

帕立骨化醇亚微乳注射剂的溶血性和血管刺激性实验

兰 洁*,刘青春(重庆华邦制药有限公司,重庆 401121)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)21-2326-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.08

摘要 目的:评价帕立骨化醇亚微乳注射剂的溶血性和血管刺激性。方法:以家兔红细胞为受试物,设帕立骨化醇亚微乳注射剂(样品)组和市售帕立骨化醇注射液(市售品)组各5个剂量,加药量(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)分别为每管0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 ml,观察3 h内的溶血和红细胞凝聚情况,同时设阴性对照(0.9%氯化钠注射液)组和阳性对照(纯化水)组进行比较。取家兔随机分为5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 样品和市售品的单次给药组和多次给药组,采用自体左右侧自身对比法,耳缘静脉左侧注射供试品0.5 ml,右侧注射0.9%氯化钠注射液0.5 ml,多次给药试验隔天给药1次,共给药5次,观察注射部位血管刺激性症状,并进行病理组织学检查。结果:阴性对照组细胞未见出现溶血和红细胞凝聚;阳性对照组细胞发生全溶血,未见红细胞凝聚;各剂量样品组和市售品组细胞3 h内均未出现溶血或红细胞凝聚。样品的单次给药组和多次给药组家兔耳缘静脉均未见血管刺激性;市售品的单次给药组和多次给药组家兔耳缘静脉均有血栓形成,对血管有轻度刺激性。结论:5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的帕立骨化醇亚微乳注射剂对家兔未见溶血性和血管刺激性。

关键词 帕立骨化醇亚微乳注射剂;溶血性;血管刺激;兔

Hemolysis and Vascular Irritation of Paricalcitol Submicroemulsion Injection

LAN Jie, LIU Qing-chun (Chongqing Huapont Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing 401121, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To evaluate the hemolysis and vascular irritation of Paricalcitol submicroemulsion injection. METHODS: The red blood cells of rabbit was taken as the subject and divided into Paricalcitol submicroemulsion injection groups (sample group) and marketed Paricalcitol injection groups (marketed product groups) at 5 different dose levels including 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 and 0.1 ml/tube with adding amount of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The hemolysis and red cell condensation were observed within 3 h. They were compared with negative control group (0.9% Sodium chloride injection) and positive control group (purified water). Rabbits were randomly divided into single administration group and multiple administration group of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sample and marketed product. Using the self comparison of left and right side, rabbits of each test group were injected 0.5 ml test samples into the left ear vein while 0.5 ml 0.9% Sodium chloride injection into the right ear vein. Multiple administration group was injected once every other day for 5 times altogether. Vascular irritation symptoms were observed by naked eyes. Histopathological examination was carried out at the same time. RESULTS: Hemolytic trial showed that no hemolysis and condensation reaction were found in negative control group; significant hemolysis was found in positive control group without condensation reaction; no hemolysis and condensation reaction were found in both sample group and marketed product group within 3 h. Vascular irritation trial showed that no vascular irritation was observed in rabbits' ear vein after single and multiple intravenous administration of sample. However, mild vascular irritation and thrombus were observed in single and multiple administration group of marketed product group. CONCLUSIONS: Paricalcitol submicroemulsion injection 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doesn't show the property of hemolysis and vascular irritation to rabbits.

KEYWORDS Paricalcitol submicroemulsion injection; Hemolysis; Vascular irritation; Rabbits

帕立骨化醇(Paricalcitol)是美国雅培公司研发的维生素D活性物质骨化三醇的类似物。经体内外试验表明,帕立骨化醇通过与维生素D受体(Vitamin D receptor, VDR)结合,激活维生素D反应途径,抑制甲状旁腺素(Parathyroid hormone, PTH)基因转录和PTH分泌,抑制能力与骨化三醇相当,从而实现继发性甲状旁腺功能亢进症的预防和治疗^[1]。目前已上市的剂型有注射液和软胶囊,注射液规格为5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。由于帕立骨化醇难溶于水,为解决溶解问题,市售的注射液中含有50%有机溶剂,其中含30%丙二醇和20%乙醇。有机溶剂对血管有一定的刺激性,注射时易引起注射部位疼痛,且反复多次注射还可能造成血管静脉炎。有专利^[2]报道使用非离子表面活性剂聚山梨酯20可增加帕立骨化醇在水中的溶解,降低有机溶剂用量,但由于聚山梨酯类增溶剂具有溶血作用,并不

适合临床实际应用。

亚微乳作为一种新型制剂,可作为水溶性差或油性药物的载体,增加其溶解度,同时具有保护被包封药物、增大载药量、提高药物稳定性、延长药物作用时间、减少毒副作用等特点^[3]。本研究将帕立骨化醇制成亚微乳注射剂,并对其溶血性和血管刺激性进行了评价,为开发帕立骨化醇非胃肠道给药新剂型提供依据。

1 材料

1.1 仪器

DELTA 320型pH计(瑞士Mettler Toledo公司);DMBA450型光学显微镜(美国Motic公司)。

1.2 药品与试剂

帕立骨化醇原料药(华邦胜凯药业有限公司,批号:Par-201201001,纯度:99.9%);帕立骨化醇注射液(商品名:ZEMPLAR[®],美国雅培公司,批号:12-112-DK,规格:5 μg :1

* 工程师,硕士。研究方向:药物制剂与新药开发。电话:023-67886932。E-mail:firesparkblue@hotmail.com

ml);注射用大豆油(广州汉方现代中药开发研究有限公司,批号:20121102);注射用蛋黄卵磷脂(Lipiod E80)、中链甘油三酸酯、中链甘油三酸酯(注射级)均购自德国Lipiod公司;泊洛沙姆188(德国BASF公司,批号:WP0D644F,纯度:99.5%);组织标本固定液[乙醇-甲醛-冰乙酸-水(14:2:1:3,V/V/V/V,自制)];水为纯化水和注射用水。

1.3 动物

新西兰家兔,普通级,♀ ♂不拘,体质量2.0~3.0 kg,购自重庆市中药研究院实验动物研究所,合格证号为SCXK(渝)2012-0006。

2 方法与结果

2.1 帕立骨化醇亚微乳注射剂的制备

根据帕立骨化醇亚微乳注射剂的处方设计与工艺研究,按以下方法制备:将蛋黄卵磷脂15 g、维生素E 0.8 g、大豆油75 g、中链甘油三酸酯75 g混合,于70℃水浴加热搅拌至卵磷脂完全溶解,再加入帕立骨化醇5 mg,继续搅拌至药物完全溶解,得到油相。将甘油22.5 g、泊洛沙姆188 5 g、油酸钠1 g分散于适量注射用水中,加热至70℃,搅拌至全部溶解,得到水相。在高速(12 000 r/min)搅拌下,将水相加入油相中,搅拌10 min,制得初乳。以0.1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至8.0,用注射用水稀释定容至1 000 ml,转移至高压均质机中,25℃下以900 bar压力均质10次,滤过,灌装,充氮,封口,121℃灭菌15 min,即得。

2.2 溶血性试验^[4-5]

2.2.1 红细胞混悬液的制备。取家兔心脏血10 ml,放入经0.9%氯化钠注射液(生理盐水)润洗的烧杯中,用玻璃棒搅动血液,除去纤维蛋白原,使之成为脱纤血液。在脱纤血液中加入生理盐水约100 ml,摇匀,340×g离心15 min,除去上清液,沉淀的红细胞再用生理盐水按上述方法重复洗涤,至上清液不显红色为止。弃上清液后,将压积红细胞用生理盐水配成2%的混悬液,备用。

2.2.2 给药与结果。取洁净试管12只,编号,1~5号管为帕立骨化醇亚微乳注射剂供试品管,6号管为阴性对照管(生理盐水),7号管为阳性对照管(纯化水),8~12号管为帕立骨化醇注射液(ZEMPLAR®)供试品管。溶血性试验加样量见表1。

表1 溶血性试验加样量

成分	管号											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2%红细胞悬液,ml	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
生理盐水,ml	2.4	2.3	2.2	2.1	2.0	2.5		2.4	2.3	2.2	2.1	2.0
纯化水,ml							2.5					
帕立骨化醇亚微乳注射剂,ml	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5							
ZEMPLAR®,ml								0.1	0.2	0.3	0.4	0.5

按表1加样后,混匀,置于(37±0.5)℃恒温水浴箱中温育,3 h后观察溶血与红细胞凝聚现象。如红细胞全部下沉,上层溶液无色澄明,表明无溶血发生;如溶液为澄明红色或棕红色,管底有少量红细胞残留,表明发生部分溶血;如溶液澄明红色,管底无红细胞残留,表明发生全溶血;如溶液中有棕红色或红棕色絮状沉淀,摇匀后不分散,则判定为红细胞凝聚。结果表明,7号管液为澄明红色,管底无红细胞残留,为全溶血;而1~6、8~12号管液3 h内均未出现溶血或红细胞凝聚。

根据溶血性检查判断标准,帕立骨化醇亚微乳注射剂和ZEMPLAR®均不引起溶血和红细胞凝聚反应。

2.3 血管刺激性实验^[6-7]

2.3.1 分组和给药。取家兔20只,随机分为帕立骨化醇亚微乳注射剂单次给药组、ZEMPLAR®单次给药组、帕立骨化醇亚微乳注射剂多次给药组和ZEMPLAR®多次给药组,每组5只。采用自体左右侧自身对比法进行给药,即家兔左侧耳缘静脉注射给予供试品,右侧耳缘静脉注射给予阴性对照品(生理盐水)。按照ZEMPLAR®临床用药剂量和最大用药剂量计算,其临床最大给药体积为0.05 ml/kg,故家兔给药体积设为每只0.5 ml。单次给药组家兔在1 d内仅给药1次;多次给药组家兔隔天给药1次,共给药5次。

2.3.2 指标检查及判断标准。每次给药前及末次给药后24 h,记录每只家兔血管和周围组织刺激性评分结果,两者之和为该家兔血管刺激性肉眼观察评分累计得分值。计算每组家兔血管刺激性肉眼观察评分累计得分值之和,再除以5,得每组家兔累计得分平均值。末次血管刺激性症状观察完毕后,每组各取5只家兔腹腔注射3%戊巴比妥钠30 mg/kg麻醉,处死;切取给药部位血管及周围组织,固定,包埋,切片,苏木精-伊红染色,在光学显微镜(简称光镜)下进行观察。计算每组家兔血管刺激性光镜观察评分累计得分值之和,再除以5,得每组家兔累计得分平均值。肉眼和光镜观察的血管刺激性判断标准:累计得分平均值<0.5为无刺激性,<2.5为轻度刺激性,<4.5为中度刺激性,>4.5为重度刺激性。肉眼、光镜观察血管刺激性评分标准分别见表2、表3。

表2 肉眼观察血管刺激性评分标准

eyes		
观察指标	评分标准	得分
血管	正常	0
	血管轻度充血发红,纹路清晰	1
	血管充血发红,纹路不清	2
	血管重度充血,呈紫红色	3
周围组织	无水肿	0
	轻微水肿	1
	明显水肿	2
	重度水肿	3

表3 光镜观察血管刺激性评分标准

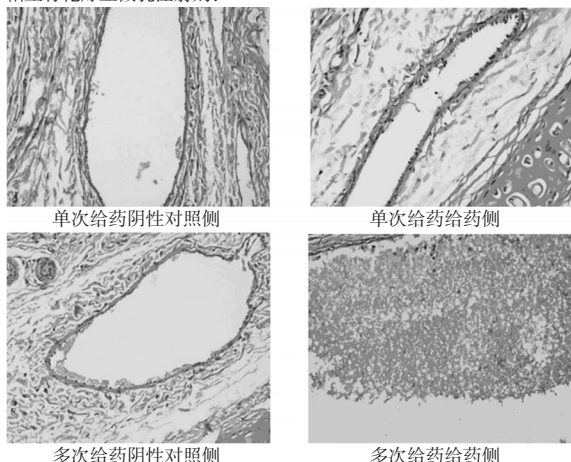
Standards for pathology scoring of vascular irritation		
观察指标	评分标准	得分
血管	内皮及血管壁完整	0
	内皮损伤	1
	血管栓塞	2
	血管破裂	3
周围组织	正常	0
	水肿	1
	出血	2
	炎症细胞浸润	3

2.3.3 肉眼观察结果。帕立骨化醇亚微乳注射剂的单次给药组和多次给药组家兔给药后24 h内未观察到血管刺激性症状,血管刺激性评分均为0分。ZEMPLAR®单次给药组和多次给药组家兔给药后24 h内均出现轻度刺激性,血管刺激性累计得分平均值分别为0.8和1.8,多次给药评分高于单次给药。

2.3.4 光镜观察结果。帕立骨化醇亚微乳注射剂单次给药组

和多次给药组家兔给药后 24 h 阴性对照侧和给药侧的耳缘静脉及周围组织均未见明显病理改变, 累计得分平均值均为 0。ZEMPLAR® 单次给药组和多次给药组家兔给药后 24 h 给药侧的耳缘静脉内均有血栓形成, 累计得分平均值均为 2, 存在轻度刺激性。显微镜图见图 1。

帕立骨化醇亚微乳注射剂:



ZEMPLAR®:

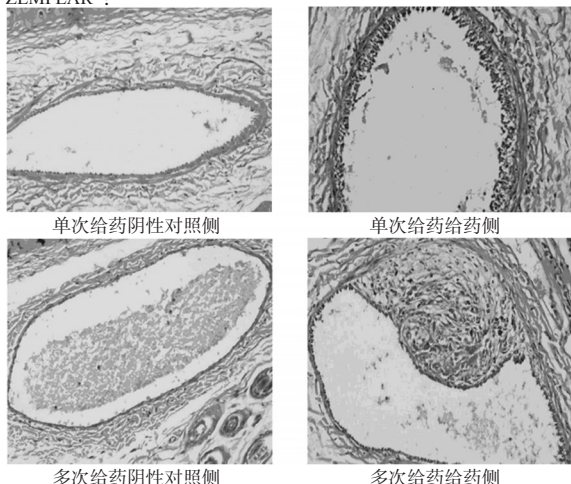


图 1 各组家兔血管刺激性病理显微镜图

Fig 1 Pathological micrographs of vascular irritation of rabbits in each group

综上所述, 5 $\mu\text{g/ml}$ 的帕立骨化醇亚微乳注射剂单次给药和多次给药, 家兔耳缘血管无刺激性反应, 而相同浓度的 ZEMPLAR® 单次给药和多次给药对家兔耳缘静脉及周围组织有轻度刺激作用。因此, 帕立骨化醇亚微乳注射液对家兔耳血管刺激性小于 ZEMPLAR®。

3 讨论

实验结果表明, 5 $\mu\text{g/ml}$ 的帕立骨化醇亚微乳注射剂对家兔无溶血性和血管刺激性, 而 ZEMPLAR® 虽无溶血现象, 但对家兔耳缘静脉及周围组织有轻度刺激性。因此, 将帕立骨化醇制成亚微乳注射剂, 既解决了药物溶解问题, 同时又克服了现有注射液的血管刺激性缺点, 从而可以提高患者的用药依从性和安全性, 这为帕立骨化醇非胃肠道给药提供了一种新颖可行的选择途径。

参考文献

- [1] 吴淑燕, 顾洒洒, 李晓莉, 等. 维生素 D 类似物帕立骨化醇的药理作用研究进展[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(22): 1700.
- [2] 骨疗国际公司. 用于亲脂性药物的制剂, 中国: CN03822203. 5[P]. 2007-11-21.
- [3] 赵永星, 张雪晓, 孙倩, 等. 注射用伊维菌素亚微乳的制备及其稳定性研究[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(6): 27.
- [4] 卢秀霞, 龙晓英, 袁飞. 辣椒碱纳米乳注射剂的溶血性与血管刺激性试验[J]. 广东药学院学报, 2010, 26(1): 77.
- [5] 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.
- [6] 苏宁, 姚全胜. 新药毒理实验动物组织病理图谱[M]. 南京: 东南大学出版社, 2005: 130-132.
- [7] 李学兰, 姜隆梅, 张红, 等. 乳糖酸红霉素药物浓度和给药次数对血管刺激性的影响[J]. 泰山医学院学报, 2002, 23(3): 227.

(收稿日期: 2014-01-24 修回日期: 2014-03-18)

国家食品药品监督管理总局办公厅关于修订生理氯化钠溶液说明书的通知

本刊讯 2014 年 5 月 16 日, 为适应科学用药需要, 保障公众用药安全, 根据食品药品监管总局技术评价结果, 决定对生理氯化钠溶液说明书的【适应证】、【用法用量】、【不良反应】、【禁忌】、【注意事项】、【孕妇及哺乳期妇女用药】、【儿童用药】、【老年用药】、【药物相互作用】、【药物过量】项进行修订。相关药品生产企业应做好以下工作: (1) 在 2014 年 7 月 15 日前, 依据《药品注册管理办法》等有关规定, 按照附件要求提出修订

说明书的补充申请。说明书的其他内容应当与原批准内容一致。补充申请获准后生产的药品, 不得继续使用原药品说明书。(2) 应当将说明书修订的内容及时通知相关医疗机构、药品经营企业等单位, 并在补充申请批准后 6 个月内对已出厂的药品说明书予以调整。(3) 药品标签涉及相关内容的, 应当一并修订。