

八、耐缺氧检验方法

1 常压耐缺氧实验

1.1 原理

缺氧对机体是一种紧张性刺激，影响机体各种代谢，特别是影响机体的氧化供能，最终会导致机体的心、脑等主要器官缺氧供能不足而死亡。

1.2 材料

250mL 磨口瓶、秒表、凡士林、钠石灰（或等量氢氧化钠和碳酸钙）。

1.3 实验动物

推荐用近交系成年小鼠，单一性别，18—22g，每组 10—15 只。

1.4 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个阴性对照组，以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

1.5 实验步骤

各剂量组经口连续给予不同浓度受试样品，对照组给予同等容量溶剂，于末次灌胃后 1 小时，将各组小鼠分别放入盛有 5g 钠石灰的 250mL 磨口瓶内（每瓶 1 只），用凡士林封瓶口，盖严，使之不漏气，立即计时，以呼吸停止为指标，观察小鼠因缺氧而死亡的时间。

1.6 统计方法及结果判定

缺氧时间为计量数据，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

受试样品组与对照组比较，存活时间延长，并具有统计学意义，则判定该实验结果阳性。

1.7 注意事项：

1.7.1 每个磨口瓶内最好只放 1 只小鼠，以防互相干扰影响耐缺氧能力的测定。

1.7.2 磨口瓶一定要密闭封严，以防漏气，否则会影响实验结果。

1.7.3 磨口瓶必须等容量（误差 $\pm 1\text{mL}$ ），实验前先用水加以校正。

1.7.4 每批实验动物的体重应尽量保持一致。

2 亚硝酸钠中毒存活实验

2.1 原理

亚硝酸钠使正常二价铁血红蛋白转变为三价铁血红蛋白，破坏血红蛋白携氧能力，造成组织缺氧死亡。

2.2 材料

亚硝酸钠、秒表、1mL 注射器

2.3 实验动物

推荐用近交系成年小鼠，单一性别，18-20g，每组 10—15 只。

2.4 剂量分组

同 1.4

2.5 实验步骤

各剂量组经口连续给予不同浓度受试样品，对照组给予同等容量溶剂，于末次灌胃后 1 小时，各组动物按 200—240mg/kg BW 剂量腹腔注射亚硝酸钠（注射量为 0.1mL/10g），立即计时，记录动物存活时间。

2.6 统计方法及结果判定

存活时间为计量数据，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

受试样品组与对照组比较，存活时间延长，并具有统计学意义，则判定该实验结果阳性。

3 急性脑缺血性缺氧实验

3.1 原理

动物断头后，由于脑供血终止，在短时间内脑中原有的血液和营养物质尚能使脑功能维持短暂时间，显示出有规律地张口喘气，以喘气时间为指标，可观察受试样品对脑缺血性缺氧的保护作用，凡能使脑耗氧降低的受试样品，均能延长动物喘气时间。

3.2 材料

剪刀、秒表

3.3 实验动物

同 1.3

3.4 剂量分组

同 1.4

3.5 实验步骤

各剂量组经口连续给予不同浓度受试样品，对照组给予同等容量溶剂，于末次灌胃后 1 小时，各组动物自颈部逐只断头，立即按秒表记录小鼠断头后至张口喘气停止时间。

3.6 统计方法及结果判定

喘气停止时间为计量数据，采用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； F 值 $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

受试样品组与对照组比较，喘气时间延长，并具有统计学意义，则判定该实验结果阳性。

3.7 结果判定

常压耐缺氧实验、亚硝酸钠中毒存活实验、急性脑缺血性缺氧实验三项实验中任二项实验结果阳性，可判定该受试样品具有耐缺氧的作用。

3.8 注意事项

3.8.1 断头用的大剪刀必须锋利，断头时操作要敏捷，捉拿小鼠不宜反复多次或捉拿时间过长。

3.8.2 断头部位在小鼠耳根后部，切勿损伤延脑，否则断头后小鼠不显现喘气活动。