ICS 71.100.70
CCS Y42

# T/GDICST

## 广东省化妆品科学技术研究会团体标准

T/GDICST XXXX—XXXX

# 化妆品 自由基防护指数（RPF）测定方法

Method for Determination of Radical Protection Factor (RPF) for Cosmetics

（征求意见稿）

**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

广东省化妆品科学技术研究会　　发 布

内部讨论资料，严禁非法授权

# 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 原理 ..... 3
5 仪器 ..... 3
6 试剂 ..... 4
6.1 通用要求 ..... 4
6.2 DPPH（1,1-二苯基-2-三硝基苯肼） ..... 4
6.3 DPPH 溶液（1mM） ..... 4
6.4 无水乙醇 ..... 4
6.5 阳性对照：L-抗坏血酸（维生素 C） ..... 4
7 实验方法 ..... 4
7.1 检测样品的 $IC_{50}$ 值 ..... 4
7.2 检测样品的 RPF 值 ..... 5
8 结果计算 ..... 5
附　录　A　（资料性）　数据处理示范 ..... 6

内部讨论资料，严禁非法授权

# 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》和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。

本文件由上海百雀羚化妆品有限公司提出。

本文件由广东省化妆品科学技术研究会归口。

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。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

内部讨论资料，严禁非法授权

# 化妆品 自由基防护指数（RPF）测定方法

## 1 范围

本标准规定了使用电子顺磁共振波谱仪测定化妆品自由基防护指数的方法。
本标准也适用于化妆品原料的自由基防护指数测定。

## 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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
JY/T 0579 电子顺磁共振波谱分析方法通则

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1
**自由基 Radical**
含有一个或多个未成对电子的分子实体。

3.2
**半抑制浓度 Half-maximal inhibitory concentration, $IC_{50}$**
体外自由基清除实验中，将自由基数量清除50%所需的化妆品或化妆品原料的浓度。

3.3
**自由基防护指数 Radical protection factor, RPF**
在体外自由基清除实验中，用于量化化妆品或化妆品原料对抗特定自由基的相对效能的指标。它是一个无量纲的值，数值越大，表明该物质的自由基清除能力越强。

## 4 原理

电子顺磁共振（electron paramagnetic resonance, EPR）波谱或称电子自旋共振（electron spin reso-nance, ESR）波谱是一种研究含有未成对电子的磁性物质结构的分析方法。自由基为未成对电子，该技术特别适合自由基的探测。本标准通过ESR技术，测定每毫克待测物清除自由基的数量，并用自由基防护指数（RPF）来表征其清除自由基的能力。

## 5 仪器

1） 电子顺磁共振波谱仪（Magnettech ESR5000，Bruker，Germany）或类似；
2） 酶标仪（MultiskanTM SkyHigh，Thermo Scientific，USA）或类似；
3） 电子天平：感量 0.1 mg；
4） 涡旋振荡器；
5） 冷冻高速离心机；
6） 恒温摇床；
7） 可调节移液枪；
8） EP 管（小型离心管）；
9） 高纯石英或优质玻璃制成的毛细管。



内部讨论资料，严禁非法授权

## 6 试剂

### 6.1 通用要求

除有另外说明外，所用试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682规定的一级水。

### 6.2 DPPH（1,1-二苯基-2-三硝基苯肼）

CAS号：1898-66-4。

### 6.3 DPPH 溶液（1mM）

准确称量DPPH药品39.4 mg，用无水乙醇溶解并移入100 mL容量瓶中定容，4℃避光保存。

### 6.4 无水乙醇

CAS号：64-17-5。

### 6.5 阳性对照：L-抗坏血酸（维生素 C）

含量≥99.0%，CAS号：50-81-7。

## 7 实验方法

### 7.1 检测样品的 $IC_{50}$ 值

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（简称 DPPH）是一种稳定的长寿命自由基，其乙醇溶液呈深紫色，在 517nm 附近有强吸收。DPPH 与样品之间的反应所引起的颜色变化，可以反映出 DPPH 自由基的浓度变化。通过测量 DPPH 与样品反应前后 517 nm 处吸光度的变化，可以计算出样品对 DPPH 自由基的清除率。例如，若样品能使 DPPH 溶液的吸光度降低 50%，则其半数抑制浓度（$IC_{50}$）即为该浓度。为保证 RPF 值测定的准确性，样品对于 DPPH 自由基的清除率需设定在 20%-80%之间，因此选择测试样品的 $IC_{50}$ 值作为后续检测样品 RPF 值的样品浓度。

注：如果无法获得待测样品的$IC_{50}$值，则不适用于本标准方法。

测试步骤如下：

1) 称量待测样品的质量，用无水乙醇作为溶剂，配制 6 个浓度梯度的样品溶液，为保证 $IC_{50}$ 计算的准确性，样品溶液的浓度梯度必须设置在清除率 20%-80%的范围内。
2) 称量 L-抗坏血酸的质量，用无水乙醇作为溶剂配制 6 个浓度梯度的 L-抗坏血酸溶液，为保证 $IC_{50}$ 计算的准确性，L-抗坏血酸溶液的浓度梯度必须设置在清除率 20%-80%的范围内。
3) 参照表 1，将无水乙醇、样品溶液和 L-抗坏血酸溶液分别与 1mM DPPH 乙醇溶液等比例混合于 EP 管中，获得空白对照组、样品组和阳性对照组。样品溶液和无水乙醇等比例混合于 EP 管中，获得溶剂对照组。

表 1 $IC_{50}$ 测试溶液配置表

| | 空白对照组 | 样品组 | 阳性对照组 | 溶剂对照组 |
|---|---|---|---|---|
| DPPH溶液（mL） | 1 | 1 | 1 | / |
| 样品溶液（mL） | / | 1 | / | 1 |
| 无水乙醇（mL） | 1 | / | / | 1 |
| L-抗化血酸溶液（mL） | / | / | 1 | / |

4) 将以上 4 组别的样品 EP 管密封好，在恒温 25℃ 摇床上进行避光反应 24 小时。
5) 反应完成后，5000 rpm 离心 10 min，取上清液用酶标仪进行样品检测。
6) 酶标仪检测：每个样品取 200 μL 上清液加到微孔板上，用酶标仪检测 517 nm 处的吸光度。分别获得空白对照组、样品组、阳性对照组和溶剂对照组的吸光度，以 $A_{空白}$、$A_{样品}$、$A_{阳性对照}$ 和 $A_{溶剂对照}$ 表示。每个样品设置 3 个平行，取平均值。
7) DPPH 自由基清除率计算：

阳性对照组的自由基清除率计算公式：Vc 自由基清除率(%)=[[$A_{空白}$-($A_{阳性对照}$-$A_{溶剂对照}$)]÷$A_{空白}$]×100%

样品组的自由基清除率计算公式：样品自由基清除率(%)=[[$A_{空白}$-($A_{样品}$-$A_{溶剂对照}$)]÷$A_{空白}$]×100%

8） $IC_{50}$计算：将样品浓度与对应的 DPPH 清除率数据，在数据处理软件（如 GraphPad Prism）中以散点图形式呈现，并进行线性回归，确保拟合直线的相关系数 $R^2 \geq 0.9$。根据回归方程，计算 DPPH 抑制率为 50%时对应的样品浓度，即为该受试样品的 $IC_{50}$值。

### 7.2 检测样品的 RPF 值

1） 用无水乙醇重新配制浓度为 $IC_{50}$ 值的样品溶液和 L-抗坏血酸溶液。称量样品时需精确到 0.1mg。

2） 参照表 2，将无水乙醇、样品溶液和 L-抗坏血酸溶液分别与 1mM DPPH 乙醇溶液等比例混合于 EP 管中。获得空白对照组、样品组和阳性对照组。

表 2 RPF 测试溶液配制表

| | 空白对照组 | 样品组 | 阳性对照组 |
|---|---|---|---|
| DPPH溶液（mL） | 1 | 1 | 1 |
| 样品溶液（mL） | / | 1 | / |
| 无水乙醇（mL） | 1 | / | / |
| L-抗坏血酸溶液（mL） | / | / | 1 |

3） 将上述 3 组别样品的 EP 管密封好，在恒温 25℃摇床上进行避光反应 24 小时。

4） 反应完成后，5000 rpm 离心 10 min，取上清液依次用 ESR 仪器进行样品检测。

5） ESR 检测：用毛细管吸取约 20 μL 上清液样品，取样结束后用封蜡板将毛细管底部密封，随后放入 ESR 仪器中检测。分别获得空白对照组和样品组的被捕获自由基数量 R1、R2。每个样品设置 3 个平行，取平均值。

注：按照 RPF 计算公式算出阳性对照组的 RPF 值，若阳性对照组 RPF 值的在 47500±2500 以内，则证明本次实验测试数据准确。

## 8 结果计算

1） 通过软件“ESR Studio”（Freiberg Instruments GmbH，Freiberg，德国）操纵 ESR 仪器检测并获得样品的测试结果波谱图。

2） 使用 ESR Studio 软件中的“spin count”对波谱图进行分析，获得自由基数量 Radicals 值（R）和测试体积 Volume 值（V）。

注：测试体积（V）为 ESR5000 仪器测试毛细管中样品的体积值，若每次测试所使用 ESR 仪器和毛细管尺寸不变，则测试体积为一个固定的值。

3） 计算样品组的 RPF 值，公式如下：

$$\mathbf{RPF} = \frac{\boldsymbol{RC} \times \boldsymbol{RF}}{\boldsymbol{SC}}$$

- 自由基浓度（RC，Radical Concentration）：空白对照组被捕获的自由基浓度，计算公式：RC=R1/V（R1为空白对照组被捕获的自由基数量，V为测试体积），单位为radicals/mL。
- 缩减系数 (RF，Reduction Factor)：样品组中减少的自由基数量与空白对照组的自由基数量之比，计算公式：RF=(R1-R2)/R1（R1为空白对照组被捕获的自由基数量，R2为样品组被捕获的自由基数量）
- 样品浓度 (SC，Sample Concentration)：待测样品的浓度，即样品清除DPPH自由基的半抑制浓度$IC_{50}$值，单位为mg/mL。
- 自由基防护指数（RPF，Radical Protection Factor）：每毫克待测物所清除的自由基个数，用正数N表示。单位为$10^{14}$ radicals/mg。

# 附 录 A
（资料性）
数据处理示范

以样品L-抗坏血酸（Vc）为例，测试结果信息如下表：

| 项目 | 样品名 | 样品浓度（SC）mg/mL | 测试体积（V）mL | 自由基数量（R）Radicals | | 自由基清除率（RF） | 标准物自由基浓度（RC），Radicals/mL | 自由基防护指数（RPF），$10^{14}$ Radicals/mg |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 计算公式 | | | | | | RF=(R1-R2)/R1 | RC=R1/V | RPF=RC x RF/SC |
| 对照 | DPPH | / | 0.158 | R1 | $5.073 \times 10^{15}$ | / | $3.211 \times 10^{17}$ | / |
| 样品1 | L-抗坏血酸 | 0.0396 | 0.158 | R2 | $2.041 \times 10^{15}$ | 59.76% | | 48607.82 |

——样品浓度（SC）为 $V_C$ 清除 DPPH 自由基的 $IC_{50}$ 值，即 SC = 0.0396 mg/mL。

——测试体积（V）为 ESR 仪器测试毛细管中样品的体积值，若每次测试所使用 ESR 仪器和毛细管尺寸不变，则测试体积为一个固定的值。本次 ESR5000 的测试体积为：V = 0.0158 mL。

——自由基数量（R）为每个样品中 ESR 仪器捕捉到的自由基数量，DPPH 对照的自由基数量：R1 = $5.073 \times 10^{15}$ radicals，Vc 样品的自由基数量计算公式：R2 = $2.041 \times 10^{15}$ radicals。

——自由基清除率（RF）为 Vc 样品清除 DPPH 自由基的比率，计算公式为：$\mathbf{RF} = \frac{R1-R2}{R1}$，即 RF=($5.073 \times 10^{15}$ - $2.041 \times 10^{15}$) / $5.073 \times 10^{15}$ = 59.76%。

——标准物自由基浓度（RC）为对照 DPPH 的自由基浓度，计算公式为：$\mathbf{RC} = \frac{R1}{V}$，即 RC = $5.073 \times 10^{15}$ / 0.0158 = $3.211 \times 10^{17}$ radicals/mL。

——自由基防护指数（RPF），计算公式为：$\mathbf{RPF} = \frac{RC \times RF}{SC}$，即 RPF =（$3.211 \times 10^{17}$ x 59.76%）/ 0.0396 = 48607.82 （$10^{14}$ radicals/mg）。

内部讨论资料，严禁非法授权