

广东省地方标准

《日化用品致畸毒性斑马鱼评价指南》

编制说明

一、工作简况

2023年5月11日，广东省市场监督管理局下达《广东省市场监督管理局关于批准下达2023年第一批广东省地方标准制修订计划的通知》（粤市监标准〔2023〕211号），批准本标准立项，标准完成周期为18个月。

本标准编制主编单位为广东省生物技术研究院（广东省实验动物监测中心）（原名称为：广东省实验动物监测所）（以下简称省生物技术院），参编单位为水中银（国际）生物科技有限公司，广州质量监督检测研究院。省生物技术院作为标准起草的主编单位，负责标准起草、处理反馈意见、会议召集以及组织编制单位之间的沟通交流。水中银（国际）生物科技有限公司和广州质量监督检测研究院作为标准起草的参编单位，参与标准的编写、讨论及技术支持等工作。

二、立项的必要性

日化用品及其原料潜在致畸现象已成为我国当前不可忽视的社会问题。据统计，我国每年约有80~120万新生儿存在出生缺陷，约占全球每年出生缺陷儿童的20%，出生缺陷不仅成为影响人口素质的重要问题，还会给家庭和社会带来沉重负担。据美国化学文摘社在2015~2019年间登记的化学品，平均每年新增量超过1200万种，

总量已达 1.5 亿种；我国生态环境部 2013 年发布《中国现有化学物质名录》中收录的化学物质也已超过 4.5 万种；欧洲化学品管理局（ECHA）报道有超过 14 万种已注册的化学品存在污染环境和食品风险。

日化用品作为日常生活中应用最广泛的产品之一，如洗涤剂、化妆品、口腔清洁用品、香料、香精等，目前除少量获注册上市化学品/药品外，绝大多数化学物质的潜在致畸毒性风险未知，且缺乏统一技术规范 and 指南，亟需制定相关标准进行引导。

目前国际上发育和致畸毒性评价标准中建议使用的实验动物主要包括常规种属（大鼠、兔、小鼠）、非常规种属（食蟹猴、小型猪）、有限使用种属（豚鼠、仓鼠、犬、雪貂）等。上述推荐物种均为哺乳类动物，哺乳类实验动物作为毒理学研究的经典测试物种，在推动毒理测试发展上做出了巨大贡献，但哺乳类动物在进行致畸等生殖毒性评价时存在动物需求量大、评价周期长、评价费用高、整体效费比偏低等问题。在面对新型海量合成类等日化用品及原料时短板明显，且大量使用高等哺乳动物不符合国际实验动物福利 3R 原则（减少、替代和优化）。因此急需建立一种低费-高效日化用品致畸毒性评价技术标准，对当前致畸评价体系进行有效补充。斑马鱼作为国际通用发育生物学研究模式生物，具备非常完备的发育毒理学研究数据，可快速实现技术方法的标准化转化，是优质致畸毒性高效费比测试生物。

广东省作为我国改革开放的南大门，经济、科技发展均处于国内领先水平，尤其在化工产品研究、化妆品和中药原料开发等领域优势

突出,但也应注意到我省目前尚无基于斑马鱼的日化用品致畸毒性前端高通量快速评价技术标准,为更好的促进我省相关产业发展,为其提供产品早期的致畸毒性鉴别,因此有必要结合广东本地产业的实际情况与需要,制定地方标准,进一步促进和规范广东地区相关产业的发展。

三、标准编制原则、标准框架、主要内容及其确定依据

(一) 标准编制原则。

1. 规范性原则。本标准按照《广东省标准化条例》要求,依据 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》,遵照我国现行相关法律、法规、规章、技术规范、标准及规范,并结合广东省地方标准的特点进行编写。

2. 科学性原则。本标准在我省日化用品致畸毒性需求调研基础上,结合行业发展现状,并充分征求高校、科研院所、企业等意见,完成标准制定工作。

3. 可操作性和实用性原则。本标准充分考虑行业各需求单位的需求及检测技术能力水平,针对致畸毒性评价中关键环节,列出具体操作要求和技术参数,满足标准的可操作性和实用性原则。

4. 适用性原则。本标准主要适用于从事日化用品研发和使用的高校、科研院所和企业等,标准编制单位为省内在日化用品检测、斑马鱼质量控制及标准化研究方面具有优势的相关单位,充分考虑了标准的适用性。

(二) 标准框架。

本标准由 12 章内容组成，分别为：1. 范围；2. 规范性引用文件；3. 术语和定义；4. 原理；5. 试验条件要求；6. 试验程序要求；7. 受试物含量的测定；8. 发育情况检查；9. 质量保证；10. 数据处理；11. 致畸危害评估；12. 结果解释。

（三）标准主要内容及其确定依据。

本标准分为 12 部分，具体内容及依据如下。

1. 范围。本部分内容规定了日化用品的致畸毒性斑马鱼评价的基本要求及适用范围,符合《广东省标准化条例》要求。

2. 规范性引用文件。结合本标准的应用范围，根据《广东省实验动物管理条例》要求，优先引用国家标准，其次引用行业标准。

3. 术语和定义。本标准列出了涉及的相关术语和定义，部门术语和定义直接引用现有标准内容，可满足标准对术语和定义的要求。

4. 原理。根据日化用品斑马鱼致畸毒性评价主要特点，对相关背景、技术原理和指标情况进行说明。

5. 试验条件要求。开展相关毒理学评价需具备一定的专门的设施设备硬件以及配套的试剂耗材等，标准对评价涉及的设备、主要试剂等条件进行了规范。

6. 试验程序要求。（1）受试物制备：标准根据样品类型，分别对水溶性和非水溶性样品制备进行了规范。（2）实验生物准备：斑马鱼质量应符合国家标准《GB/T 39649》的规定，胚胎获取可参照地方标准《HJ 1069-2019》进行；试验过程中应选取健康的受精后 6~8 h 的斑马鱼胚胎作为实验生物，该参数主要依据 HJ 1069-2019 标

准。（3）暴露试验：①预实验—“当受试物毒性难以预估时，需进行预实验。以 10 倍稀释倍数设置 3 个连续受试物浓度组，确定 100% 死亡或 100% 致畸至无死亡和无致畸的浓度范围。如有用到助溶剂，则应设置助溶剂对照组”，指标主要依据 HJ 1069-2019 标准；②正式试验—“以几何级数浓度系列设置不少于 5 个连续浓度组，浓度的间隔系数不大于 3.2”参考 GB/T 21854-2008，“推荐采用孔板作为测试容器，每孔放置 1 粒胚胎”参考标准 HJ 1069-2019，其余参数均为常规要求。

7. 受试物含量的测定：“对于理化性质不稳定的原料类受试物，整个试验期间应对试验液至少取样测定 2 次，分别为新配制的试验液和试验即将结束前的试验液”参照标准 GB/T 21807-2008 优化后设置，为简化实验操作并结合行业惯例，对于理化性质稳定的原料及产品类受试物，受试物含量根据试验需要测定。

8. 发育情况检查：①持续监测并观察记录胚胎的死亡个数、畸形数量、开始出膜时间、出膜数量以及可观测到异常行为的数量，并将死亡的鱼胚胎移除；观察时间可依具体试验的需要而设定，一般以 24~48 小时为宜。主要参考标准 GB/T 21854-2008；②组织器官发育检查，包括头部、心脏、肝脏、肾脏、卵黄囊、肠道、脊椎/体节、肌肉、皮肤、鳍条、其他指标，如运动行为等，主要参考 GB 15193.14-2015、GB/T 21035-2007 和 DB/T 396.10-2017 并结合斑马鱼主要组织和器官发育特点设定。

9. 质量保证：“试验期间，溶解氧浓度应 $\geq 80\%$ 空气饱和值、实验容器温差不大于 $\pm 1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ”主要参考GB/T 21854-2008；“对照组和助溶剂对照组胚胎总死亡率和致畸率 $\leq 10\%$ ；阳性对照组鱼胚胎致死率或致畸率与对照组有显著性差异（ $p < 0.05$ ）”，主要参考HJ 1069-2019。

10. 数据处理：“对各组各指标进行统计，利用方差分析或其他合适方法分析各单项指标在各平行组间的变化，估算各单项指标的NOEC，以最低NOEC对应的浓度值作为终点NOEC”主要参考GB/T 21854-2008；“采用适当的统计方法对各项数据进行处理（如概率单位法）对鱼胚胎死亡率及致畸率和样本测试浓度之间进行剂量反应曲线拟合计算 LC_{50} 和 EC_{50} ，以最低 EC_{50} 浓度值作为该受试物的终点 EC_{50} 值”中“ LC_{50} ”计算方法主要参考标准GB/T 27861-2011，“ EC_{50} ”计算方法主要参考HJ 1069-2019。

11. 致畸危害评估：“综合毒性试验数据，评估受试物无致畸效应对应的浓度范围。结合 LC_{50} 和 EC_{50} 等数据，综合评估受试物致畸危害程度，致畸危害指数评估参见附录D”，主要依据参考文献，同时依据标准编制团队实测数据，斑马鱼实测数据通过与已知哺乳动物或人类临床数据进行比较，支持“当致畸危害指数 ≥ 3 时，表示受试物对人致畸风险高，当致畸危害指数 < 3 时，表示受试物对人致畸风险低”。参考文献见表1，实测数据见图2。

12. 结果解释：致畸试验结果时，应注意种属的差异。试验结果从动物外推到人存在着一定的局限性。

表1 致畸指数计算方法参考文献

序号	文献名称	致畸评价方法
1	Jarque, S., Rubio-Brotons, M., Ibarra, J., Ordoñez, V., Dyballa, S., Miñana, R., & Terriente, J. (2020). Morphometric analysis of developing zebrafish embryos allows predicting teratogenicity modes of action in higher vertebrates. <i>Reproductive toxicology</i> , 96, 337-348.	致畸指数 $TI=LC_{50}/EC_{50}$; 致畸指数TI大于3为致畸阳性。
2	Escobar-Huerfano, F., Gómez-Oliván, L. M., Luja-Mondragón, M., SanJuan-Reyes, N., Islas-Flores, H., & Hernández-Navarro, M. D. (2020). Embryotoxic and teratogenic profile of tetracycline at environmentally relevant concentrations on <i>Cyprinus carpio</i> . <i>Chemosphere</i> , 240, 124969.	致畸指数 $TI=LC_{50}/EC_{50}$
3	Alafiatayo, A. A., Lai, K. S., Syahida, A., Mahmood, M., & Shaharuddin, N. A. (2019). Phytochemical evaluation, embryotoxicity, and teratogenic effects of <i>Curcuma longa</i> extract on zebrafish (<i>Danio rerio</i>). <i>Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine</i> , 2019(1), 3807207.	致畸指数 $TI=LC_{50}/EC_{50}$
4	Selderslaghs, I. W., Van Rompay, A. R., De Coen, W., & Witters, H. E. (2009). Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. <i>Reproductive toxicology</i> , 28(3), 308-320.	致畸指数 $TI=LC_{50}/EC_{50}$
5	Lee, S. H., Kang, J. W., Lin, T., Lee, J. E., & Jin, D. I. (2013). Teratogenic potential of antiepileptic drugs in the zebrafish model. <i>BioMed research international</i> , 2013(1), 726478.	致畸指数 $TI=LC_{50}/EC_{50}$
6	Selderslaghs, I. W., Blust, R., & Witters, H. E. (2012). Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds. <i>Reproductive toxicology</i> , 33(2), 142-154.	致畸指数 $TI=LC_{50}/EC_{50}$

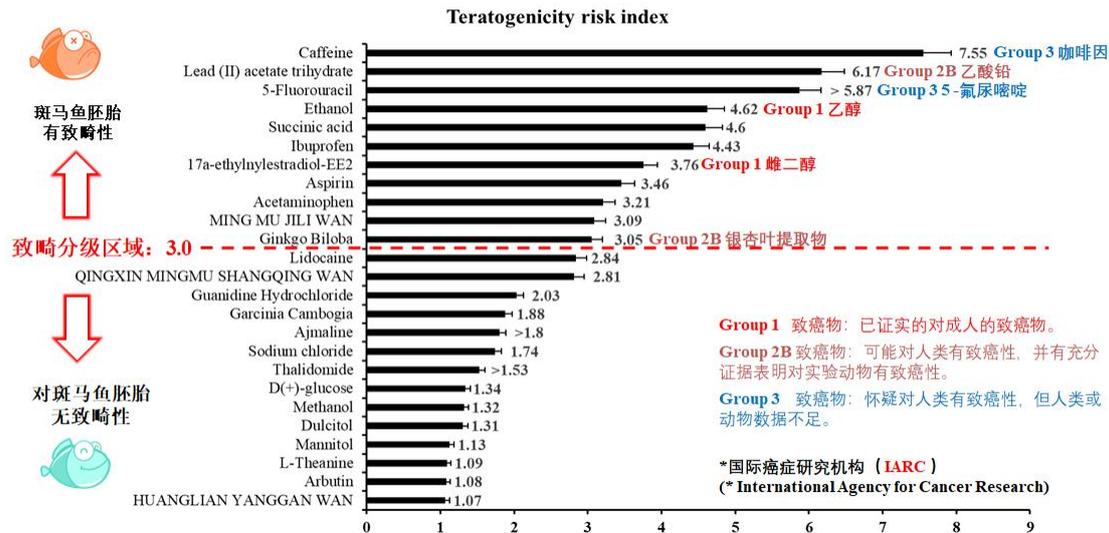


图1 标准编制团队开展的25种化合物致畸毒性评估结果

注：该研究结果已投稿至“Tox Sci”。

四、与现行法律法规、强制性标准等上位标准关系

本标准以《中华人民共和国标准化法》、《广东省标准化监督管理办法》中的相关规定要求为依据，按《广东省地方标准管理办法》的规定编制，无违反现行法律法规。

五、标准有何先进性或特色性

根据广东省药品监督管理局数据（2023年），广东化妆品产业工业总产值占全国总量的60%，位居全国第一，化妆品生产企业3100家，占全国总量约56%，是全国日化用品重要生产地区。目前在日化用品致畸毒性评价上，我国尚无相关国家和地方标准，尤其在面对新型海量合成类等日化用品及原料时，急需建立一种低费-高效日化用品致畸毒性评价技术标准，针对我省日化用品致畸评价技术领域缺乏高通量快速评价技术标准现状，提出斑马鱼致畸毒性评价技术规范，支撑我省优势日化用品产业意义重大。本标准编制具有较好的先进性

和针对地方产业的特色性。

六、标准调研、研讨、征求意见情况

（一）形成标准草案。

细致梳理国内外相关法规、标准、文献资料，重点关注日化用品致畸毒性相关评价技术及管理规定，由省生物技术院主笔起草《日化用品致畸毒性斑马鱼评价指南》初稿，形成标准基本框架。

（二）召开标准专家推荐论证会。

2022年12月10日，主编单位以线上会议的方式组织召开了《地方标准推荐论证会议》，会议特邀5名广东省实验动物标准化技术委员会专家参加。与会专家对标准立项的必要性、目的性、可行性、适用范围、自身协调性、先进性、与现行法律法规和国家标准协调配套情况、预期效益等方面进行审核，并认为标准内容满足我省地方标准立项要求，一致同意推荐。本标准由主管部门广东省科学技术厅于2023年1月向广东省市场监督管理局发函推荐立项，并于2023年5月11日获得批准立项。

（三）形成标准征求意见稿。

标准立项后，编制组对标准稿进行了反复多次的修改，并于2023年12月8日召开的广东省地方标准法规和标准制定培训暨广东省实验动物标准化技术委员会2023年年度工作会议上对该标准的编写进度进行了汇报，听取了现场专家对标准内容的意见和建议。在听取多方意见的基础上，逐条进行讨论和处理，并仔细梳理参阅文献和相关标准，形成标准征求意见稿。

（四）标准征求意见稿公开征求意见。

2024年8月27日，主编单位省生物研究院在中国实验动物信息网、广东省实验动物信息网发布《关于征求广东省地方标准〈日化用品致畸毒性斑马鱼评价指南（征求意见稿）〉意见的公告》，向社会各界公开征求意见；同时通过邮件向广东省实验动物标委会所有委员及袋鼠妈妈、雅兰国际、澳思美等国内知名日化企业（约65家单位）发送标准稿及编制说明，公开征求意见。截至9月28日，有10家单位反馈意见49条，其中采纳36条，部分采纳5条，不采纳8条。

（五）形成标准送审稿。

标准编制组综合各单位专家意见，对标准稿进行进一步完善，形成送审稿。

（六）送审稿公开征求意见

.....

（七）形成标准报批稿

.....

七、技术指标设置的科学性和可行性，量化指标的确定依据。

本标准参考《GB 15193.14 食品安全国家标准 致畸试验》、《GB/T 39649 实验动物 实验鱼质量控制》等现有国家标准，参考《HJ 1069-2019》等行业标准，结合我省在日化用品安全性等上的管理要求，设置相关技术指标，指标设置有据可循，具有科学性和可行性。

本标准中有关量化指标是参考国内已颁布技术标准中的量化指标，结合相关研究成果，各指标的确定均有明确出处和技术依据。

八、与国际、国家、行业、其他省同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况。采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

(一) 与国际同类标准技术内容的对比及合规引用或采用情况。

本标准属实验动物与日化用品毒理学交叉领域，目前国内外尚未见专门针对日化用品斑马鱼致畸毒性的相关标准，但有相关指导原则，如国际人用药品注册技术要求协调会发布的《ICH 协调指导原则人用药物生殖与发育毒性检测 S5(R3)》等。本标准有借鉴这些安全手册的管理经验，以确保标准的科学性和先进性。

(二) 与国内同类标准技术内容对比情况。

通过国家标准文献共享服务平台 (<http://www.cssn.net.cn>) 和全国标准信息服务平台 (<http://std.samr.gov.cn>) 检索，目前国际、国家、行业、地方和团体标准中关于致畸试验的仅有 4 个国标和 1 个地标，且均为哺乳类测试方法，尚无基于斑马鱼的致畸毒性评价技术标准。本项目结合我省日化用品致畸评价技术领域缺乏前端高通量快速评价技术标准现状，提出斑马鱼致畸毒性评价技术规范，与上位标准等无冲突或者内容重复等现象。

九、涉及专利的有关说明

本标准不涉及相关专利。

十、标委会技术审查情况

……

十一、其他应当说明的事项

无。

十二、贯彻地方标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期等建议

广东省地方标准《日化用品致畸毒性斑马鱼评价指南》颁布实施后，起草单位将采取多种形式，利用媒体等各种途径，组织力量宣传，并将标准条文和要求贯彻落实到我省日化用品致畸毒性评价工作中，使其发挥应有的作用和效益。