

一种体外皮肤腐蚀性试验替代方法的建立

罗飞亚, 张露勇, 邢书霞*, 王钢力

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

【摘要】 目的 建立皮肤腐蚀性的体外检测方法—大鼠经皮电阻试验(TER), 优化 OECD 指南标准 TG 430 大鼠经皮电阻方法结果判定标准, 并评价该方法作为替代方法用于评估化妆品原料的皮肤腐蚀性检测可行性。**方法** 参照经合组织(OECD)化学品检测指南中 TG 430 体外皮肤腐蚀性大鼠经皮电阻试验的流程, 使用 Wistar 大鼠对 16 种参考化学物质进行皮肤腐蚀性检测, 设定不同的判定标准方案, 通过对比筛选出最优的判定标准方案; 并在 5 个实验室内进行 11 种参考物质的结果比对。**结果** 改良后的 TER 结果判定方案结论与参考化学物质的实际腐蚀性结果具一致性(Kappa 值 0.64), 改良方案 B 的特异性为 66.7%, 敏感性为 100%, 效能最高; 实验室内比对结论差异无显著性($P > 0.05$), 实验室内对 11 种参考物质的判定一致率为 72.7%。**结论** 经改良的大鼠经皮电阻试验可较好的筛选化学物质的腐蚀性, 有望在我国的替代毒理学及化学物质安全性评价中发挥重要的作用。

【关键词】 大鼠经皮电阻试验; 皮肤腐蚀性; 替代方法; 安全性评价; 离体皮肤

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 03-0365-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.03.015

Verification and application of the rat skin transcutaneous electrical resistance test (TER) as an alternative method to replace the animal skin corrosion test

LUO Feiya, ZHANG Luyong, XING Shuxia*, WANG Gangli

(National Institutes of Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Corresponding author: XING Shuxia. E-mail: xingshuxia2007@163.com

【Abstract】 Objective In order to verify an alternative method for the skin corrosion test by using transcutaneous electrical resistance (TER) test, and to optimize the implementation criteria in OECD TG 430 procedure. **Methods** According to the OECD TG 430 procedure, Wistar rat skin was used to test the TER values of 16 reference chemicals, and selected the most optimal standard via different implementation criteria. The program B was chosen to make inter-laboratory comparison between 5 laboratories by testing 11 chemicals, which were identified as the optimal standard. **Results** After the TER test, the result of corrosion test of 16 chemicals were accordant with the reference data (Kappa value = 0.64). The program B was the most optimal implementation criteria, and the specificity was 66.7% and sensitivity was 100%. There were no significant differences between the corrosion estimations of 5 laboratories, and the concordance rate of the 5 laboratories was 72.7%. **Conclusions** Transcutaneous electrical resistance (TER) test is an feasible and efficient tool for skin corrosion testing, and may become a good interim test to replace the *in vivo* test with this *ex vivo* test in cosmetics chemical safety assessment, thus, to reduce the animal usage in our country.

【Key words】 transcutaneous electrical resistance; TER; skin corrosion; animal alternative methods; safety assessment; *ex vivo* skin

[作者简介] 罗飞亚(1984—), 女, 助理研究员, 硕士, 专业: 毒理学。E-mail: feiya.luo@nifdc.org.com

[通信作者] 邢书霞(1968—), 女, 副研究员, 硕士, 研究方向: 公共卫生。E-mail: xingshuxia2007@163.com

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

近年,随着动物福利和动物保护的“3R”(减少 Reduction、优化 Refinement、替代 Replacement)原则的提出,以及世界范围内化妆品及化学品动物试验禁令的推行^[1-5],在毒理学安全性评价领域中,动物替代检测技术受到特别的关注^[6-10]。大鼠经皮电阻试验(transcutaneous electrical resistance test, TER)是利用大鼠背部离体皮肤检测腐蚀性,与传统的家兔试验相比,TER 减少动物数量、减轻动物痛苦,符合“3R”原则^[11-12]。目前国内对该方法的建立和使用报道还较少^[13-14],本研究在参照经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)化学品安全性检测指南的基础上,对 TER 结果判定的程序进行改良和验证。该方法在 2017 年 8 月被国家食品药品监督管理总局纳入《化妆品安全技术规范》(2015 版)^[15],作为化妆品用化学原料皮肤腐蚀性的替代检测方法^[16]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 种大鼠,鼠龄 18~21 d,体重 60~80 g,由中国食品药品检定研究院实验动物资源中心提供【SCXK(京)2014-0013】。动物试验环境条件为屏障环境【SYXK(京)2016-0004】,温度 22~24℃,相对湿度 50%~70%,动物自由饮食,日光灯 12 h 照明。大鼠皮肤应健康无破损,实验前动物在实验动物房环境中至少适应 3 d。

1.1.2 试剂

从 OECD 推荐的参考物质及实验室常用皮肤腐蚀性化妆品原料中选择了 16 种已知皮肤腐蚀性的化学物质作为受试物,包括:4-氨基-1,2,4-三氮唑(TCI)、丁子香酚(国药集团北京分公司)、溴乙基苯(Alorich)、四氯乙烯(国药集团北京分公司)、异硬脂酸(Adamas)、4-甲硫基-苯甲醛(TIC)、异丙醇(国药集团北京分公司)、月桂酸(国药集团北京分公司)、十二烷基硫酸钠(SDS, 20% w/v, Sigma)、N,N-二甲基亚二丙基三胺(Adamas)、邻叔丁基苯酚(TCI)、氢氧化钾(10% w/v, 国药集团北京分公司)、硫酸(10% w/v, 国药集团北京分公司)、辛酸(国药集团北京分公司)、1,2-丙二胺(国药集团北京分公司)、丙烯酸(国药集团北京分公司)。以盐酸(10 mol/L、8 mol/L)作为阳性对照,去离子水作

为阴性对照。同时,去离子水作为溶剂,配制电解液(154 mmol/L MgSO_4)、罗丹明 B 染料(10% w/v SRB)、染料萃取液(30% w/v SDS)。

1.1.3 仪器

大鼠经皮电阻仪委托北京华清天禧医药科技有限公司研制,仪器参数符合 OECD 指南要求(工作电压 220 V, 50 Hz, 交流电,工作电极为 2 根 216 惰性银电极),皮肤固定装置选用聚四氟乙烯参照 OECD 指南装置示意图及尺寸要求制作^[11]。

1.2 方法

1.2.1 大鼠经皮电阻仪 24 h 稳定性

选取同一只 Wistar 大鼠(29 d)背部靠近脊柱两侧的皮肤,将皮肤固定于蜡板上,剃除被毛及多余的脂肪组织,制成直径约 20 mm 的小皮片 5~6 块,将小皮片表皮面向上固定在聚四氟乙烯管末端,剪去多余皮肤。在 24 h 内分别选取 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、8、20、22、23 和 24 h 的时间点,对大鼠皮片进行电阻值(TER)读数,该过程重复 3 次,统计结果。

1.2.2 大鼠经皮电阻试验^[11-12]

选用 22 d 龄的 Wistar 雄性大鼠,剃去背部和两侧被毛,间隔 3 d 以含抗生素溶液浸洗去毛区 2 次,第 29 天时牺牲大鼠(大鼠牺牲时间必须在第 28~30 天内),剪取去毛区皮肤,小心剔除皮下脂肪,表皮面向上以胶圈固定于大鼠经皮电阻仪的皮肤固定装置上(聚四氟乙烯管),剪去多余皮肤。试验前向管内加入 1 mL 硫酸镁溶液(154 mmol/L),接上电极测定 TER 值,大于 20 k Ω 者可用。

液体受试物 150 μL 直接加入管内皮片的表皮面,固体受试物先研磨成细粉,取足量(约 100 mg)撒在皮片上,再加 150 μL 去离子水润湿。加样的皮片室温静置 24 h 后以流水轻柔地冲洗以去除受试物,用洗瓶向皮片表面滴加足量体积分数为 70% 的乙醇,5 s 后去除乙醇,再以流水清洗。尽量去除净受试物后,向管内加入 1 mL 硫酸镁溶液,接上电极测定 TER 值。记录 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。

1.2.3 罗丹明 B(SRB)染料渗透量测定

向管内皮片表面滴加 150 μL 10% SRB 水溶液,室温静置 2 h,以流水轻柔的冲洗皮片,去除多余的 SRB,小心的将皮片取下,放入含 8 mL 双蒸水的离心管中轻柔震荡 5 min,换干净的双蒸水重复清洗

1 次,将皮片放入 5 mL 30% 的 SDS 水溶液中,60℃ 水浴提取过夜,去除皮片,剩余提取液以 1900 r/min 离心 8 min(相对离心力 175g),取上清液 1 mL 加 4 mL30% SDS 溶液至 5 mL,测吸光值($\lambda = 565\text{ nm}$)。

1.2.4 结果判定标准方案

标准方案 S:按 OECD TG430 的判定程序,TER > 5 kΩ 为非腐蚀性(NC);对于 TER ≤ 5 kΩ 且肉眼观察皮片有明显损伤判为腐蚀性(C);TER ≤ 5 kΩ 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 10 mol/L 盐酸的为 C,染料渗透量小于 10 mol/L 盐酸的为 NC。

调整方案 A:程序同方案 S,而判定界值改为 15 kΩ。

调整方案 B:TER > 15 kΩ 为 NC,TER < 5 kΩ 且肉眼观察皮片有明显损伤判定为 C;TER 为 5 ~ 15 kΩ 且肉眼观察皮片未见明显损伤的,或 3 个平行样的 TER 值在界值(5、15 kΩ)上下波动的或肉眼可见皮片明显破损、变色、变硬等可疑情况,需进行染料渗透量测定,染料渗透量大于或等于 10 mol/L 盐酸的为 C,染料渗透量小于 10 mol/L 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 8 mol/L 盐酸。

调整方案 D:程序同方案 A,而染料渗透量判定标准为 8 mol/L 盐酸。

调整方案 E:程序同方案 B,而染料渗透量判定标准为 8 mol/L 盐酸。

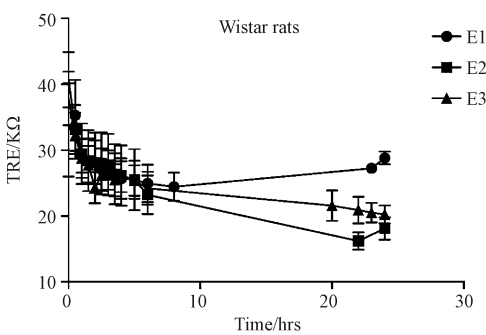
1.2.5 实验室间比对

在实验室建立 TER 试验方案后,选取 11 种参考物质发送至另外 4 家实验室进行 TER 检测,其中 3 家实验室使用本实验室相同的大鼠经皮电阻仪,1 家实验室使用自主研发的大鼠经皮电阻仪^[17]。收集 4 家实验室的数据并统一以方案 B 的判定标准判定结果,对比各实验室的结果。

2 结果

2.1 大鼠经皮电阻仪 24 h 仪器稳定性结果

正常大鼠皮片 TER 值变化如图 1 所示,在皮片置于皮肤固定装置后 2 ~ 10 h 内,TER 值明显降低,24 h 后稳定在 15 ~ 30 kΩ。3 次重复试验 TER 值变化趋势一致。



注:E1-3 分别为 3 次 24 h 稳定性监测曲线。
图 1 大鼠经皮电阻仪 24 h 稳定性监测结果
Note. E1-3 shown the repeated 3 times respectively.
Fig.1 Results of the 24 h TER stability analysis

2.2 TER 各方案腐蚀性结果判定及真实性分析

依据不同的判断方案,采用 TER 方法对 16 种参考物质进行腐蚀性判断,结果如表 1 所示,参考物质的腐蚀性强弱与 TER 值存在一定关联性。TER 值越高,其腐蚀性越弱。阴性对照(双蒸水)TER 平均值为 18.36 kΩ,符合 OECD 操作指南的参考数据(10 ~ 25 kΩ),阳性对照 10 mol/L 盐酸的 TER 平均值 3.93 kΩ,8 mol/L 盐酸的 TER 平均值 3.35 kΩ,略高于 OECD 的参考数据(0.5 ~ 1.0 kΩ)。OECD 操作指南的标准判定方案规定当 TER > 5 kΩ 时,且皮片肉眼观察无明显损伤,受试物直接判定为非腐蚀性。在本研究中,大鼠经皮电阻仪的读数均偏高,很多腐蚀性参考物质的 TER 值大于 5 kΩ 且肉眼观察皮片无损伤,但是通过罗丹明 B 染色后,染料渗透量大于阳性对照组的染料渗透量,符合 OECD 对罗丹明 B 染色结果腐蚀性的判定。此外,OECD 指南中指出如采用新的仪器检测,可能会改变判定界值,需要进一步验证。因此,基于本研究所使用的大鼠经皮电阻仪,对判定程序进行了调整,设定了方案 A-E,通过比较不同方案的真实性指标(表 2 所示),并将几种方案的判定结果经过配对 χ^2 检验与这 16 种参考物质的实际皮肤腐蚀性数据相比,方案 B 和 C 差异均无显著性($P > 0.05$)。以 B 方案的效能最高,特异性为 66.7%,敏感性为 100%,具有一致性(Kappa = 0.64)。综上,仅以 TER 值是否小于 5 kΩ 判断受试物的腐蚀性是不够的,进行第二步罗丹明 B 染色是必要的;除非肉眼观察到皮片损伤,否则应结合罗丹明 B 染色结果判定受试物的腐蚀性。

表 1 参考物质腐蚀性结果的对比

Tab.1 Comparison of the results of reference chemical skin corrosiveness

		大鼠经皮电阻试验结果									
受试物 Chemicals	CAS	参考腐蚀性 Reference Corrosion	TER results								
			TER (kΩ) (M ± sd, n≥3)	染料渗透量 Dye content (μg/disc)	肉眼可见损伤 Obvious Damage	各判定程序判定的结果 The results from different programs					
						S	A	B	C	D	E
去离子水 Deionized water		NC	18.36 ± 7.25	9.68 ± 6.28	No	NC	NC	NC	NC	NC	NC
4-氨基-1,2,4-三氮唑 4-Amino-1,2,4-triazole	584-13-4	NC	10.85 ± 4.60	34.47 ± 19.64	No	NC	C	NC	NC	C	NC
丁子香酚 Eugenol	97-53-0	NC	10.48 ± 2.49	104.01 ± 51.03	No	NC	C	NC	NC	C	C
溴乙基苯 Phenethyl bromide	103-63-9	NC	26.20 ± 6.54	—	No	NC	NC	NC	NC	NC	NC
四氯乙烯 Tetrachloroethylene	127-18-4	NC	9.34 ± 1.60	25.05 ± 8.12	No	NC	C	NC	NC	C	NC
异硬脂酸 Isostearic acid	2724-58-5	NC	36.63 ± 12.40	—	No	NC	NC	NC	NC	NC	NC
4-甲基硫基-苯甲醛 4-(Methylthio)-benzaldehyde	3446-89-7	NC	14.81 ± 4.14	172.58 ± 91.90	No	NC	C	C	NC	C	C
异丙醇 Isopropyl alcohol	67-63-0	NC	8.83 ± 0.53	138.95 ± 95.54	No	NC	C	C	NC	C	C
月桂酸 Lauric acid	143-07-7	NC	18.00 ± 5.88	—	No	NC	NC	NC	NC	NC	NC
十二烷基硫酸钠 SDS(20%)	25155-30-0	NC	7.10 ± 0.78	245.97 ± 142.94	No	NC	C	C	C	C	C
盐酸 HCL(10 mol/L)	7647-01-0	C	3.93 ± 1.08	115.89 ± 86.36	Yes	C	C	C	C	C	C
盐酸 HCL(8 mol/L)	7647-01-0	C	3.35 ± 0.37	37.75 ± 1.05	Yes	C	C	C	C	C	C
N,N-二甲基亚二丙基三胺 N,N-Dimethyldipropylenetriamine	10563-29-8	C	8.64 ± 0.21	251.72 ± 56.19	No	NC	C	C	NC	C	C
邻叔丁基苯酚 2-tert-Butylphenol	88-18-6	C	42.67 ± 12.69	577.27 ± 30.06	Yes	C	C	C	C	C	C
氢氧化钾 KOH(10%)	1310-58-3	C	6.81 ± 0.25	167.51 ± 21.22	No	NC	C	C	NC	C	C
浓硫酸 H ₂ SO ₄ (10%)	7664-93-9	C	5.09 ± 0.51	52.19 ± 13.45	Yes	C	C	C	C	C	C
辛酸 Octanoic acid	124-07-02	C	11.03 ± 1.51	345.19 ± 214.33	No	NC	C	C	NC	C	C
1,2-丙二胺 1,2-Propanediamine	78-90-0	Severe corrosive	7.78 ± 0.08	223.55 ± 61.98	Yes	C	C	C	C	C	C
丙烯酸 Acrylic acid	79-10-7	C	8.05 ± 0.49	209.26 ± 144.79	No	NC	C	C	NC	C	C

注:C:腐蚀性;NC:非腐蚀性;各受试物经皮腐蚀性为 UN GHS 目录中基于体内数据判定的结果;No:未观察到皮片损伤;Yes:观察到皮片损伤;—:未测定。

Note. C: Corrosive. NC: None corrosive. The corrosions were obtained from UN GHS catalog based on *in vivo* results. ^[18] No: There is no obvious damage on skin slice. Yes: There is obvious damage on skin slice. —: Untested.

表 2 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 (%)

Tab.2 The authenticity characteristics analysis for TER results by using different program interpretations (%)

方案 Programs	假阳性率 False positive rate	假阴性率 False negative rate	灵敏性 Sensitivity	特异性 Specificity	χ^2 -test *
S	0(0/9)	57.1(4/7)	42.9	100	$P=0.01$
A	66.7(6/9)	0(0/7)	100	33.3	$P=0.00$
B	33.3(3/9)	0(0/7)	100	66.7	$P=0.12$
C	11.1(1/9)	57.1(4/7)	42.9	88.9	$P=0.08$
D	66.7(6/9)	0(0/7)	100	33.3	$P=0.00$
E	44.4(4/9)	0(0/7)	100	55.6	$P=0.03$

注:* : 所有结果与各受试物参考腐蚀性数据进行比对。

Note. *. All results compared with the reference corrosive parameters of the tested substance.

2.3 实验室间比对结果

收集各实验室数据,统一采用方案 B 对各 11 种参考物质的腐蚀性进行判定,结果如表 3 所示。其中实验室 1~4 采用的大鼠经皮电阻仪均为北京华清天禧公司提供的仪器,实验室 5 为自主研发的大鼠经皮电阻仪^[17]。实验室间比对结果显示,丁香酚、异丙醇和 20% SDS 均有假阳性结果出现,邻

叔丁基苯酚有假阴性结果出现,其余参考物质的皮肤腐蚀性判定一致并与参考物质本身的腐蚀性相符,所有参考物质在 5 个实验室中的判定一致率为 72.7%。其中 20% SDS 在所有实验室中均检测为假阳性,可能是 TER 方法对该表面活性剂类物质过度判断。对各实验室判定结果进行一致率两两对比(表 4),各实验室对同一种参考物质的腐蚀性判

定一致率在 72.7%~90.9%,说明实验室间重复性较好。各实验室结果与参考物质的腐蚀性数据经过配对 χ^2 检验差异均无显著性($P > 0.05$),说明各实验室对参考物质的腐蚀性判定结果可靠。

表 3 皮肤腐蚀性实验室间比对结果

Tab.3 The skin corrosiveness results of different laboratories

化学物 Chemicals	参考腐蚀性 Corrosiveness reference *	实验室 1 LAB 1	实验室 2 LAB 2	实验室 3 LAB 3	实验室 4 LAB 4	实验室 5 LAB 5
去离子水 Deionized water	NC	NC	NC	NC	NC	NC
丁香酚 Eugenol	NC	NC	C	NC	C	NC
四氯乙烯 Tetrachloroethylene	NC	NC	NC	NC	NC	NC
异硬脂酸 Isostearic acid	NC	NC	NC	NC	NC	NC
4-甲基硫基-苯甲醛 4-(Methylthio)-benzaldehyde	NC	NC	NC	NC	NC	NC
异丙醇 Isopropyl alcohol	NC	C	C	NC	NC	NC
月桂酸 Lauric acid	NC	NC	NC	NC	NC	NC
十二烷基硫酸钠 SDS (20%)	NC	C	C	C	C	C
盐酸 HCL(10 mol/L)	C	C	C	C	C	C
盐酸 HCL(8 mol/L)	C	C	C	C	C	C
邻叔丁基苯酚 2-tert-butylphenol	C	C	C	NC	C	C
氢氧化钾 KOH(10%)	C	C	C	C	C	C
硫酸 H ₂ SO ₄ (10%)	C	C	C	C	C	C
1,2-丙二胺 1,2-Propanediamine	Severe corrosive	C	C	C	C	C

注:C;皮肤腐蚀性;NC;非皮肤腐蚀性。*: 各受试物经皮腐蚀性为 UN GHS 目录中基于体内数据判定的结果。
Note. C. corrosive to skin; NC. non-corrosive to skin. *. The results were obtained from UN GHS catalog based on *in vivo* results. (UN GHS 2007) [18]

表 4 实验室间一致率比对结果分析(%)

Tab.4 The reproducibility analysis for TER results between different laboratories

	实验室 2 LAB 2	实验室 3 LAB 3	实验室 4 LAB 4	实验室 5 LAB 5
实验室 1 LAB 1	90.9 (10/11)	81.8 (9/11)	81.8 (9/11)	90.9 (10/11)
实验室 2 LAB 2		72.7 (8/11)	90.9 (10/11)	81.8 (9/11)
实验室 3 LAB 3			81.8 (9/11)	90.9 (10/11)
实验室 4 LAB 4				90.9 (10/11)

3 讨论

皮肤腐蚀性/刺激性是化妆品安全性评价中较为重要的毒理学终点之一,OECD 操作指南中皮肤刺激性/腐蚀性的替代试验只有 3 类:大鼠经皮电阻试验(OECD TG 430) [11]、体外皮肤腐蚀性/刺激性的重组人表皮模型试验(OECD TG 431/439) [19~20]和体外皮肤腐蚀性膜屏障试验(OECD TG 435) [21]。与传统的动物试验 [14,22] 相比,TER 方法减少动物用量,减轻动物痛苦,符合动物伦理 3R 原则;与其他 OECD 认可的替代试验相比,TER 方法具有操作简便、试验成本低、试验材料容易获取等优点。TER 方法更适宜用于大量粗筛腐蚀性强的物质,但对腐蚀性强弱无法量化评级。

根据 OECD TG430 的标准,判定受试物是否为

非腐蚀性的标准为电阻值(TER)大于 5 k Ω ,然而在实际检测中发现,使用本课题研发的大鼠经皮电阻仪,检测阳性物质的电阻值往往大于 5 k Ω ,且肉眼很难分辨皮片是否需要染料渗透量测定,该结果与大鼠经皮电阻仪读数范围相关。在 OECD 操作指南中 [11],对大鼠经皮电阻仪的参数要求为惠斯通电桥,使用正弦或方波交流电频率为 50~1 000 Hz,但实际在仪器研发中发现,交流电频率会影响读数的稳定及读数范围 [17],而 OECD 规定的电流频率较广,虽然本实验中所使用的经皮电阻仪各项参数均符合 OECD 的指南要求,但检测出的电阻值读数仍会出现偏高的情况。另一方面,OECD 指南内也指出可根据仪器适当调整判断界值,因此建议在实验室内建立 TER 试验方法时,应通过检测参考物质的电阻值,并分析实验室内参考物质和对照组的数

据,适当调整判断基准。针对本实验研制的大鼠经皮电阻仪,经过现有数据分析,认为应在 TER 读数为 5 ~ 15 k Ω 且肉眼未观察到明显破损时,不省略罗丹明 B 染色的步骤,应结合染料渗透量的结果进一步确证受试物的腐蚀性,如有必要还可进行病理研究,观察皮肤被腐蚀的程度,以支持腐蚀性的结果判断。但目前只能说对于本研究使用的 16 种参考物质有效,对于其他化学物质的腐蚀性判断是否合适,或是否有更合理的判定标准,仍需扩大研究范围。在选取参考物质时,应同时考虑化学物质的理化性质(有机酸、无机酸、液体、固定、表面活性剂等)、是否具有明确的腐蚀性数据、是否是可购买到的常规试剂,力求尽可能具有代表性。

OECD 推荐的阳性对照物为 10 mol/L 盐酸,但在实验中发现 10 mol/L 盐酸容易造成皮片破裂而无法进行阳性对照组的染色,影响受试物染料渗透量的判定,因此可增加不会蚀穿皮肤的最高盐酸浓度(如本研究的 8 mol/L 盐酸组)作为阳性对照组。此外,大鼠皮片的质量控制及其在染毒的 24 h 内所处环境的湿度可能影响皮片状态,从而影响 TER 值的读数,这些方面仍有待进一步研究。

(致谢:感谢北京市药检所^[23]、浙江省食品药品检验研究院、广东省疾病控制中心、中国检验检疫科学研究院综合检测中心参与协助进行实验室间比对检测。感谢国家食品药品监督管理局对本研究的支持。)

参 考 文 献(References)

- [1] Regulation (EC) No. 1223/2009 of The European Parliament and of The Council of 30 November 2009 on cosmetic products. (n. d.). [S]. Official Journal of the European Union, 2009, 12, 22.
- [2] Azalea P, Rosholt. The Seventh Amendment directive — an unnecessary measure to a necessary end — possible legal challenges to directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council Amending Council Directive 76/768/EEC under European Union law [J]. Food Drug Law J, 2005, 60 (3): 421–446
- [3] Rogiers V, Pauwels M. The use of alternative methods in the safety assessment of cosmetic ingredients [J]. Curr Problems Dermatol, 2008, 36(1): 129–165.
- [4] Deshmukh GR, Kumar KH, Reddy PV, et al. In vitro skin corrosion; Human skin model test — A validation study [J]. Toxicol in Vitro, 2012, 26(6): 1072–1074.
- [5] Eskes C, Detappe V, Koëter H, et al. Regulatory assessment of in vitro skin corrosion and irritation data within the European framework; Workshop recommendations [J]. Regul Toxicol Pharmacol Rtp, 2012, 62(2): 393–403.
- [6] 程树军, 秦瑶, 柯逸晖, 等. 替代方法在化妆品检测中的应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(10): 101–106.
- [7] Cheng SJ, Qin Y, Ke YH, et al. The application analysis of alternative method in cosmetics assessment. [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(10): 101–106.
- [8] 艾德里安·史密斯. 3R 和替代方法是否进行了有效的探究(英文) [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(5): 543–550.
- [9] Adrian S. How can standardised reporting of animal research advance the 3Rs? [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(5): 543–550.
- [10] 贺争鸣, 李冠民, 岳乘飞, 等. 我国开展动物实验替代方法工作的前景研究(三) — 我国开展动物实验替代方法研究的思路及对策 [J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(1): 42–44.
- [11] He ZM, Li GM, Yue BF, et al. Research on the prospect of animal alternative methods in China (Part Three) — Ideas and Countermeasures for developing animal alternative methods in China. [J]. Chin J Comp Med, 2003, 13(1): 42–44.
- [12] 贺争鸣, 李冠民, 岳乘飞, 等. 我国开展动物实验替代方法工作的前景研究(二) — 我国动物实验替代方法研究的问题 [J]. 中国比较医学杂志, 2002, 12(6): 362–363.
- [13] He ZM, Li GM, Yue BF, et al. Research on the prospect of animal alternative methods in China (Part Two) — Research on animal alternative methods in China. [J]. Chin J Comp Med, 2002, 12(6): 362–363.
- [14] 李继平, 贺争鸣, 李冠民, 等. 我国开展动物实验替代方法工作的前景研究(一) — 我国动物实验替代方法研究的现状 [J]. 中国比较医学杂志, 2002, 12(4): 236–238.
- [15] Li JP, He ZM, Li GM, et al. Research on the prospect of animal alternative methods in China (Part One) — Present situation of research on animal alternative methods in China. [J]. Chin J Comp Med, 2002, 12(4): 236–238.
- [16] OECD (2015) TG 430. OECD guideline for the testing of chemicals No 430. In Vitro Skin Corrosion; Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER) [S].
- [17] ICCVAM (2003). ICCVAM minimum performance standards; in vitro skin transcutaneous electrical resistance (TER) tests for skin corrosion [S].
- [18] 梁志明, 杨杏芬, 杨颖, 等. 皮肤腐蚀性试验大鼠经皮电阻替代方法建立 [J]. 中国公共卫生, 2011, 27(5): 574–576.
- [19] Liang ZM, Yang XF, Yang Y, et al. Transcutaneous electrical resistance test as an alternative method of skin corrosion test in rat. [J] Chin J Public Health, 2011, 27(5): 574–576.
- [20] 俞萍, 胡启之, 陆罗定, 等. 大鼠透皮电阻实验替代皮肤腐蚀性实验的验证 [J]. 毒理学杂志, 2009, 23(5): 360–363.
- [21] Yu P, Hu QZ, Lu LD, et al. The in vitro rat skin transcutaneous electrical resistance test used as a alternative for traditional skin corrosion test. [J] J Toxicol, 2009, 23(5): 360–363.
- [22] 国家食品药品监督管理总局. 国家食品药品监督管理总局关于发布化妆品安全技术规范(2015 年版)的公告(2015 年第 268 号) [S/OL]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1870/140161.html>, 2015–12–23

China Food and Drug Administration. Announcement of the China Food and Drug Administration on Issuing the Safety and Technical Standards for Cosmetics (2015 Edition) (No. 268th 2015). [S/OL]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1870/140161.html>, 2015-12-23

[16] 国家食品药品监督管理总局. 总局关于将化妆品用化学原料离体皮肤腐蚀性大鼠经皮电阻和皮肤光变态反应 2 个试验方法纳入化妆品安全技术规范(2015 年版)的通告(2017 年第 136 号)[S/OL]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL0087/176283.html>, 2017-8-15.

China Food and Drug Administration. Announcement of the China Food and Drug Administration on Issuing the 2 methods and bring into the Safety and Technical Standards for Cosmetics (2015 Edition) (No. 136th 2017). [S/OL]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL0087/176283.html>, 2017-8-15.

[17] 胡洁泉, 杨杏芬, 杨颖, 等. 一种离体皮肤经皮电阻测量装置的研制 [J]. 中华生物医学工程杂志, 2013, 19(6): 453-456.

Hu JQ, Yang XF, Yang Y, et al. Development of a novel device for detection of transcutaneous electrical resistance in vitro. [J]. Chin J Biomed Eng, 2013, 19(6): 453-456.

[18] UN GHS (2007). United Nations, Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007 [W/OL]. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

[19] OECD (2015) TG 431. OECD guideline for the testing of chemicals Test No. 431: In vitro skin corrosion; reconstructed human epidermis (RHE) test method [S].

[20] OECD (2015) TG 439. OECD guideline for the testing of chemicals Test No. 439: In Vitro Skin Irritation; Reconstructed Human Epidermis Test Method [S].

[21] OECD (2015) TG 435. OECD guideline for the testing of chemicals Test No. 435: In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion [S].

[22] OECD (2002) TG 404. OECD guideline for the testing of chemicals Test No 404. Acute Dermal Irritation/Corrosion [S].

[23] 李丽, 郭玉东, 栗景蕊, 等. 大鼠经皮电阻试验方法研究 [J]. 实验动物科学, 2015, 32(6): 26-28.

Li L, Guo YD, Li JR, et al. The research on transcutaneous electrical resistance test. [J]. Lab Ani Sci, 2015, 32(6): 26-28.

[收稿日期] 2018-02-06