

托品酸的致突变机制研究

曲见松*, 陈德俊, 赵岩, 魏霞, 祝清芬*(山东省食品药品检验所, 济南 250101)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)09-0803-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.09.12

摘要 目的:研究托品酸的致突变机制。方法:采用鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验,设5 000、2 500、1 250、625 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 4个剂量托品酸组、自发回变组、溶剂对照组和阳性对照[非代谢活化条件下:对二甲基氨基苯重氮磺酸钠(Dexon)50 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 、注射用丝裂霉素(MMC)0.5 $\mu\text{g}/\text{皿}$;代谢活化条件下:2-氨基芴(2-AF)20 $\mu\text{g}/\text{皿}$]组,每组6皿,各组在加和不加代谢活化系统S9的条件下,计数组不同致突变类型的氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌TA97、TA98、TA100、TA102的回变菌落数。结果:与溶剂对照组和自发回变组比较,非活化条件下2 500、5 000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 托品酸组和Dexon阳性对照组TA97、TA98、TA100菌株的回变菌落数均明显增加($P < 0.01$),MMC阳性对照组TA102菌株的回变菌落数明显增加($P < 0.01$);活化条件下2 500、5 000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 托品酸组TA98菌株的回变菌落数明显增加($P < 0.01$),2-AF阳性对照组TA97、TA98、TA100、TA102菌株的回变菌落数均明显增加($P < 0.01$),其余条件的回变菌落数差异无统计学意义。结论:托品酸的致突变作用机制为诱导组氨酸靶基因中鸟嘌呤-胞嘧啶位点碱基置换和移码突变,活化条件的存在会使其诱变性减弱。

关键词 托品酸;鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验;组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌;致突变

Study on Mutagenicity Mechanism of Tropic Acid

QU Jian-song, CHEN De-jun, ZHAO Yan, WEI Xia, ZHU Qing-fen(Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the mutagenicity mechanism of tropic acid. METHODS: In *Salmonella typhimurium* reverse assay, 4 doses of tropic acid groups (5 000, 2 500, 1 250 and 625 $\mu\text{g}/\text{vessel}$), natural reverse group, solvent control group and positive control group [under non-metabolism activation condition: sodium p(dimethylamino) benzenediazo sulfonate (Dexon) 50 $\mu\text{g}/\text{vessel}$, Mitomycin for injection (MMC) 0.5 $\mu\text{g}/\text{vessel}$; under metabolism activation condition: 2-anilino fluorene (2-AF) 20 $\mu\text{g}/\text{vessel}$] were set up with 6 vessels in each group. The number of revertant colony of different mutation types of histidine auxotroph *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100 and TA102 were counted under metabolism activation condition or without metabolism activation condition. RESULTS: Compared with solvent control group and spontaneous revertant group, the number of revertant colony of TA97, TA98 and TA100 increased significantly in 2 500 $\mu\text{g}/\text{vessel}$ and 5 000 $\mu\text{g}/\text{vessel}$ tropic acid groups and Dexon positive control group ($P < 0.01$), and the number of revertant colony of TA102 increased significantly in MMC positive control group ($P < 0.01$) without metabolism activation. Under metabolism activation condition, the number of revertant colony of TA98 increased significantly in 2 500 $\mu\text{g}/\text{vessel}$ and 5 000 $\mu\text{g}/\text{vessel}$ tropic acid groups ($P < 0.01$); the number of revertant colony of TA97, TA98, TA100 and TA102 increased significantly in 2-AF positive control group ($P < 0.01$). There was no statistical significance in the number of revertant colony under other conditions. CONCLUSIONS: The tropic acid could induce base substitution and frame-shift mutation and the activation system *in vitro* could reduce the mutagenicity.

KEYWORDS Tropic acid; *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay; Histidine auxotroph *Salmonella typhimurium*; Mutagenicity

[5] 田燕, 蒋妮, 高萌, 等. 齐墩果酸纳米粒的制备及质量控制[J]. 中国药房, 2010, 21(37): 3 506.

[6] 李晓芳, 马艳结, 张晓, 等. 包载荧光探针香豆素-6的PLGA纳米粒的制备[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(8): 740.

[7] 顾晓华, 王轩, 安磊, 等. 齐墩果酸PLGA-TPGS纳米粒体外释放度的测定及质量控制[J]. 中国药房, 2012, 23(29): 2 726.

[8] Ma YD, Huang LQ, Song CX, *et al.* Nanoparticle formu-

* 主管药师, 硕士。研究方向: 药检药理与毒理学评价。电话: 0531-81216532。E-mail: sdqjs@163.com

通信作者: 副主任药师, 博士。研究方向: 药检药理与毒理学评价。电话: 0531-81216599。E-mail: 13969128018@163.com

lation of poly(ϵ -caprolactone-co-lactide)-d-a-tocopheryl polyethylene glycol 1 000 succinate random copolymer for cervical cancer treatment[J]. *Polymer*, 2010, 51(25): 5 952.

[9] Qaddoumi MG, Ueda H, Yang J, *et al.* The characteristic and mechanisms of PLGA nanoparticles in rabbit conjunctival epithelial cell layers[J]. *Pharm Res*, 2004, 21(4): 641.

[10] Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, *et al.* Size-dependent internalization of particle via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis[J]. *Biochem J*, 2004, 377(Pt 1): 159.

(收稿日期: 2013-07-19 修回日期: 2013-10-14)

托品酸是消旋山莨菪碱合成所需要的重要中间体^[1-3],同时是合成的消旋山莨菪碱中可能存在的杂质之一。托品酸也可由山莨菪碱在体内代谢转化产生^[4-6]。《中国药典》2010年版中未规定消旋山莨菪碱及其制剂中托品酸的限量范围。我们在对盐酸消旋山莨菪碱注射液的国家评价抽验工作中发现,盐酸消旋山莨菪碱注射液中存在的未知杂质,经液-质、氢谱和碳谱进行结构确认,即为托品酸。检验结果表明,国内14个企业生产的共计193批次的盐酸消旋山莨菪碱注射液中杂质托品酸的含量分布在0.5%~3.0%内。目前国内外对于托品酸的遗传毒性研究较少,致突变研究尚未见文献报道。鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames试验)能够较为灵敏地进行受试物致突变性的检测,广泛应用于药物的安全性评价研究工作^[7-9]。为了解托品酸的致突变作用机制,本文采用Ames试验对其致突变性进行了研究。

1 材料

1.1 仪器

BSC-1100A2生物安全柜(北京东联哈尔滨仪器制造有限公司产品);SI500摇床培养箱(英国Stuart公司);GHP-9270型隔水式恒温培养箱(上海一恒科技有限公司产品);高压蒸汽灭菌器(日本Sanyo公司)。

1.2 药品与试剂

托品酸对照品(百灵威科技有限公司,批号:LCA026,纯度:98%);体外代谢活化系统S9(上海宝录生物科技有限公司,来源为Aroclor1254诱导的 δ SD大鼠肝组织,批号:2875);二甲基氨基苯重氮磺酸钠[商品名:敌克松(Dexon),美国ChemService公司,批号:425-144B,纯度:98.8%];注射用丝裂霉素(MMC,浙江海正药业有限公司,批号:100901,规格:每支2mg);辅酶II(NADP,批号:F20100906,纯度: $\geq 90.0\%$);L-组氨酸(批号:F20091208)均由国药集团化学试剂有限公司提供;2-氨基芴(2-AF,批号:13152,纯度:98%);6-磷酸葡萄糖(批号:30516)、D-生物素(批号:23251,纯度:98%)均由上海晶纯试剂有限公司提供;琼脂粉(批号:120702)、营养肉汤培养基(批号:120911)、营养琼脂培养基(批号:100830)均购自北京三药科技开发有限公司。

1.3 菌落

组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌TA97、TA98、TA100、TA102,上述4种菌分别代表不同的致突变类型,详见《药物遗传毒性研究技术指导原则》([ZH]GPT2-1),均由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。试验菌株经过组氨酸缺陷、脂多糖屏障缺陷、氨基青霉素抗性、切除修复缺陷、四环素抗性和自发回变菌落数等鉴别试验,结果均符合试验要求。

2 方法与结果

2.1 阳性对照物选择

在代谢活性条件下,选择2-AF(剂量为20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)作为TA97、TA98、TA100和TA102菌株的阳性对照物;在非代谢活化条件下,选择Dexon(剂量为50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)作为TA97、TA98、TA100菌株的阳性对照物,选择MMC(剂量为0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)作为TA102菌株的阳性对照物。

2.2 分组

用灭菌注射用水将托品酸溶解制成质量浓度为25 mg/ml 的受试溶液,设5 000、2 500、1 250、625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4个剂量托品酸组,不同托品酸组每皿分别加入受试溶液200、100、50、25 μl 。同时设自发回变组(只有菌悬液)、溶剂对照组和阳性对照组。

2.3 Ames试验

将冷冻保存的试验菌株培养物TA97、TA98、TA100、

TA102分别接种于10 ml营养肉汤培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡(100次/min)培养10 h,作为试验菌株增菌液。将含0.5 mmol/L 组氨酸-生物素的顶层培养基2 ml分装于试管中,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温,不同托品酸组每皿分别加入对应的受试溶液200、100、50、25 μl ,增菌液0.1 ml和S9混合液0.5 ml(需代谢活化时),充分混匀,迅速倾入底层琼脂平板上,转动平板,使之分布均匀。水平放置待凝固固化后,倒置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱里孵育48 h,记数每皿回变菌落数。每个剂量做3个平行皿,试验重复1次,取2次试验6个平行皿菌落回变数进行计算。以受试物的回变菌落数是溶剂对照回变菌落数的2倍或者以上,并呈剂量-反应关系者判定为致突变阳性。

2.4 统计学处理

各组回变菌落数以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS19.0统计软件对试验结果进行单因素方差分析,以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2.5 试验结果

各组回变菌落数结果见表1和表2。

表1 未加S₉托品酸的Ames试验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量, $\mu\text{g}/\text{ml}$	TA97	TA98	TA100	TA102
托品酸组	5 000	3 035 \pm 516*	2 282 \pm 173*	2 708 \pm 438*	232 \pm 9
	2 500	2 159 \pm 207*	1 267 \pm 152*	500 \pm 60*	233 \pm 11
	1 250	164 \pm 13	38 \pm 5	134 \pm 8	219 \pm 10
	625	157 \pm 11	34 \pm 3	129 \pm 9	222 \pm 7
自发回变组		168 \pm 8	34 \pm 23	133 \pm 8	219 \pm 9
溶剂对照组		163 \pm 9	37 \pm 3	132 \pm 7	218 \pm 11
Dexon阳性对照组	50	2 219 \pm 163*	2 243 \pm 146*	1 110 \pm 94*	
MMC阳性对照组	0.5				2 373 \pm 231*

与溶剂对照组和自发回变组比较: * $P<0.01$

vs. solvent control group and spontaneous revertant group: * $P<0.01$

表2 加入S₉托品酸的Ames试验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量, $\mu\text{g}/\text{ml}$	TA97	TA98	TA100	TA102
托品酸组	5 000	192 \pm 7	519 \pm 41*	134 \pm 7	214 \pm 6
	2 500	164 \pm 6	374 \pm 60*	134 \pm 8	227 \pm 10
	1 250	161 \pm 8	34 \pm 5	131 \pm 6	230 \pm 14
	625	161 \pm 7	36 \pm 4	135 \pm 10	223 \pm 8
自发回变组		169 \pm 7	34 \pm 4	129 \pm 5	226 \pm 13
溶剂对照组		164 \pm 8	33 \pm 3	130 \pm 5	223 \pm 11
2-AF阳性对照组	20	3 164 \pm 141*	2 951 \pm 213*	1 892 \pm 195*	567 \pm 39*

与溶剂对照组和自发回变组比较: * $P<0.01$

vs. solvent control group and spontaneous revertant group: * $P<0.01$

由表1结果显示,在不加入S₉体外代谢活化条件下,托品酸在2 500~5 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围,TA97、TA98和TA100菌株的回变菌落数为溶剂对照组2倍以上,与溶剂对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$);在625~5 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围,TA102菌株的回变菌落数与溶剂对照组相比差异无统计学意义;阳性物Dexon和MMC诱发菌株的回变菌落数为溶剂对照组2倍以上,与溶剂对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。

由表2结果显示,在加入S₉体外代谢活化条件下,托品酸在625~5 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围,TA97、TA100和TA102菌株的回变菌落数与溶剂对照组相比差异无统计学意义;在2 500~5 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围,TA98菌株的回变菌落数为溶剂对照组2倍以上,与溶剂对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$);阳性

比伐卢定的升降压物质检查和毒性实验

刘 春*, 赵毓梅, 郑 霞(海南省药品检验所, 海口 570216)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)09-0805-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.09.13

摘要 目的:研究比伐卢定的升降压物质检查和毒性实验。方法:按照2010年版《中国药典》二部相关方法,以1~5倍(2.8~14 mg/kg)临床单次用药剂量作为降压和升压物质检查剂量,采用猫血压法确定降压物质检查限值,采用SD大鼠总动脉插管监测血压确定升压物质检查限值;小鼠经尾静脉注射给药急性毒性实验测算其半数致死量(LD₅₀),并确定异常毒性检查限值。结果:比伐卢定的降压、升压物质检查限值均为14 mg/kg;小鼠静脉注射的LD₅₀为1.60 g/kg,LD₅₀的95%可信限为1.50~1.71 g/kg;异常毒性检查注射给药后观察48 h,未见小鼠死亡。结论:比伐卢定符合《中国药典》要求。
关键词 比伐卢定;降压物质检查;升压物质检查;急性毒性;异常毒性

Pressor and Depressor Substance Test and Toxicity of Bivalirudin

LIU Chun, ZHAO Yu-mei, ZHENG Xia(Hainan Institute for Drug Control, Haikou 570216, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the pressor and depressor substance test and toxicity of bivalirudin. METHODS: According to *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition), the 1-5 times of clinical single dose (2.8-14 mg/kg) were used for the determination of depressor substances and vasopressor substance. The limit of depressor substance was determined with cat blood pressure. The blood pressure of SD rats was monitored by total arterial intubation to determine the limit of vasopressor substance. Mice were given medicines via tail vein in acute toxicity test to detect LD₅₀. The limit of abnormal toxicity test was calculated. RESULTS: The limit of depressor substance test and vasopressor substance were both 14 mg/kg. The LD₅₀ of intravenous injection of bivalirudin in mice was 1.60 g/kg and 95% confidence limit was 1.50-1.71 g/kg. The abnormal toxicity test showed that no mice died within 48 h after medication. CONCLUSIONS: Bivalirudin is in line with the requirements of *Chinese Pharmacopoeia*.

KEYWORDS Bivalirudin; Depressor substance test; Vasopressor substance test; Acute toxicity; Abnormal toxicity test

物2-AF诱发菌株的回变菌落数为溶剂对照组2倍以上,与溶剂对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

本实验结果表明,在非活化条件下,2 500~5 000 μg/ml的托品酸对鼠伤寒沙门氏菌TA97、TA98和TA100具有致突变作用;而在活化条件下,2 500~5 000 μg/ml的托品酸仅仅对TA98具有致突变作用。说明体外活化系统S₉可明显降低托品酸致菌株突变的作用,体外活化系统对托品酸起了消除和转化的作用。有文献报道,托品酸在加入烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)的条件下,可以被NAD⁺作用生成苯基丙二半醛,后者不稳定,释放出CO₂,变成稳态的苯乙醛而降低毒性^[10]。另外,在加或不加活化条件下,托品酸均未使TA102发生突变,说明托品酸的致突变作用机制为诱导组氨酸靶基因中鸟嘌呤-胞嘧啶(G-C)位点碱基置换和移码突变而非腺嘌呤-胸腺嘧啶(A-T)位点的碱基置换和移码突变。

《中国药典》2010年版中未规定消旋山莨菪碱及其制剂中托品酸的限量范围。我们在前期研究中发现了盐酸消旋山莨菪碱注射液杂质托品酸的含量范围,且其随药物储存期的延长而不断增加;本试验结果也表明,托品酸在2 500 μg/ml的剂量水平以上可使鼠伤寒沙门氏菌发生回复突变而具有致突变性。因此我们建议,《中国药典》应规定盐酸消旋山莨菪注射液杂质托品酸的杂质限量。

参考文献

[1] 汪海波,陈佳辉.托品酸的制备[J].中国医药工业杂志, 2004,35(11):645.
*主管药师。研究方向:药品检验与安全性评价。电话:0898-66832932。E-mail:liuchun2003@163.com

- [2] 王龙书,黄建军,罗春,等.乙酰基阿托品盐酸盐的制备[J].广东化工,2013,40(6):46.
- [3] Klomp D, Peters JA, Hanefeld U. Enzymatic kinetic resolution of tropic acid[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, 16(23):3 892.
- [4] 陈怀侠,杜鹏,韩凤梅,等.山莨菪碱及其大鼠肠内菌体外代谢物的液相色谱-质谱法分析[J].中草药,2009,40(4):563.
- [5] 张春华,吴惠勤,黄晓兰,等.液相色谱-电喷雾串联质谱同时检测尿液和胃液中12种有毒生物碱[J].分析化学,2012,40(6):862.
- [6] 熊小婷,吴惠勤,黄晓兰.液相色谱-电喷雾串联质谱同时检测血液中8种有毒生物碱[J].分析化学,2009,37(10):1 433.
- [7] 朱燕,张强,周玲,等.拉沃替丁鼠伤寒沙门氏菌基因回复突变试验[J].齐鲁药事,2005,24(1):48.
- [8] 熊灏,赵鹏,李彬,等.藏虫草胶囊毒理学安全性评价[J].中国药房,2011,22(15):1 367.
- [9] 程洁,靳苏香,王军,等.Ames试验与彷徨试验改良法对两种诱变物的对比研究[J].毒理学杂志,2012,26(5):391.
- [10] Long MT, Bartholomew BA, Smith MJ, et al. Enzymology of oxidation of tropic acid to phenylacetic acid in metabolism of atropine by pseudomonas sp.strain AT3[J]. *J Bacteriol*, 1997, 179(4):1 044.
- (收稿日期:2013-05-13 修回日期:2013-06-13)