附件4

毒物代谢动力学试验方法（征求意见稿）

Toxicokinetics

1 范围

本方法规定了毒物代谢动力学试验的基本原则、要求和方法。

本方法适用于结构明确的化妆品用化学原料毒物代谢动力学参数测定。

2 试验目的

通过研究结构明确的化妆品用化学原料的毒物代谢动力学，以获得有关其吸收、分布、代谢和排泄的充分信息，将浓度或剂量与观察到的毒性联系起来，以帮助理解其毒性机制。

3 定义

3.1 毒物代谢动力学 toxicokinetics

研究受试物在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程中随时间发生量变规律的科学。

3.2 吸收 absorption

受试物或其代谢产物进入体内或组织的过程。

3.3 分布 distribution

进入体内的受试物向机体的体液、组织、脏器转运的过程。

3.4 代谢 metabolism

进入体内的受试物在体液pH、酶系统或肠道菌群等作用下发生化学结构变化的过程。

3.5 排泄 excretion

已被吸收的受试物或其代谢产物排出体外的过程。

3.6 代谢产物 metabolites

代谢或代谢过程中的产物。

3.7 蓄积 accumulation

受试物随着暴露时间延长而在组织或器官中含量异常增加的现象。如果受试物进入体内速度大于其消除速度，机体就会蓄积受试物并达到毒性作用浓度。

3.8 受试物浓度-时间曲线下面积AUC area under the plasma concentration-time curve

受试物浓度随时间变化的曲线下面积，代表机体在一段时间内吸收受试物的暴露程度。

3.9 峰浓度Cmax

受试物经血管外途径暴露后出现的最大浓度值。

3.10 达峰时间tmax

暴露后达到峰浓度所需的时间。

3.11 末端消除半衰期t1/2 terminal half-life

受试物在体内的量或浓度减少一半所需的时间，其单位为“min”或“h”。

3.12 生物利用度 bioavailability

暴露剂量进入机体全身循环的剂量分数，或达到生物活性部位的剂量分数。一般情况下，生物利用度是指原型化合物的生物利用度，但也可以指代谢产物的生物利用度。

3.13 物质平衡 mass balance

通过定量分析受试物及其代谢产物在生物体系（如体内、体外或排泄系统）中的分布与去向，以确保受试物在吸收、分布、代谢和排泄过程中的总量守恒。

4 试验的基本原则

受试物通过适当的途径暴露，在规定的时间内，对一组或几组试验动物分别给予一次暴露或多次暴露。按照研究的要求，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。进而选择受试物在体内配置的合适模型和数学表达式，进行受试物浓度-时间曲线拟合，求出有关的毒物代谢动力学参数。

5 试验方法

5.1 受试物

在开展物质平衡及代谢产物鉴定时，通常需使用14C等放射性同位素标记的受试物。以下情况除外：若研究证实未标记受试物足以完成物质平衡评估和代谢产物鉴定；或有数据证明非放射性方法的检测特异性与灵敏度不低于放射性标记法；以及其他经科学论证的特殊情况。应使用适当的方法对放射性同位素标记和非放射性同位素标记的受试物进行分析，以确定其纯度和特性。放射性同位素标记的受试物的放射性纯度不应低于95%。非放射性同位素标记的受试物的纯度不应低于98%。

5.2 实验动物和饲养环境

5.2.1 动物种属和品系

尽可能选用与其他毒理学试验相同的品系。一般首选大鼠。理想情况下，所使用的品系应与得出该受试物的毒理学数据时使用的品系相同。如果需要使用其他种属或品系的动物，应提供理由。

5.2.2 年龄和体重

应使用成年健康动物（周龄通常6~12周），使用其他周龄的成年动物应提供理由。所有动物在研究开始时应具有相似的年龄。动物体重的变动范围不应超出平均动物体重的20%。

5.2.3 数量和性别

每一剂量组应至少使用4只动物。如果有证据证明在毒性方面存在明显的性别差异，则应考虑使用两种性别（4只雄性和4只雌性）。

5.2.4 饲养环境

实验动物及实验动物房应符合国家相应规定。选用标准配合饲料，饮水不限制。试验期间（最好也包括试验之前的适应期）动物应单笼饲养。

5.3 暴露剂量

预试验：在试验开始前，通常要进行预试验。通常选择一个剂量，一般选择无毒剂量，并保证在生物样品中有足够浓度的代谢产物便于分析鉴定。

正式试验：至少设置2个剂量组，低剂量组应低于最大无毒剂量，高剂量组应能出现毒性作用或引起毒物代谢动力学参数的改变，但不会引起严重中毒。在选择剂量时，应考虑现有毒性数据的信息。如果没有信息，可以考虑低于LD50（经口和经皮暴露）或LC50（吸入暴露）估计值或低于急性毒性范围估计值的较高剂量值。对于低毒性的物质，应使用1000mg/kg的最大剂量（经口和经皮暴露）或2mg/L的最大剂量（吸入暴露）。

分布和排泄试验通常选择一个剂量（一般以有效剂量为宜），该剂量应能保证在生物样品中有足够浓度原型或代谢产物可鉴定，同时不会产生明显毒性。静脉注射暴露通常选择一个剂量，该剂量应等于或小于血管外暴露的低剂量。当用放射性同位素标记的受试物暴露时，应考虑到所用剂量中放射性的强度，防止放射性损伤所致的毒物代谢动力学特征的改变。

5.4 暴露途径

暴露途径应尽可能与人体实际暴露的情况相同，根据受试物的性质和试验目的可采用经皮、经口、吸入或静脉注射暴露。

经皮暴露：根据暴露剂量，将受试物溶解在一定体积的溶媒中。溶媒需满足以下要求：在暴露实验周期内，不得引发皮肤显著刺激性反应；且不得对血液学检测指标产生干扰性影响。在试验前24h，采用剃毛法剪去动物躯干背侧区域的毛发。受试物涂敷面积约占动物体表面积的10%，对于高毒性的物质，可少于体表面积的10%。涂敷区域应采用适当的方法覆盖加以保护，暴露后的动物应单笼饲养。受试物至少与皮肤接触6h后去掉涂敷物，用中性皂液和清水对涂敷部位进行冲洗，测定冲洗液中受试物的回收率来评价受试物经皮暴露吸收的程度。

经口暴露：通常采用灌胃的方式。采用灌胃方式暴露时，溶解或混悬受试物的溶媒应与其他毒性试验相同，并提供溶媒选择合理性的依据。灌胃体积应根据动物大小、介质类型和暴露前是否禁食的具体情况而定。水溶性或非水溶性溶媒均应以实际可操作并且尽可能低的体积灌胃。啮齿类动物的灌胃体积通常为10mL/kg，不超过20mL/kg。

吸入暴露：通常采用口鼻式暴露装置，口鼻式暴露时间通常为4h，暴露期间应禁食，在全身暴露时可以提供水。暴露于气溶胶的动物应单笼饲养，避免摄入受试物。

静脉注射暴露：为了解受试物的毒物代谢动力学基本特征或计算血管外途径暴露吸收程度提供参数，有必要经静脉注射暴露。将受试物完全溶解在合适的溶媒中，并选择合适的注射体积和部位进行静脉暴露。所使用的溶剂不能对血液成分和血流产生明显影响。每只动物的输注速度应统一标准化，当使用颈静脉或股动脉插管进行暴露或采集血液，应对动物实施麻醉，且需考虑麻醉方法是否对毒物代谢动力学产生影响，动物应从麻醉状态完全清醒后才能暴露。

5.5 样本采集

血样经静脉或动脉采取，采血点应包含吸收相、平衡相（峰浓度附近）和消除相，采样时间持续到3~5个半衰期或持续到受试物浓度为Cmax的1/10~1/20，采血总量一般为动物血容量的10%~15%，最大不超过20%。皮肤样本采集通常在动物安乐死后进行。脏器组织样本采用麻醉后放血的方法处死动物后剖取，防止血液瘀滞影响受试物定量测定结果。呼出气体样本需要根据研究的目的和动物的大小选择合适的呼吸气体收集装置，常见的装置包括呼吸面罩、呼吸气袋、气管插管等。尿样采用连续分段集尿法采集，在集尿期中点设置采血点，计算肾清除率。

5.6 分离和测定方法

建立生物样本中受试物及代谢产物的分离和测定方法，根据受试物的性质选择色谱-质谱联用法或放射性同位素标记法。方法应满足专属性强、灵敏度高、线性范围宽、准确度高、精密度好的要求。用放射性同位素标记的受试物时，应根据标记同位素射线的性质建立相应的测定放射活性的方法。放射活性的测定应结合层析等分离技术进行，以了解代谢产物的图谱、生物转化程度和速度。

5.7 试验步骤

5.7.1 吸收

受试物主要有三种吸收方式，分别为经消化道、皮肤和呼吸道吸收。

经消化道、皮肤和呼吸道吸收是指受试物通过消化道、皮肤和呼吸道进入血液循环的过程。生物利用度可以通过比较静脉注射和血管外两种暴露方式的受试物浓度来计算。计算公式如下：

$$F=\frac{AUC\_{ext}×D\_{iv}}{AUC\_{iv}×D\_{ext}}×100\%$$

*F*为生物利用度（以百分比表示），*AUC*iv和$AUC\_{ext}$分别为静脉注射和血管外暴露后的受试物浓度-时间曲线下面积，*D*iv和*D*ext分别为静脉注射和血管外暴露剂量。

5.7.2 分布

研究受试物在体内的组织分布可以确定毒性靶组织，阐明毒性作用机制。组织分布的研究包括以下步骤。

（1）选择合适的时间点采集组织样本：通常情况下，吸收相、平衡相和消除相每个时相选择1个时间点。如果在研究结束时，组织中没有检测到任何物质，应注意防止对数据的误解。在这种情况下，应酌情在受试物和/或代谢产物的浓度峰值研究组织分布。此外，可能需要在其他时间点收集组织，以确定受试物和/或其代谢产物的组织分布。

（2）选择合适的组织样本采集：应收集的组织包括肝脏、脂肪、消化道、肾脏、脾脏、全血、残余尸体、目标器官组织和对受试物的毒理学评价有潜在意义的任何其他组织（如甲状腺、红细胞、生殖器官、皮肤、眼睛等）。应考虑在同一时间点对其他组织进行分析，以最大限度地利用动物，并在亚慢性或慢性毒性研究中观察到目标器官的毒性。

（3）样本浓度分析：测定步骤一般包括器官匀浆等，然后使用适当的分析技术分析。可以使用放射性同位素标记法对捕获的残留物进行液闪仪计数。通常采用整体放射自显影和受体显微自显影确定受试物在器官和/或组织中的分布。

5.7.3 代谢

通过收集排泄物对受试物原型和代谢产物进行鉴定和测定，其研究包括以下步骤。

（1）每只动物收集各个时相的排泄物，如尿液、粪便、呼出气体以及胆汁等。如果样本不够或放射活性低，可将几个时相的排泄物汇集到一起，但不可跨性别或跨剂量的汇集。

（2）使用两个不同的系统对代谢产物和已知标准物质进行共色谱分析或采用结构鉴定技术进行代谢产物鉴定。共色谱法的鉴定应使用两个不同的、独立的分析系统，如反相和正相薄层色谱法、高效液相色谱法等。结构鉴定技术包括液相色谱-质谱联用法、气相色谱-质谱联用法以及核磁共振波谱法等。

5.7.4 排泄

通过测量从尿液、粪便和呼出气体中消除的放射性剂量百分比来确定暴露剂量的排泄速度和程度，这些数据有助于建立物质平衡。其研究包括以下步骤：

（1）每只动物应放在单独的代谢单元中，在适当的时间间隔内收集排泄物，如尿液、粪便和呼出气体。在每个收集期结束时，应使用适当的溶剂冲洗代谢单元，以确保最大限度地回收受试物或放射性同位素标记的受试物。排泄物的收集应在7天后终止，或在至少回收了90%的暴露剂量后终止，以先发生者为准。

如果有研究表明，没有大量的受试物或放射性同位素标记的受试物从呼出的空气中排出，则不需要收集呼出气体。

（2）尿液中的受试物或放射性同位素标记的受试物总量应在收集的第一天至少有两个时间点进行测定，其中一个时间点应在暴露后24h，此后每天测定，直至研究结束。建议在第一天选择两个以上的采样点，如6h、12h和24h。粪便中的受试物或放射性同位素标记的受试物总量一般在暴露后24h开始每天测定，直至研究结束，可以根据预试验结果调整或增加采样点，并提供合适的样本采集时间表。在特定的试验研究中，如果在24h的收集期间，在呼出气体中发现少于1%的暴露剂量，则可以停止收集呼出的CO2和其他挥发性物质。

5.7.5 血浆/血液动力学

给予受试物或放射性同位素标记的受试物后，应使用适当的取样方法在适当的时间点从每只动物身上获取血样，每只动物可获得的血样量和数量可能受到重复采样对动物生理的潜在影响或分析方法的敏感性的限制。应对每只动物的样本进行分析。如果使用了放射性同位素标记的受试物，应分析全血和血浆，或血浆和红细胞的总放射性，以便计算血液/血浆比率。在其他情况下，可能需要进一步研究，需要识别母体化合物、代谢产物，或者评估蛋白质结合。

5.7.6 酶的诱导/抑制

在以下一种或多种情况下，需要对所研究的受试物的酶诱导/抑制进行研究：

（1）现有证据表明，毒性的增强与受试物的生物转化相关；

（2）现在的毒性数据表明，剂量和暴露之间存在非线性关系；

（3）代谢产物鉴定研究结果显示，已鉴定出一种潜在的经酶诱导途径产生的有毒代谢产物；

（4）在解释假定与酶诱导/抑制现象相关的效应时；

（5）如果在不同物种或条件下，通过体外或体内试验观察到受试物的代谢特征发生明显的毒理学改变。

5.7.7 物质平衡

通过将各排泄途径排出的受试物及其代谢产物占暴露剂量的百分比相加求和测得，包括尿液、粪便、呼出气体、组织和笼具清洗液含量百分比。一般应采用放射性同位素标记法，总放射性回收率应大于90%，如总放射性回收率＜90%，应测定残余尸体总放射性量。必要时应解剖动物，观察受试物及其代谢产物主要贮留部位和组织。

6 试验结果的评价

6.1 结果处理

可通过表格形式汇总试验数据，内容应包括不同剂量组每只动物的编号、性别、体重、暴露剂量、暴露前后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，并计算各剂量组上述测定值的均值及标准差。

绘制不同暴露方式下的受试物浓度-时间曲线，并计算不同暴露方式下与吸收、分布、代谢、排泄有关的各项毒物代谢动力学参数。对试验数据、曲线拟合和计算结果用适当的统计学方法处理。对于代谢研究，给出代谢产物的化学结构并提出代谢途径。

6.2 结果评价

一般情况下，需结合其他毒理学试验对各项毒物代谢动力学参数进行毒理学意义的综合评价。

6.2.1 吸收

测定受试物的吸收数据有助于急性毒性试验的评价和重复剂量毒性试验的剂量设计及评价。完全不吸收和无急性毒性作用的受试物，提示再无必要进行后续的重复剂量毒性试验。

6.2.2 分布

测定受试物在组织和器官内的分布有助于对重复剂量毒性试验的评价。分布试验也可提供受试物在体内或体内有关组织和器官中的蓄积情况。

6.2.3 代谢

（1）测定受试物的代谢模式和代谢速率的数据有助于长时程毒性试验的解释。此类试验中的代谢参数变异可在一定剂量范围内反映机体毒理学反应不呈比例的变化。代谢的剂量依赖性资料是长时程毒性试验剂量选择依据。

（2）重复剂量试验中可观察到毒理学反应的变化，可能与代谢酶的诱导作用有关。

（3）放射性同位素标记的受试物暴露后，与体内大分子结合的放射活性，可能来自正常的中间代谢过程，或表明活性中间代谢产物的形成。

6.2.4 排泄

受试物的排泄数据可用于重复剂量试验的评价。排泄量和排泄速率可以显示受试物或代谢产物是否能在体内贮留，残留水平可能与受试物的毒性反应的改变有关。

7 试验结果的解释

毒物代谢动力学数据可帮助评估动物毒性数据是否充分和相关，以便外推到人类危害或风险评估。

毒物代谢动力学试验方法（征求意见稿）起草说明

为加强化妆品的监督管理，进一步提高化妆品使用安全性，化妆品标准化技术委员会组织开展了毒物代谢动力学试验方法（征求意见稿）的研究制定工作。现就工作有关情况说明如下：

一、起草原则

本方法主要参照OECD在2010年发布的“OECD 417 Toxicokinetics”编制。写作结构框架按现行《化妆品安全技术规范》进行调整。本标准制定在充分考虑动物福利的前提下，本着科学性、合理性、规范性的指导原则，对某些内容及毒物代谢动力学相关特征指标进行具体化和明确化，同时也尽可能提供多种测量方法，突出体现适用性与可操作性。

二、起草过程

本研究于2021年11月由化妆品标准专家委员会立项，项目组在研究和分析国内外相关标准的基础上，起草了本标准文本及编制说明，形成方法草案。方法草案经专家会议审评，按照会议形成的意见和建议，多次修改完善文本内容，最终拟定本方法。

三、与我国已有相关标准的关系

我国现已发布国家标准GB/T 21750-2008《化学品毒物代谢动力学试验方法》和《化妆品测试方法 健康效应卷（第二版）》收载的“417 毒物代谢动力学试验”。本方法在参考上述我国已有相关标准的基础上，主要针对化妆品原料的特点，以现行《化妆品安全技术规范》写作框架为模板，本着化妆品原料检测适用性及可操作性的原则进行编制。

四、与《规范》中原方法的对比情况

现行《化妆品安全技术规范》中尚无毒物代谢动力学试验的相关内容，属于新增内容。本标准以上述试验方法的写作框架为模板，重点增加了对毒物代谢动力学相关特征指标规定。

五、与国际同类标准的关系

本方法以OECD 2010年发布“OECD 417 Toxicokinetics”为依据进行撰写，结合国内实验条件及操作的具体情况，撰写的标准内容基本涵盖了实验对象、实验操作和结果分析的技术要求，重点突出了毒物代谢动力学染毒参数的规定和确认。