

中图分类号: R927.2; R988.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)09-0084-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.09.019



复方氯化钠滴眼液中羟苯乙酯含量测定及抑菌效力评价

傅星, 杨振春, 孙丽

(江苏省宿迁市食品药品检验所, 江苏 宿迁 223800)

摘要:目的 建立测定复方氯化钠滴眼液中羟苯乙酯含量的高效液相色谱法,并评价抑菌效力。方法 色谱柱为 DIKMA Diamonsil C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢铵溶液 (氨水调 pH 至 5.0) - 乙腈 (60:40, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 256 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 20 μL。对含不同质量浓度羟苯乙酯的复方氯化钠滴眼液进行抑菌效力评价。结果 羟苯乙酯质量浓度在 3.31 ~ 105.80 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好 ($r = 1, n = 6$); 检测限为 0.08 μg/mL, 定量限为 0.15 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均低于 2.0% ($n = 6$); 平均加样回收率为 99.81%, RSD 为 1.42% ($n = 9$)。标示量为 0.05 ~ 0.5 mg/mL 羟苯乙酯的复方氯化钠滴眼液均不能完全达到 2020 年版《中国药典(四部)》规定的抑菌效力。结论 建立的方法可用于复方氯化钠滴眼液中羟苯乙酯的含量测定, 应重新对该制剂中抑菌剂的添加量进行评价。

关键词: 复方氯化钠滴眼液; 羟苯乙酯; 高效液相色谱法; 含量测定; 抑菌效力

Content Determination of Ethylparaben in Compound Sodium Chloride Eye Drops and Evaluation of Its Bacteriostatic Efficacy

FU Xing, YANG Zhenchun, SUN Li

(Suqian Institute for Food and Drug Control, Suqian, Jiangsu, China 223800)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of ethylparaben in Compound Sodium Chloride Eye Drops, and to evaluate its bacteriostatic efficacy. **Methods** The chromatographic column was Dikma Diamonsil C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.05 mol/L ammonium dihydrogen phosphate solution (pH 5.0 adjusted by aqueous ammonia) - acetonitrile (60:40, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, and the detection wavelength was 256 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 20 μL. The bacteriostatic efficacy of Compound Sodium Chloride Eye Drops containing different concentrations of ethylparaben was evaluated. **Results** The linear range of ethylparaben was 3.31 - 105.80 μg/mL ($r = 1, n = 6$). The limit of detection (LOD) was 0.08 μg/mL, and the limit of quantitation (LOQ) was 0.15 μg/mL. The RSDs of precision, stability, and repeatability tests were lower than 2.0% ($n = 6$). The average recovery of ethylparaben was 99.81% with an RSD of 1.42% ($n = 9$). Compound Sodium Chloride Eye Drops with a labeled amount of 0.05 - 0.5 mg/mL ethylparaben could not fully achieve the bacteriostatic efficacy recorded in the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 Edition, Volume IV). **Conclusion** The established method can be used for the content determination of ethylparaben in Compound Sodium Chloride Eye Drops, and the addition dose of antibacterial agents in this preparation should be re-evaluated.

Key words: Compound Sodium Chloride Eye Drops; ethylparaben; HPLC; content determination; bacteriostatic efficacy

复方氯化钠滴眼液是一种以氯化钠、氯化钾等为主要成分的多剂量眼用制剂,适用于干眼症,眼睛疲劳等。2020年版《中国药典(四部)》通则0105 眼用制剂规定^[1],多剂量眼用制剂一般可加适当抑菌剂以抑制微生物的滋生^[2-5]。羟苯乙酯为尼泊金类抑菌剂,抑菌效果良好,广泛用于多种眼用制剂中^[6-8],但过量使用会导致过敏反应及类激素作用^[9]。2015年版《中国药典(四部)》收载现行抑菌效力检查法^[10],而市售复方氯化钠滴眼液大部分首次获批于此,尚缺乏相关抑菌效力评价。现行标准并未对复方氯化钠滴眼液中抑菌剂的添加量有明确要求,且无相应的检验方法,各生产企业的抑制剂添加量标准均不相同。从安全性考虑,有必要对该制剂进行定量检测^[11-12]及抑菌效力测

定^[13-15],以评估抑菌剂的添加是否合理、有效。为此,本研究中建立了测定产品中羟苯乙酯含量的高效液相色谱法,并评价其抑菌效力。现报道如下。

1 仪器、试剂、培养基与菌株

1.1 仪器

安捷伦 1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); XS105DU 型电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司, 精度为 0.01 mg); KH5200 型超声波清洗机 (昆山禾创超声仪器有限公司, 功率为 200 W, 频率为 40 kHz); IPP260 型低温培养箱 (德国 Memmert 公司)。

1.2 试剂

复方氯化钠滴眼液 (A 公司, 批号分别为 2008041, 2008281, 2102231, 2104081, 2106161, 2103071; B 公司,

第一作者: 傅星, 男, 硕士, 主管药师, 研究方向为药品质量控制, (电话) 0527-84355879 (电子信箱) fuxing2006@126.com。

批号分别为210909, 210606; C公司, 批号为21091401; 规格均为每瓶10 mL; 羟苯乙酯对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为100847-202105, 含量为100.0%); 羟丙甲纤维素(I型, 黏度为100 mPa·s); 乙腈、磷酸二氢铵、氯化钠均为色谱纯, 氯化钾为分析纯, 水为超纯水。

1.3 培养基

pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨培养基, 胰酪大豆胨琼脂(TSA)培养基, 胰酪大豆胨肉汤(TSB)培养基, 沙氏葡萄糖琼脂(SDA)培养基, 沙氏葡萄糖肉汤(SDB)培养基, 均购自北京陆桥技术股份有限公司, 均已进行培养基适用性检查。

1.4 菌株

金黄色葡萄球菌 CMCC(B)26003, 铜绿假单胞菌 CMCC(B)10104, 大肠埃希菌 CMCC(B)44102, 白色念珠菌 CMCC(F)98001, 黑曲霉 CMCC(F)98003, 均由中国医学细菌保藏管理中心(CMCC)提供, 用于菌液制备的工作菌株均为第3代。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: DIKMA Diamonsil C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.05 mol/L 磷酸二氢铵溶液(氨水调 pH 至 5.0) - 乙腈(60:40, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 256 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

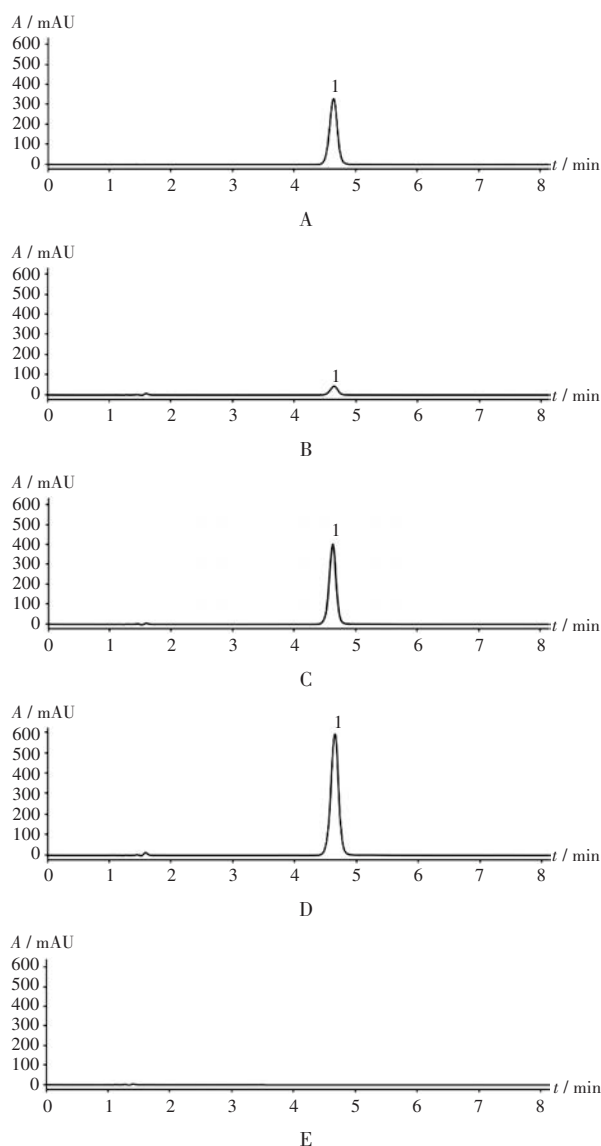
2.2 溶液制备

取羟苯乙酯对照品 10.58 mg, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 加 2 mL 乙腈溶解, 加流动相定容, 摇匀, 作为标准贮备液, 备用。精密量取样品 2 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 加流动相定容, 摇匀, 作为供试品溶液。按 2020 年版《中国药典(四部)》复方氯化钠滴眼液项下处方工艺(除抑菌剂)配制, 取氯化钠 0.9 g、氯化钾 0.014 g、碳酸氢钠 0.02 g, 精密称定, 以及羟丙甲纤维素适量(视终溶液黏度调整), 加注射用水至 100 mL, 制成空白对照溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验: 取 2.2 项下 3 种溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 辅料及主药均不干扰抑菌剂羟苯乙酯的测定。色谱图见图 1。

线性关系考察: 精密量取 2.2 项下标准贮备液, 加流动相制成质量浓度分别为 3.31, 6.61, 13.23, 26.45, 52.90, 105.80 μg/mL 的系列标准溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 56.798X - 5.7991$ ($r = 1, n = 6$)。结果表明, 羟苯乙酯质量浓度在 3.31 ~ 105.80 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。



1. 羟苯乙酯

A. 对照品溶液 B - D. 供试品溶液(批号分别为 2008041, 210909, 21091401) E. 空白对照溶液

图 1 高效液相色谱图

1. Ethylparaben

A. Reference solution B - D. Test solution (Lot No.: 2008041, 210909, 21091401) E. Blank reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

检测限和定量限确定: 取 2.2 项下标准贮备液, 加流动相逐级稀释, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录各质量浓度下对照品峰的信噪比(S/N)。以 S/N 为 3:1 和 10:1 时的质量浓度作为检测限和定量限。结果羟苯乙酯的检测限为 0.08 μg/mL, 定量限为 0.15 μg/mL。

精密度试验: 精密量取样品(批号为 2008041)适量, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定 6 次, 记录峰面积。结果羟苯乙酯峰面积的 RSD 为 0.36% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取精密度试验项下供试品溶液适量,

按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果羟苯乙酯峰面积的RSD为1.50%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取精密度试验项下供试品溶液适量,分别于室温放置0,4,8,12,16,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定。结果羟苯乙酯峰面积的RSD为0.61% ($n=6$),表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

加样回收试验:精密量取已知含量的样品(批号2008041)1.0 mL,共9份,置10 mL容量瓶中,分别加入标准贮备液0.25,0.40,0.50 mL,加流动相定容,按2.1项下色谱条件进样测定。结果平均加样回收率为99.81%,RSD为1.42% ($n=9$)。

耐用性试验:分别改变柱温(25~35 ℃)、流速(0.8~1.2 mL/min)、检测波长(251~261 nm)、流动相pH值(4.8~5.2)和色谱柱[Zorbax SB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),Ultimate LP-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)],其他条件不变,记录峰面积,并计算含量。结果测定结果不受影响,表明方法耐用性良好。

2.4 样品含量测定

分别取9批样品各适量,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定3次,记录峰面积,并计算样品含量。结果见表1。

表1 样品中羟苯乙酯含量测定结果(mg/mL, $n=3$)

Tab.1 Results of the content determination of ethylparaben in samples (mg/mL, $n=3$)

企业	批号	标示量	测定含量	企业	批号	标示量	测定含量
A	2008041	0.05	0.034	B	2103071	0.05	0.038
	2008281	0.05	0.036		210909	0.3	0.286
	2102231	0.05	0.038	210606	0.3	0.288	
	2104081	0.05	0.039	C	21091401	0.5	0.472
	2106161	0.05	0.040				

2.5 抑菌效力测定

2.5.1 菌液制备

取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌的新鲜培养物接种于TSB培养基中,取白色念珠菌和黑曲霉的新鲜培养物接种至SDB培养基中,培养24 h后,用pH 7.0的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液逐级稀释至 10^{-7} ,分别用TSA培养基和SDA培养基计数。根据计数结果将原菌液配制成含菌 $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL的菌悬液,备用。

2.5.2 抑菌效力测定

取企业A、企业B、企业C的复方氯化钠滴眼液各5瓶,分别加入上述5种菌液0.1 mL,使每瓶滴眼液中含菌量为 $10^5 \sim 10^6$ cfu/mL,20 ℃避光贮存,分别于6,24 h及7,14,28 d取样,稀释法计数,换算成lg值,并与接种菌数lg值比较差值。结果见表2。

表2 样品中羟苯乙酯抑菌效力测定结果

Tab.2 Evaluation results of the bacteriostatic efficacy of ethylparaben in samples

企业	试验菌	接种前后差值				
		6 h	24 h	7 d	14 d	28 d
A	金黄色葡萄球菌	0	0.2	0.5	-	NR
	铜绿假单胞菌	0.3	0.5	0.9	-	NR
	大肠埃希菌	0.2	0.3	0.3	-	NR
	白色念珠菌	-	-	0.2	0.5	NI
	黑曲霉	-	-	0.5	0.7	NI
B	金黄色葡萄球菌	0.2	0.6	1.5	-	NR
	铜绿假单胞菌	0.4	1.1	2.6	-	NR
	大肠埃希菌	0.2	0.5	0.6	-	NR
	白色念珠菌	-	-	0.2	0.2	NI
	黑曲霉	-	-	0.8	1.0	NI
C	金黄色葡萄球菌	0.6	1.1	1.7	-	NR
	铜绿假单胞菌	1.0	2.2	3.9	-	NR
	大肠埃希菌	0.7	1.4	1.7	-	NR
	白色念珠菌	-	-	1.1	1.5	NI
	黑曲霉	-	-	1.5	2.1	NI

注:NR为试验菌未恢复生长;NI为未增加,是指对前1个测定时间,试验菌增加的数量不超过0.5lg;-为未检测。

Note:NR refers to no recovery of test bacteria;NI refers to no increase,in the table it means that for the previous measurement time,the number of the test bacteria increase ≤ 0.5 lg;- refers to not detected.

3 讨论

由表1可知,各批号的复方氯化钠滴眼液中羟苯乙酯的含量均未超过相应标示量,各生产企业较好地控制了制剂中羟苯乙酯的含量。

通过对3家企业生产的复方氯化钠滴眼液进行抑菌效力评价,发现制剂中添加的羟苯乙酯的抑菌效力都不能完全达到2020年版《中国药典(四部)》所规定的抑菌效力的要求;从抑菌效力的结果来看,制剂的抑菌效力是随着羟苯乙酯的添加量而增强的。提示生产企业在合理范围内可适当增加羟苯乙酯的添加量而保障制剂的抑菌效果。

现行标准对于复方氯化钠滴眼液中抑菌剂的种类及添加量均无明确要求。眼用制剂中的常用抑菌剂有羟苯乙酯、羟苯丙酯、苯扎氯铵、苯扎溴铵、硫柳汞等,市售复方氯化钠滴眼液中的抑菌剂均为羟苯乙酯,且不同的生产企业的添加量有较大差异,但各滴眼液的抑菌效力均不符合2020年版《中国药典(四部)》通则1121 抑菌效力检查法的要求。

羟苯乙酯对眼刺激性较大,美国食品和药物管理局并未推荐其在眼用制剂中使用,在口服和皮肤制剂的最大用量为0.05%^[16]。相关生产企业应重新对复方氯化钠