

ICS: 71.100.70

Y40

团 体 标 准

T/HPCIA 00X-2022

化妆品舒缓功效 - 斑马鱼斑马鱼刺痛舒缓测试 方法

Soothing Efficacy of Cosmetics - Zebrafish Antinociception
Test Method

(征求意见稿)

2022-XX-XX 发布

2022-XX-XX 实施

广州开发区黄埔化妆品产业协会 发布

目 次

前言.....	2
1. 范围.....	3
2. 规范性引用文件.....	3
3. 术语和定义.....	3
4. 原理.....	3
5. 仪器设备.....	3
6. 主要试剂及耗材.....	4
7. 实验方法.....	5
8. 受试物准备.....	6
9. 测试步骤.....	6
10. 结果计算.....	7
11. 测试有效性验证.....	7
12. 结果相关性解读.....	7
13. 结果报告.....	7
附录 A（资料性附录）.....	8
参考文献.....	9

前 言

本文件按照GB/T1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》规则起草。

本文件由广东省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：

本标准主要起草人：

化妆品舒缓功效—斑马鱼刺痛舒缓测试方法

1 范围

本标准规定了斑马鱼刺痛舒缓测试方法的基本要求。

本标准提供一种化妆品舒缓功效的斑马鱼生物评估方法,适用于测试通过舒缓刺痛而达到舒缓效果的原料及配方的功效评价。

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。凡是注明日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件,凡未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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和测试方法

DB32/T 3979-2021 实验用 斑马鱼 饲养技术条件

OECD TG 236-2013 化学品测试规范 斑马鱼胚胎急性毒性测试

ISO 15088-2017 污水对斑马鱼胚胎的急性毒性测试

3 术语和定义

下列术语及定义适合于本文件。

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 没有心跳 Lack of heartbeat

一分钟内心脏没有跳动的斑马鱼。

3.3 10%致死浓度 10% Lethal concentration, LC_{10}

受试物导致 10%受试斑马鱼死亡的浓度。斑马鱼没有心跳则判定为死亡。

4 原理

化妆品会通过激活辣椒素通路 (TRPV1) 引起皮肤刺痛。人体皮肤上的辣椒素通路可以通过辣椒素、酸性 ($pH < 6.05$) 及温度高于 $42^{\circ}C$ 时被激活。斑马鱼也有辣椒素通路,且也能在高温时被激活,在 $37^{\circ}C$ 或以上时达到高峰,表现为游动速度显著增快。因此,应用高温激活的斑马鱼非常适合用于测试舒缓刺痛测试。应用软件测量斑马鱼运动距离,比较受试物处理组和模型对照组斑马鱼运动距离变化,计算运动距离减短率以评价原料或产品的刺痛舒缓效果。

5 仪器和设备

5.1 斑马鱼养殖设备

设备需配有温控装置,水循环和过滤装置,养殖容器用玻璃或常见食品级PC材质制成。可采用通

用斑马鱼养殖设备或按实验室需求配备鱼缸（如长宽高45cm×45cm×30cm）。

5.2 产卵盒/缸

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

5.3 水质监测设备

pH计、溶解氧测定仪、盐度计（电导率测定仪）。

5.4 分析天平

精度0.1mg。

5.5 显微镜

配带照相系统，最大放大倍数应大于80倍的体式显微镜。方法A中显微镜需配带绿色荧光。

5.6 测试容器

测试容器：玻璃或聚苯乙烯测试容器（如96-孔板，培养皿）。如测试物可能吸附于聚苯乙烯容器时（如非极性化学品），应选用惰性材料（如玻璃）来减少吸附。

5.7 恒温箱

精度±1℃。

5.8 丰年虾孵化器

设备需配有孵化桶，气管，气量调节阀，气泵截止开关和止逆阀装置。

5.9 斑马鱼运动记录仪

可红外线记录斑马鱼行动轨迹并能对轨迹进行测量分析。如DanioVision（Noldus Information Technology）。

5.10 其他常规测试仪器和设备

移液管、离心管、玻璃容器（如烧杯、容量瓶等）、旋涡混合仪、超声水浴锅、离心机、低温冰箱、可调节移液器和吸头。

6 主要试剂与耗材

6.1 水

符合GB/T 6682规定。

6.2 甲醇、二甲基亚砜、乙醇等助溶剂

分析纯级别。

6.3 亲鱼养殖用水

称取4g海盐溶于10L水配制而成，盐度为0.25~0.50‰，电导率为500~800μS/cm，溶解氧≥80%饱和度，pH值6.5~8.5，硬度30~300mg/L（以碳酸钙计）。

6.4 丰年虾 (*Artemia salina*) 卵

丰年虾休眠卵需干燥避光冷藏。称取约15g海盐溶于1L水配制丰年虾卵孵化水，密度以不超过4g/L丰年虾卵为宜。

6.5 鱼培养液

称取2940mg无水氯化钙，1233mg七水硫酸镁，630mg碳酸氢钠，55mg氯化钾溶于10L水配制而成。pH值6.5~8.5。化学品均为分析纯级别。

6.6 4-叔丁基环己醇溶液

用鱼培养液配制0.05g/L 4-叔丁基环己醇溶液。

7 实验方法

7.1 受试生物

应用来源可靠（如中国国家斑马鱼资源中心）的野生型 AB 品系斑马鱼 (*Danio rerio*) 产卵测试。亲鱼应具有较好的繁殖能力-鱼龄以6~12月最佳。传代尽量使用侧交以保持遗传多样性，纯品系亲鱼繁殖5代后需更换新一批亲鱼。亲鱼不应该有明显可见的感染和疾病特征，且在2个月内没有经历过药物治疗。在繁殖产卵测试前，亲鱼应在引入实验室后驯养14天以上。

7.2 养殖要求

7.2.1 养殖水温宜控制在26~28.5°C，室内温度建议控制在20~25°C。

7.2.2 养殖密度宜控制在每升水1~2条鱼，以及每日固定的12~16h光照，且需保持良好的过滤系统。

7.2.3 每天至少喂食2次，包括至少1次丰年虾 (*Artemia salina*) 幼虫，喂食间隔在3小时以上，避免过量喂食影响水质和清洁度。

7.3 产卵要求

7.3.1 如用产卵缸收集鱼卵，将雄鱼和雌鱼以2:1的比率为宜在产卵前一天关灯前1~2h放进产卵缸中。由于斑马鱼偶尔不产卵，建议同时准备多个产卵缸备用。

7.3.2 为避免基因偏差，将最少3个产卵缸中收集的鱼卵混合再进行挑选备用。若用养殖鱼缸收集鱼卵，收卵盒在产卵前一天关灯前或产卵当天开灯前放进要收集鱼卵的养殖鱼缸中。

7.3.3 为避免鱼卵被成鱼所食，收卵盒用惰性网覆盖。

7.3.4 交配、产卵和受精在开灯后大约30min内完成，届时可把收卵盒移出鱼缸。

7.3.5 鱼卵从收卵盒取出后，建议用鱼培养液清洁鱼胚胎。

7.3.6 挑选健康的斑马鱼胚胎，并以200 μ L鱼培养液中不超过1尾鱼胚胎的密度于28 \pm 1°C培养至受精后5天。

8 受试物准备

8.1 化妆品原料

8.1.1 水溶性原料：可用鱼培养液直接将受试物溶解配制成测试溶液。

8.1.2 非水溶性原料：可选常用溶剂如甲醇、二甲基亚砜、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10min，然后加入鱼培养液配制成所需浓度，震荡30s。如有颗粒物存在，则于6500 \times g离心10min，取上清液进行测试。

8.2 化妆品产品

8.2.1 水溶性产品：可用鱼培养液直接将受试物溶解配制成测试溶液。建议最高测试浓度为5g/L。

8.2.2 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 10min，然后加入鱼培养液配制成所需浓度，震荡 30s。如有颗粒物存在，则于 6500×g 离心 10min，取上清液进行测试。

9 测试步骤

以下测试步骤是96-孔板测试指引。测试流程可参见附录A图A. 如应用更大的测试容器（如24-孔板或培养皿），测试指引需做相应调整。

挑选健康的受精后5天大的斑马鱼。

9.1 测试分组

测试需设定空白对照组（鱼培养液）、阳性对照组（三卡因工作液）和受试物组（受试物溶液）。

9.1.1 空白对照组设置

随机挑选16尾斑马鱼，转移至96-孔板中，每孔含1尾鱼和0.2mL鱼培养液。

9.1.2 阳性对照组设置

随机挑选16尾斑马鱼，转移至96-孔板中，每孔含1尾鱼和0.2mL4-叔丁基环己醇溶液。

9.1.3 受试物处理

随机挑选16尾斑马鱼，转移至96-孔板中，每孔含1尾鱼和0.2mL受试物溶液。
放置于28±1℃恒温箱中2±0.2h。

9.2 游动轨迹剂量和测量

然后放入已预热至38±1℃斑马鱼运动记录仪（DanioVision, Noldus Information Technology）中，用红外线追踪软件EthoVision XT记录黑暗环境下每尾斑马鱼在5min内的游动轨迹。

将每孔中的0.18mL溶液替换为鱼培养液，然后放置于28±1℃恒温箱中24±1h后统计斑马鱼存活率。

9.3 数据和结果计算

量读每孔的像素强度作为每尾斑马鱼的运动距离。

10 结果计算

计算刺痛舒缓率：

$$\text{刺痛舒缓率} = \left(\frac{\overline{D_{\text{模型}}} - \overline{D_{\text{受试物}}}}{\overline{D_{\text{模型}}}} \right) (100\%) \text{----- (1)}$$

(1)式中：

$\overline{D_{\text{受试物}}}$ —受试物处理组斑马鱼游动距离的平均值；

$\overline{D}_{\text{模型}}$ —空白对照组斑马鱼游动距离的平均值；

对受试物处理组斑马鱼平均运动距离和模型对照组平均运动距离进行双尾 T 检验，取得 p 值。

11 测试有效性验证

11.1 测试判定

各测试组暴露完成后至少90%斑马鱼存活，否则对应测试组结果无效。

11.2 测试要求

每批次测试须设置阳性对照组，阳性对照组鱼刺痛舒缓率为正数且 $p < 0.05$ 。

12 结果报告

12.1 ROS清除率

受试物在对应测试浓度下对斑马鱼刺痛的舒缓率。

12.2 评价

评价受试物舒缓刺痛的能力，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（ $p < 0.05$ ）。

13 结果相关性解读

在刺痛舒缓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舒缓刺痛效果的支持证据，支撑舒缓功效宣称。

附录 A

(资料性附录)

图 A. 测试流程图

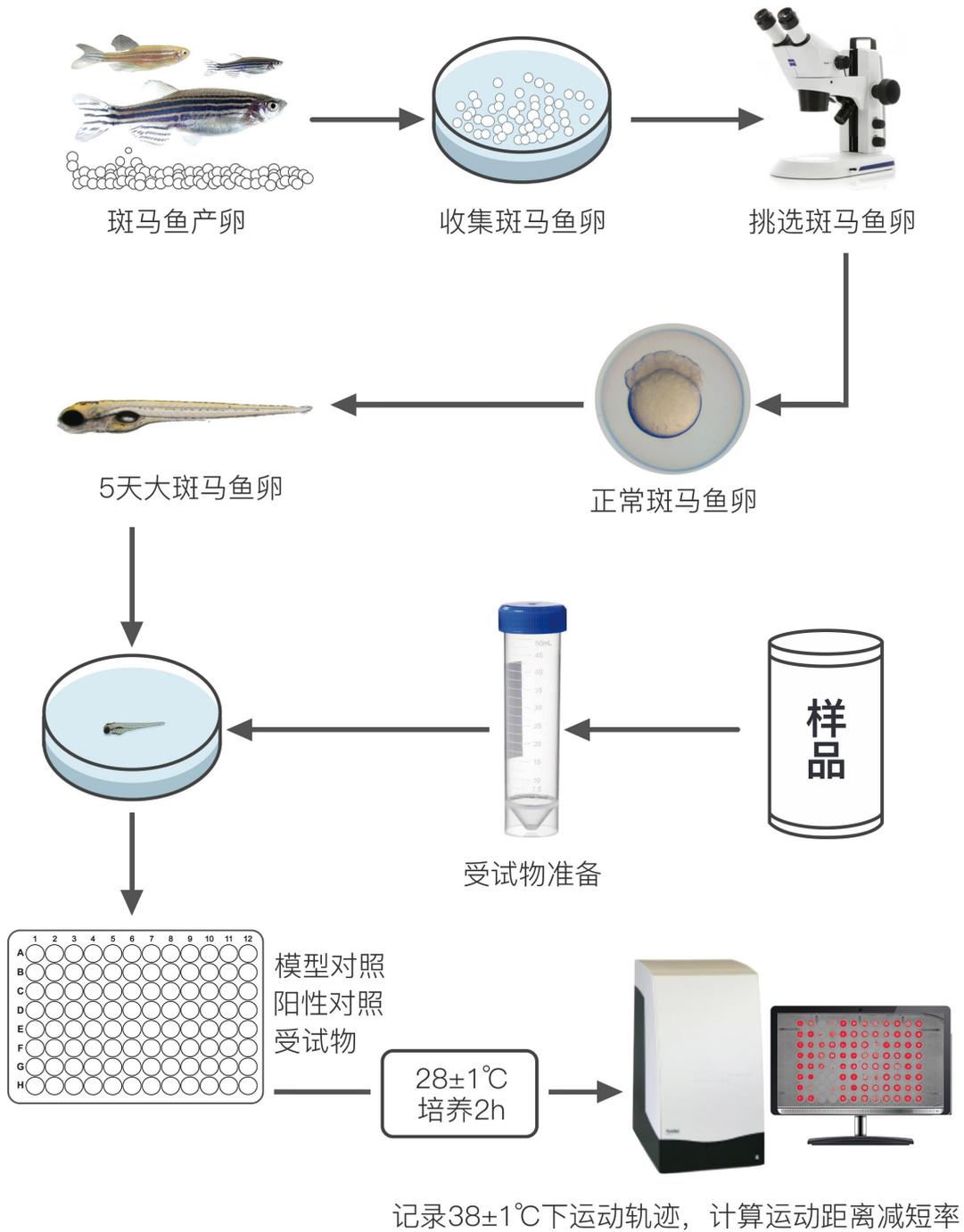


图 A. 斑马鱼行为学舒缓测试流程图

参考文献

- [1] OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test[S], OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, 2003.
- [2] T/SHRH 036-2021 化妆品黑色素抑制-斑马鱼胚胎测试方法。
- [3] T/GDST 1-2021 斑马鱼胚胎急性毒性测试 A 法和 B 法。
- [4] Ingebretson J J , Masino M A . Quantification of locomotor activity in larval zebrafish considerations for the design of high-throughput behavioral studies[J]. *Frontiers in Neural Circuits*, 2013, 7: 109.
- [5] Basnet R M , Zizioli D , Taweedet S . Dinazzi D , Memo M . Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology[J]. *Biomedicines*, 2019, 7, 23.
- [6] Gau P , Poon J , Ufret-Vincenty C , Snelson C D , Gordon S E , Raible D W , Dhaka A . The Zebrafish Ortholog of TRPV1 Is Required for Heat-Induced Locomotion[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2013, 33(12):5249–5260. DOI:10.1523/JNEUROSCI.5403-12.2013.
- [7] Soares I C R , Santos S A A R , Coelho R F , Alves Y A , Vieira-Neto A E , Tavares K C S , Magalhaes F E A , Campos A R . Oleonic acid promotes orofacial antinociception in adult zebrafish (*Danio rerio*) through TRPV1 receptors[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2019, 299: 37-43.
- [8] Esancy K , Condon L , Feng J , Kimball C , Curtright A , Dhaka A . A zebrafish and mouse model for selective pruritus via direct activation of TRPA1[J]. *eLife*, 2018, 7: e32036.