

肺靶向汉防己甲素缓释微囊的安全性评价

李凤前 陆 彬* 陈文彬¹ (成都 610041 四川大学华西药学院;¹ 华西第一医院)

摘要 目的: 探讨肺靶向汉防己甲素缓释微囊的安全性。方法: 用白蛋白为囊材、以“喷雾干燥-热变性”法制备肺靶向汉防己甲素缓释微囊(TET-MC), 进行急性毒性、长期毒性、体外溶血试验、过敏性试验以及局部刺激性试验。结果: 小鼠静脉注射和腹腔注射的 LD₅₀ 分别为 83.56 和 594.29 mg/kg, 与原药比分别大了 150% 和 140%, 体外溶血试验 3h 无溶血和凝集现象, 无刺激性和过敏反应, 大鼠腹腔注射连续 21d 给药部位未见异常, 低剂量组各实质性器官细胞未见组织学病变, 中、高剂量组的异常情况在停药 2wk 后恢复正常。结论: 汉防己甲素经微囊化后毒性明显降低, 表明 TET-MC 基本安全。
关键词 汉防己甲素; 微囊; 急性毒性; 体外溶血; 刺激性; 过敏性

Evaluation of the safety of tetrandrine loaded sustained release microcapsules for lung targeting

Li Fengqian, Lu Bin*, Chen Wenbin¹ (West China School of Pharmacy, ¹First Affiliated Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To evaluate the safety of tetrandrine (TET) loaded bovine serum albumin microcapsules (TET-MC). **METHOD:** “Spray drying-thermal denaturation” technique was used to prepare TET-MC. The acute and long-term toxicity tests, hemolysis test *in vitro*, stimulating test, allergic test were conducted. **RESULTS:** The values of LD₅₀ for mice *iv* and *ip* were 83.56 and 594.29 mg/kg, respectively, which were 1.5 and 1.4 larger than those of the original drug respectively. No hemolysis, blood coagulation (within 3h), stimulation or allergic reactions were observed. Continuous administration to rats *via ip* for 21 days resulted no abnormal phenomena in the injection positions, nor histologically pathological changes were observed in the organs for the low dosage group, while the middle and high dosage groups were a little abnormal but recovered in 2 weeks. **CONCLUSION:** Toxicity of TET was significantly decreased by microencapsulation and TET-MC was basically safe.

KEY WORDS tetrandrine, microcapsules, acute toxicity, hemolysis *in vitro*, stimulation, allergy

药物微囊化后静注可起靶向兼缓释作用, 其安全性是重要的质量考察指标。本实验以汉防己甲素(tetrandrine, TET)与无毒、生物降解的牛血清白蛋白(BSA)经喷雾干燥-热变性微囊化工艺, 制肺靶向汉防己甲素缓释微囊后, 对其安全性进行考察。

1 仪器、材料和动物

Büchi 190 小型喷雾干燥器(瑞士), 牛血清白蛋白(BSA, 上海丽珠东风生物技术有限公司), 汉防己甲素(浙江金华制药厂), 肺靶向汉防己甲素缓释微囊(TET-MC, 其混悬液含 2mg TET/ml, 自制), 空白微囊(自制), 汉防己甲素水针剂(江西彭泽制药厂), 实验用水为多效蒸馏水。

昆明种小鼠(雌雄各半, 18~22g), 大耳白家兔(2~3kg), 豚鼠(250~350g, 雌雄各半), 均由本校实验动物中心提供。

2 实验方法与结果

2.1 “喷雾干燥-热变性”工艺制备微囊

将微粉化的 TET 混悬于 BSA 水溶液中, 以适当比例制得一定浓度的样品, 经蠕动泵将样品导入喷嘴处, 进行喷雾干燥微囊化。先制得粉末状微囊, 第二步将其发装于安瓿中, 置于 120℃ 的恒温烤箱中维持 6h, 使白蛋白囊材加热变性, 同时微囊也达到灭菌要求, 即得肺靶向汉防己甲素缓释微囊(TET-MC), 其载药量为 37.88%, 平均粒径为 7.42μm, 跨距为 0.3176。同法制备空白微囊。详见文献[1]。

2.2 小鼠 LD₅₀ 的测定

2.2.1 小鼠尾静脉注射的 LD₅₀ 测定 经预试初步确定最大致死剂量和最小致死剂量后, 将 150 只小鼠, 随机分组, 每组 10 只, 雌雄各半。以灭菌生理盐水为分散介质, 按 1:0.75 比例配制供试样品, 分别一次性尾静脉注射不同剂量的 TET 水针剂、空白微囊和 TET-MC, 连续观察 14d, 记录各剂量组小鼠的死亡情况, 采用综合法^[2]计算 LD₅₀, 结果见表 1。将死亡动物进行大体解剖观察, 发现肺部有淤血, 但心、肝、脾和肾等器官无明显异常。

九五攻关国家重点项目, 批准号 96-906-02-17

李凤前, 男(1970-)2000 届博士研究生; * 陆彬, 博士生导师, 通信联系人

表 1 TET 水针剂、空白微囊和 TET-MC 对小鼠 iv 的 LD₅₀

样 品	受试对数剂量	死亡率 (%)	LD ₅₀ ± 95% 置信限 (mg/kg)
TET 水针剂	1. 810	100	33. 30± 8. 78
	1. 685	70	
	1. 560	50	
	1. 435	30	
	1. 310	30	
空白微囊	2. 279	100	100. 93± 22. 88
	2. 154	80	
	2. 029	60	
	1. 904	20	
	1. 779	10	
TET-MC	2. 222	100	83. 56± 18. 95
	2. 098	90	
	1. 972	60	
	1. 848	20	
	1. 723	20	

2. 2. 2 小鼠腹腔注射的 LD₅₀测定 同上方法以最大剂量配制空白微囊混悬液, 分别对 20 只实验小鼠(雌雄各半)进行腹腔注射, 观察小鼠对空白微囊的耐受性。结果发现, 给予 2850mg/kg 剂量后, 小鼠仍无一只死亡, 观察 7d, 小鼠活动正常, 体重于对照组无差异。

同法一次性腹腔注射不同剂量的 TET 水针剂和 TET-MC, 观察 14d, 记录各剂量组小鼠的死亡情况, 采用综合法求得 LD₅₀见表 2。

表 2 TET 水针剂和 TET-MC 对小鼠 ip 的 LD₅₀

样 品	受试对数剂量	死亡率 (%)	LD ₅₀ ± 95% 置信限 (mg/kg)
TET 水针剂	2. 655	90	246. 89± 65. 14
	2. 530	60	
	2. 405	40	
	2. 280	30	
	2. 155	20	
	2. 030	02	
	2. 999	90	
TET-MC	2. 874	80	594. 29± 122. 37
	2. 749	40	
	2. 624	30	
	2. 499	10	
	2. 374	0	

2. 3 局部刺激性试验

采用家兔耳壳法^[3], 用 2 只家兔(一雌一雄)在耳壳基部血管较少处皮下注射 0. 1ml TET-MC, 另一侧耳壳对应部位注射灭菌生理盐水作对照。分别于 0. 5, 3, 24h 后观察, 均无充血、红肿和组织坏死现象。

2. 4 体外溶血试验

取已除去纤维蛋白的家兔血 10ml, 加灭菌生理盐水 10ml, 混匀, 离心, 弃去上清液, 反复操作至上清液无红色为止。用灭菌生理盐水配成 2% 红细胞悬液, 分别取 2. 5ml 置 7

只试管中, 前 5 管依次分别加入生理盐水注射液 2. 4, 2. 3, 2. 2, 2. 1, 2. 0ml, 第 6 管加 2. 5ml 为阴性对照, 第 7 管加注射用水 2. 5ml 为阳性对照。第 1~ 5 管分别加入 TET-MC 混悬液 0. 1, 0. 2, 0. 3, 0. 4, 0. 5ml。将各管分别摇匀后置 37℃ 恒温水浴孵育, 观察 0. 5, 1, 2, 3h 时现象。以全溶血、部分溶血、无溶血与凝集为指标, 结果除阳性对照在 0. 5h 全溶血外, 其余均无溶血与凝集现象。

2. 5 过敏性试验

取豚鼠 6 只, 雌雄各半, 隔天肌肉注射 0. 3ml TET-MC, 连续 3 次后分成 2 组。一组于末次注射后的第 14 天采用腹腔注射 2. 5ml 进行攻击, 另一组于末次注射后第 21 天同样注射。观察豚鼠均无抓搔鼻、喷嚏、竖毛、抽搐、呼吸困难、大小便失禁、休克和死亡等过敏反应。

2. 6 长期毒性试验

将 80 只大鼠按体重分成生理盐水、高剂量、中剂量、低剂量 4 组, 每组 20 只, 雌雄各半, 每天同一时间腹腔注射 (10ml/kg), 连续给药 21d。另 20 只大鼠为正常组作对照。测定血液学、生化学指标和作病理组织观察, 结果表明低剂量组与正常组和生理盐水组的各项指标均无显著差异, 中、高剂量组有异常变化, 但经停药 2 周后恢复正常, 详见文献 [4]。

3 讨论

TET-MC 采用“喷雾干燥-热变性”微囊化工艺的特点是, 除了材料和药物外, 不会在制备过程中引入有机溶剂或其它外来物质, 因此, 该工艺制得的微囊更能客观评价药物微囊的安全性。

采用综合法计算 LD₅₀及有关参数, 精确度优于加权回归法及目测图解法, 且计算简便, 实验过程中动物的异常死亡情况对结果影响不大, 这优于 Bliss 法。TET 水针剂经静脉注射给药对小鼠的 LD₅₀为 33. 3mg/kg, 与文献^[5]报道结果 (37. 5mg/kg) 接近, 说明本方法可行, 而且 TET 经微囊化后的 LD₅₀提高, 毒性明显降低。

将空白微囊以腹腔注射进行小鼠耐受性试验, 受试 20 只动物无一死亡, 未体现毒性反应, 其耐受量大于 2850mg/kg, 说明了白蛋白微囊作为微囊载体是安全的。TET-MC 以腹腔注射给药的 LD₅₀比 TET 水针剂提高 140% ~ 150%。腹腔注射给药所产生的毒性经一定时间可恢复正常, 可能系腹腔内的微粒异物反应引起的腹膜间皮增生。

肺部毛细血管极为丰富, 内皮表面区域相当大, 静脉注射给药微囊可在肺部毛细血管床截留, 微囊在降解过程中, 微囊的溶胀及粘连程度在变化, 其与体细胞间的作用也在变化, 由此可导致局部栓塞。此时产生的毒性, 除囊材而外, 可能还与微囊的粒径有关^[6]。但肺部的双重供血系统(肺支气管动脉和肺动脉)使肺仍能维持正常功能。由本实验结果可以认为, 经喷雾干燥-热变性工艺、由白蛋白为材料制成的 TET-MC 在适当的剂量下是安全的。

参考文献

- 1 李凤前, 陆彬, 陈文彬, 等. 汉防己甲素缓释微囊肺靶向给药系统的研究. 药学学报, 2001, 36(3): 220.
- 2 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理学实验方法学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 北京1991: 201~203.
- 3 钱之玉主编. 药理学实验与指导. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 410~412.
- 4 李凤前, 陆彬, 陈文彬, 等. 汉防己甲素缓释微囊的长期毒性研究. 中国药品标准, 2001, 2(4): 45.
- 5 刘月盈, 张循范, 汪金平, 等. 汉防己甲素的安全性[J]. 中国药理学杂志, 1990, 25(1): 39.
- 6 Davis MA, Taube RA. Pulmonary perfusion imaging: acute toxicity and safety factors as a function of particle size. J Nuclear Med, 1978, 19: 1209.

收稿日期: 2000-08-07