

編號：CCMP95-TP-046

中草藥可添加於化妝品之品項資料研究 與安全性及有效性評估

張聰民
弘光科技大學

摘 要

研究目的：

透過資料之蒐集，建議可添加於化妝品之中草藥品項。利用網際網路資訊搜尋與整理，瞭解各國針對含中藥化妝品的相關規定。完成各項實驗驗證文獻資料蒐集與整理；進行中藥與化妝品之安全性與有效性等各項試驗方法文獻資料蒐集與查證。完成可添加於化妝品內中藥材品項藥材之安全性與有效性評估模式之建立，並且提出具體管理方案之建議。

研究方法：

利用電腦網路資訊搜尋工作，蒐尋和整理國內外的含中藥化妝品相關資料。參考歐洲、美國、日本、大陸資料等，瞭解各國針對含中藥化妝品的相關規定，以作為國內參考依據。科學文獻資料蒐集與查證，整理可添加於化妝品內中藥材品項的安全性與有效性評估模式與方法。

結果與討論：

中國大陸化妝品組成中禁用之中草藥共 108 項，但是可以添加於化妝品之中草藥則未明文規定。美國針對化妝品組成中禁用之中草藥無明文規定，美國「化妝品原料評價委員會」評估可以限量使用之中草藥共 35 項。歐盟針對化妝品組成中禁用之中草藥共 36 項，可以添加於化妝品之中草藥則未明文規定。日本針對化妝品組成中禁用之中草藥無明文規定，可以限量使用之中草藥共 3 項。關於安全性與有效性評估的方法，均有標準方法可循。建議主管機關審慎評估欲公告可添加於化妝品之中草藥品項之前，應確定於人體使用之最大限量，而安全性與有效性評估模式與方法則可舉辦相關公聽會後討論公告之，針對安全性方面首重皮膚刺激性與敏感性測試。

關鍵詞：中草藥、化妝品、安全性、有效性

Number: CCMP95-TP-046

Study on the Chinese Medicine Herb Added in Cosmetics and Evaluate the Methods of Safety and Effectiveness Assessment

Tsong Min Chang
Hungkuang University

ABSTRACT

Aim:

Review the regulations and laws of Chinese herb-containing cosmetic products announced from different countries, and establish the standard evaluation platform of safety and effectiveness of Chinese herb-containing cosmetic products.

Method:

First, we searched related news and data of Chinese herb-containing cosmetics by network and literature. Second, we want to collect the regulations and laws of Chinese herb-containing cosmetics from different countries.

Results & Discussion:

There are 108 items of Chinese herb that cannot be applied into cosmetic formulations announced from mainland of China. The American Cosmetic Ingredient Review announced 35 items of herb could be added into cosmetic formulations with limited concentration. The European Cosmetic Affiliation announced 36 items of herb could not be added into cosmetic. Japan government announced 3 items of herb preparations could be added into cosmetic formulations with limited concentration. We suggested the maximum local safety concentration of any Chinese herb should be identified before announcement. The standard assay platform of safety and effectiveness of Chinese herb-containing cosmetic products should be discussed in public and then be announced by the government.

Keywords: Chinese herb, cosmetic, safety, effectiveness

壹、前言

自古以來將中藥應用於化妝品已經有相關的歷史記載，古代的人曾經使用動植物的材料(如白芷、白芨、桑白皮、天然色素如紫草、礦物磨成細粉、油脂類如豬脂等)用來美容與滋潤肌膚，而在傳統中醫的美容理論中，中藥美容是其中一項重要的領域。中藥美容乃是利用外用美容方藥製品或內服美容方藥兩種方式，達到美容的訴求。外用美容中藥製品是直接作用於肌膚表層，經由局部藥物經皮吸收作用，達到養顏美容的訴目的(如普劑方中的丹砂方)；內服美容中藥是透過調理五臟六腑的機能與經絡氣血的運行，以潤澤肌膚、美白(如珍珠散)或消除皺紋。本研究之標的將以符合我國【化妝品衛生管理條例】第三條對化妝品之定義：「化妝品係使用於人體外部，以潤澤髮膚、刺激嗅覺、掩飾體嗅或修飾容貌之物品」為前提，針對可使用於化妝品之中藥材品項做一廣泛性與科學性的研究。

最近幾年來科技的發展日新月異，國內化妝品相關產業的發展相當蓬勃與快速，其中不乏標榜生物科技與添加中草藥抽提物的化妝品，尤其是以天然草本為行銷訴求的化妝品更是充斥整個化妝品市場。市售含中草藥化妝品的成分標示欄中經常可見單一產品添加了數種中藥單位藥材，並且宣稱具有如保濕、美白、消除皺紋、抗老化等特殊的美容功效，因此也獲得廣大消費者的青睞，而擁有一定比例的市場佔有率。隨著知識經濟時代的來臨，消費者的消費習慣與品味也跟著改變，選擇適合本身肌膚特質且天然無害的化妝品，逐漸受到消費者的重視，也形成一股化妝品的消費風潮。以往添加於化妝品中的合成色素與香料，經常含有具毒性的重金屬成分如鉛、汞等，消費者長期使用之後，會對肌膚造成相當大的傷害；而煤焦油類的合成色素，很容易對肌膚造成刺激性或過敏現象。如果能利用某些中藥具有的天然色素和香料，取代傳統添加於化妝品的化學合成性原料，不僅能避免上述問題的發生，同時因為中藥具有特定的療效，若能以科學的檢測技術證實中藥對肌膚的特殊療效，繼而添加於合適的化妝品配方中，將使消費者有更多的購買選擇，並且創造很高的經濟價值與市場願景。

行政院衛生署為推動中草藥研發工作，陸續進行許多相關的配套措施，逐年編列預算，委託學者、專家進行中醫藥相關研究，已經完成【中藥新藥查驗登記須知】修正版與【徵求教學醫院成立中藥臨床試驗中心計畫】，政府已經將化妝品產業列入【挑戰 2008】國家重點推動產業之一，許多標榜生醫材料奈米技術與天然草本的生物科技公司紛紛投入化妝品開發的行列，訴求高科技、高效能與天然草本的化妝品正在全球的化妝品市場如雨後春筍般隨處可見。根據統計，全球化妝品產業每年以 7% 驚人的速度

成長，遠超過世界 GDP 兩倍之多。工研院統計，2002 年台灣的化妝品市場規模也高達新台幣大約有 565 億元。關於全球中草藥化妝品的市場規模，根據香港貿易發展局的調查指出，自 1994 年到 2000 年，全球草本藥物市場由原先的 124 億美元增加到 196 億美元，目前全球中草藥化妝品的市場規模，仍在持續成長中。

中藥應用於化妝品其實已經有長久的歷史，古代的人曾經使用一些動植物的材料(如油脂)用來滋潤肌膚，而在傳統中醫的美容理論中，中藥美容是其中一項重要的領域。我國中醫藥的發展過程當中，許多的古典醫籍中對於護膚美容、抗肌膚衰老、抗痘等均有相關的記載：神農本草經中詳細載錄超過一百種具養顏美容功效的中藥，例如菟絲子、白芷、柏子仁等；梁朝陶弘景的肘後百一方與唐代孫思邈的千金翼方中，也許多關於中藥美容方劑的記載。實際上，許多中藥具備增加肌膚營養、防曬與防治各種肌膚疾病的功能，或者是對於粉刺、痤瘡、乾燥龜裂、色斑、皺紋等肌膚症狀有一定程度的改善效果；此外，部分中藥甚至能促進肌膚生長、強化肌膚彈性、調整角質層的角化程度與減少肌膚的色素沉著，而有增進肌膚功能與預防肌膚功能衰退及老化的作用(1)。另一方面，若能兼顧內服美容方藥與外用含中藥化妝品，同時調理內外身體功能，可以調整個人內在體質與外在美容的效果(2,3)。

一般消費者使用美容化妝品或保養品的習慣幾乎是每天使用而且是長期使用，所以美容產品首先必須是對於人體的安全無虞，同時使用後在人體不會造成任何不良反應或產生毒性。然而，化妝品業界在迎合消費者崇尚天然化妝品成分風潮之時，由於對中藥的瞭解不清楚或未曾透過科學的實驗驗證，使得消費者經常在使用含中藥化妝品的產品後，對肌膚造成嚴重刺激性或過敏現象，繼而使消費者對中藥化妝品失去信心。化妝品產業界在選擇合適的中藥添加於產品配方中，以達到特殊美容功效訴求的同時，如果能夠有規範可依循，選擇符合可以添加於化妝品的中藥品項，將能避免消費者使用中藥化妝品的疑慮。事實上，傳統中醫藥經過數千年實際臨床印證，已經有許多中藥的使用經驗與藥效記載，也因為如此，中藥具備了一般使用化學合成原料化妝品所欠缺的優勢，以致於市面上的含中藥化妝品產品種類不勝枚舉，有日益增多的趨勢，並且有愈來愈高的市場佔有率(4)。中藥化妝品的功能主要可區分為四類：

- 一、烏髮生髮：常用的化學染髮劑如對苯二胺經常造成頭皮肌膚過敏，但是含天然成分的烏髮生髮產品並不多見，曾被用於染髮的植物成分有蘇木精、指甲花等，中藥具有烏髮生髮功能者如何首烏等(5)。
- 二、保濕抗老除皺：添加於化妝品的中藥具有保持表皮角質層水分、減少肌膚細紋、促進肌膚或毛髮的細胞生長等功能，繼而賦予化妝品保濕、

抗老、除皺的功效；各種營養霜如人蔘霜屬於此類(5)。

三、美白：中醫所謂的黃褐斑，西醫認為是肌膚表皮的第五層(即基底層)的黑色素細胞的色素代謝異常所致。黑色素細胞攝取酪胺酸胺基酸進入細胞後，細胞的酪胺酸酶催化酪胺酸轉變成多巴與多巴醌，隨後進行一系列的氧化反應產生黑色素。當黑色素細胞在人體局部分佈不均勻或數量過多，產生的黑色素累積過多，無法順利被代謝，便可能形成黃褐斑。因此，中藥若具備抑制酪胺酶的酵素活性的功能，或是能促進血液循環，往往能夠對於黃褐斑有一定的防治效果或是淡化肌膚異常的色素斑。含有白芷、菟絲子、獨活、射干、益母草、桂皮等中藥化妝品均有此類功效(6,72)。

四、抗痘：痤瘡(青春痘)是肌膚皮脂分泌異常，使痤瘡桿菌的菌體外酵素(脂解酶)分解皮脂產生過多的脂肪酸，引起毛囊壁脫，落造成毛囊發炎的一種慢性發炎症狀。因此，具有抗菌消炎作用的中藥，添加於化妝品將能有效抑制痤瘡桿菌的細胞活性，進而達到抗痘的功能。傳統中藥有抑菌消炎作用者甚多，如當歸、川芎、牡丹皮、生薑、蘆薈、桂皮等均有抗痘功效(5,74,75)。

目前世界各國的化妝品中，含動植物提取物的化妝品種類極多，包括白芨、天花粉、黃芩、桑葉、黃耆、紫草、人蔘、當歸、川芎、牡丹皮、生薑、蘆薈等相關產品種類多樣化，然而卻普遍缺乏科學驗證數據與臨床療效評估研究(7)。未來開發含中藥化妝品必須考慮三個重要的方向：(一)中藥品種的鑑定：要添加於化妝品的中藥原料，其產地品質與種類必須經過鑑定，避免產地因素、同物異名、同名異物等問題會影響中藥原料的質與量(8)。(二)安全性試驗：中藥提取物要添加於化妝品必須經過安全性試驗，包括急性、亞急性、慢性毒性試驗與過敏試驗，避免消費者長期使用的潛在危險。目前已證實蒼耳、石竹、雪蓮等會引起接觸性皮膚炎(9)。(三)有效性試驗：建立含中藥化妝品的有效分析平台，作為分析與評估產品有效性，避免業者作誇大不實的廣告功效宣傳，以及誤導消費者的盲目使用(10)。

中藥化妝品的主要成分是天然中藥，功效訴求主要有保濕、抗痘、抗老、除皺與美白等功效(11,12,14)。保養用的中藥化妝品強調能滲透進入達肌膚的皮下層細胞，可以促進細胞活化，進而表現出細緻有彈性的肌膚(11,15)。抗痘用的中藥化妝品具有消炎抗菌的中藥成分，可以有效抑制痤瘡桿菌的細胞活性，達到防治面皰的功能(17,19,22)。抗老與除皺的中藥化妝品則強調促進肌膚真皮層纖維母細胞的生長，增加膠原蛋白質與彈力蛋白質的製造量，繼而增進肌膚彈性、延緩老化(13,16,18)。美白去斑的中藥化妝品，可以抑制黑色素細胞活性且能促進肌膚的局部血液微循環，加速黑

色素的代謝清除，而達到美白淡斑效果(13,20,21)。上述中藥化妝品的功效訴求與肌膚的醫療保健，有密切不可分之相關性，其最終目的在於維持肌膚的健康(23,24)。中藥化妝品應具備的特色簡述如下：(一)中藥強調原色原味，因為葉綠素不能保存，只有葉黃素才能保存，而且每一瓶味道也不相同，隨著採收季節、土壤等因素顏色也會有點差別。(二)因含植物纖維素，透氣性佳，不阻塞毛細孔，長期使用膚色自然健康。(三)不含工業酒精，使用發酵式的酒精像米釀成米酒，能使毛細孔不粗大。(四)不含人工香料，使用中藥檀香，丁香，蒼朮，苦杏仁，木香等(77)。(五)不含防腐劑，以黃蓮，黃柏，熟地，黃耆替代。(六)不含人工色素，因化妝品經常與皮膚接觸，所以要求添加的色素應該是安全無毒，無副作用，符合食品衛生標準，中草藥色素完全符合，而合成色素原料中可能含有重金屬如汞、鋁、鉛等毒性，應特別慎用。另外煤焦油類合成色素往往對皮膚刺激很大。中草藥最大優越性，它含有營養性療效性的物質，能滋養皮膚並達衛生保健目的，如紫草、丹參、薑黃、黃精、胡桃、胭脂樹紅等(78)。(七)天然中草藥乳化劑如：阿拉伯膠、杏樹膠、果膠等具備本身無生理活性，無毒性，乳化力強，能耐酸、鹼，不受冷、熱、微生物影響的優點(80)。

市面上常用添加於化妝品之中藥材舉例如下：(一)藍靛：訴求消炎殺菌，促進受損之皮脂修護並可平衡皮脂之分泌(25,26)。(二)連翹：訴求拔除膿毒(27)。(三)赤檉：訴求提升細胞之修護能力，增加抵抗，預防皮膚受到感染(28,29)。(四)貝母：訴求拔除爛瘡腫毒，促進新細胞再生與活絡(30)。(五)毛健草：訴求抑制黑色素細胞之過量分泌(31)。(六)莽草：訴求防止細胞脫水，促進黑色素細胞之代謝(32,33)。(七)真珠：訴求清熱解毒，收斂生肌，促進肌膚光澤滑嫩(34,35,36)。(八)素心藤：訴求拔除烏氣沉積(37,38)。(九)銀花：訴求消除皮膚腫痛，預防細胞感染(39,40)。(十)冬凌草：訴求抑制敏感原之發生，消除敏感因素(41)。(十一)蘆薈：訴求清涼膠狀保護劑，可消腫退火(42,43,47)。(十二)美人蕉：訴求舒緩皮膚之敏感反應，降低皮膚之過敏性(44)。(十三)刺菀，佛甲草，苦蕒，紫河車：訴求可增加細胞含水功能，使不易老化；增加細胞間組織液的活絡，加強細胞保濕功能，消爛瘡腫毒，剝落老死細胞，促進細胞再生，恢復細胞嬌嫩與光澤(45,46)。(十四)冬蟲夏草，百合，丹蔘，補骨脂，玄蔘：訴求深層細胞營養與水份的供給及補充；強化深層細胞功能，增加肌膚抵抗力；快速滋養修復肌膚表層受損細胞，增加保濕；防止日曬造成肌膚傷害；適用任何肌膚(47,48,49,50)。然而上述列舉之中藥材之品項是否符合規定並不清楚，以及缺乏中藥材本身與含中藥材配方對於皮膚的安全性暨有效性相關試驗數據資料，對於廣大的化妝品消費族群而言，實有安全之疑慮。因此，建立可添加於化妝品之中藥材品項，實有其必要性與急迫性(73, 76, 79)。

貳、材料與方法

本計畫藉由(一)對於行政院衛生署認定之醫藥品十大先進國家，其化妝品之公告書(如日本化妝品基準、歐盟法規、大陸資料等)中，所收載之中草藥可添加之化妝品品項為主，透過資料之蒐集，建議可添加於化妝品之中藥品項。(二)網際網路資訊蒐尋與整理。(三)化妝品配方設計與實驗驗證之資料蒐集與查詢，針對建議可添加之中藥品項，進行中藥品項添加於化妝品配方後之安全性與有效性等各項評估試驗，以做為是否添加該品項的參考依據。在完成可添加於化妝品之中藥材的品項資料彙編與實際科學實驗驗證之文獻查證與資料整理後，並且提出具體管理方案之建議。

參、結果

中國大陸化妝品組成中禁用之中草藥共 108 項，但是可以添加於化妝品之中草藥則未明文規定。美國針對化妝品組成中禁用之中草藥無明文規定，美國「化妝品原料評價委員會」(CIR)評估可以限量使用之中草藥共 27 項。歐盟針對化妝品組成中禁用之中草藥共 36 項，可以添加於化妝品之中草藥則未明文規定。日本針對化妝品組成中禁用之中草藥無明文規定，可以限量使用之中草藥共 3 項。

肆、討論

本研究計畫之執行發現，世界各國針對化妝品組成分之禁止使用項目與含量限制，主要以化學成分為主，關於化妝品組成中禁用或可以限量添加之中草藥品項資料相當有限，科學文獻報告關於化妝品中添加之中草藥的研究大多以體外細胞試驗為主，而且是利用某些中草藥之指標成分進行安全性或有效性研究，對於實際應用於人體仍然有一段距離。另一方面，化妝品安全性與有效性評估的方法，已有標準方法可循。具體建議主管機關審慎評估欲公告可添加於化妝品之中草藥品項之前，應確定於人體使用之最大限量，而安全性與有效性評估模式與方法則可舉辦相關公聽會後討論公告之，針對安全性方面首重皮膚刺激性與敏感性測試。

伍、結論與建議

具體建議主管機關審慎評估欲公告可添加於化妝品之中草藥品項之前，應確定該中草藥品項於人體使用之最大安全限量，目前調查資料中僅以美國「化妝品原料評價委員會」與日本公開可以限量使用的部分品項，具體建議主管機關必須掌握具體可靠的安全性數據再行公告較為妥切。

針對安全性方面具體建議主管機關注重要求皮膚刺激性(貼布試驗)與敏感性測試(致敏測試)的數據，同時必須有人體試驗倫理委員會(Interstitutional Review Board; IRB)的同意文件。

各種有效性評估模式與方法則可舉辦相關公聽會後討論公告之。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP95-TP-046 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. 喬玉梅：中藥資源在化妝品中的應用，中國民間療法 2001；9(8)：43~44。
2. 王欣、李濟：中醫美容與未來發展趨勢，中國美容醫學 2000；9(1)：71~73。
3. 黃斐莉、閻世翔：實用美容中藥學，瀋陽 遼寧科學技術出版社 2001；pp.43~44。
4. 金久寧、吳菊蘭、謝秀、余穗娟：傳統醫藥中的美容植物研究(上)，中國美容醫學 2001；10(1)：16~19。
5. 閻世翔：化妝品科學(上冊)，北京 科學技術文獻出版社 1995；pp.261~265；291。
6. 張惠：歸白藥膜治療 68 例黃褐斑療效觀察，皮膚病與性病 2000；22(4)：25~26。
7. 劉德軍：中藥材綜合開發技術與利用，北京 中國中醫藥出版社 1998；pp.3~64。
8. 童承福：臺灣市售誤用品種及桑寄生類藥材藥理活性之研究，中國醫藥學院中國醫學研究所博士論文 1999；pp.44~133。
9. 化妝品生產工藝編寫組：化妝品生產工藝，北京 中國輕工業出版社 1998；pp.19~27；55~61；377~393。
10. 韋燕梅 陳浩宏：美容藥物研究進展，現代中西醫結合雜誌 2002，18：1856-1858；。
11. 魏彩霞 鄭體厚：中藥的美容作用，陝西中醫 2002，10：940-941。
12. 貢樹銘：中國古代美容摭談，醫古文知識 2001，4：20-22。
13. 余國俊：白芷外用祛斑美容，中醫雜誌 2000，7：394。
14. 邱葵司天潤：中草藥在美容方面的研究現狀，中國中醫藥信息雜誌 2000，11：17-18。
15. 周亦農 孫玉冰：美容養膚中草藥初輯，中醫文獻雜誌 2000，4：22-23。
16. 施洪飛 楊立坤：野菜馬齒莧抗氧化美容等保健功效研究，中國醫藥學報 2000，6：31-33。
17. 陳遙：《御藥院方》美容方述略，湖北中醫雜誌 1999，4：181。
18. 劉敏張士勇：中藥去斑美容淺析，基層中藥雜誌 1999，2：62-63。
19. 余劍萍：試論《本草綱目》中美容方藥應用特色，時珍國醫國藥 1999，9：713-714。
20. 葛蒼：《醫宗金鑒》中美容藥方初探，時珍國藥研究 1998，2：103。
21. 唐美容：中藥面膜美容保健簡介，湖南中醫雜誌 1998，4：59。

22. 張德芹：《神農本草經》中美容藥物的整理和作用探討，天津中醫學院學報 1998，3：29-31。
23. 張昱：《本草綱目》中醫的美容方，湖南中醫藥導報 1998，8：20。
24. 肖祥雲：中藥保健與美容，家庭中醫藥 1998，6：34。
25. 黃霏莉：孫思邈對中醫美容的貢獻，江蘇中醫 1997，7：41~42。
26. 歷向春 董廣濱：美容潤膚浴散的研究，黑龍江醫藥 1997，2：.98~99。
27. 常敏毅：日本草藥美容術簡介，家庭中醫藥 1997，2：.40~41。
28. 王曉原：《本草綱目》美容方藥淺析，時珍國藥研究 1996 2：66~67。
29. 劉漢清 樹長春：中藥美容藥劑的制備概要，基層中藥雜誌，3：.42~43。
30. 張淑瑛：冬瓜的美容及藥用價值，中國民間療法 1996，4：49。
31. 楊群超 牛夢勇：中國醫學與顏面美容，河北中西醫結合雜誌 1996，2：.78。
32. 鄧紅：《本草綱目》醫療美容方法簡論，時珍國藥研究 1995，4：1。
33. 叢月珠：中藥美容藥劑的研究與開發，中成藥 1995，2：46-47。
34. 田素琴 周新：中藥系列美容法：悠久的中醫藥美容歷史，遼寧中醫雜誌。95/01，1：.-40；1995。
35. 連仲元 邢寶瑞：漫話中草藥與美容，大眾中醫藥 1994，3：36~。
36. 李瑛：祛病美容 杏仁立功，大眾中醫藥 1994，6：20。
37. 王方大：傳統美容藥物概述，基層中藥雜誌 1994，4：38~39。
38. 蘇鄭壽麗菊：白芷美容淺述，河南中醫藥學刊 1994，6：46。
39. 蒲昭和：我國古代方藥書中的美容醋劑，中醫藥學報 1993，6：.5~7。
40. 汪碧濤：美容與《千金要方》，大眾中醫藥 1993，3：30~31。
41. 黃星：美容藥物的歷史源流考察，北京中醫 1993，1：32~33。
42. 萬金榮：《本草綱目拾遺》中植物類美容藥物的整理和考証，時珍國藥研究 1993，4：3~5。
43. 宋蘭田 姜宏傑：白玉美容膏治療 32 例痤瘡及黑色素沉著，吉林中醫藥 1992，3：36。
44. 沈敏娟 歐秀梅：《本草綱目》中醫的美容法撮要，甘肅中醫 1992，4：39~40。
45. 孫立新：清宮中藥美容方，大眾中醫藥 1992，3：41。
46. 陳家驊：中藥對美容的貢獻，山東中醫學院學報 1991，1：58~60。
47. 王維寧：美容佳藥—蘆薈，中醫雜誌 1991，9：57。
48. 王昭雲：中藥美容化妝品漫談，大眾中醫藥 1991，2：5。
49. 嚴東標：《醫宗金鑒》美容八方，大眾中醫藥 1991，2：17。

50. 張雪峰：歷代宮廷美容方選賞，大眾中醫藥 1991，3：37~38。
51. R.J. Babu, A. Chatterjee, M. Singh: Assessment of skin irritation and molecular responses in rat skin exposed to nonane, dodecane and tetradecane. *Toxicology Letters* 2004; 153: 255-266
52. E. P. Mensah-Brown, D. E. Rizk, Mahendra Patel, Swaminathan I. Chandranath and Abdu Adem: Effects of ovariectomy and hormone replacement on submucosal collagen and blood vessels of the anal canal of rats. *Colorectal Disease* 2004; 6: 481-487
53. 張麗卿編著 1998 化粧品製造實務 台灣復文興業股份有限公司出版
54. 張麗卿編著 2003 化粧品檢驗實務 匯華圖書出版股份有限公司出版
55. Harman, D: The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981; 78: 7124-7128.
56. Orr, W.C., and Sohal, R.S: Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1994; 263: 1128-1130.
57. Parkes, T.L., Elia, A.J., Dickinson, D., Hilliker, A.J., Phillips, J.P., and Boulianne, G: Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat. Genet.* 1998; 19: 171-174.
58. Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., Jr., et al.: Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 1996; 13: 43-47.
59. Ho, Y.S., Magnenat, J.L., Bronson, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., and Funk, C.D.: Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 16644-16651.
60. Melov, S., Schneider, J.A., Day, B.J., Hinerfeld, D., Coskunra, S.S., Crapo, J.D., and Wallace, D.C.: A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 1998; 18: 59-63.
61. Klass, M.R.: A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mech. Ageing Dev.* 1983; 22: 279-286.
62. Friedman, D.B., and Johnson, T.E.: A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility.

- Genetics* 1998; 118: 75-86.
63. Larsen, P.L., Albert, P.S., and Riddle, D.L.: Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1995;139: 1567-1583.
64. Larsen, P.L.: Ageing and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 8905-8909.
65. Vanfleteren, J.R., and De Vreese, A.: Rate of aerobic metabolism and superoxide production rate potential in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Zool.* 1996; 274: 93-100.
66. Lin, Y. J., Seroude, L., and Benzer, S.: Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant *methuselah*. *Science* 1998; 282: 943-946.
67. Wang, E.: Senescent human fibroblast resist programmed cell death, and failure to suppress *bcl2* is involved. *Cancer Res.* 1995; 55: 2284-2292.
68. Ewbank, J.J., Barnes, T.M., Lakowski, B., Lussier, M., Bussey, H., and Hekimi, S.: Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. *Science* 1997; 275: 980-983.
69. Jonassen, T., Proft, M., Randez-Gil. F., Schultz, J.R., Marbois, B.N., Entian, K.D., and Clarke, C.F.: Yeast Clk-1 homologue (Coq7/Cat5) is a mitochondrial protein in coenzyme Q synthesis. *J. Biol. Chem.* 1998; 6: 3351-3357.
70. Wakayama, T., Perry, A.C.F., Zuccotti, M., Johnson, K.R., and Yamagimachi, R.: Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369-374.
71. Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H.S.: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-813.
72. 93 年 08 月 行政院衛生署中醫藥委員會學術暨臨床應用研討會成果彙編(2002-2003)
73. 93 年 08 月 台灣中草藥臨床試驗環境與試驗法規(93 年版)
74. 93 年 12 月 臺灣中醫藥網路資源網站導覽
75. 94 年 09 月 行政院衛生署中醫藥委員會學術暨臨床應用研討會成果彙編(2004) (1-5 冊)
76. 94 年 10 月 中醫藥管理法規彙編(94 年版)
77. 94 年 12 月 中藥用藥安全與實務
78. 94 年 11 月 行政院衛生署中醫藥委員會科技研發策略暨委辦計畫

(1996-2005 年)研究成果

79. 95 年 09 月 中醫醫療管理法規彙編(95 年版)
80. 95 年 09 月 行政院衛生署中醫藥委員會學術暨臨床應用研討會成果彙編(2005) (1-3 冊)
81. 化妝品衛生規範(中華人民共和國衛生部發布), 2002
82. 化妝品生產企業衛生規範(中華人民共和國衛生部發布), 2000
83. 衛生部化妝品衛生行政許可申報受理規定(中華人民共和國衛生部發布), 2006
84. Cosmetic Ingredient Review 2003 Annual Report, CIR Washington DC.
85. Cosmetic Ingredient Review Compendium 2004, CIR Washington DC.
86. The Official Journal (<http://europa.eu.int/eur-lex>) The Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the member states relating to cosmetic products; EC Journal L262-27. 09. 1976 modified, amended and completed by Directives for Amendment and Directives for Adaptation.
87. 日本藥事法
88. 日本藥事法實施細則
89. 化妝品原料基準(平成 12 年厚生省告示第三百三十一號)

柒、圖、表

表一、中國大陸化妝品組成中禁用之中草藥與相關製劑

序號	中文名稱	英文名稱
1	歐烏頭屬 (葉子、根和草藥製劑)	<i>Aconitum napellus</i> L.(leaves , roots and galenical preparations)
2	側金盞花及其製劑	<i>Adonis vernalis</i> L. and its preparations
3	大阿米芹及其草藥製劑	<i>Ammi majus</i> and its galenical preparations
4	印防己 (果實)	<i>Anamirta cocculus</i> L. (fruit)
5	蒽油	anthracene oil
6	加拿大大麻 (夾竹桃麻、大麻葉羅布麻) 及其製劑	<i>Apocynum cannabinum</i> L. and its preparations
7	顛茄及其製劑	<i>Atropa belladonna</i> L. and its preparations
8	莨菪 (葉、果實、粉和草藥製劑)	<i>Hyoscyamus niger</i> L. (leaves , seeds , powder and galenical preparations)
9	土根 (根、粉末及草藥製劑)	<i>Ipecacuanha (Cephaelis ipecacuanha</i> brot . and related species)(root , powder and galenical preparations)
10	叉子圓柏的葉子，精油及其草藥製劑	<i>Juniperus sabina</i> L. (leaves , essential oil and galenical preparations)
11	鉛和鉛化合物 (化粧品用著色劑中用於染髮劑的醋酸鉛除外)	lead and its compounds , with the exception of lead acetate in hair stain
12	月桂樹籽油	oil from the seeds of <i>Laurus nobilis</i> L.
13	毒扁豆	<i>Physostigma venenosum</i> balf
14	商陸及其製劑	<i>Phytolacca</i> spp . and their preparations
15	毛果芸香及其草藥製劑	<i>Pilocarpus jaborandi</i> holmes and its galenical preparations
16	桂櫻	<i>Prunus laurocerasus</i> L.
17	除蟲菊及其草藥製劑	<i>Pyrethrum album</i> L. and its galenical preparations
18	龍葵及其草藥製劑	<i>Solanum nigrum</i> L. and its galenical preparations
19	羊角拗及其草藥製劑	<i>Strophantus</i> species and their galenical prearetions
20	馬錢子和它的草藥製劑	<i>Strychnos</i> species and their galenical preparations
21	(a) 頭骨，包括胸以及眼、扁桃體和脊髓： — 達到 12 月齡的牛科動物 — 12 月齡以上或從牙齦以萌出一個永久性門齒的羊和山羊科動物 (b) 羊和山羊科動物的脾臟以及由此獲得的原料	(a)the skull , including the brain and eyes , tonsils and spinal cord of : — bovine animals aged 12 months — ovine and caprine animals which are aged over 12 months or have a permanent incissor tooth erupted though the gum (b)the spleens of ovine and caprine animals and ingredients derived from there .

序號	中文名稱	英文名稱
22	但是，牛羊脂衍生物可以使用，如果生產者使用下述方法，並且是嚴格保證的： — 酯基轉移作用或水解作用至少是在 200°C，以及適宜的相應壓力下 20min (甘油和脂肪酸及酯) 的條件下進行 — 與 NaOH (12M) 皂化作用 (甘油和肥皂) 是在下述條件下進行： ● 分批法：95°C 3h ● 連續法：140°C，2 巴 (2000h Pa) 8min 或相等條件	However , tallow derivative may be used provided that the following methods have been used and strictly certified by the producer : — transesterification or hydrolysis at at least 200°C and at an appropriate corresponding pressure , for 20 minutes (glycerol , fatty acids and fatty acid esters) ; — saponification with NaOH 12 M (glycerol and soap): ● Batch process: at 95°C for 3 hours or ● Continuous process: at 140°C ,2 bars (2000h Pa) for 8 minutes or equivalent conditions.
23	黃花夾竹桃苷提取物	<i>Thevetia nerifolia</i> juss . glycoside extract
24	(白)海葱及其草藥製劑	<i>Urginea scilla</i> stern . and its galenical preparations
25	藜蘆的根及草藥製劑	<i>Veratrum</i> spp . and their preparations
26	斑蝥	Cantharides , <i>Cantharis vesicatoria</i>
27	土荊芥(精油)	<i>Chenopodium ambrosioides</i> (essential oil)
28	秋水仙及其草藥製劑	<i>Colchicum autumnale</i> L. and its galenical preparations
29	毒參(果實、粉末和草藥製劑)	<i>Conium maculatum</i> L. (fruit, powder,galenical preparations)
30	巴豆(巴豆油)	<i>Croton tiglium</i> (oil)
31	箭毒及箭毒鹼	Curare and curarine
32	曼陀羅及其草藥製劑	<i>Datura stramonium</i> L. and its galenical preparations
33	種子藜蘆(沙巴草) (種子和草藥製劑)	<i>Schoenocaulon officinale</i> Lind. (seeds and galenical preparations)
34	毛茛科烏頭屬植物	<i>Aconitum</i> L, (Ranunculaceae)
35	毛茛科側金盞花屬植物	<i>Adonis</i> L, (Ranunculaceae)
36	卜芥	<i>Alocasia cucullata</i> (Lour.)Schott
37	海芋	<i>Alocasia odora</i> (Roxb) K. Koch
38	蒟蒻	<i>Amorphophallus rivieri</i> Durieu; <i>Amorphophallus sinensis</i> Belval
39	打破碗花	<i>Anemone hupehensis</i> Lemoine
40	白芷	<i>Angelica dahurica</i> (Fisch. Ex Hoffm) Benth. et Hook. f.
41	杭白芷	<i>Angelica dahurica</i> (Fisch. ex Hoffm) Benth. et Hook. f. var. <i>formosana</i> (Boiss.)Shan et Yuan
42	茄科山莨菪屬植物	<i>Anisodus</i> Link et Otto, (Solanaceae).
43	檳榔	<i>Areca catechu</i> L.

序號	中文名稱	英文名稱
44	馬兜鈴科細辛屬植物	<i>Asarum L.</i> (Aristolochiaceae)
45	芥子	<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern. et Coss. ; <i>Sinapis alba</i> L.
46	鴨膽子	<i>Brucea javanica</i> (L.) Merr.
47	蟾酥	<i>Bufo bufo gargarizans</i> Cantor ; <i>Bufo melanostictus</i> Schneider
48	長春花	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don
49	牛心茄子	<i>Cerbera manghas</i> L.
50	白屈菜	<i>Chelidonium majus</i> L.
51	藜	<i>Chenopodium album</i> L.
52	威靈仙	<i>Clematis chinensis</i> Osbeck ; <i>Clematis hexapetala</i> Pall. ; <i>Clematis manshurica</i> Rupr.
53	鈴蘭	<i>Convallaria keiskei</i> Miq.
54	馬桑	<i>Coriaria sinica</i> Maxim.
55	紫堇	<i>Corydalis incisa</i> (Thunb.) Pers.
56	文殊蘭	<i>Crinum asiaticum</i> L. var. <i>sinicum</i> Bak.
57	野百合	<i>Crotalaria sessili flora</i> L.
58	大戟科巴豆屬植物	<i>Croton</i> L. (Euphorbiaceae).
59	芫花(根、全草)	<i>Daphne genkwa</i> Sieb. et Zucc.
60	茄科曼陀羅屬植物	<i>Datura</i> L. , (Solanaceae)
61	魚藤	<i>Derris trifoliata</i> Lour.
62	玄參科毛地黃屬植物	<i>Digitalis</i> L. (Scrophulariaceae).
63	白薯蕷	<i>Dioscorea hispida</i> Dennst.
64	茅膏菜	<i>Drosera peltata</i> Sm. Var. <i>lunata</i> (Buch. –Ham.) C. B. Clarke
65	綿馬貫傘	<i>Dryopteris crassirhizoma</i> Nakai
66	麻黃科麻黃屬植物	<i>Ephedra Tourn.</i> ex L, (Ephedraceae).
67	葛上亭長	<i>Epicauta gorhami</i> Mars.
68	大戟科大戟屬植物	<i>Euphorbia</i> L, (Euphorbiaceae).
69	藤黃	<i>Garcinia morella</i> Desv.
70	鈎吻	<i>Gelsemium elegans</i> Benth.
71	紅娘子	<i>Huechys sangunea</i> De Geer.
72	大風子	<i>Hydnocarpus anthelmintica</i> Pierre ; <i>Hydnocarpus hainanensis</i> (Merr.) Sleum.
73	天仙子	<i>Hyoscyamus niger</i> L. (Leaves Seeds)
74	莽草	<i>Illicium lanceolatum</i> A. C. Smith
75	麗江山慈姑	<i>Iphigenia indica</i> Kunth et Benth.
76	桔梗科半邊蓮屬植物	<i>Lobelia</i> L, (Campanulaceae).
77	石蒜	<i>Lycoris radiata</i> Herb.
78	青娘子	<i>Lytta caraganae</i> Pallas
79	博落回	<i>Macleaya cordata</i> (Willd.) R. Br.
80	地膽	<i>Meloe coarctatus</i> Motsch.
81	含羞草	<i>Mimosa pudica</i> L.
82	夾竹桃	<i>Nerium indicum</i> Mill.
83	臭常山	<i>Orixa japonica</i> Thunb.

序號	中文名稱	英文名稱
84	北五加皮	<i>Periploca sepium</i> Bge.
85	牽牛子	<i>Pharbitis nil</i> (L.)Choisy. ; <i>Pharbitis purpurea</i> (L.) Voigt
86	商陸	<i>Phytolacca acinosa</i> Roxb ; <i>Phytolacca americana</i> L.
87	半夏	<i>Pinellia ternate</i> (Thunb.) Breit.
88	紫雪花	<i>Plumbago indica</i> L.
89	白花丹	<i>Plumbago zeylanica</i> L.
90	補骨脂	<i>Psoralea corylifolia</i> L.
91	毛茛科毛茛屬植物	<i>Ranunculus</i> L, (Ranunculaceae).
92	羅芙木	<i>Rauwolfia verticillata</i> (Lour.) Baill.
93	鬧羊花	<i>Rhododendron molle</i> G. Don
94	萬年青	<i>Rohdea japonica</i> Roth
95	烏柏	<i>Sapium sebiferum</i> (L.) Roxb.
96	一葉萩	<i>Securinega suffruticosa</i> (Pall.) Rehd.
97	苦參實	<i>Sophora flavescens</i> Ait.
98	羊角拗子	<i>Strophanthus divaricatus</i> (Lour.) Hook. et Arn.
99	菊科千里光屬植物	<i>Senecio</i> L,(Compositae).
100	茵芋	<i>Skimmia reevesiana</i> Fortune
101	狼毒	<i>Stellera chamaejasme</i> L.
102	馬錢科馬錢屬植物	<i>Strychnos</i> L, (Loganiaceae).
103	黃花夾竹桃	<i>Thevetia peruviana</i> (Pers.) K. Schum.
104	昆明山海棠	<i>Tripterygium hypoglaucom</i> (Le'VL.)Hutch.
105	雷公藤	<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook.f.
106	白附子	<i>Typonium giganteum</i> Engl.
107	百合科藜蘆屬植物	<i>Veratrum</i> L. (Liliaceae).
108	了哥王	<i>Wikstroemia indica</i> (L.) C. A. Mey.

表二、美國「化妝品原料評價委員會」評估可以限量使用之中草藥與相關製劑

1	Peppermint (<i>Mentha piperita</i>) Extract (Peppermint) Leaf Extract]; Peppermint (<i>Mentha Piperita</i>) Leaves ; Peppermint (<i>Mentha Piperita</i>) Oil ; and Peppermint (<i>Mentha Piperita</i>) water	辣薄荷提取物，辣薄荷葉，辣薄荷油，辣薄荷水。	當該成分中所含長葉薄荷酮不超過 1% 時使用是安全的。
2	Almond Meal [(Sweet Almond) Seed Meal]	杏仁粉[甜杏仁(扁桃粉)]	最高 25%
3	<i>Aracis hypogaea</i> (Peanut) Oil	花生油	最高 25%
4	<i>Astragalus gummifer</i> Gum	黃耆膠	最高 10%
5	Avocado Oil	鳄梨油 (<i>Persea gratissima</i>)	最高 50%
6	Beeswax	蜂蠟	最高 50%
7	Attapulgate	硅鎂土	最高 8%
8	<i>Capsium annum</i> Fruit Extract	辣椒果提取物	1%
9	<i>Capsium annum</i> Fruit	辣椒果粉	5%
10	<i>Capsium frutescens</i> Fruit Extract	小米椒果提取物	1%
11	<i>Elaeis guineensis</i> (Palm) Kernel Oil	棕櫚仁油 (<i>Elaeis guineensis</i>)	最高 25%
12	<i>Elaeis guineensis</i> Oil	棕櫚油 (<i>Elaeis guineensis</i>)	最高 2%
13	Hydrolyzed Rice Bran Extract	水解米糠提取物	最高 0.0004%
14	Hydrolyzed Rice Extract	水解大米提取物	最高 0.3%
15	Jojoba (<i>Simmondsia chinensis</i>) Oil	荷荷巴油 (<i>Buxus c hinensis</i>)	最高 25%
16	<i>Oryza sativa</i> (Rice) Bran Oil	稻糠油	最高 39%
17	<i>Oryza sativa</i> (Rice) Germ Oil	稻胚芽油	最高 0.1%
18	Peanut (<i>Aracis hypogaea</i>) Oil	花生油 (<i>Aracis hypogaea</i>)	最高 25%
19	<i>Prunus amygdalus</i> (Sweet Almond) Oil	甜杏仁油	最高 50%
20	Sweet Almond (<i>Prunus amygdalus Dulcis</i>) Oil	甜味扁桃油	最高 50%
21	<i>Triticum vulgare</i> (wheat) Germ Oil	小麥胚芽油	最高 50%
22	<i>Triticum vulgare</i> (wheat) Gluten	小麥麵筋	≤ 1%
23	<i>Triticum vulgare</i> (wheat) Kernel Flour	小麥麵粉	最高 1%
24	<i>Triticum vulgare</i> (wheat) Starch	小麥澱粉	最高 25%
25	Wheat (<i>Triticum vulgare</i>) Flour	小麥粉	最高 1%
26	Wheat Germ (<i>Triticum vulgare</i>) Oil	小麥胚芽油	最高 50%
27	Wild Yam (<i>Discorea villosa</i>) Extract	野薯蕷提取物	使用 2% 的植物時最高 15%

表三、歐盟化妝品組成中禁用之中草藥與相關製劑

序號	中文名稱	英文名稱
1	側金盞花及其製劑	<i>Adonis vernalis</i> L. and its preparations
2	大阿米芹及其草藥製劑	<i>Ammi majus</i> and its galenical preparations
3	蒽油	Anthracene oil
4	加拿大大麻（夾竹桃麻，大麻葉羅布麻）及其製劑	<i>Apocynum cannabinum</i> L. and its preparations
5	顛茄及其製劑	<i>Atropa belladonna</i> L. and its preparations
6	斑蝥	Cantharides , <i>Cantharis vesicatoria</i>
7	麥角菌及其生物鹼和草藥製劑	<i>Claviceps purpurea</i> Tul. , its alkaloids and galenical preparations
8	毒參（果實，粉末和草藥製劑）	<i>Conium maculatum</i> L. (fruit , powder , galenical preparations)
9	秋水仙及其草藥製劑	<i>Colchicum autumnale</i> L. and its galenical preparations
10	印防己（果實）	<i>Anamirta cocculus</i> L. (fruit)
11	箭毒和箭毒鹼	Curare and curarine
12	莨菪（葉、果實、粉和草藥製劑）	<i>Hyoscyamus niger</i> L. (leaves , seeds , powder and galenical preparations)
13	吐根（根、粉末及草藥製劑）	<i>Ipecacuanha</i> (<i>Cephaelis ipecacuanha</i> Prot . and related species)(root , powder and galenical preparations)
14	北美山梗菜及其草藥製劑	<i>Lobelia inflata</i> L. and its galenical preparations
15	毒扁豆	<i>Physostigma venenosum</i> Balf
16	鉛和鉛化合物	Lead and its compounds
17	桂櫻	<i>Prunus laurocerasus</i> L.
18	叉子圓柏的葉子，精油及其草藥製劑	<i>Juniperus sabina</i> L. (leaves , essential oil and galenical preparations)
19	龍葵及其草藥製劑	<i>Solanum nigrum</i> L. and its galenical preparations
20	曼陀羅及其草藥製劑	<i>Datura stramonium</i> L. and its galenical preparations
21	羊角拗及其草藥製劑	<i>Strophantus</i> species and their galenical preparations
22	馬錢子和它的草藥製劑	<i>Strychnos</i> species and their galenical preparations
23	毛果芸香及其草藥製劑	<i>Pilocarpus jaborandi</i> Holmes and its galenical preparations
24	黃花夾竹桃苷提取物	<i>Thevetia neriifolia</i> Juss . glycoside extrsct

25	(白) 海葱及其草藥製劑	<i>Urginea scilla</i> Stern . and its galenical preparation
26	種子藜蘆 (沙巴草) (種子和草藥製劑)	<i>Schoenocaulon olficinale</i> Lind . (seeds and galenical preparations)
27	藜蘆的根及草藥製劑	<i>Veratrum</i> spp . and their preparations
28	除蟲菊及其草藥製劑	<i>Pyrethrum album</i> L. and its galenical preparations
29	月桂樹籽油	Oil from the seeds of <i>Laurus nobilis</i> L.
30	商陸及其製劑	<i>Phytolacca</i> spp . and their preparations
31	人的細胞、組織或其產品	Cells , tissues or products of human origin
32	粗製和精製煤焦油	Crude and refined coal tars
33	土木香根油 (inula helenium) (CAS No 97676-35-2) , 當用做香料原料	Alanroot oil (<i>Inula helenium</i>) (CAS No97676-35-2) , when used as a fragrance ingredient
34	無花果葉 (ficus carica) 的純淨萃取 (CAS No 8916-52-9) , 當用做香料原料	Fig leaf absolute (<i>Ficus carica</i>) (CAS No 68916-52-9) , when used as a fragrance ingredient
35	馬鞭草油 (Lippia citriodora Kunth .) (CAS No 024-12-2) , 當用作香料原料	Verbena oil (<i>Lippia citriodora</i> Kunth .) (CAS No 8024-12-2) , when used as a fragrance ingredient
36	巴豆 (巴豆油)	<i>Croton tiglium</i> (oil)

表四、日本化妝品組成中限量使用之中草藥與相關製劑

	英文名稱	中文名稱	100g 中的最大配合量
1	Cantharides tincture, Ginger tincture or Capsicum tincture	斑蝥酊, 生薑酊或辣椒酊	總量 1.0g

捌、安全性與有效性資料

捌之一、化妝品的安全性評價

第一節 概述

“化妝品”包含了種類繁多的物質和製品，這些東西是使用在人體外表，目的是為了提升個人的外觀形象，並讓使用者自身更有魅力而且對他人更有吸引力。鑒於化妝品的使用目的是為了滿足使用者形象外觀的需求，所以這種產品變得成為一種永恆的需要。這也是為什麼隨著時間變遷，化妝品從原來單一的裝飾和修飾產品逐漸演變成為民生用途產品，以及更為複雜的用來改善人的皮膚狀況和皮膚抗老化的產品。無論化妝品演變到何種階段，所有產品都應該是通過外部途徑來使用的，不應該包括以內服、吸入、注射或植入等方式使用的產品，這些產品應該受到其他技術條款和法規的管轄。這些要求並沒有排除那些偶然會被吸入（如香水）或吞入體內（如口腔民生用品）的產品，雖然這些情況並不是產品的主要用途，僅僅是使用時的偶然情況，但是很顯然，在進行產品的安全性評價時是必須加以考慮的。實際上，因為化妝品是讓人產生幸福感和舒適感的產品，所以不論是何種類型的產品，化妝品不應對使用者產生不良反應。

負責化妝品上市的人，有責任在產品上市之前和消費者使用之前要確保產品不能對人體產生直接或間接的傷害，因為化妝品生產者並不能完全控制產品的使用情況，所以生產者必須對正常和可預見使用條件下可能發生的風險進行評價。

除了事先的評價，產品生產者還有責任在產品上市之後持續監控，從而在任何必要的時候~假設產品引發了始料未及的不良反應時，重新考慮原先的評價標準。大多數情況下，化妝品的配方比較複雜，含有許多種成分，其中包括天然來源或化學合成或半合成物質。根據產品的使用目的，其使用條件會非常不同：單獨或和其他產品同時使用、使用原液或稀釋使用、偶爾或經常使用，以及短暫接觸（淋洗型產品）或長期接觸（駐留型產品）。根據產品的預期使用效果，配方研製人員會找到最適合的製劑形式使產品的活性成分能夠到達預計的皮膚層次，這會因為配方中各種成分的穿透力不同而受影響。因此，配方成分的選擇、產品配方的複雜性、產品的使用說明、設計謀求的功效強度和相應的作用靶部位是眾多的參數，這些參數將直接或間接地影響消費者對產品的接受性。對使用化妝品的安全性評價要求逐個地考慮所有這些參數，首先個別分析，然後再更廣泛地考慮它們之間潛在的相互作用。

第二節 總論

在全面評價化妝品安全性的框架範圍中，在簡要介紹皮膚和附屬器官的結構和功能之後，本節將述及皮膚吸收功能，並強調在評價化妝品配方或成分安全性時必須考慮的危害和風險兩個概念之間的重要區別。

【經皮吸收】

人的皮膚是在不斷地且無意地接觸到各種物質，如塵埃顆粒、家庭或是工業化學物質，其接觸的頻率和接觸水平幾乎是未知的。當這些物質穿透皮膚時，它們可能會偶然引起不良反應，造成潛在和甚至致命的後果。人的皮膚也可能會全部或主動暴露在工作場所中，沾染的化學物質可以是藥品成分，但最常見的就是化妝品。在大多數情況下，化妝品是由合成的或天然的成分配方而成，在一定的濃度下成為一體，終產品將在可以預見的條件下被使用。為了產生全身性反應，使用在皮膚上的化學物質必須穿透皮膚的最外層，即角質層，進入到具有活力的表皮層和真皮淺層。通常限制這一穿透過程速度的環節是穿過角質層，其後的穿透過程比較快，即化學物質可以很快的穿透過表皮層和真皮淺層，進入表皮-真皮連接下的豐富的毛細血管網中。所以經皮吸收被定義為：物質從皮膚外層移動進入到循環系統。為了評價特定物質的安全性，了解其接觸皮膚後的生物利用度的知識是必須的。如今，評價經皮吸收是許多實驗室的常規操作項目，在很多情況下會使用放射元素標記的化學物質。但是，因為過去幾十年分析儀器的長足發展，使得越來越多的評價可以直接使用各種體內和體外方法。

體內法用在人體志願者和各種動物中。化學物質的經皮吸收也會廣泛使用體外技術，即人和動物的皮膚，以及各種合成膜。對這些實驗方法的分析表明，實驗中使用的劑量或接觸時間沒有一致性。而實驗結果表述的方式也不一樣，如在描述吸收量的百分比時，使用吸收率或者滲透率係數。所以，從不同的實驗方法中獲得結果難以相互比較。此外，從體內法和使用動物皮膚體外法研究產生的數據表明，皮膚通透性在種屬間的變異很大，這使得想利用現有數據來推測人的經皮吸收變得很困難。近些年來，在制定適合評價化妝品成分經皮吸收和經皮穿透的指導原則方面有了一些發展。本節中，在介紹一些術語定義和一些影響經皮吸收的主要因素之後，將逐一介紹目前認為是最相關的一些評價方法，然後會給出一些實際的建議。

一、術語定義

當討論經皮吸收時，遇到的困難之一是術語，很顯然研究者之間，甚至國際機構之間在這方面並沒有共識。所以，在討論具體方法之前，應該準確定義這些術語。

ECETOC 專論推薦以下幾種術語：

- (一)皮膚面積劑量(Dermal Area Dose)施用在單位皮膚面積上的化學物質的量。
- (二)皮膚面積暴露(Dermal Area Exposure)在一定時間內，單位皮膚面積上接觸的化學物質的量。
- (三)分配係數(Partition Coefficient)化學物質在相互接觸的兩個互不融合相中的濃度比例。
- (四)穿透物(Penetrant)需要評價經皮吸收的分子。
- (五)經皮吸收(Percutaneous absorption)化學物質從皮膚最外層移動到全身(循環)系統。
- (六)經皮通量(Percutaneous flux)在單位時間內，單位皮膚面積中通過的物質的量。
- (七)全身暴露量(Systemic exposure)經過皮膚接觸後吸收的化學物質(和代謝物以及分解的產品)的總量。
- (八)皮膚總劑量(Total dermal dose)皮膚表面積劑量×接觸面積
- (九)皮膚總接觸(Total dermal exposure)皮膚面積劑量×特定時間內接觸的劑量。

此外，在化妝品非食品科學技術委員會(SCCNFP)制定的指南中還定義了許多的術語，用以區別附著在角質層和更深層組織的化學物質的量。

- (一)皮膚生物利用度(Dermal bioavailability)在存活的表皮和 /或真皮層以及循環體液中出現的局部使用產品的總量。
- (二)皮膚吸附(Dermal adsorption)出現或附著在角質層的局部使用產品的量。皮膚吸附被認為不會進入全身，所以被排除在風險評價之外。
- (三)皮膚吸收(Dermal absorption)存留在固有皮膚(除了角質層)中的局部使用的產品的量，加上在受體體液中探查到的穿透皮膚的局部使用產品的量。這二者之和被認為會進入全身。只要是仿照實際使用情況來進行，那麼穿透角質層進入到深部皮層的局部使用產品的量，就被認為和安全性評價相關。這些化學物質的量被認為會遲早進入到循環系統中，除非這些物質表現出和表皮和/或真皮發生了不可逆的結合。

二、皮膚穿透的過程

和皮膚外層沒有直接接觸的化學物質，為了能夠被吸收，首先必須經過一個分解的過程，使之能夠擴散到角質層的表面。穿透物進入角質層的移動速度，受到其自身溶解性的影響。穿透物將在兩相之間分散，即溶解的穿透物出現在角質層表面或介質 /配方的溶液中，以及出現在角質層內

部，並在兩相間建立一種平衡(兩相的熱力學活動相等)。一旦進入到角質層，穿透物將從濃度高的外角質層進入到濃度較低的角質深層。一些穿透物在進入後可能會和角質層的成分結合在一起，而不再繼續擴散。儘管角質層是吸收過程的一個主要屏障，穿透物可能會從其他潛在的快速通道擴散進體內，比如繞過角質層屏障，通過毛囊和汗腺進入。在角質層底部，穿透物必須經過另一個分散步驟，從角質層進入到有活力的表皮層。從這一層向緊貼在表皮-真皮結合下方的毛細血管網擴散的速度相對較快。在這個階段，穿透物可能也會因為與組織結合或者被代謝掉而不能繼續擴散。代謝產物也可以擴散到毛細血管網，或者與表皮相結合。在表皮的基層，在進入全身循環之前，擴散的穿透物將會再一次在表皮層和真皮層之間分散。

經皮吸收式一個被動擴散的現象，該現象在每層皮膚中都發生。對物質在皮膚中擴散動力學的研究表明，經皮通透量只有經過一段潛伏期之後才能保持穩定，不同物質的經皮通透量是不同的。當經皮通透量達到一個平衡狀態時，動力曲線便呈線性。潛伏期的數值和擴散係數直接相關，是通過曲線的線性部份外推到橫座標而得出的。

受試物擴散穿透一個半透膜和膜兩側的濃度差成正比，遵循 Fick 定律：

- ①施用在皮膚上物質的濃度越大，物質的擴散就越快，當介質達到飽和時，熱力學活動就達到最大限度。
- ②滲透係數 K_p 表示了擴散速率。它只依賴於溶液和膜的特性。它是皮膚層作用所造成的，皮膚厚度越厚，滲透係數越低。
- ③分配係數 K_m 和物質對角質層的親和力成正比。由於不能被準確地測量出來，所以其數值通常由辛醇/水的分配係數推算出來。
- ④擴散係數 D 顯示了物質通過角質層的機動性。物質越複雜，擴散係數越小。該係數也表示了不同皮膚層的不可滲透性。其數值在角質層通常接近 $10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ 數量級，在有活力的表皮層和真皮層一般是在 $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 的數量級，這有就是說明角質層滲透性是其下方皮膚的 1000 倍。

總結上述如下，吸收速率依賴於在同一時間發生的多個不同的過程。

- ①化學物質在介質中的擴散。
- ②化學物質從介質中的釋放。
- ③化學物質在皮膚表面熱動力活動的修正。
- ④皮膚水合程度的修正。
- ⑤化學物質在角質層中的擴散。
- ⑥化學物質在其他皮膚層中的擴散。

需要考慮的參數如下：

- ①曲線下的面積代表了累積吸收的物質質量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
- ②達到最大通量所需的時間 (h)
- ③最大通量的數值。

三、影響經皮穿透的原因

一個化學物質經皮吸收的程度依賴於一系列的因子，這些因子和化學物質本身有關，和配方或是包含化學物質的基質有關，和接觸的條件以及皮膚的特點有關。

(一)物質的理化性質

化學物質的吸收，即通過角質層的擴散，依賴於一些特定的因子，如分子量、水溶性和脂溶性、極性和離子狀態等。總的來說，分子量小的、同時具有水溶性和脂溶性的化學物質是最容易通過角質層的親脂性環境和表皮的親水性環境而被吸收的。因為理論上擴散係數和分子量的立方根成反比，所以需要分子量之差相對較大才能顯著改變化學物質的擴散性。一般認為化學物質的親脂性可被辛醇/水的分配係數的對數值來測算出來，辛醇/水的分配係數可以影響物質吸收。如果對數值小於-1，化學物質的吸收受該對數值變化的影響不大，而這種化學物質通常被吸收的很少。如果數值大於-1，達到了約+3.5，那麼化學物質被吸收的趨勢將隨著對數值的增高而上升。對數值在+1和+2之間時，吸收量通常是最大的。

(二)介質和分配係數

介質/角質層分配係數是確定物質穿透速率的重要因素。係數描述了化學物質對於介質和角質層的相對親和力。穿透物在介質中越易溶解，則越容易被保留在介質中。在角質層中的溶解性越大，越有利於物質穿透角質層。通常介質本身被吸收的能力非常低，但是它能影響化學物質能否通過角質層的能力。所以如果對介質的本身和形式不加考慮，就不可能對特定化學物質的皮膚穿透性定量化。皮膚的穿透性總是因為物質不同而表現不一。那麼，只要對介質的組成要素起作用，就可以實際性地改變某個化學物質的穿透力。介質的製劑形式和其組成分一樣重要，可以強力地影響經皮穿透力。如眾所周知微粒乳液、油劑、水以及油包水型的介質可以促進物質吸收，而疏水性膠體則會減少皮膚吸收。當化學物質存在於某些固體介質中時，有必要特別考慮該物質對於皮膚的相對親和力。如果化合物和顆粒結合在一起，那麼解吸附作用和血管收縮使化合物從顆粒表面進入到周圍的空氣或水介質，這些情況在確定該物質的生物利用度時就會非常重要。

溶液的 pH 值變化也可以通過改變化學物質的離子化程度來改變物質的吸收，高離子化能降低吸收率。另外，如果角質層被 pH 值很高或很低的介質損害，那麼吸收屏障的完整性會受到影響，從而導致物質穿透力增強。

(三)皮膚暴露

當化學物質一接觸到皮膚的時候，經皮吸收就會發生，但是在化學物質進入到體循環被吸收之前，會有 30min 到幾個小時的延遲期。如果化學物質不從皮膚上被洗掉，其濃度會因為吸收作用或從體表喪失（如剝脫或蒸發）而不知不覺地下降到零。介質結構的化學相也可能發生改變。上述這些變化都會影響到經皮吸收。即便有例外情況發生，基本規律是化學物質在皮膚上停留的時間越長，經皮吸收的總量就越大，吸收的過程也就越長。但是因為難以判定皮膚接觸的時間，所以很難確定出接觸時間和總吸收量之間的簡單關係。因為吸收量會受到所使用的化妝品的量的影響，所以通常在這方面大家會提出問題來。當半固態化妝品以大於 2 mg/cm^2 的劑量塗抹於皮膚上時，皮膚對產品的接觸是不均勻的；使用更高劑量的產品，並不會使經皮吸收成比例地增加。因此，即便某個劑量已經被安全性評價所廣泛接受，但是對於一些情況，還是應該依據消費者估計的使用量來判斷合適的評估劑量。如果經皮吸收的研究沒有正確反應產品的使用時間，那麼該避免使用從這種試驗得出的數據進行推算。經皮吸收量也可以和接觸時間不呈線性相關，如對於淋洗型產品，如果用在皮膚上的時間非常短暫，那麼產品在皮膚上就不會達到穩定狀態。對於使用較頻繁的化妝品，很難提供一個通用的規則來計算經皮吸收量。一般來說，如果每次使用產品的間隔時間夠長，那麼就可以認為每一次都是單獨使用，並以此來計算經皮吸收量。但是，如果在相對較短的時間內反覆使用產品，那麼角質層儲留產品的能力會達到飽和，並因此會減少出現飽和狀態後的所使用產品的吸收量。

(四)暴露面積

經皮吸收量隨著產品的使用面積大小而成比例地變化，使用面積可以根據產品的使用目的計算出來。通常對於一個化學物質的總吸收量，是通過在比預期使用部位小的皮膚面積上，通過體內或體外法算出該面積的吸收量，然後再累計得出的。但是正如已經介紹過的，角質層的組成和厚度並不是均勻一致的；表面積的角質層隨部位不同而發生變化，所以化學物質在不同皮膚部位的吸收率不同。通常，在角質層較薄的會陰部和臉部的吸收率較高，而在手掌

和腳底的角質層較厚，所以吸收率較低。但是角質層還是具有滲透性的，因為其細胞結構和構成身體其他部位角質層的細胞不一樣，那些角質層細胞是緊密連接的。對於一種化妝品而言，這些差別就可能影響到安全性評價，問題是通過何種方式來影響的。像防曬劑這種使用在全身的產品，我們可以假定經皮吸收量會比在前臂皮膚試驗得出來的預測數值高兩倍。而在軀幹皮膚上（如通過外科手術獲得的胸腹部皮膚）所做的試驗可以對全身暴露量做出更好的估計。所以，需要非常謹慎地考慮採用“標準化的技術”來評估經皮吸收。如前所述，使用從軀幹上獲得的皮膚進行的體外試驗，可以對手、臉部和頭皮的吸收量做出充分準確的估算；並且，當從某些有一定通透性的皮膚獲得的數據需要外推計算時，應該首選這種方法。

皮膚的溫度也會影響經皮穿透，溫度升高通常會增加穿透量，因為物質擴散是溫度依賴性的。有時候可能僅僅因為洗澡水過熱就會使皮膚溫度升高。使用沐浴精油和沐浴液也可以提高角質層的水分含量。皮膚組織中含水量的升高在不同層次中不是均勻一致的，升高 100% 的情況僅見於角質層表層。所以，經皮穿透會隨著角質層含水量不同而改變，並且和穿透物的理化性質有關。與此相反，由於寒冷或環境乾燥所以引起的皮膚脫水，當含水量低於 10% 時，可以導致角質層剝落。於是，皮膚細胞的破壞就會讓化學物質更容易穿透皮膚，穿透率會因為皮膚屏障層的損傷而成數量級的增加。

(五) 影響經皮吸收的其他因素

未有報導男女的皮膚滲透性有顯著的差異，但是行為習慣的差異可能有顯著的影響，如女性可能會比男性洗澡更為頻繁，並且使用更多的化妝品，從而使產品在皮膚表面產生封閉效應，而且可能會使體溫升高。人種間皮膚滲透性有微小的差異。年齡也是一個影響因素，老年人的皮膚對於親水性物質的經皮吸收會減少。但是，由於沒有足夠的數據，所以對這些因素所造成的影響無法得出準確的結論。皮膚的新陳代謝也會影響經皮吸收，儘管這很可能只有微小的作用，但是被緩慢吸收的物質可以產生明確的作用。

四、測算經皮吸收的方法

對於經皮吸收的研究，關鍵的問題是要量化穿透皮膚屏障進入到循環系統的化學物質，而且如何才能量化。經皮吸收量可以通過體內法計算體液、組織或分泌物中化學物質的含量來評價，或者也可以通過體外法分析受體中化學物質的準確度來評價。

(一)體外試驗

經皮吸收的體外試驗研究應該遵循現有的常規要求。因為皮膚屏障作用在種屬之間有差異，所以相對於動物皮膚，應首選人的皮膚做研究對象。但是，豬的皮膚通常也是一個適合的替代物。體外研究也可以在裸鼠的表皮層上進行，當然這種試驗只能對經皮吸收進行特別保守的評估。對於親水性化合物，使用分層皮膚(split-thickness skin)，而不是全層皮膚(full-thickness skin)，這可能不一定是必須的，但是應該推薦使用。對於特別親水性的化合物，應該避免使用全層皮膚。一般情況下，體外研究在皮膚上的使用劑量為 2 mg/cm^2 (半固體) 或 $5 \mu\text{g/cm}^2$ (液體)。對於淋洗型製品，為了模擬實際使用條件，需要使用更大的劑量(大於 10 mg/cm^2)。產品應該被留在皮膚上保持一段時間，這樣可以反應真實的使用情況，對於淋洗型產品，停留時間至少為 10min，對於駐留型產品，至少保持 6hr。對於每一次試驗，都應該進行適當的質量平衡分析 (mass balance analysis)。對於化合物的安全性評價應該是在一段時間內(通常 24hr)的累積吸收量($\mu\text{g/cm}^2$)的基礎上來進行的。儘管經皮吸收也可以用染毒劑量的百分比來表示，但是對於不同的劑量需要進行推算，而這通常是不可行的。吸收的劑量應該不但包括感受器液體中的化合物，而且還應包括“活組織”中的估計量，如表皮和真皮中的量，這在對使用全層皮膚樣品做研究時是特別重要的。在作安全性評價時，至關重要的是要遵循良好實驗室操作規範(Good Laboratory Practices, GLP)，或者和 GLP 相似的質量控制系統。應該對於標準測試方法結果的可重複性進行片面記錄，使用該方法對於參照物質的經皮吸收的量來表示，如水、甘露醇、水楊酸或是苯甲酸。最後，為了確認表皮層的完整性，在進行試驗之前和之後應該用對照實驗來測試。

建立標準的試驗方法時，需要保證經皮吸收數據的連續性和可靠性。儘管採用了這些預防性的措施來保證實驗結果的準確性一致性，但是不同實驗室之間在評估經皮吸收時還是會出現一些變異。在此需要說明的是研究評價化合物穿透角質層出現的問題：

在去除殘存產品(排除沾染)時很微小的不標準操作，可能會導致在黏貼條上發現的化合物的量發生很大的變異。但是，在測算經皮吸收時，實驗室有良好的一致性，即在活體組織中和受體液體中發現的化合物的量。這樣，體外試驗方法就能具有較好的可複製性、可重複性以及和體內試驗的相關性，從而被安全性評價所接受。

(二)體內試驗

用人體的體內法來估算化妝品成分的經皮吸收，是測量化合物經尿液和排泄物排出體外的量來實現的。人體法的受試部位應該是和評價全身接觸最相關的地方，並具有充分的質量平衡(90%±5%)。但是在實際操作中，這種方式受到很多限制，比如檢測的敏感性、道德倫理的顧及，法規對於在人體中使用放射標記的化合物的限制，以及化合物及其代謝產物的排出效率。理論上，血清中化合物的水平表示了經皮吸收的水平，但是對於化妝品成分來說，這沒有實際可操作性。

體內法應該反映實際使用的情況。這樣，應該儘可能的表現出化妝品正常使用的情況，包括使用量、產品的配方類型、接觸的時間和封閉的程度。另外，還應該考慮到誤用產品的情況，即最壞的情況。體內法利用尿液和排泄物測試經皮吸收應該持續進行檢驗，直至檢測值下降到檢出限量之下。對於血清清除率比較快的化合物來說，檢測過程可以持續 48hr，但是也可以延長很多，在吸收階段，化學物質在身體的腔室中蓄積，這個腔室的概念是用於風險平價的。全身接觸量可以用回收水平來校正，即把沒有排洩出來的化合物的量也計算進去，這種估算是非胃腸道給藥後，通過檢測排洩出來的物質的量來完成的。但是，如果全身接觸大於 40%，那麼就需要用回收率來校正。

皮膚剝條法(skin stripping method)是一種幾乎無創性的敏感的檢測化合物經皮吸收量的人體法。這種方法還沒有得到廣泛的接受，所以需要再多個實驗室進行驗證。有一個特別的問題需要解決，即剝條法所獲得結果的變異範圍，以及這些變異是否會顯著影響安全性評價。此外，還需要建立指南，已確定該方法是否適合檢測某些特別的化合物。最後，從剝脫條上回收的化合物量和經皮吸收的化合物之間有非常好的相關性，這是因為化合物在角質層相對較緩慢的滲透性以及接觸時間較短。但是目前，我們不知道對於大多數化合物來說經過 8~16hr 延長的接觸之後，這種相關性是否會有效的保持下來。儘管存在這些評價，皮膚剝條法還是一項非常有效的測試經皮吸收的方法。

用體內動物試驗來檢測化妝品成分的經皮吸收已經變得非常過時，並且已經不再推薦用於化妝品成品的安全性評價。但是正如前面指出的(特別是用於體內和體外法的對比)，裸鼠還是被認為是比較適合的動物，因為該方法具有一些優點，如容易獲得動物來源、便於操作和長期使用的廉價性。有毛的動物並不完全適合經皮

吸收測試，化合物在鼠皮的經皮吸收量通常比人的高 2~5 倍，這樣的差異也可以通過動力學實驗反應出來。

五、危害性與危險性

任何一種物質或製劑在正常和可預見的條件下使用時應該是無害的。這一普遍原則得到全球生產廠家、使用者及衛生當局的認可。就某種意義而言，安全性彌補了毒性的缺陷，當人們沒有意識到危險性的危險時，安全性成為最好的評價標準。然而，甚至立法部門也經常對危害性與危險性存在認識混淆。依據這一標準，一個產品一旦列入“危險”範疇，就需要使用恰當的辭彙對其進行描述。實際上，需要減少對危害物的接觸，從而進可能把產生危害的機會降到最低或至少降至可以接受的水平。

然而，除了危險的性質和程度可以得到專家實驗研究和人體使用證據的充分判斷認可外，當今社會中，主觀評價亦不容忽視；實際上，對危險的認知反應了消費者對危險性質與水平可接受程度的認知。這一點很重要，因為媒體的關注與政治壓力均可成為立法的依據。在日常生活中，消費者對危險的認知十分複雜，因此對危險性質的術語表達十分重要，如可觀察到的/不能觀察到的，已知/不得而知，可控制的/不可控制的，可減少的/不可減少的，自願的/非自願的。現實情況表明綜合認知對消費者的態度影響極大，可以導致超出科學評斷的群體定位。因此，為了避免由此產生的認知缺乏，首先有必要明確每個術語的特殊涵義，以便日後識別其性質和需要的支持信息用於有效地開展正確的安全性評估。後者可分為四個部份，我們將分別就危害識別、皮膚吸收、暴露水平評估，危險性分類進行簡要闡述。

(一)術語涵義

1. 傷害：指組織或器官功能與性質的病理改變或人體功能障礙超出正常應變反應。
2. 危害：指有可能引起的損傷。危害與化合物內在特性有關，人體暴露後會引起不良反應。一般認為，應分別考慮不良反應與暴露危害物的劑量。
3. 暴露水平：指可能接觸危害物的類型、暴露頻率和程度。
4. 安全性：指暴露於某一特殊物質不存在可預見的危險的危險性或僅存在沒有實際意義的可被忽視的危害。
5. 毒性：指由於暴露某一物質引起的傷害。毒性引起的原因可能是直接的，也可能是間接的。毒性的發生也存在時間性。對毒性的反應可以是急性的，也可以是慢性或是潛在的，也可能只在下一代才顯現出來。由於毒性還可以影響功能(生理、生化或其他)和結構，因此它是指化學物質引起危害的常用術語。在全

面考慮由於接觸危害物所產生的危險時，應明確其性質、時間、關聯性及後果。

(二) 危害性的鑑別

這部份是關於如何評價某一特殊物質是否對人健康產生不良影響。目的是揭示物質的內在特性(物理和化學特性)，而不考慮暴露水平。有關物質毒性的信息可通過使用各種體內和體外動物實驗進行毒性檢測獲得，還可通過臨床和流行病調查獲得，但因倫理學的原因存在一定侷限性。近年來，另一種有趣的對危害性鑑別方法是量化結構活性相關性(QSAR)研究。每種方法均存在各自優勢與侷限性。在對危害性進行鑑別時，必須對不同檢測方法的質量、毒性作用嚴重程度，在動物與人體所觀察到的毒性的相關性等進行評價。目的是對某一暴露濃度是否對人體健康產生特定的不良影響作出科學判斷，對某一特定物質是否產生特定反應的證據進行評價。歐盟對化妝品成份危害性進行毒理學評價時要求進行的一般毒理學試驗如下。

1. 急性毒性試驗(體內經口及經皮限量試驗)用於確定毒性水平。
2. 黏膜刺激性試驗(體內或體外試驗)用於確定黏膜刺激的可能性。
3. 皮膚致敏性試驗〔根據 Magnusson Kligman(體內試驗)或 LL Na 模型試驗〕用於檢測是否存在IV型接觸性過敏。
4. 亞慢性毒性試驗(至少進行 28 天體內經口毒性試驗)用於評價反覆使用引起的毒性水平。
5. 致突變性試驗(基於三項試驗)確定是否有引起基因和染色體異常的致突變性和致癌性。
 - ①體外 Ames 試驗。
 - ②體外 CHO 染色體畸變試驗。
 - ③體內小鼠微核試驗。

根據物質的分子特性或根據其對初步試驗的特殊反應，可能要求增加其他試驗。

6. 光毒性與光致突變性試驗(與體外試驗方法相符)確定在陽光照射條件下的毒性及致突變性。
7. 致畸性與生殖毒性試驗(基於體內試驗)用於評估對後代可能產生的毒性及對生殖指標的影響。
8. 致癌性試驗(通常基於體內試驗)用於確定是否可能引發癌症。
9. 代謝研究(體內試驗)對潛在的化學轉化進行評價。

這些毒理學試驗應根據歐盟或 OECD 指南並相符合 GLP 原則進行。

需要指出的是從 2002 年 6 月起因為有了為消費者提供同樣保護水平的合法的替代試驗方法，禁止開展對化妝品成份危害性鑑定的動物性實驗。歐盟國家從 2005 年 3 月起禁止針對現有的化妝品的所有動物實驗。

(三)皮膚吸收

已經考慮了大部分有關皮膚吸收的檢驗。經皮吸收式對使用化妝品危害性進行合理檢測的一項重要指標。兩類檢測方法可用於對皮膚吸收進行評價。

1. 經皮吸收試驗（體外或體內試驗）可用於檢測經皮吸收的暴露水平。
2. 毒代動力學試驗（需要體外試驗）可用於評估全身暴露量。

只有當預計有可能發生大量經口攝入或經皮吸收試驗顯示有大量皮膚穿透時才會要求全身毒性數據。

(四)暴露水平評價

確定人體對物質的暴露量和暴露時間。對暴露水平的評價數據往往存在侷限性。對劑量的評價模型描述了某一物質通過特殊介質產生的轉傳。可對物質的吸入、食入、透皮率以及生物利用率做出假設。生物監測也成為一項很有價值的方法。在對化妝品和化妝品成份進行評價時，應明確消費者對其暴露的程度與使用途徑。雖然必須按個例逐個進行，但是以下各項可能提供一些指導。

- ①化妝品成份的類別
- ②暴露途徑：皮膚、黏膜、經口、吸入，相關危險性通常以此順序遞增。
- ③使用方法：塗擦、噴灑、塗抹及用後清洗。
- ④在成分中化妝品成份的濃度。
- ⑤每次使用量、使用條件（稀釋係數、分離係數等）。
- ⑥使用頻率。
- ⑦皮膚接觸總面積。
- ⑧接觸部位。
- ⑨接觸時間。
- ⑩使用對象的特徵。

接觸時可預見的誤用和意外事故。

用於暴露陽光的皮膚部位。

通過非直接使用的其他途徑造成的繼發暴露。

被評價的成分與其他配方成分的相互干擾。

可以對產品暴露條件構成的外部因素。

了解影響皮膚對於化妝品暴露水平的所有指標十分重要，因為檢測暴露水平時出現的任何小的錯誤都可以嚴重影響對產品安全性的評價。當考慮低劑量暴露時仍需要使用通常的概念。根據 FDA 食品接觸條款的規定，每人每天局部使用化妝品的暴露量小於 15 μ g 時 (10% 經皮吸收) 可以忽略不計的 (當然應除外具有致癌性和致突變性的物質)。

(五) 危險性特徵

一旦確定了物質的危害性和暴露水平，就可以評價其危險性，即危害產生的可能性以及危害的特徵 (類型、時間、程度、恢復)。危險性特徵就是對暴露的危險性和預期效益進行比較。由於暴露人群之間可能存在很大差異 (暴露頻率、對作用的敏感性)，因此，對危險性的評價也存在明顯的不確定性 (使用的模型、外推法、測定錯誤等)。對化妝品的危險性進行評價時，對從大劑量到小劑量效果外推得出的數據應持謹慎態度。從動物試驗結果預測人體暴露的安全性是基於如下理念：當人體的暴露水平大大低於在適宜動物試驗中未觀察到有害作用水平 (NOAEL) 時，對人將不存在明確危險性。這一方法只能在被評價的物質具有一定的毒性作用時才能被採納，如果情況不是如此，就有必要明確該物質是否存在對人體的長期危險性。

第三節 使用化妝品可能引起的不良反應

化妝品局部使用可能誘發三類不良反應。

刺激反應：由使用部位直接接觸產品引起，可能侷限於接觸部位的反應。

這種刺激反應可以在初次使用後或多次使用後皮膚狀況變差或出現生物蓄積後產生。

過敏反應：源自由一種或幾種化妝品成份被抗原識別並激活，後果是在人體接觸產品的任何新部位出現繼發性發炎反應。這種接觸性過敏反應可能在使用某種產品前已存在，但也可由產品本身引發。

全身毒性反應：由於化妝品的全部或部分成分經皮穿透引起，繼而在一個或多個靶器官出現生物蓄積，隨時間的推移發生可逆或不可逆的損傷。

一、皮膚刺激

刺激性接觸性皮膚炎 (ICD) 是由於接觸化學物質引起的皮膚炎性反應而產生的非特異損傷。其臨床表現存在非常大的差異，取決於刺激物的類別及劑量反應關係。皮膚刺激初期僅僅出現主觀反應，並無明顯可見的改變。隨後，可能出現臨床症狀，其型態與刺激強度有關。ICD 的刺激可分

為可在短時間內引發強烈反應(甚至引起壞死)的原發刺激物(primary irritants)以及在反覆使用後引起遲發反應的繼發刺激物(secondary irritants)。化妝品應該屬於後一類，因為它們不含高濃度的原發刺激物。急性 ICD 的特徵是出現紅斑、水腫、成片水泡，大水泡和滲出，而慢性 ICD 主要表現為紅腫，苔蘚、表皮脫落、脫屑和角化過度。接觸空氣易揮發刺激物和煙霧後 ICD 易發生在暴露的皮膚部位，大多位於面部，特別是眼窩周圍。慢性 ICD 組織學表現為角化過度、角化不全、棘細胞層水腫、炎細胞外滲、棘皮症、血管周圍單核浸潤伴隨有絲分裂活性增強。

(一)皮膚刺激機理

與過敏性接觸性皮炎(ACD)相比，ICD 缺乏半抗原特異性 T-淋巴細胞。ICD 處於急性期時期病源途徑為：刺激物滲透至屏障，角化細胞活化或輕微損傷，炎性遞質釋放伴隨非特異性 T-細胞活化。表皮角質細胞在 ICD 炎症方面起關鍵作用：可導致產生數種細胞因子，引發與計量相關的白細胞趨化作用。一些黏附分子的上調，也不受細胞因子的影響。一些製劑和細胞因子可以引起角化細胞因子的產生。IL-1 和 TNF-ALPHA 可以起到炎性細胞因子的作用，而 IL-8 和 IP-10 具備化學趨向素的作用，IL-6，IL-7，GM-CSF 和 TGF-ALPHA 可促進生長。其他細胞因子可以調節體液與細胞免疫。

事實上，刺激物的主要目標是針對角質層的屏障功能。角質層類脂物屏障的損傷與角質細胞黏合力喪失以及因表皮水分缺失引起的脫屑增加有關。它可以快速激發脂類合成，促進屏障恢復。接觸刺激物後通過角化細胞有絲分裂活性的提高，角質層影響表皮增生，從而加強表皮更新。角質層的破壞甚至可以刺激細胞因子自身的產生，並因此促進炎性細胞反應。最近發現，化學成分不同的刺激物在最初 24hr 對細胞因子的表達不同，表明炎性反應的“起始點”不同，而 48hr 後臨床上出現同樣的刺激物反應。對皮膚刺激的認識是複雜的，我們對其分子學基本原理的認識僅處於起步階段。

(二)感覺刺激

感覺刺激的特點是自覺症狀而不是形態改變。敏感的人在接觸刺激物後迅速或緩慢出現刺痛、灼痛、發癢甚至痛感。這些皮膚過敏的人通常存在對化妝品不相容性，最常見的反應發生在面部。這符合所謂的“STATUS COSMETICUS”現象，指某些患者試用多種化妝品，而對任何產品均不能耐受。桑拿浴出汗後使用 5% 乳酸水溶劑用於鼻唇可作為刺激物模型用於診斷所謂“刺激”。FROSH

和 KLIGMAN 最先對一些物質進行了系統研究，發現這些物質可引發遲發性刺激。經自我評價發現的過敏皮膚劇有基礎生物物理指標改變，電容值降低、經表皮水分丟失增加，PH 值增高並伴有皮脂水平降低。對於過敏可能的解釋是，除了屏障功能降低外，由於神經末梢的改變，神經介質釋放增加，獨特的中樞信息處理或神經介質遷移變緩，免疫反應加強者引起神經感覺輸入增強是引起過敏的原因。過敏性皮膚是後天獲得還是遺傳病，很可能兩者皆有。至於其他類型的 ICD，刺痛的發生存在季節性差異，尤其在冬季反應更強烈。

(三) ICD 的臨床類型

根據不同的臨床表現，ICD 存在不同的類型：

1. 非紅斑性 ICD：非紅斑性 ICD 是皮膚刺激的早期反應，炎症不多見，其特點是角質層功能改變，這一改變可使用非創傷性生物工程技術檢測。
2. 即發性(immediate) ICD：大多數即發性 ICD 因接觸了原發刺激物引起。少數病例發現一些腐蝕性成分，如酸和鹼容易可引起皮膚壞死。刺激物接觸常源於事故和職業的原因。即發性 ICD 臨床症狀和體症可在接觸刺激物幾分鐘和數小時後出現，這取決於刺激物的類型，準度和強度。臨床症狀包括皮膚灼痛而不是痛癢、刺痛和觸痛，伴有紅斑、水腫、起泡，甚至壞死。病變通常侷限在接觸刺激物的部位，邊界清楚是急發性 ICD 的重要特徵。然而，即發性 ICD 的臨床表現存在很大差異，有時甚至不能與過敏性 ICD 區別。
3. 遲發性(delayed) ICD：一些特殊的化學物質可以引起遲發性 ICD。接觸刺激物後 8~24hr 可見炎症。臨床表現與症狀與急性 ICD 相似。
4. 累積(cumulative)性 ICD：是最常見的一類 ICD。與即發性 ICD 不同的是，即發性 ICD 是僅僅一次接觸一種強烈刺激物即可引起，而累積性 ICD 是對皮膚臨界點多次的損傷，時間太短不能恢復皮膚屏障功能。在損傷超過特定的表現臨界點之後就會出現臨床症狀，而表現臨界點是由個體決定的，並與個體所處不同的時期有關。典型的累積性 ICD 與接觸幾個弱刺激物 and 水的接觸更有關係，而不是與反覆接觸一種強刺激有關。症狀包括由角化皮膚裂開所引起的搔癢和疼痛。臨床表現主要有乾燥、紅斑、苔蘚化硬化、角化過度、皸裂。乾躁症是累積性毒性皮炎最常見的一種。

5. 反覆損傷性 ICD：這個詞的應用常常與累積性 ICD 使用相似。臨床上，這兩種類型也非常相近。反復損傷性 ICD 常常可能是過早的、反覆的一種物質暴露的結果；而累積性 ICD 是過早的、反覆的不同物質暴露的結果。
6. 損傷性 ICD：有可能在皮膚外傷，諸如燒傷、傷口和即發性 ICD 這類急性皮膚損傷之後發生。皮膚不會像預期那樣痊癒，但伴隨有紅斑、水疱和/或丘疹以及脫皮。臨床病成類似金錢斑皮炎。
7. 膿皰和瘡瘡型 ICD：膿皰和瘡瘡型 ICD 可能是由於與多種刺激物接觸所引起的，如礦物油、焦油、油脂、一些金屬、巴豆油和萘。膿皰是無菌性的，而且是一致性的。當瘡瘡型皮膚感染發生在非典型的長瘡瘡的年齡，要考慮到綜合症的情況。有脂溢性皮炎、毛孔粗大、尋常瘡瘡前表現以及特異變應性的病人容易發生。
8. 刺激物反應：刺激物可能會引起皮膚的反應，其反應未達到臨床對“皮炎”的定義要求。因此，刺激物反應是刺激物皮炎的一種亞臨床形式，其臨床特點是單行而不是多型的。還可能包括一個或多個以下臨床體徵：乾燥、皮膚脫落、發紅、水泡、膿皰和糜爛。集中大量地接觸水，以及那些處在潮濕工作環境的人，如美髮師或金屬製造工人，特別是在接受培訓的最初幾個月內，刺激物反應常常出現。通常始於戴戒指處或在指縫間，並可能擴散到手指和手背至前臂。這些症狀通常會自癒，但會導致皮膚變硬，一些病例可能會發展為累積性 ICD。

(四)影響皮膚刺激的因素

不同人的皮膚對刺激的易感性有著極大的不同，已發現影響刺激性皮炎過程的因素包括年齡、遺傳背景、暴露的解剖位置以及原有的皮膚病。

儘管試驗研究並沒有證實刺激反應存在性別差異，但是，一些流行病研究結果表明女性有較大風險。數項職業性手部濕疹的研究表明，最能確定的個體危險因素是特異反應性皮炎。另一方面，關於特異反應性皮炎和非特異反應性皮炎對標準刺激物反應的實驗研究得出了互相矛盾的結果。年齡與刺激物易感染有關，隨著年齡的增長刺激反應降低。不僅即發性的 ICD，累積性 ICD 同樣如此。好的皮膚、特別是 I 類皮膚對所有類型的刺激物反應最敏感，而黑皮膚是最具抵抗性的。臨床 ICD 的表現還受刺激物的類型和濃度、可溶性、載體和暴露時間長短以及溫度和機械應力影響。在冬季，低濕度和低溫度會減少角質層的含量進而增加刺激反應。

二、眼部刺激

外部黏膜最易接觸化妝品及其成分，可作為靶器官（民生和護理產品），也可作為是由於原本打算用於皮膚的產品偶然濺到黏膜。對於大多數黏膜，刺激物的反應與皮膚上反應相似，然而，黏膜沒有角質層，因此，化妝品成分的滲透更敏感。鑒於眼睛這種主要感覺器官的特殊重要性及其結構，要特別注意眼部的刺激。像任何黏膜一樣，眼睛會接觸到化妝品，這些化妝品本應用在眼睛周圍的，而它們可能在正常應用時稀釋後進入眼內，或偶然進入眼中。因此，為保證消費者在正常或可預見的情況下使用某個產品是安全的，就要對一種化妝品及成分對眼睛潛在的刺激做出評價，這是基本的要求。

（一）眼睛的結構和功能

眼睛捕捉光亮並把它轉化成神經刺激而產生視覺。因此，它相當於一個複雜的器官，一個微管球體組成的球體，懸掛在一個由無數韌帶和深層肌肉組成的眼眶上。眼球是由三層主膜組成，三層主膜進一步分成次一級的膜，每個主膜分別有特別的功能。

1. 外層膜：指的是透明角膜和鞏膜，支撐眼球框架。
2. 中層膜：指的是眼素層，包括脈絡膜、虹膜和睫狀體。
3. 內層膜：指的是葡萄膜，是眼部神經光感受器的組織。

大多數非視網膜組織起到輔助光感保護的功能，角膜和晶體在視網膜上聚焦圖像；虹膜和睫狀肌體調控進入眼裡的光量，脈管、水和玻璃體液和淚腺系統組織提供營養，外在肌肉組織使得眼睛能活動，軀體感覺神經和眼瞼保護神經。只有眼球的前部分是直接與環境接觸的。其他部分在眼瞼和眼窩框骨架後面得到保護。角膜是眼表的透明層，透過角膜，光穿過進入到視網膜。它由三層組成。

1. 角膜上皮細胞：覆蓋整個基質表面，大約 50~90 μm 厚。
2. 基質：相當於大約 90% 的視網膜厚度。
3. 內皮細胞：只一層，但非常重要，因為它維持脫水功能，以保證視網膜清晰。

結膜：是薄的黏膜覆蓋著鞏膜和內眼瞼，用來做為保護和協助保護眼睛在前部懸浮，同時分泌前視網膜淚膜的部份成分。覆蓋在眼睛鞏膜(暴露的鞏膜表面)的結膜被稱作球結膜，而覆蓋在眼瞼表面的結膜叫做瞼結膜。結膜上皮細胞是連續的，有角質上皮細胞和淚腺排泄系統。結膜包含很多血管、神經、結膜腺和炎性細胞。佈滿小血管，但通常看不到。結膜腺供應液體並分泌前角膜淚膜的成分。

虹膜：虹膜是橫橢圓體，位於晶體和睫狀肌前面。它包括膠原質、

血管和平滑肌。虹膜通過調節瞳孔的大小，起到重要作用。如上所述，虹膜的收縮和擴大引起瞳孔的併合，調節進入眼睛的光量。

角膜前淚膜：角膜前表面被一層相對穩定的層覆蓋著，稱作前角膜淚膜。這層外薄膜對於正常的角膜功能是重要的。它推遲了角膜表面的乾燥過程並提供一個光滑、連續的表面促進了角膜的視覺特性。它也潤滑並保護眼瞼和眼睛前部的其他組織。另外一個功能是給角膜上皮細胞和基質提供營養。淚膜是通過在眼前部的淚腺分泌的。淚膜有三層：前脂質層、水液層和薄黏蛋白層。正是脂質層，遲緩了水層的蒸發過程並提供一個順滑的視覺表面。通過淚膜的分散，眼睛能從角膜排出廢異物。由於前角膜淚膜在其對於角膜的保護效應的重要性，對於有乾眼症的人，化學物品不適反應可能會加重。

(二)眼部刺激機制

眼睛損傷可以由多種因素所致。損傷可以是物理性的，如汽車或運動傷害中所導致挫傷和由利器所造成的穿刺傷。全身用藥的化學物質通過血流進入眼睛也可導致眼睛損傷。局部的化學藥品，如酸、鹼、溶劑或表面活性既可以導致不同程度的眼部損傷。

損傷的程度常常取決於化學物質的本質或特性以及化學物質的濃度，酸鹼常常引起眼睛的速發反應，而一些化學物質的作用可能是最初看起來輕微，然而在之後的一段時間裡變得嚴重，如二甲(基)胺(dimethylamine) (一些表面活性劑中的雜質)以及氧化乙烯(ethylene oxide) (通常用來消毒小的醫療用品)。

身體有它自己的防禦機制，如通過疼痛、刺痛、灼熱以及眼瞼眨動來避免全部的接觸。增加排淚和眼睛的眨動，在排泄器官的幫助下，有利於稀釋或清除這些物質。眼睛的傷害引致不同程度的功能性損失，如流淚增多、角膜渾濁、水腫，由此視力下降。眼睛組織也有能力來修復損傷，但程度是不同的。眼部損傷可以是可逆或是不可逆的，取決於損傷的程度和再生或修復的程度。只發生在角膜上皮的損傷可以很快修復，常常不伴隨有永久性損傷。但是，如果損傷擴展到了上皮細胞基底膜以及基質的部份，會出現角膜潰瘍。通常，如果損傷超過了基底膜進入到基質的表皮部份，角膜也可以很好地修復，但修復可能會花幾天或甚至幾週的時間。一旦損傷大大延伸到了基質裡，會發生角膜潰瘍。

水分的滲出導致水腫及細胞沉積。一般情況下基質可不同程度地修復，但由於不久就會被新合成的膠原所替代，這種修復所持續的時間不長。至於細胞沉積，由於渾濁、增後的演進，角膜變厚而渾濁，使視力下降。如果損傷深達內皮以下，可導致角膜穿孔。這是不可逆損傷並可能致盲。此外，由於角膜的神經豐富，受傷時有燒灼、刺痛等主觀反應。眼部刺激物亦可導致結膜的炎症，包括血管擴張充血，由於水份滲出而導致水腫、黏液等分泌物增多。充血、水腫以及分泌物增多會導致視力模糊。如果不能及時處理、治療，可引起繼發感染。

刺激物還可使淚液增多，改變淚液膜的完整性，如溼度增加。像溶劑之類的一過性刺激物還可破壞前角膜淚液膜中的脂質成份。

直接刺激或繼發於角膜損傷的反應均可引發引起虹膜炎。一旦發炎導致水腫、滲出，其調節瞳孔大小的機能受到影響，對光反應遲鈍，導致視物不清。由於虹膜中有豐富的神經，患者感到刺癢、灼痛、刺痛。

(三)影響眼部刺激的因素

一般情況下，眼部刺激物只累及眼前部結構如角膜、結膜、虹膜、淚腺和眼瞼。化學品導致眼損傷的機制很多，如有些雖屬惰性化學物質，但大面積作用或深入作用亦可至穿孔。酸性物質直接與眼組織中的蛋白質反應，導致組織凝固，因而損傷多為局限性的。而鹼性物質則溶解細胞膜，並穿入眼的深部。溶劑和催淚性物質如指甲油的丁乙基乙酸丁酯可因其對脂肪及/或脂的作用導致一過性眼部損傷。洋蔥油之類的催淚物質則直接刺激角膜上皮的神經導致流淚。這些一過性的刺激往往恢復得很快。

三、皮膚致敏

當物質穿入皮膚後，首先要激活那裏的非特異免疫系統，主要是由多形核細胞和巨噬細胞吞噬所穿入的顆粒。隨之是特異性免疫反應，即由 T 淋巴細胞介導的細胞免疫和由 B 淋巴細胞介導的體液免疫。B 細胞轉化為漿細胞後合成抗體。這兩種免疫反應均需要其他細胞的參與，如淋巴樣細胞（腋下淋巴細胞），尤其是抗原呈遞細胞。最後，由具有免疫記憶功能的淋巴細胞形成了免疫記憶。在皮膚中還有朗罕式細胞、角質細胞、肥大細胞等細胞，也承擔著重要的免疫學功能。在免疫反應中，上述這些細胞通過直接接觸或可溶性物質相互協助。詳細討論這些免疫細胞的性質、功能，皮膚致敏的類型與機制，最後勾繪出影響化妝品致過敏反應的全貌。

(一)涉及免疫反應的細胞

1. 多核性細胞

它們和其他免疫細胞依樣源自造血幹細胞，並分化為嗜中性、嗜酸性和嗜鹼性粒細胞。

(1)嗜中性粒細胞：占血液粒細胞總數的 95%。這類細胞以其吞噬能力構成強大的抗微生物特性。吞噬功能含三個階段。

①黏附期：即細胞與欲吞噬的顆粒接觸。

②吞入期：顆粒被攝入。

③消化期：顆粒在胞內受溶酶體和其他殺菌系統，尤其是氧自由基的作用。

這一吞噬過程發生在趨化期，即吸引吞噬細胞階段之前，不過亦有例外。循環中的嗜中性粒細胞可穿過毛細血管壁而進入組織中。因此，嗜中性粒細胞仍是非特異性防衛系統的成分，它們亦通過產生氧自由基和白三烯素 (leukotrienes) 而成為誘發炎性反應基本要素。

(2)嗜鹼性粒細胞：這類細胞的殺菌作用略差，但參與炎性反應，尤其是 I 型變態反應。

其表面有 IgE 和 IgG 的受體，後者與 IgG 依賴的細胞活性有關。在幾種刺激的影響下，它們釋放出很多介質如組織胺、肝素、血小板活化因子 (PAF)。

(3)嗜酸性粒細胞：它們亦參與炎性反應，表面有大量低親和力的 IgE 受體，從而在 I 型變態反應中發揮作用，近年來才發現它們其實是保護性細胞。實際上，嗜酸性粒細胞的酶能降解組織胺和白三烯素。

至此，人們才真正揭發了這類反應通過細胞毒性顆粒介質 (cytotoxic granular mediators) 和細胞因子 (cytokines) 的釋放而發揮的積極作用。

2. 單核吞噬細胞

它們亦來自造血幹細胞。

(1)單核細胞：佔血液白細胞 3%~8%，在血液中循環時間很短，進入組織後成為組織細胞而逐漸死亡。組織細胞活化後成為巨噬細胞。

(2)巨噬細胞：根據其表面的細胞化學標記、膜受體、MHC (major histocompatibility complex) I 類和 II 類抗原及特殊的模結構，可用單株抗體將它們分為若干類。

這些細胞合成多種物質：自由基(超氧離子、過氧化氫)、

細胞溶酶(溶酶體酶、膠原酶、彈性蛋白酶)、補體因子、磷脂(PAF)，二十烷類(前列腺素和白三烯素)及細胞因子。巨噬細胞通過這些因子參與炎性反應。這些因子往往是有用而且有益，能干擾抗菌免疫和調控免疫反應。實際上，被巨噬細胞處理的抗原中 90%被清除，10%表達於細胞表面。經過如此修飾的抗原可啟動特異性免疫反應。此外，巨噬細胞還可直接或經抗體介導成為細胞毒殺反應的效應細胞。

3. 淋巴細胞

有兩類淋巴細胞，即 B 淋巴細胞和 T 淋巴細胞，各自又分為若干亞群。淋巴細胞的型態和超微結構相仿，但功能有很大差別。

(1) T 淋巴細胞：它們具有不同的功能。

①通過細胞間的合作機制與別的細胞共同調節免疫反應。其中 CD4 輔助 T 淋巴細胞促進體液或細胞免疫，而 CD8 抑制 T 淋巴細胞、細胞毒殺 T 淋巴細胞的輔助作用。

②它們是免疫反應的效應細胞。CD8 抑制 T 淋巴細胞、細胞毒殺 T 淋巴細胞以及 CD4 輔助 T 淋巴細胞招集單個核細胞，尤其是巨噬細胞參與細胞免疫，如遲發型超敏反應。

③ T 淋巴細胞活化後產生白細胞介素參與細胞間的相互作用

④最後，有些長壽命的 T 淋巴細胞形成免疫記憶。

(2) B 淋巴細胞：主要參與體液免疫。B 淋巴細胞活化後轉化為漿細胞，後者合成抗體。一株漿細胞產生的免疫球蛋白具有相同的異種、同種異形和個體型抗體。產生抗體要 T 淋巴細胞的輔助，但有些非胸腺依賴抗原除外。

4. 其他的免疫細胞

(1)自然殺手細胞：它們屬於大顆粒淋巴細胞，其表面有 T 淋巴細胞，特別是抑制 T 淋巴細胞相同的表面標誌，也有其特殊的表面標誌。

(2)殺手細胞：它們有 IgG Fc 部分的受體，從而依靠抗體依賴細胞介導細胞毒作用裂解靶細胞。此類細胞既無 B 淋巴細胞標誌，亦無 T 淋巴細胞標誌，故稱為“裸”細胞。

5. 皮膚免疫系統的細胞

實際上，皮膚中的某些細胞就構成了具有重要功能的局部免疫系統。

(1)朗罕氏細胞：這是一類樹突狀細胞，大約佔皮膚細胞數的 2%~4%。它們存在於上皮、真皮淋巴結和胸腺之中。它們的

發生來源是近年才較清楚的。它們可能與單核細胞、巨噬細胞來自同類細胞，因而具有很多相同的表面標誌。受到抗原刺激時，郎罕氏細胞離開表皮進入淋巴結，轉化為一種抗原呈遞細胞，將抗原呈遞給 T 淋巴細胞。郎罕氏細胞在免疫反應中的作用如下。

- ①呈遞抗原，當抗原與其表面受體結合後，即被內吞，經過不同的胞漿內結構和代謝之後，表達在細胞的表面。
- ②呈遞抗原給淋巴細胞：這一過程始於表皮組織，隨後因為郎罕氏細胞之移行而轉移至淋巴結。
- ③產生可溶性物質。郎罕氏細胞能合成細胞因子及多種炎症介質，如 PAF 或二十烷類。

郎罕氏細胞的功能可受到醫源性因素的調控。紫外線和皮質類固醇可使郎罕氏細胞的數量減少。環孢黴素雖不減少郎罕氏細胞的數量，但可以控制它向 T 淋巴細胞呈遞抗原的功能。

- (2)角質細胞：它們占表皮細胞的 95%。一般情況下，表面有 HLA 的 I 類抗原，但在病理狀態下可表達 II 類抗原並合成各種細胞因子。
- (3)肥大細胞：它們的胞漿中有大量的顆粒，肥大細胞表面有 IgE 的受體，故參與由 IgE 介導的過敏反應和炎性反應。實際上，這些細胞有免疫球蛋白的特殊受體。

綜合上述，各類免疫細胞在不同的免疫反應中通過可溶性分子(白細胞介素)或細胞間的直接接觸而協同作用。在淋巴細胞和抗原呈遞細胞表面有大量的表面分子的表達。

(二)皮膚致敏的機理

過敏性接觸性皮炎(ACD)常因局部的產品或者其成分引起，根據 Gell 和 Combs 的分類屬於 IV 型。基本質就是抗原在已致敏個體身上引發的遲發性變態反應。過敏性接觸性皮炎可分為兩期。

- (1)致敏(誘導)期：即皮膚首次接觸半抗原(變應原)，使淋巴結內產生對半抗原特異的 T 淋巴細胞並移行至皮膚。朗罕式細胞吞噬半抗原後，從表皮移行入淋巴結，並使副皮質區形成半抗原特異性的記憶 T 淋巴細胞。致敏過程無臨床症狀，大約持續 8~15 天。
- (2)激發期：當皮膚再次接觸這種半抗原時，特異性的 T 淋巴細胞被激活，並誘發炎性反應，導致皮膚損害(接觸性皮炎、濕疹)。誘發過程大約數小時至 3 天。

這一炎性過程可持續數日，隨著生理性的下調機理發揮作用而逐漸消退。

接觸性變應原是小分子化合物，稱為半抗原，其本身並無免疫原性。當它們與皮膚中的蛋白質結合，就形成了半抗原~載體複合物。幾乎所有的半抗原均為極性物質，可與皮膚蛋白質的噬核殘基共價結合。從皮膚接觸致敏物質到出現過敏原特異的 T 淋巴細胞是一極為複雜的過程，涉及接觸部位引流淋巴結內極為精密的細胞和分子相互作用。總的來講，必須認識到皮膚是免疫活性組織，與抗原接觸後能引發反應。在上述致敏過程中，最重要的部份是樹突細胞(尤其是表皮層的朗罕氏細胞)和調控朗罕氏細胞移行、成熟和功能的細胞因子。皮膚的朗罕氏細胞構成一種半連續的網路，用於捕獲入侵的抗原。朗罕氏細胞主要的功能是識別、吞噬處理及傳送抗原。其識別化學變應原的形勢很有趣而且複雜。化學變應原均為半抗原，不和大分子結合是不能刺激免疫反應的。因此，接觸性變應原本身一定具有和蛋白質反應的特性，或經過皮膚內的代謝後形成這種特性。這種半抗原/蛋白質可能被朗罕氏細胞吞入並處理。然後這些攜抗原的朗罕氏細胞離開皮膚，通過淋巴送到達淋巴結。在此移行過程中，細胞發生表型改變，因此獲得免疫刺激的特性，並得以將抗原呈遞給引流淋巴結中的 T 淋巴細胞。朗罕氏細胞的動員和功能成熟都是由皮膚細胞因子互動並調控的，而這些細胞因子的表達多是由皮膚致敏誘導或增強的。皮膚致敏的中心環境是刺激變應原特異的 T 淋巴細胞反應，其反應場所是受到刺激並有對樹突細胞聚集的外周皮膚引流淋巴結中。抗原被呈遞給反應性 T 淋巴細胞後，T 淋巴細胞被激活繼而分裂、分化。分裂導致特異性 T 淋巴細胞克隆擴增，使更多的反應性 T 淋巴細胞只能識別變應原與之反應，如此構成皮膚致敏的細胞基礎。致敏的成效還有賴於免疫反應的質量和特異性 T 淋巴細胞亞群的分化。從功能上講有兩類 T 淋巴細胞，即輔助 T 淋巴細胞和殺手 T 淋巴細胞，其表達的標誌分子又分為 CD4 和 CD8，功能上的不同主要是因為它們產生不同的細胞因子。輔助 T 淋巴細胞又分為 Th₁ 和 Th₂，而殺傷 T 淋巴細胞亦分為 T_{C1} 和 T_{C2}。新的研究表明，成功的致敏和隨後發生的接觸性超敏反應有賴於 Th₁ 和 T_{C2} 的活性，它們分別能產生包括 γ 干擾素 (IFN- γ) 在內的各種細胞因子。然而，整個過程很複

雜，越來越多的證據表明致敏過程與 CD4 和 CD8 細胞間複雜的相互作用有關。

(三)臨床表現

變應原可通過幾種途徑到達皮膚：直接塗抹，偶然接觸含變應原的物質表面，空氣接觸(吸入蒸汽、飛沫、塵粒)，手接觸敏感部位(如眼瞼)，他人使用的產品或全身性暴露(注射的變應原可隨循環到達皮膚而導致血源性的接觸性皮炎)。此外，接觸光敏物質後暴露於日光，尤其是紫外線可致光敏性皮炎。變態反應性皮炎有時可以成擴散(全身)表現或現在並未接觸過變應性原的身體部位(與全身性反應相似的異位皮膚反應)。就一名過敏患者而言，大約在接觸變應原 24~96h 之後出現皮炎，最初侷限在接觸部位。在急性期，臨床表現是紅斑和水腫，隨之出現丘疹、水泡、滲出和結痂。在慢性期，表現為皮膚苔蘚化、開裂和色素沉著。過敏性接觸性皮炎可能伴有廣泛的搔癢。

(四)影響皮膚致敏的因素

皮膚致敏基本上與物質的性質有關，也和這種物質的透皮性有關。這可解釋有些物質單獨接觸皮膚時並無反應，一旦成為化妝品則導致皮膚的過敏反應。這也意味著除了分子本身的作用，還要考慮相應的目標受體、年齡、經歷和皮膚特性。化妝品中最常見的過敏原存在於化妝品產品、香料和防腐劑中，但亦可存在於抗氧化劑、載體、乳化劑和某些防曬劑中。一些近年來使用的天然物質亦可導致皮膚過敏。總而言之，除了本身的化學物質及透皮特性外，下列因素亦可影響一種物質成為導致接觸性皮炎的過敏原。

1. 化妝品成分的總使用量及含這種成分的產品數量。
2. 在產品中的濃度。
3. 同時存在的促透皮吸收劑。
4. 特定的使用者及施用部位。
5. 使用頻率和接觸時間。
6. 透皮能力和形成生物蓄積的能力。

四、光毒性

越來越多的證據表明，化學物質與光的作用可導致各種皮膚損傷。很多化妝品都施用在受陽光照射的部位，工業界特別注意預測可能存在的這種不良反應。化學光致敏物質能吸收光，使其成為在低輻射能量之光照下原本不發生反應的物質變成了能發生反應的物質。僅有這種光致敏物質或僅有光照均不足以產生致敏作用。簡單地講，是光生物學反應啟動了一種化學物質的光吸收，使其成為激活態。這種光激活物質可透過不同的光物

理/光化學途徑失活，或導致分子回到其原始態並釋放出能量（螢光、磷光、振動能和熱能），或形成新的反應物（單態氧、自由基），從而促進氧化或改變生物分子，或導致形成穩態毒性光物質。光致敏機理有兩大類。

第一類：有自由基的參與。自由基可能源自光致敏物質。

第二類：有單態氧參與，然後致敏物質與生物系統反應，逐漸或快速引起光反應，導致炎症乃至細胞死亡。或導致遲發型反應，其原因是蛋白質和脂質的改變和功能的變化而引起致敏（光過敏）。光過敏是典型的宿主反應，是免疫系統識別出改變的自身抗原後試圖將其排除而發生的反應。這是典型的中、長期反應，呈現非嚴格的劑量依賴性。其發生更多地取決於該個體對光抗原的耐受性如何。因此，這種反應被公認為屬於個體特異型反應。典型的光敏物質是損傷 DNA 的複合物，導致鹼基的改變，如不能修復就導致突變。大多數情況下，DNA 的損傷導致細胞死亡。突變不一定使細胞死亡，但會影響到調控細胞週期的基因，啟動光致癌變的過程。光毒性這個術語所指的是一種物質經激活輻射之後能損傷 DNA。這種損傷可導致核酸鹼基的改變/替換，也就是使密碼子改變（光致突變性）。光致癌性是指一種物質分子暴露於原本非致癌劑量的紫外線或可見光輻射後，使得發生皮膚癌的危險增加的特性。

（一）光生物學危險性

包括人在內的所有生物系統都對日光紫外線，尤其是短波紫外線很敏感。早在公元前 1500 年，人們就注意到了皮膚接觸某些物質後，對日光變得極為敏感。古埃及的醫生用一種稱為 *Ammi majus* 的植物種子搗碎後敷在皮膚上治病，結果敷藥處的皮膚很容易曬傷。現在已知，自然界中或合成的化學物中有很多成分接觸皮膚或攝入後都會導致此類問題。如植物成分引起的稱為植物光敏皮膚炎，還有職業性光敏皮膚炎（如接觸食物、農藥、染料、瀝青製品、防腐劑等物質引起），化妝品光敏皮膚炎（接觸防曬產品、香水等），藥物光敏皮膚炎（接觸抗生素、抗發炎藥物、降壓藥物、抗真菌藥物、安眠藥物等）。已經確認的光物質有 15000 種。經這種光毒物質作用後也許僅僅使得皮膚容易被曬傷，但也有證據表明可能引起嚴重的皮膚反應，抑制免疫反應和引起皮膚癌。

把具有光吸收和光反應特性或能被光激活的化學物質塗抹於皮膚上之後，就可以導致光毒性的產生。臨床所用的藥物引起的光毒性程度從中度到重度不等。儘管有時為了治療疾病的目的可以接受，而且通過告知患者避光、調整用藥時間等措施在很大程度上可

避免光毒性，但對於化妝品來說，光毒性是不能被接受的。這也是為什麼推出新的化妝品時要按常規檢查產品及成分有無光毒性危險。

(二)光致敏的物理化學機理

在光物理和光化學中廣泛提到光致敏物，是指在吸收光後改變成其他分子的物質。所以，化學光致敏就是由光和光致敏物聯合作用後導致第三種分子發生改變的過程。光致敏物是一種複合物，吸收光之後成激發態，然後通過一系列的光物理和光化學過程與生物系統(生物分子、細胞)作用，引起改變。化學物質吸收光子是導致光毒性現象的先決條件。一旦發生，則化合物進入激發態(活化的單態分子)。這是一個不穩定狀態，大多數化學物質吸收光子後發生分子內轉換，因而將吸收的能量以更長的波長(螢光)釋放出來。單態分子的半衰期很短，但可因系統間交叉而進入長壽命激發態(三體態)，並以可見光(磷光)的形式釋放出能量。更多的情況下，化合物從三體態通過分子內或分子間反應生成新的、穩定的光產物、自由基離子，或將能量或電子轉移到周圍的分子。化學致敏物正是以三體態形式與生物分子相互作用的。基本的光化學反應簡述如下。

1. 與內源性生物分子的光反應。光激活分子或短壽命中間產物(如基因)和細胞成分發生生物分子反應。細胞膜脂質脫氫導致光氧化反應而損傷細胞膜(I型機理)。最終激發態和中間產物結合到生物分子上(光結合)。和蛋白質的反應則導致蛋白質變性或產生共價光加成物(光結合)，這就是光致敏的第一步。與DNA的不可逆結合可致基因毒性。
2. 把能量或電子轉移給受體分子。這一過程因產生活性氧而增強。如單態氧會導致產生更多的單態氧最終引起多種氧化反應(III型機理)。有許多種光毒性化學分子結構都會通過能量轉移產生單態氧。
3. 單分子水平的光化學反應，如重排、異構或降解。另一種可能是形成了強毒性的穩定的光化合物，即使不再吸收光能也會導致生物學損傷(暗毒性，dark toxicity)。穩定性略差的光產物如過氧化物和生物分子反應，造成反應部位的損傷性變化。這類光產物的壽命如果足夠長的話，還可能從皮膚擴散至內臟組織，造成更為嚴重的損害(全身性光毒性)。

(三)光生物學作用

一種光致敏物與生物系統的作用可產生直接的(急性的或長期

的)光毒效應。關於光異生素與皮膚的相互作用，常常以一個廣義的詞(光毒性)來描述，及包括光毒性和光致敏現象。光刺激反應是最常見的反應。任何人(和實驗動物)只要與光和光異生素的接觸達到足夠的劑量就會發生光刺激反應。因此，第一次暴露即可有此反應，表現為紅斑、水腫和脫皮，和重度的曬傷頗為相似。只侷限在光暴露部位。這種反應起初只是炎性反應，最終導致細胞死亡。作用程度是劑量依賴的。光致敏物導致光毒作用的先決條件是光到達皮膚表面(真皮層)並被該化學物質所吸收。在日光光譜中，280~330nm (UVB)可被生物分子吸收而直接造成損傷。UVA (320~400nm)對生物分子和生物系統的作用很弱，但有光致敏物存在時則大不一樣了。不過，並非所有吸收 UVA 的化合物都引起皮膚的光損傷。關於在光毒性反應中的細胞損傷的基本機理已經有大量的研究，而穩定的和短壽命的光產物(如自由基、過氧化物)都被確認起重要的作用。涉及自由基的細胞損傷機理屬 I 型或 II 型反應。前者指複合物的基因與氧反應生成過氧化氫。後者指激發態光致敏物的能量被轉移給三態分子氧，從而產生更為活躍的單態氧。這兩種反應的途徑均能脂質氧化反應，導致細胞膜損傷和蛋白質改變(交聯、光致半抗原化)或 DNA 改變(單、雙鍵斷裂、鹼基交換交聯)。另一種可能的機制是形成穩定態的光產物，它比原體分子的光毒性更強，聚積在皮膚內，可改變細胞膜的特性或損傷細胞代謝功能，而產生細胞毒性作用。

細胞具有不同的抗活性氧和过氧化物的能力。包括各種酶(觸酶、過氧化酶、SOD、穀胱甘肽過氧化酶)，保護性分子(DNA、蛋白質)。細胞抗此類損傷的能力最終有賴於 GSH。這種三肽氧化成 GSSG，若不再生就漏到細胞之外。GSH 損失超過一定限度就會導致細胞的不可逆損傷。

上述任何一種機理均可造成細胞損傷，並引起周圍組織的炎症。炎症反應的損傷主要通過磷脂酶 A2 途徑，從受損細胞的膜釋放出二十烷酸在經過環氧化酶或脂氧化酶途徑，由靶細胞大量生成炎症介質(如前列腺素、前列環素、血栓烷和白三烯)，釋入周圍的組織中。角質細胞產生這種炎症介質的能力強於成纖維細胞。有趣的是，所釋放出的二十烷酸可刺激周圍的細胞產生 IL-6, IL-3 和 IL-8 並釋放出 IL-1。這似乎是一種遲發型炎症反應增強機理。光基因毒性是指某種物質受到輻射激活後損傷 DNA。已經證明生物體經過日光照射後因 DNA 的光化學損傷而後果嚴重。290nm 以下波長的輻射被 DNA 吸收，但在 UVA 波段 (320~400nm)，光生物學作用是

由內源性或外源性的光致敏物介導的。基因毒性光致敏物是指能在生物體暴露於自然陽光時引起 DNA 損傷的物質。能觀察到的現象是在有光致敏物存在時 DNA 斷裂。這一作用甚至在無氧條件下亦可發生。很多情況下，低濃度的光致敏物尚不足以直接導致單股 DNA 斷裂，但可使 DNA 氧化受損。如 2'-脫氫鳥嘌呤和胸腺嘧啶往往就是這種光致敏氧化的靶分子。它們的氧化需要自由基和單態氧的參與。光產物的種類就是 I 型和 II 型機理的標誌。

理論上，核酸鹼基的改變具有潛在的基因毒害或/和致突變危險。大多數情況下，DNA 的損傷可以得到有效而準確的修復。但若損傷程度太大，則細胞可能發生凋亡。若細胞的修復機制不能恢復 DNA 的完整性，突變就可能形成。核酸鹼基的改變/置換/丟失意味著某密碼子的信息改變（光致突變）。現在已經可以用釀酒酵母的缺陷株來進行這方面的研究。光致癌性是指一種分子使皮膚接受非致癌劑量的 UV 或可見光照射後發生癌症的危險增加。如果受損的是調控細胞週期的基因，則可使細胞無限增殖。只有很少幾種光致敏物經小鼠試驗證明能增加 UV 致癌的風險。最為明顯的例子是 8-甲氧補骨脂素。人體用 PUVA 光療時證明可因光致敏作用誘發皮膚癌。最新的證據提示可能還有其他化合物可因光致敏而引發皮膚癌，但其主要特性和光化學特點尚不清楚。光過敏是典型的宿主反應。當免疫系統識別出改變的自身抗原後，即發生反應將其清除。這是典型的中、長期反應不依賴劑量，而取決於宿主對光抗原刺激的耐受性如何，因而被認為是一種特異性體質現象。光過敏雖然不多見，但是可能比較嚴重。光過敏的臨床表現包括紅斑、水腫、起水泡破潰等，伴有局部的免疫反應。與光毒性相反，光過敏需要第一次接觸致敏，第二次再接觸時才有反應，其過程就是光抗原刺激免疫反應的過程。化學複合物通過光結合機理與大分子形成加成化合物，這是反應的先決條件。然後是皮膚中的抗原呈遞細胞（樹突狀細胞）攜帶新抗原移行到局部淋巴結中，激活 T 淋巴細胞。宿主一旦被致敏，再次接觸該抗原時便發生劇烈的局部炎症及/或細胞損傷（水泡、脫皮、濕疹等）。有些光致敏物引發免疫反應，有些則無此作用。研究它們的化學結構發現，由於結構的多樣性，目前尚無法判斷何種結構會引發光毒性和/或光過敏。

五、全身毒性

人們已經知道，當一種物質被皮膚吸收後，有可能會因炎症介質的釋出而導致速發型反應直接累及接觸的皮膚（刺激性接觸性皮炎），或是在已致敏個體的不相關部位引發遲發型細胞介導皮膚炎症反應。經皮膚吸收的物

質除了有上述局部作用外，亦可轉移或被代謝後轉移至重要器官，依劑量大小對器官的功能產生暫時或長期的影響。所以測定某種成分或產品的全身毒性時應該以其對生命物體不良作用之研究成果為依據。在此意義上，可把毒理學看做是藥理學的延伸。後者研究的是與最大功效相關的理想劑量，而前者研究的則是可能出現的危險，並計算出人類接觸時的危險程度。因此，準確界定任何一種化妝品成分的固有毒性特點，界定特異的靶器官以及不會發生危害的安全暴露濃度（未觀察到有害作用的劑量水平—NOAEL）是很重要的，並能由此而確定某種成分的足夠的安全係數。全身毒副作用多源自各成分物質，因而需要針對它們做直接的研究。不過，各成分在配製好的終產品中相互作用，故對終產品引起的全身性危害亦不可忽視。

（一）毒理學作用

毒理學作用的性質、靶器官、作用機理和毒性物質(及/或代謝產物)之間的相互作用以及生物體的結構均可有很大的不同。結構組織可能沒有特異性，但毒性可能針對特定的細胞群。包括受體在內的各種結構均有可能成為毒性作用的靶目標。有些物質只在接觸部位引起速發型反應，但大多數均可被吸收並轉移至各臟器後導致全身性的、與計量相關的毒性作用，不同的毒性如下。

1. 可逆和不可逆作用：凡中止暴露後其作用逐漸消失稱為可逆作用，中止暴露後仍然有作用或更甚者，稱為不可逆作用，如致突變、致癌作用。
2. 速發型和遲發型作用：單次接觸及很快發生作用的屬於速發型作用，多為強毒性物質。化妝品所用的成分多為低毒性，往往經過數天乃至數年之後才顯示出輕微的作用，而且往往需要反覆接觸（如致癌物）。
3. 功能、型態和生物化學的作用：功能性作用源自特定器官之功能的改變，多為可逆的。形態學作用源自組織或器官的改變，可用顯微鏡觀察到，多為不可逆的。生物化學作用不引起明顯的型態學改變，但相對應器官的功能有影響。
4. 某一種毒物對於各器官的毒性不盡相同，而是依靶器官的敏感性，或依該器官是否能大量儲存該毒物或其代謝成份而異。所以，呼吸系統是揮發性或氣態毒物的靶器官，而血運豐富並執行重要代謝功能的肝、腎，則直接暴露於大部分毒物。因此，在測試某種物質的毒性時，必須明確其靶器官和出現毒性的劑量。檢測某物質之全身性毒性時，應當考慮的另一參數是其作用機理，而機理往往與其分子結構有關。最受關注的是酶類，

對酶功能的抑制可以是可逆或不可逆的，特異性的或非特異性的。舉例如下：

- (1)封閉輔酶的合成或使之變性，可影響酶本身的功能活性。
- (2)多不飽和脂肪酸的過氧化反應可對特定的物質或脂類產生毒性作用。
- (3)烷化劑也能結合在核酸上，導致長期、不可逆損傷，如突變、癌變、致畸和免疫抑制。

對許多毒物之生理學作用的特異性的觀察導致了“受體物質”這一觀念，亦即分子水平上的“作用部位”。受體是一種立體蛋白質結構，當相應的某種分子與之結合後引起特殊的生物學作用。有些處於同一組織上的幾種受體通過不同的藥理、生化和免疫機理而有不同的反應，如針對胰島素、類固醇、雌激素和前列腺素等的激素受體。受體概念的提出，是在分子水平上了解毒性作用機理的一大進步。

(二)全身毒性作用的機理

毒性物質在機體中的作用強度和性質，取決於其在靶器官的濃度。首先，有賴於使用的劑量，其次是影響其穿透水平的因素如吸收狀況、分布、代謝和排出（簡稱為 ADME）。

1. 有不同的跨膜穿透機理

- (1)“被動擴散”是最常見的形式，服從於交換平衡定律，有時毒物與介質之間的親和力會影響平衡點。
- (2)“浸潤”主要受控於通過膜孔道的水的流速和孔徑的大小。
- (3)“主動轉運”該過程依靠細胞膜是內側的大分子載體進行。

2. 物質進入機理的途徑

判斷某種物質潛在的全身性作用時，必須考慮到幾種不同的進入途徑。這有賴於弄清楚使用或誤用該物質的情況，即使經口攝入，還是經肺、皮膚或黏膜攝入。

- (1)經口攝入：口服時，整個消化道均吸收。儘管胃僅有少量的交換表面，但仍然與腸道一同成為主要的吸收區域，而豐富的血管網更加大了吸收劑量。吸收水平與物質的親脂性和極性有關，有時還需要活性載體幫助吸收。胞飲過程亦可使偶氮染料或聚乙烯等特殊的分子穿入細胞內。
- (2)經呼吸道攝入：由於肺泡組織的表面積很大，成為毒物侵入的重要門戶。豐富的血運和肺泡氣體/血液之間的高效率交換過程更加劇了毒物的吸收。這一途徑主要有利於揮發性物質、噴霧劑和懸浮顆粒物的吸收。不過，吸收過程與顆粒的

大小有關，大顆粒多沉降在鼻黏膜上，被排出或進入腸胃道；中等大小的顆粒可沉降於氣管、支氣管和細小支氣管表面。由黏液-纖毛的運動逆向排出，最後經咳嗽排到體外或重新攝入，或者它們被巨噬細胞吞噬後，經過淋巴途徑吸收。最小的顆粒經過肺泡上皮擴散進入血液。它們多為水溶性的，相對分子質量不到 10000。

- (3)經皮攝入：皮膚是物理性屏障，但外部和內部的各種因素導致毒物侵入亦可能引起全身性中毒。毒物可經毛囊、汗腺、皮脂腺迅速吸收，但吸收量有限。毒物遇到的第一道屏障是表皮和角質層。只有小的極性分子可通過，而非極性分子則要依靠其脂溶性擴散。真皮層構成了選擇性較差的第二道屏障，而且比較容易通過。潮濕或出汗、皮炎、角質層損傷、衰老均可能影響皮膚的通透性。

黏膜沒有角質層，因而毒物的穿透要快得多。雖然毒物通過黏膜的機理和皮膚差不多，但黏膜顯然是重要得多的門戶。

3. 生物轉化

當異生化物質進入血液循環後，轉移到靶組織、器官、蓄積並釋放出毒性。其過程中包括被動擴散和主動轉運兩種機理，它受控於：毒物與組織蛋白之間的親和力；毒物與胞漿蛋白之間的關聯程度；相關器官的血運狀況以及機理的保護性屏障機制。大多數的物質在穿透入機理時已經完全或至少部分地發生了改變。機體識別出入侵的異物並力圖清除之。這包括一系列生物化學過程，形成比原始物質更極性化（更加親水）的物質，因而易於從腎臟經腎小球過濾後排出，從而避免被腎小球重新吸收。有關這一過程的酶主要存在於肝臟，而肺、胃、腸道、腎和皮膚亦含有。經過腸道吸收後的毒物在肝臟經過生物轉化，即解毒過程。不過，有的物質經過生物轉化後卻變成毒性更大的代謝物，導致中毒。

生物轉化涉及兩種機制：(1)經過氧化、還原或水解的降解反應(1期)。(2)結合反應(2期)。

經過吸收、分布和全部或部分生物轉化的毒物最終以遊離或結合狀態被排出。主要途徑是腎臟，而腸道、肺、唾液、汗液和外骨骼亦有輔助排毒作用。腎臟排毒的生理學過程與排出其他內源性物質相仿，包括腎小球過濾和腎小管分泌，不過後者的作用會被腎小管重吸收現象抵消一些。

(三)影響全身毒性的因素

影響物質毒性的主要因素是毒物的物理形式、濃度和暴露途徑。

1.物理形式

總體來講，顆粒越小，可溶性越強，就越容易吸收，因而毒性越強。吸入性毒性的主要影響因素就是顆粒大小。固體物質當然是與腸道、肺、皮膚和黏膜部位的體液接觸，因而可以被溶解而促進吸收。不可溶物質往往屬於惰性和無毒性物質。不過也有例外：如煤粉塵正是因其不可溶性和不吸收性才得以存留在組織中而產生毒性。液體的顆粒大小是不變的，但可能變成飛沫(氣溶膠)，其顆粒大小不一，並可能被吸入，從而成為重要的毒物暴露途徑。液體如果易於揮發，則與氣體相似。氣體和揮發蒸氣很容易被吸入或穿透皮膚，亦可溶於液體或吸附在固體物質上。有些揮發物對固體物質表面確有很強的親和力。由此可見，物質的物理形式能影響其進入人體、被吸收和釋放出毒性的能力和危險性。

2.溶劑和濃度

在大多數情況下，要測試的物質是與溶劑結合後以混合物溶液或懸液的形式存在的。如果溶劑被很好地吸收，則溶質亦被快速吸收，反之亦然。影響因素眾多，包括表面對溶劑和物質的通透性、分離係數、離子化程度以及對局部血運的影響等。溶劑中物質的濃度亦能改變該物質的毒性。一般講濃度越低，溶質的吸收越完全(假設溶劑本身是可以吸收的)。如果溶液(如乙醇)穩定，吸收可能較慢。解毒快或排出快而吸收慢的物質毒性較低，但同樣吸收率而不可代謝或不可排出的物質則毒性大。所以，當待測物質的量很大時，必須考慮到溶劑體可能影響到毒性或檢測結果。過去在用導管灌胃試驗中，曾經因玉米油過量而出現過這樣的問題。另外還應當考慮待測物質在溶劑中的濃度與其生物活性之間的關係。如塗抹在皮膚上的水楊酸吸收率與濃度呈現出負向關性。皮膚研究中發現，濃度高的物質比較容易引發局部反應，如刺激感、潰瘍、血液循環改變或壞死。這些反應又會影響吸收和全身毒性的反應。當然，局部反應本身也是毒性的表現。

3.暴露途徑

化妝品的暴露途徑主要是皮膚，當然也不能忽略吸入(香水類)或經口(口腔衛生用品)的途徑。對於後者已經進行過動物模型研究，操作亦比較簡便，也符合人體的條件。有充分證據表明，

毒性與物質進入途徑之間存在著定量而非定性的相關性。這就是我們解釋實驗結果時宜謹慎，因為化學物質進入體內的途徑可能對其作用有很大的影響，尤其是須要達到一定的量才顯示出的作用。化學物質的物理形式和作用途徑會顯著影響其吸收率，組織分佈，去除及排出。接觸表面的完整性，該物質的存留時間和表面的代謝活性均為重要的影響因素。一般來講，可以說是暴露途徑而非毒性作用的性質影響吸收率和吸收量(繼而影響中毒劑量)。例外則多與施用部位或該物質的迅速代謝有關。大多數情況下，進入途徑就決定了什麼器官最先接觸到毒性物質。這一點很重要，因為最先接觸的器官受害最嚴重，或者最早將毒物解毒或代謝。

(四)全身毒性的發生

界定毒性必須基於對其分子機理的了解。

1. 急性毒性

急性毒性係指接觸毒物後很快發生毒性反應，除非死亡，否則即因毒性物質被解毒或排出而迅速徹底恢復。如恢復過程有賴於酶的重新合成，則可能比較緩慢。

2. 慢性毒性

慢性毒性可分為兩個主要的類型。

(1)一種物質需要長期或反覆作用：以積累到足夠的濃度或其代謝物的足夠濃度，才能顯示出毒性。很多情況下，中止與毒物的接觸後，組織尚能修復，亦可不同程度地恢復功能。然而，如果組織含有不進行有絲分裂的細胞，則毒性物質就不能被清除，從而導致細胞死亡，造成永久性損傷。當然，其後果不一定都很嚴重。

(2)另一類物質屬於持續性時間長的作用：雖然只接觸一次或有限的幾次，而且在組織中存留時間也很短，但會激發生物“連鎖反應”，一段時間後導致生物學的改變。

簡言之，毒性的發生可分為四個相互關聯的時期，分別導致對機體的不同作用，它們是影響化學物質達到作用部位的系統和大分子靶物質的初始作用，由此作用引發的生化、生理和形態學的“連鎖反應”，人體或試驗動物的臨床症狀、體徵和綜合徵。

3. 生殖毒性

生殖過程包括細胞產生、成熟、受孕、宮內發育、分娩和生長。這過程中間的每一個環節都有賴於基因組的活性和對型

態發育的正確調控。胚胎期的細胞要經過程序化的細胞分化代謝和功能的改變、移行甚至死亡，最終發育成為正常的器官。這一過程可能發生變化。特定的種系和特定的時段中尤為如此。

生殖毒理學基於一些基本的毒理學原理，但有一些特殊的方法。胎兒在宮內時是發育週期中極為敏感、脆弱的階段，容易受到外來毒物的傷害。如致畸物，可依其性質和暴露途徑導致敏感組織的異常。其表現主要是智力發育遲滯、結構畸形、功能障礙甚至死亡。後果的嚴重性依照致畸物劑量而異，從無作用直至致死不等。毒物物質既可損害機體的生殖能力，亦可影響後代的生長階段，從生殖細胞直至出生後的各個階段均可能受到影響。胎兒的異常與接觸有毒物質時的妊娠時間有密切關係。因此，生殖週期分為三個階段以判斷風險程度：配子形成時期、胚/胎發育時期和圍產、產後發育成熟時期。實際上，實驗研究已經證實，每種胚胎組織均有各自的對致畸因素的敏感高峰時期。

4. 致突變性和基因毒性

致突變性是指使基因物質發生量或結構的永久性改變的能力，包括基因、基因片段及/或染色體結構或數量的變化，從而導致機體發生可遺傳的改變。

基因毒性指某種物質與 DNA 反應的特性。如果 DNA 的損傷未能修復或修復錯誤，就形成了突變。突變一詞指機體的基因發生量或結構的永久性變化，而導致可遺傳的改變。改變可涉及單個基因，基因群或染色體。單個基因的突變可源自單獨一個或幾個核酸鹼基的變化，亦可源自大段鹼基的缺失或 DNA 重排。累及整個染色體的改變則多為結構性或數量的改變。機體生殖細胞的突變可傳給後代，而體細胞的突變則可傳給其子代細胞。因此致突變物質既可引起因生殖細胞突變而導致的遺傳病，又可引起體細胞的態變，從而構成對健康的威脅。染色體 DNA 及相關蛋白的化學成分和結構複雜，影響遺傳物質改變的因素也很多，故難以一一界定。有絲分裂或減數分裂時，化學物質對染色體的作用可使染色體無法分離，成為非整倍體。這是流產或遺傳缺陷的主要原因，如唐氏綜合症 (21 三體綜合症)。基因毒性指能與 DNA 及/或調控表達的細胞器作用。這是一個廣義的術語，包括由化學物質或其代謝產物導致的突變、DNA 損傷或產生 DNA 加合物。基因毒性的作用還包括非程序 DNA 合成，姊妹染色體互換及有絲分裂重組。不過，檢測出這

些作用不等於就是發生遺傳突變的直接證據。所以，為了準確檢測某些化學物質的安全性，必須注意其基因毒性和致突變性。除了其內在的基因毒性外，還要有一系列試驗來證明人體的暴露條件和這些危險的關係。致突變性和基因毒性檢測的第二個用途是能夠弄清楚相關的化學物質在一定的使用條件下，是通過基因毒性引發癌症，還是互動漫長的致癌過程。

5. 致癌性

經驗表明，人體多在老齡時才受到腫瘤的影響。但生理狀況和環境條件的變化可使致癌過程自發互動。接觸化學物質是因素之一，甚至可能使原本緩慢的癌變過程加速。凡能通過吸入、攝入或皮膚吸收，導致腫瘤（良性或惡性）發生，增加其發生率或縮短其潛伏期的物質統稱為致癌物。動物腫瘤的自然發生史與人類有著許多共同之處。有的腫瘤生長，轉移迅速、致死快，而有的生長緩慢、不浸潤或轉移，亦不會危及生命。動物與人類的腫瘤在組織結構上亦有相似之處。當然，兩者亦有明顯不同。人類腫瘤中提示高惡性程度的結構特點並不適用於動物，甚至有完全相反的意義。有些物質對人和動物均可致癌。實驗室動物實驗確定的對某種致癌物質的易感性可用於判斷其對人的致癌風險度。不過，不要忽略一個事實，即目前已知的對人實際致癌的物質僅約 35 種，而且近 30 年來未發現新的物質。但目前已知的對啮齒類致癌的物質多達 800 餘種。人類癌症除了與吸煙相關的以外，大凡激素源的(如前列腺、乳腺、卵巢)癌症中，凡屬啮齒類致癌物”的化學物質與人類有多大關係仍然不能肯定，甚至在全身性暴露的條件下亦如此。有鑒於此，對某種低致癌性物質而言，只有當確實有線索懷疑其致癌，而閥值、致突變性、不穩定性或釋出可疑代謝物的狀況均不了解時，才有必要進行進一步的研究。這時，試驗條件要符合人體接觸的現實狀況。當今的化學致癌物是以終生暴露一百萬人中引發的腫瘤不到一個這樣的前瞻性前提下進行統計學評價的。

第四節 化妝品成份及終產品的安全性

化妝品的不良作用既源自所用的成分本身，亦源自終產品。在此討論到上市前產品中所含成分的安全性問題。根據經驗，引發全身性不良反應的產品問題很少源自成份本身。因此不妨認為，對成分做了正確的安全性評價就可以防止產品引發的全身毒性。與此相反的是，化妝品的刺激性直接與使用狀況、配方的改動、增強成分穿透力，增強與皮膚表面與皮下結

構親和力等直接相關。因此，如果已知某種成分的刺激作用與相關信息，就可以合理地確定在產品中的含量。因為含量多少是在既定使用條件下是否引發刺激反應的重要影響因素。而最好是用終產品來檢測其刺激作用。近年來的研究已經表明，化妝品的接觸性過敏基本上源自其中的致敏成分，不過配方條件有可能強過敏性。不管該成分在產品中的含量多寡，產品具有的透皮特性可以引發過敏。

所以，重點還是更詳盡的評價成分的致敏性以及全身毒理學作用。

一、安全性評價中應考慮的一般性問題

討論某種成分的安全性評價時，不僅要考慮有關該成分本身的信息，還要考慮施用時的各種影響因素。

(一)成分的理化特性

這是最為重要的，因為只有了解理化性質才能確定是何種物質，並討論與分子大小和其他特性相關聯的毒理學特性。作為安全性評價專家、配方專家或監管人員，所應了解的內容包括化學結構、物理性狀、分子量、化學純度、雜質或其他污染物的情況、可溶性、分配係數 (Log Pow)、其他的相關理化特性。

上述信息應成為毒理學資料的一部份，應由有資質的專家所出具的內部或外部分析證明中予以說明。SCCNEP 頒布的“化妝品成分試驗及其安全性評價指南”中闡述了此類分析證明的要求內容。

1. 化學識別

成分的化學結構與特性必須清楚。如係投放歐盟地區的產品，必須標註成份的 CAS(化學文摘)編號，國際化妝品成分命名 (INCI)，以及歐洲現有商品化學物質(EINECS)的編號，現在還要求加上歐洲登記化學物質清單(ELINCS)的編號。

對於無法確定結構式的成分，應當提交製備方法 (包括所有物理、化學、酶處理方法、生物學技術和微生物學方法的步驟)，以及製備過程中所用的所有材料。據此評價該成分可能的結構和活性。對於天然成分的安全評價，需要提交完整的有關原料來源 (如植物的某一部分)和提取方法以及附加的純化方法。

對於直接使用的“原料”，要提交各個成分的定性和定量的配方資料：包括主要成分物質、防腐劑、抗氧化劑、螯合劑、緩衝劑、溶劑、其他添加劑和額外的外部污染物。當化妝品中的某成分是鹽或酯類，必須在文件中註明，並提交其理化特性的材料。毒理學研究中應採用同樣的物質供安全評價，並應校正偏差。

2. 物理特性

應註明是粉末、膏體、膠體、液體等。

3. 分子量

4. 每種物質的分子量應以道爾吞為單位標出。若為混合物則需標出其中每一成份物質的分子量。

5. 化學純度

純度必須明確，還要註明分析方法的有效性。在檔案中所稱經過物理化學試驗和毒理學研究的物質必須與產品中的一致。

6. 雜質或伴有的汙染物

除了成份以外，雜質的性質及濃度亦應當說明。雜質性質的少許改變就可能改變物質的毒性。一般來說，某物質的安全性評價結論是指在使用條件下，其純度和雜質情況而言。各批次物質的純度如果不一致，則試驗結果仍然不可靠。所以，企業必須確保不含有其他的雜質，或不增加產品中送檢時已測定過，或技術上無法避免的那些雜質成份的含量。換言之，做安全評價時，送檢樣品必須和產品中的物質處於同樣的條件。

7. 可溶物

應註明成份物質在水及/或其他有機溶劑中的溶解度。有些物質在水中不溶解或幾乎不溶解。

8. 分配係數 (Log Pow)

應給出 n —辛醇/水分配係數，如為計算值，需要給出方法。

9. 其他的相關理化特性

典型的理化特性資料包括物理狀態(固體、液體、氣體)、感官特性(顏色、氣味，必要時還包括味道)、在水及相關有機溶劑的溶解度、分配係數和閃點。與物理狀態相關的物理特性如下。

- ① 液體。沸點、密度、酸鹼度 (pKa)、黏度、揮發壓力。
- ② 固體。一般外觀 (結晶、無定型)、熔點、酸鹼度 (pKa)。
- ③ 氣體。密度、燃點。

如果屬於吸收 UV 的成分，應當給出吸收光譜值。

(二)危險性評價的過程

對一種物質的危險性評價可分為四個部份。

1. 危險性鑑別：主要基於人體和體外試驗、臨床試驗、流行病學調查、事故報告，如果可能還包括定量結構活性關係 (QSAR) 研究的結果。必須研究被評價成分固有的理化和毒理學特性，

以確定是否對人體健康存在潛在危險。

2. 量反應評價：用於研究毒性反應和暴露之間的關係，由此可以確定一個不引起。如果沒有這樣的閾值，則必須確定劑量參數。
3. 暴露評價：即確定針對某種物質的暴露量和頻率。評價中應當考慮到特定的靶人群。
4. 危險特性分析：指分析某種物質造成損害的可能性和損傷的程度。在分析過程中，把暴露的危險與預計的益處做比較。任何暴露人群中都存在相當的變數（暴露率、攝入和排出率、機體的敏感性）。況且，危險性評價本身也因所使用的模型、外推、測定誤差等而有不確定性。

在有閾值的情況下，其評價是基於安全係數。在沒有閾值的情況下，應當採用劑量本身參數確定可以接受的終身危險性。

二、相關的毒理學研究

對化妝品成分潛在毒性的確定需基於一系列毒理學研究，並成為危險性鑑別工作的一部分。而後者是整個安全性評價的第一步。目前大部分毒理學研究仍然使用動物，對化學物質的毒性研究亦如此。傳統的人類毒理學資料都是將動物按人的暴露條件處理後進行研究推論出來的。單次劑量的動物試驗，一般採用高濃度的試驗樣品獲得近似的 LD_{50} 劑量。這在很多國家中成為危險物質分類的基礎。重覆染毒毒性試驗，一般採用小劑量，長期（如 28 天，90 天，24 個月等）。每日給藥，有此獲得“未觀察到有害作用的劑量水平 (NOAEL)”，由此計算出安全係數 (MOS)。這些研究還能確定靶器官、作用機理等。生殖毒性和致癌性一般用小鼠和大鼠進行，大鼠試驗持續 18~24 個月。當今人們正在試圖開發和驗證各種替代方法，以更少的動物和較少痛苦的動物試驗來獲取同樣的研究結果，以致完全取代動物試驗 (3R 策略：改進、減少和取代)。目前在改進、減少動物試驗方面已經獲得長足進步，一些替代試驗指南亦已經面世。後者是基於體外試驗，主要涉及皮膚侵蝕、光致突變、光毒性和皮膚吸收等方面。然而，由於各種原因包括脊椎動物的複雜性，目前尚無經過驗證的體外替代方法來進行重複劑量的動物毒性試驗，亦無相應的預驗證/驗證方案。

本部份將介紹現有的動物試驗及/或已有的替代方法。每種方法都有 OECD(經濟合作和發展組織)的編號。

(一)刺激性與腐蝕性

1. 皮膚刺激性與腐蝕性

皮膚刺激試驗用於評價某種物質一次施用後引起的紅斑及/或水腫的能力。目前還沒有經過驗證的替代方法來取代經典的 Draize 整體動物皮膚試驗。不過，以有幾種機體外的皮膚刺激

試驗方法正在驗證之中。皮膚腐蝕試驗用於評價某種物質導致的皮膚的不可逆損傷，即施用於皮膚後 3min~4hr 內，導致由皮膚表面至真皮層的壞死的能力。所某種化妝品的成分中含有其固有的腐蝕性，也不一定就不能使用。因為這取決於其在產品中的最終濃度，有無“中和物質”的存在，使用何種賦形劑，經過何種暴露途徑以及使用的條件等。

有三種皮膚腐蝕試驗的替代方法。

- (1)“體外皮膚腐蝕性試驗—大鼠皮膚透皮電阻試驗”：使用大鼠皮片作為試驗系統，以其電阻值作為終點。
- (2)EPIKINTM 和 EpiDermTM：是兩種市售的人體皮膚試驗模型，包括重建的人上皮類同物，以細胞存活作為終點。
- (3)CorrositexTM 試驗：是以試驗物質穿透過氧化處理的明膠層(生物屏障)和支持濾膜，代表了另一類腐蝕性試驗。該方法雖然已經通過驗證程序，但尚未被歐盟採用。據認為該方法只適用於酸性和鹼性物質。

關於皮膚腐蝕性試驗，已經再現有原始試驗方法手冊中添加了一些改變的條款。包括：凡 pH 值低於 2.0 或 pH 值高於 11.5 的物質，因可以預計的腐蝕性而不必要再進行試驗；凡經過一種替代腐蝕試驗證明有腐蝕性的物質，不應當在進行 Draize 試驗。

2. 黏膜刺激性

眼刺激試驗用於測試某種物質引起的結膜水腫，分泌增多/或發紅，虹膜腫脹及/或角膜渾濁的作用。經典的方法是 Draize 活體眼部刺激試驗，目前尚無經驗證的替代方法。

不過新近頒布的試驗方法已經有了一些改進。

- ①凡 pH 值低於 2.0 或高於 11.5 的物質，不需要進行試驗。
- ②凡已經證明會刺激皮膚的物質，不需要進行試驗。

對於中性的有機化粧品，有一種“可用的”(尚未正式驗證)的替代方法，即 BCOP-試驗(牛角膜渾濁-穿透試驗)。它是用屠宰後的動物(牛、鸕、兔)的角膜進行化學物質引發角膜渾濁和穿透的能力，並能提供定量的資料。該方法比只得出主觀打分的牛眼試驗更複雜。RBC(紅細胞)和 NRU(中性紅攝取)試驗可用於表面活性劑的測試。對於乙醇、酯類目前尚無更好的方法。最後，HET-CAM(Hen 氏鸕蛋試驗-絨毛尿囊膜)亦為一種“可用的”替代方法，用於篩查化粧品終產品。該方法尚未經過正式驗證，但已經被一些歐盟國家的法規所採納。

(二)皮膚致敏性

皮膚致敏物是指能引起敏感個體發生過敏反應的物質。其過程是經皮膚暴露於致敏物質，然後引發接觸性過敏性皮炎。目前經過驗證的皮膚致敏試驗僅一種，即 LLNA 試驗。目前共有三種整體動物試驗方法，用於評估某種物質的皮膚致敏作用。

1. Buehler 試驗：係無佐劑技術，只在局部使用待測物質。該方法的靈敏度略低於 GPMT。對 Buehler 試驗的結果要做科學的評判。
2. Magnusson kligman 豚鼠最大值試驗(GPMT)：這是一種佐劑型方法，將含有或不含有弗氏完全佐劑的待測物質注入動物皮下。試驗的結果是基於對含待測物質的非刺激性斑貼試驗的反應。因此，該方法可模擬“真實生活中”的接觸性過敏性皮炎的發生過程。該方法可進行重複刺激、交叉反應和載體效應試驗。
3. 局部淋巴結試驗(LLNA)：採用純系小鼠，局部施用待測物質後觀察引流淋巴結中的淋巴細胞增殖反應。這是一種客觀方法，其結果以刺激指數(SI)表示，即試驗組與只有用載體的對照組之比。與傳統的豚鼠模型方法相比，LLNA 做了方法學上的改進。GPMT 與 LLNA 的靈敏度相同。

(三)全身毒性

1. 急性毒性

急性毒性只暴露一次後即引發的危害健康的不良作用。

簡體經口毒性試驗原用於測定某種化合物的 LD₅₀ 值。在危險物質的相關立法中，是根據 LD₅₀ 來進行毒性分級的。原來的試驗方法含 3~5 個劑量組，各用 5~10 隻動物。修改後的方法如下。

- (1)固定劑量法：不以死亡作為終點，設計上不是以引起死亡，而是以疼痛或緊張作為觀測指標，因而可以替代 OECD 401。
- (2)急性毒性分類法：該方法不是計算準確的 LD₅₀ 值，而是確定可引起死亡的一個暴露劑量的範圍。
- (3)上下法(up and down procedure OECD 405)可估算 LD₅₀ 和可信區間，並觀察中毒症狀。

2. 重覆染毒毒性

在開發那些有特殊生物學功能，並長期與人體皮膚接觸的化妝品成分時，必須進行重複雜毒毒性試驗，以評價新成分的安全性。重複雜毒毒性系指每天重複鋪路或在某一種屬動物生命的某一個時段暴露於受試物質後引起的一般毒理學作用（除

外生殖、基因毒性和致癌性)。

目前已有的整體動物重複雜毒毒性試驗如下。

- ①重覆染毒(28 天)毒性(經口)；重覆染毒(28 天)毒性(經皮)；重覆劑量(28 天)毒性(吸入)。
- ②亞慢性經口毒性試驗：啮齒類動物經口 90 天重複染毒試驗；亞慢性口毒性試驗：非啮齒類動物經口 90 天重複染毒試驗；亞慢性經皮毒性試驗：啮齒類動物經皮 90 天重複染毒試驗；亞慢性吸入毒性試驗：啮齒類動物吸入 90 天重複染毒試驗。
- ③慢性毒性試驗。用啮齒類動物進行的 28 天和 90 天經口毒性試驗是最常用的重複染毒毒性試驗，往往能明確指示靶器官和全身毒性的類型。吸入試驗的設計複雜，大多數化妝品亦缺乏此種暴露途徑，故很少用於重複染毒毒性試驗的研究。慢性毒性研究的目的是確定哺乳類動物終生反覆暴露於受試物質後引起的有害作用。這些試驗所測試的物質往往需要較長的潛伏期或蓄積至一定數量才表現出作用。

如前所述，目前還沒有經過驗證或被普遍接受的替代方法來取代動物進行的重複染毒毒性。在神經毒性和腎毒性領域已經有了一些進展，但至今尚無成熟方法或篩查系列試驗技術。

3.致突變性/基因毒性

在化妝品的安全性評價中，不可忽略潛在的“致突變性”。致突變性的定義是使細胞和機體的遺傳物質的結構或數量發生永久性、可遺傳的改變。這種改變可指涉及單個基因或基因片段，一組基因，甚至整條染色體。目前已知，突變源自各種原因引起的 DNA 分子損傷，但不一定是由“基因毒性作用”所致。基因毒性是一個廣義的術語，泛指對基因物質的有害作用，但不一定與致突變作用有關。因此，基因毒性試驗的目的就是檢測 DNA 的損傷（但不是突變的直接證據），如非程序 DNA 合成 (UDS)，染色體互換 (SCE)，DNA 鏈斷裂，DNA 加合物形成或有絲分裂重組 (MR) 以及致突變性試驗。目前已經有幾種體外試驗方法，並收入了 OECD 指南，一般推薦從下面三種體外試驗中選兩種組合來測試化妝品成分的基因毒性/致突變性。

- ①體外細菌突變試驗 (Ames 試驗)。
- ②體外哺乳動物細胞基因突變試驗，近年來比較多地選用小鼠淋巴瘤試驗，CHO/HPRT (即 6-羥基嘌呤-鳥嘌呤-磷酸核糖轉移酶)試驗的缺點多一些。(僅用於特定的化學品，一般還需要做科學判斷)。

③體外哺乳動物細胞染色體畸變試驗。

這些試驗通常被認為足以證明某些物質的致突變性及/或基因毒性。不過，隨著人們對體外哺乳動物細胞微核試驗適用性的認識的加深，試驗方案亦可能改變。

最重要的是試驗必須按嚴格的方法操作，以最大限度地檢出潛在的致突變反應，以確保陰性結果的可靠性以及試驗結果在不同實驗室的可比性。就大多數化妝品成分而言，整體動物試驗並非屬於強制性要求。整體動物試驗能檢測出致突變性，而整體試驗系統中檢測不出致突變性的情況極為罕見。動物試驗多用於人和動物的食品和藥品。堅持要做動物試驗最有利的理由是，單靠增加 S9-mix 並不能模擬出體內的代謝活化過程。因此，體外試驗需要改進其代謝系統。還有一些理由解釋為何需要進行過基線水平的致突變試驗。一般情況下，如果有明確的致突變性的結構或體外試驗陽性，則需要用諸如哺乳類動物細胞的微核試驗來做進一步的驗證。

進行任何整體動物試驗之前，應首先查閱所有的體外試驗結果和毒物動力學的資料、化學結構、雜質、毒理學資料和類似成分物質的資料。顯然，只有明確了特定的與試驗物質及/或代謝物直接接觸的靶組織，而且已經有相關的試驗結果之後，才有必要考慮進行特殊的整體動物試驗。

4. 生殖毒性

“生殖毒性”系指某種物質對哺乳動物生殖功能的不良作用。它涉及生殖週期的各個階段，包括對雄性或雌性生殖功能的損傷，對後代的不良作用，如導致死亡、發育遲緩，結構和功能改變等。

(1) 最常見的整體動物生殖毒性試驗

①兩代繁殖毒性試驗。

①致畸試驗—啮齒類動物和非啮齒類動物。

①生殖/發育毒性聯合篩查試驗。

(2) 限於胚胎毒性檢測的替代方法：由於生殖毒性十分複雜，很難用一種替代方法來模擬各個階段的情況。現在有了三種限於胚胎毒性檢測的替代方法。

全胚培養試驗 (WEC)。

微量組織 253 試驗 (MM)。

胚胎毒幹細胞試驗 (EST)。

WEC 試驗僅限於檢測強胚胎毒性物質，後兩種試驗則

適用於下三類受試物質：無胚胎毒性，弱/中等胚胎毒性和強胚胎毒性。

5. 致癌性

致癌物係指吸入、攝入、皮膚吸收或注射後引發腫瘤（良性的或惡性的），增高其發生率和惡性程度，縮短腫瘤潛伏期的物質。

(1) 目前最常用的致癌試驗

致癌性試驗。

慢性毒性/致癌性聯合試驗。

(2) 基因毒性致癌物：指主要通過基因毒性而致癌的化學物質，如結構特點提示致癌或體外致突變試驗陽性，則無論是否為基因毒性物直接應當進行體外敘利利倉鼠胚胎 (SHE) 轉化試驗。出於對基因毒性物質的關注，已經有一系列致突變試驗方法，而非基因毒性致癌物的檢測則是另一套方法。

6. 毒代動力學的研究

“毒代動力學”指某一種物質在體內的、具有時間依賴關係的代謝過程。包括吸收、分布、生物轉化及/或排出。而“毒效動力學”一詞則是指化學物質與靶組織的相互作用及其導致的有害作用。毒代動力學方法是設計來闡明某種受試物的毒性特點。其結果可幫助設計進一步的研究和解釋。而且一種物質經皮膚吸收後，其代謝過程對毒性、體內分布和排出均有重要的影響。因此，在特定條件下，需要用整體動物或體外的生物轉化研究來證明或排除某些有害作用。有幾種體外模型適用於生物轉化研究（如肝細胞懸液或培養物），但均未經過驗證。化學結構（如 QSAR）和理化特性（如 logPOW）亦可提供信息來了解化學物的吸收、代謝和分布。毒性研究的結果也可提供一些毒代動力學的參數。最後，毒代動力學研究對於將體外和動物體內試驗之結果外推至人類是很重要的。

7. 光毒性

(1) 光毒性(光刺激性) 和光致敏性“3T3 中性紅攝取毒性試驗 (3T3 NRU PT)”是一種體外方法，其原理是在有或沒有非細胞毒性劑量的 UVA/可見光的條件下，某種化學物質的細胞毒性之比較。它適用於所有能吸收紫外線光的化學物質的光毒性/光刺激性檢測，尤其適用於化妝品中的阻隔紫外光的成分。3T3 NRU PT 已經正式驗證，可以檢測出人和動物的整體光毒性作用。不過他不能檢測出由化學物質和光的聯合作

用引起的不良後果，例如光致染色體斷裂/光致突變、光致過敏或光致癌作用。目前尚無檢測光致敏性的體外方法。不過有些致光過敏物質在 3T3 NRU PT 中呈現顯性反應。

(2)光致突變性/光致染色體斷裂：OECD 早已討論過光致突變的指南，但尚無結果。同時，歐盟 SCCP 正在逐項評價光致突變性/基因毒性試驗及其科學價值，其基礎正式前面提及的經典致突變/基因毒性試驗。目前尚無經過至敏驗證的方法。

(四)人體資料

開發出來的化妝品是被廣泛用於人體的皮膚或黏膜上，偶爾也會出現局部的和全身的不希望出現的副作用。局部的反應包括刺激、過敏性接觸性皮炎、接觸性蕁麻疹和陽光（特別是紫外線）誘發的反應。皮膚和黏膜的刺激是最常見的反應。儘管用志願者的人體試驗來取代動物試驗是不可思議的。眾所周知，相對於人體暴露，動物試驗和替代方法的預測價值是有限的。因此，在志願者身上進行的皮膚相容性試驗，可證實化妝品用於人體皮膚或黏膜是無害的，這是科學的需要。已有動物試驗和/或替代方法能提供組成成分的毒理學資料，如果證實安全性沒有問題，那麼可以預期有很高的安全性。SCCP 的意見強調了有關檢測化妝品組成成分的皮膚刺激性的人體志願者試驗，專門討論有關刺激性的倫理和實際方面的內容。SCCP 也發布了有關化妝品組成成分的皮膚過敏性的預測性試驗的意見。與刺激性試驗相比，這些類型的試驗引來更多的爭論，因預測性人體過敏試驗需在個體中誘導持續長時間或永久性免疫性過敏反應，因此，出現嚴重的倫理問題。儘管已有多年的人體過敏試驗經驗，但有關志願者在試驗期間出現斑點過敏的後果的文獻中可得到的科學信息相對有限。

三、取代動物試驗的替代方法之應用

幾十年來，已經開發出一些非動物的模型作為毒性研究的工具，主要用於檢測各類化學物質對人體可能具有的不良作用。但眾所周知，化學品在人體和動物中的某些代謝途徑可能不相同。而且近幾年來越來越多國家的公眾和決策層都呼籲停止使用動物進行毒性試驗。

(一)替代方法

替代方法係指對策是化學品對人體健康影響的正式方法指南做了任何改動而形成的方法。做為動物試驗方法的替代，這些方法研究的是較為簡單的生物學系統，從細菌培養物到來自不同哺乳類動物或人類的細胞培養物、特殊的動物器官以及非生物人造系統。計算機分析程度亦是不能忽視的一種方法。

這些替代方法都比較新，與經典的方法相比還缺乏長期的實際運用經驗，SCCP 已經規定了相關的指南，要求在接受這些方法的結果之前要進行科學性的驗證評價。

(二)驗證要求

- ①對所選用的替代試驗系統的基礎進行科學驗證。
- ①對驗證研究中所用的測試化學物質做出合理的解釋。
- ①以正確的統計分析數據證明方法已經優化。
- ④用代表性的試驗複合物系列進行吸入性試驗所獲得的統計資料(也就是驗證研究資料)。

不過，就化妝品原料而言，SCCP 除了接受已經驗證的方法之外，也接受“正確的方法(valid method)”，後者指那些不必經過全部驗證程序，但委員會認為這些方法只要有足夠的科學資料證明其相關性和可靠性就可接受。

四、安全係數的計算

(一)一般考慮

化妝品是擬與人體外不接觸的物質或機制，儘管法律框架提議化妝品是擬用皮膚或黏膜的，但其成分中大多數可透過外部屏障，部份或全部透過皮膚或黏膜而被吸收。化妝品的安全性評價直接取決於其應用條件，後者決定了可被吸收、偶爾涉入(牙膏)或吸入(噴霧、香水)物質的實際量。因此，除了進行局部作用(如刺激性和過敏性)的評價外，若不考慮因產品的配方成分中部份或全部透過皮膚或黏膜而引起的全身作用，那麼就無安全性評價可言。顯然，根據其理化特性，配方中不同成分的透皮程度是有很大大差別的，因此，可能影響到對一種或多種器官引起的反應。由於化妝品可自由地使用，因此，安全性評價時就不能僅限於在正常條件下使用。又由於誤用而造成的預計結果常常缺乏，這就不僅需要評價在正常條件下使用的安全性，而且需要確定安全係數，以確保正常使用或誤用時對消費者不會產生有害作用。安全係數來自於在最敏感動物的重複雜毒毒性試驗所得到的“未觀察到有害作用水平(NOAEL)”和預期人體全身暴露劑量(SED)間存在的關係。

(二)定義

1. 未觀察到有害作用的水平(NOAEL)

是長期毒性試驗(如 28 天、90 天大鼠、小鼠、狗長期毒性試驗，慢性毒性試驗，致癌試驗、生殖毒性試驗)的一項結果。在計算安全係數時，是只在最敏感種屬的最敏感試驗中未觀察

到有害作用的水平的最高用量。它可從經皮、經口或靜脈途徑染毒得到。NOAEL 以 mg/cm^2 或 mg/kg 體重/天表示。

2. 皮膚暴露

在確定時間內皮膚單位面積接觸的受試物的量。

3. 經皮吸收

當出現這種情況時，與受試物進入皮膚的通道一致，無須指出其最終命運。這過程有 3 個特殊的步驟。

(1) 透過：指受試物在皮膚結構的特定層進入。

(2) 滲透：指受試物從一層擴散到另一層。

(3) 吸收：指受試物的攝入通過血管系統進入中心或內腔。

一個物質可透過皮膚但沒有被吸收進體內。考慮透過皮膚的物質的整體量時應排除角質層的（很快更新）。

4. 全身暴露量(SED)

化妝品組成成分的 SED 是指被皮膚吸收，進入血液，到達靶器官的預計量（全身利用度）。 $\text{SED} = \text{給予皮膚、外部黏膜或其附件的受試物的量} \times \text{吸收率}$ ，以 $(\text{mg}/\text{kg}$ 體重) / d 表示。在實際應用中，歐盟現行的人體標準體重被視為 60kg。不過，對於其他標準的人群應當重新考慮。

這些定義可讓我們了解前面所說的，但實際上無法確定終產品安全係數。首先，即使能確定終產品的 NOAEL，也無法預測配方中組成成分的單個 NOAEL，因有時其濃度相當低。其次，因組成成分間的分子大小不一，與皮膚構件的能力也不一樣，故其皮膚吸收狀況有極大的差別。

(三) 未觀察到有害作用的水平 (NOAEL) 的確定

在評價中受試化妝品組成成分的安全性中，全身危險性是一關鍵的要素。但面對的難點是化妝品組成成分的產量很少，可免於化學物質完全申報所需全套毒理學資料的要求。顯而易見，如果缺乏對可能靶器官產生有害作用的全套毒理學資料以及不知道低於某一劑量水平就觀察不到有害作用的臨界水平，那麼就不能計算安全係數。迄今，在這方面還沒有可替代的動物試驗。故 SCCP 的意見是，為確定化妝品組成成分的安全性，從科學角度還是需要用動物試驗來研究其潛在的某些毒性作用的。如此的研究須在敏感且能涵蓋不同的潛在毒性作用的動物身上進行。

最常見的試驗是用不同劑量的物質進行的亞慢性毒性試驗。

- ① 28 天的試驗可被接受是由於它可提供行為、生理學指標和組織學檢查有關的充足信息。不過，在特定情形下，生殖毒性試驗

也可提供更為相關的信息。

- ② 儘管 SCCP 認為一些更為合適的受試動物途徑(如經皮給予)可提供更為相關的資料，但經口給予途徑是需要的。由於溶劑對組成成分的透過有可能產生影響，但實際上很難考慮這方面的問題。在大多數情況下，局部或經口給予時，受試成分的代謝可能不會不一樣。與此同時，大多數情況下經口給予的吸收高於局部給予的。因此，經口毒性試驗仍是確定最佳條件下合適 NOAEL 的最實用做法。它提出至少有一劑量水平沒有任何不良反應出現，這需要很小心地、盡最大可能地選擇好劑量，並加以判斷。

(四)皮膚吸收的測定

所得的結果可因使用的方法和所用的試驗方案的不同而有差異。

- ① 模擬人體暴露條件，使用一定劑量的物質來測定受試物在正常或可預見條件下使用時的經皮吸收。如此的劑量通常是：固體 $1\sim 5\text{mg}/\text{cm}^2$ ，液體 $10\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 。
- ② 使用一定劑量的物質來測定和維持一個最大的吸收率，以計算受試物的穩態通量或測定皮膚滲透常數 (K_p ，以 cm/h 表示)。

確定經皮吸收可用以下形式報告

- ① 透過皮膚的物質絕對量。以 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 表示，與給予通過的物質無關，但吸收量與暴露的時間有關。
- ② 經皮吸收物質的百分比。與給予物質的質量/體積有很大的係數。最為關心的是確證所給的量是固定的或接近產品擬用的量。應仔細檢查終產品配方的影響，特別是有透皮增強劑存在時，因其可極大地影響組成成分的吸收。

暴露量的估計：

為了評價安全係數，需要估計總的暴露量，該暴露量可能來自於使用含有某組成成分的所有類型的產品。由於這樣總體估計的暴露量數值實際上是達不到的，這本身就摻有一個有意義的安全因子。在各類化妝品中不是所有的組成份都會被使用，這個問題也值得考慮。為了便於對暴露量進行評估，將化妝品分成 4 種類型：口腔衛生產品、眼部產品、駐留型產品、淋洗型產品。從每類產品的暴露量估計，可推算每天的最大總暴露量，從而推斷受試成分的每天暴露量。

(五)安全係數的計算

1. 一般方法

一般認為安全係數是從合適的試驗得到的實驗性 NOAEL

除以可能的全身暴露量 (SED)計算出來了。

考慮到組成成分使用的安全性，安全係數不得低於 100。其中係數 10 是指某種屬間的差異，另一係數 10 是指人的個體差異。

一般來說，再用於完整皮膚時，無須為兒童額外制訂一個不確定係數。

當得不到合適的 NOAEL 時就無法計算安全係數，當毒性作用無閾值(致突變作用、遺傳毒性、致癌性)時就是如此。

2. 與化妝品組成成分類別相關的特數安全係數

對於下列組成成分，應根據具體情況來調整暴露的估計量。

- ①並不試圖摻入所有類型的產品中。
- ②並不試圖在皮膚上長時間保留接觸。
- ③試圖用於特定的外部介入或使用量高於一般考慮的估計量。

下面是幾個基於計算透皮物質百分比的不同例子。

(1)紫外線吸收劑：有多種化妝品使用了紫外線吸收劑。SCCP 指南中僅考慮到用於防曬劑中，但須強調的是紫外線吸收劑不僅用於防曬劑中，而是經年使用了，如用於護膚品中應做出如下的一般假定。

①使用時局部給予的制劑的量少於 $1\text{mg}/\text{cm}^2$ 的全身體表面積 (約為 1.8m^2)。

- 該制劑在皮膚的表面存留的時間為 24hr。
- 由於這些組成成分的使用受到限制，用於計算的濃度需考慮到管理部門允許的最高濃度。
- 若沒有資料，就假定該紫外線吸收劑為 100% 被吸收。
- 溶劑的性質可改變紫外線吸收劑的吸收量，選用配方與經皮吸收的實驗性測定所用的溶劑也許有不同。配方中若有這些溶劑存在時，建議進行試驗。
- 染髮劑：應考慮兩種類型的染髮劑。
- 氧化型或永久行染髮劑。在使用前將至少兩種成分混合。使用頻度每月不得超過 1 次。
- 半永久型染髮劑。正常為一種成分，染髮劑不摻入非特異性產品，應小心考慮實際應用的暴露量；染髮劑並不是直接給予皮膚表面，僅是與皮膚表面的特殊部位 (頭皮) 接觸。分配係數可考慮為 0.1，代表著頭皮的暴露量。

3. 特殊用途的化妝品：根據所滲入的產品情況，有時一個組成成分可有不同的最高使用濃度，在這種情形下，就必須確定每一

類相關產品的暴露量。由於總的暴露量仍處於可接受水平，根據其結果可接受限制的不同水平。

(六)終生危險性的確定

1.一般考慮

通過比較人群對物質暴露的毒理學特徵，基本可做出危險性的特徵性描述。

對於大多數物質而言，可找出一個閾值，此劑量下不會引起任何毒性反應。此種情況可採用安全係數(MOS)方法進行評價。

對於很多誘變劑或致癌物和其他原因，無法得到該閾值。此種情況就沒有一個小的且可產生反應的確定概率的暴露水平。為了解決這一問題，已有多個數學模型從動物至突變試驗和致癌試驗所用的最高劑量的反應來推導人體通常使用的較低暴露水平。關於致癌話題，基於劑量參數(T_{25})的方法是 SCCP 保留的用於定量無閾值致癌劑危險性的方法之一。

2. 技術步驟

危險性的特徵性描述的過程可分為下列幾步

- 用於得出終生致癌危險性結論的資料
- 可來自於流行病學研究結果，但這樣的估計在大多數情況下是不確定的，且不足以用於定量的危險性評價。但用與動物試驗所得的資料進行比較還是有用的。
- 可來自於動物試驗結果所定的劑量參數。
- 從選用的動物試驗中得到的劑量參數(T_{25}):用(mg/kg 體重)/d 表示，除以一個合適的係數就可以算出相應的人的劑量參數(HT_{25})。一旦算出多個 HT_{25} 值，應做出使用的 HT_{25} 的決定。
- 確定每天終生劑量:相應的暴露量 [(mg/kg 體重)/d] 除以一個係數($HT_{25}/0.25$)就可得出代表著特定終生致癌危險性的每天劑量。
- 如何改變可影響基於動物資料算出的危險性的因素的評價:根據現有的資料的評價得出評述性意見，解釋實際危險性與計算危險性間的不同。這些因素主要是物質的化學物類別、流行病學資料、毒代動力學、劑量-反應係數、組織、性別和關注的種屬。

3. 終生致癌危險性的確定

劑量參數 T_{25} 是只在動物種屬的標準壽命時間內，經過自發性發生率校正後誘發 25%動物特定組織腫瘤的慢性劑量。

五、化妝品的總體安全性評價

(一)一般介紹

化妝品對於消費者及相關從業人員（美容師、美髮師）必須是安全的。如前所述，就所關注的皮膚和外部黏膜，應避免的主要的不適反應是局部刺激、局部過敏和全身毒性。不過，化妝品常用於暴露於環境因素的部位，後者須小心對待，避免光誘導的反應如光刺激和光過敏。用於頭皮或面布的產品可能會與眼睛接觸，故對化妝品主要成分的安全性評價也應認真考慮。為確保化妝品的安全性須對產品的全過程，從組成成分的選用到市場跟蹤進行總體評價。因此，需考慮下列問題。

1. 小心檢查選用化妝品的組成成分，保證在終產品中所用濃度是安全的。
2. 檢查終產品的局部耐受性。
3. 選用合適的包裝來保持產品的質量，儘可能避免誤用或意外的危險性。
4. 盡量按 GMP 操作。
5. 實施質量控制，包括微生物控制和產品穩定性控制。
6. 使用合適的產品標準、使用和丟棄說明書、相關警告、意外的合適處理方法等。
7. 一旦市售產品出現副作用的處理步驟：個案處理、合適的醫學干預、皮膚病學、眼科學、忠告等，必要時，還有產品的售後跟蹤、消費者的意見和信息的保存等。

儘管如此，實際零風險及獲得對人的絕對安全是不可能的，包括化妝品學還需盡力來將化妝品的危險性降至最低限度。安全性評價過程尚未有固定的作法。根據產品組成的新穎性和相應資料的獲得情況，實際評價過程可因產品不同而有不同。不過，作為一個通用原則，現行歐洲法規建議安全性評價主要是基於組成成分的毒理學性質。從科學觀點出發，大多數終產品試驗不需要動物的毒理學試驗。這一階段的問題可用其他來源的信息來回答，包括在人體身上進行的理論上許可的皮膚相容性和可接受性試驗。

(二)化妝品組成成分的安全性評價

化妝品的組成成分大多數為化學物、合成的化學混合物或天然提取物。小心選用組成成分是確保終產品安全的關鍵環節。化學物的結構決定著其化學及生物反應性，須從兩點來考慮：化妝品的益處和安全性。其它需要考慮的還有化學物的純度、與配方

中其他組成成分的相互作用、透過皮膚的能力。總之，雜質的存在式技術上不可避免的。但這些雜質必須是對終產品的毒理學性質沒有意義的。根據現有知識，組成成分間的相互作用與潛在安全性均須考慮。對皮膚透過性的測定必須用組成成分及其穩定的溶劑進行試驗。

另一方面，組成成分的使用安全大多取決於暴露的條件，如製劑的類型、濃度、接觸的頻度和持續時間、涉及的身體部位、陽光的作用等，包括正常應用條件和可預見的誤用條件均考慮。

1. 應避免使用的組成成分

對於每一種原料，需詳細檢查是否是現行法規所收錄的，如果是，其用法用量是否在其指標描述的範圍內。下列組成成分不應使用。

- 當地或國際性法規禁用的組成成分。
- 超出允許條件限用的組成成分。
- 毒理學資料不適用於擬用濃度和條件的組成成分。
- 既欠充足的毒理學資料，且缺使用安全性經驗的組成成分。
- 沒有合適的特徵描述的組成成分。

用於考慮的資料，除了與毒性相關的以外，還包括組成成分的陽性特徵、相關的可能雜質、理化性質和分析化學、與配方中其他組成成分的相互作用、透過皮膚的能力。通過對原料相關的現有資料、發表的或未發表的資料進行的分析，可獲得原料的毒理學性質，這些資料包括體外的、體內的及臨床試驗的結果，同時也包括可以得到的流行病學研究的結果。顯然，新的組成成分或用於新用途的組成成分值得特別注意。

2. 毒理學資料的來源

組成成分的毒理學資料的主要來源是供應商。這些公司必須遵循國家化學物/危險物質的相關要求(職業安全、運輸、包裝、標籤等)，勢必對於其化學物的毒理學性質作出描述。盡力去收集毒理學資料和從供應商得來的其他相關資料。有必要鼓勵供應商進行更多的試驗，以滿足通用法規的要求，非動物的替代試驗方法的應用受到通用接受指南(OECD 指南)的限制。毒理學資料的來源如下。

- 科學文獻，數據率(Toxiline, Medline)，美國化妝品組成成分評價委員會(CIR)發布的報告，香料研究所(RIFM)的專冊，ECETOC、NTP、BIBRA 的報到。
- 安全性資料紀錄。

□根據相關化學物質的類似物做出的專家判斷(QSAR 過程)。

化妝品生產商常不能得到香料和香精品的構成成分，供應商提供安全性評價的信息供使用。歐洲香料和香精協會 (EFFA) 和 COLIPA 已著手制定如何處理這個問題的指南。供應商應報告有關構成成分的變動和組成成分的法規狀態的變化信息，以便合適的行動可被同意且得到實施。值得注意的是，歐洲 SCCP 出台一份適用於安全性評價的化妝品組成成分的檢測指南。

3.使用的條件和暴露

化妝品組成成分的安全性評價不適於做為單一的步驟，必須考慮到暴露的因素(量、途徑、持續時間、頻度等)，下列指標加以考慮。

- * 化妝品所用組成成分的類別。
- * 使用的方法 (擦、噴、抹、洗等)。
- * 產品組成成分的濃度。
- * 每次使用的量。
- * 使用的頻度。
- * 皮膚接觸的總面積。
- * 接觸的部位 (黏膜、曬傷的皮膚等)。
- * 接觸的持續時間 (駐留型產品、淋洗型產品等)。
- * 合理的可預見的增加暴露的誤用。
- * 消費人群的類型 (兒童、敏感皮膚的人等)。
- * 預計消費者的數量。
- * 用於暴露於陽光下的皮膚部位。
- * 可能進入體內的量。

最後一點與全身利用度有關，是安全性評價的一個關鍵議題，信息主義來自於經皮吸收的資料。

(三)化妝品終產品的安全性評價

任一化妝品的安全性評價均與使用的方式有關。由於它決定著物質通過皮膚、黏膜、經口攝入或吸收的量，這個因素是最重要的。如上所述，信息的主要來源是組成成分的毒理學特性和可得到的同類型的人類使用體驗 (包括市售經歷、美容師、工廠工人等)。應仔細考慮每一組成成分，特別關注新的組成成分。有關安全性評價的開放問題在對可得到的信息做出仔細審核後請專家做出判斷。總之，需在組成成分的特質基礎上對化妝品的可能過敏性、遺傳毒性、各種類型的全體毒性作用作出評價。不過，對於人體暴露的合適考慮即可得到信息的分析是至關重要的。這也涉

及對溶劑潛在作用的檢查。特別是從其他途徑進入全身循環有關的經皮吸收或定量資料。組成成分間的相互作用通常可基於經驗(類似物、相關化合物/混合物的發表資料、理論上考慮)來評價,並用體外試驗和/或皮膚相容性來控制。若原料用於新的方式,安全性評價人員就需要有額外的安全性資料。若是創新的原料或是公司新用的原料,需要有更為詳細的信息。局部耐受性很大程度上取決於整個配方,即使是用已知的和已安全使用的組成成分,也需要通過合適的試驗來檢測新配方的皮膚相容性和可接受性,個別例外。當對組成成分的毒理學資料進行了全面的分析仍顯不足以確定終產品的局部耐受性時,可進行一些額外的體外試驗和/或人體志願者試驗。進行體外試驗可補充可用的信息,需用合適的基準。可用重構皮膚模型和/或倫理上許可的人體志願者試驗檢測皮膚相容性或耐受性。可能的話,在人體的臨床試驗需遵循 GCP 規範。為了測試終產品的使用安全性,特別是局部耐受性,將其與公司上市的成功製劑進行比較是一個相當有用的作法。若新產品是現有產品的一個簡單改進,或配方中僅含的原料或組成成分先前使用的同類型產品中均處於常用水平,看起來就無須額外的安全性資料。

(四)安全性評價人員的責任

現代的安全性評價方法是基於對可得到的資料和暴露條件進行全面分析而形成的。理想的做法是,從配方開發的一開始就應與毒理學家和研究人員共同商議這些因素。選用一個合適水平的組成成分可足以避免主要的危險(遺傳毒性、致癌性、全身毒性),也可在很大程度上避免過敏反應。在大多數情況下,無須通過對終產品進行試驗來評價它們的危險性,但應考慮組成成分間潛在的相互作用和溶劑的作用。大多數情況下,可得到的所有信息就足以評估終產品的安全性。不過,對於沒有安全使用經驗的全新的組成成分、組成成分新的組合或新的配方過程,仍需要額外的試驗資料。然而,在所有的情形下,供應商和研發人員應向安全性評價人員提供有關組成成分和製劑的所有信息,以保證得出合適的安全性評價。

負責評價產品安全性的人員被稱為安全性評價人員。這些人員必須持有該領域的資質。應強調安全性評價人員的作用和職責。選用有化妝品應用毒理學專業知識、責任心強、遵守倫理規範的安全性評價人員是為了公司的利益所在。

1. 安全性評價人員負責確定的事項

- 存在於配方中的組成成分使否符合法規對於該物質規定的濃度要求，有沒有法規禁用的物質，廣義地說，符合法規的所有要求。
- 對於給定的組成成分是否有特殊的終點需考慮。
- 可得到的資料是否是相關的和足夠的。
- 是否會出現相關毒理學效應的相互作用和/或改變透皮特性。
- 是否需補充組成成分或終產品的資料。

2. 安全性評價人員必須具有的素質

- 有良好的專業知識和道德操守
- 經常接受源於安全性觀點的毒理學和分析學信息。安全性評價人員通過對一些方面(如原料的純度、雜質性質、使用的控制過程、供應商提到的或參照的試驗的詳細信息、有潛在毒性相關性的雜質的定量分析等)的關注，有可能提出一些問題。
- 不參與與產品有關的管理和商業活動。

安全性評價需要人體試驗來檢測組成成分和終產品皮膚相容性和可接受性，以及終產品的皮膚可接受性。進行這些試驗需遵循合適的倫理要求。

3. 安全性評價人員判斷的依據

- 毒理學性質的認識和經驗，以及已知組成成分的使用安全性。
- 含有同樣或類似組成成分的產品使用安全性歷史。
- 對於未知的、新的或新穎的組成成分，專家就得到的資料做出的判斷。
- 必要時，從一種或多種組成成分或市售終產品得到的額外試驗的結果。

4. 安全性評估人員可得出的結論

- 產品在無須特別警告或注意條件下使用是最安全的。
- 產品在一定類型的包裝條件下使用或添加警告、或更確定地定出使用方式和限量、提供有正面結果的補充試驗下是安全的。
- 在擬用條件下產品是不安全的。
- 已有的資料不足以確定產品是否安全，需要進行進一步的試驗來獲得所需的信息。
- 需註明或不需註明特殊的安全性聲明。

若安全性評價人員得出的結論是在正常或可預見條件下使

用是不安全的，那麼產品是能上市的。與產品使用安全相關的安全性評價人員的建議是必須遵循的。需要時，安全性評價人員簽署的安全性聲明是呈現給管理員當局資料中的一部份。因此，安全性評價人員的選用看起來是一個關鍵的議題，他們必須持有包括化妝品領域的多方面的資質。

捌之二、美國“化妝品原料評價委員會(CIR)”及其安全性評價

一、化妝品原料安全性的評價程序

(一)設定需優先評價的原料

在設定需優先評價的原料時評審組會考慮以下兩個因素：首先公眾接觸該物質的程度。其次是該物質的潛在生物特性。評審組對所需評審的化學物在以上兩方面進行評分，而後制定出需優先評審的化學物。

正如 CIR 程序中所指出一樣，CIR 對只在香水中使用的原料不予評審，因為這些原料的安全性屬美國香料原料研究所以及國際香水協會的研究範疇。與此類似，如果 FDA 已經頒布的某些化妝品的原料的使用規則，或者是 FDA 已經評審過的原料，比如，一些直銷產品中的原料，評審組也不予評審。

(二)科學文獻評審

對優先評審的化學物評審組優先對相關的科學文獻進行深入細緻的文獻檢索、匯編而起草一個初步報告。安全評價可以只涉及一種化學物或者一個化學物的家族。評審組而後將發表科學文獻綜述，進一步徵求公眾意見。這一做法提醒相關利益集團如消費者、生產廠家評審組對化學物的評審還在初級階段，他們還有機會提供補充資料。

(三)起草安全評價

基於對科學文獻的綜述以及綜合在聽證期間的公眾意見，評審組將起草安全評價報告。評審組分為兩個小組同時起草評價報告。這兩個小組在討論時是對公眾公開的，並允許相關的利益集團到場發表看法，提供資料。另外，FDA 和 CFA 的代表官員以及化學物及化妝品的生產廠家也可以參加會議。第二天的會議兩個小組共同討論，也是對公眾公開的。兩個小組對有分歧的部份進行辯論，並投票形成一致的安全評價報告。在討論期間，會議主席還會徵求參加討論的聽眾的意見。

(四)所需資料要求

在每一次的安全評價中都會有許多重要的問題需要討論。早

期，安全評價會議討論的問題多集中在諸如紫外線的吸收，化妝品原料皮膚穿透性等方面。根據不同問題的答案，諸如化學物對皮膚及其他系統（如生殖系統、生長發育系統）的光毒作用的問題會被提出。即使該化學物不透過皮膚，評審組也會考慮其對皮膚本身的毒性。儘管評審組的目的是儘可能提供一個完整詳盡的安全報告，但每種物質並不是要求所有的安全報告。例如，如果細菌及動物試驗顯示某化學物沒有遺傳毒性，在綜合考慮其代謝、分部和排泄的資料後可以不要求做其致癌性試驗。但對這些物質尚需考慮其化學特性及用途等。

(五)補充資料

一旦評審組認定需要補充資料，就會給生產廠家一個非正式的通知，要求其提供一些未公開的資料。如果不能得到補充資料，評審組會發出一個正式的材料不足的通知，來提醒廠家或相關利益集團沒有足夠的材料來證明該物質的安全，這樣同時也會給公眾一個機會發表意見，或提供補充資料。如果當時沒有完全的資料，但已有一個或幾個相關研究正在進行，評審程序可以暫時來等待研究的完成。

(六)暫時結論

當所有的收集資料的程序完畢後，或者資料已足夠下一個結論，評審組將給一個暫時的結論。當然這時公眾還有機會補充新的資料。

(七)最終結論

在所有資料收集完畢後，評審組將給予最後結論並且發表最後的安全評價報告。這些報告單行本由 CIR 發表並立即可以購買到。另外，其評價報告將以特刊的形式發表在《國際毒理學雜誌》上。

(八)最終評價報告的修訂

如果有新的資料可以影響一個已完成的最終評價報告，評審組會考慮這些資料，視其對現有最終評價報告的影響大小，將採取對現有報告進行再肯定或是進行修訂。

(九)對初步評價的重新審查

評審組對十五年前的評價報告或者不超過十五年但有新的資料可以利用的評價報告將進行重新審查。如果資料搜尋的結果沒有發現新的可用資料，或發現的資料已被包括在以往的評價中，則不進行重新評估。

捌之三、體外試驗方法在化妝品安全性評價中的應用

第一節 概述

一、前言

自從人們開始生產和使用化學物質(如藥品、食品和化妝品)以來，一直就有接觸這些化學物質產生不良反應的報告。隨著科學知識的不斷增長以及公眾對化學物質潛在危害的逐步認識和關心，一些國家制定了目的在於管制化學物質使用的法規，包括對工業化學物質的控制，並建立一套評價化學物質對人類不良反應的試驗方法。考慮到不能用人做試驗的倫理原因，而採用動物實驗進行毒理學安全性評價，以此類推對人體健康的危害。1936~1937 年在美國發生磺胺生產過程中 107 名工人中毒死亡和使用睫毛膏損傷人眼事件，1938 年美國國會通過了第一個法律“食品藥品化妝品法(FDC)”，要求“藥品、化妝品製造商再將商品投入市場前，必須確定其原料和原料混合的安全性”。有關化妝品原料的毒理學鑑定，基本上同其他化學物質(農藥、食品添加劑、工業化學品)，採用經濟合作和發展組織(OECD)推薦的化學物質毒理學試驗原則和方法進行安全性評價，如常見的急性、亞急性、和慢性毒性試驗，通過不同暴露途徑(經口、經皮)，在不同時間段後，確定化學物質的毒性強度和劑量—反應關係；急性皮膚和眼刺激性試驗，測定受試物對實驗動物皮膚和眼睛的刺激能力和腐蝕性；皮膚變態反應試驗，通過表皮接觸測定化學物質誘發變態反應的可能性和程度；皮膚光毒、光敏感試驗，確定受試物被日光活化的程度及加強毒性和致敏性的能力；毒物代謝動力學試驗、生殖毒性試驗以及致癌性試驗，從不同測試終點了解化學物質在實驗動物體內的代謝、轉化和產生生殖、胚胎毒性和致癌性的能力。可以說動物實驗是以人類和動物健康為目的，涉及生物醫學乃至生命科學各個領域的重要研究手段。然而，在人們通過大量的動物實驗進行生物醫學、教學、毒理學鑑定的同時，發現不同種動物對化學物質的體內代謝並不相同，在對某些動物實驗設計上是否能準確地預示對人體的危害提出了質疑。如瑞士毒理學家 Gerhard Z binden (1976) 指責用於確定急性毒性的 LD₅₀ 測定。犧牲大量的實驗動物獲得的致死量經臨床證明及少數與人相關；Bruce N Ames (1989) 指出，採用最小毒性劑量進行至延性實驗並不能預示人類暴露在如此低劑量下引起癌症的危險性。何況同為啮齒類動物的大、小鼠對致癌原的同一性只有 2/3，改選擇哪種動物試驗的結果外推到人呢？動物的某些組織結構如兔眼角膜的厚度、眨眼次數和淚腺分泌量與人不盡相同，採用敏感動物試驗所得結果外推到人的可靠性具有不確定性。

完成一種化學物質的全部毒理學試驗不僅需要大量的實驗動物，試驗期限長，飼養動物的環境設施、營養供給、動物福利要求高，耗資大；而

且在毒理學鑑定中，一般是測定單一化學物質，而正常接觸卻是複合物質，逐漸暴露出傳統毒理試驗的缺點和侷限性。不管從科學角度、倫理角度還是經濟角度考慮，需要更多的研究來改進毒理學各方面的試驗設計和效果。1998 年歐洲經濟共同體 (EEC) 規定“2002 年後禁止使用動物對化妝品終產品進行安全性檢測”，並將之列入 WTO 雙邊協議的條款。發展新的體外試驗方法，減少、優化和替代動物實驗是保護動物權益的需要，是生命科學研究發展的需要，也是社會經濟發展、健康發展的需要。

二、“3R”原則

1959 年英國動物科學家 William Russell 和微生物學家 Rex Burch 在《人性動物實驗技術原則》一則提出：正確的科學實驗設計應考慮到動物的權益，儘可能減少動物的用量，優化完善實驗程序或使用其他手段和材料替代動物實驗的“3R”原則。3R 即減少 (reduction)、優化 (refinement)、替代 (replacement) 的簡稱。減少原則是在動物實驗中，如某些非人道操作不可避免，在可滿足實驗要求的前提下儘可能減少實驗動物的數量，不盲目增加各實驗組動物數；選擇合適方法，用較少量動物獲得近可能多的信息。優化原則是在必須進行動物整體實驗時，應儘可能減少非人道試驗操作，如改進實驗方法，將樣品濃縮以減少灌胃次數；最大限度的減輕動物可能遭受的痛苦、緊張和悲傷感。替代原則是在達到實驗目的的前提下，儘可能用認知能力差的低等動物替代認知能力強的高等動物，如用啮齒動物替代狗、猴進行實驗；或用無感知的材料替代有感知的動物，如體外細胞或組織培養替代整體動物實驗，要求不通過與動物相關的試驗或過程去獲得所需的知識。相對於動物實驗而言，替代試驗方法亦稱體外試驗方法或離體方法。利用簡單的生物系統、培養的細菌、細胞、哺乳動物和人的組織、器官或非生物構建體系(如計算機模型)替代實驗動物。

體外試驗方法主要由生物模型、測試終點和試驗準則三部分組成。生物模型是代表體內組織結構和功能的系統生物模型，其代表的效力越高，用於評價的數據價值越大；測試終點是預計毒性出現時的尺度標準(如細胞凋亡)；試驗準則適用規範試驗的標準程序來保證實驗的質量。

根據 OECD 化學物質毒理學試驗方法指南的要求，一種試驗方法無論是整體的還是離體的試驗應該具備以下 4 個條件：

1. 有合適的相關終點。
2. 其科學性、靈敏性和重複性(包括可行性)需通過嚴格審定。
3. 方法可標準化。
4. 在正常情況下不需要特殊儀器和技能。

體外試驗方法的有效性是指，在設計上應能準確預示對人體的危害，所得數據與採用不同技術或在不同實驗室取得的數據具有可比性；而且在

同一實驗室所得數據重複性好，精密度高，最後提交權威機構進行有效性驗證、認可，形成規範的標準化文件後才能推廣使用。有效性驗證程序一般情況下需 4~6 年時間，如果一個替代方法已通過了預驗證（即實驗室間試驗的評價），有效性驗證時間可以縮短到 2 年。

“3R”原則作為系統的理論提出後，在世界範圍內得到廣大科研人員的認同，1985 年美國“倫理化國際基金會”補充第四個“R”，即責任心 (responsibility)，以增強人們在生物學實驗中的倫理觀念，實驗者對人類和對動物都要有責任心。還有人提出 6R 原則即減少、優化、替代、責任心、認知(和減輕)對動物的疼痛和傷害(Recognition or relief of pain and suffering)和矛盾的化解(Resolution of conflict)的概念。1995 年在一次“3R”討論會上，與會者一致決定將“3R”中的替代提到首位，稱為“替代方法的‘3R’原則”。“3R”原則使全世界的生化科學、藥理學、毒理學和生物醫學界對替代方法的發展、驗證更加關注，對於建立一個合理的實驗設計，使科研更人性化，科學技術更先進化具有重要意義。

三、體外試驗方法的發展

在毒理學科中體外試驗作為篩選方法已存在 20 多年。工業和管理部門最早應用體外試驗方法進行安全性評價和危險性評估，如鑑定化學物質的生物學作用的有和無，進行化學物質的分類；篩選化學物質的生物作用，探究整體反應存在的種間差異。隨著分子生物技術的發展，毒理學科從描述科學(觀察整體暴露在化學的和物理的環境條件下所產生的有害效應)發展到作用機理的研究(解釋產生這些有害生物效應的原因)，促使新的生物體系和生物工程技術的利用和發展。特別在最近 10~15 年，對體外試驗方法的研究形成高潮，如在毒理學實驗中採用細胞和組織培養，完全脫離了整體穩態和內分泌調控；在投藥的準確性和結果定量上顯示了方法的優越性。在篩選研究中，應用細胞和組織培養可以檢測到與整體實驗毒性相關的特異性毒作用，還可對一類化學物質的比較毒性進行快速篩選。Ames 致突變試驗的廣泛應用以及一些非動物試驗方法，如離體哺乳類動物細胞染色體畸變試驗和基因突變試驗的發展，對化學物質所致毒性反應的生物學過程和毒作用機理的闡明更加深入和準確。

在化妝品行業，20 世紀 70 年代美國動物保護運動者抗議使用動物進行實驗，強烈抨擊在化妝品的毒性鑑定中的眼刺激試驗和急性毒性試驗使動物遭受痛苦、損傷甚至不正常死亡。世界知名的 revlon 化妝品公司被迫與動物保護者談判，同意提供 250 萬美元資助 rockefeller 大學研究 Draize 眼刺激試驗的替代方法。1980 年，avon 公司與化妝品、盥洗用品和香水協會 (CTFA) 專門致力於替代方法的研究，由 CTFA 引導一個六年計畫(1990~1996)的體外和動物對比試驗，分三個步驟進行，每個步驟的試驗對象為一類物

質(如水-醇製劑、油-水乳劑或表面活性劑)，評價 Draize 眼部刺激替代試驗方法對不同類型物質的預測性。1993 年，美國的“動物權利法”強制研究單位建立“倫理考察委員會”，鼓勵化妝品公司和研究單位開展動物替代試驗方法和優化試驗程序的研究，同年美國過會成立了替代方法有效性驗證協調合作委員會(ICCVAM)和機構間替代方法管理小組(IRAG)，後者由三個美國管理局〔食品藥品管理局(FDA)、環境保護局(EPA)和消費品安全委員會(CPSC)〕為代表，進行了一個三年研究計畫(1991~1994)，從 41 個實驗室 29 個不同試驗方法得到 60 個實驗數據評價眼部刺激替代試驗法的有效性。

從 1898 年英聯邦廢止動物解剖行動至 1998 年 EEC 指令禁止化妝品使用動物試驗相距 100 年，歐洲是唯一有法規禁止使用動物實驗計型化妝品安全性平價(即使是部份方法)的地域。早在 1976 年，相對於法律文件的歐洲經濟共同體委員會指令(76/768/EEC)要求“化妝品在正常和可預見性條件下使用對安全無損害”。1977 年委員會決定(78/45/EEC)建立由醫學、毒理學、生物化學和其他有關科學專家組成的化妝品科學委員會(SCC)協助 EEC 起草和修定歐共體(EC)化妝品法規。1982 年 SCC 制定了“化妝品原料毒性試驗指南”。86/609/EEC 指令要求“用非動物實驗方法取代動物實驗方法”。1992~1993 年，歐洲化妝品、盥洗用品和香水協會(COLIPA)建立了動物實驗替代方法委員會(SCAAT)，為配合化妝品工業的發展，接受應用非動物的替代方法記型化妝品安全性評價。從管理的目的出發，歐共體委員會(ECC)倡議在義大利的 ISPRA 的歐盟聯合研究中心(JRC)建立歐洲替代方法有效性驗證中心(ECVAM)，歐洲政府和私人機構將共同承擔替代方法研究的經費支持。1998 年，EEC 決定建立服 453 於消費者安全保障的化妝品、非食品科學委員會(SCCNEP)(其前身為 SCC)，協助 EC 立法，根據當前科學技術發展水平，審定在化妝品原料安全性評價中替代試驗方法所得數據與動物實驗數據的可比性；並要求 SCCNEP 與 ECVAM 和 COLIPA 的科學家共同評估替代試驗方法的預驗證、有效性驗證和可行性。ECVAM 專題研究組的一些早期研究主要集中在皮膚光毒性、皮膚腐蝕性和評估經皮吸收的體外試驗，如 1994~1995 年在 11 個實驗室對精心挑選的 30 個化學物質進行的體外 3T3 成纖維細胞中性紅攝取光毒性試驗(3T3 NRU PT assay)的有效性研究獲得成功。1999~2001 年 ECVAM 贊助 5 個急性皮膚刺激性的體外試驗方法的預驗證研究，這些試驗是在人、豬和鼠的皮膚上進行的，並發展了用人的體外模型預測皮膚刺激性。

自 20 世紀 90 年代以來，化妝品毒理學安全性平價應用體外試驗方法取得了顯著性進步，科學家們已經認同不再依賴於動物實驗的新的毒理學試驗體系；在體外試驗的科學性和有效性研究方面，ECVAM 對 1990 年 Us/European 共同制定的有效性驗證程序原則提出了更謹慎的研究程序，將

預驗證、生物統計學定義的預測模型作為有效性驗證的基本元素。1995~1996年通過來自美國和日本的專家交換意見，使有效性驗證程序國際一體化，進而得到了歐盟成員國、由 ICCVAM 代表的美國管理局和 OECD 接受，目前，在歐盟國家，大多數化妝品終產品不再需要進行動物性實驗，而是利用現存數據，歷史數據庫，供給方提供的信息，計算機系統進行安全性評價。

縱觀近 20 年來在化妝品毒理學領域中動物試驗替代方法的發展和應用進程，1985 以來集中在科學文獻上報導的體外試驗方法，主要涉及急性試驗，如眼部刺激性/腐蝕性試驗、皮膚光毒性和光敏感試驗、皮膚刺激性/腐蝕性試驗和皮膚變態反應試驗。

眼部刺激性/腐蝕性體外試驗方法的研究在 1979~1989 年間歸納有 6 類。前 5 類方法所採用的生物材料有 Balb/c3T3 成纖維細胞、Hela 細胞、牛眼角膜表皮細胞和大鼠腹膜支架細胞等，對刺激反應的評估指標包括組織型態改變，構建細胞的毒性、細胞和組織的生理、發炎狀態或免疫調控的變化以及損傷恢復和修復能力等。每一類方法可能作為眼刺激反應的一個測試點，預示一組化學物質的毒性反應。不過，外推到整體系統的作用還是有限的；第 6 類方法則是藉助計算機構建的結構-活性相關模型 (SARs)。1994 年以後，歐盟、日本對化妝品原料，美國對化妝品終產品開展了體外試驗方法的研究，在 ICCVAM 和 ECVAM 進行的一系列研究基礎上，確定了四種眼刺激體外試驗方法，鸛胚-尿囊模式驗 (HET-CAM)、牛角膜渾濁和通透性試驗 (BCOP)、離體兔眼試驗 (IRE) 和離體鸛眼試驗 (ICE) 可用於鑑別具有嚴重刺激性的受試物，但是沒有一個單一方法能完全取代 Draize 試驗。某些體外方法有一定程度的預示性；某些可能有應用前景。如果將體外試驗與其他不同試驗系統或訂量構效關係 (QSARs) 方法結合，有可能提高其預示性或用於鑑別非眼刺激性化學物質。目前採用 QSARs 方法的基礎上又建立了 Draize 和 TOPKATT 兩個系統，並已形成文件備案。最近，Ottawa 大學的研究人員在試管內培養出模擬眼角膜的離體三層細胞，通過合成纖維物質黏合形成一個類似人眼角膜的贗品 (fake cornea) 有望替代 Draize 試驗，正在進行有效性驗證。

皮膚光毒性體外試驗方法的研究。至 20 世紀 80 年代末期，無論是動物的還是離體的皮膚光毒性試驗均未納入 OECD 和 EC 的互學物質毒理學試驗方法指南中。1991 年 EC 和 COLIPA 制定了一個光毒性體外試驗研究和有效性驗證的聯合項目，兩個步驟：第一步是在盲性條件下設計體外試驗過程的預驗證；第二步，選擇多種化學物質在多個實驗室對光毒性體外試驗方法進行盲樣試驗。EU/COLIPA 採用 3T3 細胞株和小鼠成纖維細胞株，測試化學物質對細胞毒性的增強作用。其結果的再現性和動物試驗的

相關性均很好，光毒性預示率達到 95%~100%。1998 年 SCCNEP 建議 EC 接受 3T3 NRU PT 是一作為唯一一個有效性的光毒性體外試驗方法，用於檢測吸收 UV 的化妝品原料及原料混合物的光毒性能力，2000 年 3T3 NRU PT 試驗被寫入 67/548/EEC 附錄 II 分類和標記有害物質指令中。2002 年 OECD 正式發佈皮膚光毒性體外試驗方法的操作指南，將其用於化學物質光毒性的安全性評價。

皮膚刺激性/腐蝕性體外試驗方法的研究始於 1960 年，由於皮膚刺激性是一種複雜的反應，涉及生化、神經和細胞反應，在體外試驗中不可能確定其主要特性和相關終點，至 1990 年研究進展緩慢。早期對皮膚刺激性/腐蝕性體外試驗方法的研究包括 5 類模型、20 個構建系統，如取自人或動物的皮件、皮膚用品、人表皮角質形成細胞、成纖維細胞的體外培養模型和數學模型。測試中點主要觀察細胞存活率，如雜質的排斥、攝取、酶的釋放和漏出、氨基酸或糖的利用，炎症反應和蛋白凝聚等。之後，對皮膚刺激性體外模型研究的一些報導，包括永生角質形成細胞株，傳統的角質形成細胞培養，皮膚人工培養和器官培養以及有氧人角質形成細胞(表皮或皮膚代用品)培養。但存在的問題 1. 器官培養沒有角質屏障，但有些體外模型不具備內皮細胞表面血管的功能，預示能力有限。2. 雖然刺激能力與細胞存活率降低有相關性，但還存在一些重要的混雜因素，單獨使用細胞毒性中點不是一個合適的預示工具。近年來，在確定皮膚刺激性反應終點的研究上選擇了更特異指標包括形態學、活細胞素的釋放、表達和皮膚生理反應等。1999 年，在 ECVAM 贊助下採用人皮膚模型和豬耳試驗取得一些進展，已進入預驗證階段。對化妝品原料的潛在刺激性的評價，採用綜合評定標準還是有可能的。OECD 已制定了皮膚刺激性體外試驗研究策略。近年來，COLIPA 在審視有效性評價的基礎上，改進了預驗證研究；而 ECVAM 建議在優化和減少原則的基礎上進行化學物質皮膚刺激作用機制的實驗研究。1995 年 EVCAM 通過了 4 中皮膚腐蝕性替代試驗方法〔大鼠皮膚經皮電阻(TER)試驗和人重組皮膚模型 EpiSkinTM、EpidermTM 和 CorrositexTM 試驗〕的有效性驗證。1998 年 ECVAM 將 TER 和 EpiSkinTM 試驗方法提交 OECD；2001~2002 年，上述 4 種體外皮膚腐蝕性試驗以寫入 OECD 指南。而皮膚刺激性體外試驗方法的有效性還將繼續研究和發展。

皮膚變態反應體外試驗方法的研究，儘管皮膚變態反應涉及一系列的生物反應，如致敏原的經皮滲透，半抗原與載體蛋白結合，表皮朗罕氏細胞被半抗原修飾蛋白的激活，經淋巴腺向淋巴結遷移，與 T 細胞反應，活化的 T 細胞對抗原的識別等。1970~1983 年利用致敏的豚鼠淋巴細胞、人周圍血淋巴細胞檢測持發性接觸性過敏反應獲得成功。近十年來，對變態反應性接觸性皮炎的分子和細胞反應基礎研究有較大的發展，使得研究非

動物的替代方法成為可能。體外試驗方法評論化學物質致敏原的研究存在多種途徑，如利用不同來源的培養細胞觀察遷移抑制因子(MIF)的產生或細胞遷移反應、表面標記物的變化、胞吞作用和酪氨酸磷酸化的變化等。20世紀到90年代以來採用以淋巴細胞增值率作為檢測終點的鼠類局部淋巴結試驗(LLNA)，不失為一個好的優化方法；2002年LLNA以作為OECD指南429試驗方法。採用QSARs方法雖然不可能100%的預示潛在的變態反應性，但如果將體外試驗與其他的物理化學方法結合起來，將有良好的應用前景。SCCNFP曾估計，到2016年有望皮膚變態反應體外試驗方法研究成功。

到目前為止，通過有效性驗證的動物替代方法有皮膚腐蝕性試驗、皮膚光毒性試驗、皮膚滲透試驗和生殖毒性試驗並以已收入OECD化學物質試驗指南中。尚待有效性試驗的替代方法，包括鑒定中等演刺激性的替代試驗、皮膚變態反應試驗、替代急性和多次性毒性試驗的細胞培養和靶組織試驗、替代致癌試驗的SHE細胞轉移試驗、計算機模擬和毒代動力學試驗，替代生殖和發育試驗的人胚胎幹細胞試驗和內分泌干擾試驗。2004年美國毒理學替代方法科學顧問委員會要求ICCVAM與ECVAM合作，共同進行眼刺激體外替代試驗的評價，ICCVAM驗證的急性毒理替代試驗已被EPA、OECD和美國運輸部(DOT)等機構認可；並探討運用肝、腎細胞聯合培養系統進行慢性試驗的早期機制研究。近來SCCNFP同意用人的志願者檢測化妝品原料及原料混合物的潛在皮膚刺激性，以及在化妝品終產品的親和試驗亦採用人的志願者。

2004年3月在bethesda, MD的hyatt regency飯店舉行了毒理學替代試驗方法的科學疑455問委員會會議，期間，國立毒理學規劃(NTP)毒理學替代試驗方法機構間平價中心(NICEATM)要求有關方面提供四種眼刺激體外試驗方法(BCOP、REET、CEET和HETCAM)和有關動物試驗的資料以便進行對比分析，並有望在2005年ICCVAM對該四種方法做出推薦。

四、替代試驗有效性驗證的程序

有效性驗證是對為某一特性目的所建試驗方法的相關性和可靠性的驗證。相關性是指測試系統的科學基礎及相關預測模型的預測能力；可靠性指試驗結果在實驗室內部和實驗室間及一段時間後的重現性。每項替代試驗的驗證內容包括1.測試系統的科學理論依據。2.預測模型的預測公式充分精確。3.測試系統所得結果的可靠性。

針對研究對象的不同，有效性驗證研究可分為機構內部驗證，商業驗證和新實驗方法安全規範的驗證。替代試驗方法的有效性驗證屬於新實驗方法安全規範的驗證。

根據有效性驗證目的的不同，替代程序的有效性驗證可分為三種類

型：1.非規範的研究(non-regulatory studies)。2.規範指南中包括的分層次驗證(for inclusion as part of hierarchical approaches in regulatory guidelines)。3.替代原有規範指南的驗證(for the replacement of existing regulatory guidelines)。此外，還存在第四種驗證，即規範試驗指南要求提供信息方面的驗證(provide part of the information which is required by regulatory testing guideline)。

(一)替代試驗研究的五個階段

1. 建立方法(起始實驗室)：明確試驗目的和必要性、方法的建立、合適試劑的使用、有效性驗證的實例和方法標準化。
2. 預驗證：指小範圍非正式的實驗室間研究，以修正試驗方法的規範和預測模型，獲得其相關性和可靠性的初期評價。預驗證過程由三個連續步驟組成：A.方法修訂。B.方法轉移。C.方法評價。第 1 步和第 2 步在單個試驗室(起始實驗室)內對測試方法的規範和預測模型進行修訂，然後將該方法轉移到第二個實驗室進行試驗評價和必要的再修訂。第 3 步是在盲性試驗條件下由多個試驗室進行試驗，以評價該方法的相關性和可靠性。如果該項試驗的預驗證結果良好，則可啟動正式驗證程序。

預驗證是有效性評價的基礎階段，可通過統一的標準摸索多個實驗室的實驗操作條件，並闡明目標試驗的替代方法是否適合正式驗證，為實驗室間評價做準備。

為保證有效性驗證的實用性和邏輯性，預驗證過程需注意：

- 1.管理隊伍在有效性驗證中的作用。2.替代試驗、實驗室及試驗物質的選擇。3.良好實驗室條件。(GLP) 原則和標準的依從性。4.試驗數據的收集和分析。5.驗證結果的評價。有效性研究早期會遇到的困難有體內數據的選擇和利用，體內外試驗終點的比較等。
3. 正式驗證：是在盲性試驗條件下大範圍正式的實驗室間研究，以獲得更明確的相關性和可靠性的評價。通常情況下，如果一項新方法的預驗證結果較理想，即可進入正式驗證。然而，在有些情況下，一項新試驗方法與另一項已通過有效性試驗的試驗在結構特徵和可靠性上很相似，進行預驗證即可充分確立該新方法的有效性。此過程稱為追隨驗證(catch-up validation)。皮膚腐蝕性替代試驗方法之一 EpidermTM 人類皮膚模型試驗就是在 EpidermTM 人類皮膚模型試驗通過有效性試驗後進行的追隨驗證。

正式驗證是驗證的重要階段，其目的是確認試驗方法在任何標準實驗室都可能實施，且能得到可信賴的結果，確認在制定行

- 政法規時具有可行性。驗證內容包括：研究設計、替代試驗和實驗室選擇、化學物質的分配和選擇、數據收集和分析、結果評價。在正式試驗階段，試驗數據庫的建立是必不可少的，充分積累化學物質數據以更好地檢驗試驗方法的性能。一般認為，正式驗證需要選擇 10~20 種不同類化學物質，可累計 200~250 個試驗數據。
4. 自主評價：經過預驗證和正式驗證後，對新建立試驗方法的預測率、速度、簡便性及經濟性做進一步評估，即可進入試驗方法的自主評價階段。然後，將驗證結果提交有關機構審查，並決定該試驗方法是否可能作為法定替代方法使用。
 5. 管理部門接受的過程(progression toward regulatory acceptance) ECVAM 的有效性試驗一旦完成，ECVAM 將出具一份有效性驗證的報告提交給 ESAC (ECVAM 科學顧問委員會)，經 ESAC 審核，如果方法確實有效，將試驗方法草案提交給歐盟主管當局認可，載入 67/548/EEC 指令附件 V 指南(Annex V guideline) 後正式推薦使用。

(二) 申請進入有效性驗證的條件

未證實新試驗方法在學術上研究的充分而申請進入有效性驗證，需提供以下資料。

1. 試驗方法研究的目的即其應用範圍。
2. 方法的基本描述。
3. 相關性證明；對於一項可預測體內毒動力學終點的試驗方法，需要提供試驗相關性的機制研究和支撐其預測能力的任何以有證據。
4. 與原有的整體試驗（動物或人體）結果和其他非動物試驗法結果存在相關性的合理解釋。
5. 試驗準則包括：a. 標準操作程序；b. 特定終點和終點計算方式；c. 結果的表達；d. 通過預設模型計算出一個或多個體內毒動力學終點的結果解釋；e. 對照的使用。
6. 試驗局限性的聲明。
7. 實驗室內重現性的證據，或實驗室間轉移試驗的證據。

(三) 驗證結果的評估

對預驗證和有效性驗證果的自主性評價應考慮以下內容。

1. 既定目標明確。
2. 總設計的質量。
3. 管理的獨立性。
4. 試驗物質選擇、編號和分配的獨立性。

5. 數據收集和分析的獨立性。
6. 試驗物質的數目和特性。
7. 結果的質檢和解釋。
8. 方法的實施與研究目標的關連性。
9. 試驗結果的相關文獻報導。
10. 原始數據的可靠性。
11. 結果評估的獨立性。

替代方法的有效性需要通過一個測試系統和預測模型的聯合驗證。測試系統提供測試化合物的理化性質和體外試驗數據，而預測模型則將這些數據按照一定公式計算，以預測毒物動力學終點。

(四) 驗證時間表

有效性驗證耗時比較長，1 年整合基金，設計操作步驟和建立科學小組；3 年實施研究，建立一個適合的預驗證方法；4~5 年預驗證和正式驗證 (ECVAM)；最後提交有關當局接受有效性驗證。一般情況下，ECVAM 進行有效性驗證的過程包括預驗證和正式驗證時間為 4~6 年。其中，現實的部份是研究階段。如果一個替代方法已通過預驗證，同時存在追隨驗證的條件，驗證時間可縮短為 2 年。

皮膚刺激性/腐蝕性體外試驗

一、概念

皮膚刺激性(Dermal irritation)：皮膚塗膚受試物後局部產生的可逆性炎症變化。

皮膚腐蝕性(Dermal corrosion)：皮膚塗膚受試物後局部引起的不可逆性組織損傷。

急性皮膚刺激性/腐蝕性試驗通常用於確定和評價化學物質對哺乳動物皮膚局部是否有刺激作用腐蝕性及其程度。

二、傳統動物試驗的優缺點

動物皮膚刺激性/腐蝕性試驗是將受試物一次(或多次)塗抹在白兔背部去毛區域，在規定的時間間隔內，採用自身對照，觀察動物皮膚局部刺激作用的程度並進行評分。一般認為兔對刺激性物質的反應較人類靈敏，特別對輕度和中度刺激性物質，但也有可能引導化學物質的錯誤分類。雖然實驗室近親繁殖動物的皮膚對環境因素(如化學物質、紫外線等)的刺激效應大致相同，由於白兔皮膚的解剖學和細胞組成與人類存在種間差異，在刺激程度，時間過程和屏障功能恢復上與人的情況是不同的。動物試驗中受試物與皮膚的封閉式接觸是一種超常的實驗室條件，在現實生活中很

少存在這種接觸方式。因此，皮膚刺激性/腐蝕性試驗結果從動物外推到人存在不可靠性。

三、體外試驗的有效性驗證

皮膚腐蝕性體外試驗已通過歐洲替代方法有效性驗證中心 (European Center for the Validation of Alternative Methods, ECVAM) 的有效性驗證。86/609/EEC 歐洲經濟共同體委員會指令“不再允許用動物試驗進行皮膚腐蝕性檢測”。皮膚刺激性體外試驗尚未通過 ECVAM 驗證。OECD 制定了皮膚刺激性體外試驗研究策略，提出盡量使用體外試驗檢測皮膚刺激性反應；在使用體外試驗前需要考慮細胞的來源，細胞的刺激特性，受試物的暴露時間以及實驗終點等影響刺激性的外在因素。

(一) 皮膚刺激性/體外試驗研究策略

由經濟合作與發展組織 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) 提出的皮膚刺激體外試驗研究策略。

第一步：通過計算機系統建立的結構-活性關係模型 (Structure-activity relationship SARs) 預測化學物質的皮膚刺激性。

第二步：強酸與強鹼 ($\text{pH} \leq 2$ 或 $\text{pH} \geq 11.5$) 受試物質可不再進行皮膚刺激試驗；已知受試物有很強的經皮吸收毒性或在急性經皮毒性試驗中受試物的一次限量為 2000mg/kg 體重仍未出現皮膚刺激性作用，也無須進行急性皮膚刺激性試驗。

第三步：採用已通過驗證的皮膚腐蝕性體外試驗或未通過驗證但允許使用的皮膚腐蝕性體外試驗(如上皮細胞電轉移耐受試驗、人重組皮膚模型或 Corrositex 試驗)，如果試驗結果為陰性則進行第四步試驗；在允許人體試驗的國家，可直接進行第五步驟。

第四步：進行人重組皮膚模型或 Corrositex 試驗，目前人重組皮膚模型正在進行有效性驗證，其結果已被歐盟和 OECD 承認，很可能通過 ECVAM 驗證，試驗結果陽性者可評價受試物為皮膚刺激性陽性。

第五步：以上第三/第四個步驟中評價為皮膚腐蝕性/刺激性陰性的物質，在條件允許時可對志願者進行 4 小時人體皮膚斑貼試驗，該數據可靠，可作為金標準。

以上研究策略可進行快速準確的皮膚腐蝕性/刺激性分級。目前有些歐洲國家禁止人體試驗，OECD 和歐盟建議這些國家最後進行動物試驗作為輔助試驗或者採用其他國家的人體斑貼試驗結

果。

(二)皮膚腐蝕性體外試驗

1. 大鼠皮膚經皮電阻試驗 (The rat skin transcutaneous electrical resistance assay, TER)：以經皮電阻值為檢測終點，通過檢測受試物對皮膚角質層完整性和屏障功能的損害能力，評定受試物的腐蝕性。
2. EpiSkin™ 皮膚腐蝕性試驗 (EpiSkin™ skin corrosivity test)：人重組皮膚模型 EpiSkin™ 是在膠原蛋白底物上用人成熟角質型成細胞培養的一種多層人皮膚模型。膠原蛋白基底物類似於人皮膚的真皮，含 I 型膠原蛋白，EpiSkin™ 人重組皮膚模型通過檢測穿透角質層並引起下層細胞死亡的受試物的腐蝕性。
3. EpiDerm™ 皮膚腐蝕性試驗 (EpiDerm™ skin corrosivity test)：人重組皮膚模型 EpiDerm™ 是用正常人表皮角質型成細胞 (Normal human keratinocytes, NHK) 培養而成的一種多層皮膚模型，它包含基底層、棘層、微粒層和一層內含細胞間脂質的角質層，通過 MTT 染色法檢測受試物穿透 EpiDerm™ 角質層下層細胞存活率的影響，評定受試物的腐蝕性。
4. CORRCSITEX™ 皮膚腐蝕性試驗 (CORRCSITEX™ assay for skin corrosivity)：CORRCSITEX™ 是一種含膠原蛋白的生物化學模片，形成一個生物屏障，受試物如能穿透該生物屏障並引起屏障下室所存放液體顏色的改變，通過計算從加入受試物到溶液改變顏色所需的時間，評定受試物的腐蝕性。所需時間越長則腐蝕性越小。CORRCSITEX™ 已得到美國運輸部 (US Department of Transportation, DOT) 的認可。實驗室內和實驗室間的比對試驗結果表明該方法具有較好的重現性，美國替代方法有效性驗證協調合作委員會 (the Interagency Coordinating Committee for the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) 肯定了該方法對酸類、酸類衍生物及其主要成分的檢測能力。但對其他受試物有一定侷限性。ECVAM 實驗紀錄裡約有 40% 具有腐蝕性的化學物質不能用該方法檢測，此試驗可以作為其他檢測方法的輔助方法。

(三)皮膚刺激性體外試驗方法

1. EpiSkin™ 人重組皮膚模型
2. EpiDerm™ 人重組皮膚模型
3. Prediskin™ 試驗
4. 豬耳試驗 (Porcine ear test)

5. 小鼠皮膚功能完整性試驗(Skin Integrate Function Test, SIFT)
6. OSEC 模型(Organotypic skin explant cultures, hOSEC 模型和 pOSEC 模型)：器官型皮膚人工培養 OSEC 模型由 Jacobs 等人提出，有人(human)和豬(porcine)兩種 OSEC 模型，以角質型成細胞毒性作用檢測終點。根據受試物組角質形成細胞毒性出現的時間得出 MGP (methyl-green pyronine) 分值(即通過 MGP 染色程度測定角質形成細胞中 RNA 的存在度)，與 20%SDS 的 MGP 分值(20%SDS 被 EU 定義為引起兔皮膚最小刺激性的物質)相比較，評價受試物是否具有刺激性。
7. 其他方法
 - (1) RE-DED 或 Prumi-eras 模型：是一種非商用的重組皮膚模型，將該模型暴露於不同濃度的受試物 24hr，通過皮膚模型型態的改變、細胞質酶的產生、炎症介體 (IL-1 α 、IL-6、IL-8 和前列腺 E₂) 的產生、MTT 值的變化來評定受試物的毒性。
 - (2) SkinEthic 皮膚模型：將該模型暴露於受試物 1 天，然後通過測試細胞質 LDH 漏出率，IL、IL-1 α 、IL-8 的釋放水平以及 IL-1 α 、IL-8 的 mRNA 表達來評定受試物的毒性。

眼部刺激性/腐蝕性體外試驗

一、概念

眼睛刺激性 (Eye irritation)：眼球表面接觸受試物後所產生的可逆性炎症變化。

眼睛腐蝕性 (Eye corrosion)：眼睛表面接觸受試物後所引起的不可逆組織損傷。

眼睛刺激性/腐蝕性試驗用於確定和評價化學物質對哺乳類動物眼睛是否有刺激作用或腐蝕作用及其程度。

二、傳統動物試驗方法的優缺點

傳統的動物眼刺激性/腐蝕性試驗即 Draize 試驗是採用自身對照方法，將受試物放入兔一側眼結膜囊內，另一側眼作空白對照，對比觀察兩眼的角膜、虹膜和結膜的反應並評分，以評價受試物對眼睛的刺激性/腐蝕性作用。

雖然 Draize 試驗已廣泛用於化學物質的安全性評價，由於兔的眼角膜厚度、眼瞼結構、Bowman 膜的厚度和細胞組成與人類存在種間差異，而且兔眼的淚腺不發達，眨眼次數少，對外來刺激物的反應耐受性低於人類。一些研究發現用 Draize 試驗檢測有色的或刺激性較小的物質，試驗結果差異較大，重複性和一致性較差，評分系統存在主觀性。儘管對 Draize 試驗方法有所改進，如再受試物的用量、作用時間、評分標準上的改變，但與

人的實際接觸情況差之甚多。由於眼對化學物質產生的刺激反應涉及免疫、生理和炎症過程，因而從動物試驗結果外推對人眼的刺激強度具有不確定性。

三、體外試驗方法的有效性驗證

國外從 20 世紀 80 年代開始研究 Draize 試驗的替代方法，如低容量眼刺激性試驗(low-volume eye test)，減少了實驗動物數和受試物用量，在評估眼刺激性的能力上無顯著下降，但仍不能避免對動物的損傷和痛苦。國內外科學家在發展科學的、可靠的眼刺激體外試驗方法進行了大量探索，至今，仍沒有一項體外試驗通過歐盟的有效性驗證。

(一)眼刺激體外試驗研究策略

由經濟合作與發展組織(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)提出的眼刺激體外試驗研究策略如下。

第一步：通過計算機系統建立的結構-活性關係模型，預測化學物質的眼刺激性。

第二步：對於強酸或強鹼($\text{pH} \leq 2$ 或 $\text{pH} \geq 11.5$)受試物或已證實對眼睛具有腐蝕性或強刺激性的受試物可不再進行眼刺激試驗。

第三步：進行體外試驗方法的研究，如離體兔眼試驗(IRE)或兔裸眼試驗(REET)、離體鵝眼試驗(ICE)或鵝裸眼試驗(CEET)、牛角膜渾濁和通透性試驗(BCOP test)和鵝胚-尿囊膜試驗 (HET-CAM test)，確定其檢測眼刺激性的能力，完成上述研究後，即可對具有眼刺激性或不可逆性眼損傷的化學物質進行標識、管理。體外試驗的陰性結果則可認為該受試物為非眼部刺激性物質。

研究結果表明，IRE 和 HET-CAM 試驗能按刺激強度分級，能有效區分嚴重刺激物和中等刺激物。目前，一些歐洲國家(英國，德國，比利時和新西 466)的管理當局已接受這些試驗方法，並用於生物製品的質量控制和毒理學鑑定。根據 IRE、ICE、BCOP 和 HET-CAM 試驗所獲得的數據，歐洲替代方法有效驗證中心(European Center for the Validation of Alternative Methods, ECVAM)將做進一步研究，確定他們能否被歐盟接受及能否通過有效性驗證。德國聯邦消費者健康保護和獸醫藥研究所(BgVV)認為，蛋白質沉澱試驗能區分嚴重刺激物和中等刺激物，建議 ECVAM 將蛋白質沉澱試驗列入眼刺激體外測試系統之內。

(二)眼刺激性的體外試驗

1. 絨毛膜尿囊層面試驗(Chorioallantoic membrane-based assays,

CAM)：鵝絨毛膜尿囊膜(HET-CAM)是鵝胚的呼吸膜，血管豐富，緊貼於蛋殼膜下，可認為是一個血管豐富而無感知的系統。Luepke 等(1985)首先提出，利用受精的 HET-CAM 與結膜結構相似的特性，通過觀察 CAM 暴露化學物質後的血管變化(充血、出血、凝血)，來檢測化學物質對 CAM 的損傷，評價受試物的刺激性。

絨毛膜尿囊層面試驗包括以下三種試驗方法。

- (1)鵝胚絨毛膜尿囊試驗(Hen's egg test on the chorioallantoic membrane, HET-CAM)。
- (2)絨毛膜尿囊膜血管試驗(Chorioallantoic membrane vascular assay, CAMVA)。
- (3)CAM 苔盼藍染色試驗(Chorioallantoic membrane-trypan blue staining assay, CAM-TBS)。

用 CAM 方法評估特定種類化學品眼刺激性的試驗都顯示了較滿意的結果，對 HET-CAM 終點的生物統計學分析表明，受試物 10% 稀釋溶液的凝血反應能很好辨別具嚴重眼刺激性的水溶性化學品，而未稀釋溶液的凝血反應可辨別水溶性較差的嚴重刺激性化學品。美國 IRAG (Interagency Regulatory Alternative Group) 的評估結果表明，CAM 試驗能很好預測角膜渾濁和虹膜炎；相對而言，HET-CAM 分析表面活性劑類產品的效果較好，CAMVA 分析醇類效果較好。CAM-TBS 方法簡便、經濟易行，適用於大多數化學物包括固體物質。刺激性評估結果與 Draize 試驗結果有很好的相關性，能明顯辨別嚴重刺激物和非嚴重眼刺激物。結合中性紅攝取試驗，HET-CAM 不但能辨別嚴重刺激和非嚴重刺激物，還能辨別非刺激物和刺激物。由於評價是以主觀判斷為依據，而且 CAM 無神經支配，將體外試驗結果外推至人的合理性仍有待進一步研究證明。

2. 紅血球細胞試驗(Red Blood Cell Test, RBC Test)：化學物質能引起細胞膜損傷使膜滲透性發生改變，破壞蛋白質空間構象，血紅蛋白從紅細胞中漏出，從而發生溶血和蛋白變性。由於紅細胞易於獲得，被廣泛用於研究細胞膜溶解及蛋白質變性。紅細胞試驗作為 Draize 眼刺激試驗的替代法或篩檢試驗包括以下兩個方法。

- (1)紅細胞溶血試驗(hemolysis test)。
- (2)紅血蛋白變性試驗(haemoglobin denaturation test)。
- (3)細胞毒性試驗(Cytotoxicity Test)：化學物質可引起上皮組織間

緊密連接破壞、上皮屏障功能受損、角膜、結膜上皮及內皮細胞損傷導致應激反應、釋放炎症因子產生眼刺激性效應。因此，理論上可通過檢測受試物對離體細胞或組織功能的影響及毒性作用預測其眼刺激性。

細胞毒性試驗涉及細胞毒性和細胞功能兩部份，通過檢測化學物質影響成纖維細胞、角質形成細胞或角膜上皮細胞等對染料或代謝產物的攝取（中性紅攝取試驗、尿嘧啶攝取試驗）、處理〔(MTT)染色試驗、雙乙酸螢光素染色試驗〕、釋放(中性紅釋放試驗)、排斥〔胎盤藍排斥試驗、溴乙啶(EB)染色〕，以及蛋白質合成、變性和釋放，以反應受試物對細胞膜性結構、細胞器功能、物質和能量代謝，以及由此導致的細胞增職和存活力的影響。

3. 中性紅攝取試驗(Neutral Red Uptake Test, NRUT)：存活細胞的溶酶體能選擇性攝取中性紅，其攝取量與存活細胞的數量直接相關，NRUT 用於測試受試物的細胞毒性，以評價受試物的刺激性。根據選用細胞的不同，目前採用的 NRU 試驗有 3T3 成纖維細胞、兔角膜上皮細胞（不含血清介質中培養，NRCE）、兔角膜上皮細胞株（含血清的介質中培養，SIRC）和人表皮角質形成細胞（NHEK）NRU 試驗等。
4. 中國倉鼠肺細胞結晶紫染色試驗(cytotoxicity test on Chinese hamster lung cell lines using crystal violet staining, CHL-CVS)：存活細胞可以吸收結晶紫，並積蓄在溶酶體中，通過測定受試細胞中的結晶紫含量，評價化學物質的刺激性。

其他組織細胞的細胞毒性試驗：如 Hela-MTT 法：Hela 細胞系是評價化學物細胞毒性的一個重要細胞系，活細胞粒線體中的琥珀酸脫氫酶能使外源性的 MTT 還原為難溶性的藍紫色結晶物 (formazan) 並沉積在細胞中，死細胞無此功能，通過 MTT 比色法可分析受試物的細胞毒性。

5. 細胞功能試驗

- (1) 螢光素鈉漏出試驗(Sodium fluorescein leakage test, FLT)：角膜上皮細胞間的緊密連接是角膜上皮對外來化合物的屏障，可以防止外來化合物的滲透，對眼睛形成有效的保護。通過檢測螢光素鈉透過上皮屏障系統的量，評價受試物的刺激性。

研究表明，FLT 能區分無刺激性和嚴重刺激性受試物。表面活性劑及醇類的 FL₅₀ 與 Draize 試驗最大平均分數(Maximum average score, MAS)相關性好，能有效預測角膜和

虹膜的反應，可作為眼刺激性評價的篩選方法。

- (2) 矽膠微生理儀檢測試驗(Silicon microphysiometer test, SM)：通過檢測不同濃度受試物對受試細胞培養液 pH 質的改變，以細胞代謝率下降 50% 時的受試物濃度(MRD50)作為評價受試物影響細胞能量代謝功能的指標。SM 試驗僅用於篩選液體受試物和水溶性固體物質的眼刺激性，不能用於難溶性固體物質，且所需設備昂貴，難以推廣應用。

細胞功能和毒性試驗，對受試物的反應較靈敏，可作為眼刺激性試驗的預篩選手段，或作為體外試驗程序組合的組成部分，但不能完全替代眼刺激試驗。

6. 生物模型替代方法

這類方法有體外培養皮膚成纖維細胞三維模型的 Living dermal MODEL™/MTT 試驗，Living dermal MODEL™/MTT EC50 試驗，Skin² Model ZK1100 MTT 還原試驗，Skin² Model ZK1100 LDH 釋放試驗，Skin² Model ZK1100 PGE₂ 釋放試驗，和檢測受試物對重組人角膜上皮 IL-1、PGE₂、LDH 釋放和螢光素通透率的 EpiOcular™、Microtox™ 試驗等。以細胞 50% 死亡的受試物濃度作為細胞功能改變的評價指標，預測受試物的眼刺激性。

7. 離體器官模型 (Organotypic models)

採用離體的兔、牛、豬、鸛的眼球或角膜等組織器官作為試驗材料，檢測角膜水腫、渾濁及螢光素滯留，並進行組織學觀察評估受試物的眼刺激性。常用的方法為離體兔眼試驗或兔裸眼試驗(IRE or REET)、離體鸛眼試驗或鸛裸眼試驗(ICE or CEET)和牛眼角膜渾濁度與滲透性試驗(BCOP)等。IRE 和 ICE 能區分具有輕度眼刺激性和嚴重刺激性的化學物，與 Draize 試驗的 MAS 有很好的線性關係。而 BCOP 試驗只能篩選嚴重眼刺激性化學物。

8. 其他

- (1) 非生物試驗方法：使用植物蛋白質作為試驗材料，通過檢測 EYTEX 蛋白變性預測受試物的眼刺激性。通常按 EYTEX 試劑盒的標準程序進行試驗，受試物與 EYTEX 試劑孵育後用色度計在 499nm 波長處測定其吸光度，按所提供的標準曲線將吸光度轉化成相應的眼刺激評分。

- (2) 膜分配試驗(the membrane partition assay, MPA)：通過半透膜杯(semi-Permeable membrane cup)將不溶或不透明的受試物

與 EYTEX 試劑分離後測定其吸光度，預測受試物的眼刺激性。僅適用於不溶或不透明受試物的檢測。

(三)體外眼刺激試驗的有效性驗證

體外眼刺激性試驗具有可定量性和客觀性，避免了動物試驗中諸如試驗週期較長、耗時、費力、動物間存在個體差異及動物外推到人的差異等缺點。但是，體外試驗方法不能完全模擬吸收、分部和代謝等複雜的體內環境，檢測指標只代表機體反應的某一部份，有時會出現假陰性和假陽性的試驗結果。1990 年在第一次國際 Amden 專題討論會上制定了體外眼刺激試驗方法的有效性驗證準則：(a)用 20~50 中參比化合物進行實驗室內初步評估。(b)在實驗室間用系列盲樣驗證方法的可行性和重複性。(c)檢測一批已知刺激性化學物，用合適的統計方法與體外和整體試驗資料比較。(d)做出最終評價。依據此準則，歐共體/英國總部(European Community/British Office, EC/HO)在 36 個實驗室對 9 種體外方法進行了驗證，沒有一種方法能完全替代 Draize 眼刺激試驗。1994 年在第二次 Amden 會議上，又增加了三項要求：1 預測模型：在盲性驗證實驗條件下建立體外試驗終點，預測在體試驗終點的數學模型。2 在實驗室內對體外法進行初評後，選擇幾種化學物質，在幾個實驗室間進行預驗證實驗，實現試驗操作標準化。3 必須保證實驗人員在整個驗證實驗過程中工作的獨立性。近十幾年來，日本、美國、歐洲等國都相繼對眼刺激體外試驗方法進行了驗證。

1. 日本：共組織了 3 次大規模的實驗間試驗，協助單位共計 67 個，進行了 12 種體外試驗方法的驗證(按 GLP 原則和 OECD 的驗證基準進行)，受試物為經編碼 38 種化妝品原料和生理鹽水並同時實施了 Draize test。
2. 美國：美國肥皂洗滌劑協會使用 22 種產品，對 HET-CAM、人重組皮膚模型、細胞毒性試驗、培養細胞蛋白質含量試驗、原代培養細胞纖維溶酶原活化因子游離法(來源於家兔角膜)和四種蟲運動試驗等 9 種體外法進行了有效性驗證。結果顯示，體外試驗與體內試驗的相關性在 0.58~0.91 之間。多數試驗能鑑別除鹼性物質外的化學物質是否具有刺激性，但不能評價化學物質的相對刺激強度。
3. 歐共體和英國：歐共體和英國分別在 4 個實驗室用 60 種物質，對 HET-CAM 試驗、RBC 試驗、REET、CEET、BCOP 試驗共 9 種體外法進行了驗證研究。結果顯示，與體外試驗結果相比，所有方法的相關係數均在 0.61 以下，順序相關性也不高。可能

存在的原因有：

- (1)受試物的種類過多。
- (2)試驗的標準操作規程(SOP)在不同實驗室有所差別。
- (3)用於對照的體內試驗數據是歷史數據，可信度存在問題。
- (4)用直線回歸方程式計算相關系的統計方法不夠準確。

1997 年歐洲化妝品工業聯合會會議上，P&G 公司 Bruner 博士指出：1. FLT、RBC 試驗結果與 Draize 試驗結果的相關性好，但單一方法替代 Draize 試驗並不充分。2.對表面活性劑的原料和產品分別進行第二次驗證研究的結果不太理想，原因可能是將受試物分為化妝品原料和最終產品，分析結果時未充分考慮受試物的理化性質的緣故。

鑒於到目前為止尚無有效的眼刺激性體外試驗方法替代 Draize 試驗，一些歐盟國家提出在化學物質或化妝品的眼刺激性的評價中，可先進行體外試驗，若結果陰性就不需開展 Draize 試驗；若結果陽性，再開展 Draize 試驗評價其刺激性和刺激強度。

皮膚光毒性體外試驗

一、概念

光毒性(Phototoxicity)：皮膚一次接觸化學物質後，繼而暴露於紫外線照射下所引發的一種皮膚毒性反應。

皮膚光毒性試驗用於評價化學物質引起皮膚光毒性的可能性。

二、傳統動物試驗的優缺點

動物皮膚光毒性試驗一直未列入 OECD (Organization for Economic Cooperation and Development)和 EC (European Community)化學物質毒理學試驗指南內。目前國際上通用的動物皮膚光毒性試驗是將一定量的受試物塗抹在動物背部已去毛的皮膚上，經一定時間間隔後暴露於 UVA 光線下，觀察皮膚反應，並確定該受試物是否有光毒性。由於兔的皮膚解剖學結構和細胞組成與人類皮膚存在種屬差異，再大多數情況下，兔對刺激性物質較人類敏感。皮膚光毒性試驗結果從動物外推到人的可靠性很有限。

三、體外試驗的有效性驗證

到目前為止，有多種光毒性試驗替代方法的研究報導，如光溶血試驗、人角質形成細胞試驗、3T3 成纖維細胞中性紅攝取光毒性試驗等。ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods)對這些體外光毒性試驗進行了有效性預驗證和正式驗證。美國 ICCVAM (the Interagency Coordinating Committee for the Validation of Alternative Methods)也進行了體外替代試驗的評價。皮膚光毒性試驗體外替代方法有效性驗證已取得了

很大進展，並建立了預測光毒性效應的人體數據庫模型。

(一)光毒效應機制

具有光毒效應的化學物質(光敏物質)與機體接觸後，在紫外線或可見光的照射下可導致兩種電子激活態的形成。一種是單線態，存活時間較短；一種是三聯態，存活時間較長。

三聯態光敏物質可誘導兩種氧化反應：不需氧的電子或氫離子轉移的 I 型反應(光敏-底物型)和需氧的自由基轉移的 II 型反應(光敏-需氧型)。I 型反應和 II 型反應的發生主要取決於光敏物質和反應底物的化學特性和試驗條件(如溶質、pH 值、光敏物質的濃度等)，有時還取決於光敏物質的吸收光譜。

單線態光敏物質具有較強的電離特性，只與富含電子的底物反應，氧化形成自由基，導致機體的過氧化反應。

光敏物質的單線態和三聯態形成後，迅速與細胞小分子物質進行光結合，形成特異的光激活物質。這些特異的光激活物質在體內降解，可形成有毒物質或再成為光敏物質，從而對機體造成二次損害。根據光敏物質的攝取和定位，光敏反應的生物學靶部位可分為細胞膜、細胞器和細胞核。

光敏反應危害主要取決於光敏物質與光刺激細胞的結合及其光化學特性，其中烷-水分配係數、溶解度高、離子性質和分子量很可能是影響光敏物質和細胞結合的理化因素。

(二)皮膚光毒性體外試驗方法

1. 光毒性篩選試驗

光毒性篩選試驗是一組試驗，通過檢測化學物質和紫外線照射的聯合作用對細胞增殖和存活率的影響。

(1) 3T3 中性紅攝取光毒性試驗(3T3 Neutral Red Phototoxicity assay, 3T3 NRU PT assay): 中性紅染料可被活細胞的溶酶體攝取，其攝取量與活細胞量直接相關。3T3 NRU PT 試驗，通過檢測 Balb/c3T3 成纖維細胞經化學物質和紫外線照射聯合作用後的細胞存活率，以判斷該化學物質是否具有光毒性。

3T3 NRU PT 試驗操作簡單、重現性好，與體內試驗結果的相關性高。ECVAM 科學顧問委員會(the ECVAM Scientific Advisory Committee, ESAC)認為 3T3 NRU PT 試驗室“一項非常有效的試驗，該試驗結果無需經過動物試驗即可確認受試化學物質的陰性結果，可考慮用於替代動物實驗”。從而成為第一個成功地通過歐盟/歐洲化妝品、盥洗用品和香水協會(EU/COLIPA) 有效性驗證的體外替代試驗，也是目前為止唯

——一個能精確預測人體試驗結果的皮膚光毒性體外替代試驗。

1998 年根據有效性驗證和紫外線濾過物質的測試結果，化妝品和非食品科學委員會(the Scientific Committee on Cosmetic and Non-Food Products, SCCNFP)認同 3T3 NRU PT 試驗是一項非常有效的試驗方法，可成為化妝品原料或終產品光毒安全性測試的標準方法。ESAC 再次確認 3T3 NRU PT 試驗方法不僅為歐盟成員國用於評價化學品光毒性的體外試驗，而且成為世界範圍內的化學品、藥品和化妝品工業試驗室的常規光毒性檢測方法，幾乎可完全替代動物的光毒性試驗。2000 年 3T3 NRU PT 試驗寫入“分類和標記有害物質的指令(67/548/EEC)附錄 II”中，作為歐盟委員會推薦的評價光毒性的體外試驗方法。2002 年 3 月經濟合作與發展組織(the Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)正式發布該項試驗的操作指南，做為動物光毒性試驗的正式替代試驗。

- (2) 人重組皮膚模型(human reconstitution dermal model)：自 1994 年第一例人完全三維皮膚模型 Skin^{2TM} 用於光毒性試驗以來，已有多種人類重組皮膚模型用於皮膚光毒性體外替代試驗的研究。1997 年 Augustin C 發現人角質形成細胞和人成纖維細胞均可用於光毒性篩選試驗，同年人體皮膚光毒性試驗的數據和預測模型從完全三維皮膚模型 Skin^{2TM} 轉向表皮模型 EpiDermTM 和 SKINETHICTM。人重組皮膚模型 SKINETHICTM 和 EpiDermTM 還可以檢測出具有弱光毒性的化學物質。重組人體皮膚模型主要有三種類型：皮膚模型（含皮膚成纖維細胞層）、表皮模型（含皮膚角質形成細胞層和成纖維細胞層）和全皮膚模型（含成纖維細胞層、角質形成細胞層和角質層）。後兩者因為含有存活的原代皮膚細胞和皮膚屏障，即稱為三維皮膚模型。目前常用的人重組皮膚模型有 MatTek 公司的 MatTekTM，SKINETHICTM，EpiDermTM 模型及 CellSystem 公司的 CellSystemTM 模型。

人重組皮膚模型與其他細胞株相比，最顯著的優點是該皮膚模型是由多層皮膚細胞組成，能較真實地模擬化學物質作用於人類皮膚的方式，亦可模擬化學物質分子與皮膚接觸後的吸收和滲透，提供更相關的數據，由於暴露光線的光譜與真實環境相似，體外試驗結果與動物試驗結果相關性好，

因此可靠性高。儘管人重組皮膚模型有一定的優點，但是，與 3T3 NRU PT 試驗相比，三維皮膚模型由建立的細胞膜型數量和種類有限，且價格昂貴(每個樣本約 25~90 歐元)，因而並不適用於常規檢測。

- (3) 人角質形成細胞試驗(the human keratinocytes assay)：人角質形成細胞試驗是運用弧燈作為光源，在暴露和不暴露於 UVB 條件下，用螢光測試人角質形成細胞與化學物接觸後的毒性效應。人角質形成細胞(無論是原代培養還是永久細胞株)對光的毒性反應敏感度要低於成纖維細胞(如 3T3 細胞)，它主要用於建立器官模型或對某一器官或某一特定的目的進行研究。
- (4) 肝細胞試驗(the hepatocytes assay)：較易獲得單一同源細胞株的肝細胞試驗由於能定量檢測藥物代謝動力學，在生化、毒理學等研究領域內應用廣泛。研究發現，當肝細胞與化學物質接觸後，在 400W 汞燈照射下，可用 473473 藍(MTT)法、乳酸脫氫酶法等多個參數評價化學物的光細胞毒性。ColombainM 認為肝纖維細胞用於光毒性試驗檢測易行且敏感。但由於肝細胞的分離、保存技術尚不完善，其活性在培養液中隨培養的時間延長進行性下降，因而不適合於體外篩選試驗；目前多用於光生物轉運、光生物動力學等光毒效應的代謝機制研究。

2. 機制評價試驗

- (1) 光-紅細胞聯合試驗 (the combined Photo-RBC test)：進入紅細胞內的光敏物質接觸到光線後，可促使細胞膜陽離子流出，膜脂質過氧化，膜蛋白交聯，細胞腫脹、破裂至溶血，造成“光動力學反應”。同時，導致甲基化血紅蛋白形成，產生自由基。

光-紅細胞聯合試驗包括光溶血和血紅蛋白光氧化兩個試驗。光溶血試驗(photohaemolysis test)用於檢測光敏物質誘導細胞溶血導致的光動力學反應；血紅蛋白光氧化試驗(hemoglobin photooxidation test)用於檢測甲基化血紅蛋白的形成，以判斷外來化學物質特別是光毒物質對氧化血紅蛋白的光毒效應。

光-紅細胞-血紅蛋白聯合試驗的準確性和敏感性較好，陽性預測率較高，重現性較好，該試驗能區分光毒物質和非光毒物質；但其陰性預測率低，假陰性較多。該試驗方法除用於篩選試驗外，由於紅細胞對太陽光中的波長 UVB 部分有較強耐受性，需較長時間暴露於完全太陽光譜下；亦可進行光

敏物質對生物膜和血紅蛋白光動力學反應的機制研究(甲基化血紅蛋白形成表明 I 型反應，紅細胞溶血效應提示 II 型反應)；但不能檢測到 DNA 的損傷。

- (2) 酵母菌試驗(the yeast assay): 厭氧酵母菌增殖率試驗是基於化學物與機體的細胞、器官或 DNA 的光動力學反應，通過測量與化學物質接觸 24hr 後的細胞增殖率來評價光照下化學物質對細胞生理狀態的總體影響。與其他體外光毒性試驗比較，它是一個相對簡單而且經濟的方法，可以快速高效地檢測化學物質的光毒性。

由於厭氧啤酒酵母菌對水溶性物質、油膏甚至在氧壓極低的情況下(如油或膏體物中)對太陽光或藥物敏感性相對較低，可長時間暴露於 UVA、UVB 或陽光輻射下；而哺乳動物細胞和細菌在光毒測試中對紫外線特別是 UVB 過於敏感，因而厭氧酵母菌增殖率試驗常用於測試化學物、水溶性或油溶性化合物的光毒性、光基因毒性及光遺傳毒性；評價光暴露和受試化學物濃度的相關性、劑量-反應關係及與臨床用藥相似濃度的化學物質的光毒性和光遺傳毒性。厭氧酵母菌還可通過 DNA 修復-缺失株的比較和 DNA 修復-競爭株的反應判斷 DNA 損傷，甚至可評價光遺傳毒性及光誘導的細胞死亡的特殊機制。但由於該方法的敏感性不強，並且在組織培養過程中易造成污染，因此，大多數情況下不作為機制評價試驗和篩選試驗研究。酵母菌試驗的陽性預測率高，而且與體內試驗結果有高度相關性，Sugiyama M 等建議將厭氧酵母菌增殖率試驗、光-紅細胞-血紅蛋白聯合試驗、3T3 NRU PT 試驗等幾種不同類型試驗結合起來用於安全性評價，並認為厭氧酵母菌增殖率試驗和光-紅細胞-血紅蛋白聯合試驗兩者結合是評價光毒性最有效的試驗組合。

- (3) 組氨酸光氧化試驗 (Hisidine Photooxidation test): 組氨酸光氧化試驗主要用於水溶性藥劑和化妝品光毒性檢測，屬機制研究試驗。在大多數情況下，組氨酸可能經過單線態氧與外源化學物質反應，主要用於檢測化學物質單線態氧化途徑。
- (4) 其他：如人淋巴細胞、Jurkat 人淋巴瘤細胞、SOLATEX-PT™ 方法和亞麻酸(Linoleic acid)過氧化反應等方法還需進一步研究。

皮膚變態反應體外試驗

一、概念

皮膚變態反應(變態反應性接觸性皮炎) (Skin sensitization, Allergic contact dermatitis, ACD)是皮膚對一種物質產生的免疫源性皮膚反應。在人類這種反應可能以搔癢、紅斑、丘疹、水疱、融合水疱為特徵。動物的反應主要是皮膚紅斑和水腫。

誘導接觸(Induction exposure)指機體通過接觸受試物而誘導出敏感狀態的試驗性暴露。

誘導階段(Induction period)指機體通過接觸受試物而誘導出致敏狀態所需的時間，一般至少一周。

激發接觸(Challenge exposure)機體接受誘導暴露後，再次接觸受試物的試驗性暴露，以確定皮膚是否會出現變態反應。

二、傳統動物試驗的優缺點

最常用的檢測化學物質皮膚變態反應的試驗方法為局部封閉塗皮法(Buehler test, BT)和豚鼠最大值法 (Guinea Pig Maximization Test, GPMT)。將受試物多次塗抹 (GPMT 法採用皮內注射) 於豚鼠皮膚上 (內)，10~14 天後，給予激發劑量的受試物，觀察和比較實驗動物和陽性對照動物對激發接觸受試物的皮膚反應強度。豚鼠或鼠類的皮膚解剖學和細胞組成與人類存在種屬差異。實驗動物在進行致敏試驗前需要先脫毛，如果皮膚與受試物接觸前已有損傷或皮膚駐社區出現輕微刺激性可使微小致敏反應放大；由於試驗中使用的致敏原劑量比人體實際接觸劑量高，引起豚鼠強烈變態反應的物質再人群中也可能引起一定程度的變態反應。有關動物試驗中所需的受試物劑量和受試物刺激的週期，國際上有 15 種試驗程序，無統一規範，使得皮膚變態反應結果外推到人是有限的。

三、體外試驗方法的有效性驗證

近年發展起來的鼠類局部淋巴結試驗 (Murine local lymph node assay, LLNA)是皮膚變態反應替代試驗方法研究的一次飛越，該方法是對小鼠耳朵進行致敏，然後取耳淋巴結，採用細胞學指標觀察淋巴細胞增殖情況。與 BT 和 GPMT 比較，LLNA 體現了優化、減少原則，觀察指標更客觀，但它仍屬於動物試驗範疇。

由於變態反應性接觸性皮炎的機理尚未闡明，至今仍無可行的體外試驗方法進入有效性驗證，科學家們正從化學物質引起皮膚變態反應的免疫學基礎著手，致力於尋找敏感指標的實驗研究。已進行的研究包括：化學物質的結構-活性關係、細胞生物學系統如角質形成細胞的培養、樹突狀細胞/朗罕氏細胞的體外培養和器官培養 (如皮膚外植株的培養、模擬人皮膚的培養) 等。由於有些致敏物同時具有刺激性，再用細胞生物學和器官培養

方法進行研究的同時，用刺激物進行對照試驗，觀察二者引起細胞、分子學的反應差異，以區別兩種不同機理的毒性反應。

(一) 變態反應性接觸性皮炎的機理

變態反應性接觸性皮炎 (ACD)：指皮膚接觸和滲透小分子化學物質引起細胞介導的免疫反應，反應過程分為兩個不同的階段，第一階段為誘導階段，化學物質滲入有活性的表皮層和細胞中成為半抗原，與載體蛋白或肽結合形成完全抗原，半抗原修飾的蛋白質/肽激活表皮內的朗罕氏細胞(LC)，亦稱抗原呈遞淋巴細胞(APC)，活化的 LC 經淋巴腺遷移到淋巴結，在淋巴結裡將抗原呈遞給 T 細胞成為記憶細胞，遍及全身(包括滲入全身皮膚)起“哨兵”作用。第二階段為激發階段，當記憶 T 細胞再次接觸相同化學物質，誘導型成抗原，激活生成各種前炎症細胞因子，觸發炎症反應。

化學物質的變應原性(或致敏性)與否取決於其物理化學性質。相對分子質量 ≤ 1000 的化學物質能通過角質層滲入皮膚真皮層；親脂性化學物質進入皮膚必需能與蛋白質結合。半抗原/蛋白質被 LC 捕獲和處理，與 MHC (Major histocompatibility complex) 抗原連接，在 LC 表面表達，被 T 細胞識別。

(二) 皮膚變態體外試驗研究策略

1. 已有資料表明某化學物質具有致敏性，可進行分級和標識，不需做進一步的測試。
2. 使用計算機定量構效關係 (QSAR) 模型，評估化學物質結合蛋白質的能力，鑑別化學物質的分子結構，預測化學物質的致敏性。
3. 根據 OECD 化學物質試驗方法指南方法進行皮膚吸收試驗或體外皮膚滲透試驗，判斷化學物質是否能夠通過皮膚屏障；利用新鮮皮片檢測化學物質在皮膚內的新陳代謝率，以確定該化學物質是否在體內轉化成致敏原。
4. 如果化學物質或其代謝物具有與致敏原相似的分子結構，並能透過皮膚，則可認為具有致敏性。根據體外蛋白質結合試驗判定化學物質與蛋白質的結合能力，試驗結果為陰性的物質可認為無致敏性。
5. 用志願者進行皮膚斑貼試驗，評價非蛋白結合物的致敏性。
6. 採用角質形成細胞、樹突細胞/朗罕氏細胞等體外培養系統，對化學物質的致敏性進行評價、分級和標識。

(三) 皮膚變態反應的體外試驗

1. 角質形成細胞培養系統

表皮中超過 90% 的細胞是角質形成細胞 (Keratinocytes, KC)，滲入角質層的化學物質首先接觸 KC，KC 能產生和分泌前炎症細胞因子、趨化性細胞因子和生長因子，從而引發免疫介導的皮膚疾病如變態反應性接觸性皮炎 (ACD)。用化學物質刺激人的 KC、人的新生包皮 KC 或鼠源 KC 系 (HEL30)，通過檢測細胞間的和分泌的細胞因子所產生的效應，判斷受試物是否為致敏原。目前能檢測出 KC 分泌的細胞因子有 IL-8、IL-1 α 或 IL-1 α mRNA。

研究發現，受試物與培養的 Balb/c 小鼠表皮 KC 或人的 KC 接觸後，通過細胞表面抗原 CD40 或 CD80 表達的變化，可判斷受試物是否為致敏原或刺激物。

KC 培養相對容易，測試簡單，在預測化學物致敏性的體外試驗方法中應用較多。KC 對化學刺激物的刺激反應只是發送信號，激活 T 細胞介導的炎症反應，因而認為 KC 對化學物質的毒性侵食並非真正的“免疫”反應，不具有區分致敏源和刺激物的能力。

2. 朗罕氏細胞培養系統

朗罕氏細胞(Langerhans cell, LC)是公認的皮膚抗原呈遞細胞(antigen-presenting cell,APC)，它在接觸性致敏反應中起關鍵的作用。目前，有關 LC 的體外試驗研究多集中於將 LC 培養系統暴露於過敏原和刺激物後所引起的表面標記物變化(樹突細胞特徵性表面標記物 33D1)、胞吞作用(APC 表面 MHC II 類分子變化)、酪氨酸磷酸化、和 LC 遷移等反應。

LC 在所有的表面細胞中僅佔 1%~3%。從人或鼠類中分離、純化的 LC 群數目相當低，至今尚未建成一個穩定、長期的 LC 系。因此不能獲得足夠數量的 LC 細胞，制約了以 LC 為基礎的體外方法的發展。近年來，從新生的 BALB/c 小鼠的表皮中生成一種 LC 樣鼠細胞系(XS52)，在形態學、表型和功能方面具有新鮮離體 LC 的特徵。XS52 細胞系與 LC 在細胞因子、細胞因子受體 Mrna 方面相似，可考慮作為變態反應試驗的體外試驗方法。

3. 外周血樹突狀細胞培養系統

外周血分離的樹突狀細胞 (Dendritic cell, DC) 是具有獨特形態學特徵的白細胞，能通過處理和呈遞抗原啟動免疫反應。

LC 是未成熟 DC 的一種 DC 與化學物質接觸後，通過檢測其表型變化、胞吞作用、細胞因子的生成及 DC 活化的應激反應，區別致敏物和刺激物。

由於用骨髓和臍帶血在體外生產 DC 較難，1990 年，研究發現用顆粒細胞 - 吞噬細胞 - 克隆刺激因子 (Granulocyte-macrophage-colonystimulating factor, GM-CSF) 在加或不加其他細胞因子(主要是 TNF α)可刺激外周血產生 DC。外周血單核細胞製備的 DC 形態學和表面標誌與骨髓細胞製備的 DC 一致，並能刺激初級同種異型混合淋巴細胞反應。採用外周血培養方法可獲得充足數量的 DC，為研究變態反應性接觸性皮炎的機制提供了條件。以 DC 為基礎的方法，可用於進一步探索建立化學物潛在皮膚變態反應體外試驗方法。

4. 協同培養系統

LC 和 T 細胞間的相互作用能誘導皮膚接觸性變態反應，協同培養系統是包含抗原提呈細胞(APC)和反應性 T 細胞的培養系統，可作為預測致敏性和探索致敏機制的體外試驗方法。

LC 是皮膚裡主要的 APC，需要獲取充足數量的 APC 才能在培養中刺激 T 細胞反應。由外周血製備的自體 DC 也可誘導初始 T 細胞。當反應細胞與刺激細胞的比例(R:S)平均為 5:1 時，能誘導體外 T 細胞處於致敏狀態；R:S 為 100:1 時，APC 提呈半抗原對初始 T 細胞的機活效率可達到相當高的水平。

另一種協同培養系統是用半抗原結合 Pam212 細胞(一種鼠角質形成細胞系)激活來源於非致敏小鼠的 T 細胞，用於評價受試物的致敏性。研究表明，該系統與豚鼠最大值法的相關性好。由於 Pam212 細胞取自小鼠，儘管需要的動物數量少(4 隻小鼠可測 13 個化學物的致敏性)，相對於 APC 協同培養系統，半抗原結合 Pam212 細胞培養系統不是一個完全的非動物替代方法。

5. 人重組皮膚/表皮培養系統

人類三維皮膚體外培養分為兩類：重組表皮或重組皮膚。重組表皮含角質形成細胞，培養在氣-液界面的濾器或基質上，發育成具有完整角質層的表皮。如 IMEDEX 公司的 EpiskinTM 等幾種商業重組表皮。重組皮膚含表皮和類真皮層，如 MatTek 公司的 EpiDermTM 和 Skinethic 公司的 Epidermis 重組皮膚。

由於表皮重組或重組皮膚的結構類似人體皮膚，與致敏原接觸後，細胞因子的釋放量與細胞因子 mRNA 表達的改變與化學物自身和化學物濃度、作用時間有關，有不少實驗室試圖通

過檢測重組表皮或重組皮膚模型的細胞因子進行皮膚變態反應的研究。

三維模型與單層培養細胞相比有幾個優勢，含有已分化的角質層和一個氣-液界面（有助於非水溶性相容的測試材料的使用），但缺乏在活體誘導和激發接觸性致敏的免疫細胞。Regnier 等和 Fransson 等介紹在重組皮膚中加入 LC 共同培養的方法。上述研究有可能開發出含有功能性免疫細胞的三維皮膚模型，但這些培養系統尚需標準化。

6. 人類皮膚外植培養

皮膚外植培養是利用從手術中獲取的，具有完整結構的胸腹部人類皮膚樣本，進行培養。與重組皮膚相比，外植培養除含有角質性成細胞和成纖維細胞外，還含有免疫系統的細胞如 LC 以及其他細胞（黑色素細胞和內皮細胞）。

檢測化學物與皮膚外植接觸後細胞表面因子和細胞因子表達的改變，可以判斷化學物質的致敏性。由於外植培養在培養過程中能夠維持它的結構和駐留的細胞群，因此外植的培養更能代表活體皮膚；但它在體外維持時間很短。如果培養時間過長，細胞（如 LC）會遷移出皮膚或離開皮膚生長。此外，進行試驗時還需考慮外植與外植之間、個體與個體之間存在的差異。

捌之四、歐盟化妝品安全性評價指南

“歐盟化妝品規程”明確規定：化妝品在正常和合理可預見的使用條件下，不得對人體健康造成損害，因而從法規的角度確保化妝品的安全使用。一般而言，化妝品很少引起嚴重健康問題，但是這並不意味著化妝品是絕對安全的。由於化妝品使用人群廣泛，而且終生的大部分時間都要使用，因此，不僅對化妝品局部使用的安全性，而且對其長期使用的安全性更應予以關注。化妝品成分及其終產品的安全性評價是保證化妝品的關鍵措施和核心內容。為使國內從事化妝品生產、開發、檢驗、監督管理的廣大同行了解化妝品檢驗及安全評價的方法，現依據歐盟(SCCNFP)發表的“化妝品成分安全性評價測試指南”的主要內容敘述如下。

第一節 概述

一、歐盟化妝品和非食品科學委員會(SCCNFP)簡介

根據歐盟委員會的決定(78/45/EEC)，化妝品科學委員會(SCC)建立於1997年12月19日，其宗旨是幫助歐盟委員會在建立和修改法規時解決複雜的科學和技術問題，這些法規涉及在歐盟成員國市場上銷售的化妝品的成分、生產、包裝和標鑒標識，該委員會每三年換屆一次。1997年根據歐

盟委員會的決定 (97/579/EC)，重新組建了一個科學委員會，即化妝品和非食品科學委員會 (SCCNFP、Scientific Committee on Cosmetic Product and Non-Food Product intended for Consumers)，該委員會是由醫學、毒理學、藥學、皮膚病學、生理學、化學和其他專業的獨立科學家組成的，在這個多科學的委員會中包括了儘可能廣泛的專家。該委員會負責回答與使用化妝品和非食用消費品有關健康的科學和技術問題，其主要工作包括二大方面，即化妝品和與非食用消費品有關的產品。SCC 及現在的 SCCNFP 已經建議了一系列的“化妝品成分安全性評價測試指南”，該指南定期更新，不斷把新的知識和科學進展收錄其中。

二、SCCNFP 對化妝品安全性評價的主要工作

(一) 安全性評價測試指南

原 SCC 和現在的 SCCNFP 建議了一系列化妝品安全性評價測試指南，已被正式接受的有下列指南。

1. 化妝品成分毒性試驗指南 (1982 年 6 月 28 日，歐盟報告 8794)。
2. 化妝品成分安全性評價試驗指南 (第一次修訂版)。
3. 化妝品成分安全性評價試驗指南 (第二次修訂版)。
4. 化妝品成分安全性評價試驗指南 (第三次修訂版)。
5. 化妝品成分安全性評價試驗指南 (第四次修訂版)。
6. 化妝品成分安全性評價試驗指南 (第五次修訂版)。

(二) 對歐盟“化妝品規程”中規定原料的評價

自 1997 年以來，SCCNFP 已經對 350 多種化學物質和/或其混合物進行了評價，提出了評價意見，大多數意見已被“化妝品規程”採納，並用於危險性管理。目前，在“化妝品規程”中的附錄 II，III，IV，VI，VII，即對原料的規定就體現了 SCCNFP 的評價意見。

(三) 對化妝品安全性評價的其他問題

SCCNFP 對化妝品安全性評價意見包括了諸多方面，主要評價意見分述如下。

1. 化妝品人體試驗指南

- (1) 化妝品志願者測試化妝品成分及其混合物潛在皮膚刺激性試驗指南。
- (2) 測試化妝品終產品相溶性人體志願者試驗指南。
- (3) 關於化妝品成分及其混合物潛在致敏性預測試驗的意見。
- (4) 關於測試潛在皮膚刺激性化妝品成分及其混合物相溶性人體志願者試驗方案基準的意見。

2. 化妝品安全性評價中替代試驗的應用

- (1) 關於化妝品成分及其混合物安全性評價中動物替代試驗的應

用。

(2)關於化妝品成分安全性試驗中動物替代試驗現狀備忘錄。

3. 與化妝品成份有關的瘋牛病問題

4. 在化妝品中的致癌性/致突變性/生殖毒性物質關於根據化學品規程(67/548/EEC)分類屬於致癌物、致突變物或生殖毒物的化妝品成分的意見。

5. 染髮劑及其安全性評價

(1)關於可預見的染髮劑使用的意見。

(2)關於永久性染髮劑的使用與膀胱癌危險性的意見。

(3)關於在化妝品中某些偶氮染料安全的總是意見。

(4)對染髮劑評價策略的討論。

(5)測試染髮劑成分潛在遺傳毒性/致突變性方案的建議。

(6)關於對“化妝品規程”附件Ⅲ中染髮劑再評價的意見。

(7)測試染髮劑的潛在遺傳毒性/致突變性/致癌性更新方案的建議。

6. UV 吸收劑及其可能的雌激素 (estrogenic) 作用、關於評價 UV 吸收劑潛在雌激素作用的意見。

7. 化妝品成份目錄

(1)化妝品成份目錄狀況報告。

(2)關於植物擬 INCI (pseudo-INCI) 名現狀的說明文件。

(3)化妝品成份目錄第一次修訂本 (第一部分)。

(4)化妝品成份目錄第一次修訂本 (第二部份)(香料和芳香料)。

8. 嬰兒及兒童安全係數計算

計算兒童化妝品成分安全係數的說明

9. 化妝品香料的過敏問題

(1)關於消費者中香料過敏問題的意見：關於過敏問題及消費者信息和過敏分析的綜述。

(2)關於禁用香料清單 (除外屬於限用條件的香料) 的意見。

(3)SCCNFP 關於消費者香料過敏的意見備忘錄。

(4)關於在洗滌劑和其他家用化學品中香料的說明。

10. 化妝品中宣稱低過敏的問題

關於化妝品中宣稱低過敏的意見。

三、SCCNFP 評價報告中的標準格式

SCCNFP 發表了一系列對化妝品成分的評價報告，其報告須按照下列標準格式編輯。

(一) 概述

1. 問題的內容。
2. 要求 SCCNFP 評價的問題。SCCNFP 需回答下述問題。
 - (1) 被評價的原料在化妝品中的使用是否安全？
 - (2) SCCNFP 對被評價成分在化妝品中使用的限制或使用條件的建議。
3. 毒理學評價的聲明

(二) 化學和物理學特性

1. 化學特性。
 - (1) 原名稱和/或 INCI 名稱。
 - (2) 化學名稱。
 - (3) 商品名稱和縮寫。
 - (4) CAS 號。
 - (5) 結構式。
 - (6) 經驗是。
2. 物理學性狀。
3. 分子量。
4. 純度、組成和物質編碼。
5. 雜質/污染物。
6. 溶解度。
7. 分配係數。
8. 其他物理和化學特性。
 - (1) 感官性狀〔色、臭、味(如果有)〕。
 - (2) 閃點。
 - (3) 蒸氣壓。
 - (4) 沸點。
 - (5) 熔點。
 - (6) 密度。
 - (7) 黏度。
 - (8) pKa。
 - (9) 紫外線吸收光譜。

(三) 功能和用途

(四) 毒理學評價

1. 急性毒性。
 - (1) 急性經口毒性。
 - (2) 急性經皮毒性。

- (3) 急性吸入毒性。
 - 2. 刺激性和腐蝕性。
 - (1) 皮膚刺激性。
 - (2) 黏膜刺激性。
 - 3. 皮膚致敏性。
 - 4. 經皮吸收。
 - 5. 多次染毒毒性。
 - (1) 多次 (28 天) 經口/經皮/吸入毒性。
 - (2) 亞慢性 (90 天) 經口/經皮/吸入毒性。
 - (3) 慢性 (>12 個月) 毒性。
 - 6. 致突變性/基因毒性。
 - 7. 致癌性。
 - 8. 生殖毒性。
 - (1) 兩代繁殖毒性。
 - (2) 致畸性。
 - 9. 毒帶動力學。
 - 10. 光毒性。
 - (1) 光毒性/光刺激性和光致敏性。
 - (2) 光毒性/光致突變性/光致染色體斷裂性。
 - 11. 人體資料。
 - 12. 特殊研究。
 - 13. 安全性評價 (包括安全係數的計算)。
 - 14. 結論。
 - 15. 參考文獻。
- (五) SCCNFP 的評價意見
- (六) 其他考慮 (如果有)
- (七) 少數人意見 (如果有)

第二節 化妝品組成成分的安全性評價

在歐盟，化妝品生產商、首家進口商或銷售商對化妝品的安全性負全部責任。化妝品安全性的基礎是組成成分的安全性，後者通過毒理學試驗來評價的。使用現有的精確證的用於化妝品終產品及其組成成分的毒理學動物試驗替代方法是強制性的，而且 Dir 2003/15/EC 設定了動物試驗的最後期限。儘管有成千上萬的化妝品在歐盟上市，但均源於少數的組成成分。因此，毒理試驗集中於這些組成成分，特別是哪些用於與生物基直反應的，因而也是對人體健康最受關注的。“化妝品規程” (Dir 76/768/EEC) 中附件

III、IV、VI、VIII中列出的現行許可使用的限用物質、著色劑、防腐劑、紫外線吸收劑的組成成分清單就基於此。為了滿足保費消費者健康的需求，“化妝品規程”(Dir 76/768/EEC) 第 4 條及其修正版指出：化妝品中禁用 Dir 67/548/EEC 附件 I 中分類為 1、2、3 的致癌、致突變、有生殖毒性的物質。分類 3 中某些經 SCCNFP 評價並認為可用於化妝品的物質方可用於化妝品。

一、SCCNFP 採用的化妝品組成成分安全性評價步驟

一般來說，SCCNFP 對化妝品組成成分的安全性評價是根據通常用於醫藥、農藥、食品添加劑組成成分的危險性評價過程的規範 (WHO2001，歐洲委員會 2000) 來進行的。危險性評價過程分為以下 4 部份。

1. 危害識別：根據體內試驗、體外試驗、臨床研究、事故、人類流行病學研究、定量構效關係 (可能的話) 的結果來確定。對物質分子內在的理化和毒理學性質進行研究，以確定該物質是否對人體健康存在潛在的危險。
2. 劑量反應評價：研究毒理學反應與暴露間的關係。存在閾值的情況下，確定“未觀察到有害作用的劑量水平 (NOAEL)”。至於無定值的致癌劑，可確定劑量描述參數 (如 T_{25})。
3. 暴露評價：確定人體暴露於該化合物的量及頻度 (包括可能的高危人群，如兒童、孕婦等)。
4. 危險特性：檢查受試分子危及人體健康的概率及範圍。

$MoS = NOAEL / SED$ MoS 代表安全係數， $NOAEL$ 代表未觀察到有害作用的劑量水平， SED 代表全身暴露量。

對於沒有閾作用的物質 (如無閾值的致癌劑)，用劑量描述性來確定終生危險性，即計算每天給予受試物後特定部位腫瘤的淨增加一定百分率 (T_{25}) 的劑量，如 (mg/kg 體重)/d，[Dybing et al. 1997]

二、化妝品組成成分安全性評價所需的物理特性和毒理學資料

(一) 理化特性

由於組成成分的理化性質可預測其毒理學性質，故被稱為是關鍵信息。如小分子疏水化合物比大分子親水化合物更易透過皮膚，揮發性強的化合物塗抹於皮膚可致明顯的吸入暴露。理化性質也與組成成分的物理性危害 (如爆炸、可燃) 相一致。此外，一些構效關係 (QASR) 程序和經驗模型也用理化性質的數值來輸入。

根據 SCCNFP 對評價用毒理學資料的基本要求的意見 [SCCNFP/0633/02]，任何組成成分的理化特性的信息至少應包括如下幾點。

1. 化學特性

應確證組成成分的確切化學本質和結構式，提供化學物的化學文摘編錄 (CAS) 號、化妝品組成成分國際命名 (INCI) 名稱、

歐洲現有商用化學物總匯 (EINECS) 中的編號。1981 年 9 月 18 日後投放歐盟市場的化學物質沒有歐洲現有商用化學物總匯 (EINECS) 編號，但需向生產地或進口所在成員國的主管部門提出申報 [Dir 67/548/EEC 是 Dir 92/32/EC 的第 7 次修訂]。接到這項申報後，主管部門根據委員會 Dir. 93/67/EC 的原則進行該物質對人及環境的危險性評估。新的物質將收錄於歐洲申報化學物質清單 (ELINCS 數據庫)，新物質的 ELINCS 編號必須在呈交進行安全性評價的資料文件中標明。

對於無法確定結構式的組成成分，應提供有關製備方法（包括所有物理、化學、酶學、生物技術、微生物方法）及製備過程所用材料的足夠信息以評價該化合物的可能結構和活性。對於天然的組成成分（提取物），應提供原料來源（植物的部位）、提取方法即採用的純化步驟的詳盡信息。對於用作原料的製劑，所有物質需給出定性和定量的配方，包括主要成分、防腐劑、抗氧化劑、螯合物、緩衝劑、溶劑、其他添加物及額外的外部污染。

當用一物質的鹽或酯作為化妝品組成成分時，應在資料中清楚地指出來。應提供特定的鹽或酯的理化性質。用於安全性評價的毒理學研究也需用同樣的特定的物質。若有偏差，應說明理由。

(1) 物理形態

應給出物理形態的描述：粉末、膏、膠、液體等。

(2) 分子量

應給出每一物質的分子量，以道爾頓表示。對於製劑，應該出每一組分的分子量。

(3) 化學物的純度

應明確化學物的純度，應顯示所有分析方法的有效性。資料文件中提到的理化試驗、毒性試驗所用的物質需能代表上市產品出現的物質。

(4) 雜質或伴隨污染物的特徵

除了物質的純度需考慮之外，也應指出可能出現的有意義雜質的本質鑑別及其濃度。雜質本質的微小變化可改變物質的毒性。一般來說，某一特定物質的安全性研究結果僅與該物質在應用時其固有的純度和製劑方式有關。在有不同純度的不同批次的物質上進行的試驗的科學有效性是受到質疑的。因此，生產商應確保在有代表性上市物質和用於進行理化研究和危害性鑑別的樣本中不含其他雜質，也不增加化學上和技術上不可避免的雜質量（可影響成品的安全性）。

(5) 溶解性

應給出組成成分在水和/或其他相關有機溶劑的溶解性 [EC A.6]，以__°C 溫度時 g/L 表示。一些物質微溶或不溶於水性介質。

(6) 分配係數 ($\log P_{ow}$)

應給出在__°C 溫度時 n-辛醇/水的分配係數 [EC A.8]。若是一個計算值，應指出具體的方法。

(7) 其他相關的理化特性

一份典型的理化性質的資料如下。

- 物理狀態 (固體、液體、氣體)。
- 感官性狀 (顏色、氣味、味道)。
- 水溶性 [EC A.6] 及相關有機溶劑的溶解性 (在__°C 時)。
- 分配係數 [EC A.8] (在__°C 時 $\log P_{ow}$) (可行的話)。
- 閃點 [EC A.9]。
- 基於物理狀態的物理性質如下。
 - A. 液體。沸點 [EC A.2]，密度 [EC A.3] (在__°C 時)，pKa (在__°C 時)，黏度 (在__°C 時)，蒸氣壓 [EC A.4] (在__°C 時)。
 - B. 固體。一般外觀 (晶型、無定型的)，熔點 [EC A.1]，pKa (在__°C 時的%)。
 - C. 氣體。密度 [EC A.3] (在__°C 時)，燃點 [EC A.15]。
- 對於紫外線光吸收的組成成分，應包括化合物的紫外線吸收光譜。

(二) 化妝品組成成分的相關毒性研究。

根據一系列的毒性試驗和危害性鑑別形式來判定化妝品組成成分的毒性強度。危害性鑑別是整個安全性評價的第一步。

目前，與其他化學物質一樣，這些毒理學研究的大部分是使用動物試驗。傳統上，採用與人體同樣的暴露途徑 (局部、經口、吸入) 的受試物對動物的毒理學資料來獲得在人體身上的相關毒理學資料。

單次染毒的動物試驗是將高濃度的受試物給予動物以獲得半數致死量 (LD_{50})，以作為危險物質分級的基礎 [2001/59/EEC]。重複染毒毒性試驗，通常是採用較低濃度、每天染毒、暴露，持續一段時間 (如 28 天、90 天或 24 個月)，以找出用於計算安全係數 (MoS) 的未觀察到有害作用的劑量水平 (NOAEL)。這些研究同時也應得出靶器官及作用機制等。致癌試驗通常用小鼠和大鼠進行 18~24 個

月。除了少用一些動物、少讓動物受苦或不用動物 (3R 策略: 優化、減少、替代), 歐盟的科學目的之一是開發和驗證能提供與現行動物試驗囊等同的信息的替代方法。對於化妝品組成成分, 除了精確證的替代試驗方法, SCCNFP 也接納了“有效”的方法。即是說, 不需要通過全部的確證過程, 但委員會認為當有充足的相關和可靠的科學數據提供時, 他們可接受這些方法。根據“化妝品規程”的第 6 修正版 [93/38/EEC] 的要求, 對人體健康的安全性評價必須遵循 Council Directive 87/18/EEC 制定的 GLP 規範。對這些原則的所有可能的偏差均需做出解釋和科學的判定 [SCCNFP/0633/02]。

現行的動物試驗和/或替代試驗。每一個方法均可參考 Dir. 67/548/EC B 部分附錄 V 中的參考號和經濟合作組織 (OECD) 指南的參考號。

1. 急性毒性

“急性毒性”是用於描述受試物經口、經皮或經吸入途徑一次暴露後對健康造成的不良作用 [ECB 2003]。

體內急性經口毒性試驗是用於判定在試驗條件下受試物的半數致死量 (LD_{50})。在危險性物質法規中, LD_{50} 是用於化合物的分級 [2001/59/EC]。

原有試驗方法 [EC B.1, OECD 401] (試驗分 3~5 組, 每組 5~10 個動物) 已被棄用 [2001/59/EC], 並被以下替代試驗方法所取代。

- (1) 固定劑量法 [EC B. 1 bis, OECD 420] 不用死亡作為終點, 並不可造成動物死亡、明顯痛苦, 因此是 EC B.1/OECD 420 有用的有話替代方法。
- (2) 急性毒性經典方法 [EC B.1 tris, OECD423] 的目的不在於計算精確的 LD_{50} , 而在於確定引起死亡的一個暴露劑量範圍。該試驗需經一複雜的逐步劑量方案, 也可能需比 EC B.1/OECD 401 和 EC B.1 bis, OECD 420 方法花更長的時間。不管怎恙, 在明顯減少使用動物的數目上也是一個大的和重要的進步。
- (3) 上下法 [OECD 425] 的目的是得出 LD_{50} 及其可信限的近似值, 以及對毒性表現的觀察。與 EC B.1/OECD 401 相比, 本指南所用的動物數少得多。

作為遵循 Dir. 67/548/EEC 第 7 版有關危險物質申報、分類、標鑒 [92/32/EEC] 的章節要求的結果, 通常化妝品組成成分的急性毒性資料是可得到的。

2. 刺激性和腐蝕性

(1) 皮膚刺激性和皮膚腐蝕性：現有的皮膚刺激試驗是測試某一物質局部使用後引起紅斑和/或水腫的可能性。至今尚未有精確證的可取代經典的 Draize 整體動物皮膚刺激試驗的替代試驗方法。

有多個體外皮膚刺激是驗正在接受確證，有望能盡快變成可用的。皮膚腐蝕性試驗是測試某一物質再給予 3min~4hr 後對皮膚引起不可逆損傷的可能性，稱為貫穿表皮及真皮的可見壞死。典型的腐蝕性反應是潰瘍、出血、結疤，到了 14 天的觀察期末，因皮膚、禿毛部位和疤痕變白而退色。任何化妝品均不可出現腐蝕性，但在生產出錯或消費者誤用後有可能偶發。另一方面，若某一化妝品組成成分具有內在的腐蝕性質，並不一定不能用於化妝品中，這主要是取決於它在化妝品終產品中的終濃度、“中和”物質的存在、所用的賦形劑、暴露途徑和使用條件等。對於皮膚腐蝕性試驗，實際上有 3 個經確證的替代方法被 Dir 67/548/EEC 的附件 V 所接受。

A. 體外皮膚腐蝕試驗：大鼠皮膚透皮電阻試驗是用離體大鼠皮膚做為試驗系統以及其電阻作為測試終點。

B. EPISKM™ 和 (3) EpiDerm™ 是兩個商業化的人皮膚模型試驗，由重構的人皮等同物組成，用細胞存活性 (MTT 試驗) 作為終點。

C. Corrositex™ 代表的是另一個腐蝕性試驗，用受試物穿透一氫化膠原基質 (生物屏障) 和支撐濾膜。儘管它通過了歐洲替代方法確證中心 (ECVAM) 科學顧問委員會 (ESAC) 的評審，但尚未被歐盟法規所採納。它被認為僅是對於酸性和鹼性物質是有用的 [ESAC 2000]。

對於皮膚刺激性試驗，試驗方案中已包含了一些一般優化的條款。

A. pH 值低於 2.0 或高於 11.5 的物質無需進行該測試，因而有致腐蝕的嫌疑。

B. 在一種替代腐蝕試驗 (Dir 67/548/EEC 的附件 V 所採納的) 中被發現有腐蝕性作用的物質無需進行 Draize 試驗。

(2) 黏膜刺激性：現有的眼刺激試驗是測試某一物質局部使用後引起結膜水腫、分泌物增多和/或紅，虹膜水腫和/或角膜渾濁的可能性。至今尚未有經確證的可取代經典的 Draize 整體動物眼刺激試驗的替代試驗方法。ECVAM 目前正在對替代眼

刺激試驗方法進行確證。由於眼刺激存在多種作用機理，相信需有一套替代試驗方法來測試眼刺激性。

不過，現行試驗方案中已包含一些一般減少的條款。

A.pH 低於 2.0 或高於 11.5 的物質無需進行核試驗。

B.疑有或證實對皮膚有刺激作用的物質無需進行眼刺激試驗。

作為一項“有效”(非正式確証)的替代試驗方法，牛角膜渾濁滲透性試驗 (BCOP 試驗) 已被採納用於中性的有機化學物的試驗。它可提供試驗條件下屠宰場動物 (牛、鵝、兔) 的角膜在受試動物或產品的作用下渾濁和滲透性的定量資料。它比僅能提供主觀記分的離體眼試驗 (牛眼) 更高級。

紅細胞試驗和中性紅攝取試驗對檢測表面活性劑也是有用的。對於酒精和酯，尚未有可用的好方法。最後，Hen's 鵝蛋絨毛膜試驗 (HET-CAM 試驗) 也是一種“有效”的替代試驗方法，常用於化妝品終產品的篩測。它尚未被正式確証，但被歐盟的一些成員國 (如法國) 的法規所採納。

3. 皮膚過敏

皮膚致敏劑是只可引起易感個體產生過敏反應的物質。皮膚暴露於該物質後，可激發過敏性接觸性皮炎為特徵的不良作用。至今尚未有經確證的可用於皮膚過敏的體外試驗方法。有 3 項常用的體內實驗動物試驗方法可用於評價受試物引起皮膚過敏的可能性。

(1)局部淋巴結試驗 (LINA) [OECD Draft Guideline 429] 用近交系小鼠，根據給受試物部位的引流局部淋巴結中淋巴細胞增值的刺激範圍來進行的。這是一項客觀性方法，結果用刺激指數來表示，即受試物組動物引起的刺激與賦形劑對照組動物引起的刺激之比。將溶於合適賦形劑中的受試物塗抹於耳廓背側皮膚，避免使用 Freund's 完全佐劑，後者可作為引起局部皮膚炎症的免疫增強劑。與以下將要介紹的傳統豚鼠模型相比，LLNA 是一項使用小鼠的優化的替代試驗。不過，它尚未被 Dir 67/548/EEC 的附件 V 所採納。

(2)Magmusson Kligman 豚鼠最大值試驗 (GPMT) [EC B.6, OECD406] 是一項佐劑型試驗，通過皮下注射含有或不含 Freund's 完全佐劑的受試物來觀察產生過敏反應的可能性。GPMT 的敏感性被稱為是等同於 LLNA。根據沒有刺激性的

斑貼試驗的激發反應來判定受試物的試驗結果。因此，試驗是模仿在“真正生命”中出現的過敏皮炎。本法可重複激發，交叉反應和研究賦形劑的作用。

(3)Buehler 試驗 [EC B. 6, OECD 406] 是一項僅是局部給予的非佐劑型試驗。方法的敏感性不如 GPMT。若用 Buehler 試驗，應說明其科學合理性。

4. 皮膚/經皮吸收

人體主要是通過皮膚暴露來接觸化妝品組成成分的。化妝品組成成份需穿過多層皮膚細胞層才能到達循環系統（血管和淋巴管），在這裡面角質層是速度決定層。有多個因素在這一過程起關鍵作用，包括化合物的親脂性、局部給予受試物的量及濃度、包扎程度等 [Schaefer et al. 1996]。

可用體內或體外試驗來研究皮膚/經皮吸收。體內皮膚/經皮吸收方法可參見 Draft OECD Guideline 427 以及“進行皮膚吸收試驗的指南草案文件”(Draft Guideline for the conduct of skin absorption studies) [OECD 2000]。OECD Guideline 428 也概述了體外試驗方法，更加詳盡的方法可參見上面提及的 OECD 指南草案文件，兩者可為試驗提供有用的指導。根據 Dir.76/768/EEC[2003/15/EC] 第 7 修正版的內容，從 2009 年 3 月 11 日起，體內試驗禁用於化妝品組成成分的試驗。

多個國際機構均介紹了體內或體外皮膚/經皮吸收試驗方法，由於術語使用廣泛，混淆在所難免。因此，SCCNFP 的指南文件確定了兩個比較重要的術語，用於體外試驗。

- (1)角質層(SC)或皮膚吸收：局部給予受試物後出現或進入角質層的量。這被認為不是全身性的，可不用進行危險性評估。
- (2)皮膚/經皮吸收：經皮給予受試物後存留於其餘皮膚的量（角質層除外），加上穿透皮膚並再接收液中檢測到的受試物量。其總和被認為是全身性的，相當於皮膚的生物利用度。

只要模仿實際使用條件，穿透角質層和進入皮膚深層的局部給予的受試物的量也被 SCCNFP 認為是可用來進行安全評價的相關資料（用於計算安全係數）。除非已經指出與表皮層和/或真皮層有不可逆的結合，不然就可估計出進入循環系統的量。

在 OECD Guideline 428 發表前一年，SCCNFP 採用了一套基本標準用於化妝品組成成分皮膚吸收的體外檢測。OECD 428 從一宏觀觀點出發來關注經皮吸收，注意到體外

試驗以外的體內試驗，且用於農用品、工業化學和化妝品。相反，上述 SCCNFP 基本標準是專注於化妝品組成成分的體外試驗，2003 年 10 月又得到更新，固在進行或擬進行的化妝品皮膚/經皮吸收試驗時應進行諮詢。

所用的受試配方應能合適地代表化妝品終產品。若受試物是用於不同類型的化妝品產品，需在一種以上的配方中進行體外試驗。進而，應選用合適的受試物組成成分濃度，使之接近於（但不低於）可接受的使用濃度。若無法進行合適的皮膚吸收試驗，在計算安全係數 (Mos) 時以皮膚吸收 100% 作為默認值。

5. 重複染毒毒性

重複染毒毒性是指在受動物種屬期望壽命的特定階段每天重複給予或暴露於受試物後所出現的有害的一般毒理學作用（不包括生殖、遺傳毒性和致癌作用）[ECB 2000]。現有的體內重複染毒毒性試驗如下。

- (1) 28 天經口重複染毒毒性試驗；28 天經皮重複染毒毒性試驗；28 天吸入重複染毒毒性試驗。
- (2) 亞慢性經口毒性試驗：齧齒類動物 90 天經口重複染毒毒性試驗；非齧齒類動物 90 天經口重複染毒毒性試驗；亞慢性經皮毒性試驗，齧齒類動物 90 天經皮重複染毒毒性試驗；非齧齒類動物 90 天經皮重複染毒毒性試驗。
- (3) 慢性毒性試驗；28 天和 90 天齧齒類動物經口重複染毒毒性試驗是最常用的重複染毒毒性試驗，常可得出全身毒性的靶器官和作用類型的指證。因吸入重複染毒毒性試驗的試驗設計複雜，且大多數化妝品也不是以重複吸入為暴露途徑，故在重複染毒毒性試驗中罕見使用吸入染毒途徑。慢性毒性試驗是研究在一種哺乳類動物整個壽命期內重複暴露受試物後所產生的毒性作用。在這些試驗中，毒性作用需經一長的潛伏期或蓄積後表現出來。前面已經提過，對於重複染毒毒性試驗，至今尚未有確證過或被採納的替代試驗方法來取代動物試驗。再一些方面以盡了認真的努力，如神經毒性和腎毒性，但時至今日，沒有任何方法或篩選方案被正式確證（或準備確證）。在危險性物質的申報過程中，當申報物質的生產或進口量大於 1t/年時，需考慮呈報重複染毒毒性試驗資料。對於有特殊生物學物質、可能長期接觸人體皮膚的化妝品組成成份的開發，SCCNFP 認為對其進行全身危險性的評價是評

價這些新的組成成分安全性的一個主要內容，不管其生產量是多少，均需按危險性物質規程所強調的嚴格要求進行。因此，SCCNFP 認為在一定的情況下，使用動物長期試驗來研究更為潛在的毒性作用仍有其科學上的需要。動物使用是應限制至最少，但不應以消費者的安全性為代價。根據 Dir. 76/768/EEC 第 7 修正版的內容，在 2013 年 3 月 11 日之前，建立確證過的重複暴露替代試驗。

(三) 致突變性/遺傳毒性

在進行化妝品組成成份的安全性評價中，明確潛在的致突變作用是需要。致突變性是指誘發細胞或微生物的遺傳物質的數量或結構發生永久的、可遺傳的變化。這些變化可牽涉到一個基因或一個基因片段、一組基因或整條染色體。對整條染色體的作用可以是結構上的和/或數目的。來自 DNA 分子誘發的損傷的突變不被認為是遺傳毒性作用的後果。遺傳毒性是個廣義的術語，指的是對遺傳物質的潛在有害作用，無需與致突變性聯繫在一起。因此，遺傳毒性可包括檢測誘導 DNA 損傷的試驗（不是突變的直接證據），如程序外 DNA 合成 (UDS)，姊妹染色單體互換 (SCE)，DNA 鏈斷裂，DNA 加合物的形成或有絲分裂重組 (MR)，以及致突變性試驗。現有多種體內和體外試驗，可參考 OECD 指南以及 Dir 67/548/EEC 的附件 V 的介紹。作為一項一般的推薦，SCCNFP 的意見是，在檢測化妝品組成成份的潛在致突變性/遺傳毒性時，需採用兩項體外試驗的組合，具體如下。

1. 微生物回復基因突變試驗(Ames 試驗)或體外哺乳動物細胞基因突變試驗(目前首選小鼠淋巴瘤試驗, CHO/HPRT 試驗有許多不足, 僅用於特定的化學物, 需說明其科學合理性)。
2. 體外哺乳動物細胞染色體畸變試驗通常認為這些試驗可為評價致突變性/遺傳毒性的可能性提供充分的證據。不過, 實際情形可能有變, 如體外哺乳動物細胞微核試驗可能是一個新亮點。最基本的是所有試驗均應嚴格按試驗方案來執行, 最大限度地檢測潛在的致突變反應, 以保證陰性結果能被接受、不同實驗室的結果可能被比較。

對於大多數化妝品組成成份, 體內試驗並不是絕對必要的。僅在一些罕見的情況下, 體內試驗可檢測到體外水平無法觀察到的潛在致突變性。動物試驗僅被認為是對於人和動物的食物和藥物是需要的。有關是否需要動物試驗的最強烈爭論是在於體內的活化不一定是經 S9 混合物刺激的。因此, 體外試

驗中代謝系統的更多變化是需要的。通常需要超出基本水平的致突變試驗，這有多個理由來說明。若在致突變試驗有明顯的結構改變或從體外試驗的陽性結果中得到啟示，應考慮進一步的試驗，如哺乳動物細胞微核試驗。在進行體內試驗之前，須對受試物的體外試驗結果及其毒代動力學資料做透徹的回顧，得到它的化學、雜質及毒理學資料，以及同系組成成份的資料等信息。顯然，僅在能合理預測受試物的所有性質及特定靶組織能合適地暴露於受試物和/或其代謝物時，才進行一項特定的體內試驗。在 2003 年 6 月，SCCNFP 採納了一套新的方法，用於檢測氧化型染髮劑的組成成份的潛在遺傳毒性、致突變性、致癌性。這套方法用 6 項體外試驗來代替上述的兩種，這是針對多種永久性染髮劑還有芳香胺或因氧化反應而形成它們的事實而出台的。預期人體暴露途徑和機會也許更為廣泛(如在家庭使用)。

(四) 致癌性

任何可誘發腫瘤(良性或惡性)或增加其發生率的物質，當被吸入、攝入、局部皮膚給予或注射時可惡化或縮短腫瘤發生時間，這些物直就可被定為致癌劑。常見的致癌試驗如下。

1. 致癌試驗。
2. 慢性毒性/致癌試驗聯合試驗。

化學遺傳毒性致癌劑致癌作用的最合理模式包括了遺傳毒性作用的後果。當出現結構性改變的致癌作用或體外致突變試驗出現陽性結果時，不管它是遺傳毒性或非遺傳毒性物質，需要進行體外敘利亞地鼠胚胎(SHE)轉化試驗。就遺傳毒性化合物受到關注的程度來說，體外致突變試驗已建立了相當好的測試系統。用於檢測非遺傳毒性致癌劑的試驗屬於另一話題。因此，在特定情形下，體內嚙齒類動物試驗仍是需要的。

(五) 生殖毒性

術語“生殖毒性”是用來描述受試物誘發的哺乳動物生殖的不良作用。它涵蓋生殖周期的各個階段，包括對男性和女性生殖功能或能力的損傷，誘發後代的非遺傳不良作用，如死亡、生長遲緩、結構和功能異常。最常進行的生殖毒性試驗如下。

1. 兩代繁殖毒性試驗。
2. 致畸試驗 嚙齒類動物和非嚙齒類動物。

OECD 還有一項聯合的“生殖/發育毒性篩選試驗”，至今尚未被 Dir. 67/548/EEC 附件 V 所採納。由於生殖毒性領域是很複

雜的，不同的階段是不可能用一替代方法來模擬的。目前，已建立有 3 項替代方法（限於胚胎毒性方面）。(1) 全胚胎培養試驗 (WEC)。(2) 微團試驗 (MM)。(3) 胚胎毒性幹細胞試驗 (EST)。

歐洲替代試驗有效性中心科學顧問委員會 (ESAC) 認為對於屬於下列 3 類中任一類受試物而言，後兩項試驗是科學有效的；非胚胎毒性、弱/中等胚胎毒性或強胚胎毒性。WEC 僅是對於強胚胎毒性物質的鑑別是科學有效的 [ESA 2001]。這 3 項替代胚胎毒性試驗得到歐洲替代試驗有效性中心 (ECVAM) 的支持及進一步優化，最近已在 SCCNFP 討論，考慮作為用於篩選胚胎毒性物質的 CMR 策略的有用方法。不過，有關陽性反應化合物的更多資料仍是需要的。

(六) 毒代動力學研究

術語“毒代動力學研究”是用來描述受試物在體內的時間依賴性過程。它包括吸收、分佈、轉化和/或排泄。術語“毒效動力學”是指化學物質在靶部位的相互作用過程以及引發不良作用的隨後反應。

毒代動力學的方案是用於闡明試驗條件下毒性的特殊問題。其結果可對進一步毒性研究和解釋提供幫助。受試物經皮吸收後，它的代謝命運對它的毒性、在體內的分布和排泄有著重要的影響。因此，需用體內或體外生物轉化試驗來證實或排除一些不良作用。多項體外模型（肝細胞懸液或培養液）適用於生物轉化研究，不過，這些模型中沒有一個經過確證。化學結構（如 QSAR）及理化性質（如 $\log P_{ow}$ ）的信息也可提供給予途徑下的吸收特徵、代謝和組織分布的指證。毒代動力學參數的信息也可來自前期的毒性研究。最後，在將體外和體內動物試驗的資料外推到人時，毒代動力學研究也顯得很重要。

(七) 光誘導毒性

1. 光毒性(光刺激)和光敏性“3T3 中性紅攝入光毒性試驗”是一項體外試驗，是用於比較在暴露和不暴露於 UVA/可見光的無細胞毒計量下，化學物的細胞毒性。1998 年，SCCNFP 推薦這項體外試驗用於測定所有紫外線(UV)吸收化學物的光毒性/光刺激性，特別是用作 UV 吸收劑的化妝品組成成分。2000 年，3T3 中性紅攝入光毒性試驗得到正式確証，並被 Dir. 67/548/EEC 附件 V 所採納，使之成為檢測光毒性的強制性方法。最近用不同化學結構的多種化學物（包括用作化妝品組成成份的 UV 吸收

劑) 對 3T3 中性紅攝入光毒性試驗的可靠性和相關性進行了評價。試驗結果顯示可預測動物和人體內的急性光毒性。不過，它並不是設計用來預測化合物和光的聯合作用產生的其他不良作用，如它不能發現光斷裂劑作用、光誘變作用、光過敏作用或光致癌作用。目前，尚無檢測光敏作用的體外方法。不過，我們期望有光敏作用的化學物在 3T3 中性紅攝入光毒性試驗中呈現陽性反應。

2. 光誘變作用/光斷裂劑作用：1990 年，SCC 採納了用於檢測吸收 UV 射線的化妝品組成成份的光誘變作用/光遺傳毒性的指南。SCCNFP 推薦歐洲化妝品、家用品和香料協會 (COLIPA) 所用的試驗方案作為確證研究的對象。由於缺乏體內參考資料，難以設計確證研究，這項推薦尚未被採用。對於光誘變作用/光遺傳毒性，考慮到已有的生理學機理 (基因、染色體、DNA 序列的改變)，無須體內參考資料。1999 年，OECD 就已經討論了用於光誘變作用的指南，但至今尚無結果。與此同時，SCCNFP 在個案分析的基礎上評價了單項光誘變作用/光遺傳毒性及其科學價值，請記住已提到的測試光誘變/光遺傳毒性作用經典方法系列組合的一般原則。

(八) 人體資料

開發出來的化妝品是被廣泛用於人體的皮膚或外黏膜上。偶爾也會出現局部的和全身的不希望出現的副作用。局部的反應包括刺激、過敏性接觸性皮炎、接觸性蕁麻疹和陽光 (特別是紫外線) 誘導的反應。皮膚和黏膜的刺激是最常見的反應。儘管用志願者的人體試驗來取代動物試驗是不可思議的。眾所周知，相對於人體暴露，動物試驗和替代方法的預測值是有限的。因此，在志願者身上進行的皮膚相容性試驗，可證實化妝品用於人體皮膚或黏膜是無害的，這是科學及倫理的需要。已有動物試驗和/或替代試驗僅能提供組成成份的毒理學資料，在這些試驗沒有問題時，人們仍期望高度的安全性。因此，終產品常在小範圍人群中試用已證實它們的皮膚和黏膜的相容性，以及其他化妝品的可接受性。

對化妝品終產品與人體志願者相容性研究相關的一般倫理和實際方面的內容見 Doc. Sccnfp/0068/98, Final。SCCNFP 有關檢測化妝品組成成分的皮膚刺激性的人體制願者試驗的意見專門討論有關刺激性的倫理和實際方面的內容 (SCCNFP/0003/98)。最後，SCCNFP 也發表了有關化妝品組成成份的皮膚過敏性的預測試驗的意見 (SCCNFP/0120/99)。與刺激性試驗相比，這些類型的試驗

引來更多的爭論，因預測性人體過敏試驗須在個體中誘導持續長時間或永久免疫性過敏反應。因此，出現嚴重的倫理問題。儘管已有多年的人體過敏試驗經驗，但有志願者在試驗期間出現斑貼過敏的後果的文獻中可得到的科學信息相對有限。由於上述的不確定性，SCCNFP 的意見是，若沒有對這些人體研究的陽性反應的免疫學背景和機理有很好的了解，不應進行預測性人體過敏性試驗。目前，尚未有精確證的替代方法可用來預測皮膚過敏的反應。僅有一“有效”的優化試驗 LLNA。

三、SCCNFP 評價“化妝品規程”附件中的物質所需的毒理學資料

(一) 一般毒理學資料要求

1. 毒理學試驗研究資料

當向 SCCNFP 呈遞化妝品組成成份資料供評審時，生產商須向委員會提供下列資料。

- (1) 急性毒性 (有的話)。
- (2) 刺激性和腐蝕性。
- (3) 皮膚過敏性。
- (4) 皮膚/經皮吸收。
- (5) 重複染毒毒性。
- (6) 致突變性/遺傳毒性。
- (7) 致癌性。
- (8) 生殖毒性。
- (9) 毒代動力學。
- (10) 光誘發毒性。
- (11) 人體資料。

一般來說，第(1)~(6)項是最低的基本要求。不過，當考慮到有經口攝入可能或/經皮吸收資料提示受試成分可透過皮膚(考慮到物質的毒理學性質和化學結構)時，第(7)~(9)項就變得需要了，同時，也需特殊地增加致突變性/遺傳毒性的資料。當化妝品擬用於暴露於陽光的皮膚時，需特別地增加光誘發毒性的資料(第(10)項)。人體資料(第(11)項)是極為有用的，隨時，均應包括進去。不過，用於檢測化妝品組成成分或組成成分混合物的皮膚刺激性的人體志願者證實試驗受到倫理學的關注。與動物試驗相比，用於檢測化妝品組成成分或組成成分混合物的皮膚刺激性的人體志願者試驗對人體安全性的作用是受到質疑的。這些試驗中人體志願者的危險是不可排除的，上缺乏有關不良作用的嚴重性和頻度的信息。若有不需要且技術上也不

能提供上述資料的個案，應給出科學合理性的理由。

安全性資料可通過試驗來獲得，這些試驗應按危險物質規程的 B 部分附件 V 報導的指南及其根據相關技術進展做出的修定來進行，並遵循 GLP (Dir. 87/18EEC) 的規範；或按合適和可接受的科學方法來進行。對這一原則的所有可能的偏差均應做出解釋和給出科學合理性的理由。在呈遞試驗結果時，均應做出這樣的聲明：試驗所用的物環與化妝品終產品所用的成分之間的純度/雜質特性具有可比性，並具有相同的物理、化學特性。試驗條件下受試物的穩定性對於結果的解釋是至關重要的。因此，需報告受試物的穩定性。

根據 Council Directive 86/609/EEC 第 7 條有關保護用於實驗和其他科研目的動物的要求，若能通過其他科學、合理的方法獲得提要的結果，不用動物是合理和可靠時，就不進行動物試驗。目前，尚未有經確證的用於檢測潛在的皮膚刺激劑、過敏性化妝品組成成分或組成成分混合物的體外方法。不過，“有效”的方法還是有的，可用於檢測化妝品終產品。用動物試驗來預測上述副作用是可靠的，且在科學文獻中也有記載。最後，SCCNFP 強調了保證呈交供評價資料的完整性的重要性。申請人應確記需簽名。

2. 其他資料

與相關試驗研究一起，還需提供下列資料。

- (1) 有關流行病學和/或觀察到的經歷的報導。
- (2) 各個物質/化合物/制劑的所有能得到的生態和環境影響的描述。
- (3) 所有有關的發表的文獻。
- (4) 所用文獻方法的描述。
- (5) 對申請人有用的發現。
- (6) 在他處得到的材料。

此後，業界和/或相關部門獲得的新資料也應傳送到委員會供審核。

(二) 對於在“化妝品規程”附件 III 和 IV 列出的染發劑的特殊要求

附件 IV 列出了多個半永久型染發劑，其中一些偶氮染料已知可釋放出一種或多種已被危險物質法規 X 入 2 類致癌劑的芳香胺。2002 年，SCCNFP 用對消費者的健康存在潛在危險的結論。

附件 III 第 1 部分列出了多個氧化型(永久型)染發劑的部分，如二氨基苯酚、氫醌、1-萘酚、間苯二酚。2002 年發布的附件 III 第 2

部分提出了臨時性允許的 60 多種用作氧化型和/非氧化型染色劑的成分。2003 年 3 月，SCCNFP 發布了對 46 種染色劑再評價的意見。2001 年 6 月，SCCNFP 針對使用永久型染發劑與膀胱癌發生率增加有聯系的試驗結果，單獨發布了一項意見【Gago Dominguez et al.2001】。SCCNFP 的結論是，由於使用這類物質的潛在危險日益受關注，應進一步控制染發用化學物的使用。最常引起的不良健康作用的染發劑類別是氧化型染色劑兩個成分體系。一個成分含有染料前體(常是芳香胺)和在城皂或合成洗滌城中的偶聯體(如間苯二酚和苯酚衍生物)，另一成分是過氧化氫的穩定溶液。在使用前將兩種成分混合在一起。對氧化型染色劑的遺傳毒性/致突變性的檢測是很複雜的，同時涉及染料前體、中間體、反應和終產物。作為一種後果，應通過檢測單個成分以及相關成分相結合來評價氧化型染色劑的危害，以便使用時生成的新的反應產物的遺傳毒性/致突變性試驗策略的文件，這一策略在 2003 年 6 月得到更新，具體見圖 2.6.2。它描繪了一個可變的、循序漸進的、用於有關染發劑致突變性/遺傳毒性/致癌性的危害鑒別的體外試驗策略，以獲取用於鑒別危險性特徵的足夠的體外試驗資料。這一策略有助於減少動物的使用，但仍未得到確証。簡單地概括，在致突變性/遺傳毒性/致癌性的第一階段應用了 6 項體外試驗，具體如下。

1. 細菌回復突變試驗。
2. 體外哺乳動物染色體畸變試驗。
3. 體外哺乳動物細胞基因突變試驗(首選小鼠淋巴瘤試驗)。
4. 體外哺乳動物細胞程序外 DNA 合成試驗。
5. 體外哺乳動物微核試驗。
6. 體外敘利亞地鼠胚胎轉化試驗。

這 6 項試驗涵蓋了用於評價致突變性/遺傳毒性的體外試驗，可得出非遺傳毒性/致癌性的信息。第二階段試驗的目的是查明體外試驗所表現出來的突變性/遺傳毒性是否可在體內條件下的體細胞中出現。考慮到染發劑的化學結構、代謝、專業知識和較早前的體外試驗結果，申請人有責任選用第二階段的體內試驗。應特別注意在模擬實際使用條件下反應產物的分離和鑒別，暴露和生物利用度，按相關要求逐步進行致突變性/遺傳毒性試驗。對內條件下的致突變性/遺傳毒性/致癌性。最後，向企業總部推薦的有關染發劑的另一個特別要求是染發劑參考樣品的處置。1999 年 2 月 17 日 SCCNFP 的第 7 次小組會議提出業界應附上一樣品，與每一

新資料一起送交委員會。在此之前，1998 年 11 月 24 日的會議上，染發劑工作小組強調需收集樣品。同時，也應提供穩定性資料。

(三)對於在“化妝品規程”附件VII列出的 UV 吸劑的特殊要求

附件VII是一個紫外線吸收或紫外線反射物質的清單，內容包括了在化妝品中的最大許可濃度。

從本質來看，所有用作防曬劑或紫外吸收劑的化妝品組成成分或是能吸收或是能反射 UV-A 和/或 UV-B 紫外線的化學物。化妝品組成成分吸收紫外線的波長被稱為“吸收譜”。化學物吸收光線後，其分子構象可出現變化，或被轉化為不同的化學反應分子。因此，有必要研究特定的光毒性作用，如光刺激性、光敏性和光誘變性。因此，在本節三(一)1(10)中列出的光誘發毒性對於附件VII擬收錄的組成成分的評價是十分關鍵的。與組成成分的光毒性相關的所有試驗均應在有組成成分的吸收譜中相應波長的紫外線條件進行。應提供使用條件下的光穩定性資料。

1.體外光斷裂劑/光誘變作用

在檢測光化學物斷裂劑/光誘變作用方面，已有多項結合受試物與 UV-可見光的試驗被採用。

- (1) 細菌和酵母突變試驗。
- (2) 用於檢測斷裂劑的試驗。
- (3) 用於檢測哺乳動物細胞基因突變的試驗。
- (4) 用於檢測體外哺乳動物細胞非整倍體作用的試驗。

2.體外光毒性

根據 2002 後 OECD432 指南和 Dir.67/548/EEC 附件 V B4.1 的要求，必須用 3T3NRUPT 試驗進行化妝品的光毒性研究。

(四)對部分評價的要求

在某些情況下，出於 SCCNFP 的要求或業界的自願，業界提供了過去已經討論的物質的補充資料。根據補充報告和以前遞交的概述做出的評價並不適於回答新危險的疑問。如附件VI提到的再評價研究，是由部分物質用於防腐劑以外的用途引發的，在其他用途時，其使用濃度可能高於用作防腐目的的，這時要標上(+)。因為，當進行部分再評價時仍需要完整的資料。

四、企業安全性評價員對“化妝品規程”附件以外化妝品成分安全性評價的毒理學資料要求

(一)一般毒理學要求

儘管 SCCNFP 的文件並沒有明確地提出未被“化妝品規程”附件收錄成分的安全性評價要求，但本部分僅提供一些一般性考慮。

從歐洲的法規觀察出發，很多化妝品組成成分可簡單地遵循危險性物質法規【67/548/EEC 及其修訂版和採用的技術方法】。根據後者，每一新申報化學物質是否需提供數據資料取決於該化合物每年生產或向歐盟進口的量。淺顯的是，用作化妝品組成成分的物質並不可能引發對毒理學資料的額外要求。

每年生產或向歐盟進口的量在 100kg~1t 的危險性物質的毒理學資料要求包括。

1. 急性毒性(經口、經皮或吸入)。
2. 皮膚和眼刺激性。
3. 過敏性。
4. 致突變性。

當每年生產或向歐盟進口的量較大時，就需要更為廣泛的毒理學資料。一項科學的安全性評價，若僅是質於上述提到的每年生產或向歐盟進口的量在 100kg~1t 所需資料是十分不可能做到的。由於很多化合物是所謂的“活性”化合物，在所有可能的濃度中並不儘然是安全的，因此，應鼓勵供應商向他們在化妝品業界的所有消費者傳遞至少這些資料。

這是相當有用的，若類似於 Dir.76/768/EEC 附件收錄的物質，從供應商、業界和/或其他部門獲得的新信息就可與化妝品業界的所有消費者進行交流。當有更為詳盡的數據包可用時(如高產量的化學物)，本節三(一)所描述的大量的一般要求就可得到。另外，應查明所有化妝品組成成分的化學本質和純度、理化性質。質於這一需求，應向成員國的主管部門提供用於鑒別和定量控制的方法。

(二)礦物質、動物性、膿物性、生物技術組成成分的鑒定

一些組成成分的本質和制劑可影響用於鑒定所需的資料的類型和數量。下列各點指出了一些要求。

1. 源於礦物質的復合成分
 - (1) 起始材料。
 - (2) 描述性資料。
 - a. 制備工藝。物過程，化學修飾，可能的純化等。
 - b. 成分組成中的特徵性元素。特徵性組分和毒性組分(%)。
 - (3) 理化特性。
 - (4) 微生物質量。
 - (5) 添加的防腐劑。

2. 源於動物的復合成分

- (1) 種屬(牛、禽、甲殼類、人等)。
- (2) 器官、組織、體液(胎盤、血清、軟體等)。
- (3) 源國家。
- (4) 描述性資料。
 - a. 制作過程。提取條件(溶劑、pH 值、溫度等)、水解類型(酸性、酶解等)、其他化學修飾、可能的純化等。
 - b. 上市形態。粉末、溶液、混懸液、凍乾劑等。
 - c. 成分組成中的特徵性元素。特徵性氨基酸、總氮、多糖、分子團等。
- (5) 理化特性。
- (6) 包括相關病毒性污染的微生物質量。
- (7) 其他的外部污染。
- (8) 添加的防腐劑。

3. 源於植物的復合成分

- (1) 植物、藻類和肉眼可見的真菌的常用名。
- (2) 科、屬、種、變種名。
- (3) 若所用的種有一種以上的變種，每一種均應特別指出。
- (4) 感官、肉眼的大體評價。
- (5) 植物或植物部位、藻類和肉眼可見的真菌的形態學和解剖學描述(可能的話，包括性)和照片。
- (6) 植物或植物部位、藻類和肉眼可見的真菌的自然習性和地理分布。
- (7) 植物或植物部位、藻類和肉眼可見的真菌的現有資源，包括地理位置，是否是培養的或在野外收獲的。
- (8) 描述性資料。
 - a. 制備過程。採摘、清洗、乾燥、提取、蒸餾、破損性蒸餾、可能的純化、保存工藝等。
 - b. 處理、運輸、儲存。
 - c. 上市形態。粉末、溶液、混懸液等。
 - d. 成分組成中的特徵性元素：特徵性組分和毒性組分(%)。
- (9) 理化特性。
- (10) 包括相關真菌的微生物質量。
- (11) 其他的外部污染。
- (12) 添加的防腐劑。

4. 源於生物技術的復合成分

對於源於特定生物技術的組成成分，修飾的微生物或潛在的毒性物質沒被充分地除去，應提供如下特別的資料。

- (1) 所用的微生物的描述性資料：供體微生物、受體微生物、修飾微生物。
- (2) 宿主的病源性。
- (3) 毒性、代謝產物的鑒定、微生物產生的毒素。
- (4) 用於傳遞的活微生物在環境共生的命運，如天然細菌。
- (5) 理化特性。
- (6) 微生物質量。
- (7) 其他的外污染。
- (8) 添加的防腐劑。

(三) 芳香物質

每一芳香化合物均應附上一份合適、正式簽署的證明。儘管大多數芳香物質供應商提供的標準證明提示該芳香化合物在每一產品類型的使用範圍內是安全的，但 SCCNFP 的意見，如是的證明應系統地補上如下內容。可能的話，用化妝品組成成分目錄第 II 部和 INCI 指出的命名的芳香化合物中組成成分的半定量濃度(如 <0.1% ; 0.1%~<1% ; 1%~<5% ; 5%~<10% ; 10%~<20% ; 20% 及以上)。

對於天然組成成分，應提供下列之一。

1. 天然組成成分的批組分的分析。
2. 天然組成成分中可能出現組分的最大水平(考慮到批間差異)。

指出這些組成成分可致過敏、光毒性和全身毒性的可能性，或受到化妝品指南或 SCCNFP 意見的限制。遵守這些限制的証實材料。化妝品產品類型清晰說明，指出用了何種化合物及最大使用濃度。應將上述信息提供給化妝品終產品的安全評價人員。在作最後的危險性評價時，應做出芳香化合物的半定量劑參照，考慮組成成分單用或合用時的可能毒性。

(四) 潛在的內分泌紊亂劑(endocrine disruptors)

近年來，全球對因暴露於可能干擾內分泌系統的化學物引起的潛在不良反應的關注與日俱增。2000 年，環境總部(DG Env)發布了一篇題為“制定需優先評價的內分泌紊亂劑名單”的文件。在這一研究中，共收集了 564 種物質的有關內分泌紊亂作用的信息。該研究共分四步進行：1. 現有名單及信息的其他來源的回顧與綜述。2. 持續時間長和/或產量高的物質的選擇。3. 內分泌紊亂作用的科學証據的初步評價。4. 人體和野生生物暴露的初步評價。最後，形成一

系列的推薦意見，包括需要有標準試驗和用於鑒別內分泌紊亂作用的標準，需對內分泌紊亂作用的評價與出現這種毒性作用(死已率、生殖方面的)的濃度進行比較。兩年後，國際化學品安全規劃署(IPCS)表了一份有關同樣議題的綜述，綜合收集了所有的出版物、討論會、研討會、專家委員會對內分泌紊亂劑的評價。這些報告指出關注這些內分泌紊亂劑的暴露主要原因如下。

1. 在一些野生生物、魚和生態系統觀察到不良作用。
2. 某些內分泌相關性人類疾病的發病率增加。
3. 實驗動物中觀察到暴露於某些環境化學物可致內分泌紊亂。

2001 年，人們公開地注意到化妝品的潛在的致內分泌紊亂作用。理由是在一份科學出版物中提到體外和體內的雌激素作用與存在於防曬產品中的紫外線吸收劑試驗中，不僅比陽性對照【17 β -雌二醇 (17 β -estradiol)】所見的低得多(一百萬單位)，而且比暴露於食物中的已知“雌激素樣”物質【類黃酮(flavonoids)】和激素治療(避孕藥、孕婦晨後藥、月經期後治療)的低得多經過對所有信息的重點分析，SCCNFP 得出的結論是：目前允許在歐盟上市的化妝品防曬劑所用的有機紫外線吸收劑未見對人體健康產生影響的雌激素樣作用。

(五)瘋牛病的問題

在 SCC 發表意見(02/10/1996)後，委員會規程規定：“牛、禽、羊的腦、脊髓和眼組織和體液及源毯這些組織的組成成分”不得成為化妝品產品的組分。不過，使下列方法並由生產商嚴格消毒的動物脂衍生物可被使用。

1. 在至少 200°C 及合適壓力條件下醴質轉移或水解 20min(甘油醇和脂肪酸酯)。
2. 在 12mol/L NaOH 皂化(甘油醇和皂)條件下。
 - (1) 分批法。95°C，3h。
 - (2) 連續法。140°C，2000hPa，8min 或相當的條件。如上所述，牛脂衍生物被認為是個例外，可用作化妝品組成成分，提供一系列的特定功效。這一例外在 2002 年得到 SCCNFP 的質疑，但在 2003 年 9 月又被再次採納。迄今，還沒有關於 TSE 可經局部暴露傳播的證據。

(六)化妝品組成成分的致癌性、致突變性和生殖毒性問題

規程 2001/59/EC 描述了用於危險性物質分類的標準，即將具有致癌性、致突變性和生殖(生殖和發育)毒性的物質分為 1 類、2 類、3 類。分為 1 類的物質必須有充足的證據確定人體暴露與致癌、

致突變和生殖毒性的出現有因果關係，分為 2 類的被認為對人有可疑的致癌、致突變和生殖毒性，分為 3 類的指應予以關注的物質，但未有合適的信息可做出滿意的評價。

規程 94/60/EC 清楚地規定：Council Directive 67/548/EEC 附件 I 出現的物質及加入 1 或 2 類致癌劑、誘變劑、生殖毒性的物質不能用於市售物質或製劑(單個濃度等於高於 67/548/EEC 附件 I 指定的洩度或與危險性制劑的分類、包裝和標籤相關的 Directive 1999/45/EC 附件 I 指定的濃度)。

SCCNFP 在其 2001 年 9 月的意見中建議禁止 Directive 67/548/EEC 加入 1 或 2 類致癌劑、誘變劑、生殖毒性的物質或有相似毒性的物質用於化妝品產品中。不要將 Directive 67/548/EEC 加入 3 類致癌劑、誘變劑、生殖毒性的物質或有相似毒性的物質用於化妝品產品中，除非能證明擬用濃度對消費者的健康沒有威脅。若化妝品中存在的致癌劑、誘變劑、生殖毒性的物質是來自於天然的成分、雜質或在生產過程形成的，應指出該產品對消費者的健康沒有威脅。

(七) 染髮劑

並是每一染髮劑均包括在 Directive 76/768/EEC 附件 IV 列出的著色劑中。不過，對於這一類化妝品，應考慮 SCCNFP 對氧化型染髮劑的要求。SCCNFP 的意見是，建立一個獨立的染髮劑名單以便於有效地管理。

五、化妝品組成成分安全係數和終生致癌危險性計算的一般原則

(一) 定義

- (1) 劑量：受試物的給予量。劑量可用質量來表示(mg 或 g)，表示為受試動物單位體重的受試物質量(如 mg/kg 體重)、或動物單位體表面稱的受試物的質量(如 mg/cm² 體表面積)、或固定的飼料中濃度【ppm 或(mg/kg 體重)/d】【96/54/EEC B 部分的一般介紹】。
- (2) 染毒方法：包含用量、使用頻次、持續時間。在計算安全係數時，以(mg/kg 體重)/d 表示【96/54/EEC B 部分的一般介紹】。
- (3) 未觀察到有害作用的劑量水平(NOAE)是長期毒性試驗(如 28 天、90 天大鼠、小鼠、兔或狗長期毒性試驗，慢性毒性試驗，致癌試驗、致畸試驗、生殖毒性試驗等)的一項結果，是指未觀察到有害作用的最高劑量【96/54/EEC B 部分的一般介紹】。在計算安全係數時，為了考慮到最敏感的種屬以及在最低劑量可能出現的相關作用，常用 NOAE 的最低值。NOAE 以(mg/kg 體重)/d 表示【96/54/EEC B 部分的一般介紹】。

(4)全身暴露量(SED):化妝品組成成分的 SED 是指預計每天每千克體重進入血液的量(全身利用度)。SED 以(mg/kg 體重)/d 表示,人的平均體重被視為 60kg。由於大部化妝品是局部給予的,全身利用度在很大程度上取決於化合物的經皮吸收。不過,這些試驗的結果可是用兩種不同的方式來解釋。

(二)安全系數的計算

從危險性特徵角度來看,在化妝品組成成分安全評價的最後階段,有一個不確定系數,稱為安全系數(MoS)。一般認為安全系數是最低 NOAEL 除以可能的全身暴露量(SED)計算出來的。

(三)計算全身暴露量(SED)時的經皮吸收問題

計算 SED 時,應首選考慮暴露於最高預期濃度一段時間後的絕對生物利用度($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)。也可根據經皮吸收百分率來計算 SED。後者得出來的數值取決於在皮膚上的使用量。在這種情況下,受試濃度應包括最低預期濃度。如 OECD 指南草案 428(皮膚吸收:體外方法)提出的,模擬人體暴露的體外試驗的給予量通常是固體為 $1\sim 5\text{mg}/\text{cm}^2$,液體可達 $10\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 。

也有例外,氧化型染發劑通常是給予量通常是給予 $20\text{mg}/\text{cm}^2$ 和持續 30min。如前所述,我們可得出:根據報告的化合物經皮吸收結果,有兩方式可用於計算 SED。

1. 受試物的經皮吸收結果(以 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 表示)

計算 SED 時,應考慮使用含受試成分的化妝品終產品的皮膚表面積和給予次數。有設計皮膚吸收試驗時,也應適當考慮其他的可變因素。

2. 受試物的經皮吸收結果(以百分率表示)

顯然,經皮吸收百分率僅是從模擬用量的體外試驗中計算得來的值,而不是超出實際條件下的用量。較高的用量會對透皮結果的估計過低。

若使用方式不同於本章終產品評價中提到的擬用產品類型的使用次數,應採用相應的 SED。最後,在考慮皮膚吸收時,了解配方對化合物的生物利用度可能產生的影響是相當重要的。在化妝品配方中常加入透皮增強劑或鋪料(如魯質體)來使其他化合物易於吸收。顯然,在這樣的配方中,若沒有進一步的特別研究,將假定這一特定組成成分的生物利用度為 100%。

(四)兒童產品的安全系數

在 2002 年 2 月的小組會議上,SCCNFP 發布了關於兒童產品安全系數計算的意見。問題的起因是:是否對國值系數進行調整,

即將國值系數 100 乘上成人與兒童皮膚表面積與體重比值 (SSA/BW) 間的差異值。0~10 歲兒童的皮膚表面面積與體重比值的差異值如下。出生時為 2.3 倍；6 個月時為 1.8 倍；12 個月時為 1.6 倍；5 歲時為 1.5 倍；10 歲時為 1.3 倍。

這意味著 0~1 歲的兒童的 SSA/BW 與成人的平均差異僅為 1.9。從圖 2.6.4 可以看出，對於完整皮膚的一般國值系數採用 100 已經考慮到個體間的差異。

因此，根據 Renwick 【1998】在一次兒童毒代動力學研討會上發表的綜述，scnfp 得出結論：當用於完整皮膚時，無需制定用於兒童的另外的不確定係數【ssnfp/0557/02】。

(五)終生致癌危險性

1. 終生致癌危險性的計算

對於沒有國值的致癌物而言，假定並不存在一個很小的、明確能引起癌症暴露水平(國劑量)問題。歐洲和美國的主管部門使用或提出了 3 種用於定量危險性特徵的方法。“線性多階段模型”已被美國環境保護局(epa)廣泛使用【1986】。美國環境保護局也提出了“LED10 方法”【1996b】，歐洲已使用了“T25 方法”。用這些外推方法得到的結果在大多數情況下是非常相似的。

終生致癌危險性的確定可通過幾個不同的步驟來進行。從試驗資料中得到的動物劑量參數後，再轉化為人體的劑量參數。隨後，通過直線外推到實際暴露劑量來確定終生致癌危險性。最後，給出對這些資料的綜合評價的評論性意見，提示實際危險是否高於或低於計算的危險性。劑量參數 T25 是指在動物重屬的標準壽命時間內，經過自發性發生率校正後誘發 25% 動物特定組織腫瘤的慢性劑量。EC1999 及 Dybing 等詳細介紹了 T25 的確定方法。根據可比的代謝率，用下面的公式可將動物的劑量參數(T25)轉化為人的劑量參數(HT25)。

2. 影響危險性評估的要素

在計算上述終生致癌危險性時應結合能以數值表示為基礎的要素不能用數值表示的要素應形成評論性意見的依據。

(1) 流行病學資料：有用的流行病學資料雖不足以用於定量危險性特徵，但可用於與動物資料得到的危險性作比較。

(2) 部位/種屬/系/性別活性：若致癌物在多種組織部位、交叉種屬和性別中均有效，這可提示其危險性高於基於一種特定腫瘤類型計算的。另一方面，若致癌物僅在某一種屬的某一性別的某一特定組織部位有效，提示其危險性低於計算的。

- (3)劑量反應關係：若用於選擇的腫瘤的有用資料強烈地提示劑量參數的線性外推，一些很低的劑量並不確切，這個事實提示計算的危險性低估或高估了實際的危險性(如數據顯示分別超出或低於反應曲線這一部分的線性劑量反應關係)，可做出一些定性或定量的判斷。
- (4)化學物的類別：若受評價的物質屬於 T25 明顯低於或高於可疑致癌物的多數致癌物組，現有資料的可信度低，那麼這一具體類別的危險性可能是高於或低於計算的。
- (5)毒代動力學：有關人體的相對生物利用度、致癌物靶劑量或活性代謝物與動物的資料進行比較，可提示危險性高於或低於從動物資料計算的。同樣的理由也可用於解釋人和動物間毒效動力學的不同。
- (6)與危險性有關的其他要素：若僅有一套動物資料系最或僅有來自一個動物種屬的資料系列可用於確定劑量參數(dose-descriptor)，其結果的不確定性大於用兩個動物種屬資料系列獲得的結果。這樣的情況提示危險性高於從動物資料計算的。若有 2 套或多套資料可用於確定劑量參數，並且其他的資料也對該參數得出了明顯的較大值，則提示危險性低於從動物資料計算的。

第三節 化妝品終產品的安全性評價

根據歐盟規定，每種化妝品的生產廠或進口商必須備有產品的技術信息檔案，檔案中需包括由安全性評價員所進行的安全性評價。對終產品的安全性評價是依據原料的毒理特性，化學結構及其暴露水平而進行的。

一、化妝品的分類及使用中的暴露水平

對化妝品的安全性評價不僅要基於毒理學資料，而且也要依據化妝品的使用方式，化妝品產品包括了廣泛的產品類型，可以概述如下。

- (一)肥皂：使用時是經過稀釋的，雖然使用部位很廣泛，但是卻很快被沖洗掉。
- (二)用於唇部和口腔的產品，有一定量的產品可能被吞嚥下去。
- (三)用於眼周或外陰區域的產品，可能分別接觸結膜或黏膜而引起反應。
- (四)體露或體霜。可能應用於大面積的身體表面，有相當濃度的化妝品成分可能殘留在皮膚上，與皮膚接觸數小時之久。
- (五)防曬產品。由於防曬產品可能與廣泛的皮膚接觸，並同時直接暴露於 UV 照射下很長時間，因此需要特殊的安全性評價。

(六)永久性氧化型染髮劑形成中間體和終產品會與皮膚接觸。

當與化妝品接觸時，可能有導致一定量的吞嚥或經皮膚或黏膜吸收，即為終產品的全身暴露 (SED)。

在確定暴露水平時，應按化妝品的產品類型逐個進行，但至少應考慮下列因素。

1. 使用被評價化妝品成分的產品類型。
2. 產品使用方式：塗抹、噴霧、用後沖洗掉等。
3. 在終產品中被評價化妝品成分的使用濃度。
4. 每次產品的使用量。
5. 使用產品的頻度。
6. 接觸皮膚的總面積。
7. 接觸部位 (如黏膜、被曬傷的皮膚)。
8. 接觸時間 (如淋洗型產品)。
9. 可預見的誤用，這可能增加暴露。
10. 使用者群體 (如兒童、敏感皮膚人群)。
11. 可能進入人體的量。
12. 預計使用者數量。
13. 暴露於陽光的皮膚面積。

相應的暴露量取決於毒理學作用，如皮膚刺激性或光毒性，則皮膚單位面積的暴露量是重要的，而對全身毒性來說則單位體重的暴露量更有意義。不是由於直接使用所致的繼發暴露的可能性也應予以考慮 (如使用頭髮噴霧產品而引起吸入，使用唇部產品引起的被吞嚥下去)。

總之，化妝品的使用可能取決於某些隨時間而變動的因素，如年齡組、季節變動、地區性習慣、時尚、趨勢、廢棄引起的後果，產品的更新等。

暴露評價是屬於全身暴露量的測定，是計算在終產品中化妝品成分安全係數 (MoS) 的一項重要指標 ($MoS = NOAEL/SED$)。

二、化妝品終產品安全性評價指南

(一) 對化妝品終產品進行安全性價的必要性

每一種化妝品均可被視為單個化妝品組成成分的組合。在得到其組成成分的最為相關的毒理學終點信息、弄清其毒性的條件下，對其做出安全評價的作法通常是可被接受的。不過，在某些情況下，為了作出更好的安全性評估，需要更多的有關化妝品終產品的信息，如用於特別消費者 (如嬰兒、敏感皮膚等)、添加有增加皮膚透過性和/或皮膚刺激物 (透皮增強劑、有機溶劑、酸性組分等)、單個組成成分間的化學反應而形成有較高毒理學意義的新物質、特殊製劑 (脂質體和其他發泡劑) 的化妝品，或聲稱有

潛在毒性的特殊組成成分被減少時。當對一終產品的安全性進行深入的評價後，安全評價者並不希望它在可預見的使用條件下引起任何不良作用，在該產品最終進入市場之前，尚須在大量的人體志願者身上進行相容性試驗。

(二) 化妝品組成成分的毒理學特性

在對化妝品終產品進行安全評價時，安全評價者應考慮所有組成成分的現有的毒理學資料。應清楚使用的資料來源，可能包括一項或多項下列內容。

1. 整體動物試驗。
2. 經確證或有效的體外替代試驗方法。
3. 人體臨床觀察和人體志願者的相容性試驗資料。
4. 源于資料庫、發表的文獻、內部經驗的資料，來自原材料供應商的資料，構效關係的結構變化資料。
5. 同類化合物的相關資料。對於化妝品終產品，評價的重點放在局部毒性（皮膚和眼刺激、皮膚過敏和紫外線吸收光誘發毒性）的評價。對於有明顯的皮膚/經皮吸收的，應詳盡地評價全身作用。在一些試驗的結果無法得到時，應附上科學的判定和解釋。這裡應重點提到的是，用於進行毒理學試驗的每一組成成分應與化妝品終產品中出現的物質是一致的（包括同樣的純度、同樣的雜質性質、同樣的添加物等）。

(三) 化妝品終產品的穩定性和理化性質

應制定化妝品終產品的物理穩定性，確保在運輸、儲存過程中終產品的物理狀態(如乳化的凝結、相分離、結晶或組成成分的沉澱、變色)不會發生改變。應進行適合於化妝品和擬用類型的相關穩定性試驗。為了確保所用容器和包裝類型不會誘發穩定性的問題，市場擬用的內容器的物理穩定性也須進行測試。應控制每批將投放市場終產品的相關理化指標。其物理狀態如下。

1. 製劑的類型 (O/W 或 W/O 乳劑、混懸液、露、粉類、氣溶膠)。
2. 感官性狀 (顏色、氣味等)。
3. 液體製劑的 pH 值 (在___°C 的溫度時)。
4. 液體狀態的黏度 (在___°C 的溫度時)。
5. 根據特定需要的其他指標。

所用的標準和方法及每批所得的結果均應具體列出。

(四) 化妝品終產品的安全性評價

安全性評價者在終產品的安全性評價報告中應對科學合理性進行清晰地描述。這意味著應全面考慮從所有單個組成成分和終

產品（好的和不好的）的毒理學資料、化學和/或生理學相互作用、人體擬使用的途徑和其他可能的途徑暴露的資料。一旦有某一特定組成成分的 NOAEL 值，就應計算其安全係數 (MoS)。安全性評價者應通過縝密的討論才能做出評價結論，應對一些需特別關注的特殊組成成分的製劑所包含的成分（如香水、紫外線吸收劑、染髮劑等）做認真對待。安全性評價者可做出接受、拒絕或在特定條件下接受的決定。安全性評價者做出的與產品使用安全有關的建議，生產商或歐盟進口商均應遵循。送評材料中應提供安全性評價者的簡歷。生產商可自己僱用安全性評價者或聘用外部的顧問，與產品或上市不存在聯繫。安全性評價者應提供有毒理學相關經驗以及可獨立做出產品有關決定的控制的證據。最後，應對產品的安全性作常規性審核。為達此目的，應收集產品在市售過程中對人體健康的副作用（正常或不適使用的投訴及跟蹤結果），供產品的下次安全性評價參考。如前所述，SCCNFP 不負責對化妝品終產品的安全性評價。

三、化妝品終產品的微生物質量指南

(一)概述

皮膚和黏膜通過一道天然機械屏障和各種防禦機制來保護其不受微生物的侵襲。不過，一些化妝品的作用可破壞這層保護性外皮及造成輕度的創傷，而促進微生物的感染。一般來說，用於眼周、黏膜、破損皮膚、3 歲以下兒童、老年人和免役反應受損的人的化妝品更受關注。在微生物質量控制線制方面化妝品分為兩類：第 1 類：特定用於 3 歲以下兒童及擬用於眼部和黏膜的產品；第 2 類：其他產品。

微生物的污染常來自於兩個不同的來源：生產和灌裝過程和消費者使用化妝品過程。從消費者開化妝品的一刻到用完一個包裝，通過家庭環境和與消費者皮膚（手和身體）的接觸可能引起化妝品的持續、可變和額外的微生物污染。保護化妝品免受微生物污染是十分重要的，其理由如下。

1. 確保化妝品對消費者的微生物安全性。
2. 保持產品的使用質量和特性。
3. 保證衛生和高質量的管理。

儘管據報導僅有一小部分的化妝品為生物污染可致消費者受微生物感染，但化妝品微生物污染可破壞或嚴重降低其使用質量。為了確保產品的質量和消費者的安全，有必要對即將投放市場的每批化妝品終產品進行日常的微生物分析。用於檢

查的指標、標準和方法，每批所得的結果均應在合適的文件報告中具體表述，並能被收錄在技術檔案中。

(二)定量和定性限制(根據 Colipa 1997, McEwen et al. 2001, US FDA 2001 制定的)

1. 對於第 1 類的化妝品,0.5g 或 0.5mL 產品中活菌總數不超過 10^2 cfu/g 或 10^2 cfu/mL 是可被接受的。
2. 對於第 2 類的化妝品,0.1g 或 0.1mL 產品中活菌總數不超過 10^3 cfu/g 或 10^3 cfu/mL 是可被接受的。
3. 假單孢綠膿桿菌、金黃色葡萄球菌和白色念珠菌被視為化妝品中的主要潛在致病菌。0.5g 或 0.5mL 第 1 類的化妝品和 0.1g 或 0.1mL 第 2 類的化妝品中不得檢出這些潛在致病菌。

需重點注意的是，上面提到的微生物限制範圍必須是分別完成 0.5g 或 0.5mL 第 1 類的化妝品和 0.1g 或 0.1mL 第 2 類的化妝品的檢測過程後得到的。這樣做是為了保證在陽性結果的情況下微生物負荷可獲得具有統計意義的數值。不過，若得到的是陰性結果，在日常的質量控制過程中可用較為少量的產品進行檢測。

(三)攻擊試驗 (根據美國藥典 2002 和歐洲藥典 2002 制定的)

化妝品產品開發階段的防腐效果也需要試驗來檢測，以保證在儲存和過程中微生物的穩定性及防護效果。可用攻擊試驗。後者對於所有在正常儲存和使用條件下可能變質的或對消費者形成感染的化妝品是強制性的。攻擊試驗包括對終產品的人為感染，接著對污染降至第 1、2 類的微生物限制水平進行評價。攻擊試驗所用的微生物可出自歐盟任一國的官方收集的菌株，以保證試驗的重現性，這些微生物是：假單孢綠膿桿菌、金黃色葡萄球菌和白色念珠菌。目前，眾所皆知，攻擊試驗的一致性更加取決於污染某一化妝品所用的微生物的能力，而不是微生物的分類狀態、起始濃度、培養條件和用於復甦培養基。具有污染某一化妝品能力的微生物是用於攻擊試驗的最佳選擇。接著，另外的“室內”細菌和霉菌也可以用於攻擊試驗的特定目的。在攻擊試驗中，通過稀釋、過濾、加入中和劑或其他方法排除化妝品中防腐劑或其他化合物的殺菌活性。微生物控制和攻擊試驗的試驗操作須在微生物學家的指導和驗證下進行。如前所述，生產商必須保證其產品在攻擊試驗中的防護效果。不過，目前還沒有法定的或被廣泛使用的攻擊試驗方法，生產商須詳細決定採用何種方法。

(四) GMP (根據 Van Der Maren 1995 , Colipa 1994 制定的)

為了遵循產品產值量管理規範 (GMP) 和微生物質量管理，化妝品生產商應定出並遵循特定的清潔、衛生和控制規程來保持所有的器械和材料的清潔和無病源性微生物。這些規程也包括對原料、批量產品和終產品、包裝材料、個人、設備、製備和儲存房間的微生物控制。

給中醫藥委員會具體建議

目前世界各國關於化妝品之組成分或是終端產品之安全性評價項目，均有明確刺激性試驗、毒性試驗之相關規範。故政府相關部門針對化妝品中若添加中草藥，要如何規範其安全性評估項目與方法，建議應該舉辦相關公聽會，集學者專家之建議取得共識後再行公告。

玖、化妝品的功效性評價

玖之一、防曬化妝品功效性評價

防曬化妝品，顧名思義其主要功效就是防曬，或防紫外線輻射對人類皮膚的不良影響。由於 UVC 被大氣臭氧層完全吸收，來自太陽輻射的紫外線只有 UVB 和 UVA 才能達到地球表面，因此防曬化妝品的主要功效體現在對 UVA 和 UVB 的防護效果上。評價防曬化妝品的防曬效果有許多客觀指標。

一、防曬化妝品的 SPF 值測定及表示法

SPF 值是日光防護係數 (Sun Protection Factor) 的縮寫，它是防曬化妝品保護皮膚避免發生日曬紅斑的一種性能指標。所謂日曬紅斑也稱作紫外線紅斑，主要是日光 UVB 誘發的一種皮膚紅斑反應，因此防曬化妝品 SPF 值也經常代表對 UVB 的防護效果指標。由於 SPF 值的定義是建立在皮膚紅斑反應的基礎之上，因此只有利用人體皮膚的紅斑反應才能準確、客觀地測定 SPF 值。目前人體法測定防曬品的 SPF 值是國際統一的技術模式。

(一) 中國的 SPF 值測定技術規範

中國自 1999 年著手建立關於測定 SPF 的技術方法，2002 年由中國衛生部以化妝品技術法規的形式頒布實施，關於 2003 年 1 月 1 日起生效。該方法的具體內容如下。

1. 範圍

此規範規定了對防曬化妝品 SPF 值的測定方法。

此規範適用於測定防曬化妝品的 SPF 值。

2. 規範性引用文件

美國食品和藥品管理局 (FDA) 對防曬產品防曬指數的測定方法。(Testing Procedure, Federal Register, 21 CER. Part352. 70~73, 1993)

3. 定義

(1) 紫外線波長

短波紫外線 (UVC) : 200~290nm

中波紫外線 (UVB) : 290~320nm

長波紫外線 (UVA) : 230~400nm

(2) 最小紅斑量 (Minimal erythema dose, MED) : 引起皮膚紅斑，其範圍達到照射點邊緣所需要的紫外線照射最低劑量 (J/m^2) 或最短時間 (s)。

(3) 防曬係數 (Sun protection factor, SPF) : 引起被防曬化妝品防護的皮膚產生紅斑所需的 MED 與未被防護的皮膚產生紅斑所

需的 MED 之比，為該防曬化妝品的 SPF。可如下表示：

$$\text{SPF} = \text{使用防曬化妝品防護皮膚的 MED} / \text{未防護皮膚的 MED}$$

4. SPF 測定方法

(1)光源：日光模擬器 529 弧燈作為光源，必須符合下列條件：

- 可連續產生波長為 290~400nm 的紫外線。
- 光源輸出經濾光片過濾後，波長小於 290nm 的紫外線應低於 1%。
- 光源輸出經濾光片過濾後，波長大於 400nm 的光線應低於 5%。
- 光源應輸出穩定，光線均一，所輻射平面上其波動範圍應小於 10%。

(2)受試者的選擇

- 選 18~60 歲健康志願受試者，男女均可。
- 既往無光感性疾病史，近期內未使用影響光感性的藥物。
- 受試者皮膚類型為 I 型、II 型、III 型，即對日光或紫外線照射反應敏感，照射後易出現曬傷而不易出現色素沉澱者。
- 受試部位的皮膚應無色素沉澱、炎症、癍痕、色素痣、多毛等。
- 妊娠、哺乳、口服或外用皮質類固醇激素等抗炎藥物、或近一個月內曾接受過類似試驗者應排除再受試者之外。
- 此方法規定每種防曬化妝品的測試人數應在 10 例以上。

(3) SPF 值標準品的製備

(4) MED 測定方法

- 受試者體位為照射後背，可採取前傾位或俯臥位。
- 樣品塗布面積不小於 30 cm²。
- 樣品用量及塗布方法：按 2MG 樣品/cm²的用量稱取樣品，使用乳膠指套將樣品均勻塗布於試驗區內，等待 15min。
- 預測受試者 MED 應在測試產品 24h 以前完成。在受試者背部皮膚選擇一照射區域，取 5 點用不同劑量的紫外線照射。24h 後觀察結果，以皮膚出現紅斑的最低照射劑量或最短照射時間為該受試者正常皮膚的 MED。
- 測定受試樣品的 SPF 值在試驗當日需同時測定下列 3 種情況下的 MED 值：A.測定受試者未保護皮膚的 MED，應根據預測的 MED 值調整紫外線照射劑量，在試驗當日再次測定受試者未防護皮膚的 MED。B.將受試產品塗抹於受試

者皮膚，然後測定在產品防護情況下皮膚的 MED。在選擇 5 點試驗部位的照射劑量增富時，可參考防曬產品配方設計的 SPF 值範圍：對於 SPF 值 <15 的產品，五個照射點的劑量遞增為 25%；對於 SPF 值 >15 的產品，五個照射點的劑量遞增為 15%。C. 在受試部位塗 SPF 標準樣品，測定標準樣品防護下皮膚的 MED，方法同上。

(5) 排除標準：進行上述測定時如 5 個試驗點均未出紅斑，或 5 個試驗點均出現紅斑，或試驗點出現紅斑後隨紫外線照射劑量增加又消失時，應判定結果無效，需校準儀器設備後重新進行測定。

(6) SPF 值的計算

樣品對單個受試者的 SPF 值用下式計算：

個體 SPF = 樣品防護皮膚的 MED / 未加防護皮膚的 MED

樣品防護受試者群體的 SPF 值即為該受試樣品的 SPF 值，用下式表示：

樣品 SPF = X

計算樣品防護全部受試者 SPF 值的算術均數，取其整數部分即為該測定樣品的 SPF 值。估計均數的抽樣誤差可計算該組數據的標準差和標準誤。要求標準誤應小於均數的 10%，否則應增加受試者人數直至符合上述要求。

5. 防曬產品防曬效果的標識

所測樣品的 SPF 值低於 2 時不標識防曬效果；SPF 值 2~30 之間可在產品標籤上標識 SPF 值；當所測產品的 SPF 值高於 30、且減去標準差後仍大於 30，應在產品標籤上標識 SPF30+。

6. 檢驗報告

報告應包括下列內容：受試物通用信息包括樣品編號、名稱、生產批號、生產及送檢單位、樣品物態描述以及檢驗起止時間等，檢驗目的、材料和方法、檢驗結果、結論。檢驗報告應有檢驗者、校核人和技術負責人分別簽字，並加蓋檢驗單位公章。其中檢驗結果以表格形式給出。

7. SPF 標準品的制備方法

在測定防曬產品的 SPF 值時，為保證試驗結果的有效性和一致性，需要同時測定防曬標準品作為對照。

防曬標準品為 8% 水楊酸三甲環己醴制品，其 SPF 均值為 4.47，標準差為 1.297。

所測定的標準品 SPF 值必須位於已知 SPF 值的標準差範

圍內，即 4.47 ± 1.297 ，在所測 SPF 值的 95% 可信限內必須包括 SPF 值 4。

製備方法：將 A 液和 B 滴分別加熱至 $72 \sim 82^{\circ}\text{C}$ ，連續攪拌直至各種成分全部溶解。邊攪拌邊將 A 液加入 B 液，繼續攪拌直至所形成的乳劑冷卻至室溫 ($15 \sim 30^{\circ}\text{C}$)，最後得到 100g 防曬標準品。

(三) SPF 測定國際標準方法

多個國際組織包括 COLIPA、JCIA、CTFA SA 於 2000 年開始探討防曬化妝品 SPF 測定方法的國際一體化問題。經多次協商、修改和徵求意見，終於在 2002 年 10 月達成一致，形成了 SPF 測定國際統一方法【20】。現將該方法介紹如下。

1. 道德論理考慮

在人類進行實驗研究的基本原則必須符合：

世界醫學會赫爾辛宣言(Declaration of Helsinki)以及各種修改版本(1964.1975.1983.1989.1996.2000)。

本國涉及人類試驗的有關法規。為遵守上述原則，在進行 SPF 試驗時強調以下幾點。

- (1) SPF 試驗是用來評價適當使用的化妝品對消費者暴露日光的保護水平。這樣的研究不應當給受試者帶來有害的、長期的影響。
- (2) 試驗應由合格的、有經驗的技術人員來實施，以避免對受試者的皮膚造成不必要的損害。
- (3) 試驗前本研究的監管人員對待測樣品的安全性評價信息應有足夠了解。
- (4) 未成年人不應參加 SPF 測定試驗。

2. 基本概念

文中所涉及的術語應表達為：

(1) 紫外輻射：在 SPF 測定中被光學家和皮膚病學家認可的紫外線波段為

UVB：290~320nm

UVA：320~400nm

(2) 最小紅斑量(MED)：MED 在人類皮膚上被定義為在紫外線照射後 16~24h，在照射部位出現清晰可辨的紅斑(邊界清晰並覆蓋大部分照射區域)所需要的最低紫外輻照劑量。

(3) SPF 值：由下式表示

MED_p：測試產品所保護皮膚的 MED。

MED_u：未保護皮膚的 MED。

測定樣品的 SPF 值是所有受試者個體 SPF 值的算術均數，個體 SPF 值保留一位小數。

3. 測定方法簡述

國際 SPF 試驗方法是一種利用已知輸出性能的氙燈日光模擬器所進行的實驗室方法。為了測定 SPF 值，需在試驗志願者皮膚上用紫外線照射出一系列遞增的遲發性皮膚點狀紅斑反應。試驗部位限於後背腰部和肩線之間。

受試者背部皮膚至少應分三區：第一區直接用紫外線照射；第二區塗抹測試樣品後進行照射，第三區塗抹 SPF 標準對照品後進行照射。照射時紫外線的劑量依次遞增，被照射皮膚由於表淺血管擴張而產生不同程度的遲發性紅斑反應。照射後 16~24h 由經過培訓的評價人員判斷。

受試者正常皮膚的 MED、測試樣品保護所保護皮膚的 MED 必須在同一受試者並在同一天判斷。在一試驗中，同一受試者皮膚上可進行多個產品的測試。單個受試者的 SPF 值就是上述兩個 MED 的比值(MED_p/MED_u)。所有受試者的個體 SPF 值保留一位小數，求其算術均數即為該測試產品的 SPF 值。每次試驗中至少保證 10 個以上的受試者出現有效結果，受試者人數不得超過 20 人。

上述 SPF 均值的可信限(95%可信區間)應位於 SPF 均值的 17%範圍之內(標準差應小於 SPF 均值的 17%)。根據測試產品配方所估計的 SPF 值大小每次試驗應選用適當的高 SPF 值或低 SPF 值標準品。標準品 SPF 值的測試結果也應位於估計範圍之內。

4. 受試者的選擇

(1)受試者的皮膚類型：按照 Fitzpatrick 皮膚分型方法，參加 SPF 試驗的所有受試者的皮膚類型或皮膚光型應屬於 I 型、II 型、III 型。或根據膚色測量結果，所有受試者膚色的個體類型角(Individual topology angle, ITA)應小於 28 度，試驗前應由經過培訓的科研人員或技術員對每個受試者進行檢查篩選，應保證受試者健康安全，受試者對紫外線照射無異常反應，受試者的皮膚條件不影響結果觀察等。

(2)受試者參加試驗的頻率：為了保證受試者參加一次試驗後所引起的皮膚曬黑或色素沉著有足夠的時間消退，受試者參加兩次 SPF 試驗的間隔時間應為 2 個月以上。所受試者均應簽

署知情同意書。

- (3)受試者的數量：每次 SPF 試驗至少應有 10 例有效結果，最大不超過 20 例。在計算一次 SPF 試驗的結果時，最多可捨棄 5 例受試者並保證每一例捨棄都公平客觀。在 SPF 試驗報告中應給出全部受試者的試驗結果，包括被捨棄的測定數值。對計算 SPF 均值而言，最少 10 例有效結果即可，但需保證均值的 95% 可信區間位於均值的 17% 範圍之內(如均值为 10，則 95%CI 應在 8.3 和 11.7 之間)。否則應增加受試者的數量直至符合統計學要求(最多可達 25 人，20 例有效結果)。如增加人數至 25 人仍不能符合統計學要求，則這次試驗應視作無效。

5. 試驗面積

後背是試驗規定的解剖學部位。試驗部位應在肩胛線和腰部之間畫出邊界。骨骼突起或其他不平部位應設法避免。

6. 紫外輻射光源

所使用的人工光源必須是氙弧燈日光模擬器並配有過濾系統。

- (1)紫外輻射的性質：紫外日光模擬器應發射連續光譜，在紫外區域沒有間隙或波峰。光源輸出在整個光束截面上應穩定、均一(對單束光源尤其重要)。光源必須配備恰當的過濾系統使輸出的光譜符合表 3.1.5 的要求。

光譜特徵以連續波段 290~400nm 的累積性紅斑效應來描述。每一波段的紅斑效應可表達為與 280~400nm 總紅斑效應的百分比值，即相對累積性紅斑效應 %RCEE(Relative Cumulative Erythematous Effectiveness)。

- (2)總輻照度(紫外線、可見光、近紅外線)：當光源的總輻照度過高時，受試者被照射的皮膚可能會有熱感甚至痛感。因此在 SPF 試驗之前應明確所使用光源最大輻照度(紫外線、可見光、近紅外線)，不應引起受試者皮膚熱感。部分試驗發現，當總輻照度達 $160\text{mW}/\text{cm}^2$ 時，可在多數受試者的照射皮膚上產生熱的感覺，而總輻照度 $120\text{mW}/\text{cm}^2$ 則不會如此。
- (3)光束的均一性：當大光束紫外光源被分隔成數束在不同照射部位上同時曝光時，光束的強度應儘可能均一。在輻照平面上，任何一點的最小光束輻照度不應低於最大輻照度的 10%。如果超過了 10%，則應在每一照射部位的曝光時間上作出適當的曝光補償。
- (4)紫外日光模擬器光源輸出的維持和監測：每一試驗部位的紫

外曝光之前，應使用經紫外日光模擬器光源輸出分光光度計校驗過的輻照計進行檢查。推薦 SPF 實驗室每年對光源光譜進行一次全波段的分光輻照度檢驗，每次更換主要的光學元件時也應進行類似校驗。強烈推薦有資格證書的獨立專家進行這項年度監測工作。

7. SPF 標準樣品

標準防曬品由固定的標準配方配制而成，在 SPF 測定中起到方法學對照作用。在測定產品的 SPF 值的同一天，必須同時測定一種防曬標準品。現有多種標準防曬品可供選用。

標準防曬品已於 1993 年由歐盟 COLIPA 組織了 7 個實驗室進行了平行對照試驗，除此之外，1996 年又由澳大利亞、歐洲、日本和南非等 19 個實驗室對上述標準品進行了國際多中心平行對照試驗(International Multiple-Ring Tests)。因此，表中所列數值範圍可被認為是暫時性標準規定值。在任何試驗中如果所得到的標準品 spf 均值不在表中規定的標準值範圍之間，或所用的標準品均值的 95% 可信限(CI)不在實測 SPF 均值的 17% 範圍之內，則整個試驗應當視作無效。預計，推行國際統一 SPF 值測定方法，標準品測定誤差會進一步減小。因此，暫定的標準防曬品規定範圍以後可能會再做修改，以使其更加接近實際誤差。

每次 SPF 試驗至少使用一種標準品。使低 SPF 值還是高 SPF 值的標準品取決於待測產品預計的 SPF 值。

如果在一次試驗中選用了高 SPF 值標準品，則不需要再用低 SPF 值標準品，即使試驗所測樣品中含有低 SPF 值產品也是如此。

8. 測試樣品的塗抹劑量和方法

測定中樣品使用量和塗抹的均一性對試驗結果的誤差有很大影響，因此遵守下列試驗條款非常重要。本方法備有 CD-ROM 以展示如何稱重和塗抹樣品。

(1)室溫條件：塗抹樣品、紫外照射和 MED 觀察均應在穩定的室內環境中進行。室內應有空調設備，室溫應維持在 18~26°C 之間。

(2)樣品塗抹部位

- ① 樣品塗抹面積應在 30~60 cm² 之間。
- ② 用於測定 uMED 的皮膚和塗抹樣品用於測定 pMED 的皮膚應儘量靠近。
- ③ 背部皮膚上塗抹樣品和標準品的部位應隨機分布以減少

因不同部位皮膚的解剖學變異而引起的系統誤差。

- ④ 塗抹不同測試樣品部位之間間距至少為 1 cm。
- ⑤ 塗抹樣品之前，應使用乾燥棉紗清潔皮膚。
- ⑥ 塗抹樣品部位應使用皮膚記號筆標出邊界，或使用不吸收材料制作的模板。

- (3) 樣品用量：測試樣品和標準品的塗抹前用量應為 $2\text{mg}/\text{cm}^2 \pm 2.5\%$ 。所用天平的敏感性至少為 0.0001g，即精確到小數點後四位。

在稱重和塗抹樣品時應考慮到樣品中揮發性成分的蒸發流失。應把稱出的樣品全部轉移到皮膚上，推薦使用減重稱重法。對於分層的液體產品應注意搖勻後再稱重。

- (4) 移樣方式：對於液體類、乳液類、膏霜類和噴霧類產品，為了使樣品均勻覆蓋測試部位的皮膚，可用注射器或加樣器將稱出的樣品分 15 滴或 30 滴 (30 cm^2 或 60 cm^2) 加在整個部位，然後戴上指套稍用壓力將樣品均勻塗抹。更換測試樣品時應更換指套。根據樣品塗抹面積和樣品性質不同應在 20~50s 之間塗抹完畢。

對於粉劑型產品，可按 CD-ROM 所示使用藥匙或手指將樣品的分量以網格方式散布在受試部位皮膚上，輕叩樣品並將其均勻塗抹。也可將化妝品置於帶噴嘴的分散器中用噴嘴頭分散樣品，在這種情況下，要注意化妝品樣品在分散器中的殘留量，務必使分散到皮膚上的樣品量為 $2\text{mg}/\text{cm}^2$ 。還可使用純化水或其他沒有紫外線吸收能力的液體將粉劑類樣品黏附在受試部位皮膚上，受試者的體位應保持前傾或俯臥位以防止樣品滑落。

- (5) 塗抹樣品後曝光前等待時間(樣品乾燥時間)

樣品塗抹之後應等待 15~30min，然後進行一系列紫外線劑量的照射。在紫外線照射前 24h、塗樣品後等待時間內以及曝光後 24h，受試者應當避免任何形式的紫外線接觸。

9. 紫外線照射

提前打開開關預熱儀器 10min 以上，待儀器穩定後即可使用。

- (1) 受試者體位：受試者可採用坐位或前傾位(粉質類產品只能採取前傾位)。塗抹樣品、紫外線曝光和判定 MED 值時所採用的體位應保持一致。
- (2) 曝光部位：曝光部位皮膚應無色素斑點並色調均一。可用對紫外線不吸收材料制作的模板界定曝光部位的邊界(適用於

大光束的紫外線日光模擬器)。每一個曝光部位的可接受面積至少為 0.5 cm²，推薦面積為 1 cm²。曝光部位之間至少有 0.8 cm 的間隔，每個曝光部位的面積應完全相同。

(3)預測受試者皮膚的 MED 值：正式實驗開始之前，需要預測受試者皮膚的 MED 值，以便在正式實驗時選擇合適的紫外線曝光劑量範圍。進行預測時可在正式實驗前一天進行一系列紫外線照射，第二天讀取結果，或不進行紫外線照射而用膚色測量技術估計受試者皮膚的 MED 值。

(4)紫外線曝光劑量的遞增幅度：對於未塗樣品皮膚，紫外線照射劑量範圍的中心可選用受試者皮膚預測的 MED 值或估計的 MED 值。以此值為中心，至少應包括五個曝光部位進行曝光，五點的曝光劑量按推薦的 12% 或 25% 呈幾何遞增。

對於塗抹樣品保護的皮膚，紫外線照射劑量範圍的中心點可用未塗樣品皮膚的預測 MED 值乘以產品估計的 SPF 值。同上，以此值為中心，至少應包括五個曝光部位進行曝光，五點的曝光劑量按推薦的 12% 或 25% 呈幾何遞增。如果估計樣品的 SPF 值超過 25，劑量遞增的最大幅度為 12%。也可以選用較小的遞增幅度，但整個曝光系列應保持一致。

(5)去除樣品：紫外線曝光之後，可使用棉紗浸沾卸妝水等輕輕擦去標準品和測試樣品。

10. MED 評價程序

未保護皮膚、樣品保護皮膚和標準保護皮膚的 MED 值應在同一天讀取。

(1)MED 值的讀取時間：應在皮膚紅斑形成的高峰期，即紫外線曝光後 16~24h 間讀取。在未讀取 MED 值前受試者試驗部位應避免任何其他的紫外線輻射(日光或人工光源)。

(2)MED 值讀取方法：用肉眼判斷 MED 值。室內光線應充足均一，推薦亮度至少 500lx。檢查者的視力和色感應經過檢查確屬正常，且每年應進行視力檢驗。

(3)數據排除標準：出現下列情況之一時應捨棄試驗數據：

- ① 五個曝光部位均未出現紅斑。
- ② 五個曝光部位的紅斑反應不隨曝光劑量依次遞增而出現隨機缺失。
- ③ 五個曝光部位均出現紅斑。

當上述情況發生在未保護皮膚或標準品保護皮膚上時，該受試者的有數據均應捨棄。

當上述情況僅發生在樣品保護皮膚上時，該樣品的試驗數據應捨棄，而受試者的其他試驗數據仍可選用。

當一次試驗中有多達 5 例(不含 5 例)以上的數據被捨棄時，該試驗應被視作無效。

(4)MED 值的表達：med 值應以能量單位($J.m^2$ ， $Mj.cm^2$)或時間單位(秒)來表達。用時間單位表達時要求日光模擬器的能量輸出在整個試驗過程中保持或穩定。在試驗前後必須用同樣的輻照計進行紫外輻射的監測。

11. SPF 值的計算和統計學要求

所有受試者個體 SPF 值的算術均數就是測試樣品的 SPF 值。

受試者的有效個體 SPF 值的最少例數為 10，最大例數為 20。試驗所得 SPF 均值的 95%可信區間(CI)必須位於所測 SPF 值的 $\pm 17\%$ 範圍之內。有關統計計算的步驟詳見本方法的附件 IV。

12. 試驗報告

推薦試驗報告應包括下列信息：

- ① 受試者情況(數量、姓名或 ID 號、皮膚類型或 ITA $^{\circ}$ 值)。
- ② 未保護皮膚、樣品保護皮膚和標準品保護皮膚的各種 MED 值。
- ③ 每一個測試樣品和標準品的個體 SPF 值。
- ④ 負責試驗人員的身份。
- ⑤ 個體 SPF 值和計算出的均值(包括所有有效數據和捨棄數據)，保留一位小數。
- ⑥ 均值的標準差和 95%可信區間。
- ⑦ 紫外線光源的說明。
- ⑧ 測試產品的名稱、編號和估計的 SPF 值。

除了上述信息之外，關於光源的均一性和%RCEE 可接受限值，應提供最近一次內部測量和近期外部監測的數據。

二、防曬化妝品 SPF 值或防曬效果儀器測定法

利用儀器測定的方法進行體外試驗，也可以粗略估計防曬產品的防曬效果。常用方法有紫外分光光度計法和 SPF 儀測定法。二者原理大致相同，即根據防曬化妝品中紫外線吸收劑和屏蔽劑可以阻擋紫外線的性質，將防曬化妝品塗在特殊膠帶上，用不同波長的紫外線照射，測定樣品的吸光度值，依據測定值大小直接評價防曬效果。SPF 儀器法增加了特殊的軟件程序，將測定結果以及其他實驗因素轉換成 SPF 值直接顯示。現將基本方法

以及對儀器法的應用評價介紹如下。

(一) 紫外分光光度計法

1. 試驗材料

- ① 石英比色皿。
- ② 3M 透氣膠帶(3M Transpore tm1527-3)。

2. 試驗儀器

- ① 紫外/可閱光分光光度計。雙光束掃描，測試波長範圍：200~900nm，備有積分球附件。
- ② 分析天平。精確度 0.0001g。
- ③ 普通乾燥箱。

3. 試驗方法

- ① 將 3M 膠帶剪成 1 cm x 4 cm 大小，粘貼在石英比色皿透光測表面上。
- ② 接通電源，預熱分光光度計，設定 UVB 區檢測波長：285nm、290nm、295nm、300nm、305nm、310nm、315nm、320nm。
- ③ 將貼有膠帶的石英比色皿置於樣品光路和參比光路中，調整儀器零點。
- ④ 精確稱取待測樣品 8MG，將樣品均勻塗抹在石英比色皿 3M 膠帶上。同上方法制備五個平行樣品。
- ⑤ 將制備好的樣品比色皿置 35°C 乾燥箱中，30min。
- ⑥ 將待測樣品比色皿置於樣品光路中，取另一貼有膠帶的石英池置於參比光路中，分別測定 UVB 區設定波長的紫外吸光度值，然後取各測定數值的算術均數。
- ⑦ 依次測定五個平行樣品，如上法得出五個樣品的均值，再計算五個樣品均值的算術均數，即為該測試樣品的吸光度值。

4. 測試結果評價

吸光度值 $< 1.0 \pm 0.1$ ，表示該樣品無防曬效果。

吸光度值 $= 1.0 \pm 0.1$ ，表示該樣品具有低級防曬效果，適用於冬日、春秋早晚和陰雨天。

吸光度值 > 1.0 而 $< 2.0 \pm 0.2$ ，表示該樣品具有中級防曬效果，適用於中等強度陽光照射。

吸光度值 > 2.0 ，表示該樣品具有高級防曬效果，適用於夏日陽光照射或戶外活動、旅遊等。

(二) SPF 值儀器測定法：

1. 試驗材料

- ① 石英比色皿。

② 3M 透氣膠帶(3M Transpore tm1527-3)或人造皮膚或聚氯乙
烯膜。

③ 質控樣品為 SPF 值標準品。

2. 試驗儀器

① Labsphere UV-1000S 紫外透射率分析儀。閃爍氙燈光源雙光
束掃描，測試波長範圍：250~400nm。

② 分析天平。精確度 0.0001g。

③ 普通乾燥箱。

3. 試驗方法

① 將 3M 透氣膠帶固定於特制的石英玻璃板(8.0 cm x 77 cm)上。

② 精確稱取待測樣品，以 2MG/cm²的用量將樣品均勻塗抹在石
英板 3M 膠帶上。

③ 將制備好的樣品置 37°C 乾燥箱中，10min。

④ 接通電源，預熱儀器，測定樣品的 SPF 值。每樣品板測定
點不得少於 6 點。

⑤ SPF 標準品測定過程同上。

4. 專用軟件包

使用 Labsphere UV-1000S 紫外透射率分析儀檢測樣品，可
通過儀器商提供的專用軟件程序包直接得到 SPF 值測定結果。

(三) 儀器法測定防曬化妝品 SPF 值的應用評價

中國多年來一直採用儀器法來評價防曬化妝品的防曬效果。
如國家質量監督部門採用紫外分光光度計法對市場上銷售的防曬
化妝品進行抽檢，國家衛生行政部門則採用 SPF 值儀器測定法檢
驗評審的防曬化妝品樣品，同一時期內多數國外化妝品企業又採
用人體測定法對其進口中國的防曬化妝品 SPF 值進行測定和標
識，致使中國防曬化妝品市場上，各種方法測定的 SPF 值同時存
在，消費者無法正確選擇標識 SPF 值的防曬產品。從市場監督的
角度看來，用儀器法檢驗上述不同方法測定的產品 SPF 值也常常
得到不一致的結果，引起市場混亂。儀器法評價化妝品的防曬效
果在某些領域內具有應用價值，如化妝品新產品配方的研究開
發、測定某種化妝品原料或某一說工藝步驟對產品防曬效果的影
響效果的影響、彩妝類產品單獨改變一色後是否導致產品 SPF 值
的變化整等。以這些需要反復測量產品 SPF 值的研發工作中，儀
器法具有人體法無法比擬的優點，如簡單快捷、費用低微，且不
對人體造成損傷。但在評價防曬化妝品的情況下，用儀器法測定
SPF 值則違背了 SPF 值的基本概念，無法對防曬化妝品的防曬效

果進行科學合理的綜合評價，其原因在於：

- ① 儀器法忽略了應用防曬化妝品後皮膚的反應。紫外線吸收了紫外線之後，其物質的化學性質可能發生改變，物理性遮光劑經紫外線照射也可以出現光催化活性，還有因防曬化妝品光不穩定性造成的防曬劑及其他原料的分解產物等等，這些因素均有可能誘發發膚光毒或光變態現象，如果皮膚出現這些情況，則產品的防曬效果無從談起。
- ② 儀器法只檢測了樣品中紫外線吸收劑單一因素，忽略了化妝品中其他成分防曬效果的影響。例如在陽光和氧的存在下，聚氧己烯乳化劑可發生自氧化作用，產生自由基損傷皮膚，從而降低產品的實際防曬效果；良好的防曬劑載體或分散體系也可使產品的 SPF 值明顯增加。
- ③ 儀器法對不是基於紫外線阻隔的光防護機制無能為力。研究發現蘆薈、燕麥、葡萄籽萃取物可減輕紫外線引起的皮膚損傷，添加到防曬化妝品中可明顯提高體系的 SPF 值；配方中加入維生素 E、C、 β -胡蘿蔔素等可起到清除自由基、抗皮膚老化的功能，也能提高產品的防曬效果。因此，當產品中含有上述天然植物活性成分時，用儀器法難於對防曬產品進行全面、正確的檢驗。

三、防曬化妝品 SPF 值的抗水性能測定法

從防曬化妝品發展的歷史看來，防曬產品具備抗水抗汗功能是一項經典的屬性。由於防曬化妝品，尤其是高 SPF 值產品，通常在夏季戶外運動中使用，季節和使用環境的特點要求防曬產品具有抗水抗汗性能，即在汗水的浸洗下或游泳情況下仍能保持一定的防曬效果。為了達到這一目的，在研發產品配方時一般應儘可能減少新水性乳化劑的使用，在不影響產品穩定性的基礎上儘可能提高油魯的含量。此外還可以使用一些特殊的抗水性高分子化合物，如 PVP220、多聚硅酮等，以提高產品的抗水效果。對防曬化妝品終產品 SPF 值的抗水抗汗性能測定，目前以美國 FDA 發布的試驗方法被公認為是客觀合理的標準方法。現簡述如下。

設備要求：預備一室內水池，具有水旋轉功能，水質應新鮮，符合美國 FDA40CFR 部分規定的飲用水標準。記錄水溫、室溫以及相對濕度。

(一) 對防曬品抗水性的一般測試

如產品 SPF 值宣稱具有抗水性，則所標識的 SPF 值應當是該產品經過下列 40min 的抗水性試驗後測定的 SPF 值：

- ① 在皮膚受試部位塗抹防曬品，並按產品標籤所示等待樣品乾燥。

- ② 受試者在水中中等量活動。
- ③ 出水休息 20min(勿用毛巾擦試驗部位)。
- ④ 入水再中等量活動 20min。
- ⑤ 結束水中活動，等待皮膚乾燥(勿用毛巾擦試驗部位)。
- ⑥ 按美國 FDA 規定的 SPF 測定方法進行紫外照射和測定。

(二) 對防曬品強抗水性的測試

如產品 SPF 值宣稱具有強抗水性，則所標識的 SPF 值應當是該產品經過下列 80min 的抗水性試驗後測定的 SPF 值：

- ⑦ 在皮膚受試部位塗抹防曬品，並按產品標籤所示等待樣品乾燥。
- ⑧ 受試者在水中中等量活動 20min。
- ⑨ 出水休息 20min(勿用毛巾擦試驗部位)。
- ⑩ 入水再中等量活動 20 min。
出水休息 20 min(勿用毛巾擦試驗部位)。
入水再中等量活動 20 min。
出水休息 20 min(勿用毛巾擦試驗部位)。
入水再中等量活動 20 min。
結束水中活動，等待皮膚乾燥(勿用毛巾擦試驗部位)。
按美國 FDA 規定的 SPF 測定方法進行紫外照射和測定。

上述人體試驗方法較為繁瑣費時，價格昂貴，在防曬產品的研究開發階段不便使用。近年來不少人研究一種快速簡便的替代試驗方法。1997 年 Carrascosa 利用非滲透蒸發儀及紫外分光光度計來已經乳化劑及乳化類型對防曬產品抗水性效能的影響；1999 年有人採用 SPF-290S 儀或 UV-1000Slabsphere 紫外投射儀進行防曬產品抗水性能體外測定；2001 年 B Markov-ic 等人將人造皮膚作為載體，用 uv-vis 分光光度計檢測防曬產品的抗水性；2002 年劉超等報道採用 3M TransporeMT 多孔薄膜作為載體，水浴法和高壓液相色譜法(HPLC)檢測技術相結合，建立了一種體外測定防曬產品抗水性的新方法。對上述方法的應用評價與上述儀器法測定防曬化妝品 SPF 值的情況類似，即這些體外試驗在一定程度上可檢驗防曬化妝品的抗水抗汗功能，對防曬產品的研究開發具有一定價值。但對防曬終產品 SPF 值抗水性能的科學評價，仍需應用人體生物學技術方法。

四、防曬化妝品 UVA 防護效果測定及表示法

標識和宣專 UVA 防護效果或廣譜防曬是防曬化妝品近年來重要的發展趨勢之一。UVA 照射的近期生物學效應是皮膚曬黑，遠期累積效應則為

皮膚光老化，兩種不良後果均為近年來化妝品美容領域內關注的焦點。關於防曬化妝品 UVA 防護效果的評價問題，目前國際上尚未形成統一的標準方法，因此防曬產品 UVA 防護效果的標識宣專也多種多樣，如以人體法測定的 PFA 值或 PA+~+++ 表示法、以儀器法或關鍵波長法測定的廣譜防曬表示法或廣譜防曬等級 0~4 表示法、UVA 防護星級評價系統等。其中以人體測定法較為常用並得到國際上多數國家的認可，現首先介紹如下。

(一) 防曬化妝品 UVA 防護效果人體測定及表示法

本方法由日本化妝品工業聯合會於 1995 年建立並作為標準發布，1996 年 1 月實施。建立本方法的主要目的是對防曬化妝品 UVA 防護等級及其產品標識提供一種統一的測試方法，以便於消費者正確選用。隨著技術發展和發現，本方法可能會進一步修改以適應需要。

1. 選擇受試者及試驗部位

18~60 歲健康人，男女均可，皮膚類型 III、IV 型。

日本 JCIA 研究發現，通過測定受試者對 UVA 照射後的最小持續色素黑化量來計算 PFA 值情況下，在皮膚類型 II、III 和 IV 型之間沒有區別，而日本人群中約 74% 的人屬於 II、III 和 IV 型。

受試者應沒有光敏性皮膚病史、試驗前未曾服用藥物，如抗炎藥、抗組胺藥等。

試驗部位選後背。受試部位皮膚應色澤均一，沒有色素沉著、色素痣或其他色斑等。

2. 受試者人數

每次試驗受試者的例數應在 10 例以上，10 例 PFA 值有效結果的標準誤差(standard error)應小於 PFA 均值的 10%。否則應增加受試者的例數直至符合上述統計學要求。

3. 標準品制備

標準品配方及制備工藝如下。標準品應和待測樣品同時測試。

A1 純化水	Purified Water	57.13%
A2 丙二醇	Dipropylene Glycol	5.00%
A3 氫氧化鉀	Potassium Hydroxide	0.12%
A4 EDTA 三鈉	Trisodium Edetate	0.05%
A5 苯氧乙醇	Phenoxyethanol	0.30%
B1 硬脂酸	Stearic Acid	3.00%
B2 單硬脂酸甘油酯	Glyceryl Monostearate, Selfmulisifying	3.00%
B3 十六/十八混合醇	Cetostearyl Alcohol	5.00%
B4 礦脂或凡士林	Petrolatum	3.00%
B5 三-2-己基己酸甘油酯	Glyceryl Tri-2-ethylhexanoate	15.00%
B6 甲氧基肉桂酸辛酯	2-Ethylhexyl p-Methoxycinnamate	3.00%

B7 4-丁基-4'-甲氧基	4-tert-Butyl-4'-Methoxydibenzoylmethane 二苯醯甲烷	5.00%
B8 對羥基苯甲酸己酯	Ethyl Parahydroxybenoate	0.20%
B9 對羥基苯甲酸甲酯	Methyl Parahydroxybenoate	0.20%

制備工藝：

分別稱出 A 相中原料，溶解在純水中，加熱至 70°C；

分別稱出 B 相中原料，加熱至 70°C 直至完全溶解；

把 B 加入 A 中，混合、乳化、攪拌、冷卻。

上述方法製備的標準品，其 PFA 值為 3.75，標準差(standard deviation)1.01。

4. 使用樣品劑量

約 2mg/cm² 或 2μl/cm²。以實際使用的方式將樣品準確、均勻地塗抹在受試部位皮膚上。受試部位的皮膚應用記號筆標出邊界，對不同劑型的產品可採用不同稱量的塗抹方法。

5. 樣品塗抹面積

約 20 cm² 以上。為了減少樣品稱量的誤差，應儘可能擴大樣品塗布面積或樣品總量。

6. 等待時間

塗抹樣品後應等待 15min，以便樣品滋潤皮膚或在皮膚上乾燥。

7. 紫外線光源

應使用人工光源並滿足下列條件

- ① 可發射接近日光的 UVA 區連續光譜。光源輸出應保持穩，在光束輻照平面上應保持相對均一。
- ② UVA I 區(340~400nm)和 UVA II 區的比例應接近日光中的比例(UVA II/UVA I =8%~20%)。
- ③ 為避免紫外灼傷，應使用適當的濾光片將波長短於 320nm 的紫外線濾掉。波長大於 400nm 的可見光和紅外線也應過濾掉，以避免其黑化效應和致熱效應。
- ④ 上述條件應定期監測和維護，應用紫外輻照計測定光源的輻照度、記錄定期監測結果、每次更換主要光學部件時應及時測定輻照度以及由生產商至少每年一次校驗輻照計等。

每次更換主要光學部件時應及時測定輻照度以及由生產商至少每年一次校驗輻照計等。光源強度和光譜的變化可使受試者 MPPD 發生改變，因此應仔細觀察，必要時更換光源燈泡。

8. 最小輻照面積

單個光斑的最小輻照面積不應小於 0.5 cm²(ψ8mm)。未加保

護皮膚和樣品保護皮膚的輻照面積應一致。

9. 紫外輻照劑量遞增

進行多點遞增紫外輻照時，增幅最大不超過 25%。增富越小，所測的 PFA 值越準確。

10. 讀取最小持續色素黑化量

最小持續色素黑化量(Minimal Persistent Pigment Darkening Dose, MPPD)的定義為：輻照 2~4h 後在整個照射部位皮膚上產生輕微黑化所需要的最小紫外線輻照劑量或最短輻照時間。觀察 MPPD 應選擇曝光後 2~4h 之內一個固定的時間點進行，室內光線應充足，至少應有兩名受過培訓的觀察者同時完成。

關於 MPPD 的定義問題：UVA 輻照後皮膚上可立即出現一種棕灰色至棕黑色反應，即稱之為即時色素黑化(Immediate Pigment Darkening, IPD)。這種反應最早由 hAUSSER 報道，其發生機理是一種光氧化反應，紫外輻照促使無色素的黑素前體氧化成了黑素體。進一步研究發現可見光也可以引起 IPD 發生。就正常人皮膚的 UVA 防護效果評價而言，IPD 是一個有用的指標，因為使皮膚發生 IPD 需要的紫外線劑量相對較小，且色素黑化消退很快，容易獲得受試者的配合。相信對日本的受試者而言，IPD 是一個評價 UVA 的防護效果的合適指標。然而，在實際應 中發現採用 IPD 指標有許多困難，主要有以下幾點。

- ⑤ 由於紫外輻照後 IPD 很快消退，致使觀察到的不同個體色素黑化差異很大，難於得到穩定的 PFA 值。
- ⑥ 測試彩妝類產品時，紫外曝光後需要 2~ 3min 時間清潔受試部位皮膚上的樣品，這樣一來則無法立即觀察記錄 IPD 結果。
- ⑦ 曝光後原則上要求多個觀察者讀取結果，在多人輪流觀察期間受試部位的黑化反應在不斷變化，難於取得一致的結果。

為克服上述問題我們對 UVA 曝光後 IPD 的動態變化進行了觀察，發現曝光後 2h 或時間更長時，色素黑化消退率減慢並逐漸穩定下來，因此確定採用 UVA 曝光後 2~4h 期間的色素反應作為指標，從而可得到一個穩定的數值來計算測試樣品的 PFA 值。相信使用上述方法評價 UVA 防護效果是一種最合適的方法。

曝光後 2~4h 間的色素黑化不應被認為是 IPD 反應，因為它不同於曝光後的即時反應，且可持續一段時間。經過充分討論這種反應可被認為是持續性色素黑化(Persistent Pigment Darkening, PPD)，引起 PPD 的 UVA 最小劑量可被認為是 MPPD。

11.UVA 防護效果的標識方法

UVA 防護產品的表示是根據所測 PFA 值的大小在產品標籤上標識 UVA 防護等級 PA(Protection of UVA)。PF 等級應和產品的 SPF 值一起標識。PFA 值只取整數部分，按下式換算成 PA 等級：

PFA 值小於 2	無 UVA 防護效果
PFA 值 2~3	PA ⁺
PFA 值 4~7	PA ⁺⁺
PFA 值 8 或 8 以上	PA ⁺⁺⁺

(二)防曬化妝品 UVA 防護效果儀器測定及表示法

將防曬化妝品塗在透氣膠帶或特殊底物上，利用紫外分光光度計法測定樣品在 UVA 區的吸光度值或紫外吸收曲線，是目前國內外所有儀檢定法的基本原理。在此基礎上，對測定結果的表達和標識有多種方法。

1. 星級表示法

此法最初由 Diffey 在 1991 年提出，英國 Boots 化學有限公司(Boots the Chemist Ltd)建立，又稱 Boots 比值法。此法根據測試樣品對 UVA 吸收的平均值與對 UVB 吸收的平均值之比值，將測試樣品的 UVA 防護效果分為 0~4 個星級，星級越高，代表紫外防護光譜越寬，覆蓋整段紫外光譜的保護越趨平衡。這種表示方法在英國較為常用。

2. 透射率表示法

澳大利亞採用的標準，即將測試樣品塗抹 0.008mm 薄膜，然後用紫外分光光度計掃描，從 320~360nm 區間任何一波段的紫外透過率如果低於 10%，則此樣品可被認為是廣譜防曬。這種方法的不足之處是僅測量了 320~360nm 這一區間範圍，不代表完整的紫外輻射波段。

3. 吸光度 A 值法

國內輕工部門技術單位曾採用此法。具體方法與本節紫外分光光度計法類似，不同點是分別測定 UVA 區各個波段的吸光度值，最後得出測試樣品對 UVA 區的吸光度值均值。根據此值的大小評價樣品對 UVA 的防護效果，一般認為吸光度 A 值大於 1 情況下樣品有為護 UVA 效果，數值越大，防護效果越強。

4. 關鍵波長法

關鍵波長法(Critical wavelength)由 Diffey 於 1994 年建立，是本節重點介紹的儀器測定法。防曬劑的紫外防護性能可以用

它的吸收曲線來描述，吸收曲線有兩個最重要的參數：即曲線的高度和曲線的寬度。吸收曲線的高度表示了防曬劑吸收某一波長紫外線的效能，在一定程度上防曬產品的 SPF 值可以反映這種性能；曲線的寬度表示防曬劑在多大波長範圍內有吸收紫外線的作用，即是否具有廣譜吸收作用。大多數防曬劑的吸收曲線者有一個共同的特點：即在較短波長時如 290nm，其吸收值較高，隨著波長的增加其吸收值逐漸下降。基於上述觀點 Diffey 提出了關鍵波長(Critical wavelength, λ_c)這一概念，所謂關鍵波長是指從 290NM 到某一波長值 λ_c 的吸收光譜曲線下面積是整個吸收光譜(290~400nm)面積的 90%時，這一波長值即為關鍵波長。

上述 90% 是人為規定的數值，它表示某一防曬化妝品 90% 的吸收紫外線能力是在 290nm 至 λ_c 的波長範圍內發揮作用。Diffey 根據關鍵波長值即 λ_c 的大小將防曬產品的廣譜防護性能分為五個等級：

關鍵波長值	廣譜分級(星級)
$\lambda_c < 325$	0
$325 \leq \lambda_c < 335$	1
$335 \leq \lambda_c < 350$	2
$350 \leq \lambda_c < 370$	3
$370 \leq \lambda_c$	4

關鍵波長法在歐美國家應用較多。COLIPA 曾建議歐盟將此法作為評價防曬產品是否具有 UVA 防護效果的備選方法。1996 年美國 CTFA/NMDA 對此法進行了改進：用人造皮膚代替透氣膠帶(3M Transpore TM)用於模仿人皮膚表面的紋理特徵；增加預照射以測試樣品的光穩定性；不採用原方法的廣譜分級系統而僅接受波長 370nm 作為判斷產品是否為寬譜防曬的臨界波長，即如果所測定的 λ_c 大於 370nm，則判定所測樣品具有 UVA 防護作用，和 SPF 值一起標識可宣傳寬譜防曬，如果所測定的 λ_c 小於 370nm，則判定該樣品無 UVA 防護作用。美國皮膚病學會曾向 FDA 建議將改進後的關鍵波長法作為評價防曬產品 UVA 防護效果的標準方法。現將這種方法介紹如下。

- (1) 儀器設備：Labsphere UV-1000S 紫外線透射分析儀，單色儀的最大容許帶寬不超過 5nm，採集透射光線的儀器必須含有積分球。
- (2) 樣品預照射：為了模擬通常使用防曬化妝品的條件，並除外

某些產品可能存在的光不穩定性，在測關鍵波長值之前，對塗抹樣品的基質進行預照射。預照射光源為氙弧燈(例如 Oriel 1000W 的氙弧燈)，其輸出光線經濾光片後，可以模擬到達地球表面的紫外線的光譜。這種光沫通常是用來測 SPF 值的。預照射劑量為樣品標注的 SPF 值的 1/3 乘 MED (J/cm^2)。MED 為最小紅斑量，I、II 型皮膚的最小紅斑量平均為 $1J/cm^2$ 。因此預照射劑量等於 1/3SPF。

(3)基質材料：可以選用 Naturalamb condeoms 或 Vitroskin 或 Transpore 膠帶，但使用 Transpore 膠帶時，必須加用透明的支持板。

(4)測試過程

- ① 基質的準備。以 Vitroskin 為例，將 Vitroskin(由合成的膠原纖維構成)模擬皮膚的一面朝上，放置於 $(22\pm 2)^{\circ}C$ 、相對濕度 80%~90%的溫箱內，24h 以上。完全水化後，將其剪成 9cm x 10.2cm 的長方形，放入溫箱內備用。
- ② 測試樣品的用量。測試樣品的用量為 $1mg/cm^2$ 或 $2mg/cm^2$ 。將樣品均勻塗抹於 Vitroskin 上，然後在 $(22\pm 2)^{\circ}C$ 條件下，乾燥 15min。
- ③ 吸收值的測量。測定未塗抹任何樣品時，Vitroskin 8 個不同位點的吸收值，作為基線值。樣品乾燥 15min 後，以 Oriel1000W 的氙弧燈對塗抹樣品的基質進行預照射。預照射後，立即在與上相同的 8 個位點測量塗抹樣品後的吸收值，經配套軟件處理後可得到相應的關鍵波長值。吸收值的測量使用的是 Labsphere UV-1000S 紫外線透射分析儀。
- ④ 樣品測試數量。對於每個樣品用五張 Vitroskin 分別測試 5 次。
- ⑤ 關鍵波長值的計算。使用不規則四邊形整合法計算 290~400nm 的曲線下面積，然後計算 290nm 到其後每一個相鄰波長的曲線下面積，並與前者相比，當比值達到或超過 0.9 時的第一圈波長值，即為關鍵波長值。以五次測量的數值，取 95%可信區間的下限值作為每種樣品的關鍵波長值。
- ⑥ UVA 防護效果的表示和產品標識。關鍵波長值 $\geq 370nm$ 表明產品具有 UVA 防護作用，和測定的 SPF 值標注在一起可宣傳寬譜或廣譜防曬；關鍵波長值 $< 370nm$ 表明產品

不具有 UVA 防護作用，產品只標識 SPF 值。

玖之二、護膚產品中保濕作用的體外評價方法

一、簡介

護膚品的保濕功效通過添加保濕劑用以模擬人體皮膚中由、水、NMF 組成的天然保溫系統，作用在於延緩水分丟失，增加真皮-表皮水分滲透，為皮膚暫時提供保護、減少損傷、促進修復。因此，有許多研究注重於護膚品中保濕劑保濕性能的評價。保濕劑保濕性能的測定分為體外與在體兩種。進行在體試驗比較難，雖然其對環境要求不高，但對測試對象要求比較高，受測試對象的年齡、皮膚類型、皮膚老化程度等因素的影響。體外測定保濕性能相對而言沒有諸多客觀因素的影響，結果比較恒定、可靠。這裡僅介紹目前保濕劑保濕作用的體外評價方法中，最主要和最常用的測定方法-稱重法。

二、原理與測定方法

(一)原理

不同保濕劑對水分子的作用力不同，吸收水分和保持水分的能力也不同。作用力大的，對水分子結合力強，吸收和保持水分的量也較大。因此，根據保濕劑濕、保濕性能的差異，在控常試驗條件的前提下，可以用稱重的方法來評價保濕劑的保濕功效。

(二)測定方法

- (1)設備：乾燥器、恆溫箱、分析天平、溫度計。
- (2)確定測定環境：測定化保濕劑的保濕性需要選定恆溫恆濕的環境下進行。一般採用密閉小容器，放置某一化學試劑的飽和水溶液，在規定的溫度下使之保持一定的相對濕度；亦可採用調溫調濕箱達到相應的測試環境。
- (3)吸濕率的測定：將乾燥至恆重的樣品稱重，分別置於溫度 20°C(或室溫)，濕度恒定(80%、44%、65%)的乾燥器中，放置不同時間(如 4h、24h、48h)後稱其質量。一般在相同條件下平行測量三次，取平均值。
- (4)失水率的測定：稱取一定量含水分的樣品，放置在乾燥器中，在恆定溫度、濕度下，定時稱量樣品的質量，計算出相應的失水率。相同條件下，平行三次試驗。
- (5)保濕率的測定：稱取一定量含水分的樣品，放置在乾燥器中乾燥，定時稱量樣品質量的減少，計算出樣品的保水率，通過對比分析，比較出不同樣品保濕性的大小。

三、影響因素和注意事項

(一)影響因素

稱重法對測試環境的要求比較高，要求恒溫恒濕的環境，所以它受到測試環境溫度、濕度的影響，並且與測試樣品的多少、樣品與空氣接觸面積的大小等因素相關，而測試時間對相對保濕率的影響不大。同時配方組成不同，保濕性能也有所不同，所以要求在測定時幾種樣品的內在狀況和外在條件必須一致，如有一種狀態發生改變，其測定值都隨之改變。

(二)注意事項

稱重法測保濕劑的吸濕性和保濕性，只是在同等狀態下測定幾個樣品的對比指標，不能作為單獨研究某一狀態下的數值。只有準確對比掌握各種保濕劑在產品中的保濕性的數據，才能根據產品的檔次有依據地選用保濕劑。

四、護膚產品保濕功效的非創傷性在體評價方法

(一)簡介

事實上，人們不僅在個人日常皮膚護理中，而且在臨床皮膚病的治療過程中常常也會使用護膚產品，因此，對護膚產品保濕功效評價顯得尤為重要。目前，國內外對護膚產品保濕功效評價使用最廣泛的是非創傷性在體評價方法。非創傷性在體評價護膚品皮膚保濕效果的方法主要有兩類：一類是測定皮膚彈性與幹糙性的方法；另一類是測定角質層水分含量的方法。後者主要有：

1. 電容量測定法：根據水是皮膚中介電常數最大的物質，當水分含量發生變化時，電容量同時發生變化的原理，通過測定電容值的變化間接反映皮膚水合狀態。常用的儀器是 Courage Khazaha 公司生產的 Corneometer CM820。
2. 電導率測定法：根據角質層內除含有水成分外，還有鹽類、氨基酸等大量電解質，存在在水分中的電解質具有電導性，通過測定表皮的電導率的變化可以反映表皮角質層含水量。目前市場上用的主要是 IBS 公司生產的 Skincon-100 與 Skincon-200 兩種測定裝置。
3. 經表皮失水率測定：稱為 TEWL (Transepidermal Water Loss)，測試原理是根據漫射原理來測定鄰近皮膚表面水分蒸氣壓變化，來反映經皮失水率。因此 TEWL 反映角質層的屏障功能，並不直接表示角質層含水量。皮膚的 TEWL 值越低，說明皮膚屏障功能越好，反之則越差，它可以作為評價護膚品通過保濕作用對表皮屏障功能的維護、修復和加強一個較為敏感的指

標。現在用於測定 TEWL 的儀器主要是 Courage-Khazaha 公司生產的 TEWAMETER TM210。上述三種測定角質層水分含量的方法中，最常用的是將電容量測定法和經皮失水率測定結合，綜合評價護膚產品的保溼功效。下面主要介紹皮膚乾燥度評價方法和測定角質層水分含量的電容量測定法，以及經表皮失水率測定。

五、皮膚乾燥度評價方法

(一)簡介

皮膚最外層的表皮角質層有保護全身皮膚完整性的作用。皮膚基底層與表皮皮脂和水合程度能控制角質層的更新。肉眼可見的角質層片的脫落被稱為蛻皮或蛻屑。一般情況下，皮膚表皮大約每 25~30 天完全更新一次，這取決於皮膚的部位。測定蛻屑速率\研究表皮角質化中病理改變的方法之一，也被用於護膚\品的評估，比如診斷乾燥病、或測量角質層的水化程度。

判斷皮膚乾燥程度最直接的方法是觀察皮膚表面的鱗屑。讚於皮膚起皺程度的外觀分級易受到環境因素改變及主觀判斷的影響，所以通過洗滌技術來收集角質細胞，將它們量化(稱量、細胞計數)或生化性質評估(提取脂類)是評估乾燥皮膚的一個合適方法。此外，膠帶黏貼技術很早就被人們用作評價皮膚乾燥程度，但從未被廣泛使用過。目前廣泛使用的是用透明膠帶獲取角質層表面的鬆弛細胞和鱗屑，用計算機圖像分析法來客觀地分析測定角質層的脫落部分，該方法具有快捷以及重現性好特點，對於乾燥皮膚的評估具有一定的價值。

(二)原理與測定方法

1. 原理

使用透明膠帶獲取角質層表面的鬆弛細胞和鱗屑，用計算機圖像分析系統來客觀地分析測定角質層的脫落部分的面積和厚度，用計算公式換算成“脫落指數”來評價皮膚的乾燥程度。

2. 裝置與方法

(1)角質層取樣：取樣裝置是一個直徑為 22mm 的透明圓碟，其一面塗有均勻醫藥級的黏滯層。黏合劑能夠安全地獲取角質層表面的鬆弛細胞和鱗屑，並能提供最佳的可見度。一般根據經驗，用手指按壓便可獲得可靠的樣品。然後用鑷子將圓碟從皮膚上取下待檢。

(2)獲取視頻圖像：應用計算機圖像分析系統獲取視頻圖像，樣品的攝影圖像通過與立體顯微相連的、具有高分辨率的黑白

CCD 攝像機拍攝。然後由圖像分析程序來分析圖像。圖像像素為 $512 * 480$ ，其亮度，在灰度的定義範圍內由 0~255。

(3) 圖像分析：應用圖像分析程序選定了圖像上的 200 μm 作為測量區域，測量脫落細胞所佔據區域和厚度。程序算出被角質細胞所佔區域的百分比，以及計算每一厚度部分作為百分比的像素數量。

Schatz 等人用這種方法對腿部不乾燥的、輕微乾燥的、嚴重乾燥的皮膚進行評估，脫落指數分別為 7.6, 28.3 和 70.0 顯示了很好的評價效果。

(三) 影響因素首注意事項

1. 光照強度

圖像分析中一個至關重要的因素就是分辨率、相似度和恒定的光照強度。用纖維光學燈所反射的白光能得到最好的效果。透過白色半透明的玻璃散射光能加強圓碟上樣品的色差對比。由於其鬆散的結構，在黑色的背景下顯得特別明亮。亮度和其厚度成反比。在測量之前，需要先用參考的灰色卡或自動曝光表來校準其亮度。

2. 其他

圖像像素為 $512 * 480$ ，其亮度，在灰度的定義範圍內由 0~255。數據可以運用 t 檢驗或方差分析等統計方法分析；根據統計分析結果，脫落指數表現出非常高的重視性。

六、電容量測定法

(一) 簡介

角質層含有足夠的水分是非常重要的，它能保持皮膚的表面柔順光滑和柔韌性，一定的濕度，維持表皮完整的屏障保護功能，人體角質層的水合程度是判斷皮膚表層健康或得病的主要依據之一，比如老年人的光化皮膚、有炎症情況的皮膚等，也是評估各種保濕產品功效的主要方法。

為了測定角質層的含水量，已經有各種商業化的實驗儀器，其中有的實驗儀器是以電導率法為基礎的：Skicon 和 Nova DPM9003，本節介紹的 Courage-Khazaha 公司生產的 Corneometer CM 820 PC 是以電容法為基礎的儀器。

電容法測量儀器對於健康或是病害的皮膚所進行的水合度檢測結果精確度和重現性高，操作簡單，使用方便，成本很低。當在設定的實驗環境下使用電容法，由於電容水合值和外界的相對濕度呈線性關係，所以所測得的電容數據可通過外的相對濕度來

修正。該設備適合用於各類皮膚保濕產品短期功效及長期功效的評估。同時，該設備也被廣泛用於皮膚病學、藥物學及皮膚護理的研究。

(二)原理與測量方法

1. 測量原理與儀器

儀器的主要部分之一是一個鍍金的探頭(電極)。探頭寬 $50\mu\text{m}$ ，交錯的空間長 $75\mu\text{m}$ ，其工作區域覆蓋了一個 $7\text{mm}\times 7\text{mm}$ 的表面。電極的工作區域由一層厚 $20\mu\text{m}$ 的絕緣玻璃化物質所包裡。整個探頭在 $1.6\text{N}/\text{m}^2$ 的恒定壓力下工作。由於探頭和皮膚表面間沒有之間的電流通過，所以不會有電流進入皮膚。只有皮膚的表層會有一個頻率各異的場強。皮膚上場強的形式和深度由電極的幾何形態和其表面包裡的絕緣物質所決定，只有電極中絕緣物質含量改變才會影響到整個電容。乾燥的角質層就是一個絕緣媒介。當角質層發生水合時，電極會探得顯著的變化。這樣整個系統的電容都發生了變化，也表明了皮膚的水合狀態有了改變。

測定結果用濕度測量值(Moisture Measurement Value,MMV)表示。理論上其範圍從 $0\sim 150$ 。一般說來該儀器得出的數據是這樣表示水合程度的：極端乾燥皮膚為 $30\sim 60$ ，乾燥皮膚為 $60\sim 70$ ，正常的水合皮膚為 $70\sim 90$ ，而 90 以上則表示為濕潤的皮膚。該儀器能夠與電腦相聯，使用標準操作軟件，能對儲存在電腦中的實驗對象的性別、年齡、日期、時間、測試的皮膚區域、溫度以及相對濕度等等數據進行處理，所有結果都將列在屏幕上或被打印出來。

Barel A O 和 Blichman 等人對該測試方法的精確度和靈敏度、可重現性等的研究結果表明：

- (1) 精確度和靈敏度：他們用電導率法獲取實驗數據和用電容法獲得的皮膚水合程度結果進行比較，並用已知的電導率數據來直接校正，由此得到兩種測試方法有很高的相關性。電容法的靈敏度範圍由 $20\sim 110$ 。他們認為電容法對於測量水合程度較低的情況靈敏度更高。
- (2) 可重現性：對於電容法的可重視性他們在同一個人不同的部位的皮膚，以及一群年齡相近的人的進行實驗。與其他測試方法的研究結果一樣，在同一實驗對象身上，水合程度測量的可重視性有 $4\%\sim 5\%$ 的差異；當研究對象性別不同，年齡相近時，差異系數約 10% 。電容法的實驗結果是可重現的。

(3)皮膚水合過程的檢測深度：他們用增加纖維帶層數在前臂的皮膚上做實驗，以研究用電容法來檢測水合過程深度。聚酯纖維帶是一種絕緣材料，對於水合沒有任何影響。結果表明電容法的皮膚檢測深度大約為 100 μ m。

2. 護膚品保濕功效評價應用

(1)測試步驟與要求：用電容測定法測試護膚保濕產品保濕功效的主要步驟如下：

- ① 選擇健康志願受試者。受試者無任何皮膚疾患，受試部位皮膚無異常，也未塗抹任何外用藥物和化妝品等外用制劑。
- ② 試驗前受試者需要用統一的溫和法潔劑清洗前臂內側面，在恒定的環境中(溫度為 20~22 $^{\circ}$ C，相對濕度為 40%~60%)靜坐 30min；在測試期間，受試者不要隨意離開測試環境，並要保持情緒穩定，切忌激動。
- ③ 受試產品塗抹量一般在每平方厘米 2mg，塗布在 2cm * 2cm 的區域，區域之間間隔至少 2cm，選擇一區域作為空白對照。
- ④ 選擇不同時間，分別測定各測試點的變化值 X_{nt} 和 X_{ot} ，每點一般測定三次，取均數；在 X_{nt} 和 X_{ot} 中，分別代表：
n=樣品編號
t=各個不同測試時間
0=空白對照
- ⑤ 結果計算。將每個點每個時段檢測的平均數值減去每個空白點的數值，即為該時段該部位的測定值，結果以濕度測量值表示；亦可以計算 X_{nt}/X_{ot} 比值。其數值或比值越高，則表示產品的皮膚保濕功能越好。

(2)即時功效測定：護膚保濕產品的即時功效可以通過使用產品後皮膚水合度的增加量來分析。實驗進行對稱、隨機的比較。在塗布產品前先要用 10~30min 來記錄皮膚原有的水合度。產品使用後，每隔 10~15min 就記錄一次數據，整個實驗持續 60~180min。圖 3.2.2 顯示了一個含 2% 的尿素作為保濕因子，典型的水包油的乳化體系對皮膚功效。從圖中可見在使用完產品後皮膚的水合度顯著的提高，這與乳化體系中的水成分有關。多餘的水分會在皮膚表面蒸發，皮膚的水合度有所降低，過一會兒後，水合度的增長又會持續一段時間。角質層水合度的增加量及持續時間就是保濕產品的功效

測量數據。圖 3.2.3 顯示含尿素 4% 的乳化體系對於前臂皮膚水合能力的功效。實驗發現，在使用該產品後，皮膚的水合度會立即顯著增長，緊接著稍有減弱。顯著增長的水合度會維持較長的時間。

- (3) 長期功效測定：護膚保濕產品的長期功效也能通過電容法來評價。保濕產品的長期功效實驗一般在有乾燥皮膚現象的中年婦女群體中(皮膚濕度測量值在 50~60，樣本大小在 12~30 例)。實驗環境可選在標準的實驗室或是家中。保濕產品在固定的皮膚部位每天塗布 2~3 次，持續 2~3 周。對稱的皮膚部位不使用產品或用對照樣品。在使用產品前及使用後 1、2 和 3 周時分別用電容法進行測量。經 Barel A O 等人實驗研究發臨床觀察到的皮膚乾燥度與皮膚的電容值間有緊密的相關性。

(三) 測定的影響因素

1. 外部環境的因素

我們知道周圍環境的溫度和相對濕度等這些外部因素對於角質層水合過程有影響。用電容法所測得的水合值和環境的相對濕度呈線性關係。因此，用電容法測皮膚水合值時實驗環境必須保持恆定的相對濕度，一般控制在相對濕度 40%~60%。如果測量水合值時環境的相對濕度差異較大，測量結果應用相應斜率曲線來修正處理。溫度也會影響測定值，當溫度超過 22°C 時電容值會增加，以及出汗時水合度很高。因此，實驗的環境溫度也必須保持恆定，最好在 20~22°C 之間。

2. 季節因素

夏季的室外溫度和相對濕度都很高，身上所有的部位的水合度都比平時要高加上表皮出汗的干擾，很難在每年中的此段時間內獲得可靠且重現性高的實驗數據。冬季，由於相對濕度較低，典型的皮膚乾燥症狀會出現在暴露在空氣中的皮膚上。為了最大限度減少這些外來因素的影響，實驗對象在實驗環境中至少休息 30 分鐘。

3. 皮膚的解剖部位因素

因為全身各個部位的角質層水合情況不同，所如何選擇進行水合檢測的皮膚區域是非常主要的。前額及手掌的水合度較高，而腹部、大腿以及腳跟部水合度較低。身上的對稱部位的水合度通常是相同的，可以進行左右對照實驗，通常選擇前臂內側部位進行。比較實際最好在對應的解剖部位進行。

4. 性別與年齡因素

關於這方面電導法和電容法的研究結果一樣，同年齡組中不同性別人的皮膚水合情況是一樣的。有人研究了 18~25 歲的成年人角質層的皮膚水合度狀況，發現其濕度測量值隨年齡的增加而緩慢地降低。

5. 皮膚疾患等因素

用電容法來檢測乾燥鱗屑損傷性皮膚的水合度時，檢測結果往往很低。當皮膚與各種刺激性化學試劑相接觸時，比如表面活性劑，會有複雜的皮膚受刺激的現象。除了典型的紅腫等受刺激症狀外，角質層的屏障功能會受到損傷，此時該層的含水量也較低。可以通過皮膚顏色的觀察、TEWL 和前臂角質層的水合度的測定來綜合評估某些家用洗滌劑的刺激強度。

四、經表皮失水率(TEWL)測定

(一)簡介

目前世界上許多研究機構通過測定經表皮失水率(Transepidermal Water Loss, TEWL)來評價皮膚屏障功能。皮膚失水可以分為兩種：角質層的不顯性失水，即皮膚本身散發著一定的水分，即通過不顯汗的水分蒸發；另一種是通過出汗的。最初 TEWL 被定義為“水蒸氣通過被動擴散的方式在角質層的不顯性失水量”；而現在其含義是“皮膚總的失水量(在汗腺不活動的狀態情況下)”。因此，我們必須記住 TEWL 是反應角質層對於水的屏障功能，是評價角質層狀態的重要因子。TEWL 通過評價角質層屏障功能達到測護膚品通過保濕作用對表皮屏障功能的維護、修復和日強作用；也可以應用於不同皮膚疾病狀態下對皮膚屏障功能的評價。本章節主要介紹較廣泛使用的 TEWAMETER TM 210。

(二)原理與測量方法

1. 測試原理與儀器

TEWAMETER TM 210 是一個測量皮膚表面水蒸發的儀器，所應用的原理是根據 Adilt Fick 的漫射定律，其物理公式是漫射的趨勢 dm/dt 表明在每個單位時間裡有多少物質被傳送。漫射趨勢是垂直與界面 A 的含量比例和每個單位長度密度的變化。D 是表示在大氣層中蒸氣的漫射。這個定律只適用於均勻的漫射區域，從皮膚表面蒸發的水分，經過兩邊開口、圓筒狀的探頭形成“水蒸氣壓梯度”，用電容傳感器測定這一範圍內兩點的水蒸氣壓，可以計算出經表皮蒸發的水分量。

TEWAMETER T 210 包括一個可分離的測量探頭，通過電

線與機身相連，專導信號。探頭前部有一個圓筒狀的頭，大約直徑為 12mm，高 15mm，組成一個小室，兩端均為開放的。這個小室裡有一個濕度和一個溫度感應頭，分別在皮膚表面上 3mm 和 9mm，即在水蒸氣梯度層的範圍內。探頭是整個儀器的核心部件之一，正確維護保養和使用對於獲得準確、重複性好的結果非常重要。因此，要注意探頭的清潔與保養、正確掌握對探頭的操作。

2. 測定條件、要求與步驟

TEWAMETER 是非常靈敏的儀器，它的測定靈敏度達到 1/100 度。因此，為了保證測定的穩定性和正確性，必須注意和控制測定的環境首條件，以及測定步驟：

- (1) 測試時必須保持溫度和濕度的恆定：理想的溫度是 20°C，相對濕度為 40%~60%。
- (2) 測試時應避免在強烈的燈光或陽光直射的下進行，因為光的熱量會影響測定的誤差。
- (3) 由於流動的空氣會造成測試數據的波動，因此，在測試時請關閉門窗，避免人員走動、說話和對著探頭呼吸，測試在有機玻璃罩子內進行被推薦。
- (4) 選擇健康志願受試者，受試者無任何皮膚疾患，受試部位皮膚無異常，也未塗抹任何外用藥物、化妝品等外用制劑。
- (5) 試驗前受試者需要用統一的溫和清潔劑清洗前臂內側面，在恆定的環境中(溫度為 20~22°C，相對濕度為 40%~60%)靜坐 15~30min；在測試期間，受試者不要隨意離開測試環境，並要保持情緒穩定，切忌激動，情緒波動往往會使蒸發值升高。
- (6) 受試產品塗抹量一般在 2mg/cm²，塗布在 2cm * 2cm 的區域，區域之間間隔至少 2cm，選擇一區域作為空白對照。
- (7) 使用後 10min、30min、60min、90min、120min，分別測定各測試點的變化值 X_{nt} 和 X_{ot}，每點一般測定三次，取均數；X_{nt} 和 X_{ot} 分別代表：

n = 樣品編號

t = 各個不同測試時間

0 = 空白對照

- ⑧ 結果計算。將每個點每個時段檢測的平均數值減去每個空白點的數值，即為該時段該部位的測定值。結果以 g/m² h 表示；亦可以計算 X_{nt} 和 X_{ot} 比值。數值和比值越低，則表示護膚產品通過其保濕功能對皮膚屏障功能的影響作

用越好。

(三) 測定的影響因素

1. 關於儀器的因素

由於 TEWAMETER 是非常靈敏的儀器，操作不慎將引起的測定誤差，因此，要注意以下幾點：

(1)開機預熱：儀器必須在開機後，預熱 15min 後方可進行測定。

如果一天中要間斷的進行測定，期間不必把機器關掉。

(2)調零：在機器預熱期，如有需要可以進行調零，保存完好的並規律性進行校正的機器不必每天都調零。

(3)測定：探針接觸皮膚的時間越短越好。一般從測量開始，大約 30~45s 就可以得到一個穩定的測定值。皮膚測試面積接近 1 cm^2 ，相應最小的測定值為 $6 * 10^{-6} \text{ g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ 。具有如此高的精確度，所環境干擾引起的 TEWL 波動也能被快速檢測出。在 TEWL 儀器中有一個阻尼濾過器，可以減少、消除引起波動的相關因素，當濾過器開啟後，探頭就不能感應波動和人為影響。上面所說的測定時間 30~45s，只是 TEWL 測定的最短時間，如在有皮膚疾病的患者，測定時間還要適當延長。

(4)零位(置)偏移：兩測定的 TEWL 零點可能不一致，這是因為外界濕度和溫度突然改變對探頭的影響

①濕度變化。TEWL 測定後，在探頭小室內可能殘留大量水蒸氣，引起梯度壓持續存在，所以在一段時間內將有零點偏移。為了加快水蒸氣的蒸發，探頭將垂直上下移動，2~4min 後，零點將恢復至正常位置。

②溫度變化。探頭的溫度感應器和探頭柄中的放大器在測定 TEWL 時非常重要。在測試過程中，探頭溫度的升高不僅僅是由於感知被測部位皮膚溫度，還取決於測試者手部溫度。在測試中，如果測試時間過長也可能引起零點偏移，可能是因為在這個長時間測試中，探頭一直握在測試者手裡的緣故，導致了溫度變化。所以在測試時避免直接用手接觸探針，最好戴一副絕緣手套。

(5)測定位置：一個站立的人，如果他的體溫高於或低於周圍環境，可以加速皮膚與周圍空氣的對流。為了避免這個“管道現象”，把被測部位放在一個水平的平面中，探頭與這個平面平行，這樣就很容易控制探頭的位置和壓力，避免探頭的移動。

- (6)探頭接觸壓力：探頭接觸皮膚壓力的不同也可引起 TEWL 值的改變，這是因為皮膚和感應器的距離不同，水滲透能力的改變；但要注意壓力太低，水蒸氣可能從空隙處跑掉，影響測定結果。
- (7)探頭保護裝置的應用：雖然在測試過程中推薦使用探頭保護裝置，但是認識到應用這些裝置後對測定值產生的影響非常重要。目前用得最多的保護裝置是保護屏和濾線柵，應用保護裝置後可能增加探頭的厚度，從而影響 TEWL 值的測定，但如果進行相對測定的話，是可以忽略的。應用和不應用保護裝置所測得的 TEWL 值間不具可比性。一般來講應用保護裝置所測得的值往往低於不應用保護裝置，如果進行 TEWL 絕對值的測定不應使用遮蓋探頭的保護裝置。在測定身體毛髮部位時，由於毛囊可以直接接觸探頭感應器，里面的灰塵、蒸發物質、溶劑等可以損害探頭，所以建議使用保護裝置。
- (8)不同的儀器和儀器內部的變化：不同儀器測定的 TEWL 值可能不同，相同儀器在最初使用和使用一段時間後也可能存在測定值間的差異，新的儀器反應比較快，得到穩定值所需要的時間短，這主要取決於探頭，可能時間長後有一定的老化。所以為了得到準確的測定值，測試前進行校正是很重要。
- (9)校正：每隔一段時間必須人工進行儀器的校正，具體的校正操作步驟可以參照相關說明書。
- (10)準確性：有報道稱用 TEWL 測得的水蒸發速度要低於實際值。當蒸發速度為 $20\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ ，測定值下降 10%；當蒸發速度超過 $80\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ ，測定值下降 50%，所以人們認為探頭會影響水蒸發的速度，錫其在水分高速蒸氣時。但大多數由清潔劑與皮膚疾病(如銀屑病、濕疹等)引起皮膚屏障功能受損的患者水蒸發速度為 $20\sim 60\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ ，所以實測值偏差不會太大，是可以忽略的。但是在一些嚴重疾病，如燒傷、創傷等，水蒸發的速度大大提高，超過 $100\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{h})$ ，這時測得的 TEWL 值要考慮這個因素。

2. 環境因素

- (1)空氣對流：這是導致測定結果波動的主要干擾因素，通常出現在室內，如人員的走動，關門和開門，在測試範圍內呼吸和當時的空氣條件等。由於這些干擾因素很難避免，所以推薦使用類似保溫箱的測試盒，上端有開口，在盒子旁邊有一

個小洞，可以把前臂伸入盒內進行測定，這樣就最大限度避免周圍空氣的影響。

- (2)周圍環境空氣溫度：周圍環境空氣的溫度可以直接或間接影響皮膚溫度，當周圍空氣溫度上升，皮膚溫度也隨之上升。周圍空氣 30°C 時所測得 TEWL 值幾乎是 22°C 的 2 倍，所以必須控制周圍空氣溫度，一般在 20~22°C。
- (3)周圍環境空氣濕度：周圍環境相對濕度是一個複雜、重要的影響檢測結果的因素。在測定 TEWL 時必須記錄周圍濕度，在進行 TEWL 值的比較時也要考慮把當時測定時的濕度。如果房間內儀器設備允許，可以將相對濕度調至 40% 左右。
- (4)季節變化：季節變化將引起環境濕度和溫度的改變。將室內溫度調至 20~22°C 可以預防季節變化帶來的影響。季節變化帶來的影響主要是相對濕度和皮膚的水合狀態的改變，後者主要取決於前者，因此，TEWL 測定值必須注明是在哪個季節檢測的。
- (5)直接光照：直接光照可以使被照射物的表面溫度上升，也可使被照小物周圍的空氣溫度上升，從而引起對流。TEWL 檢測時不能直接暴露在光照下。

3. 個體差異因素

- (1)出汗：為了得到正確的 TEWL 測定值，任何引起出汗的重要因素都是需要被控常的，如物理因素、溫度改變或情緒異常等。如果周圍環境溫度低於 20°C，皮膚溫度低於 30°C，汗腺處於靜止狀態，意味著將不會產生對流與熱量。所以在進行 TEWL 時，受試者必須在恆定的環境中進行 15~30min 的休息。
- (2)皮膚表面溫度：皮膚溫度是一個提示正常人皮膚表面失水率的必需因素。當室內溫度為 20~22°C，正常皮膚溫度為 28~32°C，幾乎不會影響 TEWL 的測定。因此在結果報告中必須註明當時的室內溫度和皮膚溫度，尤其是環境溫度不在 20~22°C 範圍內。

玖之三、黑色素生成抑制劑的評價法

一、評價技術概論

就黑色素生成抑制劑的評價法而言，重新篩查(Screening)新藥劑的評價方法和為(知道)已知特定藥劑的作用機制而進行的評價，其區別在於這些試驗方法本身的選擇組合方法。就篩查法而言，需要對大量樣品同時進行評

價，所操作必須簡便，這是很重要的。但是，為了說明作用機制，得出科學結論要採用各種各樣的分析技術。無論哪種方法，在藥劑的效果評價上不可改變的是最終要做人的效果試驗(臨床試驗)。在此，以篩查法為重點，按照從一般的黑色素生成抑制劑的評價到人體試驗的相關環節的順序進行簡要說明。

二、體外(in vitro)評價技術

(一) 體外一次篩查法

首先，要進行黑色素生成抑制劑的篩查就必須知道由日照引起的黃褐斑、雀斑的生成機制。可是有關黃褐斑、雀斑的生成機制還有很多未知的地方。從防止由日照引起的色素沉著，換句話說從抑制過剩色素的生成直接關係著防止黃褐斑、雀斑生成的機制還有很多未知的地方。從防止由日照引起的色素沉著，換句話說從抑制過剩色素的生成直接關係著防止黃褐斑、雀斑生成的觀點出發，抑制日照引起的色素沉著及其黑化過程主要是通過藥劑的篩查來進行。即使是由日照性色素沉著等引發的過剩色素生成也不可能簡單地說清楚，色素沉著的機制如前所述。其中，現在被承認的全白有效成分的大部分是從抑制酪氨酸酶活性的作用出發，即是抑制黑色素合成的關鍵酶酪氨酸酶的活性，特別是從抑制過剩的色素生成的對症療法的觀點出發來選擇。現今為止這也佔主流的觀點，是確實可行的方法。儘管目前對作用機制還不清楚，如把細胞水平的黑色素合成量的降低作為指標進行篩查，就可篩選出黑色素抑制劑，這種方法也被同時使用。這是一種優先考慮同時篩查出上述的酪氨酸酶抑制劑，而把其他物質的作用機制放在以後研究的想法。選擇從表皮細胞來的信息傳達物質的抑制劑等時，在篩查的第一階段最好把特定的信息傳達物質作為目標。這樣便可順理成章地根據目的建立起特殊系統。

(二) 酪氨酸酶活性抑制試驗

酪氨酸酶用的是蘑菇酪氨酸酶(Sigma)，試驗中小鼠 B16 黑色素瘤及人皮膚的黑素細胞已被廣泛使用。對酪氨酸酶的抑制方式有時因酶材料甚至同工酶(isozyme)的不同而有顯著變化。必須有對此充分認識的前提下進行試驗。酶活性的測定因使用酪氨酸羥化酶(Tyrosine hydroxylase)或多巴氧化酶(DOPA oxidase)而不同。前者是用閃爍計數器(scintillation counter)測量帶有氚(tritium)標志的酪氨酸基質被變換成多巴時游離出的帶有氚(tritium)標志的水量的方法，後者是用 475nm 的吸收波長觀測從多巴基質變換成的多巴色素(DOPAchrome)，求得酶反應的被始速度從而測定酶的活

性。篩查(Screening)法中一般使用較簡便的後者，根據抑制多巴氧化酶(DOPA oxidase)的活性求得酪氨酸酶抑制效果。用 B16 黑素細胞溶解液作為酪氨酸酶粗酶液使用的簡便方法說明如下：在 96 孔微型板(96-well microplate)上將 B16 黑素細胞以 3×10^4 的四次方 cells/well 的細胞密度接種培養 24h，用磷酸緩沖液(buffer solution)(50mM，pH6.8)100 μ l 洗淨細胞兩次後，再用含有 1% TritonX-100 的磷酸緩沖液(buffer solution，50mM，pH6.8)45 μ l 溶解，添加 10Mm L-DOPA(5 μ l)和材料 50 μ l，在 37°C 下培養 1h 後，用反應前後的 475nm 的吸光度測定生成的多巴色素(DOPACHROME)而得到酪氨酸酶粗酶液。

(三) 抑制黑色素合成試驗

培養細胞一般使用人體黑素細胞、黑色素瘤細胞及小鼠 B16 黑色素瘤細胞等，每種都有幾家公司銷售。在以篩查為目的使用時，以易於培養的小鼠 B16 黑色素瘤細胞最為合適。因小鼠 B16 黑色素瘤細胞在經過幾代的反復培養後，它的黑色素產生能力會降低，所以有必要實行定期的單細胞分離培養(single cell isolation)，克隆出黑色素產生能力高的細胞。即使這樣產生能力還是下降時，可在小鼠的背部皮內注入細胞，用形成的黑色腫瘤再次重新培養。簡便的測定方法是在 96 孔微型板上將 B16 黑色素瘤細胞以 3×10^4 的三次方 cells/well 的細胞密度接種培養 24h。然後換成添加有藥劑的增殖培養基(culture media)在 37°C 下繼續培養 72h 後，目視觀測判定。使用熊果苷時抑制黑色素合成效果的例子如圖 3.3.5 所示。同時用 MUH 法(Sigma)測定細胞數，選擇無細胞毒性，有效抑制黑色素合成的藥劑。

定量生成黑色素時，在 6 孔板(6-well plate)上以 1×10^6 的六次方細胞密度接種培養 24h。然後換成添加有藥劑的增殖培養基在 37°C 下繼續培養 72h 後，經酪氨酸處理採取細胞，用血球計算板或粒子計數器(Coulter counter)測定細胞數後依據細胞數添加 1mol/L 的 NaOH，加熱 30min 後，用 475nm 測定吸光度。有關用更少量的細胞定量生黑色素的方法，有報告說用酪氨酸處理細胞，採樣後在膜(membrane)上吸取印跡(blotting)固定，再用密度計(Densitometer)測定。要把優黑色素和褐黑色素等分開測定黑色素定量時，一般是用 HPLC 分別將褐黑色素在 HI 的作用下經加水分解而生成的 AHP(Amino hydroxyl phenylalanin)，優黑色素是在 KMnO₄ 的作用下氧化分解而生成的 PTCA(Pyrrrole-2,3,5-tricarboxylic acid)定量的方法。用這種方法篩查的藥劑已被確認在黑色細胞內

有抑制黑色素合成效果，其次是將它們作為有力的候補藥劑，為確定這些藥劑的作用點而進行詳細評價。一般來說最初是評價對酪氨酸酶活性(阻礙)抑制的效果，如果沒有直接的抑制效果，可以有無抑制酪氨酸酶的生成效果、抑制糖修飾作用如何、抑制細胞內信息傳達途徑的情況如何等多方面進行研論。

三、體內(in vivo)評價技術---用實驗動物做動物體內試驗

細胞水平的體外試驗已成為重要的試驗方法，但是，為了填補用細胞和人體進行評價之間的差距，一般是利用動物試驗進行評價。通常使用與人一樣在皮膚中有黑素細胞、含有與東方人同樣的黃褐色素且經紫外線照射可被曬黑的褐色土撥鼠。有色土撥鼠(guinea pig)剃毛後，用遮光布將不必要的部位蓋好，每隔幾天用紫外線照射【根據情況可用紫外線 A 聯合照射(PUVA)】數次，這樣反覆幾次使均一的紫外線色素沉著形成。可在經中波紫外線(UVB)或紫外線 A(UVA)聯合處理，最終一次的紫外線照射後，也可在色素沉著形成後開始測定藥劑的效果。前者適用於評價日曬後色素沉著的預防效果，後者則適用於評價色素沉著的早期改善效果。藥劑的效果是用肉眼或色度計(colorimeter)根據色調變化測定值 L^* 來判定的，通常在數周內實行。例如，使用中波紫外線(UVB)時，以被剃掉毛的褐色土撥鼠背部不至引起炎症的 0.7MED 計量，1 天 1 次，3 天中連續照射作成色素沉著。紫外線 A(UVA)聯合處理是指經皮或經口投入適量的 8-MOP，1~2h 後用長波紫外線(UVA)1/cm² 照射作成色素沉著。不管哪種方法，重要的是使用不至引起嚴重炎症的紫外線(UV)進行照射，因為這樣的條件因動物種類，測試系統的不同而有很大變化，應選擇適點目的的紫外線照射方法。本試驗中最值得注意的是不僅動物的個體差異，而且藥劑塗抹部位的差異也很大，因此重要的是一定要在幾個動物身上，轉換控制藥劑塗抹部位進行比較。而且因土撥鼠的皮膚很敏感，隨時觀察皮膚受刺激的狀況也是很重要的。

四、人體試驗的評價技術---人體的防止紫外線色素沉著改善試驗

說到上述被選定的與評價有關的藥劑，實際上必須是被認可了的用於人體的非醫藥品，而且顯示有“防止因日照引起的黃褐斑、雀斑”的效果。為了觀察到這種功效，常規方法是對皮膚照射人工紫外線以引起色素沉著來對藥劑進行評價。觀察防止日照後色素沉著的效果，還是觀察色素沉著的早期改善效果的評價方法，其區別在於，前者是在測定開始時，即分別通過利過紫外線使試劑塗膜逐漸變黑隨時測定，後者是從色素沉著開始出現後再測定等方法來確定藥劑效果的。通常這些方法是在無紫外線照射的手臂內側等處進行。首先階段性地在各受試者的上臂內側部位照射適量的紫外線【長波紫外線(UVA)+中波紫外線(UVB)測 MED(最小紅斑量)。之後連續 3 天在上臂內側試驗部位照射 1.0~1.5MED 的紫外線，作成兩處色素沉著

部位，用評價藥劑和對照(不使用藥劑)1天3次連續塗抹，要確保紫外線照射時皮膚上沒有殘留受試物。每過一段時間用肉眼及圖像解析的方法觀察色素沉著的變化程度。可以說皮膚的顏色主要是由黑色素和血紅蛋白(Hemoglobin)的量來決定的。可以測定這兩個因素的簡便儀器，通常是採用色彩色差計進行測定的。表色採用L*a*b表色系統，其數據主要是依據L*值(亮度)的變化，要注意這不是直接觀察黑色素量的方法。另外，最近以黑色素量為指標的黑色素測定儀(mexameter)等儀器得到量步推廣。有關利用這種方法測定的人體由紫外線引起的色素沉著的抑制效果，以3%熊果苷的測定為例加以說明。健康受試者40名(男性19名，女性21名)，1MED的紫外線1天1次，連續3次，計3次照射受試部位，紫外線照射開始後1天3次，計18次，分別用含3%熊果苷和不含熊果苷的美容液塗抹，有關7日後的黑化度和黑化度比較結果，Wilcoxon秩和檢驗的結果和使用前後的皮膚亮度(L值)差的比較繪於圖3.3.6。

在7天後的觀察結果中，效率為“稍微有效”以上的占為90%。另外測定時結合藥劑的作用機制對若干試驗方法做了精心設計。此外，多數消費者的興趣在於藥劑是否可使現有黃褐斑變淺。考慮到這些，在黃褐斑上塗抹藥劑的效果作為藥劑對肝斑等色素沉著的改善效果在臨床上受到重視。這種試驗必須有醫師的診斷。臨床評價時色素沉著的種類是很重要的，而且因臉部被作為試驗對象，日常受紫外線照射的清況必須予以考慮。一般是對黃褐斑均勻分布於臉面兩側的受試者進行控常從而比較左右臉面的差別。為了防止紫外線的影響，同時使用有遮光效果的產品。評價判定時，在數名專家的目測判定以外，利用色彩色差計、黑色素測定儀、偏光攝像機、雷蒙系統(REMO System)等方法進行定量解析。關於各種藥劑對肝斑等的有效性，圖示為被報告了的熊果苷、維生素C誘導體的例子。對各種的試驗的評價判定是由試驗醫師目視判定。

按照規定，有效性的標準、表達方法各不相同，直接引用文獻記載的說法。將配合有3%熊果苷的化妝水、乳液、護膚霜相互組合，對28名肝斑患者使用12周的臨床結果中，“稍微有用”以上的有效率占71.4%。另外做長期連續使用試驗時，使用配合有7%熊果苷的護膚霜，對39名肝斑、老年性色素斑、炎症後色素沉著患者連續使用1年的臨床結果中，“稍微有用”以上的有效率占全病例的84.6%。從對62名患者24周連續使用的臨床效果來看，“稍微有用”以上的占83.9%。對34名雀斑、肝斑、老年性色素斑、太田痣的患者3個月間投用配有10%維生素C誘導體的護膚霜，臨床結果，“稍微有效”以上的有效率占76.5%。像這樣針對消費者的對某一種黃褐斑的改善效果在臨床上被全力研論，對其有效性也已有發表的報告。

五、今後的課題和展望

(一)色素沉著的治療

消費者主要將含有美白有效成分的美白化妝品使用在黃褐斑部位。這時的美白劑可被認為是對過剩的色素合成有抑制效果的對症下藥。因此，即使這可使黃褐斑等變淺，但不能從根本上消除它們。要根除黃褐斑，就必須根除引起黃褐斑的根本因素。由體內激素等參與的因素，有必要進行體內療法，而由紫外線生成的黃褐斑是表皮細胞等的基因變異所造成的，要根除它只有通過外科的方法。最近，除了用美白化妝品治療黃褐斑以外，由醫師進行的激光治療、去角質化學療法(chemical exfoliating)等已相當廣泛。據說激光適於對日光性色素斑(老年性色素斑、雀斑狀色素斑)等的治療。但是這樣的外科方法也不是萬能的。正如人們所知道的，因黃褐斑而異，有的激光療法完全無效，就肝斑而言，有變得更黑的例子。另外，要想永久性地去除也有很多的困難，一般來說，有臨床治療後 2~4 周又復發的，有在激光治療後同時以美白劑進行集中養護的。光是為滿足這些目的，美白有效成分及其制劑的開發已變得愈來愈重要了，另據報道，黃褐斑顏色的深度在一年之內是有變化的，換句話說，夏天變得深，冬天變得淺。這顯示黃褐斑對紫外線的反應敏銳，也說明在考慮使用美白化妝品的同時首先應考慮到防紫外線對策的重要性。

(二)今後的研究課題和下一代美白劑

近年來，有關紫外線引起的黑素的形成機制及其控制的研究有了很大的進步。除以往的生物化學、細胞生物學的方法以外，還利用遺傳工程增加了對細胞間、細胞內信號傳達的分析，分子水平的表達正在急速發展，比 10 年前有了顯著的成果，但或許現在只是進入了對這些機制有了大概認識的階段。特別是“黃褐斑”在皮膚學和細胞生物學上的機制，可以說還基本上未能解開。今後的美白劑開發是我們意識到的研究課題，幾乎還未被著手的“黃褐斑”機制的解密是其中的一個重要項目。下一代的美白劑，一方面隨著這些機制的解密而被開發。更進一步，隨著對細胞間、細胞內信號傳達機制的研究，以及更豐富的分子水平知識的積累，可以想像，在新的認識的基礎上，設想從分子水平進行控制的美白劑開發會活躍起來。

如上所述，具有各種各樣作用機制的美白劑主劑已被開發研制，有關黃褐斑臨床效果的研究也有報導。可以預想，今後對已有的研究成果將進一步推廣，且新的美白劑會不斷出現。現在美白劑在功能表達上還是單純

的“防止因日照引起的黃褐斑、雀斑”，但可以認為包括是否延續現狀的議論在內，顯然今後的研究會向著擴大功能效果範圍的方向發展。

玖之四、抗皺化妝品有效性評價

皺紋是老化的典型例子。可以說對它的預防、改善是大多數女性的願望，也是化妝品的重要作用。本節將就皺紋的定義和分類、皺紋的發生機制、皺紋的評價技術以及皺紋隨年齡而增加的變化和抗皺化妝品的有用性予以介紹。

一、皺紋的分類

皺紋與黃褐斑，白發等均為老化的代表性變化。雖然關於皺紋的定義和分類，在組織學、形態學和發生機制等的觀點上已提出了許多方案，但仍未達成一個統一的見解。因此，這裡介紹 Lligman AM 等提出的皺紋的 3 種分類。

- (一) 線形皺紋(linear wrinkle)：從眼角呈放射狀走向的溝紋【還被稱為烏鴉腳印(crow's feet)】或額頭上水平走向的溝紋。由自然老化產生，經紫外線照射而被加強、加速。從組織學來看，皺紋部位呈現出彈力纖維變性(elastosis)，與周圍的正常部位相比無明顯差異。
- (二) 圖形皺紋(glyphic wrinkle)：由皺紋的相互交錯而形成的三角形或四方形圖案的皺紋，是被光老化了的皮膚，尤其是頸部、頸背和臉部更明顯，可以說是光老化的典型例子。從組織學來看，肉眼可見的皺褶部位在真皮上層也呈現出淺溝。淺溝部的真皮乳頭的形狀不鮮明，包括周圍的組織在內呈現出彈力纖維變性。
- (三) 波形皺紋(crknke)：鬆弛的皮膚形成的細小的皺紋，主要見於高齡者的非紫外線暴露部位(手臂、大腿、腹部等)。這種皺紋本是因生理老化而產生，與光老化無關。從組織學來看，表皮和真皮結合部位(dermal-epidermal junction)的縱向固定纖維(anchoring fiber)消失，真皮彈力纖維網構造消失，深部纖維變得更粗，紋絡交錯可見。表 3.3.4 示意了按照形態學分類的日本人臉部的皺紋，沿用皺紋、細紋等的習慣用法，將線形皺紋歸類於皺紋和細紋。皺紋定義為長而深的明顯的沒紋，細紋是指皮溝向一定方向延伸、變得比皮溝稍深、相對又比皺紋細而淺的溝紋。

產生的機制

皺紋是在遺傳背景的基礎上，又在環境因子，特別是日光的參與下，沿著肌肉的運動方向等身體各部位顯示出的特有外觀。產生於臉部的皺紋首先被認為是因大笑或皺眉頭時隨著表情肌的運動而產生的一時性皺紋，如多次反復這種運動，在年齡增加和光老化的作用下皮膚彈性、柔軟性隨

即降低，曾為一時性的皺紋就會固定的皮膚上，無法恢復原有面貌而成為永久性皺紋。像這樣的因皮膚彈性、柔軟性降低而產生的構造和機能上的變化，在表皮和真皮中也會出現，可以認為比較淺的皺紋是發生在表皮和真皮乳頭層等皮膚 I 層的變化，而比較深的皺紋是因真皮的變化相對較強的反應。

細紋產生的機制

沒有關於皺紋和細紋的明確分類定義，將波形皺紋和眼精周圍比較細小的皺紋歸納為細紋被認為是妥當的。有文章指出，與細紋的產生密切相關的變化，除了角質層機能的光老化和自然老化以外，角質層水分保持能力的降低也算其一。有報告顯示，對出現在眼角紋的定量評價和對表皮水分含量以及皮膚水分蒸發量的分析結果來看，角質層的水分狀態與細紋的產生密切相關。另外，自然老化的皮膚，表皮增殖能力的降低，表皮萎縮變薄，角質層變厚。光老化皮膚的表皮因慢性炎症的積累而變得肥厚化，之後隨時間的推移反而逐漸變薄。這樣隨著表皮的變薄，因表皮突起的減少而使其與真皮的交界處平坦化，致使穿過真皮乳頭層垂直走向的細彈力纖維減少、消失，這種現象被認為同時存在於自然老化和光老化的皮膚中。由上述變化可以認為，真皮上層變得鬆弛，表皮的柔軟性降低，結果在皮膚表面產生出細小的皺紋。

二、體內(in vivo)評價技術

嚴格地說是與人的皺紋相同的體內評價系統，目前體內評價系統尚未被開發出來，取而代之的用無毛小鼠光老化模型的形式而被開發的評價系統已被廣泛使用。具體地說，如果用中波紫外線(UVB)或長波紫外線(UVA)對無毛小鼠的背部大約長期照射約 3 個月，就會使其背部產生皺紋【143.144】，充分利用這樣的模型系統，在其上面塗抹各種受試物，觀察皺紋是否被減輕。

三、使用人的評價技術

有皺紋的直接評價方法和使用複製模型和照片的間接評價方法。另外，還可根據肉眼判定和儀器評價判定對評價方法進行大致分類。儀器測定可分為 2 維和 3 維的測定方法。無論哪種方法都各有所長，在評價化妝品等的有用性時對精度和簡便性均有所要求，但國內外還沒有像 SPF 測定那樣從法規的角度進行統一規定。

(一)目測判定法

利用照片或複製模型，或直接對皺紋進行目測觀察和評價，製定分類量值的方法。用照片時，因東方人紫外線照片上的皮膚紋路的變化容易觀察，此法行之有效。

(二)表面粗糙計

將皺紋印在複製模型上，用針狀探測器直接對其表面測試，或用激光束進行非接觸性描，直接測定形狀的方法。一次掃描可以得到凹凸的兩維數據，經過反復操作並將數據合在一起就可得到 3 維空間形狀的數據。難點是要獲得 10m^2 以上範圍的形狀數據很費時間。複製模型使用獲取皺紋形狀的寫印象劑。齒科用的印象劑多數採用硅橡膠(silicone rubber)類產品。從皺紋取下的複製品是反像的複製模型，根據情況可再次複寫成正像的複製模型。採取眼角部位的複製模型時，為使眼角處不要用力，要讓受試者放鬆塗抹受試物或調整複製模型。

皺紋的評價技術

測定方法	原理和特徵
目測評估法	根據皺紋的放大照片或複製模型的照片用肉眼觀察判斷，制定分類的量值；半定量化
掃描法	根據表面粗糙計(針狀或激光)對複製品表面的測試結果進行分析；可用 3 維分析，但花時間，結果準
斜光照明法	用斜光照射複製模型，陰影強的圖像要用電荷耦合式攝像機等拍照，對圖像進行分析；暗部的分析較難
圖像解析法	
落斜照明法 (兩維空間)	用近乎均一的光照射複製模型，用電荷耦合式攝像機拍照，分析各像素的亮度分布；難於測定皺紋的深度
照度差立體法 (3 維空間)	根據 3 種以上不同的照明條件下拍攝的圖像的各像素輝度的差異算得其表面的傾斜度，用得到的傾斜度對被測物體進行積分運算即可得到 3 維空間的形狀；突變的凹凸偵測不到
SEM 圖像法	用 SEM(掃描式電子顯微鏡)取得複製模型或正像複製模型的表面圖像
同焦點顯微鏡法	同焦點顯微鏡法用於複製模型縱深方向的分析
光投影法(3 維空間)	
激光切斷法	從基線的 β 角斜方向用半導體激光帶照射複製模型、在 r 角的方向觀測隨物體的凹凸狀態而變化的狀況、取得 3 維空間的形狀。複製模型的點(x,y)的高度可根據三角測量的原理由角 β 和 r 求得
花格紋投影法	將花格條紋投影在測試面上，從與投影方向不同的方向進行觀測。隨著被測面表面形狀的變化花格條紋變彎，對變了形的花格條紋圖像進行分析可測定皺紋的 3 維形狀

為了不致產生氣泡等不使用人工制品是重要的。使用複製模型與直接以受試者為對象進行測定不同，複製模型的優點是可長期保管，並在方便時隨時用來分析的好處。

(三)兩維圖像解析法

從皺紋部位採取反像硅膠複製模型，把測定面水平固定安裝在攝影裝置的平台上，用氙(Xenon)光源或乳素燈等，從一定角度以一定強度的光線進行照射而產生皺紋陰影。是一種用電荷耦合式攝像機對生成的陰影圖像等拍照，輕入到圖像分析裝置中，以一定亮度水平的二進時間調制器(binary temporal modulator)抽取出皺紋的陰影區域，計算出與皺紋的深度和面積比率等形狀有關的間接性參數的方法。有直接拍攝皮膚表面的例子，有用皮膚特寫型的擴大電荷耦合式攝像機首紫外線光源(320~400nm 的頻閃觀測儀光)得到表面圖像的方法，更有使皮膚的凹凸能定量化的系統。這時，為去除色素沉著或毛孔的影響採用十字二值化方式。這些方法間接地估算由斜光投影產生的陰影的兩維空間像在縱深方的信息，間接地得到形狀的方法，有簡便而且定量化的優點。可是當大皺相鄰或小皺相鄰時，陰影間想互重疊、遮掩，有影響精度的不利之處。

(四)掃描式電子顯微鏡(SEM)圖像法，同焦點顯微鏡

不管是用掃描式電子顯微鏡(SEM)取得複製模型的精密的表面圖像的方法，還是用同焦點顯微鏡對縱深方向的分析方法，就有用性的評價水平而言，幾乎沒有被承認的實用例子。

(五)三維圖像解析法

近年，不接觸皮膚，即通過複製模型利用光切斷法，花格紋投影法以及照度差立體法功能的擴展等方法，開發了測定皺紋 3 維空間形狀的方法。

1. 光切斷法測定原理是，從基線的 β 角斜方向用半導體激光帶照射複製模型、在 r 角的方向用電荷耦合式攝像機觀測隨物體的凹凸狀態而變化的狀況。高度方向的坐標 Z 根據三角原理由 β , r 角算出。例如，從複製模型的斜上上用光帶對整體表面進行徹底的回轉掃描，用正上方設置的電荷耦合式攝像機拍攝整個過程。為了避免測定死角，在兩處設置光源，從各自的方向進行掃描。對電荷耦合式攝像機拍攝的面像，更進一步用圖像編輯(Image Encoder)工具合成表示測定對象表面的各點與光帶通過那點的瞬間(這點最為明亮的瞬間)的投光角度的關係的投光角度符號化圖像 $\theta(x,y)$ ，由 $\theta(x,y)$ 算出測定點的高度(z)。在得到的 3 維空間數據的基礎上，用 FFT 算法除去由臉部骨骼等產生

的歪曲變形的成分，另外從功率譜密度(power spectrum)的周波數分布分離出大皺紋和細紋，算出每一條的體積、表面積、長、寬、深以及條數。更進一步，可對使用前後的 2 枚複製模型的位置進行重合比較，分析同一部位的變化。

在皮膚上進行直接計測時，由皮膚表面進入的投影光在皮膚內產生內部散亂而模糊，測定時的受試者的微妙的活動或振動可能使定量性結果變差。對此開發了選擇適當的照明並固定測定部位的器械等改善這些問題的方法。

2. 花格紋投影法將花格條紋投影在測試面上，從與投影方向不同的方向進行觀測。如果被測物是平面就會看到同樣的直線型花格條紋，如果有立體的凹凸形狀，隨著被測面表面形狀的變化花格條紋變彎。對變了形的花格條紋圖像進行分析可測定皺紋的 3 維形狀。因只有格子的點才能成為分析對象，這會使分析結果會不準確，為此，除觀測格子瞬間移動的結果以外，增加格子數可提高測定精度。另外，採用具有正弦狀的光強度分布的花格紋投影可使結果不易受皮膚顏色和顏色不均勻性(color heterogeneity)的影響。
3. 擴張照度差立體法原理是變化光源方向，根據複數的單眼單視(Monovision)濃淡圖像，決定對象物體全面的法向矢量(normal vector)，進行積分來狀復原形，成後，被期待作為皺紋的計測法得到應用。

給中醫藥委員會具體建議

目前關於化妝品之功效性評價項目，包括防曬、保濕、美白與抗皺等項目，均有明確科學試驗方法之相關規範。故政府相關部門針對化妝品中若添加中草藥，要如何規範標準功效性評估方法，建議應該舉辦相關公聽會，集學者專家之建議取得共識後再行公告。

