

浙江省健康产品化妆品行业协会文件

浙健化协〔2021〕3号

关于征求《化妆品美白功效测试——斑马鱼胚胎黑色素抑制测试方法》团体标准意见的函

各相关单位：

根据《关于发布化妆品美白功效斑马鱼胚胎测试方法团体标准立项的通知》（浙保化协〔2020〕58号），协会于2020年9月29日批准由杭州环特生物科技股份有限公司牵头制定《化妆品美白功效斑马鱼胚胎测试方法》团体标准。现牵头单位联合广东完美生命健康科技研究院有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、浙江省食品药品检验研究院等多家单位已完成《化妆品美白功效测试——斑马鱼黑色素抑制测试方法》团体标准征求意见稿（见附件2）的编制。根据《团体标准管理规定》的有关要求，为保证标准的科学性、严谨性和适用性，现公开征求意见。

征求意见时间为2021年1月26日至2月25日，请于意见征求结束日期前将《征求意见稿汇总表》反馈至协会秘书处。

联系方式:

钱 锋 0571-85871051、13738170558

陈莹艳 0571-85871051、18158434007

地址: 杭州市下城区费家塘路新天地商务中心 12 幢 10 楼

E-mail: hyfg@121jk.cn

附件: 1. 征求意见汇总表

2. 《化妆品美白功效测试——斑马鱼黑色素抑制测试方法》(征求意见稿)

浙江省健康产品化妆品行业协会

2021 年 1 月 25 日



附件 1

征求意见汇总表

单位名称					
地 址					
联系人		电 话		邮 箱	
修 改 意 见					
序号	章条编号	原文	修改意见/建议	修改依据	

注：此表可附页

ICS***
X***

团 体 标 准

T/ZHCA ###-2021

化妆品美白功效测试-
斑马鱼胚胎黑色素抑制测试方法

Whitening Efficacy Test of Cosmetics- Zebrafish
Embryos Test Method of Melanin Inhibition

(征求意见稿)

发布

实施

浙江省健康产品化妆品行业协会

发布

前 言

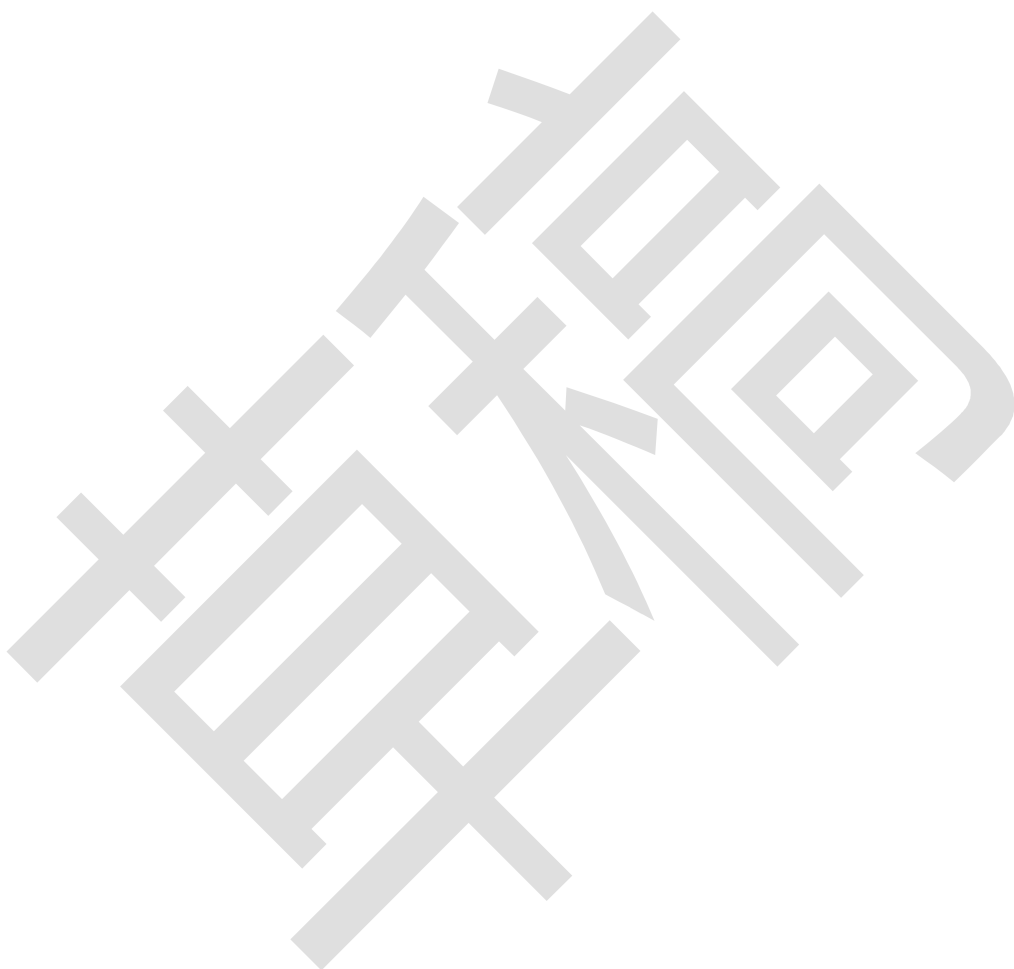
本文件按照GB/T 1.1-2020规则起草。

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。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：



化妆品美白功效测试-斑马鱼胚胎黑色素抑制测试方法

1 范围

本文件规定了一种化妆品美白功效的斑马鱼胚胎黑色素抑制测试方法。

本文件适用于化妆品及其原料美白功效的快速检测。

有以下特征的受试物不适用于本文件描述的测试方法：

——受试物不能溶解于水或不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 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

无可观察效应浓度 **no observed effect concentration ; NOEC**

与对照相比，对试验生物未产生显著效应的最高受试物浓度。

[来源：GB/T 21808,2.5]

3.2

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

是指受精卵受精后的小时数。

4 方法原理

斑马鱼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，可抑制黑色素的形成，通过与正常对照组的比较可以计算受试物对于黑色素的抑制效率。

5 材料和试剂

5.1 斑马鱼胚胎：推荐使用野生型AB品系斑马鱼的鱼卵。

5.2 斑马鱼孵育容器：用于斑马鱼胚胎和幼鱼的孵育，推荐使用6孔细胞培养板。

5.3 3%甲基纤维素（Methyl cellulose，CAS号：9004-67-5）：用于固定斑马鱼胚胎。

5.4 40×标准稀释水配制方法：NaHCO₃：2.5901g，KCl：0.2305g，CaCl₂·2H₂O：11.7603g，MgSO₄·7H₂O：4.9304g，以上试剂用超纯水定容至1L。

5.5 阳性对照：3.0mg/mL的 β -熊果苷（Arbutin，CAS号：497-76-7）。

6 仪器和设备

6.1 斑马鱼胚胎和幼鱼培养设备：带有温控和进风装置，推荐使用生化培养箱。

6.2 电子天平：精度0.1 mg。

6.3 体视显微镜：用于观察斑马鱼个体发育和行为是否正常，同时用于检测斑马鱼头部黑色素信号强度，需配备CCD相机进行图像拍摄。

7 试验准备

7.1 样品处理

受试物储备液的配制：根据受试物的自身特性，用标准稀释水配制成一定浓度的受试物储备溶液，备用。

水溶性或易在水中分散的样品用标准稀释水溶解并定容；在水溶液中难于溶解或分散的样品适当添加助溶剂助溶后进行定容，推荐使用二甲亚砜（DMSO）；含不溶性粉体的样品需进行离心取上清液或过滤处理。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，且浓度不大于1%（W/V或V/V）。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影响或其它任何可观察的不利影响，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足够数量的发育正常的斑马鱼胚胎，置于标准稀释水中进行孵育，容器的水温控制在26~28.5℃。正常和死亡胚胎的典型图片见附录A的图A.1和图A.2。

8 试验程序

8.1 预试验

预试验用于确定受试物的NOEC浓度，为后续正式试验的浓度设置提供参考。

8.1.1 受试物浓度稀释

受试物溶液：将受试物储备液用标准稀释水以几何级数稀释成一组适宜的浓度系列，备用。

8.1.2 受试物处理

选取发育正常的6hpf的斑马鱼胚胎，放入六孔板中，每孔15枚，在不伤害胚胎的情况下除去6孔板中的标准稀释水，向每孔中迅速加入3ml受试物溶液。

8.1.3 培养孵育

盖上培养板面板并用铝箔纸包裹，在28℃生化培养箱中避光孵育，孵育后24小时（30hpf）和45小时（51hpf）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NOEC浓度，以51hpf的斑马鱼胚胎未出现任何死亡和其他毒性效应的浓度组别确定为NOEC浓度。

死亡判断标准：静止不动、无心脏跳动、躯干呈白色不透明、对机械刺激无反应、约48小时尾部未分离。

异常表型：卵凝结、心包水肿、尾部未分离、眼芽缺失等。异常表型的典型图详见附录A的图A.2。

8.2 正式试验

8.2.1 试验分组

正式试验按照以下方法进行分组：

- a) 正常对照组：含斑马鱼胚胎及标准稀释水。
- b) 阳性对照组：含有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：含有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：含有溶剂和斑马鱼胚胎；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 受试物浓度设置

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NOEC值。根据测试需要，以几何级数浓度系列设置受试物浓度梯度，浓度的间隔系数 ≤ 3.2 ，推荐为2。

8.2.3 受试物处理

根据试验需求，预先筛选好足够数量且发育状况一致的6 hpf斑马鱼胚胎，并随机分配到六孔板中，每孔15枚，在不伤害胚胎的情况下除去6孔板中的标准稀释水，然后迅速向每孔中加入3ml受试物溶液。

充分混匀后，盖上培养板面板并用铝箔纸包裹，在28℃生化培养箱中避光孵育至终点（即51hpf，孵育时间共计45小时）。

8.2.4 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，所有斑马鱼的拍照结果须在相同的仪器和环境条件下完成，且斑马鱼体位应该保持一致。

8.2.5 图像分析

拍照完成后，使用图像分析软件对获取到斑马鱼的图片进行分析，选取定量区域为斑马鱼头部边缘（除眼睛部分）至与卵黄囊相切部分（如附录A的图A.3所示）。将分析参数校准为OD值，以此来计算斑马鱼头部黑色素信号强度，每组的有效数据不少于10个。

9 结果评价

9.1 数据处理

9.1.1 统计学分析

将黑色素信号强度记为S，计算各组试验的平均值（Mean）及标准误差（Standard Error, SE）统计学处理结果用 $\text{Mean} \pm \text{SE}$ 表示。使用SPSS软件对数据进行方差分析，以正常对照组（或溶剂对照组）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。

9.1.2 美白功效的定量计算

根据黑色素信号强度值 S ，计算受试物的美白作用（以黑色素抑制率表示），公式如下：

$$\text{黑色素抑制率}(\%) = \frac{S(\text{正常对照组}) - S(\text{供试品组})}{S(\text{正常对照组})} \times 100\%$$

如果受试物配制过程中使用了助溶剂，则公式中的正常对照组数值用溶剂对照组数值进行替换。

9.2 结果判定及说明

在试验满足有效性的基础上，受试物与正常/溶剂对照相比，黑色素信号强度显著降低（ $P < 0.05$ ），且黑色素抑制率 $\geq 20\%$ ，说明受试物在该浓度下，具有抑制黑色素生成的能力，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 预试验中，正常对照组（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，阳性对照组与正常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倍的正常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，溶剂对照组与正常对照组之间不能存在统计学上的显著性差异，如果溶剂对照组与正常对照组之间存在统计学上的显著性差异，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：

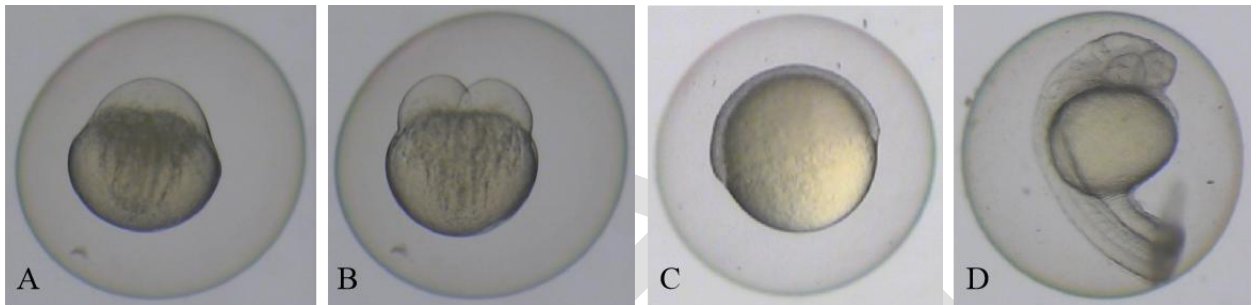
- a) 检验依据；
- b) 样品和阳性对照的信息，包括与试验操作相关的理化性状；
- c) 斑马鱼来源和品系等相关信息；
- d) 试验条件和方法，包括试验具体步骤；
- e) 试验的日期；
- f) 数据处理与结果评价方法；
- g) 结论。

附录 A

(资料性附录)

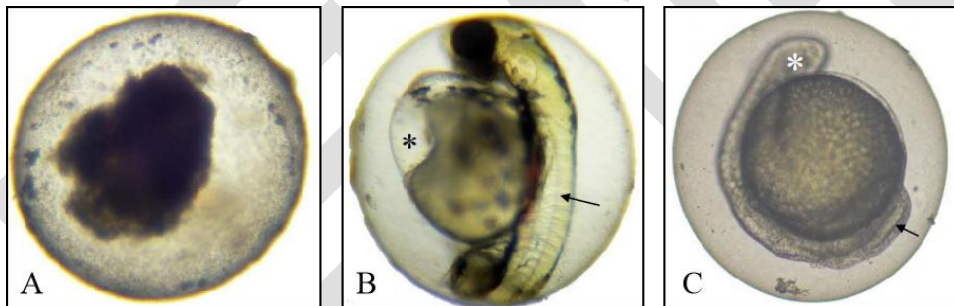
斑马鱼典型图

图A.1为在28.5℃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小时左右）；B为二细胞期（受精后0.75小时左右）；C为胚盾期，侧面观（受精后6小时左右）；D为原基-6期（受精后25小时左右）。

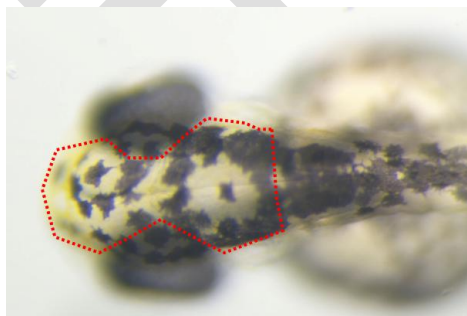


图A.1 在28.5℃环境下的正常斑马鱼早期发育图

图A.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A.2来自OECD 236（2013）。



图A.2 斑马鱼早期发育阶段的致死指标代表图



图A.3 红线区域为斑马鱼黑色素信号定量区域。

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.
- [2] Tae-Jin, YOON. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds[J]. 한국 생물 공 학 회 학 술 대 회, 2008.
- [3] Chen L,Ren X.etl.Characterization of two novel small molecules targeting melanocyte development in zebrafish embryogenesis[J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2012, 25(4).
- [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(5).
- [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.
- [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*). Edition 5, 2007.
- [10] OECD236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test——Guidlines for the Testing of Chemicals[S].
-