

ICS 71.100.70
C2682
Y42

T/SHRH

团 体 标 准

T/SHRH 021-2019

化妆品美白功效测试 体外重组 3D 黑色素模型 测试方法

Comestics whitening efficacy test- In vitro Reconstructed
human skin contaning melanocytes test method

2019-12-30 发布

2020-01-30 实施

上海日用化学品行业协会 发布

目 次

前言.....	2
1. 范围.....	3
2. 规范性引用文件.....	3
3. 术语和定义.....	3
4. 试验原则.....	3
5. 试剂及仪器设备.....	4
6. 试验步骤.....	4
7. 结果计算.....	5
8. 质量控制.....	6
9. 结果判定.....	6
附录 A: (资料性附录)	7

前 言

本标准按照 GB/T1.1-2009 给出规则起草。

本标准由上海日用化学品行业协会提出和归口。

本标准的某些内容可能涉及专利，本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准起草单位：广东博溪生物科技有限公司、上海家化联合股份有限公司、上海上美化妆品有限公司、上海创元化妆品有限公司、福建片仔癀化妆品有限公司、东阿阿胶股份有限公司、上海绿瑞生物科技有限公司、云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、上海清轩生物科技有限公司、上海天祥质量技术服务有限公司、上海日用化学品行业协会。

本标准主要起草人：卢永波、李潇、张艳云、曹平、陈田、陈静、廖箬箬、曾四立、吴梅芳、陈贞明、谢阿贵、廖峰、姜春鹏、赵奕竹、马骁、王飞飞、高宏旗、朱翠翠、李琼、金坚、陈亦华

化妆品美白功效测试 体外重组 3D 黑色素模型 测试方法

1 范围

本标准规定了一种基于体外重组 3D 黑色素模型的化妆品原料及化妆品成品的美白功效测试方法。本标准可作为化妆品美白功效测试替代方法之一,也可结合其他方法对化妆品美白功效进行评价。本标准适用于具有生物化学美白作用的**化妆品原料及成品的美白功效**测试,不适用于物理遮盖类美白原料或成品。

2 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。凡是注明日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件,凡不注明日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
化妆品安全技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 体外重组 3D 黑色素皮肤模型 *in vitro* reconstructed human skin containing melanocytes

采用人原代表皮角质形成细胞及黑素细胞共培养形成的一种复层化、高度分化的三维重建皮肤模型。该类模型需对外界刺激(UVB、 α -MSH、ET-1等)具有黑化响应,及对美白剂(曲酸等)具有美白响应。

3.2 吸光度 optical density, OD

入射光强度与透射光强度比值的常用对数值。表示被检测物吸收的光学密度。特定波长下,同一种被检测物的浓度与被吸收的能量成正比关系。

4 试验原则

4.1 方法简要步骤

本标准采用体外重组 3D 黑色素模型(MelaKutis[®])对具有生物化学美白机理的化妆品原料及成品进行美白功效性测试。化妆品原料采用液下给药方式,在气液面培养的第 6 天(TA6)开始给药,连续给药 6 次,单次孵育时长为 24h。化妆品成品采用表面给药方式,在模型气液面培养第 6 天(TA6),第 8 天(TA8)进行 2 次给药,剂量为 10 μ L/次,单次给药后孵育时长为 48h。待测物给药、孵育全部结束后,去除待测物残留,对暴露后的体外重组 3D 黑色素模型进行表观色度, L*值,黑色素分布及黑素含量等测试。

4.2 方法测试终点

生物化学美白主要通过抑制黑色素的合成、阻断黑色素的转运及加快黑色素的代谢等机制达到美白功效。体外重组 3D 黑色素皮肤模型(MelaKutis[®])具有类似天然皮肤的黑化和美白响应能力,在化

妆品原料或成品暴露后，通过如下四个测试终点评价受试物美白功效。其中，表观色度与 L*值用于测定待测物的亮白作用；黑素颗粒分布用于测定待测物的黑素转运抑制作用；黑素含量用于测定待测物的黑素合成抑制作用。

5 试剂及仪器设备

5.1 材料及试剂

- 5.1.1 体外重组 3D 黑色素皮肤模型（MelaKutis[®]）。
- 5.1.2 体外重组 3D 黑色素皮肤模型培养液（M-TA 培养液）。
- 5.1.3 PBS 缓冲液。
- 5.1.4 曲酸（Kojic Acid, KA）。
- 5.1.5 二甲基亚砷（Dimethylsulfoxide, DMSO）。
- 5.1.6 乙醇。
- 5.1.7 乙醚。
- 5.1.8 氢氧化钠（NaOH）。
- 5.1.9 丙二醇。
- 5.1.10 黑素标准品（CAS 号：29512-49-0）。
- 5.1.11 多聚甲醛（4%）。
- 5.1.12 Masson-Fontana 黑色素染色试剂盒。

5.2 仪器设备

- 5.2.1 UVB 辐照仪：50mJ/cm²。
- 5.2.2 酶标仪：405nm。
- 5.2.3 超净工作台。
- 5.2.4 CO₂ 细胞培养箱：37℃ ± 1℃，5 ± 1% CO₂，95% 相对湿度。
- 5.2.5 分析天平(精度 0.1mg)。
- 5.2.6 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。
- 5.2.7 通风柜。
- 5.2.8 电热恒温水浴锅（80℃）。
- 5.2.9 单反相机。
- 5.2.10 色度仪。
- 5.2.11 正置显微镜。
- 5.2.12 低温高速离心机。

6 试验步骤

6.1 体外重组 3D 黑色素皮肤模型的准备

该步骤在超净工作台中进行。每轮测试中，空白对照组、阳性对照组、阴性对照组和各待测物组均需要 1 块 6 孔板。标记 6 孔板，在每个孔中加入 3.7 mL 的 M-TA 培养液，并放入无菌悬架，将气液面培养 3 天（TA3）的体外重组 3D 黑色素皮肤模型转移至无菌悬架中，置于 CO₂ 培养箱中培养（37 ± 1℃、5 ± 1% CO₂、95% 相对湿度）。每组需用 6 个模型，其中表观色度、黑素颗粒分布测定需 3 个重复模型；L*值、黑素含量测定需 3 个重复模型。

6.2 UVB 诱导

阳性对照组、阴性对照组、待测样品组自 TA3 开始,连续进行 7 天 UVB 辐照,辐照剂量为 50mJ/cm²/次。每次辐照结束后,更换培养液,液量为 3.7 mL/孔。空白对照组不进行 UVB 辐照,每天仅更换培养液,液量为 3.7 mL/孔。

6.3 给药

6.3.1 化妆品成品给药方式

在气液面第 6 天 (TA6) 和气液面第 8 天 (TA8) 进行表面给药,给药量为 10 μ L。阳性对照选用曲酸,给药浓度为 0.05%。

6.3.2 化妆品原料给药方式

从气液面第 6 天 (TA6) 开始每天进行液下给药,共 6 次,给药间隔时间为 24h。阳性对照组每孔添加含 42.67 μ g/mL 曲酸的 M-TA 培养液;待测物每孔添加含一定浓度受试物的 M-TA 培养液。阴性对照组、空白对照组仅更换培养液。

6.4 清洗:

化妆品成品给药全部结束后,采用超纯水对皮肤模型表面清洗三次,去除受试物残留。

化妆品原料类给药全部结束后,用无菌棉签擦拭皮肤模型底面,去除受试物残留。

6.5 检测

6.5.1 表观色度

将比色卡置于单反相机正下方,用镊子将单个模型放置于比色卡色圈内,进行拍照。单反相机参数设置为手动拍照模式,焦距调至 5.8 mm,孔径设置为 f/8,光圈调至 F22,快门速度设置为 1/80s,ISO 设置为 1600。

6.5.2 L*值测定

用手术刀片沿模型边缘进行环切后,用干净的镊子置于相片纸上,保证角质层朝上放置;色差仪自校后,将色差仪检测孔垂直按压于模型表面进行三次读数,取平均值作为单个模型的 L*值最终读数。

6.5.4 黑素颗粒分布测定

将表观色度拍照结束后的模型,用手术刀片沿模型边缘进行环切后,放入装有 4%多聚甲醛溶液的 1.5mL 离心管中,固定 2h。采用乙醇脱水、二甲苯透明后,进行石蜡包埋,切片(厚度 5~8 μ m)。二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化结束后,根据 Masson-Fontana 黑色素染色试剂盒说明书进行染色,封片后,置于正置显微镜下 40 倍物镜下拍照,观察黑素颗粒分布。

6.5.3 黑色素含量检测

将 L*值测定后的模型置于 1.5mL 离心管中,加入 1mL PBS 缓冲液,涡旋振荡仪震荡 3min,低温高速离心机 2000r/min 离心 10min,弃上清;向 1.5mL 离心管中依次加入 200 μ L 蒸馏水,500 μ L 无水乙醇和 500 μ L 乙醚,充分混匀后,室温静置 20min,3000r/min 离心 5min,弃上清;加入 1mL 含 10%DMSO 的 1mol/L NaOH 水溶液,80 $^{\circ}$ C 水浴中加热 40min,用移液器吸取 200 μ L 至 96 孔板中,酶标仪 405nm 波长下读取 OD 值。

7 结果计算

7.1 L*值

根据每组三个重复模型的 L*值，计算平均值（Mean）及标准差（Standard Deviation, SD），结果采用 Mean±SD 形式表示。

7.2 黑素含量

以黑色素标准品的浓度为纵坐标，OD 值为横坐标，绘制标准曲线，计算回归方程式，将测定的 OD 值代入回归方程式，计算黑素含量。计算每组三个重复模型的黑素含量平均值及标准差，结果采用 Mean±SD 形式表示。

7.3 黑素颗粒分布

每个模型选 3 个区域，于 40X 镜下拍照，用图像分析软件（如 Image J 等）计算黑色素颗粒面积。

8 质量控制

8.1 基本原则：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以下标准。如任一种对照出现非下述标准，则视为质控不合格。

8.2 阴性对照：与空白对照组相比，表观色度呈现明显黑化，L*值呈现 10%以上下降，黑素含量呈现 10%以上升高、黑素分布呈现明显升高，且具有统计学差异。每组中，三个重复模型的 L*值与黑素含量标准偏差均小于等于 15%。

8.3 阳性对照：与阴性对照组相比，表观色度呈现明显变白，L*值呈现 10%以上升高，黑素含量呈现 10%以上下降、黑素分布呈现明显下降，且具有统计学差异。每组中，三个重复模型的 L*值与黑素含量标准偏差均小于等于 15%。

8.4 待测样品：三个重复模型的 L*值与黑素含量标准偏差均小于等于 15%。

9 结果判定

以下条件说明待测物具有美白功效：

与阴性对照组相比，待测物表观色度明显变白，L*值具有统计学显著性差异；

与阴性对照组相比，待测物黑色素颗粒分布减少，且有统计学显著性差异；

与阴性对照组相比，待测物黑色素含量降低，且有统计学显著性差异；

如待测物有部分指标满足上述条件，仍可说明待测物具有美白功效。

附录 A
(资料性附录)

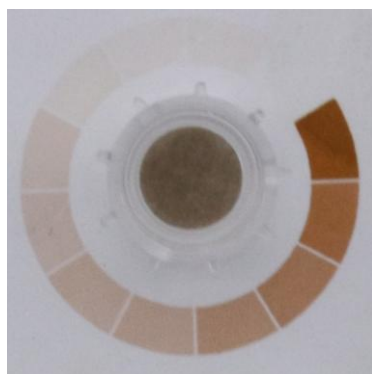


图 A.1 体外重组 3D 黑色素模型实物图

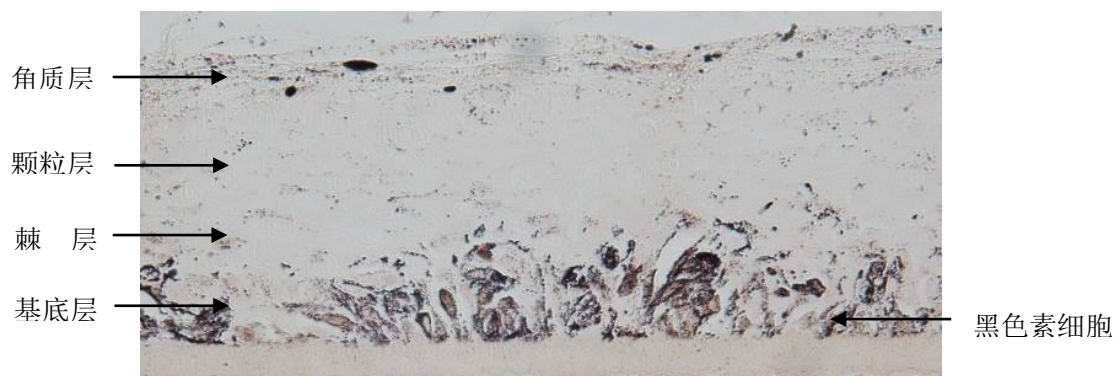


图 A.2 体外重组 3D 黑色素模型 Masson-Fontana 染色图片