

# 复方麝香注射液的非临床安全性检查

武少馨\*, 师新颖, 李晓利(河北省食品药品检验院, 石家庄 050011)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)13-1788-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.13.18

**摘要** 目的:检查复方麝香注射液的非临床安全性。方法:对D厂复方麝香注射液(批号:091022)进行急性毒性实验;对A、B、C、D厂2种不同规格17批次复方麝香注射液进行异常毒性检查(生理盐水稀释1倍);对A、B、C、D厂2种不同规格7批次复方麝香注射液进行过敏反应检查;对A、B、C、D厂2种不同规格17批次复方麝香注射液进行溶血试验(生理盐水稀释5倍,为临床体积分数的2倍)。结果:D厂复方麝香注射液(批号:091022)的小鼠最大耐受量为35 ml/kg(为人临床用量的100倍);异常毒性实验中未见小鼠异常现象;过敏实验显示豚鼠体内会出现类似过敏症状;溶血试验显示4个厂2种不同规格17批次复方麝香注射液的溶血性差异较明显,但均未出现溶血与凝聚现象。结论:复方麝香注射液对实验动物的安全范围较窄,建议临床使用中对患者密切观察,超剂量使用应谨慎。

**关键词** 复方麝香注射液;最大耐受量;异常毒性;溶血性

## Non-clinical Safety Test of Compound Shexiang Injection

WU Shao-xin, SHI Xin-ying, LI Xiao-li (Hebei Institute for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To test the non-clinical safety of Compound shexiang injection. METHODS: The acute toxicity test was conducted for the Compound shexiang injection (batch: No. 091022) from factory D. The abnormal toxicity test (normal sodium to make its volume 1 time as much as the original) were conducted for 17 batches and allergic reaction test for 7 batches of Compound shexiang injection with 2 kinds of specifications from factory A, B, C and D. For 17 batches of injection as mentioned, the hemolysis test (normal sodium to make its volume 5 times as much as the original, it was 2 times of clinical volume fraction) was conducted. RESULTS: For the Compound shexiang injection (batch: No. 091022) from factory D, the maximum tolerance dose in mice was 35 ml/kg (it was 100 times of clinical dosage). The abnormal toxicity test in mice showed no abnormal condition; the allergic reaction test in guinea pigs showed the symptom was similar to allergy; the hemolysis test showed an obvious difference in hemolytic activity among the above-mentioned 17 batches of Compound musk injection, but no hemolysis or coagulation. CONCLUSIONS: Compound shexiang injection has a small safety range for experimental animals. It is suggested that patients' conditions should be closely observed during clinical use of the injection, and a cautious attitude toward the overdose should be held.

**KEYWORDS** Compound shexiang injection; Maximum tolerance dose; Abnormal toxicity; Hemolytic activity

复方麝香注射液具有豁痰开窍、醒脑安神的功效,临床上主要用于治疗痰热内闭所致的中风昏迷。其主要成分为石菖蒲、麝香、冰片、郁金、广藿香、薄荷脑,辅料为聚山梨脂80。近年来,中药注射液的安全性问题非常突出,因此笔者对该注射剂4个厂家共17批供试品的非临床安全性进行了检查,旨在更好地控制该品种安全性,为临床用药安全提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

UV-2450型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);LDZ5-2型自动平衡离心机(北京医用离心机厂);GHA000B型隔水式培养箱(天津泰斯特仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

复方麝香注射液[A厂,批号:100103(规格:10 ml/支)、100104(规格:2 ml/支)、100107(规格:2 ml/支);B厂,批号:20091031(规格:10 ml/支)、20091035(规格:2 ml/支);C厂,批号:1003274(规格:10 ml/支)、0909193(规格:10 ml/支)、

\* 主管药师。研究方向:药品检验、药理、毒理。电话:0311-85212004-8047。E-mail:wooshaoxin@126.com

1003254(规格:10 ml/支)、0912242(规格:2 ml/支)、0912261(规格:2 ml/支)、1003121(规格:2 ml/支);D厂,批号:091022(规格:10 ml/支)、100119(规格:10 ml/支)、100124(规格:10 ml/支)、100102(规格:2 ml/支)、091016(规格:2 ml/支)、100111(规格:2 ml/支)];0.9%氯化钠注射液(生理盐水,石家庄四药有限公司,批号:09083002,规格:500 ml/瓶)。

### 1.3 动物

清洁级KM小鼠,♀♂兼用,体质量17~22 g;豚鼠,♀♂兼半,体质量250~350 g;新西兰家兔,♀♂兼用,体质量2~2.5 kg,均由河北省实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(冀)2008-1-003]。

## 2 方法与结果

### 2.1 最大耐受量测定和异常毒性检查

#### 2.1.1 最大耐受量测定

选择D厂(批号:091022)复方麝香注射液进行急性毒性实验。根据预实验结果,选定35 ml/kg作为最大耐受量进行实验。KM小鼠20只,♀♂兼半,iv给药,给药速度为0.1 ml/s。部分小鼠有毒性反应,表现为快速跑动、痉挛、侧翻、呼吸急促

等中枢神经、呼吸中枢及神经肌肉等器官系统毒性反应。观察3 d,小鼠体质量增加、饮食、活动、毛色、排泄等均无异常。

### 2.1.2 异常毒性检查

采用最大耐受量的1/3剂量作为异常毒性检查限值<sup>[1]</sup>。取4个厂家2个不同规格共17批次复方麝香注射液,分别用生理盐水稀释1倍,尾iv给药(0.5 ml)。结果全部小鼠在给药后无异常现象,48 h内无死亡。

### 2.2 过敏反应检查

54只豚鼠随机均分为阴性对照(生理盐水0.5 ml)组、阳性对照(10%新鲜鸡蛋清0.5 ml)组和7个复方麝香注射液(0.5 ml)组共9组。参考小鼠急性毒性实验结果,ip给药,隔日1次,共3次。每组再随机均分为2小组,分别在首次注射后第14天和第21天iv给予1 ml相应药物进行激发<sup>[1]</sup>,观察激发后30 min内豚鼠的过敏反应症状并进行评价<sup>[2]</sup>。竖毛及搔鼻属于弱阳性过敏反应,后肢无力不在过敏性反应评价范围内。过敏反应症状评价标准见表1;全身致敏性评价标准见表2;复方麝香注射液过敏反应实验结果见表3。

表1 过敏反应症状评价标准

Tab 1 Allergy symptoms evaluation standard

编号	过敏症状	编号	过敏症状	编号	过敏症状
0	正常	7	呼吸急促	14	步态不稳
1	不安宁	8	排尿	15	跳跃
2	竖毛	9	排粪	16	喘息
3	发抖	10	流泪	17	痉挛
4	搔鼻	11	呼吸困难	18	旋转
5	喷嚏	12	哮喘音	19	潮式呼吸
6	咳嗽	13	紫癜	20	死亡

表2 全身致敏性评价标准

Tab 2 Systemic sensitization evaluation index

过敏症状	符号	评价标准
出现编号0症状	-	过敏反应阴性
出现编号1~4症状	+	过敏反应弱阳性
出现编号5~10症状	++	过敏反应阳性
出现编号11~19症状	+++	过敏反应强阳性
出现编号20症状	++++	过敏反应极强阳性

表3 复方麝香注射液过敏反应实验结果

Tab 3 Results of allergic reaction test of compound musk injection

厂家	批号	第14天激发	第21天激发
A	100103	3只豚鼠均在给药后活动减少,其中2只后肢显无力	其中1只出现活动减少、后肢无力症状,1只出现后肢无力症状,1只未见异常
A	100104	未见异常	2只豚鼠出现连续搔鼻症状1次,另外1只略竖毛
B	20091035	未见异常	未见异常
C	1003274	1只豚鼠出现搔鼻症状,15 min时出现后肢无力症状;其他2只无异常	未见异常
C	0909193	未见异常	未见异常
D	091022	未见异常	未见异常
D	100119	未见异常	其中1只在5 min时出现连续搔鼻症状1次,其余2只未见异常
阴性对照		未见异常	未见异常
阳性对照		3只豚鼠均出现挠鼻、喷嚏、呼吸急促、步态不稳、跳跃、痉挛、旋转、潮式呼吸、死亡	3只豚鼠均出现挠鼻、喷嚏、呼吸急促、步态不稳、跳跃、痉挛、旋转、潮式呼吸、死亡

### 2.3 溶血性检查

#### 2.3.1 2%红细胞混悬液的制备

家兔心脏取血,放入有玻璃珠的三角瓶中振摇除去纤维蛋白原,再加入生理盐水于离心机中,以离心半径为12 cm、1 500 r/min离心10 min,除去上清液,再洗涤至上清液不显红色为止<sup>[1]</sup>。将所得红细胞用生理盐水配成2%混悬液,当天使用。

#### 2.3.2 溶血与凝聚检查

(1)方法研究。预试验分别取批号为100103、20091035、1003274、091022的复方麝香注射液各0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 ml,加入生理盐水至2.5 ml,再加入2%红细胞混悬液2.5 ml作为供试品溶液。阴性对照加入生理盐水+2%红细胞混悬液2.5 ml,阳性对照加入蒸馏水2.5 ml+2%红细胞混悬液2.5 ml,以4.7 ml生理盐水+0.3 ml供试品作为供试品对照溶液。于(36.5±0.5)℃温育4 h,分别于15、30、45 min,1、2、3、4 h观察。4 h后将用试管倒转3次检查有无凝聚现象<sup>[1]</sup>。参考文献[3-5]溶血率的测定:将溶液置入干燥离心管中离心,取上清液在分光光度计于545 nm波长处测定吸光度(A),以阴性为空白读取A。溶血率(%)=(供试品A-阴性对照A)/(阳性对照A-阴性对照A)×100%。4批次复方麝香注射液观察与溶血率的计算结果见表4(仅列3、4 h的结果)。

表4 4批次复方麝香注射液观察与溶血率的计算结果(n=5)

Tab 4 Results of observations and hemolysis rates of 4 batches of Compound shexiang injection (n=5)

批号	时间点/溶血率	注射液量,ml					
		0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05
100103	第3 h	+	+	±	-	-	-
	第4 h	+	+	+	±	-	-
	溶血率,%	144.9	139.7	101.2	41.7	7.2	2.3
20091035	第3 h	+	+	-	-	-	-
	第4 h	+	+	±	-	-	-
	溶血率,%	83.9	56.6	29.2	7.9	3.2	-0.5
1003274	第3 h	±	-	-	-	-	-
	第4 h	+	+	±	-	-	-
	溶血率,%	93.2	46.2	35.2	11.6	1.6	0.5
091022	第3 h	-	-	-	-	-	-
	第4 h	-	-	-	-	-	-
	溶血率,%	8.4	6.2	5.8	3.5	2.4	-3.5

注:“+”表示目测有溶血现象;“-”表示目测无溶血现象;“±”表示可疑

Note:“+” means hemolysis was found in visual inspection;“-” means no hemolysis was found in visual inspection;“±” means suspicious

正式试验根据以上结果进一步采用5倍稀释液进行试验,根据初试结果,批号为100103、1003274的复方麝香注射液溶血率较大,因此选用C厂(批号:1003274)复方麝香注射液进行正式小试验。方法同上,目测无溶血现象。5倍稀释液的4 h溶血观察结果见表5。

表5 5倍稀释液的4 h溶血观察结果(n=5)

Tab 5 Results of 4 h hemolytic observation of 5 times dilution (n=5)

样品体积,ml	溶血率,%	RSD,%
0.5	3.6	1.7
0.4	1.4	1.53
0.3	0.6	1.31
0.2	0	1.16
0.1	-0.4	1.42

(2)限度检查。限度的确定:《药物研究技术指导原则》<sup>[6]</sup>明确指出,当溶血率>5%时,不宜用于静脉注射。根据临床用法用量“静脉注射每次20 ml,用5%、10%葡萄糖注射液或生理盐水250~500 ml稀释后使用”,临床使用最大体积分数为8%。以0.3 ml计,5倍稀释后的体积分数为15%,约为临床使用体积分数的2倍,因此采用5倍稀释液进行溶血与凝聚试验<sup>[1]</sup>。试验方法:每批样品分别取试管5支,按表6分别加入2%红细胞混悬液、生理盐水、蒸馏水和供试品溶液,混匀后,置于37℃的恒温箱中进行温育,3 h后观察溶血和凝聚反应,按2010年版《中国药典》(一部)附录X III H进行结果判定。对4个厂家2种不同规格共17批次样品批号分别进行检验,均未出现溶血与凝聚现象,结果符合规定。溶血与凝聚试验加样表见表6;17批次复方麝香注射液的3 h溶血与凝聚试验结果见表7。

表6 溶血与凝聚试验加样表

Tab 6 Sample table of hemolysis and coagulation test

溶液	试管编号			
	1,2	3	4	5
2%红细胞混悬液,ml	2.5	2.5	2.5	
生理盐水,ml	2.2	2.5		4.7
蒸馏水,ml			2.5	
供试品溶液,ml	0.3			0.3

表7 17批次复方麝香注射液的3 h溶血与凝聚试验结果

Tab 7 Results of 3 h hemolysis and coagulation test of 17 batches of Compound shexiang injection

生产厂家	批号	3 h观察					结果
		1	2	3	4	5	
A	100103	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
	100104	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
	100107	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
B	20091035	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
	20091031	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
C	1003274	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
	0909193	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
	1003254	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
	0912242	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
	0912261	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
	1003121	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
	091022	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
D	100119	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
	100124	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
	100102	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
	091016	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应
	100111	-	-	-	+	无色	无溶血与凝聚反应

注:“+”表示目测有溶血与凝聚现象;“-”表示目测无溶血与凝聚现象

Note:“+” means hemolysis and coagulation was found in visual inspection;“-” means no hemolysis and coagulation was found in visual inspection

### 3 讨论

在进行半数致死量(LD<sub>50</sub>)预试验时,40 ml/kg剂量时4只

小鼠中有1只死亡,给药体积为0.4 ml/10 g,无法得到LD<sub>50</sub>。因此进行最大耐受量实验,得最大耐受量为35 mg/kg,约为临床用量的100倍。

在全身主动过敏试验中部分豚鼠出现类似过敏反应,此次实验参照我国的《药物研究技术指导原则》进行,该原则中过敏反应症状指标及全身致敏性评价标准较2010年版《中国药典》(一部)的判断标准更全面、严格。建议如果将过敏反应检查列入该品种的质量标准,则应采取更全面严格的判定标准。实验采用的剂量约为1.5 ml/kg,约相当于人临床用量的4.5倍。实验结果提示该品种在临床使用中,出现过症状的可能性较大。

溶血性试验中,通过目测观察及在545 nm波长处进行紫外吸收测定,表明不同厂家的复方麝香注射液的溶血情况差别较大,溶血现象基本出现在2 h后,批号为100103、20091035、1003274的复方麝香注射液在两个时段观察到的溶血现象有明显变化。根据4 h时的目测观察与紫外吸收对照,能目测到溶血率在7.4%~41.7%之间。因此建议如将该项检查列入质量标准,以分光光度法对结果进行判断为好。

凝血试验中的安全稀释倍数(5倍稀释)仅是临床体积分数的2倍。该品种使用的增溶剂聚山梨酯80有一定的溶血作用,且不同产地溶血性差异较大<sup>[6-7]</sup>。建议生产厂家对增溶剂进行进一步的考察,以生产出更加安全的产品。

通过以上3项非临床安全性检查可见,复方麝香注射液最大耐受量为人临床用量的100倍,凝血安全释放倍数为临床体积分数的2倍。复方麝香注射液对实验动物的安全范围较窄,建议临床使用中对患者密切观察,超剂量使用应谨慎。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录92、附录132.
- [2] 国家食品药品监督管理局.中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光过敏反应)研究的技术指导原则[S].北京:中国医药科技出版社,2006:250.
- [3] 张剑锋,项峥,窦德强.血塞通注射液溶血检测方法研究[J].中国现代中药,2011,13(1):34.
- [4] 杨光,项峥,康延国,等.人参皂苷溶血测定的实验条件研究[J].辽宁中医药大学学报,2008,10(6):190.
- [5] 国家食品药品监督管理局.药物研究技术指导原则:中药、天然药物刺激性和溶血性研究的技术指导原则[S].北京:中国医药科技出版社,2006:241.
- [6] 费建军,周丽,崔友,等.两种吐温80的溶血性试验观察[J].黑龙江医药科学,2001,24(4):40.
- [7] 贺煜星,丁选胜.吐温80体外溶血研究[J].安徽医药,2014,18(3):444.

(收稿日期:2014-06-26 修回日期:2014-10-23)

(编辑:张 静)