

HPLC 测定复方土荆皮酊中 3 种成分的含量

李晓翠^{1,2}, 苗爱东^{2*}

(1. 河北北方学院, 河北 张家口 075000;
2. 北京军区联勤部药品仪器检验所, 北京 100071;)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定复方土荆皮酊中土荆皮乙酸、苯甲酸和水杨酸 3 种成分含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法, 以 Agilent Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 为色谱柱, 流动相为甲醇-0.09% 甲酸 (58:42), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 260 nm (检测土荆皮乙酸) 和 230 nm (检测苯甲酸和水杨酸)。结果: 土荆皮乙酸、苯甲酸和水杨酸分别在 1.29 ~ 25.78 mg·L⁻¹ ($r=0.9998$), 0.022 ~ 0.266 g·L⁻¹ ($r=0.9999$), 0.011 ~ 0.110 g·L⁻¹ ($r=0.9998$) 与峰面积呈良好的线性关系; 土荆皮乙酸、苯甲酸和水杨酸的平均加样回收率 ($n=6$) 分别为 100.4%, 100.9%, 100.5%; RSD 分别是 1.00%, 0.84%, 0.75%。结论: 该方法准确、简便、重复性好, 可用于复方土荆皮酊的质量控制。

[关键词] 复方土荆皮酊; 土荆皮乙酸; 苯甲酸; 水杨酸; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0108-04

HPLC Determination of Three Components in Fufang Tujingpiding

LI Xiao-cui^{1,2}, MIAO Ai-dong^{2*}

(1. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;
2. Institute for Drug and Instrument Control of Beijing Military Area Command, Beijing 100071, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for the content determination of pseudolaric acid B, benzoic acid and salicylic acid in Fufang Tujingpiding. **Method:** The analysis was performed on the Agilent Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column with the methol-0.09% formic acid as the mobile phase at 25 °C. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was set at 260 nm for pseudolaric acid B, 230 nm for benzoic acid and salicylic acid. **Result:** The calibration curves were linear in the ranges of 1.29-25.78 mg·L⁻¹ ($r=0.9998$) for pseudolaric acid B, 0.022-0.266 g·L⁻¹ ($r=0.9999$) for benzoic acid and 0.011-0.110 g·L⁻¹ ($r=0.9998$) for salicylic acid. The average recoveries ($n=6$) of pseudolaric acid B, benzoic acid and salicylic acid were 100.4% (RSD 1.00%), 100.9% (RSD 0.84%) and 100.5% (RSD 0.75%), respectively. **Conclusion:** The developed method is accurate, convenient with good reproducibility that can be applied to the quality control of Fufang Tujingpiding.

[Key words] Fufang Tujingpiding; pseudolaric acid B; benzoic acid; salicylic acid; HPLC

复方土荆皮酊为土荆皮药材提取液与苯甲酸、水杨酸制成的复方制剂, 具有抗表皮真菌和止痒等作用, 临床上常用于手癣、脚癣和体癣等的治疗。该

制剂质量标准^[1-2]中“含量测定”项下只采用酸碱滴定法测定总酸量, 对苯甲酸和水杨酸各自的含量限度未作明确的要求, 难以客观、全面地反映复方土荆皮酊的内在质量。为此, 我们对该制剂的原标准进行了改进, 增加了制剂中土荆皮药材的指标成分土荆皮乙酸和化学成分苯甲酸、水杨酸的含量测定项目。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪 (包括低压梯度四

[收稿日期] 20120305(006)

[第一作者] 李晓翠, 硕士生, 从事药物分析, Tel: 010-66870541, E-mail: lengzhu_1986@163.com

[通讯作者] * 苗爱东, 副主任药师, 副研究员, 博士, 从事药物分析, Tel: 010-66870541, E-mail: miaoaidong@sina.com

元泵、自动进样器、恒温箱和 DAD 检测器)、Chem Station 色谱工作站(美国安捷伦科技公司);Mettler Toledo AG 285 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KQ2200E 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司)。

土荆皮乙酸对照品(批号 110880-201003,含量为 99.1%)、苯甲酸对照品(批号 100419-200301)、水杨酸对照品(批号 100106-201104,含量为 99.9%)和土荆皮对照药材(1099-200101)均购自中国药品生物制品检定所。复方土荆皮酊(市售,A 厂:1008201;B 厂:100602;C 厂:H09033,H06020,T03011;D 厂:20110718;E 厂:110320;F 厂:20110303;G 厂:100102;H 厂:20110309,20110204;I 厂:110501,101102;J 厂:110518,101118;K 厂:110102 和 101001)。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

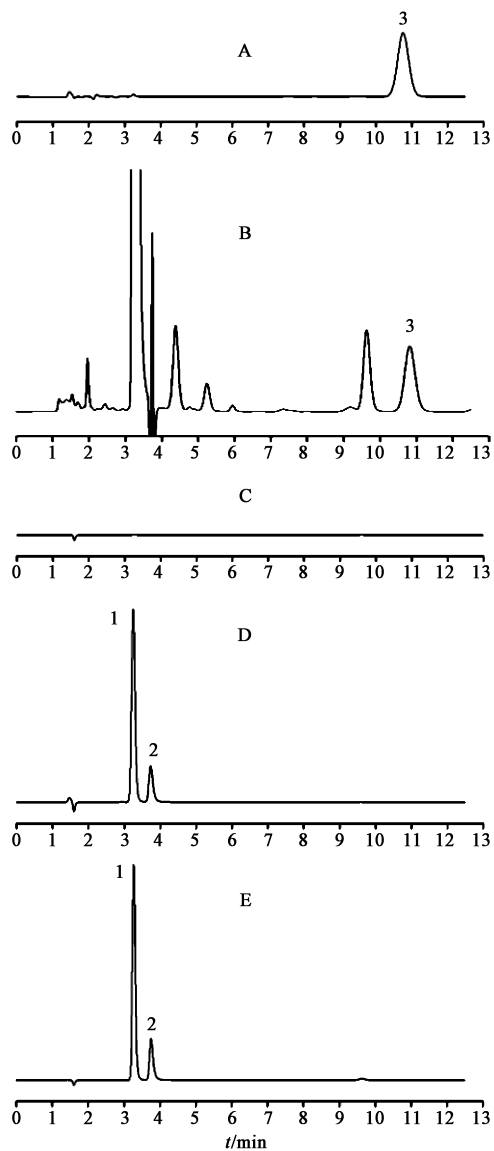
2.1 色谱条件及系统适用性实验 采用 Agilent Zorbax SB C₁₈(4.6 mm × 150 mm,5 μm)色谱柱,以甲醇-0.09%甲酸(58:42)为流动相,柱温 25 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 260 nm(土荆皮乙酸)和 230 nm(苯甲酸和水杨酸),进样体积 10 μL。

在上述色谱条件下,土荆皮乙酸的理论塔板数不低于 6 000,苯甲酸和水杨酸的理论塔板数不低于 4 500,与其他相邻峰的分度度均 > 2.0。阴性对照溶液无明显的干扰。对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液的色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取土荆皮乙酸、苯甲酸和水杨酸各对照品适量,分别置于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品储备液。精密量取土荆皮乙酸储备液适量至 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得土荆皮乙酸质量浓度为 6.44 mg·L⁻¹对照品溶液。

精密量取苯甲酸和水杨酸对照品储备液适量依次加入 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,配制成含苯甲酸和水杨酸浓度分别为 0.111 g·L⁻¹和 0.055 g·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密量取复方土荆皮酊样品 2.0 mL 置于 50 mL 量瓶中,加 60% 甲醇适量,超声处理 10 min,放冷,用 60% 甲醇定容至刻度,摇匀,作为土荆皮乙酸含量测定用供试品溶液 I。再从上述供试品溶液 I 中精密量取 2.5 mL 至 100 mL 量瓶中,加 60% 甲醇定容至刻度,摇匀,作为苯甲酸和水杨酸含量测定用供试品溶液 II。按处方工艺制



A. 土荆皮乙酸对照品;B. 供试品溶液 I (260 nm, 稀释 25 倍);C. 阴性对照(不含苯甲酸、水杨酸);D. 苯甲酸、水杨酸混合对照品;E. 复方土荆皮酊供试品 II (230 nm, 稀释 1000 倍);1. 苯甲酸;2. 水杨酸;3. 土荆皮乙酸

图 1 复方土荆皮酊 HPLC

备^[2]缺苯甲酸和水杨酸的供试品溶液,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取上述对照品储备液适量,先用甲醇配制含土荆皮乙酸为 1.29, 2.58, 3.87, 5.16, 6.44, 7.73, 9.02, 25.78 mg·L⁻¹系列对照品溶液;再配制含苯甲酸 0.022, 0.044, 0.089, 0.111, 0.177, 0.222, 0.266 g·L⁻¹, 含水杨酸 0.011, 0.022, 0.044, 0.055, 0.066, 0.088, 0.110 g·L⁻¹的混合对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪进行测定。分别以进样浓度(mg·L⁻¹)或(g·L⁻¹)为横坐标 C,峰面积为纵坐标 A,绘制标准曲线,得土荆皮乙酸、苯甲酸、水杨

酸的线性方程分别为 $A_{\text{土荆皮乙酸}} = 45.252 \cdot C_{\text{土荆皮乙酸}} - 15.814$ ($r = 0.9998$), $A_{\text{苯甲酸}} = 53.372 \cdot C_{\text{苯甲酸}} + 81.137$ ($r = 0.9999$), $A_{\text{水杨酸}} = 27.003 \cdot C_{\text{水杨酸}} - 53.17$ ($r = 0.9998$)。土荆皮乙酸, 苯甲酸和水杨酸的线性范围分别是 $1.29 \sim 25.78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.022 \sim 0.266 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.011 \sim 0.110 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 精密度考察 按照上述色谱条件, 分别吸取 2.2 项下对照品溶液 $10 \mu\text{L}$, 注入高效液相色谱仪中测定峰面积, 结果土荆皮乙酸、苯甲酸和水杨酸的 RSD ($n = 6$) 分别是 0.21%, 0.40%, 0.45%。表明仪器的精密度良好。

2.6 重复性考察 按照 2.3 项下的方法, 分别取同一批次(20110309)样品, 平行操作 6 份, 按照上述色谱条件测定土荆皮乙酸、苯甲酸和水杨酸的含量,

其 RSD 分别为 0.61%, 0.43%, 0.38%, 表明该方法的重复性良好。

2.7 稳定性考察 按照 2.3 项下的方法, 分别取同一批次(20110309)样品在上述相同色谱条件下, 于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样测定土荆皮乙酸、苯甲酸和水杨酸的含量, 其 RSD 分别为 2.04%, 0.71%, 0.32%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率 取已知含量的复方土荆皮酊(20110309)1.0 mL, 分别加入适量的土荆皮乙酸、苯甲酸和水杨酸对照品储备液, 按照 2.3 项下的方法制备供试品溶液, 平行操作 6 份, 并按上述色谱条件进行回收率测定, 结果土荆皮乙酸、苯甲酸和水杨酸的平均回收率分别是 100.4%, 100.9% 和 100.5%。表明该方法的准确度高, 结果见表 1。

表 1 土荆皮乙酸、苯甲酸和水杨酸的加样回收率试验

测定成分	取样量/mL	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
土荆皮乙酸	1.0	0.074	0.081	0.155	100.0	100.4	1.00
	1.0	0.074	0.081	0.156	101.2		
	1.0	0.074	0.081	0.156	101.2		
	1.0	0.074	0.081	0.154	98.8		
	1.0	0.074	0.081	0.155	100.0		
	1.0	0.074	0.081	0.156	101.2		
苯甲酸	1.0	57.716	65.200	123.199	100.4	100.9	0.84
	1.0	57.716	65.200	123.491	100.9		
	1.0	57.716	65.200	124.242	102.0		
	1.0	57.716	65.200	123.321	100.6		
	1.0	57.716	65.200	123.924	101.5		
	1.0	57.716	65.200	122.671	99.6		
水杨酸	1.0	30.028	29.171	59.110	99.7	100.5	0.75
	1.0	30.028	29.171	59.397	100.7		
	1.0	30.028	29.171	59.198	100.0		
	1.0	30.028	29.171	59.650	101.5		
	1.0	30.028	29.171	59.165	99.9		
	1.0	30.028	29.171	59.536	101.2		

2.9 含量测定 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 测定了 11 个生产厂家共 17 批次复方土荆皮酊中土荆皮乙酸、苯甲酸和水杨酸的含量, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 土荆皮乙酸为土荆皮药材的特征成分, 中国药典^[3]将其作为土荆皮药材的指标成分进行检测。采用二极管阵列检测器(DAD)提取了各成分在 200 ~ 400 nm 的紫外吸收光谱, 土

荆皮乙酸在 230, 260 nm 处有吸收峰, 当波长为 260 nm 时所得色谱峰面积最大; 苯甲酸在 230, 270 nm 处均有吸收峰, 以 230 nm 处吸光度最大; 水杨酸在 230, 300 nm 处有吸收峰, 在 230 nm 也有最大吸收, 故选 230 nm 作为苯甲酸和水杨酸的检测波长。考虑到处方中土荆皮乙酸浓度与苯甲酸、水杨酸的浓度差异悬殊, 为准确定量分析 3 个成分的含量, 采用双波长变换(260, 230 nm)、不同稀释倍数(25, 1000

倍)的两步进样法在一个色谱条件下分别测定制剂中土荆皮乙酸、苯甲酸和水杨酸3种成分的含量。

表2 11个生产厂家17批次复方土荆皮酊中3种成分的含量测定结果 $g \cdot L^{-1}$

生产厂家	批号	土荆皮乙酸	苯甲酸	水杨酸
A	1008201	-	40.110	33.698
B	100602	0.119	117.273	60.567
	H09033	-	129.458	69.808
C	H06020	-	117.273	60.567
	T03011	-	134.320	69.838
D	20110718	0.562	61.526	30.696
E	110320	-	59.802	30.346
F	20110303	-	55.772	27.774
G	100102	-	116.674	60.640
	20110204	0.167	107.899	55.153
H	20110309	0.148	115.432	60.056
	110501	-	117.534	60.575
I	101102	-	126.930	66.609
	110518	0.043	116.977	59.462
J	101118	0.058	114.785	58.577
	110102	-	118.112	61.012
K	101001	-	124.469	64.306

注: - 未检出。

参考相关文献[4-16]方法考察了甲醇、乙腈与水、酸溶液(乙酸、磷酸和甲酸)和磷酸盐缓冲溶液等流动相系统,结果显示,甲醇-0.1%甲酸为流动相时基线平稳,各成分的峰形较好且分离时间适宜。

3.2 分别考察了不同浓度的甲醇、乙醇和流动相作为提取溶剂,在不同超声提取时间下(0,5,10,20,30 min)对含量测定的影响,结果表明,采用60%甲醇超声提取10 min即可充分提取复方土荆皮酊中的土荆皮乙酸。

3.3 对市售的11个生产厂家共17批次复方土荆皮酊样品进行检测时发现,不同厂家生产的复方土荆皮酊中土荆皮乙酸、苯甲酸和水杨酸的含量存在明显的差别,尤其是土荆皮乙酸,只有4个生产厂家的6批次样品中检出土荆皮乙酸,且样品间含量差别很大。说明在目前复方土荆皮酊质量标准不完善的情况下,一些生产厂家为了节约成本,投料中把关不严,存在以假充真,以次充好的现象,需要引起相关药品生产、流通、使用和监管等部门的高度重视。同时也说明:为确保临床用药的安全有效,对该制剂质量标准的改进、完善和提高势在必行。

[参考文献]

[1] 中国人民解放军医疗机构制剂规范[S]. 2002:118.
 [2] 卫生部药品标准 中药成方制剂. 第17册(W33-B-3269-98) [S]. 2007: 176.
 [3] 中国药典. 一部[S]. 2010:17.
 [4] 陈桦,冯柏康,李艳园,等. 高效液相色谱法测定土荆皮药材中土荆皮乙酸的含量[J]. 中药材, 2006, 29(5):451.
 [5] Liu P, Sun J H, Xu M, et al. Characterization of diterpenoids in the bark of *Pseudolarix kaemferi* by HPLC-ESI-MSⁿ [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2011, 46(2):213.
 [6] Liu P, Guo H, Guo H Z, et al. Simultaneous determination of seven major diterpenoids in *Pseudolarix kaemferi* by high-performance liquid chromatography DAD method [J]. Journal Pharm Biomed Anal, 2007, 44:730.
 [7] Han Q B, Yip Y K, Yang N Y, et al. Rapid analysis of pseudolaric acids in Cortex Pseudolaricis and related medicinal products by high performance liquid chromatography [J]. Talanta, 2007, 73:757.
 [8] Ye X, Tang M H, Chen L J, et al. Rapid separation and identification of major constituents in *Pseudolarix kaemferi* by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2009, 23:3954.
 [9] 谢诗明,王燕青,赵蕊,等. 止痒酊质量标准研究[J]. 中国药业, 2010, 19(10):43.
 [10] 蔡敏荣. HPLC法测定祛风止痛酊中土荆皮乙酸的含量[J]. 湖南中医杂志, 2010, 26(4):123.
 [11] 沙拉麦提·艾力,凯赛尔·阿不拉. 复方卡力孜然酊质量标准的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):77.
 [12] 孙蒙,闫小玉,毕开顺,等. HPLC测定11种中药口服液6种防腐剂的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3):76.
 [13] 关恺珍,梁毅,卢丽霞. HPLC测定复方土槿皮酊中苯甲酸和水杨酸的含量[J]. 中国实用医药, 2009, 4(6):32.
 [14] 朱银春,杨矿生. RP-HPLC法测定复方土槿皮酊中水杨酸和苯甲酸的含量[J]. 首都医药, 1998, 10(5):17.
 [15] 胡晓炜,李亚芳. RP-HPLC法测定复方土荆皮酊中苯甲酸、水杨酸的含量[J]. 中国药师, 2002, 10(5):607.
 [16] 李俊松,欧阳强,张淑芳,等. 反向高效液相色谱法测定复方土槿皮酊中水杨酸和苯甲酸的含量[J]. 中国医院药学杂志, 1994, 14(3):108.

[责任编辑 顾雪竹]