

一种消毒剂急性眼刺激性猪角膜 试验检测方法的建立

李 敏, 李光先, 李培宁, 陈梓灵, 刘 颖, 朱素珍, 庞增雄, 刘冬虹, 刘香梅
(广州质量监督检测研究院, 广州 511447)

[摘要] 目的 建立一种用猪角膜进行消毒产品急性眼刺激性体外检测的方法。方法 采用乙醇和咪唑 2 种阳性物作为质控标准品, 在猪角膜体系上进行体外试验条件的探索。结果 经液体和固体 2 种消毒剂验证得出, 乙醇暴露 10 min、孵育 80 min 和咪唑暴露 3 h、孵育 70 min 的条件下, 猪角膜体外刺激评分在牛角膜混浊与通透性(bovine corneal opacity and permeability, BCOP)试验相应的阳性物标准范围内, 该试验系统成立。结论 用猪眼代替牛眼初步建立了一种消毒剂急性眼刺激性试验方法, 可为消毒产品安全性检测提供参考。

[关键词] 消毒产品; 猪角膜; 牛角膜; 眼刺激

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)03-0248-04

《消毒技术规范》(2002 版)中消毒产品安全性评价之一的急性眼刺激性试验, 是采用活体动物进行试验, 会对活体动物造成不可逆的损伤, 不符合社会公众极大关注的减少(reduce)、优化(refine)、替代(replace)的“3R”原则。在化妆品和化学品毒理安全性评价领域, 眼刺激性评价目前应用较多的是牛角膜混浊与通透性(bovine corneal opacity and permeability, BCOP)试验^[1-2]。但猪角膜在生理及反应结果方面与人角膜更为接近, 另外, 东方人的饮食习惯和宗教信仰等原因导致获取牛角膜有一定难度, 如果将此方法结合中国消费习惯进行改进, 用猪眼代替牛眼在消毒产品领域进行试验检测, 是可行的^[3-5]。

因此, 本文应用猪角膜, 进行眼刺激性体外

试验条件的探索, 建立消毒剂猪角膜眼刺激性检测方法, 期望用于消毒产品眼刺激安全性的评价。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂与仪器

猪眼球购自广东壹号食品有限公司。牛眼球购自广州市华代生物科技有限公司。新鲜离体眼球浸泡于冰冷的 Hank's 平衡盐溶液(HBSS)内运回实验室。

含酚红的 MEM 培养基、无酚红的 MEM 培养基、HBSS 缓冲溶液、胎牛血清和杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS, 含钙镁离子)均购自美国 Gibco 公司; 荧光素钠和咪唑均购自美国 Sigma 公司; 无水乙醇购自广州化学试剂厂; 生理盐水(0.9% 氯化钠溶液)购自江西科伦药业有限公司。角膜浊度仪购自德国 BASF 公司; 多功能酶标仪购自美国赛默飞公司; 恒温培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

参考欧洲经济合作和发展组织(OECD)指南中 BCOP 试验, 探究无水乙醇和 20% 咪唑溶液(用

[收稿日期] 2019-11-21

[基金项目] 广东省市场监督管理局科技项目(2018PZ07)

[作者简介] 李 敏(1989—), 男, 硕士研究生, 工程师, 研究方向: 食品化妆品毒理及替代检测。

E-mail: 397891851@qq.com

[通信作者] 刘香梅(1981—), 女, 副研究员, 研究方向: 食品化妆品毒理及替代检测。

E-mail: 283830090@qq.com

0.9% 的氯化钠溶液配制)2 种阳性物的暴露时间和孵育时间,使其猪角膜体外刺激评分(*in vitro* irritancy score, IVIS)处于各自对应的标准区间内(乙醇 39.2~64.1, 咪唑 68.8~129.9)。

1.2.1 分离和装配角膜 从新鲜眼球上完整切下角膜,周边保留 2~3 mm 巩膜,将其装配在角膜支架中。前后室均填满无酚红的 MEM 培养液,于 32 °C 培养箱中平衡 1 h,更换前后室培养液后,用浊度仪读取角膜本底浊度(OP)值(即初始 OP)。

1.2.2 暴露 分为液体和固体受试物两类,液体受试物采用无水乙醇作为阳性工具,固体受试物采用 20% 的咪唑作为阳性工具,移除前室培养液后加入 750 μ L 无水乙醇或 20% 咪唑,于培养箱中分别暴露不同时间(无水乙醇暴露时间为 6 min、8 min、10 min、12 min 和 14 min,咪唑暴露时间为 2 h、3 h、4 h、5 h 和 6 h),充分清洗后,将前室重新填满无酚红的 MEM 培养液。无水乙醇组培养箱继续孵育 2 h 后读取 OP 值(即末次 OP),咪唑组直接读取 OP 值(即为末次 OP)。

1.2.3 OP 和渗透性检测 去除前室培养液,加入 1 mL 0.4% 液体受试物或 0.5% 固体受试物(由含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 DPBS 配制的荧光素钠溶液),分别孵育 50 min、60 min、70 min、80 min、90 min、100 min、110 min、120 min 和 130 min 后收集后室全部液体,混匀后取 360 μ L 在 490 nm 波长下读取吸光度(A)值。以生理盐水为阴性对照。当校正 OP 变化值接近乙醇或咪唑的 IVIS 范围时,取当前暴露时间段进行进一步调整优化(包括孵育时间),使各自的 IVIS 处于标准范围内。

1.2.4 试验条件验证 方法建立后,选取液态消毒剂 and 固态消毒剂分别作用于猪角膜和牛角膜,进行验证。

1.3 统计学方法

计算 OP 变化值($\Delta \text{OP} = \text{初始 OP} - \text{末次 OP}$)、校正 OP 变化值($\text{OP}_{\text{Cor}} = \Delta \text{OP}_{\text{阳性}} - \Delta \text{OP}_{\text{阴性对照}}$)和校正 A 值($\text{A}_{\text{Cor}} = \text{A}_{\text{阳性}} - \text{A}_{\text{阴性对照}}$),并计算 IVIS($\text{IVIS} = \text{OP}_{\text{Cor}} + 15 \times \text{A}_{\text{Cor}}$)。每个时间点设 3 个平行,重复 3 次实验。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间比较采用 SPSS 20 软件进行 ANOVA 方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 试验条件探索

2.1.1 暴露时间探索 随着乙醇暴露时间增加,A 值和 IVIS 值相应增加(表 1)。乙醇暴露 10~14 min,IVIS 均在体外评分范围。因此,选择暴露时间 10 min 进行下一步孵育时间的探索。

表 1 乙醇暴露不同时间的 IVIS 探索

Table 1 IVIS exploration with different exposure times of ethanol

($\bar{x} \pm s, n=3$)			
作用时间 /min	OP_{Cor}	A	IVIS
6	29.67 $\pm$ 0.89	0.11 $\pm$ 0.03	31.32 $\pm$ 2.03
8	33.89 $\pm$ 0.45	0.14 $\pm$ 0.04	35.99 $\pm$ 1.78
10	36.58 $\pm$ 0.44	0.18 $\pm$ 0.04	39.28 $\pm$ 1.23
12	43.56 $\pm$ 0.87	0.21 $\pm$ 0.06	46.71 $\pm$ 1.43
14	54.36 $\pm$ 0.31	0.28 $\pm$ 0.05	58.56 $\pm$ 2.35
16	64.93 $\pm$ 0.64	0.53 $\pm$ 0.07	72.88 $\pm$ 2.78

注: OP_{Cor} 为角膜本底浊度校正值, A 为 490 nm 波长下吸光度, IVIS 为体外刺激评分。

随着咪唑暴露时间增加,A 值和 IVIS 值相应增加。暴露 3~5 h,IVIS 均在咪唑的体外评分范围,详见表 2。因此,选择暴露时间 3 h 进行下一步孵育时间的探索。

表 2 咪唑暴露不同时间的 IVIS 探索

Table 2 IVIS exploration with different exposure times of imidazole

($\bar{x} \pm s, n=3$)			
作用时间 /h	OP_{Cor}	A	IVIS
2	53.23 $\pm$ 2.32	0.25 $\pm$ 0.10	56.98 $\pm$ 2.30
3	75.45 $\pm$ 2.56	0.30 $\pm$ 0.12	79.95 $\pm$ 2.54
4	93.87 $\pm$ 1.26	0.31 $\pm$ 0.08	98.52 $\pm$ 3.69
5	112.21 $\pm$ 2.37	0.35 $\pm$ 0.09	117.46 $\pm$ 4.25
6	131.36 $\pm$ 3.50	0.38 $\pm$ 0.07	137.06 $\pm$ 3.21

注: OP_{Cor} 为角膜本底浊度校正值, A 为 490 nm 波长下的吸光度, IVIS 为体外刺激评分。

2.1.2 孵育时间探索 在乙醇暴露 10 min 和咪唑暴露 3 h 后,进行猪角膜孵育。由表 3 可看出,乙醇组在孵育 80 min 后 A 值不再增加,咪唑组孵育 70 min 后 A 值不再增加。因此选择以上两个时间进行下一步探索验证。

表3 乙醇、咪唑暴露后不同孵育时间的A值

Table 3 Absorbance values at different incubation times after exposure to ethanol and imidazole

作用时间/min	$(\bar{x} \pm s, n=3)$	
	乙醇组	咪唑组
50	0.15 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.10
60	0.18 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.08
70	0.18 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.09
80	0.19 $\pm$ 0.03	0.32 $\pm$ 0.07
90	0.19 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.08
100	0.19 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.05
110	0.19 $\pm$ 0.03	0.32 $\pm$ 0.06
120	0.19 $\pm$ 0.03	0.32 $\pm$ 0.05
130	0.19 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.08

表4 不同形态消毒剂作用下猪、牛角膜的IVIS

Table 4 IVIS of pig and bovine cornea under the action with different forms of disinfectant

组别	$(\bar{x} \pm s, n=3)$	
	猪角膜	牛角膜
无水乙醇	40.15 $\pm$ 3.68	42.80 $\pm$ 2.56
液态消毒剂	2.69 $\pm$ 1.02	2.57 $\pm$ 1.19
生理盐水(阴性对照)	2.54 $\pm$ 0.76	2.28 $\pm$ 0.58
咪唑	72.59 $\pm$ 2.13	74.05 $\pm$ 3.92
固态消毒剂	10.25 $\pm$ 1.56	9.31 $\pm$ 2.87
生理盐水(阴性对照)	2.85 $\pm$ 0.31	2.68 $\pm$ 0.49

2.2 试验条件验证

液态消毒剂暴露 10 min、孵育 80 min，固态消毒剂暴露 3 h、孵育 70 min 后，猪角膜 IVIS 与牛角膜 IVIS 相比，差异无统计学意义($P>0.05$ ，表 4)。

3 讨论

从 1990 年代开始，眼刺激的动物实验替代方法陆续进入验证程序。2009 年，BCOP 试验被 OECD 认可，列入化学品毒性测试指南的眼刺激替代方法(TG437)。至今，有效的和法规认可的眼刺激替代方法共有 8 项^[1]。2015 年，OECD 起草了用于眼刺激性测试和评估的整合方法，并于 2017 年 7 月 20 日正式发布指南 263^[6]。该方法详细说明了 BCOP 等替代方法在眼刺激性评估中的应用，该标准方法具有快速、简便和不受样品限制等优点，可单独或组合用于化学品、个人护理

品配方和成品、抗菌产品、家居护理品等的单次眼刺激性预测^[7-10]。

本研究创新性地采用离体猪角膜进行消毒产品的眼刺激性毒性测试探索，分别应用 BCOP 试验的两种阳性物作为探索工具，探索最佳试验条件。在暴露时间探索中可看出暴露时间越长，OP 值越大，角膜从“透亮”越发“发白”，提示角膜上皮基质可能发生蛋白变性，导致透光性减弱，阳性效果显著。孵育时间 90 min 的前提下，从表 1 和表 2 可筛选出较合适的乙醇和咪唑暴露时间分别为 10~14 min 和 3~5 h，这时的 IVIS 与质控体外评分范围接近。本着效率原则，选取 10 min 和 3 h 进行下一步渗透性孵育时间的探索。对于渗透性指标，A 值用于评价角膜上皮层的完整性^[11]。由表 3 可以看出短时间内，A 值随时间递增而增加，乙醇组 80 min、咪唑组 70 min 后 A 值不再增加，提示角膜上皮层可能已经破坏，渗透达到峰值。基于猪角膜面积小于牛角膜面积，故暴露时间小于 10 min 和 4 h 使角膜损坏是可能的。

本研究将 2 种消毒剂盲样按照以上试验条件同时作用于猪角膜和牛角膜，得到对应的 IVIS，由表 4 可以看出同一物质同时作用猪角膜和牛角膜的 IVIS 无显著差异，因此该试验条件下能应用于消毒产品的体外替代检测。

本研究建立的消毒产品眼刺激性试验体外检测方法，是 BCOP 测试方法的进一步创新，对消毒产品体外眼刺激毒理安全性评价可能具有重要意义。

参考文献:

- [1] 程树军. 化妆品评价替代方法标准实施指南[M]. 北京: 中国质检出版社, 2017:145-187.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 化学品牛角膜混浊和通透性试验: SN/T 4153—2015[S]. 2015-02-09.
- [3] Van den Berghe C, Guillet MC, Compan D. Performance of porcine corneal opacity and permeability assay to predict eye irritation for water-soluble cosmetic ingredients[J]. Toxicol In Vitro, 2005, 19(6):823-830.
- [4] Han JH, Seok SH, Na YR, et al. Validation of porcine corneal opacity and permeability assay as an alternative to eye irritation tests[J]. Toxicol Lett, 2010, 196(Suppl):S141-

- S141.
- [5] Piehl M, Carathers M, Soda R, et al. Porcine corneal ocular reversibility assay (PorCORA) predicts ocular damage and recovery for global regulatory agency hazard categories[J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(8):1912-1918.
- [6] OECD. Guidance document on an integrated approaches on testing and assessment for serious eye damage and eye irritation. series on testing and assessment No.263[S]. Paris: OECD, 2017.
- [7] 黄健聪, 秦瑶, 程树军, 等. 牛角膜浑浊渗透试验方法预测眼刺激性的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(14): 1980-1983.
- [8] 陈彧, 陆瑞强, 程树军, 等. 利用牛角膜浑浊渗透性方法检测纸质卫生用品对皮肤刺激性研究[J]. 日用化学科学, 2017, 40(6):1-4.
- [9] 秦瑶, 柯逸晖, 程树军, 等. 牛角膜浑浊和渗透性实验应用于个人护理产品评价的案例性分析[J]. 日用化学科学, 2017, 40(3):13-17.
- [10] 程树军, 秦瑶, 柯逸晖, 等. 替代方法在化妆品检测中的应用分析[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(10):101-106.
- [11] OECD. Bovine corneal opacity and permeability test method for identifying i) chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage. OECD guideline for testing of chemicals section 4 health effect No.437[S]. Paris: OECD, 2017.

Establishment of a Method for Detecting Acute Eye Irritation of Disinfectant Using Porcine Cornea

LI Min, LI Guangxian, LI Peining, CHEN Ziling, LIU Ying,
ZHU Suzhen, PANG Zengxiong, LIU Donghong, LIU Xiangmei
(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou, 511447, China)

[Abstract] **Objective** To establish an *in vitro* test method for acute eye irritation of disinfection products by using porcine cornea. **Methods** *In vitro* detection conditions on porcine corneal system were investigated and optimized, which used ethanol and imidazole as positive control. **Results** It was confirmed by liquid and solid disinfectants that after the exposure of ethanol for 10 min and incubation for 80 min, or the imidazole exposure for 3 h and incubation for 70 min, the *in vitro* stimulation score was within the standard range of bovine corneal opacity and permeability (BCOP) corresponding positives, and the test system was established. **Conclusion** A method for detecting acute eye irritation of disinfectants is initially established by using pig eyes instead of bovine eyes, which can provide a reference for the safety evaluation of disinfection products.

[Key words] Disinfection products; Porcine cornea; Bovine cornea; Eye irritation