

团体标准

T/LNPC 015-2024

化妆品原料防晒功效评价试验方法

Test method for sunscreen efficacy of cosmetic ingredients

2024 年 12 月 23 日 发布

2024 年 12 月 30 日 实施

辽宁省品牌建设促进会 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 原理 1

5 仪器及设备 1

6 试剂和耗材 1

7 试验步骤 2

 7.1 体外模型的准备 2

 7.2 给予化妆品原料 2

 7.3 样品收集处理 2

 7.4 试验步骤 2

 7.5 测定条件 2

8 结果计算 2

9 结果判定 3

参 考 文 献 4

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》、GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的规定起草。

本文件由辽宁省品牌建设促进会提出并归口。

本文件提出单位：肽悦（沈阳）生物科技有限责任公司

本文件起草单位：辽宁省药品检验检测院、肽悦（沈阳）生物科技有限责任公司、沈阳药科大学、辽宁天安生物制药股份有限公司、中科院沈阳应用生态研究所、大连瑞芳生物科学有限公司

本文件主要起草人：王福鑫、周训勇、张怡轩、赵龙山、李嘉文、矫筱蔓、刘智勇、徐秋阳、薛娇、孔祥翔、张轶、张国英、王雅琼、王柯、那淑虹

化妆品原料防晒功效评价试验方法

1 范围

本文件规定了基于体外人皮肤模型的化妆品原料的防晒功效试验方法。
本文件适用于具有生物学防晒作用的化妆品原料防晒功效试验。
本文件可作为化妆品原料防晒功效试验方法之一，对化妆品原料防晒功效进行评价。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

防晒对于维持胶原蛋白的健康和皮肤弹性至关重要。日光中的紫外线（UVA波段）可以直达肌肤的真皮层，促进胶原蛋白的降解、抑制其合成，并通过引发氧化应激损伤胶原蛋白。使用防晒产品可以有效减少紫外线引发的伤害，保护胶原蛋白免受降解，促进其合成，并减少光老化的发生。防晒不仅是预防皮肤癌的有效手段，也是保护皮肤胶原蛋白、延缓衰老的关键措施。

本文件通过检测加入化妆品原料后人真皮成纤维细胞中胶原蛋白表达量的变化，进而反映化妆品原料是否对皮肤有防晒功效。

5 仪器及设备

- 5.1 生物安全柜。
- 5.2 倒置显微镜。
- 5.3 CO₂培养箱：37℃，95%相对湿度、5%CO₂/空气。
- 5.4 低温高速离心机。
- 5.5 酶标仪：450nm、630nm。
- 5.6 分析天平：精度 0.1mg。
- 5.7 微量移液器：5000 μL、1000 μL、200 μL、20 μL。
- 5.8 紫外灯（UVA 波段）：320nm~420nm。
- 5.9 紫外线照度计（UVA 波段）。

6 试剂和耗材

- 6.1 人皮肤成纤维细胞（HSF 细胞）。
- 6.2 HSF 细胞专用培养基。
- 6.3 0.25%胰蛋白酶（无菌）。
- 6.4 PBS 磷酸盐缓冲液（无菌）。
- 6.5 人 I 型胶原蛋白 ELISA 检测试剂盒。

7 试验步骤

7.1 体外模型的准备

7.1.1 细胞培养

将人真皮成纤维细胞用胰蛋白酶作用5min~10min后,用专用培养基终止消化,巴氏吸管吹打细胞使其成为单细胞悬液。加入适量培养基稀释细胞悬液使其密度约为 1×10^4 个/mL。用微量移液器吸取细胞悬液以3mL/孔接种到6孔板中,然后置于CO₂培养箱培养48h。待细胞密度达到 1×10^5 个/mL,即可给予化妆品原料。

7.1.2 UVA 刺激

待细胞生长到融合度为80%~85%时,UVA紫外灯以2500mJ/cm²照射剂量照射细胞,空白对照组不做照射处理。

7.2 给予化妆品原料

试验设置空白对照组、光照对照组和化妆品原料组。称取一定量的化妆品原料,将其培养基稀释到试验浓度。化妆品原料浓度:通过细胞毒性检测试验确定化妆品原料的浓度范围。

用微量移液器吸干6孔板内的培养基;加入2mLPBS清洗细胞一次,再吸干各孔。空白对照组、光照对照组每孔仅加入2mL培养基,化妆品原料组每孔加入2mL含有化妆品原料的培养基。随后将6孔板置于CO₂培养箱中继续培养24h。

7.3 样品收集处理

照射后,紫外对照组加入专用培养基,化妆品原料组加入不同浓度的化妆品原料溶液,继续培养24h,收集细胞培养液,并以CCK-8法测定细胞活力,收集的细胞培养液用Elisa试剂盒测定I型胶原蛋白的含量。

7.4 试验步骤

7.4.1 从室温平衡 20min 后的铝箔袋中取出所需板条。

7.4.2 设置标准品孔和样本孔,标准品孔各加不同浓度的标准品 50μL。

7.4.3 样本孔先加待测样本 10μL,再加样本稀释液 40μL;空白孔不加。

7.4.4 除空白孔外,标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100μL,用封板膜封住反应孔,37℃水浴锅或恒温箱温育 60min。

7.4.5 吸干每孔液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置 1min,吸干洗涤液,将板在吸水纸上拍干,如此重复 5 次。

7.4.6 每孔加入底物 A、B 各 50μL,37℃避光孵育 15min。

7.4.7 每孔加入终止液 50μL。

7.4.8 取出 96 孔板,酶标仪检测。

7.5 测定条件

在 450nm波长测定吸光度,用 630nm波长作为参考波长进行双波长测定,计算蛋白样品浓度。

8 结果计算

以标准品浓度作横坐标,对应OD值作纵坐标,绘制出标准品线性回归曲线,按曲线方程计算各样本浓度值。

$$dc_1 = \left(\frac{x_1}{x_2} - 1 \right) \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$dc_2 = \left(\frac{x_3}{x_1} - 1 \right) \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

dc_1 ——光照对照组I型胶原蛋白含量变化率（%）；

dc_2 ——化妆品原料组I型胶原蛋白含量变化率（%）；

x_1 ——光照对照组I型胶原蛋白含量的平均值；

x_2 ——空白对照组I型胶原蛋白含量的平均值；

x_3 ——化妆品原料组I型胶原蛋白含量的平均值；

9 结果判定

全部符合以下两个条件说明化妆品原料具有防晒功效：

- (1) 与空白对照组相比，光照对照组I型胶原蛋白变化率为负值，且具有显著性差异（ $p < 0.05$ ）。
- (2) 与光照对照组相比，化妆品原料组I型胶原蛋白变化率为正值，且具有显著性差异（ $p < 0.05$ ）。

参 考 文 献

- [1] 国家药品监督管理局. 化妆品安全技术规范2015版. 2015年12月23日.
 - [2] 国家药品监督管理局. 化妆品功效宣称评价规范. 2021年4月9日.
-