



检 测 报 告

Test Report

样品名称： 和颜悦®根皮素（Benignice® Phloretin）

项目编号： HZ7307-1R1

委托单位： 合肥和晨生物科技有限公司

报告日期： 2023 年 10 月 27 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：

合肥和晨生物科技有限公司

合肥市高新区南岗科技园湖光西路与孔雀台路交口联东 U 谷 高新企业港 20#楼

项目信息：

样 品 名 称：和颜悦®根皮素（Benignice® Phloretin）

规 格 及 数 量：5 g/瓶 × 1 瓶

颜 色 及 物 态：白色粉末

生产日期或批号：20230712

限期使用日期：20250711

生 产 企 业：合肥和晨生物科技有限公司

生 产 地 址：合肥市高新区南岗科技园湖光西路与孔雀台路交口联东
U 谷 高新企业港 20#楼

储 存 条 件：干燥、避光不超过 30℃ 保存

收 样 日 期：2023.09.04

完 成 日 期：2023.09.28

检 测 项 目：美白功效

检测结论：样品和颜悦®根皮素（Benignice® Phloretin）具有美白功效，具体表现为头部黑色素信号强度减弱和抑制酪氨酸酶活性。

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 9 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 AALAC 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

检测项目 1: MTC

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		2023 年 09 月 08 日-2023 年 09 月 10 日
结果简述	体系及样本量	用鱼品系：野生型 AB 品系斑马鱼。 斑马鱼鱼龄：受精后 6 小时（6 hpf）。 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，每孔容量为 3 mL。 3. 28 °C 条件下避光孵育 45 h。 4. 根据斑马鱼死亡情况和毒性情况，确定样品对正常斑马鱼的 MTC。
	适用性及局限性	适用于原料及其产品的 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。
	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
MTC	正常对照组	-	0	0	未见明显异常
	和颜悦®根皮素 (Benignice® Phloretin)	0.001	0	0	与正常对照组状态相似
		0.0025	0	0	与正常对照组状态相似
		0.005	0	0	与正常对照组状态相似
		0.01	0	0	与正常对照组状态相似
		0.02	2	13	-

三、结论

在本次实验条件下, 和颜悦®根皮素 (Benignice® Phloretin) 对正常斑马鱼的 MTC 为 0.01%。

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].



检测项目 2：美白功效（头部黑色素信号强度）

一、实验室试验简述

方法名称		斑马鱼美白功效试验方法
方法来源		《斑马鱼美白功效评价实验标准操作规程》
试验起止日期		2023 年 09 月 16 日-2023 年 09 月 18 日
结果简述	体系及样本量	用鱼品系：野生型 AB 品系斑马鱼。 斑马鱼鱼龄：受精后 6 小时（6 hpf）。 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	斑马鱼在发育初期全身透明，胚胎发育至 24 h 时黑色素开始从视网膜上皮生长。色素细胞起源于背部外胚层分化的一群细胞——神经嵴细胞，然后增殖、迁徙、分化成色素母细胞。在黑色素形成的过程中进行干预，可抑制黑色素的形成。通过斑马鱼皮肤白度评价样品是否具有美白功效。
	实验步骤	1. 随机选取斑马鱼于 6 孔板中，每孔 15 尾。 2. 水浴给予样品，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 45 h。 4. 每个实验组随机选取 10 尾斑马鱼置于解剖显微镜下拍照，用高级图像处理软件分析并采集数据，分析斑马鱼头部黑色素信号强度（S），根据公式计算并判断样品是否具有美白功效。 $\text{美白功效 (\%)} = \frac{S(\text{正常对照组}) - S(\text{样品组})}{S(\text{正常对照组})} \times 100\%$
	适用性及局限性	适用于原料及其产品的美白功效测试，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。

- 第 4 页，共 9 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、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

	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	检测样品	检测浓度 (%)	功效 (%)	p 值	检测结果
美白功效	熊果苷 和颜悦®根皮素 (Benignice® Phloretin)	0.02	93	< 0.01	显著
		0.1	95	< 0.001	显著
		0.005	46	> 0.05	不显著
		0.01	62	< 0.001	显著
		0.02	69	< 0.001	显著

该样品功效实验表型图，如图 1 所示：

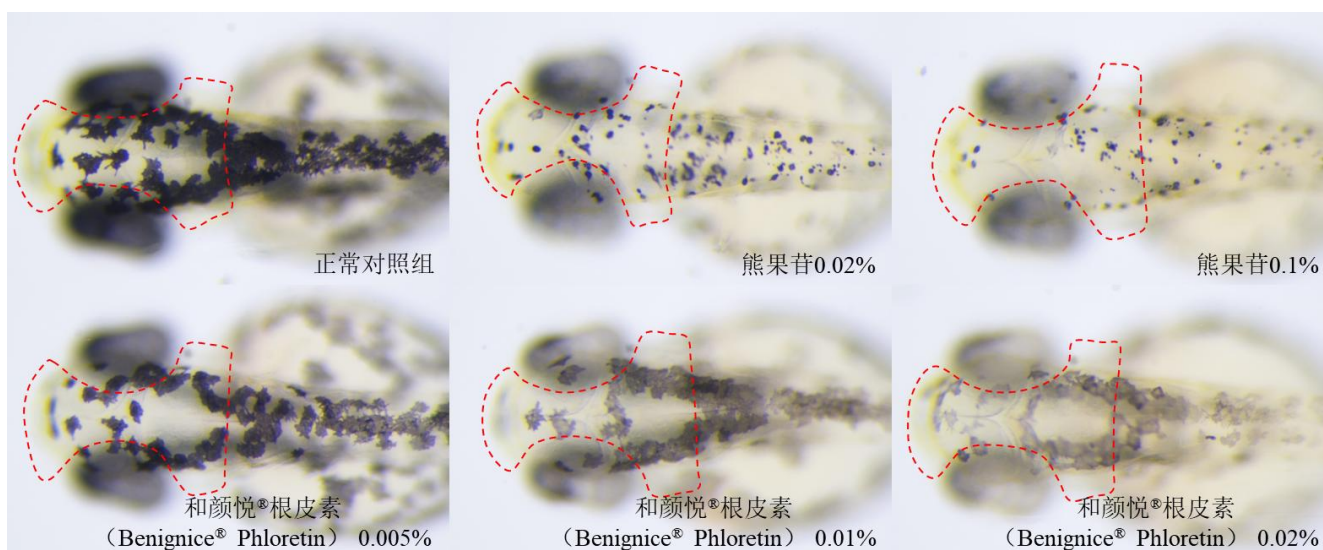


图 1. 美白典型图（红色虚线部位为定量区域）

观察发现，样品和颜悦®根皮素（Benignice® Phloretin）组的头部黑色素信号强度与正常对照组相比，明显减少，揭示了该样品具有美白功效。

三、结论

在本次实验条件下，样品和颜悦®根皮素（Benignice® Phloretin），具有美白功效，具体表现为头部黑色素信号强度减弱。适用于健康美白功能性产品。

四、参考文献

- [1] Cooper C D. Insights from zebrafish on human pigment cell disease and treatment[J]. Dev Dyn, 2017, 246(11): 889-896.
- [2] Choi T Y, Kim J H, Ko D H, et al. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds[J]. Pigment Cell Res, 2007, 20(2): 120-127.
- [3] Chen L, Ren X, Liang F, et al. Characterization of two novel small molecules targeting melanocyte development in zebrafish embryogenesis[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2012, 25(4): 446-453.



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 AALAC 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

检测项目 3：美白功效（酪氨酸酶活性）

一、实验室试验简述

方法名称		斑马鱼美白功效试验方法
方法来源		《斑马鱼美白功效评价实验标准操作规程》
试验起止日期		2023 年 09 月 21 日-2023 年 09 月 28 日
结果简述	体系及样本量	用鱼品系：野生型 AB 品系斑马鱼。 斑马鱼鱼龄：受精后 6 小时（6 hpf）。 每组实验样本量：30 尾（三次生物学重复，N=3）。 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	斑马鱼在发育初期全身透明，胚胎发育至 24 h 时黑色素开始从视网膜上皮生长。色素细胞起源于背部外胚层分化的一群细胞——神经嵴细胞，然后增殖、迁徙、分化成色素母细胞。在黑色素形成的过程中进行干预，可抑制黑色素的形成。酪氨酸酶是形成黑色素的关键酶。位于表皮基底层中的色素母细胞活化，分泌麦拉宁色素，紫外线等因素刺激麦拉宁色素，激活酪氨酸酶的活性，酪氨酸在酪氨酸酶的作用下生成多巴，多巴继续在酪氨酸酶的作用下生成多巴醌，多巴醌是形成褐黑素的前体；同时多巴醌在酪氨酸酶催化作用下生成多巴色素，接着多巴色素在多巴色素互变酶作用下，大部分生成二羟基吲哚（DHI），小部分生成二羟基吲哚羧酸（DHICA），二者在 DHICA 氧化酶作用下，生成 DHI-黑色素和 DHICA-黑色素两种真黑色素。因此可通过酪氨酸酶活性来评价样品是否具有美白功效。

	实验步骤	1. 随机选取斑马鱼于6孔板中，每孔30尾。 2. 水浴给予样品，同时设置正常对照组，每孔容量为3 mL。三次生物学重复。 3. 28 °C条件下避光孵育45 h。 4. 收样后使用研磨仪研磨匀浆，离心取上清，用BCA蛋白浓度测定试剂盒，测定各实验组蛋白质浓度。 5. 取250 µg斑马鱼样品总蛋白质，按体积比1: 1加入1 mM左旋多巴溶液，混匀。 6. 将液体转移至96孔板中，200 µL/孔，利用酶标仪在475 nm波长处测定吸光度值。根据公式计算样品的美白功效，判断其是否具有美白功效。 $\text{美白功效}(\%) = \frac{\text{OD}_{475}(\text{正常对照组}) - \text{OD}_{475}(\text{样品组})}{\text{OD}_{475}(\text{正常对照组})} \times 100\%$
	适用性及局限性	适用于原料及其产品的美白功效测试，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	检测样品	检测浓度 (%)	功效 (%)	p 值	检测结果
美白功效	熊果苷	0.02	37	< 0.001	显著
		0.1	55	< 0.001	显著
	和颜悦®根皮素 (Benignice® Phloretin)	0.005	14	< 0.001	显著
		0.01	41	< 0.001	显著
		0.02	49	< 0.001	显著

该样品功效实验柱形图，如图 2 所示：

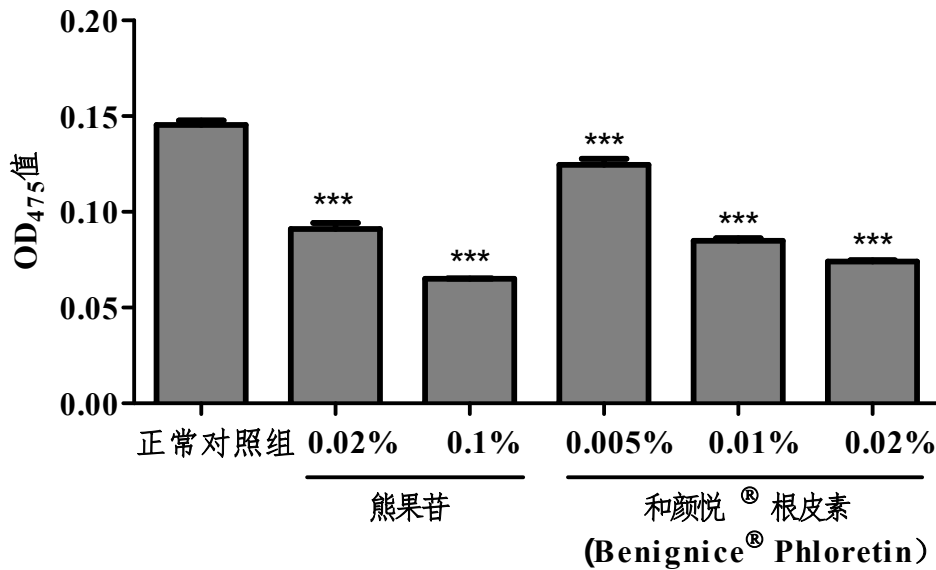


图 2. OD₄₇₅ 值柱形图

与正常对照组比较，*** $p < 0.001$

观察发现，样品和颜悦®根皮素（Benignice® Phloretin）组的酪氨酸酶活性（OD₄₇₅ 值）与正常对照组相比，明显减少，揭示了该样品具有美白功效。

三、结论

在本次实验条件下，样品和颜悦®根皮素（Benignice® Phloretin），具有美白功效，具体表现为抑制酪氨酸酶活性。适用于健康美白功能性产品。

四、参考文献

- [1] Cooper C D. Insights from zebrafish on human pigment cell disease and treatment[J]. Dev Dyn, 2017, 246(11): 889-896.
- [2] Choi T Y, Kim J H, Ko D H, et al. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds[J]. Pigment Cell Res, 2007, 20(2): 120-127.
- [3] Chen L, Ren X, Liang F, et al. Characterization of two novel small molecules targeting melanocyte development in zebrafish embryogenesis[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2012, 25(4): 446-453.

检测：彭逸、张瑞祥、沈培栋、陈星辉、傅时运
日期：2023 年 10 月 18 日

审核：沈宇淮
日期：2023 年 10 月 27 日