

复方鹿角霜的急性毒性研究^Δ

罗尚文^{1*},王燕燕^{1,2#},张学农^{1,2},韩师师^{1,2}(1.三峡大学第一临床医学院/宜昌市中心人民医院药学部,湖北宜昌443003;2.三峡大学中药新制剂研究所,湖北宜昌443003)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)14-1904-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.14.08

摘要 目的:研究复方鹿角霜的急性毒性。方法:将40只SPF级昆明小鼠分为空白对照组(等体积羧甲基纤维素钠)和复方鹿角霜低、中、高剂量组(浸膏混悬液6、14、34 g/kg,分别相当于成人临床推荐日剂量的192、448、1 088倍),每组10只,雌雄兼半,均灌胃给药1次。给药前和给药后14 d内,观察小鼠存活情况及其急性毒性反应;给药前、给药时和给药后2、3、7、14 d测定小鼠体质量;给药后14 d解剖小鼠,检查小鼠体表、给药局部和天然孔道,颅腔和脑的外表面,胸腔、腹腔和盆腔以及腔内脏器,记录病变情况。结果:各组小鼠均全部存活。空白对照组和复方鹿角霜低剂量组小鼠未见异常;复方鹿角霜中剂量组雄性小鼠未见明显异常,4只雌性小鼠于给药后20~23 min开始出现眼睛闭合症状,给药后27 min开始逐渐恢复,给药后29 min全部恢复正常;复方鹿角霜高剂量组小鼠于给药后8~29 min开始出现眼睛闭合、活动减少、弓背、竖毛等症状,给药后1 h开始逐渐恢复,给药后6 h全部恢复正常。与空白对照组比较,复方鹿角霜低、中、高剂量组小鼠体质量差异无统计学意义($P>0.05$)。各组小鼠体表、给药局部和天然孔道,颅腔和脑的外表面,胸腔、腹腔和盆腔以及腔内脏器[包括肾上腺(双侧)、脑(大脑、小脑和脑干)、食道、心、肾(双侧)、大肠(盲肠、结肠和直肠)、小肠、肝、肺、胰腺、脾、胸腺、胃、膀胱等]均未见明显病变。结论:在复方鹿角霜灌胃给药34 g/kg剂量下,小鼠产生急性毒性反应;14 g/kg剂量下,部分雌性小鼠产生轻度急性毒性反应;6 g/kg剂量下,未见明显急性毒性反应。

关键词 复方鹿角霜;小鼠;急性毒性

Study on Acute Toxicity Test of Compound Lujiao Cream

LUO Shangwen¹, WANG Yanyan^{1,2}, ZHANG Xuenong^{1,2}, HAN Shishi^{1,2} (1. Dept. of Pharmacy, Yichang Central People's Hospital/The First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, China Three Gorges University, Hubei Yichang 443003, China; 2. Institute of New TGM Preparation Research, Three Gorges University, Hubei Yichang 443003, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the acute toxicity of Compound lujiao cream. **METHODS:** A total of 40 SPF Kunming mice were divided into blank control group (constant volume of sodium carboxymethylcellulose), Compound lujiao cream low-dose, medium-dose and high-dose groups (extract suspension, 6, 14, 34 g/kg, as 192, 448, 1 088 folds of recommended human clinical daily dose, respectively), with 10 mice in each group, male and female in half. They were given medicine intragastrically once. Before medication and within 14 d after medication, the survival, toxic reaction were observed. Body weights of mice were measured before medication, during medication and 2, 3, 7, 14 d after medication. The mice was scarified 14 d after medication. The pathological changes of body surface, administration site and natural channels, the external surface of the cranial cavity and brain, thoracic cavity, abdominal cavity, pelvic cavity and visceral organs were also observed. **RESULTS:** All mice survived. No abnormality was found in blank control group and Compound lujiao cream low-dose group. In Compound lujiao cream medium-dose group, no significant abnormality was found in male mice; 4 female mice suffered eye closure 20-23 min after medication, and then began to recover 27 min after medication and returned to normal 29 min after medication. In Compound lujiao cream high-dose group, mice suffered from eye closure, activity reduction, arched back and hair shaft 8-29 min after medication, but recovered 1 h after medication. Compared with blank control group, there was no significant difference in body weight of mice in Compound lujiao cream low-dose, medium-dose and high-dose groups ($P>0.05$). There was no significant lesion in body surface, administration site and natural channels, the external surface of the cranial cavity and brain, thoracic cavity, abdominal cavity, pelvic cavity and visceral organs [adrenaline (bilateral), brain (brain, cerebellum, brain stem), esophagus, heart, kidney (bilateral), large intestine (cecum, colon and rectum), small intestine, liver, lung, pancreas, spleen, thymus, stomach, bladder]. **CONCLUSIONS:** After using Compound lujiao cream of

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30970297);国家科技重大专项课题(No.2011ZX09102-006-05);湖北省中医药中西医结合科研项目(No.鄂卫生计生通[2017]20号)

* 硕士研究生。研究方向:中药药理学。E-mail:1056345899@qq.com

通信作者:主任药师,教授,博士生导师。研究方向:中药制剂、医院药学。E-mail:wangyy1001@163.com

the intragastric dose of 34 g/kg, the mice suffer from acute toxicity reaction; by the dose of 14 g/kg, some female mice suffer from mild acute toxic reaction; by the dose of 6 g/kg, no obvious acute toxicity reaction was found.

KEYWORDS Compound lujiao cream; Mouse; Acute toxicity

复方鹿角霜由鹿角霜、鹿衔草、忍冬藤、露蜂房、桑枝、桂枝等6味中药组合而成,经中医长期使用证明其具有抗炎消肿、疏利关节、强筋健骨等功效。目前该方已被宜昌市中心人民医院引进,用于治疗类风湿性关节炎等疾病。由于该方原有剂型为煎剂,而其煎煮过程烦琐复杂,携带及服用均不便。本课题组前期运用现代中药制剂理论^[1-2],将该煎剂转化为片剂,并完成该制剂的提取工艺研究,制定了相关质量标准^[3]。本实验通过对小鼠单次灌胃给予复方鹿角霜,观察其出现的急性毒性反应,旨在为其安全性评价提供依据。

1 材料

1.1 仪器

FA2204C型电子分析天平(上海佑科仪器仪表有限公司);U-3000型高效液相色谱仪(美国Dionex公司);4℃/-20℃低温冰箱(青岛海尔股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

复方鹿角霜浸膏(宜昌市中心人民医院制剂室自制,批号:130613,每1g浸膏相当于8g生药,马钱苷含量:4.63 mg/g);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂有限公司,批号:F20110523);实验所用试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 动物

SPF级昆明小鼠40只,雌雄兼半,27~28日龄,体重18.5~21.9g,由湖北省实验动物研究中心提供,生产许可证号:SCXK(鄂)2008-0008,动物合格证号:42000600001319。实验动物设施使用许可证号:SYXK(鄂)2012-0065。动物饲养于屏障系统[独立通气笼具(IVC)]中,每笼5只;配有压差及温湿度监控和自动控制系统。动物饲料中营养成分及环境污染物由供应商定期常规检测,不含有可能干扰实验结果及动物健康的已知污染物;动物饮用水均经高温高压消毒。除给药和解剖检查前禁食外,其余时间动物自由采食。

2 方法

2.1 复方鹿角霜混悬液的制备

准确称取CMC-Na 0.15g,加适量水使充分溶胀并混匀成糊状,逐渐加入水搅拌均匀并定容至300 mL,制成0.5% CMC-Na溶液作溶剂,2~8℃保存,8d内使用。准确称取复方鹿角霜浸膏样品适量,加上述溶剂制成质量浓度分别为0.15、0.35、0.85 g/mL的混悬液,给药当天制备,制备后6h内完成给药。

2.2 复方鹿角霜混悬液分析

复方鹿角霜混悬液含量测定以马钱苷^[3-5]为指标,其均一性、质量浓度结果也均以马钱苷为指标进行考察。

2.2.1 均一性 复方鹿角霜混悬液从上、中、下3层分别取样,平行取样2次,每份10 mL(一份用于分析,另一份用作备份),取样之前轻轻搅拌该混悬液30 min,取样过程中也进行适当搅拌。均一性标准:上、中、下3层的马钱苷质量浓度在理论浓度的85%~115%之间,且RSD

小于10%。

2.2.2 质量浓度 以“2.2.1”项下上、中、下3层测定结果的均值作为复方鹿角霜混悬液的质量浓度。质量浓度标准:马钱苷质量浓度在理论浓度的85%~115%之间。

2.3 分组与给药

将40只SPF级昆明小鼠分为空白对照组(等体积CMC-Na)和复方鹿角霜低、中、高剂量组(6、14、34 g/kg,分别相当于成人临床推荐日剂量的192、448、1 088倍^[6]),每组10只,雌雄兼半。各组小鼠均灌胃给药1次。

2.4 急性毒性反应观察

给药前和给药后14 d内,观察各组小鼠存活情况及其急性毒性反应发生情况(如眼睛闭合、活动减少、弓背、竖毛等症状)。

2.5 体质量测定

给药前、给药时和给药后2、3、7、14 d测定各组小鼠体质量。

2.6 解剖检查

观察期结束后,对小鼠进行解剖检查,解剖检查前小鼠禁食过夜。存活小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(60 mg/kg)麻醉,放血后立即解剖检查。如有非计划死亡的小鼠需尽快解剖检查;死亡尸体若不能及时解剖检查,需放置冰箱中冷藏保存以减少脏器自溶。解剖时检查内容包括:可见动物体表、给药局部和天然孔道;颅腔和脑的外表面;胸腔、腹腔和盆腔以及腔内脏器,包括肾上腺(双侧)、脑(大脑、小脑和脑干)、食道、心、肾(双侧)、大肠(盲肠、结肠和直肠)、小肠、肝、肺、胰腺、脾、胸腺、胃、膀胱等,并记录所有检查过程中发现的肉眼病变。

2.7 统计学方法

采用SPSS 18.0软件进行数据统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布数据采用单因素分析,两组间数据比较采用LSD检验;多组间数据比较采用方差齐性Levene检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 复方鹿角霜混悬液分析结果

复方鹿角霜混悬液上、中、下3层的马钱苷质量浓度在理论浓度的92.9%~100.7%之间,且上、中、下3层复方鹿角霜混悬液质量浓度的RSD小于3.18%,符合标准。复方鹿角霜混悬液分析结果见表1。

3.2 急性毒性反应观察结果

各组小鼠均全部存活。空白对照组和复方鹿角霜低剂量组小鼠未见异常;复方鹿角霜中剂量组雄性小鼠未见明显异常,4只雌性小鼠于给药后20~23 min开始出现眼睛闭合症状,给药后27 min开始逐渐恢复,给药后29 min全部恢复正常;复方鹿角霜高剂量组小鼠于给药后8~29 min开始出现眼睛闭合、活动减少、弓背、竖毛等症状,给药后1 h开始逐渐恢复,给药后6 h全部恢复正常。

表1 复方鹿角霜混悬液分析结果(n=1)

Tab 1 Analysis results of Compound lujiao cream suspension(n=1)

混悬液质量浓度, g/mL	质量浓度理论值, mg/mL	取样部位	马钱苷浓度				RSD, %
			质量浓度实测值, mg/mL	质量浓度实测值与理论值之比, %	质量浓度实测平均值, mg/mL	质量浓度实测平均值与理论值之比, %	
0.85	3.936	上层	3.927	99.8	3.871	98.3	2.70
		中层	3.935	100.0			
		下层	3.752	95.3			
0.35	1.620	上层	1.522	94.0	1.542	95.2	3.18
		中层	1.505	92.9			
		下层	1.597	98.6			
0.15	0.694	上层	0.695	100.1	0.696	100.3	0.04
		中层	0.699	100.7			
		下层	0.695	100.1			

表2 各组小鼠体质量比较($\bar{x} \pm s, n=5, g$)

Tab 2 Comparison of body weight of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=5, g$)

时期	雄性小鼠				雌性小鼠			
	空白对照组	复方鹿角霜低剂量组	复方鹿角霜中剂量组	复方鹿角霜高剂量组	空白对照组	复方鹿角霜低剂量组	复方鹿角霜中剂量组	复方鹿角霜高剂量组
给药前	20.1±0.9	20.5±0.8	20.6±1.0	20.5±1.1	20.7±1.0	20.6±0.8	20.7±1.1	21.1±1.1
给药时	18.6±0.8	19.6±1.3	19.9±1.3	20.0±1.1	19.3±0.8	18.9±0.9	19.9±1.2	19.9±0.7
给药后2 d	22.9±1.3	22.3±1.7	22.8±2.4	21.8±1.3	22.7±1.4	22.7±1.4	22.8±1.3	22.6±0.4
给药后3 d	24.8±2.0	23.4±0.9	25.1±3.4	23.9±1.3	24.4±2.0	24.3±1.4	24.4±1.6	24.7±0.4
给药后7 d	30.6±2.9	29.0±1.5	31.8±3.2	29.7±2.5	27.3±3.0	28.5±1.3	28.3±1.9	30.1±1.5
给药后14 d	35.3±3.9	34.7±3.1	36.8±3.0	35.4±3.5	29.9±3.1	32.4±2.5	31.4±2.7	32.0±2.2

异常。因未见有病变的组织/脏器,本实验未采集组织作组织病理学检查。但相关实验研究结果指出,复方鹿角霜的毒性可能与神经肌肉反射相关^[7],故应在后续的长期毒性实验中重点关注此方面,以发现其可能的毒性靶器官。

本实验结果表明,单次给予34 g/kg剂量的复方鹿角霜,小鼠出现急性毒性反应,主要表现为眼睛闭合、活动减少、弓背、竖毛等症状,给药后6 h全部恢复正常;单次给予14 g/kg剂量的复方鹿角霜,部分雌性小鼠出现轻微急性毒性反应,主要表现为眼睛闭合症状,给药后29 min全部恢复正常;单次给予6 g/kg剂量的复方鹿角霜,小鼠未出现明显毒性反应。这表明,复方鹿角霜对小鼠单次灌胃给药,最大耐受量高于34 g/kg,最大无毒性反应剂量不低于6 g/kg。

参考文献

[1] 任瑾,杜倩,艾凤伟,等. 药物新剂型与新技术在中药制剂中的应用开发[J]. 中成药, 2015, 37(2):392-396.
 [2] 柯仲成,侯雪峰,贾晓斌. 基于有效成分群探讨精致型现代中药制剂原料的发展思路[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13):2566-2570.
 [3] 张雨薇,王燕燕,王亚芬,等. 复方鹿角霜片的质量控制

3.3 体质量测定结果

与空白对照组比较,复方鹿角霜低、中、高剂量组小鼠各时段体质量差异均无统计学意义(P>0.05),详见表2。

3.4 解剖检查结果

各组小鼠体表、给药局部和天然孔道,颅腔和脑的外表面,胸腔、腹腔和盆腔以及腔内脏器[包含肾上腺(双侧)、脑(大脑、小脑和脑干)、食道、心、肾(双侧)、大肠(盲肠、结肠和直肠)、小肠、肝、肺、胰腺、脾、胸腺、胃、膀胱等]均未见明显病变。

4 讨论

在本实验中未见动物濒死和非计划死亡。解剖检查各组小鼠组织/脏器的体积、颜色、质地等均未见明显

[J]. 医药导报, 2015, 34(12):1644-1648.
 [4] 吴绍康,万晓青,毛根祥,等. 3首中药方剂代煎后的稳定性研究[J]. 中国药房, 2017, 28(19):2674-2677.
 [5] 孙宁阳,张宏川,顾健,等. 葛根黄连组方毒理学研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(1):95-98.
 [6] WANG YY, SUN WG, CHEN LX, et al. Anti-arthritis activity of Fufang lujiao shuang on collagen-induced arthritis in Balb/c mice and its underlying mechanisms[J]. *Pharmacogn Mag*, 2015, 11(42):242-249.
 [7] RISPIN A, FARRAR D, GUPTA K, et al. Alternative methods for the median lethal dose (LD₅₀) test: the up-and-down procedure for acute oral toxicity[J]. *ILAR J*, 2002, 43(4):233-243.
 [8] SCHLEDE E, GENSCHEW E, STROPP G, et al. Oral acute toxic class method: a successful alternative to the oral LD₅₀ test[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2005, 42(1):15-23.

(收稿日期:2017-11-21 修回日期:2018-01-19)
 (编辑:张 静)