191020340175

中国认可
国际互认
检测
TESTING
CNAS L13034

检 验 报 告

报告编号： CSTBB20080835

扫码查询：

委 托 方 广州正康医疗器械有限公司

样品名称 医用防护口罩

型号/规格 ZKM-02

检验类别 注册检验（ ）

注册补充检验（ ） _____

其他检验（√） 委托检验

中检华通威国际检验(苏州)有限公司

注 意 事 项

一、报告无检测机构检验报告专用章或检验单位公章无效。

二、报告未经检测机构书面批准不得复制。

三、复制报告未重新加盖检测机构检验报告专用章或检验单位公章无效。

四、报告无批准人签字无效。

五、报告涂改无效。

六、对报告若有异议，应于收到报告之日起十五日内以书面方式向检验单位提出，逾期不予受理。

七、报告仅对所检样品检测项目的检测结果负责。

地　　址：江苏省苏州市工业园区若水路 388 号 G101 室。

电　　话：0512-87657288

传　　真：0512-87657103

邮政编码：215123

中检华通威国际检验(苏州)有限公司

生 物 学 评 价 试 验 报 告 首 页

报告编号：CSTBB20080835

样品名称	医用防护口罩	样品编号	YPST20080230002
商　　标	/	型号规格	ZKM-02
委托方	广州正康医疗器械有限公司	检验类别	委托检验
委托方地址	广州市白云区太和镇南岭中心扩路9号101房	样品批号	2020080502
生产单位	广州正康医疗器械有限公司	生产日期	2020/8/5
受检单位	广州正康医疗器械有限公司	样品数量	/
收样日期	2020年08月24日	试验地点	中检华通威国际检验(苏州)有限公司
试验项目	细胞毒性试验、皮肤刺激试验、皮肤致敏试验		
试验依据	医疗器械生物学评价 第5部分：体外细胞毒性试验 GB/T 16886.5-2017 医疗器械的生物学评价第10部分：刺激与皮肤致敏试验 GB/T 16886.10-2017		
试验结果	MTT值为87.3%,无细胞毒性。 皮肤刺激指数为0，无皮肤刺激反应。 皮肤致敏阳性率为0，无皮肤致敏反应。 （检验报告专用章或检验单位公章） 签发日期2020年10月13日		
备注	1）本样品测试目的是对试验样品进行生物学评价实验，结果只适用于接受测试的试验样品。 2）报告中的“——”表示此项不适用，报告中“/”表示此项空白。		

批 准：李知宾　　审 核：王雪婷　　检 验：杨帅

职 务：经理

中检华通威国际检验(苏州)有限公司

生 物 学 评 价 试 验 报 告 内 容

报告编号：CSTBB20080835

试验摘要

序号	试验项目	试验结果	评价标准	单项结论	备注
1	体外细胞毒性	MTT 值 87.3%	若细胞活力＜空白组的70%，说明样品具有潜在的细胞毒性。	符合要求，无潜在细胞毒性	/
2	皮肤刺激试验	皮肤刺激评分 0	皮肤刺激评分 0-0.4 为无皮肤刺激反应。	符合要求，无皮肤刺激反应	/
3	皮肤致敏试验	试验动物未发现致敏阳性，阳性率为 0	对照组动物等级小于 1，而试验组中等级大于或等于 1 时一般提示致敏。	符合要求，无皮肤致敏反应	/

生 物 学 评 价 试 验 报 告 内 容

报告编号：CSTBB20080835

一、细胞毒性试验

1、概述

本研究按照 GB/T 16886.5-2017 的方法要求，使用体外培养哺乳动物 L-929 细胞，测试供试品的潜在细胞毒性作用。试验日期为 2020 年 8 月 31 日~2020 年 9 月 02 日。

将试验样品与对照样品分别放在含有 10%胎牛血清的 MEM 培养基中，于 37℃浸提 24 小时。在浸提结束后将培养 24 小时的 96 孔板（10^4 个/孔）内细胞培养基去除，换成相应浸提液，并在细胞培养箱（37℃，5% CO_2，>90%湿度）中培养 24 小时。培养结束后镜下观察细胞形态和细胞裂解情况，并采用 MTT 法测定供试品的细胞毒性值。

结果显示，空白对照组和阴性对照组（高密度聚乙烯）中细胞在整个实验过程中形态完好正常，没有显示细胞毒性反应。阳性对照组（ZDEC）中显示严重的细胞毒性反应。测试样品 100%浓度浸提液在孵育细胞 24 小时后细胞形态基本完好，细胞活力值为 87.3%。各组数据均符合验收标准，本次试验结果有效。

2、试验样品和对照样品

组别	试验样品	阴性对照样品	阳性对照样品	空白对照样品
名称	医用防护口罩	高密度聚乙烯	ZDEC	MEM 含 10% FBS
制造商	广州正康医疗器械有限公司	Hatano Research Institute. FDSC	Sigma-Aldrich.	Hyclone
规格	未提供	3 cm×10 cm 5 片	25 g	500 ml
型号	ZKM-02	/	/	/
批号	2020080502	C-161	BCBQ6847V	AF29479404
试验样品材料	无纺布、熔喷布、聚丙烯	/	/	/
性状	固体	固体	固体	液体
颜色	白色	白色	白色	粉色
包装材料	塑料袋	/	/	/
是否已灭菌	未灭菌	未灭菌	未灭菌	已灭菌
浓度	/	/	0.1%	/

表面积或重量	未提供	/	/	/
保存条件	室温	室温	室温	4℃
备注说明：试验样品信息是由样品委托单位提供。				

3、主要仪器及材料

（1）主要仪器

立式蒸汽灭菌器（编号 SHB026），CO_2 培养箱（编号 SHB002），钢直尺（编号 SHB076），电子天平（编号 SHB016），洁净工作台（编号 SHB014），低速自动平衡离心机（编号 SHB022），Multiskan™ Sky 酶标仪（编号 SHB003），倒置显微镜(含成像)（编号 SHB005）

（2）主要试剂

MEM 培养基（来源：Hyclone，批号：AF29479404），胎牛血清（来源：Clark，批号：JC65941），青链霉素（来源：Gibco，批号：2145469），胰蛋白酶（来源：Gibco，批号：2085461），PBS（来源：Hyclone，批号：AE27749269），MTT（来源：Sigma，批号：MKBG2038V），异丙醇（来源：Macklin，批号：C10954717）

4、样品制备

根据下表，将测试物品在含 10% FBS 的 MEM 培养基中浸提，于 37 ℃，5% CO_2 以及 60 rpm 条件下孵育 24 小时。

组别	取样		灭菌方式	惰性容器内无菌浸提				浸提液最终状态
	取样方式	实际取样		取样比例	浸提液	浸提条件	pH	是否澄清
试验样品	整取	379.9 cm^2	环氧乙烷	6 cm^2: 1 ml	63.3 ml	37 ℃ 24 h	7.4	澄清
阴性对照	随机	60.0 cm^2	紫外	3 cm^2: 1 ml	20.0 ml	37 ℃ 24 h	7.4	澄清
阳性对照	随机	0.02 g	过滤	0.1 g: 100 ml	20.0 ml	37 ℃ 24 h	7.4	澄清
空白对照	/	/	/	/	20.0 ml	37 ℃ 24 h	7.4	澄清

在浸提后观察浸出溶液变化的状态，在提取前和提取后未观察到颗粒或颜色变化。提取后样品立即用于实验，浸提溶液颜色和 pH 值在使用前后无变化，pH 值在浸提后为 7.4。在

相同条件下制备空白对照（MEM 培养基，添加 10%FBS）和阴性/阳性对照。

5、试验方法

（1）试验细胞

L-929 小鼠成纤维细胞系来自美国菌种保存中心（ATCC）。

（2）试验细胞选择理由

小鼠成纤维细胞 L-929 因其对细胞毒性物品的敏感性多用于细胞毒性研究，通过对测试物品浸提所得溶液在体外给予 L-929 评估测试物品的细胞毒性，是标准中推荐的测试系统中可用的最佳给药途径。

（3）试验步骤

全程在超净台内操作，保证无菌操作过程。将生长至对数生长期的细胞用 0.25%的胰蛋白酶（含 EDTA）消化，消化后将细胞悬浮液离心（1000 rpm，5 分钟），弃去上清，用 MEM 培养基重悬细胞，计数得到 1×10^5 个/ml 细胞悬液。

将细胞悬液以每孔 100 μl 接种于 96 孔板中，并在细胞培养箱（37 ℃，5% CO_2，>90%湿度)中培养，镜下观察细胞形态。

待细胞贴壁生长至 70%左右，弃去 96 孔板内原培养基，在 96 孔板相应孔内各加入 100 μl 浸提液（终浓度为 100%，75%，50%和 25%），空白对照样品，阴性对照样品和阳性对照样品。将 96 孔板置于细胞培养箱（37 ℃，5% CO_2，>90%湿度)中培养 24 小时，每组设置六个复孔。

培养 24 小时后取出 96 孔板，在显微镜下观察细胞形态，然后去除液体，每孔加入 50 μl MTT（终浓度为 1 mg/ml），置二氧化碳培养箱中培养。2 小时后去除上清，每孔加入 100 μl 异丙醇溶解结晶，在酶标仪上测定 570 nm 波长下的吸光度值，计算其细胞毒性。

（4）统计方法

均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）；

细胞活力%=试验（或阳性及阴性）样品组 OD_{570} /空白对照组 $OD_{570}\times100\%$。

（5）评价标准

浓度为 50%的样品浸提液相比于浓度为 100%的样品浸提液作用下，细胞活力应相同或者更高，否则应该重复试验；

细胞活力百分比越低，潜在的细胞毒性越大；

若细胞活力＜空白组的 70%，说明样品具有潜在的细胞毒性；

样品浸提液作用下的细胞活力以浓度为 100%的浸提液为最终结果。

6、试验结果

（1）细胞形态学结果

表 1 观察细胞形态

组	接种前细胞状态	接种后细胞状态	加样后 24 小时
空白对照	胞浆内有离散颗粒，无细胞裂解，无细胞增殖下降情况。	胞浆内有离散颗粒，无细胞裂解，无细胞增殖下降情况。	细胞贴壁生长良好，胞浆内有离散颗粒，无细胞裂解，无细胞增殖下降情况。
阴性对照			细胞贴壁生长良好，胞浆内有离散颗粒，无细胞裂解，无细胞增殖下降情况。
阳性对照			细胞层几乎完全破坏。
100%样品浸提液			偶见细胞呈圆形和细胞形态改变，胞浆内有颗粒，偶见细胞溶解，轻微生长抑制。
75%样品浸提液			细胞贴壁生长良好，胞浆内有离散颗粒，无细胞裂解，无细胞增殖下降情况。
50%样品浸提液			细胞贴壁生长良好，胞浆内有离散颗粒，无细胞裂解，无细胞增殖下降情况。
25%样品浸提液			细胞贴壁生长良好，胞浆内有离散颗粒，无细胞裂解，无细胞增殖下降情况。

（2）MTT 结果

表 2 MTT 结果

组别	OD 值								细胞活性(%)
	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	s	
空白对照	0.626	0.615	0.618	0.627	0.629	0.629	0.624	0.006	100.0
阴性对照	0.619	0.627	0.612	0.601	0.607	0.604	0.612	0.010	98.0
阳性对照	0.058	0.059	0.052	0.055	0.060	0.055	0.056	0.003	9.1
100%样品浸提液	0.533	0.540	0.550	0.541	0.556	0.548	0.545	0.008	87.3
75%样品浸提液	0.575	0.575	0.571	0.574	0.568	0.578	0.573	0.004	91.9
50%样品浸提液	0.591	0.607	0.610	0.610	0.608	0.606	0.605	0.007	97.0
25%样品浸提液	0.594	0.596	0.594	0.606	0.601	0.607	0.600	0.006	96.1

7、结论

在本试验条件下，测试物浸提液细胞相对活性为 87.3%，测试物对 L-929 细胞没有潜在的细胞毒性。

以下空白

试验：杨娜　　复核：王霄彤

日期：2020 年 09 月 02 日　　日期：2020 年 09 月 02 日

二、皮肤刺激试验

1、概述

本实验按照 GB/T 16886.10-2017 的方法要求，采用新西兰大白兔进行试验，供试品在试验条件下产生皮肤刺激反应的潜在性做出评价。试验日期为 2020 年 08 月 28 日~2020 年 09 月 04 日。

在本实验中，使用 0.9 %氯化钠注射液和芝麻油浸提样品，于 50 ℃、60 rpm 恒温培养摇床浸提 72 小时。同样条件制备阴性对照溶液。将浸饱试验样品和对照样品浸提液的纱布（约 2.5 cm×2.5 cm）直接接触动物脊柱两侧的皮肤（接触前 24 小时剃毛），然后用绷带固定贴敷至少 4 小时。结束后取下敷贴片。于 1 小时，24 小时，48 小时和 72 小时后，观察敷贴部位及周围皮肤组织反应，包括红斑、水肿和坏死等，并记录评分。

结果显示，阴性对照组（0.9 %氯化钠注射液、芝麻油）中动物在实验过程中，皮肤完好，未出现皮肤红斑、水肿和坏死。阳性对照组（SDS）动物皮肤出现红斑、水肿和坏死等明显刺激反应。供试品浸提液组动物皮肤完好，未出现红斑、水肿和坏死等反应。各组数据符合验收标准，本次试验结果有效。基于以上结果可得出结论：在本实验条件下，供试品在刺激实验中没有皮肤刺激作用。

2、试验样品和对照样品

组别	试验样品	阴性对照样品（极性）	阴性对照样品（非极性）	阳性对照样品
名称	医用防护口罩	氯化钠注射液（SC）	芝麻油（SO）	十二烷基硫酸钠（SDS）
制造商	广州正康医疗器械有限公司	石家庄四药有限公司	吉安市青原区绿源天然香料油提炼厂	SIGMA
规格	未提供	500 ml	5L	25 g
型号	ZKM-02	/	/	/
批号	2020080502	1912121907	20200528	SLBL2304V
试验样品材料	无纺布、熔喷布、聚丙烯	/	/	/

性状	固体	液体	液体	固体
颜色	白色	无色	浅黄色	白色
包装材料	塑料袋	/	/	/
是否已灭菌	未灭菌	/	/	/
浓度	/	0.9 %	/	10 %
表面积或重量	未提供	/	/	/
保存条件	室温	室温	室温	室温
备注说明：试验样品信息是由样品委托单位提供。				

3、试验动物与饲养

3.1 试验动物确认

种属：新西兰兔

数量：6 只

性别：3 ♀，3 ♂

试验初体重：2.0~3.0 kg

健康状况：健康未使用过的动物。雌性未产且无孕。

饲养：兔按组饲养在笼子内，做好标识编号、试验代号、试验开始日期等信息

动物鉴别：耳号适应期：在实验环境下 7 天

3.2 动物饲养

动物来源：无锡恒泰实验动物养殖有限公司，许可证号：SCXK（苏）2020-0003

饲料：实验兔全价颗粒饲料, 无锡恒泰实验动物养殖有限公司

水：自来水（符合 GB 5749-2006 卫生标准）

室温：18-26 ℃

相对湿度：30 %-70 %

光照：每天需要 12 小时光照，全光谱日光灯

人员：检测人员有相应检测资质

选择：选择健康未使用过的动物

食物、水、垫料中无干扰试验数据污染物存在

4、主要仪器及材料

4.1 主要仪器

立式单门双层恒温震荡器（SHB007）、高压灭菌器（SHB026）、电子精密天平（SHB017）

5、样品制备

按下表比例（样品：浸提液体积）浸提样品，于 50 ℃、60 rpm 恒温培养摇床浸提 72 小时。同样条件制备对照溶液。

取样		惰性容器内无菌浸提				
取样方式	实际取样	取样比例	浸提液		浸提条件	浸提液 pH 值
整取	379.9 cm^2	6 cm^2: 1 ml	SC	63.3 ml	50 ℃，72 h	5.5
	379.9 cm^2		SO	63.3ml		/

观察浸提前后浸提液状态改变。浸提完成后室温保存，24 h 内用于测试。浸提液使用前未经过 pH 值调整、过滤、离心、稀释等处理过程。

6、试验方法

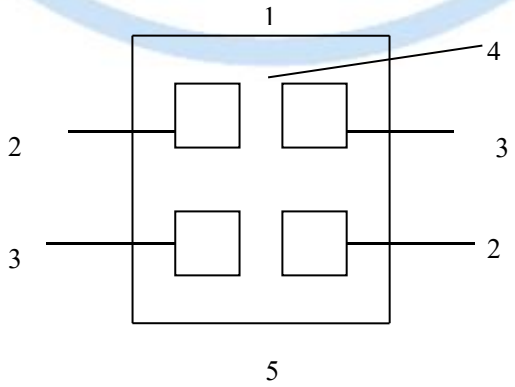
6.1 试验系统确认

依据现行试验标准，新西兰大白兔被指定作为评价皮肤刺激作用合适的动物模型。该试验采用 10 %的十二烷基硫酸钠作为皮肤刺激反应的阳性对照已经本公司试验得到证实。

6.2 试验过程

试验前 24 小时将动物背部脊柱两侧被毛除去（约 10 cm×15 cm），作为试验和观察部位。

按图 1 所示，将浸饱试验样品和对照样品浸提液的纱布直接接触兔脊柱两侧的皮肤，然后用绷带固定贴敷至少 4 小时。接触期结束后取下敷贴片。



1—头部；2—试验部位；3—对照部位；4—去毛的背部区域；5—尾部

图 1 皮肤应用部位

6.3 试验结果观察

取下敷贴片后（1±0.1）h，(24±2) h，(48±2) h 和 (72±2) h 观察敷贴部位及周围皮肤组织反应，包括红斑、水肿和坏死等记录之。根据红斑、水肿发生情况可记分为 0、1、2、3、4 标准记分等级。详见表 1。

表 1　皮肤刺激反应记分标准

红　斑	记分	水　肿	记分
无红斑现象	0	无水肿现象	0
轻度红斑(勉强可见)	1	轻度水肿(勉强可见皮肤增厚)	1
明显红斑(淡红色)	2	明显水肿(隆起而轮廓清楚)	2
中度红斑(鲜红色)	3	中度水肿(隆起近 1 mm)	3
重度红斑(紫红色伴有轻微焦痂形成)	4	重度水肿(隆起大于 1 mm)	4
刺 激 反 应 最 高 积 分			8

兔刺激反应类型	
反应种类	积分
无刺激作用	0-0.4
轻度刺激	0.5-1.9
中度刺激	2.0-4.9
严重刺激	5-8

6.4 试验结果评价

仅使用(24±2) h，(48±2) h 和 (72±2) h 的观察数据进行计算。

将每只动物在每一规定时间的红斑和水肿刺激记分相加后再除以观察总数 6（2 个试验点×3 个观察时间），即为每只动物原发性刺激记分。

三只试验动物原发性刺激记分的平均数即为原发性刺激指数。

计算出对照原发性刺激记分，将试验样品原发性刺激记分减去该记分，即得出原发性刺激记分。该值即为试验样品的原发性刺激指数。

7、试验结果

据观察，实验过程中动物未出现异常症状或死亡。据观察，试验组一侧皮肤反应未超过空白对照组一侧皮肤反应，原发性刺激指数为 0。见表 2。在该试验条件下，试验样品浸提液在兔皮肤反应类型为无刺激作用。

表 2 皮肤反应结果观察

试剂	编号	试验前体重（kg）	试验结束体重（kg）	组别	反应	间隔时间(小时)：记分=左侧/右侧			
						1±0.1 h	24±2 h	48±2 h	72±2 h
极性	1	2.10	2.24	试验样品组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
					水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
				阴性对照组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
					水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
	2	2.15	2.30	试验样品组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
					水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
				阴性对照组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
					水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
	3	2.06	2.18	试验样品组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
					水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
				阴性对照组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
					水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
原发性刺激指数						0			
非极性	4	2.17	2.33	试验样品组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
					水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
				阴性对照组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
					水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
	5	2.09	2.22	试验样品组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
					水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
				阴性对照组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
					水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
	6	2.12	2.26	试验样品组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
					水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
				阴性对照组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
					水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
原发性刺激指数						0			

表 3　皮肤刺激反应阳性对照

编号	试验组别		间隔时间(小时)：记分=左侧/右侧			
			1±0.1 h	24±2 h	48±2 h	72±2 h
1	阳性对照组	红斑	0/1	2/1	2/3	3/3
		水肿	1/0	2/2	3/2	4/3
	阴性对照组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
		水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
2	阳性对照组	红斑	0/0	1/2	3/3	4/4
		水肿	1/1	3/2	3/4	3/4
	阴性对照组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
		水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
3	阳性对照组	红斑	1/1	2/3	4/3	4/4
		水肿	1/0	2/2	4/4	4/3
	阴性对照组	红斑	0/0	0/0	0/0	0/0
		水肿	0/0	0/0	0/0	0/0
原发性刺激指数			5.8			

阳性对照实验编号：CSTBB20070001P3 (完成日期：2020-07-31)。

8、试验结论

在该试验条件下，试验样品浸提液在兔皮肤反应类型为无刺激作用。

以下空白

试验：朱永露　　复核：李晓印

日期：2020 年 09 月 04 日　　日期：2020 年 09 月 04 日

三、致敏试验（最大剂量法）

1、概述

本实验按照 GB/T 16886.10-2017 的方法要求，使用豚鼠最大剂量试验法观察供试物品的潜在皮肤致敏作用。试验日期为 2020 年 08 月 28 日~2020 年 09 月 25 日。

在本实验中，使用 0.9 %氯化钠注射液和芝麻油浸提样品，于 50 ℃、60 rpm 恒温培养摇床浸提 72 小时。同样条件制备阴性对照溶液。将配制好的浸提液与弗氏完全佐剂混合成稳定性乳化剂，在每只动物去毛的肩胛骨内侧部位皮内注射乳化剂进行皮内诱导和局部诱导。局部诱导后 14 天，在诱导阶段未试验部位进行激发试验。激发后 24 小时和 48 小时，在全光谱光线下分别观察供试品组和对照组动物激发部位皮肤反应情况，按 Magnusson 和 Kligman 分级标准对每一激发部位的皮肤红斑和水肿反应进行评分。

结果显示，阴性对照组（0.9 %氯化钠注射液、芝麻油）中动物在实验过程中，皮肤完好，未出现皮肤红斑和水肿反应。阳性对照组（DNCB）动物出现明显皮肤红斑和水肿反应。供试品浸提液组动物皮肤完好，未出现皮肤红斑和水肿反应。各组数据符合验收标准，本次试验结果有效。基于以上结果可得出结论：在本实验条件下，供试样品在致敏实验中没有皮肤致敏作用。

2、试验样品和对照样品

组别	试验样品	阴性对照样品（极性）	阴性对照样品（非极性）	阳性对照样品
名称	医用防护口罩	氯化钠注射液（SC）	芝麻油（SO）	2,4-二硝基氯苯（DNCB）
制造商	广州正康医疗器械有限公司	石家庄四药有限公司	吉安市青原区绿源天然香料油提炼厂	TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD
规格	未提供	500 ml	5L	25 g
型号	ZKM-02	/	/	/
批号	2020080502	1912121907	20200528	H2UKD-DM
试验样品材料	无纺布、熔喷布、聚丙烯	/	/	/

性状	固体	液体	液体	固体
颜色	白色	无色	浅黄色	淡黄色
包装材料	塑料袋	/	/	/
是否已灭菌	未灭菌	/	/	/
浓度	/	0.9 %	/	诱导浓度：0.5 % 激发浓度：0.1 % 溶剂为乙醇
表面积或重量	未提供	/	/	/
保存条件	室温	室温	室温	室温
备注说明：试验样品信息是由样品委托单位提供。				

3、试验动物与饲养

3.1 试验动物确认

种属：豚鼠（天竺鼠）

数量：30（试验组 20 只、对照组 10 只）

性别：15 ♀， 15 ♂

试验初体重：300.0~500.0 g

健康状况：健康未使用过的动物。雌性未产且无孕。

动物鉴别：耳标

笼子：塑料笼子

适应期：在实验环境下 7 天

3.2 动物饲养

动物来源：无锡恒泰实验动物养殖有限公司，许可证号：SCXK（苏）2020-0003

垫料：玉米芯垫料，江苏省协同医药生物工程责任有限公司

饲料：实验维持豚鼠饲料, 江苏省协同医药生物工程责任有限公司

水：自来水（符合 GB 5749-2006 卫生标准）

室温：18-26 ℃

相对湿度：30 %-70 %

光照：每天需要 12 小时光照，全光谱日光灯

人员：检测人员有相应检测资质

选择：选择健康未使用过的动物

食物、水、垫料中无干扰试验数据污染物存在。

4、主要仪器及材料

4.1 主要仪器

立式单门双层恒温震荡器（SHB007）、高压灭菌器（SHB026）、电子精密天平（SHB017）

4.2 试剂

弗氏完全佐剂（SIGMA，批号：SLCD4457）、十二烷基硫酸钠（SDS，SIGMA，批号：SLBL2304V）

5、样品制备

按下表比例（样品：浸提液体积）浸提样品，于 50 ℃、60 rpm 恒温培养摇床浸提 72 小时。同样条件制备对照溶液。

取样		惰性容器内无菌浸提				
取样方式	实际取样	取样比例	浸提液		浸提条件	浸提液 pH 值
整取	379.9 cm^2	6 cm^2: 1 ml	SC	63.3 ml	50 ℃，72 h	5.5
	379.9 cm^2		SO	63.3ml		/

二诱和激发也同条件制备，观察浸提前后浸提液状态无肉眼可见改变。浸提完成后室温保存，24h 内用于测试。浸提液使用前未经过 pH 值调整、过滤、离心、稀释等处理过程。

6、试验方法

6.1 试验系统确认

在致敏试验研究中，豚鼠被认为是最敏感的动物模型，且历史上一直用于致敏研究。该试验采用 2,4-二硝基氯苯（DNCB）作为阳性已在本公司得到试验证实。为确保阳性对照灵敏度，阳性对照每三个月进行一次。

6.2 试验过程

6.2.1 皮内诱导阶段I

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内注射 0.1 mL。

部位 A：弗氏完全佐剂与选定的溶剂以 50:50（V/V）比例混合的稳定性乳化剂。

部位 B：动物分别注射试验样品浸提液或阴性对照液。

部位 C：试验样品（部位 B 中采用的浓度），以 50:50 的体积比例与弗氏完全佐剂与溶剂（50%）配制成的乳化剂混合后进行皮内注射；对照组动物注射对照液与佐剂配制成的乳化剂。

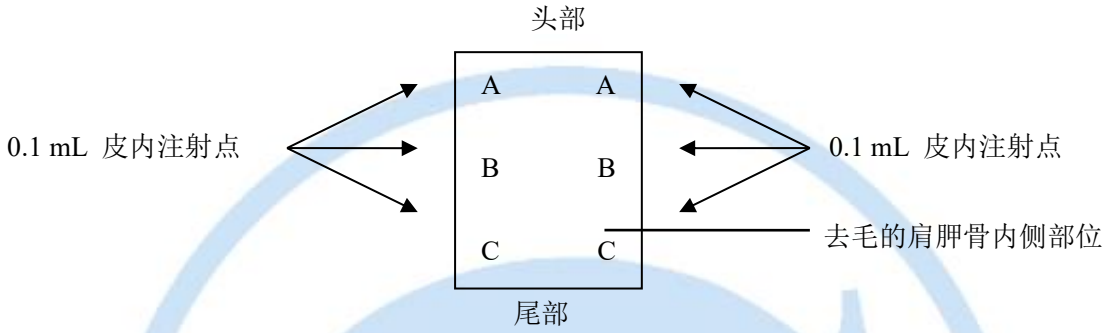


图 1 皮内注射点

6.2.2 局部诱导阶段II

皮内诱导阶段后 7 d（±1 d），去除每只动物的试验区被毛，在激发前 24h ±2 h，用 10 % 十二烷基硫酸钠（SDS）处理。在注射部位将 SDS 按摩导入皮肤产生轻微的急性炎症反应。该部位不敷贴。SDS 处理后第 2 天，用纱布轻轻清除残留的 SDS。试验组按部位 B 中选定的浓度，采用面积约 8 cm^2 的敷贴片（滤纸或吸收性纱布块）在新鲜制备的样品浸提液浸透后局部贴敷于每只动物的肩胛骨内侧部位，覆盖诱导注射点。用封闭式包扎带固定敷贴片，并于 48 h±2 h 后除去包扎带和敷贴片。对照组动物用相应对照溶液同法操作。

6.2.3 激发阶段

激发前 1 天，去除动物一侧腹背部的被毛。于局部诱导阶段后 14 d（±1 d），将滤纸或吸收性纱布块分别置于试验样品浸提液和对照液中浸透，分别贴敷于每只动物的腹背部去毛区（诱导阶段未试验部位）。用封闭式包扎带固定，并于 24h±2 h 小时后除去包扎带和敷贴片。

6.3 试验结果观察

除去样品后 24h±2 h 和 48h±2 h，分别观察供试品组和对照组动物激发部位皮肤情况，在全光谱光线下观察皮肤反应。按表 1 Magnusson 和 Kligman 分级标准对每一激发部位和每一

观察时间皮肤红斑和水肿进行描述并分级。

贴敷试验反应	等级
无明显改变	0
散发性或斑点状红斑	1
中度融合性红斑	2
重度红斑和水肿	3

表 1 Magnusson 和 Kligman 分级

6.4 试验结果评估

按表 1 Magnusson 和 Kligman 分级标准，如果对照组动物等级小于 1，而试验组中等级大于或等于 1 时一般提示致敏。

如对照组动物等级大于或等于 1 时，试验组动物反应超过对照组中最严重的反应则认为致敏。如为疑似反应，推荐进行再激发以确认首次激发结果。

试验结果显示为试验和对照动物中的阳性激发结果的发生率。

7、试验结果

试验期间，试验样品组与阴性对照组豚鼠未出现死亡及其他异常情况。皮肤评分结果见表 2。

表 2　豚鼠致敏皮肤反应

组别		编号	试验前体重(g)	最终体重(g)	去除贴敷后 24h 观察结果		去除贴敷后 48h 观察结果		阳性率
					红斑	水肿	红斑	水肿	
极性	试验样品组	1	315.2	358.7	0	0	0	0	0%
		2	312.4	351.4	0	0	0	0	
		3	304.0	361.9	0	0	0	0	
		4	306.2	376.4	0	0	0	0	
		5	302.9	376.0	0	0	0	0	
		6	310.5	373.2	0	0	0	0	
		7	305.0	381.5	0	0	0	0	
		8	304.1	375.1	0	0	0	0	
		9	317.9	365.5	0	0	0	0	
		10	304.3	366.6	0	0	0	0	
	阴性对照组	11	310.3	355.5	0	0	0	0	—
		12	303.6	355.6	0	0	0	0	
		13	307.7	361.3	0	0	0	0	
		14	305.1	362.3	0	0	0	0	
		15	306.3	365.5	0	0	0	0	
非极性	试验样品组	16	314.6	350.3	0	0	0	0	0%
		17	312.2	355.4	0	0	0	0	
		18	315.9	360.2	0	0	0	0	
		19	309.8	355.7	0	0	0	0	
		20	316.8	360.9	0	0	0	0	
		21	305.1	380.2	0	0	0	0	
		22	313.2	358.9	0	0	0	0	
		23	316.4	361.7	0	0	0	0	
		24	308.1	366.0	0	0	0	0	
		25	318.8	381.9	0	0	0	0	
	阴性对照组	26	316.7	361.1	0	0	0	0	—
		27	318.5	363.9	0	0	0	0	
		28	315.4	372.7	0	0	0	0	
		29	307.1	357.9	0	0	0	0	
		30	303.0	365.8	0	0	0	0	

表 3　阳性对照组

组别	编号	试验前体重(g)	试验后体重(g)	去除贴敷后24h 观察结果		去除贴敷后48h 观察结果		阳性率
				红斑	水肿	红斑	水肿	
试验组	1	309.8	354.0	1	0	1	0	100%
	2	307.2	352.1	2	0	2	0	
	3	306.3	360.2	1	0	1	0	
	4	314.1	382.9	1	0	1	0	
	5	307.1	351.0	1	0	2	0	
	6	318.7	352.9	1	0	2	0	
	7	312.1	374.0	1	0	1	0	
	8	310.4	358.6	1	0	1	0	
	9	303.3	366.1	2	0	2	0	
	10	308.7	354.2	1	0	2	0	
对照组	11	312.9	353.0	0	0	0	0	—
	12	307.7	359.0	0	0	0	0	
	13	303.7	353.7	0	0	0	0	
	14	307.9	372.3	0	0	0	0	
	15	310.8	380.9	0	0	0	0	

阳性对照实验编号：CSTBB20080001P1（完成日期：2020-09-11）

8、结论

在本试验条件下，该试验品未引起豚鼠皮肤致敏反应。本试验结果和结论仅适用于本测试样品。

以下空白

试验：朱永露　　复核：李晓印

日期：2020 年 09 月 25 日　　日期：2020 年 09 月 25 日

生 物 学 评 价 试 验 报 告 照 片 页

报告编号：CSTBB20080835

照片和说明
样品描述
/
型号规格或其他说明
/

报告结束