

化妆品毒理学试验方法的标准比对

谢珍¹, 桑晶¹, 高行¹, 张霄鹏², 何立成¹, 康桦¹, 李杨¹, 匡荣^{1*} (1.浙江省食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局化妆品动物替代试验技术重点实验室, 杭州 310052; 2.杭州瑞旭科技集团有限公司, 杭州 310052)

摘要: 化妆品行业的快速发展离不开标准化的技术支持, 标准化对于推动技术进步、规范市场秩序、促进国际贸易起到重要的作用。本文对毒理学试验方法中的急性经皮毒性试验、亚慢性经皮毒性试验、致畸试验的国内外相关标准进行梳理和比对, 分析目前标准存在的具体问题并提出建议。

关键词: 化妆品; 急性经皮毒性试验; 亚慢性经皮毒性试验; 致畸试验; 标准比对

中图分类号: R991 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)24-3097-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.24.008

引用本文: 谢珍, 桑晶, 高行, 等. 化妆品毒理学试验方法的标准比对[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(24): 3097-3101.

Standard Comparison of Toxicological Test Methods for Cosmetics

XIE Zhen¹, SANG Jing¹, GAO Hang¹, ZHANG Xiaopeng², HE Licheng¹, KANG Hua¹, LI Yang¹, KUANG Rong^{1*} (1.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Animal Alternative Testing Technology of Cosmetics, Hangzhou 310052, China; 2.Hangzhou REACH Technology Group Co., Ltd., Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: The rapid development of the cosmetics industry can't be separated from the standardization of technical support, standardization plays an important role in promoting technological progress, regulating market order, and promoting international trade. This paper compare domestic and foreign standards for acute dermal toxicity test, subchronic dermal toxicity test and teratogenicity test, and analysis the specific problems of the current standards and make recommendations.

KEYWORDS: cosmetics; acute dermal toxicity test; subchronic dermal toxicity test; teratogenicity test; standard comparison

安全性评价是保证化妆品使用安全的重要手段。经过多年的发展, 中国逐步完善化妆品安全评价标准体系, 在保障消费者化妆品使用安全方面发挥了重要的作用^[1]。然而众多的标准, 如国家标准(GB)、行业标准(QB)、地方标准和企业标准, 以及进出口商检标准(SN)、通用检验方法和测定方法标准等, 其间的重复、冲突也难以避免, 这将对对中国化妆品标准体系的进一步发展和完善形成一定的阻碍^[2]。

国外方面, 欧盟化妆品行业发展于 20 世纪初, 迄今已经历了百余年的历程, 已经建立了较为完善且严格的化妆品生产、审核、销售产业链监管体系, 欧盟各成员国使用同一监管法规——《化妆品规程》对化妆品行业进行监管。相配套的监管体制和标准体系对中国有借鉴作用^[3]。因此, 在对中国现行化妆品标准进行梳理、分析的基础上, 比较国内外化妆品毒理学相关法规与标准的差

异, 提出中国化妆品标准体系的框架对完善中国化妆品标准体系建设有着重要的现实意义。

此外, 公开资料显示, 2009—2019 年, 中国获批上市的化妆品新原料仅 4 个, 而今年 5 月 1 日起施行的《化妆品新原料注册备案资料管理规定》(以下简称《规定》)对化妆品新原料的安全管理设定了更加严格的监管要求。其中, 毒理学安全性评价相关资料是化妆品新原料注册备案资料中的重要部分。《规定》中要求新原料毒理学试验项目应当按照《化妆品安全技术规范》(以下简称《规范》)规定的试验方法开展, 《规范》未规定方法的项目, 应当按照国家标准或国际通行方法进行检验^[4]。面对新规下巨大的市场需求, 将《规定》中要求的毒理学试验项目所对应的国家标准或国际通行检验方法与《规范》进行比对, 为具备相应检验能力的检验检测机构提供参考。

本文对毒理学试验方法中的急性经皮毒性试

作者简介: 谢珍, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)86457970
Tel: (0571)86457970 E-mail: kuangrong@zjyj.org.cn

E-mail: cheerxie@163.com *通信作者: 匡荣, 男, 博士, 主任药师

验、亚慢性经皮毒性试验、致畸试验的国内、外相关标准情况进行梳理和比对,分析目前标准存在的具体问题并提出建议。

1 急性经皮毒性试验

从定义、受试物处理、实验动物的选择、涂皮面积、观察指标、结果评价等方面,将 GB/T 21606-2008^[5]、GBZ/T 240.3-2011^[6]、OECD 402^[7]与《规范》^[8]进行比对。

1.1 急性皮肤毒性和经皮 LD₅₀的定义

在《规范》里,急性皮肤毒性和经皮 LD₅₀的定义为“经皮 1 次涂敷受试物后……”,而其他标准里的定义均为“1 次或在 24 h 内多次经皮肤染毒受试样品……”。主要的差异为 24 h 内的染毒次数。

1.2 受试物处理

《规范》要求若受试物为固体,应研磨成细粉状;OECD402 和 GB/T 21606-2008 里要求不溶性或难溶固体或颗粒状受试样品应研磨,过 100 目筛;GBZ/T 240.3-2011 里要求不溶性或难溶固体或颗粒状受试样品应研磨,过 150 μm 孔径筛。与《规范》相比,其他标准要求更为具体,均为过 100 目筛(即为 150 μm 孔径筛)。

1.3 实验动物

《规范》要求可选用健康成年大鼠、家兔或豚鼠作为实验动物,也可使用其他种属动物进行试验。其他标准要求首选大鼠,也可选用豚鼠或家兔,并应尽可能采用单笼喂养。

1.4 涂皮面积

《规范》要求涂皮面积约占动物体表面积的 10%,应根据动物体质量确定涂皮面积,体质量为 200~300 g 的大鼠约为 30~40 cm²,体质量为 2~3 kg 的家兔约为 160~210 cm²,体质量为 350~450 g 的豚鼠约为 46~54 cm²。其他标准均在附录里列出了各类动物体表面积的数值和计算方法,更为准确。

1.5 观察指标

《规范》要求观察指标为被毛和皮肤、眼睛和黏膜以及呼吸、循环、自主神经和中枢神经系统、肢体运动和行为习惯等的改变。其他标准均用附录的形式详细列出了观察项目,包括器官系统、观察及检查项目及中毒后一般表现。

1.6 结果评价

《规范》里皮肤毒性分级:LD₅₀(mg·kg⁻¹)<5,剧毒;5~<44,高毒;44~<350,中等毒;350~<2 180,低毒;≥2 180,微毒。其他标准里给出了 LD₅₀的

计算和相应的分级原则的附录。此外,经比较后发现《规范》里该皮肤毒性分级是 WHO 推荐的依据兔经皮 LD₅₀(mg·kg⁻¹)的急性毒性分级标准,所以如果实验动物使用的是大鼠或豚鼠,则该分级标准的科学性有待考察。

2 亚慢性经皮毒性试验

从实验动物、正常值范围的要求、染毒时间、称重脏器、临床检查时间、血液生化检查项目、尿液检查、组织病理学等方面,将 GB/T 21764-2008^[9]、GBZ/T 240.19-2011^[10]、OECD411^[11]与《规范》^[12]进行比对。

2.1 实验动物

其他标准均要求试验开始时动物体质量范围为大鼠 200~300 g,家兔 2.0~3.0 kg,豚鼠 350~450 g,并应单笼饲养;而《规范》对动物的体质量范围和饲养条件无要求。

2.2 正常值范围的要求

GB/T 21764-2008 和 OECD411 提出了对历史数据的要求,即假如历史性的正常值范围资料不够充分时,在开始染毒之前,应考虑血液学和临床生化学参数的测定,确定正常范围值。《规范》和 GBZ/T 240.19-2011 无此要求。

2.3 染毒时间

《规范》要求在 90 d 试验期间,实验动物每天染毒 6 h,每周 7 d。其他标准除此要求外,还考虑到实际情况,明确每周也可染毒 5 d。

2.4 称重脏器

《规范》要求的称重脏器为肝、肾、肾上腺、睾丸、附睾、子宫、卵巢、胸腺、脾、脑和心脏。GB/T 21764-2008 和 OECD411 要求的称重脏器为肝、肾、肾上腺、睾丸。GBZ/T 240.19-2011 要求心、肝、脾、肺、肾、脑、睾丸的绝对质量和脏器系数为必测指标,必要时加测其他。

2.5 临床检查时间

包括血液学检查和血液生化测定,《规范》里规定染毒前、染毒中期、染毒结束及追踪观察结束时进行。而 GBZ/T 规定至少应在染毒结束时进行,必要时在染毒中期也进行检查。如设立附加组,在染毒结束时如有异常指标,应在附加组追踪观察结束时进行检查。

2.6 血液生化检查项目

《规范》中的检查项目与 GB/T 21764-2008 和 OECD411 一致,但项目名称不统一。与前两者

相比, GBZ/T 240.19-2011 中的检查项目多了碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH); 缺少的钙(Ca)、磷(P)、氯(Cl⁻)、钠(Na⁺)、钾(K⁺)、血糖(GLU)、鸟氨酸脱羧酶(ODC)和γ-谷氨酰转肽酶(γ-GT)检查项目均归为了补充项目; 补充指标将脂肪细化为总胆固醇、甘油三酯, 少了激素、酸碱平衡。

2.7 尿液检查

《规范》与 GB/T 21764-2008 和 OECD411 一致, 均要求一般不需要进行, 只有当怀疑存在或观察到相关毒性作用时方需进行尿液检查。而 GBZ/T 240.19-2011 中要求一般应进行, 包括外观、pH 值、尿蛋白、尿糖和血细胞。如尿样分析可作为预期或观察得到的毒性指标, 则可增加有关项目。

2.8 组织病理学

GB/T 21764-2008 和 OECD411 要求当实验动物为大鼠时, 各剂量组大鼠的肺都应进行组织病理学检查, 以证明是否存在感染。GBZ/T 240.19-2011 也是同样的要求, 只是未明确实验动物的种类, 即无论何种实验动物, 均要对所有动物的肺进行组织病理学检查。而《规范》中无此项要求。

3 致畸试验

2019 年, 国家药品监督管理局组织起草了《化妆品中游离甲醛的检测方法》《致畸试验》等共 9 项检验方法, 其中《致畸试验》作为修订的检测方法, 替换《规范》中原有的检测方法。

现从实验动物、动物更换要求、阳性物质、限量试验、染毒时间、检测指标、母体观察和胎仔检查、数据处理等方面, 将 GB/T 15193.14-2015^[13]、GBZ/T 240.21-2011^[14]、OECD414^[15]与《规范》^[16]进行比对。

3.1 实验动物

均要求啮齿类动物首选大鼠, 非啮齿类动物首选家兔, 随机分组, 试验中母体动物的死亡率不得>10%。但是每组动物数要求不一, 如《规范》和 GB/T 15193.14-2015 要求大鼠每个剂量水平的怀孕动物数不少于 16 只, 家兔不少于 12 只, 且妊娠动物应单笼饲养; GBZ/T 240.21-2011 要求大鼠每个剂量水平的怀孕动物数至少应有 15 只, 家兔至少为 12 只, 无妊娠动物单笼饲养的要求; OECD414 要求在处死当日每个剂量水平的怀孕动物数至少 16 只, 妊娠大鼠最好单独饲养, 少量的集体饲养也可接受, 并应为交配后的雌鼠提供筑

巢材料。对于家兔, 应单笼饲养。对于随机分组, OECD414 中有更为详细的说明, 如雌性动物是分批交配, 每批动物应在各组中均匀分布。同样, 由同一雄性动物授精的雌性动物也应在各组中均匀分布。

3.2 动物更换要求

《规范》和 GB/T 15193.14-2015 均要求如果 5 d 内未交配, 应更换雄鼠。GBZ/T 240.21-2011 和 OECD414 无要求。

3.3 阳性物质

《规范》和 GB/T 15193.14-2015 中列出的阳性物质有敌枯双、五氯酚钠、阿司匹林、维生素 A、环磷酰胺, 但后者还列出了这些阳性物质的给药方式和剂量。GBZ/T 240.21-2011 中推荐的阳性物质有环磷酰胺、阿司匹林、维生素 A。OECD414 无要求。

3.4 限量试验

GBZ/T 240.21-2011 和 OECD414 均列出了限量试验, GBZ/T 240.21-2011 规定如毒性较低, 1 000 mg·kg⁻¹ 对胚胎无明显毒性或致畸作用, 则可采用限量试验, 即不需设其他剂量组。若高剂量的预试验对母体确有一定的毒性作用, 但对胚胎无不良影响, 也可采用限量试验; OECD414 规定如 1 000 mg·kg⁻¹ 没有产生可观察到的毒性, 或根据现有的数据(如从结构和/或代谢相关的化合物中), 预期不会产生毒性, 则可采用限量试验。《规范》和 GB/T 15193.14-2015 无要求。

3.5 染毒时间

《规范》、GB/T 15193.14-2015 和 GBZ/T 240.21-2011 要求在器官形成期(大鼠孕期第 6~15 天, 兔孕期第 6~18 天)给予受试物。OECD414 要求, 通常情况下, 从孕期第 5~15 天, 每天染毒。如有初步研究表明胚胎着床前丢失的可能性不大时, 可将染毒时间扩大至整个妊娠期, 即交配日至分娩前 1 d。

3.6 检测指标

分别从妊娠动物体质量称取时间、摄食量称取时间、激素水平的检测和“受孕动物”的检查方面, 对各标准的相关规定进行了比较, 具体差异情况见表 1。

3.7 母体观察和胎仔检查

母体观察方面, 分别从处死日期、称重项目、检查项目及非妊娠状态确认方面对各标准进行了比较, 具体差异情况见表 2。胎仔检查方面, 《规

表 1 检测指标的差异比较

Tab. 1 Comparison of differences in detection indicators

标准	称重时间	摄食量	激素水平	“受孕动物”的检查
《规范》	受孕第 0 天、染毒第 1 天、染毒期间每 3 d 及处死当日称母体体质量	无要求	无要求	对于大鼠，查出阴栓(或精子)，认为该动物已交配，当天作为“受孕”0 d；对于家兔，雌兔和雄兔合笼后阴道涂片检查到精子当日作为“受孕”0 d
GB/T 15193.14-2015	同《规范》	无要求	无要求	同《规范》
GBZ/T 240.21-2011	每日称取妊娠动物体质量	每周记录摄食量	无要求	同《规范》
OECD414	第 0 天、染毒第 1 天称取体质量，染毒期间至少每 3 d 称取 1 次及处死当日称取母体体质量	摄食量每隔 3 d 记录 1 次，并应与体质量测定日相同	所有母体动物采血进行甲状腺激素 T4、T3 和促甲状腺激素 (TSH) 检测(必测指标)。此外，也可检测其他激素水平	对于大鼠，观察到阴栓和/或精子的当天作为妊娠的第 0 天；对于家兔，第 0 天通常是交配日或人工授精日

表 2 母体观察的差异比较

Tab. 2 Comparison of differences in maternal observations

标准	处死日期	称重项目	检查项目	非妊娠状态确认	其他
《规范》	大鼠孕第 20 天，家兔孕第 28 天	子宫连胎重	黄体数、早死胎数、晚死胎数、活胎数及着床数	无要求	无
GB/T 15193.14-2015	同《规范》	同《规范》	同《规范》	无要求	无
GBZ/T 240.21-2011	大鼠妊娠第 20 天，小鼠妊娠第 18 天，家兔妊娠第 29 天	子宫、胎盘和活胎	着床数、活胎数、死胎数及吸收胎数	无要求	无
OECD414	分娩前 1 d(未明确动物孕第几天)	子宫在内的妊娠期子宫、甲状腺	黄体数，死胎数，活胎数，描述吸收的程度(早期、晚期)，估计胎仔死亡的相对时间	啮齿类动物采用硫化铵染色，对家兔采用 Salewski 染色或适当的替代方法以确认非妊娠状态	不应从研究期间发现死亡的动物身上获取妊娠子宫的质量；进行甲状腺的组织病理学检查

范》、GB/T 15193.14-2015 和 GBZ/T 240.21-2011 基本一致，包括胎仔外观(头部、躯干部、四肢)、骨骼和内脏检查，前 2 个标准均以列表的形式详细列出了外观检查项目、骨骼检查项目及内脏检查项目，并描述了骨骼标本制作的 2 种方法，且附有头部不同种类的切片图示；GBZ/T 240.21-2011 中对胎仔的上枕骨的骨化程度采取了分级，0 级骨化程度最高，IV 级骨化程度最低。除上述检查项目外，OECD414 还要求应对存活啮齿动物胎仔的肛门距离进行测量，并将外部性别(通过大体检查确定)与内部(性腺)性别进行比较。

3.8 数据处理

分别从统计方法、需统计分析的指标、计算公式等方面对各标准进行了比较，具体差异情况见表 3。

4 《规范》制修订建议

4.1 急性经皮毒性试验

建议《规范》将急性皮肤毒性、经皮 LD₅₀ 的定义及实验动物的选择修订为与其他标准一致；

为避免试验期间动物相互抓挠，增加单笼饲养的要求；补充各类动物体表面积的数值和涂皮面积的计算方法；细化观察项目，增强可操作性；明确各类实验动物 LD₅₀ 急性毒性分级标准。

4.2 亚慢性经皮毒性试验

建议《规范》补充试验开始动物的体质量要求；为避免试验期间动物相互抓挠，增加单笼饲养的要求；可参考其他标准，明确 1 周染毒 5 d 也可接受；规范血液生化检查项目的名称，与其他标准统一，并加上英文缩写；参考其他标准，科学设置临床检查时间；增加肺脏作为组织病理学检查的指标，以证明动物是否存在感染。

4.3 致畸试验

补充阳性物质的给药剂量，增强可操作性和统一性；补充限量试验。

5 结语

尽管中国关于化妆品安全评价发布了系列标准、规范，在化妆品安全评价方面发挥了重要作用，但相比欧盟等国家或地区的化妆品安全评价

表 3 数据处理的差异比较

Tab. 3 Comparison of differences in data processing

标准	统计方法	需统计分析的指标	计算公式	其他
《规范》	没有规定	母体体质量、体质量增重、子宫连胎重、体质量净增重、着床数、黄体数、吸收胎数、活胎数、死胎数及百分率、胎仔的体质量及体长、有畸形的胎仔数、有畸形胎仔的窝数及百分率，动物总畸胎率和某项畸胎率	受孕率、活胎率、死胎率吸收胎率、外观畸胎率、骨骼畸胎率、内脏畸胎率、畸形率	无
GB/T 15193.14-2015	没有规定	同《规范》	体质量增重、体质量净增重	无
GBZ/T 240.21-2011	计量资料采用 F 检验，资料用百分率表示的用 χ^2 检验	母鼠平均体质量、黄体数、着床数、吸收胎数、活胎数、死胎数及百分率，胎仔的情况(体质量、身长、尾长、胎盘重)，畸胎的类型、数目及百分率	每组动物总畸胎率、每组动物某单项畸胎率、致畸指数、活胎率、死胎率、吸收胎率、畸形率、孕鼠体质量净增长	无
OECD414	使用普遍接受的或新的先进的统计方法，且统计方法的选择应作为试验设计的一部分	体质量、体质量变化和妊娠期子宫质量、黄体数、着床数、活胎和死胎的数量和百分比，以及再吸收的数量和百分比，着床前后损失的数量和百分比，胎仔体质量，肛门距离、有任何软组织或骨骼改变的胎仔的总数和百分比，以及个别异常的类型和发生率	无	注意雄性胎仔的睾丸下降不全/隐睾症的迹象。未存活至预定人道处死时间点动物的数据也应报告，但不包括在组间统计。在任何证实无毒性的研究中，应进一步考察确定受试物的吸收和生物利用率

体系，中国的化妆品安全评价体系面临诸多挑战，存在化妆品卫生规范和技术标准并存，且由不同的主管部门制定颁布，缺乏统一的组织协调机制，标准项目易产生交叉、重叠的问题^[17-18]。依托于中国食品药品检定研究院组织实施的化妆品标准体系建设五年规划，本文针对毒理学试验方法中的急性经皮毒性试验、亚慢性经皮毒性试验、致畸试验，通过对现有毒理学试验方法相关法规标准进行梳理整合，同时对国外标准进行跟踪研究，在对国内标准进行梳理并参考国外标准的基础上，对现有的化妆品标准之间存在对同一事项规定不一致的情形，化妆品标准体系存在不完善、不统一等问题提出意见和建议，希望能够为完善化妆品安全性毒理学评价程序和试验方法标准提供参考，保证标准的统一性、时效性、科学性和先进性，同时为具备相应检验能力的检验检测机构提供参考，更好地服务于化妆品的科学监管。

REFERENCES

[1] JIANG K X. Cosmetic standards and regulatory situation in China[J]. Deterg Cosmet(日用化学品科学), 2011, 34(8): 38, 42.
 [2] SUN B, GENG L, WANG Y. Investigation on the cosmetic standard system in China[J]. Deterg Cosmet(日用化学品科学), 2013, 36(5): 34-38.
 [3] 邢书霞. 欧盟和我国化妆品安全性评价体系的比较研究[J]. 口腔护理用品工业, 2020, 30(Z1): 51-53.
 [4] 国家药品监督管理局: 药监局公告 2021 年第 31 号. 化妆品新原料注册备案资料管理规定[S]. 2021.
 [5] 中华人民共和国国家标准: GB/T 21606-2008, 化学品 急性

经皮毒性试验方法[S]. 2008.
 [6] 中华人民共和国国家职业卫生标准: GBZ/T240.3-2011, 化学品毒理学评价程序和试验方法 第 3 部分: 急性经皮毒性试验[S]. 2011.
 [7] OECD: Test No.402. OECD guideline for the testing of chemicals Acute Dermal Toxicity: Fixed Dose Procedure[S]. 2017.
 [8] 国家药品监督管理局: 化妆品安全技术规范(2015)[S]. 2015: 488-489.
 [9] 中华人民共和国国家标准: GB/T 21764-2008, 化学品 亚慢性经皮毒性试验方法[S]. 2008.
 [10] 中华人民共和国国家职业卫生标准: GBZ/T 240.19-2011, 化学品毒理学评价程序和试验方法 第 19 部分: 亚慢性经皮毒性试验[S]. 2011.
 [11] OECD: Test No.411. OECD guideline for the testing of chemicals Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study[S]. 1981.
 [12] 国家药品监督管理局. 化妆品安全技术规范(2015)[S]. 2015: 528-531.
 [13] 中华人民共和国国家标准: GB/T 15193.14-2015, 食品安全国家标准 致畸试验[S]. 2015.
 [14] 中华人民共和国国家职业卫生标准: GBZ/T 240.21-2011, 化学品毒理学评价程序和试验方法 第 21 部分: 致畸试验[S]. 2011.
 [15] OECD: Test No.414. OECD guideline for the testing of chemicals Prenatal developmental toxicity study[S]. 2018.
 [16] 国家药品监督管理局. 化妆品安全技术规范(2015)[S]. 2015: 532-534.
 [17] LI S, LI L, WANG H L, et al. On cosmetics standards and the effectiveness in China[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2021, 35(1): 29-36.
 [18] WU T T, SHAN M. On safety supervision system of cosmetics [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2021, 35(1): 29-36.

收稿日期: 2021-07-12
 (本文责编: 沈倩)