# The Study of Acute Skin Irritation Potential of a Skincare Product by the Human 4-H Patch Testing

**Preya Kullavanijaya MD PhD MRCP,**

**Walai-orn Pratchyapruit MD,**

**Imelda Duangdeeden MD.**

**ABSTRACT:**

**KULLAVANIJAYA P, PRATCHYAPRUIT W, DUANGDEEDEN I. THE STUDY OF ACUTE SKIN IRRITATION POTENTIAL OF A SKINCARE PRODUCT BY THE HUMAN 4-H PATCH TESTING. THAI J DERMATOL 2002; 18: 5-12.**

***INSTITUTE OF DERMATOLOGY, DEPARTMENT OF MEDICAL SERVICES, MINISTRY OF PUBLIC HEALTH, BANGKOK, THAILAND.***

The daily use of skincare as moisturizers, makeup, sun protection and etc. are advocated by a large number of people to promote healthy skin and beauty. Irritant skin reactions to these skincare products are known to occur. A reliable test is essential in order to determine the irritation properties of the product. In this study, we used the Human 4-h patch test method for testing an irritant reaction potential of a skincare (product A).

One hundred healthy volunteers were patch tested with product A as a test substance, 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) and distilled water as positive and negative controls. The Hill top chamber was used as a patch test unit. The patches were removed after 1,2,3 and 4 hours of exposure and skin reactions were recorded accordingly during each hour and also after 24, 48 and 72 hours. Irritation responses were measures based on the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) scale of using increasing severity (0,±, 1+, 2+, 3+, 4+). It is the incidence of

response, not the severity, is the basis of evaluation. Sample size was calculated by Epiinfo 2000 version 6. Data analysis was calculated for percentage, sensitivity, specificity and 95% confidence intervals (CIs) and the difference between 20% SDS and product A was tested by McNemar test ($\chi^2$-test). Statistical significant level $\alpha$ equals to 0.05 was considered for analysis. The product A and the negative control showed negative results all throughout the testing period for all the volunteers.

We report the methodology of the Human 4-h patch test by using a skincare product as a test substance compared with 20% SDS as a positive control. The result showed that the product A was non-irritant.

**Key words:** predictive skin irritation, human 4-h patch test

## บทคัดย่อ:

**ปรียา กุลละวณิชย์, วลัยอร ปรัชญพฤทธิ์, อิเมลด้า ดวงดีเด่น การศึกษาฤทธิ์ระคายเคืองต่อผิวหนังของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยวิธี HUMAN 4-H PATCH TESTING วารสารโรคผิวหนัง 2545; 18: 5-12.**

***สถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข***

การศึกษาฤทธิ์ระคายเคืองของผลิตภัณฑ์ที่สัมผัสกับผิวโดยตรง มีความจำเป็นในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ยารักษาโรคและสารเคมีต่าง ๆ ที่ลักษณะการใช้งานต้องสัมผัสโดยตรงต่อผิวหนังเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค Human 4-h patch testing เป็นวิธีทดสอบผิวหนังที่มีผู้ดัดแปลงมาใช้ในปี 2538 และได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นมาตรฐานใน predictive irritation test แทนการทดสอบในสัตว์ทดลอง Draize test ซึ่งเคยเป็นที่นิยมใช้มาก่อน ผู้รายงานได้ทำการศึกษาวิธี human 4-h patch testing ในผลิตภัณฑ์ skin care ชนิดหนึ่งในระหว่างและนำเสนอขั้นตอนการทดสอบผิวหนังอย่างละเอียดในอาสาสมัครจำนวน 100 ราย โดยสามารถสรุปความน่าเชื่อถือของการทดสอบผิวหนังวิธีนี้และพบว่าผลิตภัณฑ์ที่นำมาใช้เป็นสารทดสอบ ไม่มีฤทธิ์ระคายเคือง

**คำสำคัญ:** โรคแพ้สัมผัส ฤทธิ์ระคายเคือง แพทเทส

## บทนำ

การตรวจฤทธิ์ระคายเคืองต่อผิวหนังในผลิตภัณฑ์ที่ลักษณะการใช้งานต้องสัมผัสโดยตรงต่อผิวหนังของผู้ใช้ มีความจำเป็นเพื่อยืนยันความปลอดภัยต่อผู้ใช้ ตัวอย่างเช่น เครื่องสำอาง น้ำหอม สบู่ ผงซักฟอก ยาทาภายนอก เสื้อผ้า สารเคมีและอื่นๆ โดยเฉพาะเครื่องสำอางประเภทบำรุงผิวพรรณ การตรวจโดยวิธีทดสอบในสัตว์ทดลองนิยมใช้กันมาเป็นเวลากว่า 50 ปี คือ

Draize test โดยทดสอบที่หูกระต่าย[1,2] ในระยะต่อมามีการศึกษาพบว่าผลที่ได้ไม่แน่นอน ประกอบกับปัจจุบันการทดลองในสัตว์ถูกต่อต้านมากขึ้นโดยองค์การอนุรักษ์สัตว์[3-5] ในปี 2538 Basketter และคณะได้เสนอวิธี human 4-h patch test ในการทดลองฤทธิ์ระคายเคืองให้เป็นวิธีมาตรฐานใช้แทนการทดสอบในสัตว์ทดลอง[6-11] เป็นการทดสอบในคนซึ่งได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีที่เชื่อถือได้มากกว่า Draize test[12] คณะผู้ศึกษาได้นำวิธี human 4-h patch test ทำการศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ให้ความชุ่มชื้นต่อผิวหนังเปรียบเทียบกับตัวชี้วัด คือ 20% sodium dodecyl sulphate (20% SDS)

## วัสดุและวิธีทำ

**ผู้ทดสอบ** ใช้อาสาสมัครจำนวน 100 ราย โดยกำหนดคุณสมบัติดังนี้: เป็นผู้มีสุขภาพสมบูรณ์ไม่เป็นโรคผิวหนัง อายุไม่ต่ำกว่า 15 ปี ไม่ได้ตั้งครรภ์ ไม่มีประวัติภูมิแพ้ ไม่ได้รับยาลดภูมิคุ้มกันภายในระยะ 3 เดือน เช่น ยาคอร์ติโคสตีรอยด์ เคมีบำบัด อาสาสมัครทุกคนต้องมาตรวจตรงตามเวลานัด และปฏิบัติตนตามคำแนะนำ คือ ให้ทำงานตามกิจวัตรประจำวัน งดออกกำลังกายขณะอยู่ระหว่างการทดสอบ ระวังไม่ให้บริเวณทดสอบเปียกน้ำโดยใช้ถุงพลาสติกที่มอบให้ปิดขณะอาบน้ำ และไม่ให้ใช้ครีมหรือยาทาผิวบริเวณทดสอบตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดการทดสอบ อาสาสมัครทุกคนได้รับการอธิบายให้ทราบวัตถุประสงค์และขั้นตอนของการทดสอบและลงนามยินยอมให้ทำการศึกษา

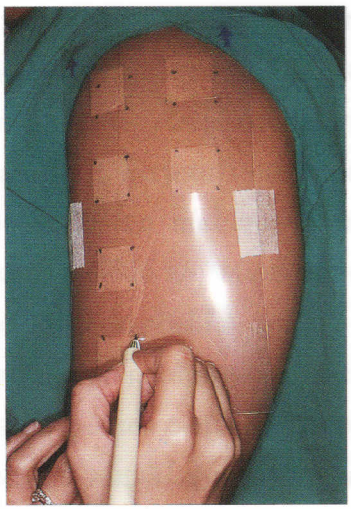
**แผ่นทดสอบ** ใช้ Hill top chamber เป็นแผ่นทดสอบผิวหนังมาตรฐาน ผลิตโดยสถาบันวิจัย Hill top แห่ง Cincinnati, Ohio, USA. เป็นแผ่นกลมตรงกลางนูนเล็กน้อยรูปร่างคล้ายขนมครก ทำด้วยพลาสติกอ่อนนุ่มมีขอบ 2 ชั้น ทำให้แปะแนบสนิทกับผิวหนังได้ดี ตรงกลางบุด้วยผ้าใยสังเคราะห์สำหรับเป็นที่รองรับสารทดสอบ เมื่อแปะลงบนผิวหนังบริเวณที่ต้องการทดสอบแล้วต้องยึดติดด้วยปลาสเตอร์อีกทีหนึ่ง แผ่น Hill top มี 2 ขนาด คือ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 19 มิลลิเมตร และ 25 มิลลิเมตร การทดลองครั้งนี้ใช้ขนาด 25 มิลลิเมตร

**สารทดสอบ** ใช้สมูทอีสกินครีม ( product A) เป็นครีมให้ความชุ่มชื้นต่อผิวหนัง สมูทอีสกินครีม ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 1 ปริมาณสารที่ใช้ในแต่ละแผ่นทดสอบเท่ากับ 0.2 กรัม โดยการบรรจุลงในหลอดฉีดยาขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วบีบลงใส่บนแผ่น Hill top ใช้เครื่องชั่งอิเล็กทริกเพื่อให้ได้ปริมาณที่เที่ยงตรงและเท่ากันทุกครั้ง เครื่องชั่งที่ใช้เป็นชนิด OHAUS AP210-0 และ Sartorius BP 3100s

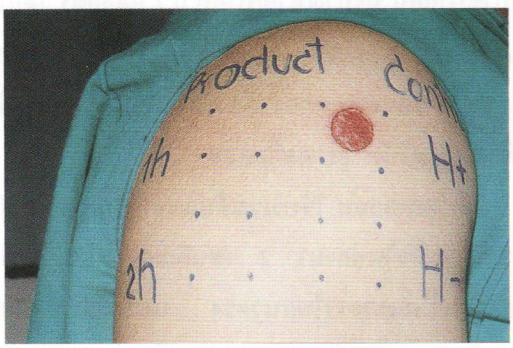
**ตัวชี้วัด** ตัวชี้วัดผลบวกใช้ 20% SDS ผสมในน้ำกลั่น deionized water ซึ่งเตรียมโดย Unilever Research Laboratories แห่งประเทศอังกฤษ ตัวชี้วัดผลลบใช้น้ำกลั่น ปริมาณที่ใช้เท่ากับ 0.2 มิลลิลิตร โดยใช้ Socorex, Calibra 822 pipette หยดลงบนแผ่นทดลอง ก่อนทำการทดสอบทุกครั้งต้องวัดค่า pH ของตัวชี้วัดเพื่อควบคุมให้ค่า pH คงที่ตลอด

**บริเวณทดสอบ** ใช้บริเวณต้นแขนด้านนอก ระดับต่ำจากปุ่มหัวไหล่ลงมา 2 เซนติเมตร โดยติดแผ่นทดสอบเป็นแถวยาวในแนวตรง แต่ละแผ่นทิ้งระยะห่างกัน 2.5 เซนติเมตร แถวแรกเป็นสารทดสอบ 4 แผ่น แถวที่สองคู่ขนานและห่างจากแถวแรก 2.5 เซนติเมตร เป็นแผ่นสารตัวชี้วัดผลบวก 1 แผ่น และผลลบ 1 แผ่น และเพื่อให้บริเวณที่ใช้ทดสอบมีมาตรฐาน

เท่ากันทุกคน ผู้ทำการศึกษาจึงได้สร้างแบบบลอค ทำด้วยแผ่นพลาสติกใสเจาะเป็นช่องสี่เหลี่ยมขนาด 2.5 x 2.5 เซนติเมตร 6 ช่อง เพื่อให้บริเวณผิวหนังที่ใช้ทดสอบอยู่ในตำแหน่งเดียวกันทุกราย (ภาพที่ 1) วิธีทำใช้ปากกาจุดทำเป็นเครื่องหมายที่มุมของช่องสี่เหลี่ยมของบลอคก่อนแปะแผ่นทดลอง ปากกาที่ใช้คือปากกาเมจิกสำหรับเขียนผ้า ชนิด Pentel Fabric M10



**ภาพที่ 1** แสดงการกำหนดตำแหน่งก่อนการติดสารทดสอบ




**ภาพที่ 2** แสดงปฏิกิริยาของผิวหนังหลังการทดสอบด้วยผลิตภัณฑ์ให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว, สารทดสอบมาตรฐาน (positive control – 20% SDS) และน้ำกลั่น

**แผ่นกาว** ใช้เทปไมโครปอร์ซึ่งเป็นแผ่นปลาสเตอร์ชนิด non-allergic แปะ Hill top ให้ติดกับผิว

**เวลาอ่านผล** อ่านผลหลังจากแปะสารทดลอง 1, 2, 3, 4 ชั่วโมง ตามลำดับ ต่อไปอ่านผลอีกครั้งในระยะ 24, 48, 72 ชั่วโมง

**แปรผล** อ่านผลปฏิกิริยาระคายเคืองที่ผิวหนังโดยดูจากสีผิวที่เปลี่ยนเป็น รอยแดง รอยบวม และตุ่มน้ำ ตามมาตรฐานของ International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG)[6] ดังนี้:

- no reaction

± doubtful reaction (mild erythema)

1+ weak reaction (erythema)

2+ moderate reaction (erythema and edema)

3+ strong reaction (erythema, edema small vesicles)

4+ severe reaction (vesicle, pustule or ulcer)

เมื่อดึงแผ่นทดสอบออก ใช้ก้อนสำลีเช็ดสารทดสอบออกให้เกลี้ยง และรอ 5 นาทีก่อนอ่านผล เพื่อป้องกันผลลวงจากการที่ผิวถูกกด ถ้ามีรอยแดงเล็กน้อยซึ่งหายไปในการอ่านครั้งต่อไปให้ถือว่าเป็นผลลบ ถ้ารอยแดงยังคงอยู่ในการอ่านครั้งต่อไป ให้ถือว่าเป็นผลบวก (ภาพที่ 2) หลังจากดึงแผ่นทดสอบออกเพื่ออ่านผลในแต่ละชั่วโมงแล้ว ไม่ต้องปิดแผ่นทดสอบซ้ำอีก แต่ยังไม่ให้ถูกน้ำ เพื่อรอการอ่านครั้งต่อไปในระยะ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

**การบันทึกภาพ** ทำการถ่ายรูปบริเวณทดสอบทุกรายด้วยกล้อง digital Sony MVC-FD88 และถ่ายสไลด์บางรายด้วยกล้อง Nikon FM2 เพื่อเป็นหลักฐานในการตรวจสอบข้อมูลและการเสนอผลงาน

**ผู้แปรผล.** ในการศึกษานี้ใช้แพทย์คนเดียวเป็นผู้อ่านผลโดยตลอด เพื่อให้มีมาตรฐานเดียวกัน เป็นการป้องกัน Inter-observer variation เพราะแต่ละคนอาจให้ score ไม่เท่ากัน ถ้าใช้แพทย์มากกว่า 1 คน อ่านผลในอาสาสมัครแต่ละคน

**ผลการทดสอบ** อาสาสมัครจำนวน 100 ราย ให้ความร่วมมือตั้งแต่เริ่มจนสิ้นสุดการศึกษา อายุอยู่ระหว่าง 18 – 59 ปี เป็นหญิง 81 ชาย 19 อาสาสมัครจำนวน 22 ราย มีประวัติรับประทานยา antibiotics, isotretinoin, antihistamines, NSAIDS, antihypertensive, pills, herbal medicine, vitamins, ferrous sulfate, antithyroid และ antidepressants ศึกษาในระหว่าง ตุลาคม-ธันวาคม 2544 ระยะเวลาการศึกษา 5 สัปดาห์

สารทดสอบและตัวชี้วัดผลลบ ให้ผลลบทุกราย ตัวชี้วัดผลบวกให้บวกทุกราย โดยมีความรุนแรงต่างกัน ดังแสดงใน ตารางที่ 2,3 และภาพที่ 3 ส่วนใหญ่ให้ผลบวกที่การอ่านผล 24 ชั่วโมง

**Statistical analysis**

เนื่องจากสารทดสอบให้ผลลบ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ค่า constant เท่ากับศูนย์ จึงไม่สามารถคำนวณค่าทางสถิติโดยวิธี McNemar test

**ตารางที่ 1** แสดงส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง product A

| |
|---|
| PEG-20 glyceryl stearate |
| Palmitic acid (and) stearic acid |
| Glyceryl stearate |
| Cetyl alcohol |
| Silicone oil |
| Caprylic capric triglyceride |
| Jojoba oil |
| Mineral oil |
| Propylene glycol isostearate |
| DL-∝-tocopherol |
| Aloe vera extract (200:1) |
| Cucumber extract |
| Deionized water |
| Perfumes |

**ตารางที่ 2** แสดงจำนวนอาสาสมัครซึ่งผลการทดสอบผิวหนังต่อผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง product A และ 20% SDS เมื่ออ่านผลที่ 4, 24, 48, 72 ชั่วโมง

| Reading | Product A | | | 20% SDS | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Time | Positive | Negative | ± | 1+ | 2+ | 3+ | 4+ |
| 4 Hours | 0 | 22 | 10 | 21 | 23 | 11 | 13 |
| 24 Hours | 0 | 0 | 6 | 21 | 43 | 16 | 14 |
| 48 Hours | 0 | 4 | 6 | 17 | 41 | 25 | 7 |
| 72 Hours | 0 | 4 | 9 | 21 | 34 | 25 | 7 |

**ตารางที่ 3** แสดงจำนวนอาสาสมัครซึ่งผลการทดสอบผิวหนังต่อผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง product A และ 20% SDS เป็น (+) หรือ (-) เมื่ออ่านผลที่ 4, 24, 48, 72 ชั่วโมง

| Reading Time | Product A positive | 20% SDS negative | 20% SDS positive |
|---|---|---|---|
| 4 Hours | 0 | 32 | 68 |
| 24 Hours | 0 | 6 | 94* |
| 48 Hours | 0 | 10 | 90 |
| 72 Hours | 0 | 13 | 87 |

* อาสาสมัครส่วนใหญ่มีปฏิกิริยาต่อสารทดสอบมาตรฐานเมื่ออ่านผล 24 ชั่วโมง

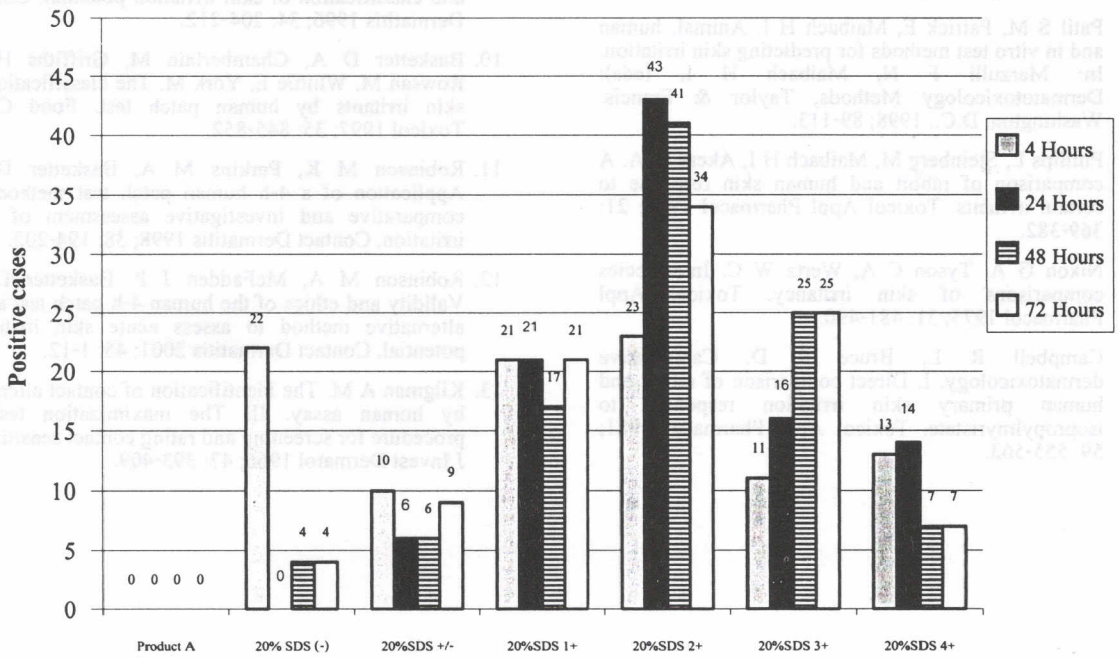
## วิจารณ์

ผลการทดสอบครั้งนี้เชื่อถือได้เนื่องจากตัวชี้วัดผลบวกมีปฏิกริยาระคายเคืองทุกรายและตัวชี้วัดผลลบไม่เกิดปฏิกริยา พบว่า 94% ของอาสาสมัครให้ผลบวกต่อ 20% SDS ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง จึงเสนอแนะว่าการอ่านผลที่ 48 และ 72 ชั่วโมง อาจไม่จำเป็น เพื่อความสะดวกแก่อาสาสมัครไม่ต้องเสียเวลามาพบแพทย์หลายครั้ง โดยใช้เวลาการทดสอบทั้งสิ้น 2 วันเท่านั้น ยกเว้นในรายที่ยังไม่ชัดเจน ความรุนแรงของปฏิกิริยาผลบวกที่แตกต่างกันในแต่ละคน ถือว่าเป็นปกติ เกิดจากความแตกต่างของสภาพสิ่งแวดล้อมและสภาพผิวของแต่ละคน[15] ส่วนยาดังกล่าวที่อาสาสมัครบางคนใช้อยู่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีผลต่อผลการทดสอบ

ความสำคัญของการทดสอบวิธีนี้ขึ้นกับ ตัวชี้วัดและแผ่นทดสอบที่ได้มาตรฐานการชั่งปริมาณสารทดสอบที่เที่ยงตรงเท่ากันทุกราย การควบคุม pH ของสารตัวชี้วัด เทคนิคการติดแผ่นทดสอบลงบนผิวหนัง การไม่มีสิ่งแปลกปลอมปะปน (contamination) ในสารทดสอบและผิวหนังบริเวณที่ใช้ทดสอบ ความสามารถ

ในการควบคุมขั้นตอนการทดสอบ และการอ่านผลให้ตรงตามเวลาที่กำหนด และเนื่องจากเป็นการทดลองในคน การรวบรวมจำนวนอาสาสมัครให้ได้ตามจำนวนที่ต้องการในเวลาเดียวกันอาจเป็นอุปสรรคสำคัญของการทดสอบวิธีนี้ Basketter และคณะผู้ริเริ่มเทคนิคนี้กล่าวว่า จำนวนอาสาสมัคร 30 รายมีนัยสำคัญและเพียงพอในการแปรผล[12,13]

**ภาพที่ 3** กราฟแสดงจำนวนอาสาสมัคร, ความรุนแรงของปฏิกิริยาผิวหนังต่อผลิตภัณฑ์ให้ความชุ่มชื้นและต่อสารทดสอบ 20% SDS ที่เวลา 4, 24, 48, 72 ชั่วโมง




## สรุป

การทดสอบฤทธิ์ระคายเคืองของผลิตภัณฑ์ที่สัมผัสกับผิวโดยตรง โดยวิธี human 4-h patch test เป็นวิธีที่เชื่อถือได้ และแนะนำให้ใช้เป็นมาตรฐานแทนการศึกษาในสัตว์ทดลอง ผู้รายงานได้นำเสนอขั้นตอนและวิธีทำโดยละเอียด ผลการศึกษาสามารถยืนยันได้ว่าผลิตภัณฑ์ครีมบำรุงผิวที่นำมาทดสอบไม่มีฤทธิ์ระคายเคืองต่อผิวของผู้ใช้

**กิตติกรรมประกาศ** ผู้รายงานขอขอบคุณ Dr. John McFadden, Dr. David Basketter, Dr. Nichola Gilmour ผู้ให้คำแนะนำและเตรียมสารทดสอบ และบริษัทสมูทอี ผู้สนับสนุนการศึกษาครั้งนี้

***References***

1. Draize J H, Woodard G, Calvery H O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J Pharm Exp Therap 1944; 82: 377-390.
2. Patil S M, Patrick E, Maibach H I. Animal, human and in vitro test methods for predicting skin irritation. In: Marzulli F N, Maibach H I, (eds): Dermatotoxicology Methods, Taylor & Francis: Washington, D.C., 1998; 89-113.
3. Phillips L, Steinberg M, Maibach H I, Akers W A. A comparison of rabbit and human skin response to certain irritants. Toxicol Appl Pharmacol 1972; 21: 369-382.
4. Nixon G A, Tyson C A, Wertz W C. Interspecies comparisons of skin irritancy. Toxicol Appl Pharmacol 1975; 31: 481-490.
5. Campbell R L, Bruce R D. Camparative dermatoxicology. I. Direct comparison of rabbit and human primary skin irritation responses to isopropylmyristate. Toxicol Appl Pharmacol 1981; 59: 555-563.
6. Basketter D A, Whittle E, Griffiths H A, York M. The identification and classification of skin irritation hazard by a human patch test. Food Chem Toxicol 1994; 32: 769-775..
7. Dykes P J, Black D R, York M, Dickens A D, Marks R. A stepwise procedure for evaluating irritant materials in normal volunteer subjects. Human Exp Toxicol 1995; 14: 204-211.
8. York M. Basketter D A, Cuthbert J A, Neilson L. Skin irritation testing in man for hazard assessment – evaluation for four patch systems. Human Exp Toxical 1995; 14: 729-734.
9. York M, Griffiths H A, Whittle E, Basketter D A. Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential. Contact Dermatitis 1996; 34: 204-212.
10. Basketter D A, Chamberlain M, Griffiths H A, Rowsan M. Whittle E, York M. The classification of skin irritants by human patch test. Food Chem Toxicol 1997; 35: 845-852.
11. Robinson M K, Perkins M A, Basketter D A. Application of a 4-h human patch test method for comparative and investigative assessment of skin irritation. Contact Dermatitis 1998; 38: 194-202.
12. Robinson M A, McFadden J P, Basketter D A. Validity and ethics of the human 4-h patch test as an alternative method to assess acute skin irritation potential. Contact Dermatitis 2001; 45: 1-12.
13. Kilgman A M. The identification of contact allergens by human assay. III The maximization test: a procedure for screening and rating contact sensitizers. J Invest Dermatol 1966; 47: 393-409.