

## 左卡尼汀注射液安全性评价的研究

刘莹 邢桂兰 杨照新 姚茂忠 符健

(海南医学院 海南省药物安全性评价研究中心 海口 571199)

**摘要:**目的 评价左卡尼汀注射液(5 mL: 1.0 g)临床用药的安全性。方法 血管刺激性试验采用耳缘静脉注射, 自体左右侧自身对比的方法; 试验用兔红细胞混悬液与供试品温育, 观察溶血情况; 用左卡尼汀注射液(5 mL: 1.0 g)在190 mg/kg和95 mg/kg剂量条件下进行致敏3次, 并用2倍体积致敏浓度进行激发时均未见过敏反应症状, 与平行对照品在相同剂量和浓度下进行比较; 左卡尼汀注射液(5 mL: 1.0 g)在高剂量190 mg/kg和低剂量95 mg/kg时进行被动皮肤过敏试验。结果 左卡尼汀注射液在对家兔红细胞混悬液(体外试管法)和血管刺激的情况下结果与平行对照品类似, 无溶血作用, 也无明显的血管刺激反应; 在主动过敏试验中豚鼠均未出现过敏反应症状, 过敏反应为阴性; 被动皮肤过敏试验豚鼠均未出现蓝斑过敏反应症状, 过敏反应阴性。结论 左卡尼汀注射液(5 mL: 1.0 g)临床用药符合注射用药的要求, 可以作为安全性评价的根据。

**关键词:**左卡尼汀注射液; 溶血; 刺激性; 过敏

**中图分类号:** R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2016)02-0020-05

左卡尼汀(L-carnitine L-CN)是一种小分子氨基酸衍生物,它在脂肪酸氧化和其他主要代谢途径中起着重要的作用<sup>[1]</sup>,是广泛存在于人体内的一种氨基酸。它的主要功能是促进脂类代谢,正常人体可以自身合成,或者从食物中摄取左卡尼汀。膳食中的左卡尼汀主要来自于动物性蛋白质。临床上左卡尼汀用于防治左卡尼汀缺乏,主要用于控制血透并发症的左卡尼汀缺乏和心血管疾病的治疗,它参与心肌脂肪代谢过程,保护缺血心肌、改善心肌能量代谢<sup>[2,3]</sup>。现对广泛使用的这一注射剂进行安全性评价的研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 动物

普通级新西兰兔7只,雌性1只,雄性6只,体质量(2.2±0.2)kg,购自广东省医学实验动物中心,实验动物质量合格证号:No 0103055;白化HD豚鼠84只,(320±20)g,雌雄各半,由长沙市开福区东创实验动物科技服务部提供,实验动物质量合格证号:No HNACSDC20122077。饲养环境:温度为(22.61±1.55)℃,相对湿度(60.29±5.33)%,光照

采用12 h/12 h明暗交替,噪声≤60 Db,通风良好。实验前适应性饲养3 d,自由饮水、摄食。实验动物使用许可证号:SYXK(琼)2007-0013。

#### 1.2 药物和试剂

供试品左卡尼汀注射液(生产厂家:海南合瑞制药股份有限公司),批号:111201,规格为5 mL:1 g,性状为无色澄明液体;0.9%(g/mL)氯化钠注射液,规格为500 mL:4.5 g,性状为无色的澄明液体;平行对照品左卡尼汀注射液(生产厂家:Sigma-Tau industrie Farmaceutiche Riunite S. P. A),批号:110021,规格为5 mL:1 g,性状为无色或微黄色澄明液体;牛白蛋白,生产厂家:国药集团化学试剂有限公司,生产批号:20110302,规格为10.0 g/瓶,性状为浅米黄色冷冻干粉,在2—8℃下保存;伊文思蓝,规格为10 g,性状为深棕色粉末;灭菌注射用水,规格为5 mL/支,性状为无色的澄清液体。

#### 1.3 仪器和设备

Centrifuge 5810 低速离心机(德国 Eppendorf); SZ93-1 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂); SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司); EG1160 生物组织冷冻包埋机(德国 Leica); 202-2-BS 电热恒温干燥箱(上海跃进医疗

收稿日期:2016-01-12

作者简介:刘莹(1984-),女,学士,研究实习生。研究方向:药理。E-mail:489364368@qq.com

通信作者:付健(1959-),男,博士,教授。

器械厂);BX41显微镜系统(日本OLYMPUS);XSP-4C光学显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司)。

#### 1.4 方法

**1.4.1 溶血性试验:**取雌性新西兰兔一只,将从家兔心脏所取的血液迅速放入置有15粒玻璃珠的三角烧瓶中,匀速振荡去除纤维蛋白原,制成脱纤血液。把脱纤血液移入10 mL刻度离心管中,再加入约2—10倍量的0.9% (g/mL)氯化钠注射液,摇匀后1 500 r/min离心15 min,去除上清液,再加入0.9% (g/mL)氯化钠注射液按上述方法反复洗涤3次,至上清液不显红色为止,去除上清液后,取红细胞3 mL置于250 mL量筒中,加入0.9% (g/mL)氯化钠注射液至150 mL,制成2% (mL/mL)的混悬液,移入无菌广口瓶中。取洁净试管12支,分别加入2% (mL/mL)的红细胞混悬液,然后进行编号,1—5号为供试品管;6号为阴性对照管,加入0.9% (g/mL)氯化钠注射液;7号为阳性对照管,加入蒸馏水;8—12号为平行对照品管。摇匀后,立即置于37℃的数显恒温水浴锅中进行温育,开始1 h内每隔15 min观察1次,1 h后,每隔1 h观察1次,连续观察3 h。判断溶血情况。

**1.4.2 血管刺激性试验:**按照供试品左卡尼汀注射液说明书中的用法用量要求,每次血透后推荐起始剂量是10—20 mg/kg,溶于5—10 mL注射用水中,2—3 min 1次静脉推注。依文献<sup>[4]</sup>根据临床人用剂量折算兔用剂量为109.1 mg/kg,取左卡尼汀注射液1瓶,加灭菌注射用水定容至9.2 mL,振摇均匀,即得供试品溶液,同法配置平行对照品溶液。给药体积均为1.0 mL/kg。取雄性新西兰兔6只,随机分为2组,分别为供试品组和平行对照品组。采用同体左右侧自身对比,一组家兔左侧外耳缘静脉推注供试品溶液,另一组家兔左侧外耳缘静脉推注平行对照品溶液,两组家兔右侧外耳缘静脉推注等体积0.9% (g/mL)氯化钠注射液。每天给药1次,连续给药3 d,每天给药前、给药后当天、末次给药后24、48、72、96 h和末次给药后14 d,观察血管注射部位是否有瘀斑、充血、硬结、红肿、溃疡等局部刺激反应。末次给药后96 h,分别处死供试品组2只家兔和平行对照品组2只家兔,剪取含有血管的耳缘组织,用4% (mL/mL)甲醛固定后进行组织病理学检查。余下的2只家兔继续观察14 d后处死、剪取含有血管的耳缘组织,固定后进行组织病理学检查,以了解刺激性反应的可逆程度。同时与平行对照品及

右侧阴性对照进行对比,判断供试品静脉滴注对血管的刺激性。

**1.4.3 全身主动过敏试验:**依文献<sup>[5]</sup>方法,取36只豚鼠,雌雄各半,随机分为供试品高剂量组、供试品低剂量组、平行对照品高剂量组、平行对照品低剂量组和阴性对照组,阳性对照组,每组各6只,雌雄各半,雌者无孕。规格为5 mL:1 g的左卡尼汀注射液为供试品,高剂量组溶液浓度为152 mg/mL,低剂量组浓度为76 mg/mL;Sigma-Tau industrie Farmaceutiche Riunite S. P. A生产的规格为5 mL:1 g的左卡尼汀注射液为平行对照品,高剂量组溶液浓度为152 mg/mL,低剂量组浓度为76 mg/mL;阴性对照品为同体积0.9% (g/mL)氯化钠注射液;阳性对照药为同体积浓度为200.0 mg/mL的牛白蛋白。激发量均为同体积2倍浓度。豚鼠致敏采用腹腔注射隔日给药1次,共3次,激发于末次致敏后第14 d,一次快速静脉注射给药,全部药量在10 s内推完。观察致敏和激发后豚鼠的情况,判断过敏反应发生程度,计算过敏反应发生率,并根据过敏反应发生率和发生程度进行综合判断。

**1.4.4 被动皮肤过敏试验:**取12只健康检疫合格豚鼠作为抗体血清制备,随机分为供试品高、低剂量组、平行对照品高、低剂量组、阳性对照组和阴性对照组,每组各2只。另取36只健康检疫合格豚鼠随机分为供试品高、低剂量组、平行对照品高、低剂量组、阳性对照组和阴性对照组,每组6只,雌雄各半,雌者无孕。豚鼠致敏采用腹腔注射隔日给药1次,共3次,末次致敏后12 d,心脏采血2 000 r/min离心10 min,分离抗体血清,-20℃保存。将各组豚鼠在背中侧两侧,预先去除被毛3×4 cm<sup>2</sup>,共4个区,每侧2个区。取上述各对应组含抗体的血清,一般用生理盐水稀释成不同的倍数(1:2、1:8、1:16、1:32),按不同浓度的抗血清次序,以0.1 mL分别皮内注射于对应组的1号点、2号点、3号点和4号点,进行被动致敏。经过24 h抗原攻击后,各组静脉注射与致敏剂量相同的激发抗原加等量的1.0% (g/mL)伊文思蓝染料共1.0 mL(即0.5 mL的致敏剂量相同的激发抗原加上0.5 mL的1.0% (g/mL)伊文思蓝染料,共1.0 mL)。一次静脉注射给药。30 min后将动物处死。

剪取背部皮肤,测量皮肤内层的斑点大小,进行蓝斑测定,并拍照;直径大于5 mm者判断为阳性。不规则斑点的直径为长径与短径之和的平均值。

## 2 结果

供试品管、平行对照管和阴性管在观察时间内均无溶血和凝集反应,阳性管出现溶血,结果见表1。

### 2.1 溶血性试验

表1 左卡尼汀注射液(5 mL: 1.0 g) (体外试管法) 溶血性实验结果

Table 1 Levocarnitine Injection(5 mL: 1.0 g) (in vitro method) hemolytic results

试管编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2% 红细胞混悬液/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
0.9(g/mL) 氯化钠注射液/mL	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	—	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4
蒸馏水/mL	—	—	—	—	—	—	2.5	—	—	—	—	—
左卡尼汀注射液/mL	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	—	—	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
加样后观察时间点	观察结果											
15 min	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
30 min	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
45 min	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
1 h	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
2 h	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
3 h	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—

注 “+”表示全溶血 “-”表示无溶血和没有红细胞凝集。

Note “+”expressed full hemolysis “-”expressed no hemolysis and no red cell agglutination.

供试品左卡尼汀注射液(5 mL: 1.0 g) 在 109.1 mg/mL 浓度下对家兔红细胞混悬液(体外试管法)无溶血作用,情况与平行对照品类似,提示供试品符合注射用药安全性要求。

### 2.2 血管刺激性试验

家兔静脉滴注给药后,一般症状观察均无异常表现,且未见明显充血、红肿、瘀斑、溃疡、硬结等局部刺激反应发生。组织切片经检报告表明供试品组以及平行对照品组均未见明显扩张、充血、内皮细胞

变性坏死、周围组织水肿及炎细胞浸润等局部血管刺激反应,见图1A。供试品左卡尼汀注射液(5 mL: 1.0 g) 在给药剂量为 109.1 mg/kg,给药浓度为 109.1 mg/mL,给药体积为 1.0 mL/kg 试验条件下,每天给药1次,连续给药3 d,对家兔外耳缘静脉多次注射给药未见明显的血管刺激反应,见图1B,情况与平行对照品类似,供试品在该浓度和剂量下对血管的刺激性符合注射用药规定。

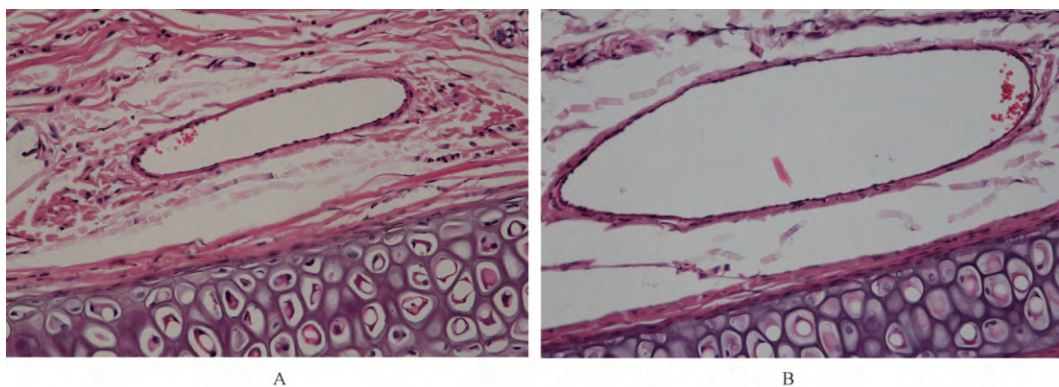


图1 未见明显扩张、充血、内皮细胞变性坏死、周围组织水肿及炎细胞浸润等局部血管刺激

Fig. 1 no significant expansion, congestion, endothelial cell degeneration and necrosis, the surrounding tissue edema and inflammatory cell infiltration of local vascular stimulation

### 2.3 全身主动过敏试验

试验期间各组动物活动和进食、毛发、鼻、眼分

泌物等一般症状观察均未见明显异常,体质量呈增长趋势。试验各给药组豚鼠初次致敏、末次致敏、激

发当日体质量和体质量净增值与阴性对照组豚鼠比较均无显著性差异。激发给药后即刻至 30 min 内观察,供试品高、低剂量组,平行对照品高、低剂量组和阴性对照组动物未观察到搔鼻、竖毛、咳嗽、痉挛、颤抖、躁动、排尿、排粪、跳跃、喘息、喷嚏、呼吸困难、流泪、哮喘音、紫癜、旋转和潮式呼吸等过敏反应症状,反应分值为零,过敏反应评价为阴性;阳性对照组用 20% (g/mL) 牛白蛋白快速静脉注射激发后,约 1 min 后出现躁动、搔鼻、喷嚏、咳嗽、呼吸急促、排尿、排粪、呼吸困难、步态不稳、跳跃、旋转和死亡等过敏反应症状,持续约 4—16 min 后死亡,过敏反应为极强阳性,致敏率为 100%。

#### 2.4 被动皮肤过敏试验

抗体血清制备致敏试验阶段,各组实验动物一般症状观察:各组动物均未见异常表现。皮内注射不同配比抗体血清被动致敏至激发前阶段,各组动物一般症状观察均未见明显异常。抗体血清稀释倍数为 1:2、1:8、1:16、1:32,供试品高、低剂量组,平行对照品高、低剂量组及阴性对照组的豚鼠均未出现蓝斑,无过敏反应,阳性对照组的 6 只豚鼠均有明显的蓝斑,蓝斑直径在 9.0—46.0 mm 之间,被动致敏率达 100%。供试品与平行对照品及阴性对照组比较,其结果相同,均未出现过敏反应症状,过敏反应评价为阴性。

### 3 讨论

供试品左卡尼汀注射液(5 mL:1.0 g)在 109.1 mg/mL 浓度下对家兔红细胞混悬液(体外试管法)无溶血作用,情况与平行对照品类似;在给药剂量为 109.1 mg/kg,给药浓度为 109.1 mg/mL,给药体积为 1.0 mL/kg 试验条件下,每天给药 1 次,连续给药

3 d,对家兔外耳缘静脉多次注射给药未见明显的血管刺激反应,情况与平行对照品类似;在 190 mg/kg 和 95 mg/kg 剂量条件下进行致敏 3 次,并用 2 倍体积致敏浓度进行激发时均未见过敏反应症状,与平行对照品在相同剂量和浓度下比较,均未出现过敏反应症状,过敏反应阴性;在高剂量为 190 mg/kg 和低剂量为 95 mg/kg,对豚鼠每组每只隔日分别腹腔注射致敏共计 3 次,观察 12 d 后心脏采血制备抗体血清,按 1:2、1:8、1:16、1:32 四个倍数稀释后进行皮内注射被动致敏,24 h 后各组一次静脉注射给药与致敏剂量相同的激发抗原加等量的 1.0% (g/mL) 伊文思蓝染料进行激发,观察症状,与平行对照品及阴性对照组比较其结果相同,均未出现过敏反应症状,过敏反应评价为阴性。

表明该供试品在 109.1 mg/mL 浓度下对家兔红细胞混悬液的溶血性、在该浓度和剂量下对血管的刺激性、全身主动过敏试验结果、豚鼠被动皮肤过敏试验方面符合注射用药安全性要求。

#### 参考文献

- [1] 方译,唐其柱,卞洲艳,等.左卡尼汀治疗扩张型心肌病的 Meta 分析[J].中国循证心血管医学杂志,2012,4(4):101-105.
- [2] Rebouche C J. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1033(1):30-41.
- [3] 王艳蓉,孙淑华,杨旭,等.三种垫料的生物学安全性评价[J].实验动物科学,2012,29(1):34-39.
- [4] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,2003:153-158.
- [5] 章元沛.药理学实验[M].第2版.北京:人民卫生出版社,1996:224-230.

### A Investigation on the Safety of Clinical Application of Levocarnitine Injection Agent

LIU Ying, XING Gui-lan, YANG Zhao-xing, YAO Mao-zhong, FU Jian  
(Hainan Medical College, Hainan Assessment Center of Drug Safety, Haikou 571199, China)

**Abstract: Objective** In order to investigate the safety of clinical application of Levocarnitine Injection (5 mL:1.0 g). **Method** Ear vein injection was used to evaluate the vascular irritation of rabbits, using left and right side of the same animals for comparison. The rabbit erythrocyte suspension was incubated with the test sample and then observed the hemolysis. Levocarnitine injection agent (5 mL:1.0 g) at 190 mg/kg and 95 mg/kg three

times was given to the rabbits for sensitization , respectively. The symptoms of allergic reaction were not found when the sensitization concentrations were stimulated by 2 times volume , compared with a parallel reference in the same dose and concentration; Levocarnitine Injection ( 5 mL: 1.0 g) in the high dose 190 mg / kg and a low dose of 95 mg/kg for passive skin allergy test. **Result** Levocarnitine Injection on rabbit red blood cell suspension ( *in vitro* method) and vascular stimulation was similar to the parallel control , with no hemolysis , no significant vascular stimulation. The symptoms of allergic reaction were not occurred in guinea pigs in the active allergic test. , Allergic reaction was negative. **Conclusion** Levocarnitine Injection ( 5 mL: 1.0 g) of clinical medicine meet the requirements of injection drug and can be used the base of safety evaluation.

**Key words:** Levocarnitine Injection; hemolysis; irritation; allergy

( 上接第 19 页)

### Improving Effects of Hyperlipidemia of Different Contents of EPA and DHA in Fish Oil in Rats

YAN Jia-rong<sup>1</sup> , LI Yun<sup>2</sup> , ZHONG Zhi-yong<sup>1</sup> , LIU Sheng-lai<sup>1</sup> , SUN Xia<sup>1</sup> , TANG Xiao-jiang<sup>1</sup>

( 1. Comparative Medical Laboratory , Guangdong Medical Laboratory Animal Center , Foshan 528248 , China)

( 2. Infinitus ( China) Company Ltd , Guangzhou 510665 , China)

**Abstract: Objective** To observe the therapeutic effect of different contents of EPA and DHA in fish oil on Hyperlipidemia of rats. **Method** 70 male SD rats were fed with high-fat diet for 10 days , then randomly divided into seven groups according to TC levels: disease model control group , Fenofibrate group ( 28 mg/kg) , Seal Oil group ( 333 mg/kg) , fish oil A group ( 167 mg/kg) , fish oil C group ( 150 mg/kg) , fish oil D group ( 183 mg/kg) , fish oil E group ( 167 mg/kg) , ten rats in each group , respectively. Rats were treated with high-fat diet and drugs for another 30 days. Then the levels of TC , TG , HDLC , LDLC , IL-2 , IL-6 , the ratio of liver weight and body weight , and histopathology changes of the liver were examined. **Result** Compared to the disease model group , Fenofibrate can decrease the level of TC , TG , HDLC , LDLC , the degree of hepatic steatosis of Hyperlipidemia of rats , but increase the ratio of liver weight and body weight (  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  ); Seal Oil decreased the level of TC , TG , HDLC , LDLC (  $P < 0.01$  ); fish oil A and fish oil E decreased the level of TC , HDLC , LDLC (  $P < 0.01$  ); fish oil D decreased the level of TC , TG , HDLC , LDLC (  $P < 0.01$  ); fish oil C did not decrease the level of TC , TG , HDLC , LDLC (  $P > 0.05$  ); all of them did not decrease the degree of hepatic steatosis of Hyperlipidemia of rats. **Conclusion** Fish oil A , fish oil D and fish oil E can improve Hyperlipidemia of rats model to a certain extent.

**Key words:** fish oil; Hyperlipidemia; animal model