

# 药物非临床药代动力学研究技术指导原则

## 一、概述

非临床药代动力学研究是通过体外和动物体内的研究方法，揭示药物在体内的动态变化规律，获得药物的基本药代动力学参数，阐明药物的吸收、分布、代谢和排泄（Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, 简称 ADME）的过程和特征。

非临床药代动力学研究在新药研究开发的评价过程中起着重要作用。在药物制剂学研究中，非临床药代动力学研究结果是评价药物制剂特性和质量的重要依据。在药效学和毒理学评价中，药代动力学特征可进一步深入阐明药物作用机制，同时也是药效和毒理研究动物选择的依据之一；药物或活性代谢产物浓度数据及其相关药代动力学参数是产生、决定或阐明药效或毒性大小的基础，可提供药物对靶器官效应（药效或毒性）的依据。在临床试验中，非临床药代动力学研究结果能为设计和优化临床试验给药方案提供有关参考信息。

本指导原则是供中药、天然药物和化学药物新药的非临床药代动力学研究的参考。研究者可根据不同药物的特点，参考本指导原则，科学合理地进行试验设计，并对试验结果进行综合评价。

本指导原则的主要内容包括进行药物非临床药代动力学研究的基本原则、试验设计的总体要求、生物样品的测定方法、研究项目（血药浓度-时间曲线、吸收、分布、排泄、血浆蛋白结合、生物转化、对药物代谢酶活性及转运体的影响）、数据处理与分析、结果与评价等，

并对研究中其他一些需要关注的问题进行了分析。附录中描述了生物样品分析和放射性同位素标记技术的相关方法和要求，供研究者参考。

## 二、基本原则

进行非临床药代动力学研究，要遵循以下基本原则：

- (一) 试验目的明确；
- (二) 试验设计合理；
- (三) 分析方法可靠；
- (四) 所得参数全面，满足评价要求；
- (五) 对试验结果进行综合分析与评价；
- (六) 具体问题具体分析。

## 三、试验设计

### (一) 总体要求

#### 1. 受试物

中药、天然药物：受试物应采用能充分代表临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。应采用工艺路线及关键工艺参数确定后的工艺制备，一般应为中试或中试以上规模的样品，否则应有充分的理由。应注明受试物的名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。由于中药的特殊性，建议现用现配，否则应提供数据支持配制后受试物的质量稳定性及均匀性。当给药时间较长时，应考察配制后体积是否存在随放置时间延长而膨胀造成终浓度不准的因素。如果由于给药容量或给药方法限制，可采用原料药进行试验。试

验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格及生产单位。

化学药物：受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映临床试验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。受试物应注明名称、来源、批号、含量（或规格）、保存条件、有效期及配制方法等，并提供质量检验报告。试验中所用溶媒和/或辅料应标明名称、标准、批号、有效期、规格和生产单位等，并符合试验要求。

在药物研发的过程中，若受试物的工艺发生可能影响其安全性的变化，应进行相应的安全性研究。

化学药物试验过程中应进行受试物样品分析，并提供样品分析报告。成分基本清楚的中药、天然药物也应进行受试物样品分析。

## 2. 试验动物

一般采用成年和健康的动物。常用动物有小鼠、大鼠、兔、豚鼠、犬、小型猪和猴等。动物选择的一般原则如下：

2.1 首选动物：在考虑与人体药代动力学性质相关性的前提下，尽可能选择与毒理学和药效学研究相同的动物。

2.2 尽量在动物清醒状态下进行试验，最好从同一动物多次采样获取药代动力学参数。

2.3 创新性药物应选用两种或两种以上的动物，其中一种为啮齿类动物；另一种为非啮齿类动物（如犬、小型猪或猴等）。其他药物，可选用一种动物，建议首选非啮齿类动物。

在动物选择上，建议采用体外模型比较动物与人代谢的种属差异性，包括代谢反应类型的差异和代谢产物种类及量的差异。通过比较，选取与

人代谢性质相近的动物进行非临床药代评价；同时尽可能明确药物代谢的研究对象（如：原形药物、原形药物与代谢产物、或几个代谢产物同时作为药代动力学研究观察的对象）。

2.4 经口给药不宜选用兔等食草类动物。

### 3. 剂量选择

动物体内药代动力学研究应设置至少三个剂量组，低剂量与动物最低有效剂量基本一致，中、高剂量按一定比例增加。不同物种之间可根据体表面积或药物暴露量进行剂量换算。主要考察在所设剂量范围内，药物的体内动力学过程是属于线性还是非线性，以利于解释药效学和毒理学研究中的发现，并为新药的进一步开发和研究提供信息。

### 4. 给药途径

所用的给药途径和方式，应尽可能与临床用药一致，也要兼顾药效学研究和毒理研究的给药途径。

## （二）生物样品的分析方法

生物样品中药物及代谢产物的分析方法包括色谱法、放射性同位素标记法和微生物学方法等。应根据受试物的性质，选择特异性好、灵敏度高的测定方法。色谱法包括高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱法（GC）和色谱-质谱联用法（如 LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS, GC-MS/MS 方法）。在需要同时测定生物样品中多种化合物的情况下，LC-MS/MS 和 GC-MS/MS 联用法在特异性、灵敏度和分析速度方面有更多的优势。

对于前体药物或有活性（药效学或毒理学活性）代谢产物的药物，以及主要通过代谢从体内消除的药物，建立生物样品分析方法时应考虑测定原形药和主要代谢产物，考察物质平衡（Mass Balance），阐明药物在体内的转归。在这方面，放射性同位素标记法和色谱-质谱联用法具有明显优点。

应用放射性同位素标记法测定生物样品可配合色谱法，以保证良好的检测特异性。如某些药物难以用上述的检测方法，可选用其他方法，但要保证其可靠性。

方法学验证（Validation）是生物样品分析的基础。所有药代动力学研究结果，都依赖于生物样品分析，只有可靠的方法才能得出可靠的结果。应通过准确度、精密度、特异性、灵敏度、重现性、稳定性等研究，对建立的方法进行验证。制备随行标准曲线并对质控样品进行测定，以确保生物样品分析数据的可靠性。

本指导原则提供了生物样品分析方法的基本要求 [见附录（一）]，研究时可根据药物特点及分析方法的具体类型进行选择。

### （三）研究项目

#### 1. 血药浓度-时间曲线

1.1 受试动物数：以血药浓度-时间曲线的每个采样点一般不少于 5 个数据为限计算所需动物数。建议受试动物采用雌雄各半。对于单一性别用药，可选择与临床用药一致的性别。

1.2 采样点：采样点的确定对药代动力学研究结果有重大影响，若采样点过少或选择不当，得到的血药浓度-时间曲线可能与药物在体内的真实情况产生较大差异。给药前需要采血作为空白样品。为获得给药后一个完整的血药浓度-时间曲线，采样时间点的设计应兼顾药物的吸收相、平衡相（峰浓度附近）和消除相。对于吸收快的血管外给药药物，应尽量避免第一个点是峰浓度（ $C_{max}$ ）；在  $C_{max}$  附近需要 3 个时间点，尽可能保证  $C_{max}$  的真实性。整个采样时间应持续到 3~5 个半衰期，或持续到血药浓度为  $C_{max}$  的 1/10~1/20。为保证最佳采样点，建议在正式试验前进行预试验，然后根据预试验的结果，审核并修正原设计的采样点。同时应注意采血途径和整个试验周期的采血总量不影响动物的正常生理功能和血液动力学，一般不超过动物总血量的 15%~20%。例如，每只大鼠 24 h 内采血总量不宜超过 2 mL。在采血方式上，同时也要兼顾动物福利（Animal welfare）。

1.3 口服给药：一般在给药前应禁食 12 小时以上，以排除食物对药物吸收的影响。另外在试验中应注意根据具体情况统一给药后禁食时间，以避免由此带来的数据波动及食物的影响。

#### 1.4 多次（重复）给药

对于临床需长期给药或有蓄积倾向的药物，应考虑进行多次（重复）给药的药代动力学研究。

多次给药试验时，一般可选用一个剂量（有效剂量）。根据单次给药药代动力学试验结果求得的消除半衰期，并参考药效学数据，确定药物剂量、给药间隔和连续给药的天（次）数。

## 1.5 血药浓度测定

按照已验证的分析方法，对采集的生物样品进行处理及分析测定，获得各个受试动物的各采样点的血药浓度数据。

生物样品的处理应与分析方法验证中的处理方法一致。

## 1.6 药代动力学参数

根据试验中测得的各受试动物的血药浓度-时间数据，求得受试物的主要药代动力学参数。静脉注射给药，应提供消除半衰期 ( $t_{1/2}$ )、表观分布容积 ( $V_d$ )、血药浓度-时间曲线下面积 ( $AUC$ )、清除率 ( $CL$ ) 等参数值；血管外给药，除提供上述参数外，还应提供峰浓度 ( $C_{max}$ ) 和达峰时间 ( $T_{max}$ ) 等参数，以反映药物吸收、消除的规律。另外，应提供统计矩参数，如：平均滞留时间 ( $MRT$ )、 $AUC_{(0-t)}$  和  $AUC_{(0-\infty)}$  等，对于描述药物药代动力学特征也是有意义的。

## 1.7 应提供的数据

### 1.7.1 单次给药

各个受试动物的血药浓度-时间数据及曲线和各组平均值、标准差及曲线。

各个受试动物的主要药代动力学参数及各组平均值、标准差。

对受试物单次给药非临床药代动力学的规律和特点进行讨论和评价。

### 1.7.2 多次（重复）给药

各个受试动物首次给药后的血药浓度-时间数据及曲线和主要药代动力学参数及各组平均值、标准差和曲线。

各个受试动物的 3 次稳态谷浓度数据及各组平均值、标准差。

各个受试动物血药浓度达稳态后末次给药的血药浓度-时间数据和曲线和主要药代动力学参数，及各组平均值、标准差和曲线。

比较首次与末次给药的血药浓度-时间曲线和有关参数。

对受试物多次给药非临床药代动力学的规律和特点进行讨论和评价。

## 2. 吸收

对于经口给药的新药，进行整体动物试验时应尽可能同时进行血管内给药的试验，提供绝对生物利用度。如有必要，可进行体外细胞试验、在体或离体肠道吸收试验等以阐述药物的吸收特性。

对于其他血管外给药的药物及某些改变剂型的药物，应根据立题目的，提供绝对生物利用度或相对生物利用度。建议采用非啮齿类动物（如：犬或猴等）自身交叉试验设计，用同一受试动物比较生物利用度。

## 3. 分布

一般选用大鼠或小鼠进行组织分布试验，但必要时也可在非啮齿类动物（如犬）中进行。通常选择一个剂量（一般以有效剂量为宜）给药后，至少测定药物及主要代谢产物在心、肝、脾、肺、肾、胃肠道、生殖腺、脑、体脂、骨骼肌等组织的浓度，以了解药物在体内的主要分布组织和器官。特别注意药物浓度高、蓄积时间长的组织和器官，以及在药效靶组织或毒性靶组织的分布（如对造血系统有影响的药物，应考察在骨髓的分布）。必要时建立和说明血药浓度与靶组织药物浓度的关系。参考血药浓度-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、平衡相和消除相的药物分布。若某组织的药物或代谢产物浓度较高，应增加观测

点，进一步研究该组织中药物消除的情况。每个时间点，一般应有 6 个动物（雌雄各半）的数据。

以下情况可考虑进行多次给药后特定组织的药物浓度研究：

（1）药物/代谢产物在组织中的半衰期明显超过其血浆消除半衰期，并超过毒性研究给药间隔的两倍；

（2）在短期毒性研究、单次给药的分布研究或其他药理学研究中观察到未预料的，而且对安全性评价有重要意义的组织病理学改变；

（3）定位靶向释放的药物。

进行组织分布试验，必须注意取样的代表性和一致性。

#### 4. 排泄

建议同时提供啮齿类和非啮齿类动物的排泄数据，啮齿类（大鼠、小鼠等）每个性别 3 只动物，非啮齿类（如犬）每个性别 2~3 只动物。根据药物特性，也可选择单一性别动物，但需说明。

4.1 尿和粪的药物排泄：将动物放入代谢笼内，选定一个有效剂量给药后，按一定的时间间隔分段收集尿或粪的全部样品，直至收集到的样品中药物和主要代谢产物低于定量下限或小于给药量的 1%。粪样品收集后按一定比例制成匀浆，记录总重量或体积，取部分尿或粪样品进行药物和主要代谢产物浓度测定或代谢产物谱（Metabolite profile）分析，计算药物和主要代谢产物经此途径排泄的速率及排泄量。每个时间段至少有 5 只动物的试验数据。

4.2 胆汁排泄：一般在动物麻醉下作胆管插管引流，待动物清醒且手术完全恢复后给药，并以合适的时间间隔分段收集胆汁，进行药物和主要代谢产物测定。

4.3 记录药物及主要代谢产物自粪、尿、胆汁排出的速度及总排出量（占总给药量的百分比），提供物质平衡的数据。

## 5. 与血浆蛋白的结合

一般情况下，只有游离型药物才能通过脂膜向组织扩散，被肾小管滤过或被肝脏代谢，因此药物与蛋白的结合会明显影响药物分布与消除的动力学过程，并降低药物在靶部位的浓度。建议根据药理毒理研究所采用的动物种属，进行动物与人血浆蛋白结合率比较试验，以预测和解释动物与人在药效和毒性反应方面的相关性。

研究药物与血浆蛋白结合可采用多种方法，如平衡透析法、超过滤法、分配平衡法、凝胶过滤法、色谱法等。根据药物的理化性质及试验室条件，可选择使用一种方法进行至少 3 个浓度（包括有效浓度）的血浆蛋白结合试验，每个浓度至少重复试验 3 次，以了解药物与血浆蛋白结合率以及可能存在的浓度依赖性和血浆蛋白结合率的种属差异。

对血浆蛋白结合率高，且安全范围窄的药物，建议开展体外药物竞争结合试验，即选择临床上有可能合并使用的高蛋白结合率药物，考察对所研究药物蛋白结合率的影响。

## 6. 生物转化

对于创新性的药物，尚需了解在体内的生物转化情况，包括转化类型、主要转化途径及其可能涉及的代谢酶表型。对于新的前体药物，除对其代

谢途径和主要活性代谢产物结构进行研究外，尚应对原形药和活性代谢产物进行系统的药代动力学研究。而对主要在体内以代谢消除为主的药物(原形药排泄 $<50\%$ )，生物转化研究则可分阶段进行：临床前可先采用色谱方法或放射性同位素标记方法分析和分离可能存在的代谢产物，并用色谱-质谱联用等方法初步推测其结构。如果临床研究提示其在有效性和安全性方面有开发前景，需进一步研究并阐明主要代谢产物的代谢途径、结构及酶催化机制。但当多种迹象提示可能存在有较强活性或毒性的代谢产物时，应尽早开展活性或毒性代谢产物的研究，以确定开展代谢产物动力学试验的必要性。

体内药物生物转化可考虑与血药浓度-时间曲线和排泄试验同时进行，应用这些试验采集的样品进行代谢产物的鉴定及浓度测定。

应尽早考察药效和毒性试验所用的实验动物与人体代谢的差异。这种差异有两种情况，其一是量的差异，动物与人的代谢产物是一致的，但各代谢产物的量不同或所占的比例不同；其二是质的差异，即动物与人的代谢产物是不一致的，这时应考虑这种代谢的种属差异是否会影响到其药效和毒性，并以此作为药效和毒性试验动物选择的依据。建议在早期非临床药代动力学研究时，进行药物体外(如动物和人肝组织匀浆、原代肝细胞、肝 S9、肝微粒体等)代谢试验，以预测动物与人体体内代谢有无差异。

## 7. 药物代谢酶及转运体研究

药物的有效性及毒性与血药浓度或靶器官浓度密切相关。一定剂量下的血药浓度或靶器官浓度取决于该药物的吸收、分布、代谢及排泄过程(ADME)，而代谢酶和转运体是影响药物体内过程的两大生物体系，是

药物 ADME 的核心机制之一。因此，创新性药物的研究开发应该重点关注药物吸收和主要消除途径的确定、代谢酶和转运体对药物处置相对贡献的描述、基于代谢酶或转运体的药物-药物相互作用的评估等。

体外试验体系是评价药物代谢酶和转运体作用机制的有力手段，应结合体内试验，综合评价药物的处置过程。非临床 ADME 研究应主要采用人源化材料（如：人肝微粒体、肝 S9、原代肝细胞及 P450 重组酶等），鉴定药物是否是代谢酶的底物或抑制剂。P450 同工酶之外的药物代谢酶，如葡萄糖醛酸结合酶、硫酸转移酶等，也应该在适当的情况下进行评估。

对细胞色素 P450 同工酶（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4 等）抑制的考察可以通过使用类药性探针底物（Drug-like Probe Substrate）完成。抑制试验应该在酶动力学线性范围进行，即探针底物药物的浓度 $\leq K_m$ （米氏常数），抑制强弱通过  $IC_{50}$  或  $K_i$  判断。P450 同工酶抑制试验的思路与方法适用于其他药物代谢酶和转运体的研究评价。药物对 P450 酶的诱导应该重点对人 CYP3A4 以及 CYP1A2、CYP2B6 进行评估。体外诱导试验可运用人肝细胞多次给药后相关 mRNA 表达和/或酶活性的变化进行评价。

具有重要临床意义的外排和摄入转运体主要包括 P-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 和 OCT2 等，建议针对这些转运体进行研究。除此之外的其他转运体研究，在必要时也可予以考虑。

创新药物非临床 ADME 研究还应该考虑到代谢酶与转运体之间的相互影响及潜在的相互作用、人特异性代谢产物的评估等。

## 8. 物质平衡

在临床前和临床早期阶段,特别是毒性剂量和有效治疗剂量范围确定的情况下运用放射性标记化合物,可通过收集动物和人体粪、尿以及胆汁以研究药物的物质平衡。这些研究能够获得化合物的排泄途径和排泄速率等信息,而且有助于代谢产物的性质鉴定,并通过有限的数据比较它们的体内吸收和分布特点。通过体外和动物样品中分离出的代谢产物有时可作为参比品用于临床和非临床的定量研究。同时,组织分布研究和动物胆管插管收集的胆汁能够提供药物的组织分布数据和明确胆汁清除特点。一般应采用放射性同位素标记技术研究物质平衡。有关试验方法的介绍及相关考虑见附录(二)。

考虑到每一个化合物及其代谢产物具有各自的理化特性,在开展不同化合物的同位素标记研究时对试验方法作慎重的调整/修改是很有必要的。

## 四、数据处理与分析

应有效整合各项试验数据,选择科学合理的数据处理及统计方法。如用计算机处理数据,应注明所用程序的名称、版本和来源,并对其可靠性进行确认。

## 五、试验结果与评价

对所获取的数据应进行科学和全面的分析与评价,综合论述药物在动物体内的药代动力学特点,包括药物吸收、分布和消除的特点;经尿、粪和胆汁的排泄情况;与血浆蛋白结合的情况;药物在体内蓄积的程度及主

要蓄积的器官或组织；如为创新性的药物，还应阐明其在体内的生物转化、消除过程及物质平衡情况。

在评价的过程中注意进行综合评价，分析药代动力学特点与药物的制剂选择、有效性和安全性的关系，从体外试验和动物体内试验的结果，推测临床药代动力学可能出现的情况，为药物的整体评价和临床研究提供更多有价值的信息。

## 六、附录

### (一) 生物样品分析方法的基本要求

#### 1. 基本概念

生物样品分析方法的基本参数包括：（1）准确度，（2）精密度，（3）特异性，（4）灵敏度，（5）重现性，（6）稳定性。现将相关的概念介绍如下：

**准确度：**在确定的分析条件下，测得值与真实值的接近程度。

**精密度：**在确定的分析条件下，相同基质中相同浓度样品的一系列测量值的分散程度。

**特异性：**分析方法测量和区分共存组分中分析物的能力。这些共存组分可能包括代谢产物、杂质、分解产物、基质组分等。

**灵敏度：**生物样品分析方法的灵敏度主要通过测定定量下限样品的准确度和精密度来表征。

**重现性：**不同试验室间测定结果的分散程度，以及相同条件下分析方法在间隔一段短时间后测定结果的分散程度。

稳定性：一种分析物在确定条件下，一定时间内在给定基质中的化学稳定性。

标准曲线：试验响应值与分析物浓度间的关系。应采用适当的加权和统计检验，用简单的数学模型来最适当地描述。标准曲线应是连续的和可重现的，应以回归计算结果的百分偏差最小为基础。

提取回收率：分析过程的提取效率，以样品提取和处理过程前后分析物含量百分比表示。

定量范围：包括定量上限（*ULOQ*）和定量下限（*LLOQ*）的浓度范围，在此范围内采用浓度-响应关系能进行可靠的、可重复的定量，其准确度和精密度可以接受。

生物基质：一种生物来源物质，能够以可重复的方式采集和处理。例如全血、血浆、血清、尿、粪、各种组织等。

基质效应：由于样品中存在干扰物质，对响应造成的直接或间接的影响。

分析批：包括待测样品、适当数目的标准样品和质控样品的完整系列。一天内可以完成几个分析批，一个分析批也可以持续几天完成。

标准样品：在生物基质中加入已知量分析物配制的样品，用于建立标准曲线，计算质控样品和未知样品中分析物浓度。

质控样品：即 QC 样品，系指在生物基质中加入已知量分析物配制的样品，用于监测生物分析方法的重复性和评价每一分析批中未知样品分析结果的完整性和正确性。

## 2. 生物样品分析方法的建立和验证

由于生物样品取样量少、药物浓度低、内源性物质（如无机盐、脂质、蛋白质、代谢产物）及个体差异等多种因素影响生物样品测定，所以必须根据待测物的结构、生物基质和预期的浓度范围，建立适宜的生物样品分析方法，并对方法进行验证。

分析方法验证分为全面验证和部分验证两种情况。对于首次建立的生物样品分析方法、新的药物或新增代谢产物定量分析，应进行全面方法验证。在其他情况下可以考虑进行部分方法验证，如生物样品分析方法在试验室间的转移、定量浓度范围改变、生物基质改变、稀少生物基质（动物组织样品）、证实复方给药后分析方法的特异性等。

应考察方法的每一步骤，确定从样品采集到分析测试的全过程中，环境、基质、材料或操作上的可能改变对测定结果的影响。

#### （1）特异性

必须证明所测定的物质是预期的分析物，内源性物质和其他代谢产物不得干扰样品的测定。对于色谱法至少要考察 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（注明浓度）及用药后的生物样品（注明样品来源基质、用药后的时间）色谱图。对于以软电离质谱为基础的检测方法（LC-MS、LC-MS/MS 等），应注意考察分析过程中的基质效应，如离子抑制等。

#### （2）标准曲线与定量范围

根据所测定物质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。

用至少 5 个浓度建立标准曲线，应使用与待测样品相同的生物基质，定量范围要能覆盖全部待测浓度，不允许将定量范围外推求算未知样品的浓度。建立标准曲线时应随行空白生物样品，但计算时不包括该点。

### (3) 精密度与准确度

要求选择 3 个浓度的质控样品同时进行方法的精密度和准确度考察。低浓度选择在定量下限附近，其浓度在定量下限的 3 倍或 3 倍以内；高浓度接近于标准曲线的上限；中间选一个浓度。每一浓度每批至少测定 5 个样品，为获得批间精密度，应至少 3 个分析批合格。

精密度用质控样品的批内和批间相对标准差 (*RSD*) 表示，相对标准差一般应小于 15%，在定量下限附近相对标准差应小于 20%。

准确度一般应在 85% ~ 115% 范围内，在定量下限附近应在 80% ~ 120% 范围内。

### (4) 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 ~ 5 个半衰期时样品中的药物浓度，或  $C_{\max}$  的 1/10 ~ 1/20 时的药物浓度，其准确度应在真实浓度的 80% ~ 120% 范围内，*RSD* 应小于 20%。应由至少 5 个标准样品测试结果证明。

### (5) 样品稳定性

根据具体情况，对含药生物样品在室温、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。

#### (6) 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。

#### (7) 稀释可靠性

样品稀释不应影响准确度和精密度。应该通过向基质中加入分析物至高于标准曲线上限浓度，并用空白基质稀释该样品（每个稀释因子至少 5 个测定值），来证明稀释的可靠性。准确度和精密度应在  $\pm 15\%$  之内。稀释的可靠性应该覆盖试验样品所用的稀释倍数。

#### (8) 残留

方法开发期间应使残留最小化。方法验证期间应通过检测标准曲线定量上限浓度后测定空白样品来确定其残留，通常残留应不大于定量下限的 20%。生物样品分析期间也应进行残留检测，如在测定高浓度样品后和分析下一个样品之前测定空白样品。

#### (9) 微生物学分析

上述分析方法验证的很多参数和原则也适用于微生物学分析，但在方法验证中应考虑到它们的一些特殊之处。结果的准确度是关键的因素，如果重复测定能够改善准确度，则应在方法验证和未知样品测定中采用同样的步骤。

#### (10) 组织分布样品

组织分布样品由于每种组织样本数目少，所以其分析方法只需验证选择性、日内精密度和准确度等。通常选择一两种代表性组织（如肝、肺、肾、大肠等）进行分析方法验证。

### 3. 生物样品分析方法的应用

应在生物样品分析方法验证完成之后开始测试未知样品。推荐由独立的人员配制不同浓度的标准样品对分析方法进行考核。

每个未知样品一般测定一次，必要时可进行复测。药代动力学比较试验中，来自同一个体的生物样品最好在同一分析批中测定。

每个分析批应建立标准曲线，随行测定高、中、低 3 个浓度的质控样品，每个浓度至少双样本，并应均匀分布在未知样品测试顺序中。当一个分析批中未知样品数目较多时，应增加各浓度质控样品数，使质控样品数大于未知样品总数的 5%。质控样品测定结果的偏差一般应小于 15%，最多允许 1/3 质控样品的结果超限，但不能在同一浓度中出现。如质控样品测定结果不符合上述要求，则该分析批样品测试结果作废。

同一天内进行不同组织样品测试时，用代表性组织作为基质建立标准曲线，但质控样品应采用目标空白组织制备。根据当日标准曲线计算质控样品的浓度，若相对偏差在 $\pm 15\%$ 之内，则可共用一条标准曲线，否则采用与待测组织样品相同的空白组织建立标准曲线。

浓度高于定量上限的样品，应采用相应的空白基质稀释后重新测定。对于浓度低于定量下限的样品，在进行药代动力学分析时，在达到  $C_{\max}$  以前取样的样品应以零值计算，在达到  $C_{\max}$  以后取样的样品应以无法定量（Not detectable, ND）计算，以减小零值对 AUC 计算的影响。

#### 4.分析数据的记录与保存

分析方法的有效性应通过试验证明。在分析报告中，应提供成功完成这些试验工作的相关资料。建立一般性和特殊性标准操作规程，保存完整的试验记录是分析方法有效性的基本要素。生物分析方法建立中产

生的数据和 QC 样品测试结果应全部记录并妥善保存，必要时接受检查。

## 5.需提交的数据与材料

提供给药品注册管理部门的材料应当包括：（1）综合信息；（2）方法建立的数据；（3）在日常样品分析中的基本资料；（4）其他相关信息。

### （1）综合信息

项目编号、分析方法编号、分析方法类型、分析方法验证简化的理由，以及相应的项目计划编号、标题等。

### （2）方法建立的数据

分析方法的详细描述；该方法所用对照品（被测药物、代谢产物、内标物）的纯度和来源；稳定性试验描述及相关数据；描述测定选择性、准确度、精密度、回收率、定量限、标准曲线的试验并给出获得的主要数据；列出批内、批间精密度和准确度的详细结果。根据具体情况提供代表性的色谱图或质谱图并加以说明。此外，尚需对所建立的方法学在实际分析过程中的优缺点进行评价。

### （3）在日常样品分析中的基本资料

所用样品（受试物、代谢产物、内标物）的纯度和来源。样品处理和保存的情况，样品编号、采集日期、运输前的保存、运输情况、分析前的保存。信息应包括日期、时间、样品所处条件，以及任何偏离试验计划的情况。样品分析批的综合信息，包括分析批编号、分析日期、分析方法、分析人员、开始和结束时间、主要设备和材料的变化，以及任何可能偏离分析方法建立时的情况。

用于计算结果的回归方程，分析样品时标准曲线列表，各分析批质控样品测定结果综合列表并计算批内和批间精密度、准确度，各分析批包括的未知样品，浓度计算结果。

在现场考核中，应能提供全部受试物样品测试的色谱图或其他原始数据，包括相应分析批的标准曲线和质控样品的色谱图或其他原始数据。

注明缺失样品的原因，重复测试的结果。应对舍弃任何分析数据和选择所报告的数据说明理由。

#### (4) 其他相关信息

缩略语列表、参考文献列表、标准操作规程列表。

## (二) 应用放射性同位素标记技术进行药物非临床药代动力学研究

新药研发过程中，了解候选药物在人体和用于毒理和药效研究的动物体内的变化情况至关重要。因此，在新药研发不同阶段必须进行各种体内、体外药代试验以阐明候选药物的吸收、分布、代谢和排泄（ADME）等性质。尤其是对于仅在人体存在的代谢产物，或在稳态时体内暴露水平高于所有与药物相关物质总暴露量的 10% 并远高于任何毒理试验动物种属中的水平的代谢产物，会有药物安全性隐患，需进行代谢产物安全性研究。尽管液质联用技术已大量应用于这些试验，但放射性同位素标记技术仍被广泛使用。低能量放射性同位素（如  $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ ）标记化合物应用于药代动力学研究，因其生物界背景值很低因而检测容易且灵敏、半衰期较长而不需根据放射性半衰期校正试验结果、可定量分析候选药物产生的代谢产物而不需知道它们的结构、产生的非离子化  $\beta$ -射线能量极低而不需特殊防

护，被证明为一种安全有效的特殊技术，其结果简单、明了、可靠，目前在多数情况下尚无别的取代方法。

### 1.放射性同位素标记药代动力学研究的应用范围

低能量放射性同位素标记技术可用于多方面 ADME 试验中，如：1) 进行原形药和代谢产物总体和分别的药动学研究，确定总体的系统暴露和生物利用度等；2) 考察物质平衡及排除途径；3) 确定血液和排泄物中的代谢产物谱，结合色谱与质谱技术可利于代谢产物鉴定；4) 确定体内清除机制；5) 进行肝细胞、肝微粒体等体外药代动力学试验可获得全面的人和动物（如小鼠、大鼠、兔、犬、猴等）体外代谢产物谱、显示种属差异、帮助毒理研究动物种属的选择；6) 鉴于同一种放射性同位素在不同结构的化合物（如：药物或代谢产物）上产生相同的放射能量，放射性代谢产物可用于同种动物稳态时、其他动物种属及人体中产生的代谢产物的定性定量分析，有助于人体代谢酶的鉴定，早期发现人体高比例代谢产物，并为药物相互作用研究的试验设计提供依据；7) 获得组织分布数据。大鼠给药后不同时间点的整体放射自显影结果还可为临床放射性剂量的计算提供数据。

### 2.放射性同位素标记方法的选择

小分子化学药物 ADME 研究中常用的低能量放射性同位素为碳-14 ( $^{14}\text{C}$ ) 和氚 ( $^3\text{H}$ )。  $^{14}\text{C}$  标记最为常用，其生物界背景低，生物学几乎无同位素效应而影响代谢，极少发生同位素交换，灵敏度较  $^3\text{H}$  高而容易定量。标记碳-14 化合物时应选择代谢稳定的位点。体内试验除非  $^{14}\text{C}$  标记非常困难或根本无法标记、给药剂量极低需很高的比活性时才选用  $^3\text{H}$  标

记。<sup>3</sup>H 标记相对简单并比 <sup>14</sup>C 标记化合物比活性高，尤其适合小剂量给药化合物或早期生物转化研究；同样，氚标记化合物时也应选择代谢稳定的位点作为标记位点，不推荐非定位的氘水交换标记方式。

<sup>14</sup>C 和 <sup>3</sup>H 标记化合物的放化纯度与化学纯度一般均应 $\geq 95\%$ ，并不含有 $>1\%$ 的单一杂质。

### 3.放射性同位素标记药物的药代动力学试验

放射性化合物药代动力学试验与非标记药物药代动力学试验相似，如剂量、给药途径、受试动物等等。剂量除按常规剂量水平(mg/kg)表示外，还需提供放射性剂量 ( $\mu\text{Ci/kg}$ )。给药制剂的配制和给药途径一般也应与非标记药代动力学试验相似，特殊情况需说明。为减少实验误差，常采用称重法确定实际给药量。样品收集常包括全血、血浆、尿液、胆汁、粪便、笼具清洗液及组织等样本。血液样本的收集时间点可根据药物的药代动力学参数决定，排泄物一般采样 7~10 天（对于长半衰期的药物，应适当延长采样时间），或采样至排出的放射性量超过给药量的 90%或连续 2 天的排出放射性量小于放射性给药剂量的 1%。进行小动物（如小鼠、大鼠等）物质平衡试验时，如总放射性回收率 $<90\%$ ，应测定尸体残留总放射量，必要时解剖动物，观察药物的主要储留部位和组织。为防止原形药及代谢产物降解，尿液和胆汁收集过程中容器置放于干冰内。样品处理（如液体样品离心去固体杂质、血浆、粪便及组织提取等）和分析（如应用 HPLC 和在线或离线放射性检测仪联用获得放射性代谢产物谱）应密切关注放射性的回收率，一般总回收率应 $\geq 85\%$ 。应根据放射性代谢产物谱研究获得

的各代谢产物的血浆暴露量百分比和在排泄物中占给药百分率选择需要鉴定的代谢产物,并使用 HPLC 在线或离线放射性检测仪帮助鉴定工作中对代谢产物的监测。

放射性 ADME 试验报告除包括常规药代动力学研究内容外,还应提供放射性同位素标记药物的标记位置、放化纯度、化学纯度、比活度等以及在给药制剂中的放化稳定性数据。实验结果应提供放射性回收率,代谢产物鉴定需提供质谱和在线或离线放射性检测仪关联数据。

### (三) 几个需要关注的问题

#### 1.关于中药、天然药物药代动力学研究

在中药、天然药物新药研究开发的过程中,通过对活性成分或活性代谢产物非临床药代动力学研究,了解其相关药代动力学参数,可作为阐明药效或毒性产生的基础及了解药效或毒性反应靶器官的依据,并为设计和优化临床试验给药方案提供有关参考信息。

中药活性成分情况较为复杂,有些活性成分较为单一,有些物质基础比较清楚但成分较多,有些活性成分复杂且不清楚。

对于活性成分单一的中药、天然药物,其非临床药代动力学研究与化学药物基本一致。

对于非单一活性成分但物质基础基本清楚的中药、天然药物,其中药效或毒性反应较强、含量较高的成分,一般需要进行药代动力学探索性研究。对于活性成分复杂且物质基础不太清楚的中药、天然药物,应根据对其中部分已知成分文献研究的基础上,重点考虑是否进行有明确毒性成分的非临床药代动力学研究。若有足够证据表明某类结构相似的一类成分中

某一个成分的药代动力学属性可以代表该类成分的药代动力学特征，可从同类成分中选择一个代表性成分进行测定。被测成分应根据机体的暴露水平和暴露形式，以及药效作用/安全性相关性等因素来确定。

此外，在进行中药、天然药物非临床药代动力学研究时，应充分考虑中药、天然药物所含化学成分不同于化学合成药物的特点，结合其特点选择适宜的方法开展体内过程或活性代谢产物的研究，为后续研发提供参考。若拟进行的临床试验中涉及到与其他药物（特别是化学药）联合应用，应考虑通过体外、体内试验开展药物相互作用研究。

## 2.关于药代动力学研究的体外方法

随着体外生物技术的发展，为深层次地了解 and 阐明药物的某一性质以及与药效和毒性的相关性，不少药代动力学的体外方法有效地应用于药物代谢和相互作用评价，如体外吸收模型（Caco-2 细胞模型）、体外肝系统研究、体外转运系统等。这些体外方法学在推测人药代动力学参数和特征时，提供了同种属的体外到体内的推测。体外方法学可以通过应用不同辅酶、不同选择性抑制物，不同重组基因纯酶，在试验设计上，可以弥补动物体内方法学的缺陷。人和动物的体外方法学结合动物的体内方法学，在新药研发的临床前阶段，可以较准确和有效地评价药物的吸收、运转、分布、代谢，比如药物代谢产物鉴定、代谢途径鉴定、药物对代谢酶和转运体的抑制和诱导等，为阐明药理和毒理作用机制和设计第一个临床研究剂量和评价潜在性药物代谢性或运转性相互作用提供可靠的参数。药代动力学的体外方法学的应用，在不影响或优化临床前研究信息量的同时，减少了实验动物的使用，使动物伦理学的实施逐渐可行。

对于体外研究发现有明显种属差异的药物，应进一步分析解释。

### 3.关于动物选择

由于动物药代动力学研究是联系动物研究与人体研究的重要桥梁,动物选择的恰当与否是该研究价值大小的关键。应尽量选择适宜的动物来进行研究,如口服给药的药物不宜选择食草类动物或与人胃肠道情况差异较大的动物,以免由于吸收的差异造成试验结果不能充分提示临床。对于创新性的药物,可利用体外药代动力学手段预先对动物种属进行筛选,以选择药物动力学特点与人体最接近的动物,提高试验结果的临床预测价值。由此也可为毒性试验选择合适的动物种属提供依据,并对毒性试验与人体的相关性做出判断。

### 4.关于手性药物

对映异构体具有几乎相同的物理性质(旋光性除外)和化学性质(在手性环境中除外),通常需要特殊的手性技术对它们进行鉴定、表征、分离和测定,但生物系统常常很容易区分它们,并可能导致不同的药代动力学性质(吸收、分布、代谢、排泄),以及药理学、毒理学效应的量或质的区别。

为评价单一对映体或对映体混合物的药代动力学,研究者应在药物开发前期,建立适用于体内样品对映体选择性分析的定量方法,为后期研究对映体之间的相互转化以及各自的吸收、分布、代谢和排泄提供方法学基础。

如果外消旋体已经上市,研究者希望开发单一对映体,则应测定该对映体转化为另一对映体的程度是否显著,以及该对映体单独用药是否与其作为外消旋体组分时的药代动力学性质一致,这对丰富和解释单一对映体研发的立题依据、优化剂量、制定给药方案具有重要的意义。

为监测对映异构体在体内的相互转化和处置,应获得单一对映体在动物体内的药代动力学曲线,并与其后在临床 I 期试验中获得的药代动力学曲线相比较。