

【附錄】

安全性資料

技術指引

引言

有關各項安全性試驗，即包括重金屬及有毒元素含量測試、農藥殘留量測試、微生物限度測試、急性毒性試驗、長期毒性試驗、局部毒性試驗、致突變試驗、致癌試驗和生殖毒性試驗的技術指引，請參看附錄一至九的說明。

附錄中所載的技術指引是該試驗項目的一般要求。除已載的方法以外，試驗亦可根據其他獲中藥組認可的方法進行。

重金屬及有毒元素測試

技術指引

1. 項目說明

1.1 中成藥的重金屬及有毒元素含量測試乃中成藥在申請註冊時所需進行的其中一項安全性測試。

2. 技術要求及指引

2.1. 指定測試之重金屬及有毒元素

2.1.1 中藥組已指定三種重金屬(汞、鉛、鎘)及一種有毒元素(砷)為必須測試的項目。因此,有關化驗機構要對此四種重金屬或有毒元素提供定量分析方法。

2.2. 檢測方法

2.2.1 化驗機構應建立準確的及切合實際的檢測方法,以測定上述四種重金屬或有毒元素含量。

2.2.2 化驗機構可根據有關文獻及相關資料,建立以儀器檢測為主的檢測技術,並建立相應的樣品前處理方法。可供考慮採納的儀器檢測方法有原子吸收光譜法(AAS);電感耦合等離子體—原子發射光譜法(ICP-AES);電感耦合等離子體—質譜法(ICP-MS)等。

2.2.3 中成藥樣品的前處理,主要是將樣本的基體破壞,使中成藥樣本的重金屬或有毒元素完全釋出,以供測試。有關化驗機構可以採用微波消解或其他有效的前處理方法,例如酸煮解或灰化法,最後將樣本變成均勻溶液,經稀釋後作重金屬檢定。

2.2.4 有關化驗機構所建立的重金屬或有毒元素分析方法,需通過適當的方法學考察,以證明該方法可作預期的用途。

2.2.5 檢測方法的檢測限(detection limit)及定量限(quantitation limit)要求,應配合有關中成藥重金屬及有毒元素限量標準(表1)而制定。

2.2.6 化驗機構建立的中成藥重金屬及有毒元素檢測方法,需經香港實驗室認可計劃認可,或具備其他同等的、中藥組接納的水平。

2.3 參考方法

2.3.1. 本方法利用電感耦合等離子體質譜儀(ICP-MS)檢測樣本中有毒元素,其應用範圍包括檢測中藥材及中成藥樣本中砷(As)、鎘(Cd)、汞(Hg)和鉛(Pb)污染物的含量。樣本會先經過微波硝酸煮解,稀釋後用 ICP-MS 測定含量。方法如下:將精密稱取樣本(約 0.5 克)置於微波煮解瓶內,加濃硝酸(7.5 毫升)後搖勻,依照儀器生產商指示將煮解瓶安置入微波消化器中,按照儀器之使用規定設定適當的微波煮解程序(升溫程序應包括逐步升溫至不少於攝氏 180 度,並保留在該溫度不少於九點五分鐘),

開始煮解。完畢後待冷，將煮解溶液移至適當定量瓶，加入適量內標銦(In)，用水定容予 ICP-MS 作含量測定。在使用 ICP-MS 作含量測定時，因不同品牌儀器在操作上各有不同，故相關的測定詳情，必須參考儀器生產商所提供的使用說明文件或有關文獻。

- 2.3.2. 以上提供的操作程序只供參考，最終的測試方法，必須透過參加實驗室間比對測試，或分析一些含基質與分析樣本相類似的檢定對照品，進行驗證。再者，為確保測試方法在使用時能有足夠的監控，在方法中必須加入適當質控程序，例如分析檢定對照品、平行雙樣和加標樣本等。

表 1：中成藥的重金屬及有毒元素含量限量標準

重金屬或有毒元素種類	上限(服量計)
砷(Arsenic)	每日 1,500 微克
鎘(Cadmium)	每劑 3,500 微克
鉛(Lead)	每日 179 微克
汞(Mercury)	每日 36 微克

農藥殘留測試 技術指引

1. 項目說明

1.1. 中成藥的農殘含量乃中成藥在申請註冊時所需進行的其中一項安全性測試。

2. 技術要求及指引

2.1. 指定測試的農藥

2.1.1. 由於有機氯農藥相對穩定，在環境中不易降解，故中藥組已指定該類農藥為必需檢查項目。有關化驗機構應就表 1 內的有機氯農藥（共 9 組 20 種）建立分析方法。

2.2. 檢測方法

2.2.1. 中成藥有機氯農殘的檢測方法，多以氣相色譜法為主，並配合電子捕獲檢測器（ECD）作定量分析。此方法不僅靈敏度高、快速，而且分離效率好，可一次同時測定多種有機氯農藥。

2.2.2. 目前中國、英國、日本及美國等各國藥典都有收載有關檢定草藥的有機氯農殘的分析方法，這些方法都是以氣相色譜法配合電子捕獲檢測器（ECD）為基本的標準方法。

2.2.3. 化驗機構可以參考藥典方法，在氣相色譜為測試方法的基礎上，優化測試條件，自行制定自動化及適用於中成藥的檢測方法。該等方法應包括進一步確定農殘含量的步驟，如使用不同的色譜柱及檢測條件，或使用氣相質譜法來作進一步確定。

2.2.4. 提取條件、淨化手段的選擇：選用的溶劑和提取方法應以欲測定的農殘成分的性質和排除該中成藥中的基體干擾為依歸。鑒於個別的中成藥有不同的干擾物和基體，有關化驗機構應建立多種淨化手段（如：磺化法、柱層析法、凝膠滲透層析法等），以應付不同的需要。

2.2.5. 有關化驗機構所建立的農殘分析方法，需通過適當的方法學考察，以證明該方法可作預期的用途。

2.2.6. 檢測方法的檢測限(detection limit)及定量限(quantitation limit)要求，應參考有關中成藥的農殘限度（表 1）而制定。

2.2.7. 化驗機構建立的中成藥有機氯農殘的檢測方法，需經香港實驗室認可計劃認可，或具備其他同等的、中藥組接納的水平。

2.3 參考方法

2.3.1. 此方法應用於檢測中藥材及中成藥中有機氯農藥殘留的含量。樣本經提取和淨化後，可用氣相色譜法 - 電子捕獲檢測器檢測此類農藥殘留的含量。可行的話，樣本中測得的農藥需由氣相質譜法去核實。方法如下：將精密稱取樣本（約 10 克）混合乙酸乙酯，經超音波萃取法提取後，用旋轉式氯化器在加溫降壓條件下揮掉溶劑。殘渣經凝膠滲透色譜柱(GPC) 及弗羅里硅土(florisil)淨化後，加入適量內標（例如 1-溴-2-硝苯，1-Bromo-2-nitrobenzene）用氣相色譜法 -

電子捕獲檢測器檢測有機氯農藥殘留的含量，相關的測定詳情必須參考儀器生產商提供的使用說明文件。懷疑含有有機氯農藥的樣本可選用另一根不同極性的氣相色譜柱作進一步分析，以核實結果。可行的話，樣本中測得的農藥需由氣相質譜法去核實。

此方法可用於下列有機氯農藥的檢測：

艾氏劑、狄氏劑、順-氯丹、反-氯丹、氧氯丹、4，4-滴滴依、4，4-滴滴滴、2，4-滴滴涕、4，4-滴滴涕、異狄氏劑、七氯、環氧七氯、六氯代苯、六六六(包括 α ， β ， δ 等異構體)、林丹、五氯硝基苯、五氯苯胺及甲基五氯苯硫醚。

2.3.2. 以上提供的操作程序只供參考，最終的測試方法必須透過參加實驗室間比對測試或分析一些含基質與分析樣本相類似的檢定對照品進行驗證。再者，為確保測試方法在使用時能有足夠的監控，在方法中必須加入適當質控程序，例如分析檢定對照品、平行雙樣和加標樣本等。

表一：中成藥製成品或其個別藥材原料的農藥殘留限量標準

英文名稱	中文名稱	測試範圍	最高殘留量 (mg/kg)
1) Aldrin & Dieldrin	艾氏劑 及狄氏劑	兩者之和	0.05
2) Chlordane	氯丹	<i>cis-</i> , <i>trans-</i> 異構體與 oxychlordane 之和	0.05
3) DDT	滴滴涕	<i>p,p'</i> -DDT, <i>o,p'</i> -DDT, <i>p,p'</i> -DDE 與 <i>p,p'</i> -TDE 之和	1.0
4) Endrin	異狄氏劑	endrin	0.05
5) Heptachlor	七氯	heptachlor 與 heptachlor epoxide 之和	0.05
6) Hexachlorobenzene	六氯苯	hexachlorobenzene	0.1
7) Hexachlorocyclohexane	六六六	α -, β -及 δ -異構體之和	0.3
8) Lindane	林丹	lindane	0.6
9) Quintozene	五氯硝基苯	quintozene, pentachloroaniline 與 methyl pentachlorophenyl sulphide 之和	1.0

微生物限度檢查方法

技術指引

微生物限度檢查法系指非規定滅菌製劑及其原、輔料受到微生物污染程度的一種檢查方法，包括染菌量及控制菌的檢查。有關微生物限度的檢查方法乃參考自《中華人民共和國藥典》(2000年版一部)及其2002年增補本。而有關中成藥的微生物限度標準，請參看下表5。

有關“培養基及其製備方法”、“試藥”、“指示液”、“稀釋劑”、“供試品的檢驗量”、“供試液的製備”及“對照用菌液”的參考資料，請參閱《中華人民共和國藥典》(2000年版一部)附錄XIIIC-微生物限度檢查法。

微生物限度檢查法

供試品應隨機抽樣。一般抽樣量為檢驗用量(2個以上最小包裝單位)的3倍量。

檢查的全過程，均應嚴格遵守無菌操作，嚴防再污染。

除另有規定外，本檢查法中細菌培養溫度為30~35℃，霉菌、酵母菌培養溫度為25~28℃，控制菌培養溫度為36℃ ± 1℃。

檢驗結果的報告以lg、1ml或10cm²為單位。

檢查法

1. 細菌、霉菌與酵母菌計數

(1) 平皿菌落計數法 取均勻供試液，進一步稀釋成1:10²、1:10³等適宜的稀釋級。分別取連續三級10倍稀釋的供試液各1ml，置直徑約90mm的平皿中，再注入約45℃的培養基約15ml，混勻，待凝固後，倒置培養，每稀釋級應作2~3個平皿。

營養瓊脂培養基用於細菌計數，玫瑰紅鈉瓊脂培養基用於霉菌計數。在特殊情況下，前者同時點計霉菌、酵母菌菌落數，後者同時點計細菌菌落數。酵母浸出粉腺葡萄糖瓊脂培養基用於酵母菌計數。含蜂蜜、王漿的製劑用玫瑰紅鈉瓊脂培養基與酵母浸出粉腺葡萄糖瓊脂培養基分別測定霉菌、酵母菌菌落數，合併計數。液體及半固體製劑用玫瑰紅鈉瓊脂培養基同時點計霉菌菌落數及酵母菌菌落數。

菌數測定陰性對照試驗 取供試用的稀釋劑各1ml，置4個無菌平皿中，分別按細菌、霉菌計數用的培養基製備平板，培養，檢查，不得長菌。

細菌培養時間為48小時，分別在24小時及48小時點計菌落數，一般以48小時菌落數為準，霉菌、酵母培養時間為72小時，分別在48小時及72小時點計菌落數，一般以72小時菌落數為準。菌落如蔓延生長成片，不宜計數。

點計後，計算各稀釋級的平均菌落數，按菌數報告規則報告菌數。

菌數報告規則 細菌宜選取平均菌落數在30~300之間的稀釋級，霉菌宜選取平均菌落數在30~100之間的稀釋級作為報告菌數計算的依據。如有1個稀釋級

在 30~300(30~100)之間時，將該稀釋級的菌落數乘以稀釋倍數報告；如同時有 2 個稀釋級在 30~300(30~100)之間時，按下式計算兩級比值。

$$\text{比值} = \frac{\text{高稀釋級的平均菌落數} \times \text{稀釋倍數}}{\text{低稀釋級的平均菌落數} \times \text{稀釋倍數}}$$

當比值 ≤ 2 時，以兩稀釋級的均值報告，當比值 > 2 時，以低稀釋級的平均菌落數乘以稀釋倍數報告；如同時有 3 個稀釋級的平均菌落數均在 30~300 之間時，以後 2 個稀釋級計算級間比值報告；如各稀釋級的平均菌落數均不在 30~300 之間，以最接近 30 或 300 的稀釋級平均菌落數乘以稀釋倍數報告；如各稀釋級平均菌落數均在 300(100)以上，按最高稀釋級平均菌落數乘以稀釋倍數報告；如各稀釋級平均菌落數均小於 30 時，一般按最低稀釋級平均菌落數乘以稀釋倍數報告。如當 1:10(或 1:100)稀釋級平均菌落數等於或大於原液(或 1:10)稀釋級時，應以培養基稀釋法測定，按測定結果報告菌數。

(2) 培養基稀釋法 取供試液(原液或 1:10、1:100 供試液)3 份，每份各 1ml，分別注入 5 個平皿內(每皿各 0.2ml)。每一平皿傾注營養瓊脂培養基約 15ml，混勻，凝固後，倒置培養，計數。每 1ml 注入的 5 個平板的菌落數之和，即為每 1ml 的菌落數，共得 3 組數據。以 3 份供試液菌落數的平均值乘以稀釋倍數報告。

如各稀釋級平板均無菌落生長，或僅最低稀釋級平均菌落數小於 1 時，則報告菌數為小於 10 個。

2. 控制菌檢查

除另有規定外，取供試液 10ml(相當於供試品 1g、1ml、10cm²)，直接或處理後接種，經增菌、分離培養後，進行革蘭染色、生化試驗與血清凝集試驗等項檢查。

(1) 大腸杆菌(*Escherichia coli*) 取膽鹽乳糖培養基 3 份，每份 100ml，2 份分別加入規定量的供試液，其中 1 份加入對照菌 50~100 個作陽性對照，第 3 份加入與供試液等量的稀釋液作陰性對照。培養 18~24 小時(必要可延至 48 小時)。陰性對照應無菌生長。取上述 3 份的培養物各 0.2ml，分別接種至 5ml MUG 培養基管內培養，分別於 5 小時與 24 小時時，取未接種的 MUG 培養基管作本底對照，將各管置 365nm 紫外光下觀察。陽性對照管呈現熒光，MUG 陽性。供試液的 MUG 管呈現熒光，MUG 陽性；無熒光，MUG 陰性。然後加數滴靛基質試液於 MUG 管內，液面呈玫瑰紅色為陽性，呈試劑本色為陰性。

當陰性對照呈陰性，陽性對照正常生長，供試液膽鹽乳糖培養基培養液澄清，並證明無菌生長，判未檢出大腸杆菌。供試液 MUG 陽性，靛基質陽性，判檢出大腸杆菌；MUG 陰性，靛基質陰性，判未檢出大腸杆菌。

如 MUG 陽性、靛基質陰性，或 MUG 陰性、靛基質陽性，均應取供試液膽鹽乳糖培養基培養物劃線於曙紅亞甲藍瓊脂平板或麥康凱瓊脂平板，培養 18~24 小時，如上述供試液培養物的分離平板無菌落生長，判未檢出大腸杆菌。或有菌落生長，應挑選 2~3 可疑菌落作靛基質試驗(I)、甲基紅試驗(M)、乙酰甲基

甲醇生成試驗(V-P)、枸橼酸鹽利用試驗(C)及革蘭染色、鏡檢、按表 1 規定判斷結果。

靛基質試驗(I) 取可疑菌落或斜面培養物，接種於蛋白胨水培養基中，培養 24 小時，沿管壁加入靛基質試液數滴，液面呈玫瑰紅色為陽性，呈試劑本色為陰性。

甲基紅試驗(M) 取可疑菌落或斜面培養物，接種於磷酸鹽葡萄糖胨水培養基中，培養 48 小時 ± 2 小時，於管內加入甲基紅指示液數滴，立即觀察，呈鮮紅色或橘紅色為陽性，呈黃色為陰性。

乙酰甲基醇生成試驗(V-P) 取可疑菌落或斜面培養物，接種於磷酸鹽葡萄糖胨水培養基中，培養 48 小時 ± 2 小時，於每 2ml 培養液中加入 α -萘酚乙醇試液 1ml，混勻，再加 40% 氫氧化鉀溶液 0.4ml，充分振搖，在 4 小時內出現紅色為陽性，無紅色反應為陰性。

枸橼酸鹽利用試驗(C) 取可疑菌落或斜面培養物，接種於枸橼酸鹽培養基的斜面上，一般培養 48~72 小時，培養基斜面有菌落生長，培養基由綠色變為藍色時為陽性，培養基顏色無改變為陰性。

結果判斷見表 1。對與 MUG-I 反應不符的可疑菌株(見注①、②)，應重新分離培養，再作生化試驗證實。

表 1 MUG 的結果判斷

MUG-I	曙紅亞甲藍瓊脂	IMVic	結果
+	+		檢出大腸桿菌
-	-		未檢出大腸桿菌
+	-		未檢出大腸桿菌
+	-	- + - - ①	檢出大腸桿菌③
-	+	+ + - - ②	檢出大腸桿菌③

注：①、②如①出現+ + - -或②出現- + - -，均應重新分離菌株，再作 MUG-I 和 IMVic 試驗。③革蘭陰性桿菌。

(2) 沙門菌 (*Salmonella species*) 取營養肉湯培養基 3 份，每份 100ml，2 份分別加入規定量的供試液，其中 1 份加入對照菌液作陽性對照，第 3 份加入與供試液等量的稀釋液作陰性對照。培養 18~24 小時，陰性對照應無菌生長。取其餘 2 份培養物各 1ml，分別接種於四硫磺酸鈉亮綠培養基 10ml 中，培養 18~24 小時。分別劃線接種於膽鹽硫乳瓊脂(或沙門、志賀菌屬瓊脂)培養基和麥康凱瓊脂(或曙紅亞甲藍瓊脂)培養基的平板上，培養 18~24 小時或延至 40~48 小時，當陽性對照的平板呈現陽性菌落時，供試品的平板無菌落生長，或有菌落但不同於表 2 所列特徵時，可判為未檢出沙門菌。

如供試品平板生長的菌落特徵有與表 2 所列菌落形態特徵相符或疑似者，均應挑選 2~3 個菌落分別接種於三糖鐵瓊脂培養基斜面上，陽性對照同時接種該培養基，培養 18~24 小時後，陽性對照的斜面應為紅色，底層為黃色，硫化氫陽性，而供試品的疑似菌斜面未見紅色、底層未見黃色，可判為未檢出沙門菌。否則，應繼續做以下試驗。

表 2 沙門菌菌落形態特徵

培養基	菌落特徵
膽鹽硫乳瓊脂	無色至淺橙色，半透明，菌落中心帶黑色或全部黑色或無黑色
沙門、志賀菌屬瓊脂	無色至淡紅色，半透明或不透明，菌落中心有時帶黑色
曙紅亞甲藍瓊脂	無色至淺橙色，透明或半透明，光滑濕潤的圓形菌落
麥康凱瓊脂	無色至淺橙色，透明或半透明，菌落中心有時為暗色

靛基質試驗 照大腸桿菌項下操作並判斷結果。

脲酶試驗 取疑似菌斜面培養物接種於脲瓊脂培養基斜面，培養 24 小時，斜面變為紅色為陽性，不變色為陰性。

氰化鉀試驗 取培養 20~24 小時的疑似菌株營養肉湯培養液，分別用白金耳沾取 1 環，接種至對照培養基及氰化鉀培養基，立即以橡膠塞塞緊，培養 24~48 小時，對照管應有菌生長，試驗管有菌生長者為陽性，無菌生長為陰性。

賴氨酸脫羧酶試驗 取疑似菌斜面培養物分別接種於賴氨酸脫羧酶培養基及對照培養基，培養 24~48 小時，對照管應為黃色，試驗管呈紫色為陽性，呈黃色為陰性。

動力檢查 取疑似菌斜面培養物穿刺接種於半固體營養瓊脂培養基中，培養 24 小時，細菌沿穿刺外周擴散生長，為動力陽性，否則為陰性。陰性培養物，應在室溫保留 2~3 天後，再判斷。

血清凝集試驗 在潔淨載玻片一端，以白金耳沾取沙門菌屬 A~F "0" 多價血清 2~3 環，再取斜面上部的培養物少許，與血清混合，將玻片前後側動，如出現凝集現象，應以 0.9% 氯化鈉溶液與同株培養物作對照試驗，無凝集現象時判為血清凝集陽性。時有反應遲緩，需將玻片與濕棉球置平皿內，約過 20 分鐘，再觀察。仍未出現凝集時，應取斜面培養物，置含少量 0.9% 氯化鈉溶液的試管中，製成濃菌懸液，在 100°C 水浴中保溫 30 分鐘，待冷，再作凝集試驗，如出現凝集，應判為陽性，否則為陰性。

上述各項試驗反應，一般應為硫化氫陽性(或陰性)，靛基質陰性，脲酶陰性，氰化鉀陰性，賴氨酸脫羧酶陽性，動力陽性，A~F "0" 多價血清凝集試驗陽性。各鑒定結果按表 3 判定。

表 3 沙門菌檢查結果判定

序號	血清凝集試驗(A~F "0" 血清)			生化試驗	結果
	凝集反應	100°C 30 分鐘凝集反應	0.9% 氯化鈉溶液對照		
1	陽性		陰性	符合	檢出沙門菌
2	陰性	陽性	陰性	符合	檢出沙門菌
3	陰性	陰性		不符合	未檢出沙門菌

上述各項試驗任何一項不符合或有可疑反應的培養物，均應進一步鑒定後再出

結論。

(3) 銅綠假單胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) 取膽鹽乳糖培養基 3 份，每份 100ml，2 份分別加入規定量的供試液，其中 1 份加入對照菌液作為陽性對照，第 3 份加入與供試液等量的稀釋液作陰性對照。培養 18~24 小時，陰性對照應無菌生長，其餘 2 份培養液劃線接種於溴化十六烷基三甲銨瓊脂培養基平板上，培養 18~24 小時。當陽性對照的平板呈現陽性菌落時，供試品的平板無菌落或無疑似菌落生長，可判未檢出銅綠假單胞菌。

銅綠假單胞菌典型菌落呈扁平、無定型、周邊擴散、表面濕潤，灰白色，周圍時有藍綠色素擴散。如生長菌落具有上述特徵或疑似者，應挑選 2~3 個菌落，分別接種於營養瓊脂培養基斜面上，培養 18~24 小時，取培養物革蘭染色，並做氧化酶試驗。

氧化酶試驗 取潔淨濾紙片置於平皿內，用無菌玻璃棒取營養瓊脂基斜面培養物塗於濾紙片上，再滴加新配製的 1% 二鹽酸二甲基對苯二胺試液，在 30 秒內呈粉紅色逐漸變為紫紅色為氧化酶試驗陽性，否則為陰性。

如證實為非革蘭陰性無芽孢桿菌或氧化酶試驗陰性，均可判為未檢出銅綠假單胞菌。否則，應進行綠膿菌素試驗。

綠膿菌素(Pyocyanin)試驗 取上述瓊脂培養物，接種於綠膿菌素測定用培養基斜面上，培養 24 小時後，在試管內加氣仿 3~5ml，攪碎培養基並充分振搖。靜置片刻，將氣仿移至另一試管中，加入 1mol/L 鹽酸試液約 1ml，振搖後，靜置片刻，如在鹽酸溶液層內出現粉紅色，即為綠膿菌素陽性。試驗同時應作陰性對照。

當陰性對照試驗呈陰性時，並為革蘭陰性桿菌、氧化酶試驗陽性及綠膿菌素陽性，可判檢出銅綠假單胞菌。

綠膿菌素陰性的培養物，應繼續做以下試驗。

硝酸鹽還原產氣試驗 取營養瓊脂培養基斜面培養物，接種於硝酸鹽胨水培養基中，培養 24 小時，如在培養基的杜氏管中有氣體產生，即為陽性。

42°C 生長試驗 取營養瓊脂培養基斜面培養物於 0.9% 無菌氯化鈉溶液中，製成菌懸液，再將菌懸液接種於營養瓊脂培養基斜面，立即置 41°C ± 1°C 水浴中培養 24~48 小時，有菌苔生長者為陽性，否則為陰性。

明膠液化試驗 以接種針沾取營養瓊脂培養基斜面培養物，穿刺於明膠培養基內，培養 24 小時，取出置冰箱內 10~30 分鐘。如培養基仍呈溶液狀，為陽性。

當革蘭陰性桿菌、氧化酶試驗陽性、綠膿菌素試驗陰性，其硝酸鹽還原產氣試驗、42°C 生長試驗及明膠液化試驗均為陽性時，應判檢出銅綠假單胞菌。

(4) 金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 取亞硝酸鈉肉湯(或營養肉湯)培養基 3 份，每份 100ml，2 份分別加入規定量的供試液，其中 1 份加入對照菌液作陽性對照，第 3 份加入與供試液等量的稀釋液作陰性對照。均培養 18~24 小時(必要時可延至 48 小時)。陰性對照應無菌生長。取其餘 2 份培養液劃線接種於卵黃高鹽瓊脂培養基平板或甘露醇高鹽瓊脂培養基平板，培養 24~72 小時。當陽性對照的平板呈現陽性菌落時，供試品的平板如無菌落生長，

或有菌落但不同於表 4 所列特徵，可判未檢出金黃色葡萄球菌。

表 4 金黃色葡萄球菌菌落形態特徵

培養基	菌落形態
卵黃高鹽瓊脂	金黃色，圓形凸起，邊緣整齊，外圍有卵磷脂分解的乳濁圈，菌落直徑 1~2mm
甘露醇高鹽瓊脂	金黃色，圓形凸起，邊緣整齊，外圍有黃色環，菌落直徑 0.7~1mm

如有菌落生長並與表 4 所列特徵相符或疑似時，應挑選 2~3 個菌落，分別接種於營養瓊脂培養基斜面上，培養 18~24 小時，取其培養物革蘭染色，並作血漿凝固酶試驗。

血漿凝固酶試驗 取滅菌小試管 3 支，各加入血漿 ①-無菌水 (1:1)0.5ml，1 支加入被檢菌株的營養肉湯培養液（或濃菌懸液）0.5ml，1 支加入金黃色葡萄球菌的營養肉湯培養液或菌懸液 0.5ml 作陽性對照，另一支加入營養肉湯或 0.9%無菌氯化鈉溶液 0.5ml 作陰性對照。將 3 管同時培養。3 小時後開始檢查，以後適當時間逐次觀察直至 24 小時。陰性對照管的血漿流動自如，陽性對照管血漿凝固，試驗管血漿凝固者為陽性；陽性對照管和陰性對照管任何一管不符合要求時，應另製備血漿，重新試驗。

當陰性對照和陽性對照符合要求，供試品的菌株為革蘭陽性球菌、血漿凝固酶試驗陽性時，判定為檢出金黃色葡萄球菌。

① 血漿的製備 以無菌注射器吸取滅菌的含 5%枸橼酸鈉的 0.9%氯化鈉溶液 1ml，用無菌操作採取家兔（或羊、人）血 9ml，輕輕混勻數分鐘。待血液不凝固時，徐徐放入滅菌離心管中，離心，分離血漿，用滅菌吸管取血漿移至滅菌試管中，置冰箱內備用。臨用前必須用已知血漿凝固酶試驗陽性的金黃色葡萄球菌測試，證明血漿合格後，方可用於試驗。

微生物限度的測試須按以下的方法處理：

- (1) 中成藥的微生物限度分為“總細菌數”、“霉菌及酵母菌數”和“特定細菌”三個項目，受試藥品應符合該劑型的三個微生物限度項目的規定，方可判定為合格。有關不同劑型在不同項目的標準，請參看附表一。
- (2) 若“總細菌數”、“霉菌及酵母菌數”在第一次測定超過該劑型的微生物限度規定時，應從同一批號中隨機抽樣，複試 2 次，以 3 次結果的平均值判定受試藥品在該項目中是否合格。
- (3) 若眼部用藥的“霉菌和酵母菌數”在第一次測定超過該劑型的微生物限度規定時，應從同一批號中隨機抽樣，複試 2 次，其後 2 次結果均不得長菌，受試藥品方可判定在該項目中合格。
- (4) 各類劑型中如檢出特定細菌時，按第一次檢出的結果為準，不再抽樣複試，即應判定該受試藥品為不合格。

(5) 其他要求：

(i) 含有動物類原藥材的口服製劑，不得檢出沙門氏菌(*Salmonella*)；含動物角、王漿、蜂蜜、阿膠的口服製劑，則毋須進行有關檢定。

(ii) 用於創傷、潰瘍、止血、深部組織的含原藥材的製劑，不得檢出破傷風梭狀芽苞桿菌(*Clostridium tetani*)。

(iii) 霉菌及酵母菌檢查：固體製劑及不含糖、王漿、蜂蜜的液體或半固體製劑檢查霉菌；含糖、王漿、蜂蜜的液體或半固體製劑檢查霉菌和酵母菌。

(iv) 陰道用製劑：每 1g 或每 1ml 細菌數不得過 100 個，霉菌及酵母菌數不得過 10 個，應不得檢出金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、銅綠假單胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)；含原藥材的不得檢出破傷風梭狀芽苞桿菌。

(v) 霉變、長蟎者，以不合格論。

(vi) 注射劑須進行及通過無菌試驗。

其他不在附表內的劑型，中藥組可視乎個別情況處理。

表 5：中成藥的微生物限度標準 (單位：個/克或個/毫升)

劑型	項目一	項目二	項目三(特定細菌)		
	總細菌數	霉菌及酵母菌數	大腸桿菌	金黃色葡萄球菌	銅綠假單胞菌
丸劑					
不含原藥材	1000	100	-		
含原藥材	30000	100	-		
散劑	30000	100	-		
口服兼外用	30000	100	-	-	-
顆粒劑、片劑及膠囊劑					
不含原藥材	1000	100	-		
含原藥材	10000	100	-		
錠劑	10000	100	-		
口服兼外用	10000	100	-	-	-
煎膏劑	100	100	-		
膠劑	1000	100	-		
糖漿劑、合劑	100	100	-		
滴丸劑	1000	100	-		
酒劑	500	100	-		
外用	500	100		-	-
酏劑	100	100	-		
外用	100	100		-	-
流浸膏劑與浸膏劑	100	100	-		
軟膏劑	1000	100		-	-
用於燒傷、潰瘍、創傷者	100	10		-	-
露劑	100	100	-		
茶劑					
不含糖	10000	100	-		
含糖	1000	100	-		
搽劑	100	100			
栓劑	10000	100		-	-
用於潰瘍、出血者	100	10		-	-
滴鼻劑、氣霧劑、噴霧劑	100	10	-	-	-
滴眼劑	100	-		-	-

註：-表示每 1 克或每 1 毫升不得檢出

急性毒性試驗 技術指引

(A) 試驗方法

藥物的急性毒性通常以其半數致死劑量 (Median Lethal Dose (LD₅₀)) 來表示。但如因受試藥物的濃度或體積限制，不能求得半數致死劑量，則可用最大耐受量 (Maximum Tolerable Dose (MTD)) 來表示。

(i) 半數致死劑量

- 指在一次過給藥後引起半數動物死亡所需的藥量
- 選用臨床證驗的給藥途徑
- 給藥後至少觀察 7 天，記錄動物毒性反應情況、體重變化及動物死亡時間分佈。對動物死亡應及時進行肉眼檢驗，當檢驗發現有病變時應對該組織進行顯微鏡檢查。

(ii) 最大耐受量

- 是指動物能承受而不引起死亡的最大劑量，可以一次或一日內多次給藥予受試動物。
- 選用臨床證驗的給藥途徑
- 一次或一日內連續 2~3 次給藥予動物，連續觀察 7 天，詳細記錄動物反應情況，計算出總給藥量，並推算出相當於臨床用藥的份量。

長期毒性試驗 技術指引

(A) 試驗方法

動物： 應用兩種動物（包括齧齒類和非齧齒類）*，每類三組，每劑量一組，雌雄各半，齧齒類常用大白鼠，每組至少 20 隻；非齧齒類常用狗或猴等，每組至少 6 隻。

劑量： 一般應設三個不同劑量。原則上低劑量應略高於藥效學研究的有效劑量，此劑量下動物應不出現毒性反應，高劑量力求部份動物出現明顯毒性反應。

給藥途徑： 應與臨床證驗的途徑相一致。

試驗用藥期： 臨床用藥屬於單一劑量或少於一星期的重複劑量，試驗用藥期應為二星期至一個月；給藥期一星期以上的重複劑量，試驗用藥期應為臨床療程的 3-4 倍（齧齒類一般最長不超過半年，非齧齒類不超過九個月）。

如試驗用藥期不在上述的範圍內，申請人須提交理據以作解釋。

觀察： 一般體徵(physical signs)、體重、外觀、血液檢驗、肝腎功能及重要器官的肉眼觀察及病理檢查。所有於試驗期內死亡的動物，均需要作解剖檢查，其他於試驗期後仍能生存的亦需要作解剖檢查。

* 以下的中成藥，必須進行兩種動物(齧齒類和非齧齒類)的長期毒性試驗：

1. 由新發現的藥材、藥材新的藥用部位、藥材中提取的有效部位或複方中提取的有效部位群組成的新藥；
2. 中藥注射劑；
3. 屬於新的中藥處方製劑、改變劑型或改變給藥途徑的新藥，而處方含附表 1 藥材或有十八反、十九畏等配伍禁忌。

其他不屬於上述所列的中成藥，如大鼠的長期毒性試驗結果顯示產品並無毒性反應，現階段可毋須進行非齧齒類動物的長期毒性試驗。但如有需要，中藥組可要求申請人須就產品進行非齧齒類動物的長期毒性試驗。

局部毒性試驗 技術指引

(A) 試驗方法

(一) 皮膚刺激性試驗

- i. 實驗動物及分組：
 - a) 實驗動物可選用白色家兔或白色豚鼠。
 - b) 進行嬰兒皮膚用藥的試驗時應相應選用年輕動物。
 - c) 分完整皮膚及破損皮膚兩組，每隻動物均以本身左右兩邊的皮膚作對照。
 - d) 每組數目：每組家兔或小型豬 3-4 隻；豚鼠則 5-6 隻，雌雄數目相約。
- ii. 受試物
受試物應採用臨床所用的製劑。
- iii. 試驗前的準備
 - a) 於給藥前 24 小時，將動物脊柱兩側去毛，去毛區約為身體表面面積的 10%。
 - b) 在去毛後檢查皮膚是否因去毛而受傷，受傷皮膚不應作完整皮膚的刺激性試驗。
 - c) 破損皮膚的製造：
先將去了毛的皮膚消毒，再以適當方法將皮膚破損(如用消毒手術刀作井字形劃破表皮，或用砂紙摩擦皮膚)，致皮膚出現輕微滲血為止。左右兩側皮膚破損程度應相約。
- iv. 試驗方法
 - a) 在動物一側去毛區塗上受試物，另一側塗上安慰劑作對照。
 - b) 用紗布、膠布等覆蓋，以適當方法固定。
 - c) 每隻動物應分籠飼養。
 - d) 在給藥 24 小時或適當時間後，用溫水或無刺激性溶劑去除殘留受試物或安慰劑。
 - e) 於去除藥物後 1、24、48 和 72 小時進行肉眼觀察和病理組織學檢查，並記錄塗抹部位有否紅斑及水腫等情況。
- v. 試驗結果及評價
 - a) 記錄於觀察時間的皮膚情況，可參考以下標準進行評分。
與對照結果作比較，並對受試物的刺激性強度作出評價。
 - b) 記錄刺激性反應的消退情況。

	刺激反應情況	分值
紅斑	無紅斑	0
	勉強可見	1
	明顯可見	2
	中度到嚴重紅斑	3
	紫紅色紅斑並有焦痂形成	4
	紅斑最高分數 4 分	
水腫	無水腫	0
	勉強可見	1
	可見(邊緣高出周圍皮膚)	2
	皮膚隆起約 1 mm，輪廓清楚	3
	水腫隆起 1 mm 以上並範圍擴大	4
	水腫最高分數 4 分	
最高總分(紅斑分數+水腫分數)		8

強度評價

平均分數	評價
0 - 0.49	無刺激性
0.5 - 2.99	輕度刺激性
3.0 - 5.99	中度刺激性
6.0 - 8.0	強刺激性

c) 試驗結果應經統計學處理。

(二) 皮膚過敏性試驗

i. 實驗動物

實驗動物應選用白色豚鼠。每組 10 隻，雌雄數目相約。

ii. 對照組

除給藥組外，應包括兩組對照組：

- 陰性對照組(給安慰劑)
- 陽性對照組(給陽性致敏物)

iii. 受試物

受試物應採用臨床所用的製劑。

iv. 試驗方法

- a) 於給藥前 24 小時將豚鼠脊柱兩側去毛，範圍約每側 3x3 平方厘米。
- b) 致敏接觸：

- (1) 在動物左側去毛區塗上藥物。
- (2) 用紗布、膠布等覆蓋，以適當方法固定。
- (3) 每隻動物應分籠飼養。
- (4) 每次藥物與皮膚接觸 6 小時。
- (5) 於第 7 天及第 14 天各重複一次，共 3 次。

c) 激發接觸：

在最後一次致敏接觸給藥後 14 天，於右側去毛區給藥 6 小時，除去藥後，即時及於 24，48 及 72 小時再次觀察，檢查皮膚是否有過敏反應情況。

V. 試驗結果及評價

- a) 注意動物是否有哮喘、站立不穩或休克等嚴重的全身性過敏反應。
- b) 對動物的局部性過敏反應進行評分，並與對照組結果作比較，以判斷其過敏反應的程度。

<u>評分方法</u>	<u>分值</u>
紅斑	
無紅斑	0
輕度紅斑，勉強可見	1
中度紅斑，明顯可見	2
重度紅斑	3
紫紅色紅斑並有焦痂形成	4
水腫	
無水腫	0
輕度水腫，勉強可見	1
中度水腫，明顯可見(邊緣高出周圍皮膚)	2
重度水腫，皮膚隆起約 1 mm，輪廓清楚	3
嚴重水腫，皮膚隆起 1 mm 以上並範圍擴大或有水泡或破潰	4

- c) 計算各組的致敏率，受試物結果與對照組結果作比較，以判斷其潛在致敏可能性

$$\text{致敏率} = \frac{\text{出現皮膚紅斑、水腫或全身性過敏反應的動物數目}}{\text{受試動物總數}} \times 100\%$$

皮膚致敏性評價：

<u>致敏發生率(%)</u>	<u>評價</u>
0-10	無致敏性
11-30	輕度致敏性
31-60	中度致敏性
61-80	高度致敏性
81-100	極度致敏性

d) 試驗結果應經統計學處理。

(三) 黏膜刺激性試驗

1. 眼部刺激性試驗

a) 實驗動物：

應選用白色家兔，至少 4 隻。

b) 對照方法：

以動物自身作對照，將受試物塗入或滴入左或右眼的眼結膜(conjunctiva)囊內，剩餘一隻眼用安慰劑作陰性對照。

c) 試驗方法：

所用受試物應採用臨床所用的製劑。將受試物及安慰劑分別塗入或滴入兩邊眼的眼結膜(conjunctiva)囊內，然後使動物眼睛閉合約 10 秒。

d) 觀察及結果判斷：

於給藥 6, 24, 48, 72 小時及 7 日後，觀察眼角膜(cornea)，虹膜(iris)及眼結膜(conjunctiva)的局部反應，需要時作病理組織學檢查。

實驗結果與對照結果比較，以作出刺激性評價。試驗結果應經統計學處理。

2. 其他黏膜部位給藥的刺激性試驗

以下方法適用於滴鼻劑，吸入劑，口腔用藥，滴耳劑，直腸及陰道用藥等。

a) 選擇適當的實驗動物：

(1) 滴鼻劑，吸入劑，口腔用藥及滴耳劑：應選用豚鼠或大白鼠

(2) 直腸及陰道用藥：應選用家兔或大白鼠。

b) 分組：

(1) 設兩個劑量組及一個陰性對照組，每組 10 隻。

(2) 以安慰劑作陰性對照。

c) 試驗方法：

受試物應採用臨床所用的製劑。依照臨床給藥途徑，將

藥物與相應的局部黏膜接觸 4 小時，如藥物漏出，則在 4 小時內平均分次給藥。

d) 觀察及結果判斷：

- (1) 於給藥 24, 48 小時及 7 日後，觀察動物的刺激性反應及反應的消退情況。此外亦應觀察全身症狀。
- (2) 於各觀察時間處死部分動物，作局部黏膜的病理組織學檢查。
- (3) 若在試驗中動物出現中毒反應或死亡，則應在死亡或處死的動物中觀察主要內臟，並作病理組織學檢查。
- (4) 實驗結果與對照組結果比較，以作出刺激性評價。試驗結果應經統計學處理。

致突變試驗 技術指引

(A) 試驗方法

(一) 微生物回復突變試驗⁽¹⁾

微生物品種：組胺酸(histidine)缺陷型的鼠傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*)突變株(mutated strain) TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100 及 大腸桿菌(*Escherichia coli*) WP2 uvr A。

劑量：最少應設 5 個不同劑量。

對照：陰性、陽性以及 S9⁽²⁾對照。

S9 對照是指細菌應在有代謝活化條件下及沒有代謝活化條件下與受試物接觸，以觀察其回復突變的情況。

代謝活化(metabolic activation)是指選用經誘導劑混合物處理後的哺乳類動物肝臟微粒體酶(microsome enzyme)(即 S9)以將受試藥物轉化為高度反應的代謝產物(highly reactive metabolites)。

測試：標準平板法或預培養法培養細菌，48 小時後觀察結果，檢查誘發的回復突變菌落數⁽³⁾。每一濃度至少三皿，求出平均值。

判定：記錄受試物誘發回復突變菌落數目。經統計學處理後，若數目超過陰性對照組 2 倍以上，並與劑量有依賴關係，判定為陽性。

註解

(1) 微生物回復突變試驗(*Bacterial Reverse Mutation Test*)的原理為利用組氨酸缺陷型的鼠傷寒沙門氏菌突變株(即培養基內沒有組氨酸便不能生長的突變株)，經誘變物作用後使突變株回復為原始的菌株(即培養基中沒有組氨酸也能生長的菌株)。本測試通過加入受試物後，在不含組氨酸的培養基上檢測所生長出來的回復突變菌落數目，來評估受試物的致突變性。

(2) S9 - 哺乳類動物肝臟微粒體酶(*microsome enzyme*)

S9 的製備方法：先用酶誘導劑(例如:Aroclor 1254)注入成年大鼠體內，誘導第 5 日後處死大鼠，在無菌操作下取出肝臟及再經處理後，放入離心機 9000xg 離心 10 分鐘，然後取出上清液(*supernatant*)。

(3) 回復突變菌落數(*number of revertant colonies*) - 突變株經誘變物作用後回復為原始菌株的菌落數目。

(二) 哺乳類動物培養細胞的染色體畸變試驗

細胞：哺乳類動物原代或傳代培養細胞。

劑量：最少應設 3 個不同劑量組。

對照：陰性、陽性以及 S9 對照。

溶劑或生理鹽水可作為陰性對照；已知於染色體畸變試驗中呈陽性的化合物可作為陽性對照。

S9 對照是指受試物在有代謝活化條件下及沒有代謝活化條件下

與細胞接觸，以觀察其誘發畸變的情況。

代謝活化(metabolic activation)是指選用經誘導劑混合物處理後的哺乳類動物肝臟微粒體酶(microsome enzyme)(即 S9)以將受試藥物轉化為高度反應的代謝產物(highly reactive metabolites)。

藥物作用及標本製作時間：藥物和細胞需接觸適當時間後進行觀察。一般在接觸 24 和 48 小時後收穫細胞，並製作標本進行觀察。代謝活化組則須作用 6 小時以上。

顯微鏡檢查：每種濃度至少觀察 100 個分裂中期細胞(metaphase cell)，在油鏡下(一般為 2500-4000 倍)觀察染色體畸變數和畸變類型。按受試物不同濃度、對照，以及不同作用時間，列表表示。

判定：符合以下任何一條並具有統計學意義的，即可判定為陽性：

1. 受試物所誘發的染色體畸變數的增加與劑量有依賴關係。
2. 某一測試點呈現可重複的增加。

(三) 嚙齒動物微核(micronucleus)試驗

動物：通常選用小鼠。一般每組 10 隻，雌雄各半，或至少每組 6 隻成熟雄性小鼠。

給藥途徑和方法：應與臨床使用的途徑一致。一般為單次給藥，也可多次給藥。

劑量：最少應設 3 個不同劑量組，另設陰性及陽性對照組。

對照：溶劑或生理鹽水可作為陰性對照；已知陽性藥物可作為陽性對照。

鏡檢：在給藥後適當時間處死動物，取骨髓塗片。每隻動物至少計數 1000 個多染紅細胞(polychromatic erythrocytes)，檢查計數中帶微核的細胞數，以%表示，經統計判定結果。

判定：在統計學上符合以下兩條其中之一，可判定為陽性：

- (1) 受試物誘發微核率增加並與劑量有依賴關係。
- (2) 某一測試點微核增加並有可重複性。

致癌試驗 技術指引

(A) 試驗方法

可分為預備試驗和正式試驗兩個階段。預備試驗旨在測定在正式致癌試驗中所應採用的最高劑量，如果已經掌握了有關資料，則不需要再做此試驗。用作試驗的動物應考慮其對感染的抵抗力、壽命長短、自發腫瘤的頻率高低以及對已知致癌原的敏感性等條件。

(一) 預備試驗

動物：應與正式試驗相同，最好用兩種動物。

劑量和分組：設三個以上不同劑量，另設對照組齧齒類動物，每組雌雄各 10 隻。

給藥期：一般須連續給藥 90 天，但或須延長給藥期。

受試物和給藥途徑：均應與正式試驗時相同。

觀察與檢查：每天觀察動物一般狀況，每周一次測量動物體重。對死亡動物及試驗期末動物，均須解剖檢查並作病理解剖記錄，肉眼觀察認為有病變，或有可疑病變的內臟，應進行病理組織學檢查。

結果判定：以無死亡、無明顯毒性症狀、體重增長不低於對照組 10% 的最高劑量，作為致癌試驗的最高劑量。

(二) 正式致癌試驗

動物：至少應採用兩種動物，例如大鼠或小鼠。

劑量和分組：最少應設 3 個不同劑量組及 1 個對照組，最好另設 1 個空白對照組。每組動物數目至少 100 隻，雌雄各半。

給藥途徑：應與臨床給藥途徑一致。

給藥期：大鼠 24 個月以上，小鼠 18 個月以上。

試驗過程：-對所有動物應每天觀察一般症狀，開始時每周測一次體重和攝食量，第十三周後，至少每四周測一次。應儘量減少腫瘤以外的死亡率。

-如發現有瀕死的動物，應立即隔離或處死，並進行器官組織的肉眼檢查，和病理組織學檢查。在處死時，可採血液樣本檢查紅、白血球數目，和作血片檢查血象。

-如在試驗組和對照組觀察到有腫瘤性病變或可疑腫瘤性病變時，則應對以下器官進行病理組織學檢查：皮膚、乳腺、淋巴結、唾液腺、胸骨、脊椎及大腿骨、胸

腺、氣管、肺及支氣管、心、甲狀腺及甲狀旁腺、舌、食道、胃、十二指腸、大腸、小腸、肝、胰、脾、腎、腎上腺、睪丸、卵巢、性腺及其附屬器、眼球、腦下垂體、脊髓及其他。

-如果試驗組和對照組無肉眼可見的腫瘤性病變，則對高劑量組的部份動物的上述器官進行病理組織學檢查，如發現有腫瘤病變，則需對全部動物進行病理組織學檢查。

結果判斷：在統計學上符合下列條件之一者，則判斷為陽性：

- i) 試驗組腫瘤陽性，對照組陰性；
- ii) 試驗組和對照組均有腫瘤發生，但試驗組腫瘤發生率高於對照組；
- iii) 試驗組腫瘤發生的部位多於對照組；
- iv) 試驗組和對照組腫瘤發生率雖無明顯差異，但試驗組腫瘤出現較早。

生殖毒性試驗 技術指引

(A) 試驗方法

應分三部份進行：

(一) 一般生殖毒性試驗 (受孕前及妊娠初期的試驗)

- 動物： 可用大鼠或小鼠，雌雄最少各 20 隻。
- 劑量和分組： 設 2-3 個不同劑量組加 1 個陰性對照組，必要時可設陽性對照組。
- 給藥途徑： 應與臨床給藥途徑一致。
- 給藥期： 雄性-配種前 60 日開始直至成功交配
雌性-配種前 14 日至成功交配後及胎兒器官開始形成為止。
- 試驗過程： 每籠內置一雌一雄受試動物，合籠期兩周。也可根據需要只給雄性動物受試物或只給雌性動物受試物，例如凡同妊娠有關的中藥可只給雌性動物受試物。每天檢查以確定動物是否交配過。試驗過程中，應記錄動物的一般狀況、體重變化和進食量。
交配過的動物，雌性到期全部處死，解剖檢查並計算妊娠率、死胎數目及比率、活胎數目及比率、胎兒重量；檢查胎兒外觀、內臟及骨骼發育，必要時進行組織學檢查。
用於交配的雄性動物，和未發現進行成功交配的雌性動物，也應在適當時候處死並進行屍體檢查，作仔細的器官組織解剖檢查。

(二) 致畸胎試驗 (器官形成期的試驗)

- 動物： 至少用一種齧齒類 (至少 30 隻) 及一種非齧齒類的雌性動物 (至少 12 隻)。
- 劑量和分組： 設 3 個不同劑量組，另設 1 個陰性對照組，最好加設陽性對照組。
- 給藥途徑： 應與臨床給藥途徑一致。
- 觀察和檢查： 整個試驗過程中，應注意觀察母體出現的症狀，定期記錄體重和攝食量，直至妊娠末期。妊娠末期處死動物，記錄每隻懷孕動物的重量、黃體 (corpus luteum) 數目、胎兒總數、活胎數目及比率、死胎數目及比率以及活胎重量、性別、外觀有無異常等。

(三) 圍產期毒性試驗 (分娩前後及授乳期的試驗)

動物： 選用至少一個在第二期試驗中使用的雌性品種，如用大、小鼠(每組可用 15-20 隻)或家兔(每組 8-12 隻)。

劑量和分組： 設 3 個不同劑量組加 1 個陰性對照組。

給藥途徑： 應與臨床給藥途徑一致。

觀察和檢查： -給藥期間，應注意觀察和記錄母體動物的一般狀況、體重和攝食量等情況。
-觀察並記錄平均每窩產兒數、死胎數、活胎重量、胎兒的性別和外觀有否畸形等。母鼠分娩後，同其子代一起，獨立分窩飼養，哺乳其子代，觀察和記錄子代的存活、生長、發育情況。
-應繼續觀察對受試動物第二代的影響。取一定數量幼子配對飼養，繼續觀察其存活、生長、發育情況，包括行爲、生殖能力及其它異常情況；生殖能力主要觀察其交配、妊娠能力。必要時可對子代進行學習能力的測定。