

# HPLC法同时测定盐酸林可霉素滴眼液中有关物质和防腐剂含量

张菁<sup>1\*</sup>,常 旸<sup>2</sup>,朱建平<sup>1</sup>,常俊山<sup>1</sup>(1.河北省食品药品检验院,石家庄 050011;2.河北医科大学第四医院,石家庄 050011)

中图分类号 R927.2;R978.1\*5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)45-4298-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.45.27

**摘要** 目的:建立同时测定盐酸林可霉素滴眼液中有关物质和防腐剂(苯扎溴铵、羟苯乙酯、苯甲酸钠、硫柳汞钠)含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Phenomenex Luna C<sub>18</sub>,流动相为磷酸缓冲液(pH 6.1)-甲醇-乙腈(77:8:15),流速为1.0 ml/min,检测波长为210 nm,柱温为50 ℃。结果:林可霉素、苯扎溴铵、羟苯乙酯、苯甲酸钠、硫柳汞钠在各自的检测质量浓度范围内线性关系良好, $r$ 为0.999 9~1.000 0,检测限分别为1.05、1.5、2.5、1.2、1 ng;4种防腐剂的平均回收率为99.3%~101.2%(RSD≤1.1%, $n=9$ )。结论:本文建立的方法结果准确可靠,可作为盐酸林可霉素滴眼液中有关物质和防腐剂的控制方法。

**关键词** 盐酸林可霉素滴眼液;有关物质;防腐剂;质量控制

## Content Determination of Related Substances and Antiseptic in Lincomycin Hydrochloride Eye Drops by HPLC

ZHANG Jing<sup>1</sup>, CHANG Yang<sup>2</sup>, ZHU Jian-ping<sup>1</sup>, CHANG Jun-shan<sup>1</sup>(1.Hebei Institute for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050011, China; 2.Hebei Medical University Fourth Hospital, Shijiazhuang 050011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for content determination of related substances and antiseptic (benzalkonium bromide, ethylparaben, sodium benzoate, merthiolate) in Lincomycin hydrochloride eye drops. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Phenomenex Luna C<sub>18</sub> column with phosphoric acid buffer (pH 6.1)-methanol-acetonitrile (77:8:15) as mobile phase at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 210 nm and column temperature was 50 ℃. RESULTS: The calibration curves of lincomycin, benzalkonium bromide, ethylparaben, sodium benzoate, merthiolate revealed good linearity ( $r=0.999\ 9-1.000\ 0$ ). The detection limits were 1.05, 1.5, 2.5, 1.2 and 1 ng. Average recoveries of 4 kinds of antiseptic were 99.3%-101.2% (RSD≤1.1%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: Result of determination is accurate and reliable. This method is suitable for quality control of related substances and antiseptic in Lincomycin hydrochloride eye drops.

**KEY WORDS** Lincomycin hydrochloride eye drops; Related substances; Antiseptic; Quality control

盐酸林可霉素对革兰阳性菌有较强抑菌作用,对敏感需氧菌,如肺炎链球菌和其他链球菌属、金黄色葡萄球菌以及厌氧菌尤为有效<sup>[1]</sup>。其滴眼液主要用于治疗敏感菌株引起的结膜炎和角膜炎。研究证实<sup>[2-4]</sup>,林可霉素在发酵过程中伴生的有关物质以及过量酸性条件下产生的降解产物有7个,而且菌种不同导致杂质种类及含量也有所不同,故其对临床应用的潜在风险不一。笔者根据林可霉素杂质的化学性质,建立了测定杂质含量的高效液相色谱(HPLC)法,结果表明建立的色谱条件可有效检出杂质,且各峰分离良好。

由于防腐剂本身具有的毒性越来越受到人们重视,为了控制滴眼剂辅料中的防腐剂种类和含量,笔者收集了5个生产企业滴眼液处方工艺,考察了加入的防腐剂的种类和加入量。结果发现,盐酸林可霉素滴眼液中的防腐剂种类有4种,为控制滴眼液质量,笔者采用同一色谱条件,同时对该滴眼液中有防腐剂的含量也进行了测定,结果表明,方法简便、准确、快速。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1260 HPLC仪(美国Agilent公司);LC-20AT型HPLC仪(日本岛津公司)。

### 1.2 药品、辅料与试剂

\*主任药师。研究方向:药物分析。电话:0311-85212008-8089。  
E-mail:jingz0326@sohu.com

羟苯乙酯对照品(批号:100847-201102,纯度:99.9%)、林可霉素对照品(批号:130432-200908,纯度:86.7%)均来源于中国食品药品检定研究院;辅料硫柳汞钠(厂家①,湖北潜江制药股份有限公司,批号:120425,含量:81.3%);辅料苯甲酸钠(厂家②,重庆科瑞制药有限责任公司,批号:120634,含量:99.6%);苯扎溴铵工作用对照品(河北省食品药品检验院标定,批号:K1102001,纯度:94.1%);2.5%林可霉素滴眼液(厂家①,批号:110411、110401、101004;厂家②,批号:421001、421002、411008;厂家③,上海信谊药业有限公司,批号:20101102、20110101、20090501;厂家④,武汉五景药业有限公司,批号:09110702、11040702、11010801;厂家⑤,上海运佳黄埔药业有限公司,批号:110801);乙腈和甲醇均为色谱纯;磷酸为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 盐酸林可霉素滴眼液中所加防腐剂的种类与加入量

盐酸林可霉素滴眼液中所加防腐剂的种类与加入量详见表1。

### 2.2 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱:Phenomenex Luna C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);以磷酸缓冲液(取34 g磷酸溶于900 ml水,用浓氨水调节pH至6.1,加水稀释至1 000 ml)-甲醇-乙腈(77:8:15, V/V/V)为流动相,流速:1.0 ml/min;柱温:50 ℃;二极管阵列检测器(DAD),检测波长:210 nm;进样量:10 μl。

取林可霉素对照品40.12 mg,置于10 ml量瓶中,加流动

表1 盐酸林可霉素滴眼液中所加防腐剂的种类与加入量  
Tab 1 Kinds and content of antiseptic in Lincomycin hydrochloride eye drops

厂家	防腐剂	防腐剂加入量,mg/ml
①	硫柳汞钠	0.2
②	苯甲酸钠	8.0
③	羟苯乙酯	0.25
④	硫柳汞钠	0.02
⑤	苯扎溴铵	0.1

相溶解并稀释至刻度。取10 μl注入色谱仪,记录色谱图。结果林可霉素峰与杂质A(相对保留时间约为0.72)色谱峰的分度度应大于5.0。色谱图见图1。

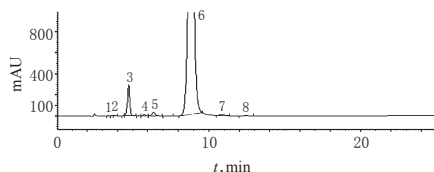


图1 林可霉素对照品高效液相色谱图

1. N-去甲基林可霉素; 2, 5. 未知杂质; 3. 林可霉素B; 4. α-酰胺基差异构体  
林可霉素(杂质A); 6. 林可霉素; 7, 8. 丙烯基类似物和Z异构体

Fig 1 HPLC chromatograms of lincomycin hydrochloride control

1. N-normethyl lincomycin; 2, 5. unknown impurity; 3. lincomycin B; 4. α-amide epimer lincomycin (impurity A); 6. lincomycin; 7, 8. propenyl analogue and Z isomers

### 2.3 溶液制备及供试品溶液色谱图

取本品适量,加流动相定量稀释制成质量浓度为1.0 mg/ml的溶液,作为供试品溶液;取供试品溶液1 ml,置于100 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,作为有关物质对照溶液;样品中如含防腐剂,取苯扎溴铵、羟苯乙酯、苯甲酸钠、硫柳汞钠对照品适量,加流动相分别制成每1 ml中含0.1、0.25、0.04、0.01 mg的溶液。取厂家①、②、③、⑤各1批供试品测定,结果在上述色谱条件下,林可霉素各杂质峰分度度、各杂质峰与各防腐剂峰分度度均符合规定。各厂家供试品溶液色谱图见图2。

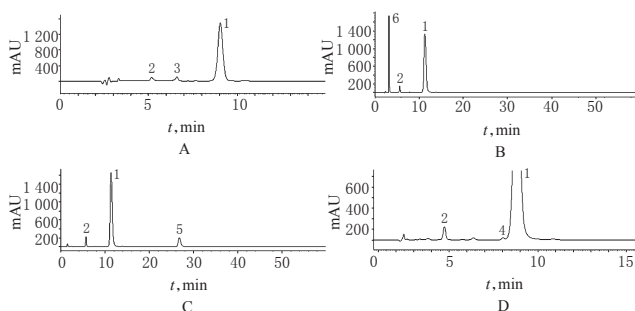


图2 供试品溶液高效液相色谱图

A. 样品①(批号:110411); B. 样品②(批号:421001); C. 样品③(批号:20101102); D. 样品⑤(批号:110801); 1. 林可霉素; 2. 林可霉素B; 3. 硫柳汞钠; 4. 苯扎溴铵; 5. 羟苯乙酯; 6. 苯甲酸钠

Fig 2 HPLC chromatograms of test samples

A. sample ① (lot No. 110411); B. sample ② (lot No. 421001); C. sample ③ (lot No. 20101102); D. sample ⑤ (lot No. 110801); 1. lincomycin; 2. lincomycin B; 3. thiomersal sodium; 4. benzalkonium branide; 5. ethylparaben; 6. sodium benzoate

### 2.4 有关物质检查方法学验证

2.4.1 专属性试验。取样品(批号:110801)5份,分别置于适

当容器中,分别经碱(5 mol/L的氢氧化钠溶液2 ml,在100 ℃水浴中加热40 min)、酸(5 mol/L的盐酸溶液2 ml,在100 ℃水浴中加热15 min)、氧化(10%过氧化氢溶液5 ml,放置10 min)、光照(4 000 lx放置48 h)、高温(100 ℃水浴中加热40 min)进行破坏。同时为了考察辅料对试验的干扰,取滴眼液中辅料氯化钠、95%乙醇、三乙醇胺、玻璃酸钠、硼砂按各厂家最大处方量混合后取适量,加流动相溶解,摇匀,制备辅料溶液。分别精密量取上述溶液10 μl注入色谱仪,记录色谱图。结果相对保留时间约在0.27以前的色谱峰为辅料峰;本品经酸、碱、高温、氧化、光照等破坏,所产生的降解物与林可霉素峰均能完全分离,表明本方法专属性好,能够满足有关物质的测定要求。色谱图见图3。

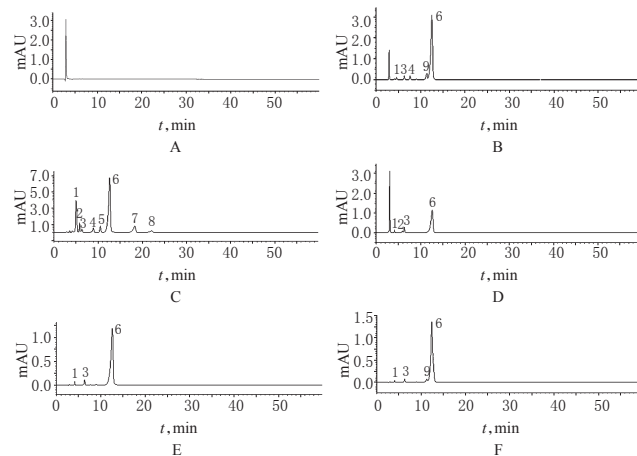


图3 专属性试验高效液相色谱图

A. 辅料; B. 碱破坏样品; C. 酸破坏样品; D. 氧化破坏样品; E. 光照破坏样品; F. 高温破坏样品; 1~2, 4~5, 7~8. 有关物质; 3. 林可霉素B; 6. 林可霉素; 9. 苯扎溴铵

Fig 3 HPLC chromatograms of specificity test

A. excipients; B. samples destroyed by alkaline; C. samples destroyed by acid; D. samples destroyed by oxidation; E. samples destroyed by light; F. samples destroyed by high temperature; 1-2, 4-5, 7-8. related substances; 3. lincomycin B; 6. lincomycin; 9. benzalkonium branide

2.4.2 耐用性考察。选用Phenomenex Luna、Waters Xterra、Shimadzu、Kromasil、大连依利特SinoChrom等5种不同品牌色谱柱进行分析,结果杂质均能有效分离。另对流动相中缓冲液的pH值和柱温进行调整,结果pH值为5.5~6.1、柱温为40~60 ℃时,杂质均能有效分离,表明该方法耐用性较好。但pH值低于6.0或柱温低于40 ℃时,林可霉素峰稍有前延。

2.4.3 线性关系与检测限试验。取对照品溶液(24.68、123.42、246.85、296.22、370.28 μg/ml)进行线性关系试验,结果线性方程为 $y(\text{峰面积})=4.19c(\text{质量浓度})-26.62(r=1.0000)$ ,林可霉素检测质量浓度线性范围为24.68~370.28 μg/ml( $n=5$ )。另取对照品溶液逐级稀释进样,按信噪比为3计,确定林可霉素检测限为1.05 ng。

2.4.4 稳定性试验。取供试品溶液(批号:110411),室温放置0、2、4、8、10 h,结果各杂质和杂质总量均无明显变化,最大单个杂质峰面积的RSD=1.2% ( $n=5$ ),杂质质量总峰面积的RSD=1.1% ( $n=5$ ),表明供试品溶液在室温放置10 h内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验。取同一批号样品(批号:110411)6份,分别进样10 μl,测得样品中单个最大杂质含量的平均值为0.23%, RSD=1.1% ( $n=6$ );杂质总含量的平均值为0.76%,

RSD=1.5% (n=6),表明本方法的重复性较好。

## 2.5 防腐剂含量测定方法学考察

2.5.1 线性关系试验。分别称取苯扎溴铵、羟苯乙酯、苯甲酸钠、硫柳汞钠适量,加水溶解并稀释制成0.539 2、1.249 0、0.019 94、0.039 96 mg/ml的溶液,分别取1.0、1.6、2.0、3.0、4.0 ml,置于10 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀;精密量取10  $\mu$ l,注入色谱仪,记录色谱图。以质量浓度(c)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线。得回归方程分别为苯扎溴铵: $A=2\ 241c+7.013$ ( $r=0.999\ 9$ );羟苯乙酯: $A=54\ 870c+74.71$ ( $r=1.000\ 0$ );苯甲酸钠: $A=30\ 655c+6.036$ ( $r=1.000\ 0$ );硫柳汞钠: $A=446\ 496\ 117c-703\ 286$ ( $r=0.999\ 9$ )。结果表明,苯扎溴铵、羟苯乙酯、苯甲酸钠、硫柳汞钠检测质量浓度线性范围分别为0.053 9~0.215 7、0.124 9~0.499 5、0.001 99~0.007 98、0.003 99~0.015 98 mg/ml。

2.5.2 精密度试验。分别取苯扎溴铵、羟苯乙酯、苯甲酸钠、硫柳汞钠对照品溶液,连续进样6次记录色谱图,计算峰面积的RSD分别为1.0%、0.5%、0.6%、0.9% (n=6)。

2.5.3 重复性试验。分别取样品(批号:110801、20101102、421001、110411)各1批,测定苯扎溴铵、羟苯乙酯、苯甲酸钠、硫柳汞钠的含量,重复测定6次,计算RSD。结果含量的RSD分别为0.9%、0.9%、0.9%、0.8% (n=6)。

2.5.4 稳定性试验。分别取苯扎溴铵、羟苯乙酯、苯甲酸钠、硫柳汞钠对照品溶液,在室温下放置,于0、2、4、8、10 h时测定。结果峰面积的RSD分别为1.1%、0.9%、0.7%、1.2% (n=5),表明溶液在10 h内稳定。

2.5.5 回收率试验。分别取“2.5.3”项下样品各9份,分别加入近等量的对照品,制成相当于防腐剂质量浓度80%、100%、120%的溶液,测定其含量,计算回收率。结果低、中、高质量浓度的苯扎溴铵、羟苯乙酯、苯甲酸钠、硫柳汞钠平均回收率分别为100.4%、99.3%、101.2%、99.8%,RSD分别为1.1%、1.1%、0.9%、0.7% (n=9)。

2.5.6 检测限试验。分别取苯扎溴铵、羟苯乙酯、苯甲酸钠、硫柳汞钠对照品溶液,逐级稀释进样,按信噪比为3计,确定其检测限分别为1.5、2.5、1.2、1 ng。

## 2.6 样品中有关物质和防腐剂的含量测定

收集不同企业的13批样品,按“2.2”项下方法制备供试品溶液和对照溶液,进样,记录色谱图。采用自身对照法对有关物质进行测定,采用外标法对防腐剂进行测定,结果见表2。

表2 样品中有关物质和防腐剂测定结果 (%)

Tab 2 Content determination of related substances and anti-septic in samples (%)

厂家	批号	杂质A	其他单一杂质	其他杂质总量	苯甲酸钠	苯扎溴铵	羟苯乙酯	硫柳汞钠
①	110411	0.41	0.23	1.65				55.9
	110401	0.41	0.23	1.62				40.9
	101004	0.21	0.27	1.41				65.3
③	20101102	0.24	0.26	0.77			85.4	
	20110101	0.24	0.26	0.77			84.3	
	20090501	0.25	0.27	0.87			76.3	
④	09110702	0.20	0.32	1.11				52.9
	11040702	0.44	0.31	1.14				50.7
	11010801	0.35	0.27	0.99				48.6
②	421001	0.22	0.28	0.69	97.1			
	421002	0.21	0.27	0.70	93.8			
	411008	0.22	0.27	0.72	98.6			
⑤	110801	0.32	0.18	0.78		134.1		

由表2可知,盐酸林可霉素滴眼液中主要杂质为杂质A(相对保留时间约为0.72),测得量为0.20%~0.44%;其他单一杂质测得量为0.18%~0.32%,杂质总量为0.69%~1.65%。参照2010年版《中国药典》原料及制剂标准<sup>[8]</sup>,制订滴眼液有关物质限度为“除辅料峰(相对保留时间在0.27以前的色谱峰)、林可霉素B、苯甲酸钠、苯扎溴铵、羟苯乙酯、硫柳汞钠峰外,单一杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积(1.0%),各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的2倍(2.0%)”。按建立的方法对苯扎溴铵、羟苯乙酯、苯甲酸钠、硫柳汞钠进行测定,结果基本符合各企业的处方比例。

## 3 讨论

### 3.1 现行标准中存在的问题

盐酸林可霉素滴眼液执行标准为化学药品地方标准上升国家标准第五册“WS-10001-(HD-0462)-2002”<sup>[5]</sup>及YBH03092007<sup>[6]</sup>、YBH08622008<sup>[7]</sup>,各标准均未对有关物质进行控制,因此有必要建立控制有关物质的方法。

《中国药典》要求控制防腐剂的种类和含量。为了操作简便,笔者建立了相同色谱条件下测定含量、有关物质及防腐剂苯扎溴铵、羟苯乙酯、苯甲酸钠、硫柳汞钠的方法。

### 3.2 检测波长的选择

《中国药典》2010年版盐酸林可霉素原料药检测波长为214 nm<sup>[8]</sup>。笔者利用DAD的全波长扫描,在210~300 nm波长内进行紫外扫描,并选取不同波长对林可霉素的主要杂质的HPLC的色谱图进行比较。为了保证最大量的检出杂质,最终选择210 nm为检测波长,在此波长处色谱峰信息较多,且各峰分离良好,防腐剂的响应值也较大。

### 3.3 流动相的选择

现行标准<sup>[8]</sup>所使用流动相是在0.05 mol/L硼砂溶液中加入60%甲醇。由于硼砂溶液与甲醇混合时,会产生大量热量,致使流动相产生气泡,进而导致检测系统不稳定,而且会出现林可霉素主峰前延的情况。经试验,笔者最终确定了本试验的流动相。结果表明可在保证各有关物质分离的情况下,主峰峰形较为对称,并且防腐剂峰不影响有关物质测定。

## 参考文献

- [1] 彭司勋,赵守训,廖清江,等.药物化学进展[M].北京:化学工业出版社,2004:56-59.
- [2] Aecoudelis AD, Fox JA, Mason DJ. Studies on the biosynthesis of lincomycin. II. antibiotic U-11, 973, N-demethyl lincomycin[J]. *Biochemistry*, 1965, 4: 710.
- [3] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Lincomycin hydrochloride[J]. *Pharmeuropa*, 2008, 20(1): 54.
- [4] Argoudelis AD, Fox JA, Eble TE. U-21, 669: a new lincomycin-related antibiotic[J]. *Biochemistry*, 1965, 4: 698.
- [5] 国家药典委员会.化学药品地方标准上升国家标准:第五册[S].北京:化学工业出版社,2002:213.
- [6] 国家食品药品监督管理局.YBH03092007 盐酸林可霉素滴眼液[S].2007-03-20.
- [7] 国家食品药品监督管理局.YBH08622008 盐酸林可霉素滴眼液[S].2008-08-10.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:727-728、附录199-201.

(收稿日期:2013-01-30 修回日期:2013-04-11)