

无动物参与的皮肤致敏试验方法

ADRA试剂盒



ADRA (Amino acid Derivative Reactivity Assay, 氨基酸衍生物反应法) 是使用了两种氨基酸衍生物 **NAC** (N-(2-(1-naphthyl) acetyl)-L-cysteine) 和 **NAL** (α -N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine) 的**化学品皮肤致敏试验方法**。ADRA 试验无动物参与, 是动物皮肤致敏试验的替代方法, 该方法现已收录于**经济合作与发展组织化学品 TG442C 测试准则(OECD TG442C)**。

Quality of NAC and NAL

11. The Nucleophilic Reagents can be obtained as an ADRA Kit for Skin Sensitisation Test, from FUJIFILM Wako (FFWK) Pure Chemical Corporation, Catalog No. 296-80901.

* 已收录于 OECD TG442C 的 ADRA 试剂盒

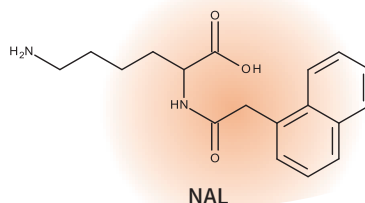
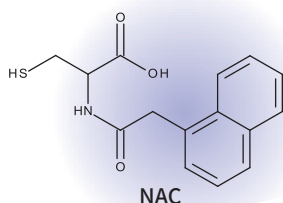
原理

皮肤致敏是由致敏物质与蛋白结合形成复合物(KE1)开始的, 该复合物通过致敏物质与蛋白中的半胱氨酸的巯基或赖氨酸的氨基的共价结合所得。ADRA 试验利用 NAC(半胱氨酸衍生物)和 NAL(赖氨酸衍生物)替代蛋白, 通过 NAC、NAL 和待测物质的反应来预测待测物质与蛋白的结合性。

ADRA 试验通过将 NAC、NAL 溶液与待测物溶液混合, 在 25°C 下反应 24 h, 然后用 HPLC 法对反应溶液中残留的 NAC 和 NAL 的浓度进行定量, 从而对待测物质的皮肤致敏性进行评估。

使用方法

用水将预混合缓冲液溶解, 再将 NAC 和 NAL 溶于其中, 然后在 96 孔板与待测物反应 24 h 后, 即可通过 HPLC 进行分析。



优点

- **灵敏度高**: 在相对长的波长下(281 nm)检测, 可防止待测样品和亲核试剂的共洗脱。
- **沉淀少**: ADRA 试验所需反应物的浓度仅为 DPRA 法的 1%, 可避免沉淀的产生。
- **重复性好**: 在 HPLC 分析前, 通过添加终止液(2.5% TFA)来停止反应, 因此检测的可重复性好。
- **高通量**: ADRA 试验使用 96 孔板和多通道移液器, 可在短时间内测定多个样品。

试剂盒组成



试剂名称	规格	包装
NAC	10 mL用	2瓶
NAL	10 mL用	2瓶
NAC Buffer(pH 8.0) (premixed)	300 mL用	2瓶
NAL Buffer (pH 10.2) (premixed)	300 mL用	2瓶
0.01 mol/L EDTA Solution	1 mL	2瓶

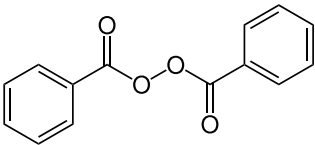




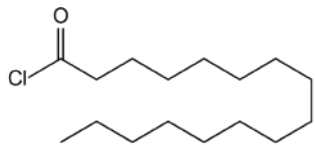




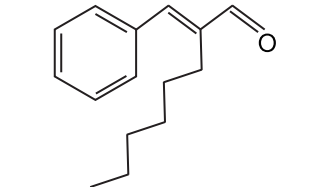




产品名称: ADRA 试剂盒
产品编号: 296-80901

* 预混缓冲液、NAC 和 NAL 都已经按照反应所需的量分装好, 只需进行溶解即可用于 ADRA 试验。

ADRA 试验与 DPRA 试验的对比

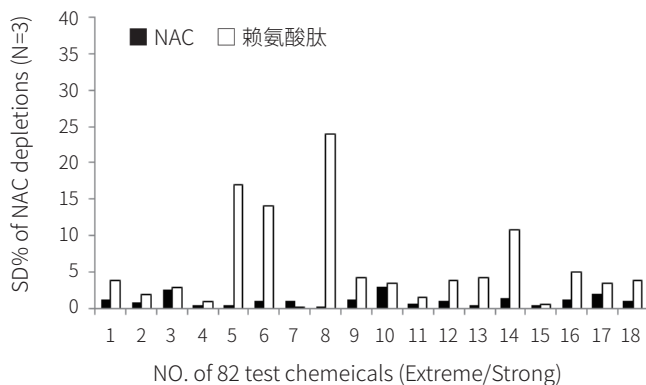
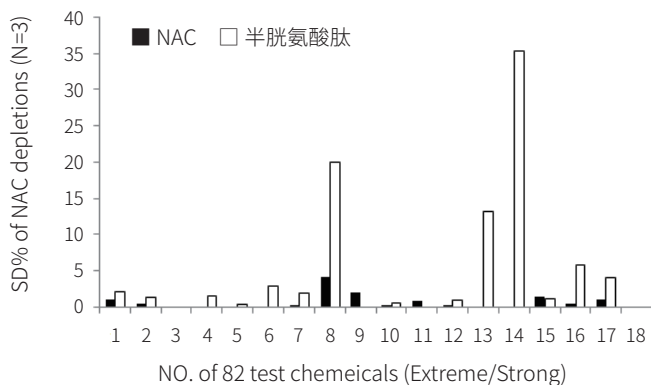
溶解性能对比 [1]

因 ADRA 试验所需待测物浓度仅为 DPRA 试验的 1/100, 因此待测物不易产生沉淀。

待测物质	待测物结构	DPRA 试验			ADRA 试验		
		溶剂	半胱氨酸肽	赖氨酸肽	溶剂	NAC	NAL
二苯基环丙烯酮 Diphenylcyclopropenone		乙腈			乙腈		
棕榈酰氯 Palmitoyl chloride		乙腈			乙腈		
α-己基肉桂醛 α-Hexylcinnamaldehyde		乙腈			乙腈		

数据稳定性对比 [2]

ADRA 试验更稳定。Gerberick (2010) 等人对 82 种物质进行了 ADRA 和 DPRA 试验, 发现 ADRA 试验的待测物质消耗标准差比 DPRA 试验的要小。



ADRA 试验与 DPRA 试验的底物消耗标准差比较 (黑色柱为 ADRA 试验的底物, 白色柱为 DPRA 试验底物)

再现性对比 [3]

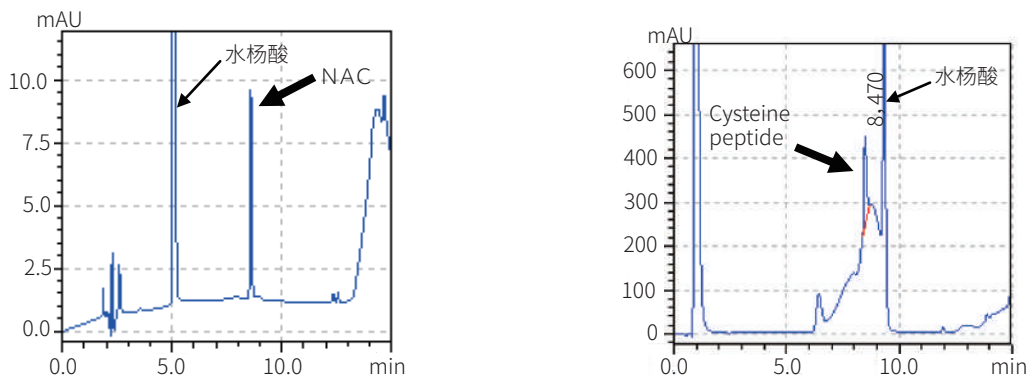
ADRA 试验比 DPRA 试验有着更好的再现性。

方法	同一实验室再现性	实验室间再现性
ADRA	97.30%	91.30%
DPRA	86.7% (84.6%)	75% (81.8%)

ADRA试验与DPRA试验的对比

共洗脱现象对比 [4]

ADRA 试验受共洗脱的影响较小, 出现待测物与底物峰重叠的可能性较小。



左右图分别为水杨酸的 ADRA、DPRA 试验, 左图中水杨酸峰与底物 NAC 峰能够分开, 而右图中与底物半胱氨酸多肽峰发生了重叠。

预测结果对比 [5]

因 ADRA 法检测原理与 DPRA 法相同, 因此两者在预测结果的准确度上相近。

待测物	CAS No.	LLNA (EC3)	ADRA预测结果	DPRA预测结果
过氧化二苯甲酰 Benzoyl Peroxide	94-36-0	0.004	S	S
柠檬醛 Citral	5392-40-5	13	S	S
香豆素 Coumarin	91-64-5	NC	NS	NS
丁香油酚 Eugenol	97-53-0	12.9	S	S
金合欢醇 Farnesol	4602-84-0	28	S	NS
对苯二酚 Hydroquinone	123-31-9	0.1	S	S
丙烯酸羟乙酯 2-Hydroxyethyl acrylate	818-61-1	1.4	S	S
2-巯基苯并噻唑 Mercaptobenzothiazole	149-30-4	1.7	S	S
5-甲基-2,3-己烷二酮 Methyl-2,3-hexanedione	13706-86-0	26	S	S
米吐尔 Metol	55-55-0	0.8	S	S

*表格中粉色标记表示该化合物的预测结果为致敏物(S), 蓝色标记表示预测结果为非致敏物(NS)。

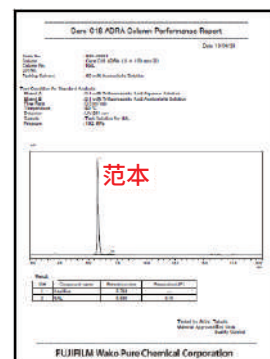
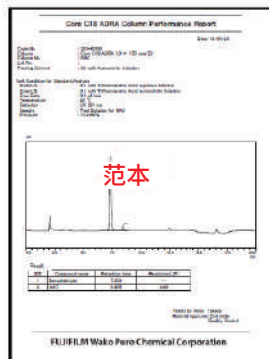
参考文献

- [1] Yamamoto Y et al. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2019;100:106624.
- [2] Fujita M et al. *J Appl Toxicol*. 2019;39(11):1492-1505.
- [3] Fujita M et al. *J Appl Toxicol*. 2019;39(2):191-208.
- [4] Fujita M et al. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2019;96:95-105.
- [5] Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) JaCVAM Validation Study Report Appendix 5.

相关产品

ADRA 专用色谱柱 Wakopak® Core C18 ADRA

ADRA 专用色谱柱 Wakopak® Core C18 ADRA 使用了粒径为 2.6 μm 的核壳型填料, 适用于 ADRA 试验。每支色谱柱附有性能报告, 可放心用于 ADRA 试验。



产品编号	产品名称	包装
233-63991	Wakopak® Core C18 ADRA φ3.0mm × 150mm ADRA 专用色谱柱 Wakopak® Core C18 ADRA	1 EA

其他需要用到的试剂

产品编号	产品名称	包装
204-02743	Trifluoroacetic Acid 三氟乙酸	25 mL
015-08633	Acetonitrile 乙腈	3 L
217-01031	Ultrapure Water 超纯水*	1 L
016-00346	Acetone 丙酮**	500 mL
043-07216	Dimethyl Sulfoxide 二甲基亚砜**	500 mL

* 请使用蒸馏水或更高级别的水 (ADRA 试验需要使用金属含量低的水。)

** 请勿在被测物质溶于水或乙腈时使用。

※需要用苯乙醛 (CAS RN® 122-78-1) 作为阳性对照化合物。

其他需要用到的实验器材

- 96 孔板
- 500 mL PE 瓶
- 试管混合器
- 微孔板振荡器
- 微孔板离心机
- 微孔板封板膜: 具有高密封性和耐溶剂性的封板膜
- 电子天平: 精确到 0.1 mg
- 恒温箱: 可设定温度为 25°C
- 12 道移液器: 量程为 50~150 μL
- 微量移液枪: 量程为 2~10 μL、10~100 μL 和 100~1000 μL 的 3 种移液枪
- HPLC 系统: 配套 96 孔用遮光自动进样器, 以 0.3 mL/min 流速进样
- UV 检测器: 二极管阵列检测器 (PDA 检测器) 或吸光度检测器 (281 nm)
- pH 计: 精确到 ±0.01, 并配套校准用缓冲液

※ADRA 中用到的所有容器或器具 (HPLC 组件除外), 要求使用 PP 或 PE 制的一次性用品。金属离子的混入会使 NAC 二聚化从而导致无法正确进行评估。

上述试剂仅供实验研究用, 不可用作“医药品”、“食品”、“临床诊断”等。

Listed products are intended for laboratory research use only, and not to be used for drug, food or human use. / Please visit our online catalog to search for other products from FUJIFILM Wako: <https://labchem-wako.fujifilm.com/> / This leaflet may contain products that cannot be exported to your country due to regulations. / Bulk quote requests for some products are welcomed. Please contact us.

富士胶片和光(广州)贸易有限公司

广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼
3002-3003室

北京 Tel: 010 64136388/13611333218

上海 Tel: 021 62884751

广州 Tel: 020 87326381

香港 Tel: 852 27999019

询价: wkgz.info@fujifilm.com

官网: labchem.fujifilm-wako.com.cn

官方微信



目录价查询

