

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4577—2016

化妆品皮肤刺激性检测 重建人体表皮模型体外测试方法

Skin irritation test for cosmetics—Reconstructed human epidermal
model in vitro alternative method

2016-08-23 发布

2017-03-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
化妆品皮肤刺激性检测
重建人体表皮模型体外测试方法
SN/T 4577—2016

*

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 18 千字
2018年1月第一版 2018年1月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 • 2-32326 定价 16.00 元

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准参照采用“经济合作与发展组织”发布的《化学品测试指南》第 439 号(OECD Guidelines for the testing of Chemicals No.439)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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:中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、欧莱雅中国研发和创新中心。

本标准主要起草人:曾静、马丹、苏宁、程树军、邱璐、蔡臻子、郑红艳、魏海燕、秦瑶、李小林、赵锸、李楠。

化妆品皮肤刺激性检测

重建人体表皮模型体外测试方法

1 范围

本标准规定了化妆品和化妆品原料对人体皮肤刺激性体外测试方法。
本标准适用于化妆品和化妆品原料的安全性检测。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

替代 alternatives

改善试验设计和提高试验效率以减少动物的应激(优化替代),减少某一试验所需动物的数量(减少替代),以及完全停止某一试验的动物使用(代替替代),以及为实现上述目的进行的研究。

3.1.2

替代试验 alternatives testing

利用低等动物或利用离体器官、培养的细胞或细胞器、生物模拟系统以优化、减少或替代传统的动物试验,进行毒理学评价、功效性评价和其他生命科学研究。

3.1.3

体外试验 in vitro testing

用体外培养的细胞或组织进行的试验。

3.1.4

重建人体表皮模型 reconstructed human epidermal skin

采用人皮肤来源细胞利用组织工程技术进行三维结构的重建,可获得与正常皮肤相似的结构和功能。体外重建表皮模型能更好地模拟人体实际接触外源性化学物的情况,可用于替代活体动物进行实验。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-di phenyl Tetrazolium Bromide]

3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑噻唑蓝,中文简称噻唑蓝。

SN/T 4577—2016

4 表皮模型体外替代试验法实验原理

4.1 方法简要步骤

本标准使用重建人体表皮模型对化妆品、化妆品原料的皮肤刺激性进行检测。化学品和化妆品原料与相应的表皮模型反应 15 min, 冲洗干净, 于 37 °C, 5% CO₂, 95% 相对湿度的 CO₂ 培养箱中, 培养 42 h 后, 用 MTT 法对反应后的表皮模型进行细胞活性的测试。化妆品成品与相应的表皮模型反应 18 h 后, 用 MTT 法对反应后的表皮模型进行细胞活性的测试。

4.2 方法测试终点

测试终点是使用 MTT 法测定细胞活性, 并以细胞活性是否超过 50% 来分类刺激性和非刺激性。MTT 是一种黄色染料, 活细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶还原 MTT, 在细胞色素 C 的作用下, 生成蓝色 (或蓝紫色) 不溶于水的甲臜 (Formazan), 用酶标仪在 570 nm 处测定甲臜的量。通常情况下, 甲臜生成量与活细胞数成正比。因此, 可根据 570 nm 处 OD 值推算活细胞数, 死细胞中不含琥珀酸脱氢酶, 不与 MTT 发生反应。然而, 一些化妆品、化妆品原料直接与 MTT 作用, 产生颜色反应, 干扰实验结果。因此, 在开始测试前, 首先测试化妆品、化妆品原料是否与 MTT 产生颜色反应, 对于产生颜色反应的化妆品、化妆品原料, 用表皮模型的死皮作为对照。

5 仪器和设备

5.1 移液器: 连续加样器和 25 mL、10 mL 吸头、M 25 活塞排代式移液器和相应吸头、100 μL~1 000 μL 移液器和相应吸头、20 μL~200 μL 移液器和相应吸头。

5.2 CO₂ 培养箱: 37 °C ± 1 °C, (5 ± 1)% CO₂, 95% 相对湿度。

5.3 酶标仪: 570 nm。

5.4 通风柜。

5.5 超净工作台。

5.6 37 °C 恒温水浴。

5.7 摇床, 70 r/min。

5.8 涡旋振荡器。

5.9 计时器。

5.10 天平 (精度 0.1 mg)。

6 试剂和材料

除另有规定外, 所有试剂均为分析纯, 试验用水参照 GB/T 6682 规定。

6.1 EpiSkin™ 表皮模型 (包含: 测试培养基、维持培养基、打孔器)¹⁾。表皮模型产品应提供相关批次的质检报告 (如 IC₅₀ 或 ET₅₀), 参见附录 A。

6.2 DPBS 缓冲液: 参见 B.1。

6.3 阴性对照: DPBS。

6.4 阳性对照: 5% SDS。

1) 推荐使用该表皮模型, 该产品购买于上海斯安肤诺生物科技有限公司, 如有等效产品也可替代该款产品。

- 6.5 MTT 母液:参见 B.2。
- 6.6 MTT 工作液:参见 B.3。
- 6.7 酸性异丙醇:参见 B.4。
- 6.8 无菌双蒸水。
- 6.9 96 孔板(平底),12 孔板。
- 6.10 离心管:1.5 mL、2 mL。
- 6.11 小钝头镊和小平头镊。
- 6.12 无菌棉签。
- 6.13 漏斗。
- 6.14 称量漏斗(weighing funnel)。
- 6.15 废液缸。

7 检测步骤

7.1 准备工作

7.1.1 待测样品与 MTT 反应

用 DPBS 缓冲液配制浓度为 3 mg/mL 的 MTT 母液。将 MTT 母液用测试培养基稀释至 0.3 mg/mL。取一个新的 12 孔板,每种待测样品进行单孔试验(根据需测试样品的个数,确定使用的孔数)。每块 12 孔板准备一个对照孔(无待测样品)。每孔加入 2 mL 0.3 mg/mL 的 MTT 溶液,将 10 μ L 或 10 mg 待测样品加入有 MTT 溶液的反应孔中,用移液器枪头混匀,将载有 MTT 溶液和样品的 12 孔板置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 ,95% 相对湿度的 CO_2 培养箱中,培养 3 h。3 h 后,从培养箱中取出,观察与对照孔相比是否有颜色变化,如果 MTT 溶液颜色变为蓝色或者紫色,说明待测样品与 MTT 反应,在之后的测试中需使用死皮对照以去掉非特异性光密度值。若没有颜色变化,则无需制备死皮对照。

7.1.2 制备死皮对照

将具有活性的表皮模型转移到 12 孔板中,每孔加入 2 mL 的无菌双蒸水。在 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 ,95% 相对湿度条件下,培养 48 h \pm 1 h。48 h 后,弃去无菌双蒸水,此时的表皮模型经 48 h 无菌双蒸水浸泡后,失去活性变成死皮。将死皮对照放置在 -18 $^{\circ}$ C \sim -20 $^{\circ}$ C 条件下,可以保存 6 个月。使用前,将死皮在 2 mL 的维持培养基中室温放置 1 h,进行解冻。死皮组织与有活性的表皮模型的试验方法一致。

7.1.3 与 MTT 有反应的待测样品的对照设置

为了准确计算结果,对于与 MTT,有反应的待测样品,应设 3 个经待测样品处理的死皮对照(消除待测样品本身与 MTT,反应对测试结果的影响)和 3 个不经待测样品处理的死皮对照(消除死皮组织中残存的微量琥珀酸脱氢酶与 MTT 反应对测试结果的影响)。

7.1.4 表皮模型的准备

该步骤应在超净工作台中进行。每轮测试需要 1 块 12 孔板用于测试阳性对照,一块 12 孔板用于测试阴性对照,如果本轮测试中有与 MTT 反应的待测样品,则需增加 1 块 12 孔板用于死皮对照。对于不与 MTT 反应的待测样品,每个待测样品需要 1 个 12 孔板用于测试待测样品;与 MTT 有反应的待测样品,需要 2 个 12 孔板。标记 12 孔板,在 12 孔板的第一列加入 2 mL 维持培养基,用镊子将表皮模型移至该培养基中。每种待测样品做 3 个平行复孔,5% SDS 为阳性对照,DPBS 为阴性对照,阳性和阴

SN/T 4577—2016

性对照均设3个平行。将转移有表皮模型的12孔板置于37℃、5% CO₂、95%相对湿度条件下,培养24 h。培养24 h后,加入2 mL维持培养基到12孔板的第二列。

7.2 称样

固体样品用称量漏斗称量10 mg±2 mg,液体样品用移液器吸取10 μL。每个待测样品称取3份,与MTT反应的待测样品称取6份,其中3份用于死皮对照试验。

7.3 样品涂抹

将10 μL或10 mg待测样品,10 μL阳性对照和10 μL阴性对照,均匀涂抹到表皮模型表面。液体样品,粘性物质或乳状液应使用吸头涂抹至少30 s,动作尽量轻柔,以免破坏表皮模型。粉末状样品,先将5 μL无菌双蒸水均匀涂抹在表皮模型表面,然后涂上待测样品。待测样品、阳性对照和阴性对照均做三个平行。需用到死皮对照的待测样品,将待测样品涂抹于死皮对照表面,后续实验方法与有活性的表皮模型一致,死皮对照做3个平行;另设3个不与待测样品反应的死皮对照。

7.4 冲洗

将涂有待测样品、阳性和阴性对照的表皮模型,室温放置15 min。15 min后,用DPBS缓冲液彻底冲洗以去除表皮模型表面的样品、阳性和阴性对照。用棉签将每个表皮模型表面残留液体轻轻吸干,将表皮模型逐个移入加有维持培养基的第二列孔中,将培养板放在37℃通有5% CO₂、95%相对湿度的培养箱中培养42 h。

7.5 MTT 反应

培养42 h后,在培养板第三列孔中加入0.3 mg/mL的MTT工作液,将表皮模型移入,检查确认表皮模型与MTT溶液间没有气泡。

7.6 MTT 孵育

将载有MTT溶液和表皮模型的培养板放在37℃通有5% CO₂、95%相对湿度的培养箱中培养3 h。

7.7 表皮模型颜色萃取

培养3 h后,使用打孔器取下表皮模型样块,用镊子轻柔的将表皮模型从胶原托上分离并将其翻转,将翻转后的表皮模型重新放置于胶原托上,将表皮模型和胶原托一并移至2 mL离心管中,加入500 μL酸性异丙醇,在涡旋振荡器上混匀,室温避光放置过夜或于4℃放置72 h,萃取表皮模型的颜色。

7.8 萃取液转移至96孔板

转移200 μL酸性异丙醇萃取液,至96孔板,在570 nm读取OD值,每一块表皮模型在96孔板上测试两个平行。

7.9 检测 OD 值

转移200 μL酸性异丙醇溶液,至96孔板,设6个空白对照重复,在570 nm读取OD值。

7.10 测试化妆品

如测试化妆品成品,则将150 μL或150 mg的待测样品涂抹到皮肤模型表面,培养18 h后冲洗并

进行 MTT 测试。其他检测流程与化妆品原料一致。测试特殊要求的化妆品成品,参照皮肤模型使用说明书进行测试。

8 结果计算

8.1 与 MTT 没有交叉反应的待测样品结果计算

8.1.1 空白对照:读取 6 个空白对照的 OD 值,其平均值作为空白对照的 OD 值。

8.1.2 阴性对照:3 个阴性对照,每个阴性对照读取 2 个平行复孔 OD 值取其平均值。然后计算 3 个阴性对照的平均 OD 值作为阴性对照的 OD 值。阴性对照 OD 值减去空白对照的 OD 值,将其设为 100% 相对细胞活性。

8.1.3 阳性对照:3 个阳性对照,每个阳性对照读取 2 个平行复孔 OD 值取其平均值。然后计算 3 个阳性对照的平均 OD 值作为阳性对照的 OD 值。(阳性对照 OD 值—空白对照的 OD 值)/阴性对照 OD 值 $\times 100\%$ =阳性对照的相对细胞活性。

8.1.4 待测样品:每个组织的 OD 值均需减去空白对照的 OD 值,计算测试样品 3 个组织的 OD 值的平均值。

8.1.5 待测样品的细胞活性的百分比值,是其与阴性对照的比值,而这个百分比值就应用于预测模型来预测此测试样品对皮肤的刺激性。

8.1.6 OD 值以及活性的百分比值都应计算标准偏差。

8.2 与 MTT 有交叉反应的待测样品结果计算

8.2.1 待测样品与 MTT 的反应会产生非特异的颜色反应,干扰 MTT 直接与细胞反应的数据,因此在计算细胞活性时有必要排除这一非特异的干扰。

8.2.2 非特异 MTT 反应的计算(NSMTT),见式(1)

$$\text{NSMTT} = \frac{(\text{OD}_{\text{kt}} - \text{OD}_{\text{ku}})}{\text{OD}_{\text{NC}}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

OD_{ku} ——未用待测样品干预的死皮组织光密度值;

OD_{kt} ——用待测样品干预的死皮组织光密度值;

OD_{NC} ——阴性对照(negative control)光密度值。

NSMTT 应该小于阴性对照活性的 30%。

8.2.3 MTT 与活细胞反应的数据(TODTT),见式(2)和式(3)

$$\text{TODTT} = [\text{OD}_{\text{TV}} - (\text{OD}_{\text{kt}} - \text{OD}_{\text{ku}})] \quad \dots\dots\dots (2)$$

$$\text{表皮模型组织的活性}(\%) = \frac{\text{TODTT}}{\text{OD}_{\text{NC}}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

OD_{TV} ——与待测样品反应的有活性的表皮模型组织(treated viable tissues)的光密度值。

9 质量控制

9.1 基本原则:实验室中设置的各种对照检测结果应符合以下情况。否则,任一种对照如果出现非下述正常结果,应重做试验。

9.2 阴性对照:阴性对照地 OD 值反映表皮模型的活性。其平均 OD 值大于或等于 0.6、小于或等于 1.5,并且相对细胞活性的标准偏差小于或等于 18%。

SN/T 4577—2016

9.3 阳性对照:阳性对照的 OD 值反映表皮模型的敏感性。阳性对照地相对细胞活性小于或等于阴性对照相对细胞活性的 40%,并且相对细胞活性的标准偏差小于或等于 18%。

9.4 待测样品:每个待测样品 3 个平行测试相对细胞活性的标准偏差小于或等于 18%。

10 结果判定报告

10.1 待测样品 3 个平行测试的平均相对细胞活性大于 50%,同时满足第 9 章质量控制要求,判定该待测样品不具有皮肤刺激性,其结果报告为该样品不具有皮肤刺激性。

10.2 待测样品 3 个平行测试的平均相对细胞活性小于或等于 50%,同时满足第 9 章质量控制要求,判定该待测样品具有皮肤刺激性,其结果报告为该样品具有皮肤刺激性。

附录 A
(资料性附录)
表皮模型

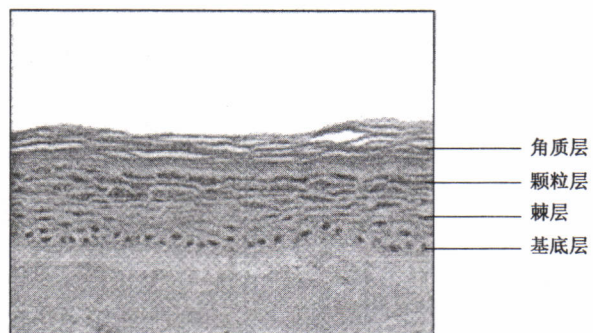


图 A.1 重建人体表皮模型(EpiSkin™表皮模型)组织切片(HE 染色)图



图 A.2 重建人体表皮模型(EpiSkin™表皮模型)实物图

附 录 B
(资料性附录)
溶液的配制

B.1 DPBS 的制备:

0.20 g	氯化钾(KCl)
8.00 g	氯化钠(NaCl)
0.20 g	磷酸二氢钾(KH_2PO_4)
2.16 g	磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
0.10 g	氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
0.10 g	氯化钙(CaCl_2)

用蒸馏水定容至 1 000 mL,调节 pH 值至 7.4,121 °C 高压灭菌 15 min。

B.2 MTT 母液的准备:

DPBS	40 mL
MTT 黄色粉末	120.00 g

配成 3 mg/mL 的 MTT 母液,涡旋震荡 15 min,4 °C 避光保存,保质期 15 d。

B.3 MTT 工作液的准备:测试培养基预热至 37 °C,3 mg/mL 的 MTT 母液与测试培养基按 1:9 比例进行稀释,MTT 终浓度达 0.3 mg/mL,避光保存。

B.4 酸性异丙醇的制备:在 500 mL 的异丙醇中加入 1.8 mL 的 12 N HCl,HCl 终浓度达 0.04 N,4 °C 避光保存,保质期 1 个月。



SN/T 4577-2016

书号:155066 • 2-32326

定价: 16.00 元