

# T/HPCIA

团 体 标 准

T/HPCIA 012—2025

## 化妆品用 积雪草（*Centella asiatica*）相关原料

*Centella asiatica* derived ingredients for cosmetics

2025 - 12 - 01 发布

2025 - 12 - 01 实施

## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 基本信息 .....	1
5 技术要求 .....	3
6 试验方法 .....	5
7 检验规则 .....	5
8 标志、包装、运输、贮藏和保质期 .....	6
附录 A（规范性） 羟基积雪草酸/积雪草酸含量测定方法 .....	7
附录 B（规范性） 羟基积雪草苷/积雪草苷含量测定方法 .....	9
附录 C（规范性） 积雪草提取物、羟基积雪草酸/积雪草酸生物效应评价方法 .....	11
附录 D（规范性） 羟基积雪草苷/积雪草苷生物效应评价方法 .....	15

## 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。

本文件由广州开发区黄埔化妆品产业协会提出。

本文件由广州开发区黄埔化妆品产业协会归口。

本文件起草单位：广西昌洲天然药业有限公司、广州蒂普生物科技有限公司、谷雨生物科技集团股份有限公司、上海家化联合股份有限公司、上海林清轩化妆品集团股份有限公司、诺德溯源（广州）生物科技有限公司、润本生物技术股份有限公司、广州暨大美塑生物科技有限公司、广州逸仙电子商务有限公司、深圳杉海创新技术有限公司、广州栋方生物科技股份有限公司、广州天玺生物科技有限公司、广州雪肌兰生物科技有限公司、广东省保化检测中心有限公司、东莞山海创智生物科技有限公司、广州山海生物科技有限公司、上海浩泰生物科技有限公司、广州市络捷生物科技有限公司、广州恒滔贸易有限公司、广东省人民医院、广东省药品检验所、暨南大学、广东工业大学等。

本文件主要起草人：赵海山、马维、于雪峰、李安章、侯森、胡玉冬、高宏旗、曹义苗、桑建梅、张建华、孙金媛、林广欣、承静、鲁旺旺、张嘉恒、冯馨舒、祁明宇、曾飒、史学东、郑伟东、王纪文、郑伟军、欧阳海锋、颜林、陈琪、田海妍、郭清泉、刘洁、谢晓娟、王雅馨、何铭杰等。

# 化妆品用 积雪草 (*Centella asiatica*) 相关原料

## 1 范围

本标准规定了积雪草相关原料的术语和定义、基本信息、技术要求、试验方法、检验规则、运输及贮存等内容。

本标准适用于由积雪草提取、分离、纯化得到，用于化妆品原料的混合物或单一成分（羟基积雪草苷、积雪草苷、羟基积雪草酸、积雪草酸）。

## 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。

化妆品安全技术规范

GB/T 39665 含植物提取物类化妆品中 55 种禁用农药残留量的测定

GB/T 6678 化工产品采样总则

GB/T 6680 液体化工产品采样通则

GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 191 包装储运图示标志

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 43808 植物提取物 术语

T/HPCIA 003-2022 化妆品 斑马鱼实验通用技术规范

## 3 术语和定义

GB/T 43808 界定的术语和定义适用于本文件。

## 4 基本信息

### 4.1 积雪草提取物

中文名称：积雪草提取物、积雪草花/叶/茎提取物、积雪草根提取物、积雪草叶提取物。

INCI名称：Centella asiatica extract；Centella asiatica flower/leaf/stem extract；Centella asiatica root extract；Centella asiatica leaf extract。

活性成分：羟基积雪草苷、积雪草苷、羟基积雪草酸、积雪草酸。

### 4.2 羟基积雪草甙

羟基积雪草甙的其他名称、结构式和基本物化参数如下：

——INCI名称：Madecassoside。

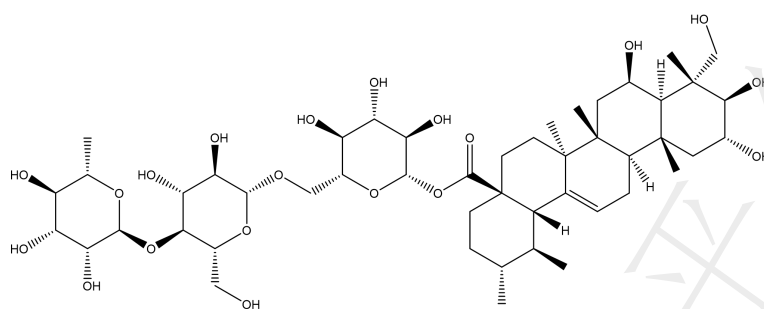
——活性成分：羟基积雪草苷

——CAS：34540-22-2

——分子式：C<sub>48</sub>H<sub>78</sub>O<sub>20</sub>

——分子量：975.1

——结构式：



#### 4.3 积雪草苷

——积雪草苷的其他名称、结构式和基本物化参数如下：

——INCI名称：Asiaticoside。

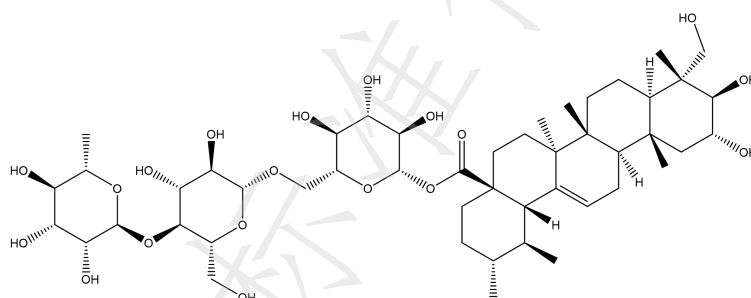
——活性成分：积雪草苷

——CAS：16830-15-2

——分子式：C<sub>48</sub>H<sub>78</sub>O<sub>19</sub>

——分子量：959.1

——结构式：



#### 4.4 羟基积雪草酸

——羟基积雪草酸的其他名称、结构式和基本物化参数如下：

——INCI名称：Madecassic acid。

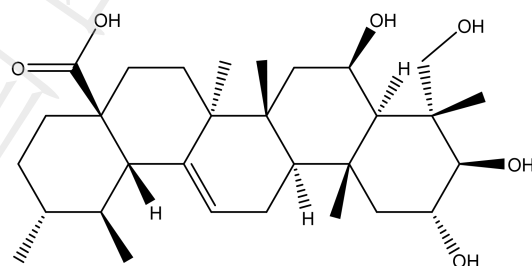
——活性成分：羟基积雪草酸

——CAS：18449-41-7

——分子式：C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>6</sub>

——分子量：504.7

——结构式：



#### 4.5 积雪草酸

——羟基积雪草酸的其他名称、结构式和基本物化参数如下：

——INCI名称：Asiatic acid。

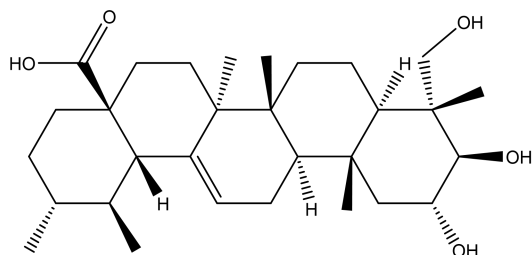
——活性成分：积雪草酸

——CAS：464-92-6

——分子式：C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>5</sub>

——分子量：488.7

——结构式：



#### 4.6 积雪草苷 B

——积雪草苷B的其他名称、结构式和基本物化参数如下：

——INCI名称：无。

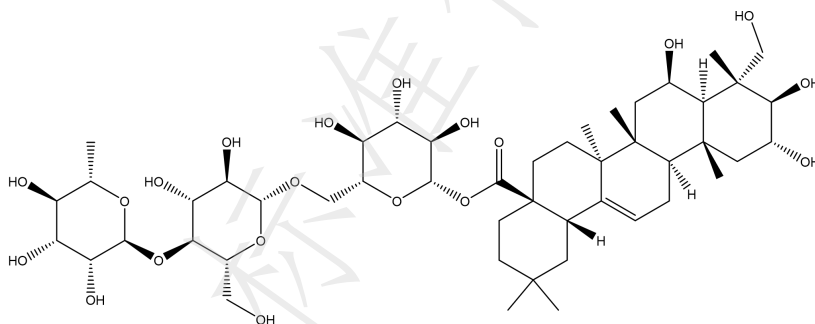
——活性成分：积雪草苷B

——CAS：125265-68-1

——分子式：C<sub>48</sub>H<sub>78</sub>O<sub>20</sub>

——分子量：975.1

——结构式：



#### 5 技术要求

根据原料INCI名，应分别符合以下各表的要求。

表 1 积雪草提取物质量指标要求

项目	分级			
	C	B	A	
理化指标	颜色与外观	棕色粉末	黄色粉末	白色/淡黄色粉末
	气味	无明显气味	无明显气味	无明显气味
	溶解性	溶于水或溶于醇	溶于水或溶于醇	溶于水或溶于醇
	灰分	≤1%	≤1%	≤1%
	水分	≤5%	≤5%	≤5%
	羟基积雪草甙、积雪草苷、积雪草酸和羟基积雪草酸的总量（方法见附录A和B）	≥20%	≥50%	≥70%
生物效应评价	有效性（方法见附录C）	≥40%参照品	≥100%参照品	

上表（续）

项目		分级		
		C	B	A
重金属	汞, mg/kg	符合《化妆品安全技术规范》的规定		
	砷, mg/kg			
	铅, mg/kg			
	镉, mg/kg			
微生物	菌落总数, CFU/mL			
	霉菌和酵母菌总数, CFU/mL			
	耐热大肠菌群			
	铜绿假单胞菌			
	金黄色葡萄球菌			
农残	按照 GB/T 39665 执行			
注: 羟基积雪草甙含量包括羟基积雪草苷和积雪草苷B				

表 2 羟基积雪草甙/积雪草苷质量指标要求

项目		分级		
		C	B	A
理化指标	颜色与外观	白色粉末	白色粉末	白色粉末
	气味	无明显气味	无明显气味	无明显气味
	溶解性	溶于水或溶于醇	溶于水或溶于醇	溶于水或溶于醇
	灰分	≤1%	≤1%	≤1%
	水分	≤5%	≤5%	≤5%
	羟基积雪草甙/积雪草苷含量 (方法见附录B)	≥80%	≥90%	≥95%
生物效应评价	有效性 (方法见附录D)	/	≥50%参照品	≥60%参照品
重金属	汞, mg/kg	符合《化妆品安全技术规范》的规定		
	砷, mg/kg			
	铅, mg/kg			
	镉, mg/kg			
微生物	菌落总数, CFU/mL			
	霉菌和酵母菌总数, CFU/mL			
	耐热大肠菌群			
	铜绿假单胞菌			
	金黄色葡萄球菌			
农残	按照 GB/T 39665 执行			
注: 羟基积雪草甙含量包括羟基积雪草苷和积雪草苷B				

表 3 羟基积雪草酸/积雪草酸质量指标要求

项目		项目		
		C	B	A
理化指标	颜色与外观	白色粉末	白色粉末	白色粉末
	气味	无明显气味	无明显气味	无明显气味
	溶解性	溶于醇	溶于醇	溶于醇
	灰分	≤1%	≤1%	≤1%
	水分	≤5%	≤5%	≤5%

表3 羟基积雪草酸/积雪草酸质量指标要求（续）

项目		项目		
		C	B	A
	羟基积雪草酸和积雪草酸的总含量 (方法见附录A)	≥70%	≥85%	≥90%
生物效应评价	有效性(方法见附录C)	/	≥25%参照品	≥50%参照品
重金属	汞, mg/kg	符合《化妆品安全技术规范》的规定		
	砷, mg/kg			
	铅, mg/kg			
	镉, mg/kg			
微生物	菌落总数, CFU/mL			
	霉菌和酵母菌总数, CFU/mL			
	耐热大肠菌群			
	铜绿假单胞菌			
	金黄色葡萄球菌			
农残		按照 GB/T 39665 执行		

## 6 试验方法

除非另有说明,所有试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的三级水。

### 6.1 颜色与外观

在非直射阳光条件下,取样品进行目测。

### 6.2 气味

取样品感官判定,不应有异常气味。

### 6.3 羟基积雪草苷、积雪草苷、羟基积雪草酸、积雪草酸、积雪草苷 B 含量

按本标准附录A与附录B的方法进行检测。

### 6.4 微生物

菌落总数、霉菌和酵母菌总数、耐热大肠菌群、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌按《化妆品安全技术规范》微生物检验方法规定操作。

### 6.5 重金属

汞、砷,按《化妆品安全技术规范》中氢化物原子荧光光度法规定操作。

铅、镉,按《化妆品安全技术规范》中火焰原子吸收分光光度法规定操作。

### 6.6 有效性

根据不同规格原料,按本标准附录C或附录D的方法进行检测。

## 7 检验规则

### 7.1 出厂检验

积雪草提取物由生产厂质量检验部门取样检验,出厂检验项目为:外观、微生物、重金属、羟基积雪草甙含量(包括羟基积雪草苷和积雪草苷B含量)、积雪草苷含量、羟基积雪草酸含量、积雪草酸含量,生产厂应保证每批出厂的产品都按本标准分级。每一批出厂的产品都应有一定格式的质量证书,内容包括出厂检验项目、产品名称、生产厂名称、生产日期或批号、净重、执行标准编号。

### 7.2 型式检验

型式检验每年不应少于 2 次。型式检验的项目为技术要求中的全部项目，有下列情况之一时，也应进行型式检验：

- 1) 当原料、工艺和设备发生重大改变时；
- 2) 产品首次投产或停产 6 个月以上恢复生产时；
- 3) 出厂检验结果与上次型式检验有较大差异时；
- 4) 生产场所改变时；
- 5) 国家质量监督机构提出进行型式检验的要求时。

7.3 检验结果若有 1 项不符合标准要求，应重新自双倍量的包装中取样进行复验，复验结果仍有指标不符合标准要求，即整批产品判定为不合格。若微生物指标不符合标准要求，不得复检。

7.4 采样按 GB/T 6678、GB/T 6680 中有关规定进行，采样量 40 g，分为两份，分别装入两个洁净、干燥的玻璃瓶中，密封、贴上标签，一瓶供检验，另一瓶作留样备查。

7.5 检验结果的判定按 GB/T 8170 数值修约值比较法进行。

## 8 标志、包装、运输、贮藏和保质期

### 8.1 标志

产品销售包装图示标志应按 GB/T 191 执行，标注内容为：产品名称、商标(如有)、保质期(用生产日期、保质期或生产批号、限期使用日期等方式组合表示)、生产者名称、地址、净含量、执行标准号以及根据产品特点所应标注的其他内容。

### 8.2 包装

产品采用适宜包装，根据用户要求包装。

### 8.3 运输

本产品属于非危险品，任何运输工具可采用，在运输时应防火、防热、防雨淋、防受潮。

### 8.4 贮藏

常温通风处、干燥密封保存。

### 8.5 保质期

在符合规定的运输和贮存条件下，产品在包装完整和未启封的情况下，保质期按销售包装标注执行。

附 录 A  
(规范性)  
羟基积雪草酸/积雪草酸含量测定方法

#### A.1 原理

试样经甲醇提取，用高效液相色谱仪测定，外标法定量。

#### A.2 试剂和材料

A.2.1 水：GB/T 6682，一级。

A.2.2 甲醇：色谱纯；乙腈：色谱纯。

#### A.2.3 对照物质

羟基积雪草酸对照 CAS No.18449-41-7（纯度 $\geq$ 98%）；积雪草酸对照 CAS No.464-92-6（纯度 $\geq$ 98%）。

#### A.2.4 对照品溶液配制

取羟基积雪草酸对照品和积雪草酸对照品各 20 mg，精密称定，置同一 50 ml 容量瓶，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。

#### A.2.5 有机滤膜

孔径 0.45  $\mu$ m，材质为尼龙。

#### A.3 仪器设备

##### A.3.1 高效液相色谱仪（HPLC）

紫外检测器（UV）。

##### A.3.2 分析天平

感量不低于 0.0001 g。

##### A.3.3 超声波清洗仪

功率不低于 250 W。

#### A.4 测定步骤

##### A.4.1 试样制备

取供试品 30 mg，精密称定，置 50 mL 容量瓶中，加甲醇适量，超声，使之溶解，并用甲醇定容至刻度，摇匀，过滤，作为供试品溶液。每批供试品制备两份平行样。

测定参考条件

——色谱柱：C18 柱，300 mm $\times$ 3.9 mm（内径），5  $\mu$ m；

——流动相：甲醇:乙腈:水(30:30:40)，等度洗脱；

——流速：1.3 mL/min；

——柱温：28  $^{\circ}$ C；

——进样体积：20  $\mu$ L；

——检测波长：214 nm。

&lt;色谱图&gt;

mV

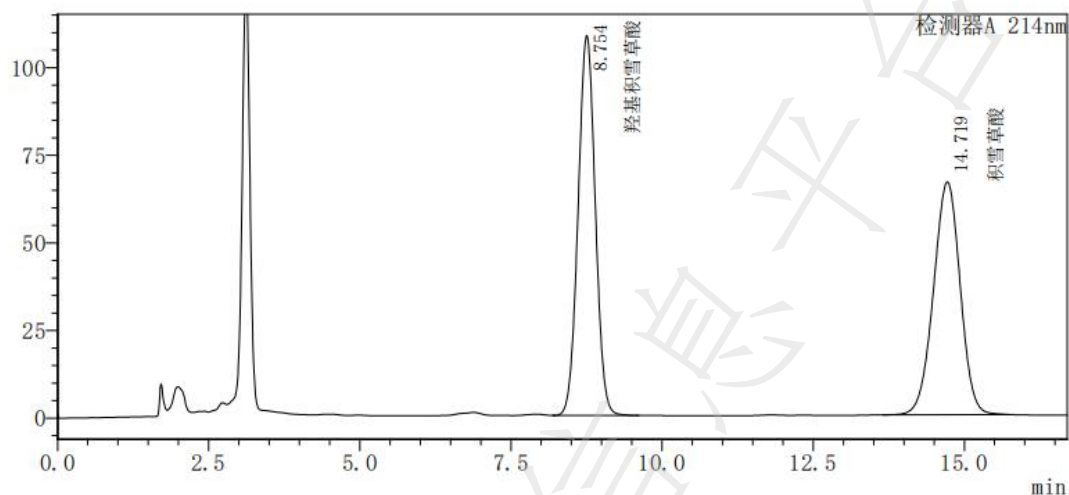


图 A.1 HPLC 色谱图

## A.5 测定法

取对照品溶液与供试品溶液 20  $\mu\text{L}$  分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按外标法以峰面积计算含量。两个平行样的相对偏差应 $\leq 0.5\%$ 。

计算公式：

$$C_{\text{样}} (\text{mg/mL}) = \frac{A_{\text{样}} \times C_{\text{对}} \times P_{\text{对}}}{A_{\text{对}} \times 100} \quad (\text{A.1})$$

式中：

$C_{\text{样}}$  ——测得供试品溶液中羟基积雪草酸组分或积雪草酸组分的浓度(mg/mL)

$A_{\text{样}}$  ——供试品溶液中羟基积雪草酸组分或积雪草酸组分的峰面积；

$C_{\text{对}}$  ——羟基积雪草酸对照品或积雪草酸对照品的浓度(mg/mL)；

$P_{\text{对}}$  ——为羟基积雪草酸对照品或积雪草酸对照品的纯度；

$A_{\text{对}}$  ——对照品溶液中羟基积雪草酸组分或积雪草酸组分的峰面积。

$$\text{总酸含量}(\%) = \frac{(C_{\text{样羟基}} + C_{\text{样积}}) \times 50}{W_{\text{样}}} \times 100\% \quad (\text{A.2})$$

式中：

$C_{\text{样羟基}}$  ——测得供试品溶液中羟基积雪草酸组分的浓度(mg/mL)；

$C_{\text{样积}}$  ——测得供试品溶液中积雪草酸组分的浓度(mg/mL)；

$W_{\text{样}}$  ——供试品的称量(mg)。

附 录 B  
(规范性)  
羟基积雪草苷/积雪草苷含量测定方法

### B.1 原理

试样经甲醇提取，用高效液相色谱仪测定，外标法定量。

### B.2 试剂和材料

B.2.1 水：GB/T 6682，一级。

B.2.2 甲醇：色谱纯；乙腈：色谱纯； $\beta$ -环糊精：分析纯。

### B.2.3 对照物质

羟基积雪草苷对照 CAS No.34540-22-2(纯度 $\geq$ 98%)；积雪草苷对照 CAS No.16830-15-2(纯度 $\geq$ 98%)；积雪草苷 B 对照 CAS No.125265-68-1(纯度 $\geq$ 98%)。

### B.2.4 对照品溶液配制

取羟基积雪草苷对照品、积雪草苷对照品和积雪草苷B对照品各 20 mg，精密称定，置同一 100 mL 容量瓶，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。

### B.2.5 有机滤膜

孔径 0.45  $\mu$ m，材质为尼龙。

### B.3 仪器设备

#### B.3.1 高效液相色谱仪 (HPLC)

紫外检测器 (UV)。

#### B.3.2 分析天平

感量不低于 0.0001 g。

#### B.3.3 超声波清洗仪

功率不低于 250 W。

### B.4 测定步骤

#### B.4.1 试样制备

取供试品 50 mg，精密称定，置 50 mL 容量瓶中，加甲醇适量，超声，使之溶解，并用甲醇定容至刻度，摇匀，过滤，作为供试品溶液。每批供试品制备两份平行样。

#### B.4.2 测定参考条件

- 色谱柱：C18 柱，250 mm $\times$ 4.6 mm (内径)，5  $\mu$ m；
- 流动相：乙腈-2 mmol/L  $\beta$ -环糊精溶液(24:76)，等度洗脱；
- 流速：1.0 mL/min；
- 柱温：35  $^{\circ}$ C；
- 进样体积：10  $\mu$ L；
- 检测波长：205 nm。

&lt;色谱图&gt;

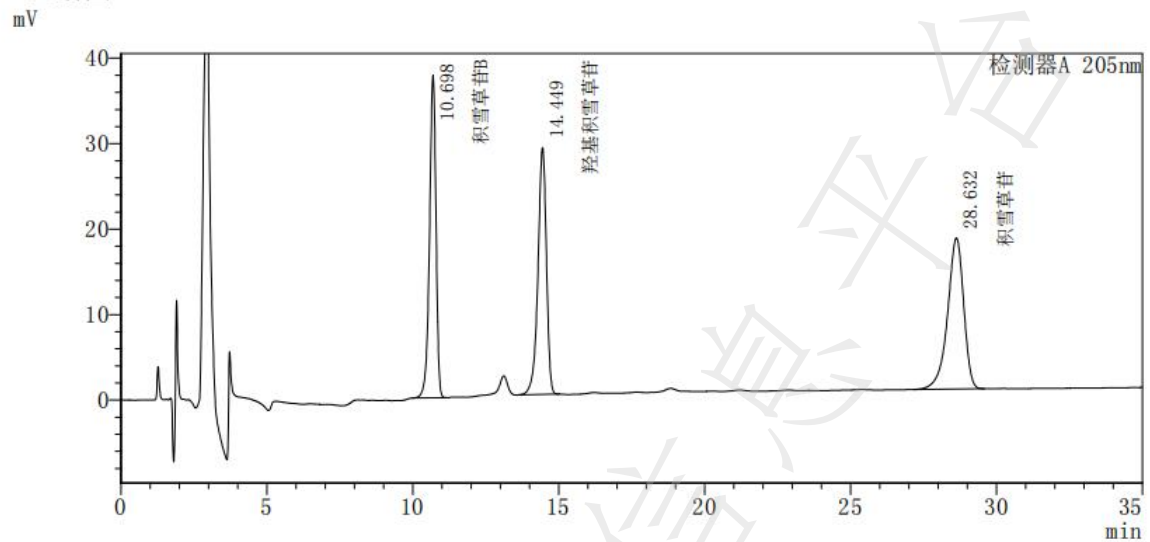


图 B.1 HPLC 色谱图

## B.4.3 测定法

取对照品溶液与供试品溶液10 μL 分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按外标法以峰面积计算含量。两个平行样的相对偏差应≤0.5%。

计算公式：

$$C_{\text{样}} (\text{ml/mL}) = \frac{A_{\text{样}} \times C_{\text{对}} \times P_{\text{对}}}{A_{\text{对}} \times 100} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

$C_{\text{样}}$  ——测得供试品溶液中羟基积雪草苷组分或积雪草苷B组分或积雪草苷组分的浓度(mg/mL)

$A_{\text{样}}$  ——供试品溶液中羟基积雪草苷组分或积雪草苷B组分或积雪草苷组分的峰面积；

$C_{\text{对}}$  ——羟基积雪草苷对照品或积雪草苷B对照品或积雪草苷对照品的浓度(mg/mL)；

$P_{\text{对}}$  ——羟基积雪草苷对照品或积雪草苷B对照品或积雪草苷对照品的纯度；

$A_{\text{对}}$  ——对照品溶液中羟基积雪草苷组分或积雪草苷B组分或积雪草苷组分的峰面积；

$$\text{总苷含量}(\%) = \frac{(C_{\text{样羟基}} + C_{\text{样积}}) \times 50}{W_{\text{样}}} \times 100\% \dots\dots\dots (B.2)$$

式中：

$C_{\text{样羟基}}$  ——测得供试品溶液中羟基积雪草苷组分和积雪草苷B组分的浓度(mg/mL)；

$C_{\text{样积}}$  ——测得供试品溶液中积雪草苷组分的浓度(mg/mL)。

$W_{\text{样}}$  ——为供试品的称量(mg)；

## 附录 C (规范性)

### 积雪草提取物、羟基积雪草酸/积雪草酸生物效应评价方法

#### C.1 范围

本方法规定了一种积雪草提取物、羟基积雪草酸/积雪草酸生物效应的斑马鱼胚胎评价方法，适用于化妆品原料积雪草提取物的快速检测。

#### C.2 方法原理

积雪草提取物含有羟基积雪草苷、积雪草苷、积雪草酸等多种活性成分，但不同来源的提取物因工艺和原料差异导致成分组成和含量波动较大。现有研究证明积雪草有较强的舒缓功效，而斑马鱼胚胎的中性粒细胞和人体中性粒细胞在形态、生化和生理功能上高度相似。应用  $\text{CuSO}_4$  诱导斑马鱼胚胎侧线区域神经丘细胞损伤而引起中性粒细胞聚集的模型进行测试，比较受试物处理组和模型对照组的鱼胚胎侧线区域的中性粒细胞的数量变化，评价积雪草提取物、羟基积雪草酸/积雪草酸舒缓的生物效应。

#### C.3 生物模型

实验动物模型及维护要求应符合 T/HPCIA 003-2022 要求。

#### C.4 材料试剂

##### C.4.1 斑马鱼胚胎

推荐使用带有中性粒细胞荧光标记的转基因斑马鱼或野生型斑马鱼。

##### C.4.2 斑马鱼交配盒

由玻璃、不锈钢或其它惰性材料制成，配备网筛（网格大小为  $2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ ，由不锈钢或多项材料组成用来保护鱼卵）。

##### C.4.3 实验用水

采用符合 GB/T 6682 规定的一级水。

##### C.4.4 缓冲水

用于空白对照组及胚胎培养，推荐使用 Holt-Buffer, E3 Buffer等，具体配制见下。

##### C.4.4.1 Holt-Buffer 配制方法

a) 按照 (C.1) 表格中的试剂，加入 2 L 烧杯中，用超纯水定容至 2000 mL。

表 C.1 Holt-Buffer 配方表

配方成分	添加量
NaCl	7.000 g
$\text{NaHCO}_3$	0.400 g
KCl	0.100 g
$\text{CaCl}_2$	0.235 g

b) 使用真空过滤器（孔径： $0.2\ \mu\text{m}$ ）过滤。

c) 使用高压灭菌锅灭菌。

##### C.4.4.2 E3 Buffer 配制方法

a) 60×母液：按照 (C.2) 表格中的试剂加入 2 L 烧杯中，用超纯水定容至 2000 mL。

表 C.2 60×E3 Buffer 配方表

配方成分	添加量
NaCl	34.800 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5.800 g
KCl	1.600 g
CaCl <sub>2</sub>	0.235 g

b) 使用氢氧化钠调 pH 至 7.2。

c) 1×E3 Buffer: 量取 16.5 mL 的 60×培养液, 用水定容至 1 L。

#### C.4.5 二甲基亚砜 (DMSO)

分析纯, CAS号: 67-68-5。

#### C.4.6 羟基积雪草酸标准品

纯度≥98%, CAS号: 18449-41-7。

#### C.5 仪器设备

##### C.5.1 斑马鱼养殖系统

##### C.5.2 生化培养箱

##### C.5.3 分析天平

感量不低于 0.0001 g。

##### C.5.4 移液器

##### C.5.5 光学显微镜

放大倍数不低于 50 倍 (如连续变焦体式显微镜、荧光显微镜等)。

##### C.5.6 实验室一般常见器材

#### C.6 实验过程

##### C.6.1 样品前处理

###### C.6.1.1 造模剂

硫酸铜溶液: 称取 8.0 mg 硫酸铜粉末于离心管中, 加入 5 mL 纯水溶解, 轻轻摇晃至完全溶解, 配制 10 mM 硫酸铜母液, 用 Holt-Buffer 缓冲液稀释 500 倍得到 20 μM 硫酸铜溶液, 备用。

将 20 μM 硫酸铜溶液与 Holt-Buffer 缓冲液同体积混合, 得到 10 μM 硫酸铜工作液。

###### C.6.1.2 参照品

羟基积雪草酸标准品溶液: 将 20 mg 羟基积雪草酸标准品粉末加入适量 DMSO 溶液, 振荡至完全溶解, 配置成 100 mM 羟基积雪草酸标准品母液, -20 °C 避光保存, 备用。临用时, 用 Holt-Buffer 缓冲液稀释得到 150 μM 羟基积雪草酸溶液, 备用。

将 20 μM 硫酸铜溶液与 150 μM 羟基积雪草酸溶液同体积混合, 得到 10 μM 硫酸铜与 75 μM 羟基积雪草酸混合溶液, 备用。

###### C.6.1.3 测试样品

精确称量测试样品, 使用 Holt-Buffer 缓冲液将其溶解为 3 g/L (积雪草提取物) 或 0.05 g/L (羟基积雪草酸/积雪草酸) 的工作液, 备用。

将 20 μM 硫酸铜溶液与不同浓度的测试样品同体积混合, 使得硫酸铜的最终浓度为 10 μM, 积雪草提取物的最终浓度为 1.5 g/L (积雪草提取物) 或 0.025 g/L (羟基积雪草酸/积雪草酸)。

##### C.6.2 斑马鱼胚胎的获取

实验前1天下午喂食后 1 h，选取健康的成年带中性粒细胞荧光标记斑马鱼或野生型斑马鱼，雌雄各半，置配种缸中，每缸1对，并用隔板将雌雄隔开。次日上午9:00，抽离隔板，自由交配后 1 h 后收集胚胎，挑选发育正常受精卵于容器中，加入适量缓冲水，置于  $28.5 \pm 0.5$  °C 生化培养箱中孵育。正常胚胎发育状态应参考 T/HPCIA 003-2022 《化妆品 斑马鱼实验通用技术规范》要求。

### C. 6. 3 实验方法

#### C. 6. 3. 1 试验分组与处理

随机挑选正常发育的带有中性粒细胞荧光标记的 72 hpf 斑马鱼胚胎于6孔板，每孔24尾。去除原有Holt-Buffer 缓冲液，每孔加入 6 mL 对应溶液。

——空白对照组：Holt-Buffer 缓冲液。

——模型对照组：10  $\mu$ M 硫酸铜溶液。

——参照品组：含 10  $\mu$ M 硫酸铜溶液和 75  $\mu$ M 羟基积雪草酸对照品的混合溶液。

——测试样品组：含 10  $\mu$ M 硫酸铜溶液和测试样品的混合溶液。

C. 6. 3. 1. 1 盖上盖板，置于  $28.5 \pm 0.5$  °C 生化培养箱中孵育 50 min。移去受试溶液，用 Holt-Buffer 缓冲液清洗 2~3 次。

C. 6. 3. 1. 2 若使用带中性粒细胞荧光标记的斑马鱼胚胎即可按 C.6.3.2 进行样本分析，若使用野生型斑马鱼胚胎则需按以下步骤进行固定和染色后才可进行样本分析。

##### C. 6. 3. 1. 2. 1 固定

将幼鱼转移到 2mL 管中。取出溶液，在 10 min内加入0.5 mL 的4% PFA固定液（通用型组织固定液），在室温下固定胚胎1小时。

##### C. 6. 3. 1. 2. 2 染色

- 移除 PFA 并用 1 mL PBST 清洗 3 次，每次 5 min。取出 PBST 并用 1 mL 50%乙醇洗涤 3 min。
- 移除乙醇，加入 0.5 mL 含苯酚的苏丹黑染色工作液。将胚胎在室温下放置 1 小时，轻轻摇动。
- 移除苏丹黑染色液，加入 1mL 70%乙醇洗涤胚胎 5 min，共 4 次。注意：苏丹黑染色液很难看到胚胎，移除苏丹黑染色液时请注意不要吸走胚胎。如果洗涤 4 次后染色仍然很深，可以用 70%醇再洗涤胚胎 2 次。
- 除去 70%乙醇，用 PBST 冲洗 2 次，每次 5 min，加入 0.5 mL 漂白水，开盖，室温孵育 5 min。
- 除去漂白剂溶液，用 1mL 70%乙醇轻轻摇晃冲洗 5 min，然后用 1 mL PBST 冲洗 3 min。
- 除去 PBST，加入 0.5 mL 50%甘油（溶于 PBS），室温放置 1 h 或 4°C 过夜。

#### C. 6. 3. 2 样本分析

用 4% 甲基纤维素将斑马鱼胚胎固定于载玻片上，呈侧卧位，于荧光正置显微镜下对鱼胚胎泄殖孔至尾部中性粒细胞的分布进行拍摄。

### C. 7 数据统计和结果计算

#### C. 7. 1 数据统计

计数每尾鱼胚胎从肛门起四分之三尾部侧线区域（见图C.1、图C.2）的中性粒细胞数目。

#### C. 7. 2 结果计算

计算中性粒细胞聚集抑制率：

$$\text{抑制率} = \frac{M-T}{M} \times 100\% \quad \text{..... (C.1)}$$

式中：

T —— 受试物处理组鱼胚胎中性粒细胞数目的平均值；

M —— 模型对照组鱼胚胎中性粒细胞数目的平均值；

对受试物处理组鱼胚胎中性粒细胞数目和模型对照组中性粒细胞数目进行双尾T检验，取得p值。

## C.8 试验有效性验证

### C.8.1 测试判定

各测试组暴露完成后至少 90 % 鱼胚胎存活，否则对应测试组结果无效。

### C.8.2 测试要求

每批次测试须设置参照组，要求每批次测试参照组鱼胚胎中性粒细胞聚集抑制率为正数且  $p < 0.05$ 。

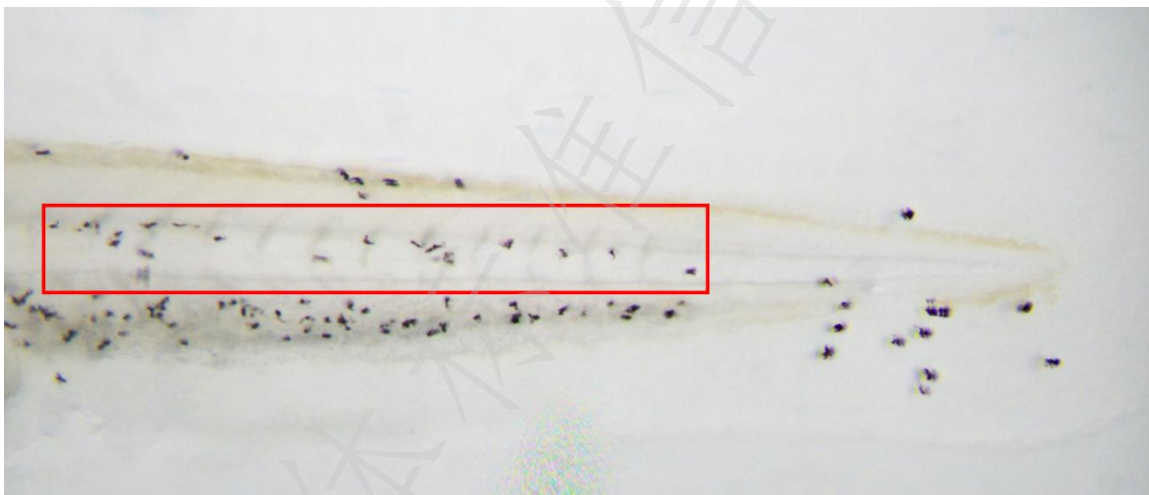
## C.9 结果解读与判定

### C.9.1 中性粒细胞聚集抑制率

受试物在对应测试浓度下对中性粒细胞的聚集抑制率。

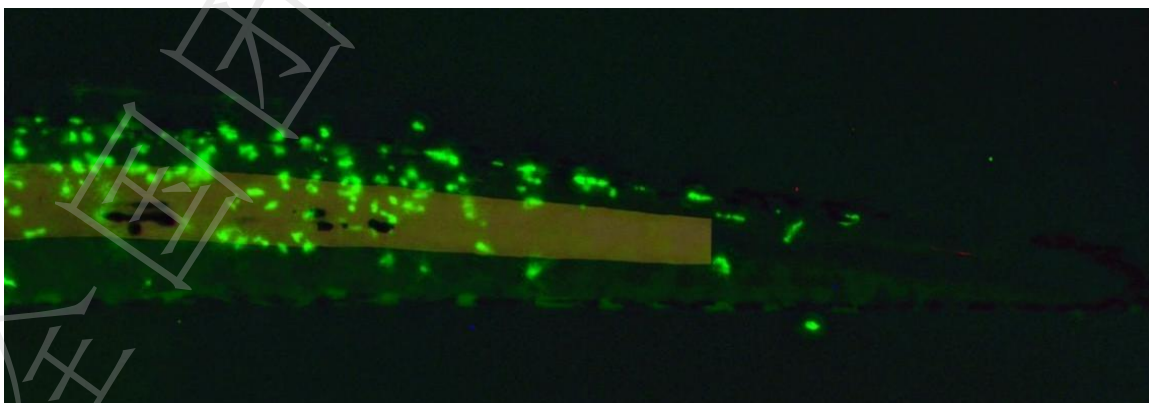
### C.9.2 评价

评价受试物处理组中性粒细胞聚集抑制率与参照组中性粒细胞聚集抑制率的比值，根据正文表1对积雪草提取物的质量进行分级，根据正文表3对羟基积雪草酸/积雪草酸的质量进行分级。



<sup>a</sup> 深色点即为染色的中性粒细胞，红色框内即为计数区域

图 C.1 野生型斑马鱼胚胎尾部中性粒细胞代表性图



<sup>a</sup> 绿色点即为带荧光标记的中性粒细胞，深色区域即为计数区域

图 C.2 荧光标记斑马鱼胚胎尾部中性粒细胞代表性图

## 附录 D (规范性)

### 羟基积雪草苷/积雪草苷生物效应评价方法

#### D.1 范围

本方法规定了一种羟基积雪草苷/积雪草苷生物效应的斑马鱼胚胎评价方法，适用于化妆品原料羟基积雪草苷/积雪草苷的快速检测。

#### D.2 方法原理

市售羟基积雪草苷/积雪草苷质量参差不齐，相同的标示含量所对应的效价各不相同，因此需通过生物效应评价客观评价其活性。现有研究证明，羟基积雪草苷/积雪草苷具有修护功效，其机制可能与促进血液血管新生相关。本研究选用斑马鱼胚胎作为实验模型，其通体透明的特性使其成为心血管研究的理想对象。借助显微观察技术，可直接清晰观测血管生长发育过程，通过精确测量体节间血管的新生长度增长率，可定量评价样品修护的生物效应。

#### D.3 生物模型

实验动物模型及维护要求应符合 T/HPCIA 003-2022《化妆品 斑马鱼实验通用技术规范》要求。

#### D.4 材料试剂

##### D.4.1 斑马鱼胚胎

推荐使用血管内皮细胞荧光标记的转基因斑马鱼品系。

##### D.4.2 斑马鱼交配盒

由玻璃、不锈钢或其它惰性材料制成，配备网筛（网格大小为 2 mm×2 mm，由不锈钢或多项材料组成用来保护鱼卵）。

##### D.4.3 实验用水

采用符合 GB/T 6682 规定的一级水。

##### D.4.4 缓冲水

同 C.4.4。

##### D.4.5 二甲基亚砜 (DMSO)

分析纯，CAS号：67-68-5。

##### D.4.6 羟基积雪草苷标准品

纯度≥98%，CAS号：34540-22-2。

##### D.4.7 索拉非尼

纯度≥99%，CAS号：284461-73-0。

#### D.5 仪器设备

##### D.5.1 斑马鱼养殖系统

##### D.5.2 生化培养箱

##### D.5.3 分析天平

感量不低于 0.0001 g。

#### D.5.4 移液器

#### D.5.5 光学显微镜

放大倍数不低于 50 倍（如连续变焦体式显微镜、荧光显微镜等）。

#### D.5.6 实验室一般常见器材

### D.6 实验过程

#### D.6.1 样品前处理

##### D.6.1.1 造模剂

精确称量索拉非尼 1.0 mg，加入 DMSO，将其配制成浓度为 2 mM 的母液，分装，置 -20 °C 冰箱中储存，备用。实验前，将母液从冰箱中取出，室温放置融化，使用 Holt-Buffer 缓冲液将其溶解成 4 μM 的工作液，备用。

将 4 μM 索拉非尼与 Holt-Buffer 缓冲液同体积混合，使得索拉非尼最终浓度为 2 μM。

##### D.6.1.2 参照品

精确称量羟基积雪草苷标准品，使用 Holt-Buffer 缓冲液将其溶解为 9 g/L 的工作液，备用。

参照品组造模剂：将 4 μM 索拉非尼和羟基积雪草苷标准品同体积混合，使得索拉非尼最终浓度为 2 μM，羟基积雪草苷标准品的最终浓度为 4.5 g/L。

参照品溶液：将 9 g/L 羟基积雪草苷标准品溶液用 Holt-Buffer 缓冲液稀释，使得其最终浓度为 4.5 g/L。

羟基积雪草苷/积雪草苷测试样品

精确称量羟基积雪草苷/积雪草苷测试样品，使用 Holt-Buffer 缓冲液将其溶解为 6 g/L 的工作液，备用。

测试样品造模剂：将 4 μM 索拉非尼和羟基积雪草苷/积雪草苷测试样品同体积混合，使得索拉非尼最终浓度为 2 μM，羟基积雪草苷/积雪草苷测试样品的最终浓度为 3 g/L。

测试样品溶液：将 6 g/L 羟基积雪草苷/积雪草苷测试样品溶液用 Holt-Buffer 缓冲液稀释，使得其最终浓度为 3 g/L。

#### D.6.2 斑马鱼胚胎的获取

实验前 1 天下午喂食后 1 h，选取健康的成年血管内皮细胞荧光标记的转基因斑马鱼，雌雄各半，置配种缸中，每缸 1 对，并用隔板将雌雄隔开。次日上午 9:00，抽离隔板，自由交配后 1 h 后收集胚胎，挑选发育正常受精卵于容器中，加入适量缓冲水，置于 28.5 ± 0.5 °C 生化培养箱中孵育。正常胚胎发育状态应参考 T/HPCIA 003—2022《化妆品 斑马鱼实验通用技术规范》要求。

#### D.6.3 实验方法

##### D.6.3.1 试验分组与处理

D.6.3.1.1 每组随机挑选 30 尾鱼胚胎，转移至 24 孔板中，每孔 10 尾，每组 3 孔。

D.6.3.1.2 本试验根据以下分组加入对应溶液 1 mL/孔：

——空白对照组：Holt-Buffer 缓冲液。

——模型对照组：2 μM 索拉非尼溶液。

——参照品组：含 2 μM 索拉非尼和 4.5 g/L 羟基积雪草苷标准品的混合溶液。

——测试样品组：含 2 μM 索拉非尼和 3 g/L 测试样品溶液的混合溶液。

D.6.3.1.3 放置于 28 ± 0.5 °C 恒温箱中孵育 6 h。

D.6.3.1.4 6h 后除空白对照组外，其余组移去溶液，用 Holt-Buffer 缓冲液清洗 1 遍，根据以下分组加入对应溶液 2 mL/孔。

——空白对照组：Holt-Buffer 缓冲液。

——模型对照组：Holt-Buffer 缓冲液。

——参照品组：4.5 g/L 羟基积雪草苷标准品溶液。

——测试样品组：3 g/L 测试样品溶液。

D. 6. 3. 1. 5 放置于 28±0.5 °C 恒温箱中孵育 6 h。培养至 72±0.5 hpf。

#### D. 6. 3. 2 样本分析

用 4% 甲基纤维素固定鱼胚胎，于显微镜下对鱼胚胎体节间血管进行拍摄。

### D. 7 数据统计和结果计算

#### D. 7. 1 数据统计

用软件（如 photoshop）对每尾鱼胚胎体节间血管（见图D.1）长度进行测量取平均值。

#### D. 7. 2 结果计算

计算相对体节间血管新生长度：

$$\text{相对血管新生长度} = \frac{T}{C} \dots\dots\dots (D.1)$$

式中：

T —— 受试物处理组鱼胚胎体节血管长度的平均值；

C —— 空白对照组鱼胚胎体节间血管长度的平均值；

对受试物处理组鱼胚胎体节间血管长度和模型组体节间血管长度进行双尾T检验，取得p值。

### D. 8 试验有效性验证

#### D. 8. 1 测试判定

各测试组暴露完成后至少 90% 鱼胚胎存活，否则对应测试组结果无效。

#### D. 8. 2 测试要求

每批次测试须设置参照组，要求每批次测试参照组鱼胚胎相对血管新生长度为正数且  $p < 0.05$ 。

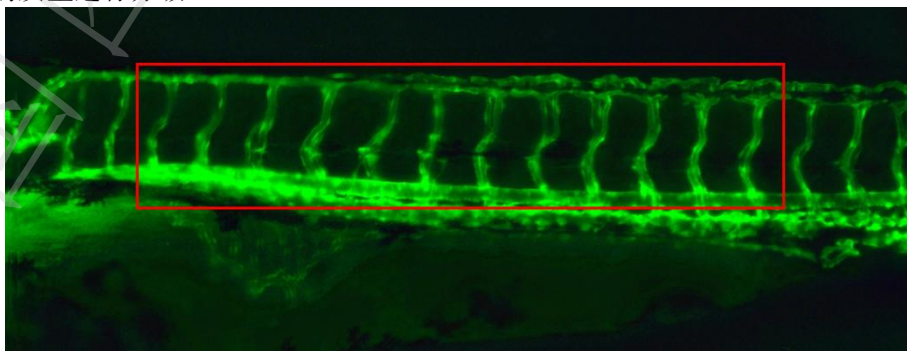
### D. 9 结果解读与判定

#### D. 9. 1 相对血管新生长度

受试物在对应测试浓度下相对血管新生长度。

#### D. 9. 2 评价

评价受试物处理组相对血管新生长度与参照组相对血管新生长度的比值，根据正文表2对羟基积雪草苷/积雪草苷的质量进行分级。



<sup>a</sup> 统计红色框内体节间新生血管新生长度

图 D. 1 斑马鱼胚胎体节间新生血管长度测量位置图