

ICS 13.340.99  
C 71



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 38120—2019

## 蓝光防护膜的光健康与光安全应用 技术要求

Technical requirements on application of light health and light safety of coating  
for protection against blue light

2019-12-10 发布

2020-07-01 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会

## 目 次

前言 .....	III
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语、定义和缩略语 .....	1
4 分类 .....	2
5 要求 .....	2
5.1 一般要求 .....	2
5.2 光安全要求 .....	3
5.3 光健康要求 .....	4
6 测试方法 .....	4
6.1 蓝光防护膜(光学镜片、显示和照明产品)光安全测试方法 .....	4
6.2 蓝光防护膜(皮肤防护)光安全测试方法 .....	6
6.3 蓝光膜层(光学镜片、显示和照明产品)的光健康测试方法 .....	6
附录 A(资料性附录) 视网膜光损伤细胞分子学评价方法 .....	9
附录 B(资料性附录) 蓝光防护膜(皮肤防护)的黑色素抑制率和自由基清除比率 .....	13
附录 C(资料性附录) 皮肤细胞的细胞活性检测(MTT)法 .....	17

## 蓝光防护膜的光健康与光安全应用 技术要求

### 1 范围

本标准规定了应用于光学镜片产品、显示产品、照明产品及皮肤防护产品的蓝光防护膜的分类、要求、测试方法。

本标准适用于在光学镜片产品、显示产品、照明产品上使用的具有蓝光防护功能的膜层和材料，附着在光学镜片产品、显示产品、照明产品上的具有蓝光防护功能的膜层和材料，以及针对皮肤蓝光防护的生物膜层和材料(包括剂型、原料等)。

### 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。

JJG 178—2007 紫外、可见、近红外分光光度计

ISO 8995-1 照明和工作场所 第1部分：室内(Lighting of work places—Part 1:Indoor)

ITU-R BT.2021-1 立体三维电视系统的主观评价方法(Subjective methods for the assessment of stereoscopic 3DTV systems)

### 3 术语、定义和缩略语

#### 3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

##### 3.1.1

**视觉 vision**

光刺激作用于视觉器官而产生的主观映像。

##### 3.1.2

**屈光状态 refractive status**

被检眼的屈光情况，也即无穷远处的物体在视网膜上的成像情况。

注：对眼屈光状态的检查称为验光。

##### 3.1.3

**调节 accommodation**

**视觉调节**

在变换注视远、近物体时，眼屈光能力改变的现象。

##### 3.1.4

**像差 aberration**

实际光学系统中，由非近轴光线追迹所得的结果和近轴光线追迹所得的结果不一致，与高斯光学(一级近似理论或近轴光线)的理想状况的偏差。

GB/T 38120—2019

3.1.5

**高阶像差 higher order aberrations**

级数展开式大于或等于 3 阶的像差。

3.1.6

**调制传递函数 modulation transfer function; MTF**

反映光学系统对不同空间频率的传递能力的函数。

注：眼睛的 MTF 值主要受瞳孔直径、衍射和人眼像差等因素的影响，可用于评价视网膜图像的质量。

3.1.7

**视觉舒适度指数 visual comfortable index**

基于复合生理指标所形成的评价光照及光介质对于人眼视觉生理功能变化及视疲劳影响的指标。

注：该指标独立于物理指标（光谱能量分布、色温、显色指数、照度、亮度、频闪、色域等），是完全从人眼视功能角度客观量化评价光照及光介质对于人眼视觉生理功能影响的指标，主要用于评价照明、显示及光学镜片产品对于人眼在视光学角度下的视疲劳影响。

3.1.8

**细胞毒性 cytotoxicity**

由细胞或化学物质引起的单纯细胞杀伤事件，不依赖于凋亡或坏死的细胞死亡机理。

3.1.9

**细胞活力比率 cell viability ratio**

实验组和对照组的细胞活力比值。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CV：细胞活力 (Cell Viability)

HOAs：高阶像差 (Higher Order Aberrations)

OD：光密度 (Optical Density)

VICO：视觉舒适度指数 (Visual Comfortable Index)

4 分类

蓝光防护膜依据其应用产品的不同，主要分类如表 1 所示。

表 1 蓝光防护膜的主要应用分类

序号	应用产品	分类
1	光学镜片	在光学镜片产品上使用，或附着在其上的具有蓝光防护功能的膜层和材料
2	显示产品	在显示产品上使用，或附着在其上的具有蓝光防护功能的膜层和材料
3	灯具产品	在照明产品上使用，或附着在其上的具有蓝光防护功能的膜层和材料
4	皮肤防护产品	针对皮肤蓝光防护的生物膜层和材料（包括剂型、原料等）

5 要求

5.1 一般要求

不包含产品的环保安全，产品进行光安全、光健康测试前应符合其明示的质量标准和环保标准。

5.2 光安全要求

5.2.1 光学镜片、显示和照明产品的蓝光防护膜

5.2.1.1 光透射比

采用 6.1 的方法进行测量,蓝光防护膜作用在以下光谱范围时,应满足对应的光透射比要求,如表 2 所示。

表 2 蓝光防护膜的光透射比要求

光谱范围 λ/nm	光透射比要求
385≤λ<415	<75%
415≤λ<445	≤80%
445≤λ<475	>80%
475≤λ<505	>80%

5.2.1.2 其他要求

光学镜片、显示和照明产品的蓝光防护膜光安全要求和测量方法参见附录 A。

5.2.2 皮肤防护产品

5.2.2.1 无细胞毒性要求

使用 6.2.2 的方法进行测试,测试中使用的剂型或原料,应使 HFF-1 人皮肤成纤维细胞或 HaCaT 细胞(人永生表皮细胞)的细胞活力比率≥95%。细胞活力比率 CV<sub>p</sub> 计算见式(1)。

$$CV_p = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{CV_{pi}}{CV_{pci}}}{n} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- CV<sub>pi</sub>——添加原料或制剂组细胞的细胞活力值;
  - CV<sub>pci</sub>——未添加原料或制剂组细胞的细胞活力值;
  - n ——配对测试有效样本的组数。
- 计算结果保留到小数点后一位。

5.2.2.2 皮肤膜层防护要求

使用 6.2.3 的方法对满足 5.2.2.1 的添加剂型或原料组的 HFF-1 人皮肤成纤维细胞或 HaCaT 细胞(人永生表皮细胞)进行细胞活力测试。

蓝光照射 3 h 后,添加和不添加材料对于细胞活性保护的比率≥1.5。细胞活性保护比率 A 计算见式(2)。

$$A = \frac{CV_{a1} - CV_{c1}}{CV_{c0} - CV_{c1}} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- A ——添加和不添加材料对于细胞活性保护的比率;
- CV<sub>a1</sub>——添加材料的光照组细胞的细胞活力值;

GB/T 38120—2019

$CV_{a1}$ ——不加材料的光照组细胞的细胞活力值；  
 $CV_{a0}$ ——不加材料的非光照组(空白对照组)细胞的细胞活力值。  
计算结果保留到小数点后两位。

### 5.3 光健康要求

#### 5.3.1 光学镜片、显示和照明产品的蓝光防护膜

VICO 共分为 5 级,级数越高说明人眼的视觉疲劳程度越大,即所测试的产品对人眼视觉健康舒适度影响程度越大,产品合格性评判如表 3 所示。

按照 6.3 的方法测量蓝光防护膜的 VICO,测量值应小于 3。基于 VICO 的产品视觉健康舒适度分级如表 4 所示。

表 3 产品合格性评判表

等级	1 级	2 级	3 级	4 级	5 级
测试值	$0 \leq VICO < 1$	$1 \leq VICO < 2$	$2 \leq VICO < 3$	$3 \leq VICO < 4$	$4 \leq VICO \leq 5$
对应视觉疲劳生理表征	基本无疲劳感	有轻微疲劳感	有明显疲劳感,但在可耐受范围内	疲劳感加剧,出现多种眼部不适症状	疲劳非常严重,有损伤可能
产品合格评判	合格			不合格	

表 4 产品视觉健康舒适度分级表

VICO	$\leq 1.5$	$>1.5 \sim 1.75$	$>1.75 \sim 2$	$>2 \sim 2.25$	$>2.25 \sim 2.5$	$>2.5 \sim 2.75$	$>2.75 \sim 3$	$>3$
分级	S	A+	A	B+	B	C+	C	不合格

#### 5.3.2 皮肤防护产品

皮肤防护产品的蓝光防护膜光健康要求和测量方法参见附录 B。

## 6 测试方法

### 6.1 蓝光防护膜(光学镜片、显示和照明产品)光安全测试方法

#### 6.1.1 分光光度计法

##### 6.1.1.1 实验环境

温度: $10 \text{ }^{\circ}\text{C} \sim 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  
相对湿度: $\leq 85\%$ 。

##### 6.1.1.2 样品制备

采用厚度为 $(2.0 \pm 0.1)\text{mm}$ 附着蓝光防护膜的平光基板或镜片进行测试。

##### 6.1.1.3 实验仪器

紫外、可见分光光度计, JJG 178—2007(Ⅱ类及以上)。

实验所用测量仪器应经过计量检定机构检定合格,并在有效期内。

#### 6.1.1.4 实验步骤

分光光度计法用于测量平光光学镜片的蓝光防护膜。实验步骤如下:

- 接通分光光度计电源开关,打开样品室暗箱盖,预热 30 min;
- 按动“功能键”,切换至透射比测试模式;
- 将实验样品置于测试槽内,按照表 2 的波长范围进行测试,读取测试数据;
- 计算  $385\text{ nm} \leq \lambda < 415\text{ nm}$ 、 $415\text{ nm} \leq \lambda < 445\text{ nm}$ 、 $445\text{ nm} \leq \lambda < 505\text{ nm}$  范围的光透射比,计算结果保留到小数点后的两位小数。

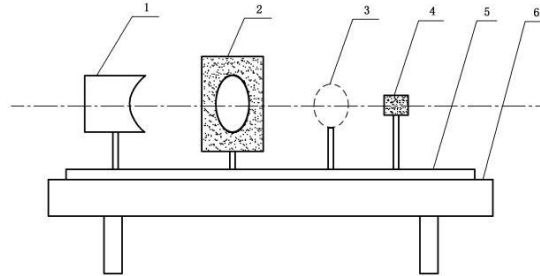
#### 6.1.2 光谱仪法

##### 6.1.2.1 实验仪器

紫外、可见光谱仪。

实验所用测量仪器应经过计量检定机构检定合格,并在有效期内。

光谱透射率测量装置组成结构示意图如图 1 所示,主要由光学实验平台、光轨、光学镜片支架、光阑、紫外、可见光谱仪组成。



说明:

- 光源;
- 光阑;
- 镜片;
- 光谱仪探测器;
- 光轨;
- 光学平台。

注 1: 光源应选取在 385 nm~505 nm 波段范围内具有连续光谱的口径不小于 70 mm 的均匀发光光源。

注 2: 测量非平光光学镜片或基板时,光谱仪光敏面放置在光阑后 25 mm 处。

图 1 光谱透射率测量装置结构示意图

##### 6.1.2.2 实验步骤

实验应在暗室环境下进行。实验步骤如下:

- 打开光源,预热 30 min;
- 接通光谱仪电源开关;

GB/T 38120—2019

- c) 测试光源光谱能量分布  $E_0(\lambda)$ ;
- d) 将被测镜片放置在镜片夹具上,读取此时的光谱能量分布  $E_1(\lambda)$ 。

### 6.1.2.3 数据处理

按式(3)计算  $385\text{ nm} \leq \lambda < 415\text{ nm}$ 、 $415\text{ nm} \leq \lambda < 445\text{ nm}$ 、 $445\text{ nm} \leq \lambda < 505\text{ nm}$  范围的光透射比  $T$ :

$$T(\lambda_1 - \lambda_2) = \frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} E_1(\lambda) d\lambda}{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} E_0(\lambda) d\lambda} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

- $\lambda$  —— 波长,单位为纳米(nm);
- $E_0(\lambda)$  —— 光源初始光谱能量分布;
- $E_1(\lambda)$  —— 光路中加入镜片后的光谱能量分布。

计算结果保留到小数点后的两位。

## 6.2 蓝光防护膜(皮肤防护)光安全测试方法

### 6.2.1 实验条件

- 实验环境:二氧化碳培养箱;
- 温度:  $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ ;
- $\text{CO}_2$  的体积浓度:5%。

### 6.2.2 细胞毒性测试方法

将 HFF-1 人皮肤成纤维细胞或 HaCaT 细胞(人永生化表皮细胞)分为对照组和实验组,在同等环境条件下进行培养。其中实验组为添加具备防蓝光效果的原料或制剂的细胞,对照组为未添加原料或制剂的细胞。待稳定后,分别测试实验组和对照组的细胞活力,并计算细胞活力比率。细胞活力测试方法参见附录 C。

### 6.2.3 蓝光防护测试方法

原料或制剂需满足 5.2.2.1 的要求,将其添加至 HFF-1 人皮肤成纤维细胞或 HaCaT 细胞(人永生化表皮细胞),分为对照组和实验组,在同等环境下进行培养。其中实验组采用峰值为  $420\text{ nm}$ 、辐照度为  $15\text{ W/m}^2$  的蓝光光源对细胞进行持续 3 h 的照射;对照组在测试环境下避光培养。待实验组完成光照后,分别测试实验组和对照组的细胞活力,并计算细胞活力比率。细胞活力测试方法参见附录 C。

## 6.3 蓝光膜层(光学镜片、显示和照明产品)的光健康测试方法

### 6.3.1 基本要求

符合光安全要求的产品才能做光健康测试。

### 6.3.2 被试者要求

视觉舒适度的测试样本量应保证大于或等于 20 人,且被试者样本无眼部疾病,无屈光参差。被试者的屈光梯度可参考表 5。



表 5 被试者的屈光梯度

屈光范围/ $m^{-1}$	等效球镜度/D	人群比例
+0.50~-1.00	+50~-100	40%
-1.00~-2.00	-100~-200	25%
-2.00~-4.00	-200~-400	25%
-4.00~-6.00	-400~-600	10%

### 6.3.3 测试环境

测试环境的设定应按照待测试产品的适用环境进行模拟。光学镜片和照明类产品的测试环境可参考 ISO 8995-1, 显示类产品的测试环境可参考 ITU-R BT.2021-1。并应避免其他产品对测试产品的交叉影响。

### 6.3.4 人眼生理功能测试

#### 6.3.4.1 测试流程

人眼生理功能测试的简要流程如图 2。



图 2 人眼生理功能测试流程

#### 6.3.4.2 视功能测试方法

在被试者进行测试光源环境下的负荷任务之前和之后分别进行双眼各类视功能数据采集, 具体项

目如下：

- a) 基础视生理功能测试  
使用光干涉式眼轴测量仪测量角膜曲率、角膜曲率；使用验光仪测量人眼屈光状态。
- b) 人眼睫状肌调节能力测试  
使用多功能验光机测量睫状肌调节幅度。
- c) 人眼视觉成像质量测试  
使用波前像差仪或自适应眼底成像仪测试被试者双眼 HOAs 及 MTF。

#### 6.3.4.3 产品体验

在测试环境下，每个被试者进行 45 min 的视觉作业任务。阅读类任务应使用蓝道环等视觉检索内容，显示类任务应使用亮度无显著波动的 2D 片源。任务内容应符合被试者的文化能力及工作习惯，保证每个被试者在测试过程中工作强度相对维持恒定水平，无明显差异。

#### 6.3.5 结果计算

将所有被试者视功能测试前后数据代入进行运算，最终得出该被试者单次测试的 VICO 值。

测试产品的 VICO 值  $V_y$  由所有被试者（个数为  $n$ ）的测试结果依照式（4）计算得出：

$$V_y = \frac{\sum_{x=1}^n V_x}{n} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

$V_x$  ——被试者单次测试的 VICO 值；

$V_y$  ——测试产品的 VICO 值；

$n$  ——被试者个数。

附录 A  
(资料性附录)

视网膜光损伤细胞分子学评价方法

A.1 CV 指数要求

细胞活力指数是表征光产品对人眼视网膜损伤的评价指标。可准确定量评价各类光产品对人眼造成的视网膜损伤情况。

细胞活力指数共分为 4 级,级数越高说明产品对人眼的视网膜损伤程度越高,具体量化分级如表 A.1 所示。

表 A.1 细胞活力指数(CV 指数)量化分级

等级	1 级	2 级	3 级	4 级
CV/%	$100 > CV \geq 90$	$90 > CV \geq 80$	$80 > CV \geq 60$	$CV > 60$
光损伤风险	无风险	低风险	中度风险	高风险
生理影响	对人眼无影响	轻微影响,可恢复	可耐受影响,可部分恢复	明显损伤
合格评判	合格		不合格	

A.2 测试方法

A.2.1 细胞要求

一般情况下,用于测试视网膜色素上皮细胞可以来源于人类或者鼠系的胚胎干细胞及诱导多能干细胞。

高光强光照条件下,应选用永生化的 ARPE-19 型视网膜色素上皮细胞株。

低光强光照条件下,用 661w 鼠系视网膜感光细胞株。

A.2.2 环境要求

测试设备的环境:室温,相对湿度 $\leq 85\%$ ;

细胞存在的环境:温度应在 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ ,相对湿度 $\leq 85\%$ ;

密闭不透光。

A.2.3 细胞培养

每款被测试灯具至少测试 3 组视网膜色素上皮细胞,所有测试细胞均应来自同一母代。

细胞增殖过程如图 A.1 所示。

稳定培养人视网膜色素上皮细胞,采用特定成分培养基,铺下细胞后持续培养 3 周至细胞呈现铺满(confluent)状态,细胞数量每平方米大于或等于  $4.5 \times 10^8$  个。

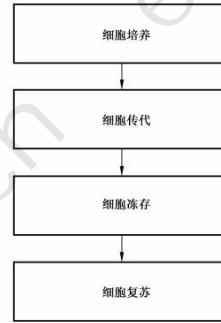


图 A.1 细胞增殖过程

#### A.2.4 测试步骤

##### A.2.4.1 细胞准备

将培养好的细胞放置在细胞光损伤测试平台的培养皿中,图 A.2 为细胞光损伤测试平台示意图,图 A.3 为测试平台仰视图。将来自同一母代的 6 组细胞放于平台上的细胞培养皿中,其中 3 组为测试组(S01/S02/S03),3 组为对照组(C01/C02/C03)。

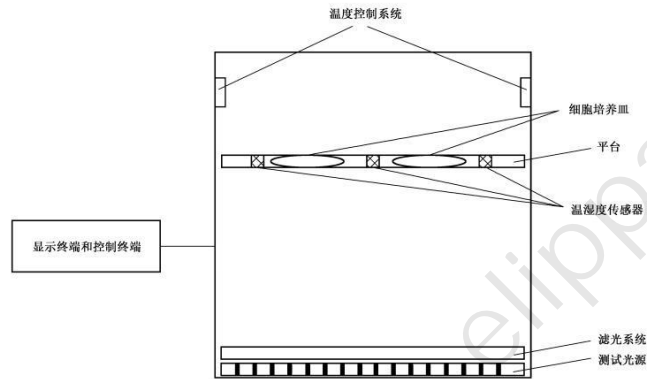
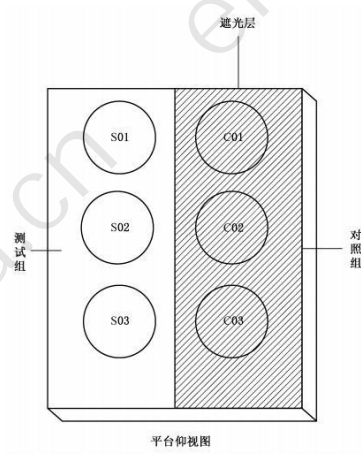


图 A.2 细胞光损伤测试平台示意图



注：对照组会放置遮光层，避免光源对细胞的照射。

图 A.3 测试平台俯视图

#### A.2.4.2 照射过程

对细胞持续照射 6 h 后，检测每组细胞中的线粒体脱氢酶的含量，通过酶含量的下降数值评定照射后的细胞活力。

#### A.2.4.3 细胞活力检测

采用水溶性四唑盐 WST-8 [化学名：2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐] 测定细胞实验中活细胞数目。在电子耦合试剂存在的情况下，被线粒体内的脱氢酶还原生成橙黄色的甲臞染料 Formazan。甲臞染料能够溶解在组织培养基中，与活细胞数量成正比。通过检测吸光值比色，可以动态地量化活细胞的数量，从而对细胞活力进行检测，获得测试光照细胞的细胞活力值  $CV_s$ 。每次设定阴性对照（非光照）组，同样条件下同时进行活力检测后获得细胞活力值  $CV_c$ 。细胞光损伤程度计算见式 (A.1)。

$$\text{细胞光损伤程度} = \frac{CV_s}{CV_c} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

$CV_s$  ——光照细胞（阳性组）的细胞活力值；

$CV_c$  ——非光照细胞（阴性组）的细胞活力值。

#### A.2.5 结果计算

细胞活力指数 CV 计算见式 (A.2)。

$$CV = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{CV_{s_i}}{CV_{c_i}}}{n} \dots\dots\dots (A.2)$$

GB/T 38120—2019

式中：

$CV_s$  ——光照细胞(阳性组)的细胞活力值；

$CV_c$  ——非光照细胞(阴性组)的细胞活力值；

$n$  ——配对测试有效样本的组数。



附录 B  
(资料性附录)

蓝光防护膜(皮肤防护)的黑色素抑制率和自由基清除比率

B.1 黑色素抑制率

黑色素抑制率总共分为 4 级,蓝光防护的生物膜层和材料(包括剂型、原料等)对于黑色素的抑制率越高,即对于抑制蓝光诱导的色沉能力越强。

该测试中所使用的蓝光防护的生物膜层,原料和制剂的浓度,应当使试验细胞活力 $\geq 95\%$ (相对于空白对照组,即无细胞毒性浓度)。

按照 B.3 的方法测试黑色素的抑制率,具体量化分级如表 B.1 所示。

表 B.1 黑色素抑制率 B

黑色素抑制率 B(相较于对照组 0)/%	$B \geq 80$	$60 \leq B < 80$	$20 \leq B < 60$	$B < 20$
评级	S	A	B	F

B.2 自由基清除比率

自由基清除比率按照 B.4 中两种不同的测试方法进行测试,自由基清除比率越高,即该产品对于防护蓝光诱导的自由基对皮肤造成损伤的防护能力越强。

该测试中所使用的蓝光防护的生物膜层,原料和制剂的浓度,应当使试验细胞活力 $\geq 95\%$ (相对于空白对照组,即无细胞毒性浓度)。

按照 B.4 的方法测试自由基清除比率,根据 2 种不同的方法,具体量化分级如表 B.2、表 B.3 所示。

表 B.2 自由基清除比率  $W_1$ (ABTS 法 非细胞试验)

自由基清除比率 $W_1$ (相较于对照组 0)/%	$W_1 \geq 90$	$70 \leq W_1 < 90$	$50 \leq W_1 < 70$	$W_1 < 50$
评级	S	A	B	F

表 B.3 自由基清除比率  $W_2$ (DCF 法 in-vitro)

自由基清除比率 $W_2$ (相较于对照组 0)/%	$W_2 > 80$	$50 \leq W_2 < 80$	$20 \leq W_2 < 50$	$W_2 < 20$
评级	S	A	B	F

B.3 蓝光防护膜(皮肤防护)黑色素抑制率测试

B.3.1 实验步骤

B.3.1.1 细胞培养

实验环境:二氧化碳培养箱;

GB/T 38120—2019

温度：(37±0.5)℃；

CO<sub>2</sub> 的体积浓度：5%。

将黑色素细胞(A375)培养在直径 10 cm 的培养皿中，培养液为达尔伯克改良伊格尔高糖培养基(DMEM)，含 10% 的胎牛血清，1% 青霉素或链霉素或两性霉素。当细胞汇合度达到 80%~90% 时，将黑色素细胞接种在 6 孔细胞培养板(细胞个数为 2×10<sup>5</sup>)，即可进行测试。

### B.3.1.2 吸光光度法测试黑色素抑制率

实验分为对照组和实验组，将对照组中的培养基替换为新鲜培养基，将实验组中培养基替换为含有待测浓度实验物质的培养基，保持细胞和实验物质不间断接触 48 h，再用 EBSS 代替培养基，将细胞培养物质用可见光源照射(480 J/cm<sup>2</sup>)，如图 B.1 所示。之后再照射后的细胞与实验物质一起培养 48 h，收集细胞裂解产物以定量黑色素的产生。

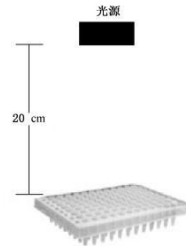


图 B.1 用可见光源照射细胞培养物质

### B.3.2 实验数据处理

黑色素细胞裂解产物悬浮在 1 mol/L 的氢氧化钠溶液中，读取酶标仪在 405 nm 处的测量数据，与已知浓度标准黑色素吸光度曲线做比较。黑色素抑制率(B)计算见式(B.1)。

$$B = \frac{c_v - c_i}{c_v - c_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

c<sub>v</sub> ——不加材料，蓝光照射后的黑色素含量(c<sub>v</sub>=100%)；

c<sub>i</sub> ——加入材料，蓝光照射后的黑色素含量；

c<sub>0</sub> ——空白对照组的黑色素含量。

计算结果表示到小数点后一位。

### B.4 清除自由基能力的测试方法

#### B.4.1 ABTS 自由基清除法

##### B.4.1.1 实验原理

ABTS[化学名：2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐]在适当的氧化剂作用下被氧化成绿色的 ABTS<sup>+</sup>·，其最大吸收波长为 734 nm。在抗氧化物存在时 ABTS<sup>+</sup>· 的产生会被抑制，测定 ABTS 在 734 nm 或 405 nm 的吸光度即可测定抗氧化物清除自由基的能力。



**B.4.1.2 实验步骤****B.4.1.2.1 实验储备液配制**

ABTS 储备液(7.4 mmol/L):取 ABTS 96 mg,加蒸馏水 25 mL。

$K_2S_2O_8$  储备液(2.6 mmol/L):取  $K_2S_2O_8$  378.4 mg,加蒸馏水 10 mL。

将 5 mL 7.4 mmol/L 的 ABTS 储备液与 88  $\mu$ L 2.6 mmol/L 的  $K_2S_2O_8$  储备液混匀,避光静置 12 h~16 h,配制成 ABTS 工作液。

**B.4.1.2.2 实验溶液配制及吸光度测试**

取 0.4 mL ABTS 工作液,用 PBS 磷酸盐缓冲溶液稀释,要求在常温下 734 nm 处吸光值为  $0.7 \pm 0.02$ 。

0.2 mL ABTS 工作液与 10  $\mu$ L 不同浓度受试物混合,常温避光静置 6 min。

用酶标仪在 734 nm 波长处测吸光度,平行 3 次。

**B.4.1.2.3 实验数据处理**

ABTS 自由基清除比率(W)计算见式(B.2)。

$$W = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B.2)$$

式中:

$A_0$ ——不加样品,加入 ABTS 的吸光度;

$A_i$ ——加入样品和 ABTS 的吸光度。

计算结果表示到小数点后一位。

**B.4.2 DCF 自由基清除法****B.4.2.1 实验原理**

DCFH-DA(化学名:二氧荧光素二乙酯)法可测定总的自由基清除能力。AAPH 产生的过氧自由基氧化 DCFH-DA,生成 DCF(化学名:二氧荧光黄)。DCFH-DA 本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜,进入细胞内后可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透细胞膜,从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。DCF 有很强的荧光(激发波长 480 nm,最大荧光 526 nm),在 504 nm 也有吸收,因此可用荧光法或分光光度法检测。

**B.4.2.2 实验步骤****B.4.2.2.1 细胞培养和测试方法**

HFF-1 人皮肤成纤维细胞,细胞冻存时为 P18 代,复苏传代后取 P25 代细胞完成试验。

实验环境:二氧化碳培养箱;

温度:( $37 \pm 0.5$ ) $^{\circ}$ C;

CO<sub>2</sub> 的体积浓度:5%。

将 10 000 个的成纤维细胞接种到黑色的 96 孔板上,培养液为达尔伯克改良伊格勒高糖培养基(DMEM),在上述试验条件下培养 24 h。然后更换成含有 0.1%FCS 的培养基饥饿培养 24 h。之后将培养基替换为含有待测浓度的实验物质的新鲜的 DMEM。经过 18 h~24 h 后,加入 25  $\mu$ M 的 H<sub>2</sub>DCF-DA,在上述条件下培养 1 h。加入 200  $\mu$ M 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 后继续培养 6 h。更换含有 25  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCF-DA 的

GB/T 38120—2019

新鲜 DMEM 培养基,上述条件下培养 1 h。

用酶标仪检测 525 nm 处荧光。

#### B.4.2.2.2 实验数据处理

DCF 自由基清除比率(W)计算见式(B.3)。

$$W = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad \text{.....( B.3 )}$$

式中:

$A_0$ ——不加样品,加入  $H_2DCF\text{-DA}$  的吸光度;

$A_1$ ——加入样品和  $H_2DCF\text{-DA}$  的吸光度。

计算结果表示到小数点后一位。



附录 C  
(资料性附录)

皮肤细胞的细胞活性检测(MTT)法

C.1 细胞培养方法

HFF-1 人皮肤成纤维细胞,细胞冻存时为 P18 代,复苏传代后取 P25 代细胞完成蓝光测试实验。

HaCaT 人永生表皮细胞,复苏传代二代后完成蓝光测试实验。

在二氧化碳培养箱中,温度为 $(37\pm 0.1)^{\circ}\text{C}$ , $\text{CO}_2$ 的体积浓度为 5%的条件下,将 HFF-1 人皮肤成纤维细胞或 HaCaT 细胞(人永生表皮细胞)培养在直径 10 cm 的培养皿中,培养液为达尔伯克改良伊格尔高糖培养基(DMEM),含 10%的胎牛血清,1%青霉素或链霉素或两性霉素。当细胞汇合度达到 80%~90%时,将 HFF-1 人皮肤成纤维细胞或 HaCaT 细胞(人永生表皮细胞)接种在 96 孔细胞培养板(细胞个数为 10 000 个),即可进行测试。(HFF-1 人皮肤成纤维细胞或 HaCaT 细胞(人永生表皮细胞)的培养与测试方法相同)。

C.2 细胞活力检测(MTT 法)

实验分为对照组和实验组,将对照组中的培养基替换为新鲜培养基,将实验组中培养基替换为含有待测浓度实验物质的培养基,继续培养 12 h。之后除去培养基,在孔板中加入 250  $\mu\text{L}$  MTT(1 mg/mL)溶液,细胞在 37  $^{\circ}\text{C}$ 下继续培育 3 h;随后去除细胞上清,并加入 250  $\mu\text{L}$  酸化异丙醇溶液溶解 MTT 还原产物甲瓒。最后将溶解产物吸取 100  $\mu\text{L}$  到酶标板中并用酶联检测仪在 590 nm 和 630 nm 处测定 OD 值。