# 附件3

# 胶原蛋白凝胶-眼刺激性试验（征求意见稿）

Collagen Hydrogel-Eye Irritation Test

1. 范围

本方法规定了化妆品用化学原料胶原蛋白凝胶-眼刺激性试验的基本原则、要求和方法。

本方法适用于化妆品用化学原料的眼刺激性/腐蚀性检测。

1. 试验目的

预测和评价化妆品用化学原料对眼睛是否具有刺激性/腐蚀性。

1. 定义
   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。

* 1. 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。

* 1. 跨膜电阻 transepithelial electrical resistance，TEER

跨细胞层的电阻，表征细胞层的完整性，单位Ω·cm2。

1. 试验原理

将人角膜上皮细胞接种在胶原蛋白凝胶上构建人角膜上皮模型，通过检测暴露于受试物后人角膜上皮模型的跨膜电阻随时间的变化来判断角膜上皮屏障的破坏程度，进而预测和评价受试物的眼刺激性/腐蚀性检测。

1. 试验材料与试剂
   1. 细胞株

采用人角膜上皮细胞HCE-T，该细胞为贴壁生长。要求来源清晰，代数明确（＜25代）。

* 1. 培养基

采用DMEM-F12（1：1）混合配养基，加入5%胎牛血清、5 μg/mL人重组胰岛素、10 ng/mL人重组表皮生长因子、0.5%DMSO、100 UI/mL青霉素和100 μg/mL链霉素。

* 1. 受试物的配制

受试物溶液或悬浮液由培养基配制，浓度为2.5%（w/v）。优先选择手动混匀。若受试物不能溶解，则依次选择下述方法促进溶解：

a. 涡旋，时间不超过1 min；

b. 超声，时间不超过2 min；

c. 加热，最高温度不超过70℃。

当受试物通过以上方法仍不能溶解或形成均匀悬浮液，则应涡旋混匀后立即使用。受试物应在使用前新鲜配制，否则必须证实储存不影响其稳定性。

* 1. 对照溶液的配制

阳性对照溶液：称取250 mg苯扎氯铵，溶解于10 mL培养基中，可以超声加速溶解，现用现配。

参考品对照溶液：称取250 mg乙醇，溶解于10 mL培养基中，现用现配。

阴性对照溶液：称取250 mg生理盐水（0.9%氯化钠溶液），溶解于10 mL培养基中，现用现配。

1. 试验步骤
   1. 角膜上皮模型的制备
      1. 胶原蛋白凝胶膜的准备

从4℃冰箱取出嵌入性胶原蛋白干凝胶膜小室，放入12孔板中，恢复至室温，向小室的外侧和内侧分别加入1.5 mL和0.5 mL培养基，平衡10 min，即得到胶原蛋白凝胶膜。

* + 1. 角膜上皮模型的构建

将小室外侧的培养基更换为1.5 mL新鲜培养基，吸走小室内侧的培养基，向小室内加入0.5 mL密度为1.2×105个细胞/mL的细胞悬液（即6×104个细胞/小室），培养2 d后，更换小室外侧的培养基，吸走小室内侧的培养基，气-液界面培养4 d ~ 6 d，隔天更换小室外侧培养基。

* + 1. 角膜上皮模型跨膜电阻的测定

气-液界面培养第6 d时，测定角膜上皮模型的跨膜电阻（TEER）。更换小室外侧的培养基为1.5 mL新鲜培养基，向小室内侧加入0.5 mL新鲜培养基，保持培养基的温度为28 ± 2℃，将电阻计的长和短电极分别插入小室的外和内侧，测定角膜上皮模型的TEER，TEER值介于140 Ω·cm2 ~ 220 Ω·cm2之间时方可使用。TEER的计算见公式1。

TEER（Ω·cm2） = R（Ω）×面积（cm2） 公式1

其中，R（Ω）为测量的电阻值，面积为角膜上皮模型的面积。

* 1. 样品测定
     1. 分组

2.5%（w/v）的受试物用于试验。应设定空白对照、阴性对照、参考品对照和阳性对照。未种细胞的胶原蛋白凝胶为空白对照。生理盐水、乙醇和苯扎氯铵分别为阴性、参考品和阳性对照。每组3个重复。

* + 1. 受试物的暴露和TEER测定

更换小室外侧的培养基为1.5 mL新鲜培养基，向小室内侧加入0.5 mL待测液，记录3 min内模型TEER值的变化，每10 s记录一次，试验温度为28 ± 2℃。

* 1. 计算

以暴露时间（s）为横坐标，以扣除空白对照的TEER值在初始值中百分比（%）为纵坐标，作图（图1）。根据图1计算延迟时间（s）、强度（%/s）和坪值（%），计算公式见公式2~公式4。

暴露时间（s）

t1

t2

t3

P3

P2

P1

100

TEER（%）

图1 受试物暴露角膜上皮模型后TEER值变化示意图

延迟时间（s）= t1 公式2

强度（%/s）= -（P2-P1）/（t2-t1） 公式3

坪值（%）= 100-P2 公式4

其中，t1表示跨膜电阻维持-0.03%/s＜dP/dT≤0的最长时间；t2表示dP/dT≤-0.03%/s后，跨膜电阻再次变为dP/dT＞-0.03%/s的起始时间；t3表示t2 + 30 s；P1、P2和P3分别表示t1、t2和t3时对应的TEER值的百分比；dP/dt表示以t对P求导数。

* 1. 结果判定

根据表1判定标准进行刺激性判定。

表1 判定标准

|  |  |
| --- | --- |
| 条件 | 结果 |
| 延迟时间≤180 s，或强度≥0.05%/s，或坪值＞5.0% | 无法判定 |
| 延迟时间＞180 s，或强度＜0.05%/s且坪值≤5.0% | 无刺激性 |

* 1. 系统成立的条件

需同时满足以下4个条件，试验方能成立：

（1）阴性对照延迟时间＞180 s，或坪值≤5.0%；

（2）阳性对照坪值≥40%；

（3）参考品对照坪值≥10%；

（4）每个样品三次重复测定的电阻值的标准偏差应≤15%。

1. 结果解释

当受试物延迟时间＞180 s，或强度＜0.05%/s且坪值≤5.0%时，则判断该受试物眼刺激强度为无刺激性；当受试物延迟时间≤180 s，或强度≥0.05%/s，或坪值＞5.0%时，则无法判断受试物是否具有眼刺激性，需要加做其他试验加以判定。本试验不适用于pH＜5的原料。

胶原蛋白凝胶-眼刺激性试验（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胶原蛋白凝胶-眼刺激性试验方法的研究制定工作。现就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 2021 年立项，起草过程包括：拟定研究内容；建立胶原蛋白凝胶-眼刺激性试验方法并确认试验条件；开展实验室间比对；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、与国内有关现行法律、法规和强制性国家标准的关系

目前，我国检测化妆品眼睛刺激性/腐蚀性的主要依据为《化妆品安全技术规范》中的家兔急性眼刺激性/腐蚀性试验、体外兔角膜上皮细胞短时暴露试验和荧光素渗漏试验。随着3R理念的发展和科学技术的进步，越来越多的替代方法被应用到化妆品毒性的预测中。我国正在努力推进化妆品安全评价中替代方法的研究、验证和技术转化工作，并形成合适的整合评价策略。本研究的主要内容是建立眼刺激性体外替代试验方法，尤其适用于眼刺激试验整合评价策略中“自下而上”方法的起始方法。本方法与《化妆品安全技术规范》内容不冲突，技术方法上形成互补，以期与有关国际条约尽快接轨，为推进我国体外试验工作的开展，建立我国自己的动物体外替代方法体系，促进我国未来的化妆品贸易提供技术支持与保证。

四、与国际同类标准的关系

2019年经济合作和发展组织（OECD）正式发布胶原蛋白凝胶-眼刺激性试验操作指南，将其用于判定眼刺激性试验中无刺激性或轻微刺激性的化学物质，之后于2021年修订该方法的操作指南，现行的指南标准为2021年版。

本方法涵盖了OECD 2021年正式发布“胶原蛋白凝胶-眼刺激性试验操作指南”的要求，而且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和优化。本方法草案体现眼刺激性体外试验的试验思路，贴近国内实验室实际情况，更具可操作性。

五、实验室验证情况概述

对OECD Guidelines for Testing of Chemicals（No.494，2021）（OECD《化学品测试指南》494号，2021年）中的各项技术内容进行验证，包括细胞株、培养基、模型构建、受试物配制、对照设置、实验操作、公式和结果计算与判定等。在此基础上，本标准还结合我国实验室检测的特点，对实验操作中的某些条款进行了确认和优化。

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。2024 年1-9 月，分别邀请 A、B、C 3 家不同实验室参与了实验室间比对工作。对于阳性物质，3家实验室的检测结果均一致，与OECD的参考数据吻合。对于阴性物质，三家单位对t1判定出现了不同的理解，综合考虑后，我们认为个别非连续点出现dP/dt＜0.03%/s的情况是由该试验本身性质决定的，此时间不应取为t1。按照OECD指南，阴性样品的判定标准为t1＞180 s且强度＜0.05%/s且坪值≤5.0%。实际上，当t1＞180 s时，则不存在t2、P1和P2，强度和坪值无法计算。当t1＞180 s时，可知TEER的最大变化值小于5.4%（180 s × 0.03%/s=5.4%）。在多次重复阴性样品时，出现了t1=110 s，强度=0.029%，坪值=0.13的案例，提醒我们该试验的灵敏性。我们建议阴性结果的判定标准为t1＞180 s或强度＜0.05%/s且坪值≤5.0%。按照这个判定标准，三家实验室的检测结果均一致，表明本方法在我国实验室建立是可行的。

六、其他需要说明的问题

1. 本方法的条件确认

本方法适用于化妆品原料进行体外眼刺激性测试，测试结果的灵敏性、再现性和稳定性良好，可有效替代动物实验，作为整合评价策略中“自下而上”的起始方法。

2. 本方法的可行性分析

本方法的检测终点为跨膜电阻，反应角膜上皮屏障的损坏，相比于其他替代方法中的细胞活性和浊度等检测终点，上皮屏障更能反应眼损伤的早期变化。

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。

本方法的模型构建和测试结果与OECD结果基本一致，表明本方法在我国实验室建立是可行的，建议有条件的实验室尽快开展该项试验。

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 TG 494，选择10种已知眼刺激性的化妆品原料作为受试物，10种受试物包括了家兔眼刺激性试验为不可逆眼损伤（UN GHS 1类）、可逆眼损伤轻刺激性（UN GHS 2A类）、可逆眼损伤刺激性（UN GHS 2B类）和无刺激性（UN GHS 未分类）四类；其中5个受试物为液体，5个受试物为固体；受试物涵盖了硅化合物、丙烯酸酯、有机盐、醇、腈类化合物、卤化物、硫化物、芳香化合物、二胺和砜类化合物。其名单见表1。

表1 本研究选用的10种受试化妆品原料

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | CAS | 类别 | 形态 |
| 家兔眼刺激试验为不可逆眼损伤（UN GHS 1类） | | | |
| N-(2-氨乙基)-3 -氨丙基三甲氧基硅烷 | 1760-24-3 | 硅化合物 | 液体 |
| 四甘醇二丙烯酸酯 | 17831-71-9 | 丙烯酸酯 | 液体 |
| 水杨酸钠 | 54-21-7 | 有机盐 | 固体 |
| 家兔眼刺激为可逆眼损伤轻刺激性（UN GHS 2A类） | | | |
| 环戊醇 | 96-41-3 | 醇 | 液体 |
| 氰乙酸甲酯 | 105-34-0 | 腈类化合物 | 固体 |
| 家兔眼刺激为可逆眼损伤刺激性（UN GHS 2B类） | | | |
| 2-甲基乙酰乙酸乙酯 | 609-14-3 | 酯 | 液体 |
| 氯乙酸钠 | 3926-62-3 | 有机盐，卤化物 | 固体 |
| 家兔眼刺激为无刺激性（UN GHS 未分类） | | | |
| 巯基乙酸异辛酯 | 25103-09-7 | 硫化物，酯 | 液体 |
| 四溴双酚A | 79-94-7 | 芳香化合物 | 固体 |
| 氨苯砜 | 80-08-0 | 二胺，砜 | 固体 |