

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.01.03

双葛止泻口服液抑菌剂用量筛选与抑菌效力研究

李焕娟,桑卡娜,周冰,杨绒娟,潘贵珍,周德刚*

(洛阳惠中兽药有限公司,国家兽用药品工程技术研究中心,河南洛阳 471003)

[收稿日期] 2021-08-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 01-0013-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 通过抑菌效力研究确定了双葛止泻口服液中抑菌剂的合理添加量。根据《中国兽药典》2015 年版一部附录“1121 抑菌效力检查法”要求,以金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、白色念珠菌和黑曲霉为试验菌株,建立双葛止泻口服液抑菌效力检查方法,对不同苯甲酸钠含量的双葛止泻口服液进行抑菌效力测定,筛选出供试品中抑菌剂合理添加量。结果表明,0.3% 的苯甲酸钠对微生物生长繁殖具有良好的抑制作用,且为最低有效剂量。因此,0.3% 的苯甲酸钠可作为双葛止泻口服液的抑菌剂用量。

[关键词] 双葛止泻口服液;剂量筛选;抑菌效力;苯甲酸钠

Study on Dosage Screening of Antimicrobial Preservatives and Antimicrobial Effectiveness of Shuangge Zhixie Oral Liquid

LI Huan-juan, SANG Ka-na, ZHOU Bing, YANG Rong-juan, PAN Gui-zhen, ZHOU De-gang*

(Luoyang Huizhong Animal Medicine Co., Ltd., National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang, Henan 471003, China)

Corresponding author: ZHOU De-gang, E-mail: zdegang_621@126.com

Abstract: The reasonable addition amount of the bacteriostatic agent in Shuangge Zhixie Oral Liquid was determined by studying the antimicrobial effectiveness. According to the appendix 1121 (method for antibacterial efficacy test) of Chinese Veterinary Pharmacopoeia (2015 edition, volume I), and *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* as test strains, method for antibacterial efficacy test of Shuangge Zhixie Oral Liquid was established. The antibacterial efficacy of Shuangge Zhixie Oral Liquid with different sodium benzoate content was tested, and the reasonable addition amount of the antimicrobial preservative added to the test product was screened out. Results showed that the growth of test microorganisms were inhibited effectively by 0.3% sodium benzoate added to Shuangge Zhixie Oral Liquid which was also the minimum effective dosage. 0.3% sodium benzoate could be used as antimicrobial preservative for Shuangge Zhixie Oral Liquid.

Key words: Shuangge Zhixie Oral Liquid; inhibition dose; antimicrobial effectiveness; sodium benzoate

作者简介: 李焕娟,工程师,硕士,从事新兽药研发工作。

通讯作者: 周德刚。E-mail: zdegang_621@126.com

双葛止泻口服液由金银花、葛根等经提取、浓缩、纯化及制剂成型而成的中药口服溶液,功能清热燥湿,解毒止泻,用于仔猪湿热泄泻,实验室研究其具有止泻、抗炎的作用。在兽药生产、贮藏和使用过程中,为防止双葛止泻口服液中微生物生长繁殖,需要加入适宜的抑菌剂用以增加抑菌作用。抑菌剂是指抑制微生物生长的化学物质,有时也称防腐剂^[1]。在口服制剂中,苯甲酸钠因其对酵母、霉菌和部分细菌都有较好的抑制作用而被广泛应用^[2-3],其用量范围一般为 0.1%~0.5%^[4]。由于抑菌剂都具有一定的毒性,制剂中抑菌剂的量应为最低有效量^[1]。

抑菌剂的抑菌有效性主要是通过抑菌效力检查法进行测定的。抑菌效力检查是对供试品中微生物的存活情况的动态监测过程。既要研究供试品被微生物污染后在短时间内抑菌剂对大量入侵微生物的抑制或杀灭的情况,又要研究随着时间的推移微生物对周围环境产生耐受或抑菌剂的稳定性发生改变后,供试品中微生物的总量是否仍能够被控制在合理范围内。

本研究依据《中国兽药典》2015 年版一部附录“1121 抑菌效力检查法”的要求,对双葛止泻口服液中的抑菌剂用量进行筛选,用以确定抑菌剂的最低有效用量。参考《中国兽药典》2015 年版二部附录“1102 非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法”和附录“1104 非无菌兽药微生物限度标准”进行微生物计数方法适用性研究,确定供试品合适的微生物计数方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 仪器 YP10002 型电子天平,金诺天平仪器有限公司;YXQ-LS-100A 型全自动立式电热压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;电热恒温水浴锅,型号 SSW-420-2S,上海博讯实业有限公司;电热恒温培养箱,型号 DNP-9272BS-Ⅲ,上海新苗医疗器械制造有限公司;双人超净工作台,型号 SW-CJ-2FD,上海博讯实业有限公司;集菌仪,型号 HTY-602,浙江泰林生物

技术股份有限公司;微量移液器,规格 100 μ L、1000 μ L、5 mL,德国 Eppendorf 公司;

1.1.2 培养基及稀释液 胰酪大豆蛋白胨液体培养基,批号 20170116;胰酪大豆蛋白胨琼脂培养基,批号 20161018;沙氏葡萄糖琼脂培养基,批号 20160924;沙氏葡萄糖液体培养基,批号 20160224;pH 值 7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液,批号 20160321;均购自青岛高科园海博生物技术有限公司。培养基适用性检查符合《中国兽药典》2015 年版要求。

1.1.3 菌种 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]、黑曲霉菌[CMCC(F) 98003],购自中国食品药品检定研究院医学菌种保藏中心。

1.1.4 试药 双葛止泻口服液,规格:每 1 mL 相当于原生药 0.45 g,250 mL/瓶。按照双葛止泻口服液制备工艺制备苯甲酸钠含量分别为 0.1%、0.2%、0.3% 和 0.5% 的样品。

1.2 试验方法

1.2.1 菌液的制备 取经 35 $^{\circ}$ C 培养 24 h 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌及大肠埃希菌的胰酪大豆胨琼脂斜面培养物适量,另取经 25 $^{\circ}$ C 培养 48 h 的白色念珠菌的沙氏葡萄糖琼脂培养基斜面培养物适量,加入适量的无菌 0.9% 氯化钠溶液,制成含菌数约为 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL 的菌悬液(用于抑菌效力检查)。取上述菌悬液用无菌 0.9% 氯化钠溶液稀释成含菌数约为 50~100 CFU/mL 的菌悬液(用于微生物计数方法适应性研究)。取经 25 $^{\circ}$ C 培养 7 d 的黑曲霉沙氏葡萄糖琼脂培养基斜面培养物,加入 5 mL 含 0.05% (V:V) 聚山梨酯 80 的 0.9% 氯化钠溶液,洗下孢子,制成含孢子数约为 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL 的孢子悬液(用于抑菌效力检查)。取上述孢子悬液用含 0.05% (V:V) 聚山梨酯 80 的 0.9% 氯化钠溶液稀释成含孢子数约为 50~100 CFU/mL 的孢子悬液(用于微生物计数方法适应性研究)。

1.2.2 微生物计数方法适用性研究 考虑到抑菌剂苯甲酸钠具较强的抗菌活性,因此,在细菌计数

试验时应采用薄膜过滤法去除其抑菌活性;由于抑菌剂的浓度与抑菌效果成正相关,故本研究以最大添加抑菌剂 0.5% 苯甲酸钠的供试品进行方法适用性研究,以保证所有浓度抑菌剂供试品微生物计数方法均能符合要求。

1.2.2.1 供试液的制备 取苯甲酸钠含量为 0.5% 的双葛止泻口服液供试品 10 mL 至无菌玻璃瓶中,分别加入 90 mL pH 7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液,充分混合,制成 1:10 (V:V) 的供试液。

1.2.2.2 计数方法适用性试验方法(薄膜过滤法) 分别按以下方法对 5 种试验菌株进行计数方法适用性试验。

试验组:用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液,润湿滤膜后(水膜),取供试液 1 mL 加入 100 mL pH 值 7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液中混匀,加入薄膜过滤器的滤筒中过滤,用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液冲洗 3 次,每次 100 mL,最后一次冲洗时,冲洗液中加入 50 ~ 100 CFU/mL 的试验菌 1 mL,摇匀后,滤过滤膜。

供试品对照组:用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液,润湿滤膜后(水膜),取供试液 1 mL 加入 100 mL pH 值 7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液中混匀,加入薄膜过滤器的滤筒中过滤,用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液冲洗 3 次,每次 100 mL。

菌液对照组:用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液,润湿滤膜后(水膜),用 100 mL pH 值 7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液代替供试液过滤,再用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液冲洗 3 次,每次 100 mL,最后一次冲洗时,冲洗液中加入 50 ~ 100 CFU /mL 的试验菌 1 mL,摇匀后,滤过滤膜。

阴性对照组:用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液,润湿滤膜后(水膜),用 pH 值 7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液冲洗 3 次,每次 100 mL。

过滤完成后将滤膜取出,将滤膜的菌面朝上贴于琼脂平板上。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌制备的滤膜贴于胰酪大豆胨琼脂培养基,35 ℃ 培养 3 d,计数。白色念珠菌和黑曲霉平行制备 2 份滤膜,一份贴于胰酪大豆胨琼脂培养

基,35 ℃ 培养 5 d,计数;另一份贴于沙氏葡萄糖琼脂培养基上,25 ℃ 培养 5 d,计数。

1.2.3 抑菌效力测定方法

1.2.3.1 供试品制备 取包装完整的苯甲酸钠含量分别为 0.1%、0.2%、0.3% 和 0.5% 的双葛止泻口服液供试品各 10 mL 至无菌玻璃瓶中,分别加入 90 mL pH 7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液,充分混合,制成 1:10 (V:V) 的供试液。

1.2.3.2 供试品接种 取“1.2.1”项下制成的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌及大肠埃希菌的菌悬液(含菌数约为 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL)及孢子悬液(含孢子数约为 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL),分别取 0.1 mL 试验菌于上述 4 份供试液中,每一容器接种一种试验菌,充分混合,使供试液中的试验菌均匀分布,置 25 ℃ 培养箱中,避光贮存。

1.2.3.3 存活菌数测定 根据《中国兽药典》2015 年版一部附录“1121 抑菌效力检查法”中表 2 – 表 3 的规定,在供试品接种 0 h、14 d、28 d 时,分别从上述每个供试品容器中取供试品 1 mL,用 pH7.0 无菌氯化钠 – 蛋白胨缓冲液稀释成 1:10、1:10²、1:10³ 等稀释级,测定每份供试品中所含的菌数。其中测定方法依据 1.2.2.2 方法适用性试验验证合格的方法(薄膜过滤法)进行供试品中微生物计数。

1.2.3.4 抑菌效力判断标准 内服制剂的抑菌效力判断标准见表 1。表中“减少的 lg 值”是指各间隔时间测定的菌落 lg 值与 1 mL 供试品中接种的菌数 lg 值的差值。

表 1 内服制剂的抑菌效力判断标准

Tab 1 Criteria for antimicrobial effectiveness of oral preparations		
	减少的 lg 值	
	14 d	28 d
细菌	3	NI
真菌	1	NI

注:NI 指未增加,是指对前一个测定时间,试验菌增加的数量不超过 0.5 lg。

2 结果与分析

2.1 方法适用性试验结果 根据《中国兽药典》

2015 年版二部要求,方法适用性检查各试验菌的回收率不得低于 70%。试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值计算回收率,结果见表 2。

表 2 计数方法适用性试验结果

Tab 2 Result of applicability test of counting method							
阳性菌回收率/%							
次数	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	白色念珠菌	黑曲霉
胰酪大豆胨琼脂培养基				沙氏葡萄糖琼脂培养基			
1	88.7	93.3	104.8	100.0	95.7	101.2	92.2
2	85.3	96.7	116.7	113.0	88.5	98.7	89.4
3	92.6	87.5	111.1	109.1	92.0	90.4	84.7

2.2 抑菌效力测定结果 抑菌效力测定结果见表 3。参考内服制剂的抑菌效力判断标准,双葛止泻口服液中苯甲酸钠含量为 0.1% 时,对白色念珠菌的抑制作用在间隔 14 d 和 28 d 均减少了 0.7 lg,未达到药典规定的至少降低 1 lg 的标准;双葛止泻口服液中苯甲酸钠含量为 0.2% 时,对白色念珠菌的抑制作用在间隔 14 d 和 28 d 均减少了 0.9 lg,未达到药典规定的至少降低 1 lg 的标准;双葛止泻口服液中苯甲酸钠含量为 0.3% 和 0.5% 时,对细菌和真菌的抑菌效力均达到了《中国兽药典》2015 年版的抑菌效力判定标准。

表 3 接种后 0 h 细菌计数结果 (CFU/mL)

Tab 3 Results of bacterial count 0 h after inoculation (CFU/mL)							
试验菌株	10 ⁻² 稀释		10 ⁻³ 稀释		10 ⁻⁴ 稀释		
大肠杆菌	P	P	229	289	31	3	
金黄色葡萄球菌	P	P	153	201	20	17	
铜绿假单胞菌	P	P	60	72	3	3	
白色念珠菌	266	253	27	23	8	7	
黑曲霉	P	P	16	22	2	3	

表 4 接种后 14 d 细菌计数结果 (CFU/mL)

Tab 4 Results of bacterial count 14 days after inoculation (CFU/mL)											
苯甲酸钠含量	金黄色葡萄球菌		铜绿假单胞菌		大肠埃希菌		白色念珠菌		黑曲霉		
	10 ⁰ 稀释		10 ⁰ 稀释		10 ⁰ 稀释		10 ⁻² 稀释		10 ⁻² 稀释		
0%	0	0	0	0	0	0	48	52	10	8	
0.1%	0	0	0	0	0	0	34	30	4	3	
0.3%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.5%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

表 5 接种后 28 d 细菌计数结果 (CFU/mL)

Tab 5 Results of bacterial count 28 days after inoculation (CFU/mL)											
苯甲酸钠含量	金黄色葡萄球菌		铜绿假单胞菌		大肠埃希菌		白色念珠菌		黑曲霉		
	10 ⁻¹ 稀释		10 ⁰ 稀释		10 ⁰ 稀释		10 ⁰ 稀释		10 ⁻¹ 稀释		
0%	0	0	0	0	10	10	P	P	0	0	
0.1%	0	0	0	0	4	4	P	P	0	0	
0.3%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.5%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

3 讨论与结论

3.1 抑菌剂用量筛选方法选择的依据 双葛止泻口服液为非无菌制剂,在制剂中添加适宜的抑菌剂,用以防止制剂在正常贮藏或使用过程中由于微生物的生长繁殖影响药物质量。抑菌效力检查法是筛选抑菌剂用量的有效方法,可用于测定无菌及非无菌制剂的抑菌活性,用于指导研发阶段制剂中抑菌剂用量的确定^[5-10],因此本研究采用抑菌效力检查法筛选抑菌剂的用量。

3.2 抑菌剂用量筛选的重要性 抑菌剂用量的筛选非常重要,抑菌剂添加量过少,会使微生物生产繁殖而引起污染,抑菌剂添加量过多,会引起不适或过敏等变态反应。理想的抑菌剂应作用迅速,其应在使用浓度范围内安全无毒,与制剂中其他成分和包装材料相容性良好^[11-12]。由于苯甲酸钠价格便宜,被广泛用于食品、制药行业^[4],双葛止泻口服液拟用于仔猪腹泻,考虑到经济动物使用成本因素,因此选择苯甲酸钠作为双葛止泻口服液的抑菌

表 6 含不同用量苯甲酸钠的双葛止泻口服液样品抑菌效力检查结果

Tab 6 Result of inhibitory effectiveness of samples of Shuangge Zhixie oral liquid containing different dosages of sodium benzoate

苯甲酸钠 含量(%)	试验菌	供试品中存活菌数(lg)			减少的 lg 值		减少的 lg 值判断标准		判断 结果
		0 h	14 d	28 d	14 d	28 d	14 d	28 d	
0.1	金黄色葡萄球菌	6.2	0	0	6.2	6.2	3	NI	不符合 规定
	铜绿假单胞菌	5.8	0	0	5.8	5.8	3	NI	
	大肠埃希菌	6.4	0	0	6.4	6.4	3	NI	
	白色念珠菌	5.4	4.7	4.7	0.7	0.7	1	NI	
	黑曲霉	5.3	3.9	3.9	1.4	1.4	1	NI	
0.2	金黄色葡萄球菌	6.2	0	0	6.2	6.2	3	NI	不符合 规定
	铜绿假单胞菌	5.8	0	0	5.8	5.8	3	NI	
	大肠埃希菌	6.4	0	0	6.4	6.4	3	NI	
	白色念珠菌	5.4	4.5	4.5	0.9	0.9	1	NI	
	黑曲霉	5.3	3.5	3.5	1.8	1.8	1	NI	
0.3	金黄色葡萄球菌	6.2	0	0	6.2	6.2	3	NI	符合 规定
	铜绿假单胞菌	5.8	0	0	5.8	5.8	3	NI	
	大肠埃希菌	6.4	0	0	6.4	6.4	3	NI	
	白色念珠菌	5.4	0	0	5.4	5.4	1	NI	
	黑曲霉	5.3	0	0	5.3	5.3	1	NI	
0.5	金黄色葡萄球菌	6.2	0	0	6.2	6.2	3	NI	符合 规定
	铜绿假单胞菌	5.8	0	0	5.8	5.8	3	NI	
	大肠埃希菌	6.4	0	0	6.4	6.4	3	NI	
	白色念珠菌	5.4	0	0	5.4	5.4	1	NI	
	黑曲霉	5.3	0	0	5.3	5.3	1	NI	

剂。苯甲酸钠防腐作用依靠苯甲酸未解离分子,因此,pH 值对其抑菌效果影响较大,双葛止泻口服液为弱酸性液体,因此选用苯甲酸钠作为防腐剂是合理的。按照《中国兽药典》2015 年版一部附录“1121 抑菌效力检查法”内服制剂抑菌剂效力判断标准,双葛止泻口服液中苯甲酸钠含量为 0.3% 和 0.5% 时,均能满足抑菌剂效力试验要求,但根据最小有效量添加的原则,确定双葛止泻口服液中苯甲酸钠含量为 0.3%,本结果与同类中药口服液体制剂考察结果基本一致^[9]。

3.3 结论 综上,根据《中国兽药典》2015 年版一部附录“1121 抑菌效力检查法”的要求,0.3% 的苯甲酸钠可作为双葛止泻口服液的抑菌剂用量。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版一部. [S]. 附录 196 – 199. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. People’s Republic of China Veterinary Pharmacopoeia (2015 edition, volume I) [S]. Appendix 196 – 199.

[2] 上海医药工业研究院药物制剂部. 药用辅料应用技术[M].

北京:中国医药科技出版社,2001:344-362.

Department of Pharmaceutical Preparations, Shanghai Pharmaceutical Industry Research Institute. Application technology of pharmaceutical excipients[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2001: 344-362.

- [3] 夏哲林,周彬.布洛芬混悬滴剂抑菌剂剂量筛选与抑菌效力研究[J].中国生化药物杂志,2016,36(03):154-156.

Xia Z L, Zhou B. Screening concentration of antimicrobial preservative for suspension and its antimicrobial effectiveness [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2016, 36 (03): 154-156.

- [4] 张兆旺.中药药剂学[M].中国中医药出版社.北京:2011:102-103.

Zhang Z W. Pharmacy of Traditional Chinese Medicine [M]. China Press of Traditional Chinese Medicine. Beijing: 2011: 102-103.

- [5] 丁勃,徐晓洁,谢元超.氢溴酸加兰他敏口服液添加抑菌剂筛选与抑菌效力研究[J].药物分析杂志,2011,31(12):2312.

Ding B, Xu X J, Xie Y C. Studies on antimicrobial effectiveness of hydrobromate galanthamine oral solution [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2011, 31 (12): 2312.

- [6] 王银环,王征南,钱凌,等.普瑞巴林口服溶液抑菌效力研究与抑菌剂浓度筛选[J].药物分析杂志,2019,03:545-550.

Wang Y H, Wang Z N, Qian L, et al. Study of antimicrobial effectiveness of pregabalin oral solution and concentration screening of antimicrobial preservative [J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 03: 545-550.

- [7] 高飞,李秋菲,余凡.四季抗病毒合剂中抑菌剂的抑菌效力观察[J].安徽医药,2018,22(12):2327-2330.

Gao F, Li Q F, She F. Studies on the antibacterial efficacy of sea-son antiviral mixture [J]. Anhui Medical and Pharmaceutical Jour-

nal, 2018, 22 (12): 2327-2330.

- [8] 程龙,毛腾霄,陈霞,等.双氯芬酸钠滴眼液抑菌剂剂量筛选及抑菌效力考察[J].中国药学杂志,2020,55(05):396-401.

Cheng L, Mao T X, Chen X, et al. Studies on antimicrobial preservatives screening and antimicrobial efficacy of diclofenac sodium eye drops [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2020, 55 (05): 396-401.

- [9] 曹寒梅,杨晓莉,蔡虎,等.3种中药口服液体剂剂抑菌效力测定与评价[J].中国药业,2019,28(14):37-39.

Cao H M, Yang X L, Cai H, et al. Determination and evaluation of antimicrobial effectiveness of three oral liquid preparations of traditional Chinese medicine [J]. China Pharmaceuticals, 2019, 28 (14): 37-39.

- [10] 张英帅,伍实花,龚云,等.甲硝唑阴道凝胶抑菌剂用量筛选及抑菌效力评价研究[J].国外医药(抗生素分册),2018,39(06):556-561.

Zhang Y S, Wu S H, Gong Y, et al. Study on the dose screening of thbacteriostatic agent and antimicrobial effect in metronidazole vaginal gel [J]. Foreign Medicine (Antibiotics), 2018, 39 (06): 556-561.

- [11] Nagai N, Ito Y, Okamoto N, et al. Decrease in corneal damage due to Benzalkonium Chloride by the addition of sericin into timolol maleate eye drops [J]. J Oleo Sci, 2013, 62 (3): 159-166.

- [12] Ammar D A, Noecker R J, Kahook M Y. Effects of benzalkonium chloride - preserved, polyquad - preserved, and sofzia - preserved topical glaucoma medications on human ocular epithelial cells [J]. Advan Ther, 2010, 27 (11): 837-845.

(编辑:陈希)