

人体斑贴试验用于评估化妆品植物原料安全性的方法学探讨

琚瑶¹, 刘宇红^{2,*}, 武雪玲³

(1. 三立慧评(北京)检测技术有限公司, 北京, 102401;

2. 北京东方森森生物科技有限公司, 北京, 101200;

3. 太和康美(北京)中医研究院有限公司, 北京, 102401)

摘要:《化妆品安全技术规范》已指出化妆品成品的封闭斑贴测试方法, 文章探讨将其运用到化妆品(植物)原料测试的适应性。结果显示方法可行, 但不宜直接照搬选用去离子水作为原料的斑贴稀释剂。在稀释剂去离子水中加入适量甘油, 可有效降低敏感季节去离子水产生的假阳性, 而且不会影响非敏感季节的试验结果, 有效解决原料误判问题。冬季及其前后的换季时期是斑贴假阳性率的高发季节($p < 0.05$)。文章对去离子水作为稀释剂的假阳性问题以及甘油发挥作用的原因进行了探讨。

关键词: 化妆品植物原料; 封闭斑贴稀释剂; 斑贴试验; 斑贴影响因素

作者简介: 琚瑶, 三立慧评(北京)检测技术有限公司安全评价部经理, 高级工程师, 主要从事化妆品和原料安全评估。E-mail: ju_yao_ok@126.com。

通讯作者简介: 刘宇红, 副教授, 北京东方森森生物科技有限公司康美研究院院长, 研究方向: 化妆品植物功效原料研发与评价。E-mail: liuyuhong@163.com。



琚瑶



刘宇红

斑贴试验在临床上广泛用于检测潜在的刺激物或过敏原,《化妆品安全技术规范》^[1]将其用于化妆品成品的人体安全性评价, 受试物可以是化妆品本身或其稀释物, 稀释剂可以为去离子水。但是化妆品原料的人体斑贴试验做法, 未直接提及。

在进行化妆品原料的斑贴测试时, 由于化妆品原料基本不是百分之百添加, 故多数情况下需要根据原料在配方中的用量, 将其稀释到规定的浓度后再进行斑贴测试。对于水溶性原料的稀释, 一个自然而直观的想法是, 采用去离子水或啫喱(仅由水和少量赋形剂组成)作为稀释剂, 以便尽可能减少测试体系成分, 更“真实”的反应原料的实际情况。

为此, 参考化妆品的做法, 我们采用去离子水为稀释剂, 将植物原料稀释到所需浓度后, 添加到斑试器小室中进行24小时封闭斑贴试验, 同时平行测试去离子水(对照孔), 结果发现, 对公认无刺激的去离子水, 时常会产生多例不良反应(假阳性), 测试体系对照孔出现问题, 数据无法采信, 受试植物原料无法开展斑贴测试。在不同季节的考察试验中发现, 去离子水或生理盐水, 其斑贴结果不稳定, 有时通过, 有时不通过, 造成无法判断受试植物原料是否通过斑贴测试的困扰。为防止受试物从斑试器小室侧漏, 我们常用啫喱代替去离子水作为原料的稀释剂, 亦出现如上问题, 应该同属去离子水的假阳性现象。

有研究显示斑贴所用基质、季节变化、斑试器品质、观察时间、受试物加样剂量、接触面积、抗原浓度、斑试物体积、对产品的包埋性及对有效成分的释放能力等多种因素都会影响斑贴试验结果的准确性和重复性^[2-11]。在综合考虑相关影响因素后, 我们仍无法避免去离子水这类公认的无刺激性的物质所显示的“刺激性”。所以选取合适的化妆品原料斑贴稀释剂, 以避免对原料的误判, 并尽可能消除季节带来的波动性, 就显得尤为重要。

本文主要探究化妆品原料用封闭斑贴稀释剂的组成等因素对化妆品原料斑贴结果的影响, 为解决化妆品植物原料斑贴测试中所遭遇的瓶颈问题, 找到适合评价化妆品原料的人体斑贴试验方案提供依据。

1. 实验部分

1.1 主要材料及试剂

斑试器: 斑试器A, 斑试器B, 和斑试器C分别由三个不同斑试器生产商提供。斑试器A为国际标准 Finn-chamber 斑试器(国际标准芬兰小室); 斑试器B和斑试器C均为国产常规斑试器。

试剂: 生理盐水: 0.9%氯化钠溶液, 由四川科伦药业股份有限公司提供; 去离子水: 自制; 甘油: 由 Procter & Gamble 公司提供; 丙烯酰胺二甲基牛磺酸铵/VP 共聚物

(以下简称 AVC)：由科莱恩化工(中国)有限公司提供。

1.2 斑试物及组别

阴性对照(样品1)：斑试器+干滤纸片+生理盐水。

阴性对照(样品2)：斑试器+干滤纸片+去离子水(经煮沸冷却后使用)。

空白对照(样品3)：斑试器+干滤纸片。

空白对照(样品4)：斑试器。

无甘油斑贴稀释剂(样品5)：取适量去离子水，加热煮沸约5min，冷却至50~55℃。取已用75%酒精消毒、烘干后的80mL样品瓶，分别加入99%(w%)煮沸且冷却后的去离子水和1%(w%)AVC，搅拌均匀并灭菌。

甘油斑贴稀释剂(样品6-样品10)：在样品5的基础上，分别添加1%，2%，3%，4%，5%(w%)的甘油，去离子水加至100%(w%)。

以上样品均为试验前新鲜配制，试剂配制及加样过程中均有专人复核。

1.3 受试对象

每批测评均选用成年健康受试者，其有效人数不少于30例，年龄18~60岁，男女不限，受试部位为背部，所有受试者均无任何皮肤疾病，受试区域皮肤完好。到访当天，背部部位没有涂抹任何化妆品。排除遗传过敏体质和皮炎等影响试验结果的受试者。此外，2个月内使用过糖皮质激素、非甾体抗炎药及抗组胺药物者，以及哺乳或妊娠期妇女、皮肤疾病、晒斑、瘢痕体质或过度纹身及遗传过敏体质者均不纳入研究。所有受试者在试验前均签订知情同意书。

1.4 试验方法

参照《化妆品安全技术规范》^[1]第七章第2节，人体皮肤封闭型斑贴试验方法，主要包括：将受试物液体0.020mL~0.025mL加入到斑试器小室内，直接贴敷于皮肤，封闭贴敷24h后，去除斑试器，并于0.5h、24h和48h

进行结果的判读。

1) 斑试器筛选：分别采用斑试器A、B、C，对样品1-4按照如上所述方法进行斑贴测试，计算不良反应人数及不良反应率，同时，对比相同样品在不同斑试器上的结果。

2) 斑贴稀释剂中甘油浓度筛选：将样品5-10置于筛选后最优的斑试器里，按照如上所述方法进行斑贴测试，计算不良反应人数及不良反应率。

3) 数据波动性研究试验：对比两种斑贴稀释剂(无甘油和含3%甘油)的斑贴结果在2018-2022年度变化的特点。

1.5 判读标准^[12]

试验结果以未出现不良反应人数(-)和出现不良反应人数(+)进行统计；不良反应率(%)为同次测试不良反应人数的总和与试验总人数之比。不良反应指受试区皮肤表面的任何非正常现象，包括但不限于红斑，褶皱，水肿，疹子等。

2. 结果与讨论

2.1 去除斑试器后的观察时间点及斑试器种类对斑贴结果的影响

如表1所示，样品1-4出现不同程度的不良反应，较高的不良反应率出现在去除斑试器后0.5h，24h不良反应人数基本趋近于0。故后续斑贴试验的观察时间点采用0.5h。去除斑试器48h后，所有样品在三种斑试器上均未出现不良反应，故表格中仅展示0.5h和24h的结果。

样品1(生理盐水)和样品2(去离子水)为公认的无刺激性的物质，在本试验中，均出现了不良反应(假阴性)，相比样品2，样品1的假阳性反应率较低，但无统计学差异($P > 0.05$)。考虑到液体受试物易侧漏流失，导致接触样品量不准确，而生理盐水电导率较高，影响AVC的

表1 去除斑试器后不同观察时间点及不同厂家斑试器下的不良反应人数及对应的不良反应率

斑试物	去除斑试器 0.5h						去除斑试器 24h					
	斑试器 A		斑试器 B		斑试器 C		斑试器 A		斑试器 B		斑试器 C	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
样品1	29	2(7%)	25	5(17%)	26	4(13%)	30	0(0%)	30	0(0%)	29	1(3%)
样品2	26	4(13%)	24	6(20%)	23	7(23%)	30	0(0%)	30	0(0%)	28	2(7%)
样品3	28	3(10%)	24	6(20%)	25	5(17%)	30	0(0%)	29	1(3%)	29	1(3%)
样品4	26	4(13%)	26	5(17%)	23	7(23%)	30	0(0%)	29	1(3%)	28	2(7%)

注：(-)和(+)项下数值分别为未出现和出现不良反应人数，括号内数值为对应的不良反应率。

增稠效果（无法做成啫喱），后续试验采用基于水的啫喱基质进行斑贴稀释剂的探究。

经过比较三种斑贴器，发现斑贴器 A 的不良反查出率低于斑贴器 B 和 C，且有统计学差异（ $P < 0.05$ ； $P < 0.01$ ），而斑贴器 B 和 C 之间的差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。故最优斑贴器选定为 A，用于开展后续斑贴试验研究。

2.2 斑贴稀释剂中不同甘油浓度对斑贴结果的影响

经过 2.1 的筛选，优选斑贴器 A，啫喱基质，观察时间为揭下斑贴器后 0.5h，对不含以及含有不同浓度甘油的斑贴稀释剂对斑贴结果的影响进行探究；为了使结果更具有代表性，考虑于不同年、不同季节开展测试，表 2 和图 1 中涉及的试验数据为 2018–2022 年期间开展的 7 次重复性试验。

样品 5（仅由去离子水和少许赋形剂组成的斑贴稀释剂），不良反应率高达 13%~30%，且数据波动大（3%~30%）。推测是由于组成过于简单（99% 为水），水的渗透压高于人类体液^[13]，经过 24h 的封闭环境后，易导致渗透压和水油平衡紊乱，从而造成皮肤不适。考虑在不影响原料本身性质的前提下，对斑贴稀释剂进行适当调整，以减弱或消除单纯水带来的假阳性，既不放过一个可能引起刺激的原料（假阴性），又不误判一个原料有刺激（假阳性）。

受化妆品成品人体斑贴试验的启发，化妆品配方通常含有多元醇或赋脂剂等，在进行人体斑贴试验时，采用去离子水进行稀释是没有问题的；但化妆品原料不一定含有相关成分，或者经过稀释相关成分已降至很低，如果稀释剂仍选用去离子水，则水带来的假阳性现象可能不可忽视。有研究表明，外源性补充的甘油可以渗透角质层，增进角质层水分的吸附，完善皮肤功能^[14]，从而在一定程度上

上缓解水带来的假阳性。因此本试验考察了向斑贴稀释剂中加入不同质量浓度的甘油，发现样品 6~10（甘油质量浓度为 1%~5%）均呈现出抑制假阳性现象的效果，且随着甘油浓度的增加，不良反应率逐渐降低，在 3% 时趋于平稳状态（见图 1）。

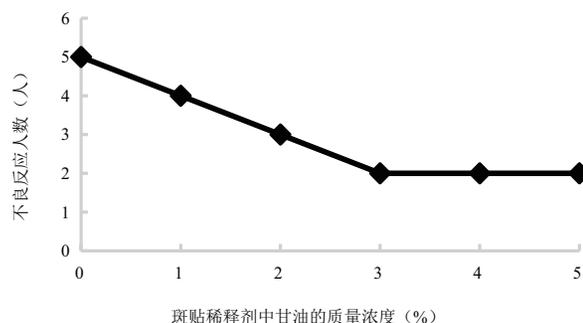


图 1 斑贴稀释剂中不同甘油浓度对斑贴结果的影响

此外，与样品 5 相比，样品 7~10（甘油质量浓度为 2%~5%）的不良反应率的降低均有统计学差异（ $p < 0.01$ ）。但考虑到高浓度的甘油可能会因自身的性能掩盖原料本身的特性^[15]，出现假阴性结果，故综合以上数据，选择 3% 甘油斑贴稀释剂，用于研究不同季节对斑贴结果稳定性的影响。

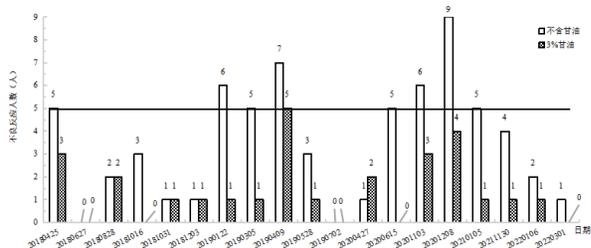
2.3 不同季节对斑贴结果稳定性的影响

2018–2022 年期间的斑贴数据显示（见图 2），不含甘油的斑贴稀释剂，多次出现不通过现象^[8]，单次测试假阳性人数最高达到 9 人。且结果有很大的波动性，时而通过，时而不通过，通过率仅占测试次数的 42%。相比之下，3% 甘油斑贴稀释剂的不良反应人数显著降低，结果比较平稳，合格率约占 95%。说明加入 3% 甘油后，可以有效降低试验结果的假阳性率和波动性，同时允许少许假阳性率，以避免由于甘油添加过多而可能造成假阴性结果。

表 2 斑贴稀释剂中不同甘油浓度对斑贴结果的影响

试验次数	不含甘油（样品 5）		1% 甘油（样品 6）		2% 甘油（样品 7）		3% 甘油（样品 8）		4% 甘油（样品 9）		5% 甘油（样品 10）	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
1	25	5(17%)	26	4(13%)	28	2(7%)	29	1(3%)	29	1(3%)	29	1(3%)
2	29	1(3%)	30	0(0%)	30	0(0%)	28	2(7%)	29	1(3%)	29	1(3%)
3	25	5(17%)	26	4(13%)	27	3(10%)	30	0(0%)	29	1(3%)	29	1(3%)
4	24	6(20%)	24	6(20%)	26	4(13%)	27	3(10%)	27	3(10%)	27	3(10%)
5	21	9(30%)	24	6(20%)	25	5(17%)	26	4(13%)	26	4(13%)	27	3(10%)
6	25	5(17%)	21	9(30%)	26	4(13%)	29	1(3%)	28	2(7%)	29	1(3%)
7	26	4(13%)	29	1(3%)	29	1(3%)	29	1(3%)	29	1(3%)	29	1(3%)
平均值	25	5(17%)	26	4(13%)	27	3(10%)**	28	2(7%)**	28	2(7%)**	28	2(7%)**

表注：(-)和(+)项下数值分别为未出现和出现不良反应的人数，括号内数值为对应的不良反应率。数据来自 2018–2022 年期间开展的 7 次重复试验。无甘油斑贴稀释剂（样品 5）不良反应率最高，结果波动大，无法采信；而添加甘油（样品 6–10），可以有效抵抗去离子水的假阳性，解决不同测试时间不含甘油的水啫喱出现的如上问题。添加甘油较不添加甘油具有显著性差异（**： $p < 0.01$ ）。



图注：不含甘油的斑贴稀释剂（白色柱图），本公认为是安全的，却经常出现很高的不良反应人数，有的甚至斑贴测试不通过（单次测试不良反应人数 ≥ 5 例，图2中横线及以上），且结果波动大，分析认为是去离子水假阳性所致，季节不同导致现象加剧；而添加3%甘油（阴影柱图），可以有效抵抗去离子水的假阳性，解决不同测试时间水基啫喱出现的上述问题。

图2 去除斑贴器0.5h，不含甘油的斑贴稀释剂与含3%甘油的斑贴稀释剂出现不良反应人数的比较结果

文献^[16-20]指出季节也是影响斑贴结果的主要因素，冬春温度和湿度都相对较低，人体皮肤较为敏感，出现不良反应的几率比夏秋时高。根据2018-2022年的斑贴数据，按照季节进行分类统计，通过计算每个季节出现不良反应人数的平均值来分析季节对人体斑贴的影响（见图3）。发现不含甘油的斑贴稀释剂，在冬季及其前后的换季期间为假阳性反应的高发期，与文献报道一致。3%甘油斑贴稀释剂在春，夏，秋，冬四个季节中的阳性反应人数均相对减少，且在冬季有显著性差异（ $p < 0.05$ ）。说明加入3%甘油后，有效降低了敏感季节产生的假阳性现象，而不影响非敏感季节的试验结果，从而解决全年试验结果波动性大的问题。此外，在4个季节中，夏季出现不良反应的人数较少，但相比于其他3个季节，无统计学差异（ $p > 0.05$ ）。

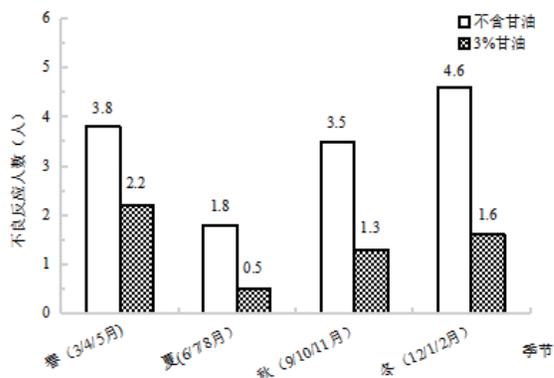


图3 去除斑贴器0.5h，不含甘油的斑贴稀释剂与含3%甘油的斑贴稀释剂在不同季节间出现不良反应的平均人数比较

3. 结论

《化妆品安全技术规范》指出了化妆品成品的封闭斑贴测试方法，本文探讨将其运用到化妆品（植物）原料测试的适应性。结果显示，方法可行，但化妆品原料的斑贴

测试不能直接照搬化妆品成品的做法，否则易造成对原料安全性的误判。技术重点归纳如下：（1）在化妆品原料的斑贴测试中，受试原料稀释剂的选择尤为重要。化妆品原料的斑贴稀释剂不宜采用去离子水或啫喱（添加少许增稠剂的去离子水），因水易造成假阳性，和判定结果的不一致性。添加适当浓度甘油可以有效抑制水的假阳性问题，同时为避免假阴性的产生，甘油浓度应以部分消除水的假阳性为宜。（2）为避免受试物外流而无法开展测试，稀释剂剂型建议采用啫喱而非水。由此构成的斑贴稀释剂组成（w%）是：3%甘油（如原料里含有多元醇，甘油添加量酌减），1%增稠剂AVC（其他高分子物质暂未考察），去离子水加至100%。（3）斑贴器品质对斑贴结果有影响，应选择和使用合格斑贴器。

该方案有助于稳定全年的皮肤状态，稳定不同季节而导致的水的假阳性和波动大问题，方法简单易行，能有效降低不同年、不同时间点化妆品植物原料（结果未展示）测试结果的波动性和不一致性，避免假阳性或假阴性给原料带来的误判，为化妆品原料的安全使用提供重要的检测手段。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家药品监督管理局. 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）[EB/OL]. (2015-12-23)[2023-12-05]. <https://www.nmpa.gov.cn/hzhp/hzhpfgwj/hzhpqzwj/20151223120001986.html>.
- [2] Li Bingjie, Cheng Ying, Tan Yimei, et al. Analysis of factors influencing patch test reactions: Results from a large-population-based study in Chinese [J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2021, 21(5): 2183-2188.
- [3] Li Bingjie, Cheng Ying, Tan Yimei, et al. Analysis of factors influencing skin reactions to sunscreens, skin whitening products, and deodorants: Results from a large-scale patch test dataset in China [J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2022, 21(9): 3986-3992.
- [4] 刘娜, 王学民, 袁肖海, 等. 体积和剂量对斑试皮肤反应结果的影响 [J]. 中国美容医学, 2005, 14(3): 344-346.
- [5] C, Tanglertsampan, H I, Maibach. The role of vehicles in diagnostic patch testing. A reappraisal. [J]. Contact dermatitis, 1993, 29(4): 169-74.
- [6] Astner S, González E, Cheung A C, et al. Non-Invasive Evaluation of the Kinetics of Allergic and Irritant Contact Dermatitis [J]. Digest of the World Core Medical Journals, 2005, 124(2): 351-9.
- [7] 陈曹军, 刘玮, 孙才. 不同斑试材料和加样剂量对斑试皮肤反应结果的影响 [J]. 中国美容医学, 2007, 16(3): 359-361.
- [8] Lazzarini R, Duarte I, Ferreira A L. Patch tests [J]. Anais Brasileiros De Dermatologia, 2013, 88(6): 879-888.

- [9] 李经增, 张良, 李慧娟, 等. 140例皮炎湿疹类皮肤病斑贴试验结果分析 [J]. 海峡预防医学杂志, 2017, 23(03): 99-100.
- [10] 邹颖. 化妆品斑贴试验的皮肤反应及其影响因素 [C]// 中国中西医结合皮肤性病委员会. 首届全国湿疹皮炎皮肤过敏学术会议论文汇编. 上海: 中国中西医结合学会, 2019: 59.
- [11] Ophaug S, Schwarzenberger K. Pitfalls in Patch Testing Minimizing the Risk of Avoidable False-Negative Reactions[J]. *Dermatologic Clinics*, 2020, 38(3): 293-300.
- [12] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 卫生部关于印发《化妆品卫生规范》(2007年版)的通知(卫监督发[2007]1号) [EB/OL]. (2007-1-4)[2023-12-05]. <http://www.nhc.gov.cn/bgt/pw10702/200703/becf8584da50413aa13d2d53f08c2b8f.shtml>.
- [13] 梁子钧. 体液渗透压测定在医学中的应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988.
- [14] 张桂蓉, 王曦, 刘小林, 等. 含甘油与芝麻油制剂治疗干性皮肤功效对比分析 [J]. 中华医学美容美容杂志, 2010, 16(3): 179-182.
- [15] 王昌涛, 王双, 潘妍, 等. 化妆品保湿功效评价研究 [J]. 日用化学品科学, 2010, 33 (10): 32-35.
- [16] Hjorth N. Seasonal variations in contact dermatitis [J]. *Acta Derm Venereol*, 1967, 47(6): 409-418.
- [17] Agner T, Serup J. Seasonal variation of skin resistance to irritants [J]. *British Journal of Dermatology*, 2010, 121(3): 323-328.
- [18] Birger K, Werner A. Seasonal influence on patch test results in central Europe. [J]. *Contact Dermatitis*, 2010, 34(3): 215-231.
- [19] Ingber A, Sasson A, David M. The seasonal influence on patch test reactions is significant in Israel [J]. *Contact Dermatitis*, 2010, 39(6): 318-319.
- [20] 戴彩虹, 郑聪聪, 施辛, 等. 季节对皮肤斑贴试验阳性结果的影响 [J]. 中国误诊学杂志, 2020, 15(5): 221-224.

A Methodology Study on Patch Test for Safety Assessment of Botanical Cosmetic Ingredients

Ju Yao¹, Liu Yu-hong^{2*}, Wu Xue-ling³

(1. Beijing EviSkin Inc. Beijing, 102401;

2. Nutri-Woods Bio-Tech (Beijing) Co. Ltd. Beijing, 101200;

3. Beijing Academy of TCM Beauty Supplements, Beijing, 102401)

Abstract : “Technical Specification for Cosmetic Safety” describes the closed patch test method for finished cosmetics, and this paper discusses the adaptability of applying it to the test of cosmetic botanical ingredients. The results show that the method is feasible, but it is not appropriate to directly copy deionized water as the patch test diluent for cosmetic ingredients. Adding proper amount of glycerol to diluent of deionized water can effectively reduce the false positive produced by water in sensitive season, while will not affect the test results in non-sensitive season, thus effectively solving the problem of misjudgment for ingredients. Winter and the changing seasons around it are the high incidence seasons of false positive of patch test ($P < 0.05$). The reasons of water-caused false positive and the role of glycerol are discussed in this paper.

Keywords : botanical cosmetic ingredients; diluent of closed patch test; patch test; influencing factors of patch test

