

## 附件 5

# 光反应性活性氧（ROS）测定试验方法

## Reactive Oxygen Species (ROS) Assay for Photoreactivity

### 1 范围

本方法规定了化妆品用化学原料光反应性活性氧（ROS）测定试验的基本要求和方法。  
本方法适用于预测化妆品用化学原料的潜在光毒性。

### 2 试验目的

预测化妆品用化学原料是否具有潜在光毒性。

### 3 定义

下列术语和定义适用于本方法。

#### 3.1 光反应性 Photoreactivity

化学物质由于吸收光子而与另一个分子发生反应的性质。

#### 3.2 光毒性 Phototoxicity

皮肤一次接触化学物质后，继而暴露于紫外线照射下所引发的一种皮肤毒性反应，或者全身应用化学物质后，暴露于紫外线照射下发生的类似反应。本方法所述光毒性包括光刺激性、光过敏性和光遗传毒性。

#### 3.3 辐照度 Irradiance

照射到某一表面的紫外线或可见光的强度，单位为瓦每平方米（ $\text{W/m}^2$ ）或毫瓦每平方厘米（ $\text{mW/cm}^2$ ）。

#### 3.4 光照剂量 Dose of light

照射到某一表面的紫外线或可见光的量[=强度×时间（秒）]，单位为焦耳每平方米（ $\text{J/m}^2$ ）或焦耳每平方厘米（ $\text{J/cm}^2$ ）。

#### 3.5 活性氧种类 Reactive Oxygen Species, ROS

活性氧种类，包括单线态氧和超氧阴离子。

#### 3.6 单线态氧 Singlet Oxygen, $\text{SO}$

由光辐照化学物质通过II型光化学反应产生的一种自由基。

#### 3.7 超氧阴离子 Superoxide Anion, $\text{SA}$

由光辐照化学物质通过I型光化学反应产生的一种自由基。

### 4 试验原理

一些具有光反应性的化学物质暴露于紫外线时，吸收某一波长光子，诱导发色团激发，激发能量转移到氧分子上，发生光化学反应，产生活性氧（包括单线态氧 $^1\text{O}_2$ 和超氧阴离子 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ），活性氧是光毒性反应中的重要中间物质。

单线态氧和咪唑反应生成的过氧化物中间体对N,N-二甲基-4-亚硝基苯胺（RNO）具有漂白作用，使其在440 nm下的吸光度降低。超氧阴离子与氯化硝基四氮唑蓝（NBT）反应生成 $\text{NBT}^{\cdot+}$ ，其在560 nm波长下具有光吸收。

本试验方法通过分光光度法测定化学物质经紫外线照射后对RNO在440 nm下吸光度的减少及对 $\text{NBT}^{\cdot+}$ 在560 nm下吸光度的增加来判断该化学物质是否具有光反应性。

## 5 试剂和材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯或以上规格，水为 GB/T6682规定的一级水。所有试剂应在配制后1个月内使用，并且在使用前应超声处理，以免物质析出、沉淀对试验造成影响。主要试剂配制方法如下：

5.1 磷酸二氢钠。

5.2 磷酸氢二钠。

5.3 N,N-二甲基-4-亚硝基苯胺（RNO）。

5.4 咪唑。

5.5 氯化硝基四氮唑蓝（NBT）。

5.6 pH 7.4的20 mmol/L磷酸钠缓冲液（NaPB）

称取 593 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ （CAS：13472-35-0）和 5.8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ （CAS：10039-32-4），加入约900 mL水，混匀，用1 mol/L的HCl将pH值调节为7.4，定容至1000 mL后混匀。于2℃~8℃冰箱或室温保存。

5.7 0.2 mmol/L N,N-二甲基-4-亚硝基苯胺（RNO，CAS：138-89-6）

称取3 mg RNO，溶于100 mL 20 mmol/L的磷酸钠缓冲液中，充分混匀。于2℃~8℃冰箱避光保存。

5.8 0.2 mmol/L咪唑（CAS：288-32-4）

称取13.6 mg咪唑，溶于10 mL 20 mmol/L的磷酸钠缓冲液中，充分混匀，得到20 mmol/L咪唑溶液。用20 mmol/L的磷酸钠缓冲液将20 mmol/L咪唑溶液稀释100倍，充分混匀。于2℃~8℃冰箱避光保存。

5.9 0.4 mmol/L 氯化硝基四氮唑蓝（NBT，CAS：298-83-9）

称取32.7 mg NBT，溶于100 mL 20 mmol/L的磷酸钠缓冲液中，充分混匀。于2℃~8℃冰箱避光保存。

5.10 溶剂的选择

优先使用分析级二甲基亚砷（DMSO）。对于不溶于DMSO的受试物，可使用20 mmol/L

的磷酸钠缓冲液作为溶剂。如果受试物在DMSO和磷酸钠缓冲液中不溶或不稳定，也可使用其他溶剂，但应保证受试物在所选溶剂中稳定，且参考化学物质的SO值和SA值应在附录A规定的范围内。

### 5.11 待测化学物质溶液的配制

待测化学物质的分子量应是已知的。测试终浓度为200  $\mu\text{mol/L}$ ，如果在200  $\mu\text{mol/L}$ 浓度下的反应混合物有沉淀、着色或其他干扰等现象，则可以使用20  $\mu\text{mol/L}$ 为终浓度进行测试。当待测化学物质在20  $\mu\text{mol/L}$ 的终浓度下得到阳性结果，表示该物质具有光反应性；但在浓度低于20  $\mu\text{mol/L}$ 下得到阴性结果，不能表示该物质无光反应性。

待测化学物质溶液应现用现配，所有操作均应避免在强紫外线和强可见光照射（例如头顶灯下或在自然光暴露的窗户附近工作），以避免在试验前待测化学物质发生光激活或光降解。待测化学物质在试管中称重，加入5.10项溶剂，涡旋混匀，超声5-10 min，配制成10 mmol/L（终浓度200  $\mu\text{mol/L}$ ）。当终浓度200  $\mu\text{mol/L}$ 的反应混合物在光照前观察到沉淀、着色或其他干扰等现象时，需将10 mmol/L的溶液用DMSO稀释成1 mmol/L溶液（终浓度20  $\mu\text{mol/L}$ ）。对于不溶于DMSO的化学物质，使用其他溶剂（如磷酸钠缓冲溶液）时，须使得反应混合物中含有20  $\mu\text{LDMSO}$ （2%，v/v）。

### 5.12 阴性对照及阳性对照

以奎宁盐酸盐二水合物（CAS: 6119-47-7）作为阳性对照，以二苯甲酮-4（CAS: 4065-45-6）作为阴性对照。用DMSO按与受试物相同的方法将阳性对照和阴性对照配制成10 mmol/L的储备溶液，分装后于-20℃冰箱冻存，于使用当天解冻，避免反复冻融，1个月内使用完毕。

## 6 仪器和设备

### 6.1 太阳光模拟器

6.1.1 选择合适的光源用于提供紫外线和可见光的照射，通过滤光片减少波长小于 290 nm 的 UVC，使光源尽量接近室外日光。推荐的测试条件如下：

a) 配备滤光片的太阳模拟器（减少紫外线波长<290 nm）（见附录 B）

— 辐照度：1.8 mW/cm<sup>2</sup>至 2.2 mW/cm<sup>2</sup>，照射 1 小时（例如，Atlas Suntest CPS+的指标设置值为 250 W/m<sup>2</sup>），

— UVA 光照剂量：6.5 J/cm<sup>2</sup>至 7.9 J/cm<sup>2</sup>（见附录 B）。

b) 配备滤光片的太阳模拟器（减少紫外线波长<300 nm）（见附录 B）

— 辐照度：3.0 mW/cm<sup>2</sup>至 5.0 mW/cm<sup>2</sup>，照射 1 小时（例如，Seric SXL-2500V2），

— UVA 光照剂量：11 J/cm<sup>2</sup>至 18 J/cm<sup>2</sup>（见附录 B）。

6.1.2 测试条件根据实际选择合适具体条件。

6.1.3 ROS 的产生受温度影响，太阳光模拟器应配备温度控制装置，光照期间温度在 20℃~29℃。

### 6.2 反应容器

推荐使用石英反应容器（规格见附录C），避免液体蒸发以及由于塑料盖造成的UV损失。也可使用其他UV透射率大于95%的盖子或密封件替代。实验室使用其他容器时，应使

用附录A中的参考化学物质（序号1-17号）确定合适的仪器辐照度及光剂量。

6.3 酶标仪。

6.4 UVA紫外照度计。

6.5 显微镜。

7 分析步骤

7.1 将下列成分在避光条件下混合：

7.1.1 溶剂为DMSO的受试物：

| 单线态氧 SO                                                                                           | 超氧阴离子 SA                                                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 20 mmol/L NaPB 480 μL<br>0.2 mmol/L 咪唑 250 μL<br>0.2 mmol/L RNO 250 μL<br>10 或 1 mmol/L 受试物 20 μL | 20 mmol/L NaPB 855 μL<br>0.4 mmol/L NBT 125 μL<br>10 或 1 mmol/L 受试物 20 μL |

7.1.2 溶剂为NaPB的受试物：

| 单线态氧 SO                                                                                                       | 超氧阴离子 SA                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 20 mmol/LNaPB460 μL<br>0.2 mmol/L 咪唑 250 μL<br>0.2 mmol/L RNO 250 μL<br>DMSO 20 μL<br>10 或 1 mmol/L 受试物 20 μL | 20 mmol/LNaPB835 μL<br>0.4 mmol/L NBT 125 μL<br>DMSO 20 μL<br>10 或 1 mmol/L 受试物 20 μL |

以20 μL溶剂替代受试物，作为空白对照。涡旋或超声5~10 min后，将200 μL反应混合物加入到96孔板中，每组设置3个平行。96孔板加样详见附录D。

7.2 在100倍显微镜下检查反应混合物中各组分溶解情况。如有沉淀、析出等现象，需降低受试物浓度重新检测或停止检测。将96孔板震荡5 s后，使用分光光度计或酶标仪测定光照前SO检测孔在440 nm下的吸光度及SA检测孔在560 nm下的吸光度。

7.3 将96孔板置于石英反应器中，或盖上其他具有高UV透射率的盖子或密封件，置于太阳光模拟器中照射1 h。记录光照前后的温度。

7.4 完成光照后，将96孔板震荡1 min，使用分光光度计或酶标仪测定光照后SO检测孔在440 nm下的吸光度及SA检测孔在560 nm下的吸光度。

步骤流程图见附录E

8 分析结果表述

8.1 SO值和SA值的计算

计算受试物及对照品的SO值和SA值，根据三个平行孔的数据计算平均值和标准偏差。

1. 根据光照前后SO测试孔在440 nm下的吸光度计算受试物的SO值

$$\text{SO值} = [A_{440}(-) - A_{440}(+) - (a - b)] \times 1000$$

式中：A<sub>440</sub>(-)：光照前440 nm下的吸光度

A<sub>440</sub>(+)：光照后440 nm下的吸光度

a：光照前空白对照440 nm下的吸光度（平均值）

b：光照后空白对照440 nm下的吸光度（平均值）

2. 根据光照前后SA测试孔在560 nm下的吸光度计算受试物的SA值

$$\text{SA值} = [A_{560}(+) - A_{560}(-) - (b - a)] \times 1000$$

式中：A<sub>560</sub>(-)：光照前560 nm下的吸光度

A<sub>560</sub>(+)：光照后560 nm下的吸光度

a：光照前空白对照560 nm下的吸光度（平均值）

b：光照后空白对照560 nm下的吸光度（平均值）

### 8.2 试验接受标准

试验应满足以下标准：

1. 光照前，反应混合物中没有受试物沉淀。
2. 光照前后，受试物对反应混合物没有颜色干扰。
3. 试验过程中温度控制在20℃~29℃范围内。
4. 所有测试孔A<sub>440</sub>及A<sub>560</sub>应在0.02~1.5范围内。
5. 应根据历史数据平均值±2标准偏差建立实验室内阴性对照与阳性对照的质控范围。

以下为根据验证数据得出的95%置信区间：

| 200 μmol/L 奎宁盐酸盐二水合物 | 200 μmol/L 二苯甲酮-4 |
|----------------------|-------------------|
| SO: 319 至 583        | SO: -9 至 11       |
| SA: 193 至 385        | SA: -20 至 2       |

### 8.3 受试物的光反应性评判标准

根据以下标准评判受试物的光反应性：

| 分类      | 样品浓度        | SO         | SA           |
|---------|-------------|------------|--------------|
| 具有光反应性  | 200 μmol/L  | ≥25        | 和 ≥70        |
|         |             | <25 和/或有干扰 | 和 ≥70        |
|         |             | ≥25        | 和 <70 和/或有干扰 |
| 具有弱光反应性 | 200 μmol/L  | <25        | 和 ≥20, <70   |
| 具有光反应性  | 20 μmol/L   | ≥25        | 和 ≥20        |
| 无光反应性   | 200 μmol/L  | <25        | 和 <20        |
| 不确定     | 不属于上述任何一种情况 |            |              |

如受试物在200 μmol/L和20 μmol/L浓度下均有沉淀、着色或其他干扰，则认为该受试物不适用于本方法，受试物的光反应性不确定。

### 9 其他限制说明

在活性氧（ROS）检测过程中，会发生如下两个反应：单线态氧和咪唑反应生成的过氧化物中间体对N,N-二甲基-4-亚硝基苯胺（RNO）具有漂白作用；超氧阴离子与氯化硝基四氮唑蓝（NBT）反应生成NBT<sup>+</sup>。该方法不适用于对上述两个反应产生干扰的化学品测试，例如，抗坏血酸和其他还原性化学品，它们会将四唑盐直接还原为甲瓚，抗坏血酸还加速咪唑衍生物的氧化，在ROS测定中提供假阳性预测。

## 附录 A

## 参考化学物质检测结果可接受范围

表 1 17 种参考化学物质 SO 值和 SA 值测定数据的可接受范围。

| 编号 | 化学物名称     | CAS 编号     | SO       | SA      | 溶剂   | 浓度                    |
|----|-----------|------------|----------|---------|------|-----------------------|
| 1  | 对氨基苯甲酸    | 150-13-0   | -8~12    | -11~7   | DMSO | 200 $\mu\text{mol/L}$ |
| 2  | 对氨基苯甲酸乙酯  | 94-09-7    | -7~9     | -7~17   | DMSO | 200 $\mu\text{mol/L}$ |
| 3  | 盐酸多西环素    | 10592-13-9 | 115~429  | 230~468 | DMSO | 200 $\mu\text{mol/L}$ |
| 4  | 红霉素       | 114-07-8   | -15~11   | -9~21   | DMSO | 200 $\mu\text{mol/L}$ |
| 5  | 非诺贝特      | 49562-28-9 | 77~203   | -31~11  | DMSO | 20 $\mu\text{mol/L}$  |
| 6  | L-组氨酸     | 71-00-1    | -8~12    | 8~120   | NaPB | 200 $\mu\text{mol/L}$ |
| 7  | 诺氟沙星      | 70458-96-7 | 131~271  | 57~161  | DMSO | 200 $\mu\text{mol/L}$ |
| 8  | 8-甲氧基补骨脂素 | 298-81-7   | 31~137   | 0~126   | DMSO | 200 $\mu\text{mol/L}$ |
| 9  | 水杨酸异辛酯    | 118-60-5   | -5~11    | -8~20   | DMSO | 20 $\mu\text{mol/L}$  |
| 10 | 吡啶        | 260-94-6   | 182~328  | 121~243 | DMSO | 200 $\mu\text{mol/L}$ |
| 11 | 盐酸氯丙嗪     | 69-09-0    | -56~70   | 66~106  | DMSO | 200 $\mu\text{mol/L}$ |
| 12 | 双氯芬酸钠     | 15307-79-6 | 34~416   | 47~437  | DMSO | 200 $\mu\text{mol/L}$ |
| 13 | 呋噻米       | 54-31-9    | 31~225   | -7~109  | DMSO | 200 $\mu\text{mol/L}$ |
| 14 | 酮基布洛芬     | 22071-15-4 | 120~346  | 77~151  | DMSO | 200 $\mu\text{mol/L}$ |
| 15 | 萘啶酮酸      | 389-08-2   | 54~246   | 88~470  | DMSO | 200 $\mu\text{mol/L}$ |
| 16 | 奥美拉唑      | 73590-58-6 | -221~103 | 30~216  | DMSO | 200 $\mu\text{mol/L}$ |
| 17 | 盐酸异丙嗪     | 58-33-3    | 20~168   | -3~77   | DMSO | 200 $\mu\text{mol/L}$ |

## 附录 B

### 太阳光模拟器光谱分布

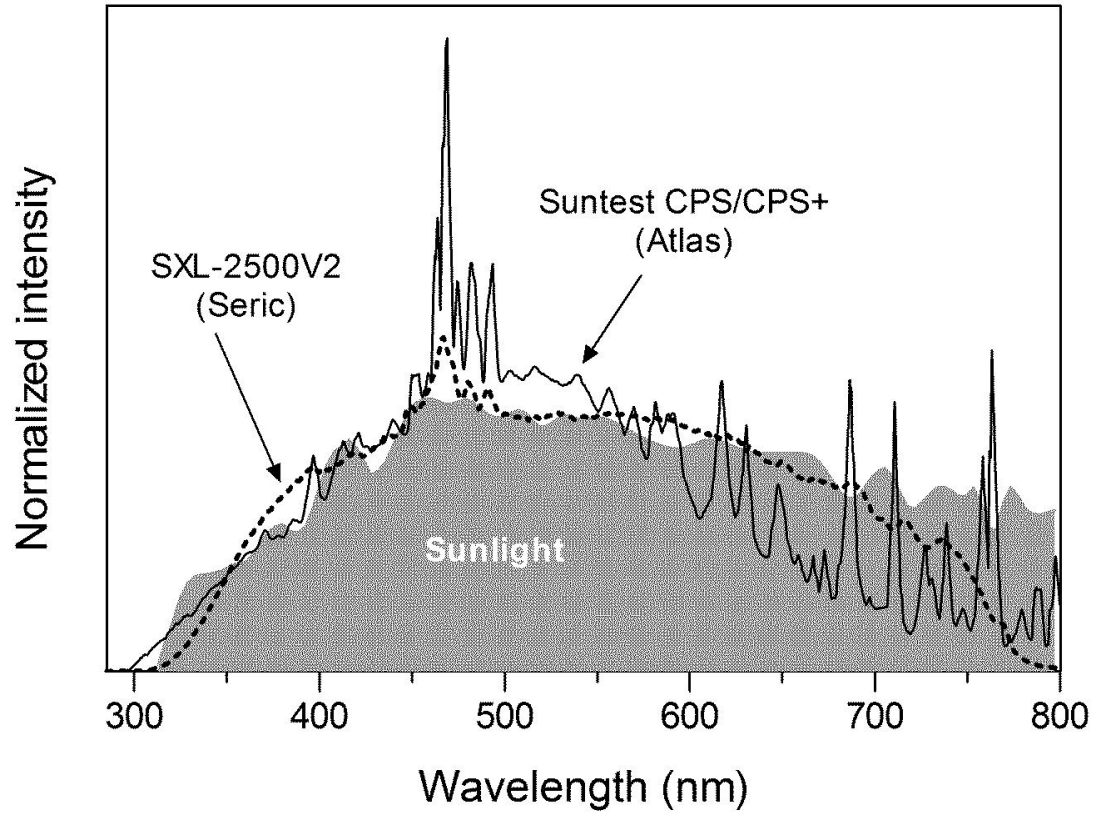


图 1 推荐的两种太阳光模拟器的光谱能量分布



附录 C

石英反应容器

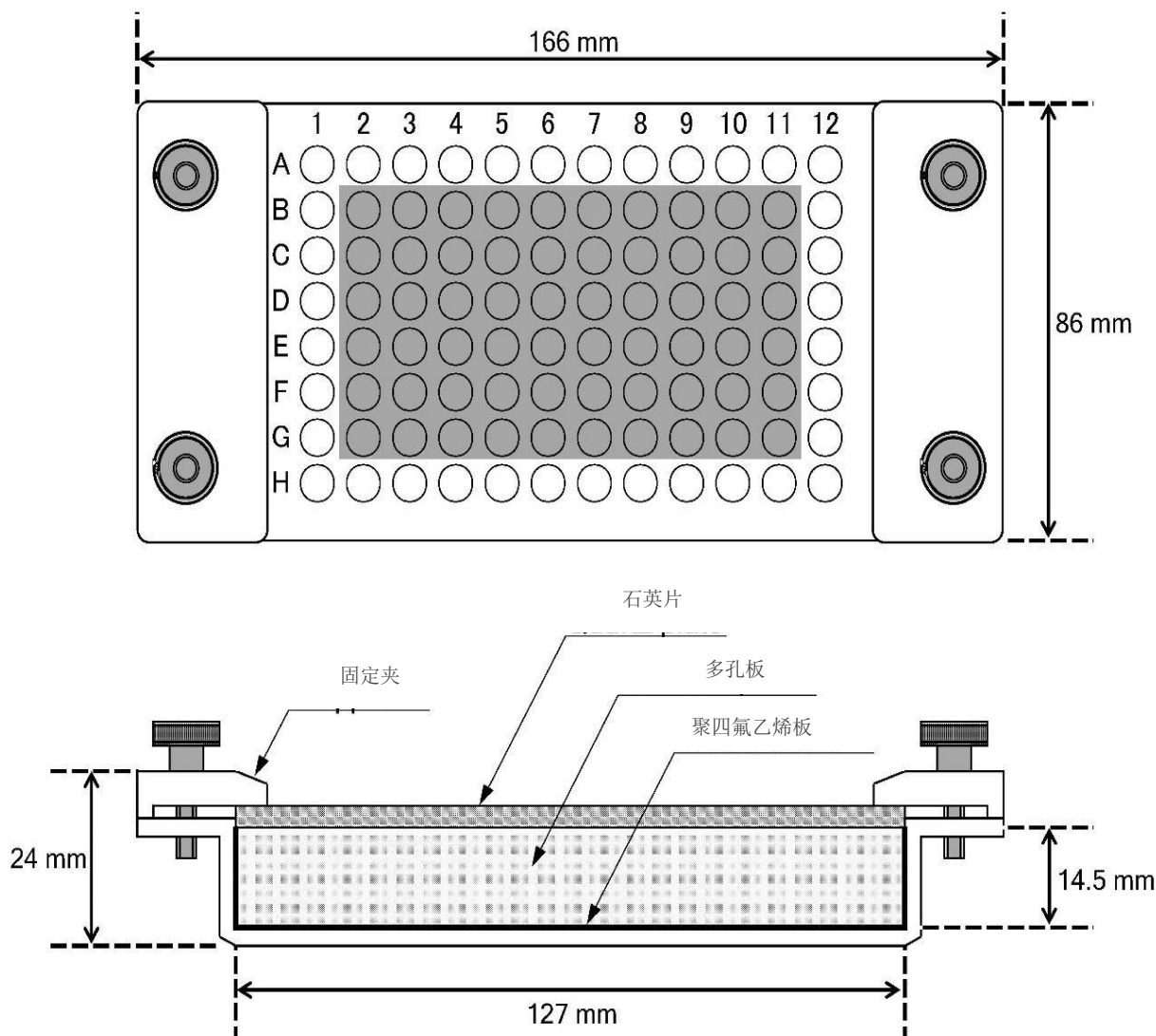


图 2 石英反应容器推荐规格图示

石英盖板推荐厚度为 3 mm

## 附录 D

### 96 孔板加样示意图

96 孔板加样示例如下：

|   | 1 | 2            | 3 | 4 | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 |
|---|---|--------------|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| A |   | 单线态氧 SO 检测孔  |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |
| B |   | B            | P | N | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 |    |
| C |   | B            | P | N | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 |    |
| D |   | B            | P | N | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 |    |
| E |   | B            | P | N | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 |    |
| F |   | B            | P | N | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 |    |
| G |   | B            | P | N | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 |    |
|   |   | 超氧阴离子 SA 检测孔 |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |

注：1.B 为空白对照；

2.P 为阳性对照（奎宁盐酸盐二水合物），N 为阴性对照（二苯甲酮-4）；

3.T1-T7 为第 1 至第 7 种受试物。

## 附录 E

### 试验流程图

将各反应成分在避光条件下混合



混合（涡旋或者超声 5-10 分钟）



200  $\mu\text{L}$  混合物加入到 96 孔板中（每组 3 个平行）



100 倍显微镜下检查溶解情况



震荡 5 s 后，检测 440 nm 和 560 nm 吸光度



光照 1 小时



震荡 1 min 后，检测 440 nm 和 560 nm 吸光度