



中华人民共和国国家标准

GB 15193.16—2014

食品安全国家标准 毒物动力学试验

2014-12-24 发布

2015-05-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准代替 GB 15193.16—2003《代谢试验》。

本标准与 GB 15193.16—2003 相比,主要修改如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 毒物动力学试验”;
- 修改了范围;
- 增加了术语和定义;
- 修改了试验目的和原理;
- 修改了仪器和试剂;
- 增加了试验方法;
- 删除了生物转化;
- 删除了同位素实验中的注意事项;
- 删除了对生物样品中受试物分析方法的要求;
- 删除了结果判定;
- 增加了数据处理和结果评价;
- 增加了试验报告;
- 增加了试验的解释。

食品安全国家标准

毒物动力学试验

1 范围

本标准规定了毒物动力学试验的基本试验方法和技术要求。
本标准适用于评价受试物的毒物动力学过程。

2 术语和定义

2.1 受试物

用于测试的物品,专指符合毒物动力学试验要求的供试品。

2.2 毒物动力学

受试物在体内吸收、分布、生物转化和排泄等过程随时间变化的动态特性。

2.3 吸收

受试物从给予部位通常是机体的外表面或内表面的生物膜转运至血循环的过程。

2.4 分布

受试物通过吸收进入血液和体液后在体内循环和分配的过程。

2.5 代谢

受试物在体内经酶促或非酶促反应,结构发生改变的过程。

2.6 排泄

受试物和(或)其代谢物从身体被清除过程。

2.7 生物利用度

受试物被机体吸收利用的程度。

2.8 速率过程

经毒物动力学过程受试物的量在单位时间内的变化率,一般用单位时间过程进行的变化量表示过程的速率。毒物动力学的速率过程包括零级、一级和非线性3种类型。

2.9 浓度-时间曲线

以给予受试物后时间为横坐标,以受试物的血液浓度为纵坐标所作的算术坐标图,反映受试物在体内的处置状态、受试物含量的经时变化和速率,该曲线下的面积反映了进入体循环的受试物含量。

2.10 表观分布容积

当体内受试物分布达动态平衡后,假设体内流体中的受试物浓度均一地与血浆中的受试物浓度一样,这样溶解体内受试物量所需的流体容积就是表观分布容积。它以体内受试物量与血浆受试物浓度的比值表示。

2.11 机体总清除率

受试物通过代谢和(或)排泄的方式从体内清除的速度;即单位时间内受试物从体内清除的表观分布容积的分数。

2.12 消除半衰期

体内血中受试物浓度下降一半所需要的时间,它是表示受试物消除速率的参数。

2.13 峰浓度

受试物给予后血中能够达到的最大浓度。

2.14 峰时间

受试物给予后达到最大血浓度的时间。

3 试验目的和原理

对一组或几组试验动物分别通过适当的途径一次或在规定的时间内多次给予受试物。然后测定体液、脏器、组织、排泄物中受试物和(或)其代谢产物的量或浓度的经时变化。进而求出有关的毒物动力学参数,探讨其毒理学意义。

4 仪器和试剂

4.1 根据试验需要,配备紫外分光光度计、荧光分光光度计、薄层层析仪、气相色谱仪、高效液相色谱仪、气质或液质联用仪等设备。

4.2 放射性测量仪器。

4.3 实验室常用仪器与试剂。

5 试验方法

5.1 受试物的基本信息

应提供受试物的名称、CAS号、批号、来源、纯度、性状、理化性质、储存条件及配制方法等有关资料。

5.2 实验动物

5.2.1 动物种、系的选择

实验动物的选择应符合 GB 14922.1 和 GB 14922.2 的有关规定。尽可能选用与其他毒理学试验相同的种、系,并能出现受试物的典型毒作用的动物。一般首选大鼠,周龄一般为 6 周~12 周,但若有证

据证明其代谢途径与人类接近,应选择相应的动物。一般应选用年轻、健康的成年动物。选用啮齿类动物时,试验开始时动物体重的差异不应超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。选择其他动物应说明其理由。

5.2.2 性别和数量

对实验动物的性别不作特殊规定,如毒理学研究表明毒性有明显的性别差异时,应设不同的性别组。一般情况下,雌性动物应选用未产过仔和非妊娠的;每一试验组不应少于5只动物,在非啮齿类动物的试验中,动物数量可酌情减少。

5.2.3 动物饲养

试验前动物在实验动物房至少应进行3 d~5 d环境适应和检疫观察。实验动物饲养条件、饮用水、饲料应符合国家标准和有关规定(实验动物饲养条件应符合 GB 14925、饮用水应符合 GB 5749、饲料应符合 GB 14924 的有关规定)。

5.3 剂量

试验中至少需要选用两个剂量水平,每个剂量水平应使其受试物或受试物的代谢产物足以在排泄物中测出。剂量设置时应充分考虑现有的毒理学资料所提供的信息。如果缺乏相应的毒理学资料,则高剂量水平应低于 LD_{50} ,或低于急性毒性剂量范围的较低值。低剂量水平应该是高剂量水平的一部分。

如果试验中仅设置一个剂量水平,该剂量理论上应使其受试物或受试物的代谢产物足以在排泄物中测出,并不产生明显的毒性,同时应提供合理的理由说明不设置两个剂量水平的理由。

5.4 试验步骤和观察指标

5.4.1 受试物的准备

受试物的纯度不应低于98%。试验可采用“未标记的”或“标记”受试物。如果使用放射性同位素标记的受试物,其放射化学纯度不应低于95%,且应将放射性同位素标记在受试物分子的骨架上或具有重要功能的基团上。

5.4.2 受试物给予途径

当选用溶媒或其他介质时,受试物应充分溶解或均匀悬浮其中,所选溶媒或介质对受试物毒物动力学不产生任何影响。一般采用灌胃的途径,某些情况下还可以采用吞服胶囊、掺入饲料的方式给予受试物。

采用静脉注射给予受试物,应选择合适的注射部位和注射量给予受试物,所选溶媒或介质应不影响血液的完整性或血流量。

5.4.3 生物样品分析方法的建立和确证

5.4.3.1 由于生物样品一般来自全血、血清、血浆、尿液、器官或组织等,具有取样量少、受试物浓度低、干扰物质多以及个体差异大等特点,因此必须根据受试物的结构、生物介质和预期的浓度范围,建立灵敏、特异、精确、可靠的生物样品定量分析方法,并对方法进行确证。

5.4.3.2 生物样品分析方法有:

- a) 色谱法:气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、色谱-质谱联用法(LC-MS、LC-MS-MS、GC-MS、GC-MS-MS),生物样品分析一般首选色谱法;
- b) 免疫学方法:放射免疫分析法、酶免疫分析法、荧光免疫分析法等;

- c) 微生物学方法；
- d) 同位素示踪法。

对方法进行确证一般应进行以下几方面的考察：

- a) 特异性：必须证明待测物是预期的分析物，内源性物质和其他代谢物不得干扰样品的测定。对于色谱法至少要分析 6 个不同个体空白生物样品色谱图、空白生物样品外加对照物质色谱图及给予受试物后的生物样品色谱图。
- b) 标准曲线与定量范围：根据待测物的浓度与响应的相关性，用回归分析方法（如用加权最小二乘法）获得标准曲线。标准曲线高低浓度范围为定量范围，在定量范围内浓度测定结果应达到试验要求的精密度和准确度。
- c) 精密度与准确度：要求选择 3 个不同浓度的质控样品同时进行方法的精密度和准确度的考察。低浓度选择在定量下限附近，其浓度在定量下限的 3 倍以内；高浓度接近于标准曲线的上限；中间选一个浓度。
- d) 定量下限：定量下限是标准曲线上的最低浓度点，要求至少能满足测定 3 个~5 个消除半衰期时样品中的受试物浓度，或峰浓度的 1/10~1/20 时的受试物浓度，其准确度应在真实浓度的 80%~120% 范围内，批内和批间相对标准差应小于 20%。
- e) 样品稳定性：根据具体情况，对含受试物的生物样品在室温、冰冻或冻融条件下以及不同存放时间进行稳定性考察，以确定生物样品的存放条件和时间。还应注意储备液的稳定性以及样品处理后的溶液中分析物的稳定性。
- f) 提取回收率：应考察高、中、低 3 个浓度的提取回收率，其结果应精密和可重现。

5.4.4 观察指标

5.4.4.1 血中受试物浓度-时间曲线

5.4.4.1.1 受试动物数

动物给予受试物后选择 9 个~11 个不同的时间点采血，每个时间点的动物数不应少于 5 只。最好从同一动物个体多次取样。如由多只动物的数据共同构成一条血中受试物浓度-时间曲线，应相应增加动物数，以反映个体差异对试验结果的影响。

5.4.4.1.2 采样点

给予受试物前需要采血作为空白样品。为获得给予受试物后的一个完整的血中受试物浓度-时间曲线，采样时间点的设计应兼顾受试物的吸收相、分布相（峰浓度附近）和消除相。整个采样时间至少应持续到 3 个~5 个消除半衰期，或持续到血中受试物浓度为峰浓度的 1/10~1/20。

5.4.4.1.3 毒物动力学参数

根据试验中测得的各受试动物的血中受试物浓度-时间数据，求得受试物的主要毒物动力学参数。静脉注射给予受试物，应提供消除半衰期、表观分布容积、曲线下面积、机体总清除率等参数值；血管外给予受试物，除提供上述参数外，尚应提供峰浓度和峰时间等参数，以反映受试物吸收的规律。

5.4.4.1.4 单次给予受试物

单次给予不同剂量的受试物（或其放射性同位素标记物）后，于不同时间测定血浆或全血中受试物浓度（或总放射活性强度），提供各个受试动物的血中受试物浓度-时间数据和曲线及其平均值、标准差及其曲线；各个受试动物的主要毒物动力学参数及平均值、标准差。

5.4.4.1.5 重复多次给予受试物

重复多次给予受试物,应结合单次试验进行,一般选取一个剂量多次给予受试物,至少提供3次稳态的受试物的谷浓度,达稳态后进行末次给予受试物试验。于不同时间测定血浆或全血中受试物浓度或总放射活性强度,与单次给予受试物相比,确定重复多次给予受试物时的毒物动力学特征。

5.4.4.2 吸收

受试物吸收的程度和速率取决于受试物的给予途径。一般认为静脉注射给予受试物时母体化学物的瞬时吸收率计为100%,经口给予受试物时应确定达峰浓度、达峰时间和曲线下面积。分析母体化学物浓度与时间变化曲线可以确定经口给予受试物的吸收常数。

生物利用度为经口给予受试物的曲线下面积与静脉注射曲线下面积的比值。

5.4.4.3 分布

选择合适的受试物剂量给予实验动物后,根据受试物的理化性质和毒性特点测定其在血液、心、肝、脾、肺、肾、胃肠道、生殖腺、脑、体脂、骨骼肌等组织的浓度,以了解受试物在体内的主要分布器官组织。特别关注受试物浓度高、蓄积时间长的组织和器官,以及在毒性靶器官的分布。参考血中受试物浓度-时间曲线的变化趋势,选择至少3个时间点分别代表吸收相、分布相和消除相的受试物分布。若某组织的受试物浓度较高,应增加观测点,进一步研究该组织中受试物消除的情况。每个时间点,至少应有5个动物的数据。

进行组织分布试验,应注意取样的代表性和一致性。

同位素标记物的组织分布试验,应提供标记受试物的放射化学纯度、标记率(比活性)、标记位置、给予受试物剂量等参数;提供放射性测定所采用的详细方法;提供采用放射性示踪生物学试验的详细过程,以及在生物样品测定时对放射性衰变所进行的校正方程等。在试验条件允许的情况下,尽可能提供给予受试物后不同时相的整体放射自显影图像。

5.4.4.4 代谢

应采用适当的技术分析生物样本,以确定受试物的代谢途径和程度。应阐明代谢产物的结构。体外试验也有助于获取受试物代谢途径方面的信息。

5.4.4.5 排泄

在排泄试验中,选定合适的剂量给予受试物后,按一定的时间间隔分段收集尿样、粪便、呼出气,测定受试物浓度,计算受试物经此途径排泄的速率及排泄量。必要时还应收集胆汁检测经此途径排泄的速率及排泄量。

在给予受试物剂量至少90%已被消除、或在上述收集到的样品中已检测不到受试物、或检测时间长达7d,可停止排泄物的收集。若呼出气中受试物和(或)代谢产物浓度 $\leq 1\%$,可停止对动物呼出气体的收集。

记录受试物自粪、尿、呼出气等排泄的速率及总排泄量,提供受试物在动物体内的物质平衡的数据。

6 数据处理和结果评价

根据具体的试验类型,将数据汇总。选择科学合理的数据处理及统计学方法,并说明所用软件的名称、版本和来源。

7 试验报告

- 7.1 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号。
- 7.2 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期。
- 7.3 试验开始和结束日期、试验项目负责人、试验单位技术负责人、签发日期。
- 7.4 试验摘要。
- 7.5 受试物：名称、批号、剂型、状态(包括感官、性状、包装完整性、标识)、数量、前处理方法、溶媒。
- 7.6 实验动物：物种、品系、级别、数量、体重、性别、来源(供应商名称、实验动物生产许可证号)，动物检疫、适应情况，饲养环境(温度、相对湿度、实验动物设施使用许可证号)，饲料来源(供应商名称、实验动物饲料生产许可证号)。
- 7.7 试验方法：试验分组、每组动物数、剂量选择依据、受试物给予途径及期限、观察指标、统计学方法。
- 7.8 试验结果：
 - a) 用表格形式汇集试验数据，内容应包括不同剂量组每只动物的编号、性别、染毒剂量、体重、给予受试物前后生物材料中受试物及其代谢产物的测定值(或放射活性强度)等原始数据；
 - b) 计算各剂量组上述测定值的均值及标准差；
 - c) 绘制不同剂量条件下的受试物浓度-时间曲线；
 - d) 计算不同剂量条件下与吸收、分布、代谢、排泄有关的各项毒物动力学参数；
 - e) 对进行代谢研究的，给出代谢产物的化学结构，并提出代谢途径；
 - f) 对试验数据、曲线拟合的计算结果用适当的统计学方法处理。

8 试验的解释

根据试验结果，对受试物进入机体的途径、吸收速率和程度，受试物及其代谢产物在脏器、组织和体液中的分布特征，生物转化的速率和程度，主要代谢产物的生物转化通路，排泄的途径、速率和能力，受试物及其代谢产物在体内蓄积的可能性、程度和持续时间做出评价。结合相关学科的知识对各种毒物动力学参数进行毒理学意义的评价。
