中文摘要

复方片剂 SSALP 的卫生学评价及对睡眠影响的实验研究

目的：

本研究对复方片剂 SSALP 进行卫生学评价、睡眠影响的研究。为该保健食品今后的研发提供科学依据，有利于人群睡眠质量和生命健康水平的提升。

方法：

应用《食品安全国家标准》和《食品中有机氯农药多组分残留量的测定》对该受试物进行有效成分、理化和微生物指标的卫生学评价；依据《保健食品检验与评价技术规范》（2003 版）对该受试品进行直接睡眠实验、戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验等睡眠影响的实验研究。

使用 PCPA 失眠模型研究该受试物对大鼠脑组织中的睡眠相关指标的影响。将 50 只 Wistar 雄性大鼠分为模型组、高中低剂量组、空白对照，除空白对照组外均使用 PCPA 造失眠模型。造模成功后给予高（124mg/ml）、中（62mg/ml）低（31mg/ml）剂量组相应浓度的受试物,造模组和空白对照组给予生理盐水。实验过程为造模 2d，造模成功后试验 7d，末次试验后处死大鼠。取脑组织，试剂盒法测得相应指标。使用水迷宫实验观察大鼠行为学变化。

结果：

该批号受试物感官性状良好，微生物和理化指标均低于方法检出限，有一定的有效成分含量。

该批号受试物对小鼠没有直接睡眠作用。受试物中高剂量可延长戊巴比妥钠实验中小鼠睡眠时间（$P<0.05$）。受试物高剂量可使戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验的小鼠睡眠发生率增高（$P<0.05$）。

该批号受试物对 PCPA 造模大鼠体重变化有积极影响。受试物可使 PCPA 失眠模型大鼠脑组织内的 GABA 含量、SOD 活性升高（$P<0.05$），5-HT、Glu、MDA 水平和 Glu/GABA 降低（$P<0.05$）。

该批号受试物对大鼠进入逃逸平台、有效区域停留时间和次数均无影响，各组间差异无统计学意义（$P<0.05$）。

结论：

1. 该批号受试样品感官性状良好，符合《中华人民共和国药典》（2015 版）和《保健食品功效成分测定方法》的标准。
2. 该批号受试样品对促小鼠睡眠可能有积极作用。
3. 该批号受试样品可提高大鼠脑内 GABA、SOD 活性，降低 GLU、MDA、5-HT 活性，可能对失眠造成的大鼠脑内相关指标改变后的恢复有积极的调节作用。
4. 该批号受试样品对大鼠记忆可能无影响。

关键词：

复方片剂，卫生学评价，睡眠功能，神经递质

Abstract

Hygiene Evaluation of SSALP Compound Tablet and Its Effects on Sleep

Objective：

The purpose of this study is to evaluate the hygiene of the SSALP compound tablet and effects on sleep. To provide scientific evidence for the future development of this health food. It is conducive to the improvement of sleep quality and life health level.

Method:

According to the National food safety standards and determination of multi-component residues of organochlorine pesticides in food were applied to evaluate the effective components, physicochemical and microbiological indexes of the test sample. The technical specification for inspection and evaluation of health food(2003) to evaluate the effect of sleep of the test sample by direct sleep experiment and subliminal hypnotic experiment.

PCPA insomnia model was used to test the effects on sleep related indexes in rat brain tissue. The fifty male Wistar rats were divided into model group, blank control group high, middle and low dose group, except the blank control group, PCPA was used to make insomnia model. The high, middle and low dose groups were given 31mg/ml, 62mg/ml and 124mg/ml test sample respectively, the model group and blank control group were given normal saline. The experimental process was made model for 2 days and then test for 7 days. Then to kill rats after the last experiment and take brain tissue to measure corresponding indexes by kit method. To observe the change of the rat behave by Morris water maze.

Result:

The samples in this batch number had no direct sleep effect on mice. High dose group can prolong the sleep time of mice in pentobarbital sodium experiment ($P<0.05$).

High dose group can increase the incidence of sleep in subthreshold dose of pentobarbital($P<0.05$).

The sensory indexes of the samples in this batch number were good, and the microbial and physicochemical indexes were lower than the detection limit of the method. It has certain content of active ingredients.

The samples in this batch number has a positive effect on the weight change of PCPA model rats. The content of GABA and the activity of SOD in the brain tissue of PCPA insomnia model rats were increased, and the levels of 5-HT, Glu, MDA and Glu/GABA were decreased by test sample($P<0.05$).

The samples in this batch number had no effect on the stay time and frequency of entering the escape platform and effective areas of rats ($P>0.05$).

Conclusion：

1. The sensory index of the samples in this batch number met the Chinese Pharmacopoeia(2015) and Method for determination of Efficacy components in health food.
2. The test samples in this batch number may has a positive effect on promoting sleep in mice.
3. The test samples in this batch number can improve the activity of GABA and SOD in rat brain. Its can reduce the activity of Glu, MDA, 5-HT. It may has a positive effect on the recovery of related indexes change in rats brain caused by insomnia.
4. The test samples in this batch number may not have the function of improving memory.

Keywords:

Compound Tablet, Hygiene Evaluation, Sleep Function, Neurotransmitter

目　录

第 1 章　绪　论 1

1.1　失眠概述 1

1.1.1　失眠诊断标准 1

1.1.2　国内外失眠的现状 1

1.1.3　导致失眠的因素 2

1.1.4　失眠的危害 4

1.1.5　失眠的治疗 5

1.2　保健食品概述 6

1.2.1　保健食品发展现状 6

1.2.2　睡眠相关保健食品现状 7

1.3　几种促进睡眠的中药材药理学研究现状 8

1.3.1　酸枣仁 8

1.3.2　红景天 10

1.3.3　五味子 11

1.3.4　刺五加 13

1.3.5　茯苓 13

1.3.6　柏子仁 14

1.4　研究意义 14

第 2 章　材料方法 16

2.1　样品 16

2.2　实验仪器和试剂 16

2.3　实验动物 17

2.4　实验方法 17

2.4.1 卫生学检测.....17
2.4.2 受试物对小鼠睡眠的影响实验.....20
2.4.3 受试物对大鼠脑内睡眠相关指标和行为学影响.....21
2.4.3 统计处理.....23
第 3 章 结 果.....24
3.1 卫生学检测结果.....24
3.1.1 感官指标和有效成分检测结果.....24
3.1.2 微生物检测和稳定性实验结果.....24
3.1.3 理化指标检测结果.....25
3.2 对睡眠影响研究结果.....26
3.2.1 对直接睡眠试验入睡动物数及睡眠时间的影响.....26
3.2.2 对戊巴比妥钠睡眠时间的影响.....26
3.2.3 对戊巴比妥钠阈下剂量催眠试验睡眠发生率的影响27
3.2.4 对巴比妥钠睡眠潜伏期的影响.....27
3.3 对大鼠脑内相关指标和行为学影响结果.....28
3.3.1 大鼠脑内相关指标检测结果.....28
3.3.2 受试物对大鼠行为学实验影响.....31
第 4 章 讨 论.....33
4.1 卫生学评价结果讨论.....33
4.2 对睡眠影响研究实验结果讨论.....34
第 5 章 结 论.....37
参考文献.....38
作者简介及攻读硕士学位期间获得的成果.....48
致 谢.....49

英文缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
5-HT	5-hydroxytryptamine	五羟色胺
GABA	Gamma Aminobutyric Acid	γ一氨基丁酸
GAPF	Glial Fibrillary Acidic Pritein	星胶质细胞标记蛋白白
GLu	Glutamate	谷氨酸
Ju A	Jujuboside A	酸枣仁皂苷 A
Ju B	Jujuboside B	酸枣仁皂苷 B
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
NF-κB	Nuclear transcription factor	核转录因子 κB
NG2	Neuron-glial Antigen 2	神经元胶质细胞抗原 2
NLRP3	NOD-like Receptor Protein 3	Nod 样受体蛋白 3
NMDA	Suanzaoren Decoction	N-甲基-D-天冬氨酸
PDGF-BB	Platelet-derived Growth Factor-BB	血小板衍生生长因子 BB
PFOS	Perfluorooctane Sulfonate	全氟辛烷磺酸
PPS	Pachyman Polysaccharides	茯苓多糖
ROS	Reactive Oxygen Species	细胞中活性氧
Sch B	Schiszndra B	五味子乙素
SCL	Schisandra Chinensis Lignans	五味子木脂素
SCP-A	Schisandra Chinensis Acidic Polysaccharide	五味子酸性多糖
SOD	Superoxide Dismutase	超氧化物歧化酶
TLR	Toll-like Receptors	Toll 样受体

第 1 章　绪　论

1.1　失眠概述

睡眠与觉醒几乎是所有动物的重要生物节律，睡眠与觉醒交替进行保证了生物机体能够正常运转。现代社会生活节奏快，压力大，越来越多的人出现睡眠问题。《中国国民心理健康发展报告（2019-2020）》中“2009 年和 2020 年青少年心理健康状况的年际演变”专题报告写到，经过对青少年心理健康状况十余年间演变的调查和研究，得到青少年的易抑郁检出率保持平稳，睡眠不足现象日趋严重的结论。因此控制失眠的发生有非常重要的意义。睡眠周期分为四个阶段即入睡、浅睡、深睡又叫慢波睡眠、快速动眼睡眠。两个基本类型即快速动眼睡眠和非快速动眼睡眠。如果在各睡眠阶段由于各种因素导致快速动眼睡眠时间减少或睡眠周期混乱即可发生失眠。

1.1.1　失眠诊断标准

当前国际上对失眠症诊断有 3 个标准，即睡眠障碍国际分类（ICSD）、精神障碍诊断和统计手册第 4 版（DSM－IV）、精神与行为障碍分类（ICD-10）[1]。

1.1.2　国内外失眠的现状

失眠问题是全世界人民普遍存在的健康问题，在不同国家失眠状况有所不同。一项关于日本全国的流行病学调查显示，日本成年男女失眠均高于 10%，其中合并日间功能紊乱的男女比例分别占 3.2%和 4.2%[2]。有调查研究表明，加拿大有 13.4%的人符合全部的失眠标准，有近 20%的成年对睡眠治疗表达了不满意，13%的人一生中至少咨询过一次睡眠问题[3]。在西班牙，成年男女失眠分别占 17.6%和 23.9%[4]，韩国 15 岁及以上人群男女每周至少三个晚上出现至少一个失眠症状（包括入睡困难、睡眠中断、早醒、无效睡眠）患病率分别为 14.8%和 19.1%[5]。

在国内，失眠问题也同时遍布各个年龄层和各地区之间的不同人群中，普遍状况女多于男。有调查显示中国 15 省中 18～64 岁人群中每天睡眠时间过少或过久的人群比例已接近 30%[6]。我国 2006 年的失眠数据报告显示北上广分别是 62%、60%、68%[7]。另外有研究显示，江苏地区成人失眠占 15.23%[1]。宁夏地区成人失

眠率为 12.52%，其中男女患病率分别为 13.69%和 11.68%[8]，甘肃成人失眠率为 22.3%，其中轻度、中度、重度失眠率分别为 11.4%、6.6%和 4.3%[9]。根据中新网北京 2021 年 3 月 1 日电，中国最新发布的一项调查显示，中国青少年睡眠不足现象继续恶化，95.5%的小学生、90.8%的初中生、84.1%的高中生睡眠时常未达标。武汉市某城区 46%的中高级小学生存在睡眠问题，14.7%存在焦虑[10]，重庆市小学生存在明显的睡眠不足情况，有 12.4%入睡困难[11]。黑龙江中学生中，18.2%存在睡眠质量问题，并且提示高中生高于初中生，地级市、县级市、省会城市间均有差别[12]。可见，睡眠障碍已经成为影响国内人群身心健康的一项不可忽视的重要问题之一。

1.1.3 导致失眠的因素

随着现代社会不断发展，人们周遭的自然环境和社会环境发生了巨大改变，各种产业层出不穷。人们物质生活和精神生活也得到了极大丰富，但随之而来的是对健康的不利因素也随之增加且不断变化。其中，影响睡眠的各种因素也逐渐增多。外界的环境变化，自身身体状况的改变，活动情况的不同等因素均会导致失眠的发生。

舒适的外部环境是影响睡眠的重要因素。有研究表明，睡眠时是否舒适和睡眠质量会受到室内热环境和床温的影响。热环境与睡眠的热舒适和睡眠质量关系相当密切，舒适的热环境可缩短的睡眠潜伏期和增加高质量睡眠时间[13]。令人心理愉悦的外部舒适的环境会促进睡眠。La´szlo´Harmat 等多位研究者的研究表明，音乐可能有效改善有失眠症状的成年人的主观睡眠质量，显著改善学生的睡眠质量，且音乐干预似乎对成人原发性失眠症有明显的优势[14-16]。Tabitha Trahan 的研究中提出，音乐调节睡眠的机制可能是生理性、心理性和物理干预性的[17]。例如音乐可能会影响焦虑和觉醒的自主神经系统，产生某种生物效应，从而调节睡眠；音乐可通过干扰自身进行消极思想的思考从而调节睡眠；音乐可通过掩盖外部噪音来促进人们的睡眠卫生。人们身处社会地位，自身的经济状况，承受的社会压力等的社会环境也会影响人们的睡眠情况。Kenneth L Lichstein 的研究提出，那些认同自己失眠身份的人，白天的损害更强烈，且无论睡眠状态如何，都有更大的风险产生一系列后遗症，包括自我羞辱、抑郁、自杀意念、焦虑、高血压和疲劳[18]。Anna Średniawa 在 7 所克拉科夫公立大学使用感知压力量表 10、问题经历

的应对取向清单、简写版本和雅典失眠量表对学生进行了一项横断面研究，研究表明十分之一的克拉科夫学生感到高度的压力，五分之一的受访者遭受失眠。失眠程度与压力程度呈显著正相关[19]。另外有研究显示在外界的压力下，人的睡眠睡眠质量和自身的睡眠系统反应性有关，有高度反应性睡眠系统的人会经历剧烈的睡眠恶化，而那些睡眠反应性低的人基本不会受到干扰[20]。

除却自然环境和社会环境对睡眠卫生的影响，人们自身状况和睡眠质量同样息息相关。包括年龄，性别，自身的健康和疾病状况，都会对睡眠质量造成一定影响。不同年纪引起失眠的原因可能不同。有研究提出，老年人失眠可能由于整体睡眠阶段前移，导致早醒从而增加日间的小憩，使生理节律进一步混乱导致了夜间的失眠。老年人比青年人更能容忍睡眠不足，这样青年人对失眠的自我知觉更高，会出现前文所说的失眠身份的认同，从而造成青年失眠比例上升。但老年人在失眠情况下引起的医学和精神影响方面的风险更高[21]。性别的不同也是导致失眠率变化的原因。Bin Zhang 的 meta 分析证实了女性患失眠症的患病风险高于男性，且女性的易感性随年龄的变化趋势是一致和渐进的，在老年人中更显著[22]，和前文所描述一致。对于女性来讲，在绝经期发生的潮热、焦虑、抑郁以及多种社会心理因素是影响绝经期女性发生失眠的原因[23]。人自身的健康和疾病状况也是影响睡眠和导致失眠的重要因素，有一些证据表明失眠的一些亚型的发生（难以入睡）与核心体温昼夜节律较正常时间延迟有关；睡眠起病和持续性失眠的与整天的核心温度升高有关[24]。处于病理状态也是影响人睡眠质量和发生失眠的因素之一。创伤性脑损伤可改变睡眠质量，且可在一定程度上改变睡眠结构。Janna Mantua 的研究中表明中重度脑外伤与慢波睡眠升高、2 期降低和睡眠效率降低相关[25]。还有报道说在脑震荡后恢复缓慢的青少年中，近四分之三的人市是 ISI 评分上认可的失眠，且高于三分之一的有中度至重度失眠症状。同时没有足够的证据表明失眠症是由于脑震荡造成的[26]。

人是社会的人，在从事社会劳动和历经社会生活中必然会接触或产生一些对与健康不利的有害因素，其中就包含许多导致睡眠质量下降和失眠的因素。有许多研究表明，职业环境也是职业人群失眠的相关因素。主要原因有不良的职业环境、不同的职业实践等，这些原因均可造成职业人群的职业紧张从而导致睡眠质量的损害。李小明在对钢铁工人职业紧张和失眠关系的研究中显示，钢铁工人总

体失眠率占 33.8%，高职业紧张工人较低职业紧张的工人失眠发生率高[27]。一项对石油工人睡眠情况的调查研究显示，不同工种、倒班、学历等不同因素下，睡眠问题发生率也不尽相同；且失眠在输油、倒班作业、大专学历的石油工人中发生率较高[28]。除职业紧张外，人群在社会中的不同经历、不同的社会实践情况也同时影响着人们的睡眠。失眠在不同职业的人群中有不同流行特征，一个对不同人群睡眠状况的研究显示，失眠者存在问题的严重程度依次为大学生、中学生、职工、军人[29]。工作负荷和组织制度的不合理也影响着人们的睡眠，工作负荷重可能导致无法完成工作的人努力想办法学习和加班，使心理压力增加、思维反刍，从而降低睡眠质量。难以自主控制的工作任务也会增大职业人群心理压力，出现睡眠问题[30]。另外组织制度不合理如倒班等也会影响睡眠质量，由于强加的睡眠-觉醒周期和个人的昼夜节律系统之间的冲突，导致非标准睡眠/觉醒时间的工作时间出现，进而会导致睡眠中断、更短的睡眠时间和困倦，有些调节能力不强的职业人群会严重损害他们的睡眠能力，导致失眠[31]。不良的生活习惯也是发生失眠的危险因素，张蕾[32]等的研究对原发性失眠人群进行单因素分析，表明饮酒是发生原发性失眠的危险因素之一。

1.1.4 失眠的危害

失眠在人群中的广泛发生对人们的身心健康会产生许多不良影响，也是很多疾病发生的危险因素。了解失眠所造成的危害和探索失眠的相关机制有十分重要的意义。近些年随着人们对睡眠问题的重视，对于失眠造成的危害也有了进一步的研究和认识。失眠可能造成机体的感染和疾病的恶化，以免疫系统为例，失眠可能会导致免疫系统的变化。Josée Savard 对失眠、免疫、感染的研究为一种假说提供了一定的支持，那就是在化疗过程中，失眠可能导致机体易感性和脆弱性增加，从而使免疫系统发生改变进而发生机体的感染[33]。而且，有对睡眠质量和癌症风险的纵向队列研究显示，在老年群体中，睡眠质量差与患癌症的长期风险呈正相关，表明睡眠质量差可能导致癌症发生风险增高[34]。除此外，一项对睡眠障碍和自杀风险的系统综述结果显示，睡眠障碍，如失眠、恶梦症状，是可改变的经验自杀行为的危险因素[35]。失眠和抑郁和焦虑的发生有着千丝万缕的联系。有研究表明，失眠作为独立危险因素增加了焦虑和抑郁的发展以及持续抑郁症的风险且失眠可能和焦虑、抑郁存在着相互作用的关系[36]。

1.1.5 失眠的治疗

失眠影响着人的身心健康，从不同的角度看待失眠可以得到不同的结论，从中医角度来看，失眠病因病机繁多而复杂。或忧思劳倦，暗伤气血，血虚则静藏之力不足而难以藏神，神魂不安则难入寐；或饮食不节，导致宿食停阻在中，痰浊扰心，故而不寐等等。但究其根本乃是阴阳的平衡失调，致阳不入阴，阴阳失交[37]。从西医角度来看，失眠的发生是由于遗传因素，性别年龄因素，环境、生活习惯、躯体疾病、精神、药物因素或与睡眠相关的神经递质相关因素发生变化中的一个或多种因素交互导致的[38]。因此，针对失眠可以采取中医治疗，西药治疗和认知行为治疗。

目前中医通过一种或几种联合治疗的方法治疗失眠，都有很好的治疗效果。主要有辩证论治，是以寻求病因，通过处以相对应症状和原因的药方制作成中药从而治疗失眠的方法。另外还有针灸疗法、推拿疗法、耳穴疗法、拔罐、刮痧、中药穴位贴敷、艾灸、食疗等[39]。有不同的研究者对临床失眠患者进行了中医的辨证论治。在不同的研究中均显示，中医的辩证论治对治疗不寐症状有着良好的效果，好转率均在 95%以上[40, 41]。推拿也是治疗失眠的中医手法之一，有对临床推拿治疗失眠效果的报道显示，推拿对治疗失眠也有很好的效果，且有效率在 90%以上[42, 43]。在各类报道中，推拿经常和针刺法相结合治疗失眠，谢孝磊[44]在针刺结合推拿对于颈源性失眠的效果的研究中得到，通过结合针刺后的推拿效果好于单独推拿治疗的效果。苏志远[45]在研究针刺结合推拿治疗大学生失眠的研究中也得到同样的结果。对于几种其他的方法，有研究耳穴法可能是通过改变患者的心理状态改善患者睡眠状态，提高睡眠质量[46]，也有耳穴法和针刺法、中药结合治疗失眠的研究显示，此方法对于失眠患者具有显著的效果[47]。

西医对失眠的治疗方法主要有药物治疗（苯二氮䓬类和非苯二氮䓬类）、认知行为治疗和物理治疗法。西医推荐失眠患者首先选用短或中效非苯二氮䓬类药物，其次可以选择经典治疗（苯二氮䓬受体激动剂）；最后选择抗抑郁剂[48]。另外苯二氮䓬类和非苯二氮䓬类药物自身具有不同程度的成瘾性和耐药性，大多失眠症患者会形成长期依赖使用两类药物来维持睡眠治疗的习惯，因此部分难治性失眠症患者需要联合用药[49]。因为西药有着一定的成瘾性和耐药性，且忽然停药会出现发条现象，因此认知行为疗法治疗失眠是另一种很好的选择。认知行为治疗

包含睡眠健康教育、放松训练、认知疗法和[50]；主要目标是去除睡眠有害因素或加剧失眠的因素。首先需要改变先前的消极经历而使失眠者对睡眠产生的消极思想和信念，其次帮助改变有害睡眠的生活习惯和影响睡眠行为，使睡眠过程在平稳的过程中进行，尽量将外来干扰降到最低[51]。赖靖慧等[52]通过对临床失眠患者采取睡眠限制联合刺激控制方法，对比仅接受睡眠健康教育和药物治疗的患者的疗效，得到了这样的结果。睡眠限制联合刺激控制对原发性失眠患者治疗效果较单独药物治疗良好，可减少催眠药物的使用量。放松训练是通过肌肉的放松、杂念的消除，使入睡更容易[53]。黄洪玲[54]对放松训练效果的研究通过对比治疗前后睡眠潜伏期和总睡眠时间，得到了显著的差异，表明了放松训练是治疗失眠的很好的辅助疗法。其他的认知行为治疗方法还有通过互联网邮件进行干预增强互联网认知行为治疗效果，Jaap Lancee[55]通过对比接受互联网支持的认知行为治疗方法联合低强度的邮件干预和单独接受互联网支持的不同失眠患者，最终结果表明了两组患者虽然在失眠症状上均有积极改善，但增加了低强度邮件干预的患者改善效果更加显著，并且在自述症状严重的患者身上仍然有很好的疗效。

1.2 保健食品概述

保健食品是声称并具有特定保健功能或者以补充维生素、矿物质为目的的食品[56]。保健食品的原材料有很大比重来源于中药。目前我国保健食品的原料组成有维生素、矿物质等营养素，还有中药和其他天然产物等材料。据统计，所有已批准注册保健食品超六成具有中药成分。如果排除营养素类，占比只会更高[57]。保健食品分为多种类型，如肽与蛋白质类、功能性油脂类、维生素类、自由基清除剂类、功能性甜味剂等[58]。现行的保健食品具有多种功能，改善记忆、减肥、调节血糖、调节免疫功能、抗氧化、改善睡眠、促进排铅、抗辐射等功能。

1.2.1 保健食品发展现状

保健食品产业从 20 世纪 80 年代中期兴起，并在 1996 年原卫生部颁布的《保健食品管理办法》中明确了其定义[59]，随后保健食品产业跟随着国家经济和民生的发展也逐步发展壮大。截至 2003 年据不完全统计共批准保健食品 5100 余个[60]。Patentics 检索系统显示，2012～2018 年间保健食品的申请量经历了先增后缓

的过程，在此间年保健食品企业总产值稳步增加，由不到千亿元增长至接近三千亿元[61]。2013～2020 年完成注册备案的保健食品就有 4620 种[62]。保健食品产业蓬勃发展，国家对于保健食品产业的监管力度也监管手段也逐步完善，后期保健食品增速放缓与国家对于保健食品标准的更加严格监管有关。由于保健食品行业近几十年发展迅速，原材料种类多，品种杂糅。虽然国家跟进的监管和制度以及分类完善速度较快，但不可避免也的存在一些问题。例如在管理体系上存在审批和管理失衡，另外还有夸大宣传、监管体制不统一、检验不规范等问题[63]。有报道中还提到的中药材及其提取物名称不规范问题，如同一种原材料在不同保健食品配料表中提到仍然是不一样的名称，如称山楂为山楂果、生山楂等。另外还有食品添加剂名称不规范问题和营养补充剂类原材料名称不规范问题[64]。

1.2.2 睡眠相关保健食品现状

睡眠相关的保健食品是多种功能的保健食品中的一种，通常是使用具有改善睡眠的功能或者辅助促进睡眠或与睡眠相关的原料通过相关的工艺制作而成，很多促进睡眠的保健食品都含有皂苷、粗多糖等多种促进睡眠的成分。2020 年依据国家市场监督管理局网站特殊食品信息查询平台检索显示，我国现已获得批准注册的具有改善睡眠功能保健食品共 594 个[65]。促进睡眠保健食品的原料大多是中药材，以酸枣仁、远志、茯苓、百合等居多。雷蕾[66]等研究者的研究显示，截至 2015 年，可检索到五百余种国产改善睡眠保健食品应用的原材料成分中，九成为中药，且安神类原材料成分以中药为主；其所属药厂遍布全国 32 个省市，数量上以北京、广东为首，其余城市大致相同。中华文化源远流长，其中蕴藏着无数的瑰宝。除厂商生产的保健食品外，药膳也是一种促进睡眠的食品，是以一些具有食药同源性的中药通过传统方剂或临床经验或实验筛选得到的。如人参炖乌骨鸡，其他还有柏子仁粥、百合粥等。另外也一些食物也可促进睡眠，如糯米、黍米、小米、苹果、红肉、食用植物中药等。以苹果为例，苹果中含有苹果酸，不仅可以促进肠胃消化，也可以通过调整肠道胞壁酸的功能而调整睡眠[67]。

1.3 几种促进睡眠的中药材药理学研究现状

1.3.1 酸枣仁

酸枣仁，是鼠李科植物，近球形，熟时暗红色，有酸味。酸枣仁产地分布较广，产量较大，主要分布在我过河北、山东、甘肃等中的一些县、市，据不完全统计，国内几个主要县市，粗略估计年销量 5000 吨[68]。酸枣仁具有补肝、宁心、敛汗、生津的功效，用于治疗虚烦不眠、惊悸多梦、体虚多汗及津伤口渴[69]。明代《本草纲目》有记载:“熟用疗胆虚不得眠，生用疗胆热好眠[70]。目前从酸枣仁中提取鉴别出来的化学成分有 120 多种[71]，大量的研究得到其中的主要成分有白桦脂酸、黄酮类、皂苷等化合物等。从古至今，酸枣仁的药理作用也被进行了大量的研究，通过大量的实验或实践检验，目前得知酸枣仁主要的药理作用包含安神催眠、抗炎、增强免疫力、调节心血管功能、增强记忆、促进骨骼生长等作用。

1.3.1.1 酸枣仁神经系统作用

（1） 酸枣仁促进睡眠作用

酸枣仁中所含有的皂苷类物质和黄酮类物质是酸枣仁镇静催眠作用的主要活性成分[72]。李中国[73]的研究提出酸枣仁治疗失眠的机制可能与参与调控 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因（B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2-assaciated X protein, Bax）表达，增加单胺类神经递质 5-HT 含量，调节了相关酶的活性起到调节睡眠作用。郭海波对失眠模型大鼠进行了酸枣仁汤（Suanzaoren Decoction,SZRD）干预，测得结果对于实验对照组来说，SZRD 组脑组织的 5-HT1A 受体 mRNA 的表达升高，神经元胶质细胞抗原 2（Neuron-glial Antigen 2,NG2）细胞、N-甲基-D-天冬氨酸（Suanzaoren Decoction,NMDA）受体 mRNA 的表达有明显下降，表示 SZRD 对失眠大鼠具有治疗作用。贾红丽[74]将 96 名顽固性失眠患者随机分为两组，对其进行了西药治疗和 SZRD 加减治疗的对比，结果基于匹兹堡睡眠质量指数量表进行评分得出，SZRD 加减治疗组的有效率与西药组的差异显著，说明了 SZRD 的加减治疗对治疗顽固性失眠具有良好的效果。另外还有许多文献表明，SZRD 对冠心病合并失眠患者、糖尿病伴失眠阴虚内热型患者均有良好的治疗效果[75-77]。

（2） 酸枣仁其他神经系统作用

季树仙[78]通过对比在临床上常用治疗方法加酸枣仁汤加减治疗前后临床疗效和汉密尔顿焦虑量表(HAMA)评分，结果表明实验组评分和疗效均高于常规组，证明了酸枣仁汤对治疗广泛性焦虑有着不错的疗效。李陆[79]等研究者采用酸枣仁合欢方治疗抑郁失眠模型小鼠，通过测定小鼠脑组织中多巴胺、单胺类神经递质的含量判断治疗效果，结果得到各给药组的 5 羟色胺（5-hydroxytryptamine ,5-HT）含量均增高。提示酸枣仁合欢方对抑郁的治疗有一定的促进效果。郭帆[80]等人给与失眠模型大鼠酸枣仁汤治疗，测定治疗后 Nod 样受体蛋白 3（NOD-like Receptor Protein 3,NLRP3）炎性小体通路相关的蛋白、细胞因子和 mRNA 的表达以及行为学实验结果探讨酸枣仁汤对大鼠学习记忆功能的改变。结果得到行为学实验中治疗组较失眠模型的大鼠记忆增强，通路中相关蛋白均有不同程度减少，表明酸枣仁具有一定的增强学习记忆功能。

1.3.1.2 酸枣仁的抗炎抗氧化作用

（1） 酸枣仁抗炎作用

酸枣仁皂苷 A（jujuboside A，JuA）是酸枣仁皂苷的成分之一，有研究表明，JuA 可能通过抑制脑内 NO 浓度，从而使一些酶难以参与炎性反应,或是 JuA 通过阻止 β 淀粉样蛋白 1-42 诱导的乙酞胆碱酷酶（Aeetyleholinesterase,AChE）增加，从而使细胞外 Ach 的浓度增加发挥抗炎作用[81]。鲍淑娟[82]等人对比了给与酸枣仁水提液、强的松和生理盐水灌胃的小鼠在不同时间下踝关节注射鸡蛋清的足肿胀抑制率，结果得到在不同时间下，水提液组均可以抑制炎症导致的足肿胀，发现酸枣仁水提液具有明显抗炎作用。朱建丽[83]等人对 JuA 调节高脂肥胖小鼠血管内皮功能的研究中，对 Toll 样受体（Toll-like Receptors,TLR）/核转录因子κB（Nuclear transcription factor,NF-κB）通路相关蛋白表达进行了测量，结果得出，JuA 各组 NF-κB、TLR2 等蛋白和 mRNA 表达低于模型组，IκBα蛋白表达量和 mRNA 高于模型组，而 TLR2、TLR4、NF-κB 是与炎症反应发生相关的蛋白，IκBα是抑制炎症反应的蛋白，研究表明 JuA 有一定的抗炎作用。

（2） 酸枣仁的抗氧化作用

酸枣仁中的总皂苷和黄酮是酸枣仁抗氧化功能的主要成分，肖凤琴等[84]人对

全氟辛烷磺酸（perfluorooctane sulfonate,PFOS）诱导小鼠肝脏氧化损伤模型给与酸枣仁黄铜的治疗，对比了不同组别间相应的酶的活性如丙转氨酶、谷胱甘肽过氧化物酶等酶以及 Nrf2/HO-1 途径相关 mRNA 的表达量，发现超氧化物歧化酶等因子、相关 mRNA 表达增加，氧化损伤的酶减少。表明了酸枣仁黄酮可以保护小鼠肝脏的氧化损伤，具有抗氧化作用。李冰洁[85]等人采用 JuA 处理星形胶质细胞 C6 的氧化应激模型，检测了星形胶质细胞标记蛋白和 SOD 等因子的水平。测得与模型组相比，处理各组的星形胶质细胞标记蛋白（glial fibrillary acidic pritein，GAFP）表达和细胞中活性氧(Reactive oxygen species,ROS)等物质水平显著降低，SOD 等物质水平显著升高，且有梯度，表示 JuA 可保护星形胶质细胞 C6 的氧化损伤，具有一定的抗氧化作用。

1.3.1.3 酸枣仁调节心血管系统功能

酸枣仁皂苷 B(jujuboside B,Ju B）是酸枣仁中重要的活性成分之一，具有调节心血管系统的功能。嵇再雄[86]等人在研究中对正常组、血小板衍生生长因子（Platelet-derived Growth Factor-BB,PDGF-BB）组和不同剂量的 JuB 组的 A7r5 细胞迁移能力以及微管相关蛋白 1 轻链 3 的 B 蛋白的表达进行检测。结果得到 Ju B 不同剂量组的 A7r5 细胞迁移与 PDGF-BB 组相比被显著抑制，且随着浓度愈高，抑制效果愈明显。且 LC3B 蛋白表达也显著减少，与 A7r5 细胞迁移结果有同样趋势。表明了 Ju B 对血管介入术后新内膜增生引起的再狭窄具有治疗作用，有调节心血管系统的功能。顾民华[87]在研究中通过在给与心肌缺血再灌注模型大鼠造模前黄酮碳苷，包括斯皮诺素和 6 ’’’ －阿魏酰斯皮诺素，然后在再灌注后提取血清测量蛋白和 RNA 的表达，得到这样的结果，两组的 cTnI 和 LDH 的释放明显减少，且降低 p62、增加 LC3B－II 表达。表明酸枣仁黄酮碳苷有通过 GSK3p 抑制、促进自噬和 PGC－1a/Nrf2/H0－1 途径保护心肌细胞的作用。

1.3.2 红景天

红景天，味甘、涩，性寒，药用历史悠久，系景天科红景天属植物;共有 96 个种,主要分布在东亚、中亚、西伯利亚以及北美地区，中国为其主产区，有 73 个种，红景天属植物在中国主要分布在西南、西北、华北及东北地区，尤以云南、四川及西藏高寒地区种类最多[88]。红景天中含有多种有效成分，如红景天苷、酪

醇及红景天多糖、黄酮类化合物、酚类化合物、蛋白质、脂肪、微量挥发油及微量元素、氨基酸等[89]。正因为成分丰富，因此红景天具有多种促进健康的作用，如加强机体新陈代谢、增强抵抗力,促睡眠、抗疲劳、抗缺氧、抗衰老、抗病毒、抗微波辐射等作用[90]。

1.3.2.1 红景天神经系统作用

有研究在特定的环境下对失眠模型大鼠及失眠模型加红景天苷治疗组大鼠进行了不同睡眠阶段如慢波睡眠和快速动眼睡眠的脑皮层脑电描记法测得不同时相的脑电记录信号，通过统计分析得到各剂量组的红景天苷治疗大鼠的慢波睡眠II期和快速动眼睡眠期均显著延长，表明红景天可能对促进睡眠有积极影响[91]。韩亚琼等人对 CUMS 致郁大鼠模型进行红景天苷治疗后进行了旷场实验、强迫游泳实验等行为学实验以及流式细胞术和 ELISA 法测定大鼠海马区细胞凋亡和相关细胞因子的含量，最终所有实验结果均为阳性，表明红景天苷可能通过 cAMP/PKA/CREB 起到保护神经细胞作用[92]。

1.3.2.2 红景天其他作用

有研究表明，红景天苷可以使肺纤维化模型大鼠肺纤维化程度减轻且增加相关保护蛋白的表达，还可使体外慢阻肺模型 A549 细胞中总-超氧化物歧化酶活性升高，对慢阻肺体外细胞模型具有一定的保护作用 [93-94]。金莉英等人[95]的研究表明，红景天可使心肌缺血再灌注模型大鼠血清中 TNF-α、IL-6 等因子水平降低，减少凋亡，可能有保护缺血再灌注下的心肌细胞的作用。

1.3.3 五味子

五味子为木兰科植物，习称“北五味子”。五味子始载于《神农本草经》，因《新修本草》记载其有五味而得名[96]。五味子主要分布于我国东三省和其他北方城市如河北等省区，在临近北方得其他国家如俄罗斯远东地区亦有分布[97]。2014 年为止，全国的种植面积达到 1 万公顷以上。2010 年左右社会中北五味子存量达到近 1.5 万吨[98]。传统中药方剂中常用到五味子这种中药材，至今为止我们对传统中药材的开发利用从来没有停止过。上世纪 80 年代至今，智慧芽及专利之星检索到五味子相关专利申请共计 1058 件，发明 974 件，吉林省申请最多[99]。五味子营养成分丰富，包含木脂素、挥发油等成分。具有保肝、兴奋呼吸中枢、

催眠等作用[100]。临床上广泛应用于心脑血管疾病、失眠、肿瘤等[101]。

1.3.3.1 五味子神经系统作用

（1） 镇静催眠作用

根据既往大量研究表明，五味子中的木脂素是发挥神经系统作用的主要物质，镇静催眠作用就是其中一种。张羽翀[102]等人对 PCPA 致失眠大鼠模型进行给与五味子木脂素（Schisandra Chinensis Lignans,SCL）干预和无处理干预，结果发现 SCL 组大鼠睡眠潜伏期减少，睡眠时间增多且下丘脑 5-HT 及 5-HIAA 水平显著升高，表明五味子具有很好的镇静催眠效果。

（2） 其他神经系统作用

郭笑[103]等的研究表明，SCL 具有一定改善学习记忆的能力，他们对对 D-半乳糖（D-galactose,D-gal）所致衰老模型小鼠分组进行不同剂量的 SCL 腹皮下注射，试验后测定相关酶的活性，蛋白、mRNA 的表达量。得出结果模型加 SCL 组的 SOD 水平升高、MDA 下降，Prdx6,GSH-Px1 mRNA 及蛋白的表达水平显著升高。不仅证明 SCL 可以改善学习记忆，也表示这种功能可能是通过调节脑内 Prdx6,GSH-Px1 来发挥作用。张丽凤[104]等建立了大鼠慢性酒精中毒模型，通过对模型组大鼠给与五味子乙素（schisandrin B, Sch B）干预，在实验后观察大鼠海马 CA1 区神经元超微结构的形态学变化，判定 Sch B 是否有保护神经的作用，结果发现，Sch B 使大鼠细胞结构更加完整，损伤程度降低，证明 Sch B 具有保护神经的作用。

1.3.3.2 五味子保肝作用

既往许多研究表明，五味子中木脂素和多糖是发挥五味子保肝作用的主要成分。王瑶[105]等给与不同的对乙酰氨基酚模型小鼠木脂素处理、多糖处理、木脂素加多糖处理，检测血清中 ALT 和 AST 水平，结果对比模型组来说，所有处理组的 ALT 和 AST 水平下降水平显著，且多糖组显著低于其他处理组。说明了五味子具有保护肝脏的作用，且多糖成分发挥更重要的作用。

1.3.3.3 五味子其他作用

五味子乙素可以通过调节 NF-κB 通路的蛋白保护脂多糖诱导的脓毒症急性

肺损伤模型大鼠的肺组织，具有一定的保护呼吸系统的作用[106]。五味子酸性多糖（Schisandra chinensis acidic polysaccharide,SCP-AP）可增强小鼠耐力，降低骨骼肌中 MDA、8-OHd G 水平，具有抗疲劳的作用[107]。五味子中五味子甲素、五味子乙素等都是有效抗肿瘤成分。可以通过抑制肿瘤细胞增殖、迁移、诱导细胞凋亡等多种途径发挥抗肿瘤作用[108]。

1.3.4 刺五加

刺五加为五加科植物，因小枝密生针刺而得名[109]。 刺五加栽植简便,在中国特别是东北、河北、山西等地分布广泛[110]。古时候就有对刺五加药用的记载，南朝陶弘景在《名医别录》和明代李时珍的《本草纲目》中均有描述，具有“坚筋骨，强意志的功效[111]。刺五加含有多种活性物质，主要有苷类、多糖、黄酮类化合物等。不仅对神经系统、心血管系统都具有保护作用，还具有抗炎、抗氧化等功能。

1.3.4.1 刺五加的药理作用

刺五加中的苷类成分是刺五加发挥促进睡眠作用的主要成分，有许多研究表明，刺五加总苷或刺五加提取物可增加果蝇睡眠时间，延长小鼠戊巴比妥钠睡眠时间、缩短睡眠潜伏期。且能改善临床原发性失眠患者的睡眠[112-114]。刺五加依靠刺五加多糖、刺五加芝麻素等成分发挥抗肿瘤作用，主要通过抑制肿瘤细胞和增强免疫系统活性减少癌症的发生。谢靖宇在对 ASE 对小鼠抗疲劳作用研究中得到，ASE 可以降低小鼠尿素氮含量，增加肝糖原、肌糖原含量，具有良好的抗疲劳活性[115]。ASE 可以通过抑制 TNF-α、IL-6 等炎性细胞因子、细胞凋亡缓解大鼠脑组织缺血再灌注损伤，表明 ASE 具有一定的保护心血管系统的作用[116]。

1.3.5 茯苓

茯苓为我国传统中药材，也是普及的药食两用资源。又名松腴、茯兔等。具有利水渗湿，健脾宁心功效[117]。茯苓在《神农本草经》中被提及有安魂养神功效,现代研究也发现茯苓可改善睡眠[118]。茯苓野生资源分布广泛，湖北产量最大,云南所产品质最佳,称为“云苓”[119]。茯苓中含有多种活性成分，如、部分甾体类化合物多糖类、三萜类等。具有镇静催眠、保肝等多种功能[120]。

1.3.5.1 茯苓的药理作用

赵天国对不同组别的小鼠进行了茯苓多糖（pachyman polysaccharides, PPS）、生理盐水和安定的处理，观察其延长小鼠戊巴比妥钠睡眠时间，发现 PPS 延长戊巴比妥钠睡眠时间显著高于对照组，但低于安定组，说明 PPS 具有一定的催眠作用[121]。孙洲等人的研究表明，PPS 能提高刚断奶仔猪血清白蛋白、IgG、等免疫指标，具有一定的增强免疫功能的作用[122]。

1.3.6 柏子仁

柏子仁的应用历史悠久，始载于《神农本草经》，列为上品。《本草纲目》记载:“养心气，润肾燥，安魂定，益智宁神”，用于惊悸怔忡，失眠健忘，盗汗，肠燥便秘[123]。主产于山东、河南、河北，陕西、湖北、湖南、甘肃、云南等地亦产[124]。柏子仁成分丰富，其中含有脂肪油、少量挥发油，皂甙，植物留醇等物质[125]。有镇静、改善睡眠、改善记忆、神经保护等作用[126]。

1.3.6.1 柏子仁的药理作用

王安林等[127]研究者通过观察采用了柏子仁单方对猫进行腹腔注射后猫的睡眠情况，得到了柏子仁单方可以延长猫的慢波睡眠作用的结论，说明柏子仁具有显著延长睡眠的作用。孙付君等[128]通过对不同的有剂量梯度组别的柏子仁油和柏子仁皂苷实验小鼠进行了戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验以及对戊巴比妥钠镇静催眠协同作用的实验，观察到，柏子仁皂苷和柏子仁油高剂量组均可以增加入睡小鼠的数量且延长睡眠时间，表明柏子仁中的有效成分均有一定程度的镇静催眠作用。索金红等[129]通过给与阿尔茨海默病（Alzheimer’s disease, AD）模型大鼠柏子仁甙治疗，测定不同组别大鼠脑中 Bcl-2、Survivin 等相关蛋白和 mRNA 表达，观察柏子仁是否具有神经保护作用，结果得到，柏子仁甙组大鼠保护性蛋白表达增高，抑制性蛋白表达降低，表明柏子仁甙具有一定的抗氧化应激、保护神经系统的作用。

1.4 研究意义

改革开放以来，我国生产力不断发展，人们关注的重心也逐步从吃饱穿暖转移到提高生命质量上来。因此，睡眠质量等系列问题越来越受关注。一些睡眠相

关的产业，如睡眠相关保健品、药物、仪器、服务等产业也逐渐出现并发展迅速。现今对于睡眠有益的保健食品以几种中药材组方而成为多，但传统中药组方复杂，功能多样，不同的组方所起到的生物活性更是未知，因此针对此复方片剂 SSALP 是否对睡眠有积极作用的课题值得探究。本研究是对批号为 19010122、19010222、19010322 的复方片剂 SSALP 进行卫生学评价及对睡眠影响的实验性研究，该产品是经几味对睡眠有益的传统中药材配伍组方后获得的保健食品，现今未有研究者对于复方片剂 SSALP 对睡眠影响进行研究。本研究通过进行一系列的试验检测和指标检测可为该保健食品今后的研发提供科学依据，促进该保健食品的研发进程，提高人群睡眠质量和生命健康水平。

第 2 章　材料方法

2.1　样品

样品批次为 19010122、19010222、19010322，样品规格为 0.62g/片；人体（60 kg）推荐剂量为每次 3 片，每日 2 次。

2.2　实验仪器和试剂

实验仪器如下表。

实验仪器	生产公司
Morris MT-200	成都泰盟科技有限公司
电子天平（Sartorius—BL610）	德国产
分析天平（AB204-N）	北京塞多利斯天平公司
离心机（Labofuge 400R）	日产
酶标仪（Synergy HT）	BIOTEK
FSH-II型匀浆器	江苏金坊金城国胜实验器械厂产

实验试剂如下表

实验试剂	生产公司
5-HT 试剂盒	南京建成
SOD 试剂盒	南京建成
MDA 试剂盒	南京建成
GABA 试剂盒	南京建成
Glu 试剂盒	南京建成
巴比妥钠	Sigma 公司
戊巴比妥钠	Sigma 公司

2.3 实验动物

192只SPF级ICR成年雄性小鼠，18~22g。50只Wistar雄性大鼠，8~9周龄，体重约180~250g之间。实验动物由长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供，实验动物生产许可证号（SCXK-（吉）2016-0003）、使用许可证号（SYXK（吉）2015-0020），环境设施合格号（吉动设字10-1005号），饲料生产许可证号（SCXK-（吉）2015-0005）。

2.4 实验方法

2.4.1 卫生学检测

2.4.1.1 感官指标检验

取适量试样置于50mL烧杯或白色瓷盘中，在自然光下观察色泽和状态，嗅其气味。

2.4.1.2 有效成分检测

（1） 总皂苷

根据《中华人民共和国药典》（2015版），取本品粉末过筛约1g，反复加热回流，弃去废渣。浓缩后定容。对样品进行前处理，以乙腈为流动相A，以水为流动相B ，按下表中的程序规定进行梯度洗脱；检测波长为203nm。

时间（分钟）	流动相A（%）	流动相B（%）
0-35	19	81
35-55	19→29	81→71
55-70	29	71
70-100	29→40	71→60

（2） 粗多糖

根据《保健食品功效成分测定方法》，取样品0.2g超声、补重、水解过滤，与对照品共同放入分光光度计中测定。最后以标准曲线计算样品粗多糖含量。

（3） 五味子醇甲

根据《中华人民共和国药典》（2015版），取本品粉末约0.25g，精密称定，超声溶解、过滤，最终与对照品共同注人液相色谱仪测定。以甲醇-水(65:35)为流动相；检测波长为250nm。

2.4.1.3 微生物检测和稳定性实验

根据GB4789.2-2016规定检测方法，对样品进行前处理并且进行试验。

（1） 菌落总数

以无菌操作制作10%样品匀液，吸取1ml的1%稀释液注入9ml灭菌生理盐水试管内另取1ml灭菌吸管，按上面操作方法，一次做10倍递增，备用。

分别吸取不同稀释度样品1㎖两次分别置于两个平皿。加入两个无菌平皿内作空白对照。将琼脂培养基倾注平皿，待琼脂凝固后,翻转,36℃培养48h，计数。

（2） 大肠菌群

样品前处理同菌落总数检测相同，分别吸取不同稀释度样品1㎖两次分别置于两个平皿。加入两个无菌平皿内作空白对照。将结晶紫中性红胆盐琼脂(VRBA)倾注于每个平皿中。待琼脂凝固后,再加VRBA，翻转,置于36℃培养24h。计数。

（3） 霉菌和酵母

样品前处理同菌落总数检测相同，将马铃薯葡萄糖琼脂倾注平皿。置水平台面待其完全凝固。正置平板,置28℃培养箱中培养,观察并记录培养至第5d的结果。最后进行菌落计数。

（4） 沙门氏菌

称取25g样品放入225mlBPW容器中，均质。无菌操作将样品转至500mL锥形瓶或其他合适容器内于36℃培养8h。

培养后移取1ml培养物转种于10mlSC中，于36℃培养22h，移取1ml培养物转中于10mlTTB内，于42℃培养22h。分别取增菌液1环,划线接种于一个BS琼脂平板和HE琼脂平板，BS琼脂平板36℃培养48h，HE琼脂平板36℃培养24h。最后观察菌落特征。

（5） 金黄色葡萄球菌

取25g样品至盛有225mL7.5%氯化钠肉汤的增菌液中，均质。将样品匀液于36℃培养24h，将增菌后的培养物,分别划线接种到 Baird-Parker平板和血平板,血平板36℃培养4h。Baird-Parker平板36℃培养24h。

（6） 稳定性实验

将样品放置在37℃相对湿度75%的恒温培养箱中四个月，与第零个月、第一个月、第二个月、第三个月测试以上微生物学指标。

2.4.1.4 理化指标检测

（1） 水分

根据GB 5009.3-2016，应用卡尔·费休法测定，使用卡尔·费休试剂作为滴定剂，计算消耗碘的量。测定出漂移量（D）、试剂消耗体积（V）、样品体积（V_1）消耗时间（t），通过公式计算水分含量。

$$X = \frac{（V - D \times t）\times T}{m} \times 100$$

（2） 灰分

根据GB 5009.4-2016食品中灰分的测定第一法进行测定。称取3g~10g样品以小火加热使试样充分炭化至无烟,然后置于高温炉中,在550℃±25℃灼烧4h。冷却至200℃左右,放入干燥器中冷却30min,称量，测量出坩埚加灰分（m_1）、坩埚（m_2）、氧化镁（m_0）、坩埚和试样（m_3）质量，用灰分计算公式计算灰分。

$$X = \frac{m_1 - m_2 - m_0}{m_3 - m_2}$$

（3） 崩解时限

根据《中华人民共和国药典》（2015版），采用升降式崩解仪，将6片样品置于玻璃管中，受试品需置于盐酸溶液中进行检查。各片均应在60min内全部崩解。

（4） 铅

根据GB 5009.12-2017，称取固体试样0.2g~3g于带刻度消化管中,将样样品进行消解定容,混匀备用。将10μl试样溶液与5μL磷酸二氢铵-硝酸钯溶液同时注入

石墨炉，原子化后测定吸光度值，与标准系列比较定量。测得试样和空白溶液铅质量浓度差（ρ - ρ_0），消化液体积（V）。通过计算公式得到铅浓度。

$$X = \frac{（\rho - \rho_0）\times V}{m \times 1000}$$

（5） 总砷

根据GB 5009.11-2014，吸取试样溶液100μL注入液相色谱-原子荧光光谱联用仪中,得到色谱图,以保留时间定性。测定试样溶液和空白溶液无机砷浓度差值（$c-c_0$）。根据标准曲线得到试样溶液中As(III)与As(V)含量, As(III)与As(V)含量的加和为总无机砷含量, 然后根据公式计算样品中无机砷的含量。

$$X = \frac{（c - c_0）\times V \times 1000}{m \times 1000 \times 1000}$$

（6） 总汞

根据GB 5009.17-2014，将样品消解，设定好仪器最佳条件,进行标准系列测量,绘制标准曲线。然后转入试样测量, 先用硝酸溶液(1+9)进样, 使读数基本回零, 再分别测定试样空白和试样消化液，测定后计算差值（$c-c_0$）。试样测定结果按总汞计算公式计算。

$$X = \frac{（c - c_0）\times V \times 1000}{m \times 1000 \times 1000}$$

（7） 六六六、滴滴涕

依据GB/T 5009.19-2008,称取样品粉末2g，加石油醚20ml，震荡30min，过滤，浓缩，定容，加0.5ml浓硫酸净化，振摇0.5min，3000r/min离心15min，取上清液进行GC分析。

2.4.2 受试物对小鼠睡眠的影响实验

2.4.2.1 直接睡眠实验

根据《保健食品检验与评价技术规范》（2003 版），将 48 只 ICR 小鼠，随机分为四组，分别为受试物高中低剂量组以及阴性对照组，低中高剂量分别为 0.62g/kg BW 、1.24g/kg BW 、1.86g/kg BW，是人体推荐剂的 10、20、30 倍。

连续每日经口灌胃 1 次持续 30 天，阴性对照组给予同体积蒸馏水灌胃。末次给药后，观察各组引起小鼠 1 小时内的睡眠情况以及睡眠时间变化。若实验组和对照组睡眠时间和情况有差异，为延长睡眠即为阳性结果。

2.4.2.2 延长戊巴比妥钠睡眠时间实验

动物数量和分组情况同 2.4.2.1。动物末次给药后，出现峰作用前 10~15 分钟，给各组动物腹腔注射 45mg/kg BW 戊巴比妥钠，注射量为 0.1mL/10g BW，观察此保健食品能否延长戊巴比妥钠的睡眠时间。若各实验组和对照组睡眠时间和情况有差异，且为延长睡眠即为阳性结果。

2.4.2.3 戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验

动物数量和分组情况同 2.4.2.1。末次给药后，出现峰作用前 10~15 分钟腹腔注射 26mg/kg BW 戊巴比妥钠为最大阈下催眠剂量，注射量为 0.1mL/10g BW，记录 30 分钟内入睡动物数。若各实验组和对照组入睡动物数有差异，且入睡动物发生率显著增加即为阳性结果。

2.4.2.4 巴比妥钠睡眠潜伏期实验

动物数量和分组情况同 2.4.2.1。正式实验前进行预实验确定巴比妥钠剂量。动物末次给药后 10~20 分钟后，给各组动物腹腔注射 260mg/kg BW 巴比妥钠，注射量为 0.1mL/10g BW，观察受试样品对巴比妥钠睡眠潜伏期的影响，若各实验组和对照组睡眠潜伏期有差异，且睡眠潜伏期显著缩短即为阳性结果。

2.4.2.5 结果判定

除直接睡眠实验，其他三项实验任意两项阳性，且无明显直接睡眠作用，可表明该批号的受试物样品对睡眠有积极的影响。

2.4.3 受试物对大鼠脑内睡眠相关指标和行为学影响

2.4.3.1 测定大鼠脑内相关指标实验

50只Wistar雄性大鼠适应性喂养7天，随机分为五组，每组10只。分别为空白对照组、模型对照组、受试物高中低剂量组。造模剂选用PCPA（对氯苯丙氨酸），造模实验选用PCPA混悬液改良法[130]，配制5%$NaHCO_3$水溶液，用PH笔调节至

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：https://d.book118.com/477100026013006131