

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BioOcular<sup>®</sup>模型对洁面类化妆品进行眼刺激性测试。

### 2 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)

### 3 术语及定义

下列术语和定义适用于本文件

#### 3.1

**洁面类化妆品 facial cleanser cosmetic products**

指用于清洁面部皮肤的化妆品。

#### 3.2

**眼刺激性 eye irritation**

眼球表面接触受试物后产生的炎性变化。

#### 3.3

**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。

### 4 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。

4.1 乙酸甲酯: CAS号: 79-20-9。

4.2 Triton<sup>™</sup> X-100: CAS号: 9002-93-1。

4.3 异丙醇: CAS号: 67-63-0。

4.4 噻唑蓝: CAS号: 298-93-1。

4.5 磷酸盐缓冲液 (DPBS): pH 7.0 ~ pH 7.3, 不含钙、镁离子。

4.6 Triton<sup>™</sup> X-100 溶液: 吸取 Triton<sup>™</sup> X-100 (4.2) 30  $\mu$ L, 溶于 10.0 mL 水中, 配制成体积分数为 0.3%的 Triton<sup>™</sup> X-100 溶液。

4.7 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。

4.8 角膜模型试剂盒: BioOcular<sup>®</sup>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  $^{\circ}$ C环境下冷冻24 h 以上。

### 5 仪器设备

5.1 分析天平: 分度值为 0.000 1 g。

5.2 二氧化碳培养箱。

5.3 超净工作台。

5.4 外置活塞式移液器: 100  $\mu$ L。

5.5 连续分液器: 25 mL。

5.6 计时器。

5.7 微孔板振荡器。

5.8 酶标仪。

## 6 测试方法

### 6.1 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。

#### 6.1.1 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。

#### 6.1.2 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。

### 6.2 测试步骤

#### 6.2.1 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 °C ± 1 °C、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。

#### 6.2.2 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 °C ~ 28 °C)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 °C ± 1 °C、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。

#### 6.2.3 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。

#### 6.2.4 甲瓖提取

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 °C ± 1 °C、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,至少振荡2 h,充分提取甲瓖。也可以采取不振摇,在4 °C下放置过夜的提取方法。

#### 6.2.5 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。

## 7 数据处理

7.1 无死亡组织模型对照组的存活率按下式计算。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{样品OD值} - \text{溶剂OD值}}{\text{阴性OD值} - \text{溶剂OD值}} \times 100\%$$

7.2 有死亡组织模型对照组的存活率按下式计算。

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

## 8 结果判定

### 8.1 试验成立条件

- 8.1.1 阴性对照组 OD 值在 1.0 ~ 2.0 之间。
- 8.1.2 阳性对照组的存活率 < 25 %。
- 8.1.3 屏障测试组的存活率在 40% ~ 60 %之间。

### 8.2 结果评价

- 8.2.1 无刺激性: 存活率  $\geq 60\%$ 。
- 8.2.2 轻刺激性:  $15\% \leq$  存活率 < 60 %
- 8.2.3 刺激性: 存活率 < 15 %。
- 8.2.4 同一样品复孔间 SD 值小于 18%。

## 9 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面内容:

- a) 检验依据;
- b) 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;
- c) 角膜模型来源等相关信息;
- d) 试验条件和方法, 包括试验具体步骤;
- e) 数据处理与结果评价方法;
- f) 试验的日期;
- g) 结论;
- h) 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。