附件2

牛角膜浑浊度和渗透性试验（征求意见稿）

Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Assay

1 范围

本方法规定了牛角膜浑浊度和渗透性试验的基本原则、要求和方法。

本方法适用于化妆品原料的潜在不可逆眼损伤和无刺激性的评价，适用于单一物质及混合物。

2 试验目的

本试验通过定量测定牛角膜浑浊度和渗透性的变化，以评价化学品原料对眼角膜的不可逆眼损伤程度。

3 定义

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 不可逆眼损伤 Irreversible Eye Damage

眼球表面接触受试物后引起的不可逆性组织损伤。

3.3 角膜的浑浊度 Corneal Opacity

角膜暴露于受试物后通透性改变的程度，角膜浑浊度增加表明角膜受损。

3.4 角膜的渗透性 Corneal Permeability

测定通过角膜细胞层的荧光素钠染料的量来代表角膜上皮损伤的指标。

4 试验原理

牛角膜浑浊度和渗透性试验是牛角膜接触化妆品原料后，通过测定角膜浑浊度和渗透性的变化来评估化学品原料的眼刺激程度。

5 试剂和材料

5.1 培养液

MEM培养液

MEM培养液（含酚红）

5.2 Hanks’溶液

称取氯化钙140 mg、六水合氯化镁100 mg、七水合硫酸镁100 mg、氯化钾400 mg、磷酸二氢钾60 mg、碳酸氢钠350 mg、氯化钠8 g、磷酸氢二钠48 mg、葡萄糖1 g，加水至1 L。临用新配。

5.3 荧光素钠溶液

液体受试物和固体受试物分别选用浓度为4 mg/mL和5 mg/mL的荧光素钠溶液进行渗透性试验。

5.4 阳性对照

N，N-二甲基甲酰胺作为液体受试物的阳性对照，20%咪唑溶液作为固体受试物的阳性对照。

5.5 阴性对照物

0.9%氯化钠溶液

5.6 牛眼

大于6月龄的牛眼，直径为1.8 cm ~2.5 cm。

牛眼放在2 ℃~4 ℃的Hanks’溶液中的使用时间为24 h内。

5.7 浑浊度仪及角膜夹持器（见附录A）

浑浊度仪是用来测量浑浊度的装置。根据浑浊度仪的光源不同，分为白光光源的浑浊度仪和单色光源的浑浊度仪。不同光源，体外刺激分的计算公式不同。

角膜夹持器由前室和后室两部分组成，前后室的内部直径均为1.7 cm，深度2.2 cm。

6 试验步骤

6.1 牛角膜的制备

剔除浑浊、有划痕、白斑、新生血管形成的牛眼。取无缺陷的牛眼，沿巩膜边缘2 mm~3 mm剪取并剥离角膜，角膜内皮层向上，置于Hanks’溶液中。

6.2 角膜安装

角膜内皮层向下对准O型环放置在夹持器的后室上，再将前室盖在角膜上，前后室组合，旋紧。

6.3 角膜平衡

按先后室再前室的顺序，将32 ℃预热的MEM培养液加满夹持器的前后室，确保没有气泡，将固定好的角膜夹持器垂直放置于32±1 ℃恒温设备中平衡1 h。

6.4 基准浑浊度的测定

角膜平衡后，按先前室再后室的顺序，吸出前后室培养液，重新加入预热的MEM培养液。 浑浊度仪测定并记录每个角膜的浑浊度值，作为基准浑浊度。白光光度仪测定浑浊度小于7的角膜、单色光浑浊度仪测定值介于1200 lux到1850 lux之间的角膜为合格角膜。

6.5 角膜的分组

取基准浑浊度符合要求的牛角膜，每次试验设受试物组、阳性对照组和阴性对照组，每组至少3只角膜。

6.6 受试物暴露

受试物暴露方式有两种，一种针对液体和表面活性剂（固体或液体），另一种针对非表面活性剂固体。

液体和表面活性剂以原液给样；半固体、乳霜和蜡通常按液体测试；纯表面活性剂以配制成浓度为10%液体测试。暴露时间为10 min。

非表面活性剂固体以配制成浓度为20%溶液或混悬液给样，暴露时间为4 h。

溶剂首选0.9%氯化钠溶液，也可根据受试物的性质选择蒸馏水或其他可证明对测试系统无影响的溶剂。

受试物根据物化性质给样方式有两种，一种直接给样法用于非粘性到微粘性的液体化学品，另一种开窗法适用于半粘性和粘性液体化学品以及纯固体。确保测试化学品充分覆盖上皮表面，并在冲洗步骤中充分去除。

直接给样：取分组后带有角膜的夹持器，吸去前室液体，加入750 µL受试物于前室中，全部加样后，确保样品覆盖整个角膜，角膜内皮层朝下水平放置于32±1℃恒温设备中。

开窗给样：用开窗器移除前室的玻璃片，夹持器前室在上，水平放置。用棉球轻轻吸干角膜上残存培养液，取750 µL受试物均匀平铺在角膜上，置于32±1℃恒温设备，暴露时间为10 min。

6.7 暴露后浑浊度值测定

暴露结束后，吸出前室内的受试物，用MEM(含酚红)培养液将角膜冲洗三次，再用MEM培养液冲洗至无色，再将MEM培养液加入前室，浑浊度仪测定每个角膜的浑浊度。

液体受试物测定后，角膜夹持器需垂直置于32±1ºC的恒温设备中再孵育2 h，再次更换前后室培养液，测定每个角膜的浑浊度，作为终浑浊度。对于固体受试物，暴露结束冲洗后测定的浑浊度值直接作为终浑浊度，无需后孵育。

每只角膜的浑浊度改变值为终浑浊度减去基准浑浊度。计算每组中角膜浑浊度改变值的平均值作为平均浑浊度。

浑浊度改变值= 终浑浊度-基准浑浊度

6.8 光密度值测定

吸去前室培养液，加入1mL荧光素钠溶液，夹持器前室向上水平放置32±1ºC恒温设备中孵育90 min。取后室液体360 μL用酶标仪在490 nm波长处测定光密度值，计算每组角膜的光密度值的平均值作为平均光密度值。

当光密度值超出线性范围时，对测定液进行稀释

光密度值= 稀释倍数×（稀释后测定液的光密度值-阴性对照光密度值）

6.9 体外刺激分数计算

根据浑浊度仪的光源不同，分别选用下列不同的体外刺激分数计算公式：

白光浑浊度仪体外眼刺激得分（IVIS）= 平均浑浊度+15×平均光密度值

单色光浑浊度仪体外眼刺激分数（LIS）= 平均浑浊度（单色光源光度值lux/7）+15×平均光密度值

7 试验成立条件

阴性对照体外刺激分类属于无刺激性，液体受试物阳性对照N，N-二甲基甲酰胺或固体受试物的阳性对照咪唑眼刺激等级分类为I类不可逆眼损伤，则此次试验成立。

8 结果判定标准

表1 眼刺激性反应分级

|  |  |
| --- | --- |
| 体外刺激分 | 眼刺激分类 |
| 白光光源 | 单色光源 |
| IVIS≤3 | LIS≤30 | 无刺激性 |
| 3< IVIS≤55 | LIS >30且lux/7≤145且OD490≤2.5 | 不可单独预测\* |
| IVIS > 55 | LIS > 30且lux/7≤145且OD490>2.5或者LIS > 30且lux/7 >145 | 不可逆眼损伤，I类  |

\*该分类需结合其他方法进一步判定。

9 结果解释

当出现以下情况时，认为检测结果不确定：

（1）3个角膜中的2个与平均值的结果不一致，或

（2）3个角膜中的1个与平均值结果不一致，并且

白光光源浑浊度仪：得到的IVIS分数>比55临界值大10；

单色光源浑浊度仪：浑浊度分为不可逆眼损伤I类（平均Lux/7 > 145），但3只角膜中的1只Lux/7<130；

单色光源浑浊度仪：光密度值分为不可逆眼损伤I类（平均光密度值 > 2.5），但3只角膜中的1只光密度值<2.0；

单色光源浑浊度仪：LIS分数为无刺激性（平均LIS分数≤ 30），但3只角膜中的1只LIS分数>40；

当检测结果不确定时，应重复测试，当第一次检测结果与第二次检测结果相反时，应进行第三次检测，以第三次检测结果为判定标准。

本试验结果能预测受试物的不可逆眼损伤和无刺激性，可作为不可逆眼损伤和刺激性的确定性方法中的组合方法之一。

附录

浑浊度仪和夹持器

1. 浑浊度仪

浑浊度仪是牛角膜浑浊度和渗透性试验中用来测量透光率的装置。根据浑浊度仪的光源不同，分为白光光源的浑浊度仪和单色光源的浑浊度仪。根据光源的不同，目前市面上浑浊度仪主要有采用卤素灯的OP-KIT浑浊度仪，采用氦氖绿光激光器的LLBO浑浊度仪以及LED白光光源和LED绿色光源的浑浊度仪。任何类型的浑浊度仪都应符合为一系列浑浊度读数提供线性响应，包含预测模型所涉及的不同刺激等级的阈值。其他证明与经过验证仪器具有相似的结果的设备也可以在实验室使用。

1. 角膜夹持器

BCOP角膜夹持器由惰性材料（如聚丙烯）制成。夹持器由两（前室和后室）两部分组成，前后室由三个不锈钢螺钉固定，位于前后室的外边缘。前后室均有1个圆柱形内腔。每个腔室容积约5 mL。两端各有一个玻璃片。浑浊度仪透过玻璃片检测光通过内径的浑浊度。在开窗暴露时，应将前室端的玻璃片用开窗器移除。玻璃窗和腔室间以及后室的O型环用于防止液体泄漏。前后室顶部的两个孔用于加入和移除受试物和培养基。在暴露和孵育的过程中，用胶塞封闭。



图1 角膜夹持器分解结构图

对于任何型号浑浊度仪的夹持器，前后室的内径表面积与后室体积的比例需与传统角膜夹持器保持一致。这是正确使用公式计算IVIS或LIS和测定渗透率值所必需的。

角膜夹持器在常规使用前应通过测量充满培养基（无角膜）的腔室的空白透光值进行检查。 定期检查空白透光值的变化，如透光率发生变化，进行适当清洁或考虑角膜更换夹持器。

牛角膜浑浊和渗透性试验方法（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牛角膜浑浊和渗透性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

本方法主要参照OECD 2020年发布的“化学品测试指南——牛角膜浑浊和渗透性测试方法”（TG437）进行编制。

本标准制定在充分考虑动物福利的前提下，本着科学性、合理性、规范性、易操作的原则，经过对国内外测定牛角膜通透性的牛角膜浊度仪器数据比较、建立了牛角膜通透性渗透性试验方法并优化了实验条件、对试验方法进行实验室内和实验室间验证、与我国现行的体内动物数据比较、征求专家意见、修改完善标准草案稿等过程，明确不同受试物剂型的给样方式和处理方法，以及对不同仪器得到的参数的计算公式进行具体化和明确化，突出体现方法适用性与可操作性。

1. 起草过程

本研究于2023年11月由化妆品标准专家委员会立项，项目组于2024年8月19日召开项目研讨会，总结课题进展情况及下一阶段工作安排各参编单位对本标准的重点、难点和关键问题进行了充分的讨论，介绍课题进展情况及下一步工作。项目组在研究和分析国内外相关标准的基础上，起草了本标准文本及编制说明，形成方法草案。

2024年9月本标准草案通过结题专家论证，形成如下意见及结论：将国内外使用的浑浊度仪都列入标准中，体现国产浊度仪的先进性。按照要求修改方法起草说明，规范方法文本，修改后再审。修改后对外征求意见，根据反馈情况对文本进行修改。

1. 与我国已有相关标准的关系

我国现已发布的眼刺激评价标准主要有《化妆品安全技术规范》第六章4化妆品急性眼刺激性/腐蚀性试验、《化妆品安全技术规范》第六章 21化妆品用化学原料体外兔角膜上皮细胞短时暴露试验、国家标准GB/T 21609-2008 《化学品 急性眼刺激性/腐蚀性试验方法》、GB/T 15670.8-2017《农药登记毒理学试验方法 第8部分：急性眼刺激性/腐蚀性试验》和GB/T 16886.10-2017医疗器械生物学评价第10部分《刺激与迟发性超敏反应试验》。本方法在参考上述我国已有相关标准的基础上，主要针对化妆品原料的特点，以现行《化妆品安全技术规范》中《化妆品用化学原料体外兔角膜上皮细胞短时暴露试验》的写作框架为模板，针对眼刺激的不同刺激等级进行分级评价，本着对不同类型化妆品原料检测适用性及可操作性的原则进行编制。

1. 与《规范》中原方法的对比情况

表1 与规范中原方法对比情况

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 1.标准名称 | 化妆品急性眼刺激性/腐蚀性试验 | 化妆品用化学原料体外兔角膜上皮细胞短时暴露试验 | 牛角膜通透性渗透性试验方法 |
| 2.判定标准 | 不可逆眼损伤可逆眼损伤2A2B不分类 | //无刺激和微刺激 | GHS分类 I不可预测不分类 |
| 3.试验系统 | 家兔 | SIRC细胞 | 牛角膜 |
| 4.关键仪器和设施 | 动物房，裂隙灯 | 细胞房，酶标仪 | 浑浊度仪酶标仪 |
| 5. 适用范围 | 化妆品和化妆品用化学原料 | 化妆品用化学原料 | 化妆品用化学原料及配方 |
| 6. 试验周期 | 14-21天 | 2-3天 | 1天 |

1. 国际相关标准情况

本方法以OECD TG437 2020年发布“化学品检测指南——牛角膜通透性和渗透性测试方法”（OECD Guidelines for Testing of Chemicals: Bovine corneal opacity and permeability Test Method）为依据进行撰写，结合国内实验条件、仪器设备现状及操作的具体情况，撰写的标准内容。基本涵盖了实验对象、实验操作、结果计算、结果判定以及试验成立条件的技术要求，重点突出了通透性和渗透性测定以及体外刺激分数的计算和确认。

1. 实验室验证情况

起草单位实验室首先收集了OECD推荐的12种参比化合物，进行了实验室内部验证, 检测结果与体内数据分类一致。2023年12月邀请了三家外部实验室进行了实验室间验证，3家机构对于提供的12种参比化合物（7种为阳性，5种为阴性）的检测结果，除氯已定和氰酸钾刺激分类等级不一致外，其余10种参比物质检测结果均一致。总体准确率、特异性、灵敏性均大于85%，满足实验室间验证的要求。

同时实验室内部对目前国内外两大类白光光源浊度仪（卤素光源和LED光源）和单色光源浊度仪（激光光源和LED绿光光源）4种仪器检测结果进行了比对，13种参比化合物中，除单色光源浊度仪对氯己定刺激等级错误分类，其余检测结果均一致。适用于预测化妆品用化学原料的潜在眼刺激性，测试结果的总体准确率、特异性、灵敏性良好，可有效替代动物实验。

1. 其他需说明的问题。

1. 阳性化合物的选择

试验中阳性化合物选择20%咪唑作为参考固体受试物阳性物质，N，N-二甲基甲酰胺作为参考液体受试物阳性物质，0.9% 氯化钠注射液作为阴性对照。按照OECD437推荐液体阳性化合物除N，N-二甲基甲酰胺外，还可以选择无水乙醇，但是根据本实验室历史数据发现采用牛角膜通透性和渗透性试验对无水乙醇检测，历史数据范围在IVIS应介于20.5～58.7之间，无法对根据该化合物的正确分类，因此，建议选择分类更为明确的N，N-二甲基甲酰胺作为液体的阳性对照。

2. 其他影响结果的因素

在试验过程中，牛角膜的质量控制是最为关键的，一般建议取材后的24小时内完成试验，取眼球后立刻放入遇冷的缓冲液，低温运输到实验室，同时建议加双抗。取角膜后也应及时放入缓冲液中，长时间脱离缓冲液会影响角膜质量。

3. 本方法的可行性分析

本方法操作简便，标准所需的相关技术、人员等条件易达到，国内浊度检测设备成熟稳定，一般化妆品检测的机构均具有建立本标准方法检测化妆品原料的条件和能力。

本方法建立过程中，通过邀请3家实验室参与了实验室间验证，结果大体一致，表明本方法在我国实验室建立是可行的。

4. 本方法与动物实验的比对结果

由于我国现行的检测化妆品急性眼刺激性/腐蚀性试验是整体动物试验，而已纳入《化妆品安全技术规范》中的化妆品用化学原料体外兔角膜上皮细胞短时暴露试验本方法适用范围有限，主要适用于能溶于5%的DMSO/生理盐水溶液、矿物油或可制成均匀混悬液的物质。当高挥发性物质和非表面活性剂类固体物质结果判定为无刺激性或微刺激性时，需加做其他试验加以判定。无法完全替代动物试验对化学品分类。而牛角膜通透性渗透性试验方法适用范围广，由于受试物直接暴露于角膜表面并可以开窗加样，该方法不但满足各类原料的检测，包括表面活性剂，乳类，蜡类，醇类等受试物检测的需求，还可以用于检测各类配方和产品。因此，牛角膜通透性渗透性试验方法是兔角膜上皮细胞短时暴露试验方法很好的补充，两个方法结合可以组成形成严重眼损伤和刺激的确定性方法对化学品实现准确分类。

本方法结果与经典动物实验进行比对，结果显示：13种参照物中，不同刺激等级的液体受试物和表面活性剂，固体受试物均可以用该方法正常分类，起草实验室13种化合物的总体准确率、特异性、灵敏性均为100%。