

舒洛地特原料药安全性检查法研究

张娟,魏霞,李水仙,祝清芬[△]

(山东省食品药品检验研究院,山东 济南 250101)

摘要:目的 探讨舒洛地特原料药的安全性。方法 按2015年版《中国药典(四部)》通则方法及要求,对舒洛地特原料药过敏反应、降压物质和异常毒性检查法进行研究。结果 舒洛地特原料药的过敏反应检查限值为500 LSU/kg,降压物质检查限值为50 LSU/kg,异常毒性检查限值为2 000 LSU/kg。结论 该研究为制订舒洛地特质量标准提供了依据。

关键词:舒洛地特;原料药;过敏反应;降压物质;异常毒性;安全性检查

中图分类号:R965.3;R972

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)14-0022-04

Safety Test of Active Pharmaceutical Ingredients of Sulodexide

ZHANG Juan, WEI Xia, LI Shuixian, ZHU Qingfen

(Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan, Shandong, China 250101)

Abstract: **Objective** To investigate the safety of active pharmaceutical ingredients (API) of sulodexide. **Methods** According to the requirements and methods of the general rule in the *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition, volume IV), allergic response test, depressor substances test, and the abnormal toxicity test of API of sulodexide were studied. **Results** The limit value of allergic response test was 500 LSU/kg and the limit value of depressor substances test was 50 LSU/kg, the limit value of abnormal toxicity test was 2 000 LSU/kg. **Conclusion** This study can provide a basis for the formulation of the quality standard of sulodexide.

Key words: sulodexide; active pharmaceutical ingredients; allergic response; depressor substances; abnormal toxicity; safety test

舒洛地特有抗血栓、降低血黏度、调血脂、减少血小板聚集、保护肾脏等作用,属多组分生化药物,有多种生物活性,用于治疗有血栓形成危险的血管性疾病及糖尿病肾病。为保证其用药安全性,提高药品质量,应做好原料药的安全性检查,但现行的2015年版《中国药典》及局颁标准均未收载舒洛地特。本研究中对舒洛地特的过敏反应、降压物质和异常毒性检查方法学进行探讨,确定限值,为制订其质量标准提供依据。现报道如下。

1 动物、仪器与试药

1.1 动物

ICR小鼠75只,SPF级,体质量18~22 g,雌雄各半,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物生产许可证号为SCXK(鲁)20140007;Hartley豚鼠42只,普通级,体质量250~350 g,雌雄各半,购自济南金丰实验动物有限公司,动物生产许可证号为SCXK(鲁)20140006;猫1只,体质量3.5 kg,雄性,购自市场。饲养条件:小鼠

第一作者:张娟,女,主管药师,主要从事药物安全性评价工作,(电话)0531-81216519(电子信箱)zhangjuan1357@163.com。

[△]通信作者:祝清芬,男,主任药师,主要从事药物安全性评价工作,(电话)0531-81216599(电子信箱)zhuqingfen73@163.com。

- [2] RETTIE AE, KORZEKWA KR, KUNZE KL, et al. Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-4502C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions[J]. *Chem Res Toxicol*, 1992, 5(1): 54-59.
- [3] RETTIE AE, TAI G. The pharmacogenomics of warfarin: closing in on personalized medicine[J]. *Molecular Interventions*, 2006, 6(4): 223-227.
- [4] MILLER GP, JONES DR, SULLIVAN SZ, et al. Assessing cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase contributions to warfarin metabolism in humans[J]. *Chem Res Toxicol*, 2009, 22(7): 1239-1245.
- [5] YASAR U, ELIASSON E, DAHL ML, et al. Validation of methods for CYP2C9 genotyping: frequencies of mutant alleles in a Swedish population[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 254(3): 628-631.
- [6] HIGASHI MK, VEENSTRA DL, KONDO LM, et al. Association

between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy[J]. *JAMA*, 2002, 287(13): 1690-1698.

- [7] SULLIVAN - KLOSE TH, GHANAYEM BI, BELL DA, et al. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism[J]. *Pharmacogenetics*, 1996, 6(4): 341-349.
- [8] HAINING RL, HUNTER AP, VERONESE ME, et al. Allelic variants of human cytochrome P450 2C9: baculovirus-mediated expression, purification, structural characterization, substrate stereoselectivity, and prochiral selectivity of the wild-type and I359L mutant forms[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 333(2): 447-458.
- [9] TAKAHASHI H, ECHIZEN H. Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2001, 40(8): 587-603.

(收稿日期:2018-11-30)

饲养于屏障级动物实验室,豚鼠和猫饲养于普通级动物实验室,使用许可证号均为SYXK(鲁)20130012。温度20~25℃,日温差≤3℃;相对湿度40%~70%;每1h换气次数不少于10次;照明12h,明暗交替。经动物伦理委员会同意后开始试验。

1.2 仪器

BL-420E型生物机能实验系统(成都泰盟科技公司,量程为 $\pm 0.5\text{ V} \sim \pm 20\text{ }\mu\text{V}$);BSA4202S型电子天平(检测精度为0.06 mg),CP225D型电子天平(检测精度为0.01 mg),均购自德国Sartorius公司。

1.3 试药

舒洛地特(国内某公司。样品A,批号为DYH-SLDT20150501,含量为12 LSU/mg,干燥失重1.6%;样品B,批号为DYH-SLDT20150502,含量为12 LSU/mg,干燥失重2.7%;样品C,批号为DYH-SLDT20150503,含量为13 LSU/mg,干燥失重1.0%);氯化钠注射液(山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司,批号为16030202,规格为每支10 mL:90 mg);苯巴比妥钠注射液(广东邦民制药有限公司,批号为130535,规格为每支100 mg);戊巴比妥钠(山东西亚化学工业有限公司,批号为05636);肝素钠(东营天东制药有限公司,批号为KH2-1704009,纯度为98%);磷酸组胺(中国食品药品检定研究院,批号为150510-201313,规格为每支20 mg)。

2 方法与结果

2.1 过敏反应检查

限值确定:取豚鼠24只,随机分为6组,每组4只,雌雄各半,取样品C,将其分别配成1 200, 600, 300 LSU/mL浓度的供试品溶液,分别腹腔注射和静脉注射,给药体积均为1 mL,连续观察7 d。按每只豚鼠体重300 g计(下同),剂量分别为4 000, 2 000, 1 000 LSU/kg,相当于普通成人(60 kg,下同)1 d最大剂量的400倍、200倍和100倍。结果,4 000 LSU/kg剂量组豚鼠腹腔注射药物后出现挠鼻、步态不稳等现象,注射1 d后症状消失,其他各组豚鼠均未出现明显毒性反应,提示豚鼠腹腔注射和静脉注射舒洛地特的无毒性反应剂量均不超过2 000 LSU/kg。根据致敏和激发剂量应小于豚鼠该途径的急性毒性反应剂量,激发剂量应大于致敏剂量的指导原则^{[1]402},本品过敏反应检查时采用临床拟用浓度300 LSU/mL的供试品溶液进行致敏和激发。即设定致敏剂量为500 LSU/kg,激发剂量为1 000 LSU/kg。

供试品检查:取豚鼠18只,雌雄各半,按体重随机分为3组,分别对3批样品进行过敏反应检查(以300 LSU/mL供试品溶液作为致敏液和激发液),各组豚鼠分别隔日腹腔注射相应致敏液0.5 mL,连续注射3次。第1次腹腔注射后14 d每组取3只豚鼠,分别于小隐

静脉注射相应激发液1 mL;第1次腹腔注射后21 d,每组取剩余3只豚鼠,分别于小隐静脉注射相应激发液1 mL。观察给药后30 min内产生的反应。依据2015年版《中国药典(四部)》通则1147“过敏反应检查法”判断结果。结果,豚鼠均未出现竖毛、发抖、干呕、连续喷嚏(或咳嗽)3声、紫癜和呼吸困难等现象,也未出现二便失禁、步态不稳或倒地、抽搐、休克、死亡现象^{[1]159[2]428-429},均为阴性。

2.2 降压物质检查^[3-4]

猫的灵敏度检查方法:猫麻醉后固定于保温手术台上,分离气管并插管使呼吸通畅,分离一侧颈动脉,插入充满抗凝剂(1 000 U/mL的肝素钠溶液)的动脉插管,插管另一端通过生理压力传感器与生物机能试验系统相连,记录动物血压。分离一侧股静脉,插入通过软管与可定量加液器相连的静脉插管,用于注射药物、组胺并补充氯化钠注射液^{[2]335-336}。按2015年版《中国药典(四部)》通则1145“降压物质检查法”,首先检查动物灵敏度,结果符合规定。详见表1。

表1 猫灵敏度检查结果

剂量($\mu\text{g/kg}$)	血压下降值(kPa)		
	1	2	$\bar{X}$
0.05	2.28	2.30	2.29
0.10	3.74	4.06	3.90
0.15	4.87	4.35	4.61

限值确定:取样品C,加氯化钠注射液溶解稀释,制成浓度为250 LSU/mL的供试品溶液。按2015年版《中国药典(四部)》通则1145“降压物质检查法”试验,注射剂量(d_r)50 LSU/kg,各次注射速率基本相同。分别记录给药前后的血压值,重复3次,计算药物引起血压下降的反应值。结果,50 LSU/kg剂量下动物血压轻微下降(分别下降0.70, 0.05, 0.66 kPa,平均0.47 kPa)。根据2015年版《中国药典(四部)》通则9301“注射剂安全性检查法应用指导原则”^{[1]401},一般以临床最大单次用药剂量的0.2~5.0倍作为降压反应物质检查剂量限值,急重病症尽量采用高限值。考虑到本品临床最大单次用药剂量为每天1支(2 mL:600 LSU),肌肉注射或静脉注射,连用15~20 d。临床最大单次用药剂量的5倍,即为 $5 \times (1 \times 600/60) \text{ LSU/kg} = 50 \text{ LSU/kg}$,因此选用50 LSU/kg的剂量作为检查限值。

供试品检查:分别将3批样品用氯化钠注射液稀释成浓度为250 LSU/mL的供试品溶液, d_r 为50 LSU/kg,磷酸组胺标准品注射剂量(d_s)为0.1 $\mu\text{g/kg}$,以 d_s , d_r , d_r , d_s 4个剂量为1组依次注射,记录反应值。然后以第1(d_{s1})与第3(d_{r2})、第2(d_{r1})与第4(d_{s2})剂量所致反应值分别比较,如 d_r 所致反应值均不大于 d_s 所致反应值的50%,即认为供试品的降压物质检查符合规定;否

则按上述次序继续注射1组4个剂量(分别用 d_{s1}' , d_{t1}' , d_{t2}' , d_{s2}' 表示),并按相同方法分别比较两组内各对 d_s 、 d_t 剂量所致反应值;如 d_t 所致反应值均不大于 d_s 所致反应值,即认为供试品的降压物质检查符合规定^{[1]158[2]336-337}。结果3批舒洛地特的降压物质检查均符合规定。详见表2。

表2 舒洛地特降压物质检查结果

样品	血压下降值(kPa)							
	d_{s1}	d_{t1}	d_{t2}	d_{s2}	d_{s1}'	d_{t1}'	d_{t2}'	d_{s2}'
A	4.00	0.52	0.84	4.10	-	-	-	-
B	4.37	0.34	0.23	3.83	-	-	-	-
C	4.35	0.91	0.13	4.67	-	-	-	-

2.3 异常毒性检查

半数致死量(LD_{50})试验^[5-7]:取小鼠60只,随机分为6组,每组10只,雌雄各半。取样品适量,加氯化钠注射液配制成浓度为2431 LSU/mL的供试品溶液,并按等比级数0.7稀释成1701.7,1191.2,833.8,583.7,408.6 LSU/mL的系列浓度,分别尾静脉注射供试品溶液(样品批号为DYH-SLDT20150503)48 620, 34 034, 23 844, 16 676, 11 674, 8 172 LSU/kg,注射剂量为20 mL/kg,注射速率为0.1 mL/s。观察给药后72 h内小鼠死亡情况及出现的反应,结果见表3。Bliss法计算72 h内 LD_{50} 。动物死亡数、 LD_{50} 和 LD_{50} 可信限结果见表4。回归方程 $Y(\text{Probit}) = -11.105 + 3.734 \log(D)$, $LD_{50} = 20\ 534 \text{ LSU/kg}$, LD_{50} (Feiller校正)95%可信限为15 957 ~ 26 580 LSU/kg。

表3 舒洛地特小鼠急性毒性试验结果($n=10$)

剂量(LSU/kg)	浓度(LSU/mL)	体质量($\bar{X} \pm s$, g)	死亡数(只)
48 620	2 431.0	21.24 ± 0.51	10
34 034	1 701.7	20.78 ± 0.87	7
23 844	1 191.2	20.75 ± 1.03	6
16 676	833.8	20.78 ± 0.84	3
11 674	583.7	20.91 ± 0.77	2
8 172	408.6	20.75 ± 0.97	1

注:观察72 h。

表4 Bliss法计算舒洛地特 LD_{50} 结果($n=10$)

剂量(LSU/kg)	对数剂量[$\log(D)$]	死亡数(只)	死亡百分率(%)	试验概率单位(Y_1)	回归概率单位(Y)
48 620	4.686 8	10	100.00		6.398 0
34 034	4.531 9	7	70.00	5.524 0	5.819 5
23 844	4.377 4	6	60.00	5.252 9	5.242 4
16 676	4.222 1	3	30.00	4.476 0	4.662 5
11 674	4.067 2	2	20.00	4.158 5	4.084 1
8 172	3.912 3	1	10.00	3.718 3	3.505 7

限值确定:根据2015年版《中国药典(四部)》通则9301“注射剂安全性检查法应用指导原则”^{[1]401},如难以计算出最低致死量,可采用小于 LD_{50} 可信限下限的1/4

(建议采用1/8~1/4)。如 LD_{50} 与临床体质量剂量之比小于20,可采用 LD_{50} 可信限下限的1/4或 LD_1 可信限下限的1/3。舒洛地特临床体质量最大剂量为10 LSU/kg,其 LD_{50} 与临床体质量剂量之比为2 053.4倍(大于20)。异常毒性检查限值可采用小于 LD_{50} 可信限下限的1/8~1/4,即1994.6~3989.2 LSU/kg。异常毒性限值采用 LD_{50} 可信限下限的1/8,即1994.6 LSU/kg($\approx 2\ 000 \text{ LSU/kg}$)。为保证用药安全,限值可适当严格,拟确定舒洛地特异常毒性检查时采用80 LSU/mL的供试品溶液,每只小鼠静脉注射给药0.5 mL,小鼠体质量按20 g计算,剂量相当于2 000 LSU/kg。

供试品检查:取3批供试品,分别用氯化钠注射液配制成80 LSU/mL的供试品溶液,根据2015年版《中国药典(四部)》通则1141,每批供试品取小鼠5只,每只小鼠尾静脉注射供试品溶液0.5 mL,4~5 s内匀速注射完毕。给药后48 h内,3组小鼠均未见死亡,表明3批舒洛地特均符合规定^{[1]153[2]305-306}。

3 讨论

舒洛地特作为抗血栓药治疗各种心血管疾病,在国外应用已超过20年^[8]。其生产工艺过程中有可能污染组胺、类组胺样降压物质、异源蛋白、未知过敏反应物质及毒性杂质,且缺乏有效的理化分析方法加以判断,影响药物的疗效及安全性。

过敏反应和急性毒性试验均显示舒洛地特有一定毒性,豚鼠的毒性症状主要表现为挠鼻、步态不稳等现象,小鼠的毒性症状主要表现为呼吸急促、步态不稳、跳跃、抽搐等,异常毒性设定限值时发现,采用 LD_{50} 可信限下限的1/4进行供试品异常毒性检查时,仍有小鼠死亡,临床用药有可能产生过敏及急性不良反应的风险。但由于其制剂在临床使用的浓度远低于产生毒性的浓度,设定的过敏反应和异常毒性的限值可保证其临床用药安全。目前,欧美等发达国家的医药企业正逐步取消异常毒性检查项,但我国医药企业的生产工艺水平参差不齐,若原料质量及工艺控制出现问题,则均会导致杂质掺入^[9-10],毒性反应不能忽视,异常毒性检查仍有必要设立,以控制毒性杂质含量^[11]。建议生产厂家加强对产品的质量控制和改进生产工艺^[12]。

通过建立舒洛地特原料药过敏反应、降压物质、异常毒性检查法,可控制由于原料药质量问题在临床使用中引起的毒性反应、过敏反应和降压反应等严重不良反应的发生,药品安全性检查法控制药品质量的同时,还可结合临床使用,但应注意监测凝血指标。舒洛地特服药后可能会出现发热反应,建议进一步对其热原进行检查,为临床用药的安全性提供保障。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: