

ICS

CCS 点击此处添加 CCS 号

# T/GDCA

## 广东省化妆品学会团体标准

T/GDCA XXXX—2022

### 去屑产品去屑功效测试方法

Test Method on efficacy of antidandruff products

(征求意见稿)

(本草案完成时间: 2021.3.21)

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。

2022 - XX - XX 发布

2022 - XX - XX 实施

广东省化妆品学会 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.....	2
5 人体功效实验方法.....	2
6 载体浸泡抑菌实验.....	6
7 微生物体外模拟试验.....	8
8 结果分析.....	9

## 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。

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：

本文件主要起草人：

# 去屑产品去屑功效测试方法

## 1 范围

本文件规定了具有去屑功能的相关产品的去屑功效的测试方法。  
本文件适用于具有去屑功能的发用化妆品和外用型去屑产品。

## 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。

消毒技术规范

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

QB/T 2738 日化产品抗菌抑菌效果的评价方法

YY 0569 II级生物安全柜

WS/T 650 抗菌和抑菌效果评价方法

化妆品分类规则和分类目录

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 去屑产品 antidandruff products

具有去屑效果、日常使用的化妆品类及其它外用型的产品。

### 3.2 去屑效果 antidandruff efficacy

产品有助于减缓头屑的产生或有助于减少附着于头皮、头发的头屑的效能。

### 3.3 黏着性头皮鳞屑分值 (adherent scalp flaking score, ASFS 分值)

通过评价头皮鳞屑大小、多少等综合指标对头屑严重程度进行分级的一种方法。

### 3.4 头皮表面油脂量 greasiness on the scalp

单位面积内头皮分泌的油脂的含量。

### 3.5 头皮表面含水量 hydration level on the scalp

头皮角质层的含水量。

### 3.6 头部培养马拉色菌 number of Malassezia on head after culture

试验面积下头部皮肤表面分离到的马拉色菌的对数值。

### 3.7 抑菌 bacteriostasis

去屑产品抑制或妨碍微生物生长繁殖及其活性的过程。

### 3.8 载体 carrier

试验微生物的支持物。

### 3.9 菌落形成单位 colony forming unit (CFU)

由单个或聚集成团的多个微生物菌体在固体培养基上生长繁殖所形成的集落,用以表达活菌的数量。

## 4 原理

### 4.1 人体功效评价试验

头屑的形成是由于头部皮肤角质形成细胞分裂加快,间伴有微生物生长活跃,从而导致头皮表皮层的加速脱落形成的。头屑主要表现为大片的角质层细胞剥落,伴随水分或油脂含量失衡、瘙痒等。因此,本方法以人体单中心开放实验进行试验,以使用前后研究者评价指标及受试者评价指标有无统计学差异或对照组与试验组试验结果有无统计学差异为评价标准,对去屑产品进行功效的总体评价。

### 4.2 载体浸泡抑菌试验

马拉色菌的异常活动也被认为是头屑形成的主要原因。因此,许多去屑产品都通过添加杀菌剂来控制头部马拉色菌的生长来改善头屑。因此,对于此种去屑原理的产品,可以将样品对马拉色菌的抑菌情况作为样品去屑性能的一个评价指标。试验以糠秕马拉色菌作为指示菌种,以布片为试验载体。将去屑产品覆盖至载体上,作用规定时间后,回收载体上的菌落数,计算其抑菌值,并结合试验样与空白样的抑菌效果,评价试样的去屑效果。

### 4.3 微生物体外模拟试验

本方法通过模拟头部清洗剂头部皮肤状况,对样品进行体外模拟试验。试验以糠秕马拉色菌作为指示菌种,以猪皮为试验载体。使用去屑产品及对照样品反复清洗,模拟头部使用情况。清洗后接种一定浓度的试验菌种模拟头部皮肤状态,培养一定时间间隔后,回收载体上的菌落数,通过比较对照样与试验样的抑菌效果,评价试样的去屑效果。

### 4.4 方法选择

方法的使用者可以根据需要,选择一种或多种试验方法进行试验,并按照相应方法予以报告。原则上,对产品的评价应选用人体功效评价试验,对于以抑制微生物为去屑机理的产品,或需要评价去屑剂的效果时,可以选择微生物试验。

## 5 人体功效实验方法

### 5.1 受试者的选择

5.1.1 志愿者人数共 30 人,建议纳入人数 32~35 人。

#### 5.1.2 纳入标准

5.1.2.1 18~65 岁健康男性或女性志愿者;

5.1.2.2 有头皮屑困扰或脱屑严重人群,头皮分区中有 ASFS 评估 分值 $\geq 2$ 分者。评估方法及标准见 5.5.3);

5.1.2.3 必要时,外用型去屑产品适应症者;

5.1.2.4 必要时,按照产品目的人群,偏好性选择油性头皮志愿者或干性头皮志愿者;

5.1.2.5 自愿参加测试并签署知情同意书,能配合完成测试者。

#### 5.1.3 排除标准:

5.1.3.1 妊娠或哺乳期妇女,或近期有备孕计划者;

5.1.3.2 测试前 30 天内有染发、烫发或漂白头发行为者;

5.1.3.3 患有精神类或心理疾病者;或者有长期睡眠、情绪控制障碍者;

5.1.3.4 现在或最近 3 个月受试部位参加过同类测试、部使用或口服抗真菌药物或糖皮质激素者;

- 5.1.3.5 既往有化妆品、发用品、去头屑产品过敏史者；
- 5.1.3.6 严重疾病、慢性消耗性疾病、免疫缺陷或免疫性疾病患者；
- 5.1.3.7 由牛皮癣等由疾病引起的头屑患者（发用化妆品测试适用）；
- 5.1.3.8 临床评估认为不适合参加试验者。

## 5.2 试剂和材料

此处使用的试剂和材料应是适用于生物学试验用的。实验室可以按照实际情况选用，允许使用验证合格的其它配方，推荐使用商品化试剂及耗材，并按照制造商提供的说明书使用。

### 5.2.1 洗脱样

不具备去屑效果的同样类型的样品，同试验样同时提供。

### 5.2.2 对照样

同洗脱样。

### 5.2.3 试验样

具有去屑效果的试验样品。

### 5.2.4 微生物学试剂及培养基

#### 5.2.4.1 水

所用的水应为符合GB/T 6682规定的三级水。

#### 5.2.4.2 Leeming 和 Notman 培养基

蛋白胨10.0g  
 牛胆盐4.0g  
 葡萄糖5.0g  
 酵母浸膏1.0g  
 单硬脂酸甘油酯0.5g  
 吐温 60 0.5mL  
 全脂牛奶10.0g  
 橄榄油20.0mL  
 琼脂12.0g  
 去离子水 1000mL  
 放线菌酮0.5 g  
 氯霉素0.05 g  
 pH 6.2±0.2 (25℃)

放线菌酮及氯霉素可以按照比例配成储备液，过滤除菌备用。其它成分充分溶解后，调节pH至6.0~6.4，置于121℃，灭菌15min~30min。使用前加入放线菌酮及氯霉素储备液。

#### 5.2.4.3 0.03mol/L 磷酸盐缓冲液

磷酸氢二钠 2.83g  
 磷酸二氢钾 1.36g  
 无离子水 1000ml  
 充分溶解后，调节pH至7.2~7.4，置于121℃，灭菌15min~30min。

## 5.3 仪器设备

### 5.3.1 成像设备

可以拍摄头皮头屑情况的数码相机或分析成像设备。

### 5.3.2 头屑分析仪

可以分析头屑或头皮角质层细胞的剥落情况的分析仪器。

### 5.3.3 头皮表面油脂测试仪

可以定量表征皮肤表面油脂分泌情况的分析仪器。

### 5.3.4 头皮水分测试仪

以定量表征皮肤表面水分含量的分析仪器。

### 5.3.5 微生物培养分离设备

#### 5.3.5.1 干热灭菌箱

控温范围50℃~200℃，温度精度2℃。

##### 1.1.1 生物安全柜

应为符合YY 0569规定的II级生物安全柜。

#### 5.3.5.2 生化培养箱

控温范围20℃~50℃，温度精度1℃

#### 5.3.5.3 水浴锅

控温范围：25℃~55℃，温度精度1℃。

#### 5.3.5.4 可调移液器

量程：10μL~100μL，100μL~1000μL，1 mL~5 mL等各种规格。

#### 5.3.5.5 电子天平

精度 0.01 g。

#### 5.3.5.6 培养皿、试管等其它微生物学试验耗材

微生物培养和试验的各个规格。

## 5.4 试验流程

5.4.1 使用本流程检验之前应先对产品完成必要的毒理学检验或安全性评价，并出具书面证明。

5.4.2 按照要求招募合格志愿者。

5.4.3 志愿者按照约定时间，进行第一次实验访问，接受研究者问询，了解试验情况，签署书面知情同意书。

5.4.4 按照试验要求，对志愿者进行筛选，筛选合格的，发放洗脱期样品，受试者回家按要求使用该样品两周。

5.4.5 两周后，志愿者进行再次回访，研究者按照评估指标对志愿者进行评估并记录结果，评估合格的进行下一步试验，不合格者，终止试验。

5.4.6 评估完成后，对合格的受试者发放试验样品及宣教样品使用说明。受试者在家按要求使用样品，并按照约定时间回访。

5.4.7 回访周期按样品使用说明要求执行，并在报告中说明。最长不超过8周，测试周期允差±2天。每次回访时按标准进行研究者评估，受试者填写受试者评估问卷。

5.4.8 实验开始及结束后对样品使用量进行确认。

5.4.9 根据需要采用自身前后对照或对照样与试验样对照进行试验。

5.4.10 所有访问前均提前两天不洗头。测试环境首先满足仪器要求，志愿者测试时，一般要求环境温度为20℃~22℃，相对湿度40%~60%。

5.4.11 同一个受试者的测试需由同一个测试人员使用同一仪器按同一程序完成。如志愿者使用过程中出现不良反应，应及时报告并终止试验。

5.4.12 如试验需要终止时，由研究者向志愿者逐一阐明情况并终止试验。

## 5.5 研究者评估指标参数

### 5.5.1 评估指标

研究者评估指标分为头屑改善、微生物水平测定及头皮水分或油脂改善。其中头屑改善为必须评价指标，微生物水平测定、头皮水分或油脂改善情况等为选做指标。

### 5.5.2 头皮分区

将受试者的头部以中点划分为前后左右四个区域，每部分作为一个试验区域，每个区域分别记录，以其均值作为其评估结果。

### 5.5.3 头屑改善情况

实验室可以根据自身能力及设备配置情况，选择以下方法评价头屑改善情况。其中目视评估法为所有实验室必须进行测试的方法，有条件的实验室可加做仪器法。

#### 1) 目视评分法

研究者依据“ASFS 分值”（adherent scalp flaking score，黏着性头皮鳞屑分值）标准（表1）对受试者的头屑严重程度进行评分，记录分值。宜同时拍摄测试区域的头屑图片。测试时，要求受试者在随访前两日内不洗头，测试者到达试验室后受试者需要在测试环境中静坐30min，期间不得抓挠触碰头部。

ASFS 评分标准

等级评分	描述
0	无可见脱屑
1	偶见细小轻微脱屑
2	头皮及头发上有较多脱屑
3	头皮及头上少量的大型脱屑或大量细小脱屑
4	大量大型脱屑

#### 2) 仪器法

使用头屑分析仪、皮肤纹理分析测试仪及其它类似功能的仪器推荐的头屑采集方法采集头屑样品，并运用仪器本身的分析指标如头屑数量、皮屑剥脱面积、皮屑剥脱指数等报告参数，对结果进行报告。

### 5.5.4 头皮油脂测定

采用头皮油脂测试仪器对头部4个区域进行测定并记录其油脂含量。如设备具有图像记录功能的，宜同时记录其图像。

### 5.5.5 头皮水分测定

采用头皮水分测试仪器对对头部4个区域进行测定并记录其水分含量。如设备具有图像记录功能的，宜同时记录其图像。

### 5.5.6 微生物水平测试



在头部四区中分别取1cm×1cm作为取样区域，以无菌棉签，用生理盐水打湿后，擦拭上述区域，并将棉签头剪入10mL无菌盐水中，之后使用Leeming和Notman培养基，（28±2）℃，培养7天后计数。

## 5.6 受试者自评指标

依据下表对受试者进行问卷调查，作为受试者自评指标。

去屑效果受试者自评表

项目及标准	按标准选择相应数值
头屑：0=完全改善；1=显著改善；2=稍有改善；3=没有改善。	(0) (1) (2) (3)
头痒：0=无不适感觉，1=轻微瘙痒；2=中度瘙痒；3=重度瘙痒，不能忍受。	(0) (1) (2) (3)
油脂：0=完全改善；1=显著改善；2=稍有改善；3=没有改善。	(0) (1) (2) (3)

## 5.7 结果分析及报告

应用统计分析软件进行数据的统计分析。计量表示为：均值±标准差，并进行正态分布检验，符合正态分布要求，采用配对t检验，否则采用两个相关样本秩和检验，等级资料采用非参数检验统计方法。上述统计分析均为双尾检验，显著性水平为 $\alpha=0.05$ 。

## 5.8 结果评价

以头屑改善情况为主要评价指标，使用前后有统计学差异（有改善）或对照组与试验组有显著差异（试验组较对照组改善效果好）为具有去屑效果。其余指标应同时进行报告，并分别评价。

## 6 载体浸泡抑菌实验

### 6.1 试验菌种：糠秕马拉色菌 ATCC44344。

可以根据需要增加使用特定人群头皮分离到的马拉色菌，但需要在报告中说明。

### 6.2 试剂和材料

#### 6.2.1 试剂和培养基

同5.2.4。

#### 6.2.2 载体

载体为10 mm×10 mm脱脂白平纹布片，脱脂方法依照《消毒技术规范》（2002版）进行，使用前压力蒸汽灭菌备用。

#### 6.2.3 空白样品

与去屑样品成分一致，不含马拉色菌抑制剂的空白样品，与试样一同提供。

#### 6.2.4 对照样品

PBS。

### 6.3 仪器设备

#### 6.3.1 冰箱

控温范围2℃~8℃，-（20±2）℃。

#### 6.3.2 计时器

精度1s。

### 6.3.3 均质器

### 6.3.4 涡旋器

6.3.5 其它微生物分离培养设备同 5.3.5。

## 6.4 试验方法

### 6.4.1 试验菌种的制备

储备菌种接种Leeming和Notman培养基斜面上，(28±2)℃，培养5~7天后取新鲜培养物使用。如菌种生长活性不够，则进行二次传代，再次活化。使用PBS缓冲液洗下新鲜培养物，并用PBS稀释至约 $5 \times 10^6$ CFU/mL~ $5 \times 10^7$ CFU/mL制成菌悬液备用。工作菌株宜使用3~6代菌种。

### 6.4.2 载体制备

用微量移液器滴染10 μl菌悬液于灭菌载体上，36℃±1℃烘干或室温晾干备用。

### 6.4.3 载体浸泡抑菌

6.4.3.1 按5g/片的量称取样品于无菌平皿内，置20℃±1℃水浴5min，用无菌镊子取染菌载体，使载体完全浸没于样品中，立即计时。

6.4.3.2 待染菌载体与样品相互作用至规定时间，分别取染菌载体加入5.0mLPBS试管或均质袋中，混匀，充分振打，将试验菌洗下。

注：也可以使用其它体积。

6.4.3.3 按照菌液浓度，使用PBS进行10倍稀释，选取合适的稀释度，分别吸取1.0mL样液，放入灭菌平皿中，倒入培养基Leeming和Notman培养基，带凝固后翻转平板，置(28±2)℃，培养7天后计数。

6.4.3.4 5g空取白样品进行试验作为空白对照，5mLPBS作为阳性对照，方法同试验样。

6.4.3.5 取同批次PBS、培养基作阴性对照。

6.4.3.6 试验2平行，重复5次，计算每组抑菌率的平均值。

### 6.4.4 质量控制

试验需满足如下要求才能合格：

6.4.4.1 阳性对照回收菌量为 $1 \times 10^4$ CFU/片~ $9 \times 10^4$ CFU/片；

6.4.4.2 阴性对照组无菌生长；

6.4.4.3 空白对照组与试样组方差一致。

## 6.5 结果计算

### 6.5.1 每片载体的回收菌落数

按照下式计算结果：

$$C = (N_1 + N_2) / 2 \times F \times V \quad (1)$$

式中：

C为每片载体的回收菌落数，单位为CFU/片；

N为每皿上点数到的菌落数量，单位为CFU；

F为稀释倍数；

V为初始回收液体积，单位为mL，本部分为一般为5mL。

### 6.5.2 单组抑菌率

$$Y = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中：

Y为抑菌率；

C0为对照组作用后2平行载体的回收菌落平均数，单位为CFU/片；

C1为试验组作用后2平行载体的回收菌落平均数，单位为CFU/片；

## 6.6 结果分析

6.6.1 分别计算五次重复试验时对照组及试验组 2 块平行载体上的菌落总数的均值，并转化为对数值；

6.6.2 计算五次重复试验的均值及标准差；

6.6.3 对试验组及空白组样品进行方差齐性检查，若两组间总体方差一致，对样品进行配对 t 检验；以空白组与试样组结果有显著差异为具有去屑效果。

6.6.4 计算每一次试验的抑菌率，并分别报告抑菌率值。

## 7 微生物体外模拟试验

### 7.1 菌种、试剂、培养基及仪器设备

所用菌种、试剂培养基及微生物分析仪器均与6中相关条款一致。

### 7.2 载体

载体采用无菌处理的猪皮。可以使用市售的成品无菌猪皮，也可以自行制备可以满足替代皮肤模型使用的猪皮。每批次猪皮应经过技术验证后方可使用。

### 7.3 试验方法

#### 7.3.1 菌悬液的制备

按照6.4.1制备菌悬液，使菌悬液浓度为 $5 \times 10^5$ CFU/mL~ $5 \times 10^6$ CFU/mL，备用。

#### 7.3.2 猪皮的清洗

7.3.2.1 试验组用 0.03 g/cm<sup>2</sup> 洗发水样品均匀轻柔擦拭猪皮表面 1 min，将猪皮置于 4L/min 流动水下、室温冲洗，冲洗时间为 1 min，冲洗结束后使用无菌纸巾或纱布拍干。

7.3.2.2 如需要，再次按 7.2.2.1 模拟洗头过程，总洗涤次数不超过 8 次。

7.3.2.3 对照组使用没有马拉色菌抑制剂的相同配方的空白洗发水进行相同程序的洗涤。

#### 7.3.3 人工污染载体

猪皮清洗完成后，将其在无菌条件下裁成4cm×4cm备用。用微量移液器滴染100 μl菌悬液于载体上，涂布均匀，注意不要溢出。无菌条件下晾干或低温烘干备用。其中制备样品3块，对照组6块。

#### 7.3.4 接种后菌落回收

接种后，立即取3块接种后的对照样品，分别置于无菌袋中，加入20mL或其它合适体积的PBS缓冲液，均质器拍打1min得到回收液。将上述回收液进行10倍系列稀释后，分别吸取1.0 mL样液，放入2块培养皿中，使用Leeming和Notman培养基，(28±2)℃，培养7天后计数。每块载体回收菌落计算公式见6.5 (1)。报告3块样品上的平均菌落数。

注：也可以使用其它合适的回收方式进行菌落回收。比如手搓或者手动振摇，拍打等。

#### 7.3.5 样品组与对照组的培养及回收

将污染后的其它载体放置于无菌培养皿中，置(28±2)℃培养48h后，取出培养后的猪皮进行菌落回收。方法同7.3.4。

#### 7.3.6 试验重复 5 次。

#### 7.4 结果计算

- 7.4.1 分别计算五次重复试验时对照组及试验组三块平行载体上的菌落总数的均值,并转化为对数值;
- 7.4.2 计算五次重复试验的均值及标准差;
- 7.4.3 对试验组及对照组样品进行方差齐性检查,若两组间总体方差一致,对样品进行配对 t 检验;
- 7.4.4 使用公式见 6.5 (2) 计算每一次试验的抑菌率,并分别报告抑菌率值。

#### 7.5 质量控制

试验结果需满足下列要求,不满足者需重新试验。

- 7.5.1 对照组 0 时回收菌量应达到  $1 \times 10^4$  CFU/片 $\sim 9 \times 10^4$  CFU/片。
- 7.5.2 试验组及对照组总体方差一致。

### 8 结果分析

应至报告少包括以下内容:

- 8.1 试验是按本标准进行的并注明具体采用的试验方法及条款;
  - 8.2 样品信息;
  - 8.3 试验结果报告
  - 8.4 人体试验报告要求
    - 8.4.1 志愿者概述;
    - 8.4.2 每位志愿者每次随访时头部皮肤测试参数;
    - 8.4.3 对数据的统计分析情况;所有志愿者不同随访时间的各计量参数的均值 $\pm$ 标准差;
    - 8.4.4 所有志愿者自评价结果及结论;
  - 8.5 微生物试验报告要求
    - 8.5.1 试验菌种信息;
    - 8.5.2 载体信息;
    - 8.5.3 试验组及对照组的菌落回收值;
    - 8.5.4 抑菌率值
    - 8.5.5 其它统计数值
  - 8.6 其它任何对本标准的偏离。
-