

采用改进的溶血试验法考察低渗静脉注射液的安全性

山广志^{1,2*},任连杰²,李群²,张彤²,陈思²,余立^{2#}(1.中国医学科学院医药生物技术研究所,北京100050;2.北京市药品检验所,北京100035)

中图分类号 R977.8;R927.11 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)29-2776-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.29.32

摘要 目的:补充完善《中国药典》中的溶血检查方法,并建立适用于低渗静脉输液的体外溶血测定方法。方法:对《中国药典》一部和二部附录中的“溶血与凝聚检查法”进行改进,将5个企业共3种规格8个批号的人血白蛋白样品的溶血情况结果判断由人工目视改为分光光度法测定。于576 nm波长处测定吸光度并计算溶血率,同时测定其渗透压摩尔浓度。结果:样品中低渗人血白蛋白的溶血率约在12%(渗透压摩尔浓度为191 mOsmol/kg)~60%(摩尔浓度<100 mOsmol/kg);不同厂家样品的溶血率与渗透压摩尔浓度的相关性不一致。结论:建立的方法适用于低渗静脉输液的体外溶血情况考察。

关键词 低渗静脉输液;人血白蛋白;改进方法;溶血率;渗透压摩尔浓度

Safety Evaluation of Hypotonic Intravenous Injection by Improved Hemolytic Experiment

SHAN Guang-zhi^{1,2}, REN Lian-jie², LI Qun², ZHANG Tong², CHEN Si², YU Li²(1.Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100050, China; 2.Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To supplement and improve the hemolytic inspection methods of *Chinese Pharmacopoeia*, and to establish the method for the determination of hemolysis of hypotonic intravenous injection *in vitro*. METHODS: "Hematolysis and coagulation method" stated in appendix of *Chinese Pharmacopoeia* I and II were improved; the absorbance and hemolytic rate of 3 specifications of 8 batches of human serum albumin from 5 manufacturers were determined and calculated by spectrophotometry instead of visual method at 576 nm; the osmolality of samples were determined. RESULTS: The hemolytic rate of human serum albumin with low osmotic pressure was about 12% (osmolality=191 mOsmol/kg)-60% (osmolality<100 mOsmol/kg). The correlation between hemolytic rate and osmolality was not consistent among the products from different manufacturers. CONCLUSIONS: The method is suitable for the hemolysis of hypotonic intravenous infusion *in vitro*.

KEY WORDS Hypotonic intravenous injection; Human serum albumin; Improved method; Hemolytic rate; Osmolarity

4.2 色谱柱的选择(5 μm 和 3 μm 色谱柱的选择)

本文建立的方法采用色谱柱为C₁₈(100 mm×4.6 mm, 3 μm),规格较特殊,在日常检验工作中不常使用。因此,对可否用常规的色谱柱替代,笔者做了如下比对试验:选用了3根不同品牌的常规C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),用系统适用性溶液分别进样,考察分离效果。结果显示,5 μm 色谱柱中,只有1根(Phenomenex)色谱柱能全部检出6个杂质,但杂质B与杂质C未达到基线分离,且杂质的相对保留时间与EP7.0中标注的完全不同,其他2根色谱柱均不能完全分出6个杂质;而不同品牌的3 μm 内径的色谱柱能将6个杂质全部分离出来,且杂质的相对保留时间与EP7.0基本相同。表明内径3 μm 色谱柱的分离效果明显优于5 μm 的色谱柱,更有利于杂质的全部检

出。故拟定标准中规定选用特殊规格的色谱柱。

综上所述,本文的色谱系统能完全有效地检出并分离地奥司明原料药及片剂的有关物质,可有效地控制本品的质量,优于国家现行质量标准。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局.YBH01832009 地奥司明[S]. 2009-02-10.
- [2] Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare of the Council of Europe (EDQM). *European Pharmacopoeia*[S]. 7.0. Strasbourg : Council of Europe, 2010: 1 864-1 865.
- [3] British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia*[S]. 2012 edition. London: Stationary Office, 2011: 729-730.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-03-27)

* 助理研究员,博士。研究方向:药物质量分析。电话:010-63021345。E-mail:IMBSGZ@gmail.com

通信作者:主任药师。研究方向:药物分析。电话:010-83226198。E-mail:yuliy8716@vip.sina.com

静脉输液的安全性问题历来都为药品研发、生产、使用与监管部门所密切关注,而静脉输液的渗透压及其导致的溶血情况与产品安全性密切相关。近年来,国内药学工作者利用冰点降低法对临床使用的多种注射剂品种进行了渗透压摩尔浓度考察^[1-3],有力地促进了国内注射剂的质量提升。

由于冰点降低法测得的数据主要反映注射剂中晶体物质产生的渗透压,因此,单一地采用冰点降低法对低渗注射液进行考察,往往忽略了药物对血细胞的保护作用以及胶体溶液产生的胶体渗透压等作用。为了掌握低渗注射液对血液细胞的真实影响程度,有必要进一步联用溶血试验对静脉注射液进行安全性考察。

本文以2010年版《中国药典》一部(中药)^[4]和二部(化学药)^[5]附录中记载的“溶血与凝聚检查法”为基础进行了方法改进,采用供试品溶液直接进行试验,消除了稀释溶剂(生理盐水,即0.9%氯化钠溶液)对样本渗透压的影响;采用分光光度计进行检测,提高了方法的客观性和准确性。通过对国内外5个企业共3种规格8个批号的人血白蛋白样品的体外溶血情况进行了考察,结果表明建立的方法能够客观反映注射液渗透压对血细胞的影响,可为该类药品的开发研究、药品标准的科学制订以及临床医师制订给药方案提供一定的参考。

1 材料

1.1 仪器

UV-2401PC紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);SMC30B渗透压摩尔浓度测定仪(天和医疗仪器有限公司);纯水机(美国Poll公司);微量移液器(北京吉尔森科技有限公司)。

1.2 试剂

校正用标准氯化钠溶液(以下简称校正溶液,天津天河医疗仪器有限公司,批号:080703、080704,渗透压摩尔浓度:100.500 mOsmol/kg);0.9%氯化钠溶液(自制,称取氯化钠4.5 g加水溶解并稀释至500 ml,渗透压摩尔浓度:289 mOsmol/kg)。

1.3 样品

市售品人血白蛋白[国内A企业,批号:200810082、200811088,规格:10%(5 g:50 ml);国内B企业,批号:20081227、20081228,规格:20%(10 g:50 ml);国内C企业,批号:20090102,规格:20%(10 g:50 ml);国外D企业,批号:TBAB7BJ001,规格:20%(10 g:50 ml);国内E企业,批号:20081126、20081128,规格:20%(5 g:25 ml)];氯化钠为优级纯。

新鲜兔血,来自北京维通利华实验动物技术有限公司的日本大耳白家兔,♂,18周龄,体质量2.3 kg,合格证号:SCXK(京)2010-0002。

2 方法与结果

2.1 渗透压摩尔浓度的测定

以超纯水调节仪器零点,分别用100、500 mOsmol/kg校正溶液进行仪器校正。

取50 μl供试品置于干燥洁净测试管中,按照2010年版

《中国药典》三部(生物制品)附录记载的渗透压摩尔浓度测定法项下要求进行测定^[6]。不同生产厂家的人血白蛋白注射液的渗透压摩尔浓度见表1,表明除国外D企业生产的产品外其余产品均为低渗注射液。

表1 8批样品渗透压摩尔浓度及溶血率测定结果

Tab 1 Results of osmolarity and hemolytic rate of 8 batches of samples

| 生产企业 | 批号 | 浓度 | 规格 | 渗透压摩尔浓度, mOsmol/kg | 溶血率, % |
|------|-----------------|-----|------------|--------------------|--------|
| A | 200810082 | 10% | 5 g:50 ml | 70 | 48.96 |
| A | 200811088 | 10% | 5 g:50 ml | 67 | 45.90 |
| B | 20081227 | 20% | 10 g:50 ml | 154 | 28.77 |
| B | 20081228 | 20% | 10 g:50 ml | 135 | 43.02 |
| C | 20090102 | 20% | 10 g:50 ml | 191 | 11.89 |
| D | TBAB7BJ001 | 20% | 10 g:50 ml | 280 | 1.23 |
| E | 20081126 | 20% | 5 g:25 ml | 113 | 59.21 |
| E | 20081128 | 20% | 5 g:25 ml | 106 | 57.72 |
| | 阳性对照(超纯水) | | | 0 | 100 |
| | 阴性对照(0.9%氯化钠溶液) | | | 289 | 0 |

2.2 低渗注射液溶血试验

2.2.1 兔血红细胞悬液的制备。取新鲜兔血约20 ml,置于锥形瓶中,加入两粒玻璃珠,室温下置于摇床中振摇15 min。加入0.9%氯化钠溶液约50 ml,振摇,弃去纤维蛋白,以3 000 r/min的速率离心5 min,弃去上清液,用0.9%氯化钠溶液洗涤沉渣,继续以3 000 r/min的速率离心5 min,直至上清液无色透明。小心移去上清液,用移液管取下层红细胞5 ml,加0.9%氯化钠溶液至50 ml,翻转混匀。按表2中的阳性对照管方法制备并测定兔血红细胞悬液在576 nm波长处的吸光度(A),调整红细胞悬液浓度,使A_{576 nm}在0.8~1.4之间。

2.2.2 溶血率的测定方法。由于试验采用可见光波长检测,考虑到各注射液颜色之间的差异,试验除了制备阴性对照管、阳性对照管和供试品试验管以外,还设置了供试品本底对照管,以消除注射液颜色对测定结果的影响。

按照表2分别加入相应溶液制备成各试验管,混匀。

表2 各试验管的制备

Tab 2 Preparation of each test tube

| 试液 | 阳性对照管 | 阳性对照管 | 供试品试验管 | 供试品本底对照管 |
|---------------|-------|-------|--------|----------|
| 红细胞悬液, ml | 1.0 | 1.0 | 1.0 | |
| 0.9%氯化钠溶液, ml | 5.0 | | | 1.0 |
| 水, ml | | 5.0 | | |
| 样品原液, ml | | | 5.0 | 5.0 |

将各管置于(37±0.5)℃水浴30 min;取出后冰浴10 min,分别测定576 nm波长处的吸光度。溶血率按照下式进行计算:溶血率=(A_{供试品试验管}-A_{供试品本底对照管}-A_{阴性对照管})/(A_{阳性对照管}-A_{阴性对照管})×100%。

2.3 精密度试验

精密量取0.9%氯化钠溶液15 ml,置于50 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,以得到的0.27%的氯化钠溶液(渗透压摩尔浓度为85 mOsmol/kg)作为供试品溶液,照“2.2.2”项下方法,平行测定6份。结果溶血率分别为93.33%、93.52%、94.54%、

94.09%、92.13%、91.33%，平均值为93.16%，RSD=1.30% (n=6)，表明方法精密度良好。

2.4 重复性试验

分别取批号为200810082的人血白蛋白注射液6份，照“2.2.2”项下方法测定，结果溶血率分别为48.96%、50.23%、48.57%、48.06%、49.36%、47.66%，平均值为48.80%，RSD=1.88% (n=6)，表明方法重复性良好。

2.5 低渗注射液溶血率考察结果

取不同生产厂家的人血白蛋白样品按照“2.2.2”项下方法进行测定，结果见表1。

表1结果显示，渗透压摩尔浓度低于200 mOsmol/kg的低渗人血白蛋白制品均存在不同程度的溶血。当人血白蛋白渗透压摩尔浓度在191 mOsmol/kg时，溶血率约为12%；当渗透压摩尔浓度降至154 mOsmol/kg时，溶血率迅速升至约30%。

各厂家不同规格的人血白蛋白渗透压摩尔浓度与溶血率之间的相关性并不完全一致，且不具有白蛋白剂量相关性。如：E厂家2批产品(20%规格)的渗透压摩尔浓度约为110 mOsmol/kg，溶血率约为60%；A厂家2批产品(10%规格)的渗透压摩尔浓度约为70 mOsmol/kg，而溶血率约为50%。说明不同厂家采用不同生产工艺和处方对溶血率亦有不同影响，同时说明单一利用冰点降低法考察摩尔渗透压浓度并不能完全反映注射液由于低渗导致的溶血状况。

3 讨论

《中国药典》(二部)(化学药)自2000年版开始就收载了冰点降低法进行渗透压摩尔浓度的测定，并要求静脉输液应尽可能与血液等渗，且应在标签上注明溶液的渗透压摩尔浓度^[7]。2010年版的《中国药典》(一部)(中药)和三部(生物制品)也增订了渗透压摩尔浓度测定法。但冰点降低法测定的摩尔渗透压浓度主要反映稀溶液的晶体渗透压^[8]，对复杂组分注射液尤其是具有胶体性质的注射液采用溶血法测定其溶血率，较单纯采用冰点降低法进行渗透压考察结果更加客观。

2010年版《中国药典》中收载的“溶血与凝聚检查法”^[4-5]主要适用于考察药品本身所具有的溶血特性。试验过程中采用0.9%氯化钠溶液稀释供试品溶液，不适用于由注射液低渗导致的溶血情况的考察；且结果判断采用人工目视，对于有色供试品的结果判断存在一定困难。本文对《中国药典》方法进行了改进，采用供试品溶液直接进行试验，消除了稀释溶剂对样本渗透压的影响；并采用分光光度法对试验结果进行检测，提高了方法的客观性和准确性。

方法建立过程中采用阳性对照管溶液在200~800 nm波长范围内进行光谱扫描，在可见光区的最大吸收波长为576 nm；而供试品本底对照管溶液在可见光区无明显吸收，且 $A_{576\text{ nm}} < 0.05$ ，故本法选择576 nm作为检测波长。

人血白蛋白属于胶体溶液，可维持70%~80%血浆有效胶体渗透压^[9]。笔者曾采用冰点降低法对国内外人血白蛋白产品的渗透压进行考察，结果显示当时的国内市场上国产人血白蛋白渗透压摩尔浓度在100~200 mOsmol/kg范围内，大多属于低渗注射液^[9]。2010年版《中国药典》(三部)在人血白蛋白质量标准中首次增加了渗透压摩尔浓度检查项^[6]。本试验结果证实：《中国药典》将人血白蛋白渗透压摩尔浓度规定在210~400 mOsmol/kg范围内，能够有效防止低渗人血白蛋白对使用者造成的影响(本文采用的试验样品为2010年版《中国药典》实施前收集的市售产品)。

利用溶血试验进一步考察低渗注射液的临床安全性是对仅凭冰点降低法检查渗透压、间接研究注射液对红细胞影响的有效补充，可以更直接准确地反映制剂对血细胞的影响。建议研发静脉输液品种时除了采用冰点降低法进行渗透压考察外，还应进行溶血情况考察；临床进行静脉注射液配伍使用和给药方式研究时，也建议关注输注药液的渗透压摩尔浓度情况，并进行溶血试验考察，防止由于输注低渗注射液导致体液渗透压改变而影响患者耐受性甚至导致安全性问题的出现。

参考文献

- [1] 李娅萍,杨敏智,张斗胜,等.2009年国产加替沙星注射剂评价性抽验结果及质量评价[J].药物分析杂志,2011,31(3):484.
- [2] 王波,李斌,孙吉令.六种静脉输液品种渗透压摩尔浓度考察结果分析[J].中国药品标准,2010,11(5):351.
- [3] 山广志,纪宏,余立,等.国内外人血白蛋白产品的渗透压现状调研[J].中国新药杂志,2009,18(16):1490.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录92-93.
- [5] 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116.
- [6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:三部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:212-213、附录30-31.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2000年版.北京:化学工业出版社,2000:附录71.
- [8] 屠锡德,张均寿,朱家璧.药剂学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:586-588.
- [9] 段红杰,柴家科,邓虎平.人血白蛋白的功能及其在危重病治疗中的应用[J].解放军医学杂志,2012,37(10):926.
(收稿日期:2013-04-26 修回日期:2013-05-10)

《中国药房》杂志——WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录期刊,欢迎投稿、订阅