

林 飞 史清水 胡宇驰 主 编

BAOJIAN SHIPIN ANQUANXING
SHIYAN FANGFA
SHIYONG CAOZUO SHOUC

保健食品安全性实验方法

实用操作手册

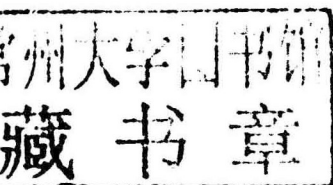


河北科学技术出版社

保健食品安全性实验方法

实用操作手册

林 飞 史清水 胡宇驰 主编



图书在版编目 (C I P) 数据

保健食品安全性实验方法实用操作手册 / 林飞, 史清水, 胡宇驰主编. -- 石家庄: 河北科学技术出版社, 2015.8

ISBN 978-7-5375-7996-4

I . ①保… II . ①林… ②史… ③胡… III . ①疗效食品—食品卫生—食品检验—手册 IV . ① TS218-62
② TS207.7-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 211192 号

保健食品安全性实验方法实用操作手册

林 飞 史清水 胡宇驰 主编

出版发行 河北科学技术出版社

地 址 石家庄市友谊北大街 330 号 (邮编: 050061)

印 刷 北京振兴华印刷有限公司

经 销 新华书店

开 本 787mm × 1092mm 1/16

印 张 18.625

字 数 415 千字

版 次 2015 年 9 月第 1 版

2015 年 9 月第 1 次印刷

定 价 58.00 元

版权所有 盗版必究

编 委 会

主 编：林 飞 史清水 胡宇驰

副主编：张宏伟 杨文婕 周宇红 李瑾翡 王志斌

编 者：（按姓氏笔画排序）

于 洲	马 玲	王 竹	王志斌	付 萍
仝国辉	卢庆生	史清水	左泽平	石 莹
刘 珊	吕 晶	孙清萍	阮浩澜	何 丽
吴虢飞	张 媛	张宏伟	李 丽	李雪梅
李瑾翡	杨文婕	杨赞昀	汪岱迪	肖贵南
陈 琪	周宇红	林 飞	金 鑫	胡宇驰
赵晋燕	徐永俊	高 华	高 芑	高 阳
高 珊	童 英	谭壮生	魏 岚	

前 言

保健食品行业是朝阳产业，近几年来市场规模不断增长。随着生活水平的提高和人们对自己健康状况的重视，对保健食品的需要量大大增加，市场规模预计将达到万亿以上。与之对应的，保健食品的研究也不断深入，不仅仅是简单的验证功能试验，而是从原料收集、机制分析、产品生产方面出现了全方位的进步。保健食品的发展，就像我们的祖国一样，是全面而蓬勃的。因此，开展对保健食品的安全性、有效性的研究实验室不断增多，发表的论文数量也有明显增加。

虽然很多试验方法的基本原理相同，但是保健食品有其特殊性，处于食品和药品之间，它既是食品又具有一定的功效性，在试验方法、判断标准上也是明显不同于一般食品和治疗用药品，要同时兼顾食品的特性和作用的有效性。《保健食品检验与评价技术规范》2003年版发行以来，到2015年已经使用了十多年，其中的很多仪器、试剂等都有了很大的变化，其中的一些方法已经不再适用或者说已经有了更加简便的方法；国家食品药品监督管理局顺应科学的发展，也陆续发布了一些新的功能试验方法和评价标准来替代2003年版。随着方法的进展，有必要总结实验中的经验体会、注意事项和一些适用的技巧。

现在从事保健食品研究与检验的机构，以疾病预防控制中心毒理所、部分大学实验室、食品药品检验机构为主。他们以前的工作重点，是教学，科研，常规药品、食品、化妆品、农药和化学品等项目检测。在进行保健食品研究的时候，难免受到自身特点的影响，好的方面是拓宽了思路，但也容易忽略保健食品的特性，容易导致试验结果的差异和因此产生误差。而且不同的实验室，会在实验细节方面产生差异，有时候是巨大的差异，有时候是微小的差异，但都可能会导致结果的巨大差异。

中国食品药品检定研究院注意到这些方面的进展和差异，在2013年组织

了中国疾病预防控制中心营养与食品安全所、中国疾病预防控制中心环境与健康产品安全所、国家食品安全风险评估中心、北京市疾病预防控制中心毒理所、北京市药品检验所、江苏省食品药品检验所、广东省药品检验所、中国食品药品检定研究院等八家单位的技术人员进行讨论，大家认为有必要总结实验中的细节和注意事项，在国家食品药品监督管理局发布标准文件的基础上，写作一本适用的操作手册，让所有的实验人员能够避免一些不必要的错误，让不同的实验室和人员在操作手册的指导下能够得到相似的试验结果和相同的试验结论，从而起到促进各地实验室对保健食品检验与试验能力提高的作用。

自 2013 年以来，八家单位的技术专家认真负责地写作了手册，大家一起讨论，付出了巨大的努力。手册中，所有的技术专家都将自己的经验，甚至把自己工作中的教训也写在其中，只是希望能够为看到这本手册的人提供有价值的参考。林飞教授在这个手册的写作中进行了召集、组织，确定项目内容、编写格式，并承担了较多篇幅的撰写，后期全部文稿的审核校对。手册的成稿，是 40 位人员的心血和实际工作经验的总结！

值此手册出版之际，向所有参加编写的人员致以敬意，向北京市药品检验所药理室所有参加后期文稿的审核校对的人员致以敬意，感谢大家的努力！希望所有读到本书的实验操作人员，都能有所收益！

当然本书中肯定也有不少不当甚至是失误之处，希望大家能够谅解并给予提出，以便今后做得更好。同时真诚欢迎大家一起讨论！

编委会

2015 年 3 月

目 录

第一部分 试验基本原则

原始记录的规范化管理	3
对受试物的预处理方法	7
常用部分致突变物、致畸物和致癌物的灭活处理方法	12

第二部分 功能学检验方法

增强免疫力功能检验方法	17
辅助降血脂功能检验方法	52
抗氧化功能检验方法	58
辅助改善记忆功能检验方法	76
促进排铅功能作用检验方法	84
清咽功能检验方法	87
改善睡眠功能检验方法	92
促进泌乳功能检验方法	97
缓解体力疲劳功能检验方法	102
提高缺氧耐受力功能学检验方法	110
对辐射危害有辅助保护功能检验方法	114
减肥功能检验方法	120
增加骨密度功能检验方法	126
改善缺铁性贫血功能检验方法	141
对酒精性肝损伤有辅助保护功能检验方法	150
调节肠道菌群功能检验方法	157
促进消化功能检验方法	162
通便功能检验方法	168
对胃黏膜损伤有辅助保护功能检验方法	173

第三部分 毒理学试验方法

急性经口毒性试验·····	185
鼠伤寒沙门菌 / 哺乳动物微粒体酶试验·····	193
骨髓细胞微核试验·····	207
哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验·····	214
小鼠精子畸形试验·····	222
小鼠睾丸染色体畸变试验·····	227
显性致死试验·····	232
体外哺乳动物细胞（V79）基因突变试验·····	237
小鼠淋巴瘤细胞 L5178YTK 基因突变试验·····	242
30 d 喂养试验方法·····	247
90 d 喂养试验方法·····	256
大鼠致畸试验·····	264
大鼠繁殖试验·····	274
慢性毒性试验·····	282

第一部分 试验基本原则

原始记录的规范化管理

原始记录是指试验过程中,根据实际情况直接记录或统计形成的各种数据、文字、图表、声像、票据等原始资料。原始记录是证明试验各种信息的依据,是试验可以重复再现的保证。原始记录的规范性,直接体现试验的科学性与结果的可信度。原始记录的规范化管理,是对原始记录的内容、格式和保存、检索等进行规定,保证记录的规范。

一、基本原则

试验人员均需接受相关培训,具有训练有素、有实际试验经验,严格按照试验设计方案的要求进行操作和书写内容。

试验的原始记录应当用签字笔手写或填写表格中有关内容,必须做到真实、及时、准确和完整,并规范化和表格化。

原始记录不能只包括数据收集,还要证明所有程序都是按照要求在正确的时间并正确实施,做到规范记录,不得漏记和随意涂改,不得伪造、编造数据。如果数据缺失或没有完整的试验记录,其试验的正确性将受到质疑。

二、基本内容

原始记录的内容通常包括试验名称、试验目的、试验设计或方案、试验时间、试验材料、试验方法、试验操作全过程、观察指标、试验结果和结果分析、试验操作人员等内容。

(一) 试验名称

每项试验开始前应首先注明试验名称,检品(试验)编号、收样日期等。

(二) 试验目的

试验记录中要注明该项试验的目的及试验依据。

(三) 试验设计或方案

各项试验,记录中均应有一份的试验设计或方案。如果是引用相关技术规范,应写清楚技术规范全称、试验项目,包括版本号或年号等,其检验方法的主要内容、主要操作过程和检测指标要明确写入。

(四) 试验时间

试验应记录试验日期和时间,具体的记录方式各实验室可以自行规定,建议日期按照年月

日的方式进行记录，时间采用 24 h 制。

（五）试验材料

（1）记录受试样品和对照品的名称、缩写名、代号、生产单位、供样单位、批号、剂型、规格、有效期、数量、主要理化性质、生物特性、溶媒和最大溶解剂量等信息，尽量保留使用说明书、理化检验报告书、购置发票等相关材料，必要时可以照相并附上照片。

（2）记录实验动物的种属、品系、年龄、性别、体重范围、来源、等级和数量等。保留生产许可证号、质量合格证号、购置证明等原件或复印件。

（3）记录实验动物室的饲料、饮水、垫料名称、批号、来源，记录特殊饲料的配方；动物笼具的材料、大小；提供实验动物生产许可证号、实验动物使用许可证号、饲料审查合格证号、生产批号等购置证明等原件或复印件。

（4）记录试验仪器设备名称、型号、生产厂家或产地；本单位仪器编号。

（5）记录主要试剂的名称、生产厂家、规格、批号和有效期。对自行配制的溶液应注明配制方法、配制浓度、配制时间和保存条件等信息。

（6）记录细菌或细胞系的名称、来源等，记录其传代情况和保存使用情况，记录鉴别或活性测定情况，尽量保留购置证明。

（7）毒麻药品、诱变剂等用于试验应有详细记录并严格管理。参照国家相关管理规定建立严格的管理和使用记录。

（六）试验环境

记录试验地点、温度及湿度，对环境条件敏感的试验，应详细具体记录当天的天气和环境，光照、通风、洁净度、噪声等。

（七）试验方法

应详细记录试验步骤和操作细节。

（八）试验过程

应详细记录研究过程中的操作及观察到的现象、异常现象的处理及其产生原因、影响因素的分析等。

（九）试验结果

准确记录定量观察指标的试验数据和定性观察指标的试验变化，肉眼观察的试验结果，可附照片作为说明材料。

采用仪器测定的结果，应打印出数据，标注日期、组别、编号、重复测定编号等，并由试验人员签名。

（十）试验结果分析

每项试验结果应作必要的数据处理和分析，参考本实验室的正常值范围，采用的统计学方法、 p 值，并附明确的文字小结。

（十一）试验人员

记录中应详细记录所有参加试验的人员，并由参加人签名；修改内容须加盖试验的人员名章，但一页记录中不能超过3处错误的修改。

三、原始记录的书写

（一）试验记录用纸

（1）试验记录应使用本实验单位抬头的原始记录专用纸。

（2）仪器自动记录并打印的图表和数据资料等应按顺序粘在记录纸上的相应位置，粘贴处盖齐缝实验者名章，并在相应处注明详细信息。不宜粘贴的，要另行装订并加以编号和说明、加盖实验者名章，同时在记录纸的相应位置处注明，以便查对。对于热敏纸记录的数据（容易自行消失）应将结果制作复印件，并将原打印记录及复印记录附在相应的位置。

（3）试验记录用纸写有记录后，应编上页码，建议每页均有试验名称或试验代码以避免混淆并便于检索。

（二）试验记录的书写

（1）试验记录必须使用钢笔或签字笔记录，不得使用铅笔或圆珠笔。

（2）试验记录中常用的外文缩写首次出现时必须用中文加以注释。

（3）试验记录中使用规范的专业术语，计量单位采用国际标准计量单位。

（4）试验记录的修改应清晰，可辨识修改前与修改后的内容。建议在修改处由左上向右下画一斜线（杠改），旁白部位写修改后内容，并由修改人加盖名章。严禁使用修正液、墨水将内容全部覆盖或使用小刀挂掉字迹。

（5）试验记录过程中尽可能采用提前准备的固定格式的表格，试验结束时，应将未填写内容的部分画一斜线，表示不能再次使用，避免补记。

（6）试验记录中采用代码或图形符号时，如1, 2, 3或A, B, C等，必须有备注说明代码的具体内容；代码或图形符号在一页中不得有多种含义，避免不同解释。

记录中提前编制的备选选择项，应有明确的选择说明，例如可采用“√”表示该项目被选择。

（7）采用统计软件进行结果统计时，应当对输入数据和输出数据均进行打印保存，便于核对。

（8）采用显微镜进行观察的结果，对照片或载玻片可进行纵、横坐标数码记录。

（9）计算机保存的电子数据，必须进行备份。电子数据的外包装或文件名称，必须具有明确和唯一的标识。

（10）试验记录中无论什么情况都要避免重复记录。

四、试验记录的签署、检查和存档

(1) 试验结束后,记录人在记录上签名,核对人员、审核人员在核对和审核后也应在记录上签名。

(2) 试验结束后,试验负责人应将记录整理归档,一般按照页码进行排列,并尽量与试验报告顺序一致。原始记录内容及页码很多的,要编制目录。

(3) 进行归档管理时。原始记录应排列在实验报告、检品卡、委托书或合同书之后,最后应是提供的资料和文献资料。

(4) 试验完成后,记录应按照档案资料要求进行归档保存管理。记录应保存在具有防止损坏、变质、丢失的环境中。

(5) 试验记录可检索,并可按规定进行查阅。

(起草:北京市药品检验所 胡宇驰)

(修改复核:中国食品药品检定研究院 林飞)

五、规程与文献

[1] 中华人民共和国卫生部.保健食品检验与评价技术规范[S],2003:2,168,199.

[2] 范玉明,等.安全性评价标准操作规程指南[M].成都:电子科技大学出版社,2009:16-17.

[3] 袁伯俊,等.新药临床前安全性评价与实践[M].北京:军事医学科学出版社,1997:226-232.

对受试物的预处理方法

一、基本要求

尽可能提供受试物的完整配方、工艺流程、理化性质（包括纯度、稳定性、溶媒、溶解度、贮存条件及时间等）、临床人每日拟用量、拟用疗程、使用说明书等与实际产品相同的资料。如提供的受试物与实际产品不相同，应提供盖有公章的文字证明，详细说明不同原因及不同内容。

二、体内动物试验的预处理方法

（一）溶媒的选择

应根据试验的特点和受试物的理化性质选择溶媒（溶剂、助悬剂或乳化剂），受试物配制后可以是溶液，也可以是悬浮在溶媒中的混悬液。常用溶媒为：纯化水、生理盐水、食用植物油、4%淀粉糊、1%明胶、0.5%~1.0%羧甲基纤维素钠和2%吐温80等，水溶性受试物首选纯化水、脂溶性受试物首选食用植物油。如使用其他溶媒应说明理由。所选用的溶媒本身应不产生毒性作用；与受试物各成分之间不发生化学反应，且保持其稳定性；无特殊刺激性或气味。

需注明所用溶媒的生产厂家、批号、装量大小等。

（二）可溶受试物

能够完全溶解在水或植物油中的受试物，应找到最大溶解浓度，使用相同的溶媒稀释较高浓度。

（三）不溶受试物

不能溶解在水或植物油中的受试物，应将受试物进一步粉碎、研磨，过80目标准筛（筛孔内径180 μm ），在乳钵中边研磨边加入助悬剂，使受试物充分、均匀地悬浮在溶媒中。使用相同的助溶剂并充分搅拌均匀来稀释较高浓度。

（四）摄入量较大的受试物

对人体推荐量较大的受试物，如最大溶解（混悬）浓度（以动物灌胃针头小鼠12号，大鼠16号能够顺利抽吸到注射器中为准）、最大灌胃体积（每只小鼠0.8 ml、0.2 ml/10g BW，每只大鼠6 ml、2 ml/100g BW）或掺入饲料中的限量（10% w/w）不能达到试验设计的高剂量时，可允许去除既无功效作用又无安全问题的辅料部分进行试验，并在试验报告中详细说明。

（五）摄入量较小的受试物

对人体推荐量较小的受试物，在按其推荐量设计试验高剂量时，如未超过动物的正常灌胃量（小鼠 0.2 ml/10 g BW，大鼠 1 ml/100 g BW）应通过灌胃方式进行试验，最好不用掺入饲料中的给予方式，避免掺入饲料中不均匀、摄入量不足或个体摄入量不一致而影响试验结果。

（六）袋泡茶类受试物

提取方法应与产品推荐饮用的方法相同，可用该受试物的水提取物进行试验。如果产品无特殊推荐饮用方法，水提取物可采用以下提取条件进行：常压、温度 80 ~ 90℃，浸泡时间 30 min，水量为受试物重量的 10 倍或以上，提取 2 次，将提取液合并煮沸浓缩或减压蒸发浓缩至所需浓度，并标明该浓缩液与原料的比例关系。如产品有特殊推荐服用方法（如推荐食用浸泡后的产品），在试验时予以考虑。

（七）吸水膨胀率较高的受试物

应考虑受试物的吸水膨胀对受试物给予剂量和实验动物的影响，以此来选择合适的受试物给予方式（灌胃或掺入饲料）。如采用灌胃方式给予，应选择水为溶媒。

（八）液体受试物

一般用原液进行试验，如原液满足不了高剂量组设计要求，需要进行浓缩处理时，应采用不破坏其中有效成分的方法。可使用温度 60 ~ 70℃ 减压或常压蒸发浓缩、冷冻干燥等方法。液体受试物最大浓缩浓度以动物灌胃针头（小鼠 12 号针头，大鼠 16 号针头）能够顺利在注射器中抽吸为准。

（九）不易粉碎的固体受试物

可用冻干粉碎的方式进行，其他需参考不溶受试物的制备方法，并在试验报告中详细说明。

（十）含乙醇的受试物

推荐量较大的含乙醇的受试物，在按其推荐量设计试验剂量时，如超过动物最大灌胃容量，可以进行浓缩。在调整受试物的乙醇浓度时，原则上应使用生产该受试物的酒基。

乙醇浓度低于 15% 的受试物，浓缩后的乙醇应恢复至受试物定型产品原来的浓度。

乙醇浓度高于 15% 的受试物，浓缩后应将乙醇浓度调整至 15%，并将各剂量组的乙醇浓度调整一致。

不需要浓缩的受试物，其乙醇浓度 > 15% 时，应将各剂量组的乙醇浓度调整至 15%。

（十一）含有人体必需营养素或已知存在安全问题等物质的受试物

如产品配方中含有某一过量摄入，容易产生安全性问题的人体必需营养素等物质（如维生素 A、硒等）或已知存在安全问题物质（如咖啡因等），在按其推荐量设计试验剂量时，如该物质的剂量达到已知的毒作用剂量，在原有剂量设计的基础上，应考虑增设去除该物质或降低该物质剂量（如降至最大无毒性反应剂量 NOAEL）的受试物剂量组，以便对受试物中其他成分的毒性作用及该物质与其他成分的联合毒性作用做出评价。

（十二）受试物掺入饲料

掺入饲料中的受试物超过 5% (w/w) 时, 应按动物的营养饲料配方调整各组饲料蛋白质(酪蛋白)量, 一致后进行试验, 并说明具体调整的方法。原则上添加的受试物最高不超过饲料的 10% (w/w)。

三、体外细菌、细胞试验的预处理方法

（一）溶媒的选择

应根据试验的特点和受试物的理化性质选择溶媒(溶剂、有机溶剂或乳化剂), 受试物配制后可以是溶液, 也可以是乳化液或混悬液。常用溶媒为: 生理盐水、0.2M 磷酸缓冲液(pH 7.4)、细胞培养液、二甲基亚砷、95%乙醇、二甲基甲酰胺、甲醇、丙酮、四氢呋喃和醋酸乙酯等, 首选生理盐水、磷酸缓冲液、细胞培养液、二甲基亚砷及 95%乙醇。如使用其他溶媒应说明理由。

有机溶媒最好使用光谱纯或分析纯; 加入量越少越好, 以能够溶解受试物, 满足试验设计高剂量组浓度为准; 少量加入对试验不应产生轻、中度毒性作用; 必须增设有有机溶媒对照组。

（二）可溶受试物

能够完全溶解在某些有机溶媒中的受试物, 在加入到培养基或培养液(即与水相关物质混合)中时, 可能出现絮状物或重新凝聚, 应找到最小凝聚浓度作为高剂量组, 使用相同的溶媒或首选溶媒来稀释较高浓度。

（三）不溶受试物

常用溶媒均不能溶解的受试物, 应反复将受试物粉碎、研磨, 过 400 目标标准筛(筛孔内径 34 μm)或 200 目标标准筛(筛孔内径 75 μm), 其细粉末在乳钵中边研磨边加入首选溶媒, 使受试物充分、均匀地悬浮在溶媒中。使用相同的首选溶媒并充分搅拌均匀来稀释较高浓度。

（四）不易粉碎的固体受试物

首选冻干粉碎的方式; 如不能研磨成细粉或不能通过 ≥ 200 目标标准筛, 其粗粉(过 10 目标标准筛, 筛孔内径 2 000 μm)或颗粒($> 2\text{ mm}$)以 0.2 g/ml 的比例悬浮在首选溶媒中, 121℃保温 1 h 或 70℃保温 24 h 或 37℃保温 72 h, 放置期间需搅拌 1 ~ 3 次, 其浸出液用于试验。在试验报告中需详细说明。

（五）含益生菌、真菌、细菌、毒素或抗生素的受试物

应将微生物灭活, 可参考以下方法, 需在试验报告中详细说明具体灭活方法。

(1) 加热到 62 ~ 65℃, 保持 30min。灭菌效率可达 97.3% ~ 99.9%, 经消毒后残留的只是部分嗜热菌及耐热性菌以及芽孢等。

(2) 加热到 75 ~ 90℃, 保温 15 ~ 16s。能将病原菌杀死, 不会有较多的营养损失。

(3) 在 100℃煮沸 20 min (有少量芽孢菌存活) 或 113℃高压保持 10 min (各种菌均杀灭)。