mm×250 mm, 5 μm
6#	Sheshido MGII C18	4.6 mm×250 mm, 5 μm

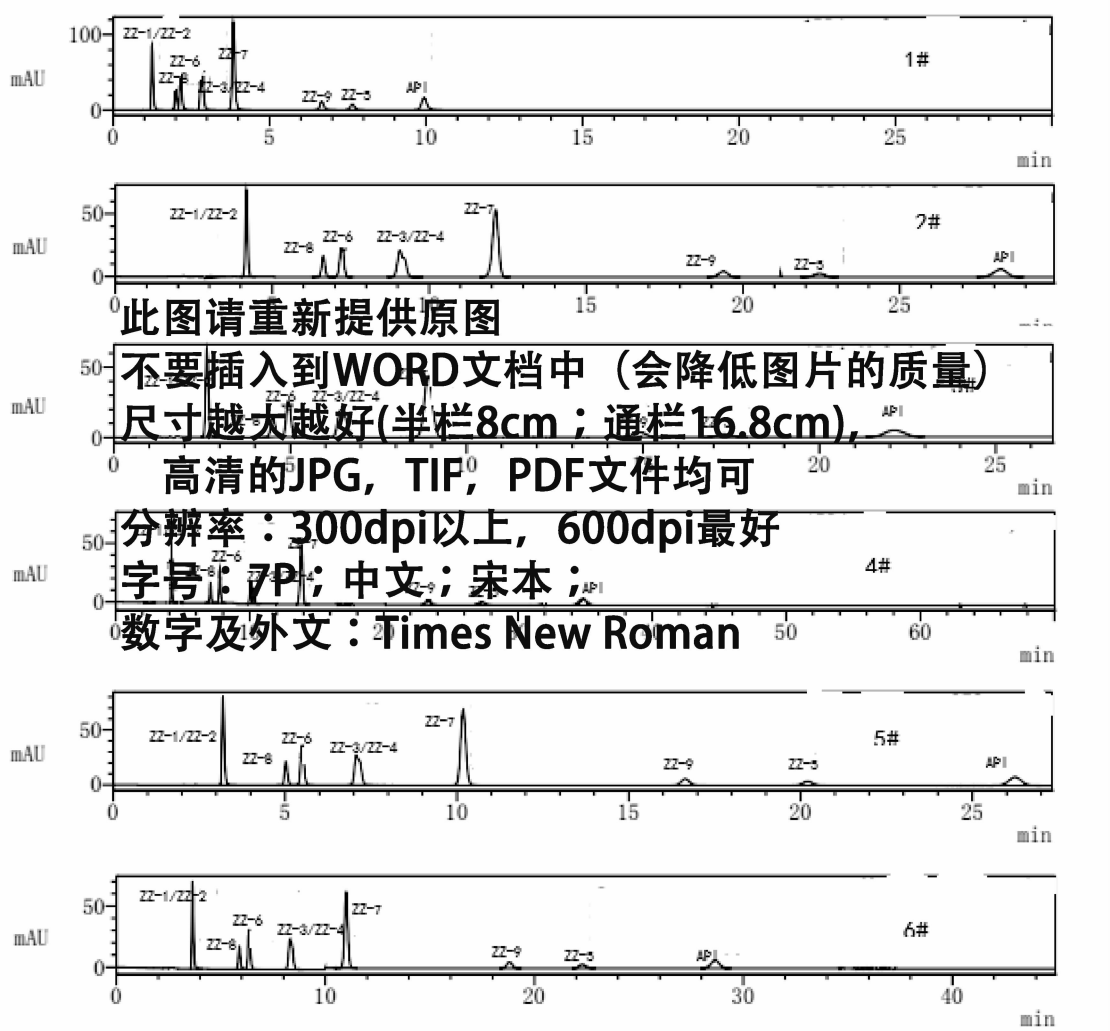


图2 不同色谱柱分离效果比较
Fig. 2 Comparison of separation effects of different chromatographic columns

2.2.2 检测波长选择 USP43 有关物质和含量测定在 275 nm 波长下检测,《中国药典》2020 年版含量测定在 278 nm 波长下检测。本文采用 PDA 检测器在 200 ~ 400 nm 范围内对主峰和指定杂质峰进行

紫外光谱扫描(表 4),主峰的最大吸收波长为 279 nm,与 278 nm 接近;ZZ-1 ~ ZZ-9 在 278 nm 波长下均有较大吸收,且相对响应值较为接近,故确定检测波长为 278 nm。

表 4 样品和指定杂质最大吸收峰
Tab. 4 Maximum absorption peaks of samples and specified impurities

	ZZ-1/ZZ-2	ZZ-3/ZZ-4	ZZ-5	ZZ-6	ZZ-7	ZZ-8	ZZ-9	主成分(BHT)
最大吸收波长 (Maximum absorption wavelength/nm)	290	280	276	259	287	290	284	279

根据以上研究结果,兼顾分离度等因素,最终确定新的 HPLC 方法用于二丁基羟基甲苯中有关物质的检查。

2.2 方法学验证

2.2.1 耐用性 按“1. 3”项下制备系统适用性溶液用于方法耐用性的考察。改变流动相的流速、

柱温、流动相比比例等条件,采用新建有关物质色谱条件测定,有关物质混合溶液色谱图见图 3(A)、3(B)、3(C)。由于醋酸易挥发,存在影响流动相 pH 值、进而影响有关物质测定结果的风险,故还考察了不同醋酸比例流动相对于色谱条件的影响。

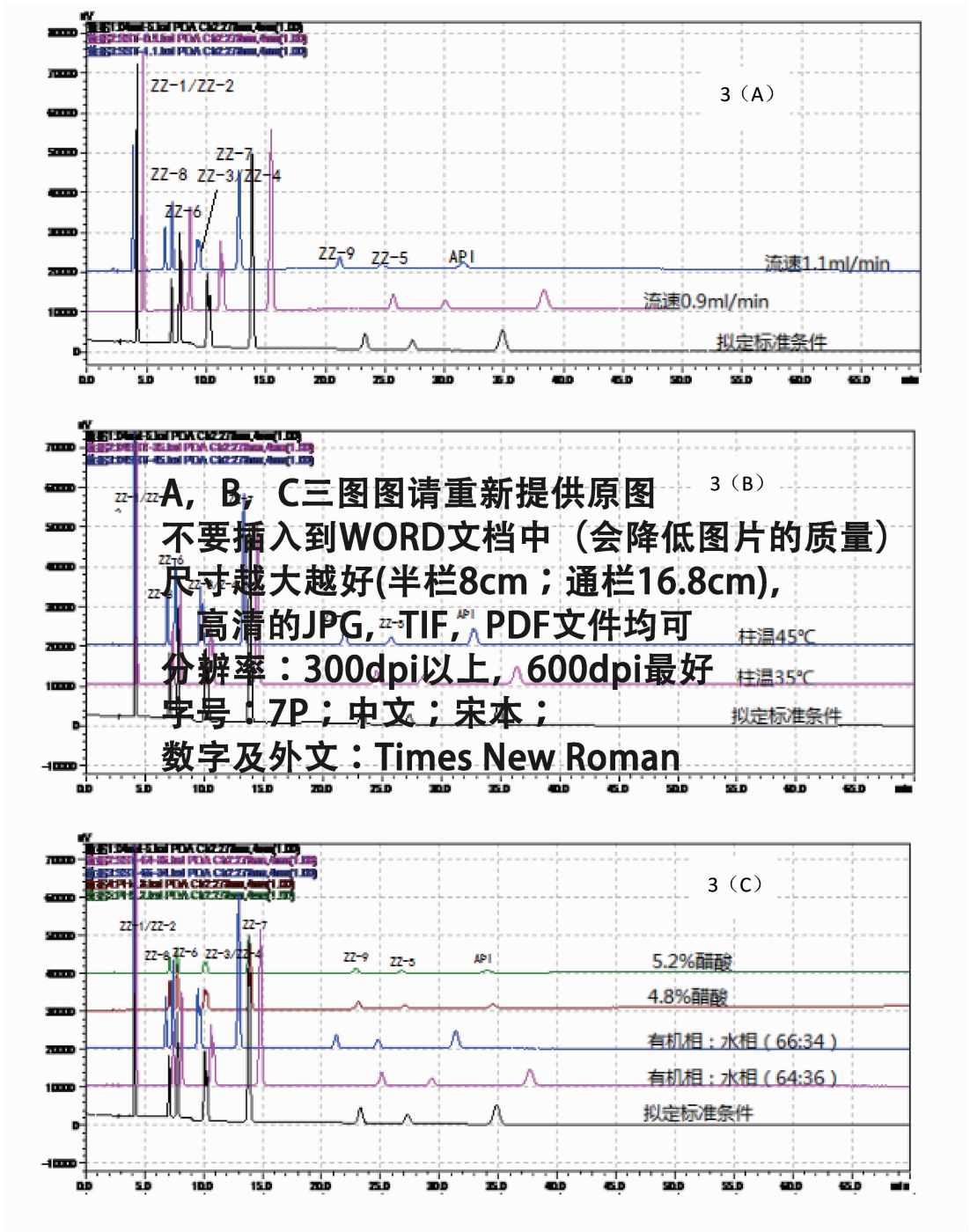


图3 不同流速(A)、柱温(B)、流动相(C)比例条件下的色谱图

Fig. 3 Chromatograms under different flow rate (A), column temperature (B), and mobile phase (C) ratios

2.2.2 专属性 本研究对二丁基羟甲基苯进行了强制破坏实验,经高温、光照破坏后,基本无降解产物出现;经强酸、强碱、强氧化剂破坏后,降解产生指定杂质及未知杂质,其中,指定杂质主要包括 ZZ-3、ZZ-4、ZZ-5、ZZ-6、ZZ-7、ZZ-9,强氧化剂破坏后产生的杂质最多,但基本均可达到基线分离,含量均小于0.1%,且与主成分分离度符合要求。新建方法专属性强。

2.2.3 稳定性 经考察,系统适用性溶液在12 h内稳定,主峰和杂质峰面积均无明显变化,无其他杂质峰出现,溶液稳定性良好。

2.2.4 线性 线性试验结果表明,ZZ-1~ZZ-9在0.001~0.1 mg·mL⁻¹浓度范围内(相当于供试品溶液0.01%~1.0%),主成分在0.001~10.00 mg·mL⁻¹浓度范围(相当于供试品溶液0.01%~100.0%)内,其浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 检测限和定量限 在主峰信噪比约为3时,测得二丁基羟基甲苯检测限为6.6 ng(相当于供试品溶液0.003%),在主峰信噪比约为10时,测得二丁基羟基甲苯检出限为26.4 ng(相当于供试品溶液0.013%),新建方法灵敏度高。

2.2.6 样品测定 采用新建HPLC方法,对2家企业4批样品进行有关物质检查,测定结果除主峰外均未检出其他杂质峰,4批样品均符合规定。

2.2.7 限度制定 《中国药典》2020年版游离酚项下规定“游离酚总量不得过0.02%”,有关物质项下规定“单个杂质不得过0.5%”。USP43规定“单个杂质不得过0.1%,杂质总量不得过0.7%”。由于新建高效液相色谱法灵敏度、分辨率和准确度均高于滴定法和薄层色谱法,结合4批样品有关物质的测定结果,新建标准限度设定与USP43相同,为“单个杂质不得过0.1%,杂质总量不得过0.7%”。

2.2.8 拟定方法 通过上述一系列的方法学验证和考察,拟定有关物质检查方法具体为:取本品适量,加乙腈溶解并稀释制成每1 mL中约含10 mg的溶液,作为供试品溶液;精密量取供试品溶液1 mL,加乙腈稀释制成每1 mL中约含10 μ g的溶液,作为对照溶液;照高效液相色谱法(通则0512)测定。用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m或效能相当的色谱柱);以乙腈-5%醋酸溶液(65:35)为流动相,检测波长为278 nm。另精密称取二丁基羟基甲苯适量,加乙腈溶解并稀释制成每1 mL中约含10 μ g的溶液,作为系统适用性溶液,取20 μ L注入液相色谱仪,记录色谱图,理论板数按二丁基羟基甲苯峰计算应不低于3 000。精密量取供试品和对照品溶液各20 μ L,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。供试品溶液色谱图中如显杂质峰,单个杂质的峰面积不得大于对照品溶液主峰面积(0.1%),各杂质峰面积之和不得大于对照品溶液主峰面积的7倍(0.7%)。

2.2.9 讨论 二丁基羟基甲苯现行标准采用滴定法和薄层色谱法进行游离酚以及其他工艺杂质等有关物质检查,两种方法均存在灵敏度较低、误差较大及操作复杂等问题。本文新建高效液相色谱法方法,采用较为常用的色谱柱,较好地分离合成工艺中产生的副产物以及各种破坏条件下产生的降解产物,灵敏度高、专属性强,参考USP43有关物质确定

杂质检测限度,可实现杂质定量检测。同时,本研究测定了9个指定杂质的校正因子,除ZZ-5外各指定杂质的校正因子均低于1.00(ZZ-5校正因子为1.05),结合有关物质检查方法中,控制单个杂质含量不超过0.1%,杂质总量不超过0.7%,因此,新建方法中采用不加校正因子的自身对照法计算,实际是更加严格地控制了杂质含量。

采用新建方法对2个企业的4批样品进行有关物质检查,结果均符合规定,可同时替代滴定和薄层色谱两种检查方法,能更真实准确地反映产品杂质情况。

3 结论

本文对二丁基羟基甲苯现行标准中的有关物质测定方法进行了优化,新建方法灵敏度高、专属性强,操作简便,9种已知工艺杂质分离效果好,经方法学验证,证明新法准确可靠,可替代《中国药典》2020年版四部中二丁基羟基甲苯质量标准有关物质检查法,为科学监管提供有力的技术支撑。

参考文献

- [1] 王豪,罗志强,刘洋,等. HPLC同时测定度他雄胺软胶囊中他雄胺及抗氧化剂二丁基羟基甲苯的含量[J]. 中国药杂志, 2016, 51(18): 1592
WANG H, LUO ZQ, LIU Y, *et al.* Content determination of dutasteride and antioxidant butylated hydroxy toluene in dutasteride soft capsules by HPLC [J]. Chin Pharm J, 2016, 51(18): 1592
- [2] 朱颜玥,熊晔蓉,段梦茹,等. 气相色谱法测定泊洛沙姆中抗氧化剂二丁基羟基甲苯的含量[J]. 中国药品标准, 2020, 21(2): 140
ZHU YY, XIONG YR, DUAN MR, *et al.* Determination of antioxidant butylated hydroxytoluene in poloxamer by gas chromatography [J]. Drug Stand China, 2020, 21(2): 140
- [3] GARCÍA IV, SENDÓN R, GARCÍA-FONTE XX, *et al.* Migration studies of butylated hydroxytoluene, tributyl acetyl citrate and dibutyl phthalate into food simulants[J]. J Sci Food Agric, 2019, 99(4): 1586
- [4] HOSSAIN KFB, HOSOKAWA T, SAITO T, *et al.* Amelioration of butylated Hydroxytoluene against inorganic mercury induced cytotoxicity and mitochondrial apoptosis in PC12 cells via antioxidant effects[J]. Food Chem Toxicol, 2020, 94(146): 111819
- [5] 中华人民共和国药典2020年版. 四部[S]. 2020: 573.
ChP 2020. Vol IV[S]. 2020: 573
- [6] USP 43-NF38[S]. 2021: 6134

(收稿日期:2022-06-21)