DB52/T XXX.1-2018

**贵州省地方标准**

**保健用品安全性评价指导及试验方法**

**第4部分 毒理学安全性评价检验**

**（征求意见稿）**

目  次

[前言](#_Toc447786010)..............................................................................Ⅱ

[1 适用范围](#_Toc447786011).......................................................................1

[2　规范性引用文件](#_Toc447786013).................................................................1

[3　术语和定义](#_Toc447786014).....................................................................1

[4　受试物](#_Toc447786015).........................................................................1

5 实验动物及环境要求..............................................................2

[6毒理学试验的项目](#_Toc447786017) ...............................................................2

7 毒理学试验项目的选择原则........................................................2

8 保健用品安全性评价毒理学试验方法.......................................... ... 2

8.1急性经口毒性验.................................................................2

8.2多次皮肤刺激性.................................................................5

8.3急性眼刺激性试验...............................................................6

8.4皮肤变态反应试验...............................................................8

8.5体内哺乳动物细胞微核试验......................................................10

8.6阴道黏膜刺激性试验............................................................11

9 注意事项...................................................................... 13

附录A...................................................................... ....13

附录B...................................................................... ....15

前  言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由贵州省卫生标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：贵州省疾病预防控制中心

本标准主要起草人：刘佳、刘泳廷、王雨、苑洁、高敏、叶建方、郑冲、刘玲、周桂芳

DB52/T XXX.1-2018

**保健用品安全性评价指导及试验方法**

1. **毒理学安全性评价检验**

**1、范围**

本标准规定了具有能改善人体微循环、缓解疼痛、祛湿通络等功效的一类外用保健用品的毒理学安全性评价检验项目。

本标准适用于评价直接或间接外用于人体皮肤的贴剂、喷剂和膏剂，还包括（但不限）浴粉或香薰包（香包）等。

**2、规范性引用文件**

1）下列文件对于本文件的应用是必不可少的，凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本文件。

GB 14925 实验动物 环境及设施

《化妆品安全技术规范》2015年版 国家食品药品监督管理局

《消毒技术规范》卫生部2002年版

**3、术语和定义**

下列术语和定义适用于本文件。

3.1保健用品

直接或间接作用于人体皮肤表面，不以预防和治疗疾病为目的，具有日常保健、促进康复功能的贴剂、膏剂、擦剂、喷剂等产品。但法律、法规对药品、保健食品、医疗器械、特殊用途化妆品、消毒产品、体育器械等另有规定的除外。

**4、受试物**

毒理学试验所用保健用品样品批号应与卫生学试验（理化、微生物）样品批号一致。

**5、实验动物及环境要求**

5.1急性经口毒性试验和体内哺乳动物细胞微核试验宜使用纯系小白鼠（大白鼠）进行试验。

5.2皮肤刺激试验、眼刺激试验、粘膜刺激试验宜使用白色家兔进行试验。

5.3皮肤变态反应试验宜使用白色豚鼠进行试验。

5.4实验动物和饲养环境、饮用水、饲料应符合GB14925的要求。购进的实验动物至少应在实验动物房环境中适应性喂养3天。

**6、毒理学试验的项目**

应包括：

——急性经口毒性试验；

——皮肤刺激性试验；

——急性眼刺激性试验；

——皮肤变态反应试验；

——体内哺乳动物细胞微核试验；

——阴道黏膜刺激性试验。

**7、毒理学试验项目的选择原则**

7.1外用部位与眼部接触可能性大的保健用品，除进行急性经口毒性试验和多次皮肤刺激试验，应加做急性眼刺激试验。

7.2外用部位与粘膜接触可能性大的保健用品，除进行急性经口毒性试验和多次皮肤刺激试验，应加做阴道黏膜刺激试验。

7.3长期使用的保健用品，除进行急性经口毒性试验和多次皮肤刺激试验，应增加皮肤变态反应试验和体内哺乳动物细胞微核试验。

**8、保健用品安全性评价毒理学试验方法**

8.1 急性经口毒性试验

8.1.1受试物处理

8.1.1.1 一般受试物 应据试验的特点和受试物的理化性质选择适合的溶媒（溶剂），将受试物溶解或悬浮于溶媒中，一般使用水或食用植物油，如使用其他溶媒应说明理由。所选用的溶媒本身应不产生毒性作用；与受试物各成分之间不发生化学反应，且保持其稳定性；无特殊刺激性或气味。

8.1.1.2 不溶解的粉剂类受试物提取方法应与产品推荐使用说明相同。如产品无特殊推荐方法，可用水提取物进行试验。水提取物可采用以下提取条件进行：温度80 ℃～90 ℃蒸馏水，浸泡时间至少为30min。

8.1.1.3 含乙醇类的受试物 灌胃给予受试物时，乙醇浓度高于体积分数的15%的受试物，浓缩后应将乙醇浓度调整至15%。乙醇浓度低于体积分数的15％的受试物，浓缩后应将乙醇恢复至受试物定型产品原来的浓度。

8.1.1.4 受试物中辅料处理：受试物如含有不直接参与功效作用的裱背材料（如辅料胶等）载体物质的原因不适合直接以定型产品进行试验时，可以对送检样品适当处理，但处理过程应与原产品的主要生产工艺步骤保持一致。

8.1.2试验过程

8.1.2.1实验动物：应使用小鼠或大鼠，小鼠体重为18g-22g。也可选用成年大鼠，体重为 180g-220g。动物在实验室中至少应适应 3-5 天，试验开始时每一性别动物的体重差异应控制在±20%内。试验前，应禁食过夜，不限制饮水。

8.1.2.2给药方法：用灌胃方法将受试物一次给予动物。若受试物灌胃容量太大，可在24小时内分2-3次给予，其总剂量作为一日剂量计算。

8.1.2.3给药后2小时内密切观察实验动物的中毒表现、死亡数及死亡时间，若动物未出现死亡，每天进行临床观察，观察时间结束后进行大体解剖病理检查，观察时间为14天。

8.1.3试验方法

8.1.3.1一次限量法（limit test）

如果受试物毒性很低，可采用一次限量法，即用10只动物（雌雄各半）一次灌胃5000mg/kg体重剂量，14gd观察期内无动物死亡，则认为LD50大于5000mg/kg体重，不再进行多个剂量的急性经口毒性试验，如果动物出现死亡则选择其他方法。

8.1.3.2霍恩氏（Horn）法

1）预试验

根据受试物的性质和已知资料，选用下述方法：一般多采用100mg/kg体重，1000mg/kg体重和10000mg/kg体重的剂量，各以2只～3只动物预试。根据24h内死亡情况，估计LD50的可能范围，确定正式试验的剂量组。也可简单地直接采用一个剂量，如215mg/kg体重，用5只动物预试。密切观察2小时内动物的中毒表现。如中毒表现严重，估计多数动物可能死亡，即可采用低于215mg/kg体重的剂量系列进入正式试验；反之中毒表现较轻，则可采用高于此剂量的剂量系列。

2）正式试验

a. 动物数：每组10只动物，雌雄各半。

b. 常用剂量系列

1.00

2.15 ×10t t=0,±1,±2,±3

4.64

正式试验时，可根上述剂量系列设计5个组，即较原来的方法在最低剂量组以下或最高剂量组以上各增设一组。

c. 观察

观察期内记录动物死亡数、死亡时间及中毒表现等，根据每组死亡动物数和所采用的剂量系列，查表求得LD50（见附录A）。

d.临床观察

包括皮肤、被毛、眼、黏膜以及呼吸系统、泌尿生殖系统、消化系统和神经系统等，特别要应观察有无震颤、惊厥、流涎、腹泻、呆滞、嗜睡和昏迷等（见附录B）。在试验开始和结束时称取并记录动物体重，并且在观察期14天内每周至少称取动物体重1次。全面观察并记录动物变化发生的时间、程度和持续时间，评估可能的毒作用靶器官。如发现动物处于濒死或表现出严重的疼痛和持续的痛苦状态应处死动物，并记录。

e.病理学检查

所有的动物包括试验期间死亡、人道处死和试验结束处死的动物应进行大体解剖检查，记录每只动物大体病理学变化，出现大体解剖病理改变时应做病理组织学观察。

f.试验结果评价

根据观察期内记录动物死亡数、死亡时间及中毒表现等，根据每组死亡动物数和所采取的剂量系列（见附录A），求得LD50。依据表1，进行毒性分级。

表1 经口毒性分级

|  |  |
| --- | --- |
| LD50(mg/kg体重) | 毒性分级 |
| ≤50 | 高毒 |
| 51—500 | 中等毒 |
| 501—5000 | 低毒 |
| ＞5000 | 实际无毒 |

**8.2 多次皮肤刺激试验**

8.2.1 受试物处理

8.2.1.1受试物原则上按使用说明书的要求进行处理，若无特殊要求，根据性状采用不同的处理方式。

8.2.1.2液体和膏体受试物：一般不需要稀释，可直接取0.5mL(g)涂抹于动物皮肤。

8.2.1.3固体受试物：固体受试物应将其研磨成细粉状，并用水或其他无刺激性溶剂充分湿润，以保证受试物与皮肤有良好的接触，取0.5g敷贴于动物皮肤。使用其他溶剂，应考虑到该溶剂对受试物皮肤刺激性的影响。

8.2.1.4贴剂受试物：剪取2.5㎝×2.5㎝有效部位敷贴于动物皮肤。

8.2.1.5需稀释后使用的产品，先进行产品原型的皮肤刺激性/腐蚀性试验，如果试验结果显示中度以上的刺激性，可按使用浓度为受试物再进行皮肤刺激性/腐蚀性试验。

8.2.1.6依据《化妆品安全技术规范》，当受试物为强酸或强碱(pH值≤2或≥11.5)，可以不再进行皮肤刺激试验。此外，若已知受试物有很强的经皮吸收毒性，经皮LD50小于200mg/kg 体重或在急性经皮毒性试验中受试物剂量为2000mg/kg 体重仍未出现皮肤刺激性作用，也无需进行皮肤刺激性试验。

8.2.2试验过程

8.2.2.1健康、成年白色家兔4只，单笼饲养，不限进食、饮水。

8.2.2.2试验前将白色家兔背部脊柱两侧被毛剪掉，去毛范围各为3cm×3cm，涂抹/敷贴面积2.5 cm×2.5cm。

8.2.2.3 取受试物涂抹/敷贴在一侧皮肤上，当受试物使用无刺激性溶剂配制时，另一侧涂溶剂作为对照，每天涂抹/敷贴1次，连续涂抹/敷贴14天。从第二天开始，每天涂抹/敷贴前应剪毛，用水或无刺激性溶剂清除残留受试物。1小时后观察结果，按表2评分，对照区和试验区同样处理。

8.2.2.4结果评价：按下列公式计算每天每只动物平均积分，以表3判定皮肤刺激强度。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 每天每只动物平均积分= | ∑红斑和水肿积分 |  | 14 |
| 受试动物数 |

表2 皮肤刺激反应评分

|  |  |
| --- | --- |
| 皮肤反应 | 积分 |
| 红斑和焦痂形成 |  |
| 无红斑 | 0 |
| 轻微红斑(勉强可见) | 1 |
| 明显红斑 | 2 |
| 中度-重度红斑 | 3 |
| 严重红斑(紫红色)至轻微焦痂形成 | 4 |
|  |  |
| 水肿形成 |  |
| 无水肿 | 0 |
| 轻微水肿(勉强可见) | 1 |
| 轻度水肿(皮肤隆起轮廓清楚) | 2 |
| 中度水肿(皮肤隆起约1mm) | 3 |
| 重度水肿(皮肤隆起超过1mm，范围扩大) | 4 |
| 最高积分 | 8 |

表3皮肤刺激强度分级

|  |  |
| --- | --- |
| 积分均值 | 强度 |
| 0— < 0.5 | 无刺激性 |
| 0.5— < 2.0 | 轻刺激性 |
| 2.0— < 6.0 | 中刺激性 |
| 6.0— 8.0 | 强刺激性 |

**8.3 急性眼刺激试验**

8.3.1受试物处理

8.3.1.1受试物原则上按使用说明书的要求进行处理，若无特殊要求，根据性状采用不同的处理方式。

8.3.1.2液体和膏体受试物：一般不需要稀释。

8.3.1.3固体受试物：不溶解的粉剂类受试物提取方法应与产品推荐使用说明相同。如产品无特殊推荐方法，可用水提取物进行试验。水提取物可采用以下提取条件进行：温度80 ℃～90 ℃蒸馏水，浸泡时间至少为30min，提取水量为受试物体积（质量）的2倍。

8.3.2试验过程

8.3.2.1健康、成年、眼睛无损伤的3只白色家兔。在试验开始前24h内对实验动物两只眼睛进行检查（包括使用荧光素钠检查）。有眼睛刺激症状、角膜缺陷和结膜损伤的动物不应用于试验。

8.3.2.2轻轻拉开家兔一侧眼睛的下眼睑，将受试物0.1mL（100mg）滴入（或涂入）结膜囊中，使上、下眼睑被动闭合1s，另一侧眼睛以生理盐水作为正常对照。滴入受试物后24h内不冲洗眼睛。

8.3.2.3 临床检查和评分

在滴入受试物后1h（小时）、24h、48h、72h、7d（天）、14d和21d，对动物眼睛进行检查。如果72h未出现刺激反应，或第7d或第14d眼睛刺激反应完全恢复，即可终止试验。如果发现累及角膜或有其他眼刺激作用，7d内不恢复者，为确定该损害的可逆性或不可逆性需延长观察时间，一般不超过21d，并提供7d、14d和21d的观察报告。除了对角膜、虹膜、结膜进行观察外，其他损害效应均应当记录并报告。

按表4对家兔眼角膜、虹膜和结膜的急性眼刺激反应进行评分，并分别计算每只动物在三个不同观察时间（24h、48h和72h）的角膜损害、虹膜损害、结膜充血和结膜水肿四方面的“平均评分”（即每只动物的24h、48h和72h评分之和除以观察数3）。

表4 急性眼刺激反应的评分标准

|  |  |
| --- | --- |
| 眼损害 | 积分 |
| 角膜：混浊（以最致密部位为准） |  |
| 无溃疡形成或混浊 | 0 |
| 散在或弥漫性混浊，虹膜清晰可见 | 1 |
| 半透明区易分辨，虹膜模糊不清 | 2 |
| 出现灰白色半透明区，虹膜细节不清，瞳孔大小勉强可见 | 3 |
| 角膜不透明，混浊，虹膜无法辨认 | 4 |
| 虹膜：正常 | 0 |
| 皱褶明显加深，充血、肿胀、角膜周围有中度充血，瞳孔对光仍有反应 | 1 |
| 出血、肉眼可见破坏，或瞳孔对光无反应 | 2 |
| 结膜（指睑结膜、球结膜部位）：  充血 |  |
| 血管正常 | 0 |
| 血管充血呈鲜红色 | 1 |
| 血管充血呈深红色，血管不易分辨 | 2 |
| 弥漫性充血呈紫红色 | 3 |
| 水肿 |  |
| 无水肿 | 0 |
| 轻微水肿（包括瞬膜） | 1 |
| 明显水肿，伴有部分眼睑外翻 | 2 |
| 水肿至眼睑近半闭合 | 3 |
| 水肿至眼睑大半闭合 | 4 |

8.3.3 结果评价

分别以动物眼角膜、虹膜和结膜充血、水肿的平均评分和恢复时间进行，按表5眼刺激反应分级标准判定受试物对动物眼睛的刺激强度。

表5 眼刺激性反应分级标准

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 眼刺激反应 | 强度 | 分 级 |
| 可逆  眼损伤 | 微刺激性 | 动物的角膜、虹膜积分=0；结膜充血和/或结膜水肿积分≤2，且积分在＜7天内降至0 |
| 轻刺激性 | 动物的角膜、虹膜、结膜积分在≤7天降至0 |
| 无刺激性 | 动物的角膜、虹膜、结膜积分在8—21天内降至0 |
| 不可逆  眼损伤 | 腐蚀性 | 动物的角膜、虹膜和/或结膜积分在第21天时＞0  2/3动物的眼刺激反应积分：角膜混浊≥3和/或虹膜=2 |

注：当角膜、虹膜、结膜积分为0时，可判为无刺激性。

**8.4 皮肤变态反应试验**

8.4.1 受试物处理

同8.2.1。

8.4.2 试验过程

8.4.2.1健康、成年（体重200g-300g)白色豚鼠，如为雌性动物应选用未孕或未曾产仔的。试验组16-20只，对照组至少10只。

8.4.2.2 试验前24h，将豚鼠背部左側去毛，去毛范围为3cm×3cm

8.4.2.3 诱导接触：将受试物约0.2mL（g）涂在实验动物去毛区皮肤上，以二层纱布和一层玻璃纸覆盖，再以无刺激胶布封闭固定6h。第7天和第14d以同样方法重复一次。

8.4.2.4 激发接触：末次诱导后14d，将约0.2mL（g）的受试物涂于豚鼠背部右侧3cm×3cm去毛区（接触前24h脱毛），然后用二层纱布和一层玻璃纸覆盖，再以无刺激胶布固定，6h后除去涂有受试物的滤纸。24h和48h后观察皮肤反应。诱导处理浓度如果引起皮肤轻度刺激反应时，激发浓度应低于诱导浓度，不得引起原发性刺激反应。如果原液不引起皮肤刺激反应，诱导和激发均使用原液。按表6评分。

8.4.2.5对照组设置要求：

a.每次试验应设置阴性对照组；

b.在实验室开展变态反应试验初期，或使用新的动物种属或品系时，需同时设阳性对照组；

c.常规试验每年做一次阳性对照物检查；

d.若检测报告中使用非本次阳性对照组的实验数据时，需注明其试验日期。

8.4.2.6阴性对照组：诱导接触时凃溶剂，激发接触时凃受试物，对照组和受试物组为同一批动物。

8.4.2.7 阳性对照组：以阳性致敏物替代受试物诱导接触和激发接触。阳性物使用已知能引起轻度/中度致敏物，一般采用2，4－二硝基氯代苯，肉桂醛，2－巯基苯并噻唑或对氨基苯酸乙酯等。至少有30％动物出现皮肤过敏反应判定为阳性对照模型成功。

8.4.3 结果评价

受试物引起的过敏性接触性皮炎，属迟发型变态反应。表现为皮肤红斑和水肿。

根据表6标准，受试动物出现皮肤反应积分（≥2）时，判定为该动物皮肤变态反应阳性。将阳性动物数除以该组实验动物数，求得致敏率（％） ，按表7评定致敏强度。

表6 变态反应试验皮肤反应评分

|  |  |
| --- | --- |
| 皮肤反应 | 评 分 |
| 红斑形成：  无红斑  轻微红斑（轻微可见）  明显红斑（散在或小块红斑）  中度-重度红斑  严重红斑（紫红色）至轻微焦痂形成 | 0  1  2  3  4 |
| 水肿形成  无水肿  轻微水肿（皮肤隆起勉强可见）  中度水肿（皮肤隆起轮廓清楚）  重度水肿（皮肤隆起约≥1mm） | 0  1  2  3 |
| 最高积分 | 7 |

表7 致敏强度

|  |  |
| --- | --- |
| 致敏率% | 致敏强度 |
| 0-8  9-28  29-64  65-80  81-100 | 弱  轻  中  强  极强 |

注：当致敏率为0％时，可判为未见皮肤变态反应。

**8.5体内哺乳动物细胞微核试验**

8.5.1受试物的处理

同8.1.1.

8.5.2 试验过程

8.5.2.1 实验动物选择：应使用小鼠或大鼠。小鼠体重为 25g-30g，也可选用成年大鼠，体重为200g-300g。动物在实验室中至少应适应 3-5 天，试验开始时每一性别动物的体重差异应控制在±20%内。

8.5.2.2 剂量分组：受试物一般设三个剂量组，每个剂量组 10 只动物，雌、雄性各半。高剂量组原则上为动物出现严重中毒表现和/或个别动物出现死亡的剂量，低剂量组应不表现出毒性，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。当受试物的 LD50 大于 5g/kgBW时，可取 5g/kgBW为最高剂量；当使用最大浓度和最大灌胃体积而动物无死亡时，高剂量组则以以下顺序（1）10g/kg，（2）人的可能摄入剂量的100倍，（3）一次最大灌胃量，再下设中、低剂量组。另外，还应设溶剂对照和阳性物对照组。常用环磷酰胺作为阳性物对照，剂量可为 40mg/kg 体重。

8.5.2.3染毒途径和方式：采用经口灌胃方式。采用 30h 两次给药法，即两次给受试物间隔 24h，第二次给受试物后 6h 取材。

8.5.3标本制作

处死动物后取胸骨或股骨，用止血钳挤出骨髓液与玻片一端的小牛血清混匀，常规涂片，自然干燥后放入甲醇固定5min -10min，当日固定后保存。将固定好的涂片放入Giemsa 应用液中，染色 10min -15min，然后立即用 1/15mol/L磷酸盐缓冲液冲洗、晾干，写好标签，阴凉干燥处保存。

8.5.4阅片与计数

8.5.4.1、选择细胞完整、分布均匀，着色适当的区域，在油浸镜下观察。以有核细胞形态完好做好判断制片优劣的标准。

8.5.4.2本法观察含微核的嗜多染红细胞（PCE）。嗜多染红细胞呈灰蓝色，成熟红细胞（NCE）呈淡桔红色。微核大多数呈单个圆形，边缘光滑整齐，嗜色性与核质相一致，呈紫红色或蓝紫色，直径通常为红细胞的1/20-1/5。

8.5.4.3依据《消毒技术规范》每只动物计数 1000 个PCE。微核细胞率指含有微核的率指含有微核的PCE，以千分率（‰）表示之。若一个PCE中出现两个或两个以上微核，仍按一个有微核细胞计数。此外，应观察PCE/NCE比例，作为细胞毒性的指标。应计数200个PCE，同时计数所见的NCE。当PCE/NCE小于0.1时，提示对骨髓具有明显抑制作用，应降低受试物剂量，重新进行试验。

8.5.5结果评价

依据《消毒技术规范》，阴性对照组小鼠，微核细胞率不超过0.3%。各组微核细胞率的均数和标准差，用适当的统计学方法如 Poinsson 分布 u 检验比较受试物各剂量组与阴性对照组的微核率。当各剂量组与应性对照组比较，微核细胞率的增加有显著性意义，并有剂量-反应关系，或仅一个剂量组微核细胞率增加有显著性意义，并经重复试验证实时，均判定为受试物具有体内染色体损伤作用。

**8.6阴道黏膜刺激性试验**

8.6.1受试物处理

同8.3.1

8.6.2 试验过程

8.6.2.1 健康、初成年的雌性白色家兔，单笼饲养，体重2.0～2.5kg。试验前检查动物阴道口有无分泌物、充血、水肿和其它损伤情况。如有炎症或（和）损伤，应弃用。应选择非动情期动物进行试验。

8.6.2.2试验分组：分试验组和对照组，每组3只动物。

8.6.2.3阴道黏膜刺激性试验步骤

a.将长度为8cm左右的钝头导管与2ml注射器连接，注射器和导管注满受试物备用，每只动物各准备一套。

b.将家兔仰面固定，暴露出会阴和阴道口，将导管用受试液湿润后轻柔地插入阴道（4cm-5cm），并用注射器缓慢注入2ml受试液，抽出导管，完成。对照组动物用生理盐水进行同样处理。

c.染毒24h后，采用空气栓塞法处死动物，破腹取出完整的阴道，纵向切开，肉眼观察是否有充血、水肿等表现，供病理取材时参考。然后将阴道组织放入10%福尔马林固定24h以上，选取阴道组织两端和中段3个部位进行制片，HE染色后，进行组织病理检查。

8.6.2.4.结果评价

a. 组织病理学检查结果，按表8规定对阴道黏膜的刺激反应进行评分。

b. 将各组3只动物3个部位的刺激反应积分相加后，再除以观察总数（动物数x3），得出各组阴道黏膜刺激反应的平均积分，最大记分为16。

c. 将试验组平均积分减去对照组平均积分得出刺激指数，按表9进行刺激强度分级。

d. 当对照组动物阴道黏膜刺激反应平均积分大于9时，应采用6只动物进行复试。

表8 阴道黏膜刺激反应评分标准

|  |  |
| --- | --- |
| 阴道组织反应 | 反应积分 |
| A.上皮组织 |  |
| 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 |
| B.白细胞浸润（每个高倍视野） |  |
| 无 | 0 |
| 极少 <25个 | 1 |
| 轻度 26-50个 | 2 |
| 中度 51-100个 | 3 |
| 重度 >100个 | 4 |
| C.血管充血 |  |
| 无 | 0 |
| 极少 | 1 |
| 轻度 | 2 |
| 中度 | 3 |
| 重度伴血管破裂 | 4 |
| D.水肿 |  |
| 无 | 0 |
| 极少 | 1 |
| 轻度 | 2 |
| 中度 | 3 |
| 重度 | 4 |

刺激反应积分=A+B+C+D

表9 阴道黏膜刺激强度分级

|  |  |
| --- | --- |
| 阴道黏膜刺激指数 | 阴道黏膜刺激反应强度 |
| <1 | 无 |
| 1-<5 | 极轻 |
| 5-<9 | 轻度 |
| 9-<12 | 中度 |
| ≥12 | 重度 |

9.注意事项

9.1出具的毒理学检验报告需详细描述样品前处理、试验过程、试验毒性反应结果等。

9.2膏贴类的保健用品送检时应送两种型式，定型包装产品和去除了不直接参与功效作用的辅料（如胶类）部分的非定型包装产品，前者主要用于哺乳动物体外试验，后者主要用于哺乳动物经口毒性试验。

附 录 A

（规范性附录）

霍恩氏（Horn）法LD50值计算（剂量递增法测定LD50计算用表）

A.1 表A.1用于每组5只动物，其剂量递增公比为，意即10×=21.5，21.5×=46.4…，余此类推。此剂量系列排列如下：

1.00

2.15 ×10t t=0，±1，±2，±3…

4.64

霍恩氏（Horn）法LD50值计算（剂量递增公比为）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组1 | 组2 | 组3 | 组4 | 剂量1=0.464 | ×10t | 剂量1=1.00 | ×10t | 剂量1=2.15 | ×10t |
|  | 或 |  |  | 剂量2=1.00 | 剂量2=2.15 | 剂量2=4.64 |
| 组1 | 组3 | 组2 | 组4 | 剂量3=2.15 | 剂量3=4.64 | 剂量3=10.0 |
|  |  |  |  | 剂量4=4.64 | 剂量4=10.0 | 剂量4=21.5 |
|  |  |  |  | LD50 | 可信限 | LD50 | 可信限 | LD50 | 可信限 |
| 0 | 0 | 3 | 5 | 2.00 | 1.37～2.91 | 4.30 | 2.95～6.26 | 9.26 | 6.36～13.5 |
| 0 | 0 | 4 | 5 | 1.71 | 1.26～2.33 | 3.69 | 2.71～5.01 | 7.94 | 5.84～10.8 |
| 0 | 0 | 5 | 5 | 1.47 | ～ | 3.16 | ～ | 6.81 | ～ |
| 0 | 1 | 2 | 5 | 2.00 | 1.23～3.24 | 4.30 | 2.65～6.98 | 9.26 | 5.70～15.0 |
| 0 | 1 | 3 | 5 | 1.71 | 1.05～2.78 | 3.69 | 2.27～5.99 | 7.94 | 4.89～12.9 |
| 0 | 1 | 4 | 5 | 1.47 | 0.951～2.27 | 3.16 | 2.05～4.88 | 6.81 | 4.41～10.5 |
| 0 | 1 | 5 | 5 | 1.26 | 0.926～1.71 | 2.71 | 2.00～3.69 | 5.84 | 4.30～7.94 |
| 0 | 2 | 2 | 5 | 1.71 | 1.01～2.91 | 3.69 | 2.17～6.28 | 7.94 | 4.67～13.5 |
| 0 | 2 | 3 | 5 | 1.47 | 0.862～2.50 | 3.16 | 1.86～5.38 | 6.81 | 4.00～13.5 |
| 0 | 2 | 4 | 5 | 1.26 | 0.775～2.05 | 2.71 | 1.69～4.41 | 5.84 | 3.60～9.50 |
| 0 | 2 | 5 | 5 | 1.08 | 0.741～1.57 | 2.33 | 1.60～3.99 | 5.01 | 3.44～7.30 |
| 0 | 3 | 3 | 5 | 1.26 | 0.740～2.14 | 2.71 | 1.59～4.62 | 5.84 | 3.43～9.95 |
| 0 | 3 | 4 | 5 | 1.03 | 0.665～1.75 | 2.33 | 1.43～3.78 | 5.01 | 3.08～8.14 |
| 1 | 0 | 3 | 5 | 1.96 | 1.22～3.14 | 4.22 | 2.63～6.76 | 9.09 | 5.66～14.6 |
| 1 | 0 | 4 | 5 | 1.62 | 1.07～2.43 | 3.48 | 2.31～5.24 | 7.50 | 4.98～11.3 |
| 1 | 0 | 5 | 5 | 1.33 | 1.05～1.70 | 2.87 | 2.26～3.65 | 6.19 | 4.87～7.87 |
| 1 | 1 | 2 | 5 | 1.96 | 1.06～3.60 | 4.22 | 2.29～7.75 | 9.09 | 4.94～16.7 |
| 1 | 1 | 3 | 5 | 1.62 | 0.866～3.01 | 3.48 | 1.87～6.49 | 7.50 | 4.02～16.7 |
| 1 | 1 | 4 | 5 | 1.33 | 0.737～2.41 | 2.87 | 1.59～5.20 | 6.19 | 3.42～11.2 |
| 1 | 1 | 5 | 5 | 1.10 | 0.661～1.83 | 2.37 | 1.42～3.95 | 5.11 | 3.07～8.51 |
| 1 | 2 | 2 | 5 | 1.62 | 0.818～3.19 | 3.48 | 1.76～6.37 | 7.50 | 3.80～14.8 |
| 1 | 2 | 3 | 5 | 1.33 | 0.658～2.70 | 2.87 | 1.42～5.82 | 6.19 | 3.05～12.5 |
| 1 | 2 | 4 | 5 | 1.10 | 0.550～2.20 | 2.37 | 1.19～4.74 | 5.11 | 2.55～10.2 |
| 1 | 3 | 3 | 5 | 1.10 | 0.523～2.32 | 2.37 | 1.13～4.99 | 5.11 | 2.43～10.8 |
| 2 | 0 | 3 | 5 | 1.90 | 1.00～3.58 | 4.08 | 2.16～7.71 | 8.80 | 4.66～16.6 |

表 (续)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组1 | 组2 | 组3 | 组4 | 剂量1=0.464 | ×10t | 剂量1=1.00 | ×10t | 剂量1=2.15 | ×10t |
|  | 或 |  |  | 剂量2=1.00 | 剂量2=2.15 | 剂量2=4.64 |
| 组1 | 组3 | 组2 | 组4 | 剂量3=2.15 | 剂量3=4.64 | 剂量3=10.0 |
|  |  |  |  | 剂量4=4.64 | 剂量4=10.0 | 剂量4=21.5 |
|  |  |  |  | LD50 | 可信限 | LD50 | 可信限 | LD50 | 可信限 |
| 2 | 0 | 4 | 5 | 1.47 | 0.806～2.67 | 3.16 | 1.74～5.76 | 6.81 | 3.74～12.4 |
| 2 | 0 | 5 | 5 | 1.14 | 0.674～1.92 | 2.45 | 1.45～4.13 | 5.28 | 3.13～8.89 |
| 2 | 1 | 2 | 5 | 1.90 | 0.839～4.29 | 4.08 | 1.81～9.23 | 8.80 | 3.89～19.9 |
| 2 | 1 | 3 | 5 | 1.47 | 0.616～3.50 | 3.16 | 1.33～7.53 | 6.81 | 2.86～16.2 |
| 2 | 1 | 4 | 5 | 1.14 | 0.466～2.77 | 2.45 | 1.00～5.98 | 5.28 | 2.16～12.9 |
| 2 | 2 | 2 | 5 | 1.47 | 0.573～3.76 | 3.16 | 1.24～8.10 | 6.81 | 2.66～17.4 |
| 2 | 2 | 3 | 5 | 1.14 | 0.406～3.18 | 2.45 | 0.875～6.85 | 6.28 | 1.89～14.8 |
| 0 | 0 | 4 | 4 | 1.96 | 1.18～3.26 | 4.22 | 2.53～7.02 | 9.09 | 5.46～15.1 |
| 0 | 0 | 5 | 4 | 1.62 | 1.27～2.05 | 3.48 | 2.74～4.42 | 7.50 | 5.90～9.53 |
| 0 | 1 | 3 | 4 | 1.96 | 0.978～3.92 | 4.22 | 2.11～8.44 | 9.09 | 4.54～18.2 |
| 0 | 1 | 4 | 4 | 1.62 | 0.893～2.92 | 3.48 | 1.92～6.30 | 7.50 | 4.14～13.6 |
| 0 | 1 | 5 | 4 | 1.33 | 0.885～2.01 | 2.87 | 1.91～4.33 | 6.19 | 4.11～9.33 |
| 0 | 2 | 2 | 4 | 1.96 | 0.930～4.12 | 4.22 | 2.00～8.88 | 9.09 | 4.31～19.1 |
| 0 | 2 | 3 | 4 | 1.62 | 0.797～3.28 | 3.48 | 1.72～7.06 | 7.50 | 3.70～15.2 |
| 0 | 2 | 4 | 4 | 1.33 | 0.715～2.49 | 2.87 | 1.54～5.36 | 6.19 | 3.32～11.5 |
| 0 | 2 | 5 | 4 | 1.10 | 0.686～1.77 | 2.37 | 1.48～3.80 | 5.11 | 3.19～8.19 |
| 0 | 3 | 3 | 4 | 1.33 | 0.676～2.63 | 2.87 | 1.46～5.67 | 6.19 | 3.14～12.2 |
| 0 | 3 | 4 | 4 | 1.10 | 0.599～2.02 | 2.37 | 1.29～4.36 | 5.11 | 2.78～9.39 |
| 1 | 0 | 4 | 4 | 1.90 | 0.969～3.71 | 4.08 | 2.09～7.99 | 8.80 | 4.50～17.2 |
| 1 | 0 | 5 | 4 | 1.47 | 1.02～2.11 | 3.16 | 2.20～4.54 | 6.81 | 4.74～9.78 |
| 1 | 1 | 3 | 4 | 1.90 | 0.757～4.75 | 4.08 | 1.63～10.2 | 8.80 | 3.51～22.0 |
| 1 | 1 | 4 | 4 | 1.47 | 0.654～3.30 | 3.16 | 1.41～7.10 | 6.81 | 3.03～15.3 |
| 1 | 1 | 5 | 4 | 1.14 | 0.581～2.22 | 2.45 | 1.25～4.79 | 5.28 | 2.70～10.3 |
| 1 | 2 | 2 | 4 | 1.90 | 0.706～5.09 | 4.08 | 1.52～11.0 | 8.80 | 3.28～23.6 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 1.47 | 0.564～3.82 | 3.16 | 1.21～8.24 | 6.81 | 2.62～17.7 |
| 1 | 2 | 4 | 4 | 1.14 | 0.454～2.85 | 2.45 | 0.977～6.13 | 5.28 | 2.11～13.2 |
| 1 | 3 | 3 | 4 | 1.14 | 0.423～3.05 | 2.45 | 0.912～6.57 | 5.28 | 1.97～14.2 |
| 2 | 0 | 4 | 4 | 1.78 | 0.662～4.78 | 3.83 | 1.43～10.3 | 8.25 | 3.07～22.2 |
| 2 | 0 | 5 | 4 | 1.21 | 0.583～2.52 | 2.61 | 1.26～5.42 | 5.62 | 2.71～11.7 |
| 2 | 1 | 3 | 4 | 1.78 | 0.455～6.95 | 3.83 | 0.980～15.0 | 8.25 | 2.11～32.3 |
| 2 | 1 | 4 | 4 | 1.21 | 0.327～4.48 | 2.61 | 0.705～9.66 | 5.62 | 1.52～20.8 |
| 2 | 2 | 2 | 4 | 1.78 | 0.410～7.72 | 3.83 | 0.883～16.6 | 8.25 | 1.90～35.8 |
| 2 | 2 | 3 | 4 | 1.21 | 0.266～5.52 | 2.61 | 0.573～11.9 | 5.62 | 1.23～25.6 |
| 0 | 0 | 5 | 3 | 1.90 | 1.12～3.20 | 4.08 | 2.42～6.89 | 8.80 | 5.22～14.8 |
| 0 | 1 | 4 | 3 | 1.90 | 0.777～4.63 | 4.08 | 1.67～9.97 | 8.80 | 3.60～21.5 |

表 (续)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组1 | 组2 | 组3 | 组4 | 剂量1=0.464 | ×10t | 剂量1=1.00 | ×10t | 剂量1=2.15 | ×10t |
|  | 或 |  |  | 剂量2=1.00 | 剂量2=2.15 | 剂量2=4.64 |
| 组1 | 组3 | 组2 | 组4 | 剂量3=2.15 | 剂量3=4.64 | 剂量3=10.0 |
|  |  |  |  | 剂量4=4.64 | 剂量4=10.0 | 剂量4=21.5 |
|  |  |  |  | LD50 | 可信限 | LD50 | 可信限 | LD50 | 可信限 |
| 0 | 1 | 5 | 3 | 1.47 | 0.806～2.67 | 3.16 | 1.74～5.76 | 6.81 | 3.74～12.4 |
| 0 | 2 | 3 | 3 | 1.90 | 0.678～5.30 | 4.08 | 1.46～11.4 | 8.80 | 3.15～24.6 |
| 0 | 2 | 4 | 3 | 1.47 | 0.616～3.50 | 3.16 | 1.33～7.53 | 6.81 | 2.86～16.2 |
| 0 | 2 | 5 | 3 | 1.14 | 0.602～2.15 | 2.45 | 1.30～4.62 | 5.28 | 2.79～9.96 |
| 0 | 3 | 3 | 3 | 1.47 | 0.573～3.76 | 3.16 | 1.24～8.10 | 6.81 | 2.66～17.4 |
| 0 | 3 | 4 | 3 | 1.14 | 0.503～2.57 | 2.45 | 1.08～5.54 | 5.28 | 2.33～11.9 |
| 1 | 0 | 5 | 3 | 1.78 | 0.856～3.69 | 3.83 | 1.85～7.96 | 8.25 | 3.98～17.1 |
| 1 | 1 | 4 | 3 | 1.78 | 0.481～6.58 | 3.83 | 1.04～14.2 | 8.25 | 2.23～30.5 |
| 1 | 1 | 5 | 3 | 1.21 | 0.451～3.25 | 2.61 | 0.972～7.01 | 5.62 | 2.09～15.1 |
| 1 | 2 | 3 | 3 | 1.78 | 0.390～8.11 | 3.83 | 0.840～17.5 | 8.25 | 1.81～37.6 |
| 1 | 2 | 4 | 3 | 1.21 | 0.310～4.74 | 2.61 | 0.668～10.2 | 5.62 | 1.44～22.0 |
| 1 | 3 | 3 | 3 | 1.21 | 0.279～5.26 | 2.61 | 0.602～11.3 | 5.62 | 1.30～24.4 |

附录B

（规范性附录）

实验动物中毒表现观察项目

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 器官系统 | 观察及检查项目 | 中毒后一般表现 |
| 中枢神经系统及神经肌肉系统 | 动作行为 | 体位异常，叫声异常，不安或呆滞，反复抓挠口周，反复梳理，转圈，痉挛，麻痹，震颤，运动失调，甚至倒退行走或自残 |
| 各种刺激的反应 | 易兴奋，知觉过敏或缺乏知觉 |
| 大脑及脊髓反射 | 减弱或消失 |
| 肌肉张力 | 强直，弛缓 |
| 植物神经系统 | 瞳孔大小 | 扩大或缩小 |
| 分泌 | 流涎，流泪 |
| 呼吸系统 | 鼻孔 | 流液，鼻翼煸动 |
| 呼吸性质和速率 | 深缓，过速 |
| 心血管系统 | 心区触诊 | 心动过缓，心律不齐，心跳过强或过弱 |
| 消化系统 | 腹形 | 气胀或收缩，腹泻或便秘 |
| 粪便硬度和颜色 | 粪便不成形，黑色或灰色 |
| 泌尿生殖系统 | 阴道，乳腺 | 膨胀 |
| 阴茎 | 脱垂 |
| 会阴部 | 污秽，有分泌物 |
| 皮肤和被毛 | 颜色，张力 | 发红，皱褶，松弛，皮疹血 |
| 完整性 | 竖毛 |
| 黏膜 | 黏膜 | 流粘液，充血，出血性紫绀，苍白 |
| 口腔 | 溃疡 |
| 眼 | 眼睑 | 上睑下垂 |
| 眼球 | 眼球突出或震颤，结膜充血，角膜混浊 |
| 透明度 | 混浊 |
| 其他 | 直肠或皮肤温度 | 降低或升高 |
| 一般情况 | 消瘦 |