附件 1

**《洁面类化妆品眼刺激性试验体外测试方法角膜上皮模型体外刺激试验（征求意见稿）》**《意见汇总表》

单位名称：

地 址：

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 页码 | 章条编号 | 原文 | 修改意见/建议 | 理由 | 联系人 | 电话 | 邮箱 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
| 注：此表可附页 |

附件 2

ICS 71.100.70

Y 42

团体标准

T/ZHCA

|  |
| --- |
|  |

洁面类化妆品眼刺激性试验体外测试方法角膜上皮模型体外刺激试验

|  |
| --- |
| Method of eye irritation test *in vitro* for facial cleanser cosmetic products -- *In vitro* eye irritation test with human cornea-like epithelial tissue model（征求意见稿） |
|  |

2021-xx-xx发布

2021-xx-xx实施

浙江省健康产品化妆品行业协会 发布

前  言

本文件按GB/T 1.1-2009规则起草。

本文件由浙江省食品药品检验研究院提出。

本文件由浙江省健康产品化妆品行业协会（ZHCA）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

洁面类化妆品眼刺激性试验体外测试方法

角膜上皮模型体外刺激试验

1. 范围

本文件规定了洁面类化妆品眼刺激性试验的一种体外测试方法。

本文件适用于用BioOcullar®模型对洁面类化妆品进行眼刺激性测试。

1. 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，仅所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

OECD No.492 化学品测试指导原则（Guideline for the testing of chemicals）

1. 术语及定义

下列术语和定义适用于本文件

* 1.

洁面类化妆品 facial cleanser cosmetic products

指用于清洁面部皮肤的化妆品。

眼刺激性 eye irritation

眼球表面接触受试物后产生的炎性变化。

角膜上皮模型体外刺激试验 eye irritation test with human cornea-like epithelial tissue model

将受试样品暴露在角膜模型上，接触一定时间后，根据细胞的存活率，评价受试样品的眼刺激性。

1. 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682规定的三级水。

* 1. 乙酸甲酯：CAS号：79-20-9。
	2. Triton™ X-100：CAS号：9002-93-1。
	3. 异丙醇：CAS号：67-63-0。
	4. 噻唑蓝：CAS号：298-93-1。
	5. 磷酸盐缓冲液（DPBS）：pH 7.0 ~ pH 7.3，不含钙、镁离子。
	6. Triton™ X-100 溶液：吸取Triton™ X-100（4.2）30 μL，溶于10.0 mL 水中，配制成体积分数为0.3%的Triton™ X-100溶液。
	7. MTT溶液：称取噻唑蓝（4.4）20 mg，溶于20.0 mL DPBS（4.5）中，配制成质量浓度为1 mg/mL的MTT溶液，临用现配，避光保存。
	8. 角膜模型试剂盒：BioOcullar ®模型及其培养液。

4.9 死亡组织模型：将角膜模型组织置于-20 ℃环境下冷冻24 h 以上。

1. 仪器设备
	1. 分析天平：分度值为0.000 1 g。
	2. 二氧化碳培养箱。
	3. 超净工作台。
	4. 外置活塞式移液器：100 μL。
	5. 连续分液器：25 mL。
	6. 计时器。
	7. 微孔板振荡器。
	8. 酶标仪。
2. 测试方法
	1. 样品干扰试验

试验前需对洁面类化妆品受试样品（以下简称受试样品）进行样品干扰试验，出现6.1.1和6.1.2的情况需增加死亡组织模型对照组，如无6.1.1和6.1.2的情况可直接取受试样品测定。

* + 1. 受试样品与MTT有反应

取MTT溶液1.0 mL，加入受试样品80 μL，分别在即刻、1 h、2 h和3 h时观察样品周边溶液颜色变化情况。若溶液颜色发生变化，需增加死亡组织模型对照组。

* + 1. 受试样品有颜色

若受试样品不溶于异丙醇，无需增加死亡组织模型对照组；若受试样品溶于异丙醇，取受试样品80 μL，溶于2 mL异丙醇中，在570 nm波长处测定吸光度（OD值），若OD值 ≥ 0.15，需增加死亡组织模型对照组。

* 1. 测试步骤
		1. 角膜模型接收和准备

收到角膜模型试剂盒后，打开外包装，肉眼观察模型与固体培养基接触界面是否有气泡，如发现接触界面有明显气泡，为不合格模型。在超净工作台中将合格的角膜模型转移至含0.9 mL培养液的无菌6孔培养板，在温度为37 ℃ ± 1 ℃、二氧化碳体积分数为5 % ± 1 %、相对湿度为95 %的条件下孵育1 h。更换培养液，继续孵育18 h后，再次更换培养液。

* + 1. 试验分组和润湿

试验分为阴性对照组（水）、阳性对照组（乙酸甲酯）、屏障测试组（0.3% Triton™ X-100 溶液）和受试样品组，每组平行使用3个角膜模型。在室温（18 ℃～28 ℃）条件下，采用外置活塞式移液器给每个模型滴加DPBS 20 μL湿润表面，在温度为37 ℃ ± 1 ℃、二氧化碳体积分数为5 % ± 1 %、相对湿度为95 %的条件下培养15 min。

* + 1. 加样和冲洗

采用外置活塞式移液器轻轻在模型表面均匀涂抹受试样品80 μL，每个角膜模型接触样品时间均为1 h，用连续分液器吸取25 mL DPBS将角膜模型逐个进行冲洗。

* + 1. 甲瓒提取

将角膜模型转移至含300 μL MTT溶液的24孔培养板中，在温度为37 ℃ ± 1 ℃、二氧化碳体积分数为5 % ± 1 %、相对湿度为95 %的条件下孵育3 h ± 5 min后，转移至新的24孔培养板中，每孔加入2 mL异丙醇，用封口膜密封培养板间隙，避免异丙醇挥发。室温条件下，将培养板固定在微孔板振荡器上，至少振摇2 h，充分提取甲瓒。也可以采取不振摇，在4 ℃下放置过夜的提取方法。

* + 1. OD值的测定

提取结束后，将提取液混合均匀，转移至96孔培养板中，每个组织模型取2个复孔，200 μL/孔，用异丙醇作为溶剂对照。在570 nm波长处读取吸光度（OD值），计算组织的存活率。

1. 数据处理
	1. 无死亡组织模型对照组的存活率按下式计算。

$$存活率\left(\%\right)=\frac{样品OD值−溶剂OD值}{阴性OD值−溶剂OD值}×100\%$$

* 1. 有死亡组织模型对照组的存活率按下式计算。

$$存活率(\%)=\frac{(样品OD值−溶剂OD值)−(死亡组织样品OD值−死亡组织阴性OD值)}{阴性OD值−溶剂OD值}×100\%$$

1. 结果判定
	1. 试验成立条件
		1. 阴性对照组OD值在1.0 ～ 2.0之间。
		2. 阳性对照组的存活率 ＜ 25 %。
		3. 屏障测试组的存活率 在40% ～ 60 %之间。
	2. 结果评价
		1. 无刺激性：存活率 ≥ 60 %。
		2. 轻刺激性：15 % ≤ 存活率 ＜ 60 %
		3. 刺激性：存活率 ＜15 %。
		4. 同一样品复孔间SD值小于18%。
2. 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面的内容：

1. 检验依据；
2. 样品、阳性对照和屏障测试物质的信息，包括与试验操作相关的理化性状；
3. 角膜模型来源等相关信息；
4. 试验条件和方法，包括试验具体步骤；
5. 数据处理与结果评价方法；
6. 试验的日期；
7. 结论；
8. 检验者、校核者和技术负责人签字，以及检验单位公章或检验专用章。