



环特生物
Hunter Biotech



acalac
INTERNATIONAL

检 测 报 告

Test Report

样品名称: 悦元素薰衣草晚安喷雾

项目编号: HZ9021R3

委托单位: 北京颜悦科技有限公司

报告日期: 2024年07月01日

杭州环特生物科技股份有限公司
HUNTER BIOTECHNOLOGY, INC.

检测报告

客户信息：

北京颜悦科技有限公司
北京市朝阳区建国门外大街甲 6 号 16 层 D 座 1909

项目信息：

样 品 名 称： 悅元素薰衣草晚安喷雾
规 格 及 数 量： 100 g/瓶 × 3 瓶
颜 色 及 物 态： 半透明液体
生 产 日期 或 批 号： 20231210
限 期 使 用 日期： 3 年
生 产 企 业： /
生 产 地 址： /
储 存 条 件： 常温&干燥避光
收 样 日 期： 2024.04.28
完 成 日 期： 2024.06.25
检 测 项 目： 急性毒性、神经毒性、改善睡眠、缓解焦虑作用

检测结论：

- 样品悦元素薰衣草晚安喷雾 96 h 急性毒性的 LC₅₀ 为 0.073%，初步判定样品无急性毒性；
- 样品悦元素薰衣草晚安喷雾 24 h 神经毒性的 MNLC 和 LC₅₀ 浓度分别为 0.202% 和 0.259%，且未诱发斑马鱼神经毒性；
- 样品悦元素薰衣草晚安喷雾具有改善睡眠作用，具体表现为减少觉醒活动量和觉醒总时间，且上调 *mtnr1aa* 基因相对表达量；
- 样品悦元素薰衣草晚安喷雾具有缓解焦虑作用，具体表现为下调 *htr2aa* 基因相对表达量。

检测方法：请详见附页

检测结果：请详见附页

备 注：本检测报告仅对接收样品的测试结果负责

杭州环特生物科技股份有限公司
授权签名：



周示玉 环特生物授权签字人

-第1页，共 30 页-



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼
www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

-第2页，共 30 页-



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家CNAS实验室认可、CMA资质认定及AAALAC国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起15日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路88号万轮科技园5号楼2楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

检测项目 1：急性毒性

一、实验室试验简述

方法名称	斑马鱼急性毒性试验方法
方法来源	《OECD 236 - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test》
试验起止日期	2024年06月21日-2024年06月25日
结果简述	试验体系：野生型 AB 品系。 斑马鱼鱼龄：4 ~ 128 细胞期。 每组实验样本量：30 尾（N=30）。 成鱼饲养及繁殖方法：按照本公司实验室标准饲养和繁殖方法，符合国际 AAALAC 认证（认证编号：001458）的要求。
	斑马鱼是目前在人类健康和生态危害评估中使用替代物种之一，斑马鱼的毒性反应可以预测哺乳动物的毒性反应。本试验通过记录受精后斑马鱼胚胎暴露于样品中 96 小时内的致死性指标：卵凝结、体节缺失、尾部未脱离和无心率来评估样品的毒性。通过斑马鱼的死亡率，确定样品的半数致死浓度 (LC_{50})。
	1. 随机选取斑马鱼于 6 孔板中，每孔 30 尾。 2. 水溶给予样品，同时设置正常对照组，每孔容量为 3 mL。 3. 26 °C 条件下避光孵育 96 h。 4. 每 24 h 观察记录各实验组斑马鱼死亡情况，并及时移除死亡斑马鱼。 5. 实验结束后，统计各实验组斑马鱼死亡率，用 SPSS26.0 软件分析并计算 LC_{50} 。
	适用于化妆品及其原料的急性毒性测试，要求样品能溶解于水或制备成能在水中均匀分散的悬浮液。
	卵凝结、体节缺失、尾部未脱离和无心率判定为死亡。

-第3页，共30页-



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家CNAS实验室认可、CMA资质认定及AAALAC国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起15日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路88号万轮科技园5号楼2楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

二、检测结果

检测项目	实验组别	检测浓度 (%)	死亡数 (尾)	死亡率 (%)	LC ₅₀
急性毒性	正常对照组	-	0	0	-
		0.03	0	0	
		0.05	9	30	
急性毒性	悦元素薰衣草	0.08	16	53	0.073%
	晚安喷雾	0.1	20	67	
		0.12	26	87	
		0.14	30	100	

该样品拟合曲线图，如下图 1 所示：

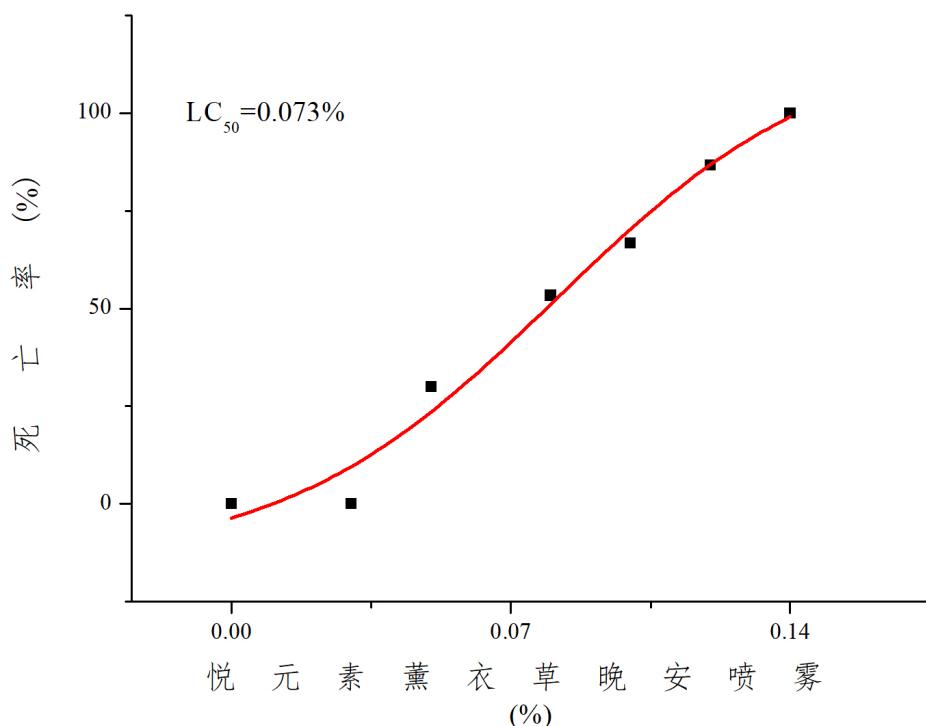


图 1. 急性毒性拟合曲线图

三、结论

在本次实验条件下，样品悦元素薰衣草晚安喷雾 96 h 急性毒性的 LC₅₀ 为 0.073%。参考《OECD236》标准，初



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

步判定样品无急性毒性。

四、参考文献

- [1] OECD (2013) Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Test Guideline No. 236, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD[S].
- [2] OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No.23, OECD, Paris[S].
- [3] OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris[S].



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家CNAS实验室认可、CMA资质认定及AAALAC国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起15日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路88号万轮科技园5号楼2楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

检测项目 2：神经毒性 (MNLC 和 LC₅₀)

一、实验室试验简述

方法名称	斑马鱼神经毒性试验方法
方法来源	《斑马鱼神经毒性实验标准操作规程》
试验起止日期	2024年05月08日-2024年05月09日
结果简述	试验体系：野生型 AB 品系。 斑马鱼鱼龄：受精后 1 天 (1 dpf)。 每组实验样本量：30 尾 (N=30)。 成鱼饲养及繁殖方法：按照本公司实验室标准饲养和繁殖方法，符合国际 AAALAC 认证（认证编号：001458）的要求。
	斑马鱼是目前在人类健康和生态危害评估中使用替代物种之一，斑马鱼的毒性反应可以预测哺乳动物的毒性反应。斑马鱼是一种与人类同源性较高的脊椎动物，大脑具有典型脊椎动物脑部形态学特征，髓鞘结构特征和少突胶质细胞分化过程与哺乳动物高度一致。而且斑马鱼生长发育周期短，神经系统简单，有利于开展神经毒性相关的研究。通过斑马鱼暴露于样品中 24 小时的死亡率，确定样品的最大非致死浓度 (MNLC) 和半数致死浓度 (LC ₅₀)。
	1. 随机选取斑马鱼于 6 孔板中，每孔 30 尾。 2. 水溶给予样品，同时设置正常对照组，每孔容量为 3 mL。 3. 28 °C条件下避光孵育 24 h。 4. 实验结束后，统计各实验组斑马鱼死亡率，用 SPSS26.0 软件分析并计算 MNLC 和 LC ₅₀ 。
	适用于化妆品及其原料的神经毒性测试，要求样品能溶解于水或制备成能在水中均匀分散的悬浮液。
	无心率判定为死亡。

-第6页，共 30 页-



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

二、检测结果

检测项目	实验组别	检测浓度 (%)	死亡数 (尾)	死亡率 (%)	MNLC	LC ₅₀
神经毒性	正常对照组	-	0	0	-	-
		0.18	0	0	-	-
		0.2	1	3	-	-
	悦元素薰衣草 晚安喷雾	0.22	3	10	0.202%	0.259%
		0.25	7	23		
		0.27	18	60		
		0.3	30	100		

该样品拟合曲线图，如下图 2 所示：

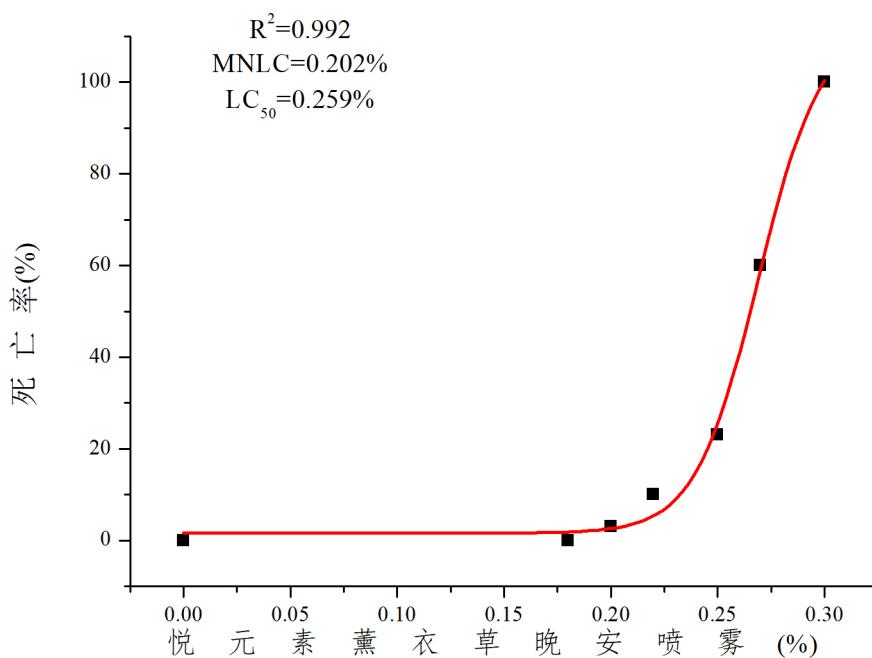


图 2. 神经毒性拟合曲线图

三、结论

在本次实验条件下，样品悦元素薰衣草晚安喷雾 24 h 神经毒性的 MNLC 和 LC₅₀ 浓度分别为 0.202% 和 0.259%。



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

四、参考文献

- [1] OECD (2013) Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Test Guideline No. 236, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD[S].
- [2] OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No.23, OECD, Paris[S].
- [3] OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris[S].
- [4] Perathoner S, Cordero-Maldonado ML, Crawford AD. Potential of zebrafish as a model for exploring the role of the amygdala in emotional memory and motivational behavior[J]. J Neurosci Res. 2016, 94(6):445-462.



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家CNAS实验室认可、CMA资质认定及AAALAC国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起15日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路88号万轮科技园5号楼2楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

检测项目 3：神经毒性（中枢神经凋亡细胞荧光强度）

一、实验室试验简述

方法名称	斑马鱼神经毒性试验方法
方法来源	《斑马鱼神经毒性评价实验标准操作规程》
试验起止日期	2024年05月09日-2024年05月10日
结果简述	试验体系：野生型 AB 品系。 斑马鱼鱼龄：受精后 1 天（1 dpf）。 每组实验样本量：15 尾（N=10）。 成鱼饲养及繁殖方法：按照本公司实验室标准饲养和繁殖方法，符合国际 AAALAC 认证（认证编号：001458）的要求。
	斑马鱼是目前在人类健康和生态危害评估中使用替代物种之一，斑马鱼的毒性反应可以预测哺乳动物的毒性反应。斑马鱼是一种与人类同源性较高的脊椎动物，大脑具有典型脊椎动物脑部形态学特征，髓鞘结构特征和少突胶质细胞分化过程与哺乳动物高度一致。而且斑马鱼生长发育周期短，神经系统简单，有利于开展神经毒性相关的研究。吖啶橙（AO）能透过胞膜完整的细胞，嵌入细胞核 DNA，荧光显微镜下，活细胞核染色质呈现均匀分布的黄绿色荧光，胞质呈橘红色荧光，而凋亡细胞核染色质的黄绿色荧光浓聚在核膜内侧，凋亡细胞核的特征性形态可被清晰地辨认。中枢神经损伤的斑马鱼在脑和脊髓部位会布满凋亡细胞，经过 AO 特异性荧光染色，可以明显被观察到。因此通过检测斑马鱼中枢神经细胞的凋亡情况可以评价样品的神经毒性。
	1. 随机选取斑马鱼于 6 孔板中，每孔 15 尾。 2. 水溶给予样品，同时设置正常对照组，每孔容量为 3 mL。 3. 28 °C 条件下避光孵育 24 h。 4. 用吖啶橙对斑马鱼进行染色处理，染色结束后，每个实验组随机选取 10

-第9页，共 30 页-



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

		尾斑马鱼置于荧光显微镜下拍照，用高级图像处理软件分析并采集数据，分析中枢神经凋亡细胞荧光强度（S），根据公式计算并判断样品的神经毒性。
	适用性及局限性	细胞凋亡率 (%) = $\frac{S(\text{样品组}) - S(\text{正常对照组})}{S(\text{正常对照组})} \times 100\%$
	判定依据	适用于化妆品及其原料的神经毒性测试，要求样品能溶解于水或制备成能在水中均匀分散的悬浮液。 统计学分析 $p < 0.05$ ，判定为有显著性差异。

二、检测结果

检测项目	实验组别	检测浓度	细胞凋亡率 (%)	p 值	检测结果
神经毒性	悦元素薰衣草晚安喷雾	霉酚酸吗啉乙酯	0.4 μM	98	< 0.001 显著
			0.034%	-6	> 0.05 不显著
			0.067%	1	> 0.05 不显著
			0.202%	4	> 0.05 不显著



该样品神经毒性实验表型图，如下图 3 所示：

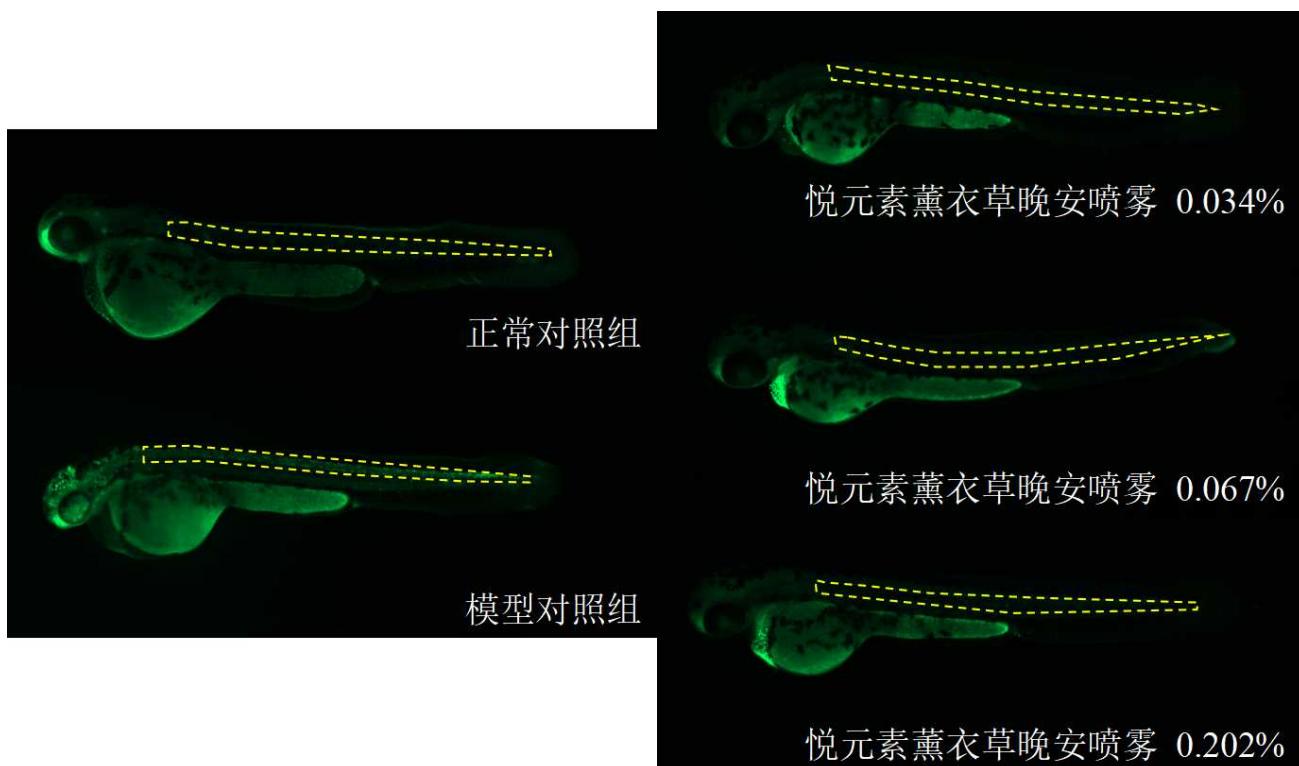


图 3. 神经毒性典型图（黄色虚线部位为定量区域）

观察发现，样品悦元素薰衣草晚安喷雾组的中枢神经凋亡细胞荧光强度与正常对照组相似，揭示了该样品不具有神经毒性。

三、结论

在本次实验条件下，样品悦元素薰衣草晚安喷雾，未诱发斑马鱼神经毒性。

四、参考文献

- [1] Perathoner S, Cordero-Maldonado ML, Crawford AD. Potential of zebrafish as a model for exploring the role of the amygdala in emotional memory and motivational behavior[J]. J Neurosci Res. 2016, 94(6):445-462.
- [2] 郭弘扬,唐天乐,朱晓鹏.斑马鱼模型在中枢神经系统疾病中的研究进展[J].中国海洋药物. 2020, 39(3):71-79.
- [3] 孙琦, 范咏梅, 赖柯华 等. 呋虫胺对斑马鱼胚胎-幼鱼生长发育及细胞凋亡的影响[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(3): 356-364.
- [4] 兰小红, 朱晓宇, 张勇, 等. 以斑马鱼模型评价 6 种药物的神经毒性[J]. 实验动物科学,2016,33(5):28-32.
- [5] Christopher Ton,Yingxin Lin,Catherine Willett. Zebrafish as a Model for Developmental Neurotoxicity Testing[J]. Birth Defects Research, 2006, 76: 553-567.
- [6] Chuenlei Parng, Nicole Marie Roy, Christopher Ton, et al. Neurotoxicity assessment using zebrafish[J]. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2007, 55: 103-112.
- [7] 朱晓宇, 王红月, 李怀平, 等. 如意珍宝丸对斑马鱼神经损伤的保护及促再生作用研究[J]. 药物评价研究, 2017, 40(3): 307-313.



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

检测项目 4: MTC (改善睡眠作用)

一、实验室试验简述

方法名称	斑马鱼最大检测浓度（MTC）试验方法
方法来源	《斑马鱼最大检测浓度（MTC）评价实验标准操作规程》
试验起止日期	2024年05月09日-2024年05月11日
结 果 简 述	体系及样本量 试验体系：野生型 AB 品系斑马鱼。 斑马鱼鱼龄：受精后 5 天（5 dpf）。 每组实验样本量：15 尾（N=15）。 成鱼饲养及繁殖方法：按照本公司实验室标准饲养和繁殖方法，符合国际 AAALAC 认证（认证编号：001458）的要求。
	原理方法 斑马鱼是目前在人类健康和生态危害评估中使用替代物种之一。斑马鱼和人类基因有着 87% 的高度相似性，是除大小鼠外的第三大模式生物。斑马鱼受环境和化合物影响出现死亡和发育毒性。因此通过斑马鱼死亡情况和毒性情况可确定样品的最大检测浓度（MTC）。
	实验步骤 1. 随机选取斑马鱼于 6 孔板中，每孔 15 尾。 2. 水溶给予样品，同时设置正常对照组和模型对照组，每孔容量为 3 mL。 3. 28 °C 条件下避光孵育 24 h。 4. 除正常对照组在外，其余各实验组均水溶给予 PTZ 建立斑马鱼失眠模型。 5. 28 °C 条件下继续避光孵育 1 h 后根据斑马鱼死亡情况和毒性情况，确定样品对模型斑马鱼的 MTC。
	适用性及局限性 适用于化妆品及其原料的 MTC 测试，要求样品能溶解于水或制备成能在水中均匀分散的悬浮液。



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

	判定依据	斑马鱼死亡情况和毒性情况。
--	------	---------------

二、检测结果

检测项目	实验组别	检测浓度 (%)	死亡数 (尾)	死亡率 (%)	表型
	正常对照组	-	0	0	未见明显异常
	模型对照组	-	0	0	未见明显异常
		0.001	0	0	与模型对照组状态相似
		0.0025	0	0	与模型对照组状态相似
		0.005	0	0	与模型对照组状态相似
MTC		0.01	7	47	-
	悦元素薰衣草晚安喷雾	0.025	9	60	-
		0.05	9	60	-
		0.1	15	100	-
		0.25	15	100	-
		0.5	15	100	-

三、结论

在本次实验条件下，样品悦元素薰衣草晚安喷雾对模型斑马鱼的 MTC 为 0.005%。

四、参考文献

- [1] OECD (2013) Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Test Guideline No. 236, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD[S].
- [2] OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No.23, OECD, Paris[S].
- [3] OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris[S].
- [4] Ellis LD and Soanes KH. A larval zebrafish model of bipolar disorder as a screening platform for neuro-therapeutics[J].



Behav Brain Res. 2012,233(2):450-457.

[5] Mi P ,Gao Q ,Feng Z , et al.Melatonin attenuates 17 β -trenbolone induced insomnia-like phenotype and movement deficiency in zebrafish[J].Chemosphere,2020,253(prepublish):126762.

[6] 何东方; 张丽军; 刘梅颜. 药物处理对失眠症斑马鱼睡眠的影响以及相关作用机制[J]. 中国循证心血管医学杂志. 2017,9(3):326-330.



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家CNAS实验室认可、CMA资质认定及AAALAC国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起15日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路88号万轮科技园5号楼2楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

检测项目 5：改善睡眠作用（觉醒活动量）

一、实验室试验简述

方法名称	斑马鱼改善睡眠作用试验方法
方法来源	《斑马鱼改善睡眠作用评价实验标准操作规程》
试验起止日期	2024年05月20日-2024年05月21日
结 果 简 述	体系及样本量 试验体系：野生型 AB 品系。 斑马鱼鱼龄：受精后 5 天（5 dpf）。 每组实验样本量：15 尾（N=10）。 成鱼饲养及繁殖方法：按照本公司实验室标准饲养和繁殖方法，符合国际 AAALAC 认证（认证编号：001458）的要求。
	原理方法 戊四唑（PTZ）是 γ -氨基丁酸（简称 GABA）及其受体复合物的抑制剂，GABA 是一种天然存在的非蛋白质氨基酸，是哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经传达物质，它能够抑制大脑神经元的兴奋性，从而维持大脑的稳定状态。小剂量 PTZ 可以抑制 GABA 的合成和释放，导致大脑神经元失去抑制作用，变得兴奋，从而造成失眠。通过斑马鱼的觉醒活动量（即快速运动距离）的变化来评价样品是否具有改善睡眠作用。
	实验步骤 1. 随机选取斑马鱼于 6 孔板中，每孔 15 尾。 2. 水溶给予样品，同时设置正常对照组和模型对照组，每孔容量为 3 mL。 3. 28 °C条件下避光孵育 24 h。 4. 每个实验组随机选择 10 尾斑马鱼转移至 96 孔板中，200 μ L/尾，1 尾/孔，除正常对照组外，其余实验组均水溶给予 PTZ 建立斑马鱼失眠模型。 5. 利用行为分析仪采集数据，分析斑马鱼的觉醒活动量（D），根据公式计算并判断样品是否具有改善睡眠作用。 $\text{改善睡眠作用 (\%)} = \frac{D(\text{模型对照组}) - D(\text{样品组})}{D(\text{模型对照组}) - D(\text{正常对照组})} \times 100\%$

-第15页，共30页-



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

	适用性及局限性	适用于化妆品及其原料的改善睡眠作用测试，要求样品能溶解于水或制备成能在水中均匀分散的悬浮液。			
	判定依据	统计学分析 $p < 0.05$ ，判定为有显著性差异。			

二、检测结果

检测项目	实验组别	检测浓度	作用 (%)	p 值	检测结果
改善睡眠作用	褪黑素 悦元素薰衣草晚安喷雾	250 $\mu\text{g/mL}$	53	< 0.05	显著
		0.00125%	8	> 0.05	不显著
		0.0025%	30	> 0.05	不显著
		0.005%	54	< 0.05	显著

该样品改善睡眠作用实验柱形图，如下图 4 所示：

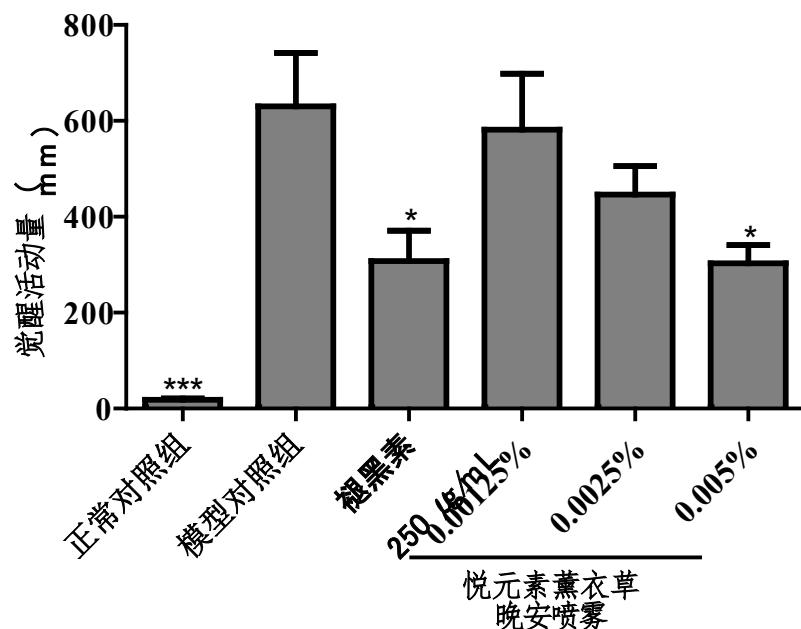


图 4. 觉醒活动量柱形图
 与模型对照组比较，* $p < 0.05$ ，*** $p < 0.001$

观察发现，样品悦元素薰衣草晚安喷雾组的觉醒活动量与模型对照组相比，明显减少，揭示了该样品具有改善睡眠作用。



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家CNAS实验室认可、CMA资质认定及AAALAC国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起15日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

三、结论

在本次实验条件下，样品悦元素薰衣草晚安喷雾，具有改善睡眠作用，具体表现为减少觉醒活动量。

四、参考文献

- [1] Ellis LD and Soanes KH. A larval zebrafish model of bipolar disorder as a screening platform for neuro-therapeutics[J]. Behav Brain Res. 2012,233(2):450-457.
- [2] Mi P ,Gao Q ,Feng Z , et al.Melatonin attenuates 17 β -trenbolone induced insomnia-like phenotype and movement deficiency in zebrafish[J].Chemosphere,2020,253(prepublish):126762.
- [3] 何东方；张丽军；刘梅颜. 药物处理对失眠症斑马鱼睡眠的影响以及相关作用机制[J]. 中国循证心血管医学杂志. 2017,9(3):326-330.



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家CNAS实验室认可、CMA资质认定及AAALAC国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起15日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路88号万轮科技园5号楼2楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

检测项目 6：改善睡眠作用（觉醒总时间）

一、实验室试验简述

方法名称	斑马鱼改善睡眠作用试验方法
方法来源	《斑马鱼改善睡眠作用评价实验标准操作规程》
试验起止日期	2024年05月20日-2024年05月21日
结 果 简 述	体系及样本量 试验体系：野生型 AB 品系。 斑马鱼鱼龄：受精后 5 天（5 dpf）。 每组实验样本量：15 尾（N=10）。 成鱼饲养及繁殖方法：按照本公司实验室标准饲养和繁殖方法，符合国际 AAALAC 认证（认证编号：001458）的要求。
	原理方法 戊四唑（PTZ）是 γ -氨基丁酸（简称 GABA）及其受体复合物的抑制剂，GABA 是一种天然存在的非蛋白质氨基酸，是哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经传达物质，它能够抑制大脑神经元的兴奋性，从而维持大脑的稳定状态。小剂量 PTZ 可以抑制 GABA 的合成和释放，导致大脑神经元失去抑制作用，变得兴奋，从而造成失眠。通过斑马鱼的觉醒总时间的变化来评价样品是否具有改善睡眠作用。
	实验步骤 1. 随机选取斑马鱼于 6 孔板中，每孔 15 尾。 2. 水溶给予样品，同时设置正常对照组和模型对照组，每孔容量为 3 mL。 3. 28 °C条件下避光孵育 24 h。 4. 每个实验组随机选择 10 尾斑马鱼转移至 96 孔板中，200 μ L/尾，1 尾/孔，除正常对照组外，其余实验组均水溶给予 PTZ 建立斑马鱼失眠模型。 5. 利用行为分析仪采集数据，分析斑马鱼的觉醒总时间（T），根据公式计算并判断样品是否具有改善睡眠作用。 $\text{改善睡眠作用 (\%)} = \frac{T_{(\text{模型对照组})} - T_{(\text{样品组})}}{T_{(\text{模型对照组})} - T_{(\text{正常对照组})}} \times 100\%$

-第18页，共 30 页-



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

	适用性及局限性	适用于化妆品及其原料的改善睡眠作用测试，要求样品能溶解于水或制备成能在水中均匀分散的悬浮液。			
	判定依据	统计学分析 $p < 0.05$ ，判定为有显著性差异。			

二、检测结果

检测项目	实验组别	检测浓度	作用 (%)	p 值	检测结果
改善睡眠作用	褪黑素 悦元素薰衣草晚安喷雾	250 $\mu\text{g/mL}$	54	< 0.05	显著
		0.00125%	10	> 0.05	不显著
		0.0025%	25	> 0.05	不显著
		0.005%	52	< 0.05	显著

该样品改善睡眠作用实验柱形图，如下图 5 所示：

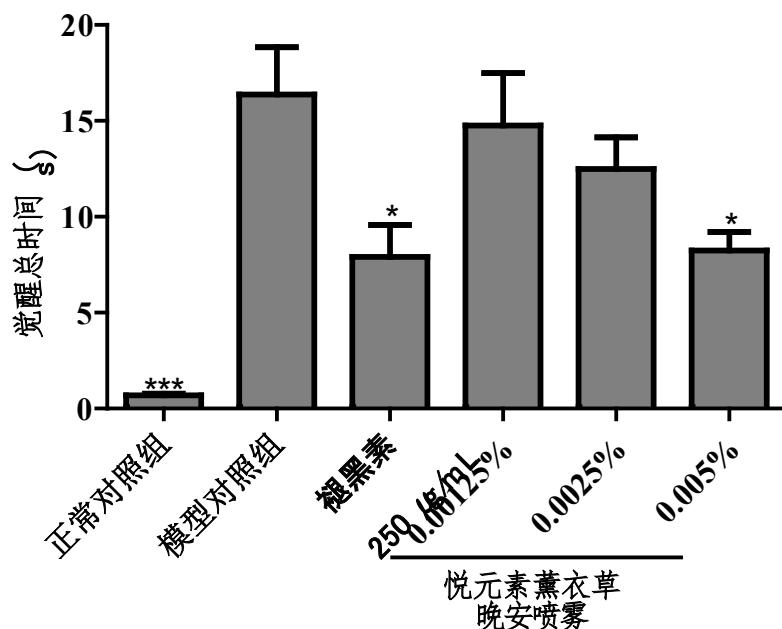


图 5. 觉醒总时间柱形图
 与模型对照组比较，* $p < 0.05$ ，*** $p < 0.001$

观察发现，样品悦元素薰衣草晚安喷雾组的觉醒总时间与模型对照组相比，明显减少，揭示了该样品具有改善睡眠作用。



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家CNAS实验室认可、CMA资质认定及AAALAC国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起15日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

三、结论

在本次实验条件下，样品悦元素薰衣草晚安喷雾，具有改善睡眠作用，具体表现为减少觉醒总时间。

四、参考文献

- [1] Ellis LD and Soanes KH. A larval zebrafish model of bipolar disorder as a screening platform for neuro-therapeutics[J]. Behav Brain Res. 2012,233(2):450-457.
- [2] Mi P ,Gao Q ,Feng Z , et al.Melatonin attenuates 17 β -trenbolone induced insomnia-like phenotype and movement deficiency in zebrafish[J].Chemosphere,2020,253(prepublish):126762.
- [3] 何东方；张丽军；刘梅颜. 药物处理对失眠症斑马鱼睡眠的影响以及相关作用机制[J]. 中国循证心血管医学杂志. 2017,9(3):326-330.



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家CNAS实验室认可、CMA资质认定及AAALAC国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起15日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路88号万轮科技园5号楼2楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

检测项目 7：改善睡眠作用 (*mtnrlaa* 基因相对表达量)

一、实验室试验简述

方法名称	斑马鱼改善睡眠作用试验方法	
方法来源	《斑马鱼改善睡眠作用评价实验标准操作规程》	
试验起止日期	2024年05月16日-2024年05月27日	
结 果 简 述	体系及样本量	<p>试验体系：野生型 AB 品系斑马鱼。</p> <p>斑马鱼鱼龄：受精后 5 天（5 dpf）。</p> <p>每组实验样本量：30 尾（三次生物学重复，N=3）。</p> <p>成鱼饲养及繁殖方法：按照本公司实验室标准饲养和繁殖方法，符合国际 AAALAC 认证（认证编号：001458）的要求。</p>
	原理方法	<p>戊四唑（PTZ）是 γ-氨基丁酸（简称 GABA）及其受体复合物的抑制剂，GABA 是一种天然存在的非蛋白质氨基酸，是哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经传达物质，它能够抑制大脑神经元的兴奋性，从而维持大脑的稳定状态。小剂量 PTZ 可以抑制 GABA 的合成和释放，导致大脑神经元失去抑制作用，变得兴奋，从而造成失眠。褪黑素是脑松果体分泌的激素之一，能诱导人自然睡眠，其分泌具有明显的昼夜节律。夜间松果体合成褪黑素的酶类活性增强，褪黑素分泌水平增加。当褪黑素与特异性的受体结合后，启动细胞信号转导，缩短睡眠潜伏期并延长睡眠时长，从而克服睡眠障碍，改善生物节律紊乱和提高睡眠质量。当人处于失眠状态时，体内褪黑素分泌减少，褪黑素受体基因 (<i>mtnrlaa</i>) 表达减少。因此，可通过检测斑马鱼 <i>mtnrlaa</i> 基因相对表达量来评价样品是否具有改善睡眠作用。</p>
	实验步骤	<ol style="list-style-type: none"> 随机选取斑马鱼于 6 孔板中，每孔 30 尾。 水溶给予样品，同时设置正常对照组和模型对照组，每孔容量为 3 mL。

- 第21页，共 30 页 -



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

		<p>三次生物学重复。</p> <p>3. 28 °C条件下避光孵育 24 h。</p> <p>4. 除正常对照组外，其余各实验组均水溶给予 PTZ 建立斑马鱼失眠模型。</p> <p>5. 28 °C条件下继续避光孵育 1 h 后，收集斑马鱼样本，提取各实验组斑马鱼总 RNA，合成 cDNA，利用 q-PCR 检测 β-actin 和目的基因的基因表达。</p> <p>6. 用 β-actin 作为基因表达的内参，计算目的基因的 RNA 相对表达量。</p> $\text{RNA相对表达量} = 2^{\Delta\Delta C(t)}$ $\Delta\Delta C(t) = \overline{\Delta C(t)}_{\text{模型对照组}} - \overline{\Delta C(t)}_{\text{样品组}}$ $\Delta C(t) = C(t)_{\text{目的基因}} - C(t)_{\beta\text{-actin}}$
	适用性及局限性	适用于化妆品及其原料的改善睡眠作用测试，要求样品能溶解于水或制备成能在水中均匀分散的悬浮液。
	判定依据	统计学分析 $p < 0.05$ ，判定为有显著性差异。

二、检测结果

检测项目	实验组别	检测浓度	<i>mtnrlaa</i> 基因 相对表达量	改善率 (%)	p 值	检测结果
改善睡眠作用	正常对照组	-	2.78	-	< 0.001	显著
	模型对照组	-	1.01	-	-	-
	褪黑素	250 $\mu\text{g/mL}$	2.08	106	< 0.001	显著
		0.00125%	1.15	14	> 0.05	不显著
	悦元素薰衣草晚安喷雾	0.0025%	1.23	22	> 0.05	不显著
		0.005%	2.64	161	< 0.001	显著



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

该样品作用实验柱形图，如下图 6 和图 7 所示：

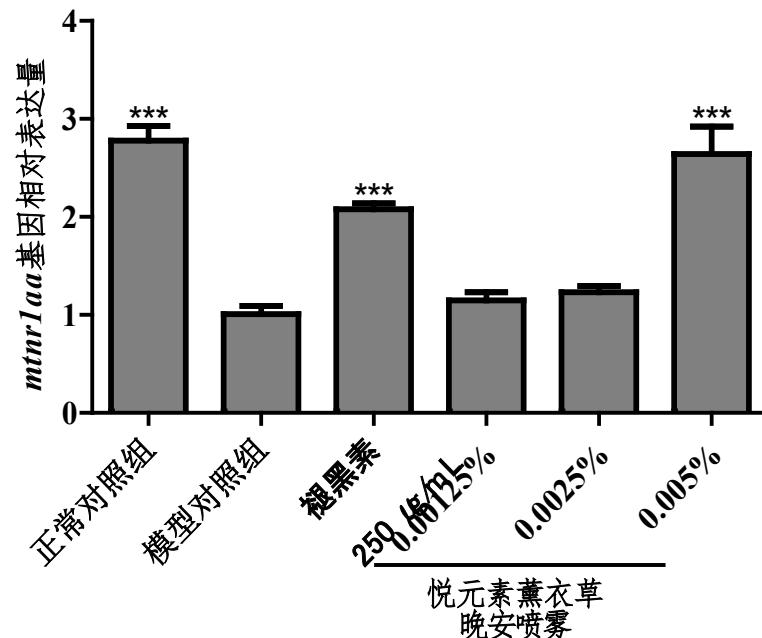


图 6. *mtnrlaa* 基因相对表达量柱形图

与模型对照组比较，***p < 0.001

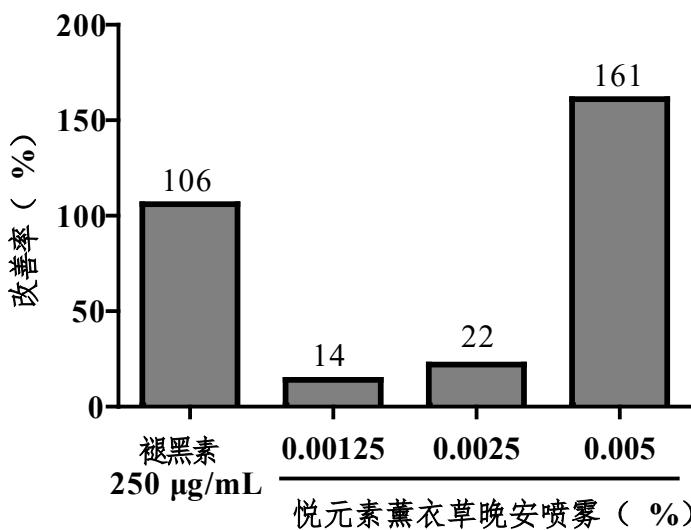


图 7. 改善睡眠作用改善率柱形图

观察发现，样品悦元素薰衣草晚安喷雾组的 *mtnrlaa* 基因相对表达量与模型对照组相比，明显上调，揭示了该样品具有改善睡眠作用。

三、结论

在本次实验条件下，样品悦元素薰衣草晚安喷雾，具有改善睡眠作用，具体表现为上调 *mtnrlaa* 基因相对表达量。

四、参考文献

- [1] Ellis LD and Soanes KH. A larval zebrafish model of bipolar disorder as a screening platform for neuro-therapeutics[J]. Behav Brain Res. 2012,233(2):450-457.
- [2] Mi P ,Gao Q ,Feng Z , et al.Melatonin attenuates 17 β -trenbolone induced insomnia-like phenotype and movement deficiency in zebrafish[J].Chemosphere,2020,253(prepublish):126762.
- [3] 何东方; 张丽军; 刘梅颜. 药物处理对失眠症斑马鱼睡眠的影响以及相关作用机制[J]. 中国循证心血管医学杂志. 2017,9(3):326-330.



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家CNAS实验室认可、CMA资质认定及AAALAC国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起15日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

检测项目 8：缓解焦虑作用

一、实验室试验简述

方法名称	斑马鱼缓解焦虑作用试验方法	
方法来源	《斑马鱼缓解焦虑作用评价实验标准操作规程》	
试验起止日期	2024年06月20日-2024年06月25日	
结 果 简 述	体系及样本量	<p>试验体系：野生型 AB 品系斑马鱼。</p> <p>斑马鱼鱼龄：受精后 5 天（5 dpf）。</p> <p>每组实验样本量：30 尾（三次生物学重复，N=3）。</p> <p>成鱼饲养及繁殖方法：按照本公司实验室标准饲养和繁殖方法，符合国际 AAALAC 认证（认证编号：001458）的要求。</p>
	原理方法	<p>斑马鱼具有经典的脊椎动物神经递质，其单胺类神经系统与哺乳类动物在结构特点上存在很多相似点，如去甲肾上腺素、5-羟色胺（5-Hydroxytryptamine, 5-HT）和组胺递质系统均具高度相似性。5-HT 是一种生物活性胺，在发育过程中 5-HT 可作为 5-羟色胺能神经元和靶组织的发育信号，在成熟大脑中 5-HT 作为神经递质调节神经元功能，在大脑发育和功能中起到了双重调节作用。5-HT 广泛存在于与焦虑相关的脑区，如下丘脑、丘脑、基底神经节、边缘系统等，是一种具有双向作用的神经递质。而 1-(3-氯苯基) 呓嗪盐酸盐 (mCPP) 是一种非特异性 5-羟色胺能激动剂，研究表明 mCPP 激动 5HT2A 受体使其表达增多，可导致焦虑样行为的增加。因此，可通过检测斑马鱼 <i>htr2aa</i> 基因相对表达量来评价样品是否具有缓解焦虑作用。</p>
	实验步骤	<ol style="list-style-type: none"> 随机选取斑马鱼于 6 孔板中，每孔 30 尾。 水溶给予样品，同时设置正常对照组和模型对照组，每孔容量为 3 mL。 <p>三次生物学重复。</p>

- 第25页，共 30 页 -



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

		<p>3. 28 °C条件下避光孵育 24 h。</p> <p>4. 除正常对照组外，其余各实验组均水溶给予 mCPP 建立斑马鱼焦虑模型。</p> <p>5. 28 °C条件下继续避光孵育 1 h 后，收集斑马鱼样本，提取各实验组斑马鱼总 RNA，合成 cDNA，利用 q-PCR 检测 β-actin 和目的基因的基因表达。</p> <p>6. 用 β-actin 作为基因表达的内参，计算目的基因的 RNA 相对表达量。</p> $\text{RNA相对表达量} = 2^{\Delta\Delta C(t)}$ $\Delta\Delta C(t) = \overline{\Delta C(t)}_{\text{模型对照组}} - \overline{\Delta C(t)}_{\text{样品组}}$ $\Delta C(t) = C(t)_{\text{目的基因}} - C(t)_{\beta\text{-actin}}$
	适用性及局限性	适用于化妆品及其原料的缓解焦虑作用测试，要求样品能溶解于水或制备成能在水中均匀分散的悬浮液。
	判定依据	统计学分析 $p < 0.05$ ，判定为有显著性差异。

二、检测结果

检测项目	实验组别	检测浓度 (%)	htr2aa 基因相对表达量	改善率 (%)	p 值	检测结果
缓解焦虑作用	正常对照组	-	0.705	-	< 0.01	显著
	模型对照组	-	1.00	-	-	-
	艾司唑仑片	0.0005	0.449	55	< 0.001	显著
		0.00125	0.586	41	< 0.05	显著
	悦元素薰衣草晚安喷雾	0.0025	0.486	51	< 0.05	显著
		0.005	0.341	66	< 0.01	显著



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

该样品作用实验柱形图，如下图 8 和图 9 所示：

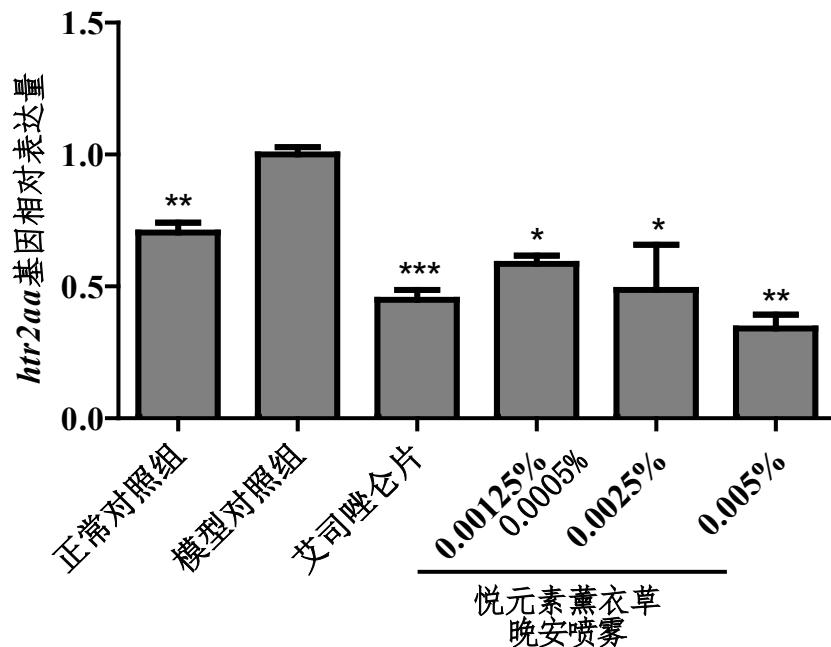


图 8. *htr2aa* 基因相对表达量柱形图

与模型对照组比较，* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

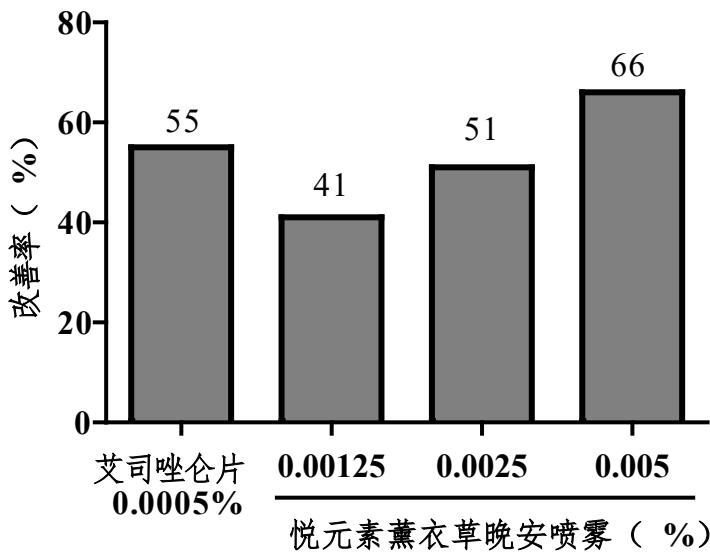


图 9. 缓解焦虑作用改善率柱形图

观察发现，样品悦元素薰衣草晚安喷雾组的 *htr2aa* 基因相对表达量与模型对照组相比，明显下调，揭示了该样品具有缓解焦虑作用。

三、结论

在本次实验条件下，样品悦元素薰衣草晚安喷雾，具有缓解焦虑作用，具体表现为下调 *htr2aa* 基因相对表达量。

四、参考文献

- [1] 方芳, 余林中. 斑马鱼-一种可用于中药抗焦虑药研究的模式生物[J]. 中药药理与临床, 2011(1): 106-108.
- [2] Stewart A, Wu N, Cachat J, et al. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2011, 35(6): 1421-1431.
- [3] Xiang M, Jiang Y, Hu Z, et al. Stimulation of anxiety-like behavior via ERK pathway by competitive serotonin receptors 2A and 1A in Post-Traumatic Stress Disordered Mice.[J]. Neurosignals, 2017, 25(1): 39-53.
- [4] Marcinkiewicz CA, Dorrier CE, Lopez AJ, et al. Ethanol induced adaptations in 5-HT2c receptor signaling in the bed nucleus of the stria terminalis: Implications for anxiety during ethanol withdrawal[J]. Neuropharmacology, 2015, 89: 157-167.



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性、真实性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

附件一：神经毒性（中枢神经凋亡细胞荧光强度）原始数据

评价指标	正常对照组	霉酚酸吗啉乙	悦元素薰衣草晚安喷雾 (%)		
		酯 0.4 μM	0.034	0.067	0.202
斑马鱼中枢神经凋亡细胞荧光强度(像素)	1	189639.22	422806.8	187980	210451.24
	2	173151.9	412258.17	208841.31	188893.46
	3	214448.24	429786.8	193443.4	220451.9
	4	213820.26	419226.8	152312.81	207666.14
	5	163702.88	362287.58	211923.79	170847.19
	6	216098.56	348328.76	162383.92	194200.92
	7	213327.32	403571.24	173832.42	207269.15
	8	160045.36	330255.95	184437.12	197139.08
	9	196467.45	368464.05	157993.59	212569.15
	10	225976.34	389018.43	208960.65	178991.37
mean		196667.753	388600.458	184210.901	198847.96
mean 取值		196668	388600	184211	198848
细胞凋亡率 (%)			98	-6	1
p			< 0.001	> 0.05	> 0.05



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家CNAS实验室认可、CMA资质认定及AAALAC国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起15日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路88号万轮科技园5号楼2楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

附件二：改善睡眠作用（觉醒活动量）原始数据

评价指标	正常对照组	模型对照组	褪黑素 250 μg/mL	悦元素薰衣草晚安喷雾 (%)		
				0.00125	0.0025	0.005
觉醒活动 量 (mm)	1	15.949	762.100	525.977	1193.463	264.137
	2	14.967	451.666	238.823	1257.177	242.451
	3	8.446	320.634	119.406	541.566	478.628
	4	31.407	1233.082	669.284	305.814	484.131
	5	36.395	645.255	296.765	318.984	571.127
	6	8.628	337.620	360.546	169.918	212.310
	7	10.835	475.320	406.612	494.198	814.022
	8	23.360	517.456	35.257	518.083	562.948
	9	16.971	314.549	75.897	341.110	516.560
	10	14.097	1248.179	351.069	675.382	316.465
mean		18.1055	630.5861	307.9636	581.5695	446.2779
mean 取值		18.1	631	308	582	446
改善睡眠作 用 (%)				53	8	30
p		< 0.001		< 0.05	> 0.05	> 0.05
					< 0.05	



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家CNAS实验室认可、CMA资质认定及AAALAC国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起15日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路88号万轮科技园5号楼2楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

附件三：改善睡眠作用（觉醒总时间）原始数据

评价指标	正常对照组	模型对照组	褪黑素 250 μg/mL	悦元素薰衣草晚安喷雾 (%)		
				0.00125	0.0025	0.005
觉醒总时 间 (s)	1	0.332	21.165	13.029	27.736	6.767
	2	0.533	11.106	5.834	30.311	8.199
	3	0.633	8.831	3.337	13.997	12.765
	4	1.200	28.730	17.165	7.436	14.033
	5	0.333	16.871	6.931	8.933	15.634
	6	0.566	10.437	8.698	4.035	6.368
	7	0.867	13.862	12.600	13.193	22.699
	8	0.765	13.428	0.900	13.368	14.361
	9	1.100	9.101	1.767	9.134	16.164
	10	0.534	30.160	8.865	19.460	8.002
mean		0.6863	16.3691	7.9126	14.7603	12.4992
mean 取值		0.686	16.4	7.91	14.8	12.5
改善睡眠作 用 (%)				54	10	25
p		< 0.001		< 0.05	> 0.05	> 0.05
					< 0.05	



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家CNAS实验室认可、CMA资质认定及AAALAC国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起15日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路88号万轮科技园5号楼2楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com

附件四：改善睡眠作用 (*mtnr1aa* 基因相对表达量) 原始数据

评价指标		正常对照组	模型对照组	褪黑素 250		悦元素薰衣草晚安喷雾 (%)	
				μg/mL	0.00125	0.0025	0.005
<i>mtnr1aa</i> 基因相对表达量	1	2.789698565	0.860262901	1.987776379	1.290134832	1.2305179	2.624305158
	2	3.030452335	1.152776225	2.192995374	1.151376737	1.120477052	3.133583154
	3	2.519135352	1.008379005	2.055850702	1.008124351	1.342900906	2.16235433
mean		2.779762084	1.007139377	2.078874152	1.14987864	1.23129862	2.640080881
mean 取值		2.78	1.01	2.08	1.15	1.23	2.64
改善率 (%)				106	14	22	161
p		< 0.001		< 0.001	> 0.05	> 0.05	< 0.001

附件五：缓解焦虑作用 (*htr2aa* 基因相对表达量) 原始数据

评价指标		正常对照组	模型对照组	艾司唑仑片		悦元素薰衣草晚安喷雾 (%)	
				0.0005%	0.00125	0.0025	0.005
<i>htr2aa</i> 基因相对表达量	1	0.638671211	0.992854661	0.376204792	0.553965257	0.282569034	0.359291405
	2	0.709186436	1.052407893	0.469570541	0.648851755	0.348084505	0.420500598
	3	0.766129965	0.957040297	0.501312971	0.554738312	0.828440268	0.24232765
mean		0.704662537	1.000767617	0.449029435	0.585851775	0.486364602	0.340706551
mean 取值		0.705	1.00	0.449	0.586	0.486	0.341
改善率 (%)				55	41	51	66
p		< 0.01		< 0.001	< 0.05	< 0.05	< 0.01

检 测：彭逸、沈培栋、陈星辉
日 期：2024 年 06 月 25 日

审 核：陈欣苗
日 期：2024 年 07 月 01 日



测试样品的斑马鱼检测结果为“有效”时，可授予其“Verified by Zebrafish”功效有效认可标识。本单位已通过国家 CNAS 实验室认可、CMA 资质认定及 AAALAC 国际实验动物认证。本单位保证检测的公正性、独立性和诚实性，对检测结果负责，对委托方所提供的检测样品及在检测活动中获得的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。本报告未盖本单位检测专用章无效。本报告涂改、缺页、部分复印无效，复制报告未重新加盖本单位检测专用章无效。委托方若对本报告有异议，须在检测报告收到之日起 15 日内向本单位提出。本单位接收的委托送检样品，其代表性和准确性由委托方负责。本报告的检测数据和结果仅对接收的样品负责。

杭州环特生物科技股份有限公司 浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号万轮科技园 5 号楼 2 楼

www.zhunter.com 0571-83782130 info@zhunter.com