



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

蓝光防护膜的光健康与光安全 应用技术要求

Application Technical Requirement of Light Health and Light Safety of Coating for
Protect Against Blue Light

(征求意见稿)

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

目 次

目次 I

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件..... 1

3 名词术语 1

4 应用分类要求 3

5 要求 3

5.1 一般要求 3

5.2 光安全要求 4

5.3 光学镜片、显示和照明产品的蓝光防护膜光健康要求..... 4

6 测试方法 5

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..... 5

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（符合光安全要求的产品才能做光健康测试） 7

附 录 A（资料性附录） 视网膜光损伤细胞分子学评价方法..... 10

附 录 B（资料性附录） 皮肤细胞的细胞活性检测（MTT）法..... 13

附 录 C（资料性附录） 蓝光防护膜（皮肤防护）的黑色素抑制和自由基清除比率..... 14

前 言

本标准编制依据GB/T 1.1-2009的规则起草。

本标准由中国标准化研究院 提出。

本标准由*****标准化技术委员会（SAC/TC *****）归口。

起草单位：中国标准化研究院、温州医科大学、中国人民解放军空军总医院、中国科学院昆明动物研究所、复旦大学附属眼耳鼻喉科医院、常州市武进区半导体照明应用技术研究院、德之馨（上海）有限公司、常州市友晟电子有限公司、国家半导体照明工程研发及产业联盟、北京世标认证中心有限公司、北京阳明智道光电科技有限公司、北京环宇蓝博科技有限公司、中国科学院半导体研究所、北京理工大学、江苏万新光学有限公司、中国计量大学、广州市奥雪化工有限公司、上海帝科精细化工有限公司、上海汉美生物科技有限公司、上海远尚科贸有限公司、广州环亚化妆品科技有限公司、广州市科能化妆品科研有限公司、诺斯贝尔化妆品股份有限公司、上海中翊日化有限公司、北京市计量检测科学研究院、昆山人因健康工程研发中心有限公司、中国科学院光电技术研究所、绵阳产品质量监督检验所。

起草人：蔡建奇、金子兵、田燕、胡新天、姜春晖、杨卫桥、郭娅、梅鹤祥、潘丽君、阮军、徐涛、温蓉蓉、郝文涛、杨华、姚然、李生海、罗爱芹、陈义、刘毅、张琳、魏凌、卫科、曾珊珊、高伟、胡英周、胡晓芸、唐珊珊、夏艾婷。

蓝光防护膜的光健康与光安全技术要求

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技术要求和检测方法。

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（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，仅所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。

GB/T 20145-2006 灯和灯系统的光生物安全性
IEC 62471-2006 Photobiological safety of lamps and lamp systems
ISO/CIE 28077:2016(E) Photocarcinogenesis action spectrum (non-melanoma skin cancers)
JJG 178-2007 紫外、可见、近红外分光光度计

3 名词术语

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

视觉 vision

由进入眼睛的辐射所产生的光感觉而获得对于外界的认识。

3.2

照度 illuminance

表面上一点处的光照度是入射在包含该点的面元上的光通量 $d\phi$ 除以该面元面积 dA 之商，单位为勒克斯（lx）。

$$E = \frac{d\phi}{dA}$$

式中：
 $d\phi$ —光通量，lm；
 dA —面积，m²。

3.3

亮度 luminance

表示光源或物体明亮程度的量，单位为坎德拉每平方米（cd/m²）。

$$L = \frac{d\phi}{dA * \cos\theta * d\Omega}$$

式中：

$d\phi$ —由指定点的光束元在包含指定方向立体角元 $d\Omega$ 内传播的光通量，单位为流明（lm）；

dA —包括给定点的光束截面积，单位为平方米（m²）；

θ —光束截面法线与光束方向间的夹角，单位为度（°）；

$d\Omega$ —指定方向的立体角元，单位为球面度（sr）。

3.4

色温 color temperature

当光源的色品与某一温度下完全辐射体的色品相同时，该完全辐射体的绝对温度为此光源的色温。色温的符号为 T_c ，单位为K。

3.5

显色指数 color rendering index, CRI

光源显色性的度量。

以被测光源下物体的颜色和参照光源下物体的颜色的相符程度来表示，用100以内的自然数表示。

3.6

频闪 flicker

光源发出的光随时间呈快速、重复的变化，使得光源跳动和不稳定。是指电光源光通量波动的深度。光通量波动深度越大，频闪越严重。

3.7

屈光状态 Refractive status, RS

是指被检眼的屈光情况，也即无穷远处的物体在视网膜上的成像情况。对眼屈光状态的检查称为验光。

3.8

调节集合调节比 Accommodative convergence/accommodation ratio, AC/A

调节性集合（AC）对于刺激与调节（A）的比率，反映了调节性集合与调节的连带运动关系。AC指注视有限距离目标时，眼的调节将刺激两眼的视轴向内集合，这种伴随着调节而来、通过调节中枢兴奋而引起的集合成分。A指在变换注视远、近物体时，眼屈光能力改变的现象。

3.9

高阶像差 Higher order aberrations, HOAs

一个点状目标通过一个光学系统后，没有形成一个理想的成像，而是发生了光学缺陷，形成了一个模糊的弥散斑。此时其像的形状与物体很相似，但不完全相同，两者之间的差异就称为像差。级数展开式大于等于3阶的像差称为高阶像差。

3.10

调制传递函数 Modulation transfer function, MTF

光学传递函数（Optical transfer function, OTF）是光学系统评价成像质量的一种光学函数，反映的是不同空间频率的正弦强度分布函数经过光学系统后其振幅的衰减程度，也即物象在调制度上地变化。当调制度随空间频率的变化而变化时，就称为调制传递函数。

3. 11

视觉舒适度指数 visual comfortable index, VICO

视觉舒适度指数（VICO）是基于眼视光学和主观认知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——视觉舒适度指标，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. 12

细胞毒性

细胞毒性是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. 13

细胞活力比率

实验组和对照组的细胞活力比值。

4 应用分类要求

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（包括剂型、原料等）

5 要求

5.1 一般要求

本标准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光安全要求

5.2.1.1 光透射比

使用6.2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	光透射比要求
385-415nm	<75%
416-445nm	≤80%
446-475nm	>80%
476-505nm	>80%

5.2.2 皮肤防护产品光安全要求

5.2.2.1 细胞无毒性要求

使用6.2.2的方法进行测试，测试中使用的剂型或原料，应使成纤维细胞/HaCaT细胞的细胞活力比率≥95%。

$$CV_p = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{CV_{psi}}{CV_{pci}}}{n}$$

式中：

CV_p为细胞活力比率

CV_{ps}为添加剂型或原料组细胞的细胞活力值；

CV_{pc}为未添加剂型或原料组细胞的细胞活力值

n为配对测试有效样本的组数。

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成纤维细胞/HcaT细胞进行细胞活力测试。蓝光照射3h后，添加/不添加材料对于细胞活性保护的比率≥1.5。

$$A = \frac{CV_{d1} - CV_{c1}}{CV_{c0} - CV_{c1}}$$

式中：

A为添加/不添加材料对于细胞活性保护的比率

CV_{d1}为添加材料的光照组细胞的细胞活力值；

CV_{c1}为不加材料的光照组细胞的细胞活力值；

CV_{c0}为不加材料的非光照组（空白对照组）细胞的细胞活力值

5.3 光学镜片、显示和照明产品的蓝光防护膜光健康要求

5.3.1 视觉健康舒适度指标（VICO 指数）

VICO指数共分为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6.1的方法测量蓝光防护膜的VICO指数，测量值应小于3。基于VICO指数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	$0 \leq \text{VICO} < 1$	$1 \leq \text{VICO} < 2$	$2 \leq \text{VICO} < 3$	$3 \leq \text{VICO} < 4$	$4 \leq \text{VICO} \leq 5$
视觉状态	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候	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	<1.5	1.5-1.75	1.75-2	2-2.25	2.25-2.5	2.5-2.75	2.75-3	>3
评分	S	A+	A	B+	B	C+	C	不合格

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 实验样品制备

分光光度计法用于测量平光光学镜片的蓝光防护膜。
测量平光光学镜片时采用厚度为 $2.0\text{mm} \pm 0.1\text{mm}$ 附着蓝光防护膜的平光基板/镜片进行测试。

6.1.1.2 实验仪器

使用紫外、可见分光光度计，测量结果的误差处理参考JJG 178-2007。

6.1.1.3 实验步骤

将实验样品置于测试槽内，按照表2的波长范围进行测试，分别计算385-415nm、415-445nm、445-475nm、475-505nm范围的光透射比。

6.1.2 光谱仪法

6.1.2.1 测量光学镜片

光学镜片类产品光谱透过率测量装置组成结构参考示意图如图2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。光源应选取在（380-550）nm波段范围内具有连续光谱的口径不小于70mm的均匀发光光源，光阑的孔径为5mm。

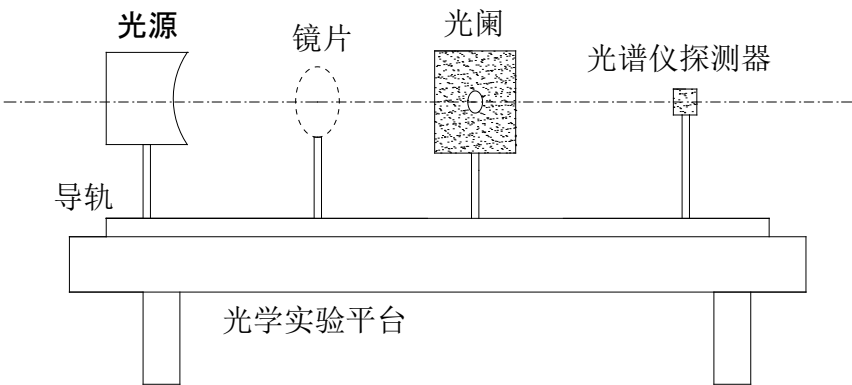


图1 光学镜片光谱透过率测量装置结构示意图

计算出镜片的焦距，调节光谱仪探测器光敏面至镜片焦点处，如测量平光光学镜片，则光谱仪位置在光阑后24mm处，平光镜片建议厚度为 $2.0\pm0.1\text{mm}$ 。对光源的光谱能量分布 $E_0(\lambda)$ 进行测量，然后将镜片至于镜片夹具上，再次测量光谱能量分布 $E_1(\lambda)$ 。

则光透射比：

$$T(\lambda_1\sim\lambda_2)=\int_{\lambda_1}^{\lambda_2}E_1(\lambda)d\lambda/\int_{\lambda_1}^{\lambda_2}E_0(\lambda)d\lambda d\lambda$$

6.1.3 测量其他产品

使用光谱仪法测量透射比，光谱透过率测量装置组成结构参考示意图如图2所示，主要由光学实验平台、光轨、光学显示产品支架、紫外、可见光谱仪组成。光源应选取在（380-550）nm波段范围内具有连续光谱的口径不小于70mm的均匀发光光源

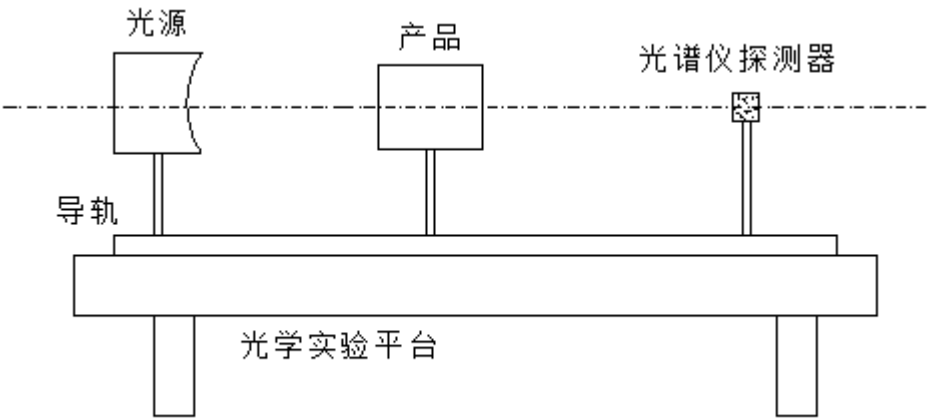


图2 显示产品光谱透过率测量装置结构示意图

测量光源的光谱能量分布 $E_0(\lambda)$ ，然后将产品置于夹具上，光谱仪在距产品后表面24mm处。再次测量光谱能量分布 $E_1(\lambda)$ ，根据6.1.1的公式计算出光透射比。

6.2 蓝光防护膜（皮肤防护）光安全测试方法

6.2.1 测试环境

在二氧化碳培养箱中，37℃，5% CO2

6.2.2 细胞无毒性测试方法

将成纤维细胞/HaCaT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剂型或原料的细胞，对照组为未添加剂型或原料的细胞。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。细胞活力测试方法可参考附录B。

6.2.3 蓝光防护测试方法

将满足5.2.2.1的添加剂型或原料组的HaCaT细胞/成纤维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光谱420nm、200lx的照度的蓝光光源，在距细胞培养皿20cm处进行持续3小时的照射；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。细胞活力测试方法可参考附录B。

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（符合光安全要求的产品才能做光健康测试）

6.3.1 被试要求

视觉舒适度的测试样本量应保证大于或等于20人，且被试样本无眼部疾病，无屈光参差。被试的屈光梯度可参考以下比例：

表5 被试的屈光梯度

屈光范围	人群比例
0.50 m ⁻¹ ~-1.00m ⁻¹	40%
-1.00 m ⁻¹ ~-2.00m ⁻¹	25%
-2.00 m ⁻¹ ~-4.00m ⁻¹	25%
-4.00 m ⁻¹ ~-6.00m ⁻¹	10%

6.3.2 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 8995-1:2002，显示类产品的测试环境可参考ITU-R BT.2021。并应避免其他产品对测试产品的交叉影响。

6.3.3 人眼生理功能测试

6.3.3.1 测试流程

人眼生理功能测试的简要流程如下：

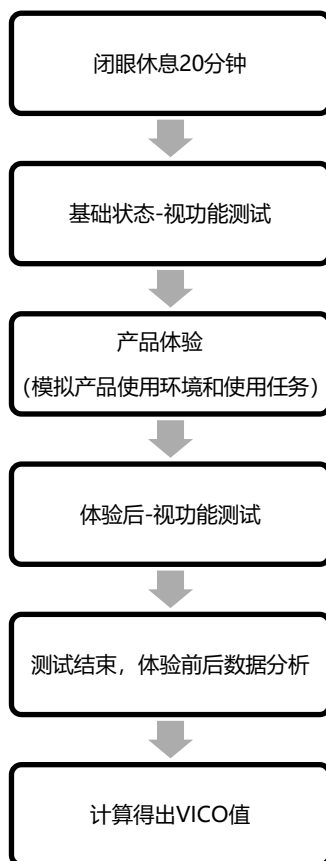


图3 人眼生理功能测试流程

6.3.3.2 视功能测试方法

在被试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眼轴长度AL、角膜曲率KR；

使用验光仪测量人眼屈光度。

b. 人眼睫状肌调节能力测试

使用验光组合台测量调节集合调节比AC/A；

使用多功能验光机测量睫状肌调节幅度ACC。

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双眼高阶像差HOAs及调制传递函数MTF。

6.3.3.3 产品体验

在测试环境下，每个被试进行45min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的文化能力及工作习惯，保证每个被试在测试过程中工作强度相对维持恒定水平，无明显差异。

6.3.4 结果计算

将所有被试视功能测试前后数据代入专用计算软件进行运算，最终得出该被试单次测试的VICO值 V_x 。测试产品的VICO值 V_y 由所有被试（个数为 n ）的测试结果依照以下公式计算得出：

$$V_y = \frac{\sum_{x=1}^n V_x}{n}$$

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LED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(CVI 指数)量化分级

等级	1级	2级	3级	4级
CV (%)	$100 > CV \geq 90$	$90 > CV \geq 80$	$80 > CV \geq 60$	$60 > CV$
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

测试设备的环境要求为室温，湿度小于等于85%
细胞存在的环境：温度应在 $37 \pm 0.5^{\circ}$ 。

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，细胞数量每平米大于等于 4.5×10^8 个。

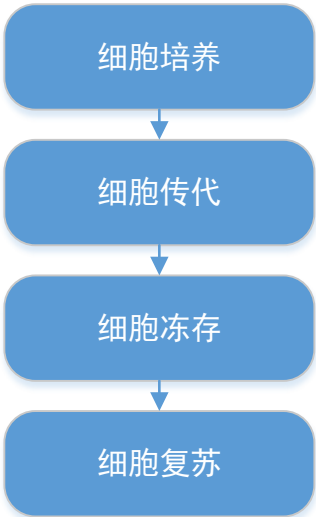


图 A. 1 细胞增殖过程

A. 2. 4 测试方法

(1) 细胞准备

将培养好的细胞放置在细胞光损伤定量研究装置测试平台的培养皿中，该测量装置内的温度恒定（ $37\pm0.5^{\circ}$ ），湿度 $\leq 85\%$ ，密闭不透光，如图2和图3所示。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）。对照组会放置遮光层，避免光源对细胞的照射。

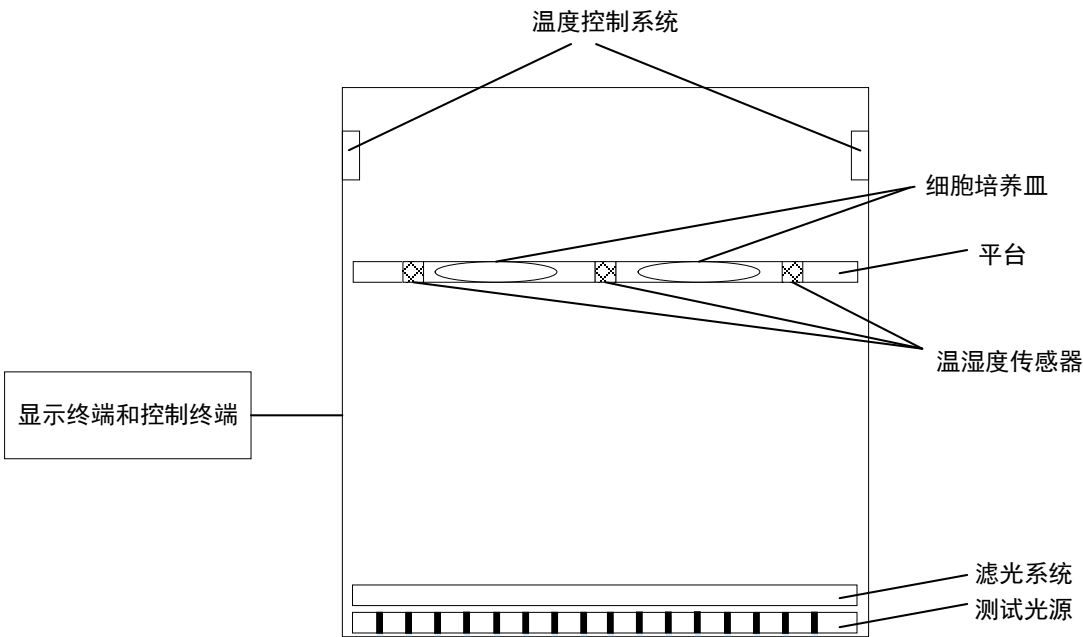


图 A. 2 细胞光损伤定量研究装置

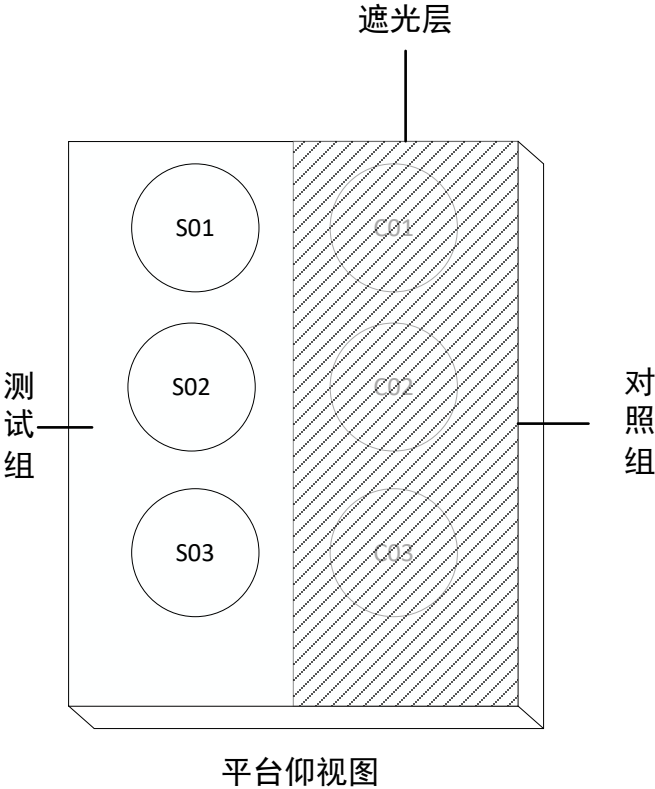


图 A.3 测试平台仰视图

(2) 照射过程

对细胞持续照射6小时后，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。

(3) 细胞活力检测方法

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-(2,4-二硝基苯)-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 = CV_s / CV_c

A.2.5 结果计算

$$CV = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{CV_{s_i}}{CV_{c_i}}}{n}$$

式中：

CV_s光照细胞（阳性组）的细胞活力值；

CV_c为非光照细胞（阴性组）的细胞活力值

n为配对测试有效样本的组数。

附录 B

（资料性附录）

皮肤细胞的细胞活性检测（MTT）法

B.1 细胞培养方法

HFF-1人皮肤成纤维细胞购自中科院细胞库，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。

在二氧化碳培养箱中，37℃，5% CO₂的条件下，将成纤维细胞（HFF-1）培养在直径10cm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/链霉素/两性霉素。当细胞汇合度达到80-90%时，将成纤维细胞接种在96孔细胞培养板，（细胞密度为 1×10^4 ），即可进行测试。

B.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小时。之后除去培养基，在孔板中加入250 μl MTT（1mg/ml）溶液，细胞在37℃下继续孵育3小时；随后去除细胞上清，并加入250 μl 酸化异丙醇溶液溶解MTT还原产物甲赞。最后将溶解产物吸取100ul到酶标板中并用酶联检测仪在590nm和630nm处测定OD值。

附录 C
(资料性附录)

蓝光防护膜（皮肤防护）的黑色素抑制和自由基清除比率

C.1 黑色素抑制率

黑色素抑制率总共分为4级，蓝光防护膜（皮肤防护）对于黑色素的抑制率越高，即该产品对于抑制蓝光诱导的色沉能力越强。该测试中所使用的化妆品剂型、原料的浓度应满足5.2.2中确定的无细胞毒性浓度要求。

按照C.3的方法测试黑色素的抑制率，具体量化分级如表x所示。

表 C.1 黑色素抑制率%

黑色素抑制率%（相较于对照组）	>80	60-80	<50	<20
评级	S	A	B	F

C.2 自由基清除比率

自由基清除比率按照6.5中两种不同的测试方法分为两种，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。使用6.5的方法进行测试，所选择的蓝光防护膜（皮肤防护）中使用的化妆品剂型、原料的测试浓度，应当使皮肤细胞活力≥95%(相对于空白对照组，即无细胞毒性浓度)。

表 C.2 自由基清除比率（ABTS 法 非细胞试验）

自由基清除比率%（相较于对照组0）	>90	70-90	50-70	<50
评级	S	A	B	F

表 C.3 自由基清除比率（DCF 法 in-vitro）

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

C.3 蓝光防护膜（皮肤防护）黑色素抑制率测试

C.3.1 实验物质分组

实验分为对照组和实验组。

C.3.2 6.4.2 测试环境

37℃，二氧化碳培养箱中

C.3.3 测试方法

C.3.3.1 细胞培养方法

在二氧化碳培养箱中，37℃，5% CO₂的条件下，将黑色素细胞（A375）培养在直径10cm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/链霉素/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（细胞密度为2×10⁵），即可进行测试。

1. 细胞照射及黑色素抑制率检测方法（吸光光度法）

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，保持细胞和实验物质不间断接触48小时，再用EBSS代替培养基，将细胞培养物质用可见光光源照射（480 J/cm²）（设备：Huxun 750，KG1滤光片（滤除红外照射）和HBM1）。之后再将照射后的细胞与实验物质一起培养48小时，收集细胞裂解产物以定量黑色素的产生。

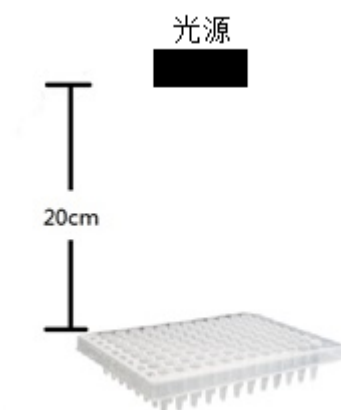


图 C.1 用可见光光源照射细胞培养物质

2. 结果计算

黑色素细胞裂解产物悬浮在1M的氢氧化钠溶液中，在405nm处用酶标仪进行测量。

与已知浓度标准黑色素吸光度曲线作比较。

$$\text{黑色素抑制率}\% = \frac{[C_v - C_i]}{[C_v - C_0]} \times 100\%$$

式中：C_v表示不加材料，蓝光照射后的黑色素含量（以该数据为100%）；C_i表示加入材料，蓝光照射后的黑色素含量；C₀是空白对照组的黑色含量

C.4 清除自由基能力的测试方法

C.4.1 ABTS自由基清除法

ABTS即2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)英文缩写ABTS，2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐。

ABTS法测定总抗氧化能力的原理是，ABTS在适当的氧化剂作用下氧化成绿色的ABTS^{•+}，在抗氧化物存在时ABTS^{•+}的产生会被抑制，在734nm或405nm测定ABTS的吸光度即可测定并计算出样品的总抗氧化能力。

1. 前期准备

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

K₂S₂O₈储备液（2.6mmol/L），取K₂S₂O₈378.4mg，加蒸馏水10ml。

将5mL 7.4mmol/L ABTS储备液与88 μL 2.6mmol/L K₂S₂O₈混匀，避光静置12-16个小时，配置成ABTS工作液。

2. 实验步骤

0.4 mL ABTS工作液，用 PBS 溶液稀释，要求在常温下734nm 处吸光值为 0.7 ± 0.02 。0.2 mL ABTS+工作液与 10uL 不同浓度受试物混合，常温避光静置 6min。

用酶标仪在 734 nm 波长处测吸光度，平行3次。

3. 结果计算

ABTS自由基清除能力由下式计算：

$$\text{清除率 (\%)} = [A_0 - A_i / A_0] \times 100\%$$

式中：A₀ 为不加样品，加入 ABTS 的吸光度；A_i 为加入样品和 ABTS 的吸光度

C.4.2 DCF自由基清除法

DCFH-DA(dichlorofluorescein-diacetate，二氧荧光素二乙酸酯)法也是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(dichlorofluorescein，二氯荧光黄)。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(Ex480 nm，Fm526nm)，在504 nm 也有吸收，因此可用荧光法或分光光度法检测。

1. 细胞培养和测试方法

HFF-1人皮肤成纤维细胞购自中科院细胞库，细胞冻存时为P18代，复苏传代后取P25代细胞完成测试实验。

将 1×10^4 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尔高糖培养基（DMEM），在二氧化碳培养箱中，37℃，5% CO₂条件下培养24小时。然后更换成含有0.1%FCS的培养基饥饿培养24小时。之后将培养基替换为含有待测浓度的实验物质的新鲜DMEM。经过18-24小时后，加入25μM的H₂DCF-DA，37℃，5% CO₂条件下培养1小时。加入H₂O₂，200 μ M后继续培养6h。更换含有25μM H₂DCF-DA的新鲜DMEM培养基，37℃，5% CO₂条件下培养1小时。

用酶标仪检测525nm处荧光。

2. 结果计算

$$\text{清除率 (\%)} = [A_0 - A_i / A_0] \times 100\%$$

式中：A₀ 为不加样品，加入H₂DCF-DA的吸光度；A_i 为加入样品和H₂DCF-DA的吸光度