

注射剂中不溶性微粒的测定及其对微循环功能的影响

梁慧慧*, 陈昕怡, 钱江辉, 沙先谊[#](复旦大学药学院药剂教研室/智能化递药教育部及全军重点实验室, 上海 201203)

中图分类号 R972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)10-1369-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.10.23

摘要 目的:考察注射剂中不溶性微粒的差异,并研究其对微循环功能的影响。方法:以盐酸氨溴索注射剂为模型药物,采用显微计数法和光子相关光度法检测4个厂家盐酸氨溴索注射剂中不溶性微粒的数量和分布。取大鼠复制肢体缺血再灌注(LIR)大鼠模型,实验分为模型组与正常组,每组再分为8小组,每小组10只,依次尾iv给予生理盐水、4个厂家的盐酸氨溴索注射剂和粒径为0.5、2.5、25 μm的聚苯乙烯微粒,给药量为250 μl。正常大鼠依次记为CN、CA、CB、CC、CD、CE、CF、CG组,模型大鼠依次记为RN、RA、RB、RC、RD、RE、RF、RG组。给药后20 min检测各组大鼠肠系膜微静脉血流速度(BFVV)和微静脉管径(DV)。结果:4个厂家的盐酸氨溴索注射剂中不溶性微粒数量均符合《中国药典》规定,但0.5~2.5 μm的不溶性微粒数量间差异具有统计学意义($P<0.05$)。在正常状态下,与CN组比较,除CG组外其余各组大鼠BFVV明显减小,CB、CD、CE、CF组大鼠DV明显增加,差异具有统计学意义($P<0.01$),其中CE、CF、CG组微循环效果与粒径大小呈负相关。在LIR状态下,与RN组比较,其余各组大鼠BFVV明显减小,RB、RD组大鼠DV明显减小,差异具有统计学意义($P<0.01$)。结论:4个厂家盐酸氨溴索注射剂中不溶性微粒数量虽然均符合《中国药典》规定,但小粒径的不溶性微粒数量存在一定差异;不溶性微粒对微循环功能有不同程度的影响,且在LIR状态下影响更显著。

关键词 盐酸氨溴索注射剂;不溶性微粒;肢体缺血再灌注;微循环;大鼠

Determination of Insoluble Particles in Injection and the Effects on Microcirculation Function

LIANG Hui-hui, CHEN Xin-yi, QIAN Jiang-hui, SHA Xian-yi (Dept. of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Fudan University/Key Laboratory of Smart Drug Delivery, Ministry of Education & PLA, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To evaluate the difference of insoluble particles in injections and study its effects on microcirculation function. METHODS: The Ambroxol hydrochloride injection (AHI) was model drug. The number and distribution of insoluble particles from 4 manufacturers were determined by microscope counting method and photon correlation photometry. The limbs ischemia-reperfusion (LIR) rats model were established. The experiments were divided into model group and normal group, each divided into 8 little groups, 10 in each little group. In turn the rats were tail iv given physiological saline, AHI from 4 manufacturers, polystyrene microspheres of 0.5, 2.5, 25 μm. The dose was 250 μl. The normal rats were marked as CN, CA, CB, CC, CD, CE, CF, CG group. The LIR model rats were marked as RN, RA, RB, RC, RD, RE, RF, RG group. The mesenteric microcirculation blood flow velocity of venule (BFVV) and diameter of venule (DV) were determined after 20 minutes of administration. RESULTS: The numbers of insoluble particles of AHI from 4 manufacturers were conformed to the requirement of *Chinese Pharmacopoeia*, but there were significantly differences among the numbers of insoluble particles in 0.5-2.5 μm ($P<0.05$). In normal conditions, compared with CN group, the BFVV of rats in other groups were significantly decreased except for CG group, and DV of rats were significantly increased in CB, CD, CE and CF groups. There were significant differences ($P<0.01$), and results of CE, CF and CG groups were negatively correlated with the particle size. In the LIR conditions, compared with RN group, the BFVV of rats was significantly decreased in other groups, and the DV of rats were significantly decreased in RB and RD groups. There were significant differences ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Though the numbers of insoluble particles of AHI from 4 manufacturers are all conformed to the requirement of *Chinese Pharmacopoeia*, there are certain differences among the number of insoluble particles with small diameter. The insoluble particles have different effect on the microcirculation function, and it appears significantly under the condition of LIR.

KEY WORDS Ambroxol hydrochloride injections; Insoluble particule; Limbs ischemia-reperfusion; Microcirculation; Rats

* 硕士研究生。研究方向:药物新剂型与新制剂。电话:021-51980071

[#] 通信作者:副教授,博士。研究方向:药物新剂型与新制剂。电话:021-51980072。E-mail:shaxy@fudan.edu.cn

近年来注射剂中不溶性微粒可能引发患者严重不良反应等问题越来越引起医药工作者关注,如不溶性微粒造成局部组织缺血、血栓、组织肉芽肿、严重肺功能障碍甚至死亡^[1]。然而,目前国内外药典对注射剂的不溶性微粒仅仅设定大于10

μm 和大于 $25\ \mu\text{m}$ 两个质控点,而对于小于 $10\ \mu\text{m}$ 的粒径,如 $2.5\ \mu\text{m}$ 并未严格规定。目前,全球范围内对空气中不溶性微粒的人体危害越来越重视,国内许多一线城市已建立对空气中粒径为 $2.5\ \mu\text{m}$ 的不溶性微粒的监测。因此,注射剂中缺乏控制的小粒径不溶性微粒是否会产生临床用药不良反应,也已成为一个重要的研究课题。

本研究选择祛痰药盐酸氨溴索注射剂(AHI)^[2-3]为模型药物,考察并比较4个不同生产厂家的盐酸氨溴索注射剂中不溶性微粒的数量和分布;通过复制肢体缺血再灌注(LIR)大鼠小肠系膜微循环模型^[4-5],考察4个厂家盐酸氨溴索注射剂中不溶性微粒在动物水平上对微循环功能的影响,旨在为进一步提高注射剂的内在质量与临床用药安全性提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

BH-2微循环显微镜(日本Olympus公司);BI-2000图像分析系统(成都泰盟科技有限公司);HANGPING FA-2004电子天平(上海天平仪器厂);MilliQ纯水仪(美国Millipore公司);台式离心机(北京市六一仪器厂);NICOMP™ CW788激光散射粒度仪(美国Nicomp公司);X90-3洁净工作台(上海正值净化科技有限公司,洁净度:100级)。

1.2 药品与试剂

盐酸氨溴索对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100599-200502,纯度: $>99.6\%$);盐酸氨溴索注射液[A厂(原研厂),国药准字J20140032,批号:227060(A1)、227086(A2)、128149(A3),规格:15 mg:2 ml;B厂,国药准字H20041473,批号:20120202(B1)、20120204(B2)、20130132(B3),规格:15 mg:2 ml];注射用盐酸氨溴索粉末[C厂,国药准字H20031344,批号:20130327G6(C1)、20130327G10(C2)、20130406T4(C3),规格:每支30 mg;D厂,国药准字H20050243,批号:12100722(D1)、13022726(D2)、13031428(D3),规格:每支15 mg];聚苯乙烯微球标准品(上海启发生物科技有限公司,规格:0.5 μm 、2.5 μm 、25 μm);甲醇、乙腈(美国TEDIA公司,色谱纯);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF级成年健康SD大鼠,♂,体质量(270 ± 10) g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,实验动物使用合格证号:SCXK(沪)2012-0002。

2 方法

2.1 显微镜计数法测定不溶性微粒^[6]

按照2010年版《中国药典》(二部)不溶性微粒检查法中显微镜计数法的规定操作,在洁净工作台内进行操作,分别测定A、B、C、D厂共12批盐酸氨溴索注射剂的有效滤过面积上最长粒径大于 $10\ \mu\text{m}$ 和大于 $25\ \mu\text{m}$ 的微粒数。其中, $10\ \mu\text{m}$ 以上的微粒不得超过3 000粒/支, $25\ \mu\text{m}$ 以上的微粒不得超过300粒/支。

2.2 光子相关光度(PCS)法测定不溶性微粒^[7-9]

采用PCS法,用激光散射粒度仪测定A、B、C、D厂共12批盐酸氨溴索注射剂中不溶性微粒的粒径及分布。测定参数为He-Ne激光;测定角度: 90° ;温度: $23\ ^\circ\text{C}$;黏度: $0.933\ \text{cPa}$;折光

系数:1.333;波长: $632.8\ \text{nm}$ 。对于注射液,取1支,将其外壁洗净,小心开启,用2 ml一次性注射器抽取药液后立即注入检测池中,测定其粒径及分布;对于注射用粉末,先用灭菌注射用水溶解15 min后,再按照注射液的方法测定。

2.3 不溶性微粒对大鼠肠系膜微循环的影响

2.3.1 不溶性微粒混悬液的制备 取盐酸氨溴索注射液1支,用 $0.2\ \mu\text{m}$ 孔径滤膜滤过,取滤膜上的残留物用250 μl 生理盐水重新混悬,即得;取注射用盐酸氨溴索粉末1支,先用生理盐水制备成7.5 mg/ml的溶液,再吸取2 ml用 $0.2\ \mu\text{m}$ 孔径滤膜滤过,取滤膜上的残留物用250 μl 生理盐水重新混悬,即得;取3种粒径的聚苯乙烯微球标准品,用生理盐水稀释成50 $\mu\text{g/ml}$ 的稀释液,即得。

2.3.2 分组、给药与取样 取大鼠于术前12 h禁食,自由饮水,采用Rosenthal法复制大鼠LIR模型,用橡皮圈环绕结扎大鼠双后肢根部,阻断血流4 h后松解,恢复血流灌注2 h后尾iv单次给药。实验分为模型组与正常组,每组再分为8小组,每小组10只,各组分别尾iv给予生理盐水、4个厂家的盐酸氨溴索注射剂和粒径为0.5、2.5、25 μm 的聚苯乙烯微球,给药量为250 μl 。正常大鼠依次记为CN、CA、CB、CC、CD、CE、CF、CG组,模型大鼠依次记为RN、RA、RB、RC、RD、RE、RF、RG组。给药20 min后观测肠系膜微循环各项指标。

2.3.3 肠系膜微循环指标的观测 实验结束时暴露大鼠距回盲部10 cm处的肠系膜,固定于盛有 $37\ ^\circ\text{C}$ 生理盐水的微循环灌流盒中,将微循环显微镜与图像分析系统连接,观察和记录各组大鼠肠系膜微循环变化,测定微静脉血流速度(Blood flow velocity of venule, BFVV)、微静脉管径(Diameter of venule, DV)。^①BFVV的测定:采用光点同步扫描法测定BFVV,调节光点使之与血管平行并顺血流方向连续扫描,调节扫描速度使之与血流速度同步并记录;^②DV的测量:取血管较直段,与血管纵轴垂直方向测血管直径3次,取平均值。

2.4 统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件进行分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间均数的比较用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不溶性微粒的显微镜计数法测定结果

4个厂家的盐酸氨溴索注射剂中不溶性微粒的数量均符合《中国药典》要求,并且厂家间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。显微镜计数法测定4个厂家盐酸氨溴索注射剂中不溶性微粒结果见表1。

3.2 不溶性微粒的PCS法测定结果

4个厂家的盐酸氨溴索注射剂在 $0.5\sim 50\ \mu\text{m}$ 的粒子扫描范围内,其不溶性微粒的平均粒径和《中国药典》规定的两个质控粒径差别无统计学意义($P>0.05$),但其小粒径($0.5\sim 2.5\ \mu\text{m}$)的不溶性微粒数量差异具有统计学意义($P<0.05$)。其中,盐酸氨溴索注射液的小粒径不溶性微粒数量明显少于注射用盐酸氨溴索粉末复溶15 min后的小粒径不溶性微粒数量。PCS法测定4个厂家盐酸氨溴索注射剂中不溶性微粒结果见表2,粒径分布见图1。

表1 显微镜计数法测定4个厂家盐酸氨溴索注射剂中不溶性微粒结果

Tab 1 Results of insoluble particles of AHI from 4 manufacturers testing by microscope counting method

厂家	批号	不溶性微粒的数量		评论
		≥25 μm	≥10 μm	
A	A1	0	31	通过检测
	A2	0	106	通过检测
	A2	0	73	通过检测
B	B1	0	65	通过检测
	B2	0	97	通过检测
	B3	0	85	通过检测
C	C1	0	98	通过检测
	C2	0	110	通过检测
	C3	0	39	通过检测
D	D1	0	35	通过检测
	D2	0	76	通过检测
	D3	0	54	通过检测

表2 PCS法测定4个厂家盐酸氨溴索注射剂中不溶性微粒结果

Tab 2 Results of insoluble particles of AHI from 4 manufacturers testing by PCS

厂家	批号	平均粒径 ($\bar{x} \pm s$), μm	每1 ml中不溶性微粒的数量		
			≥25 μm	≥10 μm	<2.5 μm
A	A1	0.80 ± 0.89	0	34	340
	A2	0.87 ± 1.18	0	68	301
	A2	0.74 ± 1.45	0	34	255
B	B1	0.77 ± 0.85	0	136	1 139
	B2	0.70 ± 0.63	0	85	748
	B3	0.79 ± 0.68	0	102	782
C	C1	0.71 ± 0.44	0	34	1 598
	C2	0.71 ± 0.57	0	56	1 343
	C3	0.70 ± 0.48	0	119	3 298
D	D1	0.70 ± 0.23	0	34	3 621
	D2	0.63 ± 0.13	0	136	1 819
	D3	0.63 ± 0.24	0	68	2 227

3.3 大鼠的肠系膜微循环情况

在正常状态下,与CN组比较,除CG组外其余各组大鼠BFVV明显减小,CB、CD、CE、CF组大鼠DV明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$),其中CE、CF、CG组微循环效果与粒径大小呈负相关。LIR条件下,与RN组比较,其余各组大鼠BFVV明显减小,RB、RD组大鼠DV明显减小,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。这表明在正常状态条件下,CA、CB、CC、CD组大鼠的肠系膜微血管均出现了一定程度的微循环障碍,其中CA组大鼠的微循环状态受影响程度最低,类似于CN组;CE、CF、CG组大鼠的肠系膜受到的微循环影响与粒径呈负相关,即粒径越小影响越严重。而在LIR状态下,RN组大鼠的肠系膜微血管表现出流速减慢的特征,表明成功复制了LIR模型;RA、RB、RC、RD组大鼠的肠系膜微循环均出现明显的一定程度的微循环障碍。正常状态下和LIR状态下各组大鼠的BFVV、DV比较分别见表3、表4。

4 讨论

本文采用PCS法考察了注射剂中不溶性微粒的粒径及分布。相比于显微镜计数法,PCS法更能直观地分析产品中不溶性微粒的分布。4个厂家的注射剂产品采用PCS法检测不溶

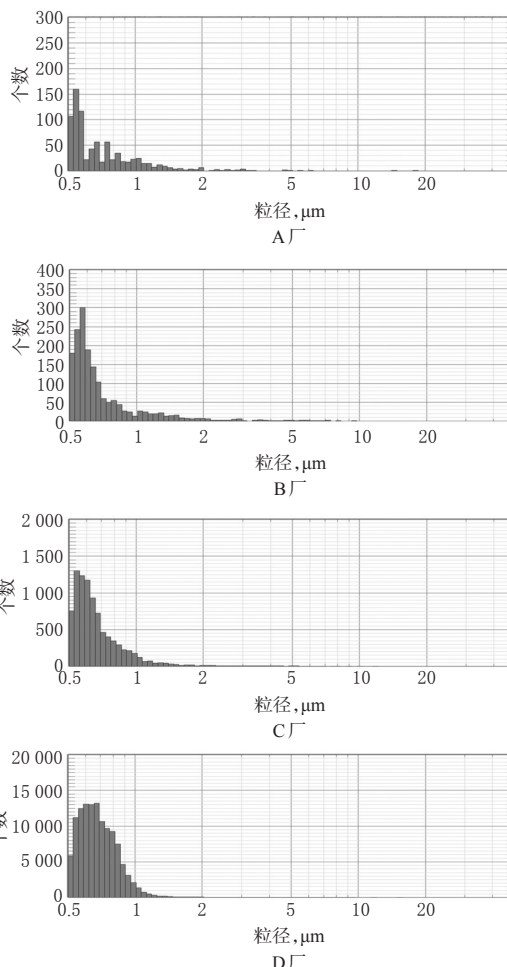


图1 4厂家盐酸氨溴索注射剂中不溶性微粒的粒径分布图
Fig 1 Distribution of particle size of AHI from 4 manufacturers

表3 正常状态下各组大鼠的BFVV、DV比较($\bar{x} \pm s, n=10$)
Tab 3 Comparison of BFVV and DV of rats among groups in normal condition ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	BFVV, μm/s	DV, μm
CN组	656.50 ± 124.20	18.45 ± 1.95
CA组	520.50 ± 112.79*	18.28 ± 2.75
CB组	414.50 ± 99.02*	34.08 ± 8.26*
CC组	388.00 ± 62.62*	25.48 ± 5.58
CD组	260.50 ± 77.85*	29.70 ± 3.90*
CE组	132.50 ± 96.45*	38.60 ± 10.61*
CF组	509.00 ± 47.39*	27.98 ± 7.87*
CG组	630.12 ± 68.11	19.65 ± 3.12

注:与CN组比较,* $P < 0.01$

Note: vs. CN group, * $P < 0.01$

性微粒的结果表明,不溶性微粒数量均符合《中国药典》规定;在0.5~50 μm的粒子扫描范围内,其不溶性微粒的平均粒径和《中国药典》规定的两个质控粒径差异无统计学意义($P > 0.05$),但小粒径的不溶性微粒数量差异具有统计学意义($P < 0.05$)。其中,原研A厂制剂中的不溶性微粒在此范围内的不溶性微粒数量相对少于其余3个厂家的产品。在考察的制剂中,盐酸氨溴索注射液的小粒径不溶性微粒数量明显少于注

表4 LIR状态下各组大鼠的BFVV、DV比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 4 Comparison of BFVV and DV of rats among groups in LIR condition($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	BFVV, $\mu\text{m/s}$	DV, μm
RN组	280.50 \pm 60.88	33.85 \pm 7.21
RA组	217.08 \pm 43.99*	34.23 \pm 5.12
RB组	154.25 \pm 53.27*	26.23 \pm 5.55*
RC组	125.75 \pm 42.55*	37.18 \pm 7.63
RD组	30.25 \pm 16.13*	27.78 \pm 4.95*
RE组	26.75 \pm 11.91*	30.23 \pm 6.54
RF组	27.71 \pm 15.24*	30.78 \pm 4.15
RG组	42.25 \pm 29.06*	30.25 \pm 5.99

注:与RN组比较,* $P < 0.01$

Note:vs. RN group,* $P < 0.01$

射用粉末,分析原因可能是:(1)注射用粉末由于需要加入一定量的甘露醇作为冻干保护剂,可能会引入不溶性微粒;另一方面,由于冻干粉末的溶解具有时间依赖性,未溶解的固体粉末可能也是导致在本研究的复溶时间条件下测定得的小粒径不溶性微粒偏多的重要原因,如延长冻干粉末的复溶时间,可能在一定程度上会降低注射用粉末中小粒径不溶性微粒的数量。(2)注射用粉末中胶塞在复溶过程中也可能导致一定程度的不溶性微粒的产生。(3)制备工艺的差异。

为了进一步评价制剂的内在质量,本文通过建立微循环的动物模型,考察了4个厂家盐酸氨溴索注射剂中不溶性微粒对微循环功能影响的差异性。研究发现,4个厂家的盐酸氨溴索注射剂组大鼠均出现了一定程度的微循环障碍,且影响微循环的程度具有明显的差异性。其中,原研A厂制剂中不溶性微粒的数量相对较少,对微循环的影响程度也相对较轻。对于已有微循环损伤的机体(即LIR状态),注射剂中的不溶性微粒对其有更大的损伤。在阳性对照组中,0.5、2.5 μm 的不溶性微粒在正常状态下对微循环的影响反而高于25 μm 的不溶性微粒,这可能主要是由于25 μm 的不溶性微粒经静脉给药后大部分微粒被肺循环滤过后,减少了不溶性微粒在观察部位肠系膜微血管的蓄积,从而在一定程度上降低了不溶性微粒对

微循环功能的影响,而小粒径微粒反而更易在微血管部位蓄积。已有文献报道,0.5 μm 左右的不溶性微粒与心血管系统疾病具有相关性^[10],而注射剂中小粒径不溶性微粒数量的差异性是否会引起临床用药过程中患者的不良反应发生的差异性,以及是否具有剂量依赖性,则需要开展进一步的临床评价研究予以确证。

参考文献

- [1] 王冰,张梅英.防范静脉输液中不溶性微粒危害的研究进展[J].上海护理,2009,9(1):63.
- [2] 杨晓蔚.氨溴索临床应用进展[J].中外医学研究,2010,8(12):26.
- [3] 杨惠娣,徐彬.氨溴索的作用机制及临床应用[J].中国医院药学杂志,2002,22(1):44.
- [4] 赵霞,孙娜,张连元.大鼠肢体缺血再灌注肠系膜微循环的变化[J].华北煤炭医学院学报,2010,12(1):1.
- [5] 姚树桐,桑慧,王家富,等.蜂胶水提液预处理对缺血再灌注大鼠小肠肠系膜微循环的改善作用及机制[J].中国病理生理杂志,2010,26(1):23.
- [6] 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:附录IXC.
- [7] 高玉成,贡立青,曲丹丹,等.基于光阻法原理的智能微粒检测仪[J].仪器仪表学报,2002,23(4):366.
- [8] 郑学宁,苏林,周金瑞,等.光阻法检查注射液中不溶性微粒[J].中国药学杂志,2002,37(6):458.
- [9] 沙先谊,马光磊,张娜娜,等.不同厂家依达拉奉注射剂中有关物质及不溶性微粒的比较[J].中国临床药理学杂志,2010,19(5):295.
- [10] Meng X, Ma Y, Chen R, et al. Size-fractionated particle number concentrations and daily mortality in a Chinese city[J]. *Environ Health Perspect*, 2013, 121(10):1 174.

(收稿日期:2014-11-25 修回日期:2014-12-18)

(编辑:邹丽娟)

国家中医药管理局局长王国强回访上海合作组织秘书处

本刊讯 2015年2月10日,应上海合作组织秘书长梅津采夫邀请,国家卫生和计划生育委员会副主任、国家中医药管理局局长王国强回访上海合作组织秘书处,与梅津采夫进行了会谈。

梅津采夫对王国强回访上海合作组织表示欢迎。他通报了自2014年11月访问国家中医药管理局后会谈事宜的进展情况,并特别强调他本人回国与俄罗斯联邦卫生部长韦罗妮卡·斯科沃尔佐娃会面时,就结合中西医力量参与俄罗斯卫生医疗保健机制的议题进行了讨论。梅津采夫希望通过与俄罗斯顶级医学家的交流,逐步推动中医药在俄更广泛地被认知和应用,并同时希望通过共同完成中文版、俄文版针灸书籍的出版,促进中医针灸在上海合作组织成员国的发展。

王国强对上海合作组织秘书处的邀请表示感谢,对上海合作组织近期在中医药领域所做的努力表示赞赏。王国强介

绍,李克强总理在2014年上海合作组织成员国政府首脑理事会第十三次会议上提出:“丝绸之路经济带与上海合作组织有关国家的发展战略是相衔接的”,并提出:“建议增加更多的民生议题,推动更多民生项目合作”“应加强公共卫生合作”。健康是各国人民共同关注的议题,我们愿与上海合作组织各成员国共同努力,通过交流互访、联合办学、举办研讨会、开设中医中心等各种形式,加强沟通,增进互信,促进合作。

双方在亲切友好的氛围中进行了交谈,一致认为在中医药领域具有广阔的合作前景。愿意共同促进中国和上海合作组织成员国在中医药医疗、教育、学术交流等各个方面开展务实合作,推动中医药在上海合作组织成员国的规范发展。

会谈后,梅津采夫饶有兴致地邀请王国强参观了上海合作组织秘书处,介绍了上海合作组织的发展历程和成就。