

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)

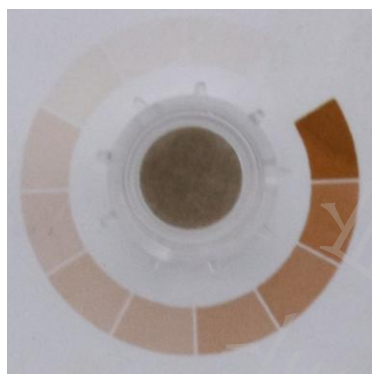


图 A.1 体外重组 3D 黑色素模型实物图

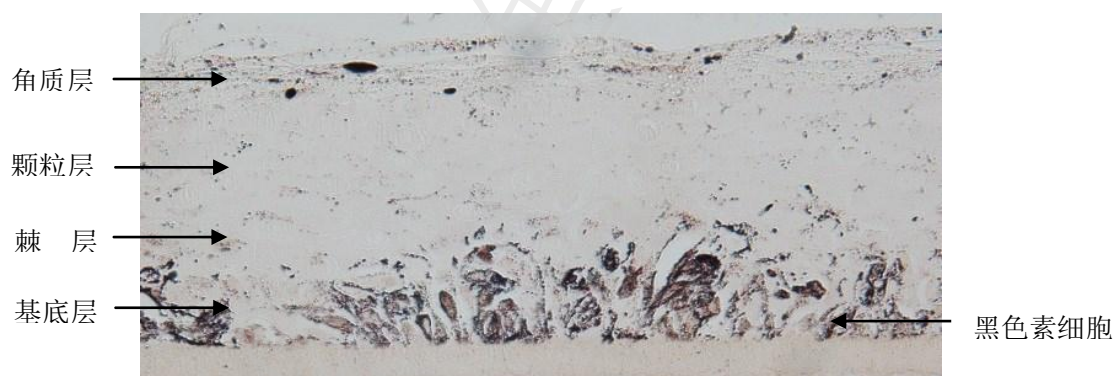


图 A.2 体外重组 3D 黑色素模型 Masson-Fontana 染色图片