

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.04.10

清呼合剂急性毒性试验研究

景慕娴^{1,5}, 谢晓莉^{2,5*}, 李连缺^{3,5*}, 张一丽^{1,5}, 米国华^{1,5}, 刘明^{1,5}, 赵达⁴

(1. 石家庄江山动物药业有限公司, 石家庄 050200; 2. 河北工程技术学院, 石家庄 050000;

3. 河北工程大学生命科学与食品工程学院, 河北邯郸 056038;

4. 石家庄市藁城区畜牧工作总站, 石家庄 050000; 5. 河北省口服兽药制剂创新技术中心, 石家庄 050200)

[收稿日期] 2021-11-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 04-0061-05 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为评价复方制剂清呼合剂在临床应用的安全性, 试验通过对 KM 小鼠单次灌胃清呼合剂, 观察试验小鼠出现的中毒症状、中毒程度、性质及死亡情况, 评价受试药物毒性作用的性质。结果显示, KM 小鼠经口灌服 5000 mg/kg 剂量的清呼合剂, 7 d 内未出现死亡、精神及行为异常, 表明本品对 KM 小鼠的 LD₅₀ 大于 5000 mg/kg。根据急性毒性分级标准判定, 本品属实际无毒类中兽药。

[关键词] 清呼合剂; 急性毒性试验; 安全性评价

Acute Toxicity Test of Qinghu Mixture

JING Mu-xian^{1,5}, XIE Xiao-li^{2,5*}, LI Lian-que^{3,5*}, ZHANG Yi-li^{1,5},

MI Guo-hua^{1,5}, LIU Ming^{1,5}, ZHAO Da⁴

(1. The Corporation of Shijiazhuang Jiangshan Animal Pharmaceutical, Shijiazhuang 050200, China;

2. Hebei Institute of Engineering and Technology, Shijiazhuang 050000;

3. School of Life Science and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Hebei Handan 056038, China;

4. Animal Husbandry Station, Gaocheng District, Shijiazhuang City, Shijiazhuang 050000, China;

5. Hebei Provincial Oral Veterinary Drug Preparation Innovation Technology Center, Shijiazhuang 050200, China)

Corresponding author: XIE Xiao-li, E-mail: 742796118@qq.com; LI Lian-que, E-mail: 836947249@qq.com

Abstract: In order to evaluate the safety of the compound preparation Qinghu Mixture in clinical application, this experiment was conducted by giving a single gavage of Qinghu Mixture to KM mice to observe the symptoms of poisoning, the degree of poisoning, the nature and the death situation, and evaluate the Test the nature of the drug's toxic effects. The results showed that KM mice were orally administered with Qinghu mixture at a dose of 5000 mg/kg, and no death, mental or behavioral abnormalities occurred within 7 days, indicating that the LD₅₀ of this product to KM mice was greater than 5000 mg/kg. According to the acute toxicity classification standard,

基金项目: 石家庄科技支撑计划项目"治疗鸡呼吸道疾病的国家三类新兽药的研制" (2021490162A)

作者简介: 景慕娴, 硕士, 兽医师, 研究方向为新药研发。

通讯作者: 谢晓莉, E-mail: 742796118@qq.com; 李连缺, E-mail: 836947249@qq.com

this product belongs to the actual non – toxic Chinese veterinary medicine.

Key words: Qinghu Heji; acute toxicity test; safety evaluation

清呼合剂为本文研究的新兽药复方制剂,由黄芩、枇杷叶等 6 味中药组成,具有清肺化痰、止咳平喘之功效,主治由风热犯肺或风寒郁而化热等各种原因引起的肺热咳喘证。为客观评价该制剂的安全性,依据农业部兽药评审中心《兽药研究技术指导原则汇编(2006 – 2011)》^[1],通过对 KM 小鼠单次灌胃清呼合剂,连续观察试验小鼠出现的中毒症状、中毒程度、性质及死亡情况,评价受试药物毒性作用的性质,毒效应的特征及可能的靶器官,初步判断受试药物的危险性,并探求受试药物的剂量 – 效应关系,求出半数致死量 LD₅₀ 及 95% 可信限,为评价其安全性提供依据^[2–4]。

1 材料与方法

1.1 受试药物 清呼合剂,250 mL/瓶,每 1 mL 相当于原生药 1 g,批号 20180327,由石家庄江山动物药业有限公司生产。试验时取本品加入蒸馏水,按最大剂量组配制供试品溶液,其他浓度按等容量稀释法(1:K 稀释)进行稀释。

1.2 实验动物 SPF 级健康 KM 小鼠,体重 18 g ~ 22 g,72 只(其中 12 只用于首次实验),雌雄各半,北京华阜康生物科技股份有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2019 – 0008。将 KM 小鼠隔离检疫 5 ~ 7 d,在检疫期间动物摄食、饮水和健康状态良好。皮毛光滑、反应灵敏,粪便成形,眼、耳、鼻及会阴处无分泌物,动物确认健康无病后可用于试验。

1.3 试验动物分组及给药剂量 选取 SPF 小鼠 12 只(雌、雄各半)进行首次试验,设 3 个剂量组,每组 4 只(雌、雄各半)。试验前禁食不禁水 12 h,分别灌服清呼合剂 1 次,灌胃体积为 0.2 mL/10 g 体重,具体剂量见表 1。如果高剂量组(剂量为 5000 mg/kg)死亡率为 0%,则进行重复试验一、重复试验二^[5–7],即分别选取 30 只小鼠(雌、雄各半),各设 3 个剂量组,每组 10 只(雌、雄各半),灌服清呼合剂 1 次,灌胃体积为 0.2 mL/10 g 体重,具体剂量见表 2 和表 3。

表 1 清呼合剂 KM 小鼠急性毒性试验首次试验 – 剂量及分组

Tab 1 Acute toxicity test of Qinghu Mixture in KM mice first test – dose and group			
组别	剂量 mg/kg	动物数/只	
		雌性	雄性
I	555	2	2
II	1666	2	2
III	5000	2	2

表 2 清呼合剂 KM 小鼠急性毒性试验重复试验一 – 剂量及分组

Tab 2 Acute toxicity test of Qinghu Mixture in KM mice repeated test one – dose and group			
组别	剂量 mg/kg	动物数/只	
		雌性	雄性
I	555	5	5
II	1666	5	5
III	5000	5	5

表 3 清呼合剂 KM 小鼠急性毒性试验重复试验二 – 剂量及分组

Tab 3 Acute toxicity test of Qinghu Mixture in KM mice repeated test two – dose and group			
组别	剂量 mg/kg	动物数/只	
		雌性	雄性
I	555	5	5
II	1666	5	5
III	5000	5	5

1.4 试验观察 给药 4 h 严密观察动物对供试品的反应,以后每天观察一次,连续观察 7 d,4 d 如有动物死亡则观察 14 d。观察内容:动物外观、活动情况、呼吸状态、粪便形态、营养状况、被毛光泽^[1,8]。对动物毒性反应情况、中毒症状、严重程度、中毒发生时间、持续时间、恢复时间、动物死亡时间及死亡数量进行详细记录,对死亡动物进行大体解剖。

1.5 结果统计 统计并分析清呼合剂各剂量组的动物死亡数。

1.6 毒性分级评定 依据半数致死量(LD₅₀)及急

性毒性(LD₅₀)剂量分级表^[1],对受试药物的毒性进行分级。见表 4。

表 4 急性毒性(LD₅₀)剂量分级表

Tab 4 Acute toxicity (LD ₅₀) dose classification table	
级别	口服 LD ₅₀ /(mg·kg ⁻¹)
极毒	<1
剧毒	1~50
中等毒	51~500
低毒	501~5000
实际无毒	5001~15000
无毒	>15000

2 结果与分析

2.1 首次试验结果 首次试验中,清呼合剂各剂

量组实验小鼠灌胃给药后,4 h 内小鼠均未出现异常现象,连续观察小鼠 7 d 后,各组小鼠行为及精神状态良好(临床表现如 2.2 图 1 所示),眼、鼻、口腔及肛门均无分泌物,二便正常,且各组小鼠均未出现死亡。结果见表 5、表 6。

表 5 急性毒性试验首次试验结果

Tab 5 First test results of acute toxicity test				
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物数/只	死亡只数	死亡率/%
I	555	4	0	0
II	1666	4	0	0
III	5000	4	0	0

表 6 啮齿动物中毒表现及观察项目

Tab 6 Rodent poisoning manifestations and observation items		
器官检查	观察及检查项目	中毒后一般表现
中枢神经系统及躯体运动	行为	姿势无异常
	动作	动作无异常
	各种刺激的反映	不易兴奋,无直觉过敏或缺乏
	大脑及脊髓反射	无减弱或消失
	肌肉张力	无强直或延缓
自主神经系统	瞳孔大小	无缩小或放大
	分泌	无流涎,流泪
呼吸系统	鼻孔	无流鼻涕
	呼吸性质和速率	无呼吸困难
心血管系统	心区触诊	无心动过缓,心律不齐,心跳
胃肠系统	腹形	无腹泻及便秘
	粪便硬度和颜色	粪便正常
	阴户,乳腺	无膨胀
生殖泌尿系统	阴茎	无脱垂
	会阴部	无污秽
	颜色,张力	无发红,褶皱,松弛和皮疹
皮肤和被皮	完整性	无竖毛
	黏膜	无流粘液,充血,出血和苍白
黏膜	口腔	无溃疡
	眼睑	无上睑下垂
	眼球	正常,无眼球突出或震颤
其他	透明度	清澈,无浑浊
	直肠或皮肤温度	正常
	一般情况	姿势正常,无消瘦

2.2 重复试验结果 重复试验一和重复试验二中,清呼合剂各剂量组实验小鼠灌胃给药后,4 h 内小鼠均未出现异常现象,连续观察小鼠 7 d 后,各组小鼠均未出现死亡(表 7),且小鼠行为及精神状态等均正常(图 1),观察结果同表 6。各组小鼠均未出现死亡,即小鼠的死亡率为 0。由此可见,清呼合剂对 KM 小鼠的 LD₅₀ 大于 5000 mg/kg · bw。

表 7 急性毒性试验重复试验结果

Tab 7 Repeated test results of acute toxicity test				
组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物数/只	死亡只数	死亡率/%
重复试验一	I 555	10	0	0
	II 1666	10	0	0
	III 5000	10	0	0
重复试验二	I 555	10	0	0
	II 1666	10	0	0
	III 5000	10	0	0

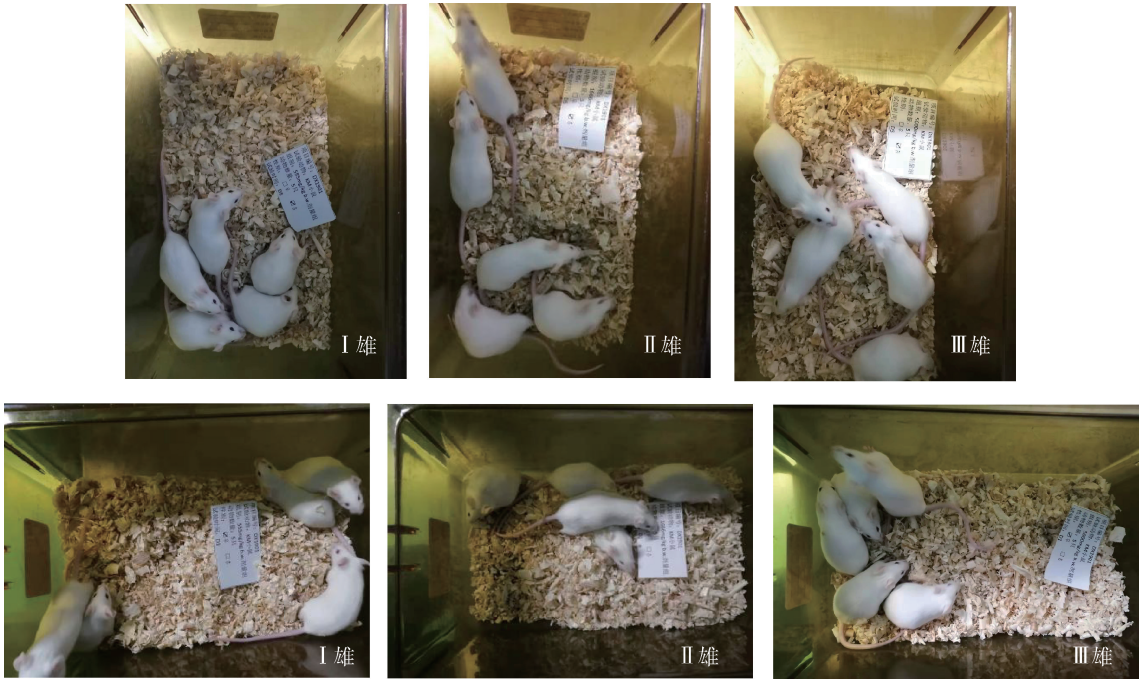


图 1 小鼠急性毒性试验临床表现

Fig 1 Clinical manifestations of acute toxicity test in mice

2.3 毒性分级评定 从本试验结果可知清呼合剂的 LD₅₀ 大于 5000 mg/kg,按 1.6 表 4 急性毒性(LD₅₀)剂量分级表进行分级,清呼合剂属于实际无毒类中兽药。

3 讨论与结论

兽药三个基本要素属性包括安全性、药品的质量可控性以及临床的有效性。兽药的优与劣,除取决于有效性,还取决于毒性的高低。因此,在新兽药的开发与研究中必须要进行安全性评价^[9-10]。急性毒理试验是安全性评价的首要内容,指一日内对动物单次或多次给药,连续观察给药后动物产生的毒性反应及死亡情况的试验方法^[11],进而测定

引起动物急性中毒的剂量,揭示动物在中毒过程中出现的毒性反应和靶器官^[12]。常用 LD₅₀的测定来评价兽药急性毒性试验。

清呼合剂为纯中药复方新制剂,由黄芩、枇杷叶等 6 味中药组成,前期药效学试验表明,清呼合剂具有镇咳、祛痰、平喘、抗菌、抗炎等作用^[13]。本试验依据《兽药研究技术指导原则汇编(2006 - 2011)》“兽药急性毒性试验(LD₅₀测定)指导原则”,对清呼合剂进行了急性毒性评价试验。首次试验结果显示,KM 小鼠口服高剂量已达 5000 mg/kg 的清呼合剂,未出现小鼠的死亡、精神及行为等异常。将小鼠增加至 10 只(雌雄各半)重复两次试验,结

果仍未见死亡及中毒症状。因此,确定了清呼合剂对 KM 小鼠的 LD_{50} 大于 5000 mg/kg。根据急性毒性 (LD_{50}) 剂量分级表进行分级判断,清呼合剂属于实际无毒类中兽药,这为评价其安全性提供了有力依据,同时为后续长期毒性试验的剂量使用提供依据。

参考文献:

- [1] 农业部兽药评审中心. 兽药研究技术指导原则汇编 (2006 - 2011) [M]. 北京:化工工业出版社,2012.
- Veterinary Drug Evaluation Center of the Ministry of Agriculture. Compilation of Guiding Principles for Veterinary Drug Research Technology (2006 - 2011) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2012.
- [2] 沈建忠. 动物毒理学 [M]. 北京:中国农业出版社,2002.
- Shen J Z. Animal Toxicology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002.
- [3] 农业部兽药审评委员会办公室. 兽药注册资料汇编 [M]. 北京:化学工业出版社,2009.
- Office of Veterinary Drug Evaluation Committee, Ministry of Agriculture. Compilation of veterinary drug registration data [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社,2000.
- Chen Q. Research Methodology of Traditional Chinese Medicine Pharmacology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000.
- [5] 姜玲玲,陈鸿宇,史开志,等. 一种新兽用止泻中药复方制剂对大鼠的急性及亚慢性毒性试验 [J]. 中国畜牧兽医,2016, 43(11):3073 - 3079.
- Jiang L L, Chen H Y, Shi K Z, *et al.* Acute and sub - chronic toxicity test of a new veterinary antidiarrheal Chinese medicine compound preparation on rats [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, 43(11):3073 - 3079.
- [6] 刘俊丹,陈彩萍,邱文才,等. 芩黄清肺散的急性毒性和长期毒性研究 [J]. 中国畜牧兽医,2018,45(1):225 - 233.
- Liu J D, Chen C P, Qiu W C, *et al.* Study on Acute Toxicity and Long - term Toxicity of Qinhuang Qingfei Powder [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018, 45(1): 225 - 233.
- [7] Jia R L, Xu S, Guo Y F, *et al.* Acute and sub - chronic toxicity as well as evaluation safety pharmacology of modified *Pulsatilla* granules [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2017, 16(3): 671 - 678.
- [8] 付海宁,孙亚磊,王艳玲,等. 禽用新中药复方制剂的急性及亚慢性毒性试验 [J],2019(4):60 - 63.
- Fu H N, Sun Y L, Wang Y L, *et al.* Acute and sub - chronic toxicity test of new Chinese medicine compound preparation for poultry [J]. 2019(4): 60 - 63.
- [9] 叶祖光. 中药毒理学的研究思路 [J]. 世界科学技术:中医药现代化,2004,5(6):1 - 5.
- Ye Z G. Research thoughts on the toxicology of traditional Chinese medicine [J]. World Science and Technology: Modernization of Traditional Chinese Medicine, 2004, 5(6): 1 - 5.
- [10] 王洪超,高珍珍,李恩涛,等. 芪藿糖散的安全性试验研究 [J]. 畜牧与兽医,2016,48(6):104 - 108.
- Wang H C, Gao Z Z, Li E T, *et al.* Study on the safety of Qihuo - tang powder [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, 48(6):104 - 108.
- [11] 刘昌孝. 药物评价学 [M]. 北京:化学工业出版社,2006.
- Liu C X. Drug Evaluation [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006.
- [12] 喻琴,陈玲,尹伶灵,等. 鱼腥草芩蓝口服液毒理学研究 [J]. 中国兽药杂志,2018,52(9):27 - 34.
- Yu Q, Chen L, Yin L L, *et al.* Toxicological study of Yuxingcao - qinlan oral liquid [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2018, 52(9):27 - 34.
- [13] 石家庄江山动物药业有限公司. 一种用于防治家禽肺热咳嗽证的中药口服溶液及其制备方法:中国,ZL202010106803.0 [P]. 2021 - 08 - 17.
- Shijiazhuang Jiangshan Animal Pharmaceutical Co., Ltd. A traditional Chinese medicine oral solution for the prevention and treatment of lung - heat, cough and asthma syndrome in poultry and its preparation method: China, ZL202010106803.0 [P]. 2021 - 08 - 17.

(编辑:陈希)