

附件 3

急性吸入毒性试验方法

Acute Inhalation Toxicity Study

1 范围

本规范规定了动物急性吸入毒性试验的基本原则、要求和方法。

本规范适用于化妆品单一成分的原料安全性毒理学检测。

2 试验目的

急性吸入毒性试验可评价化妆品原料能否被直接吸入或者通过其他途径进入呼吸道所产生的毒性反应，可对受试物进行毒性分级，为亚急性毒性和其他毒理学研究中染毒浓度选择提供依据。

3 定义

3.1 急性吸入毒性 acute inhalation toxicity

实验动物短时间（24 h 内）持续吸入一种可吸入性受试物后，在短期内出现的健康损害效应。

3.2 半数致死浓度（LC₅₀） median lethal concentration

在一定时间内经呼吸道吸入受试物后，引起实验动物总体中半数死亡的毒物的统计学剂量，以单位体积空气中受试物的质量（mg/m³）来表示。

3.3 空气动力学直径 aerodynamic equivalent diameter(AD)

气溶胶颗粒与不同直径标准单位密度（1.0 g/cm³）球形颗粒中某一颗粒的终端沉降速度相同时，该标准球形颗粒的直径即为空气动力学直径。其计量单位为μm。

3.4 质量中值空气动力学直径 mass median aerodynamic diameter(MMAD)

气溶胶中小于和等于某一空气动力学直径的颗粒总质量，占全部颗粒物质量 50%时，该直径即为空气动力学质量中位数直径。

3.5 几何标准差 geometric standard deviation(GSD)

用以描述气溶胶颗粒大小的分布状态。以撞击器各级累积百分比为 Y 轴、粒径为 X 轴拟合对数概率曲线，以累积百分比 84.1%对应的粒径除以累积百分比 50%的粒径，即为几何标准差。

4 试验的基本原则

受试物通过吸入暴露装置制备成不同浓度的样品，各试验组动物在一定时间内吸入不同浓度的受试物，暴露浓度的选择可通过预试验确定，吸入暴露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，试验结束时存活的动物要处死进行大体解剖。

5 试验方法

5.1 受试物

试验前受试物的有用信息包括：受试物的特性（如纯度），化学结构和理化性质；任何体外或者体内性试验结果；预期用途和人体暴露的可能性；得到的结构类似物的构效关系数据和毒理数据，在研究中，尽可能使用一组受试物，而且其样本应该在能保持其纯度、稳定性的条件下保存。

受试物的准备：可对受试物进行适当处理，使其达到适当浓度和粒径。如果是颗粒材料可经过机械加工，以达到所需的粒度分布，但不要分解或者改变供试品，如果在机械过程中已经被认为改变了物品组分时，应对受试物成分进行验证，验证如果不产生可吸入颗粒，则不需要进行吸入毒性试验，否则应进行吸入毒性试验。

5.2 实验动物和饲养环境

常规选择啮齿类动物，首选大鼠，一般选用 8~12 周龄的大鼠，使用雌性动物应是未孕和未曾产仔的。如需使用其他品系需说明理由。试验开始时动物体重的差异应不超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。试验前动物要在实验动物房环境中至少适应 3~5 d 时间。染毒前，动物应提前适应口鼻暴露时所用的固定器，以减少进入新环境引起的不适。

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 染毒浓度

在试验开始前，通常要进行预试验，为主试验的浓度选择提供帮助，受试物已知或预期有毒则进行限度试验。用全球化学品统一分类和标签系统（GHS）的分类系统，气体、蒸气、溶胶的限定浓度分别为 20 000 ppm、20 mg/L 和 5 mg/L。

传统 LC_{50} 试验至少设置 3 个不同浓度的染毒组，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，以便能在各浓度组的试验动物中发生一定程度毒效应和死亡。所得资料应足以绘制出浓度—死亡曲线，并在可能情况下求出 LC_{50} 值。

5.4 暴露方式

根据受试物的性质和试验目的来选择吸入染毒方式，首选的暴露方式为口鼻式暴露，特别是在研究液体或固体气溶胶或者可凝结成为气溶胶的蒸气时。对于特殊的研究目的，也可采用全身暴露染毒装置以更好地满足研究需求，但应在试验报告中予以阐释说明。采用全身暴露染毒时应保证染毒柜中气流的稳定性，试验动物的总体积不能超过染毒柜容积的 5%。

5.5 暴露条件

口鼻式暴露时间推荐为 4 h，暴露期间应禁食，在全身暴露时可以提供水。如果需更长时间的研究，应提供理由。

5.6 方法

5.6.1 传统的 LC₅₀ 法

在传统法中，暴露时间为 4 h。动物暴露在一个限定浓度（限度试验），或在至少 3 个不同的浓度下（主试验）。除已知受试物信息外，在开展主试验前，需要进行预试验。

预试验：预试验可用来估计受试物的毒性效应，确定易感性的性别差异，并为限度试验或主试验的浓度选择提供帮助。在选择预试验的浓度水平时，应该充分使用所有可得的信息，比如现有的定量—构效关系（Q）SAR 数据和类似化学品的数据。试验中，每个浓度水平的每种性别的试验动物不超过 3 只，通常只有一个浓度水平。已经进行过的急性吸入毒性试验—急性毒性分类法研究可以用来替代预试验。

限度试验：当受试物已知或预期基本无毒时，可采用限度试验。受试物的毒性作用信息，可以来源于已测试过的类似化合物或混合物或产品的特性和具有毒理意义的组成成分。在限度试验中，雌雄各 3 只动物暴露在限定浓度中。如果在限定浓度发现动物死亡或濒死，则限度试验的结果可作为其他浓度试验（如主试验）的预试验。如果受试物的理化性质决定其不可能达到限定浓度，则需测试其最大可及浓度。如果最大可及浓度的死亡率小于 50%，则不需进行进一步试验。

主试验：进行主试验时，一般每个浓度组有 10 只动物，雌雄各半（或 5 只易感性别的动物），且至少有 3 个浓度水平。必须有足够多的浓度水平足以绘制出浓度死亡曲线，并在可能情况下求出 LC₅₀ 各暴露组之间的时间间隔取决于中毒体征的出现、持续时间与严重程度。是否需要下浓度水平进行试验，取决于先前的试验动物是否能够成活。

5.6.2 浓度—时间法

浓度—时间法是传统 LC₅₀ 法的另一种替代方法。这种方法使试验动物暴露在不同浓度的受试物水平，而且暴露时间也不同。所有的试验都采用口鼻部吸入的方法。与传统法相比，浓度—时间法得到的 LC₀₁ 与 LC₁₀₀ 的值更加稳定。当在 4 个浓度水平和 5 种暴露持续时间的主试验采用浓度—时间法时，每个浓度—时间间隔只需使用 2 只动物（雌雄各半或易受影响的单一性别）。在某些情况下，在每浓度—时间间隔，可以选择两种性别的动物各 2 只，这能减少参数估计的误差和变异性，增加成功率，提高置信区间的覆盖范围。当用来参数估计的数据拟合不好时，可能需要第 5 个浓度水平。

预试验：预试验一般用各性别、各浓度 3 只动物，它可以为主试验选择 1 个合适的初始浓度和最大化减少动物使用。暴露时间为 4 h。如果能从急性吸入毒性试验—急性毒性分类法中得到死亡数据，那么可以不进行预试验。在选择研究中的初始目标浓度时，应该考虑在急性吸入毒性试验—急性毒性分类法中观察到的各性别和各个浓度的死亡率。

主试验：初始浓度（第一步暴露）可能是限定浓度，也可根据预试验选择浓度。每组雌雄各 1 只动物暴露于此浓度下，持续时间不同（如 15、30、60、120、240 min），总共用到 10 只动物。限定浓度可根据监管要求选择，气体、蒸气、气溶胶的限定浓度分别为 20 000 ppm、20 mg/L、5 mg/L（或为最大可及浓度），如果在第一步暴露中发现死亡，则引起死亡的最小暴露浓度将为下一步试验的浓度建立提供指导，每一个后续的试验都将取决于先前的试验结果。当供试品物理或化学性质无法达到极限浓度时，应测试可达到的最大浓度。如

果在可达到的最大浓度下，致死率低于 50%，则不需要进行下一步的测试，如果不能达到极限浓度，研究报告应提供说明和数据支持，如果可达到的最大蒸汽浓度不会引起毒性，则可能需要将供试品作为液体气溶胶产生。

对于很多受试物，如果暴露时间间隔适当，在初始浓度得到的结果与在其他 3 个浓度组得到的结果，就能足以绘制浓度—时间—死亡曲线。

5.7 暴露条件的监测

5.7.1 浓度监测

试验期间为保证实际浓度的稳定性，可以使用实时监测设备（如气溶胶光度计），或定期通过特异性的方法（如采用撞击器吸附或化学反应的原理直接采样，然后进行化学分析），或非特异性的方法如滤膜采样法来测定呼吸区或染毒柜内气溶胶浓度，以保证暴露条件的稳定性。对于气体和蒸汽，单个腔室浓度样品的平均浓度不得超过 $\pm 10\%$ ，对于液体或固体气溶胶，平均浓度不应超过 $\pm 20\%$ ，应计算和记录腔室的平衡时间（ t_{95} ）。

5.7.2 粒径监测

在发生系统中，应进行粒度分析，以确保气溶胶浓度的稳定性。推荐可吸入质量中值空气动力学直径（MMAD）应该在 $1\sim 4\ \mu\text{m}$ ，几何标准差（ σ ）在 $1.5\sim 3.0$ 。在染毒期间，需经常进行粒度分析，以测定粒度分布的一致性。如达不到要求，应说明理由。

气溶胶粒径的测定需在染毒 4 小时内至少采样 2 次，可采用级联撞击采样器或其他设备如气体动力学粒径仪等，粒径分析所得质量浓度应处于由滤膜分析法所得质量浓度的合理的限度范围内。

5.7.3 暴露系统内环境监测

染毒装置内气流：染毒装置应配备动态气流，口鼻吸入染毒过程中应使装置内保持轻度负压，全身暴露装置染毒柜内应密闭，以防止受试物泄露到外部环境中。暴露期间尽可能连续监测并每小时记录 1 次，在暴露系统中，氧气浓度应至少为 19%，二氧化碳浓度不得超过 1%，如果达不到要求，应定期监测氧气和二氧化碳浓度。

染毒装置内温度保持在 $22\pm 3^\circ\text{C}$ ，口鼻暴露和全身暴露都需监测记录动物呼吸区的相对湿度，试验期间应至少监测和记录三次，较短时间内每半小时测一次。理想的相对湿度一般在 30%~70%，但在某些情况下，可能无法达到（例如在测试水溶液型受试物时），应在试验报告中予以阐释说明。

5.8 临床观察

在暴露刚开始当天至少进行两次临床观察，或者根据动物反应，进行更频繁观察。观察期限最少为 14 d，以后每天至少进行一次观察。中毒体征出现和消失的时间都十分重要，特别是在有中毒体征延迟趋势时。动物濒死、疼痛剧烈与严重且持久的痛苦皆应予以安乐死。当动物被安乐死，或者发现死亡时，应该尽可能准确记录死亡时间。所有的观察应该被系统地记录，每个动物应该保持单独记录。

观察内容应该包括皮毛，眼睛和黏膜，呼吸，循环，自主和中枢神经系统，肢体活动和行为的改变。应该记录可能的局部和全身反应的差别。要注意有无震颤、惊厥、流涎、腹泻、昏睡、睡眠和昏迷症状。测试直肠温度可为出现反射性呼吸迟缓、C-纤维刺激反射或与给药方式或封闭相关的低温/高热情况提供佐证。

每只动物体重应该在暴露前一天到暴露（day 0），并且至少在第 1 天、第 3 天和第 7

天（以及此后每周），以及在第 1 天后的死亡或安乐死时进行记录。若动物体重出现 $\geq 20\%$ 的持续递减，应该进行密切监测。在暴露结束后，应测量存活动物的体重，并实施安乐死。

5.9 病理检查

所有实验的动物，包括在实验中死亡的，或者出于动物福利原因被安乐死以及从试验中撤离的，应该进行大体解剖。如果动物被发现死亡后，应尽可能快地进行尸体解剖，通常在 1~2 d 内，如不能被立即进行尸体解剖，动物应该被冷藏，以尽量减少自溶。记录每个动物的大体病理变化，并特别注意呼吸道改变。其他附加检查可为研究提供更为深入的解释价值，例如测量存活大鼠肺的重量，和/或提供呼吸道刺激性的显微镜检查证据，对死亡和存活 24 h 及 24 h 以上的动物中存在大体病理改变的器官进行组织病理学检查。如受试物对水有反应（如酸和吸湿性受试物），可开展整个呼吸道的显微镜检查。

5.10 LC₅₀ 的计算

一般可采用多种方法测定 LC₅₀，建议采用一次最大限度试验法、霍恩氏法、概率单位一对数图解法和寇氏法等。

5.11 试验结果评价

5.11.1 结果处理

应该提供每只动物的体重和尸检发现的数据。临床观察数据应该以表格的形式呈现，统计出各实验组使用的动物的数量，出现特殊中毒特征的动物数量，实验中死亡或者人道处死的动物数量，动物个体的死亡时间，毒副作用的描述和时间进程，可逆体征以及尸检发现。

5.11.2 结果评价

评价试验结果时，应将 LC₅₀ 与观察到的毒性效应和尸检结果相结合考虑，LC₅₀ 值是受试物急性毒性分级及判定受试物经呼吸道吸入后引起动物死亡可能性大小的依据，引用 LC₅₀ 值时一定要注明所用实验动物的种属、性别、暴露方式及时间长短、观察期限等。评价应包括受试物吸入暴露剂量与动物异常表现（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 吸入毒性分级

分级	气体 (ppm)	蒸气 (mg/L, 4 h)	粉尘和雾 (mg/L, 4 h)
第 1 类	LC ₅₀ ≤100	LC ₅₀ ≤0.5	LC ₅₀ ≤0.05
第 2 类	100<LC ₅₀ ≤500	0.5<LC ₅₀ ≤2.0	0.05<LC ₅₀ ≤0.5
第 3 类	500<LC ₅₀ ≤2500	2.0<LC ₅₀ ≤10	0.5<LC ₅₀ ≤1.0
第 4 类	2500<LC ₅₀ ≤20000	10<LC ₅₀ ≤20	1.0<LC ₅₀ ≤5
第 5 类	>20000	>20	>5

注：分类标准引用《全球化学品统一分类和标签制度》(GHS)。第 5 类的标准旨在识别急毒性危险相对较低，但在某些环境下可能对易受害人群造成危险的物质，这些物质的 LC_{50} 范围预计值分别为：气体大于 20000 ppm，蒸气大于 20 mg/L，粉尘和雾大于 5 mg/L，如果现有的可靠证据表明 LC_{50} 在第 5 类的数值范围内，或者其他动物研究或人类毒性效应表明对人类健康有急性影响，那么物质划入此类别。为保护动物，不应在第 5 类范围内对动物进行试验，只有在这样的试验结果与保护人类健康直接相关的可能性非常大时，才应考虑进行这样的试验。

6 试验结果的解释

急性吸入毒性试验研究和 LC_{50} 的测定，可评价受试物的急性吸入毒性及其毒性等级，其结果外推到人类的有效性很有限。