

团 体 标 准

T/GDCA 030—2023

淋洗型化妆品温和功效体外测评方法

In vitro evaluation methods of mild efficacy of rinse-off cosmetics

2023 - 08 - 22 发布

2023 - 09 - 22 实施

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。

本文件由广东省化妆品学会提出。

本文件由广东省化妆品学会归口。

本文件起草单位：广东名臣日化有限公司、广东轻工职业技术学院、广州艾卓生物科技股份有限公司、水中银（国际）生物科技有限公司、广州鲁比生物科技有限公司、澳宝化妆品（惠州）有限公司、广东雅丽洁精细化工有限公司、广州百孚润化工有限公司、广州德谷个人护理用品有限公司、美出莱（杭州）化妆品有限责任公司、上海奥利实业有限公司、深圳杉海创新技术有限公司、深圳市护家科技有限公司、伯德创研（广州）生物科技有限公司、珠海市国生健康科技有限公司、广东工业大学、珠海市大美湾化妆品创新研究院。

本文件主要起草人：林艺青、陈嘉玲、郑丹阳、冼宝仪、陈雪平、袁婵龄、卓珊珊、庄梓雄、陈浩、陈默、龙倩倩、韩婕珺、程伟峰、张嘉恒、廖雅、舒鹏、曾万祥、吴素丽、杜志云、杨露、谭雯怡。

淋洗型化妆品温和功效体外测评方法

1 范围

本文件规定了淋洗型化妆品温和功效体外测评方法，包括术语、定义、鸡胚绒毛尿囊膜试验、斑马鱼胚胎尾鳍切口中性粒细胞试验、试验报告。

本文件适用于淋洗型化妆品（包括发用产品、沐浴产品、洁面产品、卸妆产品、洗手液，儿童化妆品除外）温和功效的体外测评。

注：淋洗化妆品相关原料温和功效的体外测评可参考本文件。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 17999 SPF鸡 微生物学监测

SN/T 2329 化妆品眼刺激/腐蚀性的鸡胚绒毛尿囊膜试验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

温和 mild

轻刺激性以及无刺激性。

3.2

绒毛尿囊膜 chorioallantoic membrane, CAM

胚龄4d~5d时，由绒毛膜体壁中胚层和尿囊膜脏层中胚层融合而成，其组织学结构有三层，是鸡胚的一个呼吸性膜。

[来源：SN/T 2329 化妆品眼刺激/腐蚀性的鸡胚绒毛尿囊膜试验]

3.3

出血 hemorrhage

血液从CAM膜血管内流出血管外，可以表现为血管外出现点状出血或絮状的弥漫性出血等多种形式。

[来源：SN/T 2329 化妆品眼刺激/腐蚀性的鸡胚绒毛尿囊膜试验]

3.4

血管融解 blood vessel lysis

CAM膜上小血管壁破裂，血管融解消失。

[来源：SN/T 2329 化妆品眼刺激/腐蚀性的鸡胚绒毛尿囊膜试验]

3.5

凝血 coagulation

血管内、外蛋白的变性，表现为血管内血流变慢或血栓形成，血管呈现棕黑色；血管外凝血：可表现为血管外深色的凝血点；还可表现为浑浊（不透明），出现于膜的全部或一部分，可以是近似于乳白色薄纱样，或者呈乳浊状。

3.6

刺激分值 irritation score, IS

使鸡胚出现出血、血管融解、凝血等刺激性反应的综合分值。

3.7

斑马鱼胚胎 zebrafish embryo

处在依靠卵黄提供能量发育阶段的斑马鱼的胚胎。

3.8

无心跳 lack of heartbeat

一分钟内鱼胚胎心脏没有跳动。

4 方法选择

本文件包含鸡胚绒毛尿囊膜试验和斑马鱼胚胎尾鳍切口中性粒细胞试验，可自行选择使用。

5 鸡胚绒毛尿囊膜试验

5.1 基本原理

鸡胚绒毛尿囊膜结构类似人的结膜，被作为眼刺激的体外评估模型。本试验把鸡胚作为一个无屏障模型，利用孵化的鸡胚中期绒毛尿囊膜血管系统完整、清晰和透明的特点，将一定量受试物直接与鸡胚绒毛尿囊膜接触，作用一段时间之后观察绒毛尿囊膜毒性效应指标（如：出血、凝血和血管融解）的变化，来评估受试物的温和性质。

5.2 仪器设备

- 5.2.1 分析天平：精度 0.1mg。
- 5.2.2 自动孵化箱。
- 5.2.3 照蛋器。
- 5.2.4 100 μ L~1000 μ L 可调节移液器及 1000 μ L 吸头。
- 5.2.5 电子计时器。
- 5.2.6 解剖工具：牙科用锯齿弯头镊、尖头镊。
- 5.2.7 玻璃器皿：250mL 锥形瓶、烧杯、玻璃棒。
- 5.2.8 洗耳球。
- 5.2.9 体式显微镜：配带照相系统的体式显微镜。
- 5.2.10 冷光源（例如光纤冷光源卤素灯）。
- 5.2.11 一次性 2mL 巴氏吸管。

5.3 试剂

- 5.3.1 实验用水：符合 GB/T 6682 规定。
- 5.3.2 无菌生理盐水：0.9%NaCl（w/w），分析纯。
- 5.3.3 十二烷基硫酸钠（SDS）：1%（w/w），分析纯。
- 5.3.4 氢氧化钠（NaOH）：0.1mol/L，分析纯。
- 5.3.5 新洁尔灭：市售新洁尔灭消毒液，根据产品使用方法进行稀释配置，按照说明使用（通常使用浓度为 1.8g/L~2.2g/L）。
- 5.3.6 75%酒精溶液（v/v）：用水配置酒精。

5.4 试验前准备

5.4.1 鸡胚

采用白菜杭鸡等品种的SPF受精鸡胚，鸡胚重量50g~60g，鸡胚质量符合GB/T 17999的要求，供应商应具有农业部门认可的《兽药生产、检验用SPF鸡（蛋）定点生产企业》资格。

5.4.2 运输和存储

购买未孵化的鸡胚，气室朝上存储于蛋架上运输。应在不影响胚胎活性或发育的情况下转移或运输鸡胚。到货后用新洁尔灭喷洒鸡胚表面消毒，尽快孵育，若需要分批孵育，则将鸡胚放入22℃冰箱保存，必须在一周内进行孵育，否则将大大降低鸡胚孵化率。

5.4.3 孵化

孵化条件：温度 $37.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度55%~70%，翻蛋频率3次/h~6次/h。

5.5 对照物及受试物准备

5.5.1 阴性对照：无菌生理盐水，IS 值=0。

5.5.2 阳性对照：1%SDS 或者 0.1mol/LNaOH ，IS 值=10~19。

5.5.3 溶剂对照：试验中溶解受试物的溶剂。

5.5.4 受试物：把样品配置成1% (w/w) 浓度的溶液，且溶液需呈透明至半透状态，样品处理后存在严重影响结果评价时不适用本方法。如存在花瓣等较大固体时，吸取溶液时注意避开。

5.6 试验步骤

5.6.1 试验分组

试验设置阴性对照组、阳性对照组、溶剂对照组、受试物组，每组重复6个鸡胚。

5.6.2 CAM 制备

用照蛋器检查9日龄鸡胚的气室位置，做好标记，用镊子将气室打开，暴露鸡胚，用洗耳球吹去残余的蛋壳碎片。用吸管滴加生理盐水润湿蛋壳膜，当看到壳膜完全变透即可倒出多余的生理盐水，用镊子轻轻夹取壳膜的皱褶处，慢慢撕开，保证血管膜完整不受损。

5.6.3 加样

取0.3mL受试物添加到CAM表面，使受试物至少覆盖50%的CAM表面。

5.6.4 观察

受试物作用后立即观察CAM反应情况，记录300s内出血、血管融解、凝血出现的时间，精确到秒，并拍照保存试验图片，将观察结果与实验室历史资料或有关图片做对比。可参考附录A中的A.1。

5.7 结果分析

按照式(1)进行刺激分值(irritation score, IS)计算。

$$IS = \frac{(301 - SecH) \times 5}{300} + \frac{(301 - SecL) \times 7}{300} + \frac{(301 - SecC) \times 9}{300} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

SecH (出血时间hemorrhage time) ——CAM观察到出血的平均时间，单位为秒(s)；

SecL (血管融解时间vessel lysis time) ——CAM观察到血管融解的平均时间，单位为秒(s)；

SecC (凝血时间coagulation time) ——CAM观察到凝血的平均时间，单位为秒(s)；

300, 301——观察时间总计300s，观察时间内没出现任何现象记为301s；

5, 7, 9——分别代表出血、血管融解、凝血时间的权重。

5.8 试验可接受性标准

实验设定的阴性对照和阳性对照正好在无刺激性和强刺激性/腐蚀性的分类范围内(见表1)，则认为试验结果是可接受的。

5.9 结果评判

结果评判见表1。

表 1 结果评判表

IS 值	刺激性分类	范畴
IS<1	无刺激性	温和
1≤IS<5	轻刺激性	
5≤IS<9	中度刺激性	中度刺激性
IS≥9	强刺激性/腐蚀性	强刺激性/腐蚀性

结果评价如下：

- 当 IS 值小于 5 以下，判定为温和；
- 当 IS 值大于等于 5 小于 9 时，判定为中度刺激性；
- 当 IS 值大于等于 9 时，判定为强刺激性/腐蚀性。

6 斑马鱼胚胎尾鳍切口中性粒细胞试验

6.1 基本原理

皮肤屏障受损时容易被刺激引起免疫细胞（如中性粒细胞）聚集产生免疫反应。斑马鱼的中性粒细胞在形态、生物化学和功能上都与哺乳类动物相同。本试验应用斑马鱼胚胎尾鳍切口作为皮肤屏障受损模型，利用斑马鱼个体小，通体透明，便于在显微镜下观察中性粒细胞的特点，将一定量受试物作用于斑马鱼胚胎，通过观察尾鳍切口区域中性粒细胞数目的变化，来评估受试物的温和性质。

6.2 仪器设备

- 6.2.1 分析天平：精度 0.1mg。
- 6.2.2 （荧光）体式显微镜：配带（荧光系统和）照相系统，最大放大倍数应大于 80 倍的体式显微镜。
- 6.2.3 试验容器：玻璃或聚苯乙烯测试容器（如 6 孔板，培养皿）。如测试物可能吸附于聚苯乙烯容器时（如非极性化学品），应选用惰性材料（如玻璃）来减少吸附。
- 6.2.4 恒温箱：精度±1℃。
- 6.2.5 其他常规测试仪器和设备：移液管、离心管、玻璃容器（如烧杯、容量瓶等）、旋涡混合仪、超声水浴锅、离心机、低温冰箱、可调节移液器和吸头。

6.3 试剂

- 6.3.1 实验用水：符合 GB/T 6682 规定。
- 6.3.2 甲醇、二甲亚砜、乙醇等对鱼胚胎无影响的助溶剂，分析纯级别。
- 6.3.3 鱼胚胎培养液：称取 2940mg 无水氯化钙，1233mg 七水硫酸镁，630mg 碳酸氢钠，55mg 氯化钾溶于 10L 水配制而成，pH 值 6.5~8.5。化学品均为分析纯级别。
- 6.3.4 三卡因：称取 200mg 三卡因（分析纯）溶于 48.95mL 水配制储存液，置冰箱中冷藏，30d 内有效。工作液用鱼胚胎培养液将三卡因储存液稀释 20 倍。使用前新鲜配制。
- 6.3.5 100 μmol/L 十二烷基硫酸钠(SDS)：称取 14.4gSDS（分析纯）溶于 50mL 水配制 10mmol 储存液。室温储存。半年内有效。工作液用鱼胚胎培养液将 SDS 储存液稀释 100 倍。使用前新鲜配制。如所采用的 SDS 不属于分析纯级别，建议做多个浓度探索，找到合适的刺激浓度作为刺激对照组浓度。
注：如选用中性粒细胞荧光标记斑马鱼胚胎进行试验，不需准备 6.3.6-6.3.14 试剂。
- 6.3.6 多聚甲醛 (w/w)：用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 配制含有 4%多聚甲醛和 0.8%氢氧化钠，pH 为 7.2~7.4 的溶液。置冰箱中冷藏。
- 6.3.7 50%和 70%酒精溶液 (v/v)：用水配制酒精。
- 6.3.8 0.4%苏丹黑储存液 (w/w)：用 70%酒精配制 0.4%苏丹黑储存液。置冰箱中冷藏。
- 6.3.9 苯酚溶液：将 8g 苯酚溶于 15mL 无水乙醇，将 0.3g 十二水合磷酸氢二钠溶解于 50mL 水中，然

后将二种溶液混合配制成苯酚溶液。室温储存，半年内有效。

6.3.10 苏丹黑染色液：将 900 μ L 70%酒精，100 μ L 苏丹黑储存液和 1 μ L 苯酚溶液混合而成。使用前新鲜配制。

6.3.11 PBST (w/w)：配制 0.04%曲拉通 (Triton X-100) 于 PBS 溶液中。室温储存。

6.3.12 漂白溶液 (w/w)：用水配制含有 3%过氧化氢和 1%氢氧化钾的溶液。使用前新鲜配制。

6.3.13 清透液 1 (w/w)：用水配制含有 20%甘油和 0.25%氢氧化钾的溶液。室温保存。

6.3.14 清透液 2 (w/w)：用水配制含有 50%甘油和 0.25%氢氧化钾的溶液。室温保存。

6.4 受试物准备

6.4.1 水溶性产品：可用鱼胚胎培养液直接将受试物溶解配制成测试溶液。

6.4.2 非水溶性产品：可选常用溶剂如甲醇、二甲基亚砷、乙醇等对鱼胚胎无影响的助溶剂。如将受试物和有机溶剂按 1:1 (重量 g:体积 mL) 混匀，超声处理 10min，然后加入鱼胚胎培养液配制成所需浓度，震荡 30s 后于 6500rpm 离心 10min，取上清液进行测试。

6.4.3 测试浓度为 0.01g/L。

6.5 试验步骤

挑选健康的受精后 72h \pm 2h 的斑马鱼胚胎。斑马鱼养殖可参考附录 B。

6.5.1 损伤模型

使用三卡因溶液麻醉斑马鱼胚胎，于显微镜下用实验解剖刀切除斑马鱼胚胎尾鳍。

6.5.2 试验分组

试验需设定阴性对照组 (鱼胚胎培养液)、阳性对照组 (SDS) 和受试物处理组。如用到助溶剂，各测试组应含相同浓度的助溶剂。具体分组如下：

——阴性对照组：随机挑选 24 尾鱼胚胎暴露于 5mL 鱼胚胎培养液，放置于 28 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 3h \pm 0.5h。

——阳性对照组：随机挑选 24 尾鱼胚胎暴露于 5mL SDS 溶液，放置于 28 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 3h \pm 0.5h。

——受试物处理组：随机挑选 24 尾鱼胚胎暴露于 5mL 受试物溶液，放置于 28 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 3h \pm 0.5h。

6.5.3 斑马鱼胚胎固定染色

将每组鱼胚胎于多聚甲醛中固定至少 1h 后，用 PBST 处理鱼胚胎 3 次，每次 5min，然后用 50%酒精处理 3min。

用苏丹黑染色溶液对鱼胚胎进行室温染色 1h 后，用 70%酒精浸洗 4 次，每次 5min，然后用 PBST 处理 2 次，每次 5min。

用漂白溶液处理鱼胚胎 10min，如在试管里处理，则需保持盖子打开。然后用 70%酒精溶液处理 5min，PBST 处理 1min，用清透液 1 处理 15min，清透液 2 处理 10min，再用 PBST 处理 3min。

注：应用中性粒细胞荧光标记斑马鱼胚胎试验可省去此 (6.5.3) 步骤。

6.5.4 样本的显微分析

于显微镜下对每尾鱼胚胎尾鳍损伤处进行侧面拍照，计数每尾鱼胚胎尾鳍切口区域的中性粒细胞数目，记录鱼胚胎死亡 (无心跳) 数目。可参考附录 A 中的 A.2, A.3。

6.6 结果分析

计算中性粒细胞聚集率如式 (2)：

$$\text{聚集率} = \frac{T-C}{C} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

T ——受试物处理组鱼胚胎中性粒细胞数目的平均值；

C ——阴性对照组鱼胚胎中性粒细胞数目的平均值。

对受试物处理组鱼胚胎中性粒细胞数目和阴性对照组中性粒细胞数目进行双尾T检验，取得 p 值。

6.7 试验可接受性标准

每批次测试须设置阳性对照组，要求每批次测试阳性对照组的中性粒细胞数目显著 ($p < 0.05$) 少于阴性对照组。

6.8 结果评判

结果评判见表2。

表2 结果评判表

聚集率	刺激性分类
聚集率 ≤ 0	温和
聚集率 > 0 且 $p \geq 0.05$	
聚集率 > 0 且 $p < 0.05$	中度刺激性
有鱼胚胎死亡	强刺激性/腐蚀性

结果评判如下：

- 当聚集率小于等于 0，判定为温和；
- 当聚集率大于 0 但 p 值大于等于 0.05，判定为温和；
- 当聚集率大于 0 但 p 值小于 0.05 时，判定为中度刺激性；
- 当有鱼胚胎死亡时，判定为强刺激性/腐蚀性。

7 试验报告

试验报告可参考附录C，应至少包括以下内容：

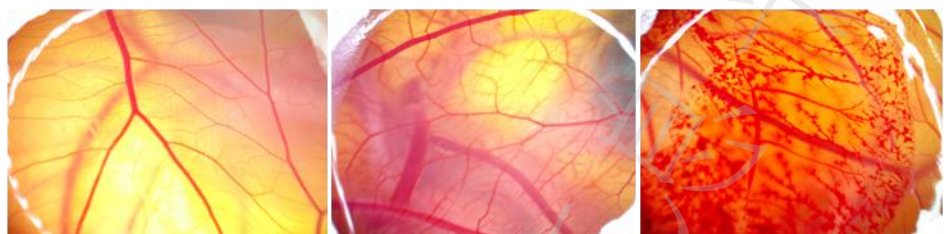
- 识别被测样品所需全部资料，包括但不限于样品编号、名称、生产批号、生产及送检单位、样品物态描述等；
- 斑马鱼品系；
- 试验项目及试验起止时间；
- 试验方法；
- 试验结果和结论。

附录 A

(资料性)

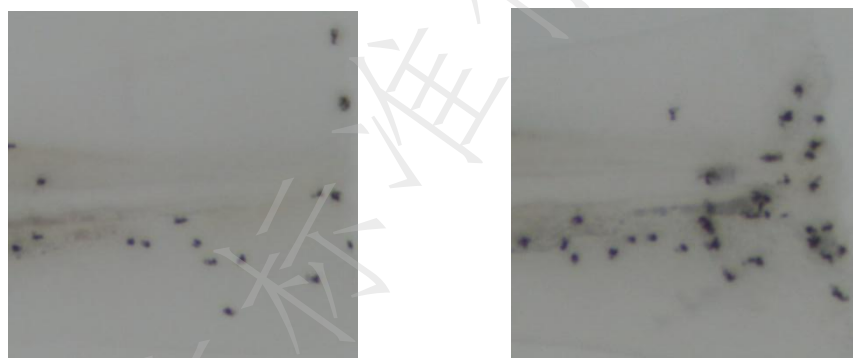
淋洗型化妆品温和功效体外测评结果代表性图例

鸡胚绒毛尿囊膜试验结果代表图例见图A.1，斑马鱼胚胎尾鳍切口中性粒细胞试验结果代表图例—染色法见图A.2，斑马鱼胚胎尾鳍切口中性粒细胞试验结果代表图例—中性粒细胞荧光标记法见图A.3。



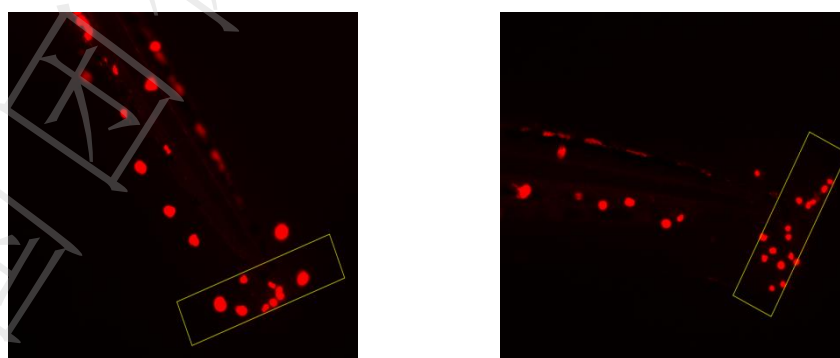
温和（左） 中度刺激性（中） 强刺激性/腐蚀性（右）

图 A.1 鸡胚绒毛尿囊膜试验结果代表图例



温和（左） 刺激（右）

图 A.2 斑马鱼胚胎尾鳍切口中性粒细胞试验结果代表图例—染色法



温和（左） 刺激（右）

图 A.3 斑马鱼胚胎尾鳍切口中性粒细胞试验结果代表图例—中性粒细胞荧光标记法

附录 B (资料性) 斑马鱼养殖及鱼卵收集方法

B.1 设备和试剂

B.1.1 斑马鱼养殖设备：设备需配有温控装置，水循环和过滤装置，养殖容器用玻璃或常见食品级PC材质制成。可采用通用斑马鱼养殖设备或按实验室需求配备鱼缸。

B.1.2 产卵盒/缸：由玻璃、不锈钢或其它惰性材料制成，配备网筛（网格大小为2mm×2mm，由不锈钢或多项材料组成用来保护鱼卵）。

B.1.3 水质监测设备：pH计、溶解氧测定仪、盐度计（电导率测定仪）。

B.1.4 丰年虾（*Artemia salina*）孵化器：设备需配有孵化桶，气管，气量调节阀，气泵截止开关和止逆阀装置。

B.1.5 亲鱼养殖用水：称取4g海盐溶于10L水配制而成，盐度为0.25‰~0.50‰，电导率为500 μS/cm~800 μS/cm，溶解氧80%饱和度，pH值6.5~8.5，硬度30mg/L~300mg/L（以碳酸钙计）。

B.1.6 丰年虾卵：丰年虾休眠卵需干燥避光冷藏。称取约15g海盐溶于1L水配制丰年虾卵孵化水，密度以不超过4g/L丰年虾卵为宜。

B.2 成鱼养殖

斑马鱼来源应选用来源可靠的野生型AB品系斑马鱼（*Danio rerio*）或荧光标记中性粒细胞的转基因斑马鱼（如：mpo, lyz等品系）。亲鱼应具有较好的繁殖能力—鱼龄以6~12月最佳。传代尽量使用侧交以保持遗传多样性，纯品系亲鱼繁殖5代后需更换新一批亲鱼。亲鱼不应该有明显可见的感染和疾病特征，且在2个月内没有经历过药物治疗。在繁殖产卵测试前，亲鱼应在引入实验室后驯养14天以上。养殖条件如下：

——养殖水温宜控制在26℃~28.5℃，室内温度建议控制在20℃~25℃。

——养殖密度宜控制在每升水1~2尾鱼，以及每日固定的12h~16h光照，且需保持良好的过滤系统。

——每天至少喂食2次，包括至少1次丰年虾幼虫，喂食间隔在3h以上，避免过量喂食影响水质和清洁度。

B.3 鱼卵收集

B.3.1 如用产卵缸收集鱼卵，将雄鱼和雌鱼以2:1的比率为宜，在产卵前一天关灯前1h~2h放进产卵缸中。由于斑马鱼偶尔不产卵，建议同时准备多个产卵缸备用。

B.3.2 为避免基因偏差，将最少3个产卵缸中收集鱼卵混合再进行挑选备用。若用养殖鱼缸收集鱼卵，收卵盒在产卵前一天关灯前或产卵当天开灯前放进要收集鱼卵的养殖鱼缸中。

B.3.3 交配、产卵和受精在开灯后大约30min内完成，届时可把收卵盒移出鱼缸。

B.3.4 鱼卵从收卵盒取出后，建议用鱼胚胎培养液清洁鱼胚胎。

B.3.5 挑选健康的斑马鱼胚胎，并以200 μL鱼胚胎培养液中不超过1粒鱼胚胎的密度于28℃培养至受精后3天。

B.4 转基因斑马鱼胚胎试验后的处理方法

将鱼胚胎用1:5漂白溶液处理5min后用自来水冲洗干净。

附 录 C
(资料性)

淋洗型化妆品温和功效体外测评方法报告示例

下面给出了淋洗型化妆品温和功效体外测评方法报告示例：

报告编号：

样品名称		样品数量及规格	
样品外观		生产日期或批号	
接收日期		保质期或限用日期	
检验项目	温和功效	样品编号	
检验方法	<input type="checkbox"/> 鸡胚绒毛尿囊膜试验 <input type="checkbox"/> 斑马鱼胚胎尾鳍切口中性粒细胞试验（斑马鱼品系：_____）		
试验时间			
委托单位			
地 址			
生产单位			
地 址			

一、试验方法

二、试验结果

三、结论

四、试验产品及对照检测结果记录表
