

T/GDCA

广东省化妆品学会团体标准

T/GDCA 011—2021

化妆品 抗氧化活性的评价 化学评价法

Cosmetics-Determination of Antioxidant-Chemical Methods

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2022.06.15）

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

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 缩略语 1

5 评价方法 1

6 评价方法选择 6

7 实验方法有效性验证 6

8 抗氧化评价结果判定 6

参考文献 7

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：

本文件主要起草人：

化妆品 抗氧化活性的评价 化学评价法

1 范围

本文件规定了运用化学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（膏霜、乳液、凝胶、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

本文件没有规范性引用文件。

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，而达到有效抑制自由基氧化的反应。

3.2

自由基 Free radicals

化学上也称为“游离基”，是指化合物的分子在光热等外界条件下，共价键发生均裂而形成的具有不成对电子的原子或基团。

3.3

活性氧 Reactive Oxygen Species (ROS)

指含氧的化学反应性物质，泛指氧来源的自由基和非自由基，包含了超氧阴离子（ $O_2^{\bullet-}$ ）、过氧化氢（ H_2O_2 ）、羟基自由基（ $\bullet OH$ ）、臭氧（ O_3 ）和单线态氧（ 1O_2 ）。

3.4

半抑制浓度 Half maximal inhibitory concentration, IC50

在抗氧化评价方法的体系中，清除掉体系中50%自由基时受试物的浓度。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ORAC: 抗氧化能力指数 (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

$O_2^{\bullet-}$: 超氧阴离子自由基 (Superoxide anion radical)

TE: 水溶性维生素E类似物 (Trolox)

$\bullet OH$: 羟基自由基 (Hydroxyl radical)

5 评价方法

5.1 超氧自由基清除能力

5.1.1 方法原理

邻苯三酚在碱性条件下迅速自氧化，在自氧化过程中会产生 $O_2^{\bullet-}$ ，同时生成有色中间产物，该产物在325nm有强烈的光吸收。该体系中加入具有抗氧化活性的物质，可以抑制邻苯三酚自氧化，阻止 $O_2^{\bullet-}$ 和中间产物的积累，从而使325nm吸光度发生变化，以此可评价受试物对超氧自由基的清除作用。

5.1.2 试剂

5.1.2.1 Tris-HCl 缓冲液 (0.05mol/L pH8.2)

Tris-HCl缓冲液配制如下:

- a) 0.1mol/L Tris 溶液: 精密称取三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 12.140g, 加蒸馏水充分混合均匀, 定容至 1000mL。
- b) 0.1mol/L 盐酸溶液: 精密量取浓盐酸 (12mol/L) 4.2mL, 加蒸馏水充分混合均匀, 定容至 500mL;
- c) 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.2): 将 0.1mol/L Tris 溶液、0.1mol/L 盐酸溶液、蒸馏水以 500:229:271 (V:V:V) 比例混合均匀。

5.1.2.2 邻苯三酚溶液 (20mmol/L)

精密称取邻苯三酚252.2mg, 加0.05mol/L盐酸溶液溶解, 定容至100mL。使用时稀释10倍。

5.1.3 仪器

所需仪器如下:

- 紫外分光光度计
- 恒温水浴锅

5.1.4 样本制备

样本制备如下:

- 精密称取样品, 加蒸馏水充分混合均匀, 配成一定浓度的样品母液。使用时以蒸馏水稀释成不同浓度梯度 (最佳浓度梯度选择需经预实验确定)。
- 阳性对照样品 (维生素 C): 精密称取维生素 C 标准物质 100mg, 加蒸馏水充分混合均匀, 定容至 10mL, 配成浓度 10mg/mL 的样品母液, 使用时以蒸馏水稀释成不同浓度梯度 (最佳浓度梯度选择需经预实验确定)。

5.1.5 评价体系

评价体系设置空白对照组 (B)、样品组 (S)、样品本底组 (S0)、阳性对照组 (P), 评价体系如表1。

表1 评价体系 (超氧阴离子清除实验)

	空白组 (B)	样品组 (S)	样品本底组 (S0)	阳性对照组 (P)
Tris-HCl 缓冲液 (mL)	4.5	4.5	0	4.5
样品溶液 (mL)	0	1	1	0
阳性样品 VC (mL)	0	0	0	1
水 (mL)	1	0	5	0
邻苯三酚溶液 (mL)	0.5	0.5	0	0.5
平行次数	3 次/样	3 次/样	3 次/样	3 次/样

注: 阳性对照样品实验操作同样品组的实验操作, 需设定样品本底空白并扣除。

在加入邻苯三酚溶液前, 评价体系与邻苯三酚需在 25℃水浴中恒温 20min, 加入邻苯三酚启动反应, 25℃恒温反应 5min, 于波长 325nm 处测定吸光度值。

5.1.6 超氧阴离子清除率计算

超氧阴离子清除率计算公式见式 (1)。

$$CL_0(\%) = \left(\frac{A_B - (A_S - A_{S0})}{A_B} \right) \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

CL₀——超氧阴离子清除率；
A_B——空白组吸光度值；
A_S——样品对照组吸光度值；
A_{S0}——样品本底组吸光度值。

5.1.7 IC50 计算

应用ORIGIN 8.5软件，以样品溶液浓度为横坐标，以自由基清除率（%）为纵坐标，制作样品溶液清除率曲线，应用“由Y值找X值工具”找到清除率50%时对应的溶液浓度，即为IC50值。

5.2 羟基自由基清除能力

5.2.1 方法原理

Fenton反应生成的羟自由基可以将橘红色的邻二氮菲-Fe²⁺溶液氧化成邻二氮菲-Fe³⁺，反应，从而使邻二氮菲-Fe²⁺在536nm处的吸收峰消失，该体系中加入具有抗氧化活性的物质，会减少羟自由基的生成，从而使536nm吸光度发生变化，以此可评价受试物对羟自由基的清除作用。

5.2.2 试剂

5.2.2.1 邻二氮菲溶液（0.75mmol/L）

精密称取邻二氮菲1.487g，加无水乙醇充分溶解，定容至100mL，使用时以蒸馏水稀释100倍。

5.2.2.2 磷酸盐缓冲溶液（0.2mol/L，pH7.4）

磷酸盐缓冲溶液配制如下：

- 0.2mol/L 的 Na₂HPO₄：精密称取 Na₂HPO₄·12H₂O 31.2g，加蒸馏水充分混合均匀，定容至 1000mL。
- 0.2mol/L 的 NaH₂PO₄：精密称取 NaH₂PO₄·2H₂O 35.6g，加蒸馏水充分混合均匀，定容至 1000mL。
- 0.2mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲溶液配制：取 19mL 0.2mol/L 的 Na₂HPO₄和 81mL 0.2mol/L 的 NaH₂PO₄，充分混合均匀。

5.2.2.3 硫酸亚铁溶液（0.75mmol/L）

精密称取2.085g FeSO₄·7H₂O，加蒸馏水充分混合均匀，定容至100mL，使用时以蒸馏水稀释10倍。

5.2.2.4 H₂O₂溶液（0.01%）

取30% H₂O₂溶液，以去离子水逐级稀释3000倍，获得0.01% H₂O₂溶液。

5.2.3 仪器

所需仪器如下：

——紫外分光光度计
——恒温水浴锅

5.2.4 样本制备

样本制备如下：

- 水溶性样品：精密称取样品，加蒸馏水充分混合均匀，配成一定浓度的样品母液。使用时以蒸馏水稀释成不同浓度梯度（最佳浓度梯度选择需经预实验确定）。
- 非水溶性样品：精密称取样品，加无水乙醇充分混合均匀，配成一定浓度的样品母液。使用时以无水乙醇稀释成不同浓度梯度（最佳浓度梯度选择需经预实验确定）。
- 阳性对照样品（维生素C）：同 5.1.4。

5.2.5 评价体系

实验体系设置空白对照组（B）、样品组（S）、样品本底组S0、损伤组（N）、未损伤组（N0）、阳性对照组（P），实验体系如表2。

表2 评价体系（羟基自由基清除实验）

	空白组 (B)	样品组 (S)	样品本底组 (S0)	损伤组 (N)	未损伤组 (N0)
邻氮二菲溶液（mL）	0	1	0	1	1
FeSO ₄ 溶液（mL）	0	1	0	1	1
PBS 缓冲液（mL）	2	2	2	2	2
样品溶液（mL）	0	1	1	0	0
H ₂ O（mL）	4	0	3	1	2
H ₂ O ₂ 溶液（mL）	0	1	0	1	0
平行次数	3 次/样	3 次/样	3 次/样	3 次/样	3 次/样

注：阳性对照样品维生素C实验操作同样品组的实验操作。

实验体系于37℃下水浴60min，于536nm下测定吸光度值。

5.2.6 羟基自由基清除率计算

羟基自由基清除率计算公式见式（2）。

$$CL_{OH}(\%) = \frac{(A_S - A_{S0}) - (A_N - A_B)}{(A_N - A_B) - (A_{N0} - A_B)} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- CL_{OH}——羟基自由基清除率；
- A_S——样品组吸光度值；
- A_{S0}——样品本底组吸光度值；
- A_N——损伤组吸光度值；
- A_{N0}——未损伤组吸光度值；
- A_B——空白组吸光度值。

5.2.7 IC50 计算

同5.1.7。

5.3 抗氧化能力指数（ORAC）

5.3.1 方法原理

自由基2, 2'-偶氮-双-(2-脒基丙烷) 氯化二氢（AAPH）热分解产生的过氧化氢自由基，过氧化氢自由基与荧光探针荧光素钠（FL）反应，会导致探针荧光强度的衰退。加入抗氧化物质，可以延缓荧光衰退的进程，从而可评价受试物的抗氧化活性。以水溶性维生素E类似物(Trolox) 当量为基准，获得抗氧化能力指数（Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC），简称ORAC指数。

5.3.2 试剂

5.3.2.1 磷酸钾缓冲液（PBS, 75mmol/L pH7.4）

磷酸钾缓冲液的配制如下：

- a) 精密称取 KH₂PO₄ 0.9696g，加 95mL 蒸馏水充分混合均匀。
- b) 精密称取 KH₂PO₄ · 3H₂O 6.9322g，加 405mL 蒸馏水充分混合均匀。
- c) 将上述两种溶液充分混合，得到最终浓度为 75mmol/L 的缓冲液。

5.3.2.2 荧光素钠溶液（630nmol/L）

精密称取荧光素钠药品23.8mg，加缓冲液充分混合均匀，定容至100mL，溶液于4℃保存备用，使用时以缓冲液稀释1000倍。

5.3.2.3 自由基 AAPH 溶液 (18.2875mmol/L)

精密称取495.938mg，加缓冲液充分混合均匀，定容至100mL。

5.3.2.4 水溶性维生素 E 标准物质 (Trolox, 10 μmol/L)

精密称取水溶性微生物E类似物Trolox 25.03mg，加缓冲液充分混合均匀，定容至10mL，使用时以缓冲液稀释1000倍。

5.3.3 仪器

酶标仪。

5.3.4 样品制备

同5.2.4。

5.3.5 评价体系

实验体系设样品组(S)、AAPH对照组(+AAPH组)、溶剂对照组(-AAPH组)、Trolox对照组(T)，实验体系如表3。

表3 评价体系(抗氧化能力指数ORAC法)

	AAPH 对照组	样品组	Trolox 对照组	溶剂对照组
	(+AAPH)	(S)	(T)	(-AAPH)
样品溶液 (μL)	0	20	0	0
Trolox 溶液 (μL)	0	0	20	0
PBS (μL)	40	20	20	180
荧光素钠 (μL)	20	20	20	20
AAPH (μL)	140	140	140	0
平行次数	3/样	3/样	3/样	1/样

评价体系(除AAPH溶液外)在37℃下预置5min后，用多道移液器迅速在各孔中加入140 μL的AAPH溶液启动反应，微孔板置于荧光分析仪中，在37℃恒温下以激发波长485nm，发射波长538nm进行连续测定，每2min测定一次各孔荧光强度，测定时间一般设定在荧光衰减呈基线后为止。

5.3.6 抗氧化能力指数 ORAC 值计算

抗氧化能力指数ORAC值计算公式见式(3)。

$$ORAC = \frac{(AUC_S - AUC_{+AAPH})}{(AUC_T - AUC_{+AAPH})} \times \frac{M_T}{M_S} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

ORAC——抗氧化能力指数ORAC值，单位 (μmol TE/mg)

AUC_S——样品组荧光曲线下面积；

AUC_{+AAPH}——AAPH 组荧光曲线下面积；

AUC_T——Trolox 组荧光曲线下面积；

M_T——Trolox 溶液浓度 μmol/mL；

M_s ——样品溶液浓度 mg/mL。

6 评价方法选择

- 6.1 化学评价体系方法选择应考虑受试物溶解性，根据受试物溶解性特点选择相应的评价方法；
- 6.2 超氧自由基清除能力评价方法仅适用于水溶性样本评价；
- 6.3 抗氧化评价方法选择应考虑受试物作用机制特点，根据清除自由基类别选择相应的评价方法；
- 6.4 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。

7 实验方法有效性验证

- 7.1 清除 $O_2^{\bullet-}$ 和 $\bullet OH$ 自由基的评价方法中，维生素 C 清除率为正值，则认为该评价方法有效。
- 7.2 抗氧化能力指数 (ORAC) 评价中，Trolox 具有淬灭自由基荧光的能力，且能力与浓度成正相关，则认为该评价方法有效。

8 抗氧化评价结果判定

- 8.1 清除 $O_2^{\bullet-}$ 和 $\bullet OH$ 自由基的评价方法中，清除率为正值，即表明受试物具有抗氧化活性。
- 8.2 抗氧化能力指数 (ORAC) 评价中，ORAC 为正值，即表明受试物具有抗氧化活性，抗氧化能力与 ORAC 呈正相关，ORAC 值越高，抗氧化能力越强。

参 考 文 献

- [1] GB/T1.1《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写规则》.
 - [2] GB/T 6682分析实验室用水规格和试验方法.
-