

附件 7

皮肤吸收体内试验方法

Skin Absorption: in Vivo Method

1 范围

本方法规定了化妆品原料皮肤吸收体内试验方法的术语和定义、试验原则、试验方法、试验数据和报告。

本方法适用于化妆品原料经皮吸收的体内试验。

本试验方法适用于单一成分的化妆品原料，非单一成分的原料若使用本方法进行评估，需要提供更多的科学依据说明其可行性。

2 试验目的

本方法阐述了化妆品原料经皮吸收的体内试验方法，以便为化妆品原料的毒性分类、标签标识和应用提供试验依据。

3 定义

3.1 未吸收剂量 unabsorbed dose

染毒后，从皮肤表面洗脱下来的和附着在遮盖装置上受试物的量，还包括在染毒过程中从皮肤表面挥发的量。

3.2 吸收剂量（体内）absorbed dose (in vivo)

去除受试部位皮肤的受试物后，包括在尿液、笼具冲洗液、粪便、呼出气体（若有测试）、血液、各种组织（若有采集）以及保留在尸体中受试物的量。

3.3 可吸收剂量 absorbable dose

皮肤冲洗后，存留在皮肤表面或皮肤组织内受试物的量。

4 试验的基本原则

受试物（最好用放射性同位素标记）施用于动物去毛的皮肤上，试验设定具有代表性的一个或多个剂量组。在预定的染毒时间内，采用适宜的（非封闭、半封闭式或封闭式）遮盖装置覆盖染毒部位以防止动物舔舐试验样品，并让受试制备物与动物皮肤持续接触染毒一段时间。在染毒结束时，去除遮盖装置并用适宜的清洁剂清洗动物皮肤，保留用过的遮盖装置和清洗液以备分析测定，并换上新的遮盖装置。在染毒前、染毒期间和染毒结束后，试验动物均需在单独的代谢笼中饲养，并收集其排泄物和呼出气体以备分析测定。如果有充足的证

据表明极少产生或不产生挥发性的放射性代谢产物，则可以不收集动物呼出气体。通常，每个剂量组内设几个动物试验组，一组在染毒结束后立即处死，其他组依次在预定时间间隔点处死。每一个采样时间点处死的试验动物，对采集血样以及受试部位皮肤进行分析，并分析动物尸体以确定未被排泄的受试物的量。采集的样品以适当的方法进行分析，并对受试物经皮吸收的程度进行评估。

5 试验方法

5.1 受试物

受试物是指被用于研究其渗透特性的物质。受试物最好用放射性同位素标记。

制备的受试物（包括纯品、稀释品或者直接施用于皮肤的包含受试物的制备物）应与人体或者其他潜在目标种属可能的暴露形态一致（或是理想的替代物）；制备过程中出现任何不同于实际使用情形的改变必须有充分的理由。必要时，受试物可溶解或者悬浮于适当的溶媒中，对于非水性溶媒，应了解其吸收特性以及与受试物的潜在相互作用。

5.2 实验动物和饲养环境

5.2.1 动物物种、品系的选择

大鼠是最常用种属，但也可使用皮肤吸收速率与人类更相似的无毛系列动物品系。一般选用年轻成年健康的单性别动物（通常用雄性）。试验开始时动物体重的差异应不超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。如雄性大鼠的适宜体重为 200 g~250 g，在该体重范围的上半区内更好。

5.2.2 性别和数量

通常，由单一性别的至少 4 只动物组成一个试验组，每个测试样品的每个预定观察终点需设一组。试验中的每个预定时间点处死一组动物，比如在染毒结束时间点（通常是 6 h 或 24 h）和后续观察期结束时间点（例如 48 h 和 72 h）。若已有资料表明受试物的经皮毒性存在明显的性别差异，则应选用更敏感的性别，否则可任选一种。

5.2.3 饲养环境

实验动物及实验动物房应符合国家相应规定。选用标准配合饲料，饮水不限制。

试验期间（最好也包括试验之前的适应期）动物应在代谢笼中单笼饲养，尽量避免食物和水溢出容器影响试验结果。

5.3 试验步骤

5.3.1 试验动物的准备

试验开始前，每只动物应做好标记加以区别，并在各自的笼具中至少饲养 5 天以适应实验环境。

然后，在染毒前约 24 h，将每只动物肩部和背部局部皮肤去毛，并用丙酮轻轻擦拭皮肤表面以去除皮脂，因肥皂残留物有可能促进皮肤对测试物的吸收，故不推荐用肥皂水清洗皮肤。剃毛面积应足够大，以确保能可靠地计算出每平方厘米皮肤对受试物的吸收量，剃毛皮

肤面积应该至少为 10 cm²，该面积对于体重在 200 g~250 g 范围内的大鼠是适宜的。动物准备完成后，重新放回代谢笼。

5.3.2 皮肤染毒

在皮肤表面确定特定面积的受试部位，将已知量的受试制备物均匀地涂抹于该部位。用量通常应采用人体可能的接触量，固体受试物通常为 1~5 mg/cm²，液体受试物最多可达 10 μL/cm²。可根据受试物预期的使用情况、研究目的以及物理性质调整染毒剂量，但应有适当理由。染毒后，受试部位应避免被触碰。通常，受试部位应采用非闭合的遮盖装置覆盖（如透气尼龙纱布罩），典型装置的示例如图 1 所示。某些特定情况下，受试部位应采取闭合性保护。若半挥发性测试物质的挥发导致受试物的回收率超出可接受的范围（另见 5.4），应在受试物装置上覆盖活性炭过滤器以捕获挥发的受试物（见图 1）。任何覆盖装置都不应损伤皮肤，也不能吸收或与受试制备物发生反应。染毒后，将动物放回单独的代谢笼中以便收集排泄物。

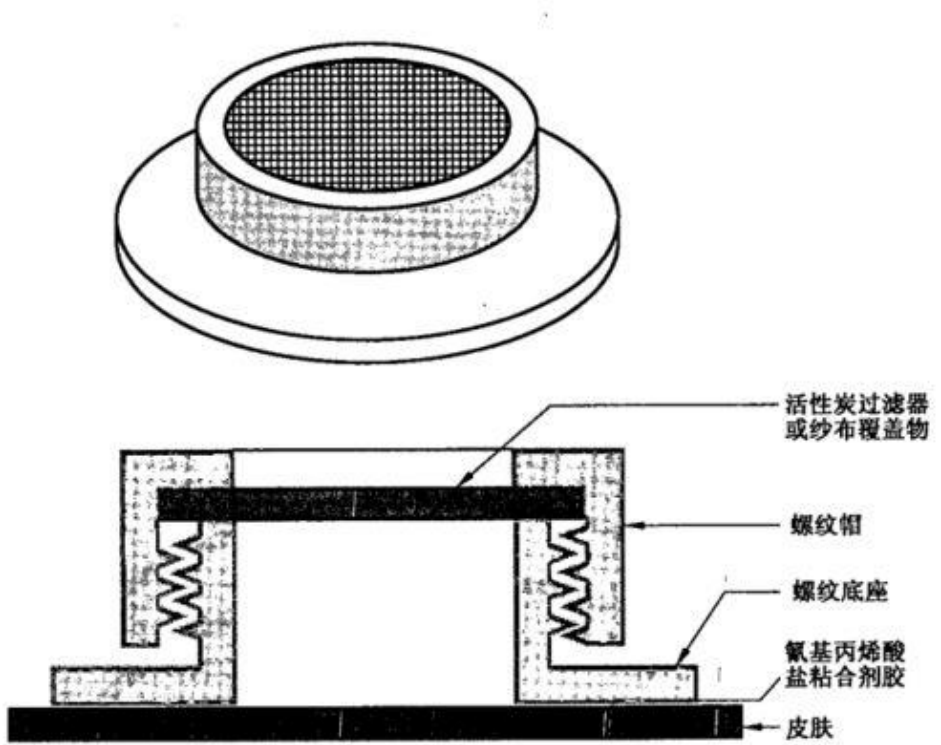


图 1 一种用于覆盖和保护受试部位皮肤的典型遮盖装置设计示例图

5.3.3 染毒时间和取样

染毒期是指在皮肤开始接触受试物，至清洗去除受试物之间的时间间隔。所采用的染毒时间（一般为 6 h 或 24 h）应与通常人体可能的接触时间相对应。染毒结束后，将动物饲养于代谢笼中保留直至预定的处死时间点。染毒结束后，应对受试皮肤进行观察并记录任何可见的刺激症状。

在整个研究过程中，应采用代谢笼分别收集尿液和粪便，并可在 ^{14}C -标记的二氧化碳和挥发性 ^{14}C 化合物 ($>5\%$) 产生时进行收集和定量分析。尿液、粪便和捕获液（如 ^{14}C 标记的二氧化碳和挥发性 ^{14}C 化合物）应在每个取样时间点从每组中单独收集。若有足够的资料证明很少或几乎不产生放射性代谢物，则可采用开放式笼架。整个试验期间，应定期观察动物的毒性或异常反应。

染毒期，从开始皮肤接触后至 24 h 以及随后的每一天，均应收集排泄物直至试验结束。一般而言，采集三个时间点的排泄物通常就足够了，但某些受试制备物的特征或现有药理学数据可能会要求有更适宜、或更多的收集时间点以便研究。

染毒结束时，从每只动物身上移去保护装置并单独保留以便试验分析。所有动物的受试部位皮肤应用适宜的棉签蘸取清洗剂清洗至少 3 次，必须注意避免污染其他部位。清洗剂应为肥皂水等有代表性的常用卫生清洁剂。最后，擦干皮肤，用新的干净遮盖装置覆盖受试部位皮肤，将这些动物放回代谢笼，作为后续时间点的实验动物组继续进行相关试验。必须保留所有擦洗棉签和洗液以供研究分析。

5.3.4 试验动物处理和检测

对于每个实验组，应在预定时间处死试验动物，收集血样，移去保护性的装置或覆盖物并进行分析。剪下每只动物的受试部位皮肤以及对应的空白对照部位皮肤，分别进行试验分析。受试部位皮肤可分层，可将角质层与下面的真皮层分离，以提供受试物分布的更多信息。在染毒后的一段时间内，检测受试物的分布，将能提供该受试物在角质层中转运的某些指征。最后清洗皮肤并处死动物后，应移去保护性的覆盖物，以便于皮肤分层处理。从受试动物身体上环状切下受试部位的皮肤并钉在板上，将黏附性胶条贴于皮肤表面，轻压，胶条将部分角质层粘附下来，继续用胶条重复粘贴，直到胶条不再粘附于皮肤表面，表明角质层已被全部去除。将同一只动物的所有胶条合并至一个单独的容器中，加入组织消化液溶解角质层。

保留每只动物的尸体以便试验分析。在对动物尸体进行吸收剂量试验前，每个可能的靶组织均可被分离单独进行试验。一般而言，仅对尸体的总含量进行分析即可，若有其他研究提示，也可将靶组织分离进行单独试验。动物处死时，膀胱中的尿液应合并到先前收集的尿液中。此外，收集了代谢笼中的粪便后，笼子和捕获装置均应采用合适的溶剂冲洗并收集，其他潜在的受污染仪器也应该进行类似的处理。

5.4 试验分析

所有试验均应达到足够的回收率（如放射性标记物的回收率 $100\% \pm 10\%$ ），超出回收率范围的应说明理由。每个样品所使用的剂量应采用适宜、有效的方法进行分析。

统计分析应考虑测定每个剂量组的平行样之间的偏差。

6 数据和报告

6.1 数据

6.1.1 应对每只动物在每个取样时间点的受试物和（或）代谢物进行以下测定（除单个动物的数据外）以便计算吸收剂量、未吸收剂量和可吸收剂量，且不同取样时间点的数据均应按组报告其平均值：

- 保护器具上的量；
- 从皮肤上清除下来的量；
- 在皮肤上/皮肤内、不能从皮肤上洗下的量；
- 血样中的量；
- 排泄物和呼出气体中的量（如适用）；
- 保留在尸体和取下单独试验的器官上的量。

6.1.2 在排泄物、呼出的气体、血样和尸体中的受试物和/或代谢物的量，用以确定每个时间点的吸收总量，从而计算出染毒后每平方厘米皮肤吸收受试物的量。

6.2 报告

试验报告应符合试验方案所规定的要求，包括所使用试验系统的合理性，具体包括以下内容：

受试物：

- 识别数据[如，CAS 编号；来源；纯度（放射化学纯度）；已知杂质；批号]；
- 物理性质、物理化学性质（如，pH、挥发性、溶解度、稳定性、分子量和脂水分配系数 $\log_{\text{POW}}$ ）；

受试物的制备：

- 配方和使用理由；
- 受试物制备详细过程、使用量、达到的浓度、溶媒、稳定性和均一性；

受试动物：

- 使用的种属/系；
- 动物的数量、年龄和性别；
- 动物来源、饲养环境、饲料、生产许可证明、使用许可证明等；
- 试验开始时每只动物的体重；

试验条件：

- 染毒的详细过程（受试部位、分析方法、闭合/非闭合、体积、提取、检测）；
- 食物和水品质的详细信息。

结果：

- 任何毒性症状；
- 吸收数据列表（以速率、数量或百分比表示）；
- 试验的总体回收率；
- 结果的解释，包括与该受试物任何可能获得的经皮吸收的数据进行比较。

结果讨论。

结论。