中国保健协会团体标准
《斑马鱼用于保健食品功能检测技术规程》（征求意见稿）编制说明

一、工作简况

1. 任务来源

斑马鱼作为一种小型脊椎类模式生物，在全球范围内已有90多年的研究历史，在药品、保健食品及食品等领域的应用已得到大量相关领域企业的认可。斑马鱼实验既有体外实验快速、高效的特点，又具备哺乳动物实验相关性好、预测性高的特点，并且符合国际动物福利保护趋势，当下已经取得了显著的科研和产业化成果。

杭州环特生物科技股份有限公司作为斑马鱼生物检测领域的领军企业，成立十余年来已为超过600家客户提供了6000余项实验服务，相关技术成熟稳定。

在此背景下，杭州环特生物科技股份有限公司联合中国标准化研究院、农业农村部食物与营养发展研究所、中国疾病预防控制中心营养与健康所、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、华熙生物科技股份有限公司、北京东方红航天生物技术股份有限公司、黑龙江飞鹤乳业有限公司、北京姿美堂生物技术有限公司、东阿阿胶保健品有限公司、漳州片仔癀药业股份有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、健合（中国）有限公司、石家庄君乐宝乳业有限公司、碧生源控股有限公司、广东完美生命健康科技研究院有限公司于2021年11月向中国保健协会提交了《斑马鱼用于保健食品功能检测技术规程》团体标准立项申请。中国保健协会组织专家召开的标准立项审核论证会通过了该团标的立项申请，并确定由杭州环特生物科技股份有限公司牵头承担标准起草任务。该项标准旨在对斑马鱼生物检测方法在食品及原料功能评价中的应用进行统一规范，以助力企业缩短产品研发周期，降低产品研发成本，提升产品质量，从而进一步提高产品市场竞争力，促进行业繁荣发展。

本文件起草单位：杭州环特生物科技股份有限公司、云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、华熙生物科技股份有限公司、北京东方

红航天生物技术股份有限公司、黑龙江飞鹤乳业有限公司、北京姿美堂生物技术有限公司、东阿阿胶保健品有限公司、漳州片仔癀药业股份有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、健合（中国）有限公司、石家庄君乐宝乳业有限公司、碧生源控股有限公司、广东完美生命健康科技研究院有限公司、北京世标认证中心有限公司、中国标准化研究院、农业农村部食物与营养发展研究所、中国疾病预防控制中心营养与健康所、中国中医科学院中药研究所、首都医科大学附属北京中医医院、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、中国保健协会行业认证分会、中国保健协会健康服务与研究专业委员会。

本文件主要起草人：李春启、赵琳、徐熙明、朱大洲、丁刚强、林如海、赵海誉、徐霄龙、邱静、王飞飞、郭珈均、谢瑶、郑成栋、孙阳恩、陈志亮、张正方、张华、柴艳兵、张耀广、黄森、宫建辉、周邦勇、李萍、李永波、孙茵、李霞、张丽丽、李妍、廉琳、朱晓宇、徐懿乔、戴明珠、朱家乐。

2. 主要工作过程

（1）2021年11月09日，中国保健协会组织召开了《斑马鱼用于保健食品功能检测技术规程》团体标准立项审核论证会，与会专家通过现场讨论对团体标准的名称、术语和定义、指标及检测方法等基础框架给出了建议，一致同意该团体标准立项。

（2）2021年11月16日，中国保健协会发布《斑马鱼用于保健食品功能检测技术规程》团体标准立项公告。

（3）2021年11月，标准起草组对国内外斑马鱼技术在保健食品功能评价中的应用情况进行全面调研，同时广泛搜集和检索了国内外斑马鱼技术应用资料，并进行了大量的研究分析、资料查证工作，在此基础上形成《斑马鱼用于保健食品功能检测技术规程》标准草稿。

（4）2021年11月-12月，标准起草组陆续组织杭州环特生物科技股份有限公司、中国标准化研究院、农业农村部食物与营养发展研究所、中国疾病预防控制中心营养与健康所、中国中医科学院中药研究所、首都医科大学附属北京中医医院、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司、华熙生

物科技股份有限公司、北京东方红航天生物技术股份有限公司等单位及企业对《斑马鱼用于保健食品功能检测技术规程》的标准内容进行了审核与修订，经过起草组数次研讨后，完成了标准征求意见稿和编制说明。

二、标准编制原则和主要内容

1. 标准编制原则

本文件的制订符合产业发展的原则，本着先进性、科学性、合理性和可操作性的原则以及标准的目标、统一性、协调性、适用性、一致性和规范性原则来进行本文件的修订工作。

本文件按照 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》的规定起草。

2. 标准主要技术内容

本文件由范围、规范性引用文件、术语和定义、基本流程、试验方案确认与准备、斑马鱼准备、试验程序、结果评价、试验报告撰写等部分构成。

2.1 范围

本文件确立了斑马鱼用于保健食品功能检测流程，规定了试验方案确认与准备、斑马鱼准备、预试验、正式试验、结果评价、数据分析、试验报告撰写/审核等阶段的操作指示，以及上述阶段之间的转换条件，描述了记录、标记、审核等追溯方法。

本文件适用于普通食品、保健食品及其原料和配方的功能评价。

2.2 规范性引用文件

列举了本文件引用的国家标准的名称和标准号。

2.3 术语和定义

对“斑马鱼”、“受精后天数”、“无可观察效应浓度”等进行了定义。

2.4 基本流程

规定了斑马鱼用于保健食品功能检测的基本流程，包括试验方案确认与准备、斑马鱼准备、预试验、正式试验（分组、造模、受试样品处理、死亡判断、数据采集）、结果评价（统计学分析、结果判定、结果有效性分析）、数据分析、试验报告撰写/审核等阶段。

2.5 试验方案确认与准备

2.5.1 受试样品信息确认

应从样品提供方获得如下样品信息：受试样品的名称、批号、规格、数量、颜色性状、保存条件、保质期、申请单位名称、理化性质、保健功能等信息；受试样品为单体成分时，还应提供相应的化学信息，包括分子量等；受试样品的溶剂信息，以及在溶剂中的溶解性，在水中、光中、实验条件下的稳定性；整个周期所用受试样品批号应一致。

2.5.2 受试样品前处理

按照表1的方法对不同类型受试样品进行前处理。

表1　不同类型受试样品前处理方法

样品类型		前处理方法
原料类		依次经过粉碎、提取、超声、均质等步骤制得受试样品
固体类	颗粒剂	依次经过粉碎、溶解、超声、均质制得受试样品
	片剂	依次经过去除包衣、内容物粉碎、溶解、超声、均质制得受试样品
	硬胶囊	依次经过去除胶囊壳、内容物粉碎、溶解、超声、均质制得受试样品
	粉剂	依次经过溶解、超声、均质制得受试样品
	硬糖/软糖	依次经过粉碎、提取、溶解、超声、均质制得受试样品
	袋泡茶	依次经过加热水、提取、溶解制得受试样品
液体类		直接稀释的方式溶解得到受试样品
油性类		依次经过去除软胶囊壳、内容物减压干燥制得受试样品

2.5.3 受试样品储备液配制

受试样品储备液宜用标准稀释水配制，受试样品难以用水溶解时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：聚氧乙烯化脂肪酸甘油酯、吐温80、0.01%的纤维素甲醚、聚氧乙烯化氢化蓖麻油。储备液配制完成的受试样品应做标识，包括受试样品名称、受试样品浓度、溶剂名称、配制日期、配制人。经前处理且做好标识的受试样品进入斑马鱼准备阶段。

2.6 斑马鱼准备

按照GB/T 39649的规定执行斑马鱼质量控制。

2.7 试验程序

2.7.1 暴露条件

本标准规定了功能评价实验中对斑马鱼暴露条件的要求，包括：持续时间；通常暴露时间在24 h及以内不需要更换溶液，如受试样品富含营养物质，试验溶液容易腐败变质，可考虑换液，换液频率宜根据水质情况调整；暴露期间避光处理，避免光照对受试样品稳定性的影响；水温控制在26～28.5 ℃；溶解氧为不低于6 mg/L饱和溶解氧；pH需要在6.8～7.5范围内。

2.7.2 预试验

预试验用于确定受试样品的NOEC浓度，为后续正式试验的浓度设置提供参考。对受试样品储备液用标准稀释水以几何级数稀释，宜设置3～5个浓度组，浓度的间隔系数≤3.2，宜设为2。如果必须使用助溶剂，所有组别中的助溶剂浓度应保持相同，同时还应设置一个相应的溶剂对照组。实时观察并清除异常的斑马鱼，对斑马鱼的死亡和其它毒性效应进行记录，确定受试样品的NOEC。只准许已经确定NOEC的受试样品进入正式实验阶段。

2.7.3 正式试验

（1）试验分组

正式试验设置正常对照组、模型对照组、阳性对照组、受试样品测试组（宜设置3～5个浓度组，以几何级数浓度系列设置受试样品浓度梯度，浓度的间隔系数≤3.2，宜设为2）、溶剂对照组（当受试样品配制过程中使用了助溶剂，应设置该组，助溶剂浓度应该保持一致，且浓度不大于1%（W/V或V/V））。

（2）造模

选择受精后一定天数的一定品系的斑马鱼，用诱导剂处理一定的时间，建立斑马鱼保健食品功能评价模型。根据保健食品功能选择合适的斑马鱼模型，不同斑马鱼模型的建立方法。

（3）受试样品处理

根据试验需求，预先筛选好足够数量且发育状况一致的斑马鱼胚胎，并随机分配到试验容器中，每孔斑马鱼数量至少为10尾。用模型诱导剂建立斑马鱼模型，然后向试验容器中加入一定体积的受试样品溶液（饲养密度宜为1尾/100 μL）、阳性对照样品。充分混匀后，用铝箔纸包裹，在28℃生化培养箱中避光孵育至终点。

（4）死亡与毒性判断

当所有试验组斑马鱼死亡率≤10%时，准许进入数据采集阶段；当有试验组斑马鱼死亡率＞10%时，应判断是否继续试验，如继续试验，应重新进入斑马鱼准备阶段，如不再继续试验，应终止试验。

（5）数据采集

应根据不同斑马鱼功能评价模型的具体评价指标选择合适的数据采集方式，数据采集具体方式如下：

a）直接拍照：孵育结束后，从表型正常的斑马鱼中随机选取至少10尾斑马鱼，用三卡因麻醉后，将斑马鱼用3%甲基纤维素固定（甲基纤维素应提前在室温放置至少30min），在体视显微镜或荧光显微镜（转基因荧光斑马鱼品系相关的试验）下观察、拍照并保存。所有试验组斑马鱼拍照应在相同的仪器和环境条件下完成，且斑马鱼体位保持一致。利用图像处理软件测量累积光密度（体视显微镜）或荧光强度（荧光显微镜），每组的有效数据量不低于10个。

b）染色后拍照：孵育结束后，试验容器中的斑马鱼用养殖水清洗3次，采用特异性荧光染料或组织化学染料对各组斑马鱼进行染色。染色后各组至少取10 尾斑马鱼，用3%甲基纤维素固定。特异性荧光染料染色的斑马鱼用荧光显微镜观察、拍照并保存，组织化学染料染色的斑马鱼用体视显微镜观察、拍照并保存。利用图像处理软件对图像进行分析，测量累积光密度（体视显微镜）或荧光强度（荧光显微镜），每组的有效数据量不低于10个。

c）运动行为分析：孵育结束后，试验容器中的斑马鱼用养殖水

清洗3次，每个试验组随机选择10尾斑马鱼转移至96孔板中，每孔1尾，利用行为分析仪记录斑马鱼的运动轨迹，记录时间宜为20 min～1 h，每组的有效数据量不低于6个。

d）酶标仪检测：孵育结束后，试验容器中的斑马鱼用养殖水清洗3次，每个试验组随机选择斑马鱼转移至96孔板中，每孔1-3尾，按照试剂盒检测说明书进行试验操作，利用酶标仪测定OD值、荧光值或生物光值。选择符合检测试剂要求的激发波长和发射波长，检测时间宜为20 min～1 h，每组的有效数据量不低于3个。

2.8 结果评价

2.8.1 统计分析

利用统计分析软件进行相关图表制作与统计学分析。计算各组试验的平均值（Mean）及标准误差（Standard Error，SE），统计学处理结果用Mean ± SE表示。宜采用方差分析，按方差分析的程序先进行按方差分析的程序先进行正态性检验（P值）和方差齐性检验（F值）。当F<0.05，P<0.05时，各组均数间组间至少有一组有显著性差异，宜采用非参数检验；当F≥0.05，P≥0.05时，采用单因素方差分析，选择事后两两比较的结果进行统计；对非正态或方差不齐的数据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。

2.8.2 结果判定

在试验满足有效性的基础上，使用统计分析软件对数据进行方差分析，比较受试样品各浓度组与模型对照组原始数据的统计学差异，P<0.05表示具有统计学差异。

2.8.3 结果有效性分析

正常对照组（当使用了助溶剂，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%则该次试验结果视为无效；模型对照组与正常对照组之间的原始数据存在统计学上的显著性差异，阳性对照组与模型对照组之间的原始数据存在统计学上的显著性差异，否则该次试验结果视为无效；当使用了助溶剂，溶剂对照组与正常对照组之间的原始数据不能存在统计学上的显著性差异，否则该次

试验视为失败。只准许有效试验结果进入试验报告撰写/审核阶段。

2.9 试验报告撰写

试验报告应包括：检测依据、受试样品和阳性对照的信息、斑马鱼来源和品系等相关信息、试验条件和方法、试验开始至完成的日期、试验结果、数据处理与统计方法、结论。

三、本标准制定参考的主要依据

本文件制定过程中参考了国际国内斑马鱼技术相关的文献。

四、预期达到的社会效益、对产业发展的作用等情况

近年来，随着经济水平的提高，人民健康意识的增强，对营养健康的需求也越来越高。人们对营养的需求有三个阶段，第一需求是安全，第二是营养，第三是功能。目前食品讲究高质量发展，高质量发展讲究的是营养和功能。

随着食品监管改革的不断推进，我国大健康产业整体确立了“预防为主”、“风险管理”、“全过程控制”和“社会共治”等科学理念。一系列法规文件的相继发布和实施进一步规范了各类健康产品的监管体系。根据《食品注册审评审批工作细则（2016年版）》的要求，食品在注册时必须提供“配方主要原料具有功能作用的科学依据，其余原料的配伍必要性；产品配方配伍及用量具有保健功能的科学依据”，明确了要加强食品配方的功能研究。

在新的法规要求之下，如何通过技术创新来提高食品配方研发的效率和质量就显得非常迫切。国家市场监管总局对新技术新方法是鼓励和支持的态度。

斑马鱼作为一种小型脊椎类模式生物，其实验方法既有体外实验快速、高效的特点，又具备哺乳动物实验相关性好、预测性高的特点。在中药、营养食品的研发和评价过程中，斑马鱼实验显示出其独特优势和价值，在功效评价、安全毒理学评价及活性成分筛选等方面的应用日渐广泛，取得了显著的科研和产业化成果，目前已经可用于食品的注册申报。

本文件通过将斑马鱼实验在保健食品功能评价中的应用方法进行统一规范，能够协助企业进一步缩短产品研发周期，降低产品研发成本，提高产品市场竞争力，对于满足社会需求和促进行业发展都有

重要意义。

五、与国际、国外对比情况

本文件在制定过程中未采用国际标准或国外文件。

六、在标准体系中的位置，与现行相关法律、法规、规章及标准，特别是强制性标准的协调性

本文件与现行相关法律、法规、规章及相关标准协调一致。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本文件在制定过程中无重大分歧性意见。

八、标准中涉及专利的情况

本标准不涉及专利。

九、标准性质的建议说明

本文件为首次制定，为中国保健协会团体标准，属于自愿性标准，供社会和会员自愿采用。

十、贯彻标准的要求和措施建议

建议本文件批准发布1个月后实施。

建议本文件由中国保健协会组织宣贯实施。

十一、其他应予说明的事项

无。

标准起草组

2021年12月