

化妆品用化学原料体外荧光素渗漏试验方法

Fluorescein Leakage In Vitro Test Method

（征求意见稿）

1 范围

本方法规定了化妆品用化学原料体外荧光素渗漏试验方法的范围、试验目的、术语和定义、试验原理、试验材料与试剂、试验步骤、结果判定标准。

本方法适用于化妆品用水溶性化学原料眼刺激/腐蚀性的检测。

2 试验目的

预测和评价化妆品用水溶性化学原料对眼睛是否具有刺激作用或腐蚀作用。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本方法。

3.1 眼睛刺激性 eye irritation

眼球表面接触受试物后所产生的可逆性炎性变化。

3.2 眼睛腐蚀性 eye corrosion

眼球表面接触受试物后引起的不可逆性组织损伤。

3.3 荧光素渗漏率 fluorescein leakage

荧光素渗漏率（FL）是指暴露于受试物后的MDCK细胞模型，一定时间内（30min）对荧光素钠溶液的渗漏率。试验以不加细胞的嵌入型细胞培养皿（transwell）对荧光素钠溶液的渗漏率作为最大荧光素渗漏率；以阴性对照组MDCK细胞模型对荧光素钠溶液的渗漏率作为最小渗漏率（0%渗漏率）。

以受试物引起20%荧光素钠溶液渗漏率时的浓度FL₂₀（mg/mL）作为判定受试物眼刺激/腐蚀性的标准。

4 试验原理

以在嵌入型细胞培养皿（transwell）内单层培养的致密犬肾细胞（MDCK）来模拟眼角膜上皮细胞的屏障结构，通过检测暴露于受试物后的MDCK细胞模型对荧光素钠的渗漏率，来判断MDCK细胞模型的屏障破坏程度，进而预测和评估受试物的眼刺激/腐蚀性。

5 试验材料与试剂

5.1 细胞株

采用犬肾细胞MDCK，该细胞为贴壁生长。要求：来源清晰，代数明确（<30代）。

5.2 培养基

本方法采用不含酚红的DMEM-F12（1：1）混合培养液，培养液加入10%胎牛血清（FBS）和适量抗生素（终浓度为青霉素50~100IU/mL，链霉素50~100μg/mL）。

5.3 溶液的配制

0.01%（w/v）荧光素钠溶液：称取50mg荧光素钠，溶解于500mL不含酚红的HBSS溶液中，室温避光保存。

100mg/mL 月桂醇聚氧乙烯醚（Brij-35，CAS 9002-92-0）溶液：称取100mg Brij-35，溶解于1mL不含酚红的HBSS溶液中，可以37℃水浴或超声10min以内的方式助溶。

5.4 溶剂的选择

本方法溶剂为不含酚红的HBSS缓冲液，受试物应在HBSS中以 $\geq 250\text{mg/mL}$ 的浓度溶解（至少满足一个剂量 $\geq 100\text{mg/mL}$ ）；若受试物在HBSS中的溶解度 $< 100\text{mg/mL}$ ，且测出 $\text{FL}_{20} < 100\text{mg/mL}$ 时，试验条件仍成立。当受试物无法满足上述溶解条件时，不适用于本方法。

5.5 受试物的浓度选择及配制

受试物浓度梯度首选1、25、100、250mg/mL、原液或饱和溶液五个浓度作为浓度梯度进行检测，若受试物为固体，最高浓度首选750mg/mL。如果细胞毒性出现在浓度25~100mg/mL之间，则需要追加浓度梯度为：1、25、50、75、100mg/mL的测试；如果细胞毒性低于1mg/mL，则需追加浓度梯度为：0.01、0.1、0.25、1、10mg/mL的测试。受试物应在染毒前30min内新鲜配制，否则必须证实储存不影响其稳定性。可采用升温或超声助溶，超声时间为10min以内，如升温助溶，需注意室温下所有浓度的受试物溶液需保持溶液或混悬液状态。

5.6 对照的选择

实验应同时设空白对照、阴性对照和阳性对照。以不种细胞的transwell模型加溶剂（不含酚红的HBSS或矿物油）作为空白对照；MDCK细胞模型以溶剂（不含酚红的HBSS或矿物油）作为阴性对照，以100mg/mL Brij-35溶液作为阳性对照。

6 试验步骤

6.1 细胞建模

6.1.1 细胞复苏

6.1.2 接种细胞于含10%胎牛血清且不含酚红的DMEM-F12（1：1）混合培养液中，每

天观察细胞生长状态，稳定传2代后准备建模。

6.1.3 用胰酶-EDTA（0.05% w/v胰酶，0.02% w/v EDTA）消化细胞，收集细胞于离心管中，800~1000rpm/min离心5min，重新悬浮细胞于培养液中，调整细胞浓度为 4×10^5 /mL。

6.1.4 取无菌24孔板每孔加入400 μ l 新鲜培养基，将嵌入型细胞培养皿transwell（嵌入型细胞培养皿厚度为80-150 μ m，孔径约0.45 μ m）放入24孔板中，注意避免气泡。其中21个transwell内室中加入400 μ l 细胞悬液（终浓度约 1.6×10^5 个/transwell），剩余3个transwell中加入同体积的培养液。将24孔板放入37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱中培养96h后，检测前一天transwell内外换新鲜培养液。

6.2 染毒和清洗

以400 μ l/孔预热至37 $^{\circ}$ C的HBSS（无酚红）清洗transwell内室2遍。以200 μ l/孔的受试物浓度梯度溶液进行染毒，染毒时间为1min，每个浓度做3个复孔，染毒后以400 μ l/孔预热至37 $^{\circ}$ C的HBSS（无酚红）清洗transwell内室2遍。同时空白对照、阴性对照和阳性对照做相应的处理。染毒图示见表1。

| | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|
| M | M | M | B | B | B |
| P | P | P | T1 | T1 | T1 |
| T2 | T2 | T2 | T3 | T3 | T3 |
| T4 | T4 | T4 | T5 | T5 | T5 |

表 1 样品染毒示意图

注：M：仅有 transwell，不加细胞

B：种了细胞的 transwell，加阴性对照（不含酚红的 HBSS 或矿物油）

P：种了细胞的 transwell，加阳性对照（100mg/mL Brij-35 溶液）

T1-T5：种了细胞的 transwell，加配制好的受试物浓度梯度工作液，T1 代表最低浓度，T5 代表最高浓度

6.3 荧光素渗漏率测定及计算

6.3.1 荧光素渗漏率测定：取新的24孔板，每孔中加入400 μ L HBSS（无酚红）溶液，将上述清洗后的transwell对应放入新的24孔板中，transwell内室加入400 μ L 0.01%荧光素钠溶液，注意避免荧光素钠溶液直接进入transwell室外的孔中，室温避光静置30min，然后从24孔板中移除transwell，移除时需避免transwell内室中多余的荧光素钠溶液进入24孔板。在多功能酶标仪中测定荧光强度(激发波长485nm，发射波长530nm)。根据荧光强度计算荧光素渗漏率FL。

$$\text{荧光素渗漏率 FL(\%)} = \frac{m-y}{x-y} \times 100$$

其中：m：三个重复测量的平均荧光强度；

x：最大荧光素渗漏的平均荧光强度（M组）；

y：0%荧光素渗漏的平均荧光强度（B组）。

6.3.2 FL₂₀计算：根据受试物各浓度FL的结果，计算FL₂₀。

$$\text{FL}_{20}(\%) = \frac{20 - B}{C - B} \times (M_C - M_B) + M_B$$

其中：B：荧光素渗漏率<20%；

C：荧光素渗漏率>20%；

M_C：C对应的浓度(mg/ml)；

M_B：B对应的浓度(mg/ml)。

6.4 结果判定

当受试物 FL₂₀（mg/mL）≤100 mg/mL时，判定受试物具有眼腐蚀性或强刺激性。

6.5 试验体系的质控

（1）0%荧光素渗漏值（B组）平均数应小于等于最大荧光素渗漏值（M组）平均数的6%；

（2）阳性对照组荧光素渗漏率应介于20%~40%之间。

7 结果解释

当受试物 FL₂₀（mg/mL）>100 mg/mL时，需开展进一步研究确证受试物的眼刺激性。本试验适用于水溶性的化学原料，在该试验中当高挥发性物质结果判定为非刺激/腐蚀性时，需加做其他试验加以判定。

化妆品用化学原料体外荧光素渗漏试验方法

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，国家药品监督管理局化妆品标准专家委员会秘书处组织开展了化妆品用化学原料体外荧光素渗漏试验方法的起草工作。现就起草工作有关情况说明如下：

一、起草原则

本方法的编制本着客观、易行、针对性强等原则，采用目前各化妆品检验检测实验室已具备的试验条件、技术能力，保证方法科学规范的同时，兼具和国际标准的接轨性、先进性，以及可操作性、便捷性。

二、起草过程

本方法于 2018 年立项，起草过程包括：拟定研究内容；建立荧光素渗漏试验(FL)试验方法并确认试验条件；开展实验室间盲样比对；与我国现行的试验方法比较分析；形成方法草案并通过标委会结题验收；根据标委会专家意见，修改完善技术方法，起草征求意见稿。

三、与我国已有相关标准的关系

为确保化妆品的安全性，我国相关法律法规要求对可能接触眼部的化妆品及其原料进行眼刺激性/腐蚀性评价。目前，我国检测化妆品眼刺激性/腐蚀性的主要依据为《化妆品安全技术规范》中急性眼刺激性/腐蚀性试验，以此外推对人体健康的可能危害；此外，对于化妆品用化学原料眼刺激性/腐蚀性的检测依据还包括《化妆品安全技术规范》中化妆品用化学原料兔角膜上皮细胞短时暴露体外试验(STE)方法，该方法不能完全替代动物试验，需结合其他方法形成眼刺激性评估策略。本研究的主要内容是建立化妆品用化学原料眼刺激性/腐蚀性的体外试验方法，与《化妆品安全技术规范》现有内容不冲突，技术方法上形成互补，为形成眼刺激性评估策略增加备选方法，为推进我国动物替代方法研究与验证，促进我国化妆品眼刺激性安全评估搭建检验策略提供技术支持与保证。

四、与国际同类标准的关系

随着经济与科技的持续高速发展、社会进步、动物福利和“3R”原则的提出，近年来对于如何减少、优化、替代动物试验成为全球化妆品安全评价领域特别关注的焦点。1999 年，英国诺丁汉大学的研究团队提出了该项方法，2006 年欧盟动物替代验证中心组织完成了方法验证并形成荧光素渗漏测试标准，2012 年经济合作和发展组织（OECD）发布了荧光素渗漏试验(FL)操作指南，2017 年进行了修订，该方法用于识别化学品的眼腐蚀性及严重刺激性。

本方法涵盖了 2017 年更新的 OECD TG 460 “荧光素渗漏试验(FL)操作指南”的技术要求，同时结合我国化妆品检验检测机构的能力，对试验操作中的重要技术参数进行了确认。本方法体现眼刺激性/腐蚀性体外检测的策略，贴近国内实验室实际情况，更具可操作性。

五、实验室验证情况

包括技术指标、参数、公式、试验方法、检验规则等在内的各项技术内容,依据来源自 OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No.460, 2017) (OECD《化学品测试指南》460号,2017年)和欧盟 EURL ECVAM 的荧光素渗漏试验测试标准 (DB-ALM Protocol No 71),基本涵盖了 OECD TG 460 对采用对象、试验操作和结果分析的各项相关技术要求。在此基础上,本方法还结合我国化妆品检验检测机构的能力,对实验操作中的某些条款和技术要求进行了确认和优化。

在方法转化过程中,参考 OECD 指南及文献数据库选择 10 种参考物质进行了实验室内方法建立,检测结果与 OECD 数据库结果一致。2019 年 11 月,分别邀请 A、B、C 3 家不同实验室参与了盲样比对工作,3 家实验室对于提供的 7 种盲样(从参考物质中选择了 4 种眼刺激化学品分类标示为 Category 1, 2 种为化学品分类标示 Category 2, 1 种为化学品分类标示 No Category 进行编号)的检测结果均一致,且与 OECD 的参考数据吻合,表明本方法在我国实验室建立是可行的。

在试验体系成立的质控条件中,OECD 指南原文为“最大荧光素渗漏值平均数应当大于 4000, 0% 荧光素渗漏值平均数应小于等于 300, 100% 荧光素渗漏(最大荧光素渗漏平均数-0% 荧光素渗漏平均数)值应在 3700-6000”,该要求中的平均数为酶标仪读数的平均值。该质控条件是为了确保试验建模成功后,MDCK 细胞与嵌入式培养皿(transwell)之间具有一定的结合度,在实验过程中不会因操作影响结果判定。但在方法转化过程中发现,随着近几年酶标仪技术的更新换代以及对光信号检测能力的提升,新式酶标仪较过去更为灵敏,显示的结果为七位数以上,存在无法以传统酶标仪的读数进行直接转换的问题。通过大量查阅该方法在早期欧盟研发及验证相关的文献报道,发现方法研发团队发表过与 OECD 指南等效的质控条件:“0% 荧光素渗漏值平均数应小于等于最大荧光素渗漏值平均数的 6%”。结合荧光素渗漏试验的原理及结果计算的方法,通过绘制荧光素渗漏的标准曲线、统计分析所有实验室原始数据等手段对上述质控条件进行确认,分析得出采用荧光素渗漏值平均数比值的方式比规定酶标仪读数的方式更为科学合理。

六、其他应予说明的事项

1. 本方法的条件确认

本方法适用于水溶性化妆品用化学原料开展眼刺激/腐蚀性的评价,测试结果的特异性、再现性和稳定性良好,可作为体外眼刺激性/腐蚀性检测策略的方法之一。

2. 本方法的可行性分析

本方法操作简便,所需的相关技术、人员、设备等条件易达到。我国开展化妆品注册备案检验检测的机构均具有建立本方法开展检验检测的条件和能力。

3. 参考化学物质

附件:参考化学物质目录

附件

参考化学物质目录

参照 OECD 的数据库（2017 版指南及文献），选择 10 种已知眼刺激/腐蚀性的化学物质作为参考化学物质。

本研究选用的 10 种参照化学物质

| 参考化学物质 | CAS | 眼刺激/腐蚀性 | |
|-----------|------------------------|-----------|-------------|
| 苯扎氯铵（5%） | Benzalkonium chloride | 8001-54-5 | Category 1 |
| 盐酸异丙嗪 | Promethazine | 58-33-3 | Category 1 |
| 氢氧化钠（10%） | Sodium hydroxide | 1310-73-2 | Category 1 |
| 十二烷基硫酸钠 | Sodium lauryl sulfate | 151-21-3 | Category 1 |
| 咪唑 | Imidazole | 288-32-4 | Category 2 |
| 4-羧基苯甲醛 | 4-carboxy-benzaldehyd | 619-66-9 | Category 2 |
| 异丙醇 | Isopropanol | 67-63-0 | Category 2 |
| 乙醇 | Ethanol | 64-17-5 | Category 2 |
| 2-甲基乙酰乙酸乙 | Ethyl-2-methylaceto-ac | 609-14-3 | Category 2 |
| 甘油 | Glycerol | 56-81-5 | No Category |

注：各受试物眼刺激/腐蚀性为 OECD TG460（2017 版）参考物质表及文献中给出的参考眼刺激/腐蚀性。

分类级别：No Category 相当于无/微刺激性；Category 2 相当于 2A(轻刺激性)/2B(刺激性)；Category 1 相当于腐蚀性(不可逆眼损伤)。