

雄黄注射液安全性研究 I

张 爽, 晏 磊, 陈志宝, 胡慧欣, 李 雪

黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319

摘 要: 目的 评价雄黄注射液注射给药的安全性。方法 利用小鼠对雄黄注射液进行异常毒性、急性毒性实验, 鲎试剂法检测内毒素, 利用家兔进行体外溶血实验。结果 雄黄注射液异常毒性实验和急性毒性实验均未见小鼠死亡, 且饮食、行为、运动等功能均正常。鲎试剂检查细菌内毒素结果呈阴性, 对家兔红细胞无溶血和凝集作用。结论 在实验条件下雄黄注射液安全性良好。

关键词: 雄黄注射液; 异常毒性; 急性毒性; 鲎试剂法; 细菌内毒素; 溶血

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2012)06-0451-03

Safety research of Realgar Injection I

ZHANG Shuang, YAN Lei, CHEN Zhi-bao, HU Hui-xin, LI Xue

College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China

Abstract: Objective To evaluate the safety of Realgar Injection (RI). **Methods** The abnormal toxicity test and acute toxicity test were performed in mice, endotoxin was determined by tachypleus amebocyte lysate method, and hemolysis test was performed *in vitro* using rabbit blood. **Results** In the abnormal toxicity test and acute toxicity test there were no dead of mice, and their functions of diet, behavior, and moving were normal. The result of tachypleus amebocyte lysate test was negative and there was no hemolysis and agglutination reaction *in vitro*. **Conclusion** The safety of RI used as the clinical injection is good.

Key words: Realgar Injection; abnormal toxicity; acute toxicity; tachypleus amebocyte lysate method; bacterial endotoxin; hemolysis

雄黄, 又称石黄, 是硫化物类矿物雄黄族雄黄, 具有燥湿祛痰、截虐等功效, 是常用的解毒杀虫药, 在我国已有上千年的药用历史^[1]。《医疗用毒性药品管理办法》中特别规定的 28 种毒性中药中也包括雄黄, 其毒性主要源于所含三氧化二砷杂质。根据《中国药典》2010 年版一部附录“中药注射剂安全性检查法应用指导原则”的要求及相关项目的技术规范, 同时结合国家新药审批办法及相关规定, 对雄黄注射液的急性毒性、异常毒性、细菌内毒性等进行安全性评价, 为雄黄注射液的质量标准提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 仪器与药物

TD5A—WS 台式低速离心机(上海恒勤仪器设备有限公司), KD—S14 电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司)。

氯化钠注射液(哈尔滨三联药业有限公司, 国

药准字 H23020612, 批号 091107B8); 鲎试剂(湛江安度斯生物有限公司, 批号 1111161); 雄黄注射液(自制, 批号 20080812)。

1.2 实验动物

健康昆明种小鼠, 17~20 g, 50 只, 雌雄兼用。健康家兔, 体质量(2.0±0.2) kg, 10 只, 雌雄兼用。以上实验动物均由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供, 在试验前及试验观察期内, 均按正常饲养条件饲养。

1.3 实验方法

1.3.1 雄黄注射液的制备 雄黄微生物浸提液的制备参照 Chen 等^[2-3]的方法进行。向制备好的雄黄浸出液中加入酒石酸及硫代硫酸钠适量, 加入药用活性炭, 滤过, 调整 pH 值至 6.0, 灌封, 115 °C 热压灭菌 45 min。所制得的雄黄注射液经电感耦合等离子体原子发射光谱仪测定质量浓度为 240.39 µg/mL, 且保持稳定。

收稿日期: 2012-09-26

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511361, 12511362); 黑龙江省青年科学基金项目(QC2009C115); 黑龙江八一农垦大学科研启动基金(B2011-13)

作者简介: 张 爽(1981—), 女, 讲师, 硕士, 现主要从事药物分析教学与研究工作。Tel: 13604662306 E-mail: zhangshuang2545@163.com

1.3.2 异常毒性实验 选取昆明种健康小鼠 20 只,雌雄各半,体质量 17~20 g,每只小鼠分别尾 iv 给予雄黄注射液 0.5 mL,在 5 s 内匀速注射完毕,观察小鼠死亡情况。结果判断标准:全部小鼠在给药后 48 h 内不得有死亡;如有死亡,另取体质量 18~19 g 的小鼠 10 只复试,全部小鼠在 48 h 内不得有死亡。

1.3.3 急性毒性实验 选取昆明种小鼠 30 只,按体质量随机分为 3 组,每组 10 只,雌雄各半。各组给药剂量分别为 0.5、0.3、0.1 mg/mL,按体质量 1 次性 ip 给药,给药体积为 10 mL/kg,注射速度为 0.5 mL/s,观察 7 d,观察其一般形态、外观、行为活动、饮食、皮毛、运动功能、反射、痛觉、眼睑、唾液分泌等毒性表现。

1.3.4 细菌内毒素检查实验 取 36 支鲎试剂,其中 16 支用供试品溶液溶解,制成 2 λ 、 λ 、0.5 λ 、0.25 λ 4 个浓度的内毒素标准溶液,每个内毒素浓度平行做 4 管,作为干扰试验系列 (E/S 系列);另 16 支用细菌内毒素检查用水溶解,涡旋 15 min,制成 2 λ 、 λ 、0.5 λ 、0.25 λ 4 个浓度的内毒素标准溶液,每个内毒素浓度平行做 4 管,作为鲎试剂标示灵敏度的对照系列 (E 系列);余下 4 管中 2 管作为供试品溶液检查 (S),另外 2 管作为阴性对照 (NC)。按凝胶法鲎试剂说明书检查操作进行,封闭管口,轻轻摇匀,垂直放入 (37 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 的恒温器中,保温 (60 $\pm$ 2) min。

结果判断标准:将试管从恒温器中轻轻取出,缓慢倒转 180 $^{\circ}$,若管内形成凝胶,并且凝胶不变形、不从管壁滑脱者为阳性;未形成凝胶或形成的凝胶不坚实、变形并从管壁滑脱者为阴性。

1.3.5 溶血试验 取家兔新鲜血液 20 mL,放入烧杯中竹签搅拌 10 min,除去纤维蛋白原,制成脱纤维血液,加约 10 倍量生理盐水,摇匀,2 000 r/min 离心 5 min,除去上清液,沉淀的红细胞再用生理盐水反复数次至上清液不显红色为止,除去上清液,将所得红血球用生理盐水配成 2%混悬液^[4]。

取干净试管 7 支,按表 1 配比量依次加入 2% 红细胞混悬液和生理盐水,混匀,于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱放置 30 min,然后分别加入雄黄注射液不同体积药液,其中第 6 管为生理盐水空白对照管,第 7 管为蒸馏水溶血对照组。各管轻轻摇匀至混匀后,置 37 $^{\circ}$ C 中放置温孵,每隔 15 min 观察一次,1 h 后,每隔 1 h 观察一次,连续观察 4 h,记录各个管的溶血情况。细胞溶血判定标准见表 2。

表 1 受试药溶血试验加液表

Table 1 Design of hemolysis test

管号	雄黄注射液/ mL	生理盐水/ mL	2%红细胞 混悬液/mL	雄黄注射液 终浓度/%
1	0.1	2.4	2.5	2
2	0.2	2.3	2.5	4
3	0.3	2.2	2.5	6
4	0.4	2.1	2.5	8
5	0.5	2.0	2.5	10
6	—	2.5	2.5	0
7	—	蒸馏水 2.5	2.5	0

表 2 红细胞溶血、凝集判断标准

Table 2 Criteria for hemolysis and agglutination of red blood cells

反应级	外观描述
全溶血	溶液澄明红色,管底无细胞残留,用 (+) 表示
部分溶血	溶液澄明红色或棕色,管底有少量红细胞残留,用 ($\pm$) 表示
无溶血	红细胞全部下沉,上层液体无色透明,用 (-) 表示
凝集	红细胞凝集成块,震荡后不能分散

2 结果

2.1 异常毒性实验

经连续 48 h 对小鼠进行观察,未见小鼠死亡,实验证明雄黄注射液无异常毒性。

2.2 急性毒性实验

实验所用小鼠初始自主活动有所减少,6 h 后全部恢复正常。整个实验过程中,没有小鼠死亡,饮食、行为、运动功能等均正常。因此未获得 LD₅₀,采用最大耐受量 (MTD) 来表示药物的急性毒性。

另取小鼠 20 只,雌雄各半,ip 给药,剂量为 20 mL/kg,4 h 后,未见小鼠死亡;继续按剂量 20 mL/kg 给药,4 h 后,仍未见小鼠死亡;第 3 次小鼠 ip 给药,剂量 20 mL/kg。观察 7 d,结果 20 只小鼠全部存活,且无明显中毒表现。按小鼠总给药量,推算出相当于临床用药量的倍数。经计算小鼠对雄黄注射液的最大耐受量相当于临床人用量的约 138 倍,因此可以判断该制剂临床静脉给药比较安全。

2.3 细菌内毒素检查实验

应用鲎试剂检查细菌内毒素,3 批样品均未形成凝胶,结果为阴性,说明雄黄注射液不含细菌内毒素,符合《中国药典》对注射液有关内毒素的相关规定。

2.4 溶血实验结果

细胞溶血实验结果以 0.3 mL (3 号试管) 在 2 h 内不产生溶血作用,即认为可供注射用。各试管观

察4 h后,将各管充分震荡,观察有无沉淀和凝集现象,结果雄黄注射液体外溶血试验中,与生理盐水组比较,无明显差别;蒸馏水组完全溶血,产生红色透明溶液;药物组未见溶血及血球凝集现象,证实本制剂溶血性符合注射剂要求。

3 讨论

注射药物的安全性评价是药物安全性实验的一个重要组成部分,主要由体外溶血实验、急性毒性实验、异常毒性实验等组成。在安全性实验中,若其中任何一项试验出现阳性结果,则表明该药不符合安全性评价的标准,不能予以生产及销售。雄黄注射剂经急性毒性实验、异常毒性实验、溶血实验,无小鼠死亡和溶血现象,证实该注射液符合要求,为雄黄注射液的开发提供重要的理论基础。

能引起机体发热反应的物质称为热原或热原质,热原多是微生物(尤其是革兰阴性杆菌)及其代谢产物或尸体,将其注入体内,特别是经由静脉

注入血中,便能引起发热反应,重则昏迷,甚至危及生命。由于家兔法费时,操作繁琐,因此多用体外热原试验法即鲎试剂法做热原检查^[5]。本实验利用鲎试剂检查药物细菌内毒素,结果证实该注射剂不含热原,符合中国药典的规定。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Chen P, Yan, L Leng F F, *et al.* Bioleaching of realgar by *Acidithiobacillus ferrooxidans* using ferrous iron and elemental sulfur as the sole and mixed energy sources [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(3): 3260-3267.
- [3] Zhang J H, Ni Y Q, Zhang X, *et al.* Bioleaching of arsenic from medicinal realgar by pure and mixed culture [J]. *Process Biochem*, 2007, 42(9): 1265-1271.
- [4] 王 凌. 复方丹芪注射剂的研制 [D]. 成都: 四川大学, 2003.
- [5] 崔福德. 药剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.