

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4597—2025

农药透皮吸收试验方法

Test methods for pesticide dermal absorption

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本文件起草单位：农业农村部农药检定所。

本文件主要起草人：于雪骊、张丽英、刘然、陶岭梅、陶传江。



农药透皮吸收试验方法

1 范围

本文件确立了农药透皮吸收体外及体内试验的基本原则和方法。

本文件适用于为农药登记而进行的健康风险评估高级阶段试验——农药透皮吸收试验。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 14925 实验动物 环境及设施

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

透皮吸收 dermal absorption

化学物质透过皮肤进入循环系统,最终导致系统暴露于化学物质及其代谢物的过程,也称为经皮吸收。

3.2

被试物 test substances

被测试的单一化学物质或混合物。

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或循环系统的量。

3.4

吸收量(体内试验) absorbed dose (in vivo)

在特定时间内,被试物透过皮肤后分布于动物血液、组织(如果收集)、呼出气(如果检测)、尿液、粪便、去除染毒部位皮肤后剩下的尸体以及笼具清洗液中的量。

3.5

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

暴露结束清洗皮肤后皮肤表面或皮肤中的被试物的量。

3.6

未吸收量(体外和体内试验) unabsorbed dose (in vitro and in vivo)

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

透皮吸收率 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

染毒于单位面积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

全厚皮肤 full-thickness skin

包括角质层,有活性的表皮和真皮,厚度 $500\ \mu\text{m}\sim 1000\ \mu\text{m}$ 。

3.12

刃厚皮肤 split-thickness skin

用植皮刀去除下层真皮,获得均一形状和厚度的皮肤,厚度 $200\sim 400\ \mu\text{m}$ 。

3.13

贴条法 tape stripping

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被试物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被试物的量。

4 试验目的

通过体外或体内透皮吸收试验检测农药经皮肤吸收的量,进而获得透皮吸收率,为农药健康风险评估提供分析评估数据。

5 试验概述

5.1 透皮吸收体外试验

被试物(可以放射性标记)染毒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测定其中被试物和代谢物(当使用代谢活化系统时)的量。

通过对接收液和供试皮肤的分析测定,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率等更多试验信息。

5.2 透皮吸收体内试验

被试物(可以用放射性标记)按符合实际使用情况配制,染毒于动物去毛后的皮肤。

被试物配制剂与皮肤接触一定时间(符合人体暴露时间),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,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,并分析动物尸体未被排泄的被试物和代谢物。最后对全部采集的样品进行分析测定,并评价透皮吸收率。

6 试验方法

6.1 透皮吸收体外试验

6.1.1 被试物

被试物可以放射性标记。

被试物的制备应与人体可能接触该被试物的状态一致,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。除水之外的溶媒需明确其皮肤吸收特征以及与被试物的相互作用

用。固体被试物,如粉剂,应用水湿润,制成糊状。颗粒状被试物在试验前应先磨碎。通常将被试物配制成为系列浓度,其浓度范围应覆盖人体实际接触的可能暴露范围。

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剂和混悬液,需验证其中被试物的均一性。

6.1.2 试验体系

6.1.2.1 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,供试皮肤放置在两个室之间。扩散池需满足以下条件:

- 由惰性材料制成,减少与被试物的相互作用;
- 可在皮肤周围提供很好的密封效果、易于采样和混匀与皮肤底面接触的接收液、可控制供试皮肤和接收液的温度;
- 供给室的设计应满足允许封闭和容易去除试验配制剂。

6.1.2.2 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,对于未经放射性同位素标记的被试物,接收液应避免干扰样品分析。

可使用的接收液:

- 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;脂溶性被试物的接收液可含有机溶剂;
- 对于有代谢活性的皮肤,选择生理性接收液。

接收液的体积及流速:

- 静态试验系统中,接收液的体积(通常为 2 mL~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。
- 流动态试验系统中,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 mL~5 mL,并不断补充接收液。
- 当未经放射性标记的被试物在接收液中的浓度过低时应减慢流速。

6.1.2.3 供试皮肤

- 人体皮肤或与人体皮肤透皮吸收率相近的动物皮肤均可使用,其中大鼠和猪的皮肤较常用,其他皮肤也可使用,但需证明适用性。
- 人皮肤通常选择腹部或胸部皮肤;猪皮肤通常选择侧身和耳朵部位皮肤,其次是背部和四肢部位皮肤;大鼠皮肤通常选背部或腹部皮肤,当需要与体内试验相匹配时,选择背部皮肤。
- 优先选择有活性的离体皮肤,其次是一次冻存皮肤,不具活性的皮肤需证明完整性,重组人体皮肤模型需验证其透皮吸收效果与天然皮肤的一致性。
- 可使用通过酶、加热或化学方法分离得到的表皮,或用植皮刀去除下层真皮得到的刃厚皮肤(厚度 200 μm ~400 μm)。当使用全厚皮肤时,其厚度不应超过 1 mm。

6.1.3 皮肤染毒

根据人体可能接触被试物的情况,一般选择有限剂量染毒。染毒剂量应模仿人体暴露量,通常固体样品上限 10 mg/cm²,液体样品上限为 10 μL /cm²。可根据预期使用情况、试验目的以及被试物的理化性质确定染毒剂量。每个剂量至少 4 个重复。

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)℃],湿度保持在 30%~70%。

6.1.4 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周期,也可以较短(如模拟人体的特定暴露场景)。对于有限剂量染毒的体外透皮吸收试验,暴露时间应反映被试物的实际使用情况。采样周期通常需要 24 h,对于穿透速度慢的被试物需适当延长,但超过 24 h 可能影响皮肤的完整性。

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 的试验周期通常需要 6

个~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)。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。

6.1.5 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,洗掉皮肤上多余的被试物,收集清洗液待测。

试验结束后,收集试验系统中的所有组成部分待测,可选择采用贴条法,分离皮肤角质层。

6.2 透皮吸收体内试验

6.2.1 被试物

同 6.1.1。

6.2.2 实验动物

通常选用大鼠,透皮吸收率和人体更接近的其他动物也可使用。一般选用成年健康的单性别动物(通常选用雄性,如有资料表明被试物的经皮毒性有明显的雌雄性别差异,应选用更敏感性别)。试验开始时,实验动物体重差异不应超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。

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和随后的观察期。

动物饲养条件应符合 GB 14925 的有关规定。动物食用常规饲料、自由饮水。试验前动物应检疫、适应至少5d时间。动物被标记并单笼饲养。

动物适应期后,大约在染毒前24h(至少16h),将每只实验动物预染毒部位去毛(去毛面积应满足可准确计算出单位面积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。

6.2.3 皮肤染毒

6.2.3.1 染毒剂量及方法

染毒剂量应模拟人体潜在暴露量,通常固体样品上限 10 mg/cm^2 ,液体样品上限 $10\text{ }\mu\text{L/cm}^2$ 。可根据预期使用情况、试验目的以及样品理化性质确定染毒剂量。

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,也不能吸收被试物或与被试物发生反应,且需防止被试物扩散到定义区域外。染毒装置必须被覆盖,例如可用纱布粘在惰性环上来保护被试物配制剂,避免其被意外去除或扩散。

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,染毒部位不需封闭,但超过24h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,如果降低到不可接受的程度,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。

6.2.3.2 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体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,分别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24h内及之后的每天,直至试验结束。一般采集3次,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。

6.2.3.3 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,可选择采用贴条法,分离皮肤角质层。

收集完代谢笼中动物的排泄物后,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 试验结果与评价

7.1 透皮吸收体外试验

7.1.1 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、皮肤表面清洗液、供试皮肤、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 $100\% \pm 10\%$,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 $100\% \pm 20\%$ 之间,若偏离应合理解释,必要时重新进行试验。

回收率计算见公式(1)。

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

7.1.2 透皮吸收率计算

透皮吸收率计算见公式(2)。

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

当采用贴条法时,根据以下不同情况计算透皮吸收率,见公式(3)~公式(5):

a) 试验周期 ≥ 24 h,并在试验周期的前一半时间吸收量 $\geq$ 总吸收量的 75% 时,

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

b) 试验周期 < 24 h,或在试验周期的前一半时间吸收量 $<$ 总吸收量的 75%,

1) 如果胶带单独分析,则第 1、第 2 次胶带不参与吸收量计算,

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

2) 如果胶带未单独分析,则所有胶带参与计算,

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

7.2 透皮吸收体内试验

7.2.1 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、覆盖物、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);
- 尿液(动物在处死时膀胱中的尿液应与之前收集的 b 尿液合并在一起进行测定)、粪便、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。

回收率计算见公式(6)。

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

7.2.2 透皮吸收率计算

根据以下不同情况计算透皮吸收率,见公式(7)~公式(9)。

a) 试验周期 ≥ 24 h,并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 h, 或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%,

1) 如果胶带单独分析, 则第 1、2 次胶带不参与吸收量计算:

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

2) 如果胶带未单独分析, 所有胶带参与计算:

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

8 试验报告

8.1 透皮吸收体外试验

试验报告至少应包括以下内容:

- a) 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号;
- b) 试验委托单位和联系方式、样品受理日期和封样情况;
- c) 试验开始和结束日期、试验项目负责人、试验单位技术负责人、签发日期;
- d) 试验摘要;
- e) 被试物基本信息及配制信息;
- f) 供试皮肤信息;
- g) 试验条件和方法;
- h) 试验结果:
 - 1) 总回收率;
 - 2) 试验系统中每部分的被试物回收情况;
 - 3) 透皮吸收率;
 - 4) 透皮吸收曲线。
- i) 试验讨论与结论;
- j) 原始记录保存情况说明。

8.2 透皮吸收体内试验

试验报告至少应包括以下内容:

- a) 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号;
- b) 试验委托单位和联系方式、样品受理日期和封样情况;
- c) 试验开始和结束日期、试验项目负责人、试验单位技术负责人、签发日期;
- d) 试验摘要;
- e) 被试物基本信息及配制信息;
- f) 实验动物信息;
- g) 试验条件和方法;
- h) 试验结果:
 - 1) 毒性反应;
 - 2) 总回收率;
 - 3) 透皮吸收率;
 - 4) 透皮吸收曲线;
- i) 试验讨论与结论;
- j) 原始记录保存情况说明。