羟苯甲酯及羟苯甲酯钠对照品的稳定性研究

熊　婧，刘　毅，宁保明*，何　兰*

中国食品药品检定研究院 化学药品质量研究与评价重点实验室，北京 100050

摘　要：目的 对羟苯甲酯和羟苯甲酯钠对照品的包装、贮存及使用风险进行评价研究。**方法** 采用多种方法联合分析，通过动态水分吸附分析法测定羟苯甲酯和羟苯甲酯钠的水分吸附动力学曲线和吸附/解吸附等温线，并与传统的引湿性试验结果相对比；通过费休氏容量滴定法测定并比较包装前后羟苯甲酯钠的水分含量和均匀性，干燥失重法测定包装前后羟苯甲酯的减失质量，考察了西林瓶和安瓿瓶两种包装用瓶的适用性；分别采用高效液相色谱（HPLC）法、粉末X射线衍射法、热重分析法和差示扫描量热分析法研究了羟苯甲酯和羟苯甲酯钠的化学稳定性、晶型稳定性以及热稳定性。**结果** 羟苯甲酯钠对照品置于温度25 ℃、相对湿度80%恒温恒湿箱内24 h，增重百分率为21.2%，极具引湿性；采用西林瓶或安瓿瓶包装均无法保证对照品量值的准确；引湿增重21.2%未对其HPLC纯度产生影响，但晶型发生了转变；热重分析表明，随着温度升高，样品中的水分完全释放。羟苯甲酯对照品无引湿性，西林瓶包装足以保证其量值的准确；长期贮存稳定，干燥不会对其稳定性产生影响，引湿前后未发生晶型转变。**结论** 通过对羟苯甲酯和羟苯甲酯钠对照品深入系统的研究，评价了对照品使用的关键点及风险级别，建议质量标准中采用羟苯甲酯对照品替代羟苯甲酯钠对照品。

关键词：羟苯甲酯；羟苯甲酯钠；对照品；引湿性；水分吸附；热分析；粉末X射线衍射；高效液相色谱

中图分类号：R927.11　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674-6376（2020）06-1065-06

DOI：10.7501/j.issn.1674-6376.2020.06.014

Study on stability of methylparaben and sodium methyl parahydroxybenzoate reference standards

XIONG Jing, LIU Yi, NING Baoming, HE Lan

National Institutes for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To evaluate the packaging, storage and use risk of methylparaben (MeP) and sodium methyl parahydroxybenzoate (SMeP) reference standards (RS). **Methods** Using a combination of methods, dynamic vapor sorption analysis was used to determine the moisture sorption dynamic curve and adsorption-desorption isotherm of MeP and SMeP, and compared with the results of traditional hygroscopicity test. The applicability of penicillin bottles and ampoule bottles were investigated by measuring and comparing the moisture content and uniformity of SMeP before and after packaging determined by the Karl fischer reaction method, and measuring the weight loss of MeP before and after packaging determined by loss on drying method. The chemical stability, crystal stability and thermal stability of MeP and SMeP were studied by HPLC, powder X-ray diffraction, thermogravimetry and differential scanning calorimetry. **Results** The weight gain of SMeP control sample was 21.2% in a constant temperature and humidity box with 25 ℃ and 80% relative humidity for 24 h, which was extremely hygroscopic; the accuracy of the weight gain of the control sample could not be guaranteed by using vials or ampoules; 21.2% of the weight gain of the control sample had no effect on the purity of HPLC, but the crystal type changed; TGA showed that the water in the sample was completely released with the increase of temperature. There is no hygroscopic property for the MeP reference product, and the packaging of Xilin bottle is enough to ensure the accuracy of its quantity value; the long-term storage was stable, and the drying will not affect its stability, and there was no crystal transformation before and after hygroscopic. **Conclusion** The key points and risk levels of MeP

收稿日期：2019-09-29

基金项目：国家药典委员会药品标准制修订研究课题（2019Y16）；国家重大研发项目（2016YFE0205400）；化学药品质量研究与评价重点实验室项目

第一作者：熊　婧，女，副研究员　研究方向：药品质量分析研究

***通信作者：**宁保明，男，研究员　研究方向：药品质量分析研究。Tel：（010）53851575　E-mail：ningbm@nifdc.org.cn

何　兰，女，研究员 研究方向：药品质量分析研究。Tel：（010）53851600　E-mail：helan1961@aliyun.com

and SMeP RS were evaluated, which provided the basis for the revision of the quality standard.It is suggested that the reference of SMeP should be replaced by the reference of MeP in the quality standard.

Key words: methylparaben; sodium methyl parahydroxybenzoate; reference standards; hygroscopicity; vapor sorption; thermal analysis; powder X-ray diffraction; HPLC

羟苯甲酯属于对羟基苯甲酸酯类抑菌剂，是国际公认的广谱、高效、低毒类抑菌剂，广泛应用于医院制剂的软膏、合剂和液体制剂处方中[1]。羟苯甲酯原料药收载于《中国药典》2015年版四部[2]药用辅料部分，另外在《美国药典》41版[3]、《欧洲药典》9.0版[4]、《英国药典》2019年版[5]和《日本药局方》17版[6]中亦有收载。羟苯甲酯对照品的使用范围很广，在《中国药典》2015年版中用于羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯、羟苯丁酯、羟苯甲酯钠、托吡卡胺滴眼液、盐酸环丙沙星滴眼液、诺氟沙星滴眼液、氯霉素滴眼液、明胶空心胶囊、肠溶明胶空心胶囊及注射用盐酸表柔比星等12个品种质量标准中的鉴别、系统适用性试验或供试品中羟苯甲酯的含量测定。

羟苯甲酯钠是羟苯甲酯的钠盐，同样是抑菌剂，收载于《中国药典》2015年版四部[2]药用辅料部分，在美、欧、英3药典中有收载[3-5]。国家食品药品监督管理局国家药品标准WS_1-（X-180）-2003Z布洛芬乳膏[7]中对防腐剂对羟基苯甲酸甲酯钠（即羟苯甲酯钠）的含量进行了控制，使用到羟苯甲酯钠对照品。

在羟苯甲酯及其钠盐对照品的标化过程中，本研究针对二者的包装、贮存及使用风险进行了评价研究，观察二者引湿性，考察了西林瓶和安瓿瓶两种包装用瓶的适用性，分别采用高效液相色谱（HPLC）法、粉末X射线衍射分析（PXRD）、热重分析法（TGA）和差示扫描量热分析法（DSC）研究了羟苯甲酯和羟苯甲酯钠的化学稳定性、晶型稳定性以及热稳定性。评价了对照品使用的关键点及风险级别，为质量标准[7]的修订提供了依据。

1 材料

1.1 药物和试剂

羟苯甲酯对照品（中国食品药品检定研究院，批号100278-201906）；羟苯甲酯钠对照品（中国食品药品检定研究院，批号100719-201502）；羟苯乙酯对照品（中国食品药品检定研究院，批号100847-201604）；羟苯丙酯对照品（中国食品药品检定研究院，批号100444-201804）；甲醇（Fisher公司，批号184868，质量分数99.9%）；冰醋酸（Fisher公司，批号175578，质量分数＞99.7%）；水为超纯水。

1.2 实验仪器

Waters e2695-2998高效液相色谱仪（美国Waters公司）；XP205DR电子天平（瑞士Mettler Toledo公司）；DL31水分测定仪（瑞士Mettler Toledo公司）；DVS advantage动态水分吸附仪（英国SMS公司）；HPP260恒温恒湿箱（德国Memmert公司）；Rigaku SmartLab粉末X射线衍射仪；DSC822^{e}差示扫描量热仪（瑞士Mettler Toledo公司）；TGA/DSC1同步热分析仪。

2 方法与结果

2.1 羟苯甲酯钠对照品的评价研究

2.1.1 引湿性测定 根据《中国药典》2015年版四部通则9103药物引湿性试验指导原则，取干燥的具塞玻璃称量瓶，于试验前1天置于温度25 ℃、相对湿度80%恒温恒湿箱内，精密称定质量m_1。取羟苯甲酯钠对照品约1 mm厚，平铺于上述称量瓶中，精密称定质量m_2。将称量瓶敞口，并与瓶盖同置于上述恒温恒湿条件下24 h，盖好称量瓶盖子，精密称定质量m_3。计算得羟苯甲酯钠对照品的增重率为21.2%，属于极具引湿性。

2.1.2 动态水分吸附分析 温度25 ℃，氮气体积流量200 mL/min，相对湿度以10%的变化步进，从20%逐渐增加到80%，之后再逐渐降低到20%，除相对湿度80%平衡时间为180 min外，其它每个湿度固定平衡时间为60 min。设定自动测定样品质量时间间隔为5 s，自动记录样品质量时间间隔为1 min。

图1是羟苯甲酯钠的水分吸附动力学曲线和吸附/解吸附等温线[8]，相对湿度20%时，羟苯甲酯钠的相对质量几乎没有变化；相对湿度不小于30%时，水分吸附量明显增加，样品迅速引湿，当相对湿度为80%，样品相对质量增加约20.0%并达到吸附平衡。之后随着相对湿度的下降，相对质量几乎不再变化，样品吸附的水不发生解吸附，推测羟苯甲酯钠从吸附过程相对湿度50%开始形成稳定的结晶态[9]。

结果提示，羟苯甲酯钠对照品极易引湿，当称量环境的相对湿度达到30%或以上时，会快速吸附环境中的水分，导致对照品含量发生变化。在夏季

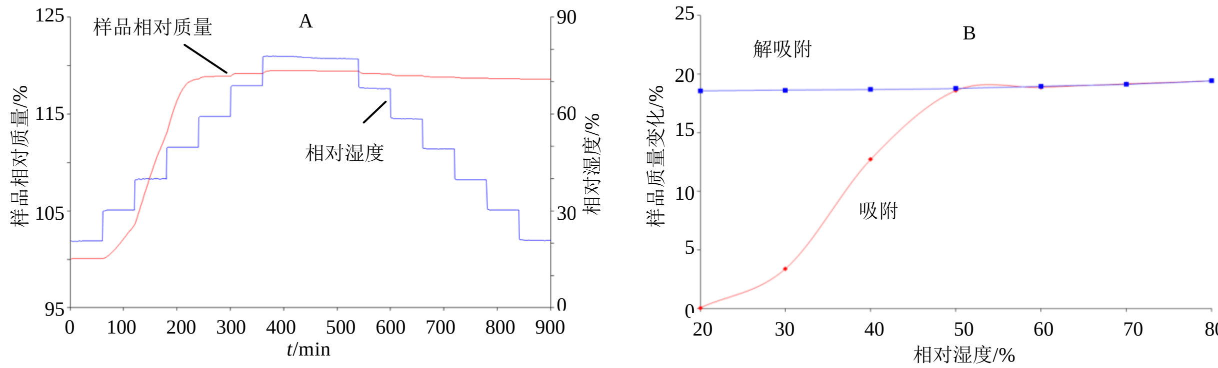


图1　羟苯甲酯钠的水分吸附动力学曲线（A）和吸附/解吸附等温线（B）

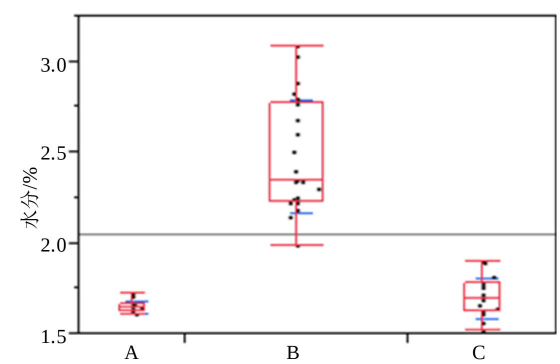
Fig. 1　Moisture sorption dynamic curve（A）and adsorption-desorption isotherm（B）of SMeP

或者湿润的南方，要把环境相对湿度控制在30%以下是很困难的，据此判断羟苯甲酯钠对照品是高风险品种。

2.1.3　对包装用瓶的考察及水分均匀性测定　对于有引湿性的对照品，需要重点关注水分含量和均匀性，二者会直接影响到对照品量值的准确[10]。将羟苯甲酯钠对照品分别采用西林瓶和安瓿瓶包装，通过采用费休氏容量滴定法考察水分含量和均匀性的变化，判断包装用瓶的密闭性，并进行评价。

将羟苯甲酯钠对照品分装于西林瓶中，分装前水分含量为1.65%，相对标准偏差（RSD）为2.1%（n=10，图2中标记为A）；分装并贮存7年后的水分含量为2.48%，RSD为12.6%（n=21，图2中标记为B）。采用JMP13.0软件进行统计分析，由于数据样本方差不齐，因此用非参数Wilcoxon检验比较西林瓶分装前后水分含量的差异，Steel-Dwass检验进一步两两比较，统计结果表明，分装并贮存7年后的水分含量显著高于分装前（P<0.01），提示西林瓶不完全密封，贮藏过程中环境的水分进入到西林瓶内与羟苯甲酯钠发生相互作用，故羟苯甲酯钠对照品不宜采用西林瓶包装。

将羟苯甲酯钠对照品分装于安瓿瓶中，分装后水分含量为1.70%，RSD为6.6%（n=14，图2中标记为C）。采用非参数Wilcoxon检验比较安瓿瓶分装前后水分含量的差异，Steel-Dwass检验进一步两两比较，统计结果表明，分装于安瓿瓶后的水分含量与分装前无显著差异，但相对标准偏差值有所增加，提示分装过程空气中的水未对羟苯甲酯钠对照品产生明显影响，这应该得益于分装时将环境湿度严格控制在20%以下。然而根据动态水分吸附分析结果，一旦打开安瓿瓶，若环境相对湿度达到30%或以上，羟苯甲酯钠对照品会迅速吸附环境中的水分。因此，无论采用西林瓶或安瓿瓶装，均无法保证羟苯甲酯钠对照品量值的准确，该品种不适合作为供含量测定用的对照品。



A-分装前；B-分装于西林瓶后；C-分装于安瓿瓶后；与A比较：$^{**}P$<0.01

A-before sub packaging; B-after sub packaging in vials; C-after sub packaging in ampoules; $^{**}P$ < 0.01 *vs* A

图2　羟苯甲酯钠水分含量的非参数检验结果

Fig. 2　Results of non-parametric test on moisture content of SMeP

2.1.4　有关物质测定　按《中国药典》2015年版羟苯甲酯钠有关物质项下方法，采用CAPCELL PAK C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为甲醇-1%冰醋酸（60∶40），体积流量0.8 mL/min，柱温30 ℃，检测波长254 nm。

精密称取“2.1.1”项引湿性测定后和未引湿的羟苯甲酯钠对照品适量，分别加流动相溶解并稀释制成1 mg/mL的供试品溶液。精密量取供试品溶液20 μL，注入液相色谱仪，按上述色谱条件测定，结果见图3。按归一化法计算，未引湿的质量分数为99.1%，引湿后的质量分数为99.2%，表明羟苯甲酯钠引湿增重21.2%未对其HPLC纯度产生影响。

2.1.5　PXRD　取“2.1.1”项引湿性测定后和未引湿的羟苯甲酯钠对照品适量，分别过300目筛，置载样玻璃片凹槽中，用玻璃片正压法制片。采用CuKα靶，D/teX Ultra探测器，电压45 V，电流200 A，狭缝

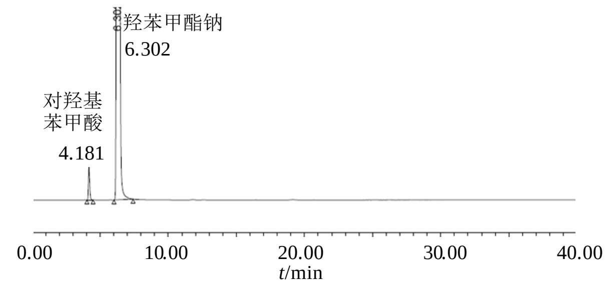


图3　羟苯甲酯钠有关物质色谱图

Fig. 3　HPLC chromatogram of SMeP

宽度：1/2°、20 mm、20 mm，扫描范围（2θ）5～50°，扫描速度10°/min，扫描间隔0.01°。记录粉末X射线衍射图谱，见图4。

未引湿的羟苯甲酯钠在2θ=8.820°、10.990°、12.990°、14.370°、14.890°、16.020°、19.320°、21.560°、25.990°、30.080°有特征衍射峰；引湿后在2θ=8.940°、14.380°、15.460°、16.030°、17.889°、19.360°、25.970°、26.370°、27.260°、27.990°有特征衍射峰[11]。表明羟苯甲酯钠对照品置温度25 ℃、相对湿度80%条件下引湿后，晶型发生了转变，进一步验证了吸附过程形成了稳定的结晶态的结论[12]。

2.1.6　TGA　称取羟苯甲酯钠对照品19.0 mg，置

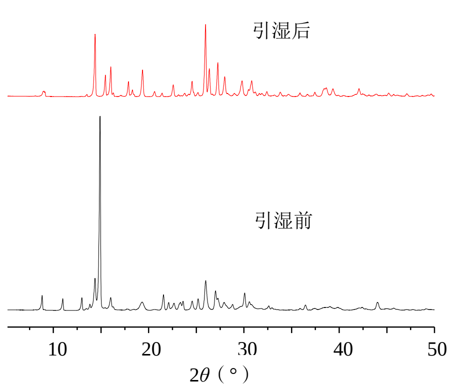


图4　羟苯甲酯钠引湿前后的粉末X射线衍射图

Fig. 4　PXRD spectra of SMeP before and after moisture adsorption

70 μL氧化铝坩埚中测定分析。温度范围30～170 ℃，升温速率为20 ℃/min，气氛氮气体积流量为50 mL/min。结果见图5，曲线提示，羟苯甲酯钠从80 ℃开始吸热，显著失重，失重率为1.6%，与水分含量值吻合，表明随着温度升高，样品中的水分完全释放。

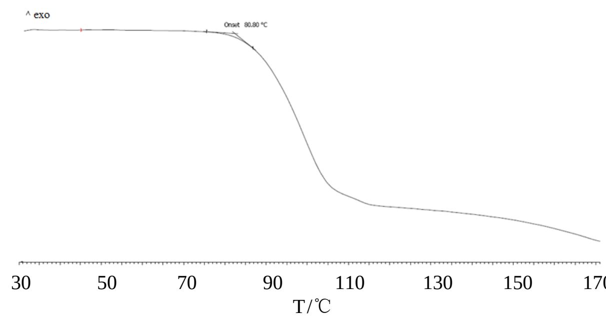


图5　羟苯甲酯钠的热重分析图

Fig. 5　TGA figure of SMeP

2.2　羟苯甲酯对照品的评价研究

2.2.1　引湿性测定　取羟苯甲酯对照品，按“2.1.1”项下同法测定，计算得羟苯甲酯对照品的增重百分率为0.1%，无引湿性。

2.2.2　动态水分吸附分析　温度25 ℃，氮气体积流量200 mL/min，相对湿度以10%的变化步进，从20%逐渐增加到80%，之后再逐渐降低到20%。dm/dt模式，即达到平衡后自动进入下个湿度。设定自动测定样品质量时间间隔为5 s，自动记录样品质量时间间隔为1 min。

图6是羟苯甲酯的水分吸附动力学曲线和吸附/解吸附等温线，随着环境相对湿度由低到高，又由高到低的整个过程，羟苯甲酯相对质量变化始终小于0.3%，说明其暴露在一定湿度的环境中时既不会吸水又不会脱水，与水分相互作用的程度很低[9]，判定为低风险品种。

2.2.3　干燥失重及对西林瓶包装的考察　按《中国

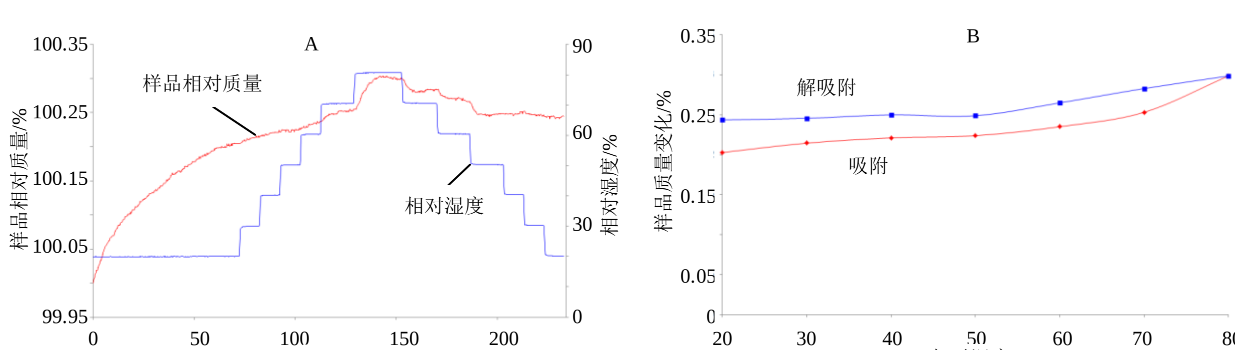


图6　羟苯甲酯的水分吸附动力学曲线（A）和吸附/解吸附等温线（B）

Fig. 6　Moisture sorption dynamic curve（A）and adsorption-desorption isotherm（B）of MeP

药典》2015年版羟苯甲酯干燥失重项下方法，取羟苯甲酯对照品置硅胶干燥器内，减压干燥至恒重，未检出减失质量。

将本品分装于西林瓶中，放置5年后考察干燥失重，结果仍未检出减失质量，表明羟苯甲酯与水分相互作用的程度低，干燥失重值未发生变化，西林瓶包装足以保证其量值的准确。

2.2.4 有关物质测定　按《中国药典》2015年版羟苯甲酯有关物质项下方法，采用CAPCELL PAK C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相为甲醇-1%冰醋酸（60∶40），体积流量0.8 mL/min，柱温30 ℃，检测波长254 nm。

称取羟苯甲酯、羟苯乙酯和羟苯丙酯对照品各适量，加流动相溶解并稀释制成10 μg/mL的系统适用性溶液。精密称取“2.2.3”项干燥后、放置5年后和未干燥的羟苯甲酯对照品适量，分别加流动相溶解并稀释制成1 mg/mL的供试品溶液。精密量取系统适用性溶液和供试品溶液各20 μL，注入液相色谱仪，按上述色谱条件测定，结果见图7。按归一化法计算，未干燥、干燥后以及放置5年后的样品质量分数均为99.9%，表明羟苯甲酯对照品长期贮存稳定，干燥不会对其稳定性产生影响。

2.2.5 XRPD　取“2.2.1”项引湿性测定后和未引湿的羟苯甲酯对照品适量，分别过300目筛，置载样玻璃片凹槽中，用玻璃片正压法制片。采用CuKα靶，D/teX Ultra探测器，电压45 kV，电流200 mA，狭缝宽度：1/2°、20 mm、20 mm，扫描范围（2*θ*）5°～50°，扫描速度10°/min，扫描间隔0.01°。记录XRPD图谱见图8。

未引湿的羟苯甲酯在2*θ*=13.910°、17.049°、18.510°、21.450°、25.220°、26.170°、27.640°、36.370°有特征衍射峰；引湿后在2*θ*=13.930°、17.049°、18.560°、21.520°、25.250°、26.220°、27.650°、36.420°有特征衍射峰。引湿前后特征衍射峰的峰位及强度基本未见变化，表明羟苯甲酯对照品引湿后未发生晶型转变。

2.2.6 差示扫描量热分析　称取羟苯甲酯对照品约3 mg，置40 μL标准铝坩埚中测定分析。温度范围116～132 ℃，升温速率为0.5 ℃/min，气氛氮气体积流量为50 mL/min。结果见图9，总面积502.7 mJ，起始熔点125.1 ℃，峰顶温度125.5 ℃，测得质量分数

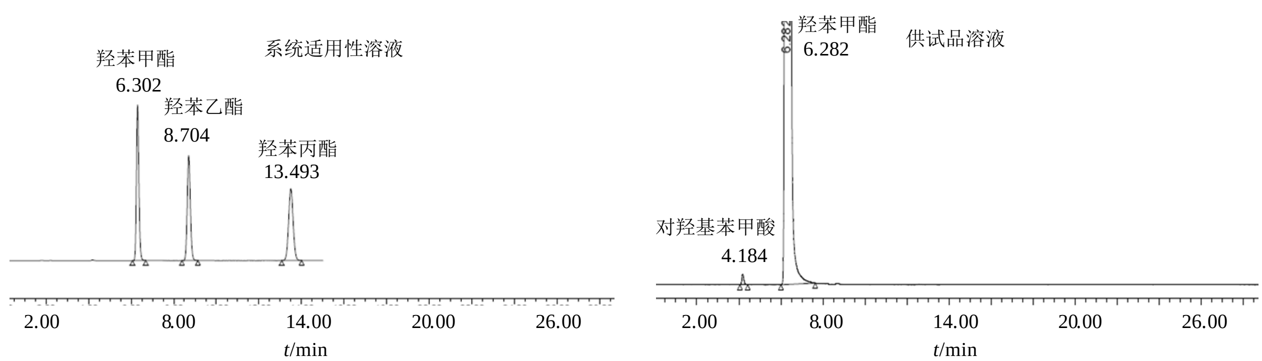


图7　羟苯甲酯有关物质色谱图

Fig. 7　HPLC chromatogram of MeP

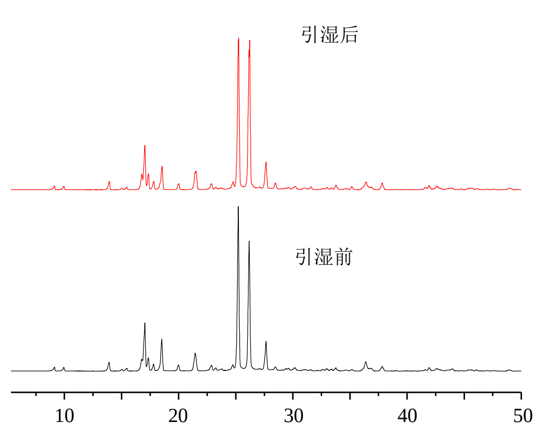


图8　羟苯甲酯引湿前后的XRPD图

Fig. 8　XRPD spectra of MeP before and after moisture adsorption

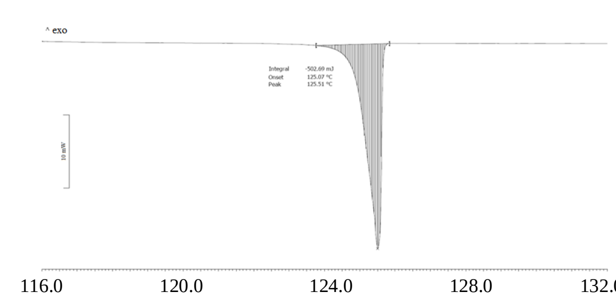


图9　羟苯甲酯的差示扫描量热图

Fig. 9　DSC figure of MeP

为99.9%。同法考察“2.2.3”项干燥后及放置5年后羟苯甲酯对照品，测得质量分数均为99.9%，佐证了羟苯甲酯对照品长期贮存以及干燥后均稳定的结论。

3 讨论

羟苯甲酯钠对照品极具引湿性，采用西林瓶包装在贮存过程有与环境中的水分发生相互作用的风险，即便采用安瓿瓶包装，当称量环境的相对湿度达到30%或以上时，羟苯甲酯钠快速引湿，可能会导致对照品含量发生变化，从而判断羟苯甲酯钠是高风险品种。羟苯甲酯对照品化学结构稳定，不具引湿性，受环境相对湿度影响小，长期贮存稳定，干燥亦不会对其稳定性产生影响，对照品含量不易发生变化，判断羟苯甲酯是低风险品种。故羟苯甲酯钠不适合作为供含量测定用的对照品，建议质量标准中采用羟苯甲酯对照品替代其钠盐。

本课题组前期研究发现化学药品的引湿性与其在水中的溶解性呈正相关[13]，通常来说，化学药品在水中的溶解度高则引湿性强，溶解度低则引湿性弱。羟苯甲酯钠在水中易溶，极具引湿性；羟苯甲酯在水中微溶，无引湿性，进一步验证了上述研究结论。

参考文献

[1] 李中东, 张云轩, 郭燕萍, 等. 羟苯酯类防腐剂的不良反应 [J]. 中国药物警戒, 2012, 9(5): 303-305.

[2] 中国药典 [S]. 四部. 2015: 572-574.

[3] USP42-NF37 [S]. 2019: 5831-5833.

[4] EP 9.0 [S]. 2017: 3029-3030, 3591-3592.

[5] BP 2019 [S]. 2019: 257-258, 910-912.

[6] JP XVII [S]. 2016: 1235-1236.

[7] 新药转正标准第39册(WS_1-(X-180)-2003Z) [S]. 2004.

[8] 赵立杰, 林 晓, 王优杰, 等. 应用动态水蒸汽吸附法分析葛根提取物的吸湿性对其压缩成形性的影响 [J]. 药学学报, 2017, 52(8): 1318-1323.

[9] 熊 婧, 杨化新, 吴建敏, 等. 基于动态水分吸附分析技术的化学对照品水分吸附特性研究 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(6): 532-535.

[10] 张 娜, 黄海伟, 熊 婧, 等. 甲钴胺的引湿性探讨 [J]. 中国药事, 2017, 31(10): 1181-1185.

[11] 仲昭毅, 吴 敏, 钱 帅, 等. 聚乙烯吡咯烷酮抑制葛根素一水合物在溶出过程中向二水合物的转变 [J]. 药学学报, 2017, 52(2): 302-309.

[12] 熊 婧, 宁保明, 吴建敏, 等. 维生素B2的晶型表征及其水分吸附特性研究 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(16): 1436-1440.

[13] 熊 婧, 石 岩, 吴建敏, 等. 基于非参数检验分析化学药品引湿性与水溶解性的关系 [J]. 中国药学杂志, 2016, 51(20): 1786-1789.