

盐酸椒苯酮胺对 Beagle 犬的长期毒性研究[△]

李健^{1*}, 李茹冰^{1#}, 张强¹, 陈新¹, 尹雁¹, 朱晋辉², 樊鸿浩², 邓乐君², 付岩霖³, 李伟达⁴(1.广州军区广州总医院药剂科, 广州 510010; 2.南方医科大学, 广州 510515; 3.广州市众为生物技术有限公司, 广州 510663; 4.广东药学院中药学院, 广州 510006)

中图分类号 R965;R972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1778-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.14

摘要 目的:观察连续静脉滴注盐酸椒苯酮胺对 Beagle 犬产生的长期毒性作用,评价其安全性。方法:取 Beagle 犬 30 只,♀♂ 各半,分成 5 组,分别为盐酸椒苯酮胺 6、12、24、48 mg/kg 4 个剂量组和阴性对照组(5%葡萄糖,24 ml/kg),静脉滴注给药,每天 1 次,连续 30 d。检测各组犬的一般生理指标、17 项血液生化指标,观察多个部位组织切片的病理变化。结果:24、48 mg/kg 盐酸椒苯酮胺组有部分犬在输液完毕后出现一过性平衡或运动失调、四肢无力,一段时间后逐渐恢复;48 mg/kg 盐酸椒苯酮胺组犬给药后第 15、30 天,血浆中丙氨酸转氨酶(ALT)与给药前比较水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各剂量组犬其他生理指标及余 16 项血浆生化指标均未观察到能表明被试药物可致毒性反应的异常改变。病理组织学检查中,24、48 mg/kg 盐酸椒苯酮胺组部分犬可见注射部位肿胀,显微镜检查可见注射部位水肿和慢性炎细胞浸润。结论:盐酸椒苯酮胺对 Beagle 犬的无毒性反应剂量为 12 mg/kg,安全剂量范围较大,该结论可作为其临床用药依据。

关键词 盐酸椒苯酮胺;长期毒性;Beagle 犬;静脉滴注;血液生化指标

Study on Long-term Toxicity of Piperphentonmine Hydrochloride in Beagle Dogs

LI Jian¹, LI Rubing¹, ZHANG Qiang¹, CHEN Xin¹, YIN Yan¹, ZHU Jinhui², FAN Honghao², DENG Lejun², FU Yanlin³, LI Weida⁴(1.Dept. of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China; 2.Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3.Guangzhou Zhongwei Biotechnology Company Limited, Guangzhou 510663, China; 4.College of TCM, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To observe the long-term toxicity of piperphentonamine hydrochloride in Beagle dogs, and to evaluate its safety. METHODS: 30 Beagle dogs were evenly composed of male and female and divided into 5 groups, including 4 piperphentonamine hydrochloride groups (6, 12, 24 and 48 mg/kg) and negative control group (5% glucose, 24 ml/kg). Beagle dogs were given relevant medicines by ivgtt once a day for consecutive 30 days. And general physiological indexes and 17 blood biochemical indicators were detected, and pathological changes were observed in multiple tissues pathological sections. RESULTS: In 24 and 48 mg/kg piperphentonamine hydrochloride groups, some dogs suffered from transient balance or movement disorders and weakness, and then recovered after some time. In 48 mg/kg piperphentonamine hydrochloride group, plasma level of ALT increased after 15 and 30 days of treatment, compared to before treatment ($P<0.05$ or $P<0.01$). Other physiological indicators and the remaining 16 plasma biochemical indexes of piperphentonamine hydrochloride groups could not explain that there was toxicity reaction. In histopathological examination, some dogs of 24 and 48 mg/kg piperphentonamine hydrochloride groups suffered from injection site swelling, and microscopic examination showed edema and chronic inflammatory cell infiltration. CONCLUSIONS: Piperphentonamine hydrochloride has no toxic reaction to Beagle dogs at the dose of 12 mg/kg. It has some wider safe dose range, and this conclusion can provide evidence for clinical drug use.

KEYWORDS Piperphentonamine hydrochloride; Long-term toxicity; Beagle dogs; Intravenous drip; Blood biochemical indicators

盐酸椒苯酮胺(Piperphentonamine hydrochloride)是我国自主研发的新型钙增敏剂类强心药及心肌保护剂^[1],其能够增加心肌收缩蛋白对钙离子的敏感性,但不增加心肌细胞内钙离子浓度^[2];不抑制钠离子、钾离子-ATP 酶与磷酸二酯酶

△基金项目:广东省教育部产学研结合项目(No. 2012B091100170);广东省科技计划项目(No.2012A080204010);广州市科技计划项目(No. 201509010012)

* 副主任医师,硕士生导师。研究方向:药理学、药事管理。电话:020-88654477。E-mail:lrb90927@126.com

通信作者:主任技师,硕士生导师。研究方向:新药研发。电话:020-88654185。E-mail:ljdengwalk@163.com

(PDE),不增加心肌环腺苷酸(cAMP)含量;可通过开放血管平滑肌细胞钙敏感钾离子通道产生舒张血管作用;对缺血及缺血再灌注损伤心肌有良好的保护作用,同时增强心功能,降低心肌耗氧量;增加清除自由基的能力,改善心肌能量代谢,对抗细胞内钙超载,从而保护缺血-再灌注心肌;其代谢快,不会在体内积蓄^[3-4]。该药在临床上拟用于心衰和心肌缺血-再灌注损伤的治疗。

为评价静脉滴注盐酸椒苯酮胺对 Beagle 犬的毒性作用,为制订其临床用药方案提供参考资料,本实验依据 2010 年版《中国药典》(二部)及《新药(西药)临床前研究指导原则汇编(药学、药理学、毒理学)》的有关技术要求^[5],以及大剂量静脉

注射的预实验结果,设计了盐酸椒苯酮胺6、12、24、48 mg/kg 4个剂量组^[6],连续静脉滴注30 d,观察盐酸椒苯酮胺给药后是否会产生蓄积作用并对机体产生毒性反应及其严重程度,考察毒性反应的靶器官及其损害的可逆性,从而确定盐酸椒苯酮胺的无毒反应剂量。

1 材料

1.1 仪器

AVL-9130型钠钾氯分析仪(瑞士AVL医疗仪器公司);6511型心电图仪(上海光电医用电子仪器有限公司);7020型自动生化分析仪(日本日立公司);TYXN-96型多功能智能血液凝集仪(上海通用机电技术研究所)。

1.2 药品、对照品与试剂

盐酸椒苯酮胺[中国医学科学院药物研究所药物化学室合成,批号:2001801,纯度:99.839%;每次临用前称取适量,在56℃水浴锅中,用5%葡萄糖溶液溶解,经超声波振荡后,制备成1 mg/ml(供低、中、高剂量组使用)或2 mg/ml(供超高剂量组使用)的溶液,经孔径为0.22 μm滤膜过滤除菌后使用];5%葡萄糖溶液(山东华鲁制药有限公司,批号:01051811,规格:250 ml,使用时调pH至3.0);盐酸(广州化学试剂厂,批号:20010104,分析纯)。所有药物均临用现配,配制后溶液在5~6 h内使用完毕。

1.3 动物及饲养条件

Beagle犬30只,♀♂各半,年龄6~12月龄,体质量7~9 kg。由取得实验动物一级合格证(证号:京动许字99001)的军事医学科学院实验动物中心供应。试验期间动物在中国医学科学院药物研究所动物试验室饲养(该动物室为清洁二级),自由进食、饮水,保持垫料干燥。饲料、饮用水均由中国医学科学院实验动物中心提供。

2 方法

2.1 分组及给药

30只Beagle犬分成5组,每组6只,♀♂各半。设低、中、高、超高剂量4个实验组,剂量分别为盐酸椒苯酮胺6、12、24、48 mg/kg;另设1个阴性对照组。实验组犬按各相应剂量每天静脉滴注盐酸椒苯酮胺,阴性对照组则静脉滴注5%葡萄糖,连续30 d,每次输注速度为2 ml/min。在最后一次给药后24 h,各组处死♀♂犬各2只,留下的2只继续观察4周后再处死。

2.2 指标观察

2.2.1 一般状态及心电图等观察 每天进行犬的一般状态观察,包括其行为活动、食量、体质量和体温,以及在给药前7 d(D₋₇)、首次给药前(D₀)和给药后15 d(D₁₅)、30 d(D₃₀)、58 d(D₅₈)检测犬心电图(十二导联)和血压的变化,其中为准确反映给药前后血压变化,D₀、D₁₅、D₃₀分别测了给药前和给药后的相关数据。

2.2.2 17项血浆生化指标检测 在D₋₇、D₀、D₁₅、D₃₀、D₅₈于犬后肢静脉取血,肝素化处理,检测17项血浆生化指标,包括天冬氨酸转氨酶(AST/GOT)、丙氨酸转氨酶(ALT/GPT)、碱性磷酸酶(ALP)、血糖(Glu)、尿素氮(BUN)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALb)、总胆红素(TBil)、总胆固醇(Tch)、甘油三酯(TG)、肌酐(Crea)、钠、钾、钙、氯、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)。

2.2.3 病理组织学检查 于D₃₀和D₅₈每组处死♀♂犬各1只,做病理组织学检查,包括血管黏膜下纤维组织、注射旁血管结构和骨髓细胞;取大脑、心肌、肺、肝、脾、肾和小肠、淋巴结、睾丸(连附睾)、卵巢等组织放入10%福尔马林固定,HE染色放大210倍镜检。

2.3 统计学方法

本研究采用本中心自行编制的计算机应用软件 Lab-Workers(V3.0),对试验中的犬进行随机分组和给药量计算,进行食耗测定、笼旁观察等数据的采集及统计处理。

对各剂量组犬的体质量、体温、心电、血压、血液学、血液生化等指标进行方差分析。如果F值有显著差异(P<0.05),则采用t检验进行组间比较。

3 结果

3.1 一般状态、体质量、摄食量及心电图状态

从给药第4天开始,超高剂量组(48 mg/kg)和高剂量组(24 mg/kg)犬相继出现与给药有关的体征,主要表现为输液过程中烦躁不安。超高剂量组犬在输液完毕后均出现一过性平衡或运动失调、四肢无力,约0.5~4 h后逐渐恢复。高剂量组3只犬在输液完毕后呈一过性的躯体摇摆、步态不稳、后肢无力的运动失调状态,一段时间后逐渐恢复。自给药8 d起,高剂量组全部犬陆续在输液过程中出现结膜充血,输液结束后4 h后恢复。中剂量组(12 mg/kg)和低剂量组(6 mg/kg)犬未出现上述这些体征,亦未观察到其他明显异常反应。

实验期间,实验组犬的体质量和体质量变化与阴性对照组比较差异不显著;各组犬进食正常;各组犬的体温均波动处于37.7~39.3℃之间,在正常范围之内;不同时间点进行血压测量,各剂量组犬的收缩压和舒张压与阴性对照组比较,或给药当天中给药前与给药后比较,差异均无统计学意义(P>0.05)。各剂量组犬的心率(HR)、PR间期(P-R interval)、QRS时限(QRS duration)、QT间期(Q-T interval)与阴性对照组比较,差异均无统计学意义(P>0.05),详见表1(注:表中剂量为0组即阴性对照组,其余表同);各组血压检测结果见表2。

表1 犬静脉滴注不同剂量盐酸椒苯酮胺后心电图检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Electrocardiogram of dogs after ivgtt different doses of piperphentonamine hydrochloride($\bar{x} \pm s$)

检测时间点	剂量, mg/kg	n	检测指标			
			HR,次/min	PR间期,s	QRS时限,s	QT间期,s
D ₋₇	0	6	156±26	0.08±0.01	0.05±0.00	0.19±0.02
	48	6	121±18	0.08±0.01	0.06±0.00	0.20±0.01
	24	6	171±17	0.08±0.01	0.05±0.00	0.18±0.01
	12	6	157±23	0.08±0.01	0.05±0.00	0.18±0.01
D ₀	6	6	158±15	0.08±0.01	0.05±0.00	0.18±0.01
	0	6	145±21	0.08±0.01	0.05±0.01	0.18±0.02
	48	6	133±10	0.09±0.01	0.06±0.01	0.19±0.01
	24	6	156±11	0.08±0.01	0.05±0.00	0.18±0.01
D ₁₅	12	6	138±30	0.08±0.01	0.05±0.00	0.19±0.02
	6	6	156±27	0.08±0.01	0.05±0.01	0.18±0.01
	0	6	152±26	0.09±0.01	0.05±0.01	0.18±0.02
	48	6	118±13	0.08±0.00	0.06±0.01	0.19±0.01
D ₃₀	24	6	162±16	0.08±0.00	0.05±0.00	0.18±0.01
	12	6	142±10	0.08±0.01	0.05±0.00	0.19±0.01
	6	6	141±22	0.08±0.01	0.05±0.00	0.18±0.01
	0	6	148±11	0.08±0.01	0.06±0.01	0.18±0.01
D ₅₈	48	6	137±20	0.08±0.00	0.06±0.00	0.19±0.01
	24	6	155±10	0.08±0.01	0.05±0.01	0.18±0.01
	12	6	154±20	0.08±0.01	0.05±0.00	0.19±0.01
	6	6	168±12	0.08±0.01	0.05±0.00	0.18±0.01
D ₅₈	0	2	153±66	0.09±0.01	0.05±0.00	0.19±0.02
	48	2	135±16	0.08±0.00	0.06±0.00	0.19±0.01
	24	2	128±1	0.08±0.01	0.05±0.00	0.19±0.03
	12	2	164±34	0.08±0.01	0.05±0.00	0.17±0.01
	6	2	133±13	0.08±0.00	0.05±0.00	0.19±0.01

表2 犬静脉滴注不同剂量盐酸椒苯酮胺后血压检测结果 ($\bar{x} \pm s, \text{kPa}$)

Tab 2 Blood pressure of dogs after ivgtt different doses of piperphentonamine hydrochloride ($\bar{x} \pm s, \text{kPa}$)

检测时间点	剂量,mg/kg	n	收缩压	舒张压
D ₋₇	0	6	19.6±1.7	9.3±1.2
	48	6	17.8±2.1	9.5±1.4
	24	6	18.8±1.6	9.8±1.8
	12	6	17.6±1.4	9.2±1.3
	6	6	18.4±2.5	8.3±1.7
D ₀ (给药前)	0	6	19.6±1.1	9.6±1.1
	48	6	20.0±2.4	9.3±1.2
	24	6	19.4±2.1	10.6±1.5
	12	6	18.3±1.3	9.9±2.8
	6	6	19.5±1.7	9.0±0.9
D ₀ (给药后)	0	6	19.3±1.7	10.1±0.7
	48	6	18.0±2.1	9.1±1.0
	24	6	20.2±0.9	11.8±1.7
	12	6	19.6±1.9	11.0±1.4
	6	6	20.1±1.0	9.0±1.2
D ₁₅ (给药前)	0	6	20.0±1.3	9.7±1.1
	48	6	19.2±1.7	10.5±1.0
	24	6	19.6±1.0	9.2±1.4
	12	6	19.9±1.6	10.3±1.0
	6	6	18.7±1.6	8.4±1.2
D ₁₅ (给药后)	0	6	20.4±2.0	9.4±2.0
	48	6	18.1±1.6	9.5±0.8
	24	6	20.4±1.8	9.9±1.6
	12	6	19.9±1.4	10.9±2.2
	6	6	20.0±1.6	9.5±1.1
D ₃₀ (给药前)	0	6	19.1±2.2	8.4±1.6
	48	2	19.5±2.6	10.3±1.8
	24	6	19.2±1.1	7.4±0.6
	12	6	17.6±0.9	7.7±1.3
	6	6	17.7±0.9	8.2±2.2
D ₃₀ (给药后)	0	6	19.8±1.5	8.6±1.8
	48	6	17.9±1.2	9.0±1.0
	24	6	19.6±1.8	8.1±1.7
	12	6	18.8±1.6	8.5±1.7
	6	6	18.9±1.7	8.0±2.2
D ₅₈	0	2	19.4±0.8	8.5±1.5
	48	2	18.5±0.8	9.3±0.5
	24	2	20.5±0.5	8.0±3.3
	12	2	20.9±3.3	7.5±0.6
	6	2	19.1±2.8	7.9±0.8

3.2 17项血浆生化指标

超高剂量组(48 mg/kg)犬给药后第15、30天,血浆ALT与药前0 d比较明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);同时,该组犬给药后第15天血浆钠离子及第15、30天血浆氯离子与给药前即刻比较水平也显著升高,但这种变化均在正常参考值范围内,故似无重要的毒理学意义;该组其余生化指标(AST、ALP、LDH、TP、ALb、TBil、TG、Tch、Glu、Crea、BUN、钙离子、钾离子)与给药前即刻比较,均无证据表明被试药物产生毒性反应的情况。故高、中、低剂量组犬检测的17项生化指标与给药前即刻比较,均无证据表明被试药物产生毒性反应的情况,详见表3、表4。

3.3 病理组织学检查

阴性对照组和各给药组给药期处死犬中均有部分犬注射部位出现皮下组织出血。高剂量组(24 mg/kg)给药期处死部

表3 犬静脉滴注不同剂量盐酸椒苯酮胺后血液中ALT、AST、ALP、TP检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The levels of ALT, AST, ALP and TP in the blood of dogs after ivgtt different doses of piperphentonamine hydrochloride ($\bar{x} \pm s$)

检测时间点	剂量,mg/kg	n	ALT,U/L	AST,U/L	ALP,U/L	TP,g/L
D ₋₇	0	6	26.3±8.1	25.0±7.8	110.2±28.2	56.8±3.2
	48	6	32.5±5.3	27.2±6.6	105.5±31.7	58.4±2.8
	24	6	22.8±3.7	18.8±3.3	106.8±12.7	57.6±2.4
	12	6	27.2±5.5	18.8±7.4	109.2±27.0	57.9±3.2
	6	6	21.8±4.3	21.7±7.4	99.2±11.9	56.4±1.4
D ₀	0	6	28.5±6.5	32.0±15.0	120.5±27.0	58.1±2.0
	48	6	28.8±3.9	23.8±6.6	117.3±38.2	68.9±4.9
	24	6	24.3±2.9	20.2±3.9	107.8±13.4	58.3±2.2
	12	6	27.8±5.1	20.3±5.5	113.3±31.5	58.4±2.3
	6	6	24.3±4.5	22.7±4.7	102.2±13.5	56.9±0.9
D ₁₅	0	6	28.3±4.1	21.5±7.4	100.5±22.9	59.4±2.3
	48	6	40.2±5.3 [#]	21.0±4.1	105.7±13.9	65.1±4.5
	24	6	27.5±2.3	18.3±2.8	99.2±17.9	61.6±1.9
	12	6	29.5±4.8	19.8±6.3	96.5±29.3	61.0±2.8
	6	6	27.2±3.6	22.8±7.7	89.0±13.3	59.1±2.4
D ₃₀	0	6	27.5±3.0	20.8±5.1	75.8±21.0	61.4±2.0
	48	6	40.3±9.5 [*]	21.8±8.4	100.0±19.2	56.8±5.0
	24	6	28.0±3.7	18.0±6.8	83.7±12.7	60.0±2.0
	12	6	27.7±5.4	20.5±6.6	81.5±23.2	60.6±3.1
	6	6	28.2±4.3	24.7±4.3	78.8±7.5	59.6±1.8
D ₅₈	0	2	20.0±5.7	22.0±5.7	69.0±2.8	58.1±1.6
	48	2	25.5±2.1	31.5±3.5	94.0±11.3	62.3±2.9
	24	2	29.0±2.8	20.0±2.8	86.0±8.5	58.0±0.1
	12	2	26.0±2.8	18.5±4.9	83.5±3.5	57.7±4.4
	6	2	31.5±3.5	26.0±2.8	68.5±12.0	59.0±0.8

注:与同剂量组D₀比较,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

Note: vs. at D₀ in the same dose group, * $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

分犬出血范围较大,同时伴有炎症反应和水肿。在超高剂量组(48 mg/kg),可见注射部位血管内膜下纤维组织显著增生,从而造成血管明显狭窄,恢复期未见明显改善,见图1A。其他给药组犬注射部位血管改变轻微,见图1B、图1C。超高剂量组(48 mg/kg)犬的心肌、肺、肝、脾、肾、小肠组织病理切片均正常,未观察到药物引起的其他器官组织的毒性病理改变,见图2。

4 讨论

长期毒性试验(即重复给药毒性试验)是药物非临床安全性评价的核心内容,其与急性毒性、生殖毒性以及致癌性等毒理学研究有着密切的联系,是药物从药学研究进入临床试验的重要环节^[7-9]。因此,本实验参考了盐酸椒苯酮胺的稳定性、药动学、致畸敏感期毒性和致突变毒性等相关资料^[10-12],发现盐酸椒苯酮胺在血中代谢较快,在组织中代谢比血中慢,为代谢型药物,“三致”试验结果均呈阴性。临床研究计划盐酸椒苯酮胺的人拟用剂量为0.1~1 mg/kg,折算后对应犬的剂量范围约为0.2~2 mg/kg,本实验设立各剂量(6、12、24、48 mg/kg)分别为临床最高有效剂量的3、6、12、24倍,符合人民卫生出版社出版的第4版《药理实验方法学》指导意见中长期毒性实验的剂量设计中根据拟用临床剂量推算的原则^[6]。在盐酸椒苯酮胺对大鼠的急性毒性研究中,大鼠灌胃和静脉注射给予盐酸椒苯酮胺的半数致死量(LD₅₀)均大于150 mg/kg^[13],因此无确定的LD₅₀值,故无法根据急性毒性的LD₅₀值设计对应的给药剂量。

表4 犬静脉滴注不同剂量盐酸椒苯酮胺后血液中CK及钠、钾、氯离子检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 The levels of CK, Na, K and Cl in the blood of dogs after ivgtt different doses of piperphentonamine hydrochloride($\bar{x} \pm s$)

检测时间点	剂量, mg/kg	n	CK, U/L	钠离子, mmol/L	钾离子, mmol/L	氯离子, mmol/L
D ₋₇	0	6	492.7 ± 330.6	151.0 ± 4.6	4.7 ± 0.3	115.2 ± 2.0
	48	6	309.3 ± 207.6	147.2 ± 1.6	4.3 ± 0.2	109.7 ± 2.4
	24	6	250.8 ± 27.2	152.3 ± 2.3	4.5 ± 0.2	115.8 ± 1.6
	12	6	275.6 ± 77.2	152.6 ± 1.7	4.3 ± 0.1	115.4 ± 1.5
	6	6	269.3 ± 61.7	151.3 ± 3.1	4.6 ± 0.2	115.5 ± 2.7
D ₀	0	6	683.2 ± 529.5	150.3 ± 1.2	5.2 ± 0.4	116.3 ± 1.5
	48	6	293.3 ± 126.8	148.7 ± 2.2	5.0 ± 0.2	108.8 ± 1.9
	24	6	270.8 ± 38.0	151.2 ± 2.8	4.9 ± 0.4	117.0 ± 2.7
	12	6	292.7 ± 50.9	151.8 ± 1.7	4.7 ± 0.4	115.3 ± 2.1
	6	6	242.5 ± 28.7	150.7 ± 3.0	4.8 ± 0.3	115.0 ± 1.7
D ₁₅	0	6	306.2 ± 120.0	150.7 ± 1.9	4.9 ± 0.3	114.0 ± 4.6
	48	6	210.7 ± 104.3	157.5 ± 1.4*	4.6 ± 0.2	117.7 ± 3.0*
	24	6	226.0 ± 38.6	152.3 ± 2.1	4.6 ± 0.3	114.2 ± 1.7
	12	6	267.7 ± 54.2	149.7 ± 2.3	4.3 ± 0.3	114.8 ± 4.5
	6	6	262.3 ± 47.5	149.5 ± 1.0	4.2 ± 0.2	113.5 ± 2.8
D ₃₀	0	6	247.7 ± 44.6	151.5 ± 2.1	4.7 ± 0.3	117.5 ± 1.6
	48	6	258.8 ± 145.7	143.8 ± 3.7	4.3 ± 0.3	112.7 ± 2.2*
	24	6	207.0 ± 60.5	149.5 ± 2.1	4.6 ± 0.3	114.7 ± 2.9
	12	6	268.0 ± 82.4	148.8 ± 2.6	4.5 ± 0.2	116.0 ± 3.3
	6	6	233.8 ± 36.3	149.7 ± 1.5	4.4 ± 0.2	114.8 ± 1.8
D ₅₈	0	2	178.5 ± 55.9	151.5 ± 0.7	4.5 ± 0.4	117.5 ± 2.1
	48	2	414.5 ± 112.4	142.0 ± 1.4	4.5 ± 0.0	106.0 ± 4.2
	24	2	261.5 ± 108.2	151.0 ± 1.4	4.8 ± 0.6	116.5 ± 0.7
	12	2	236.0 ± 63.6	149.0 ± 1.4	4.8 ± 0.1	117.5 ± 0.7
	6	2	319.0 ± 63.6	150.5 ± 0.7	4.8 ± 0.1	117.0 ± 0.0

注:与同剂量组D₀比较, *P<0.01

Note: vs. at D₀ in the same dose group, *P<0.01

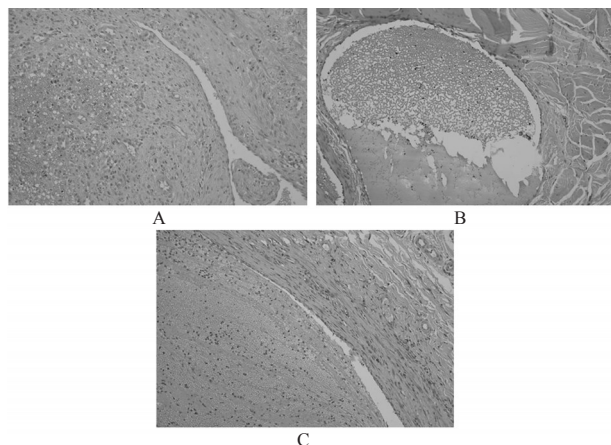


图1 犬静脉滴注不同剂量盐酸椒苯酮胺后注射部位血管情况(HE, ×200)

A. 超高剂量组血管黏膜下纤维组织; B. 高剂量组注射旁血管结构; C. 高剂量组血管壁与内容物连接处

Fig 1 Vascular condition in injection site of dogs after ivgtt different doses of piperphentonamine hydrochloride (HE, ×200)

A. vascular fibrous tissue of super-high dose group; B. vascular structure around injection site of high dose group; C. vessel wall and content joint site of high dose group

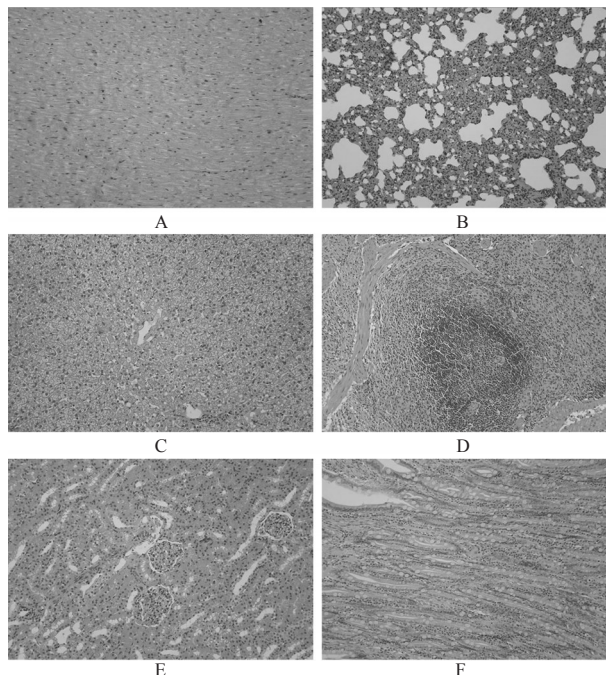


图2 犬静脉滴注盐酸椒苯酮胺48 mg/kg后30 d时(给药期)各脏器组织结构情况(HE, ×200)

A. 心肌; B. 肺; C. 肝; D. 脾; E. 肾; F. 小肠

Fig 2 Structure of visceral organs and tissues in dogs 30 d after ivgtt piperphentonamine hydrochloride of 48 mg/kg (medication period) (HE, ×200)

A. myocardium; B. lung; C. liver; D. spleen; E. kidney; F. small intestine

由于盐酸椒苯酮胺在体内血浆的半衰期较短,本实验处死犬选择了2个时间点,其中一个时间点在最后一次给药后24 h,每组♀♂犬各2只取样作血液学、血液生化及病理学检查;留下的犬继续观察4周后再处死,以便了解毒性反应的恢复情况和可能出现的延迟性毒性。在血液生化指标结果中显示,超高剂量组(48 mg/kg)给药后D₁₅、D₃₀,与D₀比较,血浆ALT水平升高,有统计学意义。但个体分析表明,该组仅个别犬在D₃₀时的血浆ALT(57 U/L)超出本实验室建立的犬ALT正常参考值上限(45 U/L),多数犬(5/6)的血浆ALT(≤46 U/L)接近或低于正常参考值上限。这种变化虽多属正常范围内的变化,但因未见于给药前,也未见于阴性对照组,而且停药后1个月(D₅₈),血浆ALT恢复至正常水平,故不能排除这种变化是超大剂量盐酸椒苯酮胺所引起,即使这种影响是轻微或可疑的。

综合本实验结果表明,给予盐酸椒苯酮胺后犬血浆ALT有轻微但可逆的升高,与药物的关系尚属“可疑”;部分犬注射部位水肿和慢性炎细胞浸润,说明药物对注射部位有刺激;犬的无毒性反应的剂量为12 mg/(kg·d),按体表面积推算,盐酸椒苯酮胺人用剂量的安全范围为6 mg/(kg·d)。

参考文献

- [1] 杨向阳,李若冰,万华印.新型钙增敏剂左西孟旦和盐酸椒苯酮胺研究进展[J].国际药学研究杂志,2010,37(1): 32.
- [2] 李茹冰,万华印,邓凤君,等.心血管创新药盐酸椒苯酮胺[C]//中国药理学会药理学专业委员会第一届第四次学术研讨会论文摘要汇编.北京:中国药理学会,2008: 44.

HPLC-UV法测定大鼠脑组织中利培酮的含量^Δ

谷福根^{1*}, 马维娜², 王毅¹, 孟根达来¹, 张艺馨², 吴春芝¹ (1. 内蒙古医科大学附属医院, 呼和浩特 010050; 2. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1782-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.15

摘要 目的: 建立大鼠脑组织中利培酮含量的测定方法。方法: 取大鼠, ig 30 mg/kg 的利培酮混悬液, 30 min 后断头处死, 分离脑组织; 采用高效液相色谱-紫外法, 以盐酸小檗碱为内标, 测定大鼠脑组织中利培酮的浓度。色谱条件采用色谱柱 Wondasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.01 mol/L 醋酸铵溶液 (50:50, V/V), 流速为 1.0 ml/min; 检测波长为 280 nm; 柱温为室温; 进样量为 25 μl。结果: 利培酮检测质量浓度的线性范围为 0.2~27.0 μg/ml ($r=0.999\ 9$), 方法回收率为 97.28%~109.10%, 提取回收率为 94.59%~97.48% ($n=5$), 日内和日间 RSD 均小于 5% ($n=5$), 定量限为 0.5 μg/ml。大鼠脑组织中利培酮的含量为 (3.48±0.50) μg/g, RSD 为 14.7% ($n=6$)。结论: 本方法简便、快速、灵敏、准确度高, 可用于大鼠脑组织中利培酮的含量测定。

关键词 高效液相色谱-紫外法; 利培酮; 大鼠; 脑组织; 含量测定

Content Determination of Risperidone in Cerebral Tissues of Rats by HPLC-UV Method

GU Fugen¹, MA Weina², WANG Yi¹, Menggendalai¹, ZHANG Yixin², WU Chunzhi¹ (1. The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China; 2. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of risperidone (RIS) in cerebral tissues of rats. METHODS: Rats were given RIS suspension 30 mg/kg, ig, and sacrificed 30 min later to separate cerebral tissue. The concentration of RIS in cerebral tissues of rats was determined by HPLC system with UV detector using berberine hydrochloride as internal standard. The chromatographic conditions were that Wondasil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with mobile phase consisted of acetonitrile-0.01 mol/L ammonium acetate (50:50, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min; the detection wavelength was set at 280 nm; the column temperature was maintained at room temperature, and sample size was 25 μl. RESULTS: There was a good linear relationship of RIS concentration in cerebral tissues of rats within the range of 0.2-27.0 μg/ml ($r=0.999\ 9$). The method recovery was from 97.28% to 109.10% and extraction recovery was from 94.59% to 97.48% ($n=5$); intra-day and inter-day RSDs were both below 5% ($n=5$). The limit of quantitation was 0.5 μg/ml. The content of RIS in cerebral tissue of rats was (3.48±0.50) μg/g (RSD=14.7%, $n=6$). CONCLUSIONS: The established method is simple, rapid, sensitive and accurate for the content determination of RIS in cerebral tissues of rats.

KEYWORDS HPLC-UV; Risperidone; Rats; Cerebral tissue; Content determination

- =====
- [3] 牟英, 孟志云, 窦桂芳. 椒苯酮胺在比格犬体内的药代动力学研究[J]. 中国血液流变学杂志, 2006, 16(3): 338.
- [4] Shi A, Hu X, Li R, et al. Determination of piperphentamine and metabolites M1 and M6 in human plasma and urine by LC/MS/MS and its application in a pharmacokinetics study in Chinese healthy volunteers[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.09.031.
- [5] 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编: 药理学 毒理学[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部药政局, 1993: 202-203.
- [6] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 393-397.
- [7] Hayes AW, Dorato MA, Andersen ME. *The toxicological assessment of pharmaceutical and biotechnology product: principles and methods of toxicology*[M]. 4th Edition. Philadelphia: Taylor and Francis, 2001: 243-283.
- [8] 国家药品监督管理局. 化学药物长期毒性试验技术指导原则[S]. 2005-03.
- [9] 黄晓舞, 梅世昌, 李外. 银杏内酯B注射液对Beagle犬的长期毒性研究[J]. 中国药房, 2008, 19(30): 2338.
- [10] 李茹冰, 耿智毅, 孙智平, 等. 注射用盐酸椒苯酮胺稳定性考察[J]. 中国药师, 2012, 15(1): 30.
- [11] 李茹冰, 李健, 吴新荣, 等. 盐酸椒苯酮胺致畸敏感期毒性试验[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(22): 5610.
- [12] 陈阳述, 李茹冰, 李健, 等. 盐酸椒苯酮胺致突变实验[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(19): 4747.
- [13] 李健, 李茹冰, 张强, 等. 盐酸椒苯酮胺对大鼠和Beagle犬的急性毒性实验研究[J]. 中国药房, 2016, 27(10): 1315.

Δ 基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目[No. 2015MS(LH)0801]; 内蒙古医科大学科技百万工程项目(No. YKD2014KJBW012)

* 主任药师, 博士. 研究方向: 药物新剂型. 电话: 0471-6636650. E-mail: fgczh@sina.com

(收稿日期: 2015-09-26 修回日期: 2016-04-15)
(编辑: 刘萍)