
附件 5

光反应性活性氧（ROS）测定试验方法

Reactive Oxygen Species (ROS) Assay for Photoreactivity

1 范围

本方法规定了化妆品用化学原料光反应性活性氧（ROS）测定试验的基本要求和方法。本方法适用于预测化妆品用化学原料的潜在光毒性。

2 试验目的

预测化妆品用化学原料是否具有潜在光毒性。

3 定义

下列术语和定义适用于本方法。

3.1 光反应性 Photoreactivity

化学物质由于吸收光子而与另一个分子发生反应的性质。

3.2 光毒性 Phototoxicity

皮肤一次接触化学物质后，继而暴露于紫外线照射下所引发的一种皮肤毒性反应，或者全身应用化学物质后，暴露于紫外线照射下发生的类似反应。本方法所述光毒性包括光刺激性、光过敏性和光遗传毒性。

3.3 辐照度 Irradiance

照射到某一表面的紫外线或可见光的强度，单位为瓦每平方米（ W/m^2 ）或毫瓦每平方厘米（ mW/cm^2 ）。

3.4 光照剂量 Dose of light

照射到某一表面的紫外线或可见光的量[=强度×时间(秒)]，单位为焦耳每平方米（ J/m^2 ）或焦耳每平方厘米（ J/cm^2 ）。

3.5 活性氧种类 Reactive Oxygen Species, ROS

活性氧种类，包括单线态氧和超氧阴离子。

3.6 单线态氧 Singlet Oxygen, SO

由光辐照化学物质通过II型光化学反应产生的一种自由基。

3.7 超氧阴离子 Superoxide Anion, SA

由光辐照化学物质通过I型光化学反应产生的一种自由基。

4 试验原理

一些具有光反应性的化学物质暴露于紫外线时，吸收某一波长光子，诱导发色团激发，激发能量转移到氧分子上，发生光化学反应，产生活性氧（包括单线态氧 1O_2 和超氧阴离子 $^{•}O_2^-$ ），活性氧是光毒性反应中的重要中间物质。

单线态氧和咪唑反应生成的过氧化物中间体对N,N-二甲基-4-亚硝基苯胺（RNO）具有漂白作用，使其在440 nm下的吸光度降低。超氧阴离子与氯化硝基四氮唑蓝（NBT）反应生成NBT⁺，其在560 nm波长下具有光吸收。

本试验方法通过分光光度法测定化学物质经紫外线照射后对RNO在440 nm下吸光度的减少及对NBT⁺在560 nm下吸光度的增加来判断该化学物质是否具有光反应性。

5 试剂和材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯或以上规格，水为 GB/T6682规定的一级水。所有试剂应在配制后1个月内使用，并且在使用前应超声处理，以免物质析出、沉淀对试验造成影响。主要试剂配制方法如下：

5.1 磷酸二氢钠。

5.2 磷酸氢二钠。

5.3 N,N-二甲基-4-亚硝基苯胺（RNO）。

5.4 咪唑。

5.5 氯化硝基四氮唑蓝（NBT）。

5.6 pH 7.4的20 mmol/L磷酸钠缓冲液（NaPB）

称取593 mg $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ （CAS：13472-35-0）和5.8 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ （CAS：10039-32-4），加入约900 mL水，混匀，用1 mol/L的HCl将pH值调节为7.4，定容至1000 mL后混匀。于2℃~8℃冰箱或室温保存。

5.7 0.2 mmol/L N,N-二甲基-4-亚硝基苯胺（RNO，CAS：138-89-6）

称取3 mg RNO，溶于100 mL 20 mmol/L的磷酸钠缓冲液中，充分混匀。于2℃~8℃冰箱避光保存。

5.8 0.2 mmol/L咪唑（CAS：288-32-4）

称取13.6 mg咪唑，溶于10 mL 20 mmol/L的磷酸钠缓冲液中，充分混匀，得到20 mmol/L咪唑溶液。用20 mmol/L的磷酸钠缓冲液将20 mmol/L咪唑溶液稀释100倍，充分混匀。于2℃~8℃冰箱避光保存。

5.9 0.4 mmol/L 氯化硝基四氮唑蓝（NBT，CAS：298-83-9）

称取32.7 mg NBT，溶于100 mL 20 mmol/L的磷酸钠缓冲液中，充分混匀。于2℃~8℃冰箱避光保存。

5.10 溶剂的选择

优先使用分析级二甲基亚砜（DMSO）。对于不溶于DMSO的受试物，可使用20 mmol/L的磷酸钠缓冲液作为溶剂。如果受试物在DMSO和磷酸钠缓冲液中不溶或不稳定，也可使用其他溶剂，但应保证受试物在所选溶剂中稳定，且参考化学物质的SO值和SA值应在附录A规定的范围内。

5.11 待测化学物质溶液的配制

待测化学物质的分子量应是已知的。测试终浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ ，如果在200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下的反应混合物有沉淀、着色或其他干扰等现象，则可以使用20 $\mu\text{mol/L}$ 为终浓度进行测试。当待测化学物质在20 $\mu\text{mol/L}$ 的终浓度下得到阳性结果，表示该物质具有光反应性；但在浓度低于20 $\mu\text{mol/L}$ 下得到阴性结果，不能表示该物质无光反应性。

待测化学物质溶液应现用现配，所有操作均应避免在强紫外线和强可见光照射（例如头顶灯下或在自然光暴露的窗户附近工作），以避免在试验前待测化学物质发生光激活或光降解。待测化学物质在试管中称重，加入5.10项溶剂，涡旋混匀，超声5-10 min，配制成10 mmol/L（终浓度200 $\mu\text{mol/L}$ ）。当终浓度200 $\mu\text{mol/L}$ 的反应混合物在光照前观察到沉淀、着色或其他干扰等现象时，需将10 mmol/L的溶液用DMSO稀释成1 mmol/L溶液（终浓度20 $\mu\text{mol/L}$ ）。对于不溶于DMSO的化学物质，使用其他溶剂（如磷酸钠缓冲溶液）时，须使得反应混合物中含有20 μLDMSO （2%，v/v）。

5.12 阴性对照及阳性对照

以奎宁盐酸盐二水合物（CAS：6119-47-7）作为阳性对照，以二苯甲酮-4（CAS：4065-45-6）作为阴性对照。用DMSO按与受试物相同的方法将阳性对照和阴性对照配制成10 mmol/L的储备溶液，分装后于-20℃冰箱冻存，于使用当天解冻，避免反复冻融，1个月内使用完毕。

6 仪器和设备

6.1 太阳光模拟器

6.1.1 选择合适的光源用于提供紫外线和可见光的照射，通过滤光片减少波长小于290 nm的UVC，使光源尽量接近室外日光。推荐的测试条件如下：

- a) 配备滤光片的太阳模拟器（减少紫外线波长 $<290\text{ nm}$ ）（见附录B）
— 辐照度：1.8 mW/cm^2 至2.2 mW/cm^2 ，照射1小时
— UVA光照剂量：6.5 J/cm^2 至7.9 J/cm^2 （见附录B）。

- b) 配备滤光片的太阳模拟器（减少紫外线波长 $<300\text{ nm}$ ）（见附录B）
— 辐照度：3.0 mW/cm^2 至5.0 mW/cm^2 ，照射1小时，
— UVA光照剂量：11 J/cm^2 至18 J/cm^2 （见附录B）。

6.1.2 测试条件根据实际选择合适具体条件。

6.1.3 ROS的产生受温度影响，太阳光模拟器应配备温度控制装置，光照期间温度在20℃~29℃。

6.2 反应容器

[Http://www.luyor.cn](http://www.luyor.cn)

推荐使用石英反应容器（规格见附录C），避免液体蒸发以及由于塑料盖造成的UV损失。也可使用其他UV透射率大于95%的盖子或密封件替代。实验室使用其他容器时，应使用附录A中的参考化学物质（序号1-17号）确定合适的仪器辐照度及光剂量。

6.3 酶标仪。

6.4 UVA紫外照度计。

6.5 显微镜。

7 分析步骤

7.1 将下列成分在避光条件下混合：

7.1.1 溶剂为DMSO的受试物：

单线态氧 SO	超氧阴离子 SA
20 mmol/L NaPB 480 μ L 0.2 mmol/L 咪唑 250 μ L 0.2 mmol/L RNO 250 μ L 10 或 1 mmol/L 受试物 20 μ L	20 mmol/L NaPB 855 μ L 0.4 mmol/L NBT 125 μ L 10 或 1 mmol/L 受试物 20 μ L

7.1.2 溶剂为NaPB的受试物：

单线态氧 SO	超氧阴离子 SA
20 mmol/L NaPB 460 μ L 0.2 mmol/L 咪唑 250 μ L 0.2 mmol/L RNO 250 μ L DMSO 20 μ L 10 或 1 mmol/L 受试物 20 μ L	20 mmol/L NaPB 835 μ L 0.4 mmol/L NBT 125 μ L DMSO 20 μ L 10 或 1 mmol/L 受试物 20 μ L

以20 μ L溶剂替代受试物，作为空白对照。涡旋或超声5~10 min后，将200 μ L反应混合物加入到96孔板中，每组设置3个平行。96孔板加样详见附录D。

7.2 在100倍显微镜下检查反应混合物中各组分溶解情况。如有沉淀、析出等现象，需降低受试物浓度重新检测或停止检测。将96孔板震荡5 s后，使用分光光度计或酶标仪测定光照前SO检测孔在440 nm下的吸光度及SA检测孔在560 nm下的吸光度。

7.3 将96孔板置于石英反应器中，或盖上其他具有高UV透射率的盖子或密封件，置于太阳光模拟器中照射1 h。记录光照前后的温度。

7.4 完成光照后，将96孔板震荡1 min，使用分光光度计或酶标仪测定光照后SO检测孔在440 nm下的吸光度及SA检测孔在560 nm下的吸光度。

步骤流程图见附录E

8 分析结果表述

8.1 SO值和SA值的计算

计算受试物及对照品的SO值和SA值，根据三个平行孔的数据计算平均值和标准偏差。

1. 根据光照前后SO测试孔在440 nm下的吸光度计算受试物的SO值

$$\text{SO值} = [A_{440}(-) - A_{440}(+) - (a - b)] \times 1000$$

式中： $A_{440}(-)$ ：光照前440 nm下的吸光度

$A_{440}(+)$ ：光照后440 nm下的吸光度

a：光照前空白对照440 nm下的吸光度（平均值）

b：光照后空白对照440 nm下的吸光度（平均值）

2. 根据光照前后SA测试孔在560 nm下的吸光度计算受试物的SA值

$$\text{SA值} = [A_{560}(+) - A_{560}(-) - (b - a)] \times 1000$$

式中： $A_{560}(-)$ ：光照前560 nm下的吸光度

$A_{560}(+)$ ：光照后560 nm下的吸光度

a：光照前空白对照560 nm下的吸光度（平均值）

b：光照后空白对照560 nm下的吸光度（平均值）

8.2 试验接受标准

试验应满足以下标准：

1. 光照前，反应混合物中没有受试物沉淀。
2. 光照前后，受试物对反应混合物没有颜色干扰。
3. 试验过程中温度控制在20℃~29℃范围内。
4. 所有测试孔A440及A560应在0.02~1.5范围内。
5. 应根据历史数据平均值±2标准偏差建立实验室内阴性对照与阳性对照的质控范围。

以下为根据验证数据得出的95%置信区间：

200 μmol/L 奎宁盐酸盐二水合物	200 μmol/L 二苯甲酮-4
SO: 319 至 583	SO: -9 至 11
SA: 193 至 385	SA: -20 至 2

8.3 受试物的光反应性评判标准

根据以下标准评判受试物的光反应性：

分类	样品浓度	SO	和	SA
具有光反应性	200 μmol/L	≥25	和	≥70
		<25 和/或有干扰	和	≥70
		≥25	和	<70 和/或有干扰
具有弱光反应性	200 μmol/L	<25	和	≥20, <70
具有光反应性	20 μmol/L	≥25	和	≥20

分类	样品浓度	SO	SA
无光反应性	200 $\mu\text{mol/L}$	<25	和 <20
不确定	不属于上述任何一种情况		

如受试物在200 $\mu\text{mol/L}$ 和20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下均有沉淀、着色或其他干扰，则认为该受试物不适用于本方法，受试物的光反应性不确定。

9 其他限制说明

在活性氧（ROS）检测过程中，会发生如下两个反应：单线态氧和咪唑反应生成的过氧化物中间体对N,N-二甲基-4-亚硝基苯胺（RNO）具有漂白作用；超氧阴离子与氯化硝基四氮唑蓝（NBT）反应生成NBT⁺。该方法不适用于对上述两个反应产生干扰的化学品测试，例如，抗坏血酸和其他还原性化学品，它们会将四唑盐直接还原为甲瓩，抗坏血酸还加速咪唑衍生物的氧化，在ROS测定中提供假阳性预测。

附录 A

参考化学物质检测结果可接受范围

表 1 17 种参考化学物质 SO 值和 SA 值测定数据的可接受范围。

编号	化学物名称	CAS 编号	SO	SA	溶剂	浓度
1	对氨基苯甲酸	150-13-0	-8~12	-11~7	DMSO	200 μmol/L
2	对氨基苯甲酸乙酯	94-09-7	-7~9	-7~17	DMSO	200 μmol/L
3	盐酸多西环素	10592-13-9	115~429	230~468	DMSO	200 μmol/L
4	红霉素	114-07-8	-15~11	-9~21	DMSO	200 μmol/L
5	非诺贝特	49562-28-9	77~203	-31~11	DMSO	20 μmol/L
6	L-组氨酸	71-00-1	-8~12	8~120	NaPB	200 μmol/L
7	诺氟沙星	70458-96-7	131~271	57~161	DMSO	200 μmol/L
8	8-甲氧基补骨脂素	298-81-7	31~137	0~126	DMSO	200 μmol/L
9	水杨酸异辛酯	118-60-5	-5~11	-8~20	DMSO	20 μmol/L
10	吡啶	260-94-6	182~328	121~243	DMSO	200 μmol/L
11	盐酸氯丙嗪	69-09-0	-56~70	66~106	DMSO	200 μmol/L
12	双氯芬酸钠	15307-79-6	34~416	47~437	DMSO	200 μmol/L
13	呋噻米	54-31-9	31~225	-7~109	DMSO	200 μmol/L
14	酮基布洛芬	22071-15-4	120~346	77~151	DMSO	200 μmol/L
15	萘啶酮酸	389-08-2	54~246	88~470	DMSO	200 μmol/L
16	奥美拉唑	73590-58-6	-221~103	30~216	DMSO	200 μmol/L
17	盐酸异丙嗪	58-33-3	20~168	-3~77	DMSO	200 μmol/L

附录 B

太阳光模拟器光谱分布

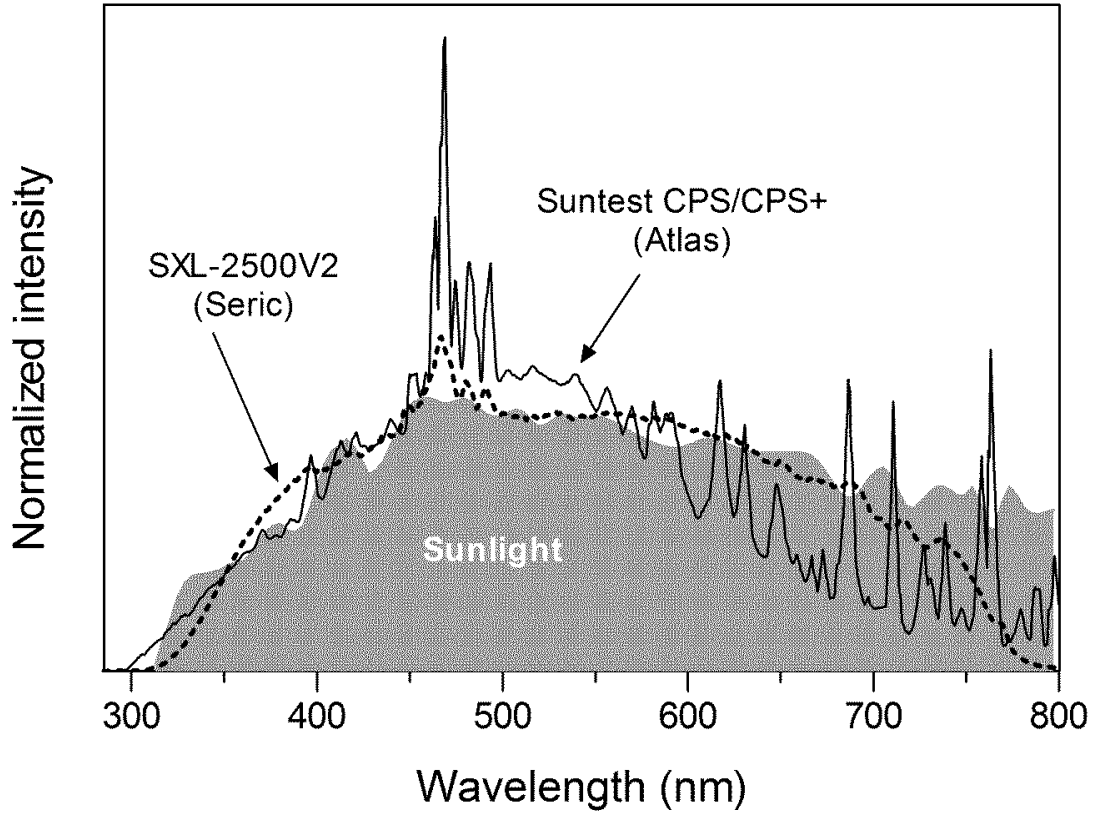


图 1 推荐的两种太阳光模拟器的光谱能量分布

附录 C

石英反应容器

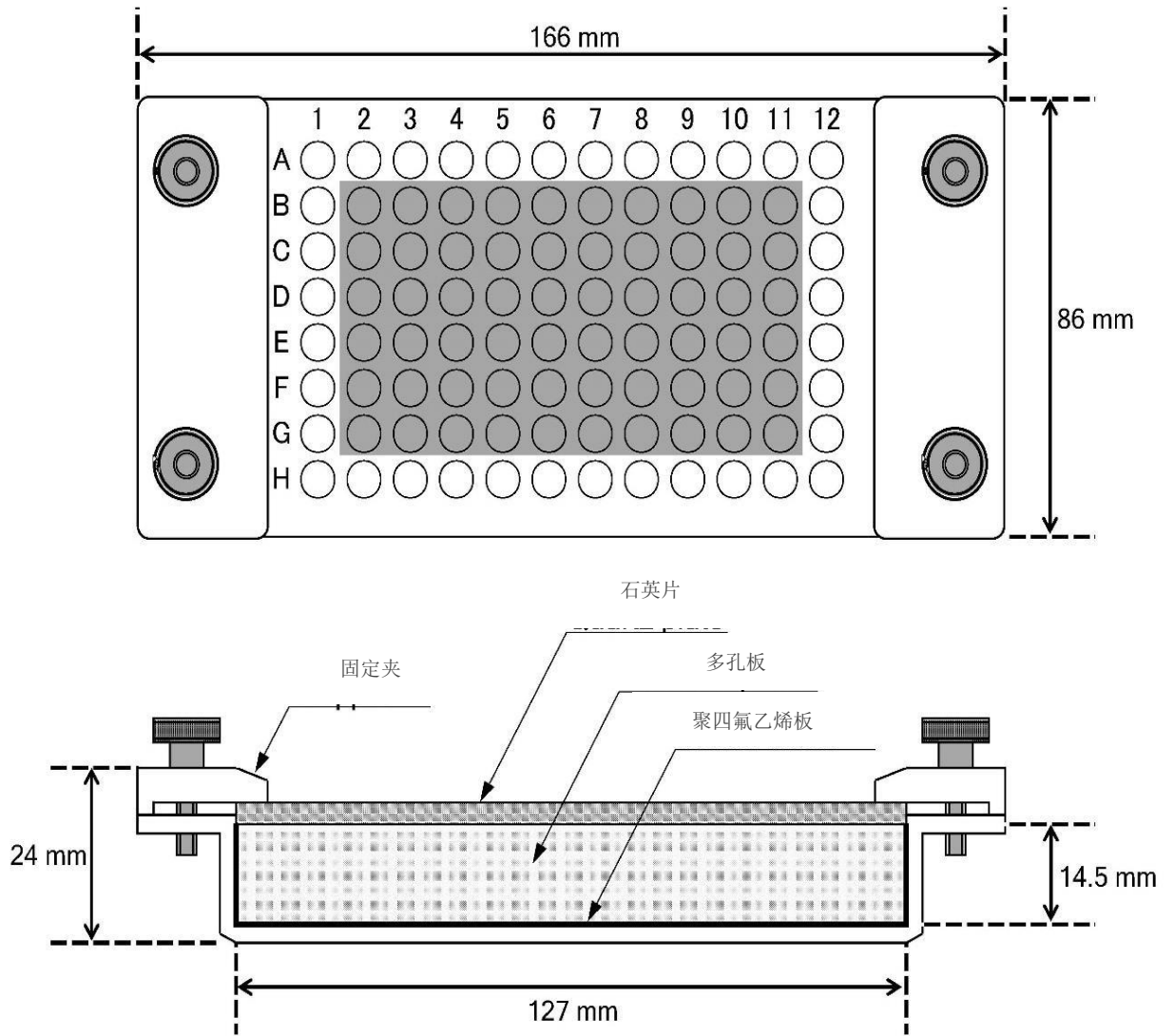


图 2 石英反应容器推荐规格图示

石英盖板推荐厚度为 3 mm

附录 D

96 孔板加样示意图

96 孔板加样示例如下：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	单线态氧 SO 检测孔											
B	B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
C	B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
D	B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
E	B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
F	B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
G	B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7		
	超氧阴离子 SA 检测孔											

注：1.B 为空白对照；

2.P 为阳性对照（奎宁盐酸盐二水合物），N 为阴性对照（二苯甲酮-4）；

3.T1-T7 为第 1 至第 7 种受试物。

附录 E

试验流程图

将各反应成分在避光条件下混合



混合（涡旋或者超声 5-10 分钟）



200 μ L 混合物加入到 96 孔板中（每组 3 个平行）



100 倍显微镜下检查溶解情况



震荡 5 s 后，检测 440 nm 和 560 nm 吸光度



光照 1 小时



震荡 1 min 后，检测 440 nm 和 560 nm 吸光度