

程培培, 杨亚军, 刘希望, 等. 新型复方氟苯尼考注射液的安全性评价[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 174-176.

新型复方氟苯尼考注射液的安全性评价

程培培^{1,2}, 杨亚军¹, 刘希望¹, 李剑勇^{1,2}

(1. 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/甘肃省新药工程重点实验室, 甘肃兰州 730050;

2. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州 730070)

摘要:按照 2010 版《中国兽药典》和《兽药及添加剂安全性毒理学评价程序》的要求, 对新型复方氟苯尼考注射液进行安全性评价, 相应进行了热原检查、注射途径 LD₅₀测定、皮肤刺激试验和肌肉刺激试验等。结果表明: 新型复方氟苯尼考注射液制剂热原检查符合药典规定; 腹腔注射对小鼠的 LD₅₀ 为 1 888.73 mg/kg, 95% 可信限为 1 575.90 ~ 2 263.65 mg/kg; 该注射液对皮肤有轻度刺激性; 对股四头肌有轻微刺激, 但在给药后 7 d 可以完全恢复。说明新型复方氟苯尼考注射液安全可靠, 可应用于兽医临床。

关键词:新型复方氟苯尼考注射液; 热原检查; LD₅₀; 皮肤刺激; 肌肉刺激; 安全性评价

中图分类号: S859.79+6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0174-03

猪、牛呼吸系统感染性疾病的发病率高, 病原微生物多种多样, 血清型复杂, 疫苗的交叉保护力较差, 在这类疾病治疗过程中, 药物防治发挥着巨大的作用^[1-3]。

新型复方氟苯尼考注射液是由抗菌药物氟苯尼考和抗炎药物氟尼辛葡甲胺以及辅料等成分组成, 用于皮下注射和肌肉注射。氟苯尼考是动物专用的广谱抗生素, 克服了氯霉素引起骨髓抑制和再生障碍性贫血的缺点, 且抗菌活性优于同类的氯霉素、甲砒霉素等, 广泛应用于畜禽和水产细菌性疾病^[4], 如由多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*)、溶血性巴氏杆菌 (*Pasteurella hemolytica*)、昏睡嗜血杆菌 (*Haemophilus somnus*) 等引起的牛呼吸系统疾病、由猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*)、多杀性巴氏杆菌、胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、支气管败血波氏杆菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 等引起的猪呼吸系统疾病、禽大肠杆菌病和霍乱等防控。氟尼辛葡甲胺是一种非选择性的非甾体抗炎药^[5], 通过抑制花生四烯酸环氧合酶途径, 阻止前列腺素的合成, 起到抗炎、镇

痛、退热的作用, 该药已被《英国兽药典》2001 版、《美国药典》2002 版^[6]和《中国兽药典》2010 版收录, 被批准用于肉牛、奶牛、马的内毒素血症引起的炎症, 控制呼吸系统疾病伴随的发热症状和急性牛乳房炎^[7]。已有的相关研究表明, 氟尼辛葡甲胺和抗菌药物联用治疗牛、猪呼吸系统疾病效果良好^[8-9]。

依据抗菌、抗炎的原则和长效、缓释的目的, 研制出新型复方氟苯尼考注射液, 用于治疗猪、牛呼吸系统原发或继发细菌和支原体感染, 具有很好的抗菌和抗炎作用。为了将复方氟苯尼考注射液制剂合理、安全的应用于临床并提供理论依据, 依据 2010 版《中国兽药典(一部)》对注射剂要求^[10]和《兽药及添加剂安全性毒理学评价程序》^[11]对该注射液进行了安全性评价, 包括热原检查、注射途径 LD₅₀测定、皮肤刺激试验和肌肉刺激试验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品 新型复方氟苯尼考注射液(批号: F20120730, 氟苯尼考含量为 30%, 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所); 空白溶剂(批号: 20120913, 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所); 0.9% 氯化钠注射液(批号: 1210032B, 安徽双鹤药业有限责任公司)。

1.1.2 试验动物 日本大耳白兔, 雌雄各半, 体重 2.0 ~ 3.0 kg, 购自中国农业科学院兰州兽医研究所, 许可证号: SCXK(甘)2012-0001; 昆明小鼠, 雌雄各半, 体重 18 ~ 22 g, 购自兰州大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(甘)2009-0004。

51-53.

[7] Greene D M, Bondy G S, Azcona - Olivera J I, et al. Role of gender and strain in vomitoxin - induced dysregulation of IgA production and IgA nephropathy in the mouse[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, 1994, 43(1): 37-50.

[8] Yi H, Nakashima I, Isobe K. Enhancement of nitric oxide production from activated macrophages by glycyrrhizin[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 1996, 24(3/4): 271-278.

收稿日期: 2013-05-09

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(编号: 1610322012005); 国家公益性行业(农业)科研专项(编号: 201303038-4)。

作者简介: 程培培(1987—), 女, 河南洛阳人, 硕士, 主要从事药物筛选研究。E-mail: chengpeipei117@163.com。

通信作者: 李剑勇(1971—), 男, 甘肃秦安人, 博士, 研究员, 主要从事新兽药的研究与开发工作。Tel: (0931) 2115290; E-mail: lijy1971@163.com。

[3] 李铁民, 梁再赋. 甘草提取物及其衍生物的抗病毒研究现状[J]. 中草药, 1994, 25(12): 655-658.

[4] 张炯文, 李凤贤, 李辉. 三七皂苷抗肝纤维化作用的现状[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(4): 260-263.

[5] 张中伟, 谢明勇, 王远兴, 等. 比色法测定苦瓜总皂苷[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2005, 29(5): 447-449, 453.

[6] 曹丙蕾. 山羊 IL-18 定量抗原捕获 ELISA 检测方法的建立及其免疫增强作用的研究[D]. 青岛: 山东农业大学, 2010:

1.2 方法

1.2.1 热原试验 依照 2010 版《中国兽药典》规定的热原检查方法^[10],经 8 次预测体温选取适合于热原检查法的健康家兔 3 只,且正常体温为 38.0~39.6℃。在试验前停食 1 h,然后每隔 30 min 测量 1 次体温,测 2 次,2 次体温差不得超过 0.2℃,以此 2 次体温的平均值为正常体温;在测正常体温后 15 min 以内,将温热至 38℃的新型复方氟苯尼考注射液,自耳缘静脉按推荐剂量 1 mL/7.5 kg 注射给药,然后每隔 30 min 测量 1 次体温,共测 6 次。以 6 次体温中,最高的一次减去正常体温,即为该兔体温的升高温度(℃),计算 3 只家兔体温升高总和,并按照兽药典的热原检查判定标准,判定供试品是否符合热原检查规定。

1.2.2 LD₅₀测定 按照改良寇氏法^[12]设计试验。预试验:每组 4 只昆明小鼠,雌雄各半,测得新型复方氟苯尼考注射液的绝对致死量(LD₁₀₀)和最大耐受量(LD₀)。正式试验:分 5 组,每组 10 只小鼠,雌雄各半,腹腔注射,给药后观察 7 d,记录小鼠死亡数量,并观察注射药物后小鼠的症状和死亡小鼠的病理变化。用改良寇氏法计算 LD₅₀及其 95%可信限。

1.2.3 皮肤刺激试验^[13] 取健康家兔 4 只,雌雄各半,采用同体左右对比法,设溶剂对照。试验前 24 h 对背部进行剪毛处理,剪毛范围左右各 3 cm×3 cm,左侧涂抹药物,右侧涂抹空白溶剂,均为 0.5 mL;然后用 2 层纱布(2.5 cm×2.5 cm)和 1 层玻璃纸覆盖,再用无刺激性胶布加以固定;贴敷 4 h 时,用温热至 38℃的温水清洁给药部位,在去除药物后 0.5、1.0、24.0、48.0、72.0 h,分别肉眼观察并记录涂敷部位有无红斑和水肿情况,按照皮肤刺激反应评分标准(表 1)进行评分,总分值为 8 分,然后再按皮肤刺激强度评价标准(表 2)进行评价。

表 1 皮肤刺激反应与评分标准

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

表 4 新型复方氟苯尼考注射液热原检查结果

编号	正常体温(℃)	给药后体温(℃)						体温升高值(℃)	体温升高总值(℃)
		0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h		
1	39.5	39.8	39.4	39.4	39.4	39.4	39.5	0.3	1.0
2	39.2	39.6	39.4	39.1	39.0	39.4	39.3	0.4	
3	39.5	39.6	39.7	39.7	39.5	39.8	39.6	0.3	

表 5 新型复方氟苯尼考注射液 LD₅₀测定结果

组别	剂量(mg/kg)	剂量对数值	试验小鼠(只)	死亡(只)	死亡率(%)	存活率(%)	$p \times q$
1	4 297.5	3.633 2	10	9	90	10	0.09
2	3 142.0	3.497 2	10	8	80	20	0.16
3	2 297.1	3.361 2	10	7	70	30	0.21
4	1 679.5	3.225 2	10	5	50	50	0.25
5	1 227.9	3.089 1	10	2	20	80	0.16

表 2 皮肤刺激强度评价标准

分值	评价
0~0.49	无刺激
0.50~2.99	轻度刺激
3.00~5.99	中度刺激
6.00~8.00	强度刺激

1.2.4 肌肉刺激试验^[14] 取体重 2.0 kg 以上家兔 15 只,采用自身对照,注射部位经乙醇消毒,左侧股四头肌按推荐剂量 1 mL/7.5 kg 注射新型复方氟苯尼考注射液,右侧注射等体积的 0.9%氯化钠注射液。给药后正常饲养,在给药后 2、4、7、14、21 d,每次取 3 只家兔,耳缘静脉注射空气处死,剖检股四头,纵向切开,观察注射部位肌肉有无刺激性变化(充血、水肿、硬结、变性或坏死)。按照注射剂(皮肤、肌肉)刺激反应评分标准^[15](表 3)评分,并对肌肉刺激进行判断。

表 3 注射剂(皮肤、肌肉)刺激反应评分标准

反应级数	刺激反应
0	无明显反应
1	给药部位肌肉组织轻度充血,范围在 0.5 cm×1.0 cm 以下
2	给药部位肌肉组织中度充血,范围在 0.5 cm×1.0 cm 以上
3	给药部位肌肉组织重充血,伴有肌肉变性
4	出现坏死或褐色变性,直径在 0.5 cm 以下
5	出现广泛性坏死

2 结果与分析

2.1 热原检查

由表 4 可见,经注射新型复方氟苯尼考注射液的每只家兔体温升高均低于 0.6℃,3 只家兔体温升高总和<1.3℃,这表明新型复方氟苯尼考注射液热原检查符合规定。

2.2 LD₅₀测定

经预试验测得新型复方氟苯尼考注射液对昆明小鼠的绝对致死量(LD₁₀₀)和最大耐受量(LD₀)分别为 4 297.5、1 227.9 mg/kg,相邻 2 组剂量的比值 $r=1.367\ 8$,正式试验时每组的给药剂量以及观察 7 d 后各组的死亡率见表 5。

采用改良寇氏法^[12]计算新型复方氟苯尼考注射液对小鼠注射给药的 LD₅₀,结果为 1 888.73 mg/kg,LD₅₀ 95%可信限为 1 575.90~22 63.65 mg/kg,按照外源化学物急性毒性分级标准^[12]判定新型复方氟苯尼考注射液为低毒。

在给药后 1~2 d,小鼠的采食量明显下降,然后逐渐恢复;给药后,高剂量组小鼠俯卧不动,低剂量组小鼠无明显变化;小鼠死亡时间集中在给药后 2~3 d;在给药后 1~2 d 死亡的小鼠腹腔中可见白色的药物沉淀,十二指肠壁变薄;3 d

及以后死亡的小鼠,药物已被吸收,小肠壁变薄,部分有出血,肝淤血,颜色加深,肺部分有出血点或颜色加深(暗红色)。

2.3 皮肤刺激试验

按照皮肤刺激反应评分标准,对新型复方氟苯尼考注射液皮肤刺激的各时间点进行评分,该制剂所有时间点反应积分的平均值为 0.55,溶剂对照为 0.25,这表明新型复方氟苯尼考注射液对皮肤有轻度刺激性。

2.4 肌肉刺激试验

由表 6 可见,新型复方氟苯尼考注射液注射后 2、4 d 对肌肉均有轻微刺激,有部分出现轻微充血现象,按照肌肉刺激试验评分标准进行评分,其平均反应分值均在 2 以下,认为新型复方氟苯尼考注射液符合规定;在给药后 7、14、21 d,所有试验家兔给药部位均无明显反应,即在给药后 7 d,新型复方氟苯尼考注射液对股四头肌的刺激性已完全恢复,可逆性良好。

表 6 新型复方氟苯尼考注射液的肌肉刺激试验给药部位评分

给药后剖检时间 (d)	各家兔给药部位评分			评分平均值
	1	2	3	
2	1	1	2	1.33
4	0	1	1	0.67
7	0	0	0	0
14	0	0	0	0
21	0	0	0	0

3 小结

新型复方氟苯尼考注射液是根据猪、牛呼吸系统疾病的临床症状和病原,依据“标本兼治”原则开发具有抗菌、消炎、解热、镇痛作用的新型药物制剂,该药剂高效、速效、低毒等特性,比单独使用氟苯尼考注射液对犊牛肺炎和猪呼吸系统疾病有更加良好的治疗效果。本试验对新型复方氟苯尼考注射液进行安全性评价,为该制剂能够更加安全、合理的应用于临床提供理论依据。

有研究显示,氟苯尼考纳米乳对小鼠的 LD_{50} 为 1 949.80 mg/kg,低毒^[16];腹腔注射氟苯尼考悬浮乳剂对小鼠的 LD_{50} 为 3 346.57 mg/kg,95% 可信限范围为 2 855.01 ~ 3 922.76 mg/kg,根据化学物急性毒性 LD_{50} 剂量分级表属于低毒性药物^[17];氟苯尼考混悬型微乳剂对小鼠的 LD_{50} 为 3 658.80 mg/kg, LD_{50} 95% 可信限为 2 075.80 ~ 5 241.80 mg/kg,低毒^[18]。国外曾报道氟苯尼考对南美白对虾幼体、蓝鳃太阳鱼和虹鳟的急性毒性试验^[19],根据毒性分级标准,氟苯尼考属于低毒级。经试验测得新型复方氟苯尼考注射液对小鼠的 LD_{50} 为 1 888.73 mg/kg,约为临床推荐剂量(163 mg/kg)的 12 倍,按照外源化学物急性毒性分级标准判定该制剂为低毒,与已有的研究结果一致,在临床使用时,为了确保家畜的安全,仍应严格按照剂量给药。

新型复方氟苯尼考注射液热原检查符合 2010 版《中国兽药典》的要求,该制剂皮肤刺激试验和肌肉刺激试验结果显示,新型复方氟苯尼考注射液对皮肤和肌肉有轻度刺激,肌肉刺激在给药后 7 d 可以完全恢复。

综上所述,新型复方氟苯尼考注射液毒性低、刺激性小,可安全用于临床,这为新药的研究开发奠定了基础,也为其临

床应用提供理论依据和参考价值。

参考文献:

- [1] Grau-Roma L, Segal's J. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 119 (2/3/4): 144 - 151.
- [2] Yazawa S, Okada M, Ono M, et al. Experimental dual infection of pigs with an H1N1 swine influenza virus (a/sw/hok/2/81) and *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. Veterinary Microbiology, 2004, 98 (3/4): 221 - 228.
- [3] Fodor L, Hodge A, Varga J, et al. Efficacy evaluations of the use of oral tilimicosin in pneumonic calves [J]. The Veterinary Journal, 2000, 159 (2): 194 - 200.
- [4] 陈杖榴. 兽医药理学 [M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2009: 218 - 220.
- [5] Radi Z A, Khan N K. Effects of cyclooxygenase inhibition on the gastrointestinal tract [J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2006, 58 (2/3): 163 - 173.
- [6] Yu Z G, Jiang C M, Guo Y G, et al. Pharmacokinetics of flunixin meglumine after intravenous and intramuscular administration in pigs [J]. Agricultural Sciences in China, 2007, 6 (11): 1396 - 1401.
- [7] Kissell L W, Smith G W, Leavens T L, et al. Plasma pharmacokinetics and milk residues of flunixin and 5 - hydroxy flunixin following different routes of administration in dairy cattle [J]. American Dairy Science, 2012, 95 (12): 7151 - 7157.
- [8] Balmer T V, Williams P, Selman I E. Comparison of carprofen flunixin meglumine as adjunctive therapy in bovine respiratory disease [J]. The Veterinary Journal, 1997, 154 (3): 233 - 241.
- [9] 李世江, 张克云, 张彬, 等. 氟尼辛葡甲胺注射液与氟苯尼考注射液联用对人工感染猪巴氏杆菌的治疗试验 [J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34 (8): 120 - 122.
- [10] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典: 一部 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [11] 中国兽医药品监察所. 兽用化学药品药理、毒理、临床部分实验研究技术指导原则 [M]. 武汉: 湖北兽药监察所, 2006: 16 - 17.
- [12] 沈建忠. 动物毒理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 84 - 99.
- [13] 袁伯俊, 廖明阳, 李波. 药物毒理学试验方法与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 236 - 238.
- [14] 《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. [H] GPT4 - 1 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则 [S]. 北京: 中国食品药品监督管理局, 2005: 16 - 17.
- [15] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 157.
- [16] 刘安刚. 氟苯尼考纳米乳的研制及对奶牛乳房炎的治疗试验 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- [17] 魏海涛, 焦晓军, 黄贤贤, 等. 氟苯尼考悬浮乳剂对小鼠的急性毒性试验 [J]. 广东农业科学, 2009 (8): 181 - 182.
- [18] 杨昆, 杨亚, 刘晗, 等. 氟苯尼考混悬型微乳剂的急性毒性试验 [J]. 中国兽药杂志, 2012, 46 (5): 14 - 16.
- [19] Williams R R, Bell T A, Lightner D V. Shrimp antimicrobial testing. II. Toxicity testing and safety determination for twelve antimicrobials with penaeid shrimp larvae [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1992, 4 (4): 262 - 270.