

ECNU-NDT 联合实验室

文件类别及编号：（实验）SOP-3.8

版次：01

药物半数致死量（LD50）测定标准操作规程		修订年份：2012 年
修 订 人：王婧	审 核 人：	批 准 人：
修订日期：2012.9	审核日期：	批准日期：
颁发部门：	分发部门：	生效日期：

药物半数致死量（LD50）的测定标准操作规程

1. 实验目的：

规范药物半数致死量（LD50）的测定方法及步骤，为药物安全性评价奠定基础。

2. 实验原理：

药物半数致死量 LD₅₀ 是指药物急性毒性实验中，当动物死亡率为 50% 时的单次给药剂量，单位通常为 mg/kg。是衡量药物毒性大小的指标，是评价药物优劣的主要参数。

由于实验动物的抽样误差，药物的致死量对数值大多在 50% 质反应的上下呈正态分布，在这样的质反应中药物剂量和质反应间呈 S 型曲线，S 型曲线的两端处较平，而在 50% 质反应处曲线斜率最大，一次这里的药物剂量稍有变动，则动物的死或活的反应出现明显差异，所以测定半数致死量能比较准确地反映药物毒性的大小。

3. 实验试剂、设备及材料：

3.1 鼠笼、烧杯、1ml 注射器、天平、电子秤等。

3.2 药品：待试药物溶液（5 个剂量）。

3.3 实验动物：Bab/c 小鼠，体重 20±2g，♀♂ 各半。

4. 操作步骤：

4.1 预试验：摸索实验剂量范围，探索引起 0~100% 的动物估计致死的药物剂量。

4.1.1 探索剂量范围：根据经验或文献找出有关药物 100% 死亡的最小剂量及 0% 死亡的最大剂量。此即上下剂量（D_m，D_n）。对于无毒性参考资料的药

物，一般先配制最大浓度药剂，然后按等比关系（如 2:1）稀释成多个剂量组，每组取 4~10 只小鼠，按体重给药（各组给药实验一起进行），观察规定时间内动物的死亡数，找到出现 100%和 0%死亡率的剂量，再分别向下和向上折半递归确定 D_m 、 D_n 的近似值。

4.1.2 确定组数、计算各组剂量：

组数 (n)：5 组

各组剂量：根据预实验中造成 0%与 100%动物死亡的剂量范围，使剂量按等比级数增减（在对数坐标系上为等距分布，即相邻两个剂量的对数差是相等不变的）。

按下列公式求工比 r ：

4.1.3 按工比求各组剂量： D_1, D_2, \dots, D_m ，其中 $D_1 = D_n = \text{最小剂量}$ 、 $D_2 = D_1 \cdot r$ ， $D_3 = D_2 \cdot r$ ， \dots ， $D_m = D_{m-1} \cdot r$

4.1.4 配制等比稀释溶液：要求各小鼠给药容积一样，一般 0.1ml/10g，按下列公式计算浓度： $C_{\text{母}}$

药液配制的具体步骤：

预试中 $D_m = 344\text{mg/kg}$ （药物实际剂量）， $D_n = 141\text{mg/kg}$ ，算出 $r = 1.25$ ，小鼠的平均体重为 20g，每组 10 只，用药量为 0.1ml/10g=10ml/kg

$C_1 = 344\text{mg/kg} / 10 \text{ ml/kg} = 34.4\text{mg/ml}$

每组药液量=每组动物总重×用药量=200g×0.1ml/10g=2ml

称取药物量= $C_1 \times 2$ /载药量

4.2 正式试验

4.2.1 分组编号：取小鼠若干只，先将小鼠雌雄分开，逐一称重。雌、雄小鼠分别按照体重由小到大（或由大到小）排序。然后按照随机原则将小鼠分为 5 组，10 只/组。

4.2.2 给药：取配制好的等比稀释溶液按 0.1ml/10g 体重给药，op/ip/iv。

4.2.3 观察记录：给药后观察并记录动物的死亡时间和数目，连续观察所需实验天数。

4.3 计算：统计按GraphPad Prism计算LD50值及其95%可信区间,具体模板见
[LD50计算](#)

4.4 实验结果：填入下表

表 1 各组小鼠用药、死亡情况及有关计算

组别	小鼠	剂量	对数剂量	死亡数	死亡率
	(只)	(mg/kg)	(Log D)	(只)	(P)
1					
2					
3					
4					
5					

5. 整理原始数据，提交实验报告。

实验报告书写要点：

实验日期、药品批号、生产厂家、溶液浓度、实验室室温。

动物名称、性别、体重、给药途径、剂量、给药时间。

给药后见到的中毒症状、死亡时间、死亡率。

LD₅₀的计算及结果。

6. 注意事项：

6.1 预实验要摸准药物引起 0 和 100%死亡率药物剂量的所在范围；

6.2 正式试验时各剂量按等比级数分组，应避免最大剂量组的死亡小于 80%，最小剂量组死亡率大于 20%，否则改用其他方法计算；

6.3 给药剂量一定要准确；

6.4 认真观察中毒症状情况；

6.5 LD₅₀的测定方法有很多。如：目测几率单位法、加权机率单位法（Bliss 法）、寇氏法、序贯法等。其中加权机率单位法是目前推荐使用的方法。此法对剂量分组无严格要求，不需要剂量组有 0%和 100%死亡率，是目前公认最准确的测定方法。但本法计算繁琐，手工计算不易进行，故本实验采用 GraphPad 计算 LD₅₀及其它相关参数。