# 输液药包材的急性全身毒性检查法和细胞毒性检查法测试结果的分析与探讨

杨　敏，曾　涛，黄成超，李　烨，张毅兰*

（中国医药工业研究总院医药先进制造国家工程研究中心，国家药品监督管理局药包材与药物相容性研究重点实验室，上海 201203）

**摘要**：急性全身毒性检查法和细胞毒性检查法是输液药包材的常规检测方法。文章总结了该实验室 7 年来的毒性检测试验，包括急性全身毒性检测有 15 674 批，用小鼠 78 000 余只，未发现不合格检品；细胞毒性检测 2 627 批，有 104 批不合格。结果显示，经细胞毒性检测不合格的样品，均未表现出急性全身毒性。因此，建议药包材的毒性检查可考虑优先采用细胞毒性检查，既可以减少实验动物的消耗，又能提高检测效率。

**关键词**：输液；药包材；毒性检测；急性全身毒性检查；细胞毒性检查

**中图分类号**：R927.1；TQ460.6$^{+}$9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)11-1578-05

**引用**：杨　敏，曾　涛，黄成超，等．输液药包材的急性全身毒性检查法和细胞毒性检查法测试结果的分析与探讨［J］．中国医药工业杂志，2024, 55(11): 1578-1582．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.11.016

# Analysis and Discussion on the Results of Acute Systemic Toxicity Test and Cytotoxicity Test for Infusion Pharmaceutical Packaging Materials

YANG Min, ZENG Tao, HUANG Chengchao, LI Ye, ZHANG Yilan*

(*NMPA Key Lab. for Compatibility Studies of Pharmaceutical Products and Packaging Materials, National Advanced Medical Engineering Research Center, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

**ABSTRACT**: The acute systemic toxicity test and cytotoxicity test are conventional detection methods for infusion pharmaceutical packaging materials. This study summarized the toxicity detection tests in our lab during the past seven years. There were 15 674 batches of acute systemic toxicity tests, using more than 78 000 mice, and no unqualified test samples have been found. And 2 627 batches of samples underwent the cytotoxicity tests, in which 104 batches were found to be unqualified. The results showed that the samples that failed the cytotoxicity test did not show acute systemic toxicity. Therefore, it is recommended that the cytotoxicity test can be considered as the preferred method for the toxicity test of pharmaceutical packaging materials, which can not only reduce the consumption of laboratory animals but also improve the detection efficiency.

**Key words**: infusion; pharmaceutical packaging materials; toxicity test; acute systemic toxicity test; cytotoxicity test

近年来，塑料包装材料已广泛被用于药品包装，如输液袋已取代了约 60％的玻璃瓶。但塑料药包材也存在一些缺陷，例如：阻隔性差；塑料加工中的添加剂、聚合反应中的催化剂、残留的未反应小分子单体等成分，可能会迁移至输液中，并随输液进入体内，引发不良反应；一些药物活性成分也可能被塑料吸附。为确保药物输液的安全性、有效性和稳定性，国内外监管部门都对输液的包装材料及其容器实施了严格的质量控制。各国药典、ISO 及一些国家标准体系都要求对塑料包材采用急性全身毒性检查法和细胞毒性检查法进行毒性安全试验。

**收稿日期**：2024-03-13

**作者简介**：杨　敏（1980—），女，工程师，从事药品包装材料生物相容性、毒性等检测、研究。

**通信作者**：张毅兰（1963—），女，研究员，从事药品包装材料相容性、检测研究。

E-mail：zhangyilansh@163.com

我国在2015年发布了国家药品包装材料标准[1]，其中收载了急性全身毒性检查法和细胞毒性检查法的详细规定。该标准随后被2020年版ChP收载。然而，急性全身毒性测试需使用大量小鼠，与国外提倡的替代、减少、优化使用实验动物3R原则有距离。澳大利亚从2017年7月起停止销售经过动物试验的化妆品；美国科学院“21世纪的毒性测试远景和策略”报告中明确了毒性测试由体内动物研究向体外试验转变的策略，寻找科学、能真实体现人体健康的安全评价测试方法。ISO发布的《医疗器械的生物学评价——第5部分：细胞毒性测试-体外法》[2]标准中收载的细胞毒性检测法包括MTT法。本研究根据上述文献和标准，对多种输液材料进行了小鼠全身毒性检测和细胞毒性检测，总结了2017—2023年间对15 674批输液材料的急性全身毒性检测结果，并对其中2 627批输液材料进行细胞毒性检测，探究优先进行细胞毒性检测、如不合格再进行小鼠全身毒性检测的可行性。

## 1 仪器与试药

SQ510C型压力蒸汽灭菌器（重庆雅马拓科技有限公司）；Thermo 371型二氧化碳培养箱和Multifuge X1 Pro型离心机（美国Thermo Fisher公司）；BSC-1304 Ⅱ A2型生物安全柜（苏州安泰空气技术有限公司）；TS2型倒置显微镜（日本Nikon株式会社）；Molecular Devices SpectraMax 340PC型酶标仪［美谷分子仪器（上海）有限公司］。

聚氯乙烯（polyvinyl chloride，PVC）输液袋、聚丙烯（polypropylene，PP）接口与内盖、PP直立式输液瓶、丁基胶塞、聚异戊二烯垫片、丁腈橡胶垫、三层共挤输液袋、五层共挤输液袋等，均来自各药包材企业或制药企业的送检样品；高密度聚乙烯（阴性对照品）、含二乙基二硫代氨基甲酸锌（zinc diethyldithiocarbamate，ZDEC）聚氨酯（阳性对照品）薄膜均购自日本Hatano研究所；MEM培养基（法国Biosera公司）；胎牛血清［铂尚生物技术（上海）有限公司］；MTT购自上海安谱实验科技股份有限公司；植物油（注射用大豆油，浙江田雨山药用油有限公司）；PEG 400（南京威尔药业集团股份有限公司）；其他试剂为分析纯。

小鼠成纤维细胞（NCTC clone 929，L929细胞）购于美国典型培养物保藏中心（American Type Culture Collection，ATCC），取处于对数生长期的细胞进行试验。

健康ICR小鼠（体质量17～23 g，雄性，购自上海必凯科翼生物科技有限公司），于恒温净化通风动物房（20.0～26.0 ℃，相对湿度40%～70%）饲养，自由进食与饮水。实验动物使用许可证号为SYXK（沪）2019-0027；伦理许可批准号为A-2023-07-09。

## 2 方法与结果

### 2.1 急性全身毒性测定

急性全身毒性检查法系将一定剂量的供试品溶液经静脉、腹腔给药途径注入小鼠体内，在规定时间内观察小鼠有无毒性反应和死亡等情况，以判定供试品是否符合规定[1]。

供试品溶液的制备过程应按无菌操作法进行。除另有规定外，按品种项下规定的浸提介质进行浸提并制备供试品溶液。供试品浸提前应进行分切处理，使之能够放入容器并浸没在浸提介质中进行充分浸提。除有明确规定的浓度和浸提条件外，照表1和表2中所示的条件制备供试品溶液。所选择的浸提条件不应该引起供试品物理形态的改变。对照液（不含供试品）以相同的方式制备。供试品溶液和对照液应在制备后24 h内使用，并于注射前平衡至室温，经剧烈振荡以确保可浸提物充分混匀。

**表1 供试品表面积或质量与浸提介质体积的比例**

Tab.1 The Ratio of the Surface Area or Mass of the Test Sample to the Volume of the Extraction Medium

| 供试品 | 单位浸提介质中的供试品（表面积或质量，±10%） |
|---|---|
| ≤ 0.5 mm | 6 $cm^2$/mL |
| 厚度 >0.5 mm，且≤ 1.0 mm | 3 $cm^2$/mL |
| >1.0 mm | 1.25 $cm^2$/mL |
| 不规则形状 | 0.2 g/mL |

按照ChP注射程序规定，对各组5只小鼠分别注射供试品溶液或对照液（分别作为试验组和对照组），注射速度为0.1 mL/s。注射后观察小鼠即时反应，于4、24、48、72 h时观察和记录试验组和对照组小鼠的一般状态、毒性表现和死亡数，并在72 h时称量小鼠体质量。结果判定按注射后小鼠的反应观察指标进行。

2017—2023年本实验室完成的输液药包材样品

**表 2　浸提条件**

Tab.2　Extraction Conditions

| 浸提温度 /℃ | 浸提时间 /h |
|---|---|
| 37±1 | 24±2 |
| 37±1 | 72±2 |
| 50±2 | 72±2 |
| 70±2 | 24±2 |
| 121±2 | 1±0.1 |

毒性检测结果如表 3 所示，按注射后小鼠的反应观察指标，供试品小鼠的毒性反应均不显著大于对照组小鼠，全部判定为合格。

**2.2**　细胞毒性测定

药包材细胞毒性检查法系将供试品或供试品溶液接触细胞，通过观察细胞形态、增殖和抑制情况，评价供试品对体外细胞的毒性作用，包括相对增殖度法（第一法）、琼脂扩散法（第二法）、直接接触法（第三法）、浸提法（第四法）。其中，相对增殖度法和浸提法是本实验室较常用的方法。

**2.2.1**　供试品溶液的制备

制备供试品溶液所采用的浸提介质一般参照药包材标准 [1] 各品种项下的规定，浸提比例和浸提条件如表 1、2 所示。除另有规定，本实验室一般优先选择含 10%胎牛血清的 MEM 培养基，37 ℃浸提 24 h 的条件制备供试品溶液。

**2.2.2**　相对增殖度法

使用 L-929 细胞，以相对增殖度法检查细胞毒性。试验时采用传代 48 ～ 72 h、处于对数生长期的细胞。与样品及细胞接触的所有器具均需无菌。

取“**2.2.1**”项下供试品溶液与 MEM 培养基 1 ∶ 1 混合作为后续供试组溶液。同法取不加供试品的 MEM 培养基制备阴性对照组溶液，取阳性对照品制备阳性对照组溶液。

照 ChP 规定培养细胞。分别设置阴性对照组（13 个培养瓶）、阳性对照组（10 个培养瓶）、供试组（10 个培养瓶）。每个培养瓶分别预先加入细胞悬液（细胞密度为每 1 mL 含 $4\times10^4$ 个）1 mL， MEM 培养基 4 mL，置二氧化碳培养箱中，于（37±1）℃、（5±1）% $CO_2$ 条件下培养 24 h。弃去原培养液，每组中各瓶分别加入对照液或供试组溶液 5 mL，置二氧化碳培养箱中，于（37±1）℃、（5±1）% $CO_2$ 条件下继续培养 7 d，分别在第 0、2、4、7 d 每组各取 3 瓶进行细胞形态观察和细胞计数（d0 只取 3 瓶阴性对照组）。

显微镜下观察并计数，评定细胞毒性。细胞形态分析结果包括无毒、轻微毒、中度毒、重度毒 4 种程度。相对增殖度（relative growth rate，RGR）计算公式如式①。

$$RGR=\frac{\text{供试品组（或阳性对照组）细胞浓度平均值}}{\text{阴性对照组细胞浓度平均值}}\times100\% \qquad ①$$

RGR 分 5 级：0 级，RGR ≥ 100 %；1 级，RGR 为 75%～ 99%；2 级，RGR 为 50%～ 74%；3 级，RGR 为 25%～ 49%；4 级，RGR 为 1%～ 24%；5 级，RGR 为 0。以 d7 的细胞浓度计，0、1 级为合格，3 ～ 5 级为不合格，2 级时细胞形态为轻微毒或无毒则判为合格。

**2.2.3**　浸提法

分别取阴性对照品、阳性对照品按“**2.2.1**”项下方法同法制备阴性对照液，阳性对照液。取对数

**表 3　2017—2023 年输液药包材的急性全身毒性和细胞毒性测试结果**

Tab.3　Test Results of Acute Systemic Toxicity and Cytotoxicity on Infusion Drug Packaging Materials from 2017 to 2023

| 测试年份 | 细胞毒性检查法 | | | 急性全身毒性检查法 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 测定批数 | 不合格批数 | 不合格率 /% | 测定批数 | 不合格批数 | 使用小鼠数 / 只 |
| 2017 | 364 | 15 | 4.1 | 1 430 | 0 | 7 155 |
| 2018 | 434 | 34 | 7.8 | 2 595 | 0 | 12 975 |
| 2019 | 404 | 20 | 5.0 | 2 830 | 0 | 14 150 |
| 2020 | 472 | 17 | 3.6 | 2 257 | 0 | 11 285 |
| 2021 | 438 | 14 | 3.2 | 3 046 | 0 | 15 230 |
| 2022 | 293 | 2 | 0.7 | 1 881 | 0 | 9 405 |
| 2023 | 222 | 2 | 0.9 | 1 635 | 0 | 8 175 |
| 总计 | 2 627 | 104 | 4.0 | 15 674 | 0 | 78 735 |

生长期的 L-929 细胞，以每 1 mL 含 $1\times10^5$ 个的细胞密度接种至直径 35 mm 的培养皿中，每皿 2 mL，培养不少于 24 h，至单层细胞密度达到 80%以上。弃去培养液，分别加入供试品溶液、阴性对照液、阳性对照液，平行试验 2 份，置二氧化碳培养箱中，于 (37±1) ℃、(5±1) % $CO_2$ 条件下培养 48 h，在显微镜下观察培养物，如有必要，可进行染色。浸提法的毒性分级如表 4 所示。

**表 4 浸提法毒性分级**

Tab.4 Toxicity Classification of Extraction Method

| 分级 | 毒性 | 毒性区域描述 |
|---|---|---|
| 0 | 无毒 | 胞内颗粒明显，无细胞溶解 |
| 1 | 轻微毒 | 圆缩、贴壁不佳及无胞内颗粒的细胞不超过 20%，偶见悬浮死细胞 |
| 2 | 轻度毒 | 圆缩细胞及胞内颗粒溶解的细胞不超过 50%，无严重的细胞溶解现象，细胞间无较大空隙 |
| 3 | 中度毒 | 圆缩或溶解的细胞不超过 70% |
| 4 | 重度毒 | 几乎所有细胞坏死 |

**2.2.4** MTT 法（增殖度法）

一般，照《医疗器械的生物学评价——第 5 部分：细胞毒性测试 - 体外法》[2] 进行试验。照《医疗器械的生物学评价——第 12 部分：样品制备和标准物质》[3] 分别制备样品供试液、阴性对照液、阳性对照液。制备方法与“**2.2.1**”项下供试液制备方法基本一致。

取对数生长期的 L-929 细胞，以每 1 mL 含 $1\times10^5$ 个细胞的密度接种至 96 孔培养板，每孔各加入 100 μL，置二氧化碳培养箱中，于 37 ℃、5% $CO_2$、相对湿度 >90% 的条件下培养。24 h 后形成半汇合单层细胞。弃去培养液，每孔分别加入样品供试液、阴性对照液、阳性对照液或空白溶剂 100 μL，至少平行 6 份，培养 24 h 后，弃去培养液，每孔分别加入 MTT 溶液 50 μL，置培养箱中继续孵育 2 h。弃去 MTT 溶液，每孔分别加入异丙醇 100 μL，于酶标仪中测定 570 nm 处的吸光度（参比波长为 650 nm）。按式②计算存活率。

$$存活率\ (\%)=\frac{100\times OD_{570e}}{OD_{570b}}\times100\% \qquad ②$$

式中：$OD_{570e}$ 为试验样品 100%浸提液吸光度的平均值；$OD_{570b}$ 为空白溶剂吸光度的平均值。

若存活率低于空白溶剂处理组的 70%，则表明样品有潜在的细胞毒性，评价为不合格。

**2.2.5** 试验结果

2017—2023 年的 2 627 批样品的细胞毒性检测结果如表 3 所示，其中 104 批不合格，平均不合格率约为 4.0%，2020 年后不合格率逐年下降至 1%以下。

## 3 讨论

2017—2023 年本实验室进行的 15 000 余批输液药包材样品检测结果显示，全身急性毒性检测未观察到一个不合格现象。这可能与国内输液药包材质量的提高有关，也可能是急性全身毒性试验方法的限值低，微量的有害物质不足以引起小鼠的全身反应。

由表 3 可见，全身急性毒性检查呈阴性的检品，细胞毒性检测出现了阳性，2017—2020 年阳性率分别为 4%、8%、5%、4%。这表明，虽然有些输液药包材的急性全身毒性检查是合格的，但可能存在不安全因素，提示该包装系统中可能含有一些不合适的添加剂，或其含量超过限度，从而产生了细胞毒性。如果其他检测单位也出现类似情形，那么急性全身毒性检查法可考虑进行改进。本研究对部分不合格样品进行了溯源分析，分析不合格原因如下。①有产品标准的，规定照表面积 6 $cm^2$/mL 的比例取样，但不同产品、不同部位的厚度不一，经过剪切后暴露的横截面积也不一致，浸出物的浓度影响试验结果。②没有产品标准的，各厂家使用的检测方法不一致，有些参照标准方法照表面积 6 $cm^2$/mL 的比例取样的，也有些按照不规则取样 0.2 g/mL；由于使用的方法不统一，再加上产品厚度不同，容易造成结果受影响。③企业生产线换品种，由于清洗不到位、不彻底，造成的产品细胞毒性试验结果不合格（厂家推测），经过重新彻底清洗后生产的产品结果合格等。细胞毒性测定是评价药包材和容器安全性的安全、简便、有效的方法之一。相比急性全身毒性检查法，基于细胞的毒性检测方法可更快速、有效地为包材、容器处方的设计找到合适的安全添加剂。因此，用细胞方法来代替小鼠急性毒性

试验是药包材毒性检测未来的发展方向。

此外，新型给药系统如脂质体、脂肪乳等，含有大量的表面活性剂，会加速或加大对药包材中添加剂的提取；一些大分子药物如多肽、蛋白类药物用量极少，可能会因被包装容器表面吸附等作用而失效；脂溶性药物、纳米药物会进入包材塑料中等。因此，建议此类制剂与包装系统一起评估安全性为宜[4—6]。

综上所述，对于输液药包材的毒性检测，细胞毒性检查法比急性全身毒性检查法更灵敏、便捷、经济。目前，美国部分输液产品的标准如 USP<381> 章节《注射用药品包装 / 给药系统中的弹性体组件》中“4.1 生物试验”的相关要求为先进行体外生物反应测定，若检测结果不合格，再进行体内试验（急性全身毒性试验等）；若结果合格则不需要进行体内试验。而欧洲从 EP 10.0 开始就删除了“2.6.9 异常毒性”项目。日本 JP18《7.03 注射液用橡胶塞的有关检测》中的“5. 急性全身毒性”项目提到，当样品溶液不满足细胞毒性试验要求时，需进行该试验。我国药品包装材料检测标准中尚未明确提出这样的要求。本文建议国内药包材标准也应做出相关说明，这样既对药包材的处方进行了筛查，又大幅减少了小鼠的使用。

## 参考文献：


[1] 中国食品药品检定研究院 , 国家药典委员会．国家药包材标准［M］．北京 : 中国医药科技出版社 , 2015: 336-337.

[2] ISO．Biological evaluation of medical devices - part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity: ISO 10993-5: 2009［S］．Geneva: ISO, 2009.

[3] ISO．ISO 10993-12: 2021, biological evaluation of medical devices - part 12: sample preparation and reference materials［S］．Geneva: ISO, 2021.

[4] 《欧盟食品接触材料安全法规实用指南》编委会．欧盟食品接触材料安全法规实用指南［M］．北京 : 中国标准出版社 , 2005: 242-664.

[5] 国家药典委员会 , 中国医药包装协会．欧美日药典药包材标准选编［M］．北京 : 化学工业出版社 , 2019: 287-308; 310-328.

[6] 马玉楠 , 杨会英 , 高用华 , 等．浸出物和可提取物手册［M］．北京 : 化学工业出版社 , 2014: 15-16.