



代如意, 殷中琼, 贾仁勇, 等. 中药组方“虎诃紫”的急性毒性试验及对鸡白痢的临床疗效[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(1): 14-17.

## 中药组方“虎诃紫”的急性毒性试验及 对鸡白痢的临床疗效

代如意<sup>1</sup>, 殷中琼<sup>1</sup>, 贾仁勇<sup>1,2</sup>, 李莉<sup>1</sup>, 李曼<sup>1</sup>, 康帅<sup>1</sup>, 彭练慈<sup>1</sup>, 曲径<sup>1</sup>  
(1 四川农业大学 动物医学院, 四川 雅安 625014; 2 四川农业大学 预防兽医研究所, 四川 温江 611130)

**摘要:**【目的】探讨中药组方“虎诃紫”的毒性及对鸡白痢沙门菌 *Salmonella pullorum* 的疗效。【方法】根据兽药研究技术指导原则,对中药组方提取物进行小鼠灌胃急性毒性试验,同时以人工诱发鸡白痢沙门菌的雏鸡感染模型,按高、中、低(4.20、1.62、0.48 g/d)剂量饮水给药,连续7 d,评价中药组方“虎诃紫”颗粒剂的疗效。【结果和结论】急性毒性试验给药剂量大于5 000 mg/kg,小鼠无死亡,即  $LD_{50} > 5\ 000\ \text{mg/kg}$ ,对其进行中药组方提取物最大耐受量的测定,其最大耐受量为40 g/kg;高剂量颗粒剂组治愈率和有效率分别是75.0%和83.3%,中剂量颗粒剂组的治愈率和有效率分别是72.7%和81.8%,低剂量颗粒剂组的治愈率和有效率分别为62.5%和75.0%,而感染对照组的死亡率为40%; $\chi^2$ 检验表明“虎诃紫”颗粒剂高、中剂量组与感染对照组的死亡率差异显著( $P < 0.05$ )。结果表明:中药组方无毒;高剂量组的治愈率、有效率都高于中、低剂量组,高、中剂量组的死亡率都低于感染对照组,说明高、中剂量组对鸡白痢沙门菌的死亡具有一定的保护作用。

**关键词:**中药组方“虎诃紫”;急性毒性试验;鸡白痢沙门菌;疗效

中图分类号:S828

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2015)01-0014-04

## An acute toxicity test of compound traditional Chinese medicine “Huhezi” and its efficacy in chickens experimentally infected with *Salmonella pullorum*

DAI Ruyi<sup>1</sup>, YIN Zhongqiong<sup>1</sup>, JIA Renyong<sup>1,2</sup>, LI Li<sup>1</sup>, LI Man<sup>1</sup>, KANG Shuai<sup>1</sup>, PENG Lianci<sup>1</sup>, QU Jing<sup>1</sup>  
(1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;  
2 Preventive Veterinary Research Institute, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China)

**Abstract:**【Objective】To investigate the toxicity of compound traditional Chinese medicine “Huhezi” and observe its efficacy in chickens experimentally infected with *Salmonella pullorum*. 【Methods】According to the veterinary drug research technical guidelines, the acute toxicity test was carried out in mice by gavage with “Huhezi” extracts. To evaluate the efficacy of “Huhezi” granules, the chickens experimentally infected with *Salmonella pullorum* were treated at a dosage of 4.20, 1.62, 0.48 g/d respectively by drinking water for 7 successive days. 【Result and conclusion】The dose of acute toxicity test of “Huhezi” extracts was over 5 000 mg/kg. No death was observed in mice, revealing  $LD_{50} > 5\ 000\ \text{mg/kg}$ . The maximum tolerated dose was 40 g/kg. The cure rates of different dose granules groups were 75.0%, 72.7%, 62.5% and the effective rates were 83.3%, 81.8%, 75.0% respectively, while the mortality rate of infected control group was 40%. The result of  $\chi^2$  test showed that the mortality rate of high and medium dose group of “Huhezi” granule was significantly different from that of the infected control group. The results indicate that compound traditional Chinese medicine extracts are non-toxic, and the high and medium dose of “Huhezi” granules have certain protection to infected death of *S. pullorum*, with cure rates

收稿日期:2014-05-10 优先出版时间:2014-12-02

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7671/j.issn.1001-411X.2015.01.003.html>

作者简介:代如意(1986—),女,硕士研究生, E-mail: luoyunxiaoyi@163.com; 通信作者:殷中琼(1968—),女,教授,博士, E-mail: yinzhongq@163.com

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划项目(2011BAD34B03-4);四川省青年科技创新研究团队项目(2013TD0015)

and effective rates of high dose group being higher than that of medium and low dose groups, the mortality rates of high and medium dose groups being lower than that of the infected control groups.

**Key words:** compound traditional Chinese medicine “Huhezi”; acute toxicity test; *Salmonella pullorum*; curative effect

鸡白痢沙门菌 *Salmonella pullorum* 对各种品种的鸡均有易感性,以2~3周龄内雏鸡的发病率与病死率为最高,呈流行性.成年鸡感染呈慢性或隐性经过,近年来,育成阶段的鸡发病也日趋普遍.火鸡对本病有易感性,一直存在本病的鸡场,雏鸡的发病率为20%~40%,新传入本病的鸡场,其发病率显著增高,有时可高达100%,病死率也比老疫场高,发病雏鸡呈最急性者,无临床症状迅速死亡,稍微者或带菌者表现精神委顿,绒毛松乱,两翼下垂<sup>[1]</sup>.临床治疗鸡白痢沙门菌病主要是复方头孢唑啉钠非批准使用的药物、氟苯尼考和硫酸安普霉素等化学药物<sup>[2-3]</sup>,化学药物治疗效果迅速,但是药物残留在动物体内对人类的产生了一定危害,由于我国滥用抗生素的现象比较突出,使得我国在外贸活动中多次遭到其他国家的禁售,面对这样的处境,国家对兽医的管理制度进行改革,减少化学药物在临床上的应用,增加中药在治疗动物疾病的比例,中兽药的开发迫在眉睫.本试验在前期通过体外抑菌试验对几十味中药的筛选,选出虎杖 *Polygonum cuspidatum*、诃子 *Terminalia chebula* 和紫花地丁 *Violet yedoensis* 3味中药组成组方,制成“虎诃紫”饮水颗粒剂的基础上,对该中药组方进行了急性毒性试验,并对人工诱发感染鸡白痢沙门菌的雏鸡进行疗效观察,以确定中药组方的药效作用,为中兽药的研发提供新的处方.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物与药品

昆明系小鼠80只(许可证号:SYXK2011-027),雌雄各半,体质量18~20g,购于四川农业大学动物医学院.试验1日龄小鸡购于四川省雅安市名山区家禽养殖合作社孵化场,隔离饲养鸡白痢沙门菌阴性.

### 1.2 试验药品

虎杖(产地四川,批次081102)、诃子(产地云南,批次090401)、紫花地丁(产地四川,批次110502)均购于四川雅安惠民堂药业连锁有限责任公司.中药组方“虎诃紫”颗粒剂(批号:130481),由四川农业大学动物医学院药理学系自制.西药庆大霉素为宜昌人福药业有限责任公司产品.

### 1.3 菌种与培养基

鸡白痢沙门菌(CVCC1792)菌种购于中国兽医

药品监察所,MH肉汤培养基(Meller-Hinton broth)、营养琼脂培养基(Nutrient agar)、麦康凯培养基(MacConkey agar)、Baird-Parker琼脂基础培养基(Baird-Parker agarbase)、SS琼脂培养基(*Salmomella Shigella* agar)均为北京奥博星生物技术有限公司产品.

### 1.4 菌液制备

将冻干鸡白痢沙门菌的菌种接种于麦康凯培养基,在37℃条件培养24h,挑取单个菌落在普通营养肉汤中进行扩增培养,按照10倍稀释法对肉汤中的细菌计数,计算出鸡白痢沙门菌原液个数为 $8 \times 10^8$  cfu/mL,以作为攻毒菌液.

### 1.5 药液的制备

将3味中药按照文献[4-6]的最佳工艺进行提取,保证浸膏得率,并将虎杖、诃子和紫花地丁3味中药的浸膏按照质量比3:2:1的比例用体积分数为5%二甲亚砜对其进行溶解,将制备好的药液放入4℃冰箱保存,作为急性毒性试验的备用药液.

### 1.6 急性毒性试验

1.6.1 预试验 将50只小鼠随机分成5组,每组10只,雌雄各半,给药前禁食6h,各组分别将配好的药液按照10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 g/kg(按原生药材计)灌胃给药,给药剂量以每只不超过0.4 mL为标准,以确定试验小鼠0和100%死亡的剂量范围.给药2h后自由饮食,连续观察7d,每天上、下午各观察1次,当给药剂量按体质量计大于5000 mg/kg时小鼠没有出现死亡,表明LD<sub>50</sub>大于5000 mg/kg<sup>[7]</sup>,进一步对中药组方进行最大耐受量的测定.

1.6.2 最大耐受量(MTD)测定 将30只小鼠平均分成3组,每组10只,雌雄各半,试验前禁食6h,按照等间距设置3个剂量组,每组给小鼠灌胃药剂量分别为42.8、45.8、49.0 g/kg,给药后记录小鼠的精神、饮食、饮水情况,连续观察14d,对死亡的小鼠和观察期满的小鼠进行解剖,观察组织变化,无小鼠死亡的剂量组为中药组方的最大耐受量.

### 1.7 “虎诃紫”颗粒剂的临床疗效观察

1.7.1 攻毒剂量测定 攻菌量以近半数致死量为宜.取试验鸡50只,随机分为5组,每组10只雏鸡,注射的鸡白痢沙门菌菌数增加,雏鸡表现出鸡白痢明显症状,见表1.对死亡鸡进行剖检,肝脏、脾脏等进行细菌

分离培养鉴定,依死亡率大小最终确定以腹腔注射方式进行攻毒,攻毒剂量定为 $2.0 \times 10^9$  cfu/mL.

表1 动物感染剂量模型

Tab.1 Models of animal infectious dose

组别	鸡数/只	注射方式	注射剂量/(cfu·mL <sup>-1</sup> )	发病率 <sup>1)</sup> /%	死亡率 <sup>1)</sup> /%
1	10	腹腔	$1.0 \times 10^9$	40	0
2	10	颈部皮下	$1.0 \times 10^9$	20	0
3	10	腹腔	$1.2 \times 10^9$	40	20
4	10	腹腔	$1.6 \times 10^9$	80	30
5	10	腹腔	$2.0 \times 10^9$	100	40

1) 为连续观察7 d的结果.

1.7.2 人工感染治疗试验 将90只1日龄的健康雏鸡,饲养至5日龄进行攻毒试验,随机分为6个组,每组15只,除健康对照组外其他各组腹腔注射0.5 mL鸡白痢沙门菌.第1~3组分别为“虎诃紫”颗粒剂的治疗组,按用药剂量分为高、中、低剂量组,单次给药剂量每只分别为1.40、0.54、0.16 g,每天3次给药;第4组为对照药物(庆大霉素可溶性粉)治疗组,单次给药剂量为33.3 mg/L;第5组为感染对照组;第6组为健康对照组,不做任何处理.感染后6 h,饮水给药,每天3次,连用7 d,隔离饲养,观察和记录雏鸡的临床症状、死亡率、治愈率等.

## 1.8 药效评价标准

发病率:凡在试验期间临床观察出现泻白色粪便典型的鸡白痢症状,判为发病.

治愈率:凡在试验期间,经饮水给药后精神状况及食欲恢复正常,不出现白色稀便,粪便经分离培养未有沙门菌检出,判断治愈,根据治愈鸡占整组试验鸡的比例计算治愈率.有效:在试验期间,鸡经混饮给药后,腹泻等症状减轻,精神状态、食欲、呼吸等逐步恢复正常者均属有效.有效率 = 症状好转鸡数/发病鸡数.死亡率:患病鸡食欲、粪便仍无明显改善,出现典型症状并死亡,剖检发现脏器有典型的病理变化,计为死亡鸡.死亡率 = 死亡鸡数/试验鸡数<sup>[8-9]</sup>.

表3 “虎诃紫”颗粒剂对鸡白痢沙门菌的临床试验结果<sup>1)</sup>

Tab.3 Results of clinical trials of “Huhezhi” granules on *Salmonella pullorum*

组别	动物数/只	死亡率/%	治愈率/%	有效率/%	相对增质量/%	$\chi^2$	
						与感染组相比(死亡率)	与庆大霉素组相比(治愈率)
“虎诃紫”颗粒剂高剂量组	15	23*	75.0	83.3	92.94	45.93	2.82
“虎诃紫”颗粒剂中剂量组	15	25*	72.7	81.8	90.90	43.24	2.53
“虎诃紫”颗粒剂低剂量组	15	36*	62.5	75.0	89.30	33.86	1.62
庆大霉素治疗组	15	13.3*	86.7	88.9	85.98	58.84	
感染对照组	15	40			78.27		
健康对照组	15				100		

1)  $\chi_{0.05,1}^2 = 3.84$ ,  $\chi_{0.01,1}^2 = 6.63$ .

## 2 结果与分析

### 2.1 中药组方提取物的急性毒性试验

预试验中药组方提取物剂量为10~40 g/kg,小鼠灌胃后出现暂时不适应,未见中毒症状或死亡,说明LD<sub>50</sub>大于5 000 mg/kg是实际无毒药物,只需测定最大耐受量,按照等比间距测定出中药组方提取物的最大耐受量.当灌胃小鼠剂量达到50 g/kg,小鼠出现精神萎靡,行动迟缓,食欲不振,12 h后10只小鼠全部死亡,其他组表现中毒症状同上,但随着中毒剂量逐渐减轻,24 h内存活者基本正常,中药组方提取物灌胃剂量大于40 g/kg有小鼠死亡,即中药组方提取物的最大耐受量为40 g/kg(表2).

表2 中药组方提取物对小鼠的最大耐受量

Tab.2 Chinese herbal compound extract maximum tolerated dose in mice results

剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	小鼠数/只	死亡数/只	死亡率/%
50.0	10	10	100
49.0	10	6	60
45.8	10	4	40
42.8	10	1	10
40.0	10	0	0

### 2.2 “虎诃紫”颗粒剂对鸡白痢沙门菌治疗效果

对治疗人工感染的鸡白痢沙门菌使用的“虎诃紫”颗粒剂的剂量不同,其治疗效果也有所差异,详见表3.“虎诃紫”颗粒剂的高剂量组的治愈率、有效率和相对增质量率分别大于中、低剂量组,其死亡率低于中、低剂量组;中剂量组治愈率、有效率和相对增质量率分别大于低剂量组,其死亡率低于低剂量组.“虎诃紫”颗粒剂相对增质量率都高于庆大霉素组,“虎诃紫”颗粒剂高、中剂量组对鸡白痢沙门菌都有一定的治疗效果. $\chi^2$ 检验表明(表3),“虎诃紫”颗粒剂高、中、低剂量组、庆大霉素组与感染对照组的死亡率差异显著( $P < 0.05$ ),“虎诃紫”颗粒剂高、中、低剂量组与庆大霉素组治愈率、有效率差异不显著( $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

中药组方“虎诃紫”是通过大量筛选中药得到治疗鸡白痢沙门菌的新药组方,为确保新药本身无毒能更好地治疗鸡白痢沙菌病,本试验通过急性试验来验证新药组方的安全性,急性毒性是评价兽药常用的方法,急性毒性试验是药物毒理学安全性评价的第一步,具有了解兽药急性毒性强弱的作用.本研究结果表明,中药组方提取物剂量分别为10、20、30、40 g/kg 时对小鼠进行灌胃,小鼠全部存活,根据毒性等级评价<sup>[7,10]</sup>,当 $LD_{50} > 5\ 000\text{ mg/kg}$ 时为实际无毒,而本组方提取物在40 g/kg 时小鼠都未有死亡,其 $LD_{50}$ 远远高于5 000 mg/kg,说明该中药组方为实际无毒组方,安全可靠.

中药组方“虎诃紫”颗粒剂由虎杖、诃子和紫花地丁3种中药共同组成,颗粒剂作用主要有清热解毒,涩肠止泻,敛肺止咳,降火利咽,肺虚喘咳,久嗽不止,凉血消肿等<sup>[11]</sup>,同时虎杖、诃子和紫花地丁都有抗菌作用<sup>[12-14]</sup>,而本研究结果也表明这3味中药组成的组方对人工感染引起的鸡白痢沙门菌具有良好的治疗效果,治疗效果随着剂量的增加而更好.其中高、中剂量组的有效率与阳性对照庆大霉素组相差不多,而治愈率稍差于庆大霉素,总体而言治疗效果与庆大霉素差异不显著.但高、中剂量组的相对增殖率均高于庆大霉素组和感染组,这可能与中药含有多种营养物质和生物活性物质,在治病的同时能调节生理机能有关.

有报道以石榴皮、地榆、诃子等药物为主药组成“白痢康”制剂,发现其对鸡白痢沙门杆菌人工感染鸡进行预防和治疗,保护率达88%~90%,治愈率75.0%~84.4%<sup>[15]</sup>,与本研究“虎诃紫”颗粒剂高剂量组83.3%的有效率和75.0%的治愈率相似.胡庭俊等<sup>[8]</sup>报道的马尾藻多糖纳米脂质体对鸡白痢沙门菌高剂量组的死亡率与本试验的死亡率也相符,表明“虎诃紫”对鸡白痢沙门菌治疗效果良好.

中药资源丰富,价格相对较低,兼具营养和治病双重作用,无残留、不易产生耐药性等,而“虎诃紫”

颗粒剂安全无毒,对人工感染鸡白痢沙门菌具有良好的治疗效果和明显的质量增加作用,具有较好的临床推广意义.

#### 参考文献:

- [1] 陈薄言. 兽医传染病学 [M]. 5 版. 北京:中国农业出版社,2006:119-120.
- [2] 李存彬. 药物对鸡白痢沙门氏菌病的临床疗效试验 [J]. 中国畜禽种业,2010(6):149-150.
- [3] 李丽,王书全,王春华,等. 雏鸡白痢和大肠杆菌病的药物治疗试验 [J]. 中国畜牧兽医,2006,33(5):62-63.
- [4] 刘丹,汤海峰,张三奇,等. 虎杖中有效成分提取方法的研究 [J]. 中成药,2007,29(4):516-521.
- [5] 付戈妍,付克,王洪光,等. 超声波提取紫花地丁总黄酮及含量测定 [J]. 内蒙古民族大学学报,2008,23(5):512-513.
- [6] 王雷,富丽静,于翔,等. 中草药五倍子、诃子有效成分提取工艺的研究 [J]. 水生态学杂志,2009,2(1):135-137.
- [7] 农业部兽药评价中心. 兽药研究技术指导原则汇编:2006—2011 [G]. 北京:化工工业出版社,2012:84.
- [8] 胡庭俊,刘珊珊,韦现色,等. 马尾藻多糖纳米脂质体对人工感染鸡白痢沙门氏菌预防试验 [J]. 中兽医医药杂志,2011,13(6):10-12.
- [9] 高迎春,张传津,都业良,等. 地锦草颗粒对人工感染鸡大肠杆菌病临床疗效试验 [J]. 中兽医医学杂志,2012(1):51-55.
- [10] 李建华. 中药类急性毒性计数法与 $LD_{50}$ 的分级 [J]. 中草药,1994,25(7):388-389.
- [11] 中华人民共和国农业部药典委员会. 中华人民共和国药典:二部 [S]. 北京:中国农业出版社,2005:187-209.
- [12] 刘晓蓉. 虎杖提取物抑菌作用的研究 [J]. 广东轻工职业技术学院学报,2002,1(1):19-21.
- [13] 肖云峰,刘小雷,刘爽,等. 诃子的药理作用研究进展 [J]. 北方药学,2011,8(11):19-20.
- [14] 康怀兴. 紫花地丁的抗菌活性分析 [J]. 中国民族民间医药,2012(14):51-52.
- [15] 卢斯亮,刘芳萍,王圣思. 中药在鸡白痢沙门氏杆菌病中的应用 [J]. 中国畜牧兽医文摘,2010(1):54-55.

【责任编辑 柴 焯】