

灯盏花氯化钠注射液生物安全性检查标准研究

王文佳, 陈志明, 肖婧薇, 潘卫松, 何华红, 李薇

(广州市药品检验所, 广州 510160)

摘要 **目的:**建立灯盏花氯化钠注射液生物安全性检查标准。**方法:**按照《中国药典》2015年版四部有关附录的要求对灯盏花氯化钠注射液的细菌内毒素、热原、溶血与凝聚、异常毒性、过敏反应和降压物质等试验进行研究。**结果:**建立灯盏花氯化钠注射液细菌内毒素、热原、溶血与凝聚、异常毒性、过敏反应和降压物质等试验方法。**结论:**本研究为灯盏花氯化钠注射液质量标准的完善和提高提供了实验依据。

关键词:灯盏花氯化钠注射液;安全性检查;细菌内毒素

中图分类号:R 921.2 文献标识码:A 文章编号:1009-3656(2019)-2-0000-0

doi:10.19778/j.chp.2019.03.00?

Establishment of biosafety tests methods for breviscapine and sodium chloride injection

WANG Wenjia, CHEN Zhiming, XIAO Jingwei, PAN Weisong, HE Huahong, LI Wei

(Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China)

Abstract Objective: To establish the biosafety tests methods for breviscapine and sodium chloride injection.

Methods: According to the relevant appendices in Chinese Pharmacopoeia 2015 Vol. IV, the tests for bacterial endotoxins, pyrogens, hemolysis and coagulation, undue toxicity, allergen, and depressor substances for breviscapine and sodium chloride injection were studied. **Results:** The test methods for bacterial endotoxins, pyrogens, hemolysis and coagulation, undue toxicity, allergen, depressor substances for breviscapine and sodium chloride injection were established. **Conclusion:** The established test methods can be referred to improve the specification of breviscapine and sodium chloride injection.

Key words: breviscapine and sodium chloride injection, biosafety tests, bacterial endotoxins

灯盏花是菊科植物短葶飞蓬的干燥全草。可用于治疗心脑血管的损伤。灯盏花乙素对血管生成和肿瘤细胞及其内皮细胞的有一定的作用,对氧化应激诱导的细胞凋亡都有显著的影响^[1]。广泛应用于脑卒中及其后遗症冠心病、心绞痛等治疗^[2]。药品不良反应累及呼吸系统、心血管系统、神经系统、消化系统、皮肤及变态反应、全身性损害等^[3]。目前国内灯盏花氯化钠注射液仅一个生

产厂家生产,现行标准为国家食品药品监督管理局国家药品标准 WS-10001-(HD-1498)-2004,该标准仅收录了热原这项安全性检查项目。考虑中药提取的注射液的成分复杂性,和细菌内毒素检查替代热原的可行性,本实验在现行标准的基础上,按照中华人民共和国药典(以下简称《中国药典》)2015年版二部有关附录的要求对灯盏花氯化钠注射液的热原、细菌内毒素、溶血与凝聚、异

第一作者简介:王文佳,副主任药师;研究方向:药理学、安全性检测。Tel:020-81744947;13826112387;E-mail:46411438@qq.com

常毒性、降压物质、过敏反应等试验进行研究并修订。

1 仪器与材料

1.1 试剂

灯盏花氯化钠注射液(通化天实制药有限公司,规格:250 mL 灯盏花乙素 20 mg 与氯化钠 2.25 g,批号:171001、171005、171101);氯化钠注射液(江西科伦药业有限公司);细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院,规格:80 EU/支,批号:150601-201784);细菌内毒素检查用水(BET水)(湛江安度斯生物有限公司,规格:100 mL/支,批号:1606290);鲎试剂(TAL)(规格:0.1 mL/支,灵敏度:0.25 EU·mL⁻¹,(湛江安度斯生物有限公司)批号:1712113,(福州新北生化工业有限公司)批号:18010812)。

1.2 动物

新西兰兔(2.5~3.3 kg,普通级),白化豚鼠(250~350 g 普通级),动物和饲料来源:广州花都信华实验动物养殖场,实验动物生产许可证编号:SCXK(粤)2014-0023;NIH小鼠(18~22 g,SPF级),动物和饲料来源:广东省医学实验动物中心,实验动物生产许可证编号:SCXK(粤)2013-0002。动物饲养环境:温度20~25℃,湿度40~70%;健康体质量3.6 kg的猫,♂。

1.3 仪器

ZRY-2D智能热原仪(天津市天大天发科技有限公司);2-16KL低温高速离心机(SIGMA);TW12六孔水浴(Julabo);MS 3 basic旋涡振荡器(IKA)。

2 方法与结果^[4]

2.1 热原

2.1.1 剂量设定 根据《中国药典》2015年版四部附录9301注射剂安全性检查法应用指导原则规定,一般为每人用每千克体重每小时最大供试品剂量的2~5倍,供试品注射体积每千克体重一般为0.5~10 mL,本品用千克体重每小时最大供试品剂量为3 mL·kg⁻¹,以最大注射体积10 mL·kg⁻¹原液给药,即为每人用每千克体重每小时最大供试品剂量的3倍。拟定的限值与现行标准吻合。

2.1.2 热原试验 取家兔9只,按《中国药典》2015年版四部1142热原检查法进行挑选。检查时每组3只,取灯盏花氯化钠注射液3批,以10 mL·kg⁻¹原液耳静脉注射给药。

2.1.3 结果 3组动物对家兔无明显刺激性,热原检查符合规定。

表1 热原试验结果

Tab.1 The results of pyrogens test

批号 (lot No.)	体重 (weight)/ kg	最高升温 (maximum temperature rise)/°C	总升温总和 (sum of temperature rise)
171001	3.2,2.6,3.3	0.2,0.1,0	0.3
171005	2.9,3.3,3.1	0,0,0	0
171101	2.8,2.5,2.7	0,0.1,0.2	0.3

2.2 细菌内毒素

2.2.1 剂量设定 《中国药典》2015年四部通则1143规定, $L = K \cdot M^{-1}$ 。注射剂 $K = 5 \text{ EU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,本品本品用千克体重每小时最大供试品剂量 $M = 3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,考虑老人用药和大输液等,限值至计算值的1/3,故 $L = 5/3 \times 1/3 = 0.56 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.2 鲎试剂灵敏度复核 按照《中国药典》2015年四部通则1143“细菌内毒素检查法”对鲎试剂灵敏度(λ)进行复核,结果均符合标准要求。

2.2.3 干扰预试验 目前市售的鲎试剂灵敏度一般在0.5~0.03 EU·mL⁻¹,最大有效稀释倍数 $MVD = cL/\lambda$,因此对应的MVD为原液、2、4、8、16倍。将本品用BET水按1:1稀释到以上4个浓度,将此系列标记为供试品管(NPC系列)。用上述稀释液作为溶剂,溶解并稀释细菌内毒素工作标准品,制得每个稀释度中细菌内毒素含量均为 2λ (0.5 EU·mL⁻¹),标记此系列溶液为供试品阳性对照管(PPC系列)。取灵敏度为0.25 EU·mL⁻¹的鲎试剂进行试验,每一稀释度做2管,同时按常规分别设细菌内毒素阳性对照(PC)和检查用水阴性对照(NC)各2管,结果见表2。由以上结果可以初步了解:两个厂家的鲎试剂对灯盏花氯化钠注射液的细菌内毒素的试验结果均在2倍及以下浓度时无干扰。

2.2.4 正式干扰试验 将3批供试品原液分别稀释2倍,用BET水和供试品稀释液将细菌内毒素工作标准品稀释成 2λ 、 1λ 、 0.5λ 、 0.25λ 浓度的BET水系列细菌内毒素溶液和供试品稀释液系列细菌内毒素溶液,取灵敏度为0.25 EU·mL⁻¹的鲎试剂进行试验,结果见表3。根据《中国药典》2015年版四部通则1143“细菌内毒素检查法”中“干扰试验”表1

的规定,C 系列(鲎试剂标示灵敏度的对照系列)平行管数为 2。结果表明,Es 和 Et 均在 0.5 ~ 2.0 范围内,确认在供试品稀释 2 倍下无干扰影响。

表 2 干扰预试验结果

Tab. 2 The results of preliminary interference test

批号(Lot No.)		项目 (item)	样品稀释倍数(Dilution ratio of sample)					PC	NC
TAL	供试品(sample)		1	2	4	8	16		
1712113	171001	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	++	++	++	++	++		
	171005	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	+-	++	++	++	++		
	171101	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	+-	++	++	++	++	++	--
18010812	171001	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	++	++	++	++	++		
	171005	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	+-	++	++	++	++		
	171101	NPC	--	--	--	--	--		
		PPC	+-	++	++	++	++		

表 3 正式干扰试验结果

Tab. 3 The results of interference test

批号(Lot No.)		内毒素浓度(concentration of endotoxin)/EU · mL ⁻¹				NC	Es or Et
TAL	供试品(sample)	0.125	0.25	0.125	0.06		
1712113	BET 水	++	++	--	--	--	Es = 0.25
	171001	++++	+-	----	----	--	Et = 0.42
	171005	++++	+-	----	----	--	Et = 0.35
	171101	++++	+-	----	----	--	Et = 0.30
18010812	BET 水	++	+-	--	--	--	Es = 0.35
	171001	++++	----	----	----	--	Et = 0.5
	171005	++++	----	----	----	--	Et = 0.5
	171101	++++	----	----	----	--	Et = 0.5

2.2.5 细菌内毒素检查 根据《中国药典》2015 年版四部通则 1143,用 0.25 EU · mL⁻¹灵敏度的鲎试剂对 3 批供试品进行细菌内毒素检查,结果均符合规定。

2.2.6 设定限值 拟定标准为“取本品,依法检查(通则 1143),每 1 mL 中含细菌内毒素的量应小于 0.56 EU。”

2.3 溶血与凝聚检查

2.3.1 方法 取家兔耳动脉血,按《中国药典》2015 年版四部通则 1148“溶血与凝聚检查法”制备红细胞悬液,供试品取原液检查,同时设置阴性和阳性对照组。结果表明,阴性对照组和阳性对照组符合标准要求,供试品组在 3h 内均未发生溶血与凝聚,符合规定。

2.3.2 设定限值 根据《中国药典》2015 年版四部附录 9301 注射剂安全性检查法应用指导原则规定,如注射剂原液无溶血和凝聚反应则以原液浓度为限值。^[4]因此,拟定标准为“取本品,依法检查(通则 1148),应符合规定。”

2.4 异常毒性

2.4.1 方法 取 NIH 小鼠 15 只,分为 3 组,取供试品原液,经小鼠尾静脉注入 0.5 mL/只,观察时间为 72 h。结果全部小鼠反应情况均正常,观察时间后均存活。

2.4.2 设定限值 由于给予供试品原液以《中国药典》2015 年版四部通则 1141“异常毒性检查法”规定的 0.5 mL 给药均无死亡,因此拟定标准为“取本品,依法检查(通则 1141),应符合规定。”

2.5 过敏反应

2.5.1 预实验 取白化豚鼠 18 只,分别每只静脉注射 1 mL 或腹腔注射 0.5 mL 供试品原液,结果动物反应均正常,无死亡。

2.5.2 正式试验 取白化豚鼠 18 只,♀ ♂ 各半,按体重均匀分成 3 组,每组 6 只。隔日每只每次腹腔注射 0.5 mL 供试品原液,共 3 次致敏并观察动物的行为和体征。将其均分为 2 组,每组 3 只,分别在首次注射后第 14 日和第 21 日,由静脉注射各组供试品原液 1 mL 进行激发。观察激发后 30 min 内动物过敏反应症状。结果在 30 min 内,动物未见过敏反应,无死亡,均符合规定。

2.5.3 设定限值 本实验以豚鼠给药的最大量进行试验,均未见过敏反应。因此,拟定标准为“取本品,依法检查(通则 1147),应符合规定。”

2.6 降压物质

2.6.1 方法 取健康合格、3.6 kg 的猫一只,♂,按照《中国药典》2015 年版四部通则 1145“降压物质检查法”进行对猫手术并进行动物灵敏度试验。经试验,猫灵敏度符合要求。取 3 批样品,均给予供试品原液 d_T ,按 1 mL · kg⁻¹ 体重给药。结果供试品所致的反应值均不大于对照品组 d_s 所致反应值的一半,3 批供试品均符合规定。

2.6.2 设定限值 结果表明,供试品原液静脉注射 1 mL · kg⁻¹ 剂量,3 批供试品 d_T 血压下降值约在 8 ~ 13 mmHg, d_s (对照品注射组胺 0.1 μg · kg⁻¹) 所致的反应值约在 32 ~ 40 mmHg, d_T 反应值均不大于 d_s 反应值的一半,无明显降压反应,该剂量可作为给药限值。因此,拟定标准为“取本品,依法检查(通则 1145),应符合规定。”

3 结论

本实验对灯盏花氯化钠注射液进行了热原、细菌内毒素、溶血与凝聚、异常毒性和过敏反应试验。本品的执行标准国家食品药品监督管理局国家药品标准 WS-10001-(HD-1498)-2004 仅收录了热原。本研究载现行标准的基础上,对各项安全性试验作出探索性研究。

灯盏花氯化钠注射液为灯盏花素(以灯盏花乙素计)与氯化钠的灭菌水溶液。灯盏花乙素是从灯

盏花中提取的主要成分。中药注射液如果提取不纯,往往含有其他致敏物质。^[3] 因此,对本品需进行安全性检查的研究。本品为大输液制剂,因此剂量设计均取最大量。本品热原、溶血与凝聚、异常毒性、过敏反应,原液给药均符合规定,表明原液给药可行。细菌内毒素法供试品溶液稀释至 2 倍及更低浓度时,用灵敏度为 0.25 EU · mL⁻¹ 的鲎试剂进行实验,干扰消失。家兔热原检查法与细菌内毒素检查法相吻合,鉴于中药成分的多样性和复杂性,建议采用家兔法进行热原物质的检测,而细菌内毒素检查可以在生产环节等需要内控的检查项时使用。异常毒性本研究以 0.5 mL 原液静脉给药,相当于 2 mg · kg⁻¹,因无一例小鼠异常反应和死亡,无法测出 LD₅₀,改为最大耐受量试验。参考文献,灯盏花素葡萄糖注射液静脉给药 LD₅₀ 为 267.57 mg · kg⁻¹^[5],限值远小于 LD₅₀,故以 0.5 mL 原液静脉给药作为限值。

参考文献

- [1] 石美娜,杨为民,刘璇. 灯盏花乙素药理作用研究进展[J]. 昆明医科大学学报,2013,34(9):151
SHI MN, YANG WM, LIU X. Research progress of scutellarin pharmacological study[J]. J Kunming Med Univ, 2013, 34(9): 151
- [2] 黄文华,闫树英,高永英,等. 灯盏花素注射液应用的合理性与安全性评价[J]. 宁夏医学杂志,2011,33(8):781
HUANG WH, YAN SY, GAO YY. Rational of application and safety test method of breviscapine injection[J]. Ningxia Med J, 2011, 33(8):781
- [3] 劳荣巨,陈惠莉. 36 例灯盏花素注射液不良反应分析[J]. 中国当代医药,2014,21(33):138
LAO RJ, CHEN HL. Analysis on 36 cases of adverse drug reactions induced by breviscapine injection[J]. China Mod Med, 2014, 21(33):138
- [4] 中国药典 2015 年版. 四部[S]. 2015:(通则 1143);153,159,400
ChP 2015. Vol IV[S]. 2015:(General Requirements 1143);153, 159,400
- [5] 李劼,徐诗强,胡霞敏,等. 灯盏花素葡萄糖注射液安全性评价[J]. 数理医药学杂志,2011,24(2):166
LI J, XU SQ, HU XM, et al. Study on the safety evaluation of scutellarin glucose injection[J]. J Mathemat Med, 2011, 24(2): 166

(收稿日期:2018-09-05)