



SHENGWU ZHIYAO SHIYAN YU SHISHI JIAOCHENG

生物制药实验 与实施教程

◎ 王素芳 朱秋华 张 捷 陈永富 编著

 ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物制药实验与实施教程 / 王素芳等编著. —杭州:
浙江大学出版社, 2011.7

ISBN 978-7-308-08760-5

I .①生… II .①王… III .①生物制品;药物—制造—
—实验—高等学校—教材 IV .①TQ464-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 108125 号

生物制药实验与实施教程

王素芳 朱秋华 张捷 陈永富 编著

责任编辑 周卫群

封面设计 刘依群

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 浙江时代出版服务有限公司

印 刷 杭州杭新印务有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 7.75

字 数 189 千

版 印 次 2011 年 7 月第 1 版 2011 年 7 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-08760-5

定 价 18.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话 (0571) 88925591

前 言

生物制药的本质是利用生物技术生产生物药物的过程,或者说是将生物技术应用于制药领域的过程。所以,生物制药课程的教学内容不仅应包括与生物工程下游技术相关的理论与技术,还应包括与药物制剂、药物质量控制等相关的药学知识。

目前,很多高校的生物类专业(如生物技术、生物工程)都开设了生物制药的理论课和实验课,但目前国内出版的生物制药实验教材还不多,而且存在以下问题:(1)多偏重采用生物技术生产药用成分的粗制品,而不是生产符合国家质量标准的药品,没有很好地将生物技术与药学结合。(2)基本是按传统教学体系编写,教学方法体现不够,只介绍实验内容和过程。使用该类教材、采用传统教学方法不能充分发挥学生的主动性和创造性,与目前高校实验教学中逐渐推行的全程参与、开放式、合作式、自主设计实验教学方式不相匹配,不能满足开展这类实验的要求。

本教材不同于传统的生物制药实验指导书,其主要特点是以鼓励和培养学生自己动手、开发创新的精神为主导,在编写实验项目和内容的同时,更体现教学方法的改革和创新,将我校近几年采用的合作研讨、自主设计实验教学方法有机地融合了进去。

本教材由生物制药基础知识与理论、基础实验、综合实验、自主设计实验四部分组成,充分体现实验教学方法的实施和运用,其主要特色为:(1)编写框架采用理论—基础—综合—自主设计渐进式实验教学技能体系。(2)注意生物产品的生产与制药行业要求的结合。生产型实验项目不仅强调生物药物的生产工艺,而且注重药品的质量控制及分析,要求生产出符合药用标准的药品。(3)详尽描述自主设计实验教学组织形式、实施流程及细则,既注重过程又注重结果的考核方法,便于教师实验教学的开展。通过生物制药自主设计实验,学生可以把大学几年来学到的理论知识进一步消化,综合运用到药物的生产中。这一方面可发挥学生的主动性、积极性,培养学生分析问题、解决实际问题的能力、创新能力和团队合作能力,培养其科学研究的基本思路和优良作风,也为更快更好地适应生物制药方面的工作打下基础。

本教材可供开设生物制药实验的各高等院校的生命科学、生物技术、生物工程等专业本科学生使用,也可作为生物工程、药学专业、科研院所等科技人员、研究生参考。

本教材是在浙江省新世纪教改项目、宁波市医药基地项目和浙江万里学院合作研究性教学试验区项目的共同资助下完成的。在教材编写过程中,得到了朱秋华副教授、尹尚军副教授和陈永富老师的大力支持和协助。黄娇、方晓春、甘玉茹等同学也为本教材做了大量的文字输入工作。在此,对他们的付出表示衷心的感谢。本书大量参考了书中所列参考文献,借此出版之际,对各位前辈表示诚挚的谢意。

由于编者水平有限,错误在所难免,敬请各位批评指正!

编 者

2011年4月

目 录

第一部分 生物制药基础知识与理论	(1)
第一章 生物药物与生物制药	(1)
第一节 生物药物	(1)
第二节 生物制药	(3)
第二章 生物药物的质量控制	(5)
第一节 药品标准与生产过程要求	(5)
第二节 生物药物分析	(7)
第三章 生物药物制剂	(11)
第一节 片 剂	(11)
第二节 胶囊剂	(13)
第三节 制剂新技术	(15)
第四节 药物新型给药系统	(18)
第五节 药物制剂的稳定性	(20)
第四章 生物药物的研发	(22)
第二部分 基础实验	(25)
实验一 《中国药典》的查阅	(25)
实验二 GMP 固体制剂实验室参观	(27)
实验三 维生素 C 片的制备	(29)
实验四 胃蛋白酶合剂的制备	(31)
实验五 硬胶囊剂的制备	(33)
实验六 维生素 C 注射液的制备	(35)
实验七 注射用阿糖腺苷粉针剂的制备	(37)
实验八 维生素 B ₁ 片的鉴别与含量测定	(39)
实验九 维生素 C 及其制剂的含量测定	(41)
实验十 热原检查	(43)
实验十一 葡萄糖(原料药)的检测	(45)
实验十二 片剂的质量检查	(49)
实验十三 头孢克肟片溶出度测定	(52)

第三部分 综合实验	(54)
实验一 胆红素的制备及其质量检定	(54)
实验二 胰酶的制备及其质量检定	(56)
实验三 盐酸小檗碱的制备及质量检测	(60)
实验四 辅酶 Q ₁₀ 的发酵法生产	(63)
实验五 鸡白痢菌苗的制造、检定与保存	(67)
实验六 基因工程药物制备技术	(71)
实验七 粉末直接压片处方设计及影响因素考察	(75)
实验八 维生素 C 注射液的稳定性影响因素考察	(79)
第四部分 自主设计实验	(82)
示例 1 胆红素的制备及产品质量鉴定(生产合格药品型)	(85)
示例 2 米邦塔仙人掌多糖的提取条件研究(项目研究型)	(89)
文档一 生物制药自主设计实验方案设计(个人版)	(97)
文档二 生物制药自主设计实验方案设计(小组版)	(99)
文档三 利用开放时间使用实验室申请表	(101)
文档四 生物制药自主设计实验个人总结报告	(103)
文档五 生物制药自主设计实验小组总结报告	(106)
文档六 生物制药自主设计实验的任务分工	(107)
文档七 项目开展过程中的研讨记录	(108)
文档八 指导教师指导记录	(111)
文档九 小组成绩评分表	(113)
文档十 个人成绩评分表	(115)
文档十一 个人总成绩评分表	(116)
参考文献	(117)

第一部分 生物制药基础知识与理论

第一章 生物药物与生物制药

20 世纪 70 年代起,生物技术以其独特的魅力和毋庸置疑的发展潜力渗透到各个领域。生物制药是生物工程研究开发和应用中最活跃、进展最快的领域,被认为是 21 世纪最有前途的产业之一。国际上生物技术领域已取得的研究成果中 60% 以上是医学领域的,目前总销售额超过 10 亿美元的生物技术产品主要是医药生物制品。

生物制药是采用生物技术人为地创造一些条件,借助生物体或生物过程生产所需的生物药物的过程。生物药物在医疗上,针对性强,药理活性高,副作用小,疗效可靠;在化学构成上,十分接近于体内的正常生理物质,进入人体内更易为机体所吸收利用;在药理学上,具有更高的生化机制合理性和特异治疗有效性。生物药物在传染病的预防、疑难病的诊断和治疗上起着其他药物不能替代的作用。

近年来,由于生物制药业已被许多国家视为强劲的经济增长点加以重点支持,随着我国加入 WTO 以及生物制药业的迅猛发展,人们对生物制药业的认识不断深入和提高。

第一节 生物药物

生物药物是指利用生物体、生物组织、体液或其代谢产物,综合利用化学、生物技术、分离纯化工程和药学等学科的原理与方法加工、制成的预防、治疗和诊断疾病的药物。生物药物的材料来源广泛,主要有动物、植物、微生物的组织、器官、细胞与代谢产物,如动物脏器、血液、尿液等。随着生物技术的发展,有目的人工制得的生物材料成为当前生物制药原料的重要来源,如用免疫法制得的动物原料、用基因工程技术制得的微生物或动植物细胞原料。

一、生物药物的分类

根据生物药物的特点、制备方法等不同,一般将生物药物分为生化药物、生物制品和抗生素三大类。

1. 生化药物

生化药物是指主要运用生物化学方法从生物体制备的内源性生理活性物质。这类物质都是维持正常生命活动所必需的,包括氨基酸、多肽、蛋白质、糖类、脂类、核酸、维生素及激素等。

正常机体在生命活动中能保持健康状态,就是依赖于机体内不断产生的这类物质的调控作用。机体一旦受到外界环境的影响或其本身老化使某种活性物质的产生或作用受到阻碍时,就会发生与该物质有关的疾病,如胰岛素分泌障碍时就会发生糖尿病。此类药物的特

点:一是来源于生物体;二是人体的基本生化成分。因此,医疗应用中显示出高效、合理、毒副作用极小的临床效果,受到极大重视。

生化药物的化学本质多数比较清楚,故一般按其化学本质和药理作用分为以下几类:氨基酸及其衍生物类药物、多肽和蛋白质类药物、酶类药物、核酸及其降解物和衍生物类药物、糖类药物、脂类药物、维生素及辅酶类药物等。该分类方法有利于对同类药物的结构与功能的相互关系进行比较研究,有利于制备方法和检测方法的研究。

2. 生物制品

生物制品是指利用微生物及其代谢产物、动物毒素、人或动物的血液或组织等加工制成,用于人类有关疾病的预防、治疗和诊断的免疫制剂,具有免疫学反应或平衡生理作用的药物制剂,主要包括各种疫苗、免疫血清、类毒素、血液制品、免疫诊断制品等。生物制品的制造有别于生化药物,它更多地涉及免疫学、预防医学与微生物学。

疫苗的品种比较多,如卡介苗、乙肝疫苗、流感疫苗、乙型脑炎疫苗、狂犬疫苗等。血液制品的研究着重于静脉注射丙种球蛋白的制备,血液中各种未被充分利用的成分如红细胞、白细胞和血小板等的分离和利用。诊断试剂是生物制品开发中最活跃的领域,许多疾病的诊断、病原体的鉴别、机体中各种代谢物的分析都需要各种诊断测试试剂,如早孕试纸、AIDS 诊断试剂盒等。

3. 抗生素

抗生素是指生物在生命活动中产生的(或并用其他方法衍生的)在低微浓度下能选择性地抑制他种生物机能的次级代谢产物及其衍生物。

抗生素的生产主要是利用微生物发酵,有些从植物、海洋生物中提取的抗生物质如小檗碱、海星皂苷也属于抗生素,只能用化学方法合成抗菌药不是抗生素。此外,在抗生素的定义中还包含一个重要的限制条件,即低微浓度,如乙醇在高浓度下也有杀菌或抑菌作用,但不属于抗生素。

实际上由于各学科的发展、交叉和渗透,并受习惯的影响,生化药物、生物制品和抗生素有时无明确的界线。随着现代生物制药技术的发展和运用,上述三者(特别是生化药物与生物制品)的关系越来越密切,其内涵也愈来愈接近。

二、生物药物的用途

与化学药、中药相比,生物药物具有药理活性高、治疗的针对性强、毒副作用小等药理特点,其优越性已经得到临床和市场验证。目前,生物药物已广泛用作医疗用品,在医学、预防医学、保健医学等领域都发挥着重要作用。

治疗疾病是生物药物的主要功能,尤其对于疑难杂症,如肿瘤、神经退化性疾病、心脑血管疾病、自身免疫性疾病、冠心病、内分泌障碍等,生物药物的治疗效果是其他药物不可比拟的。生物药物在预防疾病方面也显示出越来越重要的地位。许多疾病,尤其是传染性疾病,如天花、麻疹、百日咳等,预防比治疗更为重要,人们已用疫苗成功地消灭了天花。常见的预防用生物药物有疫苗、类毒素等。大部分临床诊断试剂都来自生物药物,这也是生物药物的重要用途之一。生物药物诊断的特点是速度快、灵敏度高和特异性强。现已成功使用的有免疫诊断试剂、单克隆抗体诊断试剂、酶诊断试剂、放射性诊断药物和基因诊断药物等。

第二节 生物制药

生物制药,也称生物技术制药,就是把生物技术应用到药物制造领域生产生物药物的过程,即采用生物技术人为地创造一些条件,借助某些微生物、植物或动物来生产所需的医药品。

一、生物制药的特点

与中药、化学药相比,生物药物在生产制备、检验过程中具有明显的特殊性。

1. 生产制备的特殊性

(1)原料易腐败,活性物质稳定性差

由于生物药物原料为营养价值高的物质,因此极易染菌、腐败,从而造成有效物质被破坏,失去活性,并且产生热原或致敏物质等。生物活性成分离开生物体后,易变性、破坏,一旦遭到破坏,就失去其药理作用。因此,生产过程中必须十分小心地保护这些化合物的生理活性,对于低温、无菌操作要求严格,这也是分离、制备生化药物的难点。

(2)原料组成复杂,有效物质含量低

一种生物材料常含成千上万种成分,各种化合物的形状、大小、分子量和理化性质都各不相同,其中有不少化合物迄今还是未知物,而且生物活性物质在分离过程中仍处于不断代谢变化中,因此常无固定操作方法可循。

有些化合物在生物材料中含量极微,只达万分之一、十万分之一,甚至百万分之一。如胰腺中胰岛素含量仅为0.002%,还含有多种酶、蛋白质等杂质。因此,分离操作步骤多,提纯工艺很复杂,不易获得高收率。

(3)生物材料具有种属特异性

由于生物体间存在种属特异性,因而,使许多内源性生理活性物质的应用受到了限制。如用人脑垂体分泌的生长素治疗侏儒症有特效,但用猪脑垂体制备的生长素则对人体无效。

(4)制备技术条件要求高

生物制药中的分离方法几乎都在溶液中进行,各种参数(温度、pH、离子强度等)对溶液中各种组分的综合影响常常无法固定,以致许多实验设计理论性不强,实验结果常常带有很大经验成分。因此,要使实验获得重复,材料、方法、条件及试剂药品等都必须严格地加以规定。

此外,为了保护目的物的生理活性及结构上的完整性,生物制药中的分离方法多采用温和的“逐级分离”方法进行。为了纯化一种生化物质常常要联用几个、甚至十几个步骤,并不断变换各种不同类型的分离方法,才能达到目的。因此,操作时间长,手续繁琐,给制备工作带来众多影响。

2. 检验上的特殊性

(1)质量控制严格

有些药物(如细胞因子药物)极微量就可产生显著的效应(白介素-12仅0.1, α 干扰素10~30 μg /剂量),任何药物性质或剂量的偏差,都可能贻误病情甚至造成严重危害,因此质

量控制非常严格,不仅要有理化检验指标,更要有生物活性检验指标。这也是生物药物生产的关键。

(2)检测方法多样

生物分子结构与功能关系比较复杂,药物活性与分子空间构象相关。生物产品最后均一性的证明与化学上纯度的概念不完全相同,对其均一性的评估常常是有条件的,或者只能通过不同角度测定,最后才能给出相对“均一性”结论。任何一种单一的分析方法都无法确保药物的安全。它需要综合生物化学、免疫学、微生物学、细胞生物学和分子生物学等多门学科的相关理论和技术,才能切实保证一些药物的安全有效。

(3)检测环节多

特别是对于基因工程药物,除鉴定最终产品外,还要从基因的来源、菌种、原始细胞库等方面进行质量控制,对培养、纯化等每个环节都要严格把关。

二、生物制药技术

生物制药是生物技术与药学相互交叉形成的一门学科,涉及的技术较多,包括生化分离技术、发酵技术、酶催化技术、细胞工程技术、基因工程技术等在内的生物技术和药物制剂技术、检测技术等。

早期的生物药物都是用生化分离手段从生物材料中直接分离的。随着时间的推移,许多新的技术发展起来,但所有生物药物的生产仍然少不了分离纯化,所以生化分离工程仍然发挥着重要的作用。

20世纪40年代,发酵工程制药迅速发展起来,具有产量高、成本低的特点,抗生素、氨基酸、酶、激素等药物仍然主要采用发酵法生产。此外,一些酶在生产药物方面也发挥着重要的作用,如用青霉素酰化酶生产半合成抗生素,用己内酰胺酶生产氨基酸等。

基因工程制药就是利用重组DNA技术生产蛋白质或多肽类药物的过程。目前,已成为生物制药领域中最有潜力的一个分支。自1982年第一个基因工程产品——人胰岛素在美国问世以来,已有人生长素、干扰素、白细胞介素、乙型肝炎疫苗、集落细胞因子、红细胞生成素、肿瘤坏死因子、胰岛降钙素等多种重组药物的生产获得成功,也为生产厂家创造了巨额利润。

细胞工程与基因工程一起代表着生物技术最新的发展前沿。通过培养、诱变等细胞工程或细胞融合途径,不仅大大提高了疫苗效率,还能制备出多价菌苗,可以同时抵御两种以上的病原菌的侵害。用同样的手段,也可培养出能在培养条件下长期生长、分裂并能分泌某种激素的细胞系。1982年美国科学家用诱变和细胞杂交手段,获得了可以持续分泌干扰素的体外培养细胞系,现已走向应用。

生化药物多采用发酵法、直接提取分离法、酶转化法,抗生素多采用发酵法,生物制品则更多应用细胞工程技术、基因工程技术,当然也离不开发酵、生化分离等传统技术。

第二章 生物药物的质量控制

药品是用于预防、治疗、诊断人的疾病,有目的地调节人的生理机能并规定有适应症或者功能主治、用法和用量的物质,是一种关系人类生命健康的特殊商品。为保证人类用药的安全、合理和有效,药品必须达到一定的质量要求。

第一节 药品标准与生产过程要求

一、生物药物的质量标准

药品质量标准是国家对药品质量、规格及检验方法所作的技术规定,是药品生产、供应、使用、检验和药政管理部门共同遵循的法定依据。我国现行的药品标准有:中国药典(国家药典)、部颁标准(卫生部药品标准)和国外药典。

国内生产药品一般遵照中国药典和部颁标准,进口药品、仿制国外药品等需要按照国外药典标准,如美国药典(USP)、英国药典(BP)、欧洲药典(PH·EU)、日本药局方(JP)。

1. 中国药典

中国药典由中华人民共和国卫生部聘请全国药政、药检、教学、科研和生产单位的专家,组成中华人民共和国卫生部药典委员会,编辑出版,政府颁布实施,在全国范围内具有法律的约束力。所以药典收录的药物和制剂一般具有药效确切、副作用小、质量较稳定的特点,通常称为“法定药”。

1953年首版,至今已先后编纂9版(1953、1963、1977、1985、1990、1995、2000、2005、2010年版)。中国药典的最新版本是2010年版,该版分为三部:一部主要收载中药材及中药成分制剂;二部主要收载生化药物、化学药品、抗生素;三部主要收载生物制品。

药典一般分为凡例、正文、附录和索引四部分。凡例是正确理解和使用药典的阐述部分,并且把与正文品种、附录及质量检查有关的共性问题加以规定,避免在全书中重复说明。正文是收载药品及其制剂的质量标准,按中文名称笔画顺序排列,原料药在前,制剂及生物制剂在后,包括质量标准、制备要求、鉴别、杂质检查与含量测定等项目;附录包括制剂通则、通用检查方法和指导原则共19类;索引主要用于查找,一般除了按笔画顺序排列外,书末还分别列有中文索引和英文索引。

2. 部颁标准

药典不可能包罗万象地将所有药品都收入其中,通常不允许收载有争议的内容,因此其收载的品种有限。国务院卫生行政部门除了颁布《中国药典》作为全国最高药品标准典籍

外,还颁布了部颁标准作为药典的补充。部颁标准也具有法律的约束力,编排形式与药典相似,故有“准药典”之称。

部颁标准分为部颁中药成方制剂、部颁化药、部颁药材标准、部颁抗生素分册、部颁生化药分册、部颁蒙药分册、部颁藏药分册、部颁维吾尔药分册等。如阿归养血颗粒、阿归养血糖浆(当归养血膏)、安神补脑液等都在部颁中药标准中,空心胶囊、口服葡萄糖、口服氯化钠等收录在部颁化药标准中。

二、药品生产质量管理规范(GMP)

药品生产要遵循药品生产质量管理规范(GMP),该规范是为生产出全面符合质量标准的药品而制定的。制剂生产的全过程及原料药生产中影响成品质量的关键工序均应符合GMP要求,其目的就是将传统的质量把关(检验结果与质量标准比较),转变成过程质量控制,从根源上保证药品的质量。

GMP是药品生产质量全面管理控制的准则,由硬件和软件组成,硬件是指人员、厂房与设施、设备等方面的规定,软件是指组织、规程、操作、卫生、记录、标准等管理规定。

1. 药物生产的洁净级别要求

法定药品标准中列有无菌检查项目的原料药,其生产等都要求在一定等级的洁净区进行,精制、干燥、包装时,其暴露环境应为10000级背景下局部100级。其他原料药精制、干燥、包装生产暴露环境的空气洁净度级别不低于300000级。

表 1-1 空气洁净度级别及应用

洁净级别	尘粒($\geq 0.5\mu\text{m}$) 最大允许数		微生物数 最大允许 值(沉降 菌/皿)	应 用
	/立方米	/立方英尺		
100级	3,500	100	1	菌种接种工作台,最终灭菌药品的大容量注射剂的灌封和非最终灭菌药品,灌装前不需过滤除菌的药液配制,注射剂的灌封、分装和压塞,直接接触药品的包装材料最终处理后的暴露环境。
10000级	350,000	10000	3	无菌原料药品的结晶、干燥工序,不能高压灭菌的注射剂瓶子烘干,储存及粉针剂的原料过筛,混粉、分装、加塞、灌封冻干;最终灭菌药品的注射剂的稀配、过滤;小容量注射剂的灌封;直接接触药品的包装材料的最终处理,灌装前不需过滤除菌的药液配制。
100000级	3,500,000	100,000	10	注射剂瓶子清洗工序,薄膜过滤设备的装配,能热压灭菌的注射剂瓶子烘干、注射剂浓配或采用密封系统的稀配;非最终灭菌药品轧盖,直接接触药品的包装材料最后一次精洗;非最终灭菌口服液体药品的暴露工序;深部组织创伤外用药品、眼用药品的暴露工序;除直肠用药外的腔道用药的暴露工序。
300000级	10,500,000	300,000	15	粉针剂轧盖工序,能高压灭菌的注射剂配制间,最终灭菌口服液体药品的暴露工序;口服固体药品的暴露工序;表皮外用药品暴露工序;直肠用药的暴露工序。

沉降菌用 $\phi 90\text{mm}$ 培养皿取样,暴露时间不低于30分钟。空气洁净度级别与每立方英

尺空气中最大允许微粒数对应。

2. 在洁净区活动的要求

进入洁净区必须经一更、二更,换上专用洁净服、鞋、帽。在洁净室工作时,动作要轻,尽量减少讲话和不必要的动作,不应做易发生的大幅度动作。洁净区专用的洁净服、鞋、帽等不得穿到非洁净区使用。

进入洁净室的材料、工具、仪器、零部件、设备等均应进行擦洗、除尘、消毒等必要的净化处理。不准将与生产无关的容易产尘的物件如铅笔、直尺、橡皮、钢笔等带入洁净室,记录应使用圆珠笔。

3. 药品生产的工艺用水

工艺用水按制备方法和水质可分为饮用水、纯化水和注射用水。

表 1-2 工艺用水的种类和用途

类别	水质	用途
饮用水	符合饮用水标准(GB5749—06)	用于原料药的生产,容器、设备的初洗等
纯化水	去离子水、蒸馏水	原料药的精制,制剂的配料,容器的清洗,药品检验试验用水,注射用水的水源等
注射用水	纯化水经蒸馏所得的水,除应符合蒸馏水的标准外,还有控制氨、热原、pH值	配制注射剂用的稀释剂

第二节 生物药物分析

一、常用的分析方法

1. 化学分析法

化学分析法是以药物的化学反应为基础的分析方法。根据反应的现象和特征进行药物组分的定性分析;根据反应中试样和试剂的用量,进行药物组分的定量分析。化学定量分析又分为重量分析与滴定分析(或容量分析),二者都是比较经典的分析方法。

化学分析法所用仪器简单、结果准确,因而应用范围广泛。但这种方法也有一定的局限性,例如对于试样中痕量或微量杂质的定性或定量分析往往不够灵敏,常常不能满足快速分析的要求,而需用仪器分析法来解决。

2. 仪器分析法

根据被测药物本身的或在化学变化中的某种物理性质(如相对密度、相对温度、折射率、旋光度及光谱特征等)与组分的关系,进行定性或定量分析的方法,叫仪器分析法。仪器分析法主要包括电化学分析、光学分析、质谱分析、色谱分析、电泳分析等,具有灵敏、快速、准确的特点。

3. 生物学活性测定法

生物学活性测定法是利用药物对生物体(整体动物、离体组织、微生物等)的作用以测定

其效价或生物活性的一种方法。生物学活性测定法可用于多种生物药物的效价测定,如神经介质、激素等药物,很难用理化方法测定或单独的物化方法不能完全反映其特性。此外,还可用于某些有害杂质的限度检查,如内毒素、降压物质等。生物活性可分为体外测定法和体内测定法。体内测定法就是利用动物体内某些指标的变化,定出产品的单位。体外测定法就是利用体外培养细胞的某些指标(细胞数量的增加或减少、生长状况等)的变化,定出产品的单位。

生物学活性测定变异范围大,同样制品在不同实验室测定结果差异很大。标准品的使用,最大限度地减少实验室之间和各种影响测定因素的干扰。如 NGF 的生物学活性测定采用鸡胚神经节生长突起的半定量计量方法,实验误差大很难用于常规生物学活性评价。采用标准品同时测定,经过标准品校正可使误差控制在一定范围,使 NGF 的生物学活性定量测定成为可能。

4. 生化酶促反应测定法

这类测定方法不依赖于活的生物系统,主要基于产品与某种物质的结合或以产品本身的化学反应为原理设计,这类生物化学测定方法具有便于操作、精确、稳定等特点。

5. 免疫学活性测定法

基因工程产品的化学本质是蛋白质,对于异种动物有相应的免疫原性,利用此特点,将不同的制品,制作相应的单克隆抗体或多克隆抗体,采取 ELISA 法测定其含量。蛋白质的生物学活性与其免疫学活性不一定相平行,如果蛋白质肽键的抗原决定簇和生物活性中心相一致时,ELISA 法测定结果和生物学活性测定结果一致;如果不一致时,两者的结果也不平行。很多细胞因子虽然有商品化的 ELISA 检测药盒,如 EPO 等,但由于两种测定法所代表的意义不同,所以免疫学活性测定法不能替代生物学活性的检测。

二、样品分析过程

药品检验的基本程序:取样→检验(性状、鉴别、检查、含量测定)→记录、报告。

药品检验结果能否真实反映药品质量,不仅需要科学的鉴别、检查及含量测定的方法,药品取样的合理性直接影响药品检验结果的真实性。欲从大量的药品中取出少量的样品进行分析,必须全面考虑取样的科学性、真实性与代表性。

根据药品质量标准,首先看性状是否符合要求,然后进行药品的鉴别、检查、含量测定等。各项的检查结果都符合规定,才能视为合格药品。

三、生化药物与抗生素的质量控制

生化药物及抗生素与化学药同放在 2010 版《中国药典》的二部中,其质量控制和化学药一样。原料药和制剂的检测项目都包括性状、鉴别、检查和含量测定这几项,但二者有着很大的区别。

1. 性状

原料药的性状描述包括外观、臭、味、物理常数(溶解度、熔点、比旋度、吸收系数)等,而制剂不再检测药用成分的物理性状,主要是观察制剂的外观。如片剂要求外观完整光洁、色泽均匀,并具有适度的硬度;注射剂要求澄清透明。

2. 鉴别

制剂的鉴别方法一般与原料药相同。

生化药物的鉴别一般可采用化学和物理学方法进行鉴定,但对于蛋白质类药物一般没有专属性强的鉴别方法,需用 SDS-PAGE 电泳和高效液相色谱共同证明其物质的正确;对于重组蛋白,一般还需进行肽图分析,以证明其与天然蛋白完全一致。

抗生素的鉴别试验包括抗生素本身的鉴别、抗生素成盐的酸根或金属离子的鉴别。抗生素本身的鉴别要求专属性强、灵敏度高的方法,目前常用的方法有红外光谱法、薄层色谱、HPLC 法。酸根或金属离子的鉴别较为简单,如青霉素钾则直接鉴定钾盐反应即可。

3. 检查

生化药物与抗生素的检查项目包括:酸碱度、溶液澄清度及颜色、干燥失重或水分、炽灼残渣及重金属、杂质、异常毒性等多项。重组蛋白药物、酶类药物还要检测高分子蛋白、相关蛋白含量,含量分别为不超过 5% 和 10%。用于注射剂的原料药还需进行热原(细菌内毒素)检查。

在制剂检查时,原料药项下的检查项目一般不需重复检查,仅对于特别关键的控制指标进行再次检查,如重组蛋白中的相关蛋白和高分子蛋白项。此外,还要检查在制剂过程中带来的和储运过程中产生的杂质及制剂项下相应的检查项目。

表 1-3 维生素 C 原料药与制剂检测项目的不同

	原 料	制剂(片)
[性状]	药粉的颜色、熔点,比旋度等	药品的外观颜色
[鉴别]	化学法	化学法
[检查]	溶液的澄清度与颜色 炽灼残渣 铁,铜,重金属	溶液的颜色 重量差异 崩解时限
[含量测定]	碘量法	碘量法

另外,不同剂型还有各自规定的检查项目。如片剂需检查重量差异(含量均匀度)、崩解时限(溶出度)等项目,注射剂需检查装量、pH 值、无菌、热原(细菌内毒素)等项目。

Vc 原料药与制剂检查项目对比见表 1-3。

4. 含量(效价)测定

有些生化药物是结构明确的小分子药物,如氨基酸、胆红素等,可以通过理化分析法进行含量测定,以表明其有效成分的百分含量。但多数生化药物如蛋白质、多肽、酶、激素等,单独的物化方法不能完全反映其特性,需进行效价测定和酶活力测定,以表明其有效成分生物活性的高低,即效价。

制剂中药量一般不用百分含量或效价表示,而是用标示量的多少表示。计算方法是每片含量比上标示量,乘以 100%,结果可能低于标示量,也可能高于标示量。

由于制剂与原料药物不同,它们常含有赋形剂、稀释剂和附加剂(稳定剂、防腐剂或着色剂等),这些附加成分的存在,常常影响对主药的测定。所以,对制剂药物含量测定的方法必须具有专属性,不受其他成分的影响。

四、生物制品的质量控制

生物制品特别是疫苗都是用于健康人群,特别是儿童的免疫接种,其质量的优劣直接关系到千百万人的健康和生命安全,因此应特别注意控制其质量。生产过程质量控制是保证生物制品质量的重要环节,生物制品生产用水、所有原料及辅料应符合现行《中国药典》、《中国生物制品规程》和《中国生物制品主要原辅料质量标准》的要求。

生物制品质量控制极其严格,检测环节、检测方法多,具体内容见《生物制药学》第四篇生物药物的质量控制。

第三章 生物药物制剂

当一种新的原料药研制成功后,紧接着就要研究将它制成适宜于一定给药途径的剂型,以发挥最佳治疗效果。给药途径不同,药物的吸收程度和速度不同,因而药效也不同。近20年来,药剂学发生了深刻的变化,药物剂型也从常规制剂(片剂、颗粒剂、胶囊、注射剂等)发展到缓释制剂、控释制剂、靶向制剂。

与化学合成药物相比,大部分生物药物分子质量大、稳定性差,给药后生物利用度低。因而,如何利用现代药剂学与制剂技术制备生物技术药物新型制剂,从而保证用药的安全、有效,成为生物技术药物领域与药剂学的研究热点。在此背景下,生物技术药物的各类给药载体(微球、纳米粒、脂质体、微乳等)和给药系统(注射给药系统、黏膜给药系统、口服给药系统、经皮给药系统以及基因药物给药系统)获得了较快发展。

本章主要介绍实验室方便制备的口服固体制剂(如片剂和胶囊剂)、药物研发涉及较多的制剂新技术、新给药系统和药物制剂的稳定性等方面的内容。

第一节 片剂

片剂是药物与辅料均匀混合后压制而成的片状制剂,包括普通压制片、包衣片、糖衣片、薄膜衣片、肠溶衣片、泡腾片、咀嚼片、多层片、分散片、舌下片、口含片、植入片、溶液片、缓释片。片剂具有剂量准确,理化性质稳定,贮存期较长,使用、运输和携带方便,价格低、产量高等优点。但药物的溶出速度较慢,儿童及昏迷、呕吐患者不易服用;特别是对于不耐热、易被胃蛋白酶降解的生物药物很多不适合制备成片剂。

一、片剂的生产

片剂生产的一般工艺流程为:原辅料—粉碎、过筛—物料配料、混合—制粒—颗粒干燥—压片—包衣—包装—储存。

粉碎的主要目的是减少粒径,增加比表面积,从而有利于提高难溶性药物的溶出度、生物利用度和制剂中各成分的均匀混合。过筛获得均匀粒度的物料后,通过制粒把粉末、水溶液等状态的物料经加工制成具有一定形状与大小粒状物。制粒能改善物料的流动性,且能防止粉尘飞扬及器壁上的黏附,也有的不需造粒和干燥,直接压成片剂。

制备片剂时,一般均需加入适宜的没有生理活性的某些物质,即辅料。辅料主要作用包括填充作用、黏合作用、崩解作用和润滑作用,此外还有着色、矫味的作用。最常用的填充剂是淀粉、糖粉和糊精;最常用的黏合剂是蒸馏水、淀粉浆和乙醇等;常用的崩解剂是干淀粉和羧甲基淀粉酶;润滑剂则常用硬脂酸镁、微分硅胶和滑石粉。

片剂在生产与贮藏期间应符合下列规定：

(1)原料药与辅料混合均匀。含药量小或含毒、剧药物的片剂,应采用适宜方法使药物分散均匀。

(2)凡属挥发性或对光、热不稳定的药物,在制片过程中应遮光、避热,以避免成分损失或失效。

(3)压片前的物料或颗粒应控制水分,以适应制片工艺的需要,防止片剂在贮存期间发霉、变质。

(4)含片、口腔贴片、咀嚼片、分散片、泡腾片等根据需要可加入矫味剂、芳香剂和着色剂等附加剂。

(5)为增加稳定性、掩盖药物不良臭味、改善片剂外观等,可对片剂进行包衣。

(6)片剂的溶出度、释放度、含量均匀度、微生物限度等应符合要求。必要时,薄膜包衣片剂应检查残留溶剂。

(7)应在符合 GMP 要求的洁净环境中操作。

(8)片剂一般应密封贮存。

二、片剂的质量检查

对于片剂的质量要求,一般是硬度适中、色泽均匀、光洁美观、含量准确、重量差异小、崩解或溶出度符合药典要求;同时,对于某些小剂量的功效成分,还应当符合含量均匀度检查的要求。

1. 外观性状

片剂外观应完整光洁、色泽均匀,有适宜的硬度和耐磨性。除另有规定外,对于非包衣片,应符合片剂脆碎度检查法的要求,防止包装、运输过程中发生磨损或破碎。

2. 片重差异

片剂重量差异限度应符合表 1-4 规定：

表 1-4

平均重量	重量差异限度
0.30g 以下	±7.5%
0.30g 或 0.30g 以上	±5%

取供试品 20 片,精密称定总重量,求得平均片重后,再分别精密称定每片的重量,每片重量与平均片重相比较(凡无含量测定的片剂,每片重量与标示片重相比较),超出限度的不得多于 2 片,并不得有 1 片超出限度一倍。

糖衣片、薄膜衣片与肠溶衣片应在包衣前检查片芯的重量差异,符合上表规定后,方可包衣。包衣后不再检查重量差异。

凡规定检查含量均匀度的片剂,一般不再进行重量差异检查。

3. 崩解时限

除规定检查溶出度、释放度的片剂不再进行崩解时限检查以外,一般口服片剂需做崩解时限检查。崩解时限检查采用吊篮法检查,取供试品 6 片,分别置吊篮的玻璃管中,启动崩