

团体标准

T/GDCA 014-2022

化妆品 抗氧化活性的评价 细胞评价法

Cosmetics-Determination of Antioxidant-Cellular Methods

2022-12-22发布

2023-01-22 实施

广东省化妆品学会 发布

目 次

前言	II
1 范围	3
2 规范性引用文件	3
3 术语和定义	3
4 缩略语	3
5 抗氧化活性评价方法选择	3
6 评价方法	3
6.1 细胞抗氧化活性试验 (CAA)	3
6.2 光老化诱导细胞中 ROS 的抑制能力	5
6.3 过氧化氢诱导细胞中 ROS 的抑制能力	7
7 实验方法有效性验证	9
8 抗氧化评价结果判定	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。

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：国珍健康科技（北京）有限公司、广东省微生物研究所（广东省微生物分析检测中心）、深圳市药品检验研究院、深圳市萱嘉生物科技有限公司、广州樊文花化妆品有限公司、诺德溯源（广州）生物科技有限公司、彭氏（惠州）实业发展有限公司、深圳中科欣扬生物科技有限公司、无限极（中国）有限公司、广州质量监督检测研究院、广东工业大学、珠海市大美湾化妆品创新研究院、珠海市大美湾科技有限公司。

本文件主要起草人：张丽梅、邢岩、黄健聪、王平、廖雅、曹文件、张建华、郭文姣、彭婷婷、张岩峰、杨凯业、张薛勤、王玥、王进美、周悦、杜志云、杨露、张蓝月。

化妆品 抗氧化活性的评价 细胞评价法

1 范围

本文件规定了运用细胞体系评价化妆品及其原料抗氧化活性的方法及操作。

本文件适用于化妆品（水剂、乳液、精华等）及化妆品原料包括天然提取物等抗氧化活性的评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗氧化能力 Antioxidant capacity

某些物质可以通过直接作用于自由基，或通过间接消耗掉可生成自由基的物质，从而达到有效抑制自由基氧化的能力。

3.2

活性氧 Reactive Oxygen Species (ROS)

指氧分子代谢产物及其衍生的所有高反应性的含氧自由基、过氧化物和单线态氧等物种。包含超氧阴离子 ($O_2 \cdot^-$)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟基自由基 ($OH \cdot$)、臭氧 (O_3) 和单线态氧 (1O_2) 等。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ROS: 活性氧 (Reactive Oxygen Species)。

CAA: 细胞抗氧化活性 (Cellular Antioxidant Activity)。

5 抗氧化活性评价方法选择

5.1 抗氧化活性细胞评价方法选择应考虑受试物溶解性，首要推荐水溶性受试物，其次乙醇溶解性良好的受试物也可选用；

5.2 抗氧化评价方法选择应考虑受试物作用机制特点，根据受试物功能指向选择 CAA 评价方法、光老化模型或 H_2O_2 氧化模型；

5.3 不同抗氧化评价方法可以单独选择使用，也可以选择多个联合使用。

6 评价方法

6.1 细胞抗氧化活性试验 (CAA)

6.1.1 方法原理

荧光探针 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 可穿过细胞膜进入细胞，在细胞里被酯酶分解形成二氯荧光素，二氯荧光素可被 2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐 (AAPH) 诱导产生的自由基氧化，生成具有荧光的物质，其荧光强度与细胞内活性氧的水平具有相关性。抗氧化物质可在细胞膜外部结合氧自

由基而阻止其进入细胞，或者在细胞膜内部清除氧自由基而阻断荧光物质的生成，所对应的荧光强度减弱程度，可以反映受试物质的抗细胞氧化的程度。

6.1.2 试剂与材料

6.1.2.1 通用要求：除非另有说明，该方法中所用试剂均为分析纯，水为 GB/T6682 规定的一级水。

6.1.2.2 皮肤成纤维细胞 (L929)：建议来源于美国典型物质保藏中心 (ATCC) 或国家生物医学实验细胞资源库 (BMCR)；其他细胞或细胞系也可用于本试验，但必须证明其等同性。

6.1.2.3 EMEM 培养基。

6.1.2.4 甲醇 (CAS: 67-56-1, 色谱纯)。

6.1.2.5 胎牛血清 (FBS)。

6.1.2.6 胰酶 (0.25%-EDTA)。

6.1.2.7 无水乙醇 (CAS: 64-17-5, 色谱纯)。

6.1.2.8 L-抗坏血酸 (维生素 C, CAS: 50-81-7)。

6.1.2.9 磷酸盐缓冲液 (PBS 缓冲液, 0.01 mol/L pH 7.4)：称取 KH_2PO_4 药品 0.24 g, Na_2HPO_4 药品 1.44 g, NaCl 药品 8.0 g, KCl 药品 0.2 g, 加水 900 mL 充分混合均匀, 调 pH 值 7.4, 定容至 1000 mL, 于 121 °C 下高压灭菌 20 min。

6.1.2.10 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA, CAS: 4091-99-0)。

6.1.2.11 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 溶液：DCFH-DA 储备液 (10 mmol/L)：称取 DCFH-DA 药品 0.0049 g, 加 1 mL 甲醇充分溶解, 用无菌管进行分装 (100 μL /管), -20 °C 下避光保存。配制过程需在无菌环境下避光操作, 储存时间不超过 6 个月。

6.1.2.12 DCFH-DA 溶液 (25 $\mu\text{mol/L}$)：吸取 DCFH-DA 储备液 2.5 μL , 加 1 mL 无血清培养基充分混匀, 配制过程需在无菌环境下避光操作, 现用现配。

6.1.2.13 2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐 (AAPH, CAS: 2997-92-4)。

6.1.2.14 2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐 (AAPH) 溶液：称取 AAPH 药品 0.0543 g, 加 PBS 缓冲液 (6.1.2.8) 充分溶解混匀, 配成浓度为 200 mmol/L AAPH 储备液, 分装 (100 μL /管), -20 °C 下避光保存。配制过程避光操作, 储存时间不超过 6 个月。使用时, 以 PBS 缓冲液 (6.1.2.9) 为溶剂稀释至 600 $\mu\text{mol/L}$, 现用现配, 避光操作。

6.1.3 仪器

6.1.3.1 多功能酶标仪：具荧光检测功能。

6.1.3.2 CO_2 培养箱 (37 °C \pm 1 °C)。

6.1.3.3 生物安全柜。

6.1.3.4 倒置显微镜。

6.1.3.5 分析天平 (\pm 0.0001 g)。

6.1.3.6 低速离心机。

6.1.4 样本制备

样本制备如下：

——水溶性样品：称取样品适量, 加水充分混合均匀, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 配成样品母液, 2 °C -8 °C 下避光保存。使用时用含 25 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 无血清培养基稀释制备成不同的浓度梯度。

——非水溶性样品：称取样品适量, 加无水乙醇充分溶解 (如使用其他溶剂, 需应用此方法验证溶剂无抗氧化活性), 0.22 μm 滤膜过滤, 配成样品母液, 2 °C -8 °C 下避光保存。使用时用含 25 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 无血清培养基稀释制备成不同的浓度梯度。

——阳性对照样品 (维生素 C)：称取维生素 C 样品 200.0 mg, 加水充分混合均匀, 定容至 10 mL, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 配成 20 mg/mL 样品母液, 2 °C -8 °C 下避光保存, 储存时间不超过 3 个月。使用时用含 25 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 无血清培养基稀释, 制备不同的浓度梯度。

6.1.5 细胞培养

将L929细胞置于细胞培养瓶中，加入5mL的细胞培养液（90% EMEM培养基+10% 胎牛血清），于37℃，5% CO₂培养箱中培养，倒置显微镜下观察细胞生长情况，当细胞生长至培养瓶的80%–90%时，进行细胞接种。

6.1.6 细胞接种

取对数期细胞，接种到96孔板，接种密度 3×10^5 个/mL，每孔100 μL，培养24 h。

6.1.7 评价体系

设置空白对照组（B）、氧化对照组（O）、样品组（S）和阳性对照组（P），评价体系见表1。

表1 抗氧化活性评价体系（CAA）

	空白对照组 (B)	氧化对照组 (O)	样品组 (S)	阳性对照组 (P)
细胞株	成纤维细胞 L929			
细胞接种培养 24 h 后，除去培养液，PBS 缓冲液清洗 1 遍 ¹ ，各组按要求分别加入不同的 DCFH-DA 溶液。				
DCFH-DA 溶液 (μL)	100	100	0	0
含样品的 DCFH-DA 溶液 (μL)	0	0	100	0
含维生素 C 的 DCFH-DA 溶液 (μL)	0	0	0	100
37℃，5% CO ₂ 培养箱孵育 1h，除去 DCFH-DA 溶液，PBS 缓冲液清洗 3 次 ¹ ，加 AAPH 溶液启动反应 ² 。				
PBS 缓冲液 (μL)	100	0	0	0
AAPH 溶液 (μL)	0	100	100	100
平行次数	6 个/样	6 个/样	6 个/样	6 个/样

注1：清洗用多通道移液器，每次吸150 μL的PBS缓冲液，吹和吸时力度轻缓；

注2：用多通道移液器加AAPH溶液启动反应，操作迅速，加完立即放入酶标仪中测定。

评价体系在启动反应前需在酶标仪中预热，保持37℃恒温，启动反应后以激发波长485nm，发射波长538 nm进行连续测定，每5 min测定一次荧光强度，持续测定1 h。

6.1.8 细胞抗氧化 CAA 值计算

6.1.8.1 数据预处理

各孔各时间点荧光强度值减去本孔0 min荧光强度值，确保各孔荧光强度-时间曲线以原点为起点。

6.1.8.2 CAA 计算

每组有6个重复孔数据，计算各组每个时间点的重复孔荧光强度平均值，每组做荧光强度-时间的曲线，并求各曲线积分面积，按公式(1)计算CAA值。

$$CAA = \left(1 - \frac{AUC_S - AUC_B}{AUC_O - AUC_B}\right) \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

式中：

CAA——细胞抗氧化活性，CAA值；

AUC_O——氧化对照组荧光曲线下面积；

AUC_B——空白对照组荧光曲线下面积；

AUC_S——样品组荧光曲线下面积。

6.2 光老化诱导细胞中 ROS 的抑制能力

6.2.1 方法原理

皮肤细胞在中波紫外线(UVB)照射下会发生过氧化反应,在细胞中产生大量的活性氧(ROS),ROS会损伤细胞致使细胞老化,在细胞培养体系中加入抗氧化物质,可以阻止细胞中ROS产生,ROS变化的量可反应受试物质的抗氧化能力。

6.2.2 试剂与材料

- 6.2.2.1 通用要求:除非另有说明,该方法中所用试剂均为分析纯,水为GB/T6682规定的一级水。
- 6.2.2.2 皮肤成纤维细胞(L929):建议来源于美国典型物质保藏中心(ATCC)或国家生物医学实验细胞资源库(BMCR);其他细胞或细胞系也可用于本试验,但必须证明其等同性。
- 6.2.2.3 EMEM培养基。
- 6.2.2.4 胎牛血清(FBS)。
- 6.2.2.5 胰酶(0.25%-EDTA)。
- 6.2.2.6 BCA蛋白检测试剂盒。
- 6.2.2.7 槲皮素(CAS:117-39-5)。
- 6.2.2.8 磷酸盐缓冲液(PBS缓冲液,0.01 mol/L pH 7.4):配制同6.1.2.9。
- 6.2.2.9 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA, CAS:4091-99-0)。
- 6.2.2.10 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)溶液:DCFH-DA储备液(10 mmol/L):称取DCFH-DA药品0.0049 g,加1 mL甲醇充分溶解,用无菌管进行分装(100 μ L/管),-20 $^{\circ}$ C下避光保存。配制过程需在无菌环境下避光操作,储存时间不超过6个月。DCFH-DA溶液(10 μ mol/L):吸取DCFH-DA储备液1 μ L,加1 mL无血清培养基充分混匀,现用现配。

6.2.3 仪器

- 6.2.3.1 CO₂培养箱:(37 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C)。
- 6.2.3.2 低速离心机。
- 6.2.3.3 生物安全柜。
- 6.2.3.4 全自动酶标仪:具荧光检测功能。
- 6.2.3.5 紫外辐照计。
- 6.2.3.6 倒置显微镜。
- 6.2.3.7 分析天平(\pm 0.0001 g)。
- 6.2.3.8 紫外灯照射装置:取一个泡沫箱,在顶部盖子的内侧固定一支UVB灯管(紫外波长308 nm),灯管距离箱子底部垂直距离约15 cm,实验中将有透明盖的24孔细胞培养板放置于泡沫箱底部,即可进行光老化造模处理。需提前摸索最佳辐照时间,以细胞存活率下降至60%-70%为造模成功。

6.2.4 样本制备

样本制备如下:

- 水溶性样品:称取样品适量,加水充分混合均匀,0.22 μ m滤膜过滤除菌,配成一定浓度的样品母液,使用时以完全培养基溶液稀释,制备不同的浓度梯度;
- 非水溶性样品:称取样品,加无水乙醇充分溶解(如使用其他溶剂,需应用此方法验证溶剂无抗光老化活性),0.22 μ m滤膜过滤除菌,配成一定浓度的样品母液,使用时以完全培养基溶液稀释,制备不同的浓度梯度;
- 阳性对照样品(槲皮素):称取槲皮素样品20 mg,加无水乙醇充分溶解,定容至10 mL,0.22 μ m滤膜过滤,配成2 mg/mL的样品母液,使用时以完全培养基溶液稀释,制备不同的浓度梯度。

6.2.5 细胞培养

将L929细胞置于细胞培养瓶中,加入5 mL的细胞培养液,于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱中培养,倒置显微镜下观察细胞生长情况,当细胞生长至培养瓶的80%-90%时,进行细胞计数和细胞接种。

6.2.6 细胞接种

取对数期细胞,接种到24孔板,接种密度 5×10^4 个/mL,培养18 h-24 h。

6.2.7 评价体系

设置空白对照组 (B)、UVB对照组 (U)、受试样品组 (S) 和阳性对照组 (P)，PBS缓冲液冲洗细胞1次，每孔加1 mL PBS缓冲液覆盖，使用铝箔纸将空白对照组覆盖，UVB辐照，辐照程度以UVB对照组细胞存活率下降至60%~70%为准。评价体系见表2。

表2 抗氧化活性评价体系（光老化模型）

	空白对照组 (B)	UVB 对照组 (U)	样品组 (S)	阳性对照组 (P)
细胞株	成纤维细胞 L929			
细胞接种培养 18 h-24 h 后，除去培养液，各组按要求分别加入不同的培养基溶液。				
培养基 (mL)	1	1	0	0
含样品培养基 (mL)	0	0	1	0
含槲皮素培养基 (mL)	0	0	0	1
37 °C，5% CO ₂ 培养箱中培养 18 h-24 h，除去培养液，PBS 缓冲液冲洗细胞 1 次，每孔加 1 mL PBS 缓冲液覆盖，使用铝箔纸将空白对照组覆盖，UVB 辐照。				
UVB 辐照	-	+	+	+
除去培养液，每孔加 1 mL 培养基，37 °C，5% CO ₂ 培养箱中孵育 18 h-24 h，除去培养液，PBS 缓冲液清洗 1 次，各组按要求加入 1 mL DCFH-DA 溶液。				
DCFH-DA 溶液 (mL)	1	1	1	1
平行次数	3 个/样	3 个/样	3 个/样	3 个/样

注：本实验中所有清洗步骤用移液器操作，每次吸取0.5 mL~1 mL的PBS缓冲液，吹吸时力度轻柔缓慢，并且一列一列的清洗。

评价体系在加入DCFH-DA溶液后，37 °C避光孵育30 min，PBS缓冲液洗涤细胞3次，用酶标仪以激发波长485 nm，发射波长538 nm进行荧光强度 (MFI) 测定。轻轻除去各孔PBS缓冲液后，立即裂解细胞提取细胞总蛋白，细胞总蛋白质含量测定应用BCA检测试剂盒方法检测。ROS用每mg蛋白质的荧光强度表示，即为：MFI/mg protein。

6.2.8 ROS 抑制率计算

ROS抑制率计算见公式 (2)。

$$I_{ROS}(\%) = \left(1 - \frac{ROS_S - ROS_B}{ROS_U - ROS_B}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中：

I_{ROS} ——ROS抑制率；

ROS_S ——样品组 ROS 数值；

ROS_B ——空白对照组 ROS 数值；

ROS_U ——UVB 模型组 ROS 数值。

6.3 过氧化氢诱导细胞中 ROS 的抑制能力

6.3.1 方法原理

皮肤细胞在一定量的H₂O₂作用下会发生过氧化反应，在细胞中产生大量的活性氧 (ROS)，ROS会损伤细胞致使细胞老化，在细胞培养体系中加入抗氧化物质，可以阻止细胞中ROS产生，ROS变化的量可反映受试物的抗氧化能力。

6.3.2 试剂与材料

- 6.3.2.1 通用要求：除非另有说明，该方法中所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。
- 6.3.2.2 成纤维细胞（L929）：建议来源于美国典型物质保藏中心（ATCC）或国家生物医学实验细胞资源库（BMCR）；其他细胞或细胞系也可用于本试验，但必须证明其等同性。
- 6.3.2.3 H_2O_2 溶液（0.2 mmol/L）：吸取浓度为 10 mol/L 的 H_2O_2 溶液，以血清培养基为溶剂，逐级稀释至 0.2 mmol/L，该溶液需现用现配。
- 6.3.2.4 其他试剂同 6.2.2。

6.3.3 仪器

- 6.3.3.1 CO_2 培养箱：（ $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ ）。
- 6.3.3.2 低速离心机。
- 6.3.3.3 生物安全柜。
- 6.3.3.4 全自动酶标仪：具荧光检测功能。
- 6.3.3.5 倒置显微镜。
- 6.3.3.6 分析天平（ $\pm 0.0001\text{ g}$ ）。

6.3.4 样本制备

样本制备如下：

- 水溶性样品：称取样品适量，加水充分混合均匀，0.22 μm 滤膜过滤除菌，配成一定浓度的样品母液，使用时以 H_2O_2 溶液（0.2 mmol/L）稀释，制备不同的浓度梯度；
- 非水溶性样品：称取样品，加无水乙醇充分溶解（如使用其他溶剂，需应用此方法验证溶剂无抗过氧化氢氧化化的活性），0.22 μm 滤膜过滤除菌，配成一定浓度的样品母液，使用时以 H_2O_2 溶液（0.2 mmol/L）稀释，制备不同的浓度梯度；
- 阳性对照样品（维生素 C）：样品母液配制同 6.1.4。使用时以 H_2O_2 溶液（0.2 mmol/L）稀释，制备不同的浓度梯度。

6.3.5 细胞培养

同 6.2.5。

6.3.6 细胞接种

取对数期细胞，接种到 24 孔板，接种密度 1×10^5 个/mL，培养 18 h–24 h。

6.3.7 评价体系

设置空白对照组（B）、 H_2O_2 对照组（H）、受试样品组（S）和阳性对照组（P），评价体系见表 3。

表3 抗氧化活性评价体系 (H₂O₂氧化模型)

	空白对照组 (B)	H ₂ O ₂ 对照组 (H)	样品组 (S)	阳性对照组 (P)
细胞株	成纤维细胞 L929			
细胞接种培养 18 h-24 h 后, 除去培养液, 各组按要求分别加入不同的溶液。				
培养基 (mL)	1	0	0	0
H ₂ O ₂ 溶液 (mL)	0	1	0	0
含样品的 H ₂ O ₂ 溶液 (mL)	0	0	1	0
含阳性对照样品的 H ₂ O ₂ 溶液 (mL)	0	0	0	1
37 °C, 5% CO ₂ 培养箱中培养 18 h-24 h, 除去培养液, PBS 缓冲液清洗 1 次。				
DCFH-DA 溶液 (mL)	1	1	1	1
平行次数	3 个/样	3 个/样	3 个/样	3 个/样

注: 本实验中所有清洗步骤用移液器操作, 每次吸取 0.5 mL~1 mL 的 PBS 缓冲液, 吹吸时力度轻柔缓慢, 并且一列一列的清洗。

评价体系在加入 DCFH-DA 溶液后操作, 荧光强度 (MFI) 测定、蛋白质含量检测、ROS 计算同 6.2.7。

6.3.8 ROS 抑制率计算

ROS抑制率计算见公式 (3)。

$$I_{ROS}(\%) = \left(1 - \frac{ROS_S - ROS_B}{ROS_H - ROS_B}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

- I_{ROS}——ROS抑制率;
- ROS_S——样品组ROS数值;
- ROS_B——空白对照组ROS数值;
- ROS_H——H₂O₂模型组ROS数值。

7 实验方法有效性验证

7.1 细胞抗氧化活性评价方法, 阳性对照样品维生素 C 的 CAA 值为正值, 则认为该评价方法有效。

7.2 光老化诱导 ROS 抑制能力评价中, 阳性对照样品槲皮素的 ROS 抑制率为正值, 且 UVB 对照组是空白对照组的 ROS 数值的 1.5 倍以上, 并具有统计学差异 (p<0.5), 则认为该评价方法有效。

7.3 过氧化氢诱导 ROS 抑制能力评价中, 阳性对照样品维生素 C 的 ROS 抑制率为正值, 且 H₂O₂ 对照组是空白对照组的 ROS 数值的 1.5 倍以上, 并具有统计学差异 (p<0.5), 则认为该评价方法有效。

8 抗氧化评价结果判定

8.1 细胞抗氧化能力评价中, 细胞抗氧化活性 CAA 值为正值, 即表明受试物具有抗氧化活性, 抗氧化能力与 CAA 值具有正相关性, CAA 值越高, 抗氧化能力越强。

8.2 光老化诱导 ROS 抑制能力评价中, ROS 抑制率为正值, 即表明受试物具有抗氧化活性, 抗氧化能力与抑制率值具有正相关性, 抑制率的值越高, 抗氧化能力越强。

8.3 过氧化氢诱导 ROS 抑制能力评价中, ROS 抑制率为正值, 即表明受试物具有抗氧化能力, 抗氧化能力与抑制率值具有正相关性, 抑制率的值越高, 抗氧化能力越强。

全国团体标准信息平台