

总 论

第一章 中药药理实验基本知识

第一节 中药药理实验的目的与要求

一、中药药理实验课的目的

中药药理实验是中药药理学教学的一个重要组成部分，是理论联系实际的重要环节，是巩固且加强学生对所学理论知识理解的重要途径，通过中药药理实验课的学习，可达到下列目标：

1. 通过实验课进一步理解并验证中药药理理论，掌握各类中药的主要药理作用和常用研究方法，将传统中医药理论与现代医学研究有机地联系起来。
2. 通过实验操作训练，正确掌握实验动物捉拿手法、给药技术、标记方法；掌握实验动物给药剂量折算方法；了解中药药理实验数据最基本的处理方法；熟悉实验方案的设计与实施、实验条件和实验方法的选择；熟悉常用仪器的性能与规范的操作，进而全面培养学生将来从事中药药理和中医药科学研究的基本技能。
3. 通过设计性、综合性实验训练，模拟中药药理研究的全过程，增强学生的创新意识、创新精神和独立工作的能力，培养学生在科学研究过程中的创新思维及严谨的科学态度、严密的工作方法和实事求是的学风。

二、中药药理实验的基本要求

为了保证实验教学的正常进行，创造良好的实验环境，进入中药药理实验室的学生应做到：

1. **遵纪守法** 按时进入实验室，不迟到、早退和旷课；进入实验室必须穿白大衣；

实验期间要保持实验室的安静,不得高声喧哗、打闹,不准抽烟、随地吐痰、乱丢纸屑杂物,注意保持实验室和仪器设备的整齐清洁。

2. 提前预习 实验前要认真预习实验内容、明确实验目的和要求,熟悉实验的基本原理、方法、步骤,了解仪器设备的操作规程和实验动物的特性,做到心中有数,避免实验过程中出现忙乱和差错。

3. 善待动物 动物是人类的朋友,所以在中药药理实验过程中要善待动物,尽量减少动物的使用量;实验操作时要尽量减少动物精神上及生理上的恐惧和痛苦;必须要处死动物时,要采取安乐死措施等。

4. 注意安全 实验过程中要小心谨慎,防范触电、火灾、中毒等事故;动物捉拿时一定要戴防护手套,防止咬伤。发生意外情况要保持镇静,迅速采取措施(切断电源、气源、清洗伤口等),并及时报告指导教师。

5. 细心观察 严格按照实验教程进行实验,实验中要听从指导教师和实验技术人员的指导,认真仔细观察动物的反应,及时客观地记录实验现象及数据。

6. 做好善后 实验结束后要及时清洗所用器械、清理实验台、打扫实验室卫生、按规定进行仪器检查及保养、做好实验动物的尸体或器官的处理工作。并对实验结果认真分析,按要求撰写实验报告。

三、实验报告的撰写

实验报告是实验实施情况的总结报告。实验报告要客观地反映实验结果,不杜撰、修改数据,文字简练,书写工整,措辞科学、逻辑性强,并对实验结果客观地分析讨论。实验报告内容应该包括以下几个方面:

(一) 实验名称

实验名称既可用实验教程上的题目,也可自己根据实验内容重新确定。

(二) 报告人及时间

在实验报告中应注明实验者姓名、专业、年级、学号和实验日期。

(三) 实验目的和原理

1. 实验目的 主要说明通过本实验将学习到的实验方法及需验证的理论。

2. 实验原理 简要介绍本实验中涉及动物模型制备原理、指标检测及受试物选择的理论依据。

(四) 实验材料

注明实验所用的仪器、药品、动物等条件。实验条件应详细、明确,如仪器型号、厂家;试剂规格、厂家、批号、浓度;受试物名称、药物组成、规格、厂家、批号、制备方法、给药浓度、剂量等;动物的来源、品种、性别、体重等。

（五）实验方法

简明扼要写出实验的主要流程，如实验如何分组、给药途径、具体的观察指标及测定方法等。

（六）实验结果

实验结果应以实验室为单位进行处理、统计及分析，常用表达形式有：

1. 统计表 采取三线表的格式，表格应有确切恰当的标题，标题要有自明性；表格中实验组别、剂量等项目一般置于表格左侧，具体检测指标置于右侧。数据包括实测值和各实测值的统计数据，统计数据一般采用均数 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 的形式表示。

2. 统计图 统计图有柱形图、折线图、散点图等形式，图也同样应注明标题、计量单位。选用哪种图形，可根据实验数据的类型合理选用。

（七）结论与讨论

结论是运用专业知识对实验现象和取得结果进行的高度概括。讨论主要包括对实验结果的分析、实验中出现异常现象的分析、体会和建议等方面。

第二节 中药药理实验设计的基本知识

一、中药药理实验设计的重要性

实验设计是指实验者在实验前根据实验目的所拟定的实验计划或研究方案。实验设计是实验实施的依据，也是实验质量的重要保证。周密而完善的实验设计，能够合理地安排人力、物力和时间，保证实验过程的科学性和合理性，严格控制实验误差，获得准确而可靠的实验资料。

二、实验设计的基本原则

实验设计的三大原则：重复、随机和对照。

1. 重复 由于实验动物存在个体差异，常需多次重复实验方能获得可靠的结果，得出可信的结论。因此说，重复是保证科学研究结果可靠性的重要措施。重复包括两方面的内容：

(1) **重现性** 即在同样的条件下能够重复出相同的结果。可靠的实验结果无论何时、何地、何人操作均应做出一致结果。另外，重复实验还能了解影响实验的关键技术及实验的稳定性，至于重复次数应根据实验要求和性质而定。

(2) **重复数** 要根据实验结果，得出一个结论，必须有足够的样本数，当然样本数越多，得出的结论越可靠。但样本数越多，实验成本就会增大，甚至影响实验质量。因此在中药药理实验中规定了动物的基本例数：

①小型动物：计量资料每组 10 例，计数资料每组 30 例，如小鼠、大鼠。

②中型动物：计量资料每组 8 例，计数资料每组 20 例，如家兔、豚鼠。

③大型动物：计量资料每组 6 例，计数资料每组 10 例，如犬、猫。

2. 随机 是指随机遇而定。其目的是减少实验者主观因素的影响及偏性误差。实验中一切有可能影响实验结果的非研究因素都应随机处理，如动物分组、给药、检查、检测等。随机的手段可采用抽签法、随机数字表或计算器的随机数字键等。近年来提出“均衡下的随机”，即根据实验需要先将与研究因素密切相关的因素（如体重、血糖、血脂、血压等）由大到小或由小到大排列，分出不同层次，然后再分别对处于不同层次中的动物进行随机分组，使控制因素得到均衡化。

3. 对照 比较研究是中药药理实验最基本的方法。对照是比较的基础，没有对照就没有比较，没有鉴别。所以实验设计必须设立对照组。

设置对照组应遵循“齐同可比”原则。“齐同可比”是指对照组与实验组之间除了实验用中药、处理的不同外，其他一切条件如实验动物、实验方法、仪器、实验环境及时间等均应相同，实验动物的种属、品系、性别、窝别、年龄、体重、健康状况等也应尽量一致，以减少误差。

在中药药理实验设计时，可根据不同的研究内容，选择不同的对照形式，常用的对照是组间对照，组间对照主要有三种：

(1) 空白对照 指用不给任何处理的正常动物进行对照观察。

(2) 假处理对照 指除不实施真正的处理因素外，其他处理（麻醉、注射、手术过程等）一切相同，实验结果应为阴性结果。

(3) 阳性对照 采用药典收载、同行公认、疗效确切的药物作为对照，实验结果应为阳性结果。根据中药药理作用的特点，中药药理实验最好同时设中药对照组和化药对照组。

三、实验动物的选择

为了保证实验结果的科学性和可重复性，必须选择标准化的及与实验目的相适应的实验动物。从某种意义上讲，选择适宜的实验动物是成功的关键之一，实验动物的选择一般应遵循以下原则：

（一）相似性原则

相似性原则是指利用动物与人类某些结构、机能、代谢及疾病特点的相似性选择实验动物。中药药理研究的根本目的是要揭示中药作用规律和作用机制，研究和开发中药新药。因此，在选择实验动物时应优先考虑的问题是尽量选择在组织结构、生理功能、疾病特征等方面与人类相似的实验动物。

（二）特异性原则

利用不同品种品系实验动物存在的某些特殊的结构、生理代谢机能和反应的特异性，可满足不同实验要求，达到预期的实验目的。如家兔对体温变化十分灵敏，适于解热和热原检查等实验；而小鼠和大鼠体温调节不稳定，则不宜选用；家兔的心血管系

统，特别是血压不稳定，一般不适合做心血管系统实验，特别是降压实验；家兔、大鼠及小鼠无呕吐反应，故止吐实验不宜选择，宜选用家鸽、猫、犬等。

(三) 适宜规格的原则

1. 年龄 实验动物的年龄（周龄）不同，生物学特性也有差异。在相同外界因素刺激下可呈现不同的反应和应激状态。如家兔出生后两周以上肝脏才有解毒功能，4周后才能达到成年家兔的水平。一般实验应该选择成熟的青壮年动物为宜。

2. 体重 在饲养环境和营养水平相一致条件下，实验动物的体重与年龄有一定的相关性，实验中可以根据体重选择符合实验要求的动物，但应注意，不同品种、品系的动物都有各自的生长曲线，实验时如无特殊要求，一般情况下选择小鼠 18~22g，大鼠 180~220g，家兔 1.5~2.5kg，犬 7~12kg。

3. 性别 同一品种或品系而不同性别的动物，对于外界刺激的反应不尽相同，因此许多实验在动物选择时还应该考虑性别问题，否则会给实验带来较大误差或导致实验失败。从统计学的角度来说，单一性别的动物比两种性别兼用者所得数据的离散度要小，可靠性要高。因此，除必须用雌性动物的实验外（如热板法测小鼠痛阈值，妇科及计划生育用药则必须采用雌性动物），其他实验一般均采用雄性动物。

(四) 标准化原则

实验动物是活的实验材料，选用符合标准化质量要求的实验动物，是实现实验结果可靠性和权威性的重要前提。使用遗传背景明确或来源清楚的实验动物进行实验，是动物实验最基本的要求之一。实验中还应严格控制实验条件，包括诸如直接影响实验结果的环境因素、营养因素、实验室管理和操作程序等，这些虽非所选动物本身的质量问题，但是，如果不严格控制，即便动物质量和选择都没有问题，也不会取得理想的实验结果。

(五) 经济易获性原则

在实验动物的选择中还要考虑所用实验动物的易获得性，宜选用价格便宜、饲养经济、容易获得的标准化实验动物，选择相匹配的实验条件与方法，力求方法简便、成本最低。

(六) 政策法规

在动物选择中还需要充分考虑有关实验动物伦理道德及政策法规问题。包括“3R”原则，即采用 reduction（减少）、replacement（代替）、refinement（优化）手段以减少动物疼痛和不安。目前在国内外已被普遍关注和接受，它不但体现了对于实验动物的爱惜、保护和伦理道德，同时也体现了科学地进行动物实验的观念。

20世纪90年代以来，我国颁布了一系列有关药品的管理规范。如 GMP（good manufacturing practice），即《药品生产质量管理规范》；GLP（good laboratory practice），即《药物非临床研究质量管理规范》等，其中均涉及有关实验动物的规定，应该参考

执行。

四、实验方法的选择

(一) 坚持中医药理论的指导

中医药学历史悠久，源远流长，经过了几千年的临床实践，每味中药从性味、归经、功能、主治、用法、用量、配伍、禁忌等，历代医家都有大量论述，这是十分宝贵的临床经验，也是最朴素最真实的记载。例如，黄芪益气、大黄泻下、附子温里等。因此，我们在进行中药药理实验设计时，可以从中得到很多启示。

(二) 整体实验与离体实验相结合

整体实验以麻醉或清醒动物为研究对象，较为接近临床实际，所得实验结果可直接为临床所借鉴，也符合中医药特点。但整体实验结果易受体内神经调节、体液调节及其他因素的干扰。

离体实验主要以离体器官、组织、细胞为研究对象，能够排除体内各种复杂因素的干扰，直接进行观测，获得的实验结果准确、可靠，但实验体系缺少了机体完整统一的内环境和神经、体液的调控作用，与临床距离较远。

整体实验与离体实验是中药药理实验中的两大重要途径，二者既各有优势，又各有不足。考虑中医药学以整体观念为核心，重视整体的调控与调节，所以，在进行中药药理实验设计时，应以整体实验为主，离体实验为辅。

(三) 采用“病”与“证”的动物模型

过去中药药理实验曾大量应用正常动物进行，也取得了许多宝贵资料。但也发现有些作用对正常动物反应不明显，而对病理模型动物反应敏感。如五苓散对健康人、正常小鼠及家兔均无利尿作用，但对有水代谢障碍的水肿患者或动物却有明显的利尿作用。中药有“寒、热、温、凉”四气，《素问·至真要大论》言：“寒者温之，热者寒之。”《神农本草经》云：“疗寒以热药，疗热以寒药。”所以研究中药的药理作用，更需要建立与临床一致的病理模型进行实验，以获得客观的结果结论。中药药理动物模型分为中药药理疾病动物模型、中药药理证候动物模型、中药药理病证动物模型三大类。

1. 中药药理疾病动物模型 根据现代病理生理观点，复制人类疾病动物模型，分为诱发性疾病动物模型和自发性疾病动物模型。诱发性疾病动物模型是研究者通过使用物理、化学、生物等因素作用于动物，造成动物组织、器官或全身一定的损害，出现某些人类疾病的功能、代谢或形态结构方面的改变。如发热动物模型、四氧嘧啶糖尿病动物模型、胃黏膜损伤动物模型等。自发性疾病动物模型是指实验动物未经任何有意识的人工处理，在自然情况下，发生染色体畸变、基因突变，并通过定向培育而保留下来的疾病模型，如无胸腺裸鼠、重症肌无力小鼠、青光眼家兔、高血压大鼠、肥胖症小鼠等。

2. 中药药理证候动物模型 是指在中医药理论指导下，运用藏象学说和病因病机

理论，将中医证候特征在动物身上加以模拟复制而成。中药药理证候动物模型，自20世纪60年代邝安建立第一个类“阳虚”动物模型以来，已采用200多种方法，复制建立了肾虚证、脾虚证、肺虚证、心虚证、血瘀证、血虚证、肝郁证、寒证、热证、痹证、里实证、厥脱证、湿阻证、温病等多种证候动物模型。从目前看，中药药理证候动物模型的研究还远远不能满足中药药理学发展的需要，在选择时应考虑：

(1) 中医证候动物模型的复制方法 中医诊治疾病的核心思想是辨证论治，所以复制中医证候动物模型是研究中药药理作用的重要手段。中医证候动物模型的复制方法一般有两类：一类是根据临床某些证候表现，采用多因素治病原则在动物身上模拟传统病因来复制，再用临床代表方剂反证，有效者亦称之为某证型的模型，如“脾虚”型、“阳虚”型等；另一类是复制西医某种疾病的模型，根据其病理状态，推测其符合中医某种证的模型，如将溶血性贫血称之为“血虚”模型或以高黏滞血症作为“血瘀”模型等。应该说前者较后者更有中医特色。

复制中医“证”的动物模型难度很大，因为中医的证是一个综合的证候群，它是疾病发生、发展过程中特定阶段的病理变化，是疾病的病因、病位及病机性质的概括，且临床多以症状学来反映，确切的客观指标尚在探索之中，即使客观表现如舌象、脉诊及神志等也不易在动物身上模拟出来。

(2) 中医证候动物模型标准 判断中医证候动物模型的方法有两种：一种是根据病因、症状直接判断；另一种是根据代表方剂反证。从直接判断来看，由于低等动物皮毛与人有差别、语言不通，脉诊又不适于动物等，中医传统的望、闻、问、切诊察方法在动物身上难以体现，所以对于复制的中医证候模型成功与否，往往难以给予比较确切的判断。如近年来复制的肝郁模型，动物表现是易激怒、好斗咬人、进食量少、体重增加慢。这一模型按中医传统的辨证方法来衡量，仅从症状来看也难说就是中医的肝郁证，因为在症状方面还缺少胸胁满闷、善太息、脉弦等辨肝郁证的主要依据。从反证法来看，由于中医辨证施治具有高度的灵活性，而且对于相当一部分证候的治疗用什么方药至今还不完全统一，所以这一方法有待进一步深入探讨和充实完善。

3. 中药药理病证动物模型 包括两类：一类是将现代医学的人类疾病动物模型与中医证候动物模型嫁接，建立病证结合动物模型，如高脂性血瘀证动物模型、失血性贫血血虚证动物模型、感染性休克厥脱证动物模型等；另一类是在中医药病证理论指导下，把现代医学的辨病论治与中医学的辨证论治结合起来，中西汇通，建立中医病证结合动物模型。

五、给药剂量的确定

剂量的确定是中药药理实验设计的核心问题。剂量太小，作用不明显，剂量太大，又有可能引起不良反应。不同的动物用多大的剂量合适？对中药来讲，可供参考的信息不多，常用的方法是根据人临床用量折算到不同动物身上，折算的方法主要是按等效剂量折算。

$$D_B = K \cdot D_A$$

K 为折算系数， D_A 为 A 种动物剂量 (g/kg)， D_B 为 B 种动物剂量 (g/kg)。

表 1-1 中列出了各种动物和人的等效剂量比值。如需将人的剂量 (D_A) 转换成动物剂量 (D_B), 就在 B 种动物所处的那一列下找到与人的那一行相交的折算系数, 将剂量乘以折算系数, 再乘上人的体重与 B 种动物体重的比值, 即得 B 种动物的用药剂量。

例如, 某中药制剂, 人的临床剂量为 Xg/kg , 换算成大鼠的剂量:

$$\text{大鼠的剂量} = Xg/kg \times 0.018 \times 70kg / 0.2kg = 6.3Xg/kg$$

依此类推, 我们还可以折算出小鼠、豚鼠等其他动物剂量。

$$\text{小鼠的剂量} = Xg/kg \times 0.0025 \times 70kg / 0.02kg = 8.75Xg/kg$$

$$\text{豚鼠的剂量} = Xg/kg \times 0.031 \times 70kg / 0.4kg = 5.42Xg/kg$$

$$\text{家兔的剂量} = Xg/kg \times 0.07 \times 70kg / 1.5kg = 3.27Xg/kg$$

$$\text{猫的剂量} = Xg/kg \times 0.076 \times 70kg / 2.0kg = 2.66Xg/kg$$

$$\text{猴的剂量} = Xg/kg \times 0.163 \times 70kg / 4.0kg = 2.85Xg/kg$$

$$\text{犬的剂量} = Xg/kg \times 0.32 \times 70kg / 12kg = 1.87Xg/kg$$

表 1-1 人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值

B 种动物		小鼠 (0.02kg)	大鼠 (0.2kg)	豚鼠 (0.4kg)	家兔 (1.5kg)	猫 (2.0kg)	猴 (4.0kg)	犬 (12kg)	人 (70kg)
A 种动物	小鼠	1.0	7.0	12.25	27.8	29.7	64.1	124.2	387.9
	大鼠	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
	豚鼠	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	10.2	31.5
	家兔	0.04	0.25	0.44	1.0	1.08	2.4	4.5	14.2
	猫	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.2	4.1	13.0
	猴	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.9	6.1
	狗	0.008	0.06	0.10	0.22	0.23	0.52	1.0	3.1
	人	0.0025	0.018	0.031	0.07	0.076	0.163	0.32	1.0

六、给药方式的选择

中药的给药方式可分预防性给药和治疗性给药。预防性给药需先给药几天, 使受试中药在体内达到有效浓度后再进行造模处理, 观察受试中药的预防作用。治疗性给药先制作动物模型, 然后给予中药干预, 观察受试中药的治疗作用, 这种方式更符合临床。但中药的特点是起效缓慢、作用温和, 有时治疗性给药, 常难以获得预期结果, 如体内抗感染实验, 可以先给药几日后, 再接种感染原, 然后继续给药几日, 观察中药的抗感染作用。所以, 具体的给药方式可参考不同的实验目的、受试中药的特点、动物模型的特点灵活选择。

七、观察指标的确定

确定了动物模型及实验方法后, 需要通过观察指标来客观准确地评价中药的药理作用。当然, 研究的中药不同, 采用的方法不同, 观察指标亦不相同。随着现代医学及分子生物学的发展, 新技术、新方法、新指标不断在中药药理研究中应用, 可供选择的指标很多, 在确定观察指标时, 应该清楚, 观察指标不是“越多越好, 越新越好”, 原则上应选择特异性强、敏感性高、重现性好, 能客观定量的指标进行观察。例如, 进行中

药保肝实验时，可通过检测血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶、碱性磷酸酶的变化来反映肝细胞膜通透性变化情况。

观察指标类型可分为三类：

1. **定量资料** 指标可用可测量的数据或量的分级表示，如血压、尿量、体温、血液生化值等。

2. **定性资料** 指标只能用全或无，阳性或阴性（有效或无效、死亡或生存、出现或不出现）表示。

3. **等级资料** 指标有等级关系，如痊愈、显效、有效、无效，-、+、++、+++、++++等。

八、完全随机分组

完全随机分组是将每个实验对象随机分配到各组，通常采用随机数字进行完全随机化分组。先将实验动物编号，按预先规定，利用随机排列表或随机数字表产生的随机数字将实验动物分配到各组中去（用随机排列表进行分组时，各组例数相等；用随机数字表进行分组时，各组例数常不相等，故常用前者）。

（一）用随机排列表分组

例1-1：按完全随机设计方法将8只小鼠随机分配到甲、乙两组。

先将小鼠随意编为1、2、3、…、8号，再从随机排列表中任意指定一行，如第3行，依次将0~7之间的随机数字记录在小鼠编号下（遇7以上的数字应舍去）。按预先规定，将随机数字为奇数者分到甲组，偶数者分到乙组。分组情况见表1-2。

表1-2 用随机排列表分组举例（分2组）

动物编号	1	2	3	4	5	6	7	8
随机数字	1	2	0	3	7	4	5	6
组别	甲	乙	乙	甲	甲	乙	甲	乙

随机分组的结果是第1、4、5、7号小鼠被分到甲组；第2、3、6、8号小鼠被分到乙组。

例1-2：按完全随机设计方法将12只大鼠随机分为甲、乙、丙三组。

先将大鼠随意编为1、2、3、…、12号，再从随机排列表中任意指定一行，如第21行，依次将0~11之间的随机数字记录在各编号下（遇11以上的数字应舍去）。按预先规定，将随机数字为0~3的大鼠分入甲组，4~7的大鼠分入乙组，8~11的大鼠分入丙组。结果见表1-3。

表1-3 用随机排列表分组举例（分3组）

动物编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
随机数字	8	4	7	0	11	1	5	3	6	10	9	2
组别	丙	乙	乙	甲	丙	甲	乙	甲	乙	丙	丙	甲

随机分组的结果是第4、6、8、12号大鼠分入甲组，第2、3、7、9号大鼠分入乙组，第1、5、10、11号大鼠分入丙组。

(二) 用随机数字表分组

例1-3：按完全随机设计方法将8只小鼠随机分配到甲、乙两组。

先将小鼠随意编为1、2、3、…、8号，然后任意指定随机数字表的某一行某一数字开始。如自第6行第一个数开始，按横的方向抄录，得16、22、…、43等8个数。设定单数代表甲组，双数代表乙组，如表1-4所示。

表1-4 用随机数字表分组举例（分为2组）

动物编号	1	2	3	4	5	6	7	8
随机数字	16	22	77	94	39	49	54	43
组别	乙	乙	甲	乙	甲	甲	乙	甲

随机分组的结果是第3、5、6、8号小鼠分入甲组，第1、2、4、7号小鼠分入乙组。

例1-4：将现有大鼠12只，随机分成3组。

将大鼠随意编号后应用随机数字表分配。如从第14行第4个数字开始，按斜角线抄下19、12、…、30等12个数字，每个数均用3除，用余数1、2、3分别代表甲、乙、丙组，结果分入甲组的大鼠5只，分入乙组的大鼠3只，分入丙组的大鼠4只。结果如表1-5所示。

表1-5 用随机数字表分组举例（分为3组）

动物编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
随机数字	19	12	40	83	95	34	19	44	91	69	03	30
余数	1	3	1	2	2	1	1	2	1	3	3	3
组别	甲	丙	甲	乙	乙	甲	甲	乙	甲	丙	丙	丙

因3组动物数不相等，需将原归甲组的5只大鼠中的1只改分入乙组。可以用随机数字表继续按斜角线抄录一个数字——60。归入甲组的大鼠有5只，故用5除，余数为0，可以视之相当于5，就可以将第五只甲组大鼠，即编号为9的大鼠改为乙组。

随机分组的结果是：第1、3、6、7号大鼠分入甲组，第4、5、8、9号大鼠分入乙组，第2、10、11、12号大鼠分入丙组。

九、常用统计方法与统计软件

(一) 量反应资料

量反应资料的统计分析最常用是两样本 t 检验，其典型公式：

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_2} + \frac{S_2^2}{n_1}}} \quad (d_f = n_1 + n_2 - 2)$$

其中 \bar{x} 代表每一组的均数, S 代表标准差。

(二) 质反应资料

质反应资料的统计分析, 通常采用以 χ^2 (卡方) 检验, 以 2 行 2 列资料为例, 其数据形式为四格表:

a	b	$a+b$
c	d	$c+d$
$a+c$	$b+d$	$a+b+c+d=n$

公式如下:

$$S^2 = \frac{(|a \times d - b \times c| - 0.5 \times n)^2 \times n}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

式中 χ^2 读作卡方; a 、 b 、 c 、 d 代表四格表中的 4 个基本数值, n 是总例数。

附: t 值表与 χ^2 值表

表 1-6 t 值表

自由度	概率 (P)			自由度	概率 (P)		
	0.05	0.01	0.001		0.05	0.01	0.001
1	12.706	63.657	636.619	18	2.101	2.878	3.922
2	4.303	9.925	31.598	19	2.093	2.861	3.883
3	3.182	5.841	12.924	20	2.086	2.845	3.850
4	2.776	4.604	8.610	21	2.080	2.831	3.819
5	2.571	4.032	6.869	22	2.074	2.819	3.792
6	2.447	3.707	5.959	23	2.069	2.807	3.767
7	2.365	3.499	5.408	24	2.064	2.797	3.745
8	2.306	3.355	5.041	25	2.060	2.787	3.725
9	2.262	3.250	4.781	26	2.056	2.779	3.707
10	2.228	3.169	4.587	27	2.052	2.771	3.690
11	2.201	3.106	4.437	28	2.048	2.763	3.674
12	2.179	3.055	4.318	29	2.045	2.756	3.659
13	2.160	3.012	4.221	30	2.042	2.750	3.646
14	2.145	2.977	4.140	40	2.021	2.704	3.551
15	2.131	2.947	4.073	60	2.000	2.660	3.460
16	2.120	2.921	4.015	120	1.980	2.617	3.373
17	2.110	2.898	3.965	∞	1.960	2.576	3.291

表 1-7 χ^2 值表

自由度	概率 (P)			自由度	概率 (P)		
	0.05	0.01	0.001		0.05	0.01	0.001
1	3.841	6.635	10.828	16	26.296	32.000	39.252
2	5.991	9.210	13.816	17	27.587	33.409	40.790
3	7.815	11.345	16.266	18	28.869	34.805	42.312
4	9.488	13.277	18.467	19	30.144	36.191	43.820
5	11.070	15.088	20.515	20	31.410	37.566	45.315
6	12.592	16.812	22.458	21	32.671	38.932	46.797
7	14.067	18.475	24.322	22	33.924	40.289	48.268
8	15.507	20.090	26.125	23	35.175	41.638	49.728
9	16.919	21.666	27.877	24	36.415	42.980	51.179

续表

自由度	概率 (P)			自由度	概率 (P)		
	0.05	0.01	0.001		0.05	0.01	0.001
10	18.307	23.209	29.588	25	37.652	44.314	52.618
11	19.675	24.725	31.264	26	38.885	45.642	54.052
12	21.026	26.217	32.909	27	40.113	46.963	55.476
13	22.362	27.688	34.528	28	41.337	48.278	56.893
14	23.685	29.141	36.123	29	42.557	49.588	58.301
15	24.996	30.578	37.697	30	43.773	50.892	59.703

(三) 常用统计软件

1. SPSS (Statistical Product and Service Solutions) 统计软件 即“统计产品与服务解决方案”软件。SPSS 是世界上最早的统计分析软件,由美国斯坦福大学的三位研究生于 20 世纪 60 年代末研制。它最突出的特点就是操作界面友好,输出结果美观。它将多种功能以统一、规范的界面展现出来,用户只要掌握一定的 Windows 操作技能,粗通统计分析原理,就可以使用该软件进行统计分析服务。

SPSS 采用类似 EXCEL 表格的方式输入与管理数据,数据接口较为通用,能方便地从其他数据库中读入数据。SPSS 的基本功能包括数据管理、统计分析、图表分析、输出管理等等。SPSS 统计分析过程包括描述性统计、均值比较、一般线性模型、相关分析、回归分析、对数线性模型、聚类分析、数据简化、生存分析、时间序列分析、多重响应等几大类,每类中又分为多个统计过程,例如回归分析中又分线性回归分析、曲线估计、Logistic 回归、Probit 回归、加权估计、两阶段最小二乘法、非线性回归等多个统计过程,而且每个过程中又允许用户选择不同的方法及参数。SPSS 也有专门的绘图系统,可以根据数据绘制各种图形。SPSS 的输出结果美观,存储时采用专用的 SPO 格式,可以方便的转存为 HTML 格式或文本格式。

2. SAS (Statistical Analysis System) 统计软件 是由美国北卡罗来纳州州立大学 1966 年开发的统计分析软件。SAS 是一个模块化、集成化的大型应用软件系统。它由数十个专用模块构成,功能包括数据访问、数据储存及管理、应用开发、图形处理、数据分析、报告编制、运筹学方法、计量经济学与预测等等。

SAS 系统可分为四大部分: SAS 数据库, SAS 分析核心, SAS 开发呈现工具, SAS 对分布处理模式的支持及其数据仓库设计。SAS 系统主要完成以数据为中心的四大任务: 数据访问, 数据管理, 数据呈现及数据分析。

第二章 中药样品的制备

第一节 中药常用的提取方法

中药所含化学成分复杂,用不同提取方式制备的样品所含有效成分不同,样品制备总的原则是最大限度提取或保留中药活性成分,以便能客观、准确反映该中药的药理作用。

一、粗提物的提取方法

提取是采用适宜的溶剂和适当的方法,将所需中药有效成分尽可能完全地提取出来。常用的提取方法为溶剂提取法,包括煎煮法、浸渍法、渗漉法、回流提取法等。提取过程中药材的粉碎度、提取时间、提取温度、提取次数等因素会影响提取效率,可采用正交设计优化提取条件,常用的溶剂为水和乙醇等。

(一) 煎煮法

煎煮法是将中药材或饮片加水煮沸,从而将中药成分提取出来的方法。操作时将中药材或饮片置煎煮容器内,加相当于药材量5~8倍的冷水浸泡1~2小时,煮沸30分钟,滤过;药渣再加3~6倍量水继续煎煮,煮沸15~20分钟,滤过。合并两次煎出液,水浴上浓缩至1~2g生药/mL的药液备用。

(二) 浸渍法

浸渍法是将适当处理过的中药材或饮片,用适当的溶剂在常温或温热(60~80℃)的情况下浸渍以溶出其中成分。操作时将中药材置于适当容器中,加入适量溶剂如稀醇、酸性醇等,密闭,时常振摇或搅拌,室温下浸提1~2天后,过滤。一般可重复提取2~3次,合并浸渍液,水浴上浓缩至1~2g生药/mL的药液备用。

(三) 渗漉法

渗漉法是将药材粗粉置渗漉筒内,使溶剂自上而下匀速流动,达到渗透浸取中药成分的一种浸出法。常用溶剂有不同浓度的乙醇、酸性乙醇、碱性乙醇等。操作步骤为浸润、装筒、排气、浸渍和渗漉,一般流速以2~5mL/min为宜。通常收集渗漉液为药材重量的8~10倍,回收乙醇,水浴上浓缩至1~2g生药/mL的药液备用。

(四) 回流提取法

回流提取法是用有机溶剂，用回流加热装置将中药材中有效成分提取出来的方法。将药材粗粉置于圆底烧瓶中，加入相当于药材量 5~8 倍的乙醇，加热回流 1~2 小时，趁热滤取提取液，药渣再回流 2~3 次，合并滤液，回收乙醇，浓缩至 1~2g 生药/mL 的药液备用。

二、各类总成分的提取

(一) 总生物碱的提取

1. 酸水提取法 具有碱性的生物碱在植物体内以盐或游离碱的形式存在，一般不溶于亲脂性有机溶剂，用酸水提取则使生物碱以盐的形式被提出。方法为将中药粉末或饮片用 0.5%~1% 的乙酸、硫酸、盐酸或酒石酸等为溶剂，采用浸渍法、渗漉法提取。如要得到较纯的总碱，可通过下列方法纯化和富集生物碱：

(1) **离子交换法** 提取液通过强酸型（氢型）阳离子交换树脂柱，则生物碱盐阳离子交换在树脂上而非生物碱类化合物分离。对于亲脂性生物碱可采用氨液碱化树脂，则生物碱从交换树脂上以游离碱的形式游离出来，树脂晾干后，再用亲脂性有机溶剂提取即得总生物碱；对于水溶性生物碱也可直接用碱水洗脱得游离碱。

(2) **萃取法** 将酸水提取液用碱液（常用氨水、石灰乳或石灰水等）碱化，使生物碱盐转变成游离碱，如沉淀，过滤即得总生物碱；如不沉淀，以适当有机溶剂萃取，回收溶剂，即得总生物碱。

2. 醇类溶剂提取法 甲醇和乙醇都是极性较大的溶剂，分子较小，易渗入到植物组织细胞内，游离生物碱及其盐类一般都能溶于甲醇和乙醇中，但由于甲醇毒性大，成本高，一般多用乙醇。用乙醇提取时一般采用浸渍法、渗漉法或加热回流提取法，具体方法是乙醇提取液回收乙醇后加稀酸水搅拌放置，滤过，溶液调成碱性后以适当的亲脂性有机溶剂萃取，回收溶剂即得含生物碱的浸膏。

3. 有机溶剂提取法 将中药材粉末用石灰乳、碳酸钠溶液或稀氨水等碱性溶液湿润，使所含生物碱游离，然后用三氯甲烷、乙醚、甲苯等有机溶剂按浸渍法或回流提取法提出总生物碱。

(二) 总黄酮类的提取

黄酮类化合物在植物体内以苷或苷元的形式存在。在大多数情况下，用乙醇为溶剂可将苷或苷元提取出来。常用的制备方法有溶剂法、碱溶解酸沉淀法及聚酰胺吸附法。

1. 溶剂提取法 常用水、乙醇为溶剂，加热提取。提取液减压浓缩后先后以乙醚、乙酸乙酯萃取。在乙醚液中可能得到苷元，乙酸乙酯液中可得到黄酮苷或极性较大的苷元。

2. 碱溶解酸沉淀法 黄酮类化合物分子中一般含有较多酚羟基，呈弱酸性，故易溶于碱水而难溶于酸水中。利用此性质可用碳酸钠、稀氢氧化钠或饱和石灰水溶液加热提取。所得碱水提取液加盐酸等调节 pH 呈酸性后，滤取析出的沉淀或用三氯甲烷、乙

酸乙酯等溶剂萃取即可得到总黄酮。

3. 聚酰胺吸附法 聚酰胺分子内含有许多酰胺键,可与酚类、醌类、硝基化合物等形成氢键。可利用此性质,先将提取得到的黄酮类化合物吸附其上,用洗脱力较小的水洗去糖等水溶性杂质,再用洗脱力较大的乙醇等将黄酮类化合物洗脱下来。

(三) 挥发油的提取

挥发油具有挥发性并能溶于石油醚、乙醚等低极性有机溶剂中,可利用此性质进行挥发油的提取。

1. 水蒸气蒸馏法 将中药粗粉或饮片加水润湿浸泡后通入热水蒸气加热药材,使其中的挥发油与水蒸气一起挥发,经冷凝后馏出,收集馏出液,馏出液水油共存,形成乳浊液,可采用盐析法促使挥发油自水中析出,然后用低沸点有机溶剂,如乙醚、石油醚(30~60℃)萃取得挥发油。

2. 溶剂提取法 利用低沸点的有机溶剂如乙醚、石油醚(30~60℃)等连续回流提取或冷浸提取,提取液在低温下蒸去溶剂即可得粗挥发油。

(四) 多糖类的提取

多糖可用热水提取,根据多糖性质的不同,有的也可用稀醇、稀碱、稀盐溶液或二甲基亚砜提取。多糖常与其他成分共存于中药中,可利用多糖不溶于乙醇的性质,在提取液中加入乙醇、甲醇或丙酮使多糖从提取液中沉淀出来,达到初步纯化的目的,必要时再将此粗多糖用透析法、葡聚糖凝胶过滤法进行精制。

第二节 试剂及样品的配制方法

一、常用试剂及样品的配制方法

1. 水溶液 以蒸馏水或生理盐水为溶媒配制而成的溶液制剂叫水溶液。配制方法:试剂或中药样品加入适量蒸馏水或生理盐水溶解(稀释),定容即可。例如10%水合氯醛的配制:称取水合氯醛10g,加入适量生理盐水溶解,定容至100mL,即得浓度为10%的水合氯醛溶液;25%氨基甲酸乙酯的配制:称取氨基甲酸乙酯25g,加入适量生理盐水溶解,定容至100mL,即得浓度为25%的氨基甲酸乙酯溶液。

2. 混悬液 对于极性居中在水中与油中均不溶解的成分,可配制成混悬液。混悬液在中药药理实验中最常用。配制时为保证样品的均匀性,常可加入助悬剂,实验室常用的助悬剂为羧甲基纤维素钠(CMC-Na)。0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配制方法如下:称取5g CMC-Na加少量蒸馏水先润湿膨化调成糊状,再加入蒸馏水至1000mL,加热煮沸,不断搅拌至全部溶解,放冷即得。黄芪胶、吐温等也可作为助悬剂使用。例如莲花清瘟胶囊(每粒装0.35g)混悬液的配制:称取胶囊内容物14g,置研钵中研细,然后加入适量0.5% CMC-Na研匀,转移至容量瓶中,定容至100mL,即配制成终浓度为0.14g/mL的混悬液。

3. 乳剂 对于与水不相溶的液体，可配制成以小液滴形式均匀分散在水中的乳剂，更易于吸收。常用的配制方法为：将脂溶性成分置乳钵或烧杯中，加入精制植物油、乳化剂（泊洛沙姆、吐温类、豆磷脂等）搅拌，然后缓缓加入蒸馏水，继续搅拌至形成分散均匀的乳剂。例如脂肪乳剂的配制：取猪油 20g 置烧杯中，在电炉上加热融化，加入 10g 胆固醇，溶化，再加入 2g 胆酸钠和 1g 甲基硫氧嘧啶，充分搅匀，然后放入 20mL 吐温 80、20mL 丙二醇及 30mL 蒸馏水，不断搅拌，待甲基硫氧嘧啶溶解后，冷却至室温，再加蒸馏水至 100mL，并充分混匀，即成 10% 胆固醇、20% 猪油、2% 胆酸钠和 1% 甲基硫氧嘧啶的脂肪乳剂。

4. 油剂 对于脂溶性成分，可用植物油为溶媒直接配制成一定浓度的油剂。油剂除口服外，还可以用作肌肉或皮下注射。例如 CCl_4 所致小鼠急性肝损伤模型中 CCl_4 油剂的配制：量取 CCl_4 溶液 0.5mL，加入适量豆油或花生油中，混匀，定容至 100mL，即得 0.5% CCl_4 油剂。

二、给药容量及所需药物浓度的计算

在中药药理实验中，除需确定试剂及样品的配制方法外，还应考虑所需药物浓度及实际给药量问题。下面通过实例举例说明：

（一）所需浓度的计算

实验中常需要根据药物剂量（g/kg 体重）和设定的给药容积（mL/kg 体重），计算出需要配制的药物浓度。

例：实验需要按 0.728g/kg 体重的剂量给大鼠灌胃通心络胶囊，灌胃容量按 10mL/kg 体重设计，需配制通心络胶囊的浓度是多少？

计算方法：0.728g/kg 体重相当于 10mL/kg 体重，即 10mL 混悬液应含通心络胶囊 0.728g，则 100mL 混悬液含通心络胶囊 7.28g。具体配制方法为：称取通心络胶囊 7.28g，置研钵中研细，然后加入适量 0.5% 羧甲基纤维素钠（CMC - Na）溶液研匀，转移至容量瓶中，0.5% CMC - Na 溶液定容至 100mL 即可。

（二）实际给药容量的计算

实验时还需在已知试剂或药物的浓度和已知的给药剂量（g/kg 或 mg/kg）情况下折算出动物实际给药的毫升数（mL），以便于给药。

例：大鼠麻醉：腹腔注射水合氯醛 350mg/kg 体重，水合氯醛浓度为 10%，对体重 200g 的大鼠，应注射多少毫升水合氯醛？

计算方法：10% 的水合氯醛溶液即每毫升含水合氯醛 100mg，350mg/kg 体重的剂量相当于 10% 的水合氯醛 3.5mL/kg 体重，即 0.35mL/100g 体重，则体重 200g 的大鼠，应注射的药量为 $0.35\text{mL} \times 200\text{g}/100\text{g} = 0.7\text{mL}$ 。

第三章 实验动物常识

第一节 实验动物的分类

实验动物是指经人工饲养，对其携带的微生物实行控制，遗传背景明确或者来源清楚的，用于科学研究、教学、生产、检定及其他科学实验的动物。随着科学技术及实验动物研究的进展，生物医学研究使用的实验动物的数量与种群愈来愈多。为此，常根据动物的遗传学原理、微生物学控制原理等对实验动物进行科学分类。

一、按遗传学控制原理分类

从遗传学的观点来看，实验动物是遗传限定的动物。按基因纯合程度，实验动物可分为相同基因类型和不同基因类型两大类。相同基因类型包括近交系、突变系和杂交 F1 代动物。不同基因类型包括封闭群、杂交群中除杂交 F1 代动物以外的其他动物种群。

1. 近交系动物 (inbred strain animals) 是指经至少连续 20 代的全同胞兄妹或亲代与子代交配培育而成，品系内所有个体都可追溯到起源于第 20 代或以后代数的一对共同祖先。

2. 突变系动物 (mutant strain animals) 是带有突变基因的品系动物。具有突变基因的动物称为突变动物，将这些突变动物按照科学研究的要求进行定向培育，使培育成的动物符合实验要求，即为突变系动物。

3. 杂交 F1 代动物 (hybrids) 杂交群是指由不同品系或种群之间杂交产生的后代。杂交 F1 代动物是由两个无关的近交品系杂交而繁殖的第一代动物，其遗传组成均等的来自两个近交品系，属于遗传均一且表现型相同的动物。

4. 封闭群动物 (closed colony animals) 又称远交群，是指以非近亲交配方式进行繁殖生产的一个实验动物群体，在不从其外部引入新个体的条件下，至少连续繁殖 4 代以上。

二、按微生物学控制原理分类

通过微生物学的检查手段，按对微生物控制的净化程度，把实验动物分为无菌动物、无特定病原体动物、清洁级动物和普通级动物。