

- [4] 孟涛, 唐奎山, 周秀峰. 齐多夫定中对甲苯磺酸甲酯检测方法的研究[J]. 辽宁医药, 2007, 22(2): 24-25.
- [5] LIU J H, ZHONG Y N, HE G T. LC-MS determination of genotoxic impurities in imatinib mesylate [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2013, 33(7): 1168-1170.
- [6] ICH. Guideline: Impurities in New Drug Substances Q3 A (R2) [EB/OL]. (2006-10-25).
- [7] ICH. Guideline: Impurities in New Drug Products Q3B (R2) [EB/OL]. (2006-10-25).
- [8] CHMP. Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities [EB/OL]. (2006-06-28).
- [9] CDER. Guidance for Industry Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products: Recommended Approaches [EB/OL]. (2008-10).

收稿日期: 2016-02-22

原子荧光法测定苄达赖氨酸滴眼剂中抑菌剂硫柳汞的含量

陈超, 程磊, 洪利娅, 俞辉* (浙江省食品药品检验研究院, 浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室, 杭州 310051)

摘要: 目的 建立苄达赖氨酸滴眼剂中抑菌剂硫柳汞的原子荧光光谱含量测定方法。方法 采用微波消解系统消解样品后, 用双道原子荧光光谱仪测定苄达赖氨酸滴眼剂中硫柳汞的含量。结果 3家企业样品的平均含量分别为 0.001%, 0.030%和 0.001%, 方法检出限为 $0.0134 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 线性范围为 $0.4\sim 2.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 线性回归方程相关系数为 0.999 3, 平均回收率为 99.2%。结论 采用本法测定滴眼剂中硫柳汞的含量灵敏准确, 专属性强, 干扰少, 对于控制滴眼剂中硫柳汞含量有实际意义。

关键词: 原子荧光分光光谱法; 苄达赖氨酸滴眼剂; 抑菌剂; 硫柳汞

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)11-1440-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.11.020

Determination of the Content of the Merthiolate in the Bendazac Lysine Eye Drops by Atomic Fluorescence Spectrometry

CHEN Chao, CHENG Lei, HONG Liya, YU Hui* (Zhejiang Insititute for Food and Drug Control, Key laboratory of Drug Contacting Materials Quality Control of Zhejiang Provincial 2014E10006, Hangzhou 310051, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an atomic fluorescence spectrometry method for the determination of the content of the merthiolate in the bendazac lysine eye drops. **METHODS** Determination of the content of the merthiolate in the bendazac lysine eye drops by dual channel atomic fluorescence spectrometry after digestion of samples with microwave digestion system. **RESULTS** The average content of the sample of 3 enterprises was 0.001%, 0.030%, and 0.001%, respectively, the detection limit was $0.0134 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the linear range was $0.4\sim 2.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the correlation coefficient was 0.999 3, and the average recovery was 99.2%. **CONCLUSION** Using this method to determine the content of the merthiolate in the bendazac lysine eye drops is sensitive and accurate, with strong specificity and little interference. It is of practical significance for the control of the content of merthiolate in the eye drops.

KEY WORDS: atomic fluorescence spectrometry; bendazac lysine eye drops; bacteriostatic agent; merthiolate

硫柳汞是一种广泛应用于眼科制剂和生物疫苗的有机汞类抑菌剂^[1], 硫柳汞又名乙基汞硫代水杨酸钠, 代谢或降解产物为乙基汞和硫代水杨酸盐。硫柳汞对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有很强的抑菌能力, 为广谱抑菌剂。其作用机制为汞离子与菌体中酶蛋白的-SH(巯基)结合而使酶失去活性, 但对细菌抗原和血清蛋白没有^[2]。但硫柳

汞可引起明显的点状角膜上皮损伤、可使隐形眼镜变色。有机汞类抑菌剂存在一定的眼表毒性, 是引起角膜毒性的一个重要原因^[3-4], 并且在体内具有蓄积性。在筛选抑菌剂用量时应尽量采用抑菌剂的最低有效浓度, 保证药品在使用过程及有效期内符合卫生学要求, 同时最大限度地降低抑菌剂对眼睛的刺激和损害。至今美国药典、欧洲

基金项目: 浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室(2014E10006)

作者简介: 陈超, 男, 高级工程师 Tel: (0571)86456586 E-mail: chenchao@zjyj.org.cn *通信作者: 俞辉, 男, 硕士, 主任药师 Tel: (0571)87180328 E-mail: ybc@zjyj.org.cn

药典、日本药局方均没有在眼用制剂中控制抑菌剂硫柳汞的用量,对此可能存在的隐患,应考虑控制其用量。

目前测定硫柳汞含量的方法很多,中国药典2015年版四部收载了<3115>硫柳汞测定法^[5],用于疫苗的质量控制,第一法采用双硫脲滴定法^[6],第二法采用冷原子吸收分光光度法^[7]。除此还有分光光度法、高效液相色谱法等^[8-11]。原子荧光光谱法将硫柳汞在氧化条件下消化成无机汞离子,在硼氢化物-酸的还原体系中将汞离子还原为汞原子后进行测定,从而计算出硫柳汞的含量,与上述方法相比具有灵敏度高、干扰少、简单方便等优点。

1 仪器与试剂

AFS3100型双道原子荧光光谱仪,断续流动氢化物发生系统(北京科创海光公司);Multiwave 3000型微波消解系统(奥地利Anton paar公司);NANOpure Diamond™型超纯水仪(美国Barnstead公司);汞空心阴极灯(北京有色金属研究总院);

标准物质:汞单元素标准液[GBW080617],国家标准物质研究中心,批号8094;

试剂:硝酸、盐酸(BV-III级,北京化学试剂研究所);氢氧化钠、硼氢化钾、重铬酸钾(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);苄达赖氨酸滴眼液(浙江莎普爱思制药有限公司,批号:070810,050607,080319,规格:5 mL;宁波唯森制药有限公司,批号:070601,071101,规格:5 mL;杭州民生药业有限公司,批号:12081651,12081751,51141210,规格:5 mL)。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

精密量取苄达赖氨酸滴眼液1.0 mL,置于聚四氟乙烯消解罐中,加入硝酸5 mL,置微波消解仪中以消解程序(5 min 功率升至600 W,维持10 min,5 min由600 W升至1200 W,维持10 min,5 min降至室温)进行消解,至溶液澄清;消解完全后,置电热板上加热赶去硝酸至近干,用5%盐酸溶液清洗,合并洗液至100 mL量瓶中,定容。再吸取2.0 mL上述溶液至100 mL量瓶,用5%盐酸溶液定容,即得。同时制备样品空白。

2.2 对照品溶液的制备

将1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 汞标准液用0.05%重铬酸钾-5%硝酸溶液稀释至10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准溶液,再用5%盐酸溶液配制成0,0.4,0.8,1.2,1.6,2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

的系列浓度标准溶液。

2.3 测定条件

负高压为300 V;灯电流为30 mA;检测高度为10 mm;氩气压力为0.60 MPa;原子化器温度为200 $^{\circ}\text{C}$;载气流量为400 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;屏蔽气流量为900 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样体积为2 mL;采集时间为10 s;延迟时间为1 s;积分方式为峰面积。

3 结果

3.1 含量测定方法学验证

3.1.1 线性关系考察以0.5%氢氧化钠-0.5%硼氢化钾溶液作为还原剂,5%盐酸溶液作载液,测定荧光强度。0.4,0.8,1.2,1.6,2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列浓度标准溶液分别对应荧光值为221.431,482.526,737.339,934.656,1217.669。以荧光值(I_f)为纵坐标、浓度(C)为横坐标绘制工作曲线。线性回归方程为 $I_f=605.917C-6.980$,相关系数 r 为0.9993。

3.1.2 检测限(LOD)与定量限(LOQ)测定空白溶液11次,计算出标准偏差 σ ,以 $\text{LOD}=3\sigma/a$ (a 为校准曲线斜率)计算公式,得到检出限为0.0134 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,定量限以3倍检出限计为0.0402 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.1.3 仪器精密度试验测定汞标准溶液(1.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的荧光值,重复进样6次,RSD为0.6%,表明在此条件下仪器精密度良好。

3.1.4 重复性试验取苄达赖氨酸滴眼液,精密量取1.0 mL,共6份,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,进样测定,平均浓度为4957.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,RSD为3.14%,表明重复性良好。

3.1.5 稳定性试验取同一供试品溶液,分别于0,1,3,6,12,18,24 h进样,RSD为2.02%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

3.1.6 加样回收率试验精密吸取苄达赖氨酸滴眼液0.5 mL,共9份,分成3组,置聚四氟乙烯消解罐中,每组分别精密加入浓度为5000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的汞标准溶液0.2,0.5,1.0 mL,加入硝酸5 mL,放入微波消解仪中进行消解,至溶液澄清;消解完全后,置电热板上加热赶去硝酸至近干,用5% HCl溶液清洗并过滤,合并滤液至100 mL量瓶中,定容。再吸取2.0 mL上述溶液至100 mL量瓶,用5% HCl溶液定容,即得。同时制备样品空白。计算加样回收率,结果见表1。

表 1 回收率试验结果($n=3$)Tab. 1 Results of recovery tests($n=3$)

样品中 含量/ μg	加入量/ μg	测得浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	测得量/ μg	回收率/ %	RSD/ %	平均回 收率/%
2.478 8	1.0	0.703 5	3.517 5	103.88		
2.478 8	1.0	0.685 6	3.428 0	94.93	4.53	
2.478 8	1.0	0.693 1	3.465 5	98.68		
2.478 8	2.5	1.018 5	5.092 5	104.55		
2.478 8	2.5	0.973 1	4.865 5	95.47	4.90	99.21
2.478 8	2.5	0.981 0	4.905 0	97.05		
2.478 8	5.0	1.500 9	7.504 5	100.52		
2.478 8	5.0	1.479 3	7.396 5	98.36	1.09	
2.478 8	5.0	1.490 5	7.452 5	99.48		

3.2 样品含量测定

取浙江莎普爱思制药有限公司、宁波唯森制药有限公司和杭州民生药业有限公司 3 家企业生产的共 9 批苳达赖氨酸滴眼液进行测定。硫柳汞分子式为 $\text{C}_9\text{H}_9\text{HgNaO}_2\text{S}$ ，分子量 404.81，其中 Hg 分子量 200.59，质量比为 49.55%，折算结果见表 2，与企业提供的处方量基本一致。同时采用中国药典 2015 年版四部<3115>硫柳汞测定法第一法(双硫脲滴定法)对杭州民生药业有限公司 3 批样品进行测定，批号 12081651，12081751，51141210 的硫柳汞含量分别为 0.001 03%，0.000 98%，0.001 04%，显示采用不同的测定方法，结果重现性基本一致。

表 2 样品分析结果

Tab. 2 Analytical result of the sample

生产企业	批号	测定值/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	硫柳汞 含量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	硫柳汞 含量/ 万分之	硫柳汞 平均 含量/%
莎普爱思	050607	4 754.75	9.596	0.10	0.001
	070810	4 981.00	10.052	0.10	
	080319	4 764.00	9.614	0.10	
	080115	5 145.25	10.384	0.10	
唯森	070601	145 880	294.40	2.94	0.030
	071101	148 070	298.82	2.99	
民生	12081651	4 967.43	10.025	0.10	0.001
	12081751	4 831.17	9.750	0.10	
	51141210	4 941.72	9.973	0.10	

4 讨论

4.1 仪器参数的选择

4.1.1 负高压和灯电流 负高压过高引起基线不稳，过低会使灵敏度下降；灯电流过高缩短灯的使用寿命，过低降低荧光强度。综合因素考虑，选择负高压为 300 V，灯电流为 30 mA。

4.1.2 载气流量 载气流量过高会将原子浓度冲

稀、灵敏度降低，流量过低难以将气体混合物迅速带入石英炉。考察载气流速为 200~800 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时对荧光强度的影响，当载气流速为 400 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时，灵敏度最高，继续增大载气流速则灵敏度下降。由此选择载气流速为 400 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

4.1.3 屏蔽气流量 屏蔽气用于防止周围大气的干扰，流量过高会冲稀原子蒸气，流量过低会使荧光猝灭。考察屏蔽气流速为 600~1 100 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时对荧光强度的影响，荧光强度随屏蔽气流速的增加而增加，当流速达 900 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时，荧光强度出现平台。由此选择屏蔽气流速为 900 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

4.1.4 其他参数 原子化器高度过低将导致气相干扰，过高使得光束射到体积小且不稳定的焰尾，而降低灵敏度。考察原子化器高度为 7~11 mm，发现在 10 mm 时荧光强度达到顶峰，由此选择原子化器高度为 10 mm。同时，根据图谱峰形确定读数时间 10 s，延迟时间 1 s。

4.2 氢化物发生系统条件的选择

4.2.1 还原剂溶液浓度 硼氢化钾浓度提高，氢火焰增强，荧光强度增大，同时噪声增大且易引起液相干扰。硼氢化钾浓度降低，反应速度下降、影响氢化物的生成效率^[12]。考察 0.5%，1.0%，1.5%，2.0% 各浓度对实验的影响，当硼氢化钾浓度为 0.5% 时，仪器信噪比最大。

4.2.2 酸性介质及其浓度 氢化反应必须保持一定酸度，酸的种类和浓度对汞的测定影响很大。硫酸与汞会形成沉淀，不能用于汞的测定。考察盐酸、硝酸作介质，实验发现采用盐酸作为反应介质和载流液，稳定性好，重现性高。考察其浓度在 2%~10% 时对荧光强度的影响，发现浓度为 5% 时，线性关系良好。

4.3 干扰及消除

高浓度时，无机汞会由于微生物的作用转变成有机汞或者金属汞而挥发，防止汞损失的措施是加入氧化剂保存。因此在实验过程中，配制高浓度标准溶液时采用了 0.05% 重铬酸钾-5% 硝酸溶液。

硫柳汞为有机汞，需要消化成无机汞离子，同时汞元素对温度比较敏感，温度过高会造成汞元素的损失。在样品前处理中采用微波消解密闭消化的方法，避免了敞开式消化所带来的样品损失。

硫柳汞化学性质不稳定，易发生降解，产生乙基汞、硫代水杨酸以及 2, 2'-二硫代二苯甲酸^[13]。采用原子荧光光谱法测定苳达赖氨酸滴眼剂中硫

柳汞的含量,以 Hg 为目标物,避免了因硫柳汞降解引起的含量下降。

4.4 检测方法的存在

化学滴定法由于不需要特殊设备,因此应用较广泛。其缺点是操作步骤多,较为繁琐,人为影响因素较多,且灵敏度较低。同时,该方法使用的三氯甲烷、四氯化碳等试剂对人体有毒害,不符合绿色环保分析的理念。按中国药典的方法灵敏度也较低,不适用于痕量检测。采用冷原子吸收分光光度法,准确性和精密度均优于滴定法,但和原子荧光分光光度法相比,仪器成本高,检出限、线性范围、稳定性、重现性也均较差^[14]。

4.5 小结

目前国内滴眼剂中加入抑菌剂硫柳汞的量没有统一的标准,不同企业的苄达赖氨酸滴眼液中硫柳汞的浓度相差有几十倍之多,在筛选抑菌剂用量时应尽量采用抑菌剂的最低有效浓度^[15],保证药品在使用过程及有效期内符合卫生学要求,同时,最大限度地降低抑菌剂对眼睛的刺激和损害。

采用氢化物发生-原子荧光光谱法测定苄达赖氨酸滴眼剂中硫柳汞的含量,方法简便灵敏,准确可靠,为用硫柳汞做为抑菌剂的滴眼剂的质量控制提供科学依据。

REFERENCES

[1] HE P, LIANG Z L. Application of thimerosal as a preservative to vaccines for human use [J]. Chin J Biol(中国生物制品学杂志), 2013, 26(1): 135-138.
[2] HUANG Q Y, WU E Y, LI H, et al. Guideline for preservatives selection of *in vitro* diagnostic reagent [J]. Lett Biotechnol(生物技术通讯), 2013, 24(4): 592-594.
[3] LIU L, LIU B, CHEN G H. Analysis of drug toxic keratopathy induced by eyedrop [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应

用药学), 2012, 29(8): 759-761.
[4] ZHANG H N. Protective effect of hyaluronan and hydroxypropyl methylcellulose against preservative induced DNA damage in ocular surface epithelial cells and the DNA damage response mechanism [D]. Huangzhou: Zhejiang University, 2013.
[5] 中国药典. 四部[S]. 2015: 231-232.
[6] TIAN W L, CHEN T Q, WAN Y F. Optimized titration method for the determination of thiomersal content in "Chinese Pharmacopoeia" [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 31(10): 1990-1992.
[7] YANG X H, LIU Y H, WANG Y C. Determination of thiomersal in hepatitis B vaccine by flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometry [J]. China Pharm(中国药房), 2008, 19(13): 1013-1014.
[8] GAO Y, ZHENG S, QIU Y L. The method for determination of mercury ion in thiomersal [J]. China Med Her(中国医药导报), 2010, 7(10): 94-96.
[9] YI D W, MA L, ZHANG Y J. Determination of thimerosal and phenylmercuric compounds in chloramphenicol eye drops by HPLC [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2014, 49(11): 1004-1008.
[10] HE P, QIU S H, GUO Y F, et al. Determination of thiomersal content in biological products by various methods [J]. Chin J Biol(中国生物制品学杂志), 2010, 23(2): 199-202.
[11] LENG T H, ZHOU Y, DUAN W F, et al. Determination of thiomersal and phenyl mercury content in cosmetics by HPLC-ICP-MS [J]. Chin J Anal Lab(分析实验室), 2013, 32(7): 75-78.
[12] CHEN C, ZHI X W, MA J, et al. Extract of arsenic and antimony in pharmaceutical glass containers determined by atomic fluorescence spectrometry simultaneously [J]. Drug Standard China(中国药品标准), 2011, 12(4):311-313.
[13] HONG X X, SHE Q. The safety issue of biological products containing thimerosal [J]. Drug Standard China(中国药品标准), 2006, 7(5): 73-74.
[14] YU L, CHEN C, LI B, et al. Research progress on sample pretreatment and methods of total Mercury determination [J]. Environm Monitor China(中国环境监测), 2014, 30(1): 129-137.
[15] LI M G, SHE J Q, ZHU S H, et al. Identification of decomposition product of thimerosal in oral vaccine by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. Chin J Biol(中国生物制品学杂志), 2013, 26(7): 1019-1022.

收稿日期: 2016-03-24

正交设计法优选止咳化痰合剂提取工艺

毛疆民¹, 刘跃林², 龚祖芳³ (1.江苏省如皋市人民医院, 江苏 如皋 226500; 2.江苏省如皋市中医院, 江苏 如皋 226500; 3.精华制药集团股份有限公司制剂研究所, 江苏 南通 226000)

摘要: 目的 优选止咳化痰合剂提取工艺。方法 采用超声浸泡-水提回流法对药材进行提取。以橙皮苷的提取率、黄芩苷的提取率以及干浸膏得率为综合考察指标, 采用正交设计法考察浸泡时间、加水量、提取时间、提取次数 4 个因素的影响, 优选最佳提取工艺, 并进行工艺验证。**结果** 最佳工艺为加 10 倍药材量的水超声浸泡 20 min, 提取 2 次, 每次 80 min。**结论** 验证试验表明, 通过正交试验优选的止咳化痰合剂提取工艺稳定可行。

作者简介: 毛疆民, 男, 副主任药师 Tel: 13906275179 E-mail: 2764753956@qq.com