

T/GDCA

广东省化妆品学会团体标准

T/GDCA 006—2021

化妆品原料对酪氨酸酶活性抑制试验方法 (体外法)

Cosmetic ingredients-Tyrosinase activity inhibition test method
(in vitro)

2021 - 10 - 29 发布

2021 - 11 - 30 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. 原理..... 1

5. 仪器..... 1

6. 试剂与材料..... 2

7. 实验方法..... 2

8. 结果计算..... 2

9. 试验有效性验证..... 3

10. 结果判定..... 3

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并归口。

本文件起草单位：广州环亚化妆品科技有限公司、广东轻工职业技术学院、广东丸美生物技术股份有限公司、广东工业大学、上海珈凯生物科技有限公司、佛山市银美联合科技有限公司、广东科玮生物技术股份有限公司、广东药科大学、广州艾卓生物科技股份有限公司、广州华淼生物科技研究院有限公司、广州市奥雪化工有限公司、完美（中国）日用品有限公司、珠海市大美湾化妆品创新研究院、珠海市大美湾科技有限公司。

本文件主要起草人：刘芳、龚盛昭、孙云起、郭清泉、陈其龙、龙洁芳、倪彦艳、刘环宇、冼宝仪、蔡义文、张逢春、贺晓静、杜志云、杨露。

本标准于2021年10月29日发布。

化妆品原料对酪氨酸酶活性抑制试验方法 (体外法)

1. 范围

本文件规定了一种体外酪氨酸酶活性抑制试验方法。
本文件适用于通过抑制酪氨酸酶活性而达到美白效果的化妆品水溶性原料的功效测试。

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 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB/T 9724 化学试剂 pH值测定通则

3. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 体外法 in vitro method

在活体生物之外的环境中进行的试验。

3.2 半数抑制浓度 median inhibition concentration

引起酪氨酸酶活性50%抑制时对应的样品受试浓度。

3.3 曲酸当量值 kojic acid equivalent value

受试样品的半数抑制浓度与阳性对照曲酸的半数抑制浓度的比值。

4. 原理

黑色素的合成受酪氨酸酶影响，酪氨酸酶能够催化L-酪氨酸羟化成多巴，并把多巴氧化成多巴醌，多巴醌形成最终的反应产物黑色素。具有酪氨酸酶活性抑制作用的受试物可以减慢酪氨酸酶催化L-酪氨酸转化成多巴醌，通过测定475nm处多巴醌的吸光度，根据吸光度的变化来评估受试物对酪氨酸酶活性的抑制效果。

5. 仪器

5.1 单道可调移液器：量程 10 μL ~100 μL ，100 μL ~1000 μL ，0.5 mL~5 mL。

5.2 8道可调移液器：量程 5 μL ~50 μL 。

5.3 分析天平：最小分度值 0.0001 g。

5.4 酶标仪：涵盖 475 nm 波长的范围。

5.5 冰箱。

6. 试剂与材料

6.1 实验用水：采用符合 GB/T 6682 规定的一级水。

6.2 磷酸盐缓冲溶液（PBS）：pH=6.8，0.1 mol/L。

6.3 L-酪氨酸：纯度 $\geq 99.0\%$ ，生化试剂 BR。

6.4 L-酪氨酸溶液：称取 0.025 g L-酪氨酸，用 PBS 缓冲液溶解，超声助溶，定容至 50 mL，现配现用。

6.5 蘑菇酪氨酸酶。

6.6 酪氨酸酶溶液：用 PBS 缓冲液将蘑菇酪氨酸酶配制成 500 U/mL，分装， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，避免二次冻融。

6.7 曲酸：纯度 $\geq 98.5\%$ ，生化试剂 BR。

6.8 96 孔酶标板。

7. 实验方法

除非另有说明，本文件所提到的受试样品的浓度均指其配制时的浓度。

7.1 受试物处理

阳性对照曲酸用 PBS 缓冲液稀释成：0.080 g/L、0.040 g/L、0.020 g/L、0.010 g/L、0.008 g/L、0.005 g/L、0.002 g/L、0.001 g/L 系列质量浓度梯度溶液。

受试物处理：受试物用 PBS 缓冲液梯度稀释成 5 个以上合适质量浓度的样品溶液。

7.2 试验分组

在 96 孔酶标板中设置溶剂本底孔（ T_a ）、溶剂反应孔（ T_b ）、样品本底孔（ T_c ）、样品反应孔（ T_d ）。其中， T_a 组为溶剂本底组，不加底物 L-酪氨酸溶液、不加样品溶液； T_b 组为溶剂反应组，加底物 L-酪氨酸溶液但不加样品溶液； T_c 组为样品本底组，不加底物 L-酪氨酸溶液、加样品溶液； T_d 组为样品反应组，既加底物 L-酪氨酸溶液又加样品溶液。每组做三个复孔。

7.3 试验步骤

参照表 1 试剂添加量，在各孔依次加入 L-酪氨酸溶液、样品溶液/溶剂、PBS 缓冲液，充分混匀，置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温环境下孵育 10 min 后依次在各孔加入 20 μL 的酪氨酸酶溶液， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 混匀反应 $5\text{ min} \pm 5\text{ s}$ 后即刻放入酶标仪，在 475 nm 波长处进行测定。

注：各孔从加入酪氨酸酶溶液到测定吸光度，保持时间一致（ $5\text{ min} \pm 5\text{ s}$ ）。

表 1 酪氨酸酶活性抑制试验的加样表

试剂	溶剂本底孔 (T_a)	溶剂反应孔 (T_b)	样品本底孔 (T_c)	样品反应孔 (T_d)
L-酪氨酸溶液（ μL ）	0	40	0	40
样品溶液（ μL ）	0	0	40	40
溶剂（PBS 缓冲液）（ μL ）	40	40	0	0
PBS 缓冲液（ μL ）	70	30	70	30
酪氨酸酶溶液（ μL ）	20	20	20	20
总计（ μL ）	130	130	130	130

8. 结果计算

8.1 酪氨酸酶活性抑制率

按式（1）计算：

$$Y = \left(1 - \frac{A_d - A_c}{A_b - A_a}\right) \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

Y—酪氨酸酶活性抑制率；

A_d —样品反应孔吸光度；

A_c —样品本底孔吸光度；

A_b —溶剂反应孔吸光度平均值；

A_a —溶剂本底孔吸光度平均值。

8.2 半数抑制浓度（ IC_{50} 值）

以受试样品的浓度为横坐标，其对应的酪氨酸酶抑制率为纵坐标，绘制曲线图，拟合得到回归方程（ $R^2 \geq 0.9$ ）。根据回归方程，计算酪氨酸酶抑制率为 50% 时对应的样品浓度，即为该受试样品的 IC_{50} 值，同时计算其 95% 置信区间。

8.3 曲酸当量值

按式（2）计算：

$$D = \frac{C}{C_0} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

D—曲酸当量值，单位为 g/g；

C—受试样品的 IC_{50} 值，单位为 g/L；

C_0 —曲酸的 IC_{50} 值，单位为 g/L。

9. 试验有效性验证

每批次实验都需要加入阳性对照的测试，阳性对照曲酸的 IC_{50} 应在 0.005 g/L~0.03 g/L，则认为试验系统有效。

各组平行孔间的抑制率间的标准差（Standard Deviation, SD）值需 $\leq 15\%$ ，则认为试验平行性有效。

加入酪氨酸酶溶液，37 °C 混匀反应 5 min $\pm$ 5 s 后即刻放入酶标仪，在 475 nm 波长处进行测定： ± 5 s 时间对测试结果 IC_{50} 的影响，标准差 SD 值 $\leq 3\%$ 。

10. 结果判定

样品在某一受试浓度下的酪氨酸酶抑制率应表述为：抑制率平均值 $\pm$ 抑制率间的标准差（SD）。

进行不同样品的酪氨酸酶抑制能力比较，在同一受试浓度下，抑制率越大代表该样品的酪氨酸酶抑制能力越强。

进行不同样品的酪氨酸酶抑制能力比较， IC_{50} 值越小代表该样品的酪氨酸酶抑制能力越强。

进行不同样品的酪氨酸酶抑制能力比较，曲酸当量值越小代表该样品的酪氨酸酶抑制能力越强。