

高效液相色谱法测定复方间苯二酚搽剂中间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松的含量

陈晓亮¹,汪旭²

(1. 海口市人民医院,海南 海口 570208;2. 长春八一医院,吉林 长春 130024)

摘要:目的 建立高效液相色谱(HPLC)法测定复方间苯二酚搽剂中间苯二酚、水杨酸和醋酸氟轻松的含量。方法 采用HPLC法。色谱柱为WondaSil C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相组成为甲醇-乙腈-0.1%磷酸溶液(55:10:35),流速为1.0 mL · min⁻¹,柱温为30℃,紫外检测器波长:240 nm,进样量:10 μL。结果 间苯二酚、水杨酸和醋酸氟轻松检测质量的线性范围分别为16~56、10~35和0.08~0.28 μg;精密性、稳定性、重复性试验的RSD ≤ 0.50%;平均加样回收率分别为99.05%(n=6, RSD=0.70%)、100.16%(n=6, RSD=0.63%)和99.20%(n=6, RSD=0.81%)。结论 该方法结果准确,精密度高,可同时测定间苯二酚、水杨酸和醋酸氟轻松的含量,可用于此制剂的质量控制。

关键词:复方间苯二酚搽剂;高效液相色谱法;间苯二酚;水杨酸;醋酸氟轻松

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.01.014

Content determination of resorcinol salicylic acid and fluocinonide in compound resorcinol liniment by HPLC

CHEN Xiaoliang¹, WANG Xu²

(1. Haikou People's Hospital, Haikou, Hainan 570208, China;

2. Department of Pharmacy, Bayi Hospital of Changchun, Changchun, Jilin 130024, China)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for determination of content of resorcinol salicylic acid and fluocinonide in compound resorcinol liniment. **Methods** HPLC method was adopted. The determination was performed on WondaSil C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase of methanol-acetonitrile-0.1% phosphoric acid (55:10:35) at flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was maintained at 30℃. The UVD wavelength was set at 240 nm and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range was good within 16~56 μg for resorcinol, 10~35 μg for salicylic acid and 0.08~0.28 μg for fluocinonide. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were not higher than 0.50%. Average recoveries were 99.05% (n=6, RSD=0.70%), 100.16% (n=6, RSD=0.63%) and 99.20% (n=6, RSD=0.81%), respectively. **Conclusions** The method is accurate and can be used in content determination of resorcinol salicylic acid and fluocinonide in compound resorcinol liniment at the same time. The method can also be used in the quality control of the preparations.

Key words: Compound resorcinol liniment; HPLC; Resorcinol; Salicylic acid; Fluocinonide

本课题组对“武当松针茶”中莽草酸提取条件作了初步的考察,其提取次数、样品粉碎粒度,提取方法对莽草酸含量的影响,以及其它主要有效成分研究有待进一步完善。

参考文献

- [1] 程兰香,黄永光,周文美,等. 马尾松不同部位中莽草酸的含量分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):260-262.
- [2] 陈英,刘成国,赵毓芝,等. 松针功能性成分及应用研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(10):5994-5996.
- [3] 刘东彦,石晓峰. 药用松针的研究进展[J]. 中药材,2012,35(10):1701-1705.
- [4] 顾小文,朱开梅. 莽草酸及其衍生物医学作用的研究进展[J]. 医学综述,2013,19(6):1099-1101.
- [5] 白朝辉,石晓峰,刘东彦,等. 雪松松针的化学成分及药理作用研究概述[J]. 中国药师,2012,15(12):1791-1793.
- [6] 战英,陈丽娜,石矛,等. 微波辅助提取红松松针总黄酮工艺优化[J]. 食品研究与开发,2015,36(16):69-72.
- [7] 俞静静,李风华,陈素红,等. HPLC测定不同产地马尾松等松叶中莽草酸的含量[J]. 药物分析杂志,2015,35(1):52-55.
- [8] 雷艳萍,石晓峰,白朝辉,等. 雪松不同部位中莽草酸的含量分析[J]. 中国药房,2015,26(6):803-805.
- [9] 张志琴,刘光明,杨永寿,等. 正交试验优化云南松松针中莽草酸的提取工艺[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(10):761-763.
- [10] 沈薇,石晓峰,王东东,等. 正交试验优选雪松松针中莽草酸的提取工艺[J]. 中国现代应用药学,2011,28(9):831-834.
- [11] 杨晓莉,周浓,段宝忠,等. 超声提取华山松松针中莽草酸工艺优化[J]. 安徽农业科学,2011,39(20):12064-12069.

(收稿日期:2016-07-09,修回日期:2016-11-23)

复方间苯二酚搽剂由间苯二酚、水杨酸和醋酸氟轻松及辅料组成的外用制剂,在临床应用多年,疗效确切。间苯二酚具有杀菌的作用,是用于足癣的首选良药。水杨酸具有消毒防腐的作用,可软化、溶解角质层。醋酸氟轻松为外用强效糖皮质激素类药物,其疗效显著而副作用较小,局部外用可以促进真皮内毛细血管收缩,抑制表皮中细胞的再生或增殖,阻止溶酶体酶释放而引起的组织损伤。因其具有较强的抗炎、抗过敏作用,临床上广泛应用于过敏性皮炎、接触性皮炎、脂溢性皮炎、湿疹、皮肤瘙痒症、银屑病、神经性皮炎等疾病的治疗^[1-2]。为了更好地控制该制剂质量,笔者采用高效液相色谱法对制剂中的三种成分同时进行质量分析,为进一步完善复方间苯二酚搽剂的质量控制提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器 岛津 LC-2010AHT 高效液相色谱仪(紫外检测器);KQ-3200E 数控超声波处理器(昆山市超声仪器有限公司);CPA225D 电子分析天平(德国 Sartorius)。

1.2 药品与试剂 间苯二酚对照品(批号 100389-201202,含量 100.0%),水杨酸对照品(批号:100106-201104,含量 99.90%),醋酸氟轻松对照品(批号:100010-201108,含量 99.60%)均为中国食品药品检定研究院提供。

复方间苯二酚搽剂(规格:每瓶 100 mL,批号:20150501、20150502、20150503),长春八一医院制剂室提供;水为纯化水,甲醇、乙腈为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 以 WondaSil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱为色谱柱,流动相组成:甲醇-乙腈-0.1% 磷酸溶液 (55:10:35),流速:1.0 mL · min⁻¹,柱温为 30 ℃,紫外检测器波长:240 nm,进样量:10 μL。理论板数分别按间苯二酚(C₆H₆N₂O₂)峰、水杨酸(C₇H₆O₃)峰和醋酸氟轻松(C₂₆H₃₂F₂O₇)峰计算,应分别不低于 2 000、4 000 和 1 000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取间苯二酚、水杨酸、醋酸氟轻松对照品适量,加 75% 乙醇制成每 1 mL 含 4 mg 的间苯二酚、2.5 mg 的水杨酸、0.02 mg 的醋酸氟轻松混合溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密量取本品 2.5 mL,置 50 mL 的容量瓶中,加入 75% 乙醇定容至刻度,振摇使之均匀,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 参照处方成分配比及制备工艺,分别制备含水杨酸和醋酸氟轻松,含间苯二酚和醋酸氟轻松,含间苯二酚和水杨酸,含间苯二酚,含水杨酸,含醋酸氟轻松,不含间苯二酚、水杨酸和醋酸氟轻松的 7 种搽剂。按供试品溶液的制备方法,分别制备含水杨酸和醋酸氟轻松,含间苯二酚和醋酸氟轻松,含间苯二酚和水杨酸,含间苯二酚,含水杨酸,含醋酸氟轻松,不含间苯二酚、水杨酸和醋酸氟轻松的 7 种阴性对照溶液。

2.3 专属性试验 将配制好的上述供试品溶液、对照品溶液以及 7 种阴性对照溶液按“2.1”项下色谱条件,分别进样 10 μL,结果表明:不含间苯二酚、水杨酸和醋酸氟轻松阴性对照溶液在与间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松色谱峰相应的位置上无干扰峰出现,间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松色谱峰互不干扰,上述试验结果表明专属性良好。结果见图 1。

2.4 线性关系的考察 分别精密称取间苯二酚、水杨酸、醋酸氟轻松对照品适量,加 75% 乙醇制成每 1 mL 含 8 mg 的间苯二酚、5 mg 的水杨酸、0.04 mg 的醋酸氟轻松混合对照品贮备液。精密吸取对照品贮备液 2、3、4、5、6、7 mL 至 10 mL 量瓶中,75% 乙醇定容至刻度,摇匀。精密吸取上述稀释液 10 μL,分别注入高效液相色谱仪,进行测定。分别以间苯二酚、水杨酸、醋酸氟轻松的进样量(X)为横坐标进行线性回归,得间苯二酚、水杨酸、醋酸氟轻松回归方程分别为: $Y = 1 \times 10^8 X + 93\ 840$ ($r = 1.000\ 0$)、 $Y = 4 \times 10^8 X - 300.35$ ($r = 1.000\ 0$)、 $Y = 2 \times 10^9 X + 3\ 053.3$ ($r = 0.999\ 9$)。结果表明:间苯二酚、水杨酸和醋酸氟轻松检测质量的线性范围分别为 16 ~ 56 μg、10 ~ 35 μg 和 0.08 ~ 0.28 μg。

2.5 检测限、定量限的测定 取“2.2.1”项下的对照品溶液,逐级稀释后,分别进样 10 μL,测定。经分析,间苯二酚的检测限($S/N \approx 3$)为 0.99 ng,定量限($S/N \approx 10$)为 3.3 ng ($n = 6$, $RSD = 0.47\%$);水杨酸的检测限($S/N \approx 3$)为 0.48 ng,定量限($S/N \approx 10$)为 1.6 ng ($n = 6$, $RSD = 1.05\%$);醋酸氟轻松的检测限($S/N \approx 3$)为 0.74 ng,定量限($S/N \approx 10$)为 2.47 ng ($n = 6$, $RSD = 0.64\%$)。

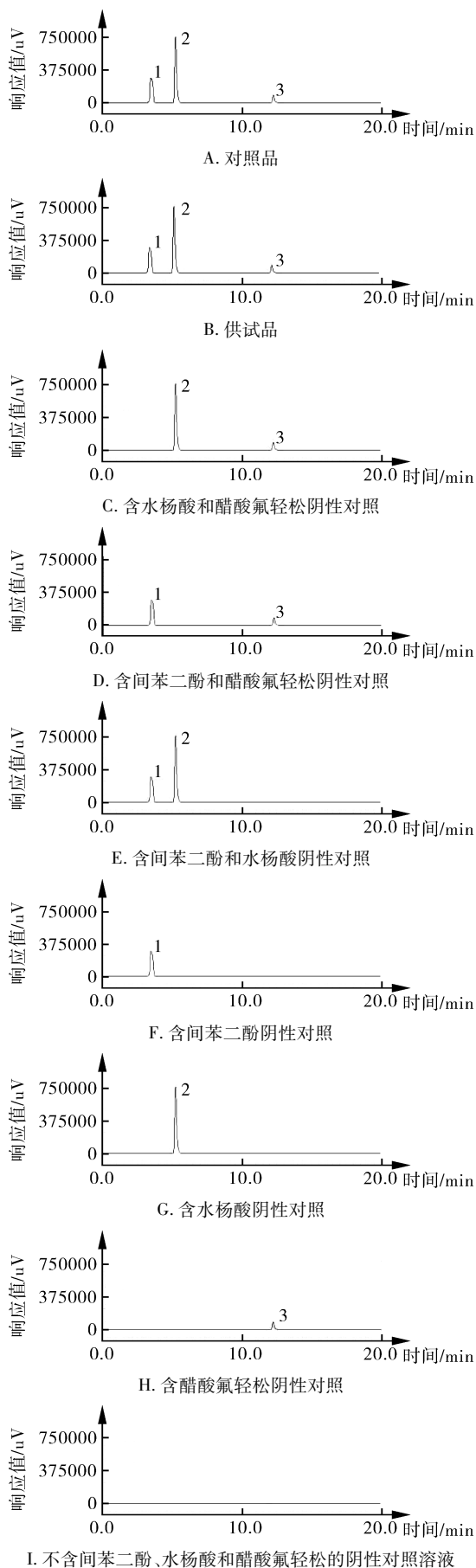


图1 高效液相色谱图

2.6 精密度考察 抽取同一对照品溶液,连续重复进样6次,每次进样量为10 μ L,在所选的色谱条件下测定间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松的含量,结果间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松峰面积RSD分别为0.04% ($n=6$)、0.05% ($n=6$)及0.13% ($n=6$),表明此方法精密度良好。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液(批号:20150501),室温放置,在上述色谱条件下,分别取放置0、4、8、12、16和24 h的供试品溶液测定间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松的含量,以考察其稳定性。RSD值分别为0.34%、0.27%及0.45%,结果表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验 取批号为20150501的复方间苯二酚搽剂6份,依法制备供试品溶液,对间苯二酚、水杨酸、醋酸氟轻松进行含量测定,计算间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松的平均含量分别为:96.52%、108.40%及106.74%,RSD分别为0.39% ($n=6$)、0.28% ($n=6$)及0.30% ($n=6$),结果表明重复性良好。

2.9 加样回收率试验 精密吸取复方间苯二酚搽剂(批号:20150501,间苯二酚含量为96.52%;水杨酸含量为108.40%;醋酸氟轻松含量为106.74%;详见重复性实验)2.5 mL,置100 mL容量瓶中,6份,再分别将适量间苯二酚、水杨酸、醋酸氟轻松对照品加入各容量瓶中,按“2.2.2”项下方法制备溶液;按“2.1”项下的色谱条件测定,计算加样回收率,结果见表1。结果表明,本法准确可靠。

2.10 样品含量测定 参照供试品溶液制备方法,取三个批次的复方间苯二酚搽剂各2份,制备供试品溶液,在上述色谱条件下,测定了三批制剂中间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松的含量,结果见表2。

3 讨论

3.1 流动相选择 本试验曾参考2015版《中国药典》^[3]中醋酸氟轻松项下含量测定方法,选用项下流动相甲醇-乙腈-水(60:10:30)进行预实验,结果色谱峰的分离度不够理想,间苯二酚和水杨酸均严重拖尾。参考其他文献^[4-9],最终选择甲醇-乙腈-0.1%磷酸溶液(55:10:35)为流动相进行洗脱,三者色谱峰理论板数、对称因子及分离度等均达到要求。

3.2 检测波长选择 对间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松对照品溶液在200~400 nm波长范围内进行紫外扫描,间苯二酚最大吸收波长为270 nm,水杨酸的最大吸收波长为235、300 nm,醋酸氟轻松的最大吸收波长为240 nm,通过几种波长下检测比较及

表 1 加样回收率试验结果(*n* = 6)

组分	取样量 /mL	样品量 /mg	加入量 /mg	实测值 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
间苯二酚	2.5	193.04	193.82	387.06	100.10	99.05	0.70
	2.5	193.04	193.82	386.43	99.78		
	2.5	193.04	193.82	383.95	98.50		
	2.5	193.04	193.82	384.29	98.67		
	2.5	193.04	193.82	384.03	98.54		
	2.5	193.04	193.82	384.31	98.68		
水杨酸	2.5	135.50	135.53	272.52	101.10	100.16	0.63
	2.5	135.50	135.53	272.25	100.90		
	2.5	135.50	135.53	270.77	99.81		
	2.5	135.50	135.53	270.72	99.77		
	2.5	135.50	135.53	270.60	99.68		
	2.5	135.50	135.53	270.71	99.76		
醋酸氟轻松	2.5	1.0674	0.9072	1.9782	100.40	99.20	0.81
	2.5	1.0674	0.9072	1.9746	100.00		
	2.5	1.0674	0.9072	1.9639	98.82		
	2.5	1.0674	0.9072	1.9614	98.54		
	2.5	1.0674	0.9072	1.9624	98.66		
	2.5	1.0674	0.9072	1.9630	98.72		

表 2 复方间苯二酚搽剂含量测定结果/(%, *n* = 3)

批号	间苯二酚	水杨酸	醋酸氟轻松
20150501	96.51	108.42	106.74
20150502	96.50	107.95	106.38
20150503	96.04	108.15	98.12

参考相关文献[4-7],考虑到醋酸氟轻松紫外吸收范围小,本文最后选择醋酸氟轻松 240 nm 下进行试验,此波长下间苯二酚及水杨酸紫外吸收响应亦

较满意,对上述结果进行分析最终选择 240 nm 作为本制剂的含量测定检测波长。

3.3 专属性 通过本试验建立了复方间苯二酚搽剂中有效成分间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松的含量测定方法,不含间苯二酚、水杨酸和醋酸氟轻松的阴性对照溶液在与间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松色谱峰相应的位置上无干扰峰出现,间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松色谱峰互不干扰,可见本试验专属性良好。

通过上述方法,本试验考察结果准确,精密度高,可同时测定复方间苯二酚搽剂中间苯二酚、水杨酸及醋酸氟轻松的含量,便于该制剂的质量控制。

参考文献

[1] 张建中. 糖皮质激素的分类及其在皮肤科的应用[J]. 中国医学文摘,2015,32(3):241.

[2] 帅茂圣,曹春育,赵建林,等. 复方间苯二酚涂剂联合异维 A 酸胶丸治疗跖疣 30 例临床观察[J]. 中国皮肤性病学杂志,2014,28(2):219-220.

[3] 国家药典委员会. 中国药典(二部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1538.

[4] 白林,朱小洁. HPLC 法同时测定四种复方制剂中苯甲酸和水杨酸的含量[J]. 解放军药学报,2014,30(1):66-69.

[5] 刘园,张华峰,宋青,等. 甲癣涂剂的制备及主要成分含量测定方法的研究[J]. 安徽医药,2015,19(10):1881-1884.

[6] 王晓青,刘皈阳,马建丽. 反相高效液相色谱法同时测定皮肤墨水中间苯二酚和苯酚含量[J]. 中国药业,2014,23(9):33-34.

[7] 汪旭,黄翠,严铁,等. HPLC 法测定皮康净乳膏中醋酸氟轻松和丹皮酚的含量[J]. 解放军药学报,2015,31(5):396-398.

[8] 王烽. HPLC 法测定复方醋酸氟轻松酊中水杨酸和间苯二酚的含量[J]. 中国医药科学,2012,2(19):92-93.

[9] 崔丽. Rp-HPLC 法同时测定复方间苯二酚洗剂中间苯二酚和苯酚的含量[J]. 中国药房,2011,22(21):2000-2001.

(收稿日期:2016-07-08,修回日期:2016-07-21)