

附件 6

急性经口毒性试验 急性毒性分类方法

Acute Oral Toxicity–Acute Toxic Class Method

(征求意见稿)

1 范围

本规范规定了动物急性经口毒性试验急性毒性分类方法的基本原则、要求和方法。

本规范适用于化妆品原料安全性毒理学检测。

2 试验目的

急性经口毒性试验是评估化妆品原料毒性特性的第一步,通过短时间经口染毒可提供对健康危害的信息,作为化妆品原料毒性分级和标签标识以及确定亚慢性毒性试验和其他毒理学试验剂量的依据。急性毒性分类方法用较少的动物逐步试验,从而确定受试物的急性经口毒性及其分类。

3 定义

3.1 急性经口毒性 acute oral toxicity

一次或在 24 h 内多次经口给予实验动物受试物后,动物在短期内出现的健康损害效应。

3.2 经口 LD₅₀ 半数致死量 medium lethal dose

经口一次给予受试物后,引起实验动物总体中半数死亡的毒物的统计学剂量。以单位体重接受受试物的重量(mg/kg 或 g/kg)来表示。

3.3 限值剂量 limit dose

受试动物进行急性经口毒性试验的上限剂量 (2000 mg/kg 或 5000 mg/kg)。

4 试验的基本原则

本方法的原则是在使用最少动物数逐步进行试验,以获得受试物的急性毒性分类所需的充分结果。受试物按规定的剂量经口给予一组实验动物,每一步使用 3 只单一性别的动物(通常为雌性)。一个步骤中动物是否存在与化合物相关的死亡率将决定下一个步骤,即:

- 无需进一步测试;
- 同一剂量水平再做 3 只动物;
- 在高一级或低一级剂量水平剂量另做 3 只动物。

5 试验方法

5.1 受试物

受试物应溶解或悬浮于适宜的介质中，建议首选水，其次是植物油(如玉米油)，或考虑使用其他介质（如羧甲基纤维素、明胶、淀粉等）。对非水溶性介质，应了解其毒理特性，否则应在试验前先确定其毒性。每次经口染毒液体的最大容量取决于实验动物的大小，对啮齿类动物所给液体容量一般为 1 mL/100g，水溶液可至 2 mL/100g。通过调整受试物溶液浓度使各剂量组经口染毒的容量一致。

5.2 实验动物和饲养环境

首选健康成年大鼠，也可选用其他啮齿动物。通常选用单一性别大鼠。在缺乏构效关系或无提示雄性更为敏感性别动物的前提下，一般选用雌性动物进行试验。当用雄性大鼠做试验时，要提供充分的理由。

应选用年轻健康动物和非经产、未受孕的雌性动物。在试验开始时，动物应在 8 周~12 周龄，体重变异应不超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。如果进行连续的试验，要注意确保在整个研究中动物的体重和周龄符合要求。试验前动物要在实验动物房环境中至少适应 3~5d 时间。

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。

5.3 剂量水平

每一步使用 3 只动物。初始剂量水平从 5、50、300 和 2000 mg/kg 4 个固定剂量中选择。初始剂量最好能引起受试动物一定的死亡。每种初始剂量应遵循的试验程序详见附件的流程图。

当现有的毒理学资料提示，最高初始剂量不引起动物死亡时，应做限量试验；如无受试物的相关资料，出于动物福利原则，应将初始剂量定为 300 mg/kg。

各剂量组间给样的时间间隔由毒作用快慢、持续时间和严重程度决定。当确信前一剂量组的动物能够存活时才可进行下一剂量组的试验。

在特殊情况或确实需要时，可考虑进行 5000 mg/kg 剂量水平的试验。出于动物福利的考虑，受试物只有在试验结果极有可能与保护人类、动物或环境直接相关时才考虑进行这一剂量的试验。

5.4 试验步骤

5.4.1 染毒

试验前，实验动物禁食不禁水（大鼠禁食不禁水过夜，小鼠禁食不禁水 3 h-4 h）。禁食期过后，称量动物体重，用管饲法一次进行染毒，若估计受试物毒性很低，一次给予容量太大，也可在 24 h 内分 2-3 次染毒，但合并作为一次剂量计算。染毒后继续大鼠禁食 3 h-4 h，小鼠禁食 1 h-2 h。若采用分批多次染毒，根据染毒间隔长短，必要时可给动物一定量的食

物和水。

5.4.2 限量试验

当现有的毒理学资料提示受试物很可能是无毒的情况下，可进行限量试验。相关毒性资料可来源于类似结构的化合物、混合物或产品。2000 mg/kg 剂量的限量试验使用 6 只动物(每步 3 只)开展(见附件 1)。

在某些情况下，可用 3 只动物进行 5000 mg/kg 剂量的限量试验。如第 1 只动物死亡，需进行 2000 mg/kg 剂量的试验程序；若第 1 只动物存活，则再对 2 只动物染毒。如 3 只动物死亡 1 只或不死亡，则受试物 LD₅₀ 大于 5000 mg/kg，毒性分类为实际无毒；否则需要进行 2000 mg/kg 剂量的试验程序。

5.4.3 观察

5.4.3.1 染毒后，对每只动物都应有单独全面的记录，在染毒后的 30 min 内每只动物至少分别观察一次，第 1 d 内要定时观察(在前 4 h 内要特别注意)实验动物的中毒表现和死亡情况，其后至少每天进行一次仔细的检查。详细记录被毛和皮肤、眼睛和粘膜，呼吸、循环、自主神经和中枢神经系统、肢体活动和行为等改变。特别注意是否出现震颤、抽搐、流涎、腹泻、嗜睡和昏迷等症状。应记录毒作用体征出现和消失的时间和死亡时间。发现处于濒死状态动物以及动物表现出剧烈的疼痛或持续严重痛苦的病症时给予人道处死。当动物因人道原因处死或被发现死亡时，应尽可能准确地记录死亡时间。

5.4.3.2 观察期限一般不超过 14 d，但观察时间并非一成不变，要视动物中毒反应的严重程度、症状出现快慢和恢复期长短而定。若有延迟死亡迹象，可延长观察时间。

观察期内存活动物每周称重，观察期结束存活动物应称重，处死后进行尸检。

5.4.4 对全部动物进行大体解剖学检查，并记录全部大体病理改变。对存活 24 h 和 24 h 以上动物并存在大体病理改变的器官可进行病理组织学检查。

5.5 试验结果评价

评价试验结果时，应将毒性分类级别与观察到的毒性效应和尸检所见相结合考虑，急性毒性分类结果是受试物毒性分级和标签标识以及判定受试物经消化道摄入后引起动物死亡可能性大小的依据。

在引用 LD₅₀ 值时一定要注明所用实验动物的种属、性别、染毒途径、观察期限等。评价应包括动物接触受试物与动物异常表现(包括行为和临床改变、大体损伤、体重变化、致死效应及其他毒性作用)的发生率和严重程度之间的关系。

6 试验结果的解释

通过急性经口毒性试验和 LD₅₀ 的测定可评价受试物的毒性。其结果外推到人类的有效性很有限。

附件 各初始剂量应遵循的操作程序

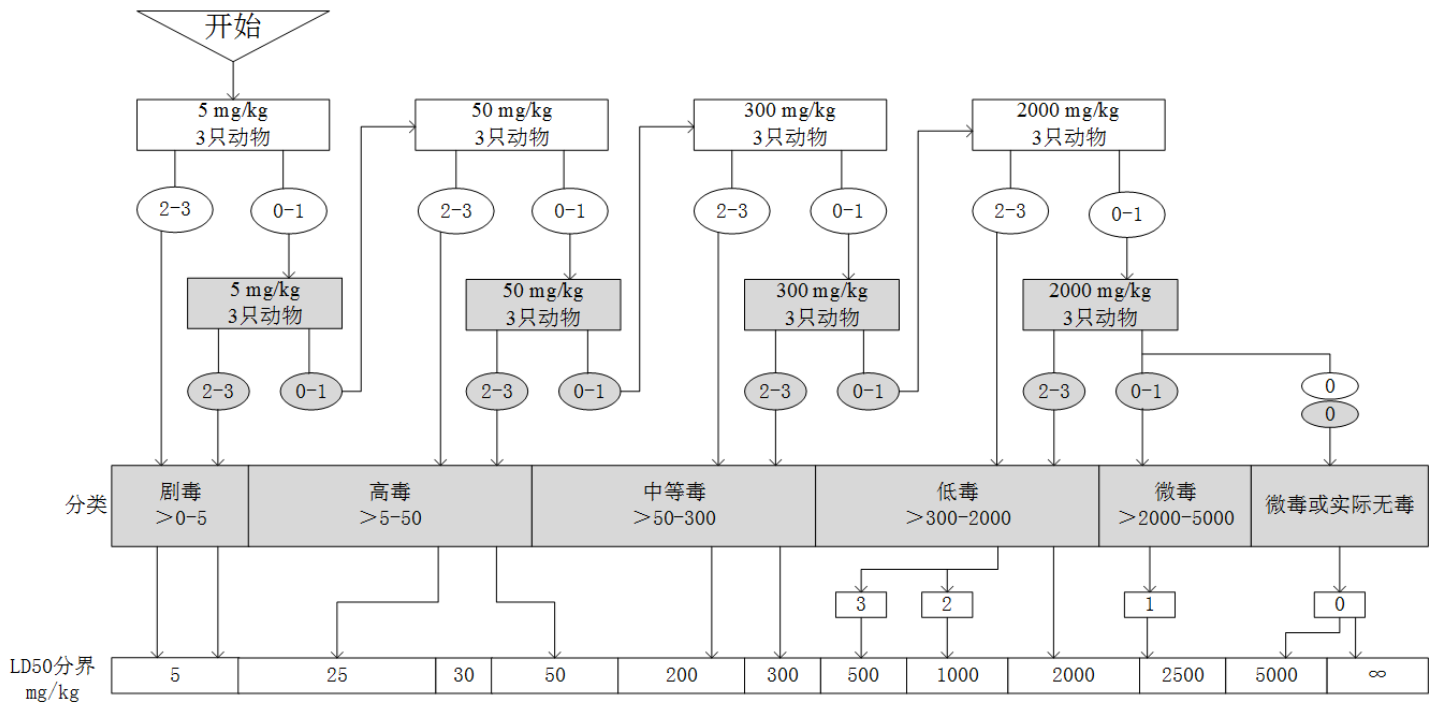
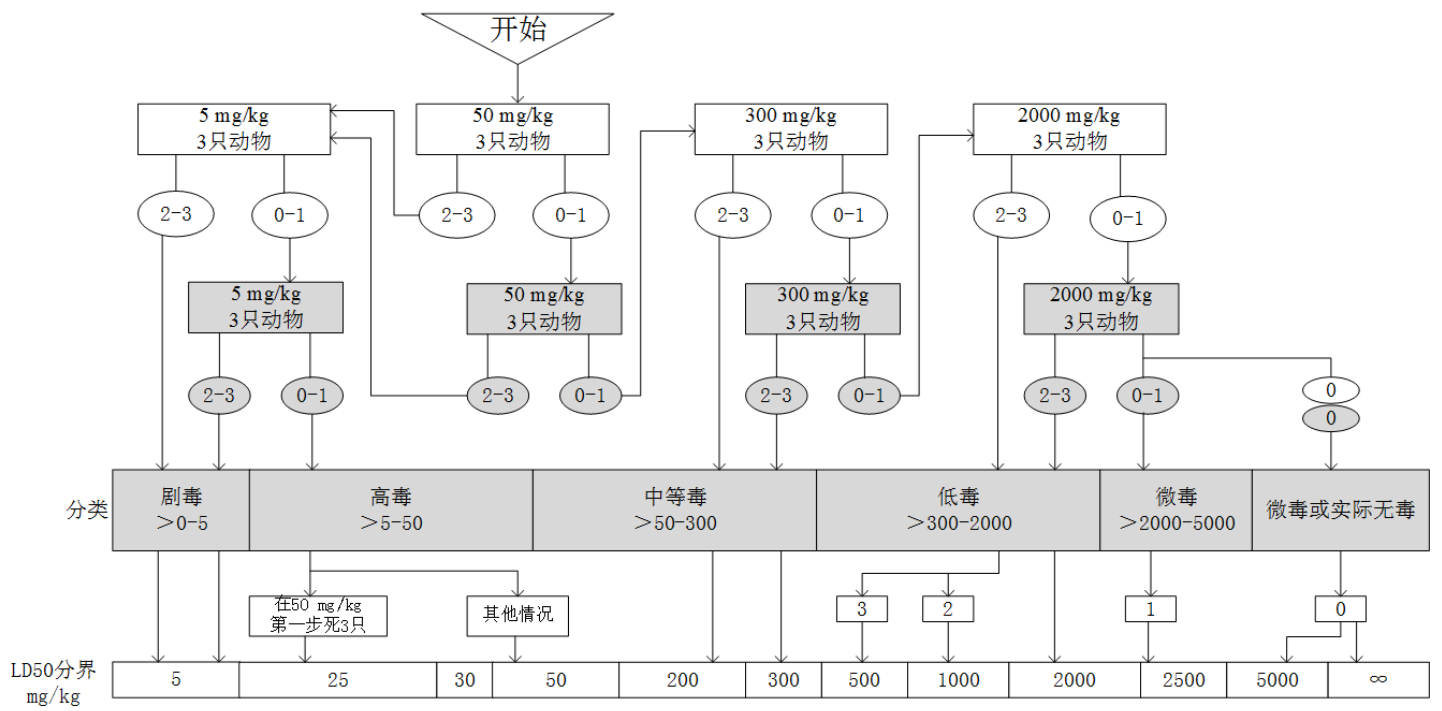
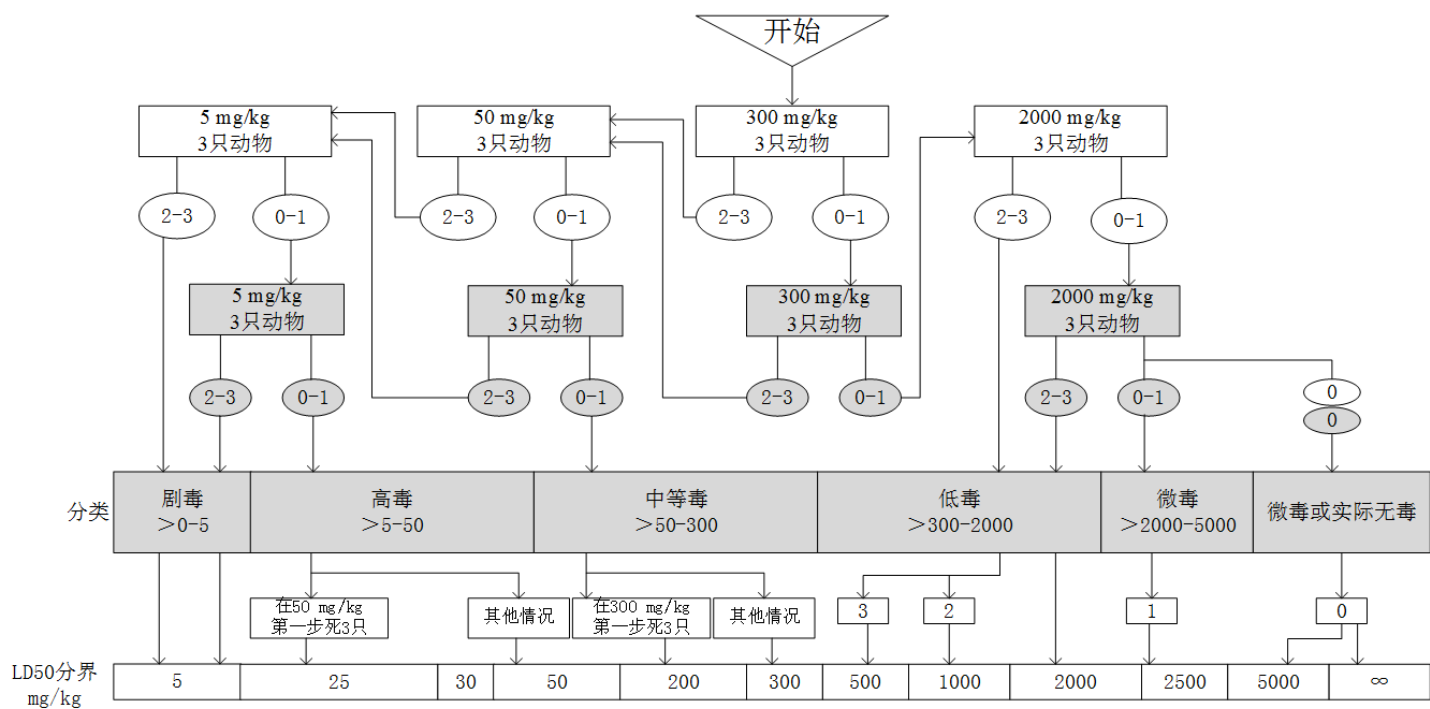


图 1 初始剂量 5 mg/kg 的试验程序



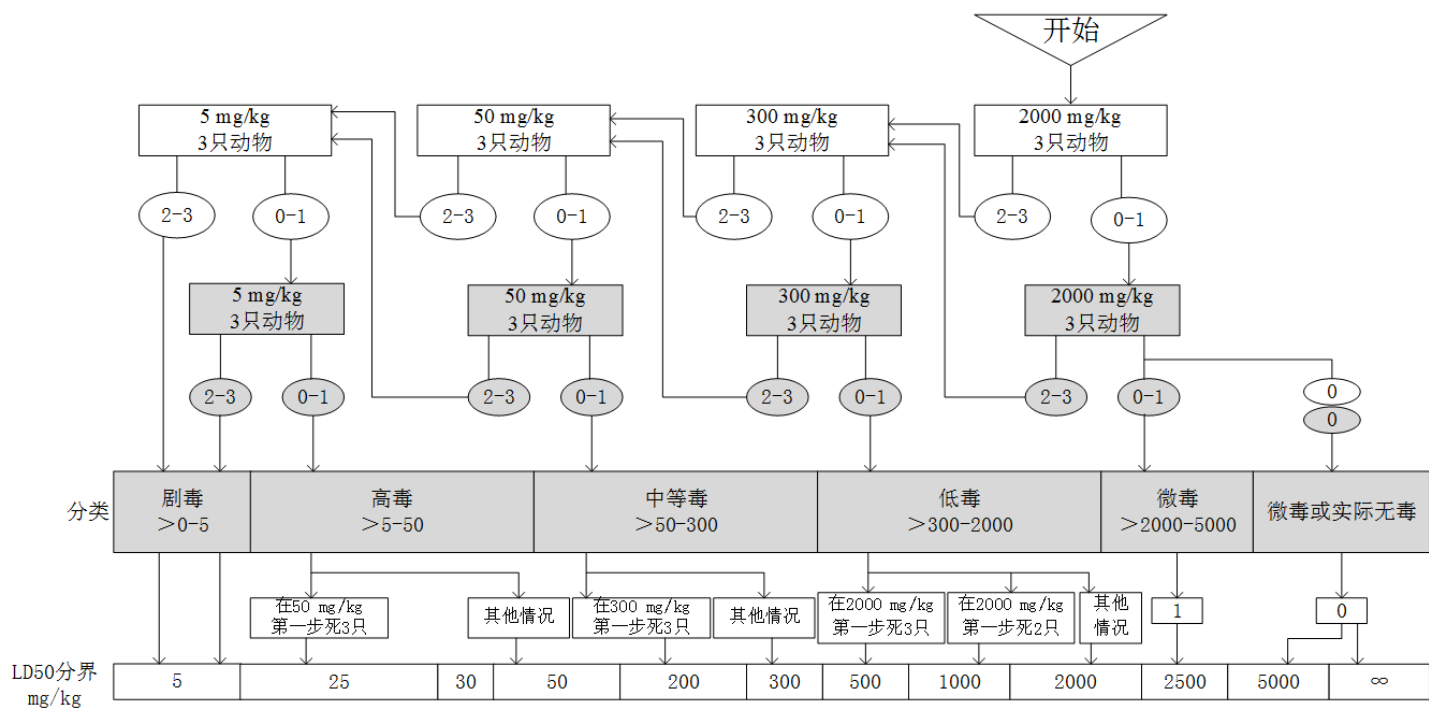
注：每步使用3只单性别动物
0, 1, 2, 3表示单步骤濒死或死亡动物数

图 2 初始剂量 50 mg/kg 的试验程序



注：每步使用3只单性别动物
0, 1, 2, 3表示单一步骤濒死或死亡动物数

图3 初始剂量 300 mg/kg 的试验程序



注：每步使用3只单性别动物
0, 1, 2, 3表示单步骤濒死或死亡动物数

图 4 初始剂量 2000 mg/kg 的试验程序

急性经口毒性试验 急性毒性分类方法

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，中国食品药品检定研究院组织开展了急性经口毒性试验急性毒性分类方法的研究制定工作。现就工作有关情况说明如下：

一、起草原则

本标准在保证方法科学性和准确性的同时，考虑到目前国内各化妆品检验检测实验室实际的试验条件和化妆品原料的特点，提高了可操作性和便捷性。同时，也兼顾与国际标准接轨，确保方法先进性。

二、起草过程

以《OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS—Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method》（OECD 423，17th December 2001）为主要参考对象，结合我国化妆品监管政策要求、检测实验室的技术水平以及化妆品原料的特点，起草了化妆品安全技术规范《急性经口毒性试验急性毒性分类方法》，内容包括方法适用范围、试验目的、术语定义、试验原则、试验方法和对试验结果的解释。

根据该标准草案，本实验室选择已知无毒物质丙三醇和已知有毒物质 1,4-丁二醇，以雌雄大、小鼠为研究对象，开展了急性经口毒性试验急性毒性分类方法验证研究。该研究不仅验证了该方法在化妆品原料及产品实际检测过程中的适用性和可操作性，也对物种选择、性别差异、剂量设计等一些主要试验因素进行了探讨。

2022 年 11 月召开了化妆品急性经口毒性试验标准研制项目研讨会，对急性经口毒性试验三种方法（急性毒性分类法、上下增减剂量法和固定剂量法）的标准草案进行体例、专业用语和表述上的规范统一。

三、与我国已有相关标准的关系

我国现已发布 GB/T 21757—2008《化学品急性经口试验急性毒性分类法》，本方法在参考上述我国已有相关标准的基础上，主要针对于化妆品原料的特点，以 OECD 发布的适用于化学品的急性经口试验急性毒性分类法为依据进行编写，具有化妆品原料检测适用性及我国本土化可操作性的特点。

四、与《规范》中原方法的对比情况

本方法起草时沿用了《化妆品安全技术规范》（2015 年版）中急性经口毒性试验的体例、格式，在共性名词术语（如急性经口毒性、LD50 等）、受试物、实验动物与环境、观察指

标、毒性分级等方面基本保持一致。

五、与国际同类标准的关系

本方法以 OECD 发布的“Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method”（TG423）为指导原则，根据国内实验条件及操作的具体情况，以现行《化妆品安全技术规范》为编撰模板，略有调整，具体变动包括：

1. 将《全球化学品统一分类和标签制度》（GHS）更改为现行《化妆品安全技术规范》的急性毒性分级制度；

2. 根据我国化妆品原料检测的实际情况，将附录 B 中“5000 mg/kg 限量试验”内容调整至正文中；

3. 为便于试验人员对试验结果的理解，保留现行《化妆品安全技术规范》中“试验结果评价”和“试验结果的解释”部分内容；

4. 根据中文表达习惯调整语序，精炼文字。

六、其他需说明的问题

（一）关于体例

本试验方法的体例主要参照现行《化妆品安全技术规范》，便于化妆品检验领域相关检验人员的阅读和实际操作。

（二）关于方法的适用性

急性经口毒性试验急性毒性分类方法自 1986 年出现后，一直以动物使用量少、方法操作简便的优点被视作传统急性经口毒性试验的替代方法之一。1996 年，该方法被 OECD 收录，并在 2001 年正式替代了传统急性经口毒性试验方法，在欧洲、美国及日本等地都被广泛使用。该方法无法得出受试物具体的 LD₅₀ 数值及可信限范围，但经过生物统计学评估证明，其试验结果可以直接将受试物进行毒性分级，比其他方法更为简便、快捷。因此，该方法适用于不需要具体 LD₅₀ 数值、只需要毒性分级结果的受试物。