

化妆品用化学原料体外皮肤变态反应： 直接多肽反应试验

In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)

1 范围

本方法规定了化妆品用化学原料体外皮肤变态反应：直接多肽反应试验的范围、试验目的、定义、试验的基本原理、试验材料与试剂、试验步骤、数据处理、试验成立条件、结果判定标准和注意事项。

本方法适用于单一组分(定量组成的物质，且其中一种主要成分含量至少80% (W/W))化妆品用化学原料或已知组成成分的多组分(定量组成的物质，且其中一种以上成分含量大于等于10%，小于80%)化妆品用原料潜在致敏性的评价。

2 试验目的

确定化妆品用化学原料对皮肤是否可引起变态反应。

3 定义

3.1 多肽消耗百分比 Percent Peptide Depletion

与溶剂对照相比，受试物消耗多肽的程度。

3.2 共洗脱 Co-elution

受试物在220nm处吸收显著，并与多肽有同样的保留时间。

4 试验原理

有致敏性的受试物与半胱氨酸多肽和赖氨酸多肽模拟的皮肤蛋白共同孵育，导致多肽量减少。测定多肽量，计算多肽消耗百分比，从而判定受试物是否具有皮肤致敏性。

5 试验材料与试剂

5.1 多肽片段与纯度

半胱氨酸多肽：Ac-RFAACAA-COOH，纯度范围：90%—95%。

赖氨酸多肽：Ac-RFAAKAA-COOH，纯度范围：90%—95%。

5.2 阳性对照与受试物的配制

试验当天配制阳性对照和受试物溶液，浓度均为100mmol/L，阳性对照为纯度90%以上肉桂醛。

溶剂选择：乙腈、水、乙腈/水(V:V=1:1)、异丙醇、丙酮、丙酮/乙腈(V:V=1:1)，以及其他不影响肽稳定性的溶剂。若仍不溶解，依次可尝试使其溶解于300μL DMSO中，并用2700μL乙腈稀释；或溶解于1500μL DMSO，并用1500μL乙腈稀释。

5.3 多肽贮备液的配制

5.3.1 半胱氨酸多肽贮备液：称取适量半胱氨酸多肽，用pH7.5的磷酸盐缓冲液配制成0.667mmol/L的溶液。

pH7.5磷酸盐缓冲液：取0.1mol/L磷酸二氢钠溶液18mL与0.1mol/L磷酸氢二钠溶液82mL混合，测定pH值，应在7.5±0.5之间。若偏酸性，加入0.1mol/L磷酸氢二钠溶液进行调节。若偏碱性，加入0.1mol/L磷酸二氢钠溶液进行调节。

5.3.2 赖氨酸多肽贮备液：称取适量赖氨酸多肽，用pH10.2的醋酸铵缓冲液配制成0.667mmol/L的溶液。

pH10.2醋酸铵缓冲液：取醋酸铵1.542g，加水200mL溶解，用氨水调节pH值至10.2。

5.3.3 多肽标准溶液的配制

稀释溶剂A：含20%乙腈的pH7.5磷酸盐缓冲液；配制方法：2mL乙腈加8mL pH7.5磷酸盐缓冲液。

稀释溶剂B：含20%乙腈的pH10.2醋酸铵缓冲液；配制方法：2mL乙腈加8mL pH10.2醋酸铵缓冲液。

半胱氨酸多肽标准溶液配制方法见表1，赖氨酸多肽标准溶液配制方法见表2。

表 1 半胱氨酸多肽标准溶液配制方法

剂量	体积	单位	TA	体积	单位	溶剂	终浓度 (mmol/L)
1	1700	μL	半胱氨酸贮备液	300	μL	乙腈	0.5670
2	1	mL	1	1	mL	稀释溶剂A	0.2835
3	1	mL	2	1	mL	稀释溶剂A	0.1418
4	1	mL	3	1	mL	稀释溶剂A	0.0709
5	1	mL	4	1	mL	稀释溶剂A	0.0354
6	1	mL	5	1	mL	稀释溶剂A	0.0177
7	NA		NA	NA		稀释溶剂A	0

表 2 赖氨酸多肽标准溶液配制方法

剂量	体积	单位	TA	体积	单位	溶剂	终浓度 (mmol/L)
1	1700	μL	赖氨酸贮备液	300	μL	乙腈	0.5670
2	1	mL	1	1	mL	稀释溶剂B	0.2835
3	1	mL	2	1	mL	稀释溶剂B	0.1418
4	1	mL	3	1	mL	稀释溶剂B	0.0709
5	1	mL	4	1	mL	稀释溶剂B	0.0354
6	1	mL	5	1	mL	稀释溶剂B	0.0177
7	NA		NA	NA		稀释溶剂B	0

5.3.4 液相待测溶液的配制

按下表格制备液相待测溶液：每个平行3份，配制方法见表3。

表 3 液相测试溶液的配制

1:10 半胱氨酸多肽 (0.5mmol/L 多肽, 5mmol/L 受试物)		1:50 赖氨酸多肽 (0.5mmol/L 多肽, 25mmol/L 受试物)	
总量	溶剂	总量	溶剂
	半胱氨酸多肽贮备液 (或受试物对照: pH7.5磷酸盐缓冲液)		赖氨酸多肽贮备液 (或受试物对照: pH10.2醋酸铵缓冲液)
750 μL		750 μL	100mmol/L的受试物溶液 (或空白对照、溶剂对照、阳性对照)
200 μL	乙腈	250 μL	
50 μL	100mmol/L的受试物溶液 (或空白对照、溶剂对照、阳性对照)		

6 试验步骤

6.1 操作步骤

受试物与多肽混合避光反应24±2h，温度为25±2.5℃，在反应结束后1h内进行HPLC测定，并在30h内完成全部检测。反应前后需对进样瓶进行观察并记录是否出现沉淀等情况。

当反应开始前出现沉淀，则多肽消耗百分比无法计算，阳性结果可用，阴性结果不确定；若仅反应后出现沉淀，则采用100-400xg低转速离心，使沉淀集聚至进样瓶底部，再进样。

6.2 液相色谱条件

6.2.1 流动相

流动相A： 1L纯水中加入1000μL三氟乙酸。

流动相B： 1L乙腈中加入850μL三氟乙酸。

6.2.2 色谱柱

十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(100mm × 2.1mm × 3.5μm)或等效色谱柱。

6.2.3 检测器及检测波长

紫外检测器，检测波长为220nm。

流动相梯度洗脱程序（根据情况可做适当调整）：

时间（min）	流速（mL/min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	0.5	90	10
10	0.5	80	20
12	0.5	10	90
14	0.5	10	90
15	0.5	90	10
22	0.5	90	10

7 数据处理

多肽消耗百分比计算公式：

$$\text{多肽消耗百分比} = \left(1 - \frac{\text{样品多肽峰面积均值}}{\text{溶剂对照多肽峰面积均值}}\right) \times 100$$

8 试验成立条件

符合以下条件，试验条件有效：

8.1 标准曲线： $r^2 > 0.990$ 。

8.2 阳性对照平均多肽消耗百分比：半胱氨酸多肽60.8%-100%，SD < 14.9%。赖氨酸多肽40.2%-69.4%，SD < 11.6%。

8.3 对照A平均肽浓度：0.45 mmol/L-0.55mmol/L。

8.4 对照B、C峰面积CV < 15.0%（n=9）。

符合以下条件，受试物结果有效：

8.5 受试物多肽消耗值SD：半胱氨酸多肽小于14.9%，赖氨酸多肽小于11.6%。

8.6 对照C平均肽浓度应在0.45mmol/L-0.55mmol/L之间。

9 结果判定标准

9.1 当受试物与半胱氨酸多肽和赖氨酸多肽都不发生共洗脱时，采用1:10半胱氨酸多肽和1:50赖氨酸多肽模型（表4）判定。

表 4 1:10 半胱氨酸多肽和 1:50 赖氨酸多肽判定模型

半胱氨酸和赖氨酸消耗百分比的均值	反应等级	DPRA 预测结果
0%≤消耗百分比的均值≤6.38%	无或轻微反应	阴性
6.38%<消耗百分比的均值≤22.62%	弱反应	阳性
22.62%<消耗百分比的均值≤42.47%	中度反应	阳性
42.47%<消耗百分比的均值≤100%	强反应	阳性

9.2 当受试物仅与赖氨酸多肽发生共洗脱时，采用1:10半胱氨酸多肽模型（表5）判定。

表 5 1:10 半胱氨酸多肽判定模型

半胱氨酸消耗百分比	反应等级	DPRA 预测结果
0%≤消耗百分比≤13.89%	无或轻微反应	阴性
13.89%<消耗百分比≤23.09%	弱反应	阳性
23.09%<消耗百分比≤98.24%	中度反应	阳性
98.24%<消耗百分比≤100%	强反应	阳性

9.3 当受试物同时与半胱氨酸多肽、赖氨酸多肽发生共洗脱时，判定结论为“无定论”。

10 注意事项

10.1 受试物对照(共洗脱对照): 用pH7.5磷酸盐缓冲液或pH10.2醋酸铵缓冲液配制，不含多肽，用来确定受试物中的峰与半胱氨酸多肽峰或赖氨酸多肽峰是否存在叠加。

10.2 空白对照：用乙腈替代受试物。

10.3 溶剂对照：用溶解样品的溶剂替代受试物。

10.4 阳性对照：用100mmol/L的肉桂醛替代受试物。

10.5 对照A：使用空白对照，用于考察HPLC系统的稳定性。

10.6 对照B：使用空白对照，在反应24小时后，于进样序列的开始和结束时测定，用于确定测定过程中多肽的稳定性。

10.7 对照C：使用溶剂对照，用于考察溶剂对多肽的影响。

10.8 多肽消耗值为负时，以“0”计算。

10.9 采用1:10半胱氨酸多肽和1:50赖氨酸多肽模型时，半胱氨酸多肽和赖氨酸多肽消耗百分比的均值在3%-10%之间；采用1:10半胱氨酸多肽模型时，半胱氨酸消耗百分比在9%-17%之间，须进行重复测试；若前两次结果不一致，须进行第三次测试。

10.10 液相进样序列参照表6执行。

表 6 液相进样序列

标准溶液和空白对照	标准溶液剂量1
	标准溶液剂量2
	标准溶液剂量3

	标准溶液剂量4
	标准溶液剂量5
	标准溶液剂量6
	稀释溶剂
	对照A平行样品1
	对照A平行样品2
	对照A平行样品3
共洗脱对照	受试物1共洗脱对照
	受试物2共洗脱对照
	对照B平行样品1
对照	对照B平行样品2
	对照B平行样品3
	对照C平行样品1
重复进样第一次	阳性对照平行样品1
	受试物1平行样品1
	受试物2平行样品1
	对照C平行样品2
重复进样第二次	阳性对照平行样品2
	受试物1平行样品2
	受试物2平行样品2
	对照C平行样品3
重复进样第三次	阳性对照平行样品3
	受试物1平行样品3
	受试物2平行样品3
	对照B平行样品4
对照	对照B平行样品5
	对照B平行样品6

10.11 本方法不能用于复杂未知组成的混合物、未知可变单一物质、复杂反应产物以及生物材料。

10.12 已知组成成分的多组分化妆品用化学原料进行试验，可根据各组成成分（除水以外）的平均分子量进行100mmol/L样品的配制。

10.13 若受试物在建议溶剂中的溶解度达不到100mmol/L，理论上仍可以进行试验。在这种情况下得出的阳性结果仍有参考意义，但得出的阴性结果不能说明受试物一定没有肽反应性。

10.14 直接多肽法是针对皮肤致敏反应多个关键因素中的一个，可结合其他方法以进一步提高其预测准确性。