

团 体 标 准

T/LNPC 016-2024

化妆品原料抗氧化功效评价试验方法

Test method for anti-oxidant 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 H ₂ O ₂ 刺激	2
7.3 样品收集处理	2
7.4 试验步骤	2
8 结果计算	3
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、沈阳美研化妆品有限公司、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、辽宁花青农业科技有限公司

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、刘梓霖、孔翔翔、苏珊、苏新、张轶、张国英、王雅琼、马冬梅、张智琦

化妆品原料抗氧化功效评价试验方法

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抗氧化功效试验方法。
本文件适用于具有生物学抗氧化作用的化妆品原料抗氧化功效试验。
本文件可作为化妆品原料抗氧化功效试验方法之一，对化妆品原料抗氧化功效进行评价。

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

环境应激导致自由基的积累是皮肤衰老症状出现的关键因素之一。角质层过量的自由基积聚时，皮肤发生氧化或过氧化损伤，会出现色斑、皱纹等问题。皮肤的氧化或过氧化损伤是皮肤衰老和美容的大敌。因此，增强皮肤抗氧化系统和天然抗氧化剂的作用是皮肤美容的一个重要组成部分。

本文件通过检测加入化妆品原料后，人表皮角质形成细胞中核因子红细胞相关因子2（NRF2）蛋白表达量相对H₂O₂对照组的变化倍数，反映化妆品原料是否对皮肤有抗氧化功效。

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 分析天平：精度 0.1mg。
- 5.5 微量移液器：5000 μL、1000 μL、200 μL、20 μL。
- 5.6 垂直电泳槽
- 5.7 电泳仪
- 5.8 半干转膜仪
- 5.9 凝胶成像仪

6 试剂和耗材

- 6.1 人表皮角质形成细胞（HaCaT 细胞）
- 6.2 DMEM 培养基
- 6.3 过氧化氢
- 6.4 0.25%胰蛋白酶（无菌）
- 6.5 PBS 磷酸盐缓冲液（无菌）
- 6.6 Western & IP 裂解液
- 6.7 PMSF
- 6.8 PAGE 预制胶（Tris-Gly，12%）

- 6.9 NRF2 Rabbit Polyclonal Antibody
- 6.10 GAPDH Rabbit Monoclonal Antibody
- 6.11 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG
- 6.12 ECL 化学发光试剂盒
- 6.13 Western 半干法转膜液
- 6.14 PVDF 膜
- 6.15 转印滤纸
- 6.16 一抗稀释液
- 6.17 二抗稀释液
- 6.18 电泳封闭液
- 6.19 电泳洗涤液
- 6.20 5×loading buffer

7 试验步骤

7.1 体外模型的准备

7.1.1 细胞培养

将人角质形成细胞用胰蛋白酶作用5min~10min后，用DMEM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2mL/孔接种到35mm培养皿中，然后置于CO₂培养箱培养48h。

7.1.2 给予化妆品原料

待细胞生长到融合度为80%~85%时，即可试验。试验设置空白对照组、H₂O₂对照组和化妆品原料组。称取一定量的化妆品原料，将其用DMEM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。

用微量移液器吸干平皿内的培养基；加入2mLPBS清洗细胞一次，再吸干各孔。空白对照组每孔加入2mL空白培养基、对照组每孔仅加入1mL空白培养基，化妆品原料组每孔加入1mL含有化妆品原料的培养基。

7.2 H₂O₂ 刺激

H₂O₂用培养基稀释至50μg/mL，对照组和化妆品原料组每孔加入1mL，摇匀，继续培养4h。

7.3 样品收集处理

培养4h后，吸掉培养液，加入1mL PBS清洗细胞1次，再吸干各孔。每孔加入300μL裂解液，收集裂解物至1.5mL EP管中，13000 g/min离心5min，收集上清，用Western Blotting检测NRF2的蛋白表达水平。

7.4 试验步骤

7.4.1 样品加入 5×loading buffer，混合均匀，95℃水浴加热 5min，13000 g/min 离心 5 min，收集上清。

7.4.2 垂直电泳，Marker 上样 5μL，样品上样 60μg/孔。

7.4.3 浓缩胶电泳条件：80V；分离胶电泳条件：120V。

7.4.4 电泳结束后，取出凝胶，进行半干式转印至 PVDF 膜上，转印条件为 20V，45min。

7.4.5 转印结束后，取出 PVDF 膜加入电泳封闭液封闭 5min。

7.4.6 按照目标蛋白和内参蛋白的分子量将膜裁剪成两半，然后分别放入用一抗稀释液稀释的 NRF2 Rabbit Polyclonal Antibody (1:1000) 和 GAPDH Rabbit Monoclonal Antibody (1:1000) 中室温振荡孵育 1h。

7.4.7 取出 PVDF 膜，加入电泳洗涤液中，室温振荡洗涤 3 次，每次 5min。

7.4.8 取出 PVDF 膜，加入二抗稀释液稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (1:2000)，室温振荡

孵育 40min。

7.4.9 取出 PVDF 膜，加入电泳洗涤液中，室温振荡洗涤 3 次，每次 5min。

7.4.10 ECL 发光试剂盒的 A、B 液 1:1 混合，取出 PVDF 膜后放入，避光孵育 5min。

7.4.11 用凝胶成像仪显影，并用软件进行条带灰度分析。

8 结果计算

各组 NRF2 蛋白相对表达量标准化计算：

$$PRE = PG_{目} / PG_{内} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

PRE：目标蛋白相对表达量；

PG_目：目标蛋白灰度值；

PG_内：内参蛋白灰度值。

蛋白表达变化倍数计算：

$$FC_1 = (PRE_{H_2O_2} / PRE_{空}) \dots\dots\dots (2)$$

$$FC_2 = (PRE_{化} / PRE_{H_2O_2}) \dots\dots\dots (3)$$

式中：

FC₁：即 Fold change 1，化妆品原料组目标蛋白质的表达水平相对于 H₂O₂ 对照组的变化倍数；

FC₂：即 Fold change 2，化妆品原料组目标蛋白质的表达水平相对于空白对照组的变化倍数；

PRE_化：化妆品原料组目标蛋白相对表达量；

PRE_{H₂O₂}：H₂O₂ 对照组目标蛋白相对表达量；

PRE_空：空白对照组目标蛋白相对表达量。

9 结果判定

全部符合以下条件说明化妆品原料具有抗氧化功效：

(1) FC₁ 小于 1。

(2) FC₂ 大于 1。

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.
-