

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.10.017

高效液相色谱法同时测定复方硫酸新霉素滴眼液中3种成分含量

赵 猛, 李 玲

(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 建立同时测定复方硫酸新霉素滴眼液中肌苷、羟苯乙酯和地塞米松磷酸钠含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为Phenomenex Gemini C₁₈柱(150 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248 nm, 柱温为25℃, 进样量为50 μL。结果 肌苷、羟苯乙酯和地塞米松磷酸钠进样量在2.525~7.575 μg、1.055~3.160 μg、2.510~7.535 μg范围内与峰面积线性关系良好($r > 0.999 0$), 精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.0% ($n=6$), 平均加样回收率分别为98.80%, 99.50%, 98.38%, RSD分别为0.74%, 1.46%, 1.23% ($n=6$)。结论 该方法简单、准确、稳定, 可用于同时测定复方硫酸新霉素滴眼液中肌苷、羟苯乙酯和地塞米松磷酸钠3种成分的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 复方硫酸新霉素滴眼液; 肌苷; 羟苯乙酯; 地塞米松磷酸钠; 含量测定

中图分类号: R927.2; R988.1

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)10-0065-03

Simultaneous Determination of Three Constituents in Compound Neomycin Sulfate Eye Drops by HPLC

ZHAO Meng, LI Ling

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

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of inosine, ethylparaben and dexamethasone sodium phosphate in Compound Neomycin Sulfate Eye Drops. **Methods** The chromatographic column was Phenomenex Gemini C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 1% triethylamine (adjusted pH to 3.0 with phosphoric acid) - methanol (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 248 nm, the column temperature was 25℃, and the injection volume was 50 μL. **Results** The linear ranges of inosine, ethylparaben and dexamethasone sodium phosphate were 2.525~7.575 μg, 1.055~3.160 μg and 2.510~7.535 μg ($r > 0.999 0$). RSDs of the precision, stability and repeatability tests were all less than 2.0% ($n=6$), the average recoveries of inosine, ethylparaben and dexamethasone sodium phosphate were 98.80% ($RSD=0.74\%$, $n=6$), 99.50% ($RSD=1.46\%$, $n=6$), 98.38% ($RSD=1.23\%$, $n=6$), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, stable, which can be used for the simultaneous determination of inosine, ethylparaben and dexamethasone sodium phosphate in Compound Neomycin Sulfate Eye Drops.

Key words: HPLC; Compound Neomycin Sulfate Eye Drops; inosine; ethylparaben; dexamethasone sodium phosphate; content determination

复方硫酸新霉素滴眼液的主要适应证为急、慢性结膜炎、角膜炎、巩膜炎、葡萄膜炎、急性巩膜炎、白内障、青光眼、角膜移植术后, 以及眼部机械性损伤或化学烧伤处理等, 主成分包括硫酸新霉素、地塞米松磷酸钠、肌苷等, 处方中还加入了抑菌剂, 以延长药品保质期。其现行质量标准含量测定仅以硫酸新霉素和地塞米松

磷酸钠为指标成分, 且后者的测定方法为异烟肼比色法^[1], 操作较烦琐, 杂质干扰大; 而对于抑菌剂类成分含量的控制, 标准中也未涉及。本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定复方硫酸新霉素滴眼液中肌苷、羟苯乙酯和地塞米松磷酸钠3种成分的含量^[2-5]。现报道如下。

第一作者: 赵猛, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为药品检验, (电子信箱)zhaom202@sina.com。

- 草中挥发性成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(17): 87-90.
- [13] 苏 曼, 陈 军, 高 洁, 等. 生姜炮制成干姜前后挥发油透皮吸收促进作用的比较研究[J]. 中草药, 2019, 50(24): 5988-5994.
- [14] 雷思敏, 夏伯候, 张智敏, 等. 夏枯草种子挥发油 GC-MS 指纹图谱及抗炎活性[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(3): 1466-1471.
- [15] 蒋鹏飞, 罗 强, 施宝珠, 等. 不同酵母发酵葛根酒的抗氧

- 化活性及香气成分分析[J]. 中国食品学报, 2019, 19(8): 230-239.
- [16] 庞 颖, 刘汉伟, 高 峰, 等. 丹七软胶囊脂溶性成分的 GC-MS 指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2018, 29(6): 766-768.
- [17] 牛向伟, 姜莉莉, 周国忠, 等. 活血润肠软胶囊挥发油的提取工艺优化及气相色谱质谱分析[J]. 中国药业, 2020, 29(19): 30-32.

(收稿日期: 2020-10-11; 修回日期: 2021-02-09)

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪,包括 Waters 2998 PDA 检测器和 Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司);BP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司,精度为十万分之一);KH-700DE 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率为 700 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 18080106,18120104,19040113);肌苷对照品(批号为 140669-201606,含量为 98.6%),羟苯乙酯对照品(批号为 100847-201604,含量为 99.9%),地塞米松磷酸酯对照品(批号为 101116-201803,含量为 99.1%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,磷酸、三乙胺为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Gemini C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:1% 三乙胺溶液[用磷酸调 pH 至(3.0 ± 0.05), A] - 甲醇(B),梯度洗脱(0~6 min 时 80% A, 6~8 min 时 80% A → 50% A, 8~30 min 时 50% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:248 nm;柱温:25 °C;进样量:50 μL。

2.2 溶液制备

取肌苷、羟苯乙酯和地塞米松磷酸酯对照品各适量,精密称定,置同一容量瓶中,加流动相制成质量浓度分别为 1 009.7, 417.4, 1 004.4 μg/mL 的混合对照品贮备溶液(地塞米松磷酸酯质量折算为地塞米松磷酸钠质量);精密移取 1.0 mL,置 10 mL 容量瓶中,加流动相定容,摇匀,即得混合对照品溶液。精密量取样品 1 mL,置 10 mL 容量瓶中,加流动相定容,摇匀,即得供试品溶液。按复方硫酸新霉素滴眼液处方和工艺制备缺肌苷、

羟苯乙酯和地塞米松磷酸钠的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2 项下 3 种溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图 1。结果阴性对照品溶液色谱中,在与肌苷、羟苯乙酯和地塞米松磷酸酯对照品溶液色谱相同保留时间处无干扰峰,表明方法专属性良好。

线性关系考察:分别精密量取 2.2 项下混合对照品溶液 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL,置 20 mL 容量瓶中,加流动相定容,摇匀,制成系列混合对照品溶液。精密量取上述系列对照品溶液各 50 μL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以肌苷、羟苯乙酯和地塞米松磷酸钠进样量(X , μg)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_1 = 1.3136 \times 10^5 X_1 - 5.9267 \times 10^4$ ($r_1 = 0.9997$), $Y_2 = 2.2778 \times 10^5 X_2 - 7.2746 \times 10^4$ ($r_2 = 0.9995$), $Y_3 = 7.1603 \times 10^4 X_3 - 7.9715 \times 10^4$ ($r_3 = 0.9995$)。结果表明,肌苷、羟苯乙酯和地塞米松磷酸钠进样量在 2.525~7.575 μg、1.055~3.160 μg、2.510~7.535 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取 2.2 项下混合对照品溶液适量,按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果肌苷、羟苯乙酯和地塞米松磷酸钠峰面积的 RSD 分别为 0.29%, 0.33%, 0.44% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取 2.2 项下供试品溶液适量,分别于室温下放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h,按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果肌苷、羟苯乙酯和地塞米松磷酸钠峰面积的 RSD 分别为 0.57%, 0.46%, 0.42% ($n=6$),表明供试品溶液在室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:精密称取样品(批号为 18080106)1 mL,各 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果肌

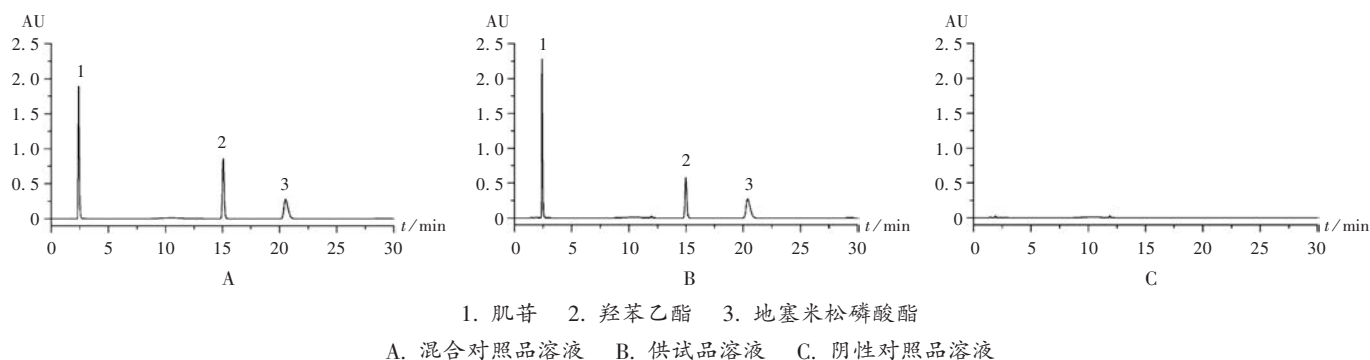


图1 高效液相色谱图

1. inosine 2. ethylparaben 3. dexamethasone sodium phosphate

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果($n=6$)
Tab. 1 Results of the recovery test($n=6$)

样品含量(μg)			加入量(μg)			测得量(μg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
937	283	982	987	298	988	1 910	575	1 968	98.58	97.99	99.80	98.80	99.50	98.38	0.74	1.46	1.23
937	283	982	987	298	988	1 906	585	1 946	98.18	101.34	97.57						
937	283	982	987	298	988	1 925	575	1 956	100.10	97.99	98.58						
937	283	982	987	298	988	1 907	580	1 951	98.28	99.66	98.08						
937	283	982	987	298	988	1 916	584	1 966	99.19	101.01	99.60						
937	283	982	987	298	988	1 909	578	1 937	98.48	98.99	96.66						

注:A为肌苷,B为羟苯乙酯,C为地塞米松磷酸钠。表2同。

Note: A is inosine, B is ethylparaben, C is dexamethasone sodium, as well as Tab. 2.

苷、羟苯乙酯和地塞米松磷酸钠平均含量分别为 937, 283, 982 $\mu\text{g}/\text{mL}$, RSD 分别为 0.68%, 0.94%, 0.51% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取已知含量的样品(批号为 18080106)适量, 共 6 份, 分别加入一定质量浓度的对照品溶液, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算回收率。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

取 3 批样品各适量, 分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.1 项下色谱条件进样测定, 平行测定 3 次, 记录峰面积, 计算样品含量, 并与原标准方法测得的地塞米松磷酸钠含量进行比较。结果见表 2。

表2 样品含量测定结果($\mu\text{g}/\text{mL}$, $n=3$)

Tab. 2 Content determination of three constituents in the samples ($\mu\text{g}/\text{mL}$, $n=3$)

批号	处方量			测得量			原标准方法测定量		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
18080106	1000	未标注	1 000	937	283	982	990		
18120104	1000	未标注	1 000	955	293	991	1 003		
19040113	1000	未标注	1 000	943	287	986	997		

3 讨论

预试验中, 参考文献[6-8], 分别考察了乙腈-水、甲醇-水、甲醇-1%三乙胺溶液为流动相时等度洗脱和梯度洗脱对测定结果的影响。结果表明, 采用甲醇-1%三乙胺溶液梯度洗脱体系, 基线平稳, 各峰出峰时间适宜, 且分离度较好, 因此最终选择甲醇-1%三乙胺溶液作为流动相, 并优化梯度洗脱程序。同时, 考察了检测波长分别为 240, 243, 248, 253 nm 时的色谱图, 结果以 248 nm 为检测波长时,

各峰吸收强度适宜, 分离度好。

眼用制剂中的抑菌剂是导致眼部不良反应的重要因素^[9-10], 长期使用该类眼用制剂可能损害眼部健康, 因此控制眼用制剂中抑菌剂的含量对于减少用药风险具有重要意义。本研究中采用 HPLC 法对地塞米松磷酸钠含量进行测定, 与原标准中异烟肼比色法测定的地塞米松磷酸钠含量相比, 结果准确度相当, 且增加了对肌苷和抑菌剂羟苯乙酯的含量测定, 方法简便, 其他组分干扰小, 精密度、重复性、回收率均良好, 可用于复方硫酸新霉素滴眼液的质量控制。

参考文献

- [1] WS-10001-(HD-0261)-2002. 国家药品标准·化学药品地方标准上升国家标准(第三册)[S].
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 340.
- [3] 陈华锋. HPLC 法测定肌苷氯化钠注射液中肌苷的含量[J]. 海峡药学, 2007, 19(5): 39-40.
- [4] 戴丽娜, 毛睿, 陈泳君. 高效液相色谱法测定消旋山莨菪碱滴眼液中抑菌剂含量[J]. 中国药业, 2018, 27(23): 31-34.
- [5] 刘艳丽, 宋俊骊. HPLC 法测定复方硫酸新霉素滴眼液中地塞米松磷酸钠的含量[J]. 中国药师, 2006, 9(11): 1013-1014.
- [6] 刘栋. 肌苷氯化钠注射液中肌苷含量的两种测定方法比较[J]. 中国药师, 2014, 17(6): 964-966.
- [7] 杨梅, 李欣, 陈红. HPLC 同时测定萘敏维滴眼液中的 9 种抑菌剂[J]. 华西药学杂志, 2017, 32(5): 533-537.
- [8] 张利, 唐双焱. HPLC 法测定肌苷片的含量[J]. 中国药业, 2001, 10(5): 38.
- [9] 王贵明. 眼用制剂中抑菌剂的眼表损害[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(19): 110.
- [10] 周文琛. 眼用制剂中抑菌剂的使用[J]. 药品评价, 2020, 17(1): 26-27.

(收稿日期: 2020-07-25; 修回日期: 2020-12-05)

本栏目由

国药控股云南有限公司

协办