

附件 3

体外皮肤变态反应 动力学直接多肽反应试验方法

In Chemico Skin Sensitisation: Kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA)

1 范围

本方法规定了动力学直接多肽反应试验的基本原则、试验方法和技术要求。

本方法用于化妆品用化学原料的皮肤致敏性评价，适用于单一成分物质、多成分物质和已知成分及含量的混合物。

2 试验目的

预测和评价化妆品用化学原料是否具有潜在的皮肤致敏性及其分级。

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 单一成分物质 mono-constituent substance

组成可定量的物质，单一主要成分含量至少为 80% (w/w)。

3.3 多成分物质 multi-constituent substance

组成可定量的物质，其中含有两种或两种以上主要成分，每种主要成分的含量 $\geq 10\%$ (w/w) 和 $< 80\%$ (w/w)。多成分物质是制造过程产生的。

3.4 混合物 mixture

由两种或两种以上不发生化学反应的化学物质组成的固体或液体物质。

4 试验原理

试验基本原理同直接多肽反应试验 (DPRA)，有致敏性的受试物与多肽模拟的皮肤蛋白 (本试验仅使用半胱氨酸多肽) 共同孵育，导致多肽量减少。不同于 DPRA 仅测试化学物质一个浓度和一个时间点，kDPRA 以时间和浓度依赖的方式量化评价被测物质的多肽结合反应性。被测物质采用 5 个浓度与半胱氨酸多肽溶液孵育不同时间 (6 个时间点) 后，通过添加单溴二胺 (Monobromobimane, mBrB, CAS 74235-78-2) 与未结合的半胱氨酸多肽形成荧光复合物，来测量多肽的剩余量。如某时间点未结合多肽百分比的自然对数与受试物浓度呈线性关系 (准一级反应)，则通过斜率绝对值求得反应速率常数 k ，换算成对应时间点的反应动力学常数 k_t (单位: $M^{-1}s^{-1}$)，并计算各时间点 lgk_t ，以其中最大值 lgk_{max} 进

行结果判断，评价受试物的皮肤致敏性。

5 试剂和受试物制备

5.1 多肽片段与纯度

半胱氨酸多肽：Ac-RFAACAA-COOH，分子量：751.35，纯度：≥95%。

5.2 阳性对照物

阳性对照物常用肉桂醛（CAS 104-55-2；纯度≥95%）。

5.3 受试物

5.3.1 溶剂的选择

溶剂首选乙腈，其次是 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液。二甲基亚砷可能导致肽二聚化，应避免使用。

5.3.2 受试物溶液的配制

进行试验前，应评估受试物的溶解度。溶解性可用肉眼鉴别，应形成澄清透明的溶液。一般受试物最大配制浓度为 20 mM（应完全溶解），对应反应体系终浓度为 5 mM。试验时用溶剂连续稀释以获得 20、10、5、2.5 和 1.25 mM 系列浓度的受试物溶液。

20 mM 的受试物溶液应于试验当日配制，否则应证明储存不影响其稳定性。通常配制量为 5 mL，受试物（阳性对照）理论称取量为分子量×0.1 mg（以纯物质计）。

KDPRA 在技术上适用于成分和含量明确的多成分物质和混合物的测试，此时，可以根据不同组分（不包括水）的占比和分子量计算受试物总的纯度和单一的表观分子量，用于计算制备 20 mM 溶液的取样量。

5.3.3 阳性对照溶液的配制

按受试物溶液的配制方法，用乙腈溶解阳性对照物制成 20 mM 浓度的溶液，并稀释得到 20、10、5、2.5 和 1.25 mM 系列浓度的溶液。

5.4 多肽贮备液的配制

称取适量半胱氨酸多肽，用 pH 7.5 的磷酸盐缓冲液配制成 0.667 mM（0.501 mg/mL）的溶液。孵育前新鲜配制，配制时使用涡旋仪震荡溶解，必要时可用超声溶解，应在冰浴中进行，防止多肽降解。

pH 7.5 磷酸盐缓冲液：取 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液 18 mL，加 0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液 82 mL 混合，测定 pH 值，应在 7.50±0.05 之间。若偏酸性，加入 0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液进行调节。若偏碱性，加入 0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液进行调节，4℃保存，可在 4 周内使用。

5.5 单溴二胺溶液的配制

称取 8.1 mg 单溴二胺置于 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度，制成 3 mM 单溴二胺溶液。现用现配，避光保存。

6 试验步骤

6.1 试验设计

试验设置受试物组（终浓度为 0.31 mM、0.63 mM、1.25 mM、2.5 mM、5 mM）、阳性对照组（positive control, PC）、受试物对照组（substance control, SC）、溶剂对照组（vehicle control, VC）和空白对照组（blank control, BC），其中受试物组每个浓度 3 个重复，VC 组、BC 组 12 个重复，PC 和 SC 每个浓度一个孔。以 3 个受试物（A、B、C）为例加样示例参见图 1。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VC 组（溶剂+0.5 mM 多肽）											
B	BC 组（溶剂）											
C	0.31 mM 受试物 A +0.5 mM 多肽			0.31 mM 受试物 B +0.5 mM 多肽			0.31 mM 受试物 C +0.5 mM 多肽			0.31 mM 受试 物 A+ 缓冲 液	0.31 mM 受试 物 B+ 缓冲 液	0.31 mM 受试 物 C+ 缓冲 液
D	0.63 mM 受试物 A +0.5 mM 多肽			0.63 mM 受试物 B +0.5 mM 多肽			0.63 mM 受试物 C +0.5 mM 多肽			0.63 mM 受试 物 A +缓冲 液	0.63 mM 受试 物 B +缓冲 液	0.63 mM 受试 物 C +缓冲 液
E	1.25 mM 受试物 A +0.5 mM 多肽			1.25 mM 受试物 B +0.5 mM 多肽			1.25 mM 受试物 C +0.5 mM 多肽			1.25 mM 受试 物 A +缓冲 液	1.25 mM 受试 物 B +缓冲 液	1.25 mM 受试 物 C +缓冲 液
F	2.5 mM 受试物 A +0.5 mM 多肽			2.5 mM 受试物 B +0.5 mM 多肽			2.5 mM 受试物 C +0.5 mM 多肽			2.5 mM 受试 物 A +缓冲 液	2.5 mM 受试 物 B +缓冲 液	2.5 mM 受试 物 C +缓冲 液
G	5 mM 受试物 A +0.5 mM 多肽			5 mM 受试物 B +0.5 mM 多肽			5 mM 受试物 C +0.5 mM 多肽			5 mM 受试 物 A +缓冲 液	5 mM 受试 物 B +缓冲 液	5 mM 受试 物 C +缓冲 液
H	0.31 mM PC+0.5 mM 多 肽	0.63 mM PC+0.5 mM 多 肽	1.25 mM PC+0.5 mM 多 肽	2.5 mM PC+0.5 mM 多 肽	5 mM PC+0.5 mM 多 肽			1.25 mM PC+ 缓冲 液	2.5 mM PC+ 缓冲 液	5 mM PC+ 缓冲 液	10 mM PC+ 缓冲 液	20 mM PC+ 缓冲 液

图 1 kDPRA 反应板加样示例

6.2 操作步骤

每个反应时间分别准备应用板（受试物溶液稀释板）和反应板。应先准备反应板，随后立即准备含有受试物稀释液的应用板，并将各组受试物溶液立即加入到反应板中。

6.2.1 反应板的准备

使用黑色 96 孔板，参照图 1 准备各时间点的反应板。分别在 A1~A12、C1-H1~C5-H5、C6~G6、C7-G7~C9-G9 孔中加入 120 μL 0.667 mM 多肽溶液，在 B1~B12、C10-G10~C12-G12、H8~H12 孔中加入 120 μL pH7.5 的磷酸盐缓冲液。

6.2.2 应用板的准备

准备 2 mL 深孔板，参照图 2 准备各时间点的的应用板。分别在 A 行、B 行、C 行~F 行中每孔分别加入 300 μL 溶剂，将 600 μL 20 mM 受试物储存液加入 G 行。使用多通道移液器从 G 行吸取 300 μL ，加入 F 行，随后按同样方法依次稀释至 C 行。在 H1 ~ H4 每孔中每孔分别加入 600 μL 溶剂，将 1200 μL 20 mM 阳性对照物储存液加入 H5 孔。使用移液器从 H5 孔吸取 600 μL ，加入 H4 行，按同样方法依次稀释至 H1。从 H1 ~ H5 中吸取 300 μL 溶液转移到 H8 ~ H12 孔。配制完成后及时用封板膜密封待用。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂
B	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂	溶剂
C	1.25 mM 受试物 A	1.25 mM 受试物 A	1.25 mM 受试物 A	1.25 mM 受试物 B	1.25 mM 受试物 B	1.25 mM 受试物 B	1.25 mM 受试物 C	1.25 mM 受试物 C	1.25 mM 受试物 C	1.25 mM 受试物 A	1.25 mM 受试物 B	1.25 mM 受试物 C
D	2.5 mM 受试物 A	2.5 mM 受试物 A	2.5 mM 受试物 A	2.5 mM 受试物 B	2.5 mM 受试物 B	2.5 mM 受试物 B	2.5 mM 受试物 C	2.5 mM 受试物 C	2.5 mM 受试物 C	2.5 mM 受试物 A	2.5 mM 受试物 B	2.5 mM 受试物 C
E	5 mM 受试物 A	5 mM 受试物 A	5 mM 受试物 A	5 mM 受试物 B	5 mM 受试物 B	5 mM 受试物 B	5 mM 受试物 C	5 mM 受试物 C	5 mM 受试物 C	5 mM 受试物 A	5 mM 受试物 B	5 mM 受试物 C
F	10 mM 受试物 A	10 mM 受试物 A	10 mM 受试物 A	10 mM 受试物 B	10 mM 受试物 B	10 mM 受试物 B	10 mM 受试物 C	10 mM 受试物 C	10 mM 受试物 C	10 mM 受试物 A	10 mM 受试物 B	10 mM 受试物 C
G	20 mM 受试物 A	20 mM 受试物 A	20 mM 受试物 A	20 mM 受试物 B	20 mM 受试物 B	20 mM 受试物 B	20 mM 受试物 C	20 mM 受试物 C	20 mM 受试物 C	20 mM 受试物 A	20 mM 受试物 B	20 mM 受试物 C
H	1.25 mM PC	2.5 mM PC	5 mM PC	10 mM PC	20 mM PC			1.25 mM PC	2.5 mM PC	5 mM PC	10 mM PC	20 mM PC

图 2 应用板加样示例

6.3 孵育

使用多通道移液器从应用板中吸取 40 μL 配制好的溶液加入反应板对应孔中，用封板膜将反应板密封，200 rpm 震摇 5 min 后，25 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 10 min $\pm$ 30 s、30 min $\pm$ 3 min、90 min $\pm$ 5 min、150 min $\pm$ 10 min、210 min $\pm$ 10 min、1440 min $\pm$ 15 min。

6.4 测定

孵育结束后，撕下封板膜，每孔加入新鲜配制的 3 mM 单溴二胺溶液 40 μ L。200 ~ 300 rpm 震荡 5 min 后，用酶标仪在激发波长 390 nm，发射波长 480 nm 下检测荧光强度。

7 数据处理

7.1 荧光值计算和校正

计算 BC 组、VC 组的平均荧光强度和标准差，VC 孔减去 BC 组的平均荧光强度值，各浓度受试物和阳性对照孔减去各自的对照组的荧光强度值。

计算每个测试浓度三个重复孔的平均荧光强度和标准差，采用 t 检验统计与 VC 组（12 个重复）的平均多肽浓度是否有显著性差异。

7.2 多肽消耗率计算

按以下公式计算多肽消除率：

$$\text{多肽消耗率 (\%)} = \left[1 - \frac{\text{校正后的受试物或 PC 孔荧光强度}}{\text{校正后的 VC 组平均荧光强度}} \right] \times 100\%$$

7.3 反应动力学常数计算

如给定时间的最高测试浓度（受试物终浓度为 5 mM）符合半胱氨酸多肽结合阳性标准，即多肽消除率 $\geq 13.89\%$ ，且与 VC 组差异有显著性，对该暴露时间进行进一步计算反应动力学常数。如不符合阳性标准，则受试物为非反应性。

每个时间点，以未消耗肽占比（%）的自然对数，即 $\ln(100 - dp)$ 为纵坐标，受试物浓度为横坐标绘制反应曲线，若两者呈线性相关（相关系数 $r > 0.90$ ），则得到的负斜率的绝对值即为准一级反应速率常数 k_{observed} (mM^{-1})，按照下式计算各时间点反应动力学常数 k_t ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)：

$$k_t = k_{\text{observed}} \cdot \frac{1000}{60t}$$

注：t 为孵育时间，以 min 表示。

计算所有满足 $r > 0.90$ 的孵育时间的 $\lg k_t$ ，取其中最大值为 $\lg k_{\text{max}}$ 。

8 试验成立条件

阳性对照组 90 min 时间点 $\lg k$ 值应在 $-1.75 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \sim -1.40 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 范围内，若 90 min 时间点没有得到 $\lg k$ 值，150 min 时间点 $\lg k$ 应在 $-1.90 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \sim -1.45 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 范围内。

至少有 5 个时间点溶剂对照组变异系数（Coefficient of Variation, CV） $< 15\%$ 。

9 结果判定标准

按表 1 对受试物进行致敏性分级。

表 1 kDPRA 结果判断

试验结果	预测结果
$\lg k_{\max} \geq -2.0$	极强或强致敏剂
非反应性或 $\lg k_{\max} < -2.0$	非致敏剂或中、弱致敏剂

10 注意事项

10.1 溶剂为磷酸盐缓冲液的受试物

如果受试物溶剂为磷酸盐缓冲液，则半胱氨酸多肽贮备液配制浓度为 1 mM (0.752 mg/mL)，同时反应板制备时半胱氨酸多肽贮备液（或磷酸盐缓冲液）每孔加样体积减少到 80 μ L，然后再加入乙腈或磷酸盐缓冲液 40 μ L 补至 120 μ L，使所有孔中乙腈总体积仍为 40 μ L。

10.2 非线性反应

出现非线性反应时无法通过斜率法求得速率常数。速率常数可以根据多肽消除率个体值按以下公式计算：

$$k = \frac{\ln(100/(100-dp))}{E \times t}$$

注：dp 为多肽消除率（%），E 为受试物的浓度，t 是孵育时间。

根据该公式，计算多肽消耗率高于 13.89% 的阈值的每个时间点 t 和每个浓度 E 下的速率常数。将每个时间点不同浓度多肽消耗率求平均值，然后得到 $\lg k_{\max}$ 值。

在发生明显多肽结合的情况下，很少会出现非线性反应。出现非线性反应须进行重复试验，以检查这种非线性反应是受试物固有的，还是试验误差所致。如果非线性结果可重复，则判定受试物存在固有的非线性反应，可采用上述公式基于个体值的计算结果进行判断。若仅在早期时间点观察到显著的肽消耗，但在随后的时间点没有观察到，也可以将早期时间点的 $\lg k_t$ 作为结果进行致敏性分级判定。

10.3 溶解度低于 20 mM 的受试物

对于最大溶解浓度低于 20 mM 的受试物，可在较低浓度下进行试验，如出现 $\lg k_{\max} \geq -2.0$ 的结果，受试物可以判断为 GHS 1A 亚类皮肤致敏物，但对于非致敏性或 $\lg k_{\max} < -2.0$ 的结果则不能得出明确结论。此外，当得到 $\lg k_{\max}$ 值在 -1.93 ~ -2.06 范围内，无法进行受试物致敏性分级判定，需要重新测试和/或补充额外的数据/信息进行结果判定。

10.4 特殊化合物的适用性

金属化合物可通过共价结合以外的机制与蛋白质发生反应，该方法不适用于金属化合物（如硫酸镍，Nickel sulphate）。此外，kDPRA 仅测量与半胱氨酸肽的反应性，不适用于

具有赖氨酸专属反应性的强致敏剂，如一些酰基卤化物、酚酯或醛类等。

有些化合物（如苯基炔丙基醛，Phenylpropionic aldehyde）不与肽共价结合，但可促进其氧化（即半胱氨酸二聚化），会引起测得多肽消耗量“增加”，可能导致假阳性结果和/或预测反应性更高。

该方法没有代谢活化系统，不能用于检测需要进行酶促反应生物活化后成为致敏剂的化学物质（如 3-二甲氨基丙胺，3-Dimethylaminopropylamine）。大部分通过非生物转换后形成致敏物质的化合物（如半抗原）能够被该方法正确评价，但发生自发快速氧化的半抗原（如芳香胺、儿茶酚类或氢醌类）由于氧化停滞阶段可引起反应速率的降低，需要更多数据确定其在氧化条件下的弱反应性。

由于 kDPRA 采用荧光检测技术，具有自发荧光（如 3,3',4',5'-四氯水杨酰苯胺，Tetrachlorosalicylanilide）或荧光淬灭（如香兰素，Vanilin）的受试物可影响试验结果。此外，应注意受试物与单溴二胺的相互作用，如硫醇结构中的-SH 可以与单溴二胺相互作用，导致荧光增强，因此该方法不适用于硫醇类物质，包括在试验条件下产生并释放游离-SH 的物质。