

T/GDCA

广东省化妆品学会团体标准

T/GDCA 012—2021

化妆品 抗氧化活性的评价 细胞评价法

Cosmetics-Determination of Antioxidant-Cellular Methods

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2022.6.15）

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

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 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（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

活性氧 Reactive Oxygen Species (ROS)

指含氧的化学反应性化学物质，泛指氧来源的自由基和非自由基，包含了超氧阴离子（ $O_2^{\cdot-}$ ）、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 ）。

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 评价方法

5.1 细胞抗氧化活性试验（CAA）

5.1.1 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。

5.1.2 试剂与材料

所需的试剂与材料如下：

——EMEM 培养基

——甲醇

——胎牛血清（FBS）

——胰酶（0.25%-EDTA）

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

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

- 无水乙醇
- L-抗坏血酸（维生素 C，CAS：50-81-7）
- PBS 缓冲液（PBS，0.01mol/L pH7.4）
 - 精密称取 KH_2PO_4 药品0.24g， Na_2HPO_4 药品1.44g，NaCl药品8.0g，KCl药品0.2g，900mL蒸馏水充分混合均匀，调PH值7.4，定容至1000mL，于121℃下高压灭菌20min。
- 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯（DCFH-DA）溶液
 - DCFH-DA储备液（10mmol/L）：精密称取DCFH-DA药品0.0049g，加1mL甲醇充分溶解，分装（100 μL /管），-20℃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使用液（25 $\mu\text{mol/L}$ ）：精密吸取DCFH-DA储备液2.5 μL ，加1mL无血清培养基充分混匀，现用现配。
- 2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐（AAPH）
 - 精密称取AAPH药品0.0543g，加PBS缓冲液（5.1.2.9）充分溶解混匀，配成浓度为200mmol/L AAPH储备液，冻存管分装（100 μL /管），-20℃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（5.1.2.9）为溶剂稀释至600 $\mu\text{mol/L}$ ，现用现配，避光操作。

5.1.3 仪器

所需仪器如下：

- 多功能酶标仪。
- CO₂培养箱（±1℃）。
- 生物安全柜。
- 倒置显微镜。
- 天平（±0.0001g）。

5.1.4 样本制备

样本制备如下：

- 水溶性物质：精密称取样品，以蒸馏水充分混合均匀，0.22 μm 滤膜过滤除菌，配成样品母液，2-8℃下避光保存。使用时用含 25 μM DCFH-DA 无血清培养基稀释制备成不同的浓度梯度。
- 非水溶性物质：精密称取样品，以助溶剂乙醇充分溶解，0.22 μm 滤膜过滤，配成样品母液，2-8℃下避光保存。使用时用含 25 μM 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）：精密称取维生素 C 样品 200.0mg，以蒸馏水充分混合均匀，定容至 10mL，0.22 μm 滤膜过滤除菌，配成 20mg/mL 样品母液，2-8℃下避光保存，储存时间不超过 3 个月。使用时以完全培养基溶液稀释，制备不同的浓度梯度。

5.1.5 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。

5.1.6 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24h。

5.1.7 评价体系

设置空白对照组（B）、氧化对照组（O）和样品组（S），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	氧化对照组	样品组	阳性对照组
	(B)	(O)	(S)	(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 使用液（μ L）	100	100	0	0
含样品的 DCFH-DA 溶液（μ L）	0	0	100	0
含维生素 C 的 DCFH-DA 溶液（μ L）	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 启动反应 ²				
PBS 缓冲液（μ L）	100	0	0	0
AAPH 使用液（μ L）	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538nm进行连续测定，每5min测定一次荧光强度，持续测定1h。

5.1.8 细胞抗氧化 CAA 值计算

5.1.8.1 数据预处理

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

5.1.8.2 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。

$$CAA = \left(1 - \frac{AUC_S - AUC_B}{AUC_0 - AUC_B}\right) \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

AUC₀——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。

5.2 光老化诱导细胞中 ROS 的抑制能力

5.2.1 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簇（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。

5.2.2 试剂与材料

所需试剂与材料如下：

——成纤维细胞（L929）

——EMEM 培养基

——胎牛血清

——胰酶（0.25%-EDTA）

——BCA 蛋白检测试剂盒

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

- 槲皮素 (CAS: 117-39-5)
- PBS 缓冲液 (0.01mol/L pH7.4)
- 配制同 5.1.2.9。
- 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 溶液
 - DCFH-DA储备液 (10mmol/L): 精密称取DCFH-DA药品0.0049g, 加1mL甲醇充分溶解, 分装 (100 μ L/管), -20℃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使用液 (10 μ mol/L): 精密吸取DCFH-DA储备液1 μ L, 加1mL无血清培养基充分混匀, 现用现配。

5.2.3 仪器

所需仪器如下:

- CO₂培养箱: ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- 低速离心机
- 生物安全柜
- 全自动酶标仪
- 紫外辐照计
- 倒置荧光显微镜
- 天平 ($\pm 0.0001\text{g}$)
- 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308nm), 灯管距离箱子底部垂直距离约15cm, 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。

5.2.4 样本制备

样本制备如下:

- 水溶性物质: 精密称取样品, 以蒸馏水充分混合均匀, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 配成一定浓度的样品母液, 使用时以完全培养基溶液稀释, 制备不同的浓度梯度。
- 非水溶性物质: 精密称取样品, 以无水乙醇充分溶解, 0.22 μm 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): 精密称量槲皮素样品 20mg, 以无水乙醇充分溶解, 定容至 10mL, 0.22 μm 滤膜过滤, 配成 2mg/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。

5.2.5 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, 于37℃, 5% CO₂培养箱中培养, 倒置荧光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。

5.2.6 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18-24h。

5.2.7 评价体系

设置空白对照组 (B)、UVB对照组 (U) 和受试样品组 (S), 阳性对照组 (P), PBS缓冲液冲洗细胞1次, 每孔加1mL 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	UVB 对照组	样品组	阳性对照组
	(B)	(U)	(S)	(P)
细胞株	成纤维细胞 L929			
细胞接种培养 18-24h 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℃，5% CO ₂ 培养箱中培养 18-24h，除去培养液，PBS 缓冲液冲洗细胞 1 次，每孔加 1mL 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 1mL 培养基，37℃，5% CO ₂ 培养箱中孵育 18-24h，除去培养液，PBS 缓冲液清洗 1 次，各组按要求加入 1mL 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0.5-1mL的PBS缓冲液，吹吸时力度轻轻缓慢，并且一列一列的清洗。

评价体系在加入DCFH-DA溶液后，37℃避光孵育30min，PBS缓冲液洗涤细胞3次，用荧光分析仪以激发波长485nm，发射波长538nm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。

5.2.8 ROS 抑制率计算

ROS抑制率计算见公式（2）。

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

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。

5.3 过氧化氢诱导细胞中 ROS 抑制能力

5.3.1 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簇（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。

5.3.2 试剂与材料

5.3.2.1 H₂O₂溶液（0.2mmol/L）

精密吸取浓度为10mmol/L 的H₂O₂溶液，以血清培养基为溶剂，逐级稀释至0.2mmol/L，该溶液需现用现配。

5.3.2.2 其他试剂同 5.2.2。

5.3.3 仪器

同5.2.3。

5.3.4 样本制备

样本制备如下：

- 水溶性物质：精密称取样品，以蒸馏水充分混合均匀，0.22 μm 滤膜过滤除菌，配成一定浓度的样品母液，使用时以 H₂O₂ 溶液（0.2mmol/L）稀释，制备不同浓度梯度。
- 非水溶性物质：精密称取样品，以无水乙醇充分溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌，配成一定浓度的样品母液，使用时以 H₂O₂ 溶液（0.2mmol/L）稀释，制备不同浓度梯度。
- 阳性对照样品（维生素 C）：同 5.1.4。

5.3.5 细胞培养

同5.2.5。

5.3.6 细胞接种

取对数期细胞，接种到24孔板，接种密度1×10⁵个/mL，培养18-24h。

5.3.7 评价体系

设置空白对照组（B）、H₂O₂对照组（H）、受试样品组（S）及阳性对照组（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	H ₂ O ₂ 对照组	样品组	阳性对照组
	(B)	(H)	(S)	(P)
细胞株	成纤维细胞 L929			
细胞接种培养 18-24h 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	1
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℃，5% CO ₂ 培养箱中培养 18-24h，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 0.5-1mL 的 PBS 缓冲液，吹吸时力度轻轻缓慢，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 5.2.7。

5.3.8 ROS 抑制率计算

ROS抑制率计算如下：

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

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 —— H_2O_2 模型组ROS数值。

6 抗氧化活性评价方法选择

- 6.1 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；
- 6.2 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；
- 6.3 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。

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 H_2O_2 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。

参 考 文 献

- [1] GB/T《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.
-