

指导原则编号：【Z】GPT4-1

# 中药、天然药物刺激性和溶血性研究的 技术指导原则

二〇〇五年三月

# 目 录

一、概述	1
二、基本内容	2
(一) 基本原则	2
(二) 刺激性试验	3
(三) 光毒性试验	4
(四) 溶血性试验	5
(五) 结果分析及评价	6
(六) 常见问题及处理	7
(七) 不同剂型的中药、天然药物试验项目的选择	9
三、参考文献	10
四、附录	11
(一) 刺激性试验方法	11
1、血管刺激性试验	11
2、肌肉刺激性试验	12
3、皮肤刺激性试验	12
4、粘膜刺激性试验	15
(二) 光毒性试验方法	20
(三) 溶血性试验方法	22
1、常规体外试管法 (肉眼观察法)	22
2、改进的体外溶血性试验法 (分光光度法)	24
3、体外红细胞计数法	25
4、体内溶血试验法 (红细胞计数法)	25
五、著者	25

# 中药、天然药物刺激性和溶血性研究的技术指导原则

## 一、概述

刺激性是指中药、天然药物制剂（包括活性成分和赋形剂）经皮肤、粘膜、腔道、肌肉、血管等非口服途径给药，经局部吸收或注射后对给药部位以及全身产生的毒性作用，包括血管、肌肉、粘膜等刺激性。溶血性是指中药、天然药物制剂（包括活性成分和赋形剂）产生的溶血或红细胞凝聚等反应。它是临床前安全性评价的组成部分。

中药、天然药物制剂，包括活性成分或组分、配伍后产生的新成分、体内代谢物、制备过程中的杂质、辅料及制剂的理化性质（如 pH、渗透压等）等均是可能导致给药部位毒性或溶血性反应产生的因素。因此，为了指导临床合理用药，提示临床应用时可能出现的毒性反应和程度、安全剂量或浓度、安全范围、临床研究监测指标、解毒或解救措施等，应进行中药、天然药物制剂局部应用的毒性试验。

本指导原则旨在阐明进行临床前非口服途径给药的毒性研究的目的、意义和重要性，阐明进行中药新药安全性评价的基本原则、相关技术要求及该领域存在的问题，阐明应利用具体问题具体分析的方法，针对药物的自身特点，结合药理学、药效学、其他毒理学及临床应用信息，通过合理、客观的试验设计和研究，探索、揭示或发现中药、天然药物非口服途径给药的毒性反应，预测临床应用中可能存在的潜在毒性，指导临床用药。

本指导原则适用于非口服给药途径的中药、天然药物，包括中药注射剂及局部用药制剂。主要内容包括研究和评价的基本原则、刺激性试验、

光毒性试验和溶血性试验的相关内容。

## 二、基本内容

### (一) 基本原则

根据《中华人民共和国药品管理法》，药物的免疫毒性试验必须执行“药物非临床研究质量管理规范”。

实验设计应符合随机、对照、重复的原则。

应在遵循安全性评价普遍规律的基础上，运用具体问题具体分析的方法，结合受试物的自身特点，充分考虑和结合药理学、药效学、其他毒理学（长毒、急毒）及拟临床应用情况等信息，体现整体性、综合性的原则，在阐明其研究方法或手段科学、合理的前提下进行规范性试验，对试验结果应进行全面分析，对药物的安全性做出综合评价。

### (二) 刺激性试验

刺激性是指非口服给药制剂给药后对给药部位产生的可逆性炎症反应，若给药部位产生了不可逆性的组织损伤则称为腐蚀性。刺激性试验是考察动物的血管、肌肉、皮肤、粘膜等部位接触受试物后是否引起红肿、充血、渗出、变性或坏死等局部反应。

#### 1. 受试物

受试物应同临床应用制剂相一致，即采用中试或中试以上规模的、制备工艺稳定、符合临床试用质量标准规定的样品。否则，应有充分的理由。同时，应注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件及配制方法等。试验中所用辅料、溶剂或赋形剂等应标明批号、规格和生产厂家，并符合试验要求。

## 2. 对照

可用溶媒和/或赋形剂和/或基质作为阴性对照。必要时可设阳性对照。因局部刺激性与受试物制剂密切相关，相同活性成分不同制剂的受试物局部刺激性可能明显不同，若出现毒性反应，应与已上市品种进行比较性研究，以保证药物临床应用的安全性。

## 3. 动物

应选择与人类皮肤、粘膜反应比较相近的动物，如家兔、豚鼠和小型猪等。动物种属依据要观察的指标和模型的合理性进行选择。通常一个试验类型选择一种动物进行评价。动物应符合国家有关规定的等级要求，来源、遗传背景清楚，并具有试验动物质量合格证。

刺激性试验结果从动物外推到人的可靠性有限。若用二种动物进行试验得到类似结果，则会增加从动物外推到人的可靠性。

## 4. 剂量

可选择几种不同浓度的制剂进行试验，其中包括拟用于临床研究的浓度，为临床研究的安全性提供选择依据。可以通过改变给药频次进行剂量的调整。对于局部用膏状制剂，在给药面积不变的情况下，不应通过增加厚度来满足增加给药量的目的。

## 5. 给药途径

一般应与临床用药途径一致，否则应加以说明。

## 6. 给药部位

一般应选择与临床应用相似的部位。并注意对可能接触到受试物的周围组织的影响。设计剂量和给药频次时，应考虑受试动物给药部位的解剖

和生理特点，保证受试物在给药部位的有效暴露时间。

## 7. 给药频率和时间

给药频率和时间应依据拟定临床用药方案来决定，多次给药一般不超过4周。

## 8. 观察指标

8.1 肉眼观察 应详细描述动物局部反应，包括红斑、水肿、充血程度及范围，并以计分的方式表示。同时观察动物的一般状态、行为、体征等。

8.2 组织病理学检查 组织病理学检查应详细描述给药部位的病理变化，并进行半定量分析、判断。提供相应的组织病理学照片。

8.3 可逆性观察 若出现刺激性反应，应进行停药后的恢复期观察，以明确毒性反应的恢复情况。

## 9. 试验方法

具体试验方法可参照附录（一）。附录中所列方法仅为推荐的方法，若有新的、更灵敏或适合的方法，可结合不同试验进行选择。

### （三）光毒性（光刺激性）试验

光敏反应是用药后皮肤对光线产生的不良反应，包括光毒性反应和光过敏反应两类，均由受试物所含的感光物质引起，但两者机制不同，实验方法、临床表现及意义亦不同。

光毒性是由光诱导的非免疫性的皮肤对光的反应，是指药物吸收的紫外光能量在皮肤中释放导致皮肤损伤的作用，可通过直接作用或通过血循环间接作用，即皮肤或全身接触或应用药物后，继而暴露于紫外线照射下所引起的一种皮肤毒性反应。光毒性反应是光敏反应中最常见的一种反应。

具有剂量依赖性，其临床表现与晒伤相似，表现为红斑、水肿、皮肤瘙痒和色素沉着。严重者可产生局部坏死、溃烂或表皮脱落。

光毒性可由局部给药和系统给药诱发，并不仅限于局部给药。因此，原则上所有给药途径的药物，只要有皮肤分布，则均应进行光毒性检测。若受试物的化学结构或某些组成（包括药物和赋形剂）文献报道有光毒性作用者，或其化学结构与已知光敏剂相似者，或曾有报道具有光毒性作用或可疑具有光毒性作用的中药制剂，建议作皮肤光毒性试验。

本试验的目的是观察受试物接触皮肤或应用后遇光照射是否有光毒性反应。

试验方法可参见附录。

#### **（四）溶血性试验**

溶血性试验是观察受试物是否引起溶血 and 红细胞凝聚等反应。

药物制剂引起的溶血反应又可分为免疫性溶血和非免疫性溶血两类。免疫性溶血是药物通过免疫反应产生抗体而引起的溶血，为 II 型和 III 型过敏反应；非免疫性溶血包括药物为诱发因素导致的氧化性溶血和药物制剂引起血液稳态的改变而出现的溶血和红细胞凝聚等。

某些中药注射剂，由于含有溶血成分或物理、化学及生物等方面的原因，在直接注入血管后可产生溶血作用；也有些注射剂中因含有杂质等成分，注入血管后可产生血细胞凝聚，引起血液循环功能障碍等不良反应；另外，因中药制剂的成分复杂，也存在因免疫反应引起的免疫性溶血。因此，凡是注射剂和可能引起免疫性溶血或非免疫性溶血反应的其他药物制剂均应进行溶血性试验。

因造成溶血反应的机制复杂，目前尚无全面的临床前溶血试验方法。中药注射剂溶血性的测定,许多年来一直采用常规的体外溶血试验，即试管观察法（见附录）。它是通过肉眼来观察溶血情况，而有色泽中药注射剂对结果判断的影响较大，难以评价溶血程度。

为了精确检查中药注射剂的溶血性，建议在常规方法的基础上，结合以下或其他方法进行试验，如分光光度法、体外红细胞计数法、体内红细胞计数及分析法。这些方法与常规法比较，尽管前两者的操作相对复杂,影响因素较多，但当采用常规法测定的结果有疑问或必要时，采用计数法和分光光度法作为一种辅助方法,可帮助更精确的判断注射剂的溶血性。

在进行长期毒性试验中，应注意溶血性指标的观察（如红细胞数量及网织红细胞数的变化、胆红素、尿蛋白、肾炎、脾脏淤血及骨髓象等）。

当受试物出现体外溶血阳性结果时，应进行体内溶血性试验，不但可以判断是否存在药物诱发溶血性的可能，而且可以通过对其他指标的测定提供更多的信息，如网织红细胞是否增高、是否有血红蛋白尿、球形红细胞是否增多，以及骨髓检查是否有溶血性贫血现象等。

具体试验方法可参照附录（二）。附录中所列方法仅为推荐的方法，若有新的、更灵敏或适合的方法，可进行选择。

## （五）结果分析及评价

对上述刺激性、溶血性等试验进行评价时应注意下列问题：

- 1、应详细论述试验方法，说明试验分组、试验步骤、给药剂量和次数、动物数等。应详细描述试验结果，如中毒表现、毒性反应持续时间、恢复情况及时间，提供组织病理学检查报告及照片，以利于对结果的分析 and 判

断。

2、应根据试验结果，按评分方式对不同剂量（或浓度）下某种反应发生情况及严重程度进行表述，分析毒性反应的量效关系和可能的时效关系及其可逆性，判断数据变化是否与受试物有关，确定中毒剂量、安全剂量及安全范围等。分析试验结果时应注意将给药的机械效应或受试物纯粹的理化作用与其毒性或药效作用区别开，正确理解试验结果的意义。

3、根据局部用药部位的毒性反应、病理检查及全身毒性观察结果，判断毒性靶器官或毒性可能涉及的器官组织等。

4、在溶血性试验中，若出现红细胞凝聚现象，应进一步判定是真凝聚还是假凝聚。若体外出现可疑溶血现象，应采用其他方法进一步试验，以确定或排除受试物的溶血作用。

5、重视组织病理学检查及结果的量化：特别应重视刺激性试验中局部组织的病理检查，其病理变化可用半定量的方法表示。

6、结合药效学及其他毒理学试验结果进行综合分析和评价。注意不能将动物试验结果不加分析就外推到人，也不能忽略甚至故意舍掉个别出现毒性反应的动物，应实事求是地反映受试物的毒性，根据试验结果获得受试物在临床应用的意义及注意事项等提示。

## （六）常见问题及处理

### 1、给药浓度及有效暴露时间

中药局部给药制剂种类繁多，如贴膏剂（橡胶膏剂、巴布膏剂、贴剂）、膏药（黑膏药、白膏药）、凝胶剂、软膏剂（乳膏剂、糊剂）、露剂、搽剂、气雾剂或喷雾剂（呼吸道吸入，皮肤、粘膜或腔道给药）、洗剂（皮肤、腔

道涂抹或冲洗剂)、涂膜剂、鼻用制剂(滴鼻剂、喷鼻剂、洗鼻剂、涂鼻膏剂、鼻用散剂)、眼用制剂(滴眼剂、眼膏剂、眼用散剂)等。在进行局部刺激性试验时,其给药浓度的保证、给药后在局部的有效暴露时间的确定等问题是应该引起重视的问题,它们均是正确评价其安全性的重要条件。

中药注射剂的给药浓度、速度及次数与药物的血管刺激性密切相关。因此,试验中应关注受试物的浓度、给药速度和次数的选择,建议根据受试物的性质、临床用药情况,采用最可能暴露毒性的方法进行评价,尽量最大可能地暴露其毒性。可通过适当增加浓度,或通过增加给药次数的方法来实现对血管刺激性的更合理评价。建议在犬静脉注射给药的长期毒性试验中同时观察受试物对犬的血管刺激性,进行肉眼观察和组织病理学检查,对试验结果进行详细报告,并提供相应的组织病理照片。

## 2、溶媒及附加剂的影响

随着新技术的不断应用,中药外用制剂及注射剂中更多地加入了溶媒及附加剂,如透皮促进剂、增溶剂、抗氧剂、乳化剂、助悬剂、pH值调节剂、渗透压调节剂等;此外,因制剂种类的不同,加入了不同的基质等。因此,在进行刺激性试验时,应尽量排除这些附加剂及基质等对局部的影响作用,若发现这些附加剂或基质等本身就具有明显的局部刺激性,则应做进一步的研究,重新或合理选择附加剂或基质,以使得中药制剂的局部用药安全性增加。另外,对含有毒性药材又加入了透皮促进剂的中药外用制剂,应更加关注其对局部及全身的毒性反应。

## 3、溶血性结果的评价

根据临床前和临床研究的结果,发现目前临床前体外溶血试验绝大多

数为阴性结果，但临床应用过程中却有许多阳性结果的相关报道，即存在临床前和临床应用结果不一致的问题。因此，建议临床前研究中，在利用常规方法的同时，考虑结合其他的试验方法，特别是在长期毒性试验（静脉给药）中增加或关注相关指标的检查，以综合评价中药注射剂的溶血性，增加与临床人用结果相关性的认识。

#### 4、多批次溶血性试验

有些中药注射剂上市后，同一厂家的同一药物，不同批号的产品，溶血度即有很大差异，其原因可能与生产中注射液的杂质去除程度、加入的附加剂的量、某些中药在水中的溶解度较低，且不同产地、生长季节及成分含量差异较大等因素有关。因此，在进行临床前溶血性试验时，建议至少进行3批制剂样品的溶血性试验。

#### 5、溶血试验中的相关问题

利用分光光度法进行溶血性试验操作时，应注意离心的速度及温度对试验结果的影响。可能有些药物分子及附加剂在离心时与红细胞发生碰撞的力量较大，若离心速度较快，易导致非药物溶血现象的出现。此外，因不同的中药注射剂颜色及深浅不同，若其色泽对血红蛋白的最大吸收有干扰，则应注意排除非药物因素的影响。

#### （七）不同剂型的中药、天然药物试验项目的选择

1、静脉注射剂：应进行血管刺激性试验、肌肉刺激性试验及溶血性试验。

2、肌肉注射剂：应进行血管刺激性试验、肌肉刺激性试验及溶血性试验。

3、皮肤给药制剂：应进行皮肤刺激性试验，必要时应进行眼刺激性试验和光毒性试验。

4、滴鼻剂：应进行鼻粘膜刺激性试验。

5、口腔用制剂：应进行口腔粘膜或鼻粘膜刺激性试验（如喷雾剂）。

6、眼用制剂：应进行眼刺激性试验。

7、直肠、阴道用制剂：应进行相关腔道粘膜刺激试验。

8、根据药物的特性，可选择其他合适的试验项目。需考察免疫毒性（如过敏反应）的制剂，应参照中药、天然药物免疫毒性研究技术指导原则进行。

### 三、参考文献

1. 皮肤用药的毒性试验和粘膜用药的毒性试验. 中华人民共和国卫生部药政管理局 《中药新药研究指南》1994年 209, 213

2. 皮肤用药毒性试验. 《新药临床前安全性评价与实践》北京：军事医学科学出版社.1997年 152

3. 其他毒性试验. 《药理实验方法学》第三版. 北京：人民卫生出版社, 2002年 234

4. Principles and methods of Toxicology. Fourth edition, edited by A. Wallace Hayes, Taylor & Francis, Philadelphia. 2001.

5. EMEA; Note for Guidance on Non-clinical Local Tolerance Testing of Medicinal Products.

6. FDA; Guidance for Industry Botanical Drug Products

7. FDA; Guidance for Industry Labeling Guidance for OTC Topical Drug

## Products for the Treatment of Vaginal Yeast Infections (Vulvovaginal Candidiasis)

8. FDA ; Guidance for Industry Bacterial Vaginosis — Developing Antimicrobial Drugs for Treatment.

### 四、附录

#### (一) 刺激性试验方法

##### 1、血管刺激性试验

###### 1.1 实验动物

首选家兔，动物数每组不少于 3 只。应设生理盐水或溶媒对照，可采用自体左右侧自身对比法。给药部位可选用耳缘静脉。

###### 1.2 给药方法

为最大可能地暴露毒性，应根据受试物的特点采用最可能暴露毒性的给药方法。一般而言按临床用药方案给予受试物，给药容积和速率应根据动物情况进行相应的调整。给药期限应根据受试物拟用于临床应用的情况来决定，多次给药一般不超过 7 天。

###### 1.3 结果观察

应根据受试物的特点和刺激性反应情况来选择适当的观察时间。通常单次给药刺激性试验，在给药后 48~96 小时对动物和注射部位进行肉眼观察；多次给药刺激性试验，每天给药前以及最后一次给药后 48~96 小时对动物和注射部位进行肉眼观察。观察期结束时应对部分动物进行给药部位组织病理学检查，并提供病理照片。病理检查取材时间的确定，应根据受试物的特点考虑选择适当的观察点。应根据受试物的特点和刺激性反应情况，继续观察 14~21 天再进行组织病理学检查，以了解刺激性反应的可逆

程度。

## 1.4 结果评价

根据肉眼观察和组织病理学检查的结果进行综合判断。

## 2、肌肉刺激性试验

试验动物首选家兔，也可选用大鼠。试验中设置生理盐水或溶媒作为阴性对照。分别在其左右两侧股四头肌内以无菌操作法各注入一定量的受试物，观察给药后不同时间注射局部肌肉反应情况，如充血、红肿、变性、坏死等。注射后 48 小时处死动物，解剖取出股四头肌，纵向切开，观察注射部位肌肉的刺激反应，按表 1 计算相应的反应级，并进行局部组织病理学检查，提供病理照片。

表 1 肌肉刺激反应分级标准

刺激反应	反应级
无明显变化	0
轻度充血，范围在 0.5×1.0cm 以下	1
中度充血，范围在 0.5×1.0cm 以上	2
重度充血，伴有肌肉变性	3
出现坏死，有褐色变性	4
出现广泛性坏死	5

根据表 1 计算出 4 块股四头肌反应级的总和。若各股四头肌反应级的最高与最低之差大于 2 时，应另取 2 只动物重新试验。

## 3、皮肤刺激性试验

### 3.1 实验动物

首选家兔，每组动物数 4~8 只，一般雌、雄各半，也可选用小型猪或其他种属的动物，但应阐明合理性。应设赋形剂或溶媒对照，采用自体左右侧自身对比法。试验前 24 小时对给药区（通常在背部）进行脱毛处理（可

剪、剃或用适宜的脱毛剂)。去毛范围左、右各 3 cm×3 cm。给药前应检查去毛皮肤是否因去毛而受损伤,有损伤的皮肤不宜进行试验。进行破损皮肤的刺激性研究时,在用药部位用砂纸磨或划“井”字并以渗血为度。

### 3.2 给药方法

取受试物 0.5 ml 直接涂布于一侧已去毛的皮肤上,然后用二层纱布(2.5 cm×2.5 cm)和一层玻璃纸或类似物覆盖,再用无刺激性胶布和绷带加以固定;另一侧涂布赋形剂或溶媒做对照。贴敷时间至少 4 小时。贴敷结束后,除去受试物并用温水或无刺激性溶剂清洁给药部位。多次给药皮肤刺激性试验应连续在同一部位给药,每次给药时间相同,贴敷期限一般不超过 4 周。

### 3.3 结果观察

在自然光线或全光谱灯光下观察皮肤反应。按表 2 给出的评分标准对皮肤红斑和水肿进行评分。

单次给药皮肤刺激性试验,在去除药物后 30~60 分钟,24、48 和 72 小时肉眼观察并记录涂敷部位有无红斑和水肿等情况。如存在持久性损伤,有必要延长观察期限以评价上述变化的恢复情况和时间。但延长期一般不超过 14 天。对出现中度及以中度上皮肤刺激性的动物应在观察期结束时对给药局部进行病理组织学检查,并提供病理照片。

多次给药皮肤刺激性试验,在每次去除药物后 1 小时以及再次贴敷前观察及记录红斑及水肿、涂敷部位是否有色素沉着、出血点、皮肤粗糙或皮肤菲薄情况及其发生时间及消退时间,并对红斑及水肿进行评分。末次贴敷后,在去除药物后 30~60 分钟,24、48 和 72 小时肉眼观察并记录涂

敷部位有无红斑和水肿等情况。如存在持久性损伤，有必要延长观察期限以评价上述变化的恢复情况和时间。但延长期一般不超过 14 天。对出现中度及中度以上皮肤刺激性的动物应在观察期结束时对给药局部进行组织病理学检查，并提供病理照片。

### 3.4 结果评价

单次给药皮肤刺激性试验，计算每一观察时间点各组受试物及赋形剂或溶媒皮肤反应积分的平均分值，按表 2 进行刺激强度评价。多次给药皮肤刺激性试验，首先计算每一观察时间点各组积分均值，然后计算观察期限内每天每只动物刺激积分均值，按表 3 进行刺激强度评价。

表 2. 皮肤刺激反应评分标准

刺 激 反 应	分 值
<b>红 斑</b>	
无红斑	0
轻度红斑（勉强可见）	1
中度红斑（明显可见）	2
重度红斑	3
紫红色红斑到轻度焦痂形成	4
<b>水 肿</b>	
无水肿	0
轻度水肿（勉强可见）	1
中度水肿（明显隆起）	2
重度水肿（皮肤隆起 1mm，轮廓清楚）	3
严重水肿（皮肤隆起 1mm 以上并有扩大）	4
<b>最高总分值</b>	<b>8</b>

表 3. 皮肤刺激强度评价标准

分 值	评 价
0~0.49	无刺激性
0.5~2.99	轻度刺激性
3.0~5.99	中度刺激性
6.0~8.00	重度刺激性

## 4、粘膜刺激试验

### 4.1 眼刺激性试验

#### 4.1.1 实验动物

首选家兔，动物数每组不少于 3 只。应设置生理盐水对照组，可采用同体左右侧自身对比法。试验前 24 小时内对每只动物的双眼进行检查（包括使用荧光素钠检查）。有眼睛刺激症状、角膜缺陷和结膜损伤的动物不能用于试验。

#### 4.1.2 给药方法

每只眼睛滴入 0.05~0.1ml 或涂敷 0.1g 受试物，然后轻合眼睑约 10 秒。一般不需冲洗眼睛。给药期限应根据受试物拟用于临床应用的情况来决定，多次给药时每天给受试物的次数应与临床用药频率相同，连续给受试物 2~4 周，一般不超过 4 周。

#### 4.1.3 结果观察

应根据受试物的特点和刺激性反应情况来选择适当的观察时间。通常单次给药眼刺激试验，在给药后 1、2、4、24、48 和 72 小时对眼部进行检查，也可根据受试物的特点适当调整观察时间；多次给药眼刺激试验，每

天给药前以及最后一次给药后 1、2、4、24、48 和 72 小时对眼部进行检查，也可根据受试物的特点适当调整观察时间。如果在 72 小时未见任何刺激症状，试验则可结束。如存在持久性损伤，有必要延长观察期限，但一般不超过 21 天。

一般采用裂隙灯（或手持裂隙灯）进行眼刺激反应检查，也可根据刺激性反应情况采用其他的合适器械（如放大镜、生物显微镜等）。在整个观察过程中应进行荧光素钠染色检查。每次检查，都应记录眼部反应的分值（见表 4）。除了观察所列出的结膜、角膜和虹膜损伤外，其他所观察到的损伤也应记录和报告。

#### 4.1.4 结果评价

按表 4 的要求，将每一个观察时间、每一动物的眼角膜、虹膜和结膜的刺激反应分值相加得总积分，将一组的积分总和除以动物数，即得最后分值。按表 5 判断其刺激程度。

观察上述结果时，也可按表 6 的方法（该方法对眼部不同部位的刺激性分值进行了权重）记录眼部反应的分值（见表 6），再按照表 7 的要求，根据总积分值判断受试物的刺激程度。

表 4 眼刺激反应分值标准-1

眼 刺 激 反 应	分 值
<b>角 膜</b>	
无混浊	0
散在或弥漫性混浊，虹膜清晰可见	1
半透明区易分辨，虹膜模糊不清	2
出现灰白色半透明区，虹膜细节不清，瞳孔大小勉强可见	3
角膜不透明，虹膜无法辨认	4
<b>虹 膜</b>	
正常	0
皱褶明显加深、充血、肿胀，角膜周围轻度充血，瞳孔对光仍有反应	1
出血/肉眼可见坏死/对光无反应（或其中一种）	2
<b>结 膜</b>	
<b>充血（指睑结膜和球结膜）</b>	
血管正常	0
血管充血呈鲜红色	1
血管充血呈深红色，血管不易分辨	2
弥漫性充血呈紫红色	3
<b>水 肿</b>	
无水肿	0
轻微水肿（含眼睑）	1
明显水肿伴部分眼睑外翻	2
水肿至眼睑近半闭合	3
水肿至眼睑超过半闭合	4
<b>分泌物</b>	
无分泌物	0
少量分泌物	1
分泌物使眼睑和睫毛潮湿或粘着	2
分泌物使整个眼区潮湿或粘着	3
<b>最大总积分</b>	<b>16</b>

表 5 眼刺激性评价标准-1

分值	评价
0~3	无刺激性
4~8	轻度刺激性
9~12	中度刺激性
13~16	重度刺激性

表 6 眼刺激反应分值标准-2

眼刺激反应	分值
<b>I: 角膜</b>	
<b>混浊 (以最致密部位为准) (A)</b>	
无混浊	0
散在或弥漫性混浊, 虹膜清晰可见	1
半透明区易分辨, 虹膜模糊不清	2
出现灰白色半透明区, 虹膜细节不清, 瞳孔大小勉强可见	3
角膜不透明, 虹膜无法辨认	4
<b>角膜受损范围 (B)</b>	
<1/4	1
1/4~<1/2	2
1/2~<3/4	3
3/4~1	4
<b>A×B×5</b>	理论最大值 80
<b>II: 虹膜 (A)</b>	
正常	0
皱褶明显加深、充血、肿胀, 角膜周围轻度充血, 瞳孔对光仍有反应	1
出血/肉眼可见坏死/对光无反应 (或其中一种)	2
<b>A×5</b>	理论最大值 10
<b>III: 结膜</b>	
<b>充血 (指睑结膜和球结膜) (A)</b>	
血管正常	0
血管充血呈鲜红色	1
血管充血呈深红色, 血管不易分辨	2
弥漫性充血呈紫红色	3
<b>水肿 (B)</b>	

无水肿	0
轻微水肿 (含眼睑)	1
明显水肿伴部分眼睑外翻	2
水肿至眼睑近半闭合	3
水肿至眼睑超过半闭合	4
<b>分泌物 (C)</b>	
无分泌物	0
少量分泌物	1
分泌物使眼睑和睫毛潮湿或粘着	2
分泌物使整个眼区潮湿或粘着	3
(A+B+C) × 2	理论最大值 20

角膜、虹膜和结膜反应累加积分=I+II + III=110 (最大评分)

**表 7 眼刺激性评价标准-2**

分值	评价	Kay and Calanda 评价
0~0.5	无刺激性	Nonirritating
0.5~2.5	轻度刺激性	Practically nonirritating
2.5~15	轻度刺激性	Minimally irritating
15~25	中度刺激性	Mildly irritating
25~50	中度刺激性	Moderately irritating
50~80	重度刺激性	Severely irritating
80~100	重度刺激性	Extremely irritating
100~110	重度刺激性	Maximally irritating

## 4.2 直肠刺激性试验

通常选用兔或狗。给药容积可参考拟订的人体治疗容积或不同动物种属最大的可给药量。给药频率根据临床应用情况而定，通常每天 1~2 次，至少 7 天，每次给药与粘膜接触至少 2~4 小时，必要时肛门可封闭一定时间。观察内容：包括肛门区域和肛门括约肌，给药后临床表现（如疼痛症状）和粪便（如血、粘液），给药后动物的死亡和尸检情况，局部组织有

无充血、水肿等现象，并进行肛周粘膜的病理组织学检查等。

### 4.3 阴道刺激性试验

通常选用大鼠、兔或狗。给药容积可参考拟订的人体治疗容积或不同动物种属最大给药量。给药频率根据临床应用情况，通常每天 1~2 次，至少 7 天，每次给药与粘膜接触至少 4 小时。观察内容：包括阴道部位、临床表现（如疼痛症状）和阴道分泌物（如血、粘液）等，给药后动物死亡和尸检情况，局部组织有无充血、水肿等现象，并进行阴道和生殖系统病理组织学检查等。

### 4.4 滴鼻剂和吸入剂刺激性试验

可选用家兔、豚鼠或大鼠，将受试物滴入或喷雾于动物，使受试物与粘膜接触至少 4 小时，给药后观察动物全身状况（如呼吸、循环、中枢神经系统）及局部刺激症状（如哮喘、咳嗽、呕吐、窒息等症状）等变化。单次给药 24 小时后或多次给药停药后 24 小时处死动物，观察呼吸道局部（鼻、喉、气管、支气管）粘膜组织有无充血、红肿等现象，并进行病理组织学检查。

### 4.5 口腔用药、滴耳剂等刺激性试验

可参照上述试验，给药途径改为口腔给药或外耳道给药，观察对口腔和喉粘膜，以及对外耳道和鼓膜等的影响。口腔用药建议用金黄仓鼠，观察受试物对颊粘膜的刺激性。

## （二）光毒性（光刺激性）试验方法

### 1. 动物

成年白色豚鼠，雌雄各半。也可选用小鼠或家兔等。

## 2. 分组

应设阴性、阳性对照组和受试物不同剂量组。阴性对照组应给予赋形剂或溶剂，阳性对照组给予 8-甲氧基补骨脂素，受试物低剂量组给予临床用药浓度，高剂量组给予不引起皮肤刺激反应的浓度。正式试验的每组动物至少 6 只。

## 3. UV 光源

3.1 UV光源：波长为 320~400nm的UVA，如含有UVB，其剂量不得超过 0.1J/cm<sup>2</sup>。

3.2 强度的测定：用前需用辐射计量仪在实验动物背部照射区设 6 个点测定光强度 (mw/cm<sup>2</sup>)，以平均值计。

3.3 照射时间的计算：照射剂量为 10J/cm<sup>2</sup>，按下式计算照射时间。

照射时间 (秒) =照射剂量 (10000mJ/cm<sup>2</sup>) /光强度 (mJ/cm<sup>2</sup> · sec)

说明：1 mw/cm<sup>2</sup>=1 mJ/cm<sup>2</sup> · sec

## 4. 试验步骤

4.1 进行正式光毒性试验前 18~24 小时，将动物脊柱两侧皮肤去毛，试验部位皮肤需完好，无损伤及异常。备四块去毛区，每块去毛面积约为 2cm×2cm。

4.2 将动物固定，按表 8 所示，在动物去毛 1 和 2 区涂敷 0.2 ml (g) 受试物或阳性对照药，3 和 4 区涂敷适量赋形剂或溶媒。给药 30 分钟后，左侧用铝箔覆盖，胶带固定，右侧用 UVA 进行照射。

4.3 UVA 照射结束后分别于 1、24、48 和 72h 观察皮肤反应，根据表 9 判定每只动物皮肤反应评分。

表 8 动物去毛区的试验安排

去毛区编号	试验处理
1 (左上区)	涂受试物或阳性对照药, 不照射
2 (右上区)	涂受试物或阳性对照药, 照射
3 (左下区)	涂赋形剂或溶剂, 不照射
4 (右下区)	涂赋形剂或溶剂, 照射

表 9 皮肤反应的评分标准

红斑和焦痂形成	分值	水肿形成	分值
无红斑	0	无水肿	0
非常轻的红斑, 勉强可见	1	非常轻度水肿, 勉强可见	1
明显的红斑	2	轻度水肿 (边缘清晰)	2
中度至重度的红斑	3	中度水肿 (皮肤隆起约 1mm)	3
重度红斑 (鲜红色) 至轻度焦痂形成 (深层损伤)	4	重度水肿 (皮肤隆起大于 1mm, 并超过涂受试物的区域)	4

## 5. 结果评价

单纯涂受试物而未经照射区域未出现皮肤反应, 而涂受试物后经照射的区域出现皮肤反应分值之和为 2 或 2 以上的动物数为 1 只或 1 只以上时, 判为受试物具有光毒性。

### (三) 溶血试验方法

#### 1、 常规体外试管法 (肉眼观察法)

##### 1.1 血细胞悬液的配制

取兔血 (或羊血) 数毫升, 放入含玻璃珠的三角烧瓶中振摇 10 分钟, 或用玻璃棒搅动血液, 除去纤维蛋白原, 使之成为脱纤血液。加入 0.9% 氯化钠溶液约 10 倍量, 摇匀, 1000~1500 转/分钟离心 15 分钟, 除去上清液, 沉淀的红

细胞再用 0.9%氯化钠溶液按上述方法洗涤 2~3 次，至上清液不显红色为止。将所得红细胞用 0.9%氯化钠溶液配成 2%的混悬液，供试验用。

## 1.2 受试物的制备

除另有规定外，临床用于非血管内途径给药的注射剂，以各受试物临床使用浓度，用 0.9%氯化钠溶液 1 : 3 稀释后作为供试品溶液；用于血管内给药的注射剂以受试物临床使用浓度作为供试品溶液。

## 1.3 试验方法

取洁净试管 7 只，进行编号，1-5 号管为供试品管，6 号管为阴性对照管，7 号管为阳性对照管。按表 10 所示依次加入 2%红细胞悬液、0.9%氯化钠溶液或蒸馏水、受试物，混匀后，立即置  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  的恒温箱中进行温育，开始每隔 15 分钟观察 1 次，1 小时后，每隔 1 小时观察 1 次，一般观察 3 小时。

表 10 体外溶血试验

试管编号	1	2	3	4	5	6	7
2%红细胞悬液(ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
生理盐水 (ml)	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	
蒸馏水 (ml)							2.5
受试物 (ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1		

## 1.4 结果观察

若试验中的溶液呈澄明红色，管底无细胞残留或有少量红细胞残留，表明有溶血发生；如红细胞全部下沉，上清液体无色澄明，表明无溶血发生。

若溶液中有棕红色或红棕色絮状沉淀，振摇后不分散，表明有红细胞凝聚发生。如有红细胞凝聚的现象，可按下法进一步判定是真凝聚还是假凝聚。若凝聚物在试管振荡后又能均匀分散，或将凝聚物放在载玻片上，在盖玻片边缘滴加 2 滴 0.9%氯化钠溶液，置显微镜下观察，凝聚红细胞能被冲散者为假凝聚，若凝聚物不被摇散或在玻片上不被冲散者为真凝聚。

## 1.5 结果判断

当阴性对照管无溶血和凝聚发生，阳性对照管有溶血发生时，若受试物管中的溶液在 3 小时内不发生溶血和凝聚，则受试物可以注射使用；若受试物管中的溶液在 3 小时内发生溶血和（或）凝聚，则受试物不宜注射使用。

考虑到该试验本身与临床实际应用存在一定的差异，故建议应根据受试物适应症的选择和受试物的特性等诸多因素进行综合分析和判断。

## 2、改进的体外溶血性试验法（分光光度法）

根据红细胞破裂释放出来的血红素在可见光波长段具有最大吸收的原理，采用分光光度法测定中药注射剂的溶血程度，具有操作简便，稳定性好，能消除常规试管观察法带来的主观误差等缺点，对临床安全用药有重要指导意义。

试验方法：同上述体外试管法试验。

结果观察：按表 10 将温育了不同时间点的各管溶液离心，取上清，在分光光度计上，545 nm 处，以蒸馏水为空白读取各管的 OD 值。

结果判断：用下式计算各试验管的溶血率%。

$$\text{溶血率}(\%) = (\text{ODt} - \text{ODnc}) / (\text{ODpc} - \text{ODnc}) \times 100\%$$

式中，ODt：试验管吸光度；

ODnc：阴性对照管吸光度；

ODpc：阳性对照管吸光度。

参考评价标准：溶血率>5%表明有溶血发生，并进行统计学处理。

### 3、体外红细胞计数法

采用显微镜直接计数红细胞的量，计算溶血百分率。重复 2-3 次，求其均值。

溶血率(%)=[(空白对照管红细胞数-受试物管红细胞数)/空白对照管红细胞数]×100%。

### 4、体内溶血试验法（红细胞计数法）

必要时，可用动物做体内试验或结合长期毒性试验进行。采用显微镜直接计数给药前和给药后红细胞的数目变化，计算出中药注射剂的溶血百分率。该方法能够较精确测定出任何浓度下溶解红细胞的具体数值。

## 五、著者

《中药、天然药物刺激性和溶血性研究的技术指导原则》课题研究组