

依诺沙星滴眼液抑菌剂考察

陈春晓, 吴宏伟*, 李玲玲(厦门市食品药品质量检验研究院, 福建 厦门 361012)

摘要: 目的 建立测定依诺沙星滴眼液中抑菌剂硫柳汞、羟苯乙酯和苯扎溴铵的 HPLC 含量测定方法, 并对这 3 种抑菌剂的稳定性进行考察。方法 选用 C₁₈ 柱, 以 1% 三乙胺溶液(用磷酸调节 pH 值至 3.0)为流动相 A, 以甲醇为流动相 B, 进行梯度洗脱; 检测波长苯扎溴铵为 218 nm, 羟苯乙酯和硫柳汞为 262 nm, 进样量为 20 μL 。同时考察抑菌剂的稳定性。结果 羟苯乙酯、硫柳汞和苯扎溴铵之间的分离度分别为 19.7, 48.7。硫柳汞在 9.1~151.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、羟苯乙酯在 2.1~41.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、苯扎溴铵在 21.8~218.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内均呈现良好的线性关系($r=0.999, 1.000, 0.999$), 其检出限分别为 1.4, 1.2, 13.1 ng。在高温条件下, 硫柳汞和羟苯乙酯含量均略有下降; 在紫外光照条件下, 硫柳汞含量下降明显; 苯扎溴铵几乎不受高温和紫外光照的影响。结论 该方法灵敏度高, 能够有效评估滴眼液中抑菌剂的含量。

关键词: 依诺沙星滴眼液; 硫柳汞; 羟苯乙酯; 苯扎溴铵; 含量测定; 稳定性

中图分类号: R914.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2018)09-1280-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.09.002

引用本文: 陈春晓, 吴宏伟, 李玲玲. 依诺沙星滴眼液抑菌剂考察[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(9): 1280-1283.

Investigation of Preservatives in Enoxacin Eye Drops

CHEN Chunxiao, WU Hongwei*, LI Lingling(Xiamen Institution for Food and Drug Quality Control, Xiamen 361012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of merthiolate, ethylparaben and benzalkonium bromide in enoxacin eye drops by HPLC, and to investigate the stability of these three preservatives. **METHODS** The analysis was performed on C₁₈ column, 1% triethylamine (adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid) served as mobile phase A, methanol as mobile phase B by gradient elution. The detection wavelength was 218 nm (benzalkonium bromide) and 262 nm (merthiolate and ethylparaben) with the injection volume of 20 μL . The stability of preservatives was investigated. **RESULTS** The resolution between ethylparaben, merthiolate and benzalkonium bromide was 19.7 and 48.7. The standard curves of merthiolate, ethylparaben and benzalkonium bromide were linear in the range of 9.1–151.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 2.1–41.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 21.8–218.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999, 1.000, 0.999$). The limit of detection were 1.4, 1.2, 13.1 ng. The content of merthiolate and ethylparaben decreased lightly under high temperature condition. Merthiolate decreased obviously under UV irradiation condition. Benzalkonium bromide was almost impervious to high temperature and UV irradiation conditions. **CONCLUSION** The method has high sensitivity and can effectively evaluate the content of preservatives in eye drops.

KEY WORDS: enoxacin eye drops; merthiolate; ethylparaben; benzalkonium bromide; determination; stability

依诺沙星为第三代喹诺酮类广谱抗菌药物, 1986 年由大日本制药株式会社研发上市, 原研剂型为片剂。原料药首仿企业为武汉制药厂[现为远大医药(中国)有限公司], 国内首仿片剂于 1989 年上市。依诺沙星滴眼液为国内首研品种, 国外无该剂型, 国内首研企业为湖北远大天明制药有限公司。适应证为敏感菌引起的结膜炎、角膜炎等眼部感染^[1-2]; 主要不良反应为轻微的刺激性^[3-5]。

经 SFDA 数据库确认, 国内共有 10 家生产企业, 10 个批准文号, 规格分别为 0.3%、5 mL: 15 mg、8 mL: 24 mg。国内执行标准为中国药典 2015 年

版二部^[6]和中国药典 2010 年版二部^[7], 国外通用药典均未收载该制剂。标准未对多剂量眼用制剂中使用的抑菌剂含量进行控制, 存在一定的安全隐患。此次国家抽样性评价的 50 批样品共涉及 4 家生产企业, 涵盖硫柳汞、羟苯乙酯和苯扎溴铵 3 种抑菌剂。故本研究通过 HPLC 同时测定依诺沙星滴眼液中抑菌剂硫柳汞、羟苯乙酯和苯扎溴铵的含量, 对 4 家企业的 50 批样品中的抑菌剂含量进行评价, 并对这 3 种抑菌剂的稳定性进行考察。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公

基金项目: 2016 年国家药品计划抽验项目(102)

作者简介: 陈春晓, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0592)5619833
Tel: (0592)5619847 E-mail: wennie621@163.com

E-mail: ccx0532@163.com *通信作者: 吴宏伟, 女, 副主任药师

司), 色谱柱为 Thermo Accucore XL C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 4 μm); XSE105 型电子分析天平(上海 Mettler Toledo 公司); SYW-300C-B 型药品稳定性试验仪(宁波东南仪器有限公司)。

苯扎溴铵对照品(批号: 135051-201401; 含量: 10.9 mg·mL⁻¹), 羟苯乙酯对照品(批号: 100847-201604; 含量: 99.9%), 硫柳汞对照品(批号: 135050-201401; 含量: 94.6%)均由中国食品药品检定研究院提供; 50 批依诺沙星滴眼液为国家评价性抽验样品; 甲醇和乙腈均为色谱级, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

Thermo Accucore XL C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 4 μm); 以 1%三乙胺溶液(用磷酸调节 pH 值至 3.0)为流动相 A, 以甲醇为流动相 B, 按下表进行梯度洗脱, 见表 1, 检测波长 218 nm(苯扎溴铵)、262 nm(羟苯乙酯、硫柳汞)。羟苯乙酯峰、硫柳汞峰与苯扎溴铵峰之间的分离度分别为 19.7 和 48.7。结果见图 1。

表 1 HPLC 流动相梯度洗脱表

Tab. 1 The gradient elution table of HPLC mobile phase

t/min	A 相/%	B 相/%
0	50	50
2	50	50
17	20	80
29	20	80
30	50	50
40	50	50

2.2 测定方法

精密称取硫柳汞对照品约 20 mg, 加水溶解并稀释至 50 mL, 作为硫柳汞储备液; 精密量取苯扎溴铵对照品 2 mL, 加水溶解并稀释至 100 mL, 作为苯扎溴铵贮备液; 精密称取羟苯乙酯对照品 20 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加乙醇 4 mL 溶解并用水稀释至刻度, 作为羟苯乙酯储备液。分别精密量取硫柳汞、苯扎溴铵、羟苯乙酯储备液各 5 mL, 置同一 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照溶液。取本品作为供试品溶液。精密量取供试品溶液与混合对照溶液各 20 μL, 分别注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。按外标法以峰面积分别计算, 供试品中含羟苯乙酯、苯扎溴铵或硫柳汞的量,

均应为标示量的 80%~120%, 结果见图 1。

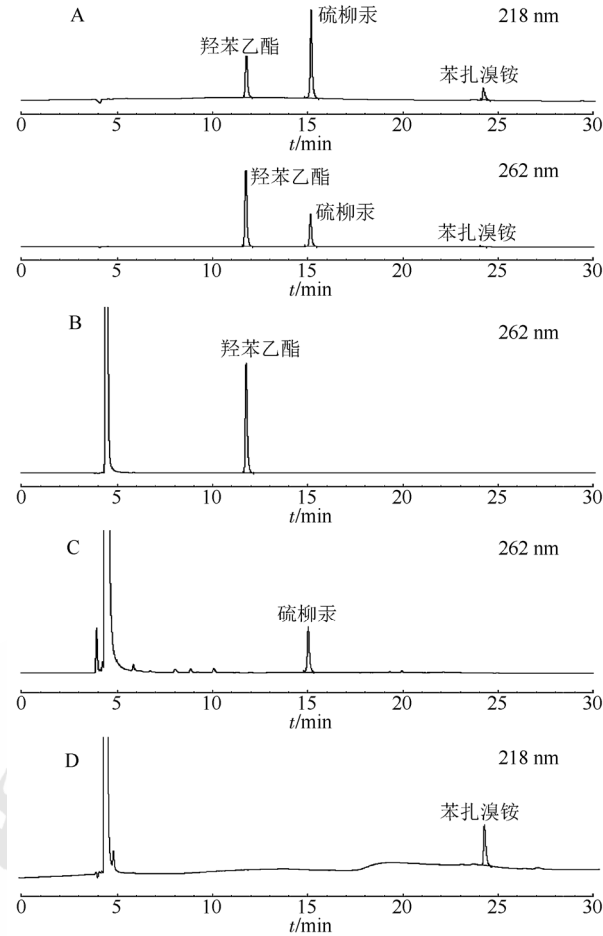


图 1 典型高效液相色谱图

A-系统适用性溶液; B-供试品(含羟苯乙酯); C-供试品(含硫柳汞); D-供试品(含苯扎溴铵)。

Fig. 1 Typical HPLC chromatograms

A-system suitability; B-sample(containing ethylparaben); C-sample(containing mercuriolate); D-sample(containing benzalkonium bromide).

2.3 对照品溶液的线性及范围

取苯扎溴铵、羟苯乙酯、硫柳汞对照品, 配制成系列浓度的标准品溶液进行测定, 3 类抑菌剂在相应的检测波长下, 均能在一定浓度范围内呈现较好的线性关系, 结果见表 2。

表 2 线性及范围

Tab. 2 Linearity and range

抑菌剂	线性范围/ μg·mL ⁻¹	线性方程	线性关系 r
苯扎溴铵	21.8~218.0	$Y=25.175\ 4X+0.816\ 4$	0.999
羟苯乙酯	2.1~41.2	$Y=160.255\ 0X+1.025\ 1$	1.000
硫柳汞	9.1~151.4	$Y=36.174\ 8X-41.206\ 6$	0.999

2.4 检出限与定量限

分别取“2.2”项下的苯扎溴铵、硫柳汞、羟

苯乙酯储备液适量,用水分别稀释至约含苯扎溴铵 $2.18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、硫柳汞 $0.20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、羟苯乙酯 $0.24 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,分别进样 $20 \mu\text{L}$ 和 $6 \mu\text{L}$,通过检测峰的信噪比(S/N), $S/N=3$ 为检出限, $S/N=10$ 为定量限,确定 3 种抑菌剂的检出限和定量限,结果见表 3。

表 3 检出限与定量限

Tab. 3 Limit of detection and limit of quantitation

抑菌剂	检出限/ng	定量限/ng
苯扎溴铵	13.1	43.6
羟苯乙酯	1.2	4.0
硫柳汞	1.4	4.8

2.5 仪器精密度试验

精密吸取“2.2”项下的混合对照溶液 $20 \mu\text{L}$,连续进样 6 次,苯扎溴铵、羟苯乙酯和硫柳汞的 RSD 值分别为 0.53%, 0.62%, 0.48%。表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

选取 3 个批号样品(批号 20160101 含硫柳汞、批号 1602211 含苯扎溴铵、批号 150217 含羟苯乙酯),各配制 6 份样品,按外标法以峰面积计算其中抑菌剂的含量,测得的 RSD 分别为 0.48%, 0.63%, 0.35%。表明该分析方法的重复性良好。

2.7 测定结果

此次抽样的 50 批样品,按外标法以峰面积分别计算供试品中含羟苯乙酯、苯扎溴铵或硫柳汞抑菌剂的量,限度按 80.0%~120.0%计算。有 17 批样品不符合规定,不合格率为 34%。不合格样品 15 批次来自企业 D(含硫柳汞),2 批来自企业 B(含苯扎溴铵),结果见图 2。

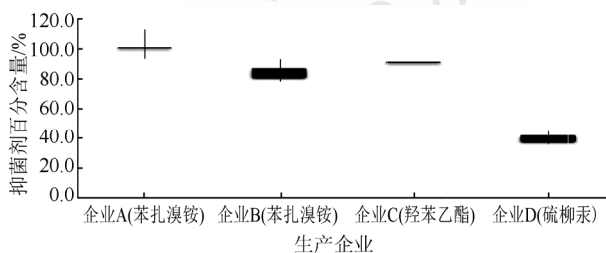


图 2 抑菌剂含量箱式图

Fig. 2 Box plot of preservative content

3 抑菌剂稳定性考察

3.1 长期稳定性试验

取放置在 40°C 、相对湿度 25%条件下 30, 60, 90 d 的样品,按拟定的方法测定其中的抑菌剂含量,并与原液比较,考察长期稳定性条件对抑菌

剂含量的影响。苯扎溴铵、羟苯乙酯和硫柳汞 3 种抑菌剂测定的 SD 值分别为 0.3%, 6.4%, 6.1%, 结果见图 3。

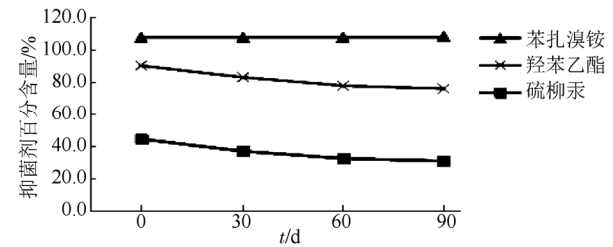


图 3 长期稳定性试验条件下对抑菌剂含量的影响

Fig. 3 Effect of long term stability test condition on preservatives

在 40°C 的长期稳定性试验中,抑菌剂硫柳汞、羟苯乙酯的含量均随着时间推移而逐渐减少,而抑菌剂苯扎溴铵含量随时间的推移基本不变。说明硫柳汞和羟苯乙酯在长期的储存过程中含量会逐步下降,通过调研以及对企业处方的研究可知,硫柳汞含量下降的原因可能是处方中辅料不相容导致,而羟苯乙酯可能由于包材对其吸附性导致含量下降。

3.2 高温影响

取放置在 60°C 下 5, 10 d 的样品,按拟定的方法测定其中的抑菌剂含量并与原液比较,考察高温条件对抑菌剂含量的影响。苯扎溴铵、羟苯乙酯和硫柳汞 3 种抑菌剂测定的 SD 值分别为 0.7%, 4.2%, 7.3%, 结果见图 4。

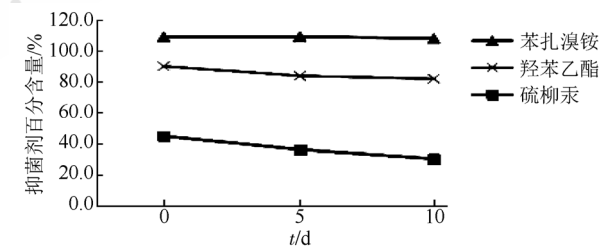


图 4 高温条件对抑菌剂含量的影响

Fig. 4 Effect of high temperature on preservatives

在 60°C 高温条件下,抑菌剂硫柳汞、羟苯乙酯的含量均随着时间推移而逐渐减少,抑菌剂苯扎溴铵含量随时间的推移变化较小。说明抑菌剂硫柳汞和羟苯乙酯在高温条件下不稳定,而温度对苯扎溴铵的影响不大。所以在储存含硫柳汞和羟苯乙酯的样品时,应注意阴凉保存,以防止抑菌剂含量下降达不到理想的抑菌浓度而使样品受到细菌的污染。

3.3 紫外光照影响

取放置在紫外光照条件下 5, 10 d 的样品, 按拟定的方法测定其中的抑菌剂含量并与原液比较, 考察紫外光照对抑菌剂含量的影响。苯扎溴铵、羟苯乙酯和硫柳汞 3 种抑菌剂测定的 SD 值分别为 1.9%, 2.7%, 25.0%, 结果见图 5。

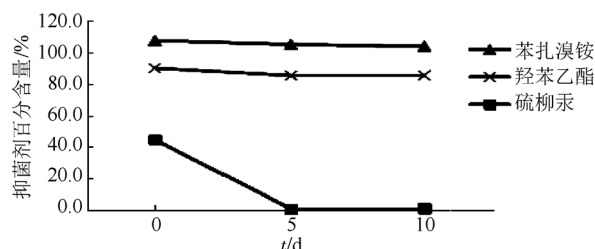


图 5 紫外光照对抑菌剂含量的影响

Fig. 5 Effect of UV irradiation on preservatives

通过紫外光照, 抑菌剂硫柳汞的含量相比于原液急剧下降。经过紫外光照 5 d 后, 硫柳汞的含量已经趋近于 0。进一步说明抑菌剂硫柳汞对于紫外光不稳定, 很容易降解。抑菌剂苯扎溴铵和羟苯乙酯的含量在紫外光照条线下变化不大。因此, 含硫柳汞抑菌剂的样品在保存和使用的过程中应尽量避免紫外光直射。

4 讨论

本研究参考中国药典 2015 年版二部阿昔洛韦滴眼液项下抑菌剂的测定方法^[8], 调整了流动相比例及检测波长。采用 HPLC 双波长法测定依诺沙星滴眼液中苯扎溴铵、羟苯乙酯、硫柳汞 3 种抑菌剂的含量。羟苯乙酯和硫柳汞在 262 nm 处的响

应较好, 而苯扎溴铵在 262 nm 处的响应较低, 易造成测定结果误差或漏检现象, 故建议苯扎溴铵含量测定应选用 218 nm 波长进行检测。试验证明, 本研究建立的抑菌剂含量测定方法, 能够较好地控制依诺沙星滴眼液中 3 种抑菌剂的含量, 及时发现问题, 弥补了依诺沙星滴眼液无抑菌剂含量控制的空白。

抑菌剂的稳定性考察发现, 硫柳汞在高温和紫外照射条件下含量均出现显著降低, 经调研还发现, 硫柳汞与辅料当中的硼酸存在不相容性, 因此含硼酸辅料的滴眼液是否应采用硫柳汞作为抑菌剂值得商榷。

REFERENCES

- [1] YAN X M. Be aware of toxicity of eye drops to ocular surface [J]. Chin J Ophthalmol(中华眼科杂志), 2005, 41(5): 387-389.
- [2] MA S M, LI Y, YAO X C, et al. Analysis of the development of the single-dose eye drops [J]. Chin Pract Med(中国实用医药), 2010, 5(24): 42-44.
- [3] AN X M. Analysis of 199 adverse reactions induced by enx [J]. China Pharm(中国药业), 2012, 21(13): 63-64.
- [4] 张明昌, 魏厚仁. 依诺沙星滴眼液治疗外眼细菌性炎症的临床观察[J]. 眼科新进展, 1995, 15(2): 27-30.
- [5] GE L K, CHEN J W, ZHANG S Y, et al. Photodegradation of fluoroquinolone antibiotic gatifloxacin in aqueous solutions [J]. Chin Sci Bull, 2010, 55(15): 1495-1500.
- [6] 中国药典. 二部[S]. 2015: 674.
- [7] 中国药典. 二部[S]. 2010: 477.
- [8] 中国药典. 二部[S]. 2015: 553-554.

收稿日期: 2017-11-10

(本文责编: 曹粤锋)