ICS 71.100.70

CCS Y42

DB61

陕西省地方标准

DB 61/T XXXXX—XXXX

基于皮肤模型化妆品保湿功效试验方法

Test method of moisturizing effect of cosmetics based on skin model

**（征求意见稿）**

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

陕西省市场监督管理局   发布

目  次

前  言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 技术原理 2

5 试验条件 2

6 材料和试剂 2

7 仪器设备 2

8 样品 2

9 试验步骤 3

10 试验数据处理 4

11 精密度和测量不确定度 4

12 质量保证和控制 5

13 试验报告 5

前  言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由陕西省药品监督管理局提出并归口。

本文件起草单位：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、陕西省药品技术审评中心、陕西省药品和疫苗检查中心、咸阳市食品药品检验检测中心、陕西省食品药品检验研究院。

本文件主要起草人：王莉芳、蔡虎、曹涵博、党琳琳、杨文娟、卢永波、李潇、吴小勇、冯润东、郝武常、罗阿利、张若冰、吴素丽、李晓春、张亚锋、李润芝。

本文件由陕西省食品药品检验研究院负责解释。

本文件首次发布。

联系信息如下：

单位：陕西省食品药品检验研究院

电话：029-62288412

地址：陕西省西安市高新区科技五路21号

邮编：710065

基于皮肤模型化妆品保湿功效试验方法

1. 范围

本文件规定了一种化妆品保湿功效评价的皮肤模型含水量测定技术要求的范围、规范性引用文件、术语和定义、技术原理、试验条件、材料和试剂、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的要求。

本文件适用于基于体外重组表皮模型含水量测定的化妆品保湿功效测试技术要求。

1. 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T6682 分析实验室用水规格和试验方法

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》

1. 术语和定义

下列术语和定义适用本标准。

3.1

体外重组表皮模型 （Reconstructed human epidermis model）

采用人原代表皮角质形成细胞，通过组织工程技术在体外重组的皮肤组织，具有与正常皮肤高度相似的复层化结构、生理及代谢功能。

3.2

阳性工作液 （Positive working fluid）

在试验过程中选择具有显著保湿功效的样品作为阳性参考，如甘油溶液，参考浓度20%，作为阳性工作液。

3.3

样品工作液 （Sample working fluid）

将一定浓度的待测样品溶于一定的溶剂中，如去离子水或磷酸盐缓冲液中形成样品工作液。

3.4

皮肤含水量 （Skin water content）

本文件中皮肤含水量是指使用采用电容法测定的皮肤模型角质层中水含量。

1. 技术原理

皮肤保湿主要取决于角质层的含水量，当角质层的含水量充足时，皮肤呈现出柔软、光滑、细嫩和富有弹性的状态，角质层含水量不足时，皮肤就会干燥、粗糙，甚至皲裂，所以角质层含水量是决定皮肤健康状态的主要指标，也是评价与水分丢失相关的皮肤状态的重要参数。保湿化妆品的功能在于增加和维持皮肤角质层的含水量，角质层含水量越高，其电容量也越高，通过测试探头与皮肤接触后电容值的变化反映皮肤角质层中的含水量，对样品保湿功效进行评估。

1. 试验条件

实验室环境：无菌室的等级达到十万级，温度控制在20-24℃，湿度控制在50%～70%。

1. 材料和试剂
	1. 材料
		1. 体外重组表皮模型：EpiKutis®

注：其他体外重组表皮模型也可用于本试验，但应证明其等同性。

* 1. 试剂
		1. 体外重组表皮模型培养液：EpiGrowth 培养液，无菌，无血清成分。
		2. 75%乙醇：无色，pH=6.0-7.0。
		3. 磷酸盐缓冲液(PBS)：0.01M的磷酸盐缓冲液（含氯化钾），pH=7.4。
		4. 甘油：无色，试剂级，纯度99.9%。

注：以上试剂可采用相同类型的试剂进行替代。

1. 仪器设备
	1. 超净工作台：洁净度达到100级。
	2. CO2细胞培养箱：37℃±1℃，5±1%CO2，95%相对湿度。
	3. 分析天平:精度0.1mg。
	4. 电容法皮肤水分测量仪：如[Corneometer® CM 825](https://www.courage-khazaka.de/en/16-wissenschaftliche-produkte/alle-produkte/183-corneometer-e)或相当者。
	5. 移液器：连续加样器和相应吸头、M25活塞排代式移液器和相应吸头、2μL~10μL、10μL~ 100μL、20~200μL、100~1000μL移液器及相应吸头。
2. 样品
	1. 样品要求

配方类样品：本文件中配方类样品剂型包括水、乳、膏、霜、啫喱、凝胶等。

原料类样品：本文件中原料类样品性状包括液体，固体。

* 1. 样品配制

配方类样品可以直接使用。

液体原料类样品，需使用蒸馏水或其他无害溶剂稀释到一定浓度，形成匀质液体。

固体原料类样品，需使用适当的溶剂溶解，并稀释到一定浓度，形成匀质液体。水溶性固体可以使用蒸馏水或磷酸盐缓冲液为溶剂；水不溶性固体宜使用二甲基亚砜（DMSO）为助溶剂，亦可采用无水乙醇或其他低细胞毒性的有机溶剂，需保证溶解体系中有机溶剂的含量低于1%。在使用溶剂前，应仔细评估它们的特殊性质，例如：是否与受试物发生反应，或溶液中的化学稳定性。可使用涡旋混合/或超声处理和/或加热到适当温度等方法辅助溶解，除非这些操作会影响到受试物的稳定性。

* 1. 样品浓度

配方类样品使用样品原浓度进行处理。

原料类样品的工作浓度应通过细胞毒性检测确定样品的安全浓度范围。

* 1. 试剂配置
		1. PBS缓冲液（pH 7.4）：准确称取0.27 g磷酸二氢钾，1.42 g磷酸氢二钠，8 g氯化钠，0.2 g氯化钾，加水800 mL溶解，用盐酸调pH至7.4，并加水定容至1 L。
		2. 阳性标准品：准确吸取200μL甘油与800μL PBS溶液混合均匀，形成浓度为20%的甘油溶液。
1. 试验步骤
	1. 体外重组表皮模型准备

将模型转移到6孔板中（提前添加0.9mL EpiGrowth培养液），在6孔板上标注测试组编号。每组设置3个重复模型。该步骤在超净工作台中进行。

* 1. 给药

配方类样品给药：设置空白对照组，阳性对照组和样品组，空白对照组表面不进行任何样品处理，阳性对照组添加1.5μL的20%甘油溶液，样品组添加1.5μL的测试样品到模型表面，使用柔软光滑的支持物，如1mL注射器的活塞，将样品涂抹均匀。

原料类样品给药：对需要稀释或溶解的原料类待测样品，需增设溶剂对照组，样品给药体积与处理方式同配方类样品。

注1：若样品溶解液难以在皮肤模型表面均匀分布，可以适当增加给药体积，最高不超过25μL，同时阳性对照组和溶剂对照组的给药体积必须与样品组保持一致。

给药结束后，将皮肤模型放入培养箱（5%CO2、37℃）中继续培养。样品孵育时间可设置为24h，也可按照样品实际测试要求设置不同时间；样品孵育时间点可以为单时间点，也可以为多时间点。

* 1. 清洗

样品孵育结束后，根据模型数量准备24孔板，并做相应标记。每孔加入0.3mL的EpiGrowth培养液。将模型从培养箱中转移到超净工作台中，观察模型表面，若模型表面有明显的样品残留，可以用棉签将表面残留样品轻轻擦掉；对于难清洁的样品，可以用磷酸盐缓冲液冲洗模型表面，至少冲洗10次以保证样品清洗干净，用棉签将模型内外残留的水轻轻擦干，然后将模型转移到24孔板中。

* 1. 平衡

关闭超净台通风系统，将装有皮肤模型的24孔板板盖取下，敞口静置30min，然后进行含水量测量。

* 1. 含水量测量

仪器准备：将[Corneometer® CM 825](https://www.courage-khazaka.de/en/16-wissenschaftliche-produkte/alle-produkte/183-corneometer-e)角质层含水量测试探头连接到MPA6适配器上，打开仪器测量软件MPACT plus，选择测量参数为含水量，选择测量模式为单点测量，然后用75%酒精清洁探头，待探头表面干燥后进行测量。

含水量测量：将模型底部的培养液擦干，用手术刀片将模型从细胞小室底部环切下来，用镊子将模型放置在测试仪的探头上，保证模型的角质层一面与探头完全接触，在平整干燥的表面按压探头进行测量，每个模型至少测量三次。测量结束后用75%酒精清洁探头，待探头表面干燥后测量下一个模型。

注1：操作过程中避免将手套上的水沾到探头上，干扰测试结果。

注2：每个模型的检测时间最好控制在2min内，一次实验中如果检测模型数量超过24个，建议分批次进行平衡和检测。

1. 试验数据处理
	1. 数据处理

每个模型测量三次取平均值作为该模型的含水量数据，每个样品组设置3个重复模型，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。

* 1. 统计分析

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，其中其中*p*<0.05表示为\*，*p*<0.01表示为\*\*，*p*值越小越显著。

* 1. 结果判定

以下条件说明待测物具有保湿功效：

配方类样品：与空白对照组相比，待测物的皮肤含水量含量显著上升，且有统计学显著性差异，说明待测物可以提升皮肤角质层含水量含量，具有保湿功效。

原料类样品：与溶剂对照组相比，待测物的皮肤含水量含量显著上升，且有统计学显著性差异，说明待测物可以提升皮肤角质层含水量含量，具有保湿功效。

1. 精密度和测量不确定度
	1. 精密度
		1. 当批次实验中，统计测量仪测得的每个组别重复模型间的含水量的标准差（ Standard Deviation， SD），并计算变异系数（Coefficient of Variation， C.V）， C.V值≤ 20%。

$变异系数（\%）=\frac{标准差Skin water content}{平均值Skin water content}$ ×100%

式中：

标准差Skin water content——皮肤含水量标准差

平均值Skin water content——皮肤含水量平均值

* + 1. 每批次试验均需设置相应的空白对照和阳性对照，针对原料样品，设计空白对照和溶剂对照。实验中设置的各种对照应符合如下标准。如任一种对照出现非下述标准，则视为质控不合格。1）与空白对照组相比，阳性对照组皮肤含水量显著增加。2）与阳性对照组相比，溶剂对照组的皮肤含水量不应有显著上升的趋势。
		2. 在相同条件下，经过3次以上测试，阳性对照均能检出皮肤含水量上调的效果，且与空白对照对照相比含水量上调率需≥15%，则认为试验系统有效。
	1. 测量不确定度
		1. [Corneometer® CM 825](https://www.courage-khazaka.de/en/16-wissenschaftliche-produkte/alle-produkte/183-corneometer-e)角质层含水量探头的测量不确定度为±3%。
		2. 含水量测量时，每个模型测量时需要至少3次重复测量，计算时应对数据进行筛选，剔除数据落于平均值±（3×标准差）以外的异常值。
1. 质量保证和控制
	* 1. 保证每个模型在给药前表面干燥，无潮湿现象。
		2. 保证每个皮肤模型表面接收到的样本量一致并且分布均匀。样品量差异和样本分布的均匀程度，均会影响含水量测试结果。
		3. 保证每次测量由同一操作员完成完整的测试过程，以避免因为操作手法导致的结果差异。
		4. 测试仪器需严格按照使用说明执行。
2. 试验报告

 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

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_