

不同浓度注射用盐酸米托蒽醌的体外溶血性试验研究

李 丽*,金 鑫,刘洪艳,周建平(北京市药品检验所,北京 100035)

中图分类号 R965;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)21-1953-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.21.12

摘 要 目的:研究不同浓度注射用盐酸米托蒽醌在家兔红细胞悬液中的体外溶血性。方法:选用家兔红细胞作为受试物,加入注射用盐酸米托蒽醌临床推荐用量0.23 mg/ml及其系列稀释质量浓度0.115、0.058、0.029 mg/ml,肉眼和显微镜下观察3 h内的溶血和红细胞凝聚情况,545 nm波长处检测3 h时吸光度来验证溶血情况。另设阴性对照(氯化钠注射液)组和阳性对照(纯化水)组进行比较。结果:3 h内肉眼、显微镜下观察和吸光度检测结果表明,阴性对照组未见溶血和红细胞凝聚;阳性对照组发生明显溶血,无红细胞凝聚;注射用盐酸米托蒽醌质量浓度为0.23~0.058 mg/ml时均发生溶血,但未见明显红细胞凝聚,0.029 mg/ml时未见溶血和红细胞凝聚。结论:注射用盐酸米托蒽醌临床推荐用量较高,在使用中可能发生溶血,建议降低临床用量。

关键词 注射用盐酸米托蒽醌;溶血;红细胞凝聚;临床推荐用量;家兔

Study on the Hemolysis of Different Concentrations of Mitoxantrone Hydrochloride for Injection *in vitro*

LI Li, JIN Xin, LIU Hong-yan, ZHOU Jian-ping(Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the hemolysis of different concentrations of Mitoxantrone hydrochloride for injection in red blood cells of rabbits *in vitro*. METHODS: Red blood cells of rabbit were chosen as the subject. Clinical recommended dosage of Mitoxantrone hydrochloride for injection was 0.23 mg/ml and diluted to 0.115, 0.058 and 0.029 mg/ml. The hemolysis and condensation reaction were observed by naked-eye and microscope within 3 h, and the absorbance was detected at 545 nm in 3 h. They were compared with negative control group (Sodium chloride injection) and positive control group (purified water). RESULTS: Results of naked-eye and microscope observation and absorbance determination in 3 h showed that no hemolysis and condensation reaction were found in negative control group; significant hemolysis was found in positive control group without condensation reaction; hemolysis occurred but no significant condensation reaction was found when the concentrations of Mitoxantrone hydrochloride for injection were 0.23-0.058 mg/ml. When the concentration of Mitoxantrone hydrochloride for injection was 0.029 mg/ml, above reation were not found. CONCLUSIONS: It is suggested to decrease clinical recommended dosage of Mitoxantrone hydrochloride for injection, because the high dosage of the injection may result in hemolysis.

KEY WORDS Mitoxantrone hydrochloride for injection; Hemolysis; Condensation reaction; Clinical recommended dosage; Rabbits

注射用盐酸米托蒽醌通过和DNA分子结合,抑制核酸合成而致细胞死亡,为细胞周期非特异性药物,主要用于治疗恶性淋巴瘤、乳腺癌和急性白血病,对肺癌、黑色素瘤、软组织肉瘤、多发性骨髓瘤、肝癌、大肠癌、肾癌、前列腺癌、子宫内膜癌、睾丸肿瘤、卵巢癌和头颈部癌也有一定疗效。该药物属于静脉注射用药,临床前需进行血管刺激性试验、过敏性试验和溶血性试验等局部安全性试验评价,本文采用传统体外试管法研究不同浓度注射用盐酸米托蒽醌在家兔红细胞悬液中是否发生溶血和红细胞凝聚,考察其体外溶血性并用显微镜观察法和紫外可见分光光度法进行了深入的对比研究,为临床应用寻找安全用药剂量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Leica DM3000显微镜(Leica Microsystems CMS GmbH); LD5-2A离心机(北京时代北利离心机有限公司);TU-1901双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);纯水器(英国ELGA Lab Water公司)。

*主管药师,硕士。研究方向:药物安全性评价。电话:010-83288837。E-mail: lili_bidc@163.com

1.2 药品与试剂

注射用盐酸米托蒽醌(市售,批号:20100501,规格:按米托蒽醌计每支5 mg);氯化钠注射液(北京双鹤药业股份有限公司,批号:1008061,规格:4.5 g:500 ml)。

1.3 动物

日本大耳白家兔,普通级,♂ ♀不拘,体质量2.1~2.6 kg,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2010-0002。

2 方法与结果

本试验以注射用盐酸米托蒽醌临床推荐用量0.23 mg/ml为试验设计起始剂量,采用传统体外试管法,肉眼观察0.23 mg/ml及其稀释液的溶血情况,并用显微镜下观察法和紫外-可见分光光度计法测定吸光度进行验证。

2.1 红细胞混悬液的制备

自家兔心脏取血10 ml,放入含玻璃珠的三角烧瓶中振荡5 min,除去纤维蛋白原,使成脱纤血液,加入氯化钠注射液清洗血细胞(1 500 r/min离心15 min)3次,至上清液不显红色为止。将所得红细胞用氯化钠注射液制备成2%(V/V)的混悬液。试验重复3次,每次试验使用1只家兔心脏血制备2%红

细胞混悬液。

2.2 溶血性试验

试验设立阴性对照(氯化钠注射液)组、阳性对照(纯化水)组和0.23、0.115、0.058、0.029 mg/ml(注射用盐酸米托蒽醌)组,共6组。因为注射用盐酸米托蒽醌药物本身颜色较深,影响吸光度测定结果,故样品每个浓度设立自身对照,用于在吸光度测定中排除药物本身颜色的干扰。取洁净试管,按照表1所列内容分别加入不同的受试物,混匀,立即将试管置(37±0.5)℃的水浴中温育3 h,开始每隔15 min观察1次,1 h后,每隔1 h观察1次。肉眼观察结束后,将受试物摇匀后取1滴于载玻片上,显微镜下观察红细胞分布情况。镜下观察结束后,将受试物以1 500 r/min离心10 min,观察红细胞凝聚情况,并在545 nm波长下测定吸光度验证红细胞凝聚情况。试验重复3次。

表1 各组受试物的不同成分

受试物	加入体积/ml						自身对照			
	0.23 mg/ml组	0.115 mg/ml组	0.058 mg/ml组	0.029 mg/ml组	阴性对照	阳性对照	0.23 mg/ml组	0.115 mg/ml组	0.058 mg/ml组	0.029 mg/ml组
	ml组	ml组	ml组	ml组	ml组	ml组	ml组	ml组	ml组	ml组
2%红细胞混悬液	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5				
氯化钠注射液	2.0	2.0	2.0	2.0	2.5		4.5	4.5	4.5	4.5
注射用盐酸米托蒽醌	0.5	0.5	0.5	0.5			0.5	0.5	0.5	0.5
纯化水						2.5				

2.3 结果判定标准

溶液呈澄明红色,管底无细胞残留或有少量红细胞残留,表明有溶血发生;如红细胞全部下沉,上清液无色澄明,表明无溶血发生。溶血结果观察后,将试管倾斜约60°,然后竖立,观察是否有红细胞凝聚。若溶液中有棕红色或红棕色絮状沉淀,振摇后不分散,表明有红细胞凝聚发生,可按下述方法进一步判定是真凝聚还是假凝聚。若凝聚物在试管振荡后又能均匀分散,或将凝聚物放在载玻片上,在盖玻片边缘滴加2滴氯化钠注射液,置显微镜下观察,凝聚红细胞能被冲散者为假凝聚;若凝聚物不被摇散或在载玻片上不被冲散者为真凝聚。

2.4 观察结果

因3次重复试验结果一致,结果中图片采用第1次试验的照片。各组受试物肉眼观察结果见图1。

由图1可见,3 h内阴性对照组受试物未见溶血和红细胞凝聚;阳性对照组受试物发生明显溶血现象,无红细胞凝聚现象;注射用盐酸米托蒽醌0.23、0.115、0.058 mg/ml组受试物均发生溶血,未见明显红细胞凝聚现象;注射用盐酸米托蒽醌0.029 mg/ml组受试物未见溶血和红细胞凝聚现象。

显微镜下观察发现,所有涂片红细胞均匀分布,说明未发生明显凝聚现象。与阴性对照组比较,阳性对照组和注射用盐酸米托蒽醌0.23、0.115、0.058 mg/ml组受试物红细胞数明显减少,这是由于部分红细胞发生溶血所致;注射用盐酸米托蒽醌0.029 mg/ml组受试物红细胞数变化不明显,说明红细胞未发生明显溶血。镜下观察结果进一步验证了肉眼观察对结果的判断。各组受试物显微镜下观察结果见图2。

各组受试物离心后未溶血的红细胞在离心力的作用下沉在试管底部,发生溶血的细胞其细胞壁破裂,其内容物释放至氯化钠注射液中,增加光吸收性,因此在545 nm波长下测定上清液的吸光度,结果见表2。

从表2可见,注射用盐酸米托蒽醌0.23、0.115、0.058 mg/ml组受试物的吸光度值均大于阳性对照组,说明发生了明显

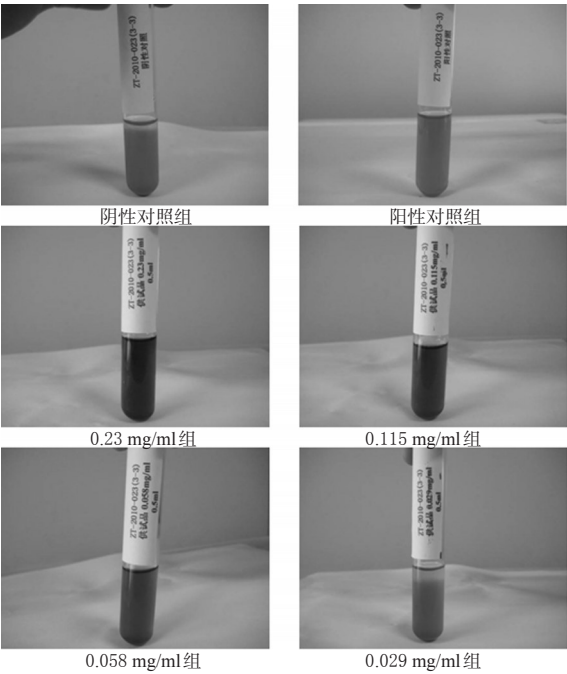


图1 各组受试物肉眼观察结果

Fig 1 Results of naked-eye observation of test samples in each group

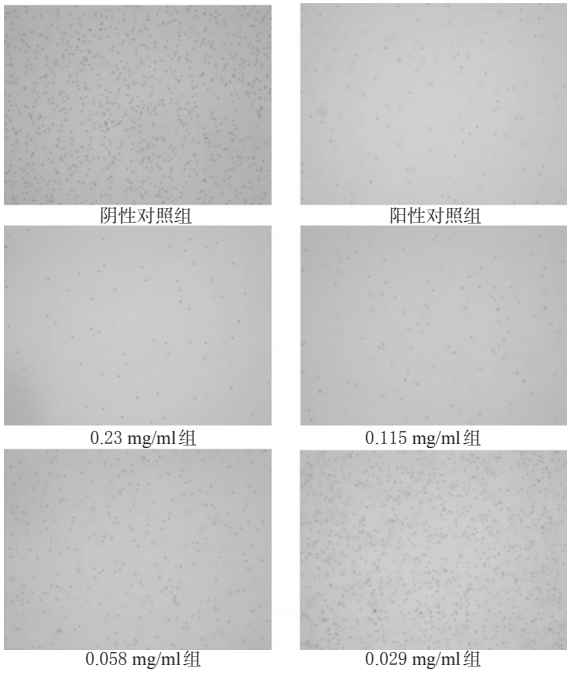


图2 各组受试物显微镜下观察结果

Fig 2 Results of microscope observation of test samples in each group

溶血;注射用盐酸米托蒽醌0.029 mg/ml组受试物的吸光度值与阴性对照组接近,可认为无明显溶血现象。

3 讨论

按照《药物研究技术指导原则》^[1]的相关要求,本文另进行了注射用盐酸米托蒽醌4个浓度0.1~0.4 ml加样量溶血性试验,结果与0.5 ml加样量基本一致。

综上所述,在本试验条件下,注射用盐酸米托蒽醌在

阿德福韦酯类似物M₁和M₂在犬体内的生物利用度研究

李澎灏^{1*},周远大^{2#},何海霞²(1.深圳市第二人民医院药学部,广东 深圳 518035;2.重庆医科大学附属第一医院药学部,重庆 400016)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)21-1955-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.21.13

摘要 目的:研究阿德福韦酯类似物M₁和M₂在犬体内的生物利用度。方法:将犬随机分为阿德福韦酯组、M₁组和M₂组,每组6只,灌服相应药物7 mg/kg,采用高效液相色谱-质谱法检测各组犬给药后0.33、0.67、1、2、3、4、8、12、24、36、48 h阿德福韦的血药浓度,用3p97药动学软件计算药动学参数。色谱柱:Phenomenex C₁₈(2)100 d,预柱:Luna C₁₈(2),流动相:1%甲酸水溶液-甲醇(98:2,V/V),流速:0.2 ml/min;质谱条件:电喷雾电离选择性正离子检测,阿德福韦测定离子质荷比(*m/z*)为274[M+H]⁺,内标更昔洛韦测定离子*m/z*为256[M+H]⁺。结果:阿德福韦酯、M₁和M₂的药动学参数分别为*t*_{max}:(0.69±0.14)、(1.30±0.98)、(1.23±1.00) h,*c*_{max}:(143.19±56.79)、(48.11±18.45)、(79.76±41.68) ng/ml,AUC_{0-48 h}:(2 559.80±896.64)、(966.91±668.36)、(954.16±1 405.65) ng·h/ml,M₁和M₂的生物利用度分别为37.77%和37.27%。结论:M₁和M₂的生物利用度未达临床需求,其原因可能是合成或纯化过程中杂质过多,或者其体内转化有限,尚待进一步探究。
关键词 阿德福韦酯类似物;生物利用度;高效液相色谱-质谱法;犬

Bioavailability Study of Adefovir Dipivoxil Analogs M₁ and M₂ in Dogs
LI Peng-hao¹,ZHOU Yuan-da²,HE Hai-xia²(1.Dept. of Pharmacy, Shenzhen Second People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518035, China;2.Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the bioavailability of adefovir dipivoxil analogs M₁ and M₂ in dogs. **METHODS:** Dogs were randomly divided into adefovir dipivoxil group, M₁ group and M₂ group with 6 dogs for each group. These groups were given appropriate drugs of 7 mg/kg. The plasma concentrations of adefovir were measured by HPLC-MS 0.33, 0.67, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h after administration. The pharmacokinetic parameters were measured by 3p97 software. The chromatographic condition was as follows: Phenomenex C₁₈(2)100 d column, Luna C₁₈(2) pre-column, 1% formic acid-methanol (98:2, V/V), flow rate of 0.2 ml/min; MS condition: electrospray ionization selective positive ion detection, (*m/z*)274[M+H]⁺ for adefovir and *m/z* 256[M+H]⁺ for ganciclovir. **RESULTS:** Pharmacokinetic parameters of adefovir dipivoxil, M₁ and M₂ were as follows: *t*_{max}:(0.69±0.14), (1.30±0.98), (1.23±1.00) h; *c*_{max}:(143.19±56.79), (48.11±18.45), (79.76±41.68) ng/ml; AUC_{0-48 h}:(2 559.80±896.64), (966.91±668.36), (954.16±1 405.65) ng·h/ml. The relative bioavailability of M₁ and M₂ were 37.77% and 37.27%, respectively. **CONCLUSIONS:** The bioavailability of M₁ and M₂ have not achieved clinical requirement. The cause that there was large number of impurity during synthesise or purification and transformation is limited *in vivo*, should be further studied.
KEY WORDS Adefovir dipivoxil analogs; Bioavailability; HPLC-MS; Beagle dogs

表2 各组受试物吸光度检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab 2 Results of absorbance determination of test samples in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	吸光度值	自身对照吸光度值	吸光度差值
阴性对照组	0.286 8±0.011 0		0.286 8±0.011 0
阳性对照组	0.983 4±0.060 8		0.983 4±0.060 8
0.23 mg/ml组	1.926 9±0.118 4	0.193 7±0.006 1	1.733 2±0.112 3
0.115 mg/ml组	1.830 2±0.184 7	0.069 6±0.009 0	1.760 6±0.175 7
0.058 mg/ml组	1.648 7±0.078 2	0.025 9±0.004 2	1.622 8±0.074 0
0.029 mg/ml组	0.376 9±0.046 3	0.013 8±0.002 8	0.363 1±0.043 5

0.058~0.23 mg/ml质量浓度下,3 h内出现溶血现象,0.029 mg/ml质量浓度时未见溶血和红细胞凝聚。说明该药物在使用中

* 副主任药师。研究方向:临床药理学。电话:0755-82723342。
E-mail:13802243490@126.com
通信作者:主任药师,教授,博士研究生导师。研究方向:临床药理学。电话:023-68898185。E-mail:zhouyuanda001@163.com

存在发生溶血的不安全因素,由于其临床用量较高,建议降低临床用量。
本试验采用了常规的家兔血^[2],有研究表明兔血细胞溶血活性明显高于羊、牛血细胞,因为兔血细胞脆性大于羊、牛血细胞。本试验方法参照“化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则”^[1],在该原则推荐的肉眼观察方法的基础上增加了显微镜下观察和吸光度测定两种方法,对注射用盐酸米托蒽醌溶血结果的判断更加科学、合理,是对常规溶血试验方法的发展和延伸。
参考文献
[1] 国家食品药品监督管理局.药物研究技术指导原则:化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[M].北京:中国医药科技出版社,2005:116-131.
[2] 华志学,马娅,江坤,等.注射用七叶皂苷钠体外溶血作用试验研究[J].中国药师,2009,12(11):1 549.
(收稿日期:2012-07-25 修回日期:2012-09-19)