

细辛脑注射制剂异常毒性检查标准研究

邓 莎,张德波,罗 洁,郑娇娇,郑 萍,蒲旭峰

(成都市食品药品检验研究院,成都 610045)

【摘要】 目的 测定细辛脑注射制剂静脉给药的小鼠 LD_{50} 值,同时起草本品异常毒性检查标准。**方法** 采用加权回归机率单位法(Bliss 法)对小鼠静脉给药测定 LD_{50} 值,同时按照《中国药典》2010 年版要求确定异常毒性检查限值,起草异常毒性标准。**结果** 测定细辛脑注射制剂的小鼠 LD_{50} 为 51.9 – 153.1 mg/kg,为标准中拟增加异常毒性检查项,异常毒性检查项的限值建议定为 15 mg/kg,按此限值检查结果符合规定。**结论** 细辛脑注射制剂毒性较大,各企业生产工艺不同毒性也差异较大,为减少本品临床使用不良反应的发生,应在其质量标准中增加异常毒性检查项。

【关键词】 细辛脑;异常毒性; LD_{50} ;限值;标准

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0035-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 – 7856. 2016. 03. 008

Study on abnormal toxicity test standard of asarone injection preparation

DENG Sha,ZHANG De-bo,LUO Jie,ZHENG Jiao-jiao,ZHENG Ping,PU Xu-feng
(ChengDu Institutes for Food and Drug Control,ChengDu 610045,China)

【Abstract】 Objective To measure the lethal dosage values (LD_{50}) of i. v. asarone injection for mice and to establish a standard for abnormal toxicity test of asarone injection to potentially reduce the occurrence of adverse drug reaction. **Methods** To obtain the LD_{50} value, a weighted linear probit regression method (Bliss method) is employed. The limit of abnormal toxicity test is determined according to Appendix XI C in its 2010 edition of the Chinese pharmacopoeia. **Results** It is found that the LD_{50} of intravenously asarone injection in mice ranges from 51.9 to 153.1 mg/kg. The abnormal toxicity test should be added as an additional item in the standard. **Conclusions** Based on analyses in this study, an appropriate limit of abnormal toxicity test is 15 mg/kg, which is also in line with current medical standard in China.

【Key words】 Asarone; Abnormal toxicity; LD_{50} ; Limit value; Standard

细辛脑主要存在于天南星科植物石菖蒲(*acorus graninues soland*)等植物的挥发油中。我国从七十年代开展对石菖蒲的药理、毒理作用以及有效成分的提取、合成等方面的研究取得了重大的进展,进入 80 年代后,我国人工合成 α -细辛脑成功,陆续制成片剂、胶囊剂和注射剂投放市场。细辛脑有很强的药理活性,具有抗菌消炎、止咳、祛痰、平

喘、镇静、解痉、抗惊厥、抗癫痫等药理作用。近年来,不乏发生细辛脑注射剂的不良反应/事件,其不良反应/事件主要为全身性损害、皮肤及其附件损害、胃肠系统损害等^[1-3]。细辛脑注射剂质量标准繁多,且质量标准要求较低,国内外药典尚未收载该品种。现行标准中安全性检查项个别标准只收载了热原或细菌内毒素检查项,按照化学药品注射

剂安全性检查法应用指导原则的建议,考虑到其在生产过程中引入或其它原因所致的毒性,故拟增加异常毒性检查项,开展了本品 LD_{50} 测定,并根据测定值确定了异常毒性检查限值,建立了异常毒性检查标准。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药品 共 15 批细辛脑注射制剂,包括注射用细辛脑 6 批(企业 1,批号 1403063、1303211;企业 2,批号 1308271;企业 3,批号 20140304、20140505;企业 4,批号 1312231;企业 5,131108A1、140403E1;企业 6,12140306、12140307);细辛脑注射液 9 批(企业 1,批号 1402053、1402273;企业 2,批号 1312175、1311265;企业 7,批号 140507、130601;企业 8,批号 131015、131024;企业 9,批号 130902、131202;企业 10,批号 1311090、1311060;企业 11,批号 131002、131005;企业 12,批号 140317、140319;企业 13,批号 140401、140507)。

1.1.2 仪器 电子秤 PB1501-S 分辨值 0.1 g (Mettler Toledo Group);高压灭菌器 HV-110 (HIRAYAMA);十段编程鼓风干燥箱 ZRD-A7140 (上海智城分析仪器制造有限公司)。用具:鼠盒、试管架、秒表、天平、75%酒精棉球、镊子、鼠固定器、烧杯、注射针头、注射器。

1.1.3 试剂 5% 葡萄糖注射液,规格:250 mL;批号:A14050206-1,有效期至 2017 年 4 月,四川科伦药业股份有限公司。10% 葡萄糖注射液,规格:500 mL,批号:14032567,有效期至 2016 年 3 月 24 日,四川美大康佳乐药业有限公司。灭菌注射用水,规格:500 mL,批号:130726103,有效期至 2015 年 7 月 26 日,四川美大康佳乐药业有限公司。

1.1.4 动物 昆明种小鼠清洁级 825 只,4 周龄,体重 17~21 g,雌雄各半,雌性无孕,由成都生物制品研究所有限责任公司提供【SCXK(川)2011-008】;小鼠雌雄分开饲养,每笼 5 只。实验动物在成都市食品药品监督管理局实验动物室进行实验以及观察和饲养【SYXK(川)2014-097】。该项实验通过成都市食品药品监督管理局实验动物伦理委员会批准,审查编号为:2014-003;并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。饲料,全价颗粒饲料,四川省实验动物专委会养殖场提供,其质量符合 GB14924.1-2001《实验动物配合饲料通

用质量标准》。

1.2 方法

1.2.1 急性毒性测定(LD_{50} 测定)

采用加权回归机率单位法(Bliss 法)^[4],对每一企业不同制剂,用 5% 或 10% 葡萄糖注射液溶解并配制成一系列不同浓度供试液进行预试,找出动物全死与全不死剂量,通过预试结果设计正式试验的剂量。取禁食不禁水 8 h 的健康活泼、体重为 19~21 g 小鼠静脉注射给药,随机分为 5 组,每组 10 只,雌雄各半,每只小鼠静脉注射 0.8 mL,立即观察记录,共观察 7 d。

1.2.2 异常毒性标准起草^[7]

1.2.2.1 剂量设定

《中国药典》2010 年版二部附录 XI X M“化学药品注射剂安全性检查法应用指导原则”异常毒性检查项下对限值设定的规定^[5],同时考虑标准的普遍适用性,取本品 6 个较小 LD_{50} 值(51.86-72.40 mg/kg)的平均值的可信限下限的 1/4 作为设定异常毒性限值的参考值。该值为 14.67 mg/kg,取整数为 15 mg/kg。异常毒性检查时供试液配制成 0.6 mg/mL,每只小鼠静脉注射 0.5 mL。

1.2.2.2 供试液的溶血与凝聚考查^[8]

取家兔心脏血,脱纤,离心洗涤至上清液不显红色,取分离红细胞用氯化钠注射液配成 2% 的混悬液备用。取各企业的细辛脑注射制剂,加 5% 或 10% 葡萄糖注射液溶解并配制成 0.6 mg/mL 的溶液,按照我国现行标准规定的方法进行溶血与凝聚常规检验,依法操作(表 1)。

1.2.2.3 标准起草

异常毒性 取本品,用 5% 或 10% 葡萄糖注射液制成每 1 mL 含细辛脑 0.6 mg 的溶液,依法检查(中国药典 2010 年版二部附录 XI C)^[4-6],按静脉注射法给药,应符合规定。

1.2.2.4 样品异常毒性常规检查

取每一企业样品 1 批(共 15 批),分别用 5% 葡萄糖注射液制成每 1 mL 含细辛脑 0.6 mg 的溶液作为供试液。

取禁食不禁水 8 h,体重为 17~20 g 的健康活泼小鼠,静脉注射给药,注射剂量为每只小鼠注射 0.5 mL,注射速度为 5 s,每一批样品共注射 5 只。注射毕立即观察,记录动物出现的毒性反应,共观察 48 h。

表1 细辛脑注射制剂溶血与凝聚检验加样方法

Tab.1 Asarone injection preparation hemolysis and coagulation test methods

试管编号 No.	1	2	3	4	5	6
供试液	0.3	0.3	0.3	0.3	/	/
Test solution(mL)						
0.9%氯化钠注射液	2.2	2.2	2.2	4.7	2.5	/
0.9% NaCl injection(mL)						
2%兔红细胞混悬液	2.5	2.5	2.5	/	2.5	2.5
2% Rabbit red blood cell suspension liquid(mL)						
纯化水	/	/	/	/	/	2.5
Purified water(mL)						

表2 细辛脑注射制剂急性毒性(LD₅₀)测定结果

Tab.2 Acute toxicity (LD₅₀) results of asarone injection preparation

序号 No	生产企业 Company	样品名称 Sample name	批号 Batch	样品规格 Size	测定的LD ₅₀ (mg/kg) LD ₅₀
1	企业2 Co.2	细辛脑注射液 Asarone injection	1312175	2ml:8mg	51.86
2	企业9 Co.9		130902	2ml:8mg	57.30
3	企业10 Co.10		1311090	2ml:8mg	60.34
4	企业8 Co.8		131015	2ml:8mg	71.80
5	企业13 Co.13		140401	2ml:8mg	72.40
6	企业7 Co.7		140507	2ml:8mg	106.58
7	企业1 Co.1		1402053	2ml:8mg	113.55
8	企业12 Co.12	注射用细辛脑 Asarone for Injection	140319	2ml:8mg	123.25
9	企业11 Co.11		131002	2ml:8mg	123.15
10	企业5 Co.5		131108A1	8mg	56.98
11	企业2 Co.2		1308271	16mg	126.12
12	企业4 Co.4		1312231	8mg	148.29
13	企业3 Co.3		20140304	16mg	148.64
14	企业1 Co.1		1403063	16mg	153.06
15	企业6 Co.6		12140306	8mg	153.10

1.3 统计分析

采用加权回归机率单位法(Bliss法)对小鼠静脉给药测定LD₅₀值^[4]。

2 结果

2.1 急性毒性测定(LD₅₀测定)

表2显示,每一企业的细辛脑注射制剂均测出了LD₅₀。其结果:细辛脑注射液LD₅₀为51.9~123.2 mg/kg;注射用细辛脑LD₅₀为57.0~153.1 mg/kg。

2.2 异常毒性标准起草

2.2.1 供试液的溶血与凝聚考查

试验结果,阴性和阳性对照管均成立,供试品管上层液与供试液颜色对照管(第4管)的溶液颜色接近,所有供试液均未引起溶血与凝聚作用。即本品异常毒性检查的0.6 mg/mL供试液不会引起溶血与凝聚作用。

2.2.2 样品异常毒性常规检查

表3显示,15批细辛脑注射制剂静脉注射后,动物均无明显异常反应,也未见死亡,观察48 h动

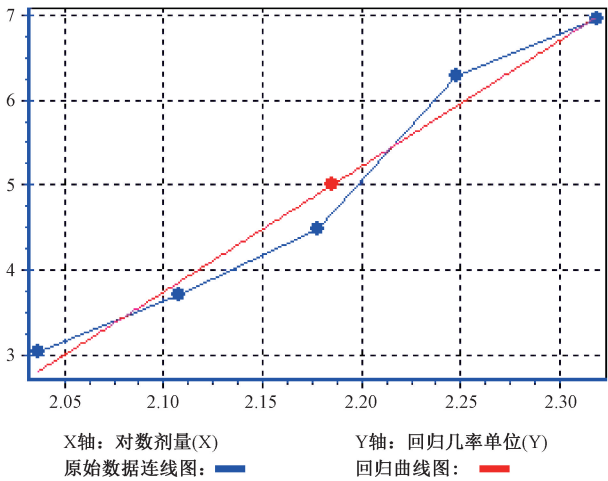


图1 注射用细辛脑LD₅₀测定计算图
(企业1,16 mg,1403063)

Fig.1 The determination of asarone for injection LD₅₀ calculation chart (Co. 1,16mg,1403063)

物均存活,健康活泼。实验认为,各企业生产的细辛脑注射制剂异常毒性检查能够满足本研究起草的标准要求。

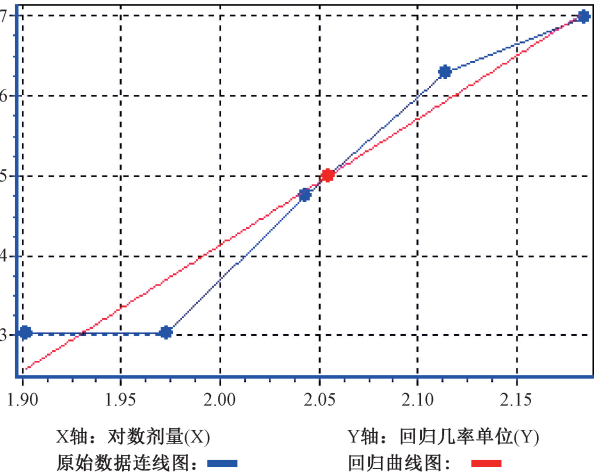


图 2 细辛脑注射液 LD₅₀测定计算图
(企业 1,2 mL;8 mg,1402053)

Fig. 2 The determination of asarone injection LD₅₀ calculation chart (Co. 1,2 mL;8 mg,1402053)

3 讨论

本研究是 2014 年我院承担的 2014 年国家药品计划抽检“细辛脑注射制剂”研究,共抽取了国内 13 家企业的细辛脑注射液和注射用细辛脑 126 批样品。本研究主要是考查细辛脑注射剂毒性情况,同时建立异常毒性检查标准。

本品临床使用说明书中标注测定 LD₅₀小鼠口服为 680.5 ± 41.4 mg/kg、腹腔注射为 388.7 ± 28.5 mg/kg。此二种测定方法与本品临床静脉给药方法不一致,其结果不能代表本品的真实毒性。本研究采用静脉给药法测定 LD₅₀为 51.9 ~ 153.1 mg/kg,与说明书中的值差别较大。《中国药典》2010 年版二部附录 XI X M“化学药品注射剂安全性检查法应用指导原则”关于异常毒性检查的剂量设定,建议限值至少应小于 LD₁ 可信限下限的 1/3 (建议采用 1/3 - 1/6);如难以计算最低致死量,可采用小于

表 3 异常毒性检验记录表
Tab. 3 Abnormal toxicity test record

序号 No.	生产 企业 Co.	样品 Sample	批号 Batch.	样品 规格 size	注射后动物出现的反应观察 The reaction of animals appear after injection						
					眼球突出 Protopsis	呼吸急 促或困难 Breath difficulty	行动失调 Action disorders	昏倒 Faint	麻痹 Paralysis	痉挛 Spasm	惊厥 Convuls- ions
1	企业 2 Co. 2	细辛 脑注 射液 Asarone injection	1311265	2ml;8mg	-	-	-	-	-	-	-
2	企业 9 Co. 9		131202	2ml;8mg	-	-	-	-	-	-	-
3	企业 10 Co. 10		1311060	2ml;8mg	-	-	-	-	-	-	-
4	企业 8 Co. 8		131024	2ml;8mg	-	-	-	-	-	-	-
5	企业 13 Co. 13		140507	2ml;8mg	-	-	-	-	-	-	-
6	企业 7 Co. 7		130601	2ml;8mg	-	-	-	-	-	-	-
7	企业 1 Co. 1		1402273	2ml;8mg	-	-	-	-	-	-	-
8	企业 12 Co. 12		140317	2ml;8mg	-	-	-	-	-	-	-
9	企业 11 Co. 11		131005	2ml;8mg	-	-	-	-	-	-	-
10	企业 5 Co. 5	注射 用细 辛脑 Asarone for Injection	140403E1	8mg	-	-	-	-	-	-	-
11	企业 2 Co. 2		1308271	16mg	-	-	-	-	-	-	-
12	企业 4 Co. 4		1312231	8mg	-	-	-	-	-	-	-
13	企业 3 Co. 3		20140505	16mg	-	-	-	-	-	-	-
14	企业 1 Co. 1		1303211	16mg	-	-	-	-	-	-	-
15	企业 6 Co. 6		12140307	8mg	-	-	-	-	-	-	-

注:(+)为正反应;(-)为无反应。
Note:(+)represents a positive reaction;(-)represents no reaction.

LD_{50} 可信限下限的 $1/4$ (建议采用 $1/4 - 1/8$) ;如半数致死量与临床体重剂量之比小于 20,可采用可信限下限的 $1/4$ 或 LD_1 可信限下限的 $1/3$ 。本研究在起草细辛脑注射制剂的异常毒性标准时,设定剂量为 6 个较低 LD_{50} 值平均值的可信限下限的 $1/4$,与其他较大 LD_{50} 值平均值的可信限下限的 $1/8$ 基本相当,符合药典以上规定要求^[5]。在对细辛脑注射制剂异常毒性标准研究中,采用小鼠为受试动物,确定了异常毒性检查限值,该限值为本品临床成人一日最大用药剂量的 30 倍。通过测定的 LD_{50} ,按照药典要求起草了异常毒性标准,使用 15 批样品进行常规检验验证,注射后动物基本上无异常反应,供试品均能符合起草的异常毒性检查标准要求。

在进行急性毒性测定时,供试液的配制均是以主药细辛脑的量来配制,稀释液采用与临床用药一致的 5% 或 10% 的葡萄糖注射液。小鼠在静脉注射供试液后,主要表现为惊厥、小便失禁、全身歪倒、呼吸急促、匍匐少动、竖毛、死亡等,毒性较大,但各企业的产品毒性又有较大区别,或同一企业的不同剂型毒性有较大差别,可能是由于制剂添加的辅料多少不同而引起。细辛脑注射制剂,各个企业的生产工艺不尽相同,添加了较多的赋形剂,主要包括吐温 80、乙醇、丙二醇、聚乙二醇 400、苯甲醇等,但不排除主药细辛脑产生了协同毒性作用^[2]。本品毒性较大,建立异常毒性检查标准,既可以通过标准来检查异常毒性物质是否超标,也可考查产品中

辅料是否过量添加,因为添加过量的辅料也可能引起毒性增加。

起草标准时,对异常毒性检查的供试液进行溶血与凝聚考查,是为了考查供试液是否会引起强烈的溶血与凝聚作用,以避免异常毒性检查时动物发生的反应是由于供试液有较强的溶血与凝聚作用引起。

本文对所有企业的名称均使用代号处理。

参考文献:

- [1] 韩颖. 52 例细辛脑注射剂不良反应分析[J]. 统计与管理, 2014, 3: 55 - 56.
- [2] 李蓓. 细辛脑注射液致不良反应 50 例分析[J]. 中国医药导刊, 2013, 15(6): 1059 - 1060.
- [3] 孙春艳, 赵亚萍, 郭江红. 细辛脑注射剂质量评价与标准现状分析[J]. 中国药品标准, 2012, 13(3): 181 - 184.
- [4] 中国药典. 二部[S]. 2010: 附录 99 - 102.
- [5] 中国药典. 二部[S]. 2010: 附录 212 - 215.
- [6] 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范(2010 年版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 310 - 325.
- [7] 张德波. 利福平注射液生物安全性检查标准研究[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(5): 515 - 518.
- [8] 张良, 蒲旭峰, 张德波. 注射用头孢地嗪钠生物安全性检查标准研究[J]. 成都医学院学报, 2014, 9(3): 281 - 285.

[修回日期]2015 - 01 - 05