

高效液相色谱法测定新霉素地塞米松滴眼液中苯扎氯铵的含量

顾晓红¹, 顾炳仁¹, 蒋伶俐²

(1. 苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州 215104; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 建立了高效液相色谱法(HPLC)测定新霉素地塞米松滴眼液中苯扎氯铵含量的方法。方法 采用 C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 0.02 mol · L⁻¹ 庚烷磺酸钠溶液[含 0.1% 三乙胺, 用磷酸调节 pH(3.45 ± 0.1)]-乙腈(20:80)为流动相, 检测波长 210 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样体积 20 μL。结果 苯扎氯铵三种同系物在其各自的线性范围内(0.98 ~ 126.08, 0.85 ~ 109.17, 0.77 ~ 98.25 mg · L⁻¹)内呈良好的线性关系。苯扎氯铵的平均加样回收率为 96.53%, RSD 为 1.75%。结论 该方法准确可靠, 操作简单快速, 重复性好, 灵敏度高, 可用于同时测定新霉素地塞米松滴眼液中苯扎氯铵三种同系物的含量, 为其安全性考察提供参考。

关键词:苯扎氯铵; 新霉素地塞米松滴眼液; 高效液相色谱法; 含量测定

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.08.008

The determination of benzalkonium chloride in neomycin dexamethasone eye drops by HPLC

GU Xiaohong¹, GU Bingren¹, JIANG Lingli²

(1. Suzhou Institute for Food and Drug Control, Suzhou, Jiangsu 215104, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of benzalkonium chloride in neomycin dexamethasone eye drops. **Methods** A C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as the stationary phase, with 0.02 mol · L⁻¹ sodium heptane-sulfonate [containing 0.1% trimethylamine and the pH value was adjusted to (3.45 ± 0.1) by phosphoric acid]-acetonitrile (20:80) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the column temperature was 40 °C and the sample volume was 20 μL. Detection wavelength was carried out at 210 nm. **Results** Three homologue benzalkonium chloride in separate its linear range (0.98-126.08, 0.85-109.17, 0.77-98.25 mg · L⁻¹) had good linear relationship. The average sample recovery rate of benzalkonium chloride was

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(四部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 545-546.
- [2] 刘巍, 赵兵, 刘宏民. 盐酸倍他洛尔与 β-环糊精包合物核磁共振研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 566-570, 582.
- [3] 甘永江, 常香玲, 李恒达, 等. 乙基化-β-环糊精绿色合成与结构表征[J]. 化学世界, 2015, 56(12): 713-717.
- [4] 符鑫森, 廖正福, 张健. 荧光光谱法研究 β-环糊精-水溶液在不同离子环境下的微观结构[J]. 广东化工, 2013, 40(8): 27-29.
- [5] 朱庆英, 何佩芝. D-樟脑与 β-环糊精包合物的结构表征[J]. 波谱学杂志, 2015, 32(1): 87-94.
- [6] 李姝静, 周自若, 邓小锋, 等. 环糊精在化妆品领域中的应用研究[J]. 应用化工, 2016, 45(10): 1942-1945.
- [7] 陈建平, 赵玲, 苏健裕, 等. 氟苯尼考-羟丙基-β-环糊精包合物的制备及其结构表征[J]. 应用基础与工程科学学报, 2013, 21(1): 63-70.
- [8] 吴电彩, 汪海斌, 马玲, 等. 参术活血颗粒中挥发油 β-环糊精包合物制备工艺研究[J]. 安徽医药, 2015, 19(3): 435-438.
- [9] 赵美霞, 李洋. L-精氨酸-β-环糊精的合成和结构表征[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2013, 43(4): 402-404.
- [10] 王天怡, 李文静, 王岩, 等. 伏立康唑/羟丙基倍他环糊精包合物的制备及性质考察[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(5): 331-335, 342.
- [11] 朱玉婷, 贺悦, 邱勇. 羟丙基倍他环糊精对氯雷他定的增溶作用[J]. 中国药师, 2015, 18(9): 1519-1522.
- [12] 李红菊, 徐全华, 陈青连, 等. 羟丙基倍他环糊精对注射用炎琥宁稳定性的影响研究[J]. 海峡药学, 2016, 28(6): 12-14.
- [13] 张扬, 周裔彬, 曹胜男, 等. β-和 γ-环糊精与丁酸乙酯包合物的制备及结构表征[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(9): 34-38.
- [14] The United States Pharmacopeial Convention. U. S. Pharmacopeia National Formulary USP38-NF33[S]. Rockville: United States by United Book Press, 2015: 6545.
- [15] Council of Europe. The European Pharmacopeia 8.0[S]. European Pharmacopeia Directorate for the quality of Medicines & Health-care of the Council of Europe, 2013: 1653.

(收稿日期: 2017-02-13, 修回日期: 2017-02-26)

96.53%, with the RSD of 1.75%. **Conclusion** The method is accurate and reliable, and also with good repeatability and high sensitivity. The operation is simple and fast. It can be suitable for the determination of three benzalkonium chloride homologues in neomycin dexamethasone eye drops, and it provides the reference for the security investigation.

Key words: Benzalkonium chloride; Neomycin dexamethasone eye drops; HPLC; Content determination

新霉素地塞米松滴眼液(新地滴眼液)是由硫酸新霉素和地塞米松磷酸钠组成的复方医院制剂,其主要用于治疗人工晶体植入术后及葡萄膜炎病人,其中添加了防腐剂苯扎氯铵来抑制微生物的污染。苯扎氯铵由同系混合物组成,主要成分为十二烷基二甲基苄基氯化铵($n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}$ 同系物)、十四烷基二甲基苄基氯化铵($n\text{-C}_{14}\text{H}_{29}$ 同系物)和十六烷基二甲基苄基氯化铵($n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}$ 同系物)。滴眼液中防腐剂对眼睛的危害越来越受到人们的关注,苯扎氯铵能破坏角膜上皮屏障,引起变态反应性结膜炎及视力减退等^[1]。有研究表明^[2]即使苯扎氯铵的浓度在0.001%以下,长时间使用仍会对眼表产生伤害。本文在参照《中国药典》^[3]和国内外相关文献[4-12]的基础上,采用高效液相色谱法(HPLC)测定苯扎氯铵的含量,对眼药水进行安全性考察,以进一步提高医院制剂新地滴眼液的质量标准。

1 仪器与试药

1.1 主要仪器 SHIMADZU LC-20AD 高效液相色谱仪,包括 SPD-20A 检测器,LC-20AD 泵,CTO-20A 柱温箱和 LC solution 工作站;SHIMADZU UV-2550 型紫外分光光度计;METTLER TOLEDO pH 计;METTLER TOLEDO 电子天平。

1.2 主要试药 $n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}$ 同系物(对照品 I,批号:MK2GD-RM); $n\text{-C}_{14}\text{H}_{29}$ 同系物(对照品 II,批号:Z45OD-AQ); $n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}$ 同系物(对照品 III,批号:JLI2D-BK)[以上3种对照品均购于梯希爱(上海)化成工业发展有限公司];新地滴眼液(批号:20151012、20151116、20151214,苏州大学附属第一医院);庚烷磺酸钠(批号:20121119,国药集团化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,霍尼韦尔公司);三乙胺(批号:20150209,国药集团化学试剂有限公司);磷酸(批号:20120807,国药集团化学试剂有限公司);实验用水为超纯水。

2 方法与结果

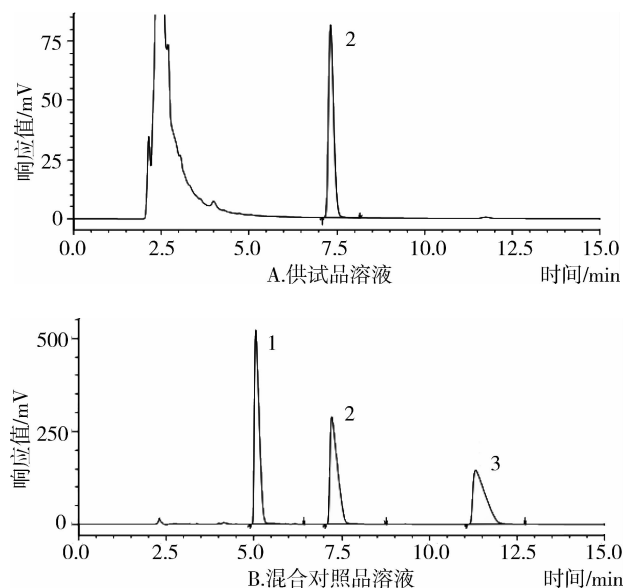
2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品 I 15.13 mg,对照品 II 13.10 mg,对照品 III 11.79 mg,分别置于20 mL容量瓶中。由于3种同系物的溶解度不同,分别用水,水-乙腈(50:50),水-乙腈(80:20)溶解3种对照品并加水稀释至刻度配制成

756.5、655.0、589.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮备液,分别精密移取1 mL置10 mL容量瓶中,加水配制成75.6、65.5、59.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品 I、II、III溶液,再分别移取等量的3种对照品储备溶液混合均匀后成混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取3批新地滴眼液,摇匀,分别精密移取3 mL置10 mL容量瓶中,加水稀释至刻度配制成含苯扎氯铵60 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的供试品溶液。

2.2 色谱条件及系统适用性 色谱柱:Phenomenex Luna C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相 A:0.02 mol · L⁻¹庚烷磺酸钠溶液[含0.1%三乙胺,用磷酸调节 pH(3.45 ± 0.1)],流动相 B:乙腈, A 与 B 的比例为20:80;流速:1.0 mL · min⁻¹;柱温:40 °C;紫外检测波长:210 nm;进样体积:20 μL 。记录3种同系物混合对照品溶液、供试品溶液色谱图,见图1。理论板数按 $n\text{-C}_{14}\text{H}_{29}$ 同系物计算不低于5 000, $n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}$ 同系物、 $n\text{-C}_{14}\text{H}_{29}$ 同系物和 $n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}$ 同系物间分离度均大于10,拖尾因子均小于2.0。



注:1. $n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}$ 同系物,2. $n\text{-C}_{14}\text{H}_{29}$ 同系物,3. $n\text{-C}_{16}\text{H}_{33}$ 同系物。

图1 HPLC图

2.3 线性关系考察 用水将混合对照品溶液依次按倍数稀释,按“2.2”项下方法进样,分别以对照品 I、II、III的浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制

标准曲线,得到的回归方程分别为: $Y = 29\ 091X - 292$, $R^2 = 0.999\ 9$; $Y = 28\ 685X - 19\ 491$, $R^2 = 0.999\ 8$; $Y = 26\ 166X - 78\ 491$, $R^2 = 0.996\ 9$ 。结果表明苯扎氯铵 n-C₁₂H₂₅ 同系物在 0.98 ~ 126.08 mg · L⁻¹, n-C₁₄H₂₉ 同系物在 0.85 ~ 109.17 mg · L⁻¹ 和 n-C₁₆H₃₃ 同系物在 0.77 ~ 98.25 mg · L⁻¹ 线性范围内呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验 取混合对照品溶液连续进样 5 次,对照品 I、II、III 的保留时间 RSD 分别为 0.12%、0.37%、0.39%,峰面积 RSD 分别为 0.11%、0.06%、0.16%,表明仪器的精密度较好。

2.5 重复性试验 取同一批号的供试品溶液平行测定 6 份,记录峰面积,按外标法计算含量,RSD 为 1.53%,表明该方法有良好的重复性。

2.6 稳定性试验 取混合对照品溶液,分别于 0、4、8、12、24 h 进样,对照品 I、II、III 的峰面积 RSD 分别为 0.40%、0.32%、0.26%,表明苯扎氯铵在 24 h 内稳定性良好。

2.7 定量限和检测限 取 3 种对照品溶液定量稀释,按“2.2”项下方法测定,以 S/N = 10 计算, n-C₁₂H₂₅ 同系物、n-C₁₄H₂₉ 同系物和 n-C₁₆H₃₃ 同系物的定量限分别约为 2.62、2.62、15.35 ng,按 S/N = 3 计算,检测限分别约为 0.66、0.66、4.60 ng。

2.8 回收率试验 由于供试品中基本只含有苯扎氯铵 n-C₁₄H₂₉ 同系物,因此仅测定了 n-C₁₄H₂₉ 同系物的加样回收率。精密称取 n-C₁₄H₂₉ 同系物制成三种不同浓度(123.0、142.9、167.8 mg · L⁻¹)的对照品溶液,精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶,再精密移取批号 20151214 的新地滴眼液 1 mL,用水稀释至刻度,各浓度平行 3 份,按“2.2”项下条件测定,结果见表 1,平均回收率为 96.53%,RSD 为 1.75%。

表 1 加样回收实验结果(n=9)

取样量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
152.8	123.0	275.5	99.76	96.53	1.75
152.8	123.0	271.9	96.83		
152.8	123.0	271.5	96.50		
152.8	142.9	289.4	95.59		
152.8	142.9	294.4	99.09		
152.8	142.9	292.8	97.97		
152.8	167.8	312.3	95.05		
152.8	167.8	312.6	95.23		
152.8	167.8	313.9	96.01		

2.9 样品测定 取样品 3 批,照“2.1.2”制备供试品溶液,按“2.2”项下方法平行测定 2 份,以投料量

0.2 g · L⁻¹,按外标法计算 n-C₁₄H₂₉ 同系物的含量,结果见表 2。

表 2 含量测定结果/%

批号	含量	RSD
20151012	75.46	0.88
20151116	74.86	0.11
20151214	74.37	0.05

3 讨论

3.1 波长的选择 苯扎氯铵在 210 nm 处有最大吸收,结果见图 2。

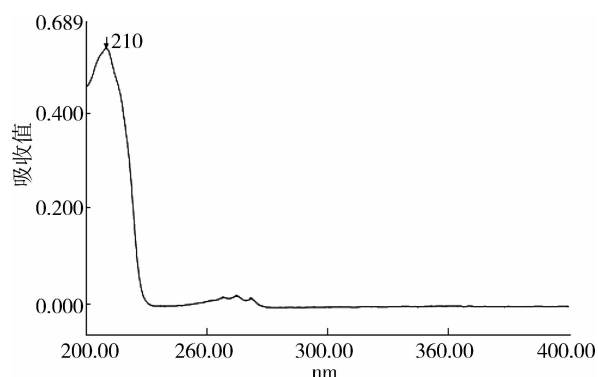


图 2 苯扎氯铵紫外扫描图谱

3.2 色谱柱的选择 根据文献报道^[4],由于滴眼液中成分简单,目前用于测定滴眼液中苯扎氯铵含量的色谱柱大多为反相 C₁₈ 柱,而对于一些成分比较复杂的样品,如化妆品中苯扎氯铵的测定大多采用氰基柱。C₁₈ 柱适用范围广泛,主要用于非极性、弱极性和中等极性的化合物分析。氰基柱既能用于正相色谱,也能用于反相色谱,具有独特的选择性。本试验比较了 C₁₈ 柱和氰基柱,结合色谱柱的日常使用情况和普及程度,选用 C₁₈ 柱。

3.3 离子对试剂的选择 苯扎氯铵是一种阳离子表面活性剂,三种同系物均以阳离子形式存在于溶液中,在反相色谱柱上难以保留,需加入离子对试剂。离子对试剂能使其阴离子基团与苯扎氯铵解离的阳离子结合形成中性核^[5],易于被非极性固定相保留,各同系物的极性随烷基数目的增加而减弱,极性越小越不容易被流动相洗脱,保留时间越长,从而使得各组分分离。测定苯扎氯铵含量通常采用庚烷磺酸钠或醋酸铵为离子对试剂。采用醋酸铵为离子对试剂时,检测器的响应值较低,而采用庚烷磺酸钠时,响应值较高,各组分能够得到很好地分离。

3.4 流动相 pH 的选择 采用离子对色谱分析,流动相需调节到适宜 pH 才能使得测样品完全电离后

与离子对试剂形成中性离子而在固定相上有所保留。苯扎氯铵是中性或弱碱性化合物,为了使弱碱性化合物完全电离,同时考虑到硅胶基质的键合相的 pH 使用范围,流动相的 pH 应在 2~5 之间,最终 pH 选为(3.45±0.10)。另外,在水相中加入 1% 的三乙胺,以改善峰形,防止拖尾现象。

3.5 样品成分分析 熊亚群等^[6]发现 n-C₁₂H₂₅同系物、n-C₁₄H₂₉同系物和 n-C₁₆H₃₃同系物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、白色念珠菌的抑菌效力有较大的差别,总体来说,n-C₁₄H₂₉同系物的抑菌效力比 n-C₁₂H₂₅同系物相对较弱。实验结果表明该 3 批新地滴眼液中苯扎氯铵的成分主要为 n-C₁₄H₂₉同系物,而 n-C₁₂H₂₅同系物和 n-C₁₆H₃₃同系物的量很少,这与文献中报道国内绝大部分市售滴眼液中多含 n-C₁₂H₂₅同系物,少含 n-C₁₄H₂₉同系物和 n-C₁₆H₃₃同系物所不一致^[7],这可能与生产时所投的苯扎氯铵原料药有关。

3.6 样品含量 国内外各大眼用制剂选用苯扎氯铵的浓度范围为 0.005%~0.02%^[8],该滴眼液以最大限度 0.2 g·L⁻¹ 投料。实验结果表明测出的苯扎氯铵含量结果较为准确,3 个批号样品含量的 RSD 相差较小。该 3 批新地滴眼液中苯扎氯铵的含量相差不大,均在投料量的 75% 左右,浓度约为 0.15 g·L⁻¹。实际含量与投料量相差较大的原因可能是苯扎氯铵在生产过程中有损耗,比如制备过程中过滤时有所吸附等,也可能是样品在贮藏过程中苯扎氯铵的含量有所下降。何丹等^[9]测定了国产滴眼液中苯扎氯铵的含量也只为处方量的 49.4%,而进口滴眼液则达到 107.5%。

3.7 问题与展望 本文采用 HPLC 法同时测定新地滴眼液中苯扎氯铵 3 种同系物的含量,经方法学验证表明该方法较为灵敏,重现性好,回收率高,样品处理简单,实验操作方便、快速,出峰时间较短,耗时少,测得的结果较为准确,为进一步提高医院制剂新地滴眼液的质量标准提供了参考依据。同时,此方法具有通用性,也可用于测定其他滴眼液中苯扎氯铵的含量^[10]。

美国药典(USP 38)^[11]规定了苯扎氯铵中 n-C₁₂H₂₅同系物和 n-C₁₄H₂₉同系物两者总含量不得少于 70%,前者含量不得少于 40%,后者含量不得少于 20%,而《中国药典》2015 年版二部^[3]定义苯扎氯铵的平均分子式为 C₂₂H₄₀ClN,并未规定苯扎氯铵烷基的组成成分,含量测定项下仅用滴定法测定烷基总量。文献^[6]表明国内外苯扎氯铵的质量存在较大差异,其比较了苯扎氯铵国产样品与进口

样品中的烷基组成,发现国产样品中只含有 n-C₁₂H₂₅同系物,不合格率为 100%,进口样品的合格率为 50%。因此,建议我国药典可以参照美国药典规定苯扎氯铵烷基的组成成分,采用 HPLC 法测定其各同系物含量,以进一步提高苯扎氯铵原料的质量标准。

滴眼液中防腐剂对眼部的损害已引起人们的重视,因此,药品标准中防腐剂含量的规定是非常有必要的。为了确保滴眼液使用更加安全有效,一方面,我们要控制产品的质量,保证防腐剂在一个最低而又有效的安全浓度范围内;另一方面,我们也要努力寻找和发现对人眼无害的或损害更低的新型防腐剂。目前,市场上也有不少不含防腐剂的滴眼液,而这类滴眼液中的主要成分本身就具有很强的抑菌杀菌作用,王海燕^[12]证明了磺胺醋酰钠滴眼液和氧氟沙星滴眼液在不添加防腐剂的条件下也能达到很好的抑菌效果,因此,开发无防腐剂滴眼液是一条可行的途径,对眼用制剂的研究与发展具有重要意义。

参考文献

- [1] 李宁,陈松杰,陈彦纯,等. 聚季铵盐-1 和苯扎氯铵在眼用制剂中的应用研究进展[J]. 今日药学,2015,25(2):140-143.
- [2] CHA SH, LEE JS, OUM BS, et al. Comeal epithelial cellularity function from benzalkonium chloride (BAC) in vitro [J]. Clinical and Experiment Ophthalmology, 2004, 32(2):180-183.
- [3] 国家药典委员会. 中国药典(二部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:514,604.
- [4] 张鹏祥,曹蕊,高晓霞,等. 高效液相色谱法测定化妆品中苯扎氯铵[J]. 日用化学工业,2012,42(3):230-233.
- [5] 叶妙华. 苯扎氯铵两种 HPLC 方法的比较与选择[J]. 亚太传统医药,2010,6(6):23-25.
- [6] 熊亚群,刘雁鸣,龙海燕,等. 国内外苯扎氯铵质量差异的研究[J]. 中国药师,2016,19(4):808-811.
- [7] 吴建敏,熊婧,黄海伟,等. 浅谈 HPLC 法测定苯扎氯铵含量的计算方法[J]. 中国药品标准,2013,14(2):88-89.
- [8] 陈曦,刘美欣. 眼用制剂中防腐剂的研究应用进展[J]. 天津药学,2013,25(5):54-59.
- [9] 何丹,杨林. HPLC 法测定复方托吡卡胺滴眼液中苯扎氯铵的含量[J]. 激光杂志,2013,34(5):105-106.
- [10] 肖学成,李丹,李金,等. 羧基维滴眼液中苯扎氯铵的含量测定[J]. 医药导报,2013,32(10):1358-1360.
- [11] The United States Pharmacopeial Convention. U. S. Pharmacopeia-National Formulary (Volume 4) [S]. Rockville: United States by United Book Press, 2015:6538.
- [12] 王海燕. 两种无防腐剂滴眼液的研究[J]. 医药世界,2007(2):50-51.

(收稿日期:2016-12-06,修回日期:2017-02-06)