



中华人民共和国国家标准

GB/T 27823—2011

化学品 急性经皮毒性 固定剂量试验方法

Chemicals—Test method of acute dermal toxicity—Fixed dose procedure

2011-12-30 发布

2012-08-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准与经济合作与发展组织(OECD)化学品测试方法 No. 434(2004)《急性经皮毒性 固定剂量法》(英文版)技术性内容一致。

本标准做了下列结构和编辑性修改：

- 增加了范围一章(见第 1 章)；
- 计量单位改成我国法定计量单位；
- 将 OECD 434 附录 1“定义”作为本标准的第 2 章；
- 将 OECD 434“试验前应考虑的问题”放入本标准的引言部分。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所、天津出入境检验检疫局、中国化工经济技术发展中心、江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：侯粉霞、王华、张园、徐斌、杨挺、赵琢、刘伟、汤礼军。

引 言

根据科学发展和动物福利方面的要求,需要定期地对 OECD 化学品试验指南进行回顾考查。急性经皮毒性指南 TG 402^[1] 是于 1987 年开始采用的。在修订后的急性经口毒性试验固定剂量法(FDP)(OECD 420^[2])开始采用后、以及在 2001 年 12 月开始废止 OECD 指南 401 后,提出急性经皮固定剂量法(FDP)是很适当的。该方法主要是采用几个固定染毒剂量、使用单性别动物(一般使用雌性动物)来检测急性经皮毒性。

传统方法在评价急性毒性时常以动物死亡作为唯一的毒性终点。1984 年,英国毒理学会提出了一项新的急性毒性试验方法,即,选择固定剂量进行受试物染毒^[3]。该方法避免了以动物死亡作为观察终点,而是以在几个固定剂量中的某个剂量出现明显的中毒症状为观察终点,这一剂量也是受试物毒性分级的依据。本试验也使用上述方法。为了达到 OECD 导则中对观察终点的人道要求^[4],建议对试验方法进行优化以便使动物承受的痛苦最小化、尽可能地减少使用动物。FDP 试验的统计学合理性已经经数学模型进行了评价^[5]。

本方法可提供受试物的危害性质的信息。对于可引起急性毒性的受试物,可根据本试验的结果、按照联合国的全球化学品统一分类和标签(GHS)对受试物进行毒性分级和分类^[6]。

在试验前应考虑所获得的受试物的所有信息,如,受试物的名称、化学结构、理化特性、其他任何体内或体外毒性试验结果、定量-结构活性关系(Quantitative structure-activity relationship, QSAR)资料、结构类似化学物的毒理学资料、受试物的预期用途以及人类接触受试物的可能程度。借助上述信息,选择一个合适的起始剂量进行试验。

化学品 急性经皮毒性 固定剂量试验方法

1 范围

本标准规定了化学品急性经皮毒性固定剂量试验方法的术语、定义和缩略语、试验原则、试验方法、试验数据和报告。

本标准适用于固定剂量法测试化学品的经皮毒性。

2 术语、定义和缩略语

下列术语、定义和缩略语适用于本文件。

2.1 术语和定义

2.1.1

急性经皮毒性 acute dermal toxicity

受试物在短时间内(24 h 以内)一次性经皮染毒所产生的有害作用。

2.1.2

明显毒性 evident toxicity

动物染毒后出现的明显毒性表现,如果采用更高的固定浓度染毒,大多数动物预期可出现明显痛苦、濒死状态甚至死亡。

2.1.3

剂量 dose

给予受试物的量。表示为试验动物单位体重所给予的受试物量(如,mg/kg)。

2.1.4

濒死 impending death

动物在死亡或垂死状态出现前的一种表现。啮齿动物临近死亡的表现包括抽搐、侧卧、斜卧和震颤。

2.1.5

半数致死量 LD₅₀

物质一次性经口染毒引起 50% 动物出现死亡的剂量。LD₅₀ 值用试验动物单位体重的受试物量(mg/kg)表示。统计学衍生词。

2.1.6

极限剂量 limit dose

试验的上限剂量(2 000 mg/kg 或 5 000 mg/kg)。

2.1.7

濒死状态 moribund status

在即使给予治疗的情况下,动物仍然即将死亡或无法存活的状态。

2.1.8

可预见的死亡 predictable death

出现的临床表现提示动物一定将在试验结束之前的某个时间死亡,例如,失去了饮水和进食的

能力。

2.2 缩略语

GHS:全球化学品统一分类和标签制度(Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)

注:由 OECD 负责人类健康和环境部分,联合国危险货物运输专家委员会负责理化性质部分和国际劳工组织(ILO)负责危险信息交流部分,联合发起,并由跨组织化学品无害管理计划(IOMC)统一协调。

3 试验原则

原则上只可应用中等毒性剂量,避免预期可致死的染毒剂量。同样,预期由于腐蚀或剧烈刺激作用而导致剧烈痛苦的剂量也应避免。濒死的动物、显示明显疼痛的、持续痛苦的动物应安乐处死,进行结果解释时,这些动物归为死亡动物。濒死和极度痛苦动物的处死标准,以及识别濒死动物的说明,可参见另一导则^[4]。单一性别的各组动物以附录 A 和附录 B 中列出的适当的固定剂量以分段方式染毒。根据预试验选择起始剂量,即预期产生明显毒性表现而不引起严重毒性反应或死亡的剂量。与疼痛、痛苦和临近死亡有关的临床表现在 OECD 关于人道终点的导则^[4]中有详细描述。根据毒性表现或死亡出现与否进一步增加或降低固定剂量。出现下列情况时终止试验:引起明显毒性或不超过一只动物死亡,或在最高剂量未观察到毒性效应,或在最低剂量出现动物死亡。

4 试验方法

4.1 动物种属选择

4.1.1 可采用成年大鼠、兔子或豚鼠。常规推荐采用雌性动物。如用雄性动物,应提供做出此种选择的充足理由。对于最合适的性别选择,通过调查传统急性经口^[7]和急性吸入^[8]毒性试验,发现通常情况下几乎没有性别敏感性差异,而那些有差异的情况表明雌性的敏感性稍高。经皮途径染毒尚无这些资料,但可推断性别敏感性的差异与经口和吸入途径相类似。但是,如果结构类似物的毒理学和毒代动力学资料表明雄性可能更敏感,则用雄性动物,但此时应提供做出此种选择的充足理由。

4.1.2 应选择实验室内常用的动物品系,健康,8 周龄~12 周龄,雌性应是未生产的和未怀孕的。体重差异应在实验动物的平均体重的±20%以内。

4.2 饲养条件

动物房的温度应保持在 22℃±3℃。相对湿度最少为 30%,最好不超过 70%(清洁期间除外),相对湿度应在 50%~60%。采用人工昼夜,12 h 明、暗交替。采用常规实验室饲料喂养,自由饮水。动物按剂量分组笼养,但每笼动物的数量应不影响对每只动物的有效观察。

4.3 动物准备

4.3.1 在开始染毒前至少适应实验室条件 5 d。动物随机选择,编号标记。

4.3.2 试验前约 24 h,剪或剃去动物背部的毛,去毛面积至少应为体表面积的 10%,确定除毛和覆盖面积时应考虑动物的体重。

4.4 经皮染毒

4.4.1 将受试物均匀涂抹于不大于体表面积 10%的范围。对于高毒性受试物,涂皮面积可以小一些,但涂敷的薄层应尽可能薄、尽可能均匀地涂满整个染毒区域。在为期 24 h 的染毒期间内,用多孔纱布

和无刺激性胶布固定,使受试物与皮肤保持接触;还应以适当的方式进一步覆盖染毒部位以防止纱布脱落并保证受试物不被动物舔食。固体受试物(有时需要研磨)染毒时用水使其充分湿润或使用适当的溶剂/赋形剂,以保证与皮肤接触良好。使用溶剂/赋形剂时,应考虑溶剂/赋形剂对皮肤渗透受试物能力的影响。液体受试物一般不需要稀释。

4.4.2 为了防止受试物被动物舔食,可使用制动器来限制动物活动,但不推荐完全制动。在染毒结束后,用水或其他合适溶剂清除残留的受试物。

4.5 程序

4.5.1 预试验

4.5.1.1 预试验的目的在于为正式试验选择合适的起始剂量。受试物按照附录 A 中的流程图以顺序方式每次对一只动物染毒,一旦能够确定正式试验的起始剂量(或在最低固定剂量下出现死亡),预试验即可停止。

4.5.1.2 预试验的起始剂量是从 50 mg/kg, 200 mg/kg, 1 000 mg/kg 和 2 000 mg/kg 这些固定剂量中选择预期产生明显毒性的剂量。如果可能的话,可根据相同化学物或结构类似物的体内、体外试验资料来选择起始剂量,若没有这些信息,则以 1 000 mg/kg 作为起始剂量。

4.5.1.3 一只动物染毒结束后间隔至少 24 h 后才进行另一只动物的染毒,所有动物的观察期至少 14 d。

4.5.1.4 若受试动物在预试验中的最低固定剂量(50 mg/kg)下死亡或出现了明显的毒性表现,这时可终止试验,并将此物质定为 GHS 急性毒性第 1 类物质(以下简称“第 1 类”)(见附录 A)。如果需要进一步证实,就以 50 mg/kg 对第二只动物染毒,如果此动物也死亡,则证明为 GHS 第 1 类,并立即终止试验;若第二只动物存活,则最多对另外三只动物以 50 mg/kg 剂量染毒,前、后动物染毒之间的时间间隔应足够长,以便确定先染毒的动物是否可能存活。如果这三只动物中的第二只动物死亡,则立即结束试验,不需要再对第三只动物染毒。附录 B 中列出了 50 mg/kg 固定剂量下的毒性分类:2 只及以上动物死亡为第 1 类(结果 A),一只死亡为 GHS 第 2 类(结果 B)。

4.5.1.5 仅在少数情况下才考虑使用 5 000 mg/kg 的上限固定剂量(见附录 C)。从动物福利考虑,不鼓励进行 GHS 第 5 类范围(2 000 mg/kg~5 000 mg/kg)的动物试验,而仅在这一试验结果很可能与保护人类或动物健康以及保护环境直接相关时才予以考虑。

4.5.2 正式试验

4.5.2.1 动物数量和染毒剂量

4.5.2.1.1 附录 B 指明了从起始剂量开始接下来的试验步骤。要求执行以下三个步骤之一:终止试验并指定适当的危害级别,以更高或更低的固定剂量继续试验。但是,为避免对动物造成不必要的痛苦,正式试验不再重复在预试验中引起死亡的剂量(见附录 B)。经验表明,在起始剂量下,最可能出现的结果就是物质可被分类而无需进一步试验。若以剂量递减的方式进行试验,观察到 2 只~3 只动物死亡(属于结果 A 的范畴),这时,考虑到动物福利,应停止试验,并将受试物按下一剂量的结果 C 进行分类。

4.5.2.1.2 每一待测剂量共需要五只同性别动物,其中一只来自于所选剂量的预试验。

4.5.2.1.3 不同剂量动物的染毒间隔取决于毒性指征的开始时间、持续时间和严重程度。下一剂量动物的染毒时间应推迟到能够确认前一剂量组动物确实存活为止。相邻剂量的染毒间隔为 3 d 或 4 d 以观察迟发毒性。若考虑使用 5 000 mg/kg 的上限固定剂量,就要按照附录 C 进行试验。

4.5.2.2 限量试验

4.5.2.2.1 限量试验主要有证据证明受试物很可能无毒的情况下进行(即,仅在超过规定的剂量时才

有毒性)的情况下才进行。受试物毒性资料可来自于结构相似化合物及其混合物,或受试物产品的试验资料、受试物组成成分中具有毒性意义的成分的名称和比例。如果没有或只有少量的相关毒性资料,或预测受试物具有毒性时,应开展正式试验。

4.5.2.2.2 采用标准试验程序,预试验中取一只动物按 2 000 mg/kg(个别情况下用 5 000 mg/kg)的起始剂量进行试验,正式试验时另取 4 只动物在这一剂量水平进行试验,可作为本标准的限量试验。某些情况下,为满足一些管理机构的要求,需按照试验程序一直测试到 GHS 第 5 类分级才停止试验(见附录 C)。

4.5.2.3 观察

4.5.2.3.1 动物于染毒后 30 min 内至少观察一次,并在前 24 h 内定时观察,尤其需要注意前 4 h 的反应,24 h 后每天观察一次,共观察 14 d,除非动物在 14 d 内死亡。但是,观察期限并不是固定的,而是取决于毒性表现的性质、出现时间及其恢复期的长短。毒性表现出现和消失的时间具有重要意义,特别是毒性表现可能迟发^[4]。所有观察结果须系统记录,且对每只动物都要做单独记录。对于濒死、明显疼痛或正在忍受严重的痛苦的动物,应及时安乐处死。尽可能准确地记录安乐处死动物的时间以及发现动物已死亡时的时间。

4.5.2.3.2 观察内容应包括皮肤、被毛、眼睛、黏膜、呼吸系统、循环系统、自主和中枢神经系统以及躯体运动和行行为模式等方面的改变。特别需要注意震颤、抽搐、流涎、腹泻、呆滞、嗜睡和昏迷的发生。应注意在“人道终点指南文件”^[4]中归纳的原则和标准。对濒死和表现明显痛苦的动物应予以安乐处死。还要注意(如设立接触空气的对照组)在检查毒作用的临床表现时,不要误把染毒过程导致的早期外观和呼吸的变化当做受试物的毒性反应。

4.5.2.4 体重

给药当天称重,之后至少每周称重一次。实验结束时,对存活动物称重后安乐处死。

4.5.2.5 病理

对所有动物进行大体解剖。记录每只动物的大体解剖观察结果。对于起始剂量染毒后存活 24 h 以上的动物,要对其大体解剖发现改变的器官进行组织病理学检查,以收集有用资料。

5 试验数据和报告

5.1 数据

应提供每只动物的数据,每组所用的动物数、出现毒性症状的动物数、试验中死亡或安乐处死的动物数、每只动物的死亡时间、毒性反应的描述及其时间过程、毒性反应是否可恢复,以及病理学结果。

5.2 试验报告

如有可能,检验报告应包含以下信息:

a) 受试物:

- 1) 物理性状、纯度,相关理化性质(包括异构体);
- 2) 鉴别资料,包括美国化学文摘服务社(Chemical Abstracts Service, CAS)号(若有)。

b) 赋形剂(若有):说明需要使用赋形剂的理由,选用的赋形剂不是水时也应说明理由。

c) 试验动物:

- 1) 种属和品系;
- 2) 动物的洁净程度等级(如已知);
- 3) 动物数量、周龄和性别(如雄性,则需说明不选雌性的理由);

- 4) 来源、饲养条件、饲料、历史数据等；
- 5) 如有动物在试验中死亡,其死亡日期和时间。

d) 试验条件:

- 1) 受试物详细成分,包括染毒时所用的受试物的物理性状;
- 2) 给予受试物的详细信息,包括染毒体积和时间;
- 3) 饲料和饮用水的质量的详细信息(包括饲料的种类/来源,饮用水的来源);
- 4) 选择起始染毒剂量的理由;
- 5) 随机动物选择的方法。

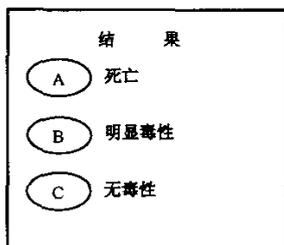
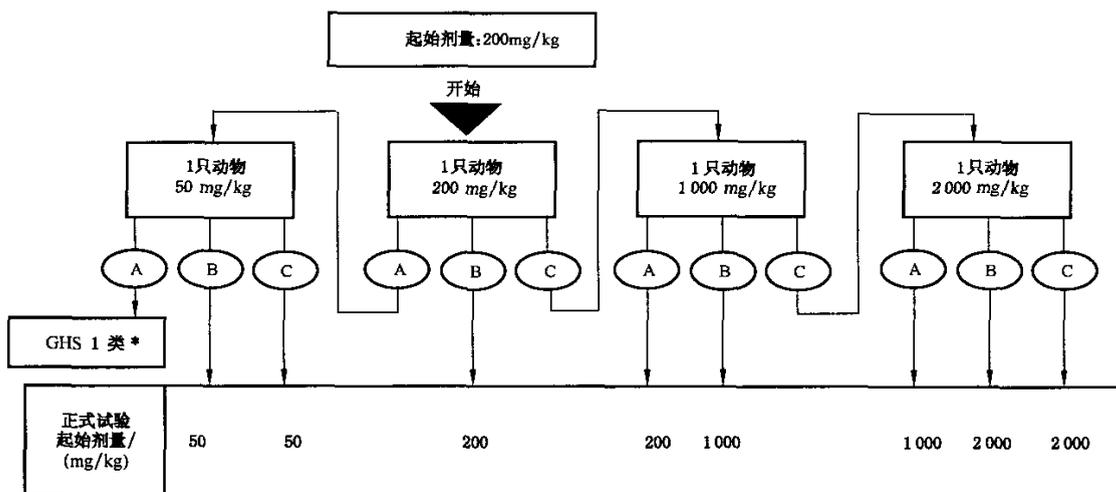
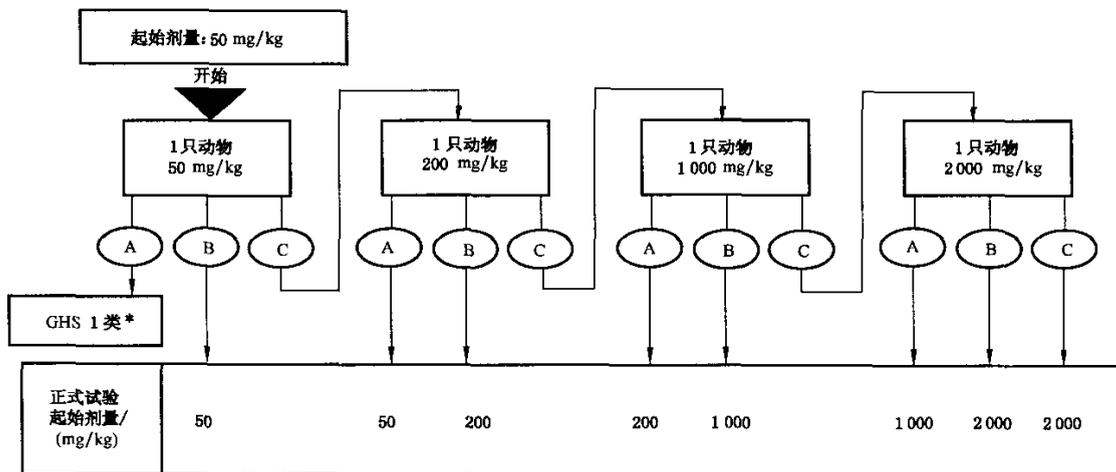
e) 结果:

- 1) 用表格报告每只动物的毒性表现和染毒剂量(例如,动物死亡情况、毒性表现的性质、严重程度及其持续时间);
- 2) 每只动物染毒当天的体重、染毒后每周的体重、死亡及安乐处死时的体重、试验过程中死亡动物的死亡日期和时间;
- 3) 每只动物毒性表现的时间过程,以及是否可恢复;
- 4) 若有可能,每只动物的尸检和组织病理学检查结果。

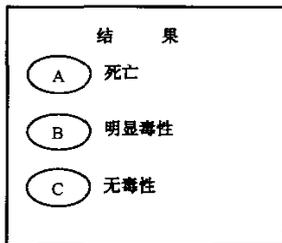
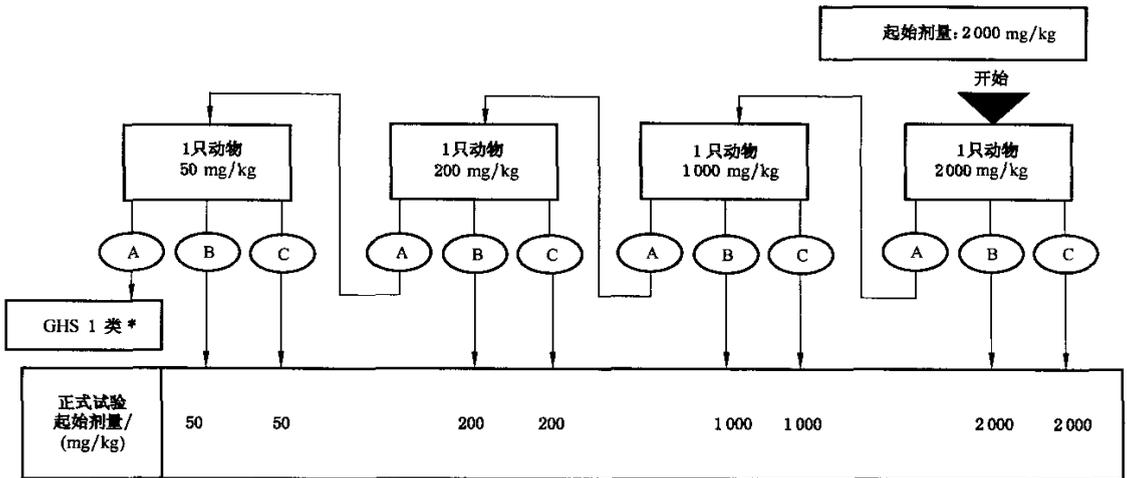
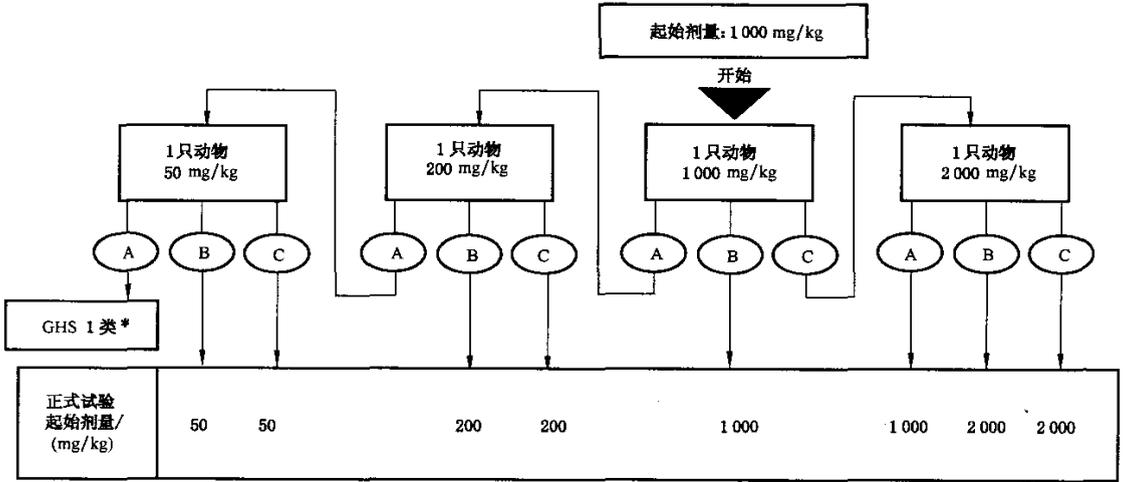
5.3 结果讨论和解释。

5.4 结论。

附录 A
(规范性附录)
预试验流程图

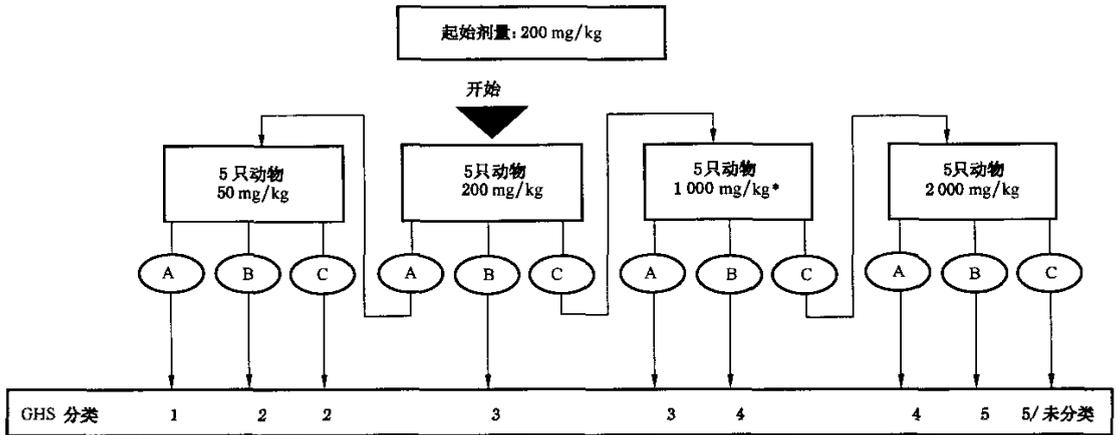
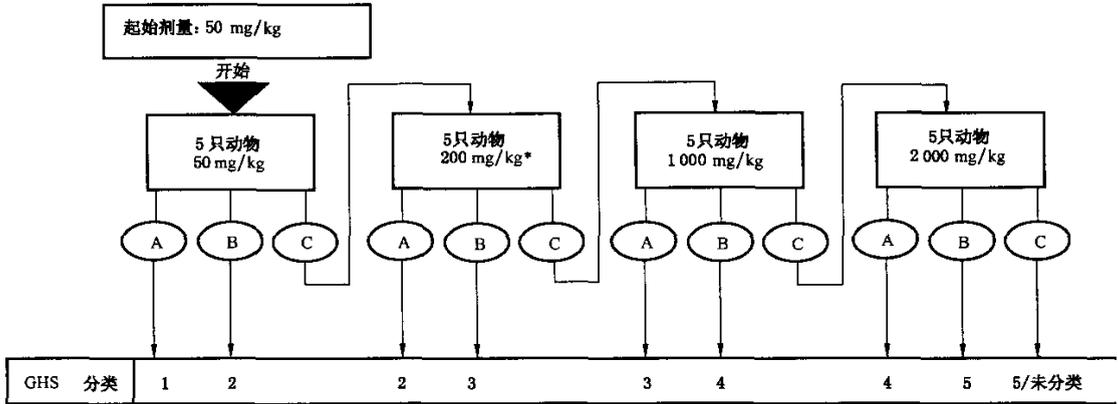


*50 mg/kg时,对于结果(A),还可选择一个补充程序,以确定 GHS分类:参见 4.5.1 预试验



*50 mg/kg 时,对于结果(A),还可选择一个补充程序,以确定 GHS 分类:参见 4.5.1 预试验

附录 B
(规范性附录)
正式试验流程图

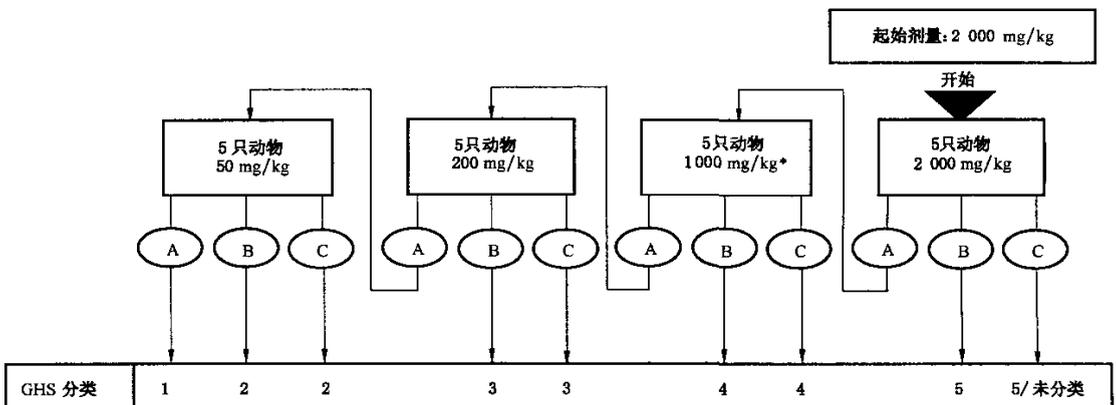
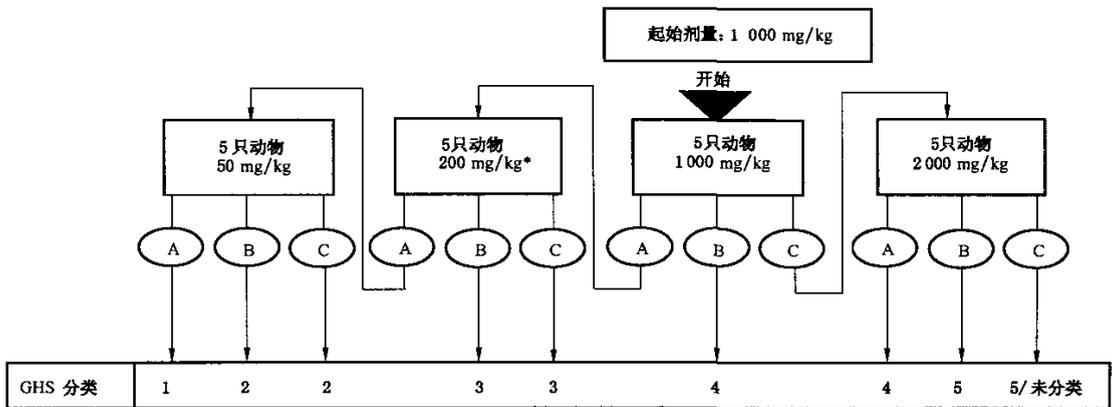


结 果

A	2只死亡
B	1只明显毒性;且/或≤1只死亡
C	无明显毒性或无死亡

试验组动物数量
正式试验中每组 5 只动物中,包括预试验中同一剂量的动物

* 违背动物福利保护,如果预试验中在此剂量下动物出现死亡,无需进一步试验,直接得出结果(A)



结 果

- (A) 2只死亡
- (B) 1只明显毒性;且/或≤1只死亡
- (C) 无明显毒性或无死亡

试验组动物数量
正式试验中每组 5 只动物中,包括预试验中同一剂量的动物

* 违背动物福利保护。如果预试验中在此剂量下动物出现死亡,无需进一步试验,直接得出结果(A)

附录 C
(规范性附录)

对预期 LD₅₀ 超过 2 000 mg/kg、不需检测的受试物进行分类的标准

C.1 5 级分类标准

5 级危害分类标准的目的在于,鉴别出急性毒性相对较低但在特定条件下对易感人群构成危险的受试物。预计这些物质的经口或经皮的 LD₅₀ 在 2 000 mg/kg~5 000 mg/kg 体重范围内,或经吸入途径的等效剂量在此范围。5 级分类的特定标准如下:

- a) 已获得可靠证据证明 LD₅₀ 在 5 级范围内;或者其他动物试验或人类的毒性反应资料表明其对人类健康可能具有急性毒性。
- b) 通过对资料的推测、评价或测量,把它分类为更高的危害级别理由不充分,并且
 - 有可靠资料表明其对人类有明显的毒性效应,或者
 - 经口、吸入或经皮染毒剂量达到 4 级时观察到任何死亡率,或者
 - 专家认定当剂量达到 4 级时,除腹泻、立毛或外观不整外,动物将出现明显的中毒效应,或者
 - 专家认定,有来自其他动物试验的可靠资料能证据其可能会引起明显的急性毒性效应。

C.2 剂量超过 2 000 mg/kg 的试验

在特殊情况下,并且只有在经特定管理要求证明需要时,才考虑另外使用更高的固定剂量(5 000 mg/kg)。为了保护动物福利,不推荐使用 5 级范围内的试验剂量,而只有在这种检测的结果与保护人类健康直接相关的可能性很大时才予以考虑。

C.2.1 预试验

决策规则要求附录 A 中列出的试验程序扩展到包括 5 000 mg/kg 的剂量水平。因此,如以 5 000 mg/kg 作为预试验的起始剂量,结果为 A(死亡)时需另取一只动物进行 2 000 mg/kg 检测,结果为 B 和 C(明显毒性或无毒性)时则要求以 5 000 mg/kg 作为正式试验的起始剂量。与此类似,如果预试验的起始剂量不是 5 000 mg/kg 而是 2 000 mg/kg,则结果为 B(观察到明显毒性)或 C 时,还应再进行 5 000 mg/kg 剂量的试验,并且应将 2 000 mg/kg 作为正式试验的起始剂量;若在随后的 5 000 mg/kg 剂量得到结果 A,则正式试验的起始剂量应为 2 000 mg/kg,而得到结果 B 或 C 时则要求正式试验的起始剂量选择 5 000 mg/kg。

C.2.2 正式试验

决策规则要求附录 B 中所列试验程序扩展到 5 000 mg/kg 剂量水平。因此,如以 5 000 mg/kg 作为正式试验的起始剂量,结果为 A(≥ 2 只死亡)时需另取一组动物进行 2 000 mg/kg 剂量检测,而得到结果 B(明显毒性和/或 ≤ 1 只死亡)或 C(无毒性)时则表明此受试物不能据 GHS 分类(不分类)。与此类似,若不以 5 000 mg/kg 而是以 2 000 mg/kg 作为起始剂量,则结果为 C 时,还应再进行 5 000 mg/kg 剂量的试验;若此 5 000 mg/kg 剂量得出结果 A 则将受试物划为 GHS 5 级,而得到结果 B 或 C 时则将其定为未分类。

参 考 文 献

- [1] OECD (1987). OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Dermal Toxicity 402. Available:
[http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html]
- [2] OECD (2001). OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure 420. Available:
[http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html]
- [3] British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, Vol. 3, 85-92
- [4] OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Available:
[http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html]
- [5] Stallard, N. and Whitehead, A. (2003). Statistical Modelling and Evaluation of an Acute Dermal Toxicity Test Using the Fixed Dose Procedure (*manuscript*)
- [6] UN Economic Commission for Europe (UNECE) (2003). Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Available:
[<http://unece.org/trans/danger/public/ghs.html>]
- [7] Lipnick, R. L., Cotruvo, J. A., Hill, R. N., Bruce, R. D., Stitzel, K. A., Walker, A. P., Chu, I., Goddard M., Segal L., Springer J. A. and Myers, R. C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD₅₀ and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.*, Vol. 33, 223-231
- [8] Warbrick, E. V., Indans, I., Blackwell, M., Hardy, C. J. and Shepherd, N. (2002). The reduction and refinement of animal use in acute inhalation toxicity testing. *Toxicol.*, Vol. 192, 92
-