

•基础研究•

•论著•

## 防腐剂羟苯甲酯和对羟基苯乙酮皮肤局部刺激性及驻留量和透皮量研究

李和伟, 代颖, 魏国志

(常州伟博海泰化妆品有限公司 江苏常州 213000)

**[摘要]**目的: 评估防腐剂羟苯甲酯和对羟基苯乙酮皮肤局部刺激和皮肤中暴露量。方法: 应用鸡胚绒毛膜尿囊膜模型评估皮肤局部刺激; 应用巴马小型猪皮肤模型评估防腐剂经皮透过量 and 皮肤中驻留量。结果: 鸡胚试验确定羟苯甲酯在浓度 $\leq 0.2\%$ 时, 无刺激性。对羟基苯乙酮在浓度 $\leq 1.0\%$ 时, 无刺激性。离体透皮试验表明, 面膜贴敷20 min、1 h和2 h后, 羟苯甲酯和对羟基苯乙酮在皮下接收液和皮肤中均有暴露, 且皮肤中驻留量远高于皮下接收液量。在贴敷20 min时, 两种防腐剂在皮肤中驻留量分别约是皮下接受液含量的14和12倍。离体透皮试验也显示, 透明质酸能降低羟苯甲酯和对羟基苯乙酮经皮透过量, 但能显著增加两者在角质层和真皮层皮肤中暴露量。皮肤中暴露与安全性分析显示, 羟苯甲酯在真皮层中2个时间点的浓度均高于细胞毒性浓度, 可能存在潜在局部皮肤毒性。对羟基苯乙酮有效抑菌浓度和安全浓度相差较小, 长时间贴敷面膜, 皮肤中驻留量累积也可能产生潜在副作用。结论: 本方法可用于评估化妆品中防腐剂局部皮肤刺激和经皮透过量 and 皮肤中驻留量, 为化妆品防腐剂的安全性评估提供一种评估方法。

**[关键词]**羟苯甲酯; 对羟基苯乙酮; 鸡胚绒毛膜尿囊膜模型; 巴马小型猪模型; 皮肤驻留量; 皮肤刺激性; 经皮透过量

**[中图分类号]**R943 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455(2025)02-0001-06

## Study on Local Irritation and Skin Resident Amount and Penetration of Methyl Para-hydroxybenzoate and P-hydroxy-acetophenone Preservatives

LI Hewei, DAI Ying, WEI Guozhi

(Changzhou Weibo Hi-Tech Co.Ltd., Changzhou 213000, Jiangsu, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluate the local skin irritation and exposure in skin for methyl para-hydroxybenzoate and p-hydroxy-acetophenone preservatives. **Methods** The chorioallantoic membrane vascular assay was used to evaluate local skin irritation, while the Bama miniature pig skin model was used to evaluate transdermal penetration and skin resident amount of preservatives. **Results** The chorioallantoic membrane vascular test determined that methyl para-hydroxybenzoate at a concentration of  $\leq 0.2\%$  was non-irritating, whereas p-hydroxy-acetophenone at a concentration of  $\leq 1.0\%$  was non-irritating. The in vitro transdermal penetration test showed that after 20 minutes, 1 hour, and 2 hours of facial mask application, both methyl para-hydroxybenzoate and p-hydroxy-acetophenone were exposed in the receiver solution and skin, and the resident amount in the skin was much higher than the amount of receiver solution, with approximately 14 and 12 times, respectively. Hyaluronic acid can reduce transdermal penetration of methyl para-hydroxybenzoate and p-hydroxy-acetophenone, but can significantly increase resident amount in the stratum corneum and dermis. The analysis of exposure in skin and safety showed that the concentration of methyl para-hydroxybenzoate at two time points in the dermis was higher than the cytotoxic concentration, indicating potential local skin toxicity. The effective bacteriostatic concentration of p-hydroxy-acetophenone and the safe concentration differ only slightly, and long-term use of facial masks may result in cumulative resident amount in skin and potential side effects. **Conclusion** This method can be used to evaluate the local skin irritation and percutaneous penetration of preservatives in cosmetics and the retention of preservatives in the skin, providing an evaluation method for the safety evaluation of cosmetic preservatives.

**Key words:** methyl para-hydroxybenzoate; p-hydroxy-acetophenone; chorioallantoic membrane vascular assay; Bama miniature pig skin model; resident amount in skin; skin irritation; percutaneous penetration

化妆品不良反应主要为皮肤刺激导致的过敏性皮炎, 占化妆品不良反应的绝大多数<sup>[1-2]</sup>, 其中由于防腐剂引起的

皮肤过敏反应在多个文献中已被报道<sup>[3-4]</sup>。面膜在化妆品领域中占有重要的位置, 在贴敷时与皮肤接触面积较大,

会导致更多的防腐剂渗透进入皮肤,增加面部皮肤中暴露量,可能产生更大的皮肤刺激,甚至长期驻留在皮肤内导致皮肤损害。

化妆品的防腐剂主要包括4大类,甲醛供体类、苯甲酸及其衍生物类、醇类和其他有机化合物<sup>[2]</sup>。羟苯甲酯是经典的防腐剂,一直在化妆品中被广泛使用<sup>[5]</sup>,但由于皮肤过敏反应,在化妆品中安全使用一直存在争议<sup>[6]</sup>。有文献研究羟苯甲酯抗菌有效性浓度是0.1%,但0.04%浓度会产生一定细胞毒性<sup>[7]</sup>。在《化妆品安全技术规范》2015年版和2022年征求意见稿中规定羟苯甲酯最大允许使用浓度单一酯为0.4%。对羟基苯乙酮近年在化妆品领域中也开始逐渐被越来越多的产品使用,但在《化妆品安全技术规范》2015年版和2022年征求意见稿中尚未规定该防腐剂用量上限。皮肤刺激文献研究发现在质量分数为2%时,对羟基苯乙酮无刺激性,体外多肽反应为阴性,对细胞存活半数抑制浓度为3.1%<sup>[8]</sup>。在对羟基苯乙酮抑菌有效性研究中,对3种细菌的最低有效浓度为 $5.0\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (相对于0.5%)<sup>[9]</sup>。在另一个以水蚤作为研究对象的急性毒性试验中,对羟基苯乙酮半数毒性量为 $64\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[10]</sup>。这些研究数据均揭示这些化妆品中防腐的安全使用值得更多关注。

一般来说,面膜的面积较大,加入的防腐绝对量较多。这些防腐剂不仅与皮肤表面接触可能产生局部皮肤刺激性,也可能长时间驻留在皮肤内部和进入系统血液循环中,导致其他刺激性,甚至细胞毒性。本研究以羟苯甲酯和对羟基苯乙酮作为研究对象,以鸡胚绒毛膜尿囊膜模型(Chorioallantoic membrane vascular assay, CAMVA)评估两种防腐剂的局部皮肤刺激性;应用巴马小型猪皮肤模型,采用离体透皮试验评估两种防腐剂在贴敷不同时间后从面膜中渗透到皮下接收液和驻留到皮肤中(角质层和真皮层)暴露量。

## 1 材料和方法

1.1 仪器:BSA323S(精度0.001 g)电子天平(德国赛多利斯公司)和PR224ZHE型(精度0.0001 g)电子天平(沙鹰科学仪器有限公司);LC-2030C型高效液相色谱仪(日本岛津公司);UV-2600型紫外检测器(日本岛津公司);TT-B(D)型Franz透皮试验仪(天津市正通科技有限公司);TD6M型台式低速离心机(昆山祥辰五金机电有限公司);pH计[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];BIO-DL型移液枪(赛多利斯公司);LHS-100F恒温恒湿培养箱(上海精其仪器有限公司);XT-02C体视显微镜(上海浦柘光电仪器有限公司);裕达牌全自动孵化机(裕达孵化设备厂);F6/10型电动均浆机(上海净信实业发展有限公司)。

1.2 材料:羟苯甲酯对照品(纯度:≥98%,上海诗丹德标准技术服务有限公司);对羟基苯乙酮对照品(纯度:≥98%,上海诗丹德标准技术服务有限公司);羟

苯甲酯原料(广州市荣宸生物科技有限公司);对羟基苯乙酮原料(肌理夫人);透明质酸(分子量:7 000,华熙生物科技股份有限公司);Welch Xtimate C18-WR(150 mm×4.6 mm, 5 μm)(上海月旭科技股份有限公司);滤膜(0.22 μm, 天津津腾公司);色谱纯乙腈(Fisher公司);娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);生理盐水,三氟乙酸,十二烷基硫酸钠(SDS)等均为分析纯(北京化工集团股份有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 CAMVA试验

1.2.1.1 试验步骤:参考文献方法<sup>[10]</sup>,结合企业制订的标准操作规程,将鸡胚置于恒温恒湿箱中孵育9 d(温度 $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,湿度50%~70%)。选取已受精和有活性的鸡胚,用牙科锯齿弯镊剥去带标记的蛋壳,暴露白色蛋膜,应小心操作不破坏蛋膜完整性。随机分组,阴性对照组(0.9% NaCl溶液),阳性对照组(1.0% SDS溶液),试验组。用塑料吸管将受试防腐剂溶液(羟苯甲酯用5%丁二醇溶解,分别配成质量浓度为0.1%, 0.2%和0.4%的溶液;对羟基苯乙酮用水加热溶解,分别配成质量浓度为0.5%, 1%和2%的溶液)滴于蛋白膜血管富集处,反应3 min后,用0.9% NaCl溶液冲洗至样品无明显残留并可清晰观察膜血管,3次。根据如下方程1和表1中评分标准计算刺激得分。

1.2.1.2 CAMVA 判定标准:采用反应时间法进行试验,采用式(1)计算刺激评分(Irritation score, IS)。

$$IS = \frac{(301 - \text{secH}) \times 5}{300} + \frac{(301 - \text{secL}) \times 7}{300} + \frac{(301 - \text{secC}) \times 9}{300} \quad (1)$$

公式中sec H(出血时间):CAM膜上观察到开始发生出血的平均时间;sec L(血管融解时间):CAM膜上观察到开始发生血管融解的平均时间;sec C(凝血时间):CAM膜上观察到开始发生出现凝血的平均时间;所有时间单位均为s。判定标准为:IS<1,无刺激;1≤IS<5,轻微刺激;5≤IS<9,中度刺激;IS>10,强刺激。评分标准见表1。

表1 CAMVA评分标准

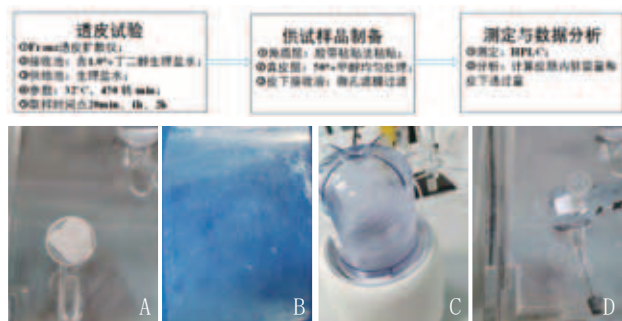
血管刺激		观察	评分/分
正常	血管正常		0
出血	轻度:仅见细小血管出血和少量出血		1
	中度:小血管和大血管出血,并有明显的血液流出		2
	重度:几乎所有血管都出血,大量血液流出		3
凝血	轻度:血管内和(或)血管外轻度凝血,和(或)CAM膜轻度浑浊		1
	中度:血管内和(或)血管外中度凝血,和(或)CAM膜中度浑浊		2
	重度:血管内和(或)血管外重度凝血,和(或)CAM膜重度浑浊		3
血管融解	轻度:仅小血管融解		1
	中度:小血管和大血管融解		2
	重度:大血管和全部血管融解		3

### 1.2.2 离体猪皮透皮试验

1.2.2.1 色谱条件：色谱柱为C18 (4.6 mm×150 mm, 5.0 μm)；流动相为0.1%三氟乙酸乙腈：0.1%三氟乙酸水溶液 (30:70)；流速1.0 ml·min<sup>-1</sup>；柱温30℃，检测波长254 nm；进样量20 μl。

1.2.2.2 离体猪皮制备：巴马小型猪处死后立即剪取腹部皮肤，剥离皮下脂肪和结缔组织，用95%酒精棉球反复擦拭皮肤表面，再用生理盐水冲洗干净，滤纸吸干水分，备用。

1.2.2.3 试验步骤：参考文献方法<sup>[11-12]</sup>，应用Franz透皮扩散仪进行透皮试验。样品接收液：生理盐水5 ml (含有1.0%丁二醇)，至与皮肤完全接触无气泡，试验开始前平衡30 min。皮肤使用滤纸吸干水分放置于接收池顶面，皮肤角质层向上，暴露的皮肤面积为0.71 cm<sup>2</sup>。样品溶液 (含3%丁二醇的甲醇) 加入至透皮供给池内 (生理盐水溶液)。扩散池温度 (32.0±0.5)℃，搅拌速度450 rpm/min，取样时间点20 min、1 h、2 h。①皮肤角质层驻留：参考文献方法<sup>[13]</sup>，用棉球擦拭干净皮肤表面残留物，再用生理盐水冲洗皮肤表面3次，然后胶带粘贴法粘贴表皮20次，将角质层粘下，并将胶带置于20 ml甲醇中超声提取。②皮肤真皮层驻留：将剩余部分剪碎，在匀浆机内加入20 ml 50%甲醇溶液进行匀浆处理，离心，取上清液。皮下接收液：取接收液1.0 ml，0.22 μm微孔滤膜过滤后超声脱气1 min进样，取样后向接收池内补充同体积接收液。在考察透明质酸对防腐剂皮肤透过和皮肤内驻留影响时，在给予池中同时加入含有1%透明质酸溶液。将上述各个样品在高效液相 (HPLC) 仪器中进行分析，随行进样两种防腐剂对照品溶液 (质量浓度8 μg·ml<sup>-1</sup>)，采用“1.2.2.1 色谱条件”项下色谱方法进行HPLC含量测定分析。通过HPLC仪器积分获得样品中防腐剂的积分面积，再将样品中防腐剂峰面积代入其对照品线性 (2.2.2项下) 方程中，应用线性方程计算获得上述样品中防腐剂的质量浓度 (C<sub>i</sub>和C<sub>n</sub>)。试验过程和主要样品制备见图1。



注：A. 离体猪皮；B. 胶带粘贴皮肤角质层；C. 真皮层匀浆液；D. 皮下接受液

图1 透皮试验流程图和供试样品制备

1.2.2.4 数据分析：单位面积皮肤内驻留量，按如下公式 (2) 计算：

$$Q_r = C_i \times V_i / S \quad (2)$$

式中Q<sub>r</sub> (μg·cm<sup>-2</sup>) 代表面膜中防腐剂在某个时间点的单位面积皮肤内驻留量；C<sub>i</sub> (μg·ml<sup>-1</sup>) 代表在“1.2.2.3”项下不同时间点的①和②中防腐剂浓度；V<sub>i</sub> (ml) 代表提取溶液体积 (20 ml)；S (cm<sup>2</sup>) 代表扩散池暴露皮肤面积 (离体猪皮：0.71 cm<sup>2</sup>)。

单位面积皮肤上面膜中防腐剂经皮累积透过量采用文献<sup>[14]</sup>的公式 (3) 计算：

$$Q_t = \frac{C_n \times V_{rec} + \sum_{t=1}^{n-1} C_t \times V_t}{S} \quad (3)$$

式中Q<sub>t</sub> (μg·cm<sup>-2</sup>) 代表面膜中防腐剂在某个时间点的单位面积累积透过量；C<sub>n</sub> (μg·ml<sup>-1</sup>) 代表不同时间点防腐剂在接收液中浓度；V<sub>rec</sub> (ml) 代表接收液体积 (5.0 ml)；C<sub>t</sub> (μg·ml<sup>-1</sup>) 代表在C<sub>n</sub>前一个时间点的防腐剂在接收液中浓度；V<sub>t</sub> (ml) 代表取样体积 (1.0 ml)。单因素方差分析 (Tukey-Kramer HSD检验) 比较均值，以P<0.05表示差异有统计学意义。本研究中的数据统计分析均由JMP 11.0.0平台实现 (SAS Institute Inc.)。

## 2 结果

2.1 CAMVA试验结果：结果显示为鸡胚接触羟苯甲酯和对羟基苯乙酮之前和接触3 min之后显微镜下观察的结果。在接触防腐剂之前，鸡胚CAM膜上的血管网络呈现正常状态，清晰且连续。在与0.1%和0.2%浓度的羟苯甲酯以及0.5%和1.0%浓度的对羟基苯乙酮接触后，血管网络保持了原有的清晰度和连续性，未出现异常的扩张或收缩现象，也没有出血、凝血或血管融解的情况 (见图2A~E、G~K)。然而，在0.4%浓度的羟苯甲酯 (见图2F) 和2.0%浓度的对羟基苯乙酮 (见图2L) 接触后，虽然血管网络整体上仍然清晰且连续，没有明显的扩张或收缩，但在个别小血管中观察到了轻微的出血和凝血现象 (见图2F、L)，高浓度羟苯甲酯接触后局部毛细血管末端出现轻微溶解现象 (见图2F)。

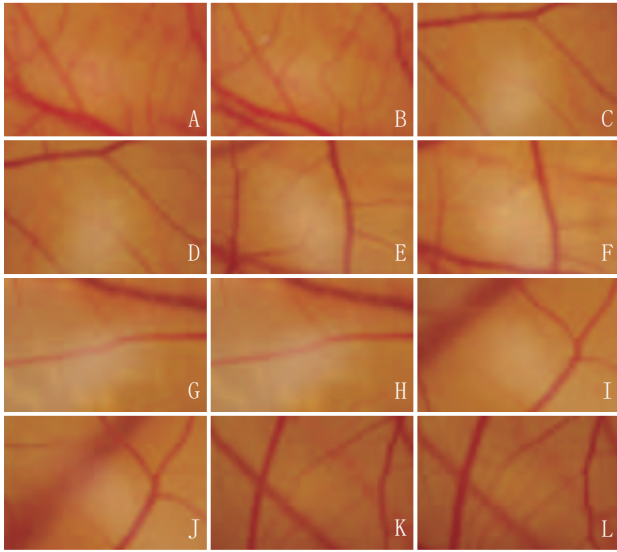
CAMVA试验结果显示，0.9% NaCl作为阴性对照，IS值是0.0。1%SDS作为阳性对照，IS值范围在10~19，阴性和阳性对照的IS值证明CAMVA实验结果可靠。羟苯甲酯在浓度为0.4%时，IS值为2.3，显示了轻微刺激；在浓度≤0.2%时，IS值小于1，无刺激性。对羟基苯乙酮在浓度为2%时，IS值为3.9显示了轻微刺激；在浓度≤1.0%时，IS值小于1，无刺激性。在CAMVA试验中，对羟基苯乙酮对局部皮肤安全性的浓度是羟苯甲酯的5倍。见表2。

### 2.2 HPLC测定羟苯甲酯和对羟基苯乙酮经皮渗透和皮肤中驻留量方法学验证结果

2.2.1 对照品溶液制备：精密称取羟苯甲酯和对羟基苯乙酮对照品各约20 mg，加入甲醇溶解并定容于10 ml量瓶中，摇匀，即得浓度约为2.0 mg·ml<sup>-1</sup>的对照品储备溶液，备用。

2.2.2 线性关系考察：用移液枪量取两种防腐剂对照品溶





注: A. 0.1%浓度接触前; B. 0.1%浓度羟苯甲酯接触3min后; C. 0.2%浓度接触前; D. 0.2%浓度羟苯甲酯接触3min后; E. 0.4%浓度接触前; F. 0.4%浓度羟苯甲酯接触3min后; G. 0.5%浓度接触前; H. 0.5%浓度对羟基苯乙酮接触3min后; I. 1.0%浓度接触前; J. 1.0%浓度对羟基苯乙酮接触3min后; K. 2.0%浓度接触前; L. 2.0%浓度对羟基苯乙酮接触3min后

图2 防腐剂接触鸡胚前后血管反应性变化

表2 CAMVA试验结果

供试样品	平均IS	判定
0.9%氯化钠	0	无刺激
1%SDS	16.3	强刺激
羟苯甲酯		
0.40%	2.3	轻微刺激
0.20%	0.44	无刺激
0.10%	0	无刺激
对羟基苯乙酮		
2%	3.9	轻微刺激
1%	0.63	无刺激
0.5%	0	无刺激

液不同体积,再用甲醇进行稀释,配制系列对照品溶液,羟苯甲酯和对羟基苯乙酮质量浓度均为200、80.0、16.0、8.0、4.0、0.4  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),分别绘制标准曲线,得羟苯甲酯回归方程分别为 $Y=54\ 000X+55\ 280$ ,  $r=0.999\ 7$ ;对羟基苯乙酮回归方程为 $Y=28\ 053X+34\ 617$ ,  $r=0.999\ 7$ 。结果表明,羟苯甲酯和对羟基苯乙酮均在0.4~200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

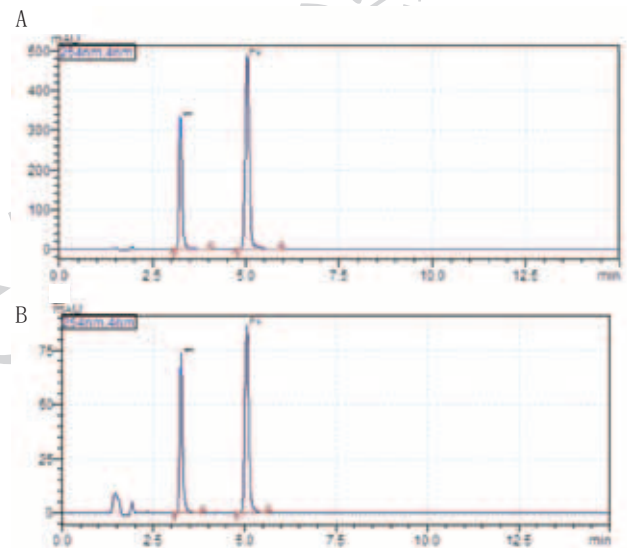
2.2.3 精密度试验:配置羟苯甲酯( $8\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )和对羟基苯乙酮( $8\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )混合对照品溶液,精密吸取对照品溶液20  $\mu\text{L}$ ,分别于同1 d之内连续进样测定6次,并在3 d之内连续进样测定,记录峰面积。结果显示两者日内精密度RSD分别为1.94%和0.99%,日间精密度RSD分别为2.33%和1.13%。

2.2.4 稳定性试验:精密量取供试品溶液20  $\mu\text{L}$  (透皮接

收液和皮肤内样品),放置在室温条件下,分别于0、1、2、4、8 h测定峰面积,结果显示2个供试样品中羟苯甲酯和对羟基苯乙酮峰面积RSD分别为1.84%、0.83%和1.37%、2.17%,表明供试品溶液在室温条件下8 h内稳定性良好。

2.2.5 回收率试验:在已知高( $10\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、中( $5\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、低( $0.5\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )3个浓度的溶液中按1:1比例分别加入高、中、低3个浓度的羟苯甲酯和对羟基苯乙酮对照品溶液,每个浓度平行制备3份供试品,按既定的色谱条件测定,计算回收率。3个浓度下两种防腐剂的回收率均在95.0%~105.0%,RSD均在3.0%以内。

2.2.6 专属性试验:取供试品溶液,混合对照品溶液、阴性样品(空白接收液和猪皮提取液),按“1.2.2.1”项下色谱条件检测,记录色谱图。对照品峰形良好,供试品与对照品在相应位置上存在相同峰,且阴性样品溶液对测定结果不产生干扰。见图3。



注: A. 对羟基苯乙酮; B. 羟苯甲酯

图3 混合对照品和供试品的高效液相色谱图

### 2.3 离体猪皮透皮试验结果

2.3.1 防腐剂在猪皮肤中的透皮吸收量:结果显示面膜中羟苯甲酯和对羟基苯乙酮在猪皮肤模型中贴敷20 min、1 h和2 h后,两种防腐剂在接收液中经皮透过量测定结果。两种防腐剂从面膜中经皮透过速度较快,面膜贴敷20 min时,两种防腐剂即可在透皮接收液中检测到,  $Q_t$ 分别为0.56  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^2$ 和0.84  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^2$ 。随着面膜贴敷时间的增加,  $Q_t$ 也逐渐增加,2 h羟苯甲酯和对羟基苯乙酮的平均经皮累积透过量 $Q_t$ 分别为5.6  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^2$ 和10.2  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^2$ 。并且对羟基苯乙酮的经皮透过量增加速度更快和累积透过量更高。见图4A。

2.3.2 防腐剂在不同层次离体猪皮肤中驻留量:结果显示,面膜中羟苯甲酯和对羟基苯乙酮在猪皮肤模型中贴敷20 min、1 h和2 h后,两种防腐剂在皮肤角质层和真皮层中驻留结果。结果显示,两种防腐剂在皮肤真皮和角质层中

驻留量 $Q_r$ 也是随着贴敷时间的增加而增加。角质层和真皮层中3个时间点的羟苯甲酯平均驻留量均小于对羟基苯乙酮平均驻留量,这与皮下接收液中两种防腐剂的经皮渗透量趋势是一致的。此外,皮肤真皮层中两种防腐剂在面膜贴敷2 h的驻留量明显增加,显著高于角质层中同样时间点的驻留量。并且研究显示,皮肤中防腐剂驻留量显著高于经皮透过量,在20 min时间点,两种防腐剂在皮肤中驻留量相当于皮下接受液量约14和12倍。见图4B~C。

2.3.3 透明质酸对防腐剂皮肤透过和皮肤内驻留影响:结果显示,透明质酸对羟苯甲酯和对羟基苯乙酮在猪皮肤经皮透过量(见图4A)和皮肤角质层、真皮层中驻留量(见图4B~C)的影响。透明质酸能降低两种防腐剂经皮透过量,在2 h时两种防腐剂透过量均有显著性降低。相反,透明质酸能增加两种防腐剂在皮肤角质层和真皮层中驻留量。

2.4 皮肤内暴露量与安全性分析:结合皮肤中两种防腐剂的驻留量数据,表3计算了皮肤角质层和真皮层中两种防腐剂的浓度。根据CAMVA试验的结果,皮肤中驻留的羟苯甲酯和对羟基苯乙酮浓度均小于不产生皮肤刺激性安全浓度,对羟基苯乙酮的浓度离产生皮肤刺激性相差较多。但羟苯甲酯在2 h真皮层中浓度比较接近产生刺激性的浓度

表3 皮肤内暴露浓度 (%)

时间	角质层平均浓度		真皮层平均浓度	
	羟苯甲酯	对羟基苯乙酮	羟苯甲酯	对羟基苯乙酮
20 min	0.020	0.025	0.014	0.019
1 h	0.046	0.052	0.044	0.070
2 h	0.049	0.064	0.110	0.170

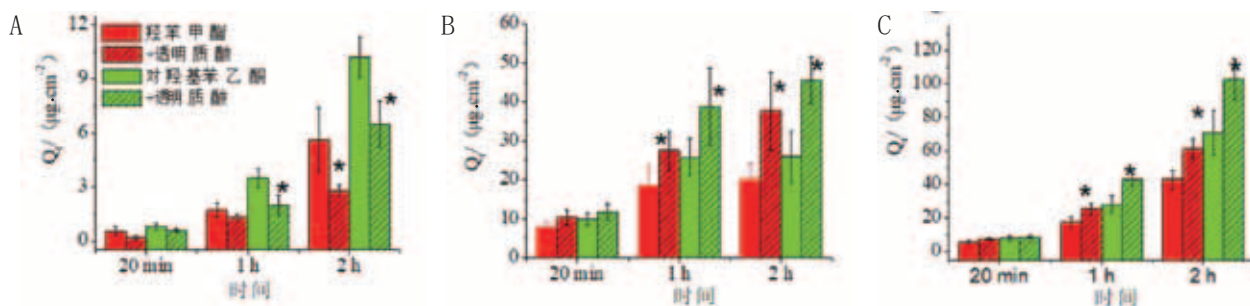
### 3 讨论

巴马小型猪的皮肤各种生理特征和透过性均被认为是与人类皮肤最为接近的,欧盟委员会等多个国际组织均推荐可用于代替人类皮肤进行经皮给药研究<sup>[14]</sup>。因此本研究采用巴马小型猪皮肤来评估化妆品中两种防腐剂羟苯甲酯和对羟基苯乙酮在该皮肤模型中经皮透过量 and 皮肤内驻留量。目前多数文献主要是测定皮下接收液中药物透过量<sup>[11,15-16]</sup>,较少的研究会同时关注皮肤中驻留量<sup>[12,17]</sup>。本研究同时测定

两种防腐剂透皮透过量 and 皮肤中驻留量,为更全面分析防腐在人体局部皮肤和系统暴露量提供一种新的离体模型方法。试验中发现两种防腐剂在面膜贴敷20 min和1 h时,皮肤角质层和层中驻留量较为接近;但在贴敷2 h时,真皮层中防腐剂驻留量显著高于角质层中驻留量。这可能是两种防腐剂均属于脂溶性成分,能较容易穿透皮肤角质层,随着贴敷时间的延长,防腐逐渐进入深层皮肤内。在贴敷1和2 h,透明质酸能显著增加羟苯甲酯和对羟基苯乙酮在皮肤中驻留量。这可能是透明质酸对皮肤的水合作用,或是与防腐剂的相互作用增强了其在皮肤中驻留量。化妆品中防腐剂多数均属于脂溶性化合物,理论上均具有良好的皮肤透过性能。同时面膜中防腐剂用量较大(常规面膜25 ml,以加入0.4%羟苯甲酯计,相当于一片面膜中含有羟苯甲酯100 mg),因此需要关注面膜中防腐剂进入皮肤后,对皮肤内部可能产生的局部副作用。

面膜的使用人群主要为女性,此处使用女性的生理参数来计算皮肤内羟苯甲酯和对羟基苯乙酮驻留浓度。女性皮肤的平均重量为3 200 g,皮肤中平均含水量约为30%,面部占皮肤的比例约为3%,这样计算女性皮肤中水分的平均含量为28.8 g。化妆品中成分的皮肤刺激性的评价方法主要包括重建人表皮3D皮肤模型<sup>[18]</sup>、直接多肽反应试验<sup>[8]</sup>、鸡胚绒毛膜尿囊膜模型和近年刚兴起的斑马鱼胚模型<sup>[20-21]</sup>。在本研究中,主要采用CAMVA方法评估防腐剂羟苯甲酯和对羟基苯乙酮对局部皮肤潜在刺激性。《化妆品安全技术规范》中规定羟苯甲酯的最大允许使用浓度为0.4%。本研究评估结果显示,0.4%的羟苯甲酯能产生轻微皮肤刺激性。此外,皮肤内暴露与安全性分析也揭示羟苯甲酯按0.4%添加到面膜中,在局部皮肤内可能产生一定的毒副作用。对羟基苯乙酮在CAMVA试验中显示1.0%浓度不会产生皮肤刺激性,但由于本品的有效抑制浓度为0.5%<sup>[9]</sup>。有效浓度和安全浓度相差较小,如果面膜中加入能确保抑菌效果的用量,长时间贴敷面膜,皮肤中驻留量累积也可能产生潜在副作用。

此外,有研究显示,面膜中某些成分,比如低分子量透明质酸会增加药物在皮肤中驻留量<sup>[22-23]</sup>。本试验也证实了低分子量透明质酸会增加羟苯甲酯和对羟基苯乙酮在皮



注: A. 猪皮肤经皮透过量; B. 猪皮肤角质层驻留量; C. 猪皮肤真皮层驻留量。\*表示与未加透明质酸组比较,  $P < 0.05$

图4 面膜中羟苯甲酯和对羟基苯乙酮经皮透过量 and 皮肤中驻留量

肤中驻留量。化妆品中其他成分是否也会增加防腐剂在皮肤中驻留量,或是其他防腐剂在透明质酸作用下是否也会显著增加其在皮肤内驻留量仍然是未知的,但这可能为潜在在局部皮肤安全性带来更复杂的情况。

本研究首次评估了面膜中防腐剂羟苯甲酯和对羟基苯乙酮经皮透过量和在皮肤中驻留量,并且分析了皮肤局部暴露浓度和安全性关系,为化妆品中防腐剂的安全使用提供了一种新的评估方法。

#### [参考文献]

- [1]黄宇锋,李光先,何树峰,等. 5类特殊用途化妆品刺激性试验结果分析[J].日用化学品科学,2021,44(12):24-27.
- [2]王瑞,王欢,韩雨晴,等. 组合应用替代方法评价5种化妆品中常用防腐剂的皮肤致敏性[J].日用化学品科学,2023,46(1):20-27.
- [3]Ma X, Wang H, Song Y, et al. Skin irritation potential of cosmetic preservatives: An exposure-relevant study[J]. J Cosmet Dermatol, 2021,20(1):195-203.
- [4]Martins M S, Ferreira M S, Almeida I F, et al. Occurrence of allergens in cosmetics for sensitive skin[J]. Cosmetics, 2022,9(2):32.
- [5]李凯利,何一波,祝愿,等. 化妆品常用防腐剂及发展趋势[J].中国洗涤用品工业, 2022,256(7):82-88.
- [6]Nowak K, Jabłońska E, Ratajczak-Wrona W. Controversy around parabens: Alternative strategies for preservative use in cosmetics and personal care products[J]. Environ Res, 2021,198:110488.
- [7]Tanaka T, Oishi M, Okazaki M. The relationship between the preservative efficacy and cytotoxicity of two common preservatives used in cosmetics[J]. J Oral Tissue Engin, 2018,15(3):186-192.
- [8]陈田. 化妆品用原料对羟基苯乙酮的局部毒性研究[J].香料香精化妆品, 2020,180(3):56-60.
- [9]Mellegård H, Stalheim T, Hormazabal V, et al. Antibacterial activity of sphagnum acid and other phenolic compounds found in Sphagnum papillosum against food-borne bacteria[J]. Lett Appl Microbiol, 2009,49(1):85-90.
- [10]Ike M, Chen M Y, Jin C S, et al. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of biodegradation products of bisphenol-A[J]. Environ Toxicol, 2002,17(5):457-461.
- [11]杨雅丽,童想柳,林国钡,等. 地佐辛外用制剂的体外透皮特性比较[J].中国医药工业杂志,2019,50(12):1463-1467.
- [12]唐泽严,郭学平,温喜明,等. 不同相对分子质量透明质酸对还原型谷胱甘肽透皮吸收的影响[J].中国药科大学学报, 2021,52(2):203-210.
- [13]吴黎莉,周可,徐兰芳,等. 胶带粘贴技术结合LC-MS法测定人体皮肤角质层中艾迪康唑浓度[J].中国药科大学学报, 2014,45(1):79-83.
- [14]Pavlačková J, Egner P, Polašková J, et al. Transdermal absorption of active substances from cosmetic vehicles[J]. J Cosmet Dermatol, 2019,18(5):1410-1415.
- [15]李花花,杨畅,杨艳玲,等. 活血止痛凝胶贴膏与微乳凝胶剂的体内外渗透性比较研究[J].中国中药杂志,2022,47(7):1857-1863.
- [16]张金伟,李翰铭,尹虹,等. 肉豆蔻酸单萜醇酯对布南色林经皮透过的影响[J].化学通报,2022,85(7):853-859.
- [17]周刚,付晓婷,潘静茹,等. 他克莫司软膏透皮一致性的体外Franz扩散池测定比较研究[J].药物分析杂志,2020,40(12):2126-2133.
- [18]Valentin J. Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: reference values: ICRP Publication 89: Approved by the Commission in September 2001[J]. Ann ICRP, 2002, 32(3-4): 1-277.
- [19]王飞强,张子琪,冯庆媛,等. 皮肤毒理学检验中的替代方法和整合测试评估方法[J].中国现代应用药理学,2021,38(24):3091-3096.
- [20]何立成,朱社敏,谢珍等. 鸡胚绒毛膜尿囊膜血管试验法用于评价化妆品眼刺激性的可行性研究[J].中国现代应用药理学,2017,34(8):1158-1162.
- [21]刘永,梁佳,郭家彬,等. 模式动物斑马鱼在微塑料毒性评价中的研究进展[J].环境与职业医学, 2022,39(10):1172-1179.
- [22]Kim Y, Bhattacharjee SA, Beck-Broichsitter M, et al. Fabrication and characterization of hyaluronic acid microneedles to enhance delivery of magnesium ascorbyl phosphate into skin[J]. Biomed Microdevices, 2019, 21:1-9.
- [23]How K N, Yap W H, Lim C L H, et al. Hyaluronic acid-mediated drug delivery system targeting for inflammatory skin diseases: A mini review[J]. Front Pharmacol, 2020,11:1105.

[收稿日期]2023-07-03

本文引用格式: 李和伟,代颖,魏国志. 防腐剂羟苯甲酯和对羟基苯乙酮皮肤局部刺激性及驻留量和透皮量研究[J].中国美容医学,2025,34(2):1-6.

#### · 告作者和读者 ·

#### 版权转让声明

凡向本刊所投稿件,全体作者需在收到编辑部发出的稿件回执时签署《论文投送介绍信》,将该论文的汇编权、发行权、印刷版和电子版的复制权、翻译权、信息网络传播权在世界范围内转让给本刊。本刊已加入《中国学术期刊综合评价数据库》,被《中国期刊网》和《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。凡被本刊录用的稿件将同时通过因特网进行网络出版或提供信息服务,并赠送当期杂志两册。