



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4153—2015

化学品 牛角膜混浊和通透性试验

Chemicals—Bovine corneal opacity and permeability test

2015-02-09 发布

2015-09-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准等同采用联合国经济合作与发展组织(OECD)化学品测试方法 437《牛角膜混浊和通透性试验》(2009)。

本标准与 OECD 化学品测试方法 No.437 相比,存在以下差异:

——对 OECD 化学品测试方法 No.411 进行了编辑性修改;

——增加了前言部分。

本标准由国家质量监督检验检疫总局提出。

本标准由国家认证认可监督管理委员会归口。

本标准起草单位:中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:赵琢、柳明、刘凤娟、冯杰、张彬、王娜、于燕燕。

化学品 牛角膜混浊和通透性试验

1 范围

本标准规定了牛角膜混浊和通透性试验(BCOP)的试验准备、试验方法和结果报告。
本标准适用于化学品眼腐蚀性或严重眼损伤的鉴别试验。

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 21609 化学品 急性眼刺激性/腐蚀性试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

角膜 cornea

眼球前部的透明部分,覆盖住瞳孔和虹膜,并能接收光线。

3.2

角膜混浊 corneal opacity

检测暴露于测试物后角膜的不透明度的一种方法。角膜混浊度的增加说明其受到损伤。可按照GB/T 21609 中的方法对角膜混浊度进行主观评价,也可通过仪器对其进行客观评价,如“浊度仪”。

3.3

角膜通透性 corneal permeability

通过测定穿过角膜细胞层的荧光素钠染料的数量对角膜内皮损伤进行定量分析。

3.4

体外刺激得分 in vitro irritancy score(IVIS)

用BCOP实验所得出的经验公式计算,该公式通过将各处理组的平均浊度值和平均通透率整合为每一组的单独体外得分。 $IVIS = \text{平均浊度值} + (15 \times \text{平均通透率})$ 。

3.5

浊度仪 opacitometer

一种通过定量分析角膜的透射光,计算出“角膜混浊度”的仪器。标准的仪器由两部分组成,每个部分都有各自的光源和光电管,一个组件用于处理过的角膜,另一个用于仪器的校准和调零。卤素灯发出的光,可经对照组件(不含液体和窗口的空容器)到达光电管,也可通过实验组件(容器内含角膜)到达光电管。分析比较光电管中两种光透射性的不同,计算得出混浊度值并以数字形式显示(参见附录B)。

4 试验准备

4.1 牛眼球的来源和要求

从正规屠宰场取得牛眼球。牛眼球应取自大于12月龄且小于60月龄的牛。

SN/T 4153—2015

4.2 牛眼球的收集及实验室运送

牛眼球应在供体死亡后尽快摘除,以尽量减少对眼球的机械和其他伤害。眼球置于大小适当的带有冰浴的容器中并完全没入添加抗生素(100 IU/mL 的青霉素和 100 μ g/mL 的链霉素)的 Hanks 盐溶液(HBSS)中,在运输过程中应尽可能减少生物降解及细菌污染程度。眼球收集的当天进行 BCOP 试验,试验中使用的所有眼球都应为当天收集的同一种群的眼球。

4.3 试验用牛眼球的选择标准及数量

牛眼球到达实验室后,应仔细检查缺陷,包括浊度增加、划痕及新生血管形成,无以上缺陷的眼球中得到的角膜才能使用。每个处理组(测试组、阴性对照组和阳性对照组)至少包括 3 只眼球。

5 试验方法

5.1 牛眼球的预处理

5.1.1 牛眼球的预处理

将眼角膜在距虹膜边缘 2 mm~3 mm 的地方切开,为避免损坏角膜的上皮细胞和内皮细胞要小心的操作。分离的角膜安装在专门设计的角膜支架上(参见附录 A),包括眼前房和眼后房,接口分别是角膜的上皮细胞和内皮细胞。两个眼房都填充预热过的伊格尔(氏)最小基础培养基(Eagle's minimal essential medium, EMEM)(后眼房优先),确保无气泡形成。然后在 32 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C 的恒温下孵育至少 1 h,使得角膜与介质达到平衡,并尽可能实现正常的新陈代谢。

5.1.2 角膜的选择标准

在平衡期,两眼房都要注入新鲜预热的 EMEM,平衡后测试每个角膜混浊度,即混浊度基线。任何眼角膜显示宏观组织损伤(如划痕,色素沉着,血管新生)或混浊度大于 7 个单位的都要丢弃。计算所有平衡角膜的平均混浊度。至少选择 3 个混浊度值接近所有角膜中位值的角膜,作为阴性对照角膜。将其余角膜分配为测试组和阳性对照组。

5.2 测试物的预处理及与角膜接触

5.2.1 液体和表面活性剂

液体测试物不进行稀释。对于表面活性剂测试物,无论是固体还是液体,均应配制成质量体积比为 10% 的溶液,溶剂使用 0.9% 的氯化钠溶液,蒸馏水或其他溶剂(被证明在试验系统中无可见效应)。半固体、乳化剂和蜡状物通常当做液体检测。眼角膜与测试物接触 10 min。若选择其他稀释浓度及接触时间应提供适当依据。

5.2.2 非表面活性剂的固体

均应配制成质量体积比为 20% 的溶液,溶剂使用 0.9% 的氯化钠溶液,蒸馏水或其他溶剂(被证明在试验系统中无可见效应)。某些情况下有适当的科学依据,固体也可以用其他方法进行灵活的检测。眼角膜与测试物接触 4 h。若选择其他稀释浓度及接触时间应提供适当依据。

5.2.3 特殊测试物

对于一些特殊的测试物(例如,难溶物质、黏稠液体等),可以根据测试物的理化性质使用不同的处理方法,但应确保测试物充分覆盖于上皮细胞表面且在清洗时可被充分去除。

5.3 剂量分组

每个实验都应同时包括阴性或溶剂对照和阳性对照。用于液体测试物的阳性对照物是 1% 的氢氧化钠或二甲基甲酰胺。用于固体测试物的阳性对照品是溶于 0.9% 的氯化钠溶液中的质量体积比为 20% 的咪唑。对于不稀释的液体测试物, 阴性对照品应为 0.9% 的氯化钠溶液或蒸馏水, 而对于溶解稀释过的测试物, 阴性对照品应为其溶剂。

5.4 清洗

测试物与角膜接触后, 洗掉眼前房和上皮上的测试物(阴性组或阳性组相同操作), 至少用 EMEM (含酚红指示剂) 洗涤 3 次(或直到无可见的测试物发现)。用含酚红的培养液冲洗直到酚红发生可见颜色改变, 来确定清洗酸碱材料的有效性。未发现酚红变色(黄色或紫色), 或仍可见测试物的角膜要洗涤 3 次以上。培养液中无测试物时, 用 EMEM(无酚红)最后冲洗角膜一次。用 EMEM(无酚红)最后清洗以确保在检测浊度之前除去眼前房的酚红。随后在眼前房中注满不含酚红的新鲜 EMEM。

5.5 孵育

对于液体或表面活性剂, 清洗后, 角膜要在 32 °C ± 1 °C 下孵化至少 2 h。对于固体不要求进一步孵化。

5.6 记录

孵育(液体和表面活性剂)或清洗(固体)后, 记录每个角膜混浊度和角膜通透率。此外, 目视观察每个角膜并做相关观察记录(例如, 组织剥离, 残留物检查, 非均一不透明图形)。这些观察结果是重要的, 可以与角膜混浊度和角膜通透率结果相互参照。

5.7 测试终点

5.7.1 用通过角膜的光传输量来测定角膜混浊度。角膜混浊度借助于一个浊度仪进行定量检测, 根据标准曲线定量(参见附录 B)。

5.7.2 角膜通透率用透过所有角膜细胞层(即, 从角膜外表面的上皮细胞透过角膜内表面的内皮细胞)的荧光素钠染料量。将 1 mL 荧光素钠溶液(液体或表面活性剂用 4 mg/mL; 非表面活性剂固体用 5 mg/mL)加到角膜支架的眼前房, 即角膜上皮细胞侧的接口, 而在后房, 即角膜内皮细胞侧的接口, 注满新鲜的 EMEM。然后, 支架以水平位在 32 °C ± 1 °C 下孵育 90 min ± 5 min。用 UV/VIS 分光光度法(或 96 微孔板酶标仪)定量测定穿入眼后房的荧光素钠的量, 测定值评价 490 nm 处记录的光密度值(OD490)或吸光度值, 对照标准曲线得出角膜通透率。荧光素角膜通透率基于一个以标准 1 cm 光程的可见光分光光度计测定的 OD490 值来确定。

6 结果报告

6.1 数据处理

计算每个处理组的平均角膜混浊度和平均角膜通透率(OD490), 并按照背景角膜混浊度和阴性对照 OD490 通透率值修正, 按照式(1)计算体外刺激积分(IVIS):

IVIS = 平均角膜混浊度 + (15 × 平均角膜通透率 OD490) (1)

SN/T 4153—2015

6.2 结果报告

6.2.1 结果评价

IVIS 不小于 55.1 的物质被称为眼腐蚀或严重眼损伤物,角膜混浊度和角膜通透率也应被单独评价以确定测试物是不是只通过两个终点的一个导致眼腐蚀或严重眼损伤。

6.2.2 试验报告

试验报告应包括以下信息:

- a) 测试物和对照物的化学名称、CAS 登记号、理化性质和预处理过程;
- b) 牛眼球的来源及鉴定;
- c) 牛眼球的储存和运输情况(例如,眼球的收集日期和时间,测试前的时间间隔,传输介质和温度条件,使用的抗生素);
- d) 测试方法、测试系统的描述及测试条件;
- e) 角膜架的使用型号,用于测量混浊度和通透率的设备信息(例如,浊度仪和分光光度计);
- f) 所用牛角膜的信息,包括有关它们质量的报告;
- g) 测试步骤;
- h) 描述所采用的评价标准;
- i) 单个测试样品的数据结果(例如,测试物混浊度和 OD490、IVIS 值、阴性对照、阳性对照和标准质控(如果包括),以表格的形式报告;
- j) 描述观察到的其他现象。

附 录 A
(资料性附录)
BCOP 角膜支持架

A.1 BCOP 角膜支持架由惰性材料(例如,聚丙烯)合成。它由两部分(前室和后室)组成(见图 A.1),有两个相似的圆柱形内室。每一室有 5 mL 的体积,终点处是一个玻璃窗,可记录透明度测量结果。每个内室的直径为 1.7 cm,高 2.2 cm。后室的 O 形环用来防止泄漏。角膜内皮朝下放置在后室的 O 形环上,前室放于角膜上皮面。室外缘的 3 个不锈钢螺丝将两室固定住。每个室的末端都有一个可移动玻璃窗口,这样可以方便地接近角膜。玻璃窗和室之间也装有 O 形环来防止漏液。每个室的顶部都有两个孔,用来放置和移除基质物及受试物。在处理期和孵育期用橡胶塞将两个孔关闭。

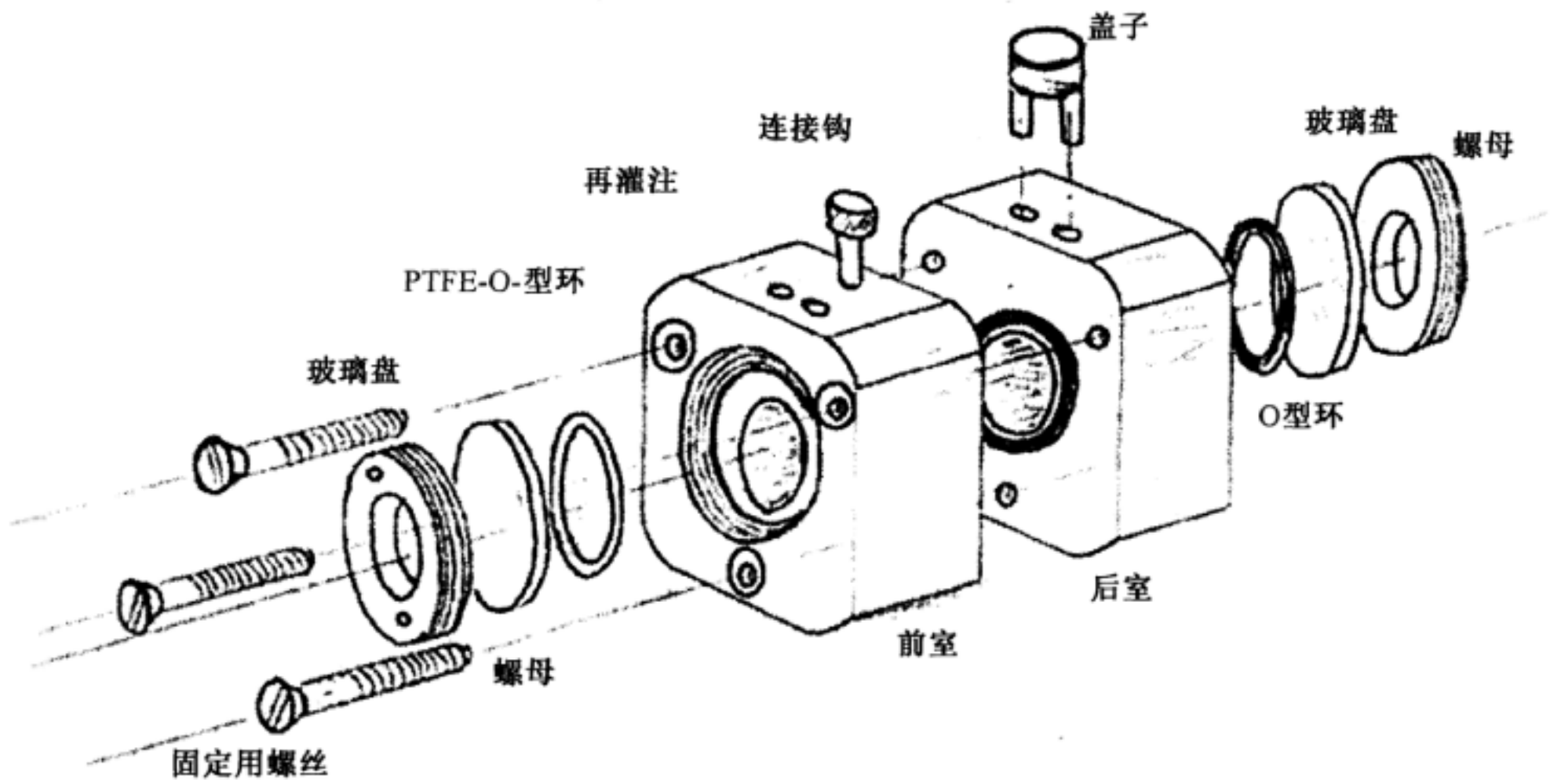


图 A.1 BCOP 角膜支持架

附 录 B
(资料性附录)
浊度仪

B.1 浊度仪是一个光透射测量设备。卤素灯发出的光,可经对照组件(不含液体和窗口的空室)到达光电管,也可经实验组件(该室内含角膜)到达光电管,分析对比两者在光电管中出来的光透射性的不同,得出浊度值并以数字形式显示。由此建立浊度单位。

B.2 浊度仪应通过一系列的不透明度读数来提供一个线性响应。为了确保 75~80 浊度单位的反应线性和读数准确性,有必要使用一系列的校准物对浊度仪进行校正。将校准物(不透明聚酯)放入校准室(用来放置标准物的角膜室),观察浊度仪上的读数。放置校准物的校准室到达光源和光电管的距离应是相等的,在浊度测量过程中可以放入角膜。首先用不含校准物的校准室将浊度仪调节到 0 浊度单位。然后将 3 种不同的校准物依次放入校准室,并分别测量其浊度。校准物 1、2 和 3 所得浊度值应该等于各自浊度设定值的 75、150、225 浊度单位(偏差分别为 $\pm 5\%$)。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
化学品 牛角膜混浊和通透性试验
SN/T 4153—2015

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

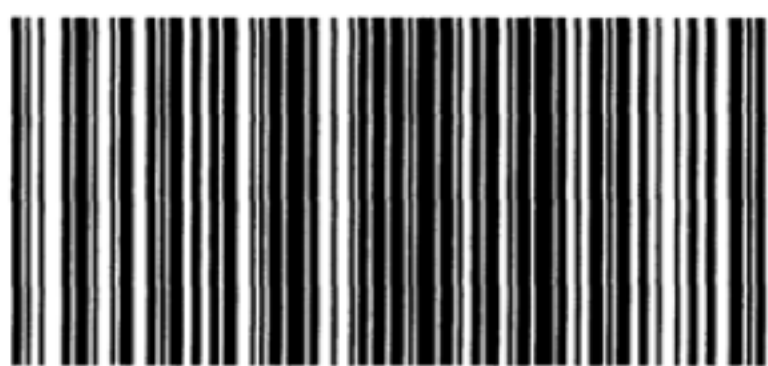
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字
2017年7月第一版 2017年7月第一次印刷
印数 1—1 100

*

书号: 155066 • 2-31769 定价 16.00 元



SN/T 4153—2015