

ICS **.***.**
C**



团体标准

T/CACM *****—20**

静脉用中药注射剂类过敏反应检测技术规范

TECHNICAL SPECIFICATION FOR THE DETECTION OF PSEUDO-ALLERGIC REACTIONS

INDUCED BY TRADITIONAL CHINESE MEDICINE INJECTIONS

(文件类型：公示稿)

202x-xx-xx 发布

202X-xx-xx 实施

中华中医药学会 发布

目 次

前 言	错误!未定义书签。
引 言	4
1 范围	5
2 规范性引用文件.....	5
3 术语和定义.....	5
4 试验操作要点.....	6

前 言

本文件按照GB/T1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》规定的规则起草。

本文件由中国中医科学院中药研究所、创新天然药物与中药注射剂国家重点实验室共同提出。

本文件由中华中医药学会归口。

本文件起草单位：中国中医科学院中药研究所、创新天然药物与中药注射剂国家重点实验室、中国食品药品检定研究院、北京市药品检验所、军事科学院军事医学研究院、暨南大学、上海中医药大学、天津中医药大学、江西青峰药业有限公司、天津天士力之骄药业有限公司、华润三九（雅安）药业有限公司、神威药业集团有限公司、丽珠集团利民制药厂、无锡济煜山禾药业股份有限公司、上海凯宝药业股份有限公司、广西梧州中恒集团股份有限公司、山东丹红制药有限公司、安徽华润金蟾药业股份有限公司

本文件主要起草人：梁爱华、谢宁、易艳、高月、蒋春红、张晗、胡宇驰、耿兴超、李春英、赵雍、金若敏、叶文才、鞠爱春、张宇实、韩佳寅、李科、刘地发、邓双炳、刘绍勇、陈明、黄文华、姜国志、朱音、高波、王臣臣、楚慧伦、田婧卓、潘辰、王连媚、刘素彦、方礼、陈宣坤。

引 言

本文件是一部指导静脉给药途径的中药注射剂类过敏反应检测的技术规范文件。

在药物过敏样反应中，类过敏反应占比约为77%；但美国FDA、国际组织ICH的相关研究指南，美国药典、欧洲药典等至今仍然没有可靠的类过敏反应动物模型和评价方法，注射剂的过敏样反应预测、产品风险识别和控制的方法学问题一直是国际上未解决的重大科技难题。因此，建立适合于静脉用中药注射剂的安全性评价方法学体系和产品风险控制技术体系和技术规范是国内外医药领域的重大需求。

该文件是在进行了系统、严谨的方法学研究后而制定的，包括不同动物品系敏感性比较（如ICR小鼠、昆明小鼠、C57小鼠、BALB/C小鼠等），不同性别以及不同体重动物的类过敏反应差异比较研究，药品前处理和处理后各种影响因素考察，用药方式（剂量、浓度、体积、速度）的影响考察，样品重复性、操作重复性、人员比对等验证等。并采用多种阳性对照品、阴性对照品以及30余种注射剂（包括中药、西药注射剂）等方法学进行了验证，证明了方法敏感性适宜、重复性好，结果判定客观、可靠。

本文件有利于促进企业对注射剂产品的工艺优化及质量提升、保障用药安全。

静脉用中药注射剂类过敏反应检测技术规范

1 范围

本文件提供了适用于静脉用中药注射剂类过敏反应评价与检测的主要技术规范。

本文件适用于静脉用中药注射剂研发过程中的非临床安全性评价、已上市产品生产过程中的风险控制及上市后安全性再评价；同时，可作为从事中药注射剂相关工作的企业、科研、检测人员用于类过敏风险的评价、检测与控制工作参考。但并不能替代现行药物过敏反应评价原则，二者互为补充。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成于本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB14925-2010 实验动物环境及设施标准

国家食品药品监督管理总局. 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[EB/OL]. [2014-05-13].<https://www.cde.org.cn/zdyz/domesticinfo?page?zdyzldCODE=11ed1282dd1b35641943de34907b317c>

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

类过敏反应 pseudo-allergic reactions

药物类过敏反应是药物进入体内后直接刺激肥大细胞、嗜碱性粒细胞或其他细胞，释放血管活性物质或致敏介质而引起的反应。

3.2

血管通透性 vascular permeability

物质透过血管壁的能力称血管通透性，也被称为血管渗透性。

4 试验操作要点

4.1 检测方法原理

临床上，类过敏反应症状与毛细血管通透性增高有关。毛细血管通透性增高是产生类过

敏反应症状的主要病理机制之一。在血管通透性正常情况下，血管内的大分子胶体物质维持正常的血浆渗透压，保持液体在血管内循环。如果在病理因素刺激下血管通透性增高，则造成大分子物质透过血管壁漏到血管外组织，并吸引血管内的液体渗出而进入组织间隙，造成组织水肿，引起皮肤黏膜起疹、水肿、瘙痒、肺水肿、呼吸困难、缺氧、恶心、呕吐、腹痛、腹泻等。血管渗透严重时可导致血容量下降，加之引发的渗出性炎症导致毛细血管扩张，可导致血压下降，促进或加重休克的发生。因此，可以以毛细血管通透性增高为指征来预测潜在的类过敏反应。

具有致类过敏反应潜能的药物首次经静脉注射进入体内后，可能刺激肥大细胞、嗜碱性粒细胞等释放组胺或其他致敏活性因子，从而导致毛细血管通透性增高、血管扩张。伊文思蓝(Evans Blue, EB)为常用的血管通透性指示剂。EB 与血浆白蛋白具有很强的亲合力，经静脉注射进入体内后，迅速与血浆白蛋白结合，形成白蛋白-EB 复合物 (ALB-EB)。当毛细血管通透性正常时，ALB-EB 不会渗出到血管外，但当致类过敏物质导致血管通透性增高时，ALB-EB 可渗出到血管外的组织间隙，而造成组织蓝染。在小鼠上，血管通透性增高造成的组织蓝染可以很直观地在小鼠耳廓观察到（耳蓝染）。通过分析小鼠发生耳廓蓝染的程度以及定量检测耳廓组织内渗出的 EB 含量，可以客观地评价类过敏反应及其程度。

4.2 基本原则

实验动物环境条件要求：符合实验动物环境及设施标准 GB14925-2010。

参照《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》要求，实验应遵循随机、对照、重复的原则。类过敏反应检测试验均应设立阳性对照组、阴性对照组以及受试物不同剂量（或不同浓度）组。

参照《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》要求，受试物为临床试验样品或上市药品。并注明受试物的名称、来源、批号、含量或规格、保存条件、配制方法、有效期。

4.3 主要试剂与器材

4.3.1 主要试剂

EB (CAS: 314-13-6)；所检测的静脉用中药注射剂在临床所使用的溶媒；甲酰胺 (CAS: 75-12-7)；组胺 (CAS:51-45-6)；Compound 48/80 (CAS:848035-21-2)。

4.3.2 器材

电子天平(感量为 0.1 mg”针对试剂称量;“感量为 0.1 g”针对动物称量);酶标仪或分光光度计;0.22 μ m 滤膜;120 目筛网;微孔板。

4.4 操作步骤

4.4.1 动物

ICR 小鼠或昆明小鼠,体重范围 23~26 g(10-11 周龄),雌雄各半,每组每种性别动物数不少于 5 只。如果经预试证明检测结果无明显性别差别,或者临床上只用于单一性别,则可选用单一性别动物进行试验,每组动物数不少于 10 只。同一批实验中同一性别动物之间体重差异不超过 20%。实验前动物适应环境 1~2 天。

4.4.2 指示剂

采用与受试物配制相同的溶媒,将 EB 配制成 0.8%的溶液,用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌,室温避光保存;配制后的 EB 溶液在一周内使用。温度降低可导致 EB 溶解度降低而析出沉淀,故 EB 溶液不宜保存于冰箱。

4.4.3 对照设置

阴性对照:采用临床推荐使用的溶媒作为阴性对照。如果受试物在临床上被推荐为直接静脉注射时,则选用 0.9%氯化钠注射液作为阴性对照。

阳性对照:采用组胺或 Compound 48/80 作为阳性对照。采用与阴性对照相同的溶媒,临用前配制成 1%组胺溶液或 2.5%Compound 48/80 溶液。

4.4.4 受试物剂量设置

受试物设不低于 2 个剂量水平。可采用以下两种方式之一设置剂量:(1)根据人与小鼠体表面积折算系数换算为人的临床剂量倍数进行剂量设置,最低剂量不低于临床等倍剂量。为了找出安全窗,最高剂量应不低于临床 5 倍剂量。如果最高剂量达不到该水平,则依动物伦理原则可接受的最高给药体积和临床允许的最高用药浓度作为最高剂量设计依据。(2)根据受试物临床使用的浓度进行剂量设置,最高浓度不低于临床最大用药浓度,或可采用制剂原液;最低浓度不低于临床最低用药浓度。

4.4.5 注射给药

受试物和 EB 溶液均为静脉注射给予。如果说明书对注射液最高输液滴数有明确规定,

则换算成对应 $\text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$ 的注射速度。本试验的注射速度与该速度接近。如果无静脉滴注速度规定者，注射速度不高于 $0.2\text{mL}\cdot 10\text{s}^{-1}$ 。

一般情况下，将受试物和指示剂 EB 分开注射，避免互相影响。考虑到操作的便捷性，可以考虑合并注射。是否适合采取合并注射方式需通过预实验判定：（1）将受试物与 EB 溶液混合后，观察是否发生浑浊、沉淀等性状明显变化，如果有变化则不宜合并注射；（2）考察受试物与 EB 溶液合并注射、受试物与 EB 溶液分开注射所产生的类过敏反应是否有明显差异（纳入统计的动物数每种注射方式不少于 10 只）。如果两种注射方法没有明显差异，则可以将受试物与 EB 合并注射，否则需要将二者分开注射。两种给药方法如下：

1) 受试物与 EB 分开注射方式：分别配制不同浓度的受试物、0.8%EB 溶液。小鼠经尾静脉注射给予受试物，随后立即注射给予 0.8%EB 溶液；

2) 受试物与 EB 合并注射方式：配制不同浓度的受试物，与 0.8%EB 溶液 1:1 混合，使 EB 终浓度为 0.4%；小鼠经尾静脉注射给予混合液。

注射体积需符合动物伦理要求，具体体积根据给药剂量、浓度进行确定。两种给药方式进行平行比较时，总的给药体积应相同。

阴性对照组和阳性对照组与受试物组处理方式一致。任何注射方式下，EB 剂量均为 $80\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

4.4.6 结果观察和分析

- 小鼠静脉注射给药完毕后，观察给药后 30 min 内的以下各种反应或结果。
- a) 全身反应：观察动物的活动、步态、口眼鼻分泌物；是否出现呼吸急促或呼吸困难，如张口呼吸、痉挛或抽搐等。
 - b) 耳廓蓝染面积评分：由两位经培训合格的研究者进行盲法评分，采用半定量方法分别评测并记录每只动物两侧耳廓的蓝染面积，各取其中耳廓蓝染面积最大的一侧计算平均值，再按照表 1 评分，作为对应动物的最终分值。

表 1 耳廓蓝染面积（S）评分和程度

分值	耳蓝染面积
0	双耳无蓝染
1	$0<S\leq 1/8$ （蓝染面积占耳廓面积的 1/8，以下类推）
2	$1/8<S\leq 1/4$
3	$1/4<S\leq 1/2$

4	$1/2 < S \leq 3/4$
5	$3/4 < S \leq 1$

c) 耳廓组织中 EB 渗出量定量测定：给药后 30 min，麻醉后脱颈椎处死小鼠。从离耳廓与脑部折叠转角处约 2~3 mm 处剪下耳廓，再用剪刀剪碎，放入试管中；加入甲酰胺溶液 2 ml，室温下浸泡 48 h，使耳组织中的 EB 染料充分被萃取到甲酰胺中，溶液用 200 目筛网过滤，去除组织残留。取滤出液 1 mL，加入到微孔板中，用酶标仪于波长 610 nm 处测吸光度 (A)。根据 EB 标准曲线，计算 EB 渗出量 (μg)。

耳廓组织中 EB 渗出量定量测定之前，以甲酰胺为溶剂，配制 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10 μg·ml⁻¹ 等不同浓度的 EB 溶液，各取 1 ml 加入到 48 孔板中，于 610 nm 处用酶标仪测吸光度（建议标曲各浓度均设置平行孔）；所得各浓度的吸光度数值对应相应浓度进行线性回归分析，绘制标准曲线。

4.4.7 判断标准

4.4.7.1 试验可接受的标准

以下条件均符合时，实验被认为可接受。

- a) 阴性对照组动物耳廓蓝染评分≥1 的动物数不超过 10%，且阴性对照组所有动物耳廓蓝染评分均<2；
- b) 阳性对照组评分≥3 的比例≥60%。

4.4.7.2 类过敏反应结果判断标准

a) 以耳廓蓝染面积评分为主要判断标准：

- 1) 受试物组动物均未出现耳廓蓝染，或受试物组动物耳廓蓝染评分均≤1、且评分为 1 的动物数≤40%，则结果判断为阴性；
- 2) 受试物组动物耳廓蓝染评分≥1 的动物数>40%，且评分≥2 的动物数≤60%、且所有动物耳廓蓝染评分<3，结果为可疑；
- 3) 受试物组动物耳廓蓝染评分≥2 的动物数>60%，且评分≥3 的动物数≤10%，则结果判断为弱阳性；
- 4) 受试物组动物耳廓蓝染评分≥3 的动物数>10%，且评分≥4 的动物数≤10%，则结果判断为阳性；
- 5) 受试物组动物耳廓蓝染评分≥4 的动物数>10%，则结果判断为强阳性。

如果结果为以上 2) 的情形，则进行重复试验进一步判断。

b) 以耳组织 EB 渗出量，作为辅助判断标准：

- 1) 与阴性对照组相比，受试物组 EB 渗出增高 $<75\%$ ，或无统计学显著性差异，判断为阴性；
- 2) 与阴性对照组相比， $75\%<$ 受试物组 EB 渗出增高 $\leq 150\%$ ，且有统计学显著性差异，判断为可疑；
- 3) 与阴性对照组相比， $150\%<$ 受试物组 EB 渗出增高 $\leq 200\%$ ，且有统计学显著性差异，判断为弱阳性；
- 4) 与阴性对照组相比， $200\%<$ 受试物组 EB 渗出增高 $\leq 300\%$ ，且有统计学显著性差异，判断为阳性；
- 5) 与阴性对照组相比，受试物组 EB 渗出增高 $>300\%$ ，且有统计学显著性差异，判断为强阳性。

辅助判断标准仅作为参考。由于该项检测取材技术要求较高，耳廓剪取时很难克服取材范围的操作误差，导致耳廓组织中 EB 渗出量受到影响，可根据单位自身条件对该辅助判断标准进行取舍。

4.4.8 注意事项

实验室控制温度范围 $20\sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，湿度范围为 $40\sim 70\%$ 。

中药注射剂配制时，受试物和稀释用溶媒平衡至实验室温度范围，在洁净环境下配制成所需浓度，分装于灭菌容器中备用。

耳朵为肉眼观察血管渗出的部位，抓取动物时应避免捏耳朵，以免由于耳朵受挤压而导致血管渗出，造成假阳性。

注射操作必须很熟练，避免多次穿刺而造成血管机械损伤。

注射量要准确，避免药液被注射到皮下或血管外。