

· 技术研究 ·

HPLC 法同时测定吡诺克辛钠滴眼液中不同抑菌剂的含量

田海燕, 李智慧 (德州市食品药品检验检测中心, 德州 253015)

摘要 目的: 建立同时测定吡诺克辛钠滴眼液中不同抑菌剂 (硫柳汞钠、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯) 含量的 HPLC 法。**方法:** 采用 C18 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相为 0.005 mol·L⁻¹ 的醋酸铵溶液 (每 1000 mL 中含三乙胺 10 mL, 用冰醋酸调节 pH 值至 5.0±0.5) - 乙腈 (70 : 30), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 256 nm, 柱温为 30 °C。**结果:** 硫柳汞钠、羟苯甲酯、羟苯乙酯和羟苯丙酯在各自的检测质量浓度范围内线性关系良好, *r* 为 0.9993~1.0000, 检测限分别为 2.3、0.4、0.7、1.1 ng; 4 种抑菌剂的平均回收率为 100.4%~102.7% (RSD ≤ 1.4, *n*=9)。**结论:** 本文建立的方法结果准确可靠, 可作为吡诺克辛钠滴眼液中不同抑菌剂的质量控制方法。

关键词: 吡诺克辛钠滴眼液; 抑菌剂测定; 硫柳汞钠; 羟苯甲酯; 羟苯乙酯; 羟苯丙酯; 高效液相色谱

中图分类号: R927.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)02-0150-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.02.007

Simultaneous Determination of Content of Different Preservatives in Pirenoxine Sodium Eye Drops by HPLC

Tian Haiyan, Li Zhihui (Dezhou Drug Testing Center, Dezhou 253015, China)

Abstract Objective: To establish the method for simultaneous determination of content of different preservatives (merthiolate sodium, methylparaben, ethylparaben, propyl hydroxybenzoate) in Pirenoxine sodium eye drops by HPLC. **Methods:** The separation was performed on a C18 column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) with ammonium acetate solution of 0.005 mol·L⁻¹ (every 1000 mL contained 10 mL triethylamine and pH was adjusted with glacial acetic acid to 5.0±0.5)- acetonitrile (70 : 30) as mobile phase at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 256 nm and the column temperature was 30 °C. **Results:** The calibration curves of merthiolate sodium, methylparaben, ethylparaben, and propyl hydroxybenzoate reflected good linearities (*r*=0.9993-1.0000). The detection limits were 2.3, 0.4, 0.7 and 1.1 ng. Average recoveries of 4 kinds of bacteriostatic agent were 100.4%-102.7%(RSD≤1.4, *n*=9). **Conclusion:** The established method is accurate and reliable, which is suitable for quality control of different preservatives in Pirenoxine sodium eye drops.

Keywords: Pirenoxine sodium eye drops; preservatives assay; merthiolate sodium; methylparaben; ethylparaben; propyl hydroxybenzoate; HPLC

吡诺克辛钠滴眼液是眼科用药, 用于治疗初期老年性白内障、轻度糖尿病性白内障或并发性白内障等。国内有 10 余家企业生产该制剂, 规格为 15 mL: 0.8 mg。该滴眼液由药片与专用溶剂组成, 临用时配制成滴眼液, 药片含吡诺克辛钠,

专用溶剂中含有抑菌剂。研究各厂家的说明书,该滴眼剂中单独或联合使用了硫柳汞钠、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯作为抑菌剂。近年来,随着研究者对滴眼剂安全性关注度的提高,有关滴眼剂中抑菌剂对眼组织造成损害及刺激性的研究日益增多^[1-3]。

文献^[4]报道,吡诺克辛钠在临床使用过程中出现了说明书以外的不良反应,除了与主药自身或杂质有关,也可能与专用溶剂的抑菌剂有关。近年来,对吡诺克辛钠滴眼液的药片中有关物质的报道^[5-7]很多,鲜有对专用溶剂中抑菌剂的报道。为控制滴眼剂质量,笔者采用同一色谱条件,同时对该滴眼剂中抑菌剂的含量进行测定。

1 材料

1.1 仪器

1260HPLC 仪(美国 Agilent 公司); Mettler XS105DU 电子天平; Mettler PB-10 pH 计。

1.2 试药

硫柳汞钠对照品(批号:135050-201401,纯度 94.6%,中国食品药品检定研究院);羟苯甲酯对照品(批号:100278-201103,纯度 99.6%,中国食品药品检定研究院);羟苯乙酯对照品(批号:100847-201203,纯度 100%,中国食品药品检定研究院);羟苯丙酯对照品(批号:100444-201102,纯度 99.6%,中国食品药品检定研究院);吡诺克辛钠滴眼液(厂家 A,批号为 13110307、14040306、15040310,规格为 15 mL: 0.8 mg; 厂家 B,批号

为 131017014,规格为 15 mL: 0.8 mg; 厂家 C,批号为 131206,规格为 15 mL: 0.8 mg; 厂家 D,批号为 130703,规格为 15 mL: 0.8 mg。乙腈为色谱纯,水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

1.3 不同厂家吡诺克辛钠滴眼液中所加抑菌剂的种类

不同厂家吡诺克辛钠滴眼液说明书中标注抑菌剂的种类详见表 1。

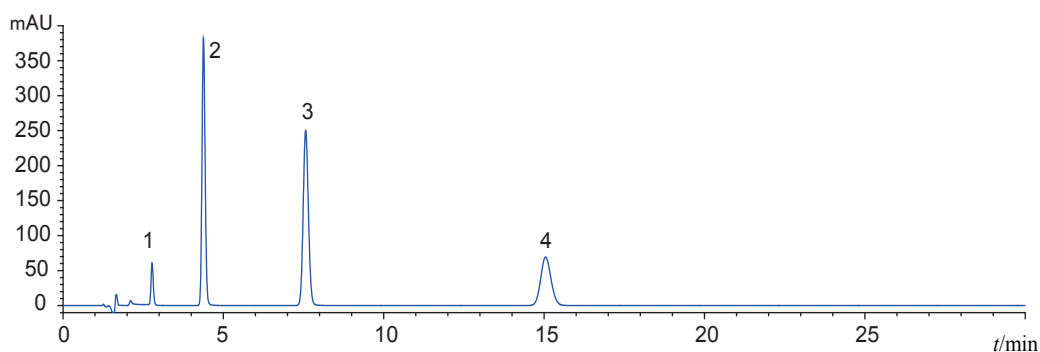
表 1 吡诺克辛钠滴眼液说明书中所含抑菌剂的种类

厂家	抑菌剂种类
A	硫柳汞钠、羟苯乙酯
B	羟苯甲酯、羟苯丙酯
C	羟苯乙酯
D	羟苯乙酯

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 0.005 mol · L⁻¹ 的醋酸铵溶液(每 1000 mL 中含三乙胺 10 mL, 用冰醋酸调节 pH 值至 5.0 ± 0.5) - 乙腈(70 : 30); 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 256 nm; 柱温为 30 °C; 进样量 20 μL。结果硫柳汞钠、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯依次出峰,理论板数按硫柳汞钠计算不低于 7000,分离度分别为 10.3、13.3 和 16.9。色谱图见图 1。



1. 硫柳汞钠; 2. 羟苯甲酯; 3. 羟苯乙酯; 4. 羟苯丙酯。

图 1 混合对照品高效液相色谱图

2.2 溶液制备

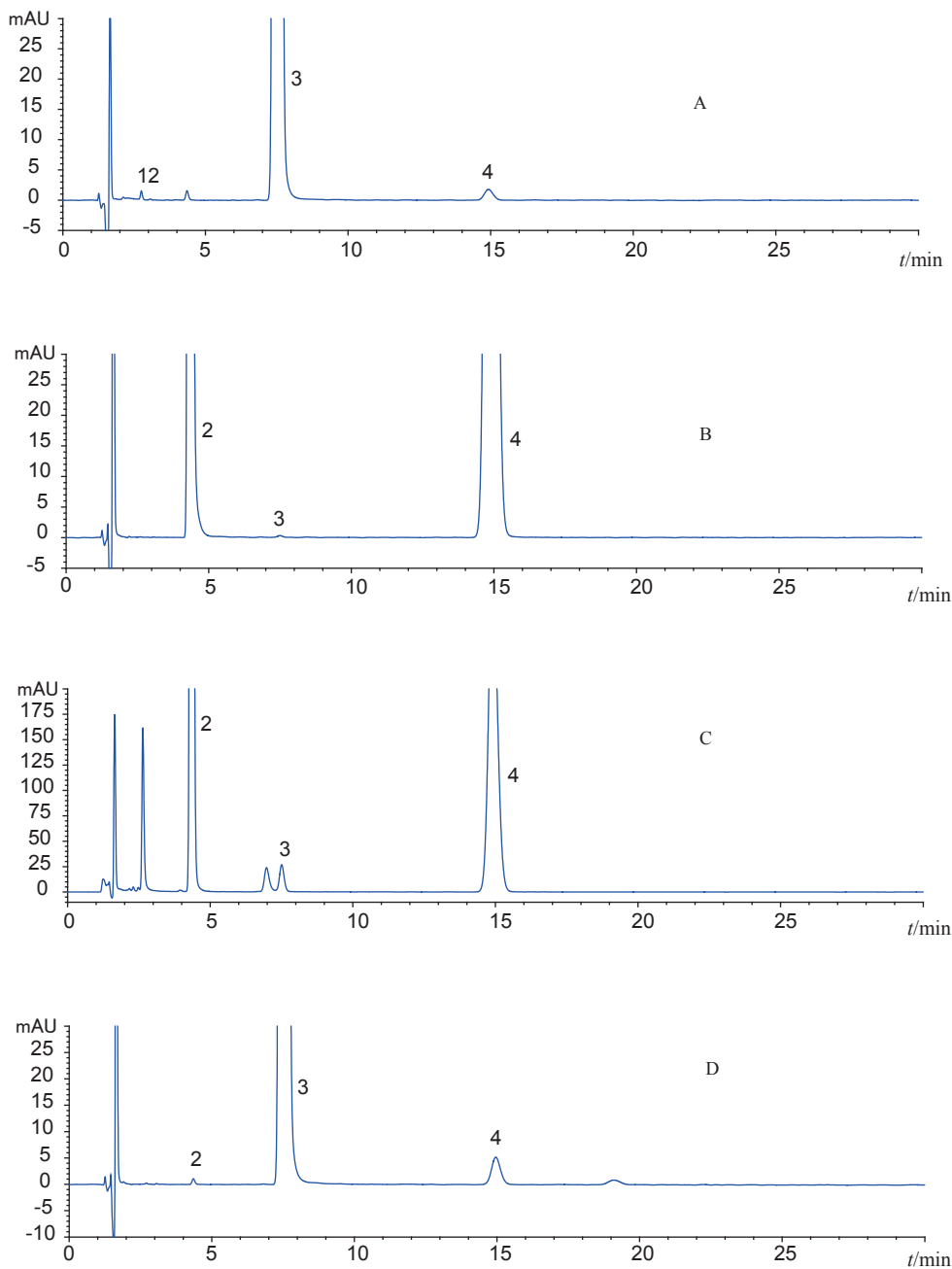
2.2.1 对照品溶液

精密称取硫柳汞钠对照品 0.0946 g, 置 100 mL 量瓶中, 加水适量使溶解 (避光操作); 精密称取羟苯甲酯 0.01127 g、羟苯乙酯 0.01361 g 和羟苯丙酯 0.01079 g, 分别置 20 mL 量瓶中, 加水适量, 置水浴溶解后, 放冷, 再加水稀释至刻度, 作为贮

备液 (酯类对照品贮备液过夜会有结晶析出, 重新水浴加热溶解, 混匀, 不影响浓度)。

2.2.2 供试品溶液

取专用溶剂原液根据各厂家不同抑菌剂实际含量, 选择原液或者稀释 5 倍, 作为最终供试品溶液。各厂家原液供试品色谱图见图 2。



A. 样品① (批号: 15040310); B. 样品② (批号: 131017014);
C. 样品③ (批号: 131206); D. 样品④ (批号: 130703);
1. 硫柳汞钠; 2. 羟苯甲酯; 3. 羟苯乙酯; 4. 羟苯丙酯。

图 2 供试品溶液高效液相色谱图

2.3 线性关系考察

精密量取硫柳汞钠贮备液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL 和羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯贮备液 0.1、0.2、0.5、1、2 mL，分别置 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，作为混合标准系列溶液。各取 20 μL 注入液相色谱仪，测定。以峰面积为纵坐标 Y ，浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标，绘制标准曲线，得回归方程：

$$Y_{\text{硫柳汞钠}} = 14.993X - 10.279 \quad r = 0.9993$$

$$Y_{\text{羟苯甲酯}} = 116.83X + 23.97 \quad r = 1.000$$

$$Y_{\text{羟苯乙酯}} = 109.09X - 37.536 \quad r = 0.9999$$

$$Y_{\text{羟苯丙酯}} = 92.346X - 70.539 \quad r = 0.9996$$

硫柳汞钠、羟苯甲酯、羟苯乙酯和羟苯丙酯的线性范围分别为 0.8949~2.6847、5.6125~112.25、6.8050~136.10 和 5.3734~107.47 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.4 精密度试验

取硫柳汞钠贮备液 0.3 mL 与羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯贮备液 0.5 mL，置同一 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，制成混合标准溶液，连续进样 6 次，记录色谱图，计算峰面积的 RSD 分别为 1.4%、0.1%、0.1%、0.1% ($n=6$)。

2.5 重复性试验

取批号为 15040310 的样品（说明书中标注含硫柳汞钠和羟苯乙酯）中的专用溶剂直接进样，测定硫柳汞钠的含量分别为 1.15、1.13、1.12、1.12、

1.15、1.11 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，RSD 为 1.5% ($n=6$)；取专用溶剂 5 mL，置 25 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，测定羟苯乙酯含量分别为 217.8、217.5、217.6、216.9、216.8、217.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，RSD 为 0.2% ($n=6$)。取批号为 131017014 的样品（说明书中标注含羟苯甲酯和羟苯丙酯）中的专用溶剂 5 mL，置 25 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，测定羟苯甲酯含量分别为 179.4、180.6、180.0、179.5、178.9、179.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，RSD 为 0.4% ($n=6$)；取专用溶剂直接进样，测定羟苯丙酯的含量分别为 74.4、74.5、73.9、74.7、73.8、74.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，RSD 为 0.5% ($n=6$)。

2.6 稳定性试验

取标准曲线中间点的混合标准溶液，在室温下放置，于 0、3、5、8、10、12 h 时测定，结果硫柳汞钠、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯峰面积的 RSD 分别为 1.8%、0.1%、0.1%、0.1% ($n=6$)，表明溶液在 12 h 内稳定。

2.7 准确度试验

取“2.5”节中测定溶液 5 mL，置 10 mL 量瓶中，分别加入近等量的相应对照品溶液，用水稀释至刻度，制成相当于防腐剂质量浓度 80%、100%、120% 的溶液，测定其含量，计算回收率。试验结果如表 2~5 所示，表明该方法准确度良好。

表 2 硫柳汞钠准确度试验结果

样品中含量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %
5.648	3.900	9.524	99.38		
5.648	3.900	9.591	101.10		
5.648	3.900	9.600	101.33		
5.648	6.205	11.86	100.11		
5.648	6.205	12.01	102.53	100.4	1.4
5.648	6.205	11.95	101.56		
5.648	8.864	14.45	99.30		
5.648	8.864	14.35	98.17		
5.648	8.864	14.52	100.09		

表3 羟苯甲酯准确度试验结果

样品中含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
179.6	112.2	291.8	100.03		
179.6	112.2	291.5	99.77		
179.6	112.2	292.0	100.15		
179.6	179.6	363.3	102.29		
179.6	179.6	362.6	101.88	101.5	1.2
179.6	179.6	363.0	102.12		
179.6	252.6	438.4	102.45		
179.6	252.6	437.9	102.26		
179.6	252.6	438.2	102.39		

表4 羟苯乙酯准确度试验结果

样品中含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
217.3	129.3	350.6	103.13		
217.3	129.3	349.9	102.59		
217.3	129.3	350.9	103.29		
217.3	211.0	429.4	100.50		
217.3	211.0	429.7	100.66	101.8	1.1
217.3	211.0	429.0	100.31		
217.3	258.6	480.3	101.72		
217.3	258.6	480.1	101.63		
217.3	258.6	481.0	101.98		

表5 羟苯丙酯准确度试验结果

样品中含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
371.2	214.9	594.9	104.09		
371.2	214.9	595.1	104.19		
371.2	214.9	595.6	104.44		
371.2	376.1	753.4	101.63		
371.2	376.1	753.7	101.71	102.8	1.2
371.2	376.1	752.9	101.48		
371.2	537.3	921.9	102.49		
371.2	537.3	921.6	102.44		
371.2	537.3	922.7	102.64		

2.8 检测限与定量限试验

取混合标准溶液, 逐级稀释进样, 按信噪比为3计, 确定硫柳汞钠、羟苯甲酯、羟苯乙酯和羟苯丙酯的检测限分别为2.3、0.4、0.7、1.1 ng; 按信噪比为10计, 确定硫柳汞钠、羟苯甲酯、羟苯乙酯

和羟苯丙酯的定量限分别为7.7、0.8、1.4、2.1 ng。

2.9 样品测定

取4个厂家7批制剂, 按“2.2.2”节方法制备溶液, 按外标法以峰面积计算硫柳汞钠、羟苯甲酯、羟苯乙酯和羟苯丙酯的含量。结果见表6。

表6 样品中抑菌剂的含量测定结果

厂家	批号	μg · mL ⁻¹			
		硫柳汞钠	羟苯甲酯	羟苯乙酯	羟苯丙酯
A	13110307	0.94	检出	208.2	检出
	14040306	1.10	检出	189.8	检出
	15040310	1.13	检出	217.3	检出
B	131017014	/	179.6	检出	74.3
C	131206	/	172.4	检出	87.4
D	130703	/	检出	375.3	检出

注: “/”表示未检出; “检出”表示在检出限以上, 但未在线性范围内。

3 讨论

3.1 分析方法的选择

《中国药典》2015年版四部^[8] 载了尼泊金酯类的含量测定方法, 还有硫柳汞的两种检验方法, 分别为滴定法和原子吸收分光光度法。滴眼剂中有关尼泊金酯类含量测定方法的相关文献亦常见^[9-13]。

《中国药典》2010年版二部载了检验盐酸环丙沙星滴眼液^[14] 中羟苯乙酯的方法, 同时用羟苯甲酯和羟苯丙酯作为系统条件。本试验在保证良好的系统条件的前提下, 大大降低了乙腈的用量, 收到了良好的效果。

3.2 辅料对测定的影响

吡诺克辛钠滴眼液由药片和专用溶剂组成。本文抑菌剂是指专用溶剂中的抑菌剂, 4个厂家的专用溶剂辅料中均含有硼酸、硼砂、氯化钾(氯化钠), 均对试验无干扰。厂家B说明书中标注还添加了氢氧化钠, 在氢氧化钠水溶液中, 羟苯甲酯、羟苯丙酯分别发生反应, 生成羟苯甲酯钠与羟苯丙酯钠, 峰面积换算系数为1.145、1.122^[15]。从羟苯甲酯与羟苯丙酯的回收率看, 厂家B未添加或添加少量的氢氧化钠, 联系厂家后得到证实未添加氢氧化钠。

3.3 抑菌剂的种类及含量

眼用制剂中的抑菌剂根据其化学结构和性质可分为以下几类: ①有机汞类, 如硫柳汞、硝酸汞; ②季铵盐类, 如苯扎氯铵、苯扎溴铵等; ③醇类, 如三氯叔丁醇; ④酯类, 常用的为羟苯酯类, 如羟苯甲酯、羟苯乙酯等; ⑤酸类, 如山梨酸^[2]。吡诺克辛钠滴眼液中使用的为有机汞类和酯类。酯类常用的为尼泊金类, 以羟苯乙酯为主, 羟苯乙酯因化学性质稳定、配伍禁忌较少, 以及对眼部的刺激性较小, 目前已成为滴眼剂中的主要抑菌剂。羟苯乙酯单独使用其有效浓度为0.03%~0.06%; 羟苯甲酯与羟苯丙酯合用, 其浓度分别为0.16%、0.02%^[3]。硫柳汞钠为有机汞类抑菌剂, 常用于滴眼剂和疫苗的防腐, 滴眼剂抑菌浓度为0.02%~0.04%, 稳定性较差, 日久会变质, 须关注其与处方中其他成分的相互作用^[16]。

本试验中, 厂家A不同批次添加硫柳汞钠浓度相对稳定, 为0.0001% (g · mL⁻¹), 羟苯乙酯为0.02%; 厂家B羟苯甲酯为0.02%, 羟苯丙酯为0.01%; 厂家C羟苯甲酯为0.02%, 羟苯丙酯为0.01%; 厂家D羟苯乙酯为0.04%。从表3可以看出, 4个厂家均联合使用了抑菌剂, 但与说明书中(表1)的标注有出入。因此, 厂家应规范处方中

抑菌剂的种类及标示量, 加强质量控制。

参考文献:

- [1] 陈曦, 刘美欣. 眼用制剂中防腐剂的研究应用进展 [J]. 天津药学, 2013, 25 (5): 54-59.
- [2] 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.
- [3] 梁光江, 王延东, 叶成添, 等. 滴眼剂中几种常用抑菌剂的兔眼刺激性实验 [J]. 中国药房, 2010, 21 (21): 1964-1966.
- [4] 丁利华. 吡诺克辛钠滴眼液致眼异常1例 [J]. 中国执业药师, 2009, 6 (11): 12-12.
- [5] 李金林, 周小娟, 安利霞, 等. HPLC法测定吡诺克辛钠滴眼液中主药及有关物质的含量 [J]. 中国药房, 2008, 19 (34): 2696-2698.
- [6] 李金林, 姚佳颖, 房桂珍, 等. HPLC法测定吡诺克辛钠的含量和有关物质 [J]. 中国现代药物应用, 2008, 2 (1): 36-37.
- [7] 孔春霞, 张庆, 刘亚妮, 等. HPLC法测定吡诺克辛钠的含量及有关物质 [J]. 中国药师, 2013, 16 (1): 66-68.
- [8] 中国药典: 四部 [S]. 2015: 231, 232, 569-573.
- [9] 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的含量 [J]. 中国药房, 2013, 24 (45): 4298-4300.
- [10] 简炎林, 邹国芳. 医院制剂中防腐剂羟苯乙酯的含量测定 [J]. 中国药房, 2009, 20 (13): 1016-1017.
- [11] 葛晓莹, 陈晨, 陈国清, 等. 托吡卡胺滴眼液中主成分及防腐剂的含量检测 [J]. 中国药事, 2014, 28 (8): 880-883.
- [12] 陈蓉. 珍珠明目滴眼液中防腐剂尼泊金乙酯的含量测定 [J]. 中国药事, 2014, 28 (8): 884-887.
- [13] 郭江红, 姜红, 赵亚萍. HPLC法同时测定氯霉素滴眼液中有关物质和尼泊金酯类防腐剂 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29 (12): 2071-2076.
- [14] 中国药典: 二部 [S]. 2010: 999-999.
- [15] 郝东涛, 战争尧, 谢晓, 等. 药剂学基础 [M]. 第1版. 长春: 吉林科学技术出版社, 2014: 134-134.
- [16] 安彦, 唐素芳. 地塞米松磷酸钠滴眼液中两种抑菌剂的分析 [J]. 中国药业, 2011, 20 (9): 14-15.

(收稿日期 2016年8月1日 编辑 王雅雯)