ICS 71.100.70
C2682
Y42

上 海 日 用 化 学 品 行 业 协 会 团 体 标 准

T/SHRH 008-2018

全国团体标准信息平台

化妆品-体外皮肤刺激性测试方法（SIT）

Cosmetics -In Vitro Skin Irritation Test Method（SIT）

全国团体标准信息平台

2018-12-01 发布　　2018-12-30 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. 参考资料…… 3
3. 术语、定义和缩略语…… 3
4. 试验方法…… 4
5 试验结果…… 7

全国团体标准信息平台

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、伽蓝（集团）股份有限公司、上海相宜本草化妆品股份有限公司、上海中翊日化有限公司、上海市质量监督检验技术研究院、玫琳凯（中国）有限公司、上海天祥质量技术服务有限公司、上海清轩生物科技有限公司有限公司、汉高（中国）投资有限公司、东阿阿胶股份有限公司、上海日用化学品行业协会。

本标准主要起草人：卢永波、李潇、李润芝、陈田、吴建铭、吕智、孙培文、林艺青、戴彦韵、万向红、李琼、高宏旗、金坚、陈亦华

全国团体标准信息平台

化妆品-体外皮肤刺激性测试方法（SIT）

1 范围

本标准规定了皮肤模型对体外皮肤刺激性试验的术语和定义、试验方法和试验结果。

本标准适用于对化妆品、化学品进行皮肤刺激性的测定。

2 参考资料

OECD 标准

《OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS：In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method》

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语、定义

3.1.1

皮肤刺激性 skin irritation

皮肤涂覆受试样品后局部产生的可逆性炎性变化

3.1.2

细胞活力 cell viability

测量细胞群总活性的参数，例如细胞线粒体脱氢酶对活性染料MTT的还原能力，这主要与活细胞的总数和/或活力相关。

3.2 缩略语

3.2.1 I – Irritation (刺激性)

3.2.2 MTT – 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide [3-（4,5 -二甲基- 2 -噻唑）-2,5 二苯基-2 氢-四氮唑溴盐]

3.2.3 NI – Non-Irritation (非刺激性)

3.2.4 OECD – Organization for Economic Co-operation and Development (经济合作与发展组织)

3.2.5 OD – Optical Density (吸光度)

3.2.6 PBS – phosphate buffered saline （磷酸盐缓冲液）

3.2.7 SDS –Sodium dodecyl sulfate（十二烷基硫酸钠）

3.2.8　SIT – Skin Irritation Test (皮肤刺激性)

4　试验方法

4.1 试验材料

4.1.1 体外重组 3D 表皮模型检测试剂盒：

表1　体外重组3D表皮模型检测试剂盒内容物

内容物	规格	保存条件/时间
体外重组 3D 表皮模型：EpiKutis®	24 个模型/孔板	4℃/3d
EpiRecovery 培养液	按每个模型使用 5 mL 计算	4℃/14d

4.1.2 试验材料

表2　试验试剂详细信息

试剂名称	生厂商/货号	保存条件/时间
PBS	博士德/PYG14190	4℃，6 个月
SDS	SIGMA/098K0067V	室温，2 年
MTT	SIGMA/V900888	-20℃，1 个月
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司/90109218	室温，2 年

4.1.3 试验耗材与设备

表3　试验耗材和设备及用途说明

耗材或仪器名称	用途说明
无菌 24 孔板	用于 MTT 孵育和浸提
无菌 6 孔板	用于培养 3D 表皮模型
无菌 96 孔板	用于读取浸提液体吸光度
超净工作台	提供百级洁净工作环境
CO_2 培养箱	用于培养 3D 表皮模型
孔板振摇器	辅助溶解甲瓒结晶
计时器	控制试验中的操作时间

表3（续）　试验耗材和设备及用途说明

无菌镊子	夹取 3D 表皮模型
无菌止血钳	在清洗过程中，夹取 3D 表皮模型
无菌尼龙膜	辅助液体受试物在模型表面的铺展
500 mL 塑料清洗瓶	用于盛装 PBS，清洗 3D 表皮模型
2000 mL 烧杯	用于 PBS 溶液配制
研钵	用于研碎固体样品
正向加液器	吸取凝胶、乳膏、半固体测试物或悬液等
酶标仪	用于读取浸提液体吸光度
封口膜	防止异丙醇挥发
无菌棉签	用于擦拭模型表面液体残留物
吸水纸	用于吸干 3D 表皮模型外部的残余液体

4.2　试验步骤

4.2.1　试剂盒接收与检定

收到试剂盒后，打开外包装。肉眼观察模型与固体培养基接触界面是否有气泡。如发现模型接触界面有明显气泡，应作丢弃处理。

4.2.2　模型复苏

a) 准备充足的无菌6孔板（按每3个模型准备一个6孔板），去除6孔板外包装后，放入超净工作台内。在6孔板每孔中添加0.9mL EpiRecovery培养液，将剩余EpiRecovery培养液放入4℃冰箱保存备用。

b) 打开模型内包装袋，观察表面及四周是否有液体渗出或收缩现象，如表面存有大量水分，应作丢弃处理。

c) 用无菌镊子沿塑料壁上缘夹出模型，并在模型包装孔板中自带的无纺布上轻轻拭去模型底部的琼脂或其他液体。

d) 在加有EpiRecovery培养液的6孔板的第一排依次放入3个模型。放入模型时，应适当倾斜模型底面，使模型与EpiRecovery培养液充分接触，防止产生气泡。

e) 将放有模型的6孔板全部转移至CO_2培养箱（37±1℃、5±1% CO_2、95%相对湿度）中，孵育60±5min。

f) 培养结束后，用无菌镊子将模型从6孔板的第一排转移到第二排孔中，再将6孔板放回到CO_2培养箱（37±1℃、5±1% CO_2、95%相对湿度）中孵育过夜（18±3 h）。

4.2.3 测试准备

a) 实验分组包含阴性对照组（无菌PBS）、阳性对照组（5% SDS）和样品组。

b) 5% SDS配制：称取0.5g SDS溶于10mL超纯水中，0.22 μm过滤后备用。

c) 受试物预处理：如果受试物在37℃或低温条件下能够用移液器吸取，可以液体受试物对待。粘稠、蜡状、树脂状、凝胶状等受试物，需在37±1℃条件下孵育15±1 min，若处理后能够用移液器吸取，可以液体受试物对待，若不能应以固体受试物对待。粉末状、颗粒状等受试物以固体受试物对待。

d) 为各实验分组准备一个新的6孔板，标记与实验分组对应，并在6孔板第一排孔中添加0.9 mL的EpiRecovery培养液。

e) 将复苏结束后的模型转移至标记后的6孔板中；第一排每孔放入一个模型，共3个模型/板，即每种受试物对应3个模型重复。

4.2.4 受试物给药（在超净工作台中进行以下操作）

a) 每个模型给药操作时间控制在1 min~2 min。

b) 受试物根据其物理性质分为两种给药方式：

1） 液体受试物：阴性对照、阳性对照和样品组的模型表面给药量为25 μL，可采用无菌尼龙膜辅助样品均匀铺展。于室温下，超净工作台内，放置30±1 min。注意：给药时不可按压模型表面。

2） 固体受试物：先在模型内表面加入25 μL PBS润湿表面，称取25 mg固体粉末均匀铺展于模型表面。给药后，用镊子轻轻晃动模型，促进固体受试物在模型表面的均匀铺展，必要时采用移液器枪头辅助固体受试物铺展。给药完毕后，于室温下，超净工作台内，放置30±1 min。注意：给药时不可按压模型表面。

4.2.5 清洗及后孵育（在超净工作台中进行以下操作）

a) 受试物给药结束后，开始清洗程序。用装有无菌PBS溶液的洗瓶清洗模型表面残留的受试物，保持PBS匀速、不间断地流出。重复清洗15次后，在装有无菌PBS溶液的烧杯中浸洗模型内、外表面，后用无菌棉签轻轻拭去模型内、外残留液体。每个模型的清洗总时间控制在1 min~2 min，保证该模型及试验中后续模型的给药时间一致。

b) 清洗结束后，将模型放入与标记对应的6孔板的第二排，并在每孔中加入0.9 mL EpiRecovery培养液。置于CO_2培养箱（37±1℃、5±1% CO_2、95%相对湿度）中进行后孵育。样品组及阴性、阳性对照组后孵育总时间为42 h。后孵育24 h后，更换0.9 mL EpiRecovery培养液。

4.2.6 MTT 检测（超净工作台中进行以下操作）

a) MTT工作液配制：用无菌PBS配制5 mg/mL MTT贮存液，避光贮存于-20℃，保存时间不超过一个月。MTT检测前，用无菌PBS溶液稀释MTT贮存液至1 mg/mL，现用现配。

b) 根据模型总数量准备24孔板，并做相应标记。每孔加入0.3 mL 的 MTT工作液。注意：避光操作。

c) 将后孵育结束的模型从CO_2培养箱中取出，用无菌镊子夹取模型，并在无菌吸水纸上拭去模型底面的残留液体；将模型转移至相应标记的24孔板中，使其与MTT溶液充分接触。将装有模型的24孔板放置于CO_2培养箱中（37±1℃、5±1% CO_2、95%相对湿度），孵育3 h±5 min。

d) MTT孵育结束后，用移液器从24孔板中吸弃MTT溶液，后在每孔中加入200 μL PBS溶液，清洗模型外表面，重复此清洗过程3次。

e) 清洗结束后，将模型外表面用无菌棉签擦干，转移到新的24孔板中，并做好标记。在模型内表面加入2 mL异丙醇，确保加入的异丙醇能够浸没整个模型内腔。

f) 用封口膜密封24孔板，避免异丙醇挥发，于4℃静置过夜或在孔板振摇器上震荡2 h。

g) 用200μL移液器枪头刺穿模型，使异丙醇浸提液从模型内流出到24孔板中。丢弃被刺穿的模型，每孔内的异丙醇浸提液至少吹打3次，使其充分混匀。

h) 混匀后，从每孔中吸取2份200 μL异丙醇浸提液，各自加入96孔板的对应孔中，做好标记。采用异丙醇作为吸光度检测时的对照。

i) 于酶标仪570 nm波长读取吸光度（OD）值。

j) 按以下公式计算相对组织活力。相对组织活力=样品组OD值/阴性对照OD值*100% 。

5 试验结果

参照OECD TG439确定最终刺激性分类，判定标准如下。

表4 皮肤刺激判断标准

相对组织活力平均值	皮肤刺激性判断结果
相对组织活力平均值≤50%	刺激性（I）
相对组织活力平均值>50%	非刺激性（NI）

全国团体标准信息平台

参 考 文 献

[1] OECD（2010）：In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method , OECD Guidelines For The Testing OF Chemicals No.439,OECD,Paris.

全国团体标准信息平台

全国团体标准信息平台