

ICS: 71.100.70

Y40

团 体 标 准

T/HPCIA 006-2022

代替 T/HPCIA 006-2021

化妆品 温和刺激性的测定 斑马鱼胚法

Cosmetics-Mild irritation-Zebrafish(*Danio rerio*) embryo assay

2022年05月05日发布

2022年05月05日实施

广州开发区黄埔化妆品产业协会 发布

目 录

前 言.....	3
1 范围.....	4
2 术语和定义.....	4
3 规范性引用文件.....	4
4 方法原理.....	4
5 生物模型.....	4
6 材料试剂.....	5
7 仪器设备.....	5
8 实验过程.....	5
9 结果计算.....	6
10 质量控制.....	6
11 废弃物处置.....	7
附录 A（资料性附录）胚胎正常发育参考图.....	8
附录 B（资料性附录）产卵盒参考示意图.....	9
附录 C（资料性附录）判定标准参考图.....	10
附录 D（资料性附录）化妆品及原料前处理参考方法.....	11
附录 E（资料性附录）斑马鱼养鱼及维护.....	12



前 言

本标准是GB/T 1.1-2020给出规则起草。

本标准代替T/HPCIA 006-2021《化妆品 温和刺激性的测定 斑马鱼胚法》。

本标准与T/HPCIA 006-2021相比，除编辑性修改外主要技术变化如下：

- 增加了刺激性和无可观察效应浓度两个术语和定义；
- 修改了实验的方法原理；
- 修改了胚胎缓冲水的配置方法；
- 修改了阳性对照组的储备溶液浓度；
- 增加了预试验的实验方法；
- 增加了视频录像的实验要求；
- 修改了结果计算的要求；
- 修改了结果判定的测试终点和评价指标；
- 修改了质量控制的空白对照试验和阳性对照；
- 增加了质量控制的溶剂对照；
- 修改附录D（资料性附录）化妆品及原料前处理参考方法。

本标准由广州开发区黄埔化妆品产业协会提出。

本标准由广州开发区黄埔化妆品产业协会归口。

本标准起草单位：澳思美日用化工（广州）有限公司、广州睿森生物科技有限公司、广东袋鼠妈妈生物科技有限公司、润本生物技术股份有限公司、广州市暨优生物科技有限公司、广州奥蓓斯化妆品有限公司、广州市络捷生物科技有限公司、广州易和生物科技有限公司、广州鲁比生物科技有限公司、广州度普化妆品科学研究院、皓雨（广州）化妆品制造有限公司、广东省保化检测中心有限公司、广州保化斑马鱼检测技术有限公司、广东药科大学、广东省人民医院、暨南大学化妆品与美容科学研究院。

本标准主要起草人：郑伟东、梅文杰、肖德凯、黄伟雄、谢水林、孙永、王俊林、何斌、王芬、黄裕、罗欣茹、潘武、杨涛、黄晓婷、刘宁芝、袁婵龄、邹俊、黄裕、赵海山、陈小佳、王雅馨、何露露、何铭杰。

本标准所代替标准历次发布情况为：

- T/HPCIA 006-2021。

化妆品 温和刺激性的测定 斑马鱼胚法

1 范围

本标准规定了评价化妆品温和刺激性的斑马鱼胚实验的方法原理及操作。
本标准适用于化妆品（膏霜、乳液、凝胶、精华等）及化妆品原料的温和刺激性评价。

2 术语和定义

2.1. hpf

受精后小时数的英文缩写，即“hours post-fertilization”。

2.2. 累计死亡率 Cumulative mortality rate

累计死亡胚胎数占胚胎总数的比率。

2.3. 摆动次数

斑马鱼卵黄囊位置的移动的次数，即为摆动次数。

2.4. 刺激性

皮肤刺激性主要表现为皮肤的疼痛或瘙痒。在 24 hpf（Prim-5 stage）时期，斑马鱼胚胎运动神经已发育，但尚未有自主运动产生，此时外界的疼痛或瘙痒刺激会使胚胎出现行为学变化。

2.5. 无可观察效应浓度

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，即“no observed effect concentration; NOEC”。

3 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。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件，凡不注明日期的引用文件，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（2015 版）

QB/T 1684-2015 化妆品检验规则

DB32/T 3979-2021 实验用 斑马鱼 饲养技术条件

OECD 236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test

4 方法原理

使用 96 孔细胞培养板，在空白对照或溶剂对照控制的条件下，将 24 hpf 的斑马鱼胚胎置于受试样品中，于体式显微镜下观察（30 s 内），根据胚胎对受试样品的温和刺激性反应记录好鱼胚刺激摆动（卵黄囊位置的移动）的次数，表征样品的温和刺激性。

5 生物模型

5.1 成鱼

采用性成熟、健康无畸形、产卵量高、产卵质量好的野生型斑马鱼 zebra fish (*Danio rerio*) 成鱼（4~18 个月）进行产卵。成鱼的体长 3~5 cm，雄鱼体型修长，体色为柠檬色，腹部扁平。雌鱼体型丰满，腹部膨大、银亮，体色为银灰色。

5.2 鱼胚

实验鱼胚为处于 24 hpf 时期发育正常的受精卵，实物鉴别参考附录 A。

5.3 鱼的养殖维护

斑马鱼养殖及维护参考附录 E。

6 材料试剂

6.1 材料

6.1.1 斑马鱼交配盒。（参考附录 B）

6.1.2 胚胎收集器：100.0 mm 培养皿。（参考附录 B）

细胞培养板：96 孔细胞培养板：每孔容积 200 μ L。

6.1.3 塑料滴管：3.0 ml，长约 150.0 mm。

6.2 试剂

除非另有说明，分析时使用符合国家标准和分析纯试剂。

6.2.1.氯化钠（NaCl）。

6.2.2.碳酸氢钠（NaHCO₃）。

6.2.3.氯化钾（KCl）。

6.2.4.无水氯化钙（CaCl₂）。

6.2.5.胚胎缓冲水。

6.3 对照组溶液

6.3.1.空白对照组：胚胎缓冲水。

胚胎缓冲水配置方法：称取 7.000 g 氯化钠，0.400 g 碳酸氢钠，0.100 g 氯化钾，0.235 g 无水氯化钙溶于 2 L 水配制而成。

6.3.2 阳性对照组：十二烷基硫酸钠（SDS）标准储备溶液（1 mMol/L，0.29 mg/ml）。

7 仪器设备

7.1 斑马鱼养殖系统：包括制水、储水、供水、排水及水循环系统。

7.2 连续变倍体视显微镜（带拍照功能）：最小放大倍数为目镜 230 \times ，物镜 1 \times 。

7.3 恒温培养箱：温度调至 28 \pm 0.5 $^{\circ}$ C。

7.4 冰箱：冷藏室 2 $^{\circ}$ C \sim 8 $^{\circ}$ C；冰冻室 \leq -18 $^{\circ}$ C。

7.5 电子天平：精度 0.1 mg。

7.6 pH 计：测量范围 0 \sim 14,最小分度为 0.01 pH 单位。

7.7 移液枪：0.5 μ l \sim 10 μ l、10 μ l \sim 100 μ l、100 μ l \sim 1000 μ l、1000 μ l \sim 5000 μ l。

7.8 温度计：0 $^{\circ}$ C \sim 50 $^{\circ}$ C。

7.9 实验室一般常规器材。

8 实验过程

8.1 胚胎准备

斑马鱼配种时，产卵盒外缸预先加入 2/3 的养殖水，接着套入带有胚胎分离作用的内缸，插入挡板，隔开雌雄两鱼。于实验前一天晚上选取大于 4 个月的性成熟的待配种斑马鱼按照 1:1 或 1:2 的雌雄比置于带有挡板的产卵盒中过夜，避光。

次日早晨打开光源，抽出产卵盒的挡板使之进行交配产卵。交配 1 h 后，检查各缸成鱼产卵情况，用漏网勺收集斑马鱼交配产生的胚胎,养殖水冲洗置 90mm 培养皿中，平均每个培养皿胚胎数量不超过 100 枚。清除培养皿中的异物后，放入恒温培养箱里孵育。

8.2 样品前处理

参考附录 D 化妆品及原料前处理方法。

8.3 实验方法

8.3.1 预实验

预试验用于确定受试物的 NOEC 浓度，为后续正式试验设置提供参考。

选取发育正常的 24 hpf (Prim 5 stage) 的斑马鱼胚胎，放入 96 孔板中，每孔 1 颗，每组 8 孔，在不伤害胚胎的情况下除去 96 孔板中的胚胎缓冲水，向每孔迅速加入 100 μL 呈浓度梯度的受试物溶液。将 96 孔板放入 $28.5\pm 0.5^\circ\text{C}$ 的生化培养箱中孵育 15 min 后，置于显微镜下观察斑马鱼胚胎畸形、死亡以及产生刺激性情况。随后洗去受试物溶液，换为胚胎缓冲水，继续在 $28.5\pm 0.5^\circ\text{C}$ 的生化培养箱中孵育 24 小时后，置于显微镜下观察斑马鱼胚胎情况。以两个观察时间点下，均为观察到刺激性及明显异常为受试品的 NOEC 浓度。

8.3.2 正式实验

在体视显微镜下用塑料滴管随机挑选 24 hpf 发育正常的胚胎用于实验（此时的胚胎为体节期，参见附录 A）。使用 96 孔细胞培养板为实验载体，每孔加入胚胎 10 枚。

用塑料吸管吸干胚胎缓冲水后，每孔加入 200 μL 受试样品液于上述 96 孔细胞培养板中，静置。根据预实验结果，确定正式试验的受试品浓度范围，试验最高浓度不得高于 NOEC 值。根据测试需要，等比稀释设置受试品浓度梯度，浓度倍数不低于 2 倍。同时设置空白对照组（或溶液对照组）、阳性对照组。

28.5 $^\circ\text{C}$ 静置 15 分钟后，于体视显微镜下（物镜 2~3 倍）拍摄不小于 30s 的视频，观察和记录胚胎刺激摆动（卵黄囊位置的移动）的情况。

8.4 实验要求

视频录像的鱼胚位于界面的正中间，鱼胚没有被人为操作所损伤。

9 结果计算

9.1 分别记录及计算各组别中每个平行组的胚胎（24 hpf）在 30 s 内的累计刺激摆动次数。

9.2 使用 GraphPad Prism 8.0 统计分析软件(或类似功能工具)对累计刺激摆动次数进行统计分析，数值用均值 \pm 标准误 (Mean \pm SEM) 表示，使用 GraphPad Prism 8.0 不同组间利用 One-way ANOVA 进行显著性分析，判定 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

10 结果判定

以 30 s 为测试终点，胚胎刺激摆动为评价指标，见表 1。

表 1 测试终点和评价指标

终点反应	终点评分	刺激性分类	评价指标
鱼胚 (摆动次数) (W)	$P < 0.05$	无刺激性	W 与空白对照组相比无显著性差异
	$P > 0.05$	有刺激性	W 与空白对照组相比有显著性差异

11 质量控制

11.1 空白对照试验

空白对照试验结果符合下列要求，结果方有效。否则，应查明原因后重新进行试验。

a) 实验开始 15 分钟内，空白对照组斑马鱼胚胎死亡率 $\leq 0\%$ 。

11.2 阳性对照

阳性对照试验结果符合下列要求，结果方有效。否则，应查明原因后重新进行试验。

a) 实验开始 15 分钟内，阳性对照组斑马鱼胚胎死亡率 $\leq 0\%$ 。

b) 实验开始 15 分钟内，阳性对照组摆动次数与空白组（或溶剂对照）有显著性提高。

11.3 溶剂对照

若设置溶剂对照，则溶剂对照试验结果符合下列要求，结果方有效。否则，应查明原因后重新进行试验。

a) 实验开始 15 分钟内，空白对照组斑马鱼胚胎死亡率 $\leq 0\%$ 。

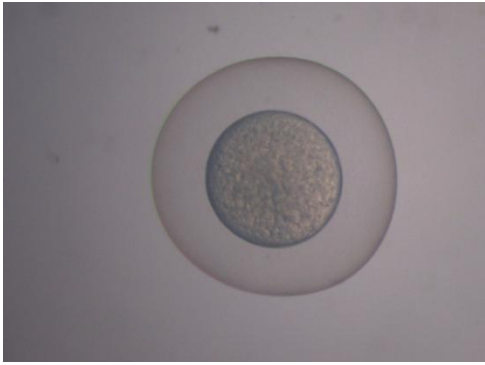
b) 实验开始 15 分钟内，溶剂对照与空白对照无显著性差异。

12 废弃物处置

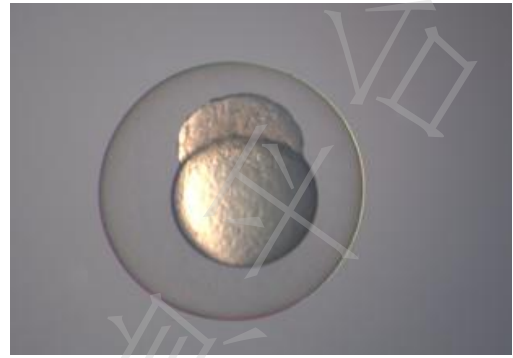
试验用斑马鱼胚于 2~8 °C 冷水中灭活处理后按一般废弃物处置。具有温和刺激性的样品、含有十二烷基硫酸钠（SDS）的废液按危险废物处置。



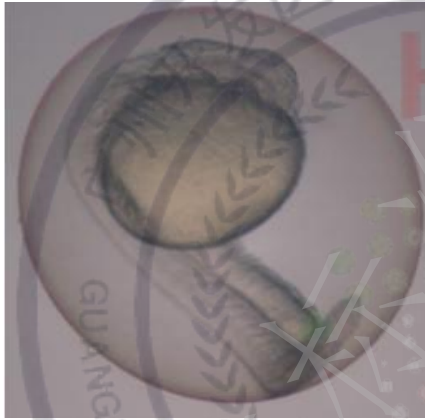
附录 A
(资料性附录)
胚胎正常发育参考图



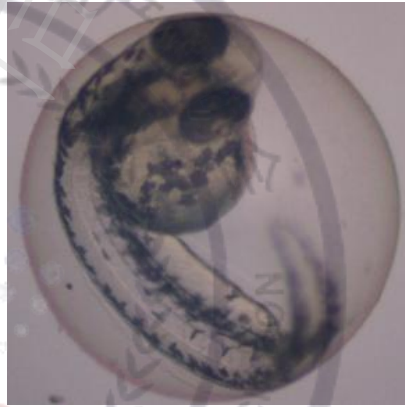
0 hpf (合子期)



6~8 hpf (原肠期)



24 hpf (体节期)

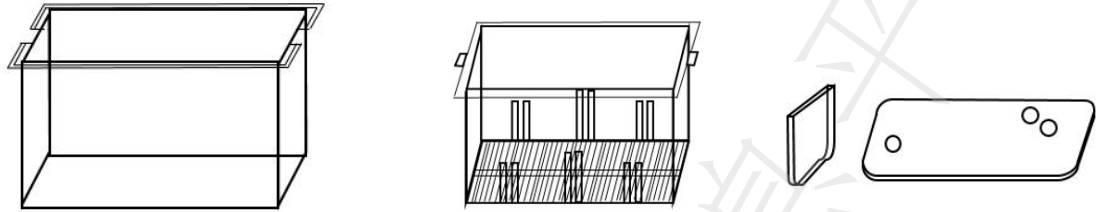


48 hpf (孵化期)



72 hpf (幼鱼)

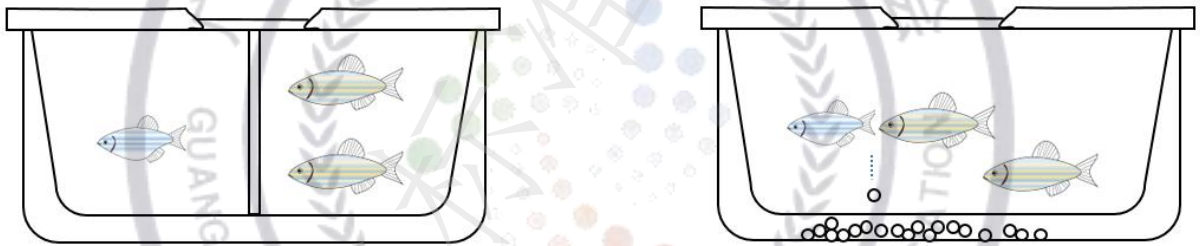
附录 B
(资料性附录)
产卵盒参考示意图



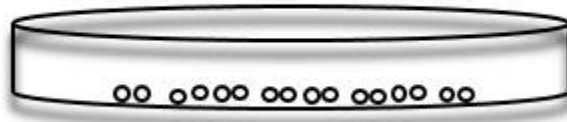
外缸：225*115*115 mm

内缸 220*110*85 mm

挡板、外盖



斑马鱼配种



胚胎收集培养皿

附录 C
(资料性附录)
判定标准参考图

C1.鱼胚凝结(死亡) 鉴别参考图

胚胎凝结(死亡)



附录 D

(资料性附录)

化妆品及原料前处理参考方法

D1.水溶性原料

可用胚胎缓冲液直接将受试物溶解配制成测试溶液。

D2.非水溶性原料

可选常用溶剂如甲醇、二甲基亚砷、乙醇等助溶。如将受试物和有机溶剂按 1: 1 (重量 g: 体积 mL)混匀,超声处理 10 min,然后加入鱼胚胎培养液配制成所需浓度,震荡 30s 后于 6500×g 离心 10 min。取上清液进行测试。

D3.化妆品产品

水溶性产品: 可用鱼胚胎培养液直接将受试物溶解配制成测试溶液。

非水溶性产品: 可选常用溶剂如甲醇、二甲基亚砷、乙醇等助溶。如将受试物和有机溶剂按 1: 1 (重量 g: 体积 mL)混匀,超声处理 10 min,然后加入鱼胚胎培养液配制成所需浓度,震荡 30 s 后于 6500×g 离心 10 min。取上清液进行测试。



附录 E
(资料性附录)
斑马鱼养殖及维护

E1.温度

水温适宜范围：24~30℃；鱼房室温范围：25~27℃；观察胚胎发育最佳温度：28±0.5℃。

E2.pH

耐受范围：6.0~9.5；养殖范围：7.0~8.0。

E3.电导率

养殖范围：200.0~1700.0 μS/cm；最适范围：500.0~800.0 μS/cm。

E4.光周期和光照强度

光周期：14 h 光照和 10 黑暗；

光照强度 54~324 lux。

E5.活饵

以市售丰年虫为种鱼饵料，按所购商品说明孵化丰年虫后喂食。

E6.产卵周期

三个月龄的斑马鱼可达到性成熟，选择鱼龄 4 月~18 月的雌雄成鱼配对，产卵后为保证获取足量的胚胎，应 1 周~2 周才能重新配对产卵。

