

3 急性经皮毒性试验

Acute Dermal Toxicity Test

1 范围

本规范规定了动物急性皮肤毒性试验的基本原则、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

急性皮肤毒性试验可确定受试物能否经皮肤吸收和短期作用所产生的毒性反应，可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提供依据。

3 定义

3.1 急性皮肤毒性 acute dermal toxicity

经皮一次涂敷受试物后，动物在短期内出现的健康损害效应。

3.2 经皮 LD₅₀ 半数致死量 mdium lethal dose

经皮一次涂敷受试物后，引起实验动物总体中半数死亡的毒物的统计学剂量。以单位体重涂敷受试物的重量(mg/kg 或 g/kg)来表示。

4 试验的基本原则

受试物以不同剂量经皮给予各组实验动物，每组用一个剂量。染毒后观察动物的毒性反应和死亡情况。试验期间死亡的动物要进行尸检，试验结束时仍存活的动物要处死并进行尸检。若已知受试物具有腐蚀性或强刺激性可不进行急性经皮毒性试验。

5 试验方法

5.1 受试物

液体受试物一般不需稀释。若受试物为固体，应研磨成细粉状，并用适量水或无毒、无刺激性、不影响受试物穿透皮肤、不与受试物反应的介质混匀，以保证受试物与皮肤有良好的接触。常用的介质有橄榄油、羊毛脂、凡士林等。

5.2 实验动物和饲养环境

可选用健康成年大鼠、家兔或豚鼠作为实验动物，也可使用其他种属动物进行试验。使用雌性动物应是未孕和未曾产仔的。建议实验动物体重范围为：大鼠 200g—300g；家兔 2kg—3kg；豚鼠 350g—450g。实验动物皮肤应健康无破损。试验前动物要在实验动物房环境中至少适应 3d—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

根据所选用的方法要求，原则上应设 4—6 个剂量组，每组动物一般为 10 只，雌雄各半。各剂量组间距大小以兼顾产生毒性大小和死亡为宜，通常以较大组距和较少量动物进行预试。如果受试物毒性很低，可采用一次限量法，即用 10 只动物（雌雄各半）皮肤涂抹 2000mg/kg 体重剂量，当未引起动物死亡，可考虑不再进行多个剂量的急性经皮毒性试验。

5.4 试验步骤

5.4.1 试验开始前 24h，剪去或剃除动物躯干背部拟染毒区域的被毛，去毛时应非常小心，不要损伤皮肤以免影响皮肤的通透性。涂皮面积约占动物体表面积的 10%，应根据动物体重确定涂皮面积。体重为 200g—300g 的大鼠约为 30cm²—40cm²，体重为 2kg—3kg 的家兔约为 160 cm²—210 cm²，体重为 350g—450g 的豚鼠约为 46 cm²—54 cm²。

5.4.2 将受试物均匀涂敷于动物背部皮肤染毒区，然后用一层薄胶片覆盖，无刺激胶布固定，防止动物舔食。若受试物毒性较高，可减少涂敷面积，但涂敷仍需尽可能薄而均匀。一般封闭接触 24h。

5.4.3 染毒结束后，应使用水或其他适宜的溶液清除残留受试物。

5.4.4 观察期限一般不超过 14d，但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，可考虑延长观察时间。

5.4.5 对每只动物都应有单独全面的记录，染毒第 1 d 要定时观察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。包括被毛和皮肤、眼睛和粘膜以及呼吸、循环、自主神经和中枢神经系统、肢体运动和行为活动等的改变。特别注意观察动物是否出现震颤、抽搐、流涎、腹泻、嗜睡、和昏迷等症状。死亡时间的记录应尽可能准确。

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。

5.4.6 对实验动物进行大体解剖学检查，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。

5.4.7 可采用多种方法测定 LD₅₀，建议采用一次最大限度试验法、霍恩氏法、上-下法、概率单位-对数图解法和寇氏法等。

5.5 试验结果评价

评价试验结果时，应将经皮 LD₅₀ 与观察到的毒性效应和尸检所见相结合考虑，LD₅₀ 值是受试物毒性分级和标签标识以及判定受试物经皮肤吸收后引起动物死亡可能性大小的依据。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。

毒性分级见表 1。

表1 皮肤毒性分级

LD ₅₀ (mg/kg)	毒性分级
<5	剧毒
5—<44	高毒
44—<350	中等毒
350—<2180	低毒
≥2180	微毒

6 试验结果的解释

急性经皮毒性试验研究和经皮 LD₅₀ 的确定提供了受试物经皮染毒的毒性。其结果外推到人类的有效性很有限。急性经皮毒性试验的结果应与经其他途径染毒的急性毒性试验结果相结合进行综合评价。