

## 1 附 1: 药包材细胞毒性试验方法

2 本法系将供试品或供试品溶液接触细胞, 通过对细胞形态、增殖和抑制影响的观察, 评  
3 价供试品对体外细胞的毒性作用。

4 **试验用细胞** 推荐使用小鼠成纤维细胞 L-929。试验时采用传代 48~72 小时生长旺盛  
5 的细胞。

6 **试验前的准备** 与样品及细胞接触的所有器具均需无菌。必要时可采用湿热灭菌, 如  
7 115℃保持 30 分钟; 干热灭菌, 如 250℃保持 30 分钟或用 180℃保持 2 小时。

8 **供试液的制备** 取供试品, 按照本指导原则中生物学试验的要求制备供试品溶液。

### 9 第一法 相对增殖度法

10 **阴性对照液制备** 为不加供试品的细胞培养液。

11 **阳性对照液制备** 取生物毒性阳性参比物质, 照供试液制备项下的规定进行, 也可使用  
12 6.3% 苯酚的细胞培养液。

13 **试验方法** 取 33 个培养瓶, 分别加入  $4 \times 10^4$  个/mL 浓度细胞悬液 1mL, 细胞培养液 4mL,  
14 置  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$  的条件下培养 24 小时。培养 24 小时后弃去原培养液。

15 阴性对照组: 取 13 个培养瓶加入 5mL 阴性对照液;

16 阳性对照组: 取 10 个培养瓶加入 5mL 阳性对照液。

17 试验组: 取 10 个培养瓶加入 5mL 含 50% 供试品溶液的细胞培养液, 置  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,  
18  $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$  的条件下继续培养 7 天。

19 细胞形态学观察和计数: 在更换细胞培养液的当天, 取 3 瓶阴性对照组, 并在更换后第  
20 2、4、7 天, 每组各取 3 瓶进行细胞形态观察和细胞计数。

21 **毒性评定** 细胞形态分析标准按表 1 规定。细胞相对增殖度分级标准按表 2 规定。

22 **表 1 细胞形态分析表**

反应程度	细胞形态
无毒	细胞形态正常, 贴壁生长良好, 细胞呈棱形或不规则三角形
轻微毒	细胞贴壁生长好, 但可见少数细胞圆缩, 偶见悬浮死细胞
中度毒	细胞贴壁生长不佳, 细胞圆缩较多, 达 1/3 以上, 见悬浮死细胞
重度毒	细胞基本不贴壁, 90% 以上呈悬浮死细胞

23 **表 2 细胞相对增殖度分级表**

分级	相对增殖度 (%)
0	$\geq 100$
1	75~99
2	50~74
3	25~49
4	1~24

5

0

24 根据各组细胞浓度按下式计算细胞相对增殖度 (RGR)。

$$25 \quad RGR = \frac{\text{供试品组 (或阳性对照组) 细胞浓度平均值}}{\text{阴性对照组细胞浓度平均值}} \times 100\%$$

26 **结果评价** 试验组相对增殖度 (以第 7 天的细胞浓度计算) 为 0 级或 1 级判为合格。试  
27 验组相对增殖度为 2 级, 应结合形态综合评价, 轻微毒或无毒的判为合格。试验组相对增殖  
28 度为 3~5 级判为不合格。

## 29 第二法 琼脂扩散法

30 本法适用于弹性体细胞毒性的测定。当聚合物样品中可滤取的化学物质扩散时, 琼脂层  
31 可起到隔垫的作用保护细胞免受机械损伤。材料中的提取物将通过一张滤纸 (表面积不小于  
32 100mm<sup>2</sup>) 被进行试验。

33 **阴性对照制备** 取无生物毒性参比物质, 例如高密度聚乙烯, 按照供试液制备项下的规  
34 定进行。

35 **阳性对照制备** 取生物毒性阳性参比物质, 例如二乙基二硫代氨基甲酸锌的聚氨酯  
36 (ZDEC), 按照供试液制备项下的规定进行。可采用 10% 二甲基亚砷 (DMSO) 溶液, 附  
37 着到生物惰性吸收性 (例如超细硼硅玻璃纤维滤纸) 的基质上。

38 **试验方法** 取细胞悬浮液 (1×10<sup>5</sup> 个/mL) 7mL, 均匀分散至直径 60mm 的培养皿中。置  
39 于含 5%±1% CO<sub>2</sub> 气体的细胞培养箱中培养 24 小时至近汇合单层细胞, 弃去培养皿中培养  
40 基, 将溶化琼脂冷却至 48℃ 左右与含 20% 血清的 2 倍新鲜哺乳动物细胞培养基混合, 使琼  
41 脂最终质量浓度不大于 2%, 在每只培养皿内加入新制备的含琼脂培养基 (要足够薄以利于  
42 可沥滤物的扩散)。

43 含琼脂培养基凝固后, 可用适当的染色方法染色。将供试品、阴性对照、阳性对照小心  
44 地放在培养皿的固化琼脂层表面。

45 每个供试品、阴性对照、阳性对照试样间尽量保持合适的距离并远离培养皿壁, 每一培  
46 养皿中放置不超过 3 个试样, 每个试样至少设置 2 个平行。置 37℃±1℃, 5%±1%CO<sub>2</sub> 的细  
47 胞培养箱中至少培养 24 小时±2 小时。用显微镜观察每个供试品、阴性对照、阳性对照试样  
48 反应区域。用活体染料, 如中性红可有助于检测细胞毒性。

49 **结果评价** 按表 3 进行细胞毒性评价和分级。如阴性对照为 0 级 (无毒)、阳性对照不  
50 小于 3 级 (中度毒), 则细胞培养试验系统有效。

51 **表 3 琼脂扩散试验的毒性分级**

分级	毒性	毒性区域的描述
0	无毒	试样周围和试样下面无可见的毒性区域
1	轻微毒	试样下面有一些退化或畸变的细胞
2	轻度毒	毒性区域不超出试样边缘 0.45cm

3	中度毒	毒性区域超出试样边缘 0.45-1.0cm
4	重度毒	毒性区域超出试样边缘大于 1.0cm

供试品和/或供试品溶液细胞毒性分级不大于 2 级（轻度毒）时，则判为合格。

### 第三法 直接接触法

**供试品制备** 采用供试品的平整部分，表面积不小于 100mm<sup>2</sup>。

**阴性对照制备** 取高密度聚乙烯或无生物毒性参比物质，照供试液制备项下的规定进行。

**阳性对照制备** 取生物毒性阳性参比物质，照供试液制备项下的规定进行。

**试验方法** 取生长旺盛的细胞悬浮液（ $1 \times 10^5$  个/mL）2mL，置直径 35mm 的平皿中培养单层细胞。置于细胞培养箱中培养 24 小时至近汇合单层细胞，吸去培养基，替换为 0.8mL 的新鲜培养基。

在每个培养皿中单独放置 1 个供试品、阳性对照或阴性对照，每个试样至少设置 2 个平行。将所有的培养物置  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  含  $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$  的细胞培养箱中至少培养 24 小时，培养箱宜保持适当的湿度。显微镜下观察每个供试品、阴性对照、阳性对照周围，必要时进行染色。

**结果评价** 按照琼脂扩散法结果评价项下的规定进行。若样品不超过 2 级（轻度毒），则样品判为合格。若试验系统无效需重复试验过程。

### 第四法 浸提法

**阴性对照制备** 取高密度聚乙烯或无生物毒性参比物质，照供试液制备项下的规定进行。

**阳性对照制备** 取生物毒性阳性参比物质，照供试液制备项下的规定进行。

**试验方法** 取生长旺盛的细胞悬浮液（ $1 \times 10^5$  个/mL）2mL，置直径 35mm 的平皿中培养单层细胞。培养不少于 24 小时至细胞至少达到 80% 近汇合后，吸去培养基，替换为供试品溶液、阴性对照液或阳性对照液。含血清培养基提取液和不含血清培养基提取液无需稀释，每个试样至少设置 2 个平行。0.9% 氯化钠注射液为介质的提取液用含血清的细胞培养基稀释至提取液浓度为 25%，每个试样至少设置 2 个平行。所有的培养物在  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ，含  $5\% \pm 1\% \text{CO}_2$  的培养箱中培养 48 小时。48 小时后，在显微镜下观察培养物，如有必要，进行染色。

**结果评价** 按表 4 进行毒性评价和分级。若试验系统不成立，重复试验。供试品不超过 2 级（轻度毒），则判为合格。如需进行剂量-反应程度评价，可通过定量稀释样品提取液，重复试验。

表 4 浸提法毒性分级

分级	毒性	毒性区域的描述
0	无毒	胞内颗粒明显，无细胞溶解
1	极轻微	圆缩、贴壁不佳及无胞内颗粒的细胞不超过 20%，偶

		见悬浮死细胞
2	轻微毒	圆缩细胞及胞内颗粒溶解的细胞不超过 50%，无严重的细胞溶解现象，细胞间无较大空隙
3	中度毒	圆缩或溶解的细胞不超过 70%
4	严重毒	几乎所有细胞坏死

## 附 2：药包材皮肤致敏试验方法

81 本法系将供试品溶液与豚鼠皮肤接触，在规定时间内观察豚鼠皮肤的红斑和水肿反应，  
82 以判定供试品在试验条件下使豚鼠产生皮肤致敏反应的一种方法。

83 **试验用动物** 使用健康、初成年的 Hartley 白豚鼠作为皮肤致敏实验动物，试验开始时体  
84 重应为 300g~500g，雌（未孕）雄不限。对于一种提取介质，供试品组 10 只动物，阴性对  
85 照组 5 只动物；复试时供试品组 20 只动物，阴性对照组 10 只动物。试验开始之前剃除豚鼠  
86 背部 4cm×6cm 区域毛发。

87 **供试品溶液的制备** 取供试品，按照本指导原则中生物学试验的要求制备供试品溶液。

88 **阴性对照液的制备** 采用供试品溶液制备同批号的提取溶剂（不含供试品），以相同的方式  
89 制备作为阴性对照液。供试品溶液和阴性对照液应在制备后 24 小时内使用，在试验前应  
90 平衡至室温并确保可提取物充分混匀。

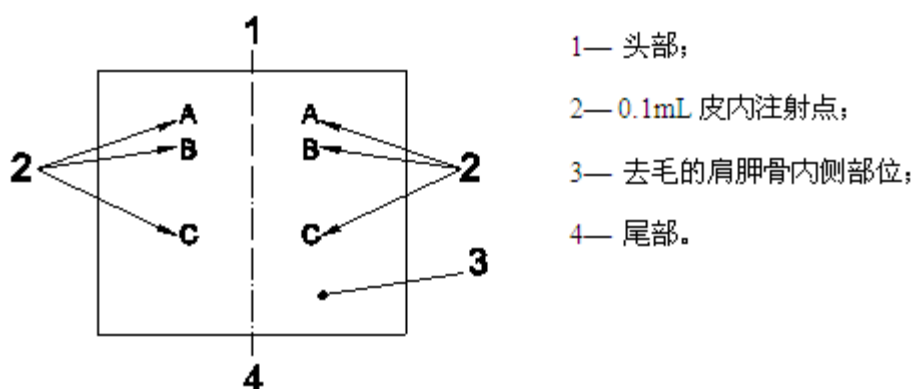
### 91 试验方法（豚鼠最大剂量法）

92 （1）皮内诱导：按图 1 所示（A、B 和 C），在每只动物去毛的肩胛骨内侧部位成对皮  
93 内注射 0.1mL。

94 部位 A：注射弗氏完全佐剂与提取溶剂以 1:1（体积比）比例混合的稳定乳化剂。

95 部位 B：注射供试品溶液；对照组动物仅注射阴性对照液。

96 部位 C：供试品溶液以 1:1 的体积比例与弗氏完全佐剂和提取溶剂配制成的乳化剂混  
97 合后进行皮内注射；对照组注射阴性对照液与弗氏完全佐剂以 1:1 的体积比混合的稳定乳  
98 剂。



99

100 图 1 皮内注射点部位

101 (2) 局部诱导：皮内诱导后 (7±1) 天，在注射部位再次剃毛，将 2cm×4cm 的敷贴  
102 片（滤纸或吸水性纱布块）置于供试品溶液或阴性对照液中浸透，局部贴敷于动物剃毛区，  
103 覆盖诱导注射点。在局部敷贴应用前 (24±2) 小时，如皮内诱导阶段部位 B 未产生刺激反  
104 应，试验区用 10% 十二烷基硫酸钠进行预处理，按摩导入皮肤。用封闭式包扎带固定敷贴  
105 片，并于 (48±2) 小时后除去包扎带和敷贴片。对照组动物使用阴性对照液同法操作。

106 (3) 激发：局部诱导后 (14±1) 天，在豚鼠左右腹侧未试验部位剃毛，将 2cm×2cm  
107 的敷贴片置于供试品溶液或阴性对照液中浸透，局部贴敷于动物剃毛区。用封闭式包扎带固  
108 定，并于 (24±2) 小时后除去包扎带和敷贴片。

109 **动物观察** 除去敷贴片后 (24±2) 小时和 (48±2) 小时观察供试品组和对照组动物激  
110 发部位的红斑和水肿，按表 1 给出的 Magnusson 和 Kligman 分级标准评级。

111 表 1 Magnusson 和 Kligman 分级

红斑形成	分级
无红斑	0
散发性或斑点状红斑	1
中度融合红斑	2
重度红斑和/或水肿	3

112  
113 **结果判定** 对照组动物分级小于 1，而供试品组分级大于等于 1 时提示致敏。如对照组  
114 动物分级大于等于 1 时，供试品组动物反应超过对照组中最严重的反应则认为致敏。如为疑  
115 似反应，或供试品组出现反应的动物数量多于对照组，但反应强度并不超过对照组时，可在  
116 首次激发后 1 周~2 周进行再次激发，以明确反应。所用方法与首次激发相同，采用动物未  
117 试验的一侧部位。将出现致敏反应的动物数除以该组试验动物数，求得致敏反应率(%)，按  
118 表 2 致敏反应率分级标准评定致敏反应发生程度。

119 表 2 致敏反应率分级

致敏率(%)	分级	致敏性
0	0	无致敏性
<10	1	极轻微
10~30	2	轻微
31~60	3	中度
61~80	4	强烈
81~100	5	极强

注：当 20 只动物/组时，致敏率应为 5% 的倍数。

120

121 为了确保试验的再现性和敏感性，应定期进行阳性对照试验。巯基苯并噻唑、己基肉桂  
122 醛和苯佐卡因是已知的致敏剂，也可采用中度致敏剂（如甲醛）和强致敏剂（如二硝基氯苯，  
123 DNCB）。至少每 6 个月采用 10 只动物进行阳性对照试验；时间间隔小于 6 个月时，至少采  
124 用 5 只动物。

### 附 3：药包材皮内反应试验方法

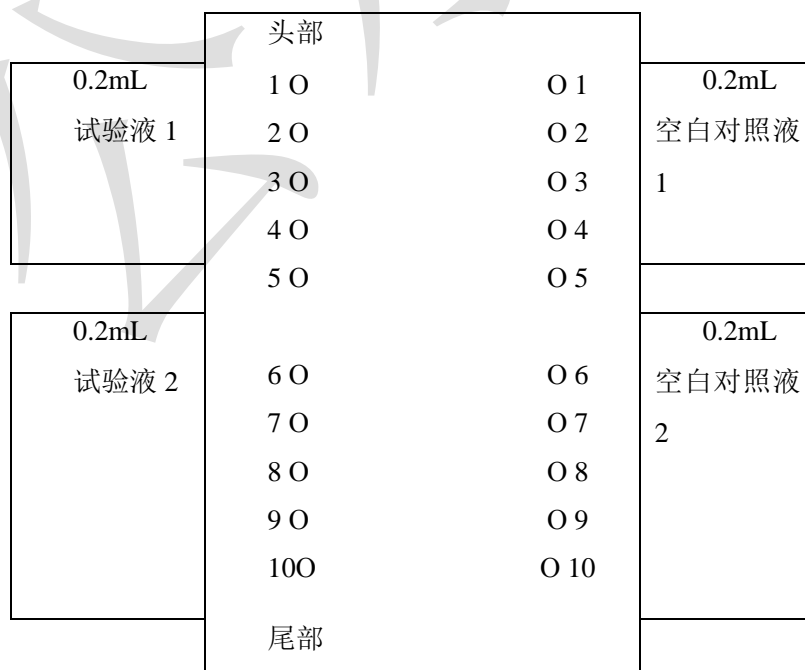
125 本法系将一定量的供试品溶液注入兔皮内，在规定时间内观察皮内注射部位红斑和水  
126 肿反应，以判定供试品是否具有刺激性的一种方法。

127 **试验用动物** 选择健康、初成年的白兔，同一品系，性别不限，雌性动物应未育并无孕，  
128 体重应不低于 2kg，无任何皮肤疾病或损伤，未做过任何试验。初试用兔 3 只，复试用兔 3  
129 只。试验前至少 4 小时在兔脊柱两侧各剪剃 5cm×15cm 区域兔毛，作为试验和观察部位，除  
130 毛过程中应避免机械刺激或损伤皮肤。

131 **供试品溶液的制备** 取供试品，按照本指导原则中生物学试验的要求制备供试品溶液。

132 **空白对照液** 采用供试品溶液制备同批号的提取溶剂（不含供试品），以相同的方式制  
133 备作为空白对照液。供试品溶液和空白对照液应在制备后 24 小时内使用，注射前溶液应平  
134 衡至室温，剧烈振荡，确保可提取物充分混匀。

135 **试验方法** 用 75%乙醇轻轻擦拭家兔去毛区，晾干后进行皮内注射。在每只兔脊椎一  
136 侧去毛区的 5 个点，皮内注射 0.2mL 供试品溶液；另一侧的 5 个点，皮内注射相同提取介  
137 质的空白对照液 0.2mL（见图 1 示例）。



138

139

图 1 注射点示例

140 注射后立即观察注射点即时反应，在注射后（24±2）小时、（48±2）小时、（72±2）小  
 141 时观察每只动物注射局部及其周围皮肤的红斑和水肿反应，按照表 1 进行反应记分，计算每  
 142 只动物每一评分时间点的红斑和水肿的平均记分。

143 表 1 皮肤反应记分标准

红斑和焦痂形成	记分	水肿形成	记分
无红斑	0	无水肿	0
极轻微红斑（勉强可见）	1	极轻微水肿（勉强可见）	1
清晰红斑	2	清晰水肿（肿起，轮廓清楚）	2
中度红斑	3	中度水肿（肿起约 1mm）	3
重度红斑（紫红色至焦痂形 成）	4	重度水肿（肿起超过 1mm，并超出接 触区）	4

144 **结果判断** 在（72±2）小时评分后，分别将每只动物试验样品或空白对照的（24±2）h、  
 145 （48±2）h 和（72±2）h 的全部红斑与水肿记分相加，再除以 15[3（记分时间点）×5（试验  
 146 样品或空白对照注射点）]，计算出每只动物试验样品或空白对照的记分。3 只动物记分相  
 147 加后除以 3 得出每一试验样品和相应空白对照的总平均记分。试验样品记分减去空白对照记  
 148 分可得出试验样品最终记分。如试验样品最终记分不大于 1.0，即认为供试品对接触部位无  
 149 刺激性。在任何观察期，如供试品平均反应疑似大于对照反应，应另取 3 只家兔复试，如供  
 150 试品平均记分与空白对照平均记分之差不大于 1.0，即认为供试品对接触部位无刺激性。

#### 附 4：药包材皮肤刺激试验方法

151 本法系将供试品溶液与动物皮肤在规定时间内接触，通过动物皮肤的局部反应情况来评  
 152 价供试品对皮肤的原发性刺激作用。

153 **试验用动物** 选择健康、初成年的白兔，同一品系，性别不限，雌性动物应未育并无孕，  
 154 体重应不低于 2kg，每组 3 只。试验前至少 4h 彻底除去家兔被毛，脊柱两侧各选 3cm×3cm  
 155 面积的去毛区，间距 10cm，除毛过程中应避免机械刺激或损伤皮肤。

156 **供试品溶液的制备** 取供试品，按照本指导原则中生物学试验的要求制备供试品溶液。

157 **空白对照液** 采用供试品溶液制备同批号的提取溶剂（不含供试品），以相同的方式制备  
 158 作为空白对照液。供试品溶液和空白对照液应在制备后 24 小时内使用，在试验前应平衡至  
 159 室温并确保可提取物充分混匀。

160 **试验方法** 用 75%乙醇轻轻擦拭家兔去毛区，晾干后用 2.5cm×2.5cm 滤纸块浸泡于供试  
 161 品溶液中至饱和，贴敷于试验部位（见图 1 示例）。贴敷后，立即用 3cm×3cm 纱布块覆盖，  
 162 最外层用胶布固定。

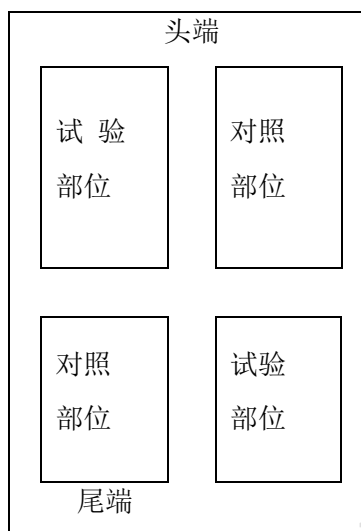


图 1 接触点排列

163

164 贴敷固定 24 小时后，除去敷贴物，用温水清洁试验部位。在除去贴敷物(1±0.1)小时、  
165 (24±2) 小时、(48±2) 小时、(72±2) 小时对试验部位进行观察后记分。应注意由于皮肤  
166 温度的改变或者皮肤破损造成的感染所引起的红斑和水肿与供试品所引起的刺激反应相区  
167 别。按照下表（表 1）观察并记录每只动物试验部位红斑和水肿反应记分，计算每只动物每  
168 一评分时间点的红斑和水肿的平均记分。

169

表 1 皮肤反应记分标准

红斑和焦痂形成	记分	水肿形成	记分
无红斑	0	无水肿	0
极轻微的红斑（勉强可见）	1	极轻微水肿（勉强可见）	1
清晰的红斑（淡红色）	2	轻度水肿（边缘明显高出周围皮面）	2
中等到严重的红斑（鲜红色，界限分明）	3	中等水肿（水肿区高出周围皮面约 1mm）	3
极严重的红斑（紫红色）至焦痂形成	4	严重水肿（水肿高出周围皮面 1mm 以上，面积超出斑贴区）	4

170

171 **结果判定** 在 (72±2) 小时评分后，分别将每只动物试验部位 (24±2) 小时、(48±2)  
172 小时和 (72±2) 小时的全部红斑与水肿记分相加，再除以 6（即 2 个试验部位×3 个时间点），  
173 计算出每只动物试验部位的平均记分；同法计算每只动物对照部位的平均记分。试验部位的  
174 平均记分减去对照部位的平均记分即为每只动物原发性刺激记分。将各受试动物的原发性刺  
激记分之和除以动物总数得出原发性刺激指数（PII），按表 2 进行皮肤反应评级。

175

表 2 皮肤反应分级标准

反应分级	原发性刺激指数（PII）
无	0.0~0.4



轻微	0.5~1.9
中度	2.0~4.9
重度	5.0~8.0

## 176 附 5: 药包材口腔黏膜刺激试验方法

177 本法系将一定量的供试品溶液置入金黄地鼠颊囊处,通过观察接触部位的口腔黏膜及其  
178 周围组织反应情况,以评价供试品在试验条件下对口腔的刺激作用。

179 **试验用动物** 检疫合格初成年的金黄色地鼠,同一品系,雌雄不限,雌性动物应未育并  
180 无孕,试验前检查动物颊囊表面有无充血、肿胀、糜烂以及溃疡等情况,若存在,应淘汰,  
181 试验时 3 只动物入组进行试验。

182 **供试品溶液的制备** 按照本指导原则中生物学试验的要求制备供试品溶液。

183 **对照液** 提取溶剂(不含有供试品)按照制备供试品溶液相同的提取条件制备作为对照  
184 液。供试品溶液和对照液应在制备后 24 小时内使用,注射前溶液应平衡至室温并确保可提  
185 取物充分混匀。

186 **试验方法** 用生理盐水冲洗颊囊后检查动物颊囊表面有无充血、肿胀、糜烂以及溃疡等  
187 情况,如需要可对动物进行麻醉。按表 1 进行记分。试验时用直径约 10mm 棉球浸透供试品  
188 溶液,放入动物的一侧颊囊内,共 4 次,每次接触时间不少于 5 分钟,每次间隔(1±0.1)小  
189 时,对侧颊囊同法接触对照液。

190 **结果判断** 每次试验操作前检查动物颊囊黏膜表面情况,按表 1 进行记分。末次接触  
191 (24±2)小时后,肉眼观察供试品溶液放置部位黏膜情况,如需要可对动物进行麻醉。按表  
192 1 进行记分,每一观察记分相加后再除以观察总数得出每只动物平均记分(首次接触前的初  
193 始观察结果不包括在平均记分中),并记录观察的红斑和或焦痂,有助于组织学评价。

194 **表 1 口腔反应记分系统**

反应	记分
红斑和焦痂形成	
无红斑	0
极轻微红斑(勉强可见)	1
清晰红斑	2
中度红斑	3
重度红斑(紫红色)至干扰红斑分级的焦痂形成	4

195 注:记录并报告组织的其他异常情况。

196 肉眼大体观察并记分后超剂量麻醉或其他无痛方法处死动物,取接触部位的颊囊组织,  
197 放入 10%福尔马林固定液中固定,石蜡包埋,切片后按照表 2 口腔组织反应显微镜检查记  
198 分系统进行组织病理学检查并记分。对照侧颊囊显微镜评价总分大于 9 时,需另取 3 只动物

199 进行复试。

200 表 2 口腔组织反应显微镜检查记分系统

反应	记分
1. 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
2. 白细胞浸润 (每个高倍视野)	
无	0
极少 (少于 25)	1
轻度 (26~50)	2
中度 (51~100)	3
重度 (大于 100)	4
3. 血管充血	
无	0
极轻	1
轻度	2
中度	3
重度伴血管破裂	4
4. 水肿:	
无	0
极轻	1
轻度	2
中度	3
重度	4

201 试验组动物显微镜评价记分相加后再除以观察总数得出试验组平均记分。对照组同法

202 计算, 试验组平均记分减去对照组平均记分得出刺激指数, 刺激指数判定等级见表 3。

203 表 3 刺激指数

平均记分	反应程度
0	无
1~4	极轻
5~8	轻度
9~11	中度
12~16	重度

204

#### 附 6: 药包材眼刺激试验方法

205 本法系将一定量的供试品溶液与动物眼部接触,在规定时间内通过观察动物眼部刺激反  
206 应,以判定供试品是否具有眼刺激性的一种方法。

207 **试验用动物** 推荐使用健康、初成年且未做过眼刺激试验的白兔,体重为(2~3) kg,同  
208 一品系,雌(未孕)雄不限。每组 3 只。试验前 24 小时内检查每只兔的双眼是否有异常现  
209 象,如发现异常应淘汰该兔。

210 **供试品溶液的制备** 取供试品,按照本指导原则中生物学试验的要求制备供试品溶液。

211 **空白对照液的制备** 采用供试品溶液制备同批号的提取溶剂(不含供试品),以相同的方  
212 式制备作为空白对照液。供试品溶液和空白对照液应在制备后 24 小时内使用,试验前应平  
213 衡至室温并确保可提取物充分混匀。

214 **试验方法** 轻轻拉开下眼睑使之离开眼球形成一小窝,滴入约 0.1mL 空白溶液,合拢眼  
215 睑 10 秒钟;在另一只眼内滴入供试品溶液 0.1mL,合拢眼睑 10 秒钟。

216 **动物观察** 分别在滴注后(1±0.1)小时、(24±2)小时、(48±2)小时和(72±2)小时,可采  
217 用荧光素染色,并使用裂隙灯、检眼镜等辅助手段检查每只动物的双眼。按表 1 规定的眼损  
218 伤记分系统对观察到的反应记分并记录。

#### 219 表 1 眼损伤记分系统

反 应	记分
1. 角膜	
浑浊程度(最致密区域):	
透明	0
云翳或弥散混浊区,虹膜清晰可见	1 <sup>a</sup>
易识别的半透明区,虹膜清晰可见	2 <sup>a</sup>
乳白色区,看不见虹膜,勉强可见瞳孔	3 <sup>a</sup>
浑浊,看不见虹膜	4 <sup>a</sup>
角膜受累范围	
大于 0, 小于或等于 1/4	0
大于 1/4, 小于 1/2	1

大于 1/2, 小于 3/4	2
大于 3/4 直至整个角膜区域	3
<b>2. 虹膜</b>	
正常	0
超出正常皱襞, 充血水肿, 角膜缘充血(其中一种或全部), 仍有对光反应(反应迟	1 <sup>a</sup>
无对光反射, 出血性严重结构破坏(其中一种或全部)	2 <sup>a</sup>
<b>3. 结膜</b>	
充血(累及睑结膜和球结膜, 不包括角膜和虹膜)	
血管正常	0
血管明显充血	1
弥散性充血, 呈深红色, 血管纹理不清	2 <sup>a</sup>
弥散性充血, 呈紫红色	3 <sup>a</sup>
水肿	
无水肿	0
轻微水肿(包括瞬膜)	1
明显水肿伴部分睑外翻	2 <sup>a</sup>
眼睑水肿使眼呈半闭合状	3 <sup>a</sup>
眼睑水肿使眼呈半闭合乃至全闭合状	4 <sup>a</sup>
分泌物	
无分泌物	0
超过正常分泌量(不包括正常动物眼内眦少量分泌物)	1
分泌物浸湿眼睑及眼睑邻近睫毛	2
分泌物浸湿眼睑、睫毛和眼周围区域	3

<sup>a</sup> 阳性结果

220

221 **结果评价** 如果 3 只动物试验眼均无阳性结果, 即认为该供试品无眼刺激性, 如果有 1  
222 只以上动物试验眼在任何观察阶段呈现阳性结果(表 1 中有脚注的记分), 即认为该供试品  
223 具有眼刺激性。如 3 只动物试验眼中仅有 1 只呈疑似反应, 则另取 3 只动物重复试验, 如果  
224 任一复试动物呈现阳性结果, 即认为该供试品具有眼刺激性。

225

#### 226 附 7: 药包材溶血试验方法

227 本法系将供试品与血液接触, 通过测定红细胞释放的血红蛋白量, 以检测供试品体外溶  
228 血程度的一种方法。

229 **稀释兔血制备** 采集健康兔新鲜血液, 制备成新鲜抗凝兔血。常见抗凝剂有 3.2% 枸橼酸  
230 钠, 与血液的体积比为 1:9; 或 2% 草酸钾, 与血液的体积比为 1:20。取新鲜抗凝兔血 8mL,  
231 加入 0.9% 氯化钠注射液 10mL 稀释。

232 **提取溶剂** 0.9% 氯化钠注射液。

233 **供试品制备** 称取 3 份供试品，每份 5g，切成小块置于试管中，保证供试品与提取溶剂  
234 充分接触。由于完整表面与切割表面可能存在潜在的提取性能差异，必要时可保持供试品的  
235 完整性。每支试管加入 0.9%氯化钠注射液 10mL。

236 **阴性对照** 不加供试品的 0.9%氯化钠注射液 10mL，平行制备 3 管。

237 **阳性对照** 纯化水 10mL，平行制备 3 管。

238 **试验方法** 全部试管置于 37℃±1℃恒温水浴中孵育 30 分钟后，每支试管加入 0.2mL 稀  
239 释兔血轻轻混匀，置 37℃±1℃水浴中继续孵育 60 分钟。倒出管内液体离心 5 分钟（800g）。  
240 吸取上清液移入比色皿内使用分光光度计或移入酶标板内采用酶标仪，按照紫外-可见分光  
241 光度法（通则 0401），于 545nm 波长处测定吸光度。

242 **结果计算** 供试品组和对照组吸光度均取 3 支管的平均值。阴性对照管的吸光度应不大  
243 于 0.03，阳性对照管的吸光度应为 0.8±0.3，否则重新实验。溶血率按下式计算：

$$244 \quad \text{溶血率 (\%)} = \frac{\text{供试品组吸光度} - \text{阴性对照组吸光度}}{\text{阳性对照组吸光度} - \text{阴性对照组吸光度}} \times 100$$

245 **结果判定** 溶血率应小于 5%。

#### 246 附 8：药包材急性全身毒性试验方法

247 本法系将一定剂量的供试品溶液注入小鼠体内，在规定时间内观察小鼠有无毒性反应和  
248 死亡情况，以判定供试品是否具有急性全身毒性的一种方法。

249 **试验用小鼠** 试验用小鼠应健康合格。须在同一饲养条件下饲养，同一来源，同一品种，  
250 性别不限，体重 17~23g。雌性动物应未育并无孕。做过本试验的小鼠不得重复使用。将小  
251 鼠随机分为试验和对照两组，每组 5 只。复试时每组取 18~19g 的小鼠 10 只。

252 **供试品溶液的制备** 取供试品，按照本指导原则中生物学试验的要求制备供试品溶液。

253 **对照液** 浸提介质（不含有供试品）以相同的方式制备作为对照液。

254 供试品溶液和对照液应在制备后 24 小时内使用，注射前溶液应平衡至室温，并确保可  
255 浸提物充分混匀。

256 **试验方法** 按照表 1 规定各组 5 只小鼠分别注射供试品溶液或对照液，缓慢注射。  
257 PEG400 供试品溶液及介质对照液在注射前应使用 0.9%氯化钠注射液以 4.1 倍稀释至终浓度  
258 200mg/ml 后注射。注射后观察小鼠即时反应，于 4 小时、24 小时、48 小时、72 小时观察  
259 和记录试验组和对照组小鼠的一般状态、毒性表现和死亡小鼠数，并在 72 小时称量小鼠  
260 体重。小鼠反应观察判断按表 2 进行。

261 **表 1 注射程序**

供试品溶液或对照液	剂量	注射途径
0.9%氯化钠注射液	50ml/kg	IV
乙醇-0.9%氯化钠注射液（1:20）	50 ml/kg	IV

PEG 400	10 g/kg	IP
新鲜精制植物油（如棉籽油等）	50 ml/kg	IP

262 注：IV. 静脉注射；IP. 腹腔注射。

263 **表 2 注射后小鼠反应观察指标**

程度	症状
无	注射后未见毒性症状
轻	注射后有轻微症状但无运动减少，呼吸困难或腹部刺激症状
中	出现明显的腹部刺激症状，呼吸困难，运动减少，眼睑下垂，腹泻，体重下降，通常下降至 15~17g
重	衰竭，发绀，震颤，严重腹部刺激症状，眼睑下垂，呼吸困难，体重急剧下降，通常低于 15g
死亡	注射后死亡

264

265 **结果判定** 如果观察期内供试品组小鼠的毒性反应不大于对照组小鼠，则判定供试品合格。如果供试品组小鼠有 2 只或 2 只以上出现中度毒性症状或死亡，或有 3 只或 3 只以上小鼠体重下降大于 2g，则供试品不合格。如任何一供试品组小鼠显示有轻微的毒性反应，并且不超过 1 只小鼠显示有中度毒性反应的大体症状或死亡，则另取 10 只小鼠进行复试。在 266 72 小时观察期内，供试品组小鼠的反应不大于对照组小鼠，判定供试品合格。

#### 270 附 9：药包材细菌回复突变试验方法

271 本法系在有和无代谢活化系统的条件下，通过观察一定量的供试品溶液诱导组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株和色氨酸缺陷型的大肠杆菌发生回复突变的情况，以评价供试品潜在的 272 致突变性。

274 **试验用菌株** 采用 5 种鼠伤寒沙门氏菌突变型菌株进行试验，菌株特性鉴定需符合要求， 275 推荐的菌株组合为：

276 a) 组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株 TA97 或 TA1537 或 TA97a；

277 b) 组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株 TA98；

278 c) 组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株 TA100；

279 d) 组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株 TA102，或大肠杆菌 WP2 uvrA，或 WP2 280 uvrA(pKM101)；

281 e) 组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株 TA1535。

282 **供试品溶液的制备** 取供试品，按照本指导原则中生物学试验的要求制备供试品溶液， 283 还可选择与试验体系相容的其他提取溶剂，如二甲基亚砜（DMSO）等。

284 **阴性对照液的制备** 采用供试品溶液制备同批号的提取溶剂（不含供试品），以相同的方

285 式制备作为阴性对照液。常用的阴性对照物包括水（或 0.9%氯化钠注射液）、含血清培养基、  
286 DMSO 等。通常 DMSO 在培养液中的终浓度不应超过 1.0%，水（或 0.9%氯化钠注射液）  
287 不应超过 10%。供试品溶液和阴性对照液应在制备后 24 小时内使用，在试验前应平衡至室  
288 温，并确保充分混匀。

289 **阳性对照** 按表 1 和表 2 为试验所用阳性对照的举例，亦可使用其他具有菌株特异性的  
290 已知阳性对照物。当使用 2-氨基蒽作为有代谢活化系统的阳性对照时，2-氨基蒽不能作为所  
291 有菌株的唯一阳性对照，还应使用其他阳性对照，如苯并(a)蒽或 7,12-二甲基苯并[a]蒽等。  
292 阳性对照应现用现配。

293 **表 1 Ames 试验阳性对照举例（有代谢活化系统）**

化学物	CAS No.
9,10-二甲基噁或	781-43-1
7, 12-二甲基苯并[a]蒽或	57-97-6
刚果红 (用于还原代谢活化法)或	573-58-0
苯并(a)蒽或	50-32-8
环磷酰胺(一水)或	50-18-0, 6055-19-2
2-氨基蒽	613-13-8

294 **表 2 Ames 试验阳性对照举例（无代谢活化系统）**

化学物	CAS No.	菌株
叠氮化钠	26628-22-8	TA1535 和 TA100
2-硝基苄	607-57-8	TA98
9-氨基吡啶或 ICR191	90-45-9 或 17070-45-0	TA1537,TA97 和 TA97a
过氧化氢异丙烯	80-15-9	TA102
丝裂霉素 C	50-07-7	WP2uvrA 和 TA102
N-乙基-N-硝基-N-亚硝基胍或	4245-77-6 或	
N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍或	70-25-7 或	WP2, WP2 uvrA, 和 WP2 uvrA (pkM101)
4 硝基喹啉 1-氧化物	56-57-5	
咪喃基咪喃酰胺 AF2	3688-53-7	WP2 uvrA （含质粒的菌株）

295 **试验方法** 在试验中应同时包括阴性对照和阳性对照，且代谢活化和非代谢活化两种测  
296 试过程应同时进行。其中，代谢活化系统是经过酶诱导剂处理的肝脏所提取的带有辅助因子  
297 和微粒体部分的测试系统。

298 供试品溶液的细菌毒性表现为回变菌落数量减少，微菌落变大，背景菌苔变薄、稀疏或  
299 减少。按表 3 对细菌回复突变试验中背景菌苔进行分级。对于背景菌苔正常，无细菌毒性的

300 供试液，可以使用 100%浓度的供试品溶液进行试验，不需要梯度稀释。如果 100%浓度的  
 301 供试品溶液出现细菌毒性或显示出明显的沉淀，以 100%浓度的供试品溶液作为最高浓度组  
 302 梯度稀释不少于 5 个浓度，浓度范围包括细菌毒性从最大到小或无细菌毒性。

303 **表 3 细菌回复突变试验背景菌苔分级标准**

分级	类型	特征
1	正常	健康的微小菌落
2	轻度减少	与空白对照相比，背景菌苔明显变薄，微菌落的大小可能略有增加
3	中度减少	与空白对照相比，背景菌苔的显著变薄导致微菌落的大小显著增加
4	重度减少	与空白对照相比，背景菌苔的极度稀疏导致微菌落的大小增加，从而使背景菌苔以孤立菌落的形式肉眼可见。
5	无	平板中大于等于 90%的区域完全缺乏任何背景菌苔
6	被样品颗粒覆盖	由于试验样品颗粒无法准确评价背景菌苔
7	无干扰性沉淀	在平板上有肉眼可见的沉淀物，但沉淀物颗粒总数小于或等于回变菌落数的 10%
8	有干扰性沉淀	在平板上有肉眼可见的沉淀物，但沉淀物颗粒总数大于回变菌落数的 10%

304 制备试验菌液：将菌株接种于含有 5mL 营养肉汤培养基的无菌试管中，在 (37±1) °C、  
 305 115r/min 条件下振荡培养 (10-12) 小时至对数增长期，活菌数不少于 1×10<sup>9</sup> 个/mL。

306 **方法一平板掺入法** 融化顶层培养基分装于无菌小试管，每管 2 mL，在 45°C 水浴中保温。  
 307 供试品组每管加入 0.1 mL 供试品溶液，0.1mL 试验菌液（至少含有 10<sup>8</sup> 个活细胞），其  
 308 中有代谢活化系统组每管加入 0.5 mL 代谢活化系统，无代谢活化系统组每管加入 0.5 mL 磷  
 309 酸盐缓冲液，每组 3 管，再混匀，迅速将每管溶液分别倒在底层培养基表面，转动平板使顶  
 310 层培养基均匀分布在底层上，平放固化。阴性对照组分别加入 0.1 mL 阴性对照液，0.1mL  
 311 试验菌液（至少含有 10<sup>8</sup> 个活细胞），其中有代谢活化系统组每管加入 0.5 mL 代谢活化系统，  
 312 无代谢活化系统组每管加入 0.5 mL 磷酸盐缓冲液；阳性对照组分别加入表 1 和表 2 列出的  
 313 阳性物质 0.1 mL，0.1mL 试验菌液（至少含有 10<sup>8</sup> 个活细胞），有代谢活化系统组每管加入  
 314 0.5 mL 代谢活化系统，无代谢活化系统组每管加入 0.5 mL 磷酸盐缓冲液，其他步骤均同供  
 315 试品组。全部平板于 37°C 培养箱中倒置培养，48 小时-72 小时后观察每个平板中回变菌落  
 316 情况。

317 **方法二预孵育法** 融化顶层培养基分装于无菌小试管，每管 2 mL，在 45°C 水浴中保温。  
 318 将 0.5mL 供试品溶液或阴性对照或阳性对照与 0.1mL 试验菌液（至少含有 10<sup>8</sup> 个活细胞）、  
 319 0.5mL 代谢活化系统或磷酸盐缓冲液搅拌均匀，在 37°C 下预孵育不少于 20 分钟，每组 3 管，



320 然后与顶层培养基混合并倒在底层培养基表面，转动平板使顶层培养基均匀分布在底层上，  
321 平放固化。全部平板于 37℃ 培养箱中倒置培养，48 小时后观察每个平板中回变菌落情况。

322 **结果判断** 计算每个平板中回变菌落的数量、平均值和标准偏差。阴性对照组回变菌落  
323 数和阳性对照组回变菌落数应在历史对照数据范围内，阳性对照组回变菌落数应至少为阴性  
324 对照的 3 倍，否则对不符合的菌株应重新试验。如供试品组的回变菌落数出现有统计学意义  
325 的剂量反应性增长或在背景菌苔生长良好条件下，供试品组回变菌落数至少为阴性对照组回  
326 变菌落数的两倍或两倍以上即为阳性反应。

327

### 328 附 10: 药包材体外哺乳动物细胞染色体畸变试验方法

329 本法系在有和无外源代谢活化系统的条件下，将一定量的供试品溶液与体外哺乳动物细  
330 胞共培养，在规定的时间内观察分裂中期细胞分裂相的情况，以判定供试品在试验条件下是  
331 否诱导体外哺乳动物细胞的染色体结构畸变。

332 **试验细胞** 选用的细胞系包括中国仓鼠肺细胞（CHL）、中国仓鼠卵巢细胞（CHO）等。  
333 需定期检查细胞系核型和染色体数目的稳定性以及支原体污染情况，否则不宜使用。

334 **供试品溶液的制备** 取供试品，按照本指导原则中生物学试验的要求制备供试品溶液，  
335 还可选择与试验体系相容的其他提取溶剂，如二甲基亚砜（DMSO）等。

336 **阴性对照液** 提取溶剂（不含有供试品）按照制备供试品溶液相同的提取条件制备作为  
337 对照液。常用的阴性对照物包括水（或 0.9% 氯化钠注射液）、含血清培养基、DMSO 等。通  
338 常 DMSO 在培养液中的终浓度不应超过 1.0%，水（或 0.9% 氯化钠注射液）不应超过 10%。  
339 供试品溶液和阴性对照液应在制备后 24 小时内使用，在试验前应平衡至室温，并确保充分  
340 混匀。

341 **阳性对照液** 阳性对照物举例见表 1，如有充分理由时也可采用其他适宜的阳性对照物。  
342 阳性对照应现用现配。

343 **表 1 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验阳性对照举例**

代谢活化条件	阳性对照物	CAS No.
	甲磺酸甲酯	66-27-3
无外源性代谢 活化系统	丝裂霉素 C	50-07-7
	阿糖胞苷	147-94-4
	4-硝基喹啉-N-氧化物	56-57-5
有外源性代谢 活化系统	苯并(a)芘	50-32-8
	环磷酸胺	50-18-0
	环磷酸胺一水化合物	6055-19-2

344 **试验方法** 在试验中应同时包括阴性对照和阳性对照，且代谢活化和非代谢活化两种测  
345 试过程应同时进行。其中，代谢活化系统是经过酶诱导剂处理的肝脏所提取的带有辅助因子

346 和微粒体部分的测试系统。

347 对于无细胞毒性的供试品溶液，可以使用 100%浓度的供试品溶液进行试验，不需要梯  
348 度稀释。如果 100%浓度的供试品溶液出现细胞毒性，则应以供试品溶液原液作为最高浓度  
349 组进行梯度稀释，即在收获细胞时试验用最高浓度的相对群体倍增数（RPD）或相对细胞增  
350 长数（RICC）达到(55±5)%的稀释浓度，所选剂量浓度范围的细胞毒性包括从最大到小或无  
351 细胞毒性。（公式 1 和公式 2 分别用于计算 RPD 和 RICC）。

$$352 \quad RPD = \frac{PD_m}{PD_M} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

353 式中：

354 RPD——相对群体倍增数；

355 PD——群体倍增数，其值等于 $\lg(\text{处理后细胞数量} \div \text{初始细胞数量}) \div \lg 2$ ；

356 PD<sub>m</sub>——试验样品培养物中群体倍增数；

357 PD<sub>M</sub>——对照品培养物中群体倍增数。

$$358 \quad RICC = \frac{d_1 - d_0}{D_1 - D_0} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

359 式中：

360 RICC——相对细胞增长数；

361 d<sub>1</sub> ——试验样品培养物中细胞的最终数量；

362 d<sub>0</sub> ——试验样品培养物中细胞的起始数量；

363 D<sub>1</sub> ——对照品培养物中细胞的最终数量；

364 D<sub>0</sub> ——对照品培养物中细胞的起始数量。

365 将一定浓度的细胞接种于培养皿（瓶）内，置于培养箱（37℃，5%CO<sub>2</sub>）内培养，保证  
366 细胞在收获期处于对数生长状态。试验分为：短期接触组（有和无代谢活化系统）和长期接  
367 触组（无代谢活化系统）。弃去培养皿（瓶）中的培养液，在处于对数生长状态的细胞中加  
368 入供试品溶液或对照液、代谢活化系统（无代谢活化系统时，需用细胞培养液补足）和细胞  
369 培养液，置于培养箱（37℃，5%CO<sub>2</sub>）中。

370 短期接触组：接触（3~6）小时，弃去培养皿（瓶）中的液体，用生理等渗液洗细胞 3  
371 次，加入新鲜细胞培养液继续培养至约为 1.5 个-2 个的正常细胞周期时收获细胞。

372 长期接触组：持续接触时间约为 1.5 个-2 个的正常细胞周期。

373 于收获前(1~3)小时加入细胞分裂中期阻断剂。收获细胞后，在 37℃水浴中采用 0.075M  
374 氯化钾溶液对细胞进行低渗处理，加入固定液（甲醇：冰醋酸的体积比为 3：1）对细胞进  
375 行固定，以 200g 离心 5 分钟，弃去上清液，经过滴片、姬姆萨染色后，在显微镜下观察中  
376 期分裂相细胞中染色单体断裂、染色体断裂、单体互换等染色体结构畸变。由于固定步骤会  
377 导致中期分裂相细胞的部分染色体丢失，因此，记录的细胞数可等于细胞模式数的  $2n \pm 2$  (n

378 为细胞染色体单倍数)。

379 **结果判断** 显微镜下每一试验组至少选择 300 个分散良好的中期分裂相细胞进行染色体  
380 畸变观察。将出现染色畸变的细胞数除以该组实际分析的总细胞数,求得染色体畸变率(%)。  
381 当观察到具有大量染色体畸变的细胞时,中期分裂相的细胞数目可以减少,并且供试品被认  
382 为是明显的阳性。记录染色体结构畸变类型(含或不含裂隙)。染色单体与染色体型畸变应  
383 分开记录,同时区分亚型(如断裂、互换等)。

384 阳性对照畸变率应在历史阳性数据范围内,并且与阴性对照相比显著增加,具有统计学  
385 意义;阴性对照畸变率应在历史阴性数据范围内。则试验系统成立。

386 在试验系统成立的前提下,与阴性对照组相比,当短期接触组(有和无代谢活化系统)  
387 和长期接触组(无代谢活化系统)中任一组供试品的结果在一个或多个浓度下,染色体结构  
388 畸变率显著增加或染色体结构畸变率的增加存在剂量反应关系或任一组结果超出了历史的  
389 阴性对照数据范围,即认为是阳性结果,否则即为阴性结果。染色体畸变试验的阳性结果表  
390 明,在试验条件下,供试品溶液具有诱发体外哺乳动物细胞染色体结构畸变的潜能。阴性结  
391 果表明,在试验条件下,供试品溶液对试验细胞无致染色体畸变作用。

#### 392 附 11: 药包材体外哺乳动物细胞 TK 基因突变试验方法

393 本法系在有和无外源代谢活化系统存在的情况下,将一定量的供试品溶液与小鼠淋巴瘤  
394 细胞 L5178Y TK<sup>+</sup>-3.7.2C 共培养,在规定的时间内,观察细胞克隆形成集落的情况,以判  
395 定供试品在试验条件下是否诱导体外小鼠淋巴瘤细胞的 TK 基因突变。

396 **试验用细胞** 应选择使用小鼠淋巴瘤细胞系(L5178Y TK<sup>+</sup>-3.7.2C)。鉴于细胞性状稳定  
397 性要求,试验细胞系最好新取自冻存细胞。细胞在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,细胞的增殖  
398 周期为 10 小时左右。经过传代培养后,保证细胞呈对数生长状态,细胞持续培养最多不超  
399 过 3 个月。

400 **供试品溶液的制备** 取供试品,按照本指导原则中生物学试验的要求制备供试品溶液,  
401 还可选择与试验体系相容的其他提取溶剂,如二甲基亚砜(DMSO)等。

402 **阴性对照液的制备** 采用供试品溶液制备同批号的提取溶剂(不含供试品),以相同的方  
403 式制备作为阴性对照液。常用的阴性对照物包括水(或 0.9%氯化钠注射液)、含血清培养基、  
404 二甲基亚砜(DMSO)等。通常二甲基亚砜(DMSO)在培养液中的终浓度不应超过 1.0%,  
405 水(或 0.9%氯化钠注射液)不应超过 10%。供试品溶液和阴性对照液应在制备后 24 小时内  
406 使用,在试验前应平衡至室温,确保充分混匀。

407 **阳性对照液** 阳性对照物举例见表 1,如有充分理由时也可采用其他适宜的阳性对照物。  
408 阳性对照应现用现配。

#### 409 表 1 体外小鼠淋巴瘤试验阳性对照物质举例

代谢活化条件	阳性对照物	CAS No.
--------	-------	---------

无外源性代谢 活化系统	甲磺酸甲酯	66-27-3
	丝裂霉素 C	50-07-7
	4-硝基喹啉-N-氧化物	56-57-5
有外源性代谢 活化系统	苯并(a)芘	50-32-8
	环磷酰胺	50-18-0
	环磷酰胺一水化合物	6055-19-2
	7,12-二甲基苯蒽	57-97-6
	3-甲基胆蒽	56-49-5

410 **试验方法** 在试验中应同时包括阴性对照和阳性对照，且代谢活化和非代谢活化两种测  
411 试过程应同时进行。其中，代谢活化系统是经过酶诱导剂处理的肝脏所提取的带有辅助因子  
412 和微粒体部分的测试系统。

413 对于无细胞毒性的供试品溶液，可以使用 100%浓度的供试品溶液进行试验，不需要梯  
414 度稀释。如果 100%浓度的供试品溶液出现细胞毒性，则应以供试品溶液原液作为最高浓度  
415 组进行梯度稀释，最高的试验浓度为细胞相对总生长（RTG）在 10%~20%的浓度，梯度稀  
416 释宜包括从中到小或无细胞毒性的浓度范围。在一些情况下，如供试液具有陡峭的浓度反应  
417 曲线，则可适当缩小浓度稀释间距。

418 在总体积为 10mL 的试验体系中，有外源活化系统组分别加入 1mL 代谢活化系统、供  
419 试品溶液以及细胞悬液（细胞总数为  $6 \times 10^6$  个），置于培养箱（37℃，5%CO<sub>2</sub>）中振荡培养  
420 （3~4）小时；无活化系统组分别加入 1mL PBS、供试品溶液以及细胞悬液（细胞总数为  $6 \times 10^6$   
421 个），置于培养箱（37℃，5%CO<sub>2</sub>）中分别振荡培养（3~4）小时和 24 小时（24 小时组额外  
422 添加生长培养基/供试液至 20mL）。培养结束后用培养基洗涤细胞两次，调整细胞浓度为  
423  $3 \times 10^5$  个/mL，在 20mL 生长培养基中继续培养 2 天，每天对细胞浓度计数并按公式 1 计算  
424 悬浮生长数（SG）。

$$SG = \frac{day2_a}{day1_b} \times \frac{day3_a}{day2_b} \dots \dots \dots (1)$$

425 式中：

426 SG——悬浮生长数

427 a——表达期计数细胞浓度

428 b——细胞初始/调整细胞浓度，若不存在细胞毒性干扰的情况下，应为  $3 \times 10^5$  个/mL。

429 注：当计算 24h 组悬浮生长数时，需延长 1d 计算 SG。

430 表达培养 2d 结束后，取适量细胞悬液，用含 20%血清的培养基梯度稀释至细胞浓度为  
431 8 个/mL，取 200μL 细胞悬液接种至 96 孔板；同时取适量细胞悬液，调整细胞浓度至  $1 \times 10^4$   
432 个/mL，加入三氟胸苷（TFT，终浓度为 3μg/mL）混匀，取 200μL 细胞悬液接种至 96 孔板。  
433 将全部平板置于培养箱（37℃，5%CO<sub>2</sub>）中，培养 10 天~12 天。平板内细胞培养结束后，  
434

435 通过目视或在显微镜及其他适宜用具下观察计数平板中集落生长的孔数。分别根据公式 2  
436 与公式 3，计算出细胞的克隆效率（CE）与突变频率（MF）。注：突变集落按大集落（LC：  
437 直径 $\geq 1/4$ 孔径，呈薄层分布，密度低）和小集落（SC：直径 $< 1/4$ 孔径，呈块状，密度高）  
438 分别计数，极小集落可再继续培养 3 天后计数。

$$439 \quad CE = \frac{-\ln(EW/TW)}{N} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

440 式中：

441  $CE$  ——克隆效率；

442  $EW$  ——无细胞集落孔数；

443  $TW$  ——平板总孔数；

444  $N$  ——每孔平均细胞数

$$445 \quad MF = \frac{CE_M}{CE_V} \dots\dots\dots (3)$$

446 式中：

447  $MF$  ——总突变频率；

448  $CE_m$  ——TFT 选择培养基细胞克隆效率；

449  $CE_v$  ——生长培养基细胞克隆效率；

450 注：当计算大集落突变频率（L-MF）和小集落突变频率（S-MF）时， $EW$  分别指无大  
451 集落生长和无小集落生长的孔数。

452 细胞相对总生长（RTG）由公式 4 和公式 5 计算得出。

$$453 \quad RSG = SG_S / SG_C \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

454 式中：

455  $RSG$  ——相对悬浮增长率

456  $SG_s$  ——试验组悬浮生长数；

457  $SG_c$  ——对照组悬浮生长数。

$$458 \quad RTG = RSG \times RCE \dots\dots\dots (5)$$

459 式中：

460  $RTG$  ——相对总生长

461  $RSG$  ——相对悬浮增长率；

462  $RCE$  ——相对克隆效率。

463 **结果判断** 阴性对照满足克隆效率（CE）在 65%~120%，突变频率（MF）在  
464  $50 \times 10^{-6}$ ~ $170 \times 10^{-6}$ ，或在实验室历史数据范围内，同时短期处理组（3 小时~4 小时）的悬浮  
465 生长数应在 8~32 倍，长期处理组（24 小时）的悬浮生长数应在 32~180 倍；阳性对照总突  
466 变频率绝对增加，比阴性对照突变频率增加  $300 \times 10^{-6}$  以上，其中小集落突变频率应占 40%

467 以上，或阳性对照的小集落突变频率比阴性对照高  $150 \times 10^{-6}$  以上，则试验系统成立。

468 在试验成立的前提下，当供试品溶液的 MF 值高于阴性对照且超过总评价因子（GEF，  
469  $126 \times 10^{-6}$ ），则判定试验结果呈阳性，该供试品具有诱导体外哺乳动物细胞 TK 基因突变的  
470 潜能；否则试验结果为阴性。

#### 471 附 12：药包材体外哺乳动物细胞微核试验方法

472 本法系在有和无外源代谢活化系统存在的情况下，将一定量的供试品溶液与体外哺乳动  
473 物细胞共培养，在规定的时间内观察双核细胞中微核的情况，以判定供试品在试验条件下是  
474 否诱导体外哺乳动物细胞出现微核。

475 **试验细胞** 选用的细胞系包括中国仓鼠肺细胞（CHL）、中国仓鼠卵巢细胞（CHO）、中  
476 国仓鼠肺细胞（V79）、小鼠淋巴瘤细胞（L5178Y）或人细胞系如 TK6 等。需定期检查细  
477 胞系核型和染色体数目的稳定性以及支原体污染情况。

478 **供试品溶液的制备** 取供试品，按照本指导原则中生物学试验的要求制备供试品溶液，  
479 还可选择与试验体系相容的其他提取溶剂，如二甲基亚砜（DMSO）等。

480 **阴性对照液** 提取溶剂（不含有供试品）按照制备供试品溶液相同的提取条件制备作为  
481 对照液。常用的阴性对照物包括水（或 0.9%氯化钠注射液）、含血清培养基、DMSO 等。通  
482 常 DMSO 在培养液中的终浓度不应超过 1.0%，水（或 0.9%氯化钠注射液）不应超过 10%。  
483 供试品溶液和阴性对照液应在制备后 24 小时内使用，在试验前应平衡至室温，并确保充分  
484 混匀。

485 **阳性对照液** 阳性对照物举例见表 1，如有充分理由时也可采用其他适宜的阳性对照物。

486 **表 1 体外哺乳动物细胞微核试验阳性对照举例**

代谢活化条件	阳性对照物	CAS No.
无外源性代谢 活化系统	甲磺酸甲酯	66-27-3
	丝裂霉素 C	50-07-7
	阿糖胞苷	147-94-4
	4-硝基喹啉-N-氧化物	56-57-5
有外源性代谢 活化系统	苯并(a)芘	50-32-8
	环磷酰胺	50-18-0
	环磷酰胺一水化合物	6055-19-2
非整倍体剂	秋水仙素	64-86-8
	长春碱	865-21-4

487 **试验方法** 在试验中应同时包括阴性对照和阳性对照，且代谢活化和非代谢活化两种测试  
488 过程应同时进行。其中，代谢活化系统是从经过酶诱导剂处理的肝脏中所提取的带有辅助因  
489 子和微粒体部分的测试系统。

490 对于无细胞毒性的供试品溶液，可以使用 100%浓度的供试品溶液进行试验，不需要梯  
 491 度稀释。如果 100%浓度的供试品溶液出现细胞毒性，则应以供试品溶液原液作为最高浓度  
 492 组进行梯度稀释，即在收获细胞时试验用最高浓度的细胞毒性发生率应控制在（55±5）%，  
 493 所选剂量浓度的细胞毒性范围包括从最大到小或无细胞毒性。

494 使用含细胞松弛素 B（CytoB）处理时，使用 CBPI[见公式（1）、公式（2）]或 RI[见  
 495 公式（3）、公式（4）]来评价细胞毒性。

$$496 \quad CBPI = \frac{[S + (2 \times D) + (3 \times M)]}{T_0} \dots\dots\dots (1)$$

497 式中：

498 CBPI——胞质分裂阻断增殖指数；

499 S——单个核细胞数；

500 D——双核细胞数；

501 M——多核细胞数；

502 T<sub>0</sub>——细胞总数。

$$503 \quad Cytostasis = \left(1 - \frac{CBPI_T - 1}{CBPI_C - 1}\right) \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

504 式中：

505 Cytostasis——细胞阻滞

506 T——试验样品组；

507 C——阴性对照组或未处理对照组。

$$508 \quad RI = \frac{[D_T + (2 \times M_T)] \div T_T}{[D_C + (2 \times M_C)] \div T_C} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

509 式中：

510 RI——复制指数；

511 D<sub>T</sub>——试验样品组双核细胞数；

512 D<sub>C</sub>——阴性对照组或未处理对照组双核细胞数；

513 M<sub>T</sub>——试验样品组多核细胞数；

514 M<sub>C</sub>——阴性对照组或未处理对照组多核细胞数；

515 T<sub>T</sub>——试验样品组细胞总数；

516 T<sub>C</sub>——阴性对照组或未处理对照组细胞总数。

$$517 \quad Cytostasis = (1 - RI) \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

518 未经 CytoB 处理时，使用 RICC[见公式（5）]或 RPD[见公式（6）]来评价细胞毒  
 519 性。

$$RICC = \frac{d_1 - d_0}{D_1 - D_0} \times 100\% \dots \dots \dots (5)$$

520

521 式中：

522

RICC——相对细胞增长数；

523

 $d_1$  ——试验样品培养物中细胞的最终数量；

524

 $d_0$  ——试验样品培养物中细胞的起始数量；

525

 $D_1$  ——对照品培养物中细胞的最终数量；

526

 $D_0$  ——对照品培养物中细胞的起始数量。

$$RPD = \frac{PD_m}{PD_M} \times 100\% \dots \dots \dots (6)$$

527

528 式中：

529

RPD——相对群体倍增数；

530

PD——群体倍增数，其值等于 $\lg(\text{处理后细胞数量} \div \text{初始细胞数量}) \div \lg 2$ ；

531

PD<sub>m</sub>——试验样品培养物中群体倍增数；

532

PD<sub>M</sub>——对照品培养物中群体倍增数。

533

534 将一定浓度的细胞接种于培养皿（瓶）内，置于培养箱（37℃，5%CO<sub>2</sub>）内培养，保证  
535 细胞在收获期处于对数生长状态。试验分为短期接触组（有和无代谢活化系统）和长期接触  
536 组（无代谢活化系统）。弃去培养皿（瓶）中的培养液，在处于对数生长状态的细胞中加入  
537 供试品溶液或对照品、代谢活化系统（不加代谢活化系统时，需用培养液补足）和含或不含  
538 CytoB 的细胞培养液，置于培养箱（37℃，5%CO<sub>2</sub>）中。

538

539 短期接触组：接触（3~6）小时，弃去培养皿（瓶）中的液体，用生理等渗液洗细胞 3  
540 次，加入含或不含 CytoB 新鲜细胞培养液继续培养至约为 1.5 个-2 个的正常细胞周期时收获  
541 细胞。

541

长期接触组：持续接触时间约 1.5 个-2 个的正常细胞周期。

542

543 收获细胞后进行在 37℃ 水浴中低渗，采用 0.075M 氯化钾溶液对细胞进行低渗处理，加  
544 入固定液（甲醇：冰醋酸体积比为 3：1）进行细胞固定，以 200g 离心 5min，弃去上清液。  
545 经过滴片，姬姆萨染色后，显微镜对分散良好的双核细胞进行微核观察。

545

546 **结果判断** 显微镜下每一试验组至少分析计数 2000 个分散良好的双核细胞。将出现微核  
547 的双核细胞数除以该组实际分析的总双核细胞数，求得微核率(%)。

547

548 阳性对照微核率应在历史阳性数据范围内，并且与阴性对照相比显著增加，具有统计学  
549 意义；阴性对照微核率也应在历史阴性数据范围内。则试验系统成立。

549

550 在试验系统成立的前提下，与阴性对照相比，当短期接触组（有和无代谢活化系统）和  
551 长期接触组（无代谢活化系统）中任一组供试品的结果在一个或多个浓度下，微核率在统计  
552 上有显著的增加或微核率的增加存在剂量反应关系或任一组结果超出了历史的阴性对照数



552 据的分布范围，即认为是阳性结果，否则即为阴性结果。体外哺乳动物细胞微核试验的阳性  
553 结果表明，在试验条件下，供试品溶液具有诱发体外哺乳动物细胞产生微核的潜能。阴性结  
554 果表明，在试验条件下，供试品溶液对试验细胞无微核诱变作用。

仅供内部参考