

102年度市售奈米藥品品質監測及奈米檢驗技術之研究

范孟棋 王博譽 陳玉盆 周秀冠 施養志 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

本研究蒐集市售奈米鐵劑之相關資料並進行檢測，以期建立奈米科技藥品之檢驗技術。目前市售奈米鐵劑包括滴劑及咀嚼錠兩種劑型，其主成分為iron hydroxide polymaltose complex，本研究共取得7件市售奈米鐵劑進行檢驗，探討的檢測項目選取ISO/TR 13014 : 2012技術報告所列舉奈米材料八大物化特性中粒徑(particle size)、形狀(shape)、組成成分(composition)及表面電荷(surface charge)等4項。7件檢體分別以動態光散射奈米粒徑分析儀檢測，平均粒徑分別為12.1、424.6、84.4、75.4、66.9、60.4及78.2 nm；以穿透式電子顯微鏡觀察奈米粒子形狀，呈現圓形或長條狀；以能量分散光譜分析檢測確認有鐵元素；並以介面電位分析儀執行奈米粒子表面電位測定，其電位介於-15.8 mV與-31.0 mV之間。關於奈米科技藥品粒徑檢驗規範，目前國際上尚未有一致之要求，亦未見於藥典各品項之規格中，本研究先就已有奈米化之產品建立粒徑檢驗技術，待日後奈米產品納入粒徑規範時，可據以檢驗並確認品質狀況。

關鍵詞：奈米科技藥品、鐵劑、動態光散射奈米粒徑分析儀、穿透式電子顯微鏡

前言

經搜尋文獻資料並評估後，本研究選定口服奈米鐵劑作為檢驗標的，以評估相關奈米檢測方法。口服奈米鐵劑主要包括滴劑及咀嚼錠兩種劑型，主成分為iron (III) hydroxide polymaltose complex，適應症為缺鐵性貧血，係為醫師處方用藥。依據文獻記載，口服奈米鐵劑成分在水中之分散性佳，懸浮液中粒子的核心由iron (III) hydroxide組成，外層包覆polymaltose，其結構特性與人體中原本存在的鐵蛋白有類似之處，可形成穩定的奈米粒子⁽¹⁾。口服奈米鐵劑在小腸中以被動擴散或胞飲作用等機轉吸收，由於奈米粒子外層包覆碳水化合物之緣故，相較於傳統鐵劑，可避免刺激腸胃道，得到較好的腸道耐受性及生體可用率⁽²⁾。

本研究檢測項目依循國際標準組織 (International standard organization, ISO) 於2012年公布之ISO/TR 13014 : 2012技術報告(Nanotechnologies - Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment)，列舉奈米材料八大物化特性，包括粒徑(particle size)、聚集度(aggregation/agglomeration)、形狀(shape)、表面積(surface area)、組成成分(composition)、表面化學(surface chemistry)、表面電荷(surface charge)、溶解度與分散性(solubility and dispersibility)，並參考ISO/TR 13014 : 2012技術報告列舉之儀器，執行奈米性檢測。由於藥品奈米特性檢測仍屬於較新的研究領域，經搜尋文獻，記載有以動態光散射奈米粒徑分析儀(dynamic light scattering, DLS)及穿透式電子顯微鏡(transmission electron

microscopy, TEM)檢測iron (III) hydroxide polymaltose complex之參考資料⁽³⁾，由於奈米檢測研究，首先必須確認研究標的具有奈米尺寸，本研究遂嘗試以上述DLS及TEM等檢測法量測奈米鐵劑藥品之粒子尺寸，作為研究開端，同時利用DLS分析儀器檢測表面電位，以能量分散光譜分析(energy dispersive spectroscopy, EDS)檢測輔助TEM檢測粒子之成分。另有關表面積、表面化學、溶解度與分散性、聚集度等4項參數，因藥品製劑賦形劑可能干擾檢測之緣故，似乎無法逕予檢測，預定於下年度研究取得主成分原料檢體後，再行探討。

本署為建立奈米科技藥品檢驗技術，執行市售奈米科技藥品品質評估研究，以因應奈米科技藥品科技發展後，隨之而來的法規管理層面與藥品品質把關之議題。

材料與方法

一、材料

(一) 檢體來源

本研究之檢體係向藥品經銷商購入，共取得7件市售奈米口服鐵劑，包括1件輸入滴劑產品、1件輸入咀嚼錠產品及5件國產咀嚼錠產品。輸入滴劑產品之標誌量為50 mg iron/mL，輸入及國產咀嚼錠產品標誌量均為100 mg iron/Tab。

(二) 儀器設備

- 動態光散射奈米粒徑暨界面電位分析儀 (Zetasizer Naon ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, England)
- 穿透式電子顯微鏡 (JEM-2100 FEI, Jeol Ltd., Tokyo, Japan)
- 烘箱(VD53, Binder GmbH, Tuttlingen, Germany)
- 能量分散光譜分析儀(phoenix, EDAX Inc., Mahwah, NJ, USA)

(三) 器具及材料

- 容量瓶：100 mL及200 mL
- 濾膜：孔徑0.45 μm，材質nylon

- 微量分注器：20 μL (Pipetman Ultra, Gilson Inc., Middleton, WI, USA)
- 鍍碳銅網：200 mesh (S162, Agar Scientific Ltd., Stansted, England)

二、實驗方法

(一) 粒徑(particle size)及表面電位(surface charge)

1. 檢體配製

取輸入滴劑檢體1 mL，置於100 mL容量瓶中，以去離子水定容，混勻，供作檢品溶液。取輸入咀嚼錠、國產咀嚼錠A、國產咀嚼錠B、國產咀嚼錠C、國產咀嚼錠D及國產咀嚼錠E檢體各1粒，分別置於200 mL容量瓶中，以去離子水定容，振搖使完全崩散，經濾膜過濾，供作檢品溶液。

2. 檢測法：

取檢品溶液至樣品槽達適當高度，以動態光散射奈米粒徑分析儀，測定懸浮液中奈米粒子的平均粒徑，計算6次測定結果數據之平均值。再以界面電位分析儀測定懸浮液中奈米粒子的表面電位。

(二) 粒子形狀(shape)及組成成分(composition)

1. 檢體配製

取輸入滴劑檢體1 mL，置於100 mL容量瓶中，以去離子水定容，混勻，以去離子水稀釋50倍，再以微量分注器取16 μL，滴於鍍碳銅網上，以烘箱乾燥後，供作電子顯微鏡檢測。取輸入咀嚼錠、國產咀嚼錠A、國產咀嚼錠B、國產咀嚼錠C、國產咀嚼錠D及國產咀嚼錠E檢體各1粒，分別置於200 mL容量瓶中，以去離子水定容，振搖使完全崩散，經濾膜過濾，以去離子水稀釋50倍，再以微量分注器取16 μL，滴於鍍碳銅網上，以烘箱乾燥後供作電子顯微鏡檢測。

2. 檢測法

於電子顯微鏡視野中觀察粒子形狀，

選擇較具代表性之區域，調整放大倍率後，記錄其影像。對於視野中呈現之奈米粒子，進行EDS檢測，由高能量電子束撞擊待測檢體，使激發X射線，偵測其X射線能譜(能量範圍：0至10 keV)，藉由能譜中特性X射線能量(characteristic X-ray)，確認含有鐵原子之元素組成。

結果與討論

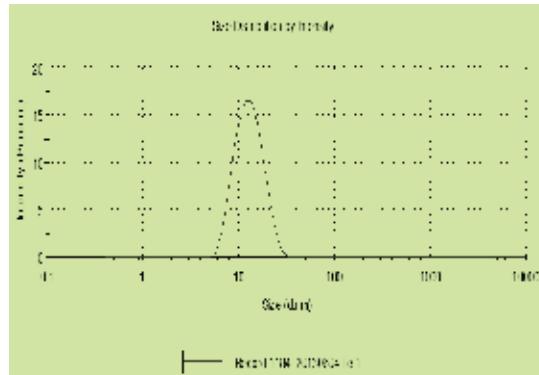
本研究取得7件檢體，進行粒徑、粒子形狀、元素組成及表面電位等項目檢測。

以DLS檢測粒徑，結果顯示：1件輸入滴劑產品之平均粒徑為12.1 nm，1件輸入咀嚼錠產品之平均粒徑為424.6 nm；5件國產咀嚼錠產品之平均粒徑分別為84.4、75.4、66.9、60.4

表一、檢體以DLS分析平均粒徑之檢測結果

| 檢體名稱 | 平均粒徑(nm) |
|--------|----------|
| 輸入滴劑 | 12.1 |
| 輸入咀嚼錠 | 424.6 |
| 國產咀嚼錠A | 84.4 |
| 國產咀嚼錠B | 75.4 |
| 國產咀嚼錠C | 66.9 |
| 國產咀嚼錠D | 60.4 |
| 國產咀嚼錠E | 78.2 |

(A)



圖一、輸入滴劑(a)及咀嚼錠(b)檢體之粒徑分布圖

及78.2 nm (表一、圖一及二)。

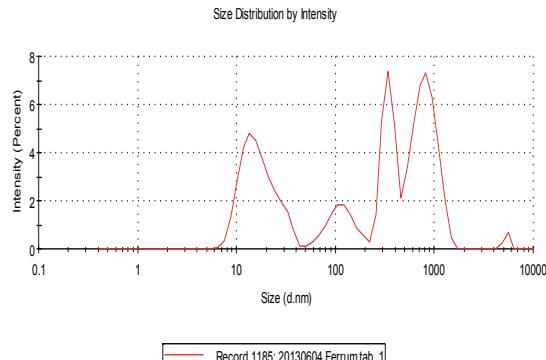
以TEM檢測粒子形狀，結果顯示：1件輸入滴劑產品及1件輸入咀嚼錠產品之粒子形狀均為圓形，根據視野參考尺規估計其直徑約5 nm；5件國產咀嚼錠產品之粒子形狀均類似長條狀，形狀較不規則，根據視野參考尺規估計長度約20 nm，寬度約5 nm。上述7件檢體以電子顯微鏡檢測視野中顯示之奈米粒子，經EDS分析結果，顯示均有鐵原子之元素組成(圖三至九)。

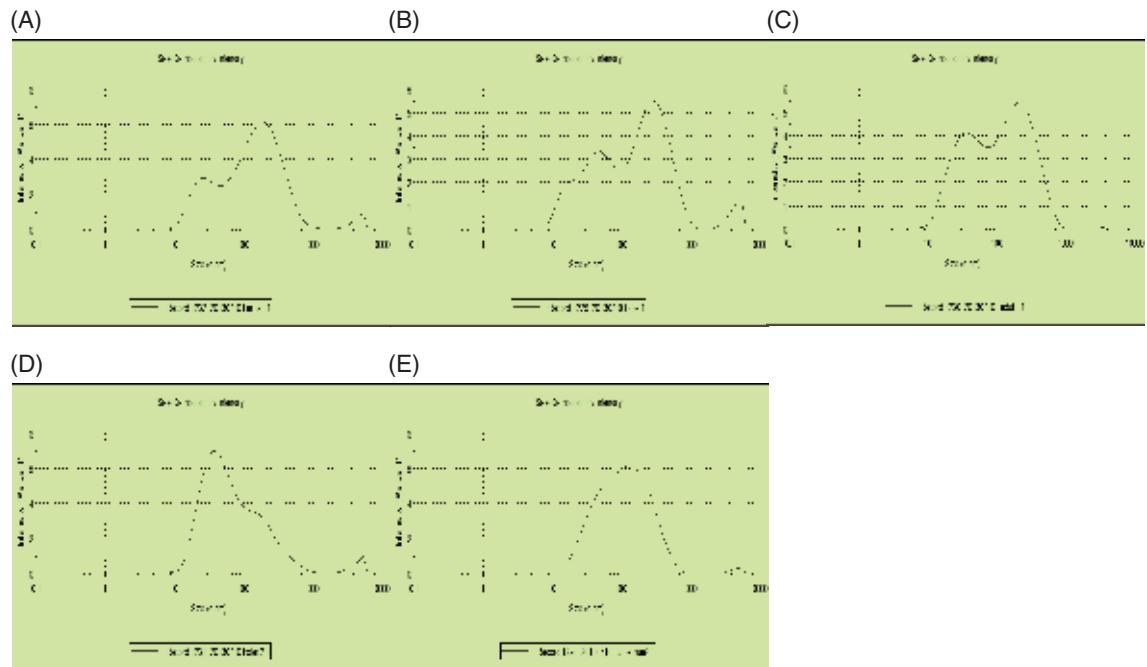
表面電位測定結果顯示：7件檢體粒子表面均帶有負電荷，其電位介於-15.8 mV與-31.0 mV之間(表二)。

本研究之檢體大部分為咀嚼錠劑型，此藥品劑型除了含奈米特性的iron hydroxide polymaltose complex主成分之外，尚包含有黏合劑、潤滑劑、矯味劑等數種賦形劑。由於DLS檢測方式，不若TEM法可利用EDS輔助鑑別所觀測到粒子的成分組成，若直接以DLS檢測由咀嚼錠配製成懸浮液之粒徑，將無法區辨粒徑分布圖中不同粒徑聚落是來自於主成分或者賦形劑。為改進上述DLS檢測法不足之處，將來研究方向若改以主成分原料代替製劑成品做為檢測對象，或可避免賦形劑對粒徑檢測造成影響。

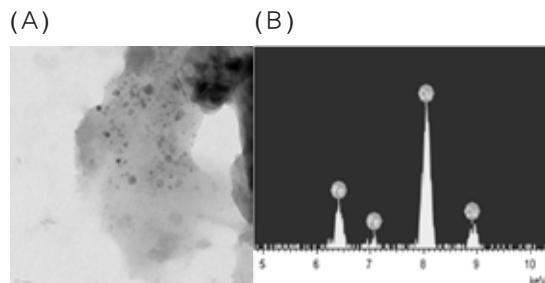
DLS與TEM檢測結果有差異，其原因之一可能來自於粒子形狀造成的影響。由於DLS原

(B)

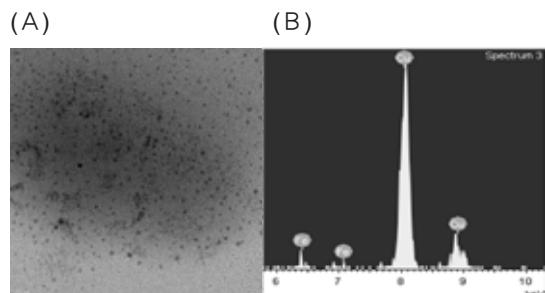




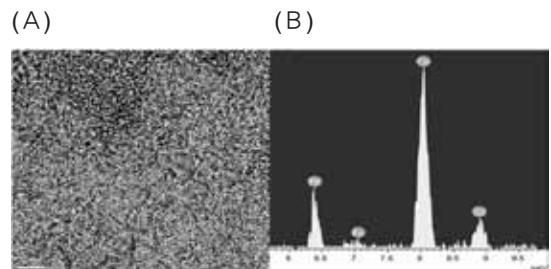
圖二、國產咀嚼錠(A)、(B)、(C)、(D)及(E)檢體之粒徑分布圖



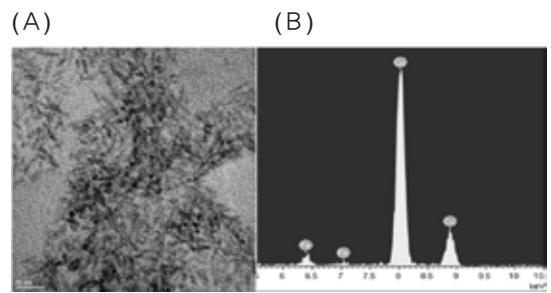
圖三、輸入滴劑檢體之穿透式電子顯微鏡影像(A)及能譜分析圖(B)



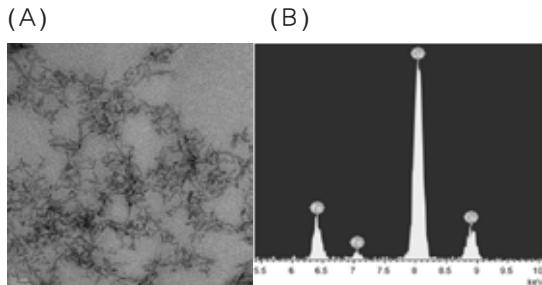
圖四、輸入咀嚼錠檢體之穿透式電子顯微鏡影像(A)及能譜分析圖(B)



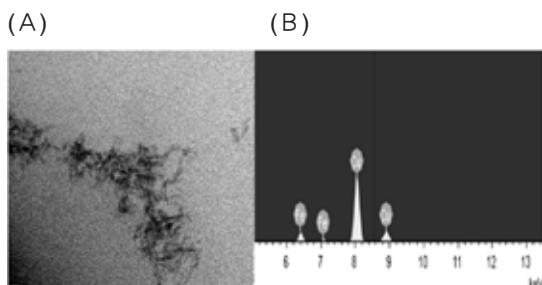
圖五、國產咀嚼錠A檢體之穿透式電子顯微鏡影像(A)及能譜分析圖(B)



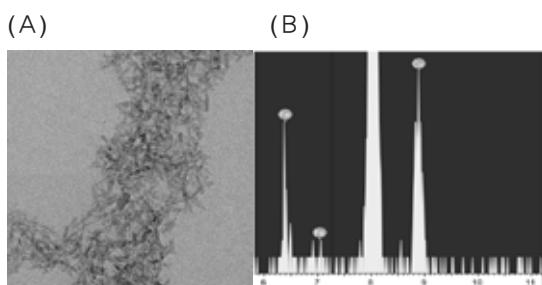
圖六、國產咀嚼錠B檢體之穿透式電子顯微鏡影像(A)及能譜分析圖(B)



圖七、國產咀嚼錠C檢體之穿透式電子顯微鏡影像
(A)及能譜分析圖(B)



圖八、國產咀嚼錠D檢體之穿透式電子顯微鏡影像
(A)及能譜分析圖(B)



圖九、國產咀嚼錠E檢體之穿透式電子顯微鏡影像
(A)及能譜分析圖(B)

表二、檢體之粒子表面電位測定結果

| 檢體名稱 | 表面電位(mV) |
|--------|----------|
| 輸入滴劑 | -15.8 |
| 輸入咀嚼錠 | -30.1 |
| 國產咀嚼錠A | -30.0 |
| 國產咀嚼錠B | -31.0 |
| 國產咀嚼錠C | -17.6 |
| 國產咀嚼錠D | -23.1 |
| 國產咀嚼錠E | -18.1 |

理係利用不同粒徑在懸浮液中發生布朗運動(Brownian motion)速率的差異性，且假設受測粒子為圓球形⁽⁴⁾，若不同檢體有粒子形狀上之不同，將增加DLS檢測結果之差異性。

除了粒子形狀可能影響DLS檢測結果之外，由於各家廠牌所製造之咀嚼錠所用賦形劑不盡相同，是否有賦形劑成分在水中產生乳化作用，而影響DLS檢測結果，也是值得探討的課題⁽⁵⁾。DLS法所量測之粒徑分布數據，也容易受儀器及實驗操作程序等因素之影響，因此，必須再併用其他奈米檢測法，才可得到較精確的粒徑分布資訊⁽⁶⁾。

粒子表面電位檢測結果顯示：7件檢體均為負電位，有助於防止粒子發生互相聚集的現象，增加懸浮液的穩定性。奈米口服鐵劑主成分為iron (III) hydroxide polymaltose complex，分子量約介於20,000至80,000 dalton之間，粒子核心由Iron (III) hydroxide構成，外層以碳水化合物包覆，形成穩定的構造，由於外層碳水化合物分子中部分羧基(carboxyl group)解離，使粒子表面帶有負電。研究顯示帶有負電外殼的奈米鐵粒子，能被細胞吸收之比例約為電中性奈米鐵粒子之40倍⁽³⁾，因此，奈米口服鐵劑之生體可用率可能高於傳統口服鐵劑。

本研究檢驗市售奈米口服鐵劑，初步結果顯示所取得檢體雖有粒子形狀上的差異性，但都符合國際間對於奈米粒徑之一般定義。此外，本研究亦發現對於同一種檢體，若使用不同儀器檢測粒徑，可能出現不同結果。由於奈米粒徑之檢測方法除了DLS法之外，尚包括了電子顯微鏡法、X光繞射法及拉曼法等，每一種方法皆各有其優越之處，也有其侷限性⁽⁶⁾。奈米科技為新興發展的技術，奈米檢測也需要累積眾人的學識與經驗，才能發展到成熟的階段。因此，同一樣品可嘗試用不同的檢測方法，比較不同方法間所得結果差異性，以更多不同的奈米檢測技術進行檢驗，發揮不同檢測法間互補的效用，是值得繼續努力的研究方向。由於藥品賦形劑的存在可能影響平均粒徑的檢測，對於其他物化特性的檢測也可能有程

度不等的干擾。有些不適合用在製劑的檢測項目，若改為直接檢測主成分原料，或許可得到較接近真實狀況的結果。

奈米科技為近代的新興科技，應用奈米科技之藥品製劑已有長足之進步，因此藥政管理也需要重視奈米科技藥品管理的相關議題。關於奈米科技藥品粒徑等檢驗規範，目前國際上尚未有一致之要求，亦未見於藥典各品項之規格中，故先就已有奈米化之產品建立粒徑等檢驗技術，待日後奈米產品納入粒徑等規範時，可據以檢驗並確認品質狀況。

結論

本研究涵蓋ISO/TR 13014：2012技術報告列舉的八大物化特性中粒徑、形狀、組成成分及表面電荷4項奈米檢測參數。綜觀其檢測結果，以DLS法檢測結果雖能測得所有粒子的平均粒徑，其結果數據卻易於受到各種因素干擾；另一方面，TEM法所觀測到粒子，較為接近實況，惟只能侷限於特定視野，無法窺其全貌。因此，若須判定藥品是否具有奈米性，須同時進行DLS法及TEM法，才可獲得較正確的結論。此外，八大物化特性中另有聚集度、表面積、表面化學及溶解度/分散性4項奈米參數尚未執行檢測，將做為爾後研究的目標。

參考文獻

1. Amstad, E., Textora, M. and Reimhult, E. 2011. Stabilization and functionalization of

- iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale* 3(7): 2819-2843.
2. Yasa, B., Agaoglu, L. and Unuvar, E. 2011. Efficacy, tolerability and acceptability of iron hydroxide polymaltose complex versus ferrous sulfate: a randomized trial in pediatric patients with iron deficiency anemia. *Int. J. Pediatr. 2011*: 524520.
3. Jahn, M. R., Nawroth, T., Fütterer, S. and et. al. 2012. Iron oxide/hydroxide nanoparticles with negatively charged shells show increased uptake in Caco-2 cells. *Mol. Pharm.* 9: 1628-1637.
4. Pusey, P. N. and Tough, R. J. A. 1982. Dynamic light scattering, a probe of brownian particle dynamics. *Adv. Coll. Int. Sci.* 16: 143-159
5. Bumajdad, A., Ali, S. and Mathew, A. 2011. Characterization of iron hydroxide/oxide nanoparticles prepared in microemulsions stabilized with cationic/non-ionic surfactant mixtures. *J. Coll. Int. Sci.* 355: 282-292.
6. Kato, H., Nakamura, A., Takahashi, K. and et. al. 2012. Accurate size and size-distribution determination of polystyrene latex nanoparticles in aqueous medium using dynamic light scattering and asymmetrical flow field flow fractionation with multi-angle light scattering. *Nanomaterials* 2: 15-30.

Investigating the Quality of Marketed Nano Drugs and Analytical Techniques in Research

MENG-CHI FAN, POR-YUH WANG, YU-PEN CHEN, HSIU-KUAN CHOU,
YANG-CHIH SHIH AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

In order to investigate the analytical techniques of nano drugs, relevant scientific data were collected based upon testing marketed oral nano-iron supplements. The current routes for marketed oral nano-iron supplements are oral drops and chewable tablets with iron hydroxide polymaltose complex as an active pharmaceutical ingredient. A total of 7 samples of marketed products were collected to test for nano characteristics. The test items included particle size, shape, composition and surface charge, which were based on the ISO/TR 13014:2012 technical report. Each average particle size of the tested samples, which were determined by dynamic light scattering, were 12.1, 424.6, 84.4, 75.4, 66.9, 60.4 and 78.2 nm. Through the transmission electron microscope, the particle shapes were observed to be round or elongated rod-like. From the surface charge analysis, all of the 7 samples were found to be between -15.8 mV and -31.0 mV. Moreover, energy dispersive spectroscopy indicated iron composition in the samples. Currently, there are no international guidelines for nano drug analysis. Similarly, the pharmacopoeias do not mention regulations for tested items related to nano drug characteristics. This study was intended to establish the analytical techniques of nano drugs. We believe that in the near future, the laboratory would be able to verify and monitor the quality of nano drugs.

Key words: nano drug, iron supplement, dynamic light scattering, transmission electron microscopy