

天麻素注射液质量评价

张玉娟, 张晓明, 杜兴, 马迎春, 杨平荣, 陈海龙

甘肃省药品检验研究院, 甘肃 兰州 730070

摘要: 目的 监测和评价天麻素注射液的质量现状。方法 采用法定检验与探索性研究相结合的模式, 按法定标准检验200批样品, 统计分析pH值、有关物质和含量测定等检验结果, 围绕安全性有效性开展了有关物质、渗透压摩尔浓度、依地酸二钠(EDTA-2Na)筛查及注射剂局部安全性4个方面的研究。结果 按法定标准检验结果均符合规定, 合格率100%。通过探索性研究建立了杂质谱, 渗透压摩尔浓度研究发现部分企业说明书中对“辅料”描述不完全, EDTA-2Na筛查与注射剂局部安全性研究结果均呈阴性反应或符合规定。结论 天麻素注射液总体质量状况好。

关键词: 质量评价; 天麻素注射液; 探索性研究; 辅料; 注射剂局部安全性;

中图分类号: R971 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)02-0232-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.02.010

Quality Evaluation of Gastrodin Injection

ZHANG Yujuan, ZHANG Xiaoming, DU Xing, MA Yingchun, YANG Pingrong, CHEN Hailong

Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730070, China

Abstract: **Objective** To monitor and evaluate the quality status of gastrodin injection. **Methods** The mode of statutory testing method and exploratory research was adopted. 200 batches of the collected samples were tested according to the current quality standard, the tested results were statistically analyzed in terms of pH, related substances and assay. Several exploratory researches, including the study on related substances, measure osmotic pressure, screening EDTA-2Na and the study of safety of in situ injection, were carried out on the basis of security and effectiveness. **Results** Statutory test showed all the samples conform to the provisions, qualification rate is 100%. Impurity profile was established by exploratory research, the study of measuring osmotic pressure showed the incomplete description of medicine specification of partial company, screening EDTA-2Na and the study of safety of in situ injection showed the negative reaction or qualified results. **Conclusions** The overall quality status of gastrodin injection was good.

Key words: quality evaluation; gastrodin injection; exploratory research; ingredients; safety of in situ injection

天麻素是兰科多年生寄生植物天麻 *Gastrodia elate* Blume. 中的主要活性成分, 又名天麻苷, 化学名为 4-羟甲基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷(β -D-Glucopyranoside)。天麻素在1979年由中国科学院植物研究所从天麻中分离合成, 1984年昆明制药厂接受成果转让, 经云南省卫生厅批准生产首次上市, 2003-2004年, 昆药集团股份有限公司在四川大学华西医院、重庆医科大学附属第一医院、第三军医大学附属西南医院进行天麻素注射液增加静脉给药途径的I、II期临床试验, 成为首家被批准生产可用于静脉给药天麻素注射液的企业。天麻素具有镇痛、安眠、抗惊厥等中枢抑制作用^[1-2], 临床上广

泛用于眩晕(美尼尔氏病、药性眩晕、外伤性眩晕、突发性耳聋、前庭神经元炎、椎基底动脉供血不足等)、头痛(血管性头痛、偏头痛等)、神衰、神衰综合征及脑外伤性综合征等^[3-4]。2001年天麻素及天麻素注射液由地方标准上升至国家药品标准(Ws1-XG-023-2001)^[5], 2014年再次标准提高(Ws1-XG-023-2001-2014)^[6], 本品国外药典无收载。

本研究采用法定标准检验以及针对此品种特殊性展开的有关物质、渗透压摩尔浓度、EDTA-2Na筛查及注射剂局部安全性的探索性研究, 结合统计学分析, 旨在评价天麻素注射液的总体质量, 为患者的安全用药提供参考。

收稿日期: 2019-06-05

第一作者: 张玉娟, 博士, 研究方向为药物分析, 药物化学。E-mail: yujuanzhang0625@126.com

1 仪器与试剂

1.1 主要仪器

Waters2695 高效液相色谱仪(UV 检测器, Empower 工作站); 资生堂 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 填料: 十八烷基硅烷键合硅胶); 岛津 LC30A 液相色谱-AB SCIEX 4500 Q-TRAP™ 复合型三重四极杆/线性离子阱串联质谱仪; Mettler AE-160 电子天平; 北京永光明 DZKW-D-4 水浴锅; 上海恒科科技 DKB-600B 型电热恒温水浴箱; 长沙湘仪 L-530 型多管架离心机; U3010 紫外可见分光光度计。

1.2 主要试剂

天麻素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110807-201306, 质量分数 96.8%); EDTA-2Na(天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号 20120508, 质量分数 ≥99.0%); 10% 四丁基氢氧化铵水溶液(国药集团化学试剂有限公司, 批号 80122515); 醋酸铜·一水(国药集团化学试剂有限公司, 批号 30044218, 质量分数 ≥98.0%); 氯化钠注射液(规格 250 mL: 2.25 g, 甘肃扶正药业科技股份有限公司, 批号 B2014122704); 乙腈为 HPLC 级(国药); 磷酸、盐酸为分析纯; 自制纯化水。

1.3 实验动物

普通级新西兰兔 36 只, 雌雄各半, 体质量 2.0~2.5 kg, 由兰州生物制品研究所动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK(甘)2012-0001, 动物饲养于普通环境中, 温度 20~24 °C, 湿度 40%~70%, 实验动物使用许可证号 SCXK(甘)2011-0002, 动物单笼饲养在不锈钢笼中, 颗粒料饲养, 动物自由饮用自来水。

昆明种小白鼠 190 只, SPF 级, 体质量 17~20 g, 雌雄各半, 由兰州生物制品研究所动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK(甘)2012-0001, 动物饲养在甘肃省药品检验研究院药品化妆品安评中心, 实验动物使用许可证号 SYXK(甘)2011-0002, 饲料、饮水、垫料均经高压蒸汽灭菌 121 °C, 20 min, 水和饲料自由饮食。

1.4 样品

天麻素注射液 200 批次, 有 4 个规格, 分别为 1 mL:0.1 g、2 mL:0.2 g、5 mL:0.5 g、5 mL:0.6 g, 其中所占比例最高的规格是 2 mL:0.2 g, 有 164 批, 其次是 5 mL:0.6 g, 有 19 批, 包装材料均采用无色透明玻璃安瓿瓶包装, 涉及生产企业 18 个: 安徽宏业药业有限公司(A)、福建古田药业有限公司(B)、辅

仁药业集团有限公司(C)、广东邦民制药厂有限公司(D)、广东三才石岐制药股份有限公司(E)、海南惠普森医药生物技术有限公司(F)、海南利能康泰制药有限公司(G)、河南神农药业有限公司(H)、湖南五洲通药业有限责任公司(I)、济南利民制药有限公司(J)、江西国药有限责任公司(K)、昆药集团股份有限公司(L)、山东方明药业集团股份有限公司(M)、山东圣鲁制药有限公司(N)、陕西博森生物制药股份集团有限公司(O)、上海现代哈森(商丘)药业有限公司(P)、西南药业股份有限公司(Q)、悦康药业集团有限公司(R)。

2 方法

2.1 依据现行质量标准检验

将 200 批次样品依据现行标准 WS1-XG-020-2001-2014^[6] 进行检验, 检验项目为: 性状、鉴别(化学反应鉴别及高效液相色谱鉴别)、pH 值、有关物质、装量、可见异物、不溶性微粒、细菌内毒素或热源、无菌、含量测定。

2.2 探索性研究

2.2.1 有关物质的研究 实施酸、碱、高温、氧化破坏试验, 分析所有可能存在的降解杂质; 依标对本次抽验 200 批次样品进行有关物质检查, 分析统计检出杂质的种类及含量范围, 建立杂质谱; 应用对照品辅助确认试验以及 QTRAP LC/MS/MS 分析确认各个杂质的结构, 结合破坏试验结果、原料药合成工艺、杂质结构等归属杂质谱各杂质的来源。

2.2.2 渗透压摩尔浓度测定 因为处方工艺的改变、添加剂的加入等都会表现为渗透压的变化, 所以可以通过测量渗透压, 将渗透压作为参考值来判断各个生产企业处方的单一性和复杂性。渗透压摩尔浓度的测定采用《中国药典》方法^[7], 取样品直接测定。

2.2.3 添加剂 EDTA-2Na 筛查 EDTA-2Na 是金属螯合剂, 会与血液中的钙离子形成水溶性螯合物, 被排出体外, 故需对制剂中 EDTA-2Na 的用量进行控制, EDTA-2Na 的常用浓度范围为 0.01%~0.05%。

采用 HPLC 法测定天麻素注射液中 EDTA-2Na 的含量^[8], 经方法学验证: 以质量浓度(μg/mL)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程: $y=9.3748 \times 10^3 x - 1.6596 \times 10^4$, $r=0.9998$ ($n=8$); 精密度的 RSD 为 0.6%; 定量限为 2.48 μg/mL; 平均回收率为 94.8% (RSD=1.2%)。

2.2.4 注射剂局部安全性研究 天麻素注射液有

静脉滴注和肌肉注射两种给药方式,依据国家食品药品监督管理局注射剂研制指导原则有关安全性实验项目要求,根据《化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》,选取代表性样品即18个厂家的18批样品,采用临床使用最高浓度即天麻素原液100 mg/mL,进行了溶血和凝聚检查以及异常毒性检查:溶血和凝聚检查以普通级新西兰兔为实验对象,家兔心脏采血40 mL制备红细胞悬液进行试验;异常毒性检查以昆明种小白鼠为试验对象,注射剂量50 mg/只(为临床剂量的200倍)或80 mg/只(为临床剂量的330倍),注射完毕后,观察72 h内动物的异常反应及死亡情况;选取3个厂家的3批样品进行肌肉和血管刺激试验,以普通级新西兰兔为实验对象,家兔耳缘静脉滴注供试品200 mg/kg,每天1次,连续3 d,家兔后腿前侧股四头肌处肌肉注射供试品200 mg,每天2次,连续注射3 d,每次给药前、后、末次给药后48 h,对注射部位进行肉眼观察,末次给药48 h后,取病理标本用10%甲醛固定,送病检,常规组织切片,观察病理变化。

3 结果

3.1 法定检验结果及分析

对200批样品依据现行标准WS1-XG-020-2001-2014^[6]进行检验,结果全部符合规定,样品合格率为100%,说明该品种质量较稳定,能够基本满足临床使用的要求,同时对主要检验项目进行了统计分析。

3.1.1 pH值 本次抽验200批次样品pH分布在5.4~6.8,均符合规定。统计分析200批次样品的pH值,其频数分布图见图1,从频数分布图发现pH值分布范围离散,更像两个交错的样本集的结果,一个样本的最大值在5.8,另一个在6.3,似两个不同的工艺产物;不同企业(抽样数≥5批次)样品pH值的箱式图见图2,发现不同企业pH值差异明显。

3.1.2 有关物质 采用现行标准WS1-XG-020-2001-2014^[6]有关物质测定方法检验179批次样品的

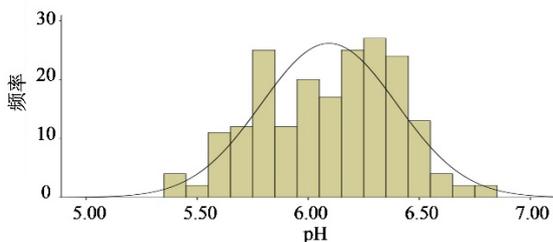


图1 200批次样品pH值的频数分布图

Fig. 1 Chart of frequency distribution of pH values of 200 batches

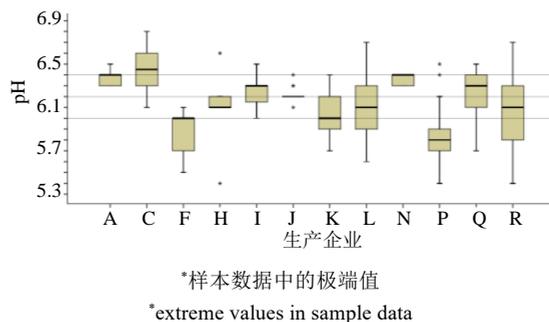


图2 不同企业(抽样数≥5批次)样品pH值的箱式图

Fig. 2 Box plot of pH values of different company (samples ≥ 5 batches)

有关物质,图3用散点图描述了样品的总杂质值,从图3可以看出,只有8个批次的总杂质达到了0.3%,有44个批次的总杂质达到了0.2%,有51批次的总杂质为0.1%,其他批次的总杂质都小于0.1%;179批次样品检出的最大单杂是同一个杂质,相对保留时间(RRT)为2.25,用皮尔逊相关分析法分析179批次的总杂量及最大单杂量,显著性 $P=0.000<0.01$,有统计学意义,相关系数为 $0.738>0.6$,相关性显著,说明最大单杂量与总杂量显著相关。对不同企业(抽样数≥5批次)样品的总杂量进行统计分析,不同企业样品总杂量的箱式图见图4,由图看出大部分企业的总杂量均控制较一致。

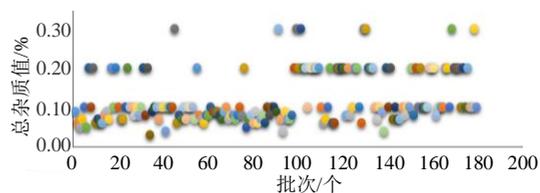


图3 179批次样品有关物质总杂量的散点图

Fig. 3 Scatter plot of total impurity amount of 179 batches

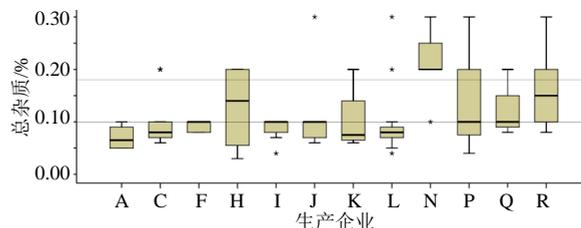


图4 不同企业(抽样数≥5批次)样品总杂量的箱式图

Fig. 4 Box plot of total impurity amount of different company (samples ≥ 5 batches)

3.1.3 含量测定 采用现行标准WS1-XG-020-2001-2014^[6]含量测定方法测定天麻素含量,200批次样品含量在90.4%~106.1%,均值为99.9%,标准差为2.69,偏度为-1.42,呈左偏分布,峰度值为

2.69,为尖顶峰,含量值分布范围集中,含量测定结果的频数分布图见图5,不同企业(抽样数≥5批次)样品含量值的箱式图见图6。由图看出大部分企业的含量较集中,控制较好。

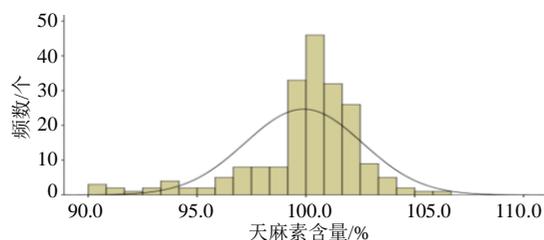


图5 200批次样品天麻素含量的频数分布图

Fig 5 Chart of frequency distribution of gastrodin content of 200 batches

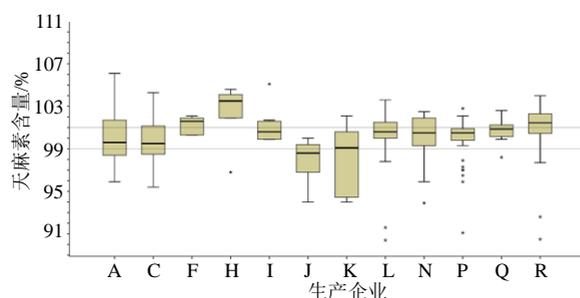


图6 不同企业(抽样数≥5批次)天麻素含量的箱式图

Fig 6 Box plot of gastrodin content of different company (samples ≥5 batches)

3.2 探索性研究结果与分析

3.2.1 有关物质的研究 依据现行标准检验有关物质,天麻素注射液中共检测到3种杂质。结合Q-TRAP LC/MS/MS技术及强制降解试验对检出的3种杂质进行结构鉴定及来源归属:3种杂质为4-醛基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷(杂质1)、对羟基苯甲醇(杂质2)和4-羟甲基苯基-二元糖苷(杂质3);其中杂质1为合成工艺杂质也是氧化降解杂质;杂质2为酸碱降解杂质;杂质3为合成工艺杂质,关于杂质谱的研究已发表于药物分析杂志^[9]。

3.2.2 渗透压摩尔浓度测定 200批样品的渗透压摩尔浓度值在345~673 mOsmol/kg范围内,跨度很大,对不同企业样品的渗透压摩尔浓度值进行统计分析,不同企业样品渗透压摩尔浓度值的箱式图见图7,如图所示,12家企业样品的渗透压值都在345~375 mOsmol/kg范围内,其余6家企业都高于这个范围且各不相同:企业J在380 mOsmol/kg左右,企业G在390 mOsmol/kg左右,企业D在400 mOsmol/kg左右,企业N在420 mOsmol/kg左右,企业B在430 mOsmol/kg左右,企业M高达673

mOsmol/kg,说明了这6家企业处方的复杂性和差异性。6家企业中的企业J、企业D、企业B和企业M的处方中辅料添加较多,在药品说明书中也有相应描述,但是企业G产品的药品说明书中缺少“辅料”这一项,企业N产品的药品说明书中“辅料”描述仅有注射用水,应完善药品说明书。

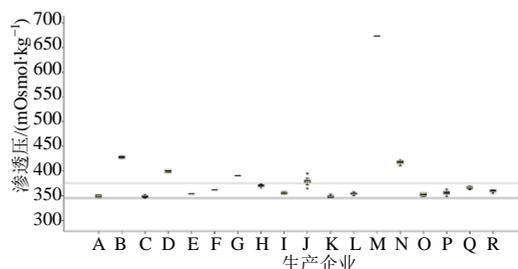


图7 18个企业样品渗透压的箱式图

Fig 7 Box plot of osmotic pressure of 18 companies

3.2.3 EDTA-2Na 筛查 18家生产企业的52批样品(EDTA-2Na的检验详见附件3),有3家企业(15批样品)检出EDTA-2Na,与药品说明书处方标示相符,浓度分别在0.02%、0.006%和0.001%,在常用浓度范围内。

3.2.4 注射剂局部安全性研究

①溶血和凝聚检查 家兔心脏采血40 mL制备红细胞悬液,加药后15、30、45、60、120、180 min观察,18批样品管红细胞全部下沉,上清液无色透明,未见有棕红色或红棕色絮状沉淀,未见溶血和红细胞凝集现象发生,计算溶血率,溶血率均小于5%(一般溶血率>5%判为溶血)。

②异常毒性检查 以昆明种小白鼠为试验对象,注射剂量80 mg/只时,注射完毕后,18批均导致动物出现呼吸急促的症状并有约13%的动物出现行动迟缓症状,1~3 min后恢复正常,72 h内均未出现动物死亡;注射剂量50 mg/只时,注射完毕后,均未出现异常反应,72 h动物均未出现死亡,此剂量远大于人用临床剂量,故临床用药安全。

③肌肉和血管刺激试验肉眼观察:每次给药前、后、末次给药后48 h对动物和注射部位进行肉眼观察,静滴后,兔耳缘静脉清晰,无血管扩张、回缩、血管内无淤血,血管周围组织无水肿等刺激反应,全身其他症状未见异常;肌肉注射末次给药后48 h后纵向解剖肌肉,肉眼观察未见明显充血、红肿、紫斑、流脓等症状,全身其他症状未见异常。病理学检查结果:镜检兔耳组织形态同对照耳,管壁未见附壁血栓,无组织变性或坏死等显著性刺激,无明显病理形态学改变;注射部位横纹肌组织肌纤

维间未见出血、变性、及坏死,未见明显的充血、水肿及炎性细胞浸润,病理图片见图8和9。试验证明无明显肌肉和血管刺激作用。

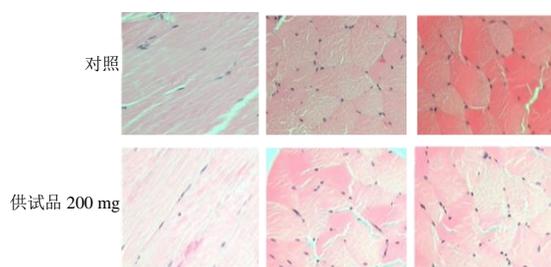


图8 肌肉刺激试验病理图片

Fig. 8 Pathological image of muscle stimulation test

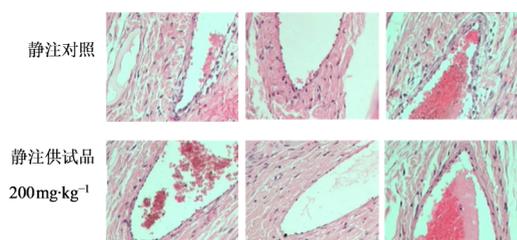


图9 血管刺激试验空白组及样品组的病理图片

Fig. 9 Pathological image of blood vessel stimulation test

4 讨论

本文通过对200批样品的依法定标准检验并结合探索性研究,对天麻素注射液目前的质量状况进行了全方位的评价及分析。按法定标准检验,全部样品结果均符合规定。为进一步评价药品质量,围绕安全性有效性开展了如下探索性研究:因药品的有关物质与其安全性密切相关,开展了有关物质的

探索性研究;因不同企业的处方设计不同,天麻素注射液又为静脉滴注给药制剂,开展了渗透压摩尔浓度和EDTA-2Na添加剂的探索性研究;天麻素注射液有肌肉注射及静脉滴注两种给药方式,因此开展了注射剂局部安全性方面的探索性研究。经探索性研究发现,部分企业药品说明书中缺少“辅料”这一项或“辅料”描述仅有注射用水,建议应完善药品说明书,有关物质、EDTA-2Na筛查及注射剂局部安全性研究结果均符合规定或呈阴性反应。天麻素注射液总体质量状况好。

参考文献

- [1] 金文姗,田德蕃.天麻药理化学研究[J].中药研究与信息,2000,2(6):21.
- [2] 胡一冰,崔佳,韩笑,等.中药天麻研究[J].贵阳中医学院学报,2001,23(4):852.
- [3] 谭来勋,陈秀芳,李金凤.天麻素治疗椎基底动脉供血不足的疗效[J].中华临床医药,2002,3(11):56-57.
- [4] 刘军山,檀战山,崔立波,等.天麻素注射液治疗颈性眩晕的临床观察[J].中国中西医结合急救杂志,2002,9(2):8.
- [5] 国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准.第16册[S].2001:214.
- [6] WS₁-XG-023-2001-2014国家药品标准[S].2014.
- [7] 中国药典[S].一部.2015.
- [8] 李琦,王伟姣,李昌亮.高效液相色谱法测定盐酸多巴酚丁胺注射液中依地酸二钠的含量[J].中南药学,2012,10(7):506.
- [9] 张玉娟,张晓明,常琦,等.天麻素注射液的杂质谱研究[J].药物分析杂志,2017,37(9):1687.