

团 体 标 准

T/ZHCA 012—2021

化妆品美白功效测试 斑马鱼胚胎黑色素抑制功效测试方法

Whitening efficacy test of cosmetics—
Zebrafish embryos test method of melanin inhibition

2021-04-28 发布

2021-06-01 实施



浙江省健康产品化妆品行业协会 发布

浙江省健康产品化妆品行业协会
团 体 标 准
化妆品美白功效测试
斑马鱼胚胎黑色素抑制功效测试方法
T/ZHCA 012—2021

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 22 千字
2021年6月第一版 2021年6月第一次印刷

*

书号: 155066·5-3208 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

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。

本文件由杭州环特生物科技股份有限公司提出。

本文件由浙江省健康产品化妆品行业协会(ZHCA)归口。

本文件主要起草单位：杭州环特生物科技股份有限公司、广东完美生命健康科技研究院有限公司、云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、浙江省食品药品检验研究院。

本文件参与起草单位：国珍健康科技(北京)有限公司、杭州百芮生物科技有限公司、杭州睿道医药科技有限公司、启迪禾美生物科技(嘉兴)有限公司、浙江方圆检测集团股份有限公司、广东立创检测技术服务有限公司。

本文件主要起草人：周示玉、朱晓宇、毛新亮、安晓虹、方国珊、匡荣、万洁、蒋水萍、李海龙、李钧翔、胡丹、罗志焕。

化妆品美白功效测试

斑马鱼胚胎黑色素抑制功效测试方法

1 范围

本文件规定了一种用于评价化妆品美白功效的快速检测方法。

本文件适用于化妆品产品和原料美白功效的快速检测,要求受试物能溶解于水或能制备成能在水中均匀分散的悬浮液。

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 21808 化学品 鱼类延长毒性 14 天试验

3 术语及定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

受精后小时数 **hour post-fertilization; hpf**

是指斑马鱼受精卵受精后的小时数。

3.2

最大耐受浓度 **maximum tolerated concentration; MTC**

以 51 hpf 的斑马鱼胚胎未出现任何死亡(无心跳、卵凝结、眼芽缺失、对机械刺激无反应、尾部未分离等)和其他毒性效应(心包水肿、躯干弯曲、肌肉纹理不清晰等)的浓度。

4 方法原理

斑马鱼胚胎在发育初期全身透明,胚胎发育至 24 h 时黑色素开始从视网膜上皮细胞处生长。色素细胞起源于背部外胚层分化的神经嵴细胞,然后增殖、迁徙、分化成色素母细胞。用受试物干预斑马鱼的黑色素形成过程,可抑制黑色素的生成。将恒温孵育至终点的受试物组与空白对照组进行比较,以光密度值(Optical Density, OD)表示斑马鱼头部黑色素信号强度,计算受试物对于黑色素的抑制效率,评价化妆品产品或原料的美白功效。

5 试剂和材料

除非另有说明,所用试剂均为分析纯。水为新制蒸馏水或去离子水,pH 为 6.5~8.5,电导率 $\leq 10 \mu\text{S}/\text{cm}$ 。

5.1 斑马鱼胚胎:野生型 AB 品系斑马鱼的胚胎。

5.2 甲基纤维素(Methyl cellulose,CAS:9004-67-5)。

5.3 3%甲基纤维素:称取 3.0 g 甲基纤维素(5.2),缓慢加入到 97.0 g 沸水中,边加边搅拌,待甲基纤维素完全溶解后,停止加热,继续搅拌冷却至室温,用铝箔纸密封烧杯口,放在 4 °C 冰箱保存。

5.4 标准稀释水:按附录 A 中描述的方法配制。

5.5 阳性对照样品:3.0 mg/mL 的 β -熊果苷(Arbutin,CAS:497-76-7,纯度 \geq 98%)。

5.6 助溶剂:二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide,DMSO,CAS:67-68-5)。

6 仪器和设备

6.1 生化培养箱:带有温控和进风装置,温度控制范围 5 °C~50 °C,精度 \pm 0.1 °C。

6.2 电子天平:分度值为 0.001 g。

6.3 六孔细胞培养板,平底。

6.4 体视显微镜:自带白光光源,最小放大倍数为 20 倍。

6.5 显微镜拍照系统:像素不低于 2 000 万。

6.6 图像分析软件:Image J 或相当者。

6.7 一般实验室常用器皿和设备。

7 试验准备

7.1 受试物储备液制备

根据受试物的自身特性,用标准稀释水(5.4)配制成一定浓度的受试物储备溶液,备用。

7.1.1 水溶性或易在水中分散的受试物:称取适量(0.01 g~0.1 g)受试物,用标准稀释水(5.4)溶解并定容至 10 mL;

7.1.2 在水溶液中难于溶解或分散的受试物:称取适量(0.01 g~0.1 g)受试物,添加 0.1 mL 助溶剂(5.6)助溶,用标准稀释水(5.4)溶解并定容至 10 mL。所有组别中的助溶剂浓度应该保持一致,且浓度(质量浓度或体积分数)不大于 1%。同时应加设溶剂对照组试验,溶剂对照组不能对斑马鱼的存活有明显或其他任何可观察到的不利影响,也不能对试验结果有显著性影响。

7.2 斑马鱼胚胎准备

在体视显微镜下挑选每孔 15 枚发育正常的斑马鱼胚胎,置于盛有标准稀释水(5.4)的六孔细胞培养板(6.3)中进行孵育,水温控制在(28.5 \pm 1.0)°C。

在 28.5 °C 环境下的正常斑马鱼早期发育图和斑马鱼早期发育阶段的致死指标代表图分别见附录 B 的图 B.1 和图 B.2。

8 试验程序

8.1 预试验

预试验用于确定受试物的 MTC,为正式试验的浓度设置提供参考。

8.1.1 受试物稀释液制备

将受试物储备液(7.1)用标准稀释水(5.4)以 2 倍几何级数稀释至 3~5 个浓度系列,备用。

8.1.2 受试物处理

选取发育正常的 6 hpf 的斑马鱼胚胎,放入六孔细胞培养板(6.3)中,每孔 15 枚,在不伤害胚胎的情况下除去六孔板中的标准稀释水,向每孔中迅速加入 3 mL 相应浓度的受试物稀释液(8.1.1)。

盖上培养板面板并用铝箔纸包裹,在 $(28.5 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 生化培养箱中避光孵育,孵育后 24 h(30 hpf)和 45 h(51 hpf)进行观察。及时清除死亡的斑马鱼。记录斑马鱼的死亡和其他毒性效应。

8.1.3 MTC 的确定

以 51 hpf 的斑马鱼胚胎未出现任何死亡(无心跳、卵凝结、眼芽缺失、对机械刺激无反应、尾部未分离等)和其他毒性效应(心包水肿、躯干弯曲、肌肉纹理不清晰等)的浓度组别确定为 MTC。

8.2 正式试验

8.2.1 正式试验分组

按照以下方法进行分组:

- a) 空白对照组:含斑马鱼胚胎及标准稀释水(5.4),每次试验设置一个空白对照组即可。
- b) 阳性对照组:含阳性对照样品和斑马鱼胚胎,根据需要,每次试验设置一个阳性对照组即可。
- c) 受试物测试组:含受试物和斑马鱼胚胎,受试物根据需要设置多个不同的浓度组。
- d) 溶剂对照组:含助溶剂(5.6)和斑马鱼胚胎。如果受试物配制过程中使用了助溶剂,则应设置该组。

8.2.2 受试物处理

根据预试验的结果确定正式试验的受试物浓度范围,试验最高浓度组不得高于 MTC。根据测试需要,将受试物储备液(7.1)用标准稀释水(5.4)以 2 倍几何级数稀释至 3~5 个浓度系列。

选取发育正常的 6 hpf 的斑马鱼胚胎,放入六孔细胞培养板(6.3)中,每孔 15 枚,在不伤害胚胎的情况下除去六孔板中的标准稀释水,向每孔中迅速加入 3 mL 相应浓度的受试物稀释液(8.1.1)。

充分混匀后,盖上培养板面板并用铝箔纸包裹,在 $(28.5 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 生化培养箱中避光孵育 (45 ± 0.5) h 到达孵育终点。

8.2.3 观察和拍照

孵育结束后,从表型和行为正常的斑马鱼中随机选取至少 12 尾斑马鱼,用 3% 甲基纤维素(5.3)固定,在体视显微镜下观察并拍照,拍照时斑马鱼应头朝左、腹部朝下、身体保持水平,所有斑马鱼的拍照应在相同的仪器和环境条件下完成,且斑马鱼体位应保持一致。

8.2.4 图像分析

拍照完成后,使用图像分析软件对获取到的斑马鱼图片进行分析,选取的定量分析目标区域为斑马鱼头部边缘(除眼睛部分)至与卵黄囊相切部分。定量分析目标区域按附录 C 所示。以光密度值(OD)表示斑马鱼头部黑色素信号强度,每组取 10 个有效数据。

9 结果评价

9.1 数据处理

计算各组试验黑色素抑制率的平均值($n=10$)、标准偏差(SD)及各实验组与空白/溶剂对照组相比

的显著性差异。以空白/溶剂对照组作为标准,比较各实验组黑色素信号强度, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

黑色素抑制率按式(1)计算:

$$C = \frac{S_0 - S_1}{S_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- C —— 受试物的黑色素抑制率, %;
- S_0 —— 空白对照组的黑色素信号强度平均值($n=10$);
- S_1 —— 受试物组的黑色素信号强度平均值($n=10$)。

注: 如果受试物配制过程中使用了助溶剂,则式(1)中的空白对照组数值用溶剂对照组数值进行替换。

9.2 结果判定

受试物与空白/溶剂对照组相比,黑色素信号强度显著降低($P < 0.05$),且黑色素抑制率 $\geq 20\%$,判定为受试物在该浓度下具有抑制黑色素生成的能力。本结果可作为美白功效评价的证据支撑之一。

10 试验有效性的条件

10.1 预试验或正式试验中,空白对照组(如果使用了助溶剂,也包括溶剂对照组)斑马鱼的死亡率和/或异常率不得超过 10%,超过 10%则该次试验视为失败。

10.2 正式试验中,阳性对照组与空白对照组之间的黑色素信号强度存在统计学上的显著性差异,且平均值之差必须大于 2 倍的空白对照组组内标准偏差(SD),否则该次试验视为失败。

10.3 正式试验中,如果使用了助溶剂,溶剂对照组与空白对照组之间的黑色素信号强度不能存在统计学上的显著性差异,否则该次试验视为失败。

11 试验报告

试验报告至少应给出以下内容:

- a) 检验依据;
- b) 受试物和阳性对照的信息,包括与试验操作相关的理化性状;
- c) 斑马鱼来源和品系等相关信息;
- d) 试验条件和方法,包括试验具体步骤;
- e) 试验开始至完成的日期;
- f) 试验结果,包括预试验和正式实验的所有测定数据、计算值、图像数据等;
- g) 数据处理与结果评价方法;
- h) 试验人员、校核人员;
- i) 试验中的异常情况(如有);
- j) 结论。

附录 A
(规范性)
标准稀释水配制方法

A.1 试剂

除非另有说明,所用试剂均为分析纯。水为新制蒸馏水或去离子水,pH 为 6.5~8.5,电导率 $\leq 10 \mu\text{S}/\text{cm}$ 。

A.1.1 碳酸氢钠(NaHCO_3 ,CAS:144-55-8);

A.1.2 氯化钾(KCl ,CAS:7647-14-5);

A.1.3 二水合氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,CAS:10035-04-8);

A.1.4 七水合硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,CAS:10034-99-8)。

A.2 配制

A.2.1 标准稀释水储备液的配制

分别称取 2.59 g 碳酸氢钠,0.23 g 氯化钾,11.76 g 二水合氯化钙,4.93 g 七水合硫酸镁用水溶解,定容至 1 L 容量瓶,备用。

A.2.2 标准稀释水的配制

吸取 2.5 mL 标准稀释水于 100 mL 容量瓶,用水定容至刻度,摇匀备用。

附录 B
(资料性)
斑马鱼典型图

图 B.1 为在 28.5 °C 环境下的正常斑马鱼早期发育图,其中:a)为单细胞期(受精后 0.2 h 左右);b)为二细胞期(受精后 0.75 h 左右);c)为胚盾期从侧面观察,受精后 6 h 左右);d)为原基-6 期(受精后 25 h 左右)。

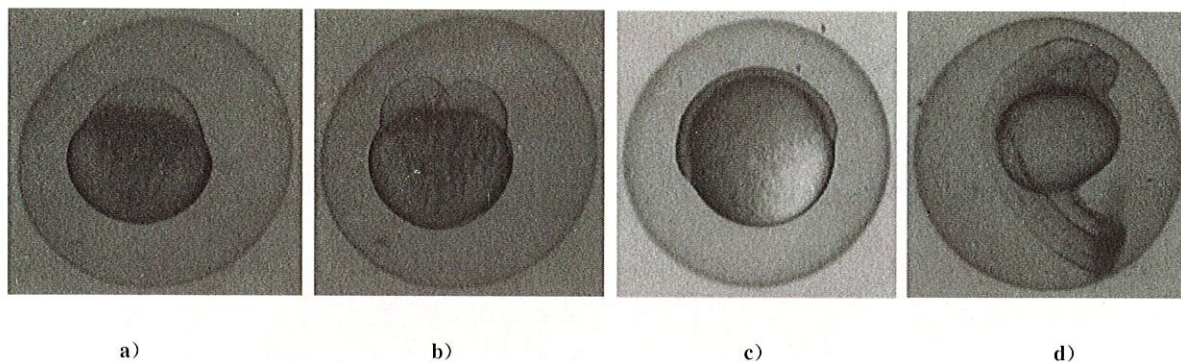


图 B.1 在 28.5 °C 环境下的正常斑马鱼早期发育图

图 B.2 为斑马鱼早期发育阶段的致死指标代表图,其中:a)为卵凝结;b)中 * 表示心包水肿,箭头所指为体节;c)中 * 表示眼芽缺失,箭头所指为尾部未分离。图 B.2 来自 OECD 236。

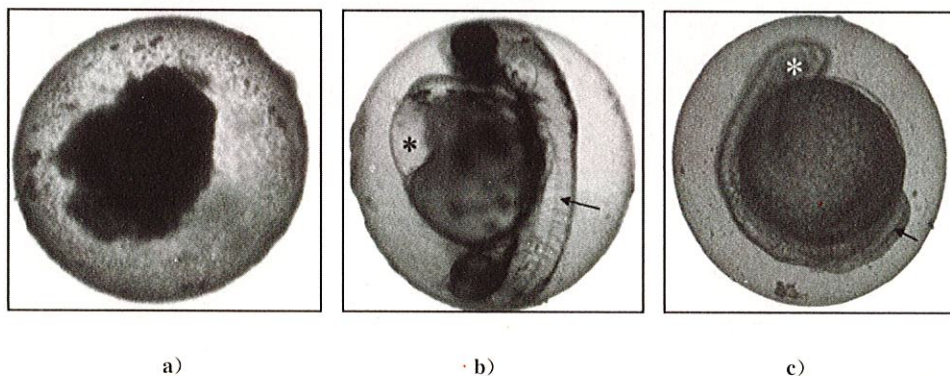


图 B.2 斑马鱼早期发育阶段的致死指标代表图

附 录 C
(规范性)
定量分析目标区域

斑马鱼黑色素定量分析目标区域如图 C.1 所示。

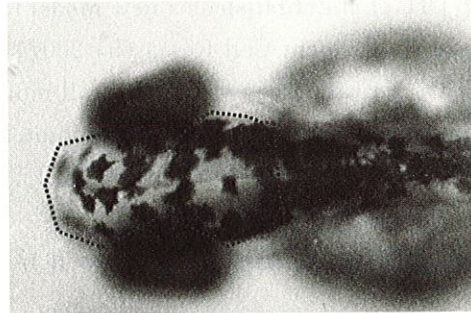
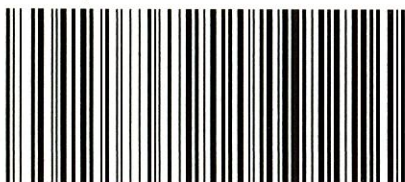


图 C.1 虚线区域为斑马鱼黑色素定量分析目标区域

参 考 文 献

- [1] Cynthia D, Cooper. Insights from zebrafish on human pigment cell disease and treatment [J]. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 2017, 246(11):889-896.
- [2] Choi TY, Kim JH, Ko DH, et al. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds [J]. *Pigment Cell Research*, 2007, 20(2).
- [3] Chen L, Ren X, et al. Characterization of two novel small molecules targeting melanocyte development in zebrafish embryogenesis [J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2012, 25(4):446-53.
- [4] 万庆家, 于晓霞, 张浩, 等. 库拉索芦荟花的美白功效研究 [J]. *香料香精化妆品*, 2020, 10(5): 46-52.
- [5] 陈维云, 何秋霞, 彭维兵, 等. 利用斑马鱼模型评价 Vc 和异 Vc-Na 抑制黑色素的生物活性 [J]. *山东科学*, 2014, 27(006):31-37.
- [6] 陆彬, 楼鸳鸯, 陈楚楚, 等. 熊果苷抑制斑马鱼胚胎黑色素合成的研究 [J]. *湖南科技大学学报*, 2015, 30(1):116-120.
- [7] GB/T 21807—2008 化学品 鱼类胚胎和卵黄囊仔鱼阶段的短期毒性试验 [S].
- [8] Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals, Guidance on the housing and care of Zebrafish *Danio rerio* [R]. West Sussex: Research animals department, science group, 2010.
- [9] Monte Westerfield. *The Zebrafish Book, a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)* [M]. Edition 5. Eugene: University of Oregon Press, 2007.
- [10] OECD 236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test—Guidelines for the Testing of Chemicals [S].
-



T/ZHCA 012—2021

版权专有 侵权必究

*

书号: 155066 · 5-3208

定价: 16.00 元