

附件 10

体外皮肤变态反应 氨基酸衍生化反应试验方法

In Chemico Skin Sensitisation: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)

1 范围

本方法规定了氨基酸衍生化反应试验方法的基本要求和试验方法。

本方法适用于已知单一组分、已知组成成分的多组分化妆品用原料潜在致敏性的评价。

2 试验目的

预测和评价化妆品用化学原料是否具有潜在皮肤致敏性。

3 定义

3.1 氨基酸衍生物消耗百分比Percent Amino acid Derivative Depletion

与溶剂对照相比，受试物消耗氨基酸衍生物的程度。

3.2 共洗脱 Co-elution

受试物在281 nm处吸收显著，并与氨基酸衍生物保留时间相同或色谱峰部分重叠，干扰氨基酸衍生物定量分析。

4 试验原理

有致敏性的受试物与N-(2-(1-萘基)乙酰基)-L-半胱氨酸(NAC)和N-(2-(1-萘基)乙酰基)-L-赖氨酸(NAL)模拟的皮肤蛋白进行反应，消耗氨基酸衍生物。测定衍生物的量，计算氨基酸衍生物消耗百分比，从而判断受试物是否具有皮肤致敏性。

5 试验材料与试剂

5.1 氨基酸衍生物片段与纯度

N-(2-(1-萘基)乙酰基)-L-半胱氨酸(NAC)：分子式 $C_{15}H_{15}NO_3S$ ，分子量289.35，纯度：>98%。

N-(2-(1-萘基)乙酰基)-L-赖氨酸(NAL)：分子式 $C_{18}H_{22}N_2O_3$ ，分子量314.38，纯度范围：>98%。

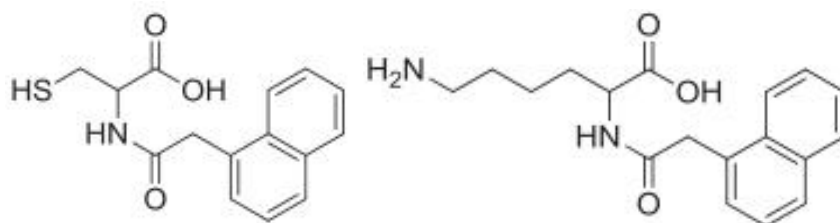


图1 NAC (左) 和 NAL (右) 的结构式

5.2 阳性对照与受试物的配制

阳性对照溶液：取苯乙醛适量（纯度>90%），加乙腈制成1 mmol/L的溶液，临用新制。

受试物溶液：溶剂选用蒸馏水、乙腈和丙酮，单一或混合使用制成1 mmol/L的溶液，临用新制。如出现溶解不完全的情况，可将受试物先溶解在二甲基亚砷（DMSO）中，然后用乙腈稀释该溶液制备成1 mmol/L受试化合物溶液。最终溶液中DMSO用量不得超过5%(V/V)。

反应固定液：1 mL三氟乙酸（TFA）加40 mL水于5 mL离心管中，得到2.5% TFA水溶液。

5.3 氨基酸衍生物贮备液的配制

5.3.1 N-（2-（1-萘基）乙酰基）-L-半胱氨酸（NAC）贮备液：称取适量 NAC，用 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液配制 6.667 μmol/L 的溶液。储备液应在-80 °C下冷冻保存，存放时间不超过六个月，每次使用应验证其稳定性。

pH8.0 磷酸盐缓冲液：取 0.18 g 无水磷酸氢二钠与 4.02 g 无水磷酸二氢钠溶于 300 mL 蒸馏水当中，每 300 mL 缓冲液加入 1 mL 的 0.1 mmol/L EDTA 溶液，混合均匀，测终溶液 pH 在 7.9-8.1 之间，配制完成，每次使用前检查 pH。

5.3.2 N-（2-（1-萘基）乙酰基）-L-赖氨酸（NAL）储备液：称取适量 NAL，用 pH10.2 的磷酸盐缓冲液配制 6.667 μmol/L 的溶液。储备液应在-80 °C下冷冻保存，存放时间不超过六个月，每次使用应验证其稳定性。

pH10.2 磷酸盐缓冲液：取 4.26 g 无水磷酸二氢钠溶于 286 mL 蒸馏水，加入 14 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液，每 300 mL 缓冲液加入 1 mL 的 0.1 mmol/L EDTA 溶液。搅拌均匀，测终溶液 pH 在 10.1-10.3 之间，配制完成，每次使用前检查 pH。

5.3.3 氨基酸衍生物标准线性溶液的配制

NAC标准线性溶液的稀释溶剂：取15 mL pH8.0磷酸盐缓冲液于50 mL离心管，加1 mL 水、100 μL三氟乙酸、3.9 mL乙腈，振荡混匀，临用新制。

NAL标准线性溶液的稀释溶剂：取15 mL pH10.2磷酸盐缓冲液于50 mL离心管，加1 mL 水、100 μL三氟乙酸、3.9 mL乙腈，振荡混匀，临用新制。

先配制 5 μmol/L 的标准溶液（std7）：300μL 6.667 μmol/L NAC 储备液加入 1.5 mL 离心管中，加入 20 μL 水、2 μL 三氟乙酸、78 μL 乙腈。

标准线性溶液：取 std7 溶液，逐步稀释到下表浓度。std1 为稀释溶剂。NAL 线性溶液操作步骤与 NAC 一致。

表 1 线性点的摩尔浓度

序号	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7
浓度μmol/L	0.000	0.15625	0.3125	0.625	1.250	2.500	5.000

5.3.4 液相待测溶液的配制

共洗脱对照：150 μL磷酸盐缓冲液+50 μL受试物溶液。

参比溶液A和B：150 μL NAC+50 μL 乙腈，平行样A三份B六份。NAL的操作步骤一致。

参比溶液C：150 μL NAC+50 μL溶解受试物的溶剂，平行三份。若用混合溶剂，则需要制备每种溶剂的参比溶液C；如用乙腈和水混合溶液溶解的，则需要配制三份NAC的水溶液，三份NAC的乙腈溶液。NAL的操作步骤一致。

阳性对照溶液制备：150 μL NAC+50 μL阳性对照（苯乙醛乙腈）溶液，三份平行样。NAL的操作步骤一致。

供试品溶液制备：150 μL NAC+50 μL测试化学品溶液，三份平行样。NAL操作步骤一致。

6 试验步骤

6.1 操作步骤

按进样顺序排列，5.3.4项下所有对照与测试样品均避光25±1 °C反应24±1 h，结束后30 min内加入反应固定液50 μL，观察反应前后是否产生沉淀。（如果反应前产生沉淀，阳性结果可用，阴性不可用；反应后产生沉淀，过滤后再进样。）

6.2 液相色谱条件

6.2.1 流动相

流动相A：0.1%三氟乙酸水溶液（V/V），1 mL三氟乙酸+1000 mL水，混匀既得；
流动相B：0.1%三氟乙酸乙腈溶液（V/V），1 mL三氟乙酸+1000 mL乙腈，混匀既得。

6.2.2 色谱柱

十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱（3.0 mm×150 mm，2.7 μm）或等效色谱柱。

6.2.3 检测器及检测波长

紫外吸收光谱检测器，检测波长为281 nm，流速0.3 mL/min。

NAC/NAL流动相梯度洗脱程序（可依据实际情况调整）：

NAC			NAL		
时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）	时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	70	30	0	80	20
9.5	45	55	9.5	55	45
10	0	100	10	0	100
13	0	100	13	0	100
13.5	70	30	13.5	80	20
20	70	30	20	80	20

7 数据处理

氨基酸衍生物消耗百分比计算公式：

氨基酸衍生物消耗百分比 = $\left(1 - \frac{\text{样品氨基酸衍生物峰面积均值}}{\text{溶剂对照氨基酸衍生物峰面积均值}}\right) \times 100$

注：当氨基酸衍生物消耗值计算为负时，视为“0”值。

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 阳性对照平均氨基酸衍生物消耗百分比：NAC：6%~30%，SD（百分数表示，下同）<10%。NAL:75%~100%，SD<10%。
- 8.3 受试物氨基酸衍生物消耗值SD：NAC小于10%，NAL小于10%。
- 8.4 参比溶液A的NAC/NAL平均浓度：3.2 $\mu\text{mol/L}$ ~4.4 $\mu\text{mol/L}$ 。
- 8.5 参比溶液C的NAC/NAL平均浓度：3.2 $\mu\text{mol/L}$ ~4.4 $\mu\text{mol/L}$ 。
- 8.6 参比溶液B、C峰面积RSD%<10%（n=9），每种溶剂对照C峰面积RSD%<10%（n=3）。
- 8.7 NAC或NAL稳定性：ST（0 h）与ST（24 h）浓度相差 $\leq 10\%$ 。ST（0 h），NAC或NAL的初始浓度；ST（24 h），反应 24 ± 1 h后NAC或NAL的浓度。

9 结果判定标准

- 9.1 当受试物与NAC和NAL都不发生共洗脱时，采用1:50 NAC和1:50 NAL模型（表2）判定。

表2 1:50 NAC和1:50 NAL判定模型

NAC 和 NAL 消耗百分比的均值	预测结果
$0\% \leq \text{消耗百分比的均值} < 4.9\%$	阴性
$4.9\% \leq \text{消耗百分比的均值} \leq 100\%$	阳性

- 9.2 当受试物仅与NAL发生共洗脱时，采用1:50 NAC模型（表3）判定。

表3 1:50 NAC判定模型

NAC消耗百分比的均值	预测结果
$0\% \leq \text{消耗百分比的均值} < 5.6\%$	阴性
$5.6\% \leq \text{消耗百分比的均值} \leq 100\%$	阳性

- 9.3 当受试物同时与NAC、NAL发生共洗脱或者与NAC单独共洗脱时，判定结论为“无定论”。

10 注意事项

- 10.1. 采用1:50 NAC和1:50 NAL模型时，NAC和NAL消耗百分比的均值在3%-10%之间；采用1:50 NAC模型时，消耗百分比在4%~11%之间，须进行重复测试；若前两次结果不一致，须再次测试。

10.2 在对已知组分的多组分化妆品用化学原料进行试验时,可根据各组成成分(除水以外)的平均分子量进行1 mmol/L样品的配制。

10.3 若受试物在建议溶剂中的溶解度达不到1 mmol/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致敏性。若一种受试物能在不同溶剂溶解度当中达到1 mmol/L,不同溶剂的溶解形成的溶液实验数值可能不同。实际选择溶剂时应考虑溶液的稳定性。

10.4 液相进样序列建议参照表4执行。建议选用带有温度控制的样品盘,温度设置在4℃,并且序列运行时间尽量控制在30 h之内。

表 4 液相进样序列

标准溶液和空白对照	稀释溶剂(Std1) Std2~ Std7 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	对照B平行样品1 对照B平行样品2 对照B平行样品3
重复进样第一次	对照C平行样品1 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
重复进样第二次	对照C平行样品2 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
重复进样第三次	对照C平行样品3 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	对照B平行样品4 对照B平行样品5 对照B平行样品6