

化妆品安全性评价程序和方法

Procedures and methods of safety
evaluation for cosmetics

1 目的

为向广大消费者提供符合卫生要求的化妆品,防止化妆品对人体产生近期和远期危害,特制定本程序和方法。

2 适用范围

本程序和方法适用于在我国生产和销售的一切化妆品原料和化妆品产品。

3 化妆品安全性评价程序

3.1 第一阶段 急性毒性和动物皮肤、粘膜试验

3.1.1 急性毒性试验

3.1.1.1 急性皮肤毒性试验。

3.1.1.2 急性经口毒性试验。

3.1.2 动物皮肤、粘膜试验

3.1.2.1 皮肤刺激试验。

3.1.2.2 眼刺激试验。

3.1.2.3 皮肤变态反应试验。

3.1.2.4 皮肤光毒和光变态反应试验。

3.2 第二阶段 亚慢性毒性和致畸试验

3.2.1 亚慢性皮肤毒性试验。

3.2.2 亚慢性经口毒性试验。

3.2.3 致畸试验。

3.3 第三阶段 致突变、致癌短期生物筛选试验

3.3.1 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验)。

3.3.2 体外哺乳动物细胞染色体畸变和 SCE 检测试验。

3.3.3 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变率检测试验。

3.3.4 动物骨髓细胞微核试验。

3.3.5 小鼠精子畸形检测试验。

3.4 第四阶段 慢性毒性和致癌试验

3.4.1 慢性毒性试验。

3.4.2 致癌试验。

3.5 第五阶段 人体激发斑贴试验和试用试验。

4 对化妆品原料和化妆品产品安全性评价的规定

4.1 凡属于化妆品新原料,必须进行五个阶段的试验。

4.2 凡属于含药物化妆品必须进行动物急性毒性试验、皮肤与粘膜试验和人体试验,但是根据化妆品所含成分的性质、使用方式和使用部位等因素,可分别选择其中几项甚至全部试验项目。

4.3 凡属于化妆品新产品必须进行动物急性毒性试验、皮肤与粘膜试验和人体试验,但是根据化妆品所含成分的性质、使用方式和使用部位等因素,可分别选择其中几项甚至全部试验项目。

4.4 凡进口化妆品应由进口单位提供安全性评价资料。

5 化妆品安全性评价试验方法

5.1 急性皮肤毒性试验

人体接触化妆品主要途径是皮肤。当评价化妆品及其成分对人体健康的可能危害时,进行皮肤毒性的研究是必不可少的。

5.1.1 目的:确定受试物能否经皮肤渗透和短期作用所产生的毒性反应,并为确定亚慢性试验提供实验依据。

5.1.2 定义:系指受试物涂敷皮肤一次剂量后所产生的不良反应。

剂量表示方法:以敷用受试物的质量(g、mg)或以实验动物平均单位体重敷用受试物的质量(mg/kg)来表示。

一次敷用受试物引起50%受试动物死亡的剂量,称之为半数致死量(LD₅₀)。LD₅₀值的单位为mg或g/kg体重。

5.1.3 动物的准备:选用两种性别成年大鼠、豚鼠或家兔均可。建议试验起始动物体重范围为大鼠200~300g,豚鼠350~450g,家兔2.0~3.0kg。

实验动物应在动物笼内观察3~5天,使其适应环境,并观察其健康状况。

正式给药前24h,将动物背部脊柱两侧毛发剪掉或剃掉,注意不要擦伤皮肤,因为损伤能改变皮肤的渗透性,受试物涂抹处,不应少于动物体表面积的10%。各类动物体表面积计算方法见附录A。

5.1.4 受试物的配制:若受试物是固体,应磨成细粉状,并用适量水或无毒无刺激性赋形剂混匀,以保证受试物与皮肤良好的接触。常用的赋形剂有橄榄油、羊毛脂、凡士林等。若受试物是液体,一般不必稀释。

5.1.5 剂量和分组:将两种性别的实验动物分别随机分为5~6组,若用赋形剂,需设赋形剂对照组。化学物质毒性的半数致死量(LD₅₀)计算方法见附录B。

机率单位-对数图解法,每组最好10只动物。各剂量组间要有适当的组距,以使各剂量组产生一系列的毒性反应或死亡率。最高剂量可达2000mg/kg。

5.1.6 试验方法:将受试物均匀地涂敷于动物背部,并用油纸和两层纱布覆盖,再用无刺激性胶布或绷带加以固定,以防脱落和动物舔食受试物,共敷药24h。试验结束后,可用温水或适当的溶剂清除残留的受试物。一般观察一周,若给药4天后仍有动物死亡时,仍需继续观察一周。

给药后注意观察动物的全身中毒表现和死亡情况,包括动物皮肤、毛发、眼睛和粘膜的变化,呼吸、循环、自主和中枢神经系统、四肢活动和行为方式等的变化,特别要注意观察震颤、惊厥、流涎、腹泻、嗜睡、昏迷等现象。

凡是试验过程中死亡的动物和/或有毒性反应的动物,均应进行尸检和肉眼观察。当肉眼可见病变时,还应进行病理组织学镜检。

5.1.7 结果评价:急性毒性分级标准详见附录C。

5.2 急性经口毒性试验

当化妆品成分的皮肤毒性低时,很难测得其经皮LD₅₀,为了解该化学物质与已知毒物的相对毒性,

以及由于婴幼儿误服化妆品的可能,进行经口毒性试验也很必要。

5.2.1 定义:系指受试物一次经口饲予动物所引起的不良反应。剂量表示法同急性皮肤毒性试验。

5.2.2 动物的准备:分别选用两种性别的成年小鼠和/或大鼠。小鼠体重 18~22g,大鼠 180~200g,或选择其它敏感的动物。

实验前,一般禁食 16h 左右,不限制饮水。

5.2.3 受试物溶液的配制:常用水或食用植物油为溶剂。若受试物不溶于水或油中,可用羧甲基纤维素、明胶、淀粉做成混悬液。给药最大体积,小鼠不超过 0.4ml/20g 体重,大鼠不超过 1.0ml/100g 体重。

5.2.4 剂量和分组:一般分为 5~6 个剂量组。每组动物数 5~10 只,根据所选 LD₅₀ 计算方法而定。各剂量组间间距大小,随受试物的毒性作用带宽窄而异。通常以较大组距和较少量动物进行预试,找出其粗略致死剂量范围,然后再设计正式试验的剂量分组。

受试物最高剂量可达 5000mg/kg 体重。

5.2.5 试验方法:正式试验时,将动物称量,并随机分组,然后用特制的灌胃针头将受试物一次给予动物。若估计受试物毒性很低,一次给药容积太大,可在 24h 内分成 2~3 次给药,但合并作为一日剂量计算。

给药后,密切注意观察并记录动物的一般状态、中毒表现和死亡情况,并进行 LD₅₀ 的计算,其方法见附录 B。

5.2.6 结果评价

急性毒性分级标准详见附录 C。

5.3 皮肤刺激试验

皮肤刺激是指皮肤接触受试物后产生的可逆性炎症症状。

5.3.1 试验方法的原则

5.3.1.1 受试物应以一次剂量或多次剂量涂(敷)于健康的无破损的皮肤上。

5.3.1.2 每种受试物至少要用 4 只健康成年动物(家兔或豚鼠)。

5.3.1.3 试验均采用自身对照。

5.3.1.4 受试物使用浓度,一般情况下,液态受试物采用原液或预计人应用的浓度。固态受试物则用水或合适赋形剂(如花生油、凡士林、羊毛脂等),按 1:1 浓度调制。

5.3.1.5 凡具有高度皮肤毒性,或 pH<2 或 pH>11.5 的化学物质,均不进行本项试验。

5.3.2 试验方法

5.3.2.1 急性皮肤刺激试验(一次皮肤涂抹实验)

5.3.2.1.1 试验前 24h,将实验动物背部脊柱两侧毛剪掉,不可损伤表皮,去毛范围左、右各约 3cm×6cm。

5.3.2.1.2 取受试物 0.1ml(g)滴在 2.5cm×2.5cm 大小的四层纱布上敷贴在一侧皮肤上,或直接将受试物涂在皮肤上,然后用一层油纸覆盖,再用无刺激性胶布和绷带加以固定。另一侧涂赋形剂作为对照。敷用时间一般为 24h,亦可一次敷用 4h。试验结束后用温水或无刺激性溶剂除去残留受试物。

5.3.2.1.3 于除去受试物后的 1、24 和 48h 观察涂抹部位皮肤反应,按表 1 和表 2 进行皮肤反应积分和刺激强度评价。

表 1 皮肤刺激反应评分

红斑形成	积 分
无红斑	0
勉强可见	1
明显红斑	2
中等~严重红斑	3
紫红色红斑并有焦痂形成	4
水肿形成	
无水肿	0
勉强可见	1
皮肤隆起轮廓清楚	2
水肿隆起约 1mm	3
水肿隆起超过 1mm,范围扩大	4
总 分	8

表 2 皮肤刺激强度评价

强 度	分 值
无刺激性	0~0.4
轻刺激性	0.5~1.9
中等刺激性	2.0~5.9
强刺激性	6.0~8.0

5.3.2.2 多次皮肤刺激试验

5.3.2.2.1 先将实验动物背部脊柱两侧皮肤的毛剪掉或剃掉,去毛范围各为 2.5cm×2.5cm。

5.3.2.2.2 取受试物 0.1~0.5ml (g) 涂抹在一侧皮肤上,另一侧涂赋形剂作为对照,每天涂抹 1~2 次,连续涂抹 14 天。每次涂药前应剪毛,不得损伤皮肤,保证受试物与皮肤充分接触。

5.3.2.2.3 每天观察皮肤反应,按表 1 评分。脱屑积分为 1。最高刺激指数为 14(观察次数)×8(总积分数)=112。

实验结束,用角膜环钻取涂抹部位皮肤进行病理组织学检查,按表 3 评分。

5.3.3 结果评价

按上述评定标准和指标的最高分值判断受试物的皮肤刺激作用的有无或刺激的强弱。多次皮肤刺激试验刺激指数超过 30、病理组织检查积分超过 4,应判断受试物对皮肤有明显刺激性。在许多情况下,家兔和豚鼠对刺激物质较人敏感,从动物试验结果外推到人可提供较重要的依据。

5.4 眼刺激试验

眼刺激性是指眼表面接触受试物后产生的可逆性炎性变化。

5.4.1 试验方法的原则

5.4.1.1 受试物应以一次剂量或多次剂量滴入(涂入)或喷洒眼内。

5.4.1.2 每种受试动物的眼睛应保证无任何炎性反应和眼损伤。

5.4.1.3 每组试验动物数至少 4 只,采用自身对照,首选动物为家兔。

5.4.1.4 受试物使用浓度一般用原液或用适当无刺激性赋形剂配制的 50%软膏或其他剂型。

5.4.1.5 已证明有皮肤刺激性的物质,不必进行本项试验。

5.4.2 试验方法

表3 皮肤慢性刺激试验评分标准

皮肤改变	积分	最高分
A. 棘层肥厚		
(a)棘层肥厚		
轻度(表皮为正常厚度 1.5~3 倍)	1	3
中度(表皮为正常厚度 3~4 倍)	2	
重度(表皮为正常厚度 4 倍以上)	3	
B. 角化过度		
(b)颗粒层增厚	1	1
(c)角层增厚	1	1
C. 其他表皮改变		
(d)颗粒层缺乏	1	1
(e)角化不全	1	1
(f)表皮细胞空泡化或细胞内水肿或基底细胞液化变性	1	1
(g)海绵形成		
棘细胞间水肿	1	2
水泡形成	2	
D. 表皮坏死		
(h)表皮坏死		
轻度(占表皮切面的 1/3 以下)	8	15
中度(占表皮切面的 1/3~2/3)	10	
重度(占表皮切面的 2/3 以上)	15	
E. 真皮变化		
(i)真皮结缔组织血管扩张充血或水肿	1	1
(j)胶原纤维变性或解离	1	1
(k)真皮炎性细胞浸润		
轻度	1	3
中度	2	
重度	3	

注：① 总分按(a+b+c+d+e+f+g)+(i+j+k)或(h)+(i+j+k)选择总分较大者。

② 解离指胶原纤维分离成细小碎片。

5.4.2.1 一次眼刺激试验

5.4.2.1.1 将液态或软膏(0.1ml 或 100mg)受试物滴入(涂入)实验动物一侧结膜囊内,另一侧眼作为对照。滴药后使眼被动闭合 5~10s,记录滴药后 6、24、48 和 72h 眼的局部反应,第 4、7 天观察恢复情况。观察时应用荧光素钠检查角膜损害,最好用裂隙灯检查角膜透明度、虹膜纹理改变。

5.4.2.1.2 如果受试物明显引起眼刺激反应,可再选用 6 只动物,将受试物滴入一侧结膜囊内,接触 4s 或 30s 后用生理盐水冲洗干净,再观察眼的刺激反应。

5.4.2.1.3 按表 4 所列眼损害分级标准积分,再按表 5 进行眼刺激强度的评价。

5.4.2.2 多次性眼刺激试验

将受试物原液 0.1ml 或配制成的 50%软膏约 100mg 滴入或涂入一侧结膜囊内,另一侧眼作为对照,每日一次,连续 14 天。实验结束后,继续观察 7~14 天,按表 4 分级标准记录眼的刺激反应,并按表 5 眼刺激性评价标准进行眼刺激强度的评价。

表 4 眼损害的分级标准

眼 损 害	积 分
角膜:A. 混浊(以最致密部位为准) 无混浊 散在或弥漫性混浊,虹膜清晰可见 半透明区易分辨,虹膜模糊不清 出现灰白色半透明区,虹膜细节不清,瞳孔大小勉强看清 角膜不透明,由于混浊,虹膜无法辨认 B. 角膜受损范围 $< \frac{1}{4}$ $\frac{1}{4} \sim \frac{1}{2}$ $\frac{1}{2} \sim \frac{3}{4}$ $\frac{3}{4} \sim 1$	0 1 2 3 4 1 2 3 4
	积分 A×B×5 最高积分为 80
虹膜:A. 正常 皱褶明显加深,充血、肿胀、角膜周围有轻度充血,瞳孔对光仍有反应 出血、肉眼可见破坏,对光无反应(或出现其中之一反应)	0 1 2
	积分 A×5 最高积分为 10
结膜:A. 充血,系指睑结膜、球结膜部位 血管正常 血管充血呈鲜红色 血管充血呈深红色,血管不易分辨 弥漫性充血呈紫红色 B. 水肿 无 轻微水肿(包括瞬膜) 明显水肿,伴有部分眼睑外翻 水肿至眼睑近半闭合 水肿至眼睑超过半闭合 C. 分泌物 无 少量分泌物 分泌物使眼睑和睫毛潮湿或粘着 分泌物使整个眼区潮湿或粘着	0 1 2 3 0 1 2 3 0 1 2 3
	总积分(A+B+C)×2 最高积分为 20
	角膜、虹膜和结膜反应累加最高积分为 110

表 5 眼刺激性评价标准

急性眼刺激积分指数 (I、A、O、I) (最高数)	眼刺激的平均指数 (M、I、O、I)	眼刺激个体指数 (I、I、O、I)	刺激强度
0~5	48h 后为 0		无刺激性
5~15	48h 后<5		轻刺激性
15~30	4 日后<5		刺激性
30~60	7 日后<20	7 日后 (6/6 动物<30) (4/6 动物<10)	中度刺激性
60~80	7 日后<40	7 日后 (6/6 动物<60) (4/6 动物<30)	中度~重度刺激性
80~110			重度刺激性

5.4.3 结果评价

按上述分级评价标准评定,如一次或多次接触受试物,不引起角膜、虹膜和结膜的炎症变化,或虽引起轻度反应,但这种改变是可逆的,则认为该受试物可以安全使用。

在许多情况下,哺乳动物眼的反应较人敏感,从动物试验结果外推到人可提供较有价值的依据。

5.5 皮肤变态反应试验

皮肤变态反应是指通过重复接触某种物质后机体产生免疫传递的皮肤反应。化学物质引起的变态性接触性皮炎,属 IV 型(即延迟型)变态反应。在人类的反应可能是瘙痒、红斑、丘疹、水泡或大疱,动物仅见皮肤红斑和水肿。

5.5.1 试验方法的原则

5.5.1.1 由于接触致敏的发病过程包括致敏(诱导)和激发两个阶段,动物在第一次接触受试物后至少 1 周,再次给予激发接触。通过激发接触能否引起皮肤反应确定有无致敏作用。

5.5.1.2 实验首选动物为白色豚鼠,每组动物数 10~25 只。

5.5.1.3 受试物剂量(浓度):致敏(诱导)浓度允许引起皮肤轻度刺激反应(即最高耐受浓度)。激发浓度一般应低于致敏浓度,不得引起原发刺激性皮肤炎症反应。

5.5.1.4 为避免出现假阳性或假阴性结果,试验中除要求使用的试剂、绷带、胶布均无刺激性外,并设立阳性或阴性对照组。

5.5.1.5 为提高皮肤反应的阳性率(增加敏感性),通常采用福氏完全佐剂(FCA),而不影响实验的评价。

注:福氏完全佐剂(FCA)的制备:

轻质石蜡油	50ml
羊毛脂(或吐温 80)	25ml
结核杆菌(灭活)	62mg
生理盐水	25ml

制成油包水乳化剂后,经高压消毒备用。

5.5.2 豚鼠最大值试验(皮内和涂皮结合法,简称 GPMT)

5.5.2.1 试验前 24h 在豚鼠颈背脊柱两侧 4cm×6cm 范围内剪毛或脱毛。

注:脱毛剂配方:

可溶性淀粉	6 份
滑石粉	6 份
硫化钡	6 份
颗粒状阳离子表面活性剂	27 份

用水调成糊状涂在脱毛部位,保留 4min 左右,用水冲洗残留脱毛剂。

5.5.2.2 从头部向尾部成对地做三次皮内注射。①注射 0.1ml FCA；②注射 0.1ml 受试物；③注射 0.1ml 受试物与 FCA 的等量混合物。如图 1 所示，各点间距 1.5cm。

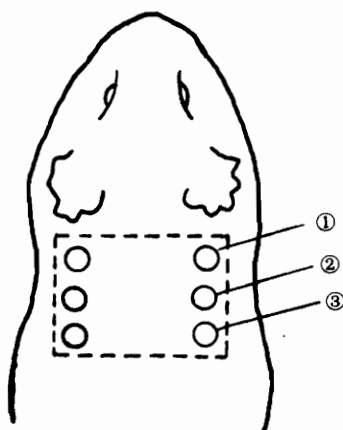


图 1

5.5.2.3 注射后第 8 天，用 2cm×4cm 滤纸涂以用适当赋形剂（花生油、凡士林、羊毛脂等）配制的受试物，将其贴敷在上背部的注射部位，持续封闭固定 48h，作为第二次致敏。为加强致敏作用，对无皮肤刺激作用的化学物质，可在第二次致敏前 24h，在注射部位涂抹 10% 十二烷基硫酸钠（SLS）。对照组仅用溶剂或赋形剂注射或涂抹。

5.5.2.4 激发接触，即在末次致敏后 14~28 天，分别用 2cm×2cm 的滤纸涂以受试物，再次贴敷在上背部两侧的去毛区，持续封闭和固定 24h。对照动物作同样处理。

5.5.2.5 激发接触后 24、48 和 72h 观察反应，按表 6 进行皮肤反应强度评分。

表 6 皮肤反应强度评价

	积 分
(1) 红斑形成	
无红斑	0
轻微可见红斑	1
中度红斑	2
严重红斑	3
水肿性红斑	4
(2) 水肿形成	
无水肿	0
轻度水肿	1
中度水肿	2
严重水肿	3
总积分	7

$$\text{平均反应值} = \frac{\Sigma(1) + (2)}{\text{合计动物数}}$$

由于化学物的接触致敏作用并非完全遵循一般的毒理学剂量 - 反应规律。Maghusson 按动物致敏百分数提出以下分级标准（表 7）。

表7 致敏率

致敏率%	分级	强度分类
0~8	I	弱致敏物
9~28	II	轻度致敏物
29~64	III	中度致敏物
65~80	IV	强度致敏物
81~100	V	极强致敏物

5.5.2.6 结果评价

本试验适用于弱致敏物（化学原料）的筛选。凡能引起10%以下动物致敏，即1/15或1/20动物致敏，可认为该受试物为弱致敏物，依以上分级标准类推。由于人群中变态性接触性皮炎的发生因素复杂，受到诸多因素如化学物的使用浓度、接触频数、持续时间及接触时原皮肤的健康状况等的影响，试验所得阳性结果应结合人群斑贴试验和流行病学调查进行综合性分析和评价。

5.5.3 局部封闭涂皮法（Buehler test, 简称BT）

5.5.3.1 实验前24h，用脱毛剂将豚鼠背部左侧3cm×3cm范围区脱毛。

5.5.3.2 将受试物0.1~0.2ml涂在2cm×2cm滤纸上，并将其敷贴在去毛区，二层纱布一层油纸覆盖，再以无刺激胶布封闭固定，持续6h。第7天和第14天以同样方法重复一次。

5.5.3.3 激发接触，即末次致敏后14~28天，将0.1~0.2ml或低于诱导浓度的受试物斑贴于豚鼠背部右侧2cm×2cm去毛区（接触前24h脱毛），然后用二层纱布、一层油纸和无刺激胶布固定6h，将斑贴受试物拿掉，24和48h后观察皮肤反应，按表5评分。

对照动物仅给予激发接触。

本试验要求动物数每组10~20只。

5.5.3.4 结果评价

本试验适用于强致敏物（或成品）的筛选。致敏途径与实际接触方式接近，按皮肤反应强度评分标准评价。根据对照组与试验组豚鼠皮肤反应的差别测定变态反应的程度。一般情况下，在豚鼠身上致强过敏物质，可能在人身上引起大量的变态反应，但在豚鼠身上致弱过敏者有可能或不可能引起人体变态反应。

5.6 皮肤光毒和光变态反应试验

皮肤光变态反应是指某些化学物质在光能参与下所产生的抗原抗体皮肤反应。不通过机体免疫机制，而由光能直接加强化学物质所致的原发皮肤反应，则称为光毒反应。

5.6.1 试验方法的原则

5.6.1.1 首选动物为白色豚鼠和白色家兔，每组动物8~10只。

5.6.1.2 照射源一般采用治疗用汞石英灯，水冷式石英灯作光源，波长在280~320nm范围的中波紫外线或波长在320~400nm范围的长波紫外线。

5.6.1.3 照射剂量按引起最小红斑量（MED）的照射时间和最适距离来控制。一般需做预备试验确定MED值。

5.6.1.4 受试物浓度采用原液或按人类实际用浓度，光变态反应试验的激发接触浓度可采用适当的稀释浓度。采用无光感作用的丙酮或酒精作稀释剂。

5.6.1.5 光变态反应试验需采用阳性对照，常用阳性光感物为四氯水杨酰替苯胺。

5.6.1.6 光源照射前应使受试物有足够的时间穿透皮肤，一般大于30min，并确证受试物存留在皮肤内。

5.6.1.7 如已证明受试物具有光毒性，可以不做光变态反应试验。

5.6.2 皮肤光毒试验方法

5.6.2.1 先将实验动物背部脊柱一侧的毛剪掉,去毛范围为 $3\text{cm} \times 8\text{cm}$ (见图 2)。

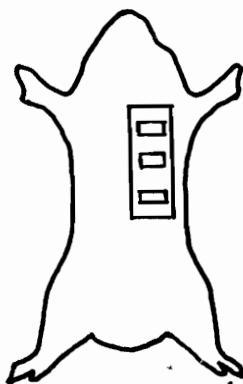


图 2

5.6.2.2 用中波紫外线灯照射去毛区,时间以秒为单位,分几档,测定 MED。

5.6.2.3 观察确定照射后 8~12h 引起一度红斑 (刚刚可见) 的照射时间为 1 个 MED。

5.6.2.4 预试验 3 天后,用剪刀再将实验动物背部脊柱两侧去毛共四块,范围每块 $2\text{cm} \times 2\text{cm}$ (见图 3)。

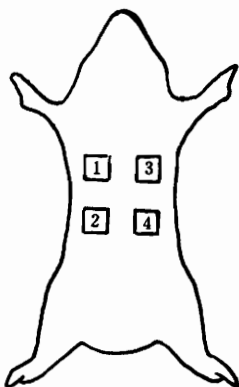


图 3

5.6.2.5 将受试物 $0.05 \sim 0.1\text{ml(g)}$ 均匀涂在 1、2 脱毛区,并用黑纸覆盖避光。

5.6.2.6 涂药 30min 后,第一脱毛区用亚 MED 的中波紫外线灯照射;第二脱毛区用黑纸覆盖不予照射;第三区仅用亚 MED 的中波紫外线照射,不涂药;第四区作空白对照,不给予任何处理。

5.6.2.7 照射后 1、24 和 48h,观察皮肤反应,按表 6 进行皮肤反应强度的评价。

5.6.2.8 结果评价

凡实验动物第一次与受试物接触,并在光能作用下引起类似晒斑的局部皮肤炎症反应,即可认为该受试物具有光毒作用。

5.6.3 皮肤光变态反应试验

5.6.3.1 诱导阶段:实验动物颈部用脱毛剂脱毛 $2\text{cm} \times 4\text{cm}$,于脱毛区四角皮内注射福氏完全佐剂 (FCA) 各 0.1ml (见图 4)。

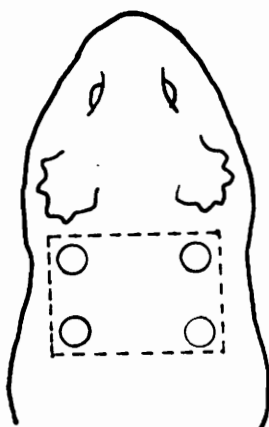


图 4

5.6.3.2 于脱毛区涂 20% 十二烷基硫酸钠 (SLS) 溶液, 再将受试物 0.1ml(g) 涂在该脱毛部位。

5.6.3.3 用波长在 280~400nm 的中长波紫外线灯照射涂药部位, 距离和时间以产生明显红斑为准。中波紫外线的照射剂量为 6.6 J/cm^2 , 长波紫外线为 10 J/cm^2 。

5.6.3.4 隔日重复 5.6.3.2 及 5.6.3.3 步骤, 共 5 次。

5.6.3.5 激发阶段: 于诱导操作后两周, 将实验动物背部脊柱两侧脱毛 $1.5\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ /块, 共 4 块 (见图 5)。

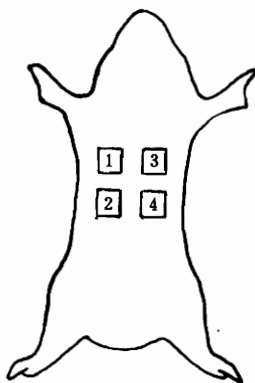


图 5

5.6.3.6 第 1 块涂受试物 0.1ml 后 30min 用长波紫外线照射; 第 2 块涂受试物后用黑纸遮盖不照射; 第 3 块不涂受试物, 仅用长波紫外线照射; 第 4 块用黑纸遮盖, 不涂受试物, 亦不照射。

5.6.3.7 照射后 24、48 和 72h, 观察皮肤反应, 按表 5 进行皮肤反应强度评分。

5.6.3.8 结果评价

凡化学物质单独与皮肤接触无作用, 经过激发接触和特定波长光照射后, 局部皮肤出现红斑、水肿、甚而全身反应, 而未照射部位无此反应者, 可认为该受试物是光敏感物质。

5.7 人体激发斑贴试验和试用试验

激发斑贴试验是借用皮肤科临床检测接触性皮炎致敏原的方法,进一步模拟人体致敏的全过程,预测受试物的潜在致敏原性。

5.7.1 人体激发斑贴试验方法的原则

- 5.7.1.1 实验全过程应包括诱导期、中间休止期及激发期。
- 5.7.1.2 受试物(可疑致敏原)与皮肤有充分接触时间。
- 5.7.1.3 选择合适敏感斑贴部位,如人体上背部或前臂屈侧皮肤。
- 5.7.1.4 受试者应无过敏史,样本数不少于 25 人。
- 5.7.1.5 实验前应向受试者详细介绍实验目的和方法,以取得圆满合作。

5.7.2 试验方法

5.7.2.1 将 5%十二烷基硫酸钠(SLS)液 0.1ml 滴在 2cm×2cm 大小的四层纱布上,然后敷贴在受试者上背部或前臂屈侧皮肤上,再用玻璃纸覆盖,用无刺激胶布固定。24h 后将敷贴物去掉,皮肤应出现中度红斑反应。如无反应,调节 SLS 浓度或再重复一次。

5.7.2.2 将 0.2ml(g)受试物按上述方法敷贴在同一部位上,固定 48h 后,去掉斑贴物,休息一日。

5.7.2.3 重复 5.7.2.2 步骤,共四次。如试验中皮肤出现明显反应,诱导可停止。

5.7.2.4 于最后一次诱导两周,选择未做过斑贴的上背部或前臂屈侧皮肤两块,间距 3cm,一块作对照,一块敷贴含上述受试物 0.2ml(g)的 1cm×1cm 纱布,封闭固定 48h 后,去除斑贴物,立即观察皮肤反应。24、48 和 72h 再观察皮肤反应的发展或消失情况。按表 8 和表 9 进行皮肤反应评定。

表 8 皮肤反应评级标准

皮 肤 反 应	分 级
无反应	0
红斑和轻度水肿、偶见丘疹	1
浸润红斑、丘疹隆起、偶而可见水疱	2
明显浸润红斑,大小水疱融合	3

表 9 致敏原强弱标准

致敏比例	分 级	分 类
0~2/25	1	弱致敏原
3~7/25	2	轻度致敏原
8~13/25	3	中度致敏原
14~20/25	4	强致敏原
21~25/25	5	极强致敏原

5.7.3 结果评定

如人体斑贴试验表明受试物为轻度致敏原,可作出禁止生产和销售的评价。

5.7.4 人体试用试验的原则及方法

- 5.7.4.1 志愿者按日常使用方法或选用前臂屈侧 5cm×5cm 皮肤进行受试物试用试验。
- 5.7.4.2 样本数为 200 人。
- 5.7.4.3 受试物每天使用 1~2 次,连续试用 30 天以上。
- 5.7.4.4 每周至少观察一次,记录受试者主诉,如痒、热、刺痛感觉等或局部皮肤反应,如皮肤脱屑、皸裂、红斑、水肿、丘疹、水疱、痤疮或色素沉着等。

5.7.4.5 结果评价

200 名受试者中有 1 人出现上述主诉和体征,均可认为该受试物有皮肤刺激或致敏作用。结合化妆品的试用情况以及动物试验结果,作出是否安全的评价。

5.8 亚慢性皮肤毒性试验

5.8.1 目的:确定受试物多次重复涂抹皮肤可能引起健康的潜在危害,为提供经皮渗透可能性,靶器官和慢性皮肤毒性试验剂量选择提供依据。

5.8.2 定义:系指受试物重复涂抹动物皮肤所引起的不良反应。

5.8.3 动物的选择:选用成年大鼠、家兔和豚鼠。建议实验起始动物体重范围,大鼠 200~300g,家兔 2.0~3.0kg,豚鼠 350~450g。

动物皮肤的准备和受试物的配制,参见急性皮肤毒性试验,不过一般需每天或两三天剪毛一次。

5.8.4 剂量和分组:至少有三个剂量组和一个赋形剂对照组。每个剂量组至少 20 只动物,雌、雄动物各 10 只。最高剂量组可出现毒性反应,但不能出现死亡。最低剂量组不能出现任何毒性反应。理想的中间剂量,应产生最小的可观察到的毒性反应。如果受试物涂抹后产生了严重的皮肤刺激毒性,应该中止试验,重新设计试验方案,使新设计的最高剂量组,由于浓度的降低致使皮肤刺激反应减弱或消失。

5.8.5 试验方法:将受试物涂抹于动物背部皮肤,涂皮面积参见急性皮肤毒性试验,对毒性强的物质,涂抹面积可适当减少。实验期限为 90 天。

5.8.5.1 临床检查:整个试验过程中,注意观察并记录动物的一般表现、行为、中毒症状和死亡情况。每周称体重一次,并调整敷药量。

5.8.5.2 血液学检查:一般于试验结束时测定之。包括项目:血色素含量、红细胞数、白细胞数及其分类计数、血小板数、网织红细胞数等。

5.8.5.3 血液生化学检查:一般认为适合于所有研究的测试范围是肝、肾功能、碳水化合物代谢、电解质平衡。特殊测定之项目由受试物的作用方式来决定。建议的项目有:谷丙转氨酶、谷草转氨酶,血中尿素氮、非蛋白氮及肌酐含量,血清中白蛋白/球蛋白等。必要时,可根据所观察的毒性反应选择其他的临床生化学指标。

5.8.5.4 脏器称重:肝、肾和其他脏器的绝对重量和脏/体之比的测定。

5.8.5.5 病理学检查:试验结束时,处死所有动物,进行大体尸检,并将主要器官和组织固定保存、制片和镜检。在各剂量组动物大体检查无明显病变时,可以只进行高剂量组和对照组动物主要脏器(肝、肾、脾、胃、肠等)和皮肤的组织病理学检查,发现病变后再对较低剂量组相应器官及组织进行镜检。许多毒物可引起肝、肾组织病变,故肝、肾的镜检已列入常规项目,其他器官或组织的镜检则需根据情况而定。

5.8.6 试验的意义和价值

亚慢性皮肤毒性试验将提供重复皮肤接触受试物时动物机体反应的资料。虽然从实验结果外推到人的正确性是有限的,但它能提供关于化学物质经皮肤吸收程度的有用资料。若实验结果表明受试物经皮吸收可能性甚微或几乎无可能性,则没有必要进行经皮慢性毒性和致癌试验。

5.9 亚慢性经口毒性试验

5.9.1 目的:确定受试物重复经口给予动物可能引起健康的潜在危害,为提供靶器官、蓄积可能性和慢性/致癌性实验提供实验依据。

5.9.2 定义:系指动物多次重复经口接受化学物质所引起的不良反应。

5.9.3 动物的选择:一般选用啮齿类动物,首选品种为大鼠。使用雌雄两种性别,理想的给药时间是小于 6 周龄。

5.9.4 剂量和分组:至少应有三个剂量组和一个对照组。每个剂量组至少 20 只动物,雌雄各 10 只。各剂量组选择的原则同亚慢性经皮毒性试验。

5.9.5 试验方法:给药方式可采用受试物掺入饲料、饮水或灌胃方式。当受试物掺入饲料时,要确保给药量不能影响动物正常的营养需要。以灌胃方式给药时,每周称体重,并按体重调整给药量,以维持稳定的给药量。

在整个实验过程中,动物一般观察、临床检查和病理检查的原则和具体要求,参见亚慢性皮肤毒性试验。

5.9.6 试验的意义和价值:亚慢性经口毒性试验将提供重复经口给药后动物所表现的不良反应的资料。虽然从动物实验结果外推到人的正确性是有限的,但它能提供无反应剂量和可允许的人类接触量的有用资料。

5.10 致畸试验

5.10.1 目的:致畸试验是鉴定化学物质是否具有致畸性的一种方法。通过致畸试验,一方面鉴定化学物质有无致畸性,另一方面确定其胚胎毒作用,为化学物质在化妆品中安全使用提供依据。

5.10.2 定义:胚胎发育过程中,接触了某种有害物质影响器官的分化和发育,导致形态和机能的缺陷,出现胎儿畸形,这种现象称为致畸作用。引起胎儿畸形的物质称为致畸原。

5.10.3 器材和试剂

5.10.3.1 生物显微镜、体视显微镜、放大镜、扭力天平、游标卡尺、眼科镊子、眼科剪、平皿、滤纸等。

5.10.3.2 1/1000 茜素红溶液:茜素红 0.1g,氢氧化钾 10g,蒸馏水 1000ml。

5.10.3.3 透明液 A:甘油 200ml,氢氧化钾 10g,蒸馏水 790ml。

5.10.3.4 透明液 B:甘油与蒸馏水等量混合。

5.10.3.5 固定液(Bouins 液):苦味酸饱和液 75 份,甲醛 20 份,冰醋酸 5 份。

5.10.4 实验动物的选择:常用的实验动物是小白鼠,大白鼠和兔,大、小白鼠为首选动物。选用健康性成熟大鼠 90~100 天龄,雌性应是初产的。

5.10.5 剂量和分组:至少设 4 组,其中三组给药组和一组空白对照组。每组至少 12 只孕鼠。初次进行致畸试验或引入新的动物种株时,需要设阳性对照组。常用阳性对照物有敌枯双、五氯酚钠、维生素 A 等等。根据受试物的动物半数致死量(LD₅₀)和蓄积性的大小,确定受试物的给药剂量,应该包括无作用剂量组,有致畸作用剂量组和明显致畸剂量组。

5.10.6 试验方法

5.10.6.1 “孕鼠”的检出和给药时间

雌鼠和雄鼠按 1:1 (或 2:1) 同笼,每日晨观察阴栓(或阴道涂片),查出阴栓(或精子)的当天定为孕期零天。如果五天内没查出“受精鼠”,应调换雌鼠。检出的“受精鼠”按随机分组,称重和编号。在大鼠孕期 6~15 天期间,每天灌胃给药。孕鼠于孕期 0 日、6 日、10 日、15 日和 20 日称重,并根据体重调整给药量。

保持动物室内环境安静,室温控制在 20℃~25℃ 为宜,适当地给孕鼠增加营养,如加麦芽或蛋糕等。

5.10.6.2 孕鼠处死和一般检查

第 20 天孕大鼠用 20% 硫贲妥钠 1~1.5ml 腹腔注射麻醉断头处死。剖腹腔检查卵巢内黄体数,取出子宫,称重;检查活胎、早期吸收和迟死胎数目。

5.10.6.3 活胎鼠的检查

逐个记录活胎鼠体重,性别,体长。外观检查头颅外形、面部、躯干、四肢等有无畸形,包括:露脑、脑膨出、眼部畸形(小眼、无眼、睁眼等)鼻孔扩大,单鼻孔、唇裂、脊柱裂、四肢及尾畸形等等。

5.10.6.4 胎鼠骨骼标本的制备

每窝约 2/3 活胎鼠以眼科镊子剥皮,小心挖掉胸腹腔内脏,去掉后颈和两肩胛骨之间的脂肪块,然后将胎鼠放入茜素红溶液软化染色。当天下午摇动玻璃瓶 2~3 次,视气温情况需染色半天至两天,至头骨染红为止,第二(或三)天,将胎鼠换入透明液 A,第三(或四)天,将胎鼠换入透明液 B,第四(或五)天,胎鼠骨骼染红而软组织的紫红色基本退色,可换入甘油中。

5.10.6.5 胎鼠骨骼检查

染好的标本连同甘油一起倒入小平皿内,在体视显微镜下,用透射光源,先观察胎鼠全身,然后逐步检查骨骼。首先,测量囟门的大小,矢状缝的宽度,观察是否囟门扩大,矢状缝增宽,头顶间骨及后头骨缺损。然后,检查胸骨的发育和数目,是否胸骨缺失或融合。肋骨常见畸形有融合肋,分叉肋,肋骨中

断, 缺肋, 短肋, 波状肋, 多肋等; 脊柱骨的缺失、融合、纵裂等畸形; 另外, 检查骨盆, 四肢骨等是否有畸形。

5.10.6.6 胎鼠内脏检查

每窝约 1/3 活胎鼠浸入 Bouins 氏液后一周作内脏检查。先用自来水冲去固定液, 把胎鼠仰放在石蜡板上, 剪去四肢和尾巴, 用刀片从头部开始, 往下逐渐经颈、胸腹部共切 6 刀。第 6 刀切完后, 可以用小剪刀剖开腹腔, 仔细检查消化系统和泌尿生殖系统各器官的大小、形状以及位置。

5.10.7 统计处理和结果评价

受精鼠数、受孕鼠数、孕鼠死亡数, 有一个以上活胎孕鼠数, 用卡方检查; 窝平均黄体数、窝平均着床数、窝平均活胎数以及活胎鼠平均体重用 t 检验; 吸收胎和迟死胎用非参数统计, 窝畸形率、胎鼠畸形率用非参数统计。

结果应能得出受试物是否有母体毒性, 胚胎毒性以及致畸性。如果受试物有致畸效应, 可以得出最小致畸剂量。为了比较不同化学物的致畸性强度, 可用致畸指数来表示:

$$\text{致畸指数} = \frac{\text{雌鼠LD50}}{\text{最小致畸剂量}}$$

暂以致畸指数 10 以下为不致畸, 10~100 为致畸, 100 以上为强致畸。

$$\text{致畸危害指数} = \frac{\text{最大不致畸剂量}}{\text{最大可能摄入量}}$$

如果致畸危害指数 > 300, 说明受试物对人危害小, 100~300 为中等, < 100 为大 (暂定)。

5.11 慢性毒性试验

5.11.1 目的: 确定动物长期接触化学物质后所产生的危害。

5.11.2 定义: 系指动物长期接触受试物所引起的不良反应。

5.11.3 动物的选择: 一般建议两种哺乳动物, 常用大鼠和小鼠。使用两种性别。试验开始时选用刚断乳的动物。

5.11.4 剂量和分组: 一般至少设三至四个剂量组和一个对照组。大鼠至少 20 只每组每性别, 小鼠比大鼠适当增加数量。在慢性毒性试验中, 最好要有剂量反应关系。最高剂量组应引起毒性反应或明确的损害作用, 低剂量组不应引起毒性作用或有害影响。

5.11.5 试验方法: 慢性经口或皮肤毒性试验, 分别采取相应的给药途径, 具体方法参见相应的亚慢性毒性试验, 试验期限至少为 6 个月, 甚至一年。

整个试验期间, 对动物的一般观察、临床检查和病理学检查, 参见亚慢性毒性试验。除此而外, 还有一些具体要求:

- ① 在试验的头三个月, 每周称重一次; 在 4~6 个月期间, 每两周称重一次, 以后每四周称重一次。
- ② 在试验开始后的第三个月、第六个月和试验结束时, 进行血液学和临床生化学有关指标的测定。一般从每组每种性别中选 10 只动物进行测定。如果可能的话, 最好每次血样来自相同的动物。
- ③ 测定脏器的绝对重量和脏体之比, 至少包括肝、肾、脾、睾丸和脑等脏器, 必要时还应选择其他脏器。
- ④ 试验结束时, 对全部动物, 包括试验过程中死亡的或因处于垂死状态而被处死的动物都应进行全面的肉眼检查。

⑤ 对所有动物 (包括中途死亡或处死的) 的主要器官和组织 (包括皮肤) 以及所有肉眼可见的病损、肿瘤或可疑为肿瘤的组织, 都应进行病理组织学检查。

5.11.6 试验的意义和价值: 慢性毒性试验为提供人体长期接触该化学物质的最大耐受量或安全剂量提供资料。

5.12 致癌试验

5.12.1 目的: 确定经一定途径长期给予试验动物不同剂量的受试物的过程中, 观察其大部分生命期间肿瘤疾患产生情况。

5.12.2 定义:系指动物长期接触化学物质后所引起的肿瘤危害。

5.12.3 动物的选择:建议对活性不明的化学物质采用两种动物,一般优先选用小鼠和大鼠,动物的敏感性对试验影响很大。一般来讲,用小鼠诱发肝癌比大鼠容易,相反地,诱发皮下肿瘤则大鼠比小鼠更容易。小鼠和兔子的皮肤对局部涂抹诱发肿瘤可能比大鼠和地鼠更为敏感。

两种性别都应该使用,常使用刚断乳或已断乳动物进行致癌试验。

5.12.4 剂量和分组:至少三个剂量组和一个对照组。最高剂量组应足以引起最低毒性反应,又没有因肿瘤以外的因素和明显改变其正常生命期限。这些毒性反应可能表现为血清酶水平的改变,或体重增加受到轻度抑制(降低百分之十)。最低剂量应该不影响动物的正常生长、发育和寿命,即不能引起任何毒性表现。中间剂量应该处于最高和最低剂量的中间范围。

每个剂量组和对照组的每种性别至少 25~50 只动物。

试验期限:应该包括动物正常生命期的大部分时间。建议参考下面几条准则:

① 一般情况,试验结束时间对小鼠和地鼠应为 18 个月,大鼠为 24 个月。

② 当最低剂量组或对照组存活的动物数只有百分之二十五时,也可以结束试验。对于有明显性别差异的试验,则其结束的时间,不同的性别应有所不同。若高剂量组因明显的毒性作用造成过早死亡,此时不应结束试验。

一个合格的阴性对照试验应符合下列标准:

① 因疾病、被同类吃掉,或因管理问题所造成的动物损失在任何组都不能高于百分之十。

② 小鼠和地鼠在 18 个月,大鼠在 24 个月时,各组存活的动物不能少于 50%。

5.12.5 试验方法:给受试物的途径,根据受试物的理化特性和对人有代表性的接触方式(经口或皮肤涂抹)而定。

整个致癌过程中,注意观察并记录动物出现的症状或死亡情况,尤其要注意肿瘤发生情况,每一个肉眼可见的或触及的肿瘤出现的时间、部位、大小、外形和发展情况都应记录。

在试验的前三个月,每周称量一次,以后每四周称量一次。

在实验过程中死亡或因处于垂死状态而被处死,以及试验结束时全部宰杀的动物,都应进行完整的大体尸检。

所有动物的全部器官和组织都应保留以进行镜检,但实际上是有困难的,只能有选择地进行,至少下述情况要进行镜检:

① 各组所有肉眼可见的肿瘤或可疑肿瘤的病变。

② 最高剂量组和对照组动物,以及试验过程中死亡或处死的所有动物所保留的器官和组织。详细描述增生、瘤前病变或肿瘤的形态学改变。

③ 如果在最高剂量和对照组之间,增生、瘤前病变或肿瘤有明显区别,则应该对该试验各组所有动物的特殊有关的器官和组织进行镜检。

④ 如果实验结果表明动物正常寿命有明显改变或产生了一些能影响肿瘤发生的作用,则下一个低剂量组动物也应按上述方式进行镜检。

5.12.6 致癌试验结果的评价

采用联合国世界卫生组织提出的四条判断诱癌试验阳性的标准:

① 肿瘤只发生在试验组动物中,对照组无肿瘤。

② 试验组与对照组动物均发生肿瘤,但试验组中发生率高。

③ 试验组动物中多发性肿瘤明显,对照组中无多发性肿瘤或只少数动物有多发性肿瘤。

④ 试验组与对照组动物肿瘤的发生率无明显差异,但试验组中肿瘤发生的时间较早。

上述四条中,试验组与对照组之间的数据经统计学处理后任何一条有显著的差异时即可认为检品的诱癌试验属阳性。动物致癌试验为人体长期接触该物质是否引起肿瘤的可能性提供资料。

5.13 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验)

鼠伤寒沙门氏菌组氨酸 (his) 回复突变系统是一种微生物试验。该试验用于测定可引起沙门氏杆菌基因碱基置换和/或移码突变的化学物质所诱发的 $his^- \rightarrow his^+$ 的回复突变。

5.13.1 定义:用来测定依赖于组氨酸的菌株产生不依赖于组氨酸的基因突变。

碱基型突变剂:它引起 DNA 分子碱基对置换。

移码型突变剂:它引起 DNA 分子增加或缺失一个或多个碱基对。

5.13.2 鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型菌株鉴定

菌株:建议使用 TA98、TA100、TA97 和 TA102 等四种组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株。

增菌培养:将贮存菌接种于 5ml 营养肉汤中,于 37℃ 振荡培养 10h。

5.13.2.1 组氨酸需求试验

凡组氨酸营养缺陷型试验菌株只能在补充组氨酸的培养基上生长,而在缺乏组氨酸的培养基上则不能生长。

鉴定方法:将试验菌株分别接种于含组氨酸培养基和无组氨酸培养基平板,于 37℃ 培养 24h,观察细菌生长情况。

结果判断:试验菌株在含组氨酸平板上生长,在不含组氨酸平板上不会生长。

5.13.2.2 脂多糖屏障缺陷鉴定

粗糙型突变的微生物,其细胞表面一层脂多糖屏障已经破坏,因此一些大分子物质能穿过菌膜进入菌体内而抑制其生长,野生型菌株或含 gal 缺失的菌株则不受影响。

鉴定方法:含 0.1ml 试验菌株增菌液的顶琼脂培养液倒入肉汤琼脂平板上,冷凝后中央放置无菌圆形滤纸片,滴上 10μl 的 0.1% 结晶紫溶液,经 37℃ 培养 24h 观察结果。

结果判断:在滤纸片周围出现一个透明的抑菌环,说明此菌存在深粗型 (rfa) 突变。TA98、TA100、TA97 和 TA102 均有抑菌环,野生型鼠伤寒杆菌没有抑菌环。

5.13.2.3 对氨苄青霉素的抗性鉴定

含 R 因子的试验菌株对氨苄青霉素具有抗性。因 R 因子太稳定容易丢失从而使试验菌株丧失 R 因子的特性,因此需要鉴定 R 因子是否存在。

鉴定方法:将试验菌株于肉汤琼脂平板上划线,然后把沾有氨苄青霉素溶液滤纸条与划线交叉放置,37℃ 培养 24h 后观察结果。

结果判断:具有 R 因子的试验菌株 (TA98、TA100、TA97 和 TA102) 有抗氨苄青霉素作用,故滤纸条周围照常生长。

5.13.2.4 对紫外线敏感性的试验

具有 *uvrB* 修复缺陷型的试验菌株,在紫外线照射后仍能照常生长,借此可以证明 *uvrB* 突变的存在。

鉴定方法:将试验菌株在肉汤琼脂平板上划线,然后用黑纸覆盖平板的一半,在 15W 的紫外灯下,距离 33cm 处照射 8s,37℃ 培养 24h 后观察结果。

结果判断:对紫外线敏感的菌株 (TA98、TA100、TA97),仅在没有照射的那一半生长,而具有野生型切除修复酶的菌株 (TA102) 仍能生长。

5.13.2.5 四环素抗性的鉴定

鉴定方法:将试验菌株增菌液在营养肉汤平板上划线,待干后,吸取四环素 (8mg/ml) 溶液与菌株划线处交叉划线,经 37℃ 培养 24h 后观察结果。

结果判断:对四环素有抗性的 TA102 菌株生长不受抑制,对四环素没有抗性的菌株,因此在四环素带的周围有一段生长抑制区。

5.13.2.6 阳性突变剂的敏感性的鉴定

试验菌株对阳性突变剂的敏感性鉴定结果,参见下表。

5.13.2.7 自发回变

测试菌株的回变性

诱变剂	剂量	S-9	TA97	TA98	TA100	TA102
柔毛霉素	6.0 μ g	—	124	3123	47	592
叠氮化钠	1.5 μ g	—	76	3	3000	188
2,4,7-三硝基-9-芴酮	0.20 μ g	—	8377	8244	400	16
4-硝基-0-次苯二胺	20 μ g	—	2160	1599	798	0
4-硝基喹啉-N-氧化物	0.5 μ g	—	528	292	4220	287
甲基磺酸甲酯	1.0 μ g	—	174	23	2730	6586
2-氨基芴	1.0 μ g	+	1742	6194	3026	261
苯并(a)芘	1.0 μ g	+	337	143	937	255

在诱变试验中,不同的试验菌株有不同的自发回变数,通常以每皿的回变菌落数来表示。各种试验菌株的自发回变数如下:

TA97(90—180),TA98(20—50),TA100(100—200),TA102(240—320)。

经过体外代谢活化系统后的自发回变数,要比不经体外代谢活化系统的自发回变数略高。

5.13.3 大鼠肝微粒体酶(S-9)的诱导和制备

选健康雄性大白鼠体重200克左右,将多氯联苯溶于玉米油中,浓度为200mg/ml,一次腹腔注射PCB剂量为500mg/kg体重。第五天断头处死动物,处死前12h停食不停饮水。消毒动物皮毛,打开腹腔,取出肝脏后,用0.15mol/L KCl溶液多次冲洗,每克肝脏加0.15mol/L KCl 3ml后,用剪刀剪碎肝脏,并在玻璃匀浆器中制成肝匀浆,然后在低温高速离心机上,以9000g离心10min,然后分装保存于液氮或-80℃冰箱中。

制备S-9的一切器皿均经消毒,全部操作在冰水浴中进行。S-9制备后,其活力必须以标准致癌物进行测定。

5.13.4 受试物的剂量选择和常用溶剂

受试物的剂量选择范围在0.1 μ g~5mg或对细菌产生毒性的剂量之间。常用的溶剂为二甲基亚砜,除此之外,还可以选择丙酮、二甲基甲酰胺、甲酰胺、95%乙醇等溶剂,最高加入量为0.1ml。每种受试物至少三个剂量,每个剂量至少三个平板。

5.13.5 试验方法

5.13.5.1 直接平板掺入法:将含0.5mmol/L组氨酸-生物素的顶层琼脂2.0ml分装于试管中,45℃恒温水浴中保温,然后每管依次加入试验菌株增菌液0.1ml、受试溶液0.1ml和S-9混合液0.5ml(需代谢活化时)混匀,迅速倾入底层培养基上,转动平板,使之分布均匀,冷凝固化,37℃下培养48h后,计数每皿回变菌落数。

突变试验中,除样品各剂量组外,还应设溶剂对照、空白对照、阳性突变剂对照和无菌对照。

5.13.5.2 点试法:方法基本同平板掺入法,不同的是,将含菌液(或S-9混合液)的顶层琼脂倒入底层培养基上,然后取直径约6mm无菌圆形滤纸片放在已固化的顶层培养基中央位置。再滴入受试物溶液或直接将受试物放在平皿中央,37℃培养48h后观察结果。

5.13.6 结果评价:如果受试物的回变菌落数超过自发回变菌落数的两倍以上,并经统计学处理证明有剂量-回变反应关系者和可重复性,则定为阳性。

5.13.7 培养基和试剂的制备

5.13.7.1 顶层培养基

琼脂	1.2g
氯化钠	1.0g
蒸馏水	200ml

121℃ (15 lb) 30min 高压消毒后,加入 0.5m mol/L 组氨酸 - 生物素溶液 20ml。

5.13.7.2 底层培养基

琼脂	7.5g
蒸馏水	465ml

121℃ (15 lb) 30min 高压消毒后,加入 (V-B) 培养基 E10ml 和 40%葡萄糖溶液 25ml,混匀,按每皿 30ml 倒平皿,冷凝固化后倒置于 37℃ 培养箱 中 24~48h。

5.13.7.3 Vogel-Bonner(V-B) 培养基 E

硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	10g
枸橼酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	100g
磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	500g
磷酸氢铵钠 ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	175g

先将后三种溶解后,再加入硫酸镁,待完全溶解后倒入容量瓶中,用蒸馏水稀释至 1000ml,分装于锥形瓶里,121℃ (15 lb) 30min 高压消毒。

5.13.7.4 40%葡萄糖溶液

称取 400g 葡萄糖,加入蒸馏水稀释至 1000ml,115℃ (10 lb) 20min 高压消毒。

5.13.7.5 肉汤培养基

牛肉膏	2.5g
胰胨	5.0g
氯化钠	2.5g
磷酸氢二钾	1.0g
蒸馏水	500ml

121℃ (15 lb) 30min 高压消毒。

5.13.7.6 肉汤斜面或平板

琼脂粉	7.5g
肉汤培养基	500ml

121℃ (15 lb) 30min 高压消毒后,倒斜面或平皿。用于菌株鉴定或常规试验用菌株保存。

5.13.7.7 0.5m mol/L 组氨酸 - 生物素溶液

D- 生物素 (分子量 247.3)	30.9mg
L- 组氨酸盐酸盐 (分子量 191.7)	24.0mg
加蒸馏水至	250ml

121℃ (15 lb) 20min 高压消毒。

5.13.7.8 S-9 混和液配制 (按每毫升 S-9 混合液计算)

大鼠肝 S-9	100μl
MgCl_2 -KCl 盐溶液	20μl
6- 磷酸葡萄糖 *	5μmol
辅酶 II *	4μmol
0.2mol/L 磷酸盐缓冲液	500μl
无菌蒸馏水	380μl

5.13.7.9 盐溶液 (1.65mol/L KCl+0.4 mol/L MgCl_2)

氯化钾 (KCl)	61.5g
氯化镁 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	40.7g

* 称量药粉,直接加入,配制时先从后往前加试剂。

蒸馏水加至 500ml

121℃ (15 lb) 20min 高压消毒。

5.13.7.10 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.4)

磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.593g

磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 5.803g

蒸馏水 100ml

121℃ (15 lb) 20min 高压消毒。

5.13.7.11 0.15mol/L 氯化钾溶液

精确称取氯化钾 11.18g, 用蒸馏水稀释至 1000ml, 121℃ (15 lb) 30min 高压消毒, 冷却后冰箱保存, 用于 S-9 制备。

5.13.7.12 氨苄青霉素溶液 (8mg/ml)

称取三羟氨苄青霉素 80mg, 加入 0.02N 氢氧化钠溶液 10ml。

5.13.7.13 0.1% 结晶紫溶液

称取结晶紫 10mg, 加 10ml 无菌水即成。

5.13.7.14 四环素溶液 (8mg/ml)

称取四环素 40mg, 加入 0.02N 盐酸溶液 5ml, 用于四环素抗性试验。

5.14 体外哺乳动物细胞的染色体畸变和 SCE 检测试验

5.14.1 意义: 用哺乳动物细胞染色体畸变和姐妹染色单体交换率的检测来评价致突变物是世界上常用的短期生物试验方法之一。方法较简单、快速。

5.14.2 试剂配制

5.14.2.1 阳性对照物: 可根据受试物的性质和结构选择不同之阳性对照物, 例如黄曲霉毒素 B₁ 和苯并 (a) 芘等。

5.14.2.2 受试物: 最好溶于培养液中, 也可溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 其浓度应低于 0.5%。

5.14.2.3 培养液: 采用 MEM (Eagle), 并加入非必需氨基酸和抗菌素 (青、链霉素, 按 100IU/ml), 胎牛血清按 10% 加入。

5.14.2.4 肝匀浆 S-9 混合物:

S-9 的制备同 Ames 试验, 按下列配方配制 S-9 混合物:

S-9 0.125ml

MgCl₂ (0.4mol/L) 0.02ml

KCl (1.65mol/L) 0.02ml

葡萄糖-6-磷酸 1.791mg

辅酶 II (氧化型, NADP) 3.0615mg

用 MEM 培养液补足至 1ml。

5.14.3 实验程序

5.14.3.1 细胞: 使用中国地鼠卵巢 (CHO) 细胞株。

5.14.3.2 实验前一天, 将 1×10^6 细胞接种于直径为 6cm 的玻璃培养皿中, 放培养箱内待用。

5.14.3.3 实验时, 吸去培养皿中的培养液, 加入一定浓度的受试物、肝匀浆 S₉ 混合物以及一定量不含血清的培养液, 放培养箱中反应 2h。结束后, 吸去含受试物的培养液, 用 Hanks 液洗细胞, 加入含 10% 小牛血清的培养液, 放回培养箱, 于 24h 内收获细胞。于收获前 4h, 加入秋水仙素 (终浓度为 1μg/ml)。如果用于检测 SCE 频率, 则待受试物与细胞反应结束后, 加入含 20μmol/L 5-溴脱氧尿苷 (BrdU) 的培养液, 于黑暗的环境下培养 27h, 加入秋水仙素后 4h 收获细胞。

5.14.3.4 收获细胞时, 用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化细胞, 待细胞脱落后, 加入含 10% 小牛血清的培养液终止胰蛋白酶的作用, 混匀, 放入离心管以 1000~1200r/min 的速度离心 5~7min, 弃去上清液, 加

入 0.075mol/L KCl 溶液低渗处理,继而以甲醇和冰醋酸液(容积比为 3:1)进行固定。按常规制片,作染色体分析用的标本可直接用姬姆萨染液染色,检测 SCE 频率的标本需进行分化染色,将制备好的玻片通过 pH6.8 的磷酸盐缓冲液 1min,移入 Hoechst 33258 液(终浓度为 1 μ g/ml)中 12min,再通过磷酸盐缓冲液 1min。移至特制的黑盒中,经紫外线照射(30W,距离 12cm)15min,将玻片移至 2 \times SSC 液中,在 62 $^{\circ}$ C 水浴内 1.5h,最后经姬姆萨染色。

作染色体分析时,对每一处理组选 100 个分散良好的中期分裂相进行染色体畸变分析。作 SCE 频率计数时,选择 25 个细胞计数 SCE 频率。

5.14.4 结果评价:对染色体畸变率用 χ^2 检验,对 SCE 检测用 t 检验进行统计学处理,以评价受试物的致突变性。

5.15 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变率检测试验

5.15.1 意义:在动物以不同途径接触受试化学物后,用细胞遗传学的方法检测骨髓细胞染色体畸变率的增加,从而评价受试物的致突变性,进而预测致癌的可能性。

5.15.2 动物选择:选用成年小鼠或大鼠。

5.15.3 剂量选择:选用 1/2、1/5、1/10、和 1/20LD₅₀ 剂量为试验组,另设阳性对照和阴性对照各一组,阳性对照组可用苯,剂量为 0.15ml/只,阴性对照为溶剂对照。每组 5 只动物。

5.15.4 染毒方式:可用经口灌入的方式,共染毒两次,间隔 24h,于第二次给药后 6h 处死动物,于处死前 4h 腹腔注射秋水仙素(按剂量 4mg/kg)。

5.15.5 实验步骤

5.15.5.1 用颈椎脱臼法处死动物,取出股骨,剃除肌肉等组织。

5.15.5.2 剪去股骨两端,用注射器吸取 5ml 生理盐水,从股骨一端注入,用 10ml 离心管,从股骨另一端接取流出的骨髓细胞悬液。

5.15.5.3 将细胞悬液以 1000r/min 的速度离心 5~7min,去除上清液。

5.15.5.4 加入 0.075mol/L KCl 溶液 7ml,用滴管将细胞轻轻地混匀,放入 37 $^{\circ}$ C 水浴中低渗处理 7min,加入 2ml 固定液(冰醋酸:甲醇=1:3),混匀,以 1000r/min 速度离心 5~7min,弃去上清液。

5.15.5.5 加入 7ml 固定液,混匀,固定 7min,以 1000r/min 的速度离心 7min,弃去上清液。

5.15.5.6 用同法再固定 1~2 次,弃去上清液。

5.15.5.7 加入数滴新鲜固定液,混匀。

5.15.5.8 用混悬液滴片,自然干燥。

5.15.5.9 用姬姆萨染液染色。

5.15.6 读片和结果评价

选择分散良好的中期分裂相,在显微镜油镜下进行读片,记录畸变类型。所得各组的染色体畸变率用 χ^2 检验进行统计学处理,以评价试验组和对照组之间是否有明显差异。

5.16 动物骨髓嗜多染细胞微核试验

研究化学物诱发哺乳动物染色体畸变的方法很多,微核试验以其简便、快速,具有一定的敏感性,被广泛应用于遗传毒理学研究中。

5.16.1 目的

该试验是一种用体内试验来检查骨髓细胞染色体畸变的方法,特别适用于检出纺锤体的部分损害而出现的染色体丢失或染色单体或染色体的无着丝点断片。

5.16.2 试剂和材料

5.16.2.1 胎牛血清

将滤菌后的胎牛(或小牛)血清放入 56 $^{\circ}$ C 恒温水浴中保温 30min 进行灭活,通常储存于冰箱冰室里。

5.16.2.2 姬姆萨染液

称取 Giemsa 3.8g, 加入 375ml 分析纯甲醇, 待完全溶解后, 再加 125ml 甘油, 放 37℃ 恒温箱中保温 48h, 保温期间振摇数次, 以促充分溶解, 取出过滤, 两周后用。

5.16.2.3 Giemsa 应用液的配制

取一份 Giemsa 液与 6 份磷酸盐缓冲液混合而成。

5.16.2.4 1/15mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.4)

称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	19.077g
KH_2PO_4	1.814g
加蒸馏水至	1000ml

5.16.2.5 解剖剪、镊子(大、小)各一把、止血钳、载物片、盖玻片(24mm×50mm)、塑料洗瓶、滤纸、纱布; 甲醇(分析纯)、二甲苯、生物显微镜。

5.16.3 实验动物和剂量分组

小白鼠是微核试验的常规动物, 也可选用大白鼠, 一般常用体重为 25~30g 的小鼠或体重为 150~200g 的大鼠, 雌雄皆可, 每个剂量组至少 5 只动物, 另外设溶剂对照组和阳性物组。常用环磷酰胺做为阳性对照物。

根据受试物理化性质(尤其是水溶性-脂溶性), 确定受试物所用的溶剂, 常用水、植物油(玉米油等)或吐温-80 等溶剂。剂量的选择是很重要的, 用药量太低, 会漏掉阳性物, 用药量太大, 可致动物死亡, 或因对骨髓毒性作用太强, 致使嗜多染红细胞受到抑制, 难以获得正确的结果。一般取受试物 LD50 的 1/2、1/5、1/10、1/20 等剂量, 以求获得微核的剂量-反应关系曲线。

5.16.4 给药途径和方式

给药途径视试验目的而定, 常用经口灌胃方式, 建议采用 30h 给药法, 即两次给药间隔 24h, 第二次给药后 6h 取材。

5.16.5 试验方法

5.16.5.1 骨髓液的制取

动物脱颈处死, 打开胸腔, 沿着胸骨与肋骨交界处剪断, 剥掉附着胸骨上的肌肉, 擦净血污, 横向切断胸骨, 暴露骨髓腔, 然后用小止血钳挤出胸骨骨髓液。

5.16.5.2 涂片

将骨髓液滴在载物片一端的胎牛血清液滴里, 仔细混匀, 一般来讲, 两节胸骨骨髓液涂一张片子为宜, 然后按血常规涂片法涂片, 约 2~3cm 长度, 将载物片在空气中晾干。若立即染色, 需在酒精灯火焰上方稍微烘烤一下。

5.16.5.3 固定

已干的涂片放入甲醇中固定 5~10min, 即使当日不染色, 也应固定后保存。

5.16.5.4 染色

将固定过的涂片放入 Giemsa 应用液中, 染色 10~15min, 然后立即用 pH7.4 磷酸盐缓冲液冲洗。

5.16.5.5 封片

用滤纸及时擦干染片背面的水分, 再用双层滤纸轻轻按压, 并吸附染片上残留的水分, 尽量吸净, 再在空气中摇动数次, 以促尽快晾干, 然后放入二甲苯中, 透明 5min, 取出滴上适量光学树脂胶, 盖上盖玻片, 写好标签。

5.16.6 观察和计数

先用低倍镜, 后用高倍镜粗检, 选择细胞分布均匀, 细胞无损, 着色适当的区域, 再在油镜下计数。虽然不计数有核细胞的微核, 但需用有核细胞形态完好做为判断制片优劣的标准。

本法系观察嗜多染细胞的微核, 嗜多染细胞呈灰蓝色, 而成熟的红细胞呈粉红色。微核大多数呈圆形、单个的、边缘光滑整齐、嗜色性与核质一致、呈紫红色或蓝紫色。

每只动物计数 1000 个嗜多染红细胞。微核率指含有微核的嗜多染细胞数, 以千分率表示。一个嗜

多染细胞中出现两个或多个微核,仍按一个计数。

5.16.7 结果评价

微核试验结果的统计学处理,推荐下述方法:

首先找出受试物各剂量组和对照组微核 95%可信限:查普阿松分布(λ)的可信限表,阳性物组的 95%可信限按正态分布处理。然后绘出受试物各剂量组和对照组的 95%可信限的直线图。最后,各剂量组与对照组进行 u 检验。

根据统计处理结果来评价受试物是否具有染色体畸变作用。

5.17 小鼠精子畸形检测试验

5.17.1 意义:一般认为异常精子数的增加可能是在精子发生中造成遗传损伤的结果。因此,小鼠精子形态试验可用于鉴别能引起精子发生功能异常以及引起突变的化学物质。

5.17.2 动物:成年雄性小鼠,体重 25~35g。

5.17.3 剂量选择和动物分组:设 1/2、1/5、1/10 和 1/20LD₅₀ 剂量组以及阳性对照和阴性对照组。阳性对照组腹腔注射环磷酰胺,剂量为 40mg/kg 体重。阴性对照组为溶剂对照。

5.17.4 染毒方式:经口灌入受试物,连续 5 天,每天一次。

5.17.5 实验步骤

5.17.5.1 于染毒后 4 周用颈椎脱臼的方式处死动物,剖腹,取出附睾。

5.17.5.2 将附睾放入盛有 2ml 生理盐水的小平皿中,用虹膜剪剪碎。

5.17.5.3 以三层擦镜纸过滤,滤液以 1000r/min 的速度离心 5min,去除上清液。

5.17.5.4 加入少量生理盐水,以混悬液涂片,自然干燥。

5.17.5.5 将玻片置甲醇中固定 5min,用 2.5%伊红染色 1h,封片。

5.17.5.6 在显微镜(40×10)下计数 2000 个精子中畸变的精子数,精子畸形的分类按 Wyrobeks 的方法进行。

5.17.6 结果评价

用柯莫洛夫-斯未尔诺夫检验方法进行统计学处理。

具体方法请参考《中国医学百科全书》医学统计学部分,第 160 页“频数分布的拟合优度”,上海科学技术出版社,1985。

附录 A

实验动物体表面积估算方法

(补充件)

A.1 兔

$$S = K \cdot m^{\frac{2}{3}} \quad \dots\dots\dots (A1)$$

式中: S ——体表面积, cm^2 ;

K ——常数, 一般成年家兔为 10;

m ——动物体重, g 。

例: 体重 2kg 成年家兔体表面积:

$$\begin{aligned} S &= 10 \times 2000^{\frac{2}{3}} \\ \lg S &= \lg 10 + 2/3 \lg 2000 \\ &= 1 + 0.6667 \times 3.3010 \\ &= 1 + 2.2008 \\ &= 3.2008 \end{aligned}$$

查反对数表: $S = 1588 \text{cm}^2$

A.2 豚鼠

$$S = K \cdot m^{\frac{2}{3}} \quad \dots\dots\dots (A2)$$

式中: K ——常数, $K = 9.26$;

m ——动物体重, g 。

例: 体重 438g 之豚鼠的体表面积:

$$\begin{aligned} \lg S &= \lg 9.26 + 2/3 \lg 438 \\ &= 0.9666 + 2/3 \times 0.8805 \\ &= 0.9666 + 1.7610 \\ &= 2.7276 \end{aligned}$$

查反对数表: $S = 534 \text{cm}^2$

A.3 大鼠、小鼠

$$S = 0.0913 m^{\frac{2}{3}} \quad \dots\dots\dots (A3)$$

式中: S ——体表面积, cm^2 ;

m ——动物体重, kg 。

例: 体重 200g 大鼠之体表面积:

$$\begin{aligned} S &= 0.0913 \times (0.2)^{\frac{2}{3}} \\ \lg S &= \lg 0.0913 + 2/3 \lg 0.2 \\ &= 2.9605 + 2/3 \times 1.3010 \\ &= 2.9605 + 1.5340 \\ &= 2.4945 \end{aligned}$$

查反对数表: $S = 0.03123 \text{m}^2 = 312.3 \text{cm}^2$

附 录 B

化学物质毒性的 LD₅₀ 计算方法

(补充件)

B.1 霍恩氏法 (Horn)

一般各剂量组使用 5 只动物,常用的剂量系列有两排:

$$\left. \begin{array}{l} 1.0 \\ 2.15 \\ 4.64 \\ 10.0 \end{array} \right\} \times 10^t \qquad \left. \begin{array}{l} 1.0 \\ 3.16 \\ 10.0 \\ 31.6 \end{array} \right\} \times 10^t$$

$$t=0, \pm 1, \pm 2, \pm 3 \dots\dots$$

前排系列的剂量间距较后排系列为小,结果较为精确,所以一般常选用之。

预备试验:通常采用 10, 100 和 1000mg/kg 的剂量,各剂量使用 2~3 只动物。根据 24h 内动物死亡情况,估计 LD₅₀ 的可能范围,以确定正式试验所用的剂量。

正式试验:按预试所确定大概的致死剂量范围选用一组适宜的剂量系列,根据四个剂量组的动物死亡数,从 Horn 氏法 LD₅₀ 计算用表中,可求出 LD₅₀ 值及其可信限。

此法的优点是简单易行,使用动物少,可用来初步了解受试物的毒性强弱。缺点是所得 LD₅₀ 的可信限范围较宽,不够精确。

B.2 机率单位 - 对数图解法

先把剂量的对数值和相应反应的机率单位用点代表画在图上(用机率对数图纸直接把剂量和死亡百分数画在图上)。画线时应照顾所有图上各点,使点散布在线的上下,并使线上点的距离和线下点的距离能相互抵消,特别注意在死亡率 15% 到 85% 间的点,机率单位 4 与 6 之间的点,尽量使线接近这部分的点。当直线划定后,由图直线上 50% 死亡率(机率单位为 5)的相应剂量对数值,就是半数致死量(LD₅₀)的对数值,经反对数变换后即得 LD₅₀ 的剂量。

半数致死量(LD₅₀)的可信限估计:

先求 LD₅₀ 的标准差 S :

$$S = \frac{X_2 - X_1}{Y_2 - Y_1} \dots\dots\dots (B1)$$

X_2 、 X_1 相当于 $Y_2 = 6$ 、 $Y_1 = 4$ (机率单位) 时相应的 X 轴上的对数剂量。

估计 logLD₅₀ 的标准误:

$$S \log LD_{50} = \frac{S}{\sqrt{\frac{N'}{2}}} \text{ 或 } \sqrt{\frac{2S^2}{N'}} \dots\dots\dots (B2)$$

式中: N' ——反应为 16~84% 之间所用试验动物数。

半数致死量对数值的 95% 可信限为 $\log LD_{50} + 1.96 S$

logLD₅₀, 经反对数变换后,可得到 LD₅₀ 的 95% 可信限剂量。

该法要求:一般每剂量组使用不少于 10 只动物,但各组动物数不一定均等。此法不要求剂量组呈等比关系,但等比可使各点距离相等,利于作图。本法优点是,不需烦琐的计算。

B.3 寇氏法(Karbermettod)

该法是一种计算简便,易于理解,而且计算结果比较准确的一种方法。

依本方法设计时,剂量范围可宽些,剂量组必须多,但组间对数剂量差(组距)可以小些。

预备试验:一般应求得动物全死(或90%以上死亡的剂量)和动物不死亡(或10%以下死亡的剂量),分别作为正式试验的最高与最低剂量。

正式试验:一般设5~10个剂量组。将上述最高、最低剂量均换算为常用对数,然后将最高、最低剂量的对数差,按所需要的组数,分为几个对数等距(也可以不等距)的剂量组。

试验结果的计算和统计:

1. 列出试验数据及其计算表:包括各组剂量(mg/kg)、对数剂量(X)、动物数(n)、动物死亡数(r)、动物死亡百分比(P ,以小数表示)以及统计公式中要求的其他计算数据项目。

2. LD50的计算公式:根据试验条件及试验结果,可分别选用下列三个公式中的一个,求出logLD50。

① 按本试验设计得出的任何结果,均可用式(B3):

$$\log LD50 = \frac{1}{2} \sum (X_i + X_{i+1})(P_{i+1} - P_i) \quad \dots\dots\dots (B3)$$

式中: X_i 与 X_{i+1} 及 P_i 与 P_{i+1} 分别为相邻两组的剂量对数以及动物死亡百分比。

② 按本试验设计,且各组间剂量为对数等距时,可用式(B4):

$$\log LD50 = X_k - d/2 \sum (P_i + P_{i+1}) \quad \dots\dots\dots (B4)$$

式中: X_k ——最高剂量对数;

d ——相邻两剂量对数值的差数。

③ 若试验条件同②,且最高、最低剂量组动物死亡百分比分别为1.0(全死)和0(全不死)时,则可用更便于计算的式(B5):

$$\log LD50 = X_k - d(\sum P - 0.5) \quad \dots\dots\dots (B5)$$

式中: $\sum P$ ——各组动物死亡百分比之和。

3. 标准误与95%可信限:

① logLD50的标准误(S):

$$S \log LD50 = d \sqrt{\frac{\sum P - \sum P^2}{n}} \quad \dots\dots\dots (B6)$$

② 95%可信限 = $\log^{-1}(\log LD50 \pm 1.96 S \log LD50)$ $\dots\dots\dots (B7)$

附 录 C
化学物质的急性毒性 (LD50) 分级
(补充件)

级 别	大鼠经口 LD50 (mg/kg)	兔涂皮 LD50 (mg/kg)
极 毒	<1	<5
剧 毒	≥1~50	≥5~44
中 等 毒	≥50~500	≥44~350
低 毒	≥500~5000	≥350~2180
实际无毒	≥5000	≥2180

附加说明:

本标准由中国预防医学科学院环境卫生监测所归口。

本标准由“化妆品安全性评价程序和方法”起草小组负责起草。

本标准主要起草人徐凤丹、贺锡雯、秦钰慧、刘景忠。

本标准由中国预防医学科学院环境卫生监测所负责解释。