附件4

体外化学法皮肤变态反应 动力学直接多肽反应试验

（征求意见稿）

***In Chemico* Skin Sensitisation: Kinetic Direct Peptide Reactivity Assay（kDPRA）**

1 范围

本方法规定了动力学直接多肽反应试验的基本原则要求和方法。

本方法用于化妆品用原料的安全性毒理学检测，适用于单一成分物质、已知成分及含量的多成分物质和混合物的潜在皮肤致敏性评价。

2 试验目的

预测和评价化妆品用化学原料是否具有潜在的皮肤致敏性。

3 定义

3.1 多肽消耗百分比Percent Peptide Depletion

与溶剂对照相比，受试物消耗多肽的程度。

3.2 单一成分物质 Mono-constituent substance

一种主要成分含量至少为80%（w/w）的物质。

3.3 多成分物质Multi-constituent substance

含有两种或两种以上的主要成分，每种主要成分的含量≥10%（w/w）和< 80% （w/w）的物质。多成分物质是制造过程产生的。

3.4 混合物 Mixture

由两种或两种以上不发生化学反应的物质组成的固体或液体物质。

4 试验原理

试验基本原理同直接多肽试验（DPRA），有致敏性的受试物与多肽模拟的皮肤蛋白（本试验仅使用半胱氨酸多肽）共同孵育，导致多肽量减少。不同于DPRA仅测试化学物质一个浓度和一个时间点，kDPRA以时间和浓度依赖的方式量化评价被测物质的多肽结合反应性。被测物质采用5个浓度与半胱氨酸多肽溶液孵育不同时间（6个时间点）后，通过添加单溴二胺（Monobromobimane, mBrB，CAS 74235-78-2）与未结合的半胱氨酸多肽形成荧光复合物，来测量多肽的剩余量。如某时间点未结合多肽百分比的自然对数与受试物浓度呈线性关系（准一级反应），则通过斜率绝对值求得反应速率常数*k*，换算成对应时间点的反应动力学常数*k*t（单位：M-1s-1），并计算各时间点lg*k*t，以其中最大值lg*k*max进行结果判断评价受试物的皮肤致敏性。

5 试剂和受试物制备

5.1 多肽片段与纯度

半胱氨酸多肽：Ac-RFAACAA-COOH，分子量：751.35，纯度：≥95%。

5.2 阳性对照物

阳性对照采用肉桂醛（CAS 104-55-2；纯度≥95%）。

5.3 受试物

5.3.1溶剂的选择

溶剂首选乙腈，其次是pH 7.5的磷酸盐缓冲液。二甲基亚砜可能导致肽二聚化，应避免使用。

5.3.2 受试物溶液的配制

进行试验前，应评估受试物的溶解度。溶解性可用肉眼鉴别，应形成澄清透明的溶液。一般受试物最大配制浓度为20 mM（应完全溶解），对应反应体系终浓度为5mM。试验时用溶剂连续稀释以获得20、10、5、2.5和1.25 mM系列浓度的受试物溶液。

20 mM的受试物溶液应于试验当日配制，如提前配制，应验证其稳定性。通常配制量为5mL，受试物（阳性对照）理论称取量为分子量×10mg（以纯物质计）。

kDPRA在技术上适用于成分和含量明确的多成分物质和混合物的测试，此时，可以根据不同组分（不包括水）的占比和分子量计算受试物总的纯度和单一的表观分子量，用于计算制备20 mM溶液的取样量。

5.3.3 阳性对照溶液的配制

按受试物溶液的配制方法，用乙腈溶解阳性对照物制成20 mM浓度的溶液，并稀释得到20、10、5、2.5和1.25 mM系列浓度的溶液。

5.4 多肽贮备液的配制

称取适量半胱氨酸多肽，用pH 7.5的磷酸盐缓冲液配制成0.667 mM（0.501 mg/mL）的溶液。孵育前新鲜配制，配制时使用涡旋仪震荡溶解，必要时可用超声溶解，应在冰浴中进行，防止多肽降解。

pH 7.5磷酸盐缓冲液：取0.1 mol/L磷酸二氢钠溶液18 mL加0.1 mol/L磷酸氢二钠溶液82 mL混合，测定pH值，应在7.50±0.05之间。若偏酸性，加入0.1 mol/L磷酸氢二钠溶液进行调节。若偏碱性，加入0.1 mol/L磷酸二氢钠溶液进行调节，4℃保存，可在4周内使用。

5.5 单溴二胺溶液的配制

称取8.1 mg单溴二胺置于10 mL容量瓶中，用乙腈定容至刻度，制成3 mM单溴二胺溶液。现用现配，避光保存。

6 试验步骤

6.1 试验设计

试验设置受试物组（终浓度为0.31 mM、0.63 mM、1.25 mM、2.5 mM、5 mM）、阳性对照组（positive control, PC）、受试物对照组（test chemical control, SC）、溶剂对照组（vehicle control, VC）和空白对照组（blank control, BC），其中受试物组每个浓度3个重复，VC组、BC组12个重复，PC和SC每个浓度一个孔。以3个受试物（A、B、C）为例加样示例参见图1。

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | VC组（溶剂+0.5 mM多肽） | | | | | | | | | | | |
| B | BC组（溶剂） | | | | | | | | | | | |
| C | 0.31 mM受试物A  +0.5 mM多肽 | | | 0.31 mM受试物B  +0.5 mM多肽 | | | 0.31 mM受试物C  +0.5 mM多肽 | | | 0.31 mM受试物A+缓冲液 | 0.31 mM受试物B+缓冲液 | 0.31 mM受试物C+缓冲液 |
| D | 0.63 mM受试物A  +0.5 mM多肽 | | | 0.63 mM受试物B  +0.5 mM多肽 | | | 0.63 mM受试物C  +0.5 mM多肽 | | | 0.63 mM受试物A  +缓冲液 | 0.63 mM受试物B  +缓冲液 | 0.63 mM受试物C  +缓冲液 |
| E | 1.25 mM受试物A  +0.5 mM多肽 | | | 1.25 mM受试物B  +0.5 mM多肽 | | | 1.25 mM受试物C  +0.5 mM多肽 | | | 1.25 mM受试物A  +缓冲液 | 1.25 mM受试物B  +缓冲液 | 1.25 mM受试物C  +缓冲液 |
| F | 2.5 mM受试物A  +0.5 mM多肽 | | | 2.5 mM受试物B  +0.5 mM多肽 | | | 2.5 mM受试物C  +0.5 mM多肽 | | | 2.5 mM受试物A  +缓冲液 | 2.5 mM受试物B  +缓冲液 | 2.5 mM受试物C  +缓冲液 |
| G | 5 mM受试物A  +0.5 mM多肽 | | | 5 mM受试物B  +0.5 mM多肽 | | | 5 mM受试物C  +0.5 mM多肽 | | | 5 mM受试物A  +缓冲液 | 5 mM受试物B  +缓冲液 | 5 mM受试物C  +缓冲液 |
| H | 0.31 mM PC+0.5 mM多肽 | 0.63 mM PC+0.5 mM多肽 | 1.25 mM PC+0.5 mM多肽 | 2.5 mM PC+0.5 mM多肽 | 5 mM PC+0.5 mM多肽 |  |  | 1.25 mM PC+缓冲液 | 2.5 mM PC+缓冲液 | 5 mM PC+缓冲液 | 10 mM PC+缓冲液 | 20 mM PC+缓冲液 |

图1 kDPRA反应板加样示例

6.2 操作步骤

每个反应时间分别准备应用板（受试物溶液稀释板）和反应板。应先准备反应板，随后立即准备含有受试物稀释液的应用板，并将各组受试物溶液立即加入到反应板中。

6.2.1 反应板的准备

使用黑色96孔板，参照图1准备各时间点的反应板。分别在A1~A12、C1-H1~C5-H5、C6~G6、C7-G7~C9-G9孔中加入120 μL 0.667 mM多肽溶液，在B1~B12、C10-G10~C12-G12、H8~H12孔中加入120 μL pH7.5的磷酸盐缓冲液。

6.2.2 应用板的准备

准备2 mL深孔板，参照图2准备各时间点的应用板。分别在A行、B行、C行~F行中每孔分别加入300 μL溶剂，将600 μL 20 mM受试物储存液加入G行。使用多通道移液器从G行吸取300 μL，加入F行，随后按同样方法依次稀释至C行。在H1~H4每孔中每孔分别加入600 μL溶剂，将1200 μL 20 mM阳性对照物储存液加入H5孔。使用移液器从H5孔吸取600 μL，加入H4行，按同样方法依次稀释至H1。从H1~H5中吸取300 μL溶液转移到H8~H12孔。配制完成后及时用封板膜密封待用。

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 |
| B | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 | 溶剂 |
| C | 1.25 mM受试物A | 1.25 mM 受试物A | 1.25 mM受试物A | 1.25 mM受试物B | 1.25 mM受试物B | 1.25 mM受试物B | 1.25 mM受试物C | 1.25 mM 受试物C | 1.25 mM 受试物C | 1.25 mM 受试物A | 1.25 mM 受试物B | 1.25 mM 受试物C |
| D | 2.5mM受试物A | 2.5mM受试物A | 2.5mM受试物A | 2.5mM受试物B | 2.5mM 受试物B | 2.5mM受试物B | 2.5mM受试物C | 2.5mM 受试物C | 2.5mM 受试物C | 2.5mM 受试物A | 2.5mM 受试物B | 2.5mM 受试物C |
| E | 5 mM受试物A | 5 mM受试物A | 5 mM受试物A | 5 mM 受试物B | 5 mM 受试物B | 5 mM受试物B | 5 mM受试物C | 5 mM 受试物C | 5 mM 受试物C | 5 mM 受试物A | 5 mM 受试物B | 5 mM 受试物C |
| F | 10 mM受试物A | 10 mM受试物A | 10 mM受试物A | 10 mM 受试物B | 10 mM 受试物B | 10 mM受试物B | 10 mM受试物C | 10 mM 受试物C | 10 mM 受试物C | 10 mM 受试物A | 10 mM 受试物B | 10 mM 受试物C |
| G | 20mM受试物A | 20mM受试物A | 20mM受试物A | 20mM受试物B | 20mM 受试物B | 20mM 受试物B | 20mM受试物C | 20mM 受试物C | 20mM 受试物C | 20mM 受试物A | 20mM 受试物B | 20mM 受试物C |
| H | 1.25 mM　PC | 2.5mM PC | 5mM  PC | 10mM PC | 20mM  PC |  |  | 1.25 mM PC | 2.5mM PC | 5mM PC | 10mM PC | 20mM PC |

图2 应用板加样示例

6.3 孵育

使用多通道移液器从应用板中吸取40 μL配制好的溶液加入反应板对应孔中，用封板膜将反应板密封，200 rpm/min震摇5 min后，25 ℃分别孵育10 min±30 s、30 min±3 min、90 min±5 min、150 min±10 min、210 min±10 min、1440 min±15 min。

6.4 测定

孵育结束后，撕下封板膜，每孔加入新鲜配制的3 mM单溴二胺溶液40 μL。200~300 rpm/min震摇5 min后，用酶标仪在激发波长390 nm，发射波长480 nm下检测荧光强度。

7 数据处理

7.1荧光值计算和校正

计算BC组、VC组的平均荧光强度和标准差，VC孔减去BC组的平均荧光强度值，各浓度受试物和阳性对照孔减去各自的对照组的荧光强度值。

计算每个测试浓度三个重复孔的平均荧光强度和标准差，采用*t*检验统计与VC组（12个重复）的平均多肽浓度是否有显著性差异。

7.2多肽消耗率计算

按以下公式计算多肽消除率：

多肽消耗率（%）=[1-] ×100%

7.3 反应动力学常数计算

如给定时间的最高测试浓度（受试物终浓度为5 mM）符合半胱氨酸多肽结合阳性标准，即多肽消除率≥13.89%，且与VC组差异有显著性，对该暴露时间进行进一步计算反应动力学常数。如不符合阳性标准，则受试物为非反应性。

每个时间点，以未消耗肽占比（%）的自然对数，即ln（100-dp）为纵坐标，受试物浓度为横坐标绘制反应曲线，若两者呈线性相关（相关系数*r*＞0.90），则得到的负斜率的绝对值即为准一级反应速率常数*k*observed（mM-1），按照下式计算各时间点反应动力学常数*k*t（M-1s-1）：

*kt*=*k*observed·

注：t为孵育时间，以min表示。

计算所有满足*r*＞0.90的孵育时间的lg*k*t，取其中最大值为lg*k*max。

8 试验成立条件

阳性对照组90 min时间点 lg*k*值应在-1.75 M-1s-1~-1.40 M-1s-1范围内，若90 min时间点没有得到lg*k*值，150 min时间点lg*k* 应在-1.90 M-1s-1~-1.45 M-1s-1范围内。

至少有5个时间点溶剂对照组变异系数（Coefficient of Variation，CV）＜12.5 %。

9 结果判定标准

按表1 对受试物进行致敏性分级。

表1 kDPRA结果判断

|  |  |
| --- | --- |
| 试验结果 | 预测结果 |
| lg*k*max≥-2.0 | 极强或强致敏剂 |
| 非反应性或lg*k*max＜-2.0 | 非致敏剂或中、弱致敏剂 |

10 注意事项

10.1 受试物溶剂为磷酸盐缓冲液

如果受试物溶剂为磷酸盐缓冲液，则半胱氨酸多肽贮备液配制浓度为1 mM（0.752 mg/mL），同时反应板制备时半胱氨酸多肽贮备液（或磷酸盐缓冲液）每孔加样体积减少到80 μL，然后再加入乙腈或磷酸盐缓冲液40 μL补至120 μL，使所有孔中乙腈总体积仍为40 µL。

10.2 非线性反应

出现非线性反应时无法通过斜率法求得速率常数。速率常数可以根据多肽消除率个体值按以下公式计算：

*k*=

注：dp为多肽消除率（%），E为受试物的浓度，t是孵育时间。

根据该公式，计算多肽消耗率高于13.89%的阈值的每个时间点t和每个浓度E下的速率常数。将每个时间点不同浓度多肽消耗率求平均值，然后得到lg*k*max值。

在发生明显多肽结合的情况下，很少会出现非线性反应。出现非线性反应进行重复试验，以检查这种非线性反应是受试物固有的，还是试验误差所致。如果非线性结果可重复，则判定受试物存在固有的非线性反应，可采用上述公式基于个体值的计算结果进行判断。若仅在早期时间点观察到显著的肽消耗，但在随后的时间点没有观察到，也可以将早期时间点的lg*k*t作为结果进行致敏性分级判定。

10.3 低溶解度受试物

对于最大溶解浓度低于20 mM的受试物，可在较低浓度下进行试验，如出现lg*k*max≥-2.0的结果，受试物可以判断为GHS 1A亚类皮肤致敏物，但对于非致敏性或lg*k*max＜-2.0的结果则不能得出明确结论。此外，当得到lg*k*max值在 -1.93~-2.06范围内，无法进行受试物致敏性分级判定，需要重新测试和/或补充额外的数据/信息进行结果判定。

10.4 特殊化合物的适用性

金属化合物可通过共价结合以外的机制与蛋白质发生反应，该方法不适用于金属化合物。此外，kDPRA仅测量与半胱氨酸肽的反应性，不适用于具有赖氨酸专属反应性的强致敏剂，如一些酰基卤化物、酚酯或醛类等。

有些化合物（如：苯基炔丙基醛，phenylpropionic aldehyde）不与肽共价结合，但可促进其氧化（即半胱氨酸二聚化），会引起测得多肽消耗量“增加”，可能导致假阳性结果和/或预测反应性更高。

该方法没有代谢活化系统，不能用于检测需要进行酶促反应生物活化后成为致敏剂的化学物质（如3-二甲氨基丙胺，3-Dimethylaminopropylamine）。大部分通过非生物转换后形成致敏物质的化合物（如半抗原）能够被该方法正确评价，但发生自发快速氧化的半抗原由于氧化停滞阶段可引起反应速率的降低，需要更多数据确定其在氧化条件下的弱反应性。如芳香胺、儿茶酚类或氢醌类。

受试物自身荧光（如3,3',4',5-四氯水杨酰苯胺，tetrachlorsalicylanilide），荧光猝灭或与单溴二胺的相互作用可影响试验结果。如：硫醇结构中的1-SH可以与单溴二胺相互作用，导致荧光增强，因此kDPRA不适用于含有1-SH的硫醇类物质，包括在试验条件下产生并释放游离-SH的物质。

体外化学法皮肤变态反应 动力学直接多肽反应试验方法（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，中国食品药品检定研究院组织开展了《体外化学法皮肤变态反应 动力学直接多肽反应试验》方法的研究制定工作。现就工作有关情况说明如下：

1. 起草原则

本方法起草是为顺应国际发展趋势，遵循实验动物3R原则，减少实验动物用量，提升动物福利水平。积极转化新途径技术方法，促进我国化妆品安全评价技术与国际接轨。

本方法主要转化自OECD Test Guideline No.442C In chemico Skin Sensitisation Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins（Adopted: 20 June 2022 Corrected: 25 June 2024），是比较成熟的、被多数国家和组织认可的方法，原则上予以接受。在保证方法科学性和准确性的同时，考虑到目前国内各化妆品检验检测实验室实际的试验条件和化妆品原料的特点，按照我国《化妆品安全技术规范》的体例要求，提高了可操作性和便捷性。

1. 起草过程

1. 2023年11月，《化妆品安全技术规范 动力学直接多肽反应试验》制修订项目签订任务书。

2. 2023年12月，组织全文翻译OECD Test Guideline No.442C In chemico Skin Sensitisation Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins中 APPENDIX Ⅲ In chemico Skin Sensitisation：kinetic direct peptide reactivity assay（kDPRA）部分和操作规程DB-ALM protocol 217：The kinetic direct peptide reactivity assay（kDPRA）。

3. 2024年1月，在本实验室建立动力学直接多肽反应试验方法，依据OECD TG442C和DB-ALM方案217，制订动力学直接多肽反应试验实验室验证作业指导书。

4. 2024年2月，组织委托国内四家实验室对10个盲样开展实验室协作验证。

5. 2024年6月，结合我国化妆品监管政策要求、检测实验室的技术水平以及化妆品原料（产品）的特点，起草了《体外化学法皮肤变态反应 动力学直接多肽反应试验》内容包括方法适用范围、试验目的、定义、试验原理、试剂和受试物制备、试验步骤、数据处理、试验成立条件、结果判定标准、注意事项部分，并对草案进行多次修订完善。期间征求了合作单位中国食品药品检定研究院对草案的意见。

5. 2024年9月，向化妆品标委会提交《体外化学法皮肤变态反应 动力学直接多肽反应试验》草案及起草说明、验证报告等相关资料。

6. 2024年9月19日，召开化妆品标准化技术委员会安全评价分技术委员会第一次全体会议，根据与会专家对“动力学直接多肽反应试验方法（kDPRA）”项目的评审意见，进一步规范了文本，修改了“9结果判定标准”中预测结论的表述。

1. 与我国已有相关标准的关系

目前尚未见该方法的国家标准或行业标准。

1. 与《化妆品安全技术规范》（2015年版）（以下简称《规范》）中原方法的对比情况

《规范》中用于检测皮肤变态反应的方法包括：皮肤变态反应试验、皮肤变态反应：局部淋巴结试验（DA）、皮肤变态反应：局部淋巴结试验（BrdU-ELISA）、化妆品用化学原料体外皮肤变态反应：直接多肽反应试验、体外皮肤变态反应人细胞系活化试验、体外皮肤变态反应氨基酸衍生化反应试验、体外皮肤变态反应 U937细胞激活试验方法。体外皮肤变态反应ARE-Nrf2荧光素酶LuSens试验方法也已经公示征求意见稿。

其中皮肤变态反应试验、局部淋巴结试验均使用动物（豚鼠、小鼠）进行试验；直接多肽反应试验方法和氨基酸衍生化反应试验方法针对皮肤变态反应中的第一个关键分子事件进行检测；LuSens试验方法是针对皮肤变态反应中的第二个关键分子事件进行检测。人细胞系活化试验针对皮肤变态反应中的第三个关键分子事件进行检测。动力学直接多肽反应试验也是针对皮肤变态反应中的第一个关键分子事件进行检测，试验原理与直接多肽反应试验方法和氨基酸衍生化反应试验一致，但可以提供化合物皮肤致敏性亚类分级。该方法可以应用在皮肤致敏评价的整合策略中，用于化妆品原料的风险评估，并进一步提高替代试验方法的准确性和特异性。

本研究建立了皮肤变态反应的替代试验方法，以期与国际标准接轨，与《化妆品安全技术规范》中皮肤变态反应检测方法在技术上形成互补，建立我国动物实验替代方法体系，增补、修订和完善现有的标准与规范方法以及促进我国未来的化妆品安全评价体系提供技术支持。

1. 国际相关标准情况

本方法主要转化自经济合作和发展组织（Organization for Economic Co-operation and Development, OECD） Test Guideline No.442C In chemico Skin Sensitisation Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins中 APPENDIX Ⅲ In chemico Skin Sensitisation：kinetic direct peptide reactivity assay（kDPRA）部分。

本方法评价了受试物与合成含半胱氨酸多肽的反应动力学。具体为：将不同浓度的供试品与半胱氨酸多肽在25 ℃下孵育不同时间后，通过添加荧光染料单溴化亚胺（mBrB）来终止反应，mBrB与未结合的半胱氨酸多肽快速反应以形成荧光复合物，然后通过荧光测量确定剩余的未耗尽肽浓度算出多肽消耗率。如果最高浓度（5 mM受试物）的消耗超过13.89%的阈值（DPRA中用于阳性的截止值），并且该消耗与仅含多肽的对照组相比具有统计学显著性，则进行进一步计算，将未消耗的肽浓度的自然对数与每个时间点的供试受试物浓度作图。如果观察到线性关系（相关系数>0.9），则确定该曲线的斜率，并除以孵育时间，以计算速率常数[min-1 mM-1]。将该速率常数转换为[s-1 M-1]单位，并取对数。将在任何时间点观察到的最大值作为log *k*max，来区分极强或强致敏剂与非致敏剂或中、弱致敏剂。

1. 实验室验证情况

为了验证本试验方法的可行性，根据拟定的标准草案，本实验室选择了OECD TG442C及验证文件中10个化合物作为验证化合物，在本实验室和四家外部实验室开展实验室验证。实验验证结果基本一致，证实了本方法用于化妆品原料致敏性分级的适用性和可操作性。

1. 其他需说明的问题

1. 关于体例

本试验方法的体例主要参照现行《化妆品安全技术规范》（2015年版）中第六章 毒理学试验方法的体例，便于化妆品检验领域相关检验人员的阅读和实际操作。

1. 关于本方法的适用性

动力学直接多肽反应性试验（kDPRA）是DPRA（OECD TG 442 C，DB-ALM方案154）的改良版。kDPRA使用半胱氨酸-肽消耗的动力学速率来区分GHS亚类1A(极强或强致敏剂)和非GHS亚类1A致敏剂(非致敏剂或中、弱致敏剂)两种水平的皮肤致敏效力。此外，用该方法产生的动力学速率与致敏效力具有很强的定量相关性，因此可以在规定的方法（DA）中使用定量数据集成程序（DIP）进行皮肤致敏效力评估。

1. 关于皮肤致敏性分级

目前国际社会主要采用GHS分级标准。由于我国《化妆品安全技术规范》尚未全面采用GHS分级标准，因此，动力学直接多肽反应性试验（kDPRA）中关于化合物皮肤致敏性强度的分级，在GHS分类的基础上，参照DPRA的结果判定标准，按照极强或强致敏剂和非致敏剂或中、弱致敏剂进行分级判定。