

冠心宁注射液安全性再评价研究 (II)

朱社敏, 康桦, 王丹, 李正, 唐登峰, 匡荣
浙江省食品药品检验所, 浙江 杭州 310004

摘要: 目的 为冠心宁注射液安全性再评价工作提供数据参考。方法 采用不同药物浓度, 按《中国药典》2010年版一部附录方法进行渗透压摩尔浓度测定和溶血与凝聚检查, 同时采用分光光度法对样品及其稀释液进行溶血率的测定; 采用显微镜法对样品及其稀释液进行血细胞凝聚检查。结果 各厂家产品的渗透压摩尔浓度均为高渗, 原液渗透压摩尔浓度 (mOsmol/kg) A厂为400~799, F厂为400~999, B、C、D、E厂为600~1 000, 并可达到1 000以上。用5%葡萄糖注射液对样品稀释后再进行测定, 结果各厂的产品按使用说明书使用时, 基本上都能达到等渗; 溶血与凝聚检查结果71批样品均符合规定; 用分光光度法测定溶血率, 结果各厂家样品原液均有一定的溶血(2批样品因凝聚, 测定值偏低), 除B厂家4批样品外, 各厂家样品最小不溶血浓度均大于1:8, B厂家3批样品的最小不溶血浓度为1:16(相当于常规体外试管法药物浓度), 1批样品的最小不溶血浓度为1:32; 红细胞凝聚检查, 各厂家样品原液检查结果有58批样品未见凝聚, 占总样品数的81.7%, A厂有3批样品凝聚严重, 用5%葡萄糖注射液对样品稀释后, 最小不凝聚浓度大于1:8, D厂家血细胞变形、破损较严重, 镜下可见大量细胞碎片。结论 不同厂家生产的冠心宁注射液渗透压摩尔浓度、溶血率及红细胞凝聚存在一定的差异, 建议用适当的渗透压摩尔浓度及溶血与凝聚检查方法来控制其质量, 以保障临床用药的安全。

关键词: 冠心宁注射液; 安全性再评价; 渗透压摩尔浓度; 溶血与凝聚

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2012)01-0018-04

Re-evaluation on security of Guanxinning Injection (II)

ZHU She-min, KANG Hua, WANG Dan, LI Zheng, TANG Deng-feng, KUANG Rong
Zhejiang Provincial Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China

Abstract: Objective To provide the data for the re-evaluation on security of Guanxinning Injection. **Methods** According to the methods in the appendix of *Chinese Pharmacopoeia 2010*, the determination of osmotic pressure molar concentration (OPMC) and the inspection of hemolysis and cohesion were carried out at different concentration, while the determination of hemolysis rate for samples and their dilution was by spectrophotometry and the red blood cell pool inspection for samples and their dilution was by microscopy. **Results** The OPMC of the samples from different manufacturers were hypertonic and the OPMC of stock solution (mOsmol/kg) were as follows: A manufacture 400-799; B-E manufactures 600-1 000 or over 1 000; F manufacture 400-999. Using 5% glucose injection to dilute the samples, with sodium chloride injection as the reference solution, the isotonic range is 0.9-1.1. In the test for hemolysis and cohesion according to *Chinese Pharmacopoeia 2010*, Seventy-one batches of samples were in line with the provisions; By hemolysis spectrophotometry, the sample stock solution of all the manufacturers had some hemolysis reaction (two batches of samples had low measured values due to cohesion); In addition to four batches of B manufacture, the lowest non-hemolytic concentrations of sample from other manufactures were more than 1:8, but 1:16 was the lowest non-hemolytic concentrations for the three batches of samples from B manufacture, the same as the conventional *in vitro* test tube method, and 1:32 was the minimum non-hemolytic concentration for one batch of sample of B manufacture. In the red blood cell pool inspection, there were 58 batches of samples with no pool, accounting for 81.7% of the total. After dilution of the samples by 5% glucose injection, three samples from A manufacture had serious cohesion with the minimum no cohesion concentration of more than 1:8; The samples from D manufacture could be observed to have deformation, serious damage, and a large number of cell debris by microscope. **Conclusion** There are obvious differences in OPMC, hemolysis, and cohesion among Guanxinning Injections produced by various manufacturers. It suggests that the OPMC, hemolysis, and cohesion could be used to control the quality so as to do some security for the clinic use of Guanxinning Injection.

Key words: Guanxinning Injection; safety re-evaluation; osmotic pressure molar concentration; hemolysis and cohesion

收稿日期: 2011-10-02

作者简介: 朱社敏, 女, 主任药师, 研究方向为药检药理。E-mail: cnczsm@126.com

冠心宁注射液为棕红色的澄明液体,其主要成分为丹参和川芎,部分厂家辅料中含聚山梨酯 80、依地酸二钠、亚硫酸氢钠。结合国家评价性抽验,在对冠心宁注射液进行异常毒性、降压物质及过敏反应评价性研究的同时^[1],本课题组对冠心宁注射液的渗透压摩尔浓度、溶血与凝聚进行了比较测试,希望能为进一步统一提高冠心宁注射液的质量标准提供参考数据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

TDL—80—2B 低速台式离心机(上海安亭科仪公司),GNP—9160 隔水式恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司),TU—1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司),DS—FIL 型生物图像分析及显微镜用数码照相系统(日本尼康),FM—8 全自动冰点渗透压计(上海医科大学仪器厂)。

1.2 试药

冠心宁注射液(厂家 A 10 批,厂家 B 15 批,厂家 C 5 批,厂家 D 13 批,厂家 E 6 批,厂家 F 22 批),氯化钠注射液(浙江康吉尔药业有限公司,批号 0910281,规格 100 mL),5%葡萄糖注射液(安

徽丰原药业股份有限公司,批号 09062596,规格 12.5 g, 250 mL)。

1.3 动物

新西兰家兔,体质量 2.5~3.0 kg,雌雄皆用,普通级。饲养温度 20~23 °C,相对湿度 40%~70%,实验动物使用许可证号 SCXK(浙)2008-0118。余姚市泗门镇建飞实验兔养殖场,生产许可证号 SCXK(浙)2006-0026。

1.4 2%兔血细胞混悬液的配制

取家兔心脏血,放入盛有玻璃珠的三角瓶中振摇,除去纤维蛋白原,使成脱纤血液,用生理盐水洗涤,2 500 r/min 离心 5 min,除去上清液,沉淀的红细胞再用生理盐水同法洗涤 3 次,至上清液不显红色为止。将所得的红细胞按其容积,用生理盐水稀释成 2%的混悬液。

2 方法与结果

2.1 渗透压摩尔浓度测定

样品原液及按 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 稀释的 5%葡萄糖注射液稀释液为供试液,依法(《中国药典》2010 年版一部附录 XI F)检查。氯化钠注射液为等渗参比,以毫渗透压摩尔浓度比值 0.9~1.1 为等渗范围。结果见表 1。

表 1 冠心宁注射液渗透压摩尔浓度测定实验结果

Table 1 Determination of OPMC for Guanxinning Injection

厂家	批数	原液渗透压/(mOsmol·kg ⁻¹)				等渗液最小稀释倍数		
		≥1 000	800~999	600~799	400~599	1:8	1:16	1:32
A	10	0	0	5	5	9	1	0
B	15	8	6	1	0	1	7	7
C	5	2	2	1	0	1	2	2
D	13	1	7	5	0	0	12	1
E	6	2	2	2	0	0	3	3
F	22	0	3	15	4	5	16	1
合计	71	13	20	29	9	16	41	14

2.2 溶血与凝聚检查

2.2.1 常规体外试管法(肉眼观察法) 样品原液为供试品溶液,依法(《中国药典》2010 年版一部附录 XIII H)检查^[2],并按其结果判断标准进行评判。结果各厂家所有批次产品均符合规定。

2.2.2 溶血率测定(分光光度法) 样品原液及按 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 稀释的 5%葡萄糖注射液稀释液为供试品溶液。取供试品溶液 5.0 mL,以纯化水 5.0 mL 为阳性对照、氯化钠注射液 5.0 mL 为阴性对照,加 2%兔血 1.0 mL,置(37±

0.5) °C 放置 1 h,2 500 r/min 离心 5 min,取上清液在 540 nm 波长处测吸光度值。另取供试品溶液,加氯化钠注射液 1.0 mL 混匀,在 540 nm 波长处测吸光度值作做为样品本底值。按以下公式计算样品的溶血率:

$$\text{样品溶血率} = \frac{[(\text{样品吸光度值} - \text{样品本底值} - \text{阴性对照}) / (\text{阳性对照} - \text{阴性对照})] \times 100\%}{}$$

当样品溶血率小于 0 时,溶血率以 0 计,以溶血率小于 5%为无溶血发生,结果见表 2。2 批< 5%的样品,溶血试验时凝聚较严重,试管底部有

表2 冠心宁注射液溶血率测定实验结果(分光光度法)

Table 2 Determination of hemolysis rate for Guanxinning Injection (spectrophotometry)

厂家	批数	原液溶血率%				最大不溶血浓度				
		<5	5~19.9	20~49.9	≥50	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
A	10	1	3	6	0	1	4	4	0	0
B	15	0	8	7	0	4	5	2	3	1
C	5	0	4	1	0	0	3	2	0	0
D	13	0	7	4	2	4	5	4	0	0
E	6	0	5	1	0	2	4	0	0	0
F	22	1	7	14	0	10	9	3	0	0
合计	71	2	34	33	2	21	30	15	3	1

棕色沉淀, 上清液测吸光度值低于本底值。A 厂 1 批样品加血后各浓度上清液吸光度值均低于本底值。无法测出最大不溶血浓度, 所以表格中为 9 批。

2.2.3 血细胞凝聚检查(显微镜法) 样品原液及按 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 稀释的 5% 葡萄糖注射液稀释液为供试品溶液。取供试品溶液 5.0 mL, 加 2% 兔血 1.0 mL, (37±0.5) °C 放置 1 h 后, 轻轻倒转混匀, 取 1 滴于玻片上, 加盖盖玻片, 置 15×40 倍显微镜下观察, DS—FIL 显微镜数码照相系统拍片保存。如果有凝聚, 在盖玻片边缘滴加 2 滴氯化钠注射液进行冲洗后, 再次观察。按表 3 进

行打分, 以冲洗后得分≤1 者为无凝聚。结果见表 4。

表3 血细胞凝聚检查(显微镜法)结果判定标准
Table 3 Determination standards of red blood cells condensed inspection (microscopy)

得分	判定标准
0分	视野中或冲洗后的视野中未见红细胞凝聚, 红细胞呈单个散在状态
1分	冲洗后的视野中有少量红细胞二、三个粘在一起或呈串状
2分	冲洗后的视野中有大量红细胞粘集在一起
3分	冲洗后的视野中红细胞凝聚严重, 即可见到大量的红细胞堆积在一起, 呈片状, 少见单个散在红细胞

表4 冠心宁注射液血细胞凝聚检查测定实验结果(显微镜法)

Table 4 Determination of red blood cells cohesion inspection for Guanxinning Injection (microscopy)

厂家	批数	原液得分情况				最大不凝聚浓度			
		0分	1分	2分	3分	原液	1:2	1:4	1:8
A	10	1	4	2	3	1	5	3	1
B	15	9	1	5	0	9	2	4	0
C	5	4	0	1	0	4	0	1	0
D	13	13	0	0	0	13	0	0	0
E	6	4	2	0	0	4	1	1	0
F	22	15	5	2	0	15	4	2	1
合计	71	46	12	10	3	46	12	11	2

3 讨论

冠心宁注射液是由丹参和川芎经科学方法精制而成的中药复方制剂。除主成分丹参酮Ⅱ_A和川芎嗪外, 还含有隐丹参酮、丹参酮Ⅰ、丹参酚酸类和川芎酚酸酯类物质等^[3]。其不良反应主要有休克、心动过速、呼吸道梗阻、严重呼吸困难等, 临床上多将其发生的原因归结为过敏反应^[4-6], 但真正的原因尚

不明确。样品摩尔渗透压浓度偏高、样品溶血及可能引起红细胞凝聚都有可能引起上述不良反应。

由表 1 数据可知, 各厂家生产的冠心宁注射液均为高渗液, 其中 A 厂生产的冠心宁注射液原液渗透压均在 400~799 mOsmol/kg, B 生产的冠心宁注射液原液渗透压相对较高, 基本在 800 mOsmol/kg 以上。本品临床用药方法为肌肉注射,

一次 2 mL, 一日 1~2 次; 静脉滴注, 一次 10~20 mL, 用 5% 葡萄糖注射液 500 mL 稀释后使用, 一日 1 次。临床静脉滴注使用稀释倍数约为 25~50 倍, 在临床使用时如果能严格按说明书给药方法使用, 基本可保证输注液与血液等渗, 否则, 有些样品在使用时应注意输注液的高渗透压性。

由表 2 实验结果表明, 按《中国药典》2010 年版一部附录 XIII H “溶血与凝聚检查法” 即常规体外试管法 (肉眼观察法) 进行检查, 样品虽然有血细胞下沉、变棕色等现象, 但上部液体颜色均不深于样品对照管, 振摇观察, 下沉细胞均能分散, 检查结果各厂家 71 批样品均符合规定。

采用溶血率测定法进行测定, 结果各厂家样品原液均有一定的溶血 (2 批样品因凝聚, 测定值偏低), 除 B 厂 4 批样品外, 各厂家样品最大不溶血浓度均小于 1:8, B 厂有 3 批样品的最大不溶血浓度为 1:16, 1 批为 1:32, 与常规体外试管法 (药物浓度相当于 1:16) 实验结果基本一致。2 批样品原液因为凝聚严重, 加血后随着血细胞下沉样品颜色反而变浅。稀释后 1 批恢复正常, 1 批在 1:32 稀释时溶液的吸收值仍略小于样品本底值。

样品原液红细胞凝聚检查时, D 厂血红细胞变形、破损较严重, 镜下可见大量细胞碎片。各厂家 71 批样品原液中有 46 批未见凝聚, 占总数 64.8%; 得分 ≤ 1 分的样品共有 58 批, 占总数 81.7%; 各厂家样品最大不凝聚浓度均小于 1:8, 与常规体外试管法 (药物浓度相当于 1:16) 实验结果一致。

冠心宁注射液全国共有 9 个批准文号, 7 家生产企业可以生产, 产地覆盖浙江、山西、河北等省, 由于药材产地、采收季节、处方组成、生产工艺等不同, 导致不同厂家生产的产品和同一厂家生产的不同批次的产品的质量可能不完全相同, 仅外观颜色就从棕黄色到棕褐色明显不同。进行渗透压摩尔浓度比测定、溶血试验及红细胞凝聚试验检查, 可以加强对药品质量的控制, 增加临床用药的安全性。综合考虑产品的生产工艺与临床使用情况, 建议在质量标准中增加按临床使用情况对样品稀释后的渗透压摩尔浓度比、溶血试验及红细胞凝聚试验检查。即将样品按 1:16 稀释后依法测定渗透压摩尔浓度比应为 0.9~1.1; 溶血率应小于 5%, 红细胞凝聚试验检查应无凝聚。

参考文献

- [1] 朱社敏, 王丹, 李正, 等. 冠心宁注射液安全性再评价研究 (I) [J]. 药物评价研究, 2011, 34(4): 258-261.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 张雪, 褚文静, 刘伟娜, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测法测定冠心宁注射液中丹参素、原儿茶醛酸、阿魏酸、迷迭香酸和丹酚酸 B [J]. 中草药, 2010, 41(2): 234-236.
- [4] 王志文, 陶礼, 胡小燕. 冠心宁注射液致严重不良反应 1 例报告 [J]. 时珍国医国药, 2004, 15(8): 542.
- [5] 王辉. 冠心宁注射液致不良反应一例 [J]. 华北国防医药, 2006, 18(4): 237.
- [6] 曹少军. 冠心宁注射液不良反应 2 例分析 [J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(19): 4771-4772.