

相对于火焰原子吸收法(FAAS)、石墨炉原子吸收法(GFAAS)和原子荧光法(AFS), ICP-MS可用于药品辅料中多种元素的同时测定,大大提高了测定效率,且具有极低的检出限,使方法更加准确可靠,灵敏便捷。已逐渐成为食品药品中多元素分析的首选方法^[5]。

实际样品测定的结果表明,有毒有害元素铬含量为0.2~207.1 mg·kg⁻¹(有10批样品超过标准规定的2 mg·kg⁻¹),铜、砷、镉的含量相对较低,铅含量为0.125~3.998 mg·kg⁻¹(出口的保健品要求使用胶囊中铅≤0.5 mg·kg⁻¹),其他元素钒、镍的含量基本<1 mg·kg⁻¹。从表4可以明显发现,9批用工业明胶生产的空心胶囊中铬含量均>2 mg·kg⁻¹,最高达到207.1 mg·kg⁻¹,而且锰、锶、钡相对含量较高,这些空心胶囊的测定元素总含量均>40 mg·kg⁻¹(药典规定重金属含量应≤40 mg·kg⁻¹);即使不是用工业明胶生产的空心胶囊,也有重金属超标的情况,

在21批样品中有1批铬含量>2 mg·kg⁻¹,3批测定元素总含量>40 mg·kg⁻¹。本方法准确可靠、灵敏便捷,可用于明胶空心胶囊中多种元素的测定,能有效控制明胶空心胶囊的质量安全。

REFERENCES

- [1] ZHENG J X, XING J C, LIN L, et al. Determination and pattern recognition of trace elements in serum samples from patients with renal cellcarcinoma by ICP-MS [J]. J Int Oncol(国际肿瘤学杂志), 2011, 38(12): 948-951.
- [2] Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010年版. 二部) [S]. 2010: 1204, 1216.
- [3] FENG K R, ZHANG Y T, DONG Z, et al. Study on microwave digestion of vacant gelatin capsules [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2012, 47(11): 919-922.
- [4] Ch.P(2010)Vol I(中国药典 2010年版. 一部) [S]. 2010: Appendix IX B.
- [5] CHEN Y. Determination of Si and Si migration into infusion of 5-Layer co-extrusion bags by ICP-MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(2): 175-177.

收稿日期: 2013-04-19

HPLC 测定盐酸林可霉素滴眼液有关物质

张菁, 朱建平, 常俊山, 杨梁(河北省食品药品检验院, 石家庄 050011)

摘要: 目的 建立测定盐酸林可霉素滴眼液有关物质 RP-HPLC。方法 采用 Phenomenex Luna C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: pH 6.1 缓冲液(取 34 g 磷酸溶于 900 mL 水, 用浓氨水调节 pH 值至 6.1, 加水稀释至 1 000 mL)-甲醇-乙腈(77:8:15), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 210 nm, 柱温: 50 °C。结果 林可霉素在 24.68~370.28 μg·mL⁻¹ 内, 峰面积与浓度呈良好线性关系($r=1.000\ 0$), 最低检出限为 1.05 ng。结论 本法林可霉素与相邻杂质之间及防腐剂之间的分离度良好, 可用于盐酸林可霉素滴眼液有关物质的检测。

关键词: 盐酸林可霉素滴眼液; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)11-1232-04

Determination of Related Substances of Lincomycin Hydrochloride Eye Drops by HPLC

ZHANG Jing, ZHU Jianping, CHANG Junshan, YANG Liang(Hebei Institute for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination of related substances in Lincomycin Hydrochloride Eye Drops by HPLC. **METHODS** The determination was performed on Phenomenex Luna C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm), and the mobile phase consisted of 77 mL buffer(dissolved 34 g phosphoric acid in 900 mL water and adjust to pH 6.1 with concentrated ammonia and diluted to 1 000 mL with water), 8 mL methanol and 15 mL acetonitrile at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 210 nm. The column temperature was 50 °C. **RESULTS** The linearity was found in the range of 24.68~370.28 μg·mL⁻¹ for lincomycin($r=1.000\ 0$). The detection limit of lincomycin was 1.05 ng. **CONCLUSION** The method can separate lincomycin effectively from its degradation product and antimicrobial, and is suitable for the determination of impurities in Lincomycin Hydrochloride Eye Drops.

作者简介: 张菁, 女, 主任药师 Tel: (0311)85212008-8089 E-mail: jingz0326@sohu.com

林可霉素由 Mason 等于 1962 年从林可链霉菌林可变种中得到。H.hoeksema 等于 1964 年采用化学降解法确定了其分子结构^[1-3]。本品对革兰氏阳性菌有较强作用,对敏感需氧菌,如肺炎链球菌和其他链球菌属、金葡菌以及厌氧菌尤为有效^[4]。滴眼液用于治疗敏感菌株引起的结膜炎和角膜炎。盐酸林可霉素滴眼液执行标准为国家化学药品化学药品标准第五册“WS-10001-(HD-0462)-2002”及 YBH03092007、YBH 08622008。各标准均未对有关物质进行控制。经查阅有关资料文献和初步考察,发现盐酸林可霉素中有多个杂质,参照盐酸林可霉素原料标准^[5]进行有关物质研究。

1 仪器与试剂

20AT 高效液相色谱仪(日本岛津); DAD 检测器; LCsolution 操作系统; 色谱柱为 Phenomenex Luna C₁₈ 键合硅胶柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); XS205 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司)。

林可霉素对照品(中国食品药品检验院,批号:130432-200908,含量:86.7%); 盐酸林可霉素滴眼液(上海运佳黄埔药业有限公司,批号:110801); 乙腈(美国 FISHER, 色谱纯); 甲醇(美国 FISHER, 色谱纯); 磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,分析纯); 氨水(天津市科密欧化学试剂有限公司,分析纯)。

2 方法与结果

2.1 可能的有关物质种类

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的降解产物有如下 7 个,分别为:①林可霉素 B; ②丙烯基类似物和 Z-异构体; ③α-酰胺差向异构体; ④N-去甲林可霉素; ⑤7-差向林可霉素; ⑥甲基-1-硫代-林可霉素; ⑦4-丙基古液酸及其他可能的并且尚待结构确证的未知杂质。而且生产厂家不同,菌种不尽相同,导致杂质种类及含量也有所不同,对临床应用的潜在风险不一。

2.2 检测波长的选择

中国药典 2010 年版盐酸林可霉素原料检测波长为 214 nm,利用 DAD 检测器在 190~400 nm 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。为了保证最大量地检出杂质,选择 210 nm 为测定波长,在

此波长处色谱峰信息较多,且各峰分离良好。

2.3 流动相的选择

现行标准所使用流动相为 0.05 mol·L⁻¹ 硼砂溶液(用 85%磷酸溶液调节 pH 值至 6.1)-甲醇(4:6)由于硼砂溶液和甲醇混合时,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,噪音大,影响测定。故流动相用前应混合均匀,冷却至室温,超声至少 15 min 脱气后使用。而且林可霉素主峰会前延的情况。因此选择流动相为 pH 6.1 缓冲液(取 34 g 磷酸溶于 900 mL 水,用浓氨水调节 pH 值至 6.1,加水稀释至 1 000 mL)-甲醇-乙腈(77:8:15)。保证各有关物质分离的情况下,主峰较为对称。

2.4 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Luna C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 以 pH 6.1 缓冲液(取 34 g 磷酸溶于 900 mL 水,用浓氨水调节 pH 值至 6.1,加水稀释至 1 000 mL)-甲醇-乙腈(77:8:15)为流动相; 柱温为 50 °C; 检测波长为 210 nm,进样量 10 μL。

2.5 溶液制备

2.5.1 系统适用性溶液的制备 取林可霉素对照品 40.12 mg,置 10 mL 量瓶中加流动相溶解并稀释至刻度,取 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,林可霉素峰保留时间约为 13 min,林可霉素峰与杂质 A(相对保留时间约为 0.72)的色谱峰分离度应 >5.0。结果见图 1。

2.5.2 供试品溶液的制备 取本品适量,加流动相定量稀释制成浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 溶液。有关物质图谱见图 1。

2.6 专属性考察

2.6.1 辅料干扰试验 经过汇总,滴眼液中辅料共有以下几种:氯化钠、95%乙醇、三乙醇胺、玻璃酸钠、硼砂。均按最大处方量配制后试验,辅料峰约出现在溶剂峰处,均能与林可霉素峰及其杂质峰完全分离。在有关物质检查时,除去相对保留时间约 0.27 以前的辅料峰。

2.6.2 破坏性试验 取上海运佳黄埔药业有限公司样品(批号:110801),分别置于适当容器中,分别经碱破坏:5 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 2 mL,在 100 °C 水浴中加热 40 min; 酸破坏:5 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液 2 mL,在 100 °C 水浴中加热 15 min; 氧

化破坏试验：10%过氧化氢溶液 5 mL，放置 10 min；光照试验：4 000 Lx 放置 48 h；高温试验：100 °C 水浴中加热 40 min。

取上述各溶液，按“2.4”项下色谱条件测定。

结果表明，林可霉素在光照、高温及氧化条件下稳定，无明显降解物。酸、碱条件下产生明显的降解物，降解产物的色谱峰均在主峰保留时间的 2 倍内，并能与主峰基线分离，结果见图 1。

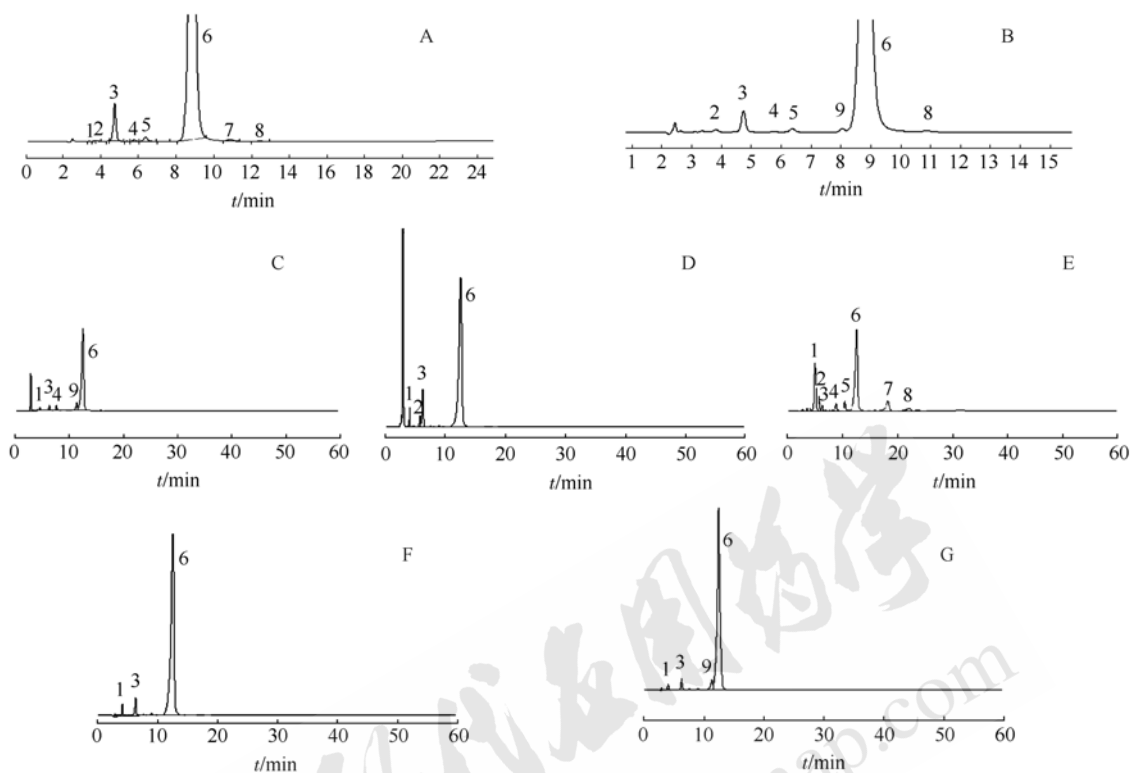


图 1 高效液相色谱图

A-系统适用性溶液；B-供试品溶液；C-碱破坏；D-酸破坏；E-氧化破坏；F-光照破坏；G-高温破坏；1-N-去甲基林可霉素；2-未知杂质；3-林可霉素 B；4- α -酰胺基差向异构林可霉素(杂质 A)；5-未知杂质；6-林可霉素；7-丙烯基类似物；8-Z-异构体；9-苯扎溴铵

Fig 1 HPLC chromatograms

A-system suitability solution; B-test solution; C-detroyed by alkaline; D-detroyed by acid; E-detroyed by oxidation; F-detroyed by light; G-detroyed by temperature; 1-N-normethyl Lincomycin; 2-impurity; 3-Lincomycin; 4- α -amide Lincomycin isomers(impurity A); 5-impurity; 6-Lincomycin; 7-propenyl analogue; 8-Z-isomers; 9-benzalkonium branide

2.7 线性关系考察

取林可霉素对照品适量，精密称定，加流动相溶解后用流动相稀释制成浓度分别为 24.68, 123.42, 246.85, 296.22, 370.28 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液，分别进样，记录色谱图。以峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归，得回归方程为： $A=4.19C-26.62$ ， $r=1.0000$ ，林可霉素在 24.68~370.28 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内与峰面积呈良好的线性关系。检测限按信噪比为 3:1 计为 1.05 ng。

2.8 稳定性试验

取“2.5.1”项下供试品溶液，室温放置 0, 2, 4, 8, 10 h，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 为 1.2%($n=5$)，总杂质峰面积的 RSD 为 1.1%($n=5$)，表明供试品溶液在

室温放置 10 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验

取同一批号样品 6 份，制备为样品溶液，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 为 1.1%($n=6$)；总杂质含量的平均值为 0.76%，RSD 为 1.5%($n=6$)，表明本方法的重复性较好。

2.10 方法的耐用性考察

选用 Phenomenex Luna、Waters Xterra、SHIMADZU、Kromasil、大连依利特 SinoChrom 等 5 种不同品牌、不同填料的 C_{18} 色谱柱进行分析，杂质均能有效分离。并对流动相中缓冲溶液的 pH 值和柱温进行调整，结果 pH 值 5.5~6.1，柱温 40~60 °C 时，杂质均能有效分离，当柱温低于 40 °C 时，

林可霉素峰形稍有前延。表明该方法耐用性较好。

2.11 样品的测定

对 5 个生产企业的 13 批样品按“2.5”项下方法制备供试品溶液和对照溶液，按“2.4”项下色谱条件，进样 10 μL 记录色谱图。采用不加校正因子的主成分自身对照法对有关物质进行测定，结果见表 1，样品中检出杂质 A 与丙烯基类似物。因此制订限度为“与林可霉素峰相对保留时间约为 0.72 的色谱峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 0.5 倍(0.5%)，其他单个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%)”。

表 1 盐酸林可霉素滴眼液有关物质测定结果

Tab 1 The related substances determination results of Lincomycin Hydrochloride Eye Drops

批号	含量/%		
	α -酰胺基差向异构林可霉素	丙烯基类似物	杂质总量
110411	0.41	0.23	1.15
110401	0.41	0.23	1.12
101004	0.21	0.27	1.21
20101102	0.24	0.26	0.77
20110101	0.24	0.26	0.77
20090501	0.25	0.27	0.87
9110702	0.20	0.32	1.11
11040702	0.44	0.31	1.14
11010801	0.35	0.27	0.99
421001	0.22	0.28	0.69
421002	0.21	0.27	0.70
411008	0.22	0.27	0.72
110801	0.32	0.18	0.78

3 讨论

3.1 系统适用性的确定

盐酸林可霉素较稳定，文献报道，本品在 70 $^{\circ}\text{C}$ 保存 6 个月，活性不下降，在 70 $^{\circ}\text{C}$ 时，0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液半衰期为 39 h^[6]。但是当其与酸、胼、高碘酸钠等作用时，即可发生化学反应，见图 2。强力破坏试验结果，在加酸、加碱后加热破坏时，能产生较多降解物，除林可霉素 B 增加外，主要杂质相对保留时间约为 0.72 的 α -酰胺基差向异构

林可霉素亦增加，由此可见，相对保留时间约为 0.72 的 α -酰胺基差向异构林可霉素为林可霉素的主要降解杂质，因此在标准中对其单独控制；由图 1 可见供试品溶液中检出 5 号未知杂质峰及 9 号防腐剂(苯扎溴铵)峰，为确保各杂质峰有效分离，规定“林可霉素峰与相对保留时间约为 0.72 的色谱峰的分度度应 >5.0 ”。

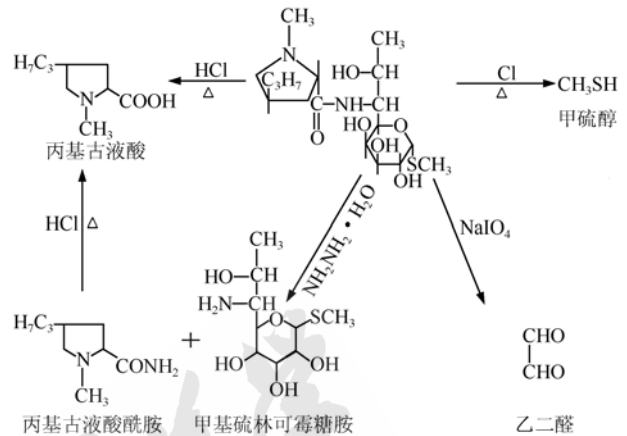


图 2 盐酸林可霉素与酸、胼、高碘酸钠反应式

Fig 2 The reaction of Lincomycin Hydrochloride with acid, hydrazinium and sodium periodate

3.2 盐酸林可霉素滴眼液的稳定性

盐酸林可霉素滴眼液说明书中规定贮藏条件为避光，阴凉处保存，有效期为 12 个月，根据强制破坏结果显示，盐酸林可霉素滴眼液较稳定，在规定的贮藏条件下，有效期内能够保证产品质量。

REFERENCES

- [1] MASON D J, DIETZ A, DEBOER C. Lincomycin, a new antibiotic I discovery and biological properties [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1962: 554-559.
- [2] HERR R R, BERGY M E. Lincomycin, a new antibiotic II [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1962: 560-564.
- [3] MEYER C E, LEWIS C. Absorption and fate of linaomycin in the rat [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1963: 169-175.
- [4] PENG S X, ZHAO S X, LIAO Q J, et al. Progress in Medicinal Chemistry(药物化学进展) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 56.
- [5] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: 727.
- [6] WALLACE E H. Lincomycin [M]. New York: Modern Scientific Publication INC, 1969: 1-60.

收稿日期: 2013-01-29