

HPLC 法检测醋酸奥曲肽注射剂中 5 种抑菌剂

李茜, 刘英 (河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

摘要 目的: 检测醋酸奥曲肽注射剂中是否添加苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯5种抑菌剂。**方法:** 采用C18(L) (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相A为水, 流动相B为甲醇, 梯度洗脱, 流速为1.0 mL·min⁻¹, 柱温30℃, 检测波长为220 nm及256 nm。**结果:** 苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯各峰均分离良好; 苯酚在1.29~258.60 μg·mL⁻¹范围内线性关系良好 ($r=1.000$), 平均回收率为100.0% ($n=9$); 苯甲醇在2.72~544.20 μg·mL⁻¹范围内线性关系良好 ($r=0.9997$), 平均回收率为100.3% ($n=9$); 三氯叔丁醇在9.95~1990.00 μg·mL⁻¹范围内线性关系良好 ($r=1.000$), 平均回收率为100.9% ($n=9$); 对羟基苯甲酸甲酯在0.27~53.80 μg·mL⁻¹范围内线性关系良好 ($r=1.000$), 平均回收率为100.5% ($n=9$); 对羟基苯甲酸丙酯在0.26~52.00 μg·mL⁻¹范围内线性关系良好 ($r=1.000$), 平均回收率为99.4% ($n=9$); 91批醋酸奥曲肽注射剂中均未检出5种抑菌剂。**结论:** 该方法准确、灵敏、简便, 可用于醋酸奥曲肽注射剂中苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯5种抑菌剂的检查。

关键词: 醋酸奥曲肽; 醋酸奥曲肽注射液; 注射用醋酸奥曲肽; 抑菌剂; 苯酚; 苯甲醇; 三氯叔丁醇; 对羟基苯甲酸甲酯; 对羟基苯甲酸丙酯

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)01-0060-09
doi:10.16153/j.1002-7777.2017.01.012

HPLC Determination of Five Antibacterial Agents in Octreotide Acetate Injection

Li Qian, Liu Ying (Henan Provincial Institute of Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

Abstract Objective: To detect whether the octreotide acetate injection was added with the five antibacterial agents of phenol, benzyl alcohol, chlorobutanol, methyl p-hydroxybenzoate and propyl p-hydroxybenzoate. **Methods:** An Agela Venusuil ASB C18 (L) (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was adopted. The mobile phase A was water and the mobile phase B was methanol, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 30℃, and the detection wavelength was 220 nm and 256 nm. **Results:** The five kinds of antibacterial agents were well separated. The linear range of phoenol was 1.29~258.60 μg·mL⁻¹, and the average recovery was 100.0% ($n=9$). The linear range of benzyl alcohol was 2.72~544.20 μg·mL⁻¹, and the average recovery was 100.3% ($n=9$). The linear range of chlorobutanol was 9.95~1990.00 μg·mL⁻¹, and the average recovery was 100.9% ($n=9$). The linear range of methyl p-hydroxybenzoate was 0.27~53.80 μg·mL⁻¹, and the average recovery was 100.5% ($n=9$). The linear range of propyl p-hydroxybenzoate was 0.26~52.00 μg·mL⁻¹, and the

average recovery was 99.4% ($n=9$). None of the five kinds of antibacterial agents were detected in the 91 batches of octreotide acetate injection. **Conclusion:** The method is accurate, sensitive and simple, and can be used for determination of phenol, benzyl alcohol, chlorobutanol, methyl p-hydroxybenzoate and propyl p-hydroxybenzoate in octreotide acetate injection.

Keywords: octreotide acetate; octreotide acetate injection; octreotide acetate for injection; antibacterial agents; phenol; benzyl alcohol; chlorobutanol; methyl p-hydroxybenzoate; propyl p-hydroxybenzoate

奥曲肽 (Octreotide) 为8个氨基酸组成的环状多肽化合物, 是生长抑素类似物, 主要与肿瘤细胞或其他组织细胞膜表面上所表达的生长抑素受体高亲和性、特异性地结合, 抑制垂体生长激素以及胃肠胰腺系统分泌多肽类激素^[1-4], 临床使用其醋酸盐, 给药途径为皮下及静脉给药。目前, 国内批准上市的醋酸奥曲肽注射剂为醋酸奥曲肽注射液及注射用醋酸奥曲肽。醋酸奥曲肽注射液有5个规格: 1 mL : 0.05 mg、1 mL : 0.1 mg、1 mL : 0.15 mg、1 mL : 0.2 mg及1 mL : 0.3 mg, 注射用醋酸奥曲肽有2个规格: 0.1 mg及0.3 mg。

2015年版《中国药典》规定, 静脉给药的注射剂均不得加抑菌剂^[5]。调研发现, 醋酸奥曲肽注射剂对高温敏感, 企业均采用薄膜过滤除菌而非高温灭菌, 个别企业可能会添加抑菌剂, 以降低除菌不彻底的风险。注射剂中常加入的抑菌剂主要有醇类 (苯甲醇、三氯叔丁醇)、酚类 (苯酚)、酯类 (羟苯酯类) 等^[6-13], 不同种类的抑菌剂通过不同的作用机理而产生抑菌作用。但抑菌剂的大量使用可发生一些不良反应, 如苯酚可导致头痛及免疫抑制等, 苯甲醇可导致中枢神经系统毒性, 三氯叔丁醇可导致溶血反应, 羟苯酯类可导致过敏反应等^[14-15], 因此, 有必要对醋酸奥曲肽注射剂进行抑菌剂检查。本文建立了HPLC同时测定苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯5种抑菌剂的方法, 该方法操作简便、重复性好, 可监测该品种中抑菌剂的添加情况, 确保该产品的质量安全稳定。

1 仪器与试剂

Waters 2690高效液相色谱仪, Waters 2996二极管阵列检测器及Waters 2487紫外检测器, Empower色谱工作站; Sartorius BP211D电子天平; Millipore去离子水发生装置 (德国Merck Millipore)。

苯酚标准品 (Sigma-alorich, 批号SZBD127XV, 含量99.9%); 苯甲醇标准品 (中国

食品药品检定研究院, 批号190019-201301, 含量99.8%); 三氯叔丁醇标准品 (中国食品药品检定研究院, 批号100492-201302, 含量100.0%); 对羟基苯甲酸甲酯标准品 (中国食品药品检定研究院, 批号100278-201404, 含量100.0%); 对羟基苯甲酸丙酯标准品 (中国食品药品检定研究院, 批号100444-201403, 含量99.6%)。醋酸奥曲肽注射液 (2015年国家评价性抽验样品, 来源于11家企业, 70批次, 规格1 mL : 0.05 mg、1 mL : 0.1 mg、1 mL : 0.15 mg、1 mL : 0.2 mg及1 mL : 0.3 mg); 注射用醋酸奥曲肽 (2015年国家评价性抽验样品, 来源于6家企业, 21批次, 规格0.1 mg及0.3 mg); 原研醋酸奥曲肽注射液 (诺华制药, 批号S0369, 规格0.1 mg · mL⁻¹)。甲醇为色谱纯, 水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为Agela Venusuil ASB C18(L) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相A为水, 流动相B为甲醇, 梯度洗脱, 洗脱程序见表1, 流速1.0 mL · min⁻¹, UV双波长检测, 检测波长为220 nm及256 nm, 柱温30℃, 进样量20 μL。

表1 HPLC 梯度洗脱程序

时间 /min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	80	20
18	80	20
40	20	80
41	80	20
56	80	20

2.2 溶液配制

抑菌剂混合对照品溶液：精密称取苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯标准品适量，加甲醇-水（1:1）溶液溶解并稀释成浓度分别为 $50.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $500.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

醋酸奥曲肽注射液供试品溶液：取本品作为供试品溶液，或精密量取本品适量，加水稀释成含奥曲肽浓度为 $0.1 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

注射用醋酸奥曲肽供试品溶液：取本品2瓶，按标示量加水溶解并稀释成含奥曲肽浓度为 $0.1 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

2.3 系统适用性

精密量取“2.2”节下抑菌剂混合对照品溶液，进样 $20 \mu\text{L}$ ，记录色谱图，结果系统适用性试验溶液的色谱图中各成分出峰顺序依次为苯酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸甲酯、三氯叔丁醇及对羟基苯甲酸丙酯，见图1。各相邻峰之间的分离度均不小于1.5。

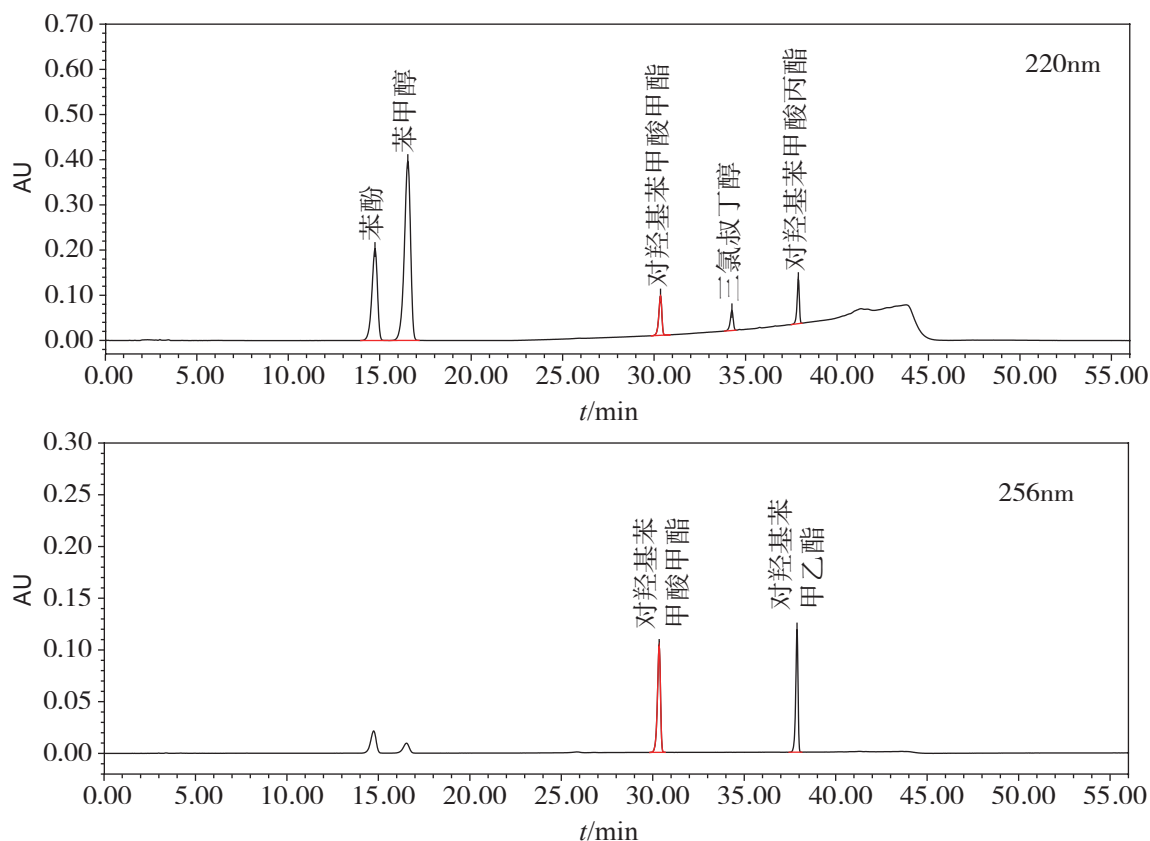


图1 系统适用性试验溶液的色谱图

2.4 空白溶液及辅料

精密吸取甲醇-水（1:1）溶液，得空白溶液进样 $20 \mu\text{L}$ ；按醋酸奥曲肽注射剂处方比例制备辅

料溶液，进样 $20 \mu\text{L}$ 。结果表明，空白溶液及辅料均对苯酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸甲酯、三氯叔丁醇及对羟基苯甲酸丙酯5种抑菌剂无干扰，见图2。

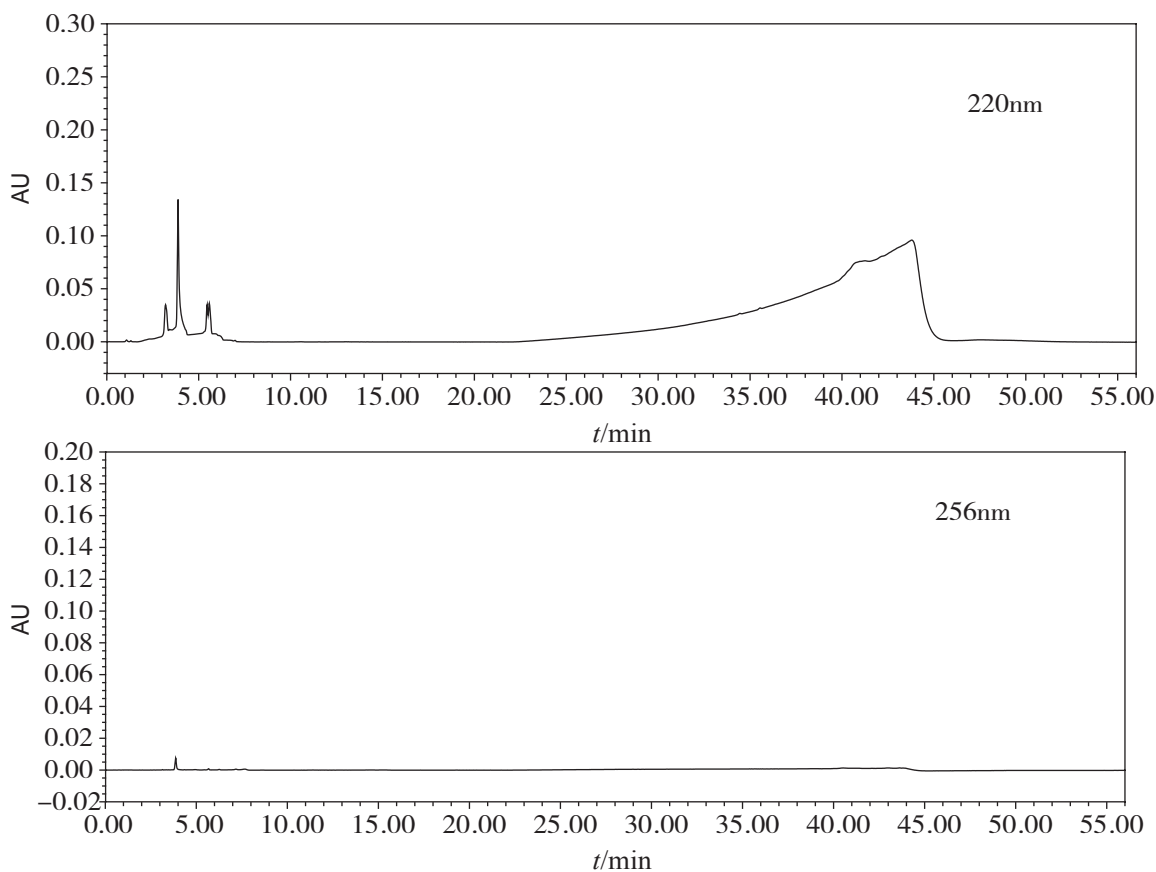


图2 空白辅料色谱图

2.5 线性关系考察

精密称取苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯标准品适量，加甲醇-水（1：1）溶解并稀释成浓度分别为260.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、550.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、2000.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、100.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、100.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。精密量取该溶液，逐级稀释成含苯酚浓度为1.29、2.59、6.47、12.93、19.40、25.86、64.65、129.30、193.95、258.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液；含苯甲醇浓度为2.72、5.44、13.61、27.21、40.82、54.42、136.05、272.1、408.15、544.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液；含三氯叔丁醇浓度为9.95、19.90、49.75、99.50、149.25、199.00、497.50、995.00、1492.50、1990.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液；含对羟基苯甲酸甲酯浓度为0.27、0.54、1.35、2.69、4.04、5.38、13.45、26.90、40.35、53.80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液；含对羟基苯甲酸丙酯浓度为0.26、0.52、1.30、2.60、3.90、5.20、13.00、26.00、39.00、52.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液；分别进样20 μL ，记录色谱图，以峰面积

Y 为纵坐标，进样浓度 X （ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）为横坐标进行线性回归，得苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯5个成分的回归方程（ $n=10$ ）：

$$\text{苯酚 } Y=72002X-18657 \quad (r=1.0000) ;$$

$$\text{苯甲醇 } Y=74547X+163087 \quad (r=0.9997) ;$$

$$\text{三氯叔丁醇 } Y=910.61X-3404.7 \quad (r=1.0000) ;$$

$$\text{对羟基苯甲酸甲酯 } Y=125139X-14319 \quad (r=1.0000) ;$$

$$\text{对羟基苯甲酸丙酯 } Y=107784X-10311 \quad (r=1.0000) .$$

结果苯酚浓度在1.29~258.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内，苯甲醇浓度在2.72~544.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内，三氯叔丁醇浓度在9.95~1990.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内，对羟基苯甲酸甲酯浓度在0.27~53.80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内，对羟基苯甲酸丙酯浓度在0.26~52.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内，均与峰面积呈现良好的线性关系。

2.6 精密度试验

取“2.2”节下抑菌剂混合对照品溶液，连续进样6次，苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯峰面积的RSD分别为

0.2%、0.1%、0.3%、0.1%、0.2%，结果表明该方法精密度良好。

2.7 定量限与检测限

逐级稀释“2.2”节下抑菌剂混合对照品溶液，以信噪比(S/N)为10:1计，苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯的最低定量限分别为0.3 ng、0.3 ng、199.0 ng、0.6 ng、0.6 ng。

以信噪比(S/N)为3:1计，苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯的最低检测限分别为0.08 ng、0.1 ng、99.5 ng、0.2 ng、0.2 ng。

2.8 稳定性试验

精密称取苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对

羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯适量，用“2.2”节下醋酸奥曲肽供试品溶解并稀释成含苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯分别为 $50.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $500.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液，按上述色谱条件测定并记录色谱图，测定24 h内溶液的稳定性，分别以各成分峰面积为指标考察溶液稳定性。结果见表2，苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯峰面积的RSD分别为0.4%、0.3%、2.0%、0.2%、0.2%，表明含苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯供试品溶液24 h内稳定性良好。

表2 稳定性试验结果

时间/h	苯酚	苯甲醇	三氯叔丁醇	对羟基苯甲酸甲酯	对羟基苯甲酸丙酯
0	3579736	8214935	345027	1273417	1063600
2	3578181	8210068	342237	1278204	1063287
4	3567141	8192040	339344	1277118	1061999
6	3563809	8179786	335526	1276439	1061322
8	3565523	8187080	333191	1277300	1062427
10	3552101	8170973	330932	1277642	1060433
12	3542600	8152203	331733	1275278	1059003
24	3541122	8156669	331484	1277946	1061605
平均值	3561277	8182969	336184	127668	1061710
RSD%	0.4	0.3	1.6	0.1	0.1

2.9 回收率试验

取醋酸奥曲肽注射剂适量，加水制成含奥曲肽浓度为 $0.1 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。再分别精密称取苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯适量，用上述醋酸奥曲肽供试品溶液溶解，分别制成高、中、低浓度的溶液，进样，以苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯各对照品

为外标计算回收率。结果苯酚平均回收率($n=9$)为100.0%，RSD($n=9$)为1.5%；苯甲醇平均回收率($n=9$)为100.3%，RSD($n=9$)为0.9%；三氯叔丁醇平均回收率($n=9$)为100.9%，RSD($n=9$)为1.2%；对羟基苯甲酸甲酯平均回收率($n=9$)为100.5%，RSD($n=9$)为0.8%；对羟基苯甲酸丙酯平均回收率($n=9$)为99.4%，RSD($n=9$)为0.8%；见表3。

表3 回收率试验结果

抑菌剂	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %
苯酚	423.2	416.0	98.30		
	422.0	416.6	98.72	98.4	0.4
	406.4	398.4	98.03		
	513.6	519.2	101.09		
	491.2	496.8	101.14	100.8	0.6
	522.4	522.7	100.06		
	583.6	592.6	101.54		
	588.4	585.5	99.51	101.0	1.3
	642.4	654.5	101.88		
苯甲醇	736.4	737.8	100.19		
	807.6	810.2	100.32	100.11	0.3
	838.8	837.2	99.81		
	961.2	954.5	99.30		
	1088.4	1109.9	101.98	100.44	1.4
	1063.2	1063.5	100.03		
	1410.0	1432.6	101.60		
	1134.0	1131.7	99.80	100.41	1.0
	1137.6	1135.7	99.83		
三氯叔丁醇	4040.0	3979.8	98.51		
	3860.0	3929.9	101.81	100.7	1.9
	3760.0	3829.9	101.86		
	5350.0	5430.3	101.50		
	5170.0	5220.1	100.97	101.1	0.4
	4820.0	4860.0	100.83		
	5720.0	5670.2	99.13		
	6580.0	6699.8	101.82	100.9	1.5
	6530.0	6639.7	101.68		

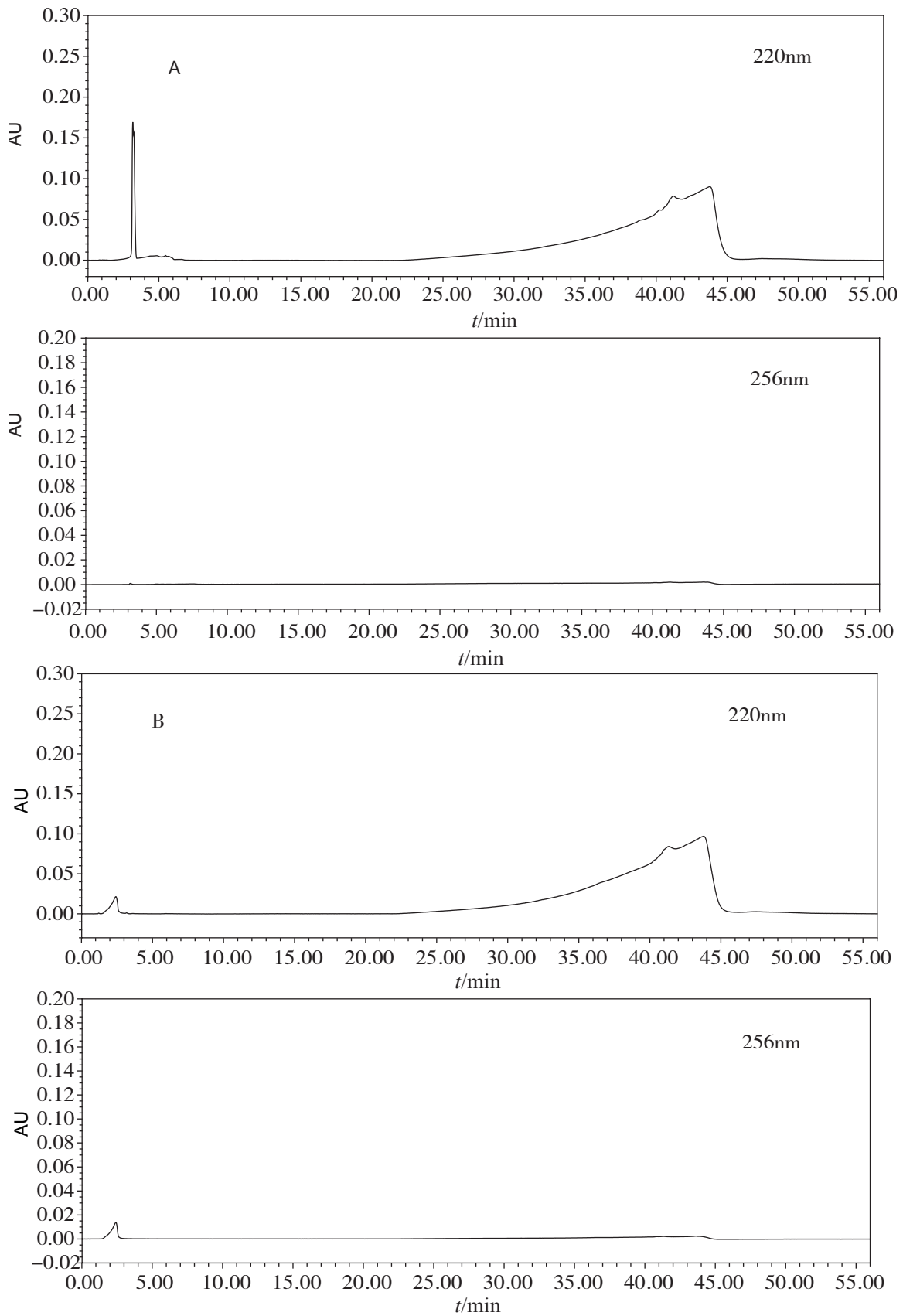
续表 3

抑菌剂	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %
对羟基苯甲酸甲酯	82.4	82.2	99.76		
	79.6	80.9	101.63	100.9	1.0
	80.2	81.3	101.37		
	106.2	105.4	99.25		
	98.2	98.6	100.41	100.1	0.8
	105.2	105.9	100.67		
	119.8	121.3	101.25		
	120.0	119.6	99.67	100.4	0.8
	127.2	127.4	100.16		
对羟基苯甲酸丙酯	95.0	94.4	99.37		
	81.4	80.5	98.89	99.5	0.6
	86.6	86.7	100.12		
	101.6	100.2	98.62		
	101.8	102.3	100.49	99.5	0.9
	106.2	105.6	99.44		
	132.0	132.0	100.0		
	122.6	120.3	98.12	99.1	1.0
	119.2	118.3	99.24		

2.10 样品测定

对 70 批醋酸奥曲肽注射液、21 批注射用醋酸奥曲肽及原研企业的 1 批醋酸奥曲肽注射液样品进行苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯

及对羟基苯甲酸丙酯 5 种抑菌剂检查, 结果均未检出以上抑菌剂。醋酸奥曲肽注射剂抑菌剂检查色谱图见图 3。



A. 注射液; B. 粉针剂。

图4 醋酸奥曲肽注射剂抑菌剂检查色谱图

3 讨论

3.1 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器对抑菌剂混合对照品溶液进行分析,得各成分的吸收光谱图,各成分最大紫外吸收波长:苯酚216 nm、苯甲醇211 nm、三氯叔丁醇210 nm、对羟基苯甲酸甲酯256 nm、对羟基苯甲酸丙酯256 nm。苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇均为末端吸收,综合考虑各峰的灵敏度及峰形,最终选择苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇检测波长为220 nm,对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯检测波长为256 nm。

3.2 抑菌剂对照品溶液的浓度

5种抑菌剂在注射剂中的常用量:苯酚0.5%,苯甲醇1.0%,三氯叔丁醇0.5%及羟苯酯类0.15%^[4],依据此用量设计抑菌剂各对照品的浓度。三氯叔丁醇由于紫外响应较低,适当地增加了其浓度,但该方法中三氯叔丁醇的检测限为99.5 ng,可满足检测要求。

3.3 样品质量分析

70批醋酸奥曲肽注射液及21批注射用醋酸奥曲肽均未检出上述5种抑菌剂,表明国内生产醋酸奥曲肽的企业均无违规添加苯酚、苯甲醇、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯这5种抑菌剂的行为。

参考文献:

- [1] 杨宁,许红波,李兆申,等.生长抑素类似物奥曲肽的临床应用[J].新药与临床,1994,13(1):31-33.
- [2] 孙晓红,陈兴田,杨树国,等.奥曲肽的临床应用[J].临床荟萃,1998,13(23):1080-1081.
- [3] 刘志峰,李萍,刘珂.奥曲肽的研究和应用进展[J].青岛大学医学院学报,2001,37(2):165-167.
- [4] 朱校勇,裴的善.奥曲肽的临床应用[J].天津药学,

2007,19(3):59-62.

- [5] 中国药典:四部[S].2015:5.
- [6] Akers M J,贺芬.开发注射剂时防腐剂的选择[J].国外药学:合成药、生化药、制剂分册,1986,7(1):32-34.
- [7] 张璐,涂家生.注射剂和滴眼剂中抑菌剂和抗氧化剂的添加及检测[J].药学与临床研究,2012,20(2):137-141.
- [8] 廖海明,吕海鸿,徐康森.骨肽注射液中苯酚含量的RP-HPLC测定[J].药物分析杂志,2005,25(4):397-398.
- [9] 张瑾,王瑾,杨英超,等.高效液相色谱法测定螯变原注射液中防腐剂苯酚含量[J].药物分析杂志,2014,34(8):1486-1488.
- [10] 张慧,杨化新,徐康森.RP-HPLC法测定注射用溶剂中苯甲醇含量[J].药物分析杂志,2004,24(4):428-429.
- [11] 黄青,张婷,陆益红,等.HPLC法测定缩宫素注射液中三氯叔丁醇的含量及应用[J].中国药品标准,2014,15(6):413-416.
- [12] 曹淑瑞,刘志勇,张雷,等.高效液相色谱法同时测定食品中6种对羟基苯甲酸酯[J].分析化学,2012,40(4):529-533.
- [13] 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.
- [14] 成海平.药品研发中防腐剂的应用及质控[J].中国新药杂质,2012,14(8):954-956.
- [15] 吴朝阳.浅谈注射剂中抑菌剂引起的不良反应[J].中国医学工程,2012,20(3):180.

(收稿日期 2016年4月9日 编辑 邹宇玲)