

团 体 标 准

T/ZHCA 502—2020

保健食品抗氧化功能的斑马鱼检测方法

A zebrafish based test for antioxidant efficacy of functional food

2020-06-10 发布

2020-08-01 实施

浙江省保健品化妆品行业协会 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由杭州环特生物科技股份有限公司提出。

本标准由浙江省保健品化妆品行业协会(ZHCA)归口。

本标准起草单位：杭州环特生物科技股份有限公司、国珍健康科技(北京)有限公司、完美(广东)日用品有限公司、浙江康恩贝制药股份有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、杭州民生健康药业有限公司、宁波御坊堂生物科技有限公司、无限极(中国)有限公司、浙江寿仙谷植物药研究院有限公司、正大青春宝药业有限公司、珠海宝德润生健康科技有限公司、启迪禾美生物科技(嘉兴)有限公司。

本标准主要起草人：张勇、俞航萍、张丽梅、高业成、吴健、张正方、杨善岩、贾福怀、刘凤松、李振皓、傅君、林相龙、李钧翔。

保健食品抗氧化功能的斑马鱼检测方法

1 范围

本标准规定了一种保健食品抗氧化功能的快速检测方法。

本标准适用于保健食品产品、配方和原料抗氧化功能的快速检测和筛查。

有以下特征的受试物不适用于本标准的方法：

- 受试物不能溶解、乳化或制备成均匀分散的悬浮液；
- 受试物溶液颜色较深或有不溶性颗粒，无法消除对测试的干扰；
- 受试物会产生自体荧光，无法消除对测试的干扰。

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。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 5749 生活饮用水卫生标准

GB 14924.2 实验动物 配合饲料卫生标准

GB/T 21808 化学品 鱼类延长毒性 14 天试验

SN/T 0476 进出口卤虫卵检验方法

NY 5072 无公害食品 渔用配合饲料安全限量

NY 5073 无公害食品 水产品中有毒有害物质限量

3 术语及定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

无可观察效应浓度 no observed effect concentration; NOEC

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。

[来源：GB/T 21808, 2.5]

3.2

亲鱼 brood fish

指用来繁殖测试所需鱼卵的成年斑马鱼。

3.3

活性氧簇 reactive oxygen species; ROS

含氧的化学物质，包括： $O_2 \cdot^-$ 、 H_2O_2 及 $HO_2 \cdot$ 、 $\cdot OH$ 等，是体内氧化反应的物质基础，也是体内过氧化效应产生的根源，与人体衰老、慢性炎症、癌症等疾病的发生、发展、预防和治疗密切相关。

4 方法原理

体内的 ROS 水平高低是由体内活性氧产生与消除的平衡状态所决定的。体内 ROS 水平上升时，会消耗体内抗氧化物质，如果体内抗氧化物质的合成速度慢且抗氧化酶对 ROS 的清除速度不够快时，

就会导致脂质和蛋白的过氧化水平升高,引起衰老等跟过氧化相关的生理现象。如果受试物能够加快体内抗氧化物质的合成速度、提升抗氧化酶的活力,就能迅速消除体内产生的 ROS,从而降低 ROS 诱发的脂质和蛋白过氧化水平,使体内活性氧产生与消除保持在一个有益于身体健康的平衡状态。因此,ROS 是一个能够更直接地反映体内活性氧产生与消除之间平衡状态的指标。用受试物处理后,斑马鱼体内 ROS 水平的降低也能直接反映受试物的抗氧化能力。

CM-H₂DCFDA[5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester]是一种常用的 ROS 特异性荧光检测试剂,将 CM-H₂DCFDA 加入养有斑马鱼的水体之后,CM-H₂DCFDA 会在斑马鱼体内 ROS 的氧化作用下形成高荧光强度的二氯荧光素(2',7'-di-chlorofluorescein,DCF),DCF 的产生量与体内 ROS 水平正相关。通过酶标仪检测 DCF 的荧光信号,就可以得到体内 ROS 的相对水平。将受试物和 CM-H₂DCFDA 共同加入养有斑马鱼的水体一段时间后,如受试物具有抗氧化活性,DCF 的产生量减少,荧光信号强度就会减弱。本方法是对斑马鱼的 ROS 进行活体检测,不需要取血或将斑马鱼解剖、匀浆,解决了因 ROS 自身不稳定造成的检测结果不可靠的问题。

5 试剂和材料

5.1 CM-H₂DCFDA 试剂(分子式:C₂₇H₁₉Cl₃O₈,相对分子质量:577.8):用于检测斑马鱼体内 ROS 水平。

5.2 三卡因(Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt,又称 MS-222,CAS:886-86-2):用于麻醉斑马鱼。

5.3 斑马鱼繁殖容器:用于繁殖斑马鱼鱼卵。用聚苯乙烯或其他惰性材料制成的容器,容器中有可移动的网格板或透明板来隔开雄鱼和雌鱼,同时要有聚苯乙烯或其他惰性材料做成的隔栅或丝网来隔离成鱼和鱼卵,网格尺寸应保证产下的鱼卵可以顺利漏过。

5.4 斑马鱼孵育容器:用于斑马鱼鱼卵和幼鱼的孵育。用聚苯乙烯或其他惰性材料制成的容器,如 24 孔细胞培养板、96 孔黑色酶标板、培养皿、培养罐等。

5.5 液体量取器材及其他易耗品:移液枪、容量瓶、烧杯、铝箔、巴氏吸管等。

5.6 其他常规试剂:如盐酸、氢氧化钠、氯化钙、硫酸镁、碳酸氢钠、氯化钾和亚甲基蓝等,试剂纯度不低于化学纯等级。

6 仪器和设备

6.1 斑马鱼养殖设备:设备需配有温控装置,养殖容器用玻璃或聚碳酸酯等惰性材料制成,用于饲养成年斑马鱼。

6.2 斑马鱼鱼卵和幼鱼培养设备:带有温控和进风装置,推荐使用生化培养箱。

6.3 电子天平:分度值为 0.1 mg。

6.4 水质检测设备:盐度计(电导率测定仪)、硬度计、pH 计、溶解氧测定仪。

6.5 普通体视显微镜:用于在明场下观察斑马鱼个体发育和行为是否正常。

6.6 多功能酶标仪:用于检测 CM-H₂DCFDA 被 ROS 氧化后的产物 DCF 的荧光信号。DCF 的最佳激发波长是(492~495)nm,最佳发射波长在(517~527)nm,多功能酶标仪能够检测的激发波长和发射波长应该尽量接近上述最佳波长范围,以确保可以检测到 DCF 的荧光信号。

7 试验准备

7.1 受试鱼类

7.1.1 鱼种的选择

推荐使用野生型 AB 品系斑马鱼(*Danio rerio*),亲鱼应具有较好的繁殖能力——鱼龄以(6~12)月

为佳。使用其他品系的斑马鱼时,要根据实际情况对试验条件做相应调整,并在报告中说明鱼种选择理由和试验方法。

7.1.2 亲鱼的驯养

在繁殖前,亲鱼应在符合下列条件的环境中驯养 14 d 以上:

- a) 水:见 7.3a) 成鱼养殖用水。
- b) 水温:(26~28.5)℃。
- c) 光照:推荐光照/黑暗周期为 14 h/10 h,每天光照应不少于 12 h。
- d) 溶解氧:6 mg/L~饱和。
- e) 喂养:每天至少喂食两次,可以搭配喂食活饵饲料(卤虫幼虫)和热带鱼配合饲料,每天至少喂食一次活饵饲料。用于孵化卤虫幼虫的卤虫卵应按 SN/T 0476 的规定进行检验,有毒有害物质的含量应符合 NY 5073 的规定执行。配合饲料的卫生安全指标应符合 GB 14924.2 和 NY 5072 的规定。
- f) 斑马鱼疾病处理:对于患病的斑马鱼不做任何疾病处理,发现患病个体应立即隔离并人道地处死。
- g) 驯养期间,亲鱼的整体死亡率不超过 10%时,该批鱼可以使用;超过 10%,应舍弃整批鱼并人道地处死。

7.1.3 斑马鱼鱼卵的繁殖和孵育

- a) 第一天,斑马鱼饲养房间灯光关闭前 5 h 左右,将亲鱼放在斑马鱼繁殖容器内做繁殖前适应性饲养,期间雌雄亲鱼以网格板或透明板隔开,雌雄比例为 2:1,密度不超过 3 尾鱼/L,不喂食。
- b) 第二天,斑马鱼饲养房间的灯光开启后 10 min 内,移除繁殖容器中隔开雄鱼和雌鱼的网格板或透明板,让斑马鱼开始繁殖。繁殖开始后 1 h 左右将亲鱼从斑马鱼繁殖容器中拿走,收集鱼卵。将存活鱼卵用成鱼养殖用水清洗干净后,放入斑马鱼孵育容器中进行孵育。鱼卵应在斑马鱼孵育容器底部稀疏地分布,不能紧密聚集,液面高度以不超过容器的 2/3 为宜。将斑马鱼孵育容器放在温度可控的环境中进行孵育,容器的水温控制在(26~28.5)℃。
- c) 鱼卵收集后 6 h 应再次检查,清理死亡的鱼卵。此后,每天检查并清理一次死亡的鱼卵,同时每次更换至少 2/3 的水体。斑马鱼开始孵化后,换水时要将卵膜清理干净。
- d) 在孵育过程中,如果要移动鱼卵/幼鱼,推荐使用巴斯德吸量管。在换水或移动鱼卵/幼鱼的过程中,尽量避免其直接暴露在空气中。

早期发育阶段的正常鱼卵和死亡鱼卵的典型图片见附录 A 的图 A.1 和图 A.2。

7.2 试验用水

- a) 成鱼养殖用水。将饮用水净化处理后(反渗透水、去离子水或双蒸水均可),每升水加入 400 mg 左右的人工海盐和 10 mg 左右的 NaHCO_3 即可作为成鱼养殖用水,人工海盐和 NaHCO_3 的用量可根据水质情况适当进行调整。水体的电导率维持在(450~550) $\mu\text{S}/\text{cm}$,pH 维持在 6.8~7.5,总硬度(以 CaCO_3 计)维持在(50~100)mg/L。饮用水水质应符合 GB 5749 的规定。
- b) 鱼卵和幼鱼孵育使用 E3 培养液(60×E3 培养液配制方法为,将 NaCl :344 mg, KCl :15.2 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:58 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 98 mg,定容至 20 mL)。
- c) E3 培养液也可用作试验用水,用于配制受试物贮备液和配制试验溶液。

7.3 试验溶液

- a) 试验溶液尽量用试验用水配制,受试物难以用水溶解时方可考虑使用低毒的助溶剂或分散剂。

推荐的溶剂有：二甲基亚砜、乙醇、甲醇、二甲基甲酰胺、三甘醇。适合的分散剂有聚氧乙烯脂肪酸甘油酯、吐温 80、0.01% 的纤维素甲醚、聚氧乙烯氢化蓖麻油。当使用某种助溶剂时，所有组别中的助溶剂浓度应该保持一致，且质量浓度或体积分数不大于 1%。同时，应加设溶剂对照组试验，溶剂对照组不能对斑马鱼的存活有明显影响或引起其他任何可观察的不利影响，也不能对试验结果有显著性影响。

- b) 试验中不需要调节试验溶液的 pH。如果加入受试物后试验溶液的 pH 有明显变化，按照 GB/T 21808 中 6.3.2 的相关规定对受试物贮备液的 pH 进行调节。
- c) 如果试验溶液富含营养物质，容易腐败变质，且无法通过换液来遏制水体变质，可考虑加入一定量的亚甲基蓝来抑菌，以减缓水质恶化。如果使用亚甲基蓝，溶液中的终质量浓度应不大于 100 $\mu\text{g/L}$ ，且所有试验组的终质量浓度应保持一致。
- d) 小分子单体化合物的检测浓度上限为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ，混合物或相对分子质量 $< 3 \text{ kD}$ 的大分子化合物的检测质量浓度上限为 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 。对于很难溶解或均匀分散的物质、相对分子质量 $\geq 3 \text{ kD}$ 的大分子化合物，均不适合采用水溶暴露方式，应考虑采用其他方式进行处理。
- e) 如果受试物溶解后颜色较深，则需要稀释至浅色；如果受试物溶解后有颗粒，则需要稀释至肉眼可见的颗粒；同时需要考虑在最终计算数据是否要扣除受试物的本底值。

8 试验程序

8.1 准备

8.1.1 斑马鱼幼鱼的选取

试验开始时，选择选取体型和行为正常、体长接近的受精后 3 d 的斑马鱼，放入 24 孔细胞培养板中，斑马鱼最大负荷不超过 10 尾/mL。

8.1.2 暴露条件

- a) 持续时间：从加入受试物开始，持续暴露 20 h。暴露期间不投饵。
- b) 光照：暴露期间避光处理，避免光照对受试物稳定性的影响。
- c) 更换试验溶液：通常暴露时间在 24 h 及以内不需要更换溶液。如果受试物富含营养物质，试验溶液容易腐败变质，可考虑换液，换液频率可根据水质情况调整。
- d) 水温：(26~28.5) $^{\circ}\text{C}$ 。
- e) 溶解氧：6 mg/L ~饱和。
- f) pH：6.8~7.5。

8.1.3 预试验

- a) 预试验用于确定受试物的 NOEC，为后续正式试验的浓度设置提供参考。以几何级数浓度系列设置 5 个初始受试物浓度，浓度的间隔系数不大于 3.2。
- b) 将受试物储备液用 E3 培养液稀释成一组浓度适宜的工作液系列，向 24 孔培养板的每个孔中加入适量的特定浓度受试物工作液。另外设置一个 E3 培养液对照组。如果必须使用助溶剂，所有组别中的助溶剂浓度应保持一致，还应设置一个相应的助溶剂对照组。每个孔 1 mL 溶液，每个孔均放入 10 尾受精后 3 d 的斑马鱼。如果一次试验需要使用多个 24 孔培养板时，每个板上至少需要设置一个 E3 培养液对照组或一个助溶剂对照组。
- c) 在暴露开始后 1 h、8 h 和 20 h 进行观察，及时清除死亡的斑马鱼，并对斑马鱼的死亡和其他毒性效应进行记录，确定受试物的 NOEC。在最后一次观察时，向水溶液中加入麻醉剂，将斑马

鱼麻醉后在普通体视显微镜的明场下观察(推荐使用三卡因作为麻醉剂,三卡因的质量浓度不超过 $160\ \mu\text{g}/\text{mL}$),观察时斑马鱼应头朝左、腹部朝下、完全侧躺,所有斑马鱼的体位应该保持一致。

死亡判断标准:静止不动、无心脏跳动、躯干呈白色不透明颜色、对机械刺激无反应。

异常表型:心包水肿、血流缺失/减少、出血、脑变性/萎缩/水肿、下颌畸形、眼畸形/水肿、肝脏变性/肿大/萎缩、卵黄囊吸收延迟、躯干弯曲/缩短、肌肉变性、鳔未充气。异常表型的典型图见附录 A 的图 A.3~图 A.6。

异常行为学指标:身体侧翻、游动剧烈。

8.2 正式试验

8.2.1 试验分组

- 正常对照组:含检测试剂和斑马鱼。
- 阳性对照组:含有阳性对照样品、检测试剂和斑马鱼,每次试验设置一个阳性对照组即可。
- 受试物测试组:含有受试物、检测试剂和斑马鱼,受试物根据需要设置多个不同的浓度组。
- 溶剂对照组:含有溶剂、检测试剂和斑马鱼;如果受试物配制过程中使用了助溶剂或分散剂,则应设置该组。
- 检测试剂对照组:只有检测试剂,没有斑马鱼和受试物;设置该试验组是为了排除检测试剂自身的干扰,检测试剂的质量浓度与受试物测试组相同。
- 受试物对照组:含有受试物,没有斑马鱼和检测试剂;当受试物自身的颜色、不溶性颗粒物或荧光对结果有干扰时应设置该组,受试物的质量浓度跟受试物测试组对应。

8.2.2 受试物浓度设置

根据预试验的结果,确定正式试验的受试物浓度范围,试验最高浓度组不得高于 NOEC 值或该类受试物的检测质量浓度上限[见 7.3d)]。以几何级数浓度系列设置至少 3 个不同的浓度组,浓度的间隔系数 ≤ 3.2 。浓度组别设置少于 3 个时需说明理由。

8.2.3 受试物处理

根据试验需求,预先筛选好足够数量的受精后 3 d 的斑马鱼,将斑马鱼随机分配到 24 孔细胞培养板中,每个孔 10 尾斑马鱼。向 E3 培养液中加入受试物,使各试验组受试物的终浓度与预先设定的浓度一致。同时设置阳性对照组和正常对照组,并在必要时设置溶剂对照组。向各组中均加入检测试剂 CM-H₂DCFDA,试剂终浓度相同(推荐质量浓度为 $0.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$),所有组别的溶液体积都是 2 mL。

充分混匀后,将斑马鱼从 24 孔细胞培养板中转移至 96 孔黑色酶标板中,每孔 1 尾斑马鱼,每孔 150 μL 溶液,每个试验组至少 10 个复孔。同时,在 96 孔酶标板上设置检测试剂对照组,设置 3 个平行复孔。如果在试验前观察到受试物自身有颜色、不溶性颗粒物或者荧光,可能对试验结果产生影响,则需要考虑在 96 孔酶标板上设置多个不同浓度的受试物对照组,受试物的浓度跟受试物测试组一一对应,每个浓度设置 3 个平行复孔即可。转移完成后,将 96 孔酶标板用铝箔纸包裹,在生化培养箱中避光孵育 20 h 至试验终点。

8.2.4 酶标仪检测

至试验终点,用酶标仪检测各试验组的荧光信号值。选择符合检测 DCF 荧光信号要求的激发波长和发射波长。每组的有效数据不少于 8 个。受试物测试组的荧光信号值减去检测试剂对照组的荧光信号值(如果设置了受试物对照组,还应减去受试物对照组的数值,以排除受试物自身的干扰),为 CM-

H₂DCFDA 被斑马鱼体内 ROS 氧化形成的 DCF 的荧光信号值。

8.2.5 注意事项

每次试验前需要检测一次受试物溶液的溶解氧和 pH, 试验过程及终点不需要再次检测。在转移斑马鱼的时候, 要注意避免损伤到斑马鱼。

9 结果评价

9.1 数据处理

9.1.1 统计学分析

将酶标仪检测到的荧光信号值记为 S (统计学处理结果用 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 表示)。如果受试物自身的性状(颜色、溶解性、自体荧光)对结果没有干扰, 将受试物测试组与正常对照组的数据直接进行比较; 如果受试物自身的性状(颜色、溶解性、自体荧光)对结果有干扰, 应先从受试物测试组的每个数据中减去受试物对照组的平均值, 然后再与正常对照组的数据进行比较。

一般采用方差分析, 但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验。方差齐, 计算 F 值。 F 值 $< F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; F 值 $\geq F_{0.05}$, $P \leq 0.05$, 用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计。对非正态或方差不齐的数据应进行适当的变量转换, 待满足正态或方差齐要求后, 用转换后的数据进行统计; 若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的, 改用秩和检验进行统计。

9.1.2 抗氧化功能的定量计算

根据各组酶标仪检测到的荧光信号值的平均值 $\bar{S}$, 计算受试物的抗氧化作用(以 ROS 清除率表示), 公式如下:

$$\text{ROS 清除率} = \left[1 - \frac{\bar{S}_{(\text{受试物测试组})} - \bar{S}_{(\text{检测试剂对照组})}}{\bar{S}_{(\text{正常对照组})} - \bar{S}_{(\text{检测试剂对照组})}} \right] \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$\text{ROS 清除率} = \left[1 - \frac{\bar{S}_{(\text{受试物测试组})} - \bar{S}_{(\text{受试物对照组})} - \bar{S}_{(\text{检测试剂对照组})}}{\bar{S}_{(\text{正常对照组})} - \bar{S}_{(\text{检测试剂对照组})}} \right] \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

受试物自身的性状对结果没有干扰时用公式(1), 受试物自身的性状对结果有干扰时用公式(2)。如果受试物配制过程中使用了助溶剂, 则公式(1)和公式(2)中的正常对照组数值用溶剂对照组数值进行替换。

9.2 结果判定及说明

9.2.1 当一个受试物的试验结果满足下列要求时, 可以判定该受试物有抗氧化功能:

受试物测试组至少有一组的荧光信号值与正常对照组相比有统计学上的显著性差异, 即 $P < 0.05$ 。

9.2.2 ROS 清除率的定量计算结果不作为判定受试物是否有抗氧化功能的依据, 仅用于比较不同受试物之间抗氧化功能的强弱。

10 保证试验有效性的条件

10.1 预试验中, E3 培养液对照组(如果使用了助溶剂, 也包括溶剂对照组), 斑马鱼的死亡率或异常率不得超过 10%, 超过 10% 则该次试验视为失败。

10.2 正式试验中, 阳性对照组与正常对照组之间存在统计学上的显著性差异, 且平均值之差必须大于

2 倍的正常对照组内标准偏差(SD);否则,该次试验视为失败。

10.3 正式试验中,如果使用了助溶剂,溶剂对照组与正常对照组之间不能存在统计学上的显著性差异,如果溶剂对照组与正常对照组之间存在统计学上的显著性差异,则该次试验视为失败。

11 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面的内容:

- a) 检验依据;
- b) 样品和阳性对照的信息,包括与试验操作相关的理化性状;
- c) 斑马鱼来源和品系等相关信息;
- d) 试验条件和方法,包括试验具体步骤;
- e) 试验的日期;
- f) 数据处理与结果评价方法;
- g) 结论。

附 录 A
(资料性附录)
斑马鱼典型图

图 A.1 为在 28.5 ℃ 环境下的正常斑马鱼早期发育图,其中:a)为单细胞期(受精后 0.2 h 左右);b)为二细胞期(受精后 0.75 h 左右);c)为胚盾期(从侧面观察,受精后 6 h 左右);d)为原基-6 期(受精后 25 h 左右)。

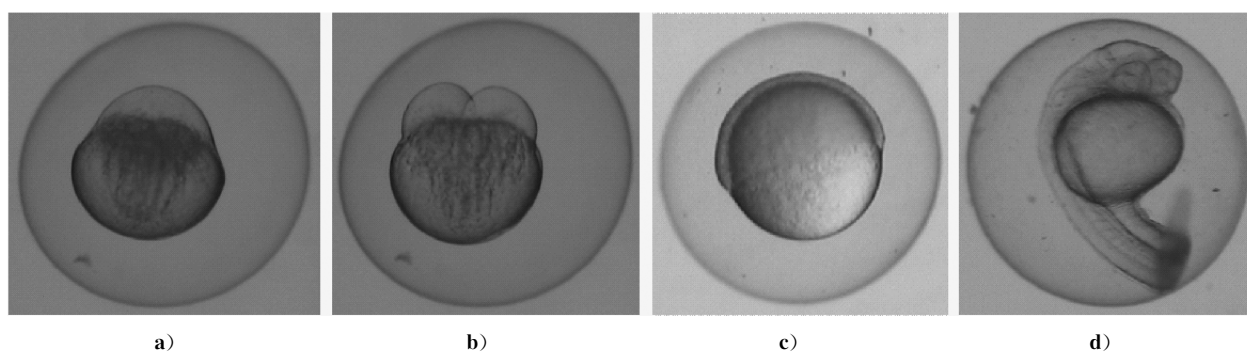


图 A.1 在 28.5 ℃ 环境下的正常斑马鱼早期发育图

图 A.2 为斑马鱼早期发育阶段的致死指标代表图,其中:a)为卵凝结;b)中 * 表示为心包水肿,箭头所指为体节;c)中 * 表示为眼芽缺失,箭头所指为尾部未分离。图 A.2 来自 OECD No.236。

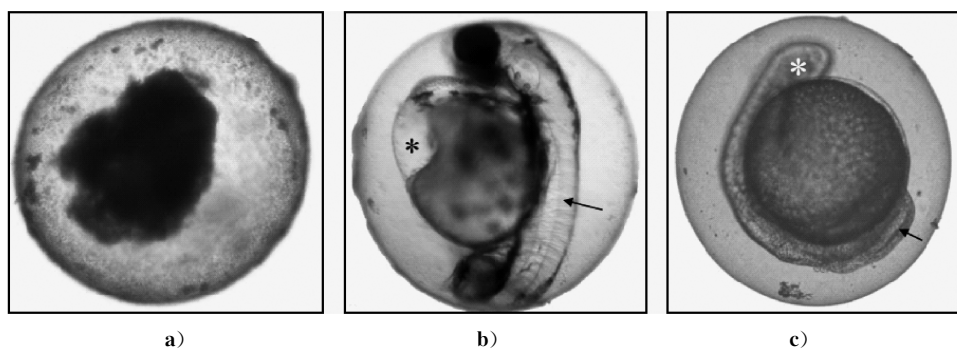


图 A.2 斑马鱼早期发育阶段的致死指标代表图

图 A.3 为受精后 3 d 和 4 d 的整体图,箭头所指为与正常斑马鱼相比异常的表型。

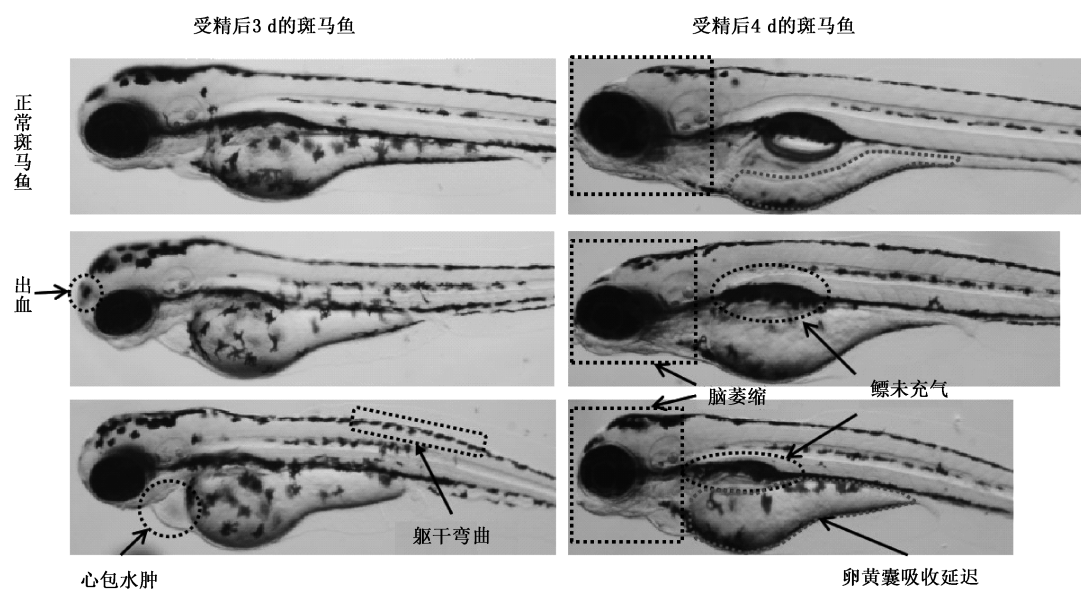


图 A.3 受精后 3 d 和 4 d 的整体图

图 A.4 为斑马鱼肝脏局部图,其中:a)为正常斑马鱼,虚线 1 所包含区域为肝脏,虚线 2 所包含区域为卵黄囊;b)为出现肝脏发黑(变性)和卵黄囊吸收延迟的斑马鱼。

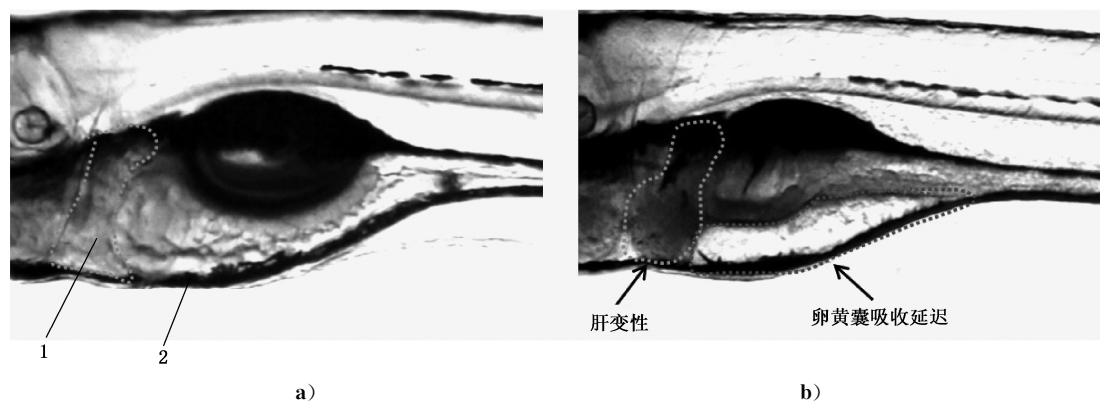


图 A.4 斑马鱼肝脏局部图

图 A.5 为斑马鱼肌肉变性典型图,其中:a)为正常斑马鱼,b)为出现肌肉变性(肌肉纹理不清晰、表面不平整、颜色偏暗)的斑马鱼。

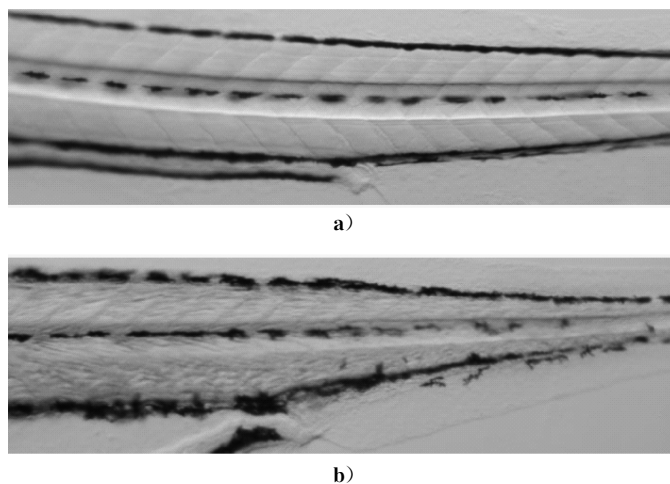


图 A.5 斑马鱼肌肉变性典型图

图 A.6 为斑马鱼下颌畸形典型图,其中:a)为正常斑马鱼,b)为出现下颌畸形(下颌发育延迟,不能与上颌咬合)的斑马鱼。

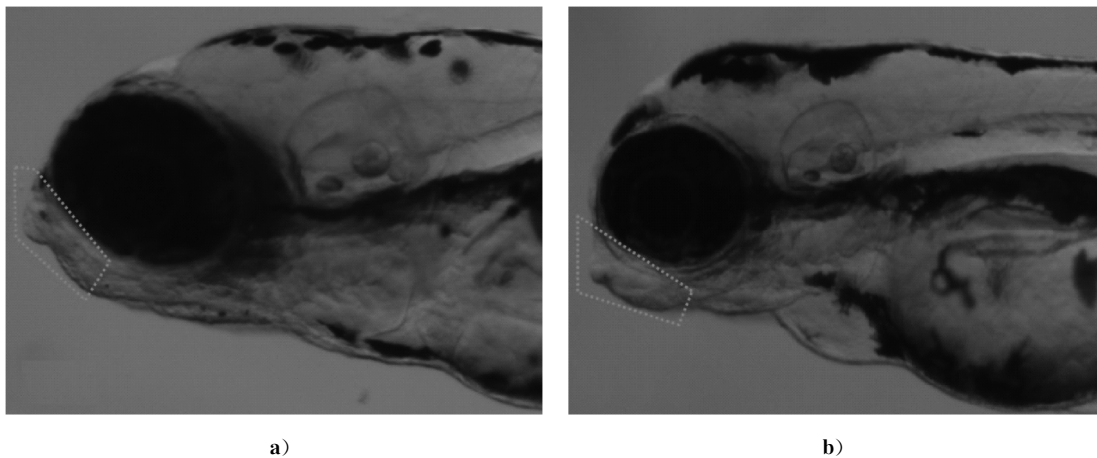


图 A.6 斑马鱼下颌畸形典型图

参 考 文 献

- [1] Kim M S, K M Louis, et al. Using citrate-functionalized TiO₂ nanoparticles to study the effect of particle size on zebrafish embryo toxicity[J]. *Analyst*, 2014, 139(5): 964-972.
- [2] Köktürk M, G Alak, et al. The effects of n-butanol on oxidative stress and apoptosis in zebra fish (*Danio rerio*) larvae[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2020, 227: 108636.
- [3] Hermann A C, P J Millard, et al. Development of a respiratory burst assay using zebrafish kidneys and embryos[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2004, 292(1): 119-129.
- [4] GB/T 21807—2008 化学品 鱼类胚胎和卵黄囊仔鱼阶段的短期毒性试验[S].
- [5] Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals. Guidance on the housing and care of Zebrafish *Danio rerio*[R]. West Sussex: Research animals department, science group, 2010.
- [6] Monte Westerfield. The Zebrafish Book, a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. Edition 5. Eugene: University of Oregon Press, 2007.
- [7] Brand M, Granato M. Keeping and raising zebrafish. In *Zebrafish: A Practical Approach* (Chapter 4), S. Schulte-Merker and C. Nüsslein-Volhard, eds[M]. New York: IRL Press, 1999.
- [8] OECD 236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test—Guidelines for the Testing of Chemicals[S].
-