

眼氨肽滴眼液中抑菌剂的含量测定及活性炭对抑菌剂的吸附性研究

覃婷婷*, 黄哲甦, 白海娇

(天津市药品检验研究院, 天津 300070)

摘要 建立一种检测眼氨肽滴眼液中抑菌剂含量的 HPLC 法, 使用 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 1% 三乙胺溶液 (用磷酸调节 pH 至 3.0) 为流动相 A, 甲醇为流动相 B 进行梯度洗脱, 检测波长为 256 nm, 柱温 40 °C, 流速 1.0 mL/min。在该条件下羟苯甲酯、羟苯乙酯和醋酸氯己定 3 种抑菌剂分离度良好, 各抑菌剂在 0.1 ~ 80 μg/mL 质量浓度范围内, 峰面积与浓度呈良好线性关系 ($r > 0.999$), 回收率分别为 97.2% ~ 104.1%, RSD 为 0.8% ~ 1.2%。用该法检测的 5 批市售眼氨肽滴眼剂抑菌剂含量均低于处方量的 10%, 经考察发现生产工艺中使用的活性炭对于抑菌剂有强吸附作用, 温度越低、活性炭浓度越高对抑菌剂的吸附越强, 其中活性炭对不同抑菌剂的吸附能力由大到小分别为: 醋酸氯己定、羟苯乙酯、羟苯甲酯。结果表明, 建立的 HPLC 法, 操作简便, 灵敏度高, 重复性好, 可用于快速准确测定眼氨肽滴眼液中抑菌剂含量; 此外, 本研究首次揭示了眼氨肽滴眼液生产中除杂工序对抑菌剂的影响, 结果表明, 在除杂质工序中, 不适宜在添加尼泊金酯类和醋酸氯己定抑菌剂前使用活性炭除杂质, 为其生产质量监控与提升提供了新的指导方案。

关键词 眼氨肽滴眼液; 活性炭; 抑菌剂; 尼泊金酯类; 醋酸氯己定; 含量测定

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)01-0038-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200107

引用本文 覃婷婷, 黄哲甦, 白海娇. 眼氨肽滴眼液中抑菌剂的含量测定及活性炭对抑菌剂的吸附性研究[J]. 中国药科大学学报, 2020, 50(1): 38-43.

Cite this article as: QIN Tingting, HUANG Zhesu, BAI Haijiao. Content determination of bacteriostats in ocular extractives eye drops and the absorption effect of activated carbon on it[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(1): 38-43.

Content determination of bacteriostats in ocular extractives eye drops and the absorption effect of activated carbon on it

QIN Tingting*, HUANG Zhesu, BAI Haijiao

Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

Abstract To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method to determine the content of bacteriostats in the ocular extractives eye drops, Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used, with gradient elution by 1% triethylamine solution (pH 3.0) (mobile phase A) and methanol (mobile phase B). The detection wavelength was 256 nm; the column temperature was 40 °C; and the flow rate was 1.0 mL/min. Under these conditions, the three bacteriostats of methylparaben, ethylparoben and chlorhexidine acetate showed good resolution. The bacteriostats exhibited good linear relationship between the peak area and the concentration in the concentration range of 0.1-80 μg/mL ($r > 0.999$). The recoveries were from 97.2% to 104.1%, and the RSD was 0.8% to 1.2%. The content of bacteriostats in all the five batches of ocular extractives eye drops was less than 10% of the prescription amount. It was found that the activated carbon used in the production process had strong adsorption effect on the bacteriostat, and that the lower the temperature and the higher the concentration of activated carbon, the stronger the adsorption of bacteriostatic agent. The adsorption capacity of activated carbon for different bacteriostats is: chlorhexidine acetate > ethylparoben > methylparaben. The results showed that the

established HPLC method was easy to operate with high sensitivity and good repeatability. It can be used to determine the content of bacteriostat in ocular extractives eye drops quickly and accurately. In addition, this study reveals for the first time the effect of impurity removal process on bacteriostat in the production of ocular extractives eye drops. It is not suitable to use activated carbon to remove impurities before adding parabens and chlorhexidine acetate bacteriostats. The current work provides a new guiding basis for the monitoring and improvement of the quality of ocular extractives eye drops.

Key words ocular extractives eye drops ; activated carbon; bacteriostat; nipagins; chlorhexidine acetate; content determination

眼氨肽滴眼液(又名眼宁滴眼液、眼生素滴眼液)系由牛、羊或猪动物眼为原料,经乙醇提取等工艺后加适量的抑菌剂并经活性炭脱色除杂质等工序无菌操作制成的滴眼液。该产品含有多种氨基酸、多肽、核苷酸及钠、钾、钙、镁等微量元素,用于治疗角膜炎、视力疲劳及青少年假性近视^[1-2],临床上也用于治疗角膜上皮持续性缺损、干眼症等眼科疾病^[3-5]。该产品目前为多剂量滴眼液,需要反复开瓶与空气接触,同时本品含有多种氨基酸、核酸、多肽等营养物质,容易滋生细菌,故处方中的抑菌剂对于防止微生物繁殖、保证滴眼液的正常使用具有重要意义。

尼泊金酯类(羟苯甲酯、羟苯乙酯和羟苯丙酯等)和醋酸氯己定^[6-8]常被作为滴眼液的抑菌剂使用,不同企业生产的眼氨肽滴眼液中添加了 0.01%~0.02% 不等的羟苯甲酯、羟苯乙酯和醋酸氯己定。由于不同种类的抑菌剂会对眼睛产生刺激作用进而造成损害^[9],近年来业界对于滴眼液抑菌剂的质量控制日益重视,并对其加入量进行严格控制,如《中华人民共和国药典》(2015 年版)二部收载的滴眼液制剂中有 11 个品种对抑菌剂含量进行控制,限度均应为处方标示量的 80%~120% 或不得过 120%,既限制了滴眼液中抑菌剂的添加量,又要保证抑菌剂的抑菌效力。眼氨肽滴眼液质量标准收载在国家药品标准化学药品地方标准上升国家标准第九册中,现行标准尚未对抑菌剂进行控制,存在着较大的风险隐患。目前尚无文献报道可以同时测定尼泊金酯类和醋酸氯己定这两类抑菌剂的检测方法,因此本研究参考相关文献^[10-11]建立了眼氨肽滴眼液中抑菌剂的检测方法,并对市售的 2 个企业共 5 批眼氨肽滴眼液进行了抑菌剂含量测定,并研究活性炭对抑菌剂的吸附作用,为眼氨肽滴眼液的生产改进提供了新的指导依据。

1 材 料

1.1 药品与试剂

羟苯甲酯(批号 100278-201705,纯度 100%)、羟苯乙酯(批号 100847-201604,纯度 99.9%)、醋酸氯己定(批号 100183-201604,纯度 96.3%)(中国食品药品检定研究院);羟苯丙酯(纯度 99.5%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司);活性炭(天津市华东试剂厂);甲醇为色谱纯,三乙胺、磷酸均为市售分析纯。眼氨肽滴眼液均为市售制剂,共 5 批,企业 1 为批号 160601(S1)和 180201(S2),企业 2 为批号 161001(S3)、161102(S4)、171004(S5)。

1.2 仪 器

1260 液相色谱仪(美国安捷伦公司);XS 205 十万分之一天平(瑞士梅特勒公司);SMHS 多点加热磁力搅拌器(韩国大韩科学株式会社)。

2 方法与结果

2.1 抑菌剂的测定

2.1.1 色谱条件 采用 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,以 1% 三乙胺溶液(用磷酸调节 pH 至 3.0)为流动相 A,甲醇为流动相 B,梯度洗脱:0~2 min,流动相 B 50%,2~17 min,流动相 B 50%→90%,17~20 min,流动相 B 90%,20~20.1 min,流动相 B 90%→50%,20.1~27 min,流动相 B 50%。检测波长为 256 nm,柱温 40 ℃,流速 1.0 mL/min,进样量 20 μL。

2.1.2 溶液配制

系统适用性溶液:分别精密称取羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯和醋酸氯己定对照品适量,加 50% 甲醇溶解并稀释制成每 1 mL 分别含 20 μg 的混合溶液作为系统适用性试验溶液,取该溶液照“2.1.1”项下条件进样分析,色谱图见图 1,各组峰之间分离度均大于 1.5。

对照品溶液:取羟苯甲酯和羟苯乙酯分别精密称定,加50%甲醇溶解并稀释制成每1 mL含羟苯甲酯20 μg 和羟苯乙酯10 μg 的溶液作为对照品溶液A;取醋酸氯己定精密称定,加50%甲醇溶解并稀释制成每1 mL含醋酸氯己定15 μg 的溶液作

为对照品溶液B。

供试品溶液:取供试品直接进样分析,以外标法计算抑菌剂含量,色谱图见图1。

阴性对照溶液:取未检出抑菌剂的样品作为阴性对照溶液,色谱图见图1。

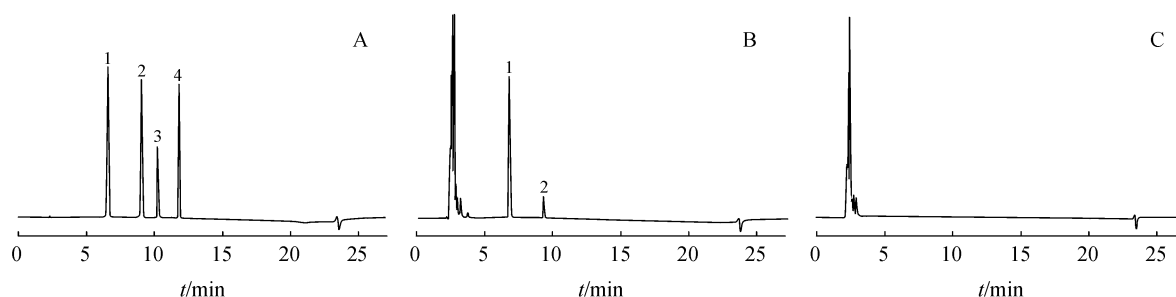


Figure 1 Chromatograms of system suitability solution (A), test solution (B) and negative control solution (C)

1: Methylparaben; 2: Ethylparaben; 3: Chlorhexidine acetate; 4: Propylparaben

2.1.3 线性关系 取羟苯甲酯、羟苯乙酯和醋酸氯己定对照品分别精密称定,用50%甲醇稀释系列梯度溶液,溶液中分别含羟苯甲酯、羟苯乙酯和醋酸氯己定0.1~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 摇匀。取上述溶液进样20 μL 分析,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,结果见表1。3种抑菌剂在相应浓度范围内,峰面积与浓度呈良好线性关系。

2.1.4 精密度、检出限和定量限 分别取对照品溶液A和对照品溶液B连续进样5次,记录各化合物峰面积,羟苯甲酯、羟苯乙酯和醋酸氯己定的RSD分别为0.43%、0.64%和0.43%;取对照品溶液A和对照品溶液B用50%甲醇稀释一系列浓度溶液进样分析,计算各化合物的信噪比,并计算3种抑菌剂的检出限和定量限,结果见表1。

Table 1 Standard curves, LOQ, LOD of three bacteriostatics ($n=10$)

Compound	Linearity	r	Range / ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOQ/ng	LOD/ng
Methylparaben	$y = 116.8x + 22.797$	0.999 9	0.1-80.5	2	0.6
Ethylparaben	$y = 110.04x + 35.132$	0.999 1	0.1-80.7	2	0.6
Chlorhexidine acetate	$y = 63.948x - 14.455$	1.000 0	0.2-77.9	5	1.7

2.1.5 重复性和回收率 分别取S1和S3的同批样品各6瓶,照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,进样分析测定计算各抑菌剂含量及RSD,结果见表2。取S1和S3各9份样品,每份分别精密加

入相当于样品中抑菌剂含量80%、100%、120%的对照品,制备低、中、高3种浓度的溶液进样测定,计算各抑菌剂的平均回收率,结果见表2。

Table 2 Results of repeatability and recovery test

Sample	Detected bacteriostatic	Repeatability ($n=6$)		Recovery ($n=9$)	
		Content / ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	RSD/%	Average recovery/%	RSD/%
S1	Methylparaben	17.9	1.38	97.2	1.21
S1	Ethylparaben	2.9	1.37	104.1	1.12
S4	Chlorhexidine acetate	0	—	101.8	0.89

2.1.6 样品测定 取收集到的5批眼氨肽滴眼液照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,进样分析测定各抑菌剂含量,结果见表3。

2.2 活性炭对抑菌剂的吸附试验

取羟苯甲酯、羟苯乙酯和醋酸氯己定分别精密称定,加50%甲醇溶解并稀释制成每1 mL含羟苯

甲酯5 mg、羟苯乙酯2.5 mg和醋酸氯己定3.75 mg的抑菌剂贮备液,精密量取上述抑菌剂贮备液适量置同一量瓶中,加活性炭适量,用不含抑菌剂的供试品S3稀释制成每1 mL溶液中含羟苯甲酯0.2 mg、羟苯乙酯0.1 mg和醋酸氯己定0.15 mg的抑菌剂溶液进行以下试验。

Table 3 Bacteriostatic detected in different samples of ocular extractives eye drops

Sample	Dectected bacteriostatic	Content/($\mu\text{g/mL}$)	Prescription amount/($\mu\text{g/mL}$)	Percentage/%
S1	Methylparaben	17.9	200	9.0
	Ethylparoben	2.9	100	2.9
S2	Methylparaben	0.8	200	0.4
	Ethylparoben	0.1	100	0.1
S3	Chlorhexidine acetate	0	150	0.0
S4	Chlorhexidine acetate	0	150	0.0
S5	Chlorhexidine acetate	0	150	0.0

2.2.1 搅拌时间影响试验 制备活性炭含量为 0.2% 的抑菌剂溶液分别在室温、40℃、60℃ 3 个不同温度下搅拌上述抑菌剂溶液,并分别在 15、30、45、60 min 取溶液过滤,照“2.1.2”项下方法测定 3 种抑菌剂的剩余百分含量,结果见图 2。由图 2 可知,在不同温度下,羟苯甲酯和羟苯乙酯在 15 min 时含量均低于初始加样量的 15%,而醋酸氯己定则被完全吸附,15 min 后活性炭的吸附作用趋于稳定。同时在不同温度下,活性炭对抑菌剂的吸附存在差异。

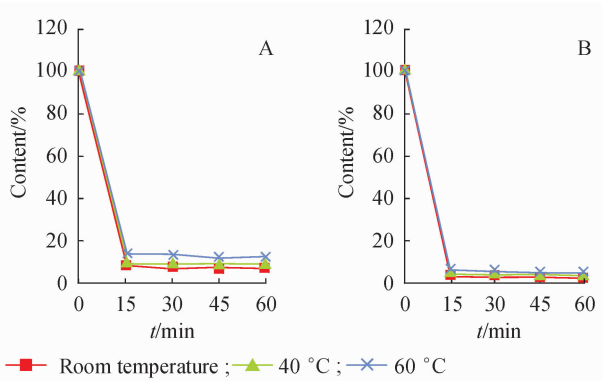


Figure 2 Effect of activated carbon on adsorption of methylparaben (A) and ethylparaben (B) under different stirring time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2.2 加热温度影响试验 考虑到眼氨肽滴眼液实际生产时,加活性炭搅拌保温的时间一般不少于 15 min,故选择 30 min 作为搅拌停止时间,考察在不同温度时活性炭对抑菌剂的吸附影响。制备活性炭含量为 0.2% 的抑菌剂溶液分别在 40℃、60℃、80℃ 3 个不同温度下搅拌上述溶液,并在 30 min 时取溶液过滤,照“2.1.2”项下方法测定 3 种抑菌剂的剩余百分含量,结果在不同温度下醋酸氯己定均被完全吸附,而对于羟苯甲酯和羟苯乙酯,温度越低,则抑菌剂剩余量越少,活性炭对抑菌剂的吸附能力越强,见图 3。

2.2.3 活性炭浓度影响试验 分别制备活性炭含量为 0.1%、0.2%、0.3% 的抑菌剂溶液。在 80℃

下搅拌上述溶液,并在 30 min 时取溶液过滤,照“2.1.2”项下方法测定 3 种抑菌剂的剩余百分含量,结果醋酸氯己定仍被完全吸附,羟苯甲酯和羟苯乙酯被部分吸附,剩余百分含量见图 4。由图 4 可知,活性炭添加量越多,抑菌剂被吸附的量越多,其中活性炭添加量为 0.1% 时,抑菌剂剩余量最高。

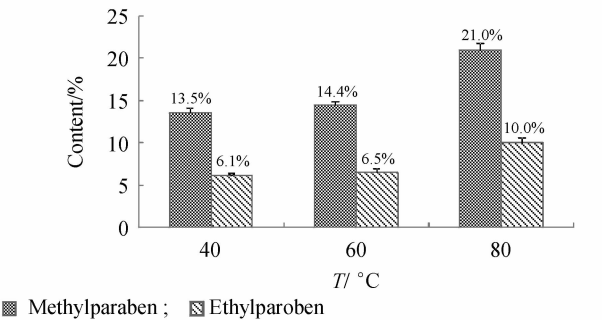


Figure 3 Effect of activated carbon on the adsorption of bacteriostat at different temperatures ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

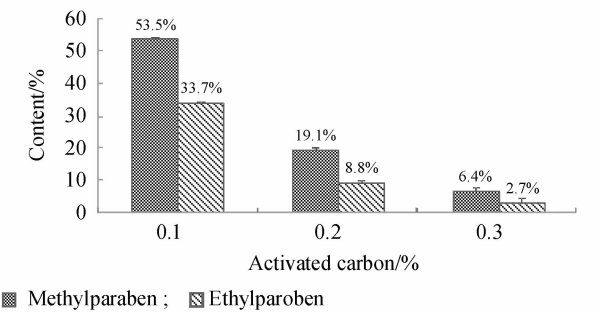
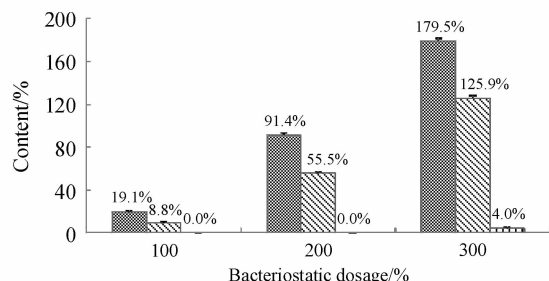


Figure 4 Effect of different amounts of activated carbon on the adsorption of bacteriostat ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2.4 抑菌剂剂量影响试验 分别精密量取“2.2”项下方法抑菌剂贮备液适量,加供试品 S3 稀释制得含抑菌剂为处方量的 100%、200%、300% 的抑菌剂溶液,活性炭添加量均为 0.2%。在 80℃ 下搅拌上述溶液,并在 30 min 时取溶液过滤,照“2.1.2”项下方法测定 3 种抑菌剂的剩余百分含量,结果见图 5。由图 5 可知,活性炭添加量为 0.2% 时,当抑菌剂添加量分别增至处方量的 200% 和 300%,剩余的羟苯甲酯和羟苯乙酯才

能接近处方量,而即使将抑菌剂添加至处方量的 300%,经吸附后,醋酸氯己定仅剩下处方量的 4.0%,抑菌剂添加量为处方量的 100% 和 200% 时,醋酸氯己定剩余量均为 0%。



■ Methylparaben; ▨ Ethylparaben; ▤ Chlorhexidine acetate

Figure 5 Effect of activated carbon on the adsorption of different concentrations of bacteriostat ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

3.1 流动相的选择

参考文献[10]试验流动相为 0.02 mol/L 磷酸二氢钾(用磷酸调节 pH 至 2.5)-乙腈(70:30)时,羟苯甲酯与醋酸氯己定同时洗脱,无法有效分离。另参考文献[11]分别考察了羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯和醋酸氯己定的峰形与分离度,发现当流动相为 1% 三乙胺溶液(用磷酸调节 pH 至 5.0)时醋酸氯己定峰有拖尾现象,而将该流动相用磷酸调节 pH 至 3.0 时,醋酸氯己定峰对称性较好。故最终选择流动相为以 1% 三乙胺溶液(用磷酸调节 pH 至 3.0)为流动相 A,甲醇为流动相 B 进行梯度洗脱,既保证 3 种抑菌剂能够完全分开,又使色谱峰具有良好的对称性。

3.2 活性炭对抑菌剂的吸附影响

本研究发现活性炭对羟苯甲酯、羟苯乙酯和醋酸氯己定 3 种抑菌剂的吸附能力由大到小分别为:醋酸氯己定、羟苯乙酯、羟苯甲酯,与眼氨肽滴眼液样品抑菌剂测定结果相一致,即抑菌剂含量由小到大依次为:醋酸氯己定、羟苯乙酯、羟苯甲酯。由此可见,在生产眼氨肽滴眼液时,不适宜在使用活性炭过滤杂质前添加尼泊金酯类和醋酸氯己定抑菌剂,该操作将导致抑菌剂被大量吸附,而这一现象在眼氨肽注射液的生产中尚未为人们所认知。此外,本实验为方便操作,将 3 种抑菌剂放在同一溶液中进行影响因素试验,在实际生产中,眼氨肽滴眼液产品只添加一种或者两种抑菌剂,被活性炭吸

附后抑菌剂的剩余量可能会更少。另外,有文献报道当活性炭浓度为 0.5%,在 85 °C 保温 30 min 时活性炭去除眼氨肽中的杂蛋白效果最好^[12],然而该条件下,大部分抑菌剂已被活性炭吸附。综上所述,建议在眼氨肽滴眼液的生产中抑菌剂应在活性炭除杂后添加,或者选择其他对抑菌剂吸附性小、影响小的过滤介质或除杂工艺。如必须在添加抑菌剂前使用活性炭吸附除杂,因则应综合考虑活性炭对杂蛋白、主成分和抑菌剂的吸附影响,选择活性炭吸附率低的抑菌剂或调整抑菌剂的添加量,并检测终产品中抑菌剂的含量,使抑菌剂维持合理有效的浓度,保证产品的抑菌效力和质量安全。

3.3 眼氨肽滴眼液中抑菌剂的测定结果

本试验仅对市售的两个企业生产的 5 批眼氨肽制剂进行了抑菌剂含量测定,其结果均低于处方量的 10%,未达到《中华人民共和国药典》中其他品种抑菌剂应为处方量 80%~120% 的限度要求,说明这两个企业的眼氨肽滴眼液质量仍有待提升,同时,应进一步建立眼氨肽滴眼液的抑菌剂测定标准,从而保证该品种的产品质量。

参考文献

- [1] Sun X. Clinical observation of ocular extractives eye drops combined with tropicamide in the treatment of pseudomyopia[J]. *Chin J Mod Drug Appl* (中国现代药物应用), 2011, 3(5):124-125.
- [2] Li JQ. Therapeutic effect of ocular extractives eye drops on non-suppurative keratitis[J]. *J Mudanjiang Med Coll* (牡丹江医学院学报), 2003, 24(1):24-25.
- [3] Xing F, Guo HY, Zhang YQ. Clinical observation of ocular extractives eye drops in the treatment of corneal epithelial persistent defects[J]. *Chin Ophthal Res* (眼科研究), 2003, 21(2):212.
- [4] Wang J, Yang MS. Therapeutic effect of ocular extractives combined with recombinant human epidermal growth factor derivative eye drops on persistent epithelial defects[J]. *China Pract Med* (中国实用医药), 2008, 3(25):127.
- [5] Zhang HZ, Yin WW, Chen M. Clinical research of vitamin A and ocular extractives eye drops ultrasonic spray inhalation in treatment of dry eye disease[J]. *J Med Forum* (医药论坛杂志), 2011, 32(11):49-50.
- [6] Li F, Chen Y. Germicidal effects of the chlorhexidine acetate[J]. *J Microbiol* (微生物学杂志), 2014, 34(1):101-103.
- [7] Chen X, Liu MX. Progress in research and application of preservatives in ophthalmic preparations[J]. *Tianjin Pharm* (天津药

- 学),2013,25(5):54-59.
- [8] An Y. Application and quality control of bacteriostatic agents in ophthalmic preparations[J]. *Tianjin Pharm*(天津药学),2011,23(1):56-58.
- [9] Liu AM, Li W, Wang BM. Ocular surface damage of bacteriostatic agents in ophthalmic preparations[J]. *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志),2002,22(6):371-373.
- [10] Zhou CD, Huang ZS. Determination of chlorhexidine acetate in ocular extractives eye drops by HPLC[J]. *Tianjin Pharm*(天津药学),2013,25(2):15-17.
- [11] Chinese Pharmacopoeia Commission. Determination of bacteriostatic agent content in eye drops [EB/OL]. (2018-03-28) [2018-09-06]. <http://www.chp.org.cn/upload/userfiles/20180328/1101522202450037.pdf>.
- [12] Dai X. Methods for improving clarity of ocular extraction injection [J]. *Chin J Biochem Pharm*(中国生化药物杂志),2002,23(3):155-156.

· 校园信息 ·

中国药科大学 ESI 学科排名取得新突破

1月9日,科睿唯安(Clarivate Analytics)公布了2020年1月的ESI最新数据。中国药科大学药理学与毒理学首次进入全球前万分之五,位列全球第43位,较上一期提升4位,稳居国内高校第一。材料科学首次进入ESI全球前1%,至此,中国药科大学进入ESI全球前1%学科数突破5个(药理学与毒理学、化学、临床医学、生物与生物化学、材料科学)。

表 中国药科大学 ESI 学科排名数据(2020 年 1 月)

学科名称	国际排名(本期)	国际排名(上期)	论文数量	被引次数	篇均被引	高水平论文
药理学与毒理学	43	47	3 069	33 931	11.06	14
化学	452	463	3 252	34 286	10.54	10
临床医学	2 439	2 441	729	8 800	12.07	9
生物与生物化学	926	897	872	8 106	9.30	5
材料科学	902	-	356	6 915	19.42	4
全部学科	1 235	1 242	9 699	108 455	11.18	48

ESI(基本科学指标数据库,Essential Science Indicators)是目前世界范围内普遍用以评价高校、学术机构、国家或地区国际学术水平及影响力的重要评价指标工具之一。本期ESI数据覆盖时间范围为2009年1月1日至2019年10月31日。中国药科大学全部学科综合排名、论文数量、篇均被引等指标均稳步提升。

近年来,中国药科大学以“双一流”建设为契机,不断凝练学科方向,提升学科内涵,积极构建具有结构性优势和国际竞争力的现代药学科体系,推动药学和中药学龙头学科跨越式发展,助力化学、生物学、基础医学等支撑学科群聚发展,谋划布局生物医药材料、生物医药大数据与人工智能等新兴交叉学科领域,支持经、管、文、法等人文社会学科协调发展。龙头学科领域(药学、药理学与毒理学、药物化学等)在国际主流排行榜(ESI、USNews、ARWU、CWUR)均位列世界前50位,药学特色世界一流研究型大学已初具雏形。

(研究生院、“双一流”建设办公室、图书与信息中心)