

# T/GDCA

## 广东省化妆品学会团体标准

T/GDCA 018—2021

---

### 化妆品 抗氧化活性的评价 秀丽线虫法

Cosmetics-Determination of antioxidant-Caenorhabditis elegans

（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。

2021 - XX - XX 发布

2021 - XX - XX 实施

---

广东省化妆品学会 发布

## 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这些专利的责任。

本文件由广东省化妆品学会提出。

本文件由广东省化妆品学会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

# 化妆品 抗氧化活性的评价 秀丽线虫法

## 1 范围

本文件规定了运用秀丽线虫评价化妆品抗氧化活性的方法原理及操作。  
本文件适用于化妆品原料及化妆品（精华、乳液、膏霜等）的抗氧化活性的功效评价。  
本文件不适用于完全抑制大肠杆菌生长的物质。

## 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/T1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写规则》

GB/T6682分析实验室用水规格和实验方法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件

### 3.1 线虫生命周期 Life Cycle of *C. elegans*（见附录 A）

线虫的生命周期可以分为胚胎发育期（受精卵至L1幼虫）、生长发育期（L1幼虫至成虫早期）、生殖期（产卵阶段）及生殖后期。20℃标准实验室条件下，野生型线虫可存活约20天。

### 3.2 生存曲线 Survival Curves

个体从幼体到死亡所能存活的比率所做出的统计曲线。一般以存活率为纵坐标，以虫龄为横坐标作图。

### 3.3 同期化 synchronized

在所有实验开始前需将线虫进行同期化处理，得到L4期线虫，在相同发育阶段进行对比实验。

## 4 检测原理

氧化应激被认为是线虫衰老的关键因素，线虫的抗氧化应激能力和寿命有较好的相关性，寿命会随着抗氧化应激能力的提高而延长。 $H_2O_2$ 常用于诱导细胞氧化损伤，它能有效地模拟自由基诱导细胞凋亡的生物过程。线粒体超氧自由基制造者百草枯（PQ，1, 1'-二甲基-4, 4'-联吡啶二氯化物）在以秀丽线虫为模型探究线粒体氧化损伤的实验中有非常广泛的应用。PQ可诱导细胞内的氧化应激，从而产生过量ROS，造成线粒体功能障碍。在PQ诱导的氧化应激环境下，线虫机体受到损伤，主要体现在其运动能力的下降及寿命的缩短。利用不同化妆品/原料对线虫进行处理，将其暴露在 $H_2O_2$ 或PQ诱导的氧化应激环境下，并对其寿命进行记录，与对照组相比，从而反映受试样品的抗氧化活性。

## 5 材料与试剂

### 5.1 材料

5.1.1 秀丽线虫（以下简称线虫）：N2 野生型秀丽线虫（*Caenorhabditis elegans*, the Bridtol strain N2）购自秀丽线虫遗传学中心（*Caenorhabditis Genetics Center*, USA）

### 5.1.2 60 mm 培养皿

### 5.1.3 挑虫器 worm picker

## 5.2 试剂

除非另有说明，化学试剂使用符合国家标准的分析纯试剂。配制方法见附录B

### 5.2.1 尿嘧啶合成缺陷菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*, OP50)购自秀丽线虫遗传学中心(Caenorhabditis Genetics Center, USA)

5.2.2 基础试剂：氯化钠(NaCl)、硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>)、氯化钙(CaCl<sub>2</sub>)、次氯酸钠(NaClO)、氢氧化钠(NaOH)、磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、磷酸氢二钾(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O)、胆固醇、无水乙醇、硫酸链霉素、技术琼脂粉、LB肉汤、胰蛋白胨、二甲基亚砜(DMSO)、30%过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、百草枯 CAS:75365-73-0 美国 Simga-Aldrich 贸易有限公司，试剂纯度均为分析纯。

### 5.2.3 实验用水：采用符合 GB/T6682 规定的三级水

## 5.3 对照品

### 5.3.1 水溶性

VC标准品，纯度 ≥ 99%，CAS号：50-81-7。

VC标准品溶液(1 mg/mL)：称取0.001 g(精确到0.0001g) VC于离心管中，加入1 mL三级水，振荡至粉末完全溶解，现配现用。

### 5.3.2 醇溶性

虾青素标准品，纯度 ≥ 97%，PubChem CID: 2246。

虾青素标准溶液(3 mM)：称取0.001 g(精确到0.0001g) 虾青素于2 mL离心管中，加入558 μL 二甲基亚砜(DMSO)。将离心管超声30 min后置于80 °C水浴锅中加热30 s至完全溶解，现配现用。

### 5.3.3 醇溶性

虾青素标准品，纯度 ≥ 97%，PubChem CID: 2246。

虾青素标准溶液(3 mM)：称取0.001 g(精确到0.0001g) 虾青素于2 mL离心管中，加入558 μL 二甲基亚砜(DMSO)。将离心管超声30 min后置于80 °C水浴锅中加热30 s至完全溶解，现配现用。

## 6 实验仪器与设备

### 6.1 连续变倍体式显微镜：物镜变倍范围 0.7X-4.5X

### 6.2 震荡培养箱：精度±1°C

### 6.3 生化培养箱：精度±1°C

### 6.4 超净工作台

### 6.5 分析天平：精度 0.1 mg

### 6.6 高压灭菌锅

### 6.7 电热恒温水浴锅

## 7 实验步骤

### 7.1 实验准备

繁殖期(3-5天龄)野生型秀丽线虫用于同期化。

## 7.2 受试物

受试物包含化妆品原料及产品。配制受试物测试溶液时，首选溶剂是M9缓冲液，如需用到有机溶剂助溶，可选用二甲基亚砜，溶剂于测试溶液中的浓度要  $\leq 2\%$ 。针对不同受试物，需结合其特性调整前处理方法，具体可参照附录C。

## 7.3 线虫 NGM 的配制：

### 7.3.1 含样品 NGM 的配制：

#### ①水溶性样品：

样品组：将样品溶解在无菌水中配制成一定浓度的母液，取E.coli OP50菌液和样品按95：5比例混合均匀，用移液枪吸取150  $\mu\text{L}$ 菌液轻缓的打在每个NGM平板上中央。样品最终上样有效浓度根据预实验确定（见8.2）。用移液枪吸取150  $\mu\text{L}$ 菌液轻缓的打在每个NGM平板上中央。

空白组：取E.coli OP50菌液轻缓的打在NGM平板上中央，避光晾干后封膜，4  $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

#### ②非水溶性样品：

样品组：将样品溶解在二甲基亚砜（DMSO）溶液中配制成一定浓度的母液，取E.coli OP50菌液和样品按98：2比例混合均匀，样品最终上样有效浓度根据预实验确定（见8.2）。用移液枪吸取150  $\mu\text{L}$ 菌液轻缓的打在每个NGM平板上中央。

空白组：取E.coli OP50菌液和DMSO按98：2比例混合均匀进行涂布。将涂布好细菌的NGM平板避光晾干后封膜，4  $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

### 7.3.2 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导培养基的配制

NGM培养基灭菌后，待培养基冷却至50-60  $^{\circ}\text{C}$ 。将30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液稀释至10%，再以体积分数为0.1%加入NGM培养基中。为保证过氧化氢活性，诱导板限制在一周内使用，建议每批次实验配置100 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导培养基。

### 7.3.3 PQ 诱导培养基的配制：

10 mM PQ溶液：称取0.257 g，溶于适量M9缓冲液，得到PQ溶液；

NGM培养基灭菌后，待培养基冷却至50-60  $^{\circ}\text{C}$ ，将PQ溶液于无菌环境加入NGM培养基中，得到含有PQ的NGM培养基（10 mM即为0.257 g PQ / 100 mL NGM培养基）。为保证百草枯活性，诱导板限制在一周内使用，建议每批次实验配置200 mL PQ诱导培养基。

### 7.3.4 对照组

水溶性阳性对照（VC）：取E.coli OP50菌液和VC母液按95：5比例混合均匀，用移液枪吸取150  $\mu\text{L}$ 菌液轻缓的打在每个NGM平板上中央；

非水溶性阳性对照（虾青素）：取E.coli OP50菌液和虾青素母液按98：2比例混合均匀，用移液枪吸取150  $\mu\text{L}$ 菌液轻缓的打在每个NGM平板上中央。

NGM平板避光晾干后封膜，4  $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。为保证样品活性，各样品板限制在一周内使用。

## 8 实验方法

### 8.1 线虫同期化

用1 mL M9缓冲溶液将NGM平板上的年轻成虫反复冲洗两次再转移至无菌2 mL离心管中，加入1 mL现配的裂解液，充分振荡3-5 min后，在3000 rpm转速下离心1 min，弃上清。再用1 mL M9缓冲液冲洗线虫及以同样条件离心2次，弃上清，余下0.3-0.4 mL的含虫卵缓冲液。然后用移液枪轻轻吹打混匀虫卵，吸取100  $\mu\text{L}$ 左右含虫卵的缓冲液滴于NGM平板上靠近OP50的无菌区域。待线虫受精卵基本发育成L4期幼虫，完成同期化。挑取L4期幼虫转移至药物板用于寿命实验。

### 8.2 预测试

受试物在进行正式测试之前,如不确定安全浓度范围,建议进行预测试,可选择倍数稀释间隔如0.1 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L受试物浓度,按照标准测试程序,确定安全浓度范围。如受试物在该测试浓度下,线虫生存曲线相比于空白对照组有显著左移的现象 ( $p < 0.05$ ),则该浓度视为毒性浓度。

### 8.3 氧化应激寿命实验

#### 8.3.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导法

挑取L4期幼虫转移至空白组和样品组培养基中,经药物作用3天后,每个培养基再挑取30只线虫暴露于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> NGM培养基上(为避免子代影响及食物不足,建议两天将线虫挑至新的样品NGM板),进行氧化应激诱导干预。每隔30 min记录线虫生存、逃逸、死亡数,直至线虫全部死亡,得到线虫在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化应激环境下生存曲线。

#### 8.3.2 PQ 诱导法

挑取L4期幼虫转移至空白组和样品组培养基中(为避免线虫在NGM上丢失,建议每板60-70条虫),经药物作用3天后(为避免子代影响及食物不足,建议两天将线虫挑至新的样品NGM板),每个培养基再挑取50只线虫暴露于PQ培养基上,进行氧化应激诱导干预。初期(线虫转到PQ诱导培养基1-2天)每隔24 h,记录线虫生存、逃逸、死亡数;后期(大约第3天后)每隔12 h记录线虫生存、逃逸、死亡数,直至线虫全部死亡,得到线虫在PQ氧化应激环境下生存曲线。

## 9 结果评价

### 9.1 统计学分析

采用Graph Pad Prism 8软件绘制survival生存曲线图(数字0代表线虫逃逸,1代表线虫死亡),log-rank检验分析生存曲线显著性, $p < 0.05$ 表示有显著性差异。各组平均寿命数据以均值  $\pm$  标准差( $\bar{X} \pm SD$ )表示,通过SPSS软件ANOVA分析组间差异, $p < 0.05$ 具有统计学意义。

$$(1) \text{ 平均寿命} = \frac{1}{n} \sum_j \frac{x_j + x_{j+1}}{2} d_j$$

其中j生存时间(d), $d_j$ 是在年龄间隔( $x_j, x_{j+1}$ )内死亡的线虫数量,n是线虫总数。

$$(2) \text{ 寿命延长率}\% = \left( \frac{\text{样品组平均寿命}}{\text{空白组平均寿命}} - 1 \right) \times 100\%$$

### 9.2 结果判定及说明

在实验满足有效性的基础上,受试物测试组与对照组对比,生存曲线有显著右移( $p < 0.05$ ),平均寿命显著大于对照组线虫( $p < 0.05$ )且寿命延长率  $> 0\%$  ( $p < 0.05$ ),说明该受试物在该浓度下,能保护线虫免受氧化应激损伤,可作为抗氧化活性评价的证据支撑之一。

## 10 实验有效性的条件

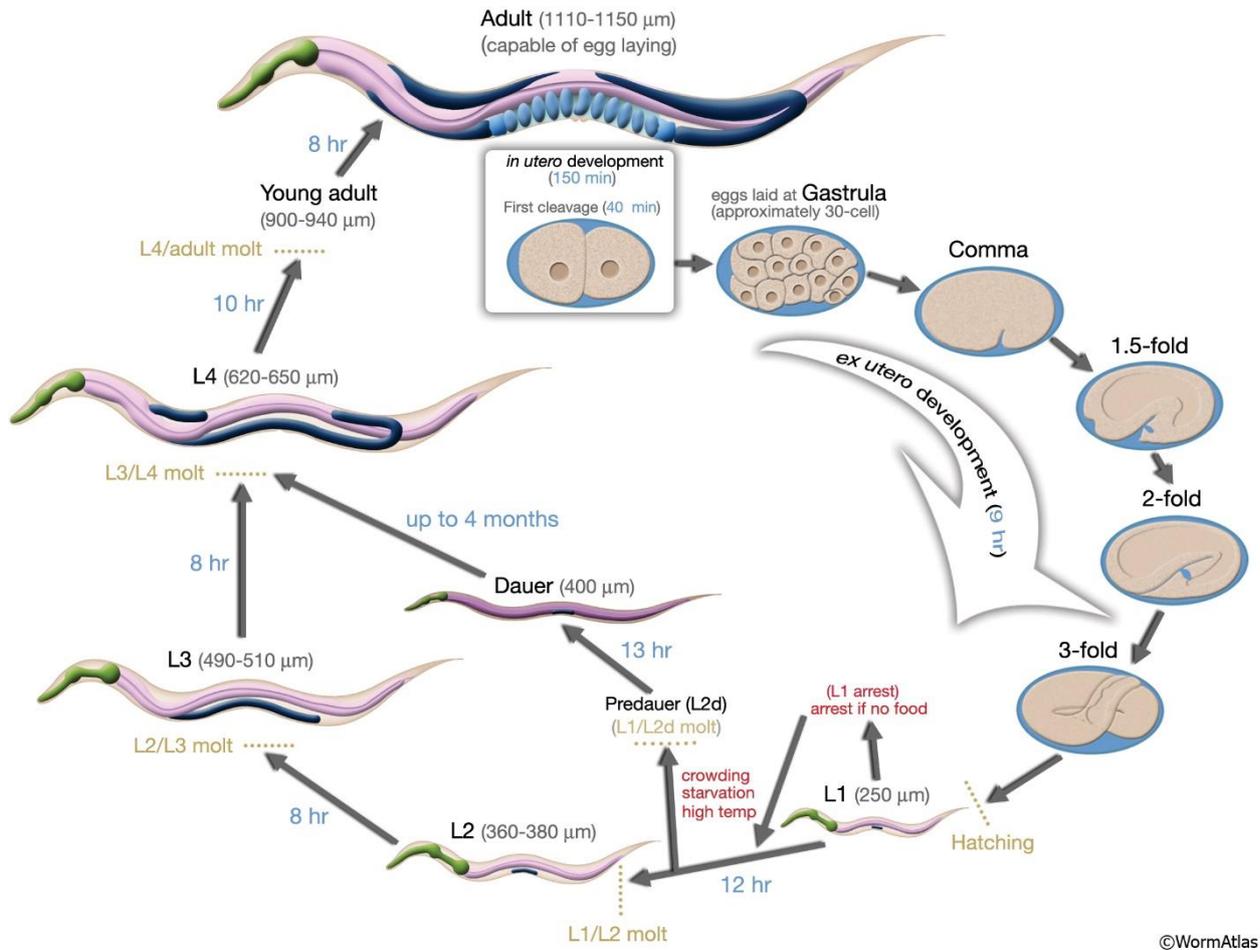
10.1 样本量要求: 每项寿命实验的线虫数量不少于 90 只。

10.2 同期化实验质量控制: 同期化实验得到受精卵后 26 小时左右孵化为 L1 期的幼虫。若同期化后 1-2 天没有观察到幼虫孵化,则同期化实验失败。

10.3 空白组与阳性对照组之间不存在统计学上的显著性差异,则该次寿命实验视为失败。

10.4 空白组与受试物组之间不存在统计学上的显著性差异,或者受试物组寿命显著短于空白组,则该受试物不具有抗氧化活性。

附录 A  
(资料性)  
线虫生命周期 Life Cycle of *C. elegans*



**附录 B**  
(资料性)  
培养基、试剂配置

**B1. 培养基、试剂配置**

## ① 1 M 磷酸钾缓冲液

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	108.39 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	35.69 g

加水至1 L, 调pH值至6.0。

## ② M9 缓冲液

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	6 g或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	15.12 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 g	
$\text{NaCl}$	5 g	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g	

加水至1 L, 121℃灭菌15分钟, 宜现用现配。

## ③ LB液体培养基

LB肉汤 20 g/L

蒸馏水配制, 用1 M的氢氧化钠溶液调至pH 7.0, 121℃灭菌15分钟。

## ④ 线虫生长固体培养基(Nematode Growth Medium, NGM), 按1 L计

$\text{NaCl}$	3 g
Agar (琼脂)	17 g
TryPtone (胰蛋白胨)	2.5 g
Streptomycin (链霉素)	0.2 g
蒸馏水	975 mL

摇匀后, 121℃灭菌30分钟, 80℃恒温15分钟, 然后加入下列溶液(胆固醇过滤除菌, 其余高温灭菌)。

1 M $\text{CaCl}_2$	1 mL
1 M $\text{MgSO}_4$	1 mL
5 mg/mL溶解于无水乙醇的胆固醇	1 mL
1 M的磷酸钾	25 mL

## ⑤ 裂解液

用4 mL蒸馏水溶解0.1g NaOH后和1.4 mL NaClO混合均匀(现配现用)。

**B2. 线虫基本操作方法**

## (1) 大肠杆菌OP50的培养

取OP50的菌种于LB平板划线, 挑取单菌落于在10 mL LB液体培养基中, 37℃、200 rpm, 振荡培养12 h, 至OD600等于0.4-0.6, 用于接种NGM喂养正常组线虫。

## (2) E.coli OP50的涂布

在每个NGM平板上加适量的菌液(一般直径60 mm平板加150  $\mu\text{L}$ ), 用无菌的涂布器或玻璃试管底部将菌液均匀地涂布在NGM平板上, 注意菌液边缘应距离平板边缘0.5 cm左右。涂布好细菌的NGM平板在室温(21-25℃)下过夜后即可使用, 如果不是立即使用则应将其置于冷室或4℃冰箱中待用。

**附 录 C**  
**(资料性)**  
**化妆品前处理参考方法**

受试物前处理方法不同受试物的特性不同，前处理方法也不一样。对于化妆品原料，可直接将受试物溶解到M9缓冲液中配置成储存液，进一步用大肠杆菌稀释到相应的测试浓度进行测试。如需用到有机溶剂助溶，选用二甲基亚砜，且溶剂在测试溶液中的浓度要  $\leq 2\%$ 。但化妆品有精华、乳液、膏霜、啫喱等不同剂型，对于众多产品而言，因质地复杂需要进行样本前处理，具体可参考下列方法。将受试物与二甲基亚砜按1: 3 (g: mL; 如0.4 g: 1.2 mL) 混匀、超声波处理后 $15000\times g$ 离心，取上清液，将上清液用大肠杆菌稀释到相应的测试浓度进行测试。二甲基亚砜在实验溶液中的最终浓度  $\leq 2\%$ 。

附录 D  
(资料性)

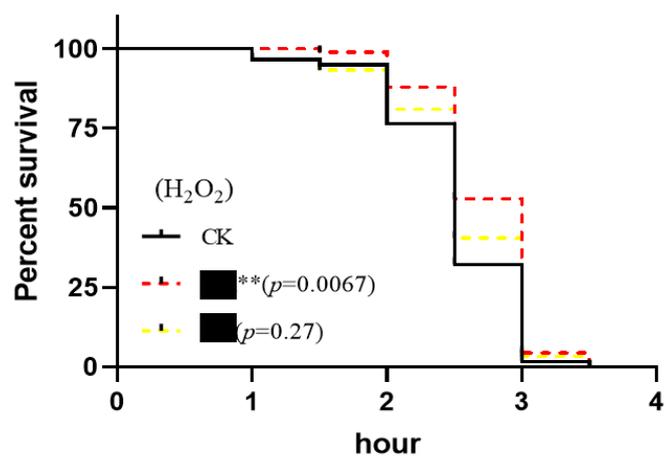
附表 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激条件下线虫生存情况记录表

受试物信息									
实验时间									
数据记录									
组别	空白组			受试物组			阳性对照组		
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 1	平行 2	平行 3	平行 1	平行 2	平行 3
0 hour	30	30	30	30	30	30	30	30	30
0.5 hour	25s3p2	29s1	25s5	30	25s2p3	28s2	28s2	26s3p1	26s4
1 hour									
1.5 hour									
2 hour									
2.5 hour									
3 hour									
3.5 hour									
4 hour									
4.5 hour									
5 hour									

注：数据记录时，s 代表死亡，p 代表逃逸。例如 25s3p2，即生存数 25，死亡数 3，逃逸数 2

附表 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化应激条件下线虫生存情况记录表

处理条件	平均寿命	寿命延长率 (%)
空白组 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )		
受试物 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )		
阳性对照 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )		

图1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化应激条件下线虫生存曲线（示例）

实验人员：\_\_\_\_\_ 审核人员：\_\_\_\_\_ 检测单位：\_\_\_\_\_

附表3 PQ氧化应激条件下线虫生存情况记录表

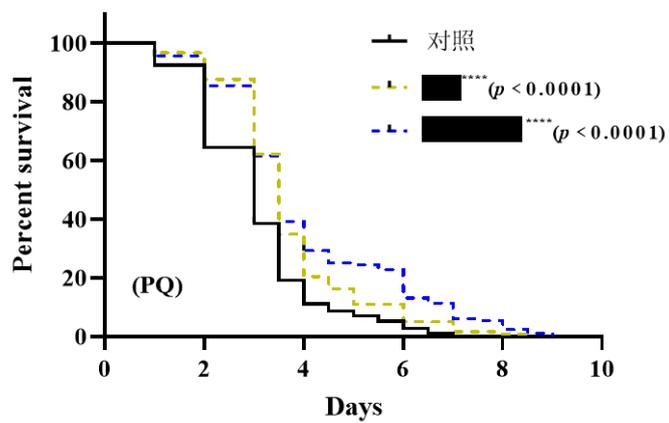
受试物信息									
实验时间									
数据记录									
组别	空白组			受试物组			阳性对照组		
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 1	平行 2	平行 3	平行 1	平行 2	平行 3
0 day	50	50	50	50	50	50	50	50	50
1 day	45s3p2	49s1	45s5	50	45s2p3	48s2	48s2	46s3p1	46s4
2 day									
3 day									
3.5 day									
4 day									
4.5 day									
5 day									
5.5 day									
6 day									
6.5 day									
7 day									
7.5 day									
8 day									

注：数据记录时，s 代表死亡，p 代表逃逸。例如 55s3p2，即生存数 55，死亡数 3，逃逸数 2

附表4 PQ氧化应激条件下线虫生存情况记录表

处理条件	平均寿命	寿命延长率 (%)
空白组 (PQ)		
受试物 (PQ)		
阳性对照 (PQ)		

图2 PQ氧化应激条件下线虫生存曲线(示例)



实验人员: \_\_\_\_\_ 审核人员: \_\_\_\_\_ 检测单位: \_\_\_\_\_

## 附录 E (资料性) 线虫培养及维护

### 1. 线虫培养环境

培养温度：20℃；培养湿度：50%

### 2. 线虫维护

#### ① Dauer现象抵御恶劣环境（短期保存）

线虫在缺少食物或生存环境不适宜的条件下，会由L1-L2期进入一种称之为 dauer 的时期（停育期），出于该状态的线虫可以存活两三个月之久，当又遇到食物充足或环境适宜的时候，dauer期线虫立即恢复发育，跳过L3期直接进入L4期，继续生长以完成整个生命周期。该特点可用于线虫的短暂保存，定期每2个月将Dauer期线虫转移至食物充足的NGM中的方式进行线虫维护。

#### ② 线虫冻存（长期保存）

线虫冻存缓冲液（100 mL）配置：

NaCl	0.585 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.68 g
Glycerol（甘油）	30 mL
NaOH（1 M）	0.56 mL
Water	70 mL

121 ℃，30 min灭菌后使用，室温保存。

将大量的处于L1-L2期的幼虫（将健康成虫饥饿2-4 d可得）用M9缓冲液冲下，定容于1 mL M9缓冲液中，加入等体积的线虫冻存液，轻轻混匀，分装到500 μL冻存管中，然后放到泡沫聚苯乙烯盒（保持温度下降速度不会过快）转到-80 ℃过夜，后期可转到液氮中长期保存。线虫在-80 ℃放置48 h后取出1管来复苏检测冻存效果。

复苏线虫时，将线虫冻存管握于手中或37 ℃水浴使冻存液迅速融化。1500 rpm 离心 1 min，让线虫幼虫沉淀到冻存管底部，弃去上清的冻存液至约50 μL左右（尽可能使线虫富集到少量冻存液中），沉淀全部转移到铺有E. coli OP50的NGM培养基的菌苔外缘。将培养基盖子稍微打开，待溶液吸干，关盖。复苏过来的线虫就已经能够开始蠕动并最终爬到菌苔中。