

附件 4

急性经口毒性试验 固定剂量方法

The fixed-dose procedure for acute oral toxicity Test

(征求意见稿)

1 范围

本方法规定了动物急性经口毒性试验 固定剂量方法的基本原则、要求和方法。

本方法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。试验结果可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。

3 定义

3.1 急性经口毒性 acute oral toxicity

一次或在24h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 经口半数致死量 (LD₅₀) 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 延迟死亡 delayed death

设定的给药间隔(通常为48h)内不引起受试动物死亡或出现濒死状态,但在14d的观察期间内出现死亡。

3.4 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级所需的充分结果。受试物按固定的剂量逐一以管饲法经口给予单只同性别动物(一般采用雌性),每个剂量染毒后根据动物毒性反应和死亡的结果来确定是否在更高剂量或更低剂量继续试验。并对染毒后所有动物进行解剖学检查,存在病理改变的器官考虑进行病理组织学检查。

本方法主要适用于啮齿类动物的研究。

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1mL/100g，水溶液可至2mL/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。受试物溶液一般要现用现配。

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，通常使用未孕和未曾产仔的雌性动物。假如有已知毒理学资料说明雄性动物可能对受试物更敏感，也可选用雄性动物并说明理由。实验动物开始试验时应为8-12周龄，体重之间相差不得超过平均体重的20%。试验前动物要在实验动物房环境中适应 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 预实验步骤

5.3.1 染毒前

动物需要禁食（大鼠禁食不禁水过夜，小鼠禁食不禁水3h~4h）。禁食后染毒前需要对动物进行称重，采用管饲法一次性染毒（如果不能一次染毒，可分次给予，但整体染毒时间不能超过24h）。染毒后仍需继续禁食（大鼠3h~4h，小鼠1h~2h）。如果染毒是分多次完成的，根据时间的长短，必要时可给动物提供一定量的水和食物。

5.3.2 初始剂量和限量实验

根据相关毒理学资料，可以从5mg/kg，50 mg/kg，300 mg/kg，2000 mg/kg中选择一个作为初始剂量，受试物的毒性资料可以通过其类似化合物或类似混合物（根据性质和所占的比例判断受试物所占的毒性重要性）的毒性资料获得。如受试物无毒理学资料，一般从300mg/kg作为初始剂量进行预实验。如果现有毒理学资料提示受试物可能无毒的情况下（致死量高于限值剂量），可进行限量试验。

采用5000mg/kg剂量进行限量试验，可按附录A中的试验准则进行。如结果为A，则第二只动物在2000mg/kg剂量试验；如出现B或C（明显毒性或无毒性）则选择5000mg/kg作为正式试验的初始剂量。对于2000mg/kg剂量的试验结果出现B或C，应将试验推进至5000mg/kg，如5000mg/kg试验结果为A，则正式试验起始剂量为2000mg/kg，如结果为B或C，则正式试验起始剂量为5000mg/kg。

5.3.3 观察及结果解释

每次取1只动物，按照附录A进行预试验，观察记录染毒后动物的毒性表现，观察间隔24h后，进行另一只动物染毒，所有试验动物观察至少14d。

预试验的结果为正式试验提供初始剂量。预试验中，如果在最低剂量（5mg/kg）动物发生死亡，根据试验程序，应立即停止试验，将该物质判定为急性毒性分级高毒（剧毒）（见附录A）。为了获取更为准确的结果，应选取第二只动物按照5mg/kg染毒，如果第二只动物死亡，结束试验，将该物质判定为高毒（剧毒）；如该动物未死亡，最多再选3只动物按单只顺序5mg/kg染毒，观察间隔为确定上一只动物已存活为准。只要有第二只动物死亡则试验结束（此时可按附录B进行分级）。

5.4 正式试验步骤

5.4.1 初始剂量及实验动物

根据预试验结果选取只产生明显毒性而不引起死亡的剂量作为正式试验的初始剂量。每个剂量组动物以5只为限，应包含预试验中该剂量组使用的一只动物。

5.4.2 染毒

在预试验结果的基础上，遵照附录B程序进行染毒。应在确定前一剂量组的动物存活后，方可进行下一剂量的试验。一般两个剂量组试验之间要间隔3d~4d，以有助于更好地观察迟发的毒性反应。间隔时间可以根据实际情况进行调整。

如果进行限量试验，参照附录B准则，选取除预实验另外4只动物进行试验。正式试验开始于5000mg/kg，结果A需选第二组动物在2000mg/kg上进行试验；结果出现B（明显毒性和/或小于或等于1只死亡）或C（无毒性）受试物按实际无毒进行分类。在2000mg/kg剂量上的试验结果是B或C，应将试验推进到5000mg/kg，如5000mg/kg试验结果为A，则该物质毒性分级为低毒，如结果为B或C，则受试物毒性可分级为实际无毒。

5.4.3 观察

染毒后，对每只动物都应有单独全面的记录，在染毒后的30min内每只动物至少分别观察一次，第1d内要定时观察（在前4h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。

观察期限一般不超过14d，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。

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24h和24h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。

5.4.4 病理学检查

对实验动物进行大体解剖学检查（包括在试验期死亡及因人道处死而移出试验室的），并记录全部大体病理改变。对死亡和存活24h和24h以上动物并存在大体病理改变的器官应进行病理组织学检查。

5.5 试验结果评价

5.5.1 试验数据

应记录每一只动物的相应数据。按各剂量水平将染毒动物的观察结果以适当形式(列表)进行总结；描述使用的动物数量；出现中毒体征的动物数；试验中引起死亡或处于人道主义处死的动物数，每只动物的死亡时间；描述毒性反应恢复的时间及大体解剖的结果。

5.5.2 结果评价

评价试验结果时，应将固定剂量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，受试物毒性分级是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。

在对受试物使用毒性分级时，需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 固定剂量法以经口毒性分级评价受试物的毒性。其结果外推到人类的有效性很有限。

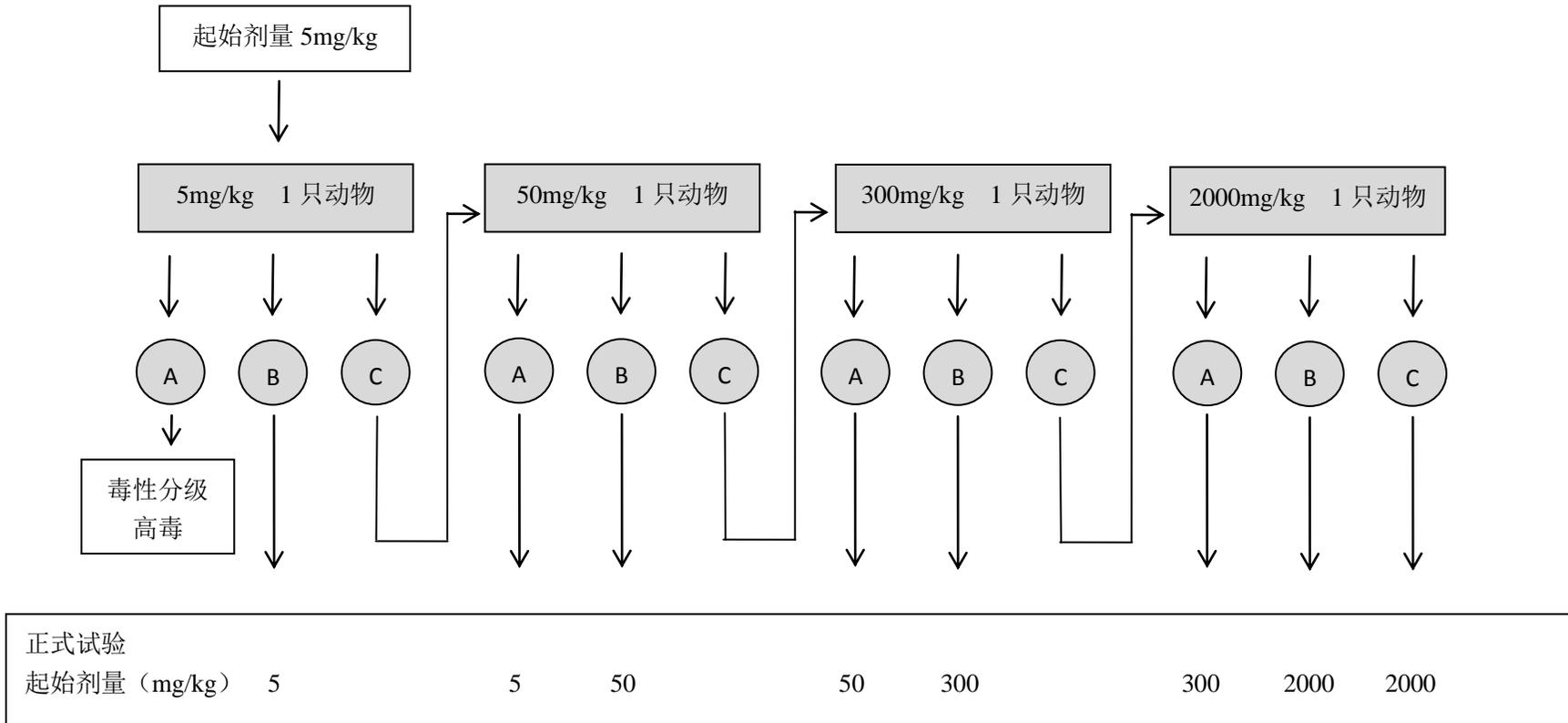
表.1 经口毒性分级评价对照表

剂量	症状	推测LD ₅₀ 区间	毒性分级
5mg/kg	A≥2	≤5mg/kg	高毒（剧毒）
	A=1、B≥1	5mg/kg-50mg/kg	高毒
50mg/kg	A≥2	5mg/kg-50mg/kg	高毒
	A=1、B≥1	50mg/kg-300mg/kg	中等毒
300mg/kg	A≥2	50mg/kg-300mg/kg	中等毒
	A=1、B≥1	300mg/kg-2000mg/kg	低毒
2000mg/kg	A≥2	300mg/kg-2000mg/kg	低毒
	A=1、B≥1	>2000mg/kg	低毒
	C	>2000mg/kg	低毒/实际无毒

注：A-死亡；B-观察到明显毒性；C-无毒性体征。正式试验中5只动物应包含预试验中该剂量组使用过的一只动物。

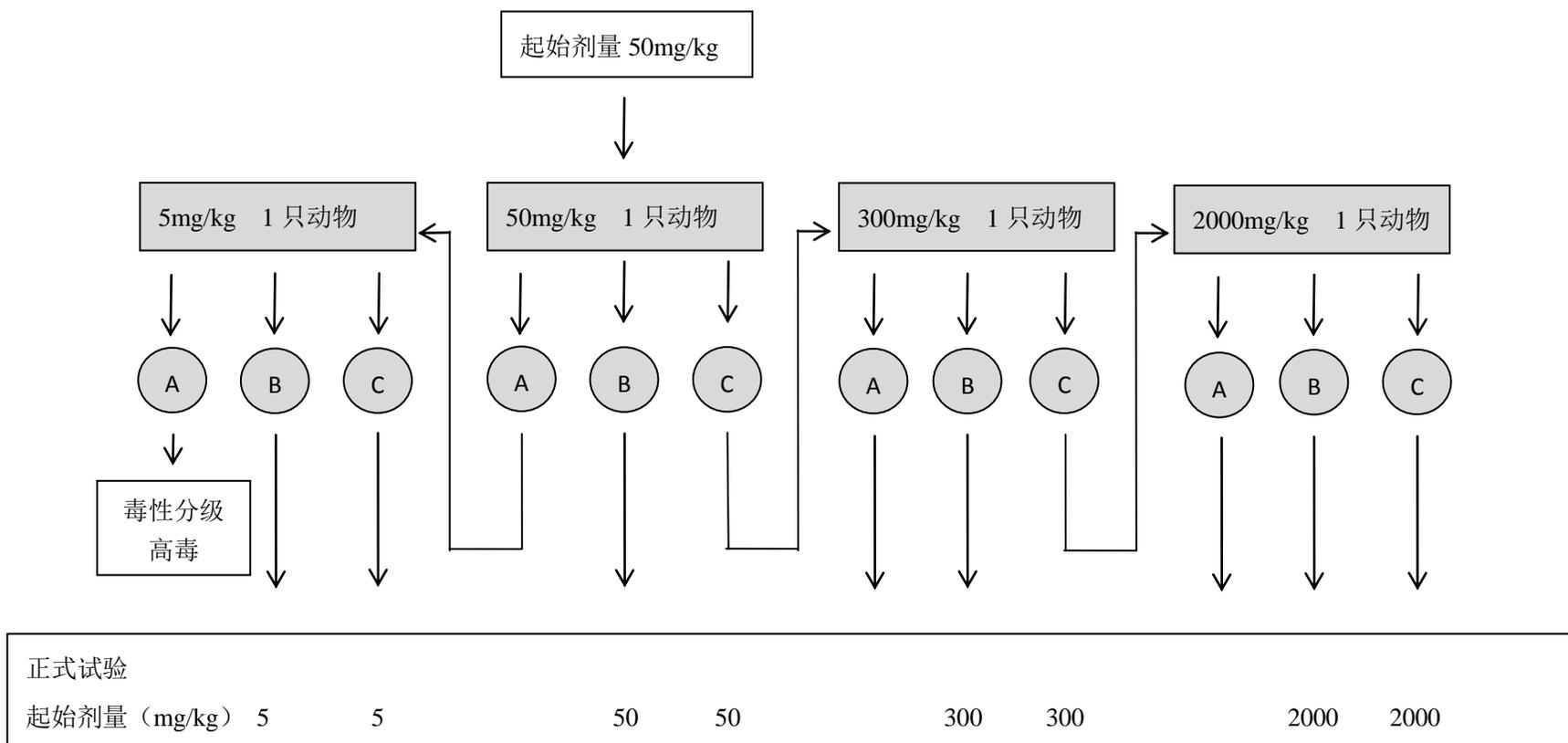
附录A（规范性附录）预试验流程

A.1 预试验流程图（图 A.1~图 A.4）



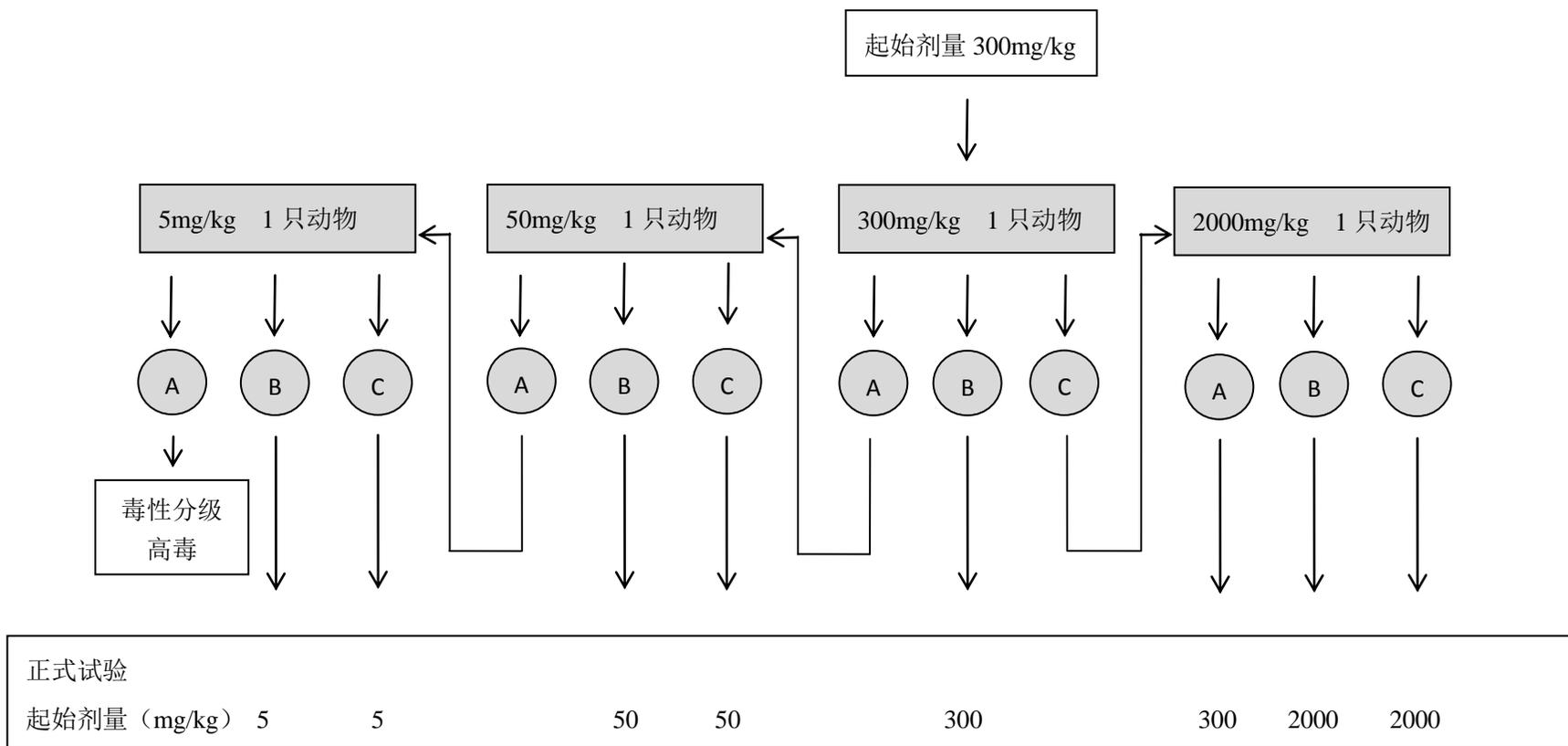
图A.1 预试验流程图（起始剂量：5mg/kg）

注：A-死亡；B-明显毒性；C-无毒性。如在 5mg/kg 剂量下出现 A，应按照 5.3 方法，对受试物毒性进行分级。



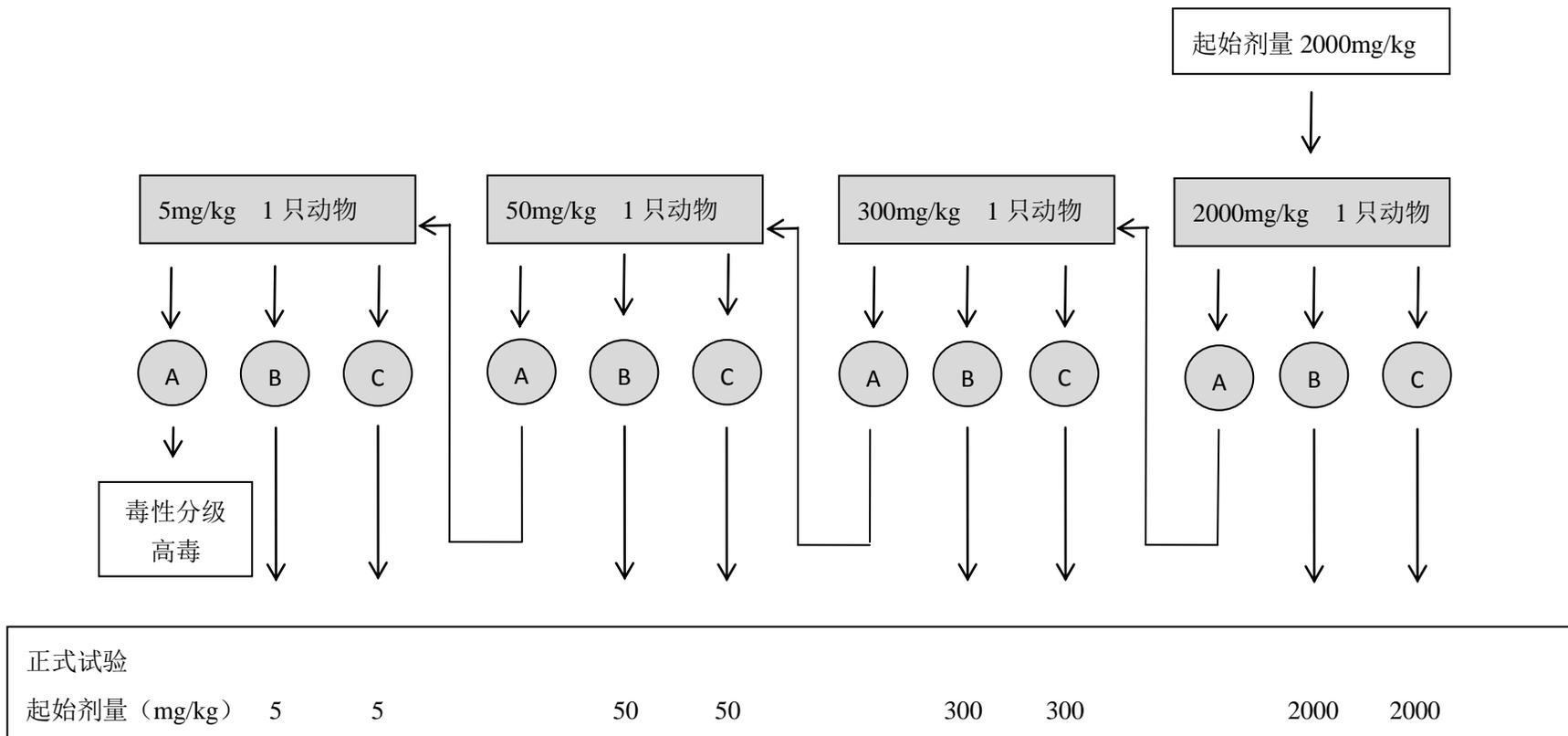
图A.2 预试验流程图（起始剂量：50mg/kg）

注：A-死亡；B-明显毒性；C-无毒性。如在 5mg/kg 剂量下出现 A，应按照 5.3 方法，对受试物毒性进行分级。



图A.3 预试验流程图（起始剂量：300mg/kg）

注：A-死亡；B-明显毒性；C-无毒性。如在 5mg/kg 剂量下出现 A，应按照 5.3 方法，对受试物毒性进行分级。

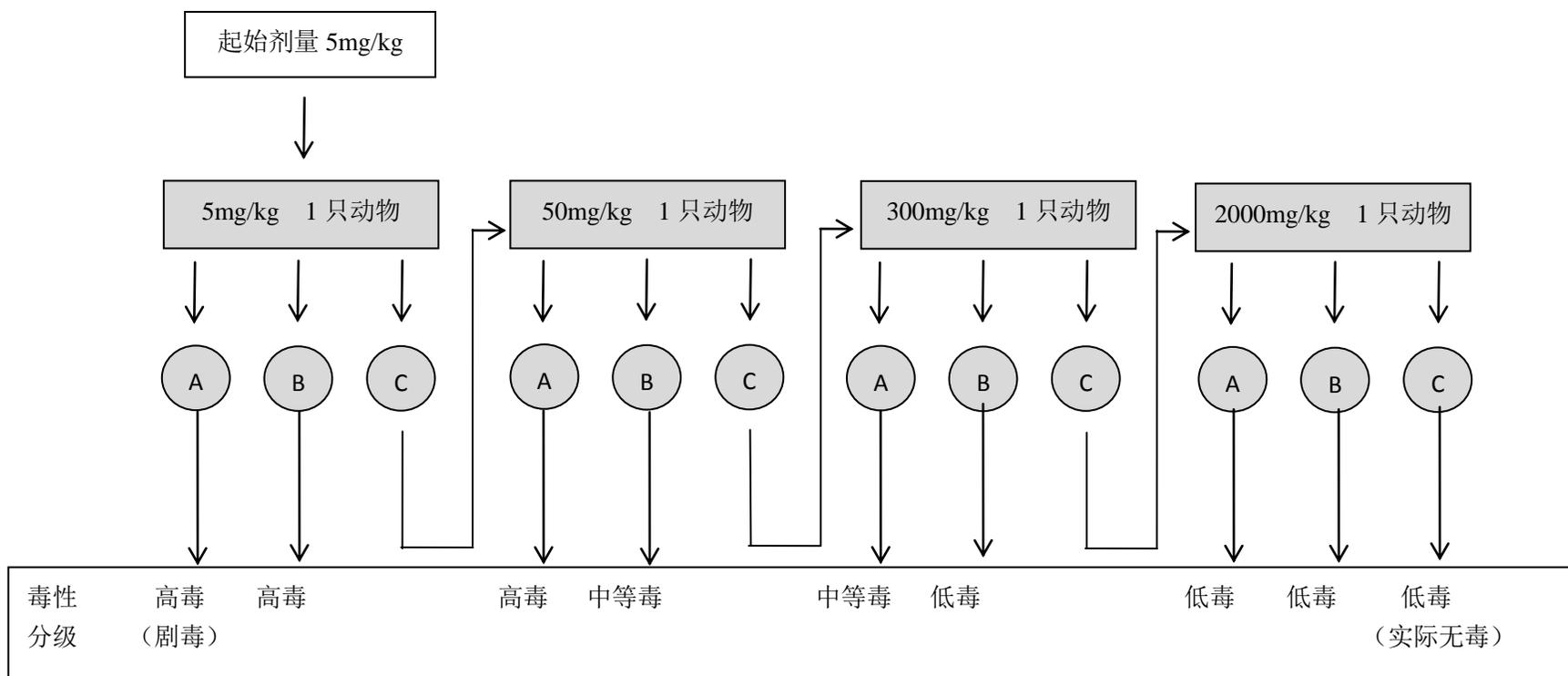


图A.4 预试验流程图（起始剂量：2000mg/kg）

注：A-死亡；B-明显毒性；C-无毒性。如在 5mg/kg 剂量下出现 A，应依照 5.3 方法，对受试物毒性进行分级。

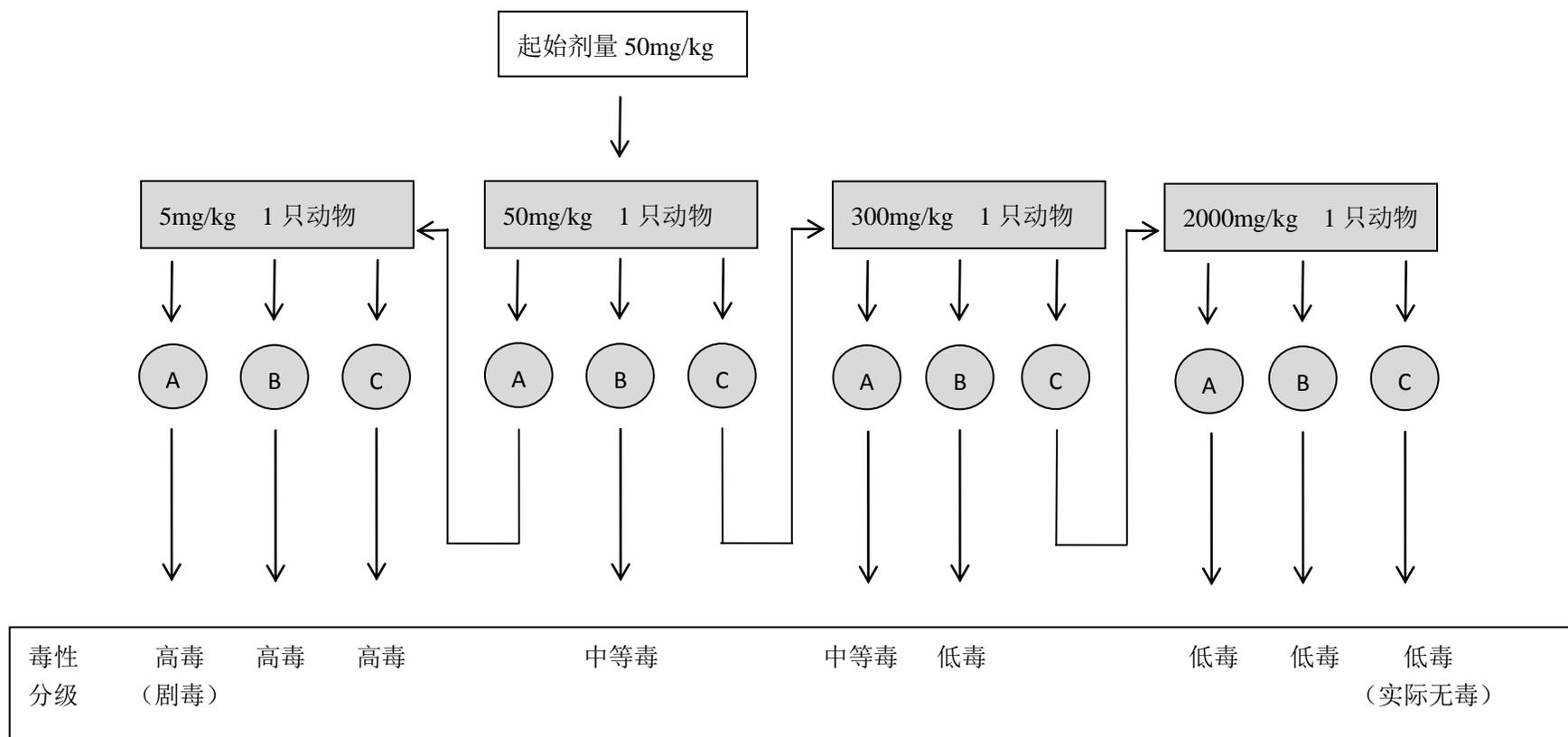
附录B（规范性附录）正式试验流程

B.1 正式试验流程图（图 B.1～图 B.4）



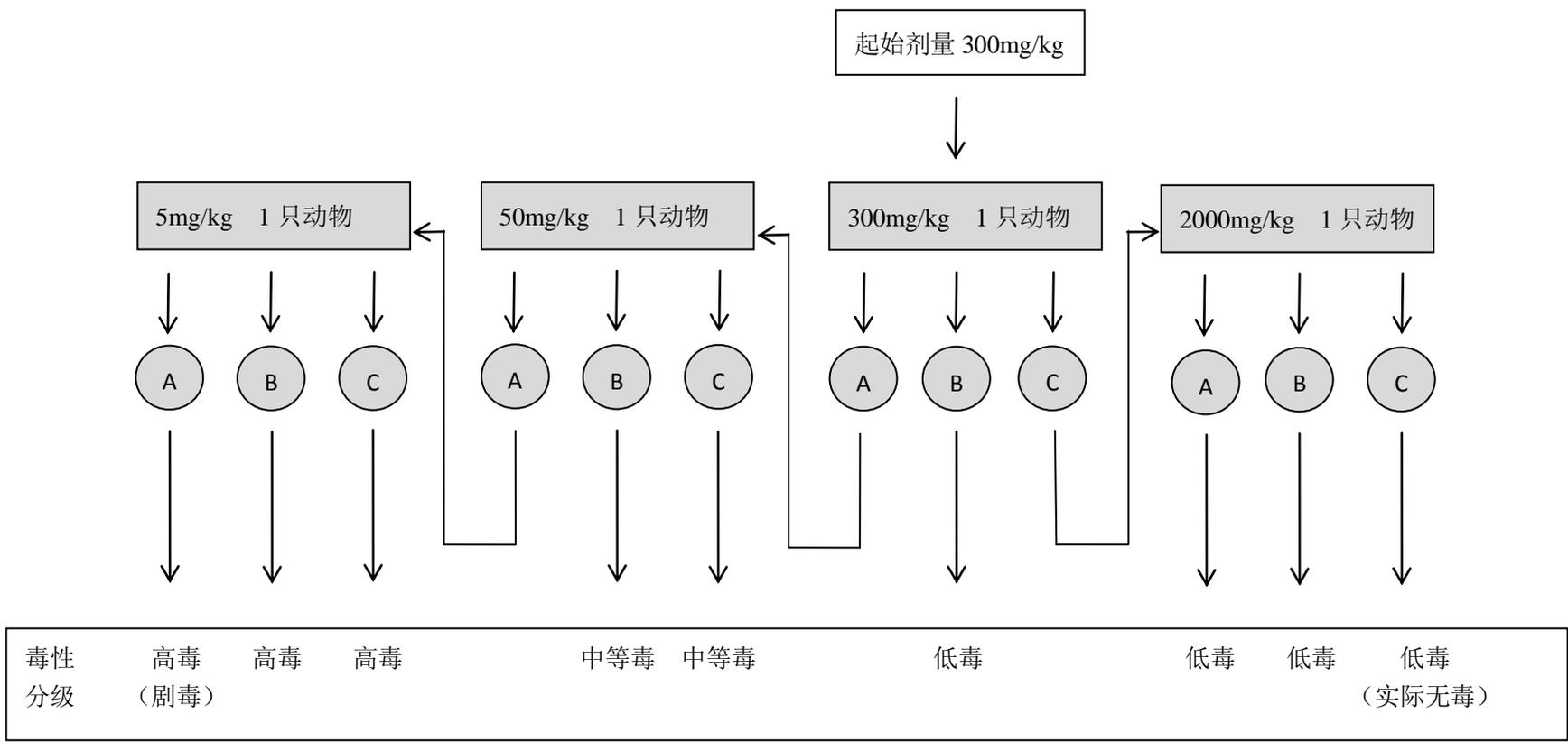
图B.1 正式试验流程图（起始剂量：5mg/kg）

注：A-死亡数大于或等于2只；B-观察到明显毒性大于或等于1只，或者1只死亡；C-无毒性。正式试验中5只动物应包含预试验中该剂量组使用过的一只动物。



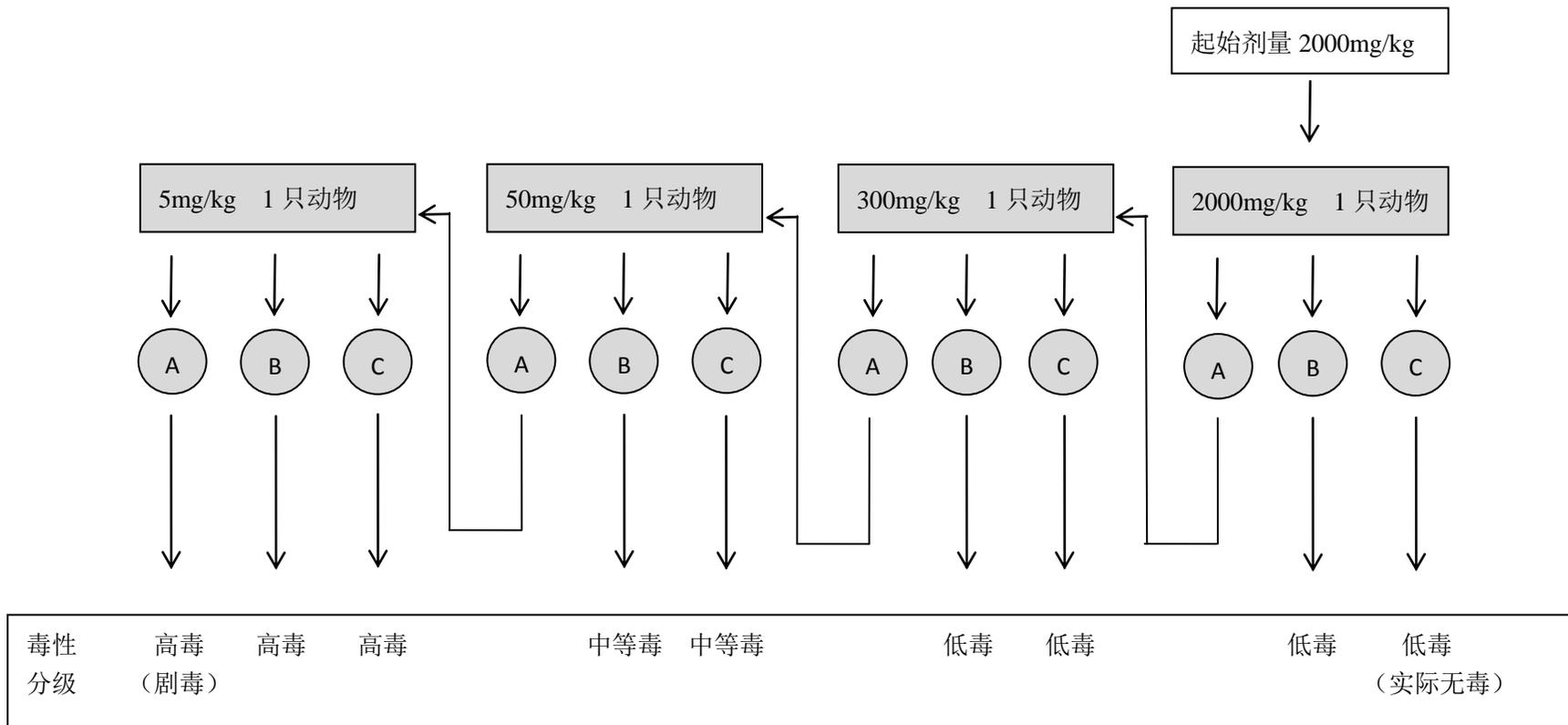
图B.2 正式试验流程图（起始剂量：50mg/kg）

注：A-死亡数大于或等于 2 只；B-观察到明显毒性大于或等于 1 只，或者 1 只死亡；C-无毒性。正式试验中 5 只动物应包含预试验中该剂量组使用过的一只动物。



图B.3 正式试验流程图（起始剂量：300mg/kg）

注：A-死亡数大于或等于 2 只；B-观察到明显毒性大于或等于 1 只，或者 1 只死亡；C-无毒性。正式试验中 5 只动物应包含预试验中该剂量组使用过的一只动物。



图B.4 正式试验流程图（起始剂量：2000mg/kg）

注：A-死亡数大于或等于 2 只；B-观察到明显毒性大于或等于 1 只，或者 1 只死亡；C-无毒性。正式试验中 5 只动物应包含预试验中该剂量组使用过的一只动物。

化妆品急性经口毒性试验 固定剂量方法

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化妆品急性经口毒性试验 固定剂量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

按中检院关于征集 2021 年《化妆品安全技术规范》制修订项目相关要求，根据化妆品（原料）申请注册等相关要求，按《化妆品安全技术规范》相关要求，起草编制《化妆品急性经口毒性试验 固定剂量方法》。

本方法本着客观、易行、快速的原则进行编制。根据目前国内各化妆品检验检测实验室具备的试验条件和技术能力，保证方法科学规范的同时，具备可操作性和便捷性，同时兼顾与国际标准接轨，确保先进性。

二、起草过程

本试验方法参考借鉴已成型的 OECD（420）《急性口服毒性——固定剂量程序》，结合中国国情和试验习惯，依据《化妆品安全技术规范》（2015 年版）要求，起草新的试验方法。在编制过程中综合考虑地域、环境、动物种属、操作、溶媒等因素，同时考虑我国国情和语言习惯，使方法的建立尽可能准确、科学、可重复，并客观地表征受试样品毒性。

三、与我国已有相关标准的关系

目前我国对化妆品成品及原料的急性经口毒性试验方法为第六章毒理学试验方法 2“急性经口毒性试验”，采用经口毒性试验，以动物死亡结果计算 LD₅₀ 值，对受试物的毒性进行分级。本方法研究的主要内容是在《化妆品安全技术规范》（2015 年版）基础上，丰富经口急性毒性试验方法，在技术方法上形成补充，并与有关国际条款接轨，降低实验动物的使用，推进我国动物福利工作的开展，对我国未来化妆品贸易提供技术支持和保证。

四、与《规范》中原方法的对比情况

《化妆品安全技术规范》原经口毒性试验采用经口方式，以动物死亡为试验终点，针对受试物进行 LD₅₀ 的计算，根据 LD₅₀ 进行分级评价的方式。使用的动物数量较多，对性别无明确要求，实验结果需要通过计算获得。

本方法以动物给药后的毒性症状以及死亡情况作为试验观察点，通过观察结果在固定的剂量上采用较少数量的动物进行试验，一般采用雌性，且试验结果直观可得，无需专门计算。相比较下，动物数量少、操作容易、周期较短、结果直观。

五、国际相关标准情况

目前，动物保护运动的兴起、动物福利和动物替代“3R”原则的提出，对于如何减少、优化、替代动物试验成为近年来全世界关注的焦点。传统的急性经口毒性试验方法是以动物死亡作为毒性终点。目前，广泛采用的是经合组织（OECD）在 2001 年 12 月 17 日发布的经合组织化学品测试指南《急性口服毒性——固定剂量程序 420》。此方法已经是比较成熟的方法，也成为原来以死亡作为终点的 LD₅₀ 方法的替代方法之一。

依据 OECD《急性口服毒性——固定剂量程序 OECD（420）》，并结合我国动物试验开展的现状和化妆品领域成品及原料市场的情况，起草编制本试验方法。此法可根据受试物的具体情况，与急性经口毒性试验方法的上下增减剂量法（UDP）和分类法等方法，选择或组合使用。将达到与国际接轨、节省研发资源、保护动物和动物福利的目的。

六、实验室验证情况

本方法建立后，选取了两种化妆品常用添加剂和防腐剂，苯甲醇和间苯二酚，并选用了两个品种大鼠、一个品种小鼠，采用 2 种不同溶媒，在冬季和夏季不同条件下，依照方法进行了试验验证。试验结果符合受试的已知化合物的文献理论值和毒性反应症状。同时对可能影响试验的因素进行了考察和比对，证明方法科学、简便、可行。

七、其他需要说明的问题

本方法适合于化妆品及其原料的急性经口毒性试验，可以通过较少的动物和时间，确定受试物的 LD₅₀ 大致范围区间，并可以比较快速简便的对受试物的毒性进行分级评价。验证结果表明，方法简单易行。

本方法经多年来国内外众多研究机构试验使用，试验方法成熟，化妆品及其原料采用本方法的程序基本相同，同时也可结合急性毒性分级试验法和急性毒性上下法，可以比较完整客观地对受试物的急性毒性做出判断。方法对人员操作技能要求不高，只要控制好试验中各项参数和影响因素，结果完全可以满足毒性评价的要求。