**《基于皮肤模型化妆品舒缓功效试验方法》征求意见稿**

**编制说明**

1. **工作概况**
2. **任务来源**

根据《中华人民共和国标准化法》和《地方标准管理办法》，陕西省食品药品检验研究院、陕西博溪通用检测科技有限公司、陕西省药品和疫苗检查中心等6家单位共同制订陕西地标准《基于皮肤模型化妆品舒缓功效试验方法》，计划编号SDBXM227-2023，本项目应在2024年5月30日之前完成。

1. **目的及意义**

根据《化妆品功效宣称评价规范》，舒缓是指有助于改善皮肤刺激等状态。2021年颁布的《化妆品功效宣称评价规范》中，舒缓功能也被列为可宣称的功能之一，且必须通过人体功效评价试验进行验证，但目前国家和行业中还没有形成完整统一的检测体系和试验方法，但对于具有舒缓功效的化妆品而言，人体试验检验周期较长，志愿者招募较难，因此，需要在舒缓功效性方面采用新的可以更加科学、合理的评价功效性的指标，评估化妆品、医用化妆品及化妆品日用化学品的舒缓功效。

现有检测标准中《化妆品舒缓功效测试-体外TNF-α炎症因子含量测定脂多糖诱导巨噬细胞系炎症细胞模型测试方法》中主要是基于诱导细胞模拟人体面部细胞受损，其自身也无法完全模拟人体面部细胞的生存状态，在其实用性上具有一定局限性。而本标准基于与真人皮肤高度相似的皮肤结构的体外重组皮肤模型，进行功效检测，其不仅可模拟人体皮肤受到外部刺激的状态，还可模拟待测的使用情景，从而更全面的模拟人体使用的真实情况。国内现有发布了化妆品舒缓功效评价标准，但对于检测指标并不完善，随着敏感性皮肤的增加，具有舒缓功效的化妆品不断被开发，但现有检测标准并未完全模拟人体所处环境，也无统一标准。因此，严格的测定标准，统一对化妆品舒缓功效进行评估，有利于维护化妆品市场的稳健发展，也有利于消费者合法权益的保护。

1. **主要工作过程**

2023年3月，任务下达后项目承担单位立即成立了标准编制工作组，对目标任务进行分解，明确成员的任务要求，制定工作计划和进度安排。项目运行以来，项目组积极收集国内外化妆品舒缓功效评价试验技术规范方面的信息，并对各类信息进行分析研究，最后由标准起草单位形成标准草案。

2023年5月初，由陕西省食品药品检验研究院组织进行地方标准立项前的会议讨论，整理立项申请答辩材料，确定技术路线，制定实施方案，确定了标准起草单位和验证单位，共同协力完成标准制定和验证任务，6月完成立项答辩。

2023年9月20日，项目承担单位组织召开了化妆品舒缓功效测试标准验证推进会议，第一起草单位介绍了目前标准工作的研究进展，根据2023年7月-9月期间的研究和试验验证，初步确定了基于体外重组表皮模型IL-1α含量测定的化妆品舒缓功效评价体系的技术要求，包括实验材料质量标准，样品处理方法，测试流程，指标检测方法以及测试仪器的性能和参数要求。验证单位随后开展标准的稳定性验证工作。

2023年10月8日开始收集、汇总分析验证单位的验证结果，对验证单位意见进行处理，形成验证总结报告。根据相关单位的验证结果，标准编制工作组对标准草案进行完善，并于2023年10月23日组织标准起草单位和验证单位进一步研讨，完善和确定标准草案各项内容，形成标准草案讨论稿。

2023年11月项目承担单位组织召开《基于皮肤模型化妆品舒缓功效试验方法》标准草案（工作组讨论稿）研讨视频会。标准起草小组代表介绍了标准草案的验证和修改情况。参会专家对标准草案逐条讨论，提出修改意见，标准起草工作组根据专家意见对标准草案进行修改，形成征求意见稿的草稿提交归口单位。根据专家最终审查意见，对标准送审稿进行了如下主要修改：

1. 封面发布单位改为陕西省市场监督管理局。
2. 前言中GB/T1.1-2009已经被2020版代替，更改为新标准号，且应该书写该标准的中文名称。
3. 针对体系检测原理进行补充说明，进一步明确SLS作用重组表皮模型与皮肤刺激性和舒缓之间的相关性。
4. **起草组成员及任务分工**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 姓名 | 职务/职称 | 单位 | 分工 |
| 1 | 曹涵博 | 检验员/主管药师 | 陕西省食品药品检验研究院 | 负责人 |
| 2 | 蔡虎 | 副院长/主任药师 | 陕西省食品药品检验研究院 | 统筹策划 |
| 3 | 刘海静 | 院长/主任药师 | 陕西省食品药品检验研究院 | 负责人 |
| 4 | 冯润东 | 主任/副主任药师 | 陕西省食品药品检验研究院 | 技术顾问 |
| 5 | 杨文娟 | 院长助理/-- | 陕西博溪通用检测科技有限公司 | 标准化检查 |
| 6 | 吴小勇 | 主任/高级工程师 | 咸阳市食品药品检验检测中心 | 标准化检查 |
| 7 | 郝武常 | 主任/主任药师 | 陕西省药品技术审评中心 | 统筹策划 |
| 8 | 党琳琳 | 副主任/主任药师 | 陕西省药品和疫苗检查中心 | 材料收集整理 |
| 9 | 卢永波 | 院长/-- | 陕西博溪通用检测科技有限公司 | 技术顾问 |
| 10 | 李潇 | 总经理/-- | 陕西博溪通用检测科技有限公司 | 技术顾问 |
| 11 | 姚婷 | 技术开发工程师 | 陕西博溪通用检测科技有限公司 | 实验验证 |
| 12 | 王莉芳 | 副主任/副主任医师 | 陕西省食品药品检验研究院 | 标准化检查 |
| 13 | 罗阿利 | 科长/副主任药师 | 陕西省药品技术审评中心 | 材料收集整理 |
| 14 | 张若冰 | 科长/主管药师 | 陕西省药品技术审评中心 | 技术顾问 |
| 15 | 李晓春 | 检验员/副主任药师 | 陕西省食品药品检验研究院 | 主要起草人 |
| 16 | 张亚锋 | 副所长/主任药师 | 西安市食品药品检验所 | 材料收集整理 |

1. **标准编制原则和标准主要内容**

**1. 标准编制原则**

本标准在编制遵循以下原则：

1. 协商一致原则
2. 不其歧视不排他原则
3. 与现有标准保持一致原则。

本标准按照GB/T1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和起草规则》和[国家标准|GB/T 20001.4](https://openstd.samr.gov.cn/bzgk/gb/newGbInfo?hcno=1C02E40CFEFFFE3A487D89C4EF5479F0" \t "https://cn.bing.com/_blank)《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的规定起草。

本标准在参照国内技术水平的基础上制定，充分考虑相关企业、使用单位等各方面的意见和建议，体现了基于皮肤模型化妆品舒缓功效试验方法的技术要求，切实可行，具有可操作性。同时，也体现了与国际先进水平接轨，对国内生产企业及相关行业的技术进步将产生积极的推动作用。

1. **标准主要内容**

本标准文件规定了基于皮肤模型化妆品舒缓功效试验方法的范围、规范性引用文件、术语和定义、技术原理、试验条件、材料与试剂、仪器设备、样品、试验步骤、试验数据处理、精密度和测量不确定度、质量保证和控制以及试验报告部分。

**2.1 范围**

本标准规定了评价舒缓类化妆品功效的检测方法，以及对样品溶解性的要求。

**2.2规范性引用文件**

GB 19489-2008 实验室 生物安全通用要求

SN/T 3899—2014 化妆品体外替代试验 良好细胞培养和样品制备规范

SNT3898-2014化妆品体外替代试验方法验证规程

《化妆品安全技术规范》

《化妆品功效宣称评价规范》

《化妆品分类规则和分类目录》

**2.3 术语和定义**

对本标准中涉及的“阴性工作液、阳性工作液、阳性工作液、阴性对照组、ELISA检测和体外重组表皮模型”等术语和定义进行了明确。

**2.4 技术原理**

本节对检测指标IL-1α分泌过程，以及其与舒缓功效间的关系、以及检测方法原理进行阐述，明确其可作为舒缓功效支持数据之一的科学性和合理性。

**2.5 试验条件**

本节对化妆品舒缓功效体外重组表皮模型IL-1α含量测定所需的基本材料生产所需实验室环境进行要求，针对室内温度、湿度以及空气洁净度。

**2.6 试剂或器材**

本节对化妆品舒缓功效体外重组表皮模型IL-1α含量测定所需过程材料和试剂进行明确和要求。主要包括模型本身、培养细胞基础培养液、血清。样品制备过程所需溶剂、阳性标准品（地塞米松）、PBS以及检测端所需试剂盒。

**2.7 仪器设备**

本节对化妆品舒缓功效体外重组表皮模型IL-1α含量测定所需设备进行明确，涉及基本模型培养设备（CO2细胞培养箱、超净工作台）、分析称量设备（分析天平、通风橱）、样品处理（低温高速离心机、移液器）与检测设备（倒置显微镜、酶标仪）。

**2.8 样品**

本节对化妆品舒缓功效体外重组表皮模型IL-1α含量测定对象待测样品的溶解性、配制过程注意问题、样品浓度选择确定以及阳标配置要求进行明确。

**2.9 试验步骤**

本节对化妆品舒缓功效体外重组表皮模型IL-1α含量测定涉及的实验处理过程进行详细明确。主要包括模型准备、受试样品给药处理过程、模型刺激处理（SLS配置）、待测样品收集以及检测等过程。

**2.10 试验数据处理**

本节对化妆品舒缓功效体外重组表皮模型IL-1α含量测定后原始读取，换算原理，计算公式、统计分析方法、结果判定进行明确要求。

**2.11 精密度和测量不确定度**

本节对化妆品舒缓功效体外重组表皮模型IL-1α含量测定的批次内以及批次间稳定性提出质控要求，以保证方法的精密度。同时对导致实验整体过程发生测量不确定的因素也提出要求。

**2.12 质量保证和控制**

本节对化妆品舒缓功效体外重组表皮模型IL-1α含量测定操作过程重要质控点进行明确。

**2.13 试验报告**

本节对化妆品舒缓功效体外重组表皮模型IL-1α含量测定呈现报告内容提出要求，包括测试目的，测试材料，测试设备，样品信息，测试方法，数据与统计分析，实验结果，实验结论，试验日期。

1. **实证研究**

验证单位使用企业提供的盲样，按照标准草案的技术要求和推荐的试验方法进行了验证，根据各家论证数据，使用本标准推荐方法，样品功效可以在不同实验间的测试结果中实现稳定重复，推荐的试验方法具有可行性。具体试验方法和部分试验验证结果总结如下：

1. **试验方法**
	1. **体外重组表皮模型的准备**

该步骤在超净工作台中进行。每轮测试中按照实验分组（空白对照组、阴性对照组、阳性对照组和各待测物组）数量，每组各准备1块6孔板并进行标记，在每个6孔板的第一排孔中各加入0.9mL EpiGrowth培养液。每组各3个体外重组表皮模型，将模型转移至6孔板第一排中，置于CO2培养箱中培养24 h（37±1℃、5±1% CO2、95%相对湿度）。

* 1. **液体配置**

配置阴性工作液：称取0.024 g SLS溶于6 mL PBS溶液中，0.22 µm过滤，配置成0.4% SLS母液，备用。

配置阳性工作液：将地塞米松整瓶置于玻璃皿中开口干燥，105℃干燥2 h，干燥后将粉末收集于1.5 mL离心管中并称重，根据重量按照100 mg加1000 µL DMSO的量等比例放大，震摇2 h，充分混匀得到浓度为100 mg/mL浓度的地塞米松母液。

配置样品工作液：需稀释至相应浓度的样品：根据样品浓度，采用0.2% SLS作为溶剂，稀释样品至相应工作浓度；原液给药样品：按照体积比1:1将样品与浓度为0.4%的SLS涡旋混匀。

* 1. **给药**

阴性对照及阳性对照表面涂抹25 µL 0.2% SLS的工作液；样品组表面涂抹样品稀释液或原液给药样品（含浓度为0.2% 的SLS）。阳性对照组给药方式为液下给药，将其母液与培养液混合稀释后换液；空白对照组、阴性对照组、样品组更换正常培养基。之后将孔板转移至CO2培养箱中，孵育培养24 h（37±1℃、5±1% CO2、95%相对湿度）。

* 1. **收样**

24 h孵育结束后，收集培养液储存于-80℃保存。

* 1. **ELISA检测**

检测前提取将样本从-80℃室温解冻，按照ELISA检测说明书进行IL-1α检测。

2. 测量分析

推荐使用专业制作曲线软件，以标准品的浓度为纵坐标，OD450值为横坐标，制作标准曲线，根据样本的OD450值，查出相应的浓度。或用标准品的浓度与OD450值计算出标准曲线的回归方程式，将样本的OD450值代入方程式，计算样本的IL-1α含量。最终取各组 3 个复孔的平均值作为最终的IL-1α结果。

IL-1α上调率计算公式：

 上调率（%）$=(\frac{T−C}{C}$)×100%

式中：

T—受试物IL-1α含量平均值；

C—阴性对照IL-1α含量平均值。

**3. 数据统计**

根据每组3个重复，计算平均值（Mean）及标准差（Standard Deviation，SD），结果采用Mean±SD 形式表示。各组间采用*t*-test检验统计分析。所有的统计分析均为双尾。 *p*<0.05 被认为具有差异显著性，其中\**p*<0.05， \*\**p*<0.01，*p* 值越小越显著。

**4. 实证效果**

下图为测试样品的IL-1α检测结果



图1 IL-1α检测结果

结果判定：与空白组相比，阴性对照组IL-1α表达量出现显著性上调（p<0.01），与阴性对照组相比，阳性样品组IL-1α表达量显著下降（p<0.01），说明检测体系成功有效。

**5. 验证报告**

包括但不限于以下几个方面的内容：

——测试目的

——测试材料

——测试设备

——样品信息

——测试方法

——数据与统计分析

——实验结果

——实验结论

——试验日期

**6. 参考文献**

### François-Xavier Bernard, Pedretti, N., Rosdy, M., & Deguercy, A. (2010). Comparison of gene expression profiles in human keratinocyte mono-layer cultures, reconstituted epidermis and normal human skin; transcriptional effects of retinoid treatments in reconstituted human epidermis. Experimental Dermatology, 11(1), 59-74.

### Seto, J. E., Polat, B. E., Lopez, R. F. V., Blankschtein, D., & Langer, R. (2010). Effects of ultrasound and sodium lauryl sulfate on the transdermal delivery of hydrophilic permeants: comparative in vitro studies with full-thickness and split-thickness pig and human skin. Journal of Controlled Release, 145(1), 26-32.

1. **知识产权说明**

无

**五、采标情况**

**1. 采用国际标准和国外先进标准的程度**

经过检索，国外无针对化妆品舒缓功效测试评价实验室方法的技术规范标准。

**2. 与国内同类标准水平的对比**

目前国内尚未见有基于重组皮肤模型评价化妆品舒缓功效的标准。国内目前有针对巨噬细胞评价化妆品舒缓功效的标准《化妆品舒缓功效测试-体外TNF-α炎症因子含量测定脂多糖诱导巨噬细胞系炎症细胞模型测试方法》(T/SHRH 033-2020 )，该标准通过在体外模拟人体生理环境来培养细胞，测量细胞接触受试物前后的变化来验证原料的功效性。但其与人体完整组织皮肤相比，仍存在差异。

**六、重大意见分歧的处理**

无

**七、其他应说明的事项**

无

**标准起草组**

**2023.11**