

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ×××××—××××

农药透皮吸收评估指南

Guidance on assessment of pesticide dermal absorption

(征求意见稿)

×××× - ×× - ××发布

×××× - ×× - ××实施

中华人民共和国农业部

发布

前言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：农业部农药检定所。

本标准主要起草人：

农药透皮吸收评估指南

1 范围

本标准规定了农药透皮吸收的评估程序和方法。

本标准适用于农药健康风险评估中涉及到的透皮吸收评估。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 19378—2007 农药剂型名称及代码;

GB 14925—2010 实验动物环境及设施;

中华人民共和国农业部公告 第2570号《农药登记试验质量管理规范》。

3 术语和定义

GB/T 19378—2007规定的农药剂型名称及代码及下列术语适用于本文件。

3.1

透皮吸收 **dermal absorption**

被试物通过皮肤进入体内循环系统,并导致系统暴露于被试物及其代谢物的过程,也称为经皮吸收。

3.2

经皮渗透 **dermal penetration**

被试物通过离体皮肤进入到接收液中的过程。

3.3

吸收量(体外试验) **absorbed dose (in vitro)**

在特定时间内,被试物透过皮肤进入接收液的量。

3.4

吸收量(体内试验) **absorbed dose (in vivo)**

移除皮肤受试部位的装置后,存在于动物排泄物、笼具清洗液、呼出气(如果检测)、血液、组织(如果收集)、尸体中的被试物的量。

3.5

可吸收量(体外和体内试验) **absorbable dose (in vitro and in vivo)**

染毒暴露结束并清洗皮肤后,残留在皮肤表面或皮肤中的被试物的量。

3. 6

未吸收量 unabsorbed dose

染毒暴露结束后, 从皮肤表面清洗下的被试物的量, 附着在开放性覆盖物上的被试物的量, 以及在暴露过程中从皮肤表面挥发的量。

3. 7

吸收率 percentage absorption

被试物吸收量与可吸收量的和占被试物用于试验的量的百分率。

3. 8

染毒剂量 applied dose

染毒于每平方厘米皮肤上的被试物的量。

3. 9

暴露时间 exposure period

从被试物染毒于皮肤至从皮肤上被清洗去除的时间。

3. 10

有限剂量 finite dose

皮肤染毒过程中, 在一定时间内, 被试物达到皮肤最大吸收率但不维持不变的剂量。

3. 11

完整皮肤 full-thickness skin

包括角质层, 有活性的表皮和真皮, 厚度500-1000 μm 。

3. 12

裂层皮肤 split-thickness skin

用植皮刀去除下层皮肤组织, 获得均一形状和厚度的皮肤, 厚度200-500 μm 。

3. 13

正辛醇/水分配系数 octanol/water partition coefficient, K_{ow}

化学物质在正辛醇相和水相达到分配平衡后, 在两相的浓度比值。

4 评估程序

农药透皮吸收评估程序遵照附录A。

农药健康风险评估中, 经皮暴露途径评估部分, 当缺少经皮染毒毒性试验数据时, 可采用经口染毒毒性数据替代, 并用透皮吸收率修正。农药透皮吸收可采用分级评估的方式获得农药透皮吸收率, 也可以直接选择较高级别的评估方法。

一级评估是指在缺少透皮吸收试验数据时, 采用最保守的透皮吸收率默认值100%。

二级评估是指采用一级评估的透皮吸收率开展健康风险评估, 风险不可接受时, 可根据被评估农药制剂的剂型, 对透皮吸收率默认值进行优化, 以降低透皮吸收率默认值。

三级评估是指采用一级或二级的透皮吸收率开展健康风险评估，风险不可接受时，可开展体外或体内任意一项单项试验，获得农药透皮吸收率。或开展体外及体内组合试验，用动物和人体皮肤体外试验修正动物体内试验的透皮吸收率，获得更符合人体实际的农药透皮吸收率。

四级评估是指测试实际暴露过程的透皮吸收率。

本文件阐述一级至三级农药透皮吸收评估方法。

5 一级评估

在缺少透皮吸收试验数据时，假设实际暴露为最坏情况，选择最保守的透皮吸收率默认值100%，实现高水平保护。若采用此默认值开展健康风险评估，风险可以接受，则不需要进一步的透皮吸收评估。

6 二级评估

农药的透皮吸收率与制剂剂型及暴露时有效成分的浓度等因素有关，当采用100%透皮吸收率默认值，风险不可接受时，可根据透皮吸收的影响因素，基于现有数据进行科学性评估，优化透皮吸收率默认值，对默认值的优化需提供充分理由及依据。

7 三级评估

7.1 试验选择原则

透皮吸收三级评估可按以下原则开展试验：

- a) 三级评估时，可任选透皮吸收单项试验或组合试验，可优先选择单项试验。
- b) 透皮吸收单项试验可按从体外到体内的顺序选择。体外试验优先选择人体皮肤体外试验，其次为动物皮肤体外试验。体内单项试验仅可选择动物体内试验。
- c) 透皮吸收组合试验通常组合为大鼠体外透皮吸收试验、人体外透皮吸收试验、大鼠体内透皮吸收试验。

7.2 数据选择与计算原则

透皮吸收三级评估对试验数据的选择与计算应遵循以下原则：

- a) 如果同时具备动物体外、体内及人体外透皮吸收单项试验数据。
 - 1) 当各单项试验满足本指南 7.6.1 及 7.6.2 所述的匹配条件时，可按组合试验计算方法得到透皮吸收率修正值。
 - 2) 当各单项试验不满足本指南 7.6.1 及 7.6.2 所述的匹配条件时，优先使用人体外试验数据用于健康风险评估。
 - 3) 当组合试验所得透皮吸收率修正值 > 单项人体外透皮吸收试验所得透皮吸收率值时，选择较低的人体外透皮吸收率用于健康风险评估。
- b) 如果具备多项动物体内或体外试验，获得多个透皮吸收率值，且试验均符合中华人民共和国农业部公告 第 2570 号《农药登记试验质量管理规范》的要求，则选择透皮吸收率最低值用于风险评估。
- c) 透皮吸收率最终结果保留两位有效数字。

- d) 当体外或体内试验各组重复值之间存在显著变异（标准差≥平均值的 25%），应剔除离群值，采用平均值±标准差计算，并提出试验有效性证据，必要时重新开展试验。
- e) 被试物的浓度应符合人的实际接触水平。对于制剂稀释液的透皮吸收评估，试验剂量设计需覆盖产品标签上推荐的最大稀释倍数（最低使用浓度）。
 - 1) 如果试验最低剂量比标签推荐的最大稀释倍数高，应按线性比例增加试验得到的透皮吸收率结果。
 - 2) 如果试验中各剂量组的透皮吸收试验结果没有剂量与吸收量关系，则不需要校正透皮吸收率。
 - 3) 如果按比例校正的值高于制剂稀释液默认值，选择默认值用于健康风险评估。

7.3 贴条法

贴条法是透皮吸收体外或体内试验结束后进行的操作，将胶带粘贴到暴露于化学物质的皮肤表面并适当按压，然后撕下胶带，角质层与胶带一起从表皮分离，此过程重复进行，直到胶带与皮肤表面不再黏着。分析胶带所剥离下的角质层中化学物质的量。

7.4 透皮吸收体外试验

7.4.1 试验概述

被试物（可以放射性标记）作用于位于扩散池两个室之间的皮肤表面，在特定条件下作用一定时间后清洗掉被试物。在试验期间对接收液定时取样并分析测定其中被试物和代谢物（当使用代谢活化系统时）。

通过对接收液和受试皮肤的分析测定，获得在给定时间内，皮肤对被试物的吸收。分析从皮肤上洗下和残留在皮肤中的被试物，获得被试物的分布情况及回收百分率等更多试验信息。

7.4.2 试验方法

7.4.2.1 被试物

被试物可以放射性标记（需明确放射性物质的活性和纯度）。

被试物的制备应与人类可能接触该被试物的形态一致，任何偏离使用状况的情况应合理解释。通常将被试物配制成系列浓度，其浓度范围应覆盖人类实际接触的可能暴露范围。固体被试物，如粉剂，应用水或生理盐水湿润，制成糊状，模仿正常使用状态（环境湿度和皮肤上的汗水存在的情况）。颗粒状被试物在试验前应先磨碎。

被试物配制过程中需确保其稳定性和均一性，对于固体和半固体试验配制液和混悬液，需验证其中被试物的均一性。

7.4.2.2 试验体系

7.4.2.2.1 扩散池

扩散池有多种类型，静态和流动态的扩散池均可使用。扩散池由供给室和接收室组成，受试皮肤放置在两个室之间。扩散池需满足以下条件：

- a) 一组扩散池中的每个池表面积相同，通常在 $0.3\text{--}5\text{ cm}^2$ ；
- b) 由惰性材料制成，减少与被试物的相互作用；
- c) 可在皮肤周围提供很好的密封效果，以易于采样和混匀与皮肤底面接触的接收液，以及控制扩散池及其内容物的温度；
- d) 供给室的设计应满足允许封闭（对于挥发性被试物供给室需封闭）和容易移除试验材料。

7.4.2.2.2 接收液

透皮吸收体外试验所选择的接收液应对被试物有足够的溶解度，且不能影响皮肤的完整性，可选择接收液如下：

a) 对于无代谢活性的皮肤，水溶性被试物的接收液通常是盐溶液，pH 值 7.4；脂溶性被试物的接收液可包含有机溶剂，如 1:1 的乙醇：水或 6%的聚乙二醇 20 油醚水溶液。

b) 对于有代谢活性的皮肤，选择生理性接收液，如组织培养液。当被试物为非极性时，可通过加入 6%的聚乙二醇 20 油醚或 5%牛血清蛋白提高溶解度。

c) 对于未经放射性同位素标记的被试物，接收液需避免干扰样品分析。

接收液的体积及流速可选择如下：

a) 静态试验系统中，接收液的体积（通常为 2-20 mL）不可限制被试物的透皮吸收。需持续搅拌接收液并定期取样。

b) 流动态试验系统中，足够的流速可防止反向扩散，同时，液体的流速不可阻碍被试物向接收液中扩散，接收室中皮肤下方接收液的体积通常为 0.1-5 mL，并被不断补充。

c) 通常 3 mL 的接收室，接收液流速为 9 mL/h, 150-300 μ L 的接收室，接收液的流速为 1.5 mL/h。

d) 当未经放射性标记的被试物在接收液中的浓度过低时宜采用更慢的流速。

7.4.2.2.3 受试皮肤制备

a) 人体皮肤最相关，大鼠和猪的皮肤较常用，其中大鼠的皮肤最常用。

b) 人皮肤通常选择腹部或胸部。猪皮肤常用侧身和耳朵，其次是背部和四肢。大鼠皮肤通常选背部或腹部，当需要与体内试验相匹配时，选择背部皮肤。

c) 优先选择新鲜的离体皮肤，其次是一次冻存皮肤，不具活性的皮肤需证明完整性，人造皮肤模型需验证其透皮吸收效果与天然皮肤的一致性。

d) 可使用通过酶、加热或化学方法分离得到的表皮膜，或用植皮刀去除下层皮下组织得到的裂层皮肤（厚度 200-500 μ m）。当使用完整皮肤时其厚度不应超过 1 mm。

7.4.2.3 皮肤染毒

根据人类可能接触被试物的情况，一般选择有限剂量染毒。染毒剂量应模仿人类暴露量，通常为固体样品 1~5 mg/cm²，上限为 10 mg/cm²，液体样品上限为 10 μ L/cm²。可根据具体试验条件、试验目的以及样品物理性质调整染毒剂量。

试验过程中扩散池和皮肤需保持接近正常活体皮肤的温度（32±1°C）。湿度保持在 30%~70%。

7.4.2.4 暴露时间和采样频率

被试物对皮肤的染毒暴露时间可以是完整的试验过程，也可以较短（如模拟人类的特定暴露形式）。对于有限剂量染毒的体外透皮吸收试验，暴露时间（从染毒到皮肤清洗的时间；或在不清洗的情况下，从染毒到试验结束的时间）应反映被试物的实际使用情况。一般为 24 h，超过 24 h 将影响皮肤的完整性。对于穿透速度慢的被试物，需适当延长暴露时间。

接收液的采样频率应满足能够以作图形式表现被试物的透皮吸收情况。24 h 的暴露时间内通常需要 6-12 个采样点，实际采样频率需基于试验前信息（如被试物理化性质等）。在静态试验系统中，更换新鲜接收液后，需对接收液体积改变进行校正。

7.4.2.5 染毒及试验结束处理

染毒结束后，移除供给室中剩余的被试物待测，用适当的清洁剂洗掉皮肤上多余的被试物，收集清洗液待测。

7.4.2.6 样品分析

对试验系统的所有组成部分均应进行分析测定，并确定回收率。其中包括供给室清洗液、皮肤清洗液、皮肤、接收液和接收室清洗液。

试验应得到足够的回收率，放射性标记试验的回收率为 100%±10%，若偏离应合理解释，必要时重新进行试验。未经放射性标记试验的回收率可在 100%±20% 之间，若偏离应合理解释，必要时重新进行试验。

回收率计算公式如下：

$$\text{回收率} = \frac{\text{吸收量} + \text{未吸收量} + \text{可吸收量}}{\text{被试物用于试验的量}} \times 100\% \quad (1)$$

7.4.3 透皮吸收率计算

透皮吸收率计算公式如下：

$$\text{透皮吸收率} = \frac{\text{吸收量} + \text{可吸收量}}{\text{被试物用于试验的量}} \times 100\% \quad (2)$$

当采用贴条法时，根据以下不同情况计算透皮吸收率：

a) 试验周期 $\geq 24\text{ h}$ ，并且在试验周期的前一半时间吸收量 \geq 总吸收量的75%时，

$$\text{透皮吸收率} = \frac{\text{吸收量} + \text{皮肤中被试物的量 (排除所有胶带)}}{\text{被试物用于试验的量}} \times 100\% \quad (3)$$

b) 试验周期 $< 24\text{ h}$ ，或者在试验周期的前一半时间吸收量 $<$ 总吸收量的75%，

- 如果胶带单独分析，则第1, 2次胶带不参与吸收量计算，

$$\text{透皮吸收率} = \frac{\text{吸收量} + \text{皮肤中被试物的量 (排除第1, 2次胶带)}}{\text{被试物用于试验的量}} \times 100\% \quad (4)$$

- 如果胶带未单独分析，则所有胶带参与计算，

$$\text{透皮吸收率} = \frac{\text{吸收量} + \text{皮肤中被试物的量 (包括所有胶带)}}{\text{被试物用于试验的量}} \times 100\% \quad (5)$$

7.5 透皮吸收体内试验

7.5.1 试验概述

被试物（可以用放射性标记）按符合实际使用情况配制，染毒于动物剃毛后的皮肤上。

被试物制剂与皮肤接触一定时间（符合人类暴露时间），并覆盖合适的材料以防被动物舔舐。暴露结束后取下覆盖物，用适当的清洁剂清洗动物皮肤并换上新的覆盖物，取下的覆盖物和清洗液保存待测。

试验前、试验期间和试验结束后，动物需单独饲养于代谢笼中，收集其排泄物和呼出气待测。如果有充足证据表明极少产生或不产生挥发性的放射性代谢产物，则可以不收集动物呼出气。

每个试验通常包括多个试验组，其中一个试验组动物在染毒结束后立即处死，其他试验组动物在计划的时间间隔处死。采样结束后处死存活动物，采集血液及染毒部位皮肤进行分析，并分析动物尸体内未被排泄的代谢物。最后对采集的样品进行分析测定，并评价透皮吸收率。

7.5.2 试验方法

7.5.2.1 被试物

被试物的制备应与人类可能接触该被试物的形态一致，任何偏离使用情况的制备应合理解释。必要时将被试物溶解或均匀分散于溶媒中。除水之外的溶媒需了解其皮肤吸收特征以及与被试物的相互作用。

7.5.2.2 实验动物

大鼠最常用，透皮吸收率和人类更相似的裸鼠以及其他品系动物也可使用。一般选用成年健康的单性别动物（默认用雄性，如有资料表明被试物的经皮毒性有明显的雌雄性别差异，应选择更敏感性别）。试验开始时，实验动物体重差异不应大于平均体重的20%。

每个被试物剂量和每个设定的观察时间点需设一个试验组, 每组至少 4 只相同性别动物, 在不同时间间隔处死一组动物, 可选择在染毒结束时 (通常是 6 h 或 24 h) 和后续观察期结束时 (例如 48 h 和 72 h)。

动物单笼饲养。动物饲养环境应符合 GB 14925 的有关规定。选用常规饲料、饮水量不限。试验前动物应在饲养环境中至少驯化检疫 5 d。

动物驯化期后 (大约染毒前 24 h, 最好 16 h), 将每只实验动物预染毒部位剃毛 (剃毛面积应足够大, 以便较准确计算出每平方厘米皮肤上被试物的吸收量), 注意避免损伤皮肤, 以防改变皮肤的渗透性。剃毛后用丙酮擦拭皮肤除去皮脂, 不建议另用肥皂和水清洗皮肤。

7.5.2.3 皮肤染毒

7.5.2.3.1 染毒剂量及方法

染毒剂量应模拟人类潜在暴露量, 通常为固体样品 $1\sim 5 \text{ mg/cm}^2$, 液体样品最大 $10 \text{ }\mu\text{L/cm}^2$ 。可根据试验具体条件、试验目的以及样品物理性质调整染毒剂量。

被试物应通过染毒装置进行皮肤染毒, 染毒装置不能损伤动物皮肤, 也不能吸收或与被试物发生反应, 且需防止被试物扩散到定义区域外。通常是在使用氰基丙烯酸酯粘合剂来限制染毒的皮肤区域之前, 用一个环状惰性材料 (例如 O 型橡胶圈, PTFE 环, 一次性烧杯等) 粘在被去毛区域的皮肤上。染毒装置必须被覆盖, 例如, 可用纱布粘在惰性环上来保护试验制剂, 避免其意外去除或扩散。

染毒时明确界定皮肤表面的每一块特定的染毒部位, 将已知量的被试物均匀涂抹在染毒部位。如果使用涂布器来均匀涂布, 应校正染毒剂量损失。

染毒后, 要防止动物舔舐或抓挠染毒部位, 一般染毒部位不需封闭, 但超过 24 小时染毒需封闭染毒部位。

被试物的回收率有可能因其具有挥发性而降低, 如果降到不可接受的程度, 需在染毒装置上安装活性炭过滤器吸附回收挥发的被试物。

7.5.2.3.2 暴露时间和采样频率

体内试验染毒暴露时间是指从皮肤染毒开始到清洗皮肤去除被试物为止。染毒暴露时间应参考人类可能接触被试物的时间。试验期间定期观察动物临床症状以及异常状态。暴露结束后观察记录染毒部位皮肤刺激症状。

在每一个采样点, 分开收集每组中每只动物的尿液、粪便以及呼出气。如有足够信息证明很少 (呼出的放射性标记的 CO_2 和挥发性化合物的量 $\leq 5\%$) 或不产生挥发性代谢产物, 可使用开放式代谢笼。

在试验中全程收集动物排泄物, 包括染毒开始后 24 h 内及之后的每天, 直至试验结束。一般采集 3 次较为合适, 根据试验目的和现有的动力学资料可增加或调整采样时间点。

7.5.2.3.3 染毒及试验结束后处理

染毒结束后, 拆除试验动物的保护装置, 保存待测。清洗动物染毒部位的皮肤且避免污染动物身体其他部位。清洗液保存待测。作为后续采样点的动物, 在将其放回各自代谢笼之前要使用新的覆盖物保护染毒部位皮肤。

试验结束后, 处死动物并采集血样待测, 采用贴条法, 分离皮肤角质层。

收集完代谢笼中动物的排泄物后, 用适当的溶剂清洗笼具, 清洗液保存待测。其他有可能被污染的器具也要清洗, 清洗液保存待测。

7.5.2.4 样品分析

对以下试验系统组成部分中的被试物和/或代谢物进行分析测定:

- 染毒系统 (例如涂布器、O 型环、覆盖物、绷带、活性炭等);
- 皮肤表面的可去除剂量 (清洗液等);
- 染毒部位皮肤 (角质层、表皮、真皮);
- 尿 (动物在处死时膀胱中的尿液应与之前收集的尿液合并在一起进行测定)、粪、笼具清洗液;

- 血液、未染毒的皮肤组织（可选）和尸体；
- 其他潜在污染物质的清洗液。

试验应得到足够的回收率，放射性标记试验的回收率为 $100\% \pm 10\%$ ，若偏离应合理解释，必要时重新进行实验。未经放射性标记试验的回收率可在 $100\% \pm 20\%$ 之间，若偏离应合理解释，必要时重新进行实验。

回收率计算公式如下：

$$\text{回收率} = \frac{\text{吸收量} + \text{未吸收量} + \text{可吸收量}}{\text{被试物用于试验的量}} \times 100\% \dots\dots\dots (6)$$

7.5.2.5 透皮吸收率计算

根据以下不同情况计算透皮吸收率：

a) 试验周期 $\geq 24\text{ h}$ ，并且在试验周期的前一半时间吸收量 \geq 试验结束时总吸收量的 75%，则所有胶带不参与计算。

$$\text{透皮吸收率} = \frac{\text{吸收量} + \text{受试部位皮肤中被试物的量 (排除所有胶带)}}{\text{被试物用于试验的量}} \times 100\% \dots\dots\dots (7)$$

b) 试验周期 $< 24\text{ h}$ ，或者在试验周期的前一半时间吸收量 $<$ 试验结束时总吸收量的 75%，

- 如果胶带单独分析，第1，2次胶带不参与吸收量计算：

$$\text{透皮吸收率} = \frac{\text{吸收量} + \text{受试部位皮肤中被试物的量 (排除第1, 2次胶带)}}{\text{被试物用于试验的量}} \times 100\% \dots\dots\dots (8)$$

- 如果胶带未单独分析，所有胶带参与计算：

$$\text{透皮吸收率} = \frac{\text{吸收量} + \text{受试部位皮肤中被试物的量 (包括所有胶带)}}{\text{被试物用于试验的量}} \times 100\% \dots\dots\dots (9)$$

7.6 透皮吸收组合试验

透皮吸收组合试验中的体外、体内单项试验方法遵照本指南7.4、7.5部分，组合试验中的单项试验之间需满足的要求遵照本指南7.6.1及7.6.2部分。

7.6.1 组合试验对体外试验之间的要求

为确保科学有效性，动物和人体外试验中，可能影响试验结果的变量需要很好的匹配，包括但不限于以下试验因素：

- 皮肤类型（例如，都使用裂层皮肤）；
- 试验材料、溶媒、有效成分浓度、单位面积皮肤上有效成分的量；
- 封闭情况、暴露时间和采样频率；
- 接收液的成分；
- 清洗方法；
- 分析方法。

7.6.2 组合试验对体内试验和体外试验之间的要求

为确保科学有效性, 动物体内试验和动物体外试验中, 可能影响试验结果的变量需要很好的匹配, 包括但不限于以下试验因素:

- 动物种/品系;
 - 皮肤染毒部位;
 - 试验材料、溶媒、有效成分浓度、单位面积皮肤上有效成分的量;
 - 封闭情况、暴露时间和采样频率;
 - 清洗方法;
 - 分析方法。

7.6.3 透皮吸收率计算

当体外试验之间以及体内试验与体外试验之间密切匹配时，透皮吸收率计算如下：

附录 A
(规范性附录)
农药透皮吸收评估流程图

