

· 科研方法研究 ·

中药新药的药理与毒理研究方法概述

第二军医大学新药评价中心 袁伯俊

中药新药的药理、毒理研究是保证新药安全有效的主要手段,是为过渡到临床研究提供科学依据,因此,它是新药研究的重要环节,也是新药审评的核心内容。然而,由于中药应用有其传统的理论,又有长期临床实践的基础,至使在中药新药研究中,对药理、毒理实验工作常会遇到一些问题和困难,感到无所适从。为此,笔者遵照《新药审批办法》有关技术要求并结合实际工作的经验与体会,就中药新药的药理与毒理研究有关内容从药效学研究、药代动力学研究和毒理学研究等三方面作一概述。

一、药效学研究

中药新药研制根据不同要求分为五类报批,综观这五类新药的中报资料项目,虽然繁简不一,但药效学研究资料是五类新药共同必须申报的项目。药效学研究的目的是回答新药的主要药理作用的性质、强度、开始和持续的时间等。新药的药效学研究包括主要药效学和一般药理学的研究。

(一)主要药效学研究: I、II类新药必须做, III—V类新药可以用文献资料。应根据新药的不同药理作用,按药物类型评价药效的研究方法和疗效判断标准即与治疗作用有关的主要药效研究。原则要求如下:

1. 药物: 被试药物应当是制剂工艺稳定,有代表性的并与其它某基础研究(质量标准、毒理学和可能的药动学)及拟提供临床研究用的药物能符合同一质量标准。

2. 动物: 实验动物必须是符合实验动物管理法规定的动物,如健康的、种属品系

来源清楚的,年龄和性别应适合被试药物作用的需要。一般用成年动物,♀、♂各半,抗衰老药宜用老年动物,儿科用药选年幼动物。

3. 动物模型: 药效试验应尽量选用合适的动物模型,即能反映中医临床疾病的病理生理过程,若临床采用西医辨证论治,则应采用西医疾病的动物模型,若临床采用中医辨证论治,则宜采用中医辨证的动物模型,模型动物尽量选用与人体解剖、生理反应和机能类似的动物,无合适动物模型时,可采用一些间接指标。

4. 设计: 实验设计必须符合随机、对照、重复三原则,随机就是机会均等,对照是比较的基础,重复就是保证在相同条件下实验的重现性,排除偶然结果。

5. 方法: 主要药效作用应当是用动物整体试验(包括正常动物或动物病理模型)或体外试验两种以上试验方法获得证明。I类新药必须用两种动物的两种以上试验方法确证其主要药效。

6. 剂量: I、II类新药,剂量应设高、中、低三个剂量组,应能显示量-效关系,应有空白对照组和已知药物对照组,此已知药物必须是公认的、疗效确切的,与原研制药物有相同药理作用的中西药物,新药可用有效剂量组与相当剂量的已知药物进行平行对照来确定药效。

7. 给药途径: I类新药应当用两种以上不同给药方法,其中一种必须是临床使用的给药途径,溶于水的药物要做静脉注射,

其余各类新药可用临床使用的给药途径。

8. 数据: 实验结果的数据处理应符合统计学要求。

总之, 中药药效试验要考虑研究方法的科学性与先进性, 动物模型的合理性和重复性, 检测指标的客观性和敏感性。

(二) 一般药理学研究: I、II类新药必须做。目的是尽可能多地了解解除新药主要药效作用以外对机体各主要系统的作用, 为临床提供更多的信息。它指对新药主要药效作用以外的广泛药理作用的研究。应当以产生主要药效作用的2~3个剂量(如受试动物与主要药效作用的动物不同, 则应折算成等效剂量), 用清醒或麻醉动物以相同给药途径观察下列系统的变化:

1. 神经系统: 要求用两种试验方法, 仔细观察给药后小鼠或大鼠的活动情况和行为变化, 应有详细的数据和结论。

2. 心血管系统: 一般宜用大鼠或狗进行试验, 观察对心率、心电图和血压的影响, 应有详细的数据和结论。

3. 呼吸系统: 一般用大鼠或狗进行试验, 观察对呼吸频率和深度的影响, 应有详细的数据和结论。

4. 其它系统: 根据新药药理作用的特点而选择。

(三) 复方制剂中各种组分对药效或毒副作用影响的研究: 首先提供组成复方的依据和理由, 用对比试验设计来研究各组分之间在药效和毒性方面的协同或拮抗作用, 或是减少用量即表明其复方的特点, 这是申请批准此复方进行临床研究的科学依据。

二、药代动力学研究: 主要是测定动物给药后血液和组织中随时间变化的药物浓度, 目的是估计药物在体内的吸收速率、吸收程度、组织分布、排泄途径、速率和程度。

中药(尤其是复方)在动物体内的吸收、分布、代谢及排泄的研究, 在方法学上

困难较大, 几乎无法进行, 有些理论问题也有待深入探讨, 新药审批办法虽未作为法定研究要求, 但为了提高中药研究水平, 目前在可能条件下, 可用中药或复方中的主要有效成份或几种代表性成分代表全方进行药代动力学的研究, 可按以下要求进行:

吸收和排泄试验可用大鼠、小鼠或兔, 至少做尿、粪中的排出量, 必要时测胆汁中的排出量(兔), 每组至少五只动物, 选一种动物做高、中、低三个剂量对吸收排泄的影响。

分布试验可选用大鼠或小鼠, 至少测定心、肝、脾、肾、胃肠道、生殖器官、脑、脂肪、骨骼肌等组织中的分布。

若用放射性标准化合物做吸收、分布、排泄试验时, 要标明标准化合物的放射纯度(>90%)和化合物的纯度, 并结合层析法进行。

应进行血浆蛋白结合试验, 尽可能选用和药理试验相同的动物进行, 并用同种动物进行药代动力学分析, 测定动物给予单次剂量后的血药浓度一时间曲线, 提出初步数学模型及清除率、Vd、C_{max}、t_{max}、t_{1/2β}、及有关转运速率常数等参数。选一种动物做高、中、低三个剂量对动力学参数的影响。

三、毒理学研究

中药新药毒理学研究包括一般毒性(全身性用药的毒性和局部用药毒性)和特殊毒性两部分。I—III类新药必须做一般毒性, I类新药必须做特殊毒性。

(一) 全身性用药的毒性试验 包括急性毒性和长期毒性

1. 急性毒性 指观察一次剂量或将一次剂量在一日内分几次(2~4次)给药后, 动物在至少7日中产生的毒性反应和死亡。若有迟发性或进行性毒性反应时, 则需根据实际情况延长观察期。

(1) 动物 一般用18~22g♀♂各半的健康小鼠, 各组至少10只, 即♀♂各5只,

分4~6个剂量组。一般要求用两种给药途径,其中一种必须是临床给药途径。有的制剂无法通过注射途径(sc、ip、或iv)给药时,可考虑只用口服。一般按体重给药,死亡动物应及时进行肉眼尸检,记录发生的病变,必要时作病理检查。用机率单位法或其它方法计算LD₅₀及可信限。

I类新药要选用两种动物和两种以上(含两种)给药途径进行急性毒性试验。

实验数据包括下列内容:动物种属和品系、性别、体重范围、每个剂量组的动物数;给药途径、药液配制、pH值、给药量和容积、剂量之间的距离、计算LD₅₀的方法、毒性反应描述。填下表:

剂量组别 (mg/kg)	对数剂量 (X)	动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)	机率单位 (y)	权重 (W)	LD ₅₀ 及可信限 (mg/kg)
-----------------	-------------	------------	------------	------------	-------------	-----------	----------------------------------

限度试验 中药口服给药超过临床人用量200倍以上,注射给药超过100倍以上仍未产生死亡和/或毒性反应和仅出现个别动物死亡和/或毒性反应时,则如实描述实验情况,不再提高剂量继续进行实验。

2. 长期毒性 指重复连续给药的毒性试验,一般持续给药时间为14、28、90和180日,观察药物在机体组织中的积蓄或其它机制而产生毒副反应和其产生的严重程度以及发生率等。提供毒性反应的靶器官及其损害是否可逆,同时确定无毒性反应的最高剂量。

(1)动物 必须选择健康的动物。除I类新药外,一般可先用一种动物进行,即啮齿类动物或非啮齿类动物,前者首选大白鼠,后者可用犬或猪,大鼠用6周龄,犬龄不大于2年。

(2)剂量 大白鼠常用三个剂量组和一个空白对照组。高剂量组应出现明显的毒性反应和/或个别动物的死亡(死亡数≤20%动物数),低剂量组应为不产生异常反应的最高剂量,中剂量组应产生轻微的毒性反应,即实验结果显示量一致之间的相关性。

犬可用两个剂量组和一个空白对照组,

高剂量组应出现毒性反应,低剂量组应无不良反应。

如果预试表明,按规定给药时间,相当于人临床用量100倍仍未产生死亡和/或毒性反应和仅出现个别动物死亡和/或毒性反应时,则可只做一个相当于人临床用量100倍的剂量组进行实验。

犬大剂量组最好6条。大鼠实验期90日以下,每组♀♂各10只,90日以上则加倍,即每组♀♂各20只。

低剂量组应略大于动物的有效量或临床用量(按等效量折算)、有的中药新药如因体积过大而难以选出动物中毒反应和死亡的高剂量时,可以选动物能够承受的最大剂量和数倍最大有效量(注明相当于临床剂量的倍数)。

(3)途径 一般同临床用药途径。口服可采用灌胃(3个月内)或掺入饲料法(6个月)。大鼠iv可考虑用ip代替。

(4)试验周期 临床重复给药1~3日者,连续给药期为2周;7日者为4周;30日者为12周;超过30日者至少应为24周。Ⅲ类中药新药如文献记载无毒、无十八反、十九畏、配伍禁忌,又未经过化学处理(经水、

乙醇粗提者除外), 并有一定临床资料可借鉴的制剂, 在进行长期毒性时可先用大鼠, 给药时间为60~90日。若试验结果表明无明显毒性, 可免做狗的长期毒性试验。

(5) 观察指标 起码按下述要求进行:

一般体征、体重、食量、体温、大小便和一般行为活动。犬试验应增加瞳孔、对光反射等。

血液学检查 Hb、RBC、HCT、WBC及DC、血小板(PLT)、网织红细胞、MCV、MCH、MCHC, 必要时进行骨髓象检查。

血液生化 用先进仪器(指自动生化分析仪)测试有困难时, 除I类新药外, 可考虑先测肝、肾功能。给药期间, 血液学和血液生化指标至少检测一次。

犬实验应观察心率和心电图变化。

病理学检查 各组织器官均应较全面地进行肉眼尸检, 病理学检查可先考虑心、肝、脾、肺、肾、脑、肾上腺、睾丸(副睾)、子宫(卵巢)、肠系膜淋巴结和尸检中发现异常现象的组织, 注射剂应观察注射部位(皮下、肌肉、血管)的局部改变。另外, 根据被试药的具体情况, 增加眼、耳、免疫系统、水盐代谢、酸碱平衡等检查。

产生毒性反应的新药, 至少应对高剂量组和对照组的动物在停药后继续观察, 对引起不可逆性功能损害和组织病变的新药, 要慎重考虑临床试验问题。一般来说不批准这样的药物进行临床研究。对毒性较大、安全范围较小的特殊新药, 如拟临床试验, 则最好研究出一种解救药, 以备过量中毒时使用。

试验周期在半年以上的新药, 可在长期毒性试验进行3个月而未出现明显毒性反应的情况下, 申请进行I期临床试验。

(二) 局部用药的毒性试验

局部用药(如呼吸道吸入药以及粘膜、腔道、皮肤用药等)大都可以被吸收, 故应

先进行局部吸收试验。如果进行局部吸收试验有困难, 则I类新药的局部用药可直接进行全身性用药的有关毒性试验。其它类别的新药, 在国外有同样剂型或不超过原剂型(全身用药)用药量的基础上, 一般可考虑免做吸收试验, 但缓释剂型则必须进行吸收试验。

局部用药的刺激性试验 根据用药方法对用药部位进行局部刺激性试验, 用肉眼观察及组织切片的镜检测试刺激性(即炎症)的发展和恢复情况。

1. 皮肤用药 皮肤用药的毒性试验包括进行完整和破损皮肤的毒性试验及致敏试验, 所选动物为家兔、豚鼠或大鼠, 除婴儿皮肤用药用刚成年动物外, 其余均用成年动物。至少设三个剂量组, 每组动物不少于6只(家兔可用4只), 观察与剂量相关的毒性反应, 观察期一般在停药后14日内。

2. 滴鼻剂和吸入剂 滴鼻剂和吸入剂的用药毒性试验指进行呼吸道(包括肺部)的局部刺激性和毒性试验。动物选大鼠或豚鼠, 至少设三个浓度组, 每一浓度组不少于10只动物(♀♂各半), 接触吸入剂时间不应少于4小时, 观察期一般为14天。

3. 滴眼剂 主要观察对眼结膜和眼球的刺激作用。首选动物为家兔, 至少4只。液体制剂的剂量一般每次用0.1ml, 软膏等制剂每次不少于0.1g。观察期一般在停药后21日内, 观察出现毒性反应的可逆性和不可逆性。

4. 直肠、阴道给药的制剂 应进行对作用部位的刺激及局部毒性试验。

以上只是中药新药的药理与毒理研究中的一些原则、技术要求和主要方法要点。中药药理研究还有许多问题有待解决。因此, 中药新药的药理试验也势必面临许多问题。面对现实, 我们认为中药新药的药理、毒理研究从技术要求到内容方法要体现以下原则, 即在传统中医药优秀理论指导下, 突出

中药特色;充分利用现代科学技术方法,提高实验水平,在继承的基础上不断创新,使

中药新药研究沿着正确的方向发展到一个新水平。

关于制备柱层析应用的几个问题

第二军医大学药学院 陈海生

层析法(色谱法,色层法,层离法)已有八十多年的历史。1903年Tswett所创用的柱上液体色谱,即经典液体色谱法,由于该色谱技术分离量大,载样品多,操作方便,设备简单,能在单位时间内获得较多量分离组分,所以直到今天仍最常使用。据有人统计,在化学成分分离方面,各种色谱方法都得到了应用,占统计使用量92.3%,其中经典液体色谱法占统计量70%。但是,随着现代液相色谱理论和技术的迅速发展,经典液体色谱在理论和技术上也发生了显著变化和进展。

一、溶剂选择

选择一个合适的溶剂系统是做好制备柱层析的关键。在选用柱层析洗脱剂时首先要考虑三个方面的因素:溶解性(Solubility),亲合性(Affinity),分离度(Resolution)。安登魁等人^[1,2]借助电子计算机选择纸层析和薄层层析溶剂系统。对制备柱层析,通常是利用薄层层析来选择洗脱溶剂。在选择薄层溶剂系统时一是参考类似物的溶剂系统,二是自己摸索溶剂系统。在自己摸索溶剂系统时,通常先用中等极性的溶剂如醋酸乙酯展开,然后根据展开的结果,适当增减溶剂的极性。

醋酸乙酯属于中等极性有机溶剂,由于它具有与硅胶适度的亲合性(Moderate affinity),所以对许多成分都有较好的或适度的溶解性。当溶剂系统中含有醋酸乙酯时,也便于调整溶剂的极性。如,TLC溶剂系统中含醋酸乙酯,展开的结果 $R_f = 0.5$,若

要把它变成 $R_f = 0.3 \sim 0.25$,只要把醋酸乙酯的量减少到原来的1/3就可以了。比如最初溶剂系统含60% EtoAc/40% CH_2Cl_2 ,那么最适制备溶剂系统应改为20% EtoAc/80% CH_2Cl_2 。

醋酸乙酯与其它极性溶剂的关系⁽³⁾

醋酸乙酯	1 : 1
甲基乙基酮	1.7 : 1
丙酮	2.7 : 1
正丁醇	3 ~ 4 : 1
正丙醇	4 ~ 5 : 1
乙醇	5 ~ 6 : 1
甲醇	7 : 1

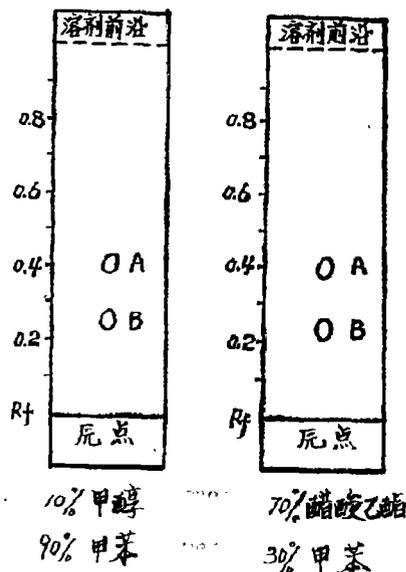


图1 醋酸乙酯与有关极性溶剂互换

二、如何利用TLC选择制备柱层析溶剂

如前所述,选择柱层析溶剂一般通过