

中国轻工业联合会
团体标准
化妆品功效人体测试
基于双光子在体显微成像技术的测试方法

T/CNLIC 0224—2025

*

中国轻工业出版社出版发行

地址：北京鲁谷东街5号

邮政编码：100040

发行电话：(010)85119832

网址：<http://www.chlip.com.cn>

Email：club@chlip.com.cn

轻工业标准化研究所编辑

地址：北京西城区月坛北小街6号院

邮政编码：100037

电话：(010)68049923

*

版权所有 侵权必究

书号：155019·7205

印数：1—200册 定价：30.00元

团 体 标 准

T/CNLIC 0224—2025

化妆品功效人体测试 基于双光子在体显微成像技术的测试方法

Human testing for cosmetic efficacy—

Test method based on two-photon *in vivo* microimaging technology

2025-12-26 发布

2025-12-26 实施

中国轻工业联合会 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 基本要求	2
5 测试原理	2
6 受试者的选择	3
7 测试方法	3
8 数据统计	5
9 结果应用	5
10 试验报告	5
附录 A（资料性） 测试仪器运行参数	6
附录 B（资料性） 皮肤结构图像的标准示例	7
附录 C（资料性） 测试指标与结果评估对照	9
参考文献	10

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国轻工业联合会提出并归口。

本文件起草单位：欧诗漫生物股份有限公司、北京颐唯实检测技术有限公司、山西锦波生物医药股份有限公司、诺斯贝尔化妆品股份有限公司、上海家化联合股份有限公司、杭州希科检测技术有限公司、华测检测认证集团股份有限公司、上海微谱检测科技集团有限公司、北京超维景生物科技有限公司、北京金宏帆商贸有限责任公司。

本文件主要起草人：赵瑞丽、范莹、刘琦、冯子然、陈传秀，周大为、邱晓锋、彭心宇、陈默、闫昕宇、王晓、李玉洁、陈映格、王思艺、崔俭杰、刘玉、王俊杰、王芳。

化妆品功效人体测试

基于双光子在体显微成像技术的测试方法

1 范围

本文件描述了化妆品功效人体测试中基于双光子在体显微成像技术的测试方法。

本文件适用于化妆品功效人体测试中采用双光子在体显微成像技术开展测试的方法。其他研究领域基于双光子在体显微成像技术的测试方法参照执行。

2 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，仅该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。

《化妆品安全技术规范》（2015版）（国家食品药品监督管理总局2015年第268号）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

双光子显微成像 two-photon microscopy

利用聚焦近红外飞秒激光作用于皮肤，从而激发皮肤组织中的双光子荧光信号及二次谐波信号的在体显微成像技术。

3.2

荧光通道投影面积 fluorescent channel projection area value

皮肤中弹性纤维荧光信号的分割投影面积。

注1：皮肤中弹性纤维是由弹性蛋白和微原纤维组成的结缔组织纤维，是真皮中的一种重要纤维。在真皮乳头内，弹性纤维呈垂直方向生长直至真皮交界处，进入到真皮网状层浅层后，其排列与胶原纤维平行或斜行。弹性纤维在吸收适当波长的光子后，会发生自发发射荧光的现象。其荧光信号由该通道输出，输出深度一般为80 μm~120 μm（不同测试部位和人群略有不同）。

注2：此值表征测试区域内真皮浅层弹性纤维的分布密度。此值越大，说明测试区域的弹性纤维分布密度越高，弹性纤维含量越高；反之则越低。

注3：此值无量纲。

3.3

谐波通道投影面积 harmonic channel projection area value

皮肤中胶原纤维二次谐波信号的分割投影面积。

注1：皮肤中胶原纤维是真皮中的主要结缔组织纤维，主要由I型胶原构成（少数为III型胶原），经多级拓扑结构组装成束，排列紧密且交织成网，因对光产生强烈米氏散射而呈现白色；在真皮层内，胶原纤维主要分布于网状层，部分延伸至乳头层，排列方向与皮肤张力方向一致，承担皮肤支撑、抵抗拉力的核心功能。在聚焦

飞秒激光作用下，胶原纤维会发生非线性光学现象—产生二次谐波信号（频率为入射光频率两倍、波长为入射光波长一半），该信号由谐波通道输出，输出深度一般为 80 μm~120 μm（不同测试部位和人群略有不同）。

注 2：此值表征测试区域内真皮浅层胶原纤维的分布密度。此值越大，说明测试区域的胶原纤维分布密度越高，胶原纤维含量越高；反之越低。

注 3：此值无量纲。

3.4

表皮厚度 **epidermal thickness**

皮肤表面至真表皮交界的平均深度。

注 1：此值越大，说明测试区域的表皮越厚；反之则越小。

注 2：单位为微米（μm）。

3.5

真表皮交界标准化面积 **dermal-epidermal junction index;DEJI**

皮肤真表皮交界的表面积与其沿皮肤表面法线方向的投影面积之比。

注 1：此值越大，说明测试区域的真表皮界面面积越大；反之则越小。

注 2：此值无量纲。

3.6

皮肤老化指数 **skin aging assessment index;SAAID**

皮肤不同深度下皮肤弹性纤维荧光图像与胶原纤维二次谐波图像的强度按照如下运算关系所得比值：

$$\text{SAAID} = \frac{\text{SHG} - \text{AF}}{\text{SHG} + \text{AF}}$$

式中：

SAAID ——皮肤老化指数；

SHG ——胶原纤维；

AF ——弹性纤维。

注 1：皮肤中该指数降低时，可能出现胶原流失、弹性纤维断裂，与皮肤松弛、皱纹加深、弹性下降相关；用于辅助评估光老化、自然老化。

注 2：此值无量纲。

4 基本要求

4.1 化妆品人体功效评价检验应符合国际赫尔辛基宣言的基本原则，要求受试者签署知情同意书并采取必要的医学防护措施，最大程度地保护受试者的利益。

4.2 被测化妆品应为微生物学指标、有害物质限值和理化指标检验合格的产品，化妆品人体功效检验之前应先完成必要的安全性评价，并出具书面证明，安全性评价不合格的样品不再进行人体功效检验，具体检测方法及合格判断标准均按照《化妆品安全技术规范》（2015 版）中的要求执行。

5 测试原理

双光子显微成像技术利用显微物镜将百飞秒量级的近红外激光脉冲聚焦至样本内，在焦点处的荧光分子发生双光子吸收而跃迁至高能级，在返回基态的过程中放出荧光光子。在扫描系统的控制下，激光对样本进行 X、Y、Z 三轴扫描，记录每一个像素点的灰度值信息，从而实现三维空间（3D）层析成像。

6 受试者的选择

6.1 受试者人数

接受试者入选标准和排除标准选择合格的受试者，并按随机表分组，确保最终完成有效例数不少于24人/组（侧）。

6.2 入选标准

入选受试者应符合如下入选标准：

- a) 18岁~60岁，健康女性或男性；
- b) 受试部位皮肤无多毛等现象；
- c) 能理解测试过程，自愿参加试验并签署书面知情同意书。

6.3 排除标准

符合下列任一项者将被排除：

- a) 妊娠或哺乳期妇女，或近期有备孕计划者；
- b) 有过敏性疾病，存在化妆品或其他外用制剂过敏史；
- c) 近1个月内参加过化妆品临床试验者；
- d) 其他临床评估认为不适合参加试验者。

7 测试方法

7.1 受试物

抗皱类或紧致类化妆品。

7.2 测试部位

面部、躯干部位或者根据试验需求选择其他部位。

7.3 测试条件

7.3.1 测试环境温度：20℃~22℃；相对湿度：40%~60%。

7.3.2 测试过程中，任何一个测试时间点的测试条件应保持一致，如：受试者、测试场所、测试仪器等。

7.3.3 测试仪器为适用于人体检测的双光子显微成像的皮肤显微成像设备，仪器参数应符合表1的规定，仪器运行参数见附录A。

表1 仪器参数

仪器		参数
激发波长/nm		780±10
水平分辨率/μm		≤0.8
轴向分辨率/μm		≤6.5
视场大小/(μm×μm)		≥125×125
轴向扫描范围/μm		≥100
成像深度/μm		≥200
成像通道/nm	绿色伪彩	420~580
	红色伪彩	375~405

表 1 (续)

仪器	参数
图像分辨率/(px×px)	512×512
存放环境温度/°C	19~30

7.4 测试前准备

为确保仪器正常运作，测试前应对测试仪器进行清洁与检查，保证测试仪器处于良好工作状态。确认各部件连接正常。启动主机，检查探头状态，确保窗片表现正常，窗片内部凝胶接触良好，无脱胶现象。同时，可准备环形胶贴、酒精棉片等物品。

7.5 测试流程

- 7.5.1 受试者在恒温恒湿环境中休息至少 30 min 后，进入实验室采集图像。
- 7.5.2 对测试探头进行消毒处理，同时清洁待测部位。
- 7.5.3 确定测试部位，做好位置标记及固定。
- 7.5.4 调整测试仪器参数，选取合适区域采集图像，每个测试区至少获取 1 条良好影像数据。
- 7.5.5 采集结束后，清洁测试探头，妥善放置测试仪器。
- 7.5.6 测试人员按要求向受试者发放受试物，将受试者随机分组并告知受试者关于受试物的使用方法与注意事项，确保受试物覆盖受试区域。
- 7.5.7 根据受试物特性设定采集时间点、间隔及周期，受试者连续使用受试物至试验结束前一天。
- 7.5.8 受试者按设定时间返回，回访允许±1 d 误差，每次测量保持测试环境、测试人员及操作步骤一致。

7.6 注意事项

测试应遵守如下注意事项：

- a) 避开受试者毛囊、毛发、皮沟较深及皮肤异常部位；
- b) 探头轻拿轻放，避免磕碰导致位移台松动以及部分零件损坏；
- c) 仪器运输前，锁定位移台，仪器运输后，解锁位移台（此步骤由测试人士进行）。

7.7 图像采集和分析

7.7.1 通用操作基础：拖动通道图像下方的进度条至目标层，出现清晰分析对象形态时，为起始帧；继续拖动进度条至清晰形态即将模糊时，为结束帧，选择结束即可分析，分析得出显示所选层数的分析数据。

7.7.2 细胞密度：按照荧光通道出现清晰颗粒状细胞核的原则，拖动进度条至该状态，标记选区(ROI)，在荧光通道图像内框选细胞核密度均匀且范围最大的区域，进行计算。

注：细胞密度指皮肤颗粒层单位面积内的细胞个数，单位为个每平方毫米（个/mm²）。

7.7.3 真表皮交界标准化面积：以谐波通道开始出现胶原纤维信号为起始、荧光通道细胞结构完全消失（网状真皮层）为结束的原则，拖动进度条分别标记起始帧和结束帧。

7.7.4 表皮厚度：以谐波通道开始出现胶原纤维信号为起始、荧光通道细胞结构完全消失（网状真皮层）为结束的原则，拖动进度条分别标记起始帧和结束帧。

7.7.5 皮肤老化指数：以网状真皮层出现清晰纤维形态为起始、清晰形态即将模糊为结束的原则，拖动进度条分别标记起始帧和结束帧。

7.8 质量控制

拍摄完成的图像应满足测试要求和分析要求，附录 B 为各皮肤结构图像的标准示例。

8 数据统计

应用统计分析软件进行数据的统计分析。计量资料表示为：均值±标准差，并进行正态分布检验，符合正态分布要求，自身前后的比较采用配对检验，否则采用两个相关样本秩和检验；测试区和对照区之间比较采用配对样本 t 检验或秩和检验。上述统计分析均为双尾检验，显著性水平为 $\alpha=0.05$ 。

9 结果应用

可根据测试指标的改善情况应用于相应的化妆品功效人体测试的效果评估中，见附录 C。

10 试验报告

试验报告应包含以下内容：

- a) 被测样品所需全部资料（生产及送检单位，受试物名称、数量及规格、生产日期或批号、颜色和物态等相关信息）；
- b) 试验材料相关信息；
- c) 试验所采用的方法；
- d) 试验起止时间；
- e) 试验结果；
- f) 试验结论；
- g) 试验中的异常现象；
- h) 试验日期；
- i) 测试人员、校核人员和授权签字人员及其签名。

附录 A
(资料性)
测试仪器运行参数

测试仪器运行参数见表 A.1。

表 A.1 测试仪器运行参数

参数	三维快速扫描
初始功率/mW	300~500
时间步长/s	1
功率步长/mW	20~40
最大功率/mW	700~850
Z 轴速度/($\mu\text{m/s}$)	1~5
扫描距离/ μm	100~150

附录 B
(资料性)
皮肤结构图像的标准示例

不同部位皮肤结构特点总体保持基本一致，以下以脸颊部位皮肤结构作为标准示例图，其他部位参照此示例进行辨识。

- a) 角质层：典型的角质层图像特点是呈现不规则状，边缘清晰，能观察暗沟或亮线。皮沟不横跨于图像中央，占比不大于 10%，较小的皮沟不宜过深，拍摄期间观察图像有无相位差，标准示例见图 B.1、图 B.2。

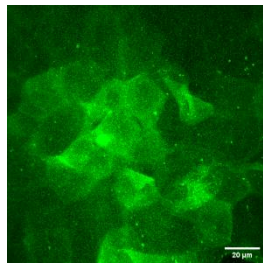


图 B.1 角质层图像 1

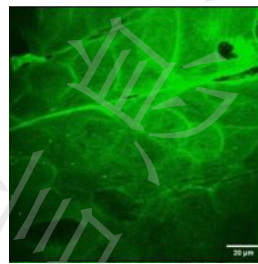


图 B.2 角质层图像 2

- b) 颗粒层：颗粒层由稍微扁平的角质形成细胞组成，能观察到明显的细胞、细胞核结构，观察是否排列规整，有无空洞缺损部分，标准示例见图 B.3、图 B.4。

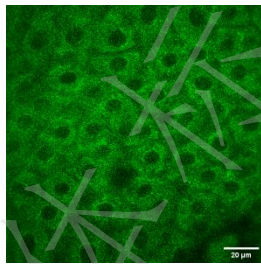


图 B.3 颗粒层图像 1

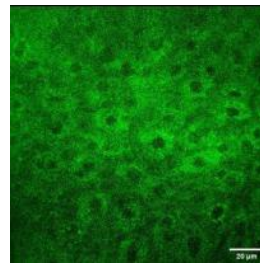


图 B.4 颗粒层图像 2

- c) 棘层：与角质层、颗粒层、棘层上部不同，基底层常表现出明显的起伏，因此在 3D 层扫时能观察到环形排布的基底细胞（发出自发荧光，用绿色伪彩展示）围绕真皮乳头的典型图像。环形结构内部一般是真皮乳头中的胶原纤维（发出二次谐波，用红色伪彩展示）和弹性纤维（发出自发荧光，用绿色伪彩展示），标准示例见图 B.5。在表皮突较为平坦的解剖部位，例如眼角，则较少观察到上述环状结构，标准示例见图 B.6。

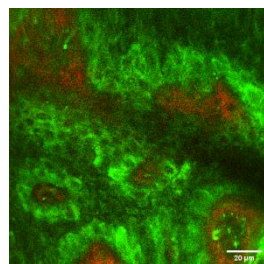


图 B.5 棘层图像 1

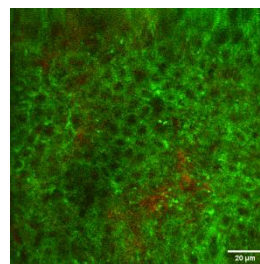


图 B.6 棘层图像 2

- d) 基底层：基底细胞色素环包裹真皮乳头，在 3D 层扫时能观察到环形结构。环形结构内部一般是胶原纤维，环绕在胶原纤维周围的一圈细胞为基底细胞层，图中绿色部分为基底细胞，红

色部分为胶原纤维，标准示例见图 B.7、图 B.8。

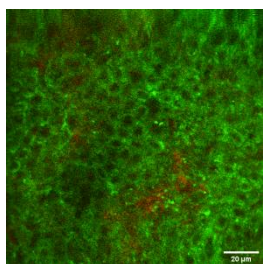


图 B.7 基层图像 1

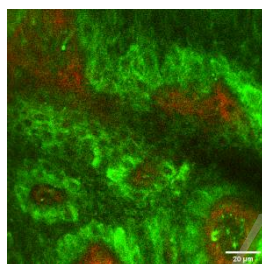


图 B.8 基层图像 2

- e) 真皮层弹性纤维：在基底细胞层下方观察到，呈网状结构，采集时到达此层若出现毛囊空洞则需重新采集，标准示例见图 B.9、图 B.10。

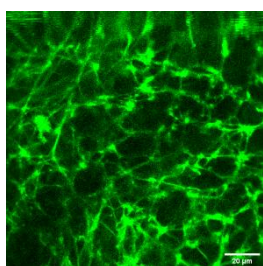


图 B.9 真皮层弹性纤维图像 1

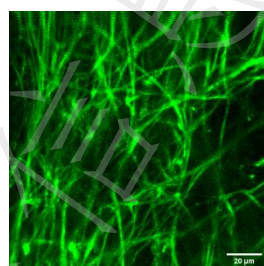


图 B.10 真皮层弹性纤维图像 2

- f) 真皮层胶原纤维：纹理结构，呈现条带状或网状，采集时到达此层若出现毛囊空洞则重新采集，标准示例见图 B.11、图 B.12。

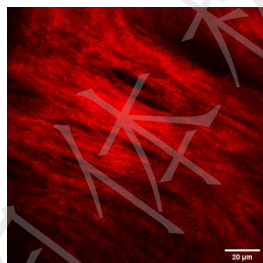


图 B.11 真皮层胶原纤维图像 1

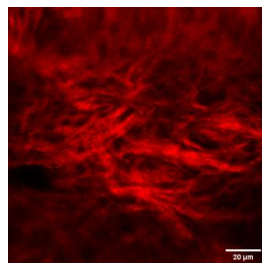


图 B.12 真皮层胶原纤维图像 2

附 录 C
(资料性)
测试指标与结果评估对照

测试指标与结果评估对照见表 C.1。

表 C.1 测试指标与结果评估对照

测试指标	结果评估
表皮厚度	使用受试物后任一测试时间点，测试指标有显著改善 ($P < 0.05$)，则可评估产品具有修护效果
真表皮交界标准化面积	使用受试物后任一测试时间点，测试指标有显著改善 ($P < 0.05$)，则可评估产品具有滋养效果
皮肤老化指数	使用受试物后任一测试时间点，任一测试指标有显著改善 ($P < 0.05$)，则可评估产品具有抗皱效果
荧光通道投影面积	
谐波通道投影面积	
真表皮交界标准化面积	使用受试物后任一测试时间点，任一测试指标有显著改善 ($P < 0.05$)，则可评估产品具有紧致效果
皮肤老化指数	
荧光通道投影面积	
谐波通道投影面积	
注：P 为显著性。	

参 考 文 献

- [1] 唐晓伟,邢军.人体解剖生理学[M]. 4版 北京:中国医药科技出版社,2021.
- [2] 张学军主编,皮肤性病学[M]. 8版 北京:人民卫生出版社,2013.
- [3] 易定容,孔令华.光谱和光谱影像技术在各学科领域中的应用[M]. 长春:吉林大学出版社,2020.
- [4] 吴金英.人体解剖学与组织胚胎学[M]. 南京:江苏凤凰科学技术出版社,2018.
- [5] 刘国琴,杨海莲主编. 生物化学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2019.
- [6] 赵国芬.基础生物化学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2014.
- [7] 韩洋,李承旭,崔勇.基于双光子激发荧光和二次谐波原理的显微成像技术在皮肤科中的应用[J]. 皮肤科学通报, 2023, 40(4):410-418.
- [8] 马月滢,刘琦,加萌等.一款紧致化妆品的功效评价方法研究[J].日用化学工业, 2024, 54(1):73-79.
- [9] 王俊杰,林枫,吴润龙等.手持式双光子显微镜及其皮肤成像应用[J].中国化妆品, 2022(12):72-75.
- [10] 张嘉琪,吴凡,韩雨晴等.多光子显微镜在皮肤科中的应用[J].中华皮肤科杂志, 2024,57(9):857-862.
- [11] 张嘉琪,吴凡,刘琦等.“表面之外”:用双光子显微镜探索皮肤结构[J].日用化学品科学, 2025, 48(10):87-93.
- [12] 国家药品监督管理局.国家药品监督管理局关于发布《化妆品分类规则和分类目录》的公告(2021年第49号)[EB/OL]. (2021-04-08)[2021-05-01].
- [13] 国家药品监督管理局.国家药品监督管理局关于发布《化妆品功效宣称评价规范》的公告(2021年第50号)[EB/OL]. (2021-04-08)[2021-05-01].
-