

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.23.010

高效液相色谱法测定消旋山莨菪碱滴眼液中抑菌剂含量

戴丽娜, 毛睿, 陈泳君

(江苏省连云港市食品药品检验检测中心, 江苏 连云港 222000)

摘要:目的 建立同时测定消旋山莨菪碱滴眼液中2种抑菌剂羟苯乙酯、苯扎溴铵含量的高效液相色谱法(HPLC)法。方法 色谱柱采用Aglient Zorbax Eclipse Plus C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为1%三乙胺溶液(用磷酸调pH至3.0)-甲醇, 梯度洗脱, 流速为1.0 mL/min, 检测波长为210 nm, 进样量为10 μL, 柱温为30℃。结果 羟苯乙酯、苯扎溴铵的峰面积与质量浓度的线性关系良好($r > 0.999$), 线性范围分别为1.07~106.80 μg/mL和5.45~545.00 μg/mL, 加样回收率分别为99.15%, 98.07%, RSD分别为1.05%和1.25% ($n=9$)。结论 该方法准确, 专属性强, 稳定且无干扰, 可用于消旋山莨菪碱滴眼液中抑菌剂的含量分析。

关键词: 消旋山莨菪碱滴眼液; 抑菌剂; 高效液相色谱法

中图分类号: R927.2; R988.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)23-0031-04

Content Determination of Bacteriosatic Agents in Raceanisodamine Eye Drops by HPLC

Dai Lina, Mao Rui, Chen Yongjun

(Lianyungang Institute for Food and Drug Control, Lianyungang, Jiangsu, China 222000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for content determination of two bacteriosatic agents(ethylparaben and benzalkonium bromide) in Raceanisodamine Eye Drops. **Methods** The chromatographic column was Aglient Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 1% triethylamine(adjusted pH to 3.0 with phosphoric acid)-methanol, gradient elution, the

第一作者: 戴丽娜, 女, 大学本科, 药师, 主要从事药物分析工作, (电子信箱)458988221@qq.com。

萄球菌适宜 pH 偏碱性环境中存活^[11]; 另一方面, 没食子酸鞣酸成分多于五倍子, 起主要作用的没食子酸鞣酸可使微生物体内的原生质凝固^[12], 并通过抑制细菌代谢所需的酶类而发挥抑菌作用。

参照文献[13], 中药有效成分提取采用传统方法—煎煮法。传统抑菌试验试管法依据 GB15979-2002《一次性使用卫生用品标准》^[14], 取样片, 加 5 mL PBS 缓冲液和 100 μL 菌液进行试验, 观察抑菌情况。因为 TSB 是高富营养培养基, 而 PBS 仅能维持微生物状态, 试验时无法判断抑菌是菌本身已经死亡还是样片抑制导致。本试验菌株和药液作用一定时间, 再置 10 mL TSB 中进行培养, 观察菌落生长情况, 更能真实反映实际情况。

一定量的菌液与不同浓度的水提取液作用 1 h, 纸片置 10 mL TSB 中, 参照 2015 年版《中国药典(四部)》通则 1106 条件培养, 接种至各自分离琼脂培养基平板, 从而利于初步判断各管区别于其他管的菌落。通过试验找出各个菌株的最小提取液浓度, 也可以参照文献[15]推算出最小抑菌浓度。

随着提取液浓度和 pH 的改变, 没食子酸和没食子鞣质抑菌活性的改变, 二者抑菌强弱、抑菌菌株和顺序可能发生变化的情况有待进一步研究。同时, 大肠埃希菌一般在人体内体现其致病性, 药液进入体内是否有作用或同于体外效果, 也有待进一步研究。

参考文献:

[1] 山东省卫生厅. 山东省中药标准[M]. 济南: 山东友谊出版社, 1995: 56.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 67.

[3] 勾明明, 张宗和, 张春枝. 五倍子醇提取物的抗氧化活性[J]. 大连工业大学学报, 2011, 30(2): 90-93.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 151-152.

[5] 宋忠臣, 束蓉, 姚菊芳. 没食子对常见细菌抑制作用的体外研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2006, 22(6): 634.

[6] 刘玉梅, 徐静舒. 五倍子抗口腔致病菌活性物质筛选及其体外抑菌效果评价[J]. 实用口腔医学杂志, 2017, 33(4): 437-441.

[7] 刘海峰, 郑玉荣, 刘小平, 等. 10 种水煎剂对念珠菌的体外抑菌作用[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(4): 72-74.

[8] 刘现兵, 杜镇镇, 王冬, 等. 五倍子的体外抑菌作用研究[J]. 中国实用医药, 2008, 3(7): 96-97.

[9] 吕雪梅, 邱毅, 董云玲, 等. 桔梗五倍子提取液的抑菌实验研究[J]. 光明中医, 2015, 30(4): 726-727.

[10] 何国庆, 贾英民. 食品微生物学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 55.

[11] 胡静, 赵小慧, 朱春玉, 等. 槐糖脂对金黄色葡萄球菌的抑菌机理[J]. 食品科学, 2012, 33(5): 33-36.

[12] 李秀萍, 李春远, 渠桂荣, 等. 五倍子的研究概况[J]. 中医药学报, 2002, 30(3): 72-74.

[13] 夏委. 中药有效成分提取方法研究进展[J]. 中国药业, 2016, 25(9): 94-97.

[14] GB15979-2002, 一次性使用卫生用品标准[S].

[15] 黎满香, 刘红旗, 陈可毅, 等. 试管法和纸片法抑菌试验的比较[J]. 中国兽医科技, 1997, 27(2): 31-32.

(收稿日期: 2018-08-10)

flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 210 nm, the sample size was 10 μ L, and the column temperature was 30 $^{\circ}$ C. **Results** Ethylparaben and benzalkonium bromide showed good linear relationship in the range of 1.07 – 106.80 μ g/mL, 5.45 – 545.00 μ g/mL ($r > 0.999$). The average recovery rates were 99.15% and 98.07%, RSDs were 1.05% and 1.25% ($n = 9$).

Conclusion The method is accurate, reproducible, stable with no interference, which can be used for content determination of bacteriosatic agents in Raceanisodamine Eye Drops.

Key words: Raceanisodamine Eye Drops; bacteriosatic agents; HPLC

消旋山莨菪碱具有明显的外周抗胆碱能作用,可松弛乙酰胆碱所引起痉挛的平滑肌,解除血管(尤其是微血管)痉挛,改善微循环。消旋山莨菪碱滴眼液可选择性拮抗 M_1 胆碱能受体,解除乙酰胆碱所致睫状肌的痉挛,改善眼部微循环,从而减缓近视进展^[1-2]。临床消旋山莨菪碱滴眼液常用于治疗和预防青少年假性近视。滴眼剂一般为多剂量给药形式,在使用过程中无法始终保持无菌,抑菌剂的加入是必要的。现行消旋山莨菪碱滴眼液质量标准为国家食品药品监督管理局标准^[3-4],其中未对抑菌剂进行质量控制,亦未见相关文献报道。为了更好地控制该滴眼液的质量,参考文献[5-7],本研究中建立了高效液相色谱(HPLC)法测定消旋山莨菪碱滴眼液中常用抑菌剂羟苯乙酯、苯扎溴铵含量的方法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);Sartorius BP211D 天平(十万分之一, Mettler Toledo 公司);超纯水仪(Milli-Q)。

1.2 试剂

羟苯乙酯对照品(批号为 100847-201203,含量为 100%, 苯扎溴铵对照品(批号为 135051-201401,含量为 10.9 g/L),均购于中国食品药品检定研究院;消旋山莨菪碱滴眼液(市售),规格均为 0.05%(南京天朗制药有限公司,批号分别为 161005,170603;上海信

谊金朱药业有限公司,批号为 1730703;武汉五景药业有限公司,批号为 17110401);甲醇和三乙胺为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

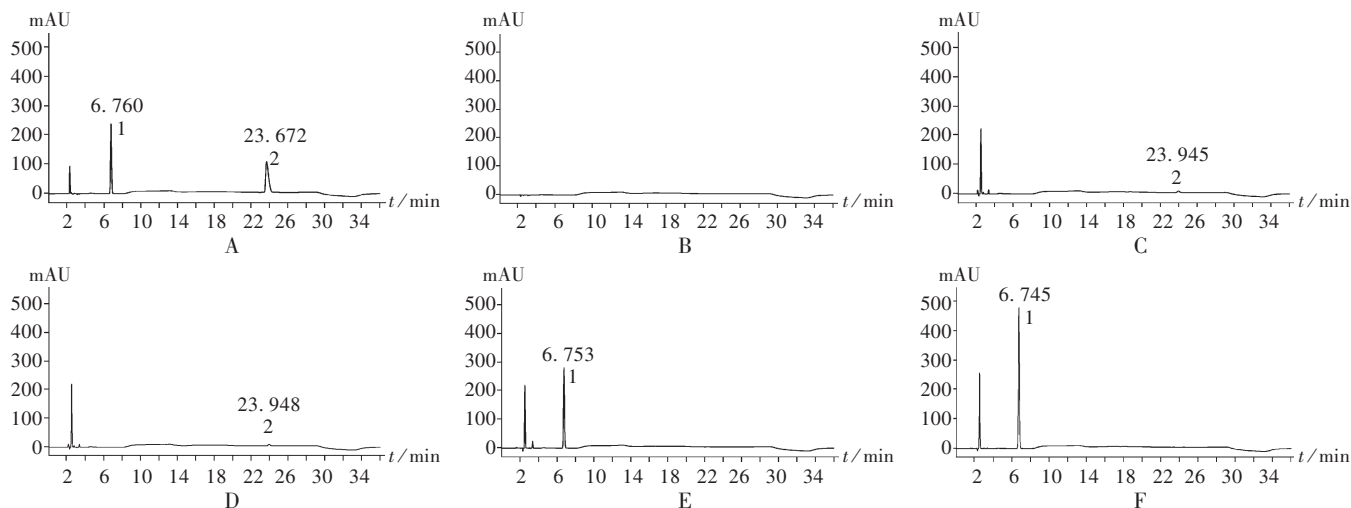
色谱柱:Agilent Zorbax Eclipse Plus C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:1% 三乙胺溶液(用磷酸调 pH 至 3.0, A) – 甲醇(B),梯度洗脱(0 min 时 45% A, 5 min 时 45% A, 10 min 时 30% A, 26 min 时 30% A, 36 min 时 45% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;进样量:10 μ L;柱温:30 $^{\circ}$ C。理论板数以羟苯乙酯峰计不低于 6 000,羟苯乙酯、苯扎溴铵的分离度均大于 1.5。色谱图见图 1。

2.2 溶液制备

分别精密称取羟苯乙酯、苯扎溴铵对照品适量,加流动相溶解并制成质量浓度为 427.20, 2 180.00 μ g/mL 的混合对照品贮备溶液。精密量取上述溶液 5 mL,置 50 mL 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液。精密量取样品 1 mL,置 5 mL 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。按消旋山莨菪碱滴眼液的处方配制不含抑菌剂及主药的样品,即得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系与检测限考察:精密量取 2.2 项下混合对



1. 羟苯乙酯 2. 苯扎溴铵

A. 对照品溶液 B. 阴性对照品溶液 C-F. 供试品溶液 I-IV(批号分别为 151001,160501,1730703,17110401)

图 1 高效液相色谱图

照品贮备溶液 0.25, 0.5, 2.5, 5, 10, 25 mL, 分别置 100 mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 制成 6 个系列质量浓度的对照品溶液, 注入高效液相色谱仪测定, 计算峰面积。以对照品质量浓度为横坐标 (X , $\mu\text{g/mL}$)、峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归。取线性溶液继续稀释, 取信噪比 (S/N) 约为 3 的溶液质量浓度为最低检测限。结果见表 1。

表 1 线性关系及检测限考察结果 ($n=6$)

化合物	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	检测限 ($\mu\text{g/mL}$)
羟苯乙酯	$Y=45.89X-27.14$	0.999 8	1.07 ~ 106.80	0.010
苯扎溴铵	$Y=10.59X-75.97$	0.999 7	5.45 ~ 545.00	0.020

精密密度试验: 精密吸取对照品混合溶液 10 μL , 重复进样 6 次, 按拟订色谱条件测定峰面积。结果羟苯乙酯、苯扎溴铵峰面积的 RSD 分别为 0.53% 和 0.68% ($n=6$), 表明仪器精密密度良好。

稳定性试验: 精密吸取抑菌剂为苯扎溴铵的供试品

溶液 I (批号为 161005)、抑菌剂为羟苯乙酯供试品溶液 III (批号为 1730703), 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时进样 10 μL , 记录色谱图, 以峰面积为指标考察稳定性。结果表明, 羟苯乙酯、苯扎溴铵峰面积的 RSD 分别为 0.7% 和 0.9% ($n=7$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验: 取供试品溶液 I (批号为 161005), 供试品溶液 III (批号为 1730703), 依法制备 6 份供试品溶液, 供试品溶液 I 中苯扎溴铵的平均含量为 0.047 g/L, RSD 为 0.8% ($n=6$); 供试品溶液 III 中羟苯乙酯的平均含量为 0.253 g/L, RSD 为 0.6% ($n=6$)。结果表明方法重复性良好。

加样回收试验: 分别取标示羟苯乙酯为抑菌剂的供试品溶液 III (批号为 1730703) 和标示苯扎溴铵为抑菌剂的供试品溶液 I (批号为 161005) 作为样品, 各 9 份, 按低、中、高浓度水平分别精密加入羟苯乙酯和苯扎溴铵对照品, 按 2.1 项下色谱条件测定, 采用标准曲线法计算羟苯乙酯和苯扎溴铵的含量, 计算回收率。结果见表 2。

表 2 羟苯乙酯、苯扎溴铵加样回收试验结果 ($n=9$)

样品含量 (μg)		加入量 (μg)		测得量 (μg)		回收率 (%)		$\bar{X}$ (%)		RSD (%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
253	47	202	38	450	84	97.52	97.37				
253	47	202	38	452	84	98.51	97.37				
253	47	202	38	451	84	98.02	97.37				
253	47	252	49	503	96	99.21	100.00				
253	47	252	49	504	96	99.60	100.00	99.15	98.07	1.05	1.25
253	47	252	49	502	95	98.81	97.96				
253	47	304	54	556	100	99.67	98.15				
253	47	304	54	558	99	100.33	96.30				
253	47	304	54	559	100	100.66	98.15				

注: A 为羟苯乙酯, B 为苯扎溴铵。下表同。

2.4 样品含量测定

按拟订色谱条件, 依法制备溶液, 对 4 批消旋山莨菪碱滴眼液样品进行测定。结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果

批号	抑菌剂名称	处方量 (g/L)	实际测定量 (g/L)	含量 (%)
161005	B	0.05	0.047	94.00
170603	B	0.05	0.048	96.00
1730703	A	未标注	0.253	-
17110401	A	未标注	0.439	-

3 讨论

检测波长选择: 由 DAD 扫描图可知, 羟苯乙酯在 258 nm 和 200 nm 波长处有最大吸收; 苯扎溴铵在 208 nm 波长附近有最大吸收, 在 210 nm 波长处 2 种抑菌剂均有较大吸收, 其检出限、定量限均能达到定性、定量的要求。故本研究中选择 210 nm 为检测波长。

流动相选择: 参考文献[8-9], 比较了甲醇-磷酸盐缓冲液、甲醇-三乙胺溶液等度洗脱和梯度洗脱, 最终确定甲醇-三乙胺溶液, 并优化梯度洗脱程序。结果表明, 选用甲醇-三乙胺溶液梯度洗脱, 羟苯乙酯和苯扎溴铵的保留时间分别为 6.8 min 和 23.7 min, 出峰时间适宜, 峰形好, 苯扎溴铵峰和羟苯乙酯峰间的分离度符合要求, 辅料无干扰。

抑菌剂的种类和用量分析: 眼用制剂在使用过程中要求保持无菌, 抑菌剂的加入是必要且重要的。查阅市售样品的药品说明书, 处方中的抑菌剂多为羟苯乙酯、苯扎溴铵, 分别属尼泊金类、阳离子表面活性剂, 均为常用眼用制剂抑菌剂。2015 年版《中国药典(二部)》对于眼用制剂明确规定了可加入适宜浓度的抑菌剂, 但不应降低药效或产生局部刺激, 且大部分品种并未规定其含量限度^[10]。收集的市售样品中, 一家生产厂家样品在药品说明书标示了防腐剂苯扎溴铵的处方量为 0.05 g/L, 但