

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.08.005

反相高效液相色谱法同时测定呋柳粉中水杨酸、苯甲酸和呋喃西林含量

戴安印, 刘洁琼, 谷 娜, 郭胜才[△]

(中国人民解放军第一一七医院, 浙江 杭州 310013)

摘要:目的 建立同时测定呋柳粉中水杨酸、苯甲酸和呋喃西林含量的反相高效液相色谱(RP-HPLC)法。方法 色谱柱为 Diamonsil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.05 mol/L 磷酸氢二钠(pH=7.0)(30:70, V/V), 检测波长为 275 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 25℃, 进样量为 10 μL, 采用外标法定量。结果 水杨酸、苯甲酸和呋喃西林质量浓度线性范围分别为 151.45~454.35 μg/mL、148.81~446.40 μg/mL、20.08~60.24 μg/mL, 平均回收率分别为 100.81%, 101.11%, 100.82%, RSD 分别为 1.73%, 1.81%, 1.68% (n=9)。结论 该方法简单、方便、灵敏度高、重复性好, 适用于呋柳粉的质量控制。

关键词:呋柳粉; 反相高效液相色谱法; 水杨酸; 苯甲酸; 呋喃西林; 含量测定; 质量控制

中图分类号: R917; R927.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)08-0014-03

Simultaneous Determination of Salicylic Acid, Benzoic Acid and Nitrofurazone in Fuliu Powder by RP-HPLC

DAI Anyin, LIU Jieqiong, GU Na, GUO Shengcai

(The 117th Hospital of PLA, Hangzhou, Zhejiang, China 310013)

Abstract: Objective To establish an RP-HPLC method for simultaneous determination of salicylic acid, benzoic acid and nitrofurazone in Fuliu Powder. **Methods** The chromatographic column was Diamonsil C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.05 mol/L Na₂HPO₄(pH=7.0)(30:70, V/V), the detection wavelength was 275 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 25℃, and the sample size was 10 μL. The external standard method was used for quantitative analysis. **Results** The salicylic acid, benzoic acid and nitrofurazone showed good relationship in the ranges of 151.45-454.35 μg/mL, 148.81-446.40 μg/mL and 20.08-60.24 μg/mL. The average recovery rates were 100.81%, 101.11% and 100.82%, RSDs were 1.73%, 1.81% and 1.68% (n=9). **Conclusion** The method is simple, convenient, sensitive and reproducible, which is suitable for the quality control of Fuliu Powder.

Key words: Fuliu Powder; RP-HPLC; salicylic acid; benzoic acid; nitrofurazone; content determination; quality control

呋柳粉为我院研制的非标准制剂, 主要成分有水杨酸、苯甲酸、硼酸、呋喃西林和鞣酸等, 有杀菌、消炎、收敛和抑制霉菌生长作用, 临床主要用于治疗各种足癣、

手癣, 已在我院临床使用多年, 疗效显著。我院现行的呋柳粉质量标准中仅有定性鉴别, 缺少对主要成分的含量测定。为了更好地控制该制剂的产品质量, 保障临床用

第一作者: 戴安印, 男, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药物制剂学, (电子信箱)48155438@qq.com。

[△]通信作者: 郭胜才, 男, 硕士研究生, 主任药师, 研究方向为临床药理学, (电子信箱)gsc117@sina.com。

- [6] 曾 燕, 张 丹, 姜丽萍, 等. 嗜铬粒蛋白 A 衍生多肽 CGA47-66 抑制胺毒症小鼠血脑屏障通透性增加[J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(2): 122-126.
- [7] 夏 敏, 柳太云. 血脑屏障与 β-淀粉样蛋白相互作用在阿尔茨海默病的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2017, 44(2): 188-191.
- [8] 许真真, 焦红军, 任 明. 康复新联合小牛血清去蛋白治疗直肠癌术后放疗致急性放射性直肠炎的临床疗效及其对血小板功能的影响[J]. 中国全科医学, 2017, 20(6): 684-688.
- [9] 胡怀强, 耿 兵, 牛 兵, 等. 热打击对大鼠血脑屏障通透性及紧密连接蛋白 Occludin 的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25(11): 1424-1427.
- [10] 柴伟娜, 程崇杰, 蒋 理, 等. 膜粘连蛋白 II 通过保护血脑

屏障促进小鼠颅脑创伤后早期神经功能的恢复[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(18): 1808-1815.

- [11] 王晓宇, 陈啸飞, 柴逸峰, 等. 血脑屏障上的 P-糖蛋白和乳腺癌耐药蛋白及其研究方法[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(9): 1557-1565.
- [12] 张轶钦, 钟文宏, 韩永丽, 等. 人血白蛋白对缺血-再灌注大鼠血脑屏障通透性的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2017, 26(4): 410-414.
- [13] 陈萌萌, 王素兰, 黄胜和, 等. 主要促进调解超家族蛋白 2A 维持血脑屏障功能的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2018, 45(2): 198-202.

(收稿日期: 2018-07-11; 修回日期: 2018-08-13)

药安全,本研究中参考2015年版《中国药典(二部)》及文献[1-7],建立了同时测定呋柳粉中水杨酸、苯甲酸和呋喃西林含量的反相高效液相色谱(RP-HPLC)法。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);FA2004B 型电子分析天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);pHS-3C 型精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);KQ-100DY 型医用数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

苯甲酸对照品(批号为 100419-201302,纯度为 100.0%),水杨酸对照品(批号为 10906-201104,纯度为 99.9%),呋喃西林对照品(批号为 101167-201001,纯度为 99.4%),均购自中国食品药品检定研究院;呋柳粉(我院自制,批号分别为 20170425,20170609,20171029,规格为每盒 30 g,含水杨酸、苯甲酸各 9.375 g,呋喃西林 0.9375 g);甲醇(色谱纯,江苏省淮安市恒天工贸有限公司);水为纯化水;硼酸、鞣酸为药用标准,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.05 mol/L 磷酸氢二钠(用磷酸调 pH 至 7.0,30:70, V/V);检测波长:275 nm;流速:1.0 mL/min,进样量:10 μL。在此色谱条件下,各待测成分峰形良好分离度均大于 1.5,理论板数以水杨酸、苯甲酸和呋喃西林峰计均大于 3 000。

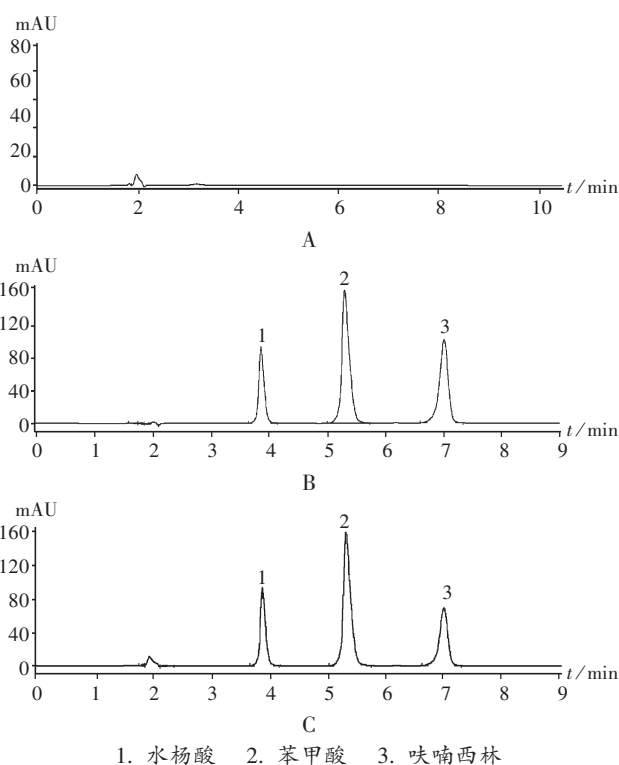
2.2 溶液制备

称取按处方比例配制的硼酸、鞣酸阴性药粉 0.0962 g,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加水约 80 mL,50 ℃ 超声 30 min 使溶解,冷却至室温,加水定容,摇匀,滤过,即得阴性对照溶液。称取样品(批号为 20171029) 0.0957 g,精密称定,同法制得供试品溶液。称取苯甲酸对照品 0.0744 g,水杨酸对照品 0.0758 g,呋喃西林对照品 0.0101 g,精密称定,同法制得对照品贮备液,精密量取 4 mL,置 10 mL 容量瓶中,加水定容,摇匀,即得对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密量取 2.2 项下 3 种溶液各 10 μL,按 2.1 项下色谱条件分别注入液相色谱仪,记录色谱图,详见图 1。可见,阴性对照溶液在水杨酸、苯甲酸、呋喃西林峰保留时间处无干扰,专属性良好。

线性关系考察:精密量取 2.2 项下对照品贮备液 2,3,4,5,6 mL,置 10 mL 容量瓶中,加水定容,摇匀,作为



1. 水杨酸 2. 苯甲酸 3. 呋喃西林
A. 阴性对照溶液 B. 对照品溶液 C. 供试品溶液
图 1 高效液相色谱图

线性系列供试品溶液,精密量取 10 μL,进样测定,记录色谱图,分别以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程,水杨酸为 $Y_1 = 2.00 X_1 - 9.65$, $r = 0.9997$ ($n = 5$),苯甲酸为 $Y_2 = 4.96 X_2 - 17.74$, $r = 0.9996$ ($n = 5$),呋喃西林为 $Y_3 = 27.52 X_3 - 31.41$, $r = 0.9996$ ($n = 5$)。结果表明,水杨酸、苯甲酸和呋喃西林质量浓度分别在 151.45 ~ 454.35 μg/mL、148.81 ~ 446.40 μg/mL、20.08 ~ 60.24 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密密度试验:在拟订色谱条件下,精密量取 2.3 项下 3 号标准曲线工作液,重复进样 6 次,记录色谱图,测定峰面积。结果苯甲酸、水杨酸及呋喃西林峰面积的 RSD 分别为 0.70%, 0.69%, 0.67% ($n = 6$),表明仪器精密密度良好。

重复性试验:称取同一批样品(批号为 20171029) 约 0.1 g,精密称定,共 6 份,依法制备供试品溶液,进样测定。结果苯甲酸、水杨酸及呋喃西林含量的 RSD 分别为 0.72%, 0.65%, 0.99% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:称取样品(批号为 20171029)适量,依法制备供试品溶液,室温下于 0,4,8,12,24 h 时分别进样 10 μL,记录峰面积。结果苯甲酸、水杨酸及呋喃西林峰面积的 RSD 分别为 1.08%, 0.72%, 0.82% ($n = 5$),表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内基本稳定。

加样回收试验:称取已知含量的样品(批号为

表1 加样回收试验结果($n=9$)

样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
3.66	3.86	0.36	2.98	3.03	0.40	6.61	6.87	0.77	98.99	99.34	102.50						
3.60	3.79	0.35	2.98	3.03	0.40	6.70	6.96	0.75	104.03	104.62	100.00						
3.63	3.82	0.36	2.98	3.03	0.40	6.65	6.90	0.77	101.34	101.65	102.50						
3.57	3.76	0.35	3.72	3.79	0.50	7.29	7.57	0.86	100.00	100.53	102.00						
3.60	3.79	0.35	3.72	3.79	0.50	7.42	7.69	0.86	102.69	102.90	102.00	100.81	101.11	100.82	1.73	1.81	1.68
3.54	3.73	0.35	3.72	3.79	0.50	7.27	7.54	0.85	100.27	100.53	100.00						
3.57	3.76	0.35	4.46	4.55	0.61	8.08	8.36	0.97	101.12	101.10	101.64						
3.51	3.70	0.34	4.46	4.55	0.61	7.99	8.29	0.94	100.45	100.88	98.36						
3.60	3.79	0.35	4.46	4.55	0.61	7.99	8.27	0.95	98.43	98.46	98.36						

注:A为苯甲酸,B为水杨酸,C为吲哚美辛。

表2 样品含量测定(%, $n=3$)

批号	苯甲酸		水杨酸		吲哚美辛	
	标示量	RSD	标示量	RSD	标示量	RSD
20170425	100.0	0.84	101.6	0.52	96.1	0.95
20170609	100.7	0.66	98.0	0.14	96.6	0.35
20171029	99.7	0.75	98.3	0.37	96.2	0.50

20171029)9份,各12 mg,精密称定,分别置9个25 mL容量瓶(编号1-9)中,加水约15 mL,50℃超声30 min使溶解,冷却至室温,加水定容,摇匀,①②③号容量瓶中各精密加入2.2项下对照品贮备液4 mL,④⑤⑥号瓶中各精密加入5 mL,⑦⑧⑨号容量瓶中各精密加入6 mL,加水定容,摇匀,即得。依法进样测定,分别记录峰面积,计算平均回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

称取3批样品,精密称定,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件分别注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算样品含量。结果见表2。

3 讨论

3.1 检测波长选择

将苯甲酸、水杨酸和吲哚美辛对照品的稀溶液用紫外分光光度计在200~400 nm波长范围内扫描,结果显示,苯甲酸在230 nm波长处,水杨酸在230 nm和300 nm波长处,吲哚美辛在260 nm和375 nm波长处有最大吸收,考虑到吲哚美辛中吲哚美辛的含量最低(约为苯甲酸和水杨酸的1/10),故选择尽量接近吲哚美辛最大吸收波长作为检测波长。在275 nm处三者吸收度相近,可同时满足3种成分的紫外检测,色谱峰分离度好,峰形良好,且不受其他成分干扰,故最终选择275 nm为检测波长。

3.2 流动相选择

通过查阅文献[3-6],比较了不同比例的甲醇-水、甲醇-磷酸氢二钠、甲醇-0.1%磷酸溶液、甲醇-1%冰醋酸溶液等流动相系统,发现被测组分的保留时

间随着甲醇浓度的增大而减小,当甲醇体积分数为40%时,苯甲酸与水杨酸峰分离度小于1,两峰有部分重叠。通过对色谱峰的分离度、保留时间及峰形等综合考虑,最终选择甲醇-0.05 mol/L磷酸氢二钠(30:70, V/V)作为流动相体系。

此外,哈永红等^[1]的类似研究中采用高效液相色谱双波长外标法测定足菌清中4种成分(水杨酸、苯甲酸、间苯二酚及吲哚美辛),以0.05 mol/L磷酸二氢钾-甲醇(用0.1%三乙胺调pH至4.3~4.4,50:50, V/V)为流动相,以260 nm作为吲哚美辛和间苯二酚的测定波长,以280 nm作为苯甲酸和水杨酸的测定波长,结果满意。

相较而言,本研究中利用RP-HPLC单波长法对吲哚美辛中多个成分进行含量测定,方法简单、操作方便,各成分分离度好,峰形良好,且保留时间缩短一半,能显著提高工作效率,适用于医院制剂吲哚美辛的质量控制。

参考文献:

- [1] 哈永红,康志健,梁春华,等. HPLC法同时测定足菌清中水杨酸等4种成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2001,18(4): 276-278.
- [2] 谢越,俞浩,汪建飞,等. 高效液相色谱法同时测定滁菊样品中的9种酚酸[J]. 分析化学,2013,41(3): 383-388.
- [3] 卡斯木,卡哈尔,滕亮,等. HPLC法测定痤疮酮中氯霉素和水杨酸的含量[J]. 中国药房,2015,26(18): 2557-2559.
- [4] 肖琦,阳文武,朱泽兵,等. 足光散质量标准提高研究[J]. 中国药业,2016,25(4): 73-75.
- [5] 吴海伟,贾燕花,王晓青,等. HPLC法测定复方氯霉素醇溶液中氯霉素和水杨酸的含量[J]. 实用药物与临床,2014,17(7): 878-881.
- [6] 安珍珍,杨云,任磊,等. RP-HPLC法同时测定复方苯海拉明滴鼻液中3种成分的含量[J]. 中国药房,2017,28(18): 2573-2575.
- [7] 吴诚,曹森,张丽平,等. 高效液相色谱法和紫外分光光度法测定吲哚美辛含量的比较研究[J]. 中国药业,2015,24(4): 34-36.

(收稿日期:2018-09-06)