

· 中药工业 ·

三种增溶剂对冠心宁注射液中蛋白质检测的影响[△]

李响明^{1*}, 张浩军¹, 冯玉康^{1*}, 孙胜斌², 姜国志³

(1. 神威药业集团有限公司, 河北 石家庄 051430; 2. 河北省中药注射液工程技术研究中心, 河北 石家庄 051430;
3. 中药注射剂新药技术开发国家地方联合工程实验室, 河北 石家庄 051430)

[摘要] 目的: 比较3种增溶剂对冠心宁注射液中有关物质蛋白质检测的影响。方法: 分别使用泊洛沙姆188(Kolliphor P188)、聚氧乙烯氢化蓖麻油(Kolliphor RH40)、15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯(Kolliphor HS15)3种辅料制备冠心宁注射液, 进行有关物质蛋白质的检测。结果: 其中Poluoshamu 188、Kolliphor RH40对冠心宁注射液蛋白质检测无影响, 而含Kolliphor HS15辅料的冠心宁注射液检测蛋白质时易出现假阳性。结论: 3种增溶剂对冠心宁注射液蛋白质的检测影响不同; 按影响程度由大到小依次是Kolliphor HS15 > Poluoshamu 188 = Kolliphor RH40。

[关键词] 冠心宁注射液; Poloxamer 188; Kolliphor RH40; Kolliphor HS15; 蛋白质检查

Effect of Three Kinds of Solubilizers on Protein Detection in Guanxinning Injection

LI Xiangming^{1*}, ZHANG Haojun¹, FENG Yukang^{1*}, SUN Shengbin², JIANG Guozhi³

(1. Shineway Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shijiazhuang 051430, China;

2. Hebei Province Engineering Research Center for TCM Injection Shijiazhuang 051430, China;

3. State-Local Joint Engineering Laboratory of New Drugs Development Technology for TCM Injection Shijiazhuang 051430, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the effects of three excipients on Guanxinning Injection related substances determination of protein. **Methods:** Poloxamer 188 (Kolliphor P188), polyoxyethylene hydrogenated castor oil (Kolliphor RH40), 15-hydroxystearate, polyethylene glycol (Kolliphor HS15), three kinds of excipients were used to prepare Guanxinning injection, the related substances protein were detected. **Results:** Poloxamer 188 (Kolliphor P188), polyoxyethylene hydrogenated castor oil (Kolliphor RH40) had no effect on protein detection of Guanxinning Injection, conversely Kolliphor HS15 in Guanxinning Injection resulted in false positive of protein detection. **Conclusion:** The effect of three kinds of solubilizers accessories in Guanxinning Injection on protein detection is different with the order of Kolliphor HS15 > Poluoshamu 188 = Kolliphor RH40.

[Keywords] Guanxinning Injection; Poloxamer 188; Kolliphor RH40; Kolliphor HS15; protein examination

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.4.020

中药注射剂特别是复方制剂, 在生产过程中受温度、灭菌时间、pH值等工艺的变化影响, 或在贮存期间受外界条件(如光线、温度、空气等)的影响, 可能出现变色、浑浊、沉淀等现象, 因此生产难度大, 易造成经济损失, 影响临床使用, 可能导致严重不良反应等。因此, 增加难溶性成分的溶解度及稳定性成为中药注射剂质量研究的焦点^[1-2]。近年来国际上新开发的药用辅料聚山梨酯80、泊洛沙姆188、聚氧乙烯氢化蓖麻油、15-羟基硬脂酸聚乙

二醇酯, 目前被认为是低毒、安全的药物增溶剂, 也是近几年来颇受重视的注射用辅料。不同的增溶剂除增溶效果不同外, 很可能在其他方面表现出差异。陈翔宇等^[3]在进行冠心宁注射液蛋白质的研究中已发现常用增溶剂聚山梨酯80对有关物质蛋白质的检测有干扰, 易出现假阳性结果。目前尚无冠心宁注射液使用其他增溶剂的文献报道。将Poloxamer 188、Kolliphor RH40、Kolliphor HS15 3种增溶剂应用于冠心宁注射液中, 探索3种辅料在冠心宁注射

[△] [基金项目] 国家重大新药创制专项(2011ZX09401-306-004)

* [通信作者] 冯玉康, 工程师, 研究方向: 药品工艺技术及产业化研究, E-mail: fykxy_206@163.com; 李响明, 助理工程师, 研究方向: 药品质量及产业化研究, E-mail: li.xiangming.com@163.com

液中的适用性。本研究重点对比3种增溶剂对冠心宁注射液蛋白质检测的影响,其他方面的影响研究另文论述。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

METTLER-ALC-210.4 电子分析天平(上海梅特勒托利多仪器有限公司);Five-Easy 实验室 PH 计(上海梅特勒托利多仪器有限公司)。

1.2 试剂

冠心宁注射液中间体总混液(神威药业集团有限公司);泊洛沙姆 188(Kolliphor P188,北京凤礼精求商贸有限责任公司,药用辅料,批号:WPC1514B);聚氧乙烯氢化蓖麻油(Kolliphor RH40)(北京凤礼精求商贸有限责任公司,药用辅料,批号:60187888Q0);15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯(Kolliphor HS15,德国 BASF 公司,药用辅料,批号:4330792400);亚硫酸氢钠(湖南尔康,药用辅料);依地酸二钠(湖南尔康,药用辅料);磺基水杨酸(分析纯)。

2 方法

2.1 蛋白质检查方法

取本品 1 mL,加新配置的 30% 磺基水杨酸试液 1 mL,混匀,放置 5 min,不得出现浑浊^[4-5]。

2.2 预实验

冠心宁注射液由丹参、川芎经水提取后,再采用醇沉、水沉结合的方式除去杂质,达到精制目的,其生产工艺复杂。在开展3种增溶剂对冠心宁注射液蛋白质检查的影响研究前,首先将冠心宁总混液稀释至成品药液浓度,检查蛋白质,确认冠心宁总混液已经满足中药注射剂对蛋白质的要求。制剂中除添加增溶剂外还有抗氧化剂亚硫酸氢钠、金属络合剂依地酸二钠。陈翔宇等^[3]的研究中已明确抗氧化剂、金属络合剂对蛋白质检测无影响,故本次研究不再进行确认。Poloxamer 188 等首次引入该品种,使用前需确定增溶剂对蛋白质检测有无干扰。按表 1 开展预实验。

2.3 不同浓度增溶剂用量的样品制备

取一定量冠心宁总混液,加入处方量的抗氧化剂和金属络合剂,按表 2 分别加入一定量增溶剂后,

加注射液用水至全量,调节 pH 值,制备成冠心宁注射液,备用。

表 1 预实验及结果

实验	混合液	RH40	Poloxamer 188	HS15	蛋白质检测结果
1	+	-	-	-	合格
2	-	+	-	-	合格
3	-	-	+	-	合格
4	-	-	-	+	合格

注:在冠心宁总混液中加入抗氧化剂、络合剂后为混合液;“+”:药液配制时添加该物质;“-”:药液配制时未添加该物质。

表 2 3种增溶剂用量对冠心宁注射液蛋白质检查结果的影响

实验组	增溶剂名称	用量	溶液浑浊度	蛋白质检查结果
1	RH40	0.2%	-	合格
		0.4%	-	合格
		0.6%	-	合格
		0.8%	-	合格
		1.0%	-	合格
2	Poloxamer 188	0.2%	-	合格
		0.4%	-	合格
		0.6%	-	合格
		0.8%	-	合格
		1.0%	-	合格
3	HS15	0.2%	+++	不合格
		0.4%	++	不合格
		0.6%	+	不合格
		0.8%	-	合格
		1.0%	-	合格

注:“+”:溶液浑浊;“+”越多则越浑浊;“-”:溶液澄清。

2.4 磺基水杨酸溶液用量与蛋白质检测结果的关系考察

近几年曾有文献报道,2010 版《中华人民共和国药典》检查中药注射剂有关物质蛋白质的方法存在不适宜性,其中郭青、祖金玥等的研究也证实了这一点^[6-7]。为了明确本研究中使用的3种新增溶剂对蛋白质检查有无影响,实验中30%磺基水杨酸试液采取缓慢加入的方式,并考察了水杨酸溶液用量对蛋白质检查现象的影响。

2.5 药液 pH 值对蛋白质检查的影响

冠心宁注射液配制时需调节 pH 值,可能药液 pH 值环境与不同增溶剂的样品在蛋白质检查过程中有一定影响,所以本研究将药液 pH 值调至多个不同值,分别检查蛋白质。

2.6 药液浓度水平与增溶剂用量的关系

当药液所含浓度不同,即所含物质水平不同时,需要的增溶剂用量也可能不同,而增溶剂的用量很可能影响蛋白质的检查结果。所以本研究开展了不同水平的药液浓度与增溶剂最小用量之间的实验,即在保证对蛋白质检查无影响的前提下,摸索找出不同的药液浓度下的最小增溶剂用量。用总固体量代表不同含量水平的药液,按表3开展实验。

表3 不同药液浓度的最小增溶剂用量

实验编号	固含物	RH40 用量	Poloxamer 188 用量	HS15 用量	%
1	5.0	0.2	0.2	0.20	
2	5.5	0.2	0.2	0.28	
3	6.0	0.2	0.2	0.35	
4	7.0	0.2	0.2	0.40	
5	8.5	0.2	0.2	0.55	

3 结果

3.1 预实验结果

冠心宁总混液蛋白质检查显示阴性,排除原料本身蛋白质阳性的可能,可应用于本次研究。Poloxamer 188、RH40、HS15 三辅料增溶剂对冠心宁注射液蛋白质检查无干扰,结果见表1,可用于后期实验。

3.2 3种增溶剂用量与蛋白质检测的结果

增溶剂 RH40、Poloxamer 188 用量在 0.2% ~ 1.0% 时,冠心宁注射液蛋白质检查均合格,而 HS15 的用量与蛋白质检查结果表现出相关性,用量在 0.2% ~ 0.6%,蛋白质检查不合格;增加用量至 0.8% ~ 1.0% 时,蛋白质检查合格。结果见表2。

3.3 30% 磺基水杨酸试液用量与蛋白质检测结果的关系

含 RH40、Poloxamer 188 增溶剂的样品,刚滴入 30% 磺基水杨酸试液时,立即出现白色浑浊;然后随试液的加入量增多,浑浊度增大;继续滴加,很快出现澄清层、浑浊层(分层明显);试液加至 1 mL 后,摇匀,溶液澄清,静置 5 min 后,溶液仍澄清。而含 HS15 增溶剂的样品蛋白质检查时的现象则不同。HS15 用量在 0.2% ~ 0.6% 时,试液加入过程中溶液始终处于浑浊,静置 5 min 后仍浑浊,但改变 30% 磺基水杨酸试液用量时(注射液与 30% 磺基

水杨酸试液 1:1.2 ~ 1:1.5),假阳性消失,而真阳性样品的浑浊不随 30% 磺基水杨酸试液的用量增加而消失;HS15 用量 0.8% 的样品,检测蛋白质时先出现浑浊,约加入 0.6 mL 后开始出现澄清层,加至 1 mL 后摇匀,溶液稍显浑浊,静置 5 min 后溶液澄清;用量 1% 的样品蛋白质检查的现象与含 RH40、Poloxamer 188 增溶剂的样品基本一致。

3.4 药液 pH 值对蛋白质检测的影响

对含 RH40、Poloxamer 188 增溶剂的不同 pH 值的冠心宁注射液药液检查蛋白质,均呈阴性,无差异;而含 HS15 的药液在 pH 值 5.5 ~ 5.7 范围内蛋白质检查有轻微浑浊,其他 pH 值的药液蛋白质检查呈阴性。

3.5 药液浓度水平与增溶剂用量间的关系

以药液中固含物的量表示药液的浓度水平,蛋白质检查结果显示,当药液浓度相对较高时,只有提高 HS15 的用量,才能保证对蛋白质检查无干扰,结果见表3。对蛋白质检查无干扰的前提下,冠心宁注射液的固含物高低与 RH40、Poloxamer 188 的用量无相关性,而与 HS15 用量呈线性相关。

4 讨论

因《中华人民共和国药典》中有关物质蛋白质的磺基水杨酸比浊法专属性不强^[6-7],不同增溶剂对冠心宁注射液蛋白质检查的影响不同,特别是不同的增溶剂用量可能出现相反的结果。因此中药注射液增溶剂的选择需慎重考虑,需加强产品的物质基础研究。建议在未添加辅料前的中间体产品中增加蛋白质的检测,确认精制工艺能满足中药注射液对有关物质蛋白质的要求。

聚氧乙烯氢化蓖麻油被广泛用于增溶剂、乳化剂等。泊洛沙姆 188 具有无毒、无抗原性、无致敏性、无刺激性、不溶血等特点,化学性质稳定,有较好安全性,目前已作为西药静脉给药的乳化剂和增溶剂,应用于临床^[8]。但用于中药注射剂效果如何目前尚无相关研究。聚乙二醇-12-羟基硬脂酸酯(SolutolHS15)是一种新型结晶抑制剂、增溶剂,目前已收录在德国药典。前期研究认为,该增溶剂具有较高的增溶能力、低溶血性、低组胺释放等优点,因此是一种高效安全的新型注射药物增溶剂。

虽泊洛沙姆 188 已被 2015 年版《中华人民共和国药典》收录,但泊洛沙姆 188、聚氧乙烯氢化蓖

麻油、15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯近年来只在少数中药注射液中开展了的探索性的研究^[9-13], 尚未广泛使用。且使用增溶性辅料的制剂安全性研究相对较少^[14-17], 因此需在了解制剂物质基础的同时结合剂型的特点开展相应的安全性研究, 谨慎添加, 为临床用药的安全提供保障。

参考文献

- [1] 冉勇, 冉云, 刘真. 7例清开灵注射液不良反应分析[J]. 药物与临床, 2009, 18(2): 81-82.
- [2] 张婷, 朱婷婷. 不同赋形剂对黄芩苷溶液稳定性的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(3): 192-193.
- [3] 陈翔宇, 孙胜斌, 李响明, 等. 冠心宁注射液蛋白质检查假阳性问题的研究[J]. 中国现代中药, 2015, 17(11): 1212-1215.
- [4] 国家食品药品监督管理局. 冠心宁注射液质量标准: WS3-B-3267-98-2012[S]. 2012.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [6] 郭青, 吴晓燕. 中药注射剂中蛋白质检查药典方法的假阳性原因探究[J]. 中国药品标准, 2011, 12(3): 219-223.
- [7] 祖金玥, 冯孟鑫, 王小红, 等. 聚山梨酯80对药典方法检查中药注射剂蛋白的影响[J]. 中国药品标准, 2015, 16(1): 36-38.
- [8] 王猛, 张钧寿, 周建平. 注射用辅料泊洛沙姆188[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(1): 10-13.
- [9] 祁星星, 李畅, 孙春萌, 等. 一种以Kolliphor HS15为增溶剂的参麦注射液的稳定性和安全性研究[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(21): 2536-2541.
- [10] 聂飞, 唐芳, 赵彬, 等. 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯在参麦注射液中的应用研究[J]. 中药与临床, 2014, 5(2): 42-44.
- [11] 张少峰, 鄢丹, 唐慧英, 等. 适宜于生脉注射液的增溶性辅料筛选研究[J]. 中药材, 2009, 6(32): 969-972.
- [12] 郭立, 杨秀荣. 清开灵注射液制备工艺对增溶性辅料增溶作用的影响[J]. 中国医药指南, 2011, 9(26): 216-217.
- [13] 王伟. 中药复方开心散和香丹注射液的制剂基础研究[D]. 北京: 中国医学科学院北京协和医学院, 2010.
- [14] 罗实. 银杏双酯注射液的制备和质量标准研究[D]. 成都: 四川抗菌素工业研究所, 2014.
- [15] 张嘉, 李贻奎, 李连达, 等. 聚山梨酯80和泊洛沙姆188等4种增溶剂对小鼠的急性毒性[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(17): 1491-1493.
- [16] 易红, 高进, 杨华, 等. 几种注射用表面活性剂的质量标准及安全性概述[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 115-119.
- [17] 张海燕, 韦迎春, 邬伟魁, 等. 3种增溶性辅料致大鼠肝肾损伤[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 237-241.

(收稿日期 2016-04-28)

(上接第556页)

- [3] 曾富华, 赵龙岩, 饶力群. 仙人掌多糖研究进展与开发利用前景[J]. 中国生化药物杂志, 2011, 32(5): 411-414.
- [4] 唐小江, 祝寿芬. 国内外高等植物多糖的研究概况[J]. 山西医科大学学报, 1998, 29(1): 94-95.
- [5] 孙元琳, 蔺毅峰, 高文庚, 等. 当归多糖抗辐射功能的构效关系探讨[J]. 中国食品学报, 2009, 9(3): 33-37, 40.
- [6] 李福香, 徐敏, 王键, 等. 肉苁蓉的药理学研究现状与展望[J]. 安徽农学通报, 2006, 12(13): 92-93.
- [7] 董彩婷, 杨青, 肖元梅, 等. 芦荟多糖抗突变作用的试验研究[J]. 华西医科大学学报, 2002, 33(3): 477-478.
- [8] 王文果, 庞杰. 多糖涂膜保鲜果蔬的研究进展[J]. 山地农业生物学报, 2006, 25(4): 358-363.
- [9] 苏玉顺, 李艳君, 赵方振, 等. 紫外-可见分光光度法在植物多糖含量测定中的应用[J]. 光谱实验室, 2011, 28(3): 1101-1107.
- [10] 丁玲, 王东, 张中林, 等. 不同商品地山药多糖含量的分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(4): 187-188.
- [11] 司志鑫, 马玉山, 马俊杰, 等. 希赫日·地格达多糖的提取及含量测定[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2009, 24(3): 280-281.
- [12] 黄秋婷, 陈远锋. 枸杞多糖的研究及其进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(1): 172-175.
- [13] 张若楠, 王三虎, 王剑波, 等. 正交法探讨独活寄生汤的提取工艺条件[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(3): 246-248.

(收稿日期 2016-09-20)