

榄香烯注射液生物安全性检查标准研究

王文佳, 吴婷, 何华红, 李薇(广州市药品检验所, 广州 510160)

摘要: 目的 建立榄香烯注射液生物安全性检查标准。方法 按中国药典 2010 年版一部、二部有关附录、《药物研究技术指导原则》(2005 年)及《药理学实验方法学》第一版的要求对榄香烯注射液的热原、溶血与凝聚、异常毒性、降压物质、过敏反应、血管刺激性、腹腔黏膜刺激性试验进行研究。结果 建立了热原、溶血与凝聚、异常毒性、过敏反应、血管刺激性、腹腔黏膜刺激性试验, 不能建立细菌内毒素和降压物质检查试验。结论 本研究为榄香烯注射液质量标准的完善和提高提供了实验依据。

关键词: 榄香烯注射液; 安全性检查

中图分类号: R297.11

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)11-1380-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.11.021

Establishment of A Safety Test Method of Elemene Injection

WANG Wenjia, WU Ting, HE Huahong, LI Wei(*Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish standards for safety tests of elemene injection. **METHODS** Study on pyrogen, bacterial endotoxins, haemolysis and blood cell agglutination, undue toxicity, depressor substance, systemic anaphylaxis, vascular stimulation and writhing tests by Ch.P(2010) Vol I, II, the guiding principles of drug and experimental methods in pharmacology. **RESULTS** Established the standard of pyrogen, haemolysis and blood cell agglutination, undue toxicity, systemic anaphylaxis, vascular stimulation and writhing tests. While bacterial endotoxins and depressor substance test standard not be established. **CONCLUSION** Provided experimental method for elemene injection.

KEY WORDS: elemene injection; detection of safety

榄香烯是从中药温莪术中提取的非细胞毒性广谱抗肿瘤新药^[1], 主要成份为 β -榄香烯。许多基础和临床研究证实 β -榄香烯具有广谱抗肿瘤作用, 广泛应用于肺癌、胃癌、大肠癌等恶性肿瘤的治疗。榄香烯的制剂为榄香烯注射液, 不良反应虽然轻微, 但临床上也有静脉炎、发热、疼痛、药液外渗(漏)致局部组织炎症或坏死等不良反应的报道^[2]。本实验在榄香烯注射液现行国家药品监督管理局标准 YBH03322011 的基础上, 按中国药典 2010 年版附录的要求, 对其安全性检查标准如热原、细菌内毒素、溶血与凝聚、异常毒性、降压物质和过敏反应等进行修订。

1 仪器与材料

1.1 动物

新西兰兔(2.0~3.0 kg, 普通级), 白化豚鼠(250~350 g 普通级 σ^7), 动物和饲料来自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)2009-0023; NIH 小鼠(17~20 g, SPF 级 σ^7), 动物和饲料来自广东省医学实验动物中心,

实验动物生产许可证编号: SCXK(粤)2008-0002; 健康体质量 3.5 kg 的猫, σ^7 。动物饲养环境: 温度: 20~25 $^{\circ}\text{C}$, 湿度: 40%~70%。

1.2 试药

榄香烯注射液(某公司, 批号: 11100202, 11100302, 12010102, 规格 10 mL : 0.2 g); 细菌内毒素工作标准品(中国食品药品检定研究院, 批号: 150601-201377, 规格: 70 EU $\cdot$ 支⁻¹); 氯化钠注射液(安徽双鹤药业有限责任公司)。

1.3 仪器

ZRY-2D 智能热原仪(天津市天大天发科技有限公司); WTB-BINDER 电热干燥箱(德国 Binder 公司); TW12 恒温水浴箱(Julabo Labortechnik GmbH); MS-1 型漩涡振荡器(德国 IKA)。

2 方法和结果

2.1 热原物质检查^[3]

2.1.1 剂量设定 根据化学药注射剂安全性检查法应用指导原则中规定, 按临床剂量计算, 一般为人用千克体质量每小时最大供试品剂量的 2~5

倍。本品用千克体质量每小时最大供试品剂量为 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ，2~5 倍量即为 $20\sim50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。榄香烯注射液用 10%葡萄糖注射液稀释样品至 5 和 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.1.2 热原测定 取新西兰兔 33 只，按中国药典 2010 年版二部附录 XI M 的热原检查法进行挑选并分成 9 组，每组 3 只。取榄香烯注射液 3 批，按 $83\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 原液缓慢给药(即 $83\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)和按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ， $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度(即 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)， $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ， $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度缓慢给药(即 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)。另外 2 组为阳性对照组(1 EU·mL⁻¹ 细菌内毒素标准溶液)和阴性对照组(10%葡萄糖注射液)， $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药。

2.1.3 结果 供试品动物均出现较强刺激性反应， $83\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 原液给药组鼻部出血，吐血反应，给药后 1~2 h 内全部死亡； $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 和 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 给药组刺激反应约 3~5 min 后症状消失，未引起动物死亡；阳性对照组升温总和为 $1.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，不符合规定，结果见表 1。

表 1 榄香烯注射液热原试验结果

Tab. 1 The results of pyrogen test of elemene injection

组别	批号	供试品浓度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	给药剂量/ $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$	死亡 数/只	结果
1		原液	4	3	-
2	11100202	5	10	0	符合规定
3		2	10	0	符合规定
4		原液	4	3	-
5	11100302	5	10	0	符合规定
6		2	10	0	符合规定
7		原液	4	3	-
8	12010102	5	10	0	符合规定
9		2	10	0	符合规定
阴性对照组		-	10	0	符合规定
阳性对照组		-	10	0	不符合规定

2.1.4 热原物质检查质量标准草案 精密量取本品 1 mL，加 10%葡萄糖注射液稀释至 10 mL，依法检查(中国药典 2010 年版二部附录 XI D)，剂量按新西兰兔体质量每 1 kg 注射 10 mL，应符合规定。

2.2 溶血与凝聚^[3-4]

2.2.1 方法 取新西兰兔耳缘静脉血，按中国药典 2010 年版二部附录 XI L 的溶血与凝聚检查法进行 2%红细胞混悬液的制备和加样，加样顺序见表 2。供试品溶液按原液给药，并于 $(37\pm0.5)^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中进行温育。3 h 后观察溶血和凝聚反应。

表 2 溶血与凝聚试验加样顺序

Tab. 2 The sample order of haemolysis and blood cell agglutination

试验组别	试管编号			
	1,2	3	4	5
2%红细胞悬液/mL	2.5	2.5	2.5	/
0.9%氯化钠溶液/mL	2.2	2.5	/	4.7
蒸馏水/mL	/	/	2.5	/
供试品溶液/mL	0.3	/	/	0.3

2.2.2 结果 各批供试品管及阴性对照管红细胞全部下沉，上清液与供试品对照管无明显差异，无溶血发生，未见棕红色和红棕色絮状沉淀，无细胞凝聚；阳性对照管中溶液呈明红色，管底无细胞残留，有溶血发生。判定供试品符合规定。根据中国药典 2010 年版一部附录 X VIII B 中药注射剂安全性检查法应用指导原则，设定限值以无溶血和/或凝聚的最大浓度的 1/2 作为限值浓度，一般应高于临床最大使用浓度。该供试品原液无溶血和凝聚反应。

2.2.3 溶血与凝聚质量标准草案 取本品依法检查(中国药典 2010 年版二部附录 XI L)，应符合规定。

2.3 异常毒性检查^[3,5]

2.3.1 预试验 榄香烯注射液(批号：11100202)，用 10%葡萄糖注射液稀释至 16，12，10，8，6，5，4， $3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。取小鼠 28 只，分成 9 组，每组小鼠数量及性别见下表。分别取 9 种浓度供试品溶液，经小鼠静脉注入体内 0.5 mL，观察小鼠死亡情况见表 3。

表 3 预试验动物存活结果

Tab. 3 The survival results of the prepare experiment

组别	供试品浓度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	动物 性别	动物 数量/只	死亡 情况/只
1	原液	♂	3	3
2	16	♂	2	2
3	12	♂	2	2
4	10	♂	2	2
		♀	1	1
5	8	♂	1	1
		♀	1	1
6	6	♂	2	2
		♀	2	2
7	5	♂	2	1
		♀	2	2
8	4	♂	2	0
		♀	2	2
9	3	♂	2	2
		♀	2	2

2.3.2 正式试验 取小鼠 100 只，按体质量均匀分成 5 组。用 10%葡萄糖注射液稀释样品至 6，5，1，

4.3, 3.7, 3.1 mg·mL⁻¹ 5 组, 每组 20 只, ♀♂各半, 每组尾经脉注射 0.5 mL, 观察动物摄食、行为、排泄物、分泌物、中毒、死亡情况 7 d。

2.3.3 结果 各组小鼠死亡多发生在给药后 5~10 min 内, 小鼠死亡率呈剂量依赖性增高, 具体表现为抽搐, 异常步态, 呼吸急促, 心动过速。各组存活小鼠亦见类似症状, 但反应情况较轻。榄香烯注射液对小鼠死亡率影响见表 4。

表 4 正式试验动物存活结果
Tab. 4 The survival results of official test

组别	供试品浓度/ mg·mL ⁻¹	注射剂量/ mg·kg ⁻¹	死亡数/只	
			♀	♂
1	6	150	8	9
2	5.1	127.5	9	5
3	4.3	108.38	7	3
4	3.6	92.125	1	0
5	3.1	78.3	0	0

本品对 NIH 小鼠以静脉注射给药, 结果 LD₅₀ 为 116.53 mg·kg⁻¹, 其 95% 可信限为 109.68~124.36 mg·kg⁻¹。根据中国药典 2010 年版二部附录 XI X M 异常毒性可知, 榄香烯注射液 LD₅₀ 与临床体质量剂量之比 < 20, 因此采用限值定为 LD₅₀ 下限的 1/4 即 31 mg·kg⁻¹ 为异常毒性检查限值。取本品 3 批(批号: 11100202, 11100302, 12010102)按 31 mg·kg⁻¹ 静脉给药, 结果均符合规定。

2.3.4 异常毒性检查质量标准草案 取本品, 用 10% 葡萄糖注射液稀释制成每 1 mL 中含 1.25 mg 的溶液, 依法检查(附录 XI C), 应符合规定。

2.4 降压物质检查^[3]

2.4.1 剂量的设计 以临床单次用药剂量的 1/5~5 倍作为降压反应物质检查剂量限值。1/5~5 倍量为 3.3~83.5 mg·kg⁻¹。

2.4.2 预试验 取本品 3 批原液(规格: 10 mL : 0.2 g)分别按 1, 0.5 及 0.25 mL·kg⁻¹ 3 个剂量对试验猫静脉给药。

2.4.3 结果 1, 0.5 及 0.25 mL·kg⁻¹ 3 个剂量均引起动物强烈的降压反应, 15 及 0.25 mL·kg⁻¹ 剂量降压反应程度均超过标准中剂量, 0.25 mL·kg⁻¹ 剂量降压反应程度与 S(标准中剂量)相当。 β -榄香烯对血管具有一定的刺激性, 可引起血管扩张^[6]。综上试验结果, 其降压作用可能为榄香烯注射液本身的药理活性所致, 其不宜进行降压物质检查。

2.5 过敏反应检查^[3-4]

2.5.1 供试品溶液的配制 取榄香烯注射液 3 批

(批号: 11100202, 11100302, 12010102), 分别使用 5% 葡萄糖注射液配制成原液(20 mg·mL⁻¹)、5 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液。

2.5.2 预实验 取白化豚鼠 9 只, 分别每只腹腔注射榄香烯注射液原液, 结果动物均出现明显的刺激反应和死亡。考虑本品不良反应较大, 故以 5 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液作为正式试验的剂量。

2.5.3 正式试验 取白化豚鼠 30 只, ♀♂各半, 按体质量均匀分成 5 组, 每组 6 只。设鸡蛋血清为阳性对照组, 氯化钠注射液为阴性对照组, 5 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液为样品试验组。隔日每只每次腹腔注射各组溶液 0.5 mL, 共 3 次, 进行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, 由静脉注射各组溶液 1 mL 进行激发。观察激发后 30 min 内动物有无过敏反应症状。

各组动物体质量在首次注射后第 14 日和第 21 日均有明显增加, 体质量均在 350~450 g 之间。供试品组和阴性对照组未见过敏反应, 阳性对照组全部动物注射后抽搐 1 min 后死亡。3 批供试品均符合规定。按照中国药典 2010 年版一部附录 X VIII B 中药注射剂安全性检查法应用指导原则规定, 致敏和激发剂量应小于该途径的急性毒性反应剂量。

2.5.4 过敏反应检查质量标准草案 取本品, 用氯化钠注射液稀释制成每 1 mL 中含 5 mg 的溶液, 依法检查(附录 XI K), 应符合规定。

3 讨论

本实验对榄香烯注射液进行了热原、细菌内毒素、溶血与凝聚、异常毒性、降压物质、过敏反应、血管刺激性、腹腔黏膜刺激性试验限值及检查方法的标准研究。本品的现行标准国家药品监督管理局标准 YBH03322011 仅收录了热原法, 没有收录其他检验项目。本研究在该标准的基础上, 对各项安全性试验作出探索性研究。

本品现行标准对热原物质的检查采用新西兰兔法: “精密量取本品 1 mL, 加 10% 葡萄糖注射液稀释至 10 mL, 依法检查(中国药典 2010 年版二部附录 XI D), 剂量按家兔体质量每 1 kg 注射 10 mL, 应符合规定。” 本研究对样品进行了家兔法和细菌内毒素检查法的研究, 考虑本品不良反应较大, 家兔法给药后有较强刺激性, 20 mg·kg⁻¹·h⁻¹ 是人用千克体质量每小时最大供试品剂量的 2 倍, 符合化学药注射剂安全性检查法应用指导原则规

定,也符合原国家标准限值,故保留期限值;细菌内毒素检查法通过预实验结果得知,榄香烯注射液对厦门市鲎试剂实验厂有限公司的鲎试剂的干扰反应较大,对湛江安度斯生物有限公司和福州新北生化工业有限公司的鲎试剂无干扰浓度均为 $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。进行正式试验发现,样品稀释至2.5, 1.25, 0.312 5, $0.16\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 均对湛江安度斯生物有限公司鲎试剂存在干扰现象。因此不宜进行细菌内毒素检查,仍推荐使用热原检查法。

本品溶血与凝聚试验,原液给药未见溶血和凝聚反应,该浓度高于临床使用剂量,表明该浓度可行。

本品现行标准“国家食品药品监督管理局标准 YBH03322011”检查项下没有收载异常毒性,本研究增加了该检查项。结果 LD_{50} 为 $116.53\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,与临床剂量比 <20 ,采用 LD_{50} 下限的 $1/4(31\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1})$ 为异常毒性检查限值。该仅为临床最大用药量的1.8倍,由于药物不良反应较大,安全范围较窄。考虑本品为抗肿瘤药物,本身存在一定的不良反应,临床使用时应严格控制用药剂量。

本研究发现本品1, 0.5及 $0.25\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3个剂量均引起动物强烈的降压反应,无法建立降压物质检查标准。可能是该药对静脉内壁刺激作用有

关,不一定是由降压物质导致,提示临床应用时应注意滴注速度。

本品过敏反应检查,通过预实验发现给药后动物产生较强刺激反应,高浓度引起动物死亡,现使用 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液,动物出现刺激性反应后症状消失,未发现动物死亡,致敏和激发剂量小于该途径的急性毒性反应剂量。因此使用该剂量起草标准。

REFERENCES

- [1] TAN G X H, N S K, XIE T. Status and progress of basic researches of elemene injection for anti-tumor [J]. Chin Clin Oncol(临床肿瘤学杂志), 2010, 15(3): 266-273.
- [2] WU Z B, MA S L. Progress of study on anti-tumor effect of elemene [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2011, 29(10): 2255-2257.
- [3] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 85-88, 93-214.
- [4] National Food and Drug Administration. The Guiding Principles of Drug(药物研究技术指导原则) [M]. Beijing: Chinese Medicine and Technology Press, 2005: 221.
- [5] ZHAN G J T. Modern Experimental Methods in Pharmacology(现代药理实验方法) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College Press, 1998: 1818-1820.
- [6] WAN G W J. Newly reported adverse drug reactions induced by elemene injection [J]. J Pract Oncol(实用肿瘤杂志), 2013, 28(4): 388-390.

收稿日期: 2014-01-02

ICP-MS 测定斑蝥中砷、铅、镉、汞含量不确定度的研究

袁利杰, 郑子栋, 宋汉敏, 郭毅(河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

摘要:目的 建立 ICP-MS 测定斑蝥中砷、铅、镉、汞含量不确定度的方法。方法 采用 ICP-MS 测定斑蝥中砷、铅、镉、汞含量,依据 JF1059-1999 确定不确定度的各个分量并合成测量不确定度。结果 斑蝥中砷、铅、镉、汞的含量分别为 (0.51 ± 0.03) , (0.24 ± 0.02) , (0.029 ± 0.002) , $(0.046\pm 0.005)\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。样品的消化、仪器的状态、曲线的拟合是斑蝥中常见有害元素含量分析的测量不确定度的主要因素。结论 选择合适的消解方法,确定仪器的状态,保证溶液的基体匹配是保证测量结果准确性的关键步骤。

关键词:斑蝥;重金属;电感耦合等离子体质谱;不确定度

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)11-1383-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.11.022

Evaluation of Uncertainty for Determination of As, Pb, Cd, Hg in Mylabris by ICP-MS

YUAN Lijie, ZHENG Zhidong, SONG Hanmin, GUO Yi(Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

作者简介: 袁利杰,女,硕士,主管药师

Tel: 18625569057

E-mail: yuanlij@126.com