HPLC 测定愈创木酚磺酸钾的有关物质

许有诚，赵庄*，李丹凤(广西壮族自治区食品药品验检所，南宁 530021)

摘要：目的 建立 HPLC 测定愈创木酚磺酸钾有关物质的方法。**方法** 采用 InertSustain C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)，以乙腈-0.02 mol·L^{-1} 磷酸盐缓冲液(20∶80)为流动相，流速 1 mL·min^{-1}，柱温 35 ℃，检测波长 279 nm。**结果** 愈创木酚磺酸钾的 2 个异构体能得到有效分离，主成分与杂质的分离度良好。主成分及其各杂质在各自浓度范围内呈现良好的线性关系(r>0.999)；异构体Ⅲ、愈创木酚和杂质Ⅰ的平均加样回收率分别为 101.35%，100.78%，99.45%，RSD 分别为 0.7%，0.7%，1.4%。**结论** 该方法快速、准确、专属性强，可用于愈创木酚磺酸钾原料药的有关物质检查。

关键词：愈创木酚磺酸钾；有关物质；高效液相色谱法；异构体

中图分类号：R917.101 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2021)09-1060-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.09.007

引用本文：许有诚，赵庄，李丹凤. HPLC 测定愈创木酚磺酸钾的有关物质[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(9): 1060-1064.

Determination of the Related Substances of Potassium Guaiacolsulfonate by HPLC

XU Youcheng, ZHAO Zhuang*, LI Danfeng(*Guangxi Zhuang Autonomous Region Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of the related substances of potassium guaiacolsulfonate. **METHODS** The analysis was performed on an InertSustain C_{18} column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the mobile phase consisted of acetonitrile-0.02 mol·L^{-1} phosphate buffer(20∶80). The flow rate was 1 mL·min^{-1}. The column temperature kept at 35 ℃, and the detection wavelength was 279 nm. **RESULTS** The separation between the two isomers of potassium guaiacolsulfonate could be effectively separated, and the separation between the main component and impurities was good. The calibration curves of potassium guaiacolsulfonate and known impurities were linear in the self-concentration range (r>0.999); and the average recoveries of isomerⅢ, guaiacol and impurity Ⅰ were 101.35%, 100.78%, 99.45%, while RSDs were 0.7%, 0.7%, 1.4%, respectively. **CONCLUSION** The method is rapid, accurate, sensitive and reliable for determination of the related substances of potassium guaiacolsulfonate.

KEYWORDS: potassium guaiacolsulfonate; related substance; HPLC; isomer

愈创木酚磺酸钾为刺激性祛痰药，主要通过刺激支气管黏膜腺体分泌，使痰液变稀容易咳出，是复方祛痰镇咳类口服液的主要成分之一[1]。现行标准为《卫生部药品标准(化学药品及制剂第一册)》，中国药典未收载，国外药典 USP40-NF35、JP17 均有收载。各标准在愈创木酚磺酸钾的化学结构式上有一定的差异，USP40-NF35 认为愈创木酚磺酸钾是 4-羟基-3-甲氧基苯磺酸钾和 3-羟基-4-甲氧基苯磺酸钾的混合物，JP17 则认为愈创木酚磺酸钾是 4-羟基-3-甲氧基苯磺酸钾的单体化合物，3-羟基-4-甲氧基苯磺酸钾则为杂质。目前未曾有文献报道这 2 个异构体的药理性质有差异，而国内有部分文献[2-7]未能有效检测出愈创木酚磺酸钾有 2 个异构体的峰，也有文献[8-9]能将愈创木酚磺酸钾分成 2 个峰，并以两峰面积之和计算愈创木酚磺酸钾含量。

愈创木酚磺酸钾是以愈创木酚为起始原料，经过硫酸磺化、钙化和钾化得到 4-羟基-3-甲氧基苯磺酸钾(异构体Ⅰ)和 3-羟基-4-甲氧基苯磺酸钾(异构体Ⅱ)的混合物，同时也可能得到 2-羟基-3-甲氧基苯磺酸钾(异构体Ⅲ)。如果同时有 2 个甲氧基取代，那么就会产生 3,4-二甲氧基苯磺酸钾(杂质Ⅰ)。综上所述，异构体Ⅲ、愈创木酚和杂质Ⅰ均属于该原料的工艺杂质，为已知杂质。但目前愈创木酚磺酸钾的现行标准未设置安全性指标有关物质检查项，不能充分了解该原料药的质量状况，且含量测定采用高氯酸滴定法专属性不强，不能明确中国目前的愈创木酚磺酸钾原料药是否存在异构体现象。本研究参考文献[10-11]建立 HPLC，不仅能将愈创木酚磺酸钾的 2 个异构体有

基金项目：2018 年国家药典委员会药品标准制修订研究课题(2018H100)

作者简介：许有诚，男，硕士，副主任药师 Tel: (0771)5828226 E-mail: ychengxu@163.com *通信作者：赵庄，女，主任药师 Tel: (0771)5827898 E-mail: 369762230@qq.com

效分离，同时建立外标法定量测定愈创木酚磺酸钾中已知杂质的含量，采用自身对照法定量测定其他未知杂质，并对来自 2 个生产企业的 14 批次的样品进行测定。

1 仪器与试剂

Waters Alliance e2695-2998 高效液相色谱仪(美国 Waters)，色谱柱为 InertSustain C_{18}(250 mm×4.6 mm，5 μm)；XD205DU 电子天平(0.1 mg，梅特勒公司)。

乙腈(德国 Merck，色谱纯)；磷酸二氢钾、硫酸氢化四丁基铵、磷酸氢二钾(均为分析纯，国药化学试剂集团有限公司)；水为超纯水；愈创木酚磺酸钾异构体Ⅰ对照品(化学名为 4-羟基-3-甲氧基苯磺酸钾，批号：201801；含量：95.6%)、愈创木酚磺酸钾异构体Ⅱ对照品(化学名为 3-羟基-4-甲氧基苯磺酸钾，批号：201801；含量：90.8%)、愈创木酚磺酸钾异构体Ⅲ对照品(化学名为 2-羟基-3-甲氧基苯磺酸钾，批号：201801；含量：99.3%)、杂质Ⅰ对照品(化学名为 3,4-二甲氧基苯磺酸钾，批号：201901；含量：99.5%)、愈创木酚对照品(批号：201901；含量：99.6%)均由浙江海洲制药有限公司提供。愈创木酚磺酸钾原料：GXYK 生产(批号：171001，170711，171005，171003，171009)，ZJHZ 生产(批号：190201，190202，190203，20GP03009，20GP03010，20GP03011，20GP03012，20GP03013，20GP03014)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 InertSustain C_{18}(4.6 mm ×250 mm，5 μm)，流动相为乙腈-0.02 mol·L^{-1} 磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾 2.72 g，硫酸氢化四丁基铵 3.4 g，加水 800 mL 使溶解，用 1 mol·L^{-1} 磷酸氢二钾溶液调节 pH 值至 3.5，加水稀释至 1 000 mL)(20∶80)，流速 1 mL·min^{-1}，检测波长 279 nm，进样量为 20 μL，柱温 35 ℃。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取愈创木酚磺酸钾异构体Ⅰ对照品、异构体Ⅱ对照品、异构体Ⅲ对照品、杂质Ⅰ对照品各 10 mg，置同一 100 mL 量瓶中，加 20%乙腈水溶液使溶解并稀释至刻度，摇匀，作为混合对照品储备液(0.1 mg·mL^{-1})。精密量取混合对照品储备液 5 mL 置 50 mL 量瓶中，加 20%乙腈水溶液稀释至刻度，摇匀，作为混合对照品溶液(10 μg·mL^{-1})。

2.2.2 供试品溶液的配制 取愈创木酚磺酸钾原料约 50 mg，精密称定，置 50 mL 量瓶中，用 20%乙腈水溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液(1%自身对照)的配制 精密量取“2.2.2”项下供试品溶液 1 mL，置 100 mL 量瓶中，加 20%乙腈水溶液稀释至刻度，摇匀，即得。

2.3 系统适用性和专属性

2.3.1 系统适用性 取空白溶剂(20%乙腈水溶液)、混合对照品溶液及供试品溶液各 20 μL，注入仪器进行分析，结果对照品溶液和供试品溶液中，愈创木酚磺酸钾出现 2 个色谱峰，分别为异构体Ⅰ和异构体Ⅱ，2 个异构体之间的分离度>2.0，理论板数>5 000。混合对照品溶液中，5 个杂质之间的分离度>2.0，空白溶液在主峰和杂质峰处无干扰。色谱图见图 1。

2.3.2 强制降解试验 酸破坏溶液：精密称取愈创木酚磺酸钾 50 mg 置 50 mL 量瓶中，加 1 mol·mL^{-1} 盐酸 1 mL，水浴加热 4 h，加 1 mol·mL^{-1} 氢氧化钠溶液调 pH 近中性，加 20%乙腈水溶液稀释至刻度，摇匀，即得。

碱破坏溶液：精密称取愈创木酚磺酸钾 50 mg 置 50 mL 量瓶中，加 1 mol·mL^{-1} 氢氧化钠溶液 1 mL，水浴加热 4 h，加 1 mol·mL^{-1} 盐酸溶液调 pH 近中性，加 20%乙腈水溶液稀释至刻度，摇匀，即得。

氧化破坏溶液：精密称取愈创木酚磺酸钾 50 mg 置 50 mL 量瓶中，加 30%过氧化氢 1 mL，水浴加热 4 h，用 20%乙腈水溶液稀释至刻度，摇匀，即得。

光照破坏溶液：精密称取愈创木酚磺酸钾 50 mg 置 50 mL 量瓶中，在 4 500 Lx 光照条件下照射 20 d，加 20%乙腈水溶液稀释至刻度，摇匀，即得。

高温破坏溶液：精密称取愈创木酚磺酸钾 50 mg 置 50 mL 量瓶中，加 20%乙腈水溶液适量，溶解后置水浴中加热 6 h，放冷至室温后，加 20%乙腈水溶液稀释至刻度，摇匀，即得。

精密量取以上各溶液 20 μL，注入液相色谱仪，同时采用二极管阵列检测器在 200~400 nm 内进行紫外扫描。结果表明，本品在高温及光照条件下较为稳定，杂质个数和总量无明显变化；在酸、碱破坏下仅降解出少量的杂质Ⅰ和其他未知杂质；氧化破坏下有明显的降解产物生成，包括

已知杂质Ⅰ、愈创木酚和异构体Ⅲ。各破坏条件下所产生的降解产物均与愈创木酚磺酸钾的 2 个异构体很好地分离，各降解产物之间也能较好地分离。峰纯度分析显示各破坏溶液的色谱图中愈创木酚磺酸钾异构体Ⅰ、异构体Ⅱ、杂质Ⅰ、愈创木酚和异构体Ⅲ均为单一峰，峰纯度>990。说明此方法专属性好，能有效检测样品中的降解产物。结果见图 1。

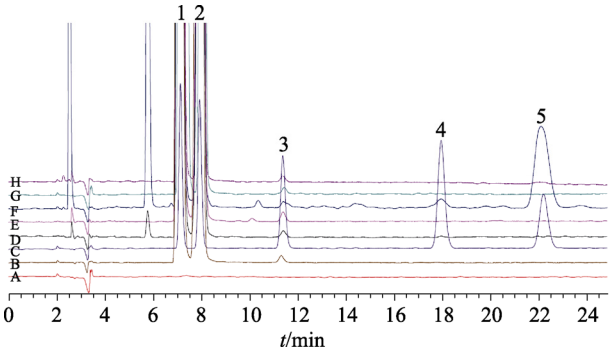

图 1　高效液相色谱图

A–空白溶剂；B–供试品溶液；C–对照品溶液；D–酸破坏溶液；E–碱破坏溶液；F–氧化破坏溶液；G–光照破坏溶液；H–高温破坏溶液；1–异构体Ⅰ；2–异构体Ⅱ；3–杂质Ⅰ；4–愈创木酚；5–异构体Ⅲ。

Fig. 1　HPLC chromatograms

A–blank solvent; B–sample solution; C–standard solution; D–solution destroyed by acid; E–solution destroyed by alkali; F–solution destroyed by oxidative; G– solution destroyed by light; H–solution destroyed by high temperature; 1–isomer Ⅰ; 2–isomer Ⅱ; 3–impurity Ⅰ; 4–guaiacol; 5–isomer Ⅲ.

2.4　线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下的混合对照品储备液 0.1，0.2，1.0，2.0，5.0 mL，置不同的 10 mL 量瓶中，加 20%乙腈水溶液稀释至刻度，摇匀，作为标准曲线溶液，浓度分别为 1.0，2.5，5.0，10，25，50 μg·mL^{-1}，按“2.1”项下色谱条件进行测定，以浓度(x，μg·mL^{-1})为横坐标，以峰面积(y)为纵坐标，绘制标准曲线，结果见表 1。5 个组分在各自的线性范围内线性关系良好，r>0.999。

2.5　检测限和定量限

取“2.2.1”项下混合对照品溶液，用 20%乙腈水溶液逐级稀释，并按“2.1”项下色谱条件进样分析，按信噪比 S/N>3 计算检测限，以信噪比 S/N>10 计算定量限，分别计算出愈创木酚磺酸钾异构体Ⅰ、异构体Ⅱ、异构体Ⅲ、愈创木酚和杂质Ⅰ的检测限和定量限，结果见表 1。

2.6　回收率试验

分别精密称取愈创木酚磺酸钾原料(批号：171001) 约 50 mg，置 50 mL 量瓶中，共 9 份，分别加入“2.2.1”项下有关物质混合对照品储备液 0.8，1.0，1.2 mL，用 20%乙腈水溶液稀释至刻度，摇匀，即得低、中、高浓度的回收率试验溶液，每个浓度 3 份。按“2.1”项下色谱条件进样分析，计算杂质Ⅰ、愈创木酚和异构体Ⅲ3 个杂质的回收率，平均回收率分别为 101.35%，100.78%，99.45%，RSD 分别为 0.7%，0.7%，1.4%。结果见表 2。

表 1　线性、检测限和定量限的检测结果

Tab. 1　Results of linear, detection limit and quantitation limit

组分	线性方程	线性范围	r	检出限/μg·mL^{-1}	定量限/μg·mL^{-1}
异构体Ⅰ	y=13 876.00x–514.26	1.30~64.86	0.999 9	0.12	0.39
异构体Ⅱ	y=14 158.82x+79.89	1.28~63.83	0.999 9	0.13	0.42
杂质Ⅰ	y=12 487.89x–856.86	1.20~60.25	0.999 9	0.20	0.65
愈创木酚	y=16 077.71x–1 611.69	1.61~80.38	0.999 9	0.20	0.68
异构体Ⅲ	y=13 711.30x–1 449.68	1.16~58.04	0.999 9	0.31	1.04

表 2　回收率试验结果(n=9)

Tab. 2　Results of recovery test(n=9)

组分	加入量/μg	已有量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
杂质Ⅰ	96.39	8.37	106.61	101.91	101.35	0.7
	96.39	7.56	104.83	100.91		
	96.39	7.97	106.49	102.21		
	120.49	8.22	129.42	100.59		
	120.49	7.54	130.81	102.31		
	120.49	8.85	131.30	101.63		
	144.59	7.39	153.07	100.76		
	144.59	6.83	153.70	101.58		
	144.59	7.99	153.03	100.31		
愈创木酚	128.60	0	130.32	101.33	100.78	0.7
	128.60	0	128.99	100.30		
	128.60	0	130.73	101.66		
	160.75	0	160.79	100.03		
	160.75	0	163.19	101.52		
	160.75	0	163.39	101.64		
	192.90	0	192.92	100.01		
	192.90	0	193.23	100.17		
	192.90	0	193.63	100.38		
异构体Ⅲ	92.86	0	93.835	101.05	99.45	1.4
	92.86	0	91.284	98.30		
	92.86	0	93.086	100.24		
	116.08	0	115.48	99.49		
	116.08	0	116.17	100.08		
	116.08	0	116.88	100.69		
	139.30	0	139.38	100.06		
	139.30	0	134.38	96.47		
	139.30	0	137.44	98.67		

http://www.chinjmap.com

2.7 重复性试验

按“2.6”项下中浓度(杂质限度)水平平行配制6份供试品溶液(批号：171001)，再分别精密量取供试品溶液1 mL置100 mL量瓶中，用20%乙腈水溶液稀释制成1%的自身对照溶液。按“2.1”项下色谱条件进样分析，以1%自身对照法(2个异构体峰面积之和) 计算单个杂质含量和总杂质含量，杂质Ⅰ、愈创木酚和异构体Ⅲ用杂质对照外标法计算含量，并计算其RSD。6份供试品溶液中，杂质Ⅰ、愈创木酚和异构体Ⅲ的RSD分别为1.4%，1.2%，0.9%，杂质总量的RSD为1.8%，表明该方法重复性良好。

2.8 仪器精密度试验

取“2.2.1”项下的混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，测得愈创木酚磺酸钾异构体Ⅰ、异构体Ⅱ、异构体Ⅲ、愈创木酚和杂质Ⅰ的峰面积RSD<1.0%。结果表明，本方法的仪器精密度良好。

2.9 稳定性试验

取“2.2.1”项下的混合对照品溶液，分别于放置0，1，2，4，8，16，24 h时进样测定，测得愈创木酚磺酸钾异构体Ⅰ、异构体Ⅱ、异构体Ⅲ、愈创木酚和杂质Ⅰ的峰面积 RSD<1.0%。结果表明，混合对照品溶液在24 h内稳定性良好。

取“2.2.2”项下的供试品溶液(批号：171001)，分别于放置0，1，2，4，8，16，24 h时进样测定，考察单个杂质和杂质总量的变化情况。结果供试品溶液在24 h未产生新的降解杂质，单个杂质含量的RSD为1.2%，杂质总量的RSD为1.5%，表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.10 样品的测定

取来自2个生产企业的14批次的愈创木酚磺酸钾原料各 50 mg，精密称定，置不同的 50 mL量瓶中，用 20%乙腈水溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进行分析，检测结果见表3。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器对愈创木酚磺酸钾异构体Ⅰ、异构体Ⅱ、异构体Ⅲ、愈创木酚和杂质Ⅰ进行全波长扫描，从各对照品溶液的DAD图谱结果可知，愈创木酚磺酸钾2个异构体及其有关物质基本在279 nm附近有最大吸收，因此选择279 nm作为愈创木酚磺酸钾有关物质的检测波长。

表3 有关物质测定结果(n=3)

Tab. 3 Determination results of relative substance(n=3)

批号	杂质Ⅰ/%	愈创木酚/异构体Ⅲ	单个杂质/%	杂质总量/%
171001	0.039	–	0.057	0.057
170711	0.040	–	0.043	0.043
171005	0.012	–	0.054	0.110
171003	0.056	–	0.064	0.064
171009	0.016	–	0.055	0.119
190201	0.010	–	0.044	0.106
190202	0.120	–	0.064	0.064
190203	0.009	–	0.140	0.200
20GP03009	0.043	–	0.052	0.052
20GP03010	0.045	–	0.033	0.033
20GP03011	0.041	–	0.041	0.041
20GP03012	0.041	–	0.042	0.042
20GP03013	0.043	–	0.051	0.051
20GP03014	0.047	–	0.052	0.052

注：“–”代表未检出。

Note: “–” representative not detected.

3.2 色谱柱的选择

JP17 的愈创木酚磺酸钾有关物质测定方法中，采用的是氨丙基色谱柱，流动相为0.05 mol·L^{-1}磷酸二氢钾-甲醇(20∶1)。前期研究发现，在该系统进行有关物质测定，柱流失很快，系统也不够稳定。因此选择传统的十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱，并选择在流动相加入离子对试剂来增加愈创木酚磺酸钾在色谱柱上的保留时间。同时考察了来自5个不同厂家不同填料，规格均为“4.6 mm×250 mm，5 μm”的色谱柱对测定结果的影响，结果发现 5 根柱子上各成分的峰型都较好，分离度均能满足要求，能满足样品有关物质检测的要求。

3.3 相对保留时间的考察

根据各成分在不同色谱柱上得到的保留时间来计算相对于愈创木酚磺酸钾异构体Ⅰ的保留时间，结果见表4。由表可知，异构体Ⅱ相对于异构体Ⅰ保留时间相对稳定，但是异构体Ⅲ、愈创木酚和杂质Ⅰ的相对保留时间不稳定，因此不建议采用相对保留时间来对已知杂质进行定位。

3.4 小结

目前含有愈创木酚磺酸钾原料药的有复方愈创木酚磺酸钾口服溶液、愈酚喷托异丙嗪颗粒、复方氨酚甲麻口服液等多种复方制剂。原料药质量标准的完善有助于制剂质量标准的提升，严格控制原料药中杂质的含量有利于控制制剂质量，

表 4 相对保留时间的考察结果
Tab. 4 Investigation results of relative retention time

色谱柱	异构体Ⅰ的相对保留时间			
	异构体Ⅱ	杂质Ⅰ	愈创木酚	异构体Ⅲ
InertSustain C_{18}	1.1	1.6	2.5	3.1
Waters XSelect T3	1.1	1.6	2.5	3.4
Syncronis AQ	1.1	1.5	2.2	2.6
Agilent HC-C_{18}(2)	1.1	1.5	2.4	2.9
Agilent SB-AQ	1.1	1.6	1.8	2.9
CAPCELL ADME	1.1	1.7	2.1	3.4

因此有必要建立健全愈创木酚磺酸钾原料药的有关物质测定方法。

本实验建立了一种 HPLC 有效检测愈创木酚磺酸钾原料药中有关物质的方法，并进行了方法学验证。结果表明，目前市场上收集到的愈创木酚磺酸钾原料药均为 2 个异构体的混合物。该方法可以将 2 个异构体有效分离并检出目前已知杂质，方法专属性强，灵敏度高，可以用于愈创木酚磺酸钾原料药的质量控制，为本品质量标准的完善和提升提供了有力的依据和技术支撑。

REFERENCES

[1] WEI N Y, ZHOU Y, HU C Q. Determination of potassium guaiacolsulfonate isomer by NMR[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2011, 46(12): 953-955.

[2] JIA F, TAO Q F, SHI H Q. Determination of three components in Shangfeng Zhike granules by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2005, 22(2): 151-153.

[3] CHEN H, LI L S, ZHANG Y, et al. Simultaneous determination of potassium guaiacolsulfonate, 4-Acetamidophenol and caffeine on a magnolol-bonded silica gel stationary phase by HPLC[J]. Chin J Anal Lab(分析试验室), 2012, 31(11): 67-71.

[4] 郭平, 史奕. HPLC 法测定愈创木酚磺酸钾的含量[J]. 江苏药学与临床研究, 2000, 8(2): 29-30.

[5] HAO L F. Determination of the content of two ingredients in sulfogaiacol oral solution by HPLC[J]. Drug Stand China(中国药品标准), 2005, 6(6): 25-26.

[6] 赵明. 高效液相色谱法测定复方愈创木酚磺酸钾口服溶液中 2 组分的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(1): 77-78.

[7] ZHAO W, MAO R, CHEN H. Establishment of A method for content determination of five active ingredients in compound methylephedrine oral solution[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2014, 28(1): 66-70.

[8] LI M F, XIAO L H, LIU M, et al. Determination of potassium guaiacolsulfonate and promethazine hydrochloride in compound guaiacol potassium sulfonate oral solution by HPLC[J]. Drug Stand China(中国药品标准), 2020, 21(3): 258-264.

[9] FU P, CHANG Y B, XIE H. Optimization of the content determination of sulfogaiacol, pentoxyverine and promethazine granule by HPLC[J]. China Pharm(中国药师), 2019, 22(3): 569-571.

[10] HU F F, HU Y L, MIAO Q Z, et al. Determination of the related substance of codeine phosphate by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(17): 2171-2176.

[11] SHI Y F, SUN X, JING Y, et al. Determination of related substances of fenofibrate extended release capsules by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(6): 706-709.

收稿日期：2020-07-11

(本文责编：沈倩)

http://www.chinjmap.com