**化妆品用化学原料皮肤腐蚀性大鼠经皮电阻试验方法**

**（征求意见稿）**

**一、范围**

本方法规定了大鼠经皮电阻试验的范围、规范性引用文件、术语和定义、试验原理、试验材料与试剂、试验步骤、结果判定标准。

本方法适用于化妆品用化学原料潜在皮肤腐蚀性的检测。

**二、规范性引用文件**

下列文件中的条款通过本方法的引用而成为本方法的条款。注明日期的引用文件，其后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本方法，但是，鼓励使用单位对修订部分的引用进行研究，并提出意见。研究是否可使用这些文件的最新版本。

经济合作与发展组织（OECD）guidelines for the testing of chemicals: *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test NO. 430 (23 Nov 2004)

美国替代方案确效跨部门协调委员会（ICCVAM）*In Vitro* Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Tests for Skin Corrosion (May 2004)

**三、术语和定义**

下列术语和定义适用于本方法。

（一）大鼠经皮电阻值（Transcutaneous Electrical Resistance value, TER value）

大鼠皮肤屏障产生的可测量的电阻值，通常为稳定数值，单位kΩ。

（二）皮肤腐蚀性

皮肤接触到受试物后局部引起的不可逆性组织损伤。

**四、试验原理**

皮肤表面的角质层可起到保护皮肤屏障的作用，产生稳定的电阻值。当腐蚀性化学物作用于离体皮肤时，会破坏皮肤屏障作用，增加皮肤离子通透性，使电阻值降低。通过惠斯通电桥的装置，可检测离体皮肤经皮电阻值的改变，从而判断受试物是否具有皮肤腐蚀性。

**五、试验材料与试剂**

（一）受试物的配制

液体受试物可直接使用原液或原膏。若受试物为固体，应将其研磨成细粉状，均匀洒在皮片表皮面，并用150μL双蒸水充分湿润，以保证受试物与皮肤有良好的接触。

本方法不适用于气雾型受试物的检测。

每次实验应设阴性对照（去离子水）和阳性对照（10M HCl）。

（二）溶液的配制

1．154mmol/L硫酸镁溶液

称取18.54g无水硫酸镁，溶至1000mL去离子水中。室温静置备用。

2．30%（w/v）SDS水溶液

称取150g十二烷基硫酸钠，溶至500mL双蒸水中，溶解时可加热搅拌。溶解过程中会产生气泡，需提前配置，室温静置备用。

3.10%（w/v）SRB水溶液

称取1g罗丹明B，溶至10mL 30% SDS水溶液中。室温静置备用。

**六、 试验步骤**

（一） 实验动物和饲养环境

来源可靠或清晰的28-30日龄大鼠（可选择Wistar、SD或其他近交系大鼠）。雌雄不限，建议使用单一性别。大鼠的年龄和种属选择相关联，皮肤来源要求为处于成年毛发生长前的毛囊休眠期的大鼠。本方法列出的鼠龄为Wistar或SD大鼠的鼠龄。

每只大鼠可产生6－8块皮片，每个受试物至少需要使用3块皮片。如要澄清某些可疑的反应则需增加皮片的数目。

实验动物及实验动物房应符合国家相应规定。

（二） 大鼠经皮电阻试验步骤

1. 取约22日龄的大鼠，将其背部脊柱两侧毛剃净，不可损伤表皮，去毛范围尽量大，用抗生素液（浓度可有效抑制微生物生长即可）小心擦拭去毛区域。饲养3－4日后，再次用抗生素液体擦拭大鼠背部去毛区域，擦拭后3天内处死取皮肤。

2. 大鼠于28－30日内以安乐死方式处死，剪下整个背部去毛区域的皮肤，小心剔除皮下脂肪，表面向内用O型橡胶圈固定于聚四氟乙烯管（内径约10mm,外径约16mm）的一端，沿边缘剪下多余的皮肤，制成直径约20mm的小皮片。每只大鼠的背部皮肤可制成约6－8块小皮片。

3. 聚四氟乙烯管内加入1ml 154mmol/L硫酸镁溶液，将整个聚四氟乙烯管泡入装有154mmol/L硫酸镁溶液的容器中，在聚四氟乙烯管内外插入电极。用惠斯通电桥装置测试大鼠皮片的电阻值（TER值）。初始TER大于20kΩ的皮片可用，否则弃用皮片。筛选皮片后，去除管内的硫酸镁溶液，并以棉签轻轻擦干皮片表面。

4. 液体受试物150μL直接加入管内皮片的表皮面，固体受试物先研成细粉，取适量（约150mg）加入管内皮片表皮面并确保完全覆盖于表皮面上，然后加入150μL去离子水,轻轻晃动聚四氟乙烯管使之混合。每个样品设3个平行样，同时设阴性对照（去离子水）和阳性对照（10M HCl）。加样的皮片室温（20-23℃）恒湿静置24h后以流水轻柔地冲洗皮片以去除受试物，用洗瓶向皮片表面滴加约1ml体积分数为70％的乙醇，边滴边轻轻摇动聚四氟乙烯管，5s后去除乙醇，再以流水清洗。遇到难以冲洗去除的物质，可重复几次，或用棉签轻轻粘取皮片表面残留受试物，注意不可损伤皮片。最后加入1mL硫酸镁溶液（154mmol／L），接上电极测定TER值。测过TER值后，去除管中的硫酸镁溶液，肉眼检查并纪录皮片的损伤情况。

（三） 罗丹明B染色

1. 当受试物TER值≤15kΩ且肉眼观察皮肤无损伤，或3个平行样的TER值在15kΩ上下浮动的，或任何有可疑的情况，需进行罗丹明B染色进行进一步确认。如TER值≤15kΩ，且3个平行样中有肉眼可见损伤的皮片，剩下的保存完好的皮片仍需进行罗丹明B染色。阳性对照和阴性对照均需进行罗丹明B染色。

2. 向聚四氟乙烯管内皮片上表皮面滴加150μL 10％（w/v）的罗丹明B（SRB）溶液，室温放置2h，以自来水冲洗皮片10s去除多余的SRB，小心的从管上取下皮片，放入含8mL左右去离子水的容器中轻柔震荡5min，换干净的去离子水重复清洗1次，将皮片转移至5mL 30％的SDS溶液中，60℃水浴提取过夜，去除皮片，剩余提取液以1900rpm离心8min，取上清液1mL加30％ SDS溶液至5ml，测吸光值（λ＝565nm）。另做标准曲线（SRB-30% SDS溶液浓度梯度曲线），根据标准曲线计算每个皮片吸收的SRB的量（吸收量单位μg/disc，μg/皮片）。

**七、结果评判标准**

当TER值大于15kΩ时，受试物无腐蚀性（NC）；当TER值小于5kΩ同时肉眼观察皮片有损伤时，受试物有腐蚀性（C）；当TER值小于5kΩ且肉眼观察皮片无损伤，或TER值介于5～15kΩ之间，或3个平行样的TER值上下波动，或有其他任何可疑现象时，均需进行罗丹明B染色，进行进一步确认。罗丹明B染色后，当受试物染料吸收量小于阳性对照时，受试物无腐蚀性（NC），染料吸收量大于等于阳性对照时，受试物有腐蚀性（C）。如结果无法判定，可重复试验或使用其他方法澄清可疑结果。阴性对照及阳性对照的结果应满足如下范围：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **组别** | **TER值（kΩ）** | **SRB吸收量（μg/disc）** |
| 阳性对照：10M HCl | 0.5-1.0 | 40-100 |
| 阴性对照：蒸馏水 | 10-25 | 15-35 |

**《化妆品用化学原料皮肤腐蚀性大鼠经皮电阻试验方法》**

**编制说明**

## 一、编制原则

本方法由国家食品药品监督管理总局提出，由中国食品药品检定研究院食品化妆品检定所承担并完成编制。

本方法的编制本着客观、易行、针对性强等原则。经过包括拟定课题研究内容、研发检测大鼠经皮电阻值的仪器设备、建立皮肤腐蚀性大鼠经皮电阻试验方法并优化实验条件、对试验方法进行实验室内验证、与我国现行的整体动物试验方法比较、征求专家意见、修改完善技术方法和完成草案稿起草及修改等过程完成编制工作。

## 二、与国内有关现行法律、法规和强制性国家标准的关系

伴随经济的持续高速发展，我国化妆品市场发展异常迅猛，市场销售量以超过两位百分数的速度递增。为确保化妆品的安全性，我国相关卫生法律法规都要求对这些化妆品成品及其原料进行皮肤刺激性/腐蚀性评价。目前，我国检测化妆品皮肤刺激性/腐蚀性的主要依据《化妆品安全技术规范》中动物皮肤刺激性/腐蚀性试验，以此外推对人体健康的可能危害，尚无体外替代试验标准，本研究的主要内容是建立皮肤腐蚀性离体替代试验方法，与《化妆品安全技术规范》内容不冲突，技术方法上形成互补，以期与有关国际条约尽快接轨，为推进我国体外试验工作的开展，建立我国自己的动物体外替代方法体系，促进我国未来的化妆品贸易提供技术支持与保证。

## 三、采用国外标准的程度以及与国外同类标准水平的比较

随着经济的持续高速发展、社会进步、动物福利、动物保护运动的兴起和“3R”原则的提出，近年来对于如何减少、优化、替代动物试验成为全世界特别关注的焦点。1998年，欧盟替代方法验证中心（ECVAM）对该方法进行了验证并批准其作为化学物质皮肤腐蚀性的替代方法之一。2002年，美国替代方法跨部门验证协调合作委员会（ICCVAM）对该方法进行了评估并将此方法作为化学品皮肤腐蚀性检测替代方法。2004年经济合作和发展组织（OECD）正式发布皮肤腐蚀性体外试验方法大鼠经皮电阻操作指南，将其用于化学物质皮肤腐蚀性的安全性评价，之后于2013年和2015年两次修订该方法的操作指南，现行的指南标准为2015年版。

本方法不仅涵盖了OECD 2004年正式发布“皮肤腐蚀性体外试验方法大鼠经皮电阻操作指南”（OECD guidelines for the testing of chemicals: In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER). NO. 430）的要求，而且结合我国实验室特点，对实验操作中的重要质量控制条件进行了确认。本方法草案体现皮肤腐蚀性体外试验的试验思路，贴近国内实验室实际情况，更具可操作性。

## 四、方法的制修订与起草原则

## 1. 与国际接轨的原则。

试验的要求和规定逐步与国际接轨，对于已经比较成熟的、被多数国家和组织认可的方法，原则上予以接受。

## 2. 结合国情的原则。

根据我国化妆品管理政策、要求和试验承担单位的水平以及化妆品原料的特点，对某些内容进行具体化和明确化，在尽量提高可操作性的同时，充分考虑了更好地发挥各试验承担单位的主观能动性，并从长远发展的观点出发，兼顾了技术发展的前瞻性。

## 3. 科学、合理、协调和有效性原则。

本方法编制过程中，同时注重了科学性、合理性、协调性和有效性，以及通俗性和规范性之间的关系。

## 五、确定各项技术内容

包括技术指标、参数、公式、试验方法、检验规则等在内的各项技术内容的依据来源自OECD Guidelines for Testing of Chemicals (No.430，2004)（OECD《化学品测试指南》430号，2004年）和美国ICCVAM的体外皮肤腐蚀性经皮电阻试验方法（2004年），基本涵盖了OECD TG 430对采用对象、实验操作和结果分析的技术要求。在此基础上，本标准还结合我国实验室检测的特点，对实验操作中的某些条款和判定标准进行了确认。

## 六、实验室内比对和实验室间预验证情况

在本方法草案建立过程中，编制方进行了两次实验室内比对。2014年7月邀请北京市药检所、浙江省食品药品检定研究院和中国检验检疫科学研究院3家实验室参与实验室间验证，3家验证机构对于提供的14种样品（7种为腐蚀阳性，7种为腐蚀阴性）的检测结果，除丁子香酚和异丙醇结果判定出现假阳性外，其余受试物检测结果均一致。2014年11月邀请广东省CDC参与实验室间不同仪器结果的比对，广东省CDC对于方法中的7种样品（4种为腐蚀阳性，3种为腐蚀阴性），检测结果均一致。

## 七、重大分歧意见及处理经过

无。

## 八、其他应予说明的事项

## 1. 本方法的判定原则

本方法适用于化妆品原料进行体外皮肤腐蚀性测试，测试结果的特异性、再现性和稳定性良好，可有效替代动物实验。

与OECD标准判定描述相比，OECD将TER值大于5kΩ且肉眼观察皮片无损伤的物质均判定为非腐蚀性物质，而实际我们试验的结果中，很多已知腐蚀性阳性的参考物质，检测其TER结果均超过5kΩ且肉眼观察皮片无损伤。因此，我们在设计试验方案时，设定了5种判定调整方案，具体描述如下：

标准方案S：完全按OECD TG430的判定程序，TER>5kΩ为非腐蚀性（NC）；对于TER≤5kΩ且肉眼观察皮片有明显损伤判为腐蚀性（C）；TER≤5kΩ且肉眼观察皮片没有明显损伤的进行染料渗透量测定；染料渗透量大于或等于10M盐酸的为C，染料渗透量小于10M盐酸的为NC。

调整方案A：程序同方案S，而判定界值改为15kΩ。

调整方案B：TER>15kΩ判定为NC，TER<5kΩ且肉眼观察皮片有明显损伤判定为C；TER为5-15kΩ或3个平行样的TER值在界值上下波动的或肉眼可见皮片明显破损、变色、变硬的情况，均为可疑情况，进行染料渗透量测定，染料渗透量大于或等于10M盐酸的为C，染料渗透量小于10M盐酸的为NC。

调整方案C：程序同方案S，而染料渗透量判定标准为8M盐酸。

调整方案D：程序同方案A，而染料渗透量判定标准为8M盐酸。

调整方案E：程序同方案B，而染料渗透量判定标准为8M盐酸。

通过对各判定方案进行真实性指标分析表明，几种方案的判定结果经过配对χ2检验与这18种化学物质实际对人体皮肤的参考腐蚀性结果相比，均无统计学差异（P>0.05），其中以E方案的效能最高（结果见表1）。

表1 各判定方案对大鼠经皮电阻试验结果判定的真实性指标分析

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **方案** | **真实性指标** | | | | |
| 假阳性率 | 假阴性率 | 敏感度 | 特异度 | 配对卡方检验 |
| **S** | 0  （0/9） | 70%  （7/10） | 30% | 100% | P=0.20 |
| **A** | 11%  （1/9） | 60%  （6/10） | 40% | 89% | P=0.34 |
| **B** | 11%  （1/9） | 20%  （2/10） | 80% | 89% | P=0.80 |
| **C** | 0  （0/9） | 50%  （5/10） | 50% | 100% | P=0.50 |
| **D** | 11%  （1/9） | 10%  （1/10） | 90% | 89% | P=0.86 |
| **E** | 11%  （1/9） | 0  （0/10） | 100% | 89% | P=0.91 |

注：受试物列表见附录A，受试物共18种，其中阳性参考物HCl检测了2个浓度，共19个结果。

以方案E为判定标准进行试验效能研究结果显示：对18种受试物共19个结果的判定中，大鼠经皮电阻试验可将8种已知皮肤腐蚀性阴性物质、9种（HCl为2个测试浓度）已知皮肤腐蚀性阳性物质正确判定，仅将1种腐蚀性阴性物质（异丙醇）判定为腐蚀性阳性。其灵敏度（TPR）为100%，特异度（Spe）为89%，阳性预测价值（PV＋）为0.9，阴性预测价值（PV－）为1。Pearson χ2检验，表明大鼠经皮电阻试验对所检验的参考受试物与其真实的参考腐蚀性结果具有高度相关性（见表2）。

表2 化学物质TER值测试结果统计学分析

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 参考腐蚀性 | TER试验（方案E） | | 合计 |
| + | - |
| + | 10 | 0 | 10 |
| - | 1 | 8 | 9 |
| 合 计 | 11 | 8 | 19 |
| 注：经校正χ2检验（p>0.05），TER方法结果无显著性差异。  灵敏度（真阳性率，TPR）＝10/10=100%, 特异度(Spe)＝8/9=89%  阳性预测价值（PV＋）=10/11=0.9，阴性预测价值（PV－）=8/8=1  假阳性率（FPR）＝1-Spe＝11％，阳性似然比（LR＋）＝TPR/FPR＝9.09，  Youden指数（J）＝TPR-FPR=0.89，符合率 P0=18/19=0.9474  Kappa 指数 k=（P0-Pe）/（1-Pe）=0.95 | | | |

## 2. 其他影响结果的因素

在试验过程中，大鼠皮片暴露时间为24小时，室温静置。静置时，皮片的环境湿度对皮片状态影响较大，环境过于干燥会加速皮片破裂。但OECD或美国ICCVAM的标准中，均未有对环境湿度的详细规定，因此建议试验时恒温恒湿静置。

试验阳性参考物10M HCl，经常会烧穿皮片，无法进行罗丹明B染色的步骤，进而影响其他需染色受试物结果的判定。可使用8M HCl作为阳性对照。

## 3. 本方法的可行性分析

本方法操作简便，课题所需的相关技术、人员、设备等条件易达到。我国开展化妆品检测的机构均具有建立本标准方法检测化妆品原料的条件和能力。

本方法建立过程中，通过分别邀请北京市药检所、浙江省食品药品检定研究院、中国检验检疫科学研究院和广东CDC等4家不同类型实验室参与了实验室间预验证，结果大体一致，表明本方法在我国实验室建立是可行的，建议作为推荐性国家标准。

## 4. 本方法与动物实验的比对结果

由于我国现行的检测化妆品皮肤腐蚀性/刺激性试验是整体动物试验，本方法为首次建立的体外测试化妆品原料腐蚀性的方法，为稳妥起见，本实验室按照课题设计研究思路将本方法与经典动物实验进行比对，结果显示：18种参照物中，8种为《化妆品卫生规范》中豁免动物试验的试剂（受试物为强酸或强碱，即pH值≤2或≥11.5），可以不进行皮肤刺激试验。其余10种受试物中，大鼠经皮电阻试验可将3种已知皮肤腐蚀性阳性物质和6种已知皮肤腐蚀性阴性物质正确判定，仅将1种皮肤腐蚀性阴性物质（异丙醇）判定为腐蚀性阳性物质。

## 九、附件

附件A：受试化妆品原料目录

**附件A：**

受试化妆品原料目录

参照OECD的数据库（2015），选择18种已知皮肤腐蚀性性的化妆品原料作为受试物，包括：9种腐蚀性阳性物质和9种腐蚀性阴性物质，其名单见表3。

表3 本研究选用的18种参照受试化妆品原料

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 受试化妆品原料 | | 腐蚀性 | 来源 |
|
| 去离子水 | Deionized water | 无腐蚀性 | - |
| 4-氨基-1,2,4-三氮唑 | 4-Amino-1,2,4-triazole | 无腐蚀性 | TCI, Tokyo, Japen |
| 丁子香酚 | Eugenol | 无腐蚀性 | 国药集团 |
| 溴乙基苯 | Phenethyl bromide | 无腐蚀性 | Alorich, USA |
| 四氯乙烯 | Tetrachloroethylene | 无腐蚀性 | 国药集团 |
| 异硬脂酸 | Isostearic acid | 无腐蚀性 | Adamas, Belgium |
| 4-甲硫基-苯甲醛 | 4-(Methylthio)-benzaldehyde | 无腐蚀性 | TCI, Tokyo, Japen |
| 异丙醇 | Isopropyl alcohol | 无腐蚀性 | 国药集团 |
| 月桂酸 | Lauric acid | 无腐蚀性 | 国药集团 |
| 十二烷基硫酸钠（SDS,20%） | Sodium dodecylbenzenesulfonate (20%) | 腐蚀性 | 国药集团 |
| HCL（10mol/L、8 mol/L） | Hydrochloric acid （10mol/L、8mol/L） | 腐蚀性 | 国药集团 |
| N,N-二甲基亚二丙基三胺 | N,N-Dimethyldipropylenetriamine | 腐蚀性 | Adamas, Belgium |
| 邻叔丁基苯酚 | 2-tert-Butylphenol | 腐蚀性 | TCI, Tokyo, Japen |
| 氢氧化钾（10%） | Potassium hydroxide (10%) | 腐蚀性 | 国药集团 |
| 硫酸（10%） | Sulfuric acid (10%) | 腐蚀性 | 国药集团 |
| 辛酸 | Octanoic acid | 腐蚀性 | 国药集团 |
| 1,2-丙二胺 | 1,2-Propanediamine | 严重腐蚀性 | 国药集团 |
| 丙烯酸 | Acrylic acid | 严重腐蚀性 | 国药集团 |

注：各受试物经腐蚀性为OECD TG430参考物质表中给出的参考腐蚀性。