

# 鸟氨酸杂质的小鼠急性毒性和细胞毒性考察

潘望平 徐小玲 蔡蓓 吕晓君 何开勇 (湖北省药品监督管理局 武汉 430064)

**摘要 目的:** 研究鸟氨酸杂质 3-氨基-2-哌啶酮盐酸盐的急性毒性和细胞毒性。**方法:** 预实验确定用药剂量,小鼠静脉注射给药,采用 Bliss 法计算其半数致死量(LD<sub>50</sub>)。根据 LD<sub>50</sub> 的结果设高、中、低 3 个剂量组和溶媒对照组,给药后连续观察 14d,记录动物反应,并进行血液生化检查,解剖后肉眼观察主要脏器变化并进行组织形态检查。应用成纤维细胞(L929)观察 3-氨基-2-哌啶酮盐酸盐的细胞毒性。**结果:** 3-氨基-2-哌啶酮盐酸盐尾静脉一次给药对小鼠的 LD<sub>50</sub> 为 802.18 mg·kg<sup>-1</sup> (95% 置信区间 758.49~848.08 mg·kg<sup>-1</sup>);高、中、低 3 个剂量组(660,330,170 mg·kg<sup>-1</sup>) 在观察期内一般毒性、体质量、血液生化指标、脏器的肉眼观察及组织形态检查与溶媒对照组比较,均无明显差异。对成纤维细胞(L929)有一定的细胞毒作用。小鼠体内 NOAEL 值为 660mg·kg<sup>-1</sup>。**结论:** 3-氨基-2-哌啶酮盐酸盐对小鼠和成纤维细胞(L929)有一定的毒性作用,本研究为氨基酸注射液质量标准中鸟氨酸杂质限度的制定提供了依据。

**关键词** 鸟氨酸;杂质;小鼠急性毒性;细胞毒性

中图分类号:R965.3 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2018)02-0346-03

## Studies on the Acute Toxicity in Mice and Cytotoxicity of the Impurity in Ornithine

Pan Wangping, Xu Xiaoling, Cai Bei, Lü Xiaojun, He Kaiyong (Hubei Institute for Food and Drug Control, Wuhan 430064, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the acute toxicity in mice and cytotoxicity of the impurity (3-amino-2-piperidinone hydrochloride) in ornithine. **Methods:** The mice were given the impurity by intravenous injection. The acute toxicity was observed and LD<sub>50</sub> in mice was calculated by Bliss method. According to the result of LD<sub>50</sub>, the mice were given the impurity respectively at high, medium and low dose. The changes of general condition and body weight were recorded, and the blood biochemical indices and histomorphology of organs and tissues were observed after 14 days. The cytotoxicity was measured on fibroblasts (L929) cells. **Results:** The LD<sub>50</sub> and 95% confidence limit of the impurity (intra-gastric administration) was 758.49-848.08 mg·kg<sup>-1</sup>. All the detected indices of the three groups (660, 330 and 170 mg·kg<sup>-1</sup>) including general condition, weight change, biochemical indices, organ morphological and histological change were all within the normal ranges. The impurity significantly decreased the viability of L929 cells. The NOAEL value was 660 mg·kg<sup>-1</sup> in mice. **Conclusion:** The impurity has certain toxicity to mice and cells. The data can provide experimental basis for the quality standard establishment for ornithine and the safety improvement in clinic use.

**KEY WORDS** Ornithine; Impurity; Acute toxicity in mice; Cytotoxicity

鸟氨酸是一种碱性氨基酸,在生物体内与精氨酸、谷氨酸、脯氨酸能相互转变。虽不属于合成蛋白质的 20 种氨基酸,但作为尿素循环的一部分,鸟氨酸几乎涉及尿素循环的活化和氨的解毒的全过程。在此过程中形成精氨酸,继而分离出尿素形成鸟氨酸。临床上常与门冬氨酸结合广泛用于各种肝脏疾病的治疗<sup>[1,2]</sup>。因此,越来越多的复方氨基酸注射液中添加了鸟氨酸,样品提供企业的 18AA 注射液(规格 500ml)中加入鸟氨酸的量为 1~2 g,鸟氨酸的杂质 3-氨基-2-哌啶酮盐酸盐的限量为“每 1 L 不得过 50 mg”,目前国内对鸟氨酸的杂质研究鲜有报道<sup>[3]</sup>。为了该药品的临床使用安全,本研究对盐酸鸟氨酸中存在的杂质进行深入细致的研究,根据前期分离鉴定出的药物分解产物和难以通过纯化工艺去除的杂质的化学结构,购买了杂质对照品,并对杂质的安全性进行评价,观察杂质对小鼠产生的急性毒性及对细胞的毒性作用,为氨基酸注射液中氨基酸杂质限度的制定提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

1.1.1 样品 3-氨基-2-哌啶酮盐酸盐,批号 B1413070,

aladdin 公司生产,湖北一半天制药有限公司提供。

1.1.2 实验动物 SPF 级 KM 小鼠,共 90 只,雌雄各半,体质量 18~20 g,武汉生物制品研究所有限责任公司提供,实验动物生产合格证号:SCXK(鄂)2012-0003。屏障级环境,实验动物使用许可证:SYXK(鄂)2014-0009。自由饮用净化水,光照为 12 h 明暗交替,温度为 19~23℃,相对湿度 50%~70%。

1.1.3 实验细胞 小鼠成纤维细胞(L929),中国典型培养物保藏中心,培养条件 37℃、5% CO<sub>2</sub>,含 10% (V/V) 血清的 RPMI1640 培养液。

1.1.4 仪器设备 ML303 电子天平,XS6001S 动物秤,KR-20000T 离心机,AU400 自动生化仪。

1.1.5 血生化检测试剂 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司提供。

#### 1.2 实验方法

1.2.1 对小鼠的急性毒性实验方法 经预实验找出 0 及 100% 估计致死量。小鼠按体质量随机分成 5 组,每组 10 只,雌雄各半。间距为 1:0.9,各组动物尾静脉注射一次给

通讯作者:徐小玲 Tel:(027)87271327 E-mail:117723313@qq.com

药,给药体积为  $20 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,给药速度  $0.1 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$ 。给药后连续观察 14d,记录动物反应和死亡情况,用 Bliss 法计算  $\text{LD}_{50}$  及 95% 置信区间 (CI)。

1.2.2 未观察到有害作用水平 (no observed adverse effect level, NOAEL) 值确定实验方法<sup>[1,2]</sup> 根据  $\text{LD}_{50}$  的结果,小鼠按体重随机分成 4 组,每组 10 只,雌雄各半。设未死亡剂量、1/2 未死亡剂量、1/4 未死亡剂量 3 个剂量组和 1 个溶媒对照组 (0.9% 氯化钠注射液)。各组动物尾静脉注射一次给药,给药体积为  $20 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,给药速度  $0.1 \text{ ml} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

1.2.3 一般症状观察 给药后连续观察 14 d,观察小鼠的行为活动,饮食及精神状态,详细记录中度症状、中毒时间、中毒持续时间及动物死亡时间。记录给药前、给药后 7 d 及给药后 14 d 小鼠体质量情况。

1.2.4 血液生化指标检测 实验结束后对 NOAEL 值确定小鼠眼眶采血,分离血清进行血液生化指标检测:丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、尿素氮 (BUN)、肌酐 (SCr)、血糖 (GLU)、总蛋白 (TP)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)。

1.2.5 病理解剖及病理形态学检查 对所有动物及时进行尸检,仔细记录病变情况。溶媒对照组和高剂量组小鼠的主要脏器 (心、肝、肺、肾) 放入 10% 甲醛中固定,组织脱水、透明,浸蜡,石蜡包埋切片,常规 HE 染色。光镜下观察组织病理变化。

1.2.6 细胞毒性试验 将已培养 24~48 h 生长旺盛的 L929 细胞用消化液消化后计数细胞浓度,用培养液将细胞制备成  $1 \times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$  浓度的细胞悬液接种于 96 孔培养板,设空白对照、阴性对照、阳性对照和样品高 ( $200 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )、中 ( $12.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )、低剂量组 ( $0.8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ),每组各设 6 孔,每孔接种  $100 \mu\text{l}$  细胞悬液。置二氧化碳培养箱  $37^\circ\text{C}$  培养 24 h 后,弃去原培养液。空白对照组加入新鲜培养液,阴性对照组、阳性对照组及样品组分别加入高密度聚乙烯浸提液、5% DMSO 溶液及样品浸提液,每孔  $100 \mu\text{l}$ ,置二氧化碳培养箱  $37^\circ\text{C}$  继续培养 72 h。置显微镜下观察细胞形态。每孔加入  $20 \mu\text{l}$  浓度为  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MTT 溶液,继续培养 4h 后弃去孔内液体,加入  $150 \mu\text{l}$  DMSO,置振荡器上振荡 10 min,在酶标仪 570 nm 和 630 nm 波长下测定吸光度,根据测定的吸光值计算相对增殖率 (RGR),并按表 1 的毒性分级标准对试验结果进行评估。 $\text{RGR} = (A_{\text{试验组}} / A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 。

表 1 细胞毒性分级标准

相对增值率 (%)	毒性级别	相对增值率 (%)	毒性级别
$\geq 100$	0	30~49	3
80~99	1	0~29	4
50~79	2		

1.2.7 数据处理 小鼠体质量及血液生化指标的结果采用

表 4 对小鼠血液生化指标的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

生化指标	ALT ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )	AST ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )	TP ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	GLU ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	BUN ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	SCr ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	TC ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	TG ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
溶媒对照组	$47.00 \pm 6.85$	$189.60 \pm 49.17$	$60.93 \pm 4.95$	$4.12 \pm 0.71$	$7.14 \pm 1.37$	$8.21 \pm 1.25$	$2.38 \pm 0.31$	$2.33 \pm 1.00$
$660 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 样品组	$39.60 \pm 8.02$	$204.50 \pm 55.71$	$57.55 \pm 3.17$	$3.78 \pm 1.15$	$6.15 \pm 0.89$	$6.44 \pm 2.54$	$2.30 \pm 0.34$	$1.78 \pm 0.25$
$330 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 样品组	$39.70 \pm 7.69$	$190.50 \pm 22.30$	$57.21 \pm 2.80$	$3.52 \pm 0.73$	$6.66 \pm 0.72$	$6.86 \pm 1.98$	$2.22 \pm 0.30$	$1.91 \pm 0.33$
$170 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 样品组	$47.80 \pm 9.30$	$259.80 \pm 101.28$	$60.70 \pm 2.61$	$3.88 \pm 1.16$	$7.95 \pm 0.65$	$6.82 \pm 2.29$	$2.36 \pm 0.52$	$2.17 \pm 0.33$

SPSS 软件进行统计分析,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 比较各剂量组与溶媒对照组的差异性,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。急性毒性实验采用 Bliss 机率单位法计算。

## 2 结果

### 2.1 小鼠的急性毒性实验结果

尾静脉一次给药后,剂量为 1 000, 900, 810, 730, 660  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,部分小鼠注射后即刻至 5min 出现呼吸急促、抽搐等症状,15 min 内死亡。各组死亡情况见表 2。采用 Bliss 法计算小鼠  $\text{LD}_{50}$  为  $802.18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,95% CI 为  $758.49 \sim 848.08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。给药后死亡小鼠大体解剖无肉眼可见的病变。

表 2 小鼠的急性毒性试验结果

剂量 ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	动物数 (只)	死亡动物数 (只)	死亡率 (%)
1000	10	10	100
900	10	8	80
810	10	5	50
730	10	3	30
660	10	0	0

### 2.2 小鼠 NOAEL 值实验结果

2.2.1 一般观察情况 未死亡剂量、1/2 未死亡剂量、1/4 未死亡剂量 3 个剂量组 ( $660, 330, 170 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 和溶媒对照组给药后小鼠眼、呼吸、分泌物、自主和中枢神经系统行为、分泌物及排泄物正常,观察期内无动物死亡。

2.2.2 小鼠体质量 各剂量组小鼠给药后 7, 14 d 体质量正常增长,与溶媒对照组比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结果见表 3。

表 3 对小鼠体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	0d	7d	14d
溶媒对照组	$19.0 \pm 0.6$	$25.3 \pm 0.9$	$34.6 \pm 1.1$
$660 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 样品组	$19.0 \pm 0.6$	$24.6 \pm 0.6$	$34.4 \pm 1.3$
$330 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 样品组	$19.0 \pm 0.7$	$24.7 \pm 0.8$	$34.4 \pm 1.3$
$170 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 样品组	$19.0 \pm 0.6$	$25.3 \pm 1.0$	$34.3 \pm 1.2$

2.2.3 血液生化指标 各剂量组小鼠 8 项血液生化指标结果与溶媒对照组比较,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),结果见表 4。

2.2.4 脏器的肉眼观察和组织形态学检查 各剂量组小鼠实验结束后大体解剖脏器无肉眼可见的病变,溶媒对照组和高剂量组主要脏器作详细病理检查,均未见明显的病理变化。

2.2.5 NOAEL 值 综合上述结果,小鼠的 NOAEL 值可确定为  $660 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

### 2.3 细胞毒性结果

$200 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  和  $12.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  样品组对成纤维细胞 (L929) 有重度细胞毒性作用; $0.8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  样品组对成纤维细胞 (L929) 有轻度细胞毒作用。见表 5。

表5 细胞毒性结果

组别	平均吸光度	相对增殖率(%)	级别
空白对照组	1.648	/	/
阴性对照组	1.547	94	1
阳性对照组	0.270	16	4
200 mg · ml <sup>-1</sup> 样品组	0.024	1	4
12.5 mg · ml <sup>-1</sup> 样品组	0.244	15	4
0.8 mg · ml <sup>-1</sup> 样品组	0.977	59	2

### 3 讨论

杂质的研究是一个复杂的过程,是药物研发中一个非常重要的环节,是保证药物质量的关键,杂质的存在对药物的安全性和有效性有很大的影响,如何制定杂质的限度也是药物研发过程中一个非常敏感的问题<sup>[4,5]</sup>。药物杂质是引起药品不良反应的因素之一,例如,青霉素过敏反应是因制剂中含微量青霉素烯酸及高分子聚合物等物质引起的<sup>[6]</sup>。从涉及药物纯度的杂质问题下手,对这些杂质的毒性进行研究,对提高药物质量标准,减少药品不良反应发生率具有重要意义。

本研究采用 Bliss 法对鸟氨酸中可能含有的杂质 3-氨基-2-哌啶酮盐酸盐进行了小鼠的急性毒性实验,小鼠的 LD<sub>50</sub> 为 802.18 mg · kg<sup>-1</sup>, LD<sub>50</sub> (Feiller 校正) 的 95% CI 为 758.49 ~ 848.08 mg · kg<sup>-1</sup>, 小鼠的 NOAEL 值为 660 mg ·

kg<sup>-1</sup>。根据 WHO 化合物急性毒性分级属于低毒<sup>[7,8]</sup>。3-氨基-2-哌啶酮盐酸盐对成纤维细胞 (L929) 有一定的细胞毒性。目前国内同类产品的质量标准中几乎都未制定控制鸟氨酸杂质的项目,这些实验数据将为杂质限度的制定和鸟氨酸注射液质量标准的提高提供了依据。

### 参 考 文 献

- 1 成军. 门冬氨酸鸟氨酸的肝病临床应用与研究进展[J]. 中国肝脏病杂志, 2015, 7(3): 49-51
- 2 李德秀, 邹灿. 肝癌介入术后门冬氨酸鸟氨酸巩固治疗的疗效[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(1): 91-93
- 3 林国英. 复方氨基酸注射液生产质量控制探讨[J]. 海峡药学, 2014, 26(12): 20-23
- 4 中华人民共和国食品药品监督管理局. 化学药物杂质研究技术指导原则[S]. 2005
- 5 何伍, 王海学. 浅谈药物杂质限度的制订方法[J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(10): 787-790
- 6 胡向青, 郝福, 李志刚, 等. 药物中杂质及有害物质控制限度的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(9): 953-964
- 7 张爱华, 孙志伟. 毒理学基础[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 60-65
- 8 王建茹, 王国辉, 张立新, 等. 复方敏维糖浆的急性毒性和长期毒性研究[J]. 中国药师, 2016, 19(8): 1578-1580

(2017-08-07 收稿 2017-10-30 修回)