

T/HPCIA

团 体 标 准

T/HPCIA 001—2023

化妆品抗皱、紧致功效 - 斑马鱼胚胎活性 氧 (ROS) 清除测试方法

Anti-Wrinkle and Elasticity Efficacy of Cosmetics - Zebrafish ROS Removing Test
Method

2023 - 12 - 15 发布

2023 - 12 - 15 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 原理	1
5 仪器设备和试剂	1
6 试剂制备和受试生物准备	2
7 试验方法	3
8 测试有效性验证	4
9 结果报告	5
10 结果相关性解读	5
附录 A（资料性） 鱼胚胎培养液配置方法	6
附录 B（资料性） 受试物准备方法	7
附录 C（资料性） 测试流程图	8
附录 D（资料性） 测试结束时斑马鱼胚胎拍照图示	9

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。

本文件由水中银（国际）生物科技有限公司提出。

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：云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、广州睿森生物科技有限公司、广州环亚化妆品科技股份有限公司、上海上水和肌生物科技有限公司、广州医药研究总院有限公司、美出莱（杭州）化妆品有限责任公司、广州鑫滢化妆品有限公司、苏州蜜思肤化妆品股份有限公司、澳思美日用化工（广州）有限公司、仁和全域（上海）大健康研究院有限公司、广州稀咖科技有限公司、广东伊丽汇美容科技有限公司、广州品赫生物科技有限公司、完美（广东）日用品有限公司、广州天玺生物科技有限公司、南方美谷（广州）集团有限公司、水中银（国际）生物科技有限公司、赛谱检测科技（广州）有限公司、广东省保化检测中心有限公司、伯德创研（广州）生物科技有限公司、清保（广州）生物科技有限公司、广州山海生物科技有限公司、广东省人民医院、广州质量监督检测研究院、广东省实验动物监测所。

本文件主要起草人：陈雪平、赵海山、安晓虹、任晓祥、陈亮、王晓枫、于海峰、林兵兵、李培宁、蔡磊、韩婕珺、岑宗晓、刘敏、黄伟雄、林梦感、唐莉凤、周靖茹、段国梅、高业成、吴明城、卢能湧、郑伟东、林启盛、钟洁瑶、刘洁、何铭杰。

化妆品抗皱、紧致功效 - 斑马鱼胚胎活性氧（ROS）清除测试方法

1 范围

本文件规定了斑马鱼胚胎ROS清除测试方法的术语和定义、原料、仪器设备和试剂、试剂制备和受试生物准备、试验方法、测试有效性验证、结果报告和结果相关性解读。

本文件提供一种化妆品抗皱、紧致功效的斑马鱼生物评估方法，适用于测试通过有效清除ROS而达到抗皱和紧致效果的化妆品功效评价。

注：化妆品原料及复配原料的功效测试可参考本文件。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和测试方法
GB/T 39649 实验动物 实验鱼质量控制
DB32/T 3979 实验用 斑马鱼 饲养技术条件
T/HPCIA 003 化妆品 斑马鱼实验通用技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

斑马鱼胚胎 zebrafish embryo
处在依靠卵黄提供能量发育阶段的斑马鱼胚胎。

3.2

无心跳 lack of heartbeat
一分钟内斑马鱼心脏没有跳动。

4 原理

抗皱是指有助于减缓皮肤皱纹产生或使皱纹变得不明显；紧致是指有助于保持皮肤的紧实度、弹性。皮肤皱纹产生和弹性丢失与活性氧（ROS）导致的蛋白质，核酸，脂质及其他分子被氧化而失活相关。在日常生活中，日照、化合物刺激等多种原因可能引起皮肤氧化应激损伤增加，导致皮肤异常衰老，从而导致皮肤失去弹性，产生皱纹。斑马鱼体内的ROS调控机制与人体相同，正常生理情况下会产生一定水平的ROS，在氧化压力等情况下会发生氧化应激反应，产生高水平ROS，使用特异活性氧荧光染色试剂，可以高效且特异的标记斑马鱼胚胎细胞内ROS，其荧光强度与细胞内ROS水平相关。应用软件分析定量读取斑马鱼胚胎中ROS的绿色荧光信号，测试比较处理组和空白对照组的鱼胚胎ROS水平变化，计算ROS清除率以评价原料或产品的抗皱和紧致功效。

5 仪器设备和试剂

5.1 水质监测设备

pH计、溶解氧测定仪、盐度计（电导率测定仪）。

5.2 分析天平

精度0.1mg。

5.3 显微镜

配带绿色荧光和照相系统，最大放大倍数应大于80倍。

5.4 测试容器

A法试验用96-孔板、B法试验用24-孔板。

5.5 恒温箱

精度±1℃。

5.6 其他常规测试仪器和设备

旋涡混合仪、超声水浴锅、离心机、低温冰箱。

5.7 水

符合GB/T 6682规定。

5.8 助溶剂

甲醇（CAS：67-56-1）、二甲基亚砜（DMSO，CAS：67-68-5）。分析纯级别。

5.9 过氧化叔丁醇（CAS：75-91-2）溶液

5.10 鱼胚胎培养液

5.11 谷胱甘肽（CAS：70-18-8）溶液

5.12 ROS 染色液

6 试剂制备和受试生物准备

6.1 斑马鱼胚胎

斑马鱼品系选择参考GB/T 39649-2020 实验动物 实验鱼质量控制，饲养环境参考T/HPCIA 003-2022 化妆品 斑马鱼实验通用技术规范，斑马鱼胚胎采集及准备参考DB32/T 3979-2021 实验用 斑马鱼 饲养技术条件。挑选健康的受精后48h（2天大）斑马鱼胚胎进行A法试验，72h（3天大）斑马鱼胚胎进行B法试验。

6.2 鱼胚胎培养液

适合斑马鱼胚胎养殖的培养液。配置方法见附录A。

6.3 过氧化叔丁醇溶液

用鱼胚胎培养液新鲜配制1.5~2.5mmol/L过氧化叔丁醇溶液，具体浓度各实验室可根据自身试剂情况确定。

6.4 谷胱甘肽溶液

6.4.1 谷胱甘肽工作液（A法）

新鲜配置0.1g/L谷胱甘肽做阳性对照。

6.4.2 谷胱甘肽工作液（B法）

新鲜配置1g/L谷胱甘肽做阳性对照。

6.5 ROS 染色液

建议选用H2DCFDA（CAS：4091-99-0）或CM-H2DCFDA（CAS：850013-49-9）对ROS进行活体荧光染色。不同染色剂最适染色浓度会有差异。

6.5.1 ROS 染色液 (A 法)

以H2DCFDA为例：称取100mg H2DCFDA溶于10mL二甲基亚砷配置21mM储存液。快速分装于1mL于棕色玻璃小瓶。冰冻储存。6个月内有效。工作液：用鱼胚胎培养液将储存液稀释为 $10\ \mu\text{mol/L}$ 溶液，使用前新鲜配制。

6.5.2 ROS 染色液 (B 法)

以H2DCFDA为例：称取23.8mg溶于10mL二甲基亚砷配置5mmol/L储存液。快速分装于1mL于棕色玻璃小瓶。冰冻储存，6个月内有效。工作液：用鱼胚胎培养液将储存液稀释为 $2.5\ \mu\text{mol/L}$ 溶液，使用前新鲜配制。

7 试验方法

7.1 受试物准备

受试物准备见附录B。

7.2 测试流程

测试流程见附录C。

7.3 给药方法

7.3.1 A 法 (不造模法)

测试需设定空白对照组 (鱼胚胎培养液)、阳性对照组 (谷胱甘肽溶液) 和受试物组 (受试物溶液)。如有用到助溶，则每组中助溶剂溶度一致。

7.3.1.1 空白对照组设置

随机挑选24尾2天大斑马鱼胚胎至96-孔板中，每孔含1尾鱼胚胎和0.2mL鱼胚胎培养液。

7.3.1.2 阳性对照组设置

随机挑选24尾2天大斑马鱼胚胎至96-孔板中，每孔含1尾鱼胚胎和0.2mL谷胱甘肽工作液 (配制方法见6.4.1)。

7.3.1.3 受试物处理组设置

随机挑选24尾2天大斑马鱼胚胎至96-孔板中，每孔含1尾鱼胚胎和0.2mL受试物溶液。
将测试孔板放置于 $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 $24\text{h}\pm 1\text{h}$ 。

7.3.2 B 法 (氧化应激造模法)

测试需设定空白对照组 (鱼胚胎培养液)、模型对照组 (过氧化叔丁醇溶液)、阳性对照组 (过氧化叔丁醇溶液+谷胱甘肽溶液) 和受试物组 (过氧化叔丁醇溶液+受试物溶液)。如有用到助溶剂，则每组中助溶剂溶度一致。

7.3.2.1 受试物预暴露

空白对照组：随机挑选24尾3天大斑马鱼胚胎至24孔板中，每孔含12尾鱼胚胎和2mL鱼胚胎培养液。
模型对照组：随机挑选24尾3天大斑马鱼胚胎至24孔板中，每孔含12尾鱼胚胎和2mL鱼胚胎培养液。
阳性对照组：随机挑选24尾3天大斑马鱼胚胎至24孔板中，每孔含12尾鱼胚胎和2mL谷胱甘肽工作液 (配制方法见6.4.2)。

受试物处理：随机挑选24尾3天大斑马鱼胚胎至24孔板中，每孔含12尾鱼胚胎和2mL过受试物溶液。
将测试孔板放置于 $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 $2\text{h}\pm 0.1\text{h}$ 。

7.3.2.2 造模+受试物暴露

空白对照组：将每孔中的溶液换为2mL鱼胚胎培养液。

模型对照组：将每孔中的溶液换为2mL过氧化叔丁醇溶液。

阳性对照组：将每孔中的溶液换为2mL过氧化叔丁醇溶液和谷胱甘肽工作液（配制方法见6.4.2）。

受试物处理：将每孔中的溶液换为2mL过氧化叔丁醇溶液和受试物溶液。

将测试孔板放置于28℃±1℃恒温箱中培养50min±5min。

7.4 ROS 染色

7.4.1 A 法（不造模法）

将每处理组的24尾鱼胚胎转移至24-孔板中，每孔含10-12尾鱼胚胎和2mL ROS染色液（配置方法见6.5.1），于28℃±1℃恒温箱中染色2h±0.2h。

7.4.2 B 法（氧化应激造模法）

用鱼胚胎培养液清洗鱼胚胎2次后，加入2mL ROS染色液（配置方法见6.5.2），于28℃±1℃恒温箱中染色50min±5min。

7.5 样本的显微分析

将鱼胚胎侧身摆放。于绿色荧光立体显微镜下对鱼胚胎按统一的拍照参数进行拍照。

7.6 数据分析

用分析软件如Image J打开照片，对每尾鱼胚胎的绿色荧光（见附录B图B）的“平均信号强度”作为ROS信号强度。

7.7 结果计算

7.7.1 A 法（不造模法）

计算活性氧（ROS）消除率：

$$ROS\text{清除率} = \frac{B-S}{B} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

S—受试物处理组鱼胚胎ROS“平均信号强度”的平均值；

B—空白（B法）对照组鱼胚胎ROS“平均信号强度”的平均值；

计算各试验组的平均值及标准误，统计学处理结果用平均值±标准误表示。使用统计学软件对数据进行方差分析，对受试物组和空白（B法）对照组间ROS平均信号强度进行双尾T检验，取得p值。p<0.05表示有显著性差异。

7.7.2 B 法（氧化应激造模法）

计算活性氧（ROS）消除率：

$$ROS\text{清除率} = \frac{M-S}{M-B} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

S—受试物处理组鱼胚胎ROS“平均信号强度”的平均值；

M—模型对照组鱼胚胎ROS“平均信号强度”的平均值；

B—空白对照组鱼胚胎ROS“平均信号强度”的平均值；

计算各试验组的平均值及标准误，统计学处理结果用平均值±标准误表示。使用统计学软件对数据进行方差分析，对受试物组和模型对照组间ROS平均信号强度进行双尾T检验，取得p值。p<0.05表示有显著性差异。

8 测试有效性验证

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。

8.2 测试要求

8.2.1 A法（不造模法）

每批次测试须设置阳性对照组，阳性对照组斑马鱼胚胎ROS清除率为正数且 $p < 0.05$ 。

8.2.2 B法（氧化应激造模法）

每批次测试须设置空白对照组，模型对照组斑马鱼胚胎ROS平均信号强度显著高于空白对照组。

每批次测试须设置阳性对照组，阳性对照组斑马鱼胚胎ROS清除率为正数且 $p < 0.05$ 。

9 结果报告

9.1 ROS清除率

受试物在对应测试浓度下对ROS的清除率。

9.2 评价

9.2.1 A法（不造模法）

评价受试物ROS清除能力，分析受试物处理组与空白对照组的检测值是否具有统计学差异($p < 0.05$)。

9.2.2 B法（氧化应激造模法）

评价受试物ROS清除能力，分析受试物处理组与模型对照组的检测值是否具有统计学差异($p < 0.05$)。

10 结果相关性解读

在ROS清除率为正数且具有统计学差异 ($p < 0.05$) 情况下，测试结果可作为受试物具有以抗氧化功效的支持证据，支持抗皱和紧致功效宣称。

附 录 A
(资料性)
鱼胚胎培养液配置方法

表 A.1 3 种常用鱼胚胎培养液配制方法

鱼胚胎培养液	配制方法
鱼胚胎培养液1	称取2940mg无水氯化钙 (CAS: 10043-52-4), 1233mg七水硫酸镁 (CAS: 10034-99-8), 630mg碳酸氢钠 (CAS: 144-55-8), 55mg氯化钾 (CAS: 7447-40-7) 溶于10L水配制而成。pH值6.5~8.5。化学品均为分析纯级别。
鱼胚胎培养液2	称取 17.2g 氯化钠 (CAS: 7647-14-5), 0.76g 氯化钾, 2.9g 氯化钙 (CAS: 10043-52-4) 和4.9g 硫酸镁 (CAS: 7487-88-9) 溶于水中定容至1000mL储备液。取16.67mL储备液用水稀释至1000mL而成。化学品均为分析纯级别。
鱼胚胎培养液3	称取7.000g氯化钠, 0.400g碳酸氢钠, 0.100g氯化钾, 0.235g氯化钙溶于2L水配制而成, 化学品均为分析纯级别。

附录 B
(资料性)
受试物准备方法

表 B.1 受试物准备方法

受试物类型	准备方法
水溶性	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	可选常用溶剂如甲醇或二甲基亚砷助溶。如将受试物和有机溶剂按1:1(重量g:体积mL)混匀,然后用鱼胚胎培养液稀释配制成所需浓度。取上清液进行测试。

附录 C
(资料性)
测试流程图

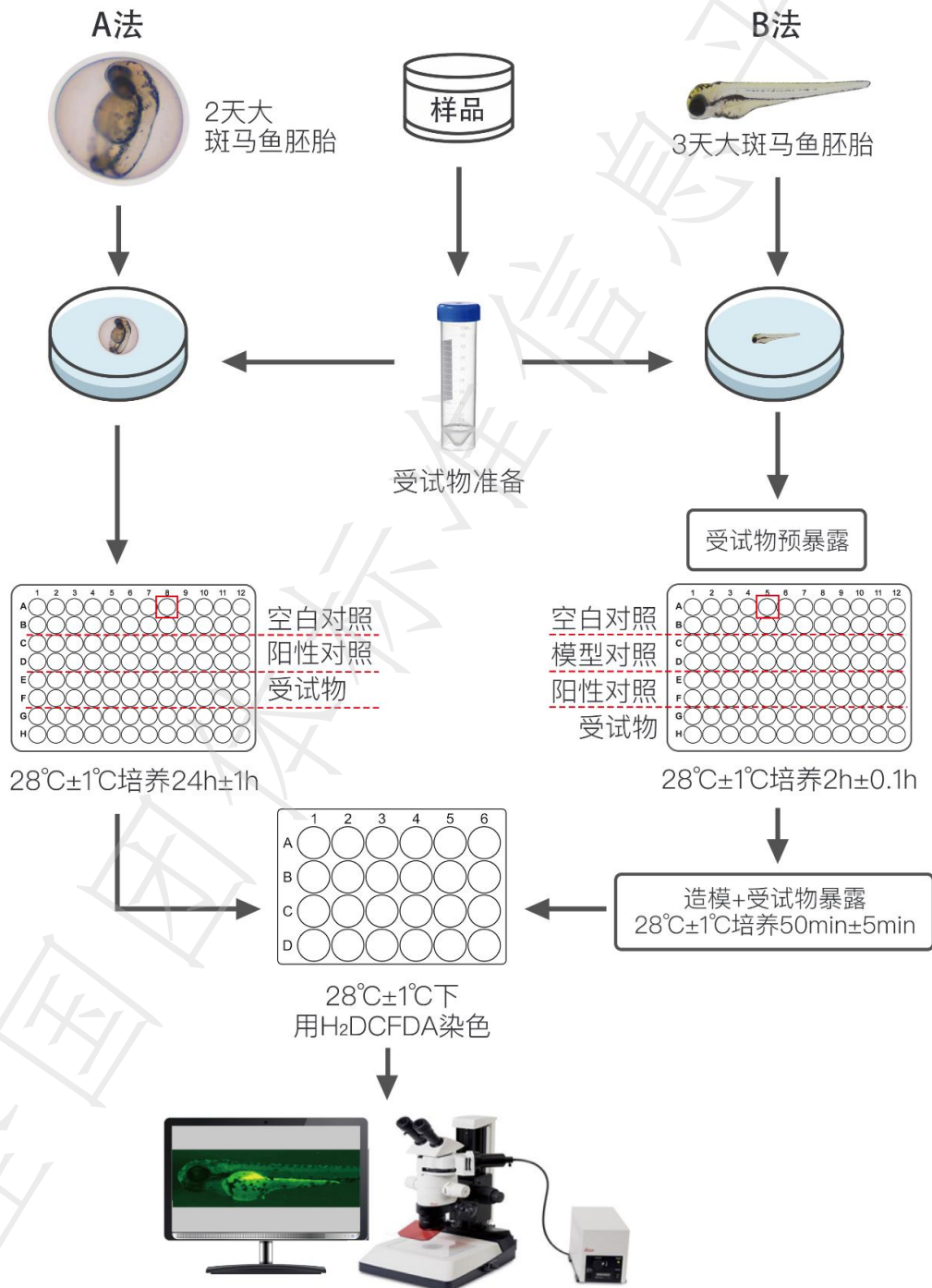
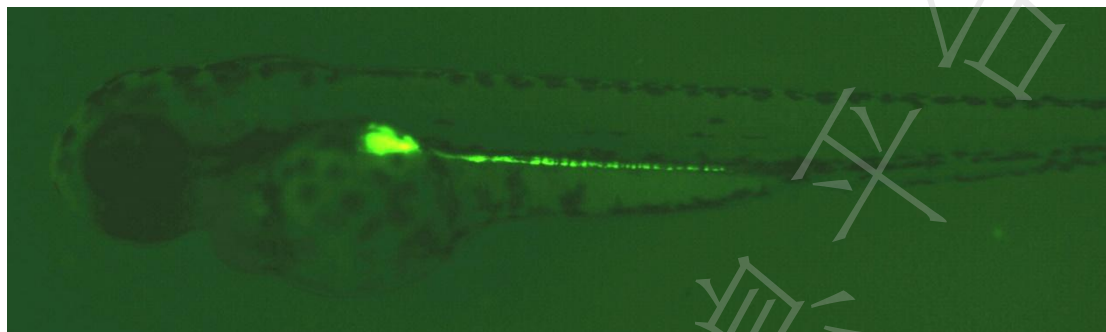


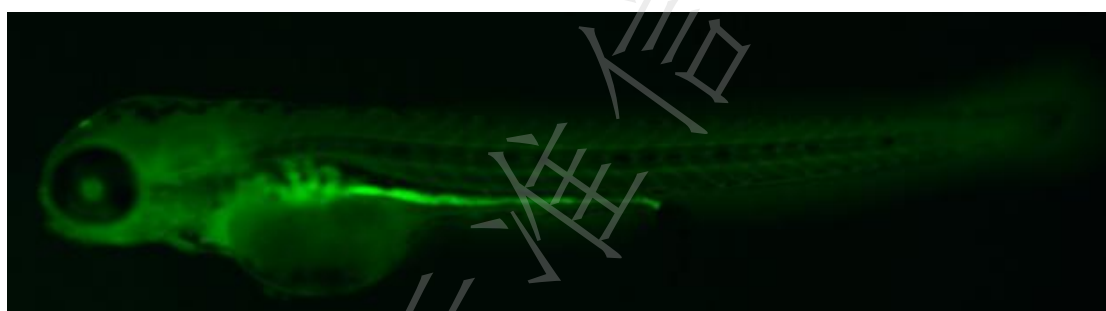
图 C.1 化妆品抗皱紧致功效 斑马鱼胚胎 ROS 清除测试流程图

附录 D
(资料性)
测试结束时斑马鱼胚胎拍照图示



^a ROS 标记为绿色荧光

图 D.1 斑马鱼胚胎 ROS 信号 (A 法: 不造模法)



^a ROS 标记为绿色荧光

图 D.2 斑马鱼胚胎 ROS 信号 (B 法: 氧化应激造模法)