

HPLC法同时测定市售滴眼液中4种抑菌剂的含量

田 洁*,彭 博,吴世杰,赵丽元,邹 亮,郝爱鱼,丁红雨(大连市药品检验所,辽宁大连 116021)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)15-2134-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.15.33

摘要 目的:建立同时测定市售滴眼液中羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯和苯扎氯铵4种抑菌剂含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Hypersil GOLD C₁₈,流动相为0.005 mol/L醋酸铵溶液(每1 L中含三乙胺10 mL,用冰醋酸调节pH为5.0±0.5)-乙腈(45:55, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长分别为262 nm(羟苯甲酯、羟苯乙酯和羟苯丙酯)、214 nm(苯扎氯铵),柱温为30 ℃,进样量为20 μL。结果:羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯和苯扎氯铵检测质量浓度线性范围分别为1.235 0~15.438 0 μg/mL($r=0.999\ 9$)、1.317 0~16.383 6 μg/mL($r=0.999\ 7$)、1.207 2~15.089 4 μg/mL($r=0.999\ 6$)、17.776~222.0 μg/mL($r=0.999\ 9$);定量限分别为2.0、2.0、2.0、1.11 μg,检测限分别为0.375、0.375、0.375、0.333 μg;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为98.14%~102.48%(RSD=1.6%, $n=9$)、98.79%~102.42%(RSD=1.3%, $n=9$)、98.19%~102.49%(RSD=1.5%, $n=9$)和98.76%~100.53%(RSD=0.6%, $n=9$)。结论:该方法结果准确、重复性好、操作简单,适用于市售滴眼液中羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯和苯扎氯铵含量的同时测定。
关键词 高效液相色谱法;滴眼液;抑菌剂;羟苯甲酯;羟苯乙酯;羟苯丙酯;苯扎氯铵

Simultaneous Determination of 4 Preservatives in Marketed Eye Drops by HPLC

TIAN Jie, PENG Bo, WU Shijie, ZHAO Liyuan, ZOU Liang, HAO Aiyu, DING Hongyu (Dalian Institute for Drug Control, Liaoning Dalian 116021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of residual methylparaben, ethylparaben, nipasol and benzalkonium chloride in marketed eye drops. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Hypersil GOLD C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.005 mol/L ammonium acetate (10 mL triethylamine in 1 L solution, pH adjusted to 5.0±0.5 with glacial acetic acid)-acetonitrile (45:55, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 262 nm (methylparaben, ethylparaben, nipasol) and 214 nm (benzalkonium chloride), respectively. The column temperature was 30 ℃ and sample size was 20 μL. RESULTS: The linear range were 1.235 0-15.438 0 μg/mL for methylparaben($r=0.999\ 9$), 1.317 0-16.383 6 μg/mL for ethylparaben ($r=0.999\ 7$), 1.207 2-15.089 4 μg/mL for nipasol ($r=0.999\ 6$) and 17.776-222.0 μg/mL for benzalkonium chloride ($r=0.999\ 9$), respectively. Limits of quantitation were 2.0, 2.0, 2.0, 1.11 μg, respectively; limits of determination were 0.375, 0.375, 0.375, 0.333 μg, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The average recoveries were 98.14%-102.48% (RSD=1.6%, $n=9$), 98.79%-102.42% (RSD=1.3%, $n=9$), 98.19%-102.49% (RSD=1.5%, $n=9$) and 98.76%-100.53% (RSD=0.6%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is accurate, reproducible, simple and suitable for the determination of residual methylparaben, ethylparaben, nipasol and benzalkonium chloride in marketed eye drops.
KEYWORDS HPLC; Eye drops; Preservatives; Methylparaben; Ethylparaben; Nipasol; Benzalkonium chloride

眼用制剂(Ophthalmic formulations)作为直接用于眼部发挥治疗作用的无菌制剂,其安全性一直为人们所关注^[1]。目前,国内市场使用的眼用制剂大多数为多剂量包装,一旦开封后,容易在使用和保存过程中被泪液及空气中的微生物污染,从而产生安全隐患^[2-3]。为了防止在使用中被微生物污染,大部分眼用制剂都添加了抑菌剂(Preservatives)。抑菌剂是指能抑制病原微生物生长与繁殖的化学药品,通过干扰微生物有机体的生长、繁殖和新陈代谢来发挥抑菌作用。但抑菌剂同时也对眼部有不同程度的刺激性或副作用^[4],其合理使用和质量控制是保证眼用制剂安全性、有效性的关键。目前,

眼用制剂中最常用的抑菌剂主要为对羟基苯甲酸酯类(如羟苯甲酯、羟苯乙酯和羟苯丙酯等)、阳离子表面活性剂类(如苯扎氯铵、苯扎溴铵等)和醇类(如三氯叔丁醇等)。

2015年版《中国药典》(四部)“通则”中规定,眼用制剂必须进行抑菌效力检查^[5],但这仅能确定其中抑菌剂的抑菌效力,并未对所加入的抑菌剂的量进行合理控制。每种抑菌剂的质量标准均在各个品种项下分别规定,且方法各异,缺少统一检测标准;而国内外很多文献报道的不同抑菌剂品种含量测定的色谱条件也有所不同^[6-9]。为了更好地保证滴眼液的用药安全、对其中抑菌剂的使用进行定量控制,笔者采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定了市售滴眼液中羟苯甲酯、羟苯乙酯、

* 副主任药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:0411-84255137。E-mail:sugar_tianjie@163.com

羟苯丙酯和苯扎氯铵4种常用抑菌剂的含量。

1 材料

1.1 仪器

2695 型 HPLC 仪,包括二极管阵列检测器、Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司);BP211D 型十万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 药品与试剂

氯霉素滴眼液(A厂,批号:130203,规格:8 mL:20 mg;B厂,批号:140316,规格:8 mL:20 mg);盐酸环丙沙星滴眼液(C厂,批号:20140904,规格:5 mL:15 mg);阿昔洛韦滴眼液(D厂,批号:14031901,规格:8 mL:8 mg);盐酸洛美沙星滴眼液(E厂,批号:1405081,规格:8 mL:24 mg);盐酸左氧氟沙星滴眼液(F厂,批号:1312285,规格:5 mL:15 mg);盐酸吗啉胍滴眼液(G厂,批号:1203003,规格:8 mL:0.32 g);氧氟沙星滴眼液(G厂,批号:13071025F,规格:5 mL:15 mg);珍珠明目滴眼液(H厂,批号:20131111,规格:8 mL/瓶);羟苯甲酯对照品(批号:100278-201103)、羟苯乙酯对照品(批号:100874-201102)、羟苯丙酯对照品(批号:100444-201102)、苯扎氯铵对照品(批号:100549-201102)均购自中国食品药品检定研究院,纯度均为99.6%;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil GOLD C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.005 mol/L 醋酸铵溶液(每1 L中含三乙胺10 mL,用冰醋酸调节pH为5.0±0.5)-乙腈(45:55,V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:262 nm(羟苯甲酯、羟苯乙酯和羟苯丙酯)、214 nm(苯扎氯铵);柱温:30℃;进样量:20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取羟苯甲酯对照品15.50 mg、羟苯乙酯对照品16.40 mg、羟苯丙酯对照品15.15 mg,置于同一200 mL量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取10 mL,置于50 mL量瓶中,再精密加入苯扎氯铵对照品1 mL,加水稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品贮备液。精密量取上述混合对照品贮备液4 mL,置于10 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密量取样品1 mL,置于10 mL量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 空白溶液 取重蒸水作为空白溶液。

2.2.4 系统适用性溶液 精密量取苯扎氯铵对照品0.5 mL,置于50 mL量瓶中。分别精密称取羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯对照品各2 mg,置于100 mL量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取20 mL,置于上述

50 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下系统适用性溶液、混合对照品溶液、空白溶液和供试品溶液(批号:140316)各适量,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度均>1.5;理论板数以羟苯甲酯峰计为5 730,保留时间为2.44 min。结果表明,空白溶液在相应的保留时间处无色谱峰出现,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品贮备液2、5、4、6、8、10 mL,分别置于25、25、10、10、10、10 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得系列混合对照品溶液。分别量取上述系列混合对照品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测抑菌剂质量浓度(x , μg/mL)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表1。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ);当信噪比为3:1时,得检测限(LOD)。结果表明,羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯和苯扎氯铵的LOQ分别为2.0、2.0、2.0、1.11 μg;LOD分别为0.375、0.375、0.375、0.333 μg。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯、苯扎氯铵峰面积的RSD分别为0.4%、0.1%、0.3%、0.9%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

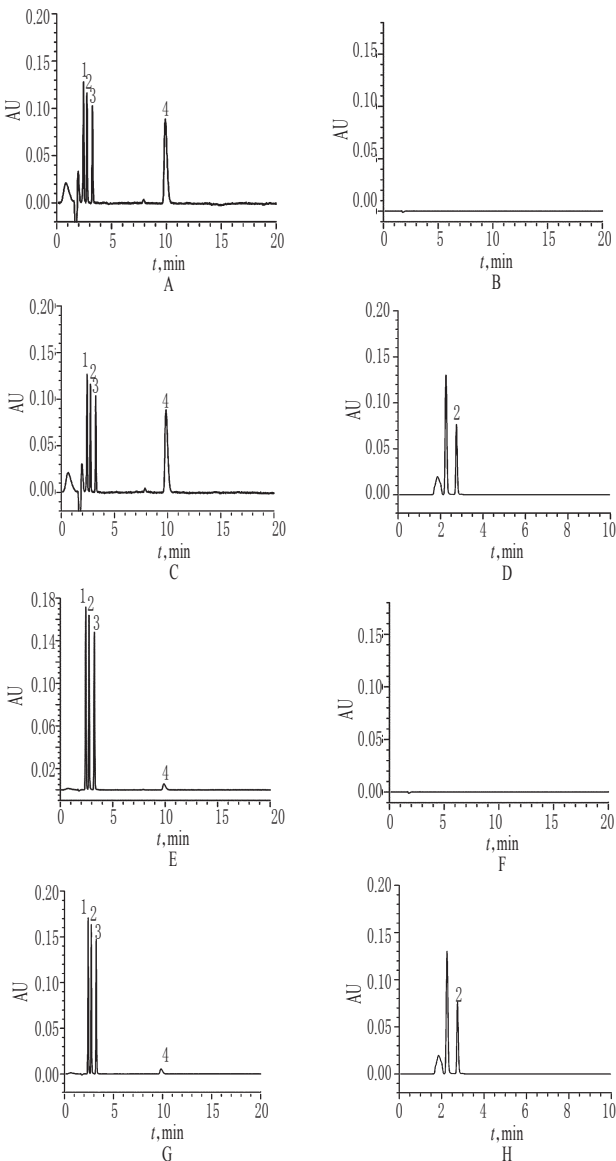
取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:140316)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,供试品溶液中只检出羟苯乙酯,其峰面积的RSD=0.8%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号:140316)适量,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各待测抑菌剂含量。结果,供试品溶液中只检出羟苯乙酯,其平均含量为0.12%,RSD=1.2%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密量取样品(批号:130203)8 mL,共9份,分别置于100 mL量瓶中,分别加入低、中、高质量的羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯和苯扎氯铵对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。



A.系统适用性溶液(214 nm); B.空白溶液(214 nm); C.混合对照品溶液(214 nm); D.供试品溶液(214 nm); E.系统适用性溶液(262 nm); F.空白溶液(262 nm); G.混合对照品溶液(262 nm); H.供试品溶液(262 nm); 1.羟苯甲酯; 2.羟苯乙酯; 3.羟苯丙酯; 4.苯扎氯铵

A. system suitability solution (214 nm); B. blank solution (214 nm); C. mixed control solution (214 nm); D. test sample solution(214 nm); E. system suitability solution (262 nm); F. blank solution (262 nm); G. mixed control solution (262 nm); H. test sample solution(262 nm); 1. methylparaben; 2. ethylparaben; 3. nipsol; 4. benzalkonium

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测抑菌剂	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
羟苯甲酯	$y=105\ 957x-6\ 832.1$	0.999 9	1.235 0~15.438 0
羟苯乙酯	$y=95\ 696x+3\ 399.4$	0.999 7	1.317 0~16.383 6
羟苯丙酯	$y=85\ 355x-14\ 648$	0.999 6	1.207 2~15.089 4
苯扎氯铵	$y=14\ 138x+803.35$	0.999 9	17.776~222.0

2.10 样品抑菌剂含量测定

取9批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供

试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各待测抑菌剂的含量,结果见表3。

表2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery tests(n=9)

待测抑 菌剂	样品含 量,mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收 率,%	平均加样回 收率,%	RSD, %
羟苯甲酯	0	0.016 1	0.016 5	102.48	100.4	1.6
	0	0.016 1	0.015 8	98.14		
	0	0.016 1	0.016 4	101.86		
	0	0.020 4	0.020 6	100.98		
	0	0.020 4	0.020 8	101.96		
	0	0.020 4	0.020 1	98.53		
	0	0.024 7	0.024 4	98.79		
	0	0.024 7	0.024 6	99.60		
	0	0.024 7	0.025 0	101.21		
羟苯乙酯	0	0.016 5	0.016 6	100.61	100.7	1.3
	0	0.016 5	0.016 9	102.42		
	0	0.016 5	0.016 3	98.79		
	0	0.020 8	0.021 0	100.96		
	0	0.020 8	0.020 7	99.52		
	0	0.020 8	0.021 2	101.92		
	0	0.024 1	0.024 4	101.24		
	0	0.024 1	0.024 5	101.66		
	0	0.024 1	0.023 9	99.17		
羟苯丙酯	0	0.016 6	0.016 8	101.20	100.3	1.5
	0	0.016 6	0.017 0	102.41		
	0	0.016 6	0.016 3	98.19		
	0	0.020 1	0.020 2	100.50		
	0	0.020 1	0.019 9	99.00		
	0	0.020 1	0.020 6	102.49		
	0	0.024 5	0.024 2	98.78		
	0	0.024 5	0.024 7	100.82		
	0	0.024 5	0.024 4	99.59		
苯扎氯铵	0	0.088 8	0.087 9	98.99	99.7	0.6
	0	0.088 8	0.088 2	99.32		
	0	0.088 8	0.087 7	98.76		
	0	0.111 0	0.111 4	100.36		
	0	0.111 0	0.110 5	99.55		
	0	0.111 0	0.110 3	99.37		
	0	0.133 2	0.132 8	99.70		
	0	0.133 2	0.133 6	100.30		
	0	0.133 2	0.133 9	100.53		

表3 样品抑菌剂含量测定结果(n=3, %)

Tab3 Results of contents determination of preservatives in samples(n=3, %)

厂家	样品批号	羟苯甲酯	羟苯乙酯	羟苯丙酯	苯扎氯铵
A	130203	0	0	0	0
B	140316	0	0.12	0	0
C	20140904	0	0.09	0	0
D	14031901	0	0	0	0
E	1405081	0	0	0	0
F	1312285	0	0	0	0.001
G	1203003	0	0.001	0	0
G	13071025F	0	0	0	0.03
H	20131111	0	0.02	0	0

3 讨论

3.1 检测波长的选择

笔者分别在262、256 nm波长处测定羟苯甲酯、羟苯

乙酯、羟苯丙酯,结果在262 nm波长条件下,无杂质峰干扰测定,各峰之间分离良好;另外在214 nm波长处,苯扎氯铵有最大吸收峰。因此,选择262 nm波长测定羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯,214 nm波长测定苯扎氯铵。

3.2 流动相的选择

笔者分别考察了0.005 mol/L 醋酸铵溶液-乙腈、乙腈-三乙胺磷酸溶液、甲醇-庚烷磺酸钠溶液3种流动相体系。结果,以乙腈-三乙胺磷酸溶液作为流动相时,羟苯甲酯、羟苯乙酯分离度不能达到要求,且样品色谱中有杂质峰干扰测定;以甲醇-庚烷磺酸钠溶液作为流动相时,苯扎氯铵峰形拖尾,且保留时间过长;而以0.005 mol/L 醋酸铵溶液-乙腈为流动相时,4种抑菌剂均能够良好分离,且样品色谱中无杂质峰干扰测定。故最终选择0.005 mol/L 醋酸铵溶液-乙腈为本试验的流动相。

3.3 抑菌剂的含量

抑菌剂作为眼用制剂中不可缺少的成分,由于其同时具有抑菌作用和毒性作用两个方面,其在制剂中的处方量显得尤为关键。羟苯乙酯的有效抑菌浓度为0.03%~0.06%,羟苯甲酯与羟苯丙酯混合使用,其有效抑菌浓度分别为0.16%和0.02%,而苯扎氯铵的常用抑菌浓度为0.001%~0.002%^[10-11]。本试验中,笔者随机抽取的8个厂家的8个不同品种的滴眼液中,2个厂家的氯霉素滴眼液和盐酸环丙沙星滴眼液中羟苯乙酯的含量均超出上述范围,1个厂家的氧氟沙星滴眼液中苯扎氯铵的含量超出上述范围;同时,5个厂家的抑菌剂加入量未达到有效抑菌浓度。可见,对滴眼液中抑菌剂的含量进行控制具有实际意义,可督促生产厂家考察及确定抑菌剂的有效浓度,控制处方用量,保证用药安全、有效。

综上所述,本方法结果准确、重复性好、操作简单,适用于市售滴眼液中羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯和苯扎氯铵含量的同时测定。

参考文献

- [1] 吴盈盈,石森林.引起眼用制剂局部安全性问题的主要原因及改善措施[J].中国医药工业杂志,2010,41(12):943-947.
- [2] 宁黎丽.眼用制剂研发过程中应关注抑菌剂的合理使用和质量控制[J].中国药理学杂志,2007,42(23):1836-1838.
- [3] 宁黎丽.对多剂量眼用制剂不添加抑菌剂的思考[J].中国新药杂志,2009,18(7):589-591.
- [4] 安彦.眼用制剂中抑菌剂的应用与质量控制[J].天津药学,2011,23(1):56-58.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:151-153.
- [6] 韩文芳,韩保萍,朱启登,等.HPLC测定盐酸奥洛他定滴眼液中苯扎氯铵的含量[J].食品与药品,2010,12(11):425-427.
- [7] 辛继跃,朱样根,危雪晖,等.马来酸噻吗洛尔滴眼液中羟苯乙酯含量测定方法研究[J].中国执业药师,2011,8(11):33-35.
- [8] 张菁,常畅,朱建平,等.HPLC法同时测定盐酸林可霉素滴眼液中有关物质和防腐剂含量[J].中国药房,2013,24(45):4298-4300.
- [9] Labranche LP, Dumont SN, Levesque S, *et al.* Rapid determination of total benzalkonium chloride content in ophthalmic formulation[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(3):989-993.
- [10] 陈龙浩,王雪荣,孙春玲,等.HPLC法测定盐酸丁卡因滴眼液中羟苯乙酯的含量[J].西北药学杂志,2015,20(2):149-151.
- [11] 崔福德.药剂学[M].北京:中国医药科技出版社,2002:90.

(收稿日期:2016-06-03 修回日期:2016-12-30)

(编辑:刘 柳)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅