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舒缓功效试验方法

Test method for soothing 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](#_Toc150527932)

[1 范围 1](#_Toc150527934)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc150527935)

[3 术语和定义 1](#_Toc150527936)

[4 技术原理 2](#_Toc150527937)

[5 试验条件 2](#_Toc150527938)

[6 材料和试剂 2](#_Toc150527939)

[7 仪器设备 2](#_Toc150527940)

[8 样品 3](#_Toc150527941)

[9 试验数据处理 3](#_Toc150527942)

[10 精密度和测量不确定度 4](#_Toc150527943)

[11 质量保证和控制 4](#_Toc150527944)

[12 试验报告 5](#_Toc150527945)

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：曹涵博、蔡虎、刘海静、冯润东、杨文娟、吴小勇、郝武常、党琳琳、卢永波、李潇、姚婷、王莉芳、罗阿利、张若冰、李晓春、张亚锋。

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舒缓功效试验方法

1. 范围

本文件规定了一种化妆品舒缓功效测试体外重组表皮模型IL-1α含量测定的范围、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、试验步骤、试验数据处理、结果判定、以及试验报告的要求。

本文件可作为化妆品舒缓功效测试替代方法之一，也可结合其他方法对化妆品舒缓功效进行评价。

1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅改日期对应的版本适用于本文件；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

阴性工作液 （Negative working fluid）

在试验过程中选择SLS（月桂醇硫酸酯钠，sodium lauryl sulfate）作为刺激体外重组表皮模型的刺激物。

3.2

阳性工作液 （Positive working fluid）

在试验过程中选择具有显著舒缓功效的样品作为阳性参考，将阳性标准品地塞米松溶于EpiGrowth培养液中，配置成地塞米松阳性工作液。

3.3

样品工作液 （Sample working fluid）

将一定浓度的待测样品溶于培养基中形成样品工作液。

3.4

ELISA检测 （Enzyme linked immunosorbent assay）

酶联免疫吸附试验，是当前应用最为广泛的一项定性/定量检测抗体(抗原)的免疫酶技术。

3.5

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。

1. 技术原理

使用SLS刺激重组表皮模型模拟皮肤刺激性状态：刺激物SLS渗进活细胞层，一方面与细胞表面的受体如胞内感应受体NLR等发生相互作用，介导炎症因子的产生；另一方面诱导角质层中储存的IL-1α释放，释放的IL-1α进一步激活炎症相关的信号通路如核因子κB（NF-κB），介导表达更多的炎症因子，从而使得炎症反应级联放大，使皮肤发生刺激性反应。通过ELISA法检测IL-1α蛋白含量来评价受试物舒缓功效。

1. 试验条件

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%，防震动，防电磁干扰。

1. 材料和试剂
	1. 材料
		1. 重组表皮模型：选用角质形成细胞构建的重组皮肤模型

注：其他角质形成细胞构建的重组皮肤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）。
		2. SLS粉末：纯度应达到分析纯级别。
		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. 二甲基亚砜（Dimethylsulfoxide, DMSO）：CAS号：67-68-5；单位：毫升。
		5. 地塞米松粉末:纯度应达到分析纯级别。
		6. IL-α ELISA试剂盒：检测范围应达到0.18-12ng/mL。

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. 酶标仪：检测波长范围200-999nm。
	5. -80℃超低温冰箱：用于收样培养液冻存。
	6. 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. 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25 µL样品工作液（含SLS和样品）。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IL-1α

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。

1. 试验数据处理
	1. IL-1α含量计算

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。

* 1. IL-1α抑制率计算公式

抑制率（%）$=(\frac{T−C}{C}$)×100%

式中：

T—受试物IL-1α含量平均值；

C—空白/溶剂对照IL-1α含量平均值。

* 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*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舒缓功效：

对于受试物抑制IL-1α释放的表述，应包含受试浓度。

与阴性对照组相比，待测物的IL-1α含量显著下调，且有统计学显著性差异，说明待测物可以抑制重组皮肤模型释放IL-1α，具有舒缓功效。

1. 精密度和测量不确定度
	1. 精密度
		1. 当批次实验中，统计酶标仪测得的每个组别复孔间光密度的标准差（ Standard Deviation， SD），并计算变异系数（Coefficient of Variation，C.V），C.V值≤ 20%。

$变异系数（\%）=\frac{标准差Relative optical density rate}{平均值Relative optical density rate}$ ×100%

式中：

标准差Relative optical density rate——相对光密度标准差

平均值Relative optical density rate——相对光密度平均值

10.1.2 每批次试验均需设置空白对照、阴性对照和阳性对照。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，IL-1α含量出现显著性上调且具有统计学差异。2）与阴性对照组相比，阳性对照（地塞米松）组的IL-1α含量显著下调且具有统计学差异。

10.1.3 在相同条件下，经过3次以上测试，阳性对照均能检出IL-1α含量下调的效果，且与阴性对照相比IL-1α含量下调率需≥20%，则认为试验系统有效。

* 1. 测量不确定度

10.2.1 进行ELISA时需对待测测上清液进行稀释以确定适当稀释比例，保证检测数值落在试剂盒标准曲线范围内。

10.2.2 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

11.1 SLS剂量不足导致细胞对刺激条件无响应，或剂量过大造成细胞形态异常损伤影响蛋白正常分泌。

11.2 样品给药浓度超过安全浓度范围，导致细胞损伤或者死亡。

11.3 试剂盒未严格按照使用说明执行。

1. 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

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