

团 体 标 准

T/ZHCA XXX-2023

化妆品抗氧化人体测试方法

In Vivo Test Method of Antioxidant Cosmetic Products

(征求意见稿)

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这些专利的责任。

本文件由珀莱雅化妆品股份有限公司提出。

本文件由浙江省健康产品化妆品行业协会（ZHCA）归口管理。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

化妆品抗氧化人体测试方法

1 范围

本文件规定了通过防御紫外线对人体皮肤的氧化损伤评价化妆品抗氧化的一种测试方法。
本标准适用于化妆品的抗氧化测试。化妆品原料抗氧化测试可参照本方法。

注：本文件不是化妆品抗氧化的唯一测试方法。

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》

《化妆品功效宣称评价规范》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 自由基和活性氧（Reactive oxygen species, ROS）

自由基，是指游离存在的，带有不成对电子的分子、原子或离子；因存在不成对电子，自由基呈现不稳定的高化学活性的特性。ROS，是含氧的化学反应性化学物质，包括超氧阴离子、羟自由基、过氧化氢等。人体正常生理代谢和环境影响如紫外线照射、环境污染等都会导致ROS的产生。

3.2 皮肤氧化

由于皮肤中过度的自由基和ROS水平而产生的氧化应激，氧化应激造成的氧化损伤主要包括对细胞组分的损伤，如细胞膜、DNA、脂质或蛋白质。自由基和ROS含量超过人体清除的能力，打破了氧化与抗氧化的平衡，就会引起氧化应激，皮肤作为人体最外层的组织，直接暴露于环境，更容易引起氧化应激造成氧化损伤，氧化应激会引起皮肤衰老和皮肤病的发生。

3.3 抗氧化

有助于减少或减缓皮肤氧化的发生。化妆品抗氧化主要通过清除自由基、降低ROS水平、提高抗氧化酶活性，减少脂质代谢产物等减少皮肤氧化应激带来的细胞膜、DNA、脂质或蛋白质损伤，降低氧化对人体皮肤造成的损害。抗氧化是抵御皮肤衰老的至关重要的途径。

3.4 紫外线波长

短波紫外线 (UVC): 200 nm ~ 290 nm

中波紫外线 (UVB): 290 nm ~ 320 nm

长波紫外线 (UVA): 320 nm ~ 400 nm

3.5 最小红斑量 (Minimal erythema dose, MED)

引起皮肤清晰可见的红斑，其范围达到照射区域边界，且红斑面积超过照射面积50%所需要的紫外线照射最低剂量 (J/m^2) 或最短时间 (s)，红斑判读应在照射后16h~24h内进行。

3.6 a^* 值

通过皮肤色度计或反射分光光度计测量皮肤 $L^*a^*b^*$ 颜色空间中 a^* 数值来表征人体皮肤血红素或红斑量 (表示皮肤颜色由绿到红的范围) 的参数。

3.7 红斑指数 (Erythema index, EI)

通过测定皮肤表面对特定波长光谱的吸收来表征皮肤中血红素含量的参数。

4 基本原则

4.1 化妆品人体功效检验应符合世界医学协会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 化妆品人体功效检验之前应按照《化妆品安全技术规范》的要求完成必要的产品安全性检验和评价，并出具书面证明，确保在正常、可预见的情况下不得对受试者的人体健康产生危害。

4.3 化妆品功效宣称评价的试验方案设计应按照《化妆品功效宣称评价规范》的要求，采用随机盲法对照原则。

5 受试者的选择

按受试者入选标准和排除标准选择合格的受试者，确保各测试区最终完成有效例数均不低于 20 人。

5.1 入选标准

入选人员应满足如下要求：

- a) 18~60岁，健康女性或男性；
- b) 测试部位肤色个体类型角 (Individual type angle, ITA $^\circ$) 应不小于28 $^\circ$ ；
- c) 无过敏性疾病，无化妆品或其它外用制剂过敏史；
- d) 既往无光感性疾病史，近期内未使用影响光感性的药物；
- e) 受试部位的皮肤应无色素沉着、炎症、瘢痕、色素痣、多毛等现象；
- f) 能够接受测试区域皮肤使用人工光源进行照射者；
- g) 能理解测试过程，自愿参加试验并签署书面知情同意书者。

5.2 排除标准

凡列入有下列任意一个条件的均排除进入入选受试者：

- a) 妊娠或哺乳期妇女，或近期有备孕计划者；
- b) 患有银屑病、湿疹、异位性皮炎、严重痤疮等皮肤病史者，或患有其他慢性系统性疾病者；
- c) 近1个月内口服或外用过皮质类固醇激素等抗炎药物者；
- d) 近3个月内使用过抗氧化的产品或药物者；
- e) 3个月内参加过同类试验或3个月前参加过同类试验，但试验部位皮肤红斑或黑化印迹没有完全褪去者；
- f) 近1个月内参加过化妆品临床试验者；

g) 其他临床评估认为不适合参加试验者。

6 试验方法

6.1 受试物

6.1.1 试验产品：宣称具有抗氧化作用的化妆品。

注：配方中使用防晒剂、未使用抗氧化剂的产品，不属于抗氧化化妆品。

6.1.2 阴性对照：仅予光照而不涂抹产品的皮肤。

6.1.3 阳性对照（可选做）：按附录A中表A.1配方配制的7%抗坏血酸（维生素C）制品（4℃冷藏、铝管避光保存）。

6.1.4 受试物涂抹

由工作人员按照随机表对应测试区进行受试物的涂抹，涂样面积应不小于30cm²，涂样量为（2.0±0.1）mg/cm²或（2.0±0.1）μL/cm²（乳液、膏霜、液体等以涂擦方式施用的产品）或按产品实际施用方式施用足够数量（贴片式面膜等）。每个测试区之间的间隔应不小于1.0cm。产品每天涂抹1次，连续涂抹4天。

6.2 试验部位

背部。每个红斑测试区面积应不小于0.5cm²，并应位于每个涂样区域内。

6.3 仪器设备

6.3.1 日光模拟仪：采用具有连续性光谱辐射、能够产生UVA+UVB波长紫外线的氙弧灯日光模拟仪。290nm以下的波长应用适当的过滤系统去除，输出波谱需经过计量检定或校准。

6.3.2 皮肤色度仪：具有可以测量国际照明委员会（CIE）制定的L*a*b*颜色空间数据的仪器。

6.3.3 皮肤血红素检测仪：具有基于光谱吸收的原理检测皮肤EI值的仪器。

6.4 环境条件

6.4.1 测试环境条件：试验结果观察应在温度为（21±2）℃、相对湿度为（50±10）% RH的恒定环境下进行，视觉评估还应在恒定光照条件（色温5500K~6500K的日光灯管或LED光照）下进行，并且所有受试者应在此环境条件下适应至少30min后方可进行评估和测试。

6.4.2 测试过程中的测试条件应保持一致，如：测试者、场所、测试部位、仪器及参数等。

6.5 试验流程

6.5.1 按照要求招募入组志愿受试者，签署书面知情同意书。入组前根据入选和排除标准等询问受试者一系列关于疾病史、健康状况等问题，同时对受试部位皮肤进行符合性评估和肤色测试筛选，并记录。

6.5.2 对入组的合格受试者进行产品使用前基础值的评估和测试，包括视觉评估和仪器测试，并记录。

6.5.3 在志愿者试验部位取3个符合纳入条件的区域，区域面积应不小于30cm²，其中2个区域随机涂抹试验产品和阳性对照，另1个区域为阴性对照。试验产品区域和阳性对照区域，每天涂抹相应产品1次，连续涂抹4天。

6.5.4 涂抹样品第1天到第3天之内，确定每位受试者试验部位的MED。在受试者背部皮肤选择其他位置作为照射区域，取至少5点用不同剂量的紫外线照射，16h~24h后观察结果。以皮肤出现红斑的最低照射剂量或最短照射时间为该受试者的MED。

6.5.5 样品涂抹第4天，先涂抹样品，再进行照射，每个区域共照射5个孔位，各孔位的照射强度分别为1×MED，2×MED，3×MED，4×MED（可选做），5×MED（可选做）。

6.5.6 照射结束后16h~24h, 应对皮肤颜色再次进行和 product 使用前相同的评估和测试, 包括视觉评估和仪器测试, 并记录。

6.5.6.1 视觉评估 (红斑视觉评分)

由皮肤科医生或经过培训且通过评判一致性考核的研究人员, 按附录B中图B.1红斑等级图谱, 对试验部位红斑进行等级评估, 并记录评分。红斑等级评估方法: 主要通过测试区域内皮肤红斑严重程度来评估红斑的等级; 红斑反应严重时, 可同时考虑水肿、疱疹; 不考虑受试者皮肤底色、汗毛、毛孔。

注: 在各红斑等级的标准照片中找不到完全匹配、介于两个等级之间的情况下, 也可给出其中间值0.5的打分。

6.5.6.2 皮肤色度仪测量 (a^* 值)

用皮肤色度仪分别测量各测试区域的 a^* 值, 每个测试区域测试三次, 并记录; a^* 值越大, 表示皮肤越红, 反之皮肤越不红。

6.5.6.3 皮肤血红素检测仪测量 (EI值)

用皮肤血红素检测仪分别测量各测试区域的 EI 值, 每个测试区域测试三次, 并记录; EI 值越小, 表示皮肤血红素含量越低, 反之皮肤血红素含量越高。

7 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t检验, 否则采用两个相关样本秩和检验; 等级资料使用前后的比较, 采用两个相关样本秩和检验; 试验产品和对照组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 $\alpha=0.05$ 。

8 结果计算

8.1 试验组和阴性对照使用产品前红斑视觉评分的初始值与照射结束后 16h~24h 的红斑视觉评分之间差值的平均值, 分别按式 (1) 和式 (2) 计算:

$$\overline{\Delta \text{红斑视觉评分}}_{\text{试验组}} = \overline{\text{红斑视觉评分}}_t - \overline{\text{红斑视觉评分}}_0 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$\overline{\Delta \text{红斑视觉评分}}_{\text{试验组}}$ —— 试验组红斑视觉评分差值的平均值;

$\overline{\text{红斑视觉评分}}_0$ —— 试验组使用产品前红斑视觉评分初始值的平均值;

$\overline{\text{红斑视觉评分}}_t$ —— 试验组照射结束后 16h~24h 红斑视觉评分的平均值。

$$\overline{\Delta \text{红斑视觉评分}}_{\text{阴性对照}} = \overline{\text{红斑视觉评分}}_{rt} - \overline{\text{红斑视觉评分}}_{r0} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$\overline{\Delta \text{红斑视觉评分}}_{\text{阴性对照}}$ —— 阴性对照红斑视觉评分差值的平均值;

$\overline{\text{红斑视觉评分}}_{r0}$ —— 阴性对照使用产品前红斑视觉评分初始值的平均值;

$\overline{\text{红斑视觉评分}}_{rt}$ —— 阴性对照照射结束后16h~24h红斑视觉评分的平均值。

8.2 试验组和阴性对照使用产品前 a^* 值的初始值与照射结束后 16h~24h 的 a^* 值之间差值的平均值, 分别按式 (3) 和式 (4) 计算:

$$\overline{\Delta a^* \text{ 值}_{\text{试验组}}} = \overline{a^* \text{ 值}_t} - \overline{a^* \text{ 值}_0} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

$\overline{\Delta a^* \text{ 值}_{\text{试验组}}}$ —— 试验组 a^* 值差值的平均值;

$\overline{a^* \text{ 值}_0}$ —— 试验组使用产品前 a^* 值初始值的平均值;

$\overline{a^* \text{ 值}_t}$ —— 试验组照射结束后 16h~24h a^* 值的平均值。

$$\overline{\Delta a^* \text{ 值}_{\text{阴性对照}}} = \overline{a^* \text{ 值}_{rt}} - \overline{a^* \text{ 值}_{r0}} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

$\overline{\Delta a^* \text{ 值}_{\text{阴性对照}}}$ —— 阴性对照 a^* 值差值的平均值;

$\overline{a^* \text{ 值}_{r0}}$ —— 阴性对照使用产品前 a^* 值初始值的平均值;

$\overline{a^* \text{ 值}_{rt}}$ —— 阴性对照照射结束后 16h~24h a^* 值的平均值。

8.3 试验组和阴性对照使用产品前 EI 值的初始值与照射结束后 16h~24h 的 EI 值之间差值的平均值, 分别按式 (5) 和式 (6) 计算:

$$\overline{\Delta \text{EI 值}_{\text{试验组}}} = \overline{\text{EI 值}_t} - \overline{\text{EI 值}_0} \dots\dots\dots (5)$$

式中:

$\overline{\Delta \text{EI 值}_{\text{试验组}}}$ —— 试验组 EI 值差值的平均值;

$\overline{\text{EI 值}_0}$ —— 试验组使用产品前 EI 值初始值的平均值;

$\overline{\text{EI 值}_t}$ —— 试验组照射结束后 16h~24h EI 值的平均值。

$$\overline{\Delta \text{EI 值}_{\text{阴性对照}}} = \overline{\text{EI 值}_{rt}} - \overline{\text{EI 值}_{r0}} \dots\dots\dots (6)$$

式中:

$\overline{\Delta \text{EI 值}_{\text{阴性对照}}}$ —— 阴性对照 EI 值差值的平均值;

$\overline{\text{EI 值}_{r0}}$ —— 阴性对照使用产品前 EI 值初始值的平均值;

$\overline{\text{EI 值}_{rt}}$ —— 阴性对照照射结束后 16h~24h EI 值的平均值。

9 结果评价

试验产品照射结束后16h~24h,任一MED测试区域红斑视觉评分差值或 a^* 差值或EI差值与阴性对照相比有显著改善 ($P<0.05$),则认定试验产品具有抗氧化功效,否则认为试验产品无抗氧化功效。

10 试验报告

试验报告应包括下列内容:

- a) 识别被测样品所需全部资料;
- b) 受试者相关信息,包括并不仅限于性别、年龄;
- 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) 试验的日期;
- i) 检验者、校核人和技术负责人签字,并加盖检验单位公章或检验专用章。

附录 A

(规范性)

7%抗坏血酸（维生素 C）阳性对照物的制备方法

A.1 在防御紫外线对人体皮肤的氧化损伤模型抗氧化人体试验中，可选择同时测定按表 A.1 配方制备的阳性对照物，作为试验质量控制参考。

A.2 阳性对照为 7%抗坏血酸（维生素 C）制品。

A.3 阳性对照物的配方和制备方法见下表：

表 A.1 7%抗坏血酸（维生素 C）的制备

	成分	重量比%
A 相:		
	水 (water)	8.65
	甘油 (glycerin)	23.00
A1	丙二醇 (propylene glycol)	6.00
	羟苯甲酯 (methylparaben)	0.20
	EDTA 二钠 (disodium EDTA)	0.05
	水 (water)	13.93
A2	抗坏血酸 (维生素 C) (ascorbic acid)	7.00
	氢氧化钾 (potassium hydroxide)	4.07
B 相:		
	环五聚二甲基硅氧烷 (和)	20.00
	PEG/PPG-18/18 聚二甲基硅氧烷	
	(Cyclopentasiloxane (and) PEG/PPG-18/18 dimethicone)	
B1	聚二甲基硅氧烷/乙烯基聚二甲基硅氧烷交联聚合物	
	(dimethicone (and) dimethicone/vinyl dimethicon	5.00
	crosspolymer)	
	苯基聚三甲基硅氧烷 (phenyl trimethicone)	4.00
B2	杏仁油 (prunus armeniaca(appicot) kernel oil)	3.00
	羟基丙酯 (propylparaben)	0.10
C 相:		
	锦纶-12 (nylon-12)	5.00

注：1. 制备方法：将 A1 和 B2 分别加热至 65°C~70°C，直至完全溶解，然后冷却至室温；再将 A2 加入到 A1 中，搅拌均匀（混合物 pH 值需在 6.0 左右）；将 B1 加入到 B2 中，室温下以 2000rpm~2500rpm 的转速搅拌 5 分钟进行均质。A、B 相分别均质好后，以 3000rpm~4000rpm 将 A 相加入到 B 相中，再以 8000rpm 搅拌 5 分钟进行乳化。乳化完成后，室温条件下加入 C 相，然后以 8000rpm~10000rpm 搅拌 10min 进行均质，完成。

2. 将配制物分装到铝管中，4°C 保存，保质期为 12 个月。

3. 本配方制备物仅限于试验用途，不能用作商业目的。

附录 B
(规范性)
红斑等级图谱

B.1 按照皮肤红斑严重程度不同，将皮肤红斑分为0.0级~7.0级：0.0级，无可见红斑；1.0级，可疑红斑；2.0级，微弱红斑；3.0级，红斑轮廓不清，红斑面积超过50%；4.0级，清晰红斑，红斑轮廓清晰，颜色为淡红色；5.0级，明显红斑；6.0级，红斑颜色加深，可能出现扩散或伴有轻微水肿；7.0级，明显红斑，颜色为暗红色，伴有水肿或疱疹，反应可能超过受试区。图片由起草组珀莱雅化妆品股份有限公司提供，已获授权。

B.2 红斑等级图谱见图B.1：

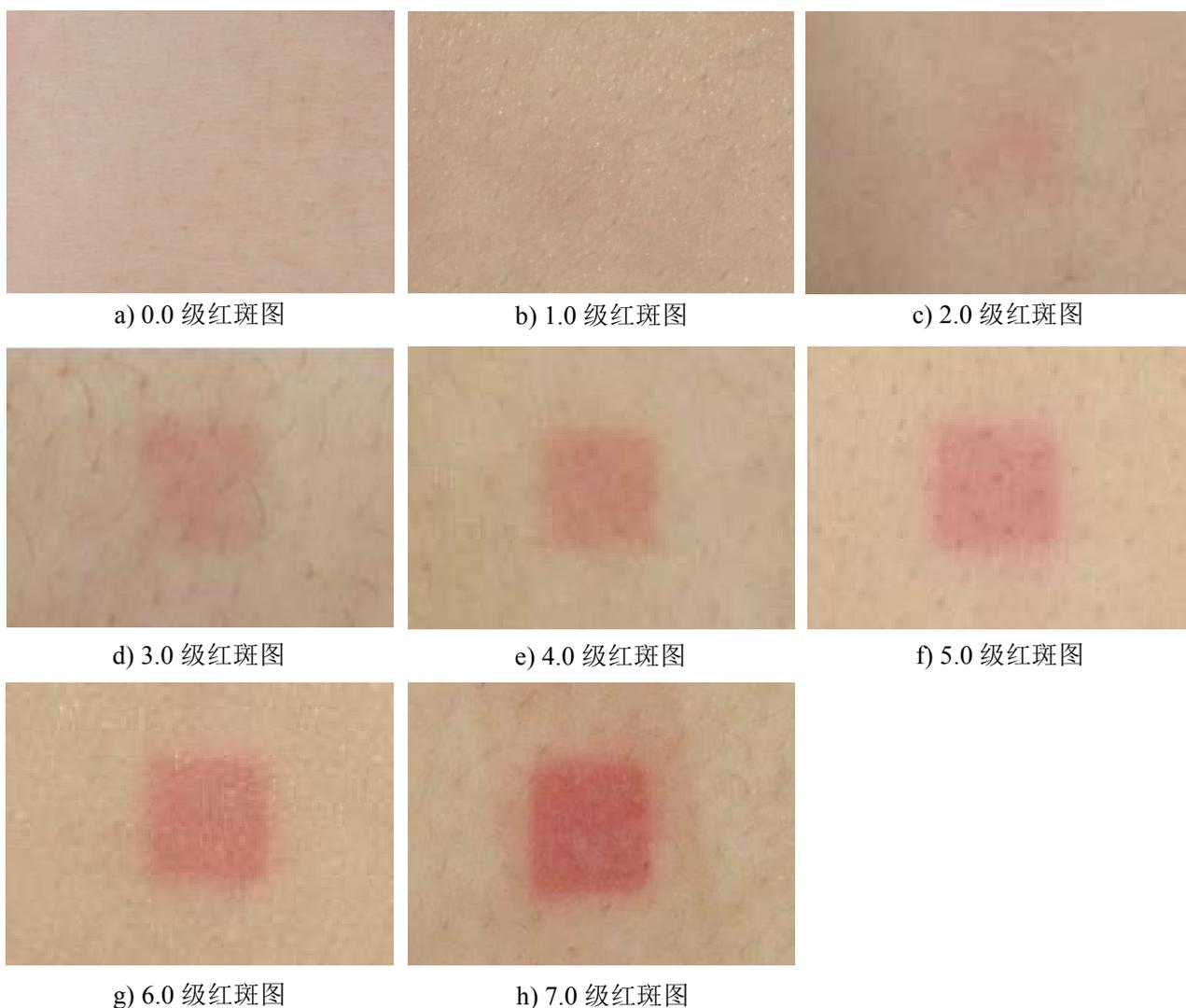


图 B.1 红斑等级图谱