

T/CVDA

团 体 标 准

T/CVDA XXXXX—2025

宠物抗氧化型衰老产品有效性评价技术标准

Technical standard for evaluating the effectiveness of antioxidant aging products for pets

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽药协会 发布

目 录

目 录.....	1
前 言.....	2
1 范围	3
2 规范性引用文件	3
3 术语和定义	3
3.1 宠物	3
3.2 衰老	3
3.3 抗氧化型衰老	4
3.4 谷胱甘肽	错误!未定义书签。
3.5 脂质过氧化产物	错误!未定义书签。
3.6 超氧化物歧化酶	3
3.7 谷胱甘肽过氧化物酶	错误!未定义书签。
4 实验设计与方法	4
4.1 体外化学体系实验	4
4.2 动物实验	5
4.3 宠物试食试验	7
5 实验报告	9
参考文献	10

前　　言

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国兽药协会提出并归口。

本文件起草单位：上海宠幸宠物用品有限公司、卫仕营养科学研究院（江苏）有限公司、江苏大学、青岛市华测检测技术有限公司、芜湖卫仕生物科技有限公司、东西志览国际文化发展无锡有限公司。

本文件主要起草人：段玉清、马海乐、李云亮、严子华、马华、刘淑琴、宋亮亮。

1 范围

本标准规定宠物抗氧化产品的相关术语和定义，并规范抗氧化型宠物产品有效性评价技术标准，包括实验设计与方法（体外化学体系实验、动物实验、宠物试食试验）、数据处理与结果判定、实验报告。

本标准适用于声称具有抗氧化型衰老的宠物饲料（宠物食品）、保健产品、宠物零食、饲料原料及添加剂的有效性评价。

本标准适用的宠物品种为犬、猫为主的伴侣动物。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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/T 668—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 39100—2020 多肽抗氧化性测定 DPPH 和 ABTS 法

GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南进行

20205075-T-424 植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法（国家标准正在审查）

T/ZHCA 502—2020 保健食品抗氧化功能的斑马鱼检测方法

T/CHAA 014—2022 抗氧化评价方法 第1部分：天然产物体外抗氧化活性评价

T/CHAA 015—2022 抗氧化评价方法 第2部分：药食同源物质抗氧化活性评价

T/ZHCA 025—2023 化妆品抗氧化人体测试方法。

T/ZGKSL001—2020 抗衰老-抗氧化评价方法

DB22/T 397.1—2017 保健用品功能学评价程序和检验方法 第1部分：评价程序

DB61/T 999.1—2015 保健用品功能学评价指导原则及试验要求 第1部分：总则

GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差

保健食品功能检验与评价技术指导原则（2023年版）

保健食品功能检验与评价方法（2023年版）

农业农村部第20号公告《宠物饲料管理办法》、《宠物饲料标签规定》

中华人民共和国农业部公告第1224号《饲料添加剂安全使用规范》。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 宠物 pet

家庭饲养的作为伴侣动物的犬和猫，或工作用途的犬。

3.2 自由基 free radical

含有电子或不配对电子的原子、原子团和分子。如羟自由基、超氧阴离子，具有很强的反应性。

3.3 氧化 oxidation

分子或原子团失去电子（或称氧化态增加）的过程。生物体内发生氧化过程的产物常常是自由基或活性氧物质。

3.4 抗氧化 antioxidant

防止因自由基产生过多或清除过慢导致生物大分子物质及各种细胞受到攻击,从而避免机体在分子水平、细胞水平及组织器官水平上受到损伤,防止机体衰老进程加速、诱发各种疾病。

3.5 衰老 aging

又称“老化(aging)”。指宠物在其生命过程中,生长发育达到成熟期以后,随着年龄的增长,在形态结构和生理功能方面出现的一系列慢性、进行性、退行性变化,导致机体适应能力、储备能力日趋下降的过程。

3.6 抗氧化型衰老 antioxidant type aging

防止因自由基产生过多或清除过慢导致生物大分子物质及各种细胞受到攻击,从而避免机体在分子水平、细胞水平及组织器官水平上受到损伤,防止机体衰老进程加速、诱发各种疾病。

4 实验设计与方法

抗氧化型衰老实验项目包括体外化学体系实验、动物实验和宠物试食试验。化学体系以测定总自由基清除能力实验为主,设置三种方法,DPPH法、ABTS法和ORAC法;动物实验检测指标包括体重、谷胱甘肽含量、脂质过氧化产物、抗氧化酶活力;宠物试食实验检测指标包括谷胱甘肽和脂质过氧化产物产量,抗氧化酶活力,抗氧化酶指标中超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶任选其一进行指标测定。动物实验和宠物犬猫试食试验所列的指标均为强制性项目;选择氧化损伤模型动物和老年动物之一进行生化指标测定。

4.1 体外化学体系实验

本项目选用DPPH法、ABTS法和ORAC法进行体外快速测定受试样品的总抗氧化能力。上述3种方法选做2种方法即可。该结果有效再进行动物实验。

4.1.1 DPPH 法

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)是一种紫色结晶状有机化合物,其分子结构中的稳定自由基特性使其成为评估物质抗氧化能力的标准试剂。该化合物通过517nm波长处的特征吸光度变化或电子顺磁共振信号衰减反映抗氧化剂的自由基清除能力,检测灵敏度可达微克级。本标准参考GB/T 39100-2020 多肽抗氧化性测定中的DPPH法。

4.1.2 ABTS 法

2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(Diammonium 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate, ABTS)是由ABTS二铵盐经过氧化剂(如过二硫酸钾)氧化生成的人工合成自由基,是一种蓝绿色的阳离子自由基,在734nm波长处有最大吸收峰。可用于评价抗氧化剂的自由基清除能力。本标准参考GB/T 39100-2020 多肽抗氧化性测定中的ABTS法。

4.1.3 ORAC 法

氧化自由基吸收能力(Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC)分析法中的自由基主要来源于偶氮化合物2,2'-偶氮-双-(2-脒基丙烷)氯化二氢[2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride, AAPH]热分解产生的过氧化氢自由基,也可以是

芬顿(Fenton) 反应过程中产生的羟自由基, 以荧光素钠(sodium flourescein, FL)为荧光探针, 观察自由基与荧光探针作用后, 探针荧光强度的衰退过程, 以水溶性维生素E类似物(6-hydro-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Trolox)作为抗氧化标准物质, 检测体系中各种抗氧化剂延缓探针荧光强度衰退的能力, 以此评价抗氧化剂的抗氧化能力。

4.1.3.1 准备样品。将待测样品准备好, 配制成一定浓度梯度的样品溶液, 并确保其浓度适当。

4.1.3.2 溶液配制。制备一定浓度的磷酸盐缓冲液、氧自由基溶液、荧光探针溶液。

①磷酸盐缓冲液的制备: 精密量取适量磷酸, 以高纯水稀释得到75 mmol/L磷酸溶液; 称取8.56g 磷酸氢二钾以高纯水 500 mL 溶解, 以磷酸溶液调 pH 7.4, 即得75 mmol/L pH 7.4的磷酸盐缓冲液。

②AAPH 溶液的制备: 精密称取 AAPH 207 mg, 以磷酸盐缓冲液溶解并定容至5 mL量瓶, 即得浓度为 153 mmol/L 的 AAPH 溶液。

③荧光素钠(sodium flourescein, FL)溶液的制备: 精密称取荧光素钠40 mg, 以磷酸盐缓冲液溶解, 制成4125 mmol/L的FL溶液, 记为FL母液a。精密吸取FL母液a 50 μ L 置50 mL 量瓶中, 以上述缓冲液定容至刻度, 记为FL 母液b; 母液 a和b 均于4℃冷藏。实验时精密吸取FL 母液 b 500 μ L置 25 mL 量瓶中, 以上述缓冲液定容至刻度, 即得 8×10^{-5} mmol/L 的稀释液。

4.1.3.3 样品量效曲线的确定: 精密吸取 FL 稀释液 100 μ L 于 96 孔荧光板中, 随后加入不同浓度样品溶液 50 μ L 振荡 5min, 37℃温育 10min 后迅速加入 AAPH 液 50 μ L 启动反应。以激发波长 485 nm, 发射波长 535 nm 进行测定并记录荧光值, 反应过程中每隔 1.5min 测定一次。荧光值(记为 Fn)。以测定时间为横坐标, 荧光值为纵坐标, 绘制不同浓度样品的荧光衰变曲线。

4.1.3.4 计算 ORAC 值。根据残留氧自由基量, 计算样品的 ORAC 值。通常, ORAC 值以抗氧化单位 (ORAC units) 表示。

4.2 动物实验

4.2.1 实验动物

实验动物可选用老龄大鼠(10月龄以上)或老龄小鼠(8月龄以上), 也可选用诱导氧化损伤模型鼠。大、小鼠选择单一性别, 小鼠每组 10~15 只, 大鼠 8~12 只。

4.2.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验分三个受试样品剂量组和一个溶剂对照组, 必要时设阳性对照组、空白对照组。受试样品给予时间 30 天, 必要时可延长至 45 天。

4.2.3 实验方法

4.2.3.1 老龄鼠模型

选用老龄大鼠或小鼠, 按血中 MDA 水平分组, 随机分为 1 个溶剂对照组和 3 个受试样品剂量组。3 个剂量组给予不同浓度受试样品, 对照组给予同体积溶剂, 实验结束时处死动物, 测定组织和/或血液中脂质氧化产物含量、蛋白质羰基含量、还原型谷胱甘肽含量、抗氧化酶活力。

4.2.3.2 D-半乳糖诱导小鼠氧化损伤模型

原理: D-半乳糖供给过量, 超常产生活性氧, 打破了受控于遗传模式的活性氧产生与消除的平衡状态, 引起过氧化损伤。

造模方法: 选 25~30g 健康成年小鼠, 除空白对照组外, 其余动物用 D-半乳糖(40mg~1.2g/kg BW)颈背部皮下注射或腹腔注射造模, 注射量为 0.1mL/10g, 每日 1 次, 连续造模 6 周, 取血测 MDA, 按 MDA 水平分组。随机分为 1 个模型对照组和 3 个受试样品剂量组, 3 个剂量组经口给予不同浓度受试样品, 模型对照组给予同体积溶剂, 在给受试样品的同时, 模型对照组和各剂量组继续给予相同剂量 D-

半乳糖颈背部皮下或腹腔注射，实验结束处死动物，测脂质氧化产物含量、蛋白质羰基含量、还原型谷胱甘肽含量、抗氧化酶活力。

4.2.3.3 乙醇诱导小鼠氧化损伤模型

原理：大量摄入乙醇，可是机体中产生过多自由基，诱导小鼠肝组织氧化损伤，表现为抗氧化酶活性下降和脂质过氧化产物增加。

造模方法：选 25~30g 健康成年小鼠（180~220g 大鼠），随机分为 4 个组，1 个模型对照组和 3 个受试样品剂量组，必要时可增设 1 个空白对照组。3 个剂量组给予不同浓度受试样品，模型对照组给予同体积溶剂，连续灌胃 30 天，末次灌胃后，模型组对照组和 3 个剂量组禁食 16 小时（过夜），然后 1 次性灌胃给予 50% 乙醇 12mL/kg. BW，6 小时后取材（空白对照组不作处理，不禁食取材），测血清或肝组织脂质氧化产物含量、蛋白质羰基含量、还原型谷胱甘肽含量、抗氧化酶活力。

4.2.4 分析测试指标

4.2.4.1 谷胱甘肽含量测定

谷胱甘肽（glutathione, GSH）是一种低分子清除剂，它可清除 O_2^- 、 H_2O_2 、 $LOOH$ 。谷胱甘肽是谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸组成的一种三肽，是组织中主要的非蛋白质的巯基化合物，可防止血红蛋白及其它辅助因子受氧化损伤，缺乏或耗竭 GSH 会促使许多化学物质或环境因素产生中毒作用。因此，GSH 量的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素。

测定原理：利用还原型谷胱甘肽（GSH）和 5,5'-二硫对硝基甲酸（DTNB）反应生成黄色的 5-硫代 2-硝基甲酸阴离子，该物质在 420nm 有最大吸收。测定该离子浓度，即可计算样品中 GSH 的含量。

测定方法：按试剂盒的操作要求进行，并按照试剂盒提供的公式计算血液和组织中 GSH 含量。注意血清和组织尽量新鲜，不易冻存，需短时间内快速检测，否则影响实验结果。

4.2.4.2 丙二醛含量测定

测定原理：丙二醛（malondiadehyde, MDA）是脂质过氧化的终产物之一，测其含量可间接估计机体脂质过氧化的程度。1 个丙二醛（MDA）分子与 2 个硫代巴比妥酸（TBA）分子在酸性条件下共热，形成粉红色复合物。该物质在波长 532nm 有最大吸收峰，可用分光光度法进行测定。

测定方法：按试剂盒的操作要求进行，并按照试剂盒提供的公式计算血液和组织中 MDA 含量。

4.2.4.3 超氧化物歧化酶活力测定

超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase, SOD）催化超氧阴离子自由基生成过氧化氢，再由谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶作用生成水，这样可以清除超氧阴离子自由基对细胞的毒害作用，两者消除自由基的能力与酶活性成正比。

测定原理：超氧阴离子氧化羟胺的最终产物为亚硝酸盐，后者在对氨基苯磺酸及甲萘胺作用下呈现紫红色，在波长 530nm 处有极大吸收峰，可用分光光度法进行测定，当 SOD 消除超氧阴离子自由基后形成的亚硝酸盐减少。

测定方法：按试剂盒的操作要求进行，并按照试剂盒提供的公式计算血液和组织中 SOD 活力。

4.2.4.4 谷胱甘肽过氧化物酶活力测定

谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathione peroxidase, GSH-Px）是体内存在的一种含硒清除自由基和抑制自由基反应的酶类，其活力以催化谷胱甘肽（glutathione, GSH）氧化的反应速度，即单位时间内 GSH 减少的量来表示。

测定原理：GSH 和 5,5'-二硫对硝基苯甲酸（DTNB）反应在 GSH-Px 催化下可生成黄色的 5-硫代 2-硝基苯甲酸阴离子，于 423nm 波长有最大吸收峰，测定该离子浓度，即可计算出 GSH 减少的量，由于 GSH 能进行非酶反应氧化，所以最后计算酶活力时，必须扣除非酶反应所引起的 GSH 减少。

测定方法：按试剂盒的操作要求进行，并按照试剂盒提供的公式计算血液和组织中 GSH-Px 活力。

4.3 宠物试食试验

4.3.1 受试样品要求

- 4.3.1.1 应提供受试样品的名称、性状、规格、批号、生产日期、保质期、保存条件、申请单位名称、生产企业名称、配方、生产工艺、质量标准、营养功能以及推荐摄入量等信息。
- 4.3.1.2 受试样品应是规格化的定型产品，即符合既定的配方、生产工艺及质量标准。
- 4.3.1.3 应提供受试样品的主要成分、功效成分/标志性成分及可能的有害成分的分析报告。
- 4.3.1.4 申请产品审定或登记的受试物，应与拟上市的产品完全一致。

4.3.2 受试宠物要求

所有评价实验应进行动物伦理审查，参照GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南进行。根据受试样品所需判定功能的要求选择适用的试验宠物。试验前对试验宠物进行常规的免疫、驱虫处理。受试宠物应当符合纳入标准和排除标准要求，以排除可能干扰试验目的的各种因素。

4.3.2.1 纳入标准

选择老龄宠物犬猫，全身健康状况良好，无明显脑、心、肝、肺、肾、血液疾患，无长期服药史，在研究开始前1个月未使用任何抗生素及抗菌药物；志愿参与受试并保证配合。

4.3.2.2 排除标准

同时参加其他临床研究的宠物；短期内服用与受试功能有关的物品，影响到对结果的判断者；处于妊娠期、哺乳期内、月经期内的雌性犬猫；对受试样品有过敏史；有心、肝、肾和造血系统等严重疾病患者；不符合纳入标准，未按规定食用受试样品，无法判定功效或资料不全影响功效或安全性判断者。

4.3.3 受试宠物分组

试食宠物应该按照品种、遗传背景相同、性别、年龄、体重相近的原则，以保证组间的可比性。对受试宠物犬猫分别按血液中MDA水平随机分为试食组和对照组，每组受试宠物不少于25例。

4.3.4 试验方法

采用自身和组间两种对照设计。试验组按推荐服用方法、服用量每日服用受试产品，对照组可服用安慰剂或采用阴性对照。受试样品给予时间30-60天。试验期间对照组和试食组原生活、饮食不变。各

4.3.5 分析检测指标

各项指标在试验开始及结束时各检测1次。

4.3.5.1 安全性指标

4.3.5.1.1 一般状况 包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等

4.3.5.1.2 常规检查 包括血、尿、便常规

4.3.5.1.3 肝、肾功能检查

4.3.5.2 功效性指标

4.3.5.2.1 GSH含量 观察试验前后GSH的变化及GSH上升百分率。（测定方法见4.2.4.1）

$$\text{GSH上升百分率\%} = \frac{\text{试验后GSH} - \text{试验前GSH}}{\text{试验前GSH}} \times 100$$

4.3.5.2.2 MDA含量 观察试验前后MDA的变化及MDA下降百分率。（测定方法见4.2.4.2）

$$\text{MDA下降百分率\%} = \frac{\text{试验前MDA} - \text{试验后MDA}}{\text{试验前MDA}} \times 100$$

4.3.5.2.3 SOD活力 观察试验前后SOD的变化及SOD升高百分率。（测定方法见 4.2.4.3）

$$\text{SOD升高百分率} = \frac{\text{试验后SOD} - \text{试验前SOD}}{\text{试验前SOD}} \times 100$$

4.3.5.2.4 GSH-Px活力 观察试验前后GSH-Px的变化及GSH-Px升高百分率。（测定方法见 4.2.4.4）

$$\text{GSH-Px 升高百分率} = \frac{\text{试验后GSH-Px} - \text{试验前GSH-Px}}{\text{试验前GSH-Px}} \times 100$$

5 数据处理与结果判定

5.1 数据处理

所有实验数据均应使用国家法定剂量单位。使用数理统计软件进行统计分析，计算总实验重复数内的平均值，所有数据以平均值±标准方差表示。一般采用方差分析，但需先进行方差齐性检验，方差齐，则计算 F 值。若 F 值<F_{0.05}，结论为各组均数间差异无显著性；若 F 值≥F_{0.05}（即 p≤0.05），结论为各组均数间差异有显著性，需进一步使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分析。对非正态分布或方差不齐的数据需进行适当的变量转换，待满足正态分布或方差齐的要求后，用转换后的数据进行统计分析；若经变量转换仍不能达到正态分布或方差齐的目的，则改用秩和检验进行统计分析。

5.2 结果判定

5.2.1 体外化学体系

DPPH、ABTS 和 ORAC 法中有两项的受试样品组与对照组间比较，均有统计学意义（p<0.05），可判定该受试样品体外具有抗氧化作用，该指标结果阳性。

5.2.2 动物实验

- ① 谷胱甘肽含量，受试样品组与模型（或老龄）对照组比较，GSH 含量升高有统计学意义（p<0.05），可判定该受试样品有提高抗氧化物质含量的作用，该项指标结果阳性。
- ② 脂质过氧化产物，受试样品组与模型（或老龄）对照组比较，MDA 含量降低有统计学意义（p<0.05），可判定该受试样品有降低脂质过氧化作用，该项指标结果阳性。
- ③ 抗氧化酶活力，受试样品组与模型（或老龄）对照组比较，SOD 活力和/或 GSH-Px 活力和/或 CAT 活力升高有统计学意义（p<0.05），可判定该受试样品有升高抗氧化酶活力作用，该指标结果阳性。

谷胱甘肽含量、脂质过氧化物 MDA 含量，抗氧化酶活性三项中有两项指标均为阳性，判定该化合物指标为阳性，即可判定该受试样品有助于抗氧化的动物实验结果阳性。

5.2.3 宠物试食试验

- ① 谷胱甘肽含量，受试样品组与对照组比较，GSH 含量升高有统计学意义（p<0.05），可判定该受试样品有提高抗氧化物质含量的作用，该项指标结果阳性。
- ② 脂质过氧化产物，受试样品组试验前后自身比较和试食后组间比较，MDA 含量降低有统计学意义（p<0.05），可判定该受试样品有降低脂质过氧化作用，该项指标结果阳性。
- ③ 抗氧化酶活力，受试样品组试验前后自身比较和试食后组间比较，SOD 活力和/或 GSH-Px 活力和/或 CAT 活力升高有统计学意义（p<0.05），可判定该受试样品有升高抗氧化酶活力作用，该指标结果阳性。

体外化学体系和动物实验评价结果均为阳性，宠物试食试验结果谷胱甘肽含量、脂质过氧化物 MDA

含量, 抗氧化酶活性三项中有两项指标均为阳性, 且对宠物健康无影响, 可判定该受试样品具有有助于宠物抗氧化的作用。

6 实验报告

实验报告应提供试验获得的所有内容、数据及可视化信息。未纳入统计分析的数据或由于数据缺乏、丢失等无法评价的情况也应报告, 并说明在各组别中的平均值及误差。所有试验样品必须留样保存, 宠物饲料(食品)留样 $\geq 500\text{g}$, 液体样品留样 $\geq 500\text{mL}$ 。

实验报告正文至少应包括:

- a. 实验名称;
- b. 实验目的;
- c. 实验材料, 至少包括实验用品、受试样品及处理方法、受试动物(包括宠物)要求;
- d. 实验方法, 测试指标和方法;
- e. 结果与分析, 根据数据统计结果给出平均值和标准方差、误差值及决定系数, 并以可视化的数据或图和表形式体现。
- f. 结论, 针对受试样品的实验结果给出判定。

此外, 试验过程中涉及的所有原始数据和相关可视化图表均要存档。

参考文献

- GB/T 39100-2020 多肽抗氧化性测定 DPPH 和 ABTS 法
GB/T 35892 实验动物 福利伦理审查指南进行
GB/T 18823 饲料检测结果判定的允许误差
GB/T 20205075-T-424 植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法（国家标准正在审查）
DB22/T 397.1-2017 保健用品功能学评价程序和检验方法 第1部分：评价程序
DB61/T 999.1-2015 保健用品功能学评价指导原则及试验要求 第1部分：总则
T/ZHCA 502-2020 保健食品抗氧化功能的斑马鱼检测方法
T/CHAA 014-2022 抗氧化评价方法 第1部分：天然产物体外抗氧化活性评价
T/CHAA 015-2022 抗氧化评价方法 第2部分：药食同源物质抗氧化活性评价
T/ZHCA 025-2023 化妆品抗氧化人体测试方法。
T/ZGKSL001-2020 抗衰老-抗氧化评价方法
保健食品功能检验与评价技术指导原则（2023年版）
保健食品功能检验与评价方法（2023年版）农业农村部第20号公告《宠物饲料管理办法》、《宠物饲料标签规定》
中华人民共和国农业部公告第1224号《饲料添加剂安全使用规范》。
-