

团 体 标 准

T/ZHCA

保健食品抗氧化功能的斑马鱼模型快速检测
方法（ROS法）

A Zebrafish Based Rapid

Test for Antioxidant Efficacy of Functional Food (Reactive Oxygen Species Test)

（征求意见稿）

发布

实施

浙江省保健品化妆品行业协会 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009规则起草。

本标准由杭州环特生物科技股份有限公司提出。

本标准由浙江省保健品化妆品行业协会（ZHCA）归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

保健食品抗氧化功能的斑马鱼模型快速检测方法（ROS法）

1 范围

本标准规定了一种保健食品抗氧化功能的快速测试方法。

本标准适用于保健食品抗氧化功能的快速评价，也适用于保健食品原料抗氧化功能的快速筛查和评价。

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。

OECD Guidelines for the testing of chemicals - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (No.236)

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

3 术语及定义

3.1

保健食品

保健食品，是指声称具有保健功能或者以补充维生素、矿物质等营养物质为目的的食品。即适宜于特定人群食用，具有调节机体功能，不以治疗疾病为目的，并且对人体不产生任何急性、亚急性或慢性危害的食品。

3.2

无可见有害作用水平(No Observed Adverse Effect Level, NOAEL)

试验中未观察到任何与受试样品有关的毒性作用的最大浓度。

3.3

活性氧簇（ROS）

活性氧簇（reactive oxygen species, ROS）是含氧的化学反应性化学物质，包括： $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 及 HO_2^{\cdot} 、 $\cdot OH$ 等，与许多衰老、慢性炎症、癌症等疾病的发生、发展预防和治疗密切相关，如老年痴呆、肿瘤、糖尿病、高血脂、疼痛等。

4 原理

CM-H₂DCFDA是一种常用的ROS特异性荧光检测试剂，将CM-H₂DCFDA加入斑马鱼养鱼水之后，CM-H₂DCFDA会在斑马鱼体内ROS的氧化作用下形成高荧光强度的DCF（2',7'-di-chlorofluorescein，二氯荧光素），荧光强度与斑马鱼体内的ROS水平呈正向线性关系。将受试样品和CM-H₂DCFDA共同加入斑马鱼养鱼水一段时间后，如受试样品具有抗氧化活性，会使DCF生成量减少，用酶标仪检测荧光强度，通过荧光强度的减少量来计算ROS清除率，从而评价受试样品的抗氧化功能。

5 试剂和材料

5.1 CM-H₂DCFDA试剂：ROS检测试剂；

5.2 测试容器：用玻璃、聚苯乙烯等惰性材料制成的容器，如培养皿、6孔细胞培养板、24孔培养板等；

- 5.3 其它常规实验器材：如移液枪、容量瓶、烧杯、铝箔、巴氏吸管、培养皿等；
- 5.4 其它常规试剂：如盐酸、氢氧化钠、氯化钙、硫酸镁、碳酸氢钠、氯化钾等。

6 仪器和设备

- 6.1 斑马鱼成鱼养殖设备：用玻璃或聚碳酸酯等惰性材料制成，带有温控设备；
- 6.2 斑马鱼繁殖容器：玻璃、不锈钢或其他惰性材料的器皿，内有不锈钢或其他惰性材料做成的隔栅或丝网来隔离成鱼和产下的卵，网格尺寸应保证产下的鱼卵可以顺利漏过。
- 6.3 电子天平：精度0.1 mg；
- 6.4 生化培养箱或温度受控的房间：保证测试容器的温度控制在26~28 ℃；
- 6.5 盐度计（电导率测定仪）、硬度计、pH计、溶解氧测定仪；
- 6.6 解剖显微镜：用于观察斑马鱼个体发育和行为是否正常；
- 6.7 酶标仪：能进行荧光信号检测，激发光波长和发射光波长能满足CM-H₂DCFDA被ROS氧化后产生的荧光信号的检测要求。

7 试验准备

7.1 受试鱼类

7.1.1 鱼种的选择

推荐使用野生型AB品系斑马鱼 (*Danio rerio*)。使用其它品系的斑马鱼时，试验条件应作相应调整，并在报告中说明鱼种选择理由和试验方法。

7.1.2 亲鱼的驯养

- 7.1.2.1 在繁殖前，亲鱼应在符合下列条件的环境中驯养14 d以上。
- 7.1.2.2 水：与试验用水相同。
- 7.1.2.3 温度：26~28.5 ℃。
- 7.1.2.4 光照：每天12~16 h光照。
- 7.1.2.5 溶解氧：不小于80%空气饱和值。
- 7.1.2.6 疾病处理：不做任何疾病处理，发现患病个体应立即隔离并按照相关标准操作规程进行安乐死。
- 7.1.2.7 喂养：每天至少喂食两次，提供多样化的饲料，每天至少喂食一次活饵饲料。

7.1.3 斑马鱼幼鱼的繁育

- 7.1.3.1 收集受精后的斑马鱼胚胎，清理死亡的胚胎并将存活的胚胎试验用水清洗干净后，放入惰性材料制成的繁育容器中进行繁育，容器的尺寸应该能满足负荷的要求，以鱼胚胎能够在容器试剂稀疏地分布为原则（如培养皿、培养罐等），水体液面高度以不超过容器的2/3为宜。将繁育容器放置在26~28.5 ℃的环境中进行繁育。
- 7.1.3.2 胚胎收集后当天下班前再次清理死亡的胚胎。此后，每天检查并清理一次死亡的胚胎，同时每次更换至少2/3的水体。斑马鱼开始孵化后，换水时要将卵膜清理干净。
- 7.1.3.3 在繁育过程中，如果要移动胚胎/幼鱼，推荐使用巴斯德吸量管。在换水或移动胚胎/幼鱼的过程中，尽量避免让鱼直接暴露在空气中。

7.2 试验用水

7.2.1 水质

7.2.1.1 成鱼养殖用水, 可用反渗透水 (R.O.水)、去离子水或双蒸水 (ddH₂O), 加入适量的人工海盐和碳酸氢钠 (NaHCO₃) 即可。水体的电导率维持在480~510 μS/cm, pH维持在6.9~7.2, 总硬度 (以CaCO₃计) 维持在50~100 mg/L。

7.2.1.2 胚胎和幼鱼繁育使用E3培养液 (60×E3 培养液配制方法: NaCl: 344 mg, KCl: 15.2 mg, CaCl₂·2H₂O: 58 mg, MgSO₄·7H₂O: 98 mg, 定容至20 mL)。

7.2.1.3 E3培养液也可用作试验用水, 用于配制受试物贮备液和配制试验溶液。

7.2.1.4 反渗透水、去离子水或双蒸水的电导率应≤10 μS/cm。

7.2.2 试验溶液

7.2.2.1 用试验用水稀释贮备液来配制试验溶液。必要时使用低毒的助溶剂或分散剂。推荐的溶剂有: 二甲基亚砜、乙醇、甲醇、二甲基甲酰胺、三甘醇。适合的分散剂有: 聚氧乙烯化脂肪酸甘油酯、吐温80、0.01%的纤维素甲醚、聚氧乙烯化氢化蓖麻油。当使用某种助溶剂时, 所有组别中的助溶剂浓度应该保持一致。同时, 应加设助溶剂对照组试验, 相应的助溶剂对照组不能对斑马鱼的存活有明显影响, 不能对其有任何可观察的不利影响, 也不能对试验结果有显著性影响。应尽量避免使用此类物质, 如必须使用, 其所有浓度应不大于1% (W/V或V/V)。

7.2.2.2 试验中不需要调节试验溶液的pH值。如果加入受试物后试验溶液的pH值有明显变化, 建议重新配制, 调节受试物贮备液的pH值, 使其接近加入受试物前试验用水的pH值。用于调节pH值的物质不应使贮备液的浓度明显改变, 也不应与受试物发生化学反应或产生沉淀。最好使用HCl和NaOH来调节。

7.2.2.3 如果试验溶液富含营养物质, 容易腐败变质, 且无法通过换液来遏制水体变质, 可考虑加入一定量的亚甲基蓝来抑菌滋生, 以减缓水质恶化。亚甲基蓝的最终浓度应不大于0.1 PPM (即100 μg/L)。

7.2.2.4 小分子单体化合物的检测浓度上限为1000 μg/mL, 混合物或分子量<3 KD的大分子化合物的检测浓度上限为2000 μg/mL。对于很难溶解或均匀分散的物质、分子量≥3 KD的大分子化合物, 均不适合采用水溶暴露方式, 应考虑采用其它方式进行处理。

7.2.2.5 如果受试物溶解后颜色较深, 则需要稀释至浅色; 如果受试物溶解后有颗粒, 则需要稀释至无肉眼可见的颗粒。如受试物溶液经稀释, 其颜色或者所含颗粒物对实验结果有严重干扰, 则不适用于本标准的检测方法。

7.2.2.6 在开始试验前, 需要先检测受试物溶液自身是否含有可能会对结果产生干扰的荧光物质。如果在CM-H2DCFDA的氧化产物DCF的检测条件下, 受试物溶液在不加入斑马鱼和检测试剂的情况下有荧光信号, 需要考虑是否可以通过稀释或扣除本底值等方式来消除受试物自身荧光的影响。如受试物自身含有的荧光物质对检测有干扰且无法消除, 则不适用于本标准的检测方法。

8 试验程序

8.1 准备

8.1.1 斑马鱼幼鱼的选取

试验开始时, 选择受精后3天的体型正常、发育一致的健康斑马鱼幼鱼, 放入惰性材料制成的测试容器中, 容器的尺寸应该能满足负荷的要求 (如6孔细胞培养板、24孔细胞培养板、96孔细胞培养板, 10 cm培养皿等)。推荐使用巴斯德吸量管移动幼鱼, 在移动幼鱼的过程中, 尽量避免让鱼直接暴露在空气中。

8.1.2 暴露条件

- a) 持续时间：从加入受试物开始，持续暴露20 h。暴露期间不投饵。
- b) 负荷：斑马鱼的数量应满足统计学要求。将斑马鱼随机分配到各处理组，每一浓度30粒受精卵，最大负荷为10尾鱼/mL。
- c) 光照：暴露期间避光处理，避免光照对受试物稳定性的影响。
- d) 更换试验溶液：通常暴露时间在24 h及以内不需要更换溶液。如果受试物富含营养物质，试验溶液容易腐败变质，可考虑换液，换液频率可根据水质情况调整。
- e) 温度： 28.5 ± 0.5 °C。
- f) 溶解氧：溶解氧浓度应为60%~100%空气饱和值。
- g) pH：6.5~7.5。

8.1.3 预试验

a) 预试验用于确定受试物的NOAEL浓度，为后续正式试验的浓度设置提供参考。以几何级数浓度系列设置5个初始受试物浓度，浓度的间隔系数不大于3.2。每个浓度系列设置一个空白对照组。如果使用了助溶剂，应增设一个助溶剂对照。

后续的说明以在24孔培养板中进行试验为例。如果使用了不同的测试容器（如6孔培养板、96孔培养板、小培养皿），则应该对说明进行相应的修改。

b) 向24孔培养板的每个孔中加入适量的受试物储备液，加入养鱼水稀释，配制成一组适宜的浓度系列。另外置一个养鱼水对照组。如果必须使用助溶剂，所有组别中的助溶剂浓度应保持相同，还应设置一个相应的助溶剂对照组。每个孔1 mL溶液，每个孔均放入10尾斑马鱼。

如果一次试验需要使用多个24孔培养板时，每个板上至少需要设置一个养鱼水对照组或一个助溶剂对照组。

c) 在暴露开始后1 h、8 h和20 h进行观察，及时清除死亡的斑马鱼，并对斑马鱼的死亡和其它毒性效应进行记录，确定受试物的NOAEL。

死亡判断标准：静止不动、无呼吸运动、无心脏跳动、躯干呈白色不透明颜色、对机械刺激无反应。

异常表型：心包水肿/心律异常/静脉淤血/血流异常、脑变性/萎缩/水肿、下颌畸形、眼畸形/水肿、肝脏变性/肿大/萎缩、肠腔缺失、躯干弯曲/水肿、鱼鳍缺失/畸形、肌肉变性、体节缺失、色素变淡、出血/血栓。

异常行为学指标：呼吸急促、身体侧翻、游动不协调、游动剧烈和反常的静止。

8.2 正式试验

8.2.1 根据预实验的结果，确定正式试验的浓度范围，试验最高浓度组不得高于NOAEL值或该类受试物的检测浓度上限（详见7.2.2 c）。以几何级数浓度系列设置3个受试物浓度，浓度的间隔系数不大于3.2。浓度设置少于3个时需说明理由。

8.2.2 受试物处理：随机选取发育健康且阶段一致的受精后3天的斑马鱼于测试容器中（比如24孔板），每实验组随机分配30尾斑马鱼。水浴给予受试物，使各实验组受试物的终浓度与预先设定的浓度一致。向各组中加入检测试剂 CM-H2DCFDA，试剂终浓度相同。同时设置阳性对照组（根据需求和受试物种类选择）、试剂对照组（只有检测试剂，没有斑马鱼的实验组）和正常对照组（含检测试剂和斑马鱼的实验组），如果使用了溶剂的话，还应设置溶剂对照组。充分混匀后，将斑马鱼转移至96孔板酶标板中，每孔1尾斑马鱼，每孔100-200 μ l受试液，每组至少10尾斑马鱼；转移完成后，将测试容器用铝箔纸包裹，在恒温培养箱中28°C避光孵育20 h至实验终点（时间从加入反应液开始算起）。

8.2.3 酶标仪检测：至实验终点，用酶标仪检测各实验组的荧光值。每组的有效数据不少于8个。受试物处理组的荧光值减去试剂对照组的荧光值，为受试物处理组斑马鱼的体内ROS相对含量。

8.2.4 注意事项：每次实验前需要检测一次受试物溶液的溶解氧和pH，试验过程及终点不需要再次检测。在转移斑马鱼的时候，要注意避免损伤到斑马鱼。

9 结果评价

9.1 数据处理

9.1.1 统计学分析

将酶标仪检测到的荧光值记为F，统计学处理结果用 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 表示；采用 Dunnett's T-检验进行统计学处理，受试物处理组与正常对照组相比较， $p < 0.05$ 表明统计学上有显著性差异。

9.1.2 抗氧化功能定量计算

$$\text{ROS清除率}(\%) = \left(1 - \frac{F(\text{受试物处理组}) - F(\text{试剂对照组})}{F(\text{正常对照组}) - F(\text{试剂对照组})}\right) \times 100\%$$
，F为荧光信号值。

9.2 结果判定

当一个受试物的试验结果满足下列要求时，可以判定该受试物有抗氧化功能：

受试物处理组至少有一组的数值与正常对照组相比有统计学上的显著性差异，即 $p < 0.05$ 。该受试物与正常对照组相比具有统计学差异的浓度即为该受试物的有效剂量。

10 保证测试有效性的条件

10.1 空白对照组斑马鱼的死亡率或异常率不得超过10%，超过10%则该次实验视为失败；

10.2 阴性对照组（溶剂对照组）与空白对照组之间不能存在统计学上的显著性差异，如果阴性对照组与空白对照组之间存在统计学上的显著性差异，则该次实验视为失败；

10.3 阳性对照组与阴性对照组之间存在统计学上的显著性差异，且平均值之差必须大于2倍的阴性对照组内标准偏差（SD）（或阳性对照组与阴性对照组之间存在统计学上的显著性差异，且平均值之差大于阴性对照组平均值的20%）。

11 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面的内容：

- a) 检验依据；
 - b) 样品和阳性对照的信息，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) 数据处理与结果评价方法；
 - f) 试验的日期；
 - g) 结论。
-