

## HPLC 法同时测定复方樟脑搽剂中苯酚和樟脑含量

陆松伟, 宋洪杰, 陈方剑(第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 建立同时测定复方樟脑搽剂中苯酚和樟脑含量的 HPLC 法。方法 色谱柱为 Kromasil-C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(55 : 45); 检测波长 287 nm; 流速 0.8 ml/min。结果 苯酚和樟脑的线性范围分别在 103.4 ~ 827.2 μg/ml ( $r=0.9991, n=5$ )、205.1 ~ 1640.8 μg/ml ( $r=0.9995, n=5$ ), 平均回收率分别为 99.61% ( $RSD=1.20%, n=9$ )、99.83% ( $RSD=1.18%, n=9$ )。结论 该方法简便、准确, 重复性好, 适用于复方樟脑搽剂的质量控制。

**[关键词]** 高效液相色谱法; 复方樟脑搽剂; 苯酚; 樟脑

**[中图分类号]** R927 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2011)05-0347-03

## Simultaneous determination of phenol and camphor in compound camphor liniment by HPLC

LU Song-wei, SONG Hong-jie, CHEN Fang-jian (Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a method for simultaneous determination of phenol and camphor in compound camphor liniment by HPLC. **Methods** The separation was performed on a Kromasil C<sub>18</sub> analytical column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of methanol-water (55 : 45). The detection wavelength was 287 nm. The flow rate was 0.8 ml/min. **Results** The standard curves were linear in the range of 103.4 ~ 827.2 μg/ml for phenol ( $r=0.9991, n=5$ ) and 205.1 ~ 1640.8 μg/ml ( $r=0.9995, n=5$ ) for camphor. The average recoveries of phenol and camphor were 99.61% ( $RSD=1.19%, n=9$ ) and 99.83% ( $RSD=1.18%, n=9$ ). **Conclusion** The method was simple and accurate with a good reproducibility, and could be used as a quality control method for compound camphor liniment.

**[Key words]** high pressure liquid chromatography; compound camphor liniment; phenol; camphor

复方樟脑搽剂是《中国人民解放军医疗机构制剂规范》中记载的外用制剂, 由液化苯酚、樟脑、薄荷脑和乙醇为主要成分组成, 有消炎止痒作用, 广泛用于皮肤瘙痒症的治疗。其主要成分常温下都不稳定, 在生产和储存过程中控制其主要成分的含量很有必要, 但本制剂的质量标准中没有含量测定项, 为进一步提高和控制复方樟脑搽剂的质量, 笔者参考有关文献<sup>[1-3]</sup>, 建立了同时测定苯酚和樟脑两种成分含量的 HPLC 法, 用于复方樟脑搽剂的质量控制。

### 1 仪器和试剂

**1.1 仪器** LC-10ADVP 高效液相色谱仪(日本岛津制作所, 包括 LC-10AT 泵、SPD-10A 紫外检测器、CLASS vp 色谱工作站和 SCL-10Avp 系统控制器); FA-2004 电子天平(上海天平仪器厂)。

**1.2 药品和试剂** 苯酚(含量 100.0%, 江门市恒

键药业有限公司, 批号 080601); 樟脑(含量 96.4%, 福建轻松股份有限公司, 批号 100402); 复方樟脑搽剂(第二军医大学长海医院自制, 批号 101024、101101、101102、101103); 水为蒸馏水, 甲醇为色谱纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 供试品溶液** 精密量取供试品 0.5 ml 于 25 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液备用。

**2.1.2 模拟样品和阴性对照样品溶液** 按处方工艺制备阴性对照和模拟样品, 按供试品溶液制备方法制备成溶液。

**2.1.3 对照品溶液** 精密称取苯酚对照品 0.1034 g、樟脑对照品 0.2501 g 一同置于 100 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得含苯酚、樟脑成分的对照品贮备液; 精密量取上述贮备液各 1.0、2.0、4.0、6.0 和 8.0 ml, 分别置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 制得苯酚和樟脑对照品混合溶液, 苯酚浓

**[作者简介]** 陆松伟(1983-), 男, 药师。Tel: (021) 81873726。

**[通讯作者]** 宋洪杰。E-mail: hjsong123@yahoo.com.cn。

度分别为 103.4、206.8、413.6、620.4 和 827.2  $\mu\text{g/ml}$ ，樟脑浓度分别为 205.1、410.2、820.4、1 230.6 和 1 640.8  $\mu\text{g/ml}$ 。

**2.2 色谱条件和系统适用性实验** Kromasil- $\text{C}_{18}$  色谱柱 (200 mm  $\times$  4.0 mm, 5  $\mu\text{m}$ )；流动相为甲醇-

水 (55 : 45)；检测波长 287 nm；流速 0.8 ml/min；进样量 20  $\mu\text{l}$ ；柱温为室温<sup>[4]</sup>。苯酚和樟脑与相邻峰的分度均  $> 1.5$ ，处方中的薄荷脑和其他辅料对 2 种成分的含量测定没有干扰。阴性样品溶液、对照品溶液和供试品溶液色谱图见图 1。

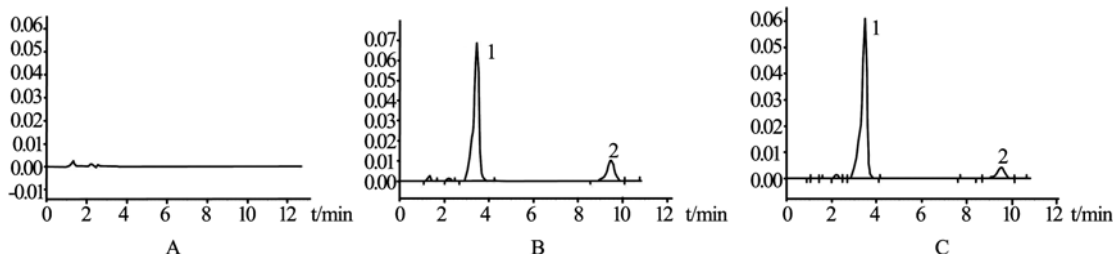


图 1 复方樟脑搽剂的 HPLC 色谱图  
A-阴性样品溶液；B-对照品溶液；C-供试品溶液；1-苯酚；2-樟脑

**2.3 标准曲线的制备** 精密吸取上述混合对照品溶液各 20  $\mu\text{l}$ ，进样，测定峰面积。以对照品溶液浓度 (C) 为横坐标，峰面积 (A) 为纵坐标，求得两组分的回归方程。结果显示，苯酚在 103.4 ~ 827.2  $\mu\text{g/ml}$  范围内线性良好，其回归方程为  $A = 2\ 149.4C + 241\ 882$  ( $r = 0.999\ 1, n = 5$ )，樟脑在 205.1 ~ 1 640.8  $\mu\text{g/ml}$  范围内线性良好，其回归方程为  $A = 305.03C + 1\ 163.3$  ( $r = 0.999\ 5, n = 5$ )。

**2.4 回收率试验** 精密称取已知含量的模拟样品适量，按供试品溶液制备项下操作，进样，记录峰面积，代入线性回归方程，计算含量并求算回收率，结果见表 1。苯酚和樟脑的平均回收率分别为 99.60% ( $RSD = 1.20\%$ ,  $n = 9$ )、99.82% ( $RSD = 1.18\%$ ,  $n = 9$ )，表明所建立的 HPLC 方法准确度高。

表 1 苯酚和樟脑的回收率试验结果 ( $n = 3$ )

组分	配制浓度 (mg/ml)	实测浓度 (mg/ml)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
苯酚	16.90	16.79 $\pm$ 0.14	99.35 $\pm$ 0.83	99.61
	20.15	20.16 $\pm$ 0.25	100.05 $\pm$ 1.24	
	24.86	24.72 $\pm$ 0.37	99.44 $\pm$ 1.49	
樟脑	16.38	16.31 $\pm$ 0.30	99.57 $\pm$ 1.83	99.83
	19.72	19.72 $\pm$ 0.23	100.00 $\pm$ 1.17	
	23.66	23.64 $\pm$ 0.13	99.92 $\pm$ 0.55	

**2.5 精密度实验** 分别取低、中、高 3 组浓度的混合对照品溶液，在上述色谱条件下日内精密度重复进样 3 次，日间精密度重复进样 5 次，每次进样间隔时间日内精密度为 4 h，日间精密度为 24 h，记录峰面积，代入线性回归方程，计算含量。苯酚 413.6、620.4、827.2  $\mu\text{g/ml}$  浓度的日内精密度  $RSD$  分别为 0.66%、

1.31% 和 0.74%，日间精密度  $RSD$  分别为 1.59%，1.88% 和 1.86%；樟脑 820.4、1 230.6、1 640.8  $\mu\text{g/ml}$  浓度日内精密度  $RSD$  分别为 0.36%、0.42% 和 0.52%，日间精密度  $RSD$  分别为 1.62%，1.48% 和 1.98% ( $n = 3$ )。结果表明所建立的 HPLC 方法重现性好，且测定时间内样品溶液稳定性良好。

**2.6 重复性实验** 取批号 101103 供试品溶液 5 份，按样品处理方法操作，并按含量测定方法测定，代入各自的回归方程计算含量，结果显示，苯酚和樟脑的含量分别为 97.43% 和 100.16%， $RSD$  分别为 0.65% 和 0.67% ( $n = 5$ )，表明方法重复性良好。

**2.7 样品测定** 取复方樟脑搽剂，按 2.1.1 项下的操作制备供试品溶液，进样 20  $\mu\text{l}$ ，记录峰面积，代入线性回归方程计算含量，共测定 4 个批号，结果见表 2。苯酚和樟脑两组分含量均在标示量的 90.0% ~ 110.0% 之间，符合外用制剂的含量限度要求<sup>[5]</sup>。

表 2 复方樟脑搽剂含量测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

批号	苯酚标示 (%)	樟脑标示 (%)
101024	102.68 $\pm$ 0.85	98.94 $\pm$ 1.04
101101	100.48 $\pm$ 0.63	99.57 $\pm$ 0.83
101102	102.07 $\pm$ 0.86	96.70 $\pm$ 0.55
101103	97.88 $\pm$ 0.24	100.46 $\pm$ 0.68

### 3 讨论

本研究建立了同时测定复方樟脑搽剂中苯酚和樟脑的 HPLC 法。经方法学研究表明，所建立的 HPLC 方法简便、快速、准确，重复性好，可为复方樟

脑搽的质量控制提供依据。由于樟脑在水中极微溶解,且樟脑在样品中含量较高,因此本实验中用甲醇作为溶剂,以增强其溶解性,避免有少量樟脑结晶析出,影响测定结果。

预实验中,经过在190~400 nm波长范围内对苯酚樟脑对照品溶液进行紫外光谱扫描,结果发现,苯酚在273 nm处有最大吸收峰,樟脑在287 nm处有最大吸收峰,由于苯酚的紫外吸收特别强,故选择287 nm为检测波长,以增强樟脑的色谱信号响应。

实验中比较了不同比例的流动相和流速,发现苯酚和樟脑的保留时间随甲醇比例的增大而缩短,流速的增加而缩短,以甲醇-水(55:45)为最佳比例流动相,流速0.8 ml/min为最佳流速。

### 【参考文献】

- [1] 宗永辉. 高效液相色谱法测定复方氧化锌涂剂中樟脑和苯酚含量[J]. 中国药业, 2009, 18(1): 16.
- [2] 余小平, 舒金富, 黄 华. 高效液相色谱法同时测定樟脑苯酚溶液中两组分的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(8): 1161.
- [3] 杨 娟, 黄敬群, 李 红, 等. 高效液相色谱法测定复方樟脑搽剂中苯酚的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(18): 1616.
- [4] 宋洪杰, 陆松伟, 朱全刚, 等. 反相离子对色谱法测定三利巴布膏剂中盐酸利多卡因的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2008, 25(2): 137.
- [5] 李丽萍, 毕雪艳, 景金柱. HPLC法测定盐酸利多卡因胶浆(1)的含量[J]. 齐鲁药事, 2006, 25(2): 92.

[收稿日期] 2011-01-05

[修回日期] 2011-04-08

(上接第341页)

**3.4 筛选结果** 附子中的双酯型生物碱如乌头碱、新乌头碱和次乌头碱在加热的过程中水解成为相应的单酯型的苯甲酰乌头胺、苯甲酰新乌头胺和苯甲酰次乌头胺,后者又可以继续水解为不含酯键乌头原碱、新乌头原碱和次乌头原碱,因此实验中主要检测到单酯型的生物碱。细胞膜色谱的筛选结果表明,单酯型的苯甲酰乌头胺、苯甲酰新乌头胺和苯甲酰次乌头胺是附子中的有效成分,这与目前认为附子中的主要药效和毒性成分是乌头碱相一致。结果同时表明,塔拉定、尼奥灵和附子灵等也可能是附子中的有效成分,虽然其含量不多,但其在细胞膜色谱上的保留时间较长,具有较强的亲和力,值得进一步研究。

### 4 结论

本研究采用细胞膜色谱技术和HPLC-TOF/MS技术相结合,实现了对附子中作用于心肌细胞膜上受体的有效成分的初步筛选和鉴定,共确定了8个可能的有效成分,其药理作用还需要进一步研究。该方法充分利用了细胞膜色谱技术简便、高通量筛选的优势,并利用了液相色谱技术弥补了细胞膜色谱法无法有效分离和鉴定的不足,同时由于HPLC-TOF/MS具有更高的灵敏度,使得细胞膜色谱的保留成分不必经过浓缩就可以直接进样进行色谱分析,操作简便、节省时间和成本。为从天然产物中快速寻找新的活性成分提供了途径。

### 【参考文献】

- [1] He LC, Yang GD, Geng XD. Enzymatic activity and chromatographic characteristics of the cell membrane immobilized on silica surface[J]. Chin Sci Bull, 1999, 44(9): 826.
- [2] He LC, Wang SC, Geng XD. Coating and fusing cell membranes onto a silica surface and their chromatographic characteristics [J]. Chromatographia, 2001, 54(1): 71.
- [3] 袁秉祥, 贺浪冲, 杨广德. 细胞膜生物亲和色谱药物筛选系统[J]. 中国药理通讯, 2003, 20(3): 68.
- [4] 方艺霖, 张艺卜, 肖小河, 等. 细胞膜色谱技术用于中药活性成分筛选的研究进展[J]. 中草药, 2008, 39(7): 1119.
- [5] 聂 红, 孟兰贞. 细胞膜色谱及其在中药活性成分研究中的应用[J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 4(17): 334.
- [6] 阎爱荣, 张 宏. 附子的药理研究[J]. 中国药物与临床, 2008, 8(9): 745.
- [7] 张菊花, 张晓艳. 探析不同炮制方法对附子药理作用及毒性的影响[J]. 海峡药学, 2008, 20(10): 89.
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 522.
- [9] 贺浪冲. 细胞膜色谱法[D]. 西安: 西北大学, 1998: 27.
- [10] 李 翔. 四逆汤化学成分和抗心肌缺血作用的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2008: 91.
- [11] Hu R, Zhao J, Qi LW, et al. Structural characterization and identification of C(19)- and C(20)-diterpenoid alkaloids in roots of *Aconitum carmichaeli* by rapid-resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Sp, 2009, 23(11): 1619.

[收稿日期] 2010-03-25

[修回日期] 2011-05-04