

UPLC 法测定 20 种滴眼液中的 9 种常用抑菌剂

夏方亮, 王玉林, 李奕婧, 王建强

(滨州市食品药品检验检测中心, 山东滨州 256600)

摘要: 建立了超高效液相色谱法测定滴眼液中的 9 种常用抑菌剂。采用 Hypersil GOLD 色谱柱, 以 0.5% 三乙胺溶液 (用磷酸调至 pH 3.0): 甲醇为流动相, 线性梯度洗脱, 使用 UPLC-PDA 检测, 检测波长 260 nm, 结合保留时间和紫外光谱定性。结果 9 种抑菌剂可完全分离, 回收率为 98%~102%, RSD 为 0.1%~0.4%。在 20 种滴眼液中检出苯氧乙醇、苯扎溴铵、对羟基苯甲酸乙酯和苯扎氯铵 4 种抑菌剂。该方法准确、快速, 灵敏度高, 可作为滴眼液中常用抑菌剂的控制方法。

关键词: 滴眼液; 抑菌剂; 超高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: TQ460.7⁺2; O657.7⁺2

文献标志码: A

文章编号: 1001-8255(2018)02-0234-05

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.02.019

抑菌剂是指抑制微生物生长的化学物质, 为避免微生物污染, 大部分滴眼液会在处方中加入抑菌剂^[1]。滴眼液中常用的抑菌剂有对羟基苯甲酸酯类、季铵盐类、有机汞类和醇类等^[2], 不同种类的抑菌剂对眼睛有不同程度的损害^[3], 如长期使用含有苯扎氯铵的滴眼液, 会产生眼异物感、灼热刺激感和眼痒等症状^[4], 而硫柳汞等含汞抑菌剂已不再推荐使用。本研究考察了临床常用的 20 种滴眼液, 发现在抑菌剂标示和使用方面均未形成规范, 可能影响滴眼液制剂的安全性。根据滴眼液中抑菌剂的使用情况, 建立了超高效液相色谱-二极管阵列检测器 (UPLC-PDA) 法检测滴眼液中常用的 9 种抑菌剂, 结果分离效果良好, 分析时间短, 可作为滴眼液中抑菌剂的质量控制方法。

1 仪器与试药

Acquity 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司)。

对羟基苯甲酸甲酯 (**1**, 含量 99.6%, 批号 100278-201103)、对羟基苯甲酸乙酯 (**2**, 含量 100.0%, 批号 100847-201203)、对羟基苯甲酸丙酯 (**3**, 含量 99.6%, 批号 100444-201403)、对羟基苯甲酸丁酯 (**4**, 含量 100.0%, 批号 110792-200503)、苯甲酸钠 (**5**, 含量 100.0%, 批号 100433-200301)、苯扎溴铵 (**6**, 含量 10.9 mg/ml, 批号

135051-201401) 和苯扎氯铵 [**7**, 含量 12.19 mg/ml, 批号 100549-201504。含 $n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}$ 取代同系物 (**7A**) 66.04%, 含 $n\text{-C}_{14}\text{H}_{29}$ 取代同系物 (**7B**) 33.96%] 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 硫柳汞 (**8**, 含量 99.2%, 批号 40707) 和苯氧乙醇 (**9**, 含量 99.5%, 批号 114682) 对照品均购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。样品信息见表 1。甲醇、磷酸、三乙胺均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称 (量) 取上述 9 种对照品适量, 加甲醇使溶解, 并稀释制成 1 mg/ml 的溶液作为对照品贮备液。分别精密量取 **3**、**4**、**5**、**6**、**9** 贮备液 0.05、0.05、1、5 和 0.5 ml, 置同一 10 ml 量瓶中, 加甲醇定容, 作为对照品溶液 I (浓度分别为 5、5、100、500 和 50 $\mu\text{g/ml}$); 分别精密量取 **1**、**2**、**7**、**8** 贮备液 0.05、0.05、5 和 0.2 ml, 置同一 10 ml 量瓶中, 加甲醇定容, 作为对照品溶液 II (浓度分别为 5、5、500 和 20 $\mu\text{g/ml}$)。

2.2 供试品溶液的制备

根据每个滴眼液品种加入抑菌剂的种类和标示量情况, 加水稀释或加入透明质酸酶处理后作为供试品溶液, 或直接取样作为供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱 Hypersil GOLD C₁₈ 柱 (2.1 mm×100 mm, 3 μm); 流动相 0.5% 三乙胺溶液 (用磷酸调至 pH 3.0, A): 甲醇 (B), 按表 2 进行线性梯度洗脱;

收稿日期: 2017-06-12

作者简介: 夏方亮 (1980—), 男, 主管药师, 从事药品质量研究。

Tel: 15305433932

E-mail: xiafl1980@126.com

表 1 样品信息表
Tab.1 Sample Information

样品	规格	标示抑菌剂	抑菌剂标示量	批号	样品处理方式*	样品代号
四味珍珠层冰硼滴眼液	8 ml	9	0.300%	160905	②	S1
利巴韦林滴眼液	8 ml : 8 mg	7	0.1 mg/ml	161003	①	S2
妥布霉素滴眼液	8 ml : 24 mg	7	0.1 mg/ml	16091501	①	S3
盐酸洛美沙星滴眼液	5 ml : 15 mg	7	5 ml : 0.5 mg	161002	①	S4
复方尿维氨滴眼液	10 ml	7	0.010%	160603	①	S5
阿昔洛韦滴眼液	8 ml : 8 mg	6	0.8 mg	16111101	①	S6
硫酸软骨素滴眼液	5 ml : 0.15 g	8	0.1 mg/ml	161002	②	S7
吡诺克辛钠滴眼液	0.8 mg+15 ml溶剂	2	未标示	16060307	②	S8
牛磺酸滴眼液	5%	2	0.025%	161003	②	S9
珍珠明目滴眼液	8 ml	2	未标示	20161226	②	S10
氧氟沙星滴眼液	5 ml : 15 mg	2	0.3 mg/ml	161101	②	S11
盐酸环丙沙星滴眼液	5 ml : 15 mg	2	1.5 mg	16101401	②	S12
苄达赖氨酸滴眼液	8 ml	7	0.1 mg/ml	161103	①	S13
羟丙甲纤维素滴眼液	10 ml	2	0.030%	161101	②	S14
诺氟沙星滴眼液	8 ml : 24 mg	2	0.050%	1608273102	②	S15
盐酸左氧氟沙星滴眼液	5 ml : 15 mg	2	0.054%	1611083101	③	S16
茶敏维滴眼液	10 ml	6	未标示	161101	③	S17
马来酸噻吗洛尔滴眼液	5 ml : 25 mg	未标示	未标示	17010104	②	S18
依诺沙星滴眼液	8 ml : 24 mg	未标示	未标示	20160901	②	S19
妥布霉素地塞米松滴眼液	5 ml	未标示	未标示	51161001	②	S20

注: *①直接进样, ②加水稀释进样, ③酶解处理

检测波长 260 nm ; 流速 0.3 ml/min ; 柱温 35 °C ; 进样量 1 μl。各色谱峰之间的分离度符合要求, 理论板数均高于 10 000, 色谱图见图 1。

表 2 梯度洗脱程序

Tab.2 Gradient Elution Procedure

t/min	A/%	B/%
0.0	55	45
3.0	35	65
7.0	10	90
7.2	55	45
10.0	55	45

2.4 线性试验

取“2.1”项下 9 种对照品贮备液适量, 用甲醇逐步稀释配制系列浓度对照品溶液, 作为线性试验用溶液, 按“2.3”项下色谱条件, 以浓度 c 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标, 计算线性回归方程, 见表 3。

2.5 精密度试验、检测限和定量限

取“2.1”项下对照品溶液 I 和 II, 按“2.3”项下色谱条件测定, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算各化合物峰面积的 RSD。将对照品溶液 I 和 II 分别逐级稀释并进样, 计算各化合物的信噪比, 并计算各抑菌剂的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。

结果见表 4。

表 3 9 种抑菌剂线性回归方程

Tab.3 Linear Regression Equations of 9 Bacteriostatic Agents

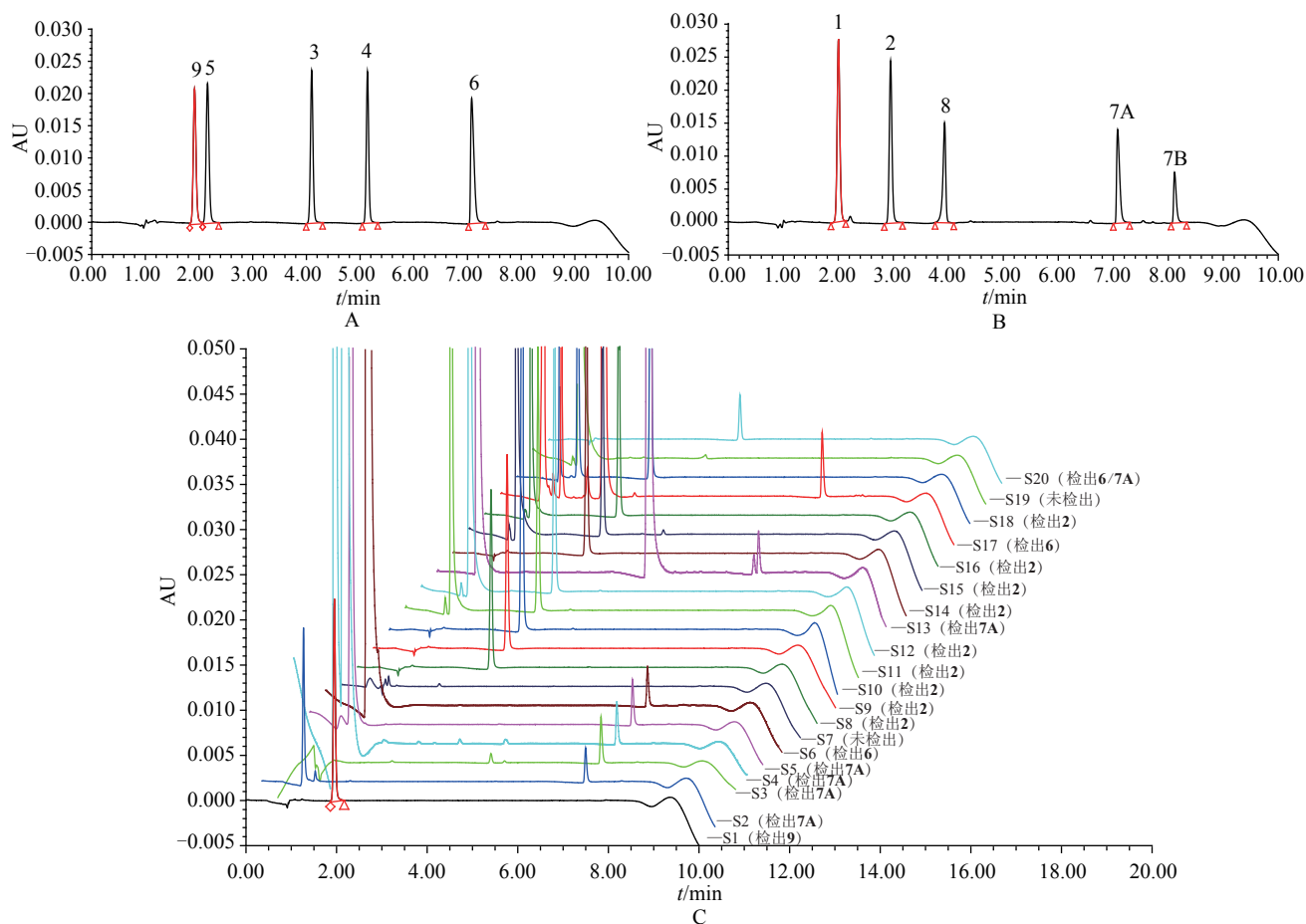
抑菌剂	线性回归方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
1	$A = 19\,595c - 5\,877$	0.5~10
2	$A = 18\,153c - 5\,587$	0.5~10
3	$A = 16\,942c - 4\,880$	0.5~10
4	$A = 15\,880c - 4\,568.6$	0.5~10
5	$A = 907.8c - 5\,485.7$	10~200
6	$A = 175.9c - 5\,920$	50~1\,000
7(7A+7B)	$A = 171.4c - 5\,166.2$	50~1\,000
8	$A = 3\,269c - 10\,453$	4~40
9	$A = 1\,354.7c - 4\,768.3$	5~100

注: $R^2 > 0.999$

表 4 精密度试验结果及 LOD 和 LOQ

Tab.4 Results of Precision Test, LODs and LOQs

抑菌剂名称	精密度RSD/%	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
1	0.13	0.050	0.100
2	0.03	0.050	0.125
3	0.12	0.033	0.100
4	0.08	0.033	0.100
5	0.04	0.667	2.000
6	0.10	2.500	10.000
7(以7A计)	0.15	5.000	15.000
8	0.18	1.000	2.000
9	0.06	0.333	1.000



A: 对照品溶液 I, B: 对照品溶液 II, C: 供试品溶液
1-1; 2-2; 3-3; 4-4; 5-5; 6-6; 7A-7A; 7B-7B; 8-8; 9-9

图 1 典型色谱图

Fig.1 Typical Chromatograms

2.6 重复性和回收率试验

20 个品种的滴眼液中检出的抑菌剂有 2、6、7 和 9, 分别取含有上述抑菌剂的 1 种样品, 按“2.2”项下方法分别制备供试品溶液, 各 6 份, 分别测定其中抑菌剂的含量并计算 RSD。

根据样品中抑菌剂的含量, S1 取半量, 分别精密加入 9 对照品 0.9、1.5 和 2.1 ml; S2 和 S6 稀释一倍, 分别精密加入 6、7 对照品 0.03、0.05 和 0.07 ml; S9 取半量, 分别精密加入 2 对照品 0.06、0.1 和 0.14 ml; 分别按“2.2”项下方法操作, 配制相当于样品中抑菌剂浓度 80%、100% 和 120% 的溶液, 各 3 份。按“2.3”项下条件进样测定, 计算每种抑菌剂的回收率。结果见表 5。

表 5 重复性和回收率试验结果

Tab.5 Results of Repeatability and Recovery Test

样品名称	检出抑菌剂	重复性 ¹⁾		回收率 ²⁾	
		含量/ mg·ml ⁻¹	RSD/%	平均回 收率/%	RSD/%
S1	9	2.77	0.17	98.6	0.26
S2	7	0.075 3	0.15	101.9	0.32
S6	6	0.092 1	0.22	98.1	0.24
S9	2	0.216	0.08	100.3	0.11

注: ¹⁾n=6; ²⁾n=9

2.7 稳定性试验

取“2.6”项下重复性供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、12 和 24 h 进样, 记录色谱图, 抑菌剂 2、6、7 和 9 峰面积的 RSD 分别为 0.11%、0.12%、0.25% 和 0.09%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 样品测定

取“2.2”项下供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件测定，结果见表6。

表6 样品测定结果 /mg·ml⁻¹
Tab.6 Sample Determination Results/mg·ml⁻¹

样品代号	标示抑菌剂	处方量	测得量
S1	9	3	2.77
S2	7	0.1	0.075 3
S3	7	0.1	0.102
S4	7	0.1	0.091 5
S5	7	0.1	0.100
S6	6	0.1	0.092 1
S7	8	0.1	未检出
S8	2	未标示	0.199
S9	2	0.25	0.216
S10	2	未标示	0.485
S11	2	0.3	0.268
S12	2	0.3	0.307
S13	7	0.1	0.090 8
S14	2	0.3	0.295
S15	2	0.5	0.434
S16	2	0.54	0.471
S17	6	未标示	0.155
S18	未标示	未标示	0.270(2)
S19	未标示	未标示	未检出
S20	未标示	未标示	<LOQ(6或7)

3 讨论

在20种滴眼液的质量标准中，有5种纳入抑菌剂检查的项目，其中仅阿昔洛韦滴眼液和盐酸环丙沙星滴眼液使用了标准中规定的抑菌剂，即在所考察的滴眼液中，有90%的制剂没有对方中的抑菌剂加以控制。在说明书中标示加入了抑菌剂的品种中，有3种没有标示加入量；标示了加入量的品种其检测结果差异也较大。硫酸软骨素滴眼液处方中标示抑菌剂为8，但是检测结果为未检出；马来酸噻吗洛尔滴眼液和妥布霉素地塞米松滴眼液未标示加入抑菌剂，但本试验分别检测出了2和微量的6(或7)。从本试验结果来看，滴眼液产品在抑菌剂的使用上存在诸多问题，亟需改善。

为降低6等抑菌剂对眼表细胞的毒性作用，部分滴眼液处方中加入了玻璃酸钠(如萘敏维滴眼液、盐酸左氧氟沙星滴眼液)、羟丙甲纤维素(如苄达赖氨酸滴眼液)或者聚维酮K30(如吡诺克辛钠滴眼液、诺氟沙星滴眼液)，这些高分子聚合物极易堵塞色谱柱，给分析造成一定的困扰。对于含有玻

璃酸钠的滴眼液，需加入适量透明质酸酶于37℃水浴保温30 min后进样，以降低对色谱柱的损害。同时，为避免出现色谱柱堵塞的情况，本试验没有使用UPLC常用的1.7 μm超细颗粒小柱，而采用粒径3 μm的色谱柱，以最大限度避免堵塞，同时亦能有效分离样品中的主成分和其他辅料峰，分析结果较好。

参考相关文献^[5-7]，尝试了乙腈-三乙胺磷酸溶液、乙腈-乙酸铵缓冲液、甲醇-乙酸铵缓冲液以及加入离子对试剂庚烷磺酸钠、四丁基硫酸氢铵等作为流动相，结果显示，使用乙腈会出现较大的基线波动，乙酸铵缓冲液和离子对试剂对分离和峰型的改善作用有限。最终采用“2.3”项下流动相系统和洗脱程序，各成分色谱峰分离度、理论板数和对称因子均可接受。

本试验所用7对照品在标定时参考了7的美国药典(USP)对照品，按C₂₂H₄₀ClN计，每1 ml中含7 12.19 mg，含*n*-C₁₂H₂₅取代同系物66.04%，*n*-C₁₄H₂₉取代同系物33.96%。采用HPLC法测定7时，当制剂中的7主要含有1种取代同系物，计算含量时只需以对照品溶液中与该组分保留时间一致的色谱峰的峰面积进行计算即可，对照品溶液中该组分的浓度根据说明书的标示值计算；当制剂中的7为同系物混合物时应按照校正公式计算。本试验样品中的7均为1种取代同系物*n*-C₁₂H₂₅，计算其含量时按照取代同系物*n*-C₁₂H₂₅的标示值计算^[8]。

6和7为八、十、十二、十四、十六、十八烷基二甲基苄基氯溴(氯)化铵的混合物^[9]，其主要成分为十二烷基二甲基苄基溴(氯)化铵，在溶液中以同一种结构存在，色谱行为相同，故本试验将对照品分为2组。7对照品有2个峰，峰面积比约为2:1，6对照品只有1个峰，可以由此来区分。从国家食品药品监督管理局网站可以查询到的7原料生产企业只有1家，主要以*n*-C₁₂H₂₅取代同系物为主，这也是样品中7只有1个峰的原因。基于上述因素，是否会出现以6替代7进行投料生产的情况值得关注，可在本研究的基础上结合离子色谱法或质谱法进行确认。

参考文献:

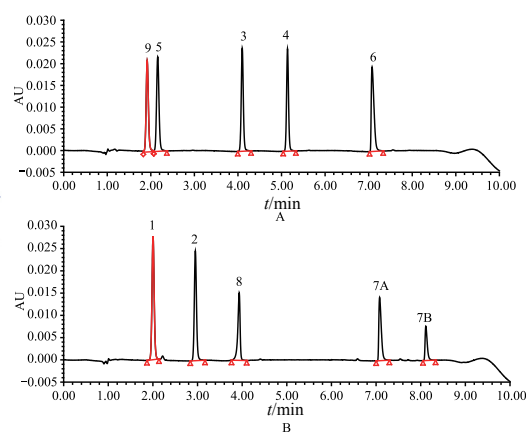
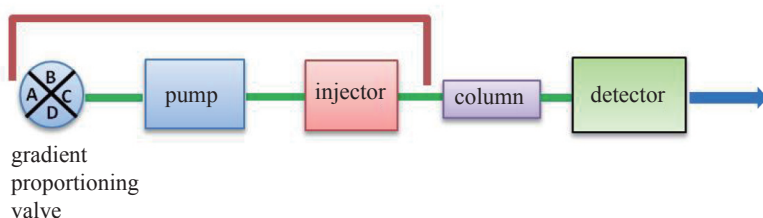
- [1] 宁黎丽, 赵德恒. 对多剂量眼用制剂不添加抑菌剂的思考[J]. 中国新药杂志, 2009, **18**(7): 589—591.
- [2] 尚悦, 韩鹏, 许华玉. 关于眼用制剂中添加抑菌剂的思考[J]. 中国药品标准, 2014, **15**(1): 12—15.
- [3] 刘爱明, 李伟, 王本敏. 眼用制剂中抑菌剂的眼表损害[J]. 中国医院药学杂志, 2002, **22**(6): 371—373.
- [4] 陈祖基. 滴眼液中防腐剂的利弊及其使用对策[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, **32**(11): 1003—1005.
- [5] 马康生, 李汶, 陈之敏. 氯霉素滴眼液中羟苯乙酯和硫柳汞含量的测定[J]. 中国药事, 2009, **23**(3): 239—242.
- [6] 王萍, 李洁, 郑和辉. 超高效液相色谱法测定化妆品中22种防腐剂[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, **19**(6): 1291—1293.
- [7] 武婷, 王超, 王星, 等. 反相高效液相色谱法测定化妆品中的24种防腐剂[J]. 分析化学, 2007, **35**(10): 1439—1443.
- [8] 吴建敏, 熊婧, 黄海伟, 等. 浅谈HPLC法测定苯扎氯铵含量的计算方法[J]. 中国药品标准, 2013, **14**(2): 88—89.
- [9] 赵文英, 张青, 武智强, 等. 苯扎溴铵、苯扎氯铵的液相色谱分析[J]. 分析试验室, 2015, **34**(4): 471—474.

Determination of Nine Commonly Used Bacteriostatic Agents in 20 Kinds of Eye Drops by UPLC

XIA Fangliang, WANG Yulin, LI Yijing, WANG Jianqiang
(Binzhou Food and Drug Inspection and Testing Center; Binzhou 256600)

ABSTRACT: A UPLC method was established for the determination of 9 commonly used bacteriostatic agents in eye drops. A Thermo Hypersil GOLD column was used, with the mobile phase of 0.5% triethylamine (adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid): methanol with linear gradient elution, at the detection wavelength of 260 nm. The qualitative analysis was carried out based on retention time and spectrum by UPLC-PDA. Under the above conditions, nine bacteriostatic agents were separated completely. Their recoveries were 98%—102%, with RSDs of 0.1%—0.4%. Four bacteriostatic agents, phenoxyethanol, benzalkonium bromide, ethyl *p*-hydroxybenzoate and benzalkonium chloride, were detected in 20 kinds of eye drops. This method is accurate, rapid and sensitive, which could be used as a reference method for the control of bacteriostatic agents in eye drops.

Key Words: eye drop; bacteriostatic agent; UPLC; content determination



1-methyl *p*-hydroxybenzoate; 2-ethyl *p*-hydroxybenzoate; 3-propyl *p*-hydroxybenzoate; 4-butyl *p*-hydroxybenzoate; 5-sodium benzoate; 6-benzalkonium bromide; 7-benzalkonium chloride; 8-thimerosal; 9-phenoxyethanol