doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.07.020

高效液相色谱法同时测定复方硫酸新霉素滴眼液中 7 种抑菌剂

陈再洁,陈艳芝,吴小梅,薛昆鹏,任兴发,屠炳芳

(月旭科技<上海>股份有限公司,上海 201600)

摘要:目的 建立同时测定复方硫酸新霉素滴眼液中羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯、苯甲酸钠、硫柳汞、苯扎氯铵、苯扎溴铵 7 种抑菌剂含量的高效液相色谱(HPLC)法。**方法** 色谱柱为月旭 Ultimate® XB - C_{18} 柱(150 mm × 4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇 - 磷酸水溶液(pH = 3.5),梯度洗脱,流速为 1.0 mL / min,柱温为 30 ℃,检测波长为 214 nm,进样量为 10 μL。**结果** 羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯、苯甲酸钠、硫柳汞、苯扎氯铵、苯扎溴铵的质量浓度分别在 0.625 ~ 62.500 μg / mL、1.080 ~ 108.000 μg / mL、0.535 ~ 53.500 μg / mL、1.015 ~ 101.500 μg / mL、1.210 ~ 121.00 μg / mL、4.965 ~ 496.500 μg / mL、5.350 ~ 535.000 μg / mL 范围内与峰面积线性关系良好(r = 0.999 9, n = 7);精密度、稳定性、重复性试验的 *RSD* 均低于 1.50%;加样回收率分别为 97.24%,98.67%,99.85%,98.55%,97.99%,98.72%,97.55%,*RSD* 分别为 0.93%,1.02%,0.97%,0.87%,0.67%,0.85%,0.88%(n = 9)。**结论** 该方法操作简便,结果准确,稳定性好,能同时测定复方硫酸新霉素滴眼液中 7 种抑菌剂的含量。

关键词:复方硫酸新霉素滴眼液;高效液相色谱法;抑菌剂;含量测定

中图分类号:R988.1;R927.2 **文献标志码:A** **文章编号:1006 - 4931(2022)07 - 0082 - 04**

Simultaneous Determination of Seven Bacteriostatic Agents in Compound Neomycin Sulfate Eye Drops by HPLC

CHEN Zaijie, CHEN Yanzhi, WU Xiaomei, XUE Kunpeng, REN Xingfa, TU Bingfang

(Welch Technology < Shanghai > Co., Ltd., Shanghai, China 201600)

Abstract: Objective To establish a high - performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of seven bacteriostatic agents such as methylparaben, ethylparaben, propylparaben, sodium benzoate, thiomersal, benzalkonium chloride and benzalkonium bromide in Compound Neomycin Sulfate Eye Drops. **Methods** The chromatographic column was Welch Ultimate® XB - C_{18} column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol - phosphoric acid aqueous solution (pH = 3.5), the elution method was gradient elution, and the flow rate was 1.0 mL / min, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 214 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, sodium benzoate, thiomersal, benzalkonium chloride and benzalkonium bromide were 0.625 - 62.500 μg / mL, 1.080 - 108.000 μg / mL, 0.535 - 53.500 μg / mL, 1.015 - 101.500 μg / mL, 1.210 - 121.00 μg / mL, 4.965 - 496.500 μg / mL and 5.350 - 535.000 μg / mL(r = 0.999 9, n = 7), the *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were lower than 1.5%, and the recovery rates were 97.24%, 98.67%, 99.85%, 98.55%, 97.99%, 98.72% and 97.55% with the *RSD*s of 0.93%, 1.02%, 0.97%, 0.87%, 0.67%, 0.85% and 0.88%(n = 9). **Conclusion** The method is simple, accurate and stable, which can be used for the simultaneous determination of seven bacteriostatic agents in Compound Neomycin Sulfate Eye Drops.

Key words: Compound Neomycin Sulfate Eye Drops; HPLC; bacteriostatic agent; content determination

复方硫酸新霉素滴眼液主要成分为硫酸新霉素、地塞米松磷酸钠、玻璃酸钠,其中硫酸新霉素为氨基苷类广谱抗菌药物,对革兰阴性菌、革兰阳性菌、抗酸杆菌和放线杆菌属都有抑菌效果,对葡萄球菌的作用比链球菌强,生物体液中的脓液、渗出液、胃肠分泌液、细菌生长产物和酶均不影响其抗菌作用;地塞米松磷酸钠为人工合成的糖皮质激素,具有较强的抗炎和抗过敏作用;玻璃酸钠是眼用制剂的载体,具有保湿、增稠、增强药物利用度、减少药物刺激等作用。其适应证为急、慢性结膜炎,巩膜炎,急性巩膜炎,角膜炎,葡萄膜炎,青光眼,白内障,角膜移植术后及眼部受伤后的处理。多剂量包装的滴眼液中通常加入了适宜的抑菌剂,以防止使用过程中被微生物污染。复方硫酸新霉素滴眼液被收载于《国家药品标准·化学药品地方标准上升国家标准(第三册)》[WS - 10001 -(HD - 0261) - 2002],注明“本品中可加适量的抑菌剂”,但对抑菌剂的具体种类和加入量未作规定,并非所有生产企业均使用相同的抑菌剂,部分生产企业也未在药品说明书中明确标示抑菌剂的含量。相关数据显示,收载的多个滴眼液品种仅部分列入抑菌剂含量测定[1]。目前尚未建立统一、规范的滴眼液常用抑菌剂的检测方法,不利于有效监管。为了更好地控制滴眼液的质量,本研究中建

第一作者:陈再洁,女,大学本科,研究方向为色谱方法的开发应用,(电话)021 - 50276760 - 823(电子信箱)zaijiechen@welchmat.com。

立了同时测定复方硫酸新霉素滴眼液中7种抑菌剂含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Wisys 5000型高效液相色谱仪(月旭科技<上海>股份有限公司),配有四元泵、自动进样器、柱温箱、紫外-可见分光光度检测器、色谱工作站;AUW120D型电子分析天平(日本岛津公司,精度为十万分之一);DHG-9123A型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);KQ-400E型台式超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司,功率为400 W,频率为40 kHz)。

1.2 试药

复方硫酸新霉素滴眼液(武汉五景药业有限公司,批号分别为20050203,20050204,20060102,20060103,20060104,20060105);羟苯甲酯标准品(批号为100444-201804,纯度为99.6%),苯甲酸钠标准品(批号为100433-201702,纯度为99.7%),羟苯乙酯标准品(批号为100847-201604,纯度为99.9%),羟苯丙酯标准品(批号为100444-202005,纯度为99.9%),苯扎溴铵标准品(批号为135051-202002,纯度为99.8%),均购自中国食品药品检定研究院;硫柳汞钠标准品(批号为12627-2001,纯度为99.5%),苯扎氯铵标准品(批号为12625-2001,纯度为99.5%),均购自上海赤芍生物科技有限公司;甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:月旭Ultimate® XB-C_{18}柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-磷酸水溶液(磷酸调pH为3.5,B),梯度洗脱(0~8 min时40%B,8~19 min时40%B → 90%B,19~27 min时90%B,27~28 min时90%B → 40%B,28~35 min时40%B);流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:214 nm;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

单标溶液:取羟苯甲酯、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丙酯、硫柳汞、苯扎溴铵、苯扎氯铵标准品各适量,精密称定,分别置10 mL容量瓶中,加水定容,超声(功率为400 W,频率为40 kHz)使溶解,得各标准品质量浓度分别为7.24,11.27,9.54,4.83,10.49,55.29,51.02 μg/mL的单标溶液。

混合标准品溶液:取羟苯甲酯、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丙酯、硫柳汞、苯扎溴铵、苯扎氯铵标准品各适量,精密称定,置50 mL容量瓶中,加水定容,超声(功率为400 W,频率为40 kHz)使溶解,得各标准品质量浓度分别为62.5,101.5,108.0,53.5,121.0,535.0,496.5 μg/mL的混合标准品贮备液;精密量取上述混合标准品贮备液1 mL,置10 mL容量瓶中,加水定容,混匀,即得各标准品质量浓度分别为6.25,10.15,10.80,5.35,12.10,53.50,49.65 μg/mL的混合标准品溶液。

供试品溶液Ⅰ:取样品5支,混匀,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得硫酸新霉素和地塞米松磷酸钠质量浓度分别为3.5,1.0 mg/mL的供试品溶液Ⅰ。样品说明书中若标注了抑菌剂,根据标示量用水适当稀释,将其质量浓度稀释至线性范围内。本研究中的样品均未标注抑菌剂信息。

供试品溶液Ⅱ:取样品5支,混匀,取5 mL,加入混合标准品贮备液2 mL,置10 mL容量瓶中,用水定容,羟苯甲酯、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丙酯、硫柳汞、苯扎溴铵、苯扎氯铵的质量浓度分别为12.50,20.30,21.60,10.70,24.20,107.00,99.30 μg/mL,以及硫酸新霉素质量浓度为0.70 mg/mL、地塞米松磷酸钠质量浓度为0.20 mg/mL的溶液,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

阴性对照品溶液:按处方工艺分别制备不含羟苯甲酯、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丙酯、硫柳汞、苯扎溴铵、苯扎氯铵的阴性样品,按供试品溶液Ⅰ方法制备阴性对照品溶液。

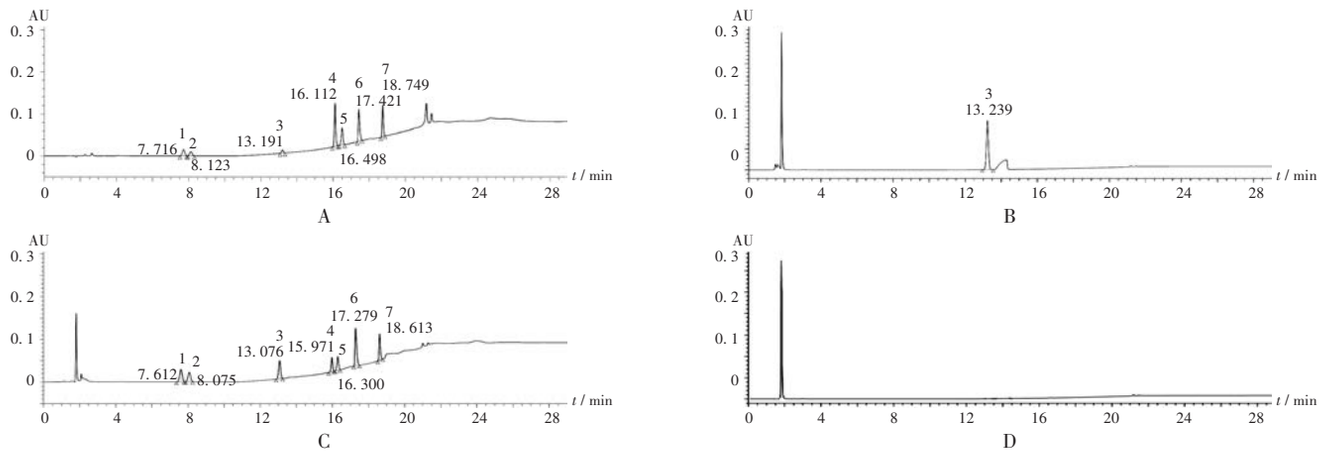
2.3 方法学考察

专属性试验:分别取2.2项下混合标准品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,色谱图见图1。本样品中未标注抑菌剂,通过单标溶液的定位,供试品溶液色谱中羟苯乙酯同位置出峰,实际样品中含有羟苯乙酯。

线性关系考察、检测限与定量限确定:精密量取2.2项下混合标准品贮备液0.1,0.2,0.5,1.0,2.0,6.0,10.0 mL,置10 mL容量瓶中,加水定容,即得系列线性标准品混标溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以质量浓度(X,μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程。结果见表1。将各标准品溶液逐级稀释,以10倍信噪比(S/N)对应的质量浓度为各成分的定量限,以3倍S/N对应的质量浓度为各成分的检测限。结果见表1。

精密度试验:精密吸取混合标准品溶液10 μL,按2.1项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果羟苯甲酯、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丙酯、硫柳汞、苯扎溴铵、苯扎氯铵峰面积的RSD分别为0.32%,0.52%,0.45%,0.39%,0.25%,0.40%,0.38%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下混合标准品溶液,分别于0,1,2,3,6,8,12 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果羟苯甲酯、苯甲酸钠、羟苯



1. 羟苯甲酯 2. 苯甲酸钠 3. 羟苯乙酯 4. 羟苯丙酯 5. 硫柳汞 6. 苯扎溴铵 7. 苯扎氯铵

A. 混合标准品溶液 B. 供试品溶液Ⅰ C. 供试品溶液Ⅱ D. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Methylparaben 2. Sodium benzoate 3. Ethylparaben 4. Propylparabe 5. Thiomersal 6. Benzalkonium bromide 7. Benzalkonium chloride

A. Mixed standard solution B. Test solution Ⅰ C. Test solution Ⅱ D. Negative control solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 线性关系考察、定量限与检测限确定结果

Tab. 1 Results of linear relationship test, *LOQ* and *LOD*

待测成分	回归方程	*r*	线性范围(μg/mL)	定量限(ng)	检测限(ng)
羟苯甲酯	$Y=41\,309X+10\,906.0$	0.999 9	0.625~62.500	0.625	0.208
羟苯乙酯	$Y=28\,249X-10\,245.0$	0.999 9	1.080~108.000	1.080	0.360
羟苯丙酯	$Y=45\,983X+8\,756.4$	0.999 9	0.535~53.500	0.535	0.178
苯甲酸钠	$Y=21\,376X+8\,290.5$	0.999 9	1.015~101.500	1.015	0.338
硫柳汞	$Y=19\,702X-2\,925.3$	0.999 9	1.210~121.000	1.210	0.403
苯扎氯铵	$Y=5\,238.3X-2\,614.0$	0.999 9	4.965~496.500	4.965	1.650
苯扎溴铵	$Y=4\,805.6X-2\,592.0$	0.999 9	5.350~535.000	5.350	1.780

乙酯、羟苯丙酯、硫柳汞、苯扎溴铵、苯扎氯铵含量的*RSD*分别为0.25%，0.35%，0.19%，0.22%，0.37%，0.43%，0.41%（$n=7$），表明混合标准品溶液在12 h内稳定性良好。

重复性试验：分别取样品5支，共6份，按2.2项下方法制备供试品溶液Ⅰ，按2.1项下色谱条件进样测定，其中含有的羟苯乙酯的*RSD*为1.32%（$n=6$）；分别取样品5支，共6份，按2.2项下方法制备供试品溶液Ⅱ，按2.1项下色谱条件进样测定。结果羟苯甲酯、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丙酯、硫柳汞、苯扎溴铵、苯扎氯铵峰面积的*RSD*分别为0.95%，1.02%，0.89%，1.11%，1.15%，0.97%，1.09%（$n=6$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取重复性试验项下供试品溶液Ⅱ9份，分为3组，分别加入混合标准品溶液0.8，1.0，1.2 mL，按2.1项下色谱条件进样测定，以外标法计算含量，并计算回收率和*RSD*。结果羟苯甲酯、苯甲酸钠、羟苯乙酯、羟苯丙酯、硫柳汞、苯扎溴铵、苯扎氯铵的加样回收率分别为97.24%，98.55%，98.67%，99.85%，97.99%，97.55%，98.72%，*RSD*分别为0.93%，0.87%，1.02%，0.97%，0.67%，0.88%，0.85%（$n=9$）。

耐用性试验：取2.2项下单标溶液各适量，按2.1项下色谱条件进样测定，分别考察3个批次月旭Ultimate® XB－C_{18}柱，按磷酸水的pH ± 0.5，梯度每个时间点 ± 1 min，柱温 ± 2 ℃，流速 ± 0.1 mL/min进行调整，分离度均能大于1.5，符合定量测定相关要求。

2.4 样品含量测定

取6批（批号分别为20050203，20050204，20060102，20060103，20060104，20060105）样品，依法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定6次，记录峰面积，并计算含量。结果羟苯乙酯的含量分别为325.29，330.86，336.61，341.25，334.57，335.26 μg/mL，其余抑菌剂未检出。

3 讨论

3.1 色谱条件选择

曾考察不同有机相（甲醇[2]、乙腈[3]、甲醇－乙腈混合溶液）；曾考察不同水相[1%三乙胺（磷酸调pH为3.5）[4]、20 mmol磷酸二氢钾和20 mmol磷酸氢二钾（磷酸调pH为3.0）、20 mmol磷酸二氢钠[5]、1%冰醋酸[6]、磷酸水溶液（磷酸调pH为3.5）[7-8]]；色谱柱曾考察不同键合相C_8柱、C_{18}柱，以及不同键合工艺具有不同选择性的C_{18}柱[9-10]；曾考察不同梯度洗脱条件[11]及不同比例等度洗脱条件[12-15]。最终，选择月旭Ultimate® XB－C_{18}柱（150 mm × 4.6 mm，5 μm），甲醇（A）－磷酸水溶液（磷酸调pH为3.5，B）进行梯度洗脱。

3.2 方法评价

本方法操作简便，结果准确，稳定性好，可用于同时测定复方硫酸新霉素滴眼液中7种抑菌剂的含量。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京：