



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3948—2014

---

## 化学品 体外皮肤刺激：重组人表皮试验

Chemical—In vitro skin irritation—Reconstructed human epidermis test method

2014-04-09 发布

2014-11-01 实施

---

中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发 布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准技术性内容与经济合作与发展组织(OECD)化学品测试方法 439《体外皮肤刺激:重组人表皮试验》(In vitro skin irritation;reconstructed human epidermis test method)(2010)内容一致。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:姚丽芳、陶海华、李宁、缪文彬、蒋伟、李蔚、朱洪坤、赵颐晴、郑华。

## 化学品 体外皮肤刺激:重组人表皮试验

### 1 范围

本标准规定了化学品体外皮肤刺激重组人表皮试验的试验原则、试验步骤及数据和报告。

本标准适用于联合国全球化学品统一分类和标签制度(简称 GHS)和欧盟物质和混合物分类、标签和包装法规(简称 CLP)刺激性化学品类别 2(刺激性化合物)的分类评估。

本标准不适用于联合国 GHS 类别 3(轻微刺激物)的分类评估。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 27830—2011 化学品 体外皮肤腐蚀 人体皮肤模型试验方法

### 3 术语和定义

GB/T 27830—2011 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**细胞活性 cell viability**

测定细胞群总体活力的指标[如细胞线粒体脱氢酶还原活性染料噻唑蓝(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐,MTT)(CAS No.298-93-1)的能力],指标的测定取决于试验终点和所用的设计方案,并与细胞总数和/或活性细胞数量有关。

[GB/T 27830—2011,定义 2.2]

#### 3.2

**半数有效时间 median effective time; ET<sub>50</sub>**

一定浓度下,导致细胞活性降低 50%所需要的时间。

#### 3.3

**半数抑制浓度 half maximal inhibitory concentration; IC<sub>50</sub>**

一定暴露时间下,导致细胞活性降低 50%时的浓度。

#### 3.4

**皮肤刺激 skin irritation**

接触受试物 4 h 后,引起的皮肤可逆性损伤。皮肤刺激是一种局部的非免疫源性反应,在受到刺激后较短时间内就会发生。主要特点为可逆的,包括炎症反应,以及与炎症进程相关的刺激临床症状(红斑、水肿、痒和疼痛)。

#### 3.5

**光密度 optical density; OD**

入射光强度与透射光强度之比值的常用对数值。表示被检测物吸收的光学密度。特定波长下,同一种被检测物的浓度与被吸收的能量成定量关系。

## 4 试验原则

4.1 本标准基于重组人表皮模型,最大程度模拟人类皮肤表层部分,即表皮的生化和生理特征。重组人表皮模型可以自己构建或通过商业途径获得。该模型是由人类非转化表皮角质形成细胞经培养形成的一个多层的、高度分化的三维重组人表皮模型。它包括基底层、荆棘层、颗粒层和多层角质层。角质层含有细胞间的薄的脂质层,其代表体内主要的脂质层。重组人表皮测试方法可以检测炎症反应的启动过程。

4.2 重组人表皮模型中细胞活性可通过 MTT 法检测得到。MTT 法是根据活性细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶将 MTT 染料[3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐]还原为水不溶性的蓝色结晶甲臞的原理,通过检测甲臞含量检测细胞活性。如果细胞活性低至临界值则判断为刺激性化合物,细胞活性高于临界值的化合物为非刺激性化合物。

4.3 本标准包括三个经验证的测试方法,即:重组人表皮模型 EpiSkin™ 测试方法、重组人表皮模型 EpiDerm™ SIT(EPI-200)和 SkinEthic™ 测试方法。

4.4 在使用三个经验证的测试方法之前,实验室应根据附录 A 的要求进行性能验证。

## 5 试验步骤

### 5.1 评价重组人表皮模型

#### 5.1.1 重组人表皮模型总条件

重组人表皮模型多层内皮细胞(基底层、荆棘层和颗粒层)外应有一层功能性角质层。角质层应含有多层重要的脂质层,能抵制标志性细胞毒性化合物如:十二烷基磺酸钠(SDS)或 Triton X-100 快速渗透。重组人表皮模型的封闭特性应能阻止角质层周围的化合物进入活性组织。重组人表皮模型不能有细菌、病毒、支原体或真菌污染。

#### 5.1.2 活性

采用 MTT 法检测细胞活性。应确保每一批使用的重组人表皮模型符合阴性对照组标准要求。阴性对照组 OD 值可接受范围(最高和最低限)由重组人表皮模型开发商/供应商提供。三个经验证的测试方法阴性对照组 OD 值可接受范围见表 1。阴性对照组处理的组织在测试暴露期间应稳定。

表 1 阴性对照组 OD 值可接受范围

重组人表皮模型	最低可接受限	最高可接受限
EpiSkin™ (SM)	$\geq 0.6$	$\leq 1.5$
EpiDerm™ SIT(EPI-200)	$\geq 1.0$	$\leq 2.5$
SkinEthic™	$\geq 1.2$	$\leq 2.5$

#### 5.1.3 屏障功能

角质层和它的脂质层应足够抵制标志性细胞毒性化合物如 SDS 或 Triton X-100 的快速渗透。屏障功能可以通过检测 IC<sub>50</sub> 值和 ET<sub>50</sub> 值来判断。

5.1.4 形态学

重组人表皮模型组织学检查应具有人类表皮类似结构。

5.1.5 重现性

阳性对照组和阴性对照组结果应说明该方法的重现性。

5.1.6 质量控制

重组人表皮模型开发商/供应商应保证每批使用的重组人表皮模型符合产品出产标准,其中活性、屏障功能和形态学是最相关的。这些数据应提供给使用者,以便他们将这些信息包含在报告中。 $IC_{50}$ 和 $ET_{50}$ 的可接受范围(最高和最低限)由重组人表皮模型开发商/供应商提供。三个经验证的测试方法的可接受限见表 2。

表 2 质量控制标准举例

重组人表皮模型	最低可接受限	最高可接受限
EpiSkin™ (SM) (SDS 处理 18 h)	$IC_{50} = 1.0\text{ mg/mL}$	$IC_{50} = 3.0\text{ mg/mL}$
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1% Triton X-100)	$ET_{50} = 4.8\text{ h}$	$ET_{50} = 8.7\text{ h}$
SkinEthic™ (1% Triton X-100)	$ET_{50} = 4.0\text{ h}$	$ET_{50} = 9.0\text{ h}$

5.2 受试物

对于液体以及固体化合物,应保证有足够量,能完全覆盖表皮,最小的剂量为  $25\text{ }\mu\text{L/cm}^2$  或者  $25\text{ mg/cm}^2$ 。对于固体化合物,表皮应在试验之前用蒸馏水或去离子水润湿,以提高表皮与受试化合物之间的接触。无论何时,固体应以细小粉末状进行试验。暴露期结束,应用缓冲溶液或 0.9%生理盐水将受试化合物清洗干净。

5.3 测试方法

5.3.1 暴露时间一般在 15 min~60 min 之间,培养温度一般在  $20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$  之间。三种商品化的重组人表皮模型暴露时间和培养温度有所不同,应按各自的标准操作规程中提供的最适合暴露时间和培养温度进行试验。

5.3.2 应使用一致的阴性和阳性对照以确定组织的活性、屏障功能以及组织重现性。推荐的阳性对照为 5%SDS 水溶液,阴性对照为水或磷酸盐缓冲溶液(PBS)。

5.3.3 每一轮试验,受试化合物和对照组至少重复 3 次。

5.4 细胞活性的检测

5.4.1 细胞活性检测不是在使用化学物之后立即检测,而是清洗过的组织经过足够长的时间培养之后再进行检测。这段时间既是对轻微细胞毒性作用的恢复,也能更清晰地反映细胞毒性作用。最佳的培养周期为 42 h。

5.4.2 MTT 法是本标准用于检测细胞活性的方法。将组织置于合适浓度的 MTT 溶液中(如:0.3 mg/mL~

## SN/T 3948—2014

1 mg/mL)3 h。使用溶剂(如异丙醇,酸性异丙醇)提取组织中蓝色的甲臞沉淀物,甲臞的浓度根据在 570 nm 处的 OD 值来判断。

5.4.3 受试化合物的光学特性或者与 MTT 的反应会影响活性的测定。当特殊的受试化合物没有从组织中完全清洗掉或者其渗透进入表皮的时候也会影响测定。如果受试化合物与 MTT 直接反应(MTT-还原剂),其本身有颜色或者在处理的过程中产生颜色,则需要增加另外的对照组来更正。

## 5.5 可接受范围

对于每一个经验证的重组表皮模型测试方法,阴性对照组的 OD 值应能反映组织经过运输等过程后的质量。对照组的 OD 值应在已定的可接受范围内。同样,阳性对照组也应反映其对刺激性化合物的反应。如果使用标准偏差的话,应在单侧 95%可接受范围内,对于经验证的重组表皮模型测试方法 SD 应小于 18%。

## 5.6 结果判定

阴性对照组的细胞相对活性设定为 100%,计算每个受试化合物得到的 OD 值与阴性对照组 OD 值的百分比,用得出的百分比表示细胞相对活性。根据联合国 GHS 类别 2,当细胞活性小于或等于 50%,则判断为皮肤刺激物,当细胞活性大于 50%时为皮肤非刺激物。

## 6 数据和报告

6.1 每一轮的数据,包括 OD 值以及计算得到的细胞活性百分比应以列表的形式表示。除此之外,还包括平均值±SD 的值。观察到的化合物与 MTT 试剂之间的反应,受试化合物的颜色等也应报道。

6.2 测试报告应包含以下信息:

- a) 受试物和对照物:
  - 1) 化学名称和 CAS 号;
  - 2) 纯度和化学成分;
  - 3) 与该研究有关的理化性质(如:物理状态、稳定性、pH 值和水溶性);
  - 4) 受试物和对照化合物的前处理(如:粉碎、加热),如果有的话;
  - 5) 存放条件。
- b) 重组人表皮模型和方法确认。
- c) 试验条件:
  - 1) 使用的细胞系统。
  - 2) 模型的完整信息,包括:
    - 活性;
    - 屏障功能;
    - 形态学;
    - 重现性和预测性;
    - 质量控制。
  - 3) 具体的测试步骤。
  - 4) 使用的剂量、暴露时间和培养时间。
  - 5) 模型历史数据的参考。包括:
    - 质量控制数据;
    - 阳性和阴性对照值;
    - 结果判定的描述;

——历史对照数据的参考。

- d) 结果：
  - 1) 以列表的形式显示数据；
  - 2) MTT 还原剂和/或有颜色的受试化合物时使用的对照；
  - 3) 描述其他观察到的作用。
- e) 结果讨论。
- f) 结论。

**附 录 A**  
(规范性附录)

**重组人表皮皮肤刺激方法性能验证试验**

在使用三个经验证的测试方法之前,实验室应使用表 A.1 中的十种化合物先进行性能验证。

作为性能验证试验的一部分,重组人表皮模型的屏障性能尤其重要,特别是模型经过长时间的运输过程之后。如果经证明测试方法有效,性能良好,则在之后的日常检测中就没必要再进行验证了。然而,建议日常测试时在规定的时间内进行一次屏障性能的评估。

**表 A.1 参考化合物列表**

化合物	CAS 号	体内评分 <sup>a</sup>	物理状态	联合国 GHS 分类
苯乙酸	86-87-3	0	固体	非刺激性
异丙醇	67-63-0	0.3	液体	非刺激性
硬脂酸甲酯	112-61-8	1	固体	非刺激性
庚基酯	5870-93-9	1.7	液体	非刺激性 <sup>b</sup> (类别 3)
水杨酸己酯	6259-76-3	2	液体	非刺激性 <sup>b</sup> (类别 3)
仙客来醛	103-95-7	2.3	液体	类别 2
溴己烷	111-25-1	2.7	液体	类别 2
5%氢氧化钾水溶液	1310-58-3	3	液体	类别 2
1-甲基-3-苯基-1-哌嗪	5271-27-2	3.3	固体	类别 2
庚醛	111-71-7	3.4	液体	类别 2
<sup>a</sup> 体内评分是根据 GB/T 21604—2008 得到的。				
<sup>b</sup> 该标准中联合国 GHS 类别 3(轻微刺激物)被认为是非刺激性。				