

# 利奈唑胺滴眼液的制备、质量控制和眼刺激性实验<sup>Δ</sup>

姚向超<sup>1\*</sup>, 王延东<sup>1#</sup>, 曾夏芸<sup>2</sup>(1.中山大学中山眼科中心, 广州 510060; 2.广东宏盈科技有限公司, 广东佛山 528531)

中图分类号 R943;R944.1<sup>2</sup> 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)21-1961-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.14

**摘要** 目的:制备利奈唑胺滴眼液,并对其进行质量控制和眼刺激性考察。方法:以玻璃酸钠、氯化钠、泊洛沙姆407和依地酸二钠为辅料,采用新型眼用释药系统纳米分子罩系统 $\alpha$ (NMHS $\alpha$ )制备利奈唑胺滴眼液,采用高效液相色谱法测定滴眼液中利奈唑胺的含量,考察滴眼液的免眼刺激性和稳定性。结果:所制滴眼液为类白色黏稠液体,规格为10 ml:20 mg,含药量为0.2%;利奈唑胺检测质量浓度的线性范围为0.025~0.8 mg/ml( $r=0.999\ 9$ ),平均回收率为101.08%,RSD=0.71%( $n=3$ )。该滴眼液对兔眼无刺激性,室温环境下12个月内稳定性良好。结论:本制剂制备方法简单、可行,质量可控,无眼刺激性。

**关键词** 利奈唑胺;滴眼液;质量控制;刺激性实验;稳定性实验

## Preparation and Quality Control of Linezolid Eye Drops and Eye Irritation Test

YAO Xiang-chao<sup>1</sup>, WANG Yan-dong<sup>1</sup>, ZENG Xia-yun<sup>2</sup>(1.Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2.Guangdong Wholewin Technology Co., Ltd., Guangdong Foshan 528531, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare Linezolid eye drops, and to control the quality and inspect the eye irritation. METHODS: Linezolid eye drops were prepared by Nano Molecular Hood System (NMHS) using sodium hyaluronate, sodium chloride, poloxamer 407 and natrium adetate as excipients. The content of linezolid in eye drops was determined by HPLC. Irritation to rabbits' eyes and stability of linezolid eye drops were observed. RESULTS: The prepared eye drops were off-white color viscous liquid with specification of 10 ml:20 ml, content of linezolid was 0.2%. The calibration curve linear range of linezolid were 0.025-0.8 mg/ml ( $r=0.999\ 9$ ) with an average recovery of 101.08% (RSD=0.71%,  $n=3$ ). The eye drops had no irritation to rabbits' eyes and its stability was relatively good at room temperature within 12 months. CONCLUSIONS: The method is simple, feasible and controllable in quality without irritation.

**KEYWORDS** Linezolid; Eye drops; Quality control; Irritation test; Stability test

利奈唑胺(Linezolid)是一种全新类别的噁唑烷酮类抗菌药物,全面覆盖革兰阳性菌,包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和耐万古霉素肠球菌(VRE)等耐药菌,具有独特的作用机制和较高的组织穿透性,可保证足量药物到达感染部位,和其他类别抗菌药物之间没有交叉耐药性<sup>[1-2]</sup>。利奈唑胺具有良好的耐受性,目前只有静脉注射液和口服片剂两种剂型。笔者采用中山大学中山眼科中心与广东宏盈科技有限公司合作研制的新型眼用释药系统纳米分子罩系统 $\alpha$ (Nano molecular hood system  $\alpha$ , NMHS $\alpha$ )来制备缓释型利奈唑胺滴眼液,该滴眼液用于治疗细菌感染性眼内炎,规格为10 ml:20 mg,根据前期的药效浓度筛选实验确定该滴眼液的药物浓度。为了有效控制该制剂的质量,笔者根据2010年版《中国药典》<sup>[3]</sup>眼用制剂项下有关规定拟订了其质量控制方法,并对其稳定性和眼刺激性进行了考察。

<sup>Δ</sup>基金项目:广东省部产学研合作引导项目(No.2010B090400081)

\* 主管药师。研究方向:新药研发。电话:020-87330541。E-mail: yxc129@163.com

# 通信作者:副主任药师。研究方向:新药研发。电话:020-87331543。E-mail: wangydsyj@163.com

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型高效液相色谱(HPLC)仪,包括G1314A紫外检测器、G1311A四元泵、G1316A柱温箱、G1322A真空脱气机、G1329A带温控自动进样器(美国Agilent公司)。

### 1.2 药品与试剂

利奈唑胺对照品(广东宏盈科技有限公司,批号:20100801,纯度:99.2%);利奈唑胺原料药(深圳市博大生物技术有限公司,批号:100802,纯度:99.3%);利奈唑胺滴眼液(广东宏盈科技有限公司,批号:20110201、20110202、20110203,规格:10 ml:20 mg);甲醇为色谱纯,其他试剂均为市售分析纯。

### 1.3 动物

健康合格一级新西兰大白兔6只,♀♂兼有,体质量(2.6±0.6) kg,均由广东省医用动物实验中心提供,实验动物许可证号:SCXK(粤)2008-0002,实验动物合格证号:0090817。

## 2 方法与结果

### 2.1 处方

利奈唑胺0.2 g,玻璃酸钠0.2 g,氯化钠0.75 g,泊洛沙姆

407 0.1 g, 依地酸二钠 0.01 g, 苯扎氯铵 0.01 g, 注射用水加至 100 ml。

## 2.2 制备工艺

取 20% 处方量的注射用水预溶玻璃酸钠 2 h 以上; 取 50% 处方量的注射用水溶解氯化钠、泊洛沙姆 407、依地酸二钠, 加入处方量的利奈唑胺, 搅拌溶解; 加入已溶解好的玻璃酸钠, 加入处方量的苯扎氯铵, 搅拌混合均匀, 加注射用水至全量, 搅拌均匀; 用稀盐酸或氢氧化钠溶液调 pH 为 6.0~7.0, 用 0.45  $\mu\text{m}$  和 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过除菌, 检验合格后, 无菌分装, 即得。

## 2.3 质量控制

2.3.1 性状。本品为类白色的黏稠液体。

2.3.2 鉴别。取本品, 照“2.4”项下方法实验, 供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。另取不含利奈唑胺的阴性样品同法试验, 结果无与利奈唑胺相同的特征吸收峰, 表明阴性样品无干扰。

2.3.3 检查。本品含利奈唑胺应为标示量的 90.0%~110.0%。

2.3.4 pH。照 pH 值测定法(2010 年版《中国药典》二部附录 VI H)测定, 根据 3 批自研产品的检测结果, 确定本品的 pH 范围为 6.0~7.0。

2.3.5 渗透压摩尔浓度。取本品, 照渗透压摩尔浓度测定法(2010 年版《中国药典》二部附录 IX G)测定, 本品的渗透压摩尔浓度比应为 0.9~1.1, 3 批自研产品的渗透压摩尔浓度比均在此范围内。

2.3.6 苯扎氯铵含量。采用 HPLC 法测定本品中苯扎氯铵的含量, 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以 0.005 mol/L 醋酸铵溶液(每 1 000 ml 中含三乙胺 10 ml, 用冰醋酸调节 pH 至 5.0 $\pm$ 0.5)-乙腈(35:65)为流动相, 流速为 1.0 ml/min; 检测波长为 214 nm; 柱温为 40  $^{\circ}\text{C}$ 。经过方法学研究, 在此色谱条件下, 苯扎氯铵峰与利奈唑胺及其降解产物峰能达到较好分离, 利奈唑胺及其他辅料对苯扎氯铵的含量测定无干扰, 苯扎氯铵含量测定的线性、稳定性、精密度、回收率和耐用性均符合规定。对 3 批自研产品进行检测, 结果表明, 3 批样品中苯扎氯铵的含量分别为 0.010 0%、0.009 9%、0.010 1%, 苯扎氯铵含量均在 0.008%~0.012%, 符合规定。

2.3.7 无菌检查。照无菌检查法(2010 年版《中国药典》二部附录 XI H)项下的薄膜过滤法进行检查, 以金黄色葡萄球菌为阳性对照菌, 对无菌检查方法进行方法学验证, 结果符合规定。对 3 批自研产品进行无菌检查, 结果均无菌生长。

2.3.8 其他。应符合眼用制剂项下有关的各项规定(2010 年版《中国药典》二部附录 I G)。

## 2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件。色谱柱: Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 甲醇-水(65:35, 用冰醋酸调节 pH 至 3.5), 流速: 2.0 ml/min; 柱温: 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长: 240 nm; 进样量: 20  $\mu\text{l}$ <sup>[4]</sup>。理论板数以利奈唑胺峰计应不低于 2 000。

2.4.2 测定方法。精密量取本品适量, 用流动相定量稀释制成每 1 ml 中约含利奈唑胺 0.1 mg 的溶液, 精密量取 20  $\mu\text{l}$  注入液相色谱仪, 记录色谱; 另精密称取利奈唑胺对照品适量, 同法测定。按外标法以峰面积计算供试品中利奈唑胺的含量。

2.4.3 检测波长的选择。参考文献中利奈唑胺的检测波长为

251 nm<sup>[4]</sup>, 但该滴眼液采用了 NMHSA 系统, 该系统中有部分辅料在检测波长 251 nm 处对利奈唑胺的测定有干扰。通过筛选, 最终选取 240 nm 作为本方法的检测波长。

2.4.4 溶液的制备。(1)对照品溶液: 精密称取利奈唑胺对照品 10.00 mg, 置于 100 ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀。(2)供试品溶液: 精密量取利奈唑胺滴眼液 5 ml, 置于 100 ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀。(3)阴性样品溶液: 精密量取不含利奈唑胺的辅料, 均按处方配制为空白滴眼液, 取 5 ml 置于 100 ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀。

2.4.5 专属性试验。在色谱条件下, 分别记录阴性样品溶液、对照品溶液和供试品溶液色谱图, 结果利奈唑胺的保留时间约为 11 min, 利奈唑胺峰与辅料峰分离良好、峰形对称, 空白辅料不干扰利奈唑胺的含量测定。色谱图见图 1。

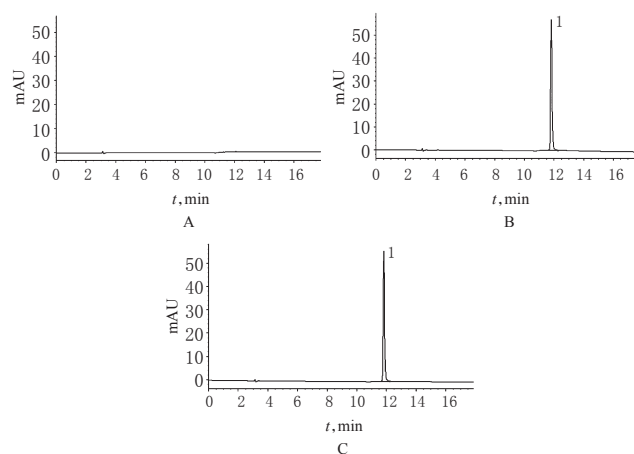


图 1 高效液相色谱图

A. 阴性样品; B. 对照品; C. 供试品; 1. 利奈唑胺

## Fig 1 HPLC chromatograms

A. negative sample; B. substance control; C. test sample; 1. linezolid

2.4.6 线性关系考察。精密量取 1 mg/ml 利奈唑胺对照品溶液 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 ml, 分别置于 10 ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度分别为 0.025、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mg/ml 的系列溶液, 进样测定, 记录色谱。以利奈唑胺峰面积(A)与质量浓度(c)进行回归分析, 得回归方程为  $A=33.276c-11.274$  ( $r=0.9999$ )。结果表明, 利奈唑胺检测质量浓度的线性范围为 0.025~0.8 mg/ml。

2.4.7 精密度试验。取样品, 配制成低、中、高(0.08、0.1、0.12 mg/ml)质量浓度的供试品溶液, 同日内进样测定 5 次考察日内精密度, 每日测定 1 次, 连续测定 5 d, 考察日间精密度。结果日内 RSD 分别为 1.11%、1.02%、0.78%, 日间 RSD 分别为 1.56%、1.21%、1.00%, 表明本方法精密度良好。

2.4.8 稳定性试验。取“2.4.4”项下对照品溶液和供试品溶液, 置室温环境下放置, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 测定其峰面积, 计算其 RSD 分别为 0.58% 和 0.66%。结果表明, 对照品溶液和供试品溶液在室温下放置 24 h 内基本稳定。

2.4.9 回收率试验。精密称取利奈唑胺原料药适量, 分别配制约为规定量 80%、100%、120% 的溶液各 3 份, 按照处方比例加入辅料, 照“2.4.2”项下方法测定含量, 计算回收率。回收率试验结果见表 1。

2.4.10 耐用性试验。在试验中对色谱柱(Agilent Eclipse

表1 回收率试验结果(n=3)

Tab 1 Results of recovery test(n=3)

含量,%	加入量,g	测得量,g	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
80	1.609	1.639	101.85	101.08	0.71
	1.611	1.642	101.94		
	1.601	1.631	101.88		
100	2.005	2.004	99.94		
	2.021	2.037	100.79		
	2.004	2.016	100.62		
120	2.410	2.443	101.36		
	2.408	2.429	100.86		
	2.421	2.431	100.43		

XDB-C<sub>18</sub>或Diamonsil C<sub>18</sub>、柱温(35、40、45℃)、流速(1.8、2.0、2.2 ml/min)条件进行考察。结果当色谱柱、柱温、流速发生细微变化时,均能满足系统适用性的要求,且对测定结果影响较小,表明本方法耐用性较好。

2.4.11 样品含量测定。取3批利奈唑胺滴眼液,按“2.4.2”项下方法测定含量,结果3批样品中利奈唑胺的含量分别为101.7%、100.2%、101.3%,RSD分别为0.40%、0.36%、0.51%。

### 2.5 眼刺激性实验

取6只兔连续给药28 d,左眼给予利奈唑胺滴眼液,右眼给予0.9%氯化钠注射液(生理盐水),每日给药4次,每次每只眼给予2滴药液。于每次给药前,第8、15、22天末次给药后约1 h与第28天末次给药后1、2、4、24、48、72 h,以荧光素染色检查和裂隙灯检查,观察全部兔眼睛的局部反应情况<sup>[9]</sup>。结果6只兔左右眼角膜、虹膜均未见明显的刺激性;部分兔左右眼分别出现结膜血管轻微充血现象,但评分值较小,均为1分,表明利奈唑胺滴眼液连用28 d对眼无刺激性。

### 2.6 稳定性考察

取3批样品,在温度(25±2)℃、相对湿度(40±5)%的条件下放置12个月,分别于0、3、6、9、12个月取样,按眼用制剂稳定性重点考察项目(性状、可见异物、含量、pH)进行检测;为了考察其生物稳定性,在0、12个月时增加了防腐剂苯扎氯铵含量和无菌检查项目,指标参照质量控制方法。结果与0个月比较,样品的性状、pH、可见异物、含量、苯扎氯铵含量等各项指标均未见明显变化,无菌检查符合规定,结果见表2。

## 3 讨论

NMHS $\alpha$ 是我们自主研发的一种眼用释药系统,该释药系统可将水和活性分子利奈唑胺包埋在其中,形成稳定的水性凝胶状滴眼液,从而解决了利奈唑胺在单纯水溶液中溶解性和稳定性差的问题,而且NMHS $\alpha$ 可在眼表面形成一种保护膜,从而大大减轻药物本身对眼睛的刺激性。

为了确保该制剂安全、有效、稳定,笔者拟订了其质量控制方法,并初步考察了其眼刺激性和稳定性。其中利奈唑胺的质量浓度测定目前多采用HPLC法、色谱-质谱串联法等<sup>[9]</sup>,但质谱法测定成本太高,制剂的含量控制多采用HPLC法,因

表2 稳定性试验结果

Tab 2 Results of stability test

批号	时间,月	性状	pH	可见异物	含量,%	苯扎氯铵,%	无菌检查
20110201	0	类白色黏稠液体	6.43	符合规定	101.7	0.010 0	符合规定
	3	类白色黏稠液体	6.43	符合规定	101.7		
	6	类白色黏稠液体	6.44	符合规定	101.6		
	9	类白色黏稠液体	6.43	符合规定	101.8		
20110202	12	类白色黏稠液体	6.43	符合规定	101.5	0.010 1	符合规定
	0	类白色黏稠液体	6.40	符合规定	100.2	0.009 9	符合规定
	3	类白色黏稠液体	6.41	符合规定	100.6		
	6	类白色黏稠液体	6.40	符合规定	100.7		
20110203	9	类白色黏稠液体	6.43	符合规定	100.9		
	12	类白色黏稠液体	6.42	符合规定	101.0	0.009 9	符合规定
	0	类白色黏稠液体	6.46	符合规定	101.3	0.010 1	符合规定
	3	类白色黏稠液体	6.45	符合规定	101.1		
	6	类白色黏稠液体	6.46	符合规定	101.2		
	9	类白色黏稠液体	6.45	符合规定	101.4		
	12	类白色黏稠液体	6.46	符合规定	100.8	0.010 1	符合规定

此本文采用HPLC法测定利奈唑胺的含量。根据国家审评中心的指导原则,防腐剂越来越受到重视,所以本文也建立了该制剂中苯扎氯铵的含量测定,并进行了方法学研究。

本研究结果表明,本制剂制备方法简单、可行,质量可控,无眼刺激性,是一种较理想的眼用制剂,可用于下一步的毒理学、药动学和药效学研究。

### 参考文献

- [1] Walkey AJ, O'Donnell MR, Wiener RS. Linezolid vs glycopeptide antibiotics for the treatment of suspected methicillin-resistant staphylococcus aureus nosocomial pneumonia: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Chest*, 2011, 139(5): 1 148.
- [2] Kalil AC, Murthy MH, Hermsen ED, et al. Linezolid versus vancomycin or teicoplanin for nosocomial pneumonia: a systematic review and meta-analysis[J]. *Crit Care Med*, 2010, 38(9): 1 802.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 882.
- [4] Swoboda S, Ober M, Anagnostakos K, et al. A simple isocratic HPLC assay to determine linezolid concentrations in different biomatrices for in vivo and in vitro studies[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2007, 45(8): 1 019.
- [5] 章元沛. 药理学试验[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 222.
- [6] Phillips OA, Abdel-Hamid ME, al-Hassawi NA. Determination of linezolid in human plasma by LC-MS-MS[J]. *Analyst*, 2001, 126(5): 609.

(收稿日期:2013-11-23 修回日期:2013-12-09)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊, 欢迎投稿、订阅