

拉坦前列素滴眼液抑菌剂抑菌效力研究

孟蕾蕾(日照市食品药品检验检测中心, 山东 日照 276800)

摘要: 目的 探索拉坦前列素滴眼液中抑菌剂的合理添加量。方法 根据药物成分的特征, 选择合适的抑菌剂, 依照中国药典 2015 年版抑菌剂效力检查法, 采用试验菌株金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉, 对合用防腐剂苯扎氯铵和苯氧乙醇按照不同加入量, 配置后进行抑菌效果检查。结果 A、B、C 组联合应用防腐剂都能达到规定的抑菌效果。0.03% 苯扎氯铵和 0.015% 羟苯乙酯联合应用防腐剂对上述 5 种试验菌的生长有良好的抑制作用, 且为最低有效浓度。结论 确定 0.04% 苯扎氯铵和 0.03% 羟苯乙酯作为拉坦前列素滴眼液的抑菌剂。

关键词: 拉坦前列素滴眼液; 抑菌剂; 抑菌效力; 苯扎氯铵; 羟苯乙酯

中图分类号: R927.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)05-0715-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.05.018

引用本文: 孟蕾蕾. 拉坦前列素滴眼液抑菌剂抑菌效力研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 715-718.

Study on Antimicrobial Effectiveness of Latanoprost Eye Drops

MENG Leilei(Rizhao City Food and Drug Inspection and Testing Center, Rizhao 276800, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the reasonable dosage of the antimicrobial agent in Latanoprost eye drops. **METHODS** According to characteristic of drug ingredients, choose appropriate antimicrobial agents, according to Chinese Pharmacopoeia 2015 Version bacteriostat effect test, the test strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*, combination of preservation benzalkonium chloride and ethylparaben according to different join the amount and configuration for antibacterial effect of food inspection. **RESULTS** A, B, C group combined with the application of preservatives can achieve the prescribed antibacterial effect. 0.03% benzalkonium had a good inhibitory effect on growth of ammonium chloride and 0.015% ethylparaben preservative combined application of the above 5 kinds of test bacteria, and was the lowest effective concentration. **CONCLUSION** The determination of 0.04% benzalkonium chloride and 0.03% phenoxy ethanol as a bacteriostatic agent of Latanoprost eye drops.

KEY WORDS: Latanoprost eye drops; antimicrobial preservative; antimicrobial effectiveness; benzalkonium; ethylparaben

拉坦前列素滴眼液用于开角型青光眼和高眼压症患者降低眼内压, 以及对其他降眼内压药物不能耐受或者疗效差(多次测量达不到目标眼压降低标准)的患者。拉坦前列素是一种新型苯基替代的丙基酯前列素 F2a, 为选择性 F2a 受体激动剂。它是一种无活性但能迅速渗透到角膜里的物质, 在角膜和血浆中可水解为具有活性的游离酸。它能增加房水通过眼角素层的流出量, 用药量小, 但促进房水充出量大, 药液能渗透到眼球上睫脉络膜上层, 具有良好的降眼压效果。为防止滴眼剂在正常贮藏或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, 需加入一定量抑菌剂保证产品在正常情况下的储存、使用。

有研究^[1-3]报道, 所有抑菌剂都有一定的毒性, 用于眼用溶液的抑菌剂要求对眼无刺激, 因此适用的品种数量不多, 常用的按其化学组成可分为

下列几类: ①有机汞类, 为常用的抑菌剂, 如硝酸苯汞, 其有效浓度为 0.002%~0.005%, 在 pH 6~7.5 时作用最强, 另外还有硫柳汞, 但稳定性较差。②季铵盐类, 如苯扎氯铵、苯扎溴铵、消毒净等, 以及洗必泰等阳离子表面活性剂, 它们的抑菌力和杀菌力都很强, 也很稳定, 但这类化含物的配伍禁忌很多, 在 pH<5 时作用减弱, 遇阴离子表面活性剂或阴离子胶体化合物失效。最常用的是苯扎氯铵和苯扎溴铵。③醇类, 常用的三氯叔丁醇, 在弱酸中作用好, 与碱有配伍禁忌, 常用浓度 0.35%~0.5%。苯乙醇的配伍禁忌很少, 但单独用效果不好, 对其他类抑菌剂有良好的协同作用。常用浓度为 0.5%。苯氧乙醇对绿脓杆菌有特殊的抑菌力, 常用浓度为 0.3%~0.6%。④酯类, 常用的为羟苯酯类, 即尼泊金类, 如羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯和羟苯丁酯, 其中羟苯乙酯

作者简介: 孟蕾蕾, 女, 副主任药师 Tel: 17706337253 E-mail: 0633mll@163.com

对角膜结膜的毒性最小。本类对细菌的抑菌作用较弱,对霉菌的抑菌效能较强。⑤酸类,常用的为山梨酸,微溶于水,常用浓度为0.15%~0.2%,对真菌有较好的抑菌力,适用于含有聚山梨酯的眼用溶液。

本实验参照文献[4-10],通过抑菌效力测定试验,筛选出合适比例的抑菌剂用量,并按照中国药典2015年版抑菌效力检查法对拉坦前列素滴眼液的抑菌效力进行考察。本实验采用联合应用抑菌剂的方式,确保抑菌剂有效性的同时,筛选出最低有效浓度,综合判断滴眼液中抑菌剂的合理添加量,以保证产品质量安全。

1 仪器与试药

1.1 仪器

MLS-3780 型高压蒸汽灭菌器(日本 SANYO 公司);XS105DU 型电子天平(瑞士梅特勒托利多公司);HNTD5-TDR-1002 麦氏比浊仪(北京天安联合科技有限公司);JJ-CJ-2FD 超净工作台(上海博迅实业有限公司);ESCO A2-4S1 型生物安全柜(新加坡 ESCO 公司);MJ-150-II2 霉菌培养箱、DHP-9082 隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司)。

1.2 菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003];大肠埃希菌[CMCC(B)44102];铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104];白色念珠菌[CMCC(F)98001];黑曲霉[CMCC(F)98003]。菌株均来自中国食品药品检定研究院,菌株传代数均为3代。

1.3 培养基和试药

胰酪大豆胨琼脂培养基、胰酪大豆胨液体培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基、沙氏葡萄糖液体培养基、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基和 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液均购自北京三药科技开发公司。

苯扎溴铵(成都明日制药有限公司,批号:20160308),羟苯乙酯(广州市汉普医药有限公司,批号:20160109),按处方比例自行配置含有不同浓度防腐剂的拉坦前列素滴眼液,规格:2.5 mL:0.125 mg。

2 方法和结果

2.1 菌液制备方法

接种金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌至胰酪大豆胨琼脂培养基上,30~35℃培养

18~24 h;白色念珠菌接种于沙氏葡萄糖琼脂培养基上,20~25℃培养24~48 h。取上述培养物,加入适量的0.9%无菌氯化钠溶液将琼脂表面的培养物洗脱,并将菌悬液移至无菌试管中,用0.9%无菌氯化钠溶液稀释并制成每1 mL含菌数约为 10^8 cfu的菌悬液。

黑曲霉接种于沙氏葡萄糖琼脂培养基上,20~25℃培养5~7 d,取培养物3~5 mL(含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液),将孢子洗脱,然后用灭菌移液管吸出孢子悬液至无菌试管内,加入适宜的含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液制成每1 mL含菌数约为 10^8 cfu的菌悬液。

2.2 试验方法

取拉坦前列素滴眼液供试品5支,分别直接接种试验菌(大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、黑曲霉)0.02 mL,1 mL供试品中接菌量为 10^5 ~ 10^6 cfu,接种菌液的体积不得超过供试品体积的1%,充分混合,使供试品中的试验菌均匀分布,然后置20~25℃避光贮存。培养过程中,分别在0,6,24 h,7,14和28 d应用麦氏比浊仪(采用BaS04麦氏浊度标准溶液进行标定,采用MCF麦氏浊度单位)测定供试品中细菌菌液浓度,对存活的微生物进行计数。

参考国内滴眼液常用防腐剂的剂量,苯扎氯铵0.01%~0.5%,羟苯乙酯0.02%~0.5%,同时参考《药用辅料手册》(第4版),考虑到防腐剂苯扎氯铵和羟苯乙酯联合应用起协同作用,为使防腐剂的不良反应降到最低,设计了4个梯度防腐剂含量的样品,平行操作以下4组含有防腐剂的供试品:A组含0.06%苯扎氯铵和0.1%羟苯乙酯的供试品,B组含0.04%苯扎氯铵和0.03%羟苯乙酯的供试品,C组含0.03%苯扎氯铵和0.015%羟苯乙酯的供试品,D组含0.01%苯扎氯铵和0.005%羟苯乙酯的供试品,同上述方法加菌液,各个时间段进行测试,结果见表1。

2.3 试验结果

参照中国药典2015年版四部1121抑菌效力检查法对眼用制剂抑菌效力判断标准,见表2。

依据表2,对表1数据进行分析,D组除了黑曲霉真菌接近“B”判断标准外,其他均不符合规定。A组,B组,C组均符合中国药典2015年版的判断标准。C组为最低有效浓度,由于考虑药品中抑菌剂的浓度可能会随储存时间增加而逐渐的

降低, 所以选择 A 组, B 组作为拉坦前列素滴眼液抑菌效力的浓度。由于抑菌剂都有一定的不良反应, 在制剂的配方中应选择低浓度的抑菌剂作

为最优的抑菌剂配方。因此, 选择 B 组含 0.04% 苯扎氯铵和 0.03% 羟苯乙酯的拉坦前列素滴眼液作为该产品的处方。

表 1 拉坦前列素滴眼液抑菌效力试验结果

Tab. 1 Inhibitory potency test results of Latanoprost Eye Drops

试验组	试验菌	供试品中菌液数值/lg					对数减少值/lg				
		0 h	6 h	24 h	7 d	14 d	6 h	24 h	7 d	14 d	28 d
A	金黄色葡萄球菌	7.8	5.4	4.2	2.1	1.5	2.4	3.6	5.7	—	NR
	大肠埃希菌	7.3	5	4.2	3.5	3.2	2.3	3.1	3.8	—	NI
	铜绿假单胞菌	6.9	4.5	3.3	2.5	1.8	2.4	3.6	4.4	—	NI
	白色念珠菌	7.1	7.1	6.9	4.5	4	—	—	2.6	3.1	NI
	黑曲霉	6.5	6.5	6.4	4.2	3.9	—	—	2.3	2.6	NI
B	金黄色葡萄球菌	7.8	5.6	4.6	3.5	3.1	2.2	3.2	4.3	—	NI
	大肠埃希菌	7.3	5.1	4.4	3.7	3.4	2.2	2.9	3.6	—	NI
	铜绿假单胞菌	6.9	4.9	3.6	3	2.4	2	3.3	3.5	—	NI
	白色念珠菌	7.1	7.1	7	5	4.6	—	—	2.1	2.5	NI
	黑曲霉	6.5	6.5	6.5	4.5	4.1	—	—	2	2.4	NI
C	金黄色葡萄球菌	7.8	6.2	5.1	4.5	3.8	1.6	2.7	3.3	—	NR
	大肠埃希菌	7.3	6.8	4.5	4.1	3.5	0.5	2.8	3.2	—	NI
	铜绿假单胞菌	6.9	5.2	4.3	3.8	2.8	1.7	2.6	3.1	—	NR
	白色念珠菌	7.1	7.1	7.1	6.6	5.3	—	—	0.5	1.8	NI
	黑曲霉	6.5	6.5	6.5	5	4.3	—	—	1.5	2.2	NI
D	金黄色葡萄球菌	7.8	7.6	7.1	6.6	5.8	0.2	0.7	1.2	2	NR
	大肠埃希菌	7.3	6.8	6.1	5.6	5.2	0.5	1.2	1.7	2.1	NI
	铜绿假单胞菌	6.9	6.2	5.9	5	4.5	0.7	1	1.9	2.4	NI
	白色念珠菌	7.1	7.1	7.1	6.9	6.7	—	—	0.2	0.4	NI
	黑曲霉	6.5	6.5	6.5	6	5.8	—	—	0.5	0.7	NI

注: NR—试验菌未回复生长。NI—未增加, 是指对前一个测定时间, 试验菌增加的数量不超过 0.5 lg。

Note: NR—test bacteria did not respond to growth. NI—does not increase, refers to the determination of the previous time, the number of bacteria increased by not more than 0.5 lg.

表 2 眼用制剂抑菌效力判断标准

Tab. 2 Evaluation of bacteriostatic effect of ophthalmic preparation

试验菌	标准	减少的 lg 值				
		6 h	24 h	7 d	14 d	28 d
细菌	A	2	3	—	—	NR
	B	—	1	3	—	NI
真菌	A	—	—	2	—	NI
	B	—	—	—	1	NI

注: 减少的 lg 值-各间隔时间测定的菌数 lg 值与 1 mL(g)供试品中接种的菌数 lg 值的相差值。“A”是指应达到的抑菌效力标准, 特殊情况下, 如抑菌剂可能增加不良反应的风险, 则至少应达到“B”的抑菌效力标准。Note: the value of the lg reduction-the interval between the number of bacteria measured in the number of women and 1 mL(g)products in the number of countries worth the difference. The "A" in the table refers to the standard of antibacterial effect that should be achieved. Under special circumstances, such as antibacterial agents may increase the risk of adverse reactions, should be at least to achieve the "B" antibacterial efficacy standards.

3 讨论

对多批不同厂家的拉坦前列素滴眼液中的抑菌剂进行分析, 发现抑菌剂应用混乱, 大多数厂家采用苯扎溴铵, 使用量为 0.03%~5%不等, 但有研究报道苯扎氯铵可破坏角膜上皮细胞的紧密连接, 使角膜上皮细胞容易脱落。高浓度的苯扎氯铵或长期应用苯扎氯铵对眼角膜结膜的毒性更大。对于一种抑菌剂来说, 由于同时兼具抑菌作用和不良反应 2 个方面, 其在制剂中的处方量显得尤为关键。不良反应具有时间和剂量依赖性, 高浓度的苯扎氯铵可导致细胞迅速死亡, 同时提示长期使用含有苯扎氯铵滴眼液的患者(尤其是干眼症患者)选择滴眼液时应充分考虑防腐剂对角膜上皮细胞的不良反应, 尽可能选择含有低浓度防

防腐剂或不含有防腐剂的药物,以减少或避免其对眼表的细胞不良反应。本实验联合使用防腐剂,0.04%苯扎氯铵和0.03%羟苯乙酯作为拉坦前列素滴眼液的抑菌剂,既降低了防腐剂苯扎氯铵和羟苯乙酯的使用量,又达到抑菌效果,保证了药品的安全有效。

多剂量包装的眼用制剂在使用过程中,很容易污染,所以需要添加适宜的抑菌剂,适宜的抑菌剂原则上满足有效性、安全性和稳定性^[1-4]。本实验抑菌剂选择和剂量上参考《药用辅料手册》(第4版)和美国FDA对眼药制剂抑菌剂的含量规定及相关文献^[5-10],根据药物特性和防腐剂的配伍禁忌,选择了起协同作用的防腐剂苯扎氯铵和羟苯乙酯,设计了4个梯度防腐剂含量的样品,试验结果良好,清晰,并比较出不同含量的防腐剂对拉坦前列素滴眼液的抑菌效力的差异,最终确定0.04%苯扎氯铵和0.03%羟苯乙酯作为拉坦前列素滴眼液的抑菌剂。

REFERENCES

- [1] 张新妹, 胡昌勤, 姜彩辉, 等. 滴眼剂中防腐剂的合理应用[J]. 广东药学院学报, 2003, 19(3): 268-269.

- [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): 43-44.
- [3] ZHANG L, TU J S. Addition and detection of preservatives and antioxidants in injections and ophthalmic solutions [J]. Pharm Clin Res(药学与临床研究), 2012, 20(2): 137-141.
- [4] LI J, WANG Z J, XIANG L T. Evaluation and testing of antimicrobial preservatives in bendazac lysine eye drops [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2015, 35(5): 884-888.
- [5] JIANG Z J, LI Y L, LIU W J, et al. Study on the preservatives-effectiveness of pirenoxine ophthalmic solution [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(6): 704-708.
- [6] WANG H B, WEI C, ZHAO R Q, et al. Research of antibacterial effects of Latanoprost eye drops [J]. China Pharm(中国药房), 2013, 24(1): 42-44.
- [7] YANG X L, HE C Y, SHENG J F. Studies on antimicrobial preservatives screening and antimicrobial efficacy of chondroitin sulfate eye drops [J]. Chin J Anal Pharm(药物分析杂志), 2016, 36(4): 678-683.
- [8] WANG H L, CHEN P P, HE J L, et al. Content determination of preservatives and sweeteners in oral liquid [reparations by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(7): 844-847.
- [9] 胡小华. 阿奇霉素滴眼液的抑菌效力测定[J]. 中国药师, 2013, 16(5): 780-781.
- [10] 郑俊民. 药用辅料手册第四版[M]. 第4版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 451.

收稿日期: 2016-11-24

(本文责编: 曹粤锋)