

表 4 3 批样品有关物质含量(n=3)

Tab. 4 Content of related substances of 3 batches of samples(n=3)

批号	含量/%					
	杂质 A	杂质 B	杂质 C	杂质 E	最大单杂	总杂质
20141201	未检出	未检出	0.013	未检出	未检出	0.013
20141202	未检出	未检出	0.013	未检出	未检出	0.013
20141203	未检出	未检出	0.012	未检出	未检出	0.012

### 3 讨论

取对照溶液 2, 按“2.2”项下色谱条件注入液相色谱仪, 采用二极管阵列检测器, 在 200~400 nm 内, 采集盐酸普拉克索及其杂质光谱图。结果显示, 盐酸普拉克索及其杂质均在 264 nm 处有较大吸收, 而在其他波长处无明显紫外吸收, 因此将 264 nm 作为有关物质测定的检测波长。

目前, 在药品有关物质的测定中, 由于有关物质和主成分的化学结构并不完全相同, 响应值可能不一样, 其校正因子可能不在 0.9~1.1 内, 则可采用加校正因子的主成分自身对照法<sup>[5-8]</sup>, 所以本研究采用加校正因子的主成分自身对照法测定有关物质的含量。

为了减小计算校正因子过程中的各种误差因素, 本研究采用了标准曲线法测定校正因子, 以求准确测定杂质相对于主成分的相对保留时间和校正因子<sup>[9]</sup>, 且采用 3 种不同的色谱柱测定校正因子及保留时间。结果表明校正因子及相对保留时间在不同的色谱柱具有很好的重复性, 适用于本品中有关物质的含量测定。

方法学实验表明加校正因子的主成分自身对照法适用于盐酸普拉克索中有关物质的检测, 且

本方法省略了已知杂质对照品, 却可产生与使用对照品相同的效果, 同时又使操作步骤简便、快速, 可靠程度优于自身对照法和面积归一化法。

### REFERENCES

- [1] MARTÍNEZ-CORRAL M, KULISEVSKY J. Pramipexole and Parkinson's disease, an update [J]. Rev Neurol, 2008, 46(1): 49-52.
- [2] LEMKE M R, BRECHT H M, KOESTER J, et al. Effects of the dopamine agonist pramipexole on depression, anhedonia and motor functioning in Parkinson's disease [J]. J Neurol Sci, 2006, 248(1/2): 266-270.
- [3] IZUMI Y, SAWADA H, YAMAMOTO N, et al. Novel neuroprotective mechanisms of pramipexole, an anti-Parkinson drug, against endogenous dopamine-mediated excitotoxicity [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 557(2/3): 132-140.
- [4] EP8.0 Vol. II [S]. 2014: 3082-3083.
- [5] ZHANG L, ZHANG W, LU X P. Discussion on hplc method of determining impurities in medicines [J]. Drug Stand China(中国药品标准), 2002, 3(6): 10.
- [6] MA C J, YAN D, YAO H T, et al. HPLC method with correction factor for determination of content of the related substances in lisinopril and hydrochlorothiazide tablets [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(20): 86-90.
- [7] SUN W J, YAN H, WANG C G. Determine of content of impurity rabeprazole sulfone in rabeprazole sodium with correction factor and self contrast method [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(9): 118-122.
- [8] YAN Q Y, ZHAO Y L, YAN H, et al. Determination of related substances in esomeprazole magnesium by HPLC method using correction factor [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2013, 30(10): 782-787.
- [9] YUAN C P, LIANG H J, LIN B S, et al. HPLC determination of impurities of fexofenadine hydrochloride in fexofenadine hydrochloride and pseudoephedrine hydrochloride sustained release capsules [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 34(11): 2021-2029.

收稿日期: 2015-04-24

## HPLC 测定苄达赖氨酸滴眼液中 3 种抑菌剂含量

许梦佳<sup>1</sup>, 杨伟峰<sup>1,2</sup>, 石云峰<sup>2\*</sup> (1.浙江工业大学, 杭州 310014; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

**摘要:** 目的 建立同时测定苄达赖氨酸滴眼液中 3 种抑菌剂(羟苯乙酯、硫柳汞、苯扎氯铵)含量的高效液相色谱法。方法 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 1%三乙胺溶液(用磷酸调 pH 值至 3.0)(A)-甲醇(B), 梯度洗脱: 0~2 min, B 50%; 2~17 min, B 50%→90%; 17~29 min, B 90%; 29~30 min, B 90%→50%; 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 262 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 40 °C。结果 羟苯乙酯、硫柳汞和苯扎氯铵的峰面积与浓度的线性关系良好( $r>0.999$ ), 线性范围分别为: 0.07~1.32, 0.38~9.51, 3.26~32.6 μg·mL<sup>-1</sup>, 加样回收率为 99.0%~100.3%。结论 本方法灵敏, 快速,

作者简介: 许梦佳, 女, 硕士生 Tel: (0571)86459422 E-mail: xumengjia2013@yeah.net \*通信作者: 石云峰, 男, 副主任药师 Tel: (0571)86459422 E-mail: lin-net@163.com

准确, 重复性好, 可用于苄达赖氨酸滴眼液中抑菌剂的含量测定。

关键词: 苄达赖氨酸滴眼液; 抑菌剂; 含量; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)11-1370-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.11.020

## Determination of Three Bacteriostatic Agents in Bendazac Lysine Eye Drops by HPLC

XU Mengjia<sup>1</sup>, YANG Weifeng<sup>1,2</sup>, SHI Yunfeng<sup>2\*</sup> (1.Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an HPLC method for simultaneous determination of three bacteriostatic agents (ethylparaben, thimerosal, benzalkonium chloride) in bendazac lysine eye drops. **METHODS** The analysis was performed on Kromasil C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of acetonitrile(A)-0.1% triethylamine(B)(adjusted to pH 3.0 by phosphoric acid) in gradient mode: 0–2 min, B 50%; 2–17 min, B 50%→90%; 17–29 min, B 90%; 29–30 min, B 90%→50%. The detection wavelength was 262 nm with injection volume of 20 μL and column temperature of 40 °C. **RESULTS** Ethylparaben, thimerosal and benzalkonium chloride showed good linearity( $r>0.999$ ) in the range of the test concentration of 0.07–1.32, 0.38–9.51, 3.26–32.6 μg·mL<sup>-1</sup>. The average recoveries of the method were in 99.0%–100.3%. **CONCLUSION** The method is sensitive, rapid and accurate with good repeatability, which can be used for rapid screening and determination of the content of bacteriostatic agents in bendazac lysine eye drops.

**KEY WORDS:** bendazac lysine eye drops; bacteriostatic agents; contents; HPLC

苄达赖氨酸滴眼液的主要成分是苄达赖氨酸, 该药作为醛糖还原酶抑制剂, 不仅对糖性白内障有效, 还对多种类型早期老年性白内障有预防和治疗作用<sup>[1-2]</sup>。生产企业为了保证滴眼剂的无菌性, 防止滴眼剂多次使用时发生微生物污染, 在处方中添加了抑菌剂。查阅收集到的产品说明书, 发现市场上销售的苄达赖氨酸滴眼液处方中标注的抑菌剂为羟苯乙酯、硫柳汞或苯扎氯铵 3 种中的 1 种<sup>[3]</sup>。眼睛是人体最娇嫩的器官之一, 过量抑菌剂的添加可能对其造成损害<sup>[4]</sup>; 同时有效的抑菌剂浓度可以降低滴眼剂微生物污染的风险<sup>[5]</sup>。目前各国都非常关注抑菌剂的安全性和有效性, 人用药物注册技术要求国际协调会议(ICH)<sup>[6]</sup>和欧美药典都要求测定制剂中抑菌剂的含量, 英国和美国规定药品包装标签中必须标明抑菌剂种类和含量。为了考察国内苄达赖氨酸滴眼液抑菌剂添加情况, 本实验建立了 HPLC 同时测定上述 3 种抑菌剂的方法。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Xs 205 Du 电子分析天平和 S40k pH 计均购自梅特勒-托利多仪器有限公司; Milli-Q 纯水仪(美国 Millipore 公司)。

三乙胺(分析纯)、磷酸(分析纯)和甲醇(色谱纯)均购自默克化工技术有限公司; 羟苯乙酯(批号: 100847-201203, 含量: 100%)、硫柳汞(批号:

135050-201401, 含量: 94.6%)和苯扎氯铵(批号: 100549-201303, 含量: 99.58%)均购自中国食品药品检定研究院; 苄达赖氨酸滴眼液样品为 2013 年全国抽验样品。

### 2 方法与结果

#### 2.1 对照品溶液的配制

分别称取硫柳汞、苯扎氯铵和羟苯乙酯的对照品适量, 加水溶解并制成每 1 mL 约含硫柳汞 200 μg、苯扎氯铵 1 000 μg 和羟苯乙酯 50 μg 的混合溶液作为对照品储备液, 精密量取 5 mL, 置 500 mL 量瓶中, 加水定容, 作为混合对照品溶液。

#### 2.2 供试品溶液的配制

取本品作为供试品溶液(含硫柳汞、苯扎氯铵的样品), 或精密量取样品 2 mL, 置 100 mL 的量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液(含羟苯乙酯的样品)。

#### 2.3 色谱条件

色谱柱: Kromasil C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 1%三乙胺溶液(用磷酸调 pH 值至 3.0)(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~2 min, B 相 50%; 2~17 min, B 相 50%→90%; 17~29 min, B 相 90%; 29~30 min, B 相 90%→50%); 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 262 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 40 °C。理论板数以羟苯乙酯计, 约为 4 000; 各成分间的分离度符合规定, 混合对照品溶液色谱图、样品色谱图及未添加抑菌剂的阴性对照溶液色谱图见图 1。

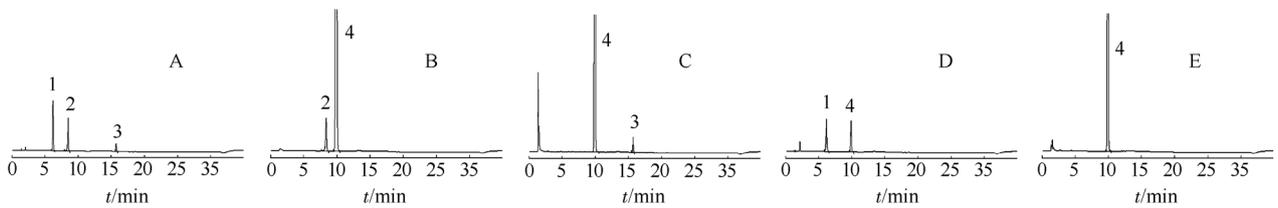


图1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液 I(批号 120966); C-供试品溶液 II(批号 20121204); D-供试品溶液 III(批号:130506); E-无抑菌剂的阴性对照溶液; 1-羟苯乙酯; 2-硫柳汞; 3-苯扎氯铵; 4-苄达赖氨酸。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-reference solution; B-sample I (batch No.120966); C-sample II (batch No. 20121204); D-sample III(batch No.130506); E-negative solution without bacteriostatic agent; 1-ethylparaben; 2-thimerosal; 3-benzalkonium chloride; 4-bendazac lysine.

## 2.4 线性关系与检测限

取“2.1”项下对照品储备液适量,逐步稀释配制系列浓度的对照品溶液,作为线性溶液,按“2.3”项下色谱条件进行测定,以对照品进样浓度为横坐标,对照品峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。取线性溶液加水继续稀释,取仪器信噪比约为3时溶液的浓度为各组分的检测限。回归方程、线性范围及检测限见表1。

表1 线性关系和最低检测限

Tab. 1 Regression equation and the limit of detection

化合物	回归方程	r	线性范围/ μg·mL <sup>-1</sup>	检测限/ μg·mL <sup>-1</sup>
羟苯乙酯	$Y=884.9X-1.9$	0.999 8	0.07~1.32	0.01
硫柳汞	$Y=199.0X+6.2$	0.999 5	0.38~9.51	0.03
苯扎氯铵	$Y=8.5X+0.3$	0.999 9	3.26~32.6	0.11

## 2.5 仪器精密度、重复性和回收率

取混合对照品溶液,精密量取20 μL,按“2.3”项下色谱条件,连续进样6次,记录峰面积,计算各化合物峰面积的RSD。分别取含有羟苯乙酯、硫柳汞或苯扎氯铵的各1批样品,各平行制备6份供试品溶液,进样测定,计算样品中抑菌剂含量及其RSD。分别精密量取“2.1”项下对照品储备液4, 5, 6 mL,置500 mL量瓶中,每个水平各3份,分别加空白辅料溶液定容,作为硫柳汞和苯扎氯铵回收率测试液;分别精密量取“2.1”项下对照品储备液4, 5, 6 mL,置500 mL量瓶中,每个水平各3份,加空白辅料溶液10 mL,加水定容,作为羟苯乙酯回收率测试液。仪器精密度、重复性和回收率试验结果见表2。

## 2.6 稳定性试验

取企业1批号为130944样品、企业2批号为130415样品、企业7批号为20130901样品,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别在0, 2, 4, 6, 8,

12 h时进样测定,记录色谱图,以主成分峰面积为指标考察稳定性,结果羟苯乙酯、硫柳汞和苯扎氯铵各个时间色谱图中峰面积RSD分别为0.6%, 0.9%和0.8%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

## 2.7 样品测定

按“2.3”项下色谱条件,对苄达赖氨酸滴眼液样品进行了测定,结果见表3。

表2 仪器精密度、方法重复性和回收率试验结果

Tab. 2 Results of precision, repeatability and recovery

化合物	仪器 精密度 RSD/%	重复性		回收率	
		平均含量/ mg·mL <sup>-1</sup>	RSD/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
羟苯乙酯	0.47	0.021	0.35	99.6	0.67
硫柳汞	1.22	0.004	0.52	100.3	0.99
苯扎氯铵	0.69	0.022	0.84	99.0	0.75

表3 样品测定结果(n=2)

Tab. 3 Test results of samples(n=2)

企业 编号	批号	抑菌剂名称	处方量/ mg·mL <sup>-1</sup>	含量/ %
1	130516	羟苯乙酯	0.03	66.7
	130717			73.3
	130944			66.7
2	120966	硫柳汞	0.001	58.0
	130114			63.0
	130415			65.0
3	20130315	硫柳汞	0.003	106.7
	20130522			110.0
	20130715			103.3
4	130115	硫柳汞	0.001	84.0
	130412			79.0
	130802			74.0
5	11130105	硫柳汞	0.005	84.0
	20130102			111.2
7	20121204	苯扎氯铵	0.01	210.0
	20130301			230.0
	20130901			240.0
8	1311073	苯扎氯铵	0.01	225.0
	1310293			216.7
	1311153			200.0

### 3 讨论

用于眼用制剂中的抑菌剂要求对眼表的刺激性较小,因此适用的抑菌剂品种不多,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。全国生产苯达赖氨酸滴眼液的生产企业共有8家,本次研究样品收集全面,查阅产品说明书可知该品种使用的抑菌剂包括硫柳汞钠、羟苯乙酯和苯扎氯铵3种,不同生产企业根据产品情况选用了其中的1种,故本研究建立了高效液相色谱法对上述3种抑菌剂同时进行测定。

生产苯达赖氨酸滴眼液的8家企业中,使用硫柳汞钠作为抑菌剂的有5家,浓度范围为0.001~0.005 mg·mL<sup>-1</sup>;使用羟苯乙酯的作为抑菌剂有1家,浓度为0.03 mg·mL<sup>-1</sup>;使用苯扎氯铵作为抑菌剂有2家,浓度均为0.01 mg·mL<sup>-1</sup>,由此可见,不同企业采用抑菌剂种类及浓度差异较大,抑菌效力差异较大。

中国药典2010年版中,硫酸新霉素滴眼液等6个品种已增加了抑菌剂含量测定,标准中一般规定抑菌剂的含量为标示量的±20%。而本次研究测

定的20批次样品中有14批次样品超出限度范围,其中苯扎氯铵含量高达200%以上,抑菌剂安全风险较大。

本研究采用梯度洗脱,在30 min内同时测定苯达赖氨酸滴眼液中3种抑菌剂的含量,方法灵敏、准确,重复性好,为滴眼剂中抑菌剂的快速筛查与含量分析提供了一种手段。

### REFERENCES

- [1] WANG P, KONG F F. Preparation and quality study of bendazac lysine eye gel [J]. China Med Her(中国医药导报), 2011, 8(24): 60-64, 83.
- [2] JIN G, LI X. Determination of related substance of bendazac lysine eye drops by HPLC [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2010, 14(1): 41-42.
- [3] LIANG G J, WANG Y D. Stimulation effect of several bacterial inhibitors of eye drops on rabbits eyes [J]. China Pharm(中国药房), 2010, 21(21): 1964-1966.
- [4] HUANG Z Y, ZHU Y G. Determination of benzalkonium chloride in pilocarpine nitrate eye drops [J]. China Licensed Pharm(中国执业药师), 2012, 9(10): 25-28.
- [5] JIANG Z J, GAO C. Study on the bacteriostatic effect of sodium hyaluronate eye drops [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 7(30): 788-792.
- [6] WU C M, ZHU J Y. HPLC rapid screening and simultaneous determination of eight bacteriostatic agents and benzaldehyde in oxymatrine injection [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(7): 1200-1204.

收稿日期: 2015-03-25

## HPLC 测定银花芒果片中绿原酸、芒果苷和橙皮苷的含量

唐德智(广西南宁食品药品检验所, 南宁 530001)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 同时测定银花芒果片中绿原酸、芒果苷和橙皮苷的含量。方法 采用 Waters SunFire™ C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 327 nm(0~10 min, 绿原酸), 258 nm(10~20 min, 芒果苷), 283 nm(20~40 min, 橙皮苷)。结果 绿原酸进样量在 0.140~2.516 μg 内线性关系良好( $r=0.9999$ ,  $n=6$ ), 平均回收率为 99.4%, RSD 为 1.2%( $n=9$ ); 芒果苷进样量在 0.042~0.761 μg 内线性关系良好( $r=0.9999$ ,  $n=6$ ), 平均回收率为 99.9%, RSD 为 1.4%( $n=9$ ); 橙皮苷进样量在 0.076~1.361 μg 内线性关系良好( $r=0.9999$ ,  $n=6$ ), 平均回收率为 99.9%, RSD 为 0.7%( $n=9$ )。结论 该方法简便、快捷、准确, 可用于该制剂的质量控制。

**关键词:** 银花芒果片; 绿原酸; 芒果苷; 橙皮苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)11-1373-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.11.021

作者简介: 唐德智, 男, 副主任中药师

Tel: 13877186930

E-mai: tangdz7497@163.com

中国现代应用药学 2015 年 11 月第 32 卷第 11 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2015 November, Vol.32 No.11

· 1373 ·