

## 多种方法综合评价有色注射液盐酸多柔比星的体外溶血作用

熊思敏<sup>1,2</sup>, 王磊<sup>2</sup>, 荆宝琴<sup>2</sup>, 张金晓<sup>2</sup>, 张宗鹏<sup>2\*</sup>, 吕雄文<sup>1\*</sup>

1. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032

2. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

**摘要:** 目的 盐酸多柔比星溶液为红色澄明液体, 不适宜采用常规肉眼观察法进行溶血性评价, 需采用多种方法综合评价有色注射液盐酸多柔比星的体外溶血作用, 为临床用药安全性提供参考。方法 采用常规家兔红细胞为实验对象, 盐酸多柔比星溶液高、低质量浓度为 4.0、2.0 mg/mL, 分别采用血球计数法、酶标仪直接比色法和间接比色法综合评价注射用盐酸多柔比星的体外溶血作用。结果 3 种不同测定方法的评价结果一致: 盐酸多柔比星溶液 4.0 mg/mL 质量浓度下各管溶血率均远远大于 5%, 即发生严重溶血; 2.0 mg/mL 质量浓度下仅加样 0.1 mL 管 (按试管中药物浓度折算该管相当于 0.4 mg/mL 药物浓度下加样 0.5 mL) 无溶血发生, 其他各管溶血率均远远大于 5%, 即发生严重溶血。结论 临床直接将 2.0 mg/mL 的盐酸多柔比星溶液进行静脉推注发生溶血的可能性较大, 建议将盐酸多柔比星溶液适当稀释后 (终质量浓度不超过 0.4 mg/mL) 静脉给药安全性更好。

**关键词:** 注射用盐酸多柔比星; 溶血; 血球计数; 酶标仪; 比色法

中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)03-0324-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.03.007

## Variety methods study on hemolytic effect of colored injection doxorubicin hydrochloride *in vitro*

XIONG Si-min<sup>1</sup>, WANG Lei<sup>2</sup>, JING Bao-qin<sup>2</sup>, ZHANG Jin-xiao<sup>2</sup>, ZHANG Zong-peng<sup>2</sup>, LV Xiong-wen<sup>1</sup>

1. Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. Center for Drug Evaluation and Research in Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China

**Abstract: Objective** The visual inspection method were not appropriate to perform a hemolysis evaluation for colored injection like doxorubicin hydrochloride, this article adopted three methods to evaluate the hemolysis test of doxorubicin hydrochloride *in vitro* and provide reference for clinical drug safety. **Methods** Using rabbit erythrocytes as experimental object, the drug concentration 4.0 and 2.0 mg/mL was chosen which range of clinical concentration and preclinical safety evaluation concentration, to evaluate the hemolysis test of doxorubicin hydrochloride injection with blood analyzer test, direct colorimetric assay, and indirect colorimetric assay. **Results** The evaluation results of three different methods were very consistent. The tube's hemolysis rate of 4.0 mg/mL dose was far greater than 5%, which means serious hemolysis; Only 0.1 mL tube of 2.0 mg/mL dose (according to the drug concentration equal to 0.5 mL tube of 0.4 mg/mL drug concentration) without hemolysis occurring, the other tubes' hemolysis rates were far greater than 5%, which means serious hemolysis. **Conclusion** The hemolysis phenomenon may occur when 2.0 mg/mL dose of doxorubicin hydrochloride solution for iv injection is used in clinic and dilution (final concentration not more than 0.4 mg/mL) is recommended.

**Key words:** Doxorubicin Hydrochloride for Injection; hemolysis; blood analyzer test; microplate reader; colorimetry

盐酸多柔比星为蒽环糖苷类抗肿瘤抗生素, 是一种高效的广谱抗肿瘤药物, 临床广泛应用于恶性淋巴瘤、乳腺癌、肺癌等多种肿瘤的治疗。体外溶

血性实验可直观、快捷地检查供试品对红细胞的影响, 可初步考察注射液的安全性<sup>[1-2]</sup>。盐酸多柔比星溶液本身为红色的澄明液体, 采用常规肉眼观察法

收稿日期: 2016-11-03

作者简介: 熊思敏 (1993-), 女, 硕士研究生。E-mail: xsm5727@sina.com

\*通信作者 吕雄文, 男, 教授, 硕士生导师。E-mail: lxw31288@aliyun.com

张宗鹏, 男, 研究员。E-mail: zhangzp@tjipr.com

进行溶血评价会受到溶液颜色的严重干扰,不能真实地反映溶血情况。因此本实验分别采用血球计数法、酶标仪直接比色法、酶标仪间接比色法综合评价受试物的溶血作用<sup>[3]</sup>,为注射用盐酸多柔比星的质量控制和临床安全性提供科学依据,也为有色注射液的体外溶血性研究提供方法学参考。

## 1 材料

### 1.1 药物与试剂

注射用盐酸多柔比星(深圳万乐药业有限公司,批号 1407E1,规格 10 mg,橙红色疏松块状物或粉末);0.9%氯化钠注射液(石家庄四药有限公司,批号 1505253202,规格 250 mL,无色澄明液体);去离子水(北京中盛茂源科技发展有限责任公司 BM-40 纯水机制备);5%葡萄糖注射液(石家庄四药有限公司,批号 1406110902,规格 100 mL,无色澄明液体)。

### 1.2 主要仪器

HZQ-F100 全温度震荡培养箱(江苏省太仓时华生化仪器厂);Varioskan Flash 酶标仪(美国 THERMO);ADVIA2120 全自动血液分析仪(Siemens Healthcare Diagnostics Inc);LXJ-IIB 低速台式离心机(上海安亭科学仪器有限公司);TC30KHA 电子天平(常熟市双杰测试仪器厂)。

### 1.3 实验动物

日本大耳白家兔,3~5月龄,普通级,雄性,体质量 2.95 kg,北京隆安实验动物养殖中心提供,生产单位许可证编号 SCXK(京)2014-0003。家兔

饲养在普通环境内,温度 18~26℃、湿度 40%~70%,每小时不少于 8 次全新风换气;每 12 小时明暗交替,自由进食和饮水。

## 2 方法

### 2.1 供试品浓度选择

注射用盐酸多柔比星临床最高使用质量浓度为 2.0 mg/mL,本实验室临床前安全性评价拟用最高质量浓度为 4.0 mg/mL,因此本实验选用注射用盐酸多柔比星高、低质量浓度 4.0、2.0 mg/mL,覆盖了临床及临床前实验拟用浓度范围。

### 2.2 2%红血球混悬液的制备

家兔麻醉后心脏取血 20 mL,置三角瓶中,放入玻璃珠不断摇动 10 min 以上,以除去纤维蛋白;然后将血分装转移入离心管中,加入生理盐水混匀后 1 500 r/min 离心 10 min,弃去上清液,如此反复清洗至上清呈无色透明;彻底移去上清,将红细胞用生理盐水稀释成 2%的红血球混悬液。

### 2.3 试管加样

取试管 24 支,均分为 2 组并进行编号:每组 1~5 管为注射用盐酸多柔比星高浓度管,6~10 管为低浓度管,11 管为阴性对照管,12 管为阳性对照管。第 2 组试管为第 1 组试管的复管。按表 1 依次加入生理盐水、去离子水、相应浓度的注射用盐酸多柔比星,轻轻摇匀,最后加入 2%红血球混悬液。将各管轻轻摇匀,37℃孵育并开始计时。

盐酸多柔比星溶液为红色澄明液体,影响酶标仪直接比色,同时设置供试品平行对照管,以去除

表 1 溶血性实验各试验管试液组成

Table 1 Composition of different test solutions in each tube of hemolysis test

试管编号	2%红血球混悬液/mL	生理盐水/mL	去离子水/mL	4.0 mg/mL 注射用 盐酸多柔比星/mL	2.0 mg/mL 注射用 盐酸多柔比星/mL
1	2.5	2.0	—	0.5	—
2	2.5	2.1	—	0.4	—
3	2.5	2.2	—	0.3	—
4	2.5	2.3	—	0.2	—
5	2.5	2.4	—	0.1	—
6	2.5	2.0	—	—	0.5
7	2.5	2.1	—	—	0.4
8	2.5	2.2	—	—	0.3
9	2.5	2.3	—	—	0.2
10	2.5	2.4	—	—	0.1
11	2.5	2.5	—	—	—
12	2.5	—	2.5	—	—

药液颜色对溶血结果的影响。另取试管 10 支, 1~5 管为供试品高浓度管, 6~10 管为供试品低浓度管, 按表 2 依次加入生理盐水、相应浓度的注射用盐酸多柔比星, 将各管轻轻摇匀, 37 °C 孵育并开始计时。

表 2 溶血性实验各对照管试液组成

Table 2 Composition of different test solutions in each tube of hemolysis test

试管编号	生理盐水/mL	4.0 mg/mL 注射用盐酸多柔比星/mL	2.0 mg/mL 注射用盐酸多柔比星/mL
1	4.5	0.5	—
2	4.6	0.4	—
3	4.7	0.3	—
4	4.8	0.2	—
5	4.9	0.1	—
6	4.5	—	0.5
7	4.6	—	0.4
8	4.7	—	0.3
9	4.8	—	0.2
10	4.9	—	0.1

#### 2.4 血球计数法测定溶血率

孵育 3 h 后, 轻轻混匀各管, 从每管中精确取液体 1.5 mL, 采用血液分析仪测定每管液体中红细胞数 (RBC), 第 2 组试管为第 1 组试管的复管。计算各管溶血率, 若溶血率小于 5%, 表明无溶血。

溶血率 = (阴性对照管 RBC - 注射用盐酸多柔比星管 RBC) / (阴性对照管 RBC - 阳性对照管 RBC)

#### 2.5 酶标仪直接比色法测定溶血率

经“2.4”项取样操作后, 各管剩余液体以 2 000

r/min 离心 5 min 后各取每管上清液 0.1 mL, 加入 96 孔板中, 酶标仪测定上清液 545 nm 下吸光度(A)值。3 组试管分别统计, 每管加样 3 个复孔, 求其平均值。计算各管溶血率, 若第 1 和 2 组试验管中溶液溶血率均小于 5%, 表明无溶血。

溶血率 = (注射用盐酸多柔比星管 A 值 - 供试品平行对照管 A 值 - 阴性对照管 A 值) / (阳性对照管 A 值 - 阴性对照管 A 值)

#### 2.6 酶标仪间接比色法测定溶血率

经“2.5”项离心取上清操作后, 小心移除各管剩余上清。每管加入生理盐水 2~3 mL, 轻轻混匀后 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 再加生理盐水混匀离心, 如此反复清洗至上清呈无色透明为止, 小心移除上清。每管中加入预冷过的去离子水定容至 5 mL, 充分混匀, 超声 10 min, 充分完全破坏管中红细胞, 然后 2 000 r/min 离心 5 min, 取上清于 545 nm 处测定 A 值, 每管加样 3 个复孔, 求其平均值, 计算各管溶血率, 若溶血率小于 5%, 表明无溶血。

溶血率 = (阴性对照管 A 值 - 注射用盐酸多柔比星管 A 值) / (阴性对照管 A 值 - 阳性对照管 A 值)

### 3 结果

#### 3.1 血球计数法

第 1 组试管: 注射用盐酸多柔比星高浓度 1~5 管和低浓度 6~9 管溶血率均远远大于 5%, 严重溶血; 10 号管溶血率小于 5%, 表明该管无溶血发生, 该管为 2.0 mg/mL 质量浓度下加样 0.1 mL。第 2 组试管 (复管) 与第 1 组试管测定结果一致。见表 3。

表 3 血液分析仪测定结果

Table 3 Determination of blood analyzer test

试管编号	RBC/( $\times 10^{12} \cdot L^{-1}$ )	溶血率/%	试管编号	RBC/( $\times 10^{12} \cdot L^{-1}$ )	溶血率/%
1 组 1 管	0.00	162.5	2 组 1 管	0.00	175.0
1 组 2 管	0.00	162.5	2 组 2 管	0.00	175.0
1 组 3 管	0.00	162.5	2 组 3 管	0.00	175.0
1 组 4 管	0.00	162.5	2 组 4 管	0.00	175.0
1 组 5 管	0.02	137.5	2 组 5 管	0.01	162.5
1 组 6 管	0.00	162.5	2 组 6 管	0.00	175.0
1 组 7 管	0.00	162.5	2 组 7 管	0.00	175.0
1 组 8 管	0.01	150.0	2 组 8 管	0.01	162.5
1 组 9 管	0.02	137.5	2 组 9 管	0.02	150.0
1 组 10 管	0.13	0.0	2 组 10 管	0.14	0.0
1 组 11 管	0.13	0.0	2 组 11 管	0.14	0.0
1 组 12 管	0.05	100.0	2 组 12 管	0.06	100.0

### 3.2 酶标仪直接比色法

第1组试管:注射用盐酸多柔比星高浓度1~5管和低浓度6~9管溶血率均远远大于5%,严重溶血;低浓度10管溶血率小于5%,表明该管无溶血发生。第2组试管(复管):各管与第1组试管测定结果一致。见表4。

表4 酶标仪直接比色测定结果

Table 4 Determination of direct colorimetric assay

试管编号	溶血率/%	试管编号	溶血率/%
1组1管	77.5	2组1管	64.7
1组2管	76.5	2组2管	66.8
1组3管	86.0	2组3管	72.1
1组4管	86.5	2组4管	76.0
1组5管	77.3	2组5管	72.8
1组6管	83.2	2组6管	73.5
1组7管	84.6	2组7管	75.2
1组8管	71.3	2组8管	66.2
1组9管	67.7	2组9管	60.3
1组10管	0.0	2组10管	0.8
1组11管	0.0	2组11管	0.0
1组12管	100.0	2组12管	100.0

### 3.3 酶标仪间接比色法

第1组试管:注射用盐酸多柔比星高浓度1~5管和低浓度6~9管溶血率均远远大于5%,严重溶血;低浓度10管溶血率小于5%,表明该管无溶血发生。第2组试管(复管):各管与第1组试管测定结果一致。见表5。

表5 酶标仪间接比色测定结果

Table 5 Determination of indirect colorimetric assay

试管编号	溶血率/%	试管编号	溶血率/%
1组1管	167.3	2组1管	152.0
1组2管	167.5	2组2管	153.1
1组3管	168.7	2组3管	153.3
1组4管	168.1	2组4管	153.1
1组5管	167.1	2组5管	150.8
1组6管	169.1	2组6管	152.4
1组7管	169.4	2组7管	153.4
1组8管	168.3	2组8管	152.9
1组9管	156.6	2组9管	142.8
1组10管	-2.4	2组10管	-1.5
1组11管	0.0	2组11管	0.0
1组12管	100.0	2组12管	100.0

## 4 讨论

体外试管法评价药物对红细胞的溶血作用是注射液临床前安全性评价研究项目之一。常规检测方法为肉眼直接观察法,即药物与红细胞混悬液直接接触一定时间后,通过用肉眼观察试管中上清液的颜色来判断溶血情况,该方法的优点是直观,缺点是此法仅能观察到溶血的大致状况,不能测定红细胞破裂的具体程度(溶血率),当溶血率在30%以下或药物本身有颜色,该方法就很难正确观察出来,容易出现假阳性或假阴性结果<sup>[4]</sup>。而比色法根据红细胞破裂出来的血红蛋白在545 nm波长处有最大吸收的原理,测定样品溶血率代替肉眼观察,可以排除人为因素、溶液颜色等各种影响,较常规体外试管法更为准确、灵敏<sup>[5]</sup>,目前国内外相关研究多采用此分析方法。

盐酸多柔比星溶液为红色的澄明液体,为了排除颜色本身对比色的干扰,酶标仪直接比色检测中设置了供试品平行对照管,计算溶血率时减去了药液本身的吸光度。酶标仪间接比色法测定的是试管中药物未破坏的红细胞中血红蛋白的吸光度<sup>[6-7]</sup>,完全排除了注射液颜色本身对比色的干扰,但反复离心洗涤红细胞过程中可能发生红细胞破裂,从而造成溶血率增大<sup>[8]</sup>,因此每次移除洗涤上清应尽量彻底,尽可能减少洗涤和离心次数。血球计数法通过直接检测试管中剩余完整红细胞的数目来间接评价溶血情况,完全不受注射液颜色本身的影响,但一定要注意取样前试管要充分混匀。

本实验采用血球计数法、酶标仪直接比色法和酶标仪间接比色法相结合对注射用盐酸多柔比星的体外溶血作用进行了评价。3种实验方法结果一致,均表明注射用盐酸多柔比星在4.0 mg/mL质量浓度下体外可致家兔红细胞严重溶血,2.0 mg/mL质量浓度除加样0.1 mL管(按试管中药物浓度折算该管相当于0.4 mg/mL药物浓度下加样0.5 mL)外均发生严重溶血,结果提示,临床直接将2.0 mg/mL的盐酸多柔比星溶液进行静脉推注发生溶血的可能性较大。本实验为体外实验结果,与临床的相关性有待于进一步研究,因此2.0 mg/mL的盐酸多柔比星溶液临床直接静脉给药是否会造成溶血发生尚不能确定,但值得给予关注。为了保证临床用药安全,建议将盐酸多柔比星溶液适当稀释后(终浓度不超过0.4 mg/mL)静脉给药安全性更好。

## 参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 [S]. 四部. 2015
- [2] 国家食品药品监督管理局. 药物研究技术指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2007.
- [3] 校月红, 卢婷利, 陈涛, 等. 药物溶血性评价方法的研究进展 [J]. 中国农业, 2012, 21(17): 1-3.
- [4] 柯正方. 中药注射剂溶血检查的两种方法比较 [J]. 中国药品标准, 2011, 12(3): 216-219.
- [5] 周燕文, 何淑华, 莫武宁. 中药注射剂溶血度测定的 3 种方法比较 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(6): 465-467.
- [6] 匡荣, 陈超凤, 朱社敏, 等. 溶血率测定法用于有色注射剂的研究 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(2): 204-207.
- [7] 陈志勇, 肖佳音, 李庆忠. 有色中药注射剂溶血试验的比较研究 [J]. 黑龙江医药, 2015, 28(1): 32-34.
- [8] 刘倩, 张媛, 陈晨, 等. 有色注射剂和乳状注射剂溶血与凝血检查法研究 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(13): 1168-1171.