

9012 兽用中药生物活性测定指导原则

生物活性测定法是以药物的生物效应为基础，以生物统计为工具，运用特定的实验设计，测定药物有效性的一种方法，从而达到控制~~和评价~~兽药质量的作用。其测定方法包括生物效价测定法和生物活性限值测定法。

中药的药材来源广泛、多变，制备工艺复杂，使得中药制剂的质量控制相对困难，此外，中药含有多种活性成分和具有多种药理作用，因此，仅控制少数成分不能完全控制其质量和反映临床疗效。为了使中药的质量标准能更好地保证每批兽药的临床使用安全有效，有必要在现有含量测定的基础上增加生物活性测定，以综合评价其质量。

本指导原则的目的是规范中药生物活性测定研究，为该类研究的实验设计、方法学建立等过程和测定方法的适用范围提供指导性的原则要求。

基本原则

符合药理学研究基本原则 建立的生物活性测定方法应符合药理学研究的随机、对照、重复的基本原则；具备简单、精确的特点，~~应有明确的判断标准。~~

体现中兽医特点 鼓励应用生物活性测定方法探索中药质量控制，拟建立~~的~~方法的测定指标应与该中药的“功能与主治”相关。~~对拟研究的中药，应充分调研其功能与主治、用法用量，结合临床应用及现代药理研究进行综合分析，通过一个或多个指标来评价其作用。~~

品种选择合理 ~~拟开展生物活性测定研究的中药材、饮片、提取物或中药制剂应功能主治明确，其中，优先考虑适应症明确的品种，应选择药理作用清晰，功能与主治明确的中药材、饮片、提取物或成方制剂开展生物活性测定研究。对中药注射剂、急重症用药等应重点进行研究。~~

方法科学可靠 ~~应可行、可重复，品种项下应制定明确的判定标准。应优先选用生物效价测定法，不能建立生物效价测定的品种可考虑采用生物活性限值测定法，待条件成熟后可进一步研究采用生物效价测定法。~~

基本内容

1. 实验条件

试验系选择 生物活性测定所用的试验系，包括整体动物、离体器官、~~血清、微生物~~组织、细胞、~~微生物亚细胞器、受体、离子通道~~和酶等。试验系的选择与~~试验~~实验原理和制定指标密切相关，应选择背景资料清楚、影响因素少、检测指标灵敏和成本低廉的试验系统。应尽可能研究各种因素对试验系的影响，采取必要的措施对影响因素进行控制。

如采用实验动物，尽可能使用小鼠和大鼠等来源多、成本低的实验动物，并说明其种

属、品系、性别和年龄。实验动物的使用，应遵循“优化、减少、替代”的“3R”原则。

供试品选择 应选择工艺稳定，质量合格的供试品。若为饮片，应基源清楚。应至少使用3批供试品。供试品制备应综合考虑试验系、工艺和临床应用的特点，以适宜的方式体现出中药的活性。

标准品或对照品标准物质选择 如采用生物效价测定法，应有基本同质的标准品标准物质以测定供试品的相对效价，标准品的选择应一般首选中药标准品标准物质，也可以考虑化学药品作为标准品标准物质。如采用生物活性限值测定法，可采用中药成分或化学药品作为方法可靠性验证用对照品标准/参考物质。采用标准品或对照品均选择的标准物质均应有理论依据和 或 实验依据。

标准物质的效价赋值方式可采用标准物质与试验系反应生物效应的变化值或变化率作为确定效价单位（U）的依据，或采用其他适宜方式。

2. 实验设计

设计原理 所选实验测定方法的原理应明确，所选择的检测指标应客观、专属性强，能够体现供试品的功能与主治或药理作用，应充分说明指标选择的合理性。

设计类型 应在充分了解剂量-效应曲线特征的基础上选择设计类型。如采用生物效价测定法，应按《中国兽药典》一部附录生物检定统计法（一部附录1431）的要求进行实验设计研究；如采用生物活性限值测定法，试验设计可考虑设供试品组、阴性对照组或阳性对照组，测定方法使用动物模型时，应考虑设置模型对照组。重现性好的试验，也可以不设或仅在复试时设阳性对照组。

剂量设计-设置 如采用生物效价测定法，供试品和标准品均采用多剂量组试验，并按生物检定的要求进行合理的剂量设计，使不同剂量之间的生物效应有显著差异。如采用生物活性限值测定法，建议只设一个限值剂量，限值剂量应以产生生物效应为宜；但在方法学研究时，应采用多剂量试验，充分说明标准中设定限值剂量的依据。

给药途径 一般应与临床用药途径一致。如采用不同的给药途径，应说明理由。

给药次数 根据药效学研究合理设计给药次数，可采用多次或单次给药。

指标选择 应客观、明确、专属，与“功能主治”相关。应充分说明指标选择的合理性、适用性和代表性。

3. 结果与统计

试验结果评价应符合生物检定统计要求。生物效价测定法应符合一部附录生物检定统计法（一部附录1431）的要求，根据样品测定结果的变异性决定效价范围和可信限率（FL%）限值；生物活性限值测定法，应对误差控制进行说明，明确试验成立的判定依据，对结果进行统计学分析，并说明具体的统计方法和选择依据。

4. 结果判断标准

生物效价测定，应按品种的效价范围和可信限率（FL%）限值进行结果判断。生物活性限值测定，应在规定的限值剂量下判定结果，初试结果有统计学意义者，可判定为符合规定；初试结果没有统计学意义者，可增加样本数进行一次复试，复试时应增设阳性对照组，复试结果有统计学意义，判定为符合规定，否则为不符合规定。

方法学验证

对不同的测定方法进行方法学验证时，可根据测定目的、方法的原理、方法的技术特点等设计具体的验证方案。

1. 测定方法影响因素考察

应考察测定方法的各种影响因素，通过考察确定最佳的试验条件，以保证试验方法的专属性和准确性。根据对影响因素的考察结果，规定方法的误差控制限值或对统计有效性进行说明。离体试验，应适当进行体内外试验结果的相关性验证。

2. 精密度考察

应至少进行重复性、中间精密度、重现性考察。

重复性 按确定的测定方法，至少用 3 批供试品，每批 3 次或同批供试品进行 6 次测定试验后对结果进行评价。生物活性测定试验结果判断应基本一致。可通过对 3 个浓度水平，且每个浓度进行 3 次独立测定，或在目标浓度下进行 6 次独立测定后对结果进行评价。

中间精密度 考察实验室内部条件改变（如不同人员、不同仪器、不同工作日和实验时间）对测定结果的影响，至少应对同实验室改变人员进行考察。

重现性 生物活性测定试验结果必须在 3 家以上实验室能够重现。

3. 方法适用性考察

按拟采用的生物活性测定方法和剂量对 10 批以上该产品进行测定，以积累数据，考察质量标准中该测定项目方法的适用性。

9013 兽用中药注射剂安全性检查法应用指导原则

本指导原则为兽用中药注射剂临床使用的安全性和制剂质量可控性而定。设立安全性检查项目是为了控制兽药中杂质和/或有毒污染物的风险，应基于全生命周期的管理理念，并采用风险评估方法，综合考虑兽药的特性、工艺流程和预定用途等因素，对可能产生的杂质和/或有毒污染物进行充分的识别和控制，确定是否设立相应的检查项目。

兽用中药注射剂安全性检查一般包括热原（或细菌内毒素）、异常毒性、过敏反应、溶血与凝聚等项。根据处方、工艺、用法及用量等设定相应的检查项目并进行适用性研究。其中，细菌内毒素检查与热原检查项目间可以根据适用性研究结果相互替代，选择两者之一作为检查项目。

一、兽用中药注射剂安全性检查项目的设定

1. 静脉用注射剂

静脉用注射剂，均应设热原（或细菌内毒素）、异常毒性、过敏反应、溶血与凝聚等安全性检查项。由于兽用中药注射剂中致机体发热成分和干扰细菌内毒素检查法的因素复杂多变，一般首选热原检查项，但若该药本身对家兔的药理作用或毒性反应影响热原检测结果，可选择细菌内毒素检查项。应设立致热物质检查项目。检查法的选择应结合兽药的特性与生产工艺，进行致热物质来源分析和风险评估。内毒素来源的致热物质可采用细菌内毒素检查法或热原检查法，非内毒素来源的致热物质可选择热原检查法。

组分结构不清晰或有可能污染毒性杂质，且又缺乏有效的理化分析方法的静脉用注射剂，应考虑设立异常毒性检查项。在已有充分的安全性数据支持，且工艺稳健，实施有效的全面质量控制措施的前提下，证明产品异常毒性风险可控，或因药物本身毒性等因素不适合进行异常毒性检查的，可不设立该项检查。

组分结构不清晰且有可能污染异源蛋白或未知过敏反应物质的静脉用注射剂，如缺乏相关的理化分析方法且临床发现过敏反应，应考虑设立过敏反应检查项。

必要时，应考虑设置溶血与凝聚检查项。

2. 肌内注射用注射剂

应设异常毒性、过敏反应等检查项。

异常毒性检查项是否设立可参考静脉用注射剂的要求。

组分结构不清晰或有可能污染异源蛋白或未知过敏反应物质的肌内注射用注射剂，如缺乏相关理化分析方法且临床发现过敏反应，应考虑设立过敏反应检查项。

注射剂生产用原料、辅料和直接接触兽药的包装材料和容器（简称药包材）应根据来源、性质、用途、用法用量，并考虑对制剂质量的影响，基于风险管理的理念，结合兽药的生产工艺，采用具体问题具体分析的原则，配合理化分析方法，设立必要的安全性检查项目。

二、安全性检查方法和检查限值确定

检查方法和检查限值可按以下各项目内容要求进行研究。研究确定限值后，至少应进行3批以上供试品的检查验证。

1. 热原或细菌内毒素检查

本法系利用家兔（或鲎试剂）测定供试品所含的热原（或细菌内毒素）的限量是否符合规定。不合格供试品在临床应用时可能产生热原反应而造成严重的不良后果。

检查方法 参照热原检查法（附录 1112）或细菌内毒素检查法（附录 1113）。

设定限值前研究 热原检查应做适用性研究，求得对家兔无毒性反应、不影响正常体温和无解热作用剂量；细菌内毒素检查应进行干扰试验，求得最大无干扰浓度。实验用家兔应定期采用抽样的方式进行反应灵敏度测试，注射不同剂量的内毒素标准品应出现不同程度的升温反应。

设定限值 热原和细菌内毒素检查的限值根据临床1小时内最大用药剂量计算。热原检查限值可参照临床剂量计算，一般为靶动物用每千克体重每小时最大供试品剂量的3~5倍，供试品注射体积每千克体重一般不少于0.5ml，不超过10ml。细菌内毒素检查限值按规定要求计算，根据由于兽药和适应症的不同，限值可适当严格，至计算值的1/3~1/2，以保证安全用药。

热原限值剂量应不影响正常体温，细菌内毒素测定浓度应无干扰反应。如有影响或干扰，可在品种项下增加稀释浓度、调节pH值和渗透压或缓慢注射等排除影响或干扰的特殊规定。

2. 异常毒性检查

本法系将一定量的供试品溶液注入小鼠体内，规定时间内观察小鼠出现的死亡情况，以判定供试品是否符合规定。供试品的不合格表明兽药中混有超过药物本身毒性的毒性杂质，临床用药将可能增加急性不良反应的风险。

检查方法 参照异常毒性检查法（附录 1111）。

设定限值前研究 参考文献数据并经单次静脉注射给药确定该注射剂的急性毒性数据（LD₅₀ 或 LD₁ 及其可信限）。有条件时，由多个实验室或多种来源动物试验求得 LD₅₀ 和 LD₁ 数据。注射速度 0.1ml/秒，观察时间为 72 小时。如使用其他动物、改变给药途径和次数、或延长观察时间和指标，应进行相应动物、给药方法、观察指标、观察时间的急性毒性试验。
对动物异常反应的判断，应排除药物本身对动物的毒性反应的影响，必要时可设置对照组。

设定限值 异常毒性检查的限值应低于该注射剂本身毒性的最低致死剂量，考虑到实验室间差异、动物反应差异和制剂的差异，建议限值至少应小于 LD₁ 可信限下限的 1/3（建议采用 1/3~1/6），如难以计算得最低致死量，可采用小于 LD₅₀ 可信限下限的 1/4（建议采用 1/4~1/8）。如半数致死量与临床体重剂量之比小于 20 可采用 LD₅₀ 可信限下限的 1/4 或 LD₁ 可信限下限的 1/3。

如对动物、给药途径和给药次数、观察指标和时间等方法 and 限值有特殊要求时应在品种项下另作规定。

3. 过敏反应检查

本法系将一定量的供试品皮下或腹腔注射入豚鼠体内致敏，间隔一定时间后静脉注射供试品进行激发，观察豚鼠出现过敏反应的情况，以此判定供试品是否符合规定。供试品不合格表明注射剂含有过敏反应物质，临床用药时可能使**机体患病动物**致敏或产生过敏反应，引起严重不良反应。

检查方法 参照过敏反应检查法（附录 1121）。

设定限值前研究 测定供试品对豚鼠腹腔（或皮下）和静脉给药的无毒性反应剂量。必要时，可采用注射剂的半成品原辅料进行致敏和激发研究，确定致敏方式和次数，在首次给药后 14、21、28 天中选择最佳激发时间。

设定限值 致敏和激发剂量应小于该**给药**途径的急性毒性反应剂量，适当参考临床剂量。一般激发剂量大于致敏剂量。常用腹腔或鼠蹊部皮下注射途径致敏，每次每只 0.5ml，~~一只~~静脉注射 1ml 激发。**必要时，可在激发时设置空白对照动物同时给药，以排除药物本身对过敏反应结果判断的影响。**如致敏剂量较小，可适当增加致敏次数，方法和限值的特殊要求应在品种项下规定。

4. 溶血与凝聚检查

本法系将一定量供试品与 2%兔红细胞混悬液混合，温育一定时间后，观察其对红细胞的溶血与凝聚反应以判定供试品是否符合规定。

检查方法 参照溶血与凝聚检查法（附录 1122）。

设定限值前研究 对注射剂原液和稀释液进行溶血与凝聚实验研究，指标除目测外可增加比色法和显微镜下观察的方法，同时观察溶血和凝聚，确定无溶血和凝聚的最大浓度。

设定限值 以无溶血和凝聚的最大浓度的 1/2 作为限值浓度，一般应高于临床最大使用浓度，如注射剂原液无溶血和凝聚反应则以原液浓度为限值。