

附件 8

28 天重复剂量经口毒性试验方法

Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study

1 范围

本规范规定了啮齿类动物 28 天重复剂量经口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的 28 天重复剂量经口毒性的评价。

2 试验目的

通过本试验确定 28 天经口连续接触化妆品原料引起的毒性效应，了解其作用靶器官和剂量-反应关系，并估计未观察到有害作用剂量，初步评价化妆品原料经口的安全性，并为慢性经口毒性试验的剂量、观察指标、毒性终点的选择提供参考信息。

3 定义

未观察到有害作用剂量 no-observed adverse effect level (NOAEL)

是指通过动物试验，以现有的技术手段和检测指标未观察到任何与受试物有关的毒性作用的最大剂量。

4 试验基本原则

化妆品原料以不同剂量每日经口给予各组实验动物，连续染毒 28 天。实验期间每日观察动物的毒性反应，死亡或濒死动物尽可能进行大体解剖、血液生化指标检测及组织病理学检查。实验结束后所有存活动物实施安乐死后进行大体解剖、临床检查。部分实验动物的组织器官进行组织病理学检查。

5 试验方法

5.1 实验动物

5.1.1 动物选择

实验动物应符合国家标准相应规定。选择已有资料证明对受试物敏感的动物物种和品系，啮齿类动物通常首选年轻的成年大鼠（一般选用 6~8 周龄，不超过 9 周龄），试验开始时动物体重的差异应不超过平均体重的±20%。如果长期毒性试验的剂量设计需要参考该试验的剂量设计，则两个试验应选用相同种系和来源的实验动物。

每组实验动物至少 10 只（雌雄各半），如果试验中期计划剖检动物，则应相应增加每组动物数量。另外，对照组和最高剂量组均应设定一个卫星组（每组 10 只，雌雄各半），在染毒结束后继续观察至少 14 d，用于了解受试物毒性作用的持续性、可逆性和迟发性。

5.1.2 饲养条件

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。动物按组别、性别分笼饲养，每笼动物数量应满足动物最低需要的空间，不影响动物自由活动和观察动物的体征为宜。

5.2 剂量设计

至少设定 3 个受试物剂量组和 1 个对照组。除不接触受试物外，对照组的其余处理均与受试物剂量组相同。最高剂量应能引起动物毒性反应，而不引起动物死亡或严重毒性反应；最低剂量应不出现任何可观察到的毒性效应，能确定 NOAEL，若有人群接触水平的资料，则最低剂量应高于人群实际接触水平；中剂量介于高、低剂量之间，可出现轻度的毒性效应，若设多个中间剂量，则各剂量应引起不同程度的毒性作用。

如果有资料表明，化妆品原料接触水平超过 1000 mg/kg BW/d 时不会产生可观察到的毒性作用，而且可以根据相关结构化合物预期其毒性时，可考虑不进行三个剂量水平的试验。

5.3 受试物制备

当受试物需使用溶媒配制成溶液或混悬液时，溶媒首选水，其次为植物油（如橄榄油、玉米油等），不溶于水或油的受试物亦可使用羧甲基纤维素、淀粉等配成混悬液。如果使用其他溶媒时，必须先了解其毒性特点。

5.4 试验步骤

实验开始前，实验动物需适应实验环境至少 5 d。实验动物随机分组。受试物可通过灌胃、掺入饲料或饮水进行染毒，具体方法应当根据受试物的物理、化学特性及其毒代动力学试验结果而定。试验期间所有动物染毒的方式应完全相同。

5.4.1 灌胃

灌胃体积一般不超过 10 mL/kg BW，且各组染毒体积相同，每日在大致相同时间段灌胃，每周至少称体重 2 次，根据体重调整灌胃体积。如为水溶性的受试物最大灌胃体积可达到 20 mL/kg BW。当受试物使用溶媒配制时，对照组应给予相同体积的溶媒。

5.4.2 掺入饲料

以不影响动物摄食、营养平衡为原则，将受试物与饲料充分混匀并保证受试物配制物的稳定性和均一性。受试物掺入量一般不超过 5% (w/w)，>5%时需调整饲料营养素水平，使各剂量组与对照组饲料营养素水平一致。

5.4.3 掺入饮水

以不影响动物饮水量为原则，将受试物与水混匀并保证溶液的稳定性和均一性。每日新鲜配制。

5.5 观察指标

5.5.1 临床观察

观察期限为 28 d。卫星组在实验结束后还要继续观察至少 14 d，不做任何处理，以了解毒性作用的可逆性、持续性及迟发性。每日应至少观察动物 1 次，观察时间段尽量相同，或在预期毒性反应出现的时间段观察，记录毒性反应的症状、发生时间、持续时间等。如果出现毒性反应，则应适当增加每日观察次数。

观察应至少包括如下内容：皮肤和被毛的改变、眼和粘膜变化、呼吸、循环、植物神经和中枢神经系统、肢体运动和行为活动等改变。

5.5.2 体重、摄食量及饮水消耗量

应记录和计算每周的体重、摄食量变化。当通过饮水染毒时应记录每日饮水量。如受试物经掺入饲料或饮水给予，应计算和报告受试物各剂量组实际摄入剂量。

5.5.3 临床检查

进行临床检查前动物应禁食过夜，麻醉后取空腹血测定。

5.5.3.1 血液学检查

在染毒结束及卫星组观察结束后，应测定白细胞计数及分类、红细胞计数、红细胞压积、血红蛋白浓度、血小板计数、网织红细胞计数、凝血功能。如果受试物或其代谢物具有氧化性，还应测定高铁血红蛋白浓度和海因茨小体。

5.5.3.2 血清生化检查

在染毒结束及卫星组观察结束后进行，检查指标包括电解质平衡、碳水化合物代谢、肝、肾功能。可根据受试物作用特点选择其他特殊检查。指标包括：钠离子、钾离子、葡萄糖、总胆固醇、尿素、肌酐、总蛋白、白蛋白、至少两种反映肝功能的酶（如丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、 γ -谷氨酰转移酶和山梨醇脱氢酶等）、胆酸。

根据受试物已有信息，必要时可增加一些血清标志物的测定，如钙、磷、甘油三酯、激素、胆碱酯酶等。

此外，还可根据所观察到的毒性作用进行其它的临床生化检查，以便进行全面的毒性评价。

5.5.3.3 尿液检查

一般不需要检查。如果根据受试物的作用特点需要进行尿液检查的时候，应在试验的最后一周收集尿液，记录尿液外观，测定尿比重、pH、尿蛋白、尿糖和潜血等。

5.5.3.4 血浆或血清可以-20℃保存，当受试物可能有内分泌效应时，用于检测甲状腺激素（T₃、T₄）和促甲状腺激素（TSH）。

5.5.4 组织病理学检查

5.5.4.1 大体解剖

所有动物均应进行系统的大体解剖，内容包括动物的体表、颅、胸、腹腔及其脏器。需要剖检的脏器有：心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、睾丸、附睾、子宫（含子宫颈）、卵巢、前列腺+精囊（含凝固腺）、胸腺、眼、脑（包括大脑、小脑、延髓/脑桥）、甲状腺/甲状旁

腺、气管、胃、小肠和大肠（十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠）及肠系膜淋巴结、膀胱、阴道、胸骨（包括骨髓）、骨骼肌、坐骨神经、脊髓（包括颈、胸、腰段）和病变组织。将上述组织和器官保存在固定液中，以备组织病理学检查。

需要称量的脏器有：心、肝、脾、肾、肾上腺、睾丸、附睾、子宫、卵巢、前列腺+精囊（含凝固腺）、胸腺、脑、甲状腺。计算脏器系数（以 g/100g BW 或 mg/100g BW 表示），上述脏器应在分离后尽快称重以防水分丢失。

当毒性作用提示可能为受试物的靶器官时，也需要剖检并进行组织病理学检查。

当受试物可能有内分泌效应时，应关注内分泌敏感指标。必选指标有睾丸、附睾、前列腺+精囊（含凝固腺）、肾上腺重量及睾丸、附睾、前列腺+精囊（含凝固腺）、卵巢、子宫（含子宫颈）、肾上腺、甲状腺、阴道组织病理学检查。可选指标有卵巢、子宫（含子宫颈）、甲状腺重量及雌性阴道涂片、雄性乳腺、垂体组织病理学检查。雌性动物阴道涂片，用于推断动物的动情周期与性腺器官组织器官组织结构是否同步，同步性发生改变提示受试物有内分泌干扰效应。

5.5.4.2 组织病理学检查

应对以下组织器官进行检查，病变组织给出组织病理学照片：

（1）对照组、最高剂量组剖检的组织器官需进行病理学检查。如果最高剂量组某组织器官出现病理学改变，则其它剂量组的相应组织器官也应进行病理学检查。

（2）各剂量组大体解剖肉眼观察有异常的组织器官。

（3）在受试物剂量组出现毒性作用的组织器官，卫星组应对其进行病理学检查。

6 试验结果评价

对所有数据应采用适当的统计学方法进行分析。将临床观察、组织病理学检查结果，结合体重、摄食量、临床检查数据统计结果进行综合分析，初步判断受试物的毒性作用特点、剂量-反应关系、可逆性、迟发性等，确定受试物作用靶器官及 NOAEL，初步评价受试物经口安全性，为进一步的毒性试验提供参考信息。

7 试验结果的解释

28 天重复剂量经口毒性试验能提供在较短时间内经口重复接触受试物引起的毒性作用资料。由于动物和人存在物种差异，试验结果外推到人有一定的局限性，但可为初步估计人群允许暴露水平提供有价值的信息。