



保健食品 代谢动力学

张彦 张双庆 刘烈刚 / 著



BAOJIANG SHIPIN

DAIXIE DONGLIXUE



电子科技大学出版社

保健食品代谢动力学

张彦 张双庆 刘烈刚 著

电子科技大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

保健食品代谢动力学 / 张彦, 张双庆, 刘烈刚著.

- - 成都: 电子科技大学出版社, 2016. 10

ISBN 978 - 7 - 5647 - 3906 - 5

I. ①保… II. ①张… ②张… ③刘… III. ①疗效食品 - 药物代谢动力学 IV. ①R969.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 220252 号

保健食品代谢动力学

张 彦 张双庆 刘烈刚 著

出 版: 电子科技大学出版社(成都市一环路东一段 159 号电子信息产业大厦 邮编:610051)

策划编辑: 汤云辉

责任编辑: 汤云辉

主 页: www.uestp.com.cn

电子邮箱: uestp@uestp.com.cn

发 行: 新华书店经销

印 刷: 成都蜀通印务有限责任公司

成品尺寸: 148mm × 210mm 印张 7.25 字数 195 千

版 次: 2016 年 10 月第一版

印 次: 2016 年 10 月第一次印刷

书 号: ISBN 978 - 7 - 5647 - 3906 - 5

定 价: 39.00 元

■ 版权所有 侵权必究 ■

◆ 本社发行部电话: 028 - 83202463; 本社邮购电话: 028 - 83201495。

◆ 本书如有缺页、破损、装订错误, 请寄回印刷厂调换。

前 言

保健食品代谢动力学是定量研究受试物在动物体内的吸收、分布、代谢和排泄等随时间变化的动态规律和特征,获得受试物的代谢动力学参数,深入阐明受试物作用机制。受试物或活性代谢产物浓度数据及其代谢动力学参数是产生、决定或阐明毒性大小的基础,可提供受试物对靶器官效应的依据。

保健食品代谢动力学是创新性保健食品必须开展的研究之一。尽管我国保健食品研发发展迅猛,但创新性保健食品发展严重滞后,缺乏国际市场竞争力。《保健食品检验与评价技术规范》自 2003 年颁布至今已有十余年时间。这期间,很多仪器、试剂等都有了很大的变化,一些方法已经不再适用或者已有更简便方法;同时,保健食品的种类和数量成几何级数增长,保健食品检验新技术和新方法层出不穷。而代谢实验技术一直没有进行修改,其中很多方面值得商榷。

在我国,目前还没有一本保健食品代谢动力学专著。本书作者从事保健食品代谢动力学工作多年,具有深厚的理论基础和实践经验,深感国内亟需此类专著。根据自己工作经验和国内外的最新研究成果,从保健食品代谢动力学总则、体内转运、生物样品采集、制备、分析、代谢动力学模型、新技术等方面详细阐述保健食品代谢动力学知识理论和应用,汇编成册,以飨读者,以期促进我国保健食品研发。

张彦 张双庆 刘烈刚

2016 年 9 月

目 录

第一章 总 论	1
第二章 体内转运	15
第一节 跨膜转运	15
第二节 吸收	21
第三节 分布	32
第四节 代谢	38
第五节 排泄	51
第三章 生物样品采集	57
第一节 小鼠与大鼠生物样品采集	57
第二节 家兔生物样品采集	74
第三节 犬生物样本的采集	80
第四节 灵长类动物生物样本的采集	89
第四章 生物样品制备与分析	95
第一节 生物样本处理通则	95
第二节 生物样品制备	100
第三节 生物样品提取分离	106
第四节 生物样品在线处理	111
第五节 生物分析方法	119

第六节	小分子生物分析方法验证	133
第七节	大分子生物分析方法验证	141
第五章	代谢动力学模型	150
第一节	线性代谢动力学模型	150
第二节	非线性代谢动力学模型	171
第三节	生理代谢动力学模型	179
第四节	代谢动力学实例	187
第六章	组学技术	192
第一节	代谢组学	192
第二节	金属组学	202
第三节	食物基因组学	211

第一章 总 论

《保健食品检验与评价技术规范》(以下简称《技术规范》)自2003年颁布以来,这十余年间很多仪器、试剂等都有了很大的变化,一些方法已经不再适用或者已有更简便方法;同时,保健食品的种类和数量成几何级数增长,保健食品检验新技术和新方法层出不穷。这期间,《技术规范》中的代谢试验技术一直没有进行修改,目前来看其中很多方面值得商榷和进一步修订。

一、定义

《技术规范》中所指的代谢实验定义为受试物在体内的吸收(Absorption)、分布(Distribution)、代谢(Metabolism, 又称生物转化biotransformation)和消除(Elimination), 简称ADME。ADME恰恰是“Pharmacokinetics”(PK)所指代的内容,国内翻译成“药物代谢动力学”或“药代动力学”,其实PK是指包括药物、激素、营养素和毒素等在内的受试物在肌体内的处置。实际上,代谢是指外源性化合物在体内经酶促或非酶促反应,结构发生变化的过程。因此,《技术规范》中的代谢实验称谓过窄,而所包含的内容又不仅是代谢研究,为了定义更准确,更符合研究内容,同时又与药物研究加以区别,我们称其为“代谢动力学”,英文依旧采用“Pharmacokinetics”。

尽管 2015 年实施的国家标准“GB15193.16 - 2014 食品安全国家标准:毒物动力学实验”将代谢实验改称为毒物动力学实验,但依然有不足之处。毒物动力学通常称为毒代动力学(Toxicokinetics),是药代动力学和毒理学相结合的新兴交叉学科,运用药代动力学的原理和方法结合毒理研究定量地研究毒性剂量下化学物在动物体内的吸收、分布、代谢和排泄过程,是药代动力学在全身暴露评价中的延伸。毒代动力学研究重点是解释毒性实验结果和预测人体安全性,而不是简单描述受试物的基本动力学参数特征。但代谢动力学侧重通过体外和动物体内的研究方法,揭示化学物在体内的动态变化规律,获得化学物的基本动力学参数,阐明化学物的 ADME 的过程和特征。因此,代谢动力学与毒物动力学在研究目的、研究内容、研究对象、剂量等方面有着本质不同,两者不可混为一谈。

保健食品代谢动力学是定量研究受试物在动物体内的吸收、分布、代谢和排泄等随时间变化的动态规律和特征,获得受试物的代谢动力学参数,深入阐明受试物作用机制。受试物或活性代谢产物浓度数据及其代谢动力学参数是产生、决定或阐明毒性大小的基础,可提供受试物对靶器官效应的依据。

二、受试物及其配制

受试物应采用工艺相对稳定、纯度和杂质含量能反映人体实验拟用样品和/或上市样品质量和安全性的样品。受试物应提供名称、CAS 号、化学结构、来源、批号、纯度、稳定性、保存条件、有效期及配制方法等,并提供质量检验报告。实验中所用溶媒和/或辅料应标明

名称、标准、批号、有效期、规格和生产单位等,并符合实验要求。受试物的纯度不应低于 98%。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%,并不含有 >1% 的单一杂质,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。

应选择适合于受试物的溶剂、乳化剂或助悬剂。溶剂、乳化剂或助悬剂本身应不产生毒性作用,与受试物之间不发生化学反应,且保持其稳定性,一般可选用水、食用植物油、淀粉、明胶、羧甲基纤维素等。通常受试物在实验开始前新鲜配制。

三、实验动物

实验动物的选择应符合 GB 14922.1 和 GB 14922.2 的有关规定。采用体外肝组织匀浆、原代肝细胞、肝 S9、肝微粒体等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,通过比较来选取与人代谢性质相近的实验动物。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。一般采用成年、健康的动物。常用动物有小鼠、大鼠、兔、豚鼠、犬、小型猪和猴等,灌胃途径通常不选用兔等食草类动物或与人胃肠道情况差异较大的动物。选用啮齿类动物时,实验开始时动物体重的差异不应超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。

对实验动物的性别不做特殊规定,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,每一实验组不应少于 5 只动物,在非啮齿类动物的实验中,动物数量可酌情减少。

四、剂量选择

动物体内代谢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受试物暴露量进行剂量换算。主要考察在所设剂量范围内,受试物的体内动力学过程是属于线性还是非线性,以利于解释毒理学研究中的发现。可单次或多次给予受试物。

五、受试物给予途径

以灌胃为主,灌胃前动物禁食 12 h 以上,自由饮水,以排除食物对受试物吸收的影响。另外在实验中应注意根据具体情况统一给予受试物后禁食时间,以避免由此带来的数据波动及食物的影响。进行代谢动力学分析时,最好同时采用灌胃和静脉注射。各种种属动物不同给予途径的适宜给予体积见表 1-1。

表 1-1 各种种属动物的不同给予途径的适宜给予体积

种属	途径和给予体积 (mL/Kg)				
	灌胃	静脉注射	皮下注射	腹腔注射	肌肉注射
小鼠	10	5	10	20	0.05
大鼠	10	5	5	10	0.1
兔	10	2	1	5	0.25
犬	5	2.5	1	1	0.25
小型猪	10	2.5	1	1	0.25
猕猴	5	2	2	< 10	0.25
狨猴	10	2.5	2	< 20	0.25

六、血样采集

采样点的确定对代谢动力学研究结果有重大影响,若采样点过少或选择不当,得到的血中受试物浓度-时间曲线可能与受试物在体内的真实情况产生较大差异。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,以反映个体差异对实验结果的影响。给受试物前需要采血作为空白样品。为获得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、平衡相(峰浓度附近)和消除相。对于吸收快的灌胃受试物,应尽量避免第一个点是峰浓度;在峰浓度附近需要3个时间点,尽可能保证峰浓度的真实性。整个采样时间应持续到3~5个半衰期,或持续到血中受试物峰浓度为峰浓度的 $1/10 \sim 1/20$ 。同时应注意采血途径和整个实验周期的采血总量不影响动物的正常生理功能和血流动力学,一般不超过动物总血量的15%~20%,建议采血体积和恢复期见表1-2和表1-3。在采血方式上也要兼顾动物福利,表1-4概述各种种属动物采血部位的优缺点及重复采血推荐的部分:①小鼠,大隐静脉及尾静脉;②大鼠,大隐静脉、尾静脉和舌下静脉;③家兔,耳边缘静脉、耳中动脉及颈静脉;④犬,头皮静脉、颈静脉及大隐静脉;⑤猕猴,头皮静脉、大隐静脉及股动脉;⑥猕猴,股动脉、大隐静脉;⑦小型猪,颅腔静脉。

表 1-2 动物采集血液体积限度及恢复期

单次采血		多次采血	
采血体积(%)	恢复期(周)	采血体积(%)	恢复期(周)
7.5	1	7.5	1
10	2	10 – 15	2
15	4	20	3

表 1-3 各种种属动物的总血液体积和建议可采集最多血液体积

种属	平均体重 (克)	总血液体积 (mL)	建议可采集最多血液体积(mL)			
			7.5%	10%	15%	20%
小鼠	25	1.8	0.1	0.2	0.3	0.4
大鼠	250	16	1.2	1.6	2.4	3.2
兔	4000	224	17	22	34	45
犬	10000	850	64	85	127	170
小型猪	15000	975	73	98	146	195
恒河猴	5000	280	21	28	42	56
食蟹猴	5000	325	24	32	49	65
狨猴	350	25	2.0	2.5	3.5	5

表 1-4 动物采血各种方法的优缺点

采血部位	是否需麻醉	组织损害	可否重复采血	种 属
颈静脉	否	小	可	大鼠、犬、家兔
头静脉	否	小	可	猴犬
隐静脉	否	小	可	小鼠、大鼠、猴、犬
跗外侧静脉	否	小	可	小鼠、大鼠、猴、犬
耳缘静脉	否或局部	小	可	家兔、小型猪
股静脉	否	小	可	猴
舌下静脉	是	小	可	大鼠
尾静脉	否	小	可	小鼠、大鼠、猴
耳中央动脉	否或局部	小	可	家兔
颅腔静脉	否	小	可	小型猪
尾尖截断	是	中	有限	小鼠、大鼠
球后静脉丛	是	大	可	小鼠、大鼠
心脏	是	中	否	小鼠、大鼠、兔

七、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, 从而提供绝对生物利用度。如有必要, 可进行体外细胞实验、在体或离体肠道吸收实验等以阐述受试物的吸收特性。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速率常数。

八、分布

一般选用大鼠或小鼠进行组织分布实验, 但必要时也可在非啮齿类动物(如犬)中进行。选择一个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。特别注意受试物浓度高、蓄积时间长的组织和器官, 以及在毒性靶器官的分布(如对造血系统有影响的受试物, 应考察在骨髓的分布)。必要时建立和说明血中受试物浓度与靶组织受试物浓度的关系。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。若某组织的受试物或代谢产物浓度较高, 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, 一般应有 6 个动物(雌雄各半)的数据。进行组织分布实验, 应注意取样的代表性和

一致性。

同位素标记物的组织分布实验,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实验的详细过程,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。在实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。

九、代谢

体外受试物代谢可采用肝微粒体、肝 S9、原代肝细胞及 P450 重组酶等,鉴定受试物是否是代谢酶的底物或抑制剂。P450 同工酶之外的代谢酶,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。体内受试物代谢可考虑与血中受试物浓度-时间曲线和排泄实验同时进行,应用这些实验采集的样品进行代谢产物的鉴定及浓度测定。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,以确定受试物的代谢类型、主要代谢途径及其可能涉及的代谢酶表型。

十、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(小鼠、大鼠等)每个性别 3 只动物,非啮齿类(如犬)每个性别 2 ~3 只动

物。根据受试物特性,也可选择单一性别动物。

(1)尿和粪排泄:将动物放入代谢笼内,选定一个适宜剂量给予后,按一定的时间间隔分段收集尿或粪的全部样品。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受试物和主要代谢产物浓度测定或代谢产物谱分析,计算受试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只动物的实验数据。

(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予受试物,并以合适的时间间隔分段收集胆汁,进行受试物和主要代谢产物测定。

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7天,可停止排泄物的收集。为防止原形受试物及代谢产物降解,尿液和胆汁收集过程中容器置放于干冰内。记录受试物及主要代谢产物自粪、尿、胆汁排出的速度及总排出量,提供物质平衡的数据。一般应采用放射性同位素标记技术研究物质平衡。

十一、生物分析方法验证

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、准确、可靠的生物样品定量分析方法,并对方法进行验证。

生物样品分析方法有:①色谱法: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,因此生物样品分析一般首选色谱法。②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。③微生物学方法。④放射性同位素标记法。

有活性代谢产物的受试物,以及主要通过代谢从体内消除的受试物,建立生物样品分析方法时应考虑测定受试物原形和主要代谢产物,考察物质平衡,阐明受试物在体内的转化。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。如某些受试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。

方法学验证是生物样品分析的基础,分为全面验证、部分验证和交叉验证。对于首次建立的生物样品分析方法、新化学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实验室间的转移、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)等。同一实验室采用不同分析方法或不同实验室采用相同分析方法获得的数据,需要比较数据且对分析方法要进行交叉验证。

全面验证一般应进行以下几方面的考察。

(一) 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(注明浓度)及给予受试物后的生物样品色谱图(注明样品来源基质、给予受试物后的时间)。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。待测物质保留时间处杂峰峰面积应小于定量下限(LLOQ)峰面积的 20%,内标保留时间处杂峰峰面积应小于内标峰面积 5%。

(二)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实验要求的精密度和准确度。

用包括 LLOQ 在内的至少 6 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推算未知样品的浓度。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。应汇总至少 3 条标准曲线的数据。标准曲线各浓度点的实测值与理论值之间的偏差在可接受的范围之内时,可判定校正曲线合格。可接受范围为 LLOQ 的偏差在 $\pm 20\%$ 以内,其余浓度点的偏差在 $\pm 15\%$ 以内;至少 75% 标样符合上述标准,定量范围确定后 LLOQ 必须符合。

(三)精密度与准确度

要求选择 4 个浓度的质控样品同时进行方法的精密度和准确度考察,即 LLOQ、低、中、高浓度。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;高浓度至少 75% 标准曲线上限;中间