

(以下附錄節錄自中華人民共和國國家藥品監督管理局的網站，全文可參閱
<https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/hzhpggtg/jmhzhtg/20250829162436189.html>)

附錄

国家药监局
关于将角膜浑浊度和渗透性试验方法等 5 项方法纳入化妆品安全技术规范
(2015 年版) 的通告 (2025 年第 32 号)

国家药监局组织起草的《角膜浑浊度和渗透性试验方法》《体外皮肤变态反应 动力学直接多肽反应试验方法》《皮肤吸收体外试验方法》《免疫毒性试验方法》《口腔黏膜刺激试验方法》等 5 项方法，经国家药监局化妆品标准化技术委员会主任会议审查通过，现予以发布，纳入《化妆品安全技术规范（2015 年版）》相应章节（见附件）。

上述 5 项方法均为新增方法，自 2026 年 3 月 1 日起实施。在实施前，鼓励化妆品注册、备案相关检验采用上述方法。

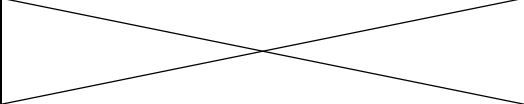
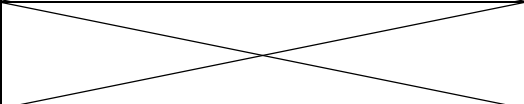
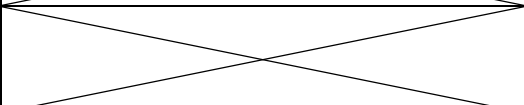
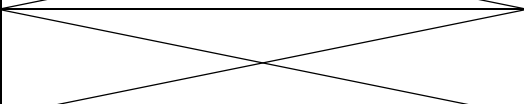
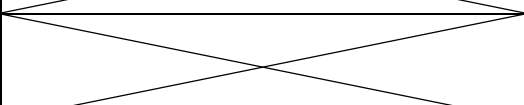
特此通告。

- 附件：1. 《化妆品安全技术规范（2015 年版）》5 项标准制定项目汇总表
2. 角膜浑浊度和渗透性试验方法
3. 体外皮肤变态反应 动力学直接多肽反应试验方法
4. 皮肤吸收体外试验方法
5. 免疫毒性试验方法
6. 口腔黏膜刺激试验方法

国家药监局
2025 年 8 月 28 日

附件 1

《化妆品安全技术规范（2015 年版）》5 项标准制定项目汇总表

序号	项目名称	类型	纳入化妆品安全技术规范的章节	同时废止的化妆品安全技术规范中原章节内容
1	牛角膜浑浊度和渗透性试验方法	新增方法	第六章 毒理学试验方法 45 牛角膜浑浊度和渗透性试验方法	
2	体外皮肤变态反应 动力学直接多肽反应试验方法		第六章 毒理学试验方法 46 体外皮肤变态反应 动力学直接多肽反应试验方法	
3	皮肤吸收体外试验方法		第六章 毒理学试验方法 47 皮肤吸收体外试验方法	
4	免疫毒性试验方法		第六章 毒理学试验方法 48 免疫毒性试验方法	
5	口腔黏膜刺激试验方法		第六章 毒理学试验方法 49 口腔黏膜刺激试验方法	

附件 2

牛角膜浑浊度和渗透性试验方法

Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Assay

1 范围

本方法规定了牛角膜浑浊度和渗透性试验的基本原则、要求和方法。

本方法适用于化妆品用化学原料的潜在不可逆眼损伤和无刺激性评价,适用于单一成分物质、多成分物质和已知明确成分及含量的混合物。

2 试验目的

本试验通过定量测定牛角膜浑浊度和渗透性的变化,评价化妆品用化学原料对眼角膜的不可逆眼损伤或无刺激性。

3 定义

3.1 眼睛刺激性 eye irritation

眼球表面接触受试物后所产生的可逆性炎性变化。

3.2 不可逆眼损伤 irreversible eye damage

眼球表面接触受试物后引起的不可逆性组织损伤。

3.3 角膜的浑浊度 corneal opacity

角膜暴露于受试物后通透性改变的程度,角膜浑浊度增加表明角膜受损。

3.4 角膜的渗透性 corneal permeability

测定通过角膜细胞层的荧光素钠染料的数量来代表角膜上皮损伤的指标。

4 试验原理

牛角膜浑浊度和渗透性试验是牛角膜接触化妆品原料后,通过测定角膜浑浊度和渗透性的变化来评估化妆品用化学原料的眼刺激程度。

5 试剂和材料

5.1 培养液

MEM培养液

MEM培养液(含酚红)

5.2 Hanks'溶液

称取氯化钙140 mg、六水合氯化镁100 mg、七水合硫酸镁100 mg、氯化钾400 mg、磷酸二氢钾60 mg、碳酸氢钠350 mg、氯化钠8 g、磷酸氢二钠48 mg、葡萄糖1 g，加水至1 L。现用现配。

5.3 荧光素钠溶液

液体及表面活性剂受试物选用浓度为4 mg/mL，固体受试物选用5 mg/mL的荧光素钠溶液进行渗透性试验。

5.4 阳性对照物

液体受试物的阳性对照物可使用100%N,N-二甲基甲酰胺（CAS 68-12-2）；固体受试物的阳性对照物可使用20%咪唑（CAS 288-32-4）溶液。

20%咪唑溶液的配制：取固体咪唑20 g，加水至100 mL溶解并摇匀。

5.5 阴性对照物

阴性对照物可使用0.9%氯化钠溶液，也可根据受试物的性质选择蒸馏水或其他可证明对测试系统无影响的溶剂，需同时设立溶剂对照。

5.6 牛眼

发育成熟的牛眼，直径大于1.8 cm，选用6~60月龄的牛。

牛眼放在2~4 °C的Hanks'溶液中，使用时间为24 h内。

5.7 浑浊度仪及角膜夹持器（见附录）

浑浊度仪是用来测量浑浊度的装置。根据浑浊度仪的光源不同，分为白光光源的浑浊度仪和单色光源的浑浊度仪。不同光源体外刺激分数的计算公式不同。

角膜夹持器由前室和后室两部分组成，前后室的内部直径均为1.7 cm，深度2.2 cm。

6 试验步骤

6.1 牛角膜的制备

剔除浑浊，有划痕、白斑、新生血管形成的牛眼。取无缺陷的牛眼，沿巩膜边缘2~3 mm剪取并剥离角膜，角膜内皮层向上，置于Hanks'溶液中。

6.2 角膜安装

角膜内皮层向下对准O型环放置在夹持器的后室上，再将前室盖在角膜上，前后室组合，旋紧。

6.3 角膜平衡

按先后室再前室的顺序，将32 °C预热的MEM培养液加满夹持器的前后室，确保没有气

泡，将固定好的角膜夹持器垂直放置于 32 ± 1 °C恒温设备中平衡1 h。

6.4 基准浑浊度的测定

角膜平衡后，按先前室再后室的顺序，吸出前后室培养液，重新加入预热的MEM培养液。浑浊度仪测定并记录每个角膜的浑浊度值，作为基准浑浊度。白光光度仪测定浑浊度小于7的角膜、单色光浑浊度仪测定值介于1200 lux到1850 lux之间的角膜为合格角膜。

6.5 角膜的分组

取基准浑浊度符合要求的牛角膜，每次试验设受试物组、阳性对照组和阴性对照组（必要时设置溶剂对照组），每组至少3只角膜。

6.6 受试物暴露

受试物暴露方式有两种，一种针对液体和表面活性剂（固体或液体），另一种针对非表面活性剂（固体）。

液体和表面活性剂（液体）以原液给样；半固体、乳霜和蜡通常按液体测试；表面活性剂（固体）配制成浓度为10%的液体进行测试。暴露时间为10 min。

非表面活性剂固体配制成浓度为20%溶液或混悬液给样，暴露时间为4 h。

溶剂除0.9%氯化钠溶液外，选择蒸馏水或其他溶剂时，需设溶剂对照。

根据受试物理化性质，给样方式有两种，一种直接给样法适用于非粘性到微粘性的液体化学品，另一种开窗给样法适用于半粘性和粘性液体化学品以及纯固体。确保测试受试物充分覆盖上皮表面，并在冲洗步骤中充分去除。

直接给样：取分组后带有角膜的夹持器，吸去前室液体，加入750 μ L受试物于前室中，全部加样后，确保样品覆盖整个角膜，角膜内皮层朝下水平放置于 32 ± 1 °C恒温设备中。

开窗给样：吸去前室液体，用开窗器移除前室的玻璃片，夹持器前室在上，水平放置。用棉球轻轻吸干角膜上残存培养液，取750 μ L受试物均匀平铺在角膜上，置于 32 ± 1 °C恒温设备中。

6.7 暴露后浑浊度值测定

暴露结束后，吸去前室的受试物，前室用MEM（含酚红）培养液将角膜冲洗至少3次（直到酚红不变色且肉眼无法识别到被测物质为止），再用MEM培养液冲洗至无色后，将MEM培养液加入前室，浑浊度仪测定每个角膜的浑浊度。

液体受试物测定后，角膜夹持器需垂直置于 32 ± 1 °C的恒温设备中再孵育2 h后，更换前后室培养液，测定每个角膜的浑浊度值，作为终浑浊度。对于固体受试物，暴露结束冲洗后测定的浑浊度值直接作为终浑浊度，无需再孵育。

每只角膜的浑浊度改变值为终浑浊度减去基准浑浊度。计算每组中角膜浑浊度改变值的平均值作为平均浑浊度。

浑浊度改变值 = 终浑浊度 - 基准浑浊度

6.8 光密度值测定

角膜的渗透性是由酶标仪测量的荧光素钠溶液透过角膜后室培养液的光密度值产生的变化来表示。吸去前室培养液，加入1 mL荧光素钠溶液，夹持器前室向上水平放置 $32 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温设备中孵育90 min。取后室液体360 μL 用酶标仪在490 nm波长处测定光密度值，计算每组角膜的光密度值的平均值作为平均光密度值。

当光密度值超出线性范围时，需对测定液进行稀释：

$$\text{光密度值} = \text{稀释倍数} \times (\text{稀释后测定液的光密度值} - \text{阴性对照光密度值})$$

6.9 体外刺激分数计算

根据浑浊度仪的光源不同，分别选用下列不同的体外刺激分数计算公式：

$$\text{白光浑浊度仪体外眼刺激分数 (IVIS)} = \text{平均浑浊度} + 15 \times \text{平均光密度值}$$

$$\text{单色光浑浊度仪体外眼刺激分数 (LIS)} = \text{平均浑浊度 (单色光源光度值lux/7)} + 15 \times \text{平均光密度值}$$

7 试验成立条件

阴性对照体外刺激分类为无刺激性，液体受试物阳性对照100%N,N-二甲基甲酰胺或固体受试物阳性对照20%咪唑溶液眼刺激等级分类为 I 类不可逆眼损伤，则此次试验成立。

8 结果判定标准

表1 眼刺激性反应分级

体外刺激分数		眼刺激分类
白光光源	单色光源	
$\text{IVIS} \leq 3$	$\text{LIS} \leq 30$	无刺激性
$3 < \text{IVIS} \leq 55$	$\text{LIS} > 30$ 且 $\text{lux}/7 \leq 145$ 且 $\text{OD}_{490} \leq 2.5$	不可单独预测*
$\text{IVIS} > 55$	$\text{LIS} > 30$ 且 $\text{lux}/7 \leq 145$ 且 $\text{OD}_{490} > 2.5$ 或者 $\text{LIS} > 30$ 且 $\text{lux}/7 > 145$	不可逆眼损伤，I类

*该分类需结合其他方法进一步判定。

9 结果解释

当出现以下情况时，认为检测结果不确定：

情况1：3个角膜中的2个与平均值结果不一致；

情况2：3个角膜中的1个与平均值结果不一致，并且不一致的值满足下面四种情形之一：

情形1：采用白光光源浑浊度仪测定，得到的IVIS分数与55（不可逆眼损伤临界值）相差大于10；

情形2：采用单色光源浑浊度仪测定，根据浑浊度可分为不可逆眼损伤，I类（平均Lux/7 >

145)，但3只角膜中有1只角膜Lux/7 < 130；

情形3：采用单色光源浑浊度仪测定，根据光密度值可分为不可逆眼损伤，I类（平均光密度值> 2.5），但3只角膜中有1只角膜光密度值< 2.0；

情形4：采用单色光源浑浊度仪测定，LIS分数为无刺激性（平均LIS分数≤ 30），但3只角膜中有1只角膜LIS分数> 40。

当检测结果不确定时，应重复测试，当第一次检测结果与第二次检测结果相反时，应进行第三次检测，以第三次检测结果为判定标准。

本试验结果能预测受试物的不可逆眼损伤和无刺激性，可作为不可逆眼损伤和刺激性的确定性方法中的组合方法之一。

附录

浑浊度仪和夹持器

1 浑浊度仪

浑浊度仪是牛角膜浑浊度和渗透性试验中用来测量浑浊度的装置。根据浑浊度仪的光源不同，分为白光光源的浑浊度仪和单色光源的浑浊度仪。根据光源的不同，目前市面上浑浊度仪主要有采用卤素灯的OP-KIT浑浊度仪、采用氩氦绿光激光器的LLBO浑浊度仪以及LED白光光源和LED绿色光源的浑浊度仪。任何类型的浑浊度仪都应符合为一系列浑浊度读数提供线性响应，包含预测模型所涉及的不同刺激等级的阈值。其他证明与经过验证仪器具有相似的结果的设备也可以在实验室使用。

2 角膜夹持器

BCOP角膜夹持器由惰性材料（如聚丙烯）制成。夹持器由前室和后室两部分组成，前后室由三个不锈钢螺钉固定，位于前后室的外边缘（分解结构图见图1）。前后室均有1个圆柱形内腔。每个腔室容积约5 mL。两端各有一个玻璃片。浑浊度仪透过玻璃片检测光通过内径的浑浊度。在开窗暴露时，应将前室端的玻璃片用开窗器移除。玻璃窗和腔室间以及后室的O型环用于防止液体泄漏。前后室顶部的两个孔用于加入和移除受试物和培养基。在暴露和孵育的过程中，用胶塞封闭。

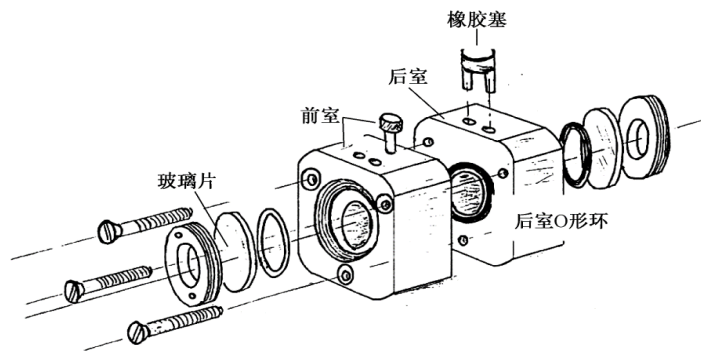


图1 角膜夹持器分解结构图

对于任何型号浑浊度仪的夹持器，前后室的内径表面积与后室体积的比例需与传统角膜夹持器保持一致。这是正确使用公式计算IVIS或LIS和测定渗透率值所必需的。

角膜夹持器在常规使用前应通过测量充满培养基（无角膜）的腔室的空白浑浊度进行检查。定期检查空白浑浊度的变化，若浑浊度发生变化，进行适当清洁或考虑角膜更换夹持器。

附件 3

体外皮肤变态反应 动力学直接多肽反应试验方法

In Chemico Skin Sensitisation: Kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA)

1 范围

本方法规定了动力学直接多肽反应试验的基本原则、试验方法和技术要求。

本方法用于化妆品用化学原料的皮肤致敏性评价，适用于单一成分物质、多成分物质和已知成分及含量的混合物。

2 试验目的

预测和评价化妆品用化学原料是否具有潜在的皮肤致敏性及其分级。

3 定义

3.1 多肽消耗百分比 percent peptide depletion

与溶剂对照相比，受试物消耗多肽的程度。

3.2 单一成分物质 mono-constituent substance

组成可定量的物质，单一主要成分含量至少为 80% (w/w)。

3.3 多成分物质 multi-constituent substance

组成可定量的物质，其中含有两种或两种以上主要成分，每种主要成分的含量 $\geq 10\%$ (w/w) 和 $< 80\%$ (w/w)。多成分物质是制造过程产生的。

3.4 混合物 mixture

由两种或两种以上不发生化学反应的化学物质组成的固体或液体物质。

4 试验原理

试验基本原理同直接多肽反应试验 (DPRA)，有致敏性的受试物与多肽模拟的皮肤蛋白 (本试验仅使用半胱氨酸多肽) 共同孵育，导致多肽量减少。不同于 DPRA 仅测试化学物质一个浓度和一个时间点，kDPRA 以时间和浓度依赖的方式量化评价被测物质的多肽结合反应性。被测物质采用 5 个浓度与半胱氨酸多肽溶液孵育不同时间 (6 个时间点) 后，通过添加单溴二胺 (Monobromobimane, mBrB, CAS 74235-78-2) 与未结合的半胱氨酸多肽形成荧光复合物，来测量多肽的剩余量。如某时间点未结合多肽百分比的自然对数与受试物浓度呈线性关系 (准一级反应)，则通过斜率绝对值求得反应速率常数 k ，换算成对应时间点的反应动力学常数 k_t (单位: $M^{-1}s^{-1}$)，并计算各时间点 $\lg k_t$ ，以其中最大值 $\lg k_{\max}$ 进行结果判断，评

价受试物的皮肤致敏性。

5 试剂和受试物制备

5.1 多肽片段与纯度

半胱氨酸多肽：Ac-RFAACAA-COOH，分子量：751.35，纯度： $\geq 95\%$ 。

5.2 阳性对照物

阳性对照物常用肉桂醛（CAS 104-55-2；纯度 $\geq 95\%$ ）。

5.3 受试物

5.3.1 溶剂的选择

溶剂首选乙腈，其次是 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液。二甲基亚砜可能导致肽二聚化，应避免使用。

5.3.2 受试物溶液的配制

进行试验前，应评估受试物的溶解度。溶解性可用肉眼鉴别，应形成澄清透明的溶液。一般受试物最大配制浓度为 20 mM（应完全溶解），对应反应体系终浓度为 5 mM。试验时用溶剂连续稀释以获得 20、10、5、2.5 和 1.25 mM 系列浓度的受试物溶液。

20 mM 的受试物溶液应于试验当日配制，否则应证明储存不影响其稳定性。通常配制量为 5 mL，受试物（阳性对照）理论称取量为分子量 $\times 0.1$ mg（以纯物质计）。

kDPRA 在技术上适用于成分和含量明确的多成分物质和混合物的测试，此时，可以根据不同组分（不包括水）的占比和分子量计算受试物总的纯度和单一的表观分子量，用于计算制备 20 mM 溶液的取样量。

5.3.3 阳性对照溶液的配制

按受试物溶液的配制方法，用乙腈溶解阳性对照物制成 20 mM 浓度的溶液，并稀释得到 20、10、5、2.5 和 1.25 mM 系列浓度的溶液。

5.4 多肽贮备液的配制

称取适量半胱氨酸多肽，用 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液配制成 0.667 mM（0.501 mg/mL）的溶液。孵育前新鲜配制，配制时使用涡旋仪震荡溶解，必要时可用超声溶解，应在冰浴中进行，防止多肽降解。

pH 7.5 磷酸盐缓冲液：取 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液 18 mL，加 0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液 82 mL 混合，测定 pH 值，应在 7.50 ± 0.05 之间。若偏酸性，加入 0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液进行调节。若偏碱性，加入 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液进行调节，4℃ 保存，可在 4 周内使用。

5.5 单溴二胺溶液的配制

称取 8.1 mg 单溴二胺置于 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度，制成 3 mM 单溴二胺溶液。现用现配，避光保存。

6 试验步骤

6.1 试验设计

试验设置受试物组（终浓度为 0.31 mM、0.63 mM、1.25 mM、2.5 mM、5 mM）、阳性对照组（positive control, PC）、受试物对照组（substance control, SC）、溶剂对照组（vehicle control, VC）和空白对照组（blank control, BC），其中受试物组每个浓度 3 个重复，VC 组、BC 组 12 个重复，PC 和 SC 每个浓度一个孔。以 3 个受试物（A、B、C）为例加样示例参见图 1。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VC 组（溶剂+0.5 mM 多肽）											
B	BC 组（溶剂）											
C	0.31 mM 受试物 A +0.5 mM 多肽			0.31 mM 受试物 B +0.5 mM 多肽			0.31 mM 受试物 C +0.5 mM 多肽			0.31 mM 受试 物 A+ 缓冲 液	0.31 mM 受试 物 B+ 缓冲 液	0.31 mM 受试 物 C+ 缓冲 液
D	0.63 mM 受试物 A +0.5 mM 多肽			0.63 mM 受试物 B +0.5 mM 多肽			0.63 mM 受试物 C +0.5 mM 多肽			0.63 mM 受试 物 A +缓冲 液	0.63 mM 受试 物 B +缓冲 液	0.63 mM 受试 物 C +缓冲 液
E	1.25 mM 受试物 A +0.5 mM 多肽			1.25 mM 受试物 B +0.5 mM 多肽			1.25 mM 受试物 C +0.5 mM 多肽			1.25 mM 受试 物 A +缓冲 液	1.25 mM 受试 物 B +缓冲 液	1.25 mM 受试 物 C +缓冲 液
F	2.5 mM 受试物 A +0.5 mM 多肽			2.5 mM 受试物 B +0.5 mM 多肽			2.5 mM 受试物 C +0.5 mM 多肽			2.5 mM 受试 物 A +缓冲 液	2.5 mM 受试 物 B +缓冲 液	2.5 mM 受试 物 C +缓冲 液
G	5 mM 受试物 A +0.5 mM 多肽			5 mM 受试物 B +0.5 mM 多肽			5 mM 受试物 C +0.5 mM 多肽			5 mM 受试 物 A +缓冲 液	5 mM 受试 物 B +缓冲 液	5 mM 受试 物 C +缓冲 液
H	0.31 mM PC+0.5 mM 多 肽	0.63 mM PC+0.5 mM 多 肽	1.25 mM PC+0.5 mM 多 肽	2.5 mM PC+0.5 mM 多 肽	5 mM PC+0.5 mM 多 肽			1.25 mM PC+ 缓冲 液	2.5 mM PC+ 缓冲 液	5 mM PC+ 缓冲 液	10 mM PC+ 缓冲 液	20 mM PC+ 缓冲 液

图 1 kDPRA 反应板加样示例

6.2 操作步骤

每个反应时间分别准备应用板（受试物溶液稀释板）和反应板。应先准备反应板，随后立即准备含有受试物稀释液的应用板，并将各组受试物溶液立即加入到反应板中。

6.2.1 反应板的准备

使用黑色 96 孔板，参照图 1 准备各时间点的反应板。分别在 A1~A12、C1-H1~C5-H5、C6~G6、C7-G7~C9-G9 孔中加入 120 μL 0.667 mM 多肽溶液，在 B1~B12、C10-G10~C12-G12、H8~H12 孔中加入 120 μL pH7.5 的磷酸盐缓冲液。

6.2.2 应用板的准备

准备 2 mL 深孔板，参照图 2 准备各时间点的的应用板。分别在 A 行、B 行、C 行~ F 行中每孔分别加入 300 μL 溶剂，将 600 μL 20 mM 受试物储存液加入 G 行。使用多通道移液器从 G 行吸取 300 μL ，加入 F 行，随后按同样方法依次稀释至 C 行。在 H1~H4 每孔中每孔分别加入 600 μL 溶剂，将 1200 μL 20 mM 阳性对照物储存液加入 H5 孔。使用移液器从 H5 孔吸取 600 μL ，加入 H4 行，按同样方法依次稀释至 H1。从 H1~H5 中吸取 300 μL 溶液转移到 H8~H12 孔。配制完成后及时用封板膜密封待用。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂
B	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂
C	1.25 mM 受试物 A	1.25 mM 受试物 A	1.25 mM 受试物 A	1.25 mM 受试物 B	1.25 mM 受试物 B	1.25 mM 受试物 B	1.25 mM 受试物 C	1.25 mM 受试物 C	1.25 mM 受试物 C	1.25 mM 受试物 A	1.25 mM 受试物 B	1.25 mM 受试物 C
D	2.5 mM 受试物 A	2.5 mM 受试物 A	2.5 mM 受试物 A	2.5 mM 受试物 B	2.5 mM 受试物 B	2.5 mM 受试物 B	2.5 mM 受试物 C	2.5 mM 受试物 C	2.5 mM 受试物 C	2.5 mM 受试物 A	2.5 mM 受试物 B	2.5 mM 受试物 C
E	5 mM 受试物 A	5 mM 受试物 A	5 mM 受试物 A	5 mM 受试物 B	5 mM 受试物 B	5 mM 受试物 B	5 mM 受试物 C	5 mM 受试物 C	5 mM 受试物 C	5 mM 受试物 A	5 mM 受试物 B	5 mM 受试物 C
F	10 mM 受试物 A	10 mM 受试物 A	10 mM 受试物 A	10 mM 受试物 B	10 mM 受试物 B	10 mM 受试物 B	10 mM 受试物 C	10 mM 受试物 C	10 mM 受试物 C	10 mM 受试物 A	10 mM 受试物 B	10 mM 受试物 C
G	20 mM 受试物 A	20 mM 受试物 A	20 mM 受试物 A	20 mM 受试物 B	20 mM 受试物 B	20 mM 受试物 B	20 mM 受试物 C	20 mM 受试物 C	20 mM 受试物 C	20 mM 受试物 A	20 mM 受试物 B	20 mM 受试物 C
H	1.25 mM PC	2.5 mM PC	5 mM PC	10 mM PC	20 mM PC			1.25 mM PC	2.5 mM PC	5 mM PC	10 mM PC	20 mM PC

图 2 应用板加样示例

6.3 孵育

使用多通道移液器从应用板中吸取 40 μL 配制好的溶液加入反应板对应孔中，用封板膜将反应板密封，200 rpm 震荡 5 min 后，25 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 10 min \pm 30 s、30 min \pm 3 min、90 min \pm 5 min、150 min \pm 10 min、210 min \pm 10 min、1440 min \pm 15 min。

6.4 测定

孵育结束后，撕下封板膜，每孔加入新鲜配制的 3 mM 单溴二胺溶液 40 μ L。200 ~ 300 rpm 震荡 5 min 后，用酶标仪在激发波长 390 nm，发射波长 480 nm 下检测荧光强度。

7 数据处理

7.1 荧光值计算和校正

计算 BC 组、VC 组的平均荧光强度和标准差，VC 孔减去 BC 组的平均荧光强度值，各浓度受试物和阳性对照孔减去各自的对照组的荧光强度值。

计算每个测试浓度三个重复孔的平均荧光强度和标准差，采用 t 检验统计与 VC 组（12 个重复）的平均多肽浓度是否有显著性差异。

7.2 多肽消耗率计算

按以下公式计算多肽消除率：

$$\text{多肽消耗率 (\%)} = \left[1 - \frac{\text{校正后的受试物或PC孔荧光强度}}{\text{校正后的VC组平均荧光强度}} \right] \times 100\%$$

7.3 反应动力学常数计算

如给定时间的最高测试浓度（受试物终浓度为 5 mM）符合半胱氨酸多肽结合阳性标准，即多肽消除率 $\geq 13.89\%$ ，且与 VC 组差异有显著性，对该暴露时间进行进一步计算反应动力学常数。如不符合阳性标准，则受试物为非反应性。

每个时间点，以未消耗肽占比（%）的自然对数，即 $\ln(100-dp)$ 为纵坐标，受试物浓度为横坐标绘制反应曲线，若两者呈线性相关（相关系数 $r > 0.90$ ），则得到的负斜率的绝对值即为准一级反应速率常数 k_{observed} (mM^{-1})，按照下式计算各时间点反应动力学常数 k_t ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)：

$$k_t = k_{\text{observed}} \cdot \frac{1000}{60t}$$

注：t 为孵育时间，以 min 表示。

计算所有满足 $r > 0.90$ 的孵育时间的 $\lg k_t$ ，取其中最大值为 $\lg k_{\text{max}}$ 。

8 试验成立条件

阳性对照组 90 min 时间点 $\lg k$ 值应在 $-1.75 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \sim -1.40 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 范围内，若 90 min 时间点没有得到 $\lg k$ 值，150 min 时间点 $\lg k$ 应在 $-1.90 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \sim -1.45 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 范围内。

至少有 5 个时间点溶剂对照组变异系数（Coefficient of Variation, CV） $< 15\%$ 。

9 结果判定标准

按表 1 对受试物进行致敏性分级。

表 1 kDPRA 结果判断

试验结果	预测结果
$\lg k_{\max} \geq -2.0$	极强或强致敏剂
非反应性或 $\lg k_{\max} < -2.0$	非致敏剂或中、弱致敏剂

10 注意事项

10.1 溶剂为磷酸盐缓冲液的受试物

如果受试物溶剂为磷酸盐缓冲液，则半胱氨酸多肽贮备液配制浓度为 1 mM (0.752 mg/mL)，同时反应板制备时半胱氨酸多肽贮备液（或磷酸盐缓冲液）每孔加样体积减少到 80 μL ，然后再加入乙腈或磷酸盐缓冲液 40 μL 补至 120 μL ，使所有孔中乙腈总体积仍为 40 μL 。

10.2 非线性反应

出现非线性反应时无法通过斜率法求得速率常数。速率常数可以根据多肽消除率个体值按以下公式计算：

$$k = \frac{\ln(100/(100-dp))}{E \times t}$$

注：dp 为多肽消除率 (%)，E 为受试物的浓度，t 是孵育时间。

根据该公式，计算多肽消耗率高于 13.89% 的阈值的每个时间点 t 和每个浓度 E 下的速率常数。将每个时间点不同浓度多肽消耗率求平均值，然后得到 $\lg k_{\max}$ 值。

在发生明显多肽结合的情况下，很少会出现非线性反应。出现非线性反应须进行重复试验，以检查这种非线性反应是受试物固有的，还是试验误差所致。如果非线性结果可重复，则判定受试物存在固有的非线性反应，可采用上述公式基于个体值的计算结果进行判断。若仅在早期时间点观察到显著的肽消耗，但在随后的时间点没有观察到，也可以将早期时间点的 $\lg k_t$ 作为结果进行致敏性分级判定。

10.3 溶解度低于 20 mM 的受试物

对于最大溶解浓度低于 20 mM 的受试物，可在较低浓度下进行试验，如出现 $\lg k_{\max} \geq -2.0$ 的结果，受试物可以判断为 GHS 1A 亚类皮肤致敏物，但对于非致敏性或 $\lg k_{\max} < -2.0$ 的结果则不能得出明确结论。此外，当得到 $\lg k_{\max}$ 值在 -1.93 ~ -2.06 范围内，无法进行受试物致敏性分级判定，需要重新测试和/或补充额外的数据/信息进行结果判定。

10.4 特殊化合物的适用性

金属化合物可通过共价结合以外的机制与蛋白质发生反应，该方法不适用于金属化合物（如硫酸镍，Nickel sulphate）。此外，kDPRA 仅测量与半胱氨酸肽的反应性，不适用于具有

赖氨酸专属反应性的强致敏剂，如一些酰基卤化物、酚酯或醛类等。

有些化合物（如苯基炔丙基醛，Phenylpropionic aldehyde）不与肽共价结合，但可促进其氧化（即半胱氨酸二聚化），会引起测得多肽消耗量“增加”，可能导致假阳性结果和/或预测反应性更高。

该方法没有代谢活化系统，不能用于检测需要进行酶促反应生物活化后成为致敏剂的化学物质（如 3-二甲氨基丙胺，3-Dimethylaminopropylamine）。大部分通过非生物转换后形成致敏物质的化合物（如半抗原）能够被该方法正确评价，但发生自发快速氧化的半抗原（如芳香胺、儿茶酚类或氢醌类）由于氧化停滞阶段可引起反应速率的降低，需要更多数据确定其在氧化条件下的弱反应性。

由于 kDPRA 采用荧光检测技术，具有自发荧光（如 3,3',4',5'-四氯水杨酰苯胺，Tetrachlorosalicylanilide）或荧光淬灭（如香兰素，Vanilin）的受试物可影响试验结果。此外，应注意受试物与单溴二胺的相互作用，如硫醇结构中的-SH 可以与单溴二胺相互作用，导致荧光增强，因此该方法不适用于硫醇类物质，包括在试验条件下产生并释放游离-SH 的物质。

附件 4

皮肤吸收体外试验方法

Skin Absorption: *In vitro* Method

1 范围

本方法规定了皮肤吸收体外试验的基本要求和方法。

本方法适用于单一成分的化妆品用化学原料。

2 试验目的

预测和评价化妆品用化学原料在离体皮肤中的经皮吸收率。

3 定义

3.1 受试物 test substances

被测试的化妆品原料，为单一化学物质。

3.2 吸收量 absorbed dose

在一定时间内透过皮肤的受试物的量。

4 试验原理

在特定条件下，将受试物(可以是放射标记物)暴露于扩散池中的皮肤表面一定时间后，采用适当的清洗程序和方法除去皮肤表面的受试物。在整个试验过程中，设置不同的时间点采集接收液，采用适当的方法测定受试物或其代谢产物。

当受试物具有代谢活性时，可以分析受试物的代谢活性产物，试验结束后，采用适当的方法测定受试物及其代谢产物的分布情况。

在本方法所描述的条件下，收集接收液和试验皮肤中的所有受试物，监测给定时间内受试物的吸收情况(一般试验周期为 24 h)。应同时测定皮肤表面清洗液中的受试物、留在皮肤里的受试物、接收室中接收液里的受试物，得到受试物在各接收液里的分布和总体回收率。残留在皮肤角质层中的受试物可能会被吸收，参考本方法 6 数据处理和计算部分判定角质层的残留量是否计入皮肤吸收率。

5 试验方法

5.1 扩散池

扩散池由供给室和接收室组成（示例图见图1），离体皮肤放置于两者之间。扩散池的供给室和接收室之间应有良好的密封性，能较好控制扩散池及其内容物的温度，并保证与皮肤接触接收液混合良好和取样方便（静态式或流通池式扩散池均可使用）。正常情况下，供给室在暴露于有限剂量受试物过程中保持开放，但在无限剂量和部分有限剂量的情况下，供给室可以封闭。

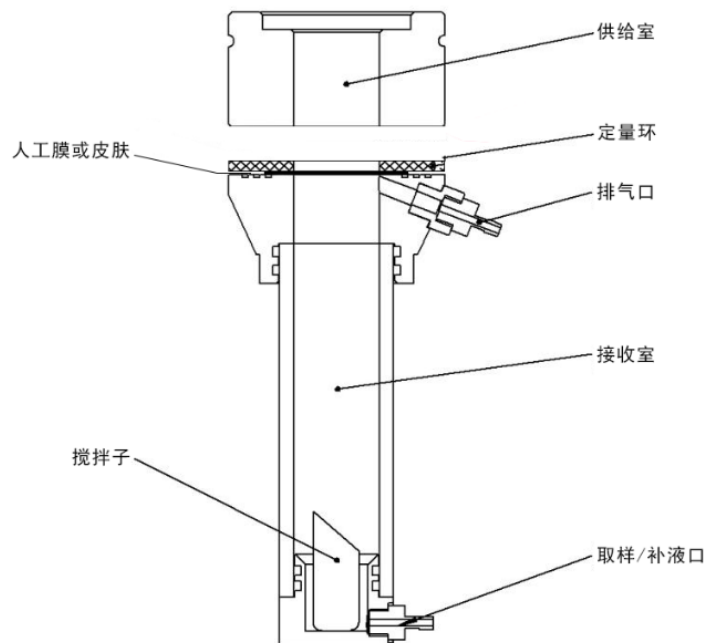


图1 一种用于皮肤吸收体外试验的直立式扩散池示例图

5.2 接收液

接收液应优先选择有益于生理的溶液，需提供接收液的精确组分，并证实受试物在接收液中能充分溶解，不影响皮肤吸收和完整性。在循环流动系统中，流速不能妨碍受试物扩散进入接收液。在静态渗透式系统中，接收液应连续搅拌。如果研究受试物在皮肤中的代谢效应，接收液必须能维持整个试验过程中皮肤的代谢活性。

5.3 皮肤制备

皮肤来源为动物，首选小型猪。须符合我国相关伦理要求，首选活性皮肤，也可以使用非活性皮肤，应证明皮肤的完整性。采用表皮层（酶、热或化学分离的）或用植皮刀分离的皮肤均可以使用。应避免使用太厚的皮肤，除非特殊受试物需使用全层皮肤测试。同时还应明确皮肤种类、解剖位置以及制备技术。

5.4 皮肤完整性

应正确制备和储存离体皮肤，使用前检查皮肤及其屏障的完整性。研究受试物在皮肤的代谢作用时，应使用新鲜皮肤，并确保其在试验过程中的代谢活性。一般新鲜的离体皮肤应在24 h内使用，也可证明在合理可行的情况下，根据代谢酶系统和贮藏温度的不同而做适当调整，但在使用前应测试和证明其屏障功能的完整性。

5.5 受试物制备

受试物可以采用放射性标记或使用其他定量方法。受试样品的制备尽可能与实际使用的状态保持一致，偏离使用情况的制备应做合理说明。受试物每个浓度要设置3个平行皮肤（皮肤来自同一个体），至少进行4次重复试验（皮肤来自不同个体）。

5.6 受试物浓度和组成

通常将受试物配制成系列浓度，其浓度范围应覆盖人体实际接触的可能暴露范围。受试物配制过程中需确保其稳定性和均一性，对于固体、半固体制剂和混悬液，需验证受试物在溶媒中的均匀性。

5.7 皮肤暴露

根据人体可能接触受试物的情况，常选择有限剂量暴露。剂量应模仿人体暴露量，通常固体受试物为2~5 mg/cm²，液体受试物最高为10 μL/cm²。实际剂量可根据预期的上样条件、研究目标或受试物的物理特性进行调整。如皮肤用量为无限剂量时，单位面积的剂量可以加大。

5.8 温度

受试物皮肤吸收一般属于被动吸收，受温度的影响较大，因此试验时扩散池和皮肤应保持恒定接近于皮肤正常温度32±1℃。不同的扩散池可根据自身情况调整水浴或干加热参数到一定温度，以确保离体皮肤温度在其正常生理标准范围内。实验室相对湿度保持在30~70%之间。

5.9 暴露时间和取样

一般情况下接收液的采样点应满足能够以作图形式表现受试物的透皮吸收情况。根据受试物理化性质结合预试验确定合适的采样频率，试验周期内通常需要6~12个采样点。

5.10 样品分析

对试验系统的所有组成部分均应进行分析测定，以确定回收率。其中包括供给室、皮肤表面、皮肤中、接收液/池中的所有受试物。试验应得到足够的回收率，放射性标记试验的回

收率应为 $100 \pm 10\%$ ，其他定量方法建议回收率应为 $100 \pm 15\%$ ，若偏离应合理解释，必要时重新进行试验。

6 数据处理和计算

应列出接收液的分析结果，不同时间内受试物在试验系统中的分布和吸收情况。对于有限暴露剂量，应计算皮肤洗液中受试物的量、与皮肤结合的数量（分析不同皮肤层）以及接收液中受试物的量。经皮吸收试验的结果有时只能用接收液的数据表示，对于受试物在试验结束时仍残留于皮肤内的情况，总的吸收量要考虑是否扣除角质层含量，并结合化合物作用位置和透过特性给出合理解释。无限剂量暴露试验时不做吸收百分比的计算。

回收率计算公式：

$$\text{回收率} = \frac{\text{清洗液中的量} + \text{皮肤中的量}^* + \text{接收液中的量}}{\text{皮肤加样量}} \times 100\%$$

注：*代表皮肤中的量包含角质层、活性表皮层和真皮层的总和

皮肤吸收率计算公式：

$$\text{皮肤吸收率} = \frac{\text{皮肤中的量}^{\#} + \text{接收液中的量}}{\text{皮肤加样量}} \times 100\%$$

注：#是否去除角质层应给予合理说明

附录

皮肤吸收体外试验方法应用示例（咖啡因）

1 试验目的

本次试验根据《皮肤吸收体外试验方法》文件中的基本原则，参考相关文献中具体方法，研究咖啡因在离体猪皮肤的吸收特性，定量分析咖啡因的透皮吸收率。本试验是以水溶性成分咖啡因作为研究对象获得其皮肤透过率，因角质层中咖啡因含量较少，故在计算皮肤吸收率时未计入皮肤吸收量中。

条件不同数据会产生变化，本示例中的所有设备参数仅供参考。

2 受试物和皮肤类型

试验使用咖啡因（MW = 194.2 Dal, Log $P_{o/w}$ = -0.07, 水中溶解度 = 21.6 mg/mL 25 °C）作为受试物。

皮肤模型：3 月龄巴马小型猪背部或腹部皮肤。

贮藏条件：制备后-20 °C 冻存，10 天内用完，冻融不超过 2 次。

3 试剂和设备耗材

3.1 试剂

生理盐水、甲醇（色谱级）、磷酸（色谱级）。

3.2 设备

透皮吸收扩散仪（配备适宜的池体，能保证受试物于接收液中均匀扩散）、超高效液相色谱仪、经皮水分流失测定仪、涡旋混匀器、离心机。

3.3 耗材

色谱柱、离心管、2 mL 进样瓶、移液器、枪头、0.22 μm 尼龙滤膜、皮肤胶带、刀片、取皮刀、外科剪刀、1 mL 注射器、吸水纸、棉签、离体猪皮。

4 试验方法

4.1 受试物制备

经预试验研究确定，配制 0.1%、0.3%、1.0% 三种浓度咖啡因溶液。取样该溶液，经前处理、稀释等步骤，用液相检测并计算溶液中咖啡因实际含量，用以计算实际加样量。将配好的咖啡因溶液在试验条件下放置 24 h 取样，检测咖啡因含量有无变化。

4.2 接收液

保证其满足漏槽条件，即接收液的体积至少是咖啡因达到饱和和溶解时所需介质体积的 3 ~ 10 倍。配制好的接收液 pH 值应保持在 pH 6.5 ~ 7.5 范围内。根据溶液中咖啡因浓度和加样体积估算不同时间点的可能最高和最低浓度设计浓度曲线，于 0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、24 h 取样，测定咖啡因在接收液中的稳定性。

4.3 离体猪皮的制备

离体猪皮采自猪背或腹侧皮肤，符合相关动物伦理要求，保证猪皮角质屏障的完整性（如不可采用热水淋洗或刮毛，以确保皮肤角质层完整性等）。用吸水纸吸干皮肤表面生理盐水，制成肉眼观察未受损伤、面积大小合适的皮肤备用。本试验中同一浓度受试物设置 3 个平行皮肤（皮肤来自同一个体）重复 4 次（皮肤来自不同个体）。

4.4 皮肤完整性检查

使用经皮水分流失仪测定猪皮角质层经皮水分流失值（TEWL） $<15 \text{ g/m}^2/\text{h}$ 的皮肤才可用于试验。加入受试物前调整温度到 $32 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 并保持稳定，将皮肤固定在扩散池的供给室和接收室之间，皮肤角质层朝向供给室，真皮层一侧朝向接收室，并通过补液管向接收室中加入接收液，去除接收液与皮肤间的气泡，确保猪皮与接收液完全接触，开启磁力搅拌器，转速设为 600 rpm，扩散池体系在此状态下平衡 30 ~ 45 min。

5 试验步骤

5.1 上样

向接收室中加入接收液。通过加样管加入接收液并准确记录接收液体积。接收液注入接收室后，去除皮肤与接收液接触面滞留的气泡，确保皮肤与接收液完全接触。该扩散池体系在正常试验条件下平衡 30 ~ 45 min，验证皮肤完整性之后，方可加样处理。

向供给室中皮肤表面加入咖啡因测试溶液，并设置不含咖啡因的生理盐水作为阴性对照。用移液器按照 $10 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 的比例，将根据供给室内径面积计算所得体积的咖啡因溶液，均匀涂布于皮肤表面。

试验期间保持实验室环境湿度为 30 ~ 70% RH。设置磁力搅拌器以 600 rpm 的速度搅拌，保持 $32 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴。

5.2 取样

分别于 0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、24 h 时间点用注射器/自动取样装置取样，具体取样体积可根据预试验结果自行确定。0.22 μm 尼龙滤膜过滤后待测。

供给室清洗：暴露结束后每次使用 1 mL 生理盐水清洗 15 次，将所有清洗液合并待测。

皮肤表面残留受试物清洗：皮肤暴露 24 h 后每次使用 3 mL 生理盐水清洗 3 次，将所有清洗液合并震荡，使用 0.22 μm 尼龙滤膜过滤后待测。

角质层：受试皮肤在干燥条件下，使用皮肤胶带进行角质层取样，重复 20 次。取样后将所有 20 张胶带置于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 甲醇震荡过夜提取、离心，提取液过滤后待测。

除去角质层后的皮肤：去除角质层后的皮肤剪碎，加入 10 mL 甲醇过夜提取，离心取上清液过滤后待测。

5.3 检测

仪器：超高效液相色谱仪（UPLC）

色谱柱：C18 反相色谱柱

流动相：A（0.1%磷酸水溶液）和 B（0.1%磷酸甲醇溶液） A:B=9:1

流速：0.25 mL/min

进样量：2 μ L

柱温：30 $^{\circ}$ C

时间：14 min

检测波长：280 nm

6 数据分析

6.1 皮肤吸收率

$$\text{皮肤吸收率} = \frac{\text{皮下渗透量}}{\text{皮肤加样量}} \times 100\% = \frac{Q+N}{\text{皮肤加样量}} \times 100\%$$

其中 Q：接收液中咖啡因总量；N：除角质层皮肤中咖啡因总量。

6.2 累计皮下渗透量 Q_n

$$Q_n = C_n \times V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V_i$$

其中 C_n ：各时间点浓度； C_i ：样品收集时间点 i 的浓度，i 为 1~n-1； V_i ：各样品收集时间点 i 的取样体积 1 mL； V_0 ：接收池体积为 8 mL。

6.3 回收率

$$\text{回收率} = \frac{Q+W+M+N}{\text{皮肤加样量}} \times 100\%$$

其中 Q：接收液中咖啡因总量；W：皮肤表面残留受试物+供给室中咖啡因总量；M：角质层中咖啡因总量；N：除角质层后皮肤中咖啡因总量；回收率应在 100 \pm 15 % 范围内。

附件 5

免疫毒性试验方法

Immunotoxicity test

1 范围

本方法规定了动物免疫毒性试验的基本原则、要求和方法。

本方法适用于化妆品原料的免疫毒性检测。

2 试验目的

本方法用于评价化妆品原料免疫毒性反应的潜在可能性。

3 定义

3.1 免疫毒性 immunotoxicity

受试物对机体免疫系统结构与功能造成损害作用的能力,包括机体免疫系统的组织或器官损伤、免疫功能的抑制或增强。

3.2 体液免疫 humoral immunity

抗原进入机体后,刺激 B 细胞产生效应 B 细胞和记忆细胞,进而产生抗体,与相应的抗原产生免疫反应。

3.3 细胞免疫 cell-mediated immunity

又称细胞介导免疫。狭义的细胞免疫仅指 T 细胞介导的免疫应答,即 T 细胞受到抗原刺激后,分化、增殖、转化为致敏 T 细胞,对抗原的直接杀伤作用及致敏 T 细胞所释放的细胞因子的协同杀伤作用。T 细胞介导的免疫应答的特征是出现以单核细胞浸润为主的炎症反应和/或特异性的细胞毒性。广义的细胞免疫还包括原始的吞噬作用以及 NK 细胞介导的细胞毒性作用。

4 试验的基本原则

本方法用于评价受试物是否改变或损伤免疫系统的机能状态。免疫毒性试验应分层级开展,初始筛选免疫毒性试验是在重复剂量毒性试验免疫毒性相关检查基础上增加淋巴细胞亚群分布、免疫球蛋白含量测定等项目。初始筛选试验提示存在免疫毒性风险时,则需开展附加免疫毒性试验。

附加免疫毒性试验时,给予不同剂量组受试物至少 28 d,每天对动物进行观察,记录所出现的任何临床毒性表现。给予受试物结束后处死动物,对相应的评价指标进行检测或分析。

5 初始筛选免疫毒性试验

5.1 初始筛选试验方法

采用初始筛选免疫毒性试验，对受试物潜在免疫毒性进行初步评估。初始筛选试验可整合至重复剂量毒性试验中。为发现免疫毒性指征，需评价以下指标：

(1) 血液学检查：白细胞总数及分类计数等。

(2) 血液生化检查：球蛋白、白蛋白/球蛋白比值。

(3) 大体病理学检查：淋巴器官/组织。

(4) 脏器重量/脏器系数：胸腺、脾脏的湿重，必要时可选代表性淋巴结进行称重，并计算脏器系数。

(5) 组织病理学检查：胸腺、脾脏、骨髓（股骨、胸骨或肋软骨部位的骨髓）、有代表性的淋巴结（黏膜附近或周围淋巴结）、所有肉眼可见的损伤。

此外，免疫毒性初始筛选试验还应增加以下指标的检测：

(1) 免疫球蛋白分类（IgG、IgM、IgA 和 IgE）水平测定。

(2) 淋巴细胞亚群测定：该试验属于免疫表型分析，目的是对淋巴细胞亚型进行鉴定和计数，通常采用流式细胞仪测试。对全血、外周血或从淋巴组织分离的免疫细胞如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等进行计数；检测免疫细胞表面标志物的改变，评估 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞或其它亚群的数量及比值。

5.2 试验结果的评价

初始筛选试验结果，应基于淋巴细胞亚群分布、免疫球蛋白分类的结果，并考虑重复剂量毒性试验中的免疫毒性相关检查，如血液学、血清免疫球蛋白含量、免疫器官重量、组织病理学（胸腺、脾、淋巴结）等结果进行综合评价。上述检查项目出现异常时，即受试物各剂量组与溶剂对照组比较存在统计学上的显著差异（但应考虑动物正常的参考范围和变化，存在毒理学意义的改变），提示受试物存在潜在免疫毒性风险，应开展附加免疫毒性试验研究，以验证受试物潜在的免疫毒性，并明确免疫细胞和免疫功能受影响的程度。

6 附加免疫毒性试验

附加免疫毒性试验包括：体液免疫、特异性细胞免疫、巨噬细胞检测、NK 细胞活性四个方面，每个方面应至少选择一种试验方法进行。

6.1 体液免疫试验

给予受试物后用抗原免疫动物，采用抗体形成细胞试验（也称溶血空斑试验）方法或酶联免疫吸附（ELISA）检测抗体滴度的方法评价受试物对体液免疫的影响。

6.1.1 抗体形成细胞试验（Antibody Plaque Forming Cell, PFC）

6.1.1.1 受试物

固体受试物应溶解或悬浮于合适的溶剂中，临用前稀释至适当浓度；液体受试物可以直接加入试验系统和/或临用前稀释至适当浓度。受试物应在临用前新鲜配制，否则须确认贮存不影响其稳定性。

6.1.1.2 实验动物及饲养环境

6.1.1.2.1 动物种系的选择

选用健康啮齿类动物，推荐使用小鼠（近交系）或大鼠。如果已知受试物对其中一种性别的动物更敏感，则应使用这种性别的动物。雌性动物应未孕、未产。试验开始时每一性别的动物体重差异应控制在 $\pm 20\%$ 内。

6.1.1.2.2 动物的性别和数量

每一个剂量组和对照组至少应该有 20 只动物（雌雄各半）。若计划在试验过程中处死动物，则应增加计划处死的动物数。

6.1.1.2.3 饲养环境

实验动物和实验动物设施应符合国家相应规定。选用标准配合饲料，不限制饮水量。

6.1.1.3 剂量分组

至少要设三个剂量组、一个溶剂对照组和一个阳性对照组，如果受试物采用未知免疫毒性的溶剂时，还应设立一个不作任何处理的空白对照组。高剂量应不使动物产生明显的应激、营养不良或死亡，但最好可使动物产生一些可测量的一般中毒表现。低剂量最好不使动物产生任何免疫毒性作用。阳性对照组可选用已知的免疫抑制剂（如环磷酰胺等）作为阳性对照物。

6.1.1.4 受试物给予

开始给予受试物前至少要有 3 ~ 5 d 时间使实验动物适应实验室饲养环境。实验动物随机分组。受试物或溶剂经口和/或经皮和/或经吸入给予，给予受试物途径一般与 90 d 重复剂量毒性试验的途径一致。每周给予受试物 7 d，至少 28 d。

6.1.1.5 临床观察

试验期间，每天对动物至少进行 1 次临床观察，记录毒性症状的出现时间、严重程度及其持续时间。观察应包括但不限于以下方面：皮肤、被毛；眼、黏膜；呼吸系统；自主性和中枢神经系统；循环系统；肢体运动功能；行为特征；抗感染能力等。

每周测量 1 次动物的摄食量。动物给予受试物前称体重，之后每周 1 次，处死前再次称体重。

任何濒死动物一被发现应与其他动物分开并被安乐死。对试验过程中任何濒死的或死亡的动物都应进行大体解剖。

6.1.1.6 试验方法

给予受试物结束前 4 d，经静脉注射 T 细胞依赖性抗原绵羊红细胞（SRBCs），通过计数动物脾脏中特异性抗体生成细胞的数量来反映抗体的产量，可用于检测受试物对脾脏内产生抗体的细胞的毒性作用。试验时，应考虑如下因素：

(1) 注射 T 细胞依赖性抗原 SRBCs, 应对动物注射抗原后测定 PFC 的最佳时间作出评价。

(2) 测定每批补体的活性。

(3) 使用双盲法进行 PFC 计数。

(4) 测定脾细胞的活性。

6.1.2 免疫球蛋白定量测定

6.1.2.1 受试物、实验动物、剂量分组、受试物给予方式及临床观察

同 6.1.1.1 ~ 6.1.1.5。

6.1.2.2 试验方法

在给予受试物结束前 4 d, 用牛血清白蛋白免疫动物, 2 周后再次用抗原免疫动物, 然后测定每只动物血清中 IgG 和 IgM 的滴度。测定抗体滴度的时间点应足够多 (通常选择 3~5 个), 以便对受试物组和对照组动物的初级抗体反应和次级抗体反应进行比较。测定抗体时受试物的给予时间至少为 28 d。试验时, 应考虑测定血清中 IgG 和 IgM 滴度的方法应足够敏感以便测得每只动物的 IgG 和 IgM 滴度。该试验评价受试物是否影响抗体对抗原的反应性。

6.2 特异性细胞免疫试验

采用下列 3 种试验方法中的任一种进行试验, 评价给予受试物至少 28 d 对特异性细胞免疫反应的影响。如选择淋巴细胞增殖试验或细胞毒性 T 淋巴细胞检测, 可与 NK 细胞活性共用一组动物。

6.2.1 淋巴细胞增殖试验

6.2.1.1 受试物、实验动物、剂量分组、受试物给予方式及临床观察

同 6.1.1.1 ~ 6.1.1.5。

6.2.1.2 试验方法

可通过测量放射性标记物 (一般为 ³H-胸腺嘧啶, 简称 ³H-TdR) 掺入 DNA 的量来说明淋巴细胞的增殖, 也可采用 MTT、BrdU-ELISA/FCM 等方法。该方法可以证明给予受试物至少 28 d 对同种异品系淋巴细胞刺激引起的淋巴细胞增殖能力的影响。采用 ³H-TdR 掺入试验时, 应对如下因素进行考虑:

(1) 应答细胞来自对照组和受试物组动物的脾细胞, 在无菌条件下制备脾细胞。应答细胞的 DNA 合成没有采取阻断处理。

(2) 刺激细胞来自未给予受试物的同种异品系动物的脾细胞, 在无菌条件下制备脾细胞。刺激细胞的 DNA 合成用丝裂霉素或 X 线处理进行阻断。

(3) 测定应答细胞和刺激细胞的活力。

(4) 应设 3 份或 4 份对照, 保证刺激细胞的非反应性、测定 DNA 合成的基础水平。

(5) 对空白对照和溶剂对照同时进行测定。

(6) 用每个培养皿中掺入应答细胞的放射性标记物的量来表示脾细胞的增殖程度, 表

示为每分钟居里数 (curie per minute, CPM)。要计算净 CPM (nCPM), 即应答细胞被刺激细胞刺激后掺入的 CPM 均值减去未经刺激的脾细胞掺入 CPM 的均值。受试物组与对照组差异的百分比表示为: $[1 - (\text{受试物组 nCPM}/\text{对照组 nCPM})]$ 。

(7) 不同的淋巴细胞增殖试验存在许多不同, 应说明所引用的试验方法及详细的试验步骤, 说明主要试剂的来源, 最好也说明这些试剂的纯度。

(8) 为了证明方法的灵敏性, 应设立阳性对照组, 给予已知的免疫抑制剂。

6.2.2 迟发型过敏 (Delayed -type Hypersensitivity, DTH) 反应

6.2.2.1 受试物

同 6.1.1.1。

6.2.2.2 实验动物及饲养环境

选用近交系小鼠, 如果已知受试物对其中一种性别的动物更敏感, 则应使用这种性别的动物。雌性动物应未孕、未产。动物 6~8 周龄时开始试验, 试验开始时每一性别的动物体重差异应控制在 $\pm 20\%$ 内。

动物的性别和数量、饲养环境同 6.1.1.2。

6.2.2.3 剂量分组、受试物给予方式及临床观察

同 6.1.1.3~6.1.1.5。

6.2.2.4 试验方法

在给予受试物结束前 4 d, 用牛血清白蛋白致敏动物, 1~2 周后用相同的抗原进行激发, 激发后 24~48 h, 比较受试物组和对照组 DTH 反应的差异, 以激发前后反应的差值来表示 DTH 的程度。该方法是一种检测受试物对实验动物诱导性 DTH 影响的体内方法。开展该试验时, 应对如下因素进行考虑:

(1) DTH 检测方法有数种, 如耳肿胀法、足跖增厚法等, 应选用灵敏度高、可重复性好、并适用于所选用实验动物品系的方法; 不同的方法中下列参数也可能不同, 如致敏及激发动物所用抗原的性质, 免疫注射的次数及途径, 免疫激发的时间, 同位素的使用等。试验时选用的这些参数及其他相关的参数应可以使所选用的实验动物产生足够的 DTH 反应。

(2) 测定 DTH 反应前, 应对动物给予受试物至少 28 d。

6.2.3 细胞毒性 T 淋巴细胞 (Cytotoxic T-lymphocyte, CTL) 检测

6.2.3.1 受试物、实验动物、剂量分组、受试物给予方式及临床观察

同 6.1.1.1~6.1.1.5。

6.2.3.2 试验方法

该方法用于证明给予受试物至少 28 d 对 CTL 生成的影响。常取动物脾淋巴细胞进行细胞毒性 T 淋巴细胞试验, 检测采用放射免疫法或流式细胞术。放射法使用同种异品系肿瘤抗原对 CTL 进行诱导 (体内或体外诱导), 然后, 来自受试物组和对照组动物的脾细胞与 ^{51}Cr 标记的同种异品系肿瘤细胞共孵育 4 h 后, 肿瘤细胞所释放的放射性标记物的量可以说明 T 淋巴细胞溶解肿瘤细胞的能力。试验时, 考虑如下因素:

(1) 应设立对照组来测定效应细胞不存在时靶细胞释放的放射性标记物的本底量和放射性标记物的总释放量。

(2) 应可以证明试验中所选用的动物可产生 CTLs, 所选用的试验方法应适合于诱导动物 CTL 的生成。

(3) CTL 检测有数种不同的方法, 引用某一种方法时应做到完全引用, 对方法进行修改时应予以说明, 合适的情况下应说明主要试剂的来源、活性和/或纯度。

6.3 NK 细胞的活性

6.3.1 受试物、实验动物、剂量分组、受试物给予方式及临床观察

同 6.1.1.1 ~ 6.1.1.5。

6.3.2 试验方法

建议采用 Reynolds 和 Herberman 的微量培养法来检测给予受试物至少 28 d 对 NK 细胞活性的影响, 也可采用 LDH 释放法等其他适合的方法。微量培养法是将受试物组和对照组动物的脾细胞与 ^{51}Cr 标记的 YAC 淋巴瘤细胞共培养。靶细胞与效应细胞共培养 4 h 后, 靶细胞中释放的放射性标记物的量可用于表示 NK 细胞杀伤肿瘤细胞的能力。LDH 释放法是将受试物组和对照组动物的脾细胞与靶细胞 (YAC 细胞) 共培养。靶细胞与效应细胞共培养 4 h 后, 靶细胞中释放的乳酸脱氢酶含量可用于表示 NK 细胞杀伤肿瘤细胞的能力。开展该试验时, 应对如下因素进行考虑:

(1) 应设立几个对照以说明在没有效应细胞存在时, 靶细胞释放放射性标记物或乳酸脱氢酶的本底量以及放射性标记物或乳酸脱氢酶总的释放量。

(2) 试验可使用除 YAC 细胞之外的靶细胞, 任何情况下都应测定靶细胞的存活力。

(3) 引用某一种方法时应做到完全引用, 对方法进行修改时应予以说明, 合适的情况下应说明主要试剂的来源、活性和/或纯度; 如果对所选用的方法作了一些修改, 则应说明修改的科学性和合理性。

6.4 巨噬细胞检测

6.4.1 受试物、实验动物、剂量分组、受试物给予方式及临床观察

同 6.1.1.1 ~ 6.1.1.5。

6.4.2 试验方法

评价给予受试物至少 28 d 对巨噬细胞数及其吞噬功能的影响。应对如下方面进行检测:

(1) 试验中应计数腹腔细胞的总数及分类计数。

(2) 评价在有或没有促进因子 (如 γ -干扰素或细菌脂多糖) 存在的条件下腹腔细胞对外源性物质 (如鸡红细胞、荧光微球等) 的吞噬作用。

(3) 有数种不同的巨噬细胞检测方法, 推荐鸡红细胞吞噬法和流式细胞法, 也可采用巨噬细胞溶酶体酶测定、巨噬细胞表面受体检测法等, 因此, 应对所选用的方法进行描述并说明方法引证的来源; 如果对所选用的方法作了一些修改, 则应说明修改的科学性和合理性。

6.5 结果处理

(1) 对于计数资料, 表格应显示试验开始时各组动物数、出现免疫毒性反应的动物数、免疫毒性损伤的类型和每种损伤的动物百分比。

(2) 对于计量资料, 一般采用方差分析, 但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算 F 值, $F \text{ 值} < F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; $F \text{ 值} \geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 用多个试验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计; 对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换, 待满足正态或方差齐要求后, 用转换后的数据进行统计; 若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的, 改用秩和检验进行统计。

(3) NK 细胞活性需进行数据转换, $X = \text{Sin}^{-1}\sqrt{P}$, 式中 P 为 NK 细胞活性, 用小数表示, 然后再进行方差分析。

(4) 以吞噬百分率或吞噬指数表示巨噬细胞的吞噬能力。吞噬百分率需进行数据转换, $X = \text{Sin}^{-1}\sqrt{P}$, 式中 P 为吞噬百分率, 用小数表示, 然后再进行方差分析。

6.6 结果评价

附加免疫毒性试验研究的结果应与初始筛选试验结果一起评估。在评价时应综合考虑生物学意义和统计学意义。评估包括:

(1) 对异常指标进行综合分析: 与溶剂对照组比较是否存在统计学的显著差异, 是否在背景数据范围内波动, 受试物的剂量与异常指标的发生与否、发生率和严重性之间的关系, 以及指标的相互关联性等, 判断受试物是否引起了某一方面免疫功能异常。

(2) 受试物组体液免疫试验、特异性细胞免疫试验、巨噬细胞检测、NK 细胞活性四个方面中任一试验结果出现异常, 均认为该受试物具有潜在的免疫毒性。

7 结果解释

免疫毒性试验能够提供受试物在反复接触机体后的毒性作用资料。其试验结果仅可在很有限的程度上外推到人, 但它可为确定人群的允许接触水平提供有用的信息。

附件 6

口腔黏膜刺激试验方法

Oral mucous irritation test

1 范围

本方法适用于评价牙膏对口腔黏膜组织潜在的刺激作用。

2 试验目的

确定和评价牙膏对动物口腔黏膜组织是否有刺激作用及其程度。

3 定义

口腔黏膜刺激 oral mucosa irritation

口腔黏膜组织接触受试物后所产生的水肿、炎性变化及组织损伤等反应。

4 试验的基本原则

将受试物置于受试动物的一侧颊囊内，对照物置于另一侧颊囊内，在规定的时间内多次接触，肉眼观察并记录动物颊囊接触部位的刺激程度，并于末次接触后 24 小时取材进行组织学评价。

5 试验方法

5.1 试样

5.1.1 受试物：受试物直接使用，单次放置量为 0.4 g 或 0.4 mL。

5.1.2 对照物：0.9%氯化钠注射液（生理盐水），用量同受试物，直接使用。

5.2 实验动物和饲养环境

5.2.1 健康的 SPF 级金黄地鼠（拉丁学名：Mesocricetus auratus），6~8 周龄。同一品系，雌雄不限，雌性动物应未孕。

5.2.2 至少使用 3 只动物。

5.2.3 试验前动物应在实验动物房环境内至少适应 3 天。实验动物及实验动物房应符合国家相关规定。选用标准配合饲料，饮水不限制。

5.3 试验步骤

5.3.1 动物准备与麻醉

用适当的麻醉剂麻醉动物，检查动物双侧颊囊有无异常（剔除颊囊黏膜异常的动物）。翻转动物颊囊用生理盐水或蒸馏水清洗干净后进行试验。

5.3.2 试样接触

5.3.2.1 将受试物置于动物一侧颊囊底部，对照物置于另一侧颊囊底部。试样与黏膜接触 5

min, 接触时间结束后将颊囊翻出, 去除试样, 用生理盐水或蒸馏水清洗接触部位, 清洗时间一般为 1 min~2 min, 直至将试样完全清除。重复上述操作 4 次, 每次操作间隔 1 h (含接触与清洗时间)。每次重复放置试样前肉眼检查颊囊, 并记录异常情况。末次接触后的 24 h 肉眼观察颊囊并取与试样接触的颊囊组织进行组织学评价。

5.3.2.2 在 5.3.2.1 试验过程中, 根据表 1 判定肉眼观察结果。在试验周期内的任意时间点, 3 只动物中如有 1 只及以上出现重度水肿、红斑、糜烂或溃疡现象, 可直接判定为重度口腔黏膜刺激反应, 无需再进行组织学评价。

5.4 结果观察

5.4.1 临床观察

5.4.1.1 试验期间观察动物, 记录异常表现, 包括局部、全身及异常行为等。

5.4.1.2 肉眼观察试验部位, 根据表 1 判定有无红斑、水肿、糜烂及溃疡等情况, 并比较同一动物的试验侧颊囊和对照侧颊囊, 记录每侧颊囊的状况, 注意试验侧与对照侧的差异。

表 1 口腔黏膜临床观察评价表

临床表现	反应程度
红斑	
无红斑	无
极轻微红斑 (勉强可见)	极轻
清晰红斑	轻度
中度红斑	中度
重度红斑 (紫红色) 至焦痂形成、糜烂、溃疡	重度
水肿	
无水肿	无
极轻微水肿 (勉强可见)	极轻
清晰水肿 (肿起边缘清晰)	轻度
中度水肿 (肿起约 1 mm)	中度
重度水肿 (肿起超过 1 mm, 并超出接触区)	重度

5.4.2 组织学观察

5.4.2.1 组织切片制作

末次接触后 24 h, 取试样接触部位的颊囊, 10%中性福尔马林缓冲液固定, 常规石蜡包埋, 半连续切片, 间隔取片 5 张, H-E 染色。

5.4.2.2 组织学观察及记分

对黏膜组织进行组织病理学观察, 并根据口腔黏膜组织反应记分表 (表 2) 计算每只动物得分。其中白细胞浸润情况应至少在 20 倍物镜下选取 3~5 个有代表性的视野观察, 每只动物的得分为所有观察视野的平均分。将试验组中所有动物的组织反应记分相加之和, 再除

以试验动物总数，得出试验组平均记分，对照组同法计算。

表 2 口腔黏膜组织反应记分表

组织反应	记分
上皮	
正常，完好无损	0
细胞变性或变扁平	1
组织变形	2
局部糜烂	3
广泛糜烂	4
白细胞浸润	
无	0
极少（少于 25）	1
轻度（26~50）	2
中度（51~100）	3
重度（大于 100）	4
血管充血	
无	0
极少	1
轻度	2
中度	3
重度伴血管破裂	4
水肿	
无	0
极少	1
轻度	2
中度	3
重度	4

6 结果评价

6.1 临床观察评价

在试验周期内的任意时间点，3 只动物中如有 1 只及以上出现重度红斑、水肿、糜烂或溃疡现象，则可直接判定该受试物为重度口腔黏膜刺激反应，其它情况以下述组织学评价为准。

6.2 组织学评价

6.2.1 若 1 只动物对照侧颊囊组织学评价记分之和大于 9 时，则考虑认为是试验操作时造成

的损伤，有必要进行重复试验。

6.2.2 试验组平均记分减去对照组平均记分得出刺激指数，并根据表 3 对口腔黏膜组织反应程度进行分级。

表 3 口腔黏膜组织反应分级

刺激指数 (X)	反应程度
0	无
$0 < X \leq 4$	极轻
$4 < X \leq 8$	轻度
$8 < X \leq 11$	中度
$11 < X \leq 16$	重度

7 结果判定

根据临床观察评价进行结果判定，临床观察为重度口腔黏膜刺激反应是不可接受的（见 6.1）；依据 6.2.2 口腔黏膜组织反应分级，认为中度、重度口腔黏膜刺激反应是不可接受的。

8 试验结果的解释

本结果通过评估受试物对口腔黏膜的刺激性和，旨在为理解其对人体的潜在影响提供了初步数据。鉴于动物与人类生理反应的差异，试验结果外推到人的可靠性有限，必要时建议在适当情况下进行临床验证。