

鸡胚绒毛膜尿囊膜血管试验用于评价化妆品配方眼刺激性质量标准的建立与评价

何立成¹, 刘璐¹, 沈琴², 钱飞飞², 朱社敏¹, 张劲松¹, 匡荣^{1*} (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 2.绍兴市现代医药公共服务中心, 浙江 绍兴 312073)

摘要: 目的 建立鸡胚绒毛膜尿囊膜血管试验用于评价化妆品配方眼刺激性的标准。方法 通过对鸡胚绒毛膜尿囊膜血管试验原有判定方法的改进, 建立针对化妆品配方眼刺激性评价的质量标准, 以此对 10 种不同类型共 20 批次的化妆品配方进行眼刺激性评价, 并将结果与家兔法相比较, 验证质量标准的可行性。结果 20 批次的化妆品配方鸡胚绒毛膜尿囊膜血管试验结果与家兔法相比一致率为 85%(17/20)。结论 所建立的标准可用于化妆品配方眼刺激性评价。

关键词: 鸡胚绒毛膜尿囊膜血管试验; 化妆品配方; 眼刺激性

中图分类号: R917.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)22-2780-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.22.006

引用本文: 何立成, 刘璐, 沈琴, 等. 鸡胚绒毛膜尿囊膜血管试验用于评价化妆品配方眼刺激性质量标准的建立与评价[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(22): 2780-2783.

Establishment and Evaluation of Eye Irritation Standard in Cosmetic Formula by Using Chorioallantoic Membrane Vascular Assay

HE Licheng¹, LIU Lu¹, SHEN Qin², QIAN Feifei², ZHU Shemin¹, ZHANG Jinsong¹, KUANG Rong^{1*} (1.Zhejiang Institute of Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 2.Shaoxing Modern Medicine Public Service Center, Shaoxing 312073, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish eye irritation test standards for evaluating cosmetics by using chorioallantoic membrane vascular assay. **METHODS** The chorioallantoic membrane vascular assay(CAMVA) standard method of eye irritation by improving the evaluation system was established, and 20 batches of cosmetics of ten different types were evaluated. Compared the results with the Draize test and verified the feasibility of the CAMVA standard method. **RESULTS** The classification consistency of 20 batches of cosmetics on CAMVA and Draize test was 85% (17/20). **CONCLUSION** Established standards can be used in eye irritation test of cosmetics.

KEYWORDS: chorioallantoic membrane vascular assay; cosmetic; eye irritation

2013 欧盟新化妆品法规 EC1223/2009 正式实施, 全面禁止了在动物身上进行化妆品原料和配方的安全性测试。我国目前仍使用动物试验进行化妆品配方安全性测试, 导致国内化妆品企业无法出口产品。

鸡胚绒毛膜尿囊膜血管试验(chorioallantoic membrane vascular assay, CAMVA)是一种灵敏度高、操作简便、对实验室要求较低的体外评价方法, 可部分代替家兔法(Draize test)进行化妆品眼刺激性评价。其原理为在鸡胚绒毛膜尿囊膜血管密集处放置特富龙环, 将受试样品均匀涂布在环内, 接触一定时间后, 洗去样品, 通过比对环内外血管变化情况, 评价受试样品的刺激作用, 判

定受试样品是否具有眼刺激性^[1-2]。

CAMVA 法对于检测中度以下的眼刺激性效果较好, 尤其适合检测没有刺激性以及刺激程度较轻的化学品、化妆品原料以及化妆品配方, 但其原有判定标准评分方式主观性强, 主要针对化学品和化妆品原料, 对化妆品配方不适用, 需要改良。

在前期实验中, 本课题组为使该方法适用于化妆品配方的眼刺激性评价, 改变了试验条件并结合原有评分标准, 通过计算加权平均数来确定受试样品的刺激程度, 但是最终发现改良后的方法仍过于复杂, 评分主观性没有下降^[3]。

本研究通过对判定标准的简化, 使该方法适

基金项目: 浙江省食品药品监管系统科技计划项目(2018019)

作者简介: 何立成, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)86457970
Tel: (0571)86457970 E-mail: 287640065@qq.com

E-mail: 240601185@qq.com

*通信作者: 匡荣, 男, 博士, 主任药师

用于没有刺激性以及刺激程度较轻的化妆品配方,并以此判定标准对 10 种不同类型共 20 批次的化妆品配方进行眼刺激性评价,最后将结果与家兔法相比较,验证质量标准的可行性。

1 材料

1.1 受试物质

市售化妆品 20 批次,具体编号见表 1。

表 1 受试样品

Tab. 1 Test articles

编号	品名	编号	品名
1	眼霜 1	11	眼线胶笔(黑)
2	眼霜 2	12	睫毛膏
3	面膜 1	13	卸妆水
4	面膜 2	14	卸妆膏
5	冻膜	15	洁面乳 1
6	眼部精华	16	洁面乳 2
7	眼线液(粉)	17	婴儿洗发露
8	眼线液(蓝)	18	洗发露
9	眼线笔(黑)	19	护发素 1
10	眼线笔(棕)	20	护发素 2

1.2 材料、试剂及仪器

受精鸡胚(浙江立华农业科技有限公司)。鸡群微生物检验达到中华人民共和国国家标准 GB/T17999.1-2008,蛋壳无破壳、花壳、砂壳、薄壳,蛋内容物无肉斑、血斑,蛋形无畸形,蛋重 50~68 g。家兔:白色新西兰家兔,体质量 2.0~3.0 kg,普通级,余姚市泗门镇建飞实验兔养殖场,生产许可证号:SCXK(浙)2017-0002。氯化钠注射液(浙江国镜药业有限公司,批号:C18061501);十二烷基硫酸钠(SDS,国药集团化学试剂有限公司,批号:20140318);纯化水(实验室自制);大豆油(浙江益海嘉里食品有限公司,批号:20180204)。特富龙环(Teflon Ring, C.E.CONOVER& CO.INC.;批号:150131);XS104 电子天平(Mettler Toledo);CTHI-150B 恒温恒湿箱[施都凯仪器设备(上海)有限公司,培养条件:温度(37±1)℃,相对湿度 50%~70%]。

2 方法与结果

2.1 CAMVA 法判定标准的改进

样品处理:液体样品直接给予;半固体、固体样品加等体积实验室用水或植物油(按样品性质选择合适的溶剂)混匀后给予。不稀释的样品使用纯化水作为阴性对照组,稀释的样品除阴性对照

组外,需增加溶剂对照组。

实验步骤:将受精鸡胚放置于恒温恒湿箱中,在(37±1)℃,50%~70%湿度的条件下孵育 4 d。检查胚胎是否存在及其位置,在蛋的窄端钻 1 个小孔,抽取适量蛋清,在胚胎位置的上方开约 2 cm² 的窗口并封口。将开窗后的鸡胚放入恒温恒湿箱,在(37±1)℃,50%~70%湿度的条件下继续孵育 6 d。取出鸡胚,观察膜血管生长情况,剔除发育不良、感染或有其他异常的鸡胚。将鸡胚随机分组,阴性对照组 3 个鸡胚(纯化水),阳性对照组 3 个鸡胚(0.288% SDS 溶液),各样品每组 3 个鸡胚。将鸡胚水平放置,剥去天窗周围的蛋壳,在血管密集处放置特富龙环。用外置活塞式移液器在每个环内加入 80 μL 样品,在(37±1)℃,50%~70%湿度的条件下孵育 30 min。取下特富龙环,用氯化钠注射液冲洗样品至可清晰观察膜血管。以特富龙环外的区域作为对照,评价并记录特富龙环内血管损伤情况。

原判定标准^[3]:根据表 2 对血管刺激效应进行评分。得分≥1 的为阳性结果。计数阳性反应的鸡胚个数,按正规 Bliss 法计算 RC₅₀,即引起一半鸡胚出现阳性反应的受试物浓度。如果样品 RC₅₀>3%,判定为无刺激性;若 RC₅₀≤3%,则判定为有刺激性。

表 2 CAMVA 评分标准

Tab. 2 Scoring criteria of CAMVA

血管刺激效应 评分	观察的描述
正常 0	无反应,膜血管正常
毛细管断流 1	血管血流减少,变清晰或无血液,血管扭曲
毛细管充血 2	充血,或膜血管血流增加
少量出血 3	出血点不超过环内区域的 25%
轻度出血 4	出血点占环内区域的 25%~50%
中度出血 5	较大出血点或小出血点占环内区域的 50%~75%
重度出血 6	环内超过 75%的区域是“血泊”,可能也会形成暗痂状的区域

由于原有 CAMVA 法判定标准针对的是化学品和化妆品原料,评分标准十分细致,主观程度较高,为了使该方法进一步降低成本,更易推广使用,本研究改进了判定标准。

新判定标准(根据表 3 对血管刺激效应进行评分):出现任何 1 种表 3 中的情况,即可判定为阳性。3 个鸡胚均无阳性反应,判定样品无刺激性;3 个鸡胚均为阳性反应,判定样品有刺激性。其他

情况另取 3 个鸡胚复试, 若复试结果均无阳性反应, 判定样品无刺激性; 若仍出现阳性反应, 判定样品有刺激性。

评价结果为无刺激性的, 说明使用该产品不存在眼刺激性的风险; 评价结果为有刺激性的, 需用其他试验方法进一步确认。

表 3 CAMVA 阳性反应判定标准

Tab. 3 Judgement standard of CAMVA positive reaction

血管刺激效应	观察的描述
血管断流	环内血管血流减少, 变清晰或无血液
血管充血	环内血管充血肿胀, 但未见出血点
血管出血	环内血管有出血点

2.2 CAMVA 法试验结果

按“2.1”项下方法与新判定标准评价受试样品, 结果见表 4, 其中眼霜、面膜、冻膜、眼部精华、眼线胶笔、睫毛膏、卸妆膏、护发素等为无刺激性; 眼线液、卸妆水、洁面乳、洗发露、婴儿洗发露等为有刺激性; 眼线笔需要复试。

表 4 CAMVA 法眼刺激性评价结果(n=3)

Tab. 4 Evaluation result of eye irritation on CAMVA(n=3)

编号	品名	是否稀释	刺激性分类
1	眼霜 1	是	无刺激性
2	眼霜 2	是	无刺激性
3	面膜 1	否	无刺激性
4	面膜 2	否	无刺激性
5	冻膜	是	无刺激性
6	眼部精华	否	无刺激性
7	眼线液(粉)	是	有刺激性
8	眼线液(蓝)	是	有刺激性
9	眼线笔(黑)	是	复试
10	眼线笔(棕)	是	复试
11	眼线胶笔(黑)	是	无刺激性
12	睫毛膏	是	无刺激性
13	卸妆水	否	有刺激性
14	卸妆膏	是	无刺激性
15	洁面乳 1	是	有刺激性
16	洁面乳 2	是	有刺激性
17	婴儿洗发露	否	有刺激性
18	洗发露	否	有刺激性
19	护发素 1	是	无刺激性
20	护发素 2	是	无刺激性

复试结果见表 5, 2 款眼线笔均为无刺激性。根据判定标准, 眼霜、面膜、冻膜、眼部精华、眼线笔、眼线胶笔、睫毛膏、卸妆膏、护发素等

不存在眼刺激性的风险, 眼线液、卸妆水、洁面乳、洗发露、婴儿洗发露等需要用其他方法进一步测试。

表 5 CAMVA 法眼刺激性评价复试结果(n=3)

Tab. 5 Re-evaluation result of eye irritation on CAMVA (n=3)

编号	品名	是否稀释	刺激性分类
9	眼线笔(黑)	是	无刺激性
10	眼线笔(棕)	是	无刺激性

2.3 Draize 试验方法与结果

试验前家兔均适应 3 d。每种样品使用 3 只家兔, 将受试物 0.1 mL 滴入结膜囊中, 另一侧眼睛不处理作自身对照。1~12 号样品滴入受试物后 24 h 内不冲洗眼睛。13~20 号样品滴入受试物后 30 s, 用足量、流速较快但又不会引起动物眼损伤的水流冲洗至少 30 s。在滴入受试物后第 1, 24, 48, 72 h 以及第 4 天和第 7 天对动物眼睛进行检查。依据国家药品监督管理局颁布的《化妆品安全技术规范》(2015 版)^[4]中“急性眼刺激性/腐蚀性试验”标准进行进行检查和评分。结果见表 6。除卸妆水、洁面乳、洗发露有轻刺激性外, 其余产品均无刺激性。CAMVA 法测试结果与家兔法相比, 一致性为 85%(17/20), 不一致的 3 批均为假阳性。

表 6 Draize 试验结果(n=3)

Tab. 6 Results of Draize test(n=3)

编号	品名	刺激性分类	编号	品名	刺激性分类
1	眼霜 1	无刺激性	11	眼线胶笔(黑)	无刺激性
2	眼霜 2	无刺激性	12	睫毛膏	无刺激性
3	面膜 1	无刺激性	13	卸妆水	轻刺激性
4	面膜 2	无刺激性	14	卸妆膏	无刺激性
5	冻膜	无刺激性	15	洁面乳 1	轻刺激性
6	眼部精华	无刺激性	16	洁面乳 2	轻刺激性
7	眼线液(粉)	无刺激性	17	婴儿洗发露	无刺激性
8	眼线液(蓝)	无刺激性	18	洗发露	轻刺激性
9	眼线笔(黑)	无刺激性	19	护发素 1	无刺激性
10	眼线笔(棕)	无刺激性	20	护发素 2	无刺激性

3 讨论

在之前的研究中, 本课题组对 CAMVA 做出过一定的调整, 试图通过稀释样品浓度, 减少样品与膜血管的接触时间以及计算若干个鸡胚阳性反应分数的加权平均数来评价化妆品的眼刺激

性,尤其是希望该方法能适用于刺激性较重的用后冲洗类化妆品,如洗面奶、卸妆油、洗发水和沐浴露等产品。但是在后期的反复研究、讨论和验证中,课题组发现改进后的方法在实际应用中仍有很大的主观性,尤其在打分的时候,对于膜血管出血量的判断还有赖实验员的经验,且样本量不够,试验条件优化准确度有限,在方法的推广上没有比原方法更简便、更易被广大研究机构掌握。本课题组认为试验方法和判定标准越简单越可靠,因此在本次的改进中将判定标准设定成不打分,仅观察是否有阳性反应,减小了人为认知上的误差。对样品与膜血管的接触时间也不再进行区别对待,方便了实验操作。此外本次改进减少了每批次样品使用的鸡胚数,进一步降低实验成本。

表 7 新旧方法对比

Tab. 7 Comparison of old and new methods

区别	原方法	原改进方法	新改进方法
每批使用鸡胚个数	32~50 个	10 个	3~9 个(含复试)
稀释浓度	至少 3~5 个浓度	1 个浓度	最多 2 个浓度
评价方法	观察、计分并计算引起一半鸡胚出现阳性反应的受试物浓度(RC ₅₀)	观察、计分并计算鸡胚阳性反应分数的加权平均数	观察是否有阳性反应
评价结果	评价样品刺激性“有”和“无”及确定样品安全浓度	评价样品刺激性程度	评价样品刺激性“有”和“无”
适用方向	风险评估	风险评估	安全性评价、风险评估、行政审批
适用范围	化学品、化妆品原料无刺激性至中刺激性	化妆品配方无刺激性至中刺激性	化妆品配方无刺激性至轻刺激性

我国实行非特殊用途化妆品备案制度,截至 2019 年 1 月共有备案信息约 170 万条,且每年都在大量增加,其中需检测眼刺激性的化妆品配方中大部分为眼部护肤品、面膜、眼部彩妆等,刺激性较小,适合用 CAMVA 法进行评价。本研究建立的 CAMVA 法评价化妆品配方眼刺激性的质量标准可以极大减少家兔以及鸡胚的使用,符合“3R”原则,不仅做到了人力物力的减少和优化,还可以很好地应对日益增长的市场需求,方便国内化妆品企业对外销售。

本研究改进的方法可作为化妆品配方眼刺激性评价标准,用于注册检验机构进行安全性评价,企业也可用作化妆品的风险评估。

每个试验方法有自己天生的优势和局限性,没有必要强行让一个试验方法适用所有样品。CAMVA 法相比于家兔法会出现较高的假阳性率,即当 CAMVA 结果为无刺激性时结果可信,当结果为有刺激性时可能产生误判,所以在使用该方法的时候,应对样品进行选择。根据本研究的结果,与眼接触的护肤、护发类产品刺激性微弱,特别适合用 CAMVA 法进行检测,而含有大量表面活性剂的用后冲洗类产品与膜血管接触几乎都会有阳性反应,不适合 CAMVA 法,可以用角膜模型或牛眼等其他方法进行评价。彩妆类产品由于种类繁多,色彩鲜明,部分还有快干特性,可以采用 CAMVA 法进行初筛,但是假阳性率比较高,需要通过其他试验进行综合评价。原方法与 2 次改进方法的具体对比见表 7。

REFERENCES

[1] BAGLEY D M, CERVEN D, HARBELL J. Assessment of the chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA) in the COLIPA in vitro eye irritation validation study [J]. Toxicol In Vitro, 1999, 13(2): 285-293.

[2] DANIEL M B, PERVEEN Y R, BETTY M K, et al. Evaluation of the vascular components of the chorioallantoic membrane assay as a model for eye irritation potential: II [J]. Cutan Ocular Toxicol, 1991, 10(1/2): 105-113.

[3] HE L C, ZHU S M, XIE Z, et al. Research on the feasibility of using Chorioallantoic Membrane Vascular Assay to evaluate eye irritation of cosmetics [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(8): 1158-1162.

[4] 国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范[S]. 杭州: 浙江省食品药品监督管理局, 2015: 493-495.

收稿日期: 2019-01-11

(本文责编: 蔡珊珊)