ICS
CCS

团　　体　　标　　准

T/SZAS XXXX—XXXX

铁皮石斛来源的纳米囊泡

Nanovesicles derived from Dendrobium officinale

（征求意见稿）

XXXX - XX - XX 发布　　XXXX - XX - XX 实施

深圳市标准化协会　　发 布

目　　次

前　　言 II
引　　言 III
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 1
4 缩略语 1
5 技术要求 2
6 检测方法 3
7 检验规则 5
8 包装、标签、储存、运输及保质期 5
附　录　A 7
附　录　B 8
附　录　C 10
附　录　D 12
附　录　E 14
附　录　F 15
参考文献 16

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。

本文件由杭州华大赛迪斯逆熵科技有限责任公司提出。

本文件由深圳市标准化协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引　言

当前，植物源纳米囊泡作为新型生物活性原料，在生物医药、化妆品、功能食品等领域应用前景广阔，产业发展迅速。但目前行业内缺乏统一的产品质量标准和检测方法，导致产品质量参差不齐、市场监管依据不足、产业发展不规范等问题突出。铁皮石斛为我国传统名贵中药材，其来源的纳米囊泡具有独特的生物活性和开发价值，目前国内外尚无针对铁皮石斛来源纳米囊泡的专项标准，严重制约了相关产品的研发、生产与市场推广。

本文件规定了铁皮石斛来源的纳米囊泡的技术要求、检测方法、检验规则、包装、标签、储存、运输及保质期要求。该标准适用于铁皮石斛来源的纳米囊泡的研究和生产。

铁皮石斛来源的纳米囊泡

1 范围

本文件规定了铁皮石斛来源的纳米囊泡的技术要求、检测方法、检验规则、包装、标签、储存、运输及保质期要求。

本文件适用于铁皮石斛来源的纳米囊泡的研究和生产。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过本文件的规范性引用而成为本文件必不可少的条款。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 9724 化学试剂 pH 值测定通则

GB/T 27428—2022 植物生物安全实验室

JJG 119 实验室pH (酸度)计

SN/T 3899—2014 化妆品体外替代试验良好细胞培养和样品制备规范

T/BDCA 0003—2020 中国特色植物资源化妆品功效评价指南

T/BJWA011—2023 活性离子水抗氧化测定 ABTS法

T/ZHCA 016—2022 化妆品舒缓功效测试 体外炎症因子含量测定 脂多糖诱导巨噬细胞RAW264.7测试方法

KMKZCD-GZ02-434 T/SHRH034-2021化妆品舒缓功效测试-体外炎症因子含量测定脂多糖诱导巨噬细胞RAW264.7测试方法

中华人民共和国药典(2025年版)

药品生产质量管理规范(2010年修订)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

铁皮石斛来源的纳米囊泡 nanovesicles derived from Dendrobium officinale

来源于铁皮石斛根茎或铁皮石斛离体培养物（铁皮石斛原球茎、铁皮石斛培养物等）汁液的细胞外囊泡(Extracellular Vesicles,EVs)的纳米结构的统称，简称“铁皮石斛囊泡”。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PS 聚苯乙烯 （Polystyrene）

CCK-8 细胞计数试剂，2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺酸苯)-2H- 四唑单钠盐（Cell Counting Kit-8）

ABTS 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐（2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)）

DPPH 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 （1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl）

5 技术要求

5.1 原材料和辅料

生产铁皮石斛囊泡的过程中，使用的原材料和辅料应符合GB/T 27428—2022要求。

5.2 产品关键质量属性

5.2.1 感官指标要求应符合表 1 的规定。

表 1 感官要求

项目	要求	
	液体	固体粉末
外观	透明液体，无肉眼可见外来异物	均匀粉末，无肉眼可见外来异物
色泽	淡黄色	无色至淡黄色
气味	植物特征性气味	植物特征性气味

5.2.2 理化指标要求应符合表 2 的规定。

表 2 理化要求

项目	要求
囊泡形态	透射电镜下应呈现不聚团的具有清晰膜结构的茶托状或杯状结 构，边缘清晰
囊泡粒径/(nm)	30-400
囊泡颗粒数/(particles/mL)或/(particles/mg)	＞1×10^7 particles/mL 或者 ＞1×10^7 particles/mg
pH值(1%粉末溶于水)	6-8

5.2.3 卫生要求应符合表 3 的规定。

表 3 卫生要求

项目	要求	
微生物指标	菌落总数/(CFU/g)	≤100
	霉菌及酵母菌数/(CFU/g)	≤10
	大肠菌群/(MPN/g)	不得检出
	金黄色葡萄球菌/(MPN/g)	不得检出
	铜绿假单胞菌/(MPN/g)	不得检出
有害物质限量	汞(Hg)/(mg/kg)	＜1
	铅(Pb)/(mg/kg)	≤10
	砷(As)/(mg/kg)	≤2
	镉(Cd)/(mg/kg)	≤5
	农药残留/(mg/kg)	＜0.1

5.2.4　生物活性要求应符合表 4 的规定。

表 4　生物活性要求

项目	要求
促进细胞增殖	能促进上皮细胞或成纤维细胞的增殖
清除自由基	对ABTS自由基或DPPH自由基具有清除作用
抗炎舒缓	能抑制RAW细胞炎症因子的释放

5.3　过程控制

应记录铁皮石斛囊泡的提取分离方法。

5.4　制备工艺

5.4.1　预处理

用无菌缓冲液提取新鲜的铁皮石斛根茎或铁皮石斛离体培养物（铁皮石斛原球茎、铁皮石斛培养物等）的汁液，或将新鲜的铁皮石斛片进行榨汁破壁预处理。

5.4.2　分离

目前分离囊泡的方法包括差速超高速离心法、超滤法、尺寸排阻色谱法、免疫亲和捕获法、聚合物沉淀法、电泳透析法和其他方法。大规模制备时，鼓励使用切向流超滤和尺寸排阻色谱法相结合分离铁皮石斛囊泡。

5.4.3　冷冻干燥

在高度真空的环境下，对铁皮石斛囊泡悬液进行冷冻干燥。

5.5　生产要求

本产品用作化妆品原料时，属微生物限度产品，其生产环境应符合化妆品生产相应的洁净要求，不适用药品GMP要求；本产品用作临床用途时，其生产全过程应当符合2010年修订的《药品生产质量管理规范》（GMP）的基本原则和相关要求。

6　检测方法

6.1　感官指标

6.1.1　外观、色泽检测

取适量样品于比色管内，在室温和非阳光直射处目测观察。

6.1.2 气味评定

取适量样品，用嗅觉进行辨别。

6.2 理化指标

6.2.1 囊泡形态

按照附录A的方法检测。

6.2.2 囊泡数量

鼓励至少选择一项光学技术(附录B 、E) 和一项非光学技术(附录D) 进行表征。

6.2.3 囊泡粒径

鼓励至少选择一项光学技术(附录C 、E) 和一项非光学技术(附录D) 进行表征。

6.2.4 pH 值

取1%粉末溶于水，按照GB/T 9724和 JJG 119规定的方法检测。

6.3 卫生指标

6.3.1 微生物指标

按《中华人民共和国药典(2025年版)》规定的方法检测。

6.3.2 重金属指标

按《中华人民共和国药典(2025年版)》规定的方法检测。

6.3.3 农药残留指标

按《中华人民共和国药典(2025年版)》规定的方法检测。

6.4 生物活性指标

6.4.1 促进上皮细胞和成纤维细胞增殖

按照T/BDCA 0003-2020和附录F 的方法检测。

6.4.2 清除氧化自由基

按照T/BDCA 0003-2020和T/BJWA011—2023规定的方法检测。

6.4.3　抗炎舒缓功效评价

按照T/BDCA 0003-2020和 T/ZHCA 016—2022规定的方法检测。

7　检验规则

7.1　出厂检验

7.1.1　同品种、同一批投料生产的产品，以同一生产日期为一检验批次。

7.1.2　每批产品均应进行出厂检验，并附检验报告。

7.1.3　出厂检验项目：外观、色泽、气味、形态、数量、粒径、pH 值以及微生物、重金属和农药残留等卫生指标。

7.2　型式检验

7.2.1　型式检验项目包括本文件中规定的全部项目。

7.2.2　正常生产时每年进行一次型式检验。

7.2.3　有以下情况之一时，应进行型式检验：

a)　原料来源变动较大时；

b)　正式投产后，如生产工艺有较大变化，可能影响产品质量时；

c)　出厂检验与上一次型式检验结果有较大差异时；

d)　产品停产 6 个月以上，恢复生产时。

7.3　判定规则

7.3.1　检验结果全部符合本文规定时，判该批产品为合格品。

7.3.2　检验结果不符合本文件要求时，可以在原批次产品中双倍抽样复检一次，判定以复检结果为准。复检后仍有一项或一项以上不符合标准时，判该产品为不合格品。

8　包装、标签、储存、运输及保质期

8.1　包装

在生产后应进行密封包装，包装满足无菌要求。包装内应附使用说明，最小包装上应附标签。

8.2 标签

标签应包括以下内容：产品名称、批号、规格、执行标准、生产厂名、厂址、产地、生产日期、保质期、储存条件。

8.3 运输

运输时必须轻装轻卸，不得与有毒、有害、有异味、易污染物品混装载运，严防挤压、雨淋、暴晒。

8.4 储存

产品应贮存于阴凉、清洁和干燥的仓库中。避免与有毒、有害、易腐、易污染等物品一起堆放。

8.5 保质期

在符合规定的运输和贮存条件、包装完整、未经开启封口的情况下，保质期按销售包装标注执行。

附 录 A

（规范性）

铁皮石斛囊泡形态检测方法(透射电镜观察法)

A.1 仪器和设备

A.1.1 透射电子显微镜。

A.1.2 Formvar-carbon 载样铜网。

A.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T 6682规定的一级水。

A.2.1 磷酸盐缓冲液：pH为7.4。

A.2.2 1% 戊二醛溶液。

A.2.3 饱和醋酸双氧铀溶液。

A.3 检测步骤

A.3.1 将附录A方法获得的囊泡样本滴加在Formvar-carbon载样铜网上，室温静置20分钟。

A.3.2 滴加适量磷酸盐缓冲液于样本上，清洗3次。

A.3.3 滴加适量1%戊二醛溶液于样本上，固定5分钟，随后用超纯水清洗8次。

A.3.4 用饱和醋酸双氧铀溶液染色5分钟。

A.3.5 铜网在室温下干燥10分钟。

A.3.6 将铜网置于透射电子显微镜样本室内，观测囊泡的形态。按照仪器说明书进行。

附 录 B

（规范性）

铁皮石斛囊泡数量检测方法(纳米流式检测法)

B.1 仪器和设备

B.1.1 纳米流式仪。

B.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T 6682规定的一级水。

B.2.1 磷酸盐缓冲液： pH 为7.4。

B.2.2 纳米流式仪浓度标准品(1.99×10^{10}个颗粒/毫升)。

B.3 检测步骤

B.3.1 按照使用说明，对纳米流式仪进行液流初始化和管路气泡排出。

B.3.2 用超纯水将浓度标准品稀释100倍，按照使用说明进行纳米流式仪的质控，将纳米流式仪调试到最佳检测状态后(散射和荧光通道的信号均达到最强且均一),在浓度标准品的测量参数下对稀释后的标准品采集数据(在最佳状态下，质控标准品颗粒计数值范围通常在 5000-7000)。

B.3.3 按照使用说明，依次用洗液和超纯水清洗进样毛细管。

B.3.4 在Labelled Exo样品测量参数下检测磷酸盐缓冲液的颗粒数，确保磷酸盐缓冲液的颗粒数不高于200,以便作为空白对照的数据采集并用于后续的样品稀释。若颗粒数计数高于 200,则需用0.22微米的滤膜过滤。

B.3.5 用洁净的磷酸盐缓冲液将囊泡样品预稀释100倍，在EXO 样品测量参数对囊泡样本进行数据采集。纳米流式仪颗粒计数在5000-7000之间为准确测量范围，若样品颗粒数计数过高或过低，则需调整样品的稀释倍数，再进行测定，记下样品的最终稀释倍数。另外需注意样品上机检测时散射通道的基线

和自动阈值与空白对照(磷酸盐缓冲液)检测的基线和自动阈值是否一致，若样品检测时出现基线抬升，则需重新制备更高纯度的样品。

B.4　结果分析

使用NF Profession软件依次进行：浓度标准设置、样品阈值设置、空白对照设置、待测样品浓度报告生成，最终得到待测样品浓度检测报告。计算囊泡样本数量的公式如下：

$$X=(B-C)/A\times1.99\times10^{8}\times D\times E$$

式中：

X——囊泡样本的数量；

A—— 测得的标准品颗粒数；

B——测得的(稀释后)样本颗粒数；

C——空白对照的颗粒数；

D—— 样本的稀释倍数；

E—— 样本的体积(毫升)。

附 录 C

（规范性）

铁皮石斛囊泡粒径检测方法(纳米流式检测法)

C.1 仪器和设备

C.1.1 纳米流式仪。

C.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T 6682规定的一级水。

C.2.1 磷酸盐缓冲液：pH 为7.4。

C.2.2 纳米流式仪浓度标准品(1.99×10^{10}个颗粒/毫升)。

C.3 检测步骤

C.3.1 按照使用说明，对纳米流式仪进行液流初始化和管路气泡排出。

C.3.2 用超纯水将浓度标准品稀释100倍，按照使用说明进行纳米流式仪的质控，将纳米流式仪调试到最佳检测状态后(散射和荧光通道的信号均达到最强且均一),在浓度标准品的测量参数下对稀释后的标准品采集数据(在最佳状态下，质控标准品颗粒计数值范围通常在5000-7000)。

C.3.3 按照使用说明，依次用洗液和超纯水清洗进样毛细管。

C.3.4 用超纯水将S16M-EXO 粒径标准品稀释100倍，在S16M-EXO 粒径标准品测量参数下对稀释后的粒径标准品进行采集数据。

C.3.5 按照使用说明，依次用洗液和超纯水清洗进样毛细管。

C.3.6 在 Labelled Exo样品测量参数下检测磷酸盐缓冲液的颗粒数，确保磷酸盐缓冲液的颗粒数不高于200,以便作为空白对照的数据采集并用于后续的样品稀释。若颗粒数计数高于 200,则需用0.22微米的滤膜过滤。

C.3.7　用洁净的磷酸盐缓冲液将囊泡样品预稀释100倍，在EXO 样品测量参数对小囊泡样本进行数据采集。纳米流式仪颗粒计数在5000-7000之间为准确测量范围，若样品颗粒数计数过高或过低，则需调整样品的稀释倍数，再进行测定，记下样品的最终稀释倍数。另外需注意样品上机检测时散射通道的基线和自动阈值与空白对照(磷酸盐缓冲液)检测的基线和自动阈值是否一致，若样品检测时出现基线抬升，则需重新制备更高纯度的样品。

C.4　结果分析

使用NF Profession软件依次进行：样品阈值设置、粒径标准曲线拟合、空白对照颗粒扣除、样品粒径分布直方图生成，最终得到待测样品粒径检测报告。

附 录 D

（规范性）

铁皮石斛囊泡数量/粒径检测方法(纳米库尔特粒度仪检测法)

D.1 仪器和设备

D.1.1 纳米库尔特粒度仪。

D.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T 6682规定的一级水。

D.2.1 磷酸盐缓冲液：pH 为7.4。

D.3 检测步骤

D.3.1 打开仪器和操作软件。此界面可选择“在线测量”、“实验报告”、“系统界面”、“用户管理”等界面。

D.3.2 选择系统参数(首次使用时)。“系统参数”界面中，在“实验模式”处勾选“自动识别”; 在“粒径梯度”处选择2nm; 在“测试时长”处根据测试所需选择自动停止的时间。

D.3.3 录入芯片信息。进入“在线测量”界面，鼠标选中“实验信息录入”框中“二维码信息录入” 处的信息框，用扫码枪扫描芯片包装上的二维码。同时“下一步”的按钮由不可点击的“灰色” 变为可点击的“蓝色”。

D.3.4 录入样本信息。在点击3.1 步骤中“蓝色”的“下一步”按钮后，即可输入本次实验的“实验名称”。“测试模式”根据需求选择“粒径测量”;“通道选择”根据芯片包装上的信息选择对应的“检测通道 A”; “盐浓度”默认为“1”;“稀释比”根据测试中样本的实际稀释倍数输入，如“100”。

D.3.5 安装芯片。将芯片放入芯片卡槽的正中央后，用小组件固定住芯片位置。

D.3.6 空白测试。在检测卡两侧样本槽均加入200μL 的磷酸盐缓冲液。将检测卡插入 A 通道后，在样本测试界面点击“空白测试”按钮。

D.3.7　样本测试。空白测试正常后，将检测卡样本槽(有蓝色 S 标志的一侧)中的空白稀释液吸出，用移液枪加入200μL 已经制备好的样本(对准芯片孔打样),另一侧的空白稀释液不需要处理。加好样本后，直接点击“记录”按钮开始样本测试。

D.3.8　数据查看和报告导出。测量完成后，点击“实验报告”模块界面左侧可预览历史测量数据，选中需要导出的数据。

附 录 E

（规范性）

铁皮石斛囊泡数量/粒径检测方法(纳米颗粒跟踪分析仪检测法)

E.1 仪器和设备

E.1.1 纳米颗粒跟踪分析仪。

E.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T 6682规定的一级水。

E.2.1 磷酸盐缓冲液： pH 为7.4。

E.2.2 标准品为100nm粒径的聚苯乙烯微球。

E.3 检测步骤

E.3.1 双击桌面快捷软件，窗口弹出按钮，点击OK, 仪器进行自动清洗。

E.3.2 用超纯水稀释100nm PS标准品，采用5mL 注射器加样并进行校准；

E.3.3 校准结束后，选择标准品检测程序(PS100-488), 对标准品进行检测；

E.3.4 标准品的粒径和浓度检测合格后，对样品进行稀释，采用5mL 注射器加样检测；

E.3.5 检测结束后，点击仪器自动清洗30s后再进行手动清洗，确认样品池干净后，关闭仪器，清理废液。

附 录 F

（规范性）

铁皮石斛囊泡促进上皮细胞/成纤维细胞增殖检测方法（CCK-8法）

F.1 一般规定

F.1.1 按SN/T 3899—2014规定的规范培养细胞。

F.2 仪器和设备

F.2.1 多功能酶标仪。

F.2.2 CO_2细胞培养箱。

F.2.3 细胞超净台。

F.3 试剂

本方法所用试剂均为分析纯，除特别说明外，实验用水均为GB/T 6682规定的一级水。

F.3.1 磷酸盐缓冲液：pH为7.4。

F.3.2 商品化CCK-8试剂盒。

F.4 检测步骤

F.4.1 将上皮细胞/成纤维细胞以3000-5000个细胞/孔的密度分别种植到96孔板中。

F.4.2 过夜培养后，实验组将铁皮石斛囊泡冻干样品复溶，检测粒子浓度，以终浓度1×10^9 个颗粒/毫升加入细胞培养基中与细胞共孵育。对照组加入相同体积的磷酸盐缓冲液。

F.4.3 商品化CCK-8试剂盒检测24h后各组细胞生长情况。

F.4.4 比较实验组和对照组的细胞生长曲线。

参考文献

[1] Welsh JA,Goberdhan DCI,O'Driscoll L,et al.Minimal information for studies of extracellular vesicles(MISEV2023):From basic to advanced approaches.Journal of Extracellular Vesicles 2024;13.[DOI:10.1002/jev2.12404].

[2] Zhao Q,Wang T,Wang H,et al.Consensus statement on research and application of Chinese herbal medicine derived extracellular vesicles-like particles(2023 edition).Chinese Herbal Medicines 2023.[DOI:10.1016/j.chmed.2023.11.002].

[3] Nemati M,Singh B,Mir RA,et al.Plant-derived extracellular vesicles:a novel nanomedicine approach with advantages and challenges.Cell Communication and Signaling 2022;20.[DOI:10.1186/s12964-022-00889-1].

[4] 中华人民共和国药典(2025 年版)

[5] 化妆品安全技术规范(2015 版)

[6] 药品生产质量管理规范(2010 年修订)