

比伐卢定的升降压物质检查和毒性实验

刘 春*, 赵毓梅, 郑 霞(海南省药品检验所, 海口 570216)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)09-0805-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.09.13

摘要 目的:研究比伐卢定的升降压物质检查和毒性实验。方法:按照2010年版《中国药典》二部相关方法,以1~5倍(2.8~14 mg/kg)临床单次用药剂量作为降压和升压物质检查剂量,采用猫血压法确定降压物质检查限值,采用SD大鼠总动脉插管监测血压确定升压物质检查限值;小鼠经尾静脉注射给药急性毒性实验测算其半数致死量(LD₅₀),并确定异常毒性检查限值。结果:比伐卢定的降压、升压物质检查限值均为14 mg/kg;小鼠静脉注射的LD₅₀为1.60 g/kg,LD₅₀的95%可信限为1.50~1.71 g/kg;异常毒性检查注射给药后观察48 h,未见小鼠死亡。结论:比伐卢定符合《中国药典》要求。

关键词 比伐卢定;降压物质检查;升压物质检查;急性毒性;异常毒性

Pressor and Depressor Substance Test and Toxicity of Bivalirudin

LIU Chun, ZHAO Yu-mei, ZHENG Xia(Hainan Institute for Drug Control, Haikou 570216, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the pressor and depressor substance test and toxicity of bivalirudin. METHODS: According to *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition), the 1-5 times of clinical single dose (2.8-14 mg/kg) were used for the determination of depressor substances and vasopressor substance. The limit of depressor substance was determined with cat blood pressure. The blood pressure of SD rats was monitored by total arterial intubation to determine the limit of vasopressor substance. Mice were given medicines via tail vein in acute toxicity test to detect LD₅₀. The limit of abnormal toxicity test was calculated. RESULTS: The limit of depressor substance test and vasopressor substance were both 14 mg/kg. The LD₅₀ of intravenous injection of bivalirudin in mice was 1.60 g/kg and 95% confidence limit was 1.50-1.71 g/kg. The abnormal toxicity test showed that no mice died within 48 h after medication. CONCLUSIONS: Bivalirudin is in line with the requirements of *Chinese Pharmacopoeia*.

KEYWORDS Bivalirudin; Depressor substance test; Vasopressor substance test; Acute toxicity; Abnormal toxicity test

物2-AF诱发菌株的回变菌落数为溶剂对照组2倍以上,与溶剂对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

本实验结果表明,在非活化条件下,2 500~5 000 μg/ml的托品酸对鼠伤寒沙门氏菌TA97、TA98和TA100具有致突变作用;而在活化条件下,2 500~5 000 μg/ml的托品酸仅仅对TA98具有致突变作用。说明体外活化系统S₉可明显降低托品酸致菌株突变的作用,体外活化系统对托品酸起了消除和转化的作用。有文献报道,托品酸在加入烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)的条件下,可以被NAD⁺作用生成苯基丙二半醛,后者不稳定,释放出CO₂,变成稳态的苯乙醛而降低毒性^[10]。另外,在加或不加活化条件下,托品酸均未使TA102发生突变,说明托品酸的致突变作用机制为诱导组氨酸靶基因中鸟嘌呤-胞嘧啶(G-C)位点碱基置换和移码突变而非腺嘌呤-胸腺嘧啶(A-T)位点的碱基置换和移码突变。

《中国药典》2010年版中未规定消旋山莨菪碱及其制剂中托品酸的限量范围。我们在前期研究中发现了盐酸消旋山莨菪碱注射液杂质托品酸的含量范围,且其随药物储存期的延长而不断增加;本试验结果也表明,托品酸在2 500 μg/ml的剂量水平以上可使鼠伤寒沙门氏菌发生回复突变而具有致突变性。因此我们建议,《中国药典》应规定盐酸消旋山莨菪注射液杂质托品酸的杂质限量。

参考文献

[1] 汪海波,陈佳辉.托品酸的制备[J].中国医药工业杂志, 2004,35(11):645.
*主管药师。研究方向:药品检验与安全性评价。电话:0898-66832932。E-mail:liuchun2003@163.com

- [2] 王龙书,黄建军,罗春,等.乙酰基阿托品盐酸盐的制备[J].广东化工,2013,40(6):46.
- [3] Klomp D, Peters JA, Hanefeld U. Enzymatic kinetic resolution of tropic acid[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, 16(23):3 892.
- [4] 陈怀侠,杜鹏,韩凤梅,等.山莨菪碱及其大鼠肠内菌体外代谢物的液相色谱-质谱法分析[J].中草药,2009,40(4):563.
- [5] 张春华,吴惠勤,黄晓兰,等.液相色谱-电喷雾串联质谱同时检测尿液和胃液中12种有毒生物碱[J].分析化学,2012,40(6):862.
- [6] 熊小婷,吴惠勤,黄晓兰.液相色谱-电喷雾串联质谱同时检测血液中8种有毒生物碱[J].分析化学,2009,37(10):1 433.
- [7] 朱燕,张强,周玲,等.拉沃替丁鼠伤寒沙门氏菌基因回复突变试验[J].齐鲁药事,2005,24(1):48.
- [8] 熊灏,赵鹏,李彬,等.藏虫草胶囊毒理学安全性评价[J].中国药房,2011,22(15):1 367.
- [9] 程洁,靳苏香,王军,等.Ames试验与彷徨试验改良法对两种诱变物的对比研究[J].毒理学杂志,2012,26(5):391.
- [10] Long MT, Bartholomew BA, Smith MJ, et al. Enzymology of oxidation of tropic acid to phenylacetic acid in metabolism of atropine by pseudomonas sp.strain AT3[J]. *J Bacteriol*, 1997, 179(4):1 044.
- (收稿日期:2013-05-13 修回日期:2013-06-13)

比伐卢定(Bivalirudin)是一种静脉抗凝药,又称双价水蛭素变体,能够与已结合纤维蛋白的凝血酶和循环中游离的凝血酶可逆性结合,而不会出现其他现有的抗凝剂经常存在的缺血和出血并发症^[1]。临床上该药作为抗凝剂用于成人择期和急诊经皮冠状动脉介入治疗、经皮冠状动脉腔内治疗、心肌梗死溶栓治疗、外周血管介入治疗、心脏外科手术及肝素诱导的血小板减少症/血栓综合征的治疗等^[2-3],治疗运用安全有效。其抗凝成分为水质素衍生物,是由20个氨基酸组成的多肽。其生产合成操作步骤多,纯化复杂,容易引入杂质,或者组分不明,不利于进行安全性检查控制。本文通过对比伐卢定的降、升压物质与毒性进行研究,确定限值,为该制剂质量控制提供了科学依据。

1 材料

1.1 仪器

MP150 16通道生理记录仪(美国Biopac公司);CAS电子计重秤(上海凯士电子有限公司);AL204电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

比伐卢定原料药(海南中和药业股份有限公司,批号:20090501、20090502、20090503,纯度:均大于88%);垂体后叶标准品[批号:5028709,效价:1.87 u/mg(子宫收缩作用)、1.48 u/mg(升压作用)]和磷酸组织胺对照品(批号:0510-9411),供测定用,均购自中国食品药品检定研究院;甲磺酸酚妥拉明注射液(瑞士诺华制药有限公司,批号:S0049,规格:1 ml:10 mg)。

1.3 动物

SPF级SD大鼠,体质量300~450 g,♂;SPF级昆明种小鼠,体质量17~22 g,♀♂不拘,均由广东省医学实验动物中心提供,生产许可证号为SCXK(粤)2008-0002;猫,♂,体质量2.0~3.5 kg,♀无孕,市售。

2 方法

2.1 降压物质检查方法^[4]

用4%的戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉猫^[5],固定后分离气管及颈动脉,在一侧颈动脉中插入与16通道生理记录仪相连的动脉插管记录血压,在一侧股静脉插入静脉插管连接三通供给药用,待血压稳定后,即可进行实验。自猫股静脉依次注入磷酸组织胺对照品溶液,剂量为0.05、0.10、0.15 μg/kg,重复给药2~3次进行灵敏度测定。猫的灵敏度符合规定后分别依次从股静脉注入0.10 μg/kg磷酸组织胺对照品溶液(d_s)、拟定限值的比伐卢定溶液(d_r),给药体积均为每只1 ml。按照下列次序注射一组4个剂量: d_s 、 d_r 、 d_r 、 d_s ,以第1与第3、第2与第4剂量所致的反应分别比较,如 d_r 所致的变化值均不大于 d_s 所致变化值的一半,即认为比伐卢定的降压物质检查符合规定;否则应按上述次序继续注射一组4个剂量,并按相同方法分别比较两组内各对 d_s 、 d_r 所致的变化值; d_r 所致变化值均不大于 d_s 所致变化值,仍认为比伐卢定的降压物质检查符合规定;反之则不符合规定,否则应另取猫复试,如复试的结果仍为 d_r 所致的变化值大于 d_s 所致的变化值,即认为比伐卢定的降压物质检查不符合规定。

2.2 升压物质检查方法^[4]

取大鼠用25%乌拉坦溶液4 ml/kg麻醉固定后分离气管^[6],剥离一侧颈动脉,插入与16通道生理记录仪相连的动脉插管,在一侧股静脉插入静脉插管,连接三通供注射药液用;缓缓注入1 mg/ml的甲磺酸酚妥拉明溶液(1 mg/kg),使血压稳定在5.32~6.65 kPa,如血压不能稳定则隔5~10 min再注射1次甲磺酸酚妥拉明溶液,直至血压稳定。选定高、低剂量(0.06、0.036 u/ml)的垂体后叶标准品稀释液,低剂量稀释液应能使大鼠血压升高1.33~3.33 kPa,将高低剂量轮流重复注入2~3次,如高剂量稀释液所致反应的平均值大于低剂量稀释液所致反应的平均值,可认为大鼠的灵敏度符合规定。取灵敏度符合规定的大鼠,以0.05 u/ml垂体后叶标准品稀释液(d_s)、比伐卢定按拟定的剂量(d_r)进行升压物质检查限度研究,给药体积为每只0.2 ml。按照下列次序注射一组4个剂量: d_s 、 d_r 、 d_r 、 d_s ,以第1与第3、第2与第4剂量所致的反应分别比较,判断方法同“2.1”项。

2.3 比伐卢定剂量选择与升降压物质检查

比伐卢定临床单次静脉给药剂量为2.8 mg/kg,根据2010年版《中国药典》二部附录“化学药品注射剂安全性检查法应用指导原则”项^[4],1/5~5倍临床单次用药剂量作为降压物质检查剂量限值^[7],将比伐卢定剂量设为2.8、5.6、11.2、14 mg/kg(1、2、4、5倍临床单次给药剂量),分别按“2.1”“2.2”项下方法进行4个剂量同一批号(批号:20090502)比伐卢定原料药的升压和降压物质检查,以供试品未产生降压或升压反应为标准选择限值,再以限值进行3个批号比伐卢定原料药的升压和降压物质检查。

2.4 急性毒性实验

取18.0~22.0 g的小鼠60只,参照文献^[8],根据预实验结果得比伐卢定的100%死亡率剂量(D_m)为1.97 g/kg,0死亡率剂量(D_n)为1.16 g/kg,组间剂量系数为0.9,共分为6组,每组10只,♀♂各半,剂量分别为1.16、1.29、1.43、1.59、1.77、1.97 g/kg,比伐卢定的质量浓度分别为46.3、51.5、57.2、63.6、70.7、78.5 mg/ml。按25 ml/kg灌胃给药,给药后4 h内严密观察、详细记录各组小鼠的一般情况、活动状态、排泄情况、中毒症状、中毒反应起始时间、严重程度、持续时间、死亡时间及死亡只数,给药后连续观察14 d。对死亡小鼠立即进行大体解剖,对主要脏器进行肉眼观察并取心、肝、脾、肺、肾、脑、胃肠,固定于10%福尔马林溶液中,稍后进行组织病理学检查。用加权回归几率法(Bliss法)计算半数致死量(LD_{50})、95%可信限,评估比伐卢定对小鼠的急性毒性。

2.5 异常毒性检查

根据小鼠急性毒性实验及预实验结果,采用 LD_{50} 的1/8作为异常毒性限值,确定比伐卢定的异常毒性检查剂量为0.20 g/kg。将3批比伐卢定配制成质量浓度为8.0 mg/ml的溶液,按照2010年版《中国药典》二部附录“异常毒性检查法”项,对每个批号比伐卢定原料药分别进行检查。取5只小鼠,♀♂不拘,体质量17~20 g,每只尾静脉注射0.5 ml,4~5 s注射完毕。全部小鼠在给药后48 h内无死亡;如有死亡,应另取体质量18~19 g的小鼠10只进行复试,全部小鼠给药后48 h内不得死亡。

3 结果

3.1 剂量选择结果

结果表明,比伐卢定的降压和升压物质检查均符合药典规定,未出现明显降压反应和升压反应。因本品属于急重病用药,故拟定本品的限值为14 mg/kg。不同剂量比伐卢定的降压和升压物质检查结果见表1。

表1 不同剂量比伐卢定的降压和升压物质检查结果(kPa)

Tab 1 Results of bivalirudin in different doses in depressor and vasopressor substances test(kPa)

剂量, mg/kg	降压物质检查				升压物质检查			
	d _s	d _r	d _r	d _s	d _s	d _r	d _r	d _s
2.8	7.79	1.10	1.02	8.01	4.33	0.89	0.94	4.11
5.6	7.55	0.69	0.65	7.79	3.98	1.02	1.32	4.05
11.2	8.20	0.89	1.26	7.66	4.42	0.76	1.44	4.61
14.0	6.91	1.41	0.68	7.49	4.12	1.18	1.52	3.91

3.2 降压物质检查结果

结果表明,3批样品的降压物质检查结果均符合规定,结果见表2。

表2 比伐卢定降压物质检查结果

Tab 2 Results of bivalirudin in depressor substances test

批号	剂量,mg/kg	d _s ,kPa	d _r ,kPa	d _r ,kPa	d _s ,kPa
20090501	14	5.43	0.47	0.72	5.20
20090502	14	5.64	0.67	0.59	5.57
20090503	14	4.34	1.32	1.08	4.26

3.3 升压物质检查结果

结果表明,3批样品的升压物质检查结果均符合规定,结果见表3。

表3 比伐卢定升压物质检查结果

Tab 3 Results of bivalirudin in vasopressor substance test

批号	剂量,mg/kg	d _s ,kPa	d _r ,kPa	d _r ,kPa	d _s ,kPa
20090501	14	5.08	1.76	0.55	3.91
20090502	14	4.18	2.03	1.77	5.64
20090503	14	4.21	0.67	0.68	3.90

3.4 急性毒性实验结果

给药后小鼠可见不同程度的抽搐、惊厥、腹式呼吸、趴卧不动,部分小鼠抽搐、惊厥后死亡,其余小鼠恢复正常。存活小鼠14 d内行动灵活、反应敏捷、被毛整洁、目光有神、眼鼻口无分泌物、进食饮水正常,未再出现死亡。小鼠经尾静脉注射给药LD₅₀为1.60 g/kg,LD₅₀的95%可信限为1.50~1.71 g/kg,急性毒性实验结果见表4。

3.5 异常毒性检查结果

给药后观察48 h,未见小鼠死亡,检查符合规定。

4 讨论

比伐卢定生产操作步骤多,纯化复杂,容易引入杂质,有可能混入组胺、类组胺样容易引起血管扩张而降低血压的物质,或有可能污染升高血压的杂质及毒性杂质并且缺乏有效的理化分析方法,从而影响药物的治疗效果、产生不良反应。

表4 急性毒性实验结果

Tab 4 Results of acute toxicity test

剂量, g/kg	样品质量浓 度,mg/ml	死亡数, 只	死亡率, %	始体质量,g	7 d体质量, g	14 d体质量, g
1.16	46.3	0	0	20.4±1.4	28.4±2.5	32.7±2.9
1.29	51.5	1	10	20.2±1.3	26.4±1.4	30.5±3.3
1.43	57.2	3	30	19.9±1.1	28.2±1.8	32.6±3.9
1.59	63.6	5	50	20.4±0.9	27.7±1.8	31.9±4.1
1.77	70.7	8	80	19.7±0.6	30.8±2.5	34.5±4.9
1.97	78.5	9	90	19.8±1.0	28.5	33.5

比伐卢定目前国外已广泛应用于临床,国内该品种也有几个厂家获得了申报批件,目前上市的虽然比较少,但扩大生产以后,对于安全性控制方面需要有一定的标准。对于比伐卢定进行降压、升压物质检查、毒性检查是控制药物安全性的几个指标。本研究建立了比伐卢定降压、升压物质检查法,根据该品种的临应用情况特点,本着从严的原则将限值均定为14 mg/kg;急性毒性检查LD₅₀为1.60 g/kg,LD₅₀的95%可信限为1.50~1.71 g/kg,异常毒性检查剂量0.20 g/kg约相当于LD₅₀的1/8,可以完全排除药物本身的毒性,从而发现杂质或其他原因而非药物本身引起的毒性,研究的剂量符合化学药品注射剂安全性检查法应用指导原则。随着国内本品种生产产量的增加,建议增加过敏反应检查和细菌内毒素检查法组成较系统全面的安全评价体系,减少或者避免比伐卢定制剂由于质量问题在临床用药时引起急性降压或升压反应、急性毒性反应、过敏反应、热原反应等严重不良反应的发生,从而确保临床用药的安全性。

参考文献

- [1] 沈忱,刘建宁,王莹,等.固相合成抗凝血药比伐卢定及合成条件的优化[J].南京医科大学学报:自然科学版,2010,30(9):1282.
- [2] 权菊香,王燕龙.直接凝血酶抑制剂比伐卢定的研究现状[J].中国临床药理学杂志,2012,28(3):231.
- [3] 潘春梅,向定成.抗凝药比伐卢定国外临床应用进展[J].中国新药杂志,2008,17(9):725.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录102-103、212-214.
- [5] 邓利娟,任雪,范慧红.骨肽及复方骨肽注射液降压物质的研究[J].中国生化药物杂志,2010,31(4):231.
- [6] 李海芳,钱德明,迪丽努尔·沙比托夫.关于缩宫素注射液中升压物质检查法的探讨[J].药物分析杂志,2008,28(9):1509.
- [7] 邓利娟,闫安庄,范慧红.胸腺肽注射剂降压物质检查及其限值的确定[J].药物分析杂志,2010,30(8):1493.
- [8] 贾鹰珏,李国辉,张平.黄连及黄连解毒汤对小鼠的急性毒性实验研究[J].中国药理学杂志,2011,46(18):1399.

(收稿日期:2013-05-21 修回日期:2013-06-13)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅