

溶血率测定法在莪术油葡萄糖注射液安全性再评价中的应用

孙叶丹, 陈超风, 匡荣, 朱社敏

浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310004

摘要:目的 研究溶血率测定法在莪术油葡萄糖注射液安全性再评价中的应用, 为提高莪术油葡萄糖注射液质量标准提供参考。方法 用《中国药典》2010年版二部附录“溶血与凝聚检查法”和紫外分光光度测定溶血率法, 对3家厂家生产的22批莪术油葡萄糖注射液进行溶血与凝聚检查和分光光度法测定溶血率, 比较实验结果, 并对检查样品进行安全性评价。结果 溶血与凝聚检查试验和紫外分光光度法测定溶血率的试验结果有一定的相关性, 部分批号莪术油葡萄糖注射液具溶血性, 临床使用存在一定的风险。结论 莪术油葡萄糖注射液应检查溶血与凝聚, 紫外分光光度测定溶血率方法可用于莪术油葡萄糖注射液的质量控制。

关键词: 溶血与凝聚; 溶血率; 莪术油葡萄糖注射液; 安全性再评价

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)06-0535-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.06.014

Application of determination method for hemolysis in safety re-evaluation of Zedoary Turmeric Oil and Glucose Injection

SUN Ye-dan, CHEN Chao-feng, KUANG Rong, ZHU She-min

Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China

Abstract: Objective To study the method for the determination of hemolysis on safety re-evaluation of Zedoary Turmeric Oil and Glucose Injection and make the references to improve the quality standards of Zedoary Turmeric Oil and Glucose Injection. **Methods** According to the appendix II of *Chinese Pharmacopoeia 2010*, the test for hemolysis and agglomeration and the method for ultraviolet spectrophotometry to determine hemolytic rate were used to measure the 22 batches of Zedoary Turmeric Oil and Glucose Injection from three manufacturers. The experimental results were compared and a safety evaluation was made. **Results** There was a certain relevance between the results of the two methods, and some batches have hemolysis leading to a risk in clinical use. **Conclusion** Hemolysis and agglomeration should be tested in Zedoary Turmeric Oil and Glucose Injection and the method of ultraviolet spectrophotometry used to determine hemolytic rate can be used for the quality control of Zedoary Turmeric Oil and Glucose Injection. **Key words:** hemolysis and agglomeration; hemolytic rate; Zedoary Turmeric Oil and Glucose Injection; safety re-evaluation

莪术油葡萄糖注射液为莪术油与葡萄糖制成的等渗注射液, 收载于《中国药典》2005年版二部, 按化学类药物进行管理, 质量标准中未进行溶血与凝聚的检查。莪术油是从姜科植物莪术的干燥根茎中提取的挥发油, 含有呋喃二烯、莪术烯、吉马酮、莪术酮、莪术醇等多种倍半萜类成分^[1], 具有中药注射剂的特性, 按《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”要求, 应进行溶血性检查。莪术油具有一定的溶血性, 并有可能增强聚山梨酯80的溶血作用, 临床使用具有一定的风险^[2-3]。本文按《中国药典》2010年版二部附录“溶血与凝聚检查法”和紫外分光光度测定

溶血率法, 对3家厂家生产的22批莪术油葡萄糖注射液进行溶血与凝聚检查和测定溶血率, 考察莪术油葡萄糖注射液进行溶血检查的必要性^[4], 并为其安全性再评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器

GNP—9160 隔水式培养箱(上海精宏试验设备有限公司); TDL80—2B 低速离心机(上海安亭科技厂); TU—1221 型紫外分光光度计(北京通用公司生产)。

1.2 试剂

莪术油葡萄糖注射液(厂家A:批号H12030505

收稿日期: 2014-02-11

作者简介: 孙叶丹 Tel: (0571)86457970 E-mail: danny19861213@126.com

等13批,规格为250 mL;厂家B:批号120339等9批,规格为250 mL;厂家C:批号2012041863,规格为250 mL);氯化钠注射液(杭州民生药业有限公司,批号31203276,规格为250 mL:2.25 g)。

1.3 动物

新西兰种家兔,雌雄兼用,体质量2.0~3.0 kg,余姚市泗门镇建飞实验兔养殖场提供,生产许可证号SCXK(浙)2012-0050。饲养条件为温度22~25℃,湿度40%~70%。

2 方法与结果

2.1 溶血与凝聚检查

参照2010年版《中国药典》二部附录X L溶血与凝聚检查法。取洁净玻璃试管5只,1、2号管为供试品管,3号管为阴性对照管,4号为阳性对照管,5号管为供试品对照管。按表1依次在各试管中加入2%兔红细胞混悬液、氯化钠注射液、纯化水、莪术油葡萄糖注射液溶液,混匀后,立即置(37±0.5)℃的恒温箱中进行温育,3 h后肉眼观察,如试管中上层溶液呈澄明红色,管底无细胞残留或有少量红细胞残留,表明有溶血发生。如红细胞全部下沉,上层溶液无色澄明,或上层溶液虽有色澄明,但与供试品对照管比较无显著差异,则表明无溶血发生。结果见表2。

表1 溶血与凝聚检查加液顺序

Table 1 Liquid adding order of haemolysis and agglomeration

试管号	2%兔红细胞混悬液	0.9%氯化钠溶液	纯化水	莪术油葡萄糖注射液
1、2	2.5 mL	2.2 mL		0.3 mL
3	2.5 mL	2.5 mL		
4	2.5 mL		2.5 mL	
5		4.7 mL		0.3 mL

2.2 紫外分光光度测定溶血率

2.2.1 10%红细胞混悬液的制备 取健康家兔心脏血液,放入含玻璃珠的锥形瓶中振摇10 min,除去纤维蛋白原,使成脱纤血液,用0.9%氯化钠注射液洗涤,2 500 r/min离心5 min,除去上清液,沉淀的红细胞再用0.9%氯化钠注射液同法洗涤3次,至上清液不显红色为止。将所得的红细胞按其容积,用0.9%氯化钠注射液稀释成10%的混悬液,备用^[5]。

2.2.2 供试品溶液的制备 用0.9%氯化钠注射液按要求稀释至所需浓度。

2.2.3 取样品 用氯化钠注射液按1→4、1→8、

1→16、1→32进行倍比稀释,取各稀释液5 mL,同时以氯化钠注射液5 mL为阴性对照、纯化水5 mL为阳性对照,分别加入10%红细胞混悬液0.2 mL,在37℃放置1 h后,2 500 r/min离心5 min,取上清液在545 nm处测定吸光度(A)值^[6-7],并分别计算各样品溶血率,结果见表2。

样品溶血率=(样品A值-阴性对照A值)/(阳性对照A值-阴性对照A值)

当样品溶血率小于0时,溶血率以0计。

表2 3厂家23批样品两种方法测定的结果

Table 2 Determination of 23 batches of samples from three factories by two methods

厂家	批号	溶血与凝聚	溶血率/%			
			1→4	1→8	1→16	1→32
A	H12030505	+	/	68	7	3
	H12030502	+	/	81	38	17
	H12041810	-	64	5	/	/
	H12041803	-	66	1	/	/
	H11122708	+	/	6	2	0
	H12041805	+	/	85	43	13
	H11122703	+	/	8	2	1
	H12041801	-	75	2	/	/
	H12030510	+	/	9	0	0
	H11122705	+	/	3	1	1
	H12030509	+	/	14	1	/
	H12041804	+	/	5	3	/
	H12051708	-	/	2	2	/
B	120339	-	12	1	/	/
	120423	-	6	0	/	/
	120341	-	73	3	/	/
	120340	-	72	2	/	/
	120419	-	40	1	/	/
	110910	-	21	3	/	/
	111175	-	/	2	0	/
	120418	-	/	2	1	1
C	120614	-	2	0	0	0
	2012041863	-	35	0	/	/

“+”表示发生溶血,无凝聚;“-”表示未发生溶血与凝聚;“/”表示未测

“+” shows haemolysis, with agglomeration; “-” shows no occurrence of hemolysis and agglomeration; “/” means non measured

从试验结果看,按2010年版《中国药典》二部附录方法检查,莪术油葡萄糖注射液23批样品中有

9批出现溶血,可判为不符合规定。

紫外分光光度法测定的11批莪术油葡萄糖注射液1→4氯化钠注射液稀释液中,有1批溶血率小于5%,供试品溶液不溶血,其余10批溶血率均大于5%,供试品溶液均为溶血;测定的23批1→8氯化钠注射液稀释液中,有16批溶血率小于等于5%,供试品溶液不溶血,7批溶血率大于5%;测定的23批1→16氯化钠注射液稀释液中,有22批溶血率小于等于5%,供试品溶液不溶血,1批溶血率大于5%。溶血与凝聚检查为不溶血的14批样品,紫外分光光度法检查也均为不溶血(溶血率小于等于5%)。

3 讨论

莪术油本身具有一定的溶血性,根据莪术油注射液使用说明书:高剂量的莪术油葡萄糖注射液具有一定的溶血性。在实验过程中,发现实验保温时间对试验结果有一定的影响,保温时间越长,溶血就越严重,因此在相同浓度下,保温3h观察结果的溶血与凝聚阳性检出率要高于保温1h后离心的溶血率测定结果。相对而言,保温1h更接近临床使用方法。

从试验结果看,不同厂家间和同一厂家不同批号间莪术油葡萄糖注射液的溶血情况不同,为保证临床用药的安全性,有必要进行与溶血相关的安全性质量控制。

溶血与凝聚试验作为安全性检查项目,所采用的方法均为体外试管法(肉眼观察法),即通过药物与红细胞直接接触,用肉眼来观察判断溶血情况。但本法结果受主观影响,且不能具体测出溶血红细胞的数量,容易引起纠纷^[8-9]。用分光光度法测定样品溶血率代替肉眼观察,消除结果判断的主观影响,能有效的规避这些问题。已经有相关的文献报道了溶血率测定法应用于中药注射剂的安全性研究^[10-11]。

莪术油葡萄糖注射液是一种中药注射剂,其作

为小儿病毒性肺炎用药,50%以上均为小儿患者^[12],其不良反应也时有报道^[13]。部分不良反应现象与溶血有一定的相关性,是否与样品溶血率有关,还待进一步证实。但莪术油葡萄糖注射液成分复杂,除了主药成分,还含有辅料,对辅料的品种和含量没有统一要求,因此控制莪术油葡萄糖注射液的安全性显得尤为重要。

参考文献

- [1] 赵艺,杨汝刚,罗岷. 莪术油的药理作用及临床应用研究进展 [J]. 实用中医内科杂志, 2006, 20(2): 125-126.
- [2] 于莲,苏瑾,田海霞,等. 乳腺康注射剂及原料溶血性考察 [J]. 黑龙江医药科学, 2003, 6: 39-40.
- [3] 牛慧玲,李庆忠,陈志勇,等. 含吐温80的不同注射剂溶血试验研究 [J]. 中国药品标准, 2012, 13(2): 108-111.
- [4] 张劲松,金婉冰,赵莉丽. 莪术油注射剂安全性评价 [J]. 医药导报, 2010, 8(29): 226-227.
- [5] 中国药典[S]. 二部. 2010.
- [6] 医用输液、输血、注射器具检验方法 [S]. 2005
- [7] 药包材检验方法标准汇编 [S]. 2003.
- [8] 张德波,蒲旭峰,杨幼琪,等. 中药注射剂溶血与凝聚试验方法研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1): 183-186.
- [9] 袁雪涛,李昇刚,孙振平. 对23种中药注射剂溶血与凝聚检查的探讨 [J]. 中国药品标准, 2010, 11(6): 430-432.
- [10] 章宝娟. 中药注射剂溶血性试验方法的研究概述 [J]. 海峡药学, 2007, 19(8): 79-80.
- [11] 朱社敏,匡荣,姚治,等. 溶血率测定法在鱼腥草注射液安全性再评价中的应用 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2008, 25(3): 233-235.
- [12] 郑火珺,叶建云. 107例莪术油葡萄糖注射液致不良反应文献分析 [J]. 药事组织, 2007, 3(16): 42.
- [13] 张岚. 莪术油注射液的不良反应及原因分析 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(17): 608-610.