(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110579552 B
(45)授权公告日 2022.09.09

(21)申请号 201910682239.4

(22)申请日 2019.07.26

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110579552 A

(43)申请公布日 2019.12.17

(73)专利权人 广州市华代生物科技有限公司
地址 510530 广东省广州市黄埔区开源大道11号B3座906

(72)发明人 程树军 罗婷婷 马莎莎

(74)专利代理机构 广州知友专利商标代理有限公司 44104
专利代理师 周克佑 刘艳丽

(51)Int.Cl.
G01N 30/06(2006.01)
G01N 30/74(2006.01)
G01N 30/90(2006.01)

(56)对比文件
CN 107446993 A,2017.12.08
Mahesh Raj Nepal 等.A simple in chemico method for testing skin sensitizing potential of chemicals using small endogenous molecules.《Toxicology Letters》.2018,第289卷75-85.

Cristina Avonto 等.A fluorescence high throughput screening method for the detection of reactive electrophiles as potential skin sensitizers.《Toxicology and Applied Pharmacology》.2015,第289卷177-184.

荆喜中 等.外用护肤品研发中皮肤过敏试验方法研究进展.《中国皮肤性病学杂志》.2015,第29卷(第3期),311-313.

G. Frank Gerberick 等.Quantification of Chemical Peptide Reactivity for Screening Contact Allergens A Classification Tree Model Approach.《TOXICOLOGICAL SCIENCES》.2007,第97卷(第2期),417-427.

审查员 董春艳

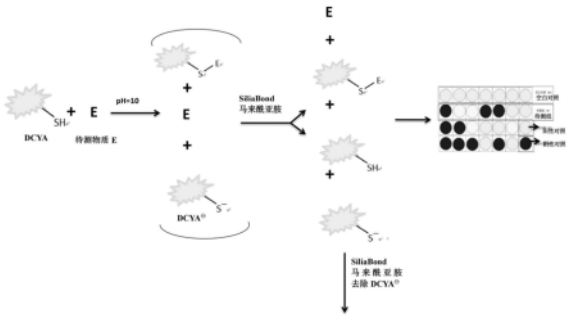
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54)发明名称

一种基于荧光化学反应系统体外高通量筛查皮肤致敏原的方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于荧光化学反应系统体外高通量筛查皮肤致敏原的方法,包括以下步骤:(一)荧光化学反应系统的制备;(二)致敏原筛选试验;(三)皮肤致敏性预测。该方法快速、简便、成本低、标准化程度高,适用范围广泛,可以对化学品、化妆品、植物提取物、化妆品原料等进行快速有效的检测和评估。



CN 110579552 B

1.一种基于荧光化学反应系统体外高通量筛查皮肤致敏原的方法,其特征是包括以下步骤:

(一)荧光化学反应系统的制备:制备5-二甲氨基-N-2-巯基乙基萘-1-磺酰胺,简称DCYA;

(二)致敏原筛选试验

(2.1)建立待测组、阴性对照、阳性对照和空白对照各实验组,其中各实验组的组成如下表1所示:

表1各实验组的组成

试剂	阳性对照(PC)	阴性对照(NC)	空白对照(BI)	待测组(R)
浓度为2.5mM的DCYA	50μL	50μL	50μL	50μL
标准缓冲溶液	--	20μL	--	20μL
乙腈溶剂	70μL	50μL	20μL	--
待测物质	--	--	50μL	50μL

;

(2.2)选取待测组,点样至TLC板,加入展开剂展开,检查TLC板是否有DCYA的黄色荧光点,计算Rf值,确定DCYA与待测物质是否发生反应;

(2.3)在步骤(2.1)中建立的各实验组中加入马来酰亚胺后过滤以除去未反应的带负电荷**DCYA⊖**,涡旋后,离心,取上清液,稀释后得稀释液;

(2.4)将稀释液转移至多功能微孔板检测系统,调节好温度和波长,读数;

(2.5)通过以下公式计算总反应指数RI;

$$RI\ (\%) = 100 \times (1 - \frac{BI-R}{PC-NC} - \frac{PC-BI}{PC})$$

式中代表:RI:总反应指数;BI:空白对照;PC:阳性对照;NC:阴性对照;R:待测物质;

(三)皮肤致敏性预测

据下表2中的预测模型作出皮肤致敏性判断:

表2.预测模型

RI(%)	致敏性预测分类
<5%	无致敏性
>5%,<20%	轻度致敏性
>20%,<80%	中度致敏性
>80%	强致敏性

;

所述标准缓冲溶 液的pH为10±0.02,在此条件下,DCYA变为带负电荷DCYAθ,与待测物质发生反应;

所述步骤(2.2)中选取待测组孵育20min±5min后,点样至TLC板;所述的展开剂为0.8%～0.9%甲醇的氯仿溶液;在紫外光波长366±5nm检查TLC板是否有DCYA的黄色荧光点;确定DCYA与待测物质是否能进行反应的Rf值0.32～0.34。

2.根据权利要求1所述基于荧光化学反应系统体外高通量筛查皮肤致敏原的方法,其特征是:步骤(2.1)中所述待测物质包括个人护理产品、家用洗涤产品、防腐剂、药品、植物提取物、医疗器械及其浸提物、生物材料、环境污染物以及其它皮肤接触产品;其中所述个人护理产品包括洗发香波、护发素、染发剂、护肤类、防晒类、粉底、BB霜、CC霜、眼影、唇彩、油、沐浴乳或身体乳;所述家用洗涤产品包括洗衣液、洗衣粉、肥皂、洗洁精、漂白剂、消毒液或柔顺剂;所述植物提取物包括植物粗提取物、植物精提取物及二者的混合物;所述其它皮肤接触产品包括纺织品的浸提物。

3.根据权利要求1所述基于荧光化学反应系统体外高通量筛查皮肤致敏原的方法,其特征是:步骤(2.3)中所述马来酰亚胺为色谱级化学试剂,购自SiliCycle公司,商品名为**SiliaBond®** Maleimide(Si-MAL),只有带负电荷DCYAθ会被马来酰亚胺过滤出来。

4.根据权利要求1所述基于荧光化学反应系统体外高通量筛查皮肤致敏原的方法,其特征是:步骤(2.3)中离心时在转速为14000±500rpm离心10±2分钟。

5.根据权利要求1所述基于荧光化学反应系统体外高通量筛查皮肤致敏原的方法,其特征是:步骤(2.3)中采用乙腈稀释至1mL得稀释液。

6.根据权利要求1所述基于荧光化学反应系统体外高通量筛查皮肤致敏原的方法,其特征是:步骤(2.4)中调剂温度为23±1℃,激发波长为350～420nm,发射波长为520nm。

一种基于荧光化学反应系统体外高通量筛查皮肤致敏原的方法

技术领域

[0001] 本发明属于皮肤知敏原筛查技术领域，具体涉及一种基于荧光化学反应系统体外高通量筛查皮肤致敏原的方法。

背景技术

[0002] 变应性接触性皮炎(allergic contact dermatitis，ACD)是皮肤对外源物质产生的免疫原性皮肤反应，即皮肤重复接触某种物质后机体产生的免疫介导的皮肤反应。ACD是人类最常见的接触性免疫疾病之一，据估计15％-20％的人会对一到多个市售的化学品产生皮肤过敏。ACD的临床表现以瘙痒、红斑、丘疹、水肿、水疱、融合性水疱为表现特征，造成人体很大的痛苦，严重影响生活质量。因此，对于有意或无意皮肤接触的物质进行致敏测试是安全性评价的重要内容。可能含有致敏原的产品包括日用化学品、化学品、药品、农药、纺织品、器械、环境污染物等。

[0003] 传统评价方法采用实验动物作为人的替身，模拟人体接触致敏原的整个过程，通过观察动物出现的临床症状判定受试物是否具有致敏性，这些方法包括豚鼠最大化试验(GPMT)、豚鼠Buehler试验(BT)和小鼠局部淋巴结试验(LLNA)。动物在整个实验过程中表现要为痛苦。在3R原则的倡导下，在欧盟化妆品法规 1223/2009/EU、欧盟《化学品注册、评估、授权和限制》(简称REACH法规) 为代表的全球48个国家化妆品法规的约束下，禁止化妆品的动物实验，寻找替代方法已成为毒性测试方法变革的重要内容。

[0004] 为加速替代方法的开发，经济与合作发展组合(Organization for Economic Cooperation and Development，OECD)建议在有害结局通路(adverse outcome pathway，AOP)的框架内开发毒性测试替代方法。AOP认为任何毒性作用的过程均由分子启始事件、若干相互关联的关键事件组成，最终导致有害结局。皮肤致敏过程也是遵循这样的AOP。分子起始事件是外源物质渗入表皮层与皮肤蛋白共价结合形成半抗原复合物，随后角质形成细胞激活发生炎性反应，同时被激活的树突状细胞迁移至局部淋巴结，将半抗原复合物呈递至T淋巴细胞，最终导致T细胞的增殖和分化。当皮肤再次接触相同过敏原时进入激发阶段，触发炎性反应。针对皮肤致敏AOP起始事件，基于肽或蛋白反应活性的方法用以筛选并鉴定潜在皮肤致敏物质，开发了直接多肽反应试验(direct peptide reactivity assay，DPRA)。DPRA立足于AOP中的分子起始事件，通过检测待测物对半胱氨酸和赖氨酸多肽的消除从而评估待测物的致敏性。2013年欧洲替代方法研究中心将DPRA推荐为皮肤致敏试验的方法，2015年DPRA方法被OECD接受并公布为指南442C。尽管直接多肽反应试验准确度和灵敏度较高，易于操作，且便于批量检测，但仍然存在局限性，DPRA试验依赖于对未反应多肽的检测，可能受到不同亲水亲核试剂盒疏水致敏物的影响。原因是大多数皮肤过敏原水溶性较差，与多肽溶液混合时可能析出沉淀，不能反映代谢活化或非生物转化，对前半抗原致敏性预测存在困难，对于混合物特别是含未知成分混合物的致敏性预测困难等。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种基于荧光化学反应系统体外高通量筛查皮肤致敏原的方法，该方法快速、简便、成本低、标准化程度高，适用范围广泛，可以对化学品、化妆品、植物提取物、化妆品原料等进行快速有效的检测和评估。

[0006] 本发明的上述目的是可以通过以下技术方案来实现：一种基于荧光化学反应系统体外高通量筛查皮肤致敏原的方法，包括以下步骤：

[0007] (一)荧光化学反应系统的制备：制备5-二甲氨基-N-2-巯基乙基萘-1-磺酰胺，简称DCYA；

[0008] (二)致敏原筛选试验

[0009] (2.1)建立待测组、阴性对照、阳性对照和空白对照各实验组，其中各实验组的组成如下表1所示：

[0010] 表1各实验组的组成

[0011]

试剂	阳性对照(PC)	阴性对照(NC)	空白对照(BI)	待测组(R)
浓度为2.5mM的DCYA	50μL	50μL	50μL	50μL
标准缓冲溶液	--	20μL	--	20μL
乙腈溶剂	70μL	50μL	20μL	--
待测物质	--	--	50μL	50μL

[0012] ；

[0013] (2.2)选取待测组，点样至TLC板，加入展开剂展开，检查TLC板是否有 DCYA的黄色荧光点，计算Rf值，确定DCYA与待测物质是否发生反应；

[0014] (2.3)在步骤(2.1)中建立的各实验组中加入马来酰亚胺后过滤以除去未反应的带负电荷$DCYA^{\ominus}$，涡旋后，离心，取上清液，稀释后得稀释液；

[0015] (2.4)将稀释液转移至多功能微孔板检测系统，调节好温度和波长，读数；

[0016] (2.5)通过以下公式计算总反应指数RI；

[0017] $$RI\ (\%) = 100 \times \left(1 - \frac{BI-R}{PC-NC} - \frac{PC-BI}{PC}\right)$$

[0018] 式中代表：RI：总反应指数；BI：空白对照；PC：阳性对照；NC:阴性对照； R：待测物质；

[0019] (三)皮肤致敏性预测

[0020] 据下表2中的预测模型作出皮肤致敏性判断：

[0021] 表2.预测模型

[0022]

RI(%)	致敏性预测分类
<5%	无致敏性
>5%,<20%	轻度致敏性
>20%,<80%	中度致敏性
>80%	强致敏性

[0023] 在上述基于荧光化学反应系统体外高通量筛查皮肤致敏原的方法中：

[0024] 优选的，步骤(2.1)中5-(二甲氨基)-N-(2-巯基乙基)萘-1-磺酰胺，5-(Dimethylamino)-N-(2-mercaptoethyl)naphthalene-1-sulfonamide，简称DCYA ，其制备

方法如下：

[0025] (1)DCYA二硫化物制备：

[0026] A.在500mL圆底烧瓶中，将丹磺酰氯(4.03g，14.94mmol)溶解于170mL 丙酮:水(30:1)的溶液中。逐滴加入胱胺二盐酸盐(1.61g，7.15mmol，0.49当量)。80mL 0.1M $NaHCO_3$水溶液中的溶液，通过加入0.5M氢氧化钠水溶液将溶液保持在pH 7.5。反应90分钟后，混合物用100毫升氯仿稀释，所得溶液用碳酸氢钠水溶液洗涤四次，然后用水洗涤。有机层用无水MgSO4干燥，浓缩并通过柱色谱(硅胶，在己烷中10％至40％的丙酮梯度洗脱)纯化，得到DCYA二硫化物(N,N′-(disulfanediylbis(ethane-2,1-diyl))bis(5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamide，N,N'-(二磺酰二基双(乙烷-2,1-二基))双(5-(二甲基氨基)萘-1-磺酰胺)，为蓬松的黄色固体。

[0027] B.定性测试：层析缸加入30％丙酮的己烷溶液，使用TLC板，点样，展开，计算Rf值，Rf值范围为0.24～0.26。

[0028] (2)DCYA制备：

[0029] A.在50mL圆底烧瓶中，将DCYA二硫化物化合物(0.32g，0.524mmol) 溶于四氢呋喃(18mL)和水(2mL)中，冷却至0℃，加入硼氢化钠(0.20g， 5.29mmol)。4小时后，蒸发溶剂，残余物用水稀释，用乙醚(3×10mL)萃取。合并的有机层用无水$MgSO_4$干燥，浓缩，硅胶上纯化(梯度洗脱10％至30％丙酮的己烷溶液)，得到DCYA硫醇，为黄绿色蓬松固体。

[0030] B.定性测试：层析缸加入30％乙酸乙酯溶液，使用TLC板，点样，展开，计算Rf值，Rf值范围为0.39～0.41。

[0031] 可选地，步骤(2.1)中所述标准缓冲液为pH为10±0.02的标准缓冲溶液，其购自梅特勒-托利多(METTLER TOLEDO)公司，在pH＝10±0.02的条件下， DCYA变为带负电荷$DCYA^{\ominus}$，与待测物质发生反应。

[0032] pH为10±0.02的标准缓冲溶液是关键条件，在pH＝10±0.02的条件下， DCYA变为(带负电荷) $DCYA^{\ominus}$，与待测物质发生反应。

[0033] 可选地，步骤(2.2)中所述待测物质包括个人护理产品、家用洗涤产品、防腐剂、药品、植物提取物、医疗器械及其浸提物、生物材料、环境污染物以及其它皮肤接触产品。

[0034] 可选地，所述个人护理产品包括洗发香波、护发素、染发剂、护肤类、防晒类、粉底、BB霜、CC霜、眼影、唇彩、油、沐浴乳或身体乳；所述家用洗涤产品包括洗衣液、洗衣粉、肥皂、洗洁精、漂白剂、消毒液或柔顺剂；所述植物提取物包括植物粗提取物、植物精提取物及二者的混合物；所述其它皮肤接触产品包括纺织品的浸提物。

[0035] 可选地，步骤(2.1)中所述待测物质为已知的或未知的皮肤致敏原，致敏原从强度可分为弱度、中度和强度三类，极强致敏物如二硝基氯苯、恶唑酮，强致敏物如甲醛、氯胺T，中度致敏物如亚苄基丙酮、苯乙醛、硫酸镍，轻度致敏物如2,3丁二酮、法呢醛，非致敏物如乳酸、6-甲基香豆素、正丁醇。

[0036] 可选地，步骤(2.2)中选取待测组孵育20min±5min后，点样至TLC板。

[0037] 可选地，步骤(2.2)中所述展开剂为0.8％～0.9％甲醇的氯仿溶液。

[0038] 优选的，步骤(2.2)中在紫外光波长366±5nm检查TLC板是否有DCYA 的黄色荧光点。

[0039] 优选的，步骤(2.2)中确定DCYA与待测物质是否能进行反应的Rf值 0.32～0.34。

[0040] 若Rf为其他值，可能存在DCYA二聚体(Rf值＝0.18)或可疑的反应产物。此时，应停止试验，受试物需要通过HPLC/MS确定结构，是否存在前半抗原体，若为Pro/Pre半抗原，需通过氧化/活化后得到半抗原，可进行此方法筛查。

[0041] 薄层色谱法是一种吸附薄层色谱分离法，薄层色谱法(TLC)是将适宜的固定相涂布于玻璃板、塑料或铝基片上，成一均匀薄层。待点样、展开后，根据比移值(Rf)与适宜的对照物按同法所得的色谱图的Rf值作对比，对混合样品进行分离、鉴定和定量的一种层析分离技术。TLC板为涂有固定相(吸附剂)或载体的载板，载板是用以涂布薄层用的载板有玻璃板、铝箔及塑料板，玻璃板是最常用的。固定相(吸附剂)或载体是薄层层析硅胶，薄层层析硅胶最常用的有硅胶G、硅胶GF、硅胶H、硅胶HF等。点样通常是使用内径为0.5mm管口平整的普通毛细管将液体点置TLC板，点样直径不超过4mm，点样距离一般为 1～1.5cm即可。可手动点样或采用自动点样机点样。展开是指在适合TLC板的玻璃层析缸，加入一定量特定的展开剂，展开一段时间，当板上展开到规定展距 (一般上行展开8～15cm，高效板一般上行展开5～8cm)，可取出晾干。Rf值为溶质移动的距离/溶液移动的距离。表示物质移动的相对距离。

[0042] 本发明中利用薄层色谱法，获得Rf值，可确定DCYA与待测物质是否发生反应，利用马来酰亚胺去除未反应$DCYA^{\ominus}$，待测物质与DCYA形成半抗原-硫醇类蛋白加合物进行荧光检测，从而从荧光值的变化来预测待测物质的致敏性，反应原理图如图1所示。

[0043] 优选的，步骤(2.3)中所述马来酰亚胺为化学试剂，商品名为SiliaBond® Maleimide(Si-MAL)，要求色谱级，可商品化采购(如购自SiliCycle公司)，，只有带负电荷$DCYA^{\ominus}$会被马来酰亚胺过滤出来。

[0044] 可选地，步骤(2.3)中离心时在转速为14000±500rpm离心10±2分钟。

[0045] 可选地，步骤(2.3)中采用乙腈稀释至1mL得稀释液。

[0046] 可选地，步骤(2.4)中调剂温度为23℃，激发波长为350～420nm，发射波长为520nm。

[0047] 可选地，步骤(2.4)中采用的多功能微孔板检测系统是可对样品吸收、荧光、化学发光的多功能全波长的检测设备。可商业购买，如spectraMax M5或 Synergy H1。

[0048] 与现有技术相比，本发明具有如下优点：

[0049] (1)本发明方法是一种体外高通量筛查皮肤致敏原的方法，是一种基于荧光半胱氨酸衍生物系统建立一种新型化学高通量筛选方法，可实现快速高效筛查皮肤致敏物质，标准化程度高；

[0050] (2)本发明发方法用荧光半胱胺衍生物快速鉴定潜在的亲电子皮肤致敏物，通过直接定量检测多孔微量培养板中的荧光半抗原-硫醇加合物的形成，可以对潜在皮肤亲电子致敏物进行快速识别；

[0051] (3)本发明方法利用体外化学反应系统，非动物测试，无需培养细胞，简单快速；

[0052] (4)本发明方法针对皮肤致敏AOP中的分子起始事件，特异性强，敏感性强，可有效评估致敏物质；

[0053] (5)本发明方法可以代替活体动物和人类皮肤，直接用于化学品、化妆品、药品、医疗器械等产品致敏物的快速筛查；

[0054] (6)本发明还可与其它多种体外方法组合。

附图说明

[0055] 图1是本发明体外高通量筛查皮肤致敏原试验反应原理图。

具体实施方式

[0056] 实施例1犬蔷薇花和金盏花植物提取物皮肤致敏性测试

[0057] (一)、荧光化学反应系统的制备:制备5-二甲氨基-N-2-巯基乙基萘-1磺酰胺,简称DCYA;

[0058] 具体过程如下:

[0059] (1.1)DCYA二硫化物制备

[0060] 在500mL圆底烧瓶中,将丹磺酰氯(4.0302g,14.94mmol)溶解于170mL 丙酮:水(30:1,体积比)的溶液中。逐滴加入胱胺二盐酸盐(1.6101g,7.15mmol, 0.49当量)。80mL 0.1M $NaHCO_3$水溶液中的溶液,通过加入0.5M氢氧化钠水溶液将溶液保持在pH 7.5。反应90分钟后,混合物用100毫升氯仿稀释,所得溶液用碳酸氢钠水溶液洗涤四次,然后用水洗涤。有机层用无水$MgSO_4$干燥,浓缩并通过柱色谱(硅胶,在己烷中10%至40%的丙酮梯度洗脱)纯化,得到 DCYA二硫化物4.1401g,为蓬松的黄色固体。

[0061] 定性测试:层析缸加入30%丙酮的己烷溶液,使用TLC板,点样,展开,计算得到Rf=0.25,定性说明该物质为DCYA二硫化物。

[0062] (1.2)DCYA制备:

[0063] 在50mL圆底烧瓶中,将DCYA二硫化物化合物(0.3211g,0.524mmol)溶于四氢呋喃(18mL)和水(2mL)中,冷却至0℃,加入硼氢化钠(0.2005g, 5.29mmol)。4小时后,蒸发溶剂,残余物用水稀释,用乙醚(3×10mL)萃取。合并的有机层用无水$MgSO_4$干燥,浓缩,硅胶上纯化(梯度洗脱10%至30%丙酮的己烷溶液),得到DCYA硫醇0.2703g,为黄绿色蓬松固体。

[0064] 定性测试:层析缸加入30%乙酸乙酯溶液,使用TLC板,点样,展开,计算获得Rf=0.40,定性说明该物质为DCYA。

[0065] (二)致敏原筛选试验

[0066] (2.1)建立待测组、阴性对照、阳性对照和空白对照各实验组,其中各实验组的组成如下表1所示:

[0067] 表1各实验组的组成

[0068]

试剂	阳性对照(PC)	阴性对照(NC)	空白对照(BI)	待测组(R)
浓度为2.5mM的DCYA	50μL	50μL	50μL	50μL
pH为10的缓冲溶液	--	20μL	--	20μL
乙腈溶剂	70μL	50μL	20μL	--
待测物质	--	--	50μL	50μL

[0069] 标准缓冲液为pH为10±0.02的标准缓冲溶液,其购自METTLER TOLEDO,在pH=10±0.02的条件下,DCYA变为带负电荷$DCYA^{\ominus}$,与待测物质发生反应。

[0070] 其中待测物质为犬蔷薇花和金盏花植物提取物,其制备方法如下:

[0071] 金盏花花瓣的提取:将金盏花花瓣研磨,研磨成粉末,精确称取1g粉末,置于15mL离心管中,加入5mL甲醇(4次)超声提取1小时,在1900g下离心 15分钟,收集上清液,并使用一次性注射器过滤器(0.45PES)过滤上清液,使用旋转蒸发仪去除大部分溶剂,剩余部分在

烘箱蒸干，去除溶剂后得到金盏花花瓣提取物141.2mg。

[0072] 犬蔷薇花瓣的提取：取干燥的犬蔷薇花瓣2.1150g，研磨成粉末，置于15mL 离心管中，加入8mL甲醇超声，萃取1小时，在1900g下离心15分钟，收集上清液，并使用一次性注射器过滤器(0.45PES)过滤上清液，使用旋转蒸发仪去除大部分溶剂，剩余部分在烘箱蒸干，去除溶剂后得到犬蔷薇花瓣提取物 724.3mg。

[0073] 精确称量20毫克两种植物提取物(20mg±0.1mg)并使用乙腈溶解至终浓度20mg/mL。如果观察到显着的沉淀物或不溶物，则使用高达20％的乙腈水溶液。将样品超声处理约20分钟，然后在1900g下离心20分钟，弃去沉淀物。将可溶性进一步稀释，使用乙腈稀释成5和10mg/mL，即为待测物质备用。

[0074] (2.2)孵育20min±5min后，利用薄层色谱法定性分析，取待测物质2μL 点样至TLC板，层析缸加入0.8％甲醇的氯仿溶液，展开，在紫外光波长366nm 检查TLC板是否有DCYA的黄色荧光点，计算得到Rf＝0.33(犬蔷薇花瓣提取物)和Rf＝0.32(金盏花花瓣提取物)，说明两种待测物质均与DCYA反应。

[0075] (2.3)使用SiliaBond马来酰亚胺(30mg)过滤，除去未反应的DCYA，获得混悬液室温涡旋1小时。在离心机14000rpm离心10分钟，取上清液，用乙腈(CAN)稀释至终体积1mL。

[0076] (2.4)将200μL稀释液转移至96孔板，三个复孔，在多功能微孔板检测系统，23℃下以发射波长520nm(激发λ350nm，截止420nm)读数。

[0077] (2.5)通过以下公式计算总反应指数(Reactivity index，RI)

[0078] $$RI\ (\%) = 100 \times \left(1 - \frac{BI-R}{PC-NC} - \frac{PC-BI}{PC}\right)$$

[0079] 式中代表：RI：总反应指数；BI：空白对照；PC：阳性对照；NC：阴性对照； R：待测物质。

[0080] (2.6)计算结果

[0081]

组别	浓度	荧光值	RI（%）
PC	--	39879720	101.14
NC	--	12210634	1.14
BI	--	38847036	97.41
犬蔷薇花瓣提取物	5 mg/mL	13646812	6.33
	10 mg/mL	17184156	19.12
	20 mg/mL	16597836	17.00
金盏花花瓣提取物	5 mg/mL	18386788	23.46
	10 mg/mL	20303758	30.39
	20 mg/mL	21361110	34.21

[0082] (三)皮肤致敏性预测结果如下表3中所示。

[0083] 表3犬蔷薇花和金盏花植物提取物皮肤致敏性测试结果

[0084]

浓度	犬蔷薇花瓣提取物	预测模型	金盏花花瓣提取物	预测模型
5 mg/mL	6.33	轻致敏性	23.46	中致敏性
10 mg/mL	19.12	轻致敏性	30.39	中致敏性
20 mg/mL	17.00	轻致敏性	34.21	中致敏性

[0085] 实施例2 10种香精成分的皮肤致敏性测试

[0086] (一)、荧光化学反应系统的制备同实施例1,可交由吉尔生化(上海)有限公司定制,纯度:〉90%。

[0087] (二)致敏原筛选试验

[0088] (2.1)建立待测组、阴性对照、阳性对照和空白对照各实验组同实施例1。

[0089] 其中待测物质如下表4中所示,具体配制过程为:精确称取样品,溶解于乙腈,配制浓度为5mg/mL备用。

[0090] 表4为10种香精成分列表

[0091]

序号	英文名称	中文名称	CAS no.
1	Amyl cinnamyl alcohol	戊基肉桂醇	101-85-9
2	Benzyl salicylate	水杨酸苄酯	118-58-1

[0092]

3	Coumarin	香豆素	91-64-5
4	Isoeugenol (cis/trans)	异丁香酚（顺式/反式）	97-54-1
5	Anisyl alcohol	茴香醇	105-13-5
6	Methyl 2-octynoate	2-辛酸甲酯	111-12-6
7	Benzyl cinnamate	苄基肉桂酸酯	103-41-3
8	(±)-Hydroxycitronellal	（±）- 羟基香茅醛	107-75-5
9	Cinnamyl alcohol	肉桂醇	104-55-2
10	(±)-α-Isomethyl ionone	（±）-α-异甲基紫罗兰酮	127-51-5

[0093] (2.2)孵育20min±5min后,利用薄层色谱法定性分析,取待测物质2μL 点样至TLC板,层析缸加入0.8%甲醇的氯仿溶液,展开,在紫外光波长366nm 检查TLC板是否有DCYA的黄色荧光点,计算得到Rf值,10种均与DCYA发生反应。

[0094]

序号	英文名称	中文名称	Rf值
1	Amyl cinnamyl alcohol	戊基肉桂醇	0.32
2	Benzyl salicylate	水杨酸苄酯	0.34
3	Coumarin	香豆素	0.32
4	Isoeugenol(cis/trans)	异丁香酚(顺式/反式)	0.34

5	Anisyl alcohol	茴香醇	0.34
6	Methyl 2-octynoate	2-辛酸甲酯	0.33
7	Benzyl cinnamate	苄基肉桂酸酯	0.32
8	(±)-Hydroxycitronellal	(±)-羟基香茅醛	0.34
9	Cinnamyl alcohol	肉桂醇	0.33
10	(±)-α-Isomethyl ionone	(±)-α-异甲基紫罗兰酮	0.32

[0095] (2.3)使用SiliaBond马来酰亚胺(30mg)过滤,除去未反应的DCYA,获得混悬液室温涡旋1小时。在离心机14000rpm离心10分钟,取上清液,用乙腈(CAN)稀释至终体积1mL。

[0096] (2.4)将200μL稀释液转移至96孔板,三个复孔,在多功能微孔板检测系统,23℃下以发射波长520nm(激发λ350nm,截止420nm)读数。

[0097] (2.5)通过以下公式计算总反应指数(Reactivity index,RI)

[0098] $$RI\ (\%) = 100 \times \left(1 - \frac{BI-R}{PC-NC} - \frac{PC-BI}{PC}\right)$$

[0099] 式中代表:RI:总反应指数;BI:空白对照;PC:阳性对照;NC:阴性对照; R:待测物质。

[0100] (2.6)计算结果

[0101]

组别	浓度	荧光值	RI(%)
PC	--	39760184	100.71
NC	--	11972762	0.28
BI	--	38590192	96.48
戊基肉桂醇	5mg/mL	12646812	2.72
水杨酸苄酯	5mg/mL	12485753	2.14
香豆素	5mg/mL	13329286	5.19
异丁香酚(顺式/反式)	5mg/mL	15486396	12.98
茴香醇	5mg/mL	12602657	2.56
2-辛酸甲酯	5mg/mL	27519124	56.47
苄基肉桂酸酯	5mg/mL	13505196	5.82
(±)-羟基香茅醛	5mg/mL	14063108	7.84
肉桂醇	5mg/mL	12711527	2.95
(±)-α-异甲基紫罗兰酮	5mg/mL	12160240	0.96

[0102] (三)皮肤致敏性预测结果如下表5中所示。

[0103] 表5为10种香精成分致敏性预测结果

[0104]

序号	英文名称	中文名称	RI（%）	预测模型
1	Amyl cinnamyl alcohol	戊基肉桂醇	2.72	无致敏性
2	Benzyl salicylate	水杨酸苄酯	2.14	无致敏性
3	Coumarin	香豆素	5.19	轻致敏性
4	Isoeugenol (cis/trans)	异丁香酚（顺式/反式）	12.98	轻致敏性
5	Anisyl alcohol	茴香醇	2.56	无致敏性

[0105]

6	Methyl 2-octynoate	2-辛酸甲酯	56.47	中致敏性
7	Benzyl cinnamate	苄基肉桂酸酯	5.82	轻致敏性
8	(±)-Hydroxycitronellal	（±） - 羟基香茅醛	7.84	轻致敏性
9	Cinnamyl alcohol	肉桂醇	2.95	无致敏性
10	(±)-α-Isomethyl ionone	（±）-α-异甲基紫罗兰酮	0.96	无致敏性

[0106] 实施例3三种品牌的水包油型防晒霜皮肤致敏性测试

[0107] (一)、荧光化学反应系统的制备同实施例1，可交由吉尔生化(上海)有限公司定制，纯度:〉90％。

[0108] (二)致敏原筛选试验

[0109] (2.1)建立待测组、阴性对照、阳性对照和空白对照各实验组同实施例1。

[0110] 其中待测物质的具体配制过程为:精确称取样品(品牌A防晒霜、品牌B 防晒霜、品牌C防晒霜)，溶解于乙腈，配制浓度为1mg/mL、5mg/mL、25mg/mL。

[0111] (2.2)孵育20min±5min后，利用薄层色谱法定性分析，取待测物质2μL 点样至TLC板，层析缸加入0.8％甲醇的氯仿溶液，展开，在紫外光波长366nm 检查TLC板是否有DCYA的黄色荧光点，计算得到Rf值，说明3种待测物质均与DCYA反应。

[0112]

序号	物质名称	Rf值
1	品牌A防晒霜	0.34
2	品牌B防晒霜	0.32
3	品牌C防晒霜	0.34

[0113] (2.3)使用SiliaBond马来酰亚胺(30mg)过滤，除去未反应的DCYA，获得混悬液室温涡旋1小时。在离心机14000rpm离心10分钟，取上清液，用乙腈(CAN)稀释至终体积1mL。

[0114] (2.4)将200μL稀释液转移至96孔板，三个复孔，在多功能微孔板检测系统，23℃下以发射波长520nm(激发λ350nm，截止420nm)读数。

[0115] (2.5)通过以下公式计算总反应指数(Reactivity index，RI)

[0116] $$RI\ (\%) = 100 \times \left(1 - \frac{BI-R}{PC-NC} - \frac{PC-BI}{PC}\right)$$

[0117] 式中代表:RI:总反应指数;BI:空白对照;PC:阳性对照;NC:阴性对照; R:待测物质。

[0118] (2.6)计算结果

[0119]

组别	浓度	荧光值	RI（%）
PC	--	39537919	99.91
NC	--	12187064	1.06
BI	--	38857505	97.45
品牌A防晒霜	1mg/mL	20173760	29.92
	5mg/mL	21815580	35.86
	25 mg/mL	22282170	37.54
品牌B防晒霜	1mg/mL	12922766	3.72
	5mg/mL	13083680	4.30
	25 mg/mL	13257388	4.93
品牌C防晒霜	1mg/mL	14670240	10.03
	5mg/mL	15127994	11.69
	25 mg/mL	17116753	18.87

[0120] (三)皮肤致敏性预测结果如下表6中所示。

[0121] 表6为三种品牌的水包油型防晒霜皮肤致敏性测试结果

[0122]

浓度 \ RI(%)	品牌A防晒霜	预测模型	品牌B防晒霜	预测模型	品牌C防晒霜	预测模型
1mg/mL	29.92	中致敏性	3.72	无致敏性	10.03	轻致敏性
5mg/mL	35.86	中致敏性	4.30	无致敏性	11.69	轻致敏性
25 mg/mL	37.54	中致敏性	4.93	无致敏性	18.87	轻致敏性

[0123] 上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围。本发明虽然仅列举了部分化妆品原料及产品、植物提取物为皮肤致敏的样品。但本发明中提到的其他非单一成分体系，如个人护理产品(洗发香波、护发素、染发剂、护肤类、防晒类、粉底、BB霜、CC霜、眼影、唇彩、油、沐浴乳、身体乳等)、家用洗涤产品(洗衣液、洗衣粉、肥皂、洗洁精、漂白剂、消毒液、柔顺剂等)、防腐剂、药品、植物提取物(粗提取物、精提取物及其混合物)、医疗器械及其浸提物、生物材料、环境污染物，以及其它皮肤接触产品(衣服、内衣等纺织品浸提物)等也可以用本发明所述方法进行皮肤致敏检测。此处不再一一列举。

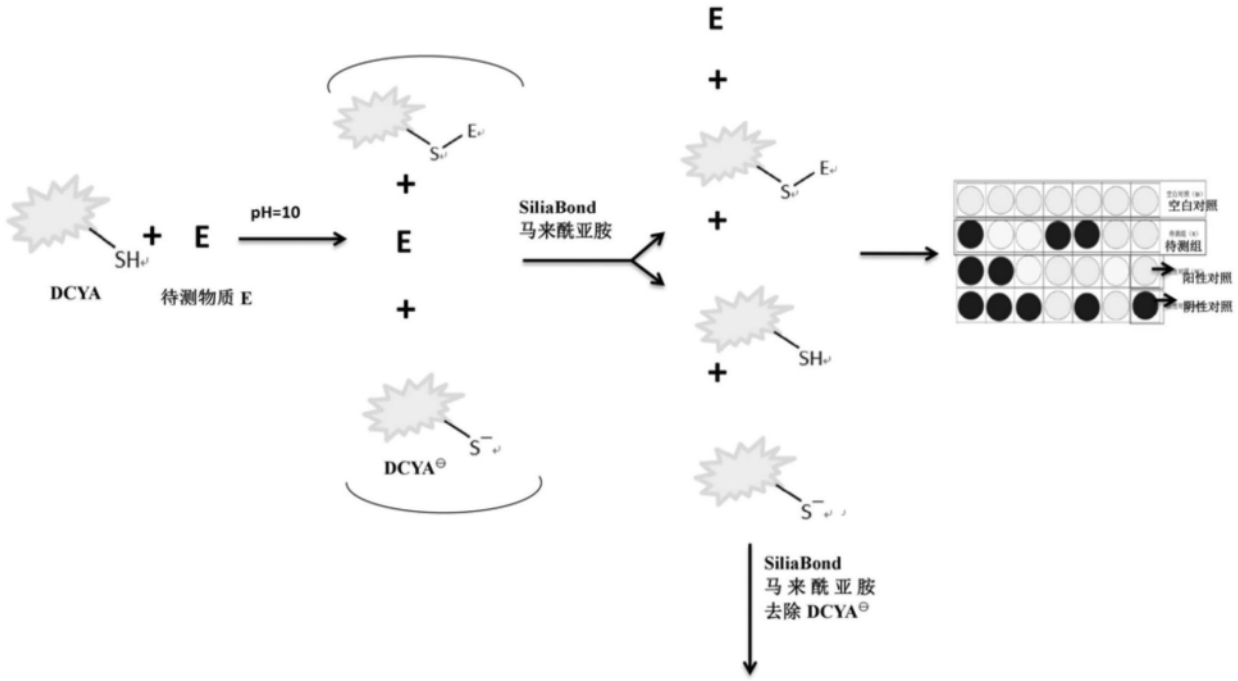

DCYA
待测物质 E
pH=10
SiliaBond
马来酰亚胺
DCYA⊖
空白对照
待测组
阳性对照
阴性对照
SiliaBond
马来酰亚胺
去除 DCYA⊖

图1