

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.17.007

高效液相色谱法同时测定复方水杨酸硫乳膏中水杨酸和醋酸氯己定含量*

彭贤东, 王娅俐, 王 丹, 潘良平, 唐志立[△]

(四川省南充市中心医院·川北医学院第二临床医学院药学部, 四川 南充 637000)

摘要:目的 建立同时测定复方水杨酸硫乳膏中水杨酸和醋酸氯己定含量的高效液相色谱法,以提升其质量标准。方法 色谱柱采用 Atlantis C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为水(乙酸铵 26 g 和三乙胺 37 mL,加水至 1 000 mL,并用冰醋酸调 pH 至 4.0)-甲醇(50:50, V/V),流速为 1.0 mL/min,柱温为 35℃,检测波长为 257 nm,进样量为 10 μL。结果 在该测定条件下阴性对照无干扰,水杨酸、醋酸氯己定的质量浓度分别在 0.099 9~0.599 6 g/L 和 0.005 0~0.030 0 g/L 范围内与峰面积线性关系良好(r 均为 0.999 9),平均回收率分别为 100.80% 和 99.41%, RSD 分别为 0.78% 和 0.99% ($n=9$)。结论 该方法简便快捷,准确可靠,可同时测定复方水杨酸硫乳膏中水杨酸和醋酸氯己定的含量。

关键词:高效液相色谱法;复方水杨酸硫乳膏;水杨酸;醋酸氯己定;含量

中图分类号:R927.2;R986

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)17-0025-04

Simultaneous Determination of Salicylic Acid and Chlorhexidine Acetate in Compound Salicylic Acid and Sulfur Cream by HPLC

PENG Xiandong, WANG Yali, WANG Dan, PAN Liangping, TANG Zhili

(Department of Pharmacy, Nanchong Municipal Central Hospital, The Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, China 637000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the simultaneous determination of salicylic acid and chlorhexidine acetate in Compound Salicylic Acid and Sulfur Cream, and to improve the quality standard of this preparation. **Methods** The chromatographic col-

*基金项目:四川省南充市科学技术和知识产权局市校合作科研专项项目[18SXHZ0453]。

第一作者:彭贤东,男,大学本科,主任药师,研究方向为药物质量控制与医疗机构制剂,(电子信箱)1057882030@qq.com。

[△]通信作者:唐志立,男,大学本科,主任药师,研究方向为临床药学与医疗机构制剂,(电子信箱)1003955916@qq.com。

- Lung Cellular & Molecular Physiology, 2016, 303(11):967-978.
- [2] BUTT Y, KURDOWSKA A, ALLEN TC. Acute lung injury: A clinical and molecular review[J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2016, 140(4):345-350.
- [3] JIANG W, LUO F, LU Q, et al. The protective effect of Trillin LPS-induced acute lung injury by the regulations of inflammation and oxidative state[J]. Chemico-Biological Interactions, 2016, 243(2):127-134.
- [4] ZHANG A, PAN W, LV J, et al. Protective Effect of Amygdalin on LPS-Induced Acute Lung Injury by Inhibiting NF-κB and NLRP3 Signaling Pathways[J]. Inflammation, 2017, 40(3):745-751.
- [5] ZHANG A, WANG S, ZHANG J, et al. Genipin alleviates LPS-induced acute lung injury by inhibiting NF-κB and NLRP3 signaling pathways[J]. International Immunopharmacology, 2016, 38(4):115-119.
- [6] ZHANG B, WANG B, CAO S, et al. Silybin attenuates LPS-induced lung injury in mice by inhibiting NF-κB signaling and NLRP3 activation[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2017, 6(3):34-35.
- [7] 姜宇懋,王丹巧. 川芎嗪药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2016, 18(10):1364-1370.
- [8] 毕 蕾,颜晓静,杨 烨,等. 川芎嗪对肝癌 HepG2 细胞迁移、侵袭和细胞骨架的影响[J]. 中国药理学通报, 2016, 7(2):194-198.
- [9] 裴建梅,贺 瑜,朱邦豪. 丹参川芎嗪注射液对缺氧/复氧损伤脑基底平滑肌细胞的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(7):45-46.
- [10] WANG C, ZENG L, ZHANG T, et al. Casticin inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. European Journal of Pharmacology, 2016, 789(3):172-178.
- [11] HAN X, WU YC, MENG M, et al. Linarin prevents LPS-induced acute lung injury by suppressing oxidative stress and inflammation via inhibition of TXNIP/NLRP3 and NF-κB pathways[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 4(3):34-35.
- [12] LUO M, HU L, LI D, et al. MD-2 regulates LPS-induced NLRP3 inflammasome activation and IL-1β secretion by a MyD88/NF-κB-dependent pathway in alveolar macrophages cell line[J]. Molecular Immunology, 2017, 90(4):1-10.
- [13] JIANG L, ZHANG L, KANG K, et al. Resveratrol ameliorates LPS-induced acute lung injury via NLRP3 inflammasome modulation[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 84(3):130-138.

(收稿日期:2019-01-01)

umn was Atlantis C₁₈ column(250 mm×4.6 mm,5 μm),the mobile phase was water(26 g of ammonium acetate and 37 mL of triethylamine,added water to 1 000 mL,and adjusted pH to 4.0 with glacial acetic acid) – methanol(50 : 50, V : V),the flow rate was 1.0 mL/min,the column temperature was 35 °C,the detection wavelength was 257 nm and the sample size was 10 μL. **Results** The negative sample had no interference under this condition. The salicylic acid and chlorhexidine acetate showed good linear relationship with peak area in the ranges of 0.099 9–0.599 6 g/L and 0.005 0–0.030 0 g/L($r=0.999\ 9$). The average recoveries were 100.80% and 99.41%, RSDs were 0.78% and 0.99% ($n=9$). **Conclusion** The method is simple,rapid,accurate and reliable,which can be used for the simultaneous determination of salicylic acid and chlorhexidine acetate in Compound Salicylic Acid and Sulfur Cream.

Key words: HPLC;Compound Salicylic Acid and Sulfur Cream;salicylic acid;chlorhexidine acetate;content

复方水杨酸硫乳膏是自制医疗机构制剂(川药制字H20080472),主要成分为水杨酸、升华硫和醋酸氯己定,用于体癣、头癣、脂溢性皮炎及疥疮疗效显著。水杨酸具有促进表皮角质层正常化、改善表皮通透屏障功能^[1]和抗真菌、止痒、溶解角质的作用;醋酸氯己定是常用皮肤黏膜消毒剂,在有效浓度下部分葡萄球菌、变异链球菌、唾液链球菌、大肠埃希菌、丙酸杆菌等对其敏感^[2],具有强抗菌作用;升华硫具有杀疥虫、杀真菌作用,能去除油脂,并可促进角质溶解。原四川省食品药品监督管理局注册质量标准中采用了酸碱中和滴定法测定水杨酸的含量,并未对醋酸氯己定进行含量控制。水杨酸的含量测定方法有酸碱中和滴定法、紫外分光光度法^[3]、高效液相色谱(HPLC)法^[4]等。由于乳膏基质为酸性,因此酸碱中和滴定法测定乳膏中水杨酸的含量偏高;其基质又有紫外吸收,因此用紫外分光光度法直接测定水杨酸的含量会影响结果的准确性。醋酸氯己定的含量测定方法有滴定分析法、紫外分光光度法^[5-6]、HPLC法^[7-9]等。为了更好地控制该制剂的质量,本研究中采用HPLC法同时测定复方水杨酸硫乳膏中水杨酸和醋酸氯己定的含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱仪,UV-1800型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);BP211D型电子分析天平(德国赛多利斯股份公司);pHS-3C型pH计(上海雷磁仪器厂)。

1.2 试剂

复方水杨酸硫乳膏(南充市中心医院,批号为180122,180123,180124,规格为每1 g含水杨酸10 mg、升华硫100 mg、醋酸氯己定0.5 mg);水杨酸对照品(批号为100106-201605,含量99.7%),醋酸氯己定对照品(批号为100183-201604,含量96.9%),均由中国食品药品检定研究院提供;甲醇为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Atlantis C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);

流动相:水(乙酸铵26 g和三乙胺37 mL,加水至1 000 mL,并用冰醋酸调pH至4.0)–甲醇(50 : 50, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:257 nm;柱温:35 °C;进样量:10 μL。理论板数按水杨酸峰、醋酸氯己定峰计算均应不低于3 000。

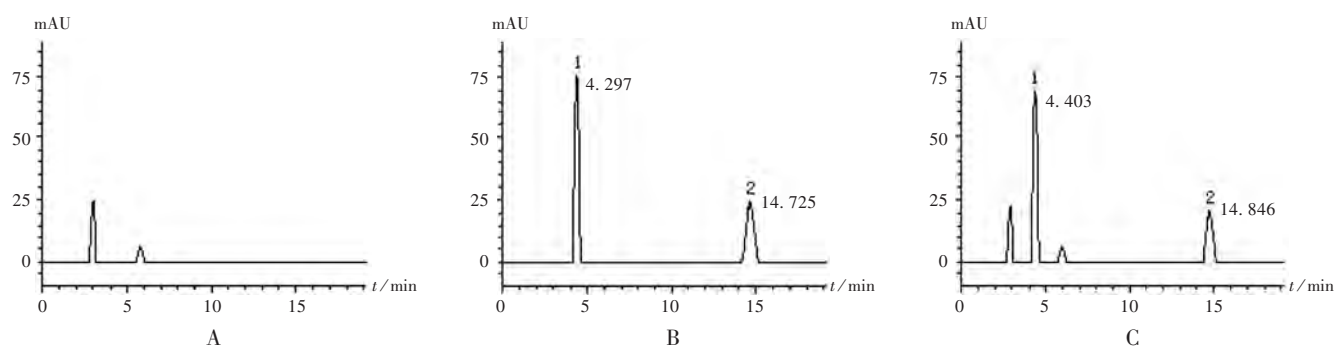
2.2 溶液制备

取水杨酸对照品200.46 mg、醋酸氯己定对照品10.32 mg,精密称定,置同一100 mL容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得含水杨酸、醋酸氯己定成分的对照品贮备液;精密量取上述贮备液7.5 mL,置50 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液(质量浓度为0.299 8 g/L的水杨酸和0.015 0 g/L的醋酸氯己定)。取本品3 g(约含水杨酸30 mg、醋酸氯己定1.5 mg),精密称定,置100 mL容量瓶中,加甲醇适量,于50 °C水浴中加热并时时振摇,使乳膏充分分散,水杨酸和醋酸氯己定溶解,放冷,用甲醇稀释至刻度,摇匀,静置,滤过,弃去初滤液,取续滤液,即得供试品溶液。按处方比例制备不水杨酸和醋酸氯己定的阴性对照品,按供试品溶液制备方法制备,即得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:吸取2.2项下3种溶液各10 μL,分别按上述色谱条件测定,记录色谱峰。结果水杨酸、醋酸氯己定的保留时间分别约为4.4 min和14.7 min,理论板数按醋酸氯己定峰计算为3 479,样品中水杨酸与醋酸氯己定分离完全,与其他组分分离良好,且阴性对照无干扰。色谱图见图1。

线性关系考察:精密量取对照品贮备液,加甲醇分别稀释成含水杨酸、醋酸氯己定质量浓度分别为0.099 9, 0.1999,0.2998,0.3997,0.4996,0.5996 g/L和0.005 0, 0.010 0,0.015 0,0.020 0,0.025 0,0.030 0 g/L的溶液,进样10 μL,依法测定。以质量浓度(C)为横坐标、峰面积积分值(A)为纵坐标绘制标准曲线,得水杨酸、醋酸氯己定回归方程分别为 $A_{\text{水}}=1.92\times 10^6 C_{\text{水}}+3\ 333.1$ ($r=0.999\ 9$, $n=6$)和 $A_{\text{醋}}=2.43\times 10^7 C_{\text{醋}}+2\ 866.7$ ($r=0.999\ 9$, $n=6$)。结果表明,水杨酸、醋酸氯己定检测质量浓度的线性范围分别为0.099 9~0.599 6 g/L和



1. 水杨酸 2. 醋酸氯己定
A. 阴性对照品溶液 B. 对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

0.0050~0.0300 g/L。

精密密度试验:取同一对照品溶液,按拟订色谱条件重复进样6次,记录峰面积。结果水杨酸、醋酸氯己定峰面积的 *RSD* 分别为 0.55% 和 0.82% ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

重复性试验:取样品(批号为 180122)6 份各 3 g,精密称定,依法制备供试品溶液,进样 10 μ L,记录峰面积。结果水杨酸、醋酸氯己定含量的 *RSD* 分别为 0.67% 和 0.70% ($n=6$),表明方法重复性较好。

稳定性试验:取同一供试品溶液(批号为 180122),分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 时进样 10 μ L,记录峰面积。结果水杨酸、醋酸氯己定峰面积 *RSD* 分别为 0.84% 和 1.00% ($n=6$),表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

回收试验:根据处方工艺,称取阴性对照品适量,分别加入水杨酸和醋酸氯己定对照品,制成相当于标示量 80%, 100%, 120% 的模拟样品,依法制备供试品溶液,每种质量浓度制备 3 份,进样 10 μ L,记录峰面积,计算回收率。结果见表 1。

表1 回收试验结果($n=9$)

加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		<i>RSD</i> (%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
24.10	1.23	24.24	1.21	100.58	98.37				
24.23	1.28	24.79	1.26	102.31	98.44				
23.95	1.29	24.07	1.30	100.50	100.78				
30.05	1.56	30.26	1.54	100.70	98.72				
30.28	1.49	30.64	1.50	101.19	100.67	100.80	99.41	0.78	0.99
30.17	1.52	30.51	1.51	101.13	99.34				
36.46	1.91	36.22	1.92	99.34	100.52				
36.11	1.87	36.30	1.85	100.53	98.93				
36.22	1.86	36.56	1.84	100.94	98.92				

注:A 为水杨酸,B 为醋酸氯己定。

2.4 样品含量测定

取 3 批样品,依法制备供试品溶液并进样测定,结

果见表 2。

表2 3 批样品含量测定结果(% , $n=3$)

批号	水杨酸		醋酸氯己定	
	标示量	<i>RSD</i>	标示量	<i>RSD</i>
180122	100.57	0.47	98.75	0.89
180123	101.41	0.58	100.50	0.62
180124	101.94	0.62	99.22	0.82

3 讨论

3.1 流动相选择

曾考察甲醇-水-冰醋酸(50:50:1, $V/V/V$)、磷酸二氢钾-甲醇(70:30, V/V)、磷酸二氢钾-乙腈(65:35, V/V),发现醋酸氯己定均不能很好地出峰,最终选择本流动相。考察了甲醇-水(55:45, V/V),发现溶剂峰与水杨酸峰分离度小,因此调高水相比比例[甲醇-水(50:50, V/V)]使水杨酸保留时间延长,基质峰与水杨酸和醋酸氯己定峰分离较好,保留时间恰当。

3.2 检测波长选择

分别配制 10 μ g/mL 的水杨酸和醋酸氯己定甲醇溶液,在 200~400 nm 波长范围内紫外扫描,结果水杨酸在 234.1 nm 和 303.9 nm 波长处有最大吸收,醋酸氯己定在 257.8 nm 波长处有最大吸收。因复方水杨酸硫乳膏中醋酸氯己定的含量只有水杨酸含量的 1/20,水杨酸在 257 nm 波长处也有一定的吸收,且 2 种成分峰面积均较适宜,峰形好,故选择 257 nm 作为检测波长。

3.3 pH 选择

水杨酸酸性较弱,因为其邻位羟基对羧基的影响,互相结合形成分子内氢键,使得氢原子解离成质子^[10],因而其在水中会发生电离,从而会产生拖尾。为了使水杨酸尽可能以分子形式存在,拟采用冰醋酸来进行调节,从而抑制水杨酸的解离。当 pH 调节为 4 时,可很好地抑制水杨酸的解离,减少拖尾现象,得到了满意的峰形。

参考文献:

[1] 马琳,申春平. 特应性皮炎与皮肤屏障相关性研究进展[J].