

T/ACCEM

中国商业企业管理协会团体标准

T/ACCEM XXXX—XXXX

青刺果油皮肤功效评价规范

Specification for skin efficacy evaluation of green thorn fruit oil

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中国商业企业管理协会 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 基本原则 1

5 人体功效试验 1

6 细胞划痕实验 4

7 评价报告 5

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。

本文件由云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司提出。

本文件由中国商业企业管理协会归口。

本文件起草单位：云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、××××、××××

本文件主要起草人：×××、×××、×××

青刺果油皮肤功效评价规范

1 范围

本文件规定了青刺果油皮肤功效评价基本原则、人体功效试验、细胞划痕实验和评价报告。
本文件适用于对青刺果油皮肤功效进行评价和认定。

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 年版）》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

经表皮失水率（TEWL） transepidermal water loss rate

单位时间单位面积内皮肤水分流失量，单位为克每平方米时 $[g/(m^2 \cdot h)]$ 。

4 基本原则

- 4.1 被测青刺果油应为理化和卫生检验合格的产品，人体试验之前应先按照《化妆品安全技术规范（2015 年版）》完成必要的毒理学检验并出具书面证明，毒理学试验不合格的样品不应进行人体检验。
- 4.2 青刺果油皮肤功效评价试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。
- 4.3 试验应采用盲法试验设计原则。

5 人体功效试验

5.1 试验环境

- 5.1.1 试验环境温度应保持 $(21 \pm 2)^\circ\text{C}$ ，相对湿度应保持 $(50 \pm 10)\%$ ，并进行实时动态监测。
- 5.1.2 测试过程中，任何一个测试时间点的测试条件应保持一致，如测试者、场所、环境、仪器、测试体位等。所有受试者应在测试环境条件下适应至少 30 min 后方可进行评估和测试

5.2 受试者

5.2.1 受试者纳入标准

受试者应符合以下条件：

- a) 年龄在 18 岁~60 岁之间；
- b) 无过敏性疾病，无化妆品及其他外用制剂过敏史；
- c) 能够理解试验过程，自愿参加试验并签署书面知情同意书，并遵守测试流程者。

5.2.2 受试者排除标准

具备以下条件之一者不应作为受试者参加测试：

- a) 计划怀孕或妊娠或哺乳期以及产后六个月内的妇女；
- b) 有严重系统性疾病，免疫缺陷或自身免疫性疾病者；
- c) 近一周使用抗组胺药或近一个月使用过免疫抑制剂者；
- d) 皮肤待试区域存在瘢痕、色素、萎缩、鲜红斑痣或其他瑕疵而影响试验结果者；
- e) 近三个月待试区域参加过其他临床试验者；
- f) 正在接受治疗的呼吸道疾病患者；
- g) 正在接受皮肤治疗的人群；
- h) 胰岛素依赖性糖尿病患者；
- i) 其他相应的排除标准。

5.2.3 受试者人数

受试者人数有效例数应不低于 30 例。

5.3 受试物

5.3.1 试验产品

1% 青刺果油。

5.3.2 对照产品

5.3.2.1 阴性对照：胶带撕拉+不含青刺果油的葵花籽油。

5.3.2.2 空白对照：胶带撕拉。

5.4 仪器

测试仪器主要包括：

- a) 分析天平：精度 0.1 mg；
- b) 经表皮失水率测试仪：Tewameter TM HEX 或相当者；
- c) 皮肤角质层水分测试仪：Corneometer CM825 或相当者。

5.5 试剂和材料

5.5.1 除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的三级水。

5.5.2 试剂与材料主要包括：

- a) 无屑吸水干纸巾；
- b) 3M 低敏胶带；
- c) 乳胶指套。

5.6 试验步骤

5.6.1 试验准备

5.6.1.1 通过初筛的受试者到达测试实验室后，由检测人员筛选前臂符合要求（无瘢痕、色素、萎缩、鲜红斑痣等）的受试者。

5.6.1.2 受试者测试前 30 min 内不能喝水饮食，按要求使用无屑吸水干纸巾对待测区域进行擦拭，在温度（20~22）℃，湿度（40~60）%RH 的环境静坐平衡 30 min。

5.6.1.3 由检测人员在受试者双手前臂内侧处标记 3 个 3 cm×3 cm 的测试区域。产品涂抹区、空白对照区和阴性对照区应随机分布于左右手臂标记区域，确保测试产品、空白对照和阴性对照区域位置在统计学上达到平衡。测试区域如图 1 所示。

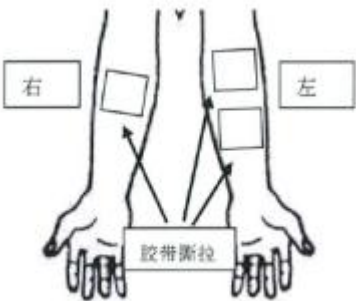


图 1 测试区域示意图

5.6.2 测定

5.6.2.1 基础值 T0

由检测人员进行 TEWL 值、角质层水分含量检测。

5.6.2.2 损伤后即刻 T1

使用 3M 低敏胶带在测试区域粘贴皮肤，直到 TEWL 值>15 g/(m²·h)，记录 TEWL 数值，并检测角质层水分含量。

5.6.2.3 使用样品后 T2、T3、T4

根据随机表，由检测人员使用乳胶指套在受试者测试区域均匀涂抹样品 (2.0±0.1)mg/cm²。由检测人员分别于使用样品后 1 h(T2)、2 h(T3)、3 h(T4)，进行 TEWL 值、角质层水分含量检测。仪器测试如表 1 所示。

表 1 仪器测试

仪器名称	测量参数	测试时间	测试区域	测量参数说明
Tewameter TM HEX	经表皮水分流失率 (TEWL)	T0/T1/T2/T3/T4	前臂内侧	测量值越小，表示经表皮水分流失量越少，屏障功能越好
Corneometer CM825	角质层水分含量	T0/T1/T2/T3/T4	前臂内侧	测量值越大，表示皮肤角质层水分含量越高

5.6.3 完成试验

结束测试，有序安排受试者离开测试实验室。

5.7 试验数据分析

5.7.1 应用统计分析软件 SPSS 22.0 进行数据的统计分析。计量数据表示为：均值±标准差。若数据为正态分布，采用配对样本 t 检验，否则采用秩和检验。上述统计分析均为双尾检验，显著性水平为 α=0.05。

5.7.2 变化率=(使用样品后数值-损伤后即刻数值)/损伤后即刻数值。

5.8 试验结果判定

试验产品区任一测试时间点与损伤后即刻的差值，经表皮水分流失率（主要参数）显著优于对照区（阴性对照或空白对照）(p<0.05) 时，则认定试验产品在该试验周期内有修护功效。

6 细胞划痕实验

6.1 原理

采用细胞划痕插件制备 HaCaT 细胞划痕模型，给药后进行显微镜拍照，通过 Image J 计算愈合率，愈合率值越大说明受试物对于 HaCaT 细胞的屏障修复功效越好。

6.2 试剂

试验使用试剂包括：

- a) DMEM 培养基；
- b) 胎牛血清 FBS；
- c) CCK-8 检测试剂盒；
- d) 胰酶（trypsin-EDTA 0.25%）；
- e) 细胞划痕插件；
- f) 无血清细胞冻存液；
- g) 12 孔细胞培养板；
- h) 10 cm 细胞培养皿。

6.3 实验步骤

6.3.1 将细胞划痕插件放置在 12 孔细胞培养板中，接种处于对数生长期生长状态良好的 HaCaT 细胞。

6.3.2 在 5% CO₂, 37 ℃ 条件下培养细胞 24 h，移除插件后，PBS 轻柔冲洗细胞，加入 5% 和 10% 青刺果油提取物，孵育 0 h、16 h、24 h 后，显微镜下拍照记录。如图 2 所示，其中：A 为 PBS 空白组，0 h；B 为 5% 青刺果油提取物，0 h；C 为 10% 青刺果油提取物，0 h；D 为 PBS 空白组，16 h；E 为 5% 青刺果油提取物，16 h；F 为 10% 青刺果油提取物，16 h；G 为 PBS 空白组，24 h；H 为 5% 青刺果油提取物，24 h；I 为 10% 青刺果油提取物，24 h。

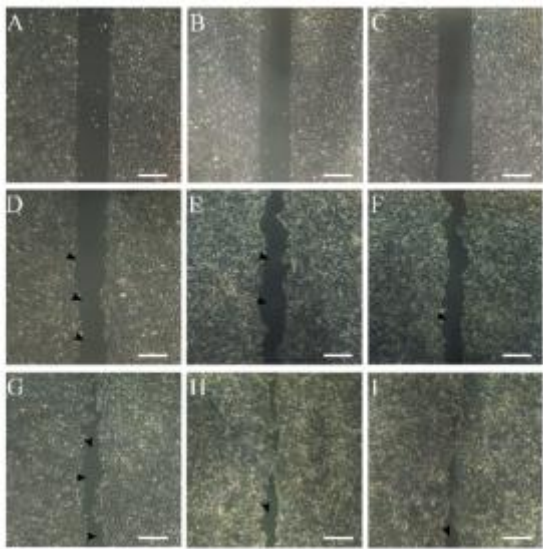


图 2 显微镜图

6.4 实验数据分析

对比 PBS 空白组、5% 青刺果油提取物和 10% 青刺果油提取物分别在 16 h 和 24 h 对 HaCaT 细胞的愈合率。如图 3 所示。

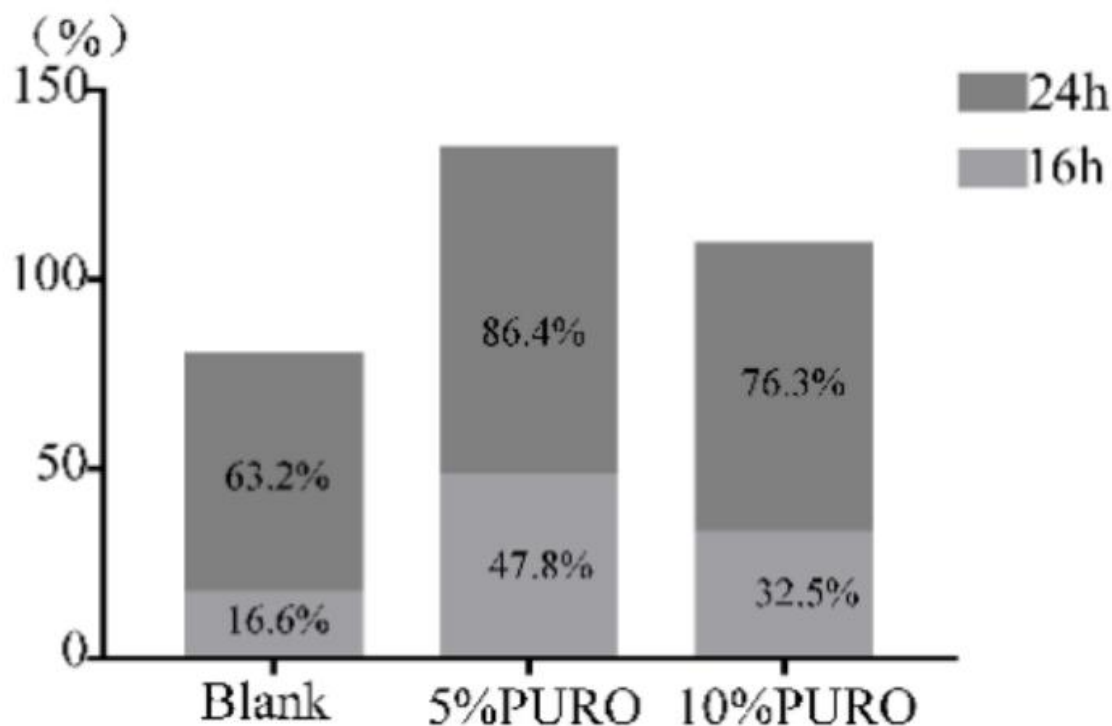


图 3 愈合率对比

6.5 实验结果判定

与 PBS 空白组相比, 5% 的青刺果油及 10% 的青刺果油均能够促进 HaCaT 体外划痕的愈合, 其中 5% 的青刺果油在 24 h 后效果最佳, 愈合率为 86.4%, 因此证明青刺果油可以加速 HaCaT 细胞的迁移, 促进伤口愈合, 具有较好的屏障修复功效。

7 评价报告

评价报告至少包括以下内容:

- a) 被测样品资料;
- b) 测试方法;
- c) 测试时间;
- d) 试验结果: 包括试验所得数据, 按规定的方法进行数据处理;
- e) 试验结论: 根据统计结果得出被测样品是否具有相应皮肤功效;
- f) 报告日期;
- g) 检验者、校核人和技术负责人分别签字以及检验单位公章。