

第七章 生物活性评价方法(一)

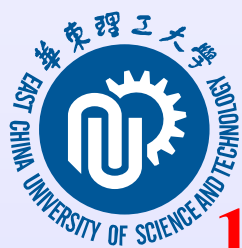
上节课内容回顾

分析方法的验证

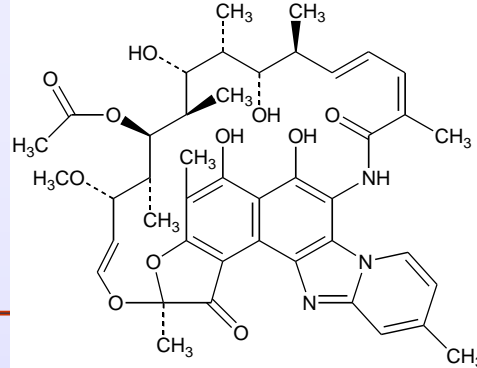
目的：证明所采用的方法适合于相应检测的要求。

一般起草药品/食品质量标准时、当生产方法变更或组分变更或原分析方法进行修订时，需要对分析方法进行验证。

内容：准确度、精密度、专属性、检测限、定量限、线性、线性范围和耐用性。



1. 准确度 (accuracy)



利福昔明	200g
羧甲基淀粉钠	15g
硬脂酸镁	18g
二氧化硅	1g
滑石粉	1g
微晶纤维素	25g
<hr/>	
共制	1000片

指用该方法测定的结果与真实值或参考值接近的程度。一般以回收率（%），Recovery rate(%)表示。常9次数据评价。

验证方法

回收试验：空白+已知量A的对照品（或标准品）测定，测定值为M。

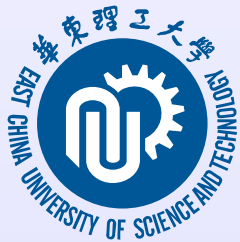
$$R = \frac{\overline{M}}{A} \times 100\%$$



加样回收试验：已测定药物含量P的真实样品+已知量A的对照品（或标准品）测定，测定值为M。

$$R = \frac{\overline{M} - \overline{P}}{A} \times 100\%$$

一般分析方法（HPLC\GC\UV）回收率常在98%—102%之间



2. 精密度 (precision)

指在规定的测试条件下，同一均匀样品，经多次取样测定所得结果之间的接近程度。一般用偏差、标准偏差或相对标准偏差（RSD）表示。常测6次进行评价。

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$RSD = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%$$

测定次数	1	2	3	4	5	6	均值	RSD (%)
含量 (%)	99.39	99.19	99.69	99.49	99.38	99.20	99.39	0.45

不同分析方法, 对精密度的要求也不同:

一般, HPLC和GC: $RSD < 2\%$; 紫外分光光度法和原子吸收分光光度法, $RSD < 1.5\%$; TLC和比色法: $RSD < 4\%$

3. 专属性 (specificity)

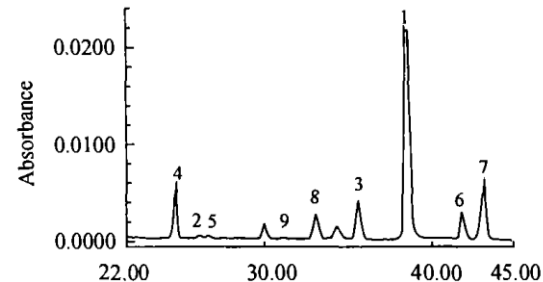
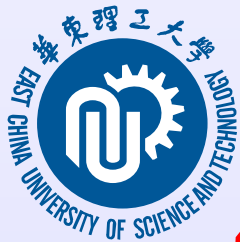


图1 PVC 发酵液 HPCE 图谱

1:PCV 2:6-APA 3:苯氧乙酸 4:对羟基 PCV 5:PCG 6:PCV 噻唑酸(5S,6R) 7:PCV 噻唑酸(5S,6R) 8:PCV 脱羧噻唑酸(5R) 9:PCV 脱羧噻唑酸(5S)

指其它成分（如空白试剂、辅料、杂质、降解产物）可能存在的情况下，所采用的分析方法能准确测出被测物的能力，是对分析方法用于复杂样品分析时抗干扰程度的度量。

- 1) **空白干扰**：测试空白（包括溶剂、制剂的空白辅料等）和待测物信号完全分离或对含量测定没有影响。
- 2) **杂质干扰**：杂质可得时，往纯的待测品中加入适量的杂质，应证明加入后的测试结果没受收到影响。与原料、中间产物等混合，检查抗干扰程度。
- 3) **强降解试验**：当杂质或降解产物不可得时，可以把待测物强力降解（酸、碱、氧化、高温、强光、高湿），把降解后的试验结果和正常的测试结果进行比较，来研究降解产物的可能干扰。



4. 检测限和定量限

检测限 (limit of detection) : 指试样中被测物能被检出的最低量。

定量限 (limit of quantitation) : 指试样中被测物能被定量测定的最低量。

一般采用信噪比法:

信噪比为 **3 : 1** 时被测物能被检出的量为检测限。

信噪比为 **10 : 1** 时被测物能被检出的量为定量限。

5. 线性和线性范围

线性 (linearity):指在一定浓度范围内, 测试结果与被测物浓度呈正比关系的程度。通常用**相关系数 (r)** 表达

GC\HPLC法: $r > 0.999$; 紫外分光光度法 $r > 0.9999$; 一般分析方法 $r > 0.9950$

线性范围 (linearity range):指能达到一定精密度、准确度和线性的前提下, 测试方法所适用的高、低限浓度或量的区间。

以吸光度为纵坐标, 蛋白质浓度为横坐标, 绘制得其线性回归方程式:

$Y = 0.00635X + 0.15735$, $r = 0.9993$,
表明蛋白质在 $1.67 \mu\text{g/mL}$ - $16.67 \mu\text{g/mL}$
范围内线性良好。

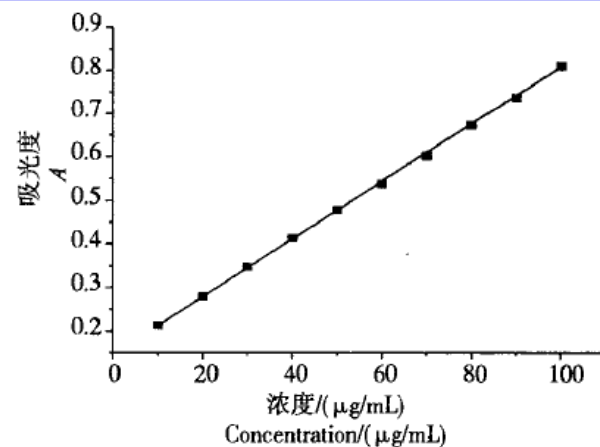
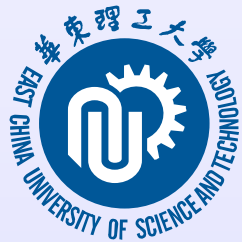


图 1 蛋白质标准曲线

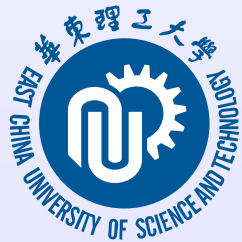
Fig.1 The standard curve of the proteins



6. 耐用性

指测定条件稍有变动时，结果不受影响的承受程度，为常规检验提供依据。是衡量实验室和工作人员之间在正常情况下实验结果重现性的尺度。

如，同样类型分析柱，但厂商不同；或同家厂商，型号同，批次不同……

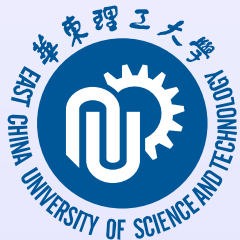


第七章 生物活性评价方法

试验设计的原则？

试验模型的选择？

考察指标的确定？



第一节 活性评价实验设计原则

1. 对照 (antitheses) 的原则:

“对照”是比较的基础。是要求在实验中设立可与实验组比较，用于消除各种无关因素影响的对照组。

阴性对照：{ 空白对照 (不施加任何药物处理)
模型对照 (造模处理,但是不给受试药物处理)

阳性对照： 已知有效药物处理。



试验分组设计

空白对照组：不给任何药物处理的对照。

模型对照组：造模处理，但是不给受试药物处理。

阳性对照组：采用已肯定疗效的药物作为对照，应产生阳性结果。

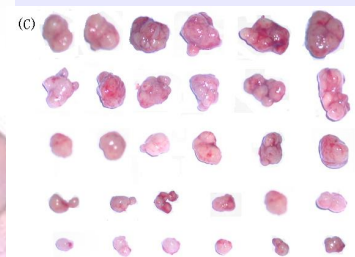
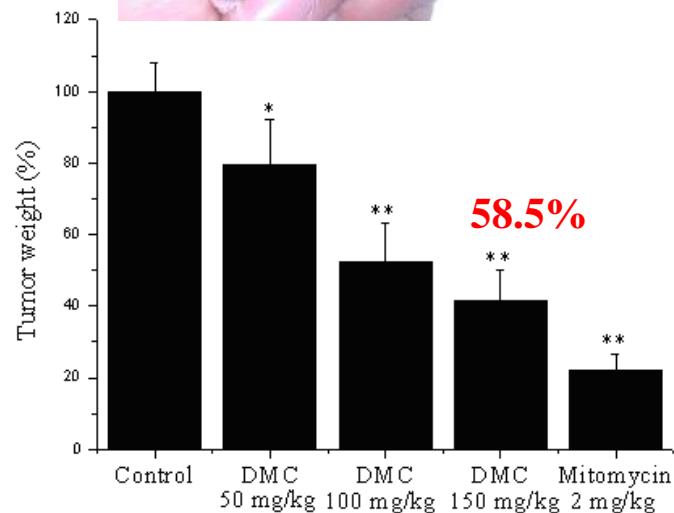
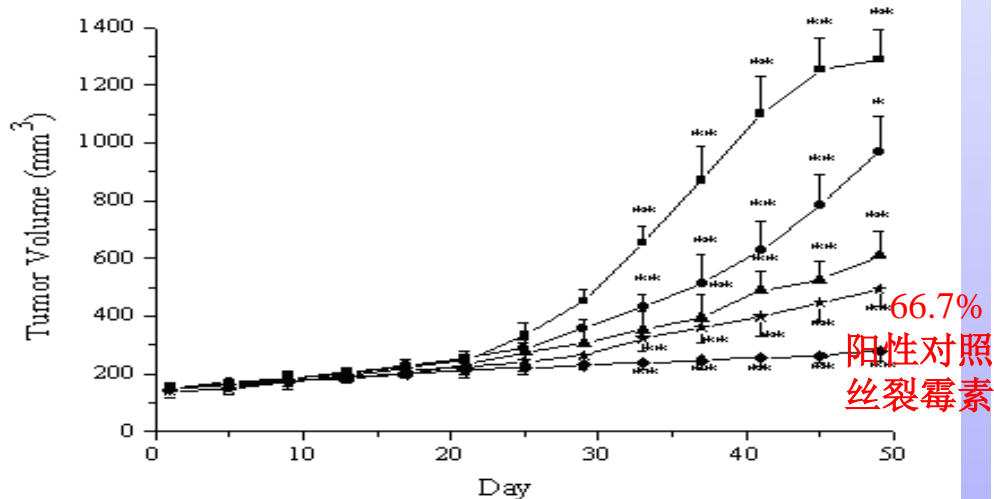
药物试验组：采用受试药物处理，常选择不同剂量（一般**3**~5个剂量组），不同给药途径给药。

阴性对照

动物试验中常设**5-6**个组

举例

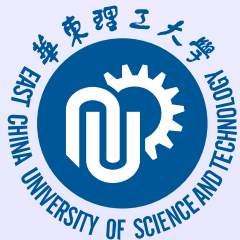
DMC 对裸小鼠K562肿瘤体积和重量的影响



control (■), animals injected with DMC (50 mg/kg, i.p. ●), DMC (100 mg/kg, i.p. ▲), DMC (150 mg/kg, i.p. ★), mitomycin-C (2 mg/kg, i.p.) (◆), each for 10 mice.

模型组 (阴性对照)

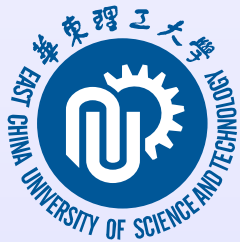
丝裂霉素 (阳性对照)



桑叶中氧化白藜芦醇对四氧嘧啶诱导糖尿病小鼠血糖的作用 (n=10)

	组别	剂量 (mg/kg)	血糖值 (mmol/L)	
			给药前	给药后
阴性对照 {	正常组	/	6.67 ± 0.71	6.53 ± 0.67
	模型组	/	24.94 ± 1.93	24.56 ± 2.15 ^{##}
阳性对照 →	优降糖	12	24.48 ± 2.03	18.68 ± 3.78 ^{**}
	低剂量组	3	24.75 ± 1.78	22.43 ± 2.74
	中剂量组	9	25.62 ± 2.23	20.65 ± 3.09
	高剂量组	12	24.98 ± 1.58	18.99 ± 2.75 ^{**}

^{##}P<0.01 vs 正常组; ^{**} P<0.01 vs 模型组



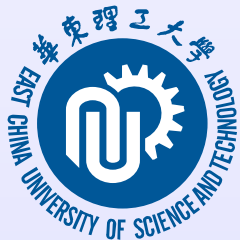
2. 重复 (repetition) 的原则

指同一处理要设置多个样本例数降低试验误差。

★ 实验动物的基本例数

- (1) 小动物 (小鼠、大鼠) : 每组10例。
- (2) 中动物 (兔、豚鼠) : 每组6例。
- (3) 大动物 (犬、猫、猴、羊) : 每组5例。

★ 细胞试验中常三次以上平行试验



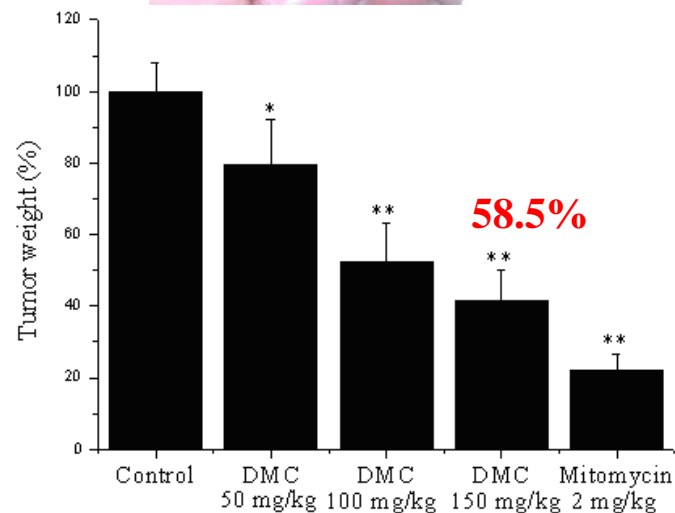
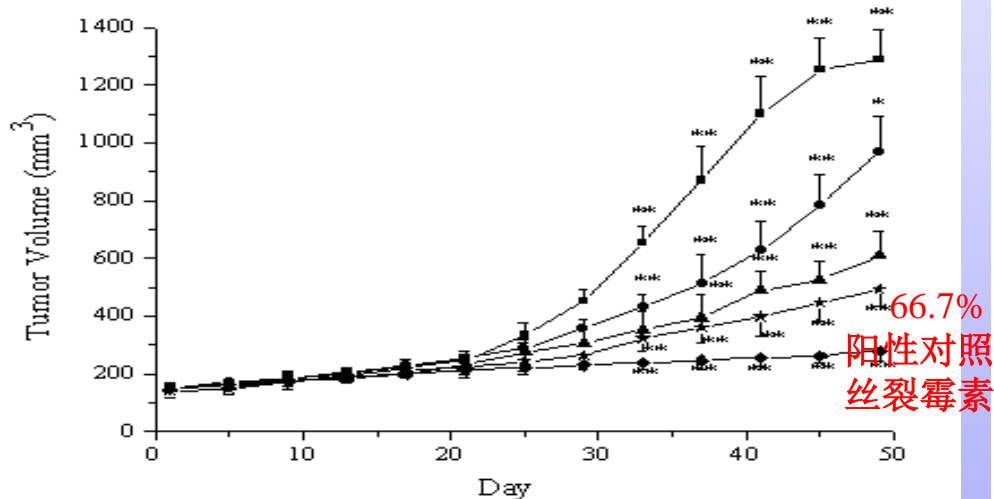
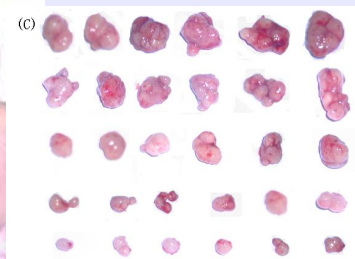
桑叶中氧化白藜芦醇对四氧嘧啶诱导糖尿病小鼠血糖的作用 (n=10)

组别	剂量 (mg/kg)	血糖值 (mmol/L)	
		给药前	给药后
正常组	/	6.67 ± 0.71	6.53 ± 0.67
模型组	/	24.94 ± 1.93	24.56 ± 2.15 ^{##}
优降糖	12	24.48 ± 2.03	18.68 ± 3.78 ^{**}
低剂量组	3	24.75 ± 1.78	22.43 ± 2.74
中剂量组	9	25.62 ± 2.23	20.65 ± 3.09
高剂量组	12	24.98 ± 1.58	18.99 ± 2.75 ^{**}

^{##}P<0.01 vs 正常组; ^{**} P<0.01 vs 模型组

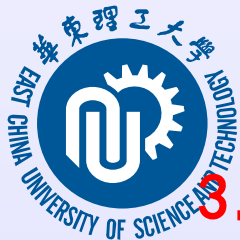
表格: ±SD

DMC 对裸小鼠K562肿瘤体积和重量的影响



control (■), animals injected with DMC (50 mg/kg, i.p. ●), DMC (100 mg/kg, i.p. ▲), DMC (150 mg/kg, i.p. ★), mitomycin-C (2 mg/kg, i.p.) (◆), each for 10 mice.

折线图、柱型图：误差棒表示

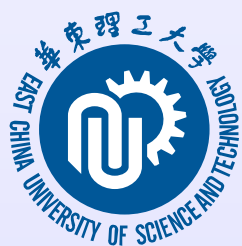


3. 随机 (random) 的原则

“随机”指每个实验对象在接受处理时，都有相等的机会，随机遇而定。随机可减轻主观因素的干扰，减少或避免偏性误差。

桑叶中氧化白藜芦醇对四氧嘧啶诱导糖尿病小鼠血糖的作用 (n=10)

组别	剂量 (mg/kg)	血糖值 (mmol/L)	
		给药前	给药后
正常组	/	6.67±0.71	6.53±0.67
模型组	/	24.94±1.93	24.56±2.15 ^{##}
优降糖	12	24.48±2.03	18.68±3.78 ^{**}
低剂量组	3	24.75±1.78	22.43±2.74
中剂量组	9	25.62±2.23	20.65±3.09
高剂量组	12	24.98±1.58	18.99±2.75 ^{**}

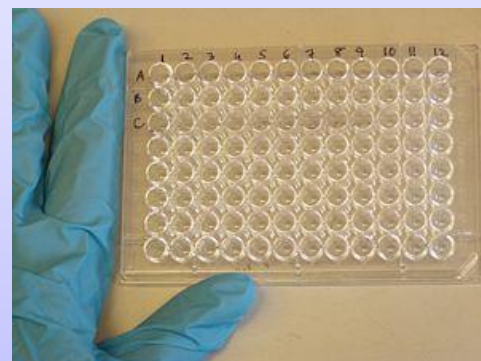


第二节 活性评价实验模型的选择

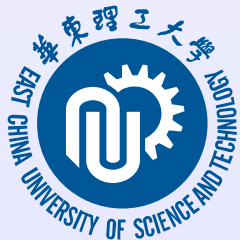
分子试验模型（分子水平）

细胞试验模型（细胞水平）

动物试验模型（动物水平）



体外试验用药量小，体内试验用药量大。
体外试验，结合整体动物体内试验，从不同层次证实其药效。



第三节 活性评价实验中考察指标的确定

观测指标应选用特异性强、敏感性高、重现性好，客观、定量或半定量的指标进行观测。

- (1) **客观性**：尽可能选择客观指标，避免一些笼统的、不确切的指标。
- (2) **精确性**：选用的指标应尽量精确，可定量或半定量。
- (3) **灵敏性**：应尽量选择高灵敏性的指标，即选择能够显著提高灵敏性的仪器对观察指标进行测量。
- (4) **特异性**：为了更好地揭示研究问题的本质，观察指标还应具备一定的特异性。

1. 抗肿瘤活性动物试验：

模型的建立包括两个阶段：

1. 体外培养细胞移植；2. 体内肿瘤细胞悬液移植。

试验分组：

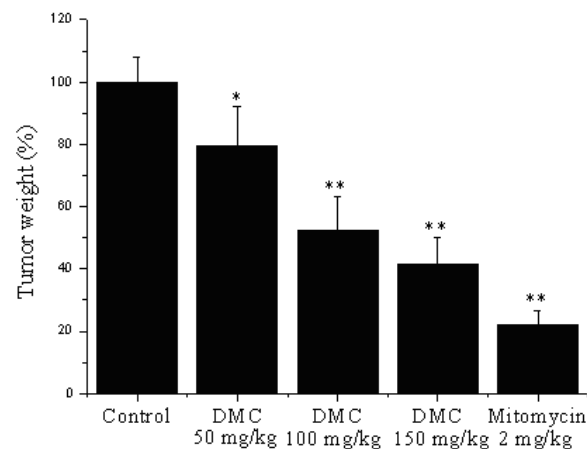
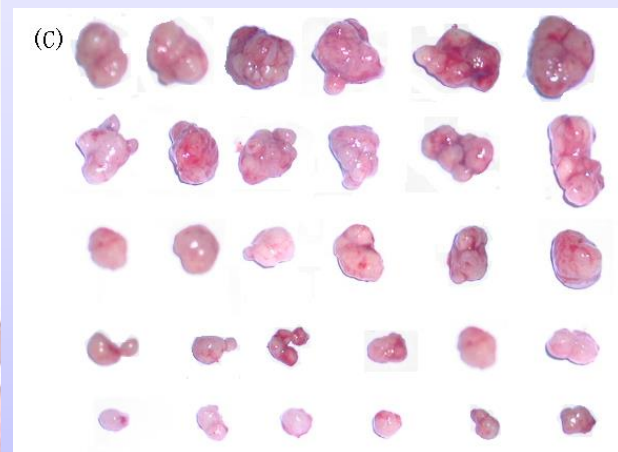
- (a) 阴性对照组：模型组
- (b) 阳性对照组：丝裂霉素组
- (c) 高浓度实验药物组；
- (d) 中浓度实验药物组；
- (e) 低浓度DMC实验药物组。

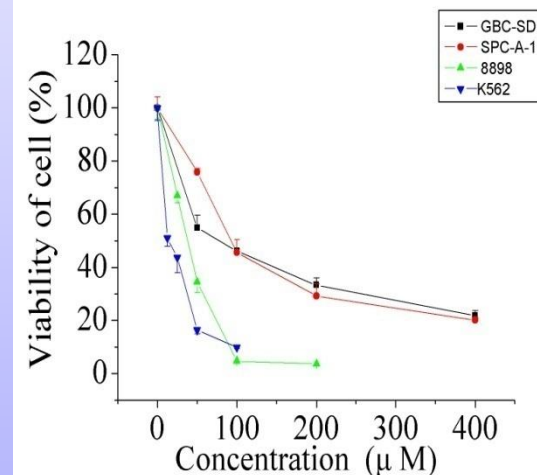
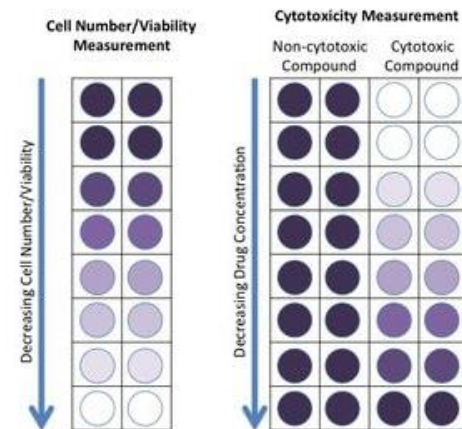
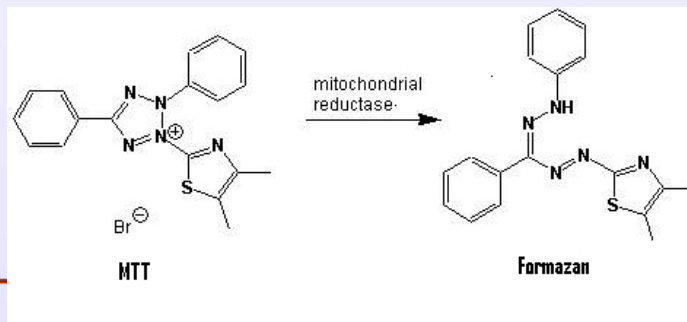
全部动物在给药处理1-2月后，断颈处死，迅速取出肿瘤，称重，测量瘤体积。

瘤体积：以测量肿瘤两个垂直直径（A和B）来确定，并通过以下公式来计算

$$V = \frac{\pi}{6} \left(\frac{A+B}{2} \right)^3$$

称重：





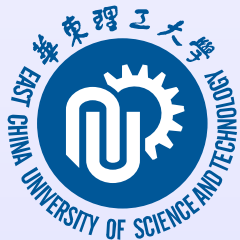
IC_{50} (14.2 μM, K562)

阳性对照: 5.8 μM

细胞存活率 = 药物组OD平均值/对照组OD平均值 × 100 %

抑制率 = 1 - 存活率

半数细胞毒的浓度 (IC_{50}): 细胞存活率达到一半时的药物作用浓度

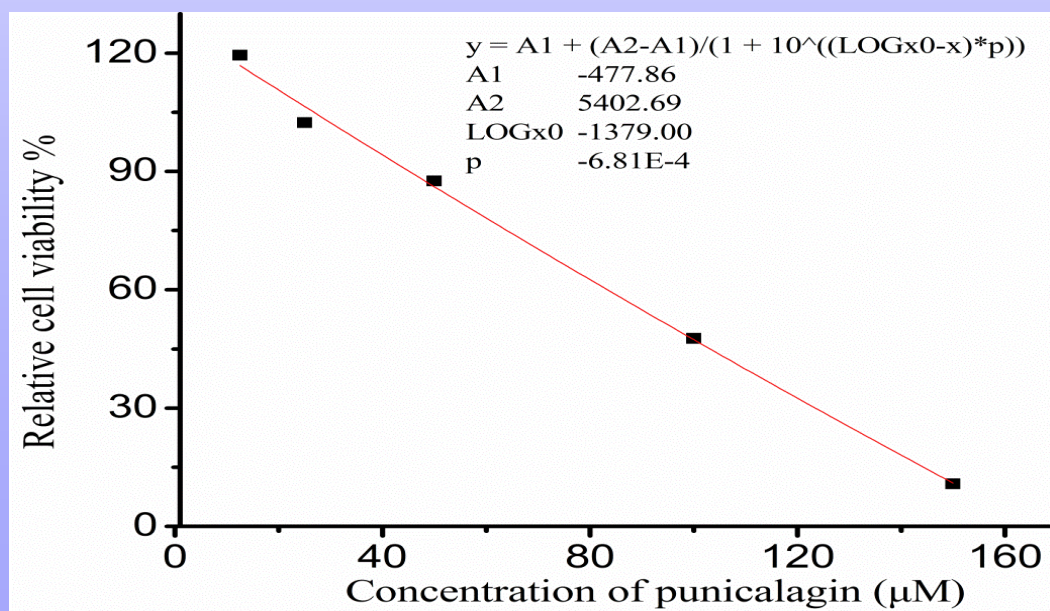


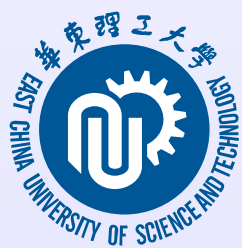
半数抑制浓度 IC_{50} 的计算

例：安石榴苷对人结肠腺癌细胞Caco2存活率的影响实验

安石榴苷浓度 (μM)	12.5	25	50	100	150
细胞存活率%	119.48	102.35	87.56	47.65	10.80

由公式拟合
计算得到
 $IC_{50}=98.32\mu M$

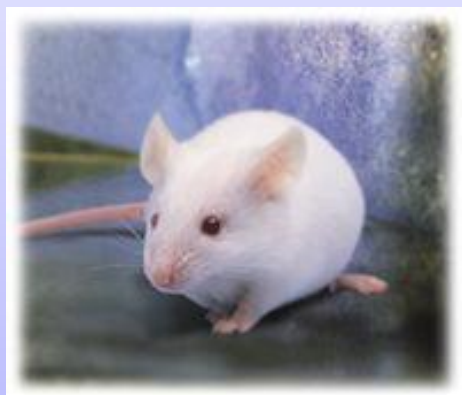




动物模型

实验动物的种类

小鼠 (Mouse)



大鼠 (Rat)



猫 (Cat)

家兔 (Rabbit)



犬 (Dog)



豚鼠 (Guinea pig)



猴 (Monkey)

常用给药方法

灌胃给药法

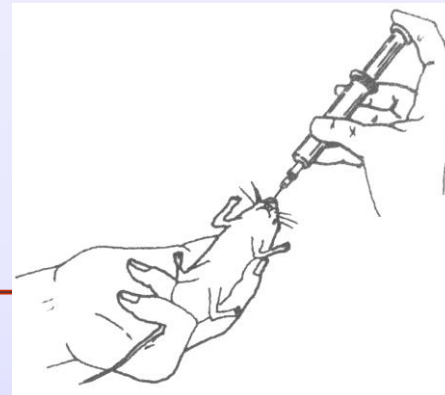
腹腔注射

静脉注射

皮下注射

肌肉注射

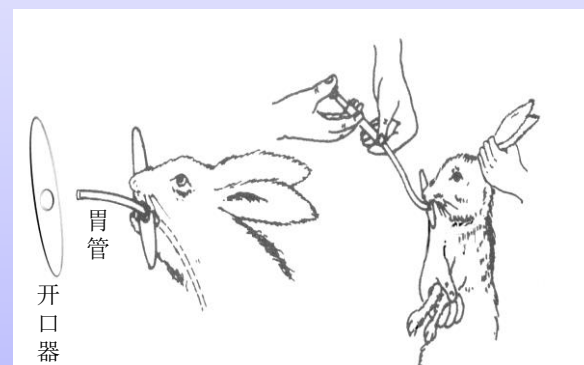
涂布给药法



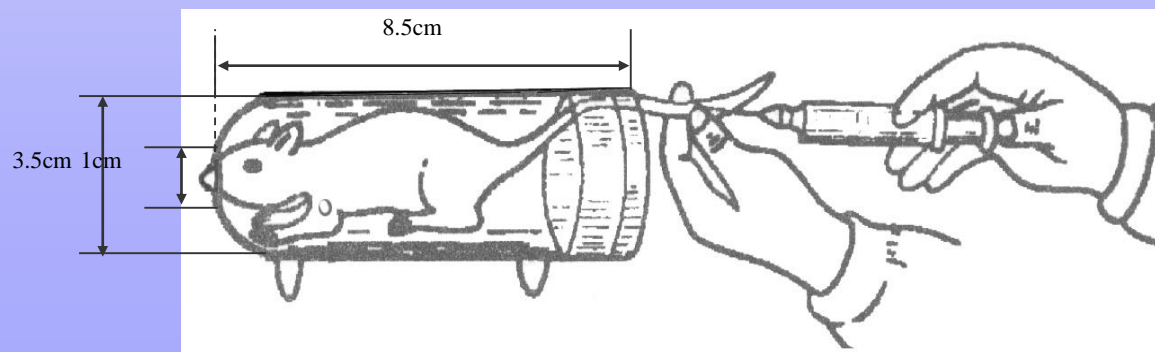
小鼠灌胃法



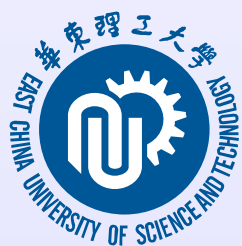
小鼠腹腔注射方法



兔灌胃方法



小鼠尾静脉注射法



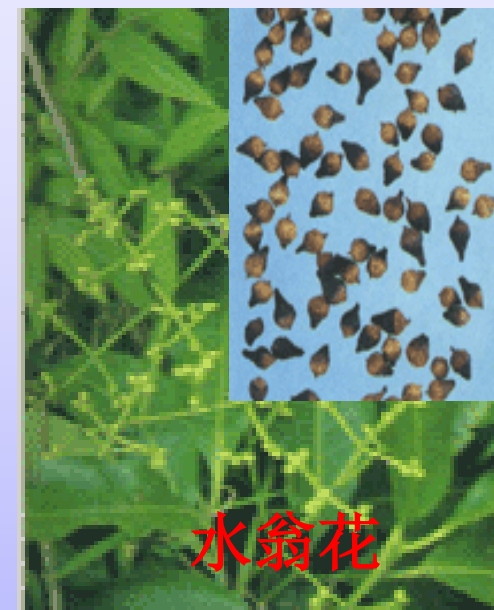
常用药物的最大给药量

动物	项 目	灌 胃	皮下注射	肌肉注射	腹腔注射	静脉注射
大鼠	最大给药量	2mL	1mL	0.4mL	2mL	4mL
	使用针头	16号(钝头)	6号	6号	6号	5号
小鼠	最大给药量	1mL	0.4mL	0.4mL	1mL	0.8mL
	使用针头	9号(钝头)	2号	2号	2号	4号
豚鼠	最大给药量	3mL	1mL	0.5mL	4mL	5mL
	使用针头	16号(钝头)	2号	2号	7号	5号
家兔	最大给药量	20 mL	2mL	2mL	5mL	10mL
	使用针头	10号导尿管	2号	2号	7号	6号

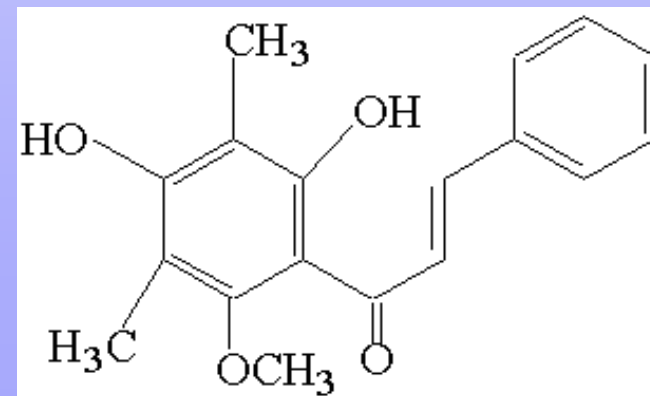
水翁花成分DMC抗肿瘤活性评价

举 例

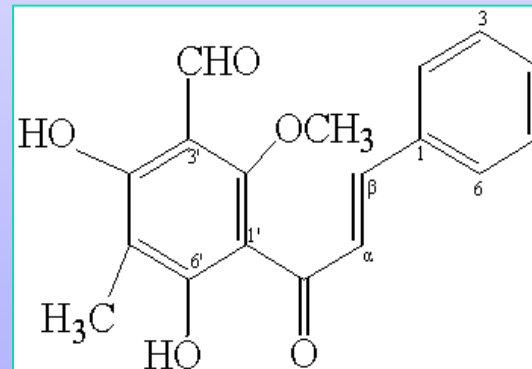
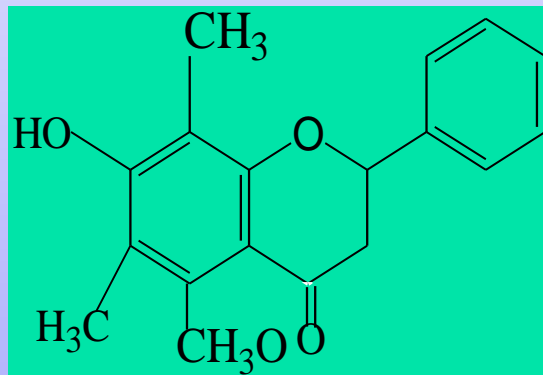
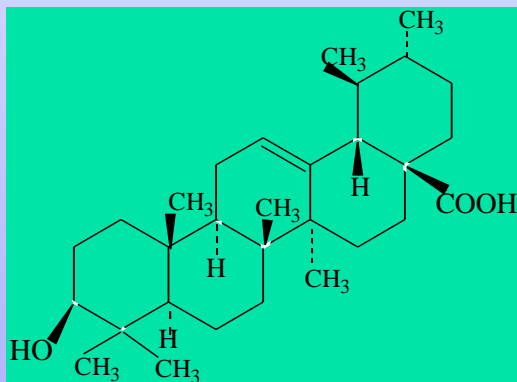
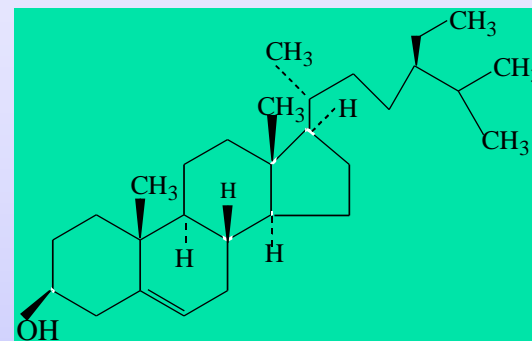
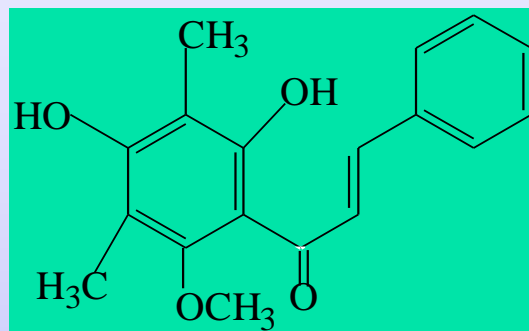
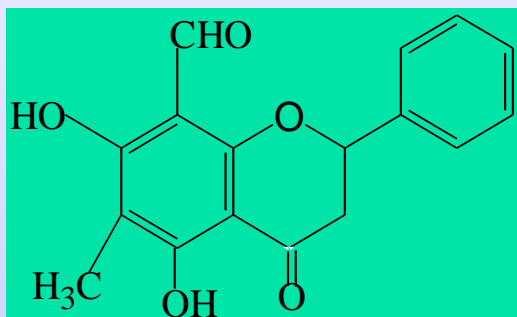
水翁花是桃金娘科植物水翁的花蕾，
味苦、性寒，广东民间常做凉茶应用，具
有清热解毒、消食化滞的功效，也是“清
热凉茶”中成药的主要原料。



2'4'-二羟基-6'-甲氧基-3', 5'-二甲基查耳酮
(DMC)



水翁花中分离纯化到的化学成分

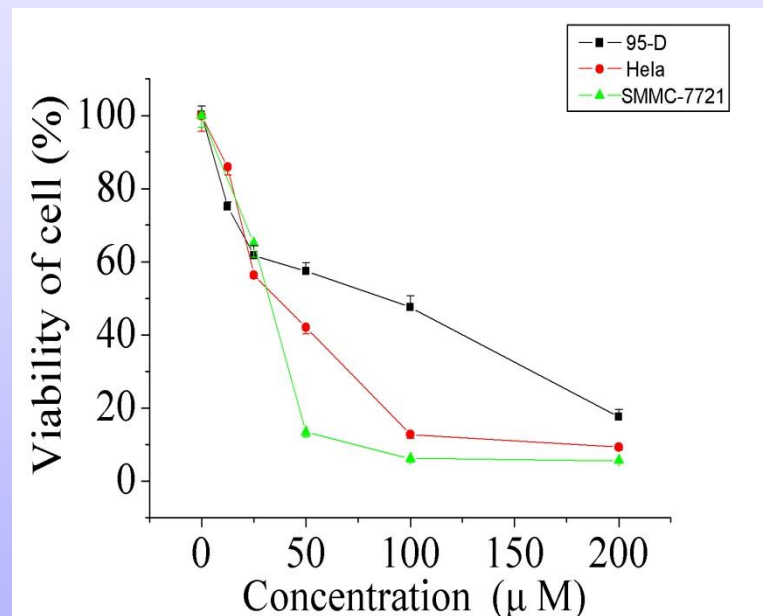
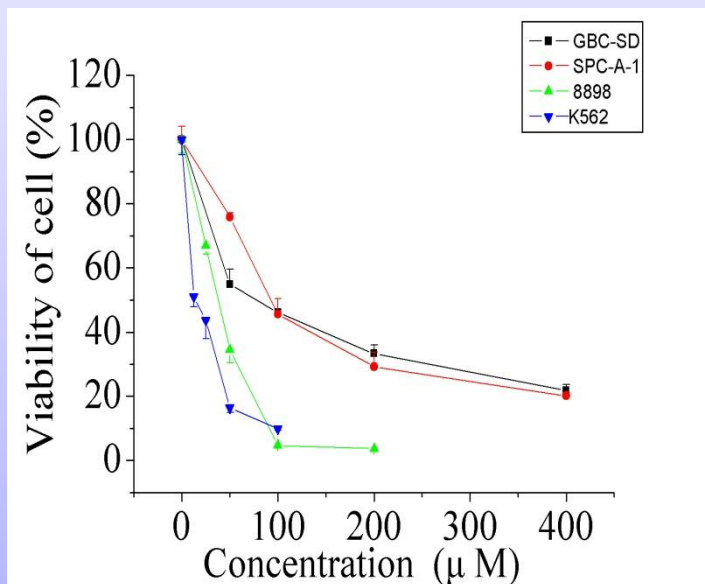


South African Journal of Botany, 2006, 72: 163-166

Phytochemistry, 2004, 65 (4) : 445-447

中国专利公开号: 1544428

DMC 对7株肿瘤细胞的毒性



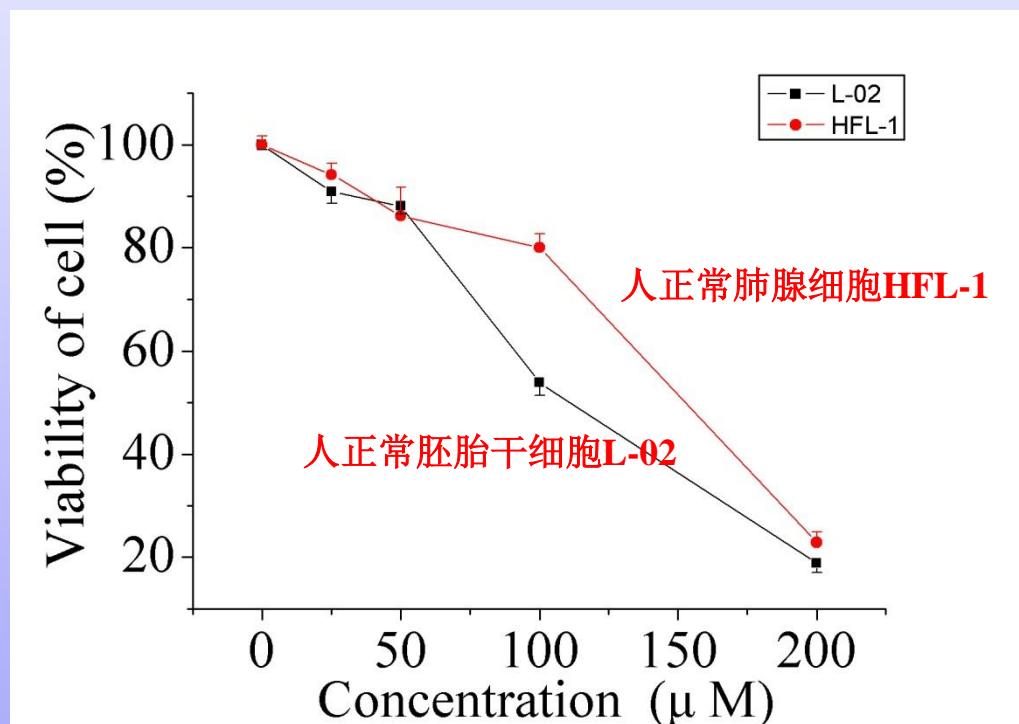
DMC对K562白血病细胞株， Smmc-7721肝癌细胞株有很强的抑制作用 IC_{50} 分别为14. 2uM, 32. 3uM。

Pharmacological Research, 2004,50:505-510;

Cancer Chemotherapy and Pharmacology,2005, 55(5):447-52;

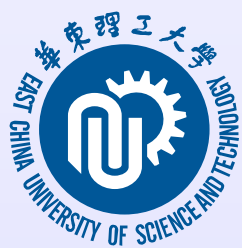
Leukemia Research, 2005,29:887-892

DMC 对正常细胞的毒性



DMC在剂量范围内对正常细胞无显示明显毒性。对人正常胚胎干细胞L-02、人正常肺腺细胞HFL-1的 IC₅₀分别为 111.0uM,152uM.

急性毒性LD₅₀为3800mg/kg，体现了其高效低毒的特点

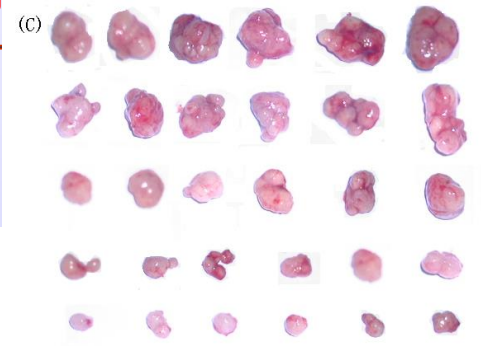
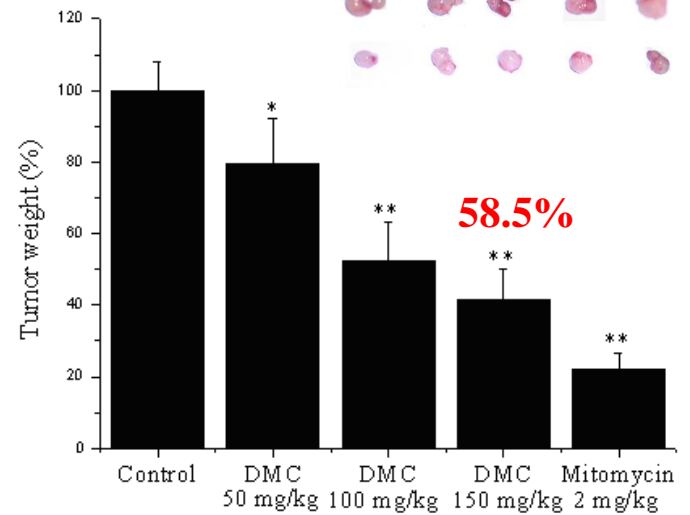
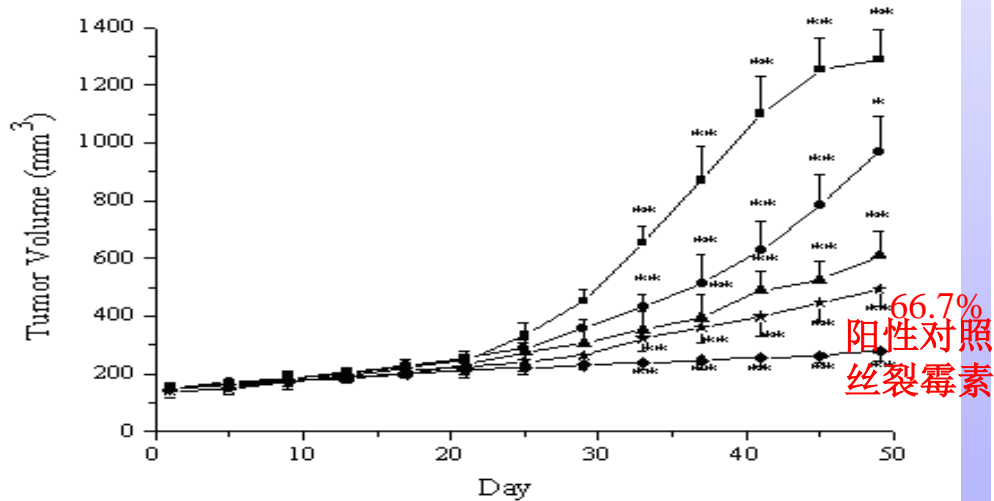


体内试验

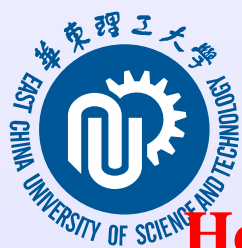
K562肿瘤细胞裸小鼠移植瘤模型的建立



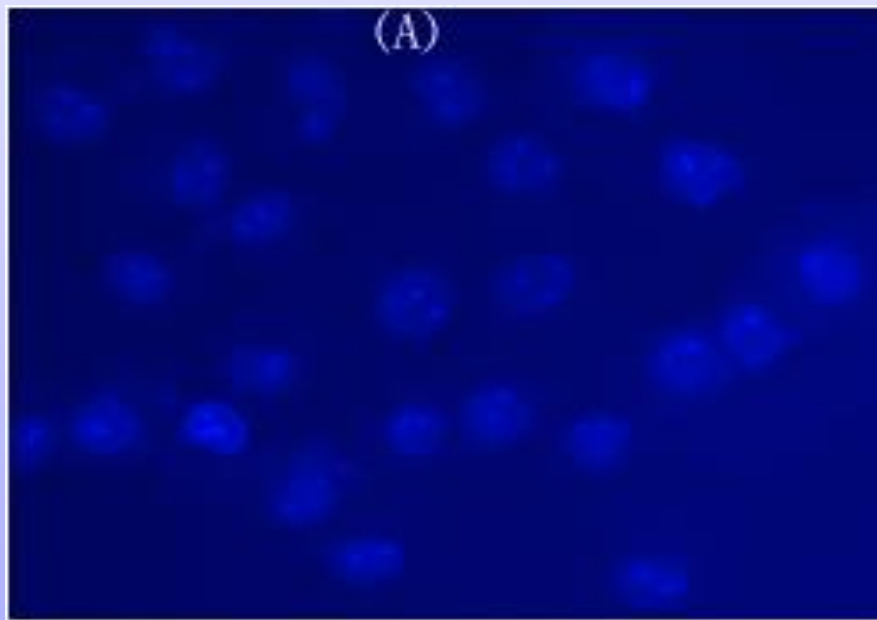
DMC 对K562肿瘤体积和重量的影响



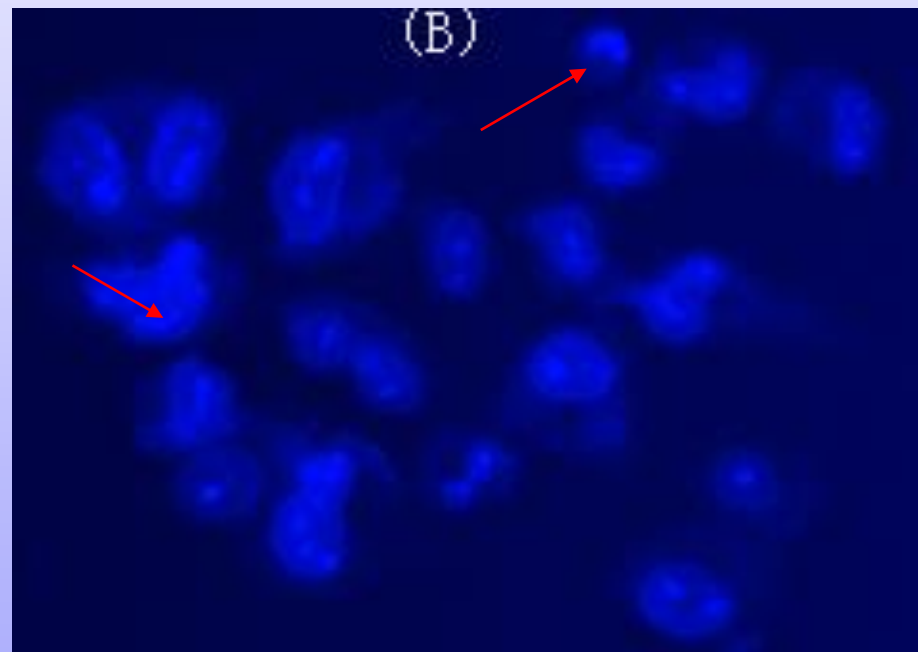
control (■), animals injected with DMC (50 mg/kg, i.p. ●), DMC (100 mg/kg, i.p. ▲), DMC (150 mg/kg, i.p. ★), mitomycin-C (2 mg/kg, i.p.) (◆), each for 10 mice.



Hoechst 33258荧光染色技术检测DMC诱导 K562 细胞凋亡



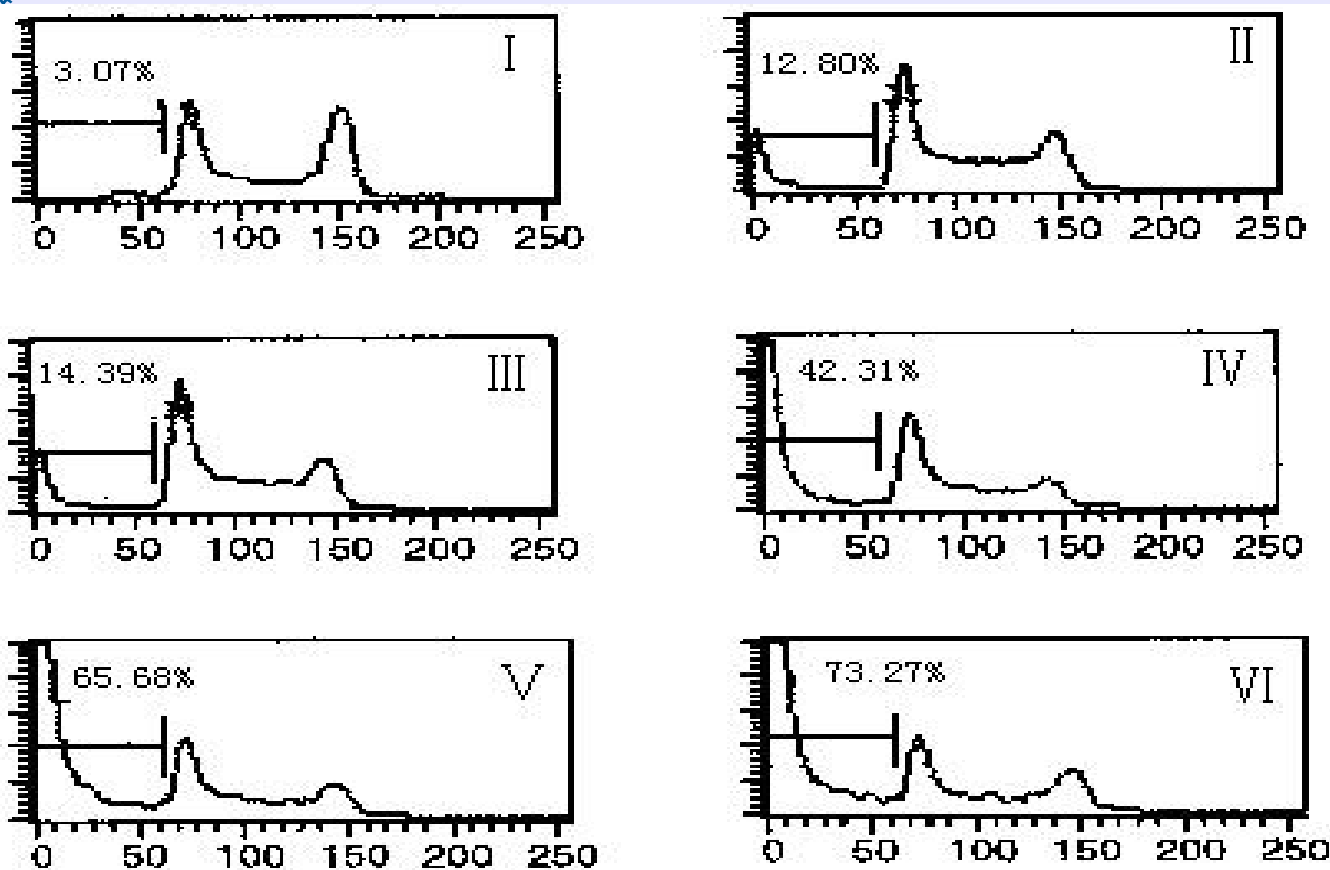
(A)



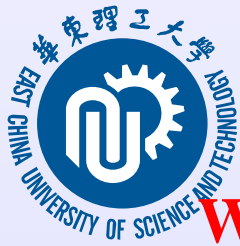
(B)

Control(A), Cells were treated with 8 μ M DMC for 48 h (B)

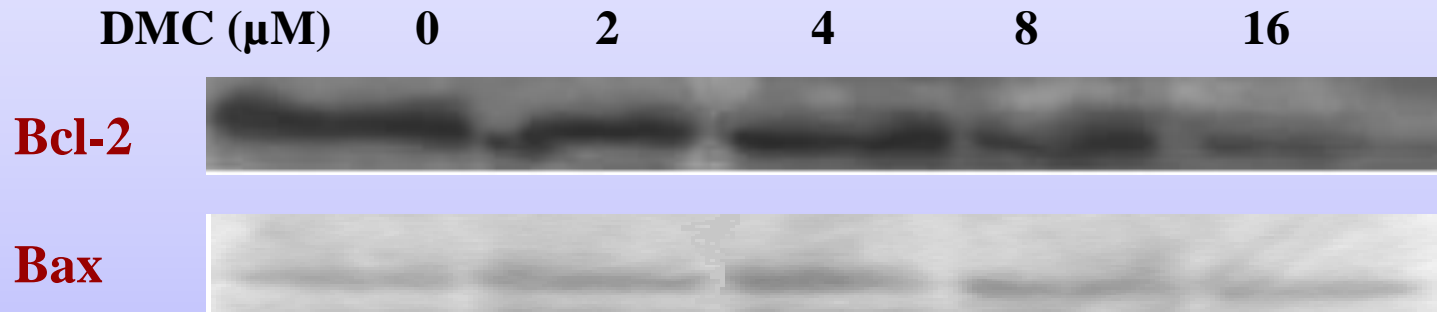
流式细胞术检测DMC诱导 K562 细胞凋亡



Analysis of the DMC induced apoptosis of K562 by flow cytometry. K562 treated with 0 μM (I), 1 μM (II), 2 μM (III), 4 μM (IV), 8 μM (V) and 16 μM (VI) for 48 h.

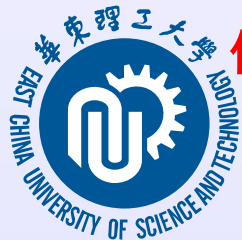


Western blot assay of Bcl-2, Bax protein expression in K562



cells were treated with different concentrations of DMC for 48 hours.

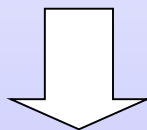
Bcl-2/Bax比值降低，从而诱导细胞凋亡。



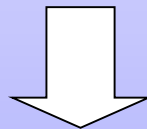
小鼠急性肝损伤实验方法

选取60只昆明种小鼠，体重(25 ± 2)g，随机分成6组，雌雄各半，每组10只。

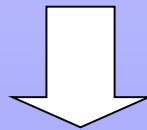
分别设置为空白对照组、模型对照组、阳性药物组、DMC给药组



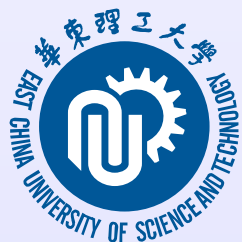
药物配制成混悬液，各给药计量组按10 mL/kg/d剂量灌胃给药，
每日灌胃给药一次，连续7 d



第7d，末次给药2h后，空白对照组腹腔注射花生油10 mL/kg，
其余实验组注射0.1% CCl_4 溶液10 mL/kg



禁食不禁水处理16h后，称量体重，摘眼球取血，
3500 rpm冷冻离心分离15~20 min，测定血清中ALT和AST活性，制作组织切片



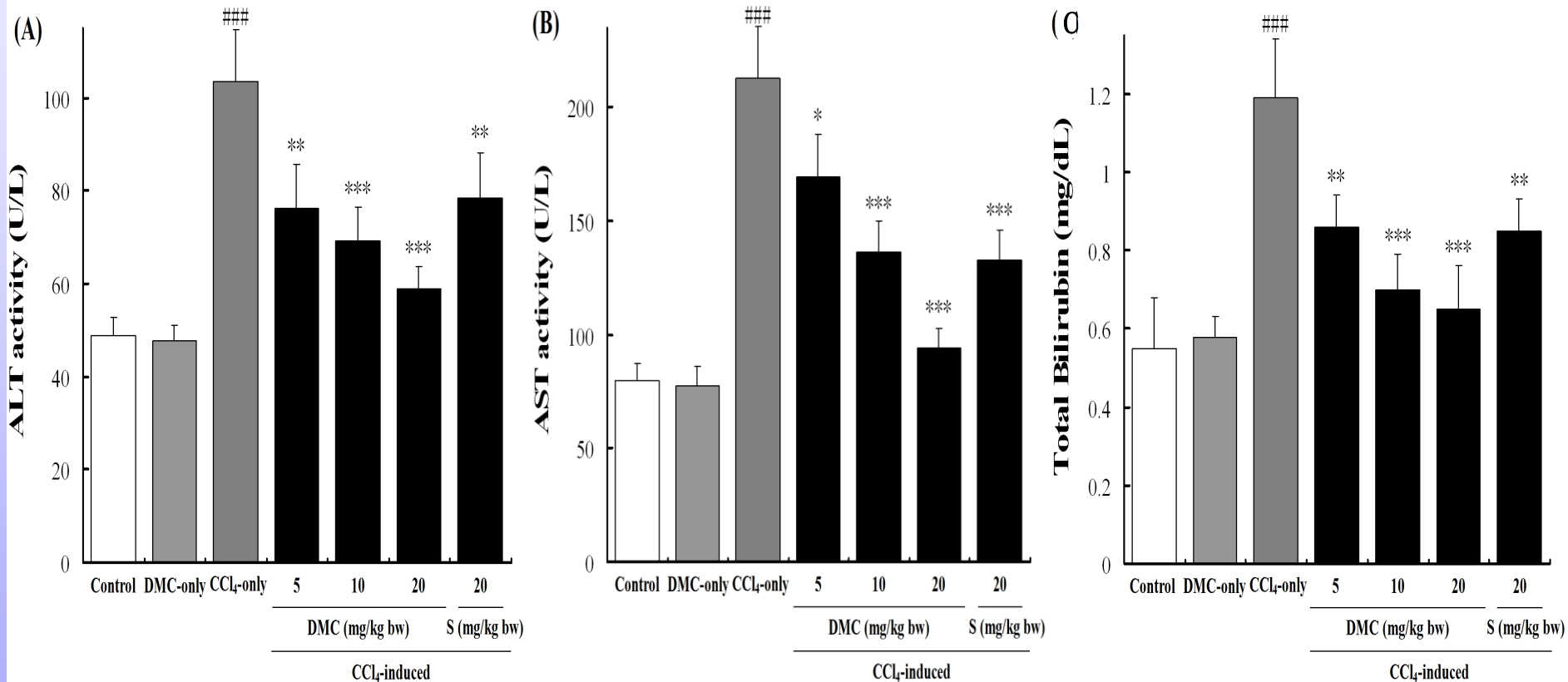
DMC预处理对CCl₄诱导的 急性肝损伤小鼠ALT和AST的影响

Treatment	ALT (U/L)	IR(%)	AST (U/L)	IR(%)
Control	35.4 ± 7.8		58.8 ± 7.6	
CCl ₄	75.7 ± 10.0 ###		153.1 ± 22.6 ###	
CCl ₄ + DMC (3 mg/kg bw)	57.3 ± 4.6 **	45.7	107.8 ± 12.9 **	48.0
CCl ₄ + DMC (9 mg/kg bw)	52.8 ± 11.2 **	56.8	95.9 ± 14.1 **	60.7
CCl ₄ + DMC (15 mg/kg bw)	40.9 ± 7.7 ***	86.4	68.2 ± 8.0 ***	90.0
CCl ₄ + BDP (9 mg/kg bw)	42.8 ± 7.5 ***	81.6	74.2 ± 14.6 ***	83.7

$P < 0.001$ as compared with control group, *** $P < 0.001$ and ** $P < 0.01$ as compared with CCl₄-induced group. IR is the inhibition ratio.

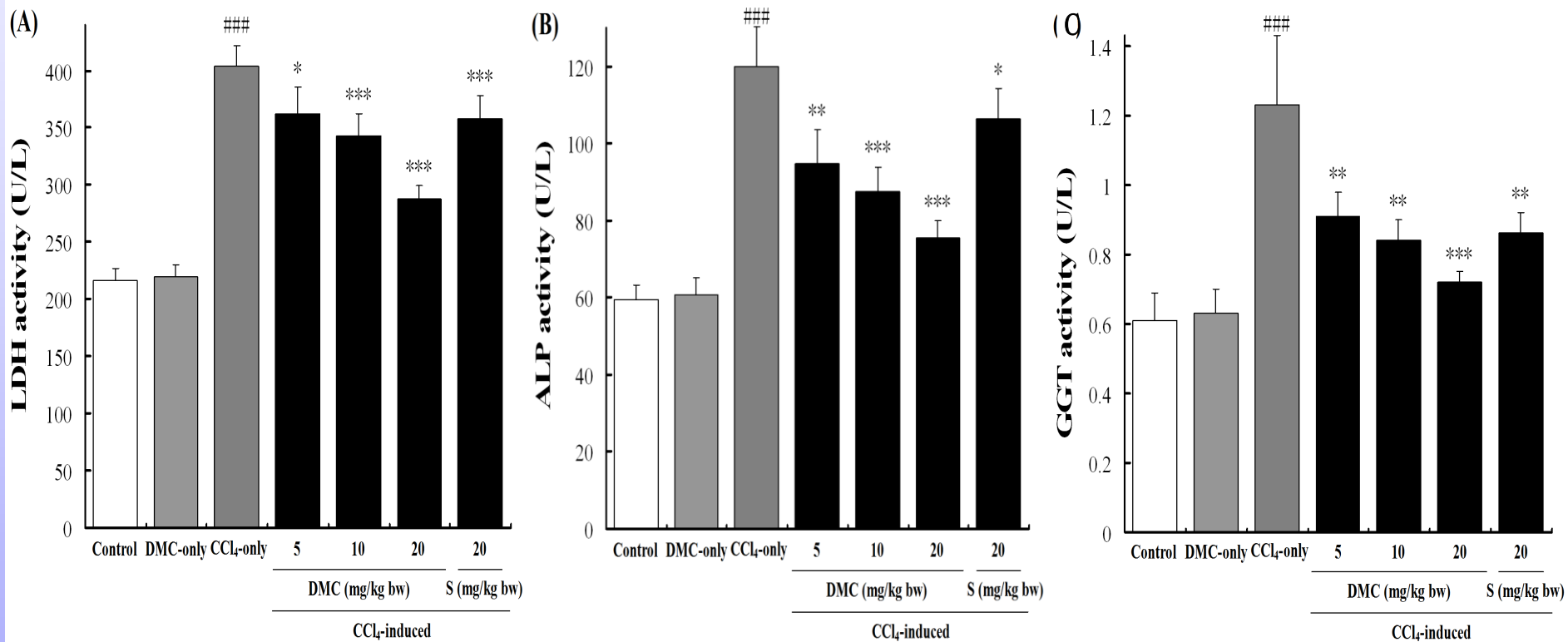
- ◆ AST: 天冬氨酸氨基转移酶
- ◆ DMC(15 mg/kg bw) 预处理分别有效降低血清中ALT和AST的酶活86.4%和90.0%, 作用效果优于阳性药物BDP, 且具有剂量依赖性
- ◆ 证明DMC具有保肝护肝作用

DMC对CCl₄诱导的急性肝损伤小鼠 肝脏组织损坏的影响



- ◆ 肝脏组织损坏程度指标：ALT、AST、T-Bili(总胆红素)
- ◆ DMC(20 mg/kg bw) 分别有效降低血清中ALT、AST和T-Bili的含量，作用效果优于同等剂量阳性药物Silymarin，且具有剂量依赖性
- ◆ 表明DMC可保护CCl₄损伤细胞的结构

DMC对CCl₄诱导的急性肝损伤小鼠 肝细胞膜破坏的影响



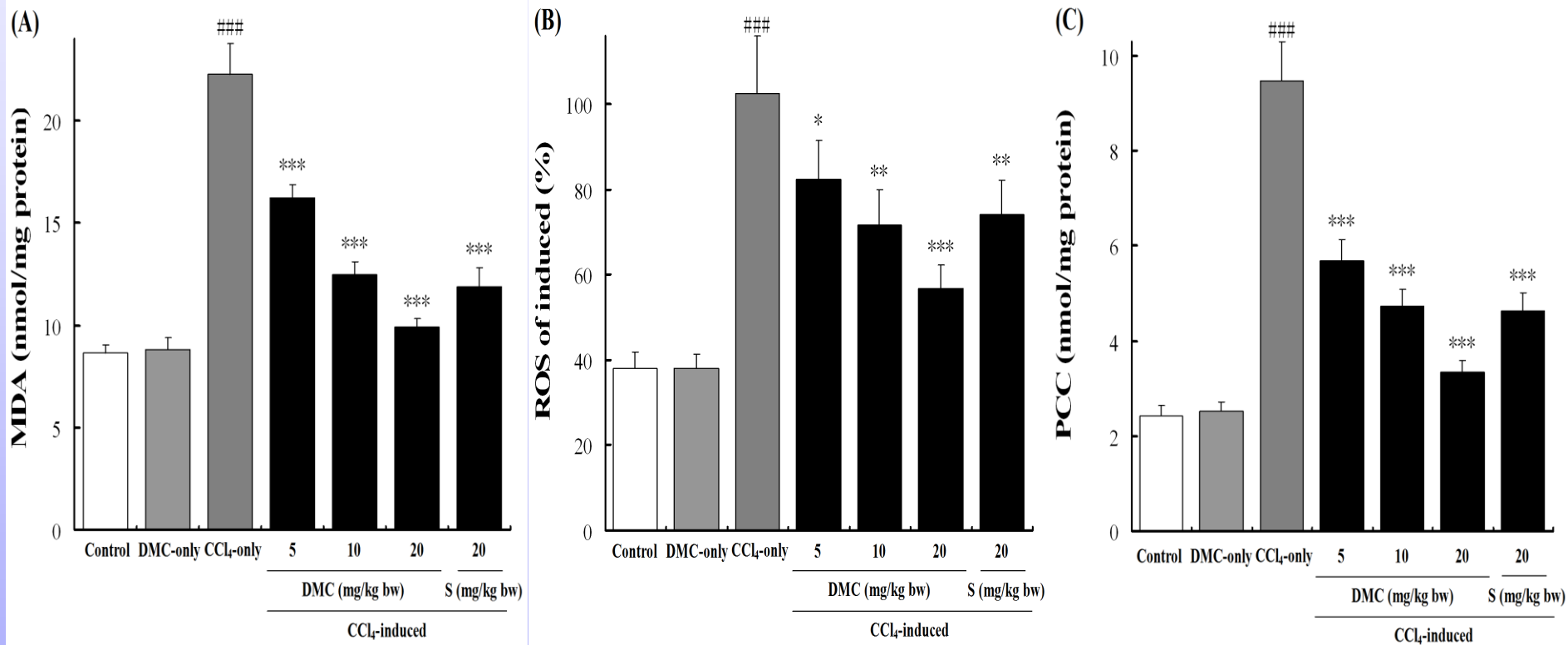
◆ 肝脏细胞膜结构破坏程度指标:

LDH(乳酸脱氢酶)、ALP(碱性磷酸酶)、GGT(γ -谷氨酰胺转移酶)

◆ DMC(20 mg/kg bw) 分别有效降低血清中LDH、ALP和GGT的酶活, 作用效果优于同等剂量阳性药物Silymarin, 且具有剂量依赖性。

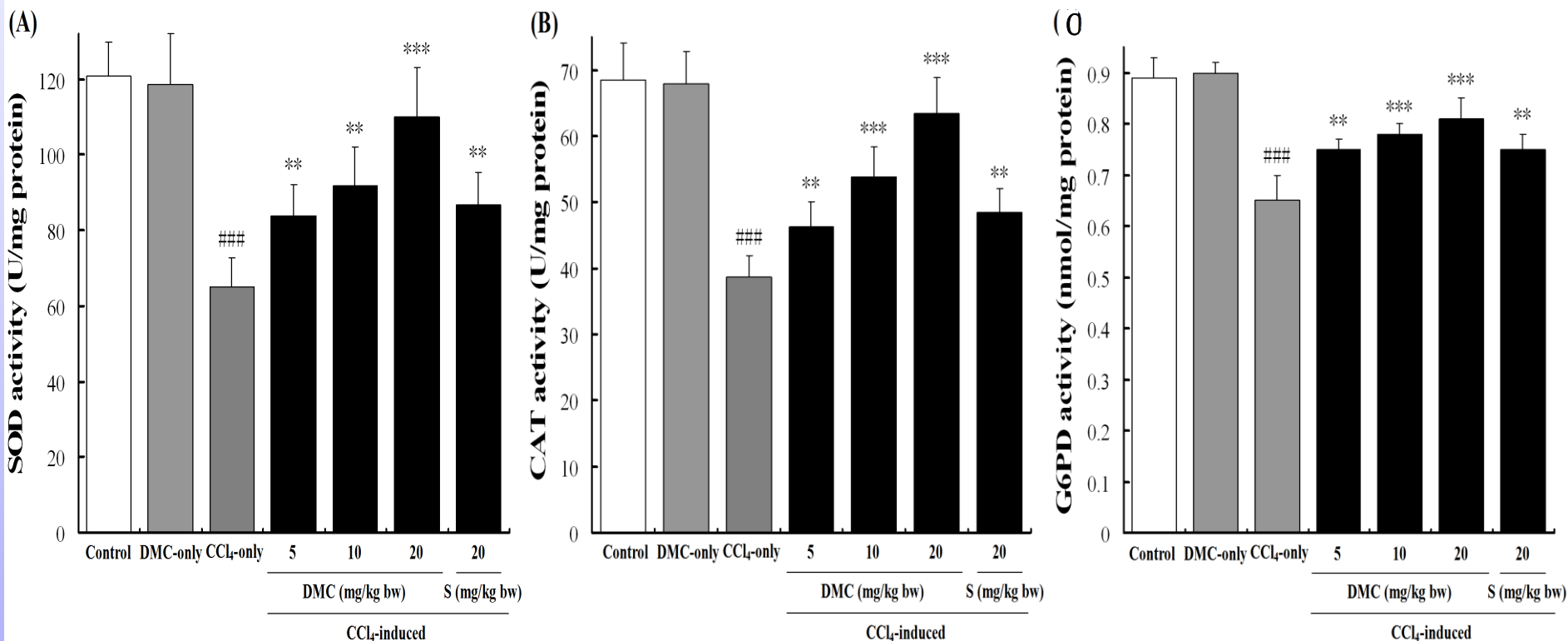
◆ 表明DMC可保护CCl₄损伤细胞膜结构的稳定性

DMC对CCl₄诱导的急性肝损伤小鼠 肝脏脂质过氧化的影响



- ◆ 肝组织脂质过氧化程度指标:MDA(丙二醛)、ROS(活性氧)、PCC(蛋白质羰基)
- ◆ DMC(20 mg/kg bw) 分别有效减少肝脏组织中MDA、ROS和PCC的含量, 作用效果优于同等剂量阳性药物Silymarin, 且具有剂量依赖性
- ◆ 表明DMC能增强细胞内抗脂质过氧化的能力, 并改善CCl₄造成的脂质过氧化

DMC对CCl₄诱导的急性肝损伤小鼠 肝脏酶类抗氧化剂的影响



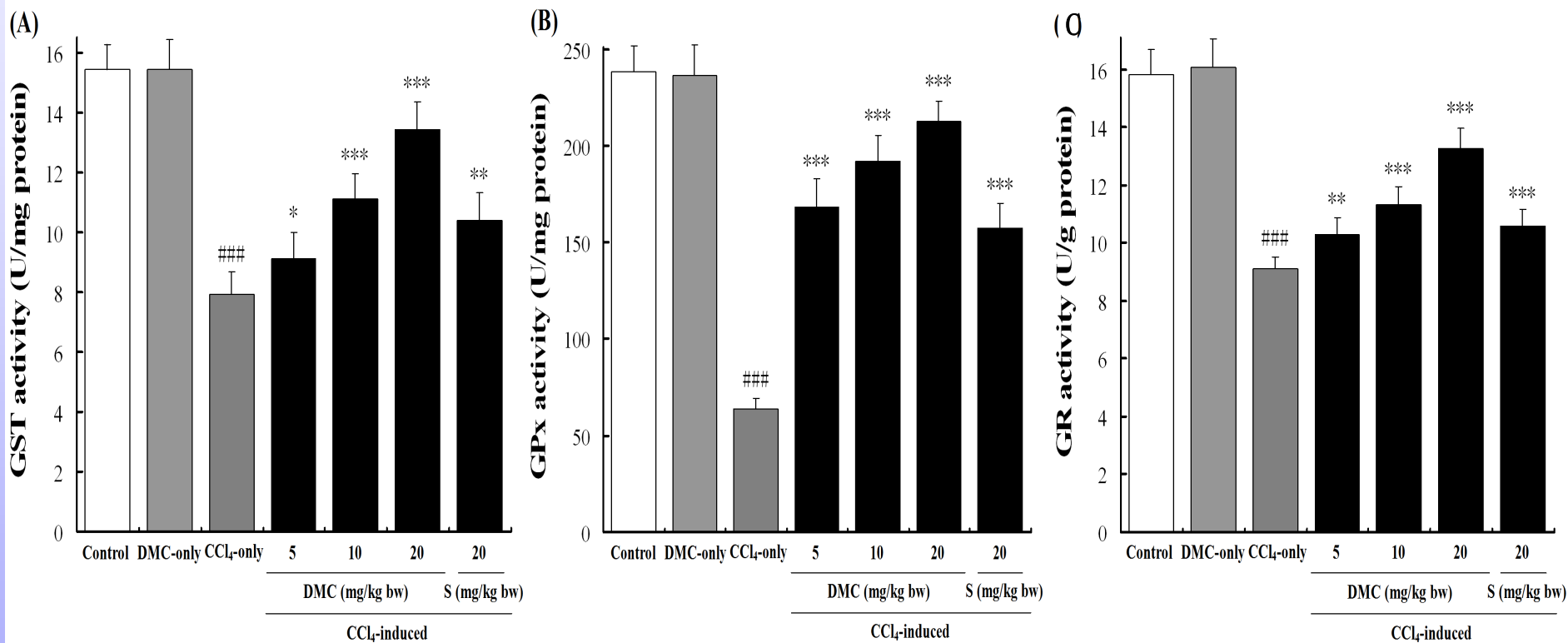
◆ 肝脏组织酶抗氧化剂指标:

SOD(超氧化物歧化酶)、CAT(过氧化氢酶)、G6PD(葡萄糖-6-磷酸盐脱氢酶)

◆ DMC(20 mg/kg bw)分别有效增加肝脏组织中SOD、CAT和G6PD的酶活, 作用效果优于同等剂量阳性药物Silymarin, 且具有剂量依赖性

◆ 表明DMC可减弱组织细胞的氧化应激压力

DMC对CCl₄诱导的急性肝损伤小鼠 肝脏酶类抗氧化剂的影响



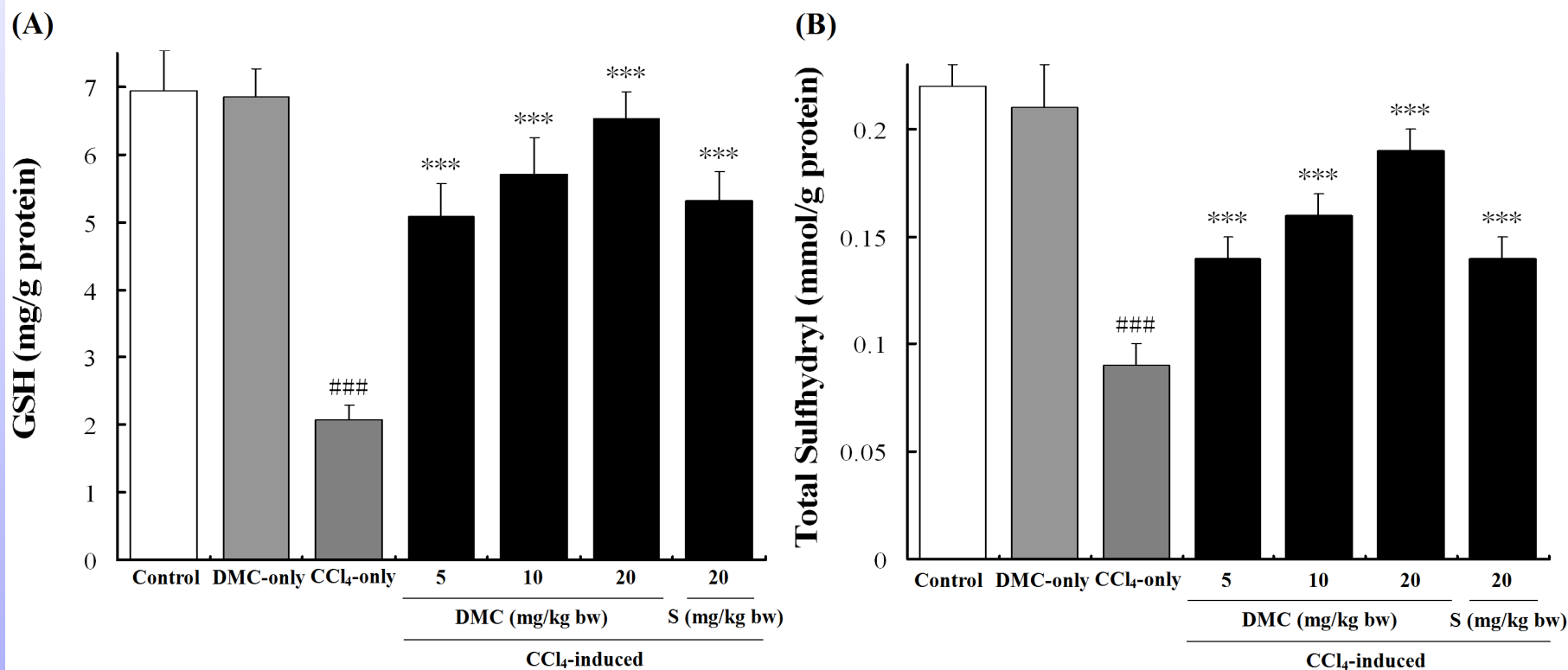
◆ 肝脏组织酶抗氧化剂指标:

GST(谷胱甘肽-S-转移酶)、**GPx**(谷胱甘肽过氧化物酶)、**GR**(谷胱甘肽还原酶)

◆ **DMC**(20 mg/kg bw)分别有效增加肝脏组织中**GST**、**GPx**和**GR**的酶活，作用效果优于同等剂量阳性药物**Silymarin**，且具有剂量依赖性

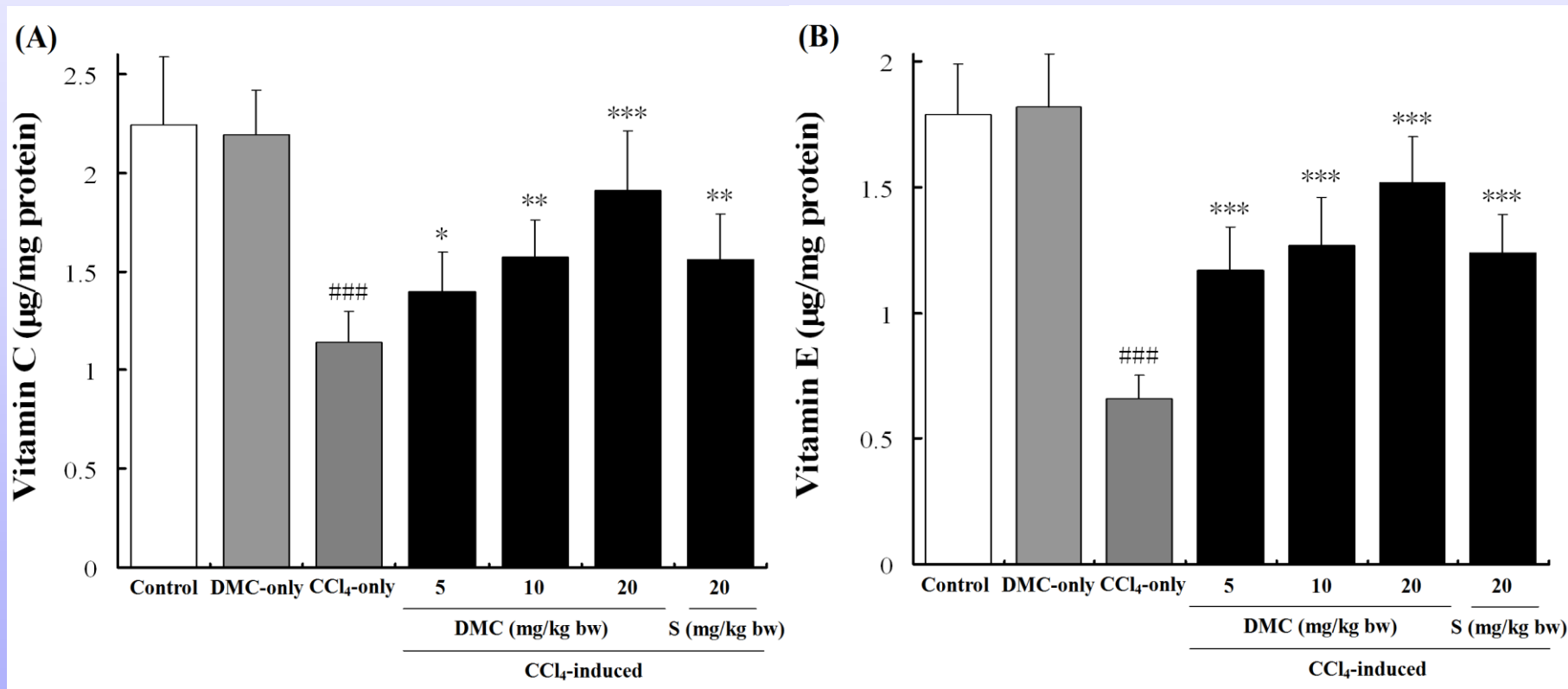
◆ 表明**DMC**可减弱组织细胞的氧化应激压力

DMC对CCl₄诱导的急性肝损伤小鼠 肝脏非酶类抗氧化剂的影响

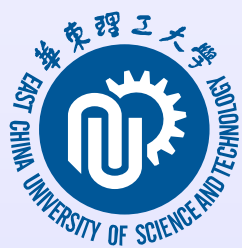


- ◆ 肝脏组织非酶抗氧化剂指标:GSH(还原型谷胱甘肽)、TSH(总巯基团)
- ◆ DMC(20 mg/kg bw)分别有效提高肝脏组织中GSH和TSH的含量91.4%和76.9%, 作用效果优于同等剂量阳性药物Silymarin, 且具有剂量依赖性
- ◆ 表明DMC能有效增加机体抗氧化性

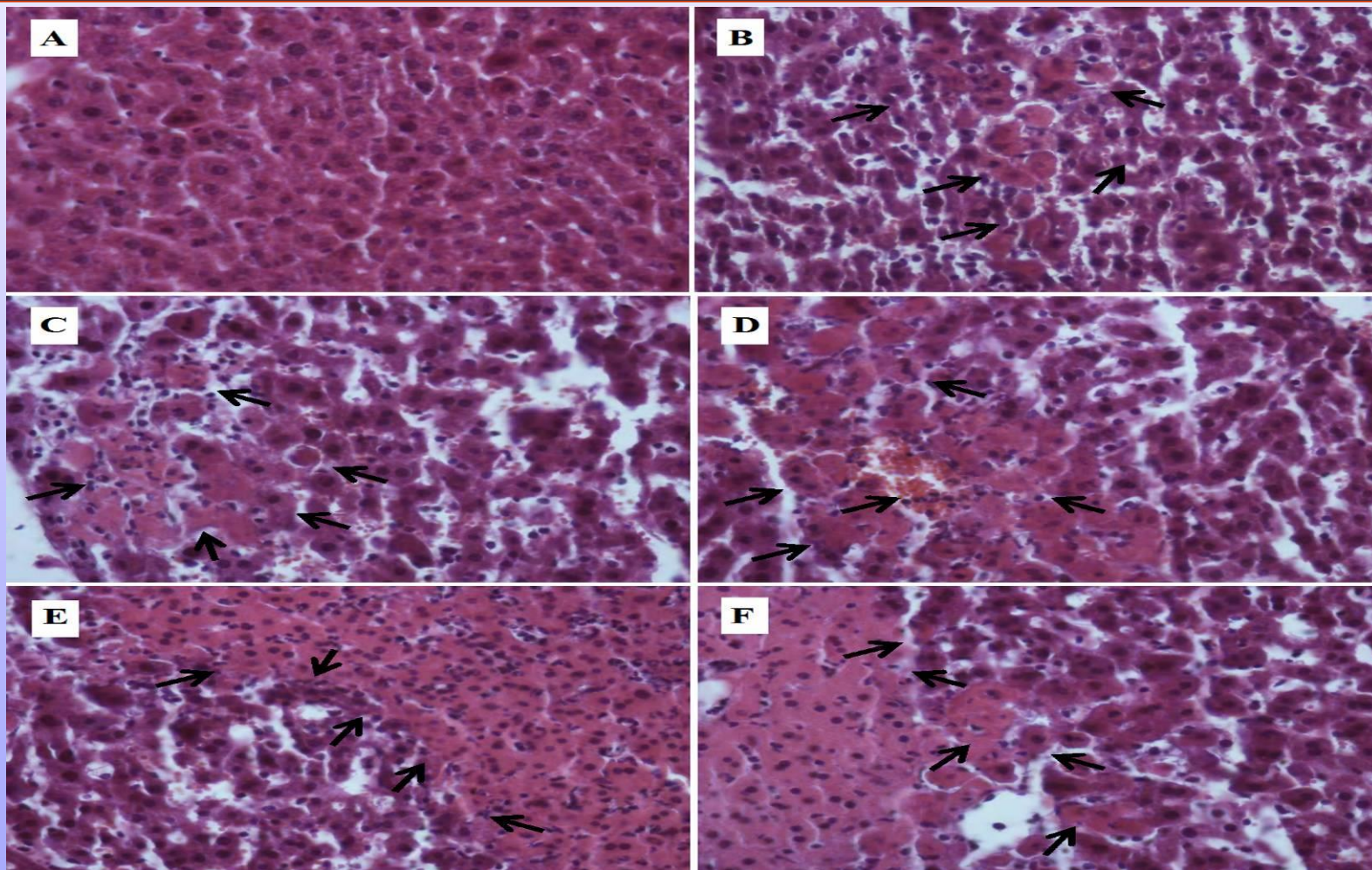
DMC对CCl₄诱导的急性肝损伤小鼠 肝脏非酶类抗氧化剂的影响



- ◆ 肝脏组织非酶抗氧化剂指标:V_C(维生素C)、V_E(维生素E)
- ◆ DMC(20 mg/kg bw)分别有效提高肝脏组织中V_C和V_E的含量70.0%和76.1%,作用效果优于同等剂量阳性药物Silymarin,且具有剂量依赖性
- ◆ 表明DMC能有效增加机体抗氧化性

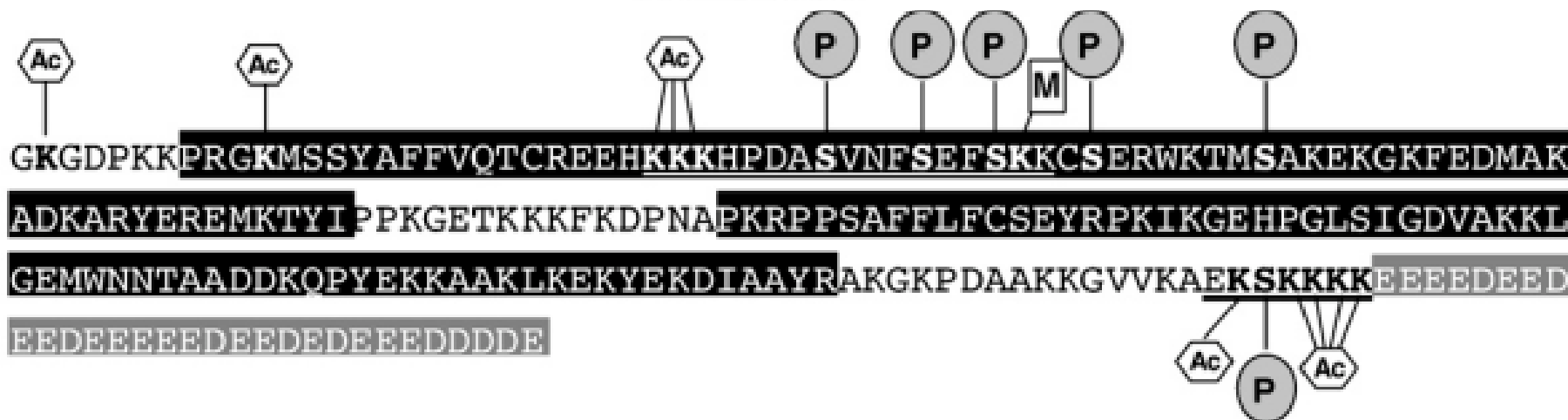
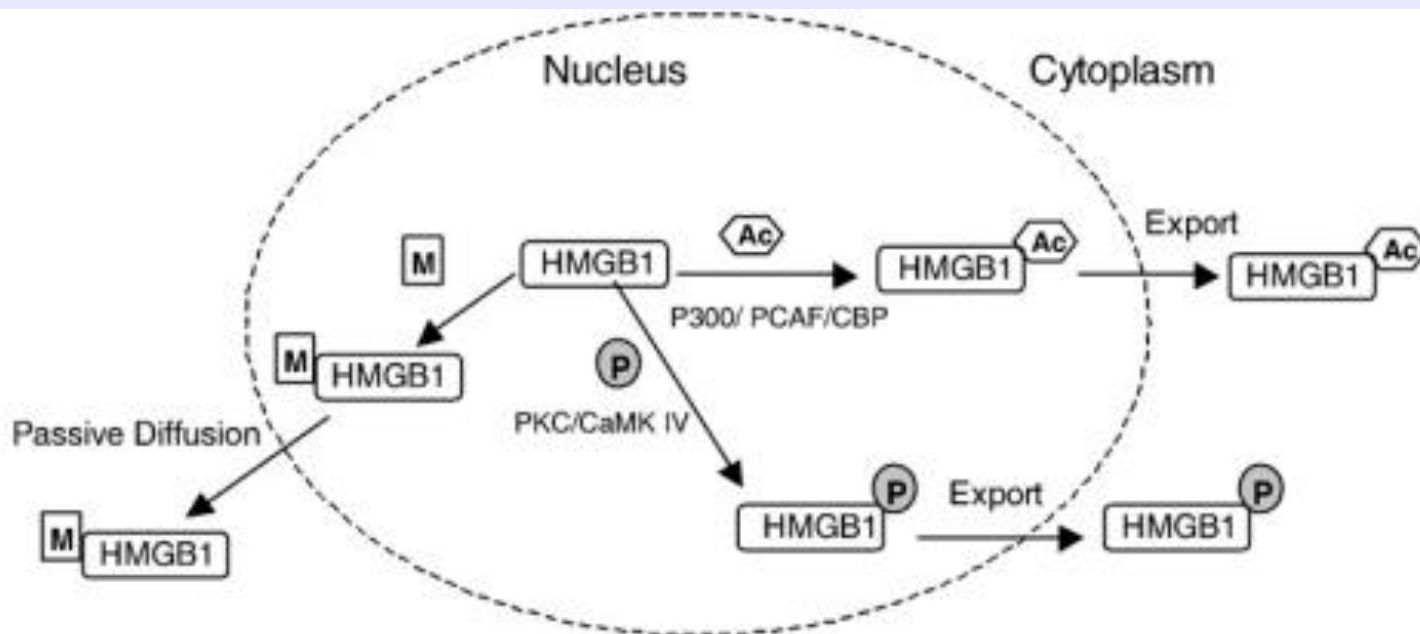


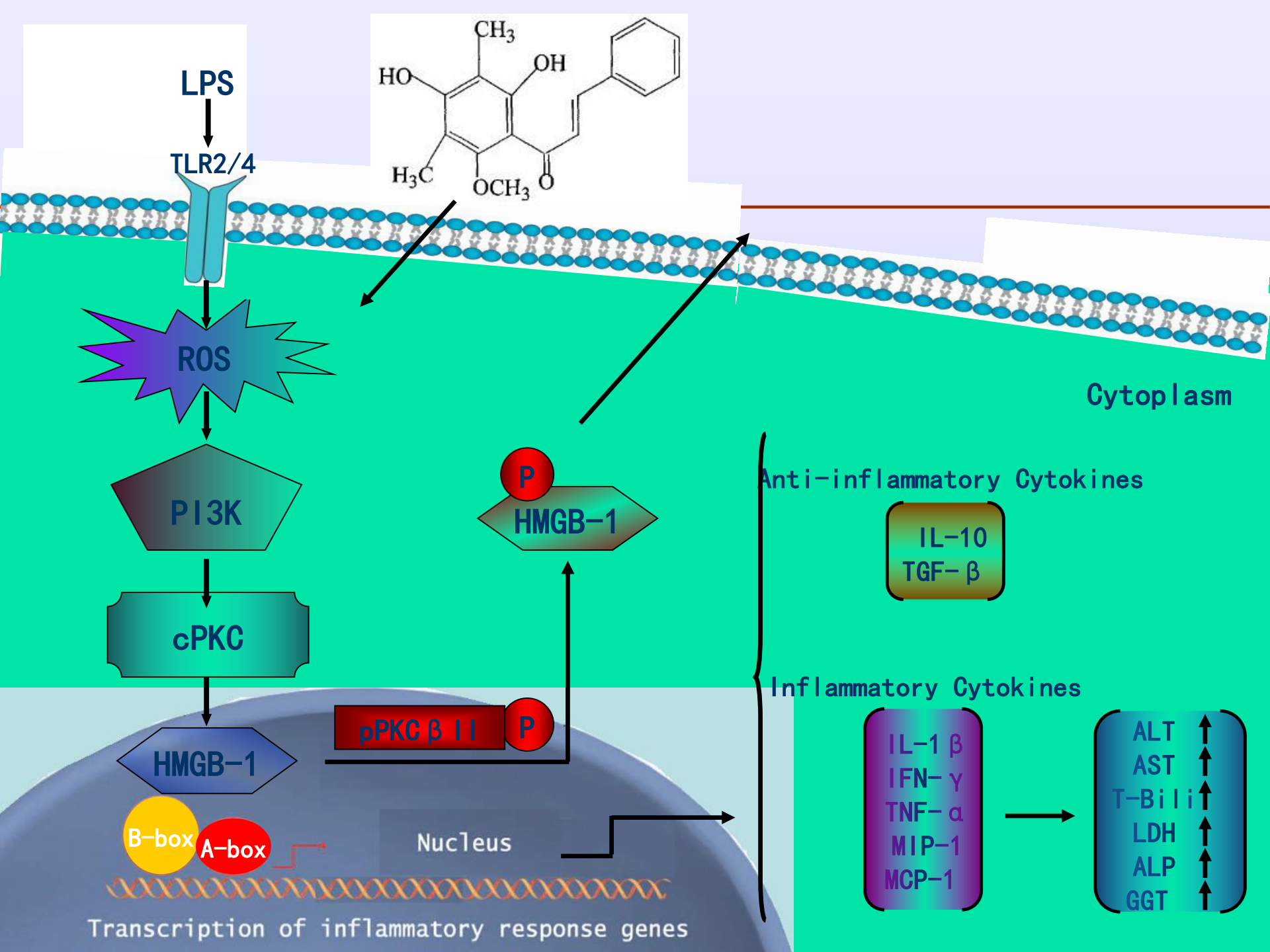
DMC预处理对CCl₄诱导的急性肝损伤小鼠的组织病理学影响



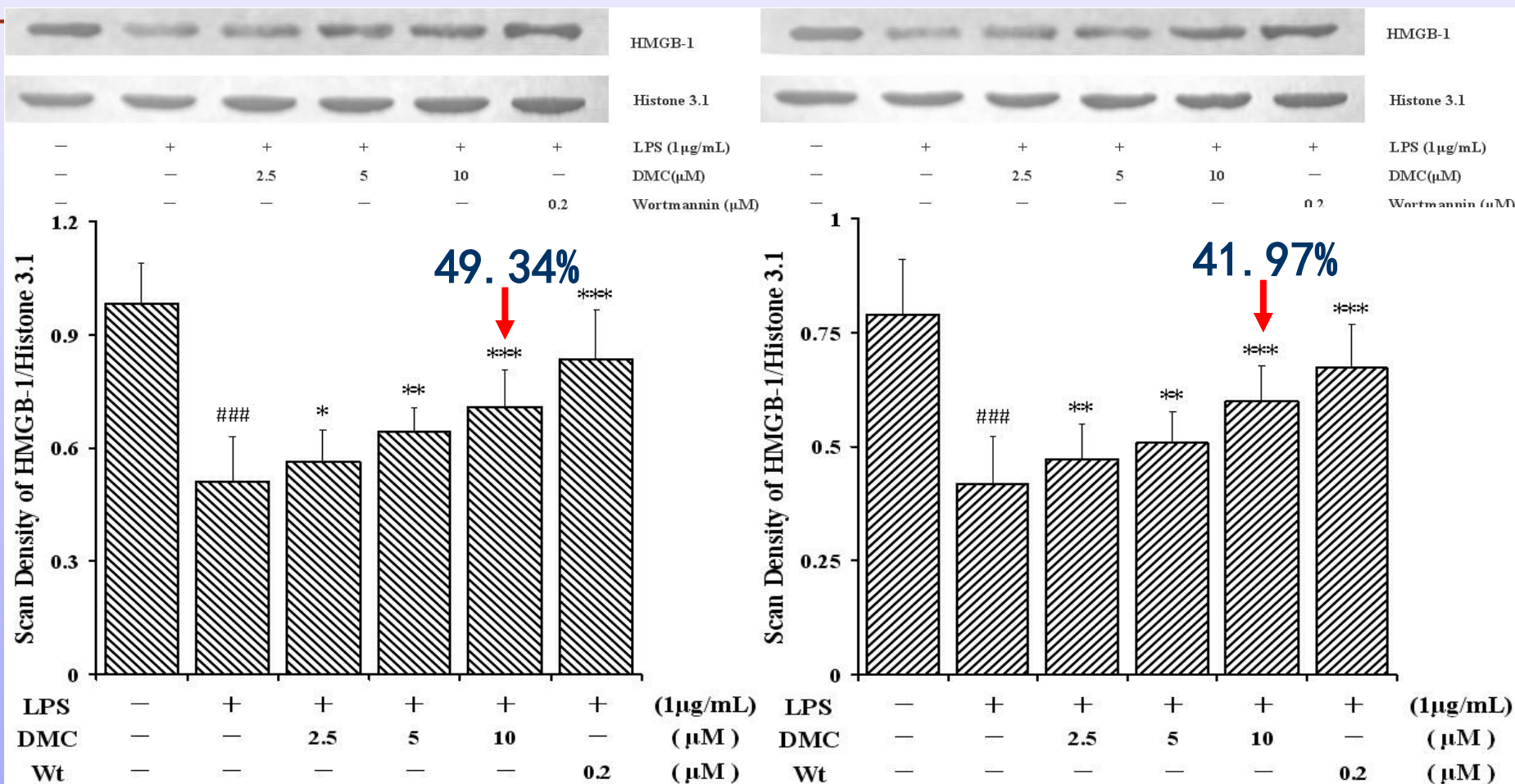
(A) 空白组; (B) CCl₄-only 模型组; (C) DMC低剂量组 (3 mg/kg bw); (D) DMC中剂量组 (9 mg/kg bw); (E) DMC高剂量组 (15 mg/kg bw); (F) BDP阳性药物组 (9 mg/kg bw)

核蛋白HMGB-1及其信号途径





DMC对细胞核中HMGB-1的影响

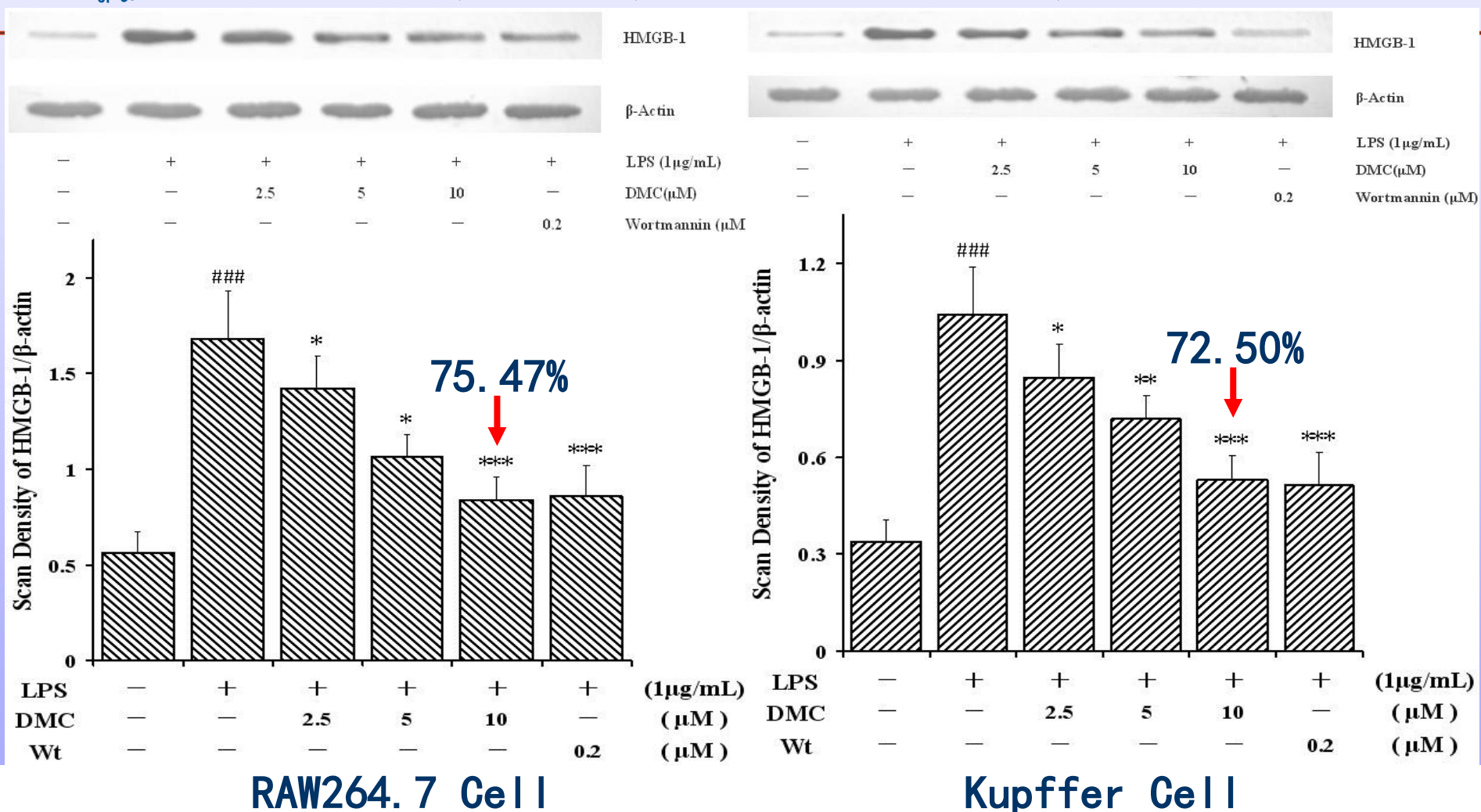


RAW264.7 Cell

Kupffer Cell

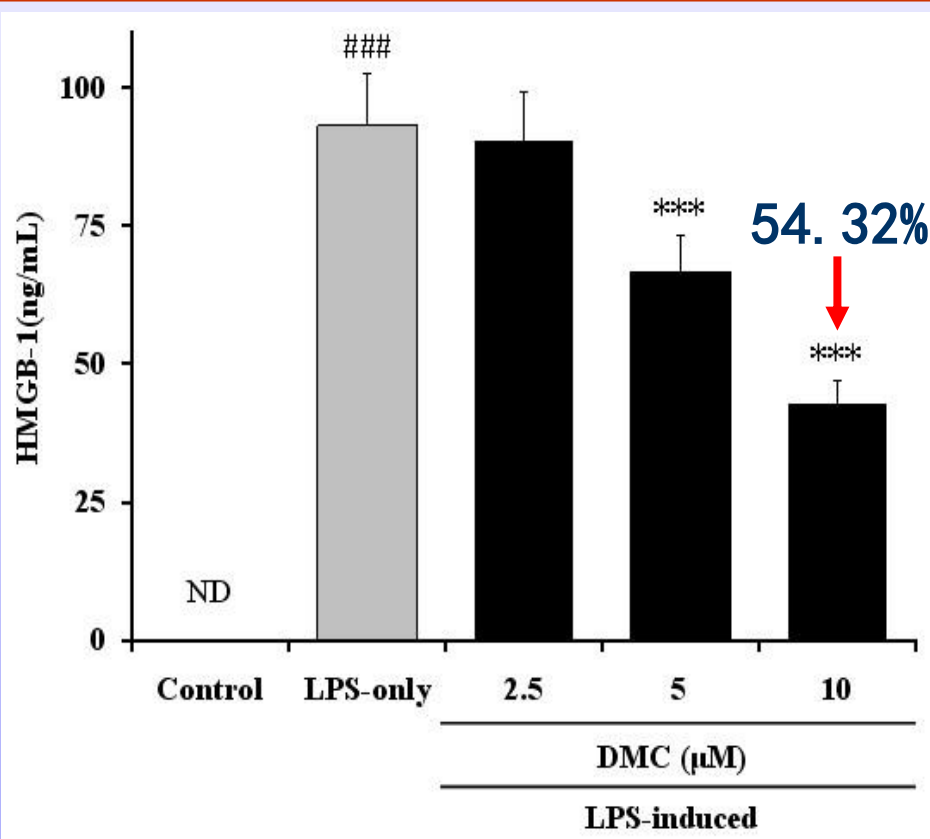
DMC具有抑制RAW264.7和KupfferCell细胞核中HMGB-1向细胞质中转移的作用

DMC对细胞质中HMGB-1的影响

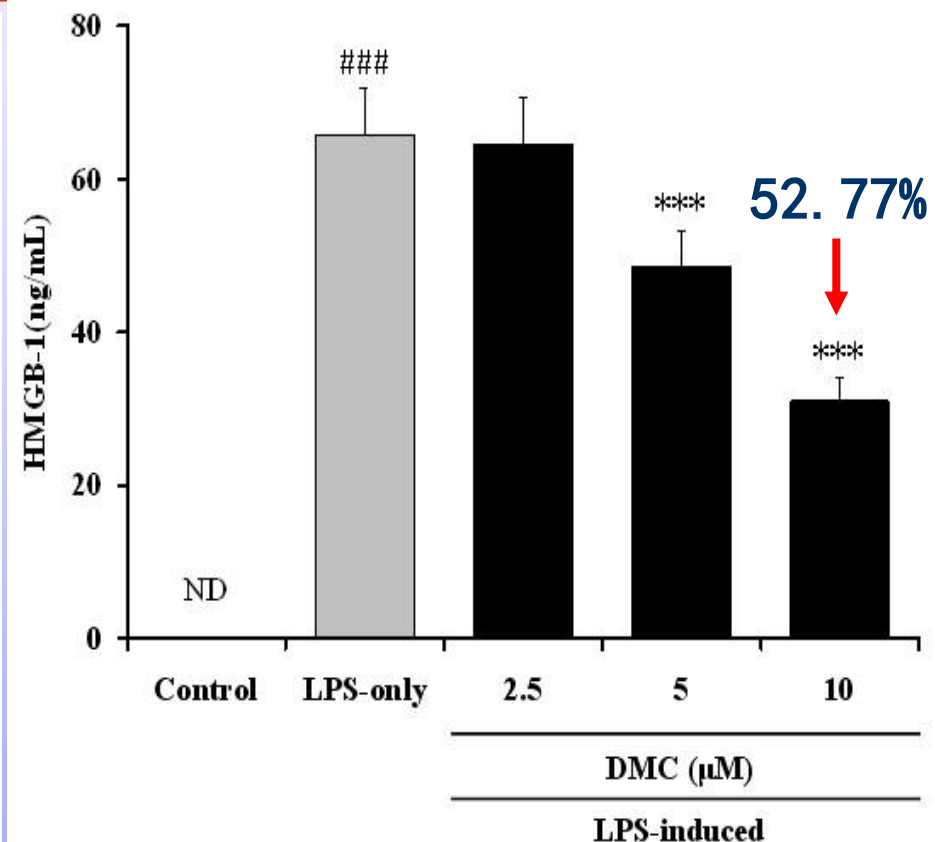


DMC具有抑制RAW264.7 Cell和Kupffer Cell细胞质中HMGB-1表达的作用

DMC抑制HMGB-1的胞外释放



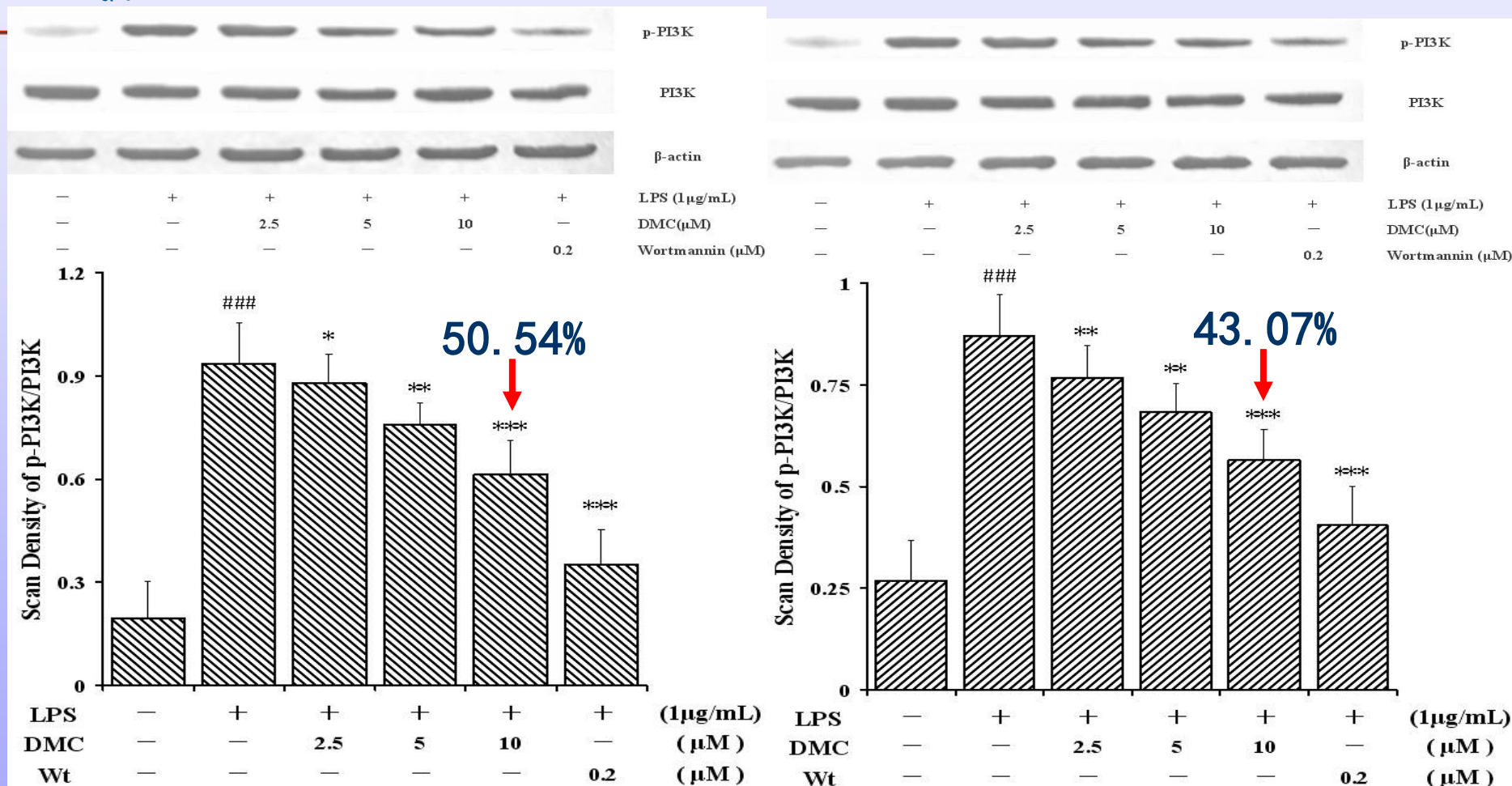
RAW264.7 Cell



Kupffer Cell

DMC具有抑制RAW264.7 Cell和Kupffer Cell胞外HMGB-1释放的作用

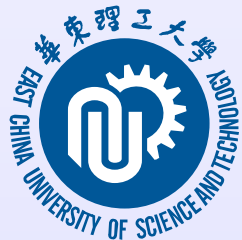
DMC对细胞质中PI3K/p-PI3K的影响



RAW264.7 Cell

Kupffer Cell

DMC具有抑制RAW264.7 Cell和Kupffer Cell细胞质中PI3K磷酸化的作用



动物安全性评价

异常毒性

有别于药物本身所具有的毒性特征，是指生产过程中引入或其它原因所导致的毒性。

操作：给予小鼠一定剂量的供试品溶液，在规定时间内（48h）观察小鼠出现的死亡情况。

附录 XI C 异常毒性检查法

本法系将一定剂量的供试品溶液注入小鼠体内或口服给药，在规定时间内观察小鼠死亡情况，以判定供试品是否符合规定的一种方法。

供试用的小鼠应健康合格，体重 17~20g，在试验前及试验的观察期内，均应按正常饲养条件饲养。作过本试验的小鼠不得重复使用。

供试品溶液的配制 除另有规定外，用氯化钠注射液按各药品项下规定的浓度制成供试品溶液。

检查法 除另有规定外，取上述小鼠 5 只，按各药品项下规定的给药途径，每只小鼠分别给予供试品溶液 0.5ml。给药途径分为以下几种。

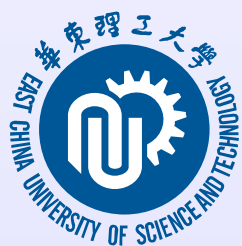
静脉注射 将供试品溶液注入小鼠尾静脉，应在 4~5 秒匀速注射完毕。

腹腔注射 将供试品溶液注入小鼠腹腔。

皮下注射 将供试品溶液注入小鼠腹部或背部两侧皮下。

口服给药 将供试品溶液通过适宜的导管，灌入小鼠胃中。

结果判断 除另有规定外，全部小鼠在给药后 48 小时内不得有死亡；如有死亡时，应另取体重 18~19g 的小鼠 10 只复试，全部小鼠在 48 小时内不得有死亡。

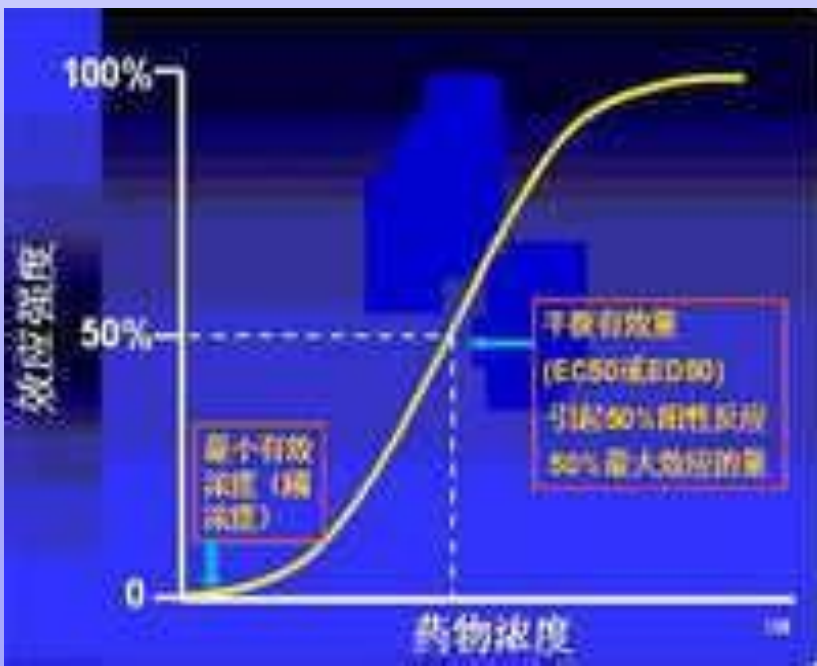


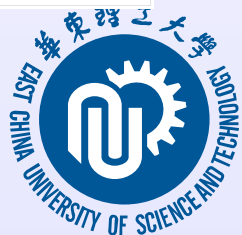
急性毒性

急性毒性：是指机体（人或实验动物）一次（或24小时内多次）接触外来化合物之后所引起的中毒效应，甚至引起死亡。通常为小鼠或大鼠采用经口、吸入或经皮染毒途径。急性毒性试验主要测定**半数致死量（浓度）**，观察急性中毒表现。

半数致死量（LD₅₀，lethal dose 50%）：是指能杀死一半试验总体之有毒物质或游离辐射的剂量（一般要求观察**14天**总死亡数）。是评价化学物质急性毒性大小最重要的参数，也是对不同化学物质进行急性毒性分级的基础标准。化学物质的急性毒性越大，其LD₅₀的数值越小。

LD₅₀ 越大越好，就是说浓度要很高很高才会导致半数死亡。





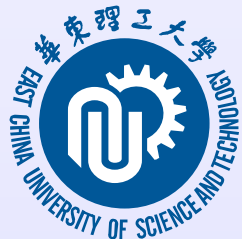
慢性毒性

慢性毒性：长期细胞毒性试验（3个月）

一般是在急性毒性试验结果的基础上，观察评价动物反复给予受试物后，机体产生毒性反应的特征及其毒性损害的严重程度，以及主要毒性靶器官及其损害的可逆性。

观察指标：

- 常规指标（一般症状、体重、摄食量）
- 血压、呼吸、心电图等（对非啮齿类动物）
- 血液学指标（红细胞频率和幅度等的变化）
- 血液生化指标
- 尿液分析（对非啮齿类动物）
- 脏器重量和脏器系数
- 组织病理学检查



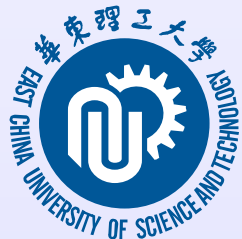
特殊安全性

生殖毒性试验：评价受试物对哺乳动物（啮齿类大鼠为首选）生殖的影响。

大鼠一般生殖毒性试验：接受试品剂量分组皮下注射给药，给药时间为交配前，雄大鼠60天，雌大鼠14天，每天一次，连续给药；雌大鼠交配后继续给药至妊娠后20天。

观察受试品各剂量组对大鼠的一般状况、体重变化、**受孕率、死胎数、活胎数、活胎重量**、外观、内脏及骨骼的影响，并与生理盐水对照组比较。

遗传毒性试验：检测基因突变；检测染色体畸变；检测染色体组畸变；检测DNA原始损伤。

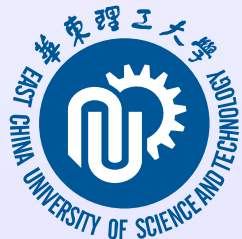


热原检查

注射剂用水及其制剂必须做热原检查：

热原：热原质引起哺乳动物体内复杂升温的反应过程。

热原质即其细胞壁的**脂多糖**组分，产生热原质的细菌大多是**革兰阴性菌**，注入人体或动物体能引起发热反应。热原耐高温，加压蒸气灭菌 121°C 20 分钟亦不被破坏。用吸附剂（活性炭）和特殊石棉滤板（超滤）可除去液体中的大部分热原。玻璃器皿需在 250°C 高温干烤，才能破坏热原。因此，在制备和使用注射药剂过程中应严格遵守无菌操作，防止细菌污染。

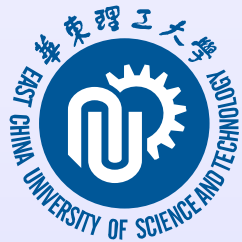


(1) 检查法：取适用的家兔3只，测定其正常体温后15min以内，自耳静脉缓缓注入规定剂量并温热至约38℃的供试品溶液，然后每隔1h按前法测量其体温1次，共测3次，从3次体温中最高的一次减去正常体温，即为该兔体温的升高度数。如3只家兔中有1只体温升高0.6℃或以上，或3只家兔体温升高均低于0.6℃，但升高的总数达1.4℃或1.4℃以上，应另取5只家兔复试，检查方法同上。

25mg/ml

1mg/kg

(2) 结果判断：在初试3只家兔中，体温升高均低于0.6℃，并且3只家兔体温升高总数低于1.4℃；或在复试的5只家兔中，体温升高0.6℃或0.6℃以上的家兔数仅有1只，并且初试、复试合并8只家兔的体温升高总数为3.5℃或3.5℃以下，均认为供试品的热原检查符合规定。



思考

如何设计一个动物模型，评价桑叶茶的降血糖活性？