

附件 3

细菌回复突变试验方法（征求意见稿）

Bacterial Reverse Mutation Test

1 范围

本方法确定了细菌回复突变试验的基本原则、要求和方法。

本方法适用于化妆品原料及其产品的基因突变检测。

2 定义

2.1 回复突变 reverse mutation

细菌在化学致突变物作用下由营养缺陷型回变到原养型（prototroph）。

2.2 基因突变 gene mutation

在化学致突变物作用下 DNA 中碱基对的排列顺序发生变化。

2.3 碱基置换突变 base substitution mutation

引起 DNA 链上一个或几个碱基对的置换。

碱基置换有转换（transition）和颠换（transversion）两种形式。

转换是 DNA 链上的一个嘧啶被另一嘧啶所替代，或一个嘌呤被另一嘌呤所替代。

颠换是 DNA 链上的一个嘧啶被另一嘌呤所替代，或一个嘌呤被另一嘧啶所替代。

2.4 移码突变 frameshift mutation

引起 DNA 链上增加或缺失一个或多个碱基对。

2.5 细菌回复突变试验 bacterial reverse mutation assay

利用一组组氨酸或者色氨酸缺陷型试验菌株测定引起细菌碱基置换或移码突变的化学物质所诱发的氨基酸缺陷型回复突变为原养型的试验方法。

3 原理

鼠伤寒沙门氏组氨酸营养缺陷型菌株不能合成组氨酸，故在缺乏组氨酸的培养基上，仅少数自发回复突变的细菌生长；大肠杆菌色氨酸营养缺陷型菌株不能合成色氨酸，故在缺乏色氨酸的培养基上，仅少数自发回复突变的细菌生长。假如有致突变物存在，则营养缺陷型的细菌回复突变成原养型，因而能生长形成菌落，据此判断受试物是否为致突变物。

某些致突变物需要代谢活化后才能引起回复突变，故需加入经诱导剂诱导的大鼠肝制备的 S₉ 混合液。

4 仪器和设备

培养箱、恒温水浴、振荡水浴摇床、压力蒸汽消毒器、干热烤箱、低温冰箱（-80℃）或液氮生物容器、普通冰箱、天平、混匀振荡器、匀浆器、菌落计数器、低温高速离心机、玻璃器皿、生物安全柜等。

5 培养基和试剂

5.1 0.5 mmol/L 组氨酸—0.5 mmol/L 色氨酸—0.5 mmol/L 生物素溶液

成分:	L-组氨酸 (MW155)	78 mg
	D-生物素 (MW244)	122 mg
	L-色氨酸 (MW204)	102 mg
	加蒸馏水/去离子水至	1000 mL

配制: 将上述成分加热, 以溶解生物素, 然后在 0.068 MPa 下高压灭菌 20 min。储存于 4 °C 冰箱。若试验中不使用大肠杆菌, 则不添加色氨酸。

5.2 顶层琼脂培养基

成分:	琼脂粉	1.2 g
	氯化钠	1.0 g
	加蒸馏水/去离子水至	200 mL

配制: 上述成分混合后, 于 0.103 MPa 下高压灭菌 30 min。试验时, 加入 0.5 mmol/L 组氨酸—0.5 mmol/L 色氨酸—0.5 mmol/L 生物素溶液 20 mL。若试验中不使用大肠杆菌, 则不添加色氨酸。

5.3 Vogel-Bonner (V-B) 培养基 E

成分:	枸橼酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	100 g
	磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	500 g
	磷酸氢铵钠 ($NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$)	175 g
	硫酸镁 ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10 g
	加蒸馏水/去离子水至	1000 mL

配制: 先将前三种成分加热溶解后, 再将溶解的硫酸镁缓缓倒入容量瓶中, 加蒸馏水/去离子水至 1000 mL。于 0.103 MPa 下高压灭菌 30 min。储存于 4 °C 冰箱。

5.4 20%葡萄糖溶液

成分:	葡萄糖	200 g
	加蒸馏水/去离子水至	1000 mL

配制: 加少量蒸馏水/去离子水加温溶解葡萄糖, 再加蒸馏水/去离子水至 1000 mL。于 0.068 MPa 下高压灭菌 20 min。储存于 4 °C 冰箱。

5.5 底层琼脂培养基

成分:	琼脂粉	7.5 g
	蒸馏水/去离子水	480 mL
	V-B 培养基 E	10 mL
	20%葡萄糖溶液	10 mL

配制: 首先将前两种成分于 0.103 MPa 下高压灭菌 30 min 后, 再加入后两种成分, 充分混匀倒底层平板。按每皿 25 mL 制备平板, 冷凝固化后倒置于 37 °C 培养箱中 24 h, 备用。

5.6 营养肉汤培养基

成分:	牛肉膏	2.5 g
	胰胨	5.0 g
	磷酸氢二钾 (K_2HPO_4)	1.0 g
	加蒸馏水/去离子水至	500 mL

配制: 将上述成分混合后, 于 0.103 MPa 下高压灭菌 30 min。储存于 4 °C 冰箱。

5.7 盐溶液 (1.65mol/L KCl+0.4mol/L MgCl₂)

成分:	氯化钾 (KCl)	61.5 g
	氯化镁 (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	40.7 g
	加蒸馏水/去离子水至	500 mL
配制: 在水中溶解上述成分后, 于 0.103 MPa 下高压灭菌 30 min。储存于 4 °C 冰箱。		

5.8 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)

成分:	磷酸二氢钠 (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	2.965 g
	磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	29.015 g
	加蒸馏水/去离子水至	500 mL
配制: 溶解上述成分后, 于 0.103 MPa 下高压灭菌 30 min。储存于 4 °C 冰箱。		

5.9 S₉ 混合液

成分:	每毫升 S ₉ 混合液	
	肝 S ₉	100 μL
	盐溶液	20 μL
	灭菌蒸馏水/去离子水	380 μL
	0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液	500 μL
	辅酶 II (NADP)	4 μmol
	6-磷酸葡萄糖 (G-6-P)	5 μmol

配制: 将辅酶 II 和 6-磷酸葡萄糖置于灭菌三角瓶内称重, 然后按上述相反的次序加入各种成分, 使肝 S₉ 加到已有缓冲液的溶液中。如辅酶 II、6-磷酸葡萄糖采用溶液, 需根据加入量调整灭菌蒸馏水/去离子水的体积。S₉ 混合液必须临用现配, 并保存于冰水浴中。试验结束, 剩余 S₉ 混合液应该丢弃。

5.10 菌株鉴定用和特殊用途试剂

5.10.1 组氨酸-色氨酸-生物素平板

成分:	琼脂粉	15 g
	蒸馏水/去离子水	934 mL
	V-B 培养基 E	20 mL
	20%葡萄糖	20 mL
	灭菌盐酸组氨酸水溶液 (0.5 g/100mL)	10 mL
	灭菌盐酸色氨酸水溶液 (0.5 g/100mL)	10 mL
	灭菌 0.5 mmol/L 生物素溶液	6 mL

配制: 高压灭菌琼脂和水后, 将灭菌 20%葡萄糖, V-B 培养基、组氨酸溶液, 加进热的琼脂溶液中 (若试验中不使用大肠杆菌, 则不添加色氨酸, 同时蒸馏水/去离子水改为 944 mL)。待溶液稍微冷却后, 加入灭菌生物素, 混匀, 浇制平板。

5.10.2 氨苄青霉素平板和氨苄青霉素/四环素平板

成分:	琼脂粉	15 g
	蒸馏水/去离子水	930 mL
	V-B 盐溶液	20 mL
	20%葡萄糖	20 mL
	灭菌盐酸组氨酸溶液 (0.5 g/100mL)	10 mL
	灭菌盐酸色氨酸水溶液 (0.5 g/100mL)	10 mL
	灭菌 0.5 mmol/L 生物素溶液	6 mL
	氨苄青霉素溶液 (8 mg/mL 于 0.02 mol/L NaOH 中)	3.15 mL
	四环素溶液 (8 mg/mL 于 0.02 mol/L HCl 中)	0.25 mL

配制：琼脂和水高压灭菌 20 min，将无菌的葡萄糖、VB 盐溶液、组氨酸溶液和色氨酸溶液，加进热的琼脂溶液中，混匀（若试验中不使用大肠杆菌，则不添加色氨酸，同时蒸馏水/去离子水改为加 940 mL）。冷却至大约 50 ℃，在无菌条件下加入四环素溶液和/或氨苄青霉素溶液。

5.10.3 营养琼脂平板

成分：	琼脂粉	7.5 g
	营养肉汤培养基	500 mL

配制：于 0.103 MPa 下高压灭菌 30 min 后倾注平板。

6 试验菌株及其生物学特性鉴定

6.1 试验菌株

采用以下菌株作为标准组合：

鼠伤寒沙门氏菌 TA1535；

鼠伤寒沙门氏菌 TA97 或 TA97a 或 TA1537；

鼠伤寒沙门氏菌 TA98；

鼠伤寒沙门氏菌 TA100；

鼠伤寒沙门氏菌 TA102 或大肠杆菌 WP2uvrA 或大肠杆菌 WP2uvrA（pKM101）。

6.2 生物学特性鉴定

新获得的或长期保存的菌种，在试验前必须进行菌株的生物特性鉴定。菌株鉴定的判断标准，如表 1 所示。

表 1 试验菌株鉴定的判断标准

菌株	组氨酸缺陷	色氨酸缺陷	脂多糖屏障缺陷	氨苄青霉素抗性	切除修复缺陷	四环素抗性	自发回变菌落参考数*	
							Ames 实验室	Zeiger 实验室
TA97	+	/	+	+	+	-	90~180*	75~200*
TA97a	+	/	+	+	+	-	90~180*	75~200*
TA98	+	/	+	+	+	-	30~50	20~50
TA100	+	/	+	+	+	-	100~200	75~200
TA102	+	/	+	+	-	+	240~320*	100~400*
TA1535	+	/	+	-	+	-	10~35	5~20
TA1537	+	/	+	-	+	-	3~15	5~20
WP2uvrA	/	+	/	-	+	-	/	5~20
WP2uvrA (pKM101)	/	+	/	+	+	-	/	100~200
注	“+”表示需要组氨酸	“+”表示需要色氨酸	“+”表示具有 rfa 突变	“+”表示具有 R 因子	“+”表示对于鼠伤寒沙门氏菌具有 Δ uvrB 突变，对于大肠杆菌具有 Δ uvrA 突变	“+”表示具有 pAQ1 质粒	*在体外代谢活化条件下自发回变菌落数略增。 对于各菌的自发回变范围，各个实验室在参考其他实验室数据的基础上应建立自己的历史对照数据库，形成适合本实验室条件的适用范围。同时，实验室背景数据应当与文献报道相符。	

6.2.1 组氨酸缺陷/色氨酸缺陷

原理：组氨酸缺陷型试验菌株本身不能合成组氨酸，只能在补充组氨酸的培养基上生长，而在缺乏组氨酸的培养基上，则不能生长；色氨酸缺陷型试验菌株本身不能合成色氨酸，只能在补充色氨酸的培养基上生长，而在缺乏色氨酸的培养基上，则不能生长。

鉴定方法：将测试菌株增菌液分别于含组氨酸或者色氨酸培养基平板和无组氨酸或者色氨酸平板上划线，于 37 °C 下培养 24 h 后观察结果。

结果判断：组氨酸缺陷型菌株在含组氨酸平板上生长，而在无组氨酸平板上则不能生长；色氨酸缺陷型菌株在含色氨酸平板上生长，而在无色氨酸平板上则不能生长。

6.2.2 脂多糖屏障缺损

原理：具有深粗糙（*rfa*）的菌株，其表面一层脂多糖屏障缺损，因此一些大分子物质，如结晶紫能穿透菌膜进入菌体，从而抑制其生长，而野生型菌株则不受其影响。

鉴定方法：吸取待测菌株增菌液 0.1 mL 于营养琼脂平板上划线，然后将浸湿的 0.1% 结晶紫溶液滤纸条与划线处交叉放置。37 °C 下培养 24 h 后观察结果。

结果判断：假若待测菌在滤纸条与划线交叉处出现一透明菌带，说明该待测菌株具有 *rfa* 突变。

6.2.3 氨苄青霉素抗性

原理：含 R 因子的试验菌株对氨苄青霉素有抗性。因为 R 因子不太稳定，容易丢失，故用氨苄青霉素确定该质粒存在与否。

鉴定方法：吸取待测菌株增菌液 0.1 mL，在氨苄青霉素平板上划线，37 °C 下培养 24 h 后观察结果。

结果判断：假若测试菌在氨苄青霉素平板上生长，说明该测试菌具有抗氨苄青霉素作用，表示含 R 因子，否则，表示测试菌不含 R 因子或 R 因子丢失。

6.2.4 紫外线敏感性

原理：具有 Δ uvrB/A 突变的菌株对紫外线敏感，当受到紫外线照射后，不能生长，而具有野生型切除修复酶的菌株，则能照常生长。

鉴定方法：吸取待测菌株增菌液 0.1 mL 于营养琼脂平板上划线，用黑纸盖住平板的一半，置紫外灯下照射（15 W，距离 33 cm）8 秒钟。置 37 °C 下孵育 24 h 后观察结果。

结果判断：具有 Δ uvrB/A 突变的菌株对紫外线敏感，经辐射后细菌不生长，而具有完整的切除修复系统的菌株，则照常生长。

6.2.5 四环素抗性

原理：具有 pAQ1 的菌株对四环素有抗性。

鉴定方法：吸取待测菌株增菌液 0.1 mL 于氨苄青霉素/四环素平板上划线，置 37 °C 下孵育 24 h 后观察结果。

结果判断：假若测试菌照常在氨苄青霉素/四环素平板上生长，表明该测试菌株对氨苄青霉素和四环素两者有抗性，具有 pAQ1 质粒，否则，说明测试菌株不含 pAQ1 质粒。

6.2.6 自发回变

原理：每种试验菌株都以一定的频率自发地产生回变，称为自发回变。这种自发回变是每种试验菌株的一项特性。

鉴定方法：将待测菌株增菌液 0.1 mL 加到 2 mL 含组氨酸-色氨酸-生物素的顶层琼脂培养基的试管内（若试验中不使用大肠杆菌，则不添加色氨酸），混匀后铺到于底层琼脂平板上，待琼脂固化后，置 37 °C 培养箱中孵育 48 ~ 72 h 后计数每皿回变菌落数。

结果判断：每种标准测试菌株的自发回变菌落数应符合表 1 要求。经体外代谢活化后的自发回变菌落数，要比直接作用下的略高。

6.2.7 回变特性-诊断性试验

原理：每种试验菌株对诊断性诱变剂回变作用的性质以及 S₉ 混合液的效应不一。

鉴定方法：按照平板掺入试验的操作步骤进行。将受试物换成诊断性诱变剂。

结果判断：标准菌株对某些诊断性诱变剂特有的回变结果参见表 2。

表 2 测试菌株的回变性

诱变剂	剂量 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	S ₉	TA97	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA1537	WP2uvrA	WP2uvrA (pKM101)
柔毛霉素	6.0	-	124	3123	47	592	/	/	/	/
叠氮化钠	1.5	-	76	3	3000	188	320 (0.5 μg)	/	/	/
ICR-191	1.0	-	1640	63	185	0	/	/	/	/
链霉素	0.25	-	inh	inh	inh	2230	/	/	/	/
丝裂霉素 C	0.5	-	inh	inh	inh	2772	/	/	/	/
2,4,7-三硝基-9-芴酮	0.20	-	8377	8244	400	16	/	/	/	/
4-硝基-O-次苯二胺	20	-	2160	1599	798	0	/	/	/	/
4-硝基喹啉-N-氧化物	0.5	-	528	292	4220	287	/	/	610	/
甲基磺酸甲酯	1.0 (μL)	-	174	23	2730	6586	/	/	/	/
敌克松	50.0	-	2688	1198	183	895	/	/	/	/
9-氨基吡啶	50	-	/	/	/	/	/	337	/	/
2-氨基苄	10	+	1742	6194	3026	261	/	/	/	/
苯并(a)芘	1.0	+	337	143	937	255	/	110 (5 μg)	/	/
2-氨基蒽	20	+	/	/	/	/	380 (5 μg)	/	300	/

注：（1）inh 表示抑菌；（2）表中数值均已扣除溶剂对照回变菌落数。

7 大鼠肝微粒体酶的诱导和 S₉ 的制备

7.1 诱导

选择 SPF 级雄性成年大鼠，体重 200 g 左右。将多氯联苯（PCB 混合物）溶于玉米油中，浓度为 200 mg/mL，按 500 mg/kg 体重一次腹腔注射，5 d 后将动物实施安乐死，安乐死前禁食 12 h。

也可采用苯巴比妥钠和 β -萘黄酮联合诱导的方法进行制备。经口或腹腔注射给予 80 mg/kg 苯巴比妥钠和 80 mg/kg β -萘黄酮，每天 1 次，连续 3 d，安乐死前禁食 16 h。

7.2 S₉ 制备

在无菌条件下，取出肝脏，去除肝脏的结缔组织，用冰浴的 0.15 mol/L 氯化钾溶液淋洗肝脏，放入盛有 0.15 mol/L 氯化钾溶液的烧杯里。按每克肝脏加入 0.15 mol/L 氯化钾溶液 3 mL。用电动匀浆器制成肝匀浆，再在低温高速离心机上，在 4 ℃ 条件下，以 9000 g 离心 10 min，取其上清液（S₉）分装，每管装 2 ~ 3 mL，储存于液氮生物容器或 -80 ℃ 冰箱中备用。

实验动物及动物试验环境、饲料、饮水应符合国家相应规定。上述全部操作均在冰水

浴中进行，均为无菌操作。制备肝 S₉ 所用一切手术器械、器皿等，均经灭菌消毒。S₉ 制备后，其活力需经诊断性诱变剂进行鉴定。

也可使用商品化 S₉，使用前需确认其活力和无菌状态。

8 溶剂的选择

如果受试物为水溶性，可用灭菌蒸馏水/去离子水作为溶剂；如为脂溶性，应选择对试验菌株毒性低且无致突变性的有机溶剂，首选二甲基亚砜（DMSO），也可选择其他溶剂。一般操作中，为了减少误差和溶剂的影响，常按每皿使用剂量用同一溶剂配成不同的浓度，固定加入量为 100 μL。

9 剂量设置

需结合受试物的溶解度及对细菌的毒性，通过预试验确定最高剂量。自发回变数的减少，背景菌变得清晰或被处理的培养物细菌存活数减少，都是毒性的标志。

对原料而言，一般最高剂量组可为 5 mg/皿或 5 μL/皿。对产品而言，有杀菌作用的受试物，最高剂量可为最低抑菌浓度，无杀菌作用的受试物，最高剂量可为原液。受试物至少应设 5 个剂量组，按等比组距的原则设定剂量间隔，推荐使用约 $\sqrt{10}$ 倍组距。每个剂量均做 3 个平行平板。

10 试验操作步骤

10.1 增菌培养

取营养肉汤培养基 5 mL，加入无菌试管中，将主平板或冷冻保存的菌株培养物接种于营养肉汤培养基内，37 °C 振荡（100 次/min）培养 10 h。该菌株培养物应每毫升不少于 $1 \sim 2 \times 10^9$ 活菌数。

10.2 平板掺入法

试验时，将含 0.5 mmol/L 组氨酸—0.5 mmol/L 色氨酸—0.5 mmol/L 生物素溶液（若试验中不使用大肠杆菌，则不添加色氨酸）的顶层琼脂培养基 2.0 mL 分装于试管中，45 °C 水浴中保温，然后每管依次加入试验菌株增菌液 0.1 mL，受试物溶液 0.1 mL 和磷酸盐缓冲液 0.5 mL 或者 S₉ 混合液 0.5 mL（需代谢活化时），充分混匀，迅速倾入底层琼脂平板上，转动平板，使之分布均匀。水平放置待凝固固化后，倒置于 37 °C 培养箱里孵育 48~72 h。计数每皿回变菌落数。

试验中，除设受试物各剂量组外，还应同时设空白对照、溶剂对照、阳性对照和无菌对照。

10.3 预培养平板掺入法

预培养对于某些受试物可取得较好效果，因此可根据情况确定是否进行预培养。在加入顶层培养基前，先进行以下预培养步骤：

（1）将受试物（需活化时另加 10% S₉ 混合液 0.5 mL）和菌液，在 37 °C 中培养 20 min，或在 30 °C 中培养 30 min；

（2）再加入 2 mL 顶层琼脂；

其他同 10.2。

11 数据处理和结果判断

记录受试物各剂量组、空白对照（自发回变）、溶剂对照以及阳性诱变剂对照的每皿回变菌落数（如有毒性或沉淀，则需描述各浓度组细菌毒性大小和沉淀情况），并计算平均数和标准差。

11.1 如果受试物 TA1535、TA1537、WP2uvrA 的回变菌落数是溶剂对照回变菌落数的 3 倍或 3 倍以上，受试物 TA97、TA97a、TA98、TA100、TA102、WP2uvrA（pKM101）的回变菌落数是溶剂对照回变菌落数的 2 倍或 2 倍以上，并出现以下情形之一，则该受试物判定为致突变阳性：

（1）呈剂量-反应关系

（2）任何一个剂量条件下，出现阳性反应并有可重复性

受试物经上述 5 个试验菌株测定后，只要有一个试验菌株，无论在加 S₉或未加 S₉条件下为阳性，均可报告该受试物细菌回复突变试验为致突变阳性。如果受试物经 5 个试验菌株检测后，无论加 S₉和未加 S₉均为阴性，则可报告该受试物为致突变阴性。

11.2 如试验中出现可疑阳性，应通过改变试验条件（如调整受试物或 S₉浓度，改变培养条件），对可疑阳性的受试物进行重复试验，以确保试验结果的可靠性和准确性。

11.3 阴性结果需要验证（即重复一次），应改变试验的条件，如剂量间距（改为 5 倍间距）等。

细菌回复突变试验方法（征求意见稿）起草说明

为加强化妆品的监督管理，进一步提高化妆品使用安全性，国家药监局化妆品标准化技术委员会组织开展了《细菌回复突变试验方法》的研究修订工作。现就工作有关情况说明如下：

一、起草原则

（一）科学规范原则。本试验方法起草宗旨是以我国 2019 年发布的化妆品《细菌回复突变试验》为基础，广泛参考国内外相关标准和技术指导原则，保证方法科学、规范的同时，兼顾与国际标准的接轨。

（二）问题导向原则。根据化妆品审评工作中遇到的实际情况，汇总、梳理《细菌回复突变试验》中存在的要求不明确、不具体等问题，并对这些问题产生的原因和解决方法进行深入分析，进而对该试验方法进行修订完善。

（三）公开透明原则。《细菌回复突变试验方法》起草过程中，坚持公开透明、广泛参与的原则，充分参考国内外相关法规和技术标准，多次积极征求检验机构、专家、行业协会意见，并根据意见反馈情况科学合理地进行修改完善。

二、起草过程

国家药监局化妆品标准化技术委员会于2025年1月委托开展细菌回复突变试验方法的修订工作。前期准备工作包括梳理并汇总原《细菌回复突变试验》方法中存在的问题，查阅文献，参考国内外相关标准等。根据文献资料分析结果和现场调研结果，结合我国化妆品审评和监管的实际情况，形成修订后的《细菌回复突变试验方法（征求意见稿）》。2025年9月通过国家药监局化妆品标准化技术委员会安全评价分技术委员会初审。

三、与我国已有相关标准的关系

我国发布的《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》（GB15193.4-2014）规定了鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验的基本技术要求，适用于评价受试物的致突变作用。

《药品遗传毒性研究技术指导原则》规定，对药物潜在的遗传毒性应进行全面评价，通常采用体外和体内试验组合的方法，同时规定其标准试验组合中应包含细菌回复突变试验，因为该试验已证明能检出相关的遗传学改变和大部分啮齿类动物和人类的遗传毒性致癌剂，并附带《细菌回复突变试验》方法。

《化妆品细菌回复突变试验研究技术指导原则（征求意见稿）》旨在为化妆品产品和原料开展细菌回复突变试验时提供技术指导。

本方法起草过程中，在参考上述我国已有相关标准和技术指导原则的基础上，对《化妆品安全技术规范》中的《细菌回复突变试验》进行修订。

四、与《化妆品安全技术规范》中原方法的对比情况

本项目是对《化妆品安全技术规范》中的《细菌回复突变试验》进行修订，主要包括：

（1）在“7.2 S₉制备”中补充对商品化 S₉的要求；（2）在“9 剂量设计”中明确最高剂量设计原则，并将受试物剂量组数量由至少 4 个调整为至少 5 个；（3）在“10 试验操作步骤”中增加预培养平板掺入法；（4）在“11 入数据处理和结果判断”中增加对可疑阳性结果和阴性结果进行重复验证的要求。

五、国际相关标准情况

2020 年经济合作发展组织（OECD）发布 TG 471 Bacterial Reverse Mutation Test。为与国际标准接轨，本项目在对《化妆品安全技术规范》中的《细菌回复突变试验》进行修订时参考了 OECD TG 471，技术性内容保持基本一致。

六、其他需说明的问题

细菌回复突变试验中受试物的最高浓度主要取决于受试物的溶解度及其对细菌的毒性。试验前，需结合受试物的溶解度和对细菌的毒性，通过预实验确定最高剂量。