附件1

体外皮肤吸收试验（征求意见稿）

Skin Absorption：*In vitro* Method

1 范围

本文件规定了体外皮肤吸收试验的基本要求和方法。

本试验方法适用于单一成分的化妆品原料。

2 试验目的

预测和评价化妆品原料在离体皮肤中的经皮吸收率。

3 定义

3.1 受试物 test substances

被测试的化妆品原料，为单一化学物质。

3.2 未吸收量 unabsorbed dose

暴露后从皮肤表面洗掉的受试物，以及非遮挡性遮盖物上存在的受试物，包括暴露期间从皮肤上挥发出来受试物的总量。

3.3 吸收量 absorbed dose

在一定时间内到达皮肤和接收液的受试物的量。

4 试验原理

在特定条件下，将受试物（可以是放射标记物）暴露于扩散池中的皮肤表面一定时间后，采用适当的清洗程序和方法除去皮肤表面的受试物；并在整个试验过程中，设置不同的时间点采集接收液，采用适当的方法测试受试物或其代谢产物的物质的量。

当受试物具有代谢活性时，可以采用适当的方法来分析其代谢活性产物。也可以在试验结束后，采用适当的方法测定受试物及其代谢产物的分布情况。

在本标准和指导性文件所描述的条件下，采用接收液和受试皮肤中的受试物的量来监测给定时间内受试物的吸收情况。同时应测定从皮肤表面冲洗下来的和留在皮肤里的受试物，包括分布和回收率。残留在皮肤角质层中的受试物可能会被吸收。一般试验周期为24 h，角质层的残留量不会显著影响物质的系统暴露量，通常不计入安全评估参数皮肤吸收率的计算。

5 试验方法

5.1 扩散池

扩散池由供给室和接收室组成（图1为典型扩散池样例），离体皮肤放置于两者之间，其与扩散池之间应有良好的密封性，能较好控制扩散池及其内容物的温度，并保证与皮肤接触的接收液的混合良好和取样方便；静态式或流通池式扩散池均可使用。正常情况下，供给室在暴露于有限剂量受试物过程中保持开放，但在无限剂量和部分有限剂量的情况下，供给室可以封闭。

5.2 接收液

接收液应优先选择有益于生理的溶液，需提供接收液的精确组分，并证实受试物在接收液中能充分溶解，不影响皮肤吸收。另外，接收液不能影响皮肤的完整性。在循环流动系统中，流速不能妨碍受试物扩散进入接收液。在静态渗透式系统中，接收液应连续搅拌并有规律取样。如果要研究受试物在皮肤中的代谢效应，整个试验过程中接收液必须能维持皮肤的活性。

5.3 皮肤制备

皮肤来源可为人类或动物，须符合我国相关伦理要求，首选活体皮肤。非活性皮肤，如采用表皮层（酶、热或化学分离的）或用植皮刀分离的皮肤，应避免使用太厚的皮肤（约小于1 mm），证明其皮肤屏障完整性后可使用。同时还应确定皮肤种类、解剖位置以及制备技术。动物皮肤来源首选小型猪。每个受试物至少进行4次重复试验。

5.4 皮肤完整性

应正确制备和储存皮肤标本，使用前检查皮肤及其屏障的完整性。需要研究受试物在皮肤的代谢作用时，应使用新鲜皮肤，并在确保其实验过程中的代谢活性。一般新鲜的离体皮肤应在24 h内使用，也可证明合理可行的情况下，根据代谢酶系统和贮藏温度的不同而适当调整。

5.5 受试物制备

受试物可以放射性标记或采用其他定量方法。受试样品的制备尽可能与实际使用的状态保持一致，偏离使用情况的制备应做合理说明。

5.6 受试物浓度和组成

通常将受试物配制成系列浓度，其浓度范围应覆盖人体实际接触的可能暴露范围。受试物配制过程中需确保其稳定性和均一性，对于固体、半固体制剂和混悬液，需验证其中受试物的均一性。

5.7 皮肤暴露

根据人体可能接触受试物的情况，一般选择有限剂量暴露。剂量应模仿人体暴露量，通常固体受试物为2 mg/cm2~5 mg/cm2，液体受试物为10 µL/cm2。如有偏差，需根据预期的上样条件、研究目标或试验准备的物理特性进行解释。如实验设计为无限剂量暴露时，则不需遵循上述剂量要求。

5.8 温度

受试物皮肤吸收一般属于被动吸收，其受温度的影响较大，因此实验时扩散室和皮肤应保持恒定接近于皮肤正常温度（32℃±1℃）。不同的扩散池可根据自身情况调整水浴或干加热到一定温度，以确保离体皮肤温度在其正常生理标准。实验室相对湿度保持在30%~70％之间。

5.9 暴露时间和取样

一般情况下安全评估仅做24 h暴露，皮肤完整性超过24 h就会变差，因此采样时间一般不建议超过24 h。但在特殊情况下也可采用更短的暴露时间，如渗透迅速的或实际使用时间非常短暂的受试物。若需要了解受试物透过行为，应根据受试物的吸收特性确定接收液的采样点。接收液的采样点应满足能够以作图形式表现被试物的透皮吸收情况。实际采样频率需基于试验前信息（如受试物理化性质等），试验周期内通常需要6个~12个采样点。

5.10 样品分析

对试验系统的所有组成部分均应进行分析测定，并确定回收率。其中包括供给室、皮肤表面、皮肤中、接收液/池中的所有受试物。试验应得到足够的回收率，放射性标记试验的回收率应为100%±10%，其他定量方法建议回收率应为100%±15%，若偏离应合理解释，必要时重新进行试验。

6 数据处理和计算

应列出接收液的分析结果，不同时间内受试物在试验系统中的分布和吸收情况。对于有限暴露剂量，应计算从皮肤清洗下的受试物的量、与皮肤结合的数量（分析不同皮肤层）以及接收液中受试物的数量（比率、数量与使用剂量的百分率）。经皮吸收试验的结果有时只能用接收液的数据表示，当受试物在试验结束时仍残留于皮肤内的情况，总的吸收量要考虑是否扣除角质层含量，并结合化合物作用位置和透过特性给出合理解释。无限剂量暴露实验时不做吸收百分比的计算。

回收率计算公式（1）：



　　\*包含角质层、活性表皮层、真皮层

皮肤吸收率计算公式（2）：



　　#是否去除角质层应给予合理说明

7 试验报告内容

7.1 受试物：

a) 物理特性、理化性质（至少包括相对分子质量和LogPow）、纯度（放射化学物纯度）；

b) 鉴定资料（如批号）；

c) 在接收液中的溶解度。

7.2 受试物制备：

a) 使用制剂的组分和理由；

b) 均一性。

7.3 试验条件

a) 皮肤来源和位置、制备方法、使用前的储藏条件、所有预处理（清洗、抗生素处理等）、皮肤完整 性测量、代谢状况、使用的理由；

b) 扩散池的设计、接收液的组分、接收液的流速或采样次数和规程；

c) 所用试验制剂的详细资料和剂量选择的依据；

d) 受试物暴露持续时间；

e) 从皮肤清除试验制剂的详细内容，如皮肤冲洗；

f) 分析皮肤的细节以及用于说明皮肤分布的分离技术；

g) 扩散池和仪器的清洗规程；

h) 检测方法、提取技术、检出限、受试物稳定性以及分析方法的有效性。

7.4 结果：

a) 受试物的回收情况（皮肤加样量=清洗液含量+皮肤中含量+接收液含量）；

b) 每个反应池的回收情况；

c) 受试物的吸收情况；

d) 经皮吸收数据（一般以百分率表示，需要时可以渗透速度、渗透量表示）。

7.5 　结果讨论

7.6 　结论

附录



一种用于体外经皮吸收试验的直立式扩散池示例图

体外皮肤吸收试验应用示例（咖啡因）

注：条件不同数据会产生变化，本示例中的数据仅供参考。

1 试验目的

本次试验根据《体外皮肤吸收试验》文件中的基本原则，参考相关文献中具体方法，研究咖啡因在离体猪皮肤的吸收特性，定量分析咖啡因的透皮吸收率。

2 受试物和皮肤类型

试验使用咖啡因（MW=194.2 Dal，LogPow =-0.07，水中溶解度=21.6 mg/mL 25℃）作为受试物。

皮肤模型：3月~4月龄巴马小型猪背部或腹部皮肤。

贮藏条件：制备后-20度冻存，10天内使用，冻融不超过2次。

3 试剂和仪器

3.1 试剂

0.9%氯化钠（生理盐水）、甲醇（色谱级）、乙腈（色谱级）、异丙醇（色谱级）、磷酸（色谱级）

3.2 仪器与用具

透皮吸收扩散仪、高效液相色谱仪、色谱柱、体式显微镜、经皮水分流失测定仪、磁力搅拌器、涡旋混匀器、台式高速冷冻离心机、真空离心浓缩仪、氮吹浓缩仪、旋转蒸发仪、离心管、2 mL进样瓶、移液器、枪头、0.45/0.22 µm尼龙滤膜、皮肤胶带、刀片、取皮刀、外科剪刀、2 mL注射器、吸水纸、棉签

4 试验方法

4.1 试验装置

透皮吸收扩散仪，配备有Franz扩散池，接收介质体积为8 mL，扩散面积均为1.78 cm2。接收室中设有磁力搅拌棒，保证受试物于接收液中能够均匀扩散。

4.2 受试物配制

称取0.1000 g咖啡因，置于10 mL容量瓶中用生理盐水定容，得到10000 mg/L（1%）咖啡因溶液。（若要研究皮肤剂量-吸收曲线，则可增设浓度为0.3%和1%咖啡因溶液用于试验）。取样该溶液，经前处理、稀释等步骤，用液相检测并计算溶液中咖啡因实际含量，用以计算实际加样量。在正式试验前，还应单独测试咖啡因在接收液中的稳定性。对刚配好的咖啡因溶液和试验条件下放置24 h取样，检测咖啡因含量有无变化。

4.3 接收液

保证其满足漏槽条件，即接收液的体积至少是咖啡因达到饱和溶解时所需介质体积的3倍~10倍。

成分组成： 0.9% NaCl水溶液（生理盐水）

配制过程：根据以上成分组成，配制接收液。测定接收液pH，应保持在pH 6.5~pH 7.5范围内。

测定咖啡因在接收液中的稳定性：根据溶液中咖啡因浓度和加样体积估算不同时间点的可能最高和最低浓度设计浓度曲线，于0.5、1、2、4、8、24 h取样检测。

4.4 离体猪皮的制备

离体猪皮采自猪背或腹侧皮肤，符合相关动物伦理要求，保证猪皮角质屏障的完整性（如不可采用热水淋洗或刮毛，以确保皮肤角质层完整性等）。用吸水纸吸干皮肤表面生理盐水，肉眼观察未受损伤的、面积大小合适的皮肤备用。本试验中受试物均设置3个平行重复4次（皮肤来源为4个不同的个体）。

4.6 猪皮肤完整性检查

在受试物加样前，通过测定经皮水分流失（TEWL）值，以检查皮肤的完整性：提前将水浴加热调整到32±1℃并温度稳定，将皮肤安装固定在扩散池的供给室和接收室之间，皮肤角质层朝向供给室，真皮层一侧朝向接收室,并通过补液管向接收室中加入接收液，去除接收液与皮肤间的气泡，确保猪皮与接收液完全接触，开启磁力搅拌器转速设为600 rpm，扩散池体系在此状态下平衡30 min~45 min。使用经皮水分流失测定仪器于猪皮角质层面测定TEWL值，TEWL值<15 g/m2·h的皮肤才可用于试验。

5 试验步骤

5.1 加入接收液

向接收室中加入接收液。通过加样管加入接收液并记录准确的接收液体积。接收液注入接收室后，去除皮肤与接收液接触面滞留的气泡，确保皮肤与接收液完全接触。该扩散池体系在正常试验条件下平衡30 min~45 min后，验证皮肤完整性之后，方可加样处理。

向供给室中皮肤表面加入咖啡因测试溶液，并设置不含咖啡因的生理盐水作为阴性对照。用移液器按照10 µL/cm2的比例将17.8 µL咖啡因溶液均匀涂布于供给室中1.78 cm2皮肤表面，每个浓度样品设3个平行重复4次。

试验期间保持实验室环境湿度为30%~70% RH。设置磁力搅拌器以600 rpm的速度搅拌，保持（32±1）℃恒温水浴。

5.2 接收液取样

分别于0.5、1、2、4、8、24 h时间点用注射器/自动取样装置取样，具体取样体积可根据化合物预实验中表现出来的透过行为自行确定。0.22 µm或0.45 µm尼龙滤膜过滤后待测。

暴露结束时取样：

供给室清洗：用15 mL生理盐水清洗（每次1 mL，清洗15次），15次清洗液合并，再与皮肤表面残留受试物冲洗液合并，一同检测。

皮肤表面残留受试物：皮肤暴露于受试物样品24 h，用生理盐水冲洗皮肤表面3次（每次用3 mL生理盐水，共9 mL），所有冲洗液合并震荡，0.22 µm或0.45 µm尼龙滤膜过滤后待测。

角质层：受试皮肤在干燥条件下，使用皮肤胶带进行角质层取样，重复20次。取样后将所有20张胶带置于50 mL离心管中，加入20 mL甲醇震荡过夜提取、离心，提取液过滤后待测。

除去角质层后的皮肤：去除角质层后的皮肤剪碎，加入10 mL甲醇过夜提取，离心取上清液过滤后待测。

5.3 检测与分析

仪器：高效液相色谱仪（HPLC）

色谱柱:Phenomenex RP MAX-80A （4 µm 4.6 mm×100 mm）

流动相: A（0.1%磷酸水溶液）和B（乙腈）

洗脱程序:见表3

流速：1.0 mL/min

进样量：/

柱温：40℃

检测波长：273 nm

表1.梯度洗脱程序

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Time(min) | A(v%) | B(v%) |
| 0 | 95 | 5 |
| 5.0 | 80 | 20 |
| 6.0 | 10 | 90 |
| 8.0 | 95 | 5 |

6.数据分析

6.1 皮肤吸收率

皮肤吸收率=$ \frac{皮下渗透量}{皮肤加样量}×100\%$=$ \frac{Q+N}{皮肤加样量}×100\%$

其中Q: 接收液中咖啡因总量 ；N: 除角质层皮肤中咖啡因总量。

6.2 累计皮下渗透量Q

Q=$C\_{n}×V\_{0}+\sum\_{i=1}^{n-1}C\_{i}×V\_{i}$

其中Cn：各时间点浓度；Ci：样品收集时间点i的浓度, i=1~n-1；Vi：各样品收集时间点i的取样体积1 mL；V0：接收室体积为8 mL。

6.3 回收率R

R=$\frac{Q+W+M+N}{皮肤加样量}×100\%$

其中Q: 接收液中咖啡因总量；W: 皮肤表面残留受试物+供给室中咖啡因总量；M: 角质层中咖啡因总量；N: 除角质层皮肤中咖啡因总量；回收率应在100％±15%范围内。

体外皮肤吸收试验（征求意见稿）起草说明

为加强化妆品的监督管理，进一步提高化妆品使用安全性，中国食品药品检定研究院组织开展了体外皮肤吸收试验研究制定工作。现就工作有关情况说明如下：

1. 起草原则

为充分衔接和配合化妆品安全评估技术导则（2021年版）的实施。本标准以欧洲经济合作与发展组织（OECD）化学品测试方法TG 428指南为基础，规范了体外皮肤吸收试验的相关技术要求适用于化妆品原料经皮吸收离体皮肤试验中测定暴露风险物质的经皮吸收率。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价，需要提供更多的科学依据说明其可行性。

二、起草过程

化妆品标准专家委员会于2021年9月委托开展体外皮肤吸收试验的制定工作。前期准备工作包括查阅文献、参考相关的国家和行业标准、研究实验方案、化妆品原料的筛选、猪皮的制备和质量指标的筛选等。拟定验证原料对象和验证方案后，开展了实验室间的协作验证，根据专家及企业的意见，完善了评价方法，整理了实验数据和分析结果，经整理归纳后，最终形成了体外皮肤吸收试验文本和验证报告。

三、国内外相关标准情况

2004年OECD发布OECD TG 428 Skin Absorption：*in vitro* Method，确定透皮吸收方法可用于化学品测试。推荐性国标《化学品 皮肤吸收 体外试验方法》GB/T 27818-2011为TG 428中文翻译版。欧洲药品管理局在2018年发布的《局部外用产品质量和等效性的指南草案》中提供了药品的体外人体皮肤渗透试验等效测试方案。欧盟消费者安全科学委员会（SCCS）2012年发布体外评价化妆品成分皮肤吸收的基本标准，并在2023年发布了第12次修订版本SCCS/1647/22。2022年，世界中医药学会联合会经皮给药专业委员会组织专家探讨，形成了《经皮给药制剂体外经皮渗透试验技术规范专家共识探讨》，规范了经皮给药制剂体外经皮渗透试验的具体操作。上述标准分别对化学品和药品提供了完善的评价方法，但一方面并未考虑我国化妆品行业特点和监管需求，另外对于检测方法的质量控制要求，尤其是皮肤的质量控制标准尚未明确。

SCCS/1647/22中3-3.5.1.1皮肤/经皮吸收明确指出OECD TG 428与SCCS的“基本标准”SCCS/1358/10的结合被认为是对化妆品成分进行适当的体外皮肤吸收研究的必要条件。因此本标准与OECD TG 428技术性内容基本一致，同时重点参考了SCCS/1358/10。

主要包含标准应用范围、术语和定义、试验原理、试验方法（扩散池、接收液、皮肤制备、皮肤完整性、受试物、受试物制备、受试物浓度和组成、皮肤暴露、温度、暴露时间和取样、结果与分析）试验数据和报告。

本标准制在参照OECD TG 428、SCCS/1358/10制定“体外皮肤吸收试验”同时，为提高可操作性也提供了“体外皮肤吸收试验应用示例（咖啡因）”。

表1 主要相关标准列表

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 来源国家或组织 | 标准号/版本号 | 标准名称 | 检测范围/适用基质 |
| 1 | 中国国家标准化管理委员会 | GB/T 27818-2011 | 《化学品 皮肤吸收 体外试验方法》 | 化学品 |
| 2 | 经济合作与发展组织 | TG 428(2004) | 《皮肤吸收：体外试验》(英文版) | 化学品 |
| 3 | 欧洲药品管理局 | CHMP/QWP/708282/2018 | 局部外用产品质量和等效性的指南草案 | 药品 |
| 4 | 欧盟消费者安全科学委员会 | SCCS/1358/10  | 体外评价化妆品成分皮肤吸收的基本标准 | 化妆品 |
| 5 | 欧盟消费者安全科学委员会 | SCCS/1647/22  | 化妆品成分测试及其安全性评价指南说明第12次修订 | 化妆品 |
| 6 | 世界中医药学会联合会经皮给药专业委员会 | 2022 | 经皮给药制剂体外经皮渗透试验技术规范专家共识探讨 | 药品 |

四、实验室验证情况

验证单位在“体外皮肤吸收试验”指引下制定了“体外皮肤吸收试验应用示例（咖啡因）”。本次选取咖啡因为研究对象验证了经皮吸收率测定的方法。同时组织4家实验室进行协作验证，充分考量了实测数据的可靠性、重复性和准确性。考虑到离体猪皮作为生物膜是一个不稳定因素。经充分的文献调研、专家论证及行业交流，制定了验证目标。一是检测方法中每个皮瓣的回收率在100土15%数据为可采纳，二是四家机构最终三次累计透皮吸收率（24 h累计透过率和24 h时间点透过率）的平均值，最高与最低值的差异小于20%。

随后开展三方验证。建立生理盐水中咖啡因检测方法。根据溶液中咖啡因浓度和加样体积估算不同时间点的可能最高和最低浓度设计浓度曲线，于0.5、1、2、4、8、24h取样检测。重复条件为分别上样3个平行皮瓣，重复4次（皮瓣需来自6只以上不同猪的皮肤）。设定体系回收率要求为100%±15%。以1%浓度上样咖啡因，测定皮肤清洗液、角质层、去除角质层后皮肤、接收液中咖啡因，计算体系回收率和24 h累计透过率，数据符合回收率要求下，四家机构最终24 h累计透过率平均值最高和最低值差为15.93%，小于20%整体目标误差；同样条件下以0.3%浓度上样咖啡因测定其24 h时间点透过率。数据符合回收率要求下，四家机构最终透过率平均值最高和最低值差为16.99%。小于20%整体目标误差。该三方验证结果显示“体外皮肤吸收试验应用示例（咖啡因）”检测方案在不同检验机构可以稳定复现。“体外皮肤吸收试验”是完备和适用的。

五、其他应予以说明的事项

OECD TG 428中首选推荐的定量方法为放射性。考虑到我国现实情况，本次仅验证了液相定量的方法，同时也对猪皮质量标准做了一定的研究和验证。在“体外皮肤吸收试验应用示例（咖啡因）”中有所体现。