

ICS: 71.100.70

Y40

团

体

标

准

T/HPCIA 007-2022

代替 T/HPCIA 007-2021

化妆品 舒敏的测定 斑马鱼胚法

Cosmetics-Determination of Soothing -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	4
7. 仪器设备	5
8. 实验过程	6
9. 结果计算	6
10. 质量控制	7
11. 结果判定	7
12. 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) 化妆品及原料前处理参考方法	10
附录 D (资料性附录) 数据记录表	11
附录 E (资料性附录) 斑马鱼养殖及维护	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 007-2021《化妆品 抗过敏的测定 斑马鱼胚法》。

本标准与T/HPCIA 007-2021相比，除编辑性修改外主要技术变化如下：

- 修改了团体标准的名字，抗过敏改为舒敏；
- 修改了Tryptase表达水平（%）为Tryptase相对活性（%）；
- 修改了实验的方法原理；
- 修改了实验鱼胚为96 hpf；
- 删改了浓盐酸以及盐酸溶液的配制；
- 增加了色甘酸钠溶液以及样品溶液的配制；
- 修改了Tryptase相对活性的计算公式；
- 删改了空白对照试验和溶剂对照试验；
- 增加了质量控制的基本原则；
- 增加了实验结果的基本判定；
- 修改了废弃物处置；
- 修改了附录C（资料性附录）化妆品及原料前处理参考方法；
- 修改了附录D（资料性附录）数据记录表。

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：广东丸美生物科技股份有限公司、广州环亚化妆品科技有限公司、广东科玮生物技术股份有限公司、广州睿森生物科技股份有限公司、广州栋方生物科技股份有限公司、广州市科能化妆品科研有限公司、广东芭薇生物科技股份有限公司、广东袋鼠妈妈生物科技有限公司、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、广州鲁比生物科技有限公司、广州度普化妆品科学研究院、广州市络捷生物科技有限公司、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、孙云起、陈亮、刘芳、郑涌璇、谢水林、曾飒、李传茂、石品靖、孙永、何斌、王芬、黄晓婷、刘宁芝、袁婵龄、邹俊、黄裕、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 007-2021。

化妆品 舒敏的测定 斑马鱼胚法

1. 范围

本标准规定了评价化妆品舒敏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）及化妆品原料的舒敏测定评价。

2. 术语和定义

2.1. hpf

受精后小时数，即“hours post-fertilization”。

2.2. Tryptase 相对活性（%）

经致敏剂 Compound 48/80 刺激后，斑马鱼幼鱼中类胰蛋白酶的相对活性。

2.3. Tryptase 抑制率（%）

样品抑制类胰蛋白酶能力的强弱。

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

将 96 hpf 斑马鱼幼鱼置于 96 孔细胞培养板，在空白对照组控制的条件下，加入 Compound 48/80 诱导过敏反应，色苷酸钠或受试样品共同处理，随后每孔加入 BAPNA 溶液于 37℃ 恒温培养箱中孵育 1 h 后，于酶标仪下测试各吸光度值，计算受试样品的 Tryptase 相对活性和抑制率。

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 96 hpf 时期发育正常的斑马鱼幼鱼，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。

6.1.3 细胞培养板：96 孔细胞培养板：每孔容积 200.0 μ l。

6.1.4 离心管：10.0、15.0、50.0 ml。

6.1.5 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分析纯试剂。试验用水使用蒸馏水或去离子水。

6.2.1 二甲基亚砷。

6.2.2 N-甲基-对甲氧基苯乙胺和甲醛缩合产生的聚合物(Compound 48/80)。

6.2.3 三羟甲基氨基甲烷。

6.2.4 Na-苯甲酰-DL-精氨酸对硝基苯酰胺盐酸盐(BAPNA)。

6.2.5 氯化钠 (NaCl)。

6.2.6 氯化钾 (KCl)。

6.2.7 氯化钙(CaCl₂·2H₂O)。

6.2.8 硫酸镁(MgSO₄·7H₂O)。

6.2.9 标准稀释水。

6.3 对照品

6.3.1 色甘酸钠标准品，纯度≥98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物。

6.4 溶液配制

6.4.1 三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液(Tris-HCl 溶液)(0.5 mol/l)：称取三羟甲基氨基甲烷 6.05 g，加入标准稀释水约 900.0 ml 溶解，用浓盐酸调节 pH 值至 8.0±0.1，并加入标准稀释水定容至 100.0 ml，于 28℃ 保存。

6.4.2 Na-苯甲酰-DL-精氨酸对硝基苯酰胺盐酸盐(BAPNA)储备溶液(500 μg/ml)：称取 Na-苯甲酰-DL-精氨酸对硝基苯酰胺盐酸盐(BAPNA)10.0 mg，用少量二甲基亚砷溶液溶解并加入三(羟甲基)氨基甲烷(Tris-HCl 缓冲液)(6.4.1)稀释定容至 20.0 ml，于 4℃ 保存。

6.4.3 N-甲基-对甲氧基苯乙胺和甲醛缩合产生的聚合物(Compound 48/80) 标准储备溶液(500.0 μg/ml)：称取标准物质 N-甲基-对甲氧基苯乙胺和甲醛缩合产生的聚合物(Compound 48/80) 10.0 mg，用标准稀释水溶解并定容至 20.0 ml，于 4℃ 保存。

6.4.4 N-甲基-对甲氧基苯乙胺和甲醛缩合产生的聚合物(Compound 48/80)溶液(10.0 μg/ml)：量取 N-甲基-对甲氧基苯乙胺和甲醛缩合产生的聚合物(Compound 48/80) 标准储备溶液(6.4.3) 20.0 μl，加入 980.0 μl 标准稀释水稀释，现配现用。

6.4.5 色甘酸钠标准储备溶液(1.0 mg/ml)：称取标准物质色甘酸 10.0 mg，用标准稀释水溶解并定容至 10.0 ml，于 4℃ 保存。

6.4.6 色甘酸钠溶液(100 μg/ml)：量取色甘酸钠标准储备溶液(1.0 mg/ml)(6.4.5)100.0 μl，加入 980.0 μl Compound 48/80 溶液(10.0 μg/ml)稀释，现配现用。

6.4.7 样品溶液：用 Compound 48/80 溶液(10.0 μg/ml)进行配置，不同浓度样品的造模剂终浓度需保持一致。

6.5 对照组溶液

6.5.1 空白对照组：标准稀释水。

标准稀释水配置方法：精密称取 17.2 g 氯化钠，0.76 g 氯化钾，2.9 g 氯化钙，4.9 g 硫酸镁，用蒸馏水或去离子水溶解并定容至 1000 ml。取以上标准稀释水储备液 16.67 ml，再用蒸馏水或去离子水稀释至 1000 ml 即可。

6.5.2 溶剂(阴性)对照组：二甲基亚砷溶液(≤1%)，水溶性样品无溶剂对照组。

6.5.3 阳性对照组：色甘酸钠标准储备溶液(100.0 μg/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 放大倍数不低于 50 倍的光学显微镜(如：连续变焦体式显微镜、荧光显微镜等)，需配备成像系统(如 CCD 相机)。

- 7.3 恒温培养箱：温度调至 28±0.5 °C。
7.4 冰箱：冷藏室 2 °C~8 °C；冰冻室≤-18 °C。
7.5 电子天平：精度 0.1 mg。
7.6 pH 计：测量范围 0~14,最小分度为 0.01 pH 单位。
7.8 移液枪：0.5 μl~10 μl、10 μl~100 μl、100 μl~1000 μl、1000 μl~5000 μl。
7.8 温度计：0 °C~50 °C。
7.9 全波长酶标仪。
7.10 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,养殖水冲洗至 90 mm 培养皿中，平均每个培养皿胚胎数量不超过 300 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 C 化妆品及原料前处理方法。

8.3 实验方法

(1) 体式显微镜下随机挑选发育正常的 96 hpf 斑马鱼幼鱼于 96 孔细胞培养板中，15 尾/孔，分别设置空白对照组、模型对照组、阳性对照组和受试样品组，每组设置 3 个平行组。

(2) 吸干 96 孔板中的养殖水，空白对照组中每孔加入 100.0 μl 标准稀释水，模型对照组中每孔加入 100 μl Compound48/80 溶液 (10.0 μg/ml)，阳性对照组中每孔加入 100.0 μl 色甘酸钠(100.0 μg/ml)，受试样品组中每孔加入 100.0 μl 样品溶液，同时分别设置 3 组对应溶液作为调零对照组，置于 28°C 恒温培养箱孵育 1 h。

(3) 孵育 1 h，每孔吸取 80.0 μl 上清液于新的 96 孔细胞培养板中，每孔加入 80.0 μL 的 IBAPNA 溶液 (500 μg/ml)，于 37 °C 恒温培养箱孵育 1 h。

(4) 孵育 1 h 后，于酶标仪下波长为 405 nm 测量吸光度值并且计算 Tryptase 相对活性和 Tryptase 抑制率。

9. 结果计算

9.1 分别计算各组别中每个平行组的胚胎 Tryptase 相对活性和抑制率。

a) Tryptase 相对活性的计算公式如下：

$$\text{Tryptase 相对表达水平(\%)} = \frac{\text{OD空白组、受试样品组、模型组、阳性对照组} - \text{OD调零组}}{\text{OD空白组} - \text{OD调零}}$$

b) Tryptase 抑制率的计算公式如下：

$$\text{Tryptase 抑制率(\%)} = \frac{\text{Tryptase 模型对照组} - \text{Tryptase 受试样品组、阳性对照组}}{\text{Tryptase 模型对照组}}$$

式中：

OD—酶标仪下测试样品吸光度。

结果保留小数点后三位

9.2 使用 GraphPad Prism 8 统计分析软件（或类似功能的其它工具）对各组别中 Tryptase 相对活性和抑

制率进行统计分析，数值用均值±标准误差（Mean±SEM）表示。

10. 质量控制

10.1 基本原则：实验中设置的各种对照应符合以下标准，否则，应查明原因后重新进行试验。

10.2 模型对照试验

a) 与空白对照组相比，模型对照组的 Tryptase 相对活性应高于空白对照组 70%，且具有统计学意义。

10.3 阳性对照试验

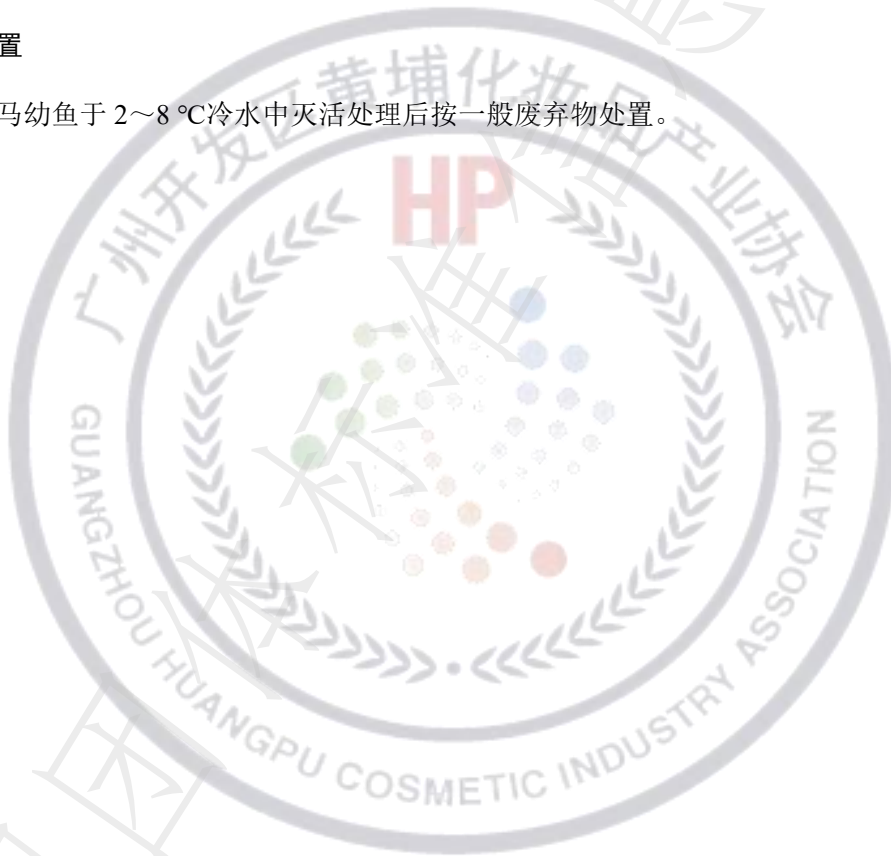
a) 与模型对照组相比，阳性对照组中 Tryptase 相对活性应低于模型对照组 50%，且具有统计学意义。

11. 结果判定

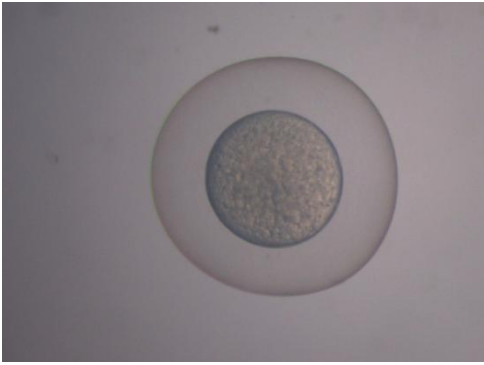
受试样品组中 Tryptase 相对活性低于模型对照组，数据具有统计学意义，说明样品具有舒敏功效。

12. 废弃物处置

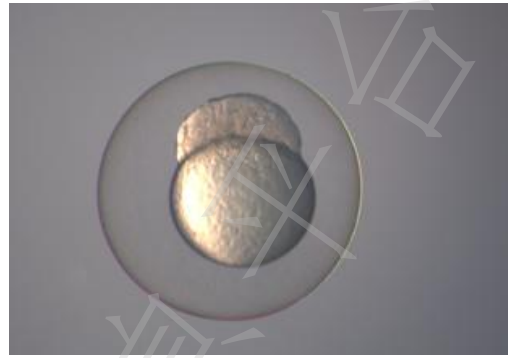
试验用斑马幼鱼于 2~8 °C 冷水中灭活处理后按一般废弃物处置。



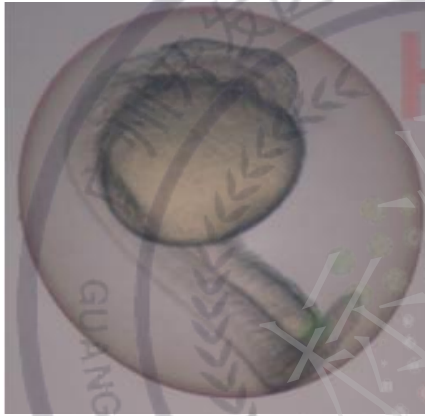
附录 A
(资料性附录)
胚胎正常发育参考图



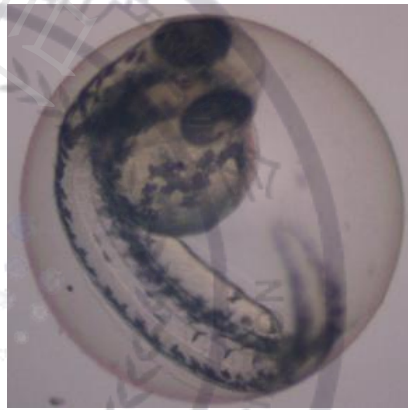
0 hpf (合子期)



6~8 hpf (原肠期)



24 hpf (体节期)

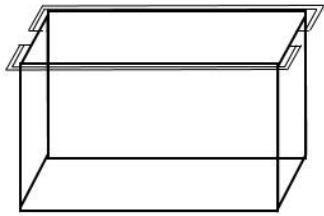


48 hpf (孵化期)

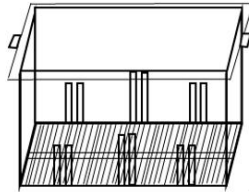


96 hpf (幼鱼)

附录 B
(资料性附录)
产卵盒参考示意图



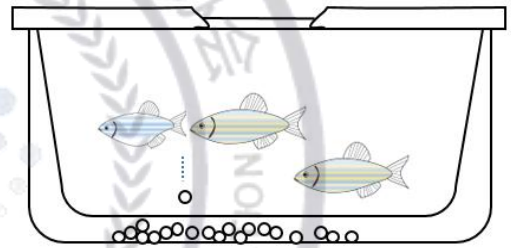
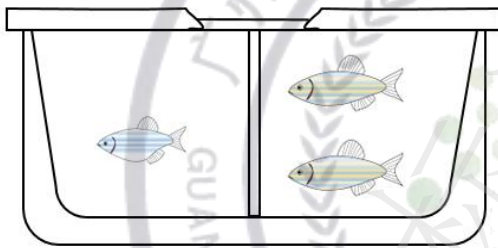
外缸：225*115*115 mm



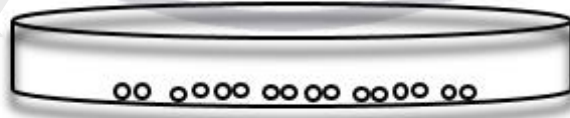
内缸 220*110*85 mm



挡板、外盖



斑马鱼配种



胚胎收集培养皿

附录 C
(资料性附录)
化妆品及原料前处理参考方法

C1.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。

C2.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 30 s 后于 6500×g 离心 10 min。取上清液进行测试。

C3.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 D
(资料性附录)
数据记录表

样品信息			
试验时间	_____年____月____日至_____年____月____日		
仪器名称及型号			
结果显示			
Tryptase 相对活性 (%)	组别	Tryptase 相对活性 (%)	显著性差异 (与模型组相比)
Tryptase 抑制率 (%)	组别	Tryptase 抑制率 (%)	显著性差异 (与模型组相比)
质量保证及质量控制	空白对照组或溶剂对照组中 Tryptase 相对活性(%)分别为 _____%	是否低于模型 对照组, 且有显 著性差异	是 否
	阳性对照组中 Tryptase 相对活性 (%)分别为_____%	是否低于模型 对照组, 且有显 著性差异	是 否

斑马鱼舒敏试验记录表

试验人员 _____ 审核人员 _____

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。

