

中药新药临床前药效 及毒理研究

总 论

第一章 基本概况

1985年国家颁布《中华人民共和国药品管理法》《新药审批办法》《中成药生产规范》使我国药品管理、生产、研发逐步规范科学。

2001年国家颁布了新《药品管理法》2002年《药品注册管理办法》完善与国际接轨

国家实行药品质量规范化管理，为GMP、GLP、GCP、GAP、GSP等，包括药品生产、研发、临床（安全生产）、栽培、种植及销售各个环节。

GLP. (good labortary praetice)

GCP(good clinie practice)

GAP(good agriculture proctice)

GSP(good sale proctice)

GMP(good manufactory proctice)

同时加大抽查力度、月、季度公布抽查结果，药品广告，使用说明书等方面。

加强整顿、遗留品种、保健品、地标升部颁、民族药物、医院制剂。

假药定义：①药品成份与国家标准不符的②非药品冒充药品者（另外还有：未经批准生产、进口、未经检验的、变质的、被污染的、功能主治超范围的）

劣药：药品成分含量不符合国家标准的为劣药，（另外：未注明有效期、或更改不注明或更改生批号，超过有效期，包括未经批准，擅自添加辅料……剂、……剂）

第一节 基本概念

一、新药（新药申请）

未曾在中国境内上市，销售的药品（西药以往按进口申请对等）
已上市药品改剂型、给药途径、按新药管理。

进口药申请，指在境外生产的药品在中国上市销售
避免在国外批准在中国生产走进品药渠道
以前指的是：我国未生产过的药品叫新药。

二、药品注册

依照法定程序，对拟上市销售的药品安全性、有效性、质量可控性等进行系统评价，并做出是否同意进行药物临床研究，生产药品或者进口药品决定的审批过程。

三、国家政策导向

国家鼓励研制新药，对创制的新药及治疗疑难危重疾病的新药实行加快审批（艾滋病、癌症等）。

四、药物的临床前研究

为申请药品（注册而进行的药物临床前研究、包括合成工艺，提取方法，理化性质及纯度、剂型选择、处方筛选、制备工艺、检验方法、质量标准、稳定性、药理、毒理、药代动力学、药材、炮制、加工、遗传学、免疫学等研究）。

其中安全性评价必须执行《药物非临床研究质量管理规范》

五、非处方药

指国家药监局公布，不需凭执业医师处方，消费者可自行判断，购买和使用的药品（OTC）九十九条。

六、药品标准

国家药品标准，指国家为保证药品质量制定的质量指标，检验方法以及生产工艺等技术要求，包括《中华人民共和国药典》《药品注册标准和其它药品标准》

注册标准，国家药监局批准给申请人特定药品标准。

生产企业必须执行。

七、注册分类

1. 未在国内上市销售的从中药，天然药物中提取的有效成分及其制剂。
2. 未在国内上市销售的来源于植物、动物、矿物等药用物质制成的制剂。
3. 中药材的代用品。
4. 未在国内上市销售的中药材新的药用部位。

5. 未在国内上市销售的从中药、天然药物中提取的有效部位制成的制剂。
6. 未在国内上市销售的中药、天然药物制成的复方制剂。
7. 未在国内上市销售的中药、天然药物制成的注射剂。
8. 改变国内已上市药品给药途经的制剂。
9. 改变国内已上市药品给药剂型的制剂。
10. 改变国内已上市药品给药工艺的制剂。
11. 已有国家标准的中成药和天然药物制剂。

6中分为：传统中药复方制剂。

现代中药复方制剂。

天然中药复方制剂。

分别按技术要求（32套资料）

第二节：目前中药形势

随着中国加入WTO，必须遵守国际标则，特别是知识产权的保护。

阶段标志：仿制药物时代结束，创新药物时代开始，给我们提供了很好的机遇，但中医药也面临了严峻的挑战。

有利因素：

国家政策优势，（国内方面）

美国FDA《植物药管理办法》颁布，使中药可以合法身份进入国际主流市场（国际上）。

需求：回归自然。

不利因素

1、国内方面：

- ①自身技术落后，三、四、五类居多。
- ②有效成分不清，机理不清，质控手段落后。

2、国际方面：

- ①市场份额太小，多是原料药。
- ②日、韩、欧、美、高速发展。
- ③洋中药进口（10亿元左右）。

3、传统药物受到的挑战。

人权保护、动物保护，以及一些伦理上的原因。

- ①人体器官：紫河车、血余炭等。
- ②动物保护、穿山甲等。

新鲜动物脏器：来源、安全。

- ③动物粪便、五灵脂、蚕砂。

第二章 中药新药的开发研究

第一节：中药新药开发研究原则

一、中医理论为指导作用。

中医理论的指导作用

处方组成、功能主治、应用范围，包括药效学研究体现出中医理论特色。

二、社会效益、经济效益为前提。

开发前景，充分体现其优势艰病率高，广大患者需要，市场缺乏，附加值高等。

三、以临床疗效为基准。

按《指导原则》 I II III IV

四、突出创新特点。

第二节 选题

一、了解国家药品注册法规、政策。

二、根据长期实践经验，选方做到有的放矢，是在大量基础研究基础上，而进行开发研究，中医药开发与西药（化学药）的开发是不同的途径。在中医理论指导下进行。

症、证明确，治则，清楚，疗效明确。

科学性，可操作性，先进性，创新性。

三、选题目的：临床价值，科研究价值，经济价值。

四、选方途径 临床实践 选题依据：科学试验

古代文献

1. 专统古方。

2. 民间单方、验方、祖传秘方。

3. 现代先进科学技术筛选法。

4. 由已知成分筛选发现新药，（五味子丙素——联苯双酯）。

5. 活性成分结构改造（秋水仙碱结构改造）等等。

第三节 中药新药开发研究的具体内容

一、中医理论研究

处方组成、处方来源、古籍文献、立题理论依据。

条件具备：

1. 符合中医理论，辨证用药理论。
2. 君、臣、佐、使配伍合理。
3. 来材来源明确，标准明确。
4. 功能主治，适应证体现中医理论。
5. 病因病机理论。
6. 治则治法，论证逻辑性。
7. 从医角度：明确适应症侯。

从药角度：方药分析，治则。

活血化瘀——医——治法

二、药学研究

（一）制备工艺和研究

1. 提取工艺研究

①药材的鉴定，与前处理

②设计与选择

③技术条件（参数）的研究

2. 分离、纯化、浓缩、干燥、工艺研究

3. 剂型选择

4. 成型工艺研究

5. 中试生产

（二）质量标准研究

1. 名称：（汉语拼音、拉丁名）按中药命名原则。
2. 来源：科名、中文名、拉丁名、药用部位，来源、矿物成分。
3. 性状：形状、颜色、味、表面特征。
4. 鉴别：专属、灵敏、快速、准确（显微、TLC、理化）。
5. 检查：杂质。
6. 浸出物测定。
7. 含测。
8. 炮制（药材）
9. 性味、归经、功能主治，用法用量，注意事项，贮藏、起草说明。

（三）质量稳定性研究

三、中药新药药理研究

中药药理学是以中医基本理论为指导，运用现代科学方法，研究中药对机体的作用与作用机理以及体内代谢过程，阐明方治疾病原理的科学，指导用药基本规律。

中药药理研究为指中药与中药理论的现代药理学。

对中药新药而言指药效，一般药理学，药代——旨为申请临床提供依据。

四、中药非临床安全性研究（毒理）

安全性包括临床和非临床两方面，临床期间完成的叫——临床安全性研究，临床前完成的叫非临床安全性研究研究目的。

1. 消除不安全因素进入临床
2. 了解药物可能出现的毒副反应
3. 为临床确定治疗有效剂量和安全剂量，提供依据，参考
4. 为确定临床，禁忌证提供参考：

GLP直译为优良实验室规范，在国外又被称作“新药非临床安全性试验规范”。

各 论 篇

第一章 中药新药药效学研究的基本内容与要求

一、中药新药药效学研究的意义

中药新药的基本要求是安全、有效、可控和稳定，其中有效性或疗效不切是新药治病救人的首要条件，否则就不成其为药物，因此，它是研究评价新药的基础，新药有效性评价，主要包括两部分，实验部分（即主要药效学研究）和临床部分（即临床研究）。主要药效学试验是在机体（主要为动物）或其器官、组织、细胞、亚细胞、分子、基因水平等模型上，采用整体和离体的方法，进行综合和分析的实验研究，以阐明药物防治疾病的作用及其作用机制，从而为新药的有效性评价提供科学的依据。通过药效学研究，可以初步明确新药是否有效，药理作用的强弱和范围；与同类药的毒副反应上的优缺点和特色等。从而确定有无实用价值及发展前景，可否开始人体试用及进行系统的临床研究等。

中药的复方药效学研究除观察药物的有关作用处，还可在更深层次上揭示方剂疗效的物质基础，作用的机制及配伍的规律等，有效地指导临床用药和中药新产品的研制。

二、中药新药药效等研究的重要性及局限性

1. 发现研制新药及对进行再评价：中药大多来自古方和经验方，有长期的临床实践经验，但其用药特点强调辨证施治，随证加减；用药个体化；多为处方煎剂服用。而研制的新药，包括利用现代医学知识研制的组方，从复方or单味中药内提取的有效成分or有效部位（群），则为固定处方和剂型；工业化生产，有一定的提取工艺；其化学成分，药物性质、功能主治、剂量用法等，均会有很大的变化，特别是原有的治疗作用，毒副反应也可能有变化；应用上强调通用性和社会化。因此，必须进行药效学研究，对研究药物的有效性和安全性进行新评价，以便了解该药可能发生的变化。以及出现新的治疗作用or毒副反应等。

2. 为新药的临床研究奠定基础：在不了解新药安全性、有效性的情况下，进行人体试用和临床研究，有可能对试用者造成危害，甚至发生意外。因此，动物试验作为人的潜身，在新药用于人体之前，先进行药效及毒理试验，为临床研究提供可靠的依据，确保受试病人不致延误病情及产生不良后果。尽管人与动物有差异，但大量研究工作表明药物在人体和动物，尤其是哺乳动物，所表现的作用和毒性在大多数情况下与临床研究结果是一致的。例如，黄连的抗菌作用可用于各种感染性疾病，益母草的收缩子宫作用可用于产后子宫复旧不全，甘草的肾上腺皮质样作用可用于治疗艾狄森病。再如人参、黄芪、淫羊藿等的提高免疫功能，丹参、川芎等的扩张冠脉，抗心肌缺血等作用，都可作为临床处方用药及有关药物的研制提供基础。

3. 补充临床研究的不足：临床上有些疾病的发病率低，和（or）潜伏期，病程长，因素等干扰，影响研究的准确性，以及难于了解某些细节和规律。而药效学研究；可根据试验目的，严格控制试验条件和各种影响因素，以及造成群体的动物病理模型，便于在复杂因素中发现内在规律性；满足实验研究客观性、准确性、重复性及数据化等要求。再说，动物试验不存在人体试验所受的种种限制和社会道德舆论，可反复进行在人体无法进行的伤害性试验。采用动物模型作为人类疾病的“缩影”，按要求随时收集各种样品，乃至处死动物收集标本，这在临床上是很难做到的。

4. 揭示中药复方药效的物质基础，开展作用机制及配伍规律的研究：中药复方是中医用药的主要形式，运用高新技术手段探讨方剂作用的物质基础及其作用机制，综合分析配伍——化学成分——药理效应三者之间的关系是中药复方系统研究的发展趋势。例如，对于生脉散（人参、麦冬、五味子）复方化学动态变化与药效关系研究发现，配伍后产生了新物质5-羟甲基-2-糖醛（5-HMF）。药效试验表明，5-HMF能降低心脏缺血小鼠血清乳酸脱氢酶（LDH）水平及心肌组织中丙二醛（MDA）含量，有益于全方的抗心肌缺血的作用。等量配伍的芍药甘草汤（白芍药、炙甘草），两药单用对神经肌突触无阻滞作用的浓渡，并用后则产生明显的作用。进而用它们的有效成分芍药苷（PF、25ug/ml）与甘草甜素（GLR, 75ug/ml），亦能产生同类样品剂量依赖性的并用效果，最佳配比为PF：GLR=1：2。其作用机制类似于琥珀胆碱，作用点在突触后膜。此外，通过药效学研究，可以寻找能代表总体药效最佳成分及其配比的有效成分or有效部位（群），为开发研制新药奠定基础。例如，从安宫牛黄丸中化裁出清开灵注射液，从当归龙荟丸中提取出靛玉红，以及由苏合香丸化裁出冠心苏合丸等。

配伍是中医用药的特点和优势，用药理研究观察方剂配伍组成及剂量比例与药效学变化之间的关系，探讨方剂配伍的规律，仍然是复方药理研究的重要内容。许多传统处方中 君药的药理作用常是该方的主要药效的体现，如治疗胸痹的瓜蒌、薤白白酒汤（枯萎、薤白、白酒），在扩张冠状动脉，增加冠脉流量，拮抗垂体后叶素所引起的冠脉流量降低等方面，单味瓜蒌均有与复方相似的作用，体现了君药的主导地位，但在有些方剂中发挥主要药效作用的药味，与原配伍关系的阐述并不一致，如正交设计研究旋覆代赭汤（旋覆花、代赭石、人参、半夏、炙甘草、生姜、大枣）对正常大鼠胃底条收缩的影响，结果表明方中主药为旋覆花、党参、与传统认为的旋覆花为君，代赭石为臣，党参、生姜、甘草为佐使药不尽相同。再如，生津止渴方剂白琥加人参汤可以降低糖尿病小鼠的血糖水平，方中人参调节血糖，知母促进唾液分泌（解除口渴），石膏对二者均有效，说明全方配伍有相辅相成关系。当归芍药汤在改善小鼠学习记忆障碍方面，当归和芍药两者最佳配比为1：1.35。

5. 药效学研究的局限性：动物试验有一定局限性，人与动物间存在种属差异，临床疾病与动物模型的差异，以及社会因素和精神的差异等，都有可能影响试验结果；有的症状动物也无法反映现来。有些药物对人有明显作用，但对动物却无作用。例如，巴豆为峻下逐水药，使人类产生剧泻，而对小鼠却无泻下作用，反使其长肥，故俗称“肥鼠子”。雷公藤对人有毒，甚至可引起中毒死亡，但对羊无毒性。有些药物在动物实验中有效，而临床上却无效or效果不好，如丹皮中提取的丹皮酚，对实验性高血压有明显降压作用，而对人的高血压则无明显效果，甚至无效；葛根中的黄酮类化合物，对小鼠有很好的避孕效果，但对人无效；垂盆草治肝炎，总黄酮部分动物实验有效，但临床却无明显效果。因此，动物实验不能代替人体观察，中药研究结果最终要由临床来检验。药效学试验及临床研究、是新药有效性评价不可分割的两个主要组成部分的基础。后者是前者的继续与最后判定，两者相辅相成，综合判断，才能对新药的有效性及安全性作出科学、准确、全面的评价。

三、中药新药药效学研究的基本要求

1. 试验主要负责人应具有药理、毒理专业高级技术职称和有较高的理论水平，工作经验与资历。确保试验设计合理，数据可靠，结果可信，结论判断准确。试验报告应有负责人签字及单位盖章。

2. 研究单位应具有有效的科研水平：技术力量及组织管理能力，具有良好的客观条件，实验室、仪器设备等。从事新药安全性研究的实验室应符合国家药品监督管理局《药品非临床研究质量管理规范》GLP (Good Laboratory Practice) 相应要求，药效学研究也可参照实行。直译为优良实验室规范，在国外又被称作“新药品临床安全性试验规范”。

3. 实验记录：实验记录应符合国家药品监督管理局《药品研究实验记录暂行规定》要求。实验记录应真实、完整、规范，对实验中出现的新部题特殊现象均应写明情况，防止漏记和随意涂改。描记和形态学检查应有相应的记录图或照片。不得伪造，编造数据。实验记录的内容通常应包括下列几项：

①实验的名称：每项实验应首先注明课题各称和实验名称。

②实验设计方案，这是实验研究的实施依据。各项实验的首页应有一份详细的实验设计方案。

③实验时间：每次实验须按年月日顺序记录实日期和时间。

④实验材料：受试样品，对照样品，及其他实验材料的来源及批号；实验动物的种属，来源及合格证；菌种、瘤株、细胞株及其来源；实验仪器设备名称，型号；主要试剂的生产厂家、规格和生产批号；自制试剂的配制方法时间和保存的条件等。实验材料如有变化，应在相应的实验记录中加以说明。

⑤实验环境：根据实验的具体要求，记录实验当天的天气情况和实验微小气候，如温度湿度，光照及通风等。

⑥实验方法：常规实验方法应在首次记录时注明方法来源，并简述主要步骤。改进，创新的实验方法应详细记录实验步骤和操作细节。

⑦实验过程：详细记录操作过程，观察到的现象，异常现象的处理，影响国因素的分析等。

⑧实验结果：准确记录，计量观察指标的实验数据和定性观察指标的实验变化。

⑨结果分析：每次实验结果应做数据处理和分析，并有明确的文字小结。

⑩实验人员：应记录所有参加实验研究的人员。

四、中药新药药效学研究的步骤及其本内容

（一）试验设计

在进行药效学研究工作之前，首先应该在查阅和熟悉文献的基础上，制订试验设计方案，拟定开展药效试验的范围和方法，观察指标，确定阳性对照药，选择动物模型和采用的动物，设立分组和剂量，给药途径，所需仪器设备及其他材料，安排试验进度，参加人员及分工等。这是实施的依据，当然也不是一成不变的，在实施过程中，根据具体情况，可以进一步修改、补充、完善及调整。

科学和周密的设计，可以排除各种干扰or无关因素，获得正确、可靠的结果，并能节省人力，物力和时间，避免走弯路。

1. 试验设计的根据和原则

试验设计应依据《新药审批办法》及有关药政法和规定；参照新药的组方剂型，给药途径，特别是功能主治；临床经验及有关科研和文献资料。其原则是要求实事求是；体现出高水平；坚持中药特点及有新意。研究工作要严格做到：“随机、对照、重复”，以及统计学处理等。

2. 根据新药不同情况设计试验方案

(1) 以病名为主治的新药：要根据主治，参考功能选择相应的试验方法，这适合大多数中药，包括以西医病名为主治的新药。例如，主治阳痿证的药物，应首先与生殖系统（特别是性功能）有关的试验；同时参照新药的功能和（或）疾病的主要症状，以相应的试验，作为辅助药效，从多方面证实新药的药效。健脾补肾可选用一些健脾调整胃肠功能的试验。治疗急性支气管炎的药物，除了抗感染抗炎作用外，针对疾病的症状，选做镇咳、祛痰及解热试验等。有时还需做针对新药作用环节or作用机制的试验，如治疗糖尿病药物的降血糖作用是由胰脏内还是胰脏外因素发挥的机制探讨。

(2) 以中医证名为主治的新药：应根据该病症的现代认识设计关键主要的试验，参照新药的主要功能和病证的临床症状；设计药理试验方案，例如：治疗脾虚证的药物，根据脾虚证的表现 of 消化系统功能减退，副交感，神经系统功能偏亢，免疫功能和代谢能力偏低等。药效学试验应以运化水谷及健脾益气为主，故选做有关胃肠功能的试验，对脾虚模型动物的治疗作用，以及抗应激试验和免疫功能测定等。

(3) 缺乏适当动物模型的新药：如系统性红斑狼疮，皮炎、系统性硬皮病等系统疾病，精神病，以及梅核气，奔豚证等，应根据疾病因、病理变化、临床症状及及新药的主要功能等，设计药理试验方案，用间接的药效提示新药的作用。再结合临床研究，对新药的有效性作出评价。例如，银屑病的确切病因尚不明，可能与遗传、代谢障碍、感染、免疫功能紊乱等因素有关；基本病理特点为皮损部位表皮细胞过度增殖和角化不全。药效学可选择调节表皮细胞生长，影响免疫功能，抗炎和止痒作用，以及活血化瘀等试验。

3. 新药研究要求的水平：中药及其复方的药理作用广泛，常为多成分、多靶点、多系统的综合效应，故应行选择相应的方法从多方面反映新药的药效。但必须紧扣功能主治，避免“以广取胜”。主要药效学研究，应选择能够反映中药作用本质的实验方法和观察指标，首先应确定主要作用（关键性药效）。一般主要作用设1-3项，每项应选作2~3种实验方法，从多指标验证其药效。其他作用（辅助性药效）可酌情做2~5项，每项选做1~2种实验方法。应分清主次，突出重点。

例如：抗癌中药多从多方面进行研究。第一为抗癌作用，抑制或杀死癌细胞；第二为扶正作用：增强免疫功能，提高机体的抗病能力；第三为增效作用：对瘤动物或者患者的化疗的放疗具有增效作用；第四为减毒作用：可减轻正常的荷瘤动物对化疗和放疗的毒副反应。上述四种作用中，抗癌作用是主要的，有明确的抗癌作用，可能开发为抗癌药物；抗癌作用不明显，但具有扶正，增效的减毒作用者，只能作为抗癌辅助药应用。研究抗癌药物应主要去荷瘤动物非观察其抗癌作用应选择3种以上（包括实体瘤，腹水瘤和白血病各一种）肿瘤，重复3批实验，观察新药对肿瘤大小、重量、外观、可通过切片及荷瘤动物体重、全身症状和生存期等的影响；还要进行试管内抗癌作用研究，可选择对药物较敏感的肿瘤细胞，进行试管内抗癌试验或进行肿瘤细胞培养的抗癌试验。

新药的药效能证实其主要的治疗作用，以较主要的其他治疗作用。主要的药效作用该应明确，并力求反映量效和（or）时效关系。有时药效不够明显，or仅见作用趋势，统计学处理无显著差异，应如实上报作为参考，但仅适用于辅助药效；药效学实验，通过体内，体外多种实验方法，从多方面、多层次、全面深入地阐明其药作用；也可只做能充分证实其主要治疗作用的药效，但应有明确的量效关系和时效关系，并有一定的作用机制研究，尽可能用实验证明其有效成分和有效部位（群）就是主要药理作用的成分。药效学试验应尽量反映出受试药的特点，包括作用强度作用时间，作用特点，避免低水平重复。

对于局部用药治疗远隔部位**or**全身疾患的药物，如局部**or**穴位贴药治疗高血压，冠心病等，如有可能应进行透皮吸收实验，以了解药物吸收数量及速度等，有助于评价药效。但很多中药成分复杂，目前正难以确定有效成分，进行透皮吸收试验尚有困难。至于药物的作用机制，药代动力学及复方中药的配伍试验等，在可能的情况下适当选做，由于中药的特点及技术的困难等因素，目前不宜强求。

中药材新的药用部位，以人工方法在动物体内制取物和引种（养殖）药材的药效学试验、均应与原药材作比试验。以中药疗效为主的中药和化学药品复方剂，需做该组方中的中药、化学药品，制剂三者 in 药效、毒理方面的对比试验，以出现组分间的任何协同**or**毒副反应等方面具有一定的优点，包括药效作用的增强和（**or**）互补，毒副反应在的降低等。

（二）药效学试验的方法

中药药效试验的方法大致分为体外实验和体内实验两类：

1. 体外实验：又称离体实验，是在体外进行的实验观察方法，包括离体器官、离体组织，细胞体外培养及试验等。它可以排除体内多种因素的干扰，重复性好，结果易于分析，具有省药、省动物等优点，适用于分析试验，特别是作用机制的研究。但存在一定的缺点和局限性，尤其是中药的粗制剂，直接与器官、细胞等接触，杂质和理化性质均能影响实验结果，如药物溶解性、粒度、PH、无机离子及鞣质、不溶物质等。在试管内抗菌作用强的中药，在体内不一定出现抗菌效果。含有大量钙离子or鞣质的煎剂，尽管对离体平滑肌，有明显兴奋作用，在口服时不一定出现相应作用。再则，离体实验失去了机体完整统一的内环境和体液调节，与临床状态相距较远。有些药物须经代谢为活性成分后才有药理作用。因此离体实验与体内实验结果不一致的现象时有发生。如理气药陈皮、青皮等对胃肠平滑肌作用表现，离体为抑制，口服煎剂一般为兴奋，主要原因是离体时为其中橙皮苷和对羟福林等成份的作用；口服时药物所含挥发油对胃肠粘膜的刺激发挥作用。栀子苷的利胆作用很弱，在体内代谢物京尼平（genipin）作用增强；正如磺胺类药物体外抗菌作用甚弱一样。

为解决这个问题，血清药理学实验方法是首先给动物服药，然后取其血清作为药物源进行药理学观察。粗制剂和复杂的成分经过消化已吸收分布，代谢排除等体内过程，再取含药的血清进行药理实验，比较接近药物体内环境中产生药理作用的真实过程，适用于中药，特别是复方进行药效评价及其作用机制的研究，还可进行血清药化学及药动力学的研究。受试动物多用大鼠，豚鼠、家兔等。每日服药1次或2次（间隔2~4h），连用3日，亦可每日1次，连续7日。给药剂量可参考公式：剂量=在体实验的给药量×反应系统中被稀释的倍数。但可能因血药浓度不完全随给药剂量相应增加，以及受浓度和容量的限制等，不可能使之达到需要的浓度。给药后采血的参考时间，如每日给药2次，连续3日，为末次给药后的30min至1h。血清药理实验，虽然可以克服离体实验中存在的某些缺点，但尚未完全成熟，还存在着一定的问题。例如，血清的来源和含药浓度、加药剂量（不能添加100%浓度的血清），以及动物给药的剂量、给药方式、采血时间、血清处理等诸多因素，需要进一步完善和确定，故影响其推广应用。另外，对不通血液而起的作用，尤其是中药对整体的调节功能，便不能反映和观察。因此，不能完全取代体内实验。

2. 体内实验 又称在体实验，是用整体动物进行药理实验的方法。根据试验需要可以选用正常动物或病理模型动物，按照试验的周期可以分为急性实验和慢性实验。前者一般指观察一次给药后机体在短时间内出现的反应，如麻醉动物血压实验、急性毒性试验等。但中药往往起效较慢，作用较温和，即使急性实验，有时也需持续多次给药，如3~7日甚至更长时间后才能出现效应。慢性实验指观察机体在较长时间内多次给药出现的反应，如寿命试验、慢性造瘘（胃肠瘘、子宫瘘等）、长期毒性试验等。在体实验比较接近临床状态，尤其符合中药多成分、多靶点、多系统的调节整体作用，并可弥补离体实验的不足和局限性，故中药的药效学试验以体内实验为主，体外实验为辅。结合中医临床用药的实践，以消化道给药为主，其他给药途径为辅。尚若为中药有效成分或有效部位（群）、制剂较纯者，或临床为注射给药者，可用体外实验或注射给药进行主要药理学试验。

（三）药效学试验的动物模型

研究和评价新药的防治作用需要建立动物模型，20世纪以来，新药研究发展较快的原因之一是成功建立了很多病理模型，从而开辟了实验治疗的广阔领域。

1. 药效学研究中动物病理模型的基本要求：理想的动物模型应与人类疾病的临床相似，特别是中医“病”或“证”的动物模型应具有中医特点，与临床辨证相似。但要求一个动物模型完全与人类疾病及临床表现相似，这几乎是不可能的。因为许多人类疾病的病因和病理变化尚未阐明，除传染病以外，大多来类推于基因的异常和缺陷。中医的“病”、“证”尤为复杂，例如，脾虚证可见消化道吸收、分泌、自主神经功能紊乱，体温调节中枢和血管运运中枢失常，内分泌和免疫功能变化等系统的异常。某些动物模型往往侧重于体现有关“病”、“证”的一定阶段，某一证型，某些主要症状或病理变化。

动物模型有自发性动物模型及诱发性或实验两大类。前者包括突变系的遗传疾病和近交系的肿瘤模型，如高血压大鼠、高血糖小鼠、肥胖症小鼠、无胸腺裸鼠、青光眼兔等。其最大优点是疾病的发生发展类似于人类，但这些模型来源困难，不可能大量使用。近代医学常用的是实验性动物模型，即通过物理、化学和生物等致病因素，人工诱发动物某些组织器官或全身的损伤，在功能、代谢和（或）形态学上出现与人类相应疾病类似的病变。这类模型可以在短期内大量复制及适应研究目的等特点，但其自然发生的疾病模型毕竟存在一定差异性。为此，在设计制造该类模型时，应尽可能克服其不足之处，发挥特点。

评价模型的好坏、成功与否，关键是看能否反映防治对象的本质。只要能反映事物的本质，模型的设计越简单好。例如，抗毒药的模型，只要给动物攻毒就行；药物的抗菌、抗病毒作用常用体内保护试验可做常规的抗菌谱，观察指标合理，效率也高。至于技术的先进性，方法的难易固然能反映研究的水平，但不是主要的。如果模型选择不当，再高的水平只是花架子，不可能得到正确的结果。

动物模型选择标准应尽可能符合中医临床证或病的要求，以整体模型为主。例如，根据“虚则补之”的辨证施治原则，研究补益药最好采用虚证模型，因为正常动物属阴阳平衡，正气不虚的机体，故对许多临床患者有效的补益药用正常动物往往看不到补益的效果。研究证明，在“气虚证”动物模型上，免疫指标比正常动物普遍低下，给予参芪注射液后，多项免疫指标明显回升，而对正常动物则不如虚证模型升高明显。正如解热药只降低发热者的体温，对正常体温却无降温作用，解痉药则对痉挛情况下的器官作用强而显著一样。

2. 动物模型的意义 动物病理模型是具有人类疾病模拟性表现的实验对象和材料，它是探索人类疾病本质及新药有效性评价的一个重要方法和手段。人类各种疾病的发生发展极为复杂，要深入研究其发病机制和病理变化，以及观察和评价药物的疗效，不能也不应该在病人身上进行。例如，放射病、毒气中毒、烈性传染病等平时很难见到，急性白血病、血友病及自身免疫性疾病等收集亦较困难。有的疾病潜伏期及病程较长，如肿瘤、慢性气管炎、肺心病等，要几年、几十年，有些致病因素需要隔代乃至几代才能显示。即使病种病情相同，因病人的性别、年龄、体质、遗传及社会因素等不同，也会影响疾病的病理过程。利用动物，可以在控制实验条件下，用单一或特定的病因，短期或较短时间内复制出典型的病理模型，不但在群体上容易得到满足，并且可以避免在人身上进行实验的危险性。

正确制作或选择一个合理的动物模型，可以增加药效学研究的真实性、可信性、成功率，提高研究的设计水平和科学性。相反，使用一个不合理的模型，则会使实验结果失去准确性，甚至与原设计完全相反。即使得出实验者满意的结果，也会因动物模型选择不当而得不到认可。

3. 中医证的动物模型 “证”是中医在长期临床实践中对某些症候群的概括，对诊断和治疗等十分重要，辨证才能施治。可见，建立证的动物模型，一方面可提供该证的研究对象，探索其病因、病机、证候及病理变化等，以便了解疾病的本质；另一方面则用于观察和评价新药的疗效。在中药药理研究中，目前应用较多的动物模型主要有两类：一类是拟“病”的模型，另一类是拟“证”的模型。后者如“血瘀”、“阴虚”、“阳虚”、“气虚”、“血虚”、“脾虚”、“肾虚”、“厥脱证”等动物模型。但由于目前对各种“证”的病因病机和生理生化变化等本质远未彻底阐明，故很难复制与临床有关“证”相符的动物模型。

为检验所制“证”模型的可靠性，目前常从两个方面加以衡量，一是用比较法，将动物模型的症状与中医临床症状加以比较。由于中医辨证是从人体出发，采用望、闻、问、切的诊断方法很难在动物身上进行，所以要用模型动物上所测得的生理生化指标、组织形态变化与临床患难与共者情况进行比较。另一是用药物反证法，即用中药代表方（药）对所建立病理模型进行治疗，根据有无疗效来判断模型的可靠与否，同时也可以观察中药的作用。例如，模拟血瘀证的病理模型能被活血瘀方（药）所逆转；血虚证动物模型，用养血药治疗，应产生预期的治疗作用。为使动物模型尽量接近中医的“证”，应采用多种病因，不同动物，以及多方法，多指标地进行研究。

4. 模型的相对性 动物模型虽然在人类疾病及药物的研究中，发挥了不可抹灭的作用，但由于种属差异，造模方法，机体反应性的不同，特别社会因素和环境因素等，很难与人类疾病及证候的临床表现完全相同。尽管人们建立了一些病（证）的动物模型，但尚处于探索阶段，有的仅用于病因病机证候的研究，不适宜药理学试。比较成熟、科学合理的中医病（证）动物模型甚少，无论是数量或是质量均与目前要求相差甚远。在不同模型上，药物疗效的差异给新药的研制工作带来较大的困难。为此，研究中应尽量选择与人体反应比较接近的动物模型，发现矛盾时应深入分析原因，从中找出比较合理的模型。一个药物往往需要用几个模型（一般为2个或以上），从不同侧面证实其药效。有的要在研制工作中反复进行，切忌单凭个别动物指标就作绝对的肯定或否定。

在实际评价具体的模型时，仍然存在很多分歧，即使像病因已明的病毒性乙型肝炎，至今仍无大家能接受的模型，有的认为鸭肝炎可以作为模型，但有人认为鸭肝炎与人的乙型肝炎相差较大。对中医“证”的动物模型争议更大，如20世纪60年代的糖皮质激素“阳虚”模型，至今仍持有不同见解。有些疾病的模型本身就不大好建立，如高血压、冠心病、风湿病等，虽相应地建了许多模型，亦成功的评选过一些新药，但与人体比较，在病因和病理上还有相当的距离。有的疾病现在还缺乏模型，如神经性皮炎、鳞屑病、酒渣鼻等。有些药物剂型也难以在动物上实施，如脐敷、坐敷及肛门栓剂等。

由上可见，很多动物模型尚有待改进、完善和积累经验，更多的则有待于创新建立。应该支持和鼓励人员努力探索，在充分实验基础上，创建新的动物模型。由于中药与化学药品药效学研究的基本原则、主要内容和技术要求，有很多相同之处，故亦可借鉴现代药理学的理论、方法和手段，以补充中药药理学研究工作方法的不足。例如，结扎冠状动脉造成“心肌缺血”的动物模型，用醋酸刺激制造“溃疡病”动物模型等。只有这样，才能促进药效学评价的发展。另外，每一种动物模型，常常对某些药效反应较敏感和准确，而对其他方面则较差，在选用动物模型时，应充分权衡其优缺点，用其所长，以取得理想的结果。

（四）药效学试验指标的选择

药效学试验选用的指标应能准确无误地反映药物对机体的影响，所以要注意以下几项要求。

1. 特异性 所选指标应该针对性强、专属性好，能够反映变化本质。例如，要观察药物的降压或升压作用，检测血压是特异性的关键指标；如要说明药物对急性肾炎的治疗作用，尽管血压升高也是急性肾炎常见症状，但并非特异的关键指标。因为急性肾炎并不一定会有血压升高，血压变化也不能代表药物对急性肾炎的疗效；而应选择肾功能检查、尿液检查或肾形态学检查等作为关键指标。在中药药理研究中，有时确定特异性指标还存在困难。例如，要说明中药的解表、开窍、助阳、滋阴等，难以找到单一的特异性指标。对此，在一个指标不够时，可以用一组指标来弥补。如解表药可选用发汗解热、镇静、镇咳、祛痰、平喘、抗炎、抗敏及免疫功能等药效学试验指标。

2. 敏感性 指标要敏感，能准确反映病情、证候的变化及药物的防治作用。敏感性差或迟钝的指标，会遗漏某些阳性变化，造成假阴性。有的指标，由于弥散度大，标准差大，而导致统计学无显著性意义。

3. 重视性 指标要稳定，重现性好，结果才可靠。如发现重复性差，应及时排除种种干扰因素，纠正对检测指标的影响，重新实验。否则重复性差的结果不可信，不能作为新药疗效评价的依据。

4. 客观性 主观检测的指标，不够准确。例如，肉眼观察动物自发活动的影响，可带有很大的主观性。如果用光电计数器，计算动物活动的次数，或用记录仪记录小鼠在一定时间内活动或行走的轨迹，那就是客观的量化指标。肉眼测量血压计水银柱，亦有很大误差，而用描记仪直接描记血压曲线，动态的记录血压的变化，则更为客观。

5. 指标的量化 为了判断和比较药物的作用，便于统计学处理，检测指标应有量的概念。但是指标本身并不都是有数量的。量反应指标有数量可表示，而质反应指标则没有。后者只反映现象的出现与否，如死与不死、惊厥与不惊厥等。这类指标只能通过累计现象出现的频率来达到数量化（如阳性反应的百分率）。也可采用计分法，按阳性反应的程度人为地区分为若干级。例如，S. Irwin介绍的动物行为观察法，把小鼠的行为分解为40多个指标，每个指标都区分为8级，以反映给药后行为变化的程度。形态学（如组织、病理）指标亦难于定量、常需采用定量组织学方法，如根据病理改变的范围程度等，人为地进行定量或半定量。

各种指标均有其优缺点，例如生理、生化指标可以定性定量及动态观察，但有时定位欠佳，可受多种因素干扰，稳定性较差；而形态学指标可定性、定位，但难于定量及动态观察。如果一项指标难于满足要求，可综合选用生理、生化、形态学等多方面的指标，使试验结果更为全面和准确。但若单一指标已能达到要求，则不必为了多和全而勉强采用多指标的检测。

（五）药效学研究中的动物选择

动物的选择，首先应根据试验目的和要求，以及动物本身的特点，再参考是否容易获得、经济、饲养和管理等情况。尤其要注意动物的种类、品系及质量、健康状态等。

1. 种类 动物的类别和种属不同对药物的反应存在很大差异，有时对药效试验的成败起着关键的作用。选择动物既要考虑对药效学设置检测指标的敏感性，更要注意与临床病人反应的一致性。在可能条件下，尽量选择功能、代谢、结构与人类相似的实验动物，使用期对药物的反应接近人类。灵长类（猴、猩猩等）是最近似于人类的理想动物，但价贵、难得，又需特殊饲养条件，所以选择动物时亦不能盲目追求。例如，药理实验最常用小鼠，因其有易繁殖和饲养，价廉，消耗药量少等优点。家兔对体温变化十分灵敏，常用于观察药物解热作用及检查热源。豚鼠易于致敏，适用于做过敏实验。猫、狗和大鼠血压稳定，适宜观察药物对血压的影响。狗具有发达的血液循环和神经系统，以及与人相似的消化过程，在毒理方面的反应与人比较接近，常选用于药理和毒性学研究。猪在解剖和生理上与人相似，近年来选用猪做实验动物的日见增多；尤其是它的皮肤组织结构与人近似，选用小猪作烧伤实验研究是较理想的动物。

2. 品系 不同系列的动物对药物的敏感性不一，这也是普遍存在的现象。例如，C57BL小鼠对肾上腺皮质激素的敏感性比DBA和BALB/C小鼠高12倍。DBA小鼠对音响刺激非常敏感，电铃声可引起性痉挛，甚至死亡，而C57BL小鼠却根本不会出现此反应。DBA/2与DBA/1小鼠对同一病毒（如new castle 病毒）的反应完全不同，前者引起肺炎，而后者引起脑炎。A、C3H、津白II等品系小鼠易致癌，AKR、DBA/2、L615等易致白血病。C3H雌鼠乳腺癌自发率达90%，AKR小鼠白血病自发率达65%。这些均可选作有关实验的动物。

目前国内外使用的实验动物，以小鼠为例，大部分是近交系和封闭群，而在使用数量上，封闭群动物远远超过近交系。这是因为近交系动物虽然有遗传均质性、反应一致性及实验结果精确性等优点，但其品系繁多，又不易大量生产，所以限制了其应用范围，往往适用于设备条件较好的研究机构或有专门科技人员亲自保种使用。而封闭群动物保持相当程度的杂合性，避免了近交衰退的出现，为此其生活力、生育力都比近交系强，具有繁殖率高，可以大量生产等特点，对各种刺激的平均反应，有一定的稳定性，可以反映药物的平均综合疗效，远优于市售动物，故为药理学研究广泛采用。例如，昆明种（瑞士种）小鼠、Wistar大鼠、SD（sprague Dawley）大鼠、青紫蓝兔、新西兰白兔和日本大耳白兔、豚鼠、ddN小鼠、NIN小鼠、LACA小鼠。

3. 动物等级和健康 实验动物应选用符合等级要求的健康动物，并附有供应单位的合格证书。我国的药理学研究大多采用普通动物和清洁动物。普通动物（conventional animal, CV）是未经积极的微生物学控制，普遍地饲养在开放卫生环境里的动物，但要求不带有与人兽共患病的病原体及体外寄生虫，如结核、痢疾、沙门菌感染，皮肤真菌等。普通动物只能供教学和一般性实验。为此，药理学研究一般应采用清洁动物（clean animal, CL），宏观世界要求在CV的基础上，还须不带有动物传染病的病原体，如脱胎换骨脚病（鼠痘）、流行性腹泻病毒、致死性肠道病毒等。血清病毒抗体检验（脑脊髓炎病毒、鼠肝炎病毒等）可能检出一定滴度，但不允许出现临床症状和脏器的病理性变化或自然死亡。安全性评价研究中使用的大鼠、小鼠应符合无特定病原体（即SPF）动物的标准，豚鼠应符合清洁级动物标准。并要有动物种群的近期健康及病原微生物检测结果。

一般情况下，健康动物对药物和各种刺激的耐受量较大，实验结果稳定。疾病或处于衰竭、饥饿、寒冷、炎热等条件下的动物，均会影响实验结果。例如，有病动物容易中毒死亡；炎症组织对肾上腺素的收缩血管作用极不敏感；有病或营养差的家兔不易制成动脉粥样硬化模型；饥饿、创伤动物易于进入休克；发热动物代谢增加，体温升高1℃，代谢一般可增加7%左右。动物潜在性感染，对实验结果的影响也很大，如观察药物对肝功能的影响，感染球虫病的动物，肝脏上可能有球虫囊，其肝功能必然会有变化。

4. 实验设施 从事新药研究的实验室及其设施应符合国家药品监督管理局的有关规定。在药品非临床研究阶段，评价安全性的资料，主要来自动物实验。因此，动物的饲料，实验室及配套设施等，应尽量避免工作人员、实验器材及实验动物之间发生交叉污染，尽量降低各种生物、化学及物理因素干扰实验动物对药物的正常反应。

动物饲养条件应与所用动物的等级相适应，例如，普通动物在开放或半开放系统内饲养；清洁动物在半开放或封闭系统内饲养。

5. 年龄 动物的解剖生理特征和反应性随年龄而有明显的变化，一般幼年动物比成年动物的敏感性要高，这可能与抗体发育不健全，解毒排泄的酶系尚未完全发育有关。所以一般认为幼年动物不能完全取代成年动物。老年动物的代谢功能低下，反应不灵敏，不是特别需要一般选用。有人观察不同年龄组大鼠和小鼠对乙醇、汽油、戊烷、苯和二氯乙烷等急性毒性的影响，按LD₅₀及麻醉浓度来看，其敏感性基本上为幼年>老年>成年。因此，药理学研究一般选用成年动物，体重为小鼠18~22g（或扩大到16~25g），大鼠200g（150~250g），家兔2kg（1.5~2.5kg），猫2~3kg，狗8~10kg，猴8~15kg。应该指出的是，动物的年龄与体生一般呈正比关系，小鼠和大鼠常根据体重来推算其年龄，但其体重与饲养管理等亦有密切的关系，动物正确年龄应以其出生日期为准，故除标明选用动物的体重外，还应注意其年（月、周）龄。常用动物性成熟年龄，小鼠为6~8星期，大鼠8~9星期，豚鼠6~10星期，兔4~5月，猫6~8月，狗6~8月。

必要时，可根据试验要求，选用特定年龄、性别的动物。例如，有些慢性试验，观察时间较长，可选择年幼、体重较小的动物；研究性激素对机体影响时，一定要用幼年或新生的动物；制备四氧嘧啶（alloxan）糖尿病模型和进行一些老年医学的研究，应选用老年动物。

6. 性别 不同性别的动物对同一药物的敏感性可以差异较大。例如，激肽酶能增加雄性大鼠血清中的蛋白结合碘，减少胆固醇水平；而对雌性大鼠，则反使蛋白结合碘减少。麦角新碱给予5~6周龄大鼠，雄性有镇痛效果，雌性则无。大鼠参四氯化碳的敏感性雄性>雌性，而对固醇类激素和巴比妥类则雌性>雄性。雌性动物性周期不同阶段和怀孕、授乳时，机体的反应性有较大的改变，所以研究工作一般优选雄性动物或雌雄各半做实验，雌者庆未孕。特定的实验，如为了观察药物的避孕作用、保胎作用以及对生殖期或围产期的毒性等，则应选用雌性动物。

（六）对受试药物的要求

受试药物是药效学研究的对象和物质基础，所以应符合一定要求，否则各项试验等资料不能反映受试药物的实际情况。因此，处方、生产工艺、质量标准及剂型等尚未固定者，不宜开展药理学研究，其试验结果也不能用作新药药学或毒性学的评价。对受试药的要求如下：

1. 处方固定 受试药的处方务必固定，并应符合中医药理论。手忙脚乱的中药材要经过生药学鉴定，确定中药品种、产地及药用部位。加工炮制品种，方法应合理，明确辅料用量和炮制品质量。对药典内未收载品种，应按（新药审批办法）规定，完成并申报有关资料。

2. 制备工艺、药品质量标准应基本稳定 工艺要经过优选确定。中药成分复杂，药效各异，组成复方并非药物简单相加，所以对复方中药一般应复方提取。此外，质量标准应基本可控。

3. 制剂或提取物作为受试药的优缺点 药效试验可用成品制剂或提取物。成品制剂与临床用药一致，发挥药效作用的快慢、强弱、维持时间，以及生物利用度等更近似于临床。但成品制剂内含有辅料（溶媒、基质）等。例如，大量糊精和蔗糖等给药容积大，水溶后粘稠状，灌胃不便；挥发油包裹物及缓释制剂等颗粒较大，小动物难以灌胃给药。一般说，提取物溶解性好，含药量高及相对稳定，给药量容易控制和相对正确，故多用之。

4. 给药途径对受试药的要求 消化道给药，包括灌胃、胃管、十二指肠给药及喂饲等，可根据具体情况，采用制剂或提取物。注射给药及离体试验，尤其是静脉给药，宜用水溶性高、精制的中药制剂，尽量去除杂质及可能干扰试验的因素，要求控制在生理范围内或符合注射剂的要求。气雾剂、吸入剂及体腔内给药（胸、腹腔等）基本同上注射剂。粗制剂在试管内给药或离体试验时，可以考虑用含药血清。否则有可能出现假阳性，其结果仅供参考，不能作为判断和评价药效的主要依据。外用药，包括活剂、擦剂、膏剂等，以外用给药方式为主，可采用制剂或提取物给药。但对眼、耳、鼻等粘膜的用药要求较为严格，应注意药物对粘膜的刺激性及损害等。

（七）药效学试验的剂量

1. 药效学试验剂量的确定 在观察一个药物作用时，应该给动物多大的剂量是实验开始时应确定的一个重要问题。剂量太小，难以显示药效，剂量过大，又可引起动物中毒，乃至死亡。尤其在离体试验中，药物浓度和用量如不加限制，可出限各种各样的结果，从而会导致片面或错误的结论。严格地讲，药效最终是指在人体所能接受的剂量下，药物所产生的作用，因此剂量选择应合理，并有一定的限制。

由于中药与化学药品不尽相同，后者的一些计算公式不完全适用，目前尚无公认的计算公式和方法，以下介绍几种估算剂量的方法供参考选用。

(1) 临床等效剂量，人与动物对同一耐受性相差很大，一般动物的耐受量比人大，也就是单位体重的用药量动物比人要大。其中一个重要的因素是动物个体小，单位重量内所占的体表面积大，因此，如果用体表面积来测量则相对比较合理。所谓临床“等效”剂量，即指根据体表面积折算法的在同等体表面积（ m^2 、 cm^2 ）单位时的剂量。尤其对于一些安全系数小的药物，如抗癌药、强心苷等药物按体表面积计算比按体重用药更为合理，实验误差可以明显缩小。但体表面积不易直接测得，通过公式近似估算后再计算用药量，相比之下就显得有些复杂；而且这种合理具有相对性，因为动物与人的耐受性和反应性不尽一致。

(2) 根据临床用量的体重计算：这是中药药理试验中常用的方法。具有长期大量用药经验的中药及其制剂，可根据人用剂量按体重折算，用量一般以计算单位内所含生药量（g或mg）表示，以体重（kg或g）计算用量。动物试验用量为人用剂量的数倍至几十倍。其粗略的等效倍数为1（人）、3（狗、猴）、5（猫、兔）、7（大鼠、豚鼠）、10~11（小鼠）。

以上剂量大致等于等效量，误差允许达0.5倍至1倍。例如，小鼠有效量为1.0mg/kg，则大鼠大致为07.mg/kg，可在0.35~1.4mg/kg范围。保健食品功能试规定，剂量组中有一个剂量应相当于人摄食量的5~10倍，一般前者指大鼠倍数，后者为小鼠倍数。

(3) 根据半数致死量 (LD₅₀) 计算；凡能测出LD₅₀者，尤其是一、二类新药，可用其1/10、1/20、1/30、1/40等相近剂量作为摸索药效试验高、中、低剂量组的基础。

(4) 根据文献估计剂量：文献中相似药物的用量，若处方相似，提取工艺相似，可作为参考，估计出供试药剂量范围。

(5) 一般情况下，药效试验的高剂量应低于长期毒性试验的中剂量或低剂量。特殊情况下（如抗癌药），药效试验剂量可适当提高，但不应超过长期毒性试验的高剂量。

(6) 通过预试验测定剂量：不论以何种方法选用的给药剂量均应通过预试验，摸索到能出现药效的适宜剂量范围，然后再确定正式试验的剂量。

2. 剂量的设置

(1) 剂量组：一般情况下，各种试验至少应设置3个剂量组，以便迅速获得关于药物作用较完整的资料，例如，受试药物有无作用，作用强弱，与剂量之间的关系等。理想的做法是从不起作用的剂量开始，一直到接近完全反应的剂量。根据剂量与效应的关系，画出剂量效应曲线。大动物（猴、狗等）试验或特殊情况下，如用来源较少、昂贵动物或试验难度大者，可设2个剂量组。

每组试验动物数，一般小鼠不得少于10只，大鼠为8只，猫、狗等为4只以上，以避免个体差异和实验误差，以便进行统计学处理。

(2) 量效关系：药效学试验结果应呈现明确的量效关系，即在一定剂量范围内，药物效应随剂量的加大而增强。特别是一、二类新药及注射剂应尽量找出明确的量效关系，以提供更多的信息量，使结果更为可靠。但亦应看到，中药成分复杂，不同成分对同一效应可能出现不同或相反的作用，从而会打乱剂量与效应间的平行关系，失去规律性。例如，人参中含有皂苷、多糖、有机酸和麦芽醇等多个活性成分，其皂苷又有20余个，它们作用有所不同。Rb1为代表的人参二醇型皂苷，对中枢为抑制作用，而Rb1为代表的人参三醇型皂苷，对中枢为兴奋作用。在心血管方面，人参既有增强心肌收缩力的作用，此作用以三醇型皂苷为主；又有扩张血管的作用，此作用以三醇型皂苷为主。当血压过低，或休克时，衰弱心脏对强心成分反应增强，使血压回升；反之，当血管痉挛、血压升高时，对扩张血管的成分反应增强，使血压下降。尤其是三、四、五类药有时难以做出明确的量关系，则不宜强求。

(3) 剂量组设置的原则要求：一般按等比级数分组，在量效关系明确的情况下，根据剂量效应关系，以纵标表示效应强度（E），横坐标表示剂量（D），画出的曲线，在普通坐标纸上呈不对称的S型曲线，在对数表格纸上呈对称的S型曲线，其最大反应的50%处是对称的，而且这个居中点的斜率最大，达到该点反应所需的药物剂量为半数有效量（ED₅₀）。如果用双对数坐标纸作图，将效应强度改为几率单位，就会得到一条直线。它比曲线准确、方便，易于计算斜率及测出任意的ED值，故在药效研究中广泛应用。

特殊情况下，可用等差级数分组，尤其当药物的安全范围较小，组距不能拉大，而药效作用又明显时。如抗肿瘤药等。

（八）药效学试验的给药途径和方法

1. 给药途径 不同的给药途径对药物的作用、作用强度和时间，以及其体内过程等都有很大影响，因此药理研究应尽可能与临床应用途径一致。如口服用的药物可采用灌胃、胃管、十二指肠等给药。有时动物试验采用临床相同的给药途径确有困难者，可根据具体情况采用其他给药途径进行试验。例如心脏血流动力学实验，要求药物在短时间内发挥作用，口服给药难于显示结果，而需用注射给药。但所用制剂要符合注射的要求，适当精制的粗制剂，只能皮下、肌肉或腹腔注射，而宜静脉给药。大鼠或小鼠进行连续多次或长期静脉注射或输注给药时，困难较大，可酌情改用皮下、肌肉或腹腔注射（有刺激性者不宜），或换用大动物（狗、猴等）进行试验。

应注意有时注射给药可产生与口服给药不同的作用，例如，枳实、青皮等含有对羟福林，注射给药可激动肾上腺素受体而产生升压效应，而口服时该成分易被碱性肠液破坏，故无此作用。桃仁提取物静脉注射用于治疗肝纤维化，其所含苦杏仁苷，大部分以原型排出，少量转化为无毒的硫氰酸盐排出体外；如采用口服给药，苦杏仁苷在胃肠道内转化为氢氰酸，毒性比静脉注射大40倍，量大时可以致死。为此，凡采用不同于临床给药途径进行试验时，应说明原因和选用给药途径的理由，并分析试验结果，排除可能存在的干扰因素及假象，充分估计不同给药途径可能产生的影响，正确判断试验结果。有疑问的结果仅供参考，不能作为新药有效性评价的主要根据。

为准确评价新药的有效性，各种试验最好采用两种给药途径。一种与临床给药途径相同，另一种以注射给药（静脉、腹腔或皮下注射）。但中药粗制剂，不适于注射给药者，可免作第二种给药途径的试验。

2. 给药方法

(1) 给药容量：根据试验用药剂量而定，但应该适宜。如果容量过小，容易产生误差；容量过大，则动物难于耐受乃至死亡，亦会给药效观察带来困难，如小鼠灌胃过多，会产生匍匐少动，与药物的镇静作用混淆。药理试中最大的给药容量参见如下：

小鼠禁食（不禁水）12~16h，每次用量：灌胃（ig）不超过0.4ml/10g（体重）（最大为1ml/只）；皮下（sc）、腹腔（ip）和静脉注射（iv）不超过0.5ml/只。大鼠禁食（不禁水）12~16h，每次用量：灌胃一般为1~2ml/100g（体重），最大不宜超过5ml/只；腹腔注射1.5ml/只；皮下和静脉注射不超过1ml/只；肌肉注射0.4ml/只。兔和猫最大用量：灌胃20ml/次，皮下、肌肉注射2ml/次，腹腔5ml/次，静脉10ml/次。

(2) 不同剂量的体现：原则上，不同组间的高低，灌胃给药采用等容积不同浓度；皮肤外用药不同浓度或不同面积或不同次数，而一般不宜用不同体积来体现；滴鼻、滴眼药用等容积不同浓度等。配制或稀释的液体要求无生理活性，如蒸馏水、生理盐水、注射用水、食用水等；不溶性物质则加用助悬剂或增溶剂等。

(3) 给药方式：有预防性给药和治疗性给药，或防治结合的给药方式等。预防性给药、先给药几日或几次，使药物在体内达到有效浓度，再观察药物的保护作用。治疗性给药，先制造动模型，然后观察药物的治疗作用。后者符合临床实际，更为合理，药效实验应尽量采用，特别是关键实验。但对起效缓慢、温和的受试药物或迅速出现作用而持续时间短的指标，一次性给药或造模后给药，常难获得预期结果，只能先给药再进行试验。两种给药方式，尽量以治疗给药为主，部分试验可根据具体情况采用预防性给药。有些实验如抗感染体内保护性试验，常采用预防与治疗相结合的给药方式，即先给药几日（次），接种感染原后，再给药几日（次）。

此外，给药次数、给药间隔、全部疗程等，应根据实验要求及药物的特点合理选定，使之正确、充分显示药效，有利于对新药作出科学的评价。

（九）药效学研究的对照

比较研究是科学实验不可缺少的条件，没有比较，就没有区别，也就谈不上科学性。中药药理研究中常设的对照组如下：

1. 正常对照组 又称“空白对照组”即用正常动物对照。其目的是检测试验方法的可靠性，防止假阳性，以及评价造模是否成功。如果新药中含有特殊辅料，包括溶媒、基质等。例如，溶媒本身有活性（如乙醇），基质有促透皮吸收作用（或含经皮吸收促进剂），则除设空白对照组外，尚应设辅料对照组，以了解对药效试验的影响等。

2. 模型对照组 除了不用被研究的药物以外，其他处理均同给药组，即模型组动物要经受同样的造模处理。是进行药物有效性的测定。

3. 阳性（已知有效药物）对照组 除所用药物为已知有效药外，其他一切条件与受试药相同。选择适当的对照药是准确判断试验结果及药效的重要依据之一。测试方法的可靠性，防止假阴性。以选用化学药品为佳，比较受试药的优劣和特点，以选用同类中药为佳。

阳性对照药的选择应注意三项要求①可比性，应用药效肯定的同类中药或化学药，要求主治（或作用）相同，给药途径尽量一致。如为中药还要求功能及剂型相同。有时找不到符合要求的同类中药，在主治、给药途径相同的情况下，其功能、剂型可有些差异，如益气活血的颗粒剂，可采用行气活血的片剂、口服液、丸剂等作阳性药。②合法性，应用《药典》或部颁布标准收载，或近来批准生产的合法药物。③择优性，选用目前医学界公认有效的代表药。要防止为了突出受试药而选用疗效差、不良反应严重，甚至即将淘汰的药物。

由于中药的作用范围较广泛，有的作用可能与一个阳性药不尽相同，可再选作用相似的其他中药或化学药，所以一个受试药可能有几个阳性对照药。根据需要，阳性药可设一个或多个剂量组。由于中药发按作用常较缓慢、温和，以口服给药为多，而有的阳性对照药（特别是化学药）作用快而明显，或者注射给药，所以给药时间和给药途径既要考虑受试药物能完全发挥作用，也要兼顾阳性对照药的作用特点，可以不强求同步一致。

4.原剂型对照 主要用于四类新剂药效的比较及评价，以了解新药（新剂型）在哪些方面优于原剂型。

中药注射剂需与口服给药途径的中药制剂或提取物比较作用强度和时效关系等，以证明注射剂的优越性和特点。

（十）实验结果的处理

实验结束后，对结果要进行数据处理和分析，其目的主要是证实是否符合试验设计的假说，判断结果的可靠性及准确性等，并且经过归纳、综合，找出内在规律。

1. 图表 实验数据的表达方式，可用表格、线条图、照片等，它们是表达统计数量关系的主要工具，故全称为统计表和统计图。统计表是把分析的事物（如组别）及其指标（如试验结果的数据）用表格列出，以便于计算、分析、对比。一般包括标题、分组、动物数、给药途径、剂量、指标单位、数据及统计学标记等。图是用点、线、面的形式，把事物之间的数量关系表示出来。由于图对数量的表达较粗略，不便于进行深入的分析，故图不能取代表。一般作图时仍然要附有统计表。

表及图可以节省繁琐的文字叙述，本身要求简单明了，层次清楚。简单明了是指结构要简单，使人一目了然；层次清楚指内容要按照逻辑合理安排。使之便于阅读、比较和分析。

2. 统计学处理 实验数据处理大多求助于统计，中医药实验研究中所观察或测量的数据，按机体对药物的反应从统计学角度可分为三类。

(1) 质反应资料，又称计数资料或定性资料。机体对药物回答只有“是”或“否”两种，如死与不死，翻正反射的存在或消失，某种病理症状如惊厥、异常步态) 出现或不出现等。实验结果常是百分比或自然比，其显著性检验一般采用 χ^2 检验。

(2) 量反应资料，又称计量资料或定量资料，这种反应可表现为数量差异如体温、血压、尿量、咳嗽次数、肌肉收缩幅度，以及血液生化测定数值等。其实验结果常用t检验，特殊设计的试验结果用方差分析。

(3) 等级资料，可以认为是一种有序的计量资料，它包括①时反应资料，如潜伏期、凝血时间、药效持续时间等；②病变程度及临床疗效等按等级分组的资料，如一、+、++、+++或痊愈、显效、好转、无效和恶化等；③两端确毁数据不明的分组资料，如血清滴度为： $>1:40$ 、 $1:80$ 、 $1:160$ 、 $1:320$ 及 $<1:320$ 等，这些资料不宜用均数及标准差作常规的统计学分析，目前主张用等比差值法、等级序值法、秩和法及R分析等非参数统计分析，尤其是后者，能确定各个比较组的强或劣，故为多用。

实验研究中，对实验数据应保持真实性，不能轻易废弃。如果试验者随意挑选数据，那就毫无科学性了。除非实验失败，如操作失误、动物死亡等，资料已失去正确性，可以废弃不用。对个别严重偏离的数据，即超过3个标准差，分析可能的原因后，为排除个体对实验结果的干扰，也可考虑废弃不用。

(十一) 中药新药药效学研究的申报内容及对实验结果的评估

根据国家药品监督管理局1999年3月12日发布，从5月1日起施行的《新药审批的办法规定，新药（中药材）或新药（中药制剂）申报项目表第13项；与功能主治有关的主要药效学试验资料及文献资料，是评价新药有效性，决定能否开展人体试用，进行临床研究的重要依据之一。主要药效学试验申报资料，一般包括试验摘要，试验目的，试验材料，试验方法和结果，讨论和结论，参考文献等。

1. 摘要 简要说明药效学主要研究内容及其结果。
2. 试验目的 说明所选做试验及其目的。

3.材料

(1) 受试药物的来源、批号、制剂或提取物每1g(ml)含提取物或生药量(g或ml)，以及含特殊辅料情况；试验前有无预处理，离体试验或注射给药注明可能影响试验结果的因素(如无机离子、pH等)。并写明临床所用制剂，用法用量及疗程等。

(2) 阳性对照药应注明生产单位、批号、规格、处方主要组成、功能主治、用法用量。

(3) 其他主要试药应列出生产厂家、批号、级别。

(4) 动物的种属、性别、年龄、体重、健康状况、饲养条件、提供单位和合格证，试验前有无预处理及特殊要求等。

(5) 主要仪器的型号、规格、生产厂家及主要性能参数等

4. 方法 按主要药效和辅助药效逐项书写。常规实验方法和常用指标可以简单介绍，较复杂、不熟悉、改进或自己建立的方法应详细描述，包括方法指标的内容、操作程序、仪器主要性能参数、试验条件的控制等；动物分组处理、手术、指标的测试等；给药途径、剂量及容量、给药时间、次数、预防性给药和（或）治疗性给药等。

5. 结果 试验结果根据主次，按序介绍，数据应进行统计学处理，制表绘图要规范。数据应准确无误，真实可靠，结果的分析判断应客观，切忌夸大、虚报，或无限推论以及用主观愿望代替客观事实。对阴性、矛盾结果，仅有作用趋附势和（或）量效关系不明确等，应认真分析，提出合理解释。注意排除对实验影响的各种因素，例如，实验设计不合理，主攻方向不明确，模型、方法和观察指标选择不当，以及动物的选择、实验环境、饲养条件、昼夜节律、药物的质量、剂型、剂量、给药途径和方式、技术操作和仪器测试误差等。

6.讨论 应简明扼要，着重讨论与新药有效性评价有关的问题，例如，受试药的疗效，作用范和强度，起效快慢和持续时间，与同类药（或原剂型）相比何优缺点，对试验有关问题的解释和分析等。最后对受试药物的开发研制作一客观的评估。

7.结论 根据试验结果，提出准确可靠而精辟的科学结论，有时可将讨论与结论合在一起叙述。

8.参考文献 应符合惯例的各项要求，少而精，不宜罗列过多。直接引用公开发表的第一手资料，以及与本实验有密切关系，有重要参考价值的文献为主，特别是新方法、新指标、新发现、新进展或新论点的文献。

第二章 中药血清药理实验方法

体外实验方法（in vitro）对于药理学研究非常重要，特别是在细胞、亚细胞、分子等水平进行深入的机制研究，没有体外实验方法几乎是无法实现的。在新药研究领域，国外目前也日益重视体外实验，包括在细胞模型上的观察，一是由于所需样品量较少，实验效率高；另一方面则是由于道德上的原因，减少动物的痛苦和牺牲。但是，体外实验方法对于中药而言，一直是一个难题，中药粗制剂中含有大量杂质，若直接加入体外反应系统，其渗透压、PH、鞣质、无盐等许多非特异性理化因素，会严重干扰实验，产生假阳性或假阴性一结果，故其科学性难以得到认可。

再同近年来发现，中药口服后其有机成分常在胃肠内受到水解转化液和微生物作用，经转化而后进入机体产生作用，如柴胡皂苷a在胃肠道内可转化为9种不同化合物吸收，秦艽和龙胆所含龙胆苦苷部分在肠道内转成龙胆碱、龙胆醛等其他活性物质后吸收，所以中药中的有效成分并不一定就是在体内直接发挥作用的成分。这就使人们对中药提取物直接用于体外实验的价值产生了怀疑。近年来开展的中药血清药理实验方法是一种新的体外实验方法，它将受试物经品给予动物后，取其血清作为药物源加入离体反应系统中研究其药理作用。本章以下对该方法每个实验环节的具体操作及需要注意的问题作一简单介绍。

一、动物给药

(1) 动物选择，作为含药血清的供体，大鼠、家兔等常用实验动物均可采用。在体外培养细胞的实验中，如果选择与培养细胞相同或亲缘关系较近的动物作为含药血清的供体，培养细胞似生长较好。家兔可多次采血及提供较多的血清，故也可考虑以空兔犬作为含药血清的供体动物。

(2) 给药剂量：目前多数研究者常参考动物等效剂量（按体表面积）给药，但各实验差异很大。从等效剂量——等效剂量 \times 体外培养系统中血清被稀释的倍数。

(3) 给药方法：目前较一致的看法是，多次给药优于单次给药；连续多日给药优于一日给药。虽然并非所有中药的所有药理观察指标都是如此，“优于”的程度也有差异理论上它取决于药物有无蓄积性和蓄积性大小。蓄积性愈大，多次给药后累积血浓度愈高。据分析，如按每日两次给药，412个已知药物，根据其药动学参数推算约有67%的药物具有一定的蓄积性。故血清药理实验一般以采用多次给药为好。

二、采血时间

含药血清的采血时间应落在服药后血药浓度的高峰期。其方法有：

(1) 通法：每日给药2次，连续3日，末次给药后1h采血。按此法给药，理论上80%以上的药物成分的药浓可达单次给药的峰浓度以上。给药的持续时间愈长，药物内各种成分的血浓度蓄积愈高，直至稳态。但根据药动学规律推算，最长不必超过20日，在末次给药后1~2h采血均可，但每个实验采血时间必须一致。

(2) 预试验法：先取少量动物进行预初试验，通过不同采血时间进行比较后确定。但需注意，每种中药或复方的各个药理指标的最佳采血时间都可能不同，不能互相替代。阳性对照药也必需另测其最佳采血时间。

三、含药血清的制备

（一）关于灭活

灭活的目的是希望消灭或减少空白血清（指未给药情况下的血清）的活性。通常采用的方法是55℃min灭活。在特殊情况下还可采用其他方法灭活，例如在浴槽离体组织实验中，用去蛋白的方法灭活以减少通气产生的大量泡沫影响实验操作。

灭活是否应作为血清药理实验方法的常规措施尚有不同意见。实验证明，灭活可以降低血清对细胞的毒性，这是有利的一面，但另一方面，它也有可能消除（或部分消除）药物刺激机体产生的体内活性物质，如抗体、补体等，而后者也应视为药物作用，已有实验证明，灭活确可使含药血清的部分实验指标活性下降，这是灭活对实验不利的一面。

（二）关于血清的添加量和方法

（二）关于血清的添加量和方法

在体外细胞培养实验中特别要注意血清的添加量。影响血清添加量的因素主要有：导种动物血清对细胞的毒性作用，添加量过大，细胞不能正常生长或存活；即使使用同种动物的血清对不同部位的细胞也会出现不同的毒性，致使血清的加入量受到限制。此外，血清对细胞还可能有其他活性，例如有报道空白血清对自由基损伤血管内皮细胞有一定保护作用，培养基中如加入血清量过多可使该细胞模型难以形成。所以在正式实验之前，宜先观察空，白血清对培养细胞的影响，并确定添加量大小。

血清的加入法，可以直接加入，也可以制成冻干粉加入。

四、含药血清的保存

实验证明，含药血清的保存对药效的影响，视药物、环境条件和测试指标不同而异。在桂枝汤抗流感病毒实验中，含药血清经4℃5日保存后，作用未见明显影响。在头风饮的实验中，含药血清-20℃低温保存2个月，14C-HT释放抑制率从78.56%降至52.61%；对血管内皮细胞Ca²⁺通道阻滞作用也有所降低，45Ca²⁺摄取抑制率从57.68%下降至19.08%；灭活对以上两指标并无明显影响，反有所提高。

五、实验设计

（一）空白血清对照

血清药理实验方法必需设有严格的空白血清对照，这是因为不含药的空白血清对细胞或组织也能有活性或有影响细胞生长的“毒性”，故必须有相同质和量的空白血清作为对照。

（二）量效设置的两种方式

为观察不同剂量的药物效应，需设置不同剂量组。血清药理实验方法的剂量组设置可有以下两种方式：

1. 按给药剂量分组 动物摄入药物剂量不同，体外实验系统中血清添加量相同，这是最常用的一种方式。

六、基本评价和与中药新药研制开发的关系

自日本和我国开展中药血清药理研究以来，大量的实验证明该方法可行，目前已在抗菌、抗病毒、抗肿瘤、心血管、免疫、呼吸、消化、泌尿、神经系统等中药研究方面取得了可喜的成绩。且研究证明，这种研究结果与整体药效相关性较好。例如以当归补血汤含药血清与整体给药抑制小鼠肝组织过氧化脂质作用的药效动力学参数相比较，结果见表17-3。

其结果表明，药效动力学各项参数，血清药理实验方法与整体药效研究结果较为接近，证明两者具有较好的相关性。

血清药理实验方法的建立，为中药体外实验研究找到了一种有效方法，其科学性、可信度较粗制剂直接用于体外实验明显提高。

（三）影响因素较多，实验设计和操作务必注意

可以认为，血清药理实验方法对于中药体外实验而言是一个突破性进展，许多以往无法进行的细胞和分子水平的实验可以采用本法进行。但是，必须看到，影响该方法结果的因素较多，在评价时务必注意。这主要包括以下两个方面：①空白血清本身也有活性；②服药后不同时间采取的血样，药效强度可以有较大差异。此外，体外反应系统中药物产生药效的浓度同临床服药剂量之间尚无明显规律可循。血清药理实验所需给药剂量，各种药物差异很大，且无法预见。理论上，细胞体液环境药物进入量多少，取决于药物入血后的分布情况，有些药物很易进入组织，而有些药物则由于其相对分子质量或其他各种原因，主要分布于血液内，而在细胞微环境内分布甚少。如血小板等血细胞，其微环境是血液，其作用的药物浓度就是血药浓度，而药物进入脑细胞的微环境须通过血脑屏障，血药浓度并不反映细胞周围的药浓度。这个问题是所有中西药物共同的问题，所不同的是合成药物尚有表观分布容积等参数可以参考，而中药则否。

七、注意点

以上介绍了中药血清药理实验方法中有关动物选择、给药剂量、给药方法、采血时间、体外实验系统中的血清加入量等方法，都仅提供参考，采用其他方法也是允许的。但以下因涉及实验结果的科学性，是必须遵循的。

（一）大量的研究资料表明，空白血清对离体标本是有活性或“毒性”的，无论是浴槽内实验或体外培养细胞实验都是如此。如在小青龙汤对豚鼠离体气管平滑肌作用的实验中，发现豚鼠正常血清有显著的抗组胺作用，营养液中混入1/60和1/30的空白血清，即可使气管平滑肌产生 $41.4\% \pm 3.0\%$ 和 $76.6\% \pm 3.0\%$ 的松弛率。在桂枝汤体外抗流感病毒实验中，正常血清也表现明显的抗流感病毒作用，由副流感病毒 I 型引起的体外培养细胞病变度为2.47，如含有正常血清则其细胞其细胞病变度仅为0.5，两者比较， $P > 0.01$ 。还发现，正常血清对于细胞具有不同程度的“毒性”如以不同动物的血清加入体外培养的3T3细胞培养基内，发现随着添加量的增加，其生长繁殖受到明显影响。

所以，在血清药理实验，空白血清的对照必须非常严格，对照血清的质和添加量必须与给药组完全一致。实验设计时必须注意，否则可能出现假阳性结果。

常见的错误设计举例。如下：

1. 空白血清对照的“质”不同如表17-8。

表16-8 含×××汤血清对××细胞的××××作用
(错误设计举例之一)

组 别		作用指标
正常血清对照组		X、X±X、X
含药血清模型动物	5g/kg	X、X±X、X
	10g/kg	X、X±X、X

注：与模型组比较， $P<0.05$

上例中，对照组是正常动物血清而给药组是模型动物血清，是两种不同的血清，理应增加一组模型动物（不给药）血清作为对照

2. 空白血清对照的“量”不同 见表17-9。

表17-9 不同含×××汤血清添加量对××细胞××作用的影响

组别	血清添加量	作用变化量	变化(%)
正常血清组	10%	X、X±X、X	
含药血清组	10%	X、X、X±X、X	XX、X
	20%	X、X、X±X、X	XX、X
	30%	X、X、X±X、X	XX、X
	50%	X、XX、X±X、X	XX、X

注：与正常血清组比较， $P<0.05$ ， $P<0.01$ 。

上例中，对照组血清量是10%，而给药组血清添加量高达50%，两者血清加入量不同，对照组比较，虽有显著差异，但如果对照组加血清量增加至相等体积，是否也会相似程度的变化？合理的设计应该是，设不同含量的正常血清作对照，或者以50%添加量的正常血清为对照，给药组含血清总量均为50%，而其中所含药物血清的比例不同。

（二）操作方面

操作程序不当可以引起系统误差。前已述及，动物给药后不同时间采血，其药效可有明显差异，因此，要特别注意不同剂量组采血时间的可比性，注意避免因采血时间不同造成的系统误差。例如：××浸膏研究中，设置大、中、小三个剂量组。统一同时给药。给最后一个先给小剂量组动物采血，接着给中剂量组动物采血，最后给大剂量组动物采血，到最后一个动物采血完成，可能已是给药后2h了。如果××浸膏给药后血浓高峰 C_{nmx} 出现在给药后2h；则很可能出现一个非常理想的量效关系结果。但是也许这是因采血时间不同而造成的。