

化妆品用化学原料体外皮肤变态反应： 氨基酸衍生生化反应试验

In Chemico Skin Sensitisation: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)

(征求意见稿)

1 范围

本方法适用于已知单一组分化妆品用原料潜在致敏性的评价。

2 试验目的

确定化妆品用化学原料是否会引起皮肤变态反应。

3 定义

3.1 氨基酸衍生物消耗百分比Percent Amino acid Derivative Depletion: 与溶剂对照相比, 受试物消耗氨基酸衍生物的程度。

3.2 共洗脱 Co-elution: 受试物在281nm处吸收显著, 并与氨基酸衍生物保留时间相同或色谱峰部分重叠, 干扰氨基酸衍生物定量分析。

4 试验原理

有致敏性的受试物与N-(2-(1-萘基)乙酰基)-L-半胱氨酸(NAC)和 α -N-(2-(1-萘基)乙酰基)-L-赖氨酸(NAL)模拟的皮肤蛋白进行反应, 消耗氨基酸衍生物。测定衍生物的量, 计算消耗值, 从而评价受试物是否引起皮肤致敏性。

5 试验材料与试剂

5.1 试剂

N-(2-(1-萘基)乙酰基)-L-半胱氨酸(NAC): 分子式 $C_{15}H_{15}NO_3S$, 分子量289.35, 纯度: >98%。

α -N-(2-(1-萘基)乙酰基)-L-赖氨酸(NAL): 分子式 $C_{18}H_{22}N_2O_3$, 分子量314.38, 纯度范围: >98%。

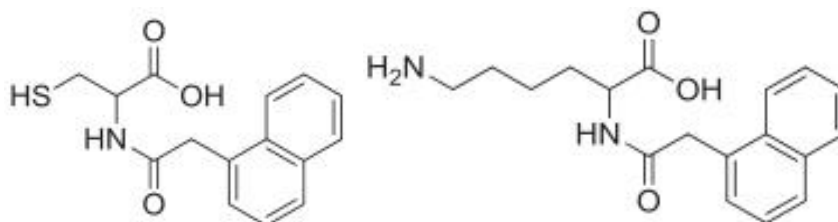


图1 左为 NAC 结构式 右为 NAL 结构式

5.2 阳性对照与受试化合物的配制

阳性对照溶液：取苯乙醛适量（纯度>90%），加乙腈制成1mmol/L的溶液，临用新制。

受试化合物溶液：溶剂选用蒸馏水、乙腈和丙酮，单一或混合使用制成1mmol/L的溶液，临用新制。如出现溶解不完全的情况，可将受试物先溶解在二甲基亚砜（DMSO）中，然后用乙腈稀释该溶液制备成1mmol/L受试化合物溶液。最终溶液中DMSO用量不得超过5%（V/V）。

反应固定液：1mL三氟乙酸（TFA）+40mL水于50ml离心管中，得到2.5% TFA水溶液。

5.3 氨基酸衍生物贮备液的配制

5.3.1 N-(2-(1-萘基)乙酰基)-L-半胱氨酸(NAC)贮备液：称取适量 NAC，用 pH8.0 的磷酸盐缓冲液配制成 6.667 μ mol/L 的溶液。储备液应在-80 $^{\circ}$ C下冷冻保存，存放时间不超过六个月，每次使用应验证其稳定性。

pH8.0 磷酸盐缓冲液：取 0.18g 无水磷酸氢二钠与 4.02g 无水磷酸二氢钠溶于 300ml 蒸馏水当中，每 300ml 缓冲液加入 1ml 的 0.1mmol/L EDTA 溶液，混合均匀，测终溶液 pH 在 7.9-8.1 之间，配制完成，每次使用前检查 pH。

5.3.2 α -N-(2-(1-萘基)乙酰基)-L-赖氨酸(NAL)储备液：称取适量 NAL，用 pH10.2 的磷酸盐缓冲液配制成 6.667 μ mol/L 的溶液。储备液应在-80 $^{\circ}$ C下冷冻保存，存放时间不超过六个月，每次使用应验证其稳定性。

pH10.2 磷酸盐缓冲液：取 4.26g 无水磷酸二氢钠溶于 286 mL 蒸馏水，加入 14 mL 0.1mol/L NaOH 溶液，每 300ml 缓冲液加入 1ml 的 0.1mmol/L EDTA 溶液。搅拌均匀，测终溶液 pH 在 10.1-10.3 之间，配制完成，每次使用前检查 pH。

5.3.3 氨基酸衍生物标准线性溶液的配制

NAC系列标准溶液的稀释溶剂：取15ml pH8.0磷酸盐缓冲液于50ml离心管，加1ml水、100 μ l三氟乙酸、3.9ml乙腈，振荡混匀，临用新制。

NAL系列标准溶液的稀释溶剂：取15ml pH10.2磷酸盐缓冲液于50ml离心管，加1ml水、100 μ l三氟乙酸、3.9ml乙腈，振荡混匀，临用新制。

先配制 5 μ mol/L 的标准溶液（std7）：300 μ L 6.667 μ mol/L NAC 储备液加入 1.5mL 离心管中，加入 20 μ L 水、2 μ L 三氟乙酸、78 μ L 乙腈。

系列标准溶液：取 std7 溶液，逐步稀释到下表浓度。std1 为稀释溶剂。NAL 线性溶液操作步骤与 NAC 一致。

表 1 线性点的摩尔浓度

序号	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7
浓度 $\mu\text{mol/L}$	0.000	0.15625	0.3125	0.625	1.250	2.500	5.000

5.3.4 液相待测溶液的配制

共洗脱对照：150uL磷酸盐缓冲液 + 50uL受试物溶液。

参比溶液A和B：150uLNAC + 50uL乙腈，平行样A三份B六份。NAL的操作步骤一致。

参比溶液C：150uLNAC + 50uL溶解受试物的溶剂，平行三份。若用混合溶剂，则需要制备每种溶剂的参比溶液C；如用乙腈和水混合溶液溶解的，则需要配制三份NAC的水溶液，三份NAC的乙腈溶液。NAL的操作步骤一致。

阳性对照溶液制备：150uLNAC + 50uL阳性对照（苯乙醛乙腈）溶液，三份平行样。NAL的操作步骤一致。

供试品溶液制备：150uLNAC + 50uL测试化学品溶液，三份平行样。NAL的操作步骤一致。

6 试验步骤

6.1 操作步骤

按进样顺序排列，5.3.4项下所有对照与测试样品均避光 $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 反应 $24\text{h}\pm 1\text{h}$ ，结束后30min内加入反应固定液50uL，观察反应前后是否产生沉淀。（如果反应前产生沉淀，阳性结果可用，阴性不可用；反应后产生沉淀，过滤后再进样。）

6.2 液相色谱条件

6.2.1 流动相

流动相A 0.1%三氟乙酸水溶液（V/V）；

流动相B 0.1%三氟乙酸乙腈溶液（V/V）。

6.2.2 色谱柱

十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(3.0mm \times 150mm, 2.7 μm)或等效色谱柱。

6.2.3 检测器及检测波长

检测波长为281nm，流速0.3ml/min。

NAC/NAL流动相梯度洗脱程序（可依据实际情况调整）：

NAC			NAL		
时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	70	30	0	80	20

NAC			NAL		
时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
9.5	45	55	9.5	55	45
10	0	100	10	0	100
13	0	100	13	0	100
13.5	70	30	13.5	80	20
20	70	30	20	80	20

7 数据处理

氨基酸衍生物消耗百分比计算公式：

$$\text{氨基酸衍生物消耗百分比} = \left(1 - \frac{\text{样品氨基酸衍生物峰面积均值}}{\text{溶剂对照氨基酸衍生物峰面积均值}} \right) \times 100$$

注：当氨基酸衍生物消耗值计算为负时，视为“0”值。

8 方法质控标准

符合以下条件，试验成立：

8.1 标准曲线： $r^2 > 0.990$ 。

8.2 阳性对照平均氨基酸衍生物消耗百分比：NAC: 6%-30%，SD（百分数表示，下同） $< 10\%$ 。NAL: 75%-100%，SD $< 10\%$ 。

8.3 受试物氨基酸衍生物消耗值SD：NAC小于10%，NAL小于10%。

8.4 参比溶液A的NAC/NAL平均浓度：3.2 $\mu\text{mol/L}$ -4.4 $\mu\text{mol/L}$ 。

8.5 参比溶液C的NAC/NAL平均浓度：3.2 $\mu\text{mol/L}$ -4.4 $\mu\text{mol/L}$ 。

8.6 参比溶液B、C峰面积RSD% $< 10\%$ (n=9)，每种溶剂对照C峰面积RSD% $< 10\%$ (n=3)。

8.7 NAC或NAL稳定性：ST(0h)与ST(24h)浓度相差 $\leq 10\%$ 。ST(0h)，NAC或NAL的初始浓度；ST(24h)，反应24h ± 1 h后NAC或NAL的浓度。

9 结果判定标准

9.1 当受试物与NAC和NAL都不发生共洗脱时，采用1:50 NAC和1:50 NAL模型（表2）判定。

表2 1:50NAC和1:50NAL判定模型

NAC 和 NAL 消耗百分比的均值	预测结果
0% \leq 消耗百分比的均值 $< 4.9\%$	阴性
4.9% \leq 消耗百分比的均值 $\leq 100\%$	阳性

9.2 当受试物仅与NAL发生共洗脱时，采用1:50 NAC模型（表3）判定。

表3 1:50 NAC判定模型

NAC消耗百分比的均值	ADRA预测结果
0%≤消耗百分比的均值<5.6%	阴性
5.6%≤消耗百分比的均值≤100%	阳性

9.3 当受试物同时与NAC、NAL发生共洗脱或者与NAC单独共洗脱时，消耗百分比<4.9%时判定结论为“无定论”，消耗百分比≥4.9%时判定结论为致敏阳性。

10 注意事项

10.1. 采用1:50 NAC和1:50 NAL模型时，NAC和NAL消耗百分比的均值在3%-10%之间；采用1:50 NAC模型时，消耗百分比在4%-11%之间，须进行重复测试；若前两次结果不一致，须再次测试。

10.2 已知组分的多组分化妆品用化学原料进行试验，可根据各组成成分（除水以外）的平均分子量进行1mmol/L样品的配制。

10.3 若受试物在建议溶剂中的溶解度达不到1mmol/L，理论上仍可以进行试验。在这种情况下得出的阳性结果仍有参考意义，但得出的阴性结果不能说明受试物一定没有致敏性。若一种受试物能在不同溶剂溶解度当中达到1mmol/L，不同溶剂的溶解形成的溶液实验数值可能不同。实际选择溶剂时应考虑溶液的稳定性。

10.4 液相进样序列建议参照表4执行。建议选用带有温度控制的样品盘，温度设置在4℃，并且序列运行时间尽量控制在30h之内。

表 4 液相进样序列

	标准溶液剂量1
	标准溶液剂量2
	标准溶液剂量3
	标准溶液剂量4
标准溶液和空白对照	标准溶液剂量5
	标准溶液剂量6
	稀释溶剂
	对照A平行样品1
	对照A平行样品2
	对照A平行样品3
共洗脱对照	受试物1共洗脱对照
	受试物2共洗脱对照...
	对照B平行样品1
对照	对照B平行样品2
	对照B平行样品3

重复进样第一次	对照C平行样品1 阳性对照平行样品1 受试物1平行样品1 受试物2平行样品1...
重复进样第二次	对照C平行样品2 阳性对照平行样品2 受试物1平行样品2 受试物2平行样品2...
重复进样第三次	对照C平行样品3 阳性对照平行样品3 受试物1平行样品3 受试物2平行样品3...
对照	对照B平行样品4 对照B平行样品5 对照B平行样品6

化妆品用化学原料体外皮肤变态反应：氨基酸衍生物试验 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皮肤变态反应：氨基酸衍生物试验的起草工作。现就起草工作有关情况说明如下：

一、起草原则

试验要求和规定逐步与国际接轨，对于已经比较成熟的、被多数国家和组织认可的方法，原则上予以接受。对某些内容进行具体化和明确化，在尽量提高可操作性的同时，兼顾了技术发展的前瞻性。本标准制定过程中还注意了科学性和合理性、协调性和有效性，以及通俗性和规范性之间的关系。

二、起草过程

本研究于2019年由化妆品标准专家委员会立项；2021年10月通过结题专家论证。

三、与我国已有相关标准的关系

本研究的主要内容是建立新的皮肤变态反应体外替代实验方法，与《化妆品安全技术规范》在技术方法上形成互补，以期与国际标准接轨，为推动我国动物实验替代方法体系的建立，促进化妆品贸易发展提供技术支持。

四、与国际同类标准的关系

2018年，经济合作和发展组织（OECD）正式发布ADRA方法的操作指南，将其用于化学物质皮肤致敏性的安全评价。

本方法涵盖了OECD 2018年正式发布“皮肤致敏性体外试验方法氨基酸衍生化反应试验操作指南”（OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS In Chemico Skin Sensitisation: Amino acid Derivative Reactivity Assay(ADRA)）的要求，并结合我国实验室特点，对实验操作中的重要质量控制条件进行了确认。本方法草案体现皮肤致敏性体外试验的试验思路，符合国内实验室实际情况，具有可操作性。

此方法各项技术内容的依据来源自OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS In Chemico Skin Sensitisation: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)（OECD《化学品测试指南》TG 442C，2018年），基本涵盖了其对采用对象、实验操作和结果分析的技术要求，并通过试验确认。

五、实验室验证情况

在本方法研究建立后，邀请3家单位对方法进行验证。所有单位对10种化合物（6种致敏阳性物，4种致敏阴性物）的预测判定结果与OECD TG 442C附表中给出的结果完全一致。

六、其他需要说明的问题

专家结题意见：明确方法适用范围，科学制定判定依据，修订溶液配制、操作步骤，规范文字说明，完善文本，修改后通过。

修改说明：明确使用范围与判定依据，修订溶液配置步骤操作步骤说明，修改部分文字表述。