

HPLC 法同时测定马来酸噻吗洛尔滴眼液中噻吗洛尔和羟苯乙酯的含量

谷亦平¹, 杨园¹, 李霜霜², 李苗^{1*}

(1. 武汉药品医疗器械检验所, 武汉 430075; 2. 湖北科技学院药学院, 咸宁 437100)

摘要 目的: 建立同时测定马来酸噻吗洛尔滴眼液中噻吗洛尔和羟苯乙酯含量的 HPLC 法。**方法:** 采用 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以乙腈 (B) - 0.1% 磷酸溶液 (A) (1 000 mL, 加三乙胺 1 mL, 用氢氧化钠试液调节 pH 至 3.9) 为流动相, 梯度洗脱 (0~5 min, 78%A; 5~5.2 min, 78%A → 55%A; 5.2~10 min, 55%A; 10~11 min, 55%A → 78%A; 11~13 min, 78%A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 275 nm, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL。**结果:** 噻吗洛尔和羟苯乙酯质量浓度分别在 6.07~505.99 μg · mL⁻¹ ($r=1.000$) 和 0.37~30.68 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$) 范围内呈良好的线性关系, 平均回收率 ($n=9$) 分别为 99.8% (RSD=0.8% 和 99.8% (RSD=0.9%)。7 批样品中噻吗洛尔的含量分别为 102.7%、100.4%、99.8%、100.4%、104.1%、98.9% 和 94.2%, 羟苯乙酯的含量分别为 0.283、0.286、0.291、0.291、0.434、0.137 和 0.270 mg · mL⁻¹。**结论:** 该方法经方法学验证, 可用于马来酸噻吗洛尔滴眼液的质量控制。

关键词: 马来酸噻吗洛尔; 肾上腺素受体阻滞药; 无菌制剂; 眼用制剂; 抑菌剂; 噻吗洛尔; 羟苯乙酯; 含量测定; 高效液相色谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 01-0125-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.01.16

Simultaneous determination of timolol and ethylparaben in timolol maleate eye drops by HPLC

GU Yi-ping¹, YANG Yuan¹, LI Shuang-shuang², LI Miao^{1*}

(1. Wuhan Institute For Drug and Medical Device Control, Wuhan 430075, China;

2. School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for simultaneous determination of timolol and ethylparaben in timolol maleate eye drops. **Method:** The analysis was performed on a C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with a mobile phase consisting of acetonitrile (B) - 0.1% phosphoric acid solution (A) (1 mL triethylamine per 1 000 mL, pH was adjusted to 3.9 with used sodium hydroxide solution) using gradient elution (0~5 min, 78%A; 5~5.2 min, 78%A → 55%A; 5.2~10 min, 55%A; 10~11 min, 55%A → 78%A; 11~13 min, 78%A) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 275 nm, and the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 20 μL. **Results:** The linear range of timolol and ethylparaben were 6.07~505.99 μg · mL⁻¹ ($r=1.000$) and 0.37~30.68 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$), respectively. The average recoveries ($n=9$) were 99.8% (RSD=0.8%) and 99.8%

* 通信作者 Tel: (027) 65395468; E-mail: 18696154788@163.com

第一作者 Tel: 13995556159; E-mail: 13995556159@163.com

(RSD=0.9%), respectively. In seven batches of samples, the content of timolol were 102.7%, 100.4%, 99.8%, 100.4%, 104.1%, 98.9% and 94.2%, the content of ethylparaben were 0.283, 0.286, 0.291, 0.291, 0.434, 0.137 and 0.270 mg·mL⁻¹. **Conclusion:** The established method is proved by methodology validation that it can be applied to the quality control of timolol maleate eye drops.

Keywords: timolol maleate; adrenaline receptor blockers; sterile preparations; eye-drops preparations; bacteriostatic agent; timolol; ethylparaben; content determination; HPLC

中国药典 2015 年版定义眼用制剂是直接用于眼部发挥治疗作用的无菌制剂^{[1]8}。眼用制剂中主药成分本身不具有充分的抗菌效力,添加适宜的抑菌剂,可防止眼用制剂在正常贮藏和使用过程中,由于微生物污染和繁殖,使药物变质而对使用者造成危害^{[1]151}。但所有的抑菌剂都具有一定的毒性^{[1]151, [2-4]},眼用制剂中抑菌剂的加入量应加以控制,不可过量添加。目前,国内眼用制剂中只有少数几个滴眼液,例如硫酸新霉素滴眼液、氯霉素滴眼液、诺氟沙星滴眼液等的质量标准中对抑菌剂含量进行控制和测定。

马来酸噻吗洛尔滴眼液是 β 肾上腺素受体阻滞药,对原发性开角型青光眼具有良好的降低眼内压的治疗效果。对无晶性青光眼、某些继发性青光眼、高眼压症以及其他药物及手术无效的青光眼,使用本品滴眼可进一步增强降压效果。临床也用于高血压症。

中国药典 2015 年版未对马来酸噻吗洛尔滴眼液中抑菌剂质量进行控制。噻吗洛尔的含量采用紫外-可见分光光度法测定。文献报道中,噻吗洛尔^[6-8]和羟苯乙酯^{[1]569, [9-10]}的含量测定分别有一定研究,但目前没有同时测定噻吗洛尔和羟苯乙酯含量的方法。本文采用 HPLC 法同时测定滴眼液中噻吗洛尔和羟苯乙酯的含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent Technologies 1260 高效液相色谱仪,二极管阵列检测器(1260DAD);色谱柱:Agilent ZORBAX SB C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m; 单官能团硅烷,具有较大的二异丁基侧链基团);METTLER TOLEDO XS105 天平,梅特勒公司 METTLER AE-200 电子天平;ELGA 公司 CLXXXUVM2 纯水机;武汉嘉鹏电子有限公司 JPCQ1028 全数字超声波发生器。

1.2 试剂

对照品:马来酸噻吗洛尔, Timolol Maleate 14823:006, 99.8%; 羟苯乙酯, 中国食品药品检定研究院,

批号 100847-200501。马来酸噻吗洛尔滴眼液:批号 15040101、15100101、15120101、15120102,规格 5 mL:25 mg(以噻吗洛尔计),武汉五景药业有限公司;批号 1507113102,规格 5 mL:25 mg(以噻吗洛尔计),辰欣药业股份有限公司;批号 140801,规格 5 mL:12.5 mg,湖北潜江制药股份有限公司;批号 151002,规格 5 mL:12.5 mg,湖北远大天天明制药有限公司。马来酸为化学纯,成都科龙化工试剂厂。乙腈为色谱纯,磷酸、三乙胺为分析纯。

2 方法与结果

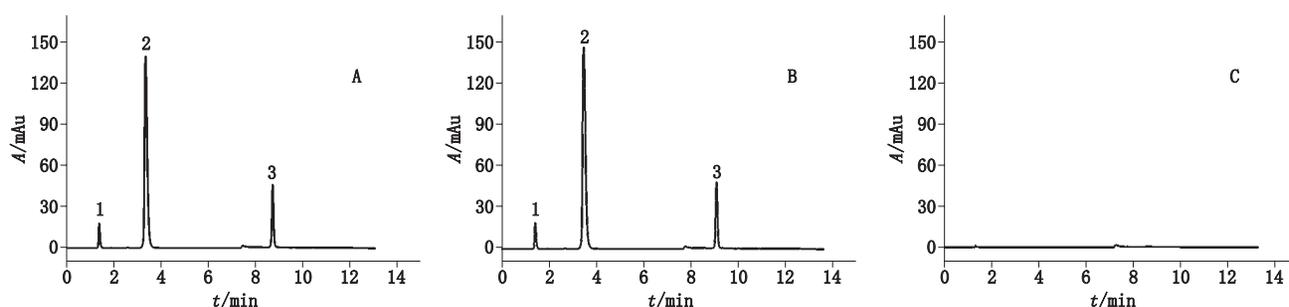
2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 取马来酸噻吗洛尔(以噻吗洛尔计)和羟苯乙酯对照品适量,精密称定,置量瓶中,加溶剂[乙腈-磷酸盐缓冲液(5:5)]制成每 1 mL 含噻吗洛尔 5 mg 和羟苯乙酯 0.3 mg 的溶液,作为混合对照品储备液;精密量取对照品储备液 2 mL,置 100 mL 量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含噻吗洛尔 100 μ g 和羟苯乙酯 6 μ g 的混合溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液 精密量取马来酸噻吗洛尔滴眼液 2 mL,置 100 mL 量瓶中(规格 5 mL:25 mg)或 50 mL 量瓶中(规格 5 mL:12.5 mg),用溶剂稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2 色谱条件

色谱柱:ZORBAX SB C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(B)-0.1% 磷酸溶液(A)(1 000 mL,加三乙胺 1 mL,用氢氧化钠试液调节 pH 至 3.9),梯度洗脱(0~5 min, 78%A; 5~5.2 min, 78%A → 55%A; 5.2~10 min, 55%A; 10~11 min, 55%A → 78%A; 11~13 min, 78%A);流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:275 nm;柱温:35 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。在上述色谱条件下,样品中其他成分对噻吗洛尔和羟苯乙酯的测定无干扰。对照品、样品及溶剂色谱图见图 1(用化学纯的马来酸确定样品和对照品中马来酸峰位置)。



1. 马来酸 (maleate) 2. 噻吗洛尔 (timolol) 3. 羟苯乙酯 (ethylparaben)

图 1 混合对照品 (A)、供试品溶液 (B) 及空白溶剂 (C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mix standards (A), test solution (B) and blank solvent (C)

2.3 含量测定方法学验证

2.3.1 线性关系考察 精密量取“2.1.1”项下混合对照品储备液 10.0、5.0、2.0、1.0、0.4、0.2、0.12 mL, 分别置 100 mL 量瓶中, 加溶剂稀释至刻度, 摇匀, 制备成噻吗洛尔质量浓度分别为 505.99、252.99、101.20、50.60、20.24、10.12、6.07 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 羟苯乙酯质量浓度分别为 30.68、15.34、6.14、3.07、1.23、0.61、0.37 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列混合对照品溶液。精密吸取上述溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录峰面积。以对照品质量浓度 C ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 分别绘制标准曲线, 进行线性回归。噻吗洛尔和羟苯乙酯的回归方程:

$$Y=8.08C+2.39 \quad r=1.000$$

$$Y=44.59C+11.22 \quad r=0.9999$$

结果表明, 噻吗洛尔和羟苯乙酯质量浓度分别在 6.07~505.99 和 0.37~30.68 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.3.2 精密度试验 取“2.1.1”项下的混合对照品溶液, 按“2.2”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 记录色谱图。结果噻吗洛尔和羟苯乙酯峰面积的 RSD 分别为 0.03% 和 0.7%, 表明色谱系统的精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取制备好的同一样品 (批号 15040101) 的供试品溶液, 室温放置, 按“2.2”项下色谱条件, 分别于制备后 0、2、4、6、8、12、20 h 进样 20 μL 进行分析, 记录色谱图。结果噻吗洛尔和羟苯乙酯峰面积的 RSD 分别为 0.9% 和 1.2%, 表明供试品溶液中噻吗洛尔和羟苯乙酯在室温放置 20 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 取同一批号马来酸噻吗洛尔滴眼液 (批号 15040101), 分别按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件, 分别进样 20 μL 进行测定。结果样品中噻吗洛尔和羟苯

乙酯的平均含量分别为 103.1%、0.28 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 分别为 1.4%、1.7%, 表明该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收试验 精密量取已知含量的马来酸噻吗洛尔滴眼液 (批号 15040101) 2 mL, 共 9 份, 置 200 mL 量瓶中, 分别以 80%、100% 和 120% 3 个水平精密加入马来酸噻吗洛尔 (以噻吗洛尔计) 和羟苯乙酯对照品, 按照“2.1.2”项下方法制备供试溶液, 按“2.2”项下色谱条件, 分别进样 20 μL 进行测定, 计算回收率, 结果见表 1。噻吗洛尔和羟苯乙酯的平均回收率 ($n=9$) 为 99.8%、99.8%, 说明该方法准确度高。

2.3.6 样品测定

精密量取不同批号的马来酸噻吗洛尔滴眼液各 2 份, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件分别进样 20 μL , 依法测定, 记录峰面积, 按照外标法计算样品中噻吗洛尔和羟苯乙酯的含量, 结果见表 2。

2.3.7 其他羟苯酯类抑菌剂的影响 取羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯和羟苯丁酯的对照品适量, 精密称定, 置量瓶中, 加溶剂 (乙腈 - 磷酸盐缓冲液 (5:5)) 制成每 1 mL 分别含羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯和羟苯丁酯各 6 μg 的混合溶液。按“2.2”项下色谱条件, 进样 20 μL , 在上述色谱条件下, 羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯和羟苯丁酯能完全分离, 色谱图见图 2。

3 讨论

3.1 检测波长的确定

噻吗洛尔的紫外最大吸收波长为 295 nm, 羟苯乙酯的最大吸收波长为 257 nm。取“2.1.1”项下的混合对照品溶液, 用溶剂稀释, 当噻吗洛尔质量浓度为 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 羟苯乙酯质量浓度为 0.03 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 按“2.2”项下色谱条件, 同时在 257、265、275、285、295 nm 的波长检测, 记录色谱图。比较噻吗洛尔和羟苯乙酯的在不同波长处的信噪比, 结果见表 3。

表 1 加样回收率试验结果

Tab. 1 Results of recovery test

成分 (component)	成分含量 (sample content)	加入量 (added)/mg	测得量 (detected)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
噻吗洛尔 (timolol)	102.7%	8.20	8.11	98.9	99.8	0.8
		8.14	8.22	101.0		
		8.09	8.12	100.4		
		10.06	10.02	99.6		
		10.13	10.01	98.8		
		10.12	10.15	100.3		
		12.16	12.24	100.7		
		12.03	11.97	99.5		
羟苯乙酯 (ethylparaben)	0.28 mg · mL ⁻¹	0.484	0.481	99.5	99.8	0.9
		0.491	0.482	98.3		
		0.486	0.483	99.4		
		0.606	0.610	100.7		
		0.605	0.599	99.1		
		0.599	0.606	101.3		
		0.712	0.715	100.5		
		0.721	0.718	99.7		
		0.724	0.725	100.2		

表 2 样品中噻吗洛尔和羟苯乙酯含量测定结果

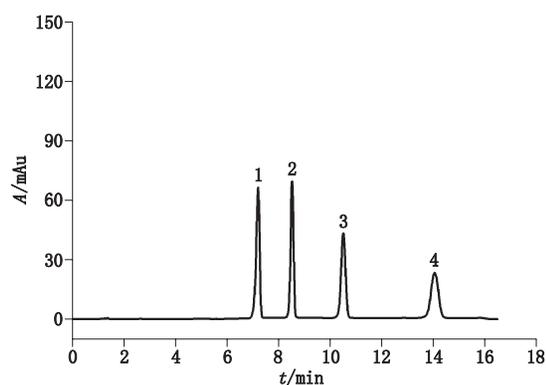
Tab. 2 Results of content determination of samples

样品批号 (sample No.)	噻吗洛尔含量 (timolol content)/%	羟苯乙酯含量 (ethylparaben content)/ (mg · mL ⁻¹)
15040101	102.7	0.283
15100101	100.4	0.286
15120101	99.8	0.291
15120102	100.4	0.291
1507113102	104.1	0.434
140801	98.9	0.137
151002	94.2	0.270

由表 3 结果可知,检测波长在 275 nm 时,噻吗洛尔和羟苯乙酯的信噪比均在 10 以上,可以准确定量。因此选择 275 nm 作为检测波长。

3.2 流动相的选择

参考文献[6-11]报道的色谱条件,比较了甲醇-磷酸盐缓冲液、乙腈-磷酸盐缓冲液等度洗脱和



1. 羟苯甲酯 (methylparaben) 2. 羟苯乙酯 (ethylparaben) 3. 羟苯丙酯 (propylparaben) 4. 羟苯丁酯 (butylparaben)

图 2 羟苯酯类 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of paraben

梯度洗脱,最终确定乙腈-磷酸盐缓冲液,并优化梯度洗脱程序,结果表明,选用乙腈-磷酸盐缓冲液梯度洗脱,噻吗洛尔和羟苯乙酯的保留时间分别为 3 min 和 8 min,出峰时间适宜,峰形好,噻吗洛尔峰峰和羟苯乙酯峰间的峰间的分离度为 28,辅料无干扰。

表 3 样品中噻吗洛尔和羟苯乙酯信噪比结果

Tab. 3 Results of S/N determination of samples

波长 (wavelength)/nm	噻吗洛尔 (timolol)	羟苯乙酯 (ethylparaben)
257	2.8	22.4
265	9.5	19.6
275	32.6	13.1
285	40.3	3.9
295	49.6	0.5

3.3 抑菌剂的种类和用量

抑菌剂的种类很多,从市场上购买到 6 个生产企业的 10 批马来酸噻吗洛尔滴眼液。药品说明书成分中标明抑菌剂种类的有:江苏远恒药业有限公司生产,抑菌剂为硫柳汞;宁夏康亚药业有限公司,抑菌剂为苯扎溴铵;其余 4 家企业说明书中未明确标明抑菌剂种类。经实验检测,滴眼液中抑菌剂为羟苯乙酯,但不同企业抑菌剂羟苯乙酯含量不同(见表 2)。美国 FDA^[12]对羟苯乙酯的含量规定最大用量为 0.05%,4 家企业中羟苯乙酯的含量均未超过 FDA 规定的最大值。文献[10]报道了 15 家生产企业的马来酸噻吗洛尔滴眼液中使用的抑菌剂种类和用量,除以上 3 种抑菌剂外,还包括醋酸苯汞。羟苯乙酯的处方量分别为 0.030%、0.015%、0.050%,苯扎溴铵处方量分别为 0.009 0%、0.010 0%、0.003 0%,硫柳汞处方量为 0.005 0%,醋酸苯汞处方量未知。

在眼用制剂中合理使用抑菌剂及有效控制抑菌剂的质量,对保证眼用制剂安全性及有效性有重要的意义^[13-14]。因此,在眼用制剂的质量标准中,应对抑菌剂的种类进行鉴别,抑菌剂的用量进行含量测定。同时,建议在眼用制剂说明书中明确标明抑菌剂的种类和用量,以便更好地指导临床用药。

本文采用 HPLC 法同时测定马来酸噻吗洛尔滴眼液中噻吗洛尔和羟苯乙酯的含量,该方法灵敏、准确、专属性强,可作为滴眼液主药和抑菌剂的质量控制。

参考文献

[1] 中国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015: 8, 151, 569
ChP 2015. Vol IV [S]. 2015: 8, 151, 569

[2] 梁光江,王延东,叶成添,等. 滴眼剂中常用几种抑菌剂的应用和观察[J]. 今日药学, 2010, 20(3): 43
LIANG GJ, WANG YD, YE CT, *et al.* Application and observation of several commonly used bacteriostatic agents in eye drops [J]. Pharm Today, 2010, 20(3): 43

[3] 安彦. 眼用制剂中抑菌剂的应用和质量控制[J]. 天津药学, 2011, 23(1): 56
AN Y. Application and quality control of bacteriostatic agents in ophthalmic preparation [J]. Tianjin Pharm, 2011, 23(1): 56

[4] 葛玲,徐健江. 防腐剂对眼表的损伤[J]. 国际眼科纵览, 2007, 31(5): 318
GE L, XU JJ. The damage of preservatives on the ocular surface [J]. Int Rev Ophthalmol, 2007, 31(5): 318

[5] 中国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 66
ChP 2015. Vol II [S]. 2015: 66

[6] 钱厚海,梁贵键,朱莉,等. 高效液相色谱法测定马来酸噻吗洛尔滴眼液的含量[J]. 空军总医院学报, 1994, 10(4): 202
QIAN HH, LIANG GJ, ZHU L, *et al.* Content determination of intimolol maleate eye drops by HPLC [J]. J Gen Hosp Air Force PLA, 1994, 10(4): 202

[7] 钱厚海,梁贵键,朱莉,等. 马来酸噻吗洛尔滴眼液的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志, 1995, 26(5): 209
QIAN HH, LIANG GJ, ZHU L, *et al.* HPLC Determination of timolol maleate eye drops [J]. Chin J Pharm, 1995, 26(5): 209

[8] 彭俊青,郑穹,段建利. 马来酸噻吗洛尔眼用凝胶剂的含量测定及药效研究[J]. 武汉大学学报(理学版), 2005, 51(S2): 269
PENG JQ, ZHENG Q, DUAN JL. Study on content determination and efficacy of timolol maleate ophthalmic gel [J]. J Wuhan Univ (Nat Sci Ed), 2005, 51(S2): 269

[9] 辛继跃,朱样根,危雪晖,等. 马来酸噻吗洛尔眼用中羟苯乙酯含量测定方法研究[J]. 中国执业药师, 2011, 18(11): 33
XIN JY, ZHU YG, WEI XH, *et al.* The Study on the content determination of ethylparaben in timolol maleate eye drops [J]. China Licensed Pharm, 2011, 18(11): 33

[10] 刘荷英,周敏,程奇珍,等. 马来酸噻吗洛尔眼用中抑菌剂的质量控制[J]. 中国药房, 2015, 26(7): 995
LIU HY, ZHOU M, CHENG QZ, *et al.* Quality control of bacterial inhibitor in timolol maleate eye drops [J]. China Pharm, 2015, 26(7): 995

[11] 胡兵,单晓芸. HPLC 法测定马来酸噻吗洛尔眼用中有关物质[J]. 中国药师, 2012, 15(8): 1138
HU B, SHAN XY. Determination of related substances in timolol maleate eye drops by HPLC [J]. China Pharm, 2012, 15(8): 1138

[12] FDA. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products [EB/OL]. [2013-08-13] <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>.

[13] 宁黎丽. 眼用制剂研发过程中应关注抑菌剂的合理使用和质量控制[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(23): 1836
NING LL. Focusing on the reasonable use and quality control of bacterial inhibitor in the studying of process in ophthalmic preparation [J]. Chin Pharm J, 2007, 42(23): 1836

[14] 尚悦,韩鹏,许华玉. 关于眼用制剂中添加抑菌剂的思考[J]. 中国药品标准, 2014, 15(1): 12
SHANG Y, HAN P, XU HY. Rethink of bacteriostatic agents in ophthalmic preparations [J]. Drug Stand China, 2014, 15(1): 12

(本文于 2016 年 2 月 2 日收到)