

国产药用气雾剂辅料 1,1,1,2-四氟乙烷的吸入毒理安全性评价

赵燕君, 林飞, 仪忠勋, 孙会敏*, 杨会英* (国家药品监督管理局药用辅料质量研究与评价重点实验室, 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: 目的 对国产药用气雾剂辅料 1,1,1,2-四氟乙烷 (hydrofluoroalkane-134a, HFA-134a) 进行吸入毒理安全性评价。方法 对国内 2 个主要生产厂家的药用吸入气雾剂 HFA-134a 样品进行大鼠 21 d 重复吸入亚慢性毒性试验和 Hartley 豚鼠主动全身过敏试验。结果 2 个厂家的 HFA-134a 剂量分别为 $(2\ 140\pm 58)\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ 和 $(2\ 129\pm 59)\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ 时, 21 d 重复吸入 (每天 2 h), 出现统计学差异的指标有: 血液学部分指标 (中性粒细胞数、嗜碱性粒细胞、嗜碱性粒细胞比率、单核细胞比率、红细胞容积、血小板计数)、血液生化学部分指标 (白蛋白、总胆红素、氯离子、钾离子)、尿液检测部分指标 (亚硝酸盐、白细胞、尿胆原、蛋白和胆红素)、部分脏器的脏器湿重值和脏器系数值 (肾脏、胸腺、心脏、垂体、肺脏)。未见豚鼠全身致敏反应。结论 国产药用气雾剂辅料 HFA-134a 在相当于临床最大用量的 250 倍下连续染毒 21 d, 对大鼠部分脏器和血尿生化指标有一定的毒性作用, 但在临床正常应用中是否吸入安全还需进一步进行安全性评价研究。

关键词: 药用吸入气雾剂; 抛射剂; 1,1,1,2-四氟乙烷; 吸入毒理; 安全性评价

中图分类号: R99 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2024)03-0341-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223154

引用本文: 赵燕君, 林飞, 仪忠勋, 等. 国产药用气雾剂辅料 1,1,1,2-四氟乙烷的吸入毒理安全性评价[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(3): 341-346.

Evaluation of the Inhalation Safety of Domestic Pharmaceutical Metered-dose Inhalers Accessories Hydrofluoroalkane-134a

ZHAO Yanjun, LIN Fei, YI Zhongxun, SUN Huimin*, YANG Huiying* (NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Pharmaceutical Excipients, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the inhalation safety of domestic pharmaceutical metered-dose inhalers accessories hydrofluoroalkane(HFA)-134a. **METHODS** The 21 d repeat dose inhalation toxicity study and Hartley guinea pig active systemic anaphylaxis for samples from two major domestic manufacturers were tested. **RESULTS** SD rats were exposed nose-only separately to the samples from two major domestic manufacturers at the concentration of $(2\ 140\pm 58)\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ and $(2\ 129\pm 59)\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ respectively for 21 consecutive days(2 h each day), there were statistically significant differences in the following indicators: some indicators of hematology such as neutrophil count, basophil, basophil ratio, monocyte ratio, hematocrit and platelet count, some indicators of blood biochemistry such as albumin content, total bilirubin content, chloride ion and potassium ion, some indicators of urine such as nitrite, leukocytes, urobilinogen, protein and bilirubin, organ weight and coefficients of kidney, thymus, heart, pituitary and lung. No systemic sensitization reaction were observed in guinea pigs. **CONCLUSION** The domestic pharmaceutical HFA-134a have certain toxic effects on some organs, blood and urine biochemical indicators of SD rats exposed to 250 times of the clinical maximum dose for continuously 21 d, however, further research is need to access whether inhalation is safe in normal clinical dose.

KEYWORDS: pharmaceutical metered-dose inhalers; propellant; hydrofluoroalkane-134a; inhalation toxicology; safety evaluation

药用吸入气雾剂指药物及辅料与抛射剂共同封装于具有定量阀门系统和一定压力的耐压容器中, 形成溶液、混悬液或乳液, 使用时借助抛射剂的压力, 将内容物呈雾状喷出而用于呼吸道局部治疗的制剂^[1]。由于吸入气雾剂直接接触呼吸道黏膜或破损组织并迅速被毛细血管吸收, 是风险

等级“最高”的制剂剂型之一^[2]。抛射剂是气雾剂药液雾化的动力, 也是溶解或分散药物及辅料的介质^[3], 临床使用时会随药液直接吸入体内, 其质量的优劣直接影响到药品的安全性和有效性。

过去最常用的抛射剂是全氯氟烃类物质 (三氯氟甲烷、二氟二氯甲烷和二氯四氟乙烷), 但

基金项目: 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金课题 (2020C2)

作者简介: 赵燕君, 女, 硕士, 助理研究员 E-mail: zhaoyanjuan24@163.com *通信作者: 孙会敏, 男, 博士, 研究员 E-mail: sunhm@126.com 杨会英, 女, 主任技师 E-mail: yanghuiying@nicpbp.org.cn

1974 年发现这类物质会破坏臭氧层, 已在全球范围内各个领域被逐步淘汰。1,1,1,2-四氟乙烷(hydrofluoroalkane-134a, HFA-134a), 常温下是一种无色无味的气体, 由于其热力学和物理性质与传统抛射剂二氟二氯甲烷类似, 但是不含氯, 臭氧消耗潜能值为零, 因此替代全氯氟烃类物质成为目前应用最广泛的气雾剂抛射剂^[4]。

对于 HFA-134a 的毒理作用, 欧洲碳氟化合物替代毒性测试计划评估了其毒性、生态毒性、环境归宿和影响^[5], 发现 HFA-134a 对实验动物的毒性极低, 大鼠吸入 15 min 的半数致死浓度 (median lethal concentration, LC_{50}) $>3\ 340\ g\cdot m^{-3}$, 吸入 4 h 的 $LC_{50}>2\ 080\ g\cdot m^{-3}$ ^[6]。

虽然 HFA-134a 的安全性得到了国际社会的认可, 但由于其合成路线复杂, 生产过程中会产生很多杂质, 不同生产厂家因生产工艺的不同会导致产品中杂质的成分和含量不同^[7], 因此目前还未有批准使用的国产吸入气雾剂用 HFA-134a。笔者所在实验室在 HFA-134a 质量检测时也发现国内外不同厂家在酸碱度、高沸点残留物、水分、有关物质等方面差异较大, 国内部分样品的碱含量、水分、高沸点残留物较高, 有关物质尤其是未知杂质的种类多、含量高^[8]。因此为考察国产 HFA-134a 的吸入安全性, 本研究对国内主要 HFA-134a 生产厂家的样品应用动物口鼻式吸入染毒^[9]进行了主动全身过敏试验和 21 d 重复剂量吸入毒性试验。

1 材料

1.1 仪器与试剂

HRH-7981 口鼻式给药装置 (北京慧荣和科技有限公司); HP1712 吸入全身暴露装置 (北京汇普仪器设备科技有限公司); NE-C28 医用雾化器 (日本欧姆龙公司); TVA-1000B 挥发性有毒气体检测仪 (美国热电公司); BS-220 全自动生化分析仪、BC-5000VET 全自动血液分析仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); CBS-400 电解质分析仪 (烟台卓越生物技术责任有限公司); PUN-2048B 半自动凝血分析仪 (北京普朗新技术有限公司); 37XB 倒置生物显微镜 (上海光学仪器厂); $5\ L\cdot min^{-1}$ 流量计 (美国德威尔公司); IP-20T 真空泵 (日本 SIBATA 公司); L535R 低速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒 (批号:

140119001)、天冬氨酸氨基转移酶 (批号: 140219001)、碱性磷酸酶测定试剂盒 (批号: 140319011)、尿素测定试剂盒 (批号: 141319001)、肌酐测定试剂盒 (批号: 141119001)、葡萄糖测定试剂盒 (批号: 141419008)、白蛋白测定试剂盒 (批号: 14831911)、总蛋白测定试剂盒 (批号: 148619009)、总胆固醇测定试剂盒 (批号: 141619001)、甘油三酯测定试剂盒 (批号: 141719012)、总胆红素测定试剂盒 (批号: 140619011) 均购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; 凝血酶原时间测定试剂盒 (冻干型) (批号: 191005101)、活化部分凝血酶时间测定试剂盒 (鞣花酸) (批号: 190705100) 均购自上海太阳生物技术有限公司; 苏木素染色液 (批号: G1140)、伊红染液 (批号: G1100)、卵白蛋白 (批号: A67410) 均购自北京索来宝科技有限公司; 99.99% 高纯氧、人造空气均购自北京亚南伟业气体有限公司。

1.2 动物

无特定病原体级 SD 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体质量: 雄性 200~230 g, 雌性 150~180 g。普通级 Hartley 豚鼠 36 只, 雌雄各半, 体质量: 雄性 290~340 g, 雌性 280~320 g。以上动物均由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(京)2016-0002。实验动物使用许可证号: SYXK(京)2018-0009。本试验的动物使用方法经本机构动物伦理委员会批准 (编号: IACUC2019037)。

1.3 受试样品

HFA-134a (CAS 登记号: 811-97-2), 摩尔质量 $102\ g\cdot mol^{-1}$, 室温为无色气体, 加压呈液态, 沸点 $-26.2\ ^\circ C$, 分别由厂家 A 和 B 提供, 含量均 $>99.95\%$; HFA-134a 与洁净空气和氧气混合后直接进入全身暴露装置内, 对动物进行吸入给样。

2 方法

2.1 主动全身过敏试验^[10-11]

取 6~9 周龄 Hartley 豚鼠 36 只, 随机分为空白对照组、试验组 A (受试样品为 A 厂家样品, 分为低浓度 A1 和高浓度 A2)、试验组 B (受试样品为 B 厂家样品, 分为低浓度 B1 和高浓度 B2)、阳性对照组, 每组雌、雄各 3 只, 给药剂量和分组见

表 1。空白对照组吸入洁净空气；阳性对照组雾化吸入卵白蛋白，诱导浓度为每只 60 mg(10 mg·mL⁻¹)，激发浓度为每只 120 mg(20 mg·mL⁻¹)。口鼻暴露染毒每次 30 min，诱导吸入隔天 1 次共 5 次，于第 1 次染毒后的第 22 天和第 29 天进行激发吸入。2 次激发吸入后分别观察各组豚鼠 3 h，根据激发后豚鼠过敏反应出现的体征 (序号 1~4 为弱阳性；5~10 为阳性；11~19 为强阳性；20 为极强阳性)，最终评价豚鼠过敏反应程度，见表 2。

表 1 主动全身过敏试验给药剂量和分组
Tab. 1 Dosing and grouping of active systemic anaphylaxis

组别	给药浓度	
	诱导	激发
空白对照组 (洁净空气)	—	—
试验组 A	A1	2.65 g·m ⁻³
	A2	8.92 g·m ⁻³
试验组 B	B1	2.60 g·m ⁻³
	B2	9.09 g·m ⁻³
阳性对照组 (卵白蛋白)	每只 60 mg	每只 120 mg

表 2 豚鼠过敏反应观察体征
Tab. 2 Observation signs of allergic reaction in guinea pigs

编号	体征	编号	体征	编号	体征	编号	体征
1	不安宁	6	咳嗽	11	呼吸困难	16	喘息
2	竖毛	7	呼吸急促	12	哮鸣音	17	痉挛
3	颤抖	8	排尿	13	紫癜	18	旋转
4	搔鼻	9	排粪	14	步态不稳	19	潮式呼吸
5	喷嚏	10	流泪	15	跳跃	20	死亡

2.2 重复吸入亚慢性毒性试验^[11-12]

取 6~8 周龄大鼠 60 只，随机分为空白对照组、试验组 A(A 厂家样品)、试验组 B(B 厂家样品)，每组雌、雄各 10 只。空白对照组吸入洁净空气；试验组 A 吸入 A 厂家样品浓度为 2 140 g·m⁻³，试验组 B 吸入 B 厂家样品浓度为 2 129 g·m⁻³，口鼻暴露每天染毒 2 h，连续染毒 21 d。在染毒期间观察和检测大鼠的临床体征、进食量、体质量变化。染毒结束取血进行血液学：红细胞、白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、红细胞容积、血红蛋白、血小板计数及凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间等 12 项；血液生化学：丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、肌酐、尿素氮、碱性磷酸酶、血糖、总胆红素、总胆固醇、甘油三酯、总蛋白、白蛋白、钾离子、氯离子、钠离子

共 14 项；尿液：比重、酸碱度、亚硝酸盐、尿蛋白、潜血、尿胆红素、尿胆原、酮体、尿糖、白细胞共 10 项检查。解剖大鼠组织器官，采集以下组织脏器：神经系统——脑 (大脑、小脑、脑干、嗅脑)、颈髓、垂体；消化系统——舌、食管、颌下腺及颌下淋巴结、胃、十二指肠、空肠 (Peyer 氏淋巴结)、结肠、肝脏、脾脏、肠系膜淋巴结、胰腺、喉部；泌尿生殖系统——肾脏、膀胱，雌性生殖系统 (子宫、宫颈、卵巢)，雄性生殖系统 (前列腺、精囊腺、尿道、睾丸和附睾)；呼吸及心血管系统——气管、肺脏、鼻咽部组织、心脏、主动脉；其他——胸腺、肾上腺、甲状腺及甲状旁腺、眼睛、眼睑、哈氏腺、视神经、泪腺、皮肤、乳腺 (雌性)、骨髓 (胸骨)。采集的组织脏器用 4% 中性甲醛或 Davidson's 溶液 (眼球及视神经、睾丸及附睾) 进行固定。其中肺脏在称重结束后，用 4% 中性甲醛进行灌注，然后放到 4% 中性甲醛中进行固定。固定后的组织经过取材、脱水、石蜡包埋、切片 (厚约 3~4 μm)，经苏木素-伊红染色。试验组和对照组大鼠组织脏器均在光学显微镜下检查，按 5 级法对病变进行观察、判定，未见异常用 0 级表示，见表 3。

表 3 重复吸入亚慢性毒性试验病理组织学观察病变分级
Tab. 3 Histopathological grading of lesions in repeat dose inhalation subchronic toxicity study

严重程度	组织受累及的比例	分级	定量标准
临界或轻微	极少量	1	1~2 个局灶
轻度或少量	少量	2	3~6 个局灶
中度或数个	中等量	3	7~12 个局灶
明显或很多	大量	4	>12 个局灶
严重	极大量	5	弥漫

2.3 统计学分析及判定

试验动物的体质量、血液学、生化学、脏器系数等指标的统计以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 19.0 软件进行回归计算和统计分析，经 F 检验、泊松分布或双侧 t 检验判定 P 值，以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。豚鼠主动全身过敏试验根据过敏反应出现的症状和程度进行级别判定。

3 结果

3.1 主动全身过敏试验

豚鼠口鼻暴露染毒激发给药后第 22 天和第 29 天分别进行大体观察：空白对照组和 A、B 2 个受试样品组，未出现过敏反应体征；阳性对照组全部动物则出现颤抖、搔鼻、呼吸急促、呼吸

困难、步态不稳、喘息及痉挛等不同程度的阳性过敏反应，见表4。

表4 豚鼠激发给药后全身过敏反应观察
Tab. 4 Observation of systemic sensitization for guinea pig after challenge sensitization

组别	过敏反应体征*	结果判定
空白对照组	0	阴性
阳性对照组	1, 2, 4, 7, 11, 14, 16, 17 弱阳性、阳性、强阳性	
试验组A(A1, A2)	0	阴性
试验组B(B1, B2)	0	阴性

注：*数字为表2过敏反应体征。
Note: *Figures were allergic reaction signs in Tab 2.

3.2 重复吸入亚慢性毒性试验

21 d 口鼻暴露染毒期间，所有大鼠精神好、行为正常、反应敏捷、被毛润泽、棕黑色软便，未见明显中毒体征。与空白对照组比较，试验组A的雄性大鼠饲料摄入量1~2周降低，雌性大鼠第1周体重质量增长缓慢，试验组B的雄性大鼠饲料摄入量在前2周内降低，第3周恢复正常，见表5；试验组A和B雄性大鼠的红细胞容积均降低，雌性大鼠的嗜碱性粒细胞、嗜碱性粒细胞比率均升高，试验组A雄性大鼠的单核细胞比率升

高，雌性大鼠的中性粒细胞数升高，试验组B的雌性大鼠血小板计数升高，见表6；试验组A和B所有大鼠的总胆红素均升高，雄性大鼠血液中的氯离子均降低，试验组A雌性大鼠白蛋白降低，试验组B雌性大鼠的钾离子升高，见表7；尿液中试验组A和B均有部分大鼠的亚硝酸盐升高，个别大鼠尿液中出现白细胞、尿胆原、蛋白、酮体和胆红素，见表8；试验组A和B雄性大鼠的心脏、垂体、肺脏脏器湿重值和脏器系数值均降低，试验组A的雄性大鼠肾脏和胸腺的脏器湿重值和脏器系数值也出现了降低，以上差异均有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，见表9。组织病理学检查未见与样品暴露相关的病变；未见呼吸系统和其他脏器组织与试验样品暴露相关的病变。

4 讨论

HFA-134a 是国际公认的氟利昂抛射剂替代物，对其安全性已有多方面的研究。Silber 等^[13]将ChR-CD大鼠(每组10只)暴露于0或4170 g·m⁻³ HFA-134a 中14 d(6 h·d⁻¹，每周5 d)，暴露期间，动物表现出呼吸频率增大，9 d后采集的尿样分析显示暴露导致大鼠的氟化物排泄显著增加，但未

表5 21 d 重复吸入对大鼠体重质量增长及摄食量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别		染毒各周大鼠体重质量				染毒各周大鼠摄食量		
性别		第0周	第1周	第2周	第3周	0~1周	1~2周	2~3周
空白对照组	♂	212±10	275±15	310±22	337±27	376±17	382±14	317±18
	♀	176±6	196±7	213±9	221±11	246±11	248±11	238±10
试验组A	♂	229±14	268±14	300±14	318±14	351±15	325±32 ¹⁾	296±16
	♀	186±10	209±13 ¹⁾	222±11	227±13	238±9	249±38	220±11
试验组B	♂	232±21	272±27	297±30	319±35	330±17 ¹⁾	307±29 ¹⁾	309±24
	♀	181±10	206±11	218±15	228±16	243±28	228±10	233±18

注：与同一周次空白对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ；摄食量以整笼动物的摄食量计算。
Note: Compared with the blank control group in the same week, ¹⁾ $P<0.05$; food consumption change was calculated as the changes of the whole cage rats.

表6 21 d 重复吸入对大鼠血液学部分指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	性别	中性粒细胞数/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	嗜碱性粒细胞/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	嗜碱性粒细 胞比率/%	单核细胞比率/%	红细胞容积/%	血小板计数/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$
空白对照组	♂	1.98±0.33	0.07±0.03	0.51±0.20	5.31±1.79	50.00±1.71	1182.00±151.12
	♀	1.32±0.48	0.03±0.01	0.31±0.12	5.88±1.83	44.15±2.19	1094.20±62.30
试验组A	♂	1.70±0.38	0.05±0.02	0.48±0.14	7.22±1.94 ¹⁾	45.96±1.20 ¹⁾	1074.30±150.61
	♀	1.92±1.18 ¹⁾	0.05±0.02 ¹⁾	0.53±0.16 ¹⁾	6.06±1.56	42.71±3.09	1240.10±182.34
试验组B	♂	1.66±0.69	0.05±0.02	0.46±0.15	6.14±0.93	48.17±1.44 ¹⁾	1157.9±150.77
	♀	1.45±0.62	0.05±0.02 ¹⁾	0.52±0.13 ¹⁾	5.97±1.80	42.88±1.73	1292.60±254.51 ¹⁾

注：与同一周次空白对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with the blank control group in the same week, ¹⁾ $P<0.05$.

表 7 21 d 重复吸入对大鼠血液生化部分指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 7 Effect of 21 d repeated inhalation on some biochemical indicators of blood in rats($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	性别	白蛋白/g·L ⁻¹	总胆红素/ μ mol·L ⁻¹	尿素氮/mmol·L ⁻¹	球蛋白/g·L ⁻¹	钾离子/mmol·L ⁻¹	氯离子/mmol·L ⁻¹
空白对照组	♂	35.5±1.2	0.50±0.21	5.17±0.65	31.2±2.9	6.19±0.60	95.1±1.9
	♀	37.2±1.3	0.60±0.26	6.87±1.41	31.5±1.6	5.71±0.41	96.4±1.9
试验组A	♂	35.9±1.0	0.93±0.22 ¹⁾	5.64±0.57	33.2±1.9	6.34±0.43	93.5±1.1 ¹⁾
	♀	35.0±1.4 ¹⁾	0.78±0.18 ¹⁾	5.66±0.96	32.5±1.1	6.18±0.66	95.0±1.4
试验组B	♂	36.0±1.7	0.94±0.19 ¹⁾	5.76±0.61	33.5±3.2	6.64±0.42	93.4±1.0 ¹⁾
	♀	36.3±1.8	0.92±0.31 ¹⁾	6.21±0.69	33.0±2.6	6.46±0.48 ¹⁾	95.1±1.6

注：与同一周次空白对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group in the same week, ¹⁾ $P<0.05$.

表 8 21 d 重复吸入对大鼠尿液部分指标的影响

Tab. 8 Effect of 21 d repeated inhalation on some urine indicators in rats

组别	性别	亚硝酸盐(阳性数/ 总动物数)	pH	白细胞(阳性数/ 总动物数)	尿胆原(阳性数/ 总动物数)	蛋白(阳性数/ 总动物数)	酮体(阳性数/ 总动物数)	胆红素(阳性数/ 总动物数)
空白对照组	♂($n=10$)	0/10	7.6±0.6	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	♀($n=9$)	0/9	8.6±0.2	0/9	0/9	1/9	0/9	0/9
试验组A	♂($n=10$)	7/10	8.2±0.8	2/10	1/10	2/10	2/10	2/10
	♀($n=10$)	8/10	7.4±1.3	1/10	0/10	0/10	0/10	1/10
试验组B	♂($n=10$)	8/10	8.4±0.5	1/10	1/10	3/10	0/10	0/10
	♀($n=10$)	4/10	7.1±0.8	2/10	0/10	1/10	0/10	1/10

表 9 21 d 重复吸入对大鼠脏器部分指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 9 Effects of 21 d repeated inhalation on some organ indicators in rats($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

项目	组别	性别	肾脏	胸腺	心脏	垂体	肺脏
脏器湿重值/g	空白对照组	♂	2.62±0.37	0.64±0.15	1.36±0.14	0.014±0.005	3.42±1.20
		♀	1.64±0.13	0.34±0.08	0.88±0.05	0.013±0.002	1.76±0.32
	试验组A	♂	2.30±0.17 ¹⁾	0.50±0.12 ¹⁾	1.17±0.11 ¹⁾	0.009±0.002 ²⁾	2.12±0.31 ²⁾
		♀	1.69±0.15	0.38±0.09	0.93±0.08	0.013±0.003	1.73±0.31
	试验组B	♂	2.57±0.46	0.53±0.13	1.18±0.14 ¹⁾	0.010±0.002 ¹⁾	2.27±0.34 ²⁾
		♀	1.79±0.19 ¹⁾	0.41±0.08 ¹⁾	0.90±0.04	0.013±0.002	1.59±0.25
脏器系数值/%	空白对照组	♂	0.84±0.07	0.20±0.03	0.44±0.04	0.004 4±0.001 6	1.09±0.36
		♀	0.80±0.05	0.17±0.04	0.43±0.03	0.006 4±0.001 1	0.86±0.12
	试验组A	♂	0.77±0.06 ¹⁾	0.17±0.04 ¹⁾	0.39±0.03 ¹⁾	0.003 0±0.000 7 ¹⁾	0.71±0.11 ²⁾
		♀	0.81±0.08	0.18±0.03	0.44±0.03	0.006 3±0.001 3	0.82±0.13
	试验组B	♂	0.86±0.08	0.18±0.04	0.40±0.01 ¹⁾	0.003 4±0.000 5 ¹⁾	0.77±0.12 ¹⁾
		♀	0.85±0.14	0.19±0.03	0.43±0.04	0.006 3±0.000 9	0.75±0.09

注：与空白对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the blank control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

观察到与化合物相关的病理变化。Riley 等^[13]将 Wistar-derived 大鼠 (每组 32 只, 雌雄各半) 暴露至 0, 4.17, 41.7, 208 g·m⁻³ HFA-134a 中持续 4 周 (6 h·d⁻¹, 每周 5 d), 获得了在暴露过程中 HFA-134a 被吸收到血液中的证据, 发现暴露在 208 g·m⁻³ 下的大鼠肝脏和肾脏质量增加、性腺质量减少。Hext 等^[13]将 SD 大鼠 (每组 40 只, 雌雄各半) 暴露浓度在 0, 8.34, 41.7, 208 g·m⁻³ HFA-134a 中持续 13 周 (6 h·d⁻¹, 每周 5 d), 没有发现与暴露相关的宏观或微观病理学改变。关于国产

HFA-134a 的安全性, 也有学者进行了研究, 张伟等^[14]将昆明小鼠 (每组 12 只) 暴露至 0, 100, 500, 1 000, 5 000 mg·m⁻³ 国产 HFA-134a 中连续 4 h, 观察 7 d 后未发现明显的急性毒副反应, 未发现体质量、行为、肝、肾、胰腺等脏器异常改变。竺乃恺等^[15]研究了国产 HFA-134a 的急性、亚急性和亚慢性毒性, 结果发现 Wistar 雄性大白鼠在多次吸入 50% HFA-134a (每天 4 h, 连续 8 周) 后未见器质性改变, 未见动物死亡, 染毒组动物的一般状态、体质量、生化指标和病理组织学检查均

未发现阳性改变。

为进一步考察国产 HFA-134a 的吸入毒理安全性,本研究在前人研究基础上用国内主要 HFA-134a 生产厂家的样品进行了主动全身过敏试验和 21 d 重复剂量吸入毒性试验。2 个厂家的产品对豚鼠全身过敏反应均为阴性。鉴于前人研究中大鼠吸入 4 h 的 $LC_{50} > 2\ 080\text{ g}\cdot\text{m}^{-3}[6]$, 因此本研究大鼠连续吸入染毒 21 d 亚慢性毒性试验中,直接将染毒剂量设置为约 $2\ 000\text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$, 结果发现 2 个厂家样品浓度分别在 $(2\ 140\pm 58)\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ 和 $(2\ 129\pm 59)\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ (体积浓度均为 80%) 时出现统计学差异并不在本实验室正常值范围的指标如下: A 厂家样品中,出现摄食量减少,体质量增长缓慢,血液红细胞容积降低,中性粒细胞数、嗜碱性粒细胞、嗜碱性粒细胞比率、单核细胞比率升高,生化总胆红素升高,白蛋白、氯离子降低,尿液亚硝酸盐升高,个别大鼠尿液中出现白细胞、尿胆原、蛋白、酮体和胆红素,肾脏、胸腺、心脏、垂体、肺脏脏器官湿重值和脏器系数降低; B 厂家样品中,出现摄食量减少,血液红细胞容积降低,嗜碱性粒细胞、嗜碱性粒细胞比率、血小板计数升高,生化总胆红素升高,氯离子降低,钾离子升高,尿液亚硝酸盐升高,个别大鼠尿液中出现白细胞、尿胆原、蛋白和胆红素;心脏、垂体、肺脏脏器官湿重值和脏器系数降低。其他升高或降低的各指标平均值在各组性别之间出现差异,并无相同项目指标的辅证,认为无毒理学意义。提示 2 个厂家的受试样品 HFA-134a 在高浓度、连续染毒后,对大鼠脏器官(肾脏、胸腺、心脏、垂体、肺脏)以及血液、尿液检测指标中均存在一定的不良反应,但组织病理学检查未见与样品暴露相关的病变,也未见呼吸系统和其他脏器组织与样品暴露相关的病变。

根据大鼠吸入 HFA-134a 的浓度换算大鼠吸入剂量 $[(\text{HFA-134a 浓度}\times\text{大鼠的呼吸频率}\times\text{大鼠的潮气量}\times\text{每天吸入时长})/\text{大鼠体质量}]$,可换算出试验中大鼠吸入 2 家 HFA-134 产品的剂量均约为 $75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,按人用剂量=大鼠剂量/6.3 计算,试验中 HFA-134a 的人用剂量约为 $12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,HFA-134a 的成人每日临床最大使用量为 $0.048\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}[16]$,试验用量是临床最大用量的 250 倍,因此出现上述部分指标的统计学差异可能是剂量较高的原因,如评估在临床正常应用中的吸入安全,还需进一步进行较低剂量的安全性评价研究工作。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 四部[S]. 2020: 12-16.
- [2] USP. 41th Edition[S]. 2018: 7927.
- [3] 国家药品监督管理局. 关于印发已上市吸入气雾剂变更抛射剂研究技术要求的通知(国食药监注[2011]185 号)[EB/OL]. (2011-04-22) [2020-09-01]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20110422120001845.html>.
- [4] HOU S G, WEI N N, JIN F. Transition of propellants in metered dose inhalers (MDIs) II. technical challenge and industrial manufacture of alternative propellant MDIs[J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2009, 40(8): 622-627.
- [5] ALEXANDER D J, LIBRETTO S E, ADAMS M J, et al. HFA-134a (1, 1, 1, 2-tetrafluoroethane): Effects of inhalation exposure upon reproductive performance, development and maturation of rats[J]. Hum Exp Toxicol, 1996, 15(6): 508-517.
- [6] COLLINS M A. ICI Chemicals & Polymers: Klea 134a: Acute inhalation data. Personal communication[M]. UK Cheshire: Runcorn, 1990.
- [7] ZHANG D N, MAO L G. Synthesis technologies for tetrafluoroethane(HFC-134a)[J]. Shandong Chem Ind(山东化工), 2016, 45(5): 40-41,44.
- [8] ZHAO Y J, XU X X, YI Z X, et al. Comparative research on quality of pharmaceutical 1, 1, 1, 2-tetrafluoroethane from different manufacturers[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2020, 40(9): 1659-1667.
- [9] FENG H M, HU Y, SHENG Y H, et al. Application progress of *in vitro* cell exposure test in inhalation toxicology[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(5): 617-624.
- [10] 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[EB/OL]. (2014-05-13)[2020-08-17]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=11ed1282dd1b35641943de34907b317c>.
- [11] 环境保护部化学品登记中心,《化学品测试方法》编委会. 化学品测试方法(健康效应卷)[M]. 2 版. 北京: 中国环境出版社, 2013.
- [12] 国家药品监督管理局药品审评中心. 药物重复给药毒性研究技术指导原则[EB/OL]. (2014-05-13) [2020-08-17]. <https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=eb1121e208d156f8fb0384d1e77edb8f>.
- [13] European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. Joint Assessment of Commodity Chemicals (JACC) Reports. No. 50: 1, 1, 1, 2-Tetrafluoroethane (HFC-134a)(CAS No. 811-97-2)[M]. Second Edition. Brussels: ECETOC AISBL, 2006.
- [14] ZHANG W, BAI H, LIU R, et al. Acute toxicity studies on medical propellant HFC-134a[J]. Carcinog Teratogenesis Mutagen(癌变·畸变·突变), 2013, 25(1): 64-66.
- [15] 竺乃恺, 杜秀英, 夏晔娟. 氯氟烃替代物—四氟乙烷的毒性研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1994, 12(6): 359.
- [16] ALEXANDER D J, LIBRETTO S E, CHEVALIER H J, et al. HFA-134a (1, 1, 1, 2-tetrafluoroethane); lack of oncogenicity in rodents after inhalation[J]. Hum Exp Toxicol, 1995, 14(9): 706-714.

收稿日期: 2023-03-03

(本文责编: 李艳芳)