



中华人民共和国国家标准

GB/T 38496—2020

消毒剂安全性毒理学评价程序和方法

Toxicological procedures and methods of safety evaluation for disinfectant

2020-03-06 发布

2020-10-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言 III

1 范围 1

2 术语和定义 1

3 消毒剂安全性毒理学评价程序 1

4 消毒剂毒理试验项目确定原则 2

5 毒理试验用受试物的要求 3

6 消毒剂安全性评价的毒理试验方法 3

 6.1 急性经口毒性试验 3

 6.2 急性吸入毒性试验 11

 6.3 皮肤刺激试验 13

 6.4 急性眼刺激试验 15

 6.5 阴道黏膜刺激试验 17

 6.6 皮肤变态反应试验 19

 6.7 亚急性经口毒性试验 20

 6.8 致突变试验 21

 6.9 亚慢性毒性试验 32

 6.10 致畸胎试验 33

 6.11 慢性毒性试验 34

 6.12 致癌试验 35

7 对消毒剂的安全性评价 37



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国国家卫生健康委员会提出并归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、湖北省疾病预防控制中心、上海市疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：金银龙、班海群、李毅民、张流波、黄晓波、肖萍、王有森。



消毒剂安全性毒理学评价程序和方法

1 范围

本标准规定了消毒剂安全性毒理学评价的程序、确定毒理试验项目的原则、对毒理试验用受试物（受检消毒剂样品）的要求、毒理试验方法和对毒理试验结果的安全性评价。

本标准适用于在我国生产或国外生产在我国销售和使用的消毒剂以及器械或装置产生的消毒剂的毒理学安全性评价。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

新消毒剂 new disinfectants

利用新材料、新工艺技术和新杀菌原理生产的消毒剂。

3 消毒剂安全性毒理学评价程序

3.1 评价程序要求

消毒剂安全性毒理学评价程序采用分阶段系统法，逐阶段进行毒理试验，毒理试验依次分为四个阶段，如果前一阶段毒理试验结果不符合安全性要求，应增做其后阶段相应的毒理试验。

3.2 消毒剂安全性评价毒理试验

3.2.1 第一阶段试验，包括：

- a) 急性经口毒性试验。
- b) 急性吸入毒性试验。
- c) 皮肤刺激试验：
 - 1) 一次完整皮肤刺激试验；
 - 2) 一次破损皮肤刺激试验；
 - 3) 多次完整皮肤刺激试验。
- d) 急性眼刺激试验。
- e) 阴道黏膜刺激试验。
- f) 皮肤变态反应试验。



3.2.2 第二阶段试验，包括：

- a) 亚急性毒性试验。
- b) 致突变试验：
 - 1) 体外哺乳动物 L5178Y 细胞基因突变试验（体细胞基因水平，体外试验）；
 - 2) 体外哺乳动物 V79 细胞基因突变试验（体细胞基因水平，体外试验）；
 - 3) 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验（体细胞染色体水平，体外试验）；
 - 4) 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验（体细胞染色体水平，体内试验）；

- 5) 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验(体细胞染色体水平,体内试验);
- 6) 程序外 DNA 修复合成试验(DNA 水平,体外试验);
- 7) 小鼠精原细胞染色体畸变试验(性细胞染色体水平,体内试验)。

3.2.3 第三阶段试验,包括:

- a) 亚慢性毒性试验;
- b) 致畸胎试验。

3.2.4 第四阶段试验,包括:

- a) 慢性毒性试验;
- b) 致癌试验。

4 消毒剂毒理试验项目确定原则



4.1 原则要求

确定毒理试验项目,取决于消毒剂的特点、使用范围 and 安全性评价前一阶段毒理试验的结果。

4.2 消毒剂必做的毒理试验项目

消毒剂均应进行以下试验项目:

- a) 急性经口毒性试验;
- b) 1 项致突变试验。

4.3 消毒剂增做的毒理试验项目

根据消毒剂使用范围,除 4.2 必做的 2 项毒理试验外,分别增做以下试验:

- a) 使用于室内空气的消毒剂,增做急性吸入毒性试验和急性眼刺激试验。
- b) 使用于手和(或)皮肤的消毒剂:
 - 1) 偶尔使用或间隔数日使用的消毒剂,增做一次完整皮肤刺激试验;
 - 2) 手消毒剂增做多次完整皮肤刺激试验;
 - 3) 接触破损皮肤(包括用于注射部位、手术切口部位消毒)的消毒剂,增做一次破损皮肤刺激试验;
 - 4) 接触创面(包括用于外科换药、烧伤皮肤消毒)的消毒剂,增做一次破损皮肤刺激试验和急性眼刺激试验。
- c) 使用于黏膜的消毒剂,增做急性眼刺激试验,使用阴道黏膜消毒的,增做阴道黏膜刺激试验。
- d) 使用于游泳池水的消毒剂,增做急性眼刺激试验。
- e) 在消毒过程中接触手和(或)皮肤的消毒剂,增做一次完整皮肤刺激试验。

4.4 新消毒剂增做的毒理试验项目

4.4.1 在我国首次生产和(或)销售含有新的杀菌主要成分的新消毒剂,应做的毒理试验:

- a) 急性经口毒性试验(包括小鼠和大鼠);
- b) 亚急性经口毒性试验;
- c) 3 项致突变试验(包括反映体细胞基因水平、体细胞染色体水平和性细胞染色体水平三种类型试验);
- d) 亚慢性经口毒性试验;
- e) 致畸胎试验。

4.4.2 根据消毒剂的成分,可能有致敏作用的,增做皮肤变态反应试验。

5 毒理试验用受试物的要求

5.1 受试物应是按照消毒剂生产者既定的生产工艺和配方进行规范化生产的消毒剂,其成分和浓度应与实际生产和销售的相同。

5.2 生产者应提供受试物的物理、化学性质的资料(包括消毒剂的配方、杀菌有效成分的化学结构和含量、pH 等,但植物消毒剂可不提供化学结构)。

5.3 在急性经口毒性试验、急性吸入毒性试验、亚急性毒性试验、致突变试验、亚慢性毒性试验、致畸胎试验、慢性毒性试验和致癌试验时,采用消毒剂原形样品。消毒剂原形是指在销售过程中原包装的粉剂、片剂或原液。对于二元包装的消毒剂,按产品使用说明比例混合配制后作为消毒剂原形样品。

5.4 在皮肤刺激试验、急性眼刺激试验和阴道黏膜刺激试验中所用样品的浓度,应是对皮肤、黏膜消毒时应用浓度的 5 倍。对使用产品原液对皮肤、黏膜进行消毒的消毒剂,则采用消毒剂原液作为试验样本。

5.5 在皮肤变态反应试验时,采用的诱导浓度应为引起皮肤轻度刺激反应的最高浓度或原液,激发浓度应为不引起皮肤刺激反应的最高浓度或原液。

6 消毒剂安全性评价的毒理试验方法

6.1 急性经口毒性试验

6.1.1 目的

6.1.1.1 检测消毒剂对实验动物的急性毒性作用和强度。

6.1.1.2 为亚急(慢)性毒性试验和致突变试验提供剂量选择的依据。

6.1.2 实验动物

小鼠或大鼠任选一种,雌雄各半。小鼠体重 18 g~22 g,大鼠体重 180 g~220 g,根据不同的急性毒性试验设计方法,选用适当的动物数量,通常分为 4 个~6 个剂量组。一般小鼠每组选用 8 只~10 只动物,动物总数不少于 50 只;大鼠每组选用 5 只~6 只动物,动物总数不少于 30 只。

6.1.3 试验分组

6.1.3.1 概率单位-对数图解法:计算 LD_{50} ,随机分为 5 个~6 个剂量组。通常最高剂量组的动物死亡率应大于或等于 90%,最低剂量组动物死亡率应小于或等于 10%。可先以较大的组距,对少量动物进行预试验,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。

6.1.3.2 霍恩(Horn)法:则可先通过预试验找出其粗略致死剂量范围,然后按照 1.0、2.15、4.64 乘以 t^{10} ($t=0, \pm 1, \pm 2, \pm 3$),或者按照 1.0、3.16 乘以 t^{10} ($t=0, \pm 1, \pm 2, \pm 3$)的方法设 4 个~5 个剂量组。

6.1.4 操作程序

6.1.4.1 动物的准备:试验前,禁食过夜,不限制饮水。

6.1.4.2 受试物的配制:用水或食用植物油为溶剂配制成溶液,或采用 0.5% 羧甲基纤维素配制成混悬液。

6.1.4.3 染毒方法:用灌胃方式将受试物一次给予动物。一般小鼠灌胃量不超过 0.2 mL/10 g 体重,大鼠灌胃量不超过 1.0 mL/100 g 体重。若受试物毒性很低,一次灌胃容量太大,可在 24 h 内分成 2 次~3 次给予,其总剂量作为一日剂量计算。

6.1.4.4 染毒后观察动物的中毒表现和死亡数及死亡时间,并对死亡动物和观察期满处死动物进行尸体解剖,肉眼观察,发现有异常的组织或脏器,尚需进一步作组织病理学检查。观察时间 14 d。

6.1.4.5 根据给予受试物后 14 d 内的各剂量组动物死亡率计算 LD_{50} (半数致死剂量)。

6.1.5 LD_{50} 的计算方法

6.1.5.1 概率单位-对数图解法

6.1.5.1.1 根据各剂量组动物死亡率,从表 1 中查各组的概率单位。因死亡率为 0% 和 100% 的概率单位,与所试动物数有关,故应另在表 2 中查找。

示例:某组死亡率为 45% 的概率单位,查表 1。先在表的左侧第一列上找到 40,而后在表的第一行找到 5,两者交叉点处的 4.87,即为 45% 的概率单位。某组用 10 只实验动物,如果全部存活(死亡率为 0%),查表 2,其概率单位为 3.04。

表 1 百分率-概率单位换算表

死亡率的 十位数	死亡率的个位数									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.001	4.005	4.008	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.003	5.005	5.008	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

表 2 相应于反应率为 0% 及 100% 的概率单位

该组动物数	反应率		该组动物数	反应率	
	0%	100%		0%	100%
—	—	—	11	3.00	7.00
2	3.85	6.15	12	2.97	7.03
3	3.62	6.38	13	2.93	7.07
4	3.47	6.53	14	2.90	7.10
5	3.36	6.64	15	2.87	7.13
6	3.27	6.73	16	2.85	7.15
7	3.20	6.80	17	2.82	7.18
8	3.13	6.87	18	2.80	7.20
9	3.09	6.91	19	2.78	7.22
10	3.04	6.96	20	2.76	7.24

- 6.1.5.1.2 用方格纸绘散点图,横轴表示剂量的对数值(x),纵轴为概率单位值(y),将各组数值点在图上。
- 6.1.5.1.3 按各点的分布趋势,用直尺绘出一条最适合于各点的直线,使线上方的点到线的总距离与线下方的点到线的总距离相近,此线应尽量靠近概率单位为 5 的点及附近的点。
- 6.1.5.1.4 查出求概率单位 5 处的剂量对数,其反对数即为 LD_{50} 。
- 6.1.5.1.5 按式(1)、式(2)和式(3)计算 LD_{50} 的 95%可信限:

$$S = \frac{x_2 - x_1}{y_2 - y_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

S —— LD_{50} 的标准差;

y_1 ——概率单位等于 4;

y_2 ——概率单位等于 6;

x_1 ——概率单位等于 4(y_1)时相应的剂量对数值;

x_2 ——概率单位等于 6(y_2)时相应的剂量对数值。

$$S_m = \frac{S}{\sqrt{\frac{N}{2}}} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

S_m —— LD_{50} 的标准误;

N ——概率单位 $y_1 (=4)$ 及 $y_2 (=6)$ 相应的死亡率间所用的动物数。

$$\log(LD_{50}) \text{ 的 } 95\% \text{ 可信限} = \log(LD_{50}) \pm 1.96S_m \dots\dots\dots (3)$$

式中:

LD_{50} ——半数致死剂量;

S_m —— LD_{50} 的标准误。

注: 式(3)结果,经反对数变换后,可得 LD_{50} 的 95%可信限。

6.1.5.2 霍恩法

根据各剂量组动物死亡率,从表 3 或表 4 查出其相应的 LD_{50} 值和 95%可信限。表 3 用于每组 5 只动物,组距剂量递增公比为 $\sqrt[3]{10}$,即 $10 \times \sqrt[3]{10} = 21.5, 21.5 \times \sqrt[3]{10} = 46.4, \dots$,以此类推。此剂量系列排列如下: $1.00 \times 10^t, 2.15 \times 10^t, 4.64 \times 10^t, \dots, t = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$ 。表 4 用于每组 5 只动物,组距剂量递增公比为 $\sqrt{10}$,即 $10 \times \sqrt{10} = 31.6, 31.6 \times \sqrt{10} = 100, \dots$,余此类推。此剂量系列排列如下: $1.00 \times 10^t, 3.16 \times 10^t, 10.0 \times 10^t, \dots, t = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$ 。

表 3 每组 5 只动物、组距 $\sqrt[3]{10}$ 倍 LD_{50} 值和 95%可信限

各剂量组动物死亡数	剂量组									
	剂量 1=0.464×10 ^t				剂量 1=1.00×10 ^t				剂量 1=2.15×10 ^t	
	剂量 2=1.00×10 ^t				剂量 2=2.15×10 ^t				剂量 2=4.64×10 ^t	
	剂量 3=2.15×10 ^t				剂量 3=4.64×10 ^t				剂量 3=10.0×10 ^t	
	剂量 4=4.64×10 ^t				剂量 4=10.0×10 ^t				剂量 4=21.5×10 ^t	
1 组 2(3)组 3(2)组 4 组	LD_{50}		可信限		LD_{50}		可信限		LD_{50}	
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	

表 3 (续)

各剂量组动物死亡数				剂量组					
				剂量 1=0.464×10' 剂量 2=1.00×10' 剂量 3=2.15×10' 剂量 4=4.64×10'		剂量 1=1.00×10' 剂量 2=2.15×10' 剂量 3=4.64×10' 剂量 4=10.0×10'		剂量 1=2.15×10' 剂量 2=4.64×10' 剂量 3=10.0×10' 剂量 4=21.5×10'	
1 组	2(3)组	3(2)组	4 组	LD ₅₀	可信限	LD ₅₀	可信限	LD ₅₀	可信限
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	5.70~15.00
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	5.001	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	5.001	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	4.94~1.67
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	3.007~8.51
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	4.008	2.16~7.71	8.80	4.66~16.6
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

表 3 (续)

各剂量组动物死亡数				剂量组					
				剂量 1=0.464×10' 剂量 2=1.00×10' 剂量 3=2.15×10' 剂量 4=4.64×10'		剂量 1=1.00×10' 剂量 2=2.15×10' 剂量 3=4.64×10' 剂量 4=10.0×10'		剂量 1=2.15×10' 剂量 2=4.64×10' 剂量 3=10.0×10' 剂量 4=21.5×10'	
1 组	2(3)组	3(2)组	4 组	LD ₅₀	可信限	LD ₅₀	可信限	LD ₅₀	可信限
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	0.997~6.13	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	0.980~15.00	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 3 (续)

各剂量组动物死亡数				剂量组					
				剂量 1=0.464×10'		剂量 1=1.00×10'		剂量 1=2.15×10'	
				剂量 2=1.00×10'		剂量 2=2.15×10'		剂量 2=4.64×10'	
				剂量 3=2.15×10'		剂量 3=4.64×10'		剂量 3=10.0×10'	
				剂量 4=4.64×10'		剂量 4=10.0×10'		剂量 4=21.5×10'	
1 组	2(3)组	3(2)组	4 组	LD ₅₀	可信限	LD ₅₀	可信限	LD ₅₀	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

表 4 每组 5 只动物、组距 $\sqrt{10}$ 倍 LD₅₀ 值和 95% 可信限

各剂量组动物死亡数				剂量组			
				剂量 1=0.316×10'		剂量 1=1.00×10'	
				剂量 2=1.00×10'		剂量 2=3.16×10'	
				剂量 3=3.16×10'		剂量 3=10.0×10'	
				剂量 4=10.0×10'		剂量 4=31.6×10'	
1 组	2(3)组	3(2)组	4 组	LD ₅₀	可信限	LD ₅₀	可信限
0	0	3	5	2.82	1.60~4.95	8.91	5.007~15.7
0	0	4	5	2.24	1.41~3.55	7.08	4.47~11.2
0	0	5	5	1.78	—	5.62	—
0	1	2	5	2.82	1.36~5.84	8.91	4.30~18.5
0	1	3	5	2.24	1.08~4.64	7.08	3.42~14.7
0	1	4	5	1.78	0.927~3.41	5.62	2.93~10.8
0	2	2	5	2.24	1.01~4.97	7.08	3.19~15.7
0	2	3	5	1.78	0.801~3.95	5.62	2.53~12.5
0	2	4	5	1.41	0.682~2.93	4.47	2.16~9.25

表 4（续）

各剂量组动物死亡数				剂量组			
				剂量 1=0.316×10' 剂量 2=1.00×10' 剂量 3=3.16×10' 剂量 4=10.0×10'		剂量 1=1.00×10' 剂量 2=3.16×10' 剂量 3=10.0×10' 剂量 4=31.6×10'	
1 组	2(3)组	3(2)组	4 组	LD ₅₀	可信限	LD ₅₀	可信限
0	2	5	5	1.12	0.638~1.97	3.55	2.02~6.24
0	3	3	5	1.41	0.636~3.14	4.47	2.01~9.92
0	3	4	5	1.12	0.542~2.32	3.55	1.71~7.35
1	0	3	5	2.74	1.35~5.56	8.66	4.26~17.6
1	0	4	5	2.05	1.11~3.80	6.49	3.51~12.0
1	0	5	5	1.54	1.07~2.21	4.87	3.40~6.98
1	1	2	5	2.74	1.10~6.82	8.66	3.48~21.6
1	1	3	5	2.05	0.806~5.23	6.49	2.55~16.5
1	1	4	5	1.54	0.632~3.75	4.87	2.00~11.9
1	1	5	5	1.15	0.537~2.48	3.65	1.70~7.85
1	2	2	5	2.05	0.740~5.70	6.49	2.34~18.0
1	2	3	5	1.54	0.534~4.44	4.87	1.69~14.1
1	2	4	5	1.15	0.408~3.27	3.65	1.29~10.3
1	3	3	5	1.15	0.378~3.53	3.65	1.20~11.2
2	0	3	5	2.61	1.01~6.77	8.25	3.18~21.4
2	0	4	5	1.78	0.723~4.37	5.62	2.29~13.8
2	0	5	5	1.21	0.554~2.65	3.83	1.75~8.39
2	1	2	5	2.61	0.768~8.87	8.25	2.43~28.1
2	1	3	5	1.78	0.484~6.53	5.62	1.53~20.7
2	1	4	5	1.21	0.318~4.62	3.83	1.00~14.6
2	2	2	5	1.78	0.434~7.28	5.62	1.37~23.00
2	2	3	5	1.21	0.259~5.67	3.83	0.819~17.9
0	0	4	4	2.74	1.27~5.88	8.66	4.003~18.6
0	0	5	4	2.05	1.43~2.94	6.49	4.53~9.31
0	1	3	4	2.74	0.968~7.75	8.66	3.06~24.5
0	1	4	4	2.05	0.843~5.00	6.49	2.67~15.8
0	1	5	4	1.54	0.833~2.85	4.87	2.63~9.01
0	2	2	4	2.74	0.896~8.37	8.66	2.83~26.5
0	2	3	4	2.05	0.711~5.93	6.49	2.25~18.7

表 4 (续)

各剂量组动物死亡数				剂量组			
				剂量 1=0.316×10 ^t 剂量 2=1.00×10 ^t 剂量 3=3.16×10 ^t 剂量 4=10.0×10 ^t		剂量 1=1.00×10 ^t 剂量 2=3.16×10 ^t 剂量 3=10.0×10 ^t 剂量 4=31.6×10 ^t	
1 组	2(3)组	3(2)组	4 组	LD ₅₀	可信限	LD ₅₀	可信限
0	2	4	4	1.54	0.604~3.92	4.87	1.91~12.4
0	2	5	4	1.15	0.568~2.35	3.65	1.80~7.42
0	3	3	4	1.54	0.555~4.27	4.87	1.76~13.5
0	3	4	4	1.15	0.463~2.88	3.65	1.47~9.10
1	0	4	4	2.61	0.953~7.15	8.25	3.01~22.6
1	0	5	4	1.78	1.03~3.06	5.62	3.27~9.68
1	1	3	4	2.61	0.658~10.4	8.25	2.08~32.7
1	1	4	4	1.78	0.528~5.98	5.62	1.67~18.9
1	1	5	4	1.21	0.442~3.32	3.83	1.40~10.5
1	2	2	4	2.61	0.594~11.5	8.25	1.88~36.3
1	2	3	4	1.78	0.423~7.48	5.62	1.34~23.6
1	2	4	4	1.21	0.305~4.80	3.83	0.966~15.2
1	3	3	4	1.21	0.276~5.33	3.83	0.871~16.8
2	0	4	4	2.37	0.539~10.4	7.50	1.70~33.00
2	0	5	4	1.33	0.446~3.99	4.22	1.41~12.6
2	1	3	4	2.37	0.307~18.3	7.50	0.970~58.0
2	1	4	4	1.33	0.187~9.49	4.22	0.592~30.0
2	2	2	4	2.37	0.262~21.4	7.50	0.830~67.8
2	2	3	4	1.33	0.137~13.00	4.22	0.433~41.0
0	0	5	3	2.61	1.19~5.71	8.25	3.77~18.1
0	1	4	3	2.61	0.684~9.95	8.25	2.16~31.5
0	1	5	3	1.78	0.723~4.37	5.62	2.29~13.8
0	2	3	3	2.61	0.558~12.2	8.25	1.76~38.6
0	2	4	3	1.78	0.484~6.53	5.62	1.53~20.7
0	2	5	3	1.21	0.467~3.14	3.83	1.48~9.94
0	3	3	3	1.78	0.434~7.28	5.62	1.37~23.00
0	3	4	3	1.21	0.356~4.12	3.83	1.13~13.00
1	0	5	3	2.37	0.793~7.10	7.50	2.51~22.4
1	1	4	3	2.37	0.333~16.9	7.50	1.05~53.4

表 4（续）

各剂量组动物死亡数				剂量组			
				剂量 1=0.316×10' 剂量 2=1.00×10' 剂量 3=3.16×10' 剂量 4=10.0×10'		剂量 1=1.00×10' 剂量 2=3.16×10' 剂量 3=10.0×10' 剂量 4=31.6×10'	
1 组	2(3)组	3(2)组	4 组	LD ₅₀	可信限	LD ₅₀	可信限
1	1	5	3	1.33	0.303~5.87	4.22	0.958~18.6
1	2	3	3	2.37	0.244~23.1	7.50	0.771~73.00
1	2	4	3	1.33	0.172~10.3	4.22	0.545~32.6
1	3	3	3	1.33	0.148~12.1	4.22	0.467~38.1

6.1.5.3 一次最大限度试验

如 20 只动物(雌雄各半)一次灌胃剂量 5 000 mg/kg 体重,在 14 d 内又无一死亡,可判定 LD₅₀≥5 000 mg/kg 体重。

6.1.5.4 其他方法

也可采用其他方法如寇氏(Karber)法、固定剂量法(Fixed dose method)及上下法(Up and down procedure)等。

6.1.6 急性经口毒性试验分级评价规定

急性经口毒性试验分级评价规定见表 5。

表 5 急性经口毒性试验分级

LD ₅₀ mg/kg 体重	毒性分级
LD ₅₀ ≥5 000	实际无毒
500≤LD ₅₀ <5 000	低毒
50≤LD ₅₀ <500	中等毒
1≤LD ₅₀ <50	高毒
LD ₅₀ <1	剧毒

6.2 急性吸入毒性试验

6.2.1 目的

检测消毒剂对实验动物的急性吸入毒性作用和强度。

6.2.2 实验动物

小鼠或大鼠任选一种,雌雄各半。小鼠体重为 18 g~22 g,大鼠体重为 180 g~220 g。

6.2.3 操作程序

6.2.3.1 试验设计

染毒浓度的设计、动物分组、观察期限、观察指标等可按 6.1 的要求进行。

6.2.3.2 染毒方法

急性吸入毒性试验可采用静式染毒法或动式染毒法。

6.2.3.3 静式染毒法

6.2.3.3.1 静式染毒是将实验动物放在一定体积的密闭容器(染毒柜)内,加入一定量的消毒剂,并使其挥发,造成实验需要消毒剂浓度的空气,一次吸入性染毒 2 h。

6.2.3.3.2 染毒柜的容积以每只染毒小鼠不少于 3 L/h 空气计,每只大鼠不少于 30 L/h 计。

6.2.3.3.3 计算染毒浓度,染毒浓度一般应采用实际测定浓度。在染毒期间一般可测 4 次~5 次,求其平均浓度。在无适当测试方法时。可用式(4)计算染毒浓度:

$$c = \frac{a \times d}{V} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

c ——染毒浓度,单位为毫克每立方米(mg/m^3);

a ——消耗消毒剂量,单位为立方米(m^3);

d ——消毒剂密度,单位为毫克每立方米(mg/m^3);

V ——染毒柜容积,单位为立方米(m^3)。

6.2.3.4 动式染毒法

6.2.3.4.1 动式染毒是采用机械通风装置,连续不断地将含有一定浓度消毒剂的空气均匀不断地送入染毒柜,并排出等量的染毒气体,维持相对稳定的染毒浓度。一次吸入性染毒 2 h。

6.2.3.4.2 气体消毒剂,经流量计与空气混合成一定浓度后,直接输入染毒柜。易挥发液体消毒剂,通过空气鼓泡或适当加热促使挥发后输入染毒柜。若消毒剂现场使用采取喷雾法时,可采用喷雾器或超声雾化器使其雾化后输入染毒柜。

6.2.3.4.3 计算染毒浓度,染毒浓度一般应采用动物呼吸带实际测定浓度,每 30 min 一次,取其平均值。若无适当的测试方法,也可采用式(5)计算染毒浓度:

$$c = \frac{a \times d}{V_1 + V_2} \dots\dots\dots (5)$$

式中:

c ——染毒浓度,单位为毫克每立方米(mg/m^3);

a ——气化或雾化消毒剂量,单位为立方米(m^3);

d ——消毒剂密度,单位为毫克每立方米(mg/m^3);

V_1 ——输入染毒柜风量,单位为立方米(m^3);

V_2 ——染毒柜容积,单位为立方米(m^3)。

6.2.3.5 LC_{50} 的计算

6.2.3.5.1 LC_{50} (半数致死浓度)的计算可按 6.1 的要求进行。

6.2.3.5.2 在预试验的基础上,如 20 只动物(雌雄各半)一次 2 h 吸入染毒浓度 10 000 mg/m^3 ,在 14 d 内无一死亡,可判定 $\text{LC}_{50} \geq 10\,000 \text{ mg}/\text{m}^3$ 。

6.2.4 急性吸入毒性试验评价规定

急性吸入毒性试验评价规定见表 6。

表 6 急性吸入毒性分级

2 h LC ₅₀ mg/m ³	毒性分级
LC ₅₀ ≥10 000	实际无毒
1 000≤LC ₅₀ <10 000	低毒
100≤LC ₅₀ <1 000	中等毒
10≤LC ₅₀ <100	高毒
LC ₅₀ <10	剧毒

6.3 皮肤刺激试验

6.3.1 目的

检测消毒剂对实验动物皮肤的刺激(腐蚀)作用和强度。

6.3.2 实验动物

每次试验至少 3 只皮肤完好的健康家兔或豚鼠。

6.3.3 操作程序

6.3.3.1 一次完整皮肤刺激试验

6.3.3.1.1 试验用受试物的浓度一般为皮肤消毒应用液的 5 倍或使用消毒剂原液。

6.3.3.1.2 在试验前 24 h,用脱毛剂或剪刀将家兔或豚鼠背部脊柱两侧的毛去掉。去毛范围,各约 3 cm×3 cm,不得损伤皮肤。

6.3.3.1.3 次日将受试物 0.5 mL(g)直接滴于面积为 2.5 cm×2.5 cm 的一侧去毛完整皮肤上,或滴于同样大小的 2 层~4 层纱布上并敷贴在一侧去毛皮肤表面,然后用一层无刺激塑料膜或油纸覆盖,再用无刺激胶布固定。另一侧去毛皮肤作为空白对照(或溶剂对照)。敷贴时间为 4 h。对于用后清洗的消毒剂,敷用时间至 2 h。试验结束后,用温水或无刺激性溶剂除去残留受试物。

6.3.3.1.4 分别于去除受试物后 1 h、24 h 和 48 h 观察皮肤局部反应,并按表 7 进行刺激反应评分。

表 7 皮肤刺激反应的评分标准

皮肤刺激反应		皮肤刺激反应评分
红斑形成	无	0
	勉强可见	1
	明显	2
	严重	3
	紫红色红斑,并有焦痂	4

表 7 (续)

皮肤刺激反应		皮肤刺激反应评分
水肿形成	无	0
	勉强可见	1
	皮肤隆起,轮廓清楚	2
	水肿隆起约 1 mm	3
	水肿隆起超过 1 mm	4

6.3.3.2 一次破损皮肤刺激试验

6.3.3.2.1 涂受试物前,在 2.5 cm×2.5 cm 的去毛皮肤上,用 75%酒精清洁、消毒暴露皮肤,待酒精挥发后,用灭菌刀片或注射针头在皮区内划一个“井”形的破损伤口,并在该破损皮区内染毒。注意皮肤破损仅达表皮,不要伤及真皮。

6.3.3.2.2 试验用受试物的浓度、手术前的皮肤准备、手术后受试物的涂抹、局部皮肤反应的观察和评分方法按 6.3.3.1 的要求进行。注意鉴别感染和原发性刺激反应的区别,若有感染可疑,应进行重复测试。

6.3.3.3 多次完整皮肤刺激试验

6.3.3.3.1 试验前动物皮肤准备按 6.3.3.1.2 的要求。

6.3.3.3.2 次日将受试物 0.5 mL(g)涂在一侧皮肤上,受试物的浓度同 6.3.3.1.1,另一侧涂溶剂作为对照,在涂抹后 4 h,用水或无刺激的适宜溶剂清洗,除去残留物。每天涂抹一次,连续涂抹 14 d。在每次涂抹后 24 h 观察结果,按表 7 评分。为了便于受试物的涂抹和结果观察,必要时应剪毛。对照区的处理方法同试验区。

6.3.4 评价规定

6.3.4.1 一次皮肤刺激试验

在各个观察时间点,按照表 7 对动物的皮肤红斑与水肿形成情况进行评分,并分别按时间点将 3 只动物的评分相加,除以动物数,获得不同时间点的皮肤刺激反应积分均值(刺激指数)。取其中最高皮肤刺激指数,按表 8 评定该受试物对动物皮肤刺激强度的级别。

表 8 皮肤刺激强度分级

皮肤刺激指数 DI	刺激强度级别
$0 \leq DI < 0.5$	无刺激性
$0.5 \leq DI < 2.0$	轻刺激性
$2.0 \leq DI < 6.0$	中等刺激性
$6.0 \leq DI \leq 8.0$	强刺激性

6.3.4.2 多次皮肤刺激试验

按式(6)计算每天每只动物皮肤刺激指数(DI),并以表 8 判定皮肤刺激强度。

$$DI = \frac{M}{n \times 14}$$

.....(6)

式中：

DI ——皮肤刺激指数；

M ——每只动物 14 d 的红斑和水肿总积分；

n ——受试动物数；

14 ——多次皮肤试验刺激天数。

6.4 急性眼刺激试验

6.4.1 目的

检测消毒剂对实验动物眼睛的急性刺激和腐蚀作用。

6.4.2 实验动物

使用 3 只家兔。试验前检查家兔双眼,有异常者不能用于试验。

6.4.3 操作程序

- 6.4.3.1 试验用受试物一般为黏膜或空气消毒应用液的 5 倍浓度的溶液或消毒剂原液。
- 6.4.3.2 吸取受试物 0.1 mL,滴入家兔一侧眼结膜囊内。另一侧眼以生理盐水作为正常对照。
- 6.4.3.3 滴受试物后,将眼被动闭合 4 s,30 s 后用生理盐水冲洗。于滴眼后 1 h、24 h、48 h、72 h、7 d、14 d 和 21 d,肉眼观察家兔眼结膜、虹膜和角膜的损伤与恢复情况。如果 72 h 内未出现刺激反应,或第 7 d 或第 14 d,眼睛刺激反应完全恢复,即可提前终止试验。必要时,用 2% 荧光素钠溶液、裂隙灯、放大镜检查角膜及虹膜变化。

6.4.4 评价规定

按表 9 对家兔眼角膜、虹膜和结膜的急性刺激反应进行评分,并分别计算每只动物在 3 个不同观察时间(24 h、48 h 和 72 h)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 24 h、48 h 和 72 h 评分之和除以观察数 3)。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,按表 10、表 11 判定受试物对眼睛的刺激强度。

表 9 家兔急性眼刺激反应的评分标准

眼损害表现		评分
角膜损害	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
	角膜不混浊,虹膜无法辨认	4
虹膜损害	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

表 9 (续)

眼损害表现		评分
结膜(睑结膜、球结膜) 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
结膜(睑结膜、球结膜) 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

表 10 眼刺激性反应分级标准(一)

损伤类型		分级标准
可逆性损伤	无刺激性	3 只动物的平均评分:角膜损害<1、虹膜损害<1、结膜充血<2 和结膜水肿<2 或 3 只动物中至少有 2 只动物的平均评分符合上述标准,另外 1 只动物的刺激反应在 21 d 内完全恢复 ^a
	轻刺激性	3 只动物中有 2 只动物的平均评分:角膜损害≥1;虹膜损害≥1;结膜充血≥2;结膜水肿≥2,且 7 d 内全部动物的刺激反应完全恢复 ^a
可逆性损伤	刺激性 ^b	3 只动物中有 2 只动物的平均评分:角膜损害≥1;虹膜损害≥1;结膜充血≥2;结膜水肿≥2,且 21 d 内全部动物的刺激反应完全恢复
不可逆性损伤	腐蚀性 ^c	至少有 1 只动物的角膜、虹膜或结膜的刺激反应在 21 d 的观察期内未完全恢复或(和)在 3 只动物中有 2 只动物的平均评分:角膜损害≥3;虹膜损害≥1.5
^a 完全恢复是指动物的眼刺激反应评分,角膜损害=0,虹膜损害=0,结膜充血=0 或 1,结膜水肿=0 或 1。 ^b 刺激性是指接触受试物后所产生的可逆性炎性反应。 ^c 腐蚀性是指接触受试物后所产生的不可逆性组织损伤。		

表 11 眼刺激性反应分级标准(二)

平均评分	动物数 只	恢复时间 ^a d	损伤类型	
角膜损害<1 和 虹膜损害<1 和 结膜充血<2 和 结膜水肿<2	≥2	≤21	可逆性损伤	无刺激性
角膜损害≥1 或 虹膜损害≥1 或 结膜充血≥2 或 结膜水肿≥2	≥2	≤7	可逆性损伤	轻刺激性
		≤21		刺激性

表 11（续）

平均评分	动物数 只	恢复时间 ^a d	损伤类型	
角膜损害≥3 或 虹膜损害≥1.5	≥2	—	不可逆性损伤	腐蚀性 ^b
角膜损害≥1 或 虹膜损害≥1 或 结膜充血≥1 或 结膜水肿≥1	≥1	>21		
^a 恢复时间是指动物刺激反应评分恢复至角膜损害=0,虹膜损害=0,结膜充血=0 或 1,结膜水肿=0 或 1 的时间。				
^b 至少有 1 只动物于 21 d 尚存在角膜粘连或血管翳,也可判为腐蚀性。				

6.5 阴道黏膜刺激试验

6.5.1 目的

检测消毒剂对实验动物阴道黏膜的刺激作用和强度。

6.5.2 实验动物

选用健康、初成年的雌性白色家兔,同一品系,体重 2.0 kg~3.0 kg。试验前应检查动物阴道口有无分泌物、充血、水肿和其他损伤情况。如有炎症或(和)损伤,应弃用。选择未交配的动物进行试验。

6.5.3 试验分组

分为染毒组和对照组,每组 3 只。

6.5.4 操作程序

6.5.4.1 稀释使用的消毒剂采用黏膜消毒时应用液 5 倍浓度的溶液作为受试物。若应用液为原液的消毒剂则用原液作受试物。对照组采用生理盐水。

6.5.4.2 将长度为 8 cm 左右的钝头软管或 12 号硅胶导尿管与 2 mL 的注射器连接。注射器和导管注满受试液备用。每只动物各准备一套。

6.5.4.3 一次阴道黏膜刺激试验的染毒方法:将动物仰面固定,暴露出会阴和阴道口。将导管用受试液或对照液湿润后轻柔地插入阴道(4 cm~5 cm),并用注射器缓慢注入 2 mL 受试液,抽出导管,完成染毒。对照组动物用生理盐水作同样处理。

6.5.4.4 由于动物阴道容积的个体差异,有时受试液注入后可能有溢出,可用消毒棉或软纸拭去。

6.5.4.5 末次染毒后 24 h,采用气栓法处死动物,剖腹取出完整的阴道,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。然后将阴道放入 10% 福尔马林溶液中固定 24 h 以上,选取阴道的两端和中央(即位于耻骨联合处附近)3 个部位的组织制片,HE 染色后,进行组织病理学检查。

6.5.5 评价规定

6.5.5.1 组织病理学检查结果,按表 12 规定对阴道黏膜的刺激反应进行评分。

表 12 阴道黏膜刺激反应评分标准^a

阴道组织反应		反应评分
A. 上皮组织	完整—正常	0
	细胞变性或变扁平	1
	组织变形	2
	局部糜烂	3
	广泛糜烂或溃疡	4
B. 白细胞浸润(每个高倍视野)	无	0
	极少<25 个	1
	轻度 25 个~50 个	2
	中度 51 个~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
^a 刺激反应积分=A+B+C+D。		

6.5.5.2 将实验组 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×3),得出实验组阴道黏膜刺激反应的平均积分,最大记分为 16(见表 12)。

6.5.5.3 对照组评分方法同 6.5.5.1 和 6.5.5.2。

6.5.5.4 将实验组平均积分减去对照组平均积分得出刺激指数后,按表 13 进行刺激强度分级。

表 13 阴道黏膜刺激强度分级

阴道黏膜刺激指数 DI	阴道黏膜刺激反应强度
$0 \leq DI < 1$	无
$1 \leq DI < 5$	极轻
$5 \leq DI < 9$	轻度
$9 \leq DI < 12$	中度
$DI \geq 12$	重度

6.5.5.5 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,以鉴别是否与操作损伤有关。

6.6 皮肤变态反应试验

6.6.1 目的

检测消毒剂重复接触后,实验动物产生皮肤变态反应的可能性及其强度。

6.6.2 实验动物

选用皮肤完好的健康白色豚鼠,雌雄各半,体重 200 g~300 g。

6.6.3 试验分组

将豚鼠随机分为实验组、阴性对照组和阳性对照组,每组动物至少 16 只。

6.6.4 操作程序

6.6.4.1 对实验组豚鼠,给予受试物诱导和激发处理。阳性对照组给予阳性致敏物(如:2,4-二硝基氯苯)诱导和激发处理。阴性对照组仅给以受试物激发处理。

6.6.4.2 诱导处理浓度允许引起皮肤轻度刺激反应。激发浓度可低于诱导浓度,并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。

6.6.4.3 试验前 24 h 将豚鼠背部左侧 3 cm×3 cm 范围内去毛。取诱导浓度的消毒剂溶液(或原液) 0.5 mL(g),直接涂在 2 cm×2 cm 左侧去毛皮肤上或滴于同样大小的 2 层~4 层纱布上,再将其敷贴在左侧去毛区。用一层无刺激塑料膜或油纸复盖,再以无刺激胶布固定,持续 6 h。第 7 d 和第 14 d 以同样方法重复一次。

6.6.4.4 在末次诱导后 14 d,将激发浓度的消毒剂溶液 0.5 mL(g)直接涂在 2 cm×2 cm 右侧脱毛皮肤上或滴于同样大小的 2 层~4 层纱布上,敷贴于豚鼠背部右侧 3 cm×3 cm 去毛区。然后,用一层塑料膜或油纸和无刺激胶布固定,6 h 后将敷贴的受试物洗去。24 h 和 48 h 后观察皮肤反应,按表 14 对皮肤反应进行评分。

表 14 皮肤反应的评分标准

皮肤反应		评分
红斑形成	无红斑	0
	轻微红斑	1
	中度红斑	2
	严重红斑	3
	水肿性红斑	4
水肿形成	无水肿	0
	轻度水肿	1
	中度水肿	2
	严重水肿	3

6.6.4.5 实验室开展皮肤变态反应试验初期,或使用新的动物种属或品系时,应同时设阳性对照组,阳性对照物可使用 2,4-二硝基氯代苯。为保证试验方法的可靠性,在进行该类试验时,每隔半年应使用阳性对照物检查一次。若检测报告中需要用非本次阳性对照组的实验数据时,应注明其实验日期。阳性对照组的操作程序同实验组,以阳性致敏物替代受试物。

6.6.4.6 阴性对照组,仅对动物给予受试物的激发处理,每次试验应设置。

6.6.5 评价规定

6.6.5.1 化学物质引起的过敏性接触性皮炎,属迟发型变态反应。对于动物,仅见皮肤红斑和水肿。

6.6.5.2 根据表 14 标准,将出现皮肤反应(评分 ≥ 1)的动物数除以该组实验动物数,求得致敏率(%),按表 15 评定致敏强度。

表 15 致敏强度分级标准^a

致敏率 %	致敏强度
0~8	极轻度
9~28	轻度
29~64	中度
65~80	强度
81~100	极强度
^a 致敏率为 0%时,可判为未见皮肤变态反应。	

6.7 亚急性经口毒性试验

6.7.1 目的

6.7.1.1 检测消毒剂多次接触对实验动物的蓄积毒性作用及其靶器官,并确定其最大未观察到有害作用剂量和最小观察到有害作用剂量。

6.7.1.2 为亚慢性、慢性毒性或致癌试验的剂量设计提供依据。

6.7.2 实验动物

一般用啮齿类动物,首选大鼠,所用大鼠应为 6 周~8 周龄,每组至少 10 只,雌雄各半。

6.7.3 试验分组

将实验动物随机分为 4 组(3 个剂量组和 1 个对照组)。选择受试物剂量时,高剂量组应出现明显的毒性反应,但不引起死亡,如果出现动物死亡应不超过 10%;中间剂量组应可观察到轻微的毒性效应;低剂量组应不引起任何毒性效应(属未观察到有害作用剂量)。至于具体的剂量设计,可考虑高剂量为 LD₅₀ 的 1/5~1/10,高、中、低 3 个剂量间的组距以 3 倍~5 倍为宜,最低不小于 2 倍。对于 LD₅₀ $\geq$ 5 000 mg/kg 体重的消毒剂,高剂量应用 1 000 mg/kg 体重。另以受试物溶剂代替受试物进行试验,作为阴性(溶剂)对照组。

6.7.4 操作程序

6.7.4.1 采用灌胃方式经口染毒。

6.7.4.2 灌胃法每天灌胃一次,每周称体重,并按体重调整受试物的给予量。

6.7.4.3 试验期为 28 d,末次染毒后 24 h 处死实验动物,检测各项观察指标。



6.7.5 观察指标

6.7.5.1 临床检查

观察动物中毒表现,每周称量体重一次。

6.7.5.2 血液学检查

包括血红蛋白含量、红细胞计数、白细胞计数及其分类计数等。

6.7.5.3 血液生化检查

例如天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、尿素氮、肌酐、血清总蛋白和白蛋白、总胆固醇等。必要时,可根据所观察到的受试物毒性效应,或与受试物化学结构相似物质的毒性作用,选择其他一些生化指标。

6.7.5.4 脏器重量

测量肝、肾等重要脏器的重量,并计算其脏器重量系数。

6.7.5.5 病理学检查

实验结束时,处死所有动物,进行全面的肉眼尸检,并将尸检发现的异常组织和主要脏器和组织(如心、肺、肝、肾、脾、脑、肾上腺、睾丸、卵巢和胃肠等)固定保存。当各剂量组动物尸检未发现明显病变,先进行高剂量组和阴性对照组动物的肝、肾、胃肠和其他可能受损的脏器的组织病理学检查。如大体解剖发现异常或高剂量组动物组织病理学检查发现病变,还应对中、低剂量组动物相应的器官进行组织病理学检查。

6.7.6 评价规定

将各实验组动物观察指标与阴性对照组加以比较,并进行统计学检验,注意各剂量组间的剂量-反应(效应)关系。评定受试物的最小观察到有害作用剂量和最大未观察到有害作用剂量及毒性作用的靶器官。

6.8 致突变试验

6.8.1 体外哺乳动物 L5178Y 细胞基因突变试验

6.8.1.1 目的

检测消毒剂对体外培养的哺乳动物细胞的基因突变作用,以作为评价消毒剂致突变性的依据。

6.8.1.2 试剂

6.8.1.2.1 F_{10P} 培养液:为完全培养液。以 Fischer 或 RPMI1640 培养液,加入马血清 10%,丙酮酸钠 220 $\mu\text{g}/\text{mL}$,青霉素 100 IU/mL 和链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 配制而成(pH 7.2~pH 7.4)。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

6.8.1.2.2 F_{0P} 培养液:为无血清培养液。以 Fischer 或 RPMI1640 培养液,加入丙酮酸钠 220 $\mu\text{g}/\text{mL}$,青霉素 100 IU/mL 和链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等配制而成(pH 7.2~pH 7.4)。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

6.8.1.2.3 马血清:将过滤除菌后的马血清,经 56 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min 灭活补体。分装后,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

6.8.1.2.4 集落用培养基:用 Fischer 或 RPMI1640 培养液,加入马血清 20%、丙酮酸钠 220 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、琼脂 0.37% 配制而成。

6.8.1.2.5 无钙镁磷酸盐缓冲液(无钙镁 PBS,pH 7.2~7.4):

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.20 g
磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.89 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
氯化钠(NaCl)	8.00 g
双蒸水(压力蒸汽灭菌)	1 000 mL

6.8.1.2.6 受试物:最好能直接溶于 $\text{F}_{10\text{P}}$ 与 $\text{F}_{0\text{P}}$ 培养液中。否则应先溶于二甲基亚砜(DMSO),而后再加于上述培养液内。所加 DMSO 的量应低于 1%(体积分数)。

6.8.1.2.7 阳性对照物:选用甲基磺酸乙酯(EMS),丝裂霉素 C(MMC),甲基硝基亚硝基胍(MNNG),苯并(a)芘(BaP)等。

6.8.1.2.8 三氟胸苷(TFT):用生理盐水配成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液,可冻存 3 个月。

6.8.1.2.9 肝微粒体酶混合液(S9 混合液):取健康的雄性成年 SD 或 Wistar 大鼠,体重 150 g 左右,约 5 周龄~6 周龄。将多氯联苯(Aroclor 1254),溶于玉米油中,浓度 200 mg/mL ,按 500 mg/kg 体重一次腹腔注射。5 d 后,断头处死动物,取出肝脏称重后,用预冷的 0.15 mol/L 氯化钾溶液冲洗肝脏数次。每克肝(湿重)加 0.15 mol/L 氯化钾溶液 3 mL。剪碎肝脏,在冰浴中用玻璃匀浆器制成肝匀浆。以上操作应注意无菌和局部冷环境。

将肝匀浆用低温(0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$)高速离心机,以 9 000 g 离心 10 min。取上清液即为 S9,分装于无菌冷冻安瓿中。S9 制成后,应进行无菌检查,以及用间接致癌物鉴定其活性。合格者置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 或液氮中储存备用,储存期不超过半年。

S9 混合液应以上述 S9 液在临用时按无菌要求配制。一般配成含 10% S9 的混合液。其配方如下:

S9	0.10 mL
1.65 mol/L 氯化钾+0.4 mol/L 氯化镁	0.04 mL
葡萄糖-6-磷酸 $\cdot 2\text{Na}$	1.8 mg
氧化型辅酶 II (NADP)	3.1 mg
用 $\text{F}_{0\text{P}}$ 培养液补足至 1.0 mL。	

6.8.1.3 细胞

试验以小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞[胸苷激酶(TK)座位为杂合子(tk^+/tk^-)]检测 TK 基因的突变。为减少细胞的自发突变率,在制备该细胞试验用悬液时,先将其在加有 THMG 的 $\text{F}_{10\text{P}}$ 培养液中培养 24 h,杀灭培养液中所存在的自发突变细胞(tk^-/tk^-),然后将细胞悬浮于 THG 培养液(不含氨甲喋呤的 THMG 培养液)中培养 1 d~3 d。

THMG 含下列 4 种成分,各成分的终末浓度如下:

胸苷	$5 \times 10^{-6} \text{ mol}/\text{L}$
次黄嘌呤	$5 \times 10^{-5} \text{ mol}/\text{L}$
氨甲喋呤	$4 \times 10^{-7} \text{ mol}/\text{L}$
甘氨酸	$1 \times 10^{-4} \text{ mol}/\text{L}$

6.8.1.4 试验分组

6.8.1.4.1 一般设 4 个剂量组。有细胞毒性的受试物,最高剂量组的细胞存活率为 10%~20%,无细胞毒性受试物最高剂量不超过 10 mmol/L 或 5 mg/mL 。

6.8.1.4.2 同时应有阴性(溶剂)对照组、阳性对照组和未处理对照组。阳性与阴性对照组的操作程序同实验组,阳性对照组用阳性对照物代替受试物,阴性(溶剂)对照组用受试物溶剂代替受试物。

6.8.1.4.3 除未处理对照组外,实验组和其他对照组,还均应包括有加 S9 混合液和不加 S9 混合液的两部分。

6.8.1.5 操作程序

6.8.1.5.1 细胞准备

将新清除了自发突变体的细胞群体,用 F_{10P} 培养液制成悬液。以无菌烧瓶加入细胞悬液和 F_{10P} 培养液至 100 mL,细胞终末密度为 7×10^3 个/mL $\sim 8 \times 10^3$ 个/mL。培养物以含 5% 二氧化碳的空气充气后,加盖密闭,于 $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行培养。L5178Y 细胞的细胞增殖周期约为 10 h $\sim$ 11 h,在常规培养 24 h 后,细胞数将增加约 5 倍。用稀释法维持生长,每天将细胞培养物用 F_{10P} 培养液作 4 倍稀释(或隔天用 F_{10P} 培养液作 24 倍稀释),继续培养。实验前一天用 F_{10P} 培养液和 F_{0P} 培养液各 50% 的对半混合液(马血清终末浓度为 5%)稀释。

6.8.1.5.2 受试物处理

用 6.8.1.5.1 中 F_{10P} 和 F_{0P} 的对半混合液将细胞培养物稀释至 1×10^6 个/mL,并分种于 50 mL 有盖试管中,每管 6 mL,再加 S9 混合液 4 mL(总量共 10 mL)。不加 S9 混合液管,代之以 F_{0P} 培养液。在上述试管内加入一定浓度的受试物,并以含 5% 二氧化碳的空气充气后加盖密闭,于 $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h。

处理结束后,以 200 g 离心 10 min,除去含受试物的上清液,收集细胞。细胞用 Hanks 液洗涤,再加入 20 mL F_{10P} 培养液充分混悬(细胞浓度为 0.3×10^6 个/mL),以含 5% 二氧化碳的空气充气后,加盖密闭,于 $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养,开始表达。

6.8.1.5.3 表达

细胞的表现型表达时间为 2 d。表达开始后 24 h 和 48 h 经计数后将细胞稀释至 3×10^5 个/mL。

6.8.1.5.4 选择和集落化

表达结束后,取 10 mL 培养物经离心后除去大部分上清液。并将细胞在留下的约 1 mL F_{10P} 培养基中混悬。将细胞悬液移入含 100 mL 集落培养基的烧瓶中。此时细胞密度为 3×10^4 个/mL。在 $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 30 min。取出 0.5 mL 后,向余下的细胞悬液中加入 1.0 mL TFT 贮存液,继续振荡培养 15 min。将样本取出,倒于 3 个直径 10 cm 平皿中,每平皿 33 mL,含 1×10^6 个细胞(称为 TFT 平板),作突变体的选择。将先前取出的 0.5 mL 细胞悬液用集落培养基先作 1:100 稀释,细胞悬液浓度为 3×10^2 个/mL。振荡培养 15 min 后,取出 2.0 mL 再用集落培养基作 1:50 稀释(此时细胞悬液浓度为 6 个/mL)后振荡培养。经 15 min 培养后,倒入 3 个直径为 100 mm 的平皿中,每平皿 33 mL,含细胞 200 个(称为 VC 平板)。待琼脂凝固后,置二氧化碳培养箱($36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$)中静置培养 10 d。计数各个平皿中出现的集落数(m)。

6.8.1.5.5 相关指标的计算

按式(7)、式(8)计算绝对集落形成效率(E_a)和相对集落形成效率(E_r),按式(9)计算突变频率(MF)。

$$E_a = \frac{m}{n} \dots\dots\dots (7)$$

式中：

E_a ——绝对集落形成效率；

m ——形成集落数，单位为细胞集落数(CFU)；

n ——接种细胞数，单位为细胞个数。

$$E_r = \frac{E_{a1}}{E_{a0}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (8)$$

式中：

E_r ——相对集落形成效率；

E_{a1} ——实验组绝对集落形成效率；

E_{a0} ——溶剂对照组绝对集落形成效率。

$$MF = \frac{m_{TFT}}{m_{VC}} \times f \quad \dots\dots\dots (9)$$

式中：

MF ——突变频率；

m_{TFT} ——TFT 平板集落数，单位为细胞集落数(CFU)；

m_{VC} ——VC 平板集落数，单位为细胞集落数(CFU)；

f ——稀释系数为 2×10^{-4} 。

6.8.1.6 评价规定

6.8.1.6.1 对 L5178Y 细胞，自发突变频率推荐可接受的范围为 $20 \times 10^{-6} \sim 100 \times 10^{-6}$ 。

6.8.1.6.2 用适当的统计学检验方法处理，当各剂量组 MF 与阴性(溶剂)对照组相比突变率升高，且有统计学意义，并呈剂量-反应关系时，或仅一个剂量组有统计学意义的升高并经重复试验证实者，均可判为阳性结果，即受试物对 L5178Y 细胞 TK 系统有致突变性。

6.8.2 体外哺乳动物 V79 细胞基因突变试验

6.8.2.1 目的

检测消毒剂对体外培养的哺乳动物细胞可否引起基因突变，以对消毒剂的致突变性做出评价。

6.8.2.2 试剂

6.8.2.2.1 完全培养液：以 Eagle 最低必需培养液(EMEM)或 RPMI1640 培养液加 10% 小牛血清、青霉素(100 IU/mL)和链霉素(100 μ g/mL)配制而成。

6.8.2.2.2 小牛血清：将过滤除菌后的小牛血清放入 56 $^{\circ}$ C 水浴中，保温 30 min 以灭活补体，而后分装，保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

6.8.2.2.3 无钙镁磷酸盐缓冲液(无钙镁 PBS)：见 6.8.1.2.5。

6.8.2.2.4 胰蛋白酶-EDTA 溶液：分别用无钙镁 PBS 配制胰蛋白酶与 EDTA 溶液，胰蛋白酶溶液浓度为 0.05%，EDTA 溶液浓度为 0.02%。两溶液按 1 : 1 混合。存放于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

6.8.2.2.5 受试物：最好能直接溶于无血清培养液内。否则，先溶于二甲基亚砜(DMSO)，而后加于无血清培养液内。所加 DMSO 溶液量为 0.5% (体积分数)。

6.8.2.2.6 阳性对照物：可根据受试物的性质和结构选用不同的阳性对照物，例如甲基磺酸乙酯(EMS)，丝裂霉素 C(MMC)，甲基硝基亚硝基胍(MNNG)，苯并(a)芘(BaP)等。

6.8.2.2.7 6-硫代鸟嘌呤(6-TG)：用 0.5% 碳酸氢钠溶液配制为 1.0 mg/mL 溶液，保存于 4 $^{\circ}$ C 备用。

6.8.2.2.8 肝微粒体酶混合液(S9 混合液)：见 6.8.1.2.9。

6.8.2.2.9 磷酸盐缓冲液(0.067 mol/L, pH 6.8):取磷酸氢二钠 9.47 g 溶于蒸馏水 1 000 mL 中,配成第一液;取磷酸二氢钾 49.07 g 溶于蒸馏水 1 000 mL 中,配成第二液;取第一液 49.5 mL 加于第二液 50.5 mL 中混匀,即为 pH 6.8 的 0.067 mol/L 磷酸盐缓冲液。

6.8.2.2.10 姬姆萨染液:取姬姆萨染料 3.8 g,置玛瑙乳钵中,加少量甲醇研磨。逐渐加甲醇至 375 mL,待完全溶解后,再加 125 mL 甘油,放入 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中保温 48 h。保温期间振摇数次,使充分溶解。取出过滤,两周后使用,作为姬姆萨染液原液。

使用时,取 1 份姬姆萨染液原液,与 9 份 0.067 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.8)混合,配成其应用液。

6.8.2.3 细胞

以中国仓鼠肺(V79)细胞株进行试验。为减少其自发突变,正式试验前将野生型细胞接种于含 THMG(见 6.8.1.3)的 MEM 培养液内并在二氧化碳培养箱中培养一周,以杀灭自发 HGPRT 位点突变体。遂后重新接种于 MEM 培养液中。

6.8.2.4 试验分组

6.8.2.4.1 一般设 4 个试验剂量组。对有细胞毒性的受试物,最高剂量组的细胞存活率为 10%~20%,无细胞毒性受试物最高剂量不超过 10 mmol/L(或 5 mg/mL)。

6.8.2.4.2 同时应设阴性(溶剂)对照组、阳性对照组和未处理对照组。阳性与阴性对照组的操作程序同实验组,阳性对照组用阳性对照物代替受试物,阴性(溶剂)对照组用受试物溶剂代替受试物。

6.8.2.4.3 除未处理对照组外,各组均应包括加 S9 混合液和不加该液的样本。

6.8.2.5 操作程序

6.8.2.5.1 细胞准备

将 5×10^5 个细胞接种于含完全培养液的直径为 100 mm 的平皿中,除未处理对照组一皿外,其余每组二皿,共 13 皿。于二氧化碳培养箱中($36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)培养 24 h。

6.8.2.5.2 接触受试物

吸去 6.8.2.5.1 培养皿中的培养液,用无钙镁 PBS 洗 2 次。将含有细胞的培养皿分为两大组,一组加 S9 混合液,另一组不加 S9 混合液。加 S9 混合液组,在培养皿中加入 2 mL S9 混合液,对不加 S9 混合液组,则用 2 mL 无血清培养液代替,再加一定量不同浓度受试物的供试液,最后用不含血清的培养液补足至 10 mL。并将培养皿置二氧化碳培养箱中培养 5 h,处理结束后,吸去培养皿中液体部分,用无钙镁 PBS 洗涤细胞 2 次,再加入完全培养液 10 mL,在二氧化碳培养箱中培养 19 h~22 h。阳性和阴性(溶剂)对照组也分加与不加 S9 混合液两大组,操作方法同上。

6.8.2.5.3 表达

将培养物用胰蛋白酶-EDTA 消化。待细胞脱落后,加入完全培养液,终止消化。混匀、计数并进行表达。表达时,以 5×10^5 个细胞接种于直径为 100 mm 的平皿中。培养 3 d 后,分传一次,仍接种 5×10^5 个细胞,培养 3 d 后再进行突变体的选择,并按 6.8.1.5.5 中式(7)和式(8)计算绝对集落形成效率(E_a)和相对集落形成效率(E_r)。

6.8.2.5.4 细胞毒性测定

将 6.8.2.5.3 消化计数后的细胞,每平皿接种 200 个,每组 5 个平皿,于二氧化碳培养箱内($36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)培养 7 d。取出样本,固定并进行姬姆萨染色后,计数各平皿的细胞集落数。并按 6.8.1.5.5 中式

(8) 计算相对集落形成效率(E_r),以相对集落形成效率表示细胞的毒性。

6.8.2.5.5 突变频率的测定

表达结束后,消化细胞,分别接种,每组 5 个平皿,每平皿种 2×10^5 个细胞。待细胞贴壁后加入 6-TG,终末浓度为 $5 \mu\text{g/mL}$ 。放入二氧化碳培养箱培养 7 d~10 d。固定后进行姬姆萨染色,计数平皿内集落数,并计算其突变频率(MF)。

6.8.2.5.6 突变频率(MF)的计算

按式(10)计算突变频率:

$$\text{MF} = \frac{m}{n \times E_a} \dots\dots\dots (10)$$

式中:

MF —— 突变频率;

m —— 突变集落数,单位为细胞集落数(CFU);

E_a —— 绝对集落形成效率;

n —— 接种细胞数。

6.8.2.6 评价规定

6.8.2.6.1 对 V79 细胞,推荐可接受的自发突变频率范围为 $10 \times 10^{-6} \sim 100 \times 10^{-6}$ 。

6.8.2.6.2 用适当统计学检验方法处理,当各剂量组 MF 与阴性(溶剂)对照组者相比,突变率升高,且有统计学意义,并呈剂量-反应关系时,或仅一个剂量组有统计学意义的升高并经重复试验证实者,均可判为阳性结果,即受试物对 V79 细胞 HGPRT 系统有致突变性。

6.8.3 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

6.8.3.1 目的

用细胞遗传学方法检测体外培养的哺乳动物细胞染色体畸变,评价消毒剂的致突变性。

6.8.3.2 试剂

6.8.3.2.1 完全培养液:采用 Eagle 最低必需培养液(EMEM)或 Dulbecco 最低必需培养液(DMEM)等,并加入 10% 小牛血清以及青霉素(100 IU/mL)和链霉素($100 \mu\text{g/mL}$)。

6.8.3.2.2 小牛血清:见 6.8.2.2.2。

6.8.3.2.3 无钙镁磷酸盐缓冲液(无钙镁 PBS,pH 7.2~7.4):见 6.8.1.2.5。

6.8.3.2.4 胰蛋白酶-EDTA 溶液:见 6.8.2.2.4。

6.8.3.2.5 受试物:最好能直接溶于无血清完全培养液内。否则,先溶于二甲基亚砜(DMSO),而后加于完全培养液内。所加 DMSO 溶液量应低于 1.0%(体积分数)。

6.8.3.2.6 阳性对照物:加 S9 时选用环磷酰胺等,不加 S9 时选用丝裂霉素 C 等。

6.8.3.2.7 肝微粒体酶混合液(S9 混合液):见 6.8.1.2.9。

6.8.3.2.8 秋水仙素溶液(0.04%):取 40 mg 秋水仙素溶解于 100 mL 无菌 0.85% 氯化钠溶液中,过滤除菌。

6.8.3.2.9 甲醇-冰醋酸(3:1,体积比)固定液:临用现配。

6.8.3.2.10 姬姆萨染液:见 6.8.2.2.10。

6.8.3.2.11 氯化钾溶液(0.075 mol/L)。

6.8.3.3 细胞

可选用中国仓鼠肺(CHL)细胞、中国仓鼠肺(V79)细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,或人外周血淋巴细胞等进行试验。在一般情况下,本试验推荐使用CHL细胞。

6.8.3.4 试验分组

6.8.3.4.1 所设试验剂量组应不少于4个。最高剂量组的细胞存活率一般应为10%~20%,无毒性受试物最高剂量组不超过10 mmol/L(或5 mg/mL)。

6.8.3.4.2 同时应设阴性(溶剂)对照组、阳性对照组和未处理对照组,阳性与阴性对照组的操作程序同实验组,阳性对照组用已知染色体断裂剂替代受试物,阴性(溶剂)对照组用受试物的溶剂。

6.8.3.4.3 除未处理对照组外,各组均应包括加S9混合液和不加该液的样本。

6.8.3.5 操作程序

6.8.3.5.1 细胞准备

使用CHL细胞时,在试验前一天,将其 1×10^6 个细胞接种于直径为100 mm平皿中,置 $36 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱内待用。

6.8.3.5.2 接触受试物

试验时,吸出细胞培养平皿中的培养液,加入试验所规定浓度的受试物和S9混合物(10%)以及不含小牛血清的完全培养液,放二氧化碳培养箱内作用2 h。结束后,吸去完全培养液,用Hanks液洗细胞3次。加完全培养液,再置二氧化碳培养箱中培养,于24 h收获细胞。收获细胞之前2 h~4 h,加入秋水仙素溶液(终末浓度为 $1 \text{ } \mu\text{g/mL}$),阻断细胞于有丝分裂中期相。

6.8.3.5.3 收获细胞

用胰蛋白酶-EDTA溶液消化细胞,待细胞脱落,加入培养液并混匀以终止胰蛋白酶作用。离心($1\,000 \text{ r/min} \sim 1\,200 \text{ r/min}$,5 min~7 min),弃去上清液后,加入0.075 mol/L氯化钾溶液低渗处理10 min~20 min。离心后,再以甲醇-冰醋酸液固定2次。按常规滴片干燥,用姬姆萨应用液染色15 min左右。

6.8.3.5.4 细胞染色体畸变分析

每组各选100个染色体分散良好的中期分裂相细胞,进行染色体畸变分析,观察和记录染色体结构的异常及数量异常。染色体结构异常可有:断裂、微小体、有着丝点环、无着丝点环、单体互换、双微小体、裂隙、非特定性型变化(粉碎化等)。染色体数量异常可有:非整倍体、多倍体、内复制。

6.8.3.6 评价规定

用 χ^2 检验或其他适当的统计学检验方法,对所得试验数据进行处理。当各剂量组与阴性(溶剂)对照组相比,畸变细胞率升高,且有统计学意义,并有剂量-反应关系时;或仅一个剂量组有统计学意义的升高并经重复试验证实者,并经重复试验证实时,可判为该受试物在本试验中具有致突变性。

6.8.4 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

6.8.4.1 目的

检测消毒剂对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核形成的影响,评价消毒剂的染色体损伤毒性。

6.8.4.2 试剂

6.8.4.2.1 受试物:用水、植物油或用 0.5% 羧甲基纤维素钠配制成溶液或混悬液。

6.8.4.2.2 阳性对照物:常用环磷酰胺或丝裂霉素 C。

6.8.4.2.3 小牛血清:见 6.8.2.2.2。

6.8.4.2.4 姬姆萨染液:见 6.8.2.2.10。

6.8.4.3 实验动物

选用体重为 25 g~30 g 的小鼠,雌雄各半。

6.8.4.4 试验分组

随机分为 5 组,受试物至少设 3 个剂量组,每个剂量组用 10 只动物,雌雄各半。另设阴性(溶剂)和阳性对照组。剂量组一般取受试物的 $1/2LD_{50}$ 、 $1/5LD_{50}$ 、 $1/20LD_{50}$ 等剂量,以得到剂量-反应关系。高剂量组应不引起动物死亡,不引起明显骨髓抑制。若采用一次最大限度试验测得 LD_{50} 大于 5 000 mg/kg 体重,即以 5 000 mg/kg 体重为高剂量。阳性对照组选用环磷酰胺(40 mg/kg 体重)或丝裂霉素(1 mg/kg~1.5 mg/kg 体重)。阴性(溶剂)对照组用受试物溶剂。

6.8.4.5 操作程序

6.8.4.5.1 动物染毒采用经口灌胃 30 h 染毒法,即两次染毒间隔 24 h,第二次染毒后 24 h 取材。

6.8.4.5.2 用颈椎脱臼法处死动物,取股骨或胸骨。剥除肌肉,擦净血污。切断股骨或胸骨两端,暴露骨髓腔。

6.8.4.5.3 用注射器吸取 0.1 mL 小牛血清,冲洗骨髓腔。用冲洗液常规涂片,晾干或热风吹干。

6.8.4.5.4 将已干的涂片,在甲醇中固定 5 min~10 min。用姬姆萨应用液染色 10 min~15 min,然后用 pH 6.8 PBS 液冲洗,晾干。

6.8.4.5.5 阳性与阴性对照组的操作程序同实验组。

6.8.4.5.6 选择细胞分布均匀、完整、着色适当的区域。在油镜下计数含微核的嗜多染红细胞(PCE)数。成熟红细胞(NCE)呈粉红色,而 PCE 呈灰蓝色,微核多呈圆形、边缘光滑、整齐,嗜色性与有核细胞核质一致,呈紫红色或蓝紫色。直径通常为红细胞的 $1/20\sim 1/5$ 。

6.8.4.5.7 每只动物计数 1 000 个 PCE。微核细胞率指含有微核的 PCE 数,以千分率表示。一个 PCE 中出现有两个或多个微核,仍按一个计数。此外,还应观察 PCE/NCE 比例,作为对细胞毒性的指标。一般计数 200 个 PCE,同时记数所见到的 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。

6.8.4.6 评价规定

6.8.4.6.1 阴性对照组小鼠,微核细胞率一般不超过 0.3%。

6.8.4.6.2 用泊松分布、二项分布或其他适当的统计学检验试验方法处理。当各剂量组与溶剂对照组相比,微核细胞率升高,且有统计学意义,并有剂量-反应关系,或仅一个剂量组微核细胞率有统计学意义的升高,并经重复试验证实时,均可判为受试物具有体内染色体损伤作用。

6.8.5 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验

6.8.5.1 目的

用细胞遗传学方法检测实验动物骨髓细胞染色体畸变率,评价消毒剂的致突变性。

6.8.5.2 试剂

- 6.8.5.2.1 阳性对照物:常用环磷酰胺,丝裂霉素 C 等。
- 6.8.5.2.2 秋水仙素溶液(0.04%):见 6.8.3.2.8。
- 6.8.5.2.3 甲醇-冰醋酸(3:1,体积比)固定液:临用现配。
- 6.8.5.2.4 姬姆萨染液:见 6.8.2.2.10。
- 6.8.5.2.5 磷酸盐缓冲液(PBS,0.067 mol/L,pH 7.4)。
- 6.8.5.2.6 氯化钾溶液(0.075 mol/L)。

6.8.5.3 实验动物

成年小鼠(体重 25 g~30 g),或大鼠(体重 180 g~220 g)。动物总数不少于 30 只,雌雄各半。

6.8.5.4 试验分组

随机分为 5 组。至少 3 个受试物剂量组,为 $1/2LD_{50}$ 、 $1/5LD_{50}$ 、 $1/20LD_{50}$ 。若采用一次最大限度试验,测得 LD_{50} 大于 5 000 mg/kg 体重,即以 5 000 mg/kg 体重为高剂量。另设阳性对照组和阴性(溶剂)对照组,每组 6 只动物,雌雄各半。阳性对照组可用环磷酰胺(40 mg/kg 体重)或丝裂霉素 C(1.5 mg/kg~2 mg/kg 体重)。阴性(溶剂)对照组采用受试物溶剂。

6.8.5.5 操作程序

- 6.8.5.5.1 用经口灌胃方式,共染毒两次,间隔 24 h。于第二次染毒后 6 h 处死动物。处死动物前 2 h~4 h 腹腔注射 0.04%秋水仙素溶液,剂量为 4 mg/kg 体重。
- 6.8.5.5.2 用颈椎脱臼法处死动物,取出股骨,剔除肌肉等组织。
- 6.8.5.5.3 剪去股骨两端,用注射器吸取 5 mL 生理盐水,从股骨一端注入,用 10 mL 离心管从股骨另一端接取流出的骨髓细胞悬液。
- 6.8.5.5.4 将骨髓细胞悬液离心(1 000 r/min,5 min~7 min),除上清液。加 0.075 mol/L 氯化钾溶液 7 mL,用滴管将细胞轻轻混匀,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中低渗处理 7 min。
- 6.8.5.5.5 加入 2 mL 甲醇-冰醋酸固定液,混匀。离心(1 000 r/min,5 min~7 min),弃上清液。再加入 7 mL 固定液,混匀,固定 7 min。离心(1 000 r/min,7 min),弃去上清液。
- 6.8.5.5.6 用同法再固定 1 次~2 次,弃上清液,加入数滴新鲜固定液,混匀。
- 6.8.5.5.7 用悬液滴片,晾干,以姬姆萨应用液染色。
- 6.8.5.5.8 每组各选 100 个染色体分散良好的中期分裂相细胞,进行染色体畸变分析,观察和记录染色体结构的异常和数量的异常。染色体结构异常可有:断裂、微小体、有着丝点环、单体互换、双微小体、裂隙、粉碎化等。染色体数量的异常可有:非整倍体、多倍体、内复制等。
- 6.8.5.5.9 计算畸变细胞率。畸变细胞率为 100 个中期分裂相细胞中有染色体畸变的细胞数。一个中期分裂相细胞出现两种或多种畸变,仍按一个有染色体畸变细胞计。
- 6.8.5.5.10 阳性与阴性(溶液)对照组的操作程序同实验组。只是阳性组选用环磷酰胺(40 mg/kg 体重)或丝裂霉素(1.5 mg/kg~2.0 mg/kg 体重)作为受试物的替代物。阴性(溶剂)对照组用受试物溶剂作为受试物的替代物。

6.8.5.6 评价规定

用 χ^2 检验或其他适当的统计学检验方法对所得试验数据进行统计学处理。当各剂量组与阴性(溶剂)对照组相比,畸变细胞率升高,且有统计学意义,并有剂量-反应关系时;或仅一个剂量组畸变细胞率有统计学意义的升高,并经重复试验证实时,可判为该受试物在本试验中具有致突变性。

6.8.6 程序外 DNA 修复合成试验

6.8.6.1 目的

检测受试物是否可引起体外哺乳动物细胞的原发 DNA 损伤。推荐用放射自显影法进行测定。

6.8.6.2 试剂

6.8.6.2.1 完全培养液:用 Eagle 最低要求培养基(EMEM)85 份加小牛血清 15 份,青霉素(终末浓度 100 IU/mL)与链霉素(终末浓度 100 μ g/mL),pH 7.2~7.4。过滤除菌后,保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

6.8.6.2.2 同步培养液:用不含精氨酸的 EMEM 培养基 98 份,加小牛血清 2 份,再加青霉素(终末浓度 100 IU/mL)与链霉素(终末浓度为 100 μ g/mL)配制而成。

6.8.6.2.3 小牛血清:见 6.8.2.2.2。

6.8.6.2.4 无钙镁磷酸盐缓冲液(无钙镁 PBS):见 6.8.1.2.5。

6.8.6.2.5 胰蛋白酶-EDTA 溶液:见 6.8.2.2.4。

6.8.6.2.6 甲醇-冰醋酸(3:1,体积比)固定液:临用现配。

6.8.6.2.7 肝微粒体酶混合液(S-9 混合液):见 6.8.1.2.9。

6.8.6.2.8 显影液及定影液:包括柯达(Kodak)D-196 显影液、停显液及 F-5 定影液。

6.8.6.2.9 羟基脲(HU)贮备液(250 mmol/L)。

6.8.6.2.10 1%枸橼酸钠溶液。

6.8.6.2.11 3 H-胸腺嘧啶核苷。

6.8.6.2.12 NTB-2 核乳胶或国产核-4 乳胶。

6.8.6.3 细胞

可选用人成纤维细胞、大鼠原代肝细胞、外周血淋巴细胞等进行试验,宜使用人胚肺成纤维细胞(2BS)。

6.8.6.4 试验分组

受试物可设 4 个剂量组。最高剂量组应使细胞存活率在 10%~20%之间。无毒性受试物最高剂量不超过 10 mmol/mL。同时应有阳性对照组和阴性(未处理、溶剂)对照组。阳性对照组用阳性对照物代替受试物,阴性(溶剂)对照组用受试物溶剂代替受试物。

6.8.6.5 人胚肺成纤维细胞(2BS)放射自显影法操作程序

6.8.6.5.1 将细胞增殖至所需数量后,用完全培养液制成单细胞悬液,浓度为 0.5×10^5 个/mL~ 1.0×10^5 个/mL。将细胞悬液接种至有小盖玻片的 6 孔细胞培养板中,在 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱内培养 1 d~3 d,至细胞 50%融合。每一剂量组和各对照组分别作 2 个~3 个平行样本。

6.8.6.5.2 换用同步培养液,培养 3 d。

6.8.6.5.3 在试验的前一日下午,加入羟基脲(HU)贮备液使 HU 的终末浓度为 10 mmol/L。继续在 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下培养 16 h,然后将上述长有细胞的盖片置于含有不同浓度的受试物、HU(10 mmol/L)及 3 H-胸腺嘧啶核苷(13.5 kBq/mL~27 kBq/mL, 8.11×10^7 kBq/mmol)同步培养液中。在 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 5 h。

6.8.6.5.4 阳性及阴性对照组的操作程序同实验组,只是阳性对照组用阳性对照物代替受试物,阴性(溶剂)对照组用受试物溶剂代替受试物。

6.8.6.5.5 处理结束后,用 Hanks 液洗涤 3 次,再用 1%枸橼酸钠溶液处理 10 min。将小盖玻片用甲

醇-冰醋酸固定液固定 30 min,重复 2 次。干燥过夜,将有细胞的盖玻片用少量中性树胶,粘固于载玻片上,长有细胞的一面朝上。

6.8.6.5.6 在暗室中,将适量的 NTB-2 乳胶(或核-4 乳胶)移入浸渍用的玻璃器皿中,置于 40 °C 水浴中融化,再加入等量 40 °C 蒸馏水,继续在水浴中加温,用玻璃棒轻轻搅拌 10 min~20 min,使气泡逸出。同时将准备做自显影处理的载玻片,置水浴箱平台上预热。而后,将附有样本的载玻片垂直浸渍于乳胶液中约 5 s。提出玻片,拭去其背面乳胶并待其干固。

6.8.6.5.7 将干固的附有样本的载玻片置于有变色硅胶干燥剂袋的曝光盒中,盒外包黑色避光纸,于 4 °C 冰箱中曝光 10 d。曝光后,将玻片在 D-19 显影液中显影 4 min,在停显液中漂洗 30 s,在 F-5 定影液中定影 10 min,再用水漂洗数小时。

6.8.6.5.8 细胞在显影后用姬姆萨染液染色,脱水透明后,用盖片封固。在油镜下,计数各样本细胞核的显影银粒数,每个样本计数 100 个细胞,同时计数相当面积的本底银粒数,两者之差为细胞核净银粒数。计算各实验组和对照组“银粒数/核”的均值及其标准差。

6.8.6.6 评价规定

用 t 检验或其他适当的统计学检验方法处理,当各试验剂量组“银粒数/核”均值比阴性(溶剂)对照组者升高,且有统计学意义,并呈剂量-反应关系时;或仅一个剂量组有统计学意义的升高,但经重复试验证实者,可判为该受试物诱导了 DNA 修复合成,具有 DNA 损伤作用。

6.8.7 小鼠精原细胞染色体畸变试验

6.8.7.1 目的

利用细胞遗传学方法,以哺乳动物体内试验检测受试物引起的生殖细胞染色体损伤。

6.8.7.2 试剂

6.8.7.2.1 受试物:用水、植物油配成溶液,或用 0.5% 羧甲基纤维素钠制成混悬液。

6.8.7.2.2 阳性对照物:常用环磷酰胺,或丝裂霉素。

6.8.7.2.3 秋水仙素溶液(0.04%):见 6.8.3.2.8。

6.8.7.2.4 甲醇-冰醋酸(3:1,体积比)固定液:临用现配。

6.8.7.2.5 姬姆萨染液:见 6.8.2.2.10。

6.8.7.2.6 枸橼酸三钠。

6.8.7.3 实验动物

选用 3 月龄~4 月龄,体重 25 g~30 g 的雄性小鼠。动物总数不少于 25 只。

6.8.7.4 试验分组

受试物至少设 3 个试验剂量组,每个剂量组 5 只动物。另设阳性对照组和阴性(溶剂)对照组。阳性对照组用环磷酰胺(40 mg/kg 体重)或丝裂霉素 C(1.5 mg/kg 体重~2 mg/kg 体重),腹腔注射。

6.8.7.5 操作程序

6.8.7.5.1 用经口灌胃方式,共染毒两次,间隔 24 h。于第二次染毒后 6 h 处死动物。处死动物前 3.5 h~5.0 h 腹腔注射 0.04% 秋水仙素溶液,剂量为 4 mg/kg 体重。

6.8.7.5.2 用颈椎脱臼法处死小鼠,取睾丸,去除脂肪。置含 2.2% 枸橼酸三钠溶液平皿中去除睾丸被膜,用针头使曲精小管松散。一个动物的 2 个睾丸可分别或合并处理。

6.8.7.5.3 用吸管尽可能去除 2.2%枸橼酸三钠溶液,将曲精小管置于含 3 mL~4 mL 低渗液(1%枸橼酸三钠)的试管中。10 min 后更换低渗液,以去除碎片和精子。在室温下,低渗时间总计不超过 25 min。低渗结束后去除低渗液。加入预冷的固定液(甲醇-冰醋酸),固定 10 min 后,更换固定液,再固定 10 min。第 3 次固定至少 30 min,也可在冰箱中过夜。用镊子将已固定的曲精小管移到含 50%醋酸 5 mL 的离心管中,吸管吹打至不透光,离心(1 000 r/min,5 min)。

6.8.7.5.4 将固定液 1.0 mL~1.5 mL 加至离心所得细胞沉淀物中。滴管吹打后,滴 2 滴至用 70%乙醇浸湿的玻片,分散后,热风干燥。

6.8.7.5.5 用姬姆萨应用液在室温染色 10 min,自来水淋洗两次。

6.8.7.5.6 以油镜检查染色体结构的异常情况。每只动物做两个睾丸,每个睾丸分析 50 个中期分裂相精原细胞。记录观察染色体型和染色单体型染色体的结构异常。检查染色体数目异常时,记录非整倍体和多倍体。

6.8.7.6 评价规定

用 χ^2 检验或其他适当的统计学检验方法对所得试验数据进行统计学处理。当各剂量组与阴性(溶剂)对照组相比,畸变细胞率升高,且有统计学意义,并有剂量-反应关系时;或仅一个剂量组有统计学意义的升高,经重复试验证实后,可判为该受试物对哺乳动物睾丸细胞具有致突变性。

6.9 亚慢性毒性试验

6.9.1 目的

6.9.1.1 检测消毒剂较长期染毒对实验动物的毒性作用及其靶器官,并确定其最大未观察到有害作用剂量。

6.9.1.2 为慢性毒性和致癌试验的剂量设计提供依据。

6.9.2 实验动物

一般用啮齿类动物,首选大鼠。所用大鼠应为 4 周龄~6 周龄者。全部试验至少用 80 只动物。

6.9.3 试验分组

将实验动物随机分为 4 组(3 个剂量组和 1 个对照组),每组 20 只动物,雌雄各半。选择受试物剂量时,高剂量组应出现明显的毒性反应,但不引起死亡,如果出现动物死亡应不超过 10%;中间剂量组应可观察到轻微的毒性效应;低剂量组应不引起任何毒性效应(属未观察到有害作用剂量)。至于具体的剂量选择,可考虑高剂量为 LD_{50} 的 $1/20 \sim 1/5$,高、中、低 3 个剂量间的组距以 3 倍~5 倍为宜,最低不小于 2 倍。另以受试物溶剂代替受试物进行试验,作为阴性对照组。

6.9.4 操作程序

6.9.4.1 采用灌胃方式或将受试物掺入饲料经口染毒。

6.9.4.2 灌胃法每天灌胃一次,每周称体重,并按体重调整受试物给予量。如受试物掺入饲料时,应定期称饲料消耗量,计算消毒剂摄入量。

6.9.4.3 试验期为 3 个月(90 d),末次染毒后 24 h 处死实验动物,检测各项观察指标。

6.9.5 观察指标

6.9.5.1 临床观察:观察动物中毒表现,每周称量体重一次,食物消耗量至少 1 次~2 次。

6.9.5.2 血液学检查:包括血红蛋白含量、红细胞数、白细胞及其分类计数、血小板数、网织红细胞数等。

6.9.5.3 血液生物化学检查:例如天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶、尿素氮、肌酐、血清总蛋白和白蛋白、总胆固醇、总胆红素等。必要时,可根据所观察到的受试物毒性效应,或与受试物化学结构相似物质的毒性作用,选择其他一些生化指标。

6.9.5.4 脏器重量:测量主要脏器(如肝、肾、脾、睾丸等)的脏器重量和脏器系数(脏器重/体重 $\times 100\%$)。

6.9.5.5 病理学检查:实验结束时,处死所有动物,进行系统解剖和肉眼观察,并将主要器官和组织(如心、肺、肝、肾、脾、脑、肾上腺、睾丸、卵巢、胃肠和系统解剖时发现的异常组织等)固定、保存。当各剂量组动物尸检未发现明显病变时,先进行高剂量组和阴性对照组动物肝、肾、胃、肠及其他重要的和可能受损的脏器的组织病理学检查。如发现病变,还应对中、低剂量组动物相应的器官进行组织病理学检查。

6.9.6 评价规定

将各实验组动物观察指标与阴性对照组加以比较并进行统计学检验,注意各剂量组间的剂量-反应(效应)关系。评定受试物最小观察到有害作用剂量和最大未观察到有害作用剂量及毒性作用的靶器官。

6.10 致畸胎试验

6.10.1 目的

检测消毒剂对妊娠实验动物有无致畸胎性,确定其未观察到发育毒性的剂量。

6.10.2 试剂

6.10.2.1 1/1 000 茜素红溶液:茜素红 0.1 g,氢氧化钾 10 g,加蒸馏水 1 000 mL。

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

6.10.2.3 透明液 B:甘油与蒸馏水等量混合。

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

6.10.3 实验动物

试验用大鼠或小鼠(必要时可用家兔)。用大鼠和小鼠试验时,取健康、性成熟、未交配过的体重为 200 g~250 g 的大鼠,或体重为 25 g~30 g 的小鼠。

6.10.4 试验分组

至少设 4 组,其中 3 个为实验组,1 个为阴性对照组。每组至少有 15 只孕鼠。高剂量组可用雌鼠的 $1/10LD_{50}$ 作为试验剂量;低剂量组,可用雌性动物的 $1/100LD_{50}$ 作为试验剂量。其间设中剂量组。阴性对照组以受试物的溶剂代替受试物进行试验。阳性对照组常用阿司匹林(270 mg/kg 体重~280 mg/kg 体重)、敌枯双(1 mg/kg 体重)或维生素 A(40 000 IU)。对于实验室首次进行的动物品种或品系应设阳性对照组。为了保证试验方法的可靠性,每隔半年应用阳性对照物检查一次。

6.10.5 操作程序

6.10.5.1 将雌鼠和雄鼠按 1:1 或 2:1 的比例同笼饲养。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 5 d 内未交配,调换雌鼠。查出的孕鼠按上述随机分组,并进行称重和编号。

6.10.5.2 在大、小鼠孕期 6 d~15 d 期间,每天用灌胃法给予受试物。分别于孕期 0 d、6 d、10 d、15 d 和 20 d 称重孕鼠,并根据体重调整受试物给予量。注意观察并记录孕鼠的毒性反应。

6.10.5.3 大鼠于孕期第 20 天,小鼠于孕期第 18 天,用颈椎脱臼法处死。剖腹,取出子宫称重,检查活胎、吸收胎、早期死胎和晚期死胎数。

6.10.5.4 逐个记录活胎鼠的性别、体重、身长和尾长。外观检查头面部、躯干部、四肢等有无畸形,诸如皮下出血、露脑、脑膨出、眼部畸形(无眼或开眼等)、鼻孔扩大、单鼻孔、唇裂、脊柱裂、四肢和尾畸形、肛门闭锁等。

6.10.5.5 每窝取约 $1/2 \sim 2/3$ 活胎鼠,用眼科镊剥皮。取出内脏(注意勿拉断肋骨),去掉后颈和两肩胛骨之间的脂肪块。将胎鼠放入茜素红溶液染色。当天摇动玻璃瓶 2 次~3 次。待骨骼染成红色时为止。将胎鼠换入透明液 A 中 1 d~2 d,换入透明液 B 中 2 d~3 d。待胎鼠骨骼已染红,而软组织的紫红色基本褪去,可换置甘油中。

6.10.5.6 将染好的标本连同甘油一并倒入含水平皿内,在解剖显微镜下,用透射光源,先观察胎鼠全身,然后逐步检查:

- a) 头骨、胸骨、脊椎骨、肋骨和四肢等有无骨化不全、骨化迟缓和其他缺陷;
- b) 观察脊椎骨有无缺失、融合、纵裂等畸形;
- c) 观察胸骨的发育和数目,有无胸骨缺失等;
- d) 检查肋骨有无融合肋、分叉肋、肋骨中断、缺肋、短肋、波状肋、多肋畸形等;
- e) 最后检查四肢骨畸形。

6.10.5.7 每窝取约 $1/3 \sim 1/2$ 活胎鼠浸入固定液 2 周,作内脏检查。将已固定的胎鼠用水冲净,仰放于石蜡板上。剪去四肢和尾,用刀片在头颈部常规共切 4 刀,再用剪刀剖开胸、腹腔。着重检查:

- a) 有无裂舌、双叉舌、裂腭及眼、鼻和脑部的畸形;
- b) 是否出现右位心、心脏过大、肺过大或过小等畸形;
- c) 消化系统和泌尿生殖系统各器官的大小、形状以及位置;
- d) 有无肾盂积水,双侧有无睾丸,以及子宫发育不全等畸形。

6.10.6 观察指标

6.10.6.1 主要观察动物畸胎出现率,同时观察其他指标,如着床数、活胎数、晚期死胎数、早期死亡数,以及活胎体重、身长、尾长等。

6.10.6.2 观察全部结果的剂量-反应关系,确定受试物的母体毒性、发育毒性及致畸性。求出受试物的最小致畸剂量和最大无致畸作用剂量。对致畸强度应以致畸指数表示。

6.10.6.3 按式(11)计算致畸指数:

$$TI = \frac{LD_{50}}{TD_{min}} \dots\dots\dots (11)$$

式中:

TI ——致畸指数;

LD_{50} ——雌鼠 LD_{50} ;

TD_{min} ——最小致畸剂量。

6.10.7 评价规定

致畸指数小于或等于 10 为基本不致畸;10~100 为致畸;大于 100 为强致畸。

6.11 慢性毒性试验

6.11.1 目的

检测受试物长期染毒对实验动物所产生的毒性作用,确定其最小观察到有害作用剂量,最大未观察到有害作用剂量及毒性作用的靶器官。

6.11.2 实验动物

试验选用刚离乳的大鼠。在试验结束时,每个剂量组每种性别的动物应不少于 10 只。中间需要活杀动物检查时,应相应增加实验动物数量。

6.11.3 试验分组

将实验动物随机分在 3 个剂量组和 1 个阴性对照组。阴性对照组除不接触消毒剂外,其他与实验组相同,若在试验中对受试物使用溶剂或赋形剂时,阴性对照组应给予相应剂量的溶剂或赋形剂。试验剂量根据亚慢性试验结果选择。高剂量应引起明显的毒性效应甚至个别动物死亡,低剂量应不引起毒性效应。

6.11.4 操作程序

6.11.4.1 用灌胃法或将受试物掺入饲料或饮水中喂饲。掺入饲料的受试消毒剂的最高浓度一般不超过 5%。饲料中受试消毒剂应定期监测,观察其均匀性和稳定性。

6.11.4.2 灌胃法每天给药 1 次。

6.11.4.3 前 3 个月每周称量体重,3 个月后每月称 1 次体重,调整受试物灌胃量。如受试物掺入饲料,应定期称饲料消耗量。如受试物溶于饮水中喂饲,应记录动物的饮水量。

6.11.4.4 试验期限为一般为 6 个月,必要时可延长至 2 年。

6.11.5 观察指标

6.11.5.1 与亚慢性毒性试验基本相同,也可根据受试物对实验动物的亚慢性毒性作用和靶器官,可适当增加或更换一些针对性更强更灵敏的观察指标。

6.11.5.2 临床观察:观察中毒表现,体重前 3 个月每周 1 次,以后每月 1 次。

6.11.5.3 血液学检查:于试验的第 3 个月、第 6 个月及以后每半年进行 1 次血液学检查。

6.11.5.4 血液生化检查:检查时间同血液学检查。

6.11.5.5 病理学检查:包括如下内容:

- a) 系统解剖:所有实验动物包括试验过程中死亡的动物都应进行完整的系统解剖和详尽的肉眼观察。肉眼可见的异常组织都应留样作进一步组织病理学检查。
- b) 脏器重量:称取脑、肝、肾、脾和睾丸重量并计算脏器系数。
- c) 组织学检查:对照组、高剂量组动物及系统解剖发现异常的组织均应作详尽的组织学检查。当高剂量组有异常发现时,其他剂量组才进行相应检查。检查脏器一般包括脑、心、肺、肝、脾、肾、胃、肠、肾上腺、甲状腺、垂体、睾丸(卵巢)和子宫等。

6.11.6 评价规定

比较各剂量组与对照组观察指标的变化。计算分析其剂量-反应关系,并确定受试物最小观察到有害剂量和最大未观察到有害作用剂量,及毒性作用靶器官。

6.12 致癌试验

6.12.1 目的

检测长期接触消毒剂后实验动物出现肿瘤的情况,评价其致癌性。也可将致癌试验和慢性毒性试验结合在一批动物中进行。

6.12.2 实验动物

以刚离乳的大鼠或小鼠进行试验。如与慢性毒性试验结合进行,通常选用大鼠。各剂量组和阴性对照组使用的有效动物数,至少雌雄各 50 只。如与慢性毒性结合进行,试验中间需要处死动物进行检查时,应相应增加实验动物数。

6.12.3 试验分组

实验动物分组按 6.11.3 的要求进行,一般设 3 个剂量组与 1 个阴性对照组。根据亚慢性试验结果选择剂量。最高剂量组为最大耐受剂量,可引起轻度毒性效应,但不能因肿瘤以外因素明显缩短其生命期限。最低剂量组应不影响动物正常的生长、发育和寿命,即不引起任何毒性效应。中间剂量处于最高和最低剂量之间。若在试验中对受试物使用溶剂或赋形剂时,阴性对照组应以相应的溶剂或赋形剂进行试验。

6.12.4 操作程序

6.12.4.1 将受试物灌胃或掺入饲料或饮水中喂饲。掺入饲料中的受试物最高浓度不应超过 5%。如用灌胃法,每天给药 1 次。

6.12.4.2 前 3 个月每周称体重,3 个月后每月称体重,并调整受试物的灌胃量。每周称饲料消耗量 1 次。若受试物溶于饮水中喂饲,应记录饮水量。试验期应包括动物正常寿命期的大部分时间,大鼠为 2 年以上,小鼠为 18 个月以上。

6.12.4.3 试验过程中,除观察一般临床症状外,着重观察动物的肿瘤发生情况。对每一肉眼可见或可触及的肿瘤,其出现的时间、部位、大小、外形和发展情况均应有记录。

6.12.4.4 凡在试验过程中死亡或濒死而提前处死,以及试验结束全部处死的动物,均应进行完整的尸检及系统的、全面的、详细的器官和组织的病理学检查。对肉眼可见肿瘤或可疑病变组织,对试验过程中死亡或濒死而提前处死的动物,高剂量组和对照组的全部动物,均应进行全面的病理组织学检查。如果高剂量组肿瘤、癌前病变或增生的发生率和阴性对照组者相比,差别有统计学意义时,则中、低剂量组所有动物的有关器官和组织均应进行病理组织学检查。若高剂量组存活动物数显著少于对照组或存在影响肿瘤发生的毒作用时,则中剂量组也应按上述高剂量组的要求进行系统检查。

6.12.4.5 若致癌试验和慢性毒性试验结合在一起进行,还应按慢性毒性试验的要求,对有关指标进行观察和记录。

6.12.5 评价规定

6.12.5.1 肿瘤发生率

按式(12)计算肿瘤发生率:

$$TR = \frac{M}{n} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (12)$$

式中:

TR ——肿瘤发生率,整个实验终了时瘤动物总数在有效动物总数中所占的比例,%;

M ——试验终了时患肿瘤动物数;

n ——有效动物数,最早出现肿瘤时的存活动物总数。

6.12.5.2 致癌试验阳性的判断标准

6.12.5.2.1 阴性对照组动物出现的一种或数种肿瘤,实验组均有发生且发生率超过前者。

6.12.5.2.2 实验组发生阴性对照组未有的肿瘤。

6.12.5.2.3 实验组肿瘤发生的时间早于阴性对照组者。

6.12.5.2.4 实验组每个动物的平均肿瘤数超过阴性对照组者。

6.12.5.3 致癌试验阴性结果的确立

假如动物试验规模为两种种属、两种性别,至少 3 个剂量,其中一个接近最大耐受剂量,每组动物至少 50 只,实验组肿瘤发生率与对照组无差异,则致癌试验结果为阴性。

6.12.5.4 试验报告

在结果报告中,应写明所发现肿瘤的部位、数量、性质、癌前病变、其他毒性效应,以及剂量-反应关系及统计学分析结果。

7 对消毒剂的安全性评价

7.1 对第一阶段毒理试验的评价



7.1.1 在急性经口毒性试验中, $LD_{50} \geq 5\,000\text{ mg/kg}$ 体重,消毒剂符合要求;对于稀释使用的消毒剂,当 $LD_{50} < 5\,000\text{ mg/kg}$ 体重时,则增做消毒剂最高应用浓度 5 倍溶液的急性经口毒性试验,如增做的实验结果 $LD_{50} > 5\,000\text{ mg/kg}$ 体重,消毒剂符合要求;否则,应增做消毒剂原形样品的亚急性经口毒性试验。

7.1.2 在急性吸入毒性试验中, $LC_{50} \geq 10\,000\text{ mg/m}^3$,消毒剂符合要求; $1\,000\text{ mg/m}^3 \leq LC_{50} < 10\,000\text{ mg/m}^3$ 时,在产品使用说明书中应增加警示; $LC_{50} < 1\,000\text{ mg/m}^3$ 时,应放弃使用。

7.1.3 在皮肤刺激试验中,如结果为无刺激或仅具轻度刺激作用,消毒剂符合要求。

7.1.4 在急性眼刺激试验中,如对眼无刺激性或具有轻刺激性,消毒剂符合要求;否则,应放弃使用。

7.1.5 在阴道黏膜刺激试验中,如对阴道黏膜无刺激性或轻度刺激性,消毒剂符合要求;否则,应放弃使用。

7.1.6 在皮肤变态反应试验中,如对皮肤仅具有极轻度致敏作用,消毒剂符合要求;否则,应放弃使用。

7.2 对第二阶段毒理试验的评价

7.2.1 在亚急性试验中,如各剂量组均未观察到毒性作用,消毒剂符合要求;否则,根据实验的最小观察到有害作用剂量或最大未观察到有害作用剂量(以 mg/kg 计),在参考消毒剂的毒理作用特点和使用条件,是否放弃使用或再进行下阶段毒理试验,由专家评定。

7.2.2 对新消毒剂所进行的分别反映基因水平、体细胞染色体水平和性细胞染色体水平的 3 种类型致突变试验中,如有 2 种或 3 种类型试验结果为阳性,该消毒剂不符合要求应放弃。若仅 1 种类型试验为阳性,应再增做另一项同类型致突变试验,如结果为阴性,消毒剂符合要求;否则,该消毒剂亦应放弃使用。

7.2.3 对一般消毒剂的 1 项致突变试验中,如结果为阴性,消毒剂符合要求;如结果为阳性,应增做其他的 2 项致突变试验(包括反映基因水平和染色体水平各 1 项)。如果在这 2 项试验中结果均为阴性,消毒剂符合要求;如果还出现阳性结果,不符合要求,应放弃使用。

7.3 对第三阶段毒理试验的评价

在亚慢性毒性试验和(或)致畸胎试验中,如各剂量组均未观察到毒性作用,消毒剂符合要求;否则,是否放弃使用或增做下阶段毒理试验,由专家评定。

7.4 对第四阶段毒理试验的评价

如果在慢性毒性试验和(或)致癌试验中,结果未观察到毒性作用,消毒剂符合要求;否则,应放弃使用。