

刘磊,张继瑜,周绪正,等.伊维菌素微乳制剂的家兔刺激性试验[J].江苏农业科学,2013,41(8):197-199.

伊维菌素微乳制剂的家兔刺激性试验

刘磊^{1,2},张继瑜²,周绪正²,李冰²

(1.甘肃农业大学动物医学院,甘肃兰州 730070;

2.中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所/农业部兽用药物创制重点实验室/甘肃省新兽药工程重点实验室,甘肃兰州 730050)

摘要:白兔背部分区进行脱毛处理,将伊维菌素微乳制剂一次性涂抹于暴露的皮肤,观察皮肤接触受试物后是否引起红肿、充血、渗出等局部反应,评价药物对家兔皮肤的刺激性。同时将受试物滴于家兔眼结膜囊内,观察虹膜、角膜和结膜是否出现浑浊、充血、水肿等局部反应,评价药物对家兔眼睛的刺激性。结果表明,伊维菌素微乳制剂未引起白兔皮肤明显的充血、红肿;同时对兔子的结膜、虹膜和角膜也没有刺激性。因此该制剂对白兔的皮肤和眼睛的刺激程度为无刺激。本试验为伊维菌素微乳制剂的安全性评价提供了试验依据。

关键词:伊维菌素微乳制剂;白兔;刺激性试验

中图分类号: S859.83 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0197-03

伊维菌素(ivermectin, IVM)具有广谱、高效、用量小和安全等优点,对体内外寄生虫特别是线虫和节肢动物均具有高效驱杀作用,对哺乳动物的机体组织有更强的渗透性和安全性,持效期更长,特别适用于一般口服驱虫剂难以到达的肌

肉、器官和特殊组织中的寄生虫防治^[1],对家畜的胃肠道线虫、外寄生虫有着特殊的疗效,临床应用表明,它具有广谱、高效、用量小、副作用轻等优点^[2]。纳米乳作为一种新型药物载体,近年来一直受到国内外学者的广泛关注,它具有增加难溶性药物溶解度及提高药物稳定性和生物利用度等优点,许多难溶性药物制成纳米乳制剂后具有缓释和靶向作用。将伊维菌素制成纳米乳脂质体,作为药物载体它可以提高药物的治疗指数,降低药物毒性,减少药物副作用,并具有延长有效血药浓度时间、减少药物用量等优点^[3]。该微乳为一种新型的注射剂剂型,在传统醇类为溶剂的基础上,经过新的制备工艺,其中 80% 以上的溶剂被水取代,其特点为物理稳定性好,提高了生物利用度,具有一定的靶向性,易于吸收,更加安全,毒性更低,刺激性更低,溶剂残留降低。

收稿日期:2013-01-31

基金项目:国家现代农业肉牛牦牛产业技术体系建设专项资金(编号: CARS-38);中央级科研院所基本科研业务费(编号: 1610322011005)。

作者简介:刘磊(1987—),男,山东人,硕士,研究方向为兽医药理学与毒理学。E-mail: marsll666@163.com。

通信作者:张继瑜,研究员,博士生导师,从事兽医药理学与毒理学的研究。E-mail: infzjy@sina.com。

状况有关。

3.3 肌肉肌苷酸含量与鸡体质量相关性分析

相关分析结果表明,良凤花鸡肌肉肌苷酸含量与 90 日龄鸡体质量呈负相关。鸡的体重越大,肌苷酸含量越低,说明肌肉肌苷酸含量与生长强度存在较强的相关性,这一显著相关性可为今后进行鸡种选育提供一定的理论依据,同时也为人们膳食中对鸡种及个体的选择提供一定的指导。

参考文献:

- [1]孙玉民,罗明.畜禽肉品学[M].济南:山东科学技术出版社,1993.
- [2]Suzuki A N, Homma A, Fukuda T Y, et al. Effect of high pressure treatment on the flavor-related components in meat[J]. Meat Science, 1994, 37(3): 369-379.
- [3]Fujimura S. Identification of taste-active components in the meat of the Japanese native chicken: Hinai-dori and Broils, and effect of feeding treatments on taste-active components[J]. Animals Food Science, 1998, 50(2): 99-158.
- [4]Davidek J, Khan A W. Estimation of inosinic acid in chicken muscle and its formation and degradation during post-mortem aging[J].

Journal of Food Science, 1967, 32: 155.

- [5]Khan A W, Davidek J, Lentz C P. Degradation of inosinic acid in chicken muscle during aseptic storage and its possible use as an index of quality[J]. Journal of Food Science, 1968, 33: 25.
- [6]刘望夷.肉用鸡肌肉中肌苷酸含量的比较[J].中国农业科学, 1980, 13(4): 79-83.
- [7]苏淑贞.鹌鹑、鸡、鸽子肌肉中肌苷酸含量的比较[J].家禽, 1987(2): 32-33.
- [8]苏淑贞.不同品种猪肉肌苷酸含量的测定[J].中国畜牧杂志, 1997, 33(4): 13-15.
- [9]李建凡,黄梅南.不同品种鸡胸肌中肌苷酸含量的比较[C]//中国农业科学院畜牧所.优质黄羽肉鸡品系选育和配套研究论文集.北京:中国农业科学技术出版社,1995: 287-290.
- [10]李石友,徐英,李琦华,等.品种与日粮营养水平对肌肉肌苷酸含量的影响[J].中国畜牧兽医, 2007, 34(10): 133-135.
- [11]苏一军,李慧芳,沈晓鹏,等.不同类型鸡肌肉肌苷酸含量分析和比较[J].中国家禽, 2002, 24(23): 9-10.
- [12]陈国宏,侯水生,吴信生,等.中国部分鸡种肌肉肌苷酸含量研究[J].畜牧兽医学报, 2000, 21(3): 287-290.
- [13]徐琪,王克华,谢恺舟,等.部分鸡品种胸肌肌苷酸含量的比较研究[J].河南畜牧兽医, 2003, 24(12): 7-8.

1 材料与方法

1.1 供试药品

伊维菌素注射液,规格:1 g/100 mL,中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所研制;荧光素钠,广西梧州制药(集团)股份有限公司生产。

1.2 供试动物

成年日本大耳白兔 4 只,雌雄各半,体重 2~2.2 kg,购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物场,许可证号:SCXK(甘)2012-0001。饲养环境:温度 20~26℃,相对湿度 40%~70%。自由采食饲料,自由饮水。试验前临床健康观察 7 d。

1.3 仪器

裂隙灯生物显微镜(Nikon FS-3 型,日本)。

1.4 试验方法

1.4.1 皮肤刺激性试验 试验前 24 h 对 4 只家兔背部两侧进行剪毛,脱毛,并对暴露出的皮肤进行清洗消毒处理。试验操作:将兔子背部两侧分为 4 个区,左侧为对照区;右侧为试验区,每侧有前后 2 个区,前面为破损皮肤试验区,后面为完整皮肤试验区,破损皮肤试验区用碘伏消毒并用注射器针头划“井”字破口,破损区面积 3 cm×3 cm,划痕间距 1 cm×1 cm,完整皮肤试验区面积 3 cm×3 cm。左侧每个对照区给以生理盐水 0.5 mL,右侧每个受试区给以伊维菌素微乳制剂 0.5 mL,直接涂布于暴露的皮肤上,加 2 层纱布(2.5 cm×2.5 cm)覆盖保护,再用无刺激性胶布加以固定。24 h 后擦除受试物,温水洗净,分别于去除受试物 10 min、20 min、1 h、2 h、24 h、48 h、72 h 观察涂敷部位有无红斑和水肿情况,以及上述变化的恢复时间和情况。结果评价:单次给药皮肤刺激性试验,计算每一观察时间点各组受试物以及对照皮肤反应积分的平均分值,按表 1、表 2 进行刺激强度评价。

表 1 皮肤刺激反应评分标准

刺激反应	分值
无红斑	0
轻度红斑(勉强可见)	1
中度红斑(明显可见)	2
重度红斑	3
紫红色红斑到轻度焦痂形成	4
无水肿	0
轻度水肿(勉强可见)	1
中度水肿(明显隆起)	2
重度水肿(皮肤隆起 1 mm,轮廓清楚)	3
严重水肿(皮肤隆起 1 mm 以上并有扩大)	4

表 2 皮肤刺激强度评价标准

分值	评价
0~0.49	无刺激性
0.5~2.99	轻度刺激性
3.0~5.99	中度刺激性
6.0~8.0	强刺激性

1.4.2 眼刺激试验

1.4.2.1 动物预选 肉眼观察:角膜无混浊,结膜无充血、水肿及分泌物,瞳孔圆形,两侧等大,对光反射良好。裂隙灯检

查:角膜透明,无云翳、斑翳,虹膜纹理清晰,无充血水肿。荧光素染色:10% 荧光素钠注射液,临用时用生理盐水稀释 5 倍,每兔眼滴 1 滴后用生理盐水冲洗干净,观察角膜未着色者为角膜正常。经上述预选出无眼疾而健康家兔 4 只用于本试验。

1.4.2.2 眼刺激试验 将兔子保定在保定盒中,左眼滴入生理盐水 2 滴,右眼滴入受试液 2 滴,受试药物液体均应滴在眼结膜囊内,闭合眼睑 10 s 以免药液流出。根据眼刺激评分标准(表 3)在给药后 30 min、60 min、90 min、120 min、6 h、12 h、24 h、72 h 和 7 d 用裂隙灯进行荧光素检查,观察眼刺激反应情况,记录虹膜、角膜和结膜的刺激反应得分。将虹膜、角膜和结膜的刺激反应分值相加后除以受试动物数,即为刺激反应最后得分,再根据表 4 进行刺激程度判断。试验中除观察虹膜、角膜和结膜的损伤程度外,其他损伤也要观察。

表 3 眼刺激试验评分标准

眼组织	眼刺激反应	分值
角膜	无浑浊	0
	散在或弥漫性浑浊,虹膜清晰可见	1
	半透明区易分辨,虹膜清晰可见	2
	出现灰白色半透明区,虹膜细节不清,瞳孔大小勉强可以看清	3
	角膜不透明,由于浑浊,虹膜无法辨认	4
虹膜	正常	0
	皱褶明显加深,充血,肿胀,角膜周围有轻度充血,瞳孔对光仍有反应	1
	出血,肉眼可见坏死,对光无反应(或出现其中一种反应)	2
结膜	1. 充血(指睑结膜,球结膜反应)	
	血管正常	0
	血管充血呈鲜红色	1
	血管充血呈深红色,血管不易分辨	2
	弥漫性充血呈紫红色	3
	2. 水肿	
	无水肿	0
	轻微水肿	1
	明显水肿,伴有部分眼睑外翻	2
	水肿至眼睑近半闭合	3
	水肿至眼睑超过半闭合	4
3. 分泌物	无分泌物	0
	少量分泌物	1
	分泌物使眼睑和睫毛潮湿或黏着	2
	分泌物使整个眼睑潮湿或黏着	3
总积分		16

表 4 眼刺激程度评价标准

刺激程度	积分
无刺激性	0~3.9
轻度刺激性	4~8.9
中度刺激性	9~12.9
强度刺激性	13~16

2 试验结果

皮肤刺激性试验结果见表 5。受试物破损皮肤试验区

24 h 后已无刺激性,完整试验区 30 min 后已无刺激性。对照组破损皮肤试验区在去除受试物 30 min 后对皮肤无刺激性,完整皮肤试验区对皮肤无刺激性。根据上述得分将伊维菌素微乳制剂的皮肤刺激反应程度判为无刺激。参照《化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》课题研究组^[4]评分标准,本试验结果显示,伊维菌素微乳制剂对家兔完整皮肤和破损皮肤无刺激,红斑在给药后 24 h 消失,伊维菌素微乳制剂作为外用药,对家兔皮肤无刺激性,故可以供临床使用。

表 5 伊维菌素微乳制剂家兔皮肤刺激反应得分

去除受试物后时间	受试物井字 线组刺激 反应分值	受试物完整 皮肤试验组 刺激反应分值	对照组井字 线组刺激 反应分值	对照组完整 皮肤试验组 刺激反应分值
10 min	0.75	0.25	0.25	0
30 min	0.75	0.25	0.25	0
1 h	0.25	0	0	0
2 h	0.25	0	0	0
24 h	0	0	0	0
48 h	0	0	0	0
72 h	0	0	0	0

眼刺激性试验结果见表 6。受试物主要对兔子结膜有轻微刺激,对角膜和虹膜无刺激性(表 6)。给以受试药物 30 min 后,4 只兔子右眼结膜囊出现充血,第三眼睑肿胀轻微充血,无肿胀,给药后 4 只兔子的右眼都能完全睁开,给药 24 h 后兔子眼睛充血现象消失。试验结果表明,伊维菌素微乳制剂对家兔结膜、角膜和虹膜均无明显影响,双眼角膜透明,无混浊,虹膜纹理清晰,结膜无充血,无水肿、无分泌物。根据对眼刺激反应的评分得出伊维菌素微乳制剂对家兔眼的刺激性是无刺激性,故伊维菌素微乳注射液临床应用是安全的。在试验进行期间,该药不影响动物的饮食、正常活动和体重增长。

表 6 伊维菌素制剂眼刺激反应得分

给药后时间	生理盐水组 眼刺激试验得分	受试物组 眼刺激试验得分
30 min	0	2
60 min	0	2
90 min	0	1
120 min	0	1
6 h	0	1
24 h	0	0
72 h	0	0
7 d	0	0

3 讨论

本试验以《化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》为指导,结果测得伊维菌素微乳制剂对家兔的皮肤和眼睛均无刺激性,可为伊维菌素微乳制剂的安全性评价提供试验依据。

药物的活性成分及其代谢物、辅料、有关物质及理化性质

(如 pH 值、渗透压等)均有可能引起受试动物整体或部分刺激性反应的发生。因此,本研究对伊维菌素微乳制剂进行了家兔皮肤刺激性试验,观察药物在给药部位使用后引起的局部毒性,以提示临床应用时可能出现的毒性反应并为临床解毒或解救措施提供参考,保障临床用药的安全、有效。

眼用药物及可能接触到眼的化学物质均应考虑进行眼刺激性试验,本试验也通过眼刺激试验观察药物对黏膜的刺激性。目前常用的 Draize 眼刺激性试验是 Draize 等在 Friedenwald 等工作的基础上建立起来的^[5-6]。Draize 眼刺激性试验通过对角膜、虹膜、结膜的刺激程度进行评分,在评分过程中有很大的主观性,对刺激性较大的药物可充分检出,但对只有很轻刺激性的药物用该法评价不是很准确。为此,已开始研究眼刺激性试验的替代方法,如离体器官试验^[7-9]、鸡胚尿囊膜血管试验^[10-11]、细胞毒性试验^[12]、EYTEX 试验系统^[13]、MATREXTM 工具箱^[14]等。

参考文献:

[1] 马永铸,魏春妹. 阿维菌素同系物和衍生物[J]. 上海农业学报, 2000,16(增刊):64-68.

[2] 吴中兴,钱益新. 伊维菌素的药效、药理和临床研究[J]. 热带病与寄生虫学,2003,1(3):184-187.

[3] 陈小军,孙忠良,杨惠麟. 伊维菌素制剂在动物医学中的研究进展[J]. 湖南畜牧兽医,2005(1):1-3,11.

[4] 中华人民共和国卫生部药政局. 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[M]. 2005:208-209.

[5] Burton A B G, York M, Lawrence R S. The *in vitro* assessment of severe eye irritants[J]. Food Cosmetics Toxicol, 1981, 19: 471-481.

[6] Muir C K. A simple method to assess surfactant-induced bovine corneal opacity *in vitro*: preliminary findings[J]. Toxicol Lett, 1984, 22: 199-203.

[7] Muir C K. Opacity of bovine cornea *in vitro* induced by surfactants and industrial chemicals compared with ocular irritancy *in vitro*[J]. Toxicol Lett, 1985, 24: 157-162.

[8] Lupke N P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential[J]. Food Chemical Toxicol, 1985, 23: 287-291.

[9] Hagino S, Kinoshita S, Tani N, et al. Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients Chorioallantoic Membrane (CAM) Test[J]. Toxicol in vitro, 1999, 13: 99-113.

[10] Okumura H, Arashima M, Ohuchi J, et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (10) Evaluation of cytotoxicity tests on CHL cells[J]. Toxicol in vitro, 1999, 13: 199-208.

[11] Gordon V C, Bergman H C. EYTEX™: an *in vitro* method for evaluation of ocular irritancy[M]//Goldberg A M. *In vitro* toxicology: approaches to valuation. New York: Mary Ann Liebert, 1987: 293-302.

[12] Ohuchi J, Kasai Y, Sakamoto K, et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (6) Evaluation of MATREXTM[J]. Toxicol in vitro, 1999, 13(1): 153-162.