

## · 论 著 ·

## HPLC 法同时测定多效防护霜中盐酸苯海拉明、甲氧基肉桂酸辛酯和水杨酸辛酯的含量

韩 凌<sup>1,3</sup>, 王新霞<sup>2</sup>, 吕 磊<sup>2</sup>, 张静如<sup>3</sup>, 阚月一<sup>2</sup>, 鲁 莹<sup>3</sup>, 傅 翔<sup>1</sup> (1. 上海控江医院药剂科, 上海 200093; 2. 上海东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438; 3. 海军军医大学药学院, 上海 200433)

**【摘要】** 目的 建立同时测定多效防护霜中盐酸苯海拉明、甲氧基肉桂酸辛酯和水杨酸辛酯的含量的方法。方法 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Agilent Extend-C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙酸铵缓冲溶液 (20 mmol/L, pH = 7.5), 梯度洗脱, 甲醇比例随时间变化为: 0~10 min, 甲醇→60%; 10~12 min, 甲醇 60%→92%; 12~20 min, 甲醇→92%, 采集时间 20 min, 平衡时间 10 min, 流速 1 ml/min, 紫外检测波长 218 nm, 柱温 25℃, 进样量 15 μl。结果 3 种成分在 30 min 内基线分离, 方法学验证表明, 线性关系良好 ( $r > 0.9995$ ), 日内日间精密密度均小于 3.0%, 回收率在 90%~108% 之间, 稳定性和重复性 RSD 均 < 3.0%, 符合方法学要求。按照新建立的方法测定了 3 个批次样品中 3 种成分的含量, 结果符合要求。结论 本方法简便可靠, 可为多效防护霜的质量控制提供依据, 也为其质量标准研究奠定了基础。

**【关键词】** 多效防护霜; 高效液相色谱; 盐酸苯海拉明; 甲氧基肉桂酸辛酯; 水杨酸辛酯; 含量测定

**【中图分类号】** R927 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1006-0111(2019)06-0508-04

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.007

## Simultaneous determination of diphenhydramine hydrochloride, octyl methoxycinnamate and octyl salicylate in multi-effect protective cream by HPLC

HAN Ling<sup>1</sup>, WANG Xinxia<sup>2</sup>, LV Lei<sup>2</sup>, ZHANG Jingru<sup>3</sup>, KAN Yueyi<sup>2</sup>, LU Ying<sup>1</sup>, FU Xiang<sup>3</sup> (1. Department of Pharmacy, Shanghai Kongjiang Hospital, Shanghai 200093, China; 2. Department of Pharmacy, Shanghai Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China; 3. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**【Abstract】** **Objective** To establish a HPLC method for the simultaneous determination of diphenhydramine hydrochloride, octyl methoxycinnamate and octyl salicylate in multi-effect protective cream. **Methods** The HPLC condition was as follows. The column was Agilent Extend-C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol and ammonium acetate buffer solution (20 mmol/L, pH = 7.5). Gradient elution. The methanol ratio varies with time as follows: 0-10 min, methanol→60%; 10-12 min, methanol 60%→92%; 12-20 min, methanol→92%. Acquisition time was 20 minutes. Liquid phase equilibrium time was 10 min. Flow rate was 1 ml/min. UV detection wavelength was 218 nm. Column temperature was 25℃. Injection volume was 15 μl. **Results** The three components were separated at baseline within 30 min. The methodological verification showed that the standard curves had good linearity ( $r > 0.9995$ ). The inter-day precision were less than 3.0%. The recovery was between 90% and 108%. The RSD% of stability and repeatability were also less than 3.0%. The **results** showed that the method could meet the requirements of method validation. The contents of the three components in three batches were determined according to the newly established method. **Conclusion** The method is simple and reliable, can provide a basis for the quality control of multi-effect protective cream, and laid a foundation for its quality standard research.

**【Key words】** multi-effect protective cream; HPLC; diphenhydramine hydrochloride; octyl methoxycinnamate; octyl salicylate; content determination

随着我国开发海洋战略的加速实施, 部队海上训练和驻岛守礁的任务日益繁重, 长远航已成为我海军维护国家海洋权益、彰显维护世界和平责任的

常规军事任务, 任务执行过程中, 有毒海洋生物蛰伤和紫外线灼伤是减少非战斗减员, 提高军事作业能力亟待解决的问题<sup>[1-2]</sup>。本研究根据课题组的前期基础(高原防晒产品列装高原部队使用多年), 设计包括抑制刺丝囊发射的预防成分、舒缓蛰伤后局部症状的治疗成分以及抗紫外线成分组成的兼具防护有毒海洋生物蛰伤和紫外线灼伤的多效防护霜<sup>[3-5]</sup>。

**【基金项目】** 国家科技重大专项资助项目(2018ZX09J18110-001-001)

**【作者简介】** 韩凌, 硕士, 研究方向: 药剂学, Email: 827107333@qq.com

**【通讯作者】** 傅翔, 博士, 副主任药师, Email: 15000611618@139.com

该制剂可填补我海军卫勤保障军特药品种的空白,极大促进我军海上卫勤保障实力。

多效防护霜采用环戊硅氧烷、氢化蓖麻油、甲氧基肉桂酸辛酯、水杨酸辛酯、氧化锌、二氧化钛、盐酸苯海拉明等成分制备而成,采用特殊处方工艺,确保防蛰伤成分和防晒剂成分在高湿及海水浸泡条件下维持有效浓度 2 h 以上,抗紫外线灼伤能力可靠(SPF 值达到 30),可防水浸泡与冲刷。处方中盐酸苯海拉明是防止有毒海洋生物蛰伤的成分之一,而甲氧基肉桂酸辛酯和水杨酸辛酯作为防晒剂是对抗紫外线的成分。本研究选择多效防护霜中的 3 种药效成分,采用 HPLC 法进行同时测定<sup>[6-8]</sup>,以为制剂的质量标准研究提供依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Thermo Scientific U3000 系列高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔公司),配有四元泵、自动进样器、柱温箱和紫外检测器;分析软件为 Chromeleon 工作站。AL-104 电子天平(瑞士梅特勒公司);DL-360A 超声发生器(上海之信仪器有限公司);VORTEX-6 涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器有限公司);Barnstead D3750 超级纯水仪(美国赛默飞世尔公司)。

### 1.2 药品与试剂

对照品盐酸苯海拉明(批号:100066-200807)购自中国食品药品检定研究院、二苯酮(批号:H179Z67919)购自鼎瑞化工有限公司、甲氧基肉桂酸辛酯(批号:PHR1080)、水杨酸辛酯(批号:PHR1081)购自 Sigma 公司(纯度>98.0%),乙腈和甲醇为色谱纯(Sigma 公司,USA),其余试剂均为分析纯,水为纯水。3 批多效防护霜批号分别为 20180726、20181129、20181205,均为实验室自制。

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品溶液的制备

精密称取盐酸苯海拉明、二苯酮、甲氧基肉桂酸辛酯和水杨酸辛酯对照品 20.08、20.10、100.04、100.03 mg,置 10 ml 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得浓度分别为 2008.00、2010.00、10004.00、10003.00  $\mu\text{g/ml}$  的对照品储备液,其中二苯酮仅用于专属性实验。将其余 3 种储备液各取 0.5、1.0、1.0 ml,定容至 10 ml 量瓶中,并按 1、2.5、10、15、20 的比例逐级稀释,即得系列浓度的混合对照品溶液,浓度分别为:盐酸苯海拉明:5.02、10.04、

25.10、50.20、75.30、100.40  $\mu\text{g/ml}$ ;甲氧基肉桂酸辛酯:50.02、100.04、250.10、500.20、750.30、1000.40  $\mu\text{g/ml}$ ;水杨酸辛酯:50.02、100.03、250.08、500.15、750.23、1000.30  $\mu\text{g/ml}$ ,置于 4℃ 冰箱保存。

### 2.2 供试品溶液的制备

精密称取多效防护霜 1.0 g,置 50 ml 量瓶中,加入甲醇约 35 ml,超声 20 min 至完全破乳溶解(功率 240 W,频率 40 kHz),甲醇定容至 50 ml,摇匀;取初提液 1 ml,加乙腈 1 ml,涡旋 30 s,13 000 r/min 离心 5 min,取上清即得样品溶液。置 4℃ 冰箱密封,避光保存。

### 2.3 色谱条件

色谱柱:Agilent Extend-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:甲醇(A)-乙酸铵缓冲溶液(B, 20 mM, pH = 7.5),梯度洗脱, A 相比比例随时间变化为:0 ~ 10 min、A → 60%; 10 ~ 12 min、A 60% → 92%; 12 ~ 20 min、A → 92%, 采集时间 20 min,平衡时间 10 min,流速:1 ml/min;紫外检测波长:218 nm;柱温:25℃;进样量:15  $\mu\text{l}$ ;外标法定量。

### 2.4 方法学验证

#### 2.4.1 系统适用性试验

按出峰顺序,盐酸苯海拉明、二苯酮、甲氧基肉桂酸辛酯、水杨酸辛酯的保留时间分别为:5.7、9.7、17.3、18.5 min。根据色谱图中 4 个峰的相关参数计算系统适用性,其理论塔板数均>3 000,相邻峰的分度均>1.5,脱尾因子在 0.9~1.1 的范围内。盐酸苯海拉明的降解产物二苯酮不干扰其出峰。空白基质、对照品以及样品的色谱图见图 1。

#### 2.4.2 线性关系

将“2.1”项下制备的系列混合对照品溶液按“2.3”项下色谱条件依次连续进样,分别重复 3 次,以对照品溶液浓度( $X$ ,  $\mu\text{g/ml}$ )对峰面积( $Y$ )进行线性回归,呈良好的线性关系,见表 1。

#### 2.4.3 定量限和检测限

将 3 种对照品溶液进行逐级稀释,以信噪比 10 : 1,确定其最低定量限;以信噪比 3 : 1,确定其最低检测限。盐酸苯海拉明、甲氧基肉桂酸辛酯、水杨酸辛酯的最低定量限分别为 2.5、1.0、1.0  $\mu\text{g/ml}$ ;最低检测限分别为 1.0、0.4、0.4  $\mu\text{g/ml}$ 。

#### 2.4.4 精密度试验

取“2.1”项下制备的混合对照品溶液中的第 2、3、5 三个点作为低、中、高 3 个浓度点,在 1 d 以内连续进样 3 次,以及连续 3 d 分别进样,根据所得峰面

积分分别考察日内和日间精密度。结果盐酸苯海拉明的日内和日间精密度 RSD 均 < 3.0%, 甲氧基肉桂

酸辛酯和水杨酸辛酯的日内和日间精密度 RSD 均 < 2.0%, 表明本方法的精密度良好。

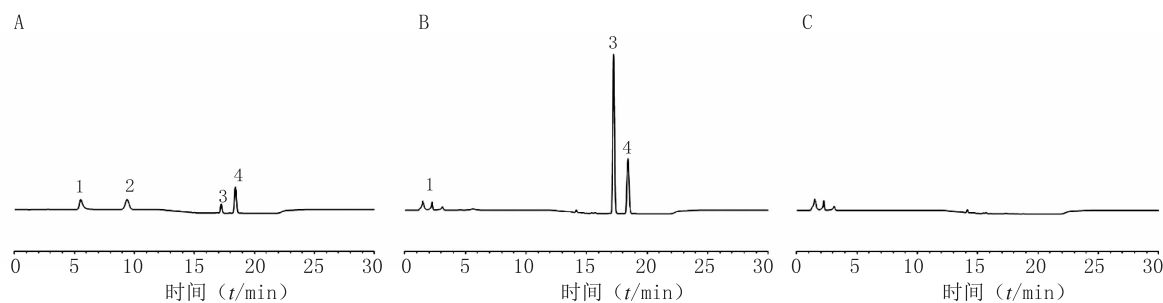


图1 多效防护霜的 HPLC 图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 盐酸苯海拉明; 2. 二苯酮; 3. 甲氧基肉桂酸辛酯; 4. 水杨酸辛酯

表1 3种成分的线性关系

待测成分	回归方程	线性范围( $\mu\text{g/ml}$ )	$r$
盐酸苯海拉明	$Y = 0.3941X - 0.2699$	5~100	0.9999
甲氧基肉桂酸辛酯	$Y = 0.3822X + 0.9392$	50~1000	0.9999
水杨酸辛酯	$Y = 0.2351X + 6.1051$	50~1000	0.9995

#### 2.4.5 重复性试验

精密称取同一批次样品 1.0 g(批号:20180726), 共 5 份, 按“2.2”项下方法分别制成样品溶液, 进样分析。结果盐酸苯海拉明、甲氧基肉桂酸辛酯、水杨酸辛酯的平均含量和 RSD 分别为 1.88 mg/g(RSD = 0.55%)、71.93 mg/g(RSD = 0.27%)、48.94 mg/g(RSD = 0.25%), 表明本方法的重复性良好。

#### 2.4.6 稳定性试验

取按“2.2”项下方法新制备的样品溶液(批号:20180726), 分别在 0、1、2、4、8、12、24 h 测定 3 种成分的峰面积, 考察稳定性, 结果盐酸苯海拉明、甲氧

基肉桂酸辛酯、水杨酸辛酯的峰面积 RSD 分别为 3.53%、3.26%、2.88%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

#### 2.4.7 加样回收率试验

精密称取空白基质 1.0 g, 共 9 份, 每 3 份为 1 组, 按低、中、高 3 个水平分别加入对照品一定量(样品中各成分含量的 80%、100%、120%), 按“2.2”项下方法制备, 进样分析, 结果见表 2。盐酸苯海拉明、甲氧基肉桂酸辛酯、水杨酸辛酯的低、中、高浓度的平均回收率均在 93%~104%, 表明以本法同时测定多效防护霜中 3 种成分的回收率良好。

表2 加样回收率试验结果

待测成分	原有量(mg)	加入量(mg)	平均测得量(mg)	平均回收率(%)	RSD(%)
盐酸苯海拉明	0	1.60	1.50	93.58	0.78
	0	2.00	1.88	94.07	0.54
	0	2.40	2.29	95.41	0.23
甲氧基肉桂酸辛酯	0	60.00	62.03	103.38	0.11
	0	75.00	76.06	101.41	0.13
	0	90.00	93.08	103.42	0.42
水杨酸辛酯	0	40.00	41.34	103.35	0.17
	0	50.00	50.67	101.34	0.11
	0	60.00	61.17	101.95	0.11

#### 2.4.8 耐用性试验

考察 4 个因素的微小改变对试验结果的影响, 包括不同流速(0.9、1.0、1.1 ml/min), 流动相中初始甲醇比例(58%、60%、62%), 柱温(22℃、25℃、28℃), 检测波长(217、218、219 nm)。结果显示, 3 种成分的峰面积及保留时间的 RSD 均 < 10%, 分离度和拖尾因子等系统适用性参数均符合方法学要

求, 证明方法的耐用性良好。

#### 2.5 样品测定

按“2.2”项下方法制备 3 个批次的样品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样分析, 计算样品中盐酸苯海拉明、甲氧基肉桂酸辛酯、水杨酸辛酯的含量, 结果见表 3。

表3 三批样品含量测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

批次	盐酸苯海拉明(mg/g)	甲氧基肉桂酸辛酯(mg/g)	水杨酸辛酯(mg/g)
20180726	1.89±0.01	71.81±0.19	48.86±0.12
20181129	1.88±0.01	76.84±0.38	52.31±0.11
20181205	1.93±0.01	77.95±0.14	53.32±0.11

### 3 讨论

#### 3.1 提取方法的优化

本研究根据乳膏剂的特性,选择了提取效率高,操作简便的超声提取法进行样品前处理,对溶剂种类、溶剂体积、提取时间进行考察,最终选择了甲醇50 ml,超声提取20 min的方法。而后采用乙腈对于初提液进行二次提取,可以有效的除去样品中的杂质,让测定的专属性更高。

#### 3.2 色谱条件的选择

对于流动相的选择,本研究先后考察了甲醇-水、乙腈-水-三乙胺、甲醇-磷酸盐缓冲液、甲醇-乙酸铵缓冲液。其中,甲醇-磷酸盐缓冲液条件下,3种成分峰形佳,出峰时间短,但专属性考察,盐酸苯海

拉明始终存在无法与杂峰分开的问题,换用甲醇-乙酸铵缓冲液后,通过pH调节,最终获得了较好的分离度,因此选为流动相。对于检测波长的选择,中国药典2015版第二部中盐酸苯海拉明的检测波长为258 nm,通过预实验发现,盐酸苯海拉明在258 nm处紫外吸收较弱,选用该波长对于盐酸苯海拉明含量的测定灵敏度低。而在肩峰218 nm处盐酸苯海拉明有较好的紫外吸收,两种防晒剂甲氧基肉桂酸辛酯和水杨酸辛酯也有较好响应,因此选为最佳检测波长(图2)。对于色谱柱的选择,本研究考察了安捷伦、沃特世和资生堂3个品牌的色谱柱,最终选择了安捷伦Extend-C<sub>18</sub>柱。在pH偏碱性环境下,3个待测成分在该柱上分离度好,峰形佳,所以确定为最佳色谱柱。

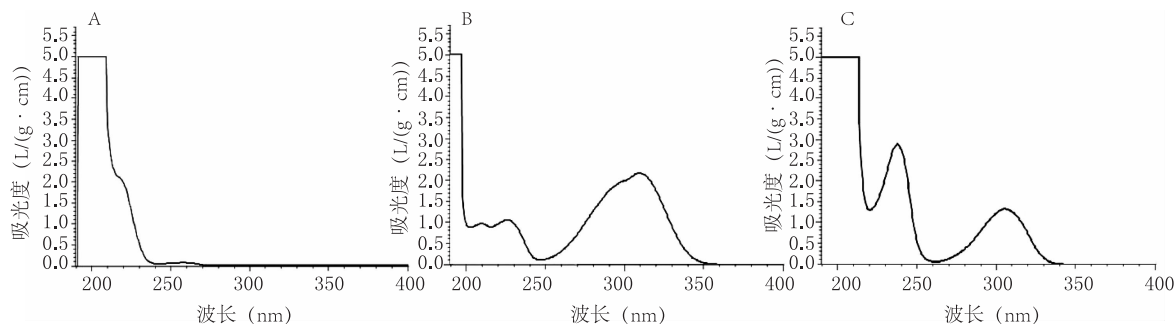


图2 紫外波长扫描图

A. 盐酸苯海拉明; B. 甲氧基肉桂酸辛酯; C. 水杨酸辛酯

#### 3.3 含量测定结果分析

3个批次的多效防护霜均为实验室自制,测定结果可以看出,不同批次的样品中盐酸苯海拉明、甲氧基肉桂酸辛酯和水杨酸辛酯的含量有一定波动,这提示我们在进行中试放大生产时,要充分考虑各因素的影响,保证制剂中主要成分的含量稳定,同时对霜剂的长期稳定性也需要进行考察。

本研究建立了HPLC同时测定多效防护霜中盐酸苯海拉明、甲氧基肉桂酸辛酯和水杨酸辛酯含量的方法。经全面的方法学验证,成功应用于3个批次样品中3种成分的测定,该法简便可靠,可为多效防护霜的质量控制提供依据,也为其质量标准研究奠定了基础。

#### 【参考文献】

[1] 刘鹏,蔡杨. 某特种部队海训期间伤病情况分析及对策[J].

海军医学杂志,2016,37(4):296-298.

[2] 卢畅,费文超,纪世召,等. 海军某士官学校学员基层部队服役期间训练伤发生情况调查[J]. 解放军预防医学杂志,2017,35(1):16-18.  
[3] Lotan A. Method for inhibiting nematocyst discharge; US, US6406709[P]. 2002.  
[4] 张智. 水母蜇伤皮肤防护剂研究[D]. 上海:第二军医大学,2010.  
[5] Ginestar G J, Panyella C D, Catalá E R, et al. Anti-jellyfish combinations; EP 2380577 A1[P]. 2011.  
[6] 陈云霞,马强,白桦,等. 祛痘化妆品中苯海拉明的高效液相色谱检测及质谱确证[J]. 分析科学学报,2014,30(4):521-524.  
[7] 肖庚鹏,方永培,王水生,等. 化妆品中甲氧基肉桂酸辛酯和水杨酸乙基己酯含量的测定[J]. 日用化学工业,2009,39(1):68-70.  
[8] 徐惠金,林峰,吴映璇. 高效液相色谱法测定化妆品中9种防晒剂[J]. 理化检验-化学分册,2015,51(5):621-624.

【收稿日期】 2019-08-20 【修回日期】 2019-11-04

【本文编辑】 陈盛新