

高效液相色谱法测定复方苯甲酸软膏中苯甲酸和水杨酸的含量

刘道平¹, 金克宁², 葛新² (1. 上饶铁路医院, 江西 上饶 334000; 2. 南昌铁路中心医院, 江西 南昌 330003)

摘要:目的 建立测定复方苯甲酸软膏中苯甲酸和水杨酸含量的高效液相色谱法。方法 固定相采用 μ Bondapak C_{18} 柱, 流动相为: 甲醇- $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ 溶液(磷酸调 $\text{pH}=3.1$)(60:40), 检测波长为 270 nm。结果 水杨酸和苯甲酸的线性范围分别 $5 \sim 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9995$)、 $10 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9998$); 平均加样回收率分别为 99.3%, 100.6%; 日内 RSD 分别为 0.64%, 0.58%; 日间 RSD 分别为 0.65%, 0.66% ($n=5$)。结论 本法适用于复方苯甲酸软膏的质量控制, 方法简便、灵敏, 结果准确。

关键词: 苯甲酸; 水杨酸; 软膏; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.01; R978 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2004)03-0224-03

Determination of benzoic acid and salicylic acid in compound benzoic acid ointment by HPLC

LIU Dao ping, JIN Ke ning, GE Xin (Shangrao Hospital of Railway, Shangrao 334000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a reverse-phase high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of benzoic acid and salicylic acid in compound benzoic acid ointment. **METHOD** μ Bondapak C_{18} column was used as stationary phase and methanol- $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ solution (pH adjusted to 3.1 with H_3PO_4)(60:40) as mobile phase, the detection wavelength was 270 nm. **RESULTS** The linear ranges of salicylic acid and benzoic acid were $5 \sim 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9995$) and $10 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9998$); the average recovery was 99.3% and 100.6%; RSDs of intra-day were 0.64% and 0.58% ($n=5$); the RSDs of inter-day were 0.65% and 0.66% ($n=5$), respectively. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive and accurate, and can be used for the quality control of this preparation.

KEY WORDS: benzoic acid; salicylic acid; ointment; HPLC

复方苯甲酸软膏收载于《中国医院制剂规范》第 2 版, 它是由苯甲酸(benzoic acid)水杨酸(salicylic acid)及软膏基质组

成,具有软化角质及杀霉菌作用,主要用于体癣、股癣等^[1]。苯甲酸及水杨酸的含量方法主要有:容量法^[1]、气相色谱法^[2]、高效液相色谱法^[3]等。本实验建立反相高效液相色谱法,同时测定软膏中两组份,结果满意。

1 仪器与试剂

美国 Waters 高效液相色谱系统,包括 510 泵、486 紫外检测器、U6K 进样阀;中科院化学物理研究所提供的 DL-800 色谱工作站;上海超声波仪器厂生产的 SQ-50 超声波清洗器。苯甲酸(批号:010401)、水杨酸(批号:020130)含量均为 99%,由上海炎晨化工实业有限公司提供;氢化可的松(批号:010716M)含量为 100.2%,由湖北制药厂提供;凡士林及羊毛脂均为医用原料;甲醇为色谱纯;其余试剂均为分析纯;水为重蒸馏水。复方苯甲酸软膏由上饶铁路医院制剂室提

供。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱:μBondapak C₁₈柱(3.9 mm × 300 mm, 10 μm);流动相:甲醇-0.02 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ 溶液(磷酸调 pH 至 3.1) = 60:40,使用前超声脱气 15 min;检测波长:270 nm;流速:0.9 mL·min⁻¹;进样量:10 μL。

2.2 系统适应性试验

在上述色谱条件下,样品色谱图见图 1。理论塔板数按水杨酸和苯甲酸计算均不低于 3 000,水杨酸峰与苯甲酸峰的分离度为 1.56,苯甲酸峰与内标氢化可的松峰的分离度为 3.43,水杨酸、苯甲酸及氢化可的松的保留时间分别为 4.36 nm, 5.09 nm 及 7.34 nm。

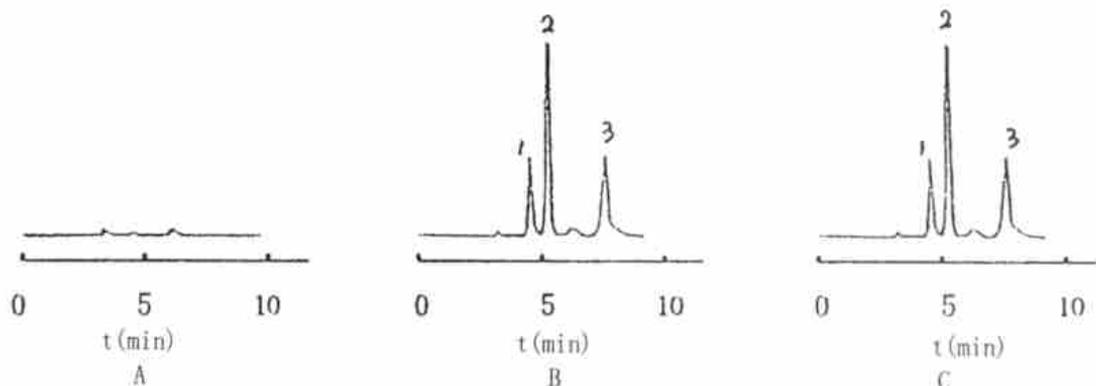


图 1 样品高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of samples

A.空白样品;B.对照品+空白样品;C.样品;1.水杨酸;2.苯甲酸;3.内标物(氢化可的松)
A. blank; B. standard + blank; C. sample; 1. salicylic acid; 2. benzoic acid; 3. internal standard (hydrocortisone)

2.3 线性关系

精密称取苯甲酸 50 mg,水杨酸 25 mg,氢化可的松 200 mg,分别至 100 mL 量瓶中,用 70% 甲醇溶解并定容,得贮备液。分别精密量取苯甲酸和水杨酸贮备液各 1, 2, 3, 4, 5 mL 置于 50 mL 量瓶中,每个量瓶中加入内标氢化可的松 1 mL,再加 70% 甲醇溶液至刻度,摇匀,按上述色谱条件,依次进样 10 μL,测定峰面积。以苯甲酸、水杨酸峰面积与内标氢化可的松峰面积的比值为纵坐标(A),苯甲酸、水杨酸浓度为横坐标(C),分别进行线性回归。结果,水杨酸的浓度在 5 ~ 25 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好,回归方程为: $A = 0.0253 C - 1.54 \times 10^{-3}$, $r = 0.9995$;苯甲酸的浓度在 10 ~ 50 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, $A = 0.0281 C - 1.09 \times 10^{-3}$, $r = 0.9998$ 。

2.4 加样回收率试验

精密称取已知含量的同一样品(含水杨酸约 0.75 mg,含苯甲酸 1.5 mg)置 100 mL 量瓶中,分别加入苯甲酸及水杨酸贮备液 2, 4, 6 mL,照样品测定项下方法操作,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果(n=5)

Tab 1 Results of recovery test(n=5)

成份	加入量 (μg·mL ⁻¹)	平均回收率 (%)	RSD (%)
水杨酸	5.02	100.1	0.59
	10.04	99.2	0.77
	15.06	98.5	0.56
苯甲酸	10.08	100.9	0.89
	20.16	99.8	0.78
	30.24	101.1	1.08

2.5 精密度试验

取回收率项下 1 份供试液,按上述色谱条件,间隔 1 h,重复进样 5 次,结果水杨酸和苯甲酸的 RSD 分别为 0.64%, 0.58%;上述供试液隔日进样 1 次,共 5 次,结果水杨酸和苯甲酸的 RSD 分别为 0.65%, 0.66%。

2.6 样品测定

精密称取样品适量(含水杨酸 2.25 mg,含苯甲酸 4.5 mg)至 100 mL 量瓶中,加入氯仿液 10 mL,溶解,充分振摇,加入内标液 2 mL,加 70% 甲醇至刻度,摇匀,于水浴中放置 2 h,取出,抽滤,弃去初滤液,恢复至室温时,按上述色谱条件测定,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3)

批号	水杨酸(%)	RSD(%)	苯甲酸(%)	RSD(%)
030311-1	98.9	0.66	101.1	0.58
030311-2	100.5	0.75	99.4	0.50
030311-3	99.4	0.51	100.1	0.92

3 讨论

3.1 流动相的选择

实验中选择不比例甲醇-水做流动相时,发现水杨酸、苯甲酸及氢化可的松的保留时间随甲醇的比例增大而减少,且保留时间重复性不好,考虑到被测物为有机酸,故将水相改为缓冲溶液。当用磷酸调 pH 时发现, pH 在 3.0 ~ 6.0 范围内,被测物保留时间随 pH 增大而减少,其中水杨酸变化最大,苯甲酸次之,氢化可的松最小,这可能与它们的酸性强弱有关,综合上述各种因素,将甲醇与缓冲液比例调为 60:40, pH 值调至 3.1 时,被测物保留时间适当,分离度较好,系统稳定。

3.2 检测波长的选择

由紫外扫描光谱图可见,水杨酸、苯甲酸及氢化可的松分别在 300, 228nm 及 242nm 波长处有最大吸收,但吸收大小不尽相同,其中氢化可的松大,水杨酸次之,苯甲酸最小。综合被测物紫外最大吸收的位置、吸收大小及被测物在该制

剂处方中的量等因素,通过实验,最后选择 270nm 为测定波长,在此波长下峰型较好,完全满足测定要求。

3.3 样品的处理

样品处理时,用滤纸常规过滤,滤液混浊,效果不好,改用 0.45 μ m 的脂溶性滤纸抽滤,滤液澄清,效果良好。冰浴冷却时一定要充分(2h),否则会影响过滤效果。总之,过滤一定要彻底,否则会使柱压升高,柱效降低,影响测定。

《中国医院制剂规范》中复方苯甲酸软膏的含量测定方法为测定苯甲酸和水杨酸的总酸量,这显然达不到质量控制的目的,本法同时测定两种药物的浓度,能够满足医院制剂的质量控制要求。

参考文献

- [1] 潘学田. 中国医院制剂规范[S]. 第 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 1995, 127.
- [2] 刘福清, 谢亚芝, 李春颖. 高效液相色谱法测定复方制剂中苯甲酸和水杨酸含量[J]. 中国药学杂志, 1992, 27(5): 284.
- [3] 刘晋华, 李建新, 李冬梅, 等. 高效液相色谱法测定复方替硝唑擦剂中替硝唑和水杨酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(5): 329.