

# 维生素 K1 注射液安全性评价实验的探讨\*

范能全<sup>1</sup>, 张 璞<sup>1</sup>, 杨 柳<sup>1</sup>, 詹宇杰<sup>1</sup>, 彭 兰<sup>2</sup>

(1. 重庆市食品药品检验所, 重庆 401121; 2. 重庆医药高等专科学校, 重庆 401331)

**摘要:** 本文旨在研究药物的过敏物质检测方法, 为药品的安全性评价提供参考。通过对白色豚鼠(*Cavia porcellus*)主动全身过敏实验、被动皮肤过敏实验、RBL-2H3 细胞脱颗粒实验、 $\beta$ -氨基己糖苷酶释放率实验和 L929 细胞毒性实验考察不同厂家维生素 K1 注射液的产品质量。结果发现, 供试的 10 个厂家的产品质量存在明显差异。研究认为细胞实验作为一种快捷有效的过敏物质检测手段, 可用于药品的质量评价。

**关键词:** 维生素 K1 注射液; 安全性评价; 过敏反应; 细胞实验

**中图分类号:** Q2-33; R977.2<sup>+</sup>6; R965.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-6693(2014)01-0099-03

维生素 K1 注射液作为国家基本药物目录品种, 主要用于各种维生素 K 缺乏引起的出血性疾病的治疗。根据国家食品药品监督管理局(SFDA)发布的第 43 期药品不良反应信息通报显示, 2004 年 1 月 1 日至 2011 年 5 月 31 日, 国家药品不良反应监测中心病例报告数据库中维生素 K1 注射液严重不良反应事件报告 893 例, 其中过敏性休克 328 例(占 36.7%), 严重过敏反应是其中最突出的不良反应<sup>[1]</sup>。鉴于上述背景, 笔者通过动物实验、细胞实验等药物过敏物质检测手段, 重点考察不同厂家维生素 K1 注射液的产品质量, 以便为该药品的安全性评价提供参考。

## 1 实验材料和实验动物

### 1.1 材料和样品

100  $\mu$ g/mL C48/80、10%胎牛血清 1640 培养液、CCK-8、DMSO; 0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液; DMEM 培养基、胰蛋白酶-EDTA 消化液、PBS、MTT 细胞毒性检测试剂盒; MILLEX-GP 0.22  $\mu$ m 过滤器; L929(小鼠成纤维细胞); RBL-2H3(大鼠嗜碱性细胞白血病细胞); 牛血清白蛋白;  $\beta$ -氨基己糖苷酶。供试维生素 K1 注射液样品来自 10 个厂家, 研究中分别以 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J 表示。

### 1.2 实验动物

白色豚鼠(*Cavia porcellus*), 健康合格, 雌雄各半, 体重范围 250~350 g, 取自重庆医科大学实验动物中心; 实验动物生产许可证号为[SCXK(渝)2012-0001], 实验动物使用许可证为[SYXK(渝)2011-0002]。

## 2 方法及结果

### 2.1 主动全身过敏实验<sup>[2]</sup>

每批样品取 6 只豚鼠, 隔日腹腔注射样品溶液 0.5 mL, 共 3 次, 然后分为 2 组, 分别在首次注射后第 14 d 和第 21 d 静脉注射样品溶液 1 mL, 激发后 30 min 内进行观察。结果显示 10 个厂家的维生素 K1 注射液均未出现过敏反应。

### 2.2 被动皮肤过敏实验<sup>[3-4]</sup>

将豚鼠分为样品组、阳性对照组(0.5%牛血清白蛋白)、阴性对照组(0.9%氯化钠注射液), 于第 1、3、5 d 腹腔注射 0.5 mL, 末次致敏后 12 d 心脏采血, 2 000 r/min 离心 10 min 分离血清, 配制成 2、4、8、16 和 32 倍稀释液, 分别皮内注射 0.1 mL。48 h 后静脉注射上述 3 种溶液和 0.5%伊文思兰染料的等体积混合液 1 mL, 注射后 30 min 测量皮肤内侧的蓝色反应斑直径。样品组与阴性对照组均呈阴性, 阳性对照组出现大于 5 mm 的明显蓝斑, 呈阳性反应。结果表明 10 个厂家的维生素 K1 注射液均未出现过敏反应。

\* 收稿日期: 2013-01-15 网络出版时间: 2014-01-16 08:16

作者简介: 范能全, 男, 高级工程师, 研究方向为药品分析与新药药理, E-mail: fannqccq@163.com; 通讯作者: 彭兰, E-mail: pl2007pl@163.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20140116.0816.017.html>

### 2.3 RBL-2H3 细胞脱颗粒实验<sup>[5-6]</sup>

取对数生长期的 RBL-2H3 细胞,用 10% 胎牛血清 1640 培养液配成细胞悬液,每孔  $5 \times 10^4$  个。待细胞贴壁后分别加入空白对照组(1640 培养液)、阳性对照组(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  C48/80)和供试品 IC50 组各 30  $\mu\text{L}$ ,每组 3 个复孔。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 1 h 后,加入 0.5% 中性红染液 0.4 mL,染色 3 min,对细胞的脱颗粒数量进行计数,计算脱颗粒率。具体公式为“脱颗粒率 = [脱颗粒的细胞数 / (脱颗粒的细胞数 + 未脱颗粒细胞数)]  $\times 100\%$ ”。结果如表 1 所示。

### 2.4 RBL-2H3 细胞 $\beta$ -氨基己糖苷酶释放率实验<sup>[7]</sup>

取细胞密度为  $2 \times 10^5$  个/mL RBL-2H3 细胞悬液接种 24 孔板,每孔 500  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养过夜。待细胞贴壁后分别加入阴性对照组(0.9% 氯化钠注射液)、阳性对照组(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  C48/80)、裂解组(0.1% Triton X-100 250  $\mu\text{L}$ )、供试品 IC50 组各 50  $\mu\text{L}$ ,每组 3 个复孔,继续培养 1 h 后置于冰袋 10 min 终止反应;1 500 r/min 离心 5 min,吸取上清细胞培养液 60  $\mu\text{L}$  转至 96 孔板,加入 60  $\mu\text{L}$  底物溶液(0.5 mmol/mL  $\beta$ -氨基己糖苷酶,0.1 mol/mL 柠檬酸钠,pH 值为 4.5),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h,加入终止液 150  $\mu\text{L}$ ,405 nm 测定吸光值 A,计算释放率。具体公式为“ $\beta$ -氨基己糖苷酶释放率 =  $(A_{\text{样品组}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{裂解组}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ ”。结果如表 1 所示。

### 2.5 L929 细胞毒性实验<sup>[8]</sup>

取细胞密度为  $1 \times 10^4$  个/mL 的 L929 细胞悬液接种于 96 孔板,分别加入阴性对照组(0.9% 氯化钠注射液)、阳性对照组(10% DMSO)、样品组(10% 样品溶液)100  $\mu\text{L}$ ,设 6 个复孔,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 72 h,按 MTT 法检测,550 nm 测定吸光值 A,计算相对增值率(RGR),公式为“ $RGR = A/A_{\text{空白}} \times 100\%$ ”。另设吐温 80 的不同浓度实验组,同法操作。结果如表 1、表 2 所示。

### 2.6 3 种细胞实验方法的相关性分析

通过 SPSS 17.0 统计软件对 3 种细胞实验方法的相关性分析结果如表 3 所示。

表 3 3 种细胞实验方法的相关性分析

	RBL-2H3 细胞脱颗粒实验	L929 细胞毒性实验	RBL-2H3 细胞 $\beta$ -氨基己糖苷酶释放率实验
SD	4.393 5	12.199 1	3.873 0
CV/%	13.77	13.29	12.32
相关性分析	脱颗粒率 = $7.191 7 + 0.759 9 \times \text{细胞毒性}$ ( $R^2 = 0.862, p < 0.05$ ) *		
	释放率 = $55.057 - 0.257 3 \times \text{细胞毒性}$ ( $R^2 = 0.810, p < 0.05$ ) * *		

注:上述实验样本量为  $n = 10$ ; \* 可解释 86% 的数据变化; \* \* 可解释 81% 的数据变化。

## 3 结论

吐温 80 属于亲水型非离子表面活性剂,常作为增溶剂、乳化剂和稳定剂广泛地应用于注射剂型的生产。但该物质具有一定的细胞毒性,会直接刺激肥大细胞或嗜碱性粒细胞脱颗粒,引发类过敏反应<sup>[7]</sup>。RBL-2H3 细胞具有肥大细胞的生物学特性,当受到抗原或非抗原刺激时,可释放含有组胺、 $\beta$ -氨基己糖苷酶等物质,可作为细胞模型用于类过敏反应的研究<sup>[9]</sup>。本研究中动物实验结果显示不会引发过敏,但细胞实验结果显示会导致过敏。笔者推测这应与所选择的模型动物敏感性不够有关。然而,该结果同时也提示药品如果发生过敏反应时应从多方面寻找原因,找到问题根源所在,从而有利于生产工艺的改进。10 个厂家的维生素 K1 注射液均含有吐温 80,与空白对照组相比有明显差异,这一因素可能是引起临床应用中过敏等不良反应较多的重要原因。因此,建议生产厂家重视吐温 80 的进货来源、批间差异检测、生产工艺考察以及质量稳定性考察,将临床应用中吐温 80 造成的不良影响降到最低限度。

通过 SPSS 17.0 统计软件对 3 种细胞实验方法的相关性进行分析,结果表明 3 种检测手段均显著相关( $p < 0.05$ ):L929 细胞毒性实验与 RBL-2H3 细胞  $\beta$ -氨基己糖苷酶释放率实验显著负相关( $p < 0.05$ ),与 RBL-2H3 细胞脱颗粒实验显著正相关( $p < 0.05$ )。这表明上述 3 种检测方法结论可靠,结果相互验证,检验方法可相互替

表 1 10 个厂家维生素 K1 注射液的细胞实验结果 %

生产厂家代号	脱颗粒率	释放率	相对增值率
A	34.9	31.2	90.5
B	24.2	26.9	104.0
C	25.8	28.5	98.7
D	32.5	30.4	101.4
E	32.2	33.2	70.1
F	35.1	34.5	92.1
G	38.1	39.1	71.0
H	32.6	30.9	97.3
I	28.8	26.1	102.4
J	34.9	33.6	90.3

表 2 不同体积百分比的吐温 80 对 L929 细胞毒性影响

RGR/%	吐温 80 的体积百分比/%				
	0.2	0.1	0.05	0.025	0.01
	19.04	23.35	35.56	62.86	93.03

代,并从不同方面保证了检测结果的准确性和有效性。因此,细胞实验作为一种快捷有效的过敏物质检测手段,可用于药品的质量评价。

### 参考文献:

- [1] 国家食品药品监督管理局. 药品不良反应信息通报(第43期) 警惕维生素 K1 注射液的严重过敏反应[EB/OL]. (2011-12-26) [2013-01-15]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0078/67960.html>.  
State Food and Drug Administration. Adverse drug reaction information bulletin(43). Severe allergic reaction vigilance injection of vitamin K1 [EB/OL]. (2011-12-26) [2013-01-15]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0078/67960.html>.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社,2010.  
Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China[M]. 2010 ed. Beijing:China Medical Science Press,2010.
- [3] 罗霞,王青,周联,等. 几种常见中药注射剂对 RBL-2H3 细胞脱颗粒的影响[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(6):506-510.  
Luo X, Wang Q, Zhou L, et al. Effect of several traditional Chinese medicine injections on degranulation in RBL-2H3 cells[J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2009, 20(6): 506-510.
- [4] 李佳,金晶,关翠雯,等. 聚山梨酯 80 刺激肥大细胞 RBL-2H3 脱颗粒作用的评价[J]. 药物评价研究,2010,33(5):379-383.  
Li J, Jin J, Guan C W, et al. Study of degranulation in mast cell RBL-2H3 induced by Tween 80 [J]. Drug Evaluation Research, 2010, 33(5): 379-383.
- [5] 郭薇,陈玉川,刘水平,等. RBL-2H3 细胞诊断过敏性休克的可行性初探[J]. 中国免疫学杂志,2002,18(9):611-613.  
Guo W, Chen Y C, Liu S P, et al. Study of diagnose guinea pigs anaphylaxis shock with RBL-2H3 cells [J]. Chinese Journal of Immunology, 2002, 18(9): 611-613.
- [6] 李佳,黄芝瑛. 注射用辅料类过敏反应的非临床评价方法[J]. 药物评价研究,2010,33(1):9-12.  
Li J, Huang Z Y. Non-clinical evaluation on pseudoallergy induced by injective excipient [J]. Drug Evaluation Research, 2010, 33(1): 9-12.
- [7] 张嘉,李澎,李贻奎,等. 吐温 80 诱导 RBL-2H3 细胞脱颗粒作用研究[J]. 现代免疫学,2009,29(3):240-245.  
Zhang J, Li P, Li Y K, et al. Effect on Tween 80 on the degranulation of RBL-2H3 cells [J]. Current Immunology, 2009, 29(3): 240-245.
- [8] 郭玉,杨清敏,王晶翼,等. 聚山梨酯-80 致 RBL-2H3 肥大细胞脱颗粒的研究[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(19):1676-1679.  
Guo Y, Yang Q M, Wang J Y, et al. Study on RBL-2H3 mast cell degranulation caused by tween-80 [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2008, 28(19): 1676-1679.
- [9] 张美玉,李贻奎,张嘉,等. 鱼腥草注射液过敏及类过敏实验研究[J]. 中国现代应用药学杂志,2009,29(8):610-614.  
Zhang M Y, Li Y K, Zhang J, et al. Experimental study on anaphylactic and anaphylactoid reactions of Houlttuynia cordata injections [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2009, 29(8): 610-614.

## Study of the Safety Evaluation Test for Vitamin K1 Injection

FAN Neng-quan<sup>1</sup>, ZHANG Pu<sup>1</sup>, YANG Liu<sup>1</sup>, ZHAN Yu-jie<sup>1</sup>, PENG Lan<sup>2</sup>

(1. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121;

2. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China)

**Abstract:** This study was designed to obtain new methods of sensibilisin detection and to supply some references to judge the safety of medicines. The active whole body allergy test, the negative skin allergy test, the RBL-2H3 cell degranulation test, the  $\beta$ -hexosaminidase release rate test, and the L-929 cytotoxicity test on white Guinea pigs (*Cavia porcellus*) were used to judge quality of the vitamin K1 injections produced by different manufacturers. The results showed that the production quality was significantly different among the productions from the ten manufacturers. This research suggests that the cell test is an easy effective method for sensibilisin detection and could be used to judge the quality of medicines.

**Key words:** vitamin K1 injection; safety judge; anaphylactic reaction; cell test